

**MİTOKONDRIYAL DEMİR TAŞIYICI GENLERİN KAVAK
AĞACINDA (*Populus trichocarpa*) GENOM DÜZEYİNDE
BELİRLENMESİ VE BİYOBİYOİNFORMATİK ANALİZLERİ**

ONUR POYRAZ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
ORMAN MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN
PROF. DR. ERTUĞRUL FİLİZ**

DÜZCE, 2023

T.C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

MİTOKONDRIYAL DEMİR TAŞIYICI GENLERİN KAVAK AĞACINDA
(*Populus trichocarpa*) GENOM DÜZEYİNDE BELİRLENMESİ VE
BİYOİNFORMATİK ANALİZLERİ

Onur POYRAZ tarafından hazırlanan tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından Düzce Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Orman Mühendisliği Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Ertuğrul FİLİZ

Düzce Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Ertuğrul FİLİZ

Düzce Üniversitesi

Prof. Dr. Emrah ÇİÇEK

Düzce Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Emin URAS

Haliç Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi: 17.07.2024

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlamasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

17.07.2024

Onur POYRAZ

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans öğrenimimde ve bu tezin hazırlanmasında gösterdiği her türlü destek ve yardımdan dolayı değerli danışmanım Prof. Dr. Ertuğrul FİLİZ'e en içten dileklerimle teşekkür ederim,

Yüksek Lisans sürecim boyunca desteklerimden dolayı değerli hocalarım Doç. Dr. Şemsettin KULAÇ'a ve kıymetli jüri üyesi Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Emin URAS'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma boyunca yardımını, desteğini esirgemeyen ve yürüdüğüm yolda tecrübeleriyle beni aydınlatan arkadaşım Asım DİNÇ'e en içten dileklerimle teşekkür ederim.

17 Temmuz 2024

Onur POYRAZ

İÇİNDEKİLER

ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vi
TABLO LİSTESİ	vii
KISALTMALAR.....	viii
SİMGELER	ix
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1 BİTKİ BİYOLOJİSİNDE BİYOİNFORMATİK YAKLAŞIM VE UYGULAMALAR	3
2.2 MITOKONDRIYAL DEMİR TAŞIYICI GENLER.....	4
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	7
3.1 MIT GEN/PROTEİN DİZİLERİN BELİRLENMESİ VE TOPLANMASI...7	
3.2 AMİNO ASİT BİLEŞİMİ, KORUNMUŞ MOTİF VE FİLOGENETİK ANALİZLER	8
3.3. MIT PROTEİN DİZİLERİN SEKONDER VE TERSİYER YAPI ANALİZLERİ.....	8
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	9
4.1 MIT GEN VE PROTEİN DİZİ ANALİZLERİ	9
4.1.1 Kavak MIT Protein Dizilerinin Amino Asit Dağılımı	11
4.1.2 Gen Ontoloji (GO) Annotasyonları	12
4.1.3 Korunmuş Motif, Gen Yapısı ve Promotor Dizi Analizleri	13
4.2 P _t MIT GEN EKSPRESYON VE FİLOGENETİK ANALİZLER	15
4.3 TRANSMEMBRAN TOPOLOJİ VE POSTTRANSLASYONEL MODİFİKASYON	18
4.4 SEKONDER VE TERSİYER YAPI ANALİZLERİ	21
5. ÖNERİLER.....	25
6. KAYNAKLAR	26
7. ÖZGEÇMİŞ.....	31

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

- Şekil 1. Beş farklı bitki türüne ait MIT protein dizilerinin çoklu dizileme analizleri 11
- Şekil 2. Kavak bitkisine ait MIT protein dizilerinin amino asit bileşenleri (%)..... 12
- Şekil 3. Beş farklı bitki (kavak, söğüt, Arabidopsis, çeltik ve mısır) türüne ait olan korunmuş motif yapıları. Resimdeki her bir renk farklı bir motif yapısını göstermektedir.)..... 13
- Şekil 4. Beş farklı bitki (kavak, söğüt, Arabidopsis, çeltik ve mısır) türüne ait olan MIT gen yapıları. İçi dolu sarı kutular ekzonları temsil ederken, gri çizgiler intron bölgelerini temsil etmektedir..... 14
- Şekil 5. PlantCARE veri bankası kullanılarak elde edilen PtMIT genlerinin 5' bölgesinde elde edilen 2000 baz çiftlik promotör dizisi analizleri. Şekildeki her bir renk farklı cis-düzenleyici elementi temsil etmektedir. 15
- Şekil 6. Potri.009G077600.1, Potri.001G282400.1 ve Potri.016G125200.1 genlerinin GEPSdb veri bankası kullanılarak kuraklık ve sıcaklık stresleri altındaki ekspresyon seviyeleri. 17
- Şekil 7. MIT proteinlerinin evrimsel akrabalık ilişkileri Maksimum Olabilirlik (ML) yöntemi kullanılarak MEGA11 programıyla oluşturuldu. Ayrıca, kümeler üzerindeki rakamlar bootstrap değerlerini göstermektedir..... 18
- Şekil 8. MIT protein dizilerinin phobius sunucusu kullanılarak transmembran topoloji analizleri. Ayrıca, mor yapılar transmembran heliks (sarmal) yapılarını göstermektedir..... 20
- Şekil 9. Kavak ve söğüt bitkilerine ait MIT proteinlerinin 3D (tersiyer) yapıları. Ayrıca kırmızı renk alfa sarmalı ve gri renk ise ilmek (loop) yapılarını göstermektedir. 22
- Şekil 10. PtMIT proteinlerinin CASTp sunucusu kullanılarak gerçekleştirilen yüzey topoğrafya analizleri. Kırmızı bölgeler proteinlerin sahip olduğu en geniş hacimli cepleri (pocket) göstermektedir..... 23

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Bitki biyolojisinde kullanılan yaygın bazı veri bankaları.....	4
Tablo 2. Beş farklı bitkiden elde edilen MIT gen/protein dizilerine ait detaylar	10
Tablo 3. PtMIT protein dizilerinin posttranslasyonel modifikasyon analizleri	20
Tablo 4. PtMIT proteinlerinin sekonder yapı analizleri	21



KISALTMALAR

Cu	Bakır
EAA	Esansiyel Amino Asit
Fe	Demir
GO	Gen Ontoloji
MIT	Mitokondriyal Demir Taşıyıcı
Mn	Manganez
NA	Nikotinamin
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SRA	Dizi Okuma Arşivi
Zn	Çinko

SİMGELER

kDa

Kilo Dalton

pI

İzoelektrik nokta



ÖZET

MİTOKONDRIYAL DEMİR TAŞIYICI GENLERİN KAVAK AĞACINDA (*Populus trichocarpa*) GENOM DÜZEYİNDE BELİRLENMESİ VE BİYOİNFORMATİK ANALİZLERİ

Onur POYRAZ

Düzce Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Orman Mühendisliği Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Ertuğrul FİLİZ

Temmuz 2024, 30 Sayfa

Demir (Fe) hemen hemen tüm organizmalar için gerekli bir mikro besindir ve özellikle fotosentez yapan canlılarda demir gereksinimi çok yüksektir. Bitkilerde, kloroplast ve mitokondri organellerinde demir elementi çok yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Mitokondrilere demir alınımında rol oynayan *MIT* (Mitochondrial Iron Transporter: mitokondriyal demir taşıyıcı) genlerinin keşfiyle, mitokondriyal demir dengesi ve önemi daha iyi anlaşılmıştır. Bu çalışma, kavak (*Populus trichocarpa*) bitkisinde *MIT* genlerinin genom çaplı belirlenmesi ve biyoinformatik analizlerle yapılarının ortaya konulması amaçlanmıştır. Bu bağlamda, kavak bitkisinin genomunda üç adet *MIT* geni (Potri.001G282400.1, Potri.009G077600.1 ve Potri.016G125200.1) bulunmuştur. Moleküler ağırlık ve izoelektrik nokta değerlerinin ise 34.95-37.23 kDa ile 7.62-9.12 arasında olduğu bulundu. Kavak bitkisinin *MIT* protein dizilerinin amino asit kompozisyonu incelenmiş olup, yüzde olarak en fazla bulunan amino asit çeşidi ortalama %12.2 ile alanin (Ala) bulunmuştur. Yapılan filogenetik analizler sonucunda, monokot-dikot bitkilerin net bir şekilde birbirinden ayrıldığı tespit edildi. Özellikle, kavak *MIT* protein dizilerinin söğüt bitkisiyle gruplaştığı belirlendi. Ayrıca, kavak *MIT* genlerinin kuraklık stresi altında, gen çeşidine bağlı olarak ifade seviyelerinin çeşitlilik gösterdiği belirlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: *Populus*, Demir, Biyoinformatik, Filogenetik Ağaç, Gen İfadesi

ABSTRACT

GENOME-WIDE IDENTIFICATION AND BIOINFORMATIC ANALYSIS OF MITOCHONDRIAL IRON TRANSPORTER GENES IN POPLAR (*Populus trichocarpa*)

Onur POYRAZ

Düzce University
Graduate School, Department of Forest Engineering
Master's Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Ertuğrul FİLİZ

July 2024, 30 Pages

Iron (Fe) is an essential micronutrient for almost all organisms, and iron requirements are particularly high in photosynthetic organisms. In plants, iron is used intensively in the chloroplast and mitochondrial organelles. The discovery of the *MIT* (Mitochondrial Iron Transporter) genes, which are involved in the uptake of iron into the mitochondria, has led to a better understanding of the mitochondrial iron balance and its importance. The aim of this study was to determine the genome-wide *MIT* genes in poplar (*Populus trichocarpa*) and to reveal their structures by bioinformatic analyses. In this context, three *MIT* genes (Potri.001G282400.1, Potri.009G077600.1 and Potri.016G125200.1) were found in the genome of poplar plant. The amino acid composition of the *MIT* protein sequences of poplar plants was analyzed and the most abundant amino acid type was alanine (Ala) with an average of 12.2%. Phylogenetic analyses revealed a clear separation between monocot and dicot plants. In particular, it was found that poplar *MIT* protein sequences grouped with willow plants. It was also found that the expression levels of poplar *MIT* genes under drought stress varied according to gene type.

Keywords: *Populus*, Iron, Bioinformatics, Phylogenetic Tree, Gene Expression

1. GİRİŞ

Mikro besinler bitki metabolizmasının sürdürülmesinde, büyüme ve üretimde, stres toleransında ve hastalık direncinde merkezi bir rol oynamaktadır (Shahzad ve Amtmann, 2017). Bakır (Cu), manganez (Mn), demir (Fe) ve çinko (Zn) gibi mikro besinler optimum konsantrasyonda bitkiler için gereklidir. Ancak, optimumun üzerindeki seviyelerde toksiktirler (Shingles et al., 2004). Bitkiler, uygun iyon homeostazını sürdürmek için bu metallerin alımı, taşınması, kullanımı ve depolanmasında sıkı bir denge sağlar çünkü bu metaller, oksidatif strese neden olan optimumun üzerindeki konsantrasyonlarda (Fenton reaksiyonu yoluyla reaktif oksijen türlerinin üretimi) toksik olma potansiyeline sahiptir (Grotz and Gueriot, 2006). Bitkiler sitoplazmaya taşınmak üzere topraktan metalleri emer. Çekirdek, mitokondri ve kloroplast gibi belirli hücre altı bölmeler belirli işlevleri yerine getirirken, vakuoller hücre metalik dengesini düzenlemek için bir rezervuar görevi görür. Hücresel metal taşınımı, çeşitli membran proteinleri tarafından yönetilir. Serbest metaller toksik olduğundan, bitkiler bu metalleri çözündürmek ve hücreleri oksidatif hasardan korumak için nikotianamin (NA), deoksimuginik asit (DMA), sitrat, askorbat ve fenolikler gibi çeşitli şelatlama maddelerini kullanır (Jeong ve Gueriot, 2009; Palmer ve Gueriot, 2009). Demir (Fe), redoks özellikleri nedeniyle çoğu canlı organizma için çok önemli bir mikro besin maddesidir. Elektronları kolayca transfer etme (kazanma veya kaybetme) yeteneği sayesinde Fe, hücresel solunum, fotosentez ve DNA sentezi gibi birçok hayati kimyasal reaksiyonda kofaktör olarak görev yapar (Hänsch and Mendel, 2009, Rengel vd., 2023). Dünya Sağlık Örgütü'ne göre insanlarda Fe eksikliği dünyadaki en ciddi beslenme sorunudur ve diyetle alınan Fe eksikliğinden kaynaklanan anemi dünya nüfusunun yaklaşık %15'ini etkilemektedir (World Health Organization, 2016). Bitkiler, Fe'in kullanılamamasına karşı koymak için iki farklı Fe edinim stratejisi geliştirmiştir. Strateji I olarak adlandırılan ilk strateji, indirgemeye dayalı bir stratejidir ve Gramineae hariç tüm bitki türleri tarafından Fe absorbe etmek için kullanılır. Kökten salınan protonlarla yerel bir rizosfer asitlenmesine, ardından Fe indirgenmesine ($Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+}$) ve kök hücrelerine demir (Fe^{2+}) alımına bağlı çok aşamalı bir süreçten oluşur (Schmidt, 2003, Spielmann vd., 2023). Graminaceous bitkiler, Fe kazanımı için strateji II olarak adlandırılan şelasyona dayalı bir strateji kullanır ve mugineik asitler (MA) gibi fitosideroforları kitlesel olarak salgırlar (Schmidt, 2003). MA'lar kök çevresinde TRANSPORTER OF MUGINEIC ACID 1 (TOM1) efflux taşıyıcısı aracılığıyla Fe^{3+} 'ü

şelatlamak ve çözünürleştirmek için salgılanır (Nozoye vd., 2015). Fe-MA kompleksleri daha sonra YELLOW STRIPE 1(YS1)/YS1-LIKE(YSL) taşıyıcısı tarafından kök hücrelerine alınır (Lee vd., 2009, Inoue vd., 2009).

