

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
DOKTORA TEZİ

HAŞHAŞ (*Papaver somniferum* L.)’DA TEBAİN ÜRETİM MEKANİZMASININ
YENİ NESİL DİZİLEME SİSTEMİ İLE TRANSKRİPTOM DÜZEYİNDE
İNCELENMESİ

Behcet İNAL

Danışman Öğretim Üyesi
Prof. Dr. Sebahattin ÖZCAN

OCAK
2015

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağlı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Behcet İNAL
İmzası

ONAY

Prof. Dr. Sebahattin ÖZCAN danışmanlığında, Behcet İNAL tarafından hazırlanan bu çalışma 19/01/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan Prof. Dr. Bilal GÜRBÜZ

İmza:

Üye Prof. Dr. Sebahattin ÖZCAN

İmza:

Üye Prof. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR

İmza:

Üye Doç. Dr. Mine TÜRKTAS

İmza:

Üye Yrd. Doç. Dr. Sezer OKAY

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof.Dr. Aykut ÖZKUL
Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

Haşhaş (*Papaver somniferum* L.)’da Tebain Üretim Mekanizmasının Yeni Nesil Dizileme Sistemi ile Transkriptom Düzeyinde İncelenmesi

Behcet İNAL

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Danışman: Prof. Dr. Sebahattin ÖZCAN

Tebain biyosentezi oldukça karmaşık bir üretim şemasına sahip olup haşhaşta yaklaşık olarak %0,1-2 civarında tebain bulunmaktadır. Son yıllarda çok yaygın olarak kullanılan çeşitli analjeziklerin hammaddesi olmasından dolayı tebain üretiminin artırılması önem taşımaktadır. Bu çalışmada, fungal bir elisitör olan Metil Jasmonat (MeJA)’nın tebaince zengin haşhaş kapsül dokusuna uygulandıktan sonra ToF-LC/MS (Time of Flight Liquid Chromatography-Mass Spectrometry) ile yapılan alkaloid ölçümleri sonucunda başta tebain olmak üzere birçok alkaloid miktarının indüklenme sonucu arttığı saptanmıştır. MeJA uygulaması sonucunda kapsül dokusunda meydana gelen transkriptom düzeyindeki farklılıklar Roche 454-GS FLX+ platformu kullanılarak belirlenmiştir. Yüksek verimli dizileme sonucunda ortalama uzunlukları 461 baz çift olarak toplama 36.640.814 baz okuma belirlenmiştir. Okumaların, *i*Assembler yazılımı ile *de novo* birleştirme sonucunda 3371 unigene tespit edilmiştir. Transkriptlere ait gen GO biyoenformatik analizleri sonucunda, metallokarboksipeptidaz inhibitörü, dehidrin, hücre duvarı bağlantılı hidrolaz gibi çeşitli biyotik stres koşullarına dirençlilik mekanizmalarında rol alan genler bulunmuş ve haşhaşta alkaloid üretimiyle bağlantılı olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bununla birlikte BIA biyosentezi indüklenmiş haşhaş kapsülünde sekonder metabolit sentezi ile ilişkili, LBD, bZIP, MYB, Zinc Finger Protein 622, WRKY, bHLH Transkripsiyon faktörleri (TF) bulunmuştur. Ayrıca tebain sentezinde rol aldığı düşünülen mikroRNA’lar, Transposable Elementler (TE) ve genik-SSR (Simple Sequence Repeat) gibi moleküler elementler belirlenerek tebain biyosentezi ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca bazı genlerin ifade seviyeleri eş zamanlı PZR (qRT-PCR) analizi ile ölçülmüş ve bu genlerin MeJA muamelesi ile indüklendikleri belirlenmiştir.

2015, 169 sayfa

Anahtar Kelimeler: Haşhaş, tebain, transkriptom, Roche GS 454 FLX+

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

Transcriptome Based Analysis of the Thebaine Biosynthesis Mechanism in Opium Poppy
(*Papaver somniferum* L.) via Next Generation Sequencing

Behcet İNAL

Ankara University Biotechnology Institute

Supervisor: Prof. Dr. Sebahattin ÖZCAN

Thebain biosynthesis has a highly complex production scheme and in opium is around 0.1-0.2% thebain. To increase of thebain production is critically important due to its use in various analgesics that are widely used recently. In this study; the evaluation of ToF-LC/MS (Time of Flight Liquid Chromatography-Mass Spectrometry) resulted that after application of MeJA (Methyl Jasmonate)– a fungal elicitor- on capsule tissue, an increase biosynthesis of at first thebain and many alkaloids were observed Transcriptomic differences in thebain-rich kind opium whose BIA biosynthesis was induced by MeJA treatment were identified by using Roche 454-GS FLX+ platform. As a result of high throughput sequencing 36.640.814 base reads were obtained. The average length of reads were 461 base pair. The de novo assembly analysis via iAssembler software resulted 3371 unigene. Gene ontology (GO) of transcripts were analysed via bioinformatics and revealed that genes taking role in resistance against biotic and abiotic stress such as; dehydrin, metalcarboxypeptidase inhibitor, cell wall connected hydrolase, are in association with alkaloid production in opium. Along with this, in 6USS and 9USS opium capsules that were induced by BIA biosynthesis, transcription factors (TF) like LBD, bZIP, MYB, Zinc Finger Protein 622, WRKY, bHLH that are related with metabolite synthesis were found. In addition, miRNAs, Transposable Elements (TE), genic-SSR (Simple Sequence Repeat) which are thought to be involved in thebain synthesis defined and they were associated with thebain biosynthesis. Besides, the expressions of some genes were analysed via Real Time PCR (qRT-PCR) and it was revealed that these genes were induced with MeJA treatment.

2015, 169 pages

Keywords: Poppy, thebaine, transcriptome, Roche GS 454 FLX+

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilgi dolu mütevazı halini, babacanlığını, insanlığını ve güler yüzünü benden hiç esirgemeyen ve tez çalışmalarımı yürütebilmem için gerekli imkanları kat kat fazlasıyla her zaman sağlayan danışman hocam sayın **Prof. Dr. Sebahattin ÖZCAN'a**, bilgisine, bilime verdiği değeri ve gösterdiği saygısını her zaman imrendiğim, tez çalışmalarım esnasında beni her zaman en doğru bir şekilde kararlılıkla yönlendiren ve gelişmem için gerekli bütün imkanları maksimum seviyede sağlayan değerli eş danışman hocam sayın **Doç. Dr. Turgay ÜNVER'e**, tez çalışmam süresince tezime yön veren ve yardımlarını esirgemeyen tez izleme komitemde bulunan değerli **Prof. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR** ve **Yrd. Doç. Dr. Sezer OKAY** hocalarıma, bilgisinden her zaman çok faydalandığım sayın **Doç. Dr. Mine TÜRKTAŞ** hocama, tez materyalinin yetiştirmesinde yardımını esirgemeyen sayın **Doç. Dr. Arif İPEK** hocama, tezimin her aşamasında beni yalnız bırakmayan sayın **Yrd. Doç. Dr. Tuğba GÜRKÖK'e**, tez çalışmam boyunca verdiği motivasyonlarından dolayı Araş.gör. **Adnan AYDIN**, **Dr. Mortaza HJYZADEH'e**, Bilim Uzmanı **Huriye YANIK'a** Öğretim Görevlisi **Ebru TÜFEKÇİ** ve **Esmâ ÖZHÜNER'e**, **Günseli BABAOĞLU'na**, **Emine AÇAR'a**, **Yağız ALAGÖZ'e**, **Yusuf PEKMEZCİ'ye**, **Ümmü Gülsüm ZIPLAR'a**, biyoenformatik analizler için **Araş. Gör. Vahap ELDEM** ve **Gökmen ZARARSIZ'a**, eğitimim için hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan, mutlu ve üzüntülü anlarımı paylaşan sevgili **aileme**, güler yüzlülükleri ile insanlara bilimsel birikim sağlayan değerli **Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsünün** tüm değerli bireyelerine, en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Bu tez çalışması 'Haşhaş (*Papaver somniferum* L.)'da Tebain Üretim Mekanizmasının Yeni Nesil Dizileme Sistemi İle Transkriptom Düzeyinde İncelenmesi' adlı 212T196 kodlu **TÜBİTAK** projesi ile desteklenmiştir. Bu desteğinden dolayı **TÜBİTAK'a** teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	i
ONAY	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
SİMGELER DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	4
2.1. Haşhaş (<i>Papaver somniferum</i> L.)	4
2.2. Haşhaş (<i>Papaver somniferum</i> L.) 'da Alkaloit Sentez Mekanizması	5
2.2.1. Alkaloitler	5
2.2.2. Benzilzokininin alkaloitleri (BIA) ve sentez mekanizması.....	6
2.2.3. Haşhaş bitkisinde yapılmış proteomik, transkriptomik ve metabolomik çalışmalar	9
2.2.3. Haşhaşta tebain biyosentezi ve hücredeki taşınım mekanizması	12
2.3. MeJA Yapısı ve Bitkiler Üzerindeki Etkisi	16
2.4. Transkripsiyon Faktörleri ve Alkaloit Biyosentezi	18
2.5. Transpozon Elementleri ve Alkaloit Biyosentezi	19
2.6. Mikro-RNA (miRNA)	21
2.6.1. Bitkilerde miRNA'lar ve fonksiyonları.....	21
2.6.2. Bitkilerde miRNA'ların biyogenez ve çalışma mekanizması	21
2.6.3. Bitki miRNA'ların sekonder metabolitlerin biyosentezindeki rolü	22
2.7. Bitki Transkriptom Çalışmalarında Kullanılan Dizileme Metotları	23
2.7.1. İlk nesil dizileme metodu	23
2.7.2. İkinci nesil dizileme platformları	24

2.8. Roche 454 FLX+ Platformu ile Transkriptom Analiz Basamakları	28
2.8.1. RNA izolasyonu ve iki zincirli cDNA oluşturulması.....	28
2.8.2. 454 GS-FLX+ cihazı ile transkriptom dizileme	29
2.8.3. Dizilerin biyoenformatik analizleri	29
2.9. Yeni Nesil Dizileme Teknolojisi ile RNA Dizileme	31
2.9.1. Geçmişten günümüze kadar transkriptomik çalışmalarda kullanılan araçlar	33
2.9.2. Transkriptomik çalışmalarda RNA-dizileme teknolojileri ve avantajları	34
2.10. RNA-Dizileme Tekniğinin Başlıca Sınırlamaları	37
2.10.1. Kütüphane yapılandırılması	37
2.10.2. Veri zenginleştirmedeki biyoenformatik problemler	38
2.11. Transkriptomik Çalışmalarda RNA-diziliminin Getirdiği Yenilikler	39
2.11.1 Maliyete Karşı Kapsamlı Okuma	39
2.11.2. Yeni transkript adaylarının bulunması	39
2.11.3. Gen haritalanması ve ekzon sınırların belirlenmesi	39
2.11.4. Transkripsiyon seviyesini dijital olarak tanımlanması	40
<u>3. GEREKÇE VE AMAC</u>	<u>42</u>
<u>4. MATERYAL VE YÖNTEM.....</u>	<u>43</u>
4.1. Bitki Materyali ve Yetiştirilmesi.....	43
4.2. Metil Jasmonat (MeJA) Uygulaması	43
4.3. Alkaloidlerin ToF-LC/MS Ölçümleri ve Analizi.....	44
4.4. RNA İzolasyonu.....	45
4.4.1. İzole edilen RNA'ların DNase ile muamele edilmesi ve yıkanması.....	46
4.5. Roche 454 FLX+ ile RNA dizileme	46
4.5.1. Transkriptom kütüphanesinin hazırlanması	46
4.5.2. Birinci iplik cDNA sentezlenmesi.....	48
4.5.3. İkinci iplik cDNA sentezlenmesi	48
4.5.4. Amplikon kütüphanesinin pürifikasyonu	48
4.5.5. Fragment uçlarının tamir edilmesi	49
4.5.6. Adaptör ligasyonu	49
4.5.7. cDNA kütüphanesinden küçük fragmentlerin uzaklaştırılması.....	49
4.6. Emülsiyon PZR (emPZR).....	50
4.6.1 Boncukların Saflaştırılması	50

4.6.2. DNA Boncuk Zenginleştirme.....	51
4.6.3 Zenginleştirilmiş Boncukların Toplanması.....	52
4.7. Dizileme.....	53
4.8. Veri İşleme ve Biyoenformatik Analiz.....	54
4.8.1. Okumaların <i>de novo</i> birleştirme yapılması	55
4.8.2. Gen ontoloji (GO) ve KEEG analizleri	55
4.8.3. Transkripsiyon faktörlerinin belirlenmesi	55
4.8.4. Mikro-RNA (miRNA) ve hedefledikleri genlerin belirlenmesi	56
4.8.5. SSR dizilerinin belirlenmesi.....	56
4.8.6. Transpozon elementlerinin belirlenmesi	56
4.8.7. Farklı ifade olunmuş gen ya da gen adaylarının ifade seviyelerinin dijital olarak analiz edilmesi	56
4.9 qRT-PZR Analizi İçin cDNA Sentezi	57
4.10. MeJA Uygulaması Sonucu Gen İfadesinin qRT-PZR ile Belirlenmesi	58
<u>5. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</u>	<u>59</u>
5.1. MeJA Uygulaması Sonucu Haşhaş Kapsülünde Değişen Alkaloid Miktarı	59
5.2. RNA İzolasyonu, Miktar ve Kalite Tayini	61
5.3. Roche 454 FLX+ ile RNA-Dizileme	63
5.3.1. Dizileme için oluşturulan cDNA kütüphanesinin kalite analizi	63
5.3.2. Emülsiyon PZR sonucu.....	64
5.4. cDNA Kütüphanelerinin Dizilenmesi ve Yapılan Biyoenformatik Analizlerin Sonucu ...	65
5.4.1. Dizilenen kütüphanelerin dizi uzunlukları ve okuma sayıları	66
5.4.2 Dizilenen kütüphanelerde genik-SSR motiflerinin dağılımı	67
5.4.3. Gen atıflandırması ve fonksiyonel sınıflandırma sonucu	70
5.4.4. MeJA muamelesi sonucunda sentezlenen transkripsiyon faktörleri	73
5.4.5. MeJA muamelesi sonucunda sentezlenmiş miRNA'lar ve miRNA'ların hedef gen analizleri	89
5.4.6 Elde edilen dizileme kütüphanelerinden belirlenen retrotranspozon elementleri	94
5.5. Transkriptom okumalarında farklı ifade olunmuş transkriptler.....	97
5.6. Transkriptom Verisinin Eş Zamanlı PZR ile Teyit Edilmesi.....	99
<u>6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</u>	<u>101</u>
6.1. MeJA Uygulaması Sonucunda Haşhaş Kapsülündeki Alkaloid Değişim Profili	101

6.2. Roche 454 FLX+ ile Transkriptom Dizilenmesi	103
6.3. MeJA ile İndüklenmiş Tebaince Zengin Haşhaş Transkriptomunda Genik-SSR'ların Dağılımı	104
6.4. Gen Atıflandırılması ve Fonksiyonel Sınıflandırma	106
6.5. Transkripsiyon Faktörlerinin Karşılaştırılması.....	107
6.6. miRNA ve Hedef Genlerinin Analizi	109
6.7. Okuma Kütüphanelerindeki Retrotranspozon Elementlerin Karşılaştırılması	112
6.8 Eş zamanlı PZR ile Bazı Genlerin Analizi İfade Seviyelerinin Analizi	113
6.9. Sonuç	116
<u>KAYNAKLAR.....</u>	118
<u>EKLER.....</u>	133
<u>EK 1.....</u>	133
<u>EK 2.....</u>	138
<u>EK 3.....</u>	145
<u>EK 4.....</u>	146
<u>EK 5.....</u>	147
<u>EK.6.....</u>	157
<u>EK.7.....</u>	158
<u>EK.8.....</u>	167
<u>ÖZGEÇMİŞ.....</u>	168

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Dünya Yasal Haşhaş Ekim Alanları.....	4
Şekil 2.2. Türkiye’de haşhaş ekimine izin verilen iller.....	5
Şekil 2.3. Haşhaşta alkaloit biyosentez yolağının özeti	7
Şekil 2.4. Haşhaşta tebain biyosentez yolunu gösteren aşamalar.....	14
Şekil 2.5. Haşhaşta kalburlu boru ve latisiferlerde tebain biyosentez ile ilgili enzimlerinin lokalizasyonu	15
Şekil 2.6. Jasmonatların gelişimsel ve çevresel sinyallere cevap olarak sentezlenme mekanizması	17
Şekil 2.7. Bitkilerde JA uygulaması sonucu sentezlenen transkripsiyon faktörlerinin Antasiyonin, Alkaloit ve Sekuiterpenler biyosentezi üzerine olan etkisi.....	19
Şekil 2.8. Bitkilerde meydana gelen miRNA’ların yazılımı ve çalışma mekanizması	22
Şekil 2.9. Dizileme için kütüphane hazırlama aşamaları	25
Şekil 2.10. Roche 454 FLX+ platformunda gerçekleşen emülsiyon tabanlı klonal çoğalma	25
Şekil 2.11. Boncukların PicoTiterPlate aparatına yüklenmesi	26
Şekil 2.12. Pirodizileme metodu	27
Şekil 2.13. Dizilerin biyoenformatik analiz şeması	30
Şekil 2.14. Tipik bir RNA Dizileme deneyi akış basamakları	35
Şekil 4.1. Bitkilerin büyüme kabinlerinde (a,b) ve tarla şartlarında yetiştirilmesi (c,d)	44
Şekil 4.2. ToF/LC-MS analizi haşhaş kapsüllerinin a) kurutulması, b) alkaloit ekstraksiyonu, c) standartların konsantrasyon ayarlaması ve d) alkaloit ölçüm için cihaza verme aşamaları.....	45
Şekil 4.3. a-b) em-PZR için hazırlık aşaması ve reaksiyonun termal döngü cihazına yerleştirilmesi c) % olarak geri kazanılan boncuk sayısını bulmak için boncuk sayım cihazı ile ölçülmesi.....	51
Şekil 4.4. Sekiz cDNA kütüphanesine ait boncukların 16'lık gasket takılmış olan PicoTiter Plate üzerinde işaretli alana yüklenmesi.....	54
Şekil 4.5. Dizilemede kullanılan Roche 454 FLX+ cihazının hazır hale getirilmesi ve PicoTiter Plate'in yüklenmesi	54

Şekil 5.1. MeJA uygulanması sonucu 6. ve 9. saat bitki örneklerinde tebain alkaloidinin ToF-LC/MS analizi.	59
Şekil 5.2. MeJA uygulanması sonucu 6. ve 9. saat bitki örneklerinde morfin alkaloidinin ToF-LC/MS analizi.	60
Şekil 5.3. MeJA uygulanması sonucu 6. ve 9. saat bitki örneklerinde kodein alkaloidinin ToF-LC/MS analizi.	60
Şekil 5.4. MeJA uygulanması sonucu 6. ve 9. saat bitki örneklerinde noskapin alkaloidinin ToF-LC/MS analizi.	60
Şekil 5.5. MeJA uygulanması sonucu 6. ve 9. saat bitki örneklerinde S-retikülün alkaloidinin ToF-LC/MS analizi.	61
Şekil 5.6. MeJA uygulanması sonucu 6. ve 9. saat bitki örneklerinde laudanozin alkaloidinin ToF-LC/MS analizi.	61
Şekil 5.7. RNA örneklerinin Agilent Bioanalyzer 2100 cihazında analiz sonuçları	62
Şekil 5.8. MeJA uygulamasının ardından 6. ve 9. saat haşhaş örneklerine ait total RNA'nın %2'lik agaroz jelde görüntülenmesi.....	62
Şekil 5.9. MeJA uygulama sonrası 6. ve 9. saat haşhaş örneklerine ait cDNA'nın 18s rRNA optimizasyon PZR sonucunun %2'lik agaroz jelde görüntülenmesi	63
Şekil 5.10. Dizileme için hazırlanan cDNA kütüphanelerine ait fragmantasyon işleminin Agilent Bioanalyzer 2100 cihazı ile ölçülmesi.....	64
Şekil 5.11. Roche 454 FLX+ cihazı ile dizilenen 6. saat kütüphanelerine ait dizi uzunlukları dağılımı.....	66
Şekil 5.12. Roche 454 FLX+ cihazı ile dizilenen 9. saat kütüphanelerinin dizi uzunlukları dağılımı.....	67
Şekil 5.13. MeJA uygulaması yapılmayan 6. saat kontrol zaman diliminde ifadesi değişen transkriptlerin yüzdesi	71
Şekil 5.14. MeJA uygulamasından sonra 6. saat uygulama zaman diliminde ifadesi değişen transkriptlerin yüzdesi	71
Şekil 5.15. MeJA uygulaması yapılmayan 9. saat kontrol zaman diliminde ifadesi değişen transkriptlerin yüzdesi	72
Şekil 5.16. MeJA uygulamasından sonra 9. saat uygulama zaman diliminde ifadesi değişen transkriptlerin yüzdesi	73
Şekil 5.17. 6. saat zaman dilimine ait heat-map görüntüsü.....	97
Şekil 5.18. 9. saat zaman dilimine ait heat-map görüntüsü.....	98
Şekil 5.19. 6. ve 9. saat zaman diliminde farklı ifade edilen transkriptleri gösteren venn..	98

Şekil 5.20. Her iki zaman dilimi için seçilen anlamlı 50'şer gene karşılık gelen gen kümeleri.....	99
Şekil 5.21. MeJA uygulamasına cevap veren genlerin haşhaşa ifade seviyelerinin qRT-PZR ile belirlenmesi.	100

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.2. Mevcut Dizileme Platformlarının Karşılaştırılması	28
Çizelge 5.1. RNA örneklerinin NanoDrop 2000c (Thermo) cihazında ölçüm değerleri	62
Çizelge 5.2. emPZR sonucunda kazanılan pozitif boncuk sayıları	65
Çizelge 5.3. cDNA kütüphanelerinin dizileme istatistikleri	66
Çizelge 5.4. 6. saat uygulama kütüphanesinde elde edilen SSR motifleri	68
Çizelge 5.5. 9. Saat kontrol kütüphanesinde elde edilen SSR motifleri.....	68
Çizelge 5.6. Analiz Sonucunda 9. saat uygulama kütüphanesinde elde edilen SSR motifleri	69
Çizelge 5.7. 6. saat kontrol zaman diliminde tespit edilen transkripsiyon faktörü	74
Çizelge 5.8. 6. saat uygulama zaman diliminde tespit edilen transkripsiyon faktörleri.....	74
Çizelge 5.9. 9. saat kontrol zaman diliminde tespit edilen transkripsiyon faktörleri.....	78
Çizelge 5.10. 9. saat uygulama zaman diliminde tespit edilen transkripsiyon faktörleri....	79
Çizelge 5.11. 6. saat kontrol kütüphanesinde bulunan miRNA'lar	88
Çizelge 5.12. 6. saat uygulama kütüphanesinde bulunan miRNA'lar	89
Çizelge 5.13. 9. saat uygulama kütüphanesinde bulunan miRNA'lar	90
Çizelge 5.14. Elde edilen miRNA'lara ait hedef genlerin annotasyon analizi	91
Çizelge 5.15 6. saat uygulama ve kontrol kütüphanelerinde elde edilen transpozon elementleri	94
Çizelge 5.16 9. saat kontrol ve uygulama kütüphanelerinde elde edilen transpozon elementleri	95

SİMGELER DİZİNİ

18s rRNA	18s ribozomal ribonükleik asit
6OMT	Norkoklaurin 6-O metiltransferaz
Aa	Amino asit
bç	Baz çifti
BIA	Benzilizokinolin alkaloidleri
cDNA	Komplementer deoksiribonükleik asit
COR	Kodeinon redüktaz
°C	Santigrat
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
EST	İfade edilmiş dizi etiketleri
EmPCR	Emülsiyon PCR
ERF	Etilen Cevap Faktörü
g	Gram
Gb	Giga baz
GO	Gen ontolojisi
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
JA	Jasmonik asit
KAAS	KEGG Otomatik Annotasyon Sunucusu
KEGG	Kyoto Gen ve Genom Ansiklopedisi
MeJA	Metil jasmonat
mg	Miligram
MIA	Monoterpenoit indol alkaloidleri
mRNA	mesajcı RNA (messenger RNA)
miRNA(miR)	mikroRNA
ml	Mililitre
mM	Milimolar
NCBI	Ulusal Biyoteknoloji Bilişim Teknolojisi
NCS	Norkoklaurin sentaz
ng	Nanogram
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
pmol	Pikomol
PTP	Pico Titrasyon Plakası

ppm	Milyonda bir
SSR	Basit Dizi Tekrarı
TRAPID	Transkriptom Verisinin Hızlı Analizi
qRT-PCR	Real Time (Eş zamanlı) PCR
RNA	Ribonükleik asit
RNAi	RNA interferens
rpm	Dakikadaki devir sayısı
RT	Ters transkriptaz
SA	Salisilik asit
SalR	Salutaridin redüktaz
sn	Saniye
sff	Standard flowgram format
TMO	Toprak Mahsülleri Ofisi
ToF MS	Uçuş zamanı kütle spektrofotometresi
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TF	Transkripsiyon Faktör
TYDC	Tirozindekarboksilaz
u	Birim
USS	Uygulama sonrası zaman
VIGS	Virüsle indüklenmiş gen susturma

1. GİRİŞ

Ülkemizde ve dünyada tıbbi amaçla kullanılan afyonun üretimi haşhaş (*Papaver somniferum* L.)'dan yapılmaktadır. Dünyada haşhaş ekimi, Birleşmiş Milletler Teşkilatı'nın kontrolü altındadır. Birleşmiş Milletler Teşkilatı, Türkiye, Hindistan, Avustralya, Fransa, İspanya, Macaristan, Çek Cumhuriyeti ve Çin'i yasal ana üretici ülkeler olarak belirlemiştir.

Ülkemize bu kapsamda Birleşmiş Milletler Teşkilatınca 70.000 hektarlık ekim alanı limiti verilmiştir. Bu limit dâhilinde 13 ilde yaklaşık 100.000 üreticiye haşhaş ekimi ve çizilmemiş haşhaş kapsülü üretimi yaptırılmaktadır. Haşhaştan afyon üretimi 1974 yılına kadar haşhaş kapsüllerinin çizimi ile yapılırken bu üretim şekli yasaklanmış ve daha güvenli bir yöntem olan çizilmemiş haşhaş kapsüllerinden yani kuru kapsüllerden alkaloid üretimine geçilmiştir. Bu durum dünyada ülkemizi en güvenilir şekilde afyon alkaloidleri üreten ülkeler arasına sokmuştur (1). Afyon, haşhaşın kapsüllerinden elde edilmekte olup içerisinde çeşitli alkaloidleri yüksek oranda bulundurmaktadır. Birçok önemli alkaloid biyosentezi için öncül bir alkaloid olan tebainin afyon içerisindeki oranı %0,1-2 arasında değişmektedir (2). Kapalı formülü $C_{19}H_{21}NO_3$ olup molekül ağırlığı 311,37 g/mol, erime noktası 193 °C dir. Molekülün adlandırılması; 6,7,8,14-Tetradehidro-4,5-epoksi-3,6-dimeoksi-17-metil morfinan olarak yapılmıştır. Diğer kısa ismi paramorfin olan tebain, kodeinon türevidir ve kodein sentezinde kullanılır. İlaç olarak kullanılmaz, ancak morfinin yanı sıra, kodein, oksikodon, hidromorfon, nalokson, naltrekson, nalbupin ve buprenorfin gibi tedavi amaçlı kullanılan pek çok ilaç etken maddesinin sentezinde önemli bir öncü bileşiktir. Merkezi sinir sistemini uyarıcı özelliği olup oksikodon yapımında kullanılır ve toksik özelliği vardır. Tebain alkaloidini ilk olarak 1835 yılında Pelletier ve Thiboumeriy meydana çıkarmıştır (3). Önceleri morfinin bir izomeri zannedildiğinden dolayı paramorfin olarak adlandırılmıştır (4). Tebain biyosentetik açıdan morfinan grubu alkaloidler arasında ilk oluşandır. Çok sayıda *Papaver* türünde olduğu gibi *P. fugax* Poir. türünde de, bu bileşik yüksek oranda biriken bir terminal sekonder metabolittir. Diğer türler 6 konumundaki karbonda bulunan enol eterinin demetilasyonu için gerekli enzimi taşımadıklarından sadece *P. somniferum* L. tebainden morfini sentezlemektedir. Kodein ve/veya tebainin morfine alternatif oluşturacak şekilde pek çok ilaç etken maddesinin öncül bileşiği olarak kullanımının mümkün olması açısından oldukça önemli bir alkaloid olduğunu göstermektedir. Tebain, morfin ve kodein için öncül molekül olup oksikodon, naltrekson

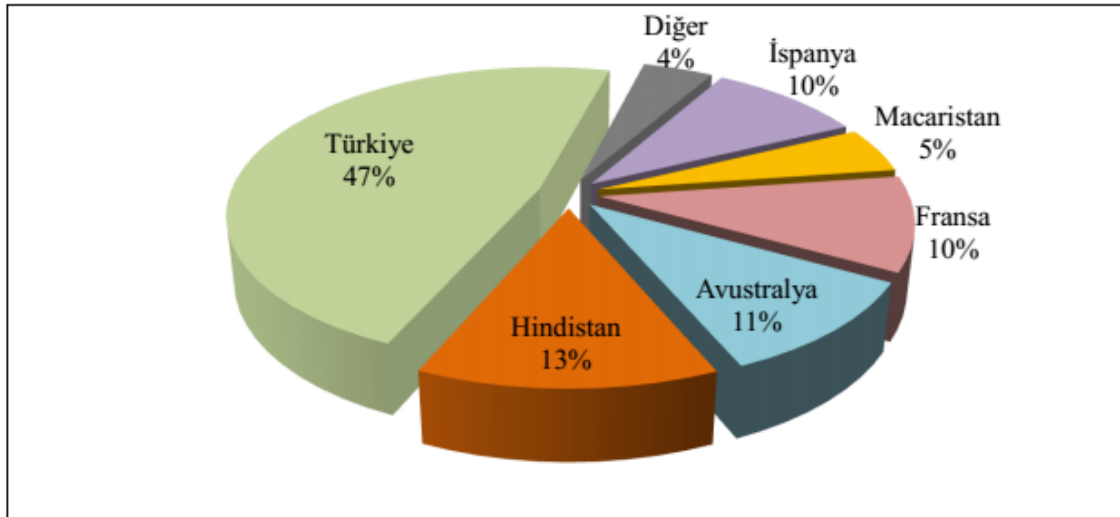
ve buprenorfin gibi analjeziklerin sentezi için kullanılmaktadır. Ancak, bu bileşiklerin çoğu uygulanabilir değildir. Bu alkaloidler çoğunlukla Papaveraceae, Ranunculaceae, Berberidaceae, Menispermaceae familyalarında bulunurken, en çok araştırılan *P. somniferum*, *Eschscholzia californica*, *Thalictrum flavum* ve *Coptis japonica* türleridir (5). Önemli bir alkaloid olan tebainden morfin biyosentezi iki yoldan ilerler. Birinci yol, neopinon üzerinden spontan olarak kodeinon ve ardından kodeinon redüktaz (*COR*) enzimi ile kodein oluşumu ve son olarak kodeinin, kodein demetilaz (*CODM*) enzimi ile metillenerek morfine dönüşümüdür. İkinci yol ise tebainden *CODM* ile oripavin, oripavinin tebain 6-O-demetilaz (*T6ODM*) enzimi ile morfinon ve ardından *COR* enzimi ile morfin oluşumudur. Daha önce yapılan bir çalışmada da fonksiyonel genomik kullanarak tebain *T6ODM* ve *COMD* enzimlerini izole edilmiştir. (6). Yapılan çalışmada yüksek tebain ve oripavin içeren, ancak morfin ve kodein içermeyen *top1* (thebaine oripavine poppy 1) mutantları ile morfin biriktiren 3 farklı varyetenin gövde dokusu transkriptomları karşılaştırılmıştır. Radyoaktif ara ürünler, *top1* mutantında tebain ve oripavin'den sonraki basamaklarda bir blok olduğunu göstermiştir. Bu bloğun tebain ve oripavin'in her ikisinin de 6-O-demetilasyonundan sorumlu tebain demetilaz enzimideki bir kusurdan kaynaklandığı düşünülmektedir. Morfinin enzimatik sentezi hemen hemen açıklanmış olmasına rağmen morfinyan kolundaki genler, bunların koordinasyonu ve regülasyonu hakkındaki bilgiler halen yetersizdir. Bu bilgiler ışığında, yeni teknolojilerden biri olan Roche GS-454 FLX+ (pirosekanslama) transkriptom analizi ile günde yaklaşık 1 Gb veri okuma yapabilmektedir. Yeni genlerin keşfinde oldukça yaygın kullanılan bir sistem olup, doğruluğu, güvenilirliği ve yüksek hacimli özelliğinin yanında uzun okumaları yapabilen benzersiz bir sistemden oluşmaktadır. Roche GS-454 FLX+ ile çeşitli bitkilerde transkriptom profillemesi çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalara örnek verilecek olursa, daha önce yapılmış bir çalışmada *Gossypium herbacuum* L.'ye ait iki aksesiyonun kuraklığa karşı durumunu genom düzeyinde geniş ekspresyon profilli yaparak ortaya koymuşlardır (7). Başka bir çalışmada Roche GS-454 FLX+'i kullanarak bir orchid türüne ait yaprak dokularında kuraklığa karşı transkriptom analizi yapılmıştır (8). Diğer bir araştırmada *Phalaenopsis orchids* için Roche GS-454 FLX kullanarak yeni genleri tespit edilmiş ve EST geliştirilmiştir (9). Aynı zamanda *Salvia miltiorrhiza* bitkisinde de transkriptom analizi için oldukça güvenilir ve yüksek hacimli okuma özelliğine sahip Roche GS-454 FLX platformu kullanılmıştır (10).

İlaç endüstrisini besleyen önemli kaynaklardan biri de tıbbi bitkilerdir. Bu bitkilerin sahip olduğu önemli bileşiklerin biyosentez mekanizmalarının aydınlatılması, metabolik mühendisliği ile miktarının artırılması için ön basamaktır. Bu çalışmada, Roche GS-454 FLX+ cihazı kullanılarak yüksek tebain üretimine sahip olan haşhaş çeşitlerinde MeJA muamelesi sonucunda, 6 ve 9. saatlerde gen ifadesindeki farklılıkların tüm transkriptom düzeyinde belirlenmesi amaçlanmıştır. Bütüncül tarama yapılarak tebain üretim mekanizmasında rol alan genlerin ifade seviyelerindeki farklılıkların belirlenmesi ve genlerin birbirleriyle olan koordinasyonu ile ilgili bilgiler elde edilmeye çalışılmıştır. Belirlenen genlerin bazıları için eş zamanlı PZR analizi ile doğrulama deneyleri yapılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Haşhaş (*Papaver somniferum* L.)

Haşhaş bitkisi sistematik olarak Papaveraceae familyasının içerisinde yer alan *Papaver* cinsine aittir. Bu familyaya ait bilinen 28 cins ve yaklaşık 250 tür yeryüzünün kuzey yarım küresinde ılıman ve subtropik bölgelerde yayılış göstermektedir. Ülkemizde bu familyaya ait 5 cins bulunmaktadır (11, 12). Söz konusu bitki, *Papaver somniferum* L. bilimsel ismini taşımakta olup tek yıllık bir kültür bitkisidir. Latince de papaver, gelincik anlamına gelirken, somniferum ise rüya görmek' veya 'uyku verici' anlamına gelmektedir (13). Haşhaş bitkisi ülkemizde özellikle Orta Anadolu da Hititler zamanından bu yana yetiştirilen ülkemizin en önemli endüstriyel ve tıbbi bitkilerinden bir tanesidir. Dünyada haşhaş ekimi Birleşmiş Milletler Teşkilatı denetiminde yasal ana üretici olarak Türkiye, Hindistan, Avustralya, Fransa, İspanya, Macaristan'da yapılmaktadır (Şekil 2.1). Haşhaş iklimsel olarak Anadolu da fazla yağışlı Doğu Karadeniz ve fazla sıcak olan Güneydoğu Anadolu Bölgeleri hariç hemen her bölgede yetiştirilir (Şekil.2.2). Türkiye ve Hindistan Birleşmiş Milletler Teşkilatınca geleneksel haşhaş üreticisi ülkeler olarak kabul edilmektedir.



Şekil 2.1. Dünya Yasal Haşhaş Ekim Alanları (2013 yılı Haşhaş Raporu, Toprak Mahsülleri Ofisi, 2014, www.tmo.gov.tr).

Ülkemizde haşhaş ekimi 3298 Sayılı uyuşturucu maddelerle ilgili kanun ve yönetmelik çerçevesinde lisansa tabi olup, kontrollü ve çizilmemiş haşhaş kapsülü üretimi şeklinde

yapılmaktadır. Bakanlar Kurulunca haşhaş ekimine müsaade edilen yerlerde Toprak Mahsulleri Ofisi Genel Müdürlüğü'nce yapılan planlama çerçevesinde Birleşmiş Milletler Teşkilatınca ülkemize verilen 700.000 dekar limiti dahilinde haşhaş ekimi ve çizilmemiş kapsül üretimi yaptırılmaktadır (13).



Şekil 2.2. Türkiye’de haşhaş ekimine izin verilen iller (2013 yılı Haşhaş Raporu, Toprak Mahsulleri Ofisi, 2014, www.tmo.gov.tr)

Ülkemizde haşhaş bitkisi hem gıda amaçlı hemde sentezlediği önemli alkaloitler (morfin, kodein, tebain ve sanguarin) nedeniyle tıbbi amaçlı olarak üretilmektedir (13). Haşhaş bitkisi özellikle narkotik, morfin, öksürük kesici kodein, antimikrobiyal ajanlar, sanguarin ve berberin ile kas gevşetici papaverin, güçlü antineoplastik (antikanserojen) noskabin ve son olarak morfin ,kodein gibi alkaloitlerin biyosentezi için önemli bir öncül olan tebain alkaloitini başta olmak üzere benzilizokuinolin tipi alkaloitini üretebilen bir bitkidir. Tıbbi öneme sahip olan ana alkaloitlerin yanı sıra yaklaşık 30 adet değişik alkaloitleri ihtiva ettiği bilinmektedir (14).

2.2. Haşhaş (*Papaver somniferum L.*) 'da Alkaloit Sentez Mekanizması

2.2.1. Alkaloitler

Alkoloid bitkilerden elde edilen, genellikle kuvvetli fizyolojik ve farmakodinamik aktivite gösteren, halka içinde bir veya birden fazla azot taşıyan, bazik karakterli maddelerdir. Ayrıca alkaloitlerin canlı fizyolojisi üzerinde kuvvetli etkileri bulunmaktadır. Alkaloitler bitkilerde özellikle biyotik ajanlara karşı savunma amaçlı sentezlenir (14). Potansiyel

biyolojik aktivitelerine bağlı olarak bilinen yaklaşık 12.000 alkaloid, farmasötik, uyarıcı, narkotik ve zehir olarak kullanılmaktadır (14, 15). Alkaloidler yüksek bitkilerde bol miktarda bulunur. Yüksek bitkilerin en az %25'i bu molekülleri içerir. Genellikle bir bitkinin alkaloid bitkisi olup olmadığını göstermek için söz konusu bitkide alkaloid içeriğinin minimum %0.01 değerine sahip olması beklenir. Bu bağlamda bu bitkilere, alkaloid içeren bitkiler olarak bir tanımlanma getirilebilir (21). Genel olarak alkaloidler, bir türe ya da o türe yakın türlere özel olmasının yanında, bir kısmı alkaloid ise sadece bir familyaya özgü olduğu bilinmektedir. Alkaloidler kimyasal özellikleri bakımından suda az, organik ve benzeri çözücülerde ise daha fazla çözünürler (22, 23).

Bilinen alkaloid çeşitleri şunlardır:

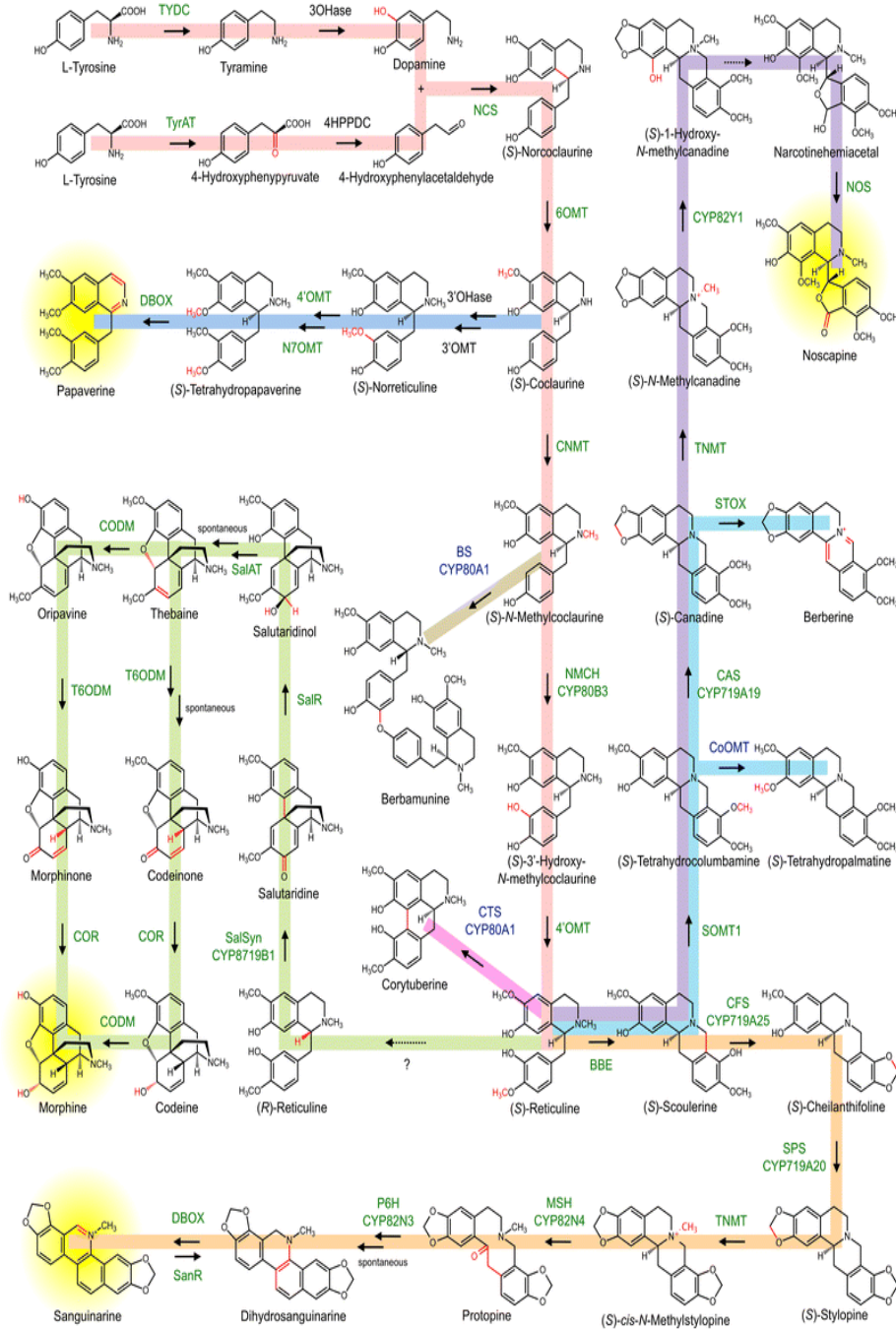
- Monoterpenoid indol alkaloidleri,
- Tropan alkaloidleri ve nikotin,
- Pürin alkaloidleri,
- Pirolizidin alkaloidleri,
- Kuinolizidin alkaloidleri,
- Benzilzokinolin alkaloidleri (BIA).

Haşhaş bitkisinde sentezlenen önemli alkaloidler ise benzilzokinolin alkaloidleri (BIA) sınıfında yer almaktadır (5, 15, 16).

2.2.2. Benzilzokinolin alkaloidleri (BIA) ve sentez mekanizması

L-tirozinin bir türevi BIA'nın biyosentezi, karmaşık biyokimyasal bir ağa sahip olmakla beraber yer aldığı moleküller arası bağlanma, indirgenme, metilasyon ve hidroksilasyon gibi birçok tepkime sonucunda, bilinen 2500 civarında değişik yapılar meydana gelmektedir (17). Farmasötik olarak kullanılan diğer benzilzokinolin alkaloidler, antimikrobiyal ajanlar olan sanguinarin ve berberin, öksürük kesici ve güçlü antineoplastik (antikanserojen) noskapin, damar genişletici papaverin, kas gevşetici (+)-tubokurarinindir. Tebain, morfin ve kodein için öncül molekül olup oksikodon, naltrekson ve buprenorfin gibi analjeziklerin sentezi için kullanılmaktadır. Ancak, bu bileşiklerin çoğu uygulanabilir değildir. Bu alkaloidler çoğunlukla Papaveraceae, Ranunculaceae, Berberidaceae, Menispermaceae familyalarında bulunurken, en çok araştırılan türler *P. somniferum*, *E. californica*, *T. flavum*, *C. japonica* türleridir (17). Haşhaşta sentezlenen başlıca alkaloidler şunlardır; Morfin türevi alkaloidlerinden morfin, kodein, tebain ve oripavin; fitalideizokinolin alkaloidlerinden noskapin; basit benzilzokinolin alkaloidlerinden

papaverin; ve benzofenantridin alkaloidlerinden sanguinarin (5). Bu bileşikler ve ilgili yollarda günümüze kadarki bilgiler ışığında yer alan enzimlerle ilgili tüm detaylar Şekil 2.3’de gösterilmektedir (18).



Şekil 2.3. Haşhaştaki alkaloid biyosentez yolunun özeti (Beaudoin ve Facchini, 2014)

Oldukça önemli bir benzilisokinolin alkaloidi olan tebain, morfin ve kodein gibi alkaloidlerin sentezi için bir kaynak olarak görev almaktadır. Bu bağlamda tebainden morfin biyosentezi özetlenecek olursa; bu biyosentez olayı iki yoldan ilerler. Birinci yol, neopinon üzerinden spontan olarak kodeinon ve ardından kodeinon redüktaz (*COR*) enzimi ile kodein oluşumu ve son olarak kodeinin, kodein demetilaz (*CODM*) enzimi ile metillenerek morfine dönüşümüdür. İkinci yol ise tebainden *COMD* ile oripavin, oripavinin tebain 6-O-demetilaz (*T6ODM*) enzimi ile morfinon ve ardından *COR* enzimi ile morfin oluşumudur. *COR* enzimi haşhaştan saflaştırılmış ve klonlanmıştır (19). Bütün *Papaver* türlerinde bulunduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte, *COR* çoklu gen ailesi tarafından kodlanmakta, hem enzimler hem de transkriptleri dokularda gelişim süreci boyunca bulunmaktadır (20-22). Morfin biyosentezinin son basamağı iki demetilasyon ve bir redüksiyon içerir. Daha önce yapılan bir çalışmada, fonksiyonel genomik kullanarak tebain *T6ODM* ve *COMD* enzimlerini izole edilmiştir (6). Yapılan çalışmada yüksek tebain ve oripavin içeren, ancak morfin ve kodein içermeyen topl (thebaine oripavine poppy 1) mutantları ile morfin biriktiren 3 farklı varyetenin gövde transkriptomları karşılaştırılmıştır. *T6ODM* ve *COMD* enzimlerinin metabolik işlevlerini belirlemek için bu enzimlere ait transkriptler VIGS (Virus Induced Gene Silencing, Virüsle İndüklenmiş Gen Susturma) yöntemi ile susturarak belirtilmiştir. Bu bağlamda toplam alkaloid miktarındaki artış, morfin, kodein ve tebain miktarındaki artışa bağlanabilmektedir (23).

COR enziminin miktarının artmasıyla birlikte morfin ve kodeinde artış beklenebilir olmakla birlikte tebaindeki artış tahmin edilmeyen bir durumdur, çünkü tebain oluşumu *COR* enziminin aktivite göstermesinden önce gerçekleşmektedir. Tebain miktarındaki artışın sebebi morfin ve kodein miktarının artması sonucunda demetilasyon basamaklarının geri besleme inhibisyonu ile sonuçlanması ya da tebainin morfin ve kodein biriktiren veziküllere geçişinin engellenmesi olabileceği belirtilmiştir (24). Radyoaktif ara ürünler, *top1* mutantında tebain ve oripavin'den sonraki basamaklarda bir blok olduğunu göstermiştir. Bu bloğun tebain ve oripavin'in her ikisinin de 6-O-demetilasyonundan sorumlu tebain demetilaz enzimidaki bir kusurdan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Alkaloid sentez yolağının regülasyonunun anlaşılması için pek çok çalışmalar yapılmıştır. RNAi kullanılarak *COR* enziminin fazla ifadesi ile morfin ve türevlerinin artırılmasının hedeflendiği bir çalışma sonucunda, *COR* enziminin miktarının artmasıyla birlikte toplam alkaloid miktarında %28, morfin miktarında %22 ve kodein miktarında %58'lik artış, miktarında artış olmakla birlikte, beklenmeyen tebainde ise %75 oranında bir artma ile karşılaşılmıştır (24). Aslında yolakta tebain oluşumu *COR* enziminin aktivite

göstermesinden önce gerçekleşmektedir. Genetik olarak müdahale edilmemiş haşhaş bitkisinde normalde toplam alkaloid miktarının %22'si S-retikulin ve metillenmiş türevlerinden oluşmaktayken *COR* geninin susturulduğu bir çalışmada %25'lik bir artış saptanmıştır (25). *BBE* geni susturulmuş ve sonuçta sanguarinin kontrol edildiği gösterilmiştir. *CYP80B3* geni haşhaşa aşırı ürettirilmiş ve toplam alkaloid miktarında %450 artış saptanmış ve tebain ile oripavin alkaloidinde azalma tespit edilmiştir (26). *SalAT* geninin aşırı ifade ettirilmesi sonucu tebain, morfin, kodein miktarında artış saptanmış ve tüm alkaloid içeriğini yaklaşık %40 oranında arttırılmıştır (27). *SalAT* geninin susturulması sonucu ise salutaridinde beklenmedik bir azalma ve tebain ile kodeinde düşme gözlenmiştir (28). Alkaloid sentez yolağının tüm yönleriyle aydınlatılabilmesi için yapılan moleküler çalışmaların miRNA yönüyle eksik kaldığı görülmektedir. Yolaktaki genlerin transkripsiyonunun regülasyonunda yer alan miRNA'ların tespit edilmesiyle, susturulan veya aşırı ifade ettirilen genlerin beklenmeyen sonuçlarının kolaylıkla açıklanabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, yönlendirmelerin ve metabolik mühendisliği uygulamalarının daha ayrıntılı yapılması sağlanabilecektir.

2.2.3. Haşhaş bitkisinde yapılmış proteomik, transkriptomik ve metabolomik çalışmalar

Haşhaş bitkisindeki görülen ilk fonksiyonel genomik çalışma temel amaç olarak, 2D SDS-PAGE yapılması ile latekste bulunan proteinler ve bunlara ait peptid dizilerinin tanımlanmasıdır. Ardından homoloji yapılarak genlere ait diziler klonlanmış ve bu anlamda rekombinant proteinler elde edilmiştir (29). *P. somniferum*'a özgü elde edilen *BBE* cDNA'sı, endüstriyel hat olan C048-6-14-64'e antisens yönünde transforme edilmiş ve bu bitkilerin transformasyonu PZR, Northern ve Southern hibridizasyon teknikleri ile teyit edilmiştir. Bu değerlendirme sonucunda transgenik bitkilerin aktarılan genin bir ek kopyasını taşıdığı görülmüş ve bunun akabinde lateks ve köklerdeki alkaloid içeriği analitik yöntemler olan HPLC ve LC-MS ile belirlenmiştir. Bütün biyosentez kollarında S-Retikülin, laudanın, laudanozin, dehidroretikülin, salutaridin ve (S)-skolerin gibi çeşitli ara ürünlerin derişimlerinin arttığını bulunmuştur (26). Yapılan başka bir çalışmada da morfin ve kodein öncülleri olan tebain ve oripavin biriktiren, ancak morfin ve kodein biyosentezini tamamlanması istenmeyen *top1* olarak adında bir haşhaş mutant ortaya konmuştur (30). Buna göre, mutajenle muamale edilmiş kültür haşhaşlarının bir sonraki generasyonlarına bakıldığında, mutant bitkilerin tebain veya oripavin biriktirdiği, ancak morfin veya kodein biriktirmediği gözlemlenmiştir. Ayrıca, 375 F2 bireyin açılımının sabit

olduğu gözlenmiş dolayısıyla Mendel açılımına uygun ve tek genle ifade edildiği bulunmuştur. Mutantın dış görünüşünde görebilecek tek farklılık lateksin normal beyaz görüntüsünden daha koyu olması olduğu da gözlemlenmiştir. Yani pigmentasyonun bir anlamda fazla olduğu ön görülmüştür. Ayrıca lateksteki bu renk değişiminin tebain için fenotipik bir markör olabileceğini de belirtilmiştir. Bir diğer çalışmada, *P. somniferum* 'da morfin yerine diğer benzilzokinolin alkaloidlerini üreten 8 *Papaver* türünün doku kültür hatları arasındaki ifade farklarını bulmak için AFLP tekniği tekniğine dayanan makroarray çalışması yapılmıştır (31). Ayrıca BlastX analizleri sonucunda elde edilen unigenlerin %50'si fonksiyonel olarak kategorilere ayıramamıştır. Kategorilere ayrılanların ise %16'sı metabolizmadaki proteinleri kodlayan unigenler, %11,6'sı hücre büyümesi ve bölünmesi ile protein sentezinden sorumlu unigenler, %5,9'u hücresel iletim/sinyal iletimini kodlayan genler ve bunların yanı sıra stres cevabı ve redoks kontrolünden sorumlu genler olduğu belirlenmişlerdir. Total transkript sayısı incelendiğinde benzer bir dağılım olduğu sadece tek belirgin farklılığın, fotosentezde görev alan proteinlerde olduğunu gözlemlenmiştir ve bunun bir nedeni olarak da muhtemelen klorofil a/b bağlanma proteinlerini ve rubisko aktivazı kodlayan dizilerin yüksek olduğundan kaynaklı olabileceği öngörülmüştür. *P. somniferum* 'da fungal elisitörle indüklenmiş haşhaş hücre kültüründe gen transkriptleri ve metabolit profillerinin çıkarılması sonucundaki çalışmada cDNA kütüphanesinden izole edilen 10.224 rastgele klonlanmış olan EST veri tabanı oluşturulmuş ve en fazla bulunan EST'lerin sırası ile savunma cevabı proteinleri, BIA enzimleri ve S-adenozilmetiyonin bağlı metil transferazları ve fenilpropanoid biyosentezinde yer alan transkriptler olduğu ortaya konulmuştur. Meydana gelen en fazla artışın BIA enzimleri ve savunma proteinlerinin transkriptlerinde olduğu belirlenmiştir. Bununla beraber bütün sanguinarin biyosentetik gen transkriptlerine ek olarak primer metabolik enzimlerini kodlayan transkriptlerde de belirgin bir artışın meydana geldiği bildirilmiştir (32). Elisitör ile muamele edilmiş haşhaş hücre kültürü veri tabanından rastgele 6.048 cDNA seçilerek mikroarray deney dizaynı gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında elisitör ile muamele edildikten bir saat sonraki hücre kültürlerinden elde edilen genlerin ifade seviyelerinde ciddi manada hızlı bir artış gözlenmiştir. Transkript birikimindeki değişimin durumu elisitör eklendikten 5 ile 30 saat sonra en yüksek seviyelere çıkmıştır. Elisitör muamelesinden 12 saat sonra çoğu transkriptin seviyeleri başlangıç (0. Saat) transkript seviyeleri ile karşılaştırıldığında yavaş yavaş azalmasına rağmen artanların sayısı azalanların sayısından belirgin bir şekilde daha fazla olduğu bulunmuştur. Bu transkriptlerin yanı sıra şeker katabolizması, şikimat yolağı ve aromatik aminoasit

metabolizması gibi primer metabolizmada görevli mRNA'larında elisitör muamelesi sonucunda indüklendiğini gözlemlenmiştir (32). *P. somniferum* bitkisinde RNAi kullanılarak *COR* enzimini kodlayan genin fazla ifadesi (overekspresyonu) ile morfinan alkaloidlerinin arttırılması amaçlanmıştır. Hem serada hem de tarlada yetiştirilen transgenik hatların ikisine de ait kapsüllerindeki alkaloid seviyelerinde dört yıl sonra belirgin bir artış gözlemlenmiştir. Kuru ağırlık bazında değerlendirilen alkaloid içerikleri, yüksek verimli genotipleri ve transgenik olmayan kontrol bitkilerden %15 ile %30 arasında daha yüksek elde edilmiştir. Morfin, kodein ve tebain miktarındaki artışın toplam alkaloid artışına neden olabileceği kanaati güçlenmiştir. Ayrıca *COR* geni ifadesinin artmasıyla birlikte morfin ve kodeinde artış beklenirken tebaindeki artışın tahmin edilmeyen bir durum olduğu bildirilmiştir. Çünkü tebain oluşumu *COR* enziminin aktivite göstermesinden önce gerçekleşmektedir. Tebain miktarındaki artışın bir sebebi olarak ta morfin ve kodein miktarının artması sonucunda demetilasyon basamaklarının feedback inhibisyonu ile sonuçlanması ya da tebainin morfin ve kodein biriktiren veziküllere geçişinin engellenmesi olabileceğini ortaya konmuştur (24). Haşhaşın alkaloid içeriğinde değişikliklere sebep olabilecek başka bir durum olarak da *SalAT* gen ekspresyonunun düzenlenmesi olmuştur. Bunun bir sonucu olarak *SalAT* transgeninin aşırı ifadesinin bir çıktısı olarak alkaloid içeriğini yaklaşık %40 oranında arttırdığı belirlenmiştir. Diğer taraftan *SalAT* transkriptlerinin normal seviyenin yaklaşık onda biri kadar RNAi ile susturulması salutaridin molekülünün beklenmeyen birikimiyle sonuçlanmıştır. Bu olayın bir açıklaması olarak da *SalAT*'ın substratı olan salutaridinolün, tekrar geri dönüşümlü çalışan *SalIR* enzimi ile salutaridine dönüşümü olarak düşünülebileceği olarak belirtilmiştir (33).

