

Bitkilerde Ağır Metal Toksisitesi: Proteomik Yaklaşım

Hakan TERZİ, Mustafa YILDIZ

Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Afyonkarahisar
e-posta: biyolokum@yahoo.com, mustafa_yildizus@yahoo.com

Geliş Tarihi:04.07.2013; Kabul Tarihi:02.08.2013

Özet

Ağır metal kirliliği, insan sağlığını olumsuz etkileyen ve tarımsal verimde kayıplara neden olan önemli çevresel tehlikelerden biridir. Bitki hücresinin en önemli fonksiyonu, kendi savunması için ağır metal stresine karşı cevap vermektir. Ağır metal stresine cevap olarak fonksiyonel genler veya proteinlerin teşhisi stres cevaplarının moleküler mekanizmalarının anlaşılmasında önemli bir basamaktır. Protein ekspresyonu sadece transkripsiyonel seviyede değil, aynı zamanda translasyonel ve post-translasyonel seviyelerde de düzenlenmektedir. Bu nedenle, farklı stres koşulları altında bitki proteomundaki değişimleri araştırmak önemlidir. Genom tarafından eksprese olan proteinlerin geniş ölçekli analizi olarak tanımlanan proteomik, sadece proteomun tamamını tanımlamak için değil, aynı zamanda ağır metal stresi gibi farklı fizyolojik koşullar altındaki proteomların karşılaştırılması için güçlü bir moleküler araçtır. Bu derlemede, proteomik teknolojileri ve bitkilerde farklı metabolik olaylarda rolü olan ağır metal teşvikli proteinler tartışılmıştır.

Anahtar kelimeler

Bitkiler;
Ağır Metal;
Toksisite;
Proteomik;
Kütle Spektrometrisi

Heavy Metal Toxicity in Plants: Proteomics Approach

Abstract

Heavy metal contamination is one of the major environmental hazards, leading to losses in agricultural yields and harmfully affecting human health. The most crucial function of plant cell is to respond against heavy metal stress for self-defence. The identification of the functional genes or proteins that are involved in responses to heavy-metal stress is a fundamental step in understanding the molecular mechanisms of stress responses. Protein expression is regulated not only at the transcriptional level, but also at the translational and post-translational levels. Therefore, it is crucial to investigate the changes in plant proteome under different stress conditions. Proteomics, defined as the large-scale analysis of proteins expressed by the genome, is not only a powerful molecular tool for describing complete proteome, but also for comparative proteomes under different physiological conditions, such as heavy metal stress. In this review, proteomics technologies, and heavy metal induced proteins which play a role in different metabolic events in plants are discussed.

Key words

Plants;
Heavy Metal;
Toxicity;
Proteomics;
Mass Spectrometry

© Afyon Kocatepe Üniversitesi

1. Giriş

Birçok ağır metal toprakta doğal olarak bulunmakla birlikte, farklı endüstriyel uygulamalar sonucu çevreye yayılmaktadır. Bitkiler ağır metal toksisitesinin üstesinden gelebilmek için karmaşık fizyolojik ve biyokimyasal işlevler, gen ekspresyonu, protein modifikasyonları ve metabolit içeriklerindeki değişimlerin bir koordinasyonuna gerek duymaktadır (Urano et al. 2010).

Bazı ağır metaller bitki gelişimi için gerekli olan elementlere benzediğinden direkt olarak köklere girebilmekte ve esansiyel elementler için var olan

yolla alınabilmektedir. Bu ağır metaller daha sonra yapısal olarak benzerlik gösterdikleri esansiyel elementler için var olan yolla veya diğer taşıyım mekanizmalarıyla toprak üstü organlara taşınmaktadır (Ma et al. 2008). Ürün kaybına ek olarak tarımsal bitkilerde ağır metallerin birikimi insan sağlığını ve tüm ekosistemi tehdit etmektedir (Satarug et al. 2003). Bu nedenle, kirlenmiş alanlardan ağır metallerin uzaklaştırılması oldukça önemlidir. Organik kirleticilerin aksine ağır metaller bilinen herhangi bir biyolojik işlem ile parçalanamamakta ve bu nedenle ağır metallerin

biriktirilmesi ve detoksifiye edilmesi için bitkilerin kullanıldığı fitoremediasyon gibi etkili ve çevre dostu bir teknoloji ile kirlenmiş alanların iyileştirilmesi gerekmektedir (Pilon-Smits 2004). Fitoremediasyon kirlenmiş alanlardan ağır metallerin uzaklaştırılması için hiperakümülatör bitkilerin kullanıldığı gelecek vaat eden bir yaklaşımdır. Bu nedenle, diğer birçok bitkinin aksine hiperakümülatör bitkiler toprak üstü organlarında ağır metalleri yüksek seviyelerde biriktirebilmelidir (Baker and Brooks 1989). Bununla birlikte, bu yaklaşımın uygulanması yeterli biyokütle ve hızlı büyüme oranına sahip hiperakümülatör bitkilerin eksikliğinden dolayı sınırlanmaktadır (Eapen and D'Souza 2005). Bu sınırlamaların üstesinden gelebilmek için istenilen özelliklere sahip genetik olarak modifiye edilmiş bitki türlerinin geliştirilmesine gerek duyulmaktadır. Bu nedenle, hiperakümülatör bitkilerde ağır metal birikimi mekanizmasının fizyolojik ve moleküler düzenlenmesinin iyi şekilde anlaşılması gerekmektedir.

Ağır metal stresine cevap ile ilişkili fonksiyonel gen veya proteinlerin teşhisi ağır metal toleransının moleküler mekanizmalarının anlaşılmasında önemli bir basamaktır. Bu tarz bilgiler ağır metallerle kirlenmiş alanların fitoremediasyonu için toleranslı transgenik bitkilerin geliştirilmesini sağlayabilmektedir. Son zamanlarda, gen ekspresyonundaki ağır metal teşvikli değişimler, mikroçip analizleri ile mRNA seviyesinde araştırılmış ve bitkilerde ağır metal cevaplarının anlaşılması için değerli bilgiler sağlamıştır (Chakrabarty et al. 2009; Yu et al. 2012; Shen et al. 2013). Bununla birlikte, bitkilerde ağır metal stresine cevap olarak eksprese olan proteinler ile ilgili birçok soru cevapsız kalmaktadır. Bu nedenle, bir hücre hattı, doku veya organda eksprese olan proteinlerin kapsamlı ve nicel analizi olan proteomik, biyolojik sistemler ile ilgili genomik ve transkriptomik yaklaşımlardan sağlanamayacak önemli bilgiler vermektedir. Çünkü transkriptlerin aksine proteinler bitkilerdeki stres cevaplarını direkt olarak yansıtmaktadır. Bununla birlikte, mRNA'ların ekspresyon seviyeleri ve ilgili proteinler

arasında zayıf korelasyon bulunması transkripsiyonel analizlerde bazı sınırlamalara neden olmaktadır (Rose et al. 2004; Bogeat-Triboulot et al. 2007). mRNA ve protein seviyeleri arasında korelasyon belirlenmiş olmasına karşın (Joosen et al. 2007; Li et al. 2007), protein ekspresyonu sadece transkripsiyonel seviyede değil, aynı zamanda translasyonel ve post-translasyonel seviyelerde de düzenlenmektedir. Sonuç olarak, bitki proteomundaki değişimlerin araştırılması oldukça önemlidir.

Proteomik yaklaşım, farklı proteomların karşılaştırılması temeline dayanmaktadır. Ağır metaller gibi abiyotik stres çalışmalarında, kontrol ve uygulama grubu bitki dokularından izole edilen proteomlar karşılaştırılmaktadır (Kosová et al. 2011). İki-yönlü (2-D) elektroforez ile birlikte kütle spektrometrisi proteomik çalışmaların gerçekleştirilmesinde en fazla kullanılan etkili bir yoldur ve biyolojik fonksiyona sahip karmaşık protein ağlarının çalışmasına olanak sağlamaktadır. Son yıllarda, bitki proteomu üzerine ağır metal stresinin etkilerini inceleyen çalışmalar artmıştır (Ahsan et al. 2010; Wang et al. 2011; Sharmin et al. 2012). Yapılan bu proteomik analizler, ağır metal stresine cevap olarak bitki proteomunda meydana gelen değişimlerin anlaşılmasına katkıda bulunmuş olmasına rağmen, spesifik bir ağır metal için biyomarkörlerin teşhisini sağlayacak ileri çalışmalara gereksinim duyulmaktadır. Bu nedenle, ağır metallerin translokasyonu, transformasyonu, içsel alıkonulması ve hücre içerisinde bu metallerin detoksifikasyonunda muhtemel role sahip proteinlerin daha iyi tanımlanmasını sağlayacak proteomik üzerine yoğunlaşılması gerekmektedir (Ahsan et al. 2009; Hossain and Komatsu 2013).

Bu derlemede, bitki proteomik çalışmalarında kullanılan farklı yaklaşımlar ve ağır metal teşvikli proteom değişimlerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. Proteomik Teknikler ve Stratejiler

Proteomik analizler bir örnek içerisindeki yüzlerce proteinin nicel ve nitel olarak belirlenmesini sağlayan etkili bir araçtır. Bununla birlikte, bu analizlerin etkinliği örneklerin karmaşıklığı tarafından sınırlanmaktadır. Bu sorunu aşmanın bir yolu kütle spektrometrisi ile proteinlerin teşhisinden önce bir (1-DE) veya iki-yönlü (2-DE) elektroforezin gerçekleştirilmesidir. Jel temelli proteomik stratejilerin yerini çözümlenmiş protein sindirimini takiben nanoLC (nano sıvı kromatografisi) temelli peptid fraksiyonu olmasına rağmen, bitkilerdeki proteomik çalışmaların çoğu 2-DE'yi takiben yapılan kütle spektrometrisi analizleridir (Bah et al. 2010; Wang et al. 2011; Sharmin et al. 2012). Sonuç olarak, proteomik analizler ile elde edilen referans haritaları herhangi bir zaman veya gelişimsel evrede bir hücre veya dokudaki proteinler hakkında bilgi vermekte ve proteomun daha sonraki analizleri için temel oluşturmaktadır (Villiers et al. 2011).

Bitki dokularının proteinlerin çökmesine neden olan polisakkaritler ve polifenoller gibi sekonder metabolitleri yüksek miktarlarda bulundurması ve hücre çeperinin varlığından dolayı protein ekstraksiyonu en kritik ilk basamaktır (Cánovas et al. 2004). Bununla birlikte, protein bolluğu, moleküler ağırlık, yük, hidrofobisite ve translasyon sonrası modifikasyonlardaki farklılıklar ve diğer moleküller ile olan etkileşimden dolayı protein ekstraksiyonu için ideal bir protokolün sağlanması oldukça zordur. Bitki dokularından proteinlerin ekstraksiyonu için birçok protokol bildirilmiştir; fakat bitki türleri arasındaki farklılıklardan dolayı aynı ekstraksiyon protokolünün kullanımı mümkün değildir ve farklı bitki türleri için ekstraksiyon koşullarının modifiye edilmesi gerekmektedir (Carpentier et al. 2005; Wang et al. 2006). Bununla birlikte, trikloroasetik asit (TCA)/aseton ve fenol temelli olmak üzere iki farklı ekstraksiyon yöntemi bitki dokularından proteinlerin ekstraksiyonu için sıklıkla kullanılmaktadır. Metal stresine maruz bırakılmış dokulardan protein ekstraksiyonu için TCA/aseton (Requejo and Tena 2006; Sarry et al.

2006; Aina et al. 2007; Kieffer et al. 2008; Semane et al. 2010) veya fenol temelli (Ingle et al. 2005; Bona et al. 2007; Ahsan et al. 2010; Sharmin et al. 2012) metotlar sıklıkla kullanılmaktadır. Fenol temelli metot glikoproteinlerin ekstraksiyonunu arttırmakta (Saravanan and Rose 2004) ve yüksek miktarda sekonder metabolit içeren bitki dokuları için yüksek çözünürlüklü protein profillerinin çıkarılmasını sağlayabilmektedir (Komatsu and Ahsan 2009).

Metal toksisitesi ile ilişkili proteomik çalışmalarda iki yönlü elektroforez (2-DE) ile kombine edilmiş kütle spektrometri analizleri sık kullanılmaktadır. (Çizelge 1). İlk yön olan izoelektrik fokuslamada (IEF), proteinler yüklerine göre ayrıştırılırken, ikinci yön olan sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS-PAGE) ise proteinler moleküler ağırlıklarına göre ayrıştırılmaktadır (Beranova-Giorgianni 2003).

İki yönlü elektroforez büyük protein komplekslerinin ayrıştırılması ve görüntülenmesinde kullanılmaktadır. Bu teknik basitlik, üretkenlik ve geniş aralıktaki proteinlerin (10 ila 500 kDa) analiz edilmesine olanak sağlamanın yanında kısmen hidrofobik ve oldukça asidik veya bazik proteinlerin analiz edilmesine izin vermektedir. Bununla birlikte, düşük bolluktaki proteinlerin görüntülenememesi, sınırlı pI aralıkları ve membran proteinlerinin kaybolması gibi sebeplerden dolayı 2-DE bazı sınırlamalara maruz kalmaktadır (Santoni et al. 2000).