Mitokondri, endosimbiyoz yoluyla evrimleşmiştir ve heme ve lipoik asit sentezi gibi çok sayıda işlev kofaktörlerin yanı sıra bakteriyel Fe-S kümesinin (ISC) montaj yolağına da sahiptir (Lill vd., 2015). Bitki mitokondrileri, redoks düzenlemesinin merkezi olarak hizmet eder ve farklı metabolik yolları birbirine bağlayarak enerji dönüşümüne katkı sağlar. Bu özellikler mitokondriyi hücrel enerji ve metabolik durumları yansıtmak için ideal bir sensör konumuna taşır (Millar vd., 2011). Hücrenin güç merkezi olarak hizmet eden mitokondriyal aktiviteleri yeniden yapılandırılabilir. Sonuç olarak, mitokondriyal durumdaki değişiklikler, fotosentetik aktivite veya nükleer gen ekspresyonundaki değişiklikler gibi diğer hücrel kompartımanlardaki fonksiyonları etkileyebilir (Schwarzländer vd.,2012). Metallerin bitki mitokondrilerine taşınmasıyla ilgili konular hakkında çok bilgi bulunmamaktadır ve metal taşınmasında rol oynayan ve karakterize edilmiş sadece birkaç protein anlaşılmıştır. Mitokondriyal demir taşıma (Mitochondrial Iron Transporter: *MIT*) genleri, mitokondriyal membranda ferrik indirgenmesine katılır ve mitokondriyal Fe taşınmasına katkıda bulunur (Jain vd., 2014).

Ormanlar, Dünya'nın karasal yüzeyinin %30'unu (yaklaşık 3,8 milyar hektar) kaplar, biyoçeşitliliğe ev sahipliği yapar ve insanlığa temiz hava ve su, kereste, elyaf ve yakıt gibi faydaları vardır (Tuskan vd.,2006). Kavak (*Populus* sp.) türü, model ve ekonomik olarak önemli bir odunsu bitkidir ve aynı zamanda kolay yayılma, hızlı büyüme, geniş kök sistemleri, yüksek toprak üstü biyokütle ve muazzam endüstriyel değer gibi özellikleri nedeniyle kirlenmiş toprak fitoremediasyonu için potansiyel bir adaydır (Yadav vd. 2010). *P. trichocarpa*'nın genom dizilemesi için model orman türü olarak seçilmesinin nedeni, uygun genom büyüklüğü ek olarak, aynı zamanda hızlı büyümesi, deneysel manipülasyonun nispeten kolay olması ve mevcut genetik araçların çeşitliliği nedeniyle tercih edilmiştir (Tuskan vd., 2006). Yukarıda verilen bilgiler ışığında, bu tez çalışmasında kavak ağacında (*P. trichocarpa*) ilk defa tarafımızdan mitokondriyal demir taşıyıcısı (Mitochondrial Iron Transporter: *MIT*) genleri, kavak genomunda *in silico* olarak belirlenip, *Arabidopsis thaliana*, söğüt (*Salix purpurea*) ve pirinç (*Oryza sativa*) bitkileriyle kıyaslanarak biyoinformatik açıdan analiz edilecektir. Bu tezin bulguları, özellikle odunsu bitki türlerinde demir asimilasyon mekanizmasının anlaşılmasına teorik temelde katkı sağlayacaktır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. BİTKİ BİYOLOJİSİNDE BİYOİNFORMATİK YAKLAŞIM VE UYGULAMALAR

Biyoinformatik, genomik ve proteomik verilerin analizi ve yorumlanması için matematik, biyoloji ve bilgisayar bilimlerini tek bir disipline dönüştüren bilgisayar tabanlı bir bilimsel alan olarak adlandırılabilir (Zhang ve Liu, 2013). Biyoinformatik, biyolojinin birçok alanında önemli bir rol oynamıştır ve uygulamaları çeşitli verileri kapsar, örneğin nükleotid ve amino asit dizileri, protein domainleri ve yapılarının yanı sıra çeşitli organizmalardan gen ifade kalıpları (Tiwari vd., 2020). Benzer şekilde, bitki biyoteknolojisi alanı da insanlara biyolojik kaynak olarak bitkilerin verimli bir şekilde araştırılmasına olanak sağlamak için çeşitli bitki türlerinin tam genomik bilgilerini sağlayan biyoinformatikten yararlanmıştır (Rhee vd., 2006). Biyoinformatik ve hesaplamalı biyolojinin bitki biyolojisi alanına girmesi, yaşam bilimlerindeki bilimsel buluşları büyük ölçüde hızlandırmaktadır. DNA dizileme teknolojisinin yardımıyla, bitki biyolojisindeki bilim insanları çeşitli bitki ve mikroorganizma türlerinin genetik mimarisini ortaya çıkarmışlardır, örneğin proteom, transkriptom, metabolom ve metabolik yollar (Gomez-Casati vd., 2018).

Biyoinformatik alanında, bitki biyoteknolojisi ile ilgili analizlerin gerçekleştirilmesine yönelik çeşitli veri tabanı ve biyoinformatik araçlar bulunmaktadır (Tablo 1). Yıllar boyunca bitki genomları üzerinde yapılan yeni nesil dizileme (NGS) ve biyoinformatik analizler büyük miktarda dijital veri üretmiştir. Tüm bu veriler, çevrimiçi olarak kamuya açık olan çeşitli ve birden fazla veri tabanında dijital olarak depolanmaktadır (Yu vd., 2021). Bu veri bankalarından küresel olarak bilinen ve tüm araştırmacılar ve biyologlar tarafından tanınan veri tabanı NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri tabanıdır. NCBI moleküler biyoloji, biyokimya ve genetik hakkında bilgi toplamaya ve analize odaklanmış bir veri bankasıdır. NCBI veri tabanında, ilgilenilen bitki türlerinin genom bilgileri, gen ekspresyonu omnibusundan (GEO) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) veya dizi okuma arşivinden (SRA) indirilebilir. GEO ve SRA verileri, bitkilerin işlenmiş veya ham gen ekspresyon verilerini veya RNA dizilimlerini içerir. Bitki genomları için erişim mevcut olan bir diğer veri tabanı ise Ensembl Plants'tir (<https://plants.ensembl.org/index.html>). NCBI veri tabanı

karşılaştırıldığında, Ensembl Plant yalnızca ilgilenilen bitki türlerinin genom dizisini, gen modellerini ve fonksiyonel açıklamalarına ek olarak, aynı zamanda poliformik lokusları, popülasyon yapısını, genotipi, bağlantıyı ve fenotip bilgisini de içerir (Bolser vd., 2016). Yukarıda belirtilen veri tabanlarının yanı sıra, bitki gen/genom dizilimini elde etmek için yaygın olarak kullanılan PlantGDB, MaizeDIG ve Phytozome gibi diğer bitki veri tabanları da dikkate alınabilir.

Tablo 1. Bitki biyolojisinde kullanılan yaygın bazı veri bankaları

Fonksiyon	Sunucu	URL	Detaylar
Genom veri bankası	ArrayExpress	www.ebi.ac.uk/arrayexpress	Mikroarray ve dizilemeden elde edilen fonksiyonel genomik veri arşivi
Genom veri bankası	BarleyGenes	https://ics.hutton.ac.uk/barleyGenes/	Arpa için gen ve RNA-seq veri bankası
Genom veri bankası	Expression Atlas EMBL-EBI	www.ebi.ac.uk/gxa/home	Gen ve protein ekspresyonu için açık kaynak platformu
Genom veri bankası	Ensembl Plants	https://plants.ensembl.org/index.html	Bitkileri kapsayan genomik veribankası
Genom veri bankası	Gene Expression Omnibus	www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo	Fonksiyonel genomik veri deposu
Genom veri bankası	MaizeGDB	https://www.maizegdb.org	Mısır genetik ve genomik veri tabanı
Genom veri bankası	Phytozome	https://phytozome-next.jgi.doe.gov	Bitkiler için karşılaştırmalı genomik portalı
Genom veri bankası	PLEXdb	http://www.plantgdb.org/prj/PLEXdb/	Gen ekspresyonu profili veri setleri, yapısal genomik ve fenotipik verileri içeren bitki ekspresyonu veri tabanı
Genom veri bankası	SolGenomics Network	https://solgenomics.net/gem/experimental_design.pl?id=2	Solanaceae üyeleri için genetik veri tabanı

2.2 MİTOKONDRIYAL DEMİR TAŞIYICI GENLER

Demir (Fe) hemen hemen tüm organizmalar için gerekli bir mikro besindir ve aslında fotosentetik organizmalar, diğer canlılardan fotosentetik komplekslerin yüksek demir gereksinimiyle ayırt edilir. Demir genellikle toprakta oldukça bol olmasına rağmen, aerobik ortamlarda nötr ila bazik pH'ta düşük biyoyararlanımı vardır ve sonuç olarak dünya topraklarının yaklaşık %30'unun bitki büyümesi için demiri sınırladığı kabul edilir. Demir eksikliği insan popülasyonlarında da çok büyük bir sorun teşkil ediyor ve yaklaşık iki milyar insan bu durumdan etkilenmektedir (Wu vd., 2002). Demir, önemine rağmen hücrelerde yüksek düzeylerde biriktiğinde toksik olabilir. DNA ve proteinler gibi hücresel bileşenlere zarar verebilecek hidroksil radikallerinin oluşumunu katalize eder (Halliwell vd., 1992). Demir eksikliği solunum ve fotosentetik performansı önemli oranda etkiler. Ancak aşırı demir, bu redoks merkezlerinde reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu hızlandırır ve bu da hücreler üzerinde son derece zararlı etkilere neden olabilir. Böylece mitokondri ve kloroplast demir metabolizması ve hücresel demir homeostazisi için özellikle önemlidir. Fe, solunum ve fotosentetik elektron taşıma zincirleri gibi organellerdeki hayati metabolik reaksiyonlar için gereklidir; dolayısıyla dengesizliği tüm hücresel metabolizmayı olumsuz etkiler (Vigani vd., 2013). Mitokondriyal demir homeostazisinin korunmasında çeşitli proteinlerin rol oynadığı bilinmektedir. Mitokondrilere demir alınımında rol oynayan pirinç MIT'nin (Mitochondrial Iron Transporter: mitokondriyal demir taşıyıcı) son keşfi ve karakterizasyonu ile mitokondriyal demir şaperonu (mitochondrial iron chaperone) olan frataksin (frataxin) geninin bitkilerde demir homeostazisinin anlaşılmasına önemli katkı sağlamıştır (Busi et vd., 2006; Bashir vd., 2011).

