

Kayın Mantarı (*Pleurotus ostreatus*) Genomunda Bulunan ABC Proteinlerinden MDR Alt Ailesinin Biyoinformatik Analizi ve İfade Profili

Hatice Kübra DÜZEL¹, Birsen ÇAKIR AYDEMİR^{2*}

¹Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Bornova, İzmir, Türkiye,

²Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Bornova, İzmir, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author

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

Orcid ID: 0000-0003-4268-8547

Araştırma Makalesi/Research Article

Geliş Tarihi/Received: 02.11.2021

Kabul Tarihi/Accepted: 28.11.2021

ÖZET

Hücre zarında birçok farklı metabolik yolu kontrol eden yapılardan biri olan ve en büyük protein ailelerinden birini oluşturan ATP bağlayan kaset taşıyıcı proteinleri (ABC) ATP enerjisini kullanarak madde taşınımında görev alırlar. Çözünür ABC proteinleri transmembran taşınmasına dahil değildir, ancak hücresel süreçlerde, örneğin ribozom biyojenezi ve mRNA translasyonunda önemli bir rol oynamaktadır. ABC proteinlerinin bir alt ailesi olan çoklu ilaç direnci (MDR) alt ailesi, antimikrobiyal peptitler, lipit taşınması, feromon taşınması, mitokondriyal porfirin alımı, ökaryotik peptit taşınması, antijenlerin işlenmesi, oksidatif stresden korunma, ağır metal dayanıklılığı, v.b. olaylarda rol oynamaktadır. Bu çalışmada kayın mantarı (*Pleurotus osteradus*) genomunun biyoinformatik analizi ile ABC proteinlerinin bir alt üyesi olan ABCB gen ailesine ait 8 tane MDR protein kodlayan gen (*PoMDRs*) belirlenmiştir. *PoMDRs* genlerinin kodladığı proteinler ile filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Ayrıca bu çalışma kapsamında ilk defa sap ve şapkada *PoMDR* genlerinin ifade seviyeleri incelenmiş ve bu genlerin ifade düzeylerinin benzer profillere sahip oldukları ancak bu genlerin ifade seviyelerinin şapkada daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: ABC kaset taşıyıcıları, MDR alt ailesi, mRNA ifadesi, *Pleurotus ostreatus*, Kayın mantarı

Bioinformatic Analysis and Expression Profile of MDR Subfamily of ABC Proteins from Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus*) Genome

ABSTRACT

ATP-binding cassette proteins (ABC), one of the largest protein families involved in the transport of substances by consuming ATP in many different metabolic reactions in the cell membrane. Soluble ABC proteins, on the other hand, are not involved in transmembrane transport, but play an important role in cellular processes, such as ribosome biogenesis and mRNA translation. Multidrug resistance (MDR) subfamily, which is a subfamily of ABC proteins, plays a role in the transport of antimicrobial peptides, lipid transport, pheromone transport, mitochondrial porphyrin uptake, multidrug resistance, eukaryotic peptide transport, antigen processing, protection from oxidative stress, heavy metal resistance, etc. In this study, 8 MDR protein-coding genes (*PoMDRs*) belonging to the ABCB gene family, which is a sub-class of ABC proteins, were determined by bioinformatic analysis of the beech mushroom (*Pleurotus osteradus*) genome. And a phylogenetic tree was formed with the proteins encoded by these genes. In addition, within the scope of this study, the expression levels of *PoMDR* genes in the stem and cap were examined for the first time and it was determined that the expression levels of these genes had similar profiles, but the expression levels of these genes were higher in the cap.

Keywords: ABC cassette transporters, MDR subfamily, mRNA expression, *Pleurotus ostreatus*, Oyster mushroom

Atf için (Cite);

Düzel, H.K., Aydemir, B.Ç. (2021). Kayın Mantarı (*Pleurotus ostreatus*) Genomunda Bulunan ABC Proteinlerinden MDR Alt Ailesinin Biyoinformatik Analizi ve İfade Profili, *Recep Tayyip Erdogan University Journal of Science and Engineering*, 2(2), 72-82. Doi: 10.53501/rteufemud.1017979

1. Giriş

Şapkalı mantarlar, humuslu ve nemli toprakları tercih eden, toprak altında olabileceği gibi toprak üzerinde de gelişme gösteren makrofunguslardır (Chang ve Miles, 1992). Görünüşleri, yapıları ve gelişimlerdeki farklılıklara bağlı olarak *Basidiomycota* veya *Ascomycota* bölümleri içinde yer alan makrofunguslar, yenilebilir, yenilemez, tıbbi ve zehirli türleri içerirler (Stamets ve Chilton, 1985). Bunlar arasında, şapkalı mantar türlerinin sayısının 140,000 olduğu tahmin edilmektedir (Wasser, 2002). 2019 FAO verilerine göre Türkiye’de Kültür mantarı üretim miktarı 49.364 ton/yıl olarak vermiştir. Ancak ülkemiz kültür mantarı ticaretinde kayıt dışı üretim oranı azımsanmayacak bir oranda olup, toplam mantar üretiminde kullanılan ithal ve yerli misel miktarları ile ticari olarak satılan kompost miktarları göz önünde bulundurulduğunda (Eren ve Pekşen, 2019)’a göre 2018 ülkemiz mantar üretim miktarı yaklaşık 65.000 ton olarak belirtilmiştir. Dünyada kültür mantarı üretiminde ilk sırayı alan ülke 8.948.099 ton/yıl ile Çin Halk Cumhuriyetidir (FAO, 2019).

Mantarların kuru madde üzerinden %50 ila 65’i karbonhidrat, %19-35’i proteinler ve %2 ila 6’sı ise yağdan oluşmaktadır. Yağ asitleri yönünden mantarlar incelendiğinde ise oleik asit, linoleik asit gibi doymamış yağ asitleri ve özellikle palmitik asit gibi doymuş yağ asitlerinin öne çıktığı görülmektedir. Yağda çözünen vitaminlerle beraber ergosterol içerikleri de zengin olan mantarların, aynı zamanda, D vitamini açısından da tek vejetaryan kaynak olarak gösterilmektedir (Stamets ve Chilton, 1985). Mantarlar sadece yukarıda bahsedilen bu özellikleri bakımından değil, özellikle tıbbi çalışmalarda kullanılıp başarı göstermelerinden dolayı da dünya üzerinde oldukça önemli bir yere sahiptirler (Pekşen, 2013; Wasser, 2010).