İki yönlü elektroforeze ek olarak blue-native PAGE (BN-PAGE) tekniği hidrofobik ve/veya membran proteinlerinin analiz edilmesi için geliştirilmiştir (Schägger and von Jagow 1991). Blue-native (BN) ve SDS-PAGE tekniklerinin ardışık kullanımı, kloroplast gibi organellere ait protein komplekslerinin iyi bir şekilde ayrıştırılmasını sağlamaktadır. Kısaca bu metotta protein kompleksleri organellerden izole edilmekte, protein komplekslerine bağlanan boya molekülleri (Coomassie gibi) ile muamele edilmekte ve PAGE ile ayrıştırılmaktadır. Coomassie boyanın

kullanımından dolayı bu teknik BN-PAGE olarak adlandırılmaktadır (Ahsan et al. 2009). BN-PAGE proteinlerin doğal koşullar altında etkili şekilde çözünmesini sağlamakta ve proteomdaki nicel değişimlerin direkt olarak belirlenmesine izin vermektedir. Yaprak apoplast proteomundaki Mn

teşvikli değişimler BN-SDS PAGE ve 2-D BN/BN PAGE ile ortaya konmuş ve Mn stresi ile ilişkili proteinler nano-ölçekli LC-MS/MS ile tanımlanmıştır (Fecht-Christoffers et al. 2003; Führs et al. 2008).

Çizelge 1. Bitkilerde ağır metal toksisitesi ile ilgili bazı proteomik çalışmalar (Ahsan vd. 2009'den değiştirilerek)

Metal	Bitki	Doku	Örnek hazırlama	Proteomik teknolojisi	Kaynak
Al	<i>O. sativa</i>	Kök	Protein çöktürme (TCA/Aseton)	2-DE, MALDI-TOF	Fukuda et al. 2007
	<i>O. sativa</i>	Kök	Protein çöktürme (Aseton)	2-DE, MALDI-TOF	Yang et al. 2007
	<i>G. max</i>	Kök	Protein çöktürme (TCA/Aseton)	2-DE, MALDI-TOF	Zhen et al. 2007
	<i>S. esculentum</i>	Kök	Protein çöktürme (TCA)	2-D DIGE, MALDI-TOF-TOF	Zhou et al. 2009
As	<i>Z. mays</i>	Kök	Protein çöktürme (TCA)	2-DE, MALDI-TOF	Requejo and Tena 2005
	<i>Z. mays</i>	Gövde	Protein çöktürme (TCA)	2-DE, MALDI-TOF	Requejo and Tena 2006
	<i>O. sativa</i>	Kök	Fenol ekstraksiyonu	2-DE, MALDI-TOF	Ahsan et al. 2008
	<i>O. sativa</i>	Yaprak	Protein çöktürme (Aseton)	2-DE, MALDI-TOF	Ahsan et al. 2010
Cd	<i>A. thaliana</i>	Hücre kültürü	Protein çöktürme (TCA)	2-DE, LC-MS	Sarry et al. 2006
	<i>O. sativa</i>	Kök	Protein çöktürme (Aseton)	2-DE, MALDI-TOF	Aina et al. 2007
	<i>Lepidium sativum</i>	Hücre kültürü	Protein çöktürme (Aseton)	2-DE, LC-MS/MS	Gianazza et al. 2007
	<i>O. sativa</i>	Tohum	Protein çöktürme (PEG)	2-DE, MALDI-TOF	Ahsan et al. 2007
	<i>Populus nigra</i>	Hücre Kültürü	Protein çöktürme (PEG)	2-DE, MALDI-TOF	Giovanna et al. 2010
	<i>Populus tremula</i>	Yaprak	Protein çöktürme (TCA/Aseton)	2-DE, MALDI-TOF	Kieffer et al. 2009
	<i>Populus tremula</i>	Yaprak	Protein çöktürme (TCA/Aseton)	DIGE; MALDI-TOF/TOF	Kieffer et al. 2008
	<i>O. sativa</i>	Kök ve yaprak	Protein çöktürme (PEG)	2-DE, MALDI-TOF	Lee et al. 2010
	<i>T. aestivum</i>	Yaprak	Protein çöktürme (PEG)	2-DE, MALDI-TOF	Cailin et al. 2009
	<i>A. thaliana</i>	Kök	Protein çöktürme (Fenol)	2-DE, MALDI-TOF	Roth et al. 2006
	<i>G. max</i>	Hücre kültürü	Santrifügasyon	SDS-PAGE, RP-HPLC, Q-TOF	Sobkowiak and Deckert 2006
	<i>T. caerulea</i>	Kök ve gövde		2-DE, MALDI-TOF	Tuomainen et al. 2006
	<i>T. aestivum</i>	Kök	Protein çöktürme (TCA/Aseton)	2-DE, MALDI-TOF	Wang et al. 2011
	<i>T. aestivum</i>	Yaprak	Protein çöktürme (TCA/Aseton)	2-DE, MALDI-Q-TOF	Wang et al. 2010
<i>L. esculentum</i>	Kök	Protein çöktürme (Fenol)	2-DE, MALDI-TOF	Rodríguez-Celma et al. 2010	
Cr	<i>Z. mays</i>	Fide	Protein çöktürme (Aseton)	2-DE, MALDI-TOF/TOF	Labra et al. 2006
	<i>Typha angustifolia</i>	Yaprak	Protein çöktürme (Fenol)	2-DE, MALDI-TOF/TOF	Bah et al. 2010
	<i>Miscanthus sinensis</i>	Kök	Protein çöktürme (Fenol)	2-DE, MALDI-TOF/TOF	Sharmin et al. 2012

Çizelge 1 (Devamı). Bitkilerde ağır metal toksisitesi ile ilgili bazı proteomik çalışmalar (Ahsan vd. 2009'den değiştirilerek)

Metal	Bitki	Doku	Örnek hazırlama	Proteomik teknolojisi	Kaynak
Cu	<i>Cannabis sativa</i>	Kök	Protein çöktürme (Fenol)	2-DE, MALDI-TOF	Bona et al. 2007
Cs	<i>G. max</i>	Tohum	Sonikasyon ve Tuzdan arındırma	2-DE, LC-MS/MS	Danchenko et al. 2009
	<i>A. thaliana</i>	Hücre kültürü	Protein çöktürme (TCA)	2-DE, MALDI-TOF	Le Lay et al. 2006
Cu	<i>O. sativa</i>	Fide	Protein çöktürme (PEG)	SDS-PAGE, MALDI-TOF	Ahsan et al. 2007
	<i>O. sativa</i>	Tohum	Sonikasyon ve santrifügasyon	2-DE, MALDI-TOF	Zhang et al. 2009
Mn	<i>Vigna unguiculata</i>	Yaprak	Protein çöktürme (Fenol)	2-DE, LC-MS/MS	Fecht-Christoffers et al. 2003
	<i>Vigna unguiculata</i>	Yaprak	Protein çöktürme (Fenol)	2-DE, LC-MS/MS	Fühns et al. 2008
Ni	<i>Alyssum lesbiacum</i>	Kök	Protein çöktürme (Fenol)	2-DE, LC-MS/MS	Ingle et al. 2005
Pb	<i>Helianthus annuus</i>	Yaprak	Protein çöktürme (TCA/Aseton)	2-DE, ESI-MS/MS	Walliwagedara et al. 2010
Zn	<i>A. halleri</i>	Gövde	Protein çöktürme (Aseton)	2-DE, nanoHPLC ESI-Q-TOF	Farinati et al. 2009

Diğer taraftan, tilakoid membran proteinlerinin ayrıntılı şekilde ayrıştırılması ve teşhisi için yeni bir üç boyutlu (3-D) doğal elektroforetik protokol geliştirilmiştir (D'Amici et al. 2008). İlk boyutta protein komplekslerinin doğal sıvı faz izoelektrik fokuslamasını (N-LP-IEF) takiben ikinci boyutta protein komplekslerinin moleküler ağırlık ve pI'ları kullanılarak blue-native elektroforez (2-DE NLP-IEF-BN) gerçekleştirilmektedir. Bu yöntem membran proteinlerinin çözünmesindeki zorlukları ve sınırlamaları azaltmak için geliştirilmiştir (Timperio et al. 2008).

Jel elektroforezini takiben proteomdaki nicel değişimleri belirlemek için boyama ve görüntü analizleri gerçekleştirilir. Coomassie brilliant blue ve gümüş nitrat gibi boyama ajanları bitki proteomundaki ağır metal teşvikli değişimlerin analizinde sıklıkla kullanılmaktadır (Ahsan et al. 2010; Lee et al. 2010; Zhao et al. 2011; Sharmin et al. 2012). Jel üzerinde protein benekleri boyandıktan sonra jeller görüntülenmekte ve özel yazılımlar ile analiz edilebilmektedir. Bu yazılımlar arasında, Progenesis (Nonlinear Dynamics), ImageMaster 2D Platinum (Ge Healthcare, Amersham Biosciences), PDQuest (Bio-Rad), Proteovue (Eprogen) ve Phoretix 2D Advanced (PerkinElmer) gibi yazılımlar proteomik analizlerde

kullanılmaktadır. Bu yazılımlar farklı jellerdeki protein beneklerinin tespit edilmesi, bu beneklerin eşleştirilmesi ve benek yoğunluklarının karşılaştırılmasında kullanılmaktadır. Diğer taraftan, tek bir jel üzerinde birkaç örneğin eş zamanlı olarak ayrıştırılması ve görsel hale getirilmesinde izin veren 2-D DIGE (difference gel electrophoresis) tekniğinde, 2-D elektroforezden önce protein örnekleri çeşitli flüoresan boya ile etiketlenerek ağır metal teşvikli proteinler teşhis edilebilmektedir (Tonge et al. 2001; Kieffer et al. 2008; Evlard et al. 2013; Printz et al. 2013). 2-D DIGE tekniği, jeller arasında gözlenen varyasyonları azaltmakta ve üç farklı boyanın (Cy1, Cy2 ve Cy3) kullanımıyla tek bir jel üzerinde üç protein örneğinin karşılaştırılmasına olanak sağlamaktadır.

Kütle spektrometrisi (MS) teknolojisindeki ilerleme sadece elektroforetik veya kromatografik yöntemler ile elde edilen proteomik verilerin kalitesi ve miktarında önemli artışa neden olmuştur. Kütle spektrometrisi proteinlerin tanımlanmasının yanı sıra fosforilasyon ve asetilasyon gibi transasyon sonrası modifikasyonların da belirlenmesini sağlamaktadır (Bantscheff et al. 2012). Matriks destekli lazer desorpsiyon iyonizasyon (MALDI) ile kristal halde ve elektrosprey iyonizasyon (ESI) ile solüsyon

içerisinde proteinler gibi büyük makromoleküller analiz edilmektedir (Fenn et al. 1989; Tanaka et al. 1988). Birçok proteomik uygulamada, 2-D elektroforez MALDI-TOF kütle spektrometrisi ile kombine edilmiştir (Çizelge 1). Bu yaklaşımda, her bir protein beneğinin triptik sindirimi ile elde edilen her bir peptidin kütleleri kullanılarak ilgili proteinin peptid kütle parmak izleri (PMF) oluşturulmakta ve daha sonra bu PMF'ler veritabanlarındaki teorik peptid kütleleri ile karşılaştırılarak proteinler tanımlanmaktadır (Yates 1998). Bununla birlikte, PMF analizlerinde peptid kütleleri bir protein veya DNA veritabanından üretilmiş teorik peptid kütleleri ile eşleştirildiğinden dolayı sadece genomu bilinen türler için gerçekleştirilebilir. Genom bilgilerinin olmadığı durumlarda, EST (large expressed sequence tag) veri setlerinin bazı bitki türlerinde gerçekleştirilen proteomik araştırmalarda etkin şekilde kullanılabilirdiği gösterilmiştir (Requejo and Tena 2005; Visioli et al. 2012). PMF yaklaşımı yaygın olarak kullanılmasına karşın, tek bir jel alanında birden fazla protein olduğu durumlarda MS spektrumu karmaşık hale gelmekte ve bu durum ilgili proteinin tanımlanmasını imkansız hale getirmektedir. Bu potansiyel problemin üstesinden gelebilmek için bazı proteomik uygulamalarda, peptidlerin sekanslanmasına izin veren ve daha güvenilir bir protein tanımlanmasını sağlayan ardışık kütle spektrometrisi (MALDI-TOF/TOF veya LC-MS/MS) kullanılmıştır (Çizelge 1). Ardışık kütle spektrometrisi amino asit sekansı ve spesifik kimyasal modifikasyonları ortaya koyarak protein yapısı hakkında kesin bilgi sağlamaktadır. Bu yöntem kompleks peptid karışımlarının yapısal karakterizasyonunu sağlayarak protein tanımlanması için daha güvenilir sonuçlar vermektedir. Bununla birlikte, MS/MS bilinmeyen proteinlerin ve translasyon sonrası modifikasyonların teşhisi için de uygulanmaktadır (Timperio et al. 2008; Wang et al. 2013).

Kantitatif proteomik stratejisi ile ilgili olarak protein ve peptidlerin etiketlenmesi temeline dayanan ICAT (isotope-coded affinity tag), SILAC (stable-isotope labeling by amino acids in cell culture), ICPL

(isotope-coded protein label) ve iTRAQ (isobaric tags for relative and absolute quantitation) gibi birkaç strateji geliştirilmiştir (Kennedy 2002; Mann 2006; Zieske 2006; Kellermann 2008). Bununla birlikte, bu ikinci nesil proteomik stratejilerinin bitki proteomu üzerine ağır metallerinin etkisini araştıran çalışmalarda kullanımı sınırlı kalmıştır. iTRAQ tekniği kullanılarak metal stresine maruz kalan arpa, *Arabidopsis* ve *Brassica juncea* bitkilerinde çok sayıda protein teşhis edilmiştir (Patterson et al. 2007; Alvarez et al. 2009; Schneider et al. 2009; Fukao et al. 2011). Patterson vd. (2007), iTRAQ tekniğinin stresle ilişkili proteinlerin teşhisinde önemli bir potansiyele sahip olduğunu ileri sürmüşlerdir. Sonuç olarak, bitkilerdeki metal teşvikli proteom değişimlerinin araştırılmasında klasik proteomik teknolojileri sıklıkla kullanılırken, SILAC, ICAT, ICPL ve iTRAQ gibi ikinci nesil proteomik teknolojilerinin kullanımı yaygın olmamakla birlikte giderek artmaktadır.

