



Fasulye Genotiplerinde Tuz ve Kuraklık Stresleri Altında VPE Gen Ailesinin Genom Çapında Analizi ve Karakterizasyonu

Ahmed Sidar Aygören^{1*}, Selman Muslu¹, Murat Isıyel¹, Burak Muhammed Öner¹, Ayşe Gül Kasapoğlu¹, Recep Aydın², Esra Yaprak¹, Sümeyra Uçar¹, Emre İlhan¹, Murat Aydın²

^{1**}Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Erzurum, Türkiye, (ORCID: 0000-0002-6264-9935), ahmed.aygoren17@erzurum.edu.tr

¹ Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Erzurum, Türkiye, (ORCID: 0000-0003-4777-0726), selman.muslu25@erzurum.edu.tr

¹ Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Erzurum, Türkiye, (ORCID: 0000-0003-4157-2729), murat.isiyel13@erzurum.edu.tr

¹ Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Erzurum, Türkiye, (ORCID: 0000-0003-2785-2089), burakmuhammed.oner3@erzurum.edu.tr

¹ Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Erzurum, Türkiye, (ORCID: 0000-0002-6447-4921), aysegul.kasapoglu@erzurum.edu.tr

¹ Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Erzurum, Türkiye, (ORCID: 0000-0003-3743-1835), recep.aydinyurt62@erzurum.edu.tr

¹ Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Erzurum, Türkiye, (ORCID: 0000-0002-8753-494X), esra.yaprak2@erzurum.edu.tr

¹ Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Erzurum, Türkiye, (ORCID: 0000-0002-7629-0206), sumeyra.ucar61@erzurum.edu.tr

¹ Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Erzurum, Türkiye, (ORCID: 0000-0002-8404-7900), emre.ilhan@erzurum.edu.tr

² Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Erzurum, Türkiye, (ORCID: 0000-0003-1091-0609), maydin@atauni.edu.tr

(2nd International Conference on Applied Engineering and Natural Sciences ICAENS 2022, March 10-13, 2022)

(DOI: 10.31590/ejosat.1083440)

ATIF/REFERENCE: Aygören, A. S., Muslu, S., Isıyel, M., Öner, B. M., Kasapoğlu, A. G., Aydın, R., Yaprak, E., Uçar, S., İlhan, E., & Aydın, M., (2022). Fasulye Genotiplerinde Tuz ve Kuraklık Stresleri Altında VPE Gen Ailesinin Genom Çapında Analizi ve Karakterizasyonu. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (34), 553-560.

Öz

Vakuolar işleme enzimleri (Vacoular Processing Enzymes; VPE'ler) önemli sistein proteazlarıdır ve protein öncüllerinin işlenmesi ve olgunlaşmasında, bitki gelişiminde, yaşlanmasında ve bağışıklığında, programlanmış hücre ölümünün yanı sıra şeker birikiminde işlev görür. Ayrıca biyotik ve abiyotik streslere karşı yanıt vermede önemli roller oynarlar. Çalışmanın amacı *Phaseolus vulgaris* bitkisinde in siliko olarak gerçekleştirilen VPE gen ailesi üyelerinin genom çaplı analizini ve karakterizasyonu sağlamak ve belirlenen gen ailesi üyelerinin abiyotik stresler (tuz ve kuraklık) altında vermiş olduğu yanıtın değerlendirilmesidir. Çeşitli in siliko yöntemler kullanılarak *P. vulgaris* genomunda 5 adet *Pvul-VPE* gen ailesi üyesi tespit edildi. Bu gen ailesi üyeleri 13,97 kDa ile 55,11 kDa arasında değişen moleküler ağırlığa sahipken, 123 ile 493 arasında değişen aminoasit sayısına sahip olduğu tespit edildi. İzoelektirik noktaları 5,48 (*Pvul-VPE-4*) ile 9,16 (*Pvul-VPE-3*) arasındadır. Ayrıca *Pvul-VPE* genleri fasulye genomunun 1, 3, 9 ve 11. kromozomları üzerinde konumlandığı tespit edilmiştir. *Pvul-VPE* gen ailesi üyeleri arasında yapılan ekzon ve intron analizleri sonucunda, toplam 40 ekzon ve 35 intron içerdikleri tespit edildi. Yapılan filogenetik analizler sonucunda *Pvul-VPE* proteinleri *Arabidopsis thaliana* ve *Glycine max* türleri ile 4 ana grupta kümelenemiştir. *Pvul-VPE-1* ve *Pvul-VPE-3* genleri arasında segmental duplikasyon olduğu tespit edildi. *Pvul-VPE* genlerinin ifade profilleri ile yapılan analizlerde farklı ifade seviyelerine sahip oldukları tespit edildi ve bitkinin büyümesinde, gelişiminde ve olgunlaşmasında, protein öncüllerinin işlenmesinde ve bitkide şeker birikimi gibi görevlerin yanı sıra abiyotik ve biyotik streslere karşı yanıt oluşturmada önemli görevler üstlendiği tespit edildi. Yapılan çalışmanın sonuçları, *VPE* gen ailesinin *P. vulgaris* türünde kuraklık ve tuz streslerine karşı yanıtta ilk defa gerçekleştirilmiş olup, bitki ve tarımsal biyoteknoloji ve moleküler biyoloji alanlarında literatür bakımından kaynak ve ilave bilgiler sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: VPE, Genom Çaplı Analiz, Fasulye, Biyoinformatik, Abiyotik Stres

* Sorumlu Yazar: ahmed.aygoren17@erzurum.edu.tr

Genome-Wide Analysis and Characterization of the VPE Gene Family under Salt and Drought Stress in Common Bean Genotypes

Abstract

Vacuolar processing enzymes (VPEs) are cysteine proteases which are involved in the processing and maturation of protein precursors, as well as plant growth, senescence, and immunity, programmed cell death, and sugar accumulation. They also play a key role in biotic and abiotic stress responses. The goal of this study is to perform genome-wide analysis and characterization of VPE gene family members in *Phaseolus vulgaris* in silico, as well as to assess the reactions of the determined gene family members to abiotic stimuli (salt and drought). 5 members of the *Pvul-VPE* gene family was discovered in the *P. vulgaris* genome using a variety of in silico approaches. Members of this gene family have molecular weights ranging from 13.97 kDa to 55.11 kDa, and amino acid lengths ranging from 123 to 493 have been discovered. Its isoelectric points range from 5.48 (*Pvul-VPE-4*) to 9.16 (*Pvul-VPE-3*). Additionally, the *Pvul-VPE* genes were discovered on chromosomes 1, 3, 9, and 11 of the common bean genome. Exon and intron analysis of members of the *Pvul-VPE* gene family revealed that they have a total of 40 exons and 35 introns. *Pvul-VPE* proteins have been found to be clustered in four main groups with *Arabidopsis thaliana* and *Glycine max* species as a result of the phylogenetic analysis. Between the *Pvul-VPE-1* and *Pvul-VPE-3* genes, segmental duplication was discovered. The results of this study, which was performed for the first time in the response to drought and salt stresses in the VPE gene family's *P. vulgaris* species, will be a valuable source of information in the disciplines of plant breeding, agricultural biotechnology and molecular biology.

