



**T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DOMATES (*Lycopersicon esculentum*) BİTKİSİNDE ENDOPLAZMİK  
RETİKULUM (ER) STRESİ KOŞULLARINDA GEN ANLATIM  
ANALİZLERİ**

**Elif PULAT**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**Moleküler Biyoteknoloji ve Genetik Programı**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Özgür ÇAKIR**

**Aralık, 2022**

**İSTANBUL**

Bu alışma, 22.12.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoteknoloji ve Genetik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

### **Tez Jürisi**

Prof. Dr. Özgür ÇAKIR(Danışman)  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Neslihan TURGUT KARA  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Veysel Sabri HANÇER  
İstinye Üniversitesi  
Tıp Fakültesi

### **İntihal Programı Beyanı**

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

### **Proje Destekleri**

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin FYL-2021-38244 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

### **Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri**

Tezden üretilmiş yayın bulunmamaktadır.

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimimin her aşamasında bana destek olup yol gösteren ve kendilerinden hem akademik hem de hayata dair çok şey öğrendiğim, başta danışmanım Prof. Dr. Özgür ÇAKIR olmak üzere, Bitki Genetiği ve Biyoteknolojisi Araştırma Laboratuvarında beraber çalıştığımız hocalarım Prof. Dr. Neslihan TURGUT KARA'ya, Araştırma Görevlisi Burcu ARIKAN'a ve İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümündeki tüm değerli hocalarıma teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca desteğini benden esirgemeyen, ilk öğretmenlerim ve hayatımın her anında bana güç ve motivasyon kaynağı olan babam Cem PULAT ve annem Gülten PULAT'a; azmine ve çalışkanlığına daima hayran olduğum ilk rol modelim teyzem Gülbeyaz GÜRSOY'a,

Daha bir lisans öğrencisiyken benimle laboratuvar deneyimlerini paylaşıp bana her konuda destek olan, uzakta da olsa hep en yakınımda olan arkadaşım Uzman Moleküler Biyolog Seda YAŞAR'a,

Aynı lisede yıllarca beraber okuyup sonra yollarımın yeniden kesişmesine sonsuz bir mutluluk duyduğum ve arkadaşlığı benim için en büyük dayanak olan laboratuvar çalışma partnerim ve dostum Ali Harun ARSLANTÜRK'e,

Laboratuvarda beraber çalıştığım arkadaşlarımdan, neşe kaynağım, her şeyimi paylaştığım tanıdığım en yetenekli, en becerikli insanlardan olan ve hayatımda olduğu için çok şanslı hissettiğim Gizem Şafak BARANSEL'e, bana o mükemmel enerjisiyle destek olan, sadece varlığıyla bile iyileştirici etkisini anında hissettiren Zeynep Begüm ŞEN'e, en güzel anılarımda büyük rol oynayan, desteğini hep hissettiğim Yağmur Vecide YEŞİLDİREK'e

Hayatımda dostum, meslektaşım ve motivasyon kaynağım olan; akademik, sosyal ve diğer her konuda yeteneğine ve azmine hep hayranlık duyduğum, daima sevgisi ve desteğiyle yanımda olacağını bildiğim için çok şanslı hissettiğim Onur AYDIN'a büyük bir teşekkürü borç biliyorum.

TÜBİTAK 2210 Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı Desteği alarak, yüksek lisans eğitimimi tamamladığım için TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Aralık 2022

Elif PULAT

# İÇİNDEKİLER

Sayfa No

|                                                            |      |
|------------------------------------------------------------|------|
| ÖNSÖZ .....                                                | iv   |
| İÇİNDEKİLER.....                                           | v    |
| ŞEKİL LİSTESİ .....                                        | vii  |
| TABLO LİSTESİ.....                                         | x    |
| SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ.....                             | xii  |
| ÖZET .....                                                 | xv   |
| SUMMARY .....                                              | xvii |
| 1. GİRİŞ.....                                              | 1    |
| 2. GENEL KISIMLAR.....                                     | 6    |
| 2.1. MODEL ORGANİZMALAR .....                              | 6    |
| 2.1.1. <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.....            | 6    |
| 2.2. BİTKİLERDE STRES .....                                | 7    |
| 2.2.1. Abiyotik Stres .....                                | 8    |
| 2.2.2. Biyotik Stres .....                                 | 10   |
| 2.2.3. Oksidatif Stres .....                               | 11   |
| 2.3. ER STRESİ .....                                       | 12   |
| 2.3.1. Katlanmamış Protein Yanıtı (UPR).....               | 14   |
| 2.3.2. ER İlişkili Degradasyon (ERAD).....                 | 17   |
| 2.3.3. ER Fajı.....                                        | 19   |
| 2.3.4. ER Stresinin Kimyasal Yolla İndüksiyonu.....        | 20   |
| 2.3.5. ER Stresinin Erken ve Geç Yanıt Mekanizmaları ..... | 21   |
| 2.4. ER STRESİ İLE İLİŞKİLİ YOLAKLAR.....                  | 23   |
| 2.4.1. Ubikitin-Proteozom Sistemi .....                    | 25   |
| 2.4.2. Terpenoid Biyosentezi.....                          | 27   |
| 2.4.3. Jasmonik Asit Aracılı Sinyalleşme .....             | 28   |
| 2.4.4. MAPK Sinyalleşme .....                              | 29   |
| 2.4.5. Etilen Yanıt Faktörleri .....                       | 29   |
| 2.5. RNA DİZİLEME.....                                     | 30   |
| 3. MALZEME VE YÖNTEM.....                                  | 32   |
| 3.1. BİTKİ MATERYALİ.....                                  | 32   |

|                                                                                     |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.2. BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ.....                                                        | 32         |
| 3.2.1. Besiyerlerinin Hazırlanması .....                                            | 32         |
| 3.2.2. <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. Tohumlarının Yüzey Sterilizasyonu ..... | 33         |
| 3.2.3. Domateslerin Çimlendirilmesi ve Yetiştirilmesi .....                         | 33         |
| 3.3. DOMATESLERE ER STRESİ UYGULANMASI .....                                        | 33         |
| 3.3.1. Tunikamisin Çözeltilisinin Hazırlanması .....                                | 33         |
| 3.3.2. Stres Uygulaması Besiyerlerinin Hazırlanması .....                           | 34         |
| 3.3.3. Stres Uygulamasının Gerçekleştirilmesi .....                                 | 34         |
| 3.4. RNA İZOLASYONU.....                                                            | 35         |
| 3.4.1. DNaz I Uygulaması .....                                                      | 36         |
| 3.4.2. RNA Kalite Analizi .....                                                     | 37         |
| 3.5. RNA DİZİLEME.....                                                              | 38         |
| 3.5.1. Dizileme Kitaplıklarının Hazırlanması.....                                   | 39         |
| 3.5.2. RNA Dizileme Reaksiyonlarının Gerçekleştirilmesi .....                       | 39         |
| 3.5.3. Dizileme Verilerinin İstatistiksel Analizleri.....                           | 40         |
| <b>4. BULGULAR.....</b>                                                             | <b>41</b>  |
| 4.1. BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ.....                                                        | 41         |
| 4.2. ER STRESİ İNDÜKLENEN BİTKİLERDE GÖZLEMLENEN DEĞİŞİMLER .....                   | 42         |
| 4.3. RNA MİKTAR VE KALİTE ANALİZLERİ .....                                          | 43         |
| 4.4. DİZİLEME VE BİYOİNFORMATİK ANALİZ SONUÇLARI .....                              | 49         |
| 4.4.1. Dizileme Sonrası Anlatımı Değişen Genlerin (DEG) Belirlenmesi .....          | 50         |
| 4.5.2. Gen Ontoloji Analizleri .....                                                | 61         |
| 4.5.3. KEGG Metabolik Yolak Analizleri .....                                        | 70         |
| <b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>                                                   | <b>88</b>  |
| <b>KAYNAKLAR.....</b>                                                               | <b>101</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>                                                               | <b>112</b> |

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa No

|                                                                                                                                                                                                                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 2.1:</b> Abiyotik stres sinyalleşme yollarını düzenleyen transkripsiyon faktörleri ve stres sinyallerinin hücre içerisinde stres yanıtlarına dönüşümünün şeması. CaM=Kalkmodulin, ROT=Reaktif oksijen türleri (Khan ve diğ., 2018). ....                                         | 9  |
| <b>Şekil 2.2:</b> Bitkilerde ER stres yanıtı sinyalleşme yollarının iki kolu: bZIP28 ve IRE1/bZIP60 (Howell, 2013). ....                                                                                                                                                                  | 16 |
| <b>Şekil 2.3:</b> ERAD, biyotik ve abiyotik stres yanıtlarında rol alma mekanizmaları. Stres koşulları, ER homeostazisini yeniden sağlamak ve bitkinin stres toleransını artırmak için stresle ilişkili ve UPR ile ilişkili genlerin anlatımını aktive eder (Chen, Yu ve Xie, 2020). .... | 17 |
| <b>Şekil 2.4:</b> Tunikamisin molekül yapısı. ....                                                                                                                                                                                                                                        | 20 |
| <b>Şekil 2.5:</b> Ubikitin-Proteozom sisteminin bileşenleri ve poliubikitinlenmiş proteinlerin iki farklı hücresel mekanizma için seçilimi. (Ub=ubikitin) (Zientara-Rytter ve Sirko, 2016). ....                                                                                          | 26 |
| <b>Şekil 3.1:</b> ER stresinin uygulanması için oluşturulan deney düzeneği. A1: 2 saat kontrol koşulu, MS+DMSO. A2: 2 saat tunikamisin uygulaması, MS+TM. B1: 6 saat kontrol koşulu, MS+DMSO. B2: 6 saat tunikamisin uygulaması, MS+TM. ....                                              | 35 |
| <b>Şekil 4.1:</b> Çimlenmiş domates bitkileri. ....                                                                                                                                                                                                                                       | 41 |
| <b>Şekil 4.2:</b> 14 günlük domates bitkileri. ....                                                                                                                                                                                                                                       | 42 |
| <b>Şekil 4.3:</b> ER Stresi indüklenmiş uygulama bitkileri. A: 2 saat uygulama yapılmış bitki, B: 6 saat uygulama yapılmış bitki. ....                                                                                                                                                    | 43 |
| <b>Şekil 4.4:</b> RNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü. ....                                                                                                                                                                                                                             | 44 |
| <b>Şekil 4.5:</b> 1A ve 1B örneklerinin biyoanalizör elektroferogramı, 1A: 2 saatlik kontrol koşulu 1. biyolojik tekrar, 1B: 2 saatlik kontrol koşulu 2. biyolojik tekrar. ....                                                                                                           | 45 |
| <b>Şekil 4.6:</b> 2A ve 2B örneklerinin biyoanalizör elektroferogramı, 2A: 2 saatlik tunikamisin uygulaması 1. biyolojik tekrar, 2B: 2 saatlik tunikamisin uygulaması 2. biyolojik tekrar. ....                                                                                           | 46 |
| <b>Şekil 4.7:</b> 3A ve 3B örneklerinin biyoanalizör elektroferogramı, 3A: 6 saatlik kontrol koşulu 1. biyolojik tekrar, 3B: 6 saatlik kontrol koşulu 2. biyolojik tekrar. ....                                                                                                           | 47 |
| <b>Şekil 4.8:</b> 4A ve 4B örneklerinin biyoanalizör elektroferogramı, 4A: 6 saatlik tunikamisin uygulaması 1. biyolojik tekrar, 4B: 6 saatlik tunikamisin uygulaması 2. biyolojik tekrar. ....                                                                                           | 48 |

|                                                                                                                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 4.9:</b> ER Stresi uygulamaları sonucunda anlatımı değişen transkript sayısı grafiği. (fold change<-1 veya fold change>1, FDR<0,05). ....                                                           | 51 |
| <b>Şekil 4.10:</b> 2 saat ER stresi uygulamasında kontrole göre yüksek oranda anlatımı değişen transkriptler ve kat değişimi değerleri. (FDR<0,05; kat değişimi < -3 veya kat değişimi>3). ....              | 53 |
| <b>Şekil 4.11:</b> 6 saat ER stresi uygulamasında kontrole göre anlatımı değişen transkriptler ve kat değişimi değerleri. ....                                                                               | 54 |
| <b>Şekil 4.12:</b> ER stresinin 2 saat ve 6 saat uygulandığı örneklerde anlatım değişimi görülen transkript sayılarının Venn şeması ile gösterimi. (FDR<0,05 ve fold change <-1 veya fold change >1).....    | 55 |
| <b>Şekil 4.13:</b> 6 saat ER stresinde 2 saate göre anlatımı en belirgin şekilde değişen (fc <-5 veya >5) transkriptlerin -log2fc değerlerini ve gen sembollerini gösteren grafik. (FDR<0,05). ....          | 56 |
| <b>Şekil 4.14:</b> Yapılan tüm kıyaslamalarda ortak tespit edilen DEG'lerin kat değişimi değerleri grafiği. ....                                                                                             | 57 |
| <b>Şekil 4.15:</b> 2 saat boyunca ER stresi indüklenmiş domates yapraklarında anlatımı değişen genlerin ait olduğu GO kategorilerinde anlamlı şekilde zenginleştirilmiş terimler ve <i>p</i> değerleri. .... | 61 |
| <b>Şekil 4.16:</b> 6 saat boyunca ER stresi indüklenmiş domates yapraklarında anlatımı değişen genlerin ait olduğu GO kategorilerinde anlamlı şekilde zenginleştirilmiş terimler ve <i>p</i> değerleri. .... | 62 |
| <b>Şekil 4.17:</b> 2 saatte kontrole göre anlatımı değişen genlerin ait olduğu zenginleştirilmiş metabolik yollara ait KEGG analizi. ....                                                                    | 72 |
| <b>Şekil 4.18:</b> 6 saatlik ER stresi uygulamasında kontrole göre anlatımı değişen genlerin ait olduğu zenginleştirilmiş metabolik yollara ait KEGG analizi. ....                                           | 74 |
| <b>Şekil 4.19:</b> Diterpenoid biyosentez yolağı KEGG haritası. Kırmızı ile işaretli kutular anlatımı azalmış genleri gösterir. ....                                                                         | 76 |
| <b>Şekil 4.20:</b> Taurin ve hipotaurin metabolizması KEGG haritası. Kırmızı ile işaretli kutular anlatımı azalmış genleri gösterir. ....                                                                    | 77 |
| <b>Şekil 4.21:</b> Bitki hormon sinyal transdüksiyonu KEGG haritası. Kırmızı ile işaretli kutular anlatımı azalmış genleri gösterir. ....                                                                    | 78 |
| <b>Şekil 4.22:</b> 2 saat uygulamaya kıyasla 6 saat ER stresi indüklenmiş örneklerde anlatımı değişen genlerin KEGG yollarına göre sınıflandırılması ve zenginleştirilme oranları.....                       | 80 |
| <b>Şekil 4.23:</b> ER'de protein işlenmesi KEGG haritası. Kırmızı ile işaretli kutular anlatımı azalmış genleri gösterir.....                                                                                | 81 |

|                                                                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 4.24:</b> 6 saat vs. 2 saat ER stresi, diterpenoid biyosentezi yolağı KEGG haritası.<br>Kırmızı ile işaretli kutular anlatımı azalmış genleri gösterir..... | 82 |
| <b>Şekil 4.25:</b> 2 saat ER stresi indüklenmiş örneklerin kontrole göre değişmiş protein etkileşimleri. ....                                                        | 84 |
| <b>Şekil 4.26:</b> 6 saat ER stresi indüklenmiş örneklerin kontrole göre değişmiş protein etkileşimleri. ....                                                        | 86 |



## TABLO LİSTESİ

Sayfa No

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 4.1:</b> RNA örneklerinin konsantrasyon ve saflık değerleri. Örnek açıklamalarında: 1A= 2 saat tunikamisin uygulaması için kontrol 1. biyolojik tekrar, 1B= 2 saat tunikamisin uygulaması için kontrol 2. biyolojik tekrar, 2A= 2 saat tunikamisin uygulaması 1. biyolojik tekrar 2B= 2 saat tunikamisin uygulaması 2. biyolojik tekrar, 3A= 6 saat tunikamisin uygulaması için kontrol 1. biyolojik tekrar, 3B= 6 saat tunikamisin uygulaması için kontrol 2. biyolojik tekrar, 4A= 6 saat tunikamisin uygulaması 1. biyolojik tekrar, 4B= 6 saat tunikamisin uygulaması 2. biyolojik tekrar..... | 44 |
| <b>Tablo 4.2:</b> Biyoanalizör elektroferogram raporlarına ait değerlerin tablosu. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 49 |
| <b>Tablo 4.3:</b> Dizileme reaksiyonu verim tablosu. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 50 |
| <b>Tablo 4.4:</b> 2 saat ER stresinde kontrole göre anlatımı değişen ER stresi ile ilişkili transkriptlerin kat değişimi değerleri. (FDR<0,05 ve -log2(foldchange)<-1 veya >1).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 58 |
| <b>Tablo 4.5:</b> 6 saat ER stresinde kontrole göre anlatımı değişen ER stresi ile ilişkili transkriptlerin kat değişimi değerleri. (FDR<0,1 ve -log2(foldchange)<-1 veya >1). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 59 |
| <b>Tablo 4.6:</b> 6 saat ER stresinde 2 saate göre anlatımı değişen ER stresi ile ilişkili transkriptlerin kat değişimi değerleri. (FDR<0,05 ve -log2(foldchange)<-1 veya >1).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 59 |
| <b>Tablo 4.7:</b> 2 saat stres indüksiyonu yapılmış örneklerde bp (biological process) GO sınıfı için anlatımı artan genlerin ait olduğu zenginleştirilmiş terimlerin ve genlerin listesi (FDR <0,05). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 63 |
| <b>Tablo 4.8:</b> 2 saat stres indüksiyonu yapılmış örneklerde bp (biological process) GO sınıfı için anlatımı azalan genlerin ait olduğu zenginleştirilmiş terimlerin ve genlerin listesi (FDR <0,05). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 63 |
| <b>Tablo 4.9:</b> 2 saat stres indüksiyonu yapılmış örneklerde kontrole göre cc (cellular compartmentalization) GO sınıfı için anlatımı azalan genlerin ait olduğu terimlerin ve genlerin listesi. (FDR <0,05). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 66 |
| <b>Tablo 4.10:</b> 2 saat stres indüksiyonu yapılmış örneklerde kontrole göre mf (molecular function) GO kategorisi için anlatımı artan genlerin ait olduğu terimlerin ve genlerin listesi. (FDR < 0,05). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 67 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 4.11:</b> 6 saat uygulama örneklerinde kontrole göre bp (biological process) GO kategorisi için anlatımı azalan genlerin ait olduğu terimlerin ve genlerin listesi. (FDR<0,05). ....                                                                             | 68 |
| <b>Tablo 4.12:</b> 2 saat ER stresi uygulamasında kontrole göre değişen anlatım göstermiş DEG'ler için zenginleştirilmiş KEGG terimleri. ....                                                                                                                             | 70 |
| <b>Tablo 4.13:</b> 2 saat ER stresi uygulamasında kontrole göre en çok anlatım değişimi gösteren geni içeren yollar. (Enrichment FDR < 0,01). ....                                                                                                                        | 72 |
| <b>Tablo 4.14:</b> 6 saatlik ER stresi indüksiyonu sonrası yapılan analizlerde kontrole göre anlatım değişimi gösteren genlerin ait olduğu metabolik yolların listesi. (Enrichment FDR<0,01). ....                                                                        | 73 |
| <b>Tablo 4.15:</b> 6 saat boyunca ER stresi indüksiyonu gerçekleştirilmiş örneklerin, 2 saatlik ER stresi indüksiyonu gerçekleştirilenlere göre kıyaslanması sonucu anlatım değişimi gösteren genlerin ait olduğu metabolik yolların listesi. (Enrichment FDR<0,01). .... | 80 |
| <b>Tablo 4.16:</b> 2 saat ER stresinde kontrole göre yapılan STRING analizlerinde tespit edilen proteinlerin listesi. ....                                                                                                                                                | 85 |
| <b>Tablo 4.17:</b> 6 saat ER stresinde kontrole göre yapılan STRING analizlerinde tespit edilen proteinlerin listesi. ....                                                                                                                                                | 87 |

## SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

| Simgeler         | Açıklama              |
|------------------|-----------------------|
| -                | : Eksi                |
| ≥                | : Büyük Eşittir       |
| ~                | : Yaklaşık            |
| °C               | : Santigrat Derece    |
| µg               | : Mikrogram           |
| µL               | : Mikrolitre          |
| /                | : Bölü – Bölme - Oran |
| %                | : Yüzde               |
| <                | : Küçüktür            |
| =                | : Eşittir             |
| >                | : Büyüktür            |
| atm              | : Atmosfer            |
| bç               | : Baz Çifti           |
| Ca <sup>+2</sup> | : Kalsiyum iyonu      |
| dk               | : Dakika              |
| g                | : Gram                |
| GlcNAc           | : N-asetilglukozamin  |
| mA               | : Miliamper           |
| mg               | : Miligram            |
| mL               | : Mililitre           |
| mM               | : Milimolar           |
| NaAc             | : Sodyum asetat       |
| ng               | : Nanogram            |
| OD               | : Optik dansite       |
| pH               | : Asitlik birimi      |
| V                | : Volt                |
| W                | : Watt                |
| x                | : Çarpı – Kat         |

| <b>Kısaltmalar</b> | <b>Açıklama</b>                         |
|--------------------|-----------------------------------------|
| <b>ABA</b>         | : Absisik Asit                          |
| <b>ATF6</b>        | : Aktive Edici Transkripsiyon Faktörü 6 |
| <b>BiP</b>         | : Bağlayıcı Protein                     |
| <b>bp</b>          | : biyolojik süreç                       |
| <b>cc</b>          | : hücresel bölümlendirme                |
| <b>cDNA</b>        | : Tamamlayıcı DNA                       |
| <b>DEG</b>         | : Farklılaşmış Anlatım Gösteren Genler  |
| <b>DEPC</b>        | : diethylpyrocarbonate                  |
| <b>DMSO</b>        | : dimethylsulfoxide                     |
| <b>DNA</b>         | : Deoksiribonükleik Asit                |
| <b>DNaz</b>        | : Deoksiribonükleaz                     |
| <b>DTT</b>         | : Dithiothreitol                        |
| <b>ER</b>          | : Endoplazmik retikulum                 |
| <b>ERAD</b>        | : ER Aracılı Degradasyon                |
| <b>ERQC</b>        | : ER Kalite Kontrol                     |
| <b>ET</b>          | : Etilen                                |
| <b>EtBr</b>        | : Etidyum bromür                        |
| <b>FDR</b>         | : Hatalı Keşif Oranı                    |
| <b>g</b>           | : Rölatif Santrifüj Kuvveti 'RCF'       |
| <b>GA</b>          | : Giberellin                            |
| <b>GO</b>          | : Gen Ontoloji                          |
| <b>GSH</b>         | : Glutasyon                             |
| <b>HR</b>          | : Hipersensitif Yanıt                   |
| <b>IRE1</b>        | : Inositol Gerektiren Enzim 1           |
| <b>JA</b>          | : Jasmonik Asit                         |
| <b>KEGG</b>        | : Kyoto Gen ve Genom Ansiklopedisi      |
| <b>MAPK</b>        | : Mitojen ile aktive edilmiş fosfokinaz |
| <b>mf</b>          | : moleküler fonksiyon                   |
| <b>mw</b>          | : moleküler ağırlık                     |
| <b>NGS</b>         | : Yeni Nesil Dizileme                   |
| <b>PCD</b>         | : Programlanmış Hücre Ölümü             |
| <b>PERK</b>        | : PKR-benzeri Kinaz                     |
| <b>PK</b>          | : Fosfokinaz                            |

|                |                                  |
|----------------|----------------------------------|
| <b>PP</b>      | : Protein fosfataz               |
| <b>RIDD</b>    | : Düzenlenmiş IRE1-bağımlı Yıkım |
| <b>RIN</b>     | : RNA Integrity Number           |
| <b>RNA</b>     | : Ribonükleik Asit               |
| <b>RNAi</b>    | : RNA interferansı               |
| <b>RNA-seq</b> | : RNA Dizileme                   |
| <b>ROT</b>     | : Reaktif Oksijen Türleri        |
| <b>SA</b>      | : Salisilik Asit                 |
| <b>SAR</b>     | : Sistemik Kazanılmış Direnç     |
| <b>TAE</b>     | : Tris-Asetat-EDTA               |
| <b>TM</b>      | : Tunikamisin                    |
| <b>UPR</b>     | : Katlanmamış protein yanıtı     |
| <b>UPS</b>     | : Ubikitin Proteozom Sistemi     |

## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

#### DOMATES (*Lycopersicon esculentum*) BİTKİSİNDE ENDOPLAZMİK RETİKULUM (ER) STRESİ KOŞULLARINDA GEN ANLATIM ANALİZLERİ

Elif PULAT

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Özgür ÇAKIR

ER stresi, mayalar ve hayvanlarda tanımlanmış, ardından bitkilerde de aydınlatılmaya başlanan hücresel bir süreçtir. Çevresel stres koşullarına veya çeşitli kimyasal ajanlara maruz kalan hücrede protein katlanma süreci sekteye uğrar ve hücrenin protein fabrikası olan ER lümeninde katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinler birikir. Biriken proteinler ER homeostazisini bozarak ER stresine neden olur.

UPR, protein katlanma ve yıkım kapasitesini ihtiyaca uygun hale getirerek, ER'deki katlanmamış protein yoğunluğunu azaltmak için çalışan yanıt mekanizmasıdır. ER stresıyla başa çıkabilmek için nükleusa sinyal iletimini sağlayarak çeşitli hedef genlerin anlatımını düzenler ve bir stres yanıtı meydana getirir. UPR, bitkilerde bir süredir moleküler imzaları olan, protein katlanmasıyla ilişkili genlerin anlatımının indüksiyonu ve ERAD (ER ile ilişkili degradasyon) mekanizmalarıyla tanınmaktadır. Hücrenin uzayan ER stresıyla başa çıkamaması ve protein işleme kapasitesinin uzun süreli aşılması durumunda ER stresi aynı zamanda otofajiyi de tetikleyebilir, bunun sonucu olarak ağır ER stresi koşullarında programlı hücre ölümü (PCD) meydana gelebilir.

UPR, laboratuvar koşullarında bitkilere, protein katlanmasını bozabilecek ER stres ajanları uygulanarak indüklenebilir. Bu ajanların en yaygın olarak kullanılanı salgı glikoproteinlerinin

N-bağılı glikozilasyonlarını engelleyerek protein katlanmasını önleyen, sonuç olarak da katlanmamış proteinlerin ER lümeninde birikmesiyle ER stresine yol açan tunikamisin ajanıdır.

ER stresinin önemli bir tarımsal bitki olan domateste işlev mekanizmalarının aydınlatılması ve diğer hücresel süreçler ve metabolik yollarla etkileşimlerinin ortaya konulması, bitkilerde çeşitli stres koşullarına dayanıklılık ve ıslah çalışmaları için faydalı olabilecek yeni bilgilerin ortaya konulmasını sağlayabilecektir.

Bu fıkirden yola çıkılarak bu tez çalışmasında, 14 günlük domates bitkilerinde, tunikamisin ajanı ile 2 saat ve 6 saat boyunca ER stresi indüklenmiştir. Uygulama ve kontrol bitkilerinin yapraklarından RNA izolasyonları gerçekleştirilmiş ve kalite ve miktar tayinleri yapılmıştır. RNA dizileme aşamasına geçilmek için uygun görülen RNA'lerden cDNA kitaplıkları sentezlenmiş ve RNA dizileme reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Dizileme verileri filtrelenerek istatistiksel analizler ve değişmiş anlatım gösteren genlerin (DEG) analizleri yapılmıştır. Farklı zaman uygulamaları ile bitkinin ER stresine erken ve geç yanıtlarıyla ilgili yorum yapılabilmesi amaçlanmıştır.

Yapılan analizlerde 2 saat tunikamisin uygulanmış domates yapraklarında kontrole göre anlatımı değişmiş 817 tane, 6 saatlik uygulamada kontrole göre 124 tane, 6 saat uygulamada 2 saat uygulamaya göre ise 1141 tane DEG tespit edilmiştir. Bulgular, ER stresine ilişkili olduğu bilinen genlerin çoğunun anlatımının 2 saat ER stresinde anlamlı şekilde arttığını gösterirken, 6 saat uygulama sonunda belirlenen DEG'lerin çoğunda anlatımların azaldığı tespit edilmiştir. Bu durumun, ER stresinin 2. saatte domates yapraklarında UPR yollarını tetiklediği ve hücrenin biriken katlanmamış proteinlerle baş etmeye çalıştığını gösterdiği düşünülmüştür. ER stresinin 6. saatinde tespit edilen DEG'lerin çoğunda anlatımların baskılandığının görülmesi, hücrenin protein üretimini yavaşlatmasının bir sonucu olarak düşünülmektedir.

Aralık 2022, 130 sayfa.

**Anahtar kelimeler:** ER stresi, domates, transkriptom

## **SUMMARY**

### **M.Sc. THESIS**

#### **GENE EXPRESSION ANALYSIS IN TOMATO (*Lycopersicon esculentum*) UNDER ENDOPLASMIC RETICULUM (ER) STRESS**

**Elif PULAT**

**İstanbul University**

**Institute of Graduate Studies in Sciences**

**Department of Molecular Biology and Genetics**

**Supervisor : Prof. Dr. Özgür ÇAKIR**

ER stress, is a cellular condition first described in yeast and animals, though it was also elucidated recently in plants. In a cell exposed to environmental stress conditions and various chemical agents, protein folding process is disrupted, therefore, unfolded or misfolded proteins accumulate and form aggregates in the ER lumen, which is the protein processing factory of cells. Protein aggregates damage ER homeostasis and consequently, cause ER stress.

UPR is a response mechanism working to lessen the load of unfolded proteins in the ER by adjusting the protein folding and degradation capacity of ER. To be able to cope with ER stress, UPR regulates the expression of various target genes by allowing the signal transduction into the nucleus, resulting in a stress response. UPR is represented in plants by its molecular markers, which are ERAD (ER-associated degradation) and the induction of the gene expressions related to protein folding. When the cell can not deal with the prolonged ER stress and the capacity of protein processing is exceeded for a long time, ER stress can also trigger autophagy, leading to PCD (programmed cell death) under adverse ER stress conditions.

UPR can be induced in plants, in vitro, by treatment with ER stress agents which will disrupt the protein folding process in the ER. The most widely used chemical for such purpose is the tunicamycin reagent, which acts to prevent N-linked glycosylations of secretory glycoproteins resulting in the accumulation of unfolded protein in the ER, causing ER stress.

Clarifying the functional mechanisms of ER stress in tomato, which is an important agricultural plant, and revealing its interactions with other cellular processes and metabolic pathways will provide new information that may be useful for studies involving plant breeding and the resistance of plants to various stress conditions.

Based on these ideas, in this thesis study, tomato plants were grown in tissue culture for 14 days, then ER stress was induced in plants for 2 hours and 6 hours with tunicamycin ER stress agent. RNA isolations were performed from the leaves of both treatment and control plants, and their quality and quantity determinations were made. cDNA libraries were synthesized from the RNAs deemed suitable to proceed to the RNA sequencing stage. After the RNA-seq reactions are carried out, statistical analyzes and analyzes of genes showing altered expression (DEG) were performed by filtering the sequencing data. Different time points were chosen to be able to comment on the earlier and later responses of the plant to ER stress.

Expression analysis resulted in 817 DEGs detected in 2 hours of treatment compared to control samples and 124 DEGs in 6 hours of ER stress. 1141 DEGs were detected in 6 hours compared to 2 hours of treatment with tunicamycin. The findings showed that the expression of most of the genes known to be associated with ER stress increased significantly at 2 hours treatment, while the expression of most of the DEGs determined at the end of 6 hours of treatment decreased. These results could indicate that ER stress triggered the UPR pathways in the 2nd hour of treatment and the cells were trying to cope with the fast accumulating unfolded proteins. However, the downregulation of the majority of DEGs in the 6th hour of treatment, is thought to be a result of the cells slowing down the protein synthesis to lessen the load of ER.

December 2022, 130 pages.

**Keywords:** ER stress, tomato, transcriptome

## 1. GİRİŞ

Domates (*Lycopersicon esculentum*) küresel boyutta en önemli ticari bitkilerden biridir ve üretiminin verimliliği çeşitli stres koşullarından büyük ölçüde etkilenmektedir. Dünya çapında ıslah yöntemleriyle elde edilmiş birçok domates varyetesi bulunur. Bu varyeteler yüksek oranda abiyotik streslere dirençli olsa da zorlu çevresel koşulların bitkiler üzerinde beklenmedik boyutta ciddi etkileri olabilmektedir. Domates varyetelerinde kültür temelli, ıslah veya biyoteknolojik yaklaşımlarla yapılan çalışmalarla bitkilerin strese karşı direnci artırılmaya çalışılmıştır. Islah çalışmalarında sınırlı şekilde başarılı olunsa da stres yanıtında veya toleransında rol aldığı bilinen genlerin bitkilere aktarımı gibi biyoteknolojik yaklaşımların daha güçlü bir stres direnci oluşturabileceği düşünülmektedir (Pandey ve diğ., 2011).

Bitkilerde strese karşı dayanıklı bitkilerin elde edilebilmesi için gerçekleştirilecek biyoteknoloji ve genetik mühendisliği çalışmalarının temelini, bitkilerde yapılan çalışmalarda elde edilen genomik ve transkriptomik veriler oluşturmaktadır. Domates, genomu 2012 yılında tamamen dizilenmiş, üzerinde birçok yüksek verimli yöntem kullanılarak çalışılmış ve birçok farklı stres koşulunda transkriptom seviyesinde veri elde edilmiş önemli bir ticari bitki ve model organizmadır (Sato ve diğ., 2012). Bu nedenle domates bitkisinin daha dirençli hale getirilebilmesi için bilgi sağlayabilecek moleküler seviyedeki çalışmalar büyük önem arz etmektedir.

Endoplazmik retikulum (ER), transmembran veya salgı proteinlerinin çoğunun olgunlaştırılıp aktif formlarına katlandığı hücresel bölümdür. ER, hücrenin büyüme ve farklılaşma süreçlerinde pek çok farklı durumla baş etmek zorunda olan oldukça dinamik bir organeldir. Çevresel stres koşulları da bitkide çeşitli stres yanıtlarını aktive ederken aynı zamanda oksidatif strese neden olur ve protein katlanma mekanizmalarını bozarak ER stresine yanıt yollarını aktive eder. Hücrenin sürekli olarak değişim gösteren protein katlanma ihtiyacına yanıt veren hücre içi bu sinyalleşme yollarının bütününe katlanmamış protein yanıtı (*'unfolded protein response'*, UPR) adı verilir (Ron ve Walter, 2007).

Protein katlanması biyolojinin en çok çalışılan alanlarından biridir. DNA ve RNA tarafından yönlendirilen protein sentezinin aksine protein katlanması, protein molekülünün kendisi tarafından yönetilen bir süreçtir. Protein katlanma süreci büyük ölçüde proteinin kendi entropi ve enerjisine bağımlı olduğundan büyük protein molekülleri için bu süreç daha da hataya açık olabilmektedir. Molekül üzerindeki enerji değişimlerinden dolayı protein, kolayca doğal olmayan konformasyonlara katlanabilir. Protein katlanmasının kolayca bozulabilen bir süreç olması, protein katlanmasını bitkilerin değişen sert çevresel koşulları algılaması ve yanıt vermesi için uygun bir yol haline getirmektedir (Howell, 2013).

Protein katlanması salgı proteinleri için önemli bir sorundur çünkü sentezleri sırasında bu proteinler ER lümenine katlanmamış proteinler olarak girer. Katlanmaları ER'deki faktörler aracılığıyla yönlendirilir. Doğru katlanamayan proteinler ER kalite kontrol (ERQC) sistemi tarafından tespit edilir ve ER ilişkili degradasyon (ERAD) yoluyla ile degrade edilir.

ERQC sisteminin doğru çalışması, katlanmamış proteinler bitkinin sağlığı için oldukça zararlı olduğundan büyük bir önem taşımaktadır. Zorlu çevresel koşullarda veya protein salgısının arttığı ve protein katlanmasına duyulan ihtiyacın, protein katlanmasıyla ilişkili sistemlere fazla geldiği durumlarda, ER'de katlanmamış veya yanlış katlanmış protein miktarı artar; bu durum da bitkilerde ER stresinin oluşmasına neden olur (Vitale ve Boston, 2008).

ER stres yanıtı en başta, ER şaperonu ve katlanma enzimleri olan BiP'leri de ('*binding protein*', HSP70'in '*heat shock protein 70*' ER'de bulunan ilişkili faktörü) kodlayan genlerin transkripsiyonunun tetiklenmesinden sorumlu olan süreç olarak karakterize edilmiştir. Tunikamisin (TM), N-bağlı glikozilasyon inhibitörü, yaygın olarak ER stresini indüklemek için kullanılmıştır. Maya ve memeli hücrelerinde de BiP indüksiyonunun moleküler mekanizmalarının ortaya konulması için pek çok çalışma gerçekleştirilmiştir (Iwata, Sakiyama, M.H. Lee, ve diğ., 2010).

Bitkiler protein katlanması için daha elverişli bir ortam yaratmak adına BiP ve  $Ca^{2+}$  bağımlı ER katlanma proteinlerinin anlatımlarını artırıcı etki göstererek ER stresini yanıtlarını başlatır. UPR'nin 3 ana kolunun ER stresine girmiş hücrelerde güçlü bir hayatta kalmayı artırıcı etkisi vardır. Bunlar; IRE1 (*inositol-requiring enzyme 1*), PERK (*protein kinase R-like ER kinase*) ve ATF6 (*activating transcription factor 6*) tarafından yönetilen ve birbiriyle iç içe olan sinyalleşmeleri ve protein katlanmalarının düzenlenmesini sağlayan yollardır. Bazı durumlarda

homeostazi sağlanamayabilir ve UPR sinyalleşme yolağının bazı bileşenlerinin de aktif katkısıyla ER stresi altındaki hücre ölümüne gider (Kamauchi *ve diğ.*, 2005; Ron ve Walter, 2007).

ER stresiyle ilgili başlıca mekanizmalar olan ERQC, ERAD ve ER ilişkili otofaji ve programlanmış hücre ölümü (PCD), maya ve memeli sistemlerine göre bitkilerde daha az bilinir. UPR'nin bitkilerdeki aktivasyon ve duraklama mekanizmaları ve UPR'nin hücrenin hayatta kalması veya ölümünü nasıl teşvik ettiği hala aydınlatılması gereken noktalardır. UPR'nin bitkilerde önemli fizyolojik rolleri de bulunur, bu rollerin daha iyi anlaşılması bitki ıslahı çalışmalarına potansiyel olarak fayda sağlayabilecektir (Deng, Srivastava ve Howell, 2013).

RNA dizileme (RNA-seq), hücrenin transkriptomuna dair bilgi edinmek üzere yüksek verimli dizileme yöntemlerini kullanır. Daha önce kullanılan Sanger dizileme ve mikroarray temelli yöntemlere göre RNA-seq, transkriptomun dinamik yapısı için uygun olacak, daha yüksek kapsamlı veriler sunmaktadır. Gen anlatımının ölçülmesinin ötesinde, RNA-seq ile elde edilen veriler yeni transkriptlerin keşfedilmesi, alternatif kırılmış genlerin tanımlanması ve allel-spesifik anlatımların belirlenmesini sağlamaktadır. RNA-seq yönteminin akış şemasında örneklerin hazırlanmasından kitaplık oluşturulmasına ve en son verilerin analizine kadar gerçekleşen ilerlemeler transkripsiyonun fonksiyonel karmaşıklığının daha ileri düzeyde aydınlatılmasına olanak vermiştir.

Yüksek verimli yeni nesil dizileme (NGS) teknolojilerinin kullanılması transkriptomik çalışmalarda yeni bir çağı başlatmıştır. Hibridizasyon temelli mikroarray ve Sanger dizileme yöntemlerinin pek çok dezavantajının üstesinden gelerek gen anlatımının transkriptom boyutunda ölçülmesi için en verimli yöntemlerden biri haline gelmiştir. Tipik bir RNA-seq deneysel süreci RNA izolasyonu, RNA'ların cDNA'lara çevrilip cDNA dizileme kitaplıklarının oluşturulması ve bunların NGS platformunda dizilenmesi aşamalarını içerir (Kukurba ve Montgomery, 2015).

Transkriptom analizleri, son yıllarda ER stresi yanıtına dair pek çok verinin aydınlatılmasında rol oynamıştır. ER stres yanıtında salgı yolaklarının fonksiyonlarına dair pek çok faktörün anlatımının arttığı transkriptomik analizlerle ortaya konmuştur. Bunlar, ER'de bulunan moleküler şaperonları kodlayan genlerin yanında, ER-Golgi taşıma sistemleri, ER ilişkili

degradasyon (ERAD) bileşenleri ve lipid/inositol metabolizması için çeşitli genleri de içermektedir (Travers *ve diğ.*, 2000).

2010 yılında *Arabidopsis thaliana*'da (Iwata, Sakiyama, M. H. Lee, *ve diğ.*, 2010) ve 2014 yılında pirinçte yapılan transkriptom analizleri (Wakasa *ve diğ.*, 2014) bitkilerde ER stresine yanıtla ilgili önemli metabolik yolların ortaya konulmasını sağlamıştır. Ardından domates bitkisinde de ER stresi mekanizmalarıyla ilgili çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Jasmonik asit, etilen ve salisilik asit gibi fitohormonların ER stresi üzerine etkileri domateste araştırılmış ve UPR ile ilişkili genler üzerinde etkili oldukları ortaya konmuştur (Nagashima *ve diğ.*, 2014; Czékus *ve diğ.*, 2020, 2022).

2021 yılında yapılan bir başka çalışma domateste önemli bir UPR bileşeni olan bZIP60'ın ER stresi durumunda kırılma profillerinin aydınlatılmasını sağlamıştır. Domateste bZIP60 faktörünün ER stresi altında hayvan hücrelerindeki ve *Arabidopsis* ve mısır gibi bitkilerdeki sistemlere benzer şekilde indüklenmiş olması, UPR yanıtının IRE1/bZIP60 kolunun domateste de korunmuş olduğunu ortaya koymuştur (Kaur ve Kaitheri Kandoth, 2021).

ER stresi, bitki büyüme ve gelişmesini ve tarımsal bitkilerin verimliliğini önemli ölçüde etkileyen biyotik ve abiyotik stres koşullarının da yol açtığı önemli bir hücresel süreçtir. ER stresine ilişkin mekanizmalar hayvan hücreleri ve mayalarda oldukça detaylı bir şekilde belirlenmiş olsa da bitkilerde bu mekanizmaların aydınlatılması hala devam etmektedir. Yeni nesil dizileme teknolojileriyle beraber elde edilen yüksek doğrulukta ve kapsamlı verilerle bu süreçleri incelemek ve ER stres yanıtına ait önemli bileşenleri ve bunların ilişkili metabolik yollarını tespit etmek mümkün olacaktır.

Bu tez çalışmasında, doku kültüründeki domates bitkilerinde tunikamisin stres ajanı ile 2 saat ve 6 saatlik uygulama sürelerinde ER stresi indüklenmiştir. ER stresi indüklenen bitkilerden elde edilen RNA'lar RNA-seq yöntemi ile NGS platformunda dizilenerek, transkriptom seviyesinde analizler gerçekleştirilmiştir. 2 saat ve 6 saat boyunca ER stresine maruz kalmış bitkilerde gen anlatım seviyelerinde görülen değişimler kontrol koşullarına ve birbirlerine göre kıyaslanarak analiz edilmiş, istatistiksel olarak anlamlı veriler gen ontoloji ve KEGG yolak analizlerine tabii tutulmuştur.

Elde edilen bulgular, hem 2 saat hem de 6 saatte tunikamisinin birçok metabolik yolaktaki kilit genler üzerinde etkili olduğunu göstermiştir. 2 saatlik uygulamalarda abiyotik stres yanıtına ait genlerin yanında DNA'ya bağlanan proteinler ve transkripsiyon faktörlerinin de anlatımı dikkat çekici şekilde artmıştır. 6 saatlik uygulamada ise ER'de protein işlenmesi ile ilişkili birçok gende ve jasmonik asit aracılı sinyalleşme yollarında belirgin değişimler olması uzamış ER stresinden bu yolların etkilendiğini ortaya koymuştur.

Bu çalışmadan elde edilen bulguların, ER stresi ile ilişkili yolların daha iyi anlaşılmasında rol oynayacağı düşünülmektedir. Tez çalışmasında, bu yolların önemli tarımsal bitkilerden biri olan domateste strese karşı dirence nasıl katkı sağladığına dair yeni yaklaşımlarda bulunulmasına ışık tutacak bilgiler edinilmiştir.

## 2. GENEL KISIMLAR

### 2.1. MODEL ORGANİZMALAR

Model organizma terimi, *Drosophila* ve fare gibi küçük boyutları ve kısa jenerasyon süreleri sayesinde deneysel süreçleri hızlandıran türleri tanımlamak için kullanılmıştır. Son yıllarda genom dizileme projelerinin hızlanmasıyla bu tanımın kapsamı genişletilmiştir. Türler, deneysel süreçlere uygunluğuna kıyasla genomlarının özgün özellikleri açısından tercih edilirler ve bunlar genomik modeller olarak tanımlanır. Ekonomik olarak önemli olmaları çalışılacak model organizmanın seçiminde önemli rol oynamıştır, tarımsal önemi olan pirinç, domates ve arpa gibi bitkiler de bu kapsamda model organizma teşkil etmektedir (Hedges, 2002).

Kalıtım, gelişim, fizyoloji gibi süreçlerin altında yatan hücresel ve moleküler temeller model organizmaların çalışılmasıyla ortaya konulmaktadır. Organizmaların çeşitliliğine rağmen deneysel süreçlere uygunluğuna göre seçilen belirli bir grup organizmanın araştırılmasıyla belli temel prensipler ortaya konulabilir. Bilimsel araştırmalarda en yaygın kullanılan model organizmalar arasında *E. coli*, maya, *C. elegans*, *Drosophila melanogaster*, Zebra balığı, *Mus musculus*, *Zea mays* ve *Arabidopsis thaliana* bulunur. Bu model organizmalar, önemi ve geniş kullanımları nedeniyle seçilmiş ve genom boyutunda çalışmalar için tercih edilen sistemler olmuşlardır. Genomlarının tamamı öncelikli olarak dizilenen organizmalardır, bu da geniş çaplı transkriptomik ve proteomik çalışmaları için önemli fırsatlar sunmaktadır (Müller ve Grossniklaus, 2010).

#### 2.1.1. *Lycopersicon esculentum* Mill.

Domates, tüm dünyada en önemli ekilebilir bitkiler arasındadır. İlk olarak Güney Amerika'nın batısında görülmüştür. Bitkinin ehlileştirilmesi de Amerika'da başlamıştır. Gıda olarak önemli bir bitki olduğu için, domatesin verimini, meyve kalitesini ve biyotik veya abiyotik streslere karşı direncini artırmak için birçok ıslah çalışması yapılmıştır. Domates yalnızca gıda olarak değil, aynı zamanda araştırma materyali olarak da geniş kapsamda kullanılmıştır. Geliştirilmiş domates varyeteleri ile çaprazlanabilen ve çok çeşitli fenotipler sergileyen 13 adet tanımlanmış yabani domates türü bulunmaktadır. Bu yabani tip domatesler, istenilen özelliklerin kaynağı olarak ıslah çalışmaları için ve evrimsel çalışmalar için oldukça önemlidir. Domates çok geniş

bir aile olan Solanaceae'ye dahildir. Ticari önemi olan patates, patlıcan, biber ve tütün gibi birçok bitkiyle de yakın akrabadır. Domates'te yapılan çalışmalarda elde edilen bilgiler kolaylıkla bu bitkilere de uygulanabilmektedir (Bai ve diğ., 2007).