Mitokondriyal demir taşıyıcıları (MITs) korunmuş proteinlerdir ve mitokondriyal taşıyıcı ailesine (MCF: mitochondrial carrier family) dahildirler. Bu aile, küçük (~30 kDa) proteinlerden oluşur ve bu proteinler mitokondriyal iç membranda lokalize olmuşlardır; çözünen madde taşınmasında (keto asitler, nükleotidler, amino asitler vd.) rol oynarlar (Kunji ve Robinson, 2006). *MIT* knockdown mutantları yavaş bir büyüme fenotipi, düşük klorofil konsantrasyonu ve zayıf tohum verimi sergiler. Ek olarak, bu mutant genotiplerde mitokondriyal demir konsantrasyonunda azalma tespit edilirken, toplam demir konsantrasyonunun yükseldiği tespit edilmiştir, bu da *mit* fonksiyon kaybı olan genotiplerde, demirin yanlış lokalize olduğunu gösterir (Bashir vd., 2011). *MIT* geninin yokluğunda, vakuolar demir taşıyıcı 1'i (*VIT1*) kodlayan genin ifade seviyesinin arttığı

görüldü, bu da aşırı sitozolik demirin vakuollere doğru yönlendirilebileceğini düşündürmektedir (Jain ve Connolly 2013). *Arabidopsis* bitkisinde yapılan çalışmada, *MIT1* ve *MIT2* genlerinin diğer organizmalardaki genlerle yüksek seviyede benzerlik gösterdiği anlaşılmıştır. Mutant “*mrs3mrs4*” maya genotiplerinde, *MIT1* veya *MIT2* geninin fenotipik olarak canlıları normalleştirdiği bulunmuştur. *Arabidopsis* bitkisinde *mit1* veya *mit2* mutantlarının fenotipte fark edilebilir bir bozulma yapmadığı, buna karşın *mit1mit2* bitkilerinin embriyonik seviyede öldüğü anlaşılmıştır. Sonuç olarak, hem mitokondriyal hem de tüm bitki Fe homeostazisinin devamı için *MIT1* ve *MIT2* genleri gereklidir ve bu da bitkinin uygun şekilde büyümesi ve gelişmesi için önemlidir. (Jain vd., 2019). Çeltik (*Oryza sativa*) bitkisinde yapılan başka bir çalışmada, knockdown mutant (*mit-2*) çeltik bitkisinde, transkriptom ve metabolom seviyesinde hem kök hem toprak üstü kısımlarda kontrol grubu bitkilere göre geniş ölçekli değişimler olduğu gözlemlenmiştir. Özellikle, krebs çemberiyle ilgili olan aspartik asit yollarıyla ilgili (köklerde aspartik asit, lizin ve treonin, sürgünlerde ise aspartik asit ve ornitin) değişimler tespit edilmiştir. Ayrıca, bazı metabolitler (örneğin pirüvik asit, fumarik asit, ornitin ve rafinoz ailesinin oligosakkaritleri) sadece *mit-2* bitkilerinin sürgünlerinde birikmiştir (Vigani vd., 2016). Çeltik bitkisinde yapılan başka bir çalışmada, MIT-knockdown (*mit-2*) bitkilerinin büyümesi bol miktarda Fe birikmesine rağmen önemli ölçüde bozulmuştur. Bu sonuçlar, *MIT* geninin pirinç büyümesi ve gelişimi için gerekli bir mitokondriyal Fe taşıyıcısı olduğunu göstermektedir (Bashir et al. 2011). Patates (*Solanum tuberosum*) bitkisinde yapılan biyoinformatik çalışmada, spesifik motif çeşitliliği olduğu ve monokot-dikot ayrımının bariz bir şekilde ortaya çıktığı bulunmuştur. Docking (yerleştirme) analizleri sonucunda demir iyonuna bağlanmada *Asp172* ve *Gly100* amino asitlerinin etkin olduğu görülmüştür. Ayrıca, patates MIT proteinlerinin 3D yapılarının %80,18 ile %85,71 arasında *Arabidopsis*, mısır ve pirinç bitkisine benzerlik gösterdiği bulunmuştur (Kurt et al. 2022).

Yapılacak bu çalışmada, kavak ağacında (*P. trichocarpa*) ilk defa tarafımızdan mitokondriyal demir taşıyıcısı (Mitochondrial Iron Transporter: MIT) genleri, kavak genomunda *in silico* olarak belirlenip, *Arabidopsis thaliana*, söğüt (*Salix purpurea*) ve pirinç (*Oryza sativa*) bitkileriyle kıyaslanarak biyoinformatik açıdan analiz edilecektir. Bu tezin bulguları, özellikle odunsu bitki türlerinde demir asimilasyon mekanizmasının anlaşılmasına teorik temelde katkı sağlayacaktır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 MIT GEN/PROTEİN DİZİLERİN BELİRLENMESİ VE TOPLANMASI

İlk olarak, AtMIT1 (AT2G30160.1) ve AtMIT2 (AT1G07030.1) genlerinin amino asit dizileri (Jain ve ark. 2019) Phytozome veri tabanından (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) gen ID numaraları yazılarak elde edilmiştir. Daha sonra, *Arabidopsis thaliana* referans dizileri kullanılarak kavak (*Populus trichocarpa*) bitkisi genomunda blastp metoduyla MIT protein dizileri belirlenmiştir. Kıyaslamalı analizler yapmak için, *A. thaliana*, söğüt (*Salix purpurea*) ve pirinç (*Oryza sativa*) bitkilerinin genomlarında MIT gen dizileri toplanmıştır. MIT genlerinin protein uzunluğu, moleküler ağırlıkları (kDa) ve izoelektrik nokta (pI) gibi fizyokimyasal özellikleri, ExPASy/ProtParam aracı (<https://web.expasy.org/protparam/>) kullanılarak yapıldı. MIT protein dizilerinin domain analizleri Pfam 36.0 (<http://pfam.xfam.org/>) kullanılarak gerçekleştirildi (Mistry vd., 2021). Hücre içi lokalizasyonlar BUSCA (Bologna Unified Subcellular Component Annotator) (<http://busca.biocomp.unibo.it>) sunucusu kullanılarak tamamlandı (Savojardo vd., 2018). MIT protein dizileri arasındaki yüzde özdeşlik değerleri, NCBI'deki BlastP (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) aracı kullanılarak hesaplandı. Promotor dizilerini elde etmek için, MIT genlerinin 2000 bp öncesi Phytozome veri bankasından toplandı. Daha sonra, elde edilen diziler PlantCARE sunucusu (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) kullanılarak analiz edildi (Lescot vd., 2002). *P. trichocarpa* MIT genlerinin (PtMITs) kuraklık ve sıcaklık stresleri altında ekspresyon analizleri GEPSdb (Gene Expression Database of Poplar under Stress) (<http://gepsdb.ahau-edu.cn/>) veri bankası kullanılarak tespit edildi (Liu vd., 2022). Elde edilen proteinlerin anotasyonu PANNZER2 (<http://ekhidna2.biocenter.helsinki.fi/sanspanz/>) sunucusu kullanılarak analiz edildi (Toronen vd., 2018). MIT protein dizilerinin transmembran topolojisi ve sinyal dizileri Phobius (<https://phobius.sbc.su.se/>) sunucusu kullanılarak tahmin edildi (Käll vd., 2007).

3.2 AMİNO ASİT BİLEŞİMİ, KORUNMUŞ MOTİF VE FİLOGENETİK ANALİZLER

Elde edilen protein dizilerinin hizalanması (alignment), amino asit kompozisyonu BioEdit v7.2.5 programıyla yapılmıştır. Korunmuş motif analizleri MEME (Multiple Em for Motif Elicitation) v5.5.4 sunucusu (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>) kullanılarak yapıldı. Motif teşhisinde klasik mod, motif genişliği olarak 6-50 amino asit ve 10 farklı motife kadar bulunması amaçlanmıştır (Bailey vd., 2009). MIT protein dizilerinin filogenetik ilişkileri MEGA11 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Tamura vd., 2021) programı kullanılarak analiz edildi. Filogenetik ağaç, ML (Maximum Likelihood) istatistik metodu ve 1000 bootstrap değeri kullanılarak oluşturuldu. Filogenetik ağaç çizimi için, *Arabidopsis* MIT1 (AT1G07030.1) ve MIT2 (AT2G30160.1), *S. purpurea* MIT1 (Sapur.009G060800.1), MIT2 (Sapur.016G108100.1) ve MIT3 (Sapur.016G166600.1) ve çeltik (*Oryza sativa*) MIT (LOC_Os03g18550.1) protein dizileri kullanılmıştır.

3.3 MIT PROTEİN DİZİLERİN SEKONDER VE TERSİYER YAPI ANALİZLERİ

MIT protein dizilerinin sekonder (ikincil yapı) analizleri SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html) çevrimiçi sunucusu ile belirtilen parametreler kullanılarak tahmin edildi: dört konformasyonel durum (alfa sarmalı, beta yaprağı, dönüş ve düzensiz sarmal: helix, beta sheet, turn, coil) (Geourjon ve Deleage 1995). Protein dizilerinin tahmini 3D (tersiyer) yapıları SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) sunucusu kullanılarak elde edildi (Waterhouse vd., 2018). Proteinlerin yüzey topografisinin hesaplanması CASTp 3.0 sunucusu (<http://sts.bioe.uic.edu/castp/index.html?1bxw>) kullanılarak elde edildi (Titan vd., 2018). Serin, treonin ve tirozin amino asitleri için fosforilasyon tahminleri (çeviri sonrası değişiklikler, PTM: Protein Posttranslational Modifications) NetPhos- 3.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/>) online sunucusu kullanılarak bulundu (Blom vd., 2004). N-bağlantılı glikozasyon bölgeleri (N-linked glycosylation sites) NetNGlyc- 1.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetNGlyc-1.0/>) sunucusu kullanılarak elde edildi (Gupta ve Brunak 2002).

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1 MIT GEN VE PROTEİN DİZİ ANALİZLERİ

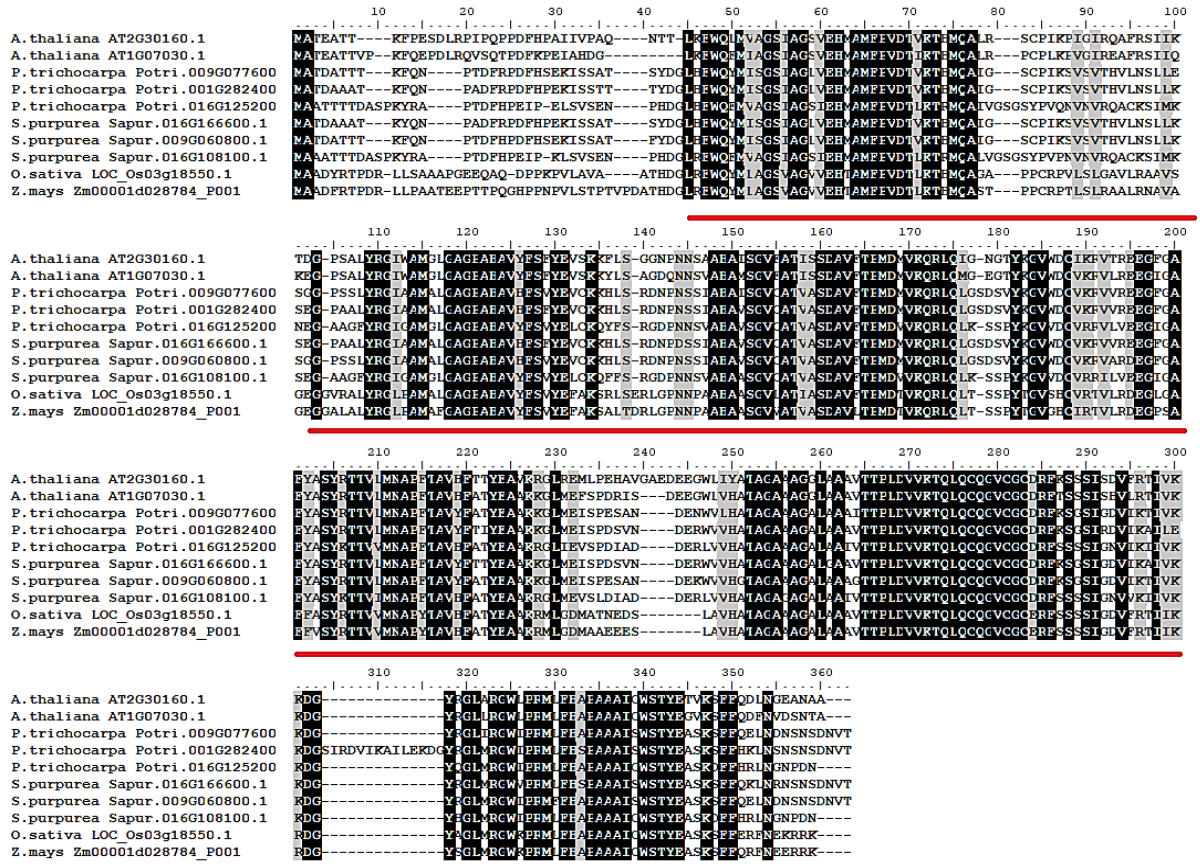
İlk olarak, *MIT* gen ailesinin daha iyi anlaşılması adına kavak (PtMIT), söğüt, *Arabidopsis*, pirinç ve mısır bitkilerindeki *MIT* üyelerinin ekzon sayıları, protein uzunluğu, domain ailesi, moleküler ağırlık (kDa), izoelektrik nokta (*pI*), hücre içi lokalizasyon ve transmembran heliks (TH) sayısı çeşitli çevrimiçi sunucular kullanılarak Tablo 2’de gösterilmiştir. Bütün bitki türlerinde *MIT* genlerinin ekzon sayısı iki bulundu ve protein uzunluğu 326-343 amino asit arasında değiştiği tespit edildi. Proteinlerin fonksiyonel birimi olarak kabul edilen “domain” aileleri incelendiğinde ise, bütün bitki türlerinin “mitokondriyal taşıyıcı protein” (Mitochondrial carrier protein: PF00153) domainini taşıdığı tespit edilmiştir (Şekil 1). Moleküler ağırlık ve izoelektrik nokta değerlerinin ise 34.95-37.23 kDa ile 7.62-9.12 arasında olduğu bulundu. Proteinlerin asidik ve bazik karakterlerini yansıtan *pI* değerlerinin aynı tür içinde bile değişkenlik göstermesi, *MIT* genlerinin fonksiyonel çeşitlilik potansiyelinin genişliğini göstermektedir. Bütün MIT proteinlerinin tahmin edilen hücre içi lokalizasyonları organel membran (GO:0031090) olarak bulunmuştur. Yapı belirlemenin ana deneysel yöntemleri (X-ışını kristalografisi ve çok boyutlu nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi) için zor hedefler olan membran proteinleri, yine de çoğu genomun yaklaşık %20’sini oluşturur ve iki yapısal sınıfa ayrılır: α -sarmal ve β -varilleri (β -barrel). α -sarmal membran proteinleri çoğu hücre ve çevreleri arasındaki etkileşimlerden sorumludur (Frishmanve Mewes 1997). Bu çalışmada, TH sayılarının 6 ve 7 arasında değiştiği ve aynı sayı kavak bitkisinde de tespit edilmiştir ki bu bulgular *MIT* gen ailesinin yapısal korunaklılığını desteklemektedir.