Keywords: VPE, Genome Wide Analysis, Common Bean, Bioinformatics, Abiotic Stress

1. Giriş

Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) dünya çapında tüketimi en fazla yapılan baklagil bitkisidir. Fasulye, özellikle gelişmekte olan ülkelerde insan beslenmesi için önemli protein (~%22), vitaminler (folat) ve mineraller (Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Zn) sağladığı bilinmektedir (Broughton et al., 2003). Fasulyenin kullanılması ile obezite, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet ve kanser gibi çok çeşitli kronik ve dejeneratif hastalıkların önlenmesi ve kontrolünde faydalı fizyolojik etkiler sağladığı tespit edilmiştir (Díaz-Batalla et al., 2006; Jenkins, 2007; Chung et al., 2008). Bu sağlık yararları, önemli lif ve nişasta içeriğine, glisemi ve gastrointestinal fonksiyonu düzenleme yeteneği ve ayrıca fenolik bileşikler ve proteinlerin varlığı ile sağlanan antioksidan özelliklerine bağlanabilir (De Ron et al., 2015).

Bitkiler, büyüme ve gelişmeleri bakımından biyotik ve abiyotik stres olaylarına karşı en az zarar görecektir şekilde reaksiyonları fizyolojik ve metabolik olarak vermektedirler (Kalefetoğlu & Ekmekçi, 2005). Biyotik ve abiyotik stres koşullarında olan bu değişimler, yıllardan beri çalışılmasına rağmen, henüz tam anlamıyla çalışma mekanizmaları anlaşılabilmiştir. Bitkilerin kuraklık ve tuzluluk gibi abiyotik streslere karşı toleransını arttırmak için yapılan çalışmalara yeni yaklaşımlar geliştirilmelidir (Selda & Ekinci, 2015).

Ökaryotların gelişimsel süreçlerinde ve stres direncinde önemli rol oynayan programlanmış hücre ölümü (PHÖ), genetik olarak düzenlenen fizyolojik bir süreçtir (Hatsugai et al., 2015). Hayvanlarda, PHÖ'nün gerçekleştirilmesi, sistein bağımlı aspartil proteaz aktivitesine sahip kaspaz enzimlerini gerektirir (Fagundes et al., 2015) ve kaspaz enzimleri, substratları spesifik aspartik asit kalıntıları ile hidrolize edebilir (; Lamkanfi et al., 2002; De Pinto et al., 2012). Hayvanlarda bulunan benzer yapıdaki kaspaz-1 aktivitesine sahip bir sistein proteazı olan bitki vakuolar işleme enziminin (VPE), başlangıçta tohumlarda depolama proteini olgunlaşmasında yer aldığı gösterilmiş ve bu özel fonksiyondan sonra adlandırılmıştır (Hara-Nishimura et al., 1998). Bitkilerdeki β -VPE (embriyo tipi), γ/α -VPE (bitkisel organ tipi) ve δ -VPE (tohum kabuğu tipi) olan üç tip VPE, sınıflandırılmıştır (Hara-Nishimura et al., 1998; Kinoshita et al., 1999; Nakaune et al., 2005). Biyotik ve abiyotik streslere karşı üretilen yanıtlar üzerine

bitkiler, VPE'ler aracılığıyla bir dizi adaptif mekanizma üretebildiği keşfedilmiştir (Nakaune et al., 2005). VPE gen ailesinin bitki büyümesi ve gelişmesi, protein öncüllerinin işlenmesi, programlanmış hücre ölümü ve abiyotik streslere karşı vermiş olduğu cevapta kritik roller oynamasına rağmen şimdiye kadar fasulye bitkisinde VPE'nin tuz ve kuraklık stresleri altındaki rolü işlevsel ve fonksiyonel olarak karakterizasyonu ve tanımlası yapılmamıştır. Bu çalışmada, fasulyenin tuz ve kuraklık gibi abiyotik stresler altında VPE gen ailesinin kapsamlı bir araştırmasını yaptık.

2. Materyal ve Metot

2.1. Fasulye Genomunda VPE Proteinlerinin Tanımlanması, Dizi Hizalaması ve Filogenetik Analiz

Fasulye genomundaki VPE gen ailesinin PF01650 (<http://pfam.xfam.org/family/PF01650>) erişim kodu ile Phytozome v13 veritabanı (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>) kullanarak protein dizilerine ulaşıldı. Tüm muhtemel VPE proteinlerini belirlemek için *Phaseolus vulgaris* (Schmutz et al., 2014), *Arabidopsis thaliana* (Lamesch et al., 2012) ve *Glycine max* (Valliyodan et al., 2019) hem Phytozome veritabanı v13'teki blastp hem de gizli Markov model (HMM) (<http://www.ebi.ac.uk>) araması varsayılan parametrelerle taranmıştır. InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/interpro>) veritabanı kullanılarak ve KEGG Motif Search (<https://www.genome.jp/tools/motif>) araması yapılarak elde edilen protein verilerinin içerdiği domainler tespit edildi. Elde edilen VPE proteinlerinin moleküler ağırlığı (mW, Da), amino asit sayısı, kararsızlık indeksi, teorik izoelektrik noktası (pI) ve stabilite durumu "ProtParam aracı" (<https://web.expasy.org/protparam/>) kullanılarak belirlenmiştir.

Filogenetik ağaç, *Pvul-VPE* protein dizileri ClustalW kullanılarak hizalandıktan sonra Neighbor-Joining tree (1000 tekrarlı bootstrap değeri ve Poisson model) MEGA v11 programı kullanılarak elde edilmiştir (Tamura et al., 2011; Thompson et al., 1997). Filogenetik ağaç, iTOL (<https://itol.embl.de/>) arayüzü kullanılarak şekillendirilmiştir (Letunic & Bork, 2011).

2.2. *Pvul-VPE* Genlerinin Yapısı, Fiziksel Konumları, Gen Duplikasyonları, Türler Arası Karşılaştırmalı Haritalama ve Korunmuş Motiflerin Belirlenmesi

Gene Structure Display Server v2.0 kullanılarak *Pvul-VPE* proteinlerinin ekzon-intron bölgeleri hakkında bilgi edinilmiştir (<http://gsds.gao-lab.org/>) (Hu et al., 2015).