Bir diğer çalışmada fungal elisitör ile muamele edilmiş haşhaş hücre kültürlerinden farklı zamanda alınan örnekler ile cDNA kütüphanesi oluşturularak 454 GS-FLX Titanium ile pirosekanslama yapılarak transkriptom profili ortaya konmuştur (34). Yapılan örneklerde önemli bir kaç tane retikülin, protopin ve sanguinarin gibi alkaloid içerikleri belirlenmiştir. Çalışmanın sonucu olarak retikülin tüm zaman dilimlerinde az seviyede belirlenmiş, ancak bu ortak ara ürünün seviyesi elisitör uygulamasından 50 saat sonra azalmıştır. Uygulamanın başlangıç zamanlarında protopin ve sanguinarin alkaloidleri belirlenememiştir. Ancak sonraki zaman dilimlerinde ise her iki alkaloid seviyesinde de artma olmuştur. Sanguinarin birikimi ilginç olarak 10 ve 50 saat sonra gerçekleşmiştir. Muameleden sonraki yüzüncü saatte sanguinarin seviyesi retikülin veya protopin seviyesinden 40 kat daha fazla bulunmuştur. Pirosekanslama ile oluşturulan transkript

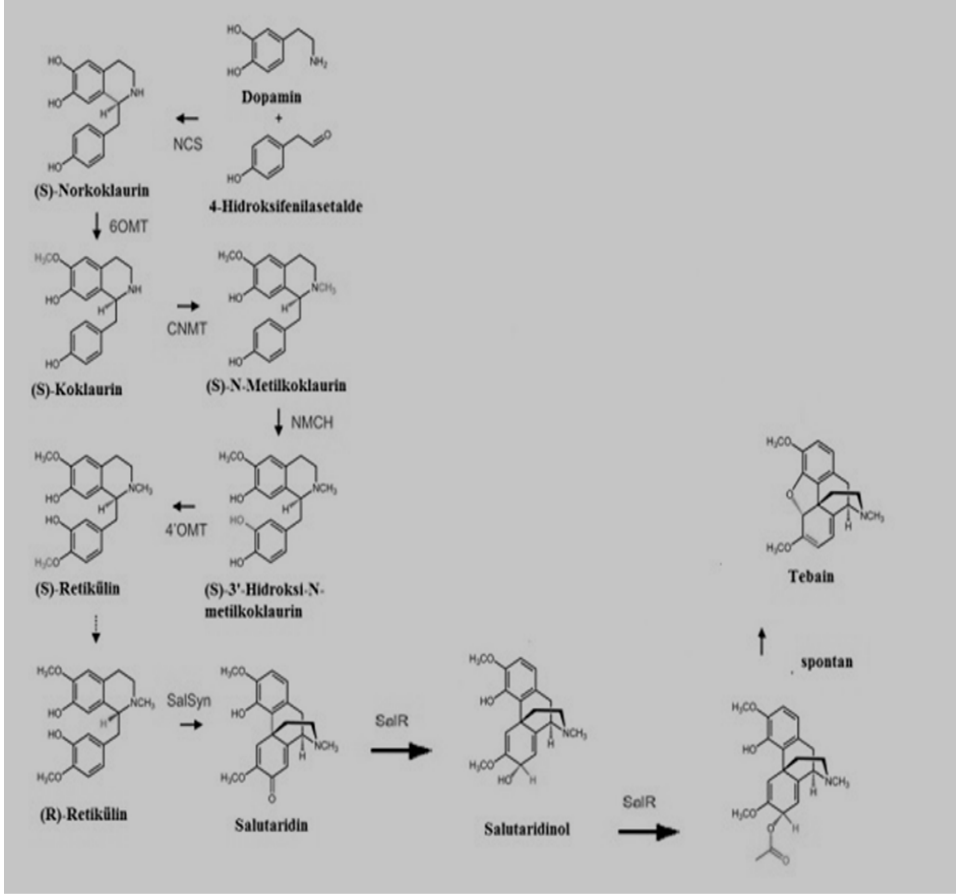
okumalarının raporunda ise, ortalama 462 bç uzunluğunda 427,369 yüksek kaliteli EST elde edilmiştir. Ayrıca, 93,723 unigenden 37,329 (%39,8) tanesi 2 veya daha fazla kontig içerirken 56,934 tanesi tek unigen dizisine sahip olmuştur. BLASTX analizleri sonucunda 73,496 tanesi bilinen genlerle benzerlik gösterirken 20,227 tanesi bilinen hiçbir genle benzerlik göstermemediği analizler sonucunda ortaya konmuştur. Savunmada yer alan kitinaz, β -laktamaz, polifenol oksidaz, ksiloglukonaz inhibitörü, peroksidaz ve PR proteinlerini kodlayan transkriptlerin de oldukça fazla bulunduğu görülmüştür. Sadece bitkilerde bulunan bir transkripsiyon faktörü ailesi olarak bilinen *WRKY* genleri, hem abiyotik hem de biyotik stresler sırasında aktif hale gelerek stres genlerinin ekspresyonunu düzenlemektedirler (35). Çeşitli biyosentetik genlerin regülasyonunda yer alan *Coptis japonica* bitkisinden izole edilmiş *WRKY* proteinini (*CjWRKY1*) kodlayan cDNA'nın tanımlanması BIA metabolizmasında ilk keşfedilen transkripsiyonal düzenleyicidir (35). Haşhaş bitkisinde yapılan başka bir çalışma da, yaralanma ile indüklenen *PsWRKY* olarak isimlendirilen EST belirlemişlerdir (36). Bu bağlamda, haşhaşta yer alan ve alkaloit sentez yolağı ile ilişkili miRNA'ların saptanması amacıyla bitkinin çeşitli dokularına ait küçük RNA kütüphaneleri yüksek işlem hacimli Illumina Solexa teknolojisi ile dizilerek farklı doku örneklerinden izole edilen RNA'lar ile miRNA mikroarray uygulaması yapılmıştır. Haşhaş bitkisinde, alkaloit sentez mekanizmasının regülasyonunu sağlayan 23 adet miRNA bu çalışma kapsamında tespit edilmiştir. Bu miRNA'lardan ps-miR13 ve ps-miR408' in doğrudan alkaloit sentezinde yer alan genleri hedeflediği belirlenmiştir (37).

2.2.3. Haşhaşta tebain biyosentezi ve hücredeki taşınım mekanizması

Dopamin, tebainin de içinde bulunduğu BIA alkaloitlerdeki izokinolin kısmının öncülü iken tiraminin deaminasyonundan oluşan 4-hidroksifenilasetaldehit, benzil bileşeni olarak katılmaktadır. Monoterpenoit indol alkaloitleri (MIA) biyosentezinde olduğu gibi BIA biyosentezi de Pictet-Spengler (38)tip reaksiyondur ve sentez yolunun ilk kararlı adımı norkoklaurin sentaz (*NCS*) ile katalizlenir (39). *NCS*, dopamin ve 4-hidroksifenilasetaldehiti birleştirerek C-C köprüsünün oluşumuyla (S)- norkoklaurini oluşturur dolayısıyla 1- benzilizokinolin ana yapısı da meydana gelmiş olur. (S)- norkoklaurin bitkilerde tebain dahil tüm BIA sentezi için merkezi öncül moleküldür (40). (S)- Norkoklaurinin (S)-retikuline dönüşümü 6. pozisyondaki O-metilasyon, Nmetilasyon, 3'-hidroksilasyon ve ikinci bir 4-O-metilasyonu içerir Şekil (2.4). Norkoklaurin 6-O metiltransferaz (*6OMT*) ve 3-hidroksi-N-metilkoklaurin 4-O-metiltransferaz (*4-OMT*) II. sınıf O-metiltransferazlardır ve sıkı bir bölge spesifik özellik göstermektedirler. *NCS*

enziminin yanı sıra sitokrom P450 (*CYPs*) gibi oksidoredüktaz enzimler de çeşitli BIA ana iskelet yapılarını oluşturmak için C-C veya C-O bağlarının oluşumunu katalizlemektedirler (41). (S)-retikulin, tebain sentez yolunda, merkezi ara üründür (17). Retikülinen itibaren devam eden çoğu biyokimyasal reaksiyon, retikülin molekülünün (S) epimeri ile başlasa da morfinan alkaloid biyosentezi için (R) epimerinin oluşması, ilk kararlı basamaktır (42). Benzil C2 ve izokinolin C4a kısmı arasındaki molekül içi karbon-karbon eşleşmesi tebain sentezi için önemli bir basamak olan salutaridin oluşumuna önderlik etmektedir. Bu enzim P450 monooksijenaz ailesine aittir (43). Tebain sentez yolundaki bir sonraki basamak salutaridin redüktaz (*SalR*) enzimi tarafından katalizlenir (44). Salutaridin stereospesifik redüksiyonu salutaridinol 7-O-asetiltransferaz (*SalAT*) tarafından katalizlenen bir sonraki basamak için gereklidir. Bu enzim, özellikle salutaridinolun 7 (S)-epimerini, salutaridinol-7-O-asetat asetiller ve bu asetil grubu sentez yolunun ilk pentasiklik alkaloidi olan tebaini oluşturmak için kendiliğinden yok edilir (19). Rekombinant enzim, salutaridinol molekülününün 7-hidroksil kısmını asetil-CoA varlığında asetillemiştir. Salutaridinol 7-O-asetat tebain sentaz (*THS*) enzimi ile tebaine dönüştürülür (Şekil 2.4). Meydana gelen tebain, morfin ve kodein için öncül molekül olup oksikodon, naltrekson ve buprenorfin gibi analjeziklerin sentezi için kullanılmaktadır. Örneğin tebainden morfin biyosentezi iki farklı yoldan ilerlemektedir. Birinci yol neopinon üzerinden spontan olarak kodeinon ve ardından kodeinon redüktaz (*COR*) enzimi ile kodein oluşumu ve son olarak kodeinin, kodein demetilaz (*CODM*) enzimi ile metillenerek morfine dönüşümüdür. İkinci yol ise tebainden *COMD* ile oripavin, oripavinin tebain 6-Odemetilaz (*T6ODM*) enzimi ile morfinon ve ardından *COR* enzimi ile morfin oluşumudur (20, 45).

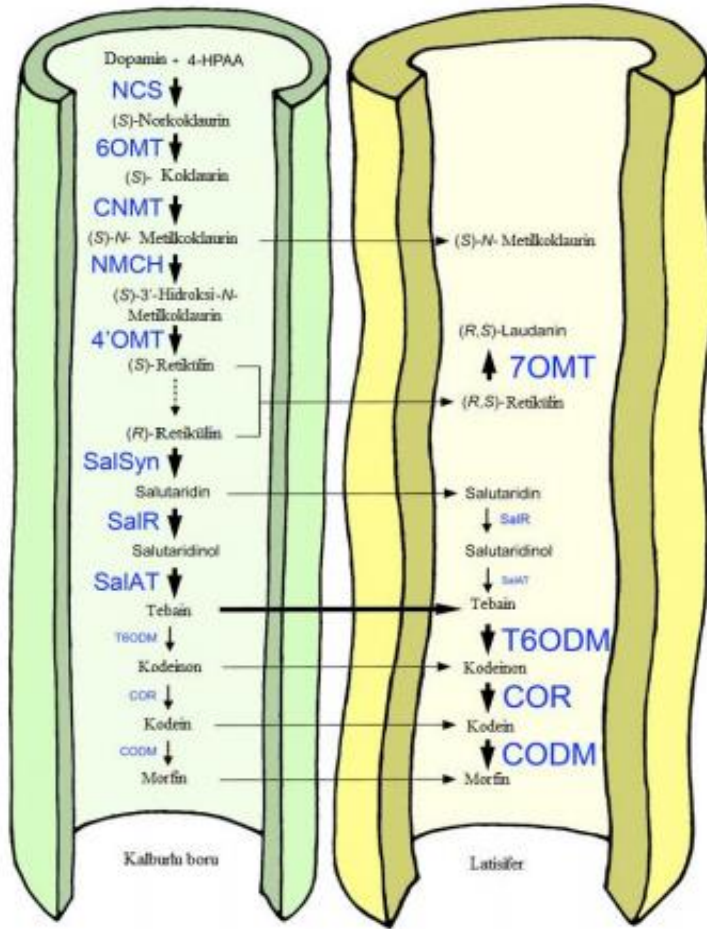
Hücrede sentezlenen tebainin bitkinin hangi dokularında depolandığı ve öncü bir alkaloid olarak depolanan tebainin diğer alkaloidlere dönüşümünün nasıl bir transfer mekanizmaya sahip olduğunun ortaya çıkması tebain biyosentezini anlamak için önem arz etmektedir. Bu bağlamda tebain alkaloidi de dahil haşhaşa alkaloidler genel olarak latisifer adı verilen özelleşmiş hücrelerde depo edilirler. BIA birikimi floemin kalburlu boru hücrelerine bitişik veya yakın latisiferlerde meydana gelmektedir (17, 46). Latisiferlerin veya lateksin sitoplazması tüm hücresel organelleri ve alkaloidlerin çoğu ayrıştırılarak depolanmış geniş vezikülleri içerir. Morfin, kodein ve tebain hem kökte hem de bitkinin toprak üstü kısımlarında bulunur, özellikle de latisiferlerdeki veziküllerde biriktirilir, sanguinarin ise kök dokusunda biriktirilmektedir (47).



Şekil 2.4. Haşhaşta tebain biyosentez yolunu gösteren aşamalar (Onoyovwe *vd.*, 2013'ten değiştirilerek alınmıştır)

BIA metabolizma bileşenlerinin, latisiferlerden uzak floem hücrelerindeki lokalizasyonu alkaloid biyosentez enzimlerinin ve biyosentez yolu ara ürünlerinin hücreler arası taşındığını göstermektedir. Son zamanlarda kalburlu boru elemanlarının jasmonik asit (48), askorbik asit (49) ve savunmayla ilgili bileşiklerin (50) biyosentezini de içerdiğini açıklamaktadır (42). Alkaloid biyosentez enzimlerinin subselüler kompartmantalizasyonu, gen transkriptlerinin, enzimlerin ve metabolitlerinin hücre tipi özellikli lokalizasyonu kadar karmaşıktır. Endoplazmik retikulum alkaloid oluşumu için tercih edilen bölge olmasına rağmen biyosentez enzimleri kloroplast tilakoid membranlarında, mitokondrilerde, vakuollerde ve sitozolde bulunmaktadır. Yolak enzimleri arkadaş hücrelerinde toplanır, ardından alkaloid biyosentezine katılmak için kalburlu boru elemanlarına taşınır (Şekil 2.5). En sonunda alkaloidler her zaman kalburlu boru elemanları/arkadaş hücresi çiftlerine yakın veya uzak olan latisiferlerde birikir (51). Ayrıca *in situ* hibridizasyon ile tebain enzimleri salutaridin sentaz (Cyp719B1) ve salutaridin *NADPH* 7-oksidoredüktaz (SalR) latekste belirlenmemiştir (43). Diğer yedi tane tebain biyosentezi etkileyen enzimler olan 6-OMT, CNMT, (S)-N-metilcoclaurine 3 - hidroksilaz (Cyp80B1), 4-OMT, BBE, SalAT ve COR

haşhaşın kalburlu boru hücrelerinde lokalize olmuş ve bu enzimlere karşılık gelen gen transkriptleri de arkadaş hücrelerinde belirlenmiştir (39, 51, 52). Ancak, fungal elisitör ile muamele edilmiş hücre süspansiyon kültürlerinde enzim aktivitesinin daha fazla olduğu gözlenmiştir (39). Diğer taraftan salutaridinden tebaine dönüşümün öncelikli olarak kalburlu borularda olduğunu ancak aynı zamanda latisiferlerde de olabileceğini ve tebainden morfine dönüşümünde yoğun olarak latisiferlerde ama kalburlu borularda da olabileceğini belirtilmiştir (53) (Şekil 2.5).



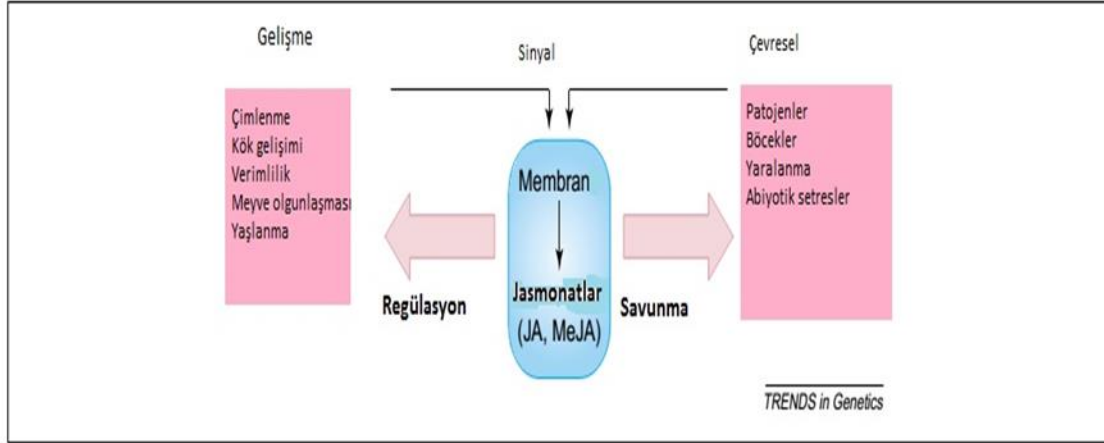
Şekil 2.5. Haşhaşta kalburlu boru ve latisiferlerde tebain biyosentez ile ilgili enzimlerinin lokalizasyonu (Guillaume ve Facchini, 2014'ten değiştirilerek alınmıştır) Mavi renk ile gösterilmiş enzimlerin font büyüklükleri enzimin bolluğu ile doğru orantılıdır. Dikey oklar dönüşümleri göstermekte ve okların kalınlığı olası dönüşümleri göstermektedir. Yanal oklar ise alkaloidlerin taşınımını göstermektedir.

2.3. MeJA Yapısı ve Bitkiler Üzerindeki Etkisi

MeJA, bitki yaşlanmasında ve tohum çimlenmesi, kök gelişimi, çiçeklenme, meyve olgunlaşması gibi değişik gelişimsel yollarda ve bitkinin savunmasında kullanılan uçucu organik bir bileşik olup jasmonic asitten türevlenir. Bu türevlenme reaksiyonu, jasmonik asit karboksil metiltransferaz enziminin S-adenosil-L-metyonini kataliz etmesi ile meydana gelmektedir. Bitkiler, metil jasmonatı ve jasmonik asiti birçok biyotik ve abiyotik strese karşı (herbivor ve yaralanma stresi) cevap olarak üretirler. Aynı zamanda MeJA, orjinal bitki savunma sistemlerinde sinyal için kullanılabilir. Normal koşullarda stres verilmemiş bitki, yaprak hücrelerinin stoplazmasının difüzyon aracılığı ile ya da stomaların hava yolu ile MeJA'yı absorbe edebilmektedir. Literatürlerde geçen Jasmonat, MeJA ve onun serbest asidi olan JA olarak tanımlanmaktadır. Jasmonatlar, değişik gelişimsel işlemlerde yer alan önemli hücresel düzenleyicilerdir. Söz edilen gelişimsel işlemler, tohum çimlenmesi, kök gelişimi, verimlilik, meyve olgunlaşması ve yaşlanma olarak söylenebilmektedir (54, 55). Ek olarak, jasmonatların, böceklerin yaralanmalarından kaynaklanan bitkinin savunma mekanizmasını aktive ettiği bilinmektedir. Değişik patojenler ve tuzluluk, kuraklık, düşük sıcaklık gibi değişik çevresel streslere karşı savunma mekanizmasında jasmonatları önemli derecede görev aldığı bulunmuştur (56). Jasmonatlar; etilen, oksin, salisilik asit ve absisik asit gibi diğer bitki hormonları ile sinerjetik ya da antogonistik olarak çalışabilirler. Özellikle, metil jasmonat ile etilen sinerjetik olarak bir grup savunma genlerini uyarabilmektedirler (54, 56). Bir *Arabidopsis* mutanlığı olan *Cv1* temel olarak jasmonat ve etilen üretir ve böylece bitki, patojenlere karşı dirençli hale gelmeye çalışır. *Cv1* geni, jasmonat-etilene bağlı stres cevabında, hücre duvarı sentezi inhibisyonu gerçekleştiren selüloz sentaz genini kodlamaktadır (57) Son zamanlardaki mikroarray çalışmaları da, etilene cevap transkripsiyon faktörü (*ERF1*)'nin jasmonat ve etilene karşı sentezlenen birçok genin ifadesini düzenlediğini ortaya koymuştur (58). Jasmonat ile oksin hormonu arasında ki bağlantıyı, oksine karşı cevap veren ama MeJA açısından eksik olan *axr1 Arabidopsis* mutanlığı ile ortaya çıkarılmıştır (59).

Sonuç olarak MeJA diğer hormon yolları ile karmaşık düzenleyici bir ilişki sergilemektedir (56) (Şekil 2.4). Şimdiye kadar ki çalışmalarda, MeJA'nın güçlü bir sistemik sinyalde önemli bir rol aldığı ortaya çıkarılmıştır. MeJA, bitkinin bir bölgesinden diğer bölgesine buharlaşma yolu ile yayılabilmektedir (60). Bununla beraber hücreler arası

yayılmaması da muhtemelen floem ile gerçekleşmektedir (61). Yakın zamana kadar, jasmonat muamele edilmiş bitkilerde elde edilen cevaplar genelde bitkilerde normal bir dengede sentezlenen değişik kimyasal ve izomerlerini ortaya koymada etkili olmuştur. Ayrıca bitkilerde henüz bilinmeyen metabolitlerin de belirlenmesinde uygulanabileceği belirtilmiştir (56, 60).



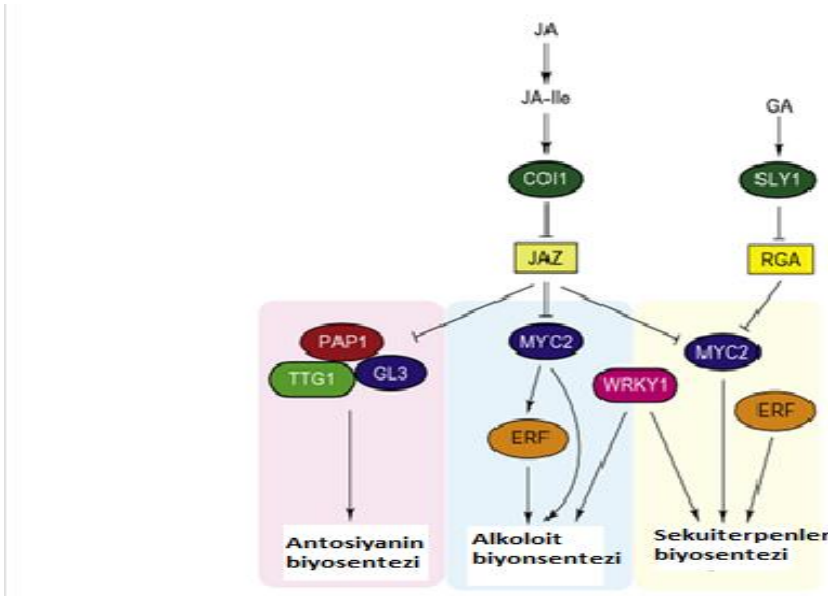
Şekil 2.6. Jasmonatların gelişimsel ve çevresel sinyallere cevap olarak sentezlenme mekanizması (Cheong *vd.*, 2003 değiştirilerek sunulmuştur)

Önceki çalışmalardan da elde edilen bilgilere göre fungal elisitör olarak bilinen MeJA *P. somniferum* (62, 63) ve *C. roseus*'ta (61) alkaloid birikimine yol açacak bir dizi reaksiyonlara etki ettiği ortaya konulmuştur. Ayrıca yapılan çalışmalar, Jasmonatların, bitkilerde gelişim sürecinde yaşlanmada ya da patojen enfeksiyonunda görev aldığı birçok çalışma sonucunda ortaya konulmuştur (64-66). Bitkilerde Jasmonatların sentezlenmesi sonucunda ortaya çıkan ve bitki savunmasında önem arzeden cevaplarından birisi olarak sekonder metabolit birikimi olarak bilinmektedir (67). Jasmonatlar ilgili özgün bitki hücresinde sekonder metabolitlerin biyosentezinden sorumlu gen yada genlerin ifadelerini değiştirerek etkide bulunduğu görülmüştür (66, 68). Dışardan MeJA uygulanması yapılmaması sonucunda JA sinyal iletim yolağının aktif hale gelmesi sonucunda bitki köklerinden flavanoid ve indol gibi sinyal bileşiklerinin salınımının arttırdığı bilinmektedir (69). Bununla birlikte bitkideki tüm organların farklı JA sinyal iletim yoluna sahip olduğu ve böylece indüklenen bölge hakkında edinilen bilgiye bağlı olarak yaralanan bölgeye özgü cevap verdiği bulunmuştur (70). Bu sonuçla beraber bitkilerde JA muamelesi sonucunda regülasyon görevini üstlenen bazı transkripsiyon faktörlerinin , genlerin ifade dengelerine etki ettiği bulunmuştur (71, 72).

2.4. Transkripsiyon Faktörleri ve Alkaloit Biyosentezi

Ökaryotlarda, genlerin düzenlenmesinde ya da transkripsiyonunda etkili olan düzenleyiciler olarak bilinen transkripsiyon faktörleri, DNA üzerinde belli bir diziyeye bağlanabilen proteinlerdir. Çevreden kaynaklı çeşitli etkenlere karşı hücre sürekli sinyal üretir bu süreçte RNA polimeraz doğrudan promotöre bağlanmak yerine transkripsiyonu özgün olarak başlatacak olan değişik proteinler aracılığı ile bağlanmaktadır. Dolayısı ile RNA polimeraz, bir genin transkripsiyonunu, ya (bir aktivatör olarak) kolaylaştırır veya (bir represör olarak) engelleyebilmektedir (73). Transkripsiyon üzerindeki etkisinden dolayı düzenleyici rolü olduğu bilinen tüm proteinler, düzenleyici protein olarak tanımlanmakla beraber bazı kaynaklarda düzenleyici proteinlerin yapı ve fonksiyonlarının birlikte ele alınmasından ötürü oldukça karmaşık bir sınıflandırma oluşturmaktadır (74). Genel olarak trans-etkili faktörler, transkripsiyon sürecinde cis-etkili bölgeler olarak tanımlanan düzenleyici bölgeleriyle etkileşim kuran proteinler olarak bilinmektedir (75). Transkripsiyon faktörleri DNA bağlanma bölgesine sahip olmanın yanında farklı olarak transkripsiyonu aktive eden bölgeler, 30 ile 100 aminoasitlik bir kısımdan meydana gelmektedir (74). Bu bölgeler, ve bölgede bulunan aminoasitler, diğer transkripsiyon faktörleri ile veya doğrudan doğruya RNA polimeraz ile etkileşirler. Ökaryotlarda transkripsiyon seviyesindeki gen düzenlenmesi oldukça karmaşıktır. Bitkilerde MeJA uygulaması sonucunda, alkaloit biyosentezi yollarında etkili olan çok sayıda TF görev almaktadır (Şekil.2.5) *Catharantus. roseus* bitkisinde terpenoid indole alkaloids (TIA) yollağını regüle eden birçok sayıda transkripsiyon faktörü belirlenmiş ve karakterize edilmiştir (76). TIA ürünleri, biyosentez hızını sınırlayan enzimleri kodlayan genlerin ektopik olarak ifade olunması ile miktarları artırılmaktadır. Örneğin *C. roseus* bitkisinde *TYDC* (triptofan dekarboksilaz) genin aşırı ifade ettirilmesi ile hücrede alkaloit birikimine neden olduğu bulunmuştur (77). Umut verici bir yaklaşım sonucu, transkripsiyon faktörleri, metabolit birikimini artırmaya yönelik rol oynayan yolların birçok aşamalarında düzenleyici olarak görev almaktadır (78). Bu transkripsiyonel düzenleyiciler, metabolik yollarının manipüle etmede görev alarak metabolik mühendislik ile ilişkili biyosentetik yolların birçok aşamasında oldukça etkili olabilmektedirler (79). Bazı karakterize edilmiş *AP2* benzeri transkripsiyon faktörleri TIA yollağında yer alan *ORCA3*, *ORCA2*, ve *ORCA1* genlerini pozitif yönde düzenleyebilmektedir. Diğer taraftan *ZCT1*, *ZCT2* ve *ZCT3* TIA yollağında baskılayıcı olarak görev almaktadır (80, 81). *WRKY* proteinleri, hedef genlerin promotor bölgelerinde yer alan W-box [TTGAC (T/C)] cis

elementi ile interreaksiyona girerek genlerin ifadelerini düzenlerler (82, 83). *WRKY* ailesinde yer alan proteinler, bitki savunmasında, gelişimde ve bitki metabolizmasında olmak üzere çeşitli görevlerde yer almaktadır (82). Ayrıca metil jasmonat ile uyarılmış bitkilerde flavanoid ve terpenoidler gibi savunmada yer alan bileşiklerin sentezinde oldukça önemli bir rol aldığı bilinmektedir (84). MeJA ile uyarılmış *P. somniferum*'da *PsWRKY* karakterize edilmiş ve bu proteinin BIA yollağında önemli bir düzenleyici olduğu ortaya konulmuştur. Son zamanlarda birçok çalışmada olduğu gibi alkaloid biyosentezinde rol oynayan mekanizmaların ve genlerin anlaşılması için güvenilirliği yüksek yeni nesil dizileme teknoloji platformları kullanılmakta olup elde edilen oldukça yüksek hacimli veriler çeşitli biyoenformatik araçlar ile karakterize edilmektedir.



Şekil 2.7. Bitkilerde JA uygulaması sonucu sentezlenen transkripsiyon faktörlerinin Antasiyonin, Alkaloid ve Sekuiterpenler biyosentezi üzerine olan etkisi (Kwang ve Jeon, 2013'den değiştirilmiştir)

Transkripsiyon faktörlerinde olduğu gibi tranpozon elementleri ve miRNA'lar da alkaloid biyosentezine doğrudan etkide bulunabilmektedir.

2.5. Transpozon Elementleri ve Alkaloid Biyosentezi

Transpozonlar, transpozisyon özelliklerinden dolayı genomların birçok farklı bölgelerine dahil olma özelliğine sahiptirler. Bu durumda ekzonlara veya genlerin yakınındaki bölgelere yer aldıklarında; çerçeve-kayma mutasyonu, delesyon, duplikasyon, inversiyon gibi çeşitli mutasyonlara yol açtıkları bilinmektedir. Bu mutasyonlar, alternatif gen ürünü

oluşumuna sebebiyet verdiği gibi gen ürünü olan proteinin oluşmasını engelleyebilir ve bu durum fenotipik değişikliklere hatta patolojik oluşumlara bile sebep olabilecek sonuçlar doğurmaktadır. Bununla birlikte replikatif transpozisyonla hareket eden transpozonlar, genom büyüklüğünün büyümesine neden olmak ile beraber gen fonksiyonunu, yapısını veya aktivitesini değiştirebilmekte aynı zamanda genom ve kromozom yapılarının da ciddi boyutlarda değişmesini de sağlayabilmektedirler (85). Transpozonların bu bahsedilen dezavantajlarına karşılık, içinde buldukları konak genomlara birçok yararları da vardır. Bu elementler literatürlerde çoğu zaman fosil olarak da adlandırılmaktadır (86). Bu inaktif elementler aslında doğal seçim sonucunda ortaya çıkmış ve genoma zarar vermeyen elementler olarak bilinmektedir., Aksi takdirde mutasyonları meydana getirerek, transpozonlar, konak genomlarına zarar verdikleri durumda organizmaya ciddi zarar vererek yaşayamayacak ve dolayısı ile bu yeni insersiyonlar yeni döllere aktarılamayacaktır (86). Bu bağlamda transpozonların aynı zamanda çok önemli varyasyon kaynakları olarak görev yapmakta ve fenotipik esnekliğe de yol açmaktadırlar. Çok sayıda bilimsel çalışma, türlerin evrimsel geçmişinde tek bir genin replikatif transpozisyonu yoluyla gen ailelerinin ortaya çıkmış olduklarının ve bu sayede türlerin farklı gelişimsel ortamlara uyum sağlayabildiklerini öne sürmektedir (87, 88). Transpozonlar, gen düzenlenmesini hem metil gruplarının komşu bölgeleri etkilemesi sayesinde, hemde RNAi (RNA interferans) mekanizmasını kullanarak transkripsiyona engel teşkil etmektedir. Bu epigenetik gen düzenlenmesi sayesinde transpozonlar, embriyonik gelişim sırasındaki doku farklılaşmasından, ergindeki farklı dokuların farklılıklarının korunmasına kadar birçok mekanizmada görev almaktadırlar (89, 90). Bununla beraber bazı transpozonların çeşitli biyotik ve abiyotik stresler ile aktive olduğu bulunmuş ve aktive olan bu transpozonların bitkide savunma sisteminde, sinyal yollağının uyarılması gibi sekonder metabolitlerin biyosentezini tetikleyen reaksiyonların oluşmasına neden olduğu ortaya konmuştur. Buna ek olarak aynı çalışmada, *Ortrt2* transpozunun JA ve salisilik asit muamelesi sonucunda ifadesinin seviyesinin arttığı bulunmuştur (91). Bununla ilgili yapılan bir çalışmada, patojen inokulasyonu yapılarak ya da mikrobial elisitörlerin etki etmesi sonucunda, tütün bitkisinde *Tnt1* retrotranspozunun aktive olduğu bulunmuştur (92). Dolayısı ile bu sonuç göz önüne alındığında fungal bir elisitör olan ve aynı zaman bu elisitörün BIA biyosentezini indüklediğini düşündüğümüzde dolayısı ile transpozonların aynı zamanda dolaylı olarak alkaloit biyosentezinin düzenlenmesinde etkili bir rol aldığı söylenebilmektedir. Daha önce yapılan başka bir çalışmada genom üzerinde transpozon elementlerinin sekonder metabolit gen kümelerinin yakınında çevrelediğinden böylece sekonder metabolit genlerin

çeşitlenmesinde de etkisi olduğu düşünülmektedir (93). Dolayısı ile yapılan çalışmalardan da görüldüğü üzere transpozon elementlerinin bitkilerde bir savunma mekanizması aktörü olan alkaloidlerin biyosentezinde görev aldığı ortaya çıkmıştır. Transpozonların etki mekanizmasına benzer olarak mikroRNA'lar da transkripsiyon sonrası gen düzenlemesinde önemli bir rol aldığı bilinmektedir.

2.6. Mikro-RNA (miRNA)

mikroRNA'lar, yüksek seviyede korunan DNA bölgelerinden kodlanan, proteine translasyonu gerçekleşmeyen, yaklaşık 18-24 nükleotit uzunluğundaki küçük RNA molekülleridir (94, 95). İlk defa, 2002 yılında *Arabidopsis*'te miRNA'ların ilk defa keşfedilmesinden (96) sonra, iki farklı yaklaşım (üç farklı yöntem) kullanılarak 70057 bitki miRNA'sı ve karakterize edilmiştir (miRBase v. 21) (97). Bu yöntemler; 1) Farklı dokular ve koşullardaki küçük RNA kütüphanelerinden doğrudan klonlama (deneysel yaklaşım), 2) *C. elegans*'da küçük RNA'ların ilk kez tespitine neden olan geleneksel mutant tarama metodu (deneysel yaklaşım), 3) Bitki miRNA'larının korunan sekansları üzerinden mevcut genomik veri tabanlarından yapılan biyoenformatik tahmin (biyoenformatik yaklaşım) olarak keşfedilmiştir (98).

2.6.1. Bitkilerde miRNA'lar ve fonksiyonları

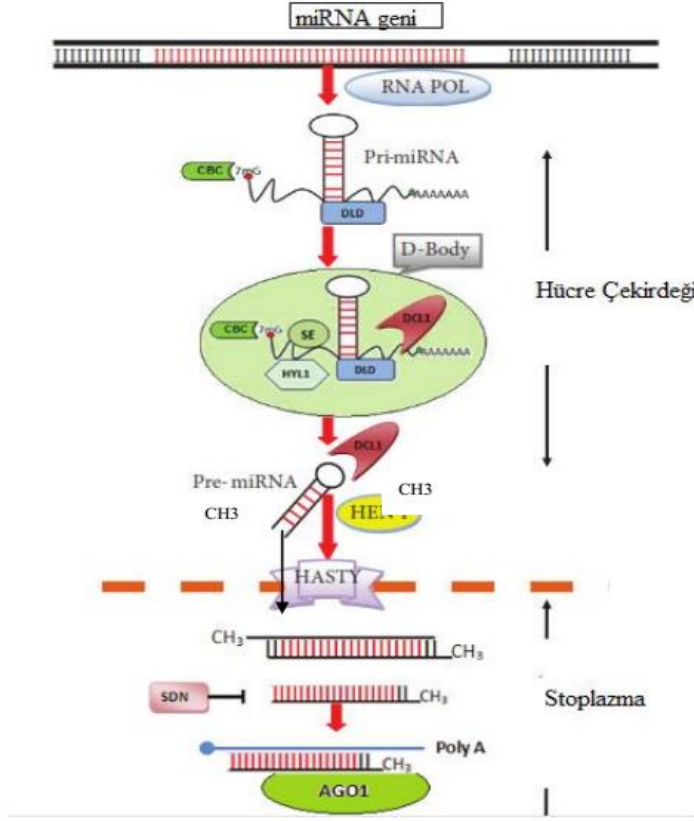
Son yıllarda bitki miRNA'larıyla ilgili araştırmalarda ciddi artışlar olmuş ve araştırmalar hala devam etmektedir. Bugüne kadar 73 bitki türüne ait 7000 den fazla miRNA, klonlama metodu veya miktar tayini yaklaşımlarıyla tespit edilebilmiştir (miRBase v21). Aynı şekilde miRNA hedefleri olan mRNAların pek çoğu deneysel olarak doğrulanmıştır (99).

Bitki miRNAları yaprak morfogenezisi, floral organ oluşumu ve kök gelişimi gibi organ gelişimindeki önemli fonksiyonlarına ilave olarak, küçük RNA yolağında feedback düzenleyici ve bazı siRNAların direkt olarak biyogenesizinde de fonksiyon göstermektedir. Üstelik bunlar oksidatif, mineral beslenme, dehidrasyon stresi ve mekanik stres gibi çeşitli stres yanıtlarında da görev almaktadır (98, 100).

2.6.2. Bitkilerde miRNA'ların biyogenezi ve çalışma mekanizması

miRNA'lar, birbirini izleyen üç adımlık işlem süreci sonucunda meydana gelmektedir. İlk adımda miRNA genlerinden veya bazı intronlardan primer miRNA (pri-miRNA)'ların transkripsiyonu gerçekleşir. İkinci adımda pri-miRNA'lar prekürsör miRNA

(pre-miRNA)'lara nükleus içinde dönüştürülür (Şekil 2.6). Üçüncü ve son adımda olgun miRNA'ların sitoplazma içinde oluşumu gerçekleşir (98).



Şekil 2.8. Bitkilerde meydana gelen miRNA'ların yazılımı ve çalışma mekanizması (Eldem vd. 2013'den değiştirilerek alınmıştır)

2.6.3. Bitki miRNA'ların sekonder metabolitlerin biyosentezindeki rolü

miRNA'lar değişik biyolojik mekanizmalarda oldukça önemli fonksiyonlara sahiptir. miRNA'lar özel hedef genlerine etki ederek bitkide biyotik stres, sinyal iletimi, metabolizma ve protein degradasyonu gibi biyolojik mekanizmalarda oldukça önemli görevler üstlenmektedir. Ayrıca miRNA'lar bitkide sekonder metabolit biyosentez mekanizmasını da regüle etmektedir (Böke vd., 2014 Plant Biotechnology (baskıda)). Örneğin, yapılmış bir çalışmada miR393'ün oksin sinyal mekanizmasına etki ederek, sekonder metabolit metabolizmasına yön verdiği bulunmuştur. Ayrıca miR393'ün aşırı ifade edilmesi ile glukosinolate ve kameleksin biyosentez miktarını değiştirdiği bulunmuştur (101). Ayrıca miR163'ün *Arabidopsis* bitkisinde aşırı ifade ve nakavt edildiğinde bu sonucun bitkide sekonder bitki miktarını değiştirdiği bulunmuştur (68).

Bunlara ek olarak, miRNA'ların sekonder metabolit sentezinde önemli bir görevi olan JA biyosentezinde de etkili oldukları konusunda önceden yapılan bir çalışmada, miR319'un hedef genlerinden biri olan TCP transkripsiyon faktör ailesinin JA biyosentezini kontrol ettiği bulunmuştur (98). Ayrıca tütün bitkisinde de yapılan bir çalışmada, yeni nesil dizileme teknoloji ile tütün bitkisinde yaralama sonucunda sentezlenen sekonder metabolitlerin biyosentezini regüle ettiği düşünülen bazı yeni miRNA adayları bulunmuştur (102). Daha önce yapılan başka bir çalışmada anti kanser alkaloidler bakımından oldukça zengin olan *C. roseus* bitkisinde in silico yöntemler kullanılarak sekonder metabolit ve alkaloidler ilişkili çok sayıda miRNA ve bunların hedef genleri belirlenmiştir (103). Böke 2013, haşhaş bitkisinde yaptığı doktora tez çalışmasında miRNA mikroarray ve derinlemesine miRNA dizilimi analizleri yapılarak, hedef genlerin BIA biyosentezi ile olan ilişkisi açığa çıkarılmıştır. Ayrıca, miRNA hedef genlerinin belirlenmesi ile ontoloji analiz edilerek miRNA regülasyonu ve BIA biyosentezi arasında olan bağlantılar çalışılmıştır (Böke *vd.*, 2014 Plant Biotechnology (baskıda)). Sonuç olarak görülmüştür ki, özellikle sekonder metabolit ve alkaloid biyosentez regülasyonu ile ilişkili miRNA ve onların hedef gen analizlerini konu alan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu anlamda günümüzde birçok çalışmada BIA biyosentezini indükleyen MeJA benzeri çeşitli elisitörler kullanılarak elde edilen alkaloid ağının değişimlerini ve bu değişimlerin miRNA'lar ile ilişkilendirilerek ortaya konulması bu anlamda bir literatür boşluğunu dolduracağı tahmin edilmektedir.

2.7. Bitki Transkriptom Çalışmalarında Kullanılan Dizileme Metotları

2.7.1. İlk nesil dizileme metodu

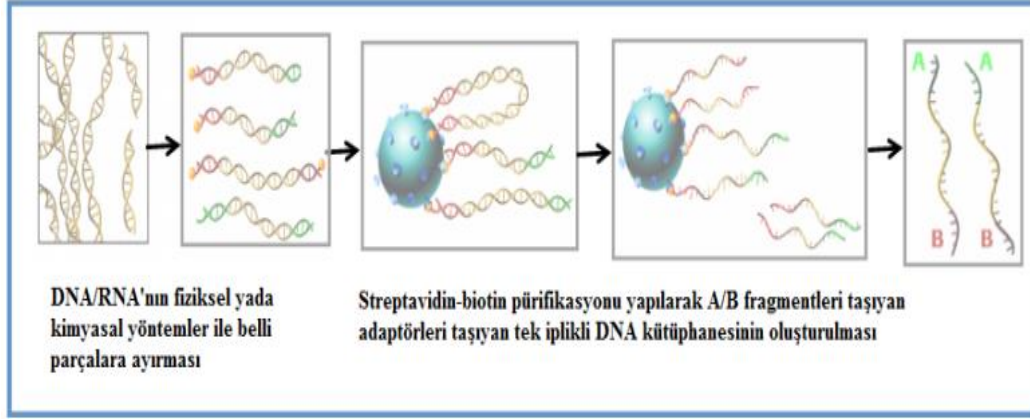
Dizileme çalışmalarında en yaygın olarak kullanılan metot, Shotgun tekniği ile Sanger (dideoksi) metodudur. Zincir sonlama olarakta bilinen Sanger metodu, uzun DNA parçalarını dizilemek için kullanılır (104). Sanger yöntemi ile uzun diziye sahip kontigler bir kerede dizilenmediği için DNA'lar önce küçük parçalara bölünür ve parçaların her biri uygun bir plazmide klonlanıp doğru vektöre aktarılır. Klonlanan plazmitler Sanger metodu ile tek tek dizilenir. Bu dizilerin bioinformatik analizlerle bir araya getirilmesi ile uzun DNA parçasının dizisi elde edilir (104). Dizilemesi yapılacak olan DNA dizilerinin birçok kopyası primer normal deoksi nükleotidler (dNTP) dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dideoksi nükleotidler: ddNTP; ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP ve DNA Polimeraz I enzimi ile kanştırılır. DNA dört baz şifresinden meydana gelen bir biyo polimerdir. Her yeni nükleotid bir önceki nükleotidin 3' OH ucuna eklenir. Dideoksinükleotid trifosfat (ddNTP)

ise 3' OH ucu içermez. Dolayısıyla böyle bir molekül zincir uzamasını durdurur ve zincirin son nükleotidini oluşturur (105). Bu DNA dizileri kapiller jel elektroforezi kullanılarak okunur.

2.7.2. İkinci nesil dizileme platformları

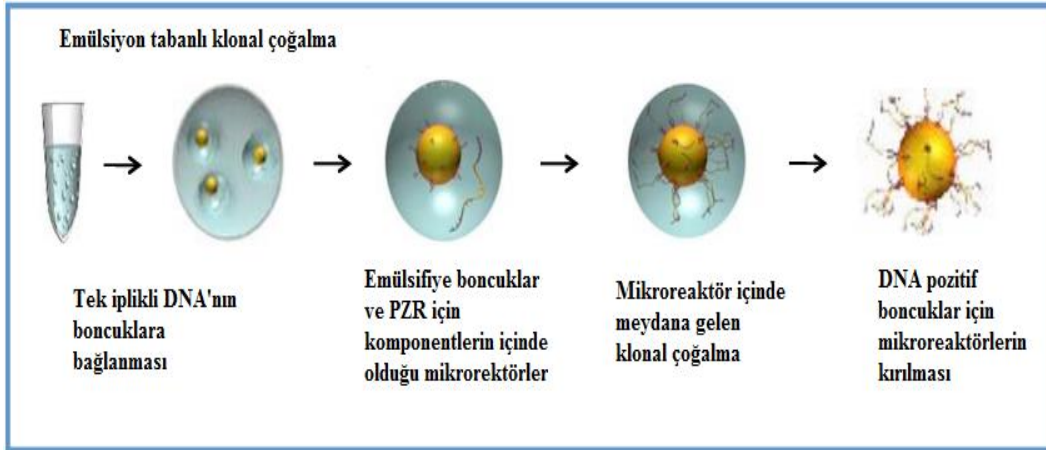
Yeni nesil dizileme sistemleri olarak da bilinen ikinci nesil dizileme platformları, gün geçtikçe oldukça değişik kullanım alanlarında kullanılmaya devam edilmektedir. Yeni nesil dizileme; genom, transkriptom, DNA-protein etkileşimlerinin geniş kapsamlı analizini ucuz, rutin ve yaygın hale dönüştürdüğünden biyolojik araştırmaları önemli ölçüde hızlandırma potansiyeline sahiptir. Yeni nesil dizileme teknolojisi; mRNA, küçük RNA profili, transkripsiyon faktör bağlanma bölgelerinin genom boyu karakterizasyonu, kromatin yapısı ve metilasyon paterni, atasal DNA mikrobiyolojisi ve metagenomik için yeni ve hızlı yollar sağlar. Günümüzde kullanılan yeni nesil dizileme sistemleri, Roche 454 genome analyzer, Illumina Genome Analyzer, Applied BioSystem SOLiD, Complete Genomics, Helios, Pacific Biosciences ve IonTorrent sistemleridir (106).

Bir grup araştırmacı tarafından 'Sentez Yoluyla Dizileme' (sequencing by synthesis) prensibine dayalı 'Pyrosequencing' metodunu geliştirmesi bu arayışların sonucu olarak ortaya çıkmıştır (107). Pirodizileme (pyrosequencing) yüksek işlem hacmi ve düşük maliyeti sayesinde geleneksel Sanger dizilemenin yerini almıştır. Pirodizilemenin temeli DNA polimeraz aktivitesinin kemilüminesans bir enzim aracılığıyla tespitine dayanmaktadır. Dizileme reaksiyonu, dizilenecek DNA'nın tek sarmalı (ssDNA) üzerinde tamamlayıcı sarmalının (complementary DNA/ cDNA) sentezlenmesi şeklindedir. Öncelikle çift zincirli DNA'nın nebulizasyonu yapılarak (400-800 bp'lik küçük fragmanlara ayrılması gerçekleştirilir.



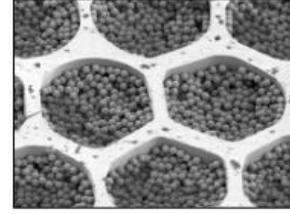
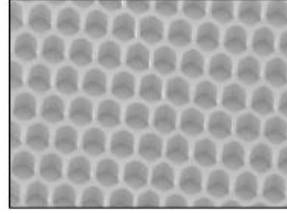
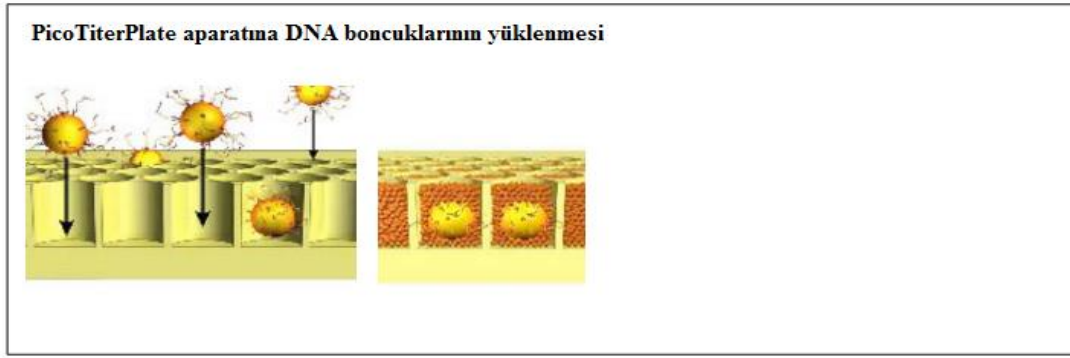
Şekil 2.9. Dizileme için kütüphane hazırlama aşamaları (<http://454.com/> Apr 2014 'den değiştirilmiştir)

Bu fragmanlara dizileme primerlerini taşıyan adaptörler eklenir. Adaptörleri taşıyan DNA fragmanlarının mikroyükler içerisinde emülsiyon bazlı klonal amplifikasyonu (em-PZR) gerçekleştirilir (Şekil 2.10).



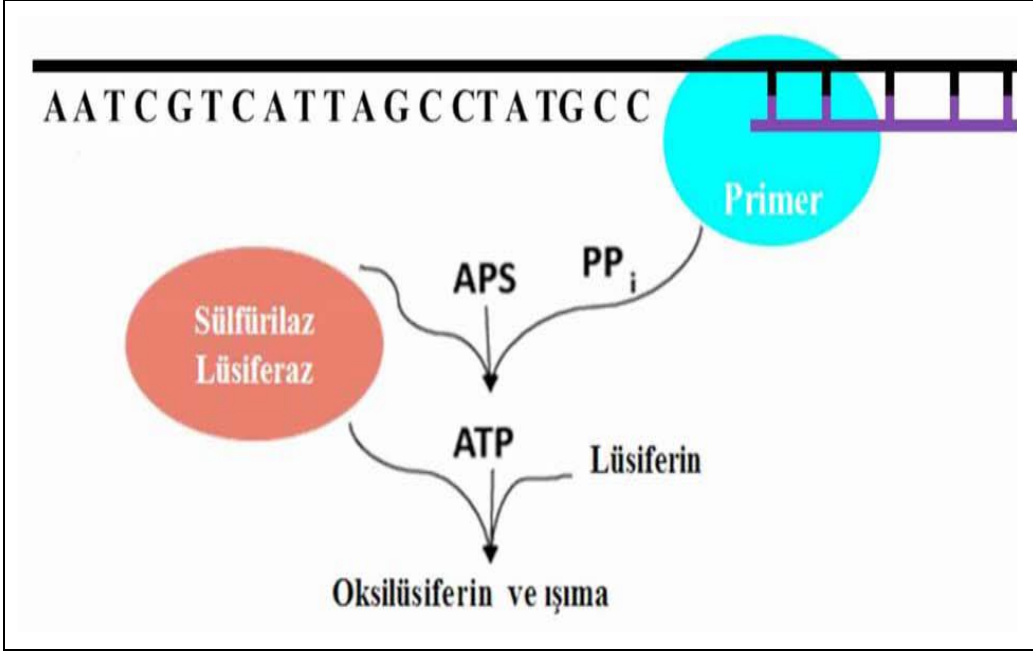
Şekil 2.10. Roche 454 FLX+ platformunda gerçekleşen emülsiyon tabanlı klonal çoğalma (<http://454.com/> Apr 2014'den değiştirilmiştir)

Bu aşama sonucunda yaklaşık olarak 10 milyon kopyaya çıkarılmış DNA fragmanları sentez yoluyla dizileme yöntemiyle yaklaşık 3. 6 milyon kuyu içeren bir plate üzerinde dizilir (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. Boncukların PicoTiterPlate aparatına yüklenmesi (<http://454.com/Apr2014>)’den değiştirilmiştir)

Dizileme primeriyle sabitlenen tek sarmallı kalıp DNA üzerine ardışık olarak akan A, C, G, T nükleotitlerinin kalıp DNA dizisine tamamlayıcı olması durumunda ortamda bir ışık oluşur. Bu ışığı yaratan kemilüminesan sinyalin hangi nükleotidin bağlanması sırasında olduğu tespit edilir. Sabitlenen ssDNA, DNA polimeraz, ATP sülfirilaz, lüsiferaz, apiraz, APS ve lusiferin ile inkübe edilir. Nükleotid akışı sırasında tamamlayıcı nükleotidin gelmesi durumunda DNA polimeraz pirofosfat (PPi) açığa çıkmasını sağlar. ATP sülfirilaz enzimi bu PPi’yi kantitatif olarak ATP’ye dönüştürür (Şekil 2.11). ATP, lüsiferaz enzimi aracılığıyla lusiferinin oksilusiferine dönüşmesini sağlar. Oksilusiferinin görülebilir bir ışık yaratır. Bu ışığın şiddeti ATP miktarıyla doğru orantılıdır ve bu sayede aynı dizi üzerindeki tek nükleotid tekrarları (homopolimer) tespit edilir. Ortaya çıkan bu ışık CCD kamera tarafından kaydedilir ve bilgisayar program yardımıyla dizi verilerine (flogram) dönüştürülür.



Şekil 2.12. Pirodizileme metodu (<http://454.com/> Apr 2014'den değiştirilmiştir)

Pirodizileme yöntemi kullanılarak, klonlama yapmaksızın, 7.5 saatte 100-500 milyon bazlık dizileme yapmak mümkündür. Bu sistem daha önce yıllar alan dizileme projelerini haftalar içinde sonuçlandırmayı mümkün kılmıştır. DNA'nın çift sarmallı yapısını bulan Nobel ödüllü araştırmacı Dr. James Watson'ın genomu bu yöntemle dizilenmiştir. Yine Neandertal genomu ve nesli tükenen mamut türünün genomu bu yöntemlerle kısa sürelerde bütünüyle dizilenebilmiştir. Bu yöntem bu tip karmaşık genomların haricinde, bakteri ve virus gibi daha basit genomların da bir gün içinde tüm genomunun dizilenebilmesini sağlar.

Bir diğer YND platformu Solexa-Illumina sistemi olup, bu Solexa platformu, bitki biyoteknolojisi ve üretiminde en yaygın olarak kullanılan YND sistemidir. Illumina ilk olarak bir akış hücresindeki özgün adaptörlere bağlanmış olan kalıp DNA'nın yakalanması işlemine dayanmaktadır. Illumina sistem dört nükleotitin akış hücresi kanalına eş zamanlı olarak DNA polimerazın eklenmesi ile oluşan dizi sentezleme yaklaşımını kullanır. Özellikle bu nükleotitler tek bir floresan etiket taşırlar ve 3' OH grubu kimyasal olarak bloke olmuştur. Pirodizilemeden farklı olarak, DNA her yıkamadan sonra bir nükleotid uzar. Her bir fotoğraflama adımı, her bir bazın katılma adımını takip eder. Fotoğraflama aşamasından sonra 3' OH ucu kimyasal olarak bloke olmuş grup, DNA polimerazın sonraki katılımı için her bir ipliği hazırlamak için uzaklaştırılır. Adımların bu

serileri kullanıcı tarafından belirlenen döngüye kadar devam eder. Buda 25-35 bazlık farklı okuma uzunluklarına izin verir. Baz aramalı bir algoritma, her okuma sonucundaki değerleri belirler ve bu değerleri kontrol eden pipeline yetersiz özellikteki sekansları uzaklaştırarak her bir çalışma sonucu elde edilen Illumina verisini değerlendirir

Çizelge 2.2. Mevcut Dizileme Platformlarının Karşılaştırılması (Turktas *vd.*, 2014'den değiştirilmiştir)

Özellikler	Roche/ 454	ABI /SOLiD	Solexa/Illumina
Dizileme kimyası	Pirodizilime	Köprü çoğalma	Sentez yolu ile dizileme
Okuma uzunluğu (bç)	1000	75	2x101
Okuma sayısı (milyon)	1	5	3 (SE) ve 6 (PE)
Total yüksek hacim	700mb	120Gb	540-600Gb
Hata oranı (%)	0,1	0,01	0,1
Reaksiyonu bitirme zamanı	23 saat	14 gün	8,5 gün
Mb başına fiyat (\$)	8	0,05	0,02

2.8. Roche 454 FLX+ Platformu ile Transkriptom Analiz Basamakları

2.8.1. RNA izolasyonu ve iki zincirli cDNA oluşturulması

Total RNA "RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)" ile izole edilir. İzole edilen RNA'ların kalite ve miktarları agaroz jel ve nano-drop spektrofotometre ile kontrol edildikten sonra, cDNA yapım aşamasına geçilir. Yüksek kaliteli, tam (full-length) cDNA oluşturmaya olanak sağladığı için, cDNA yapımında SMART™ (Clontech) teknolojisi kullanılabilir. Protokol kısaca şu şekilde uygulanabilir: cDNA'nın birinci zincirini hazırlamak için, RNA, cDNA sentez primeri (CDS) (Clontech), 3' ucunda oligo (G) bulunan SMART Oligo (Clontech), dNTP, tampon çözelti ve "reverse transcriptase" enzimi ile inkübe edilir. İkinci zincir, cDNA birinci zincir sentez karışımının, PZR primeri ile uygun sıcaklıklarda PZR ile çoğaltılmasıyla elde edilir. Oluşturulan iki zincirli cDNA'ların kalite ve miktarları agaroz jel ve spektrofotometre ile kontrol edilir (108).