ABC Proteinlerine aynı zamanda ATP Bağlayan Kaset Taşıyıcıları veya bir diğer deyişle ABC Taşıyıcıları isimleri de verilmiştir (Fath ve Kolter, 1993; Rea, 2007; Rea vd., 2003). ABC proteinlerinin temel olarak iki adet NBD

(Nükleotid Bağlanma Alanı) ile birlikte iki adet de TMD (Transmembran Alanı) olmak üzere toplam dört birimden oluştuğu bildirilmiştir (Varadi vd., 2003). Membranının iç kısmında yaklaşık olarak altı α -heliks dönüşlü bir alanı kaplayan TMD hidrofobik özellikte olan amino asitlerden oluşmaktadır (Varadi vd., 2003; Oswald vd., 2006).

Arabidopsis thaliana ve *Oryza sativa* genomlarının yayımlanmasının ardından yapılan analizler sonucunda, ABC Kaset Taşıyıcı proteinlerinin yapısal farklılıklarına ve başlıca görevlerine göre on üç alt aileye ayrıldığı bildirilmiştir (Sanchez-Fernandez vd., 2001; Rea vd., 2003; Schulz ve Kolukisaoglu, 2006; Rea, 2007; Yazaki vd., 2009). Daha sonra yapılan çalışmalarda insan homologları ile yapısal özelliklerinin benzerlikleri de dikkate alınarak A’dan I’ya kadar uzanan farklı alt kategorilere ayrıldığı belirlenmiştir (Theodoulou, 2000; Sanchez-Fernandez vd., 2001; Rea vd., 2003; Vasiliou vd., 2008; Yazaki vd., 2009).

Hücre ve organellerin membranlarında yer aldığı bildirilen ABC proteinleri temel olarak hücre içi ve dış çevresi ile olan madde alışverişinden sorumludurlar. Ancak, bununla birlikte nükleik asitlerin ve kromozom yapısının düzenlenmesi, sinyal iletimi, protein salınımı ve ilaç direnci gibi diğer birçok metabolik olaylarda da görev aldıkları belirlenmiştir (Fath ve Kolter, 1993; Higgins ve Linton, 2003). Araştırmacılar bu protein ailesinin bitkilerdeki görevlerinin insan ve bakterilerde olduğu gibi ilaç direnci ile sınırlı olduğunu düşünseler de, devam eden araştırmalar, bu proteinlerin, aynı zamanda bitkilerde çok farklı metabolik olaylarda önemli roller üstlendiklerini göstermektedir (Kang vd., 2010; Rea, 2007; Rea vd., 2003).

ATP bağlayıcı kaset (ABC), substratların ATPaz alt ünitesini kullanarak hücre membranı boyunca translokasyonunu kolaylaştırır (Wang vd., 2017). Bu taşıyıcı aile insanlarda çoklu ilaç direnci, antijen işleme, bağışıklık, lipid homeostazi, hematopoezde kilit ve hücre proliferasyonu rollere sahip olduğu kanıtlanmıştır (Wang vd., 2017). Bunun yanında ABC kaset taşıyıcılarının

bitkilerde, bitki gelişimi, tohum gelişimi, tohum çimlenmesi, organ oluşumu ve ikincil büyüme gibi süreçlerde görev aldığı bildirilmiştir (Yazaki vd., 2009). ABC taşıyıcılarının, fitohormonların taşınmasında rolleri de dahil olmak üzere bitkilerin büyümesi ve gelişmesinde de aldığı roller bilinmektedir.

ABC proteinlerinin en önemli alt ailelerinden birisi ABCB olarak isimlendirilen ailedir. Bu ailede olduğu bildirilen iki protein grubu vardır. Bunlardan birincisi ve en önemlisi MDR (Multi Drug Resistance) proteinleri olup, bunlar tam molekül yapıları ile bilinmektedirler. Diğer grup ise yarım molekül yapıya sahip olan TAP (Transporter associated with Antigen Processing) ve ATM (ATP-binding cassette transporter of the Mitochondria) proteinleridir (Dean vd., 2001). MDR proteinleri ilk olarak insan kanser hücrelerinde aşırı ekspresyonunda çoklu ilaç etkisine karşın direnç göstermesinden dolayı bu isim verilmiştir. Ökaryotik sınıflandırma içerisinde ABCB ailesi içerisinde yer alan MDR, TMD1-NBD1-TMD2-NBD2 yapısına sahip ileri yönlü (forward-orientation) ve yaklaşık 1200 amino asit büyüklüğünde olan proteinleri içermektedir (Rea vd., 2003; Rea, 2007). ABCB/MDR alt ailesi (P-Glikoprotein Homologları) 22 tane *Arabidopsis thaliana*'da, 24 tane de çeltik (*Oryza sativa*) genomunda (Garcia vd., 2004) ve 28 adetde *Vitis vinifera* genomunda (Çakır vd., 2013) bulunarak bitkilerde ikinci en büyük alt aileyi ve en büyük tam-taşıyıcı (full transporter) alt ailesini oluşturmaktadır.

Arabidopsis bitkisinde Dudler ve Hertig (1992) tarafından yapılan bir çalışmada ABCB protein ailesine ait olan ve AtABCB1 olarak isimlendirilen bir genin öncelikli olarak savunma mekanizmasında görev aldığı düşünülmüş, ancak daha sonra yapılan araştırmalar sonucunda bir bitki hormonu olan oksinin taşınmasında fonksiyonel olarak görev aldığı gösterilmiştir. Aynı şekilde AtABC19 proteininde oksin taşınmasında görev aldığı ve bu proteini kodlayan genin susturulması durumunda ise yaprak morfolojisi farklı ve aynı zamanda bodur

bitkilerin geliştiği gösterilmiştir (Noh vd., 2001). Yine *Arabidopsis* bitkisinde bu gen ailesinin diğer üyeleri ile yapılan çalışmalar bu proteinlerin aynı zamanda farklı biyolojik süreçlerde de rollerinin olduğunu göstermiştir. *AtABCB14* geninin CO₂ değişimine bağlı olarak stomaların kapanmasında (Lee vd., 2005) ve *AtABCG25*, *AtABCG40*, *AtNPF4.6* ve *AtDTX50* genlerinde absisik asit (ABA) taşınımında rol aldıkları belirlenmiştir (Kuromori vd., 2018).