VPE genlerinin kromozomal lokasyonları Phytozome veritabanı v13'ten elde edilmiştir (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>). *Pvul-VPE* genleri konumlandığı tüm fasulye kromozomlarına işaretlenmiş ve MapChart programı kullanılarak çizilmiştir (Voorrips, 2002). Varsayılan parametreler MCSanX (The Multiple Collinearity Scan Toolkit) (Wang et al., 2012) veritabanı kullanılarak, *P. vulgaris*, *A. thaliana* ve *G. max* arasındaki gen duplikasyon olayları belirlenmiştir. *Pvul-VPE* genlerinin PAL2NAL (Suyama et al., 2006) web arayüzü kullanılarak duplikasyon olayı içeren çiftleri arasında homolog özellikte olanlar için (Ks), homolog özellikte olmayanlar için (Ka) ve homolog olmayanın homolog olana bölümünü ifade eden (Ka/Ks) değişim oranları PAML arayüzü ile saptanmıştır (Yang, 2007). *P. vulgaris* ile *G. max* ve *A. thaliana*'da bulunan VPE genlerinin karşılaştırmalı haritası TBtools programı kullanılarak çizilmiştir (Chen et al., 2020). Her bir VPE gen ailesinin kopyalanma ve milyon yıl önce ayrılma süresi (MYÖ) $T = Ks/2\lambda$ ($\lambda = 6.56E - 9$) formülü kullanılarak tahmin edilmiştir (Lynch and Conery, 2003).

MEME Suite aracı kullanılarak (<https://meme-suite.org/meme/index.html>) (Bailey et al., 2006) *Pvul-VPE* proteinlerinin korunmuş motifleri belirlenmiştir. MEME Suite aracında 6-50 genişlik, maksimum motif sayısı 10, min:2-max:600 bölge olacak şekilde ve bölge bağımlı ise tekrarların herhangi bir sayısı olacak şekilde ayarlanmıştır. Belirlenen motifler InterPro veritabanının varsayılan ayarları kullanılarak taranmıştır (Quevillon et al., 2005). Ayrıca korunmuş bölge dizi analizleri için VPE domainlerinin dizi logo analizleri WEBLOGO online web aracı kullanılarak çizilmiştir (Crooks et al., 2004).

2.3. *Pvul-VPE* Gen Ailesinin Promotor Analizi

Pvul-VPE genlerini 2000 bp (baz çifti) yukarı akış bölgelerine Phytozome v13 veritabanı aracılığı ile ulaşıldıktan sonra her bir proteini için ayrı olacak şekilde PlantCARE (Lescot et al., 2002) web arayüzü kullanılarak cis acting element analizi gerçekleştirilmiştir. Fenogram, TBtools programı kullanılarak çizilmiştir (Chen et al., 2020). Hücre içi lokalizasyonları ise WoLF PSORT (Horton et al., 2007) kullanılarak tahmin edilmiştir.

2.4 *Pvul-VPE* Proteinlerinin Homoloji Modellemesi

Tespiti sağlanan VPE protein dizileri Phyre2 veritabanına girilerek tahmini 3 boyutlu modellemesi yapılmıştır (Kelley et al., 2015). Protein modellerinin güvenilirlik oranları (confidence level) dikkate alınarak %95'ten büyük olanlar görselleştirilmiştir.

2.5 *Pvul-VPE* Proteinlerin Protein-Protein Etkileşimleri

Protein-protein etkileşimlerinin (PPI) fiziksel, fonksiyonel ve deneysel olarak belirlenmesi amacıyla STRING (<https://string-db.org/>) veritabanı kullanılmıştır. Alınan veriler sınıflandırılmış ve Cytoscape programı kullanarak görselleştirilmiştir.

2.6 İn Siliko Gen İfade Analizi

Illumina RNA-seq veri seti kullanılarak *Pvul-VPE* genlerinin *P. vulgaris* bitkisinin farklı dokularda ifade profilleri belirlenmiştir. İlgili RNA-seq verileri SRR957668 (tuz stresiyle muamele edilmiş yaprak), SRR958469 (yaprak tuz kontrol) (Hiz et al., 2014), SRR8284481 (kuraklık stresiyle muamele edilmiş yaprak) ve SRR8284480 (yaprak kuraklık kontrol) erişim numaraları kullanılmış ve in siliko ifade profilleri RPKM (Reads per Kilobase: Kilobaz başına transkript, transkript ifadesinin normalleştirilmiş biçimi) (Mortavazi et al., 2008) değerlerinin log₂ dönüşümü hesaplandı ve CIMMiner (<https://discover.nci.nih.gov/cimminer/>) algoritması ile ısı grafiği (heatmap) elde edildi.

3. Araştırma Sonuçları ve Tartışma

3.1. Araştırma Sonuçları

3.1.1. *P. vulgaris* Genomunda Keşfedilen VPE Gen ailesi Özellikleri

PFAM erişim numarası (PF01650) ile Phytozome veritabanı v13'te bulunan fasulye genomunda VPE gen ailesi üyeleri tarandı. Elde edilen sonuçlarda *P. vulgaris* genomunun 5 adet VPE gen ailesi üyesi içerdiği keşfedildi. Tablo 1, *Pvul-VPE* genlerinin kromozomal lokasyonlarını ve bu kromozomların başlangıç ve bitiş konumlarını, amino asit sayıları, izoelektrik noktaları, moleküler ağırlıkları, kararsızlık indeksleri ve hücre içi lokalizasyonunu göstermektedir.

Tanımlanan *Pvul-VPE* genlerinin *P. vulgaris* genomunda 1, 3, 9 ve 11. kromozomlar üzerinde konumlandığı tespit edildi (Şekil 1). Elde edilen veriler sonucunda VPE gen ailesi üyeleri 123 (*Pvul-VPE-3*) ile 493 (*Pvul-VPE-2*) arasında değişen aminoasit sayısına sahipken, 13.97 kDa (*Pvul-VPE-3*) ile 55.11 kDa (*Pvul-VPE-2*) arasında değişen moleküler ağırlığa sahip olduğu tespit edildi. İzoelektrik noktaları *Pvul-VPE-3* hariç diğer genlerin asidik bölgede olduğu ve 5,48 ile 9,16 arasında değişen değerler aldığı gözlemlendi. WoLF PSORT (Horton et al., 2007) veri tabanından elde edilen veriler sonucunda *P. vulgaris* genomundaki VPE genlerine ait hücre içi lokalizasyon Tablo 1'de verilmiştir.