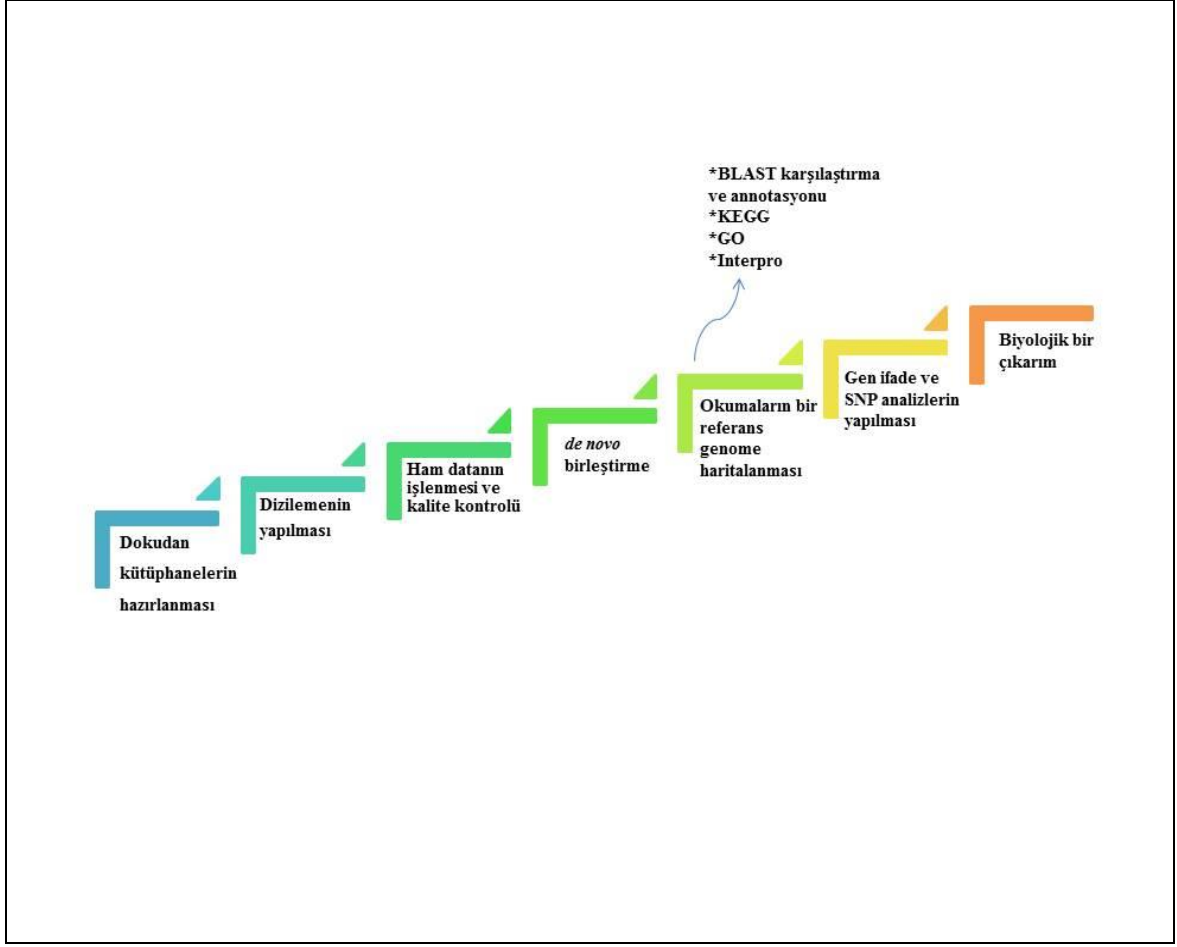
2.8.2. 454 GS-FLX+ cihazı ile transkriptom dizileme

Her bir örnekten yaklaşık 5 µg cDNA, küçük parçalara ayrılır ve tüm genom dizileme çalışması için belirtilen ilgili protokoller uygulanır. Bu durum transkriptom dizilemesi için de aynı şekilde uygulanır. Transkriptom dizileme çalışmalarında dizilemenin derinliğinin artması, düşük seviyelerdeki anlatım düzeylerinin daha rahat belirlenebilmesini sağlamaktadır. Benzer çalışmalarda yaklaşık 30 Mb uzunluğunda dizilemenin, mevcut transkriptomların tamamına yakınına kapsadığı belirtilmiştir (109, 110).

2.8.3. Dizilerin biyoenformatik analizleri

Dizilerin analizi için bir çok farklı biyoenformatik program mevcut olmakla birlikte, uygulamalar genellikle belirli bir çerçevede dahilinde yapılmaktadır (103). Tüm genom dizilerinin biyoenformatik analizinde izlenecek aşamalar Şekil 2.11.'de şematik olarak gösterilmiştir.

İlk aşamada, ham datayı işleme amacı ile, adaptör bölgeleri ve düşük kalitede okumaya sahip diziler Lucy (<http://lucy.sourceforge.net/>) ve benzeri programlar kullanılarak transkriptom dizilerinden çıkartılır. Ardından mikrosatellit gibi basit tekrar dizileri, "low complexity" kısa tekrarlı bölgeleri (örn, poli-A kuyruğu) ve diğer tekrar bölgeleri bilgi bankalarından elde edilerek ilgili genomda aranmak amacı ile yaygın bir şekilde uygulanan ve Linux işletim sistemi üzerinde çalışan "RepeatMasker" programı (www.repeatmasker.org) kullanılabilir. Program ile, hem programın içerisinde bulunan tekrar dizileri hem de bilgi bankalarından (RepPop, TIGR, RepBase) elde edilecek olan tekrar dizisi kütüphaneleri, elde edilen diziler ile karşılaştırılır. %90'ın üzerinde homoloji gösteren bölgelere sahip diziler "X" harfi ile belirtilerek maskelenir. Aynı zamanda programda, CrossMatch algoritması kullanılarak ve diğer parametreler değiştirilmeden uygulanır.



Şekil 2.13. Dizilerin biyoformatik analiz şeması

Söz konusu örneğin genomunda, bilinen tekrar bölgelerinin dışında yeni tekrar bölgeleri de bulunabilmektedir. Genom içerisinde olabilecek yeni tekrar bölgelerinin tespiti için Linux işletim sisteminde BLASTN analizi yapılabilir. Bunun için elde edilen dizi önce kendisi ile karşılaştırılır, ardından da bilgi bankasında bulunan diğer türlerinden elde edilen "Genome Survey Sequences" (GSS) dizilerine ait kütüphaneler ile karşılaştırılır. Genomda en az beş kez bulunan, %80'in üzerinde benzerlik içeren ve 50 bç'den daha uzun olan bölgeler, potansiyel yeni tekrar bölgeleri olarak örneğin dizisinde yeniden "X" harfi ile maskelenerek filtrelenir. Ayrıca örneğin genomuna ait genlerin bulunabilmesi için, tekrar bölgeleri maskelenmiş olan diziler bilgi bankalarından bulunabilecek olan birçok bitki türünden elde edilebilecek transkript dizileri], CDS [Coding DNA Sequence]) ile karşılaştırılır. Bu amaç için BLASTN analizi yapılır. "E" değeri (E-value) $1e^{-30}$ olan ve 200 bç'den uzun olan potansiyel kodlama yapan (coding) gen bölgeleri, BLASTX analizi ile bilgi bankalarında mevcut "non-redundant" protein dizileri ile karşılaştırılır. "E" değeri (E-value) $1e^{-20}$ olan, %80'in üzerinde homoloji gösteren diziler, protein kodlayan gen

dizileri olarak adlandırılır. Bu diziler Blast2GO analizi ile UniProtKB bilgi bankasında bulunan dizilere karşı taranır ve her birinin fonksiyonel gruplandırılmaları TAIR gibi bilgi bankasında bulunan Gene Ontology (GO) terimlerine göre yapılır. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) analizi ile de transkriptlerin rol aldıkları yollar belirlenerek analizler tamamlandıktan sonra ham veriler ve analiz sonuçları bilgi bankalarına sunulur.

Fonksiyon belirleme analizlerin yanı sıra, haritalama amacı ile de Burrows-Wheeler Alignment (BWA) programı (<http://bio-bwa.sourceforge.net/>) kullanılarak yapılabilir. Bu amaç doğrultusunda, okuma kütüphanesindeki tekrar bölgeleri "X" harfi ile maskelenir. BLASTN analizi kütüphanedeki okumalar kendi kendileri ile karşılaştırılır. Analiz sonucunda en az 100 bp uzunluğunda olan ve %90 benzerlik gösteren diziler gruplandırılır. Bu parametrelere uymayan diziler ise tekil (singleton) olarak adlandırılır. BLASTN analizi sonucunda okuma kütüphaneleri arasında var olan insersiyon, delesyon, inversiyon gibi yapısal farklılıklar ile tek nükleotid polimorfizm (SNP) markörleri de tespit edilebilir.

Data zenginleştirme amacı ile, maskelenmiş olan diziler ise, "E" değeri (E-value) $1e-20$ ile BLAST analizleri yapılarak ve diziler bilgi bankalarında bulunan transkript dizileri ile karşılaştırılır. Her bir transkriptin hangi fonksiyonlara sahip oldukları GO terimlerine göre bulunacaktır. Transkriptlerin hangi yollarda görev aldıkları ise KEGG analizi ile belirlenir. InterPro Scan programı mevcut parametreler değiştirilmeden kullanılarak transkriptler içindeki fonksiyonel motifler tespit edilir. Analizler tamamlandıktan sonra analiz sonuçları bilgi bankalarına sunulur.

2.9. Yeni Nesil Dizileme Teknolojisi ile RNA Dizileme

Günümüzde, transkriptom analizleri, dizileme tekniğinin en son teknolojisini kullanmaktadır. RNA-dizileme, bir örnekteki tüm RNA populasyonunu belirleyen ve kantitatif olarak çözen oldukça güçlü ve etkin yeni bir yöntem olarak yaygın bir biçimde kullanılan bir araçtır. Bununla beraber RNA-dizileme tekniği, doğrudan RNA dizilimden ziyade, biyolojik örneğe ait RNA hakkında geniş bir moleküler bilgiyi sağlar (111, 112). Transkriptomik ya da geniş genom ekspresyon profillenmesi çalışmaları, santral dogma döngüsü içerisinde üretilen tüm RNA çeşitlerini sistematik bir biçimde birbirleri ile ilişkilendirerek kategorilendirmeyi amaçlarken aynı zamanda farklı hastalık durumlarında ve gelişim safhalarında her bir transkriptin değişen ifadesini ve miktarını dijital olarak belirlerken yeni ya da nadir görülen transkriptleri (rare transkript)'de ortaya koyar. Ayrıca

RNA-dizilemenin uygulama sonuçlarından bir diğeri de genlerin yapılarını, ve onların kırılma motiflerini ve diğeri posttranskripsiyonel modifikasyonları da belirleyerek bu bağlamda beraberinde yeni bir biyolojik bakış açısının da getirmesini sağlar (113). Günümüze kadar belirlenen transkriptom profillenmesinin yukarıda ifade edilen uygulamalarına dışında diğeri birkaç uygulamaları olarak; yeni kırılma durumları ortaya koymak, gen füzyonları, SNP'ler ve diğeri özgün mutasyonları belirlemek gibi sıralanabilmektedir (111, 114). Transkriptom analizleri, tek bir deneyle kapsamlı bir verinin ortaya çıkarılmasına olanak sağlar (111, 115).

RNA-dizileme, mikroarray'de olduğu gibi önceden bilinen herhangi bir sekans bilgisine ihtiyaç duyulmaz. Böylece ikincil yapı bilgisine ve önceden bilinen bir sekansı baz alarak herhangi bir prop dizaynına ihtiyaç duymaz. Bu nedenle, her hangi bir bireydeki transkriptom profillenmesi, özellikle model olmayan bir tür için çok ilgi çekici görülmektedir. Bu amaç için RNA-dizileme verileri, *de novo* gen modeli analizinde kullanılabilir (111, 116). Bu uygulama bir anlamda yeni bir devrim olarak da tanımlanabilecek RNA-dizileme, gün geçtikçe bilimsel biyolojik çalışmalarda artan dinamik bir alana ve hassasiyete sahiptir (111, 117). RNA-dizileme, teknolojisi ile biyolojik örneğe ait dizilenen ve sayılan transkriptin ifade seviyesini dijital olarak göstermeyi sağlayarak kantifikasyon açısından oldukça güvenilir bir araç olarak da öne çıkmaktadır. Bu teknolojinin önemli bir parametresi olarak, sekans derinliği (deep-seq) değerinin yüksek çıkması durumunda, sınırsız bir dinamik alan oluşması ve ender bulunan transkriptlerin belirlenmesinde oldukça ideal bir araç olarak kullanma değerini gün geçtikçe daha güçlü bir şekilde korumaktadır (111). RNA-dizileme, transkriptler arasında sekans varyansları hakkında da geniş bir bilgi sağlarken transkripsiyonel mutasyonlar ve onun genomik içerikleri hakkında geniş bilgiler içeren zengin bir ürün ortaya koymaktadır (118). Çünkü ekzonların nasıl birbiriyle bağlantı kurduğunu, bu durumdan kaynaklanarak, alternatif kırılma olgusu nedeni ile transkripler içerisindeki olmuş olan varyasyonlara ait dizileri de ortaya koymada yenilikçi bir araç olarak büyük bir hızla kullanılmaktadır. Son olarak RNA-dizileme teknolojisi, fonksiyonel gen haritasını çıkarmak amacı ile yapılan çalışmalarda, allele ya da izoform yapılarına özgün gen ifade bilgisini sağlayan, ekzon sınırlarını ve UTR (Un Translated Region) uzunluklarını belirleyebilen, güvenilir bir araç olarak kullanılmaktadır (111, 119).

2.9.1. Geçmişten günümüze kadar transkriptomik çalışmalarda kullanılan araçlar

Bir canlıda ya da ona ait herhangi bir dokusunda belirli bir zamanda dışarıdan gelen çeşitli ajanlara karşı oluşturulan RNA popülasyonunun tümüne transkriptom denilmektedir (120). Bir biyolojik organizmadaki hücrelerin genomları aynı olmasına rağmen transkriptom motifleri değişiklik gösterebilmektedir (121). Farklı mRNA'ların hücresel miktarlarının ölçülmesi ile gen ekspresyon motiflere çıkarılmaktadır (122). Yıllardır yüksek çıktılı verilerin elde edilmesine olanak sağlayan ifade edilmiş dizi etiketleri (EST) dizileme, gen ifadelerinin seri analizi gen ifadesi (SAGE) gen ifade mikroarrayleri ve RNA dizileme gen ifade motiflerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemlerdendir (111).

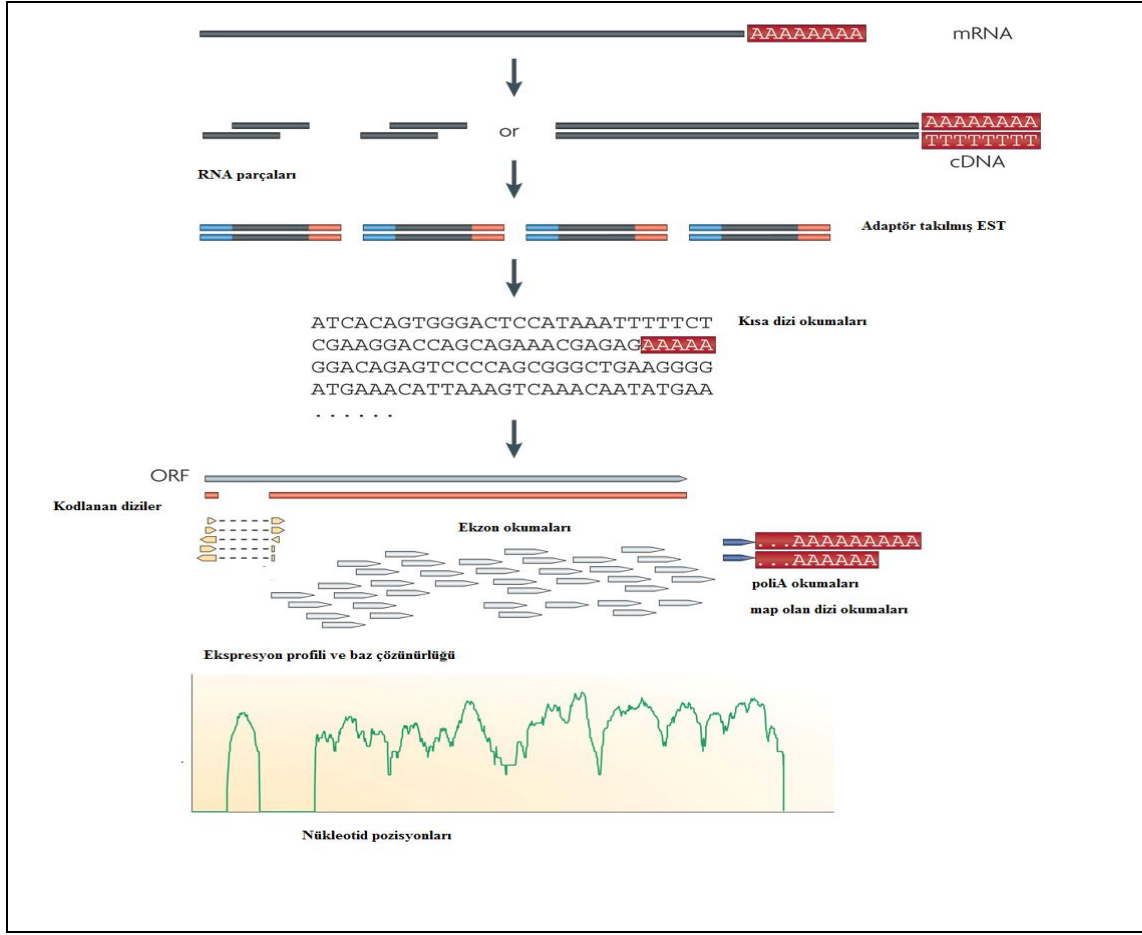
Ancak hibridizasyon tabanlı çalışma prensibine sahip mikroarray metoduna karşılık, dizi-tabanlı yaklaşımlar doğrudan cDNA dizilemesini yapmaktadır. cDNA dizilemesinde ilk başlarda Sanger dizileme teknolojisi EST kütüphaneleri oluşturmak için kullanılmıştır (123, 124). Fakat bu metot, nispeten düşük hacimli olması, pahalı ve genelde kantifikasyon yapamaması gibi bazı önemli sınırlamalar içermektedir. Bu kısıtlamaların üstesinden gelmek için işaretleme tabanlı gelişmiş metotlar geliştirilmiştir. Örneğin SAGE (serial analysis of gene expression) Türkçe ifadesi ile gen ekspresyonunun seri analizi (125, 126), CAGE (cap analysis of gene expression) (110, 127) ve MPSS (massively parallel signature sequencing) yani yoğun paralel imza dizileme gibi metotlar transkriptomik çalışmalarda oldukça yaygın kullanılmaktadır (128-130). Bu işaretlenmeye dayalı yaklaşımlar yüksek hacimli olup gene ekspresyon seviyesini dijital bir biçimde sağlayabilmektedir. Ancak bunlardan birçoğunun, pahalı olan Sanger dizilime ile yapılması ve önemli derecede kısa işlatlenmiş bölümlerin olması referans bir genomuna karşı benzersiz bir haritalama yapılamamaktadır (110). Ayrıca transkriplerin sadece bir bölümünü analiz etmesi nedeni ile izoformlar genelde birbirlerinden ayırt edilememektedir. Bu dezavantajlar ve sınırlamalar klasik dizileme teknoloji kullanımı, transkriptomik çalışmalarda hedeflenen yapılarının annotate edilmesinde bazı önemli sınırlamalar getirmektedir.

Bu sınırlamalara karşın günümüzde yüksek hacimli teknolojik metotlar ile RNA-dizileme çalışmaları yapılmaktadır (111). Bu metotlar kullanarak oldukça büyük ve karmaşık olan ökaryot transkriptomları hakkındaki bakış açısını değitirilmiştir. Yeni nesil dizileme ile RNA-dizileme metodu, diğer metotlardan farklı olarak transkriptlerin ve izoformların seviyelerini oldukça bütüncül ve hasas bir şekilde ölçmektedir.

Son zamanlarda yeni yüksek hacimli genom dizileme teknolojilerinin gelişmesiyle transkriptomların haritalanması ve miktarların belirlenmesi daha kolay hale gelmektedir. Bu metot, RNA-Seq (RNA-Dizileme) olarak tanımlanmıştır (110). Bu yöntem, hali hazırdaki yaklaşımlara nazaran daha avantajlı olup, ökaryot transkriptomların analizinde bir devrim olması beklenmektedir. Bu yöntem zaten *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *A. thaliana*, fare ve insan hücrelerinde de uygulanmaktadır (109, 131-134).

2.9.2. Transkriptomik çalışmalarda RNA-dizileme teknolojileri ve avantajları

RNA-dizileme son zamanlarda gelişen derin dizileme teknolojisini kullanmaktadır. Genel olarak bir RNA popülasyonu olarak total RNA, iki ucuna adaptör bağlanarak cDNA'ya dönüştürülmüş poli(A) amplifiye olmuş ya da olmamış her bir molekül daha sonra yüksek hacimli dizileme ile bir uçtan (single end dizileme) veya iki uçtan (paired end dizileme) ile dizilir. Genom dizileme teknolojisine göre farklılık göstermekle birlikte okumalar, genellikle 30-400 bp arasında değişmektedir. Prensipte herhangi bir yüksek hacimli dizileme teknolojisi (135) RNA-dizileme için kullanılabilir. Bu bağlamda Illumina IG (109, 113, 131, 132, 136), Applied Biosystems SOLiD (134) ve Roche 454 Life Science (137-139) sistemleri RNA-dizileme amacı için kullanılmaktadır. Ancak Helicos Biosciences tSMS sistemi, RNA-dizileme çalışmalarında çok yaygın kullanılmamıştır. Ancak hedef cDNA çoğaltımının korunmasında bazı ek avantajlara sahip olduğu için uygun görülmektedir. Bu dizileme takibinde yapılan okumalar, referans genom ya da transkriptler ile hizalanabilir ve her bir genin ifade seviyesi ve yapısını içeren genom ölçekli transkript haritası genomik referans genom olmaksızın yeniden (*de novo*) birleştirme yaparak model olmayan organizmaların dizileme çalışmalarında oldukça önemli bir rol oynamaktadır.



Şekil 2.14. Tipik bir RNA Dizileme deneyi akış basamakları (Wang vd., 2010'dan değiştirilmiştir)

RNA-dizileme platformları, array teknolojisi gibi hibridizasyon tabanlı yaklaşımların aksine RNA-dizileme, var olan genomik sekans bilgisiyle transkript belirleme mantığına ile sınırlı değildir. Örneğin Illumina teknolojisini kullanarak, tatlı patates (*Impomoea batatas* L.)'e (140) ait transkriptom analizi, CAM bitkilerde model sayılan *Mesembryanthemum crystallinum*'e ait mRNA ifade profili (141) ayrıca birçok bitkiye ait mitokondri transkriptom analizleri RNA-dizileme metodu ile gerçekleştirilmiştir (142). Bu durum yukarıda da ifade edildiği gibi RNA-dizileme teknolojisinin, henüz genomu açıklanmamış ve model olmayan organizmalar için çok ilgi çekici bir araç haline gelmiştir. RNA-dizileme, tek bç'te kadar transkripsiyon çözünürlük sınırlarını bile tamamı ile açıklayabilmektedir. Dahası gen düzenlemesinde önemli bir role sahip olan miRNA'lar gibi 30 bç'den kısa dizilere sahip genom oyuncularının RNA-dizileme okumaları oldukça güvenilir bir şekilde ortaya koymaktadır. Bu avantajlar, RNA-dizileme teknolojisinin karmaşık transkriptom çalışmaları için çok kullanışlı bir yöntem olduğunu göstermektedir. Buna ek olarak, RNA-dizileme, önemli bir varyasyon kaynağı olan SNP ve SSR (simple

sequence repeat) gibi belirteçlerin belirlenmesi için de yaygın bir biçimde başvurulan bir araç metot haline gelmiştir transkript içindeki bölgelerde sekans varyasyonlarını da (örneğin SNP) belirlemeye yardımcı olur (113, 134).

Aynı zamanda RNA-dizileme, kantifikasyon için bir sınıra sahip değildir sadece elde edilen diziler ile ilişkilidir. Sonuç olarak, RNA-dizileme tekniği ifade seviyesi için geniş bir dinamik bir veri oluşturmaktadır. Buna karşılık mikroarraylerin çok düşük ve çok yüksek örneğin 9 kat üzerindeki ekspresyonlara karşı olan hassasiyetsizliği sebebi ile RNA-dizilemeden daha küçük bir dinamik aralığa sahiptir olduğu kabul edilmektedir (109).

Hibridizasyona bağlı yüksek hacimli platform ile sentez, ligasyon ya da köprü yolu ile dizi sentezleme yapan platformlar arasındaki ilişkiye biraz daha açıklık getirmek amacı ile örnek bir çalışma ile pekiştirilecek olunursa, mısır bitkisinde (*Zea mays* L.) büyüme ve gelişme ile ilgili genleri ve dahil oldukları yolakları belirlemek için çeşitli dokularından örnekler alınarak RNA-dizileme ve mikroarray yöntemi ile gen ifade seviyelerinin karşılaştırılmasını ele alınan bir bilimsel çalışma sonucunda her iki metot, orta seviyedeki gen ifadesinin bulunduğu ve birbirleri ile oldukça uyumluluk göstermiştir (143). Çok düşük ve yüksek seviyede gen ifadesinin olduğu verilerde iki teknik arasındaki korelasyon çok düşük çıkmaktadır aynı zamanda RNA-dizileme verileri, qRT-PZR ile belirlenmek istendiğinde gen ifadesi açısından oldukça yüksek doğruluk ve paralellik göstermektedir (109). Ayrıca, RNA-dizileme sonuçlarının biyolojik ve teknik replikalar için yeniden üretilebilirliği de yüksek seviyededir (109, 134). Son olarak herhangi bir klonlama safhasının olmaması, Helicos teknolojisi ile yapılan transkriptomik çalışmalarda herhangi bir amplifikasyon adımının olmaması ve RNA-dizileme'nin az miktardaki örneğe ihtiyaç duyması, tekniğin önemli farklılıklarını oluşturmaktadır. Bütün bu özellikler göz önüne alındığında RNA-dizileme, kantitatif bir şekilde oldukça yüksek hacimde tüm transkriptom araştırmasına olanak sağlayan ilk metottur. Bu metot, hem annotasyon için tek baza kadar çözünürlüğe sahip hem de genom ölçümünde dijital gen ifade seviyesini vermektedir. Ayrıca Sanger metodunda geniş ölçekte olan EST dizileri ve tilling arraylerde gerekli maliyetten daha düşük bir maliyet ile çalışabilmektedir.

2.10. RNA-Dizileme Tekniğinin Başlıca Sınırlamaları

2.10.1. Kütüphane yapılandırılması

Transkriptom için ideal olan metot, tüm RNA (küçük ya da büyük boyuttaki RNA)'ların kantifikasyonunun doğrudan belirlenmesidir. Bilindiği gibi RNA-dizileme protokolü için çok az aşama olmasına rağmen, tüm transkript profillenmesindeki karmaşıklığı azaltmak için cDNA aşamasında birkaç manipülasyon gerektirebilmektedir. Küçük RNA (miRNA, piRNA, siRNA)'lar adaptör ligasyonundan hemen sonra okunabildiği halde büyük RNA'larda ise durum biraz farklıdır. Bu durumdaki RNA'lar, derin dizileme teknolojisine uygun hale gelebilmek için 200-500 bp arasında fragmentlere dönüştürülmek zorunda kalmaktadır (111).

Bu amaç için birçok RNA fragmentasyon metodu mevcuttur (RNA hidrolizi ve nubilizasyonu gibi) cDNA fragmentasyonu için ayrıca sonikasyon veya DNaseI ile muamele etme gibi yöntemler de kullanılmaktadır. Bu metotların her biri kendine göre avantaj ve dezavantajlara sahiptir (132). Ancak cDNA fragmentasyonu, transkriptin 3' ucuna ait dizinin tanımlanması için daha güçlü bir eğilim göstermektedir. Böylece, uçlara ait dizinin belirlenmesinde kayda değer bilgiler sağlamaktadır (109).

Kütüphane oluşturulması esnasında yapılma zorunluluğu gerektiren bazı düzenlemeler, RNA-dizileme sonucunun analizini karışık hale getirebilmektedir. Örneğin, birbirine benzeyen oldukça kısa okumalar, cDNA kütüphanesinin çoğaltımı sonucu elde edilebilmektedir. Bunlar bol RNA türleri olabildiği gibi PZR kalıntıları da olabilmektedir. Bu olasılığın hangisinin doğru olduğunu ayırmak için izlenecek bir yol olarak, aynı dizilerin farklı biyolojik tekrarlarda gözlenmesidir. İlgili kütüphanenin kurulmasında bir diğer anahtar, özgün ya da özgün olmayan iplik kütüphane hazırlanmasıdır (131, 134). Bu kütüphaneler, transkriptom annotasyonu için özellikle karşı yönde oluşan, transkripsiyonla örtüşen bölge için transkriptlerin yönlendirilmesi hakkında verimli bilgi elde edilmesinde avantaj sağlamaktadır (136, 144). Ancak, özgün iplik kütüphane oluşturulmasındaki adım (134) veya verimsiz olan RNA-RNA ligasyonu gerektirdiğinden oldukça güç olan bir sınırlama olarak tanımlanabilmektedir (131). Dahası antisens transkriptler, reverse transkripsiyonun kalıntısı olmadığından bu karmaşıklık yüzünden şimdiye kadar birçok çalışmadaki cDNA analizi, iplik bilgisi olmaksızın analiz edilmektedir (145).

2.10.2. Veri zenginleştirmedeki biyoenformatik problemler

Diğer yüksek çıktılı dizileme tekniklerinde olduğu gibi, RNA-dizileme tekniğinde de çok miktardaki verinin işlenmesi, düzeltilmesi ve depolanmasını içeren etkili metotların geliştirilmesi gibi bazı sorunlarla karşılaşılmaktadır. Görüntüleme analizleri, baz çağırma ve düşük kalitedeki okumaların uzaklaştırılması gibi hataların üstesinden bir şekilde gelmek gerekmektedir. Yüksek kaliteli okumalar bir kere elde edildiğinde, veri analizindeki ilk iş referans bir genoma başvurma veya transkriptom yapısını ortaya çıkarmak için elde edilen genomik dizileri belli bir sıraya dizmeden önce kontiglere dönüştürülmelidir. Okumaları haritalamak üzere ELAND, SOAP (146), MAQ (147) ve RMAP (103) içeren çeşitli yazılımlar bulunmaktadır. Ancak bu yazılımların uygunluğu elde edilen dizilerin uzunluk ve kısalık durumuna göre ve genom dizileyen platformlara göre değişmesi gerektiği gibi bir sınırlama gerekmektedir. Bir diğer biyoenformatik sınırlama da, kısa transkriptomik okumalarına ait, ekzon bağlantılarını veya sadece poli (A) uçlarını kapsayan okumaları içerdiklerinden bunlar aynı yolla analiz edilememektedir (111). Karmaşık transkriptomlarda, yaygın alternatif ve trans kırılma nedeniyle kırılma bağlantılarının yanındaki okumaların haritalanması daha zor bir problemdir. Buna bir çözüm olarak, bilinen ve belirlenen bütün bağlantı dizilerini içeren bağlantı kütüphanesini oluşturarak okumaları bu kütüphaneye haritalamaktır. Transkriptom analizlerinde karşılaşılan problemlerden biri olarak, iki uzak dizi veya iki farklı genin ekzonları arasında gerçekleşen yeni alternatif kırılma durumlarını tanımlamak için henüz basit biyoenformatik yazılımların gelişme altında olmasıdır. Daha büyük transkriptomlarda karşılaşılan başka bir sorun da, belirgin bir dizi okumasının genomda pek çok bölge ile eşleşebildiğinden dizi sıralaması da karmaşık olabilmektedir. Bu duruma da bir çözüm olarak, çoklu eşleşen okumaların kendi komşu dizilerine haritalanarak, okuma sayısına oransal bir biçimde ortaya koyarak belirlenebilmektedir. Bu metot, düşük kopya sayısına sahip tekrarlı dizilerde başarılı olmuştur. Yüksek kopya sayısına sahip kısa okumalar (>100) ve uzun tekrarlı bölgelerin varlığı da sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Örneğin; 454 teknolojisini kullanarak daha uzun dizi okumalarının elde edilmesi, çoklu eşleşme problemini azaltabilir. Buna alternatif olarak DNA'nın her iki ucundaki kısa dizilerin saptandığı paired-end dizileme stratejisi, haritalanan parça uzunluğunu 200-500 bp'ne kadar uzatmaktadır ve gelecekte kullanışlı bir yöntem olarak görülmektedir (111). Dizileme hataları ve polimorfizmler, sadece tekrarlı DNA için değil tüm genom için haritalama problemlerini de çıkarabilmektedir. Genellikle tek baz farklılıkları problem

olmamaktadır çünkü çoğu haritalama algoritması, bir veya iki baz farklılıklarına uyum sağlamıştır. Ayrıca daha büyük farklılıkları çözmek polimorfizm ve daha derin dizileme kapsamı için genom anotasyonunun bilinmesini gerektirmektedir (111).

2.11. Transkriptomik Çalışmalarda RNA-diziliminin Getirdiği Yenilikler

2.11.1. Maliyete Karşı Kapsamlı Okuma

Yeni nesil dizileme platformları ile gerçekleştirilen RNA-dizilim çalışmalarının sonucunda elde edilen önemli bir konu da, ortaya çıkan dizi miktarı veya elde edilen transkriptlerin yüzdesi olabilmektedir. Büyük genomlar daha çok dizileme derinliği gerektirir ve bu duruma bağlı olarak da nadir bir transkripti veya varyantı belirlemek de daha fazla derinlik gerektirmektedir. Yeni nesil derin dizileme araçları ve klasik dizileme yöntemlerinin ortaya çıkardıkları veri büyüklüğü karşılaştırıldığında, derin dizileme araçlarının oldukça daha az maliyetli olmasının yanında, zaman olarak ta kısa bir süre içinde dizileme işini gerçekleştirmektedirler. Bu bağlamda RNA-dizilemenin bu avantajları, dizileme sistemlerinin daha da gelişmesi ile ortaya çıkan bir yenilik olarak kabul edilmektedir.

2.11.2. Yeni transkript adaylarının bulunması

RNA-dizilemenin önemli bir amacı da, gerçekleştirdiği transkriptom verilerinden yeni bir transkript dolayısı ile yeni bir fonksiyonu ortaya koymak için güçlü bir araç niteliğinde olmasıdır. Bu anlamda yukarıda anlatılan RNA-dizilemenin sınırlamalarının aksine RNA-dizileme, hücredeki tüm transkriptoma büyük bir resim olarak bakmamızı sağlayarak bir kısım farklı hücre ve tür için organizasyonu sağlamak gibi avantajları mevcuttur. RNA-dizileme metodu geliştirilmeden önce maya, *Drosophila melanogaster* ve insan genomlarında tahmin edilenden daha fazla transkript olduğu bilinmekteydi. Ayrıca, maya ve insanda çoğu genin bir miktar uzak izoformu bulunmuştur. Bununla birlikte çoğu transkript ve ekzonun başlangıç ve bitişleri tam olarak çözülememiş ve splized heterojenitesi çok az anlaşılmıştır. Yüksek çözünürlük ve duyarlılığa sahip RNA-dizileme pek çok yeni transkribe edilmiş bölge ve bilinen genlerin kırılma izoformları açığa çıkarılmış ve çoğu genin 5' ve 3' sınırları belirlenip haritalanmaktadır (111).

2.11.3. Gen haritalanması ve ekzon sınırların belirlenmesi

RNA-dizileme tekniğinin tek baza kadar belirleme çözünürlüğünün olması özelliği ile, genlerin tam ve güvenilir bir şekilde atıflandırmasında önem kazanmaktadır. Ayrıca gen sınırları bilinen transkriptlerde bulunan intronların yanında yeni belirlenmiş transkribe

edilen bölgelerin tanımlanması yaparak 3' sınırlarında, poli(A) etiketlerini aratarak doğru bir etiketleme sağlamaktadır. Yine intronlar da GT-AG dinükleotidlerinin yanındaki korunmuş dizi etiketleri de aratarak haritalama yapılabilmektedir. Bu metotlar kullanılarak *S. cerevisiae* de ifade edilen tüm genler, 5' ve 3' uçlarında sırasıyla %80 ve %85 oranında haritalanmıştır. Benzer bir şekilde *S. pombe*'deki sınırlar da RNA-dizileme veri ve tiling array verisi birleştirilerek belirlenmiştir (134). Transkript sınırlarının haritalanması, ökaryotik gen organizasyonunda yeni özellikleri ortaya çıkarmıştır. Çoğu maya geni, 3' uçlarında çakışmış olarak bulunmaktadır. Ayrıca fare transkriptlerinin 3' ekzonları, antisense ifade ile zenginleştirilmiştir (134). Gene ait bu özellikler ortaya çıkarılarak, etiketlenmiş genlerde ilginç olabilecek yeni düzenleyici nitelikler ortaya çıkabilmektedir. (148, 149).

Geniş ölçüde yapılan transkript karmaşıklığı ya da güçlüğü RNA-dizileme, kantitatif olarak bilinen splice bağlantı okumalarını arama yoluyla kırılma çeşitliliğini incelemek için kullanılabilirdiği gibi yenilerini bulmak için de kullanılabilir. İnsanlarda bilinen bütün kırılma durumlarının %11'i yani 31,618 tanesi belirlenerek ve 379 yeni kırılma durumu ortaya çıkarılmıştır. İnsan hücreleriyle yapılmış diğer bir çalışmada, 4,096 tanesi yeni olan 94,241 bağlantı bulunarak ileriki çalışmalarda alternatif kırılmaya ait mevcut formlarında ekzon atlaması olduğunu göstermiştir. Farelerde, 3,462 gende yoğun alternatif kırılma gözlenmiştir. Buna ilaveten, birçok fare geninden bağlanan kırılma durumu belirlenmiştir (150).

2.11.4. Transkripsiyon seviyesini dijital olarak tanımlanması

RNA-dizileme, kantitatif olduğu gibi RNA ifade seviyelerini mikroarray yöntemine göre daha kesin olarak belirlemek için de kullanılmaktadır. Prensipte bir hücre popülasyonundaki her molekülün tam miktarını belirlemek ve deneylerden elde edilen sonuçları karşılaştırmak mümkündür. Ancak miktarı belirtmek için çeşitli metotlar kullanılmaktadır. RNA parçalanmasını takip eden, her ekzonun daha benzer kapsamını ve gen ifade seviyelerini veren cDNA sentezi toplam okuma sayısından anlaşılabilir. Bu okumalar, bir genin ekzonlarında yer alan, benzersiz olarak haritalanmış ekzonların uzunlukları tarafından standartlaştırılmıştır. Gen ifade seviyeleri qRT-PZR ve yakinen uyumlu metotlarla ve RNA spike-in kontrolleri ile belirlenmiştir. RNA-dizileme tekniğinin en etkili avantajlarından birisi de veri setlerinin gelişmiş normalizasyonu olmadan farklı doku veya şartlardaki transkriptom dinamiğini kontrol altına almasıdır. RNA-dizileme,

mayanın vejetatif büyümesi, maya mayozu ve fare embriyonik kök hücre farklılaşması boyunca gen ifadesinin tam olarak görüntülenmesinde, gelişim süreci boyunca gen ifadesi değişikliklerinin izlenmesinde ve farklı dokular arasında gen ifadesi değişikliklerinin digital ölçümü için kullanılmıştır (150). Bu avantajlardan dolayı RNA-dizileme gelişim sürecinde, normal fizyolojik değişmelerde, hastalıklı ve normal dokular arasında güçlü bir karşılaştırma yapmayı sağladığı gibi hastalıklı bölgelerin alt sınıflandırmasına da olanak sağlayan biyomedikal örneklerin analizindeki transkriptom dinamiklerini anlamada oldukça faydalı görülmektedir (134). Okumaların dijital olarak belirlenmesi için gerekli bir metot olan, RPKM (reads/Kb transcript length/milion total reads) (132) bir muameleye tanıtılmış genlerin ifadelerini birbirleri ile karşılaştırılmaktadır. RPKM değerinin hesaplaması şu formül ile gerçekleştirildiği belirlenmiştir. $RPKM = (10^9 * C)/(N * L)$ (C: bir gene map olan okuma sayısı, N: deneyde map olan total okuma sayısı, L: gene ait ekzon uzunluğu (bç) (132). Okumaların ifade farklılıklarını ortaya koymak için de DESeq (Differential expression of Sequence) metodu ile kullanılarak belirlenebilmektedir (151). Sonuç olarak, devrim niteliğinde tanımlanabilecek bir yöntem olan RNA-dizileme, hala kullanımının ilk aşamalarında olmasına rağmen daha evvelden geliştirilmiş transkriptomik metotlara göre daha çok avantaja sahiptir. RNA-dizileme için gelecekteki sorun, daha karışık transkriptomların hedeflenmesi için bütün genlerdeki nadir RNA izoformlarındaki ifade değişimlerinin tanımlanması ve izlenmesidir. Bu hedefe ulaşmayı sağlayacak teknolojiler pair-end dizileme, özgün iplik dizileme ve kapsamla derinliği arttıracak daha uzun dizilerin kullanımınıdır. Dizilemenin maliyeti düşmeye devam ettiği için RNA-dizileme tekniğinin transkriptomun dinamiğini ve yapısını çözmeyi de içeren çoğu uygulama için mikroarray tekniği ile yer değiştireceği düşünülmektedir.

3. GEREKÇE VE AMAÇ

Yeni teknolojilerden biri olan Roche GS-454 FLX+ (pirodizileme) ile transkriptom analizi günde yaklaşık 1 Gb veri okuma yapabilmektedir. Ayrıca, bu teknolojinin doğruluğu, güvenilirliği, uzun okuma yapabilen ve yüksek hacimli olma özelliği ile oldukça yaygın kullanılan bir sistem haline gelmiştir. Bu teknolojinin kullanılması ile yeni ya da nadir görülen genler ve yer aldıkları yolaklar ortaya çıkarılabilmektedir. Sahip olduğu bu özelliklerinden dolayı GS-454 FLX+ teknolojisi büyük genomlara sahip bitkileri ele alan çalışmalarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. GS-454 FLX+ sistemi şimdiye kadar neredeyse çoğu saygın dergilerde olmak üzere 1000 civarı genomik çalışmaların temelini oluşturmuştur. Sekanslama kimyasında, cihaz donanımının ve biyoenformatik programların daha gelişmiş olması sonucunda GS-454 FLX+ sistemi şuan 1kb nin üzerinde olan uzunluktaki okumaları yapabilmektedir. Roche GS-454 FLX+ ile haşhaş bitkisini konu alan çeşitli sayıda transkriptom profillemesi çalışmaları yapılmıştır (34, 152). Ancak, tebain üretim mekanizmasında henüz aydınlatılmayan noktalar olduğunu düşünerek ve gelecekte farklı bir işlevsel genomik yöntemiyle tebain üretim mekanizmasını ortaya çıkaran ayrıntılı bir çalışmanın yapılmadığı görülmüştür. Ayrıca elisitör uygulamasıyla alkaloit üretimi tetiklenmiş tebaince zengin haşhaşta yeni nesil dizileme yöntemiyle tüm transkriptom profilinin çıkarılması da henüz gerçekleştirilmemiştir. Bu anlamda BIA biyosentez yolağında oldukça önemli bir öncü madde olan tebain biyosentezinde rol alan genlerin tanımlanması oldukça büyük bir önem arzettiği gözönüne alınarak bu çalışma planlanmıştır. Bu amaçla, Roche GS-454 FLX+ cihazı kullanılarak ilk defa yüksek tebain üretimine sahip olan haşhaşın kapsül dokusunun MeJA ile muamelesi edilmesi sonucunda, tebain sentezi ile ilişkili gen ifadesindeki farklılıklar tüm transkriptom düzeyinde belirlenmiştir. Ayrıca tebain sentezinde etkili olduğu düşünülen transkripsiyon faktörleri ve transpozon elementleri, tebain sentezinde rol oynayan genleri regüle eden miRNA'lar ve onların hedef genleri bunlarla birlikte tebaince zengin haşhaş çeşidine özgü varyasyonları belirleyebilme amacıyla SSR motifleri ortaya çıkarılmıştır. Böylece bütüncül bir tarama yapıldığı için tebain üretim mekanizmasında hangi gen farklılıkları olduğu belirlenmiş, genlerin birbirleriyle olan koordinasyonu ve regülasyonu hakkında önemli bilgiler elde edilmiştir. Söz konusu genler veri bankalarında taranarak tanımlanmıştır. qRT-PZR ile analizi yapılan genlerin bazıları için doğrulama işlemi de gerçekleştirilmiştir.

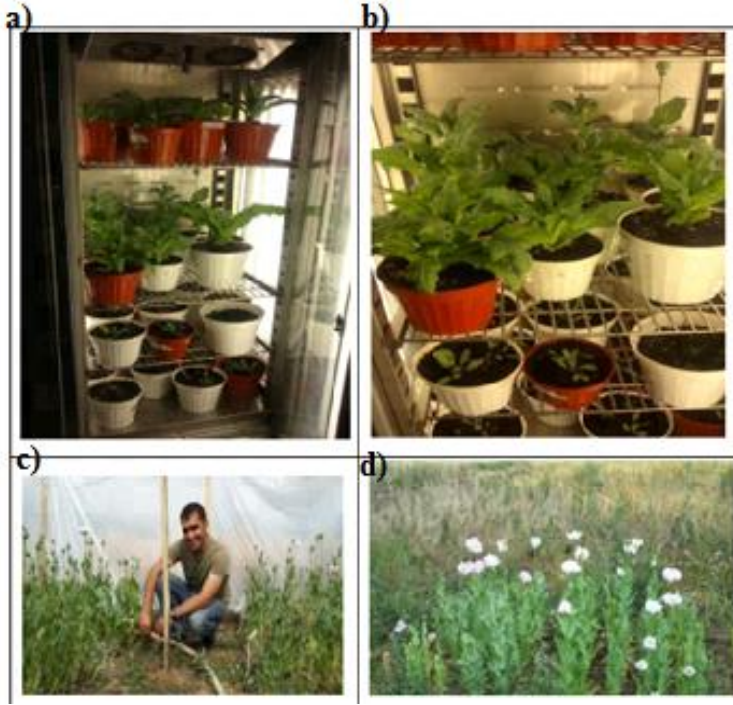
4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. Bitki Materyali ve Yetiştirilmesi

Tebain içeriği zengin *Papaver somniferum* L.'nin TMO-T çeşidi Toprak Mahsulleri Ofisi, Haşhaş Dairesi'nden sağlanarak Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü arazisine 3 tekerürlü 3 sıra şeklinde ekilmiştir. Aynı zamanda bitkiler sera ve bitki büyüme kabinlerinde saksılarda olacak şekilde 20 °C/18 °C de 16/8 saatlik (aydınlık/karanlık) fotoperiyotta sera şartlarında %55-60 nem koşullarında yetiştirilmiştir (Şekil 4.1). Bitki petallerini dökmeye başlar başlamaz uygulama yapılmış ve dokular hasat edilmiştir.

4.2. Metil Jasmonat (MeJA) Uygulaması

Metil jasmonat (MeJA; Sigma, Almanya), haşhaşa alkaloid biyosentezi için kimyasal indükleyici ajan (elisitör) olarak kullanılmıştır. Uygulama için, 10 ml saf etanol içerisine 229,2 µl MeJA eklenerek 100 mM ara stok MeJA çözeltisi hazırlanmıştır. 100 µM uygulama çözeltisi hazırlamak için de ara stok çözeltisinden 100 µl alınarak üzeri steril saf su ile 100 ml'ye tamamlanarak içine 100 µl Tween-20 eklenmiştir. Kontrol bitkilerine uygulanacak karışım için 100 ml su içerisine 100 µl etanol ve 100 µl Tween-20 eklenmiştir. Tarla koşullarında yetiştirilen bitkilerde gelişim daha iyi gerçekleştiğinden MeJA uygulaması için bu bitkiler kullanılmıştır. Uygulama için öncelikle bistüri yardımı ile kapsülden başlayarak bitkinin gövde, yaprak dokuları zedelenecek ve 100 µM MeJA çözeltisi püskürtme yöntemi ile muamele edilmiştir. Çiçek açmış olan bitkiler petallerini döktükten 2 gün sonra boyları ve kapsül büyüklükleri yaklaşık olarak eşit olanlar seçilmiş ve hem kontrol hem de uygulama bitkilerinin kapsül, gövde ve yapraklarında steril enjektör ucu ile hafif yaralanmalar yapılmıştır. 0., 3., 6. ve 12. saatlerde hasat edilmek üzere 4 farklı bitki grubuna MeJA, kontrol bitkilerine kontrol çözeltisi, üzerlerinden çözelti damlayacak hale gelene kadar, sprey yoluyla uygulanmıştır. Seçilen bitkilerin mümkün olduğunca morfolojik ve fizyolojik olarak aynı durumda olmalarına dikkat edilmiştir. Bitkiler şeffaf poşetlere alınıp hızla sıvı azot içinde muhafaza edildi. Daha sonra materyaller ToF-LC/MS ölçümleri ve RNA izolasyon çalışmalarında kullanılmak üzere -80 °C derin dondurucuya alınmıştır.

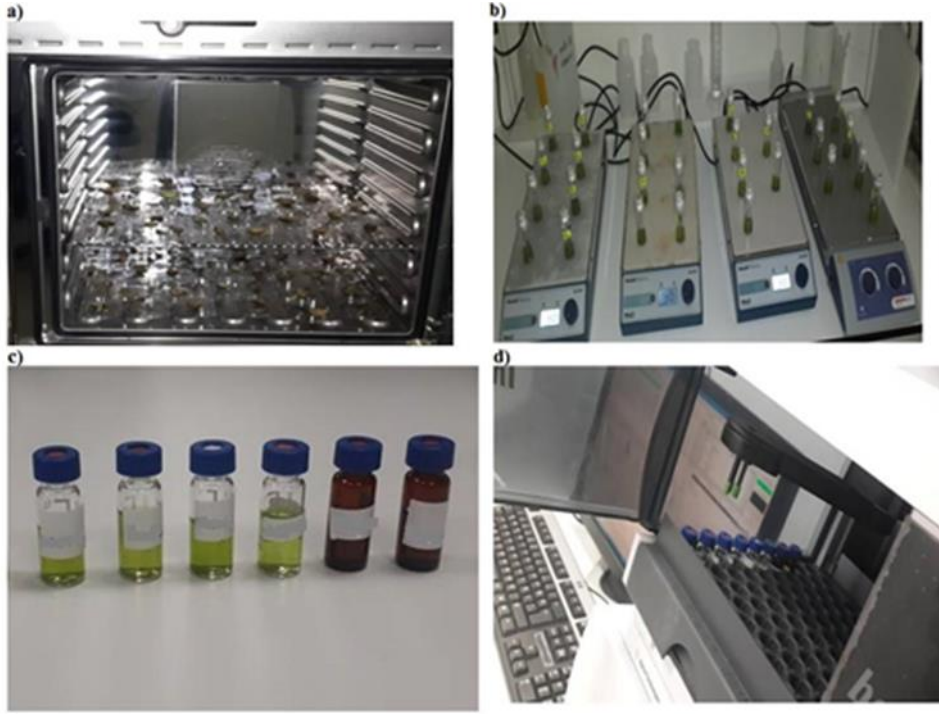


Şekil 4.1. Bitkilerin büyüme kabinlerinde (a,b) ve tarla şartlarında yetiştirilmesi (c,d)

4.3. Alkaloitlerin ToF-LC/MS Ölçümleri ve Analizi

MeJA uygulaması sonucunda bitkilerde BIA sentezinin tetiklendiğini göstermek için haşhaş örnekleri alınarak ayrıntılı ToF-LC/MS analizleri yapıldı. MeJA uygulamasının 0, 3, 6. ve 9. saat dilimlerine ait bitkilerden üç kontrol ve üç uygulama bitkisi olmak üzere her zaman dilimi için toplam altı tane bitki seçilmiştir. Tebain içeriklerinin saptanması için ToF-LC/MS analizleri Zulak *et al.* (2009) tarafından yapıldığı gibi takip edilmiştir (153). MeJA uygulaması yapılan ve kontrol bitkilerinden örnekler alınarak 2 gün 28 °C'de bekletilerek kurutulan (Şekil 4.2) bu numunelerden 0,1 g tartılmıştır. Eşit hacimli kaplarda 2,5 ml metanol (HPLC grade, Merck) eklenerek 24 saat karıştırılmıştır. Elde edilen sıvı ekstratlar mavi bant süzgeç kağıdından geçirilerek, 25 ml'lik balonlara süzülüp ve çözücüleri evapore edilmiştir. Bitki ekstratları tartılıp her birinin ağırlığı oranında çözelti hacmi 2000 ppm (mg/ml) olacak şekilde metanol (HPLC grade, Merck) eklenerek ultrasonik banyoda bütün ekstratlar çözülmüştür. Daha sonra 2000 ppm'lik ekstratlar 1/200 oranında seyreltilerek çözelti konsantrasyonu 10 ppm olacak şekilde steril enjektör ile alınarak 0,45 µm' lik filtrelerden viallere (1,5 ml) süzülerek ToF-LC/MS cihazında analize hazır hale getirilmiştir. Mevcut alkaloitlerin 100 ppm'lik stok çözeltileri kullanılarak her bir alkaloit için 10, 25, 50, 100, 250, 500 ve 1000 ppb derişiminde standart çözeltiler hazırlandı (Şekil 4.2) ToF-LC/MS (Agilent technologies, 1260 infinity LC, 6210 ToF-

LC/MS) cihazı ile morfin, kodein, tebain, noskabin, laudanosin, (S)-Retikülin ve papaverin alkaloid miktarları kantitatif olarak (mg alkaloid/g bitki) ölçülmüştür.



Şekil 4.2. ToF/LC-MS analizi haşhaş kapsüllerinin a) kurutulması, b) alkaloid ekstraksiyonu, c) standartların konsantrasyon ayarlaması ve d) alkaloid ölçüm için cihaza verme aşamaları

4.4. RNA İzolasyonu

ToF-LC/MS analizi sonucu tebain üretimi indüklendiği belirlenen kapsül örneklerinden RNA izolasyonu aşağıdaki protokole göre gerçekleştirilmiştir: Yaklaşık 300 mg bitki örneği sıvı azotla ezilerek 15 ml'lik falkonlara konulmuştur. Ezilmiş materyalin üzerine 3 ml RNA ekstraksiyon tamponu eklendikten sonra 65 °C'de 20 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra -20 °C'de bekletilen kloroform–izoamilalkol (24:1) çözeltisinden 3 ml eklenmiş ve buzda 5 dk inkübe edilmiştir. 4.250 g hızda 20 dk 4 °C santrifüj yapılmıştır. Süpernatant atılıp sıvı kısım dikkatli bir şekilde yeni 15 ml'lik tüplere alınmıştır. Üzerine 3 ml tekrar kloroform–izoamilalkol eklendi. 4.250 g hızda 20 dk 4 °C santrifüj yapılmıştır. Süpernatant steril 2 ml'lik eppendorf tüplere alınarak miktarı ölçülmüştür. Her tüpe eklenen süpernatant miktarının ¼ ü kadar buzda bekletilerek ve steril olan 10 M LiCl₂ eklendi ve bir gece -20 °C'de tutulmuştur. 12000 g hızda 1 saat 4 °C'de santrifüj yapılmıştır. Süpernatant atılıp peletin üzerine 2 ml %75 etanol eklenmiştir. Pelet dikkatlice yüzdürülmüş ve 1 saat -80 °C'de bekletilmiştir. 12000 g hızda 20 dk 4 °C santrifüj yapıp süpernatant dikkatlice alınmıştır. Peleti çözmek için üzerine 50 µl steril su eklenip 2 dk 60

°C'de bekletilmiştir. RNA izolasyonu aşamasında muhtemel DNA kalıntılarının RNA dizilemesini olumsuz etkilememesi için total RNA'ya Qiagen RNeasy Mini Kiti kullanarak DNaz muamelesi yapılmıştır. Ardından RNA'nın kalitatif ve kantitatif özelliklerini belirlemek için agaroz jel, Nanodrop 2000 (Thermo), Bioanalyzer 2100 (Agilent) gibi araçlar kullanılmıştır. Daha sonra RNA örnekleri -80 °C'de saklanmıştır.

4.4.1. İzole edilen RNA'ların DNase ile muamele edilmesi ve yıkanması

İzole edilen RNA'ların yıkanması için QIAGEN firmasına ait RNeasy Mini Kit (74204, Valencia, CA) kullanılmıştır. Kit protokolüne göre 10.000 ng miktarında RNA alarak yıkama işlemi şu şekilde yapılmıştır: 2 ml'lik ependorf tüp içerisine 10 µl buffer RDD, 2.5 µl DNase, yıkanması istenen RNA örnek miktarı ve üzerine toplam hacim 100 µl olacak şekilde steril su konur. 10 dk oda sıcaklığında inkübasyonu yapılır. Bu tüp içerisine 350 mikrolitre Buffer RLT eklenip, iyice karıştırılmıştır. Üzerine 250 µl %100 etanol eklenerek pipetaj yapıp, iyice karıştırılmıştır. Bu tüpte toplanan sıvının tamamı RNeasy Mini spin column içine yerleştirilmiştir. 15 sn 8000 g de santrifüj edilir. Spin column altında toplanan sıvı atılmıştır. RNeasy Mini spin column üzerine 500 µl Buffer RPE eklenir. 15 saniye 8000 g de santrifüj edilmiştir. Altta toplanan sıvı atılır. Tekrar RNeasy Mini spin kolon üzerine 500 mikrolitre Buffer RPE eklenmiştir. 2 dk 8000g de santrifüj edilmiştir. Altta toplanan sıvı atılmıştır. En son kalan sıvıların uzaklaştırılması için tekrar 1dk 8000g de santrifüj edilmiştir. RNeasy Mini spin kolon yeni 1.5 ml'lik tüp içine yerleştirilmiştir. Daha sonra kolonun üzerine 30-50 µl arası içinde RNaz enzimi olmayan su eklenmiştir. Daha sonra 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 1dk 8000 g de santrifüj edilerek yıkanan RNA'lar 1.5 ml'lik tüpte toplanarak RNA elüsyon gerçekleştirilmiştir. RNA miktarını ve kalitesini ölçmek için NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, Waltham, US) cihazı ve jel elektroforezi kullanılmıştır (Şekil 5.8). Elektroforez için % 2'lik agaroz jel hazırlanmış 1:1 oranında 3 µl RNA örneği, 1 µl yükleme boyası ile karıştırarak agaroz jele yükleme yapılmıştır.

4.5. Roche 454 FLX+ ile RNA dizileme

4.5.1. Transkriptom kütüphanesinin hazırlanması

Transkriptom kütüphanesinin hazırlanmasında ToF-LC/MS analizi sonucu tebain üretiminde indüklemeye görülen çeşitler kullanılmıştır. RNA dizileme için seçilen 8 genotipe (6. ve 9. saatler için bir örnek ve üç uygulama) ait kütüphaneler 454 FLX+ protokolüne uygun olarak hazırlanmıştır. Bu protokole göre, kullanılacak RNA'ların dizileme

aşamasına hazırlanmak için öncelikle RNA'nın parçalanma işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem için şu adımlar, sırası ile izlenmiştir; ilk olarak her bir RNA örneğinden 200 ng olacak şekilde 200 µl hacimde olan tüplere içerisinde alındıktan sonra tüplerin üzerlerine son hacim 19 µl olacak şekilde otoklavlanmış saf su ile tamamlanmıştır. Daha sonra bu solüsyon 1 µl daha sonra RNA'nın parçalanıp parçalanmadığını kontrol etmek için ayırmıştır. Geride kalan 18 µl solüsyona 2 µl RNA parçalama solüsyonu (0,1363 g ZnCl₂, 1 M Tris-HCl pH: 7.0 (1 ml) son hacim 10 ml) eklendikten sonra iyi vorteks yapılmıştır. Ardından solüsyon 2 sn süre ile minifüj yapılmıştır. Bu aşamada örnekler PZR cihazında 70 °C'de 30 sn inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda örnekler hızlı bir şekilde buza gömülmüştür. Daha sonra örneklerin üzerine 2 µl 0,5 M EDTA, pH 8.0 ve 28 µl 10 mM Tris-HCl, pH : 7,5 solüsyonlarından eklenerek vorteks yapıldıktan sonra 2 sn minifüj yapılmıştır. Bu adımdan sonra RNA parçalarını temizlemek için örneklerin üzerine SPRI (solid-phase reversible immobilization) boncukları içeren 80 µl RNAClean solüsyonu eklenmiştir. Ardından pipet yardımı iyice karıştırılıp, oda sıcaklığında 10 dk inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra örnekleri manyetik boncuk seperatörüne yerleştirerek boncukların tamamen tüpün yan tarafına yapışması beklendikten sonra, yapışmış olan boncuklara zarar vermeden pipet ile süpernatant kısmı uzaklaştırılmıştır. Örnekler manyetik boncuk seperatöründe bekletilerek bağlı bulunan boncukları temizleme amacı ile, her bir örneğe 200 ul %70 etanol eklenmiştir. Örneklerin üzerinde bulunduğu manyetik boncuk seperatörü birkaç kere yavaşça ters-düz edildikten sonra pipet yardımı ile etanol uzaklaştırılmıştır. Daha sonra örneklere ait tüpler kapakları açık bir şekilde manyetik boncuk seperatörün üzerinde 3 dk süre boyunca kurutma amacı ile bekletilmiştir. Daha sonra tüpler manyetik boncuk seperatöründen alınarak her birinin üzerine, 19 ul 10 m M Tris-HCl, pH 7,5 solüsyonundan eklenmiştir. Bu karışım 20 sn vorteks yapıldıktan sonra 2 sn minifüj yapılmıştır. Ardından boncukları pellet haline getirmek için örnekler manyetik boncuk seperatörüne yerleştirildikten sonra boncuklara zarar vermeden yaklaşık olarak 19 µl miktarında ki süpernantantı başka temiz bir 200 µl tüplere alınıp buz üzerinde bekletilmiştir. Daha sonra içinde 19 µl RNA bulunan tüpten 1 µl alınıp üzerine 2 µl otoklavlanmış steril su eklenerek protokülün başından ayırmış olan 1 µl RNA ile Agilent 2100 Bioanalyzer RNA 6000 Nano Chip üzerinde karşılaştırılmıştır. Bu aşama RNA örneklerimizin ZnCl₂ ile muamelesi sonucunda istenilen uzunlukta ki parçalama skalasının (450 bç ile 1200 bç) gerçekleşip gerçekleşmediği teyit edilmiştir. Bundan sonraki çift iplikli cDNA sentezi geride kalan 17 µl hacimdeki örnekler ile devam edilmiştir. Çift iplikli cDNA yapımına başlamak için ilk olarak RNA örnekleri denatüre edilmiştir. Bu

aşama için her bir örneğe 4 µl 400 uM konsantrasyonunda ki random primer eklenmiştir. 10 sn boyunca vorteks edildikten sonra minifüj ile 2 sn döndürülmüştür. Daha sonra örnekler 70 °C 10 dk boyunca edildikten hemen sonra buz üzerine alınmıştır. Ardından cDNA'nın ilk ipliğini sentezlemek için gerekli olan reaksiyon şartları ve solüsyonları aşağıda sıralanmıştır.