3. Bitki Proteomundaki Ağır Metal Teşvikli Değişimler

Birçok proteomik çalışmada, bazı protein sınıflarının ağır metal stresine cevap olarak teşvik edildiği ve bu proteinlerin savunma ve uyum süreçlerinde önemli rol oynayabileceği gösterilmiştir (Çizelge 2). Bitkilerde ağır metal stresi, metal bağlayıcı ligandlar ile şelatlama, antioksidant savunma sistemi ve şaperonlar gibi birkaç savunma mekanizmasını teşvik etmektedir. Bununla birlikte, ağır metal stresine cevap olarak patojenle ilişkili (PR) proteinlerin sentezinde artış görülmektedir. Ayrıca, ağır metaller fotosentez ve fotosolunum gibi primer metabolizmada değişimlere neden olabilmektedir (Çizelge 2) (Ahsan et al. 2009).

3.1. Karbondioksit Özümlemesi ve Fotosentez ile İlişkili Proteinler

Ağır metal stresi altındaki bitkilerde farklı şekilde eksprese olan proteinlerin büyük çoğunluğunu fotosentez ile ilişkili proteinler oluşturmaktadır (Farinati et al. 2009; Ahsan et al. 2010; Zhao et al. 2011). RuBisCO (ribuloz 1,5-bifosfat

karboksilaz/oksijenaz) çözünebilir yaprak proteininin %30-70'ini oluşturmaktadır (Douillard and Mathan 1994) ve fotosentezde önemli rol oynamaktadır. RuBisCO, karbon metabolizmasının ilk basamağı olan CO₂ fiksasyonunu kataliz etmektedir. Bununla birlikte, RuBisCO-bağlayıcı altbirim, RuBisCO aktivaz ve fosforibulokinaz CO₂ fiksasyonu için gerekli bileşenlerdir. RuBisCO-

bağlayıcı altbirim, RuBisCO büyük altbiriminin katlanması için gerekli bir proteindir (Boston et al. 1996). RuBisCO aktivaz, RuBisCO'nun katalitik aktivitesini sağlamaktadır (Portis 2003). Fosforibulokinaz, Calvin döngüsünün CO₂ fiksasyonu için bir alıcı molekül olan ribuloz-1,5-bifosfatın oluşumunu kataliz etmektedir (Miziorko 2000).

Çizelge 2. Metal stresine cevap olarak proteomik analizlerle belirlenmiş proteinler ve fonksiyonları (Ahsan vd. 2009'den değiştirilerek)

Protein	Fonksiyon	Metal	Kaynak
APX, CS, CAT, DHAR, GSH1, GPX, GST, MDHAR, POD, Prx, SOD, Trx	Antioksidatif savunma	Al, As, Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb	Fecht-Christoffers et al. 2003; Bona et al. 2007; Ahsan et al. 2010; Bah et al. 2010; Cai et al. 2011; Wang et al. 2011; Sharmin et al. 2012; Hossain et al. 2012a, Song et al. 2013
Şaperonin 60, HSP70, Dnaj-benzeri protein, küçük HSP, Şaperonin 21, DnaK-tip moleküler şaperon, HSP101, PDI	Şaperonlar	Al, As, B, Cd, Cu, Hg, Ni	Ingle et al. 2005; Tuomainen et al. 2006; Patterson et al. 2007; Ahsan et al. 2008; Zhao et al. 2011; Wang et al. 2013a; Chen et al. 2012
SAMS, ACC oksidaz, OPR, CHS, lipoksigenaz, ABP19, jasmonat-teşvikli protein-benzeri, oksin-teşvikli protein	Sinyal molekülleri Sekonder metabolizma	Al, As, B, Cd, Cs, Cr, Cu, Hg	Labra et al. 2006; Aina et al. 2007; Fukuda et al. 2007; Patterson et al. 2007; Ahsan et al. 2008; Wu et al. 2013
RuBisCO büyük ve küçük altbirimler, RuBisCO aktivaz	CO ₂ özümlemesi Fotosentez	As, B, Cd, Co, Cu, Hg, Mn, Pb, Zn	Führs et al. 2008; Cailin et al. 2009; Li et al. 2009; Ahsan et al. 2010; Bah et al. 2010; Tuomainen et al. 2010; Zhao et al. 2011; Hossain et al. 2012b
PR-1 protein, PR protein P4, PR protein 5-1, PR10-benzeri proteinler, PR protein 5 öncüsü, sınıf I kitinaz, kitinaz 2, kitinaz III C10701, kitinaz 4, taumatin-benzeri protein 1, taumatin-benzeri protein TLP5, taumatin-benzeri protein PR-5a, β-1,3-glukanaz	Patojen savunma	Al, B, Cd, Cu, Mn, Hg, Pb	Patterson et al. 2007; Zhen et al. 2007; Führs et al. 2008; Farinati et al. 2009; Zhang et al. 2009; Walliwalagedara et al. 2010; Cai et al. 2011

Metal stresine cevap olarak RuBisCO proteininin miktarındaki azalma birçok bitki türünde rapor edilmiştir (Hajduch et al. 2001; Führs et al. 2008; Kieffer et al. 2009; Ahsan et al. 2010; Zhao et al. 2011). Bununla birlikte, RuBisCO alt birimlerindeki azalma Cd stresine maruz kalan hiperakümülatör *Thlaspi caerulescens* bitkilerinde de belirlenmiştir (Tuomainen et al. 2006). Ayrıca, As'e toleranslı bitki türlerinin yanı sıra toleranslı bitkilerde de RuBisCO alt birimlerinin As stresine cevap olarak azaldığı bildirilmiştir (van Keulen et al. 2008; Duquesnoy et al. 2009; Ahsan et al. 2010). Arsenik stresi altındaki bitkilerde fotosentezdeki azalmanın RuBisCO alt birimlerindeki azalma ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir (Ahsan et al. 2010). Bununla birlikte,

protein miktarındaki azalmanın yanında RuBisCO aktivitesinde de önemli bir azalmanın olduğu bildirilmiştir (Nováková et al. 2004). Karbon fiksasyonu proteinlerinin miktarındaki azalmayla birlikte, fotosentezin ışık evresi, fotosistem II kompleksi ve klorofil biyosentezi ile ilişkili proteinlerin miktarında da azalma olduğu rapor edilmiştir (Kieffer et al. 2008). Sonuç olarak, ağır metal stresine cevap olarak fotosentezdeki inhibisyon ve klorofil üretimindeki azalmanın RuBisCO ve diğer fotosentezle ilişkili proteinlerin miktarındaki azalmadan kaynaklanabileceği bildirilmiştir (Ahsan et al. 2009).

Fotosentez ile ilişkili proteinlerin (klorofil a/b bağlayıcı proteinin özel alt birimleri ve fotosistem II'nin membran ekstrinsik altbirimi miktarındaki artış Cd ve Zn stresine maruz bırakılan hiperakümülatör *A. halleri* (Farinati et al. 2009) ve As stresine maruz bırakılan *Pteris vittata* bitkilerinde (Bona et al. 2010) belirlenmiştir. Benzer sonuçlar, Zn/Cd hiperakümülatörü *Arabidopsis paniculata* ve Pb hiperakümülatörü *H. annuus* bitkilerinde de belirlenmiştir (Walliwagedara et al. 2010; Zeng et al. 2011). Ağır metal stresi altında artan enerji ihtiyacı, hiperakümülatör türlerde miktarı artan fosforibulokinaz, fruktoz bifosfat aldolaz ve RuBisCO'nun büyük altbirimi gibi enerji metabolizması ve Calvin döngüsü ile ilişkili enzimlerin aktivasyonunu gerektirmektedir (Bona et al. 2010; Zeng et al. 2011). Farinati vd. (2009), ağır metal stresi altındaki bitkilerde ışık toplayıcı komplekslerin alt birimlerinin (klorofil a/b bağlayıcı protein) aşırı ekspresyonunun tüm hücre metabolizmasının artan enerji ihtiyacını karşılamak için gerekli olduğunu belirtmiştir. Bununla birlikte, *T. caerulea* bitkilerinin hassas aksiyonlarına göre toleranslı aksiyonlarında bazı Calvin döngüsü enzimlerinin (RuBisCO büyük altbirimi, gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenaz ve sedoheptuloz-1,7-bifosfat) daha fazla eksprese olduğu bildirilmiştir (Tuomainen et al. 2006). Bah vd. (2010), Cr(VI) stresi altındaki bitkilerde ATP sentaz, RuBisCO küçük altbirimi ve koproporfirinojen III oksidazın ekspresyonunun artmasından dolayı bu proteinlerin Cr(VI) detoksifikasyonunda ve klorofil biyosentezi ve karbon metabolizmasının yüksek seviyelerde sürdürülmesinde önemli rol oynadığını rapor etmiştir.

3.2. Primer Karbon ve Enerji Metabolizması ile İlişkili Proteinler

Ağır metal stresi birçok katabolik yolu etkilemekte ve ATP üretimini azaltmaktadır. Ağır metal stresine maruz kalan bitkilerde artan enerji ihtiyacına cevap olarak enerji metabolizması (karbohidrat metabolizması, pentoz fosfat yolu ve trikarboksilik asit döngüsü) ile ilgili birçok enzimin miktarı değişim göstermektedir (Ahsan et al. 2010; Hossain

et al. 2012b; Sharmin et al. 2012; Visioli et al. 2012).

Gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH), fruktoz-1,6-bifosfatın gliseraldehid-3-fosfat ve sonunda 1,3-bifosfoglisera dönüşümünü sağlayan bir housekeeping enzimdir. Bununla birlikte, Giege vd. (2003), bu enzimin programlanmış hücre ölümü, DNA onarımı ve DNA replikasyonunda işleve sahip olduğunu bildirmiştir. Birçok proteomik çalışmada, ağır metal stresine cevap olarak GAPDH proteininin farklı şekilde eksprese olduğu belirtilmiştir (Kieffer et al. 2009; Ahsan et al. 2010; Sharmin et al. 2012). Arsenik stresi altındaki çeltik yapraklarında artan GAPDH miktarından dolayı As stresi sırasında karbohidrat metabolizmasının köklere göre yapraklarda daha aktif olduğu bildirilmiştir (Ahsan et al. 2010). Domates köklerinde glikolitik yolla ilişkili GAPDH, pirüvat dehidrogenaz ve enolaz enzimlerinin 10 µM Cd uygulamasında arttığı, buna karşın 100 µM Cd uygulamasının bu enzimlerin ekspresyonunu baskıladığı rapor edilmiştir (Rodríguez-Celma et al. 2010). Bununla birlikte, Cd'a toleranslı *Brassica juncea* bitkilerinde glikolitik enzimlerin 250 µM Cd uygulamasında azaldığı, *Arabidopsis thaliana* bitkilerinde ise 10 µM Cd uygulamasında arttığı bildirilmiştir (Sarry et al. 2006; Alvarez et al. 2009). Kadmiyum stresine maruz kalan bitkilerde karbohidrat metabolizması ile ilişkili proteinlerin ekspresyonundaki değişimlerin doz ve türe bağlı olduğu belirtilmiştir (Rodríguez-Celma et al. 2010). Bununla birlikte, enolaz ve GAPDH gibi glikolitik yol ile ilişkili proteinlerin Cr(VI) altındaki *Miscanthus sinensis* köklerinde azaldığı ve bu nedenle glikolize karbon akışının Cr(VI) stresi tarafından inhibe edildiği ileri sürülmüştür (Sharmin et al. 2012). Chen vd. (2012), enolaz ve fruktokinaz gibi enzimlerin Hg stresi altındaki çeltik köklerinde azaldığı ve karbohidrat metabolizmasının ciddi şekilde Hg stresinden etkilendiğini belirtmiştir. Song vd. (2012), Cu'a toleranslı çeltik köklerinde pirüvat dekarboksilaz miktarının azaldığı ve bu nedenle karbonun etanol fermantasyonundan ziyade trikarboksilik asit (TCA) döngüsüne katıldığını bildirmiştir.

Pirüvat dehidrogenaz kompleksinin (PDC) bileşenleri, akonitaz, NADP-bağımlı malik enzim (NADP-ME), süksinat dehidrogenaz ve malat dehidrogenaz (MDH) gibi TCA döngüsü ile ilişkili enzimlerin ekspresyonundaki değişimler ağır metal stresine maruz kalan bitkilerde belirlenmiştir (Ahsan et al. 2010; Rodríguez-Celma et al. 2010; Chen et al. 2012). Dihidrolipoamid dehidrogenaz, plastidlerde PDC, mitokondrilerde ise glisin dekarboksilaz kompleksinin (GDC) alt birimidir. Karbonun TCA döngüsüne girişini düzenleyen PDC ve fotosolunumun mitokondriyal basamağını kataliz eden GDC solunumda önemli rol oynamaktadır. Bu nedenle, PDC ile ilgili proteinlerin miktarındaki artış glikolitik ürünlerin TCA döngüsüne girişini arttırabilmektedir (Ahsan et al. 2010). Ağır metal stresine cevap olarak bu proteinin ekspresyonunda artış gözlenmiş olmasına karşın (Fukuda et al. 2007; Ahsan et al. 2010; Sharmin et al. 2012), ağır metal stresindeki kesin rolü henüz bilinmemektedir.