Diğer bitkilerde bu proteinlerle ilgili olarak yapılan çalışmalar incelendiğinde ise bu proteinlerin *Coptis japonica*'da berberin, patatest ve buğdayda ise calmodulin taşınımından sorumlu olduğu bildirilmiştir (Rea, 2007). Wang vd. (2017) yaptıkları çalışmada ise patates bitkisinden izole edilen *PMDR1* geninin bitkide kalsiyum taşınmasında rol oynadığını göstermiştir. Maya hücrelerinde (*S. cerevisiae*) ifade edilen Ste6p ABC proteininin görevinin ise peptit feromon taşınması olduğu bildirilmiştir (Jungwirth ve Kuchler, 2005).

Bitki ve hayvanlarda ABC kaset taşıyıcıları ve görevleri hakkında çeşitli bilgilere sahipken mantarlarda bu çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu nedenle de yapılmış olan bu çalışma kapsamında gelecekte yapılan çalışmalara katkı sağlaması açısından bu protein ailesinin, ekonomik değeri yüksek olan kayın mantarında (*P. ostreatus*) biyoinformatik analizler kullanılarak tanımlanması ve fonksiyonlarının anlaşılması amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Materyal

Bu çalışmada kullanılan Kayın Mantarı (*Pleurotus ostreatus*) bitkisel materyali, İzmir mantar işletmesi bünyesinde Foça'da faaliyet gösteren Baba Mantar işletmesinden temin edilmiştir. Ülkemizde *P. ostreatus* en çok Kayın mantarı olarak bilinmesine karşın, Kavak mantarı, İstiridye mantarı veya Yaprak mantarı gibi isimlerle de anılmaktadır (Pekşen, 2013). Mantarlar ilk flaş döneminin ikinci günü ve oda

dolumunun 46. gününde (03.06.2018) toplanmıştır.

2.2. *Pleurotus ostreatus* Genomunda ABC Taşıyıcı Genlerinin Belirlenmesi

Yeni nesil dizileme (NGS) ve Bionano optik haritalama yöntemleri kullanılarak 34.76 Mb büyüklüğündeki *P. ostreatus* genomu dizisi elde edilmiştir. Bu genom içerisinde toplam 20 *MYB* geni (*PoMYB*) genom boyunca tanımlanmış ve tam uzunlukta açık okuma çerçeveleri belirlenmiştir.

P.ostreatus genomunda olası ABC kaset taşıyıcılarının biyoinformatik analizinde öncelikle Kovalchuk vd. (2015)'nin diğer fungus türlerinde tanımlanmış olduğu protein sekansları kullanılmıştır. Basidiomiset grubundaki tam molekül MDR alt protein ailesine ait protein dizileri '*Pleurotus ostreatus* genom browser' veri tabanı kullanılarak BLAST (Basic Local Alignment Search Tool – Temel Yerel Hizalama Arama Aracı) analizi yapılmış ve sekanslar elde edilmiştir. Elde edilen sekansların yarım molekül TMD ve tam molekül MDR ayırımını sağlamak için NCBI (National Center for Biotechnology Information) veritabanı kullanılarak motif taraması yapılmış ve tam molekül MDR alt ailesine ait genler tespit edilmiştir.

2.3. Filogenetik ve Motif Analizi

Elde edilen tam molekül MDR alt ailesine ait gen dizileri Mega7 (Tamura vd., 2011) programı kullanılarak hem test edilmiş hem de filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Yine bu aşamada Motif Scan (https://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan) veritabanı yardımı ile proteinlerin olası fonksiyonları araştırılmıştır.

2.4. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için Zhu vd. (2017)'nin bildirmiş oldukları toplam RNA izolasyonu protokolü izlenmiştir. Sap ve şapkalardan 160 mg örnek alınarak 600µl tampon çözeltisi (pH

9'da 50 mM Tris, 5 mM EDTA, 150 mM LiCl, ve %5 SDS) ilave edilmiş ve vorteks ile karıştırılarak 35 dk. 10.000 rpm de santrifüjlenmiştir. Üst faz alınarak fenol/klorofom/ izoamil alkol (25:24:1) ilave edilerek vortekslenmiş ve santrifüjden geçirilmiştir. Elde edilen üst faz alınarak 10 Mm LiCl ilave edilmiş ve toplam RNAlar çöktürülmüştür. Çöken RNAlar %70' lik etanol ile yıkanarak saf su içinde çözdürülmüştür. Jele yüklenerek miktarı ve kalitesi kontrol edilen RNA'ların, kullanılacak miktarı belirlendikten sonra DNA'dan arındırılmaları için DNase I RNase Free (Thermo, Waltham, Massachusetts, ABD) enzimi ile muamele edilerek genomik DNA, toplam RNA'dan uzaklaştırılmıştır. Elde edilen RNA'nın, DNase enzimi, parçalanmış DNA veya kalıntılarından ve tuzlar'dan temizlenmesi amacıyla "RNeasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen, Hilden, Germany)" kiti üretici firmanın önerileri doğrultusunda kullanılmıştır.

2.5. cDNA Sentezi

Elde edilen toplam RNAlar, cDNA sentezi eldesinde kullanılmıştır. Toplam RNA'lar dan (Fermentas, Waltham, Massachusetts, ABD), üretici firmanın protokolleri izlenerek cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

2.6. Real-Time Poymeraz Zincir Reaksiyonu (Polymeraz Chain Reaction, PCR) Analizleri

Real Time PCR reaksiyonları Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Merkez Laboratuvarı'nda Rotor Gene Q Real Time PCR (Qiagen, Hilden, Germany) cihazında gerçekleştirilmiştir. Biyoinformatik analizler kullanılarak karakterize edilmiş MDR alt ailesine ait genlerin dizi bilgileri üzerinden primerler tasarlanmıştır (Tablo 1). Real Time Reaksiyonu için; 1µL cDNA, 12,5 µL SYBR® Green Master Mix (2X), 2 µL Forward ve 2 µL Reverse primer (10 µM) ve 7,5 µL dH₂O tüplere total hacim 25 µL olacak şekilde amplifikasyon gerçekleştirilmiştir.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan primerlerin dizilimi**Table 1.** Primers used in the study