4.5.2. Birinci iplik cDNA sentezlenmesi

Bu aşamada her örneğe 4 µl 400 µM random Roche primer eklendikten sonra sırası ile her bir örneğe 8 µl 5x RT buffer, 4 µl DTT (0,1 M), 4 µl dNTP (10mM), 1 µl Protector RNaz inhibitörü (Roche Diagnostic SpA, Milan, Italy) ve 2 µl AVM RT (25 U/µl) eklendikten sonra total hacim 40 µl'ye tamamlanmıştır. Karışım iki saniye vorteksledikten sonra spin edilmiş, 25 °C'de 10 dk ve 42 °C'de 60 dk inkübasyondan sonra örnekler hızlıca buza alınmıştır.

4.5.3. İkinci iplik cDNA sentezlenmesi

Bir önceki aşamada elde edilen 40 µl hacmin üzerine sırası ile, 30 µl 5X ikinci iplik sentez bufferı, 72 µl ddH₂O, 1,5 µl dNTP (10 mM) ve 6,5 µl ikinci iplik sentez enzimi eklendikten sonra total hacim 150 µl'ye tamamlanmıştır. Karışım vorteksledikten sonra 16°C'de 2 saat inkübe edildikten sonra her bir örneğe 20 µl T4 DNA polimeraz eklenip 5 sn boyunca iyi vortekslenmiştir. Daha sonra örneklerin içinde bulunduğu tüpler 16 °C 5 dk süresince inkübasyona bırakılmıştır. Bu işlemin ardından reaksiyonu durdurmak amacı ile her bir tüpe 17 µl 0,2 M EDTA, pH :8 solüsyonu eklenerek, 5 sn vorteks yapıldıktan sonra minifüjde 2 sn döndürülmüştür. Bu adımın sonunda meydana gelmiş olan çift iplikli cDNA'nın arındırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Oluşan cDNA ürünü içerisinde AMPure boncukları kullanılarak çift iplikli cDNA pürifikasyonu gerçekleştirilmiştir

4.5.4. Amplikon kütüphanesinin pürifikasyonu

Bu şekilde oluşturulan havuzdan elde edilen amplikon kütüphanesinden, küçük kalıntı halindeki DNA fragmanlarının uzaklaştırılması için manyetik boncuklar kullanılmaktadır. Pürifikasyon için *Agencourt Ampure XP* boncuklar kullanılmıştır. Stok Ampure Boncuklar içeriğinde 1000 µl olacak şekilde 1.5 ml'lik ependorflara bölünmüştür. Pürifikasyon çalışmasına başlamadan önce Ampure Boncuklar vortekslenip ve daha sonra şu adımlar takip edilmiştir; 34 µl *Agencourt Ampure XP* ile amplikon kütüphanesinden elde edilen 40 µl karışım karıştırıldıktan sonra 10-12 kez pipetaj yapılarak, 5 dakika oda

ısısında bekletildikten sonra spin yapma ve tüpleri aşağıya doğru silkeleme hareketi yapılarak, boncukların ependorfların diplerine inmesi sağlanmıştır. Solüsyonla boncukların ayrılması için 1.5 ml'lik ependorflar manyetik boncuk seperatörüne koyularak ve 2 dakika bekledikten sonra berraklaşan kısım uzaklaştırılmıştır. Daha sonra taze hazırlanmış %70'lik etanolden 200 µl her bir tüpe koyulup. seperatörle beraber ters-yüz edildikten sonra berraklaşınca kadar bekledikten sonra berraklaşan kısım atılmıştır. Bir önceki basamak bir kez daha tekrarlanarak devam edilmiştir. Daha sonra ependorfların diplerinde kalan kısım alındıktan sonra tüpler kapatılıp spin yapılmıştır ve spinden sonra tekrar seperatöre yerleştirilerek bir kez daha spin yapıp pipetle kalan kısım alınmıştır. Ondan sonra kuruması için oda ısısında 3 dk bekletilmiştir. Mat görünüm oluşana kadar bekledikten sonra, örneklerin daha sonra fazla kurumasını önlemek için 16 µl 10 mM Tris-HCl, pH :7,5 solüsyonundan eklendi ve aşağı- yukarı çalkalanarak ıslanmaları sağlandıktan sonra vorteksleme yaparak 1-2 dk oda ısısında bekletilmiştir. Daha sonra tekrar seperatöre alındı ve ependorfların içeriği alınarak yeni 200 µl'lik tüplere aktararak böylece pürifiye edilmiş amplikon kütüphanesi elde edilmiştir.

4.5.5. Fragment uçlarının tamir edilmesi

Roche Rapid Library kiti kullanılarak 2,5 µl RL 10X PNK buffer, 2,5 µl RL ATP, 1 µl RL dNTP, 1 µl RL T4 polimeraz, 1 µl RL PNK, 1 µl Taq polimeraz karışımından her bir cDNA'nın üzerine 9 µl eklenmiştir. Daha sonra tüpler 25 °C'de 20 dk, 72 °C'de 20 dk ve en son 4 °C'de kalacak şekilde PZR cihazında inkübe edilmiştir.

4.5.6. Adaptör ligasyonu

Pürifikasyon, kantifikasyon, çoğalma ve dizileme işlemleri için DNA fragmentlerine kısa adaptörler bağlanma ihtiyacı duyulur. Bunun için, PZR'dan sonra her bir tüpe 1 µl RL adaptörü eklenmiştir. Karışım 5 sn vorteksledikten sonra spin edilip 25 °C'de 10 dk inkübasyona bırakılmıştır.

4.5.7. cDNA kütüphanesinden küçük fragmentlerin uzaklaştırılması

Adaptör bağlanan cDNA fragmentleri manyetik parçacık toplayıcısı ile ayrılıp 100 µl TE buffer, 500 µl sayzing çözeltisi ve 1 ml %70 etanol ile yıkanmıştır. Tüpler oda ısısında kurutulduktan sonra peletin üzerine 53 µl TE buffer eklenip kütüphanedeki cDNA yoğunluğu TBS 380 Fluorometer cihazı ile ölçülmüştür. Bir mikrolitresinde 2,5x10⁹ RL

standart moleköl olacak şekilde TE buffer ile standartlar oluşturulup kütüphanedeki fragment sayısı buna göre belirlenmiştir. Aynı zamanda cDNA kalitesi DNA çipi (Agilent Bioanalyzer High Sensitivity) ile gözlemlenmiştir.

4.6. Emülsiyon PZR (emPZR)

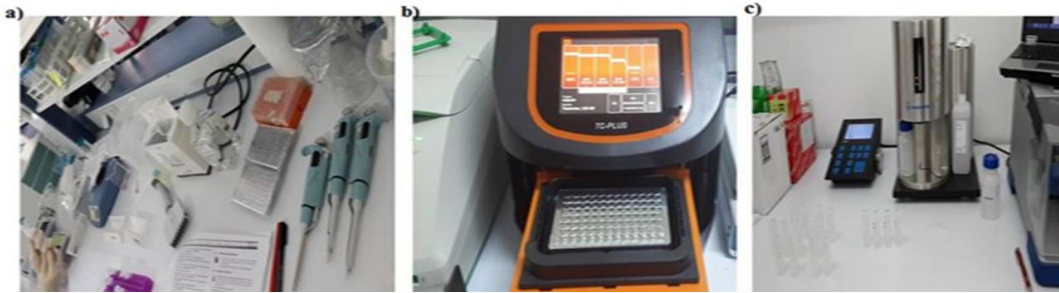
emPCR amplifikasyon işlemi, boncuk üzerinde immobilize edilmiş DNA fragmentlerinin meydana getirdiği klonal bir kütüphane çoğaltımıdır. Çalışmamızda kullandığımız “small volume emulsion preparation (SV)” daha küçük ölçekteki örneklerin hazırlanmasına izin verdiği kit kategorisine girmekte olduğu varsayılmıştır.

Dizileme için titrasyon işlemi yapıldıktan sonra emPZR aşamasına geçilmiştir. Bu çalışmada 16'lı gasket kullanıldığı için GS FLX+ Titanium SV emPZR Kit (Lib-L) kitinin içinde bulunan tüm komponentler kullanılmıştır. Bu aşamada, daha önce iki ucuna paired end yöntemi ile adaptör yerleştirilmiş cDNA fragmentlerinin amplifikasyonu yapılmıştır. Bu amaç için öncelikle Roche emPZR komponentleri kutusunda bulunan 16 adet emülsiyon yağı TissueLyser cihazında 25 Hz'da 2 dk boyunca çalkalanmıştır. Çıkarılan tüplerin üzerine, pre-emülsiyon aşaması için 290 µl 1X mock amplifikasyon karışımı (1 ml 5X mock amplifikasyon karışımı ve 4 ml ddH₂O) eklenmiştir. Ardından doku parçalayıcı cihazına (QIAGEN, Valencia, CA) 25 Hz'da 5 dk boyunca çalkalanmıştır. Bu arada DNA Library Capture aşaması gerçekleştirilmiştir. Boncuklar iki defa yıkandıktan sonra peletin üzerine 640 µl 1X “Capture Bead Wash Buffer” eklenip cDNA örnekleri 95 °C'de 2 dk denatüre edildikten sonra hızlıca buza alınmıştır. Emülsiyon ve klonal çoğaltım için her bir emülsiyon tüpüne uygun miktarda cDNA ile PZR için gerekli komponentleri içeren Live Amplifikasyon karışımı eklenip TissueLyser cihazına 15 Hz'da 5 dk boyunca çalkalanmıştır. Daha sonra her bir emülsiyon tüpünün içindeki karışım 96'lık platalere her kuyucuğa 100 µl gelecek şekilde dağıtılmıştır. Reaksiyon, 94 °C 4 dk (1 döngü), 94 °C 30 sn, 60 °C 10 dk (50 döngü) ve son olarak 10 °C programında gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.3). emPZR'dan sonra boncuk yıkama ve zenginleştirme (klonal çoğaltım) gösteren boncukları geri kazanma işlemleri yapılmıştır.

4.6.1. Boncukların Saflaştırılması

Emülsiyon PZR sonrası, DNA boncuklarının yıkanması ve emülsiyon yağından uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu işlem için aşağıdaki basamaklar sırasıyla uygulanmıştır. Emülsiyonlar sekiz kanallı pipet ile plate'in kuyularından çekilerek 1,5

ml'lik tüp içerisinde toplanmıştır. Boncukların üzerine toplam hacim 35 ml olacak şekilde izopropanol eklenerek ve 950 rpm'de 7 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant serolojik pipetle çekilerek atıldıktan sonra pellet üzerine 10 ml Enhance Fluid (zenginleştirici solüsyon) eklenmiştir. Solüsyon iyice vortekslenerek pellet çözülmüştür. Pelletin üzerine 100 µl olacak şekilde izopropanol eklenerek 950 rpm'de beş dakika santrifüj edilmiştir. İşlem bittikten sonra süpernatant atılmıştır. Daha sonra pellet üzerine 100 µl izopropanol eklenerek, 950 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten ve süpernatant atılmıştır. Bir önceki basamak tekrarlanarak ardından pellet üzerine 3 ml zenginleştirici solüsyon eklendikten sonra, 950 g'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Daha sonra süpernatant uzaklaştırılarak boncuklar tekrar süspanse edildikten sonra 1.5 ml ependorf tüp içerisine transfer edilmiştir. Ardından 125 µl ul sıvı Sodyum hidroksit (NaOH), 9.875 ml su ile karıştırılarak melt solüsyonu hazırlanmıştır. İkinci zinciri eriterek dsDNA'yı ssDNA'ya dönüştürmek için 1 ml Melt solüsyonu yıkanma işlemi biten DNA boncukları üzerine eklenerek iki dakika oda ısısında inkübe edilmiştir. Melt solüsyonu ile inkübasyon bir kez daha tekrarlandıktan sonra örnekler 500 ml bağlanma solüsyonu ile yıkanarak NaOH etkisi uzaklaştırılmıştır. DNA Boncuk Zenginleştirme basamağı için 6 µl Enrich Primer A (Zenginleştirilmiş Primer A) ve Enrich Primer B (Zenginleştirilmiş Primer B) örnekler üzerine eklenerek, 65°C'lik kuru ısı bloğunda 5 dk, ardından 2 dk buz üzerinde bekletilmiştir. Zenginleştirilmiş primer bağlanması sonrası bağlanamayanları uzaklaştırmak için zenginleştirici solüsyon ile üç kez yıkama işlemi yapılmıştır. Son olarak örnekler 100 µl zenginleştirici solüsyon ile çözülmüştür.



Şekil 4.3. a-b) em-PZR için hazırlık aşaması ve reaksiyonun termal döngü cihazına yerleştirilmesi c) % olarak geri kazanılan boncuk sayısını bulmak için boncuk sayım cihazı ile ölçülmesi

4.6.2. DNA Boncuk Zenginleştirme

Hazırlanan DNA boncukları, yıkanarak hazırlanmış olan zenginleştirilmiş boncuklardan 80 µl eklenerek ve vorteks yapılmıştır. Örneklerin içinde bulunduğu tüpler 5 dk rotatorda

döndürülmüştür. Rotatordan alınan tüpler, Magnetic Particle Collector (Manyetik Partikül Toplayıcı (MPC)) üzerine yerleştirilerek, zenginleştirilmiş boncuklar toplanana kadar yaklaşık beş dakika beklenmiştir. Bekleme süresinde MPC birkaç kez öne ve arkaya doğru eğilerek çevrilmiştir. Süpernatant, zenginleştirilmiş boncukları çekmeden dikkatlice toplandı. Toplanan süpernatant zenginleşmemiş (anti-enrichment) boncukları içerdiği için herhangi bir trouble-shooting (sorun çözme) durumu için saklanabilir Zenginleştirilmiş boncuklar üzerine, 500 µl zenginleştirici solüyon eklenerek, tüpler MPC'den çıkartılıp ve vortekslenmiştir. Tüpler tekrar MPC'ye yerleştirildikten sonra boncukların toplanması beklenmiştir. Bekleme süresinde MPC birkaç kez öne ve arkaya doğru eğilerek çevrilmiştir. Süpernatant, zenginleştirilmiş boncuklara dokunmadan pipet yardımı ile uzaklaştırılmıştır. Bu yıkama işlemi en az 6, en fazla 10 kez, süpernatant içerisindeki beyaz boncuklar tamamen temizlenene kadar tekrarlanmıştır. Altıncı yıkamadan sonra toplanan süpernatant spin edilip beyaz boncukların çöküp çökmediği kontrol edilerek, beyaz boncuklar mevcut ise zenginleştirici solüsyon ile yıkamaya devam edilmiştir.

4.6.3. Zenginleştirilmiş Boncukların Toplanması

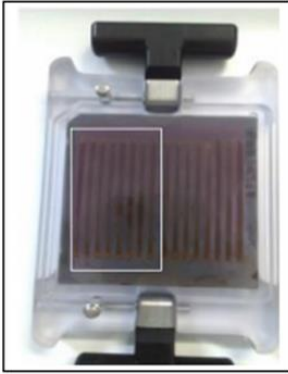
Zenginleştirilmiş DNA boncuklarını içeren tüpler MPC'den çıkartılarak, 500 µl Melt solüsyonu ile tekrar süspansedilmiştir. Daha sonra 5 saniye vortekslendi ve tekrar MPC üzerine yerleştirildi. Zenginleştirilmiş boncuklar toplanırken, serbest kalan zenginleştirilmiş DNA boncuklarının oluşturduğu süpernatant toplanarak (zenginleştirilmiş boncuklar ile DNA boncukları birbirinden ayırdığı için) ependorf tüpe transfer edilmiştir. Zenginleştirilmiş boncuklar üzerine tekrar 500 µl melt solüsyon eklenerek, daha sonra 5 sn vortekslenmiştir. Ardından örnekler MPC üzerine yerleştirilmiştir. Toplanan süpernatant, bir basamak önce toplanan süpernatantın üzerine eklenip, zenginleştirilmiş boncuklar atılmıştır. Tüpler 14.000 rpm'de 10 sn kadar spin edilerek, rotate edildikten sonra, tekrar spin edilerek ve süpernatant atılmıştır. Boncuklar üzerine 500 µl bağlanma solüsyonu eklenip, vortekslenmiştir. Spin-rotate-spin aşamaları tekrarlandıktan sonra süpernatant atılmıştır. İki kez 500 µl bağlayıcı solüsyon ile yıkama tekrarlanmıştır. Son olarak boncuklar 100 µl bağlayıcı solüsyon ile tekrar süspansedildi. 15 µl sequence primer A, 15 µl sequence primer B eklendi ve vortekslenmiştir. Ependorf tüp, kuru ısı bloğu üzerinde 65°C'de 5 dk ve hemen ardından buz üzerinde 2 dk bekletildikten sonra 500 µl Annealing Buffer ile spin-rotate-spin yapılarak üç kez yıkama işlemi yapılmıştır. Son olarak 30 µl bağlayıcı solüsyon ile çözülmüştür. Daha sonra boncuklara dizileme için primer bağlanıp %

olarak geri kazanılan boncuk miktarını bulmak için boncuk sayım cihazı (Coulter Counter, Casy, Germany) kullanılmıştır (Şekil 4.3). emPZR ürünleri toplanarak cDNA taşıyan boncuklar zenginleştirilmiştir.

4.7. Dizileme

Dizileme aşaması Roche 454 FLX+ (Roche 454 Life Science, Mannheim, Germany) cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Bunun için, Paired-end ile hazırlanmış kütüphanelerin dizilenmesi “GS FLX+ Titanium Sequencing Kit XL+” (05233682001) kullanılarak yapılmıştır. Öncelikle deneyi başlatmak için -20°C 'de muhaza edilmiş “GS FLX+ Titanium Sequencing Kit XL+” kitin içindeki enzim tüpleri buz üzerine alınarak diğer reaktiflerin bulunduğu kap içerisine normal çeşme suyu eklenip, karanlık ortamda çözünmeye bırakılmıştır. “GS FLX+ Bead and Wash Buffer Kit” içeriğindeki yıkama solüsyonları ile cihaza otomatik ön yıkama işlemi yaptırılmıştır. Cihazın CDD kamerası, kamera lens temizleyici ile Picotiter Plate yerleştirilen bölümü %50 etanol ve Tween 20 ile silinerek temizlenerek ön hazırlık işlemleri gerçekleştirilmiştir. Picotiter Plate'e yüklemek için Packing boncukları, DNA fragmanlarını taşıyan boncuklar, enzim boncukları ve Ppiase boncukları olmak üzere dört farklı yapıda boncuk hazırlanmıştır. BB2 (Prepare Bead Buffer 2) solüsyonu ile boncuklar yıkanma işlemi gerçekleştirilmiştir. Dizilim için hazırlanan amplifiye olmuş fragmanları taşıyan DNA boncukları üzerine 6 μl kontrol DNA boncukları eklendi, 500 μl BB2 içerisinde, 20 dk rotator üzerinde inkübe edilmiştir. Yirmi dakika sonunda DNA boncukları üzerine polimeraz, polimeraz kofaktör ve BB2 eklenerek on dakika daha rotator üzerinde inkübe edilmiştir. Packing boncukları, BB2 ile üç kez spin-rotate-spin yöntemi ile yıkanmıştır. (Packing boncukları, Picotiter Plate kuyucukları içerisinde DNA boncuklarını sarmalayıp stabil kalmalarını sağlamaktadır). Yıkanan Packing boncukları son olarak 200 μl BB2 içerisinde çözülmüştür. Hazırlanan Packing boncukları DNA boncukları ile birleştirilerek 5 dk rotator üzerinde inkübe edilmiştir. Dizileme reaksiyonunda, ışmaları sağlayan enzimleri içeren enzim boncukları, 1 ml BB2 ile MPC üzerinde yıkanmıştır. Son olarak 400 μl BB2 içerisinde çözüdürerek hazırlanan enzim boncukları “enzim alt tabaka” ve “enzim üst tabaka” olarak ikiye ayrılmıştır. En üst tabaka olan Ppiase boncukları, 1 ml BB2 ile MPC üzerinde yıkandı. Son olarak 410 μl BB2 içerisinde çözülmüştür. Önce Picotiter Plate, daha sonra plate için uygun olan 16'lık gasget boncuk, yükleme aparatı üzerine uygun şekilde yerleştirilerek, aparatın üst kapağı kilitlemiştir (Şekil 4.4). Picotiter Plate'i ıslatmak amaçlı BB2 pipetlendikten sonra ve

plate santrifüj edilmiştir. “Enzim alt tabaka” “Picotiter Plate”e yüklendikten sonra santrifüj edilmiştir. DNA ve packing boncuk karışımı Picotiter Plate içerisine gerekli hacimde pipetlendi, santrifüj edilerek boncukların kuyulara inmesi sağlanmıştır. Ardından “Enzim üst tabaka” plate’e pipetlendi ve santrifüj edilerek boncukların kuyulara inmesi sağlanmıştır. Son olarak PPIase boncukları pipetlendi ve santrifüj edilmiştir. Karanlığa bırakılarak çözünmesi beklenen Sequencing reaktifleri cihazın reaktif bölmesine yüklenmiştir. Daha sonra “Picotiter Plate” aparat içerisinden çıkartılarak cihaza yüklenmiştir (Şekil 4.5). Cihazda istenen siklus sayısı ve istenen analiz şekli seçildikten sonra dizileme çalışması başlatılmıştır. Okunan diziler, CCD kamera tarafından kaydedilmiş ve bilgisayar program yardımıyla dizi verilerine (flogram) dönüştürülmüştür.



Şekil 4.4. Sekiz cDNA kütüphanesine ait boncukların 16'lık gasket takılmış olan PicoTiter Plate üzerinde işaretli alana yüklenmesi



Şekil 4.5. Dizilemede kullanılan Roche 454 FLX+ cihazının hazır hale getirilmesi ve PicoTiter Plate'in yüklenmesi

4.8. Veri İşleme ve Biyoformatik Analiz

Dizileme işlemi tamamlandıktan sonra veri işlenmesi “GS run processor application”ın kullanılması ile gerçekleştirilmiştir. Veri işleme genel olarak iki adımda

gerçekleştirilmiştir. Bu iki adım görüntü ve sinyal işlenmesidir. İlk aşamada ham görüntü verisi işlenip piksel seviyesinde normalize edildikten sonra temel sinyal sonuçlarına dönüştürülmüştür. Sinyal işleme basamağında, görüntü işleme basamağında üretilen sinyal verileri analiz edilmiştir. Bir seri normalizasyon, düzeltme ve kalite filtreleme algoritmasından sonra her okuma için yüksek kalitedeki sinyaller “flowgram”lara dönüştürülmüştür. Uygulama, her bir okuma için baz-çağrılar (basecalls) ve bağlantılı kalite skorları üretmiş ve okumalar hakkındaki bilgi filtrelerden geçerek ve her bölge için elde edilen baz okumaları FASTA formatında depolanmıştır.

4.8.1. Okumaların *de novo* birleştirme yapılması

GS-FLX+'ın cDNA'lardan ürettiği sekans okumalarından adaptör bölgeler ve kaliteli olmayan okumalar atıldıktan sonra geriye kalan kaliteli okumalara ait farklı ekspresyon seviyelerine bakmak için 454 Newbler (Roche) programı kullanılarak *de novo* birleştirme ile kontigler oluşturulmuştur.

4.8.2. Gen ontoloji (GO) ve KEEG analizleri

Elde edilen kontiglerin hangi genlere benzediğini bulmak için NCBI BLAST programında E" değeri (E-value) 1e-20 olacak şekilde BLAST analizleri (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/BlastAlign.cgi>) yapılmıştır. Transkriptlerin rol aldıkları yollar belirlenmesi için web tabanlı KAAS (KEGG Automatic Annotation Server) (<http://www.genome.jp/kegg/kaas>) kullanılarak KEEG analizi yapılmıştır. Ayrıca, web tabanlı TRAPID sunucusu (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/trapid>) ve Blast2GO (154) kullanılarak gene aileleri, GO ve protein domainleri belirlenmiştir.

4.8.3. Transkripsiyon faktörlerinin belirlenmesi

Çalışmada ilgili transkripsiyon faktörlerini elde etmek için, plant transcription factor database (PlantTFDB v2.0) (<http://planttfdb.cbi.edu.cn/>) olarak adlandırılan internet veri tabanının yer alan toplamda 83 türe ait, 58 aileye ayrılmış 129.288 adet transkripsiyon faktörü veri olarak kullanılmıştır. Çalışmada elde edilen tüm transkriptom verisi kullanılarak, BLASTX 2.2.27 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) algoritması ile TF taranması gerçekleştirilmiştir (155).

4.8.4. Mikro-RNA (miRNA) ve hedefledikleri genlerin belirlenmesi

Elde edilen transkriptom okumalarından miRNA'ların belirlenmesi için, kütüphanelerden elde edilen okumalarını miRBase v21.0 (<http://www.mirbase.org/>)'dan elde edilen ve daha önce bilinen miRNA'lar e-value değeri $1e-10$ baz alınarak Blastn yapılmıştır. Ayrıca miRNA'ların hedefledikleri genlerin ontolojileri ve fonksiyonları analizi için miRNA'ların sistematik isimleri, miRBase v21 (<http://www.mirbase.org/>) (156) veri tabanına girilerek miRNA'ya özel 22-24 bp uzunluğundaki diziler elde edilmiştir. Daha sonra bu dizilerin, miRU (<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/>) (157) veri tabanına girilmesiyle hedef genlerin dizileri elde edilmiştir. Hedef gen analizleri, Blast2GO (154) programı kullanılarak analiz edilmiştir.

4.8.5. SSR dizilerinin belirlenmesi

RNA-Seq okumalarından genic-SSR'ların ikili, üçlü, dörtlü motiflerini belirlemek için de GMATo program E değeri $1e-20$ olarak (<http://www.bioinformation.net>) kullanılmıştır (158).

4.8.6. Transpozon elementlerinin belirlenmesi

Çalışma kapsamında yapılan transpozon analizi için de repbase (<http://www.girinst.org/repbase/>) web tabanından transpozon kütüphanesini oluşturarak, elde ettiğimiz okumalara karşı Blastn işlemi E değeri $1e-20$ yaparak okumalara ait transpozon elementleri bulunmuştur.

4.8.7. Farklı ifade olunmuş gen ya da gen adaylarının ifade seviyelerinin dijital olarak analiz edilmesi

Çalışmada ele alınan haşhaş bitkisinin genomu henüz dizilenmediği için, ifadesi farklı olarak gerçekleşen genlerin belirlenmesi ve bu genlerin ifade düzeyinin saptanması için de novo transkriptom yaklaşımında kullanılan analiz yöntemini uygulanmıştır. Bu yaklaşım; (i) referans transkript veri setinin oluşturulması, (ii) deneysel analiz sonucu elde edilen okumaların referans transkript veri setine haritalanması ve haritalanan transkript sayısının kaydedilmesini içermektedir. Analizde, haşhaşın kapsül dokularından elde edilen transkript dosyaları bir araya getirilmiştir. Bu işlemi takiben, CD-HIT-EST (159) ve *iAssembler* (160) yazılımı kullanılarak istenmeyen (redundant; aynı transkriptin farklı uzunlukta kopyaları) ve dizi uzunluğu 200 bazın altında olan transkriptler kaldırılmıştır ve daha tam ve doğru referans transkript veri seti elde edilmiştir. Dizileme cihazından elde edilen

okumalar, Corset (161) yazılımı ile referans transkriptome haritalanmıştır ve transkript sayıları alınarak kaydedilmiştir. Corset yazılımı sonrası elde edilen RNA sayma verilerine, örneklere özgü farklılıkları gidermek üzere 'Trimmed Mean of M values' (TMM) (162) normalizasyon yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntem sonrası verilere voom (163) dönüşümü uygulanarak ekspresyon verileri elde edilmiştir. Tüm örnekler için okuma elde edilemeyen genler filtrelenmiştir. Filtrelenmiş ekspresyon verilerine limma yöntemi (164) uygulanarak ilgilenilen koşullar açısından anlamlı genlerin tespit edilmesi amaçlanarak çoklu test düzeltmesi olarak da Benjamini-Hochberg prosedürü ve FDR (false discovery rate) yöntemi kullanılmıştır. Ayrıca ilgilenilen koşullar açısından benzer fonksiyonlar gösteren genleri gruplamak amacıyla birleştirici hiyerarşik kümeleme yöntemi kullanılmıştır. Uzaklık ölçümü olarak öklit uzaklığı, birleştirme yöntemi olarak 'Average' yöntemi kullanılmıştır ve bulguları heatmap grafikleri ile özetlenmiştir. 6. saat ve 9. saat koşulları için en anlamlı 50'şer gen kullanılarak, ilgili koşullar altında benzer genler araştırılmıştır. Bulguları Venn diyagramı olarak özetlenmiştir (165). Tüm analizler R 3.1.0 yazılımının (www.r-project.org) CRAN ve BIOCONDUCTOR ağlarında yer alan çeşitli paketlerde gerçekleştirilmiştir.

4.9. qRT-PZR Analizi İçin cDNA Sentezi

Eş zamanlı PZR ile bazı genlerin doğrulamasını yapmak amacı ile materyalden elde edilen RNA'dan cDNA elde etmek için Fermentas Kiti (Fermentas, Ontario, Canada) kullanılmıştır. Eşit miktarda RNA ile çalışmaya başlamak amacıyla, her bir dokuya ait total RNA'lardan 1000 ng olacak şekilde, ayarlanarak RNA kullanılmıştır. 1X için 1 µl Oligo dT, 1000 ng RNA olacak şekilde üzerine su eklenerek toplam hacim 11 µL ye tamamlanmıştır. Tüpler PZR cihazında 65 °C'de 5 dk tutulduktan sonra hemen buza gömülmüş ve en az 2 dk. buzda bekletilmiştir. Ardından herbir tüpe 4 µL 5X Buffer, 2 µL 10 mM dNTP, 1 µL RNase out, 2 µL Revers Transkriptaz enzimi eklenerek toplam hacim 20 µL ye tamamlanmıştır. 37 °C'de 60 dk PZR cihazına konulmuş ve 70 °C'de 5 dk. bekletilmiş ve +4 °C'de reaksiyon sona erdirilmiştir. Ardından oluşturulan tüm cDNA'lar, 18S rRNA primerleri ile (GenBank ID: AF147501; ileri primer: 5'-GTGACGGGTGACGGAGAATT-3'; geri primer: 5'-GACACTAATGCGCCCGGTAT-3') PZR optimizasyonu yapılmış ve cDNA ların oluşup oluşmadığının kontrolü %1'lik jel yürütülerek tespit edilmiştir.

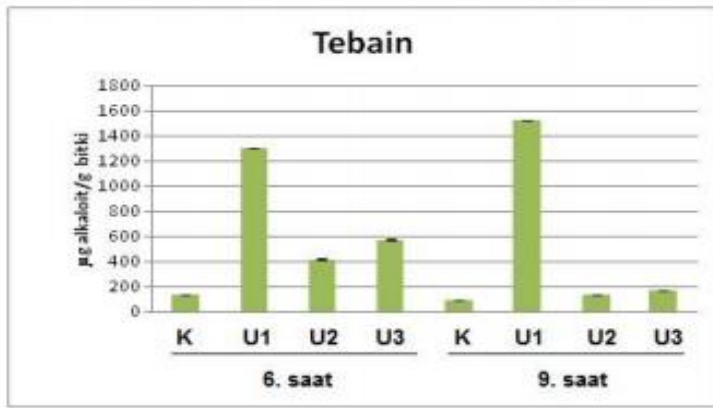
4.10. MeJA Uygulaması Sonucu Gen İfadesinin qRT-PZR ile Belirlenmesi

MeJA uygulaması sonucunda ifade durumlarında değişiklik olan genlere özgü primerler primer3 programı ile (<http://primer3plus.com>) (166) dizayn edilerek, bu genlerin bitkideki anlatım düzeyleri qRT-PZR (Roche Light Cyclus 480) ile gösterilmiştir. qRT-PZR 96 kuyucuklu optik platelerde 0,1 µl primer (100 pmol), 2 µl cDNA, 10 µl FastStart SYBR Green I Master Mix (Roche Applied Science, Penzberg, Germany) ve toplam hacim 20 µl olacak şekilde nükleaz içermeyen su ile tamamlanarak gerçekleştirilmiştir. Normalizör olarak 18S rRNA geni kullanılmıştır. PZR programı şu şekilde ayarlanmıştır: 95°C'de 5 dk ön ısıtma; 95°C'de 10 s, 53°C'de 20 s ve 72°C'de 10 s (50 döngü). Floresan sinyalleri 530 nm'de 65°C'den 95°C'ye kadar her bir 0.5 °C derecede kaydedilmiştir. Son olarak sonuçlar "Roche Light Cyclus 480 Software" yazılımı aracılığı ile analiz edilmiştir (167).

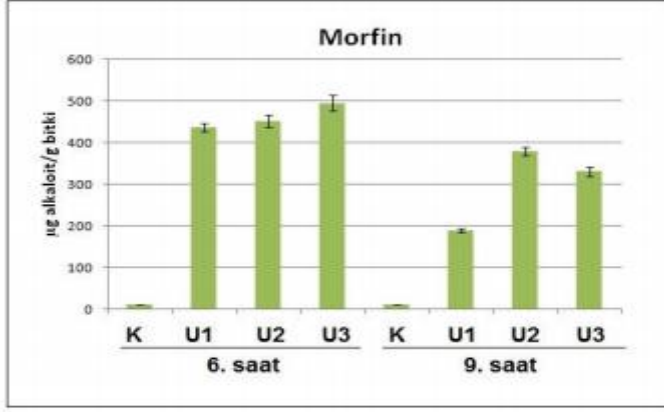
5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. MeJA Uygulaması Sonucu Haşhaş Kapsülünde Değişen Alkaloit Miktarı

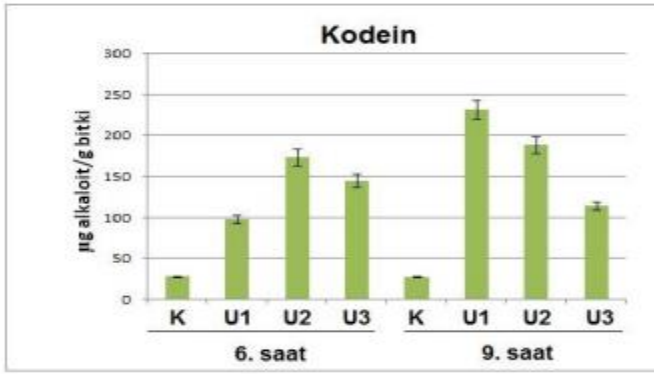
Tebaince zengin haşhaş çeşidinin kapsül dokusuna MeJA uygulaması sonucunda meydana gelen alkaloit değişimini belirlemek için ToF-LC/MS teknolojisi kullanılmıştır. Analiz sonuçlarına göre, MeJA uygulandıktan 6 (6USS) ve 9 saat (9USS) sonrasında bitkilerin kapsül dokularındaki tebain üretimi, kontrol bitki grubuna göre daha fazla miktarda ölçülmüştür (Şekil 5.1.). Bunun yanı sıra, bitki örneklerinde morfin, kodein, laudanozin, noskabin, papaverin gibi önemli alkaloitlerin ve (S)-Retikülin ara bileşiğinin kantitatif analizi de gerçekleştirilmiştir. MeJA uygulaması ile her iki saat diliminde (6USS, 9USS) de morfin, kodein ve noskabin miktarlarında artış gözlemlenirken, (Şekil 5.2., Şekil 5.3., Şekil 5.4.) tebain ve morfin miktarının 6. saate daha fazla indüklendiği görülmüştür. Buna karşılık kodein miktarının ise, 9. saate daha çok akümüle olduğu sonucu elde edilmiştir. Noskabin seviyesindeki değişim için, her iki zaman dilimi arasında net bir farklılık görülmemiştir. (S)-Retikülin ve laudanozin miktarlarında kontrol grubuna göre uygulama örneklerinde azalma olduğu tespit edilmiştir (Şekil 5.5. ve Şekil 5.6.). Papaverin miktarı ise her iki zaman diliminde de ölçülemeyecek kadar az bulunmuştur.



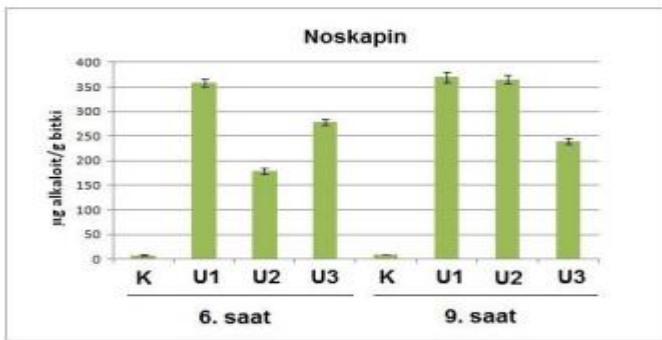
Şekil 5.1. MeJA uygulaması sonucu 6. ve 9. saat bitki örneklerinde tebain alkaloitinin ToF-LC/MS analizi. K: Kontrol, U: Uygulama



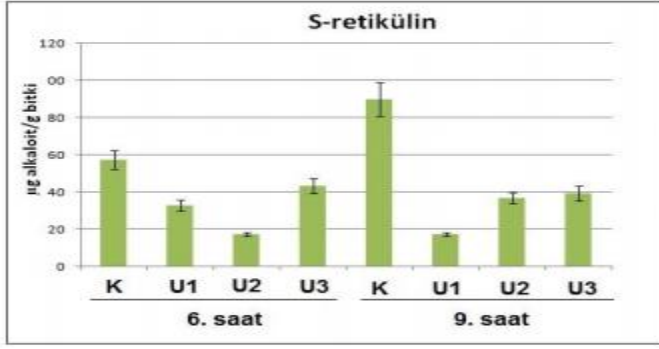
Şekil 5.2. MeJA uygulanması sonucu 6. ve 9. saat bitki örneklerinde morfin alkaloitinin ToF-LC/MS analizi. K: Kontrol, U: Uygulama



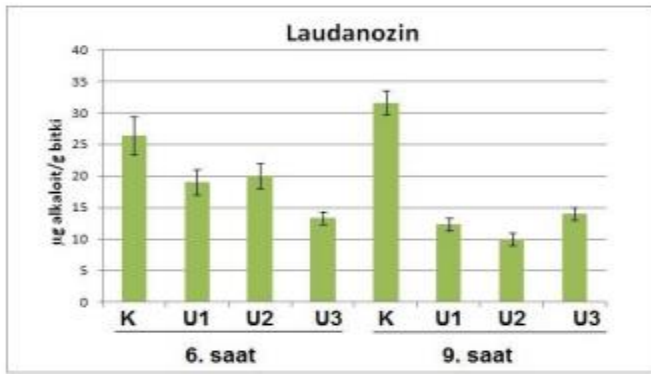
Şekil 5.3. MeJA uygulanması sonucu 6. ve 9. saat bitki örneklerinde kodein alkaloitinin ToF-LC/MS analizi. K: Kontrol, U: Uygulama



Şekil 5.4. MeJA uygulanması sonucu 6. ve 9. saat bitki örneklerinde noskapin alkaloitinin ToF-LC/MS analizi. K: Kontrol, U: Uygulama



Şekil 5.5. MeJA uygulanması sonucu 6. ve 9. saat bitki örneklerinde S-retikülin alkaloidinin ToF-LC/MS analizi. K: Kontrol, U: Uygulama



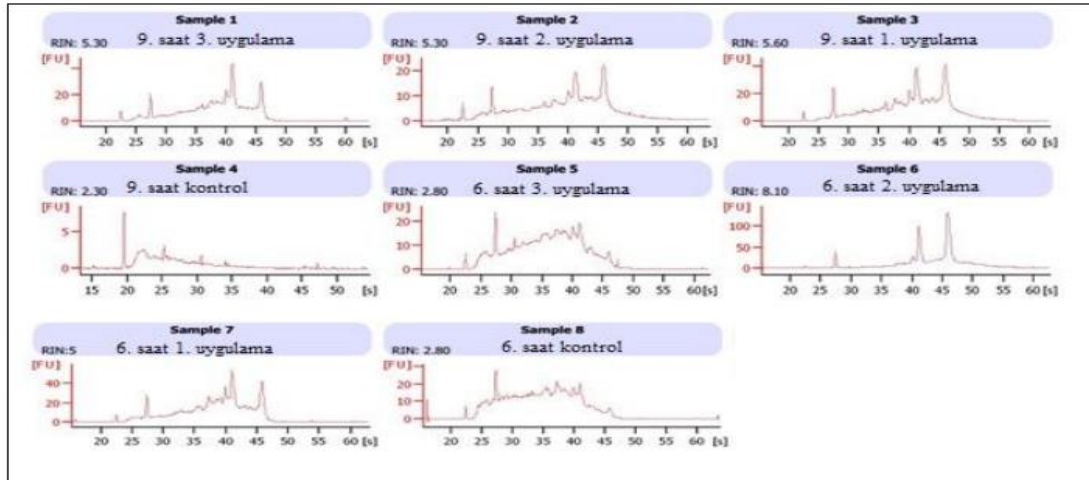
Şekil 5.6. MeJA uygulanması sonucu 6. ve 9. saat bitki örneklerinde laudanozin alkaloidinin ToF-LC/MS analizi. K: Kontrol, U: Uygulama

5.2. RNA İzolasyonu, Miktar ve Kalite Tayini

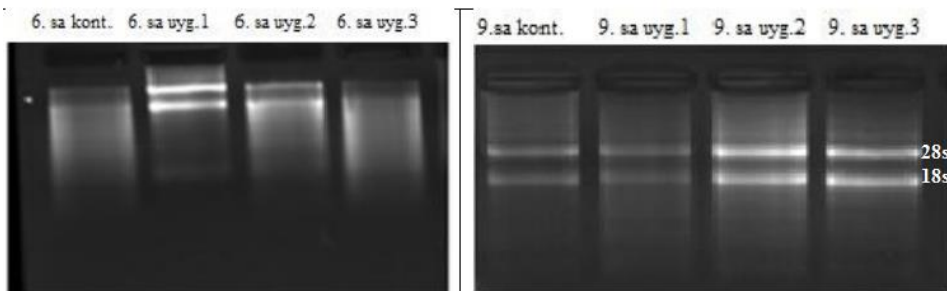
ToF-LC/MS sonuçlarına göre MeJA uygulaması sonrasında 6. ve 9. saatlerde tebain üretimi indüklenmiş üç tane uygulama yapılmış bitki ve bir tane MeJA uygulaması yapılmamış kontrol bitkisinin kapsül dokusundant örnekler alınarak CTAB protokolüne (168) göre izole edilen total RNA örnekleri Nanodrop 2000c ve Agilent Bioanalyzer 2100 cihazları ile saflık ve konsantrasyon tayinleri yapılmıştır (Çizelge 5.1., Şekil 5.6.). Aynı zamanda kalitatif analizi için RNA örnekleri %2'lik agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 5.8), Ayrıca, örneklere ait nanodrop sonuçları olarak; 260/280 oranı 1,98-2,16; 260/230 oranı ise 1,25-2,16 değerleri arasında sonuç göstermiştir. Genel olarak her iki zaman dilimine ait RNA kalitesini gösteren parametrelerin birbirine oldukça benzer olduğu ve dizileme için de uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

Çizelge 5.1. RNA örneklerinin NanoDrop 2000c (Thermo) cihazından elde edilen ölçüm değerleri

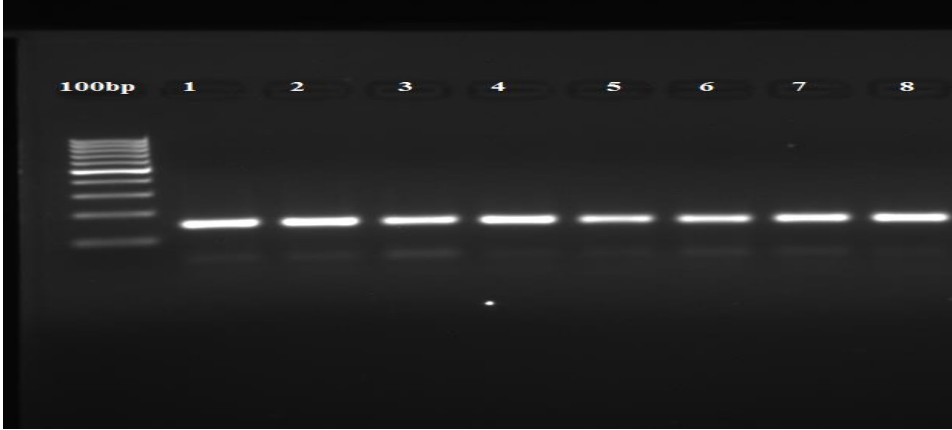
Örnekler	Nükleik asit konsantrasyonu (ng/µl)	260/280	260/230
6. saat kontrol	1521,4	2,15	2,16
6. saat 1. uygulama	540,9	2,09	2,05
6. saat 2. uygulama	1689,9	2,1	1,85
6. saat 3. uygulama	690,4	2,1	1,96
9. saat kontrol	1609,6	2,16	2,03
9. saat 1. uygulama	593,0	1,98	1,25
9. saat 2. uygulama	894,5	2,16	2,16
9. saat 3. uygulama	1890,5	2,15	2,04



Şekil 5.7. RNA örneklerinin Agilent Bioanalyzer 2100 cihazında analiz sonuçları



Şekil 5.8. MeJA uygulamasının ardından 6. ve 9. saat haşhaş örneklerine ait total RNA'nın %2'lik agaroz jelde görüntülenmesi

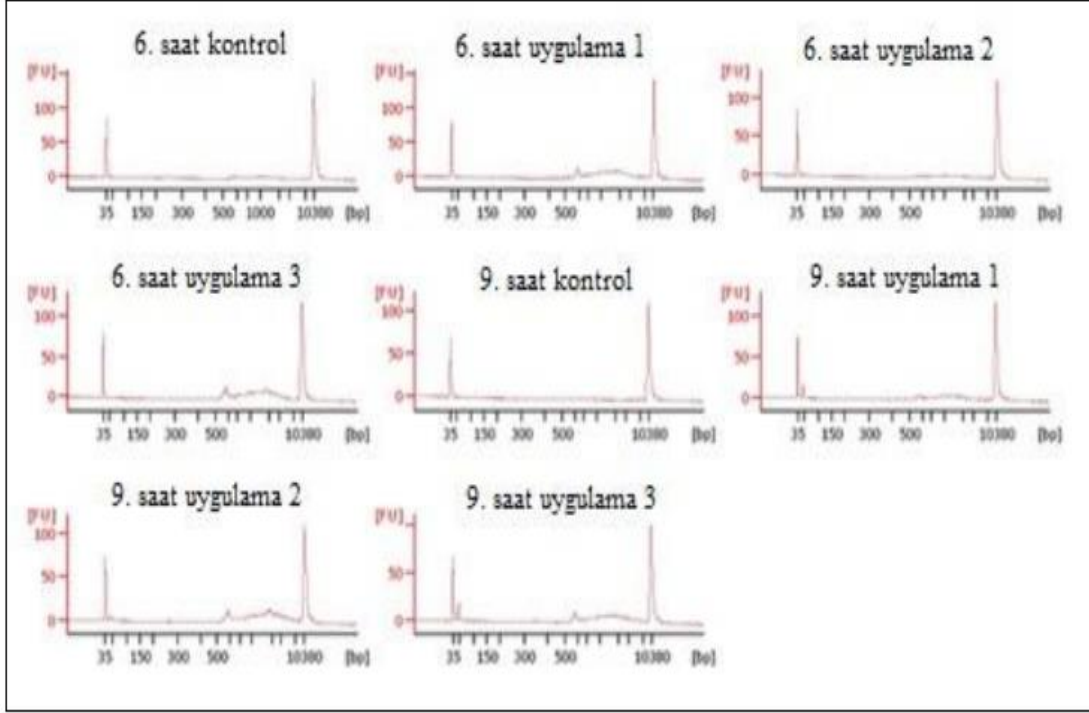


Şekil 5.9. MeJA uygulama sonrası 6. ve 9. saat haşhaş örneklerine ait cDNA'nın 18s rRNA optimizasyon PZR sonucunun %2'lik agaroz jelde görüntülenmesi (100bp : markır, 1: 6.saat kontrol, 2: 6. saat uygulama1, 3: 6. saat uygulama2, 4: 6. saat uygulama3, 5: 9. saat kontrol, 6: 9. saat uygulama1, 7: 9. saat uygulama2, 8: 9. saat uygulama3)

5.3. Roche 454 FLX+ ile RNA-Dizileme

5.3.1. Dizileme için oluşturulan cDNA kütüphanesinin kalite analizi

RNA dizileme için seçilen toplam 8 uygulama ve kontrol örneklerine (6. ve 9. saatlerin her biri için bir kontrol ve üç uygulama olmak üzere) ait kütüphaneler, 454 FLX+ protokolüne uygun olarak hazırlamak için çinko klorür kullanılarak fragmente edilmiştir. Fragmentasyon sonucunda oluşan uygun 450-1200 bp uzunluktaki RNA parçalarından üretilen cDNA'ların uzunluklarının görmek için Agilent 2100 Bioanalyzer cihazı ile ölçüm yapılmıştır. Bu ölçüm sonucunda cDNA uzunluğunun yaklaşık 6000-1200 arasında olduğu sonucu elde edilmiştir (Şekil 5.10). Daha sonra elde edilen bu sonuca göre Roche 454 FLX+ teknolojisi ile dizileme yapmak için, elde edilen cDNA'ları normalize etme amacıyla Qubit 2.0 (Invitrogen) cihazı kullanılarak her bir kütüphane 1×10^8 /ul olacak şekilde cDNA konsantrasyonu ayarlanmıştır.



Şekil 5.10. Dizileme için hazırlanan cDNA kütüphanelerine ait fragmentasyon işleminin Agilent Bioanalyzer 2100 cihazı ile ölçülmesi

5.3.2. Emülsiyon PZR sonucu

Bu aşamada, her bir boncuğa tek bir DNA fragmentinin bağlanması ile gerçekleşen emPZR sonucunda söz konusu fragmentin milyonlarca kopyasının elde edildiği bir klonal çoğaltım gerçekleştirilmiştir. Öncelikle yağ içinde suyun emülsiyonu sağlanmıştır. Daha sonra boncuk üzerine bağlanmış fragment ve bu fragmentin çoğaltması için gerekli olan bileşenler yağ damlacıklarının içerisine aktarılmıştır. Bu mikroreaktörlerin içerisinde PZR gerçekleştirilmiştir. PZR'ın ardından pozitif boncuklar bir dizi yıkama işlemleri sonucu geri kazanım ve pürifikasyon aşamalarına tabi tutulmuştur. Dizileme için gerekli olan uygun boncuk sayısını bulmak için boncuk sayma cihazı kullanılmıştır ve bu ölçüm sonuçlarına dayanarak yüzde olarak ne kadar boncuk kazanımı olduğu “Casy bead counter” cihazı ile hesaplanmıştır (Çizelge 5.2). Bu işlemler göz önüne alınarak dizileme işlemi sırasında PTP'ye ne kadar boncuk yüklenmesi gerektiğinin hesaplaması yapılmıştır. Boncuk zenginleştirme yüzdesinde bakıldığında, dokuzuncu saat birinci uygulama örneğinde düşük olduğu bulunmuşken, altıncı saat dilimine ait kütüphanelerine ait boncuk zenginleştirme yüzdesinin ise, olması gereken optimum değerler arasında olduğu bulunmuştur. Dizileme çalışmasında 16 kuyucuklu picotiter plate kullanıldığı için her

kütüphaneden $2,4 \times 10^6$ sayıda boncuk olacak şekilde bir hesaplama yapılarak ve böylece kütüphaneler dizilemeye hazır hale getirilmiştir.

Çizelge 5.2. emPZR sonucunda kazanılan pozitif boncuk sayıları

Örnekler	Boncuk sayısı	Boncuk zenginleştirme (%)
9. saat 3. uygulama	$6,02 \times 10^5$	2,3
9. saat 2. uygulama	$8,03 \times 10^5$	3,1
9. saat 1. uygulama	$2,23 \times 10^5$	0,9
9. saat kontrol	$1,17 \times 10^6$	4,6
6. saat 3. uygulama	$6,17 \times 10^6$	24,9
6. saat 2. uygulama	$1,44 \times 10^6$	5,6
6. saat 1. uygulama	$2,54 \times 10^6$	9,5
6. saat kontrol	$2,40 \times 10^6$	9,2

5.4. cDNA Kütüphanelerinin Dizilenmesi ve Yapılan Biyoenformatik Analizlerin Sonucu

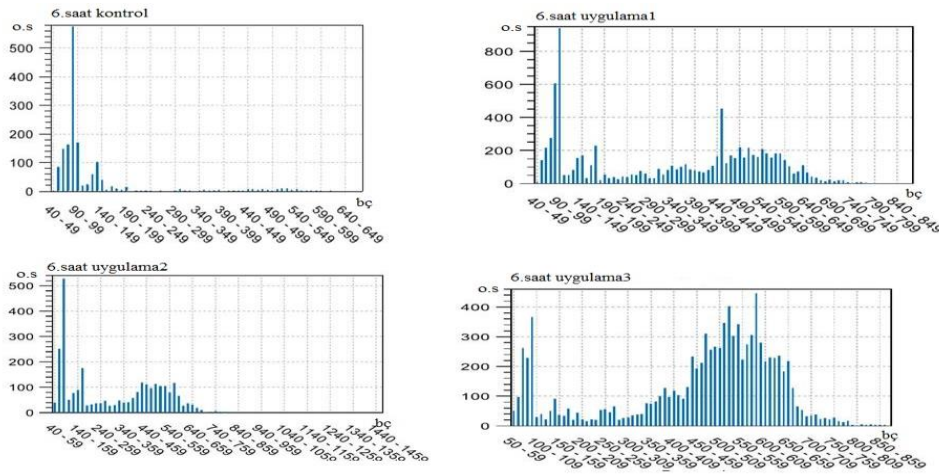
Elde edilen emPZR ürünleri gerekli enzimlerle birlikte her bir kütüphaneden $2,4 \times 10^6$ sayıda boncuk PTP'ye yüklendikten sonra dizileme işlemi Roche 454 GS-FLX+ cihazında gerçekleştirilmiştir. Toplam sekiz kütüphane için okuma değerleri Çizelge 5.3'de verilmiştir. RNA-dizilimi okumaları sonucunda en fazla okumanın 12.026.344 bç ile dokuzuncu saat diliminin birinci uygulamasına ait olduğu görülmüştür. En düşük okumanın ise, 765.003 bç ile altıncı saat kontrol kütüphanesinde görülmüştür. Genel olarak okuma sayılarına bakıldığında, dokuzuncu saat dilimine ait okuma sayılarının, altıncı saat dilimine ait okuma sayılarından daha fazla olduğu görülmüştür. İlginç bir sonuç olarak, dokuzuncu saat dilimine göre, altıncı saat dilimine ait boncuk kazandırma yüzdesinin daha yüksek olduğu halde okuma sayılarının daha düşük görülmesi gibi bir sonuç tespit edilmiştir. CLC Genomics Workbench v6.0.4 (CLC Inc, Aarhus, Danimarka) kullanılması sonucunda elde edilen okuma dağılımları (Şekil 5.11) ve (Şekil 5.12)'de gösterilmiştir. Buna göre altıncı saatin uygulama 1 ve uygulama 3 kütüphanelerinde ve dokuzuncu saate kontrol, uygulama 1 ve uygulama 3 kütüphanelerine ait okuma okuma sayısı ve

okuma uzunluğu gösteren dağılımın optimuma yakın olduğu görülmüştür. Buna karşılık altıncı saatin kontrol ve dokuzuncu saat uygulama 2 kütüphanelerine ait okuma sayılarının ve uzunluklarının daha düşük olduğu sonucu tespit edilmiştir.