Bitkilerde farklı metabolik yollara katılan NADP-ME'ler solunum ve ATP üretimi için mitokondrilere pirüvat sağlamaktadır. Bununla birlikte, NADP-ME'in çevresel stresler ile ilişkili olarak savunma reaksiyonlarında fonksiyon gördüğü bildirilmiştir (Casati et al. 1999). Tuz, ozmotik ve kuraklık stresi altındaki çeltik bitkilerinde NADP-ME transkript ve NADP-ME aktivitesinin arttığı bulunmuştur (Liu et al. 2007; Ke et al. 2009). Ayrıca, Arabidopsis bitkilerinde aşırı NADP-ME ekspresyonunun tuz ve ozmotik stres toleransına katkıda bulunduğu belirtilmiştir (Cheng and Long 2007; Liu et al. 2007). Arsenik stresi altındaki bitkilerde artan NADP-ME aktivitesinin yüksek enerji üretimi ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (Ahsan et al. 2010).

Mitokondri membranlarında ADP'den ATP oluşumunu kataliz eden mitokondriyal ATP sentazın miktarının arttığı ve bu nedenle Cr(VI) stresi altında mitokondriyal solunumun artabileceği belirtilmiştir (Sharmin et al. 2012). Bununla birlikte, ATP üretimi için gerekli dihidrolipoamid dehidrogenaz (pirüvat dehidrogenazın E-3 bileşeni) enziminin miktarında artış belirlenmiştir. Bu enzimlerin miktarındaki artış Al ve As stresine maruz bırakılan çeltik bitkilerinde

de belirlenmiştir (Fukuda et al. 2007; Ahsan et al. 2010). Bununla birlikte, *Phytolacca americana* bitkilerinin tilakoid membranlardaki CF1 ATP sentazın β altbiriminin Cd stresine cevap olarak artış gösterdiği belirtilmiştir (Zhao et al. 2011). Diğer taraftan, düşük Cd uygulamasının (10 μ M) ATP sentazın beta alt biriminin miktarında artışa neden olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte, yüksek Cd uygulamasının (100 μ M) ATP sentaz ve sitokrom c redüktaz altbirimlerini azaltarak enerji üretimini baskıladığını bildirilmiştir (Rodríguez-Celma et al. 2010). Benzer sonuçlar Cd stresine maruz bırakılan *Solanum torvum* köklerinde de belirlenmiştir (Wu et al. 2013). Ağır metallerin etkilerinin metal tipi, bitki türü ve dokuya bağlı olarak değişebilmektedir (Ahsan et al. 2009).

3.3. Kükürt ve Glutatyon Metabolizması ile İlişkili Proteinler

Karbon metabolizmasına ek olarak kükürt metabolizması da ağır metal stresinden etkilenmektedir (Chen et al. 2012; Hossain et al. 2012; Song et al. 2013). Bitkilerde S-adenozil-L-metiyonin (SAM) birkaç transmetilasyon reaksiyonunda önemli bir metil vericisidir (Van Breusegem et al. 1994). L-metiyonin ve ATP'den SAM sentetaz ile SAM oluşmaktadır. Kobalamin-bağımsız metiyonin sentaz (MS) ise L-homosisteine bir metil grubunun transferini kataliz etmektedir (Pejchal and Ludwig 2005). Metal stresine maruz kalan birçok bitki türünde gerçekleştirilen proteomik çalışmalarda SAMS ve MS enzimlerinin miktarında artış belirlenmiştir (Farinati et al. 2009; Ge et al. 2009; Zhao et al. 2011). Ayrıca, Cd stresi altındaki hücrelere uygulanan SAM'in koruyucu etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Noriega et al. 2007). Bu enzimlerin metiyonin oluşumu ve metil döngüsündeki ara reaksiyonların kataliz edilmesindeki fonksiyonundan dolayı (Sarry et al. 2006), bu proteinlerin miktarındaki artışın metiyonin seviyesinde bir artışa neden olabileceği ve bu artışın Cd toksisitesinin üstesinden gelmede birçok biyosentetik yoldaki metilasyon reaksiyonları için gerekli metil gruplarının sağlanmasıyla sonuçlanabileceği bildirilmiştir (Zhao et al. 2011). Bununla birlikte, çeltik bitkilerinde Cu stresinin

SAM sentetaz miktarını arttırdığı, buna karşın MS ekspresyonunu azalttığı ve bu durumun metiyonin seviyesinde azalmaya neden olabileceği bildirilmiştir (Song et al. 2013).

İnorganik kükürt özümlemesinde anahtar bir enzim olan sistein sentaz (CS) sistein amino asidini sentezlemektedir. Protein yapısına katılmasının yanı sıra sistein enzimatik olmayan bir antioksidant olan glutatyonun (GSH) öncüsüdür. Bitkilerde γ -glutamilsistein sentetaz (γ -ECS) ve glutatyon sentetaz enzimleri tarafından GSH sentezlenmektedir. GSH ise sisteince zengin ve ağır metal bağlayıcı özelliğe sahip fitoşelatinlerin (PC'ler) öncüsüdür (Cobbett and Goldsbrough 2002). Çeltik köklerinde Cu stresinin kükürt özümlemesi ve GSH biyosentezi ile ilgili proteinlerin ekspresyonunda artışa neden olduğu bildirilmiştir (Song et al. 2013). Bununla birlikte, bu proteinlerde CS'nin bakıra hassas çeltik çeşidine göre toleranslı çeşitte daha fazla oranda eksprese olduğu belirtilmiştir. Diğer taraftan, kükürt özümlemesi ve GSH metabolizması ile ilgili enzimleri kodlayan bazı genlerin Pb tarafından teşvik edildiği rapor edilmiştir (Liu et al. 2009). Song vd. (2012), Cu stresi altındaki çeltik bitkilerinde GSH, PC ve MT'lerin sentezi için artan sistein gereksinimi karşılamak amacıyla kükürt özümlemesinin arttığını ileri sürmüştür. Ingle et al. (2005), hiperakümülatör *Alyssum lesbiacum* bitkilerinde kükürt metabolizması ile ilgili bazı proteinlerin Ni toleransında önemli bir rol oynayabileceğini bildirmiştir. Diğer taraftan, Hg stresine maruz kalan çeltik köklerinde CS ekspresyonunun ve GSH içeriğinin azaldığı ve GSH içeriğindeki azalmanın artan PC biyosentezinden veya CS ekspresyonundaki azalmadan kaynaklanabileceği belirtilmiştir (Chen et al. 2012).

3.4. Azot Metabolizması ile İlişkili Proteinler

Glutamin sentetaz (GS) amonyum özümlemesinde önemli bir enzimdir. Bu enzim, glutamini oluşturmak için amonyum iyonları ile glutamatın ATP bağımlı birleşmesini kataliz etmektedir. Ağır metal stresinin bazı bitki türlerinde GS proteininin

miktarında azalmaya neden olduğu belirtilmiştir (Lee et al. 2010; Zeng et al. 2011; Hossain et al. 2012a; Sharmin et al. 2012). Foto-oksidatif stres koşullarında, GS proteininin hidroksil radikalleri tarafından süratle parçalandığı rapor edilmiştir (Ishida et al. 2002). Sharmin vd. (2012), Cr(VI) stresi altındaki bitkilerde GS miktarındaki azalmanın artan oksidatif stres koşullarına bağlı olduğunu bildirmiştir. Bununla birlikte, Cr(VI) stresi altındaki bitkilerde azot metabolizması ile ilgili bir enzim olan nitrat redüktaz proteininin miktarında azalma belirlenmiştir (Sharmin et al. 2012). Diğer taraftan, Cd stresine maruz bırakılan *Arabidopsis thaliana* ve soya fasulyesi bitkilerinde GS proteininin ekspresyonunda artış belirlenmiştir (Semane et al. 2010; Hossain et al. 2012a). GS proteininin ekspresyonundaki artış daha fazla GSH oluşumuna neden olabilmektedir. GSH biyosentezindeki artış, oksidatif strese karşı hücrel savunma mekanizmasının artmasının yanı sıra metal bağlama kapasitesinin de artması anlamına gelmektedir (Verbruggen et al. 2009).

3.5. Antioksidant Savunma ve Detoksifikasyon ile İlişkili Proteinler

Bitkilerde ağır metal stresinin etkilerinden biri de oksidatif stresle ilişkili birkaç enzimin ekspresyonundaki değişimlerdir. Ağır metal stresi altındaki bitkilerde reaktif oksijen türlerinin temizlenmesinde fonksiyon gören askorbat-glutatyon döngüsü enzimlerinin yanı sıra birçok antioksidant enzimin arttığı proteomik çalışmalarla gösterilmiştir (Alvarez et al. 2009; Wang et al. 2010; Chen et al. 2012). Süperoksit dismutaz (SOD), süperoksit radikallerinin ($O_2^{\bullet-}$) hidrojen perokside (H_2O_2) dönüşümünü katalizleyen detoksifikasyon işleminin ilk enzimidir. Birçok proteomik çalışma metal toksisitesinin SOD proteininin miktarında artışa neden olduğunu göstermiştir (Labra et al. 2006; Alvarez et al. 2009; Wang et al. 2013a). Alvarez et al. (2009), *Brassica juncea* bitkilerinde Cd stresinin Fe-SOD proteininin miktarında artışa, Cu/Zn-SOD proteininin miktarında ise azalmaya neden olduğunu bildirmiştir. Araştırmacılar, bu durumun Cd stresinin Cu ve Zn alınımını

azaltmasından kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir. Bununla birlikte, Al'a hassas çeltik çeşidine göre toleranslı çeşitte SOD proteininin miktarının daha fazla artış gösterdiği belirtilmiştir (Wang et al. 2013a). Askorbat peroksidaz (APX), indirgenmiş askorbik asidin (AsA) varlığında H₂O₂'in suya indirgenmesinde işlev görmekte ve oluşan dehidroaskorbat indirgenmiş glutasyonu elektron vericisi olarak kullanıldığı reaksiyonla dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) tarafından AsA'ya dönüştürülmektedir. Bu askorbat döngüsü enzimlerinin yanında monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR) ve okside glutasyonun (GSSG) GSH'a indirgenmesini sağlayan glutasyon redüktaz (GR) proteininin de ağır metallerce teşvik edildiği birçok proteomik çalışmada gösterilmiştir (Lee et al. 2010; Song et al. 2013; Chen et al. 2012). Bu enzimlerden APX ve DHAR'ın yanı sıra bir diğer H₂O₂ temizleyici enzim olan peroksidazların (POD) bakıra toleranslı çeltik çeşidinde daha fazla eksprese olduğu belirtilmiştir (Song et al. 2013). Peroksiredoksinler kloroplast ve mitokondrilerde lokalize olmuş düşük etkinlikli peroksidazlardır (Dietz 2003). Peroksiredoksinler gelişim, antioksidant, içsel apoptoz düzenleyicisi (Ichimia et al. 1997), hücreler arası sinyal molekülü ve moleküler şaperon (Jang et al. 2004) gibi farklı hücre fonksiyonlarına sahiptir. Bu proteinin ekspresyonundaki artış metal stresi altındaki birçok bitki türünde tespit edilmiştir (Labra et al. 2006; Wang et al. 2011; Hossain et al. 2012a).

Birkaç proteomik çalışma sistein sentaz, γ -glutamilsistein sentaz, glioksalaz 1 ve glutasyon-S-transferaz (GST) gibi glutasyon biyosentezi veya döngüsü ile ilgili proteinlerin ağır metal stresinde farklı şekilde eksprese olduğunu göstermiştir (Çizelge 2). Bitkiler çoklu gen ailesi tarafından kodlanan ve ağır metal detoksifikasyonunu da içeren birkaç hücre fonksiyonunda işlev gören çok sayıda GST izozimlerine sahiptir (Dixon et al. 2002). GST'ler normal bitki gelişiminin sürdürülmesinin yanı sıra çevresel stres koşullarında bitkileri koruyan GSH bağımlı detoksifiye edici enzimlerdir (Marrs 1996). GST'ler hidrofobik, elektrofilik bileşiklerin GSH ile birleşmesini kataliz ederek bu

maddelerin detoksifiye edilmesini sağlamaktadır (Jwa et al. 2006). Hem mRNA hem de protein seviyesinde artan GST ekspresyonu metal stresine maruz bırakılan bitki türlerinde belirlenmiştir (Herbette et al. 2006; Alvarez et al. 2009; Zhao et al. 2011). Bununla birlikte, Al stresi altındaki çeltik bitkilerinde iki GST proteininin sadece toleranslı çeşitte belirlendiği ve GST'lerin Al toleransında önemli bir rol oynayabileceği belirtilmiştir (Wang et al. 2013a). Diğer taraftan, Ahsan vd. (2007) Cu stresine maruz bırakılan çimlenen çeltik tohumlarında GST proteininin azaldığını bildirmiştir. Çeltikte OsGST1 ve OsGST2'nin karakterizasyonu, bu proteinlerin savunma ve stres cevap yollarında rol oynadığını ileri sürmüştür (Jwa et al. 2006). Sonuç olarak, SOD, CAT, POD ve APX metal teşvikli oksidatif strese karşı ilk savunma hattını oluşturmaktadır. Diğer taraftan, MDHAR, DHAR, GR ve GST'ler gibi glutasyon biyosentezi ve döngüsü ile ilgili enzimler ikinci savunma hattı olarak değerlendirilen detoksifikasyonla ilişkili basamaklarda fonksiyon görebilmektedir (Ahsan et al. 2009).