*Lycopersicon esculentum* Mill, *Solanum lycopersicum* L. olarak da isimlendirilir. Linnaeus tarafından kullanılan binominal sistemle domates, 1753 yılında *Solanum* cinsi altında sınıflandırılmıştır. Buna karşın 1754'te Philip Miller, ıslah edilmiş domates kültürlerini de içeren birkaç türü *Lycopersicon* cins adı altında yeniden sınıflandırmıştır, domates de *Lycopersicon esculentum* tür adını almıştır (Peralta ve Spooner, 2000).

Domates bitkisinin genomu 2012 yılında tamamen dizilenmiştir. Moleküler düzeyde çalışmalara uygun olması ve kolaylıkla doku kültürüne alınabilmesi de dahil olmak üzere sayılan birçok özelliğiyle Solanaceae ailesine ait bitkiler ve diğer etli meyvesi olan bitkiler için önemli bir model organizma teşkil etmektedir (Kimura ve Sinha, 2008).

## 2.2. BİTKİLERDE STRES

Tarımsal bitkilerin verimini düşüren ve kısıtlayan çevresel stres koşulları bitkileri doğal koşullarda sürekli olarak etkilemektedir. Bitkilerin karşılaştığı bu stres koşulları temel olarak iki grupta incelenir, abiyotik ve biyotik stresler. Radyasyon, tuzluluk, sel, kuraklık, yüksek sıcaklıklar, ağır metaller vb. koşullar abiyotik streslerdir ve dünya çapında mahsul kaybına en çok neden olan koşullardır. Mantar, nematod, bakteri gibi patojenlerin saldırıları da biyotik stres koşullarını oluşturur (Gull, Ahmad Lone ve Ul Islam Wani, 2019).

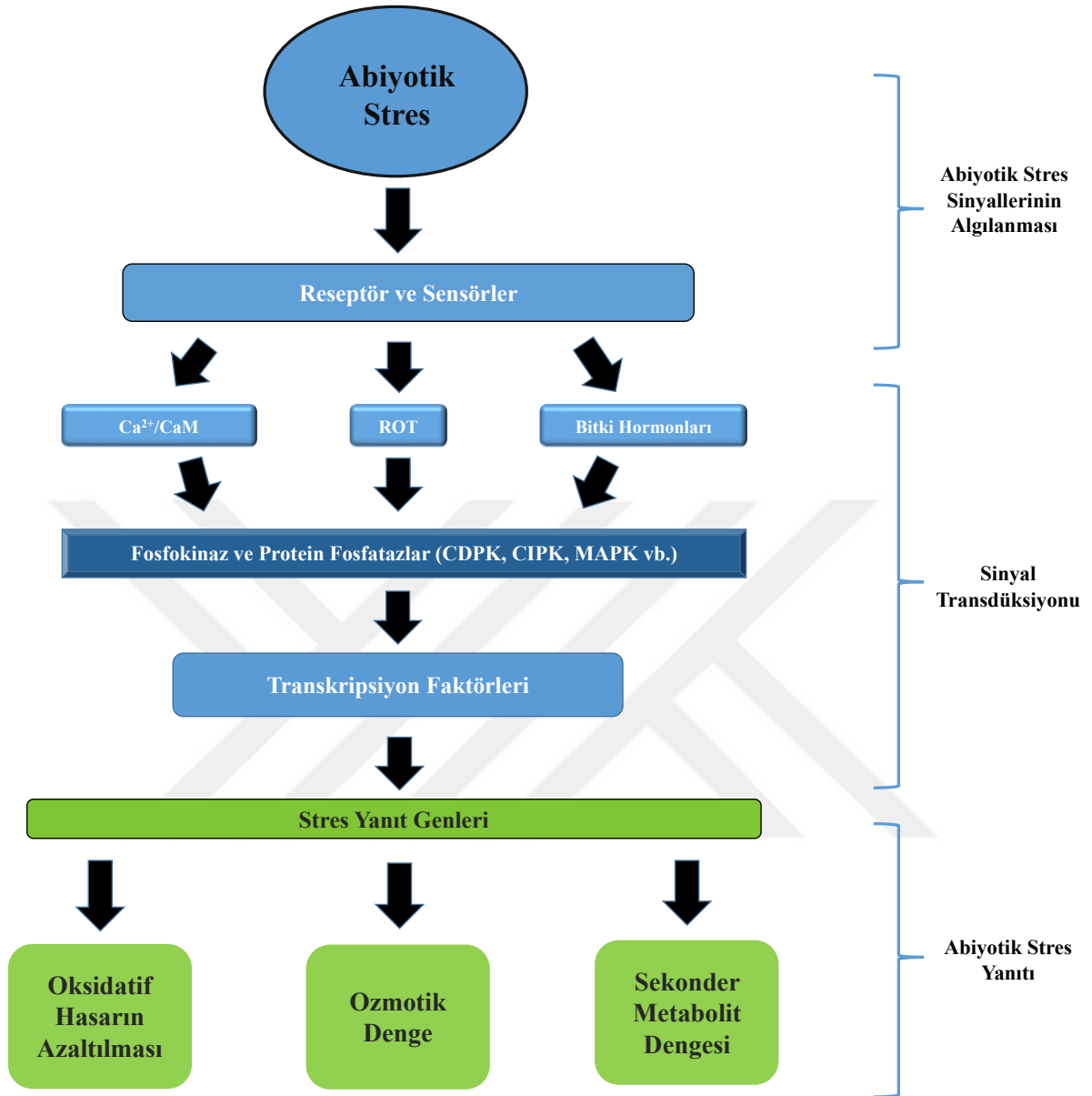
Bitkiler hareketsiz organizmalar olduklarından çevresel koşullardan uzaklaşamazlar. Bu etmenlerle baş etmek için geliştirdikleri çeşitli mekanizmalar bulunur. Çevrelerindeki strese neden olan etmenleri sezerler ve uygun hücresel yanıtları geliştirirler. Hücre yüzeyinde veya sitoplazmasında yer alan sensörler aracılığıyla bu etmenleri algılayarak bunları çeşitli sinyal transdüksiyon yollarıyla nükleusta bulunan transkripsiyonel mekanizmaya iletirler. Bu durum bitkinin transkriptomunda değişiklikler yaratarak bitkiyi strese daha toleranslı hale getirir. Sinyalleşme yolları stresin ortamdaki sezişmesi ve ona uygun biyokimyasal ve fizyolojik yanıtın üretilmesi arasında bağ kurarak stres yanıtında kilit bir rol oynar (Verma, Nizam ve Verma, 2013).

### 2.2.1. Abiyotik Stres

Bitkiler dünya çapında tarımsal üretimi etkileyen çok sayıda abiyotik stres faktörüyle karşılaşır. Başlıca abiyotik stresler arasında tuz, kuraklık, sıcaklık, soğuk, ultraviyole radyasyon, ağır metal ve besin açlığı gibi koşullar bulunmaktadır. Tüm bu stres faktörleri birbirleri ile bağımlıdır ve bitki hücrelerinde kendilerini ozmotik stres şeklinde veya iyon dağılımının ve hücre homeostazisinin bozulması yoluyla gösterirler. Büyüme hızı ve verimi anlatım biçimlerini değiştiren bir grup gen tarafından etkilenir. Abiyotik streslere yanıt veren genlerin tanımlanması ve karakterize edilmesi tarımsal bitkilerde stres yanıt mekanizmalarının anlaşılması için gereklidir. Herhangi bir abiyotik stres koşulu için sinyalleşme akışının aktivasyonunun ilk aşaması bitki hücresinin membranında konumlanmış reseptörler aracılığıyla stres sinyalinin tanınmasıdır. Tanınma sonrasında bu sensörler sinyali,  $Ca^{2+}$  ve ROT'lar gibi fitohormonlar veya sekonder mesajcılar aracılığıyla ileri aşamalara iletir. Stresin algılanmasından hücre içinde oluşan yanıtı çevrilmesine kadar giden süreç Şekil 2.1'de şematize edilmiştir.

ER stresi yanıtlarında marker genler olan BiP'ler de abiyotik stres yanıtlarında rol oynarlar. Soya fasulyesi ve tütün bitkilerinde BiP'in artırılmış anlatımının kuraklık toleransı sağladığı gözlemlenmiştir (Jia ve diğ., 2008; Valente ve diğ., 2009). Bunun olası nedeninin kuraklık stres yanıtları ve UPR arasındaki dinamik etkileşimler olduğu öngörülmüştür. *A. thaliana*'da da yüksek tuz veya sıcaklık stresi yanıtında UPR'nin rol alabildiği gösterilmiştir. Sıcaklık stresinde, bZIP28, Golgi aracılığıyla ER'den nükleusa göçer, burada peptidazlar tarafından kesilerek aktive edilir (Liu ve diğ., 2007a). Tuz stresinde de benzer bir aktivasyon mekanizması bZIP17 için tetiklenir (Liu ve diğ., 2007b).

ROT'lar gibi sekonder mesajcılar bir grup ROT-aracılı protein kinaz ve protein fosfatazların aktivasyonunu tetikler. Bu enzimler arasında MAPK (mitogen-activated protein kinase) enzimleri, CDPK'lar (calcium-dependent protein kinases), CBL'ler (calcineurin-B-like proteins), CIPK (CBL-interacting protein kinase), ve PP2C (protein phosphatase 2Cs)'ler bulunur. Tüm bu enzimler gelen sinyali ileri aşamalara ileterek fosforilasyon/defosforilasyon akışlarını başlatır. Özellikle transkripsiyon faktörlerinin fosforilasyon akışlarının indüklenmesi, hücresel korunmada görev alan veya sinyalleşme akışlarında rol alan düzenleyici genlerin anlatımında ve gen anlatımının transkripsiyonel düzenlenmesinde başroldedir (Khan ve diğ., 2018).



**Şekil 2.1:** Abiyotik stres sinyalleşme yollarını düzenleyen transkripsiyon faktörleri ve stres sinyallerinin hücre içerisinde stres yanıtlarına dönüşümünün şeması. CaM=Kalmodulin, ROT=Reaktif oksijen türleri (Khan ve diğ., 2018).

Stres yanıt genlerinin anlatımlarının düzenlenmesi MYB, NAC, bHLH, bZIP, WRKY gibi transkripsiyon faktörleri aracılığıyla gerçekleşir. Strese yanıt genleri oksidatif hasarı azaltarak ya da ozmotik denge ile sekonder metabolit dengesini düzenleyerek, abiyotik strese karşı bitkinin tolerans göstermesini sağlar (Khan ve diğ., 2018).

### 2.2.2. Biyotik Stres

Bitkilerin, mantar, virüs, bakteri, nematod ve böcekler gibi çeşitli canlı organizmaların neden olduğu biyotik streslerle de baş etmeleri gerekir. Biyotik stres ajanları bitkilerde hastalık, enfeksiyon ve fiziksel hasara yol açarak tarımsal verimliliği düşürür. Yapılan araştırmalarla biyotik stresin etkisinin üstesinden gelinebilmesi için çeşitli mekanizmalar geliştirilmiştir. Strese yol açan ajanların genetik mekanizmalarının araştırılması ile biyotik streslerin etkisi azaltılabilir. Genetik olarak modifiye edilmiş bitkiler, tarımsal bitkilerin dirençli varyetelerinin geliştirilmesi için güçlü bir araç olarak görülmektedir (Gull ve diğ., 2019).

Biyotik stresler bitki hormonları salisilik asit (SA) ve JA gibi sinyal moleküllerini tetikleyerek bir savunma yanıtı ortaya çıkarır. SA, HR (*'hypersensitive response'*) ve SAR (*'systemic acquired resistance'*) yanıtlarını indükleyerek biyotrofik patojenlere karşı direnci aktive eder (Smith, de Moraes, Mescher, 2009; Caarls, Pieterse ve van Wees, 2015). JA ise, böceksavar proteinleri, vejetatif depo proteinleri veya terpenoidler, poliaminler, kinonlar, alkaloidler, fenilpropanoidler ve glukozinolatlar gibi özelleşmiş metabolitleri sentezleyerek, herbivor böcekler ve nekrotrofik patojenlere karşı savunma yanıtını aktifleştirir (Farmer, Ryan, 1992; Verma, Ravindran, Kumar, 2016). Hücrenin karşılaştığı koşullara göre, birbirine bağımlı SA- ve JA- sinyalleşme yolları diğer hormonlarla düzenlenme yoluyla sinerjik veya antagonistik olarak çalışabilir.

Bitkilerde, ER'de lokalize olmuş stres sensörleri ve transdüksörleri bulunur. bZIP transkripsiyon faktörleri bZIP28, bZIP17 ve bZIP60, NAC transkripsiyon faktörleri, NAC062 ve NAC089, ve RNA kırılma enzimi IRE1 gibi bileşenler ER stresinde bu görevleri üstlenirler. Patojenle enfeksiyon durumunda IRE1 aktifleşir ve bZIP60 mRNA kırılmasını sağlar. Böylece bZIP60'ın ER stres yanıtlarını indüklediği nükleusa taşınan aktif formunun translasyonu sağlanmış olur. Biyotik streslerde UPR'nin rolünü göz önünde bulundurarak Moreno ve diğ., (2012), *ire1a* tek mutantının patojen enfeksiyonlarına artmış bir hassasiyet gösterdiğini ve sistemik kazanılmış direnç (SAR) sisteminde bozulmalar olduğunu tespit etmiştir (Sever ve diğ., 2003; Moreno ve diğ., 2012). Bu durumun SA ile veya patojen ile indüklenmiş IRE1 aracılı bZIP60 kırılmasından ortaya çıktığı düşünülmektedir. Benzer şekilde *Nicotiana benthamiana*'da, *NbbZIP60*'ın susturulduğu bitkilerin, *Pseudomonas cichorii* enfeksiyonuna karşı daha duyarlı olduğu gösterilmiştir (Valente ve diğ., 2009).

### 2.2.3. Oksidatif Stres

ER, protein işlenmesi ve katlanması için sorumlu olan anahtar bileşen olmakla beraber birçok sinyal transdüksiyonu ve metabolik süreçte de rol almaktadır. Reaktif oksijen türleri (ROT), redoks dengesinde ve stres yanıtında rolü olan önemli sinyalleşme mesajcılarıdır. Çevresel stres koşulları katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin birikimini tetikleyerek ER stresine neden olur. Son yıllarda yapılan çalışmalarla redoks metabolizması ve ROT'ların ER stresine yakın ilişkisi ortaya konmuştur. ER stres, ROT üretimini artırıp bitkide oksidatif yüke neden olabilir, bunun sonucunda ER stresinin derecesine bağlı olarak oksidatif strese yol açar (Ozgur ve diğ., 2014). ER stres, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz aracılı ROT sinyalleşmesini aktive eder, antioksidan savunma mekanizmalarını artırır ve glutatyon (GSH) redoks durumunu değiştirir. Aynı zamanda ROT birikimi de ER stres yanıtının indüklenmesinde özel bir rol oynar. Bu faktörler göz önüne alındığında bitkiler, ER stres karşısında ROT'larla etkileşmek için bir seri karmaşık düzenleyici mekanizmaları geliştirmiştir (Cao ve diğ., 2022).

ROT'ların abiyotik/biyotik stresler için rolü oldukça önemlidir, bitki biyolojisinde ikili roller üstlendikleri kabul edilir. Bunlardan birinde toksik olmayan seviyelerde sinyalleşme molekülleri olarak görev alırken, diğerinde aerobik metabolizmanın yan ürünleri olarak toksik seviyelerde DNA, RNA, protein ve membranlara zarar verirler. Dolayısıyla, pek çok hücrel antioksidan sistemi ROT'ların toksik etkilerini önlemek için bir grup antioksidan enzim ve antioksidan bileşenle ROT'ların yok edilmesi veya detoksifikasyonu için çalışır (Mittler, 2017).

Anahtar enzimatik antioksidan olan süperoksit dismutaz (SOD), çeşitli organizmalarda ROT seviyelerinin dengelenmesi için bulunur. Ek olarak katalaz (CAT), peroksidaz (PER), glutatyon peroksidaz (GPX) vb. antioksidan enzimler de bitkilerde geniş kapsamlı olarak çalışılmıştır. Bitkilerde enzimatik olmayan majör antioksidanlar temel olarak çeşitli metabolitleri ve vitaminleri kapsar: Glutatyon (GSH), karotenoidler, flavonoidler, askorbik asit (AsA) ve tokoferol bunların arasındadır (Mittler ve diğ., 2004). GSH'nin ER'de okside formu glutatyon disülfite (GSSG) oranı disülfidlerin stabilitesini etkilediğinden doğru protein katlanması için önemlidir. ER aynı zamanda,  $Ca^{2+}$  iyonları da biriktirir. Lüminal  $Ca^{2+}$  protein katlanması ve işlenmesiyle ilgili fonksiyonları teşvik eder ve ROT üretimini aktive eder.  $Ca^{2+}$  birikimi de ROT sinyallerinin düzenlenmesi altında gerçekleşmektedir (Csordás ve Hajnóczky, 2009; Aller ve Meyer, 2013).

### 2.3. ER STRESİ

Endoplazmik retikulum, protein sentezi, bir araya getirilmesi ve taşınımı için temel üretim merkezi olarak üretim sürecini denetleyen bir ER kalite kontrol '*ER Quality Control*' (ERQC) sistemine sahiptir. Organizmalar, abiyotik veya biyotik çevresel stres koşullarına maruz kaldığında yanlış katlanmış proteinlerin seviyesindeki artış ERQC sistemine yük oluşturabilir. Bu durum, ER kalite kontrolü için talep ve kapasite arasındaki dengenin kaçmasına ve ER stresinin oluşmasına neden olur (Wan ve Jiang, 2016).

ER stresi, ilk kez Kozutsumi ve diğ. (1988), tarafından katlanmamış proteinlerin ER'de birikmesi sonucu glukoz ile düzenlenmiş protein 78'in (GRP78; immunoglobulin ağır-zincir bağlayıcı protein (BiP)/ısı şoku 70 kDa protein) artan üretimiyle tanımlanmıştır (Kozutsumi ve diğ., 1988). BiP geni bu nedenle ER stresinin marker geni olarak da bilinmektedir.

ER stresinin ortaya çıkışını engellemek için hücreler ER homeostazisini sıkı bir şekilde denetlemek ve düzenlemek zorundadır. ER stresi glikozilasyonu inhibe eden (tunikamisin vb.) bileşenlerle indüklenebilir. Bunun yanında hücrenin kalsiyum homeostazisinde bozulmalar, proteinlerin fazla anlatımı, yanlış katlanmış veya katlanmamış proteinlerin birikimi, besin açlığı, oksidatif koşullar, serbest yağ asitlerinin birikimi ve viral enfeksiyonlar gibi birçok durum, ER stresine yol açmaktadır (Koumenis ve diğ., 2002; Harding ve diğ., 2003).

Uzun veya şiddetli ER stresi durumunda ER ve diğer organeller hasar alabilir veya ciddi durumlarda hücre ölümü görülebilir. Bu durumun önüne geçmek için hücreler protein homeostazisini yeniden sağlamak adına kendini kurtarma programlarını harekete geçirir. Protein katlama veya degradasyon kapasitesi artırılarak ya da bu reaksiyonlara duyulan talep azaltılarak ER'de protein homeostazisi sağlanabilir. Bu süreçlerin bütününe katlanmamış protein yanıtı '*unfolded protein response*' (UPR) adı verilir (Bao ve Howell, 2017).

Arabidopsis *AtbZIP60* bitkilerde ER stresi yanıtında rol alan en iyi karakterize edilmiş transkripsiyon faktörüdür. İlk olarak ER stresinde transkripsiyonel olarak indüklenen bir gen olarak tanımlanmıştır. *AtbZIP60* proteininin transmembran domeni stres olmayan durumlarda ER membranında konumlanır, ER stresi koşullarında ise proteolizis sonucunda aktive olur. Bu durum, bZIP domenini taşıyan sitozolik parçanın nükleusa taşınımına ve transkripsiyon faktörü olarak görev yapmasına izin verir. *AtbZIP60*'a ek olarak *AtbZIP28*'in de Arabidopsis ER stres

yanıtında BiP genlerini aktive eden bir transkripsiyon faktörü olarak rol aldığı gösterilmiştir (Liu ve diğ., 2007a; Iwata, Fedoroff ve Koizumi, 2008).

ER’de protein katlanmasında görev alan diğer faktörler de moleküler şaperonlardır. Bu moleküller, protein katlanmasını yönetmez ancak sürece yardımcı olurlar. Bağlanma proteini (BiP), ER lümeninde en yaygın bulunan şaperondur ve ER’ye giren olgunlaşmamış proteinleri bağlayarak bunların agregatlar oluşturmaya engel olur (Otero, Lizák ve Hendershot, 2010). Şaperonlar için bu fonksiyon kritiktir çünkü ER oldukça kalabalık bir protein katlanma ortamıdır ve yeni sentezlenmiş proteinin açıkta kalan hidrofobik yüzeyleri onları agregat oluşturmaya daha yatkın kılar. BiP’ler ATP bağlayan ve J-domeni içeren proteinlerle etkileşim halinde çalışan ısı şoku 70 proteinleridir. J proteinleri BiP ile etkileşerek ATP hidrolizini stimüle eder, BiP tarafından polipeptidlerin hızlı şekilde hapsedilmesini sağlar. Daha sonra, bu polipeptidler nükleotid değişimi sonucunda yavaş yavaş serbest bırakılır (Misselwitz, Staack ve Rapoport, 1998; Yamamoto ve diğ., 2008). BiP proteini, Hsp70’in eşleniği bir proteindir ve ER’de protein katlanmasına yardımcı olan temel moleküler şaperonlardan biridir. GRP94 ve HSP40 gibi diğer şaperonlar da BiP fonksiyonunu yönlendiren ko-şaperonlar olarak tanımlanmıştır (Iwata ve Koizumi, 2012).

*Arabidopsis* ER stres yanıtı için tipik bir marker gen olan BiP1 ve BiP3 mRNA seviyeleri, tunikamisin (TM) uygulamasından sonra 2. saatte artmış, 5. saatte en yüksek seviyeye ulaşmış ve 10. saatte azalmıştır. Aynı çalışmada TM uygulaması sonrası mikroarray ile yapılan transkriptom analizlerine göre, protein katlanmasında görevli 25 gen, salgı yollarında görevli 21 gen, protein yıkımında görevli 11 gen ve 13 transkripsiyon faktörü kodlayan gen de dahil olmak üzere *Arabidopsis thaliana*’da toplam 129 transkriptin anlatımının ER stresinde kontrole göre en az 3 kat arttığı tespit edilmiştir (Iwata, Fedoroff ve Koizumi, 2008).

Pirinç bitkisinde yaratılmış bir mutasyon sonucu elde edilen mutantlar ve yabani tip bitkilerde TM ile ER stresi indüklenerek yapılan RNA-seq analizleri sonucu elde edilen veriler, *OsIRE1* aracılı ER stres yanıtıyla ilgili bilgi edinilmesini ve ER stresıyla ilişkili yeni genlerin keşfedilmesini sağlamıştır (Wakasa ve diğ., 2014).

ER stresinin ilişkili 3 temel mekanizması olan UPR, ERAD ve otofaji süreçleri, ER homeostazisinin geri kazanılmasında önemli roller oynarlar. ER stresine ilk yanıtı oluşturanlar ER membranında konumlanmış ER stres sensörleridir. Memeli hücrelerindeki ER sensörleri 3

sınıftan oluşur, bunlar da UPR sinyalleşme yolağının 3 kolunu oluştururlar: IRE1, ATF6 ve PERK kolları. Bitkilerde bunlardan yalnızca IRE1 ve ATF6 aracılı olmak üzere iki kolun etkili şekilde çalıştığı belirlenmiştir (Howell, 2013).

bZIP28/bZIP17 faktörleri, memelilerdeki ATF6'nın bitkilerdeki homologu BiP ile etkileşimli ER Tip II transmembran proteini, ER stresinde aktifleşir ve Golgi'ye taşınır. IRE1'in bitkilerdeki homologuna baktığımızda, IRE1a ve IRE1b olmak üzere iki farklı enzim işlev göstermektedir fakat IRE1b'nin rolü daha baskındır. Bitkilerdeki bZIP60 faktörü de hayvanlardaki XBP1 (*'X-box binding protein 1'*)'in homologudur (Zeng ve diğ., 2019).

### 2.3.1. Katlanmamış Protein Yanıtı (UPR)

UPR, ER'de stres koşulları ile aktive olan bir stres yanıtı yolağıdır. ER stresi, yanlış katlanmış veya katlanmamış proteinlerin ER'de birikmesi ile sonuçlanabilecek çeşitli koşullar ile ortaya çıkar. Bu koşullar arasında yüksek sıcaklık veya tuz gibi abiyotik stresler ya da viral ve bakteriyel patojenler gibi biyotik ajanlar bulunabilir. UPR aynı zamanda, protein katlanmasının ihtiyacı karşılayamadığı protein sentezinin yoğun olduğu durumlarda aktive edilir.

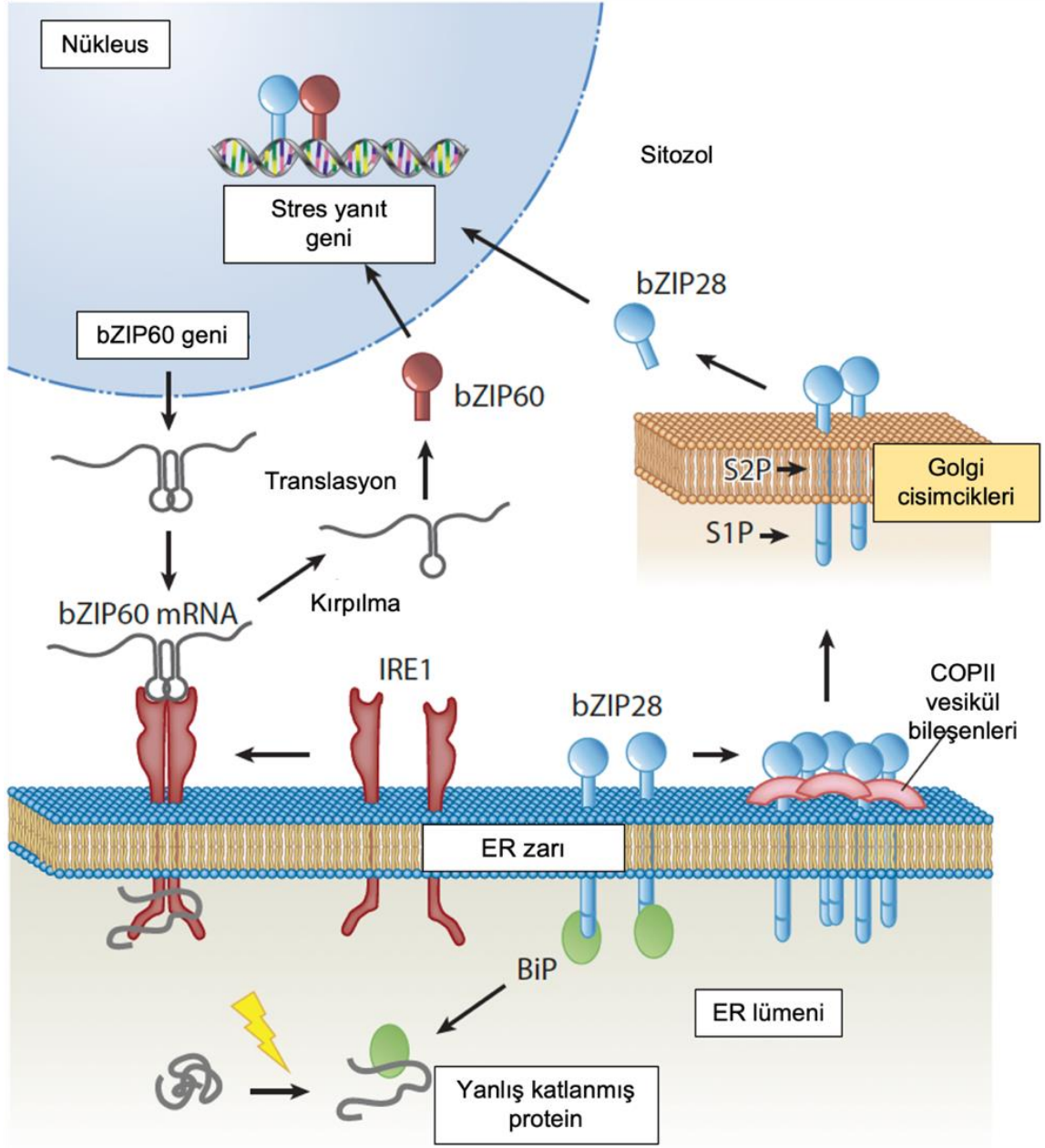
ER'de oluşan stres koşulları nükleusa UPR sinyalleşme yolağı aracılığıyla iletilir. Memeli hücrelerinde ER homeostazisi bozulduktan sonra ER stresi, üç farklı transmembran proteinin aktivasyonunu tetikler: IRE1, ATF6 ve PERK. Bu transmembran proteinler, akümüle olmuş katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlere bağlanan GRP78 faktörünün salınmasıyla aktive olur ve IRE1 ve PERK kompleksleri dimerleşip aktif kompleksler haline gelir. Bu kompleksin aktifleşmesi ATF6'nın Golgi'ye translokasyonunu sağlar. Sonuç olarak tüm bu komplekslerin aktivasyonu UPR'nin sinyalleşme akışını düzenler.

Memelilerde keşfedilmiş UPR'nin 3 farklı yolu varken bunlardan iki tanesi bitkilerde de çalışılmıştır. ER zarı ile ilişkili *ATF6* ve *IRE1* genlerinin bitkilerdeki homologları bu iki yolun başrollerini oluşturur. Bu yollardan biri RNA kırılma faktörü, IRE1 ile yönetilir. IRE1, N terminali ER lümeninde, protein kinaz ve ribonükleaz domenlerini içeren C terminali ise sitozolde bulunan bir ER transmembran proteindir. IRE1'in lümenal domeni ER'deki proteinlerin durumunu algılar. Bitkilerde IRE1'in birincil hedefi bZIP60 mRNA'sıdır ve stres durumunda kırılmaya uğrar (Gardner ve diğ., 2013).

*Arabidopsis thaliana*'da IRE1'in bZIP60 mRNA'sını kesmesi 23 baz çiftlik bir intronun kesilip çıkarılmasını sağlar. bZIP60 mRNA'sının kırılmamış formu membran bağımlı bir transkripsiyon faktörünü kodlarken, kırılma bir çerçeve kaymasına neden olarak transmembran domenini elimine eder. Kırılma sonucu oluşan bZIP60 formu, nükleusa yönlendirilir ve stres yanıt genlerinin anlatımını düzenler (Deng ve diğ., 2011a). Şekil 2.2'de bitkilerde ER stres yanıtına ilişkin sinyalleşme yollarının şeması verilmiştir.

Stres karşısında, bZIP28 ve IRE1 yanlış katlanmış proteinlerin ER'de birikmesiyle aktive edilir. bZIP28/bZIP17 transkripsiyon faktörleri, ATF6'nın bitkilerdeki homolog sistemidir. bZIP28, ER'den mobilize olarak Golgi'ye taşınır. Golgi'de S1P ve S2P tarafından işlenirler. S2P membran içerisinde kesim yaparak bZIP28'in N-terminal bileşeninin sitozole salınmasını sağlar. Bileşen daha sonra nükleusa göç eder. Aktive edildiğinde IRE1, bZIP60 kodlayan mRNA'yı kırarak, bir çerçeve kayması yaratır. Kırılmış bZIP60 RNA'sı nükleer hedef sinyali içeren bir transkripsiyon faktörünü kodlar. bZIP28 ve bZIP60 heterodimer oluşturabilir ve sinyalleşme yolağının 2 ayrı kolu stres yanıt genlerinin anlatımını artırabilen heterodimerlerin oluşturulmasıyla bir araya gelebilir (Howell, 2013).

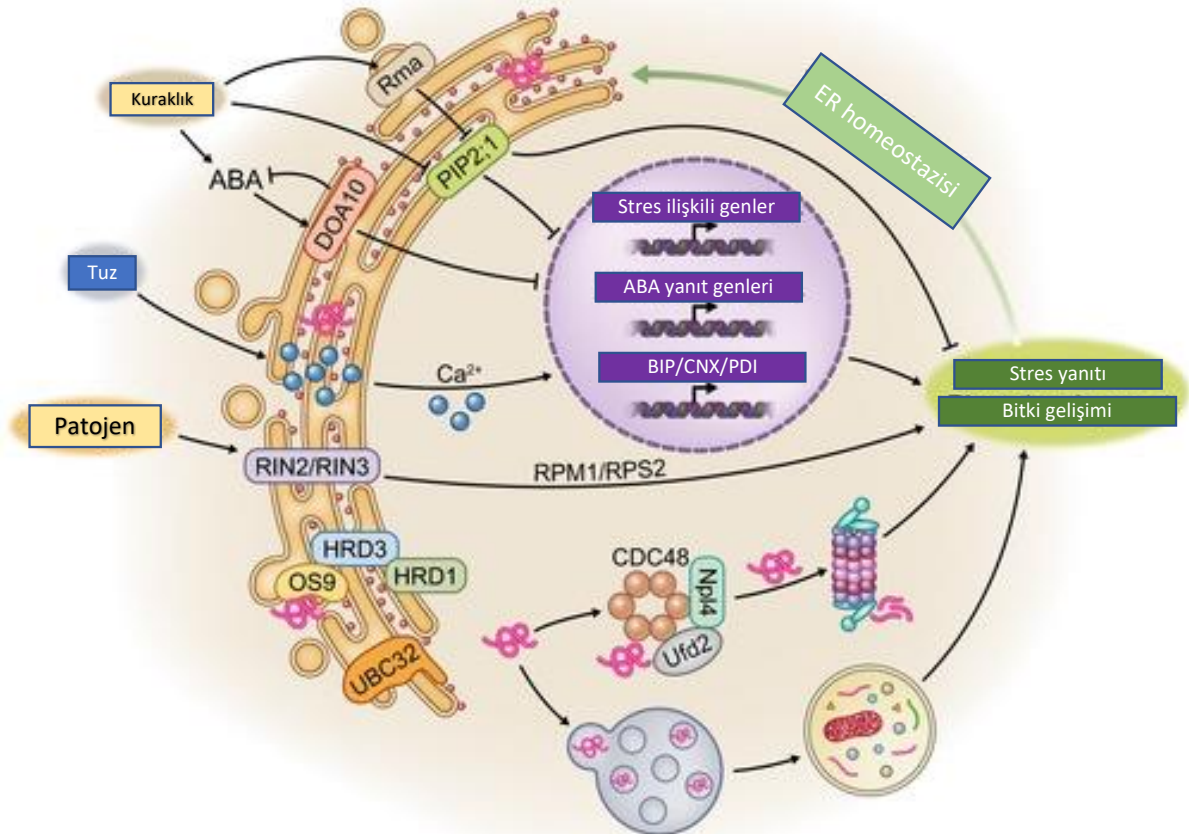
Geri döndürülemeyen ER stresi durumunda, çeşitli mRNA moleküllerinin hızlıca yıkımının sağlanması için, IRE1'in farklı bir sinyalleşme yolağı olan RIDD (*Regulated IRE1-dependent decay*) tetiklenir. Bu mekanizmanın fonksiyonuyla ilgili iki farklı görüş bulunmaktadır: mRNA transkript sayısı azaltılarak ER'ye daha fazla protein akışının önüne geçilebilmesi (Mishiba ve diğ., 2013) veya mekanizmanın, stres genlerinin anlatım artışının tersi yönünde işlev görmesinden dolayı, ER stresinin etkisinin artırılarak, hücreyi programlanmış hücre ölümüne götüren bir mekanizma olması ihtimali de değerlendirilmektedir (Chen ve Brandizzi, 2013).



**Şekil 2.2:** Bitkilerde ER stres yanıt sinyalleşme yollarının iki kolu: bZIP28 ve IRE1/bZIP60 (Howell, 2013).

### 2.3.2. ER İlişkili Degradasyon (ERAD)

ERAD sistemi direkt olarak katlanmamış proteinleri tanır ve proteozomlar aracılı yıkımlarını yönlendirir. Mayada ve memelilerde yapılan çalışmalarla ERAD yolağının 4 temel aşaması ortaya konulmuştur. İlk aşamada kargo proteinleri lektinler veya şaperonlar tarafından, Man7GlcNAc2 N-glikanlar veya protein omurgası aracılığıyla tanınır. Daha sonra ER lümeni veya membranına ait kargo proteinlerinin bir ER membran protein kanalı aracılığıyla sitoplazmaya retro-translokasyonu gerçekleştirilir. Ardından substrat proteinlerin, ubiquitin-proteozom sisteminde protein ubiquitinasyonu için esansiyel olan, E1 (ubikitin aktive edici enzim), E2 (ubikitin konjuge edici enzim) ve E3 (ubikitin E3 ligaz) enzimleri tarafından ubiquitinasyonu gerçekleşir. Son olarak da ubiquitinlenmiş substratlar 26S proteozom tarafından yıkıma uğrar (Chen, Yu ve Xie, 2020).



**Şekil 2.3:** ERAD, biyotik ve abiyotik stres yanıtlarında rol alma mekanizmaları. Stres koşulları, ER homeostazisini yeniden sağlamak ve bitkinin stres toleransını artırmak için stresle ilişkili ve UPR ile ilişkili genlerin anlatımını aktive eder (Chen, Yu ve Xie, 2020).

Bu 4 aşamada görev alan proteinler, Arabidopsis'te tanımlanmıştır. Kargo adaptörleri AtOS9 ve HRD3A (Liu ve diğ., 2010; Su ve diğ., 2012), E2 UBC32 (Cui ve diğ., 2012), E3'ler HRD1 ve AtRma1 (Lee ve diğ., 2009) ve AAA ATPaz CDC48 ve proteozom alt birimleri tanımlanan proteinler arasındadır (Müller ve diğ., 2005).

Bitkiler bunların yanında, maya ve hayvan sistemlerinde bulunmayan özgün ERAD bileşenlerine de sahiptir. Bu bileşenler Arabidopsis'te *ethyl methanesulfonate-mutagenized brassinosteroid-insensitive 1 suppressor 7* (EBS7), *ERAD-Mediating Ring Finger* (EMR) ve *Protein Associated With HRD1-1* (PAWH1) ve PAWH2; ve *Medicago falcata*'da *E3 ligase Salt Tunicamycin-Induced Ring Finger Protein* (MfSTMIR)'dir. Bileşenlerin her biri farklı ERAD aşamalarında rol alırlar (Liu ve diğ., 2015; Park ve diğ., 2018; Lin ve diğ., 2019; Zhang ve diğ., 2019).

Şekil 2.3'te ERAD'ın stres yanıtında rol alma mekanizmaları ve görev alan bileşenleri gösterilmektedir. OS9 ve HRD3 kümelenmiş proteinlerin tanınmasına yardımcı olan adaptörlerdir. UBC32, E2 enzimidir. Rma1, DOA10, RIN2/RIN3 ve HRD1, RING tipi E3 ligazlardır. ERAD bileşenleri olarak yanlış katlanmış proteinlerin ubiquitinasyonunda önemli roller oynarlar. PIP2;1 direkt olarak Rma1 tarafından hedeflenir. ER lümeni veya membranından sitozole tekrar taşınımında yanlış katlanmış proteinler CDC48 kompleksine bağımlı olarak proteozomlara veya degradasyon için otofaji yollarına yönlendirilir. BiP, kalneksin (CNX) ve PDI, protein katlanmasına ve monitör protein glikozilasyonuna yardımcı olan ER şaperonlarıdır. Ca<sup>2+</sup> tuz stresi altında ER'den salgılanır. HDR3A ile yapılan çalışmalarda tuz stresinde UPR'nin indüklenmesinin ER'den kalsiyum salınımına bağımlı olduğu gösterilmiştir (Chen, Yu ve Xie, 2020).

ERAD bileşenlerinin biyotik ve abiyotik stres yanıtlarındaki fonksiyonlarının yanında, ERAD ve bitki gelişimi arasındaki korelasyon, bitki stres yanıtları ve büyüme düzenlenmesi arasında önemli bir denge bulunduğunu göstermektedir. Özellikle de hem kuraklık yanıtında hem de ABA sinyalleşmesi aracılı fide gelişiminde ortak olan ERAD bileşenlerinin rolleri, CER9/DOA10A/SUD1, ERAD'ın bitki büyümesi ve stres adaptasyonu arasındaki denge için zorunlu bir mekanizma olduğunu ortaya koymuştur (Chen, Yu ve Xie, 2020).

### 2.3.3. ER Faji

ER, ökaryotlarda protein salgılanmasının ve lipid biyosentezinin başlangıç noktasıdır. ER homeostazisi, stresle baş edebilmek için transkripsiyonel ve translasyonel regülatörler aracılığıyla UPR ile hassas bir şekilde düzenlenmektedir. Uzayan stres durumlarında hücreler stresle baş edemeyip otofajiye gidebilir. Otofaji, çift zarlı yapıya sahip otofagozomlar ile yönlendirilen hücre içi bir kendi kendini sindirme mekanizmasıdır. Otofagozomlarda sitozolik bileşenlerin ve hasarlı organellerin degradasyonu ile besin açlığı veya diğer stres koşullarında besin bileşenlerinin geri eldesi sağlanır (Zeng ve diğ., 2019).

Fagofor oluşumu için membran kaynağı görevi olmasının yanında, ER aynı zamanda spesifik bir otofagozom ile stres koşulları altında sıkı bir şekilde düzenlenir. Bu sürece ER faji adı verilir. ER faji, memeliler ve mayalarda tanımlanmış fakat bitkilerde hakkında oldukça az şey bilinen reseptörlerle kategorize edilmiştir. ER stres yanıtları altında bitkilerde ER faji ve ER homeostazisi sürekli bir etkileşim içerisinde.

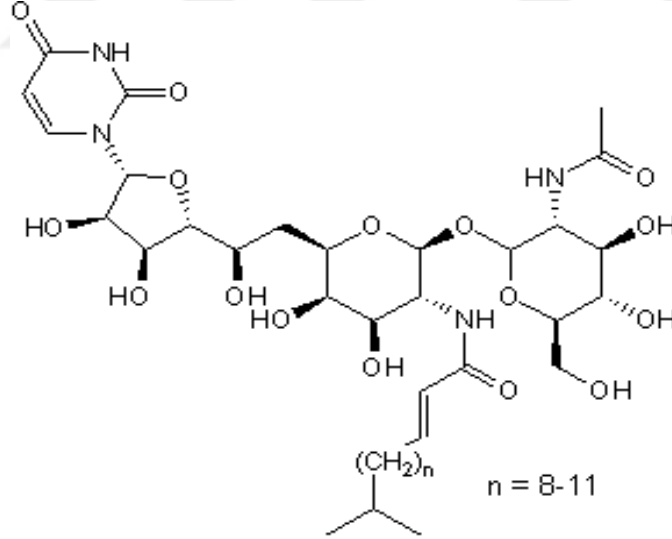
Bitkilerde otofaji, ATG5 (*autophagy-related protein 5*)'in ER'ye çağırılmasıyla başlar. Membran genişlemeye başlar ve kase şeklindeki çift-membranlı ortamı, yani fagoforu oluşturur. Membran genişlemesi devam eder, fagoforun uçları birleşip ER'den ayrılır ve çift-membranlı yapıda, otofagozom adı verilen vesikülü oluşturur (Lundgren Rose ve diğ., 2006; le Bars ve diğ., 2014). Otofagozom oluşumu için membran yapının kaynağı net bilinmese de ER kökenli yeni sentezlenmiş lipitlerden veya ER, golgi, endozomlar ve plazma membranı gibi var olan organellerden ayrılan membran yapılardan kökenlendiği düşünülmektedir (Lamb, Yoshimori ve Tooze, 2013).

Yıkıma uğratılacak kargo, oluşturulan otofagozom yapıya iki farklı yolla entegre edilir. Bu durum seçici olmayan şekilde rastgele gerçekleşebilirken, kargonun otofagozom membran proteini ATG8 (*autophagy-related protein 8*) ile etkileşerek bir reseptör proteine bağlanmasıyla seçici olarak da gerçekleşebilir. Otofagozomun dış membranı, vakuol membranı ile birleşerek iç zarı ve taşıdığı kargoyu yıkım ve geri dönüşüm için vakuol içerisine serbest bırakır (Marshall ve diğ., 2015).

UPR sırasında, hücresel strese karşı çıkmak için ER genişler. Stres etmeni azaldıkça, akut UPR sırasında fazladan oluşturulan ER, reseptör aracılı ER-faji ile degrade edilir. ER faji, spesifik ER-faji reseptörleri, ER-konumlu veya sitozolden ER membranına yönlendirilen proteinler aracılığıyla yönlendirilen seçici otofaji biçimidir. ER faji reseptörleri otofaji ilişkili protein, LC3/ATG8 ile, LC3-etkileşim bölgesi (LIR) aracılığıyla etkileşim kurar (Song ve diğ., 2018). Bitkilerde C53, bir ER faji reseptörü, ER stresi koşullarında AIM ('ATG8-interacting motif') aracılığıyla ATG8 ile etkileşerek ribozom tutulması sonucu otofajiyi yönlendirir ve ER proteinlerinin yıkımına neden olur (Stephani ve diğ., 2020).

#### 2.3.4. ER Stresinin Kimyasal Yolla İndüksiyonu

UPR, bitkilere ER stres ajanlarıyla muamele edilerek laboratuvar ortamında indüklenebilir. Bu ajanlar ER'de protein katlanmasını etkileyerek ER stresini indüklerler. Tunikamisin (mw= 844,95), *Streptomyces* türü bakterilerden elde edilmiş bir antibiyotiktir. GlcNAc fosfotransferaz aktivitesini inhibe ederek, proteinlerin N-glikozilasyonunu engeller ve glikoprotein sentezinin ilk aşamasını bloke etmiş olur (Kaufman, 1999).



Şekil 2.4: Tunikamisinin moleküler yapısı.

Tunikamisin (TM), salgılanan glikoproteinlerin N-glikozilasyonunu bozarak etki gösterir. N-glikanlar protein katlanma sürecinin çeşitli aşamalarında tanınır dolayısıyla N-bağlı glikozilasyonlar olmadan katlanma süreci sekteye uğrar ve katlanmamış proteinler ER'de birikerek ER stresine neden olur.

Dithiothreitol (DTT) gibi indirgeyici ajanlar da ER stresi ajanlarındandır. Disülfid bağları içeren proteinlerin doğru katlanması, okside edici bir ortam gerektirdiğinden DTT, proteinlerin katlanmasını olumsuz yönde etkilemektedir. Bu iki ER stres ajanı dışında siklopiazonik asit gibi ER kalsiyum pompası inhibitörleri de ER stresini indükleyici etki gösterir. Bu durum kalneksin ve kalretikülin gibi ER protein katlanmasının majör bileşenlerinin kalsiyum-bağımlı işlev göstermesinden kaynaklanmaktadır (Michalak ve diğ., 2009; Howell, 2013).