Sıra	Primer adı	Primer dizisi	TM	(bp)
1	<i>PoMDR1F</i>	CCATGACGCCCGTCTTCTCC	58°C	20
	<i>PoMDR1R</i>	TGACCCACGAAGAGGCGAGA	62°C	20
2	<i>PoMDR2F</i>	CCATGACGCCCGTCTTCTCC	60°C	20
	<i>PoMDR2R</i>	CGATGCCGCCAAAGGTGTTG	60°C	20
3	<i>PoMDR3F</i>	CATCGGGCTGGTTACCGCAT	60°C	20
	<i>PoMDR3R</i>	GTTGCGTCTGCATCGCCTTG	58°C	20
4	<i>PoMDR4F</i>	GTACCTCCGCCTTGGATGCC	58°C	20
	<i>PoMDR4R</i>	CAACACGGCCCTCGTCTACC	60°C	20
5	<i>PoMDR5F</i>	ACCTCAGCATCGAGCATGGC	62°C	20
	<i>PoMDR5R</i>	GCGCAGCGATTGTGGACTTG	60°C	20
6	<i>PoMDR6F</i>	AACTCGTGCACGCCAGAAA	58°C	20
	<i>PoMDR6R</i>	GGGCTGCTTCTCCATGTCC	58°C	20
7	<i>PoMDR7F</i>	CATCGGGCTGGTTACCGCAT	60°C	20
	<i>PoMDR7R</i>	GTTGCGTCTGCATCGCCTTG	58°C	20
8	<i>PoMDR8F</i>	TACGCAAGTAGGCGGCAAGG	58°C	20
	<i>PoMDR8R</i>	GGCGATCGCAATGCGTTGTT	58°C	20
9	<i>PoMDR9F</i> actin	TGCTGGTCGTGACCTTACCG	62°C	20
	<i>PoMDR9R</i> actin	AGCTCTTCTCCAGGGCGGAT	62°C	20

3. Bulgular ve Tartışma

3.1. *Pleurotus osteratus* ABCB Protein Ailesine Ait Bulgular

Referans ABCB protein dizileri (Kovalchuk vd., 2015) kullanılarak yapılan analizler sonucunda 16 adet ABCB protein ailesine ait protein dizisi elde edilmiştir. Yapılan bu çalışmada elde edilen sekansların sekiz tanesinin yarım molekül TMD, diğer sekiz tanesinin ise tam molekül MDR oldukları belirlenmiştir. Bu çalışmada tam molekül MDR genleri kullanılmıştır. MDR alt ailesinin üyelerinin isimlendirilmesi daha önceki çalışmalar baz alınarak yapılmıştır. Bu çalışmada belirlenen tam molekül *PoMDR* alt ailesinin 8

üyesi ile ilgili genom, gen ve protein özellikleri Tablo 2’de gösterilmektedir.

PoMDR alt ailesinde sekiz farklı genin beş farklı kromozom üzerinde (4, 5, 8, 24 ve 28) lokalize olduğu saptanmıştır. *PoMDR* genleri içerisinde en uzun okuma çerçevesine sahip *PoMDR8* geni iken, en kısa okuma çerçevesine sahip *PoMDR4* geninin olduğu belirlenmiştir. Protein yapısı incelendiğinde ise *PoMDR* alt ailesinin büyük proteinlerden oluştuğu görülmüştür. Bu çalışmada belirlenen 8 tam molekül MDR alt aileleri ile ilgili topolojilerin tümü (TMD-NBD)₂ olarak belirlenmiş ve her alt ailenin protein adları yine Tablo 2’de açık olarak verilmiştir.

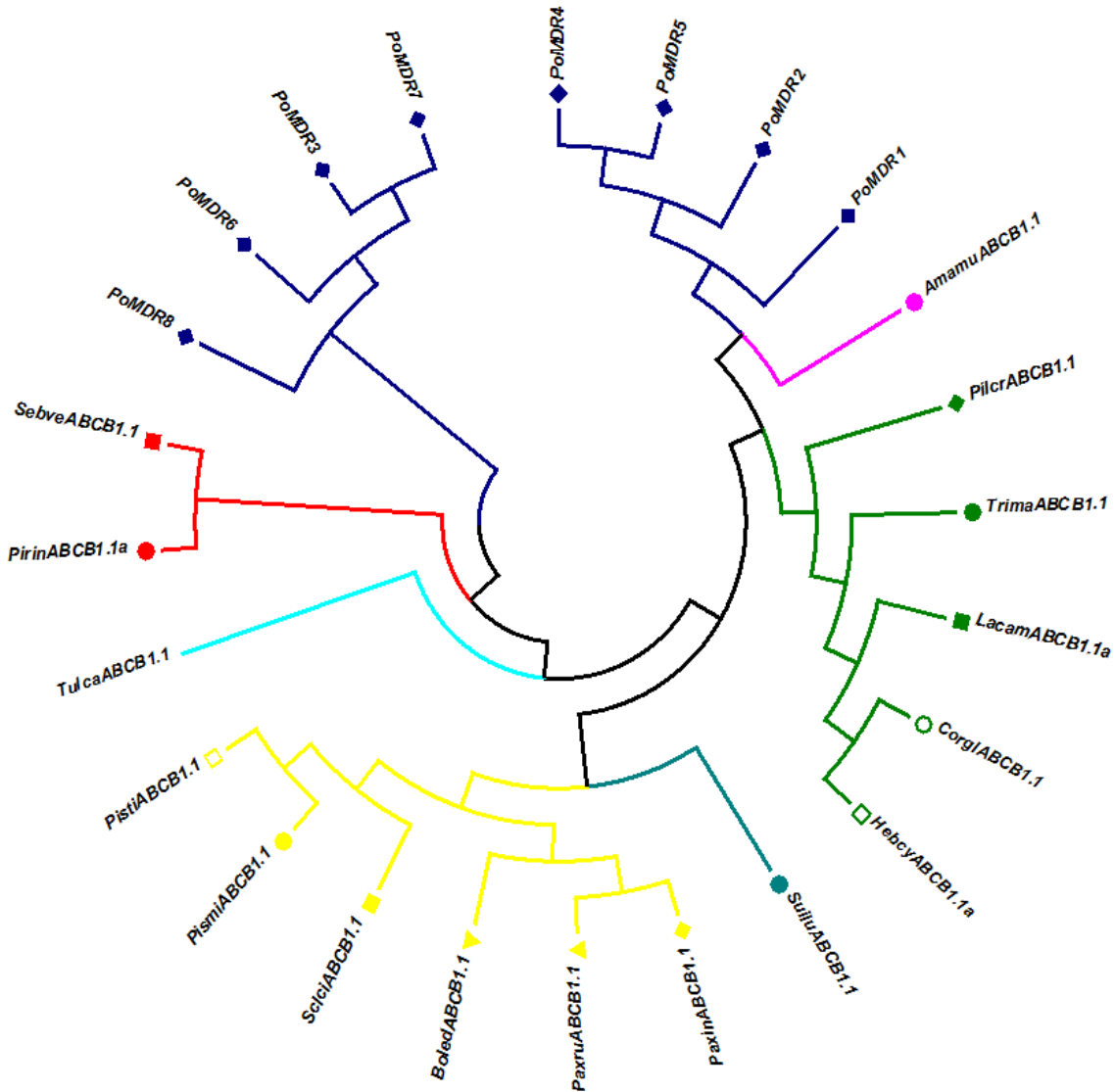
Tablo 2. Tam Molekül PoMDR Alt Ailesi üyelerinin sahip olduğu genom, gen ve protein özellikleri**Table 2.** Genome, gene, protein characteristics of full length PoMDR subfamily members