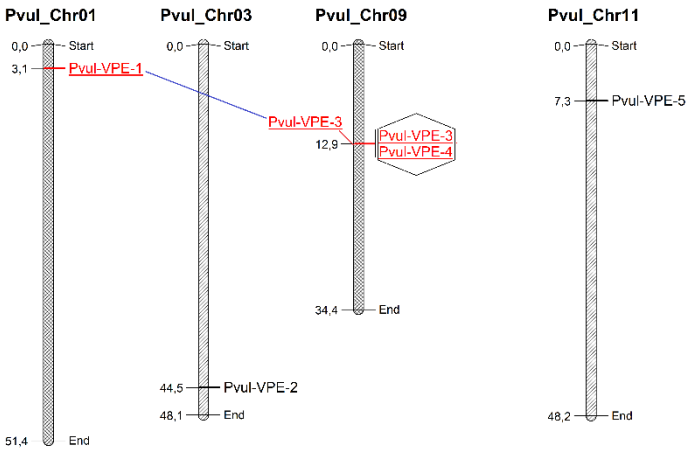
Gen duplikasyon analizleri sonucunda *Pvul-VPE-1* ile *Pvul-VPE-3* arasında segmental, Ka/Ks değerinin 0,26 ve 88,78 milyon yıl önce ayrıştığı (MYÖ), *Pvul-VPE-3* ile *Pvul-VPE-4* arasında ise tandem duplikasyon olayı, Ka/Ks oranı 0,33 ve 60,46 milyon yıl önce ayrıştığı tespit edildi ve Ka, Ks ve Ka/Ks oranları Tablo 2'de gösterilmiştir. Ayrıca *Pvul-VPE-1* ve *Pvul-VPE-3*, *Pvul-VPE-3* ve *Pvul-VPE-4* arasında arındırıcı seleksiyon gözlemlenmiştir.

Tablo 1. *Phaseolus vulgaris* L. genomunda tanımlanan VPE proteinleri ve dizi bilgileri

| Gen Adı | AA sayısı | MW (kDa) | pI | Kararsızlık indeksi | Hücre içi lokalizasyon |
|-------------------|-----------|----------|------|---------------------|------------------------|
| <i>Pvul-VPE-1</i> | 484 | 53.37 | 5.59 | 41.17 | chlo: 7, |
| <i>Pvul-VPE-2</i> | 493 | 55.11 | 6.19 | 37.83 | chlo: 8, |
| <i>Pvul-VPE-3</i> | 123 | 13.97 | 9.16 | 55.97 | nucl: 8.5, |
| <i>Pvul-VPE-4</i> | 483 | 53.28 | 5.48 | 49.94 | E.R.: 5.5, |
| <i>Pvul-VPE-5</i> | 393 | 45.09 | 6.32 | 37.41 | plas: 8, |

Tablo 2. *Pvul-VPE* genlerinin duplikasyon olayları

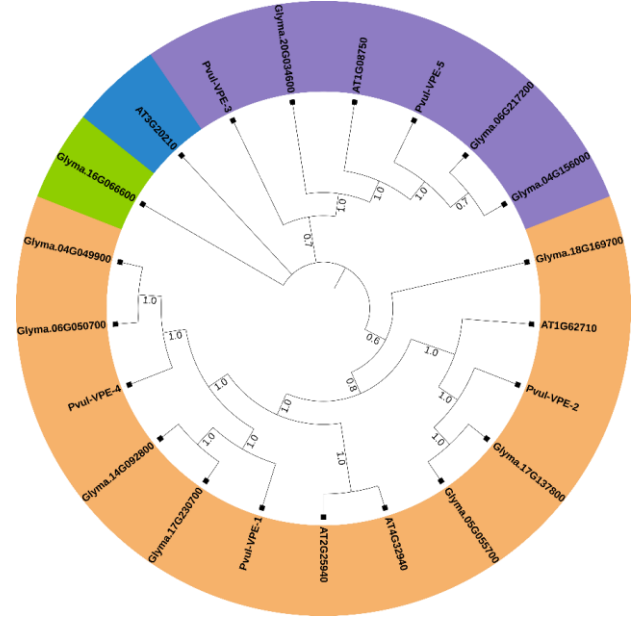
| Gen 1 | Gen 2 | Ka | Ks | Ka/Ks | Duplikasyon |
|-------------------|-------------------|------|------|-------|-------------|
| <i>Pvul-VPE-1</i> | <i>Pvul-VPE-3</i> | 0,31 | 1,16 | 0,26 | Segmental |
| <i>Pvul-VPE-3</i> | <i>Pvul-VPE-4</i> | 0,26 | 0,79 | 0,33 | Tandem |



Şekil 1. *Pvul-VPE* genlerinin kromozomal dağılımları (Mavi çizgi ile belirtilen iki gen arasında segmental duplike gen çiftlerini belirtir. Şekil içerisinde bulunan iki gen tandem duplike gen çiftlerini belirtir)

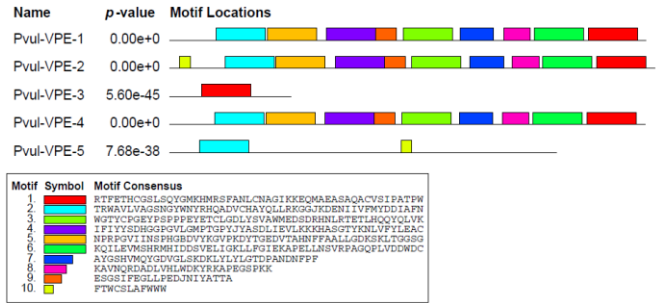
3.1.2. *Pvul-VPE* Proteinlerinin Türler Arası Filogenetik Analizi, Korunmuş Motif ve Gene Yapısı

Filogenetik analizler için *P. vulgaris*, *A. thaliana* ve *G. max* türlerinin VPE ile ilişkili proteinleri kullanılarak filogenetik ağaç iTOL web ara yüzü kullanılarak görselleştirildi. Üç bitki türünden toplamda 21 adet VPE proteinin filogenetik ağaç analizi MEGA v11 programı ile Neighbor Joining: NJ metodu kullanılarak yapıldı. Şekil 2’de gösterildiği gibi VPE proteinleri 4 ana gruba ayrıldıği tespit edildi.