ER stres ajanları olarak kullanılan bu kimyasallar, bitkilerde ER stresini ortaya çıkaran doğal koşulları simüle etmek için kullanılmaktadır. Doğal süreçlerde UPR pek çok abiyotik stres veya biyotik ajanlar tarafından da indüklenebilmektedir (Ye ve diğ., 2011).

Asma bitkisinde (Grapevine) yapılmış bir çalışmada TM ve DTT, ER stres ajanları olarak kullanılmış ve bu iki ajanın transkriptom üzerine etkileri kıyaslanmıştır. Her iki ajan da transkripsiyon faktörlerinin, hormon biyosentez yollarındaki genlerin anlatımlarını artırmıştır. Gen ontoloji sınıflandırmalarında protein katlanması, oksidatif stres, protein fosforillenmesi, transmembran taşıma, transkripsiyon ve proteolizis düzenlenmesi kategorileri ön plana çıkmıştır (Çakır Aydemir ve diğ., 2020).

Potansiyel bir ER stres ajanı olmasına rağmen DTT, protein sentezinde disülfid bağı oluşumunu ER ve sitozolde aynı şekilde inhibe ettiği için, ER stresine spesifik yanıt elde edilmesini kısıtlamaktadır. Ek olarak TM ve DTT, ER stresinin kinetiklerini farklı şekilde etkilediğinden UPR hedef gen anlatımlarını da farklı şekillerde değiştirebilirler (McCormack ve diğ., 2015). Bu tez çalışmasında TM'nin stres ajanı olarak seçilmesinde de bu faktörler etkili olmuştur.

### 2.3.5. ER Stresinin Erken ve Geç Yanıt Mekanizmaları

ER stresi koşullarında çeşitli bitkilerde TM kullanılarak yapılan çalışmalarda farklı süre ve konsantrasyon koşulları denenmiştir. Domates'te yapılan güncel bir çalışmada, *bZIP60*'ın kırılma ürününün agaroz jelde görüntülendiği en erken zaman 3 saatlik TM uygulaması olarak belirlenmiştir (Kaur ve Kaitheri Kandoth, 2021). Arabidopsis'te TM'nin *AtbZIP60* kırılmasını uyardığı süre 2 saat olurken (Deng ve diğ., 2011b), mısır bitkisinde *bZIP60* kırılması 4 saatlik TM uygulamasında tespit edilebilir olmuştur (Li, Humbert ve Howell, 2012).

Arabidopsis'te anlatımı yapılan genler arasında UPR genlerini tanımlamak için, fluid mikroarray yöntemiyle hedef genler klonlanmıştır. Array analizleri için fluid mikroarray

boncukları ve problemleri, 6 saat boyunca TM uygulanmış ve uygulanmamış örneklerin mRNA'ları kullanılarak hazırlanmıştır. Gerçek zamanlı PZR ile yapılan analizlerde TM uygulanmış bitkilerdeki marker UPR geni olan BiP mRNA'sının anlatımının, uygulama yapılmamış bitkilere göre 5,7 katına çıktığı tespit edilmiştir (Kamauchi ve diğ., 2005).

Arabidopsis'te 2 saat ve 5 saat boyunca 0,3 µg/mL TM ile uygulama yapılarak ER stresi indüklenen yabancı tip bitkiler ve *ire1* mutantlarıyla yapılan çalışmada, *IRE1a* ve *IRE1b* transkriptleri yabancı tipte her iki zaman diliminde de indüklenirken *ire1a* mutantlarında *IRE1b* transkripti, *ire1b* mutantında da *IRE1a* transkriptlerinde anlatım artışı görülmüştür. Bu çalışmayla *IRE1* genlerinin ER stresi ile ilişkisi ortaya konulmuştur (Moreno ve diğ., 2012). Arabidopsis'te yapılan başka bir çalışmada 6 günlük bitkiler, 0, 2 ve 5 saat boyunca ER stres ajanı ile (TM veya DTT) muamele edilerek, UPR başarılı bir şekilde harekete geçirilmiştir (Martínez ve Chrispeels, 2003).

Farklı zaman aralıklarında ER stres yanıtı *Arabidopsis thaliana* bitkisinde transkriptom analizleriyle incelenmiştir. ER stres ajanı olarak TM kullanılmış, 10 günlük bitkilere 5 µg/mL konsantrasyonda TM, 30 dakika, 1, 2, 5, 10 ve 24 saat boyunca uygulanmıştır. Mikroarray temelli yapılan anlatım analizlerinde toplam 259 gen, TM'ye yanıt veren genler olarak tespit edilmiştir. 175 genin anlatımı artarken, 84 genin anlatımı azalmıştır. 259 anlatımı değişen gen için 2, 5 ve 10 saat sonraki bitkilerdeki kıyaslı transkript seviyelerine hiyerarşik kümeleme yapılmıştır. Her gen, 6 farklı anlatım kümesinden birine atanmıştır. Anlatım kümesi I, II ve IV, anlatımı artan transkriptleri içerirken, V ve VI numaralı kümeler anlatımı azalan transkriptleri içermektedir. II ve IV numaralı kümelerdeki genlerin, 2 saat TM uygulamasında anlatımı artmış, küme I'deki genler daha geç fazlarda (5 ve 10 saat) anlatım artışı göstermiştir (Iwata, Sakiyama, M.H. Lee, ve diğ., 2010).

Tüm bu çalışmalarda farklı zaman aralıklarında ve farklı konsantrasyonlarda ER stres ajanları bitkilere uygulanmış, çeşitli koşullarda oluşan değişmiş anlatım profilleri belirlenmiştir. Farklı sürelerde yapılmış uygulamalardan, ER stresinde rol alan mekanizmaların ve bunlarla ilişkili genlerin anlatımlarının belirlenmesiyle erken ve geç ER stresi yanıtlarındaki farklar ortaya konulmuştur.

## 2.4. ER STRESİ İLE İLİŞKİLİ YOLAKLAR

Bitkilerin çeşitli biyotik ve abiyotik stresler karşısında verdiği temel yanıtların başında ROT üretimi gelmektedir, ROT oluşumu bitkide oksidatif hasara yol açar. Bitkiler bu durumla baş edebilmek için antioksidan savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir. Bu mekanizmalar temelde ROT'ları avlayan ve hücreleri oksidatif hasardan koruyan antioksidan enzimleri içerir. ROT'ların fazla birikimi hücre membranında hasara hatta hücre ölümüne yol açabilir (Mittler, 2002; Gill ve Tuteja, 2010). Programlanmış hücre ölümü, 'planned cell death' (PCD) sırasında bitkilerde kaspaz benzeri aktiviteler de tespit edilmiştir. Kaspaz benzeri aktivitelerden sorumlu olan bitki proteazlarının tanımlanması uzun zaman almıştır (del Pozo ve Lam, 1998; AG ve diğ., 2000).

Antioksidan enzimlerin ER stresine yanıtının araştırılması için buğdayda yapılan bir transkriptom çalışmasında, antioksidan enzimlerle ilişkili POD'lar (39 gen), SOD'lar (2 gen) ve CAT (1 gen) olmak üzere toplam 42 gende anlatım değişimi tespit edilmiştir. SOD'ların anlatımı DTT uygulamasında azalmıştır (Yu ve diğ., 2019).

Membran bağımlı transkripsiyon faktörleri, özellikle de NAC ailesi bitkilerde tanımlanmış ve çevresel stres koşullarıyla tetiklendikleri gösterilmiştir. ER-membranı ile ilişkili NAC transkripsiyon faktörü, NAC089 ve plazma membranı ilişkili NAC062, ER stresine yanıt olarak nükleusa göç etmektedir (Kim ve diğ., 2007; Yang ve diğ., 2014).

Yu ve diğ., (2019) yaptığı RNA dizileme çalışmasında en çok gözlemlenen 5 transkripsiyon faktörü ailesini, MYB, NAC, orphans, bHLH ve bZIP'ler olarak belirlemiştir. MYB ailesi metabolizmayı, gelişimi ve çevresel streslere yanıtı kontrol eden düzenleyici ağlarda önemli bir rol oynar. bZIP faktörleri de ER stresine yanıt mekanizmalarının başrolünü oluşturur (Yu ve diğ., 2019).

ER stresi uygulamasını takip eden süreçte bZIP28'i içeren transkripsiyonel kompleks bir araya gelir. Kompleksin oluşmasıyla bZIP28 aktive olur ve NF-YC2 gibi ilişkili hedef genlerin anlatımı artar. NF-YC2, NF-YB3 ile dimer oluşturur ve nükleusa taşınarak NF-YC3 ile trimerik CCAAT-kutusu bağlanma faktörünü meydana getirirler. CCAAT-kutusu bağlanma faktörü ve bZIP28 ER stres yanıtı genleri için bir başlatıcı kompleks görevi görür ve stres karşısında genlerin anlatım artışını tetikler (Liu ve Howell, 2016).

Moleküler şaperonlar, protein katlanma sürecinin verimini artıran proteinlerdir (Hartl ve Hayer-Hartl, 2009). Şaperonlar öncelikli olarak, BiP, kalneksin (CNX)/kalretikulin (CRT), protein disülfid izomeraz (PDI)'ler, GRP94, ER oksidoredüktaz 1 (Ero1) ve DnaJ (HSP40 ailesi) proteinlerini içerir. BiP (binding protein), aynı zamanda '*glucose-regulated protein 78*' (GRP78) olarak da bilinir. HSP70 ailesinin bir üyesi ve ER lümeninde en yüksek miktarda bulunan, protein agregasyonunu engelleyip, proteinlerin doğru katlanmasını yönlendiren şaperondur. GRP94, HSP90 ailesine aittir ve BiP'e benzer şekilde ER lümeninde yüksek miktarda bulunan glukoz ile düzenlenen bir şaperondur. Birincil fonksiyonu salgı proteinlerinin işlenmesi ve taşınımıdır. CNX/CRT, PDI ve DnaJ gibi diğer şaperonlar da ER'de protein katlanmasında önemli roller oynarlar (Liu ve Howell, 2010).

UPR'nin hormon biyolojisinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir, bu da UPR'nin vejetatif büyüme ve gelişme üzerinde etkisini açıklayabilir. Arabidopsis'te UPR ve oksin düzenlenmesi arasındaki ilişki araştırılmış, ER stresi uygulamasının, ER- ve hücre membranında konumlanmış oksin akışı taşıyıcı proteinleri ( '*auxin efflux transporters*' veya PIN proteinleri) ve oksin reseptörleri TIR1/AFB'lerin anlatımında düşüşe yol açtığı bulunmuştur. Anlatım seviyelerinin düşmesinde rol oynayan mekanizma belirlenememiştir ancak IRE1 ile ilişkili olmadığı tespit edilmiştir (Chen ve diğ., 2014).

Buğday bitkisinde ER stresi uygulamasında yapılan transkriptom çalışmasında bitki hormon sinyal transdüksiyonu yolağında 98 genin temsil edildiği gösterilmiştir. Bu genler arasında salisilik asit (SA), etilen (ET), oksin, jasmonik asit (JA), giberellin (GA), absisik asit (ABA), sitokinin ve brassinosteroid (BR) ilişkili sinyalleşme genleri bulunmaktadır. ER'de protein işlenmesi yolağında 46 tane anlatımı değişen gen tespit edilmiştir. Özellikle moleküler şaperonları içeren bu genler arasında, BiP'ler, GRP94, CNX, PDI'ler, HSP40'lar, HSP70'ler, sHSF'ler ve RMA1, Ubch5 gibi ubiquitin-ligaz kompleksleri bulunmaktadır (Yu ve diğ., 2019).

UPR'nin brassinosteroid-aracılı yanıtlarda da rol aldığı gözlemlenmiştir. Bu ilişkili çalışma sistemi, UPR sinyalleşme yollarının RNA kırılmayı içeren kolunu değil, bZIP17 ve bZIP28 membran bağımlı transkripsiyon faktörlerinin dahil olduğu kolu kapsamaktadır. Brassinosteroid-aracılı sinyalleşme ve UPR arasındaki ilişkinin ortaya konulması S2P mutantlarıyla yapılan çalışmada gerçekleştirilmiştir (Che ve diğ., 2010).

UPR sinyalleşme yolağının ve diğer ER stresi yanıt mekanizmalarının bahsedilen ilişkili mekanizmaları dışında özellikle Ubikitin-Proteozom sistemi, terpenoidlerin biyosentezi, jasmonik asit aracılı sinyalleşme yolları, MAPK sinyalleşme yolları ile ilişkileri ve etilen yanıt faktörleri aracılı düzenlenmeleri ile ilgili yapılan çalışmalar dikkat çekmektedir. Sayılan bu mekanizmaların ER stres yanıtlarıyla ilişkisini ortaya koymak üzere birçok çalışma gerçekleştirilmiştir.

#### 2.4.1. Ubikitin-Proteozom Sistemi

Proteozomlar büyük çoklu katalitik altbirimlere sahip, sitozolik ve nükleer protein degradasyonundan sorumlu proteazlardır. Yapıları ve fonksiyonları ökaryotlarda korunmuştur. Proteozomlar ilk başta, ubikitin bağımlı proteoliziz yolağının proteolitik modülü olarak tanımlanmıştır. Proteozomlar, ubikitinden-bağımsız proteoliziz sürecini de yönetir, RNAz aktivitesi göstererek transkripsiyonel düzenlenmede proteolitik olmayan bir rol oynarlar (Kurepa ve Smalle, 2008).

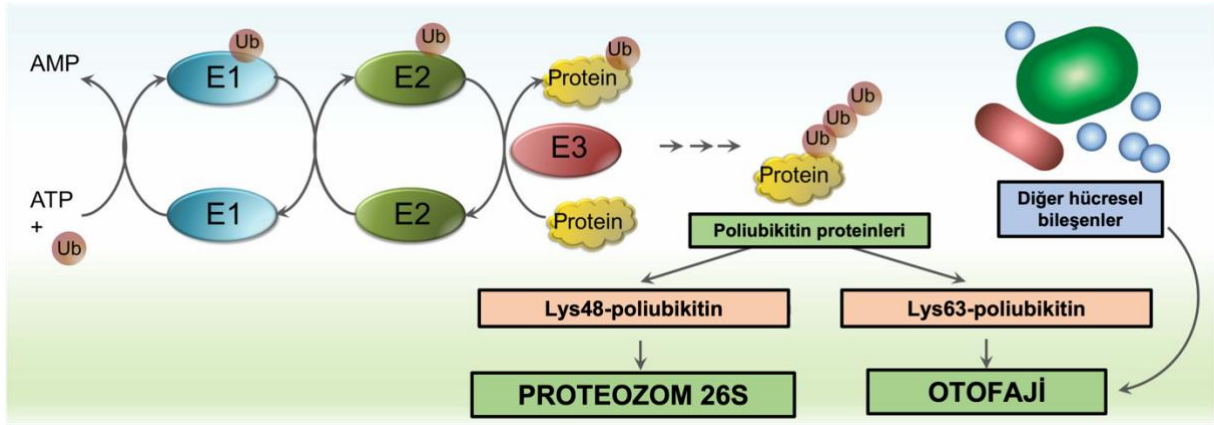
Ubikitin proteozom sistemi (UPS), ökaryotik hücrelerde pek çok enzimin, yapısal ve düzenleyici proteinin degradasyonundan sorumlu proteolitik sistemdir. Sistemde birbirini takip eden iki süreç bulunur: Birincisi, seçilen proteine ubikitin moleküllerinden oluşan zincirin bağlanması iken, ikinci aşama, ubikitin moleküllerinin geri dönüşümünü sağlayan multiproteaz kompleksi 26S proteozom tarafından modifiye proteinin yıkımıdır (Stone, 2019).

Ubikitin, oldukça yüksek oranda korunmuş, ökaryotik organizmaların tüm dokularında bulunan ve çok miktarda anlatımı yapılan bir proteindir (Goldstein *ve diğ.*, 1975). Yüksek korunmuşluk, bitki türleri arasında ubikitin amino asit dizisinin birbirinin tamamen aynısı olmasının gözlenmesiyle anlaşılmıştır. Bitki ubikitini, maya ve insanlardakine kıyaslandığında ise sırasıyla, yalnızca 2 ve 3 amino asit birimi fark göstermektedir (Callis ve Vierstra, 1989).

Ubikitin, çoklu ubikitin birimlerini tekrarlı olarak içeren veya ilişkisi olmayan rastgele bir proteine bağlı tek ubikitin birimini taşıyan öncül bir protein olarak sentezlenir. Arabidopsis'te 7 adet ubikitin geni (UBQ), ribozomal protein içeren ubikitini (UBQ1, UBQ2, UBQ5, UBQ6 ve UBQ17) veya "related to ubiquitin" (RUB) füzyonlarını (UBQ7 ve UBQ15) kodlar. 5 adet Arabidopsis UBQ geni ise (UBQ3, UBQ4, UBQ10, UBQ11 ve UBQ14) 3-6 arası ubikitin birimi içeren poliubikitin öncüllerini kodlar (Vijay-Kumar *ve diğ.*, 1987).

Ubikitinin 7 adet korunmuş lizin birimi (Lys6, Lys11, Lys27, Lys29, Lys31, Lys48 ve Lys63) bulunur. Her biri, başka bir ubikitin molekülünün Gly76 birimi ile izopeptid bağı kurarak, ubikitin-ubikitin bağlantıları oluşturmak için kullanılabilir. Lys48 birimlerini kullanan poliubikitin zincirleri, Arabidopsis'te en yaygın görülen zincirlerdir.

Ubikitinasyon, tek bir birimin (monoubikitinasyon) ya da çoklu ubikitin moleküllerinin ayrı ayrı (multimonoubikitinasyon) veya zincir şeklinde (poliubikitinasyon), spesifik bir substrata konjugasyonuna denir. Modifiye proteine ne olacağı, ona bağlanmış ubikitin molekülü sayısı ve poliubikitin zincirinin topolojisiyle (Lys63-bağlı veya Lys48-bağlı) belirlenir.



**Şekil 2.5:** Ubikitin-Proteozom sisteminin bileşenleri ve poliubikitinlenmiş proteinlerin iki farklı hücresel mekanizma için seçilimi. (Ub=ubikitin) (Zientara-Rytter ve Sirko, 2016).

Proteozomlar tarafından yıkıma uğrayan proteinlerin çoğu bir poliubikitin zincirinin kovalent bağlanması ile modifiye edilmiştir. Konjugasyon reaksiyonu, yüksek enerjili bir bağ ile Ub aktive edici enzime (E1) bağlanan 76 aminoasitlik peptid ubikitin ile başlar. Aktive edilmiş Ub, Ub konjuge edici enzim (E2)'ye transfer edilir. Ub ligaz (E3) ile beraber E2 enzimi, hedef proteinin lizin birimine Ub monomerinin konjugasyonunu katalize eder (Kurepa ve Smalle, 2008).

Modifikasyonlara ubikitin kodu adı verilir ve modifiye protein için ayırt edici sonuçlara sahip olabilir. Monoubikitinasyon, endositoz, endozomal sınıflandırma, proteinlerin lizozomal degradasyonu ve protein-protein etkileşimlerinin yönlendirilmesi gibi süreçlerle ilişkilendirilmiştir. Multimonoubikitinasyon, protein lokalizasyonunda görevlidir. Poliubikitin zincirlerinin yapısı ve topolojisi, ubikitin-ubikitin bağlarının 7 farklı lizin biriminden hangisiyle

kurulduğuna göre farklılık gösterir. Lys48 bağları kuran poliubikitin zincirleri, bitişik ubikitin moleküllerinin kovalent olmayan etkileşimlerden dolayı kapalı ve kompakt bir yapıya sahiptir ve substratları 26S proteozom aracılı yıkıma yönlendirmek için hedef alır. Buna karşın Lys63 bağlı zincirler, daha açık ve çizgisel yerleşime sahip olduğundan protein aktivasyonunu ve etkileşimlerini düzenlemede görev alır. Ubikitinasyonda rol alan enzimler ve hedef proteinin izlediği yolların şematize gösterimi Şekil 2.4'te verilmiştir.

UPS'deki aksamalar, bitkinin etkili ve verimli şekilde çevresel streslere yanıt verme yeteneğini değiştirir. 26S proteozomun RP bileşenlerindeki mutasyonlar abiyotik strese karşı toleransı yok eder. Arabidopsis RPN10 mutantlarında, yüksek tuz, sıcaklık ve UV radyasyona karşı tolerans daha düşük olmuştur (Smalle ve diğ., 2003).

Bitkiler UPS'yi, değişen çevresel koşullarında hayatta kalabilme, büyüme ve gelişmenin devamlılığı için gerekli hücresel protein içeriğindeki değişimleri hızlandırmak için kullanır. Çevresel etmenlere yanıt olarak transkripsiyon faktörleri gibi düzenleyici proteinlerin ubikitinasyonu artırılabilir veya inhibe edilebilir. Bu durumun sonucu olarak, degradasyon veya stabilizasyon artar, gen anlatım düzenlerinde değişimler meydana gelir. Protein yoğunluğunun hedefli kontrolü sinyalleşme olaylarını yönlendirir, dış stres kaynaklarının zarar verici etkisini elimine edecek uygun yanıtların oluşturulmasını sağlar (Stone, 2019).

#### 2.4.2. Terpenoid Biyosentezi

ERAD ve ERAD ile ilişkili metabolik süreçlerin (UPR vb.), terpenoid biyosentezinin düzenlenmesinde rol aldığını gösteren birçok bulgu vardır. ERAD ve ilişkili süreçlerindeki çeşitli bileşenler, çevresel stres koşullarıyla tetiklenir ve terpenoid metabolizmasıyla ilişkili bazı gelişimsel süreçlerle iç içedir (Erffelinck ve Goossens, 2018).

Bitki triterpenoid saponinlerinin biyosentezi, oksilipin türevi JA hormonunun başrolde olduğu sinyalleşme akışı ile kontrol edilir (de Geyter ve diğ., 2012; Zhou ve Memelink, 2016). Son yıllarda, JA aracılı terpenoid biyosentezini kontrol eden transkripsiyon faktörlerinin tanımlanması için çalışmalar gerçekleştirilmiştir. İlk olarak, *Arabidopsis thaliana* L. Heynh, *Solanum lycopersicum* L. ve *A. annua* bitkilerinde bir bHLH transkripsiyon faktörü olan MYC2'nin sesquiterpenoid biyosentezini kontrol ettiği gösterilmiştir (Hong ve diğ., 2012; Kazan ve Manners, 2013; Spyropoulou, Haring ve Schuurink, 2014; Goossens, Mertens ve Goossens, 2017).

ER stres sinyalleşmeleri, strese uyum sağlama mekanizmalarıyla, büyüme ve gelişmede etkili olan terpenoid sinyal molekülleri BR'ler arasında bir bağlantı bulunmuştur. Abiyotik stresler, olgunlaşmayı ve lösün-zengini bir reseptör kinaz olan, *brassinosteroid insensitive 1*'in endomembrandan plazma membranına translokasyonunu inhibe edebilir. Bu durum, S2P ile aktive olan bZIP'lerin *brassinosteroid insensitive 1*'in taşınımını plazma zarına çevirebileceğini ve strese uyum sağlama ve büyüme için gerekli olan BR sinyalleşmesini direkt olarak düzenleyebileceğini göstermiştir (Che ve diğ., 2010).

#### 2.4.3. Jasmonik Asit Aracılı Sinyalleşme

Hücre homeostazisinin korunması için ER stresi UPR adı verilen koruyucu mekanizmayı çalıştırır bu mekanizma da savunma hormonları tarafından düzenlenebilir. Pek çok çalışmada çeşitli fitohormonların ER stresinin indüklenmesi ve UPR'nin düzenlenmesinde önemli roller aldığı gösterilmiştir. SA'nın ER stres sinyalleşmesinde ve UPR'deki rolü oldukça yakın bir zamanda karakterize edilmesine rağmen, altında yatan mekanizmalar, etkileşimler ve JA gibi diğer savunma ile ilişkili fitohormonların potansiyel moleküler ve fizyolojik rolleri henüz tam olarak aydınlatılmamıştır (Nagashima ve diğ., 2014).

Domateste yapılan bir çalışmada, jasmonik asidin domates yapraklarında UPR sinyalleşmesi ve ER stresinde fizyolojik rolü araştırılmıştır. Eksojen JA uygulaması UPR marker geni *SIBiP* transkriptinin birikimini indüklemiş ve aynı zamanda, *SIIRE1* ve *SibZIP60* transkript seviyelerini de artırmıştır. JA sinyalleşme mutanlığı *jai1* bitkilerinin de çalışılmasıyla, JA'nın ER stresinin algılanması ve sinyalleşme mekanizması daha iyi anlaşılmıştır (Czékus ve diğ., 2020).

TM uygulanması *SIBiP* transkript seviyelerini artırmıştır. Mutant *jai1* bitkilerinde *SIIRE1a* ve *SIIRE1b* seviyeleri belirgin şekilde daha düşük olmuştur. Bax inhibitörü-1 (*SIBI1*) ve *SibZIP60* transkriptlerinin birikimi ise tam tersi şekilde *jai1* bitkilerinde daha yüksektir. Kimyasal bir şaperonun TM ile indüklenmiş ER stresini nasıl yönettiğinin değerlendirilmesi için bitkilere sodyum 4-fenilbütirat uygulanmıştır. Kimyasal şaperon, TM ile indüklenen *SIBiP*, *SIIRE1a* ve *SIBI1* transkript artışlarını da azaltıcı etki göstermiştir. Ek olarak bu çalışmalarda, domates yapraklarında hidrojen peroksit içeriği, proteozom aktivitesi ve lipid peroksidasyonuna dair TM ile indüklenmiş değişimlerin JA ile düzenlendiği tespit edilmiştir. Nitrikoksit ise ER stresi ve UPR sinyalleşmesinde etkili olmamıştır (Czékus ve diğ., 2020).

#### 2.4.4. MAPK Sinyalleşme

MAPK (mitojen-aktif edilmiş protein kinaz) sinyalleşme akışları, peptid lijanları ve hasar ile ilişkili moleküler desenler (DAMPs) gibi endojen olarak üretilen stimülasyonları veya patojen ilişkili moleküler desenler (PAMPs), patojen türevi efektörler ve çevresel faktörler gibi ekzojen kökenli stimülasyonları algılayan reseptör veya sensörlerin aldığı sinyalin iletimini sağlayan sinyalleşme modülleridir. Tipik bir MAPK akışında en az bir MAPK, bir MAPK kinaz (MAPKK) ve bir MAPKK kinaz (MAPKKK) bulunur. Sinyalleşme akışında, algılanan stimülasyon ile MAPKKK'lar aktive olur ve daha alt katmanlardaki MAPKK'ların fosforile olup aktive olmasına yol açarlar. Algılanan sinyalin hücre içerisinde MAPK sinyal akışıyla iletimi bu yolla gerçekleşir (Zhang ve Zhang, 2022).

Birçok stres çalışmasında MAPK sinyalleşme akışlarının stres toleransı geliştirmede önemli rolleri olduğu gösterilmiştir. Etilen biyosentezinde MAPK'nın düzenlenmesinin domates bitkisini soğuk stresinden korumak için bir yol olduğu ortaya konmuştur (Zhao ve diğ., 2013). Arabidopsis'te tuz toleransının sağlanmasında MAPK'ların rol aldığı (Yan ve diğ., 2021), bir ısı şoku faktörünün MAPK aracılı düzenlenmesiyle de tuz, sıcaklık ve kuraklığa direnç gösterilebildiği rapor edilmiştir (Andrási ve diğ., 2019).

ER stresinin indüklenmesi, ER protein katlanma kapasitesi ve protein yükü arasındaki dengeyi yeniden kurmak için UPR'yi aktive eder, bunun sonucu olarak hücre stres koşulunu atlatacak hayatta kalabilir ya da durum, kronik ER stresini takip eden hücre ölümüyle sonuçlanabilir. ER stresine adaptasyonla ER stresi ile indüklenmiş hücre ölümü arasındaki geçişin mekanizmaları hala araştırılmaktadır. MAPK sinyalleşme ağının çeşitli stres koşullarını takiben hücre döngüsünün ilerleyişini ve hücrenin hayatta kalma veya ölüm yanıtlarını düzenlediği bilinmektedir. UPR ve MAPK sinyalleşme yolları arasındaki kesişim noktalarının tanımlanması ER stresinin sonuçlarının daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır. (Darling ve Cook, 2014).

#### 2.4.5. Etilen Yanıt Faktörleri

UPR, ER stresi altında hücresel homeostazinin sağlanmasında önemli bir rol oynar, bu süreç savunma ile ilişkili fitohormonların düzenlenmesine yüksek oranda bağlıdır. Domates yapraklarında yapılan çalışmada etilenin ER stresi ve UPR'deki rolü incelenmiştir. Etilen öncülü 1-aminosiklopropan-1-karboksilik asit'in ekzojen uygulanması, yapraklardan daha

yüksek etilen emisyonu elde edilmesini sağlarken, UPR marker geni BiP ve ER stres sensörü IRE1 transkript seviyelerini de artırmıştır. 24 saatten sonra *bZIP60* seviyeleri de yükselmiştir (Czékus ve diğ., 2022).

Etilen reseptörü *Never ripe (Nr)* mutantları kullanılarak etilenin TM ile indüklenmiş ER stresinin sensörlerle algılanması ve sinyallerle iletimindeki önemli rolü *SIIRE1b* ve *SIBiP* anlatım seviyelerindeki değişimler temel alınarak ortaya konulmuştur. Diğer savunma ile ilişkili fitohormonların analizi, TM ile indüklenmiş etilenin, salisilik aside yanıtta ve SA seviyelerinde pozitif etki yaratabileceğini göstermiştir. Nitrik oksit üretimi, lipid peroksidasyonu ve elektrolit sızıntısının da TM ile indüklendiği durumda, etilen aracılı düzenlenebildiği belirlenirken, ER stresi altındaki domates yapraklarında, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seviyelerinin ve proteolitik aktivite düzeyinin etilenden bağımsız olarak değiştiği bulunmuştur (Czékus ve diğ., 2022).

## 2.5. RNA DİZİLEME

Transkriptomik yaklaşımlar, bitkilerin abiyotik streslere yanıtlarını anlamamanın yolunu açmıştır. Yeni Nesil Dizileme (NGS) teknolojileri kullanılarak gerçekleştirilen transkriptom analizleri, RNA dizileme (RNA-seq) ve bunların genomik araştırmalarda kullanılması bitki genomik kaynaklarının gelişmesini sağlamıştır.

Hızla gelişen teknolojilere rağmen, post-transkripsiyonel gen düzenlenmesinin ve bunların protein komplekslerinin kimyasal dengesine etkisinin anlaşılması hala tam anlamıyla gerçekleşmemiştir. Transkriptomik teknolojileri sürekli olarak ilerlemektedir. RNA-seq yönteminin, mikroarray analizleriyle uyumlu kapsamlı bir transkriptom verisinin elde edilmesi için eşsiz bir yöntem olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Karan, 2015).

2014 yılında yapılan bir çalışmada homolog rekombinasyonla üretilen transgenik pirinç bitkilerinin ER stresi koşullarında RNA-seq aracılı anlatım profillemesi gerçekleştirilmiştir. Transgenik bitkilerde, endojen genomik *OsIRE1* (ER stres sensörü), ribonükleaz aktivitesi hasarlı olan yanlış anlamlı mutant bir allelle yer değiştirilmiştir. Bu çalışmada elde edilen veriler, pirinç bitkilerinde ER stresine yanıtla ilgili önemli bilgiler ortaya koymuş ve ER stresıyla ilişkili yeni genlerin keşfini sağlamıştır (Wakasa ve diğ., 2014).

Buğday bitkisinde yapılan bir RNA-seq çalışmasında morfofizyolojik sonuçlar, DTT'nin bitki boyu ve biyokütlesini azalttığını ve klorofil ve su miktarını düşürdüğünü göstermiştir. Aynı zamanda, elektrolit akış hızını ve antioksidan enzim aktivitelerini artırmış, hücre ölüm oranı da artmıştır RNA-seq ile buğdayın strese verdiği yanıtların düzenlenmesinde görevli genlerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Transkriptomik analizlerle, 8204 genin 3 farklı uygulama grubunda değişmiş anlatım gösterdiği ortaya konulmuştur. Belirlenen genler içerisinde 158'i fotosentezle ilişkili genler, 42'si antioksidan enzim genleri, 318'i bitki hormonlarıyla ilişkili genler ve 457 gen transkripsiyon faktörleridir. Bu genlerin tümü buğdayın ER stresi yanıtını düzenlemede kritik roller oynar (Yu ve diğ., 2019).

Transkriptomik teknolojiler kapsamlı olması ve transkript yoğunluğunu kapsamlı şekilde temsil etme potansiyeliyle son yıllarda ön plana çıkmış ve yaygın olarak kullanılmıştır. Bu özellikler, genom dizi verisi eksik olan model olmayan organizmalar için ekstra önem arz etmektedir. Sıklıkla karşılaşılan protein seviyeleriyle bunlara karşılık gelen gen transkriptlerinin yoğunluğu arasındaki tutarsızlıklar, tamamlayıcı proteom analizleri kullanılarak aday genler ve yolların valide edilmesine duyulan ihtiyacı da ortaya koymuştur.

### 3. MALZEME VE YÖNTEM

#### 3.1. BİTKİ MATERYALİ

09.01.2018 tarihinde, Hollanda Genetik Kaynaklar Merkezi'nden (CGN; Centre for Genetic Resources the Netherlands, Wageningen University and Research Center) temin edilen *Lycopersicon esculentum* Mill. tohumları, İstanbul Üniversitesi Alfred Heilbronn Botanik Bahçesi'nde çoğaltılmak üzere kullanıldı. Bu tez çalışmasında 2018 yılında Burcu Karpuz'un Yüksek Lisans Tezi kapsamında elde edilen *Lycopersicon esculentum* Mill. tohumları kullanılmıştır.

Familiya: Solanaceae

Cins: *Lycopersicon*

Tür: *L. esculentum*

#### 3.2. BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ

Bitki doku kültüründe optimum çimlenme ve büyüme koşullarını sağlayacak besiyerleri hazırlanmış ve bu besiyerlerine sterilizasyonu yapılmış tohumlar ekilerek domatesler *in vitro* olarak kontrollü ve steril bir ortamda yetiştirilmiştir. Doku kültüründe 14 günlük olana kadar yetiştirilen bitkiler, ER stres uygulaması gerçekleştirilmeden önce ve sonra fizyolojik olarak gözlemlenmiş ve fotoğraflanmıştır.

##### 3.2.1. Besiyerlerinin Hazırlanması

Kullanılacak bitki materyalinin elde edilmesi için domates tohumlarını çimlendirmek üzere Murashige-Skoog (MS) Besiyerleri hazırlanmıştır (Murashige ve Skoog, 1962). MS besiyerinin optimize edilmiş protokolüne uygun olarak 1 litre distile suda 30 gram süktroz (Multicell, 800-081-LG), 4,4 gram MS tozu (Duchefa Biochemie, M0221.0050) çözündürülmüştür. Çözeltinin pH değeri 5,7'ye ayarlanmış ve 9 gram Agar (Sigma, 05039-500G) eklenmiştir. Agar eklenen çözelti 121 °C'de 1,2 atm basınçta 15 dakika boyunca otoklavlanarak (Nüve, OT 012) steril edilmiştir. Steril besiyeri elle tutulabilir sıcaklığa geldikten sonra laminar hava akışlı steril kabinde (Telstar Bio II Advance, EN-12469), 1 mg/L olacak şekilde MS vitamin solüsyonu (Sigma, M3900) eklenmiştir. Besiyerleri 30 mL hacimde ölçülerek steril plastik petrilere

bölüştürülmüş ve katılaşması beklenmiştir. Oda sıcaklığına gelen petrillerdeki besiyerlerinin kapakları kapatılarak çevresi parafilmle sarılmış, kullanılabileceği kadar +4 °C’de saklanmıştır.

### 3.2.2. *Lycopersicon esculentum* Mill. Tohumlarının Yüzey Sterilizasyonu

Domates tohumları, sterilizasyon aşaması için öncelikle pastör fırınında (WiseVen, WON-50) 180 °C’de 2 saat tutularak steril edilmiş metal süzgeçlere alınmıştır. Süzgeç içerisindeki tohumlar %70’lik etil alkol içerisinde 15 saniye yıkandıktan sonra, 10 dakika boyunca %20’lik çamaşır suyunda (ACE™) bekletilmiştir. Ardından steril distile su ile 3 kez 10’ar dakikalık durulama işlemi gerçekleştirilmiştir. Durulanan steril tohumlar, otoklavlanarak steril edilmiş olan kurutma kağıtlarında bekletilerek kurutulmuş ve steril bir pens ile MS besiyeri içeren petrilere ekilmiştir.

### 3.2.3. Domateslerin Çimlendirilmesi ve Yetiştirilmesi

Petrilere ekilen tohumlar, 24 °C’de,  $75 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  ışık şiddetinde, 16 saat gündüz/8 saat gece ışık koşullarında, %70 nem oranına sahip bitki büyüme kabini (Sanyo, MLR-352H) çimlenme gerçekleşene kadar tutulmuştur. Çimlenen bitkiler boy uzaması için steril cam tüplere dökülmüş besiyerlerine transfer edilmiştir. Burada 14 gün süre ile büyütülen domates bitkileri, 14. günde stres uygulamasına tabi tutulmuştur.

## 3.3. DOMATESLERE ER STRESİ UYGULANMASI

Bitkilerde ER stresinin indüklenmesi için bir N-glikozilasyon inhibitörü olan tunikamisin kullanılmıştır. Tunikamisin sentetik bir antibiyotik olduğundan besiyerlerinin sterilizasyonu aşamasında yapısının bozulmaması için steril besiyerlerine sonradan ilave edilmiştir.

### 3.3.1. Tunikamisin Çözeltisinin Hazırlanması

Tunikamisin (Cayman Chemicals, 3516, 10 mg) ticari olarak gelen şişesine 0,2 mikron porlara sahip milipor filtreden (Millipore, GSWP04700) geçirilerek steril edilmiş dimethyl sulfoxide (DMSO)’dan (Sigma, D8418-100ML) 2 mL eklenerek çözündürülmüştür. İçerisinde çözünmemiş toz kalmayana kadar alt üst edilerek karıştırılmıştır. Elde edilen ana stoktaki tunikamisin konsantrasyonu 5 mg/mL olmuştur. Bitkilere stres uygulanacak besiyerlerindeki tunikamisin son konsantrasyonunun 10 µg/mL olması istendiğinden ana stok 10 kat seyreltilerek bir ara stok

elde edilmiştir. 1,5 mL hacminde 0,5 mg/mL konsantrasyonunda ara stoğun oluşturulması için ana stoktan 150 µL tunikamisin alınarak 1,35 mL steril DMSO ile çözelti seyreltilmiştir.

Her bir uygulama için kullanılacak besiyeri hacmi 5 mL olarak belirlendiğinden son hacim olan 5 mL’de 10 µg/mL konsantrasyonda tunikamisin bulunması için uygulama besiyerlerine 0,5 mg/mL olarak hazırlanmış tunikamisin ara stoğundan 100 µL eklenmiştir.

### 3.3.2. Stres Uygulaması Besiyerlerinin Hazırlanması

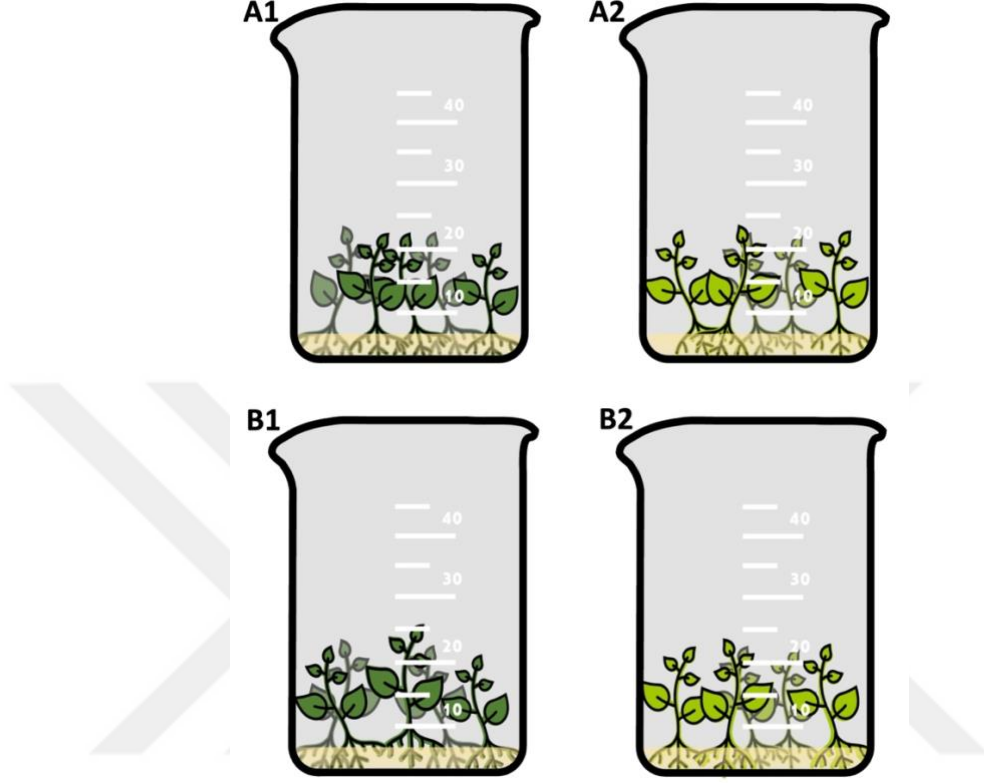
Stres uygulaması besiyerleri Kandoth ve diğ. (2021) protokolüne göre hazırlanmıştır. Sıvı MS besiyeri, 100 mL besiyeri için 1x MS ve %1 ağırlık/hacim sükröz içerecek şekilde 0,43 g MS tozu ve 1 g sükrözün distile suda çözülmesi ile hazırlanmıştır. Besiyeri 121 °C’de 1,2 atm basınçta 15 dakika boyunca otoklavlanarak steril edilmiştir. Besiyeri elle tutulur sıcaklığa geldikten sonra MS vitamin solüsyonundan konsantrasyonu 1 mg/L olacak şekilde eklenmiştir. Hazırlanan sıvı MS besiyeri stres uygulamasına kadar +4 °C’de kapağının çevresi parafilmle çevrilerek saklanmıştır.

### 3.3.3. Stres Uygulamasının Gerçekleştirilmesi

100 mL’lik cam beherler üstleri alüminyum folyo ile kapatılarak 200 °C’de pastör fırınında steril edilmiştir. Tunikamisin çözeltisi hazırlanırken yapılan hesaplamalara uygun olarak 2 saatlik ve 6 saatlik tunikamisin uygulaması için kullanılacak deney düzenekleri Şekil 3.1’deki gibi tasarlanmıştır. Hazırlanan sıvı MS besiyerleri her bir cam beherde 5 mL olacak şekilde dağıtılmıştır. Daha sonra besiyerlerinden 100’er µL mikropipetle (Eppendorf, Research 20-200 µL) çekilerek uzaklaştırılmış; kontrol besiyerlerine 100 µL DMSO, uygulama besiyerlerine ise Başlık 3.3.1’de anlatılan Tunikamisin ara stoğundan (0,5 mg/mL) 100 µL eklenmiştir. DMSO kontrol besiyerlerine, uygulama besiyerlerinde tunikamisinin çözücüsü olarak kullanılan DMSO’nun etkisinin göz ardı edilebilmesi için eklenmiştir. 14 günlük bitkiler ER stresinin indüklenmesi için cam tüplerdeki katı besiyerinden alınarak cam beherlerdeki sıvı MS besiyerlerine kökleri tamamen besiyerinde olacak şekilde daldırılmıştır. Her beherde 5 mL besiyerinde 5 bitkiye uygulama yapılmıştır.

Şekil 3.1’deki örneklerden 2 biyolojik tekrar yapılmıştır. Stres uygulaması gerçekleştirilen bitkiler 2 saat ve 6 saat sonra uygulama besiyerlerinden alınmış ve kökleri distile su ile yıkanarak fazla su kurutma kağıdı ile uzaklaştırılmıştır. Bitkilerin yaprakları bistüri yardımıyla

kesilerek 0,1 gram olacak şekilde tartılmış ve paketlenerek sıvı azot ile dondurulmuştur. Dondurulan bitki dokuları izolasyon aşamasına geçilene kadar -80 °C’de muhafaza edilmiştir.



**Şekil 3.1:** ER stresinin uygulanması için oluşturulan deney düzeneği. A1: 2 saat kontrol koşulu, MS+DMSO. A2: 2 saat tunikamisin uygulaması, MS+TM. B1: 6 saat kontrol koşulu, MS+DMSO. B2: 6 saat tunikamisin uygulaması, MS+TM.

### 3.4. RNA İZOLASYONU

100 mg domates yaprak dokusu, otoklavda steril edilmiş ardından da -20 °C’ye soğutulmuş havana alınarak sıvı azot yardımıyla mekanik olarak parçalanmış ve toz haline getirilmiştir. Toz haline gelen örnek 1 mL Hibrizol (Hibrigen®) eklenerek havanda ezilmiştir. Hibrizol tamamen sıvı hale geçtikten sonra örnekler 1,5 mL’lik steril tüplere alınmış ve 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Örnekler 200 µL kloroform (ISOLAB, 910.033) eklendikten sonra alt üst edilerek karıştırılmış, 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Faz ayrımlarının oluşması için örnekler, 12000xg’de 4 °C’de 20 dakika santrifüj (Nüve, NF 800R) edilmiştir. Oluşan üç fazdan en üst fazdaki sıvı, ara faza temas etmeyecek şekilde yeni steril tüplere alınmıştır. Örneklerle

500 µL izopropanol (MERCK, 1.09634.2500) eklenerek 10 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmişlerdir. 12000xg'de 4 °C'de 10 dakika boyunca tekrar santrifüj edilen örneklerden üst faz uzaklaştırılmış pellet 1 mL %75 soğuk etanol (ISOLAB, 920.026.2500) ile yıkanmıştır. 7500xg'de 4 °C'de 5 dakika santrifüj sonrasında etanol tamamen uzaklaştırılmış, elde edilen RNA pelletleri 35 µL dietil pirokarbonat (DEPC) içeren distile su eklenerek 37 °C, 250 rpm'de termal çalkalayıcıda (Biosan, TS-100 ThermoShaker) çözündürülmüştür. Örnekler kalite analizleri gerçekleştirildikten sonra porsiyonlanarak belli bir kısmı dizileme reaksiyonları için ayrılmış kalanı ise uzun süreli saklama için -80 °C'ye kaldırılmıştır.