Alt aile adı	Alt aile adı	Topoloji	CDS	<i>Pleurotus osteratus</i> protein adı	Protein ID	Strand	Lokasyon	Exon	Transcript Uzunluğu	AA	pI	mW (Da)
<i>PoMDR1</i>	<i>PoABCB1</i>	(TMD-NBD)2	Tam	estExt_fgenes2_pg.C_11107	175376	+	1:4435918 to 4442729	8	6812	1883	8.68	205888.78
<i>PoMDR2</i>	<i>PoABCB2</i>	(TMD-NBD)2	Tam	genemark.1594_g	153729	+	1:4437665 to 4442459	4	4795	1544	7.52	167843.01
<i>PoMDR3</i>	<i>PoABCB3</i>	(TMD-NBD)2	Tam	e_gw1.7.692.1	32010	-	7:1318591 to 1323781	24	5191	1320	6.20	143049.19
<i>PoMDR4</i>	<i>PoABCB4</i>	(TMD-NBD)2	Tam	estExt_Genewise1.C_12691	43044	+	1:4437791 to 4442729	5	4969	1354	6.64	146428.72
<i>PoMDR5</i>	<i>PoABCB5</i>	(TMD-NBD)2	Tam	fgenes2_pg.1_#_1118	165012	+	1:4435918 to 4442459	8	6542	1883	8.68	205888.78
<i>PoMDR6</i>	<i>PoABCB6</i>	(TMD-NBD)2	Tam	genemark.8090_g	160225	-	7:1318591 to 1323781	24	5191	1319	6.13	149928.05
<i>PoMDR7</i>	<i>PoABCB7</i>	(TMD-NBD)2	Tam	gw.1.7.535.1	6711	-	7:1318660 to 1323772	24	5173	1315	6.12	142431.47
<i>PoMDR8</i>	<i>PoABCB8</i>	(TMD-NBD)2	Tam	fgenes2_pg.7_#_320	169568	-	7:1316880 to 1323781	28	6902	1689	5.80	182640.01

3.2. *Pleurotus osteratus* MDR Proteinlerinin Filogenetik Analizi

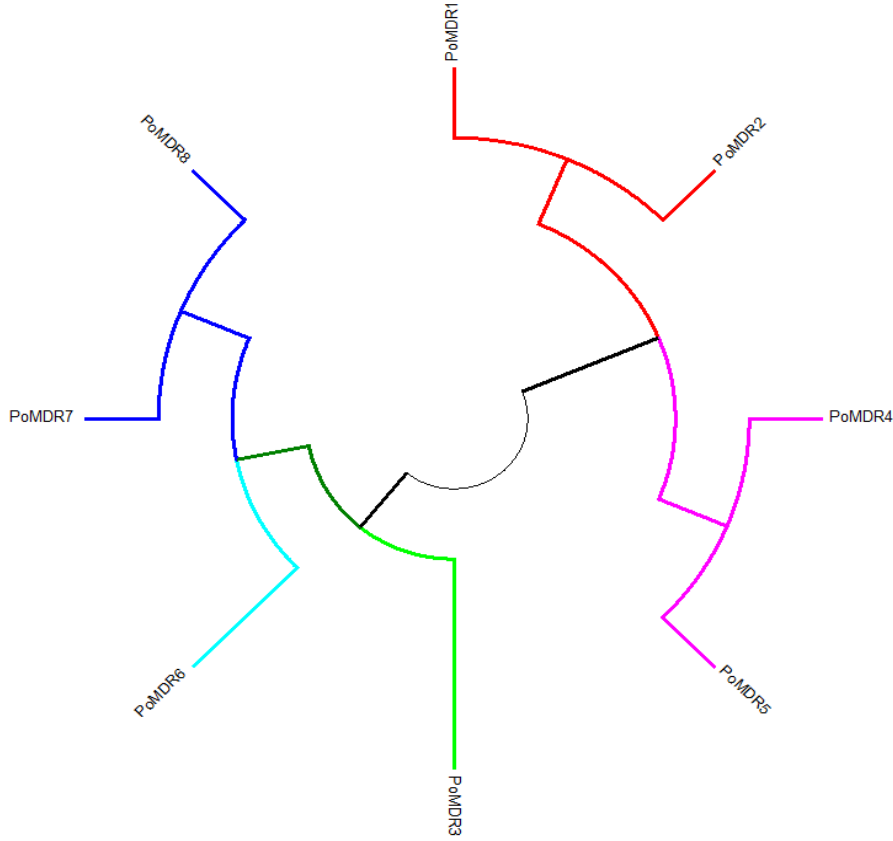
Yapılan filogenetik analiz sonucunda *PoMDR* alt ailesinin üyeleri *Amanita muscaria* Koide (amanuABC1.1) ile ortak atadan dallandığı, sebve ve pirin türleriyle yakınlık gösterdiği görülmüştür. *PoMDR* alt ailesi ve bu çalışmada referans olarak kullanılan diğer mantar türlerinin filogenetik ağacı Şekil 1'de, *Pleurotus osteratus*