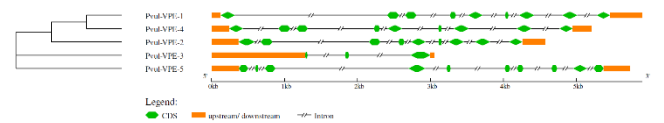
Şekil 2. 3 bitki türünden VPE proteinleri ile çizilmiş filogenetik ağaç. *P. vulgaris* ve diğer türlerden VPE tam uzunluktaki amino asit dizileri, amino asit dizileri, ClustalW ile hizalanmış ve filogenetik ağaç 1000 bootstrap ile komşu-katılım (NJ) yöntemi ile MEGA v11 programı kullanılarak oluşturulmuştur. *Pvul-VPE* alt familyaları, A, B, C ve D grupları sırasıyla yeşil, mavi, mor ve turuncu ile işaretlenmiştir.

MEME Suite (v5.4.1) (Bailey et al., 2006) web arayüzü kullanılarak, *Pvul-VPE* genlerinde 10 korunmuş motif tespit edilmiştir (Şekil 3). *Pvul-VPE-3* geni en az motif (1) içerirken *Pvul-VPE-2* geni en fazla motif (10) içerdiği gözlemlenmiştir. Ayrıca *Pvul-VPE-3* ve *Pvul-VPE-5* hariç diğer tüm genlerin 3, 4, 5, 6, 7, 8 ve 9. motifleri içerdiği tespit edilmiştir.



Şekil 3. *Pvul-VPE* genlerinde tahmin edilen motif dağılımı

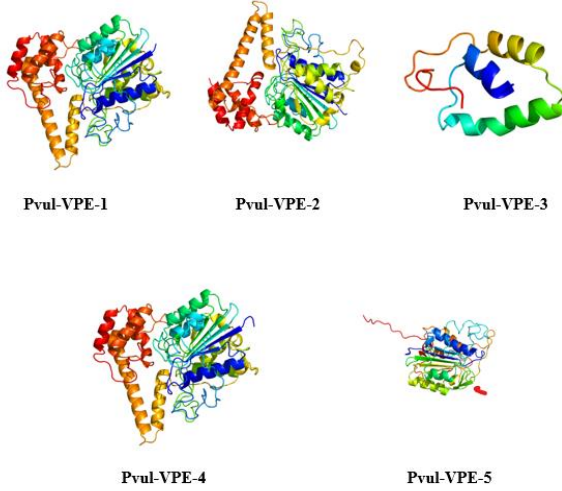
Gene Structure Display Server v2.0 veritabanı kullanılarak *Pvul-VPE* genlerinde yapılan yapısal analizler sonucunda ekzon ve intron sayıları tespit edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda, *Pvul-VPE* genlerinde toplam 35 intron ve 40 ekzon tespit edilmiştir (Şekil 4). Ekzon sayıları bakımından en yüksek *Pvul-VPE-5*’de 10 ekzon olurken, en düşük *Pvul-VPE-3*’te 3 ekzon olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4. *Pvul-VPE* genlerindeki ekzon ve intron sayısı uzunluğu ve pozisyonları.

3.1.3. *Pvul-VPE Gen Ailesinin 3 Boyutlu Homoloji Modellemesi*

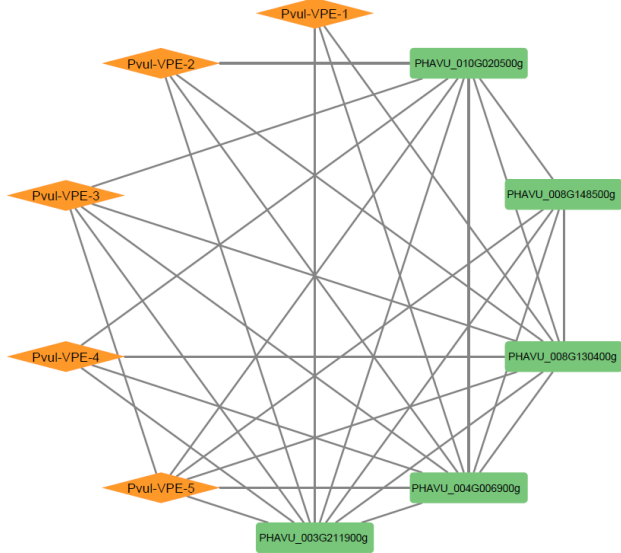
Protein Veri Bankasından (PDB) elde edilen VPE proteinleri BLASTP ile taraması yapıp, VPE proteinlerinin yapı ve fonksiyonları hakkında bilgi edinmek için kullanılan Phyre2 veri tabanı bu proteinlerin 3 boyutlu homoloji modellemesi görselleştirmiştir. Şekil 5, bu çalışmada tanımlana VPE proteinlerini 3D homoloji modellerini göstermektedir.



Şekli 5. *Pvul-VPE* proteinlerinin 3 boyutlu homoloji modellemesi

3.1.4. *Pvul-VPE Proteinlerinin Protein-Protein Etkileşimleri (PPI)*

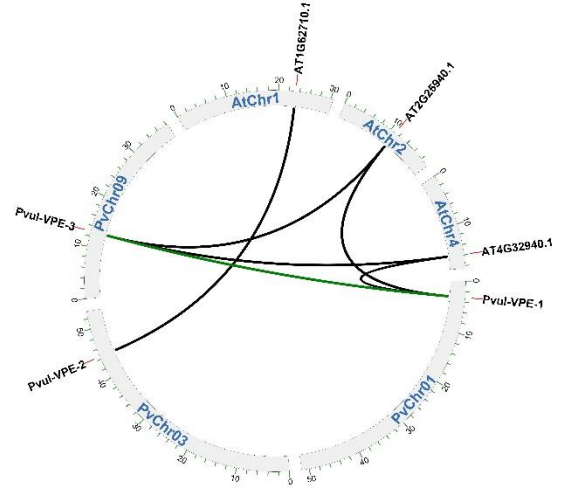
Pvul-VPE proteinlerinin protein-protein etkileşimleri, STRING veri tabanı kullanılarak görsel açıdan anlaşılır olması için Cytoscape programı yardımıyla çizilmiştir. (Şekil 6.)