#### 3.4.1. DNaz I Uygulaması

Dizilemeye gönderilecek RNA örneklerinin herhangi bir DNA kontaminasyonu içermediğinden emin olmak için tüm örnekler DNaz I (Thermo Fisher, EN0525) enzimi uygulanmıştır. 2000 ng RNA içeren tüplere 0,5 µL DNaz I, 1X DNaz I tampon çözeltisi ve reaksiyon hacmine uygun miktarda DEPC'li su eklenmiştir. Toplam reaksiyon hacminin kaç olacağı RNA'ların konsantrasyonuna göre belirlenen başlangıçtaki RNA hacmine göre seçilmiştir. Bileşenler eklendikten sonra tüpler 37 °C'de 30 dk boyunca termal çalkalayıcıda (Biosan, TS-100 ThermoShaker) bekletilmiştir. Ardından her bir tüpe 1 µL 50 mM etilendiamintetraasetik asit (EDTA) (Merck, 101830) eklenmiştir. 10 dakika boyunca 65 °C'de enzim inaktivasyonu gerçekleştirilmiştir.

Enzim inaktive edilmiş olsa bile DNaz I uygulamasının ardından ortamda kalan protein ve tuzlar gibi kontamine edici bileşenlerin uzaklaştırılması için Sodyum Asetat (NaAc) (Sigma, 86H05555) ile yeniden çöktürme yöntemi kullanılmıştır. DNaz I uygulanmış tüplere 0,1 v 3M NaAc çözeltisi ve 2,5 v %100 etanol eklenmiş, tüpler masaüstü mini santrifüjde (ScanSpeed Mini, Labnet) 15 saniye döndürüldükten sonra -20 °C'de gece boyunca bekletilmiştir. Ertesi gün tüpler 4 °C'de 12000xg'de 30 dakika boyunca santrifüj edilmiş, üst faz atılarak pellet 500 µL %75 soğuk etanol ile yıkanmıştır. Örnekler 4 °C'de 12000xg'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve pellet tekrar %75 soğuk etanolle yıkanarak 12000xg'de 10 dakikalık santrifüj aşaması tekrarlanmıştır. Santrifüjden sonra üst fazlar uçurulmuş ve pellet DEPC'li su eklenerek 37 °C'de yeniden süspense edilmiştir.

### 3.4.2. RNA Kalite Analizi

İzole edilmiş ve olası DNA kontaminasyonundan arındırılmış RNA'ların konsantrasyonlarının belirlenmesi ve saflıklarıyla ilgili kantitatif bir değerlendirme yapılabilmesi için spektrofotometrik bir araç olan NanoDrop® (Thermo Scientific, Nanodrop 2000®) kullanılmıştır. Her RNA örneğinden 1 µL alınarak NanoDrop okuyucusuna konulmuş ve ölçüm alınmıştır. NanoDrop cihazı çeşitli dalga boylarında okuma yaparak, RNA konsantrasyonu ( $\mu\text{g/ml}$ ) = (OD260) x (sulandırma faktörü) x [(40µg RNA/ml) / (1 OD260 birimi)] formülüne göre örneklerin nükleik asit konsantrasyonlarını hesaplamıştır. Nükleik asitlerin protein varlığı açısından saflığına dair bilgi edinmek için OD260/OD280 değerinin ve fenolik bileşenler, tuzlar ve diğer kontaminantlar açısından saflığı için OD260/OD230 değerinin ~2 olması beklenmiştir.

RNA kalite analizi için örnekler %1,2 oranında Agaroz jele yüklenerek jel elektroforezi gerçekleştirilmiştir. Agaroz jel içeriğinde kullanılan 50X TAE tampon çözeltisi hazırlanırken, son konsantrasyonlarına göre 2 M Tris-base (Sigma, T1503), 0,05 M EDTA (pH=8,0) (Merck, 324503) yaklaşık 1 L distile suda çözölmüştür. 1 M son konsantrasyonda olacak şekilde glasiyel asetik asit (Merck, 101830) eklenmiştir. 50X TAE stoğu 1X'e sulandırılmış ve %1,2'lik agaroz jel elde etmek için, 40 mL 1X TAE tamponu içerisine 0,48 gram Agaroz (Sigma, 29H069125) eklenerek mikrodalgada çözdürölmüştür. Jelleşme gerçekleşmeden önce çözeltiye 10 mg/mL konsantrasyonda 3 µL Etidyum Bromür (Sigma, MKCL8014) eklenmiş, iyice karıştırıldıktan sonra çözelti jel kasedine (Thermo, EC 320) dökölmüş ve polimerizasyonun gerçekleşmesi beklenmiştir. Örneklerin hepsi yaklaşık 300 ng/µL konsantrasyona denk gelecek şekilde DEPC'li su ile sulandırılmış ve 4 µL örnek, 0,8 µL 6X Jel yükleme boyası (Hibrigen) ile karıştırılarak jele yüklenmiştir. 75V, 110 mA, 50W 'da 35 dakika jelde yürütölen örnekler, elektroforezin ardından, RNA'ların sağıamlığının ve hücreden tüm RNA'nın izolasyonunun verimli şekilde gerçekleşip gerçekleşmediğinin tayin edilebilmesi için jel görüntöleme sisteminde (Avegene-Xlite 30R), UV ışık altında görüntölenmiştir.

Elde edilen RNA'lardan dizileme için cDNA kitaplıkları sentezlenmeden önce örneklerin hepsinin kalite kontrolü yapılmıştır. Elektroforetik bir yöntem olan biyoanalizör (Agilent 2100 Bioanalyzer) kullanılmış, ham veri okunarak depolanmıştır. Veri filtrelendikten sonra elektroferogramlar olarak rapor edilmiştir.

Öncelikle, bilinen konsantrasyonlarda RNA'ların bir karışımını içeren RNA markerı biyoanalizöre yüklenmiştir. Biyoanalizör RNA kitlerinin parçası olarak gelen marker solüsyonu 50 bp uzunluğunda bir DNA parçası içermektedir. Bu parça tüm örneklerin hizalanabilmesi için marker olarak kullanılmıştır. Marker, elektroferogramdaki ilk pik olarak görülmüştür.

İçsel kontrol olarak marker yüklenmiş ve örneklerle hizalanmıştır. RNA sağlamlık değeri (RIN) cihaz tarafından otomatik olarak hesaplanmıştır. RNA'nın konsantrasyonunun hesaplanması için biyoanalizör, RNA elektroferogramının altında kalan alanı hesaplamıştır. Ladder, konsantrasyon/alan oranını belirleyen faktör olarak alan değerinden konsantrasyon değerine geçiş yapılmasını sağlamıştır.

RIN uzantısı, biyoanalizör sisteminde analiz edilen ökaryotik tüm RNA örneklerine otomatik olarak bir sağlamlık numarası atamaktadır. Bu araç kullanılarak örneklerin sağlamlığı yalnızca ribozomal bantların oranı ile değil, degradasyon ürünlerinin varlığı veya yokluğu da dahil olmak üzere RNA örneğinin bütün elektroforetik izi ile belirlenmektedir. Bu şekilde elektroferogramların yorumlanması daha hızlı hale gelirken örneklerin kıyaslanması da daha kolaylaşmıştır (Agilent Technologies, Bioanalyzer System 2100 Kullanım Kılavuzu).

### 3.5. RNA DİZİLEME

Saf ve yeterli kalite değerlerinde izole edilen RNA'lardan RNA-dizileme (RNA-seq) ile anlatım analizlerinin gerçekleştirilmesi için birinci aşamada RNA'lardan dizileme kitaplıkları hazırlanmıştır. RNA dizileme reaksiyonları gerçekleştirilmiş ve yapılan okumalar dizilemenin kalite kontrolü için filtrelenmiştir.

Elde edilen yüksek kalitede verinin daha ileri analizleri gerçekleştirilerek, anlatımı değişen gen '*differentially expressed genes*' (DEG) listeleri elde edilmiştir. DEG listeleri istatistiksel olarak anlamlı verileri elde etmek üzere filtrelenmiş ve anlatımı anlamlı şekilde değişen transkriptler listelenmiştir. Bu transkriptlerden Gen Ontoloji (GO) ve KEGG yolak analizleri gerçekleştirilerek ER stresi uygulanmış domates örneklerinin dizileme sonuçları yorumlanmıştır. Kitaplık hazırlanması, dizileme reaksiyonu ve verilerin istatistiksel analiziyle ilgili aşamalar, İstanbul Üniversitesi BİBUM (Bitki ve Bitkisel Ürünler Uygulama ve Araştırma Merkezi)'dan hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir.

### 3.5.1. Dizileme Kitaplıklarının Hazırlanması

Elde edilen total RNA'dan mRNA'lar manyetik boncuklar (Invitrogen, ABD) kullanılarak üreticinin talimatları doğrultusunda izole edilmiştir. Bu örnekler Qubit RNA BR kiti (Invitrogen, ABD) ile miktar tayini yapıldıktan sonra RNA dizileme kitaplık hazırlığı için kullanılmıştır. Kitaplıklar, Ultra II Directional RNA Library Prep Kit hazırlama kiti (NEB, ABD) kullanılarak üreticinin talimatları doğrultusunda hazırlanmıştır. Bunun için başlangıç materyali olarak 2 µg RNA kullanılmış ve fragmentasyon tamponu ile örnekler parçalanmıştır. Fragmente edilmiş RNA parçalarından rastgele heksamer-primerleri kullanılarak birinci sarmal iplik cDNA sentezi yapılmış ve daha sonrasında DNA polimeraz I ve RNaz H enzimleri kullanılarak ikinci sarmal iplik cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Çift iplikli cDNA'lar AMPure XP boncuklar (Beckman Coulter, ABD) kullanılarak saflaştırılıp resüspanسیون tamponu ile elüsyon sonrasında 3' ucu adenin nükleotidleri eklenmiştir.

Son olarak, dizileme adaptörleri parçaların ucuna eklenmiş ve cDNA parçaları, PCR ile çoğaltılarak zenginleştirilmiştir. Zenginleştirilen cDNA kitaplıkları, AMPure XP boncukları kullanılarak saflaştırılmıştır. 2 µl'lik kitaplık ürünü kullanılarak SYBR Gold boyama (Invitrogen, ABD) ile agaroz jel elektroforezinde (%2 jel) elde edilen cDNA'ların boyu (250-400 bp) kontrol edilmiştir. Kitaplıklardaki cDNA miktarı Qubit DNA BR kiti (Invitrogen, ABD) kullanılarak tayin edilmiştir. Zenginleştirilen cDNA kitaplıkları, küme oluşturma ve dizileme için kullanılmıştır. Her örnek için iki tane biyolojik tekrar RNA-seq dizilemeye tabii tutulmuştur.

### 3.5.2. RNA Dizileme Reaksiyonlarının Gerçekleştirilmesi

cDNA kütüphanelerinin iki uçtan (*paired-end*) dizilemesi Illumina NovaSeq6000 dizileme platformu (Illumina, ABD) kullanılarak yapılmıştır. 2 × 150 baz çifti uzunluğundaki tüm dizi verileri yüksek kaliteli ".fastq" uzantılı dosyalar olarak kaydedilip dizileme floresan görüntüleri kullanılarak, *base-calling* ve kalite değeri hesaplamaları Illumina veri işleme programı (v1.5) tarafından yapılmıştır. Dizileme kalite kontrolleri için:

- (1) Adaptör kontaminasyonu olan okumaların filtrelenmiş,
- (2) Belirsiz 'N' dizilerini barındıran düşük kaliteli okumalar filtrelenmiş,

(3) Kalite skoru  $<Q30$  olan düşük kaliteli bazlar Trimmomatic (v 0.40) programı ile filtrelenmiştir.

Bu kalite kontrol adımlarının uygulanması sonrasında yapılacak bütün ileri analizler, yüksek kalitede temiz verilere dayanılarak yapılmıştır.

### 3.5.3. Dizileme Verilerinin İstatistiksel Analizleri

Anlatım seviyeleri değişmiş genleri (*'differentially expressed genes'* DEGs) tespit etmek için Linux ortamında cufflink- cummeRbund programları kullanılmıştır. Cufflinks programındaki (v2.2) “cuffdiff” komutu ile deneysel koşullar arasında farklılık gösteren gen anlatım seviyeleri hesaplanmıştır. CummeRbund programı ile koşullar arasındaki genlerin anlatım seviye değerlerinin dağılımı gösterilmiştir. Koşullar arasındaki istatistiksel gen anlatım değişimlerini tespit etmek için eşik değeri olarak  $|\text{Kat değişimi (fold change)}| \geq 1$  ve  $\text{FDR} < \%5$  (*'False discovery rate'*, yanlış keşif oranı) baz alınmıştır.

Keşfedilen DEG'ler için KEGG (*'Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes'*) yolak analizi DAVID (<https://david.ncifcrf.gov>) programı kullanılarak yapılmış ve istatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0.05$ ) yolaklar rapor edilmiştir. DEG'leri fonksiyonel olarak sınıflandırmak için gen ontolojisi (GO) terim zenginleştirme analizi DAVID aracı kullanarak, Bonferroni çoklu düzeltme testi ile yapılmıştır. Çeşitli Gen Ontoloji ve KEGG ile ilişkili analizlerde ve elde edilen verilerin görselleştirilebilmesi için çizilen grafiklerde ShinyGO (v0.76.3) kullanılmıştır.

## 4. BULGULAR

### 4.1. BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ

Domates tohumları *in vitro* doku kültürlerine alındığında tohumların çimlenme süresi belirlenen koşullar altında ortalama 8 gün olmuştur. Şekil 4.1’de 8 günün sonunda çimlenen tohumlar görülmektedir. Her iki biyolojik tekrarda da toplam 4 farklı petriye domates tohumları ekilmiştir. Ekilen tohumlar sayılmış, ardından da çimlenen tohumlar sayılarak çimlenme yüzdeleri hesaplanmıştır. Çimlenen bitkilerin ekilen tohum sayısına oranından yola çıkılarak, domates tohumları için çimlenme yüzdesi birinci biyolojik tekrarlarında %83,78 ve ikinci biyolojik tekrarlarında %80 olarak hesaplanmıştır. Çimlendikten sonra cam tüplere alınarak büyütülen bitkiler 14. günde Şekil 4.2’deki gibi görüntülenmiştir.



Şekil 4.1: Çimlenmiş domates bitkileri.



**Şekil 4.2:** 14 günlük domates bitkileri.

#### **4.2. ER STRESİ İNDÜKLENEN BİTKİLERDE GÖZLEMLENEN DEĞİŞİMLER**

Şekil 4.3'te 2 saat boyunca tunikamisin uygulanmış 14 günlük bitkide herhangi bir fizyolojik değişim görülmezken 6 saat tunikamisin uygulanmış 14 günlük bitkinin yapraklarında bükülmeler ve yaprak kenarlarında sararmalar meydana geldiği görülmektedir.



**Şekil 4.3:** ER Stresi indüklenmiş uygulama bitkileri. A: 2 saat uygulama yapılmış bitki, B: 6 saat uygulama yapılmış bitki.

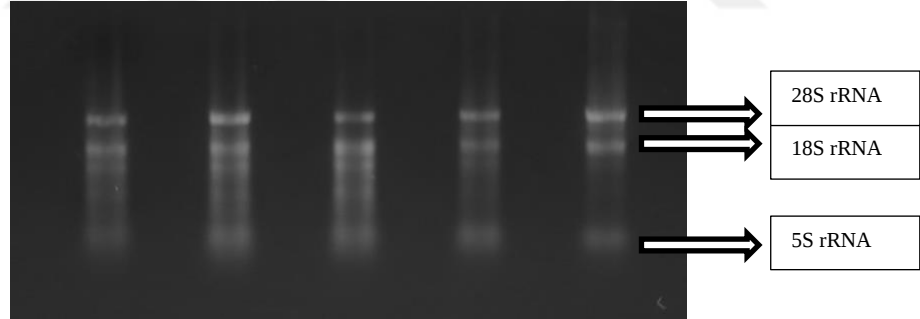
#### 4.3. RNA MİKTAR VE KALİTE ANALİZLERİ

Her iki stres uygulaması için kendi kontrolleri ile beraber 4 bitki örneğinin yapraklarından toplam RNA'lar izole edilmiştir. Dizilemeye gönderilecek örnekler 2 biyolojik tekrar olarak dizileneceği için toplamda 8 tane RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. RNA örneklerinin saflık ve konsantrasyonları, Nanodrop 2000 cihazı ile spektrofotometrik olarak belirlenmiştir (Tablo 4.1).

Agaroz jel elektroforezi sonucu elde edilen jel görüntülerinde beklenen 28S, 18S ve 5S rRNA bantları net bir şekilde görüntülenmiştir (Şekil 4.4). Jelde herhangi bir sürüklenmiş görüntü “smear” gözlenmemesi sonucu RNA'ların yüksek oranda sağlam bir şekilde izole edildiği sonucuna varılmıştır.

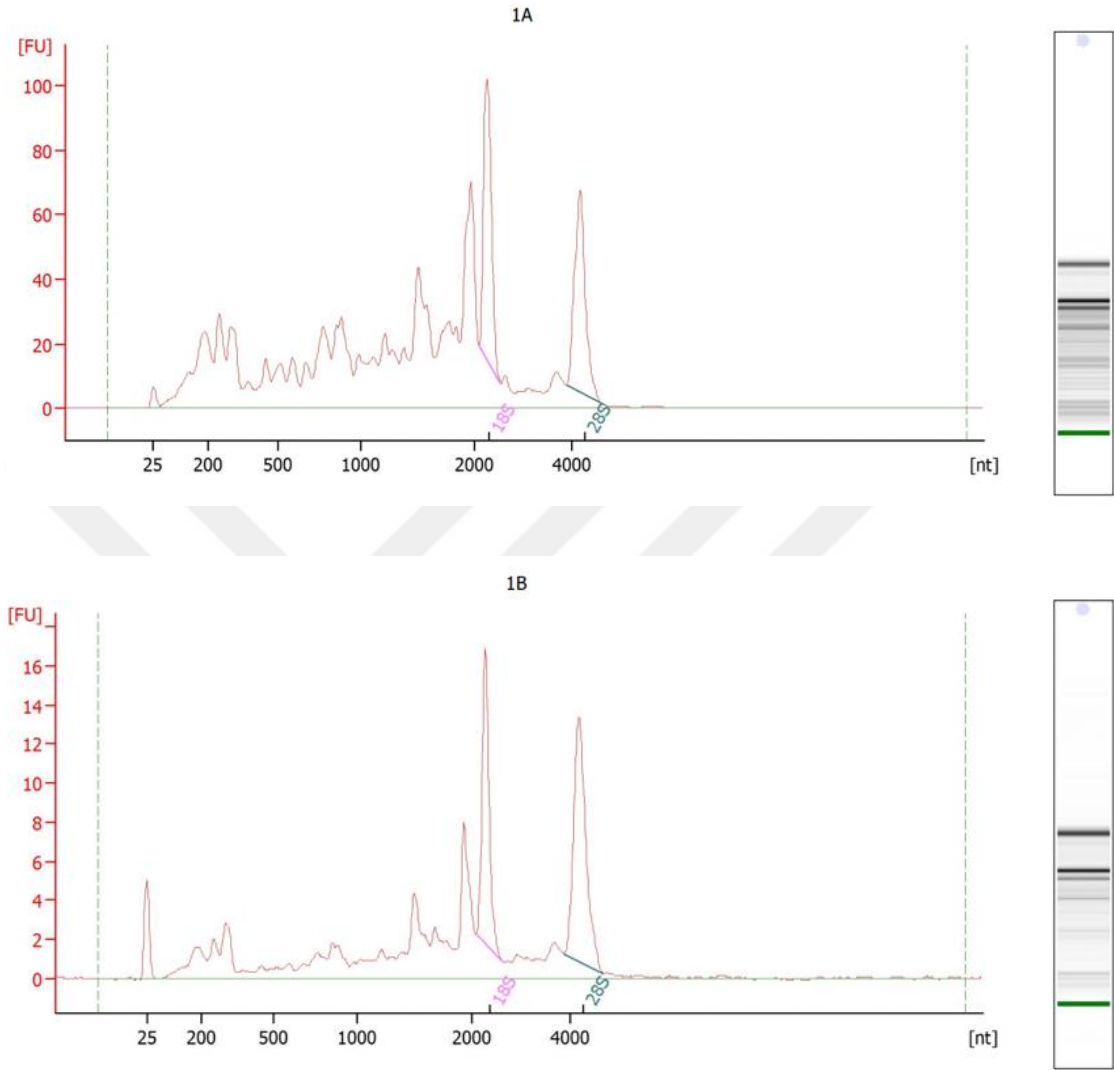
**Tablo 4.1:** RNA örneklerinin konsantrasyon ve saflık değerleri. Örnek açıklamalarında: 1A= 2 saat tunikamisin uygulaması için kontrol 1. biyolojik tekrar, 1B= 2 saat tunikamisin uygulaması için kontrol 2. biyolojik tekrar, 2A= 2 saat tunikamisin uygulaması 1. biyolojik tekrar 2B= 2 saat tunikamisin uygulaması 2. biyolojik tekrar, 3A= 6 saat tunikamisin uygulaması için kontrol 1. biyolojik tekrar, 3B= 6 saat tunikamisin uygulaması için kontrol 2. biyolojik tekrar, 4A= 6 saat tunikamisin uygulaması 1. biyolojik tekrar, 4B= 6 saat tunikamisin uygulaması 2. biyolojik tekrar.

| Örnek Açıklaması | RNA Konsantrasyonu (ng/μL) | OD260/280 | OD260/230 |
|------------------|----------------------------|-----------|-----------|
| 1A               | 305,7                      | 2,14      | 2,43      |
| 1B               | 1410,8                     | 2,17      | 2,25      |
| 2A               | 537,5                      | 2,05      | 1,97      |
| 2B               | 563,4                      | 2,02      | 2,39      |
| 3A               | 941,8                      | 2,13      | 2,4       |
| 3B               | 1020,9                     | 2,13      | 2,41      |
| 4A               | 705,1                      | 2,1       | 2,21      |
| 4B               | 1028,1                     | 2,02      | 1,54      |

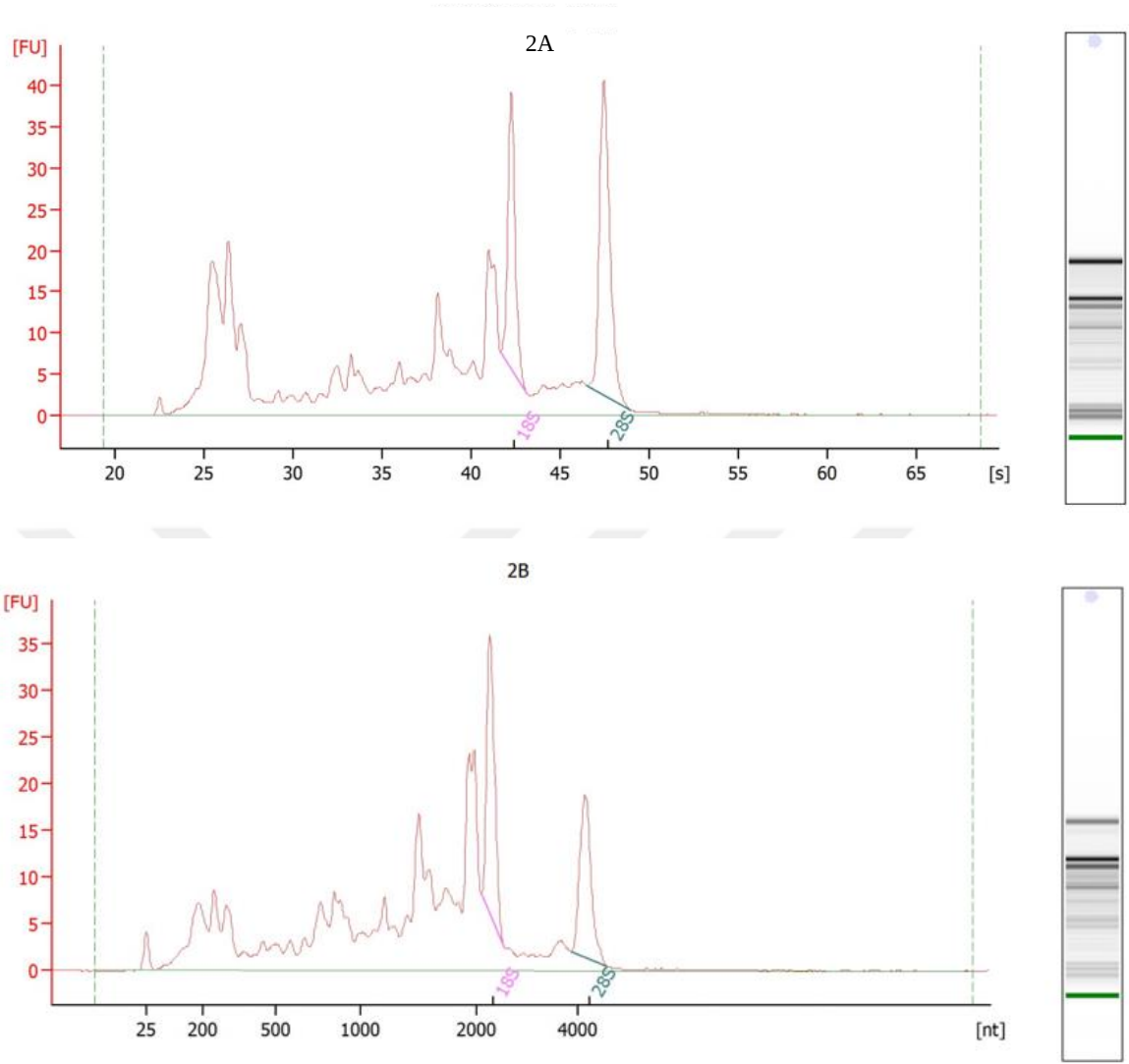


**Şekil 4.4:** RNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü.

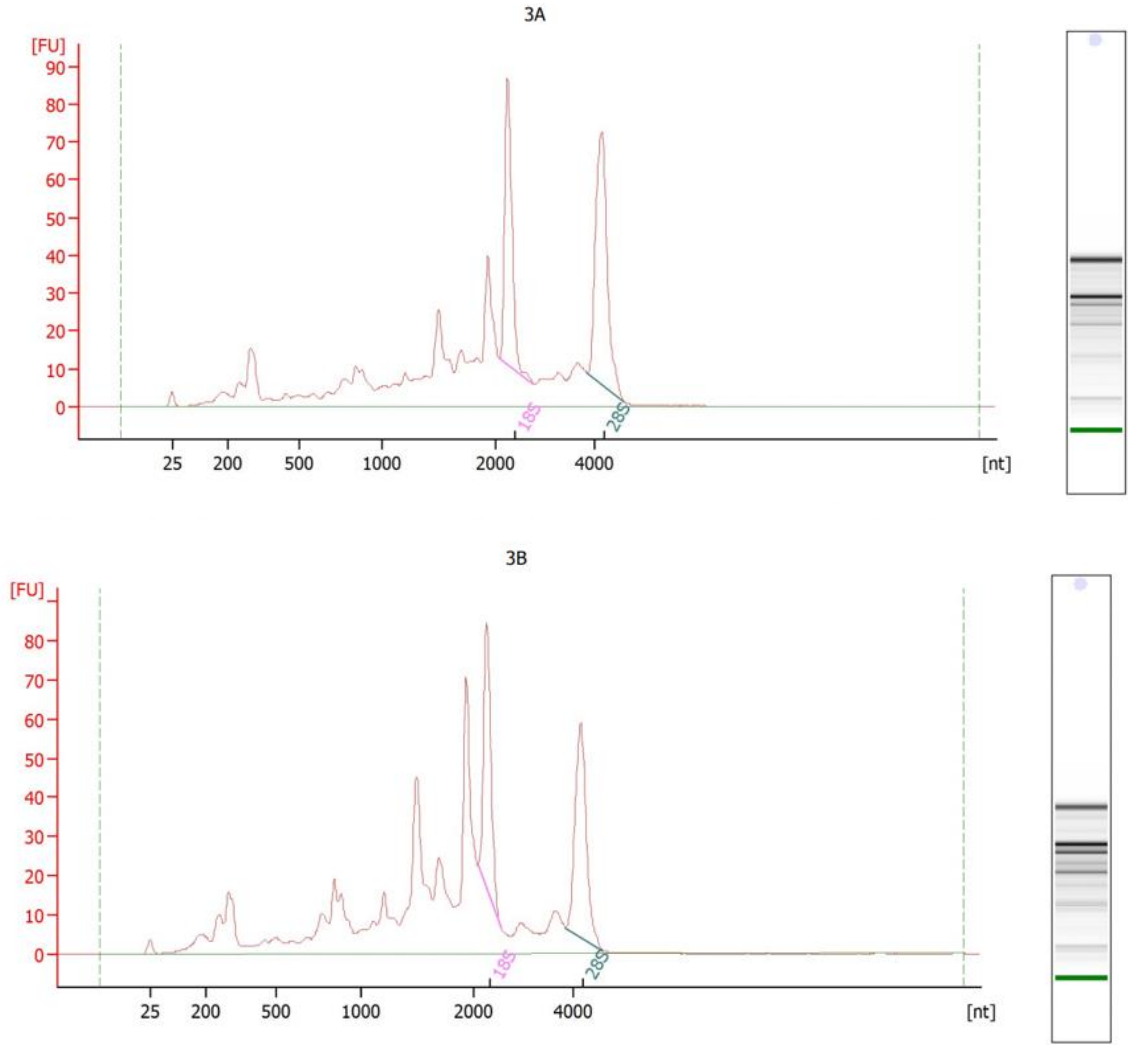
Biyoanalizörden elde edilen sonuçlar elektroferogram raporları olarak analiz edilmiştir. 2 saatlik kontrol örneklerinin elektroferogram grafikleri Şekil 4.5, 2 saatlik uygulamaların grafiği Şekil 4.6, 6 saatlik kontrol örneklerinin grafiği Şekil 4.7, 6 saatlik uygulamaların grafiği ise Şekil 4.8’de verilmiştir.



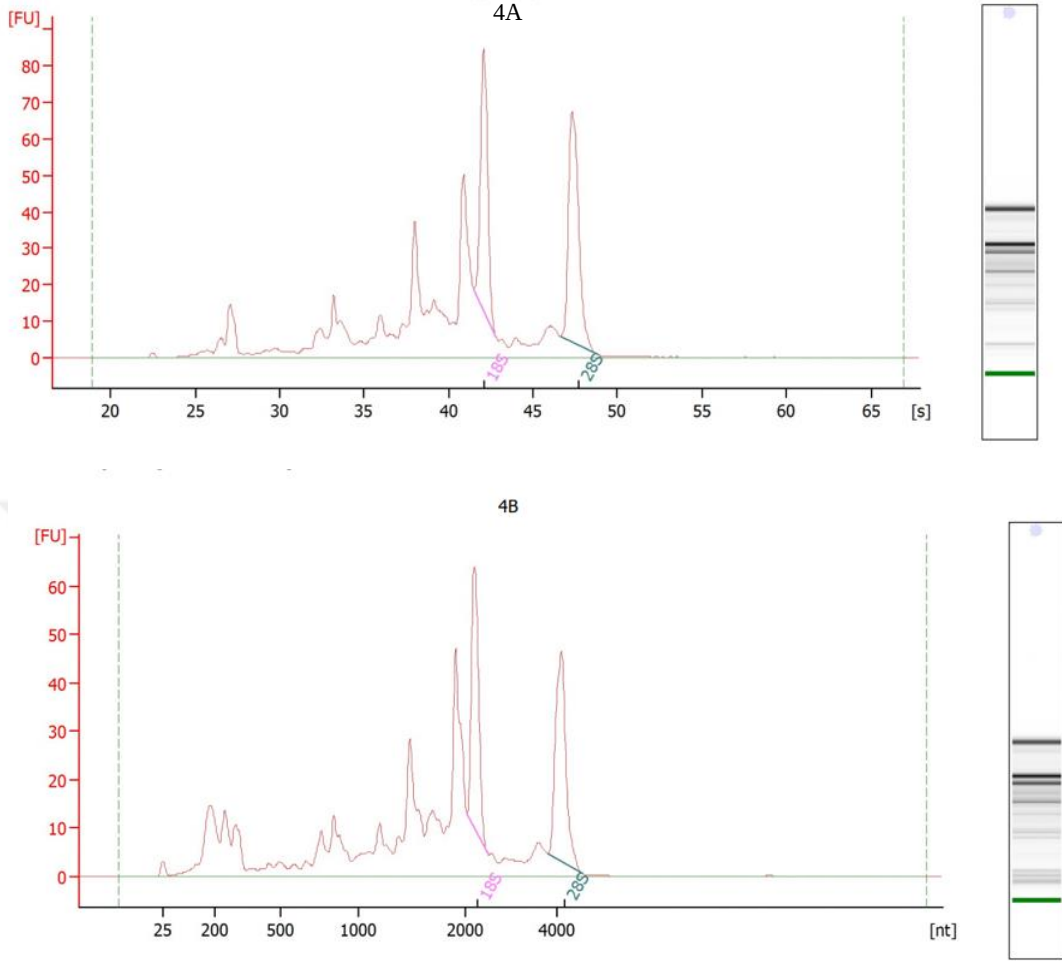
**Şekil 4.5:** 1A ve 1B örneklerinin biyoanalizör elektroferogramı, 1A: 2 saatlik kontrol koşulu 1. biyolojik tekrar, 1B: 2 saatlik kontrol koşulu 2. biyolojik tekrar.



**Şekil 4.6:** 2A ve 2B örneklerinin biyoanalizör elektroferogramı, 2A: 2 saatlik tunikamisin uygulaması 1. biyolojik tekrar, 2B: 2 saatlik tunikamisin uygulaması 2. biyolojik tekrar.



**Şekil 4.7:** 3A ve 3B örneklerinin biyoanalizör elektroferogramı, 3A: 6 saatlik kontrol koşulu 1. biyolojik tekrar, 3B: 6 saatlik kontrol koşulu 2. biyolojik tekrar.



**Şekil 4.8:** 4A ve 4B örneklerinin biyoanalizör elektroferogramı, 4A: 6 saatlik tunikamisin uygulaması 1. biyolojik tekrar, 4B: 6 saatlik tunikamisin uygulaması 2. biyolojik tekrar.

Elektroferogramlardan elde edilen RNA alanı ve konsantrasyonu, 28S/18S rRNA oranı ve RNA'nın bütünlüğüne dair fikir veren RIN '*RNA Integrity Number*' değeri gibi veriler her örnek için Tablo 4.2'de gösterilmiştir. RIN değeri 5,5 ve üzerinde olan RNA örnekleriyle dizileme reaksiyonlarının gerçekleştirilmesi uygun bulunmuştur.

**Tablo 4.2:** Biyoanalizör elektroferogram raporlarına ait değerlerin tablosu.

| Örnekler | RNA Alanı | RNA Konsantrasyonu<br>(ng/µL) | 28S/18S rRNA<br>Oranı | RIN |
|----------|-----------|-------------------------------|-----------------------|-----|
| 1A       | 1322,4    | 769,0                         | 0,9                   | 5,5 |
| 1B       | 134,3     | 78,0                          | 1,2                   | 6,7 |
| 2A       | 477,1     | 752,0                         | 1,4                   | 6,3 |
| 2B       | 407,1     | 237,0                         | 0,7                   | 5,6 |
| 3A       | 707,0     | 411,0                         | 1,2                   | 6,4 |
| 3B       | 809,0     | 470,0                         | 1,0                   | 5,9 |
| 4A       | 651,8     | 1,027                         | 1,1                   | 6,2 |
| 4B       | 619,9     | 360,0                         | 1,1                   | 6,0 |

#### 4.4. DİZİLEME VE BİYOİNFORMATİK ANALİZ SONUÇLARI

Toplamda 8 tane örnek dizilenmiştir. Milyon okuma değerleri, 1A örneği için 2141672 okuma ve %82,89 tüm hizalanma oranı '*overall alignment rate*' (OAR), 1B örneği için 19105481 okuma ve %91,56 OAR, 2A örneği 18542846 okuma ve %90,95 OAR, 2B örneği için 2961743 okuma ve %80,30 OAR, 3A örneği için 10704967 okuma %75,21 OAR, 3B örneği için 52781988 okuma %84,32 OAR, 4A örneği için 35903814 okuma %93,56 OAR, 4B örneği için 11952079 okuma %53,92 OAR olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.3'te dizileme reaksiyonunun verimine ilişkin Q30 değerleri listelenmiştir. Dizilemenin kalitesine dair önemli bir veri olan Q30 değeri tüm okumalar için yaklaşık %90 olduğundan dizileme reaksiyonu verimli bir şekilde gerçekleşmiş olarak kabul edilmiştir.

**Tablo 4.3:** Dizileme reaksiyonu verim tablosu.

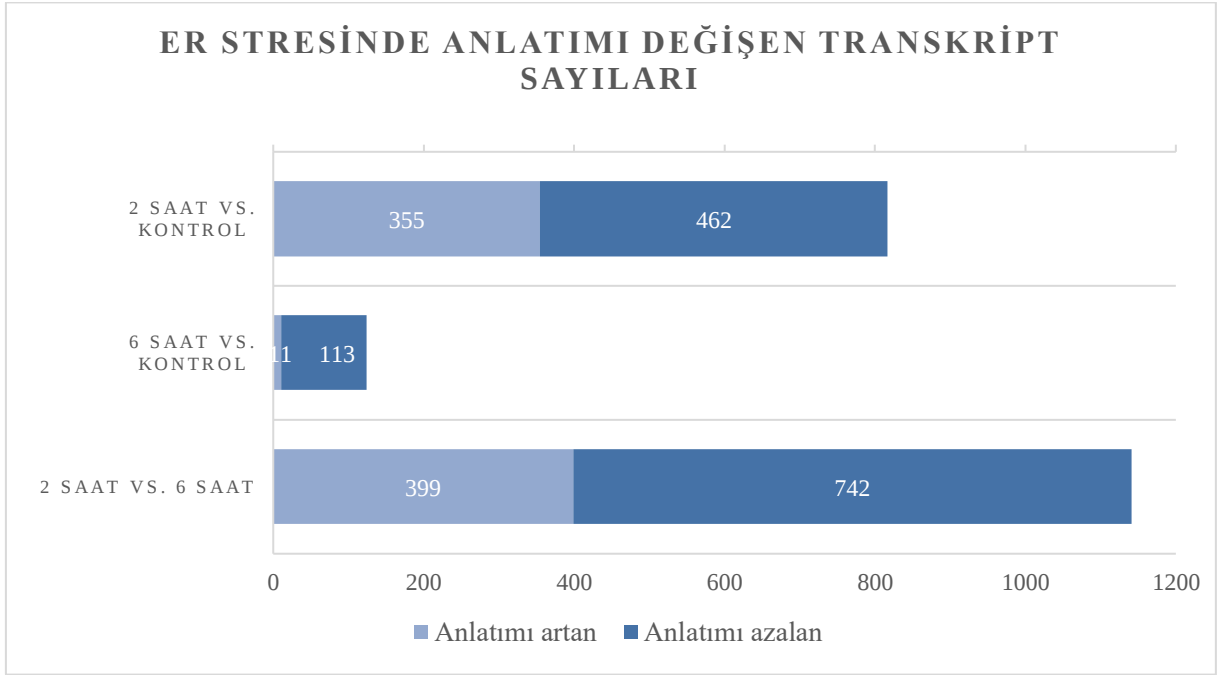
| Seviye                | %>= Q30 |
|-----------------------|---------|
| Okuma 1               | 90,78   |
| Okuma 2               | 90,59   |
| Okuma 3               | 88,87   |
| Okuma 4               | 90,73   |
| İndekslenmemiş Toplam | 90,76   |
| Toplam                | 90,70   |

Dizileme sonrası elde edilen veriler, NCBI GEO (‘*Gene Expression Omnibus*’) veri bankasına GSE220689 erişim numarasıyla kaydedilmiştir.

#### 4.4.1. Dizileme Sonrası Anlatımı Değişen Genlerin (DEG) Belirlenmesi

ER stresinin indüksiyonu ile yaprak dokularında farklı zaman dilimlerinde anlatım yapmış transkriptlerin tanımlanması ve anlatım seviyelerinin belirlenmesi, bitkinin ER stresine erken ve geç yanıtına dair kayda değer bilgi sağlayacaktır. Transkriptler belirlenirken, 2 saatlik tunikamisin uygulanmış örnek 2 saatlik kontrol koşulu bitkisiyle ve 6 saatlik tunikamisin uygulanmış örnek de 6 saatlik kontrol koşulu bitkisiyle kıyaslanmıştır. Bu kıyaslamalardan, anlamlı şekilde anlatım değişimi gösteren transkriptler belirlenmiştir. Daha sonra 2 saatlik ve 6 saatlik uygulama örneklerinin de kendi içinde kıyaslanmasıyla daha detaylı bir DEG listesi ortaya konmuştur.

Dizilemeden elde edilen okumalar, referans genoma hizalanmış, bahsedilen her üç kıyaslama ayrı ayrı gerçekleştirilmiş ve her kitaplığa ait transkriptlerin ‘*fold change*’ kat değişim değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen transkript listesi ‘*False Discovery Rate*’ Hatalı Keşif Oranı (FDR) değeri  $<0,05$  ve kat değişimi  $< -1$  veya  $>1$  olacak şekilde filtrelenmiştir. Yapılan filtreleme sonucu üç farklı kıyaslamada anlatım değişimi göstermiş transkript sayıları Şekil 4.9’da verilmiştir.



**Şekil 4.9:** ER Stresi uygulamaları sonucunda anlatımı değişen transkript sayısı grafiği. (fold change<-1 veya fold change>1, FDR<0,05).

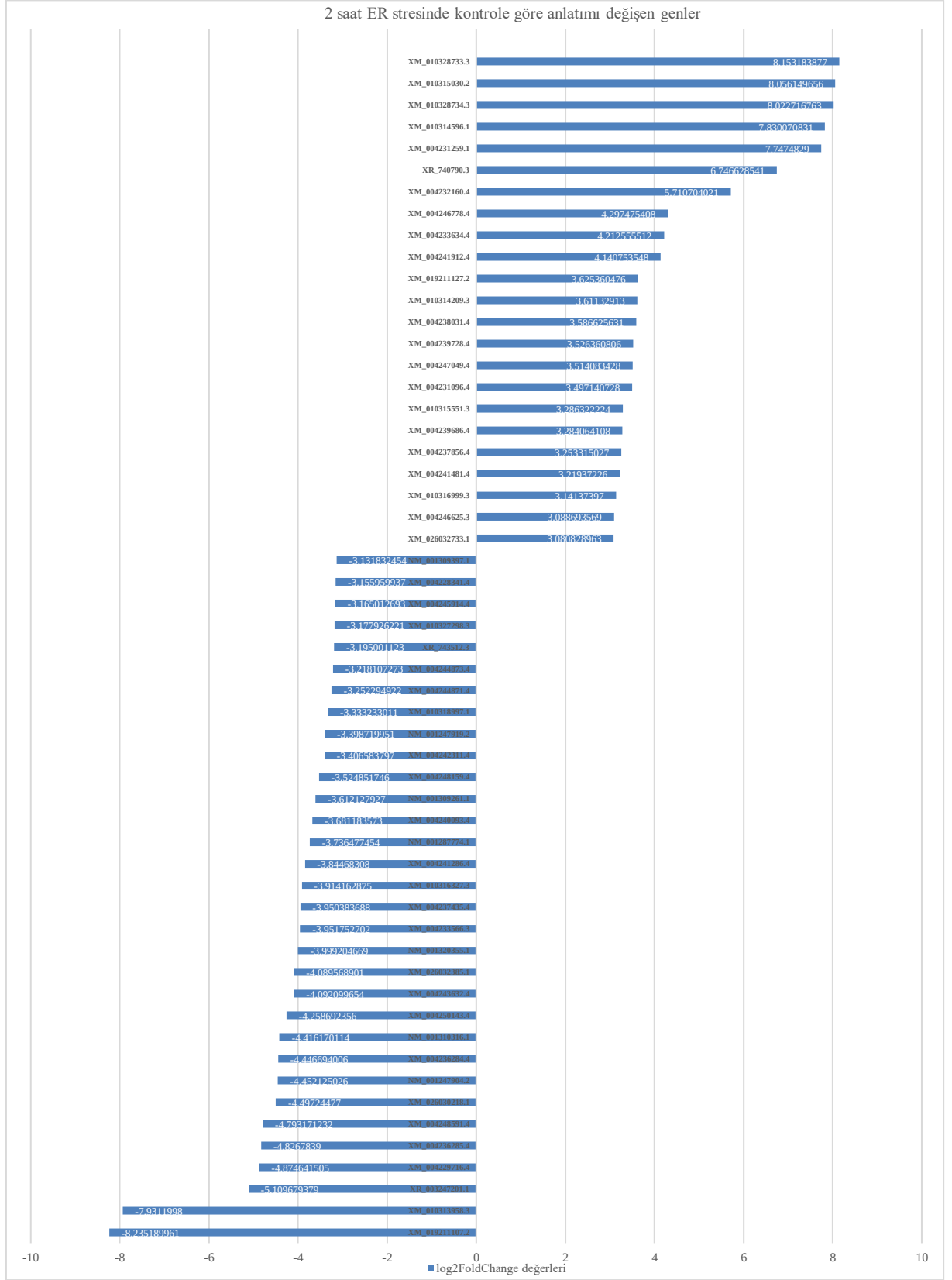
2 saat tunikamisin uygulanmış örneklerde 2 saatlik kontrole göre toplam 817 transkriptte (kat değişimi<-1 veya >1, FDR<0,05) anlatım değişimi gözlenirken, 6 saatlik tunikamisin uygulanmış örnekler 6 saatlik kontrole kıyaslandığında 124 transkriptte anlamlı bir anlatım değişimi tespit edilmiştir. 6 saat tunikamisin uygulanmış örnekler 2 saat tunikamisin uygulanmış örneklerle kıyaslandığında ise 1141 transkriptin anlamlı şekilde anlatımının değiştiği bulunmuştur.

2 saatlik ER stresi indüksiyonunda anlatımı önemli derecede artan transkriptler (kat değişimi>3, FDR<0,05) Şekil 4.10'da kat değişimi değerleriyle beraber verilmiştir. Bu transkriptler arasında, *wound-induced protein 1* (4,29 kat), *peroxidase 21* (3,08 kat), *flavanone 3-dioxygenase 3-like* (3,49 kat), *zinc finger protein ZAT11-like* (3,52 kat), *glutaredoxin-C9-like* (8,15 kat), *BTB/POZ and TAZ domain-containing protein 1* (3,21 kat), *proteinase inhibitor PSI-1.2* (4,14 kat), *putative NAC domain-containing protein 94* (4,21 kat), *protein EPIDERMAL PATTERNING FACTOR 1* (3,28 kat), *phytosulfokines 3-like* (3,58 kat) dikkat çekmektedir.