MDR alt ailesinin filogenetik ağacı ise Şekil 2'de gösterilmektedir. Filogenetik analiz sonucunda *PoMDR1-PoMDR2-PoMDR4-PoMDR5* ve *PoMDR8-PoMDR7-PoMDR6-PoMDR3* ayrı iki dallanma göstermiştir. Daha sonra evrimsel olarak *PoMDR1-PoMDR2*, *PoMDR5-PoMDR4* ve *PoMDR7-PoMDR8* genlerinin kendi aralarında birbirlerine daha yakın oldukları belirlenmiştir (Şekil 2).



Şekil 1. *Pleurotus osteratus* MDR alt ailesi ve referans olarak kullanılan diğer mantar türlerinin filogenetik ağacı

Figure 1. Phylogenetic tree of *Pleurotus osteratus* MDR subfamily members and used reference MDRs from other fungi



Şekil 2. *Pleurotus osteratus* MDR alt ailesinin filogenetik ağacı.

Figure 2. Phylogenetic tree of *Pleurotus osteratus* MDR subfamily members

3.3. PoMDR Gen Ailesine Ait İfade Analizleri

PoMDR genlerinin sap ve şapkadaki ifade düzeyleri Şekil 3'te gösterilmektedir. Alınan sonuçlar genel olarak incelendiğinde *PoMDR* genlerinin sap ve şapkadaki ifade düzeylerinin benzerlikler gösterdiği ve aynı zamanda bu genlerin ifadelerinin şapka kısmında, sapa oranla daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen qRT-PCR sonuçlarına göre *PoMDR1* geninin ifadesinin şapka kısmında sapa oranla dört kat arttığı görülmüştür. Yapılan motif analizinde (Motif Scan) *PoMDR1* geninin B12 vitamini taşınımında görevli motif içerdiği saptanmıştır. Ayrıca, *PoMDR1* geni "Bipartit nükleer lokalizasyonu" sinyali taşımaktadır ve buna bağlı olarak da bu genin çekirdekte lokalize olduğu ve görev yaptığı düşünülebilir.

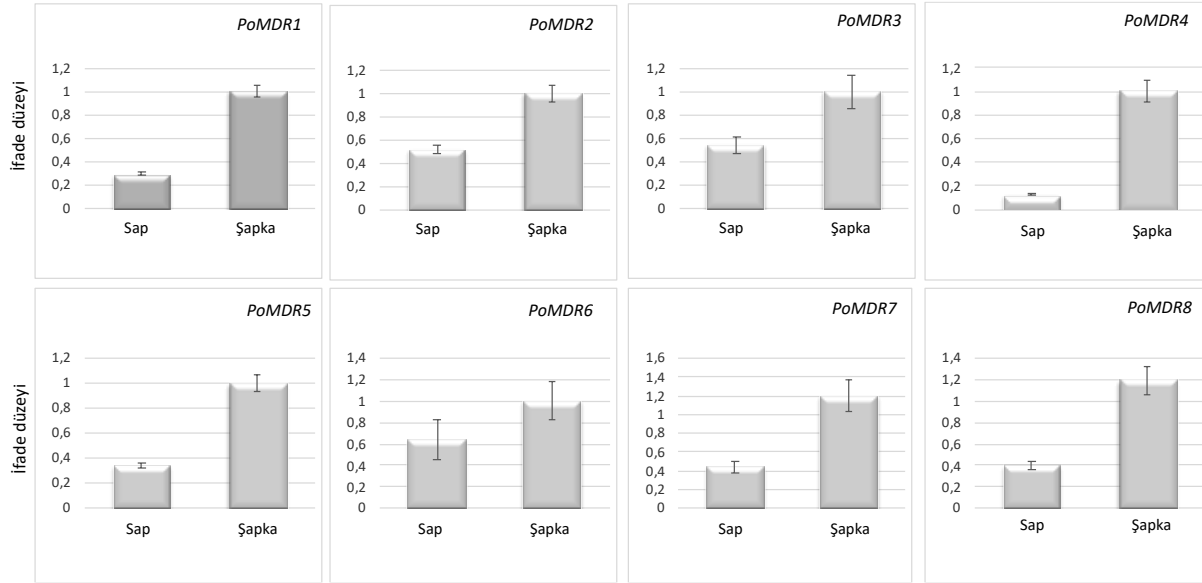
PoMDR2 geninin ifadesinin şapka kısmında, sapa oranla iki kat artış gösterdiği belirlenmiştir.

Pleurotus osteratus, B12 vitaminince zengin bir mantardır (Correa vd., 2016). *PoMDR1* geni gibi *PoMDR2* geninde aynı motifi içerdiği görülmüş ve motif benzerliğinden yola çıkılarak *PoMDR* grubu üyelerinin B12 vitamini taşınımında görev aldığı düşünülebilir. *PoMDR3* geninin motif analizi yapıldığında, ilk iki gen gibi bu geninde B12 vitamininin taşınımı için aynı motife sahip olduğu belirlenmiştir.

PoMDR4 geninin ifade profili incelendiğinde ise bu genin ifadesinin de sapa oranla, şapkada yüksek olduğu ve hatta diğer genlerle karşılaştırıldığında bu ifade düzeyinin çok daha yüksek olduğu görülmüştür. *Pleurotus ostreatus* mantarının şapka kısmının sekonder metabolitlerce oldukça zengin olduğu bilinmektedir (Beltran-Garcia vd., 1997). Ayrıca MDR grubunun sekonder metabolitlerin taşınmasında görev yaptığı da bilinmektedir

(Carrasco-González vd., 2017). Bu nedenle, *PoMDR4* geninin ifadesinin sapa oranla, şapkada çok daha yüksek olması *PoMDR4* geninin

sekonder metabolit taşınımında görev alabileceğini düşündürmektedir.