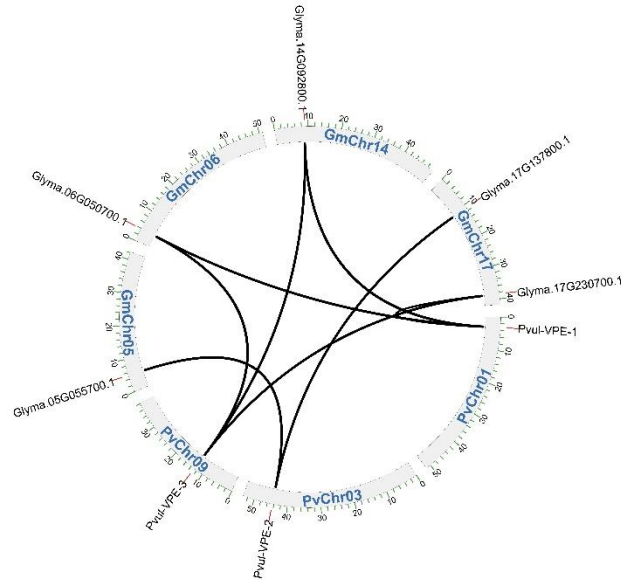
Şekil 6. *VPE* proteinlerini protein-protein etkileşimleri

3.1.5. *Pvul-VPE Gen Ailesinin Karşılaştırmalı Gen Haritalaması*

Gerçekleştirilen analizler sonucunda, *P. vulgaris* ile *A. thaliana* ve *P. vulgaris* ile *G. max* türleri arasında bulunan ortolog genlerin sintenik ilişkisi Şekil 7 ve Şekil 8'de gösterildi.



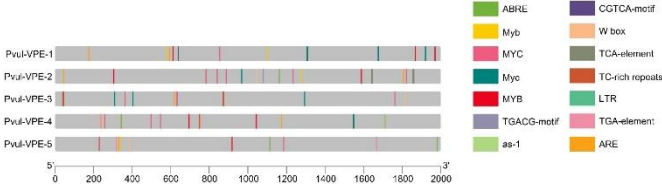
Şekil 7. *P. vulgaris* ile *A. thaliana* arasındaki sintenik ilişki (Yeşil çizgi *Pvul-VPE* genleri arasındaki ilişkiyi göstermektedir, Siyah çizgiler *Pvul-VPE* ve *A. thaliana* arasındaki ilişkiyi göstermektedir.)



Şekil 8. *P. vulgaris* ile *G. max* arasındaki sintenik ilişki (Siyah çizgiler *Pvul-VPE* ve *G. max* arasındaki ilişkiyi göstermektedir.)

3.1.6. *Pvul-VPE Genlerinin Promotor Analizi*

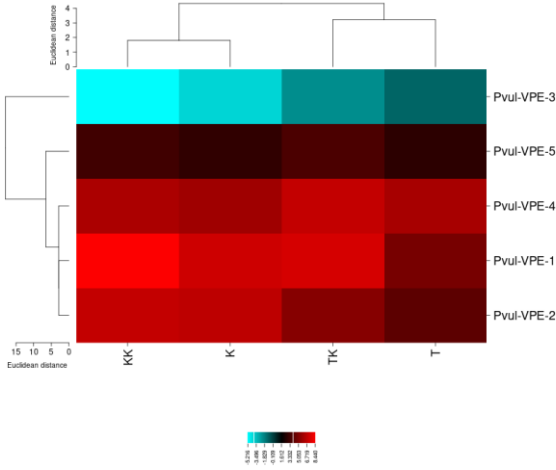
VPE genlerinin 2000 bç yukarı akış bölgesinden elde edilen sekanslar incelenmiş ve VPE genlerinde bulunan promotor bölgelerin bitki gelişimi, abiyotik streslere karşı verilen moleküler yanıtta ve çevresel etmenlere uyum sağlamada etkili olduğu belirlendi. *Pvul-VPE* genlerine ait dizilerde bulunan cis acting elementler PlantCARE veri tabanında gerçekleştirilen analizler sonucunda tespit edilmiş ve TBTools programı ile görselleştirilmiştir (Şekil 9). *Pvul-VPE* genlerinde toplamda 58 adet cis-acting element tespit edildi. Abiyotik ve biyotik streslerle ilişkili olan MYB (*Pvul-VPE*-1, -2, -4, -5), TC-rich repeats (*Pvul-VPE*-3 ve *Pvul-VPE*-4), LTR (*Pvul-VPE*-4), W box (*Pvul-VPE*-2, -3, -4, -5) gibi elemanlar *Pvul-VPE* genlerinde bulunduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 9. PvuI-VPE genlerinin promotor bölgeleri. PlantCARE veritabanı yardımı ile 5 PvuI-VPE genini promotor sekansları (-2000 bç) analiz edildi. Ölçek, translasyon kodonu boyunca yukarı akış (up stream) uzunluğunu gösterir. Farklı renkteki kutular, farklı cis-acting elementlerini gösterir.

3.1.7 PvuI-VPE Genlerinin Tuz ve Kuraklık Stresleri ile İlişkili İn Silico Ekspresyon Analizi

Fasulye VPE genleri tuz ve kuraklık stresi için SRR957668 (tuz stresi uygulanmış yaprak), SRR958469 (yaprak tuzu kontrolü), SRR8284481 (kuraklık stresi ile işlenmiş yaprak) ve SRR8284480 (yaprak kuraklığı kontrolü) NCBI SRA veri tabanından (Sekans Okuma Arşivi) RNAseq verileri ile in silico ifade analizi yapılmıştır. RNAseq verilerinden elde edilen sonuçlar RPKM değerlerinin log₂ dönüşümü ile oluşturulan ısı haritası (heatmap) grafiğine göre PvuI-VPE genlerinin tuz ve kuraklık stresleri altında göstermiş olduğu ifade seviyeleri Şekil 7'de gösterilmiştir. Bu bağlamda, PvuI-VPE-1, -2 ve -4 genleri tuz ve kuraklık stresi altında kontrol grubuna karşı yapılan analizlerde ifade seviyesinde ciddi farklılıklar görülmemiştir. Fakat bu genlerin tuz ve kuraklık stresleri altında aşırı ifade edildiği grafikte açıkça gösterilmiştir.



Şekil 9. PvuI-VPE genlerinin in silico heatmap grafiği (KK: kuraklık kontrol, K: kuraklık, TK: tuz kontrol, T: tuz)

3.2 Tartışma

P. vulgaris bitki türünde VPE gen ailesini biyoinformatik analizi, tanımlanması ve karakterizasyonu çeşitli veri tabanları ve programlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. *P. vulgaris* genomundaki VPE gen ailesi ile in silico olarak yürütülen bu çalışmada 5 adet PvuI-VPE üyesi tanımlanmıştır. PvuI-VPE genlerinin 4 farklı fasulye kromozomunda yerleşik olduğu belirlenmiştir. Bu genlerin 123 ile 493 arasında değişen amino asit sayısına ve 13,97 kDa ile 55,11 kDa arasında değişen moleküler ağırlığa, toplamda 40 ekzon ve 35 introna sahip olduğu tespit edilmiştir. Song vd. (Song et al., 2020) yaptıkları çalışmada 20 MdVPEs geninin 118 ile 780 arasında değişen aminoasit sayısına, 18,9 kDa ile 85,5 kDa moleküler ağırlığa ve 6 farklı *Malus x Domestic* kromozomunda yerleşik olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca tüm MdVPEs genlerinin toplamda 165 ekzon ve 149 introna sahip olduğu keşfedilmiştir.