Vakuolar alıkonmanın ağır metal detoksifikasyonunda önemli bir mekanizma olduğu bilinmektedir (Hall 2002). Vakuolar-H⁺-ATPaz (V-ATPaz) vakuol membranında elektrokimyasal pH derecelenmesinin oluşturulması için ATP hidrolizinden sağlanan enerjiyi kullanmakta (Sun-Wada et al. 2003) ve bu derecelenme toksik iyonların vakuolde birikimi için itici gücü sağlamaktadır (Hamilton et al. 2001). V-ATPaz'ların serbest veya tiyol bileşiklerine bağlı Cd iyonlarının vakuole taşınmasını sağlayan pH derecelenmesini oluşturduğu belirtilmiştir (Mendoza-Cózatı and Moreno-Sánchez 2005). Bu nedenle, V-ATPazın Cd detoksifikasyonunda fonksiyon görebildiği belirtilmiştir (Wang et al. 2011). Birkaç proteomik çalışmada Cd ve Cr stresinin V-ATPaz proteininin sentezinde artışa neden olduğu bildirilmiştir (Ge et al. 2009; Wang et al. 2011; Sharmin et al. 2012).

Metallotiyoneinler (MT'ler) düşük moleküler ağırlıklı, sisteince zengin ve metal şelasyonu için tiyol gruplarına sahip bir grup metal bağlayıcı

proteindir (Cobbett and Golsbrough 2002). ABC (ATP-binding cassette) taşıyıcılar metal iyonlarının vakuollerde veya hücre çeperinin dışında alıkonulmasında fonksiyon görmektedir (Sanchez-Fernandez et al. 2001; Martinoia et al. 2002). Her iki proteinin sentezindeki artış ağır metal stresine maruz bırakılmış bitki türlerinde belirlenmiştir (Alvarez et al. 2009; Visioli et al. 2012). Bununla birlikte, ağır metal konsantrasyonu ve MT içerikleri arasında korelasyon kurulamamasına karşın, bu proteinin içeriği *Thlaspi caerulescens*, *Arabidopsis halleri*, *Silene paradoxa* ve *Silene vulgaris* gibi hiperakümülatör türlerde belirlenmiştir (van Hoof et al. 2001; Mengoni et al. 2003; Chiang et al. 2006; van de Mortel et al. 2006; Visioli et al. 2012).

3.6. Protein Metabolizması ile İlişkili Proteinler

Ağır metal stresi altındaki bitkilerde transkripsiyon ve translasyon ile ilgili birçok proteinin sentezinde farklılıklar tespit edilmiştir (Lee et al. 2010; Zhao et al. 2011; Wang et al. 2013a). Uzama faktörleri (EF) translasyonel uzamayı sağlayan bir protein setidir. Kloroplast translasyonel EF-Tu ve EF-P proteinlerinin miktarının Cd stresi altındaki *Arabidopsis thaliana* ve çeltik bitkilerinde arttığı belirtilmiştir (Ge et al. 2009; Lee et al. 2010; Semane et al. 2010; Cai et al. 2011). Kloroplastik EF-Tu'nun bitkilerde sıcaklık toleransına katkıda bulunduğu ve sıcaklığa hassas kloroplast proteinlerini termal çökelmeden ve inaktivasyondan koruyan bir moleküler şaperon olarak işlev gördüğü bildirilmiştir (Ristic et al. 2007). Wang vd. (2012), EF-2 proteininin Al'a hassas çeltik çeşidinde arttığı ve EF-2'nin bir erken cevap geni olduğu ve Al stresine adaptasyonda bir negatif düzenleyici olarak fonksiyon görebileceğini belirtmiştir. Bununla birlikte, Cd hiperakümülatörü *Phytolacca americana* bitkilerinde EF-2'nin Cd stresine cevap olarak azaldığı bildirilmiştir (Zhao et al. 2011).

Sıcaklık şoku proteinleri (HSP) normal koşullar altında hücrelerde bulunmasına karşın, ağır metaller gibi birçok stres koşulunda sentezleri artış gösterebilmektedir. Protein-protein etkileşimleri, katlanma, parçalanma, hücre içi lokalizasyon,

salgilama ve zarar görmüş proteinlerin yeniden aktivasyonu gibi birçok olayda HSP'ler önemli rol oynamaktadır (Parsell and Lindquist 1993). Sharmin vd. (2012), Cr(VI) stresine maruz kalan bitkilerde HSP70 ailesine ait üç proteinin ekspresyonunun arttığını belirtmiştir. Bununla birlikte, Cd stresi altındaki soya fasulyesinde HSP70 proteininin ekspresyonunda azalma belirlenmiştir (Hossain et al. 2012b). HSP70 hücrelerin her bölümünde olmasına karşın, şaperonin 60 mitokondri ve plastidlerde daha fazla bulunmaktadır (Nelson et al. 1992). Şaperonin 60 proteininin çeltik yapraklarında Cd stresine cevap olarak azaldığı bildirilmiştir (Lee et al. 2010). Şaperonin 60, yeni sentezlenen proteinlerin katlanması, multimerik yapının kurulması ve bozulmasında ve birçok stres koşulunda koruyucu proteinlerin denatürasyonunda fonksiyon görmektedir (Nelson et al. 1992). *Arabidopsis*'te şaperonin 60 geninin delesyonunun, sistemik kazanılmış direnç gibi savunma cevaplarının oluşumuna neden olan hücre ölümünü tetiklediği gösterilmiştir (Ishikawa et al. 2003). Bu nedenle, şaperonin 60 proteininin ekspresyonundaki azalmanın genel bir stres cevabı olarak bitki savunma sistemi ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (Lee et al. 2010). Bununla birlikte, HSP90 protein ailesi protein katlanmasının yanı sıra sinyal iletim ağında ve stres adaptasyonunda önemli rol oynamaktadır (Wang et al. 2004). Çeltik bitkilerinde HSP90 proteininin ağır metal stresi, yüksek sıcaklık ve tuzluluk gibi çeşitli abiyotik stresler tarafından teşvik edildiği bildirilmiştir (Liu et al. 2006; Song et al. 2013).

Sıcaklık şoku proteinlerine ek olarak protein disülfid izomeraz (PDI) proteininin miktarındaki ağır metal teşvikli değişimler birçok proteomik çalışmada gösterilmiştir (Ahsan et al. 2008; Zeng et al. 2011; Chen et al. 2012). Bir endoplazmik retikulum proteini olan PDI, yanlış oluşmuş disülfid bağlarını düzelterek yeni sentezlenen proteinlerin olgunlaşmasında önemli rol oynamaktadır (Song and Wang 1995). Bu durum, ağır metal stresi altındaki bitkilerde moleküler şaperonların teşvikinin proteinlerde meydana gelebilecek zararı önleyebildiğini göstermektedir (Ahsan et al. 2009).

3.7. Sinyal İletim Mekanizması ve Sekonder Metabolizma ile İlişkili Proteinler

Bitkilerde Ca^{+2} ve kalmodulin mesaj sisteminin bitki-çevre etkileşimlerinde fonksiyon gördüğü bilinmektedir (Arazi et al. 2000). Kalmodulin bağımlı protein kinazlar (CPK) Ca^{+2} -kalmodulin kompleksleri tarafından düzenlenmektedir. Bu protein ailesinin bazı üyeleri metal taşıyıcıları olarak fonksiyon görebilmektedir. Tütün bitkilerinde kalmodulin bağlayıcı plazma membran proteininin (NtCBP4) halkasal-nükleotid kapılı seçici olmayan katyon kanallarının yapısına benzer olduğu tespit edilmiştir. Transgenik bitkilerde aşırı NtCBP4 ekspresyonunun Pb alımını ve hassasiyetini arttırdığı buna karşın Ni alımını azaltarak Ni toleransında artışa neden olduğu bildirilmiştir (Arazi et al. 2000). Bununla birlikte, Cr(VI) stresinin CPK miktarında artışa neden olduğu bildirilmiştir (Sharmin et al. 2012).

Birçok proteomik çalışmada, antioksidant ve savunma ile ilişkili proteinlerin yanı sıra jasmonik asit (JA), etilen ve salisilik asit (SA) gibi sinyal yolları ile ilgili proteinlerin farklı şekilde eksprese olduğu gösterilmiştir (Çizelge 2). Bitki hormonları ağır metal toleransının düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Bununla birlikte, ağır metal toleransının hormonal düzenleme mekanizması ile ilgili bilgiler sınırlıdır. Kadmiyumun Cd stres cevaplarının düzenlenmesinde, poliaminler ve etilen hormonlarının fonksiyon gördüğü bildirilmiştir (Groppa et al. 2001; Yakimova et al. 2008). Birçok proteomik çalışmada, etilen ve poliamin biyosentezinde rol alan S-adenozil-L-metiyonin (SAM) sentetaz proteininin miktarında önemli artış belirlenmiştir (Aloui et al. 2009; Sharmin et al. 2012; Wu et al. 2013). Bitkilerde SAM, 1-aminosiklopropan-1-karboksilik asit (ACC) ve ACC'de etilen biyosentezi için substrattır. SAM sentetaz ve ACC'den etilen biyosentezinde rol alan ACC oksidaz enzimlerinin ağır metallerce teşvik edilmesiyle etilen üretiminin arttığı ve dolayısıyla bu artışın ağır metal teşvikli hücre ölümü ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (Yakimova et al. 2006). Bununla birlikte, Cr(VI) stresinin SAM sentetaz

miktarını azaltarak SAM ve ACC biyosentezini azalttığı ve bu nedenle azalan etilen sentezinin Cr(VI) teşvikli senesensi geciktirdiği bildirilmiştir (Sharmin et al. 2012).

Jasmonik asit bitkilerde birçok gelişimsel süreçte fonksiyon görmekle birlikte birçok savunma ile ilişkili genin ekspresyonunu tetikleyen bir sinyal molekülüdür (Turner et al. 2002). Bitkilerde 12-okso-fitodienoik asit redüktaz (OPR) jasmonik asidin öncülü olan 12-okso-fitodienoik asit (OPDA)'in siklopenton halkasının sentezini kataliz etmektedir. Ağır metal stresine maruz kalan bitkilerde OPR ekspresyonunun teşviki hem mRNA hem de protein seviyesinde gösterilmiştir (Agrawal et al. 2003; Ahsan et al. 2008). Bununla birlikte, ağır metal stresi altındaki bitkilerde JA seviyesinin artması (Rodriguez-Serrano et al. 2006), JA biyosentezi veya sinyal yolunun ağır metal toleransında önemli olduğunu göstermektedir.

Bitkilerde karboksivinil-karboksifosfonat fosforilmutaz sekonder metabolit biyosentezinde sıra dışı C-P bağının oluşumunu kataliz etmektedir. Bu enzimin rolü mikroorganizmalarda iyi bilinmesine karşın (Hidaka et al. 1990), yüksek bitkilerdeki rolü hakkında nispeten daha az bilgi mevcuttur. Bununla birlikte, bu enzimin miktarının As stresine maruz bırakılan çeltik yapraklarında azaldığı rapor edilmiştir (Ahsan et al. 2010). Çeltik bitkilerinde *Osr40c1* proteininin absisik asit (ABA) cevap proteini olduğu aşırı ozmotik koşullara adaptasyonda rol oynadığı gösterilmiştir (Moons et al. 1997). Bununla birlikte, *Osr40c1* ekspresyon seviyesinin ABA'ya cevap olarak artmasına karşın, JA ve SA tarafından negatif olarak düzenlendiği bildirilmiştir. Ayrıca *Osr40c1* proteininin As stresi altındaki çeltik bitkilerinde azaldığı bildirilmiştir (Ahsan et al. 2008; 2010).

3.8. Patojenle İlişkili Proteinler

Bitkilerde çoklu stres cevap proteinleri olarak kabul edilen patojenle ilişkili (PR) proteinler yapısal ve fonksiyonel olarak β -1,3-glukanaz (PR-2), kitinaz (PR-3, PR-4, PR-8 ve PR-11), endoproteinaz (PR-7),

peroksidaz (PR-9) ve ribonükleaz (PR-10) gibi 17 farklı aileye sınıflandırılmaktadır (Edreva 2005; van Loon et al. 2006). Glukanazlar bitkilerde bol miktarlarda bulunan hidrolitik enzimlerdir. Hwang vd. (2007), çeltik bitkilerinde 27 glukanaz geninin ekspresyon seviyesini farklı gelişim evrelerinin yanı sıra biyotik ve abiyotik faktörlere cevap olarak karakterize etmiştir. Bununla birlikte, glukanaz ekspresyonunun ağır metaller tarafında da düzenlendiği proteomik yaklaşımla gösterilmiştir (Führs et al. 2008; Kieffer et al. 2008; Ahsan et al. 2010; Lee et al. 2010). Glukanazların ağır metal cevaplarındaki rolleri tam olarak açık olmamasına karşın, genel stres cevabı olarak düzenlendiği ileri sürülmüştür (Ahsan et al. 2009). Ayrıca, mRNA seviyesinde glukanaz ekspresyonunun çeltik yapraklarında JA ve etilen gibi bitki hormonları tarafından artırıldığı bildirilmiştir (Akiyama et al. 2009). Bitkilerde metal toksisitesine cevap olarak JA ve etilen seviyesinin artmasının (Rodriguez-Serrano et al. 2006) artan glukanaz aktivitesi ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (Ahsan et al. 2010).