Şekil 3. *PoMDR* alt ailesine ait genlerinin qRT-PCR analizlerine göre ifadesi
Figure 3. Expression of *PoMDR* subfamily genes by qRT-PCR analysis

PoMDR5 geninin ifadesi incelendiğinde ise yine diğer genlerde olduğu gibi şapkada çok daha yüksek düzeyde ifade gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 3). Ayrıca, yapılan motif analizlerinde “Bipartit nükleer lokalizasyonu” sinyali taşıdığı belirlenmiştir. Bu nedenle de bu genin çekirdekte lokalize olduğu ileri sürülebilir.

PoMDR6 geninin ifade profilini incelediğimizde ise bu geninde diğer *PoMDR* genleri ile ifade düzeyleri yönünden benzerliklere sahip olduğu gibi şapkada ifade düzeyinin fazla olduğu söylenebilir. Ancak bu genin sapta olan ifade düzeyi, diğer *PoMDR* genlerinin aynı organdaki ifade düzeylerinden çok daha fazla olduğu görülmüştür (Şekil 3).

PoMDR7 geninin ifadesi incelendiğinde ise yine bu geninde, diğer üyelerle benzer şekilde, şapkada çok daha yüksek düzeyde ifade gösterdiği ve “Bipartit nükleer lokalizasyonu” sinyali taşıdığı tespit edilmiştir (Şekil 3). MDR alt ailesinin mayada yapılan çalışmalarda feromon taşınımında görev aldığı bildirilmiştir (Michaelis ve Barrowman, 2012). Nükleusla ilişkili sinyal metabolizmasında özellikle feromon taşınımında *PoMDR1*, *PoMDR5* ve

PoMDR7 genlerinin görev alabileceği düşünülebilir.

PoMDR8 geninin ifade düzeyi de diğer *PoMDR* genlerinin ifade profilleri ile benzerdir. Ancak *PoMDR8* geninin protein yapısı incelendiğinde, metiyonin, serin, fenilalanin ve prolin yönünden zengin bölgelere sahip motifler taşıdığı belirlenmiştir. Bu motifler özellikler bakımından incelendiğinde ise bu motiflerin daha çok fibrik proteinlere bağlanma ve bu proteinlerin biyosentezinde etkili oldukları görülmüştür (Laurent vd., 2000; Williamson, 1994). Ayrıca, MDR proteinlerinin peptid taşınımında da görev yaptıkları daha önce yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur (Jungwirth ve Kuchler, 2006). Bu veriler göz önüne alındığında *PoMDR* alt ailesine ait proteinlerin, kayın mantarı gelişimi boyunca gerçekleşen lipit taşınımı, peptid taşınımı ve belirlenen motiflerin fibrik proteinlere bağlanma ve bu proteinlerin biyosentezinde görev aldıkları ve varsayılan bu fonksiyonların ileride yapılacak olan çalışmalarla aydınlatılması öngörülebilir.

4. Sonuçlar

Bu çalışma ile *Pleurotus osteratus* genomu taranarak ABCB proteinleri biyoinformatik analizler kullanılarak belirlenmiştir. Bu genlere ait genom, gen ve protein özellikleri de saptanmıştır.

MDR alt ailesinin sekiz tane gen içerdiği saptanmıştır. Bu analizlerin yanı sıra *PoMDR* alt ailesine ait genlerin sap ve şapkada mRNA ifade profili çıkarılmıştır. Motif Scan analizleriyle tespit edilen proteinlerin taşıdığı motifler belirlenmiş ve taşımış oldukları bu motiflere göre *PoMDR* proteinlerinin görevlerine dair tahmini bilgiler elde edilmiştir. Ayrıca yapılan real-time PCR analiz sonuçları; *PoMDR* genlerinin sap ve şapkada bulunan ifade profillerinin benzerlikler gösterdiği ve şapkada, sapa göre ifade düzeylerinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Teşekkür

Bu çalışma Kübra Düzel'in Yüksek Lisans tez çalışmasından elde edilmiştir. Kayın mantarı temini sağlayarak her türlü teknik desteği esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Erkan EREN'e teşekkür ederiz. Bu çalışma Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje Numarası: FY-2018-20023).

Kaynaklar

Beltran-Garcia, M.J., Estarron-Espinosa, M., Ogura, T. (1997). Volatile compounds secreted by the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) and their antibacterial activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(10), 40-49. Doi: 10.1021/jf960876i

Carrasco-González, J.A., Serna-Saldívar, S.O., Gutiérrez-Urbe, J.A. (2017). Nutritional composition and nutraceutical properties of the *Pleurotus* fruiting bodies: Potential use as food ingredient. *Journal of Food Composition and Analysis*, 58, 69-81. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2017.01.016>

Chang S. T., Miles P.G. (1992). Mushroom biology—a new discipline. *The Mycologist*, 6, 64-65. Doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-010-3022-4>

Correa, R.C.G., Brugnari, T., Bracht, A., Peralta, R.M., Ferreira, I.C.F.R. (2016). Biotechnological, nutritional and therapeutic uses of *Pleurotus* spp. (*Oyster mushroom*) related with its chemical composition: A review on the past decade findings. *Trends in Food Science & Technology*, 50, 103e117 Doi: 10.1016/j.tifs.2016.01.012

Çakır, B., Kılıçkaya, O. (2013) Bitkilerde atp bağlı kaset (abc) taşıyıcı proteinlerinin yapısal özellikleri. *Adnan Mendere Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 9(1), 39-44.

Dean, M., Rzhetsky, A., Allikmets, R. (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Research*, 11(7), 1156-66. Doi: 10.1101/gr.184901

Dudler, R., Hertig, C. (1992). Structure of an *mdr*-like gene from *Arabidopsis thaliana*, Evolutionary implications. *Journal of Biological Chemistry*, 267, 5882-5888. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)42636-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)42636-1)

Eren, E., Pekşen A. (2019). Türkiye'de Kültür Mantarı Üretimi ve Teknolojik Gelişmeler. *Mantar Dergisi (Journal of Fungus)*, 10, 225-233.