Anlatımı önemli derecede azalmış transkriptler arasında (kat değişimi<-3), *allene oxide synthase* (-4,45 kat), *peroxidase 3* (-4 kat), *polygalacturonase non-catalytic subunit AroGP3*

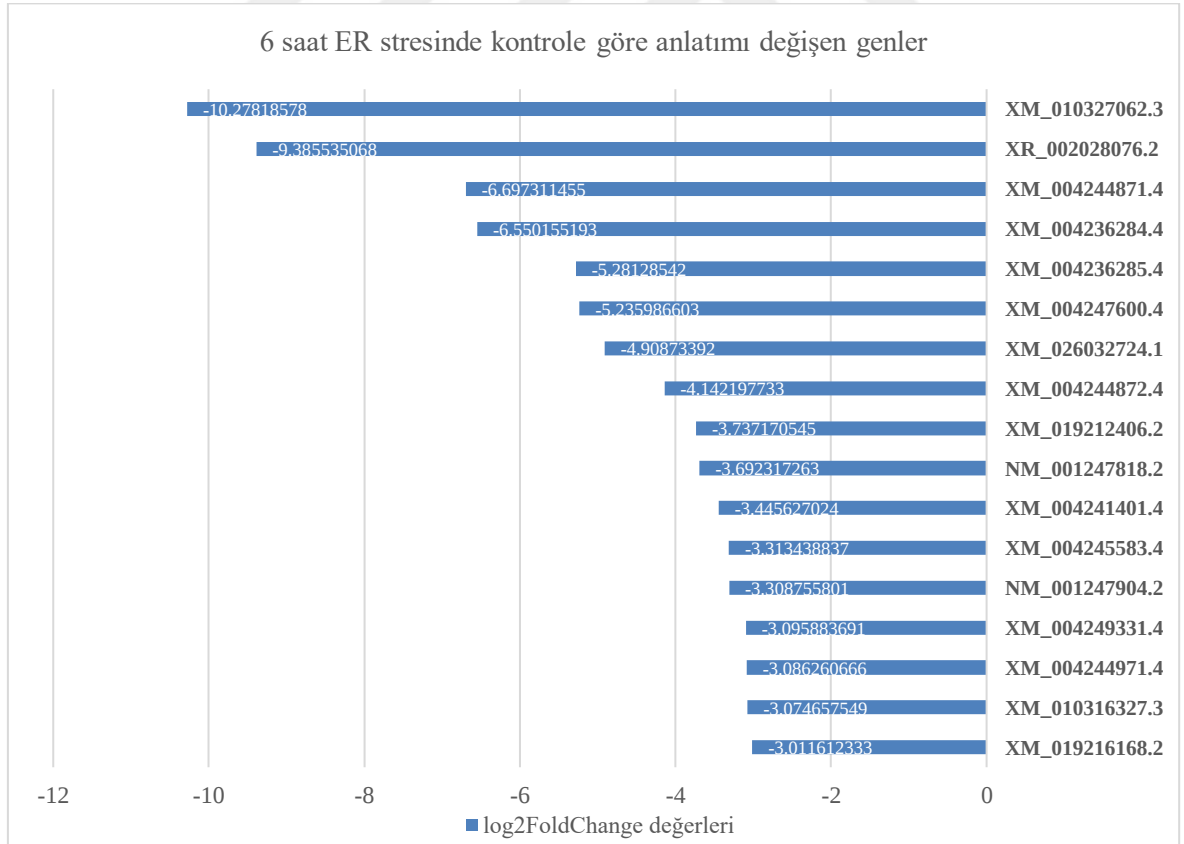
(*AROGP3*) (-3,6 kat), *cytochrome P450 94B3-like* (-4,45 kat), *peroxidase 3-like* (-3,68 kat), *transcription factor bHLH18-like* (-3,95 kat), *transcription factor MYB13-like* (-3,4 kat), *ethylene response factor H.1* (-3,4 kat), *pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DEAH7-like* (-3,91 kat), *protein TIFY 5A-like* (-3,23 kat), *myb family transcription factor PHL11* (-3,17 kat), *lysine histidine transporter-like 8* (-4,8 kat), *ethylene-responsive transcription factor ERF038-like* (-4,87 kat), *polyphenol oxidase B chloroplastic-like* (-3,13 kat), *ethylene-responsive transcription factor ABR1-like* (-3,95 kat), *polygalacturonase non-catalytic subunit AroGP2* (-4,41 kat), *protein SENSITIVITY TO RED LIGHT REDUCED 1-like* (-8,23 kat), *E3 ubiquitin-protein ligase PUB24-like* (-3,84 kat), *peroxidase 44-like* (-7,93 kat), *putative glycine-rich cell wall structural protein 1* (-3,33 kat), *8-hydroxygeraniol dehydrogenase* (-4,25 kat), *serine carboxypeptidase-like 45* (-3,15 kat), *TIP protein* (-3,73 kat) ve *sucrose synthase-like protein* (-4,1 kat) bulunmaktadır.

2 saat ER stresinde kontrole göre yapılan anlatım değişimlerinde anlamlı olarak değişen transkriptlerde önemli transkripsiyon faktörlerinin anlatımlarında artış görülmüştür. *Ethylene-responsive transcription factor ERF017* (1,91 kat), *WRKY transcription factor 3* (1,68 kat), *BEE2* (2,7 kat), *MYB1R1 TF* (1,4 kat), *MYB48 TF* (2,26 kat), *TCP19 TF* (1,47 kat), *heat stress TF A2-like* (2,2 kat), *MYB family TF PHL5-like* (2,84 kat), *ERF1* (2,16 kat), *AP2/ERF and B3 domain-containing TF RAV1* (2,04 kat), *TF PAR1* (2,84 kat) ve *ethylene-responsive TF ERF014* (2,66 kat) anlatım artışı göstermiştir. TF'ler dışında birçok ROT ilişkili ve protein katlanmasıyla ilişkili gende de artan anlatımlar tespit edilmiştir. *NAC domain containing protein 1* (2,58 kat), *F-box protein PP2-A13* (2,51 kat), *Zinc-finger protein ZAT10* (2,95 kat), *peroxidase 21* (3,08 kat), *Zinc-finger protein ZAT11-like* (3,52 kat), *glutaredoxin-C9-like* (8,15 kat), *NAC domain containing protein 104* (2,02 kat), *stress associated endoplasmic reticulum protein 2* (1,18 kat) anlatım artışı göstermiştir.

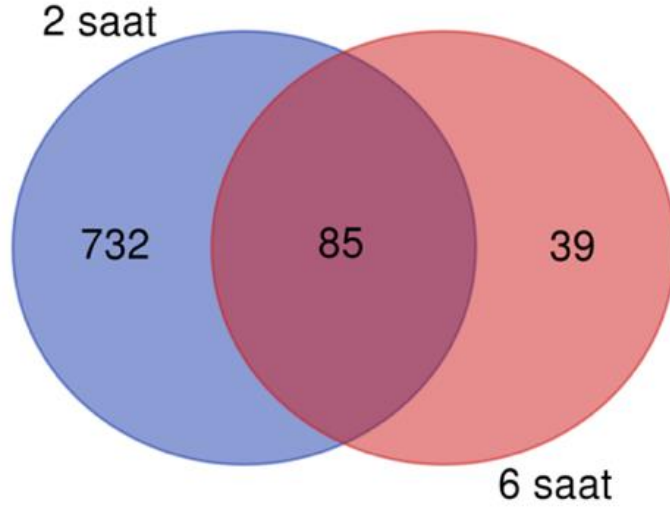


**Şekil 4.10:** 2 saat ER stresi uygulamasında kontrole göre yüksek oranda anlatımı değişen transkriptler ve kat değişimi değerleri. (FDR<0,05; kat değişimi < -3 veya kat değişimi>3).

6 saat tunikamisin uygulanmış örnekler, 6 saatlik kontrol koşuluna göre kıyaslanarak 6 saat ER stresi indüksiyonu sonucunda anlatımı değişen genler tespit edilmiştir. Toplam 124 transkriptte (kat değişimi  $<-1$  veya  $>1$ ,  $FDR < 0,05$ ) anlatım değişimi gözlenmiştir. Bunlardan 113 tanesinin anlatımı azalırken, 11 tanesinin anlatımı artmıştır. Tüm transkriptler içerisinde anlatımı önemli ölçüde değişmiş olanlar Şekil 4.11’de kat değişimi değerleriyle birlikte gösterilmiştir (kat değişimi  $>3$  veya  $<-3$ ,  $FDR < 0,05$ ). Bu transkriptler arasında, *allene oxide synthase* (-3,3 kat), *gibberellin 2-oxidase* (-3,69 kat), *cytochrome P450 94B3-like* (-6,55 kat), *protein TIFY 5A-like (LOC101252609)* (-6,69 kat), *ethylene-responsive transcription factor 13-like* (-10,27 kat), *phosphatidylinositol:ceramide inositolphosphotransferase 1* (-3,01 kat), *cytochrome P450 94B3-like (LOC101263598)* (-5,28 kat), *transcription factor bHLH92 var.X2* (-4,9 kat), *protein TIFY 5A-like (LOC101252907)* (-4,14 kat), *transcription factor bHLH92 var.X1* (-5,23 kat), *ABC transporter F family member 4* (-3,09 kat), *pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DEAH7-like* (-3,07 kat), *11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1B* (-3,44 kat), *F-box protein At5g49610-like* (-3,73 kat) bulunmaktadır.



**Şekil 4.11:** 6 saat ER stresi uygulamasında kontrole göre anlatımı değişen transkriptler ve kat değişimi değerleri.

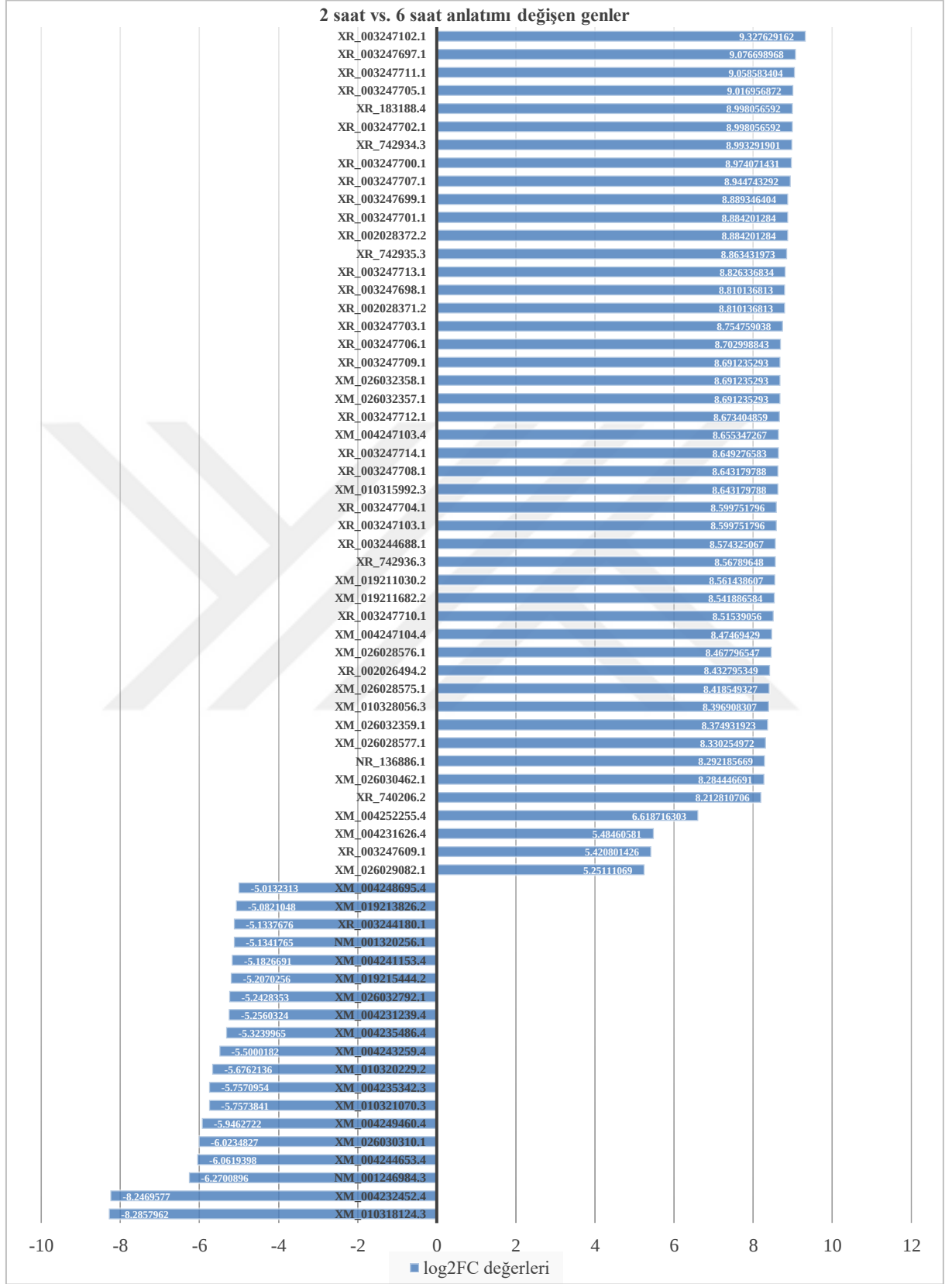


**Şekil 4.12:** ER stresinin 2 saat ve 6 saat uygulandığı örneklerde anlatım değişimi görülen transkript sayılarının Venn şeması ile gösterimi. (FDR<0,05 ve fold change <-1 veya fold change >1).

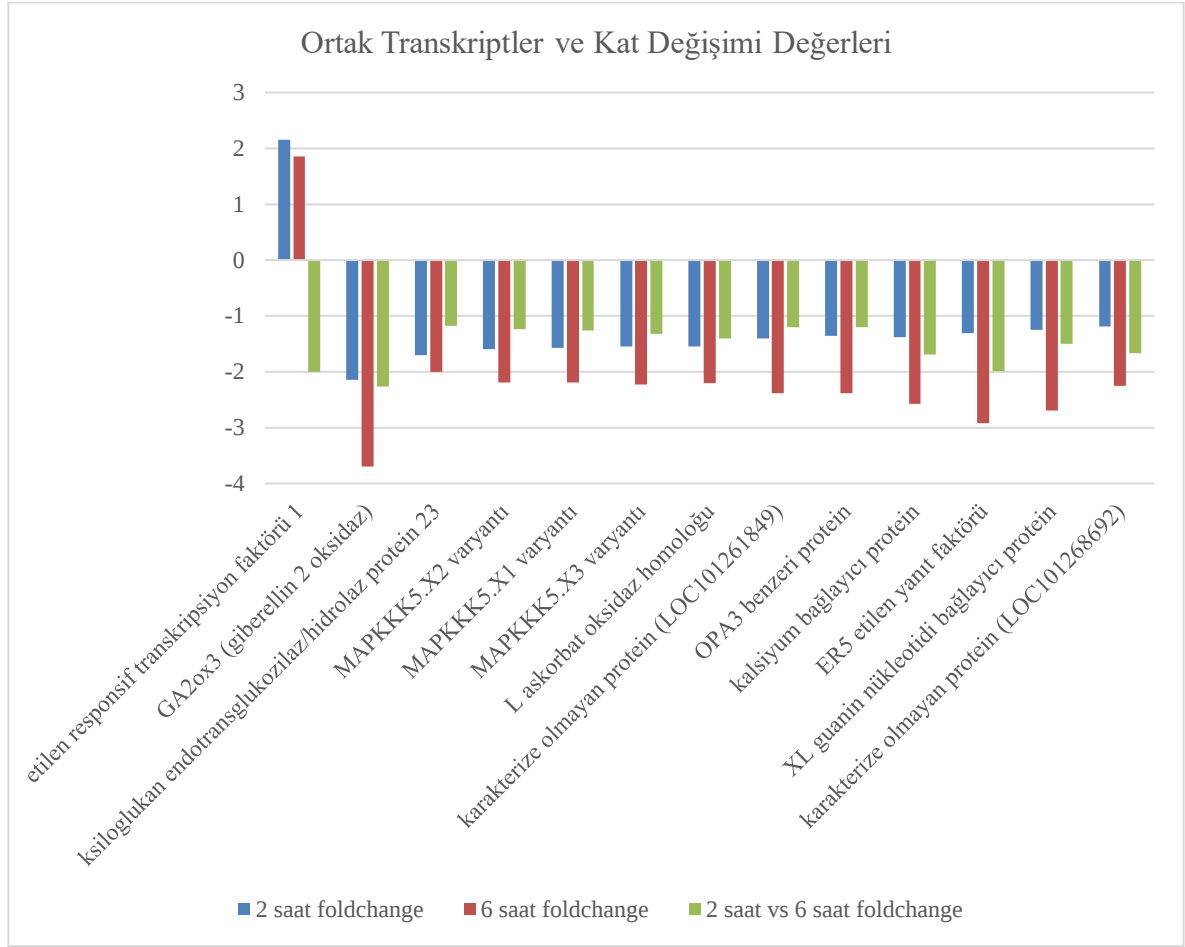
2 saat ve 6 saat ER stresi indüklenmiş bitkilerin yapraklarında görülen değişmiş anlatım gösteren transkriptlerin bazılarının her iki koşulda da ortak olarak etkilendiği tespit edilmiştir. Şekil 4.12’de görüldüğü gibi 85 transkript hem 2 saat hem de 6 saat süren uygulamada ortak olarak düzenlenmiştir.

Kontrole göre yapılan kıyaslamalar haricinde 6 saatlik ER stresi yanıtında 2 saate göre oluşan anlatım değişimlerinin tespit edilmesi için 6 saat uygulama örnekleriyle 2 saat uygulama örnekleri de kıyaslanmıştır. Toplam 1141 transkriptte anlamlı (fold change<-1 veya fold change>1, FDR<0,05) anlatım değişimleri olduğu belirlenmiştir. 6 saatlik ER stresinde 2 saate göre 399 transkript artmış anlatım gösterirken, 742 transkript azalmış anlatım göstermiştir.

Anlatımının değiştiği belirlenen transkriptlerde daha ileri bir filtreleme yapıldığında (fold change>3 veya fold change<-3, FDR<0,05) 6 saatlik uygulamada 2 saate göre 80 adet genin anlatımı önemli ölçüde artarken 140 genin anlatımı anlamlı şekilde azalmıştır. Şekil 4.13’te 6 saat ER stresi indüklenmiş domates yapraklarında 2 saate göre anlatımı önemli ölçüde değişmiş genlerin kat değişimlerine ait grafik yer almaktadır. 6 saat ER stresinde anlatımı 2 saate göre en önemli şekilde azalmış olan gen tiyosülfat sülfürtransferaz 18 (-8,28 kat) olurken, anlatımı en önemli şekilde artan karakterize edilmiş transkript UNE12 transkripsiyon faktörü (+8,65 kat) olmuştur.



**Şekil 4.13:** 6 saat ER stresinde 2 saate göre anlatımı en belirgin şekilde değişen ( $fc < -5$  veya  $> 5$ ) transkriptlerin  $-\log_{2}fc$  değerlerini ve gen sembollerini gösteren grafik. ( $FDR < 0,05$ ).



**Şekil 4.14:** Yapılan tüm kıyaslamalarda ortak tespit edilen DEG'lerin kat değişimi değerleri grafiği.

Yapılan her üç kıyaslamada da ortak olarak anlatımının değiştiği tespit edilen transkriptler bulunmuştur. Toplamda 13 adet transkript 2 saat TM'de ve 6 saat TM'de kontrole göre, aynı zamanda da 6 saat TM'de 2 saat TM'ye göre anlatım değişimi göstermiştir. Bu transkriptler ve her kıyaslamada elde edilen kat değişimi değerlerinin grafiği Şekil 4.14'te verilmiştir.

2 saat ER stresinde kontrole göre yapılmış anlatım analizlerinde elde edilen DEG listeleri filtrelenip incelenmiş, kat değişimi değerleri  $<-1$  veya  $>1$  ve  $FDR < 0,05$  olan transkriptler içerisinde ER stresi ile ilişkili olduğu daha önceden tanımlanmış genlerin kat değişimi değerleri, Tablo 4.4'te listelenmiştir. Aynı incelemeler 6 saatte kontrole göre değişmiş transkriptler ve 6. saatte 2 saatlik uygulamaya göre değişmiş transkriptler için de yapılmış, Tablo 4.5'te 6. saatte kontrole göre değişen ER stresi ile ilişkili olabilecek transkriptlerin listesi ve kat değişimi değerleri verilmiştir. 6 saat TM'de 2 saate göre anlatımı değişen ER stresi ile ilişkili transkriptlerin listesi ve kat değişimi değerleri Tablo 4.6'da verilmiştir.

**Tablo 4.4:** 2 saat ER stresinde kontrole göre anlatımı değişen ER stresi ile ilişkili transkriptlerin kat değişimi değerleri. (FDR<0,05 ve  $-\log_2(\text{foldchange}) < -1$  veya  $> 1$ ).

| Gen adı                                    | Gen ID         | $-\log_2(\text{foldchange})$ | FDR         |
|--------------------------------------------|----------------|------------------------------|-------------|
| Şaperon protein dnaJ 11                    | XM_010325932.3 | 1,48336093                   | 0,00406527  |
| Isı şoku 70 kDa protein 8                  | XM_004247315.4 | 1,82555049                   | 1,28E-04    |
| HSP21                                      | NM_001246971.2 | 1,65948627                   | 3,12E-04    |
| Şaperon protein dnaJ 8                     | XM_004241628.4 | 2,983790181                  | 7,16226E-12 |
| 26.5 kDa ısı şoku proteini                 | XM_004252271.4 | 2,905260495                  | 8,72635E-09 |
| E3 ubiquitin protein ligaz RHA1B           | XM_004245531.4 | 2,17430772                   | 3,71E-07    |
| E3 ubiquitin protein ligaz RMA1H1          | XM_004248113.3 | 2,134006237                  | 1,63E-06    |
| Şaperon protein dnaJ 20                    | NM_001329727.1 | 2,003135438                  | 1,09E-05    |
| Isı şoku binding protein                   | NM_001246906.2 | 2,202505678                  | 1,66E-05    |
| Kalretikulin-3-benzeri protein             | XM_004237507.3 | -2,506957905                 | 2,72E-04    |
| Şaperon protein dnaJ                       | XM_004238793.4 | 2,631022274                  | 5,87E-04    |
| Ubikitin konjuge enzim E2 benzeri protein  | NM_001346567.1 | 1,571032282                  | 1,63E-03    |
| Şaperon protein dnaJ 11                    | XM_010325932.3 | 1,483360929                  | 0,004065271 |
| Otofaji ilişkili protein 18f               | XM_004244109.4 | 1,49284218                   | 4,37E-03    |
| E3 ubiquitin protein ligaz PUB22 benzeri   | XM_004228643.4 | 1,942508503                  | 4,50E-03    |
| 17.3 kDa Sınıf-I ısı şoku proteini benzeri | XM_004246257.4 | 1,416208589                  | 4,74E-03    |
| Ubikitin domen içeren protein 1-benzeri    | XM_004234030.3 | 1,502195793                  | 5,56E-03    |
| 17.4 kDa Sınıf-III ısı şoku proteini       | XM_004235486.4 | 1,403942425                  | 7,55E-03    |
| E3 ubiquitin ligaz SINA2                   | XM_004229940.4 | 1,267360814                  | 0,013160575 |
| 18.1 kDa Sınıf-I ısı şoku protein benzeri  | XM_010314063.3 | -2,485576902                 | 0,013516839 |
| E3 ubiquitin-protein ligaz MPSR1           | XM_004238775.4 | 2,524749343                  | 0,016127344 |
| E3 ubiquitin-protein ligaz PUB24-benzeri   | XM_004241286.4 | -3,84468308                  | 0,018786707 |
| Isı şoku cognate 70 kDa protein 2-benzeri  | XM_004250910.4 | -1,217223062                 | 0,022725082 |

**Tablo 4.5:** 6 saat ER stresinde kontrole göre anlatımı değişen ER stresi ile ilişkili transkriptlerin kat değişimi değerleri. (FDR<0,1 ve -log2(foldchange)<-1 veya >1).

| Gen adı                                     | Gen ID         | -log2(foldchange) | FDR         |
|---------------------------------------------|----------------|-------------------|-------------|
| Peroksidaz 44-benzeri protein               | XM_004247458.4 | 1,738463217       | 0,04188634  |
| Etilen-yanıt transkripsiyon faktörü 1       | NM_001247912.2 | 1,859888472       | 0,03274887  |
| Kalmodulin bağlayıcı protein 60C            | XM_004230236.4 | -2,145305705      | 0,04188634  |
| Kalmodulin bağlayıcı protein 60B-benzeri-X3 | XM_010320626.3 | -1,99648521       | 0,04188634  |
| Isı şoku proteini cognate 70 (Hsc70.1)      | NM_001247562.2 | -1,873147161      | 0,087611962 |
| E3 ubiquitin protein ligaz RHF1A            | XM_004229373.4 | -1,556168485      | 0,090479312 |

**Tablo 4.6:** 6 saat ER stresinde 2 saate göre anlatımı değişen ER stresi ile ilişkili transkriptlerin kat değişimi değerleri. (FDR<0,05 ve -log2(foldchange)<-1 veya >1).

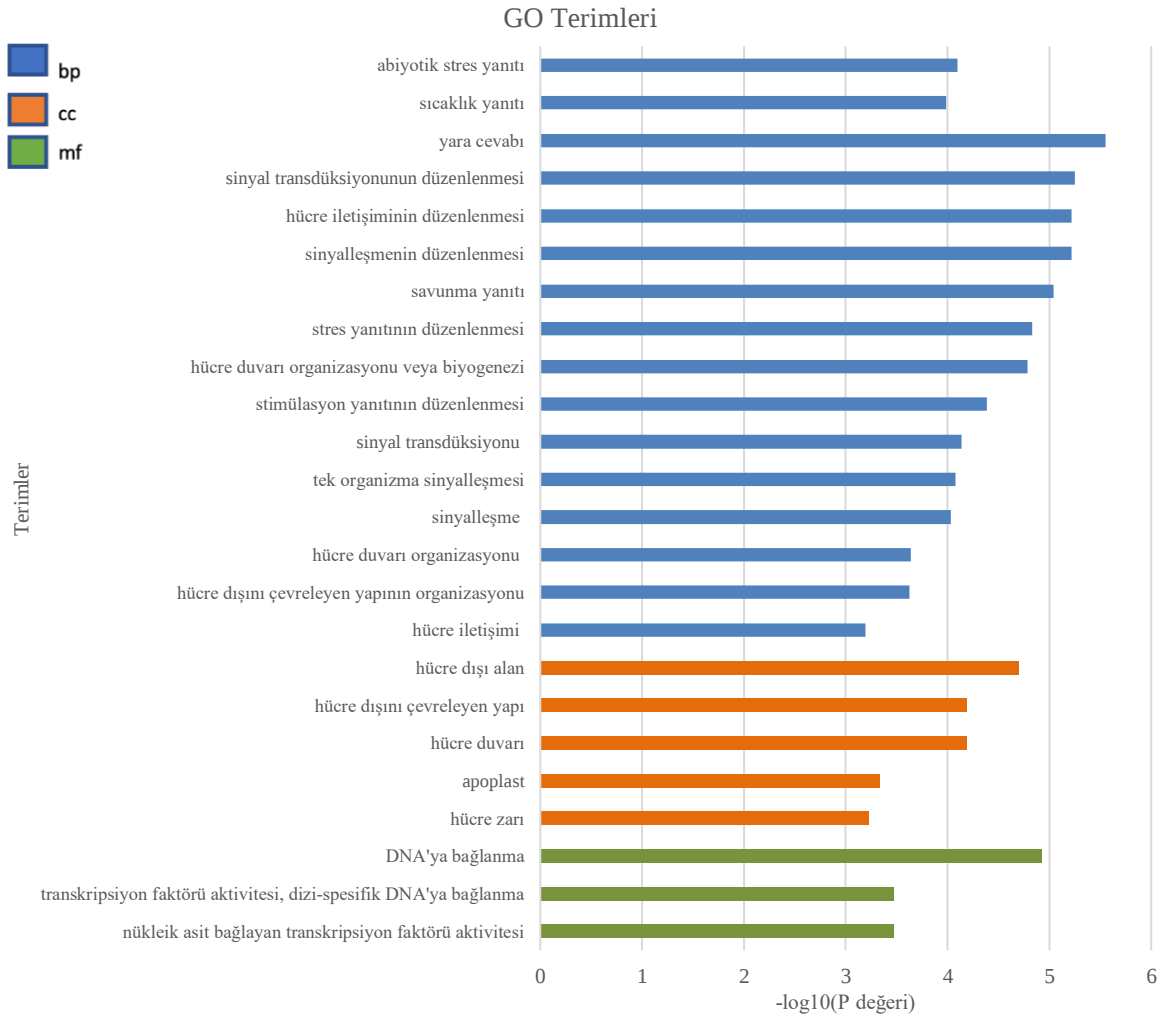
| Gen adı                              | Gen ID         | -log2(foldchange) | FDR      |
|--------------------------------------|----------------|-------------------|----------|
| 17.4 kDa Sınıf III ısı şoku proteini | XM_004235486.4 | -5,323996486      | 2,64E-25 |
| Sınıf II sHSP (HSP17.6)              | NM_001246984.3 | -6,270089586      | 1,88E-24 |
| HSP17.4                              | NM_001247201.3 | -4,45404558       | 1,88E-24 |
| HSP70.3                              | XM_010320820.3 | -4,200147102      | 2,62E-22 |
| HSP5 70 kDa                          | XM_010320399.3 | -3,677194108      | 1,16E-17 |
| HSP8 70 kDa                          | XM_004247315.4 | -3,6554832        | 2,72E-17 |
| HSP21                                | NM_001246971.2 | -3,256709823      | 1,99E-14 |
| 22.7 kDa sınıf IV HSP-benzeri        | XM_004230361.3 | -3,438595134      | 2,95E-14 |
| HSP17.6                              | NM_001247296.2 | -3,8829219        | 2,71E-13 |
| Isı şoku cognate 70 kDa protein      | XM_004250911.4 | -2,840319107      | 2,81E-11 |
| HSP20.0                              | NM_001320262.1 | -3,561992262      | 5,14E-11 |
| Şaperon protein dnaJ C76             | XM_004231452.4 | 3,236207803       | 5,22E-10 |
| ER-sHSP                              | NM_001247671.2 | -4,374602159      | 4,07E-07 |

**Tablo 4.6:** (devam)

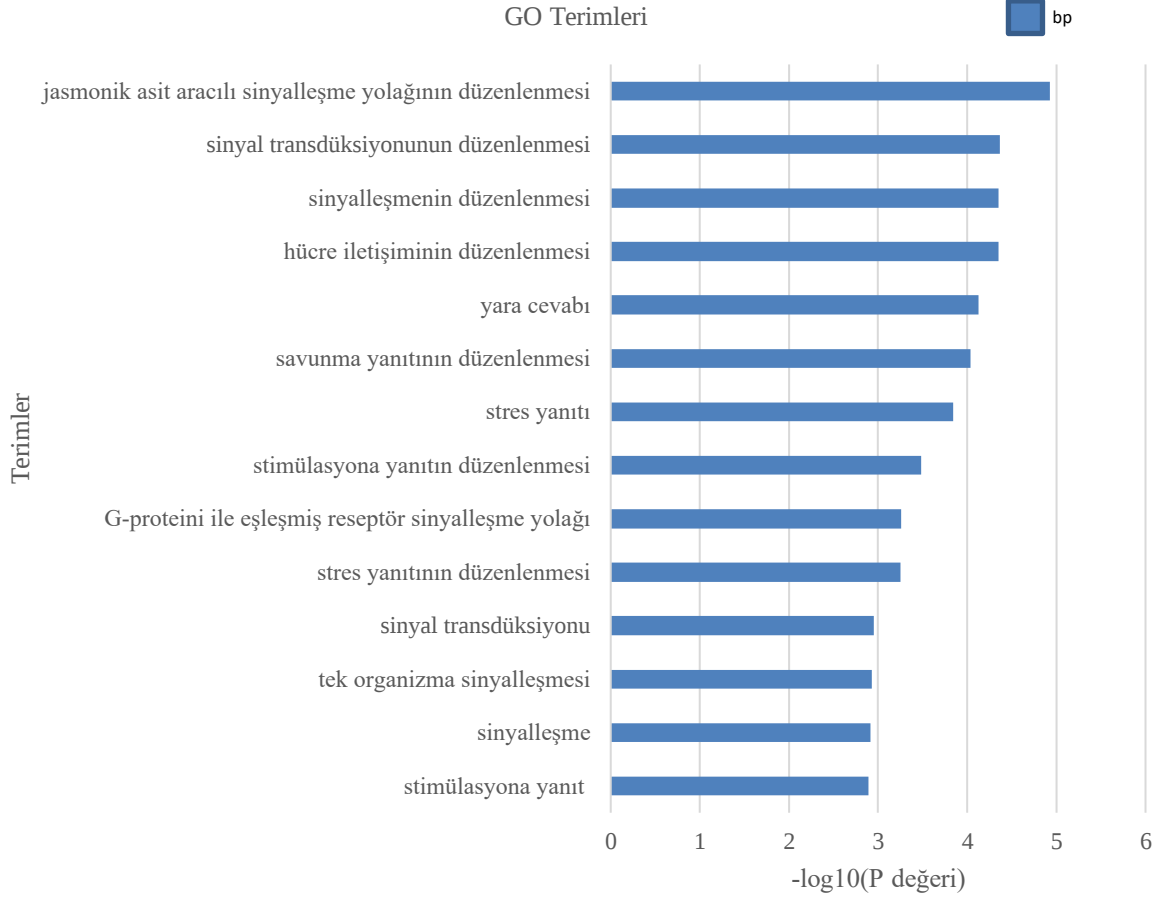
|                                          |                |              |             |
|------------------------------------------|----------------|--------------|-------------|
| Peroksidaz 44-benzeri                    | XM_004247458.4 | 2,207731227  | 5,32E-07    |
| HSP17.8                                  | NM_001279116.2 | -2,812210013 | 6,52E-07    |
| 15.7 kDa HSP, peroksizomal               | XM_004236641.4 | -2,385302906 | 1,76E-06    |
| HSP90                                    | NM_001321563.1 | -2,660179214 | 6,29E-06    |
| Şaperon protein ClpB1                    | XM_004235918.4 | -1,972590116 | 8,30E-06    |
| Şaperon protein dnaJ 11                  | XM_010325932.3 | -2,323823899 | 9,40E-06    |
| Ubikitin domen içeren protein 2          | XM_004244238.4 | -2,619667071 | 1,05E-05    |
| HSP70                                    | NM_001246851.2 | -2,308374561 | 1,90E-05    |
| Gibberellin 20-oksidaz-1 (GA20ox1)       | NM_001247141.1 | 4,65548411   | 3.14E-05    |
| Ubikitin konjuge enzim E2 20             | XM_004250863.4 | 1,812488714  | 0,000169917 |
| E3 ubikitin protein ligaz MPSR1          | XM_004238775.4 | -3,24604211  | 0,000248906 |
| HSP83                                    | XM_004234170.4 | -1,996527761 | 0,000288252 |
| E3 ubikitin protein ligaz RHA1B          | XM_004245531.4 | -1,694385958 | 0,000307213 |
| Şaperon protein dnaJ                     | XM_010320157.3 | -1,752328625 | 0,000372914 |
| Şaperon protein dnaJ 8                   | XM_004241628.4 | -1,865874277 | 0,000627181 |
| E3 ubikitin-protein ligaz PUB22 benzeri  | XM_010317379.2 | -1,472869186 | 0,002660538 |
| HSP binding protein (BiP)                | NM_001246906.2 | -2,166006535 | 0,002762583 |
| 17.7 kDa sınıf I HSP                     | XM_004241153.4 | -5,182669146 | 0,002781383 |
| Kalmodulin bağlayıcı protein 60A benzeri | XM_010320629.3 | -1,725807635 | 0,002844745 |
| Glutasyon peroksidaz                     | NM_001247638.2 | -1,51101334  | 0,016693607 |
| AAA-tipi ATPaz ailesi proteini           | NM_001346867.1 | 1,299667069  | 0,025945196 |
| Katalaz 2                                | NM_001247257.2 | -1,540815628 | 0,044380129 |

#### 4.5.2. Gen Ontoloji Analizleri

Dizileme reaksiyonları sonucu anlatım değişimi gösterdiği tespit edilen genler 3 temel gen ontoloji terimi kategorilerine göre sınıflandırılmıştır. Biyolojik prosesler, ‘Biological processes’ (bp), hücresel bölümlendirme ‘cellular compartmentalization’ (cc) ve moleküler fonksiyon ‘molecular function’ (mf) gen ontoloji sınıflarına göre anlatım değişimi gösteren genler kategorize edilmiş ve GO zenginleştirme analizlerine göre 2 saat ve 6 saatlik ER stresi indüksiyonunda en anlamlı şekilde zenginleştirilmiş GO terimleri Şekil 4.15 ve Şekil 4.16’da gösterilmiştir. 2 saat ER stresi uygulanan örneklerde toplam 24 GO terimi anlamlı şekilde zenginleştirilmişken 6 saat ER stresi uygulanan örneklerde 14 GO terimi anlamlı olarak zenginleştirilmiştir (FDR<0,05).



**Şekil 4.15:** 2 saat boyunca ER stresi indüklenmiş domates yapraklarında anlatımı değişen genlerin ait olduğu GO kategorilerinde anlamlı şekilde zenginleştirilmiş terimler ve  $p$  değerleri.



**Şekil 4.16:** 6 saat boyunca ER stresi indüklenmiş domates yapraklarında anlatımı değişen genlerin ait olduğu GO kategorilerinde anlamlı şekilde zenginleştirilmiş terimler ve  $p$  değerleri.

2 saat boyunca ER stresi indüklenmiş örneklerin kontrol koşuluna göre kıyaslamasında anlatımı değişen genlerin bp gen ontoloji sınıfı altında zenginleştirme analizi yapıldığında anlatımının arttığı görülen genlerin listesi ve ait olduğu bp terimleri Tablo 4.7 'te gösterilmiştir. Anlatımı azalan genler ve bp terimleri ise Tablo 4.8.'te listelenmiştir.

**Tablo 4.7:** 2 saat stres indüksiyonu yapılmış örneklerde bp (biological process) GO sınıfı için anlatımı artan genlerin ait olduğu zenginleştirilmiş terimlerin ve genlerin listesi (FDR <0,05).

| Kategori   | Terim                       | Sayı | P değeri    | Genler                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | FDR        |
|------------|-----------------------------|------|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| GO:0009628 | Abiyotik stimülasyona yanıt | 11   | 8.00E-05    | NM_001246971, XM_004247716, U86662, AK246348, XM_004252271, AW030225, NM_001247823, NM_001247724, NM_001247828, AK327655, BI206608, BW692869, XM_004236641, U59917, DB710482, BW692353, AK326370, U66300, XM_004243702, DB726677, XM_004237889, AY623905, XM_004235486, AK324600, EF441355, EF441354, NM_001247052, BT014113 | 0.03105082 |
| GO:0009408 | Sıcaklığa yanıt             | 6    | 0.000102817 | U66300, XM_004243702, NM_001246971, AK246348, DB726677, XM_004252271, NM_001247724, AK327655, AY623905, BW692869, XM_004235486, XM_004236641, U59917, BT014113                                                                                                                                                               | 0.03105082 |

**Tablo 4.8:** 2 saat stres indüksiyonu yapılmış örneklerde bp (biological process) GO sınıfı için anlatımı azalan genlerin ait olduğu zenginleştirilmiş terimlerin ve genlerin listesi (FDR <0,05).

| Kategori   | Terim                                 | Sayı | P değeri | Genler                                                                                                                                                   | FDR             |
|------------|---------------------------------------|------|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| GO:0009611 | Yara cevabı                           | 7    | 2.79E-06 | XM_004243648, NM_001247090, XM_010320353, NM_001247954, XM_010320352, XM_004235723, NM_001247294, XM_004244871, XM_004244872, XM_019211978               | 0.00039343<br>6 |
| GO:0009966 | Sinyal transdüksiyonunun düzenlenmesi | 9    | 5.65E-06 | XM_004243648, XM_004232936, XM_010320353, NM_001247954, XM_010320352, XM_004235723, NM_001247838, NM_001247294, XM_010323205, XM_004244871, XM_004244872 | 0.00053702<br>5 |
| GO:0010646 | Hücre iletişiminin düzenlenmesi       | 9    | 6.10E-06 | XM_004243648, XM_004232936, XM_010320353, NM_001247954, XM_010320352, XM_004235723, NM_001247838, NM_001247294, XM_010323205, XM_004244871, XM_004244872 | 0.00053702<br>5 |
| GO:0023051 | Sinyalleşmenin düzenlenmesi           | 9    | 6.10E-06 | XM_004243648, XM_004232936, XM_010320353, NM_001247954, XM_010320352, XM_004235723, NM_001247838, NM_001247294, XM_010323205, XM_004244871, XM_004244872 | 0.00053702<br>5 |

Tablo 4.8: (devam)

|            |                                          |    |          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |             |
|------------|------------------------------------------|----|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| GO:0006952 | Savunma yanıtı                           | 22 | 9.14E-06 | NM_001247547, XM_004240509, NM_001247904, XM_004237435, XM_004252915, XM_010323205, NM_001247487, XM_010326319, NM_001246962, XM_026032142, NM_001247830, XM_004245604, NM_001321130, XM_004235762, XM_004251596, NM_001247919, NM_001317104, XM_026031817, XM_004232936, XM_026031818, NM_001247090, XM_026031816, XM_010324006, XM_004229716, XM_004246993, XM_004244551, XM_004243467, XM_019211978               | 0.000715304 |
| GO:0080134 | Stres yanıtının düzenlenmesi             | 8  | 1.48E-05 | NM_004243648, NM_001247090, XM_010320353, NM_001247954, XM_010320352, XM_004235723, NM_001247294, XM_010323205, XM_004244871, XM_004244872, XM_019211978                                                                                                                                                                                                                                                             | 0.001041215 |
| GO:0071554 | Hücre duvarı organizasyonu ve biyogenezi | 15 | 1.65E-05 | NM_001247546, NM_001247832, NM_001247543, XM_004235108, NM_001347333, NM_001247906, XM_004238770, NM_001309261, XM_004235233, NM_001310316, XM_004230324, XM_004252915, XM_004241223, NM_001247088, XM_004229323                                                                                                                                                                                                     | 0.001053558 |
| GO:0048583 | Stimülasyona yanıtın düzenlenmesi        | 10 | 4.12E-05 | NM_004243648, NM_001247954, XM_004235723, NM_001247838, XM_004232936, NM_001247090, XM_010320353, XM_010320352, NM_001247294, XM_010323205, XM_004244871, XM_004244872, XM_019211978                                                                                                                                                                                                                                 | 0.002416817 |
| GO:0007165 | Sinyal transdüksiyonu                    | 22 | 7.25E-05 | NM_001247547, NM_001247526, XM_004240509, XM_004237435, NM_001279159, XM_004246220, XM_010320353, XM_004233715, XM_010320352, XM_010323205, XM_004243648, NM_001247954, NM_001246986, XM_004235723, XM_004233005, NM_001247838, XM_004230792, NM_001317104, XM_026031817, XM_004232936, XM_026031818, NM_001247090, XM_026031816, XM_004237507, NM_001247294, XM_010328927, XM_004244871, XM_004244872, XM_019211978 | 0.003928224 |
| GO:0044700 | Tek organizma sinyalleşmesi              | 22 | 8.33E-05 | NM_001247547, NM_001247526, XM_004240509, XM_004237435, NM_001279159, XM_004246220, XM_010320353, XM_004233715, XM_010320352, XM_010323205, XM_004243648, NM_001247954, NM_001246986, XM_004235723, XM_004233005, NM_001247838, XM_004230792, NM_001317104, XM_026031817, XM_004232936, XM_026031818, NM_001247090, XM_026031816, XM_004237507, NM_001247294, XM_010328927, XM_004244871, XM_004244872, XM_019211978 | 0.004189692 |

**Tablo 4.8:** (devam)

|                   |                                               |    |             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |             |
|-------------------|-----------------------------------------------|----|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>GO:0023052</b> | sinyalleşme                                   | 22 | 9.23E-05    | NM_001247547, NM_001247526, XM_004240509, XM_004237435, NM_001279159, XM_004246220, XM_010320353, XM_004233715, XM_010320352, XM_010323205, XM_004243648, NM_001247954, NM_001246986, XM_004235723, XM_004233005, NM_001247838, XM_004230792, NM_001317104, XM_026031817, XM_004232936, XM_026031818, NM_001247090, XM_026031816, XM_004237507, NM_001247294, XM_010328927, XM_004244871, XM_004244872, XM_019211978 | 0.004332763 |
| <b>GO:0071555</b> | Hücre duvarı organizasyonu                    | 11 | 0.000227943 | NM_001247546, NM_001247832, NM_001247543, XM_004230324, XM_004235108, NM_001247906, XM_004238770, NM_001309261, NM_001310316, NM_001247088, XM_004229323                                                                                                                                                                                                                                                             | 0.009747626 |
| <b>GO:0045229</b> | Hücre dışını çevreleyen yapının organizasyonu | 11 | 0.000235383 | NM_001247546, NM_001247832, NM_001247543, XM_004230324, XM_004235108, NM_001247906, XM_004238770, NM_001309261, NM_001310316, NM_001247088, XM_004229323                                                                                                                                                                                                                                                             | 0.009747626 |
| <b>GO:0007154</b> | Hücre iletişimi                               | 22 | 0.000635514 | NM_001247547, NM_001247526, XM_004240509, XM_004237435, NM_001279159, XM_004246220, XM_010320353, XM_004233715, XM_010320352, XM_010323205, XM_004243648, NM_001247954, NM_001246986, XM_004235723, XM_004233005, NM_001247838, XM_004230792, NM_001317104, XM_026031817, XM_004232936, XM_026031818, NM_001247090, XM_026031816, XM_004237507, NM_001247294, XM_010328927, XM_004244871, XM_004244872, XM_019211978 | 0.024855658 |

2 saat boyunca ER stresi indüklenmiş örneklerde anlatımı değişen genlerden cc GO kategorisine ait terimlerden anlamlı şekilde zenginleştirilmiş olanlar Tablo 4.9’da verilmiştir. Anlamlı olarak zenginleştirilmiş terimlerin tamamı anlatımı azalan genleri içermektedir. 2 saat ER stresinde anlatım artışı gösteren genlerden cc GO kategorisi terimleri için anlamlı bir zenginleştirme gerçekleşmemiştir.

**Tablo 4.9:** 2 saat stres indüksiyonu yapılmış örneklerde kontrole göre cc (cellular compartmentalization) GO sınıfı için anlatımı azalan genlerin ait olduğu terimlerin ve genlerin listesi. (FDR <0,05).

| Kategori   | Terim                        | Sayı | P değeri    | Genler                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | FDR         |
|------------|------------------------------|------|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| GO:0005576 | Hücre dışı bölge             | 22   | 2.00E-05    | NM_001247546, NM_001247832, NM_001247543, NM_001309377, NM_001247900, XM_004232664, XM_004235108, NM_001247906, XM_004238770, NM_001309261, NM_001310316, XM_004235762, NM_001320857, XM_004230324, XM_004240094, NM_001302921, XM_004240042, XM_004248615, XM_004252915, XM_004250839, XM_004243642, NM_001247088                                                                                                                 | 0.001152463 |
| GO:0030312 | Hücre dışını çevreleyen yapı | 13   | 6.42E-05    | NM_001247546, NM_001247832, NM_001247543, XM_004232664, XM_004235108, NM_001247906, XM_004238770, NM_001309261, NM_001310316, XM_004230324, XM_004240094, NM_001247388, NM_001247088                                                                                                                                                                                                                                               | 0.001846273 |
| GO:0005618 | Hücre duvarı                 | 13   | 6.42E-05    | NM_001247546, NM_001247832, NM_001247543, XM_004232664, XM_004235108, NM_001247906, XM_004238770, NM_001309261, NM_001310316, XM_004230324, XM_004240094, NM_001247388, NM_001247088                                                                                                                                                                                                                                               | 0.001846273 |
| GO:0048046 | Apoplast                     | 8    | 0.000462932 | NM_001247546, NM_001247543, XM_004248615, XM_004235108, NM_001247906, NM_001309261, XM_004243642, NM_001310316                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 0.010647429 |
| GO:0005886 | Hücre zarı                   | 29   | 0.000594115 | NM_001247324, XM_004240509, NM_001348445, XM_010324021, XM_004237116, XM_004235233, XM_004232420, XM_004247453, XM_004231215, XM_004243193, XM_004229562, NM_001247487, NM_001247484, NM_001247342, NM_001247677, XM_004235463, NM_001329215, XM_004243601, NM_001321130, XM_004251596, XM_004233409, XM_004232936, XM_026028879, XM_010325598, XM_004248591, XM_004250329, XM_004241223, XM_004246993, XM_004243467, XM_010320867 | 0.011387195 |

2 saat örnekleri kontrole göre kıyaslanıp mf GO kategorisine ait terimler için analiz edildiğinde anlatımı azalan genler için anlamlı şekilde zenginleştirilmiş bir GO terimi tespit edilmemiştir. Anlatım artışı gösteren genlerin anlamlı olarak zenginleştirilen mf GO terimlerine göre sınıflandırılması Tablo 4.10'da verilmiştir.