Tablo 2. Beş farklı bitkiden elde edilen MIT gen/protein dizilerine ait detaylar

Phytozome ID	Tür	Ekzon sayısı	Protein uzunluğu (aa)	Domain ailesi	Moleküler ağırlık (kDa)	İzoelektrik nokta (pI)	SL	TH
Potri.001G282400.1	<i>P. trichocarpa</i>	2	343	PF00153	37.23	8.38	OM	7
Potri.009G077600.1	<i>P. trichocarpa</i>	2	329	PF00153	35.49	6.82	OM	7
Potri.016G125200.1	<i>P. trichocarpa</i>	2	329	PF00153	35.37	7.62	OM	6
Sapur.009G060800.1	<i>S. purpurea</i>	2	329	PF00153	35.45	7.66	OM	7
Sapur.016G108100.1	<i>S. purpurea</i>	2	329	PF00153	35.30	8.56	OM	6
Sapur.016G166600.1	<i>S. purpurea</i>	2	329	PF00153	35.57	8.58	OM	7
AT1G07030.1	<i>A. thaliana</i>	2	326	PF00153	35.70	8.15	OM	6
AT2G30160.1	<i>A. thaliana</i>	2	331	PF00153	35.96	8.82	OM	6
LOC_Os03g18550.1	<i>O. sativa</i>	2	328	PF00153	34.95	9.12	OM	7
Zm00001d028784_P001	<i>Z. mays</i>	2	333	PF00153	35.55	8.51	OM	6

SL: hücre içi lokalizasyon, PF00153: mitokondriyal taşıyıcı protein (Mitochondrial carrier protein), OM: organel membran (GO:0031090, organelle membrane), TH: transmembran heliks sayısı

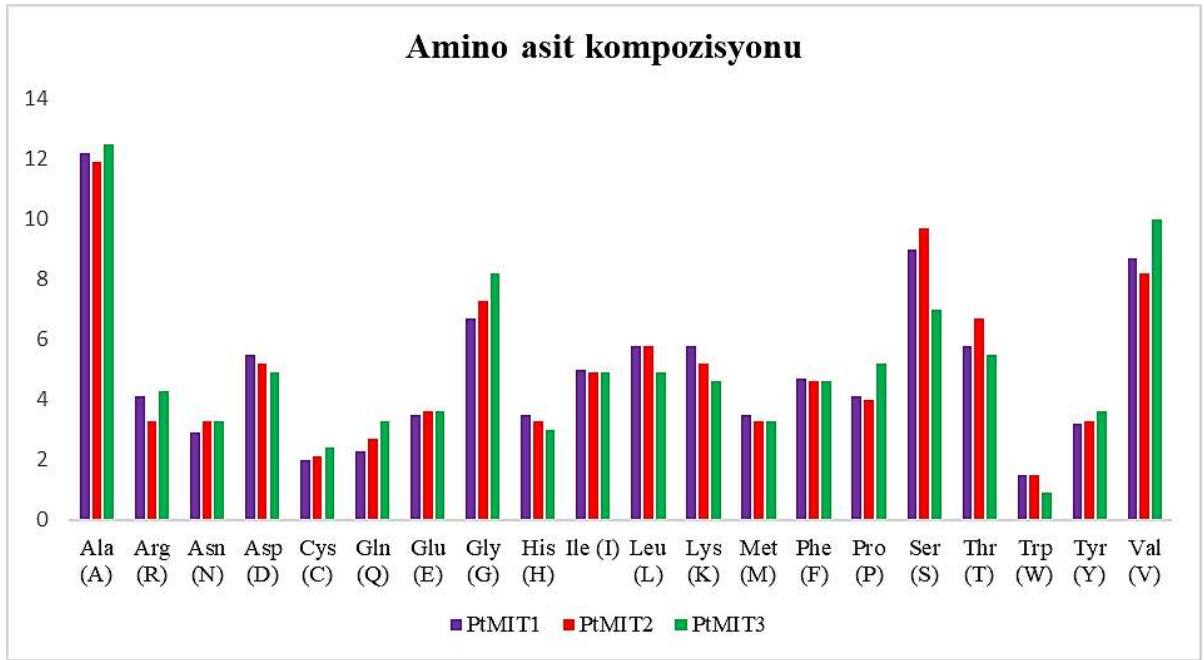
MIT protein dizilerindeki korunaklı bölgelerin tespiti ve domain yapısının daha iyi anlaşılabilmesi için çoklu dizileme yapıp domain bölgesi, %100 korunaklı bölgeler (siyah) ve benzer bölgeler (gri) Şekil 1'de gösterilmiştir. Çoklu dizi sıralama analizlerinin bulguları mitokondriyal taşıyıcı protein (PF00153) domain yapısının bitki türleri arası çok korunaklı olduğunu ortaya çıkarmıştır.



Şekil 1. Beş farklı bitki türüne ait MIT protein dizilerinin çoklu dizileme analizleri. Siyah ve gri bölgeler sırasıyla aynı ve benzer bölgeleri göstermektedir. Ayrıca, kalın kırmızı çizgi korunaklı olan PF00153 (mitokondriyal taşıyıcı protein: mitochondrial carrier protein) domain yapısını göstermektedir.

4.1.1 Kavak MIT Protein Dizilerinin Amino Asit Dağılımı

Amino asitler, proteinlerin yapı taşlarıdır ve insanlarda sentezlerine göre esansiyel ve esansiyel olmayan amino asitler olarak sınıflandırılır. Esansiyel amino asitler (EAA) yalnızca bitkiler tarafından sentezlenirken, esansiyel olmayan amino asitler hem bitkiler hem de diğer canlılar tarafından sentezlenir. Bu çalışmada, kavak bitkisinin MIT protein dizilerinin amino asit kompozisyonu incelenmiş olup, yüzde olarak en fazla bulunan amino asit çeşidi ortalama %12.2 ile alanin (Ala) bulunmuştur. Onu takiben ortalama %8,96 ile valin (Val), %8.56 ile serin (Ser), %7.4 ile glisin (Gly) ve %6 ile treonin (Thr) amino asidi bulunmuştur (Şekil 2).



Şekil 2. Kavak bitkisine ait MIT protein dizilerinin amino asit bileşenleri (%)

4.1.2 Gen Ontoloji (GO) Annotasyonları

Kavak MIT (PtMIT) genlerinin GO annotasyonları PANNZER veri bankası kullanılarak üç açıdan analiz edilmiştir, bunlar biyolojik proses (biological process), moleküler fonksiyon (molecular function) ve hücrel bileşenler (cellular component). Biyolojik proses incelendiğinde, *PtMIT* genlerinin mitokondriye demir taşınımı (GO:0048250), hücrel solunum (GO:0045333) ve transmembran taşınımı (GO:0055085) olmak üzere üç tip bulunmuştur. Moleküler fonksiyon annotasyonları incelendiğinde, demir iyonu transmembran taşıyıcı aktivitesi (GO:0005381) ve Fe^{2+} transmembran taşıyıcı aktivitesi (GO:0015093) olmak üzere iki çeşit tespit edilmiştir. *PtMIT* genlerinin hücrel bileşenler açısından GO annotasyon sonuçları incelendiğinde, mitokondriyal membran (GO:0031966), mitokondriyal zarf (GO:0005740) ve membran (GO:0016020) olarak üç ana bileşen bulunmuştur. GO analiz sonuçları, *PtMIT* genlerinin mitokondriyal demir dengesinde rol oynadığını desteklemektedir.

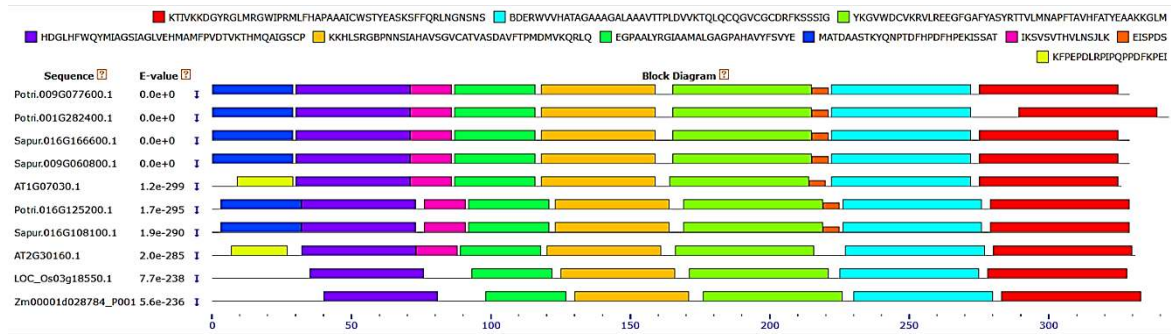
4.1.3 Korunmuş Motif, Gen Yapısı ve Promotor Dizi Analizleri

Korunmuş motif analizlerinin daha iyi anlaşılması ve kıyaslamak için, beş farklı bitki türüne ait olan (kavak, söğüt, *Arabidopsis*, çeltik ve mısır) MIT protein dizileri MEME

sunucusuna yüklenerek analiz edilmiştir (Şekil 3). Toplamda 10 korunaklı motif yapısı tespit edilmiştir ve bulunan motifler sırasıyla şunlardır:

“KTIVKKDGYRGLMRGWIPRMLFHAPAAAICWSTYEASKSFFQRLNGNSNS”,
 “BDERWVVHATAGAAAGALAAAVTTPLDVVKTLQCQGVCGCDRFKSSSIG”,
 ”YKGVWDCVKRVLREEGFGAFYASYRTTVLMNAPFTAVHFATYEAACKGLM”,
 , “HDGLHFWQYMIAGSIAGLVEHMAMFPVDTVKTTHMQAIGSCP”,
 “KKHLRGRBPNNIAHAVSGVCATVASDAVFTPMMDVMKQRLQ”,
 “EGPAALYRGIAAMALGAGPAHAVYFSVYE”,
 “MATDAASTKYQNPTDFHPDFHPEKISSAT”,
 “IKSVSVTHVLNSJLK”,
 “EISPDS”, ve “KFPEPDLRPIPQPPDFKPEI”.