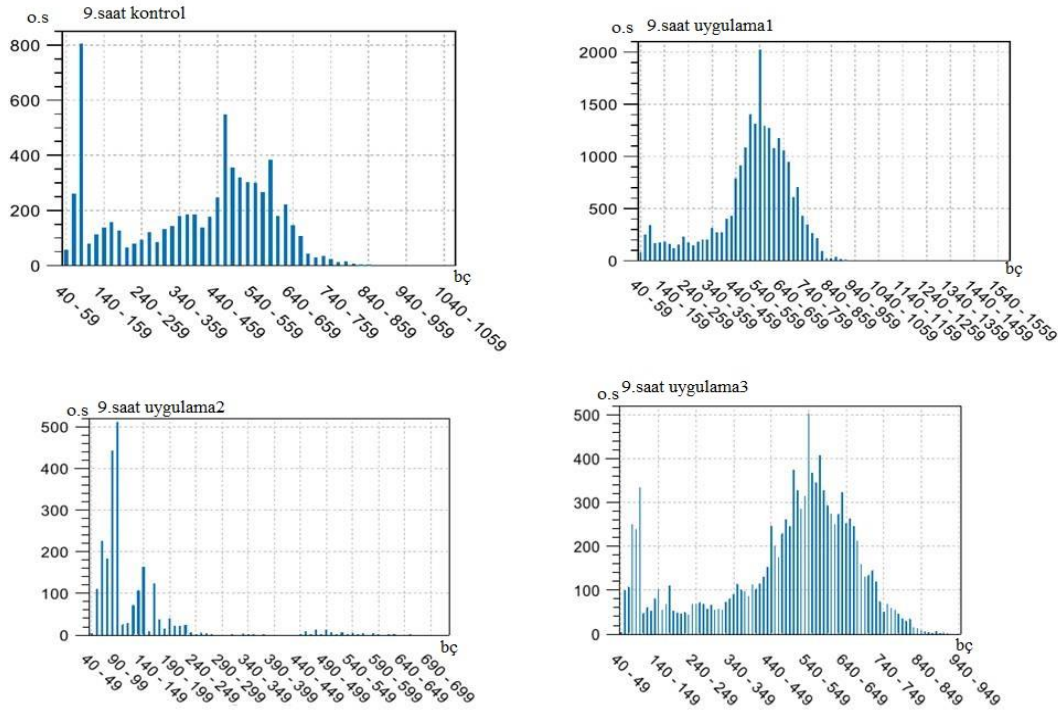
Çizelge 5.3. cDNA kütüphanelerinin dizileme istatistikleri

Örnekler	Okuma sayısı	Toplam baz sayısı	Ortalama uzunluk (baz)
9. saat 3. uygulama	13.378	6.545.355	524
9. saat 2. uygulama	3.701	1.066.219	394
9. saat 1. uygulama	22.854	12.026.344	550
9. saat kontrol	9.245	4.078.380	488
6. saat 3. uygulama	12.187	5.982.892	524
6. saat 2. uygulama	4.613	1.811.071	435
6. saat 1. uygulama	10.920	4.359.550	500
6. saat kontrol	2.572	765.003	401
Toplam	79.470	36.640.814	461

5.4.1. Dizilenen kütüphanelerin dizi uzunlukları ve okuma sayıları



Şekil 5.11. Roche 454 FLX+ cihazı ile dizilenen 6. saat kütüphanelerine ait dizi uzunlukları dağılımı (o.s : okuma sayısı, bç: baz çifti)



Şekil 5.12. Roche 454 FLX+ cihazı ile dizilenen 9. saat kütüphanelerinin dizi uzunlukları dağılımı (o.s : okuma sayısı, bç: baz çifti)

5.4.2. Dizlenen kütüphanelerde genik-SSR motiflerinin dağılımı

6USS ve 9USS'ye ait okumalarda SSR dizilerini analiz etmek için öncelikle her iki zaman dilimine ait sff formatında olan üç uygulama kütüphanesinin tümü birleştirilerek fasta formatında olacak şekilde tek bir dosya haline getirilmiştir. Daha sonra her zaman dilimine ait kontrol ve uygulama adı altında iki dosyada yer alan RNA-dizileme okumalarından genik-SSR motiflerini belirlemek için de GMATo yazılımı kullanılmıştır (158). Buna göre analiz sonucunda, altıncı saat kontrol kütüphanesinde herhangi bir SSR motifi bulunmazken, uygulama kütüphanesinde ise toplamda 14 transkriptin çeşitli SSR motiflerini içerdiği görülmüştür. Ayrıca bu SSR motiflerinin, hangi transkriptte kaç tekrerr halinde bulunduğu da ortaya çıkarılmıştır (Çizelge 5.4.). Altıncı saat uygulama kütüphanesinde, üçlü AAG motifi hariç geride kalan bütün motiflerin ikili şeklindeki motifler olduğu bulunmuştur. Dokuzuncu saat kontrol kütüphanesine ait okumaların analiz sonucunda yalnızca bir tanesi üçlü (GGT) motif diğeri ise, ikili (GA) motif bulundurmak üzere sadece iki transkript bulunmuştur (Çizelge 5.5.). Dokuzuncu saatin uygulama kütüphanesinde ise, toplamda 26 transkriptde bazı SSR motifleri elde edilmiştir. Bu motiflerden 20 tanesi ikili, 4 tanesi üçlü ve 2 tanesi de dördü bulunmuştur (Çizelge 5.6.).

Sonuç olarak her iki zaman dilimi (6. saat ve 9. saat) karşılaştırıldığında SSR motiflerinin sayı ve çeşit olarak daha çok dokuzuncu saat dilimine ait kontrol ve uygulama kütüphanelerinde olduğu görülmüştür.

Çizelge 5.4. 6. saat uygulama kütüphanesinde elde edilen SSR motifleri

Transkript	Sekans Uzunluğu	Başladığı baz	Sonladığı baz	Tekerür	Motif
>IRTH9WL05C4UEW	423	177	191	5	AAG
>IRTH9WL05C4UZ4	480	412	427	8	AG
>IRTH9WL05C5B23	480	412	427	8	AG
>IRTH9WL05C61OF	343	306	323	9	TG
>IRTH9WL05C61OF	343	329	342	7	GA
>IRTH9WL05C64JP	542	148	163	8	TC
>IRTH9WL05C7QYY	568	93	102	5	AT
>IRTH9WL05C7QYY	568	105	118	7	AT
>IRTH9WL05C7QYY	568	120	131	6	TA
>IRTH9WL05CZBKN	438	412	427	8	AG
>IRTH9WL07D6LO9	418	198	215	9	AT
>IRTH9WL07EA3CB	370	96	105	5	CA
>IRTH9WL07EE13H	268	218	227	5	TA
>IRTH9WL07EFIBS	483	424	433	5	TG

Çizelge 5.5. 9. saat kontrol kütüphanesinde elde edilen SSR motifleri

Transkript	Okuma uzunluğu	Başladığı baz	Sonladığı baz	Tekrar sayısı	Motif
>IRTH9WL04CCFTX	832	791	805	5	GGT
>IRTH9WL04CD86U	579	349	358	5	GA

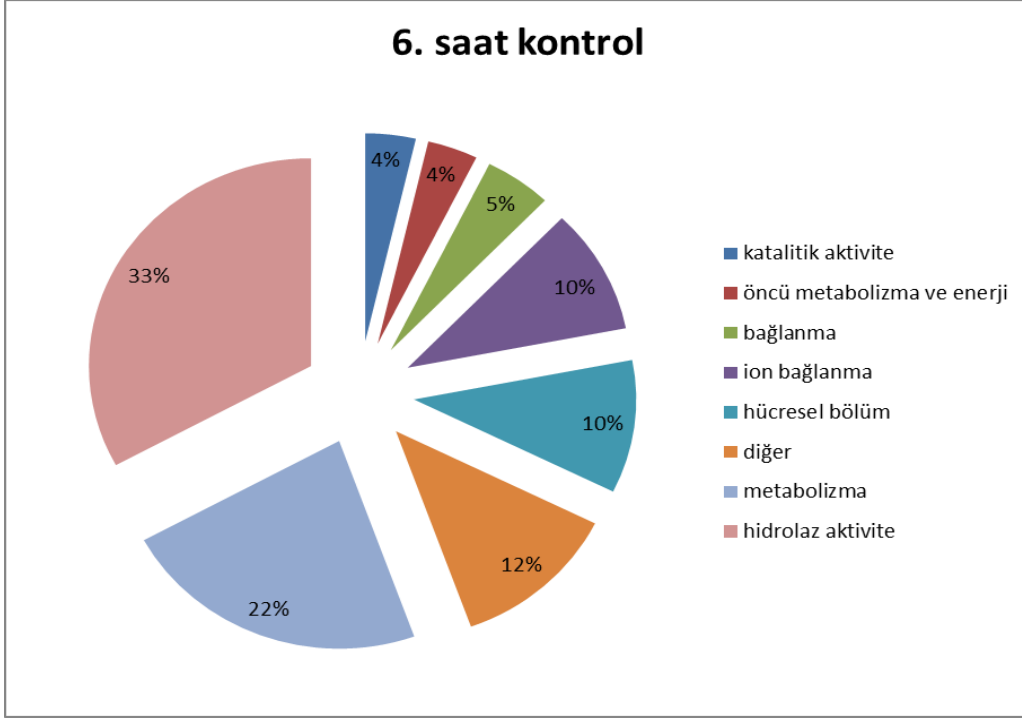
Çizelge 5.6. Analiz Sonucunda 9. saat uygulama kütüphanesinde elde edilen SSR motifleri

Transkript	okuma uzunluğu	Başladığı baz	Sonladığı baz	Tekrar sayısı	Motif
>IRTH9WL01AK96A	550	199	208	5	CT
>IRTH9WL01AL8GY	151	1	10	5	TA
>IRTH9WL01AN3R3	610	2	11	5	GT
>IRTH9WL01AN3R3	610	161	176	8	GT
>IRTH9WL01AN3R3	610	39	48	5	TG
>IRTH9WL01AOTYH	430	122	143	11	TC
>IRTH9WL01AQ89D	314	149	184	18	TG
>IRTH9WL01ARFHK	467	338	347	5	GC
>IRTH9WL01AROOV	520	135	144	5	AG
>IRTH9WL01ATXKQ	406	306	325	5	TTTG
>IRTH9WL03BQMXW	640	540	554	5	TGG
>IRTH9WL03BQMXW	640	565	579	5	GTG
>IRTH9WL03BS4XV	212	202	211	5	TA
>IRTH9WL03BSDOZ	498	334	348	5	GAT
>IRTH9WL03BSDRL	558	13	24	6	TC
>IRTH9WL03BT9E5	563	70	79	5	TC
>IRTH9WL03BTP9W	464	408	425	6	TGT
>IRTH9WL03BULOL	344	264	275	6	CA
>IRTH9WL03BULOL	344	277	308	16	AC
>IRTH9WL03BULOL	344	317	328	6	AG
>IRTH9WL03BULOL	344	330	343	7	AG
>IRTH9WL03BULOL	344	39	48	5	AC
>IRTH9WL03BXXNY	590	112	126	5	CTC
>IRTH9WL03BYAPF	474	393	404	6	GT
>IRTH9WL03BYAPF	474	406	419	7	TG
>IRTH9WL03BYZS6	226	202	215	7	TA

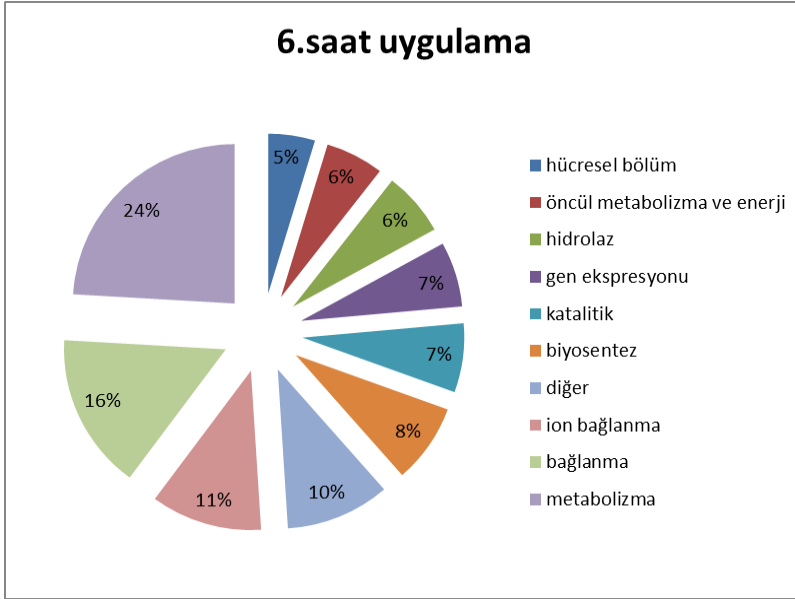
5.4.3. Gen atıflandırması ve fonksiyonel sınıflandırma sonucu

6USS ve 9USS kütüphanelerine ait her bir okumanın karşılık bulduğu gen atıflandırmasını ve genin kendine özel fonksiyonunu ortaya koymak için Blast2GO (Basic Local Alignment Search Tool to Gen Ontology) (168) ve TRAPID (Rapid Analysis of Transcriptom Data <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/trapid/>) programları kullanılmıştır. Her iki programın yaptığı analiz sonuçları değerlendirilerek, hem farklı zaman dilimlerindeki örneklerin hem de kontrol ve uygulama örneklerinin birbirleriyle arasındaki gen ontoloji profilleri karşılaştırılmıştır.

Buna göre analiz sonucunda, altıncı saat diliminin kontrol grubuna ait okumalarına ilişkin sonuçlara bakıldığında, gen ontolojileri ortaya çıkan transkriptlerin %33'ü hidrolaz aktivitesi, %22'si metabolizma, %10 iyon bağlama, %10 hücresel bölüm, %4'ünün öncü metabolizma ve enerji, %4'ünün katalitik aktivite ve %5'inin bağlanma gibi işlemlerde yer aldığı bulunmuştur (Şekil 5.13.). Buna karşılık altıncı saat zaman dilimi uygulama gruplarına ait okumalara ait gen anotasyonu ve fonksiyonunun belirlenmesi sonucunda transkriptlerin %24'ünün metabolizma, %16'sının bağlanma, %11'inin iyon bağlama, %8'inin biyosentez, %7'sinin gen ifadesi, %8'inin biyosentez, %6'sının hidrolaz, %5'inin hücresel bölünme, %6'sının öncü metabolizma ve enerji ve %10'ununda diğer işlemler adı altında stres, transkripsiyon faktörü aktivitesi, uyarıya karşılık cevap vermenin yer aldığı çeşitli işlemler tespit edilmiştir (Şekil 5.14.). Genel olarak kontrol ile uygulama gruplarının sonuçları karşılaştırıldığında, hidrolaz, metabolizma, iyon bağlama, öncül metabolizma ve enerji, gen ifadesi işlemleri ile ilişkili genlerin, uygulama grubunda kontrole göre nispeten arttığı, hücresel bölüm ve katalitik işlemler ile ilişkili genlerin ise azaldığı sonucuna varılmıştır.



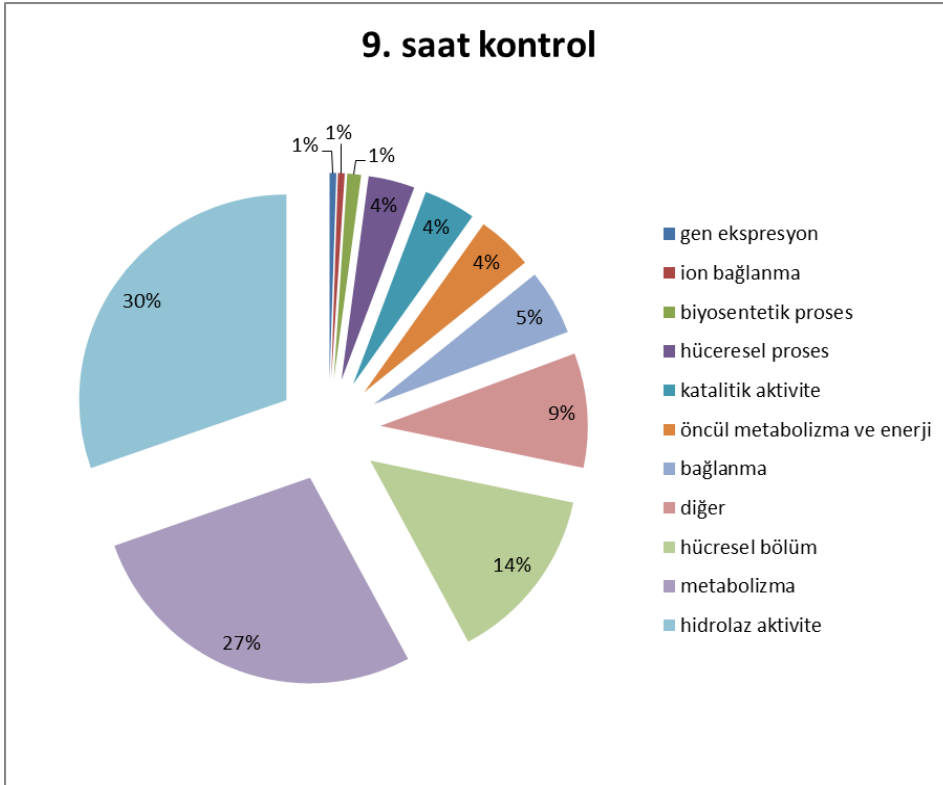
Şekil 5.13. MeJA uygulaması yapılmayan 6. saat kontrol zaman diliminde ifadesi değişen transkriptlerin yüzdesi



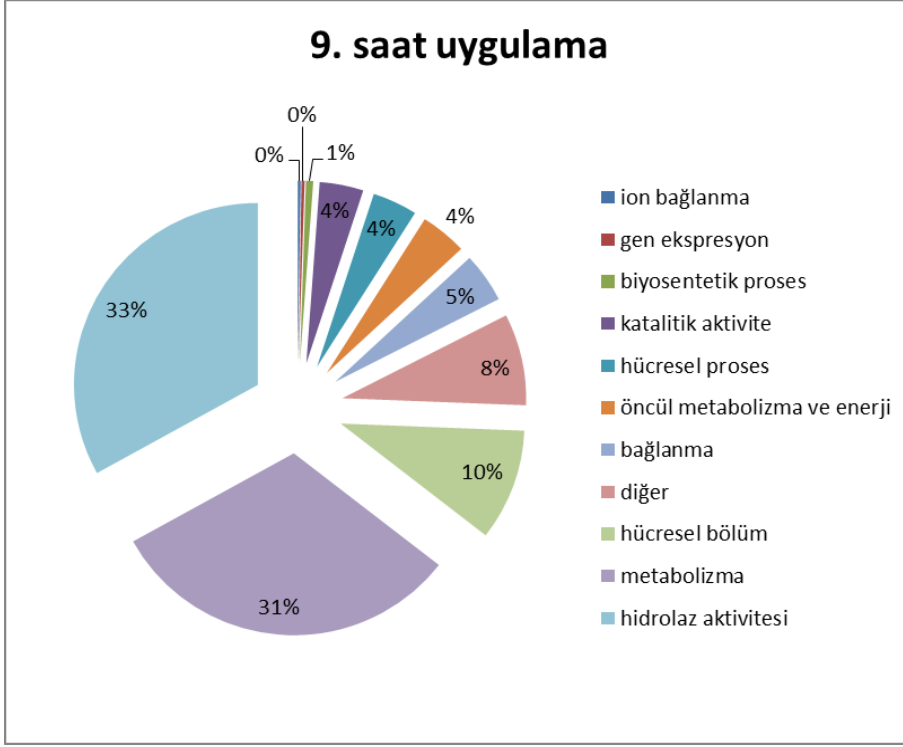
Şekil 5.14. MeJA uygulamasından sonra 6. saat uygulama zaman diliminde ifadesi değişen transkriptlerin yüzdesi

Çalışmada ele alınan diğer bir zaman dilimi olan 9. saate ait kontrol ve uygulama kütüphanelerinin gen anotasyonu ve fonksiyonunu belirlemek için yapılan analiz sonucunda, kontrol grubuna ait transkriptlerinden gen ontolojisi bulunan transkriptlerin %30'unun hidrolaz aktivitesi, %27'sinin metabolizma, %14'ünün hücresel bölünme, %1'inin biyosentetik işlem, %1'inin gen ifadesi ve %9'unun diğer işlemler adı altında

sinyal iletimi, uyarılara cevap, biyolojik regülasyon ve protein modifikasyonu ile ilgili çeşitli genleri içeren birkaç biyolojik işlemten oluştuğu tespit edilmiştir (Şekil 5.15.). Buna karşılık uygulama gruplarındaki transkriptin gen ontolojisi ve fonksiyonuna bakıldığında, gen ontolojisi bulunan genlerin %33'ünün hidrolaz, %31'inin metabolizma, %10'unun hücrel bölme, %1'inin biyosentetik işlem, %4'ünün katalitik aktivite, %4'ünün öncül metabolizma ve enerji, gen ifadesi ile ilgili %0 gen , %8 diğer işlemler adı altında ve kimyasal uyarılara cevap, sinyal işlemi, metal iyon transportu, protein ve aminoasit fosforilasyonu ile ilişkili çeşitli genler içerdiği sonucu elde edilmiştir (Şekil 5.16.). Dokuzuncu saat zaman dilimine ait kontrol ve uygulama grupları gen ontolojileri açısından karşılaştırıldığında, genel olarak uygulama grubunda, kontrol grubuna göre metabolizma ve hidrolaz aktivitesi ile ilgili genlerin arttığı, gen ifadesi, hücrel bölme ve iyon bağlama ile ilgili gen yüzdelerinin azaldığı belirlenmiştir. İlginç bir şekilde bağlanma, öncül metabolizma ve enerji, hidrolaz aktivitesi, biyosentetik işlemler ve katalitik aktivite işlemi ile ilgili gen yüzdelerinin her iki grupta da aynı kaldığı fakat uygulamada hidrolaz ile ilgili transkript sayısının daha fazla olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 5.15. MeJA uygulaması yapılmayan 9. saat kontrol zaman diliminde ifadesi değişen transkriptlerin yüzdesi



Şekil 5.16. MeJA uygulamasından sonra 9. saat uygulama zaman diliminde ifadesi değişen transkriptlerin yüzdesi

5.4.4. MeJA muamelesi sonucunda sentezlenen transkripsiyon faktörleri

Çalışmada dizilenen RNA'dan transkripsiyon faktörlerini (TF) tanımlamak için tüm transkriptom verisi kullanılmıştır. Bu transkripsiyon faktörlerine ait DNA bağlanma domainlerinin plant transcription factor database (PlantTFDB v2.0) (<http://planttfdb.cbi.edu.cn/>) olarak adlandırılan veri tabanında yer alan tüm transkripsiyon faktörleri indirildikten sonra, transkriptom okumaları (BLASTX 2.2.27) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ile default parametreler kullanılarak sonuçlar elde edilmiştir (155). Analiz sonucunda, hangi transkriptin hangi transkripsiyon familyası ile homoloji gösterdiği, söz konusu transkripsiyon proteinin aminoasit (aa) uzunluğu ve hangi bitki türünde yer aldığı hakkında çeşitli veriler elde edilmiştir. Buna göre analiz sonucunda, 6. saat zaman dilimine ait kontrol grubunda sadece tek bir transkriptin (IRTH9WL08EZ29O), 348 aa uzunluğundaki LBD TF familyasına ait bir protein ile homoloji gösterdiği bulunmuştur (Çizelge 5.7).

Çizelge 5.7. 6. saat kontrol zaman diliminde tespit edilen transkripsiyon faktörü

Transkript	Tür	TF ailesi	Uzunluğu (aa)
IRTH9WL08EZ29O	<i>Theellungiella parvula</i>	LBD ailesi proteini	348

Analiz sonucunda 6. saat uygulama kütüphanelerine ait okumaların, toplamda 97 transkriptin çeşitli TF familyaları ile homoloji gösterdiği bulunmuştur (Çizelge 5.8). Bu transkriptlerden, 77'sinin LBD TF ailesine ait proteinler, 63'ünün çinko parmak protein 622'i, 7'sinin arginosuccinate syn. familyasına ait proteinler, 5'inin bZIP familyasına ait proteinler, 3'ünün MYB TF ailesine ait proteinler, 3'ünün C₂H₂ familyasındaki proteinler, 1'inin retrotransposon TF proteini, 1'inin TCP TF ailesi proteini, 1'inin chloroplast sulfur E proteini, 1'inin G2-like familyasına ait protein, 1'inin GRAS familyasındaki protein ve son olarak 1'inin de retrotransposon benzer proteini ile homoloji gösterdikleri sonucu elde edilmiştir (Çizelge 5.8). Sonuç olarak 6. saat zaman dilimine ait kontrol ve uygulama okumaları karşılaştırıldığında, uygulama yapılan dokuların okuma kütüphanelerinde TF'lerin, hem familya düzeyindeki çeşitlilik hem de sayı açısından daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 5.8. 6. saat uygulama zaman diliminde tespit edilen transkripsiyon faktörleri

Transkript	TF Familyası
IRTH9WL05CX54I	arginosuccinate syn. ailesi
IRTH9WL05C2ORC	arginosuccinate syn. ailesi
IRTH9WL05CZQ4J	arginosuccinate syn. ailesi
IRTH9WL05C79GY	arginosuccinate syn. ailesi
IRTH9WL05CY6DL	arginosuccinate syn. ailesi
IRTH9WL05CVHLY	arginosuccinate syn. ailesi
IRTH9WL05C44UT	arginosuccinate syn. ailesi
IRTH9WL07EE0I6	bZIP aile proteini
	bZIP aile proteini
	bZIP aile proteini
	bZIP aile proteini
	bZIP aile proteini

Çizelge 5.8 (Devam)

	C2H2 aile proteini
	C2H2 aile proteini
	C2H2 aile proteini
IRTH9WL07EC521	chloroplast sulfur E
IRTH9WL05C4EI9	G2-like aile proteini
IRTH9WL05C3ENE	GRAS aile proteini
IRTH9WL07D88ZX	LBD aile proteini
IRTH9WL07EC6ZI	LBD aile proteini
IRTH9WL07D8QCC	LBD aile proteini
IRTH9WL07EEUUG	LBD aile proteini
IRTH9WL07D5XFH	LBD aile proteini
IRTH9WL07EEC73	LBD aile proteini
IRTH9WL07D6MFU	LBD aile proteini
IRTH9WL07D86UV	LBD aile proteini
IRTH9WL07EE4OJ	LBD aile proteini
IRTH9WL07D84UU	LBD aile proteini
IRTH9WL07D41E8	LBD aile proteini
IRTH9WL07D9UJV	LBD aile proteini
IRTH9WL07D5Z7D	LBD aile proteini
IRTH9WL07D6YGM	LBD aile proteini
IRTH9WL07EA2RX	LBD aile proteini
IRTH9WL07D95CX	LBD aile proteini
IRTH9WL07D9ZBA	LBD aile proteini
IRTH9WL07D7Q1S	LBD aile proteini
IRTH9WL07EAQMT	LBD aile proteini
IRTH9WL07EEP5L	LBD aile proteini
IRTH9WL07EFT78	LBD aile proteini
IRTH9WL06DSZSI	LBD aile proteini
IRTH9WL06DNH2A	LBD aile proteini
IRTH9WL06DM9QO	LBD aile proteini
IRTH9WL06DPFHH	LBD aile proteini
IRTH9WL06DRCH2	LBD aile proteini
IRTH9WL06DJIP1	LBD aile proteini
IRTH9WL06DLVFK	LBD aile proteini
IRTH9WL06DTNCG	LBD aile proteini
IRTH9WL07D76HL	LBD aile proteini
IRTH9WL07EAJHN	LBD aile proteini
IRTH9WL07D86Z4	LBD aile proteini
IRTH9WL07EEF5T	LBD aile proteini
IRTH9WL07EFXX8	LBD aile proteini
IRTH9WL07EFDNB	LBD aile proteini
IRTH9WL06DS5FW	LBD aile proteini
IRTH9WL06DK7E2	LBD aile proteini

Çizelge 5.8 (Devam)

IRTH9WL06DMIQR	LBD aile proteini
IRTH9WL06DORIX	LBD aile proteini
IRTH9WL05C5J6D	LBD aile proteini
IRTH9WL05C5HKD	LBD aile proteini
IRTH9WL05CXZ02	LBD aile proteini
IRTH9WL05C3UEM	LBD aile proteini
IRTH9WL05C3KF9	LBD aile proteini
IRTH9WL05C2Z9R	LBD aile proteini
IRTH9WL05C3WV9	LBD aile proteini
IRTH9WL05CZSQ7	LBD aile proteini
IRTH9WL05C12NB	LBD aile proteini
IRTH9WL05C5CA3	LBD aile proteini
IRTH9WL05C6ZOS	LBD aile proteini
IRTH9WL05C1MZB	LBD aile proteini
IRTH9WL05C1CZK	LBD aile proteini
IRTH9WL05CYFA9	LBD aile proteini
IRTH9WL05C315J	LBD aile proteini
IRTH9WL05CZ42T	LBD aile proteini
IRTH9WL05C0HB3	LBD aile proteini
IRTH9WL05CX4W1	LBD aile proteini
IRTH9WL05C3F79	LBD aile proteini
IRTH9WL05C0HTK	LBD aile proteini
IRTH9WL05C0255	LBD aile proteini
IRTH9WL05CZBFL	LBD aile proteini
IRTH9WL05CZXAG	LBD aile proteini
IRTH9WL05CZVAO	LBD aile proteini
IRTH9WL05C0P88	LBD aile proteini
IRTH9WL05CXWO7	LBD aile proteini
IRTH9WL05C3UAS	LBD aile proteini
IRTH9WL05C7YWR	LBD aile proteini
IRTH9WL05C7L8A	LBD aile proteini
IRTH9WL05CZFNW	LBD aile proteini
IRTH9WL05C143F	LBD aile proteini
IRTH9WL05C5RUX	LBD aile proteini
IRTH9WL05C33R5	LBD aile proteini
IRTH9WL05CZCR7	LBD aile proteini
IRTH9WL05C78CG	LBD aile proteini
IRTH9WL05C5K9O	LBD aile proteini
IRTH9WL05C4RKH	LBD aile proteini
IRTH9WL05C4NXN	LBD aile proteini
IRTH9WL05C536P	MYB aile proteini
IRTH9WL05C36HD	MYB aile proteini MYB aile proteini
IRTH9WL07ED8T1	retrotransposon prot. Putve.
IRTH9WL06DTCMX	TCP aile proteini

Çizelge 5.8 (Devam)

	Zinc finger protein622
	Zinc finger protein622
	Zinc finger protein622
	Zinc finger protein622
	Zinc finger protein622
	Zinc finger protein622
	Zinc finger protein622
IRTH9WL05C57XR	Zinc finger protein622
	Zinc finger protein622
	Zinc finger protein622
	Zinc finger protein622
	Zinc finger protein622
	Zinc finger protein622
	Zinc finger protein622
	Zinc finger protein622
	Zinc finger protein622
	Zinc finger protein622
	Zinc finger protein622
	Zinc finger protein622
	Zinc finger protein622
	Zinc finger protein622

Aynı analizler, 9. saat zaman dilimine ait kontrol ve uygulama okuma kütüphanelerinde de yapılmıştır. Bu sonuçlara göre, 9. saat zaman dilimi kontrol okumalarına ait toplamda 36 transkript farklı sayılarda çeşitli TF'ler ile homoloji göstermiştir. Bu transkriptlerin sırasıyla 32'si LBD TF ailesine ait proteinler, 2'si TCP TF ailesine ait proteinler, 1'i GATA TF ailesi, 1'i WRKY TF ailesindeki protein, 1'i MYB TF ailesine ait protein ve son olarak da 1'inin de ARF TF ailesine ait protein ile homoloji gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 5.9).

Çizelge 5.9. 9. saat kontrol zaman diliminde tespit edilen transkripsiyon faktörleri

Transkript	TF familyası
IRTH9WL04CK92X	LBD aile proteini
IRTH9WL04CK65I	LBD aile proteini
IRTH9WL04CAEMF	LBD aile proteini
IRTH9WL04CFHGZ	TCP aile proteini
IRTH9WL04CIMOR	LBD aile proteini
IRTH9WL04CGNBT	LBD aile proteini
IRTH9WL04CMZPO	LBD aile proteini
IRTH9WL04CH3V6	TCP aile proteini
IRTH9WL04CG0CD	LBD aile proteini
IRTH9WL04CDBLY	ARF aile proteini

Çizelge 5.9 (Devam)

	WRKY aile proteini
	MYB_ilgili aile proteini
IRTH9WL04CCCCG	LBD aile proteini
IRTH9WL04CCBP0	LBD aile proteini
IRTH9WL04CHR1J	LBD aile proteini
IRTH9WL04CJP0G	LBD aile proteini
IRTH9WL04CI3MV	LBD aile proteini
IRTH9WL04CCHH7	LBD aile proteini
IRTH9WL04CJX6O	LBD aile proteini
IRTH9WL04CH5US	LBD aile proteini
IRTH9WL04CHSJ	LBD aile proteini
IRTH9WL04CB9GV	LBD aile proteini
IRTH9WL04CCYQV	LBD aile proteini
IRTH9WL04CC16X	LBD aile proteini
IRTH9WL04CFKL6	GATA aile proteini
IRTH9WL04CEVEJ	LBD aile proteini
IRTH9WL04CGTL8	LBD aile proteini
IRTH9WL04CCPHH	LBD aile proteini
IRTH9WL04CHHP9	LBD aile proteini
IRTH9WL04CDPWC	LBD aile proteini
IRTH9WL04CERP3	LBD aile proteini
IRTH9WL04CH3RV	LBD aile proteini
IRTH9WL04CGVCL	LBD aile proteini
IRTH9WL04CHFT9	LBD aile proteini
IRTH9WL04CHFT9	LBD aile proteini
IRTH9WL04CK91K	LBD aile proteini
IRTH9WL04CLSXB	LBD aile proteini
IRTH9WL04CMJRE	LBD aile proteini

9. saat uygulama grubuna ait okumaların, TF analizine karşılık MeJA uygulaması yapılan kapsül dokusundan elde edilen okuma kütüphanesinde toplamda 172 transkriptin çeşitli TF'ler ile homoloji gösterdiği bulunmuştur (Çizelge 5.10.). Analiz sonucuna göre, 155 transkript LBD TF ailesi proteinleri, 35'i bHLH TF ailesine ait proteinler, 10'u helix-loop-helix (bHLH) super ailesi proteinleri ve 8'i de basic helix-loop-helix (bHLH) ile homoloji göstermiştir. Ayrıca bu transkripsiyon faktörlerin, WRKY TF ailesi proteinleri, WOX ailesi proteinleri, ubiquitin 6, Tesmin/TSO1-like CXC domain-içeren protein, TALE TF ailesi protein, MYB TF ailesi protein, GRAS TF ailesi protein, auxin response factor 6, Aspartat kinaz ailesi protein, aspartate kinase 3 gibi proteinler de çeşitli sayıda homoloji gösterdiği sonuçları elde edilmiştir (Çizelge 5.10). Genel olarak her iki zaman (6. saat, 9. saat) dilimi arasında TF'lerin çeşit ve sayıları bakımından bir karşılaştırma yapıldığında, 9. saat uygulamasının daha fazla sayıda ve çeşitte olduğu görülmüştür. Aynı zamanda her iki

zaman diliminin kendi içinde kontrol ve uygulama okuma kütüphaneleri düşünüldüğünde, uygulama yapılmış kütüphanelerin kontrol grubuna göre daha fazla sayıya ve çeşide sahip olduğuna dair veriler elde edilmiştir.

Çizelge 5.10. 9. saat uygulama zaman diliminde tespit edilen transkripsiyon faktörleri

Transkript	TF familyası
IRTH9WL03BYTWF	GRAS ailesi proteini
IRTH9WL03BQG40	LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BS0ZM	protein kinase ailesi
	protein kinase ailesi
	protein kinase ailesi
IRTH9WL03BZSQL	LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BV7Q5	LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BYQED	LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BTP9W	myb-like HTH TF
	myb-like HTH TF
	lipid transfer protein
	auxin response factor
	ARF ailesi proteini
	MYB_ilgili ailesi proteini
IRTH9WL03BUE4V	LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BRCTJ	LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BQVQM	LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BVZO0	LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BTW3G	LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BRU4E	LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BYP5P	LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BUSON	LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BZN9N	LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BXFCJ	LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BSYUJ	LBD ailesi proteini

Çizelge 5.10 (Devam)

IRTH9WL03BY3U1	ubiquitin
IRTH9WL03BTQ1D	LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BQEC1	LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BX1L9	bHLH ailesi proteini
	helix-loop-helix (bHLH) superailesi proteini
	bHLH ailesi proteini
	bHLH ailesi proteini
	helix-loop-helix (bHLH) superailesi proteini
	bHLH ailesi proteini
	helix-loop-helix (bHLH) superailesi proteini
	bHLH ailesi proteini
	bHLH ailesi proteini
	bHLH ailesi proteini
	helix-loop-helix (bHLH) superailesi proteini
	helix-loop-helix (bHLH) superailesi proteini
	bHLH ailesi proteini
	helix-loop-helix (bHLH) superailesi proteini
	bHLH ailesi proteini
	bHLH ailesi proteini
	bHLH ailesi proteini
	helix-loop-helix (bHLH) superailesi proteini
	helix-loop-helix (bHLH) superailesi proteini
	bHLH ailesi proteini
	Basic helix-loop-helix DNA-binding protein
	bHLH ailesi proteini
	bHLH ailesi proteini
	basic helix-loop-helix (bHLH) super ailesi
	DNA binding protein
	helix-loop-helix (bHLH) superailesi proteini
	Basic helix-loop-helix DNA-binding protein
	Transcription factor (AHRD)
	bHLH ailesi proteini

Çizelge 5.10 (Devam)

helix-loop-helix (bHLH) suprailesi proteini
bHLH ailesi proteini
basic helix-loop-helix (bHLH) protein;
basic helix-loop-helix (bHLH)
Helix-loop-helix DNA-bağlama
similar to bHLH transkripsiyon
bHLH ailesi proteini
bHLH ailesi proteini
bHLH ailesi proteini
DNA binding protein,
basic helix-loop-helix (bHLH) super ailesi
helix-loop-helix (bHLH) super ailesi
helix-loop-helix (bHLH) super ailesi
helix-loop-helix (bHLH) super ailesi
helix-loop-helix (bHLH) super ailesi
bHLH ailesi proteini
helix-loop-helix (bHLH) super ailesi
helix-loop-helix (bHLH) super ailesi
helix-loop-helix (bHLH) super ailesi
helix-loop-helix (bHLH) super ailesi
helix-loop-helix (bHLH) super ailesi
helix-loop-helix (bHLH) super ailesi
bHLH ailesi proteini
bHLH ailesi proteini
FAR1 ailesi proteini
bHLH ailesi proteini
bHLH ailesi proteini
bHLH ailesi proteini
bHLH ailesi proteini
bHLH ailesi proteini
bHLH ailesi proteini
basic helix-loop-helix (bHLH)
basic helix-loop-helix (bHLH)

Çizelge 5.10 (Devam)

	basic helix-loop-helix (bHLH)
	basic helix-loop-helix (bHLH)
	bHLH ailesi proteini
	bHLH ailesi proteini
	bHLH ailesi proteini
	helix-loop-helix (bHLH) super ailesi
	helix-loop-helix (bHLH) super ailesi
	helix-loop-helix (bHLH) super ailesi
	bHLH ailesi proteini
	helix-loop-helix (bHLH) super ailesi
	bHLH ailesi proteini
	bHLH ailesi proteini
	helix-loop-helix (bHLH) super ailesi
	helix-loop-helix (bHLH) super ailesi
IRTH9WL03BROZF	LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BTAY7	LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BYPU0	LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BP7K9	LBD ailesi proteini
IRTH9WL03B0U4B	MYB ailesi proteini
IRTH9WL03BT3JU	LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BSM96	LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BVUJE	LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BTM44	LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BUE92	LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BRX2L	LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BTA44	LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BXT2S	LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BR17J	LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BRSDI	LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BX0XC	LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BV5GI	LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BXQDY	LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BSSF0	LBD ailesi proteini

Çizelge 5.10 (Devam)

IRTH9WL03BSIFP		LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BVE01		LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BYHA4		LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BUHIX		LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BZDE5		LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BVEE6		LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BZIF2		LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BX02Q		LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BR2QW		LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BW7SB		LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BS0BM		LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BVK73		LBD ailesi proteini
IRTH9WL03B1A0X		LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BRJMV		LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BVZRX		LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BUCPP		LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BX3OB		LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BT3TZ		LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BSLG8		LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BYPV9		LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BXUMB		LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BZCR2		LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BQKIJ		LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BU0JY		LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BRF35		LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BT5RN		LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BXFOS		LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BXVSW		LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BXI0T		LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BSHYT		LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BUVNX	B3	ailesi proteini
	B3	ailesi proteini
IRTH9WL03BSDRL		TARGET OF MONOPTEROS

Çizelge 5.10 (Devam)

IRTH9WL03B19Q1	C3H ailesi proteini
IRTH9WL03BSB45	LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BT9E5	ARF ailesi proteini
	WRKY ailesi proteini
	MYB_related ailesi proteini
	basic leucine-zipper 7
IRTH9WL03BSGZM	aspartate kinase
	kinase family
IRTH9WL03BYG2G	LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BQM8M	LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BUMC3	LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BVHY8	LBD ailesi proteini
IRTH9WL03BZOD1	CPP ailesi proteini
	Tesmin/TSO1-like CXC domain-containing
	Tesmin/TSO1-like CXC domain-containing
	CPP ailesi proteini
	Tesmin/TSO1-like CXC domain-containing
	CPP ailesi proteini
	Tesmin/TSO1-like CXC domain-containing
	Tesmin/TSO1-like CXC domain-containing
	Tesmin/TSO1-like CXC domain-containing
	Tesmin/TSO1-like CXC domain-containing
	CPP ailesi proteini
	Tesmin/TSO1-like CXC domain-containing
	CPP ailesi proteini
	CPP ailesi proteini
	similar to tesmin/TSO1-like
	similar to tesmin/TSO1-like
	similar to tesmin/TSO1-like
	similar to tesmin/TSO1-like
	transcription factor, putative
	Tesmin/TSO1-like CXC domain-containing
IRTH9WL03BVKQR	G2-like ailesi

Çizelge 5.10 (Devam)

	G2-like ailesi
	HRT-like ailesi
	Subtilase ailesi
	bHLH ailesi
IRTH9WL03BW84U	LBD ailesi
IRTH9WL03BRUOD	LBD ailesi
IRTH9WL03B1G7F	LBD ailesi
IRTH9WL03BZ5WL	LBD ailesi
IRTH9WL03BUZCE	LBD ailesi
IRTH9WL03BRMGL	LBD ailesi
IRTH9WL03BSN0K	LBD ailesi
IRTH9WL03BUVW1	LBD ailesi
IRTH9WL03BSDXH	LBD ailesi
IRTH9WL03BVT9H	LBD ailesi
IRTH9WL03BT0OT	LBD ailesi
IRTH9WL03BU5C0	LBD ailesi
IRTH9WL03BQ5EV	LBD ailesi
IRTH9WL03BRBSS	LBD ailesi
IRTH9WL03B04I2	LBD ailesi
IRTH9WL03BWC14	NAC domain
IRTH9WL03BX4LF	LBD ailesi
IRTH9WL03BSYSB	LBD ailesi
IRTH9WL03BVQ6X	LBD ailesi
IRTH9WL03BQQWW	LBD ailesi
IRTH9WL03BYJWY	LBD ailesi
IRTH9WL03BW76C	LBD ailesi
IRTH9WL03BWPXD	LBD ailesi
IRTH9WL03BU7DW	LBD ailesi
IRTH9WL03BZUDY	LBD ailesi
IRTH9WL03BTABM	LBD ailesi
IRTH9WL03BRCJO	LBD ailesi
IRTH9WL03B19UB	LBD ailesi
IRTH9WL03BT9TV	LBD ailesi

Çizelge 5.10 (Devam)

IRTH9WL03B2I5Q	LBD ailesi
IRTH9WL03BXD4N	LBD ailesi
IRTH9WL03BSX3J	LBD ailesi
IRTH9WL03B1B1Q	LBD ailesi
IRTH9WL03BVC2H	LBD ailesi
IRTH9WL03BVAPG	LBD ailesi
IRTH9WL03BSGS2	LBD ailesi
IRTH9WL03BT9L8	LBD ailesi
IRTH9WL03BYCIJ	LBD ailesi
IRTH9WL03B0H64	LBD ailesi
IRTH9WL03B0JHJ	LBD ailesi
IRTH9WL03BWG8S	LBD ailesi
IRTH9WL03BR1K8	LBD ailesi
IRTH9WL03BTVA8	LBD ailesi
IRTH9WL03BYTM1	LBD ailesi
IRTH9WL03BT86S	LBD ailesi
IRTH9WL03BQ54H	LBD ailesi
IRTH9WL03BXVR0	LBD ailesi
IRTH9WL03BZUM8	LBD ailesi
IRTH9WL03BWGYD	LBD ailesi
IRTH9WL03BXL TJ	LBD ailesi
IRTH9WL03BZFBZ	LBD ailesi
IRTH9WL03BQ8T9	LBD ailesi
IRTH9WL03BTV8B	LBD ailesi
IRTH9WL03BS5ZS	LBD ailesi
IRTH9WL03B1QQF	LBD ailesi
IRTH9WL03BXW32	LBD ailesi
IRTH9WL03BWTM7	LBD ailesi
IRTH9WL03BRUSC	LBD ailesi
IRTH9WL03B19UV	LBD ailesi
IRTH9WL03B07PF	LBD ailesi
IRTH9WL03BSIST	LBD ailesi

Çizelge 5.10 (Devam)

IRTH9WL03BX9AX	LBD ailesi
IRTH9WL03BYTTL	LBD ailesi
IRTH9WL03B0U2U	LBD ailesi
IRTH9WL03BXDI2	LBD ailesi
IRTH9WL03B2I9O	LBD ailesi
IRTH9WL03BWVDE	LBD ailesi
IRTH9WL01AQK55	LBD ailesi
IRTH9WL01AQUHX	LBD ailesi
IRTH9WL01AOXN1	LBD ailesi
IRTH9WL01AP65R	LBD ailesi
IRTH9WL01AO8R4	LBD ailesi
IRTH9WL01AOYUC	LBD ailesi
IRTH9WL03BYXKF	aspartate kinase aspartate kinase
IRTH9WL03BTBBO	LBD ailesi
IRTH9WL03BS4Z9	LBD ailesi
IRTH9WL03BW24H	LBD ailesi
IRTH9WL03BWJVV	LBD ailesi
IRTH9WL03BVK8J	LBD ailesi
IRTH9WL03BYSC0	LBD ailesi
IRTH9WL03BSJ1W	LBD ailesi
IRTH9WL03BTIWQ	HD-ZIP ailesi
	MIKC ailesi
	WOX ailesi
	MYB ailesi
	DNA/RNA polymerases
	TALE ailesi
	M-type ailesi
IRTH9WL03BWCLO	LBD ailesi
IRTH9WL03BRESI	LBD ailesi
IRTH9WL03BSDKN	LBD ailesi

Çizelge 5.10 (Devam)

IRTH9WL03BTJ9A	LBD ailesi
IRTH9WL03BT5KC	LBD ailesi
IRTH9WL03BULOZ	LBD ailesi
IRTH9WL03BR5SO	Nin-like ailesi

5.4.5. MeJA muamelesi sonucunda sentezlenmiş miRNA'lar ve miRNA'ların hedef gen analizleri

Transkriptom okumalarından miRNA'ların belirlenmesi için kütüphanelerden elde edilen okumaların, miRBase v19.0 (<http://www.mirbase.org/>)'dan elde edilen ve daha önce bilinen miRNA'ların e-value değeri $1e-10$ alınarak Blastn ile analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda elde edilen miRNA'ların stem loop uzunluğu, 454 FLX+'ın hangi okuması ile homoloji gösterdiği ve hangi organizmaya ait olduğu gibi birçok data elde edilmiştir. Bununla birlikte, bulunan miRNA'lara ait hedef gen analizleri gerçekleştirilmiştir (Çizelge 5.14).

Yapılan analiz sonucuna göre, 6. saat kontrol okumalarının pre-miRNA içeren veri tabanının Blastn ile analizi yapıldığında, toplamda 19 okumanın mmumMIR6236, peuMIR2916, gmaMIR5368 ve gmaMIR4995 pre-miRNA dizileri ile homoloji gösterdiği sonucu elde edilmiştir (Çizelge 5.11).

Çizelge 5.11. 6. saat kontrol kütüphanesinde bulunan miRNA'lar

Transkript	miRNA	Bulunma sayısı
IRTH9WL08ETAR5	gmamiR4995	1
IRTH9WL08EVR1F	gmamiR5368	1
IRTH9WL08EW4AR	gmamiR5368	1
IRTH9WL08EU05S	gmamiR5368	1
IRTH9WL08ERH4S	mmumiR6236	1
IRTH9WL08EQMLA	mmumiR6236	1
IRTH9WL08EV78M	mmumiR6236	1
IRTH9WL08ETN9U	mmumiR6236	1
IRTH9WL08ET5JT	mmumiR6236	1
IRTH9WL08EQJCJ	mmumiR6236	1
IRTH9WL08EZXRf	mmumiR6236	1
IRTH9WL08E0I07	mmumiR6236	1
IRTH9WL08EY3AY	mmumiR6236	1
IRTH9WL08EXTAB	mmumiR6236	1
IRTH9WL08EWC11	mmumiR6236	1
IRTH9WL08ET4CY	mmumiR6236	1
IRTH9WL08E0N5G	mmumiR6236	1
IRTH9WL08E0QHU	mmumiR6236	1
IRTH9WL08ETSEE	peumiR2916	1

6. saat uygulama kütüphanesinde ise, toplamda 4399 okuma çeşitli miRNA'lar ile homoloji göstermiştir. Bu okumalardan 3910'u mmu-mir-6236, 222'si peu-MIR2916, 171'i gma-MIR5368, 55'i gma-MIR4995, 38'i hbr-MIR6173, 1'i bmo-mir-6497, 1'i hsa-mir-5096 ve son olarak 1'i ise ppy-mir-1273a miRNA'sı ile homoloji göstermiştir (Çizelge 5.11).

Çizelge 5.12. 6. saat uygulama kütüphanesinde bulunan miRNA'lar

miRNA	Bulunma sayısı
bmo-miR-6497	1
gma-miR4995	55
hbr-miR6173	38
gma-miR5368	171
hsa-miR-5096	1
mmu-miR-6236	3910
peu-miR2916	222
ppy-miR-1273a	1

Dokuzuncu saat zaman diliminin analiz sonuçlarına bakıldığında, 9. saat kontrol kütüphanesine ait okumalardan hiçbirinin pre-miRNA dizilerinden meydana gelen veri kütüphanesindeki herhangi bir miRNA ile homoloji göstermediği görülmüştür. Buna karşılık, 9. saat uygulama kütüphanesine ait okumaların toplamda 8096'sının çeşitli pre-miRNA dizileri ile eşleştiği sonucu elde edilmiştir. Buna göre, bu 8096 okumadan 6107'sinin mmu-mir-6236, 870'inin peu-MIR2916, 749'unun gma-MIR5368, 247'sinin gma-MIR4995, 116'sının hbr-MIR6173, 3'ünün mmu-mir-6240, 3'ünün rno-mir-6320, 1'inin ptr-mir-1285, 1'inin hsa-mir-1285-1 ve son olarak 1'inde osa-MIR5523 ile homoloji gösterdiği tespit edilmiştir (Çizelge 5.12). Genel olarak her iki uygulama örneği karşılaştırıldığında, 6. saat zaman dilimine ait okumalarda pre-miRNA dizisinin bulunma oranının daha yüksek olduğu görülmüştür. Ayrıca diğer analizlerde olduğu gibi her iki zaman dilimi için de kendi içerisindeki uygulama kütüphanelerine ait okumaların, kontrol grubuna göre pre-miRNA dizisi bakımından daha zengin olduğu sonucu elde edilmiştir.

Çizelge 5.13. 9. saat uygulama kütüphanesinde bulunan miRNA'lar

miRNA	Bulunma sayısı
gma-miR4995	247
gma-miR5368	749
hbr-miR6173	116
hsa-miR1285-1	1
mmu-miR6236	6107
mmu-miR6240	3
osa-miR5523	1
peu-miR2916	870
ptr-miR-1285	1
rno-miR-6320	3

MIR2916, MIR4995, MIR6173, MIR5523 (Çizelge 5.13) miRNA'larına ait toplamda 86 hedef genin, gen ontoloji analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda, mekanik stres ve alkaloit biyosentezi ile ilişkili olabilecek birden fazla moleküler element elde edilmiştir (Çizelge 5.14). Aynı zamanda elde edilen miRNA'ların hedefledikleri genlerin ontolojileri ve fonksiyonları analiz edilmiştir. Fonksiyonu belirlenmiş genlerden birkaçının

metiltransferaz, metilasyon, oksidasyon redüksiyon ve hidrolaz aktivitesi gibi alkaloid biyosentezinde ilişkili olabilecek transkriptler olduğu sonucu elde edilmiştir (Çizelge 5.14).

Çizelge 5.14. Elde edilen miRNA'lara ait hedef genlerin atıflandırma analizi

GO ID :	miRNA	Hedef Gen Annotasyon
GO:0008152	miR2916	Metabolik işlem
GO:0016787	miR2916	Hidrolaz aktivite
GO:0005488	miR2916	Bağlama
GO:0022626	miR2916	Sitozolik ribozom
GO:0016020	miR2916	Hücre zarı
GO:0044446	miR2916	Hücreler arası organel bölüm
GO:0071944	miR2916	Hücre zarı
GO:0043232	miR2916	Hücreler arası bağlanmayan organ
GO:0044444	miR2916	Sitoplazmik bölüm
GO:0030529	miR2916	Ribonükleo protein karmaşık
GO:0005829	miR2916	Sitozol
GO:0005886	miR2916	Plasma membran
GO:0046872	miR2916	Metal iyon bağlama
GO:0003676	miR2916	Nükleik asit bağlama
GO:0009536	miR2916	Plastid
GO:0005634	miR2916	Nükleus
GO:0044464	miR2916	Hücre bölüm
GO:0009555	miR4995	Polen gelişimi
GO:0042744	miR4995	Hidrojen peroksit katabolik işlem
GO:0009793	miR4995	Embriyo tohum dormansisi
GO:0005886	miR4995	Plazma zarı
GO:0046872	miR4995	Metal iyon bağlama
GO:0003676	miR4995	Nükleik asit bağlama

Çizelge 5.14 (Devam)

GO:0008270	miR4995	Çinko iyon bağlama
GO:0015074	miR4995	DNA integrasyon
GO:0008705	miR4995	Metyonin synthase aktivite
GO:0009086	miR4995	Metyonin biyosentetik işlem
GO:0032259	miR4995	Metilasyon
GO:0009507	miR4995	Kloroplast
GO:0005829	miR4995	Sitozol
GO:0008270	miR4995	Çinko iyon bağlama
GO:0003871	miR4995	S-methyltransferaz aktivite
GO:0009086	miR4995	Metyonin biyosentetik işlem
GO:0032259	miR4995	Metilasyon
GO:0008270	miR4995	Çinko ion bağlama
GO:0003871	miR4995	S-methyltransferaz aktivite
GO:0009086	miR4995	Metyonin biyosentetik işlem
GO:0032259	miR4995	Metilasyon
GO:0008270	miR4995	Çinko ion bağlama
GO:0003871	miR4995	S-methyltransferaz aktivite
GO:0010103	miR6173	Stomatal karmaşık morfogenezis
GO:0009941	miR6173	Kloroplast zar
GO:0016117	miR6173	Karotenoit biyosentetik işlem
GO:0006636	miR6173	Doymamış yağ asidi biyosentetik işlem
GO:0070330	miR6173	Aromataz aktivite
GO:0020037	miR6173	Heme bağlama
GO:0009055	miR6173	Elektron bağlama aktivite
GO:0016556	miR6173	mRNA modifikasyon
GO:0015995	miR6173	Klorofil biyosentetik işlem
GO:0019288	miR6173	Metileritritol 4-fosfat yolağı
GO:0009965	miR6173	Yaprak morfogenezis
GO:0019825	miR6173	Oksijen bağlama
GO:0005506	miR6173	Demir ion bağlama
GO:0030154	miR6173	Hücre farklılaşması
GO:0055114	miR6173	Oksidasyon-redüksiyon işlem
GO:0009974	miR6173	Zein oksantin epsilon hidroksilaz aktivite
GO:0020037	miR5523	Heme bağlama

Çizelge 5.14 (Devam)

GO:0016023	miR5523	Sitoplazmik membran-bounded vesicle
GO:0016705	miR5523	Oksiredüktaz aktivite,
GO:0004497	miR5523	Mono oksijenaz aktivite
GO:0005506	miR5523	Demir iyon bağlama
GO:0009055	miR5523	Elektron bağlama aktivite
GO:0055114	miR5523	Oksidasyon-redüksiyon işlem
GO:0016021	miR5523	İntegral to membran
GO:0006655	miR5523	Fosfotidilgliserol biyosentetik işlem
GO:0030785	miR5523	Lizin N-metiltransferaz aktivite
GO:0009793	miR5523	Embriyo tohum dormansisi
GO:0019252	miR5523	Nişasta biyosentetik işlem
GO:0009902	miR5523	Kloroplast lokasyon
GO:0000023	miR5523	Maltoz metabolik işlem
GO:0018023	miR5523	Peptidil-lizin trimetilasyon
GO:0016853	miR5523	İzomeraz aktivite
GO:0016226	miR5523	Demir-sülfür cluster birleştirme
GO:0019288	miR5523	Metileriritol 4-fosfat yolağı
GO:0009570	miR5523	Kloroplast stroma
GO:0034660	miR5523	ncRNA metabolik işlem
GO:0009073	miR5523	Aromatik a.a ailesi biyosentetik işlem
GO:0016279	miR5523	Protein-lysine N-methyltransferaz
GO:0010027	miR5523	Tilakoid membran organization
GO:0000145	miR5523	Ekzosist
GO:0006887	miR5523	Ekzosist
GO:0016787	miR5523	Hidrolaz aktivite
GO:0008152	miR5523	Metabolik işlem
GO:0005739	miR5523	Mitokondri
GO:0055085	miR5523	Transmembran taşıma
GO:0016021	miR5523	İntegral zar

5.4.6. Elde edilen dizileme kütüphanelerinden belirlenen retrotranspozon elementleri

RNA dizileme çalışmalarında yaygın bir biçimde elde edilen okumalarda, mobil elementler (transpozonlar) belirlenmektedir. Bu çalışmada, 6. saat ve 9. saat kontrol ve uygulama

kütüphanelerine ait dizileme kütüphanelerinden transpozon elementleri elde edilmiştir. Bu analiz için öncelikle repbase (<http://www.girinst.org/repbase/>) veri tabanı kullanılarak bitkilere ait transpozon elementleri içeren bir kütüphane oluşturulmuştur. Daha sonra elde edilen okumalar, oluşturulan bu kütüphaneye karşı Blastn yapılmıştır. Analiz sonucunda, 6. saat kontrol grubundaki toplam 43 okuma, 3 transpozon elementi ile homoloji göstermiştir (Çizelge 5.14). Uygulama kütüphanelerinde ise 2.493 transkript, 16 transpozon elementi ile homoloji göstermiştir (Çizelge 5.14). Sonuç olarak bakıldığında, uygulama kütüphanelerinden elde edilen transpozon okuma sayısı, kontrol grubuna göre oldukça fazla çıkmıştır.