**Tablo 4.10:** 2 saat stres indüksiyonu yapılmış örneklerde kontrole göre mf (molecular function) GO kategorisi için anlatımı artan genlerin ait olduğu terimlerin ve genlerin listesi. (FDR < 0,05).

| Kategori   | Terim                                                               | Sayı | P değeri        | Genler                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | FDR             |
|------------|---------------------------------------------------------------------|------|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| GO:0003677 | DNA bağlama                                                         | 35   | 1.18E-05        | NM_001329523, XM_019212950, XM_010314475, AK328401, XM_004233634, XM_004235136, AK321449, AY034473, AK321565, AK323986, GQ496337, NM_001247460, BP895457, AI896177, NM_001246892, XM_004243945, AK324390, Z11842, XM_010315613, XM_004243702, NM_001247912, NM_001309366, NM_001247519, MF095101, XM_004230592, MF095100, AK322526, AK322126, AY192370, BP887254, NM_001247194, AJ715788, XM_004241246, AW039518, MF113381, MF113382, BT013291, AK246681, XM_004251842, AK321300, NM_001319178, NM_001345837, XM_019212814, XM_004244019, AK328435, CK715147, XM_010321080, XM_004235944, AK224660, EU755369, XM_010315517, XM_004236113, XM_004251699, BT013228, AI488773, GQ261228, GT167832, XM_010323933, AK321091, XM_004231908, XM_019214651, AK327477, XM_004240928, XR_003244297, XM_004251260, AY044236, XR_003244296, MF095099, XM_004250697, NM_001247384, AW041100, DB701336, AK324191, NM_001320184, AK329700, AJ224931, AK247342, ES892379, AK321990, AI488278, AK323010, AK323372, AK322284, AK323092, AK328503, AW443045, AI894656, MF095102, DY523910, XM_004249119, NM_001247576, AK224625, NM_001347388, XM_004236951, XM_004251654, BT012856, AK320884, XM_004249902, EU636698, AK319935 | 0.0031203<br>84 |
| GO:0003700 | Transkripsiyon faktörü aktivitesi,<br><br>Dizi-spesifik DNA bağlama | 21   | 0.000338<br>952 | NM_001247789, XM_019212950, XM_010314475, AK328401, AY044236, XM_004240928, XR_003244297, XM_004251260, HQ738351, NM_001279257, XM_004235136, XR_003244296, MF095099, AY034473, GQ496337, BI921623, NM_001247384, NM_001246892, KT236084, AK324590, AK324390, XM_004243702, EF667346, NM_001247912, AK329700, AK246932, MF095101, MF095100, AK247342, AK322526, AK322126, AY192370, BP887254, AK321990, AK323010, NM_001247194, AJ715788, HM061128, AW039518, MF113381, MF113382, BT013291, MF095102, XM_004234507, AK321300, BT013336, XM_004249119, XM_019212814, NM_001247576, XM_004244019, AK224625, AK328435, CK715147, NM_001347388, XM_004235944, XM_004236951, EU755369, XM_004251654, AK320126, AK320884, BT013228, AK321498, AK319935, XM_010323933, XM_004231908                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 0.0298278<br>06 |

**Tablo 4.10:** (devam)

|                   |                                                          |    |                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                 |
|-------------------|----------------------------------------------------------|----|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| <b>GO:0001071</b> | Nükleik asite bağlanan transkripsiyon faktörü aktivitesi | 21 | 0.000338<br>952 | NM_001247789, XM_019212950, XM_010314475, AK328401, AY044236, XM_004240928, XR_003244297, XM_004251260, HQ738351, NM_001279257, XM_004235136, XR_003244296, MF095099, AY034473, GQ496337, BI921623, NM_001247384, NM_001246892, KT236084, AK324590, AK324390, XM_004243702, EF667346, NM_001247912, AK329700, AK246932, MF095101, MF095100, AK247342, AK322526, AK322126, AY192370, BP887254, AK321990, AK323010, NM_001247194, AJ715788, HM061128, AW039518, MF113381, MF113382, BT013291, MF095102, XM_004234507, AK321300, BT013336, XM_004249119, XM_019212814, NM_001247576, XM_004244019, AK224625, AK328435, CK715147, NM_001347388, XM_004235944, XM_004236951, EU755369, XM_004251654, AK320126, AK320884, BT013228, AK321498, AK319935, XM_010323933, XM_004231908 | 0.02982780<br>6 |
|-------------------|----------------------------------------------------------|----|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|

6 saat boyunca ER stresi indüklenmiş örneklerin kontrole göre kıyaslanmasıyla yapılan zenginleştirme analizlerinde anlatımı azalan genlerin bp GO kategorisine ait zenginleştirilmiş terimlere göre listesi Tablo 4.11’de verilmiştir. Anlatımı artan genler için zenginleştirilmiş bir bp terimi tespit edilmemiştir. 6 saat uygulamaları kontrole göre kıyaslandığında anlatımı değişen transkriptler arasında cc GO kategorisine ait anlamlı şekilde zenginleştirilmiş GO terimi tespit edilememiştir. Aynı şekilde mf kategorisi GO terimleri için zenginleştirme analizleri yapıldığında da anlamlı şekilde zenginleştirilmiş bir terim görülmemiştir.

**Tablo 4.11:** 6 saat uygulama örneklerinde kontrole göre bp (biological process) GO kategorisi için anlatımı azalan genlerin ait olduğu terimlerin ve genlerin listesi. (FDR<0,05).

| Kategori          | Terim                                                    | Sayı | P değeri | Genler                                                               | FDR         |
|-------------------|----------------------------------------------------------|------|----------|----------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>GO:2000022</b> | jasmonik asit aracılı sinyalleşme yolağının düzenlenmesi | 4    | 1.19E-05 | NM_001247954, NM_001247294, XM_004244871, XM_004244872               | 0.003241157 |
| <b>GO:0009966</b> | Sinyal transdüksiyonunun düzenlenmesi                    | 5    | 4.28E-05 | XM_004232936, NM_001247954, NM_001247294, XM_004244871, XM_004244872 | 0.003241157 |
| <b>GO:0023051</b> | Sinyalleşmenin düzenlenmesi                              | 5    | 4.46E-05 | XM_004232936, NM_001247954, NM_001247294, XM_004244871, XM_004244872 | 0.003241157 |
| <b>GO:0010646</b> | Hücre iletişiminin düzenlenmesi                          | 5    | 4.46E-05 | XM_004232936, NM_001247954, NM_001247294, XM_004244871, XM_004244872 | 0.003241157 |

Tablo 4.11: (devam)

|            |                                                    |    |             |                                                                                                                                                                                                                                                            |             |
|------------|----------------------------------------------------|----|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| GO:0009611 | Yara cevabı                                        | 4  | 7.45E-05    | NM_001247954, NM_001247294, XM_004244871, XM_004244872                                                                                                                                                                                                     | 0.00433708  |
| GO:0031347 | Savunma yanıtının düzenlenmesi                     | 4  | 9.27E-05    | NM_001247954, NM_001247294, XM_004244871, XM_004244872                                                                                                                                                                                                     | 0.004495776 |
| GO:0006950 | Strese yanıt                                       | 12 | 0.000143642 | XM_004245604, NM_001247547, NM_001247954, NM_001247009, XM_004240509, NM_001247904, XM_004250354, XM_026031817, NM_001317104, XM_004232936, XM_026031818, XM_026031816, NM_001247294, XM_004244871, XM_004244872, XM_004248687                             | 0.005971401 |
| GO:0048583 | Stimülasyona yanıtın düzenlenmesi                  | 5  | 0.000331818 | XM_004232936, NM_001247954, NM_001247294, XM_004244871, XM_004244872                                                                                                                                                                                       | 0.012069864 |
| GO:0007186 | G-protein ile eşleşmiş reseptör sinyalleşme yolağı | 3  | 0.00055108  | XM_026031817, NM_001317104, XM_026031818, NM_001247547, XM_004240509, XM_004230792                                                                                                                                                                         | 0.016444558 |
| GO:0080134 | Strese yanıtın düzenlenmesi                        | 4  | 0.000565105 | NM_001247954, NM_001247294, XM_004244871, XM_004244872                                                                                                                                                                                                     | 0.016444558 |
| GO:0007165 | Sinyal transdüksiyonu                              | 8  | 0.00111182  | XM_026031817, NM_001317104, XM_004232936, XM_026031818, XM_026031816, NM_001247547, NM_001247954, XM_004240509, NM_001247294, XM_004244871, XM_004230792, XM_004244872                                                                                     | 0.026693389 |
| GO:0044700 | Tek organizma sinyalleşmesi                        | 8  | 0.001177185 | XM_026031817, NM_001317104, XM_004232936, XM_026031818, XM_026031816, NM_001247547, NM_001247954, XM_004240509, NM_001247294, XM_004244871, XM_004230792, XM_004244872                                                                                     | 0.026693389 |
| GO:0023052 | Sinyalleşme                                        | 8  | 0.001228182 | XM_026031817, NM_001317104, XM_004232936, XM_026031818, XM_026031816, NM_001247547, NM_001247954, XM_004240509, NM_001247294, XM_004244871, XM_004230792, XM_004244872                                                                                     | 0.026693389 |
| GO:0050896 | Stimülasyona yanıt                                 | 14 | 0.001284218 | XM_004245604, NM_001247547, NM_001247954, NM_001247009, XM_004240509, NM_001247818, NM_001247904, XM_004230792, XM_004250354, XM_026031817, NM_001317104, XM_004232936, XM_026031818, XM_026031816, NM_001247294, XM_004244871, XM_004244872, XM_004248687 | 0.026693389 |

#### 4.5.3. KEGG Metabolik Yolak Analizleri

2 saatlik ER stresi uygulamasının sonunda kontrole göre anlatım değişimi görülen genlerin listesi ve ait olduğu KEGG metabolik yolları anlatımı azalan genler için Tablo 4.12’de verilmiştir. Anlatımı artan genlerin KEGG yolları için anlamlı bir sınıflandırma yapılamamıştır. 6 saatlik uygulamada da kontrole göre yapılan kıyaslamalarda anlatım değişimi görülen transkriptler için anlamlı bir KEGG yolağı tespit edilememiştir.

**Tablo 4.12:** 2 saat ER stresi uygulamasında kontrole göre değişen anlatım göstermiş DEG’ler için zenginleştirilmiş KEGG terimleri.

| Kategori | Terim                          | Sayı | P değeri | Genler                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | FDR         |
|----------|--------------------------------|------|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| sly00940 | Fenil propanoid biyosentezi    | 14   | 1.46E-05 | XM_004241139, NM_001309805, XM_026033098, XM_004242429, XM_004232664, XM_010313958, NM_001320040, XM_004251764, XM_004240093, XM_004240094, XM_026031765, NM_001302921, NM_001320355, NM_001319172, XM_004231808                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 0.001064714 |
| sly01110 | Sekonder metabolit biyosentezi | 42   | 6.76E-05 | XM_004241139, XM_004253081, NM_001247547, XM_004242429, NM_001246898, XM_004233193, XM_004232664, NM_001309397, NM_001247904, NM_001348361, NM_001347956, NM_001279052, NM_001302921, NM_001320355, XM_004241256, XM_004243632, NM_001309805, XM_026033098, NM_001246944, XM_010313958, XM_004233149, NM_001317104, NM_001309881, NM_001319322, XM_004231808, XM_004229851, XM_019211978, NM_001320292, NM_001247687, NM_001247726, NM_001247526, XM_004240509, XM_004251764, XM_026031765, NM_001319172, XM_019211274, NM_001321372, XM_004238813, NM_001247818, NM_001320040, XM_004237202, XM_026031817, XM_026031818, NM_001247090, XM_026031816, XM_004240093, XM_004240094, XM_004249187, NM_001247691, NM_001331130 | 0.00246594  |

Tablo 4.12: (devam)

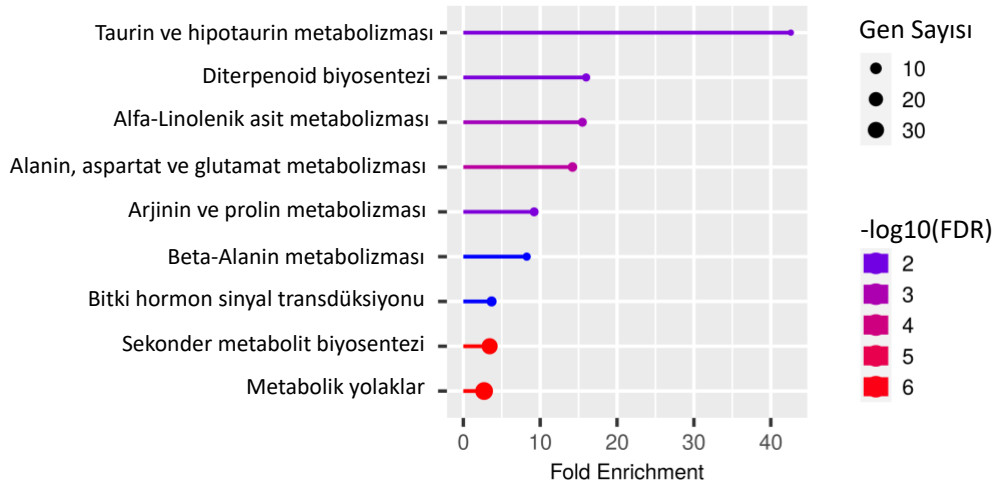
|          |                       |    |                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |             |
|----------|-----------------------|----|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| sly01100 | Metabolik<br>yolaklar | 60 | 0.00050646<br>9 | XM_004241139,<br>XM_004242429,<br>XM_004232664,<br>NM_001348361,<br>NM_001347956,<br>NM_001302921,<br>XM_004243632,<br>XM_026033098,<br>XM_010313958,<br>NM_001317104,<br>XM_004248194,<br>XM_004243148,<br>XM_019211978,<br>NM_001247687,<br>XM_026030111,<br>NM_001347333,<br>XR_003246659,<br>XM_004250839,<br>XM_004238777,<br>XM_004238813,<br>XM_004237202,<br>NM_001247090,<br>XM_004240094,<br>NM_001247450, XM_004228466 | XM_004253081,<br>NM_001246898,<br>NM_001309397,<br>XM_004229603,<br>NM_001279052,<br>NM_001320355,<br>XM_004229323,<br>NM_001246900,<br>XM_004233149,<br>XR_002027179,<br>NM_001319322,<br>XM_004231808,<br>NM_001320292,<br>NM_001247726,<br>XM_004240509,<br>XM_004235597,<br>XM_010322397,<br>NM_001319172,<br>XM_019211274,<br>NM_001320040,<br>XM_026031817,<br>XM_026031816,<br>NM_001331130,<br>NM_001247691, | NM_001247547,<br>XM_004233193,<br>NM_001247904,<br>XM_004232748,<br>XM_004240042,<br>XM_004241256,<br>NM_001309805,<br>NM_001246944,<br>XM_004252565,<br>NM_001309881,<br>NM_001323058,<br>XM_004229851,<br>NM_001247720,<br>NM_001247526,<br>NM_001246916,<br>XM_004251764,<br>XM_026031765,<br>XM_010320539,<br>NM_001321372,<br>XM_004235942,<br>XM_026031818,<br>XM_004240093, | 0.012324073 |
|----------|-----------------------|----|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|

2 saat boyunca tunikamisine maruz kalmış bitkilerin yapraklarında kontrole göre anlatım değişimi gösteren genlerin en çok bulunduğu metabolik yolakların listesi Tablo 4.13'te verilmiştir. Şekil 4.17'de 2 saatte kontrole göre yapılan analizde zenginleştirilen KEGG yolaklarının grafiğinde yolaklara ait tespit edilen gen sayıları ve '*fold enrichment*' kat zenginleştirme değerleri verilmiştir.

**Tablo 4.13:** 2 saat ER stresi uygulamasında kontrole göre en çok anlatım değişimi gösteren geni içeren yollar. (Enrichment FDR < 0,01).

| Enrichment FDR       | Gen sayısı | Yolak Genleri | Fold Enrichment  | Yolak                                      |
|----------------------|------------|---------------|------------------|--------------------------------------------|
| 6.48088553479596e-07 | 39         | 1229          | 2.70430560143077 | Metabolik yollar                           |
| 6.48088553479596e-07 | 29         | 722           | 3.4229759194756  | Sekonder metabolit biyosentezi             |
| 0.000445290205890932 | 5          | 30            | 14.2033828382838 | Alanin, aspartat ve glutamat metabolizması |
| 0.00158919526828906  | 4          | 22            | 15.494599459946  | Alfa-linolenik asit metabolizması          |
| 0.00713678735752565  | 4          | 37            | 9.21300508429221 | Arjinin ve prolin metabolizması            |
| 0.00713678735752565  | 2          | 4             | 42.6101485148515 | Taurin ve hipotaurin metabolizması         |
| 0.00713678735752565  | 3          | 16            | 15.9788056930693 | Diterpenoid biyosentezi                    |

6 saatlik ER stresi indüksiyonuna bitki yapraklarının gösterdiği tepkiye bakıldığında Tablo 4.14'teki yolların kontrol koşuluna göre kıyaslanarak analizler gerçekleştirildiğinde ER stresinden en çok etkilenmiş yollar olduğu tespit edilmiştir.



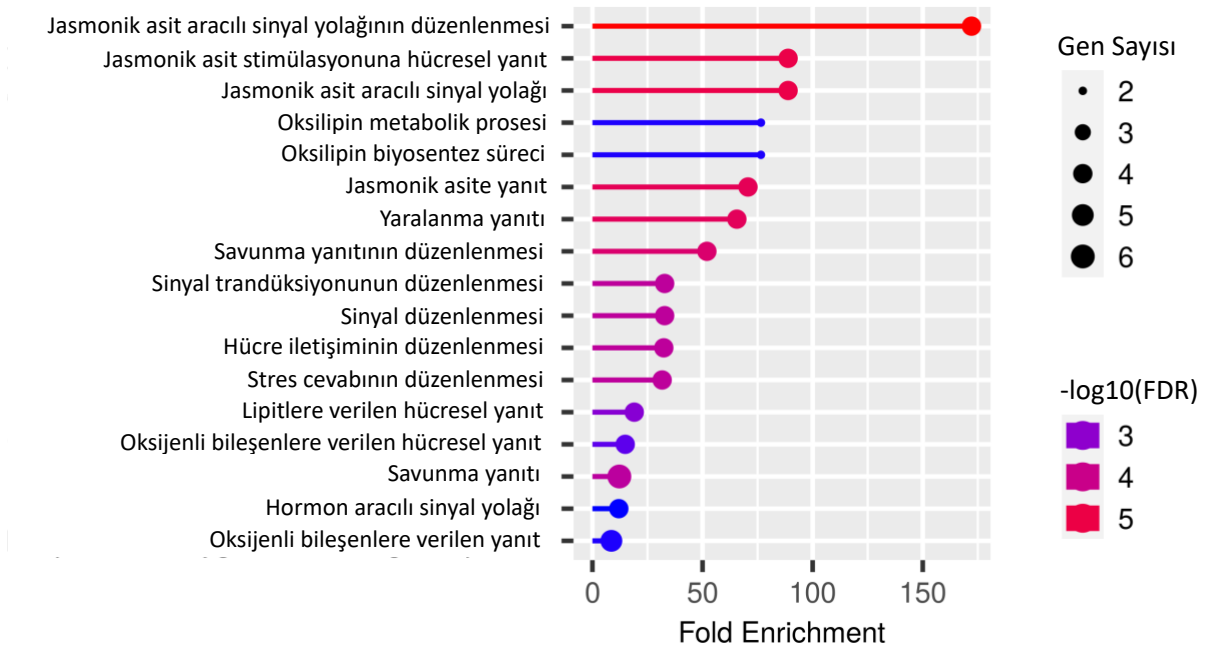
**Şekil 4.17:** 2 saatte kontrole göre anlatımı değişen genlerin ait olduğu zenginleştirilmiş metabolik yollara ait KEGG analizi.

**Tablo 4.14:** 6 saatlik ER stresi indüksiyonu sonrası yapılan analizlerde kontrole göre anlatım değişimi gösteren genlerin ait olduğu metabolik yolların listesi. (Enrichment FDR<0,01).

| Enrichment FDR       | Gen sayısı | Yolak Genleri | Fold Enrichment  | Yolak                                                    |
|----------------------|------------|---------------|------------------|----------------------------------------------------------|
| 1.99356451933187e-06 | 4          | 16            | 172.145          | Jasmonik asit aracılı sinyalleşme yolağının düzenlenmesi |
| 1.13057800583958e-05 | 4          | 31            | 88.8490322580645 | Jasmonik asit stimülasyonuna hücrel yanıt                |
| 1.13057800583958e-05 | 4          | 31            | 88.8490322580645 | Jasmonik asit sinyalleşme yolağı                         |
| 1.75813220744673e-05 | 4          | 37            | 74.4410810810811 | Yağ asitlerine hücrel yanıt                              |
| 1.75813220744673e-05 | 4          | 39            | 70.6235897435897 | Jasmonik asite yanıt                                     |
| 1.98739009933807e-05 | 4          | 42            | 65.5790476190476 | Yara cevabı                                              |
| 2.2603158566857e-05  | 4          | 45            | 61.2071111111111 | Yağ asidi yanıtı                                         |
| 3.85390520415858e-05 | 4          | 53            | 51.9683018867925 | Savunma yanıtının düzenlenmesi                           |
| 0.000187294465610833 | 4          | 84            | 32.7895238095238 | Sinyal transdüksiyonunun düzenlenmesi                    |
| 0.000187294465610833 | 4          | 85            | 32.4037647058824 | Hücre iletişiminin düzenlenmesi                          |
| 0.000187294465610833 | 4          | 84            | 32.7895238095238 | Sinyalleşmenin düzenlenmesi                              |
| 0.000188336598264858 | 4          | 87            | 31.6588505747126 | Stres yanıtının düzenlenmesi                             |
| 0.000205166517047743 | 6          | 338           | 12.2233136094675 | Savunma yanıtı                                           |
| 0.00120434074401814  | 4          | 145           | 18.9953103448276 | Lipidlere hücrel yanıt                                   |
| 0.00212831094491032  | 4          | 171           | 16.107134502924  | Stimülasyona yanıtın düzenlenmesi                        |
| 0.00270021753695196  | 4          | 185           | 14.8882162162162 | Oksijen taşıyan bileşenlere hücrel yanıt                 |
| 0.00462444435339946  | 2          | 18            | 76.5088888888889 | Oksilipin metabolik süreci                               |
| 0.00462444435339946  | 2          | 18            | 76.5088888888889 | Oksilipin biyosentez süreci                              |
| 0.00462444435339946  | 5          | 400           | 8.60725          | Oksijen taşıyan bileşenlere yanıt                        |
| 0.00495097757262379  | 4          | 230           | 11.9753043478261 | Hormon aracılı sinyalleşme yolağı                        |
| 0.00495193378782759  | 4          | 233           | 11.8211158798283 | Lipidlere yanıt                                          |

**Tablo 4.14:** (devam)

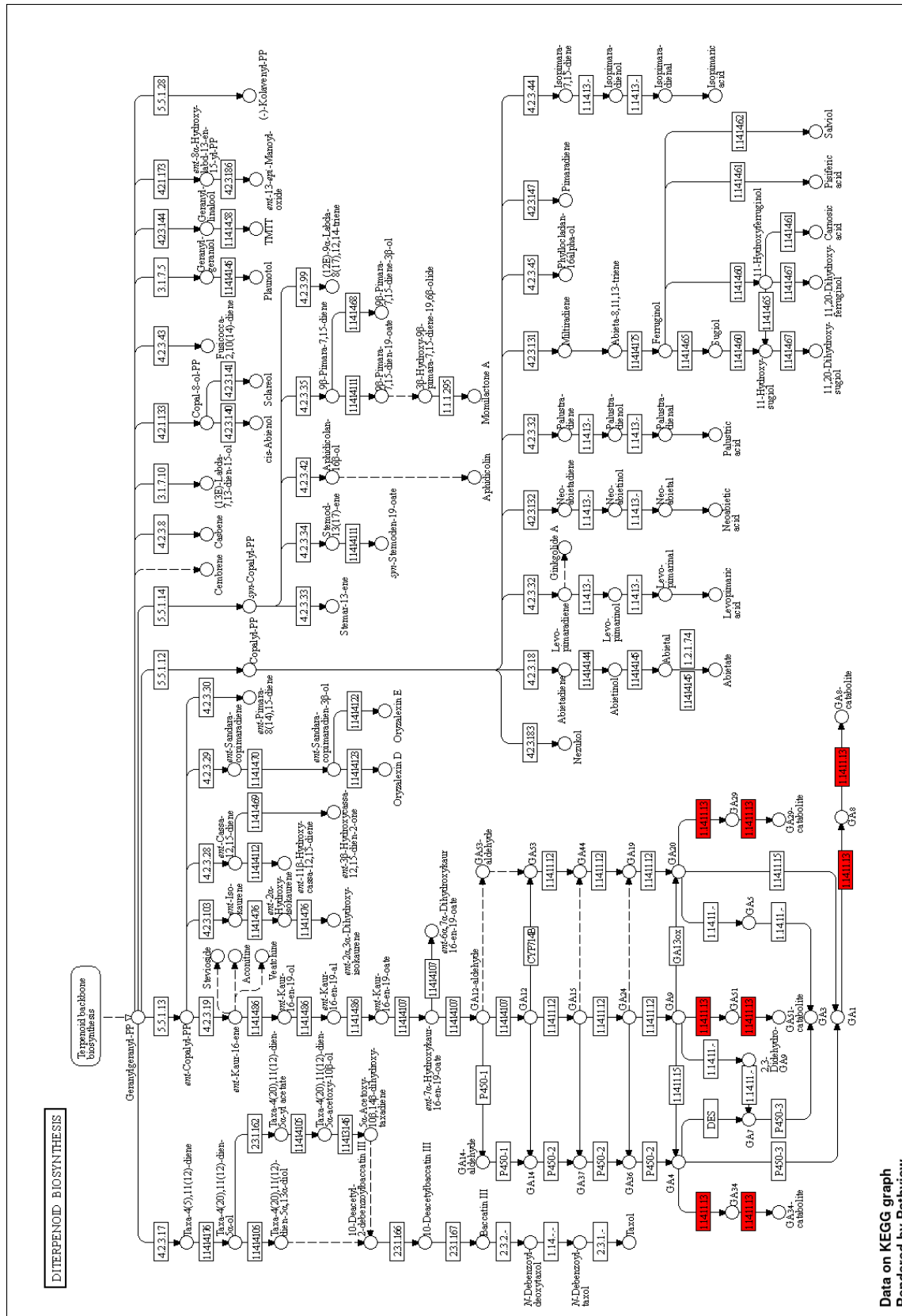
|                     |   |     |                  |                                      |
|---------------------|---|-----|------------------|--------------------------------------|
| 0.00536900659475959 | 4 | 241 | 11.4287136929461 | Hormon stimülasyonuna hücresel yanıt |
| 0.00580727663135732 | 4 | 249 | 11.0615261044177 | Endojen stimülasyona hücresel yanıt  |
| 0.00860285727527406 | 2 | 28  | 49.1842857142857 | Fosfolipit taşınımı                  |
| 0.00860285727527406 | 4 | 281 | 9.80185053380783 | Organik maddelere hücresel yanıt     |

**Şekil 4.18:** 6 saatlik ER stresi uygulamasında kontrole göre anlatımı değişen genlerin ait olduğu zenginleştirilmiş metabolik yollara ait KEGG analizi.

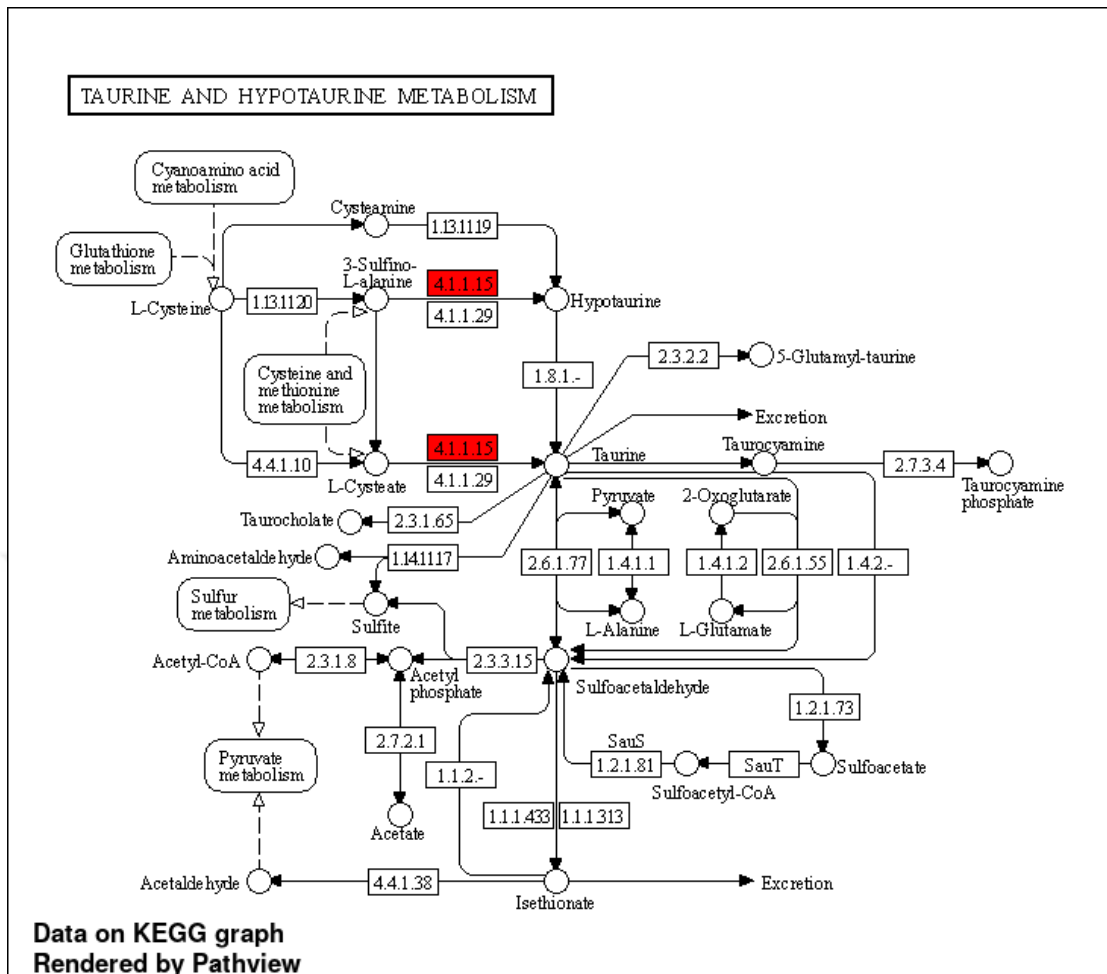
Şekil 4.18’de 6 saat ER stresi indüklenmiş domates yapraklarında kontrole göre yapılan kıyaslamalarda tespit edilen DEG’ler için KEGG analizi sonucu anlamlı şekilde zenginleştirilmiş KEGG yolları grafik halinde gösterilmiştir. Bu analize göre en yüksek oranda zenginleştirilmiş terim jasmonik asit aracılı sinyalleşme yolağının düzenlenmesi olmuştur.

2 saat ER stresi indüklenmiş örneklere ait anlamlı olarak zenginleştirilmiş KEGG haritaları Şekil 4.19, Şekil 4.20 ve Şekil 4.21’de verilmiştir. Şekil 4.19’da diterpenoid biyosentez yolağı üzerinde giberellin 2-beta dioksigenaz (KEGG:1.1411.13) enziminin anlatımının 2 saatlik tunikamisin uygulamasında değiştiği gösterilmiştir. 2 saatte kontrole göre -2,14 kat değişimi ile anlatımı azalırken, 6 saatte kontrole göre -3,69 ve 6 saatte 2 saate göre -2,26 kat değişimi ile anlatımı azalmıştır.

Şekil 4.20’de taurin ve hipotaurin metabolik yolağı üzerinde görev alan glutamat dekarboksilaz (KEGG:4.1.1.15) enziminin anlatımının 2 saatlik tunikamisin uygulamasında kontrole göre yapılan KEGG analizlerinde anlamlı şekilde etkilendiği gösterilmiştir. GAD3 (NM\_001246898.2) geninin 2 saatte kontrole göre -1,69 kat değişimi ile anlatımının azaldığı görülürken, 6 saat uygulamada kontrole göre anlamlı bir anlatım değişimi görülmemiştir. 6 saat TM uygulamasında 2 saate göre glutamat dekarboksilaz (NM\_001247112.2) geninin anlatımı 1,49 kat değişimi ile artmıştır.



**Şekil 4.19:** Diterpenoid biyosentez yolağı KEGG haritası. Kırmızı ile işaretli kutular anlatımı azalmış genleri gösterir.

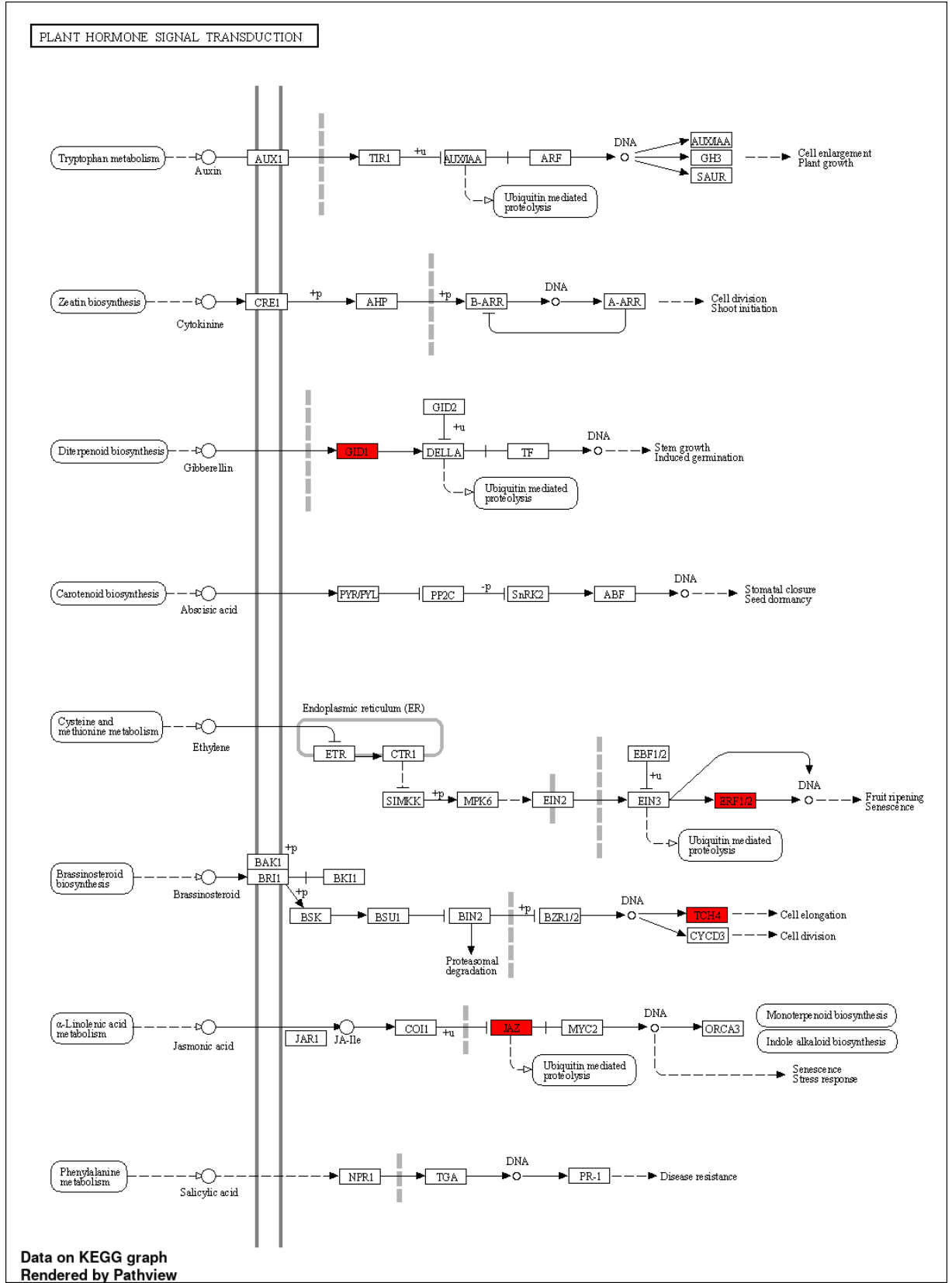


**Şekil 4.20:** Taurin ve hipotaurin metabolizması KEGG haritası. Kırmızı ile işaretli kutular anlatımı azalmış genleri gösterir.

Şekil 4.21'deki KEGG haritasında bitki hormonlarının sinyal transdüksiyonu yolları üzerinde 2 saat TM uygulamasında kontrole göre anlatımı değişen genler gösterilmiştir. Anlatımı etkilenen genlerin bulunduğu sinyal hormonları giberellin, etilen, brassinosteroid ve jasmonik asit olmuştur.

2 saat TM'de kontrole göre, Giberellin reseptörü GID1'in (NM\_001247838.2), -1,88 kat değişimi ile anlatımı azalırken, 6 saat TM'de kontrole ya da 2 saat TM'ye göre yapılan kıyaslamalarda anlamlı bir değişim tespit edilmemiştir.

Etilen yanıt faktörü 1 (NM\_001247919.2)'in, 2 saat TM'de kontrole göre -3,39 kat değişimi ile büyük ölçüde anlatımı baskılanmıştır. ERF4 (NM\_001247384.2), 1,33 kat değişimi ile artmış anlatım göstermiştir. 6 saatte ise anlamlı bir anlatım değişimi görülmemiştir.



**Şekil 4.21:** Bitki hormon sinyal transdüksiyonu KEGG haritası. Kırmızı ile işaretli kutular anlatımı azalmış genleri gösterir.

Brassinosteroid ile düzenlenen sinyal enzimi Ksiloglukan endotransglukozilaz XET2 (KEGG: Ksiloglukozil transferaz TCH4), 2,13 kat değişimi ile 2 saat TM'de kontrole göre artmış anlatım göstermiştir. XTH5 (ksiloglukan endotransglukozilaz-hidrolaz) anlatımı 1,47 kat değişimi ile artarken, XTH7 ve XTH3 anlatımları diğerlerinin aksine azalmıştır. Olası ksiloglukan endotransglukozilaz/hidrolaz protein 23'ün (XM\_004235108.4), -1,99 kat değişimi ile anlatımı 2 saat TM'de azalmış, aynı proteinin 6 saat TM'de 2 saate göre anlatımı da -1,29 kat değişimi ile azalmıştır. XTH3 de 6 saat uygulamada 2 saate göre azalmış anlatım göstermiş (-1,3), XET2'nin de -1,17 kat değişimi ile 2 saat uygulamanın aksine 6 saatte anlatımı azalmıştır.

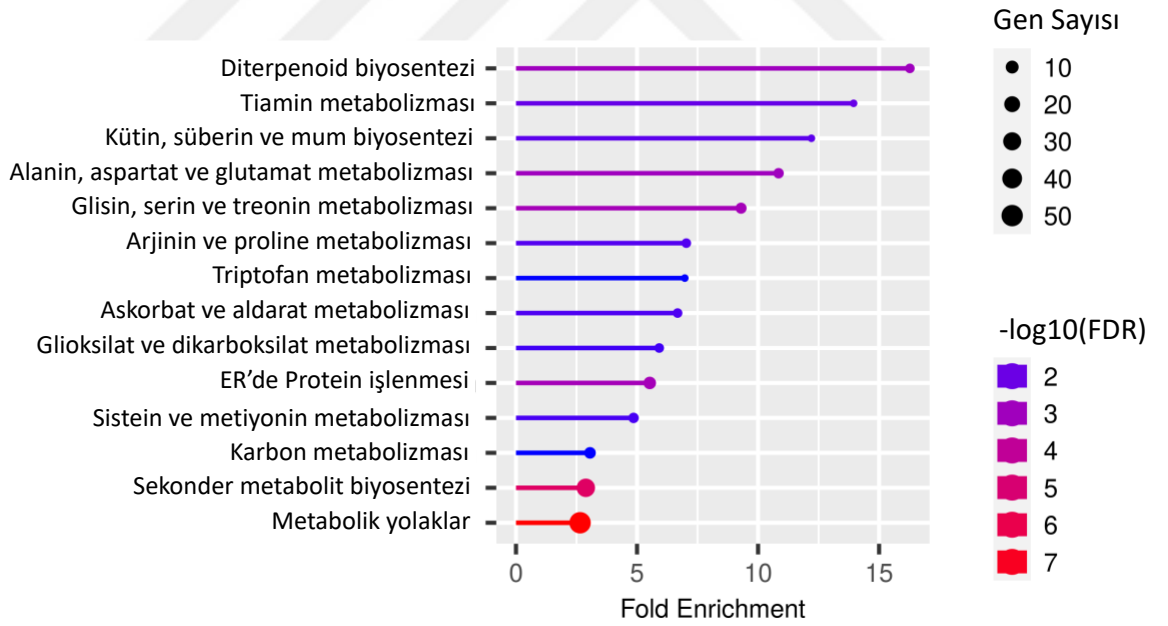
Jasmonik asitle yönetilen sinyalleşme yollarında JAZ, 2 saat TM'de kontrole göre önemli değişim gösteren bir gen olmuştur. 2 saat TM uygulamasında kontrole göre, Jasmonat ZIM-domeni içeren protein 2'nin (KEGG: JAZ) -2,61 ve JAZ3'ün de -2,48 kat değişimi ile anlatımı azalmıştır. 6 saatte kontrole göre, JAZ2 ve JAZ3 anlatımları sırasıyla -2,93 ve -2,29 kat değişim göstererek azalmış, 6 saat uygulaması 2 saate göre kıyaslandığında ise JAZ2-benzeri proteinin anlatımında, -1,79 kat değişim tespit edilmiştir.

6 saat uygulamada kontrol koşuluna göre anlamlı şekilde belirlenebilen bir KEGG Metabolik harita tespit edilemezken 6 saatlik örneklerin DEG'leri 2 saat stres uygulanmış örneklerle göre kıyaslanarak analiz edildiğinde pek çok anlamlı KEGG metabolik haritasında değişim tespit edilmiştir.

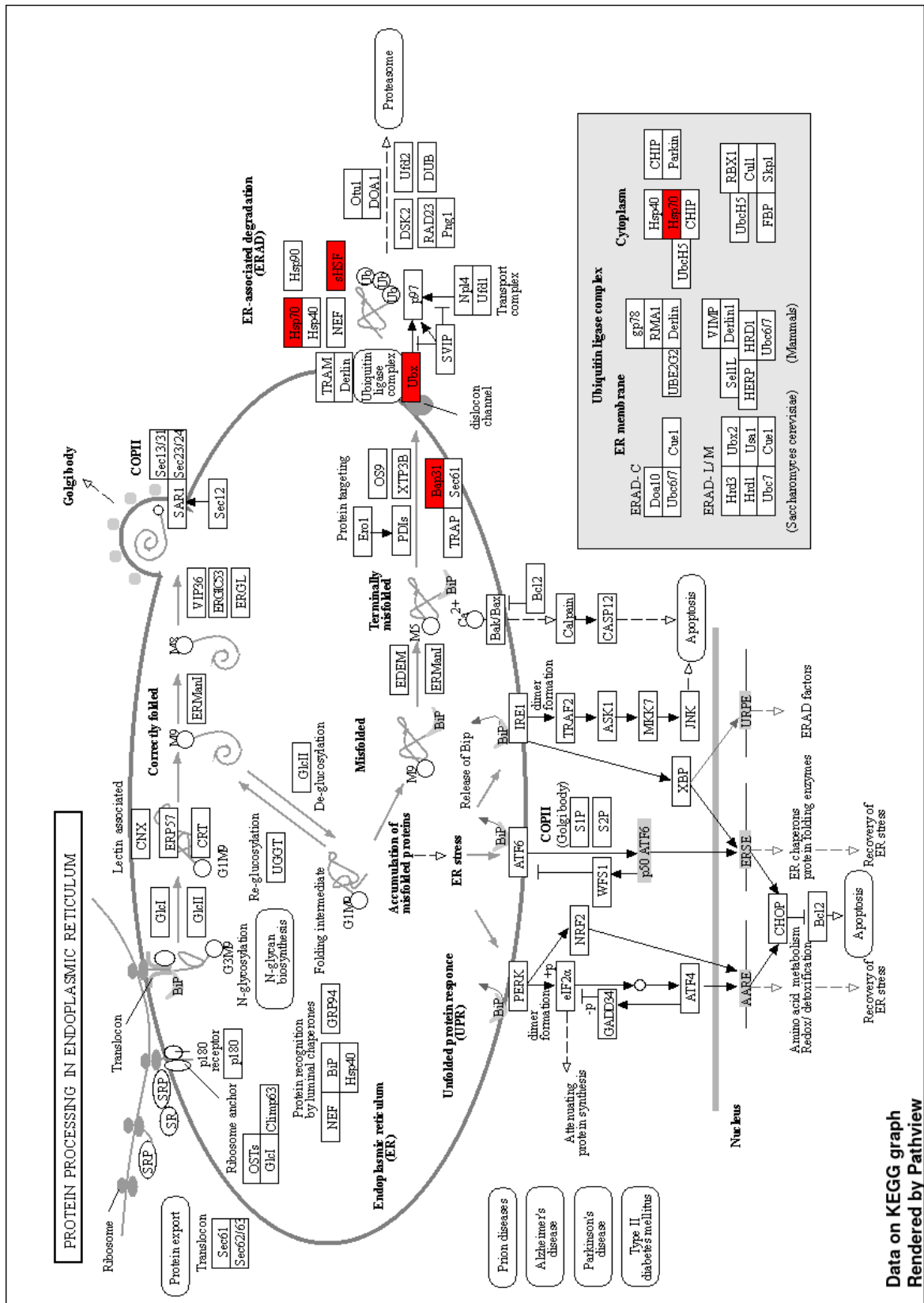
6 saat ER stresi uygulanan örneklerde 2 saate göre yapılan kıyaslamalarda, Tablo 4.15'te gösterildiği gibi 6 farklı yolağa ait genlerde anlatım değişimi görülmüş ve bu yollar anlamlı şekilde ( $FDR < 0,01$ ) zenginleştirilmiştir. 6 saat boyunca uygulanan ER stresinde 2 saatlik uygulamalara göre kıyaslama sonucu anlamlı şekilde zenginleştirilmiş KEGG kategorileri Şekil 4.22'de grafik halinde gösterilmiştir. Sonuçlara göre en anlamlı zenginleştirme diterpenoid biyosentezinde gerçekleşirken en yüksek anlatımı değişen gen sayısı metabolik yollarında görülmüştür. Analiz edilen KEGG haritaları arasında Şekil 4.23'te ve Şekil 4.24'te gösterilen, ER'de protein işlenmesi ve diterpenoid biyosentez yolları bulunmaktadır.