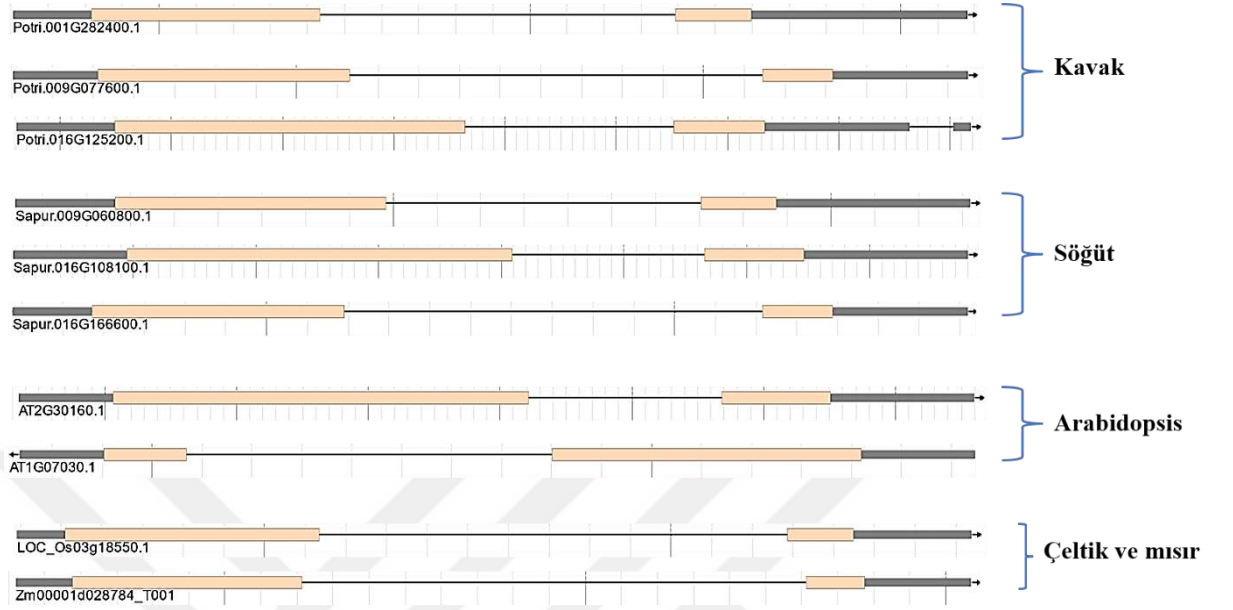
Motif dağılımları incelendiğinde, sarı motif yapısının (KFPEPDLRPIPQPPDFKPEI) sadece *Arabidopsis* bitkisinde bulunduğu, “IKSVSVTHVLNSJLK” ve “EISPDS” motif yapılarının ise monokot bitkilerde olmadığı saptanmıştır. İlk üç motif yapısının ise PF00153 (mitokondriyal taşıyıcı protein: mitochondrial carrier protein) domain yapısıyla ilişkili olduğu bulunmuştur. Ayrıca, kavak ve söğüt bitkilerinin korunaklı motif yapılarının birbirine çok benzediği ve sarı motif dışında bütün korunaklı motif yapılarının olduğu görülmüştür.



Şekil 3. Beş farklı bitki (kavak, söğüt, Arabidopsis, çeltik ve mısır) türüne ait olan korunmuş motif yapıları. Resimdeki her bir renk farklı bir motif yapısını göstermektedir.

MIT gen ailesinin yapısının daha iyi anlaşılması için beş farklı bitki türüne (kavak, söğüt, *Arabidopsis*, çeltik ve mısır) ait olan *MIT* genlerinin gen yapıları Phytozome v13 veri bankasından elde edilmiştir (Şekil 4). *MIT* gen yapısının farklı bitki türlerinde yapısının

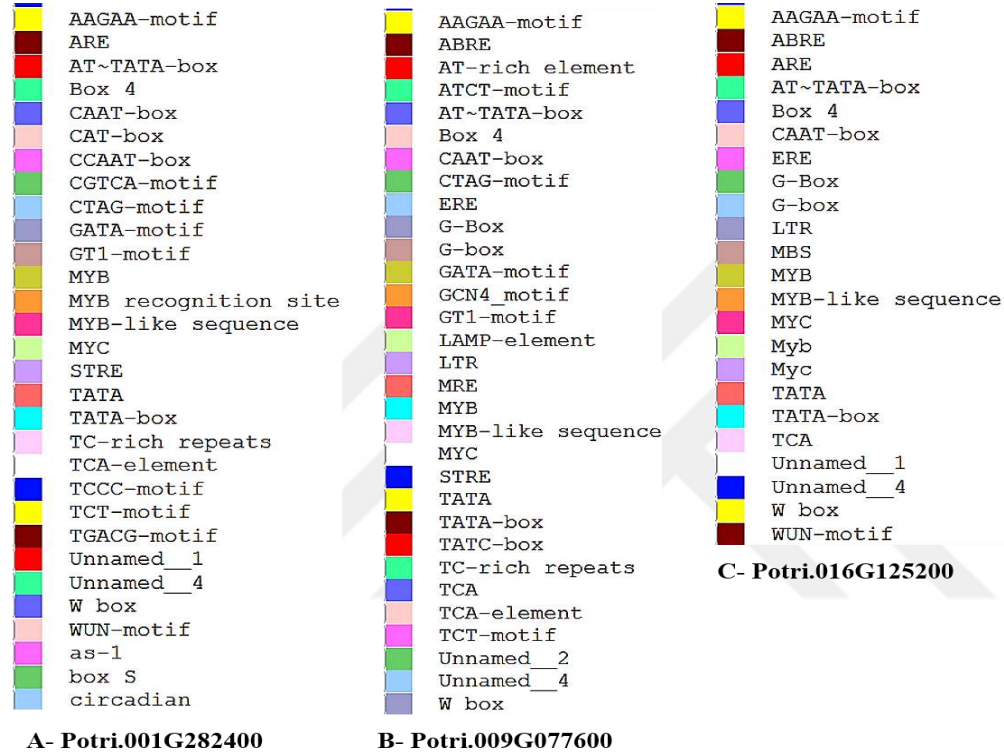
korunaklı olduğu ve bütün bitki türlerinde iki ekzona sahip olduğu tespit edildi. Buna karşın, ekzon (kodlama bölgeleri) bölgelerinin uzunluklarının farklılık gösterdiği ve bununda genin fonksiyonel varyasyonuna neden olabileceği söylenebilir.



Şekil 4. Beş farklı bitki (kavak, söğüt, *Arabidopsis*, çeltik ve mısır) türüne ait olan *MIT* gen yapıları. İçi dolu sarı kutular ekzonları temsil ederken, gri çizgiler intron bölgelerini temsil etmektedir.

Promotorlar, bir genin 5' bölgesinde bulunurlar ve DNA'nın ekspresyonunu fiziksel ve fonksiyonel bir şekilde kontrol eden spesifik bir nükleotid dizisinden oluşur. Bu şekilde gen düzenlemesi, temel olarak da transkripsiyonun başlatılması bu hayati düzenleyici unsurlara bağlıdır (Potenza vd., 2004). Bir genin kodlama bölgesinin 5' ucunda yer alan ve transkripsiyon faktörleri için farklı bağlanma bölgeleri içeren belirli bir DNA dizisine promotor adı verilir (Southern vd., 2006). Promotorlar yapısal, dokuya özgü, uyarılabilir ve sentetik olarak sınıflandırılabilir. Sınıflandırma işleve, türe ve gen ifade düzeyine bağlı olarak yapılabilir (Shahmuradov vd., 2003). Bu çalışmada, *PtMIT* genlerine ait ve 5' bölgesinden toplanan 2000 baz çiftlik promotör bölgesinin analizleri PlantCARE veri bankası kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 5). *Potri.001G282400.1*, *Potri.009G077600.1* ve *Potri.016G125200.1* genleri sırasıyla 30, 31 ve 23 adet *cis*-düzenleyici element kapsamaktadır. *Cis*-düzenleyici elementler incelendiğinde, sirkadiyen kontrol (circadian), yaralanma (WUN-motif), *WRKY* transkripsiyon faktör bağlanma dizisi (W-box), ışık reaksiyonlarına cevap (TCT-motif, Box 4, GT1-motif, GATA-motif, GT1-motif, TCCC-motif), salisilik asit cevabı (TCA-element, as-1), genel promotor elementleri (TATA box ve CAAT-box), abiyotik stresle mücadele (STRE,

MYC, TC-rich repeats), meristem ekspresyonu (CAT-box), metil jasmonat (MeJA) cevabı (CGTCA-motif, TGACG-motif), anaerobik indüksiyon (ARE), absisik asit cevabı (ABRE) ve nitrat cevabı (ERE) gibi diziler saptanmıştır. Çok çeşitli *cis*-düzenleyici elementlerin *PtMIT* promotorlarında bulunması, bitki metabolizmasında özellikle de mitokondriyal demir dengesinin çok sayıda metabolik yollarla ilgili olduğu ileri sürülebilir.

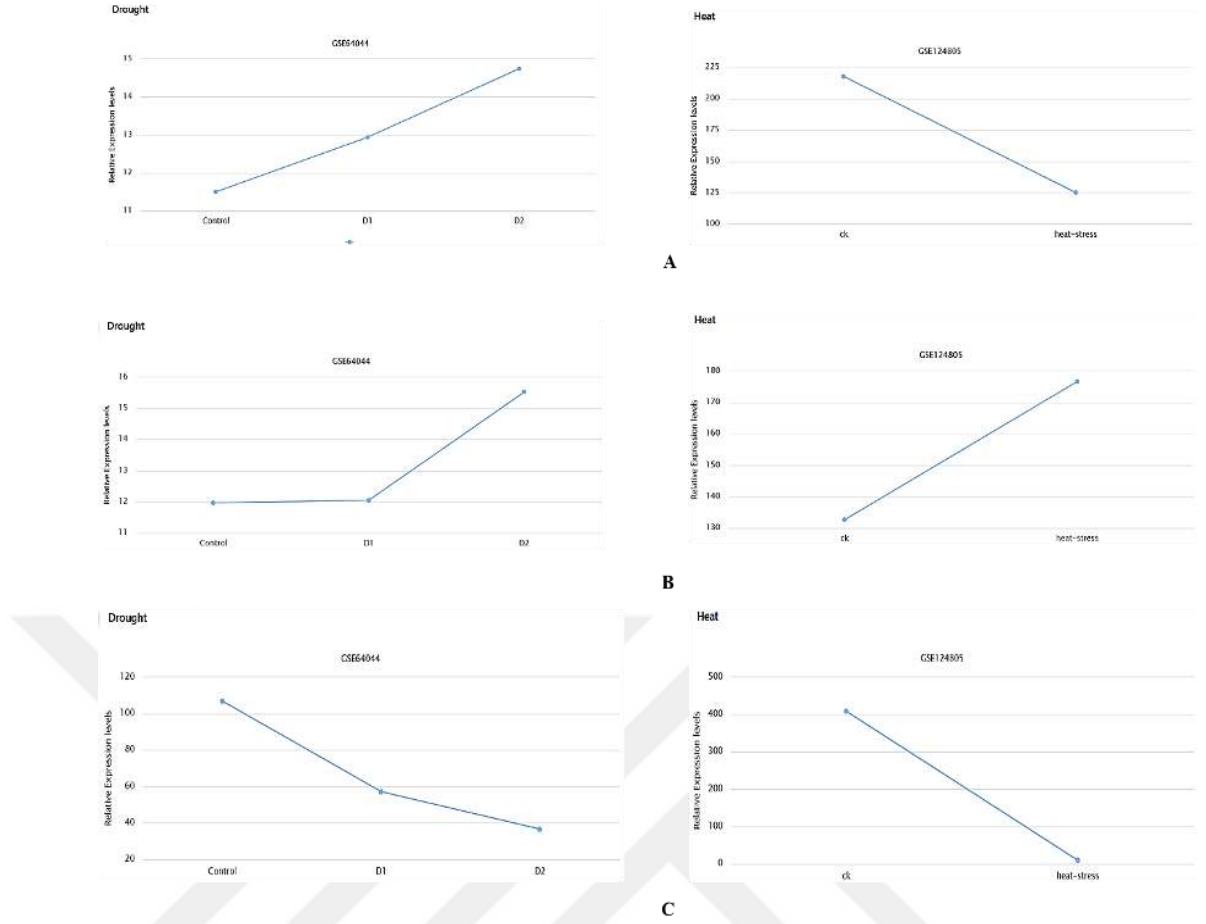


Şekil 5. PlantCARE veri bankası kullanılarak elde edilen *PtMIT* genlerinin 5' bölgesinde elde edilen 2000 baz çiftlik promotör dizisi analizleri. Şekildeki her bir renk farklı *cis*-düzenleyici elementi temsil etmektedir.