Kitinaz, fungal hücre çeperinin önemli bir bileşeni olan kitini parçalayan proteindir. Bununla birlikte, patojen saldırısı ve ağır metal stresine karşı bitki savunma sisteminin bir bileşenidir (Graham and Sticklen 1994). Birkaç proteomik çalışmada kitinaz izoformlarının ağır metal stresine maruz kalan bitkilerde arttığı rapor edilmiştir (Cai et al. 2011; Sharmin et al. 2012). Ayrıca, kitinaz proteininin Cd'a hassas çeltik çeşidine göre toleranslı çeşitte daha fazla oranda arttığı bildirilmiştir (Cai et al. 2011). Abiyotik streslere maruz bırakılan bitkilerde kitinaz aktivitesindeki artışın sinyal iletim yolları ile çapraz toleransın teşvikinden kaynaklanabileceği belirtilmiştir (Sharmin et al. 2012). Fungal kitinaz genini eksprese eden transgenik tütün bitkilerinin hem fungal enfeksiyona hem de metal ve tuz stresine daha toleranslı olduğu gösterilmiştir (Dana et al. 2006). Metal toleransı ve kitinaz izoformları arasındaki ilişki açıklanmaya çalışılsa da, metal spesifik kitinazlar ile yapılacak çalışmalar ağır metal detoksifikasyonu ile ilgili mekanizmaların aydınlatılmasına katkıda bulunacaktır.

Ağır metal stresi altındaki bitkilerde glukanaz ve kitinazların yanı sıra PR-4, PR-5, PR-10 ailelerine ait proteinler, PR-5 benzeri protein, taumatin benzeri protein, P69G gibi patojenle ilişkili proteinlerin farklı şekilde eksprese olduğu gösterilmiştir (Führs et al. 2008; Zhang et al. 2009; Rodriguez-Celma et al. 2010). Çeltik bitkilerinde, ağır metal stresi teşvikli reaktif oksijen birikiminin PR proteinlerinin ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Jwa et al. 2006). Sonuç olarak, birçok PR proteininin ağır metaller gibi stres faktörleri tarafından teşvik edilmesi bu proteinlerin sinyal yollarındaki muhtemel fonksiyonunu göstermektedir. Bununla birlikte, bitkilerin ağır metallere olan cevabında PR proteinlerinin kesin rolünü açıklamak için kapsamlı çalışmalara gerek duyulmaktadır.

4. Sonuç

Bitkilerin çevreyle nasıl ilişki kurdukları ve adapte olduklarını daha iyi anlayabilmek için, stres cevaplarının kapsamlı ve karşılaştırmalı kantitatif "omik" çalışmalarına, düzenleyici mekanizmaların karakterizasyonuna ve fonksiyonel analizlerine gereksinim vardır. Genomik, transkriptomik, proteomik ve metabolomik gibi yüksek verimlilikli teknolojiler ile ağır metal cevaplarına ilişkin veriler gün geçtikçe artmaktadır. Bu bilgiler, ağır metal stresinin tarımsal üretim ve insan sağlığı üzerindeki etkilerini değerlendirmede etkili olacaktır.

Kaynaklar

- Agrawal, G.K., Jwa, N.S., Shibato, J., Han, O., Iwahashi, H. and Rakwal, R., 2003. Diverse environmental cues transiently regulate OsOPR1 of the "octadecanoid pathway" revealing its importance in rice defense/stress and development. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **310**, 1073-1082.
- Ahsan, N., Lee, D.G., Lee, S.H., Kang, K. Y., Lee, J.J., Kim, P.J., Yoon, H.S., Kim, J.S. and Lee, B.Y., 2007. Excess copper induced physiological and proteomic changes in germinating rice seeds. *Chemosphere*, **67**, 1182-1193.
- Ahsan, N., Lee, D.G., Alam, I., Kim, P.J., Lee, J.J., Ahn, Y.O., Kwak, S.S., Lee, I.J., Bahk, J.D., Kang, K.Y., Renaut, J., Komatsu, S. and Lee, B.H., 2008.

- Comparative proteomic study of arsenic-induced differentially expressed proteins in rice roots reveals glutathione plays a central role during As stress. *Proteomics*, **8**, 3561-3576.
- Ahsan, N., Renaut, J. and Komatsu, S., 2009. Recent developments in the application of proteomics to the analysis of plant responses to heavy metals. *Proteomics*, **9**, 2602-2621.
- Ahsan, N. and Komatsu, S., 2009. Comparative analyses of the proteomes of leaves and flowers at various stages of development reveal organ-specific functional differentiation of proteins in soybean. *Proteomics*, **9**, 4889-4907.
- Ahsan, N., Lee, D.G., Kim, K.H., Alam, I., Lee, S.H., Lee, K.W., Lee, H. and Lee, B.H., 2010. Analysis of arsenic stress-induced differentially expressed proteins in rice leaves by two-dimensional gel electrophoresis coupled with mass spectrometry. *Chemosphere*, **78**, 224-231.
- Aina, R., Labra, M., Fumagalli, P., Vannini, C., Marsoni, M., Cucchi, U., Bracale, M., Sgorbati, S. and Citterio, S., 2007. Thiol-peptide level and proteomic changes in response to cadmium toxicity in *Oryza sativa* L. roots. *Environmental and Experimental Botany*, **59**, 381-392.
- Akiyama, T., Jin, S., Yoshida, M., Hoshino, T., Opassiri, R. and Ketudat Cairns, J.R., 2009. Expression of an endo-(1,3;1,4)-beta-glucanase in response to wounding, methyl jasmonate, abscisic acid and ethephon in rice seedlings. *Journal of Plant Physiology*, **166**, 1814-1825.
- Aloui, A., Recorbet, G., Gollotte, A., Robert, F., Valot, B., Gianinazzi-Pearson, V., Aschi-Smiti, S. And Dumas-Gaudot, E., 2009. On the mechanisms of cadmium stress alleviation in *Medicago truncatula* by arbuscular mycorrhizal symbiosis: a root proteomic study. *Proteomics*, **9**, 420-433.
- Alvarez, S., Berla, B. M., Sheffield, J., Cahoon, R. E., Jez, J. M. and Hicks, L. M., 2009. Comprehensive analysis of the *Brassica juncea* root proteome in response to cadmium exposure by complementary proteomic approaches. *Proteomics*, **9**, 2419-2431.
- Arazi, T., Kaplan, B., Sunkar, R. and Fromm, H., 2000. Cyclic-nucleotide-and Ca^{2+} /calmodulin-regulated channels in plants: targets for manipulating heavy-metal tolerance, and possible physiological roles. *Biochemical Society Transactions*, **28**, 471-475.
- Bah, A.M., Sun, H., Chen, F., Zhou, J., Dai, H., Zhang, G. and Wu, F., 2010. Comparative proteomic analysis of *Typha angustifolia* leaf under chromium, cadmium and lead stress. *Journal of Hazardous Materials*, **184**, 191-203.
- Baker, A.J.M. and Brooks, R.R., 1989. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements – a review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery*, **1**, 81-126.
- Bantscheff, M., Lemeer, S., Savitski, M.M. and Kuster, B., 2012. Quantitative mass spectrometry in proteomics: critical review update from 2007 to the present. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **404**, 939-365.
- Beranová-Giorgianni, S., 2003. Proteome analysis by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry: strengths and limitations. *Trends in Analytical Chemistry*, **22**, 273-281.
- Bogeat-Triboulot, M.B., Brosché, M., Renaut, J., Jouve, L., Le Thiec, D., Fayyaz, P. Vinocur, B., Witters, E., Laukens, K., Teichmann, T., Altman, A., Hausman, J.F., Polle, A., Kangasjärvi, J. and Dreyer, E., 2007. Gradual soil water depletion results in reversible changes of gene expression, protein profiles, ecophysiology, and growth performance in *Populus euphratica*, a poplar growing in arid regions. *Plant Physiology*, **143**, 876-892.
- Bona, E., Marsano, F., Cavaletto, M. and Berta, G., 2007. Proteomic characterization of copper stress response in *Cannabis sativa* roots. *Proteomics*, **7**, 1121-1130.
- Bona, E., Cattaneo, C., Cesaro, P., Marsano, F., Lingua, G., Cavaletto, M. and Berta, G., 2010. Proteomic analysis of *Pteris vittata* fronds: two arbuscular mycorrhizal fungi differentially modulate protein expression under arsenic contamination. *Proteomics*, **10**, 3811-3834.
- Boston, R., Viitanen, P. and Vierling, E., 1996. Molecular chaperones and protein folding in plants. *Plant Molecular Biology*, **32**, 191-222.
- Cai, Y., Cao, F., Wei, K., Zhang, G. and Wu, F., 2011. Genotypic dependent effect of exogenous glutathione on Cd-induced changes in proteins, ultrastructure and antioxidant defense enzymes in rice seedlings. *Journal of Hazardous Materials*, **192**, 1056-1066.
- Cánovas, F.M., Dumas-Gaudot, E., Recorbet, G., Jorin, J., Mock, H.P. and Rossignol, M., 2004. Plant proteome analysis. *Proteomics*, **4**, 285-298.
- Carpentier, S.C., Witters, E., Laukens, K., Deckers, P., Swennen, R. and Panis, B., 2005. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: an evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. *Proteomics*, **5**, 2497-2507.
- Casati, P., Drincovich, M.F., Edwards, G.E. and Andreo, C.S., 1999. Malate metabolism by NADP-malic

- enzyme in plant defense. *Photosynthesis Research*, **61**, 99-105.
- Chakrabarty, D., Trivedi, P.K., Misra, P., Tiwari, M., Shri, M., Shukla, D., Kumar, S., Rai, A., Pandey, A., Nigam, D., Tripathi, R.D. and Tuli, R., 2009. Comparative transcriptome analysis of arsenate and arsenite stresses in rice seedlings. *Chemosphere*, **74**, 688-702.
- Chen, Y.A., Chi, W.C., Huang, T.L., Lin, C.Y., Quynh Nguyeh, T.T., Hsiung, Y.C., Chia, L.C. and Huang, H.J., 2012. Mercury-induced biochemical and proteomic changes in rice roots. *Plant Physiology and Biochemistry*, **55**, 23-32.
- Cheng, Y. and Long, M., 2007. A cytosolic NADP-malic enzyme gene from rice (*Oryza sativa* L.) confers salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Biotechnology Letters*, **29**, 1129-1134.
- Chiang, H.C., Lo, J.C. and Yeh, K.C., 2006. Genes associated with heavy metal tolerance and accumulation in Zn/Cd hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*: a genomic survey with cDNA microarray. *Environmental Science and Technology*, **40**, 6792-6798.
- Cobbett, C.S. and Goldsbrough, P., 2002. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology*, **53**, 159-182.
- Danchenko, M., Skultety, L., Rashydov, N.M., Berezhna, V.V., Matel, L., Salaj, T., Pretova, S. and Hajduch, M., 2009. Proteomic analysis of mature soybean seeds from the Chernobyl area suggests plant adaptation to the contaminated environment *Journal of Proteome Research*, **8**, 2915-2922.
- D'Amici, G.M., Timperio, A.M. and Zolla, L., 2008. Coupling of native liquid phase isoelectro focusing and blue native polyacrylamide gel electrophoresis: a potent tool for native membrane multiprotein complex separation. *Journal of Proteome Research*, **7**, 1326-1340.
- de las Mercedes Dana, M., Pintor-Toro, J.A. and Cubero, B., 2006. Transgenic tobacco plants overexpressing chitinases of fungal origin show enhanced resistance to biotic and abiotic stress agents. *Plant Physiology*, **142**, 722-730.
- Dietz, K.J., 2003. Plant peroxiredoxins. *Annual Review of Plant Biology*, **54**, 93-107.
- Dixon, D.P., Davis, B.G. and Edwards, R., 2002. Functional divergence in the glutathione transferase superfamily in plants. Identification of two classes with putative functions in redox homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 30859-30869.
- Douillard, R. and de Mathan, O., 1994. Leaf proteins for food use: potential of RUBISCO. In: Hudson, B.J. (Ed.), *New and Developing Sources of Food Proteins*, Chapman & Hall, London.
- Duquesnoy, I., Goupil, P., Nadaud, I., Branlard, G., Piquet-Pissaloux, A. and Ledoigt, G., 2009. Identification of *Agrostis tenuis* leaf proteins in response to As(V) and As(III) induced stress using a proteomics approach. *Plant Science*, **176**, 206-213.
- Eapen, S. and D'Souza, S.F., 2005. Prospects of genetic engineering of plants for phytoremediation of toxic metals. *Biotechnology Advances*, **23**, 97-114.
- Edreva, A., 2005. Pathogenesis-related proteins. Research progress in the last 15 years. *General and Applied Plant Physiology*, **31**, 105-124.
- Evlard, A., Sergeant, K., Ferrandis, S., Printz, B., Renaut, J., Guignard, C., Paul, R., Hausman, J.F. and Campanella, B., 2013. Physiological and proteomic responses of different willow clones (*Salix fragilis x alba*), exposed to dredged sediment contaminated by heavy metals. *International Journal of Phytoremediation*, DOI: 10.1080/15226514.2013.821448.
- Farinati, S., DalCorso, G., Bona, E., Corbella, M., Lampis, S., Cecconi, D., Polati, R., Berta, G., Vallini, G., and Furini, A., 2009. Proteomic analysis of *Arabidopsis halleri* shoots in response to the heavy metals cadmium and zinc and rhizosphere microorganisms. *Proteomics*, **9**, 4837-4850.
- Fecht-Christoffers, M.M., Braun, H., Lemaitre-Guillier, C., Vandorselaer, A. and Horst, W.J., 2003. Effect of manganese toxicity on the proteome of the leaf apoplast in cowpea. *Plant Physiology*, **133**, 1935-1946.
- Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F. and Whitehouse, C.M., 1989. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, **246**, 64-71.
- Fukao, Y., Ferjani, A., Tomioka, R., Nagasaki, N., Kurata, R., Nishimori, Y., Fujiwara, M. and Maeshima, M., 2011. iTRAQ analysis reveals mechanisms of growth defects due to excess zinc in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **155**, 1893-1907.
- Fukuda, T., Saito, A., Wasaki, J., Shinano, T. and Osaki, M., 2007. Metabolic alterations proposed by proteome in rice roots grown under low P and high Al concentration under low pH. *Plant Science*, **172**, 1157-1165.
- Fühns, H., Hartwig, M., Molina, L.E.B., Heintz, D., Van Dorselaer, A., Braun, H.P. and Horst, W.J., 2008. Early manganese-toxicity response in *Vigna*