Çizelge 5.15 6. saat kontrol ve uygulama kütüphanelerinde elde edilen transpozon elementleri

6. saat kontrol	Bulunma sayısı	6. saat uygulama	Bulunma sayısı
CiR2#LINE/R2	16	CiR2#LINE/R2	1648
Copia-18_BD-I#LTR/Copia	10	Alu1_OG#SINE/Alu	489
R2-1_SM#LINE/R2	17	Copia-18_BD-I#LTR/Copia	265
		L1_BT#LINE/L1	30
		SVA_B#Retroposon/SVA	27
		ALRb#Satellite/centromeric	9
		FLAM_A#SINE/Alu	7
		GarnAlu1#SINE/B4	6
		7SLRNA#SINE/Alu	2
		FAM#SINE/Alu	2
		FRAM#SINE/Alu	2
		TUBE4#SINE/tRNA-7SL	2
		Angela1_AT_LTR#LTR/Copia	1
		B1F1A#SINE/Alu	1
		BC200#SINE/Alu	1
		WIS21A_TA-LTR#LTR/Copia	1

9. saat zaman dilimine ait analiz sonuçlarına göre ise, kontrol grubundaki toplam 1.217 transkript, 9 transpozon elementi ile homoloji göstermiştir (Çizelge 5.15). Uygulama grubunda ise, toplam 11.884 transkript 34 transpozon elementi ile homoloji göstermiştir (Çizelge 5.15). Sonuç olarak 6. saatte olduğu gibi 9. saat zaman diliminde de uygulama

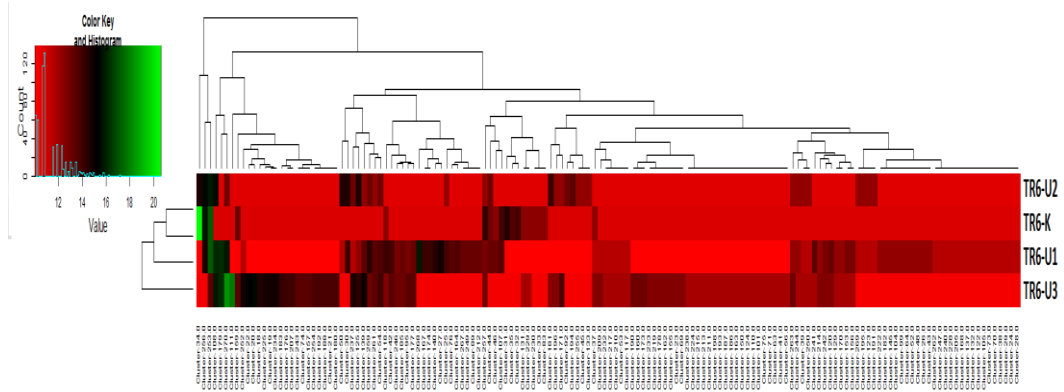
grubunda, kontrole göre oldukça fazla sayıda transpozon elementi elde edilmiştir. 9. saat okumalarında, 6. saate göre oldukça fazla sayıda transpozon elementi bulunmuştur.

Çizelge 5.16 9. saat kontrol ve uygulama kütüphanelerinde elde edilen transpozon elementleri

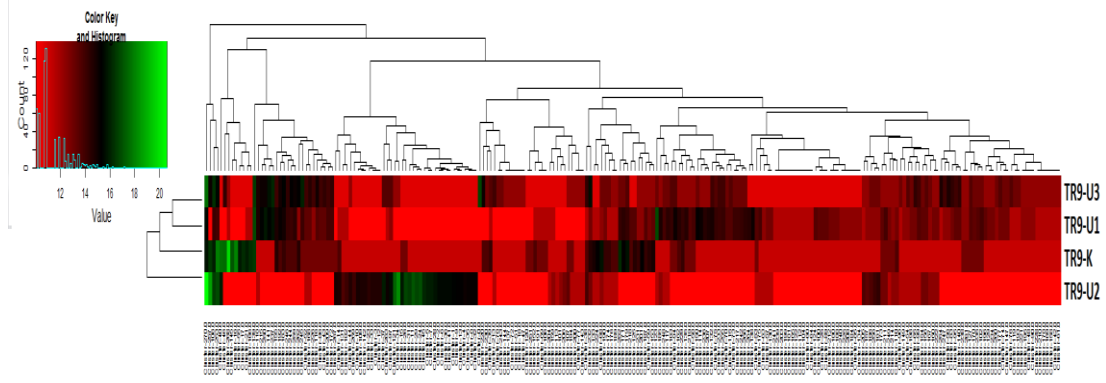
9. saat kontrol	Bulunma sayısı	9. saat uygulama	Bulunma sayısı
Alu1_OG#SINE/Alu	647	7SLRNA#SINE/Alu	2
B1F1A#SINE/Alu	3	ALR#Satellite/centromeric	8
BC200#SINE/Alu	1	Alu1_OG#SINE/Alu	404
CiR2#LINE/R2	410	ANGELA1_TM-int#LTR/Copia	2
Copia-18_BD-I#LTR/Copia	134	B1F#SINE/Alu	3
FLAM_C#SINE/Alu	18	BARE1_HV-int#LTR/Copia	1
FRAM#SINE/Alu	2	BC200#SINE/Alu	1
IS5#ARTEFACT	1	BovB#LINE/RTE-BovB	1
L1P1_orf2#LINE/L1	1	BTSAT1#Satellite/centromeric	2
		Charlie1#DNA/hAT-Charlie	8
		CiR2#LINE/R2	4843
		Copia-18_BD-I#LTR/Copia	970
		ERIKA1_TM-LTR#LTR/Gypsy	1
		FAM#SINE/Alu	2
		FLAM_A#SINE/Alu	13
		FRAM#SINE/Alu	6
		GarnAlu1#SINE/B4	5
		Gypsy-1-LTR_TA#LTR/Gypsy	3
		HAL1-1B_Cja#LINE/L1	1
		IS1#ARTEFACT	1
		L1_Carn5_3end#LINE/L1	75
		LTR13#LTR/ERVK	2
		MSTA#LTR/ERV1-MaLR	2
		MSTB#LTR/ERV1-MaLR	3
		MuLV-int#LTR/ERV1	34
		PB1#SINE/Alu	3
		piggyBac-4_BF#DNA/PiggyBac	486
		R2-1_SM#LINE/R2	4957
		RLTR4_MM-int#LTR/ERV1	34
		SUKKULA3_TM-LTR#LTR/Gypsy	1
		THE1D#LTR/ERV1-MaLR	3
		Tigger2#DNA/TcMar-Tigger	2
		TUBE4#SINE/tRNA-7SL	4
		WIS21A_TA-int#LTR/Copia	1

5.5. Transkriptom okumalarında farklı ifade olunmuş transkriptler

Haşhaş bitkisinin referans genom veya transkript seti olmadığından dolayı, farklı ifade edilen genlerin belirlenmesi ve bu genlerin ifade düzeylerinin saptanması için *de novo* transkriptom yaklaşımında kullanılan analiz yöntemi uygulanmıştır. Bu yaklaşım gözönüne alınarak referans transkript veri setinin oluşturulması, deneysel analiz sonucu elde edilen okumaların referans transkript veri setine haritalanması ve haritalanan transkript sayısının kaydedilmesi gerçekleştirilmiştir. Haşhaşın kapsül dokularından elde edilen transkript dosyalarının bir araya getirmesi sonucunda 3371 unigene elde edilmiştir. Bu işlemi takiben CD-HIT-EST (159) ve iAssembler (160) yazılımı kullanılarak, istenmeyen (redundant; aynı transkriptin farklı uzunlukta kopyaları) ve dizi uzunluğu 200 bazın altında olan transkriptlerin kaldırılmasıyla daha uzun ve doğru referans transkript veri seti elde edilmiştir. Dizileme cihazından elde edilen okumalar, Corset (161) yazılımı ile referans transkriptoma haritalanmış ve transkript sayıları kaydedilmiştir. Kontrol ve uygulama yapılmış genotiplerde, benzer fonksiyonlar gösteren genleri gruplamak amacıyla birleştirici hiyerarşik kümeleme yöntemi kullanılmıştır. Ayrıca uzaklık ölçümü olarak öklit uzaklığı, birleştirme yöntemi olarak 'Average' yöntemi kullanılmıştır ve elde edilen bulgular kullanılarak heatmap grafikleri elde edilmiştir (Şekil 5.17, Şekil 5.18).

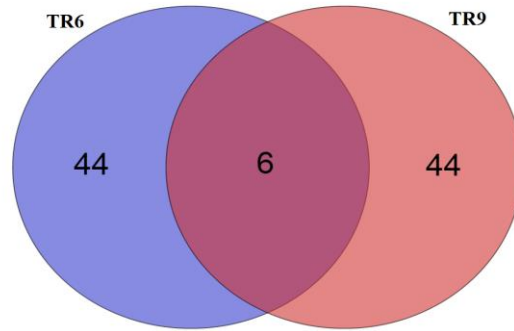


Şekil 5.17. 6. saat zaman dilimine ait heat-map görüntüsü (K : Kontrol, U : Uygulama)



Şekil 5.18. 9. saat zaman dilimine ait heat-map görüntüsü (K : Kontrol, U : Uygulama)

6. saat ve 9. saat koşulları için en anlamlı 50'şer gen seçilerek, ilgili koşullar altında benzer genlerin ifade seviyelerinin araştırılması sonucunda elde edilen bulgulardan venn diyagramı elde edilmiştir (Şekil 5.19).



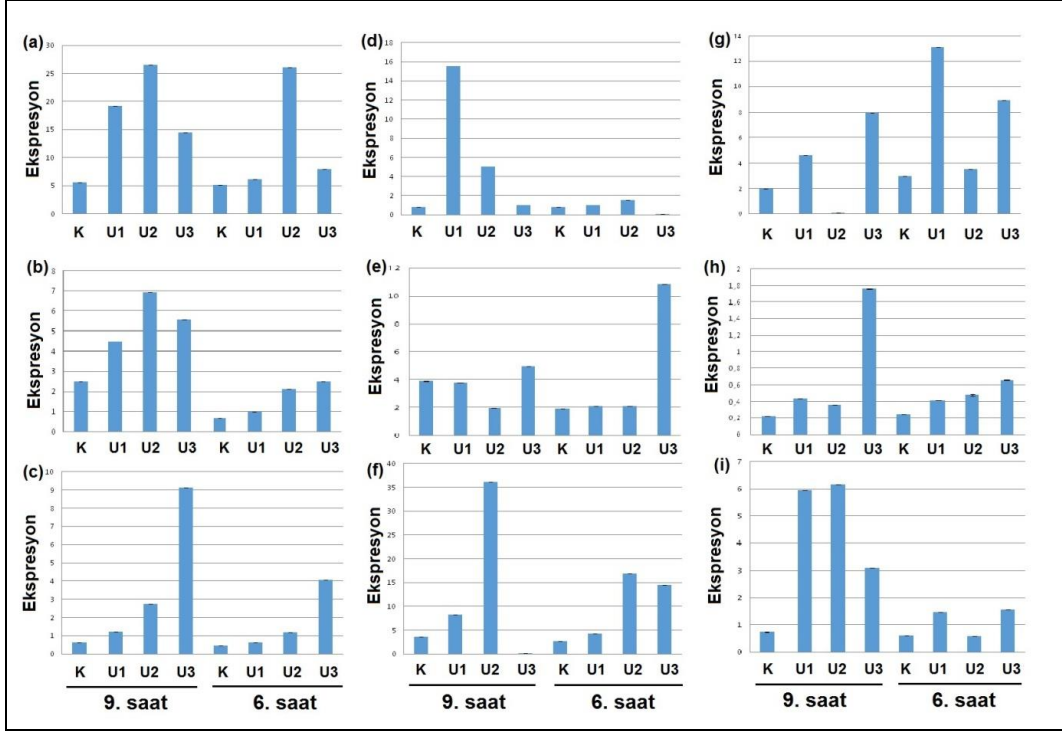
Şekil 5.19. 6. ve 9. saat zaman diliminde farklı ifade edilen transkriptleri gösteren venn görüntüsü

Total	Elementler
6	Cluster-101.0 Cluster-122.0 Cluster-240.0 Cluster-69.0 Cluster-230.0 Cluster-137.0
44	Cluster-71.0 Cluster-131.0 Cluster-133.0 Cluster-163.0 Cluster-215.0 Cluster-205.0 Cluster-73.0 Cluster-186.0 Cluster-70.0 Cluster-211.0 Cluster-238.0 Cluster-187.0 Cluster-38.0 Cluster-155.0 Cluster-229.0 Cluster-132.0 Cluster-105.0 Cluster-32.0 Cluster-24.0 Cluster-75.0 Cluster-262.0 Cluster-23.0 Cluster-29.0 Cluster-213.0 Cluster-168.0 Cluster-33.0 Cluster-193.0 Cluster-198.0 Cluster-224.0 Cluster-56.0 Cluster-92.0 Cluster-150.0 Cluster-247.0 Cluster-228.0 Cluster-110.0 Cluster-41.0 Cluster-83.0 Cluster-35.0 Cluster-45.0 Cluster-31.0 Cluster-63.0 Cluster-124.0 Cluster-255.0 Cluster-28.0
44	Cluster-200.0 Cluster-51.0 Cluster-17.0 Cluster-165.0 Cluster-208.0 Cluster-77.0 Cluster-225.0 Cluster-18.0 Cluster-241.0 Cluster-243.0 Cluster-239.0 Cluster-180.0 Cluster-145.0 Cluster-152.0 Cluster-120.0 Cluster-64.0 Cluster-144.0 Cluster-188.0 Cluster-181.0 Cluster-206.0 Cluster-78.0 Cluster-55.0 Cluster-203.0 Cluster-106.0 Cluster-184.0 Cluster-113.0 Cluster-104.0 Cluster-60.0 Cluster-72.0 Cluster-251.0 Cluster-61.0 Cluster-47.0 Cluster-85.0 Cluster-134.0 Cluster-199.0 Cluster-191.0 Cluster-194.0 Cluster-112.0 Cluster-21.0 Cluster-166.0 Cluster-16.0 Cluster-212.0 Cluster-143.0 Cluster-42.0

Şekil 5.20. Her iki zaman dilimi için seçilen anlamlı 50'şer gene karşılık gelen gen kümeleri

5.6. Transkriptom Verisinin Eş Zamanlı PZR ile Teyit Edilmesi

MeJA uygulaması sonucunda ifadesinde değişiklik tespit edilen genler transkriptom analizi ile ortaya konulduktan sonra elde edilen sonuçların doğrulanması için, bu çalışmada belirlenen cell wall-associated hydrolase (CWH), metalloprotease inhibitor (CPI), dehydrin (DHN), proteinlerini kodlayan genler ile daha önceki çalışmalarımızda elisitör uygulamasına yanıt verdiği belirlenen integral membrane sensor hybrid histidine kinase (SHK), bifunctional nuclease in basal defense response 1 (BDR), blue copper protein (BCP), flavonol synthase flavanone 3 (FSF), methyltransferase-like protein 1-like (MTP), calvin cycle protein cp12 (CCP) kodlayan genlerin MeJA uygulamasının 6. ve 9. saatlerinde tebain içeriği zengin haşhaşa ifade değişimleri üç farklı biyolojik tekrar kullanılarak eş zamanlı PZR ile belirlenmiştir (Şekil 5.21). MeJA uygulaması sonucunda bu genlerin ifadesinin kontrole göre arttığı tespit edilmiştir.



Şekil 5.21. MeJA uygulamasına cevap veren genlerin haşhaşa ifade seviyelerinin qRT-PZR ile belirlenmesi. (a) SHK, (b) BDR, (c) BCP, (d) FSF, (e) MTP, (f) CCP, (g) CPI, (h) CWH, (i) DHN (genlerin açık adları metin içerisinde verilmiştir). K: Kontrol, U: Uygulama, $\bar{\pm}$: standart sapma

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Haşhaş bitkisi, sahip olduğu farmakolojik potansiyeli itibari ile çok geniş bir biçimde çalışılan tıbbi aromatik bir bitkidir. Haşhaşta BIA biyosentez mekanizmasının araştırıldığı birçok çalışma olmasına rağmen yolakta bulunan bazı karmaşık adımlar hala çok net anlaşılammaktadır. Yeni nesil dizileme teknolojilerini aracılığı ile yeni genlerin bulunması, bazı moleküler genetik problemlerin çözümüne katkı sağlamaktadır. Bu tez kapsamında yürütülen çalışmada da Roche 454 FLX+ teknolojisi kullanılarak, fazla miktarda tebain üretimine sahip olan haşhaş çeşidinin kapsül dokusuna MeJA muamelesi yapıldıktan 6 ve 9 saat sonrasında oluşan transkriptom havuzu analiz edilmiştir. Bu sayede ortaya çıkan gen ifadelerindeki değişiklikler belirlenmiş ve tebain üretim mekanizmasında rol aldığı düşünülen gen/genler, transkripsiyon faktörleri, transpozonlar, SSR dizileri, olası miRNA'lar ve bu miRNA'ların hedef genleri belirlenmiştir. Bu bağlamda literatürde şimdiye kadar yapılan araştırma taramaları baz alındığında bu çalışma kendi amacına özgün olarak ilk sayılmaktadır. Bu çalışma sonucunda, MeJA aracılığıyla alkaloid üretimi indüklenmiş haşhaş bitkisinde morfin, kodein, oksikodon, hidromorfon, nalokson, naltrekson, nalbupin ve buprenorfin gibi tedavi amaçlı kullanılan pek çok ilaç etken maddesinin sentezinde önemli bir öncü bileşik olan tebainin üretim mekanizmasındaki genlerin tespit edilmesi ve bu genlerin birbiriyle olan koordinasyonunun incelenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, tebain biyosentez yolağının anlaşılması, morfin ve kodein gibi alkaloidlerin biyosentez mekanizmalarının da derinlemesine incelenmesi için açıklayıcı bilgiler sunmaktadır. Bu bağlamda, yapılan çalışma haşhaşta temel ve önemli alkaloidlerin biyosentez mekanizmalarının genetik temellerinin ortaya konulmasında ve alkaloid yollarının daha açıklayıcı hale gelmesinde önemli katkılar sağlamaktadır.

6.1. MeJA Uygulaması Sonucunda Haşhaş Kapsülündeki Alkaloid Değişim Profili

JA ve metil esteri MeJA, gen ifadesinin düzenlenmesinde ve bitki hücrelerinde sekonder metabolit biyosentezinin uyarılmasında rol oynadığı bilinen sinyal elisitörlerdir (169). Son yıllarda MeJA'nın elisitör etkisinden yararlanılarak çeşitli bitkilere uygulama yapılmış ve bitkinin savunma mekanizmasında yer alan moleküllerin sentezlenip birikmesi ve karakterize edilmesi amaçlanmıştır. Bu sebeple yeni nesil dizilime teknolojilerinden yararlanılarak tüm transkriptom düzeyinde analizlerin gerçekleştirilmesi sağlanmıştır. Daha önce yapılan birçok çalışmada, MeJA'nın *Polygonum minus*, (170), *Artemisia annua* (171) gibi bitkilere ve haşhaş bitkisinin hem fide hem de hücre kültürlerinde başarılı bir

şekilde muamele edilmiş bu bağlamda metabolom ve transkriptom profilleri çıkarılmıştır (36, 63, 172). Ayrıca, başka birçok çalışmada MeJA'nın, çeşitli fizyolojik ve gelişimsel işlemleri düzenleyen jasmonatların (JAs) bir indükleyicisi olduğu anlaşılmıştır (173). MeJA muamelesi sonucunda *Catharantus roseus* bitkisinde de terpenoid indol alkaloit gibi birçok sekonder metabolitin bitki hücre kültüründe biriktiği görülmüştür (174). *Papaver somniferum* bitkisinde, kapsül dokusunun MeJA ile muamele edilmesi sonucunda, morfin ve noskapin alkaloit biyosentezinin indüklendiği, belirgin bir şekilde görülmüştür (175). Ayrıca, tütün bitkisinde de nikotin/fenilpropanoid konjugatının da indüklendiği gözlemlenmiştir (98, 99). Yukarıda da ifade edildiği gibi MeJA, bitkilerde sekonder metabolizmayı tetikleyen bir elisitör olarak kullanılmaktadır (176). Haşhaş bitkisi de alkaloit bakımından oldukça zengin bir profil sergilemektedir. Bu alkaloitlerden biri olan tebain, haşhaş kapsüllerinde bulunan başlıca alkaloitlerden birisidir. Bunun yanı sıra tebain; kodein, oksimorfon, oksikodon, nalokson ve etorfin gibi birçok narkotik antagonist ilaca kolayca çevrilebildiği için ilaç endüstrisi açısından olarak büyük bir öneme sahiptir (177). Bu tez çalışmasında, Türkiye'de yetiştiriciliği yapılan, tebain üretim kapasitesi yüksek haşhaş (*P. somniferum*) çeşidine ait kapsül dokusuna MeJA uygulaması yapıldıktan 6 ve 9 saat sonra kapsül örnekleri alınmıştır. Her bir zaman dilimi için üçer adet kontrol ve uygulama bitkisi kullanılarak analizler yapılmıştır. Bitkilerden örnek alma zamanı olarak, bitkinin çiçek açıp petallerini döktükten iki gün sonrasına (post anthesis) denk getirilmiştir. Özellikle bu zamanın belirlenmesinde, haşhaş bitkisinin farklı gelişim evrelerinde alkaloit miktarlarının ölçülmesi sonucunda petallerin döküldükten sonraki zaman diliminde kapsülde en fazla tebain, morfin, noskapine miktarlarının bulunduğu ve papaverin alkaloidinin ise bulunmadığının tespit edildiği bir çalışma esas alınmıştır (178).

MeJA uygulaması yapılmış kapsül örneklerinde tebain içeriği ToF-LC/MS ile ölçülmüştür. Yapay elisitör uygulaması yapılan haşhaşa, uygulama yapılmayan bitkilere göre daha fazla miktarda tebain bulunduğu saptanmıştır. Bu durum özellikle 6. saat ve 9. saat dilimleri için oldukça belirgin bir şekilde tespit edilmiştir (Şekil 5.1). Ancak bununla beraber söz konusu örnekler için morfin, noskapin, kodein, S-retikülin, laudonozin ve papaverin alkaloit seviyeleri de ToF-LC/MS ile analiz edilmiştir. Analiz sonucunda tebain ve morfinin MeJA etkisi ile kontrol grubuna göre indüklendiğini ve bu indüklenmenin söz konusu her iki alkaloit için de 6. saat diliminde, 9. saate göre, daha fazla olduğu görülmüştür (Şekil 5.2). Ancak bu olayın noskapin ve kodein alkaloitleri için ters bir durumda sergilediği gözlemlenmiştir (Şekil 5.3, Şekil 5.4). Yani söz konusu noskapin ve

kodein alkaloidleri, 9. saat uygulama diliminde daha fazla miktarda olduğu ölçülmüştür. Ancak ToF-LC/MS analizleri sonucunda yapılan alkaloid ölçümlerinde papaverin alkaloidine hiç rastlanmamıştır. Bunun bir nedeni olarak, papaverinin de diğer morfin alkaloidleri gibi latisferlerde bulunmasına karşın çoğu haşhaş çeşitinde az miktarda sentezlendiği düşünülmektedir (179). Fakat yukarıda da ifade edildiği gibi, bu tez çalışmasında kullanılan *P. somniferum* L. TMO-T çeşidinin tebaince zengin olması itibari ile aynı zamanda çalışmanın odak noktası olarak "tebain alkaloidin biyosentez mekanizması incelenmesi" olduğu için ToF-LC/MS ölçümüyle MeJA uygulaması sonucunda bariz tebain indüklemesinin 6. ve 9. saat dilimlerinde sağlandığı dikkat çekilmiştir. Ayrıca bu durumu destekleyici daha önce yapılan bir çalışmada, alkaloid öncülü aminoasit olan tirozin ile beraber MeJA uygulamasının İran haşhaşı (*P. bracteatum*) hücre kültüründe tebain üretimini arttırdığı tespit edilmiştir (177).

Yukarıda da ifade edildiği gibi, ToF-LC/MS ile ölçümü yapılan diğer alkaloidlerden morfin ve kodein miktarlarında artış meydana gelmiştir. Bu duruma paralel olarak yapılan bir çalışmada, tebainden kodein ve morfin sentezlenmesinde görevli *CodR* geninin aşırı ifade edildiği *P. somniferum* kapsüllerinde tebain, morfin ve kodein miktarında artış gözlemlenmiştir (35). Bir diğer çalışmada ise, kodein redüktaz (*CodR*) geninin aşırı ifade edildiği *P. bracteatum* saçak köklerinde tebain miktarında azalma, kodein ve morfin miktarlarında artış olduğu bildirilmiştir (180). Bu çalışmada da bu her üç alkaloid miktarında da artış olmasının 1500 µg/g seviyesine ulaşan tebainin bir kısmının morfin ve kodeine dönüşmüş olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Ayrıca, bitki çeşidi ve dokusunun farklı olması da bu olayda etkili olduğu tahmin edilmiştir. (S)-Retikülün miktarındaki azalma ise yolakta tebaine dönüşmesinden kaynaklı olabileceği öne sürülmüştür.

6.2. Roche 454 FLX+ ile Transkriptom Dizilenmesi

RNA dizileme için seçilen 8 farklı örneğe (6USS ve 9USS için bir kontrol ve üç uygulama) ait cDNA kütüphaneleri, 454 FLX+ kütüphane kurma protokolüne uygun olarak hazırlanmıştır. Daha sonra kütüphane dizileme işlemi pirodizileme teknolojisini kullanan Roche 454 FLX+ platformu ile 16'lık PTP üzerinde gerçekleştirilmiştir. Dizileme reaksiyonu sonrasında elde edilen sonuçlar kontrol ve uygulama yapılmış bitkiler arasında ve ayrıca uygulamanın süresi ile ilişkili zaman dilimlerinde (6USS ve 9USS) kendi aralarında karşılaştırılarak, MeJA uygulama süresinin tebain indüklemeye üzerindeki etkisine

dikkat çekilmiştir. Dolayısıyla okuma sonuçlarına bakıldığında, emPZR aşamasında boncuk zenginleştirme yüzdesi daha az olmasına rağmen, 9USS örneklerine ait okuma sayılarının daha fazla olduğu görülmüştür. Bu durumun deney aşamasından kaynaklanmış olan bir kaç teknik nedenlerden biri olarak, MeJA'nın 6USS örneklere ait yüksek zenginleştirilmiş boncuk (pozitif boncuk) olarak ölçülen yüzde değerinin büyük bir kısmının tek DNA ipliğinin bağlı bulunmadığı boş boncuk (negatif boncuk) olma ihtimalinin olduğu düşünülmektedir. Bu durum ile birlikte pipetaj hatası, kalibrasyon ve olası bireysel hatalardan kaynaklanan nedenler de sözkonusudur. Ancak yukarıda da ifade edildiği gibi boş boncuk olma ihtimali daha güçlü bir olasılıktır. Bu bağlamda 9USS genotiplerinden uygulama 1 örneğine ait boncuk zenginleştirme yüzdesi %0,9 (Çizelge 5.2) gibi çok düşük bir yüzde olarak kabul edilirken ancak bu genotipe ait okuma sayısı en fazla miktarda 12.026.344 (Çizelge 5.3) olarak bulunmuştur. Bu nedenle elde edilen okuma sayılarının emPZR'da elde edilen boncuk zenginleştirme yüzdesi ile doğru orantılı olmadığı görülmüştür. Dikkat çeken başka bir sonuç, MeJA'nın uygulama yapıldıktan sonra geçen süre olarak 9. saat uygulamasının 6 saat uygulama örneğine göre nispeten daha dinamik bir transkriptom havuzuna sahip olduğudur. Söz konusu bu yargıya, 9USS'den elde edilen okuma sayıları ve okuma uzunluklarına ait dağılımlarının değerleri (Şekil 5.12) 6USS'ye göre dizileme platformunun normal değerlerine daha çok uygunluk göstermesi nedeni ile varılmıştır. Ayrıca, 9USS'ye ait örneklerden elde edilen okuma uzunlukları dağılımının daha iyi olması nedeni ile gen atıflandırması ve fonksiyonel analizlerde kullanılmak üzere birleştirme işlemi için de daha doğru ve güvenilir sonuçlar sağlayacağı bildirilmiştir (181). Ama genel olarak MeJA uygulaması sonrasındaki 6. ve 9. saate ait örneklerin çoğunda okuma uzunluğu 500 bp civarında bulunmuştur. Daha önceki çalışmalarda da bu uzunluğun annotasyon işlemi için yeterli ve güvenilir seviyede olduğunu öne sürülmüştür (182).

6.3. MeJA ile İndüklenmiş Tebaince Zengin Haşhaş Transkriptomunda Genik-SSR'ların Dağılımı

Yeni nesil dizileme sistemleri ile RNA-dizileme, birçok organizmaya ait transkripsiyon analizi sonucunda, yeni gen bulma, moleküler markır geliştirme amacı ile büyük ölçekte bir dizi kütlesi üretmek için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (183). SSR, son yıllarda oldukça fazla çalışma alanı bulan mikrosatellit markörlerden biridir. Bitki genomunda sık bulunması, yüksek polimorfizm göstermesi, mendel kalıtımına uygun açılım göstermesi, kodominantlık ve farklı laboratuvarlarda tekrar üretilebilir olması gibi güvenilirlik

özellikleri sayesinde bu markır tekniğinin, filogeni çalışmalarında, adli tıp, evrim, gıda, ziraat gibi alanlarda giderek daha çok tercih edilmesi sağlamıştır (184). Bitki genetiği ve ıslahında kullanılan SSR'lar, genomik ve genik SSR olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (185). Genik-SSR'lar, genomik SSR'lara göre daha korunmuş olduğundan türler arası geçişteki frekansı genomik SSR'lara göre daha fazladır (186). Bu tez çalışmasında, Roche 454 FLX+ gerçekleştirdiği pirodizileme teknolojisinden faydalanarak tebaince zengin haşhaş kapsülünde MeJA uygulaması yapılan 6USS ve 9USS örneklerinden elde edilen transkriptomdan genik-SSR markırları geliştirilmiştir. Markırlar geliştirilirken, 6USS ve 9USS'ye ait okuma kütüphaneleri birbirleri ve kendi kontrol kütüphaneleri arasında karşılaştırma yapılmıştır. Buna göre, 6USS okuma kütüphanelerinde, üçlü nükleotid tekrarlı bir motif bulunurken, ikili nükleotid tekrarlı 13 motif bulunmuştur (Çizelge 5.4). Bu kütüphanede, dominant motifin ikili nükleotid olduğu görülmüştür. Görülen SSR'ların motif sayılarının kütüphanenin okuma büyüklüğü ile pozitif bir korelasyon içinde olması beklenmektedir. Ancak *de novo* birleştirme yapılarak belli bir uzunluğun altındaki dizilerin filtre edilmesi ile SSR motiflerinin az sayıda görülmesine neden olabilmektedir. Bu duruma binaen, 2572 okuma sayısı (Çizelge 5.3) ile çalışmanın en düşük okuma sayısını içeren 6.saat kontrol bitkisinin herhangi bir SSR motifinin içermediği görülmüştür. Çalışmada ele alınan, 9USS kontrol bitkisinde ise, toplamda iki transkriptte biri üçlü, diğeri ikili nükleotid tekrarına sahip iki SSR motifi bulunmuştur (Çizelge 5.5). 9USS bitkilerde de toplamda, 26 transkriptin, 20 tanesi ikili, 5 tanesi üçlü ve bir tanesi de dördü nükleotid içeren motifler içerdiği bulunmuştur (Çizelge 5.6). 6USS ve 9USS okumalarına ait SSR dağılımlarına bakıldığında ikili ve üçlü nükleotid içeren motiflerin sayısının daha çok sayıda olduğu görülmüştür. Bu durum daha önce yeni nesil dizileme ile SSR motifleri belirlenen *Nothofagus nervosa*, *Setaria italica* ve susam bitkilerinde de benzer bir durum olduğu tespit edilmiştir (187-189). Ayrıca, 6USS ve 9USS karşılaştırıldığında; 9USS'den elde edilen motif çeşidi ve sayısı daha fazla bulunmuştur. Bu durum, MeJA uygulaması sonrası 9USS'nin, 6USS'ye göre transkriptoma daha dinamik bir etki bıraktığı tahmin edilmiştir. Bunun yanısıra, SSR bulunma frekansı, SSR belirleme kriterlerine, veri seti büyüklüğüne, veritabanı zenginleştirme araçlarına, farklı tür ve materyaller gibi birçok etken ile korelasyon gösterdiği daha önceki çalışmalarda da ortaya konulmuştur (186, 190). Sonuç olarak MeJA ile muamele edilen haşhaşta, yeni nesil dizileme teknolojisi aracılığı ile RNA dizileme yapılarak ilk defa genik-SSR motifleri belirlenmiştir. Ayrıca belirlenen motif sayısı ve çeşidi MeJA uygulaması sonrasındaki 6. ve 9. saat zaman dilimleri açısından da değerlendirme yapılarak indüklemeye için hangi zaman diliminin daha uygun

olduğu da belirlenmiştir. Ayrıca bu sonuçların gelecekte haşhaşta ilgili filogenetik ve haritalama çalışmalarında kullanılabileceği tahmin edilmektedir.

6.4. Gen Atıflandırılması ve Fonksiyonel Sınıflandırma

6USS ve 9USS uygulamalarına ait her bir okumanın karşılık bulduğu gen atıflandırmasını ve kendine özel fonksiyonunu ortaya koymak için Blast2GO (Basic Local Alignment Search Tool to Gen Ontology) (168) ve TRAPID (Rapid Analysis of Transcriptom Data <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/trapid/>) yazılımları kullanılmıştır. Her iki yazılımın yaptığı analiz sonuçları değerlendirilerek 6USS ve 9USS uygulamalarına ait okumaların hangi biyolojik işlemlere denk geldiği bulunmuştur. Buna göre 6USS'e ait biyolojik işlemlerin (bağlanma, biyosentez işlem, gen ifadesi, hidrolaz aktivitesi, hücresel işlem, hücresel kısım, iyon bağlanma, katalitik aktivite, metabolizma, öncül metabolizma ve enerji) tümü kontrole göre oldukça belirgin bir şekilde artış göstermiştir. nceki çalışmalarda da MeJA uygulaması sonucunda, bitki hücresinde birçok sayıda biyolojik işlemlerin uyarıldığı bulunmuştur (176, 191). Hem 6USS hem de 9USS'ye ait kontrol bitkisinde, özellikle nc metabolizma ve enerji işlemi, metabolizma işlemi ve hidrolaz aktivitesi ile ilgili genlerin biyosentez seviyelerinin daha fazla olduğu görülmüştür. Daha önce yapılan çalışmalarda da sonuçlarımızı destekleyecek şekilde, önceden yapılan bazı çalışmalarda bitkiye MeJA uygulaması sonucunda hücrede primer metabolizma ve enerji işleminin uyarıldığı bulunmuştur (176, 192). Hücrede biyotik ve abiyotik stres koşulları, JA gibi lipit türevli hormonların stres cevaplı moleküller gibi davranmasına yol açmaktadır. Ayrıca gelişme, yaşlanma ve alkaloitler gibi sekonder metabolitlerin üretimini de etkilediği tespit edilmiştir (193, 194). Bu çalışmada olduğu gibi dışarıdan MeJA uygulaması yapılarak JA sinyal iletim yolağının aktifleştirilmesinin bitki köklerinden flavanoid ve indol gibi sinyal bileşiklerinin salınımını arttırdığı bilinmektedir (69). Haşhaşta MeJA uygulayarak yapılan başka bir tez çalışmasında da 12USS'de, JA ve SA gibi lipit türevli hormonlar ile ilişkili genlerin değerim kat sayılarının oldukça yüksek olduğu bulunmuştur (67). Gürkök 2013'de yaptığı tez çalışmasında 'MeJA uygulaması yapılmış haşhaş kapsülüne ait transkriptom profilini 95.608 DNA probu kullanarak ortaya çıkarmış, çalışma sonucunda 0USS, 3USS ve 12USS'de hasat edilen haşhaş kapsülünde gen ifade değerimleri genom seviyesinde analiz edilmiştir. Analiz sonucunda, uyarılara cevap, stres cevabı, iyon bağlayıcı, oksidoredüktaz ve transferaz aktiviteleri ile ilişkili transkriptlerin daha fazla sayıda olduğu belirlenmiştir ve BIA biyosentez yolunda; NCS, CNMT, SalR, OMT, COR, CAS, CheSyn, StySyn enzimlerine ait transkriptlerde ifade

değişimleri belirlenmiştir' (67). Ayrıca, abiyotik ve biyotik stres altında olan haşhaş bitkisinde MeJA'nın serbest asidi olan JA sentezlenmesi ile hücre sinyal yolağının uyarıldığı bulunmuştur (175). Bu tez çalışmasında da biyosentez değerleri yüksek bulunan hidrolaz enzimlerinin, hücrede fungal bir elisitör olarak davranan MeJA'nın etkisi ile indüklendiği daha önceki çalışmalarda da tespit edilmiştir (195). Ayrıca hidrolitik enzimlerin, bitkide patojen ile ilişkili bir grup proteini oluşturmasının yanında stres koşullarında bitkide sistemik olarak elde edilmiş direnç (SRA) oluşma esnasında ifade seviyelerinde büyük bir artış olduğu bulunmuştur (196, 197). Yapılan bu çalışmada da biyotik ve abiyotik strese maruz bırakılan 6USS ve 9USS kütüphanelerinde, hidrolaz ifade seviyesinin oldukça yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Dolayısıyla yukarıda da ifade edildiği gibi, strese bağlı olarak değişen hidrolaz aktivitesi sonucunda sekonder metabolitlerin arttığını, bu çalışmada TOF-LC/MS ile 6USS ve 9USS örneklerinde bir sekonder metabolit olan alkaloidlerin indüklendiği açıkça görülmüştür. Ancak total alkaloid indüklenmesi gözönüne alındığında 9USS bitkilerinde daha fazla alkaloid birikiminin olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum, belirtildiği gibi daha önceki bir çalışmada da hidrolazların alkaloid birikimini arttığına bir kanıt olabileceği tespit edilmiştir (198).

6.5. Transkripsiyon Faktörlerinin Karşılaştırılması

Transkripsiyon faktörleri, hedef genlerin promotor bölgelerinde ki cis-acting elementlerine özel bir biçimde bağlanarak gen ifadesini düzenlemektedirler. Buna bağlı olarak, gelişmiş bitkilerde biyotik ve abiyotik stresler ile meydana gelen sinyallere karşı olarak sekonder metabolitler üretilmektedir. Bu sinyaller, ya da patojen türevli olan bu elisitörler, JA üretimini tetikleyen bazı transkripsiyon faktör genlerinin ifadelerini artırmaktadır. Aynı zamanda JA miktarının artması durumunda, alkaloidleri de içeren sekonder metabolitlerin, savunma proteinlerinin ve savunmadan sorumlu birçok geni indükleyebilen bir hücrel mekanizmayı da harekete geçirebilmektedir (169, 199). Günümüze kadar bitki savunma sisteminde rol alan birçok transkripsiyon faktörüne ait rolün iyi bir şekilde çözüldüğü bilinmektedir. Örneğin; WRKY'lerin senesens, gelişim ve savunma sisteminde rol aldığı bulunmuştur (82, 200, 201). Ayrıca bitki ve hayvan hücrelerinde birçok temel biyolojik işlemlere etkide bulunan bHLH TF'nin, özellikle bitkilerin, gelişimsel ve fizyolojik işlemlerinde çeşitli düzenlemeler yapmasının yanı sıra, ışık sinyali, meyve, çiçek gelişimi ve stres durumunda etkili olduğu bulunmuştur (202). Son zamanlarda yeni nesil dizileme teknolojisini de kullanılarak yapılan birçok çalışmada *Solanum lycopersicum*, *C. roseus*, *P. somniferum* bitkilerinde MeJA muamelesi sonucunda birçok transkripsiyon faktörün,

sekonder metabolitler ile ilişkili genleri regüle etme amacı ile indüklendiği bulunmuştur (36, 203, 204). Bu çalışmada da yeni nesil dizileme teknolojisi kullanılarak tebaince zengin haşhaş çeşidine MeJA muamelesi sonucunda 6USS ve 9USS'de birçok transkripsiyon faktörü bulunmuştur. 6USS okumalarında, 97 transkript, çeşitli transkripsiyon faktörleri ile homoloji gösterdiği bulunmuştur. Bunlardan bazılarının, zinc finger protein 622, MYB, C₂H₂, TCP, GRAS TF aileleri olduğu bulunmuştur. Daha önce yapılan çalışmalarda da TCP (TEOSINTE BRANCHED/CYCLOIDEA/PCF) TF'nin, miR319 için hedef gen olduğu ve TCP transkripsiyon faktör ailesi, MeJA serbest asidi olan JA biyosentezini kontrol ettiği bulunmuştur. Ayrıca yaralama stresi durumunda, TCP TF' nin ifadesinin arttığı bulunmuştur (205). Bu çalışmada da hem yaralama hem de MeJA elisitörü ile muamele edilmesi sonucunda, TCP TF'nin fazla bulunması, önceki çalışmalardan elde edilen sonuçları destekler nitelikte bulunmuştur. Başka bir çalışmada C₂H₂ Zn finger familyasına ait TF'in ve zinc finger proteinlerinin MeJA'nın bir serbest asidi olan JA 'nın sentezini kontrol edildiği bulunmuştur (176). Ayrıca, C₂H₂ Zn finger proteinlerinin ERF ile ilişkili amfilik baskılama domaini içerdiği için, bitki savunmasında hem pozitif hem de negatif etkide bulunabileceğini göstermişlerdir (206). Bu tez çalışmasında da TOF-LC/MS sonuçlarına ait analizlere göre, 6USS bitkilerinde sekonder metabolit miktarında artış bulunduğundan zinc finger proteinlerinin bitki savunma sisteminde pozitif yönde bir etki ettiği tahmin edilmiştir. Ayrıca bitkinin MeJA benzeri bir elisitör olan kitin ile muamelesi sonucunda, bu çalışmadaki 6USS'de eldilen MYB ve GRAS TF'lerinin ifade seviyelerinin de arttığını ve dolayısıyla bitki savunma mekanizmasında rol aldıkları bulunmuştur (207, 208). 9USS'de ise 6USS'ye göre daha fazla sayıda transkript (172 transkript) ve daha çeşitli TF familyası ile homoloji gösterdiği bulunmuştur. Bu TF'lerin bazıları 6USS ile ortak çıkan olan, GRAS, LBD, MYB iken, 6USS'den farklı olarak 9USS'de, bHLH, WRKY ailesi proteinleri gibi TF'lerin olduğu gözlemlenmiştir. WRKY'ler, bitki savunma sisteminde büyük bir düzenleyici olarak bilinmektedir. Önceki çalışmalar, WRKY'nin ilk defa *Camellia japonica*'ya ait hücre kültüründe özellikle berberin tipi alkaloid üreten BIA biyosentezinden izole edildiğini göstermiştir (23). Buna benzer başka bir çalışmada, *M. truncatula* bitkisinde MeJA etkisi ile indüklenen WRKY familyasına ait genlerin, savunmada etkili flavanoid ve terpenoid gibi bileşiklerin sentezinde görev aldığı bulunmuştur (84). Son zamanlarda yapılan başka bir çalışmada, WRKY'nin MIA biyosentezinde de görev aldığı rapor edilmiştir. Ayrıca, MeJA ile muamele edilmiş *C.roseus* bitkisinde bir çok WRKY geninin sentezlendiği bulunmuştur (79). Bir diğer çalışmada ise WRKY'nin haşhaşta noskapin biyosentezinde önemli bir rol aldığı

bulunmuştur (209). Yapılan bu tez çalışmasında da tebaince zengin haşhaş çeşidinin 9USS bitkilerinde tebain miktarının arttığı bulunmuştur. Dolayısıyla tebain alkaloidindeki bu artışa WRKY ile ilişkili genlerin de etkisinin olduğu tahmin edilmiştir. Bu ifadeyi destekleyecek şekilde, yapılan bir başka çalışmada haşhaşta MeJA muamelesi sonucunda WRKY familyasına ait 8 transkriptin, BIA yolağındaki bazı alkaloidleri regüle ettikleri bulunmuştur. Aynı çalışmada, PsWRKY'nin W-box, BIA yollağında bulunan genlerin promotor bölgesinde bulunan cis elementleri ile bağlantı yaptığı ve BIA yollağının başındaki genlerden biri olan *Tydc* geninin promotorunu da aktive ettiğini bulunmuştur. 9USS bitkilerinde belirlenen başka bir TF'de bHLH'dir. MeJA elisitörünün bitki ile muamelesi sonucunda, bHLH, bZIP TF ile beraber sinyal iletiminde çok önemli düzenleyici bir rol oynadıklarını önceki çalışmalar sonucunda belirlenmiştir (36). Aynı çalışmada bHLH ve bZIP TF ailesine ait çok sayıda gen olduğu için değişik sayıdaki yolaklarda ve işlemlerde farklı görevler üstlenebildiklerini bildirmişlerdir (210). Bu çalışmada da gerek 6USS gerekse de 9USS bitkilerinde tebain alkaloidinin indüklendiği gözlemlenmiştir. Bu tez araştırmaları kapsamında alkaloid artışında yukarıda bahsedilen çalışmalarda ifade edildiği üzere transkripsiyon faktörlerini düzenleyici olarak rol aldıkları tahmin edilmiştir. 6USS ve 9USS'de en dikkat çeken TF'lerden birinin belirlendiği analizlerde en dikkat çeken transkripsiyon faktörlerinden bir tanesi de LBD (Lateral Organ Boundry Domein) TF ailesine ait olduğu bulunmuştur. LBD ailesi, önceki çalışmalarda da ifade edildiği gibi yeni bir TF familyası sayıldığından, fonksiyonu çok ayrıntılı bilinmemekle beraber LBD TF ailesinin, *Arabidopsis*'te antosiyanin flavanoidinin sentezini negatif yönde etkilediği bulunmuştur (211). LBD ile ilgili yapılan başka bir çalışmada, LBD'nin sekonder metabolit birikimini tetikleyen bHLH ile etkileşim içerisine girdiği rapor edilmiştir (212). Dolayısıyla bu çalışmada dolaylı ya da doğrudan LBD proteinlerinin alkaloid üzerinde bir etkisi olduğu düşünülmüştür. Çünkü 6USS ve 9USS'ye ait okumalarda, oldukça fazla sayıda LBD transkripsiyon faktörü gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, tebaince zengin haşhaş çeşidinde MeJA elisitörünün kullanılması sonucunda, yukarıda da fonksiyonları ifade edildiği gibi birden fazla transkripsiyon faktörünün haşhaşta tebain biyosentez mekanizmasında görev aldığı tahmin edilmiştir.

6.6. miRNA ve Hedef Genlerinin Analizi

miRNA'lar 21 nükleotid uzunluğunda, küçük, çoğu organizmada gen ifadesinde düzenleyici olarak rol alan ve kodlanmayan RNA'lardır. Bitkilerde miRNA'lar büyüme, gelişme, sinyal iletim işlemlerinde, çevresel stres durumunda ve patojen yayılmasındaki

kontrolü düzenleyen hücrenin önemli aktörleri olarak görev almaktadırlar (213). Haşhaş bitkisi özellikle narkotik morfin, öksürük kesici kodein ve kas gevşetici papaverin başta olmak üzere birçok çeşit benzilzokinolin alkaloid çeşidini üretebilen bir bitkidir. Bu bağlamda miRNA'ların sekonder metabolit sentezinde önemli bir görevi olan JA biyosentezinde de etkili oldukları konusunda önceden yapılan bir çalışmada, miR319'un hedef genlerinden biri olan TCP transkripsiyon faktör ailesinin JA biyosentezini kontrol ettiği bulunmuştur (98). Şimdiye kadar alkaloid senteziyle ilgili birçok çalışma yapılmasına rağmen özellikle morfin, kodein, etorfin, eroin, naltrekson, nalokson gibi alkaloidlerin biyosentezinde öncü bir madde olması itibari ile çok önem arz eden tebain alkaloidinin biyosentez mekanizmasında yer alan miRNA'larla ilgili bir çalışma yapılmamıştır. Bu tez çalışmasında, alkaloid sentez yolağı ile ilişkili miRNA'ların saptanması amacıyla MeJA ile muamele edilen tebaince zengin haşhaş bitkisinin kapsül dokusundan total RNA kütüphaneleri oluşturularak, yüksek işlem hacimli Roche 454 FLX+ teknolojisi ile dizilenmiştir. Bu çalışmada, 6USS ve 9USS'de in siliko olarak belirlenen miRNA'ların büyük bir çoğunluğunun aynı olduğu gözlemlenmiştir fakat 9USS'de, 6USS'den farklı olarak osa-miR5573 bulunmuştur. Her iki zaman diliminde ortak olan miRNA'lar: gma-miR5368, gma-miR4995, peu-miR-2916, hbr-miR-6173 olarak belirlenmiştir. Ancak bu miRNA'lar ile homoloji gösteren transkript sayıları 9USS'de 8096 iken, 6USS'de 4399 olarak bulunmuştur. Bu farklılığın nedenlerinden biri, 9USS'de elde edilen okuma sayısının 6USS'de elde edilen okuma sayısından daha fazla olması olarak tahmin edilmiştir. Ancak 6USS ve 9USS okumalarının analizi sonucunda, belirlenen miRNA'ların büyük bir çoğunluğu aynı miRNA olduğu gözlenmiştir. Bunun muhtemel bir nedeni olarak, 6USS ve 9USS bitkilerinde başta tebain alkaloidi olmak üzere diğer alkaloidlerin miktarında bir artış olduğu gözlenmiştir. Ancak miRNA'ların 6USS'de sekonder metabolit mekanizmasında ya da düzenlenmesinde görev aldığı düşünülürse, buna paralel olarak hemen aynı sekonder metabolit profiline sahip 9USS bitkilerinde de aynı yönde bit etki etmesi gerektiği tahmin edilmiştir. Ancak gerek 6USS gerekse 9USS bitkilerinde belirlenen miRNA'ların şimdiye kadar yapılan literatürlerin taraması sonucunda, bu miRNA'ların herhangi bir alkaloid biyosentez mekanizması ile ilişkilendirmediği ortaya çıkmıştır. Bu bağlamda, belirlenen miRNA'lar ilk defa tebaince zengin haşhaş çeşidinde yeni nesil dizileme teknolojisi kullanılarak belirlenmiştir. Belirlenen bu miRNA'lara ait in siliko olarak belirlenen hedef genlerinin, atıflandırma ve fonksiyon analizleri de gerçekleştirilmiştir (Çizelge 5.14). Bu analiz sonucuna göre, hedefledikleri genlerin fonksiyonu oldukça farklı özellik ve sayıda bulunmuştur. Bu hedef genlerin bazılarının,

çinko iyon bağlama, hidrolaz aktivitesi, oksido redüktaz, metabolik işlem ve sekonder metabolit sentezi ile ilişkilendirebilecek bir çok sinyal taşıma ile ilgili hedef genler olduğu görülmüştür (Çizelge 5.14). Hedef genlerin, miRNA ifade seviyesi ile ters bir ilişki içinde olduğu bilinmektedir. Yani miRNA ifade seviyesi ne kadar yüksek ise hedef gen ifadesini de o kadar bir düşük olması beklenmektedir. Bu durum göz önüne alındığında 9USS'deki miRNA'lar ile homoloji gösteren transkript sayısı 6USS'ye göre iki kat daha fazla görülürken, buna karşılık 9USS'de oluşan tebain alkaloid birikimini, 6USS'de akümüle olan tebaine göre belirgin bir şekilde daha az olarak olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada MeJA elisitörünün kullanılması sonucunda, başta tebain olmak üzere bazı alkaloidlerin miktarının indüklendiği belirlenmiş ve bu indüklenme sonucunda bazı miRNA'ların da görev aldığı düşünülmüştür. Önceden yapılan bazı çalışmalarda da MeJA'nın serbest bir asidi olan jasmonik asitin, yalnızca alkaloid sentezini değil aynı zamanda bitkide miRNA ifade profilinde de değişikliklere neden olduğu rapor edilmiştir (214). Günümüze kadar yapılan bir çok çalışma, jasmonik asitin bitkinin savunma mekanizmasında rol aldığını göstermiştir. Elisitör olarak uygulanan MeJA'nın, birçok savunma genlerini düzenlediği ve ifade edilmesini indüklediği bulunmuştur (215). Bununla beraber abiyotik ve biyotik stres koşullarında yine jasmonik asitin sekonder metabolit mekanizmasını aktive ettiği bildirilmiştir (36, 216-219). Ayrıca, miRNA hedef genlerinin belirlenmesi ontoloji analiz edilerek miRNA regülasyonu ve BIA biyosentezi arasında olan bağlantılar çalışılmıştır (Böke *vd.*, 2014 Plant Biotechnology (baskıda)), Yine Unver ve ark. 2010'da haşhaş'ta yaptıkları bir çalışmada 16 aileye ait toplam 20 tane korunmuş miRNA'nın BIA biyosentezi ile ilişkilendirmişlerdir(94). Sonuç olarak görülmüştür ki, özellikle sekonder metabolit ve alkaloid biyosentez regülasyonu ile ilişkili miRNA ve onların hedef gen analizlerini konu alan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bunlara ek olarak Ayrıca, miR393'ün aşırı ifade edilmesi ile glukosinolat ve kameleksin biyosentez miktarını değiştirdiği bulunmuştur (101). Ayrıca miR163'ün *Arabidopsis* bitkisinde aşırı ifade ve nakavt edildiğinde bu sonucun bitkide sekonder bitki miktarını değiştirdiği bulunmuştur (68). Bu anlamda günümüzde birçok çalışmada BIA biyosentezini indükleme amacı ile MeJA benzeri çeşitli elisitörler kullanılarak elde edilen alkaloid ağının değişimlerini ve bu değişimlerin miRNA'lar ile ilişkilendirilerek ortaya konulması hedeflenerek bu anlamda söz konusu çalışmanın bir literatür boşluğunu dolduracağı tahmin edilmiştir.

6.7. Okuma Kütüphanelerindeki Retrotranspozon Elementlerin Karşılaştırılması

Günümüze kadar transpozon elementleri ile ilgili yapılan çalışmalar sonucunda; bu elementlerin, gen fonksiyonunu, yapısını ve aktivitesini değiştirebildiğini aynı zamanda genom ve kromozom yapılarında da düzenleme de sağlayabildiği bildirilmiştir (85). Transpozonların bahsedilen bu dezavantajlarına karşılık, transpozonların içinde buldukları konak genomlara pozitif yönde katkıları olabilmektedir. Aynı zamanda bu elementler, literatürde çoğu zaman fosil olarak da adlandırılmaktadır (86). Bu inaktif elementler aslında doğal seçilim sonucunda ortaya çıkmış ve genoma zarar vermeyen elementler olarak bilinmektedir. Aksi takdirde mutasyona neden olan transpozonlar, konak genomlarına zarar verdikleri takdirde organizmaya ciddi zarar vererek yaşayamayacak ve dolayısıyla bu yeni insersiyonlar yeni döllere aktarılamayacaktır (86). Neden oldukları mutasyonlar, gen ve genom düzeyinde oluşturdukları gerek yapısal gerekse fonksiyonel değişiklikler ve de gerektiğinde yeni alellerin oluşmasını sağlamaları sayesinde başarılı ve aktif transpozonlar özellikle bitki ve hayvan türlerinin evriminde ve hatta yeni türlerin evriminde oldukça önem arz etmektedirler (86). Ayrıca yapılan çalışmalar sonucunda retrotranspozon elementlerin, salisilik asit (SA), absisik asit (ABA), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve MeJA gibi ajanlara ait stres sinyal molekülleri tarafından tekrar aktif hale getirebilmektedir (220). Bununla birlikte retrotranspozonlar, bitkilerde stres koşullarına toleransta görev alarak, Ty1/Copia benzeri bir retrotranspozon olan ONSEN, *Brassicaceae* familyasında yüksek sıcaklık stresiyle aktive olduğu bulunmuştur (221). Gypsy benzeri bir retrotranspozon olan Corky de, meşe (*Quercus* spp.) ağacında gelişim süreci ve stres koşullarına toleransla bağlantılı bulunmuştur (222). rRNA intronu tarafından kodlanan homing endonükleazın ise fungal bir endofit olan *Neotyphodium uncinatum*'da lolin alkaloidi sentezinde görev aldığı belirtilmiştir (223). Buna göre, haşhaşa tebain alkaloidinin üretimi için genomda yeni organizasyonlar meydana geldiği tahmin edilerek, bu çalışmada da MeJA elisitörü ile muamele edilmiş tebaince zengin haşhaş çeşidinin kapsül dokusundan izole edilen total RNA, yeni nesil dizileme teknolojisi olan Roche 454 FLX+ platformu ile dizilenmiştir. Dizileme sonucunda 6USS ve 9USS'ye ait okumalardan mevcut retrotranspozon elementleri belirlenmiştir. Buna göre 6USS'ye ait okumalarda, 2493 transkript 16 değişik retrotranspozon elementi ile homoloji göstermiştir (Çizelge 5.15). Buna karşılık 9USS okumalarında toplamda, 11.884 dizi, 16 retrotranspozon elementi ile homoloji göstermişlerdir (Çizelge 5.16). Şimdiye kadar yapılan literatür taramaları sonucunda, bu çalışma dışında haşhaşa alkaloit biyosentez mekanizması ile

ilişkili retrotranspozonların nasıl bir görev aldığı hakkında herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Bu anlamda tebain biyosentez mekanizması ile ilişkisi olduğu tahmin edilen retrotranspozonlar ilk defa bu çalışmada belirlenmiştir. Günümüze kadar elde edilen bilgiler doğrultusunda retrotranspozonların; genlerin yapısını, fonksiyonunu ve biyocoğrafyasını değiştirerek transkriptom dinamikleri üzerinde yadsınamaz bir etkisinin olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada da yapılan diğer analizlerde elde edilen sonuçlar da gözönüne alındığında 9USS transkriptomunun 6USS transkriptomuna nazaran transpozon sayısı ve çeşidi bakımından daha dinamik olduğu görülmüştür. Bu dinamizme 9USS de belirlenen daha fazla retrotranspozon sayıları ve çeşidinin de etkili bir faktör olarak alkaloid değişimine bir ivme kazandırdığı tahmin edilmiştir.

6.8. Eş zamanlı PZR ile Bazı Genlerin Analizi İfade Seviyelerinin Analizi

Bu çalışmada qRT-PZR analizi ile MeJA uygulamasının, metallo-karboksipeptidaz inhibitörü geninin ifadesinde artış meydana getirdiği gösterilmiştir. Buna göre, haşhaşa tebain üretiminin artmasında sinyal iletim yolağının önemli bir yer kapladığı görülmektedir. Hücre duvarı bağlantılı hidrolazlar (cell wall-associated hydrolases) bitki gelişiminde ve stres cevabında rol alan enzimlerdir. Kapalı tohumlu bitkilerde yerçekiminin etkisine karşı koymak için "tension wood" denilen kalın bir lif tabakasından oluşan ikincil bir kabuk bulunur. Kavak (*Populus* sp.) ağacında bu yapıyı oluşturan polimer lignin dokusunun monomerleri olan monolignoller hücre duvarında polimerleşmeden önce glikolize olup daha sonra glikozil hidrolazlar tarafından serbest bırakılırlar. Hücre duvarı bağlantılı hidrolazların havuç (*Daucus carota*) bitkisinde lif oluşumunda rol aldığı rapor edilmiştir (224). Bir mantar çeşidi olan *Ganoderma lucidum*'un gövde gelişimi sırasında da bu hidrolazları kodlayan genlerin ifadesi artmaktadır (225). Bunun yanı sıra, şeker pancarında hücre duvarı bağlantılı hidrolaz genlerinin kuraklık stresinde daha fazla ifade edildiği bildirilmiştir (226). Bu çalışmada, MeJA uygulaması sonucu haşhaşa hücre duvarı bağlantılı hidrolaz enzimini kodlayan genin ifadesinde artış meydana geldiği belirlenmiştir. Buna göre, haşhaşa MeJA uygulamasına karşı oluşan stres cevabı sonucunda bitki hücresinin yapısal bileşenlerinde değişiklikler meydana gelmekte ve savunma mekanizmasının uyarılması alkaloid üretimini de tetiklendiği düşünülmüştür

Dehidrinler (DHN), çok sayıda yüklü amino asit içeren, hidrofilik, ısıya dayanıklı stres proteinleridir. Üzümde DHN genlerinin ifadesi kuraklık, yüksek sıcaklık, soğuk, embriyogenez, absisik asit (ABA), salisik asit (SA) ve MeJA etkisiyle artmaktadır (227).