4.2. *PtMIT* GEN EKSPRESYON VE FİLOGENETİK ANALİZLER

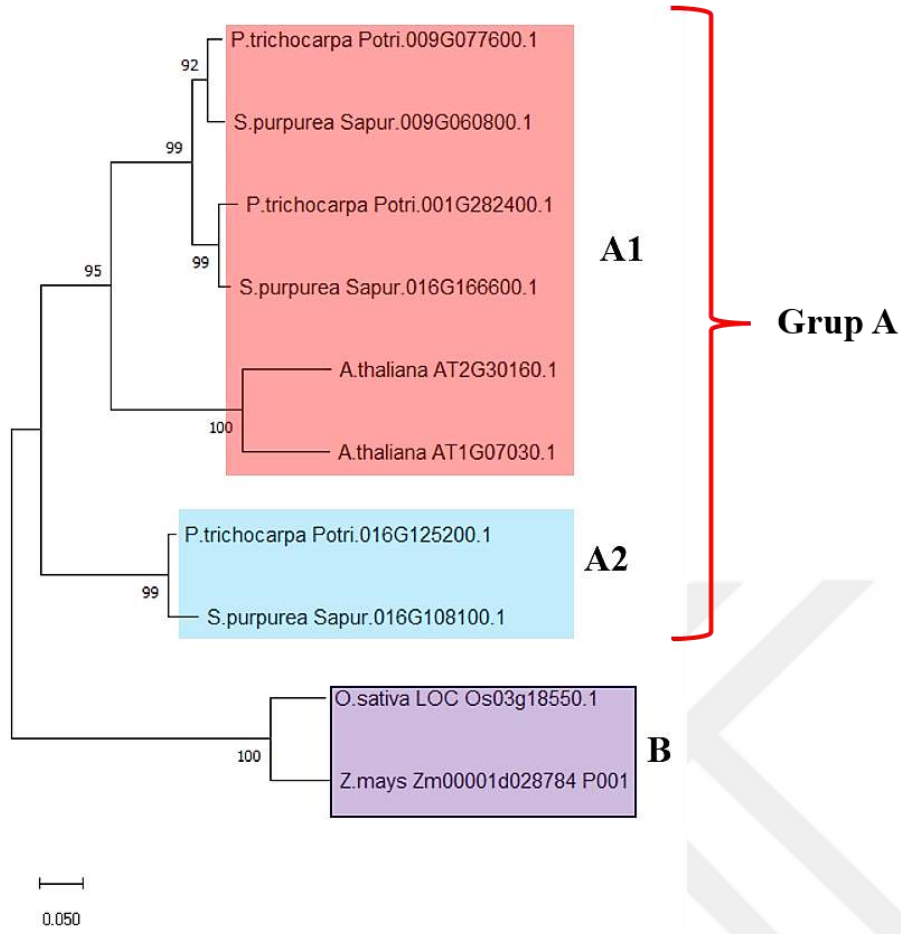
Bitkilerde metal homeostazisi, demir metabolizmasının çeşitli yönlerini (alım, akış, şelasyon ve depolama dahil) kontrol eden detaylı bir biçimde düzenlenmiş mekanizma aracılığıyla gerçekleştirilir (Arosio vd., 2009). Çevresel streslere cevap olarak bitki gen ekspresyonu, transkripsiyonel düzenleyiciler tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilir. Kavak bitkisine ait olan *PtMIT* genlerinin ekspresyon seviyeleri GEPSdb veri bankası kullanılarak kuraklık ve sıcaklık stresleri altında değerlendirildi (Şekil 6). Kuraklık stresi uygulamalarında orta (8 gün) ve yüksek seviyede (13 gün) kuraklık stresi uygulaması

yapılırken, sıcaklık stresi için bitkiler 45°C’de 5 saat sıcaklık stresine maruz bırakılmışlardır. Strese maruz bırakılan bitkilerin yapraklarından elde edilen RNA’lar dizilenecek transkriptomik veri elde edilmiştir. Kuraklık stresi altında, *PtMIT* genlerinin ekspresyon seviyeleri incelendiğinde, *Potri.009G077600.1* ve *Potri.001G282400.1* genlerinin ifade seviyelerinde artış gözlenirken, *Potri.016G125200.1* geninin ifade seviyesinin düştüğü görülmüştür. Sıcaklık stresi altında, *Potri.009G077600.1* ve *Potri.016G125200.1* genlerinin ifade seviyeleri azalırken, *Potri.001G282400.1* geninin ifade seviyesinin arttığı tespit edildi. Aynı gen ailesine ait olan *MIT* üyelerinin, aynı stres altında farklı tepki vermeleri fonksiyonel çeşitliliklerinin bir göstergesi olabilir. Çeltik (*O. sativa*) bitkisinde yapılan bir çalışmada, homozigot *MIT* geninin susturulması ölü bir fenotipe neden olmuştur. Ayrıca, MIT-knockdown (*mit-2*) bitkisinde klorofil miktarının azaldığı, demir birikiminin artışı olmasına karşın bitki büyümesinde sorunlar oluşmuştur (Bashir vd., 2011). *MIT1* ve *MIT2* genlerinin bitkilerde gelişme dönemi boyunca ifade edildiği, ama özellikle tohum ve genç fidanlarda çok fazla miktarda gen ifadesi olduğu bilinmektedir (Jain vd., 2009). Patates (*S. tuberosum*) bitkisinde yapılan çalışmada, kuraklık stresi altında kontrol grubuna göre yaprakta *StMIT* geninin yaklaşık 1,8 kat arttığı bulunmuş olup buna karşın kökte ise kontrol bitkisine göre düşük bir azalma tespit edilmiştir (Kurt vd., 2022). Bu sonuçlar bizim çalışmamızın bulgularıyla benzerlik göstermektedir.



Şekil 6. Potri.009G077600.1, Potri.001G282400.1 ve Potri.016G125200.1 genlerinin GEPSdb veri bankası kullanılarak kuraklık ve sıcaklık stresleri altındaki ekspresyon seviyeleri.

MIT ailesinin üyeleri arasındaki evrimsel ilişkiyi analiz etmek için, 10 dizi üzerinde çoklu dizi hizalaması gerçekleştirildi ve maksimum olabilirlik kestirimi (ML: Maximum Likelihood) yöntemleri kullanılarak beş bitki türünden 10 MIT protein dizisi ile filogenetik ağaç oluşturuldu (Şekil 7). Filogenetik ağaçta iki ana grubun (grup A ve B) oluştuğu, grup A'nın tamamen dikot bitkilerden (kavak, söğüt ve *Arabidopsis*) oluşmasına karşın grup B'nin sadece monokot bitkilerden (çeltik ve mısır) oluştuğu tespit edildi. Özellikle, filogenetik ağaçta monokot-dikot bitki ayrımının çok net bir şekilde oluştuğu görüldü. Grup A'daki dikot bitkilerin dağılımı incelendiğinde, *Arabidopsis* MIT protein dizilerinin kavak-söğüt ikilisinden ayrılarak kendi içlerinde %100 bootstrap değeriyle kümelendiği bulundu. Buna karşın, kavak-söğüt MIT protein dizilerinin %99 bootstrap değerleriyle karışık bir şekilde kümelendiği tespit edildi. Bu sonuç, MIT genlerinin kavak-söğüt arasındaki benzerlik ve moleküler akrabalık düzeyinin yüksek olduğunu desteklemektedir.

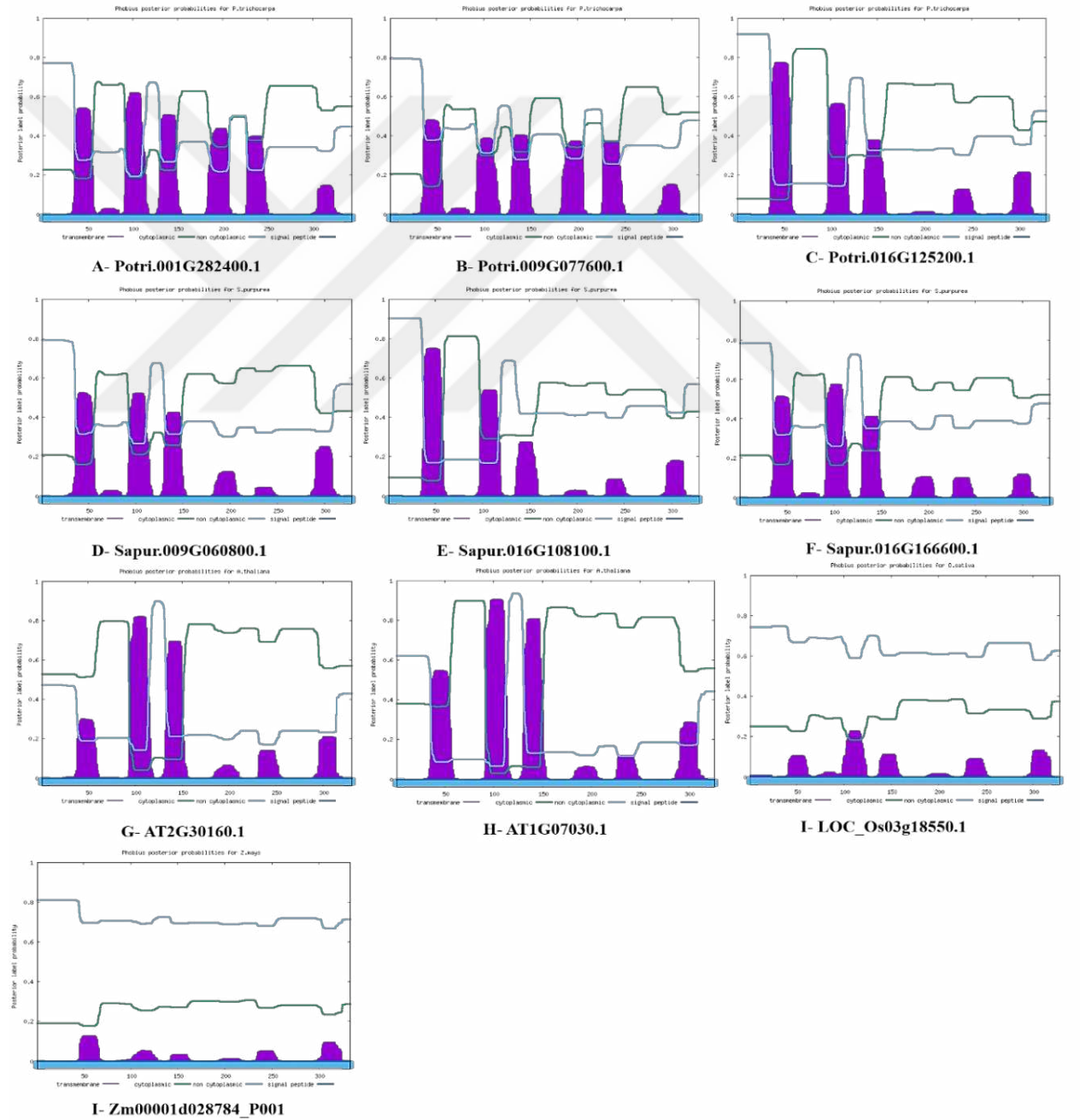


Şekil 7. MIT proteinlerinin evrimsel akrabalık ilişkileri Maksimum Olabilirlik (ML) yöntemi kullanılarak MEGA11 programıyla oluşturuldu. Ayrıca, kümeler üzerindeki rakamlar bootstrap değerlerini göstermektedir.

4.3. TRANSMEMBRAN TOPOLOJİ VE POSTTRANSLASYONEL MODİFİKASYON

Transmembran proteinleri, bitkilerde sinyal iletimi, madde taşınması ve enerji dönüşümü dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik aktivitelerde rol alırlar. Her ne kadar genomda gen ürünlerinin %20'sinden fazlasının transmembran proteinler olduğu tahmin edilse de transmembran alanların karmaşıklığı nedeniyle bunların güvenilir bir şekilde tanımlanması zordur ve genel olarak farklı üç boyutlu (tersiyer) yapıya sahip olabilirler (Zhou vd., 2022). Transmembran proteinler, özellikle transmembran alanlarda, proteinler arasında büyük farklılıklar gösteren ve işlevlerini yerine getiren karmaşık yapıya sahiptirler (Barrera vd., 2019). Çoğu transmembran proteini, bir veya daha fazla α -heliks

yoluyla lipid çift katmanını geçer ve bu proteinlerde hidrofobik bölge, lipid çift katmanındaki lipid moleküllerinin hidrofobik kuyruklarıyla etkileşime girerken, hidrofilik bölgeler zarın her iki yanında bulunur (Shinoda vd., 2007). Yapılan bu çalışmada, beş farklı bitki türünde transmembran topoloji (heliks) analizleri yapılmış olup, ayrıca heliks sayıları da tespit edilmiştir (Tablo 3 ve Şekil 8). Analiz sonuçları incelendiğinde, bitki türleri arasında topoloji farklılıklarının yanında transmembran heliks sayılarının 6 ile 7 arasında değiştiği bulunmuştur. Bu yapısal varyasyonların *MIT* genlerinin fonksiyonel çeşitlilik potansiyeli ve hücre içi demir dengesinin ayarlanmasındaki rolleriyle ilgili olduğu söylenebilir.



Şekil 8. MIT protein dizilerinin transmembran topoloji analizleri. Ayrıca, mor yapılar transmembran heliks (sarmal) yapılarını göstermektedir.