FAO (2019). The state of Food and Agriculture. www.fao.org

Fath, F.J. and Kotler, R. (1993). ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiology Review*, 57, 995-1017. Doi: 10.1128/mr.57.4.995-1017.1993

Higgins, C.F., Linton, K.J. (2003). The ATP switch model for ABC transporters. *Nature Structural Molecular Biology*, 11, 918-926. Doi: <https://doi.org/10.1038/nsmb836>

Garcia, O., Bouige, P., Forestier, C., Dassa, E. (2004). Inventory and comparative analysis of rice and *Arabidopsis* ATP-binding cassette (ABC) systems. *Journal of Molecular Biology*, 343(1), 249-65. Doi: 10.1016/j.jmb.2004.07.093.

Jungwirth, H., Kuchler, K. (2006). Yeast ABC transporters-- a tale of sex, stress, drugs and aging. *FEBS Letters*, 580(4), 1131-8. Doi: 10.1016/j.febslet.2005.12.050.

Kang, J., Hwang, J.U., Lee, M., Kim, Y.Y., Assmann, S.M., Martinoia, E., Lee, Y. (2010). PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phyto hormone abscisic acid. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America*, 107, 2355-2360. Doi: 10.1073/pnas.0909222107

Kovalchuk, A., Kohler, A., Martin, F. and Asiegbu, F.O. (2015). Diversity and evolution of ABC proteins in mycorrhiza-forming fungi. *BMC Evolutionary Biology*, 15, 249. Doi: <https://doi.org/10.1186/s12862-015-0526-7>

- Kuromori, T., Seo, M. and Shinozaki, K. (2018). ABA transport and plant water stress responses. *Trends in Plant Science*, 23(6), 513-522. Doi: 10.1016/j.tplants.2018.04.001
- Laurent, F., Labesse, G. and Wit, P. (2000). Molecular Cloning and Partial Characterization of a Plant VAP33 Homologue with a Major Sperm Protein Domain. *Biochem Biophys Res Commun*, 2(1), 286-92. Doi: 10.1006/bbrc.2000.2387.
- Lee, M., Lee, K., Lee, J., Noh, E. W., Lee, Y. (2005). AtPDR12 contributes to lead resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 138, 827-836. Doi: 10.1104/pp.104.058107
- Michaelis, S., Barrowman, J. (2012). Biogenesis of the *Saccharomyces cerevisiae* pheromone a-factor, from yeast mating to human disease. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 76, 626-651. Doi: 10.1128/MMBR.00010-12
- Noh, B., Murphy, A. S., Spalding, E. P. (2001). Multidrug resistance-like genes of *Arabidopsis* required for auxin transport and auxin-mediated development. *The Plant cell*, 13(11), 2441-2454. Doi: https://doi.org/10.1105/tpc.010350
- Oswald, C., Holland, I.B., Schmitt, L. (2006). The motor domains of ABC-transporters/what can structures tell us? *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 372, 385-399. Doi: https://doi.org/10.1007/s00210-005-0031-4
- Pekşen A. (2013). Mantarların insan hayatı ve sağlığındaki yeri. *Bahçe Haber*, 2(1), 10-15.
- Rea, P.A. (2007). Plant ATP-binding cassette transporters. *Annual Review of Plant Biology*, 58, 347-375. Doi: https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105406
- Rea, P.A., Sánchez-Fernández, R., Chen, S., Peng, M., Klein, M., Geisler, M., and Martinoia, E. (2003). The Plant ABC Transporter Superfamily: The Functions of a Few and Identities of Many, ABC Proteins, Holland, I. B., Cole, S. P. C., Kuchler, K. ve Higgins, C. F. (Eds.), ABC proteins from bacteria to man. *Academic Press*, London, 335-355.
- Sánchez-Fernández, R., Davies, T.G., Coleman, J.O., Rea, P.A. (2001). The *Arabidopsis thaliana* ABC protein superfamily, a complete inventory. *Journal of Biological Chemistry*, 276(32), 30231-44. Doi: 10.1074/jbc.M103104200.
- Schulz, B., Kolukisaoglu, H.Ü. (2006). Genomics of plant ABC transporters: The alphabet of photosynthetic life forms or just holes in membranes. *FEBS letters*, 580(4), 1010-1016. Doi: 10.1016/j.febslet.2006.01.002
- Stamets, P., Chilton, J.S. (1985). *The Mushroom Cultivator: A Practical Guide to Growing Mushrooms at Home*, Richmond Publishing Co Ltd., London.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10), 2731-2739. Doi: https://doi.org/10.1093/molbev/msr121
- Theodoulou, F.L. (2000). Plant ABC transporters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bio membranes*, 1465(1-2), 79-103. Doi: 10.1016/s0005-2736(00)00132-2
- Varadi, A., Tusnady, G. E., Sarkadi, B. (2003). Membrane Topology of the Human ABC Transporter Proteins. In ABC Proteins (I. B. Holland, P. C. C. Susan, K. Karl, S.P.C.C.K. Christopher) Academic press, 37-46, London
- Vasiliou, V., Vasiliou, K., and Nebert, D. (2008). Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Human Genomics*, 3, 281-290. Doi: 10.1186/1479-7364-3-3-281
- Wang, W., Buitrago, L., and Wang, Y. (2017). ABC transporters in megakaryopoiesis and platelet activity. *Thrombosis Research*, 156, 126-133. Doi: 10.1016/j.thromres.2017.06.020
- Wasser, S.P. (2010). Medicinal mushroom science: history, current status, future trends, and unsolved problems. *Int J Med Mushrooms*, 12(1), 1-16. Doi:10.1615/IntJMedMushr.v12.i1.10
- Wasser, S.P. (2002). Medicinal Mushrooms as a Source of Anti-tumor and immuno-modulating Polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60, 258-274. Doi: 10.1007/s00253-002-1076-7
- Williamson, M.P. (1994). The structure and function of proline-rich regions in proteins. *Biochemistry Journal*, 15(2), 249-60. Doi: 10.1042/bj2970249
- Yazaki K., Shitan N., Takanashi K. (2009). Cell and molecular biology of ATP-binding cassette proteins in plants. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 263-299. Doi: 10.1016/S1937-6448(09)76006-X
- Zhu, H., Sun, X., Liu, D., Zheng, L., Chen, L., Ma, A. (2017). An improved total RNA extraction method for white jelly mushroom *Tremella fuciformis* rich in polysaccharides. *Mycobiology*, 45(4), 434-437. Doi:10.5941/MYCO.2017.45.4.434