Buğdayda da DHN'ler düşük sıcaklık, anoksia, ABA, oksin, giberellin ve MeJA uygulamasına cevapta rol almaktadır (228). Muz bitkisinde *MusaDHN-1* geni ifadesinin kuraklık ve tuzluluk koşullarında arttığı bildirilmiştir (229). Domateste yapılan bir transkriptom çalışmasında dehidrinin soğuk stresi için transkripsiyonel bir markör olduğu rapor edilmiştir (230). Dehidrin genlerinin regülasyonu çay bitkisinde kafein sentez geninin ifadesini artırmıştır (23). Bu çalışmada da MeJA uygulamasının haşhaşa dehidrin geni ifadesini artırdığı tespit edilmiştir. Buna göre, haşhaşa dehidrin geninin ifadesindeki artış moleküler düzeyde stres cevabını uyararak tebain üretimini tetiklemektedir.

Transkriptom analizi ile tespit edilen diğer genler de bitkilerde stres koşullarıyla bağlantılı olup haşhaşa tebain üretiminin artışında rol oynamaktadır. Ribuloz-1-5 bisfosfat karboksilaz/oksijenaz, ribuloz bisfosfat karboksilaz, dehidrin, sitokrom P450 benzeri TATA bağlanma proteini (*TBP*), ATP sentaz, ribozomal protein ve kloroplast proteini genlerinin fasulyede (*Phaseolus vulgaris* L.) tuzluluk stresine toleransta rol aldığı rapor edilmiştir (231). Kloroplast tarafından kodlanan *Ycf* proteinleri abiyotik stres durumunda hücre ya da organel bileşenlerini korumaktadır (232). Yabanmersini (*Vaccinium* spp.) çiçek tomurcuğunda soğuk uygulaması sonucu miktarı en çok artan cDNA'lar arasında senesens ile alakalı protein ve dehidrin bulunmaktadır (233). Çay (*Camellia sinensis*) yapraklarında senesens (yaşlanma) ile alakalı proteininin, sitokrom P450 benzeri proteinin ve *YcfI*'in sekonder metabolizma ile bağlantılı olduğu rapor edilmiştir (234). Kloroplast ve fotosentez ile bağlantılı genlerin haşhaşa da bir sekonder metabolit olan tebain alakaloitinin üretimini tetiklediği gözlenmiştir.

Stres koşullarında hücre içerisindeki mitokondriyel protein miktarında artış olmakta, haşhaşa da tebain üretimini tetiklemektedir. Mitokondrideki ATP bağımlı proteazlar bitkiyi oksidatif strese karşı korumada rol aldığı belirlenmiştir (235). *Arabidopsis*'te mitokondriyel SCO proteinlerinin UV-B stres cevabında yer aldığı bildirilmiştir (236). Aynı zamanda, bitkilerdeki büyüme, gelişme ve stres sürecinde çekirdekte kodlanan mitokondriyel proteinlerinin üretimi de etkilendiği bulunmuştur (237). Uzun süreli bor eksikliğinde, portakal ağacı (*Citrus sinensis*), kanola (*Brassica napus*) ve beyaz acı bakla (*Lupinus albus*) köklerinde glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (*G6PDH*) aktivitesinde de artış meydana geldiği gözlenmiştir (238). Buna göre, haşhaşa tebain üretiminin artışının, mitokondriyel aktivitenin artışı ve enerji metabolizması ile bağlantılı olduğu görülmüştür.

Retrotranspozonlar bitkilerde stres koşullarına toleransta görev alırlar. Ty1/Copia benzeri bir retrotranspozon olan ONSEN, Brassicaceae familyasında yüksek sıcaklık stresıyla

aktive olmaktadır (221). Gypsy benzeri bir retrotranspozon olan Corky, meşe (*Quercus* spp.) ağacında gelişim süreci ve stres koşullarına toleransla bağlantılıdır (222). rRNA intron tarafından kodlanan homing endonükleazın ise fungal bir endofit olan *Neotyphodium uncinatum*'da lolin alkaloidi sentezinde görev aldığı belirtilmiştir (223). Buna göre, haşhaşa tebain üretimi için genomda yeni organizasyonlar meydana gelmektedir. NRAMP (natürel rezistans bağlantılı makrofaj proteini) metal taşıyıcılarının *Arabidopsis*'te fotosentez gibi bitki büyümesindeki önemli süreçlerde gerekli olan esansiyel metallerin bitkiye alınımında ve soğuğa dirençte görevli olmasının yanı sıra (239), *Erwinia chrysanthemi* enfeksiyonuna direnç mekanizmasında rol aldığı bildirilmiştir (240). Buna göre, metal taşınımının haşhaşa tebain üretiminde rolü olduğu söylenebilir.

Kantitatif eş zamanlı (qRT) PZR ile ifadesinde artış olan diğer genler (integral membrane sensor hybrid histidine kinase, bifunctional nuclease in basal defense response 1, blue copper protein, flavonol synthase flavanone 3, methyltransferase-like protein 1-like, calvin cycle protein cp12) de bitkilerde stres cevabıyla bağlantılı olup haşhaşa tebain üretiminin artışından sorumludur. *Arabidopsis*'te histidin kinazların kuraklık, soğuk, tuzluluk ve ozmotik stresle beraber bakteriyel ve fungal hastalıklara dirençte rol aldığı bilinmektedir (241). Çift fonksiyonlu (RNaz ve DNaz aktivitesi olan) OmBBD ve AtBBD1 nükleazları pirinci fungal patojen (*Magnaporthe oryzae*) ve böcek (*Nilaparvata lugens*) saldırısına karşı korumada görev almaktadır ve bu genlerin *Arabidopsis*'te ifade edilmesiyle ABA aracılığıyla kalloz depo edilmesinde ve *Botrytis cinerea*'ya karşı dirençte artış olduğu bildirilmiştir (242). Mavi bakır bağlanma proteinleri de buğdayda çizgili pas (*Puccinia striiformis*) hastalığına karşı dirençte rol aldığı bulunmuştur (243). Flavaonoidler bitkileri özellikle oksidatif strese karşı koruduğu belirlenmiştir (244). Ayrıca, flavonoid spektrumunu değiştiren enzimlerden flavonol sentazın elmada ateş yanıklığı (*Erwinia amylovora*) ve kara leke (*Venturia inaequalis*) hastalıklarına karşı direnci artırdığı rapor edilmiştir (245). DNA'nın metilasyonu da bitkilerde biyotik stres cevabında önemli aşamalarından biridir. Örneğin, *Arabidopsis*'te tekrar dizileri ya da transpozonlardaki dinamik DNA metilasyonu değişimleriyle salisilik asit stresine direnç mekanizması uyarılmaktadır (246). Bir kalvin döngüsü proteini olan CP12, birçok fotosentetik canlıda bulunan küçük ve redoksa duyarlı bir moleküldür. CP12 *Arabidopsis*'te birçok dokuda ifade olur ve bitki gelişiminin yanı sıra, oksidatif stres koşullarında CP12'nin redükte formunda artış meydana geldiği bulunmuştur (247).

6.9. Sonuç

Sonuç olarak, tebaince zengin haşhaş kapsülüne MeJA elisitörü uygulandıktan 6 (6USS) ve 9 (9USS) saat sonra hasat edilen kapsül dokusuna ait transkriptom çalışması Roche 454 FLX+ platformu ile gerçekleştirilmiştir. MeJA uygulaması yapılmış kapsül dokusundaki alkaloit değişimi ToF-LC/MS ile ölçülmüştür. Buna göre tebain, morfin kodein ve noskabin gibi alkaloit miktarlarında kontrol bitkisine göre artış olduğu görülmüştür. 6USS ve 9USS kapsül örneklerinin transkriptomu sonucunda elde edilen okumaların birleştirme ve atıflandırma işlemleri yapılarak veri zenginleştirilmesi gerçekleştirilmiştir. Yapılan GO ve KEGG analizi sonucunda kapsül dokusunda sekonder metabolit biyosentezi ile ilişkili birçok enzimi kodlayan gen ve sekonder metabolit biyosentezi ile ilişkili çok sayıda transkripsiyon faktörü ile ilgili transkript bulunmuştur. Yine gen regülasyonunda önemli rol oynayan genomun işlevsel oyuncuları ve post transkripsiyonel aktörler olan miRNA'lar ve hedef genlerine ait analizler yapılarak, miRNA'ların alkaloit sentezi ile olan ilişkileri ortaya konulmuştur. Ayrıca, tebaince zengin haşhaş çeşidi için ıslah çalışmalarında kullanılacak genik-SSR dizileri de elde edilmiştir. Buna ilaveten transkriptom okumlarından, gen regülasyonu ve alkaloitlerle ilişkili olduğu bilinen çok sayıda transpozon elementi de ortaya çıkarılmıştır. Yapılan analitik ve in silico analizler 6USS ve 9USS karşılaştırılarak gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda 9USS transkriptomunun 6USS'ye göre daha dinamik olduğu ve veri madenciliği açısından da 9USS transkriptom okumasının bize daha zengin çeşit ve sayıda moleküler elementler sunmuştur. Buradan yola çıkarak bu çalışmada MeJA elisitörünün, kapsül dokusuna uygulandıktan 9USS zaman diliminin 6USS zaman dilimine nazaran BIA biyosentezi üzerinde daha çok indükleyici bir etki gösterdiği düşünülmüştür. Bu bağlamda, MeJA uygulamasının haşhaşta çeşitli biyotik ve abiyotik stres koşullarına dirençlilik mekanizmalarında rol alan genlerin ifadesini artırdığı, bunun bir yansıması olarak da tebain üretiminde artış meydana geldiği ortaya konulmuştur. Bu bilgiler ışığında, metabolik mühendisliği teknikleri kullanılarak, ifadesi artan genlerin çoklu kopyalarının bitkiye aktarılmasıyla daha fazla tebain üretme yeteneğine sahip haşhaş çeşitlerinin geliştirilebileceği öngörülmektedir. Elde edilen verilerin, haşhaş genomunda ortaya çıkarılması ve derinlemesine analiz edilmesiyle tespit edilen kontiglerin annotasyonu yapılabilecektir. İşlevsel genomik yaklaşımların tespit edilen gen ve transkriptlere uygulanmasıyla i) tebain ve BIA biyosentez mekanizmalarının moleküler olarak aydınlatılması, ii) BIA üretiminin regülasyonunun belirlenmesi, iii) tespit edilen genlerin moleküler yollardaki rollerinin belirlenmesi, iv) transgenik ve transgenik-

olmayan yaklaşımların bu genlerin farklı haşhaş çeşitlerine aktarılması sağlanarak ilgili BIA'ların sentezi ürün bazında artırılma amacıyla kullanılabilir. Bu sayılan hedefler doğrultusunda proje sonuçlarının yeni proje geliştirme potansiyeli bulunmaktadır. Ayrıca çalışmaların daha da kapsamlı bir şekilde genişletilmesi ile alkaloid biyosentezi metabolik mühendisliği uygulamalarının katkıları ile SSR'ların, transkripsiyon faktörlerinin, miRNA'ların, transpozon elementlerinin alkaloid biyosentez mekanizmasıyla özellikle tebain alkaloidi ile olan bağlantılarını susturma ve/veya aşırı ifade ettirme deneyleri yapılarak, ya da miRNA'ları regüle etmek için hedeflediği genlerin üzerinden manipülasyonlar yapılarak tebain alkaloid sentezi yönlendirilebilir.

KAYNAKLAR

- 1 Valizadeh N, Arslan N. Haşhaş Islahı. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi. 2013;**6** (2): 86-92.
- 2 Toroğlu S, Çenet M. Tedavi Amaçlı Kullanılan Bazı Bitkilerin Kullanım Alanları ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Metodlar. KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi. 2006;**9**(2):12-20.
- 3 Small LF, Lutz RE. Chemistry of the opium alkaloids: US Government Printing Office; 1932.
- 4 Ott I. Action of the Alkaloids of Opium. The Journal of Nervous and Mental Disease. 1878;**5**(1):12-47.
- 5 Ziegler J, Facchini PJ. Alkaloid biosynthesis: metabolism and trafficking. Annu Rev Plant Biol. 2008;**59**:735-69.
- 6 Hagel JM, Facchini PJ. Benzylisoquinoline alkaloid metabolism: a century of discovery and a brave new world. Plant & cell physiology. 2013 May;**54**(5):647-72.
- 7 Ranjan A, Sawant S. Genome-wide transcriptomic comparison of cotton (*Gossypium herbaceum*) leaf and root under drought stress. 3 Biotech. 2014 1-12.
- 8 Hsiao Y-Y, Pan Z-J, Hsu C-C, et al. Research on orchid biology and biotechnology. Plant and Cell Physiology. 2011;**52**(9):1467-86.
- 9 Hsiao Y-Y, Chen Y-W, Huang S-C, et al. Gene discovery using next-generation pyrosequencing to develop ESTs for Phalaenopsis orchids. BMC genomics. 2011;**12**(1):360.
- 10 Li Y, Sun C, Luo H, Li X, Niu Y, Chen S. [Transcriptome characterization for *Salvia miltiorrhiza* using 454 GS FLX]. Yao xue xue bao= Acta pharmaceutica Sinica. 2010;**45**(4):524-9.
- 11 Seçmen Ö, Gemici Y, Görk G, Bekat L, Leblebici E. Tohumlu bitkiler sistematığı. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi. 1995;**116**:394.
- 12 Parmaksız I, Özcan S. Morphological, chemical, and molecular analyses of Turkish *Papaver* accessions (Sect. Oxytona). Turkish Journal of Botany. 2011;**35**(1):1-16.
- 13 2013 Yılı Haşhaş Raporu. 2013 ed. Ankara: Toprak Mahsülleri Ofisi Genel Müdürlüğü; 2014. p. 12.
- 14 Ziegler J, Facchini PJ, Geißler R, et al. Evolution of morphine biosynthesis in opium poppy. Phytochemistry. 2009 10//;**70**(15–16):1696-707.
- 15 Facchini PJ, Alkaloid Biosynthesis In Plants: Biochemistry, Cell Biology, Molecular Regulation, and Metabolic Engineering Applications. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 2001;**52**:29-66.
- 16 Gürkök T, Parmaksız İ, Boztepe G, Kaymak E. Haşhaş (*Papaver somniferum* L.) Bitkisinde Alkaloid Biyosentez Mekanizması. Electronic Journal of BioTechnology. 2010;**1**(2):31-45.
- 17 Ziegler J, Facchini PJ. Alkaloid Biosynthesis: Metabolism and Trafficking. Annual Review of Plant Biology. 2008;**59**(1):735-69.

- 18 Dang TTT OA, Farrow SC, Facchini PJ. Functional biochemical genomics as a gene discovery platform in benzyloquinoline alkaloid biosynthesis. *Methods in Enzymology*. 2012;**515**:231-66.
- 19 Lenz R, Zenk MH. Acetyl coenzyme A: salutaridinol-7-O-acetyltransferase from *Papaver somniferum* plant cell cultures: The enzyme catalyzing the formation of thebaine in morphine biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*. 1995;**270**(52):31091-6.
- 20 Unterlinner B, Lenz R, Kutchan TM. Molecular cloning and functional expression of codeinone reductase: the penultimate enzyme in morphine biosynthesis in the opium poppy *Papaver somniferum*. *The Plant Journal*. 1999;**18**(5):465-75.
- 21 Huang F-C, Kutchan TM. Distribution of morphinan and benzo [*c*] phenanthridine alkaloid gene transcript accumulation in *Papaver somniferum*. *Phytochemistry*. 2000;**53**(5):555-64.
- 22 Facchini PJ, Park S-U. Developmental and inducible accumulation of gene transcripts involved in alkaloid biosynthesis in opium poppy. *Phytochemistry*. 2003 9//;**64**(1):177-86.
- 23 Kato N, Dubouzet E, Kokabu Y, et al. Identification of a *WRKY* protein as a transcriptional regulator of benzyloquinoline alkaloid biosynthesis in *Coptis japonica*. *Plant and cell physiology*. 2007;**48**(1):8-18.
- 24 Larkin PJ, Miller JA, Allen RS, et al. Increasing morphinan alkaloid production by over-expressing codeinone reductase in transgenic *Papaver somniferum*. *Plant biotechnology journal*. 2007 Jan;**5**(1):26-37.
- 25 Allen RS, Millgate AG, Chitty JA, et al. RNAi-mediated replacement of morphine with the nonnarcotic alkaloid reticuline in opium poppy. *Nat Biotech*. 2004 12//print;**22**(12):1559-66.
- 26 Frick S, Kramell R, Kutchan TM. Metabolic engineering with a morphine biosynthetic P450 in opium poppy surpasses breeding. *Metabolic Engineering*. 2007 3//;**9**(2):169-76.
- 27 Allen E XZ, Gustafson A M, Sung GH, Spatafora JW, Carrington JC. Evolution of microRNA genes by inverted duplication of target gene sequences in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Genet*. 2004;**36**:1282-90.
- 28 Kempe K, Higashi Y, Frick S, Sabarna K, Kutchan TM. RNAi suppression of the morphine biosynthetic gene salAT and evidence of association of pathway enzymes. *Phytochemistry*. 2009 3//;**70**(5):579-89.
- 29 Decker G, Wanner G, Zenk MH, Lottspeich F. Characterization of proteins in latex of the opium poppy (*Papaver somniferum*) using two-dimensional gel electrophoresis and microsequencing. *Electrophoresis*. 2000;**21**(16):3500-16.
- 30 Millgate AG, Pogson BJ, Wilson IW, et al. Analgesia: morphine-pathway block in top1 poppies. *Nature*. 2004;**431**(7007):413-4.
- 31 Ziegler J, Diaz-Chávez ML, Kramell R, Ammer C, Kutchan TM. Comparative macroarray analysis of morphine containing *Papaver somniferum* and eight morphine free *Papaver* species identifies an O-methyltransferase involved in benzyloquinoline biosynthesis. *Planta*. 2005;**222**(3):458-71.
- 32 Zulak KG, Cornish A, Daskalchuk TE, et al. Gene transcript and metabolite profiling of elicitor-induced opium poppy cell cultures reveals the coordinate regulation of primary and secondary metabolism. *Planta*. 2007;**225**(5):1085-106.

- 33 Allen RS, Li J, Stahle MI, Dubroué A, Gubler F, Millar AA. Genetic analysis reveals functional redundancy and the major target genes of the *Arabidopsis* miR159 family. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2007 October 9, 2007;**104**(41):16371-6.
- 34 Desgagné-Penix I, Khan MF, Schriemer DC, Cram D, Nowak J, Facchini PJ. Integration of deep transcriptome and proteome analyses reveals the components of alkaloid metabolism in opium poppy cell cultures. BMC plant biology. 2010;**10**(1):252.
- 35 Larkin PJ, Miller JAC, Allen RS, et al. Increasing morphinan alkaloid production by over-expressing codeinone reductase in transgenic *Papaver somniferum*. Plant Biotechnology Journal. 2007;**5**(1):26-37.
- 36 Mishra S, Triptahi V, Singh S, et al. Wound induced transcriptional regulation of benzyloquinoline pathway and characterization of wound inducible PsWRKY transcription factor from *Papaver somniferum*. PloS one. 2013;**8**(1):e52784.
- 37 Böke H. Haşhaş (*Papaver somniferum* L.) Mikro-RNA'larının (miRNA) Tanımlanması ve miRNA Hedef Gen Ekspresyon Analizlerinin Belirlenmesi. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Doktora Tezi 2013:212 sayfa.
- 38 Luk LY, Bunn S, Liscombe DK, Facchini PJ, Tanner ME. Mechanistic studies on norcoclaurine synthase of benzyloquinoline alkaloid biosynthesis: an enzymatic Pictet-Spengler reaction. Biochemistry. 2007;**46**(35):10153-61.
- 39 Samanani N, Facchini PJ. Isolation and partial characterization of norcoclaurine synthase, the first committed step in benzyloquinoline alkaloid biosynthesis, from opium poppy. Planta. 2001;**213**(6):898-906.
- 40 Stadler R, Kutchan TM, Zenk MH. (< i> S</i>)-norcoclaurine is the central intermediate in benzyloquinoline alkaloid biosynthesis. Phytochemistry. 1989;**28**(4):1083-6.
- 41 Hagel JM, Facchini PJ. Benzyloquinoline alkaloid metabolism—a century of discovery and a brave new world. Plant and Cell Physiology. 2013: 54(5) :647-672.
- 42 Facchini PJ, Hagel JM, Liscombe DK, et al. Opium poppy: blueprint for an alkaloid factory. Phytochemistry Reviews. 2007;**6**(1):97-124.
- 43 Gerardy R, Zenk MH. Formation of salutaridine from (< i> R</i>)-reticuline by a membrane-bound cytochrome P-450 enzyme from< i> *Papaver somniferum*</i>. Phytochemistry. 1992;**32**(1):79-86.
- 44 Ziegler J, Voigtländer S, Schmidt J, et al. Comparative transcript and alkaloid profiling in *Papaver* species identifies a short chain dehydrogenase/reductase involved in morphine biosynthesis. The Plant Journal. 2006;**48**(2):177-92.
- 45 Lenz R, Zenk MH. Purification and properties of codeinone reductase (NADPH) from *Papaver somniferum* cell cultures and differentiated plants. European journal of biochemistry. 1995;**233**(1):132-9.
- 46 Facchini PJ, Bird DA. Developmental regulation of benzyloquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy plants and tissue cultures. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant. 1998;**34**(1):69-79.
- 47 Weid M, Ziegler J, Kutchan TM. The roles of latex and the vascular bundle in morphine biosynthesis in the opium poppy, *Papaver somniferum*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2004;**101**(38):13957-62.

- 48 Hause B, Hause G, Kutter C, Miersch O, Wasternack C. Enzymes of jasmonate biosynthesis occur in tomato sieve elements. *Plant and cell physiology*. 2003;**44**(6):643-8.
- 49 Hancock RD, McRae D, Haupt S, Viola R. Synthesis of L-ascorbic acid in the phloem. *BMC Plant Biology*. 2003;**3**(1):7.
- 50 Walz C, Giavalisco P, Schad M, Juenger M, Klose J, Kehr J. Proteomics of curcubit phloem exudate reveals a network of defence proteins. *Phytochemistry*. 2004;**65**(12):1795-804.
- 51 Facchini PJ, De Luca V. Opium poppy and *Madagascar periwinkle*: model non-model systems to investigate alkaloid biosynthesis in plants. *The Plant Journal*. 2008;**54**(4):763-84.
- 52 Bird DA, Franceschi VR, Facchini PJ. A tale of three cell types: alkaloid biosynthesis is localized to sieve elements in opium poppy. *The Plant Cell Online*. 2003;**15**(11):2626-35.
- 53 Ounaroon A, Decker G, Schmidt J, Lottspeich F, Kutchan TM. (R, S)-Reticuline 7-O-methyltransferase and (R, S)-norcoclaurine 6-O-methyltransferase of *Papaver somniferum*—cDNA cloning and characterization of methyl transfer enzymes of alkaloid biosynthesis in opium poppy. *The Plant Journal*. 2003;**36**(6):808-19.
- 54 Creelman RA, Mulpuri R. The oxylipin pathway in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis book*/American Society of Plant Biologists. 2002;**1**.
- 55 Creelman RA, Mullet JE. Biosynthesis and Action Of Jasmonates In Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 1997;**48**(1):355-81.
- 56 Cheong J-J, Choi YD. Methyl jasmonate as a vital substance in plants. *Trends in Genetics*. 2003;**19**(7):409-13.
- 57 Ellis C, Turner JG. The *Arabidopsis* mutant *cevl* has constitutively active jasmonate and ethylene signal pathways and enhanced resistance to pathogens. *The Plant Cell Online*. 2001;**13**(5):1025-33.
- 58 Lorenzo O, Piqueras R, Sánchez-Serrano JJ, Solano R. Ethylene Response Factor1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *The Plant Cell Online*. 2003;**15**(1):165-78.
- 59 Tiryaki I, Staswick PE. An *Arabidopsis* mutant defective in jasmonate response is allelic to the auxin-signaling mutant *axr1*. *Plant physiology*. 2002;**130**(2):887-94.
- 60 Karban R, Baldwin I, Baxter K, Laue G, Felton G. Communication between plants: induced resistance in wild tobacco plants following clipping of neighboring sagebrush. *Oecologia*. 2000;**125**(1):66-71.
- 61 Ruiz-Medrano R, Xoconostle-Cázares B, Lucas WJ. The phloem as a conduit for inter-organ communication. *Current opinion in plant biology*. 2001;**4**(3):202-9.
- 62 Holková I, Bezáková L, Bilka F, Balažová A, Vanko M, Blanáriková V. Involvement of lipoxygenase in elicitor-stimulated sanguinarine accumulation in *Papaver somniferum* suspension cultures. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2010 10//;**48**(10–11):887-92.
- 63 Huang F KT. Distribution of morphinan and benzo[c]phenanthridine alkaloid gene transcript accumulation in *Papaver somniferum*. *Phytochemistry*. 2000;**55**(1):555-64.
- 64 Kai G, Yang S, Zhang Y, et al. Effects of different elicitors on yield of tropane alkaloids in hairy roots of *Anisodus acutangulus*. *Mol Biol Rep*. 2012;**39**(2):1721-9.
- 65 Balbi V, Devoto A. Jasmonate signalling network in *Arabidopsis thaliana*: crucial regulatory nodes and new physiological scenarios. *New Phytologist*. 2008;**177**(2):301-18.

- 66 Memelink J, Verpoorte R, Kijne JW. Organization of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism. Trends in plant science. 2001;**6**(5):212-9.
- 67 Gürkök T. Morfin içeriği indüklenmiş haşhaş (*Papaver somniferum* L.) bitkisinde genom düzeyinde transkriptom analizi. Gazi Osman Paşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi 2013 340sayfa.
- 68 Ng DW, Zhang C, Miller M, et al. cis-and trans-Regulation of miR163 and target genes confers natural variation of secondary metabolites in two *Arabidopsis* species and their allopolyploids. The Plant Cell Online. 2011;**23**(5):1729-40.
- 69 Badri DV, Loyola-Vargas VM, Du J, et al. Transcriptome analysis of Arabidopsis roots treated with signaling compounds: a focus on signal transduction, metabolic regulation and secretion. New Phytologist. 2008;**179**(1):209-23.
- 70 Tytgat TO, Verhoeven KJ, Jansen JJ, et al. Plants know where it hurts: root and shoot jasmonic acid induction elicit differential responses in *Brassica oleracea*. PloS one. 2013;**8**(6):e65502.
- 71 Pré M, Atallah M, Champion A, De Vos M, Pieterse CM, Memelink J. The AP2/ERF domain transcription factor ORA59 integrates jasmonic acid and ethylene signals in plant defense. Plant physiology. 2008;**147**(3):1347-57.
- 72 Rowe HC, Walley JW, Corwin J, Chan EK-F, Dehesh K, Kliebenstein DJ. Deficiencies in jasmonate-mediated plant defense reveal quantitative variation in *Botrytis cinerea* pathogenesis. PLoS pathogens. 2010;**6**(4):e1000861.
- 73 Latchman DS. Transcription factors: an overview. The international journal of biochemistry & cell biology. 1997;**29**(12):1305-12.
- 74 Karoğlu Z. Karpuzda (*Citrullus lanatus* L.) izole edilmiş erf transkripsiyon faktör genlerinin karakterizasyonu: SDÜ Fen Bilimleri Enstitüsü; 2012.
- 75 Metin K. Moleküler Biyoloji Teknikleri II: Protein Analiz Teknikleri. Moleküler Biyoloji Protein Sentezi ve Yıkımı (Yıldırım, A, Bardakçı, F, Karataş, M, Tanyolaç, B-eds). Nobel Yayınevi , Ankara 2007:596-7.
- 76 Liu D-H, Ren W-W, Cui L-J, Zhang L-D, Sun X-F, Tang K-X. Enhanced accumulation of catharanthine and vindoline in *Catharanthus roseus* hairy roots by overexpression of transcriptional factor ORCA2. Afr J Biotechnol. 2011;**10**:3260-8.
- 77 Hong S-B, Peebles CA, Shanks JV, San K-Y, Gibson SI. Expression of the *Arabidopsis* feedback-insensitive anthranilate synthase holoenzyme and tryptophan decarboxylase genes in *Catharanthus roseus* hairy roots. Journal of biotechnology. 2006;**122**(1):28-38.
- 78 Memelink J, Gantet P. Transcription factors involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. Phytochemistry Reviews. 2007;**6**(2-3):353-62.
- 79 Suttipanta N, Pattanaik S, Kulshrestha M, Patra B, Singh SK, Yuan L. The transcription factor CrWRKY1 positively regulates the terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. Plant physiology. 2011;**157**(4):2081-93.
- 80 Menke FL, Champion A, Kijne JW, Memelink J. A novel jasmonate-and elicitor-responsive element in the periwinkle secondary metabolite biosynthetic gene Str interacts with a jasmonate-and elicitor-inducible AP2-domain transcription factor, ORCA2. The EMBO journal. 1999;**18**(16):4455-63.

- 81 Pauw B, Hilliou FA, Martin VS, et al. Zinc finger proteins act as transcriptional repressors of alkaloid biosynthesis genes in *Catharanthus roseus*. Journal of Biological Chemistry. 2004;**279**(51):52940-8.
- 82 Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S, Somssich IE. The *WRKY* superfamily of plant transcription factors. Trends in plant science. 2000;**5**(5):199-206.
- 83 Zheng Z, Qamar SA, Chen Z, Mengiste T. Arabidopsis *WRKY33* transcription factor is required for resistance to necrotrophic fungal pathogens. The Plant Journal. 2006;**48**(4):592-605.
- 84 Naoumkina MA, He X, Dixon RA. Elicitor-induced transcription factors for metabolic reprogramming of secondary metabolism in *Medicago truncatula*. BMC plant biology. 2008;**8**(1):132.
- 85 Bennetzen JL. Transposable element contributions to plant gene and genome evolution. Plant molecular biology. 2000;**42**(1):251-69.
- 86 Evrensel C. Arpa (*Hordeum vulgare* L.) Doku Kùltùrlerinde Transpozon Analizi. İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi. 2010:66 sayfa.
- 87 Bergman CM, Quesneville H. Discovering and detecting transposable elements in genome sequences. Briefings in bioinformatics. 2007;**8**(6):382-92.
- 88 Wicker T, Sabot F, Hua-Van A, et al. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. Nature Reviews Genetics. 2007;**8**(12):973-82.
- 89 Jurka J. Conserved eukaryotic transposable elements and the evolution of gene regulation. Cellular and Molecular Life Sciences. 2008;**65**(2):201-4.
- 90 Biéumont C. Are transposable elements simply silenced or are they under house arrest? Trends in Genetics. 2009;**25**(8):333-4.
- 91 Kimura Y, Tosa Y, Shimada S, et al. OARE-1, a Ty1-copia retrotransposon in oat activated by abiotic and biotic stresses. Plant and cell Physiology. 2001;**42**(12):1345-54.
- 92 Grandbastien M-A, Lucas H, Morel J-B, Mhiri C, Vernhettes S, Casacuberta JM. The expression of the tobacco Tnt1 retrotransposon is linked to plant defense responses. Genetica. 1997;**100**(1-3):241-52.
- 93 Huber F, Bignell E. Distribution, expression and expansion of *Aspergillus fumigatus* LINE-like retrotransposon populations in clinical and environmental isolates. Fungal Genetics and Biology. 2014;**64**:36-44.
- 94 Unver T, Parmaksız İ, Dündar E. Identification of conserved micro-RNAs and their target transcripts in opium poppy (*Papaver somniferum* L.). Plant Cell Reports. 2010 2010/07/01;**29**(7):757-69.
- 95 Saydam F Dİ, Veysi G. MikroRNA'lar ve kanser. Dicle Medical Journal. 2011;**38**(1):113-20.
- 96 Reinhart B J SFJ, Basson M. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. Nature. 2000;**403**:901-6.
- 97 Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. Nucleic Acids Research. 2011 January 1, 2011;**39**(suppl 1):D152-D7.
- 98 Eldem V OS, Unver T. Plant microRNAs: New players in functional genomics. Turkish J Agr and Forestry. 2013;**37**:1-21.
- 99 Yang T, Xue L, An L. Functional diversity of miRNA in plants. Plant Science. 2007 3//;**172**(3):423-32.

- 100 Ambros V. MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress, and timing. *Cell*. 2003;**113**(6):673-6.
- 101 Robert-Seilaniantz A, MacLean D, Jikumaru Y, et al. The microRNA miR393 re-directs secondary metabolite biosynthesis away from camalexin and towards glucosinolates. *The Plant Journal*. 2011;**67**(2):218-31.
- 102 Tang S, Wang Y, Li Z, et al. Identification of wounding and topping responsive small RNAs in tobacco (*Nicotiana tabacum*). *BMC plant biology*. 2012;**12**(1):28.
- 103 Pani A, Mahapatra RK. Computational identification of microRNAs and their targets in *Catharanthus roseus* expressed sequence tags. *Genomics Data*. 2013;**1**:2-6.
- 104 Üstek D. Yeni Nesil DNA Dizileme (New Generation DNA Sequencing). *Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi*. 2011;**1**(1):11-8.
- 105 Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1977;**74**(12):5463-7.
- 106 Türктаş M, Kurtoğlu KY, Dorado G, Zhang B, Hernandez P, Unver T. Sequencing of plant genomes—a review. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. 2014:38.
- 107 Ronaghi M, Nygren M, Lundeberg J, Nyrén P. Analyses of secondary structures in DNA by pyrosequencing. *Analytical biochemistry*. 1999;**267**(1):65-71.
- 108 Mathews H, Clendennen SK, Caldwell CG, et al. Activation tagging in tomato identifies a transcriptional regulator of anthocyanin biosynthesis, modification, and transport. *The Plant Cell Online*. 2003;**15**(8):1689-703.
- 109 Nagalakshmi U, Wang Z, Waern K, et al. The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing. *Science*. 2008;**320**(5881):1344-9.
- 110 Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*. 2009;**10**(1):57-63.
- 111 Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet*. 2009 01//print;**10**(1):57-63.
- 112 Marguerat S, Bähler J. RNA-seq: from technology to biology. *Cellular and molecular life sciences*. 2010;**67**(4):569-79.
- 113 Marioni JC, Mason CE, Mane SM, Stephens M, Gilad Y. RNA-seq: an assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. *Genome research*. 2008;**18**(9):1509-17.
- 114 Wilhelm BT, Landry J-R. RNA-Seq—quantitative measurement of expression through massively parallel RNA-sequencing. *Methods*. 2009;**48**(3):249-57.
- 115 Auer PL, Doerge R. Statistical design and analysis of RNA sequencing data. *Genetics*. 2010;**185**(2):405-16.
- 116 Anders S, Huber W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome biology*. 2010;**11**(10):R106.
- 117 Haas BJ, Zody MC. Advancing RNA-seq analysis. *Nature biotechnology*. 2010;**28**(5):421.
- 118 Korpelainen E, Tuimala J, Somervuo P, Huss M, Wong G. *RNA-seq Data Analysis: A Practical Approach*: CRC Press; 2014.
- 119 Robertson G, Schein J, Chiu R, et al. De novo assembly and analysis of RNA-seq data. *Nature methods*. 2010;**7**(11):909-12.

- 120 Kogenaru S, Yan Q, Guo Y, Wang N. RNA-seq and microarray complement each other in transcriptome profiling. *BMC genomics*. 2012;**13**(1):629.
- 121 Tang S, Wang Y, Li Z, et al. Identification of wounding and topping responsive small RNAs in tobacco (*Nicotiana tabacum*). *BMC Plant Biology*. 2012 2012/02/22;**12**(1):1-16.
- 122 Guo H-S, Xie Q, Fei J-F, Chua N-H. MicroRNA Directs mRNA Cleavage of the Transcription Factor NAC1 to Downregulate Auxin Signals for Arabidopsis Lateral Root Development. *The Plant Cell Online*. 2005 May 1, 2005;**17**(5):1376-86.
- 123 Chen X-R, Xing Y-P, Li Y-P, Tong Y-H, Xu J-Y. RNA-Seq Reveals Infection-Related Gene Expression Changes in *Phytophthora capsici*. *PloS one*. 2013;**8**(9):e74588.
- 124 Gerhard DS, Wagner L, Feingold EA, et al. The status, quality, and expansion of the NIH full-length cDNA project: the Mammalian Gene Collection (MGC). *Genome research*. 2004;**14**(10B):2121-7.
- 125 Chen J-J, Rowley JD, Wang SM. Generation of longer cDNA fragments from serial analysis of gene expression tags for gene identification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000;**97**(1):349-53.
- 126 Harbers M, Carninci P. Tag-based approaches for transcriptome research and genome annotation. *Nature methods*. 2005;**2**(7):495-502.
- 127 Kodzius R, Kojima M, Nishiyori H, et al. CAGE: cap analysis of gene expression. *Nature methods*. 2006;**3**(3):211-22.
- 128 Brenner S, Johnson M, Bridgham J, et al. Gene expression analysis by massively parallel signature sequencing (MPSS) on microbead arrays. *Nature biotechnology*. 2000;**18**(6):630-4.
- 129 Peiffer JA, Kaushik S, Sakai H, et al. *BMC plant biology* Volume: 8 ISSN: 1471-2229 ISO Abbreviation: *BMC Plant Biol*. Publication Date: 2008. Detail:.
- 130 Reinartz J, Bruyns E, Lin J-Z, et al. Massively parallel signature sequencing (MPSS) as a tool for in-depth quantitative gene expression profiling in all organisms. *Briefings in functional genomics & proteomics*. 2002;**1**(1):95-104.
- 131 Lister R, O'Malley RC, Tonti-Filippini J, et al. Highly Integrated Single-Base Resolution Maps of the Epigenome in *Arabidopsis*. *Cell*. 2008;**133**(3):523-36.
- 132 Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature methods*. 2008;**5**(7):621-8.
- 133 Morin RD MV, Aksay G, Mardis ER, Dolgosheina E, Sahinalp SC, Ehardt HA, Unrau PJ ,18: 571-584. Comparative analysis of the small RNA transcriptomes of *Pinus contorta* and *Oryza sativa*. *Genome Research*. 2008 APR;**18**:571-84.
- 134 Cloonan N, Forrest AR, Kolle G, et al. Stem cell transcriptome profiling via massive-scale mRNA sequencing. *Nature methods*. 2008;**5**(7):613-9.
- 135 Holt RA, Jones SJ. The new paradigm of flow cell sequencing. *Genome research*. 2008;**18**(6):839-46.
- 136 Wilhelm BT, Marguerat S, Watt S, et al. Dynamic repertoire of a eukaryotic transcriptome surveyed at single-nucleotide resolution. *Nature*. 2008;**453**(7199):1239-43.
- 137 Barbazuk WB, Emrich SJ, Chen HD, Li L, Schnable PS. SNP discovery via 454 transcriptome sequencing. *The plant journal*. 2007;**51**(5):910-8.
- 138 Vera JC, Wheat CW, Fescemyer HW, et al. Rapid transcriptome characterization for a nonmodel organism using 454 pyrosequencing. *Molecular ecology*. 2008;**17**(7):1636-47.

- 139 Emrich SJ, Barbazuk WB, Li L, Schnable PS. Gene discovery and annotation using LCM-454 transcriptome sequencing. *Genome research*. 2007;**17**(1):69-73.
- 140 Xie F, Burklew CE, Yang Y, et al. De novo sequencing and a comprehensive analysis of purple sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) transcriptome. *Planta*. 2012;**236**(1):101-13.
- 141 Yim WC, Cushman JC. 112. Transcriptome sequencing and RNA-seq mRNA expression profiling in the facultative CAM model species *Mesembryanthemum crystallinum*. 2014 Genomic Science Contractor-Grantee Meeting XII; 2014; 2014. p. 190.
- 142 Stone JD, Storchova H. The application of RNA-seq to the comprehensive analysis of plant mitochondrial transcriptomes. *Molecular Genetics and Genomics*. 2014:1-9.
- 143 Sekhon RS, Briskine R, Hirsch CN, et al. Correction: Maize Gene Atlas Developed by RNA Sequencing and Comparative Evaluation of Transcriptomes Based on RNA Sequencing and Microarrays. *PloS one*. 2014;**9**(1).
- 144 Dutrow N, Nix DA, Holt D, et al. Dynamic transcriptome of *Schizosaccharomyces pombe* shown by RNA-DNA hybrid mapping. *Nature genetics*. 2008;**40**(8):977-86.
- 145 Wu JQ, Du J, Rozowsky J, et al. Systematic analysis of transcribed loci in encode regions using RACE sequencing reveals extensive transcription in the human genome. *Genome Biol*. 2008;**9**(1):R3.
- 146 Li R, Yu C, Li Y, et al. SOAP2: an improved ultrafast tool for short read alignment. *Bioinformatics*. 2009;**25**(15):1966-7.
- 147 Li H, Ruan J, Durbin R. Mapping short DNA sequencing reads and calling variants using mapping quality scores. *Genome research*. 2008;**18**(11):1851-8.
- 148 Tomari Y, Zamore PD. MicroRNA biogenesis: drosha can't cut it without a partner. *Current Biology*. 2005;**15**(2):R61-R4.
- 149 Xia H, Mao Q, Paulson HL, Davidson BL. siRNA-mediated gene silencing in vitro and in vivo. *Nature biotechnology*. 2002;**20**(10):1006-10.
- 150 Ross-Macdonald P, Coelho PS, Roemer T, et al. Large-scale analysis of the yeast genome by transposon tagging and gene disruption. *Nature*. 1999;**402**(6760):413-8.
- 151 Cabeza RA, Liese R, Lingner A, et al. RNA-seq transcriptome profiling reveals that *Medicago truncatula* nodules acclimate N₂ fixation before emerging P deficiency reaches the nodules. *Journal of experimental botany*. 2014;**65**(20):6035-48.
- 152 Pathak S, Lakhwani D, Gupta P, et al. Comparative Transcriptome Analysis Using High Papaverine Mutant of *Papaver somniferum* Reveals Pathway and Uncharacterized Steps of Papaverine Biosynthesis. *PloS one*. 2013;**8**(5):e65622.
- 153 Zulak KG, Khan MF, Alcantara J, Schriemer DC, Facchini PJ. Plant defense responses in opium poppy cell cultures revealed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2009;**8**(1):86-98.
- 154 Conesa A, Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Talón M, Robles M. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*. 2005;**21**(18):3674-6.
- 155 Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*. 1997;**25**(17):3389-402.
- 156 Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic acids research*. 2013:gkt1181.

- 157 Dai X, Zhao PX. psRNATarget: a plant small RNA target analysis server. *Nucleic Acids Research*. 2011 July 1, 2011;**39**(suppl 2):W155-W9.
- 158 Wang X, Lu P, Luo Z. GMATo: A novel tool for the identification and analysis of microsatellites in large genomes. *Bioinformatics*. 2013;**9**(10):541.
- 159 Huang Y, Niu B, Gao Y, Fu L, Li W. CD-HIT Suite: a web server for clustering and comparing biological sequences. *Bioinformatics*. 2010;**26**(5):680-2.
- 160 Zheng Y, Zhao L, Gao J, Fei Z. iAssembler: a package for de novo assembly of Roche-454/Sanger transcriptome sequences. *BMC bioinformatics*. 2011;**12**(1):453.
- 161 Davidson NM, Oshlack A. Corset: enabling differential gene expression analysis for de novo assembled transcriptomes. *Genome biology*. 2014;**15**(7):410.
- 162 Robinson MD, Oshlack A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biol*. 2010;**11**(3):R25.
- 163 Law CW, Chen Y, Shi W, Smyth GK. Voom: precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts. Preprint 2013. 2013.
- 164 Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical applications in genetics and molecular biology*. 2004;**3**(1).
- 165 Chen H, Boutros PC. Venn Diagram: a package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R. *BMC bioinformatics*. 2011;**12**(1):35.
- 166 Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, et al. Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic acids research*. 2012;**40**(15):e115-e.
- 167 Unver T, Bakar M, Shearman R, Budak H. Genome-wide profiling and analysis of *Festuca arundinacea* miRNAs and transcriptomes in response to foliar glyphosate application. *Molecular Genetics and Genomics*. 2010 2010/04/01;**283**(4):397-413.
- 168 Konlechner C, Türkteş M, Langer I, et al. Expression of zinc and cadmium responsive genes in leaves of willow (< i> *Salix caprea*</i> L.) genotypes with different accumulation characteristics. *Environmental Pollution*. 2013;**178**:121-7.
- 169 Pauwels L, Inzé D, Goossens A. Jasmonate-inducible gene: what does it mean? *Trends in plant science*. 2009;**14**(2):87-91.
- 170 Ee S-F, Oh J-M, Noor NM, et al. Transcriptome profiling of genes induced by salicylic acid and methyl jasmonate in *Polygonum minus*. *Mol Biol Rep*. 2013;**40**(3):2231-41.
- 171 Mehrjerdi MZ, Bihamta M-R, Omidi M, Naghavi M-R, Soltanloo H, Ranjbar M. Effects of exogenous methyl jasmonate and 2-isopentenyladenine on artemisinin production and gene expression in *Artemisia annua*. *Turkish Journal of Botany*. 2013;**37**(3).
- 172 Facchini PJ, De Luca V. Phloem-Specific Expression of Tyrosine/Dopa Decarboxylase Genes and the Biosynthesis of Isoquinoline Alkaloids in Opium Poppy. *The Plant Cell Online*. 1995 November 1, 1995;**7**(11):1811-21.
- 173 Unver T N-CDM, Budak H. Review of Current Methodological Approaches for Characterizing MicroRNAs in Plants. *International Journal of Plant Genomics*. 2009 Feb 17.
- 174 Palatnik JF, Allen E, Wu X, et al. Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature*. 2003 09/18/print;**425**(6955):257-63.

- 175 Gurkok T, Turktas M, Parmaksiz I, Unver T. Transcriptome Profiling of Alkaloid Biosynthesis in Elicitor Induced Opium Poppy. *Plant Molecular Biology Reporter*. 2014;1-16.
- 176 Pauwels L, Morreel K, De Witte E, et al. Mapping methyl jasmonate-mediated transcriptional reprogramming of metabolism and cell cycle progression in cultured *Arabidopsis* cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;**105**(4):1380-5.
- 177 Zare N, Farjaminezhad R, Asghari-Zakaria R, Farjaminezhad M. Enhanced thebaine production in *Papaver bracteatum* cell suspension culture by combination of elicitation and precursor feeding. *Natural product research*. 2014(ahead-of-print):1-7.
- 178 Singh SK, Shukla AK, Dhawan OP, Shasany AK. Recessive Loci Pps-1 and OM Differentially Regulate PISTILLATA-1 and APETALA3-1 Expression for Sepal and Petal Development in *Papaver somniferum*. *PloS one*. 2014;**9**(6):e101272.
- 179 Grover A, Kumari M, Singh S, et al. Analysis of *Jatropha curcas* transcriptome for oil enhancement and genic markers. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 2014;**20**(1):139-42.
- 180 Sharafi A, Sohi HH, Mirzaee H, Azadi P. In vitro regeneration and Agrobacterium mediated genetic transformation of *Artemisia aucheri* Boiss. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 2014:1-8.
- 181 Koren S, Schatz MC, Walenz BP, et al. Hybrid error correction and de novo assembly of single-molecule sequencing reads. *Nature biotechnology*. 2012;**30**(7):693-700.
- 182 Pop M, Salzberg SL. Bioinformatics challenges of new sequencing technology. *Trends in Genetics*. 2008;**24**(3):142-9.
- 183 Wei L, Li S, Liu S, et al. Transcriptome Analysis of *Houttuynia cordata* Thunb. by Illumina Paired-End RNA Sequencing and SSR Marker Discovery. *PloS one*. 2014;**9**(1):e84105.
- 184 Martín JP, Luis Santiago J, Pinto-Carnide O, Leal F, del Carmen Martínez M, Ortiz JM. Determination of relationships among autochthonous grapevine varieties (*Vitis vinifera* L.) in the Northwest of the Iberian Peninsula by using microsatellite markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 2006;**53**(6):1255-61.
- 185 Wang S, Wang X, He Q, et al. Transcriptome analysis of the roots at early and late seedling stages using Illumina paired-end sequencing and development of EST-SSR markers in radish. *Plant Cell Rep*. 2012;**31**(8):1437-47.
- 186 Varshney RK, Graner A, Sorrells ME. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *TRENDS in Biotechnology*. 2005;**23**(1):48-55.
- 187 Torales SL, Rivarola M, Pomponio MF, et al. Transcriptome survey of *Patagonian southern beech Nothofagus nervosa* (= *N. Alpina*): assembly, annotation and molecular marker discovery. *BMC genomics*. 2012;**13**(1):291.
- 188 Zhang H, Wei L, Miao H, Zhang T, Wang C. Development and validation of genic-SSR markers in sesame by RNA-seq. *BMC genomics*. 2012;**13**(1):316.
- 189 Jia X-P, Shi Y-S, Song Y-C, Wang G-Y, Wang T-Y, Li Y. Development of EST-SSR in foxtail millet (*Setaria italica*). *Genetic Resources and Crop Evolution*. 2007;**54**(2):233-6.

- 190 Wei L-B, Zhang H-Y, Zheng Y-Z, Guo W-Z, Zhang T-Z. Developing EST-Derived Microsatellites in Sesame (< i> *Sesamum indicum*</i> L.). *Acta Agronomica sinica*. 2008;**34**(12):2077-84.
- 191 Wolucka BA, Goossens A, Inzé D. Methyl jasmonate stimulates the de novo biosynthesis of vitamin C in plant cell suspensions. *Journal of experimental botany*. 2005;**56**(419):2527-38.
- 192 Ruiz-May E, De-la-Peña C, Galaz-Ávalos RM, et al. Methyl jasmonate induces ATP biosynthesis deficiency and accumulation of proteins related to secondary metabolism in *Catharanthus roseus* (L.) G. hairy roots. *Plant and Cell Physiology*. 2011;**52**(8):1401-21.
- 193 Avanci N, Luche D, Goldman G, Goldman M. Jasmonates are phytohormones with multiple functions, including plant defense and reproduction. *Genetics and Molecular Research*. 2010;**9**(1):484-505.
- 194 Noir S, Bömer M, Takahashi N, et al. Jasmonate controls leaf growth by repressing cell proliferation and the onset of endoreduplication while maintaining a potential stand-by mode. *Plant physiology*. 2013;**161**(4):1930-51.
- 195 Genovesi V, Fornalé S, Fry SC, et al. ZmXTH1, a new xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase in maize, affects cell wall structure and composition in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of experimental botany*. 2008;**59**(4):875-89.
- 196 Lawrence CB, Singh NP, Qiu J, Gardner RG, Tuzun S. Constitutive hydrolytic enzymes are associated with polygenic resistance of tomato to< i> *Alternaria solani*</i> and may function as an elicitor release mechanism. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 2000;**57**(5):211-20.
- 197 Dannenberg Jr AM. Cellular hypersensitivity and cellular immunity in the pathogenesis of tuberculosis: specificity, systemic and local nature, and associated macrophage enzymes. *Bacteriological reviews*. 1968;**32**(2):85.
- 198 Leménager D, Ouelhazi L, Mahroug S, et al. Purification, molecular cloning, and cell-specific gene expression of the alkaloid-accumulation associated protein CrPS in *Catharanthus roseus*. *Journal of experimental botany*. 2005;**56**(414):1221-8.
- 199 Zhao J, Davis LC, Verpoorte R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology advances*. 2005;**23**(4):283-333.
- 200 Eulgem T, Somssich IE. Networks of *WRKY* transcription factors in defense signaling. *Current opinion in plant biology*. 2007;**10**(4):366-71.
- 201 Rushton PJ, Somssich IE, Ringler P, Shen QJ. *WRKY* transcription factors. *Trends in plant science*. 2010;**15**(5):247-58.
- 202 Buck MJ, Atchley WR. Phylogenetic analysis of plant basic helix-loop-helix proteins. *Journal of molecular evolution*. 2003;**56**(6):742-50.
- 203 Spyropoulou EA, Haring MA, Schuurink RC. RNA sequencing on *Solanum lycopersicum* trichomes identifies transcription factors that activate terpene synthase promoters. *BMC Genomics*. 2014;**15**(1):402.
- 204 Van Moerkercke A, Fabris M, Pollier J, et al. CathaCyc, a metabolic pathway database built from *Catharanthus roseus* RNA-Seq data. *Plant and Cell Physiology*. 2013:pct039.
- 205 Böke H. Haşhaş (*Papaver Somniferum* L.) Mikro-RNA'larinin (miRNA) Tanımlanması ve miRNA Hedef Gen Ekspresyon Analizlerinin Belirlenmesi. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Doktora Tezi 2013:212 sayfa.

- 206 Sakamoto H, Maruyama K, Sakuma Y, et al. Arabidopsis Cys2/His2-type zinc-finger proteins function as transcription repressors under drought, cold, and high-salinity stress conditions. *Plant Physiology*. 2004;**136**(1):2734-46.
- 207 Libault M, Wan J, Czechowski T, Udvardi M, Stacey G. Identification of 118 *Arabidopsis* transcription factor and 30 ubiquitin-ligase genes responding to chitin, a plant-defense elicitor. *Molecular plant-microbe interactions*. 2007;**20**(8):900-11.
- 208 Gutterson N, Reuber TL. Regulation of disease resistance pathways by AP2/ERF transcription factors. *Current opinion in plant biology*. 2004;**7**(4):465-71.
- 209 Winzer T, Gazda V, He Z, et al. A *Papaver somniferum* 10-gene cluster for synthesis of the anticancer alkaloid noscapine. *Science*. 2012;**336**(6089):1704-8.
- 210 Duek PD, Fankhauser C. bHLH class transcription factors take centre stage in phytochrome signalling. *Trends in plant science*. 2005;**10**(2):51-4.
- 211 Rubin G, Tohge T, Matsuda F, Saito K, Scheible W-R. Members of the LBD family of transcription factors repress anthocyanin synthesis and affect additional nitrogen responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online*. 2009;**21**(11):3567-84.
- 212 Husbands A, Bell EM, Shuai B, Smith HM, Springer PS. Lateral Organ Boundaries defines a new family of DNA-binding transcription factors and can interact with specific bHLH proteins. *Nucleic acids research*. 2007;**35**(19):6663-71.
- 213 Jia L, Zhang D, Qi X, Ma B, Xiang Z, He N. Identification of the Conserved and Novel miRNAs in Mulberry by High-Throughput Sequencing. *PloS one*. 2014;**9**(8):e104409.
- 214 Qiu D, Pan X, Wilson IW, et al. High throughput sequencing technology reveals that the taxoid elicitor methyl jasmonate regulates microRNA expression in Chinese yew (*Taxus chinensis*). *Gene*. 2009 5/1/;**436**(1-2):37-44.
- 215 Stintzi A, Weber H, Reymond P, Browse J, Farmer EE. Plant defense in the absence of jasmonic acid: The role of cyclopentenones. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001 October 23, 2001;**98**(22):12837-42.
- 216 Blee E. Phytooxylipins and plant defense reactions. *Progress in Lipid Research*. 1998 May;**37**(1):33-72.
- 217 Pauli HH, Kutchan TM. Molecular cloning and functional heterologous expression of two alleles encoding (S)-N-methylcoclaurine 3'-hydroxylase (CYP80B1), a new methyl jasmonate-inducible cytochrome P-450-dependent mono-oxygenase of benzyloquinoline alkaloid biosynthesis. *The Plant Journal*. 1998;**13**(6):793-801.
- 218 Wasternack C. Jasmonates: An Update on Biosynthesis, Signal Transduction and Action in Plant Stress Response, Growth and Development. *Annals of Botany*. 2007 October 1, 2007;**100**(4):681-97.
- 219 Yang X-Y, Jiang W-J, Yu H-J. The Expression Profiling of the Lipoyxygenase (LOX) Family Genes During Fruit Development, Abiotic Stress and Hormonal Treatments in Cucumber (*Cucumis sativus* L.). *International Journal of Molecular Sciences*. 2012;**13**(2):2481-500.
- 220 Alzohairy A, Yousef M, Edris S, et al. Detection of LTR Retrotransposons Reactivation induced by in vitro Environmental Stresses in Barley (*Hordeum vulgare*) via RT-qPCR. *Life Science Journal*. 2012;**9**(4).

- 221 Ito H, Yoshida T, Tsukahara S, Kawabe A. Evolution of the ONSEN retrotransposon family activated upon heat stress in Brassicaceae. *Gene*. 2013;**518**(2):256-61.
- 222 Rocheta M, Carvalho L, Viegas W, Morais-Cecílio L. Corky, a gypsy-like retrotransposon is differentially transcribed in *Quercus* suber tissues. *BMC research notes*. 2012;**5**(1):432.
- 223 Spiering MJ, Wilkinson HH, Blankenship JD, Schardl CL. Expressed sequence tags and genes associated with loline alkaloid expression by the fungal endophyte *Neotyphodium uncinatum*. *Fungal Genetics and Biology*. 2002;**36**(3):242-54.
- 224 Park J-S, Kim IS, Cho MS, Park S, Park SG. Identification of differentially expressed genes involved in spine formation on seeds of *Daucus carota* L.(carrot), using annealing control primer (ACP) system. *Journal of Plant Biology*. 2006;**49**(2):133-40.
- 225 Luo H, Sun C, Song J, et al. Generation and analysis of expressed sequence tags from a cDNA library of the fruiting body of *Ganoderma lucidum*. *Chinese medicine*. 2010;**5**(1):9.
- 226 Prabu G, Kavar PG, Pagariya MC, Prasad DT. Identification of water deficit stress upregulated genes in sugarcane. *Plant Molecular Biology Reporter*. 2011;**29**(2):291-304.
- 227 Yang Y, He M, Zhu Z, et al. Identification of the dehydrin gene family from grapevine species and analysis of their responsiveness to various forms of abiotic and biotic stress. *BMC plant biology*. 2012;**12**(1):140.
- 228 Zhu W, Zhang L, Lv H, et al. The dehydrin wzy2 promoter from wheat defines its contribution to stress tolerance. *Funct Integr Genomics*. 2014;**14**(1):111-25.
- 229 Shekhawat UKS, Srinivas L, Ganapathi TR. MusaDHN-1, a novel multiple stress-inducible SK3-type dehydrin gene, contributes affirmatively to drought-and salt-stress tolerance in banana. *Planta*. 2011;**234**(5):915-32.
- 230 Weiss J, Egea-Cortines M. Transcriptomic analysis of cold response in tomato fruits identifies dehydrin as a marker of cold stress. *Journal of applied genetics*. 2009;**50**(4):311-9.
- 231 Hernández-Lucero E, Rodríguez-Hernández AA, Ortega-Amaro MA, Jiménez-Bremont JF. Differential expression of genes for tolerance to salt stress in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Molecular Biology Reporter*. 2014;**32**(2):318-27.
- 232 Peter E, Wallner T, Wilde A, Grimm B. Comparative functional analysis of two hypothetical chloroplast open reading frames (ycf) involved in chlorophyll biosynthesis from *Synechocystis* sp. PCC6803 and plants. *Journal of plant physiology*. 2011;**168**(12):1380-6.
- 233 Dhanaraj AL, Slovin JP, Rowland LJ. Analysis of gene expression associated with cold acclimation in blueberry floral buds using expressed sequence tags. *Plant Science*. 2004;**166**(4):863-72.
- 234 Park J-S, Kim J-B, Hahn B-S, et al. EST analysis of genes involved in secondary metabolism in *Camellia sinensis* (tea), using suppression subtractive hybridization. *Plant Science*. 2004;**166**(4):953-61.
- 235 Smakowska E, Czarna M, Janska H. Mitochondrial ATP-dependent proteases in protection against accumulation of carbonylated proteins. *Mitochondrion*. 2014.