Proteinlerin translasyon sonrası modifikasyonları (PTM), proteom çeşitliliğini büyük ölçüde genişletir, işlevselliği artırır ve moleküler yanıtların tümü hızlıca hücre içinde etkili bir şekilde sağlanır. PTM'ler sinyalleşme, gen ifadesi, protein stabilitesi ve etkileşimleri ve enzim kinetiği üzerindeki etkileriyle bitkilerde önemli roller oynar (Friso ve Wijk, 2015). PTM analizleri için, dört farklı tip seçilmiştir, bunlar serin, treonin veya tirozin fosforilasyon; N-Glikozilasyon; lizin asetilasyon ve sumolasyon (Tablo 3). Lizin asetilasyonu (LysAc), bitki fizyolojik ve metabolik süreçlerinde anahtar rol oynayan, korunmuş ve önemli bir translasyon sonrası modifikasyondur (Xia vd., 2022). Fosforilasyonun bitkilerdeki metabolik ve fizyolojik yolların çoğunun düzenlenmesinde rol oynadığı görülmektedir (Arsova vd., 2018). Fosforilasyon, en yaygın PTM'lerden biridir ve protein aktivitelerini, protein etkileşimlerini veya hücre içi konumu değiştirerek bitki sinyal iletiminde ve metabolizmasında önemli bir rol oynar (Silva-Sanchez vd., 2015). Serin, treonin veya tirozin fosforilasyon bölgeleri PtMIT proteinleri üzerinde 33 ile 40 bölge arasında, N-glikozilasyon bölgeleri bir ile iki bölge arasında, sumolasyon bölgeleri 17-22 bölge arasında bulunmuştur. Buna karşın, lizin asetilasyon bölgesinin *Potri.016G125200.1* geninde mevcut olmadığı tespit edilmiştir. PtMIT proteinlerindeki çeşitli tipteki ve sayıdaki PTM'ler dikkate alındığında, *PtMIT* genlerinin fonksiyonel çeşitliliğine ve genlerin düzenlenmesine katkı sağladığı söylenebilir.

Tablo 3. PtMIT protein dizilerinin posttranslasyonel modifikasyon analizleri

Protein	Serin, treonin veya tirozin fosforilasyon bölgeleri	N-Glikozilasyon bölgeleri	Lizin asetilasyon	Sumolasyon
Potri.001G282400.1	41	1	2	22
Potri.009G077600.1	40	2	1	17
Potri.016G125200.1	33	1	-	19

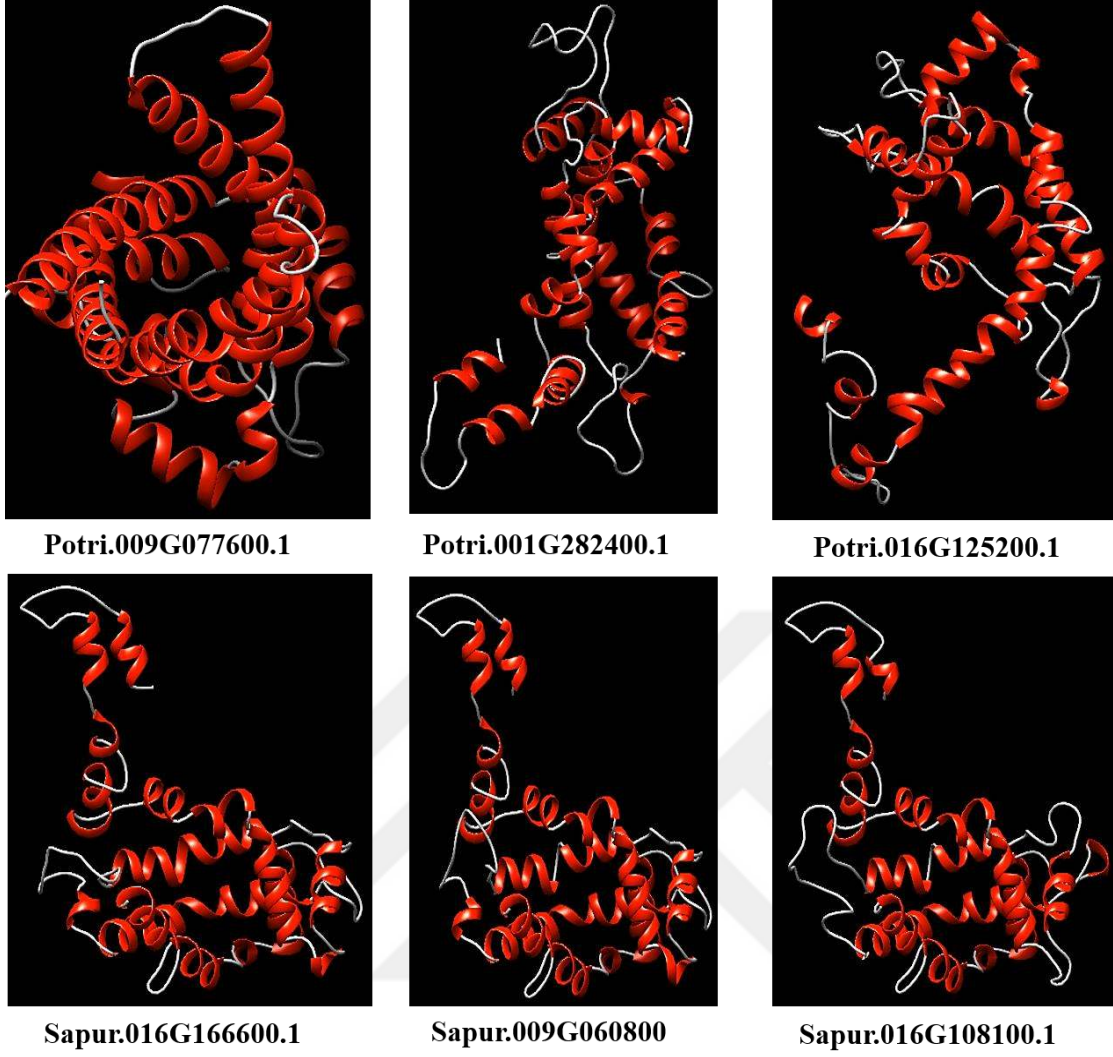
4.4. SEKONDER VE TERSİYER YAPI ANALİZLERİ

Kavak bitkisine ait MIT proteinlerinin sekonder yapıları SOPMA sunucusu kullanılarak analiz edildi ve sonuçlar Tablo 4’de gösterildi. Potri.001G282400.1, Potri.009G077600.1 ve Potri.016G125200.1 proteinleri için alfa sarmal, beta yaprağı, beta dönüşü ve tesadüfi sarmal yüzdelерinin (%) 48.63-52.89, 8.81-10.94, 3.95-4.86 ve 32.94-36.47 aralığında olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 4. PtMIT proteinlerinin sekonder yapı analizleri

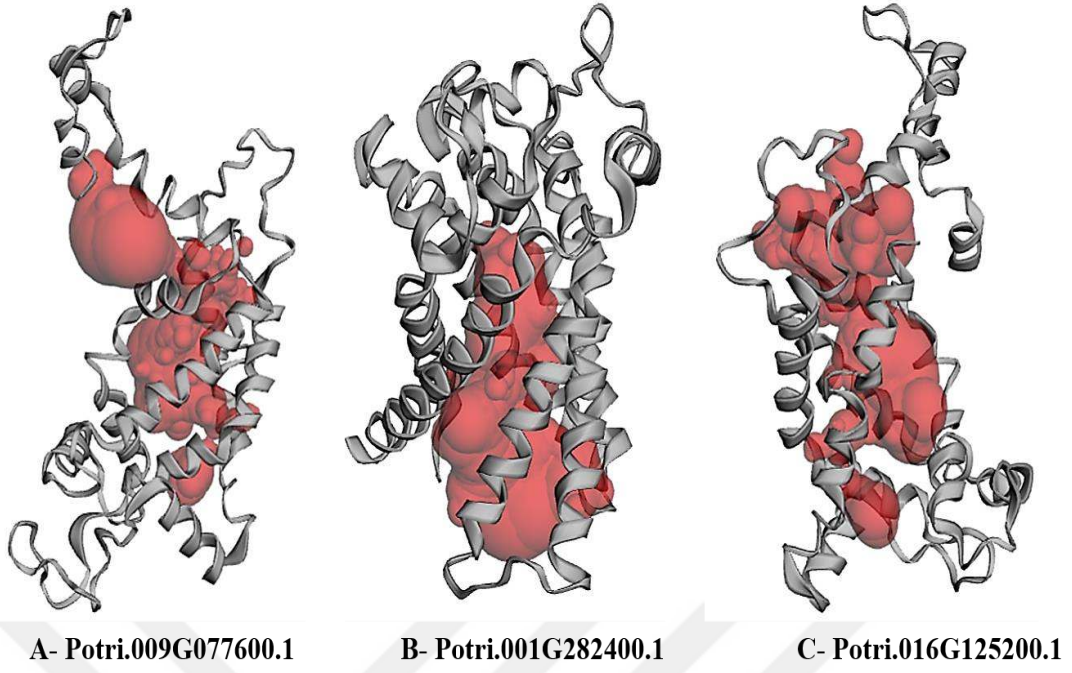
Protein	Alfa sarmal (%)	Beta yaprağı (%)	Beta dönüşü (%)	Tesadüfi sarmal (%)
Potri.001G282400.1	51.60	10.79	4.66	32.94
Potri.009G077600.1	48.63	10.94	3.95	36.47
Potri.016G125200.1	52.89	8.81	4.86	33.43

Protein tersiyer yapısı, bir proteinin üç boyutlu şeklidir. Tersiyer yapı, bir veya daha fazla protein ikincil yapısına, yani protein domainlerine sahip tek bir polipeptit zincirine (omurga) sahip olacaktır. Amino asit yan zincirleri çeşitli şekillerde etkileşime girebilir ve bağlanabilir. Belirli bir protein içindeki yan zincirlerin etkileşimleri ve bağları onun üçüncül yapısını belirler. Protein 3D yapısı atomik koordinatlarıyla tanımlanır. Bu koordinatlar ya bir protein “domain”ine ya da 3D yapının tamamını temsil edebilir (Branden ve Tooze, 2012). Bu çalışmada, özellikle kavak bitkisiyle akrabalık gösteren söğüt bitkisinin MIT proteinlerinin 3D yapısı oluşturularak kıyaslanması amaçlanmıştır. 3D yapılar incelendiğinde, MIT proteinlerindeki yapısal varyasyonlar dikkat çekmektedir (Şekil 9). Bu değişimlerin türe spesifik olma ihtimali ve *MIT* gen çeşitliliğiyle ilgili olduğu söylenebilir.



Şekil 9. Kavak ve söğüt bitkilerine ait MIT proteinlerinin 3D (tersiyer) yapıları. Ayrıca kırmızı renk alfa sarmalı ve gri renk ise ilmek (loop) yapılarını göstermektedir.

Protein yapılarının yüzey cepleri, iç boşlukları ve çapraz kanalları içeren geometrik ve topolojik özellikleri, proteinlerin işlevlerini yerine getirebilmeleri için temel öneme sahiptir (Tian vd., 2018). Bu topografik özellikler, proteinlerin ligand bağlanması, DNA etkileşimi ve enzimatik aktivite gibi işlevlerini yerine getirebilmeleri için yapısal temel ve mikro ortamlar sağlar. Bu nedenle proteinlerin bu topografik özelliklerinin tanımlanması ve niceliğinin belirlenmesi, proteinlerin yapı-işlev ilişkisinin anlaşılması açısından temel öneme sahiptir (Toh vd., 2015). PtMIT proteinlerinin yüzey topoğrafik yapıları incelendiğinde, her bir MIT proteinin sahip olduğu ceplerin hacim ve konumlarının birbirinden farklı olduğu bulunmuştur (Şekil 10), bu bulgulara *PtMIT* genlerindeki varyasyondan kaynaklı olduğu ve metabolik yollardaki spesifik moleküler adaptasyona katkı sağlayacağı düşünülebilir.



Şekil 10. PtMIT proteinlerinin CASTp sunucusu kullanılarak gerçekleştirilen yüzey topoğrafya analizleri. Kırmızı bölgeler proteinlerin sahip olduğu en geniş hacimli cepleri göstermektedir.

5. ÖNERİLER

Demir (Fe) biyokimyada çok önemli bir rol oynar ve hem bitkiler hem de insanlar için temel bir mikro besindir. Yerkabuğunda bol miktarda bulunmasına rağmen genellikle bitkilerin kullanımına hazır bir biçimde bulunmaz. Bu bağlamda, bitkilerde demir metabolizmasının anlaşılması ve özellikle mitokondriyal demir dengesinin korunması bitki yaşamı ve gelişmesi için hayati önem arz etmektedir. Bu çalışmada, tarafımız tarafından ilk defa kavak bitkisinde (*P. trichocarpa*) MIT (Mitochondrial Iron Transporter) genlerinin genom çaplı belirlenmesi ve biyoinformatik araçlarla analizi yapılmıştır. Bu çalışmanın bulguları, mitokondriyal demir metabolizmasının bitkilerde anlaşılmasına ve özellikle odunsu türler için verimli bir bilimsel zemin sağlama yanında; gelecekte yapılacak olan laboratuvar temelli bilimsel çalışmalar için de yararlı bir teorik zemin sağlayacaktır.