**Tablo 4.15:** 6 saat boyunca ER stresi indüksiyonu gerçekleştirilmiş örneklerin, 2 saatlik ER stresi indüksiyonu gerçekleştirilenlere göre kıyaslanması sonucu anlatım değişimi gösteren genlerin ait olduğu metabolik yolların listesi. (Enrichment FDR<0,01).

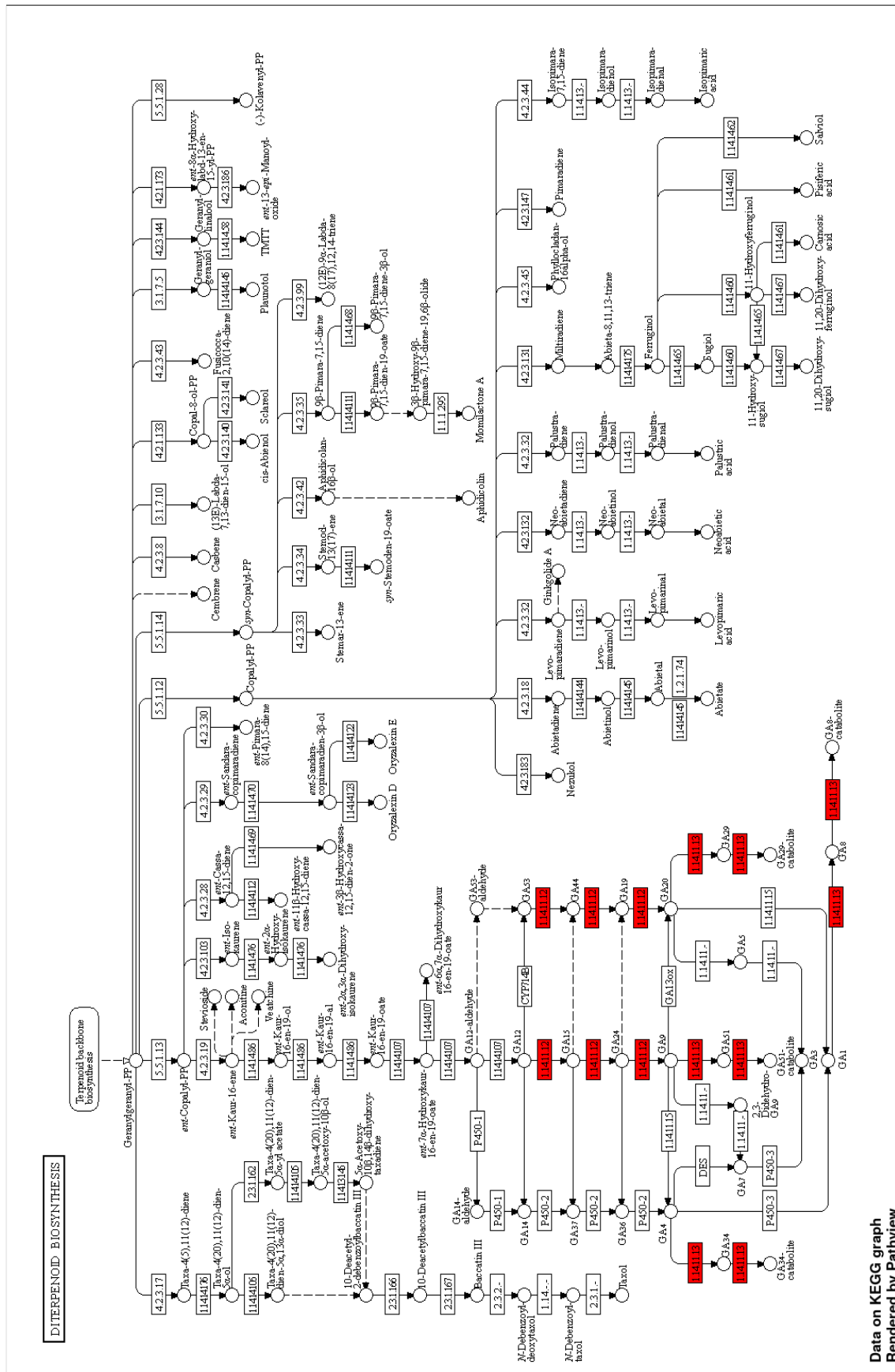
| Enrichment FDR       | Gen sayısı | Yolak Genleri | Fold Enrichment  | Yolak                                      |
|----------------------|------------|---------------|------------------|--------------------------------------------|
| 3.7690131161985e-08  | 50         | 1229          | 2.64781024423933 | Metabolik yollar                           |
| 4.1152822361891e-06  | 32         | 722           | 2.88457288879347 | Sekonder metabolit biyosentezi             |
| 0.000744755937389671 | 6          | 42            | 9.29759654334324 | Glisin, serin ve treonin metabolizması     |
| 0.000744755937389671 | 9          | 106           | 5.52593002104362 | Endoplazmik retikulumda protein işlenmesi  |
| 0.00103150005902366  | 5          | 30            | 10.8471959672338 | Alanin, aspartat ve glutamat metabolizması |
| 0.00103150005902366  | 4          | 16            | 16.2707939508507 | Diterpenoid biyosentezi                    |



**Şekil 4.22:** 2 saat uygulamaya kıyasla 6 saat ER stresi indüklenmiş örneklerde anlatımı değişen genlerin KEGG yollarına göre sınıflandırılması ve zenginleştirilme oranları.



Şekil 4.23: ERde protein işlenmesi KEGG haritası. Kırmızı ile işaretli kutular anlatımı azalmış genleri gösterir.



**Şekil 4.24:** 6 saat vs. 2 saat ER stresi, diterpenoid biyosentezi yoluğ KEGG haritası. Kırmızı ile işaretli kutular anlatımı azalmış genleri gösterir.

6 saat ER stresi altında 2 saatlik uygulamaya kıyaslanarak elde edilen DEG'lerin listelerinden anlamlı sonuç veren genler kullanılarak KEGG veritabanından metabolik yolak analizleri gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.23'te ER'de protein işlenmesi yolağı için KEGG haritası üzerinde anlatımı değişen genler gösterilmiştir. Bap31, Ubx, Hsp70, sHSF anlamlı şekilde değişim gösteren genler olmuştur. 6 saat TM'de 2 saate göre, Karakterize edilmemiş protein LOC101250189, -1,32 kat değişimi ile anlatımı azalmış bir Bap31 ortoloğudur. UBX domen içeren protein 2, 6 saat TM'de 2 saate göre -1,52 kat değişimi ile azalmış anlatım gösterirken, ubiquitin domen içeren protein 1 anlatımı, 2 saat uygulamada kontrole göre 1,5 kat artmış, ubiquitin domen içeren protein 2, 6 saat uygulamada 2 saat uygulamaya göre 2,61 kat azalmıştır. Hsp70 gen anlatımı, 6 saat TM'de 2 saate göre 2,3 kat azalmış ve 70 kDa boyutunda başka bir HSP'nin 2 saat TM'de kontrole göre anlatımı 1,82 kat artmıştır. sHSF veya HSP20'nin, 6 saat TM'de 2 saate göre -3,56 kat değişimi ile yüksek oranda anlatımı azalmıştır.

Şekil 4.24'te, diterpenoid biyosentez yolağı üzerinde 6 saat ER stresinde 2 saate göre değişen transkriptlerin kodladığı genlerin konumları ve gen erişim numaraları belirtilmiştir. Giberellin 20 oksidaz-1 (KEGG: 1.14.11.12) geni 6 saat TM uygulamasında 2 saat uygulamaya göre 4,65 kat artmış anlatım gösterirken, giberellin 2-oksidad genleri de aynı koşullarda en az 2 kat azalmış anlatım göstermiştir.

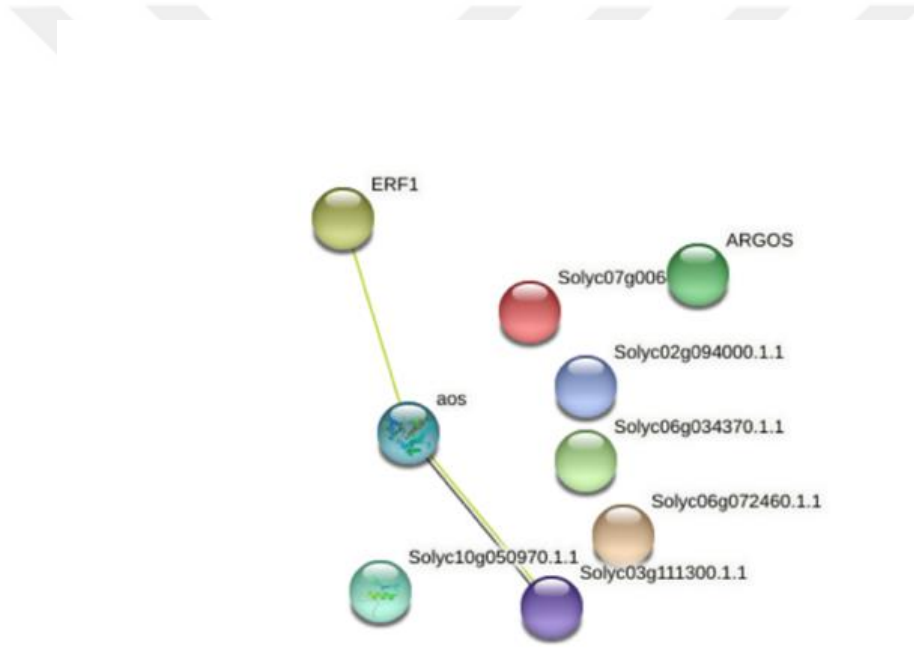
**Şekil 4.25:** 2 saat ER stresi indüklenmiş örneklerin kontrole göre değişmiş protein etkileşimleri.

**Tablo 4.16:** 2 saat ER stresinde kontrole göre yapılan STRING analizlerinde tespit edilen proteinlerin listesi.

| Protein Sembolü    | Protein Adı                                                                                                                                                          |
|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| SAP8               | <i>A20/AN1 zinc finger protein; Stress-associated protein 8</i>                                                                                                      |
| RAV1               | <i>AP2/ERF and B3 domain-containing transcription factor RAV1</i>                                                                                                    |
| CZFP1              | <i>C2H2-type zinc finger protein; Cold zinc finger protein 1</i>                                                                                                     |
| ZF2                | <i>C2H2 family protein</i>                                                                                                                                           |
| Solyc09g015020.1.1 | <i>17.3 kDa class I heat shock protein-like; small heat shock protein (HSP20) family</i>                                                                             |
| TCP19              | <i>TCP transcription factor 19</i>                                                                                                                                   |
| GAME1              | <i>UDP-galactosyltransferase precursor; Glycosyltransferase; Glycoalkaloid metabolism 1; UDP-glycosyltransferase family protein</i>                                  |
| Solyc02g079780.1.1 | <i>glycine-rich protein</i>                                                                                                                                          |
| Solyc04g078060.1.1 | <i>Small hydrophobic protein</i>                                                                                                                                     |
| Solyc05g005520.1.1 | <i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase; Protein phosphatase inhibitor 2 (IPP-2)</i>                                                                                  |
| ERF4               | <i>Ethylene response factor 4</i>                                                                                                                                    |
| Lemir              | <i>Miraculin precursor; Lemir</i>                                                                                                                                    |
| Solyc05g053010.1.1 | <i>L-type lectin-domain containing receptor kinase s.4-like precursor; Clade XI lectin receptor kinase; Concanavalin A-like lectin protein kinase family protein</i> |
| sbt4a              | <i>Subtilisin-like protease; Belongs to the peptidase S8 family</i>                                                                                                  |
| ERF1               | <i>Ethylene response factor 1</i>                                                                                                                                    |
| aos                | <i>Allene oxide synthase</i>                                                                                                                                         |
| ODC                | <i>Ornithine decarboxylase</i>                                                                                                                                       |
| LOC544163          | <i>Nine-cis-epoxycarotenoid dioxygenase; 1st step of ABA biosynthesis</i>                                                                                            |
| Solyc06g074530.1.1 | <i>Arogenate dehydratase/prephenate dehydratase 6</i>                                                                                                                |
| Solyc06g072460.1.1 | <i>CHP-rich zinc finger protein-like</i>                                                                                                                             |
| Solyc03g111300.1.1 | <i>Jasmonoyl-l-amino acid 12-hydroxylase</i>                                                                                                                         |
| Solyc02g091180.1.1 | <i>Pfam-domain containing protein</i>                                                                                                                                |
| BAC19.14           | <i>Scarecrow-like protein 15</i>                                                                                                                                     |
| MTB2               | <i>Transcription factor bhlh13-like; negatively regulates jasmonate (JA) signaling</i>                                                                               |
| Solyc05g012030.1.1 | <i>Karakterize edilmemiş protein</i>                                                                                                                                 |
| Solyc01g098690.2.1 | <i>Pfam-domain containing protein</i>                                                                                                                                |
| Solyc02g094000.1.1 | <i>EFh-domain containing protein</i>                                                                                                                                 |

**Tablo 4.16:** (devam)

|                    |                                                                            |
|--------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| Solyc05g054650.1.1 | <i>Zinc finger C2H2-domain containing protein</i>                          |
| Solyc06g068960.1.1 | <i>EFh-domain containing protein</i>                                       |
| Solyc06g074750.1.1 | <i>Histone H2B family protein</i>                                          |
| Solyc06g075220.1.1 | <i>FAS1 family protein</i>                                                 |
| Solyc07g049370.2.1 | <i>Glucan endo-1,3-beta-glucosidase 12</i>                                 |
| Solyc08g059730.1.1 | <i>G-type lectin s-receptor-like serine/threonine-protein kinase sd2-5</i> |
| Solyc08g078670.2.1 | <i>Eukaryotic aspartyl protease family protein</i>                         |

**Şekil 4.26:** 6 saat ER stresi indüklenmiş örneklerin kontrole göre değişmiş protein etkileşimleri.

Şekil 4.26’da gösterilen 6 saat ER stresi örneklerinin STRING analizine ait proteinlerin sembol ve isim listeleri de Tablo 4.17’de listelenmiştir.

**Tablo 4.17:** 6 saat ER stresinde kontrole göre yapılan STRING analizlerinde tespit edilen proteinlerin listesi.

| Protein Sembolü    | Protein Adı                                            |
|--------------------|--------------------------------------------------------|
| ERF1               | <i>Ethylene-responsive factor 1</i>                    |
| aos                | <i>Allene oxide synthase</i>                           |
| Solyc10g050970.1.1 | <i>ERF Family Protein</i>                              |
| Solyc03g111300.1.1 | <i>jasmonoyl-amino acid hydroxylase</i>                |
| Solyc06g072460.1.1 | <i>CHP-rich zinc finger protein-like</i>               |
| Solyc06g034370.1.1 | <i>PMEI domain-containing protein</i>                  |
| Solyc02g094000.1.1 | <i>Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor</i> |
| ARGOS              | <i>ethylene signal modulator</i>                       |

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

ER, protein biyosentezinin önemli bir hücresel bölgesi olan ökaryotik organelidir. ER fonksiyonunun biyotik veya abiyotik stresler aracılığıyla bozulması, yanlış katlanmış veya katlanmamış proteinlerin ER’de birikmesini tetikleyerek, ER stresini oluşturur. ER kalite kontrol sistemi (ERQC), ER homeostazisini korumak için ER’nin durumunu sürekli olarak izler ve ER fonksiyonunu güçlendirerek önlem alır. ER’de konumlanmış proteinler olan şaperonlar, koşaperonlar, lektinler, redoks enzimleri ve glukozidazlar protein işlenmesinde önemli rollere sahiptir. ERAD yolağı da ubiquitin bağımlı proteozomal protein katabolik süreci ile ER’deki katlanmamış protein yükünü düşürür. Katlanmamış protein birikimi, ERQC bileşenlerinin anlatımlarını teşvik ederek ER fonksiyonunu güçlendiren gen düzenleyici bir mekanizma olan UPR’yi tetikler (Hancock ve diğ., 2022).

Önemli bir tarımsal bitki olarak domateste yapılan moleküler düzeydeki çalışmaların, domatesin yakın akrabaları olan birçok önemli tarımsal bitkiye de kolaylıkla uygulanabilir olması, domatesin stresle ilişkili yanıtlarının aydınlatılmasını daha da anlamlı hale getirmektedir. Daha önce domateste birçok abiyotik ve biyotik stres koşulunda gen anlatım analizleri gerçekleştirilmiştir. ER stresi tetiklenerek yapılan çalışmalarda da birçok ilişkili marker gen tanımlanmıştır. Kapsamlı bir transkriptom çalışmasının domatesin ER stresi ile ilişkili spesifik yanıtlarının aydınlatılmasında yardımcı olabilecek veriler sunacağı düşünülmektedir.

Tunikamisin (TM) uygulaması için seçilen 2 saat ve 6 saat kriterleri ve konsantrasyonların belirlenmesi literatürde yapılan çalışmalar temel alınarak kararlaştırılmıştır. Konsantrasyon belirlenirken *Arabidopsis thaliana*, domates ve pirinçte yapılan çalışmalar incelenmiştir. *Arabidopsis*’te 7 günlük bitkiler 2 µg/mL (Srivastava ve diğ., 2013), 10 günlük bitkilere 1, 2 ve 5 saat 5µg/mL (Iwata, Sakiyama, M. H. Lee, ve diğ., 2010), 14 günlük bitkilere 6 saat 5 µg/mL (Kamauchi ve diğ., 2005), 5 günlük bitkilere 8 saat 5 µg/mL (Hu ve diğ., 2020) tunikamisin uygulanarak ER stresi indüklenmiştir. Pirinç’te yapılan ER stresi çalışmalarında, 14 günlük bitkilere 4 ve 10 saat boyunca 5 µg/mL (Lu ve diğ., 2012), 7 günlük bitkilere 2 saat 5µg/mL (Wakasa ve diğ., 2014), 8 günlük bitkiler 16 saat 5 µg/mL (Hayashi ve diğ., 2013) tunikamisin uygulanmıştır. Soya fasulyesinde de yapılmış bir ER stresi çalışmasında, 3 haftalık bitkilere 24 saat 10 µg/mL tunikamisin uygulanmıştır (Irsigler ve diğ., 2007). En son domates bitkisindeki

alışmalar da incelendiğinde; 14 günlük bitkiler 3, 6, 12 ve 24 saat boyunca 10 µg/mL (Kaur ve Kaitheri Kandoth, 2021), 14 günlük bitkiler 24 saat 10 µg/mL (Zhao ve diğ., 2007), 5 yapraklı evrede 24 saat 0,5 µg/mL (Czkus ve diğ., 2020) tunikamisin uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Tunikamisin uygulanarak ER stresinin indüklendiği sayılan tüm bu çalışmalara bakıldığında, bu tez çalışması kapsamında ER stresi uygulaması için 10 µg/mL tunikamisinin 14 günlük bitkilere uygulanmasının domatestte istenilen stres yanıtının oluşturulabilmesi için uygun olacağı ngrlmştır. Daha nce *Arabidopsis thaliana*'da tunikamisin ile yapılan çalışmalarda gözlenmiş morfolojik değişimlerden yola çıkılarak (Kang ve diğ., 2021), bitkilerde 6 saat sonunda gözlenen yaprak kenarlarında sararma ve bükülmelerin de domateslerde stres yanıtının oluştuğuna dair ilk işaretçileri olduğu dşnlmştır. 2 saat ve 6 saat ER stresi uygulama süreleri seçilirken, ER stresinin erken ve geç yanıt mekanizmalarının transkriptom üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. 2 saat ER stresinde domates yapraklarının ER lümeninde hızlıca biriken katlanmamış proteinlerle baş edebilmek için transkriptom seviyesinde oluşturduğu ilk yanıtların, 6 saat uygulamasında ise uzamış ER stresine verilen yanıtın gözlenmeye başlanacağı ngrlmştır.

Biyotik ve abiyotik streslerin etkisi altında ER'nin protein fabrikası fonksiyonu olgunlaşmamış proteinlerle normalden fazla yüklenir, bu durum da ERQC sisteminin dengesinin bozulmasına neden olur. ER homeostazisinin yeniden sağlanabilmesi için, protein katlanma veya degradasyon kapasitesini artırmak ya da protein sentez hızını düşürmek üzere UPR sistemi harekete geçirilir. Bitki hücrelerinde, ER membran bağımlı stres sensörleri bZIP17/28 ve IRE1'i içeren iki ER stresi transdüksiyon yolağı tanımlanmıştır. Hafif stres durumunda, bZIP17/28 ER'de konumlu şaperonları ve foldaz enzimleri kodlayan genlerin anlatımını artırmayı hedeflerken, IRE1, bZIP60'ın spesifik kırpılmasıyla stres yanıt genlerinin anlatımını artırır (Wan ve Jiang, 2016).

Uzayan veya şiddetlenen ER stresi durumunda, ER membranına bağlı mRNA'ların rastgele yıkımı sonucu mRNA akışını düşürerek daha ileri protein sentezini engellemek amacıyla IRE1-RIDD (IRE1-bağımlı yıkım) yolağı çalışır. Eğer UPR ile ilişkili tüm bu yolaklar ER stresini dengeleme ve elimine etme konusunda yetersiz kalırsa, hücre otofajiye veya programlı hücre ölümüne gider (Wan ve Jiang, 2016). ER stresinin birincil yanıtlarından olan UPR çerçevesinde, bu tez çalışması kapsamında birçok protein katlanmasıyla ilişkili protein ve enzimde anlamlı anlatım değişimleri tespit edilmiştir.

HSP'lerin ('*heat shock protein*' ısı şoku proteinleri) anlatımı 2 saat ve 6 saat TM uygulamalarında değişim göstermiştir. 2 saatte kontrole göre anlatım değişimi tespit edilen 8 adet HSP ve HSP-benzeri protein kodlayan genlerin 6'sında (Isı şoku 70 kDa protein 8, HSP21, 26.5 kDa ısı şoku proteini, Isı şoku binding protein, 17.3 kDa Sınıf-I Isı şoku proteini benzeri, 17.4 kDa Sınıf-III ısı şoku proteini) gen anlatımlarının arttığı görülürken, yalnızca 2 tanesinde (Isı şoku cognate 70 kDa protein 2-benzeri, 18.1 kDa Sınıf-I ısı şoku protein benzeri) anlatım düşmüştür. 2 saat TM uygulamasında *heat shock binding protein* (NM\_001246906.2) anlatımı 2,2 katına çıkmıştır. ER stresinin birincil yanıt mekanizması olan UPR'nin 2 saatlik TM uygulamasında tetiklendiği, UPR'nin marker geni olan BiP anlatımındaki artıştan da görülmektedir.

6 saat ER stresi indüklenmiş örnekler kontrole göre kıyaslandığında ısı şoku proteinleriyle ilişkili olabilecek yalnızca *Hsc cognate 70* (HSC70.1)'i kodlayan genin anlatımında bir azalma tespit edilmiştir. HSC70.1, ısı şoku proteini 70 ailesinden bir proteini kodlar, HSP101'in anlatımını ısı şoku faktörleri (HSF) aracılığıyla negatif olarak düzenler. Isı şoku olmayan koşullarda, HsfA'ların aktivitesini düşürür ve HsfA2 ile HSP101 genlerinin anlatımını etkiler. *Hsc70-1* mutantları, HSP101 ve diğer ısı şoku ile indüklenen genlerin artmış anlatımları nedeniyle ısı toleransı fenotipi göstermiştir (Tiwari ve diğ., 2020). Bu veri istatistiksel olarak anlamlı bulunmadığından, ısı şoku proteinlerinin anlatımıyla ilgili yorum yapabilmek için yeterli güvenilirliğe sahip değildir ve ısı şoku proteinlerinin anlatımının 6 saatte kontrole göre nasıl değiştiğiyle ilgili yeterli bilgi elde edilememiştir. Çalışmanın genelinde de 6 saat TM uygulaması yapılmış bitki yapraklarında, kontrol koşuluna göre yapılan kıyaslamalarda diğer verilere göre daha az sayıda istatistiksel olarak anlamlı DEG tespit edilmiştir.

6 saat TM uygulanmış örneklerin 2 saat TM uygulanmış örneklere kıyaslanması sonucunda 19 adet farklı HSP ve HSP-benzeri proteine ait transkriptler tespit edilmiştir. 6 saat TM'de 2 saat TM'ye göre anlatımı artan bir HSP tespit edilememiştir. HSP'lerin tamamının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde anlatımı azalmıştır. UPR marker geni BiP anlatımı da -2,16 kat değişimi ile 6 saat TM'de oldukça azalmış bir anlatım göstermiştir.

Yapılan transkriptom analizlerinde anlatım değişimi gösteren genlerden biri de sHSP'ler olmuştur. sHSP (*small heat shock protein*)'yi kodlayan gen *LeHSP21.5* daha önce domatesten klonlanmış ve ER'de lokalize olan diğer sHSP'lerin aminoasit dizilimine benzerlik göstermiştir. Bu gen ürününün de ER'de şaperon görevi gördüğü tespit edilmiştir. 6 saat TM'de

2 saat TM'ye göre ER-sHSP'nin anlatımı 4 kat azalmıştır. Sınıf II HSP'lerden olan HSP17.6'da da 6 kat azalmış anlatım belirlenmiştir. 6 saatte genel olarak şaperon proteinleri ve ısı şoku proteinlerinin anlatımında görülen düşüş bu proteinler için de tespit edilmiştir (Mamedov ve Shono, 2008). Bu durumun, UPR sisteminin, 6 saat sonrasında domates yapraklarındaki ER stresine baş edememesi, dolayısıyla hücrenin uzamış ER stresi sonucu farklı yanıtlar oluşturmaya başlamasıyla ilişkilendirilebileceği düşünülmektedir.

Tüm HSP'ler ve çoğu UPS ilişkili ubiquitin konjuge edici enzimin anlatımı 6 saat TM'de 2 saat TM'ye göre azalmıştır. Bu durumun nedeni, 6 saat ER stresinin UPR sisteminde uzun süreli bir ER stres yanıtı oluşturmaya ve hücrenin sistemlerin ERAD veya otofaji gibi süreçlere yönlendirilmesi sonucu, hücrede gen anlatımlarında azalmaların tetiklenmesi olabilir. ER stres yanıtları başlangıçta protein agregatlarının birikimini engellemek adına protein katlanma süreçlerini düzenlemeye yönelik olsa da uzamış ER stresinde hücre, baş edebileceğinden fazla proteinin ER'ye hücum edişini engellemek için protein üretimini askıya almak ister (Mishiba ve diğ., 2013; Y. Liu ve diğ., 2022). Bu durum, 6 saat TM'de yüksek oranda görülen anlatım düşüşlerini açıklayabilir.

Arabidopsis'te ER stresindeki bir transkriptom çalışmasında gen anlatımındaki düşüşün aynı nedenle gerçekleşmiş olabileceği saptanmıştır (Iwata, Sakiyama, M. H. Lee, ve diğ., 2010). Memeli hücrelerinde ER stres sensörü PERK, eIF2a'yı fosforilleyerek translasyonunu inhibe eder (Harding, Zhang ve Ron, 1999). Homoloji araştırmalarında bitki türlerinde bir PERK homoloğu tespit edilememiştir ve Arabidopsis'te yapılan çalışmalar ER stresinde translasyon düzenlenmesinin gerçekleşmediğini ortaya koymuştur. Dolayısıyla, ER stresine yanıtta Arabidopsis'te gerçekleşen düşmüş transkript seviyelerinin translasyonun düzenlenmesinden önce transkripsiyon seviyesinde, üretilen mRNA seviyesinin azalmasından kaynaklanabileceği sonucuna varılmıştır. Arabidopsis'te, Iwata ve diğ. (2010), yaptığı bu çalışma için, tunikamisin uygulamasında mRNA yoğunluğundaki düşüşün var olan mRNA'ların aktif olarak yıkımına mı yoksa transkripsiyonun baskılanmasına mı bağlı gerçekleştiği net olarak belirlenememiştir. RSAT oligoanaliz yöntemi kullanılarak yapılan analizlerde anlatımı azalan genlerin promotör bölgelerinde daha fazla temsil edilen diziler tespit edilememiştir, bu da bu genlerdeki anlatım baskılanmasının promotörlere dizi-bağımlı şekilde bağlanan bir transkripsiyonel baskılayıcının etkisiyle gerçekleşmediğini düşündürmüştür. Metazoan IRE1'in ER stresine yanıt olarak salgı proteinlerini kodlayan spesifik mRNA alt grubunun hızlı degradasyonunu yönettiği

bilinmektedir. Hedef mRNA'ları tanımlanmamış Arabidopsis IRE1 homologlarının bu süreçte görev alıp almadığı henüz bilinmemektedir (Hollien ve diğ., 2009; Iwata, Sakiyama, M. H. Lee, ve diğ., 2010). Buna rağmen, ER stresine yanıt olarak anlatımı azalan genlerin bir kısmının IRE1'in RNaz aktivitesine bağımlı olabileceği düşünülmüştür. Hayvanlarda, IRE1'in RNaz aktivitesinin çeşitli mRNA'ları direkt olarak yıkıma uğratabildiği gösterilmiştir (Hollien ve Weissman, 2006). Yıkılan mRNA'ların çoğunun ER lümeninden geçen membran veya salgı proteinleri olduğu görülmüştür. Pirinç bitkisinde yapılan bir çalışmada da IRE1 RNaz enziminin çeşitli membran proteinlerini kodlayan mRNA'ların yıkımında etkili olduğu, dolayısıyla *OsbZIP50* (*AtbZIP60* homoloğu) dışında çok çeşitli substratları olabileceği ortaya konulmuştur (Wakasa ve diğ., 2012). Daha önce *Schizosaccharomyces pombe* mayasında yapılan bir çalışmada da IRE1'in birincil rolünün, transkripsiyon faktörü mRNA'nın kırılmasından çok ER-hedefli proteinleri kodlayan mRNA'ların yıkımı olduğu düşünülmüştür (Kimmig ve diğ., 2012). Bu bilgilerden yola çıkılarak, ileri seviye ER stresinde, IRE1'e bağımlı olarak oluşan RNaz aktivitesinin, yani RIDD yolağının, mRNA seviyelerini azalttığı düşünülebilir (Hollien ve Weissman, 2006; Han ve diğ., 2009).

*Caenorhabditis elegans*'ta yapılan güncel bir çalışma ise ER ilişkili yeni bir RNA susturma mekanizmasını tanımlamış ve ER kalite kontrolünü destekleyici şekilde işlev gösterdiğini ortaya koymuştur. ERAD modeli substratı olarak *C. elegans* kullanılan genetik taramada, anti-viral bir RNA interferans yolağı ('*ER-associated RNA Silencing*' ERAS) bulunmuştur. Bu mekanizma ERAD ile beraber çalışarak ER homeostazisini sağlar. ERAS, Argonat proteini RDE-1/AGO2 ile yönlendirilir ve ER ilişkili RNA yıkımı tetiklenir (Efsthathiou ve diğ., 2022). Memeli hücrelerinde IRE1'in artmış anlatımının spesifik mRNA'ların yıkılmasına neden olduğu sürecin, RIDD süreci, bu bağlamda fonksiyonelliğinin net olarak belirlenmediği belirtilmektedir. Bunun nedeni de düzenlenen IRE1-bağımlı mRNA yıkım hedeflerinin çoğunun mRNA seviyelerinin ER stresinde fark edilir şekilde değişmemesidir (Moore ve Hollien, 2015). ER stresi oluştuğunda, RDE-1/AGO2 proteini, ER ilişkili mRNA'ların toplu şekilde yıkımını yönlendirir ve ER'deki yükü azaltmaya çalışır. Viral enfeksiyon, ER'de UPR ilişkili gen anlatımlarını artırıp, sinyal akışını başlatmıştır. Enfeksiyon öncesi tunikamisin uygulanmış solucanlarda da viral RNA1 seviyeleri düşmüştür. Bu da ER stresinde viral RNA yıkımının arttığını işaret etmektedir. ERAD ve UPR bileşenlerinin mutantlarında, düşmüş viral RNA1 seviyeleri görülmüştür. Bu durum viral RNA'nın yıkımıyla ER stresi arasındaki ilişkiyi göstermektedir. ER stresi, ER ilişkili mRNA'ların ve exo-RNAi mekanizmasıyla viral

RNA'ların degradasyonunu tetikler (Efsthathiou ve diğ., 2022). *C. elegans*'ta keşfedilen ve hayvanlarda korunmuş ERAS mekanizmasının bitkilerde olası bir benzer işlevdeki sisteminin, bu tez çalışmasında 6 saat TM uygulamasında tespit edilen düşmüş transkript seviyelerini açıklayabileceği düşünülmektedir.

BiP proteinleri ATP bağlayarak J-domeni içeren proteinlerle (J proteinleri) beraber işlev gösteren ısı şoku 70 proteinleridir. J proteinleri BiP ile etkileşerek ATP hidrolizini tetikler, polipeptidlerin BiP tarafından hızlıca tutulmasını sağlar (Yamamoto ve diğ., 2008). Dolayısıyla J proteinlerinin anlatım değişimleri de ER stresi yanıtlarıyla ilgili anlamlı veriler sunmaktadır. DnaJ Şaperon proteinleri, J proteinleri, 2 saat TM uygulamasında kontrole göre 1,5~3 kat artış göstermiştir. 6 saat ER stresi uygulanan örneklerde kontrole göre anlamlı değişim gösteren J proteini saptanamamıştır. 6 saat TM uygulama örnekleri 2 saate kıyaslandığında, Şaperon dnaJ C76 proteini 3,5 kat artış gösterirken diğer J proteinlerinde 6 saatte 2 saate göre -1,5~-2,5 kata kadar anlatım düşmüştür. UPR ile ilişkili marker gen BiP'te de benzer bir anlatım değişimi gözlemlendiğinden, beraber işlev gösteren bu iki proteinin ER stresinin erken ve geç yanıtlarında da benzer davrandığı düşünülebilir. C76-J proteini ise önemli bir abiyotik stres yanıtı düzenleyicisi olduğundan (Nagaraju ve diğ., 2020) uzamış ER stresi yanıtında 2 saat TM uygulamasına göre artmış transkript seviyesi göstermiş olabilir.

UPR'den sonra uzayan ER stresi durumunda aktive edilen ERAD ve ER faji sistemleriyle ilişkili genler de tespit edilmiştir. Özellikle uzamış stres durumunda UPS enzimlerinin anlatımlarında meydana gelen değişimler, hücrenin yanlış katlanmış proteinlerle başa çıkma yollarına dair fikir vermektedir. 2 saat ER stresinde kontrole göre E3 ubiquitin protein ligaz RHA1B, E3 ubiquitin protein ligaz RMA1H1, E3 ubiquitin protein ligaz PUB22 benzeri ve E3 ubiquitin-protein ligaz MPSR1 genlerinin anlatımının yaklaşık 2 katına çıktığı belirlenmiştir. Ubikitin konjuge enzim E2 benzeri protein, Ubikitin domen içeren protein 1-benzeri genleri de 1,5 kat değişimi ile anlatım artışı göstermiştir. Bu durum, ER stresinin katlanmamış protein miktarında 2. saatte hızlı bir artışa neden olacağı düşünüldüğünden, beklenen bir sonuçtur. Bu enzimlerin anlatım artışı, ubiquitin proteozom sisteminin çalıştığını gösterebilir.

6 saat TM'de kontrole göre tek bir UPS ilişkili enzim tespit edilmiştir, E3 ubiquitin protein ligaz RHF1A geni -1,5 kat değişimi ile azalmış anlatım göstermiştir. Ancak bu veri istatistiksel olarak anlamlı değildir. 6 saat ER stresi indüklenen örnekler 2 saat uygulamasına kıyaslandığında Ubikitin domen içeren protein 2, Ubikitin konjuge edici enzim E2 20, E3

ubikitin protein ligaz MPSR1, E3 ubikitin protein ligaz RHA1B ve E3 ubikitin-protein ligaz PUB22-benzeri enzimleri kodlayan genler, sırasıyla, -2,6, 1,8, -3,24, -1,69 ve -1,47 kat değişimleri göstermiştir. Burada da HSP'lerde olduğu gibi 2 saat ER stresinde artmasına rağmen daha uzun bir ER stresi durumunda 6 saat TM uygulamasında genelde azalan gen anlatımları tespit edilmiştir. Bu durum da benzer sebeplerle ER hedefli transkriptlerin yıkımıyla ilişkilendirilebilir, ancak ubikitin konjuge edici enzim E2 20, diğerlerinin aksine 6 saatte artmış anlatım göstermiştir. Buradan, genel olarak anlatımlar baskılansa da ERAD yollarının hala işlev gösterdiği ve ubikitin proteozom sisteminin çalıştığı sonucuna varılabilir.

UPS ile ilişkili başka bir gen olan AAA ATPaz family protein anlatımı 6 saat TM uygulamasında 2 saat TM uygulamasına göre 1,3 kat artmıştır. AAA ATPaz ailesine ait proteinlerin yanlış katlanmış proteinlerin 26S proteozom kompleksine taşınmada görevli önemli proteinleri de kapsadığı bilinmektedir (Sun ve diğ., 2021). 6 saat ER stresinde ERAD yollarının da tetiklenmesi beklendiğinden bu koşulda artmış AAA ATPaz family protein anlatımı UPS'nin çalışmasıyla ilişkilendirilebilir.

ER stresinin rolü ve ROT'lar gibi diğer metabolik süreçlerle bağlantısı memelilerde, özellikle de farklı hastalık durumlarında ayrıntılı bir şekilde belirlenmiştir. Ancak bitkilerde ER stresine bağımlı ROT üretiminin rolü ve sinyal transdüksiyonu hala araştırılmaktadır. Hayvan sistemlerine benzer şekilde, ER oksidatif protein katlanması için ortam sağlar ve sonucunda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretir. Çevresel etmenlerin etkisiyle abiyotik veya biyotik stres koşullarıyla karşı karşıya kalındığında bitkiler büyük miktarda katlanmamış veya yanlış katlanmış proteini ER lümeninde biriktirir. Bu proteinlerin herhangi bir işlevselliği olmadığından birikerek agregat oluşturur ve ER stresine yol açarlar (Ozgur ve diğ., 2018). Buna ek olarak, ER stresi ROT üretimini teşvik eder ve bitkilerde oksidatif yüke neden olarak oksidatif strese yol açabilir. ER stresi aynı zamanda, NADPH oksidaz ile yönlendirilen ROT sinyalleşmesini aktive eder, antioksidan savunma mekanizmalarını artırır ve glutasyon (GSH) redoks durumunu değiştirir. ER'nin yanında büyük miktarda ROT'un stres koşullarında farklı bitki hücrel bölümlerinden de üretilbildiği ve UPR'yi tetiklediği gösterilmiştir. Dolayısıyla ER stresi ve ROT, pozitif geribildirim mekanizması olarak nitelendirilebilecek karşılıklı bir çapraz etkileşim içerisinde. Her iki durum da çevresel koşullarla tetiklenen ikincil stres durumlarıdır ve diğer sinyal yollarıyla etkileşim içindedir (Ozgur ve diğ., 2018; Liu ve Li, 2019).

Bu bilgiler ışığında bu tez çalışmasından elde edilen bulgular incelendiğinde, ROT'larla ilişkili genler, yapılan RNA dizileme veri analizleri sonucunda ER stresinin erken ve geç yanıtında tespit edilmiştir. 2 saat ER stresi indüklenen bitkide kontrole göre peroksidaz 3 geni anlatımı 4 kat azalmıştır. Peroksidaz 21'de 3 kat artış, peroksidaz 44-benzeri proteinde (PRX44-like) 8 kat azalma görülmüştür. 6 saat ER stresinde kontrole göre PRX44-like geni 1,8 kat artış göstermiştir. PRX44-like anlatımındaki dramatik düşüş sonrasındaki artış, 6 saatte artan birikmiş ROT miktarıyla ilişkilendirilebilir. Domateste çeşitli biyotik streslerde de PRX44-like proteininin anlatımının arttığı görülmüştür (Meng ve diğ., 2022). NAC domeni içeren proteinler 2 saat ER stresinde genel olarak artış göstermiştir.

Her 3 kıyaslamada da anlatımı değişen 13 transkript tespit edilmiştir. Bu 13 transkriptten anlatım artışı gösteren yalnızca biridir. Etilen yanıt transkripsiyon faktörü 1 (ERF1), 2 saat TM ve 6 saat TM'de kontrole göre yaklaşık 2 kat artış göstermiştir. Domates ERF1 transkripsiyon faktörünün yapılan bir çalışmada transgenik tütün bitkisinde NaCl uygulaması sonrası anlatım artışı göstermesi ve osmotin gibi ileri basamaklardaki ilişkili genlerin de ERF1 aracılı düzenleniyor olması, domates ERF1'in abiyotik stres yanıtlarıyla ilişkili olabileceğini göstermiştir (Huang ve diğ., 2004). Bu durumda 2 ve 6 saat TM uygulamasında ERF1 anlatımının artışının abiyotik stres yollarının uyarılmasıyla ilişkili olduğu düşünülebilir.

Ortak 13 transkriptten biri olan *ethylene-responsive late-embryogenesis like protein 5* (ER5) anlatımı ise kontrole göre 2 saatte -1,5 kat azalırken 6 saatte -3 kat azalmıştır. Literatürde abiyotik stres faktörleriyle domateste yapılan çalışmalara bakıldığında bu genin anlatımında bir indüksiyon görülmesi beklenmektedir (Frank ve diğ., 2009; Li, Yin ve Zheng, 2020). Diğer etilen yanıt faktörleri (ERF1, ERF4, ERF014) anlatımları 2 saatte kontrole göre artış gösterirken 6 saatte ERF1 dışında tüm etilen yanıt faktörlerinin anlatımı yüksek oranda azalmıştır. Özellikle *ethylene-responsive transcription factor 13-like* geninin anlatımı -10,27 ile kontrole göre 6 saat ER stresinde dramatik bir düşüş göstermiştir. Domateste ERF'ler ile yapılan bir çalışma çeşitli abiyotik stres koşullarında ERF anlatımlarının düştüğünü gösteren veriler elde etmiştir (Klay ve diğ., 2018). Tez çalışmasında elde edilen sonuçlar, etilen sinyalleşmesi yolları düşünülerek yorumlandığında, 2 saat ER stresinde ortamda etilen varken, 6 saat ER stresinde etilen miktarının düştüğü düşünülebilir (Song ve Liu, 2015). ERF'lerle daha fazla çalışma yapıldıkça yeni ERF'lerin tanımlanması ve ilişkili yollarının tespit edilmesiyle ER stresi ile ilişkisinin de ayrıntılı olarak yorumlanması mümkün olacaktır.

UPR ve MAPK sinyalleşme yolları arasında çok sayıda kesişim noktasının tanımlanması ER stresinin sonuçlarının daha iyi anlaşılmasını sağlayabilecektir. MAPK sinyalleşme ağının hücre döngüsünün ilerlemesi ve stres durumunu takiben hücrenin hayatta kalma veya hücre ölümüne gitme yanıtlarını düzenlediği de bilinmektedir (Darling ve Cook, 2014). Bu durumda MAPK sinyalleşme yollarının ER stresinde aktive olması beklenir. Bu tez çalışmasında, ortak tespit edilen transkriptlerden olan MAPKKK5 enziminin 3 farklı kırılma varyantının üçü de 2 saat TM'de kontrole göre ~1,6 kat azalmışken 6 saat TM'de kontrole göre ~2 kat azalmıştır. Daha önce stres koşullarında yapılan çalışmalara bakıldığında, kadmiyum stresinde MAPK transkriptlerinin anlatımı 3 saat stres uygulamasında azalmış, 6. saatte ise artmıştır. *Camellia sinensis*'te MPK3-1, MPK3-2, MPK3-3 ve MPK3-4 anlatımları sıcaklık stresinde düşüş göstermiştir. Bu sonuçlar, *SlMPK3*'ün domateste sıcaklık stresini negatif düzenlediği çalışmayla paralellik göstermektedir (W. Yu ve diğ., 2019; Liu ve diğ., 2022).

*Arabidopsis thaliana*'da MKK5-MPK3/MPK6 fosforilasyon akışında MKK5 enzimi soğuk stresinde MPK3/MPK6'nın negatif düzenlenmesini gerçekleştirerek soğuğa karşı direnç yanıtını tetikler (Zhao ve diğ., 2017). MAPKKK5'in stres yanıtında negatif düzenleyici etkisi olduğunu ortaya koyan bu çalışmadan ve MAPK enzimlerinin anlatımının stres koşullarında baskılandığı çalışmalardan yola çıkılarak, ER stresinde azalmış MAPKKK5 anlatımının da benzer bir şekilde stres yanıtları üzerindeki olası bir negatif düzenleyici etkisi nedeniyle baskılandığı düşünülebilir. Ancak, ER stresinin sinyal transdüksiyonu ile ilişkili yollarının aydınlatılmasıyla ve MAPK'ların ER stres yollarıyla ilişkilerinin daha iyi anlaşılmasıyla, bu verilerin doğru şekilde yorumlanması mümkün olacaktır.

Giberellin 2 oksidaz (GA2ox3) enzimi de her 3 kıyaslamada tespit edilmiştir. Kontrole göre genin anlatımı 2 saat TM uygulamasında 2~, 6 saat TM uygulamasında 3,5~ kat azalmıştır. Diterpenoid biyosentez yolağına ait KEGG haritasında da tespit edilen değişim giberellin oksidazlara aittir. Giberellinlerin biyosentezinin önemli bir aşamasına ait enzimin anlatımının düşüşü giberellin üretimini negatif yönde etkileyecektir. GA'nın ER stresi yollarını düzenlenmesi ile ilgili daha fazla veri elde edilmesiyle bu çalışmada elde edilen anlatım değişimlerine dair anlamlı bir yorum yapılabilecektir.

Kalsiyum bağlayıcı protein (*Calmodulin-like protein 19*, CML19), 4 adet  $Ca^{2+}$ -spesifik bağlanma bölgesi içerir, bunlardan ikisi N-terminal domeninde yüksek, C-terminal domeninde düşük afiniteye sahiptir.  $Ca^{2+}$  CML19'a bağlandığında, proteinin alfa-sarmal içeriği yükselir,

tersiyer yapısı daha kararlı hale gelir ve konformasyonel bir değişim tetiklenir. Bunun sonucunda, hidrofobik bölge açığa çıkarak hedef proteinin tanınmasına yardımcı olur (la Verde ve diğ., 2018). Her 3 kıyaslamada ortak tespit edilen anlatım değişimi 2 saat TM’de -1,5 kat, 6 saat TM’de -2,5 kat olmuştur. Arabidopsis’te yapılan bir çalışmada elde edilen verilere göre, *AtBI-1* proteinine bağlı bulunan kalmodulin, hücre ölümünü baskılamaktadır. Azalan kalmodulin miktarıyla *BI-1* serbest kaldığında hücre, programlanmış hücre ölümüne gidebilir (Kawai-Yamada ve diğ., 2009). Bu durumdan yola çıkılarak CML19’un azalmış anlatımının da hücrenin 6 saatte programlanmış hücre ölümüne gitmesiyle açıklanabileceği düşünülmektedir.