- unguiculata* L. - a proteomic and transcriptomic study. *Proteomics*, **8**, 149-159.
- Ge, C., Ding, Y., Wang, Z., Wan, D., Wang, Y., Shang, Q. and Luo, S., 2009. Responses of wheat seedlings to cadmium, mercury and trichlorobenzene stresses. *Journal of Environmental Sciences*, **21**, 806-813.
- Gao, J., Sun, L., Yang, X. and Liu, J.X., 2013. Transcriptomic analysis of cadmium stress response in the heavy metal hyperaccumulator *Sedum alfredii* Hance. *PLoS ONE*, **8(6)**, e64643.
- Gianazza, E., Wait, R., Sozzi, A., Regondi, S., Saco, D., Labra, M. and Agradi, E., 2007. Growth and protein profile changes in *Lepidium sativum* L. plantlets exposed to cadmium. *Environmental and Experimental Botany*, **59**, 179-187.
- Giegé, P., Heazlewood, J.L., Roessner-Tuanli, U., Millar, A.H., Fernie, A.R., Leaver, C.J. and Sweetlove, L.J., 2003. Enzymes of glycolysis are functionally associated with the mitochondrion in *Arabidopsis* cells. *Plant Cell*, **15**, 2140-2151.
- Graham, L.S. and Sticklen, M.B., 1994. Plant chitinases. *Canadian Journal of Botany*, **72**, 1057-1083.
- Groppa, M.D., Tomaro, M.L. and Benavides, M.P., 2001. Polyamines as protectors against cadmium or copper-induced oxidative damage in sunflower leaf discs. *Plant Science*, **161**, 481-488.
- Hajduch, M., Rakwal, R., Agrawal, G.K., Yonekura, M. and Pretova, A., 2001. High-resolution two-dimensional electrophoresis separation of proteins from metal-stressed rice (*Oryza sativa* L.) leaves: drastic reductions/fragmentation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and induction of stress-related proteins. *Electrophoresis*, **22**, 2824-2831.
- Hall, J.L., 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, **53**, 1-11.
- Hamilton, C.A., Good, A.G. and Taylor, G.J., 2001. Induction of vacuolar ATPase and mitochondrial ATP synthase by aluminium in aluminium-resistant cultivar of wheat. *Plant Physiology*, **125**, 2068-2077.
- Herbette, S., Tacconat, L., Hugouvieux, V., Piette, L., Magniette, M.L.M., Cuine, S., Auroy, P., Richaud, P., Forestier, C., Bourguignon, J., Renou, J.P., Vavasseur, A. and Leonhardt, N., 2006. Genome-wide transcriptome profiling of the early cadmium response of *Arabidopsis* roots and shoots. *Biochimie*, **88**, 1751-1765.
- Hidaka, T., Imai, S., Hara, O., Anzai, H., Murakami, T., Nagaoka, K. and Seto, H., 1990. Carboxy phosphoenol pyruvate phosphonmutase, a novel enzyme catalyzing C-P bond formation. *Journal of Bacteriology*, **172**, 3066-3072.
- Hossain, Z., Hajika, M. and Komatsu, S., 2012a. Comparative proteome analysis of high and low cadmium accumulating soybeans under cadmium stress. *Amino Acids*, **43**, 2393-2416.
- Hossain, Z., Makino, T. and Komatsu, S., 2012b. Proteomic study of β -aminobutyric acid-mediated cadmium stress alleviation in soybean. *Journal of Proteomics*, **75**, 4151-4164.
- Hossain, Z. and Komatsu, S., 2013. Contribution of proteomic studies towards understanding plant heavy metal stress response. *Frontiers in Plant Science*, **3**, 1-12.
- Hwang, D.H., Kim, S.T., Kim, S.G. and Kang, K.Y., 2007. Comprehensive analysis of the expression of twenty-seven b-1,3-glucanase genes in rice (*Oryza sativa* L.). *Molecules and Cells*, **23**, 207-214.
- Iakimova, E.T., Woltering, E.J., Kapchina-Toteva, V.M., Harren, F.J.M. and Cristescu, S.M., 2008. Cadmium toxicity in cultured tomato cells - role of ethylene, proteases and oxidative stress in cell death signaling. *Cell Biology International*, **32**, 1521-1529.
- Ichimia, S., Davis, J.G., O'Rourke, D.M., Katsumata, M. and Greene, M.I., 1997. Murine thioredoxin peroxidase delays neuronal apoptosis and is expressed in areas of the brain most susceptible to hypoxic and ischemic injury. *DNA and Cell Biology*, **16**, 311-321.
- Ingle, R., Smith, J. and Sweetlove, L., 2005. Responses to nickel in the proteome of the hyperaccumulator plant *Alyssum lesbiacum*. *Biometals*, **18**, 627-641.
- Ishida, H., Anzawa, D., Kokubun, N., Makino, A. and Mae, T., 2002. Direct evidence for nonenzymatic fragmentation of chloroplastic glutamine synthetase by reactive oxygen species. *Plant Cell and Environment*, **25**, 625-631.
- Ishikawa, A., Tanaka, H., Nakai, M. and Asahi, T., 2003. Deletion of a chaperonin 60 beta gene leads to cell death in the *Arabidopsis* lesion initiation 1 mutant. *Plant and Cell Physiology*, **44**, 255-261.
- Jang, H.H., Lee, K.O., Chi, Y.H., Jung, B.G., Park, S.K., Park, J.H., Lee, J.R., Lee, S.S., Moon, J.C., Yun, J.W., Choi, Y.O., Kim, W.Y., Kang, J.S., Cheong, G.W., Yun, D.J., Rhee, S.G., Cho, M.J. and Lee, S.Y., 2004. Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. *Cell*, **117**, 625-635.
- Joosen, R., Cordewener, J., Supena, E. D., Vorst, O., Lammers, M., Maliepaard, C., Zeilmaker, T., Miki, B.,

- America, T., Custers, J. and Boutilier, K., 2007. Combined transcriptome and proteome analysis identifies pathways and markers associated with the establishment of rapeseed microspore-derived embryo development. *Plant Physiology*, **144**, 155-172.
- Jwa, N.S., Agrawal, G.K., Tamogami, S., Yonekura, M., Han, O., Iwahashi, H. and Rakwal, R., 2006. Role of defense/stress-related marker genes, proteins and secondary metabolites in defining rice self-defense mechanisms. *Plant Physiology and Biochemistry*, **44**, 261-273.
- Ke, Y., Han, G., He, H. and Li, J., 2009. Differential regulation of proteins and phosphoproteins in rice under drought stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **379**, 3-8.
- Kellermann, J., 2008. ICPL--isotope-coded protein label. *Methods in Molecular Biology*, **424**, 113-123.
- Kennedy, S. 2002. The role of proteomics in toxicology: Identification of biomarkers of toxicity by protein expression analysis. *Biomarkers*, **7**, 269-290.
- Kieffer, P., Domes, J., Hoffmann, L., Hausman, J.F. and Renaut, J., 2008. Quantitative changes in protein expression of cadmium-exposed poplar plants. *Proteomics*, **8**, 2514-2530.
- Kieffer, P., Planchon, S., Oufir, M., Ziebel, J., Domes, J., Hoffmann, L., Hausman, J.F. and Renaut, J., 2009. Combining proteomics and metabolite analyses to unravel cadmium stress-response in poplar leaves. *Journal of Proteome Research*, **8**, 400-417.
- Kosová, K., Vítámvás, P., Prášil, I.T. and Renaut, J., 2011. Plant proteome changes under abiotic stress-contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. *Journal of Proteomics*, **74**, 1301-1322.
- Labra, M., Regondi, S., Grassi, F. and Agradi, E., 2006. *Zea mays* L. protein changes in response to potassium dichromate treatments. *Chemosphere*, **62**, 1234-1244.
- Lee, K., Bae, D. W., Kim, S. H., Han, H. J., Liu, X., Park, H. C., Lim, C. O., Lee, S.Y. and Chung, W.S., 2010. Comparative proteomic analysis of the short-term responses of rice roots and leaves to cadmium. *Journal of Plant Physiology*, **167**, 161-168.
- Le Lay, P., Isaure, M.P., Sarry, J.E., Kuhn, L., Fayard, B., Le Bail, J.L., Bastien, O., Garin, J., Roby, C. and Bourguignon, J. 2006. Metabolomic, proteomic and biophysical analyses of *Arabidopsis thaliana* cells exposed to a caesium stress. Influence of potassium supply. *Biochimie*, **88**, 1533-1547.
- Li, Q., Wang, B.C., Xu, Y. and Zhu, Y.X., 2007. Systematic studies of 12S seed storage protein accumulation and degradation patterns during *Arabidopsis* seed maturation and early seedling germination stages. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, **40**, 373-381.
- Li, F., Shi, J., Shen, C., Chen, G., Hu, S. and Chen, Y., 2009. Proteomic characterization of copper stress response in *Elsholtzia splendens* roots and leaves. *Plant Molecular Biology*, **71**, 251-263.
- Lin, C.Y., Trinh, N.N., Fu, S.F., Hsiung, Y.C., Chia, Y.C., Lin, C.W. and Huang, H.J., 2013. Comparison of early transcriptome responses to copper and cadmium in rice roots. *Plant Molecular Biology*, **81**, 507-522.
- Liu, D., Zhang, X., Cheng, Y., Takano, T. and Liu, S., 2006. *rHsp90* gene expression in response to several environmental stresses in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, **44**, 380-386.
- Liu, S., Cheng, Y., Zhang, X., Guan, Q., Nishiuchi, S., Hase, K. and Takano, T., 2007. Expression of an NADP-malic enzyme gene in rice (*Oryza sativa* L.) is induced by environmental stresses; over-expression of the gene in *Arabidopsis* confers salt and osmotic stress tolerance. *Plant Molecular Biology*, **64**, 49-58.
- Liu, T., Liu, S., Guan, H., Ma, L., Chen, Z., Gu, H. and Qu, L.J., 2009. Transcriptional profiling of *Arabidopsis* seedlings in response to heavy metal lead (Pb). *Environmental and Experimental Botany*, **67**, 377-386.
- Ma, J.F., Yamaji, N., Mitani, N., Xu, X.Y., Su, Y.H., McGrath, S.P. and Zhao, F.J., 2008. Transporters of arsenite in rice and their role in arsenic accumulation in rice grain. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, **105**, 9931-9935.
- Mann, M., 2006. Functional and quantitative proteomics using SILAC. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **7**, 952-958.
- Marrs, K.A., 1996. The function and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **47**, 127-158.
- Martinoia, E., Klein, M., Geisler, M., Bovet, L., Forestier, C., Kolukisaoglu, U., Müller-Röber, B. and Schulz, B., 2002. Multifunctionality of plant ABC transporters—more than just detoxifiers. *Planta*, **214**, 345-355.
- Mendoza-Cózatl, D.G. and Moreno-Sánchez, R., 2005. Cd²⁺ transport and storage in the chloroplast of *Euglena gracilis*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1706**, 88-97.
- Mengoni, A., Gonnelli, C., Hakvoort, H.W.J., Galardi, F., Bazzicalupo, M., Gabbriellini, R. and Schat, H., 2003. Evolution of copper-tolerance and increased