VPE gen ailesi farklı türlerde yapılan genom çapında analizi ve karakterizasyonu sonucunda, armutta (*Pyrus*) 8 adet (Zhang et al., e-ISSN: 2148-2683

2021), *Gossypium hirsutum*, *Gossypium barbadense*, *Gossypium arboreum* ve *Gossypium raimondii* sırasıyla 13, 12, 7 ve 7 adet gen (Zhu et al., 2022), *Vitis vinifera* 3 adet (Tang et al., 2016), *Malus x Domestic* türünde 20 adet (Song et al., 2020) VPE gen ailesi üyesini tanımlamışlardır.

Gen duplikasyon olaylarının çoğu, tandem, segmental ve tam genom duplikasyon olaylarından meydana gelir (Adams & Wendel, 2005). Ka/Ks değeri 1'den büyük olduğunda evrimsel süreçte pozitif seleksiyonu, 1'den küçük olması durumunda arındırıcı seleksiyonu ve 1'e eşit olması halinde ise duplikasyon olaylarında doğal seleksiyonu göstermektedir (Juretic et al., 2005). Bu bağlamda PvuI-VPE-1 ve PvuI-VPE-3 arasında segmental duplikasyon olayı görülürken, PvuI-VPE-3 ve PvuI-VPE-4 arasında ise tandem duplikasyon olayı görülmüştür.

Song vd. (Song et al., 2020) yaptıkları çalışmada *Malus x domestic* türüne ait filogenetik ağaç sınıflandırmasında belirledikleri 20 MdVPE geninin 4 gruba ayrıldığı ve bütün VPE genlerinin bu 4 grup içinde dağıldığını gözlemlemiştir. Bu bilgiler ışığında VPE genleri evrimsel açıdan çoğunlukla 4 gruba ayrıldığı ve bu genlerin *A. thaliana* türü ile yakın ilişki içerisinde olduğu bilgisine erişilmiştir. Yine bu çalışmada yapılan cis-acting promotor analizinde MdVPE genlerinin W box, ABRE, LTR ve TC-rich repeats elementlerini içerdiğini ve sırasıyla MdVPE genlerinden 10 tanesinin W box, 14 tanesi ABRE, 11 tanesinin LTR ve 2 tanesinin TC-rich repeats elemanları içerdiği tespit edilmiştir.

PvuI-VPE genleri arasında yapılan in silico gen ekspresyon analizinden elde edilen veriler sonucunda PvuI-VPE genlerinin ifade seviyesinde önemli bir değişiklik olmamıştır. Zhu vd (Zhu et al., 2022) *G. hirsutum* türünde yapmış olduğu çalışmada doku spesifik in silico ifade analizleri sonucunda GhVPE genlerinin ifade seviyelerinde herhangi bir değişikliğin olmadığını gözlenmiştir. Ayrıca yapılan bu çalışmada ek olarak aynı alt gruplarda bulunan VPE genlerinin ekzon ve intron yapısının, örn., alt grup I ve grup II ailelerinde bulunun VPE genleri, sırasıyla 9 ve 8 ekzondan oluşan yapıya sahip olduğunu, grup III'teki dört VPE gen ailesinin ise 8 ekzon bulunduğu ve geri kalan üyelerin 9 ekzondan oluştuğunu tespit etmişlerdir.

Tüm VPE genleri PHAVU_003G211900g, PHAVU_008G130400g ve PHAVU_010G020500g gibi glikan biyosentezi ve metabolizmasında görevli diğer proteinler ile etkileşim halinde olduğu tespit edilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda N-glikan biyosentezi ve metabolizmasında görevli proteinlerin tuz ve kuraklık stresine karşı yanıtta, selüloz biyosentezinde ve hücre bölünmesinde önemli işlevlere sahip olduğu rapor edilmiştir (Nagashima et al., 2018).

4. Sonuç

Bitkilerin gelişmesi, büyümesi ve olgunlaşması, programlı hücre ölümü, abiyotik ve biyotik stres etmenlerine karşı vermiş olduğu cevaplar için önemli olan VPE gen ailesi bu çalışmada kapsamlı bir şekilde araştırıldı. Ayrıca belirlenen gen ailesi üyelerinin tuz ve kuraklık stres tepkileri ile bu streslere karşı vermiş oldukları cevaplar incelenmiştir. *P. vulgaris* bitki türünde ilk kez yapılan bu çalışmanın ıslah çalışmaları, bitki ve tarımsal biyoteknoloji alanlarında araştırma yapan bilim insanları için değerli bir kaynak ve ilave bilgiler sunacağına inanıyoruz.