6. KAYNAKLAR

- Arosio, P., Ingrassia, R., and Cavadini, P. (2009). Ferritins: a family of molecules for iron storage, antioxidation, and more. *Biochim. Biophys. Acta* 7, 589–599
- Arsova B, Watt M and Usadel B (2018) Monitoring of Plant Protein Post-translational Modifications Using Targeted Proteomics. *Front. Plant Sci.* 9:1168. doi: 10.3389/fpls.2018.01168
- Bailey TL, Boden M, Buske FA, Frith M, Grant CE, Clementi L, Ren J, Li WW, Noble WS. (2009) MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res* 37: W202–W208
- Barrera, E.E.; Machado, M.R.; Pantano, S. Fat SIRAH (2019) Coarse-grained phospholipids to explore membrane–protein dynamics. *J. Chem. Theory Comput.* 15: 5674–5688
- Bashir, K., Ishimaru, Y., Shimo, H., Nagasaka, S., Fujimoto, M., Takanashi, H., et al. (2011). The rice mitochondrial iron transporter is essential for plant growth. *Nat. Commun.* 2, 322. doi:10.1038/ncomms1326
- Bolser D, Staines DM, Pritchard E, Kersey P (2016). Ensembl plants: integrating tools for visualizing, mining, and analyzing plant genomics data. In: Edwards D (ed) *Plant Bioinformatics Methods in Molecular Biology*, vol 1374. Humana Press.
- Branden, C. I., Tooze, J. (2012). Introduction to protein structure. *Garland Science*.
- Busi, M. V., Zabaleta, E. J., Araya, A., and Gomez-Casati, D. F. (2004). Functional and molecular characterization of the frataxin homolog from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS. Lett.* 576, 141–144. doi: 10.1016/j.febslet.2004.09.003.
- Frishman, D. Mewes, H. W. (1997). Protein structural classes in five complete genomes. *Nature structural biology*, 4: 626-628.
- Friso, G., & van Wijk, K. J. (2015). Posttranslational protein modifications in plant metabolism. *Plant physiology*, 169: 1469-1487.
- Gomez-Casati DF, Busi MV, Barchiesi J, Peralta DA, Hedin N, Bhadauria V (2018) Applications of bioinformatics to plant biotechnology. *Curr Issues Mol Biol* 27:89–104. <https://doi.org/10.21775/cimb.027.089>

- Grotz, N., Guerinot, M.L., 2006. Molecular aspects of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* doi: 10.1016/j.bbamcr.2006.05.014.
- Geourjon C, Deleage G (1995) SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Bioinformatics*. 11(6):681–684
- Gupta R, Brunak s 2002. Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function. *Pac Symp Biocomput.* 310-22.
- Hänsch, R., and Mendel, R. R. (2009). Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 259–266. doi: 10.1016/j.pbi.2009.05.006
- Inoue, H., Kobayashi, T., Nozoye, T., Takahashi, M., Kakei, Y., Suzuki, K., et al. (2009). Rice. OsYSL15 is an iron-regulated iron(III)-deoxymugineic acid transporter expressed in the roots and is essential for iron uptake in early growth of the seedlings. *Journal Biol. Chem.* 284, 3470–3479. doi: 10.1074/jbc.M806042200
- Jain, A., & Connolly, E. L. (2013). Mitochondrial iron transport and homeostasis in plants. *Frontiers in plant science*, 4, 348.
- Jain, A., Wilson, G. T., and Connolly, E. L. (2014). The diverse roles of FRO family metalloreductases in iron and copper homeostasis. *Front. Plant Sci.* 5:100. doi:10.3389/fpls.2014.00100
- Jain A, Dashner ZS and Connolly EL (2019) Mitochondrial Iron Transporters (MIT1 and MIT2) Are Essential for Iron Homeostasis and Embryogenesis in Arabidopsis thaliana. *Front. Plant Sci.* 10:1449. doi: 10.3389/fpls.2019.01449
- Jeong, J., and Guerinot, M. L. (2009). Homing in on iron homeostasis in plants. *Trends Plant Sci.* 14, 280–285. doi: 10.1016/j.tplants.2009.02.006
- Käll, L., Krogh, A., & Sonnhammer, E. L. (2007). Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction—the Phobius web server. *Nucleic acids research*, 35(suppl_2), W429-W432.
- Kunji, E. R., and Robinson, A. J. (2006). The conserved substrate binding site of mitochondrial carriers. *Biochim. Biophys. Acta* 1757, 1237–1248. doi: 10.1016/j.bbabi.2006.03.021

- Kurt, F., Kurt, B., Filiz, E., Yildiz, K., & Akbudak, M. A. (2022). Mitochondrial iron transporter (MIT) gene in potato (*Solanum tuberosum*): comparative bioinformatics, physiological and expression analyses in response to drought and salinity. *BioMetals*, 35(5), 875-887.
- Lee, S., Chiecko, J. C., Kim, S. A., Walker, E. L., Lee, Y., Guerinot, M. L., et al. (2009). Disruption of OsYSL15 leads to iron inefficiency in rice plants. *Plant Physiol.* 150, 786– 800. doi: 10.1104/pp.109.135418
- Lescot, M., Déhais, P., Thijs, G., Marchal, K., Moreau, Y., Van de Peer, Y., ... & Rombauts, S. (2002). PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic acids research*, 30(1), 325-327.
- Lill, R., Dutkiewicz, R., Freibert, S. A., Heidenreich, T., Mascarenhas, J., Netz, D. J., et al. (2015). The role of mitochondria and the CIA machinery in the maturation of cytosolic and nuclear iron–sulfur proteins. *Eur. J. Cell Biol.* 94, 280–291. doi:10.1016/j.ejcb.2015.05.002
- Liu, S. Wang, Z. Lan, Y. He, T. Xiong, R. Wu, C., ... & Yan, H. (2022). GEPSdb: The Gene. Expression Database of Poplar under Stress. *The Plant Genome*, 15(1), e20163.
- Millar, A. H., Whelan, J., Soole, K. L., and Day, D. A. (2011). Organization and regulation of mitochondrial respiration in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 62,79–104.
- Mistry, J., Chuguransky, S., Williams, L., Qureshi, M., Salazar, G. A., Sonnhammer, E. L., & Bateman, A. (2021). Pfam: The protein families database in 2021. *Nucleic acids research*, 49(D1), D412-D419.
- Nozoye, T., Nagasaka, S., Kobayashi, T., Sato, Y., Uozumi, N., Nakanishi, H., et al. (2015). The phyto siderophore efflux transporter TOM2 is involved in metal transport in rice. *Journal. Biol. Chem.* 290, 27688–27699. doi: 10.1074/jbc.M114.635193
- Palmer, C. M., and Guerinot, M. L. (2009). Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. *Natural Chem. Biol.* 5, 333–340. doi: 10.1038/nchembio.166
- Potenza, C.; Aleman, L.; Sengupta-Gopalan, C (2004). Targeting transgene expression

in. research, agricultural, and en-vironmental applications: Promoters used in plant transformation. *Vitr. Cell. Dev. Biol. Plant* 40: 1–22

Rengel, Z., Cakmak, I., and White, P. J. (2023). Marschner's mineral nutrition of higher plants. *Elsevier/Academic Press*. doi: 10.1016/C2019-0-00491-8

Savojardo, C., Martelli, P. L., Fariselli, P., Profiti, G., & Casadio, R. (2018). BUSCA: an integrative web server to predict subcellular localization of proteins. *Nucleic acids research*, 46(W1), W459-W466.

Schmidt, W. (2003). Iron solutions: acquisition strategies and signaling pathways in plants. *Trends Plant Sci.* 8, 188–193. doi: 10.1016/S1360-1385(03)00048-7

Schwarzländer, M., König, A.-C., Sweetlove, L. J., and Finkemeier, I. (2012). The impact of impaired mitochondrial function on retrograde signalling: a meta-analysis of transcriptomic responses. *Journal Exp. Bot.* 63, 1735–1750. doi:10.1093/jxb/err374

Shahmuradov, I.A.; Gammernan, A.J.; Hancock, J.M.; Bramley, P.M.; Solovyev, V.V (2003) PlantProm: A database of plant promoter sequences. *Nucleic Acids Res.* 31: 114–117

Shahzad, Z., Amtmann, A., 2017. Food for thought: how nutrients regulate root system architecture. *Curr. Opin. Plant Biol.* doi:10.1016/j.pbi.2017.06.008.

Shingles, R., Wimmers, L.E., McCarty, R.E., 2004. Copper transport across pea thylakoid membranes. *Plant Physiol.* doi:10.1104/pp.103.037895.

Shinoda, K.; Shinoda, W.; Mikami, M (2007). Molecular dynamics simulation of an archaeal lipid bilayer with sodium chloride. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 9: 643–650

Silva-Sanchez C, Li H, Chen S (2015) Recent advances and challenges in plant phosphoproteomics. *Proteomics* 15:1127–1141

Southern, M.M.; Brown, P.E.; Hall, A (2006). Luciferases as Reporter Genes. *Methods Mol. Biol.*, 323: 293–306

Spielmann J, Fanara S, Cotellet V and Vert G (2023) Multilayered regulation of iron homeostasis in Arabidopsis. *Front. Plant Sci.* 14: 1250588.

- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular biology and evolution*, 38: 3022-3027.
- Tian, W., Chen, C., Lei, X., Zhao, J., & Liang, J. (2018). CASTp 3.0: computed atlas of surface topography of proteins. *Nucleic acids research*, 46(W1), W363-W367.
- Toh, S., Holbrook-Smith, D., Stogios, P. J., Onopriyenko, O., Lumba, S., Tsuchiya, Y., Savchenko, A. and McCourt, P. (2015) Structure-function analysis identifies highly sensitive strigolactone receptors. *Striga Science* 350, 203–207
- Toronen P, Medlar A, Holm L (2018) PANNZER2: A rapid functional annotation webserver. *Nucl. Acids Res.* 46, W84-W88
- Tuskan, G. A., Difazio, S., Jansson, S., Bohlmann, J., Grigoriev, I., Hellsten, U., ... & Rokhsar, D. (2006). The genome of black cottonwood. *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *science*, 313(5793), 1596-1604.
- Tiwari A, Singh P, Kumawat S (2020) Applications of bioinformatics in plant breeding system. *Int Journal Curr Microbial App Sci.* 11:2825–2831
- Vigani, G., Zocchi, G., Bashir, K., Philippar, K., and Briat, J.-F. (2013). Signals from chloroplasts and mitochondria for iron homeostasis regulation. *Trends Plant Sci.* 18, 305–311. doi:10.1016/j.tplants.2013.01.006
- Vigani, G., Bashir, K., Ishimaru, Y., Lehmann, M., Casiraghi, F. M., Nakanishi, H., ... & Nishizawa, N. K. (2016). Knocking down mitochondrial iron transporter (MIT) reprograms primary and secondary metabolism in rice plants. *Journal of Experimental Botany*, 67(5), 1357-1368.
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., ... & Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic acids research*, 46(W1), W296-W303.
- Wu, A. C., Lesperance, L., and Bernstein, H. (2002). Screening for iron deficiency. *Pediatr. Rev.* 23, 171–178. doi: 10.1542/pir.23-5-171
- Xia, L., Kong, X., Song, H., Han, Q., & Zhang, S. (2022). Advances in proteome-wide analysis. Of plant lysine acetylation. *Plant Communications*, 3(1).

Yadav, R.; Arora, P.; Kumar, S.; Chaudhury, A. Perspectives for genetic engineering of poplars for enhanced phytoremediation abilities. *Ecotoxicology* 2010, 19, 1574–1588

Yu J, Jung S, Cheng CH, Lee T, Zheng P, Buble K et al (2021) CottonGen: the community database for cotton genomics, genetics, and breeding research. *Plants*. 10(12):2805. <https://doi.org/10.3390/plants10122805>

Zhang SY, Liu SL (2013) Bioinformatics. In: Maloy S, Hughes K (eds) Brenner's Encyclopedia. Of Genetics, 2nd edn. *Academic Press, London*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00155-8>.



7. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Onur POYRAZ

Yabancı Dili : İngilizce

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Orman Müh.	Düzce Üniversitesi	2024
Lisans	Orman Müh.	İstanbul Üniversitesi	2021
Lise		Düzce And. Öğretmen Lisesi	2017