- expression of a 2b-type metallothionein gene in *Silene paradoxa* L. populations. *Plant and Soil*, **257**, 451-457.
- Miziorko, H.M., 2000. Phosphoribulokinase: current perspectives on the structure/function basis for regulation and catalysis. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, **74**, 95-127.
- Moons, A., Gielen, J., Vandekerckhove, J., Van Der Straeten, D., Gheysen, G. and Van Montagu, M., 1997. An abscisic-acid- and salt-stress-responsive rice cDNA from a novel plant gene family. *Planta*, **202**, 443-454.
- Nelson, R.J., Ziegelhoffer, T., Nicolet, C., Wernerwashburne, M. and Craig, E.A., 1992. The translation machinery and 70 kd heat shock protein cooperate in protein synthesis. *Cell*, **71**, 97-105.
- Noriega, G.O., Balestrasse, K.B., Batlle, A. and Tomaro, M.L., 2007. Cadmium induced oxidative stress in soybean plants also by the accumulation of delta-aminolevulinic acid. *Biometals*, **20**, 841-851.
- Nováková, M., Matějova, E. and Sofrová, D., 2004. Cd²⁺ effect on photosynthetic apparatus in *Synechococcus elongatus* and spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Photosynthetica*, **42**, 425-430.
- Parsell, D.A., and Lindquist, S., 1993. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: Degradation and reactivation of damaged proteins. *Annual Reviews of Genetics*, **27**, 437-496.
- Patterson, J., Ford, K., Cassin, A., Natera, S., and Bacic, A., 2007. Increased abundance of proteins involved in phytosiderophore production in boron-tolerant Barley. *Plant Physiology*, **144**, 1612-1631.
- Pejchal, R. and Ludwig, M.L., 2005. Cobalamin-independent methionine synthase (MetE): a face-to-face double barrel that evolved by gene duplication. *PLoS Biology*, **3**, e31.
- Pilon-Smits, E., 2005. Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology*, **56**, 5-39.
- Portis, A.R., 2003. Rubisco activase - Rubisco's catalytic chaperone. *Photosynthesis Research*, **75**, 11-27.
- Printz, B., Sergeant, K., Guignard, C., Renaut, J. and Hausman, J.F., 2013. Physiological and proteome study of sunflowers exposed to a polymetallic constraint. *Proteomics*, **13**, 1193-2015.
- Requejo, R. and Tena, M., 2005. Proteome analysis of maize roots reveals that oxidative stress is a main contributing factor to plant arsenic toxicity. *Phytochemistry*, **66**, 1519-1528.
- Requejo, R. and Tena, M., 2006. Maize response to acute arsenic toxicity as revealed by proteome analysis of plant shoots. *Proteomics*, **6**, 156-162.
- Ristic, Z., Momcilović, I., Fu, J., Callegari, E. and DeRidder, B.P., 2007. Chloroplast protein synthesis elongation factor, EF-Tu, reduces thermal aggregation of rubisco activase. *Journal of Plant Physiology*, **164**, 1564-1571.
- Rodríguez-Celma, J., Rellán-Alvarez, R., Abadía, A., Abadía, J. and López-Millán, A.F., 2010. Changes induced by two levels of cadmium toxicity in the 2-DE protein profile of tomato roots. *Journal of Proteomics*, **73**, 1694-1706.
- Rodríguez-Serrano, M., Romero-Puertas, M.C., Zabalza, A., Corpas, F.J., Gómez, M., Del Río, L.A. and Sandalio, L.M., 2006. Cadmium effect on oxidative metabolism of pea (*Pisum sativum* L.) roots. Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide accumulation in vivo. *Plant Cell and Environment*, **29**, 1532-1544.
- Rose, J.C., Bashir, S., Giovannoni, J.J., Jahn, M.M. and Saravanan, R.S., 2004. Tackling the plant proteome: practical approaches, hurdles and experimental tools. *Plant Journal*, **39**, 715-733.
- Roth, U., Roepenack-Lahaye, E. and Clemens, S., 2006. Proteome changes in *Arabidopsis thaliana* roots upon exposure to Cd²⁺. *Journal of Experimental Botany*, **57**, 4003-4013.
- Sanchez-Fernandez, R., Davies, T.G., Coleman, J.O. and Rea, P.A., 2001. The *Arabidopsis thaliana* ABC protein superfamily, a complete inventory. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 30231-30244.
- Santoni, V., Kieffer, S., Desclaux, D., Masson, F. and Rabilloud, T., 2000. Membrane proteomics: use of additive main effects with multiplicative interaction model to classify plasma membrane proteins according to their solubility and electrophoretic properties. *Electrophoresis*, **21**, 3329-3344.
- Saravanan, R.S. and Rose, J. K., 2004. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. *Proteomics*, **4**, 2522-2532.
- Sarry, J.E., Kuhn, L., Ducruix, C., Lafaye, A., Junot, C., Hugouvieux, V., Jourdain, A., Bastien, O., Fievet, J.B., Vailhen, D., Amekraz, B., Moulin, C., Ezan, E., Garin, J. and Bourguignonet, J., 2006. The early responses of *Arabidopsis thaliana* cells to cadmium exposure explored by protein and metabolite profiling analyses. *Proteomics*, **6**, 2180-2198.
- Satarug, S., Baker, J.R., Urbenjapol, S., Haswell-Elkins, M., Reilly, E.B., Williams, D.J. and Moore, M.R., 2003. A global perspective on cadmium pollution and toxicity in nonoccupationally exposed population. *Toxicology Letters*, **137**, 65-83.
- Schägger, H. and von Jagow, G., 1991. Blue native

- electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Analytical Biochemistry*, **199**, 223-231.
- Schneider, T., Schellenberg, M., Meyer, S., Keller, F., Gehrig, P., Riedel, K., Lee, Y., Eberl, L. and Martinoia, E., 2009. Quantitative detection of changes in the leaf-mesophyll tonoplast proteome in dependency of a cadmium exposure of barley (*Hordeum vulgare* L.) plants. *Proteomics*, **9**, 2668-2677.
- Semane, B., Dupae, J., Cuyper, A., Noben, J.-P., Tuomainen, M., Tervahauta, A., Kärenlampi, S., Frank, V.B., Karen, S. and Jaco, V., 2010. Leaf proteome responses of *Arabidopsis thaliana* exposed to mild cadmium stress. *Journal of Plant Physiology*, **167**, 247-254.
- Sharmin, S. A., Alam, I., Kim, K.H., Kim, Y.G., Kim, P.J., Bahk, J.D. and Lee, B.H., 2012. Chromium-induced physiological and proteomic alterations in roots of *Miscanthus sinensis*. *Plant Science*, **187**, 113-126.
- Sobkowiak, R. and Deckert, J., 2006. Proteins induced by cadmium in soybean cells. *Journal of Plant Physiology*, **163**, 1203-1206.
- Song, J.I. and Wang, C.C., 1995. Chaperone-like activity of protein disulfide-isomerase in the refolding of rhodanese. *European Journal of Biochemistry*, **231**, 312-316.
- Song, Y., Cui, J., Zhang, H., Wang, G., Zhao, F.J. and Shen, Z., 2013. Proteomic analysis of copper stress responses in the roots of two rice (*Oryza sativa* L.) varieties differing in Cu tolerance. *Plant and Soil*, **366**, 647-658.
- Sun-Wada, G.H., Wada, Y. and Futai, M., 2003. Vacuolar H⁺ pumping ATPases in luminal acidic organelles and extracellular compartments: common rotational mechanism and diverse physiological roles. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, **35**, 347-358.
- Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y. and Yoshida, T., 1988. Protein and polymer analyses of up to m/z 100,000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **2**, 151-153.
- Timperio, A. M., Egidi, M. G. and Zolla, L., 2008. Proteomics applied on plant abiotic stresses: role of heat shock proteins (HSP). *Journal of Proteomics*, **71**, 391-411.
- Tonge, R., Shaw, J., Middleton, B., Rowlinson, R., Rayner, S., Young, J., Pognan, F., Hawkins, E., Currie, I. and Davison, M., 2001. Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology. *Proteomics*, **1**, 377-396.
- Tuomainen, M.H., Nunan, N., Lehesranta, S.J., Tervahauta, A.I., Hassinen, V.H., Schat, H., Koistinen, K.M., Auriola, S., McNicol, J. and Kärenlampi, S.O., 2006. Multivariate analysis of protein profiles of metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* accessions. *Proteomics*, **6**, 3696-3706.
- Tuomainen, M., Tervahauta, A., Hassinen, V., Schat, H., Koistinen, K.M., Lehesranta, S., Rantalainen, K., Häyrynen, J., Auriola, S., Anttonen, M. and Kärenlampi, S.O., 2010. Proteomics of *Thlaspi caerulescens* accessions and an inter-accession cross segregating for zinc accumulation. *Journal of Experimental Botany*, **61**, 1075-1087.
- Turner, J.G., Ellis, C. and Devoto, A., 2002. The jasmonate signal pathway. *Plant Cell*, **14**, 153-164.
- Urano, K., Kurihara, Y., Seki, M. and Shinozaki, K., 2010. 'Omics' analyses of regulatory networks in plant abiotic stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, **13**, 132-138.
- van de Mortel, J.E., Schat, H., Moerland, P.D., Van Themaat, E.V.L., Van der Ent, S., Blankestijn, H., Ghandilyan, A., Tsiatsiani, S. and Aarts, M.G.M., 2008. Expression differences for genes involved in lignin, glutathione and sulphate metabolism in response to cadmium in *Arabidopsis thaliana* and the related Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Cell and Environment*, **31**, 301-324.
- van Breusegem, F., Dekeyser, R., Gielen, J., Van Montagu, M. and Caplan, A., 1994. Characterization of a S-adenosylmethionine synthetase gene in rice. *Plant Physiology*, **105**, 1463-1464.
- van Hoof, N.A., Hassinen, V.H., Hakvoort, H.W., Ballintijn, K.F., Schat, H., Verkleij, J.A., Ernst, W.H., Kärenlampi, S.O. and Tervahauta, A.I., 2001. Enhanced copper tolerance in *Silene vulgaris* (Moench) Garcke populations from copper mines is associated with increased transcript levels of a 2b-type metallothionein gene. *Plant Physiology*, **126**, 1519-1526.
- van Keulen, H., Wei, R. and Cutright, T.J., 2008. Arsenate-induced expression of a class III chitinase in the dwarf sunflower *Helianthus annuus*. *Environmental and Experimental Botany*, **63**, 281-288.
- van Loon, L.C., Rep, M. and Pietersen, C.M.J., 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology*, **44**, 135-162.
- Verbruggen, N., Hermans, C. and Schat, H., 2009. Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. *New Phytologist*, **181**, 759-776.

- Villiers, F., Ducruix, C., Hugouvieux, V., Jarno, N., Ezan, E., Garin, J., Junot, C. and Bourguignon, J., 2011. Investigating the plant response to cadmium exposure by proteomic and metabolomic approaches. *Proteomics*, **11**, 1650-1563.
- Visioli, G., Marmiroli, M. And Marmiroli, N., 2010. Two-dimensional liquid chromatography technique coupled with mass spectrometry analysis to compare the proteomic response to cadmium stress in plants *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, **129**, 565-574.
- Visioli, G., Vincenzi, S., Marmiroli, M. and Marmiroli, N., 2012. Correlation between phenotype and proteome in the Ni hyperaccumulator *Noccaea caerulescens* subsp. *caerulescens*. *Environmental and Experimental Botany*, **77**, 156-164.
- Walliwagedara, C., Atkinson, I., Van Keulen, H., Cutright, T. and Wei, R., 2010. Differential expression of proteins induced by lead in the Dwarf Sunflower *Helianthus annuus*. *Phytochemistry*, **71**, 1460-1465.
- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O. and Altman, A., 2004. Role of plant heat shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science*, **9**, 244-252.
- Wang, W., Vignani, R., Scali, M. and Cresti, M., 2006. A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. *Electrophoresis*, **27**, 2782-2786.
- Wang, Y., Hu, H., Xu, Y., Li, X. X. and Zhang, H.J., 2010. Differential proteomic analysis of cadmium-responsive proteins in wheat leaves. *Biologia Plantarum*, (X), 1-5.
- Wang, Y., Qian, Y., Hu, H., Xu, Y. and Zhang, H., 2011. Comparative proteomic analysis of Cd-responsive proteins in wheat roots. *Acta Physiologiae Plantarum*, **33**, 349-357.
- Wang, C.Y., Shen, R.F., Wang, C. and Wang, W., 2013a. Root protein profile changes induced by Al exposure in two rice cultivars differing in Al tolerance. *Journal of Proteomics*, **78**, 281-293.
- Wang, Y., Kroon, J.K.M., Slabas, A.R., and Chivasa, S., 2013b. Proteomics reveals new insights into the role of light in cadmium response in *Arabidopsis* cell suspension cultures. *Proteomics*, **13**, 1145-1158.
- Wu, L., Ge, Q., Zhang, J., Zhou, J. and Xu, J., 2013. Proteomic analysis of Cd-responsive proteins in *Solanum torvum*. *Plant Molecular Biology Reporter*, **31**, 485-491.
- Yakimova, E.T., Kapchina-Toteva, V.M., Laarhoven, L.J., Harren, F.M. and Woltering, E.J., 2006. Involvement of ethylene and lipid signalling in cadmium-induced programmed cell death in tomato suspension cells. *Plant Physiology and Biochemistry*, **44**, 581-589.
- Yang, Q.S., Wang, Y.Q., Zhang, J.J., Shi, W.P., Qian, C.M. and Peng, X.X., 2007. Identification of aluminum-responsive proteins in rice roots by a proteomic approach: cysteine synthase as a key player in Al response. *Proteomics*, **7**, 737-749.
- Yates, J.R.I., 1998. Mass spectrometry and the age of the proteome. *Journal of Mass Spectrometry*, **33**, 1-19.
- Yu, L.J., Luo, Y.F., Liao, B., Xie, L.J., Chen, L. C. S., Li, J.T., Hu, S.N. and Shu, W.S., 2012. Comparative transcriptome analysis of transporters, phytohormone and lipid metabolism pathways in response to arsenic stress in rice (*Oryza sativa*). *New Phytologist*, **195**, 97-112.
- Zeng, X.W., Qiu, R.L., Ying, R.R., Tang, Y.T., Tang, L. and Fang, X.H., 2011. The differentially-expressed proteome in Zn/Cd hyperaccumulator *Arabis paniculata* Franch. in response to Zn and Cd. *Chemosphere*, **82**, 321-328.
- Zhang, H., Lian, C. and Shen, Z., 2009. Proteomic identification of small, copper-responsive proteins in germinating embryos of *Oryza sativa*. *Annals of Botany*, **103**, 923-930.
- Zhao, L., Sun, Y.L., Cui, S.X., Chen, M., Yang, H.M., Liu, H.M., Chai, T.Y. and Huang, F., 2011. Cd-induced changes in leaf proteome of the hyperaccumulator plant *Phytolacca americana*. *Chemosphere*, **85**, 56-66.
- Zhen, Y., Qi, J.L., Wang, S.S., Su, J., Xu, G.H., Zhang, M.S., Miao, L., Peng, X.X., Tian, D. and Yang, Y.H., 2007. Comparative proteome analysis of differentially expressed proteins induced by Al toxicity in soybean. *Physiologia Plantarum*, **131**, 542-554.
- Zieske, L.R., 2006. A perspective on the use of iTRAQ reagent technology for protein complex and profiling studies. *Journal of Experimental Botany*, **57**, 1501-1508.