Kaynakça

- Adams, K. L., & Wendel, J. F. (2005). Polyploidy and genome evolution in plants. *Current opinion in plant biology*, 8(2), 135-141.
- Bailey, T. L., Williams, N., Misleh, C., & Li, W. W. (2006). MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs. *Nucleic acids research*, 34(suppl_2), W369-W373.
- Broughton, W. J., Hernandez, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P., & Vanderleyden, J. (2003). Beans (*Phaseolus* spp.)—model food legumes. *Plant and soil*, 252(1), 55-128.
- Chen, C., Chen, H., Zhang, Y., Thomas, H. R., Frank, M. H., He, Y., & Xia, R. (2020). TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. *Molecular plant*, 13(8), 1194-1202.
- Chung, H.-J., Liu, Q., Pauls, K. P., Fan, M. Z., & Yada, R. (2008). In vitro starch digestibility, expected glycemic index and some physicochemical properties of starch and flour from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties grown in Canada. *Food Research International*, 41(9), 869-875.
- Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J.-M., & Brenner, S. E. (2004). WebLogo: a sequence logo generator. *Genome research*, 14(6), 1188-1190.
- De Pinto, M. C., Locato, V., & De Gara, L. (2012). Redox regulation in plant programmed cell death. *Plant, cell & environment*, 35(2), 234-244.
- De Ron, A. M., Papa, R., Bitocchi, E., González, A. M., Debouck, D. G., Brick, M. A., . . . Geffroy, V. (2015). Common bean. In *Grain legumes* (pp. 1-36). Springer.
- Díaz-Batalla, L., Widholm, J. M., Fahey, G. C., Castaño-Tostado, E., & Paredes-López, O. (2006). Chemical components with health implications in wild and cultivated Mexican common bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(6), 2045-2052.
- Fagundes, D., Bohn, B., Cabreira, C., Leipelt, F., Dias, N., Bodanese-Zanettini, M. H., & Cagliari, A. (2015). Caspases in plants: metacaspase gene family in plant stress responses. *Functional & integrative genomics*, 15(6), 639-649.
- Hara-Nishimura, I., Kinoshita, T., Hiraiwa, N., & Nishimura, M. (1998). Vacuolar processing enzymes in protein-storage vacuoles and lytic vacuoles. *Journal of plant physiology*, 152(6), 668-674.
- Hatsugai, N., Yamada, K., Goto-Yamada, S., & Hara-Nishimura, I. (2015). Vacuolar processing enzyme in plant programmed cell death. *Frontiers in plant science*, 6, 234.
- Hiz, M. C., Canher, B., Niron, H., & Turet, M. (2014). Transcriptome analysis of salt tolerant common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under saline conditions. *PloS one*, 9(3), e92598.
- Horton, P., Park, K.-J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C. J., & Nakai, K. (2007). WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic acids research*, 35(suppl_2), W585-W587.
- Hu, B., Jin, J., Guo, A.-Y., Zhang, H., Luo, J., & Gao, G. (2015). GSDS 2.0: an upgraded gene feature visualization server. *Bioinformatics*, 31(8), 1296-1297.
- Jenkins, A. L. (2007). The glycemic index: Looking back 25 years. *Cereal foods world*, 52(2), 50.
- Juretic, N., Hoen, D. R., Huynh, M. L., Harrison, P. M., & Bureau, T. E. (2005). The evolutionary fate of MULE-mediated duplications of host gene fragments in rice. *Genome research*, 15(9), 1292-1297.
- Kalefetoğlu, T., & Ekmekçi, Y. (2005). The effects of drought on plants and tolerance mechanisms. *Gazi University Journal of Science*, 18(4), 723-740.
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., & Sternberg, M. J. E. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature protocols*, 10(6), 845-858.
- Kinoshita, T., Yamada, K., Hiraiwa, N., Kondo, M., Nishimura, M., & Hara-Nishimura, I. (1999). Vacuolar processing enzyme is up-regulated in the lytic vacuoles of vegetative tissues during senescence and under various stressed conditions. *The Plant Journal*, 19(1), 43-53.
- Lamesch, P., Berardini, T. Z., Li, D., Swarbreck, D., Wilks, C., Sasidharan, R., . . . Garcia-Hernandez, M. (2012). The Arabidopsis Information Resource (TAIR): improved gene annotation and new tools. *Nucleic acids research*, 40(D1), D1202-D1210.
- Lamkanfi, M., Declercq, W., Kalai, M., Saelens, X., & Vandenaebelle, P. (2002). Alice in caspase land. *A phylogenetic analysis of caspases from worm to man. Cell death and differentiation*, 9(4), 358-361.
- Lescot, M., Déhais, P., Thijs, G., Marchal, K., Moreau, Y., Van de Peer, Y., . . . Rombauts, S. (2002). PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic acids research*, 30(1), 325-327.
- Letunic, I., & Bork, P. (2011). Interactive Tree Of Life v2: online annotation and display of phylogenetic trees made easy. *Nucleic acids research*, 39(suppl_2), W475-W478.
- Lynch M, Conery JS (2003) The evolutionary demography of duplicate genes. *Genome Evolution*:35-44.
- Nagashima, Y., von Schaewen, A., & Koiwa, H. (2018). Function of N-glycosylation in plants. *Plant Science*, 274, 70-79.
- Nakaune, S., Yamada, K., Kondo, M., Kato, T., Tabata, S., Nishimura, M., & Hara-Nishimura, I. (2005). A vacuolar processing enzyme, δ VPE, is involved in seed coat formation at the early stage of seed development. *The Plant Cell*, 17(3), 876-887.
- Mortazavi A, Williams BA, Mccue K, Schaeffer L, Wold B (2008) Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods* 5(7):621-628. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1226>
- Quevillon, E., Silventoinen, V., Pillai, S., Harte, N., Mulder, N., Apweiler, R., & Lopez, R. (2005). InterProScan: protein domains identifier. *Nucleic acids research*, 33(suppl_2), W116-W120.
- Schmutz, J., McClean, P. E., Mamidi, S., Wu, G. A., Cannon, S. B., Grimwood, J., . . . Chavarro, C. (2014). A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. *Nature genetics*, 46(7), 707-713.
- Selda, Ö., & Ekinci, M. (2015). Kuraklık stresi ve bitki fizyolojisi. *Derim*, 32(2), 237-250.
- Song, J., Yang, F., Xun, M., Xu, L., Tian, X., Zhang, W., & Yang, H. (2020). Genome-wide identification and characterization of vacuolar processing enzyme gene family and diverse expression under stress in apple (*Malus* × domestic). *Frontiers in plant science*, 11, 626.
- Suyama, M., Torrents, D., & Bork, P. (2006). PAL2NAL: robust conversion of protein sequence alignments into the corresponding codon alignments. *Nucleic acids research*, 34(suppl_2), W609-W612.
- 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.
- Tang, Y., Wang, R., Gong, P., Li, S., Wang, Y., & Zhang, C. (2016). Gene cloning, expression and enzyme activity of *Vitis vinifera* vacuolar processing enzymes (VvVPEs). *PloS one*, 11(8), e0160945.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., & Higgins, D. G. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic acids research*, 25(24), 4876-4882.
- Valliyodan, B., Cannon, S. B., Bayer, P. E., Shu, S., Brown, A. V., Ren, L., . . . Daum, C. G. (2019). Construction and comparison of three reference-quality genome assemblies for soybean. *The Plant Journal*, 100(5), 1066-1082.
- Voorrips, R. E. (2002). MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *Journal of heredity*, 93(1), 77-78.
- Wang, Y., Tang, H., DeBarry, J. D., Tan, X., Li, J., Wang, X., . . . Guo, H. (2012). MCScanX: a toolkit for detection and evolutionary analysis of gene synteny and collinearity. *Nucleic acids research*, 40(7), e49-e49.
- Yang, Z. (2007). PAML 4: phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Molecular biology and evolution*, 24(8), 1586-1591.
- Zhang, H., Tao, X., & Zhang, F. (2021). Genome-wide identification and expression analysis of the vacuolar processing enzyme (VPE) family genes in pear. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 96(4), 469-478.
- Zhu, L., Wang, X., Tian, J., Zhang, X., Yu, T., Li, Y., & Li, D. (2022). Genome-wide analysis of VPE family in four *Gossypium* species and transcriptional expression of VPEs in the upland cotton seedlings under abiotic stresses. *Functional & Integrative Genomics*, 1-14.