Gen Ontoloji ve KEGG analizlerinin sonuçları değerlendirildiğinde, her uygulama koşulu için en yüksek oranda zenginleştirilen GO terimleri ve KEGG yolları belirlenmiştir. 2 saat ER stresi sonrası kontrole göre analiz edilen domates yapraklarında en anlamlı şekilde zenginleştirilmiş bp GO terimleri olan abiyotik stimülasyona yanıt ve sıcaklık yanıtına ait genler artmış anlatım gösterirken, yara cevabı, sinyal transdüksiyonunun düzenlenmesi, hücre iletişiminin düzenlenmesi, sinyalleşmenin düzenlenmesi bp terimlerine ait genlerde azalmış anlatımlar görülmüştür. DNA’ya bağlanma ve transkripsiyon faktörü aktivitesi mf terimleri de anlamlı şekilde zenginleştirilirken burada tespit edilen genlerin de anlatımları artış göstermiştir.

ER stresi uygulamasının 2 saatte abiyotik streslerle ilişkili yanıt yollarını harekete geçirmesi beklenen bir durumdur. Yara cevabı ile ilişkili genlerin anlatımının değişmesi bu yolların stres uygulaması sırasında bitkinin uğradığı fiziksel hasara bağlı olarak tetiklenmesiyle açıklanabilir. Sinyal transdüksiyonu ve sinyalleşme ile ilgili genlerin anlatımının düzenlenmesi de hücrenin uygulanan stres ajanını algıladığı ve hücresel bileşenlere ilettiğini gösteriyor olabilir. Bu terimlerde anlatımı değişen genler arasında TIFY ailesine ait genler ve JAZ ailesine ait genlerin bulunduğu dikkat çekmiştir. 2 saat TM uygulamasında anlamlı değişimler tespit edilen, bitki hormon sinyal transdüksiyonu KEGG haritasında da JAZ genlerinin anlatımının ER stresi uygulamasından etkilendiği görülmüştür.

*JA-zinc-finger inflorescence meristem (ZIM)-domain (JAZ)* ailesi baskılayıcı ‘*represör*’ proteinlerinin, *Novel Interactor of JAZ (NINJA) / TOPLESS (TPL)* eş-baskılayıcı proteinleriyle beraber, sinyal akışının ileri basamaklarındaki transkripsiyon faktörleriyle etkileşerek JA yanıtlarını baskıladığı bilinmektedir. Aktif JA’ların algılanmasıyla, JA reseptörü *Coronatine Insensitive 1 (COI1)*, JAZ proteinlerini yıkımları üzere hedef alır. Böylece transkripsiyon

faktörleri serbest kalır, transkripsiyon ve JA yanıtları düzenlenebilir (Chini *ve diğ.*, 2007; Yan *ve diğ.*, 2007; Pauwels *ve diğ.*, 2010).

Bu bilgiler ışığında jasmonik asit aracılı sinyalleşme yollarının negatif düzenleyicisi olan JAZ ailesi üyesi genlerin 2 saat ER stresi uygulamasında baskılanması, jasmonik asit sinyalleşmesiyle ilgili transkripsiyon faktörlerinin aktive edilmesini sağlayabilecektir. 6 saat ER stresi uygulanmış örneklerde kontrole göre yapılan GO analizlerinde en yüksek oranda zenginleştirilen bp terimi jasmonik asit aracılı sinyalleşme yolağının düzenlenmesi olmuştur. JAZ ailesine ait proteinleri kodlayan transkriptlerin anlatımları bu sefer daha yüksek oranda baskılanmıştır. Aynı koşullardaki KEGG analizlerinde de en anlamlı şekilde zenginleştirilmiş ilk üç yolağın sırasıyla; jasmonik asit aracılı sinyalleşme yolağının düzenlenmesi, jasmonik asit stimülasyonuna hücrel yanıt ve jasmonik asit aracılı sinyalleşme yolağı olduğu tespit edilmiştir.

JA'nın UPR ve ER stresi üzerine etkisini araştırmak için domates yaprakları kullanılarak yapılan bir çalışmada, yabani tip ve *jai1* mutanlığı bitkiler kullanılmıştır. Tunikamisin uygulaması, JA marker geni defensin miktarını artırmıştır. Mutant bitki yapraklarında marker genin anlatımı değişmemiştir. UPR marker geni BiP anlatımı da yabani bitkide TM uygulamasında artış gösterirken *jai1* yapraklarında bu artış çok daha düşük kalmıştır. Bu durum, JA'nın UPR üzerinde önemli bir rolü olduğunu göstermektedir (Czékus *et al.*, 2020).

Jasmonik asitle yönetilen sinyalleşme yollarında JAZ ailesi proteinleri, aynı zamanda, ubiquitin aracılı protein yıkımı ile ilişkili bir enzimdir. JAZ enzimlerinin özellikle 6 saat ER stresinde önemli anlatım değişimleri gösterdiği bulgulara tespit edilmiştir. E3 ligazlar da benzer şekilde değişen anlatımlar göstermiştir. Sinyal transdüksiyon yollarında yeni E3 ligazların tanımlanması, UPS'nin JA sinyalleşmesindeki rolünü daha iyi anlamamızı sağlayacaktır (Durand, Pauwels ve Goossens, 2016). Bu şekilde UPS-JA sinyalleşmesinin ilişkisi aydınlatılarak ER stresinde gözlenen anlatım değişimleri daha iyi yorumlanabilecektir.

Elde edilen bulgulardan ve literatürdeki bu verilerden yola çıkılarak, jasmonik asit aracılı sinyalleşmenin ER stresi yanıtları için anahtar bir konumda olduğu ve uzun süreli ER stresinde jasmonik asitin üretildiği ve hücrenin hormona yanıt vermeye başladığı yorumunda bulunulabilir.

JAZ proteinlerinin ZIM domeni, dimerizasyonları ve NINJA ile etkileşimi yönetir. ZIM domeni içerisinde yüksek oranda korunmuş amino asit düzeni, TIFY motifini oluşturur (Vanholme ve diğ., 2007). Çeşitli TIFY proteinleri ile ilgili fonksiyonel veriler, bitki gelişimi ve stres yanıtındaki düzenleyici rolleriyle ilgili fikir edinilmesini sağlamıştır. Bu çalışmada ER stresinde TIFY anlatımları, 6 saat TM'de 7 kata kadar azalmıştır. Asma bitkisinde yapılan TM uygulamasında da 2. saat ve 6. saatte kontrole göre TIFY10A-like gen anlatımında düşüş görülmüştür, ancak 24 saatte TIFY anlatımı artmıştır (Çakır Aydemir *et al.*, 2020). Bu tez çalışmasında elde edilen veriler de TIFY'nin 6 saate kadar olan TM uygulamasında anlatımının azaldığı yönündedir.

Biyotik ve abiyotik streslere yanıt veren mekanizmalar anlaşılmadıkça, bitkiler bu koşullara sürekli olarak maruz kalacak ve dünya çapında tarım için bir tehdit halini alacaktır (Gull, Ahmad Lone ve Ul Islam Wani, 2019). Bitkileri farklı stres koşullarına karşı korumak üzere mekanizmalar geliştirebilmek için genetik düzeyde çalışmaların yapılması gerekmektedir. Biyoteknolojik çalışmalarla bitkilere stresle baş edebilecek mekanizmaların geliştirilebilmesi için genom ve transkriptom seviyesinde yapılan yüksek verimlilikli çalışmalardan elde edilen veriler büyük önem arz etmektedir. Bitkilerin stresle baş etme mekanizmaları bu mekanizmaların ilişkili olduğu anahtar genler ve metabolik yollar tanımlanarak bu alanda yapılacak çalışmaların önü açılacaktır.

ER stresi, özellikle bitkilerde hala aydınlatılmayı bekleyen pek çok yolla ilişkili bir hücrel yanıttır. Bitkilerin çoklu stres unsurlarıyla karşılaştığında ER yanıtlarının nasıl değiştiğinin aydınlatılması, ER ve ROT sinyalleşme süreçlerini düzenleyen anahtar faktörlerin belirlenmesi, sekonder mesajcıların ER stresinde oynadığı roller, RNT'lerin de ER stresinde olası fonksiyonları hala üzerinde çalışılan sorulardır. ERAD bileşenleri, düzenleyicileri veya substratlarıyla yapılan çalışmaların çoğu da ubiquitinasyon modifikasyonuna yoğunlaşmıştır. Fosforilasyon vb. diğer post-translasyonel modifikasyonların ERAD sürecinin düzenlenmesinde rol alıp almadığı hala araştırılmaktadır (Chen, Yu ve Xie, 2020).

ER stresi ve ROT mekanizmaları iç içe hücrel mekanizmalar olduğundan, bunlar arasındaki ilişkinin daha iyi anlaşılması, bitki hormon sinyallerinin ER stres yanıtlarını düzenleme yollarının aydınlatılması, UPR yolağının bileşenlerinin tanımlanması ve ERAD ile ilişkili diğer olası etki mekanizmalarının belirlenmesi, ER stresine başa çıkabilmek için stratejiler

geliştirilmesi ve tarımsal uygulamalarda bitkilerin hayatta kalma oranının artırılması için yardımcı olacak veriler sunabilecektir.

ER stresinin temel mekanizmaları bilinse de bitkilerde bu mekanizmaların bileşenlerinin ve ilişkili yollarının detaylı olarak aydınlatılması, bitkilerde stresle indüklenen sinyalleşme ve metabolik yolların daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır. Özellikle abiyotik veya biyotik stres etmenlerinin ER stresini indükleyici etkisi düşünüldüğünde, bu streslerle başa çıkabilmek için yapılacak bitki ıslah çalışmalarında ER stresıyla ilişkili elde edilmiş verilerin yeni alternatif yaklaşımlar sunmada rol oynayabileceği öngörülmektedir.

Bu tez çalışmasının ER stresi durumunda domates bitkisinin verdiği transkriptom düzeyindeki yanıtlarla ilgili fikir edinilmesi için ışık tutması beklenmektedir ve elde edilen veriler, bahsedilen tüm konular dahilinde anlamlı bulgular sunmaktadır. Bu bulguların yapılan diğer çalışmalarla geliştirilmesi ve yeni elde edilecek verilere göre yorumlanmasıyla bitkilerdeki ER stresi yanıtlarının daha iyi anlaşılabilmesi umulmaktadır. Bitkilerin stresle başa çıkmak için geliştirdiği mekanizmaların aydınlatılması ile gerçekleştirilecek biyoteknolojik çalışmalar için gerekli literatür verisinin sağlanmasına bu tez çalışması kapsamında elde edilen veriler de hizmet etmektedir.

## KAYNAKLAR

- Uren, AG., O'Rourke, K., Aravind, L. A., Pisabarro, M. T., ..., 2000, Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma, *Mol Cell*, 6 (4), 961–967.
- Aller, I., Meyer, A.J., 2013, The oxidative protein folding machinery in plant cells, *Protoplasma*, 250 (4), 799–816.
- Andrási, N., Rigó, G., Zsigmond, L., Pérez-Salamó, I., Papdi, C., Klement, E., ..., 2019, The mitogen-activated protein kinase 4-phosphorylated heat shock factor A4A regulates responses to combined salt and heat stresses, *J Exp Bot*, 70 (18), 4903–4918.
- Bai, Y., Im, P., In, L., ..., 2007, Domestication and Breeding of Tomatoes: What have We Gained and What Can We Gain in the Future?, *Ann Bot*, 100 (5), 1085–1094.
- Bao, Y., Howell, S.H., 2017, The unfolded protein response supports plant development and defense as well as responses to abiotic stress, *Front Plant Sci*, 8, 344.
- Caarls, L., Pieterse, C.M.J., van Wees, S.C.M., 2015, How salicylic acid takes transcriptional control over jasmonic acid signaling, *Front Plant Sci*, 6, 170.
- Çakır Aydemir, B., Yüksel Özmen, C., Kibar, U., Mutaş, F., Büyük, P.B., ..., 2020, Salt stress induces endoplasmic reticulum stress-responsive genes in a grapevine rootstock, *PLoS One*, 15 (7), e0236424.
- Callis, J., Vierstra, R.D., 1989, Ubiquitin and ubiquitin genes in higher plants, *Oxford Surveys Plant Mol. Biol*, 6, 1-30.
- Cao, J., Wang, C., Hao, N., Fujiwara, T., Wu, T., 2022, Endoplasmic Reticulum Stress and Reactive Oxygen Species in Plants, *Antioxidants*, 11 (7), 1240.
- Che, P., Bussell, J.D., Zhou, W., Estavillo, G.M., Pogson, B.J., Smith, S.M., 2010, Signaling from the endoplasmic reticulum activates brassinosteroid signaling and promotes acclimation to stress in Arabidopsis, *Sci Signal*, 3 (141), 69.
- Chen, Q., Yu, F., Xie, Q., 2020, Insights into endoplasmic reticulum-associated degradation in plants, *New Phytologist*, 226 (2), 345–350.
- Chen, Y., Aung, K., Rolčík, J., Walicki, K., Friml, J., Brandizzi, F., 2014. Inter-Regulation of the Unfolded Protein Response and Auxin Signaling, *Plant J*, 77 (1), 97–107.
- Chen, Y., Brandizzi, F., 2013, IRE1: ER stress sensor and cell fate executor, *Trends Cell Biol*, 23 (11), 547–555.
- Chini, A., Fonseca, S., Fernández, G., Adie, B., Chico, J.M., Lorenzo, O., ..., 2007, The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling, *Nature* 2007, 448 (7154), 666–671.

- Csordás, G., Hajnóczky, G., 2009, SR/ER-mitochondrial local communication: Calcium and ROS, *Biochim Biophys Acta*, 1787 (11), 1352.
- Cui, F., Liu, L., Zhao, Q., Zhang, Z., Li, Q., Lin, B., Wu, Y., Tang, S., Xie, Q., 2012, Arabidopsis Ubiquitin Conjugase UBC32 Is an ERAD Component That Functions in Brassinosteroid-Mediated Salt Stress Tolerance, *Plant Cell*, 24 (1), 233–244.
- Czékus, Z., Csíkos, O., Ördög, A., Tari, I., Poór, P., 2020, Effects of Jasmonic Acid in ER Stress and Unfolded Protein Response in Tomato Plants, *Biomol* 2020, 10 (7), 1031.
- Czékus, Z., Szalai, G., Tari, I., Khan, M.I.R., Poór, P., 2022, Role of ethylene in ER stress and the unfolded protein response in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants, *Plant Physiology and Biochemistry*, 181, 1–11.
- Darling, N.J., Cook, S.J., 2014, The role of MAPK signalling pathways in the response to endoplasmic reticulum stress, *Biochim Biophys Acta*, 1843 (10), 2150–2163.
- de Geyter, N., Gholami, A., Goormachtig, S., Goossens, A., 2012, Transcriptional machineries in jasmonate-elicited plant secondary metabolism, *Trends Plant Sci*, 17 (6), 349–359.
- del Pozo, O., Lam, E., 1998, Caspases and programmed cell death in the hypersensitive response of plants to pathogens, *Current Biology*, 8 (20), 1129–1132.
- Deng, Y., Humbert, S., Liu, J.X., Srivastava, R., Rothstein, S.J., Howell, S.H., 2011, Heat induces the splicing by IRE1 of a mRNA encoding a transcription factor involved in the unfolded protein response in Arabidopsis, *Proc Natl Acad Sci USA*, 108 (17), 7247–7252.
- Deng, Y., Srivastava, R., Howell, S.H., 2013, Endoplasmic Reticulum (ER) Stress Response and Its Physiological Roles in Plants, *Int J Mol Sci*, 14 (4), 8188.
- Durand, A.N., Pauwels, L., Goossens, A., 2016, The Ubiquitin System and Jasmonate Signaling, *Plants*, 5 (1), 183–205.
- Efstathiou, S., Ottens, F., Schütter, L.S., Ravanelli, S., Charmpilas, N., Gutschmidt, A., ..., 2022, ER-associated RNA silencing promotes ER quality control, *Nature Cell Biology* 2022, 24 (12), 1714–1725.
- Erffelinck, M.L., Goossens, A., 2018, Review: Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation (ERAD)-Dependent Control of (Tri)terpenoid Metabolism in Plants, *Planta Med*, 84 (12-13), 874-880.
- Farmer, E.E., Ryan, C.A., 1992, Octadecanoid Precursors of Jasmonic Acid Activate the Synthesis of Wound-Inducible Proteinase Inhibitors, *Plant Cell*, 4 (2), 129–134.
- Frank, G., Pressman, E., Ophir, R., Althan, L., Shaked, R., Freedman, M., Shen, S., Firon, N., 2009, Transcriptional profiling of maturing tomato (*Solanum lycopersicum* L.) microspores reveals the involvement of heat shock proteins, ROS scavengers, hormones, and sugars in the heat stress response, *J Exp Bot*, 60 (13), 3891–3908.

- Gardner, B.M., Pincus, D., Gotthardt, K., Gallagher, C.M., Walter, P., 2013, Endoplasmic Reticulum Stress Sensing in the Unfolded Protein Response, *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5 (3), a013169.
- Gill, S.S., Tuteja, N., 2010, Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants, *Plant Physiol Biochem*, 48 (12), 909–930.
- Goldstein, G., Scheid, M., Hammerling, U., Schlesinger, D.H., Niall, H.D., Boyse, E.A., 1975, Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells, *Proc Natl Acad Sci USA*, 72 (1), 11.
- Goossens, J., Mertens, J., Goossens, A., 2017, Role and functioning of bHLH transcription factors in jasmonate signalling, *J Exp Bot*, 68 (6), 1333–1347.
- Gull, A., Ahmad Lone, A., Ul Islam Wani, N., 2019, Biotic and Abiotic Stresses in Plants, *IntechOpen*.
- Han, D., Lerner, A.G., vande Walle, L., Upton, J.P., Xu, W., Hagen, A., Backes, B.J., ..., 2009, IRE1 $\alpha$  Kinase Activation Modes Control Alternate Endoribonuclease Outputs to Determine Divergent Cell Fates, *Cell*, 138 (3), 562–575.
- Hancock, J.T., Umehara, M., Basile, A., Kim, J.-S., Mochida, K., Shinozaki, K., 2022, ER Stress and the Unfolded Protein Response: Homeostatic Regulation Coordinate Plant Survival and Growth, *Plants* 2022, 11 (23), 3197.
- Harding, H.P., Zhang, Y., Ron, D., 1999, Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase, *Nature*, 397 (6716), 271–274.
- Harding, H.P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P.D., Calfon, M., Sadri, N., Yun, C., ..., 2003, An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress, *Mol Cell*, 11 (3), 619–633.
- Hartl, F.U., Hayer-Hartl, M., 2009, Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo, *Nat Struct Mol Biol*, 16 (6), 574–581.
- Hayashi, S., Takahashi, H., Wakasa, Y., Kawakatsu, T., Takaiwa, F., 2013, Identification of a cis-element that mediates multiple pathways of the endoplasmic reticulum stress response in rice, *Plant Journal*, 74 (2), 248–257.
- Hedges, S.B., 2002, The origin and evolution of model organisms, *Nature Reviews Genetics* 2002, 3 (11), 838–849.
- Hollien, J., Lin, J.H., Li, H., Stevens, N., Walter, P., Weissman, J.S., 2009, Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells, *J Cell Biol*, 186 (3), 323–331.
- Hollien, J., Weissman, J.S., 2006, Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response, *Science*, 313 (5783), 104–107.

- Hong, G.J., Xue, X.Y., Mao, Y.B., Wang, L.J., Chen, X.Y., 2012, Arabidopsis MYC2 interacts with DELLA proteins in regulating sesquiterpene synthase gene expression, *Plant Cell*, 24 (6), 2635–2648.
- Howell, S.H., 2013, Endoplasmic Reticulum Stress Responses in Plants, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 64, 477–499.
- Hu, S., Ye, H., Cui, Y., Jiang, L., 2020, AtSec62 is critical for plant development and is involved in ER-phagy in Arabidopsis thaliana, *J Integr Plant Biol*, 62 (2), 181–200.
- Huang, Z., Zhang, Z., Zhang, X., Zhang, H., Huang, D., Huang, R., 2004, Tomato TERF1 modulates ethylene response and enhances osmotic stress tolerance by activating expression of downstream genes, *FEBS Lett*, 573 (1-3), 110–116.
- Irsigler, A.S.T., Costa, M.D.L., Zhang, P., Reis, P.A.B., Dewey, R.E., Boston, R.S., Fontes, E.P.B., 2007, Expression profiling on soybean leaves reveals integration of ER- and osmotic-stress pathways, *BMC Genomics*, 8 (1), 1–15.
- Iwata, Y., Fedoroff, N. v, Koizumi, N., 2008, Arabidopsis bZIP60 is a proteolysis-activated transcription factor involved in the endoplasmic reticulum stress response, *Plant Cell*, 20 (11), 3107–21.
- Iwata, Y., Koizumi, N., 2012, Plant transducers of the endoplasmic reticulum unfolded protein response, *Trends Plant Sci*, 17 (12), 720–727.
- Iwata, Y., Sakiyama, M., Lee, M.-H., Koizumi, N., 2010, Transcriptomic response of *Arabidopsis thaliana* to tunicamycin-induced endoplasmic reticulum stress, *Plant Biotechnology*, 27 (2), 161–171.
- Jia, X.Y., Xu, C.Y., Jing, R.L., Li, R.Z., Mao, X.G., Wang, J.P., Chang, X.P., 2008, Molecular cloning and characterization of wheat calreticulin (CRT) gene involved in drought-stressed responses, *J Exp Bot*, 59 (4), 739–751.
- Kamauchi, S., Nakatani, H., Nakano, C., Urade, R., 2005, Gene expression in response to endoplasmic reticulum stress in *Arabidopsis thaliana*, *FEBS Journal*, 272 (13), 3461–3476.
- Kang, C.H., Lee, E.S., Nawkar, G.M., Park, J.H., Wi, S.D., Bae, S. bin, Chae, H.B., ..., 2021, Constitutive photomorphogenic 1 enhances ER stress tolerance in Arabidopsis, *Int J Mol Sci*, 22 (19).
- Karan, R., 2015, Omics Study for Abiotic Stress Responses in Plants, *Advances in Plants & Agriculture Research*, 2 (1).
- Kaufman, R.J., 1999, Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls, *Genes Dev*, 13, 1211–1233.

- Kaur, N., Kaitheri Kandoth, P., 2021, Tomato bZIP60 mRNA undergoes splicing in endoplasmic reticulum stress and in response to environmental stresses, *Plant Physiology and Biochemistry*, 160, 397–403.
- Kawai-Yamada, M., Hori, Z., Ogawa, T., Ihara-Ohori, Y., Tamura, K., Nagano, M., ..., 2009, Loss of Calmodulin Binding to Bax Inhibitor-1 Affects Pseudomonas-mediated Hypersensitive Response-associated Cell Death in *Arabidopsis thaliana*, *Journal of Biological Chemistry*, 284 (41), 27998–28003.
- Kazan, K., Manners, J.M., 2013, MYC2: the master in action, *Mol Plant*, 6 (3), 686–703.
- Khan, S.A., Li, M.Z., Wang, S.M., Yin, H.J., 2018, Revisiting the Role of Plant Transcription Factors in the Battle against Abiotic Stress, *International Journal of Molecular Sciences* 2018, 19 (6), 1634.
- Kim, S.Y., Kim, S.G., Kim, Y.S., Seo, P.J., Bae, M., Yoon, H.K., Park, C.M., 2007, Exploring membrane-associated NAC transcription factors in *Arabidopsis*: implications for membrane biology in genome regulation, *Nucleic Acids Res*, 35 (1), 203–213.
- Kimmig, P., Diaz, M., Zheng, J., Williams, C.C., Lang, A., Aragón, T., Li, H., Walter, P., 2012, The unfolded protein response in fission yeast modulates stability of select mRNAs to maintain protein homeostasis, *Elife* 2012, 1.
- Kimura, S., Sinha, N., 2008, Tomato (*Solanum lycopersicum*): A Model Fruit-Bearing Crop, *Cold Spring Harb Protoc* 2008, 3 (11).
- Klay, I., Gouia, S., Liu, M., Mila, I., Khoudi, H., Bernadac, A., Bouzayen, M., Pirrello, J., 2018, Ethylene Response Factors (ERF) are differentially regulated by different abiotic stress types in tomato plants, *Plant Science*, 274, 137–145.
- Koumenis, C., Naczki, C., Koritzinsky, M., Rastani, S., Diehl, A., Sonenberg, N., Koromilas, A., Wouters, B.G., 2002, Regulation of Protein Synthesis by Hypoxia via Activation of the Endoplasmic Reticulum Kinase PERK and Phosphorylation of the Translation Initiation Factor eIF2 $\alpha$ , *Mol Cell Biol*, 22 (21), 7405–7416.
- Kozutsumi, Y., Segal, M., Normington, K., Gething, M.J., Sambrook, J., 1988, The presence of malfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins, *Nature* 1988, 332 (6163), 462–464.
- Kukurba, K.R., Montgomery, S.B., 2015, RNA sequencing and analysis, *Cold Spring Harb Protoc* 2015, 11, 951–969.
- Kurepa, J., Smalle, J.A., 2008, Structure, function and regulation of plant proteasomes, *Biochimie*, 90 (2), 324–335.
- la Verde, V., Trande, M., D’Onofrio, M., Dominici, P., Astegno, A., 2018, Binding of calcium and target peptide to calmodulin-like protein CML19, the centrin 2 of *Arabidopsis thaliana*, *Int J Biol Macromol*, 108, 1289–1299.

- Lamb, C.A., Yoshimori, T., Tooze, S.A., 2013, The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14 (12), 759–774.
- le Bars, R., Marion, J., le Borgne, R., Satiat-Jeunemaitre, B., Bianchi, M.W., 2014, ATG5 defines a phagophore domain connected to the endoplasmic reticulum during autophagosome formation in plants, *Nature Communications* 2014, 5 (1), 1–10.
- Lee, H.K., Cho, S.K., Son, O., Xu, Z., Hwang, I., Kim, W.T., 2009, Drought Stress-Induced Rma1H1, a RING Membrane-Anchored E3 Ubiquitin Ligase Homolog, Regulates Aquaporin Levels via Ubiquitination in Transgenic Arabidopsis Plants, *Plant Cell*, 21 (2), 622–641.
- Li, P., Yin, F., Zheng, X., 2020, Microarray analysis of gene expression profile induced by pre-storage application of oxalic acid in tomato fruit under chilling stress, *Eur J Hort Sci*, 85 (4), 232–241.
- Li, Y., Humbert, S., Howell, S.H., 2012, ZmbZIP60 mRNA is spliced in maize in response to ER stress, *BMC Res Notes*, 5 (1), 1–11.
- Lin, L., Zhang, C., Chen, Y., Wang, Y., Wang, D., Liu, X., Wang, M., Mao, J., Zhang, J., ..., 2019, PAWH1 and PAWH2 are plant-specific components of an Arabidopsis endoplasmic reticulum-associated degradation complex, *Nature Communications* 2019, 10 (1), 1–13.
- Liu, J.X., Howell, S.H., 2016, Managing the protein folding demands in the endoplasmic reticulum of plants, *New Phytologist*, 211 (2), 418–428.
- Liu, J.X., Howell, S.H., 2010, Endoplasmic Reticulum Protein Quality Control and Its Relationship to Environmental Stress Responses in Plants, *Plant Cell*, 22, 2930.
- Liu, J.X., Srivastava, R., Che, P., Howell, S.H., 2007a, An endoplasmic reticulum stress response in Arabidopsis is mediated by proteolytic processing and nuclear relocation of a membrane-associated transcription factor, bZIP28, *Plant Cell*, 19 (12), 4111–4119.
- Liu, J.X., Srivastava, R., Che, P., Howell, S.H., 2007b, Salt stress responses in Arabidopsis utilize a signal transduction pathway related to endoplasmic reticulum stress signaling, *Plant Journal*, 51 (5), 897–909.
- Liu, L., Cui, F., Li, Q., Yin, B., Zhang, H., Lin, B., Wu, Y., Xia, R., Tang, S., Xie, Q., 2010, The endoplasmic reticulum-associated degradation is necessary for plant salt tolerance, *Cell Research* 2010, 21 (6), 957–969.
- Liu, L., Li, J., 2019, Communications Between the Endoplasmic Reticulum and Other Organelles During Abiotic Stress Response in Plants, *Frontiers in Plant Science*, 10, 749.
- Liu, X., Zhao, M., Gu, C., Jiang, H., Sun, J., Li, J., 2022, Genome-wide identification of MAPK family genes and their response to abiotic stresses in tea plant (*Camellia sinensis*), *Open Life Sci*, 17 (1), 1064–1074.

- Liu, Y., Zhang, C., Wang, D., Su, W., Liu, L., Wang, M., Li, J., 2015, EBS7 is a plant-specific component of a highly conserved endoplasmic reticulum-associated degradation system in Arabidopsis, *Proc Natl Acad Sci USA*, 112 (39), 12205–12210.
- Lu, S.J., Yang, Z.T., Sun, Ling, Sun, Le, Song, Z.T., Liu, J.X., 2012, Conservation of IRE1-Regulated bZIP74 mRNA Unconventional Splicing in Rice (*Oryza sativa* L.) Involved in ER Stress Responses, *Mol Plant*, 5 (2), 504–514.
- Lundgren Rose, T., Bonneau, L., Der, C., ele Marty-Mazars, D., Marty, F., 2006, Starvation-induced expression of autophagy-related genes in Arabidopsis, *Biol Cell*, 98 (1), 53–67.
- Mamedov, T.G., Shono, M., 2008, Molecular chaperone activity of tomato (*Lycopersicon esculentum*) endoplasmic reticulum-located small heat shock protein, *J Plant Res*, 121 (2), 235–243.
- Marshall, R.S., Li, F., Gemperline, D.C., Book, A.J., Vierstra, R.D., 2015, Autophagic Degradation of the 26S Proteasome Is Mediated by the Dual ATG8/Ubiquitin Receptor RPN10 in Arabidopsis, *Mol Cell*, 58. (6), 1053.
- Martínez, I.M., Chrispeels, M.J., 2003, Genomic analysis of the unfolded protein response in Arabidopsis shows its connection to important cellular processes, *Plant Cell*, 15 (2), 561–576.
- McCormack, M.E., Liu, X., Jordan, M.R., Pajerowska-Mukhtar, K.M., 2015, An improved high-throughput screening assay for tunicamycin sensitivity in Arabidopsis seedlings, *Front Plant Sci*, 6 (8), 663.
- Meng, F., Lv, R., Cheng, M., Mo, F., Zhang, N., Qi, H., Liu, J., Chen, X., Liu, Y., ..., 2022, Insights into the molecular basis of biocontrol of *Botrytis cinerea* by *Clonostachys rosea* in tomato, *Sci Hortic*, 291, 110547.
- Michalak, M., Groenendyk, J., Szabo, E., Gold, L.I., Opas, M., 2009, Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum, *Biochem J*, 417 (3), 651–666.
- Mishiba, K.I., Nagashima, Y., Suzukia, E., Hayashi, N., Ogata, Y., Shimada, Y., Koizumi, N., 2013, Defects in IRE1 enhance cell death and fail to degrade mRNAs encoding secretory pathway proteins in the Arabidopsis unfolded protein response, *Proc Natl Acad Sci USA*, 110 (14), 5713–5718.
- Misselwitz, B., Staack, O., Rapoport, T.A., 1998, J proteins catalytically activate Hsp70 molecules to trap a wide range of peptide sequences, *Mol Cell*, 2 (5), 593–603.
- Mittler, R., 2017, ROS Are Good, *Trends Plant Sci*, 22 (1), 11–19.
- Mittler, R., 2002, Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance, *Trends Plant Sci*, 7 (9), 405–410.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., van Breusegem, F., 2004, Reactive oxygen gene network of plants, *Trends Plant Sci*, 9 (10), 490–498.

- Moore, K., Hollien, J., 2015, Ire1-mediated decay in mammalian cells relies on mRNA sequence, structure, and translational status, *Mol Biol Cell*, 26 (16), 2873–2884.
- Moreno, A.A., Mukhtar, M.S., Blanco, F., Boatwright, J.L., Moreno, I., Jordan, M.R., ..., 2012, IRE1/bZIP60-Mediated Unfolded Protein Response Plays Distinct Roles in Plant Immunity and Abiotic Stress Responses, *PLoS One*, 7 (2), e31944.
- Müller, B., Grossniklaus, U., 2010, Model organisms — A historical perspective, *J Proteomics*, 73 (11), 2054–2063.
- Müller, J., Piffanelli, P., Devoto, A., Miklis, M., Elliott, C., Ortmann, B., Schulze-Lefert, P., Panstruga, R., 2005, Conserved ERAD-Like Quality Control of a Plant Polytopic Membrane Protein, *Plant Cell*, 17 (1), 149–163.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962, A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures, *Physiol Plant*, 15 (3), 473–497.
- Nagaraju, M., Kumar, A., Rajasheker, G., Manohar Rao, D., Kavi Kishor, P.B., 2020, DnaJs, the critical drivers of Hsp70s: genome-wide screening, characterization and expression of DnaJ family genes in *Sorghum bicolor*, *Mol Biol Rep*, 47 (10), 7379–7390.
- Nagashima, Y., Iwata, Y., Ashida, M., Mishiba, K.I., Koizumi, N., 2014, Exogenous salicylic acid activates two signaling arms of the unfolded protein response in *Arabidopsis*, *Plant Cell Physiol*, 55 (10), 1772–1778.
- Otero, J.H., Lizák, B., Hendershot, L.M., 2010, Life and death of a BiP substrate, *Semin Cell Dev Biol*, 21 (5), 472–478.
- Ozgun, R., Turkan, I., Uzilday, B., Sekmen, A.H., 2014, Endoplasmic reticulum stress triggers ROS signalling, changes the redox state, and regulates the antioxidant defence of *Arabidopsis thaliana*, *J Exp Bot*, 65 (5), 1377.
- Ozgun, R., Uzilday, B., Iwata, Y., Koizumi, N., Turkan, I., 2018, Interplay between the unfolded protein response and reactive oxygen species: a dynamic duo, *J Exp Bot*, 69 (14), 3333–3345.
- Pandey, S.K., Nookaraju, A., Upadhyaya, C.P., Gururani, M.A., Venkatesh, J., Kim, D.H., Park, S.W., 2011, An Update on Biotechnological Approaches for Improving Abiotic Stress Tolerance in Tomato, *Crop Sci*, 51 (6), 2303–2324.
- Park, J.H., Kang, C.H., Nawkar, G.M., Lee, E.S., Paeng, S.K., Chae, H.B., Chi, Y.H., ..., 2018, EMR, a cytosolic-abundant ring finger E3 ligase, mediates ER-associated protein degradation in *Arabidopsis*, *New Phytologist*, 220 (1), 163–177.
- Pauwels, L., Barbero, G.F., Geerinck, J., Tilleman, S., Grunewald, W., Pérez, A.C., ..., 2010, NINJA connects the co-repressor TOPLESS to jasmonate signalling, *Nature* 2010, 464 (7289), 788–791.
- Peralta, I., Spooner, D., 2000, Classification of wild tomatoes: a review, *Kurtziana*, 28 (1), 45–54.

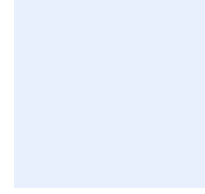
- Ron, D., Walter, P., 2007, Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2007, 8 (7), 519–529.
- Sato, S., Tabata, S., Hirakawa, H., Asamizu, E., Shirasawa, K., Isobe, S., Kaneko, T., Nakamura, Y., ..., 2012, The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution, *Nature* 2012, 485 (7400), 635–641.
- Sever, N., Song, B.L., Yabe, D., Goldstein, J.L., Brown, M.S., DeBose-Boyd, R.A., 2003, Insig-dependent ubiquitination and degradation of mammalian 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase stimulated by sterols and geranylgeraniol, *J Biol Chem*, 278 (52), 52479–52490.
- Smalle, J., Kurepa, J., Yang, P., Emborg, T.J., Babychuk, E., Kushnir, S., Vierstra, R.D., 2003, The Pleiotropic Role of the 26S Proteasome Subunit RPN10 in Arabidopsis Growth and Development Supports a Substrate-Specific Function in Absciscic Acid Signaling, *Plant Cell*, 15 (4), 965.
- Smith, J.L., de Moraes, C.M., Mescher, M.C., 2009, Jasmonate- and salicylate-mediated plant defense responses to insect herbivores, pathogens and parasitic plants, *Pest Manag Sci*, 65 (5), 497–503.
- Song, L., Liu, D., 2015, Ethylene and plant responses to phosphate deficiency, *Front Plant Sci*, 6, 796.
- Song, S., Tan, J., Miao, Y., Zhang, Q., 2018, Crosstalk of ER stress-mediated autophagy and ER-phagy: Involvement of UPR and the core autophagy machinery, *J Cell Physiol*, 233 (5), 3867–3874.
- Spyropoulou, E.A., Haring, M.A., Schuurink, R.C., 2014, RNA sequencing on *Solanum lycopersicum* trichomes identifies transcription factors that activate terpene synthase promoters, *BMC Genomics*, 15 (1).
- Srivastava, R., Deng, Y., Shah, S., Rao, A.G., Howell, S.H., 2013, BINDING PROTEIN Is a Master Regulator of the Endoplasmic Reticulum Stress Sensor/Transducer bZIP28 in Arabidopsis, *Plant Cell*, 25 (4), 1416–1429.
- Stephani, M., Picchianti, L., Gajic, A., Beveridge, R., Skarwan, E., ..., 2020, A cross-kingdom conserved ER-phagy receptor maintains endoplasmic reticulum homeostasis during stress, *Elife*, 9, 1–105.
- Stone, S.L., 2019, Role of the Ubiquitin Proteasome System in Plant Response to Abiotic Stress, *Int Rev Cell Mol Biol*, 343, 65–110.
- Su, W., Liu, Y., Xia, Y., Hong, Z., Li, J., 2012, The Arabidopsis Homolog of the Mammalian OS-9 Protein Plays a Key Role in the Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation of Misfolded Receptor-Like Kinases, *Mol Plant*, 5 (4), 929–940.
- Sun, J.L., Li, J.Y., Wang, M.J., Song, Z.T., Liu, J.X., 2021, Protein Quality Control in Plant Organelles: Current Progress and Future Perspectives, *Mol Plant*, 14 (1), 95–114.

- Agilent Technologies Agilent 2100 Bioanalyzer System 2100 Expert Software User's Guide.
- Tiwari, L.D., Khungar, L., Grover, A., 2020, AtHsc70-1 negatively regulates the basal heat tolerance in *Arabidopsis thaliana* through affecting the activity of HsfAs and Hsp101, *The Plant Journal*, 103 (6), 2069–2083.
- Travers, K.J., Patil, C.K., Wodicka, L., Lockhart, D.J., Weissman, J.S., Walter, P., 2000, Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation, *Cell*, 101 (3), 249–258.
- Valente, M.A.S., Faria, J.A.Q.A., Soares-Ramos, J.R.L., Reis, P.A.B., Pinheiro, G.L., ..., 2009, The ER luminal binding protein (BiP) mediates an increase in drought tolerance in soybean and delays drought-induced leaf senescence in soybean and tobacco, *J Exp Bot*, 60 (2), 533.
- Vanholme, B., Grunewald, W., Bateman, A., Kohchi, T., Gheysen, G., 2007, The TIFY family previously known as ZIM, *Trends Plant Sci*, 12 (6), 239–244.
- Verma, S., Nizam, S., Verma, P.K., 2013, Biotic and abiotic stress signaling in plants, *Stress Signaling in Plants: Genomics and Proteomics Perspective*, 1, 25–50.
- Verma, V., Ravindran, P., Kumar, P.P., 2016, Plant hormone-mediated regulation of stress responses, *BMC Plant Biol*, 16 (1), 1–10.
- Vijay-Kumar, S., Bugg, C.E., Wilkinson, K.D., Vierstra, R.D., Hatfield, P.M., Cook, W.J., 1987, Comparison of the Three-dimensional Structures of Human, Yeast, and Oat Ubiquitin, *Journal of Biological Chemistry*, 262 (13), 6396–6399.
- Vitale, A., Boston, R.S., 2008, Endoplasmic reticulum quality control and the unfolded protein response: insights from plants, *Traffic*, 9 (10), 1581–1588.
- Wakasa, Y., Hayashi, S., Ozawa, K., Takaiwa, F., 2012, Multiple roles of the ER stress sensor IRE1 demonstrated by gene targeting in rice, *Sci Rep*, 2.
- Wakasa, Y., Oono, Y., Yazawa, T., Hayashi, S., Ozawa, K., Handa, H., Matsumoto, T., Takaiwa, F., 2014, RNA sequencing-mediated transcriptome analysis of rice plants in endoplasmic reticulum stress conditions, *BMC Plant Biol*, 14 (1).
- Wan, S., Jiang, L., 2016, Endoplasmic reticulum (ER) stress and the unfolded protein response (UPR) in plants, *Protoplasma*, 253 (3), 753–764.
- Xu, Z., Dong, M., Peng, X., Ku, W., Zhao, Y., Yang, G., 2019, New insight into the molecular basis of cadmium stress responses of wild paper mulberry plant by transcriptome analysis, *Ecotoxicol Environ Saf*, 171, 301–312.
- Yamamoto, M., Maruyama, D., Endo, T., Nishikawa, S.I., 2008, *Arabidopsis thaliana* has a set of J proteins in the endoplasmic reticulum that are conserved from yeast to animals and plants, *Plant Cell Physiol*, 49 (10), 1547–1562.

- Yan, Y., Stolz, S., Chételat, A., Reymond, P., Pagni, M., Dubugnon, L., Farmer, E.E., 2007, A Downstream Mediator in the Growth Repression Limb of the Jasmonate Pathway, *Plant Cell*, 19 (8), 2470–2483.
- Yan, Z., Wang, J., Wang, F., Xie, C., Lv, B., Yu, Z., Dai, S., Liu, X., Xia, G., ..., 2021, MPK3/6-induced degradation of ARR1/10/12 promotes salt tolerance in Arabidopsis, *EMBO Rep*, 22 (10).
- Yang, Z.T., Wang, M.J., Sun, Ling, Lu, S.J., Bi, D.L., Sun, Le, Song, Z.T., ..., 2014, The Membrane-Associated Transcription Factor NAC089 Controls ER-Stress-Induced Programmed Cell Death in Plants, *PLoS Genetics*, 10 (3), e1004243.
- Ye, C., Dickman, M.B., Whitham, S.A., Payton, M., Verchot, J., 2011, The Unfolded Protein Response Is Triggered by a Plant Viral Movement Protein, *Plant Physiol*, 156 (2), 741.
- Yu, W., Wang, L., Zhao, R., Sheng, J., Zhang, S., Li, R., Shen, L., 2019, Knockout of SLMAPK3 enhances tolerance to heat stress involving ROS homeostasis in tomato plants, *BMC Plant Biol*, 19 (1), 1–13.
- Yu, X., Wang, T., Zhu, M., Zhang, L., Zhang, F., Jing, E., Ren, Y., Wang, Z., Xin, Z., Lin, T., 2019, Transcriptome and physiological analyses for revealing genes involved in wheat response to endoplasmic reticulum stress, *BMC Plant Biol*, 19 (1), 1–22.
- Zeng, Y., Li, B., Zhang, W., Jiang, L., 2019, ER-Phagy and ER Stress Response (ERSR) in Plants, *Front Plant Sci*, 10, 1192.
- Zhang, M., Zhang, S., 2022, Mitogen-activated protein kinase cascades in plant signaling, *J Integr Plant Biol*, 64 (2), 301–341.
- Zhang, R., Chen, H., Duan, M., Zhu, F., Wen, J., Dong, J., Wang, T., 2019, *Medicago falcata* MfSTMIR, an E3 ligase of endoplasmic reticulum-associated degradation, is involved in salt stress response, *The Plant Journal*, 98 (4), 680–696.
- Zhao, C., Shono, M., Sun, A., Yi, S., Li, M., Liu, J., 2007, Constitutive expression of an endoplasmic reticulum small heat shock protein alleviates endoplasmic reticulum stress in transgenic tomato, *J Plant Physiol*, 164 (7), 835–841.
- Zhao, C., Wang, P., Si, T., Hsu, C.C., Wang, L., Zayed, O., Yu, Z., Zhu, Y., ..., 2017, MAP Kinase Cascades Regulate the Cold Response by Modulating ICE1 Protein Stability, *Dev Cell*, 43 (5), 618–629.e5.
- Zhao, R., Xie, H., Lv, S., Zheng, Y., Yu, M., Shen, L., Sheng, J., 2013, LeMAPK4 participated in cold-induced ethylene production in tomato fruit, *J Sci Food Agric*, 93 (5), 1003–1009.
- Zhou, M., Memelink, J., 2016, Jasmonate-responsive transcription factors regulating plant secondary metabolism, *Biotechnol Advances*, 34 (4), 441–449.
- Zientara-Rytter, K., Sirko, A., 2016, To deliver or to degrade – an interplay of the ubiquitin–proteasome system, autophagy and vesicular transport in plants, *FEBS J*, 283 (19), 3534–3555.

## ÖZGEÇMİŞ

| Kişisel Bilgiler |                                                                          |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| Adı Soyadı       | Elif Pulat                                                               |
| Doğum Yeri       |                                                                          |
| Doğum Tarihi     | Tarih girmek için tıklayın veya dokununuz.                               |
| Uyruğu           | <input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer: |
| E-Posta Adresi   |                                                                          |
| Web Adresi       |                                                                          |



| Eğitim Bilgileri |                               |
|------------------|-------------------------------|
| Lisans           |                               |
| Üniversite       | İstanbul Üniversitesi         |
| Fakülte          | Fen Fakültesi                 |
| Bölümü           | Moleküler Biyoloji ve Genetik |
| Mezuniyet Yılı   | 04.07.2020                    |

| Yüksek Lisans |                                                         |
|---------------|---------------------------------------------------------|
| Üniversite    | İstanbul Üniversitesi                                   |
| Enstitü Adı   | Fen Bilimleri Enstitüsü                                 |
| Anabilim Dalı | Moleküler Biyoloji ve Genetik                           |
| Programı      | Moleküler Biyoteknoloji ve Genetik, Tezli Yüksek Lisans |

| Makale ve Bildiriler                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| Pulat E., Arslantürk A. H., Cakir O. Effect of ER stress on various miRNA expressions in tomato. In proceeding title; IV. International Agricultural, Biological and Life Sciences Conference; August 28- 30, 2022; Edirne; AGBIOL.                                                                                      |  |
| Odabasi B., Sebikbay S., Pulat E., Cakir O. ANALYZING OF ANTHOCYANIN ACCUMULATION AND GROWTH RATIOS OF <i>Black carrot</i> SSP. CALLUS UNDER THE SALICYLIC ACID AND SALINITY STRESSES. In proceeding title; IV. International Agricultural, Biological and Life Sciences Conference; August 28-30, 2022; Edirne; AGBIOL. |  |