- 236 Steinebrunner I, Gey U, Andres M, Garcia L, Gonzalez DH. Divergent functions of the *Arabidopsis* mitochondrial SCO proteins: HCC1 is essential for COX activity while HCC2 is involved in the UV-B stress response. *Frontiers in plant science*. 2014;**5**.
- 237 Kühn KK, Yin G, Duncan O, et al. Decreasing electron flux through the cytochrome and/or alternative respiratory pathways triggers common and distinct cellular responses dependent on growth conditions. *Plant Physiology*. 2014;pp. 114.249946.
- 238 Yang L-T, Qi Y-P, Lu Y-B, et al. iTRAQ protein profile analysis of *Citrus sinensis* roots in response to long-term boron-deficiency. *Journal of proteomics*. 2013;**93**:179-206.
- 239 Ichnatowicz A, Siwinska J, Meharg AA, Carey M, Koornneef M, Reymond M. Conserved histidine of metal transporter AtNRAMP1 is crucial for optimal plant growth under manganese deficiency at chilling temperatures. *New Phytologist*. 2014;**202**(4):1173-83.
- 240 Segond D, Dellagi A, Lanquar V, et al. NRAMP genes function in *Arabidopsis thaliana* resistance to *Erwinia chrysanthemi* infection. *The Plant Journal*. 2009;**58**(2):195-207.
- 241 Soni P, Kumar G, Soda N, Singla-Pareek SL, Pareek A. Salt Overly Sensitive pathway members are influenced by diurnal rhythm in rice. *Plant Signal*. 2013.
- 242 You MK, Shin HY, Kim YJ, et al. Novel bifunctional nucleases, OmBBD and AtBBD1, are involved in abscisic acid-mediated callose deposition in *Arabidopsis*. *Plant physiology*. 2010;**152**(2):1015-29.
- 243 Coram TE, Huang X, Zhan G, Settles ML, Chen X. Meta-analysis of transcripts associated with race-specific resistance to stripe rust in wheat demonstrates common induction of blue copper-binding protein, heat-stress transcription factor, pathogen-induced WIR1A protein, and ent-kaurene synthase transcripts. *Funct Integr Genomics*. 2010;**10**(3):383-92.
- 244 Agati G, Azzarello E, Pollastri S, Tattini M. Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Science*. 2012;**196**:67-76.
- 245 Halbwirth H, Fischer TC, Schlangen K, et al. Screening for inhibitors of 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases: flavanone 3 β -hydroxylase and flavonol synthase. *Plant science*. 2006;**171**(2):194-205.
- 246 Downen RH, Pelizzola M, Schmitz RJ, et al. Widespread dynamic DNA methylation in response to biotic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;**109**(32):E2183-E91.
- 247 López-Calcagno PE, Howard TP, Raines CA. The CP12 protein family: a thioredoxin-mediated metabolic switch? *Frontiers in plant science*. 2014;**5**.

EKLER

EK 1. 6USS'de farklı ifade olan transkriptler (Sayfa 133-137)

	unigenler	logFC	AveExpr	t	P.Value	adj.P.Val	B
Cluster-31.0	Cluster-31.0	10,34277188	11,42823834	21,87247443	4,52E-64	1,13E-62	5,622699462
Cluster-32.0	Cluster-32.0	10,34277188	11,24399695	21,87247443	4,52E-64	1,13E-62	5,622699462
Cluster-33.0	Cluster-33.0	10,34277188	10,84775632	21,87247443	4,52E-64	1,13E-62	5,622699462
Cluster-35.0	Cluster-35.0	10,34277188	11,15335443	21,87247443	4,52E-64	1,13E-62	5,622699462
Cluster-83.0	Cluster-83.0	10,34277188	10,84775632	21,87247443	4,52E-64	1,13E-62	5,622699462
Cluster-230.0	Cluster-230.0	10,34277188	10,84775632	21,87247443	4,52E-64	1,13E-62	5,622699462
Cluster-45.0	Cluster-45.0	11,39334843	10,84775632	18,38860448	4,27E-51	7,12E-50	-0,315637504
Cluster-133.0	Cluster-133.0	11,39334843	10,84775632	18,38860448	4,27E-51	7,12E-50	-0,315637504
Cluster-255.0	Cluster-255.0	11,39334843	10,84775632	18,38860448	4,27E-51	7,12E-50	-0,315637504
Cluster-41.0	Cluster-41.0	10,88839851	10,84775632	17,57362683	5,04E-48	2,44E-47	-0,687676891
Cluster-56.0	Cluster-56.0	10,88839851	10,84775632	17,57362683	5,04E-48	2,44E-47	-0,687676891
Cluster-63.0	Cluster-63.0	10,88839851	10,84775632	17,57362683	5,04E-48	2,44E-47	-0,687676891
Cluster-71.0	Cluster-71.0	10,88839851	10,84775632	17,57362683	5,04E-48	2,44E-47	-0,687676891
Cluster-75.0	Cluster-75.0	10,88839851	10,84775632	17,57362683	5,04E-48	2,44E-47	-0,687676891
Cluster-101.0	Cluster-101.0	10,88839851	10,84775632	17,57362683	5,04E-48	2,44E-47	-0,687676891
Cluster-110.0	Cluster-110.0	10,88839851	10,84775632	17,57362683	5,04E-48	2,44E-47	-0,687676891
Cluster-124.0	Cluster-124.0	10,88839851	10,84775632	17,57362683	5,04E-48	2,44E-47	-0,687676891
Cluster-131.0	Cluster-131.0	10,88839851	11,24399695	17,57362683	5,04E-48	2,44E-47	-0,687676891
Cluster-150.0	Cluster-150.0	10,88839851	10,84775632	17,57362683	5,04E-48	2,44E-47	-0,687676891
Cluster-163.0	Cluster-163.0	10,88839851	10,84775632	17,57362683	5,04E-48	2,44E-47	-0,687676891
Cluster-186.0	Cluster-186.0	10,88839851	10,84775632	17,57362683	5,04E-48	2,44E-47	-0,687676891
Cluster-187.0	Cluster-187.0	10,88839851	10,84775632	17,57362683	5,04E-48	2,44E-47	-0,687676891
Cluster-193.0	Cluster-193.0	10,88839851	10,84775632	17,57362683	5,04E-48	2,44E-47	-0,687676891
Cluster-198.0	Cluster-198.0	10,88839851	10,84775632	17,57362683	5,04E-48	2,44E-47	-0,687676891
Cluster-211.0	Cluster-211.0	10,88839851	10,84775632	17,57362683	5,04E-48	2,44E-47	-0,687676891
Cluster-213.0	Cluster-213.0	10,88839851	10,84775632	17,57362683	5,04E-48	2,44E-47	-0,687676891
Cluster-215.0	Cluster-215.0	10,88839851	10,84775632	17,57362683	5,04E-48	2,44E-47	-0,687676891
Cluster-224.0	Cluster-224.0	10,88839851	10,84775632	17,57362683	5,04E-48	2,44E-47	-0,687676891

Cluster-229.0	Cluster-229.0	10,88839851	11,24399695	17,57362683	5,04E-48	2,44E-47	-0,687676891
Cluster-238.0	Cluster-238.0	10,88839851	10,84775632	17,57362683	5,04E-48	2,44E-47	-0,687676891
Cluster-24.0	Cluster-24.0	10,76215052	10,84775632	17,36986546	2,96E-47	9,45E-47	-0,778059475
Cluster-28.0	Cluster-28.0	10,76215052	10,84775632	17,36986546	2,96E-47	9,45E-47	-0,778059475
Cluster-29.0	Cluster-29.0	10,76215052	10,84775632	17,36986546	2,96E-47	9,45E-47	-0,778059475
Cluster-38.0	Cluster-38.0	10,76215052	10,84775632	17,36986546	2,96E-47	9,45E-47	-0,778059475
Cluster-70.0	Cluster-70.0	10,76215052	10,84775632	17,36986546	2,96E-47	9,45E-47	-0,778059475
Cluster-73.0	Cluster-73.0	10,76215052	10,84775632	17,36986546	2,96E-47	9,45E-47	-0,778059475
Cluster-105.0	Cluster-105.0	10,76215052	10,84775632	17,36986546	2,96E-47	9,45E-47	-0,778059475
Cluster-122.0	Cluster-122.0	10,76215052	10,84775632	17,36986546	2,96E-47	9,45E-47	-0,778059475
Cluster-132.0	Cluster-132.0	10,76215052	10,84775632	17,36986546	2,96E-47	9,45E-47	-0,778059475
Cluster-137.0	Cluster-137.0	10,76215052	10,84775632	17,36986546	2,96E-47	9,45E-47	-0,778059475
Cluster-168.0	Cluster-168.0	10,76215052	10,84775632	17,36986546	2,96E-47	9,45E-47	-0,778059475
Cluster-205.0	Cluster-205.0	10,76215052	10,84775632	17,36986546	2,96E-47	9,45E-47	-0,778059475
Cluster-228.0	Cluster-228.0	10,76215052	10,84775632	17,36986546	2,96E-47	9,45E-47	-0,778059475
Cluster-240.0	Cluster-240.0	10,76215052	10,84775632	17,36986546	2,96E-47	9,45E-47	-0,778059475
Cluster-247.0	Cluster-247.0	10,76215052	10,84775632	17,36986546	2,96E-47	9,45E-47	-0,778059475
Cluster-262.0	Cluster-262.0	10,76215052	10,84775632	17,36986546	2,96E-47	9,45E-47	-0,778059475
Cluster-92.0	Cluster-92.0	12,00572205	11,03199772	18,0114274	1,13E-49	1,69E-48	-1,035825998
Cluster-23.0	Cluster-23.0	11,00556691	11,03199772	16,51095774	5,15E-44	1,43E-43	-1,605926436
Cluster-69.0	Cluster-69.0	11,00556691	11,03199772	16,51095774	5,15E-44	1,43E-43	-1,605926436
Cluster-155.0	Cluster-155.0	11,00556691	11,03199772	16,51095774	5,15E-44	1,43E-43	-1,605926436
Cluster-162.0	Cluster-162.0	11,00556691	11,03199772	16,51095774	5,15E-44	1,43E-43	-1,605926436
Cluster-178.0	Cluster-178.0	11,00556691	11,03199772	16,51095774	5,15E-44	1,43E-43	-1,605926436
Cluster-219.0	Cluster-219.0	11,00556691	11,03199772	16,51095774	5,15E-44	1,43E-43	-1,605926436
Cluster-233.0	Cluster-233.0	11,00556691	11,03199772	16,51095774	5,15E-44	1,43E-43	-1,605926436
Cluster-26.0	Cluster-26.0	10,87273894	11,03199772	16,31168432	2,90E-43	6,80E-43	-1,677912142
Cluster-43.0	Cluster-43.0	10,87273894	11,03199772	16,31168432	2,90E-43	6,80E-43	-1,677912142
Cluster-48.0	Cluster-48.0	10,87273894	11,03199772	16,31168432	2,90E-43	6,80E-43	-1,677912142
Cluster-52.0	Cluster-52.0	10,87273894	11,03199772	16,31168432	2,90E-43	6,80E-43	-1,677912142
Cluster-64.0	Cluster-64.0	10,87273894	11,03199772	16,31168432	2,90E-43	6,80E-43	-1,677912142
Cluster-99.0	Cluster-99.0	10,87273894	11,03199772	16,31168432	2,90E-43	6,80E-43	-1,677912142
Cluster-104.0	Cluster-104.0	10,87273894	11,03199772	16,31168432	2,90E-43	6,80E-43	-1,677912142
Cluster-145.0	Cluster-145.0	10,87273894	11,03199772	16,31168432	2,90E-43	6,80E-43	-1,677912142

145.0						43	
Cluster-182.0	Cluster-182.0	10,87273894	11,03199772	16,31168432	2,90E-43	6,80E-43	-1,677912142
Cluster-222.0	Cluster-222.0	10,87273894	11,03199772	16,31168432	2,90E-43	6,80E-43	-1,677912142
Cluster-194.0	Cluster-194.0	11,86080604	11,15335443	13,95422021	1,89E-34	4,37E-34	-3,272782439
Cluster-160.0	Cluster-160.0	11,17611065	11,15335443	13,14867713	1,71E-31	3,16E-31	-3,421817062
Cluster-173.0	Cluster-173.0	11,17611065	11,15335443	13,14867713	1,71E-31	3,16E-31	-3,421817062
Cluster-190.0	Cluster-190.0	11,17611065	11,15335443	13,14867713	1,71E-31	3,16E-31	-3,421817062
Cluster-252.0	Cluster-252.0	12,59896473	12,00872037	13,66424925	2,22E-33	5,04E-33	-3,515629378
Cluster-95.0	Cluster-95.0	12,46266341	11,94583568	13,58400101	4,38E-33	9,80E-33	-3,517772129
Cluster-185.0	Cluster-185.0	12,4437489	11,94583568	13,56338465	5,21E-33	1,15E-32	-3,521057728
Cluster-268.0	Cluster-268.0	12,30706546	11,9097382	13,42534032	1,67E-32	3,53E-32	-3,541232824
Cluster-246.0	Cluster-246.0	12,34582619	11,85519316	13,43812203	1,50E-32	3,21E-32	-3,543780504
Cluster-120.0	Cluster-120.0	12,31044277	11,82447897	13,37920053	2,47E-32	5,14E-32	-3,55616598
Cluster-177.0	Cluster-177.0	12,49687707	12,0364782	13,46675844	1,18E-32	2,56E-32	-3,560001904
Cluster-181.0	Cluster-181.0	12,15486852	11,89685562	13,25522423	7,00E-32	1,40E-31	-3,568546844
Cluster-123.0	Cluster-123.0	11,57524095	11,24399695	12,91835938	1,18E-30	1,92E-30	-3,574798277
Cluster-191.0	Cluster-191.0	11,57524095	11,24399695	12,91835938	1,18E-30	1,92E-30	-3,574798277
Cluster-195.0	Cluster-195.0	11,57524095	11,24399695	12,91835938	1,18E-30	1,92E-30	-3,574798277
Cluster-269.0	Cluster-269.0	11,57524095	11,24399695	12,91835938	1,18E-30	1,92E-30	-3,574798277
Cluster-25.0	Cluster-25.0	12,19516241	11,82447897	13,25391185	7,08E-32	1,40E-31	-3,575642754
Cluster-244.0	Cluster-244.0	12,16636306	11,82447897	13,22261223	9,20E-32	1,79E-31	-3,580479834
Cluster-118.0	Cluster-118.0	12,4326933	12,45010405	13,35160349	3,11E-32	6,30E-32	-3,584620305
Cluster-44.0	Cluster-44.0	12,12194273	12,40496099	13,17433545	1,38E-31	2,65E-31	-3,587918162
Cluster-263.0	Cluster-263.0	12,59510847	12,13007707	13,35785183	2,95E-32	6,06E-32	-3,608384812
Cluster-50.0	Cluster-50.0	11,9644721	11,82447897	13,00319366	5,79E-31	1,02E-30	-3,614067939
Cluster-74.0	Cluster-74.0	11,28656131	11,24399695	12,59618316	1,72E-29	2,60E-29	-3,625360953
Cluster-157.0	Cluster-157.0	11,28656131	11,24399695	12,59618316	1,72E-29	2,60E-29	-3,625360953
Cluster-159.0	Cluster-159.0	11,28656131	11,82447897	12,59618316	1,72E-29	2,60E-29	-3,625360953
Cluster-243.0	Cluster-243.0	11,28656131	11,24399695	12,59618316	1,72E-29	2,60E-29	-3,625360953
Cluster-53.0	Cluster-53.0	11,2587821	11,24399695	12,56518062	2,22E-29	3,20E-29	-3,630159174
Cluster-117.0	Cluster-117.0	11,2587821	11,24399695	12,56518062	2,22E-29	3,20E-29	-3,630159174
Cluster-210.0	Cluster-210.0	11,2587821	11,24399695	12,56518062	2,22E-29	3,20E-29	-3,630159174
Cluster-217.0	Cluster-217.0	11,2587821	11,24399695	12,56518062	2,22E-29	3,20E-29	-3,630159174
Cluster-232.0	Cluster-232.0	11,2587821	11,24399695	12,56518062	2,22E-29	3,20E-29	-3,630159174

Cluster-242.0	Cluster-242.0	12,17518111	11,73383645	13,05056294	3,90E-31	7,04E-31	-3,633501895
Cluster-46.0	Cluster-46.0	11,23100289	11,64023757	12,53417808	2,87E-29	3,91E-29	-3,63494557
Cluster-89.0	Cluster-89.0	11,23100289	11,24399695	12,53417808	2,87E-29	3,91E-29	-3,63494557
Cluster-212.0	Cluster-212.0	11,23100289	11,24399695	12,53417808	2,87E-29	3,91E-29	-3,63494557
Cluster-249.0	Cluster-249.0	11,23100289	11,24399695	12,53417808	2,87E-29	3,91E-29	-3,63494557
Cluster-267.0	Cluster-267.0	11,23100289	11,24399695	12,53417808	2,87E-29	3,91E-29	-3,63494557
Cluster-20.0	Cluster-20.0	12,04258844	11,75387904	12,96970552	7,66E-31	1,31E-30	-3,636518872
Cluster-241.0	Cluster-241.0	12,19006077	11,71261422	12,99773218	6,06E-31	1,05E-30	-3,651219868
Cluster-27.0	Cluster-27.0	12,26666169	11,69006477	13,00230661	5,83E-31	1,02E-30	-3,661531092
Cluster-257.0	Cluster-257.0	12,69240622	13,17654371	13,14744001	1,73E-31	3,16E-31	-3,682944173
Cluster-42.0	Cluster-42.0	12,45452841	12,22071959	13,01804066	5,12E-31	9,13E-31	-3,68479892
Cluster-171.0	Cluster-171.0	11,86875715	11,71261422	12,65514008	1,05E-29	1,68E-29	-3,700616474
Cluster-22.0	Cluster-22.0	11,89402531	11,69006477	12,60732283	1,57E-29	2,47E-29	-3,717724884
Cluster-21.0	Cluster-21.0	11,38491709	11,3163736	12,23833485	3,29E-28	4,08E-28	-3,745384317
Cluster-180.0	Cluster-180.0	11,38491709	11,3163736	12,23833485	3,29E-28	4,08E-28	-3,745384317
Cluster-188.0	Cluster-188.0	11,38491709	11,3163736	12,23833485	3,29E-28	4,08E-28	-3,745384317
Cluster-192.0	Cluster-192.0	11,38491709	11,3163736	12,23833485	3,29E-28	4,08E-28	-3,745384317
Cluster-254.0	Cluster-254.0	11,38491709	11,3163736	12,23833485	3,29E-28	4,08E-28	-3,745384317
Cluster-76.0	Cluster-76.0	11,36889563	11,3163736	12,22111241	3,79E-28	4,63E-28	-3,747790377
Cluster-107.0	Cluster-107.0	11,36889563	12,10885485	12,22111241	3,79E-28	4,63E-28	-3,747790377
Cluster-39.0	Cluster-39.0	11,89844627	11,64023757	12,46980727	4,89E-29	6,55E-29	-3,755916805
Cluster-250.0	Cluster-250.0	11,89844627	11,64023757	12,46980727	4,89E-29	6,55E-29	-3,755916805
Cluster-214.0	Cluster-214.0	11,92963702	11,61247974	12,4166257	7,58E-29	9,98E-29	-3,774373361
Cluster-140.0	Cluster-140.0	12,01825634	11,58240618	12,42575353	7,03E-29	9,34E-29	-3,78392874
Cluster-111.0	Cluster-111.0	12,73307883	12,3458729	12,73682206	5,34E-30	8,62E-30	-3,79652819
Cluster-19.0	Cluster-19.0	11,76722167	11,61247974	12,24758028	3,05E-28	3,95E-28	-3,796714938
Cluster-234.0	Cluster-234.0	11,76722167	11,61247974	12,24758028	3,05E-28	3,95E-28	-3,796714938
Cluster-164.0	Cluster-164.0	11,50510611	11,37662562	12,02678589	1,86E-27	2,18E-27	-3,818805374
Cluster-225.0	Cluster-225.0	11,73089622	11,58240618	12,12865003	8,10E-28	9,64E-28	-3,822507822
Cluster-176.0	Cluster-176.0	11,45708477	11,37662562	11,97658711	2,81E-27	3,19E-27	-3,82531766
Cluster-207.0	Cluster-207.0	11,45708477	11,37662562	11,97658711	2,81E-27	3,19E-27	-3,82531766
Cluster-153.0	Cluster-153.0	11,84982788	11,54959505	12,1732071	5,62E-28	6,74E-28	-3,826607955
Cluster-156.0	Cluster-156.0	11,84982788	11,54959505	12,1732071	5,62E-28	6,74E-28	-3,826607955
Cluster-18.0	Cluster-18.0	11,69307902	11,54959505	12,01218059	2,10E-27	2,44E-27	-3,846943095

						27	
Cluster-196.0	Cluster-196.0	11,65473483	11,42823834	11,95985458	3,22E-27	3,60E-27	-3,855077659
Cluster-129.0	Cluster-129.0	11,59345357	11,42823834	11,89696898	5,37E-27	5,84E-27	-3,862894502
Cluster-170.0	Cluster-170.0	11,59345357	11,42823834	11,89696898	5,37E-27	5,84E-27	-3,862894502
Cluster-37.0	Cluster-37.0	11,57617422	11,82447897	11,87923726	6,20E-27	6,65E-27	-3,865091154
Cluster-209.0	Cluster-209.0	11,57617422	11,42823834	11,87923726	6,20E-27	6,65E-27	-3,865091154
Cluster-34.0	Cluster-34.0	11,77063895	13,94058704	11,96649466	3,05E-27	3,44E-27	-3,867821035
Cluster-183.0	Cluster-183.0	11,5390122	11,42823834	11,84110234	8,46E-27	9,00E-27	-3,869804304
Cluster-167.0	Cluster-167.0	11,74760577	11,47338141	11,94307822	3,69E-27	4,07E-27	-3,870684757
Cluster-174.0	Cluster-174.0	11,74760577	11,47338141	11,94307822	3,69E-27	4,07E-27	-3,870684757
Cluster-30.0	Cluster-30.0	13,17741134	12,45010405	12,55823116	2,35E-29	3,36E-29	-3,889904087
Cluster-261.0	Cluster-261.0	12,96176894	12,50509548	12,07874004	1,22E-27	1,44E-27	-3,971423881
Cluster-237.0	Cluster-237.0	13,19542072	12,55912883	11,99007308	2,51E-27	2,90E-27	-4,010604674
Cluster-256.0	Cluster-256.0	13,61142137	14,06750852	11,21314632	1,32E-24	1,40E-24	-4,174726387
Cluster-259.0	Cluster-259.0	13,46300705	12,8319158	11,083706	3,70E-24	3,88E-24	-4,184981373
Cluster-54.0	Cluster-54.0	13,54840806	12,88221758	11,03293367	5,53E-24	5,76E-24	-4,197477557
Cluster-139.0	Cluster-139.0	13,53669864	12,9013361	10,97828885	8,52E-24	8,82E-24	-4,204633719
Cluster-125.0	Cluster-125.0	13,88996999	13,07572914	10,91042483	1,46E-23	1,50E-23	-4,233220692
Cluster-179.0	Cluster-179.0	14,30795647	13,49329182	10,74769939	5,22E-23	5,33E-23	-4,273867409
Cluster-253.0	Cluster-253.0	15,48009358	15,91004539	10,5678382	2,12E-22	2,14E-22	-4,338415778
Cluster-108.0	Cluster-108.0	15,83028008	14,57118045	10,60994592	1,53E-22	1,55E-22	-4,345651742
Cluster-270.0	Cluster-270.0	15,65792127	14,48979978	10,53769471	2,68E-22	2,68E-22	-4,347044289

EK 2. 9USS'de ifadesi değişen transkriptler (Sayfa 138-144)

	genes	logFC	AveExpr	t	P.Value	adj.P.Val	B
Cluster-16.0	Cluster-16.0	8,946444504	10,81789262	15,90516524	8,88E-46	3,43E-44	-0,735356751
Cluster-17.0	Cluster-17.0	8,946444504	10,37966584	15,90516524	8,88E-46	3,43E-44	-0,735356751
Cluster-55.0	Cluster-55.0	8,946444504	10,28902332	15,90516524	8,88E-46	3,43E-44	-0,735356751
Cluster-120.0	Cluster-120.0	8,946444504	9,587184589	15,90516524	8,88E-46	3,43E-44	-0,735356751
Cluster-145.0	Cluster-145.0	8,946444504	10,59462143	15,90516524	8,88E-46	3,43E-44	-0,735356751
Cluster-251.0	Cluster-251.0	8,946444504	9,587184589	15,90516524	8,88E-46	3,43E-44	-0,735356751
Cluster-18.0	Cluster-18.0	9,822079916	9,587184589	14,38815756	4,48E-39	8,66E-38	-2,43121771
Cluster-47.0	Cluster-47.0	9,822079916	9,587184589	14,38815756	4,48E-39	8,66E-38	-2,43121771
Cluster-51.0	Cluster-51.0	9,822079916	9,587184589	14,38815756	4,48E-39	8,66E-38	-2,43121771
Cluster-72.0	Cluster-72.0	9,822079916	9,587184589	14,38815756	4,48E-39	8,66E-38	-2,43121771
Cluster-137.0	Cluster-137.0	9,822079916	9,587184589	14,38815756	4,48E-39	8,66E-38	-2,43121771
Cluster-144.0	Cluster-144.0	9,822079916	9,587184589	14,38815756	4,48E-39	8,66E-38	-2,43121771
Cluster-113.0	Cluster-113.0	9,456154426	9,587184589	13,85212104	9,16E-37	8,31E-36	-2,59022462
Cluster-21.0	Cluster-21.0	9,438483517	10,71807508	13,8262353	1,18E-36	8,31E-36	-2,597750435
Cluster-60.0	Cluster-60.0	9,438483517	9,587184589	13,8262353	1,18E-36	8,31E-36	-2,597750435
Cluster-64.0	Cluster-64.0	9,438483517	9,587184589	13,8262353	1,18E-36	8,31E-36	-2,597750435
Cluster-69.0	Cluster-69.0	9,438483517	9,983425214	13,8262353	1,18E-36	8,31E-36	-2,597750435
Cluster-104.0	Cluster-104.0	9,438483517	9,587184589	13,8262353	1,18E-36	8,31E-36	-2,597750435
Cluster-106.0	Cluster-106.0	9,438483517	9,983425214	13,8262353	1,18E-36	8,31E-36	-2,597750435
Cluster-112.0	Cluster-112.0	9,438483517	9,587184589	13,8262353	1,18E-36	8,31E-36	-2,597750435
Cluster-122.0	Cluster-122.0	9,438483517	9,587184589	13,8262353	1,18E-36	8,31E-36	-2,597750435
Cluster-152.0	Cluster-152.0	9,438483517	10,16766661	13,8262353	1,18E-36	8,31E-36	-2,597750435
Cluster-165.0	Cluster-165.0	9,438483517	9,587184589	13,8262353	1,18E-36	8,31E-36	-2,597750435
Cluster-166.0	Cluster-166.0	9,438483517	10,80167984	13,8262353	1,18E-36	8,31E-36	-2,597750435
Cluster-181.0	Cluster-181.0	9,438483517	9,587184589	13,8262353	1,18E-36	8,31E-36	-2,597750435
Cluster-191.0	Cluster-191.0	9,438483517	9,983425214	13,8262353	1,18E-36	8,31E-36	-2,597750435
Cluster-199.0	Cluster-199.0	9,438483517	9,587184589	13,8262353	1,18E-36	8,31E-36	-2,597750435
Cluster-203.0	Cluster-203.0	9,438483517	9,587184589	13,8262353	1,18E-36	8,31E-36	-2,597750435
Cluster-239.0	Cluster-239.0	9,438483517	9,587184589	13,8262353	1,18E-36	8,31E-36	-2,597750435
Cluster-241.0	Cluster-241.0	9,438483517	9,587184589	13,8262353	1,18E-36	8,31E-36	-2,597750435
Cluster-78.0	Cluster-78.0	10,49148778	9,771425988	13,95341768	3,37E-37	5,22E-36	-2,911874757

Cluster-230.0	Cluster-230.0	10,49148778	10,35190801	13,95341768	3,37E-37	5,22E-36	-2,911874757
Cluster-243.0	Cluster-243.0	10,49148778	9,771425988	13,95341768	3,37E-37	5,22E-36	-2,911874757
Cluster-101.0	Cluster-101.0	9,587134592	9,771425988	12,75065045	3,91E-32	2,67E-31	-3,191001374
Cluster-85.0	Cluster-85.0	9,568828987	9,771425988	12,72630445	4,93E-32	2,86E-31	-3,196391729
Cluster-134.0	Cluster-134.0	9,568828987	9,771425988	12,72630445	4,93E-32	2,86E-31	-3,196391729
Cluster-184.0	Cluster-184.0	9,568828987	9,771425988	12,72630445	4,93E-32	2,86E-31	-3,196391729
Cluster-208.0	Cluster-208.0	9,568828987	9,771425988	12,72630445	4,93E-32	2,86E-31	-3,196391729
Cluster-225.0	Cluster-225.0	9,568828987	9,771425988	12,72630445	4,93E-32	2,86E-31	-3,196391729
Cluster-240.0	Cluster-240.0	9,568828987	9,771425988	12,72630445	4,93E-32	2,86E-31	-3,196391729
Cluster-206.0	Cluster-206.0	9,684222854	9,892782695	11,27291256	3,23E-26	1,78E-25	-3,752395571
Cluster-180.0	Cluster-180.0	9,657473487	9,892782695	11,24177498	4,26E-26	2,20E-25	-3,757081744
Cluster-188.0	Cluster-188.0	9,657473487	9,892782695	11,24177498	4,26E-26	2,20E-25	-3,757081744
Cluster-212.0	Cluster-212.0	9,657473487	9,892782695	11,24177498	4,26E-26	2,20E-25	-3,757081744
Cluster-77.0	Cluster-77.0	10,370687	9,983425214	10,84654392	1,39E-24	5,99E-24	-3,964063609
Cluster-143.0	Cluster-143.0	10,370687	9,983425214	10,84654392	1,39E-24	5,99E-24	-3,964063609
Cluster-194.0	Cluster-194.0	10,370687	10,37966584	10,84654392	1,39E-24	5,99E-24	-3,964063609
Cluster-200.0	Cluster-200.0	10,370687	9,983425214	10,84654392	1,39E-24	5,99E-24	-3,964063609
Cluster-42.0	Cluster-42.0	10,36243649	9,983425214	10,83791484	1,50E-24	5,99E-24	-3,965075948
Cluster-61.0	Cluster-61.0	10,36243649	9,983425214	10,83791484	1,50E-24	5,99E-24	-3,965075948
Cluster-158.0	Cluster-158.0	10,36243649	9,983425214	10,83791484	1,50E-24	5,99E-24	-3,965075948
Cluster-169.0	Cluster-169.0	10,36243649	9,983425214	10,83791484	1,50E-24	5,99E-24	-3,965075948
Cluster-178.0	Cluster-178.0	10,36243649	9,983425214	10,83791484	1,50E-24	5,99E-24	-3,965075948
Cluster-210.0	Cluster-210.0	10,36243649	9,983425214	10,83791484	1,50E-24	5,99E-24	-3,965075948
Cluster-228.0	Cluster-228.0	10,36243649	9,983425214	10,83791484	1,50E-24	5,99E-24	-3,965075948
Cluster-268.0	Cluster-268.0	10,36243649	12,04183013	10,83791484	1,50E-24	5,99E-24	-3,965075948
Cluster-46.0	Cluster-46.0	10,99486957	11,56139382	10,85104523	1,34E-24	5,99E-24	-4,032073303
Cluster-133.0	Cluster-133.0	9,753807448	10,84828312	10,20135897	3,50E-22	1,33E-21	-4,037532913
Cluster-204.0	Cluster-204.0	9,753807448	9,983425214	10,20135897	3,50E-22	1,33E-21	-4,037532913
Cluster-224.0	Cluster-224.0	9,753807448	10,96014786	10,20135897	3,50E-22	1,33E-21	-4,037532913
Cluster-25.0	Cluster-25.0	9,745556942	9,983425214	10,19272989	3,77E-22	1,36E-21	-4,03848501
Cluster-89.0	Cluster-89.0	9,745556942	9,983425214	10,19272989	3,77E-22	1,36E-21	-4,03848501
Cluster-100.0	Cluster-100.0	9,745556942	9,983425214	10,19272989	3,77E-22	1,36E-21	-4,03848501
Cluster-124.0	Cluster-124.0	9,853269599	10,05580187	9,724378581	1,82E-20	5,88E-20	-4,143879949
Cluster-125.0	Cluster-125.0	9,853269599	10,84828312	9,724378581	1,82E-20	5,88E-20	-4,143879949

125.0					20		
Cluster-218.0	Cluster-218.0	9,853269599	10,63628389	9,724378581	1,82E-20	5,88E-20	-4,143879949
Cluster-119.0	Cluster-119.0	10,56426799	10,16766661	9,813305268	8,81E-21	3,01E-20	-4,187488012
Cluster-193.0	Cluster-193.0	10,56426799	10,16766661	9,813305268	8,81E-21	3,01E-20	-4,187488012
Cluster-48.0	Cluster-48.0	10,40547278	10,16766661	9,665798038	2,94E-20	8,52E-20	-4,199778601
Cluster-90.0	Cluster-90.0	10,40547278	10,16766661	9,665798038	2,94E-20	8,52E-20	-4,199778601
Cluster-195.0	Cluster-195.0	10,40547278	10,16766661	9,665798038	2,94E-20	8,52E-20	-4,199778601
Cluster-201.0	Cluster-201.0	10,40547278	11,14438926	9,665798038	2,94E-20	8,52E-20	-4,199778601
Cluster-221.0	Cluster-221.0	10,40547278	10,16766661	9,665798038	2,94E-20	8,52E-20	-4,199778601
Cluster-231.0	Cluster-231.0	10,40547278	10,86950534	9,665798038	2,94E-20	8,52E-20	-4,199778601
Cluster-238.0	Cluster-238.0	10,40547278	10,56390724	9,665798038	2,94E-20	8,52E-20	-4,199778601
Cluster-261.0	Cluster-261.0	10,40547278	10,56390724	9,665798038	2,94E-20	8,52E-20	-4,199778601
Cluster-220.0	Cluster-220.0	10,74115628	10,83340787	9,809401935	9,09E-21	3,06E-20	-4,201320512
Cluster-39.0	Cluster-39.0	10,54369007	10,99086205	9,584293972	5,69E-20	1,61E-19	-4,222832768
Cluster-76.0	Cluster-76.0	10,54369007	10,28902332	9,584293972	5,69E-20	1,61E-19	-4,222832768
Cluster-63.0	Cluster-63.0	10,05642175	10,16766661	9,341559363	3,99E-19	7,00E-19	-4,226140518
Cluster-159.0	Cluster-159.0	10,05291748	10,16766661	9,338304194	4,09E-19	7,03E-19	-4,226400616
Cluster-269.0	Cluster-269.0	10,04538099	10,16766661	9,331303433	4,32E-19	7,21E-19	-4,226959692
Cluster-59.0	Cluster-59.0	10,45740595	11,08150457	9,505861055	1,07E-19	2,72E-19	-4,228968114
Cluster-129.0	Cluster-129.0	10,45740595	10,28902332	9,505861055	1,07E-19	2,72E-19	-4,228968114
Cluster-234.0	Cluster-234.0	10,45740595	10,28902332	9,505861055	1,07E-19	2,72E-19	-4,228968114
Cluster-264.0	Cluster-264.0	10,34552937	10,28902332	9,40416439	2,42E-19	4,96E-19	-4,236848182
Cluster-57.0	Cluster-57.0	10,33667469	10,28902332	9,396115422	2,58E-19	4,99E-19	-4,237468245
Cluster-130.0	Cluster-130.0	10,33667469	10,28902332	9,396115422	2,58E-19	4,99E-19	-4,237468245
Cluster-23.0	Cluster-23.0	10,23296229	10,25292584	9,345291842	3,87E-19	6,85E-19	-4,238086148
Cluster-3.0	Cluster-3.0	10,3209909	10,28902332	9,381858739	2,89E-19	5,32E-19	-4,238565224
Cluster-12.0	Cluster-12.0	10,3209909	10,28902332	9,381858739	2,89E-19	5,32E-19	-4,238565224
Cluster-33.0	Cluster-33.0	10,3209909	10,28902332	9,381858739	2,89E-19	5,32E-19	-4,238565224
Cluster-109.0	Cluster-109.0	10,40656744	10,32183445	9,413720498	2,24E-19	4,73E-19	-4,239560552
Cluster-142.0	Cluster-142.0	10,40656744	10,32183445	9,413720498	2,24E-19	4,73E-19	-4,239560552
Cluster-260.0	Cluster-260.0	10,50638864	10,35190801	9,440581088	1,81E-19	4,00E-19	-4,242225032
Cluster-10.0	Cluster-10.0	10,47769883	10,35190801	9,414801676	2,22E-19	4,73E-19	-4,244171631
Cluster-267.0	Cluster-267.0	10,47769883	10,74814864	9,414801676	2,22E-19	4,73E-19	-4,244171631
Cluster-138.0	Cluster-138.0	10,63060083	10,40543921	9,462671294	1,52E-19	3,48E-19	-4,247115212

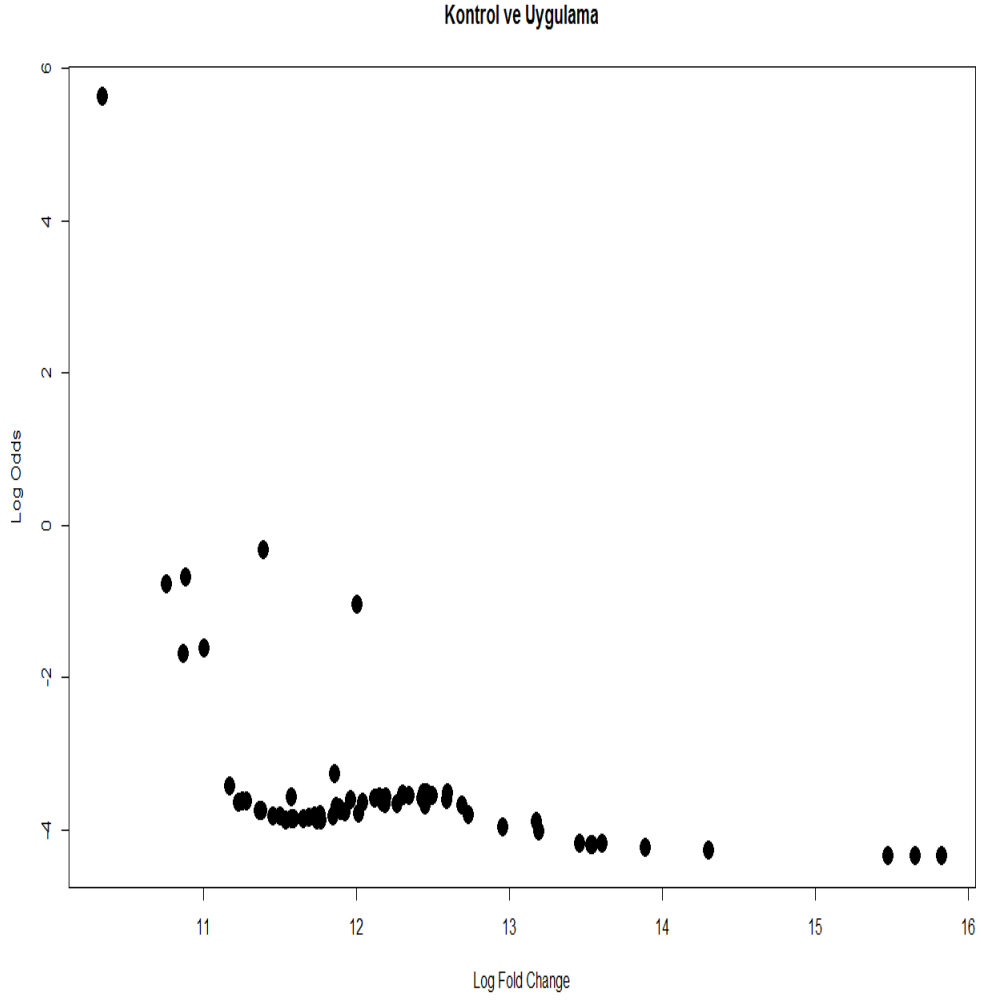
Cluster-270.0	Cluster-270.0	16,31669322	15,78061238	11,70011468	6,88E-28	3,90E-27	-4,247546491
Cluster-4.0	Cluster-4.0	10,61698215	10,40543921	9,450548826	1,67E-19	3,76E-19	-4,24801639
Cluster-8.0	Cluster-8.0	10,67284835	10,42949304	9,471356936	1,41E-19	3,28E-19	-4,248571628
Cluster-32.0	Cluster-32.0	10,67284835	10,42949304	9,471356936	1,41E-19	3,28E-19	-4,248571628
Cluster-35.0	Cluster-35.0	10,67284835	10,42949304	9,471356936	1,41E-19	3,28E-19	-4,248571628
Cluster-153.0	Cluster-153.0	10,52738789	11,24452374	9,405686565	2,39E-19	4,95E-19	-4,248797176
Cluster-196.0	Cluster-196.0	10,52738789	10,37966584	9,405686565	2,39E-19	4,95E-19	-4,248797176
Cluster-176.0	Cluster-176.0	10,52072206	10,96014786	9,399730989	2,51E-19	4,97E-19	-4,249240645
Cluster-189.0	Cluster-189.0	10,52072206	10,96014786	9,399730989	2,51E-19	4,97E-19	-4,249240645
Cluster-53.0	Cluster-53.0	10,72426779	10,84828312	9,488567425	1,23E-19	3,07E-19	-4,249354877
Cluster-1.0	Cluster-1.0	10,762185	10,47326472	9,505062482	1,08E-19	2,72E-19	-4,249370141
Cluster-131.0	Cluster-131.0	10,72170617	10,45204249	9,486300971	1,25E-19	3,08E-19	-4,2495219
Cluster-9.0	Cluster-9.0	10,71954019	10,45204249	9,484384564	1,27E-19	3,08E-19	-4,249663095
Cluster-13.0	Cluster-13.0	10,71954019	10,45204249	9,484384564	1,27E-19	3,08E-19	-4,249663095
Cluster-107.0	Cluster-107.0	10,51405624	10,77590646	9,393775413	2,63E-19	5,04E-19	-4,249683834
Cluster-2.0	Cluster-2.0	10,78845426	10,49330731	9,513061229	1,01E-19	2,72E-19	-4,249877134
Cluster-6.0	Cluster-6.0	10,78845426	10,49330731	9,513061229	1,01E-19	2,72E-19	-4,249877134
Cluster-36.0	Cluster-36.0	10,81691894	10,51229452	9,512422305	1,02E-19	2,72E-19	-4,251770166
Cluster-41.0	Cluster-41.0	10,81691894	10,51229452	9,512422305	1,02E-19	2,72E-19	-4,251770166
Cluster-213.0	Cluster-213.0	10,47644163	10,37966584	9,360168667	3,44E-19	6,17E-19	-4,252179439
Cluster-175.0	Cluster-175.0	10,80998449	10,51229452	9,506324134	1,07E-19	2,72E-19	-4,252215187
Cluster-28.0	Cluster-28.0	10,86921099	10,54751015	9,505830984	1,07E-19	2,72E-19	-4,255984049
Cluster-187.0	Cluster-187.0	10,60665212	11,15388122	9,384503986	2,83E-19	5,32E-19	-4,256982518
Cluster-219.0	Cluster-219.0	10,60665212	10,84828312	9,384503986	2,83E-19	5,32E-19	-4,256982518
Cluster-58.0	Cluster-58.0	10,68676063	10,90853514	9,397960797	2,54E-19	4,99E-19	-4,26007554
Cluster-182.0	Cluster-182.0	10,88070496	10,56390724	9,479309951	1,33E-19	3,17E-19	-4,260462592
Cluster-74.0	Cluster-74.0	10,57361522	10,47326472	9,338519393	4,08E-19	7,03E-19	-4,261515061
Cluster-147.0	Cluster-147.0	10,57361522	10,47326472	9,338519393	4,08E-19	7,03E-19	-4,261515061
Cluster-15.0	Cluster-15.0	10,90679191	10,9758318	9,459660509	1,55E-19	3,53E-19	-4,264807779
Cluster-149.0	Cluster-149.0	10,76391769	10,56390724	9,377564455	2,99E-19	5,47E-19	-4,2676888
Cluster-40.0	Cluster-40.0	10,92282937	12,11114372	9,428666661	1,99E-19	4,35E-19	-4,270073328
Cluster-96.0	Cluster-96.0	10,71460959	10,56390724	9,334607063	4,21E-19	7,13E-19	-4,270716325
Cluster-174.0	Cluster-174.0	10,71460959	11,26574597	9,334607063	4,21E-19	7,13E-19	-4,270716325
Cluster-170.0	Cluster-170.0	10,70727682	10,96014786	9,328218724	4,43E-19	7,21E-19	-4,271165371

170.0					19		
Cluster-5.0	Cluster-5.0	10,9336293	10,6090503	9,402094438	2,46E-19	4,96E-19	-4,274359341
Cluster-7.0	Cluster-7.0	10,9336293	10,6090503	9,402094438	2,46E-19	4,96E-19	-4,274359341
Cluster-226.0	Cluster-226.0	10,65053996	10,96014786	9,278789367	6,56E-19	1,00E-18	-4,274629444
Cluster-247.0	Cluster-247.0	10,65053996	10,56390724	9,278789367	6,56E-19	1,00E-18	-4,274629444
Cluster-254.0	Cluster-254.0	10,60123187	10,56390724	9,235831975	9,21E-19	1,21E-18	-4,277625006
Cluster-229.0	Cluster-229.0	10,81971542	11,31088903	9,304137119	5,36E-19	8,52E-19	-4,281084678
Cluster-177.0	Cluster-177.0	10,72837785	10,59462143	9,260814679	7,56E-19	1,03E-18	-4,281674449
Cluster-45.0	Cluster-45.0	10,95602373	10,66160473	9,327615656	4,45E-19	7,21E-19	-4,285683516
Cluster-70.0	Cluster-70.0	10,83366639	10,63628389	9,269190928	7,08E-19	1,03E-18	-4,286576846
Cluster-235.0	Cluster-235.0	10,83366639	11,03252452	9,269190928	7,08E-19	1,03E-18	-4,286576846
Cluster-44.0	Cluster-44.0	10,95180585	10,68526394	9,282967497	6,34E-19	9,81E-19	-4,291346784
Cluster-249.0	Cluster-249.0	10,93533458	11,08150457	9,269006117	7,09E-19	1,03E-18	-4,292270592
Cluster-135.0	Cluster-135.0	10,92603531	11,08150457	9,26112387	7,54E-19	1,03E-18	-4,292791537
Cluster-162.0	Cluster-162.0	10,92603531	11,26574597	9,26112387	7,54E-19	1,03E-18	-4,292791537
Cluster-236.0	Cluster-236.0	10,92603531	10,68526394	9,26112387	7,54E-19	1,03E-18	-4,292791537
Cluster-56.0	Cluster-56.0	11,1056676	10,74814864	9,333304802	4,26E-19	7,15E-19	-4,293170769
Cluster-0.0	Cluster-0.0	10,7707803	10,64916647	9,19254075	1,30E-18	1,64E-18	-4,293210209
Cluster-102.0	Cluster-102.0	10,94578311	11,09277654	9,2614467	7,52E-19	1,03E-18	-4,293831545
Cluster-83.0	Cluster-83.0	11,11053435	10,7576406	9,326928489	4,48E-19	7,21E-19	-4,294258851
Cluster-86.0	Cluster-86.0	11,13761462	11,17214709	9,328431705	4,42E-19	7,21E-19	-4,295516358
Cluster-95.0	Cluster-95.0	11,13761462	10,77590646	9,328431705	4,42E-19	7,21E-19	-4,295516358
Cluster-115.0	Cluster-115.0	11,07860253	10,7576406	9,300122769	5,54E-19	8,62E-19	-4,296005876
Cluster-127.0	Cluster-127.0	11,07860253	11,15388122	9,300122769	5,54E-19	8,62E-19	-4,296005876
Cluster-207.0	Cluster-207.0	10,96920253	10,71807508	9,253675428	8,00E-19	1,07E-18	-4,296115602
Cluster-14.0	Cluster-14.0	10,96065702	11,2985571	9,246466397	8,47E-19	1,12E-18	-4,296586819
Cluster-73.0	Cluster-73.0	11,03844257	10,74814864	9,276808271	6,66E-19	1,00E-18	-4,296857706
Cluster-217.0	Cluster-217.0	11,03844257	10,74814864	9,276808271	6,66E-19	1,00E-18	-4,296857706
Cluster-214.0	Cluster-214.0	11,01961582	11,14438926	9,260986095	7,55E-19	1,03E-18	-4,297886242
Cluster-262.0	Cluster-262.0	11,46691393	11,66198659	9,444537536	1,75E-19	3,91E-19	-4,297987097
Cluster-43.0	Cluster-43.0	11,31606536	11,24452374	9,359365075	3,46E-19	6,17E-19	-4,300948462
Cluster-140.0	Cluster-140.0	11,31606536	10,84828312	9,359365075	3,46E-19	6,17E-19	-4,300948462
Cluster-242.0	Cluster-242.0	11,11285	10,7932917	9,2752278	6,75E-19	1,00E-18	-4,301011722
Cluster-252.0	Cluster-252.0	11,11285	11,98201357	9,2752278	6,75E-19	1,00E-18	-4,301011722

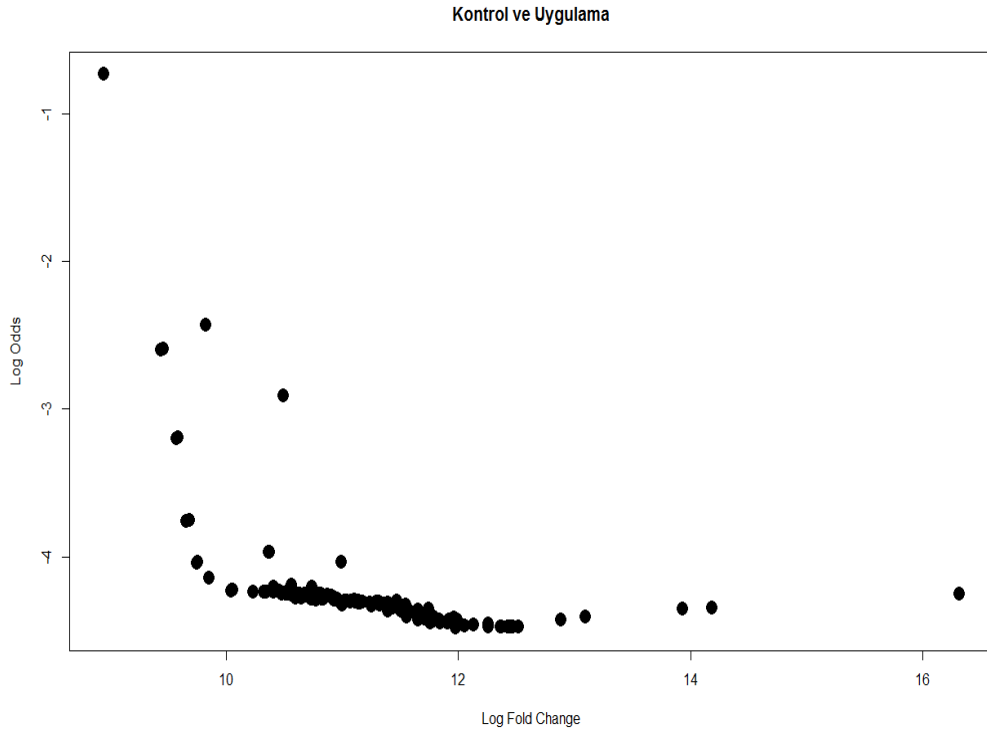
Cluster-31.0	Cluster-31.0	10,97437322	10,7576406	9,212625694	1,11E-18	1,43E-18	-4,301673383
Cluster-114.0	Cluster-114.0	11,07041874	10,80167984	9,22454162	1,01E-18	1,31E-18	-4,305209198
Cluster-171.0	Cluster-171.0	11,17532798	11,81013052	9,263808757	7,38E-19	1,03E-18	-4,305701695
Cluster-266.0	Cluster-266.0	11,17532798	10,83340787	9,263808757	7,38E-19	1,03E-18	-4,305701695
Cluster-54.0	Cluster-54.0	11,29290325	10,86950534	9,301216461	5,49E-19	8,62E-19	-4,307038483
Cluster-26.0	Cluster-26.0	10,98488555	11,19792046	9,153270198	1,76E-18	2,18E-18	-4,309725009
Cluster-190.0	Cluster-190.0	11,23714636	11,57134407	9,255293201	7,90E-19	1,07E-18	-4,309909469
Cluster-198.0	Cluster-198.0	11,23714636	10,86950534	9,255293201	7,90E-19	1,07E-18	-4,309909469
Cluster-205.0	Cluster-205.0	11,13957131	10,84828312	9,213389225	1,10E-18	1,42E-18	-4,310158649
Cluster-209.0	Cluster-209.0	11,39593067	11,30477577	9,30705964	5,24E-19	8,39E-19	-4,311475906
Cluster-29.0	Cluster-29.0	10,98818521	10,81789262	9,13087579	2,10E-18	2,58E-18	-4,312683541
Cluster-110.0	Cluster-110.0	11,156236	11,44998737	9,188652697	1,34E-18	1,67E-18	-4,314050364
Cluster-160.0	Cluster-160.0	11,156236	10,86950534	9,188652697	1,34E-18	1,67E-18	-4,314050364
Cluster-222.0	Cluster-222.0	11,156236	10,86950534	9,188652697	1,34E-18	1,67E-18	-4,314050364
Cluster-75.0	Cluster-75.0	11,3574042	10,9146484	9,263459679	7,40E-19	1,03E-18	-4,31488808
Cluster-163.0	Cluster-163.0	11,3574042	11,31088903	9,263459679	7,40E-19	1,03E-18	-4,31488808
Cluster-179.0	Cluster-179.0	11,3574042	11,97663028	9,263459679	7,40E-19	1,03E-18	-4,31488808
Cluster-24.0	Cluster-24.0	10,9915966	10,84828312	9,09100134	2,87E-18	3,49E-18	-4,317769002
Cluster-68.0	Cluster-68.0	11,32529207	11,99437191	9,199511646	1,23E-18	1,56E-18	-4,321028825
Cluster-167.0	Cluster-167.0	11,32529207	10,93239004	9,199511646	1,23E-18	1,56E-18	-4,321028825
Cluster-233.0	Cluster-233.0	11,47338167	10,96014786	9,24895172	8,30E-19	1,10E-18	-4,322209102
Cluster-172.0	Cluster-172.0	11,54461129	11,37715242	9,252540248	8,07E-19	1,08E-18	-4,325125107
Cluster-11.0	Cluster-11.0	11,0016038	10,88954793	9,02301473	4,87E-18	5,83E-18	-4,32648172
Cluster-157.0	Cluster-157.0	11,25507072	10,96014786	9,07296634	3,30E-18	3,99E-18	-4,332618044
Cluster-255.0	Cluster-255.0	11,53393946	11,00529092	9,180472043	1,42E-18	1,77E-18	-4,332980792
Cluster-108.0	Cluster-108.0	14,18146523	14,24746556	10,06287184	1,12E-21	3,99E-21	-4,343981339
Cluster-150.0	Cluster-150.0	11,43528841	11,03252452	9,013236582	5,26E-18	6,26E-18	-4,347427125
Cluster-116.0	Cluster-116.0	11,7467585	11,4739082	9,096872951	2,74E-18	3,35E-18	-4,351445548
Cluster-253.0	Cluster-253.0	13,92818663	14,52934389	9,888313422	4,75E-21	1,67E-20	-4,352452969
Cluster-246.0	Cluster-246.0	11,65379113	11,6581496	9,024877571	4,80E-18	5,77E-18	-4,355334443
Cluster-248.0	Cluster-248.0	11,50739092	11,09277654	8,857623281	1,75E-17	2,04E-17	-4,36701634
Cluster-173.0	Cluster-173.0	11,39012637	11,4777452	8,807333558	2,57E-17	2,96E-17	-4,367584105
Cluster-94.0	Cluster-94.0	11,58835213	11,50351857	8,867321436	1,62E-17	1,90E-17	-4,369183608
Cluster-	Cluster-155.0	11,64771569	11,90679695	8,887109414	1,39E-17	1,64E-17	-4,369457233

155.0						17		
Cluster-132.0	Cluster-132.0	11,67796903	11,14438926	8,801767271	2,68E-17	3,08E-17	-4,379148436	
Cluster-65.0	Cluster-65.0	11,73281548	11,15388122	8,809465018	2,53E-17	2,93E-17	-4,380399234	
Cluster-52.0	Cluster-52.0	11,71159442	11,56838772	8,729474965	4,65E-17	5,31E-17	-4,387374444	
Cluster-186.0	Cluster-186.0	11,65371902	11,21676592	8,532528409	2,05E-16	2,30E-16	-4,403691094	
Cluster-211.0	Cluster-211.0	11,55176787	11,61037387	8,466731798	3,35E-16	3,71E-16	-4,406280683	
Cluster-257.0	Cluster-257.0	13,09380119	13,56627692	9,001747077	5,75E-18	6,80E-18	-4,406888377	
Cluster-117.0	Cluster-117.0	11,66197468	11,22964849	8,494365189	2,72E-16	3,04E-16	-4,407372299	
Cluster-99.0	Cluster-99.0	11,78793904	11,24452374	8,533800394	2,03E-16	2,29E-16	-4,407890736	
Cluster-244.0	Cluster-244.0	11,9595636	11,84622799	8,582366406	1,41E-16	1,60E-16	-4,409003356	
Cluster-154.0	Cluster-154.0	11,70814693	11,26574597	8,401945945	5,41E-16	5,92E-16	-4,416853117	
Cluster-168.0	Cluster-168.0	11,91820077	11,70101639	8,413369743	4,97E-16	5,46E-16	-4,422108337	
Cluster-259.0	Cluster-259.0	11,98900507	11,89538974	8,425082179	4,56E-16	5,03E-16	-4,423177167	
Cluster-139.0	Cluster-139.0	12,88127049	13,53383496	8,72545824	4,79E-17	5,45E-17	-4,423541682	
Cluster-37.0	Cluster-37.0	11,83317799	11,31088903	8,330995656	9,12E-16	9,94E-16	-4,426430011	
Cluster-185.0	Cluster-185.0	11,65357267	11,2985571	8,249050033	1,66E-15	1,80E-15	-4,427991131	
Cluster-256.0	Cluster-256.0	11,78632872	11,32863066	8,230115468	1,91E-15	2,06E-15	-4,433219101	
Cluster-38.0	Cluster-38.0	11,97975938	11,95763445	8,183558958	2,68E-15	2,88E-15	-4,441915294	
Cluster-161.0	Cluster-161.0	11,83986709	11,37377372	8,100085325	4,89E-15	5,21E-15	-4,444625248	
Cluster-121.0	Cluster-121.0	11,75616088	11,36691986	8,067251378	6,20E-15	6,54E-15	-4,444957812	
Cluster-156.0	Cluster-156.0	11,90842735	11,38710268	8,099180628	4,93E-15	5,22E-15	-4,446411939	
Cluster-245.0	Cluster-245.0	12,25568289	11,84622799	8,121461869	4,20E-15	4,49E-15	-4,453122777	
Cluster-192.0	Cluster-192.0	12,12913523	12,03184078	8,033078941	7,92E-15	8,31E-15	-4,456399583	
Cluster-183.0	Cluster-183.0	12,2577791	12,21239506	7,930069455	1,65E-14	1,72E-14	-4,466157099	
Cluster-263.0	Cluster-263.0	12,05377068	11,50351857	7,819448614	3,60E-14	3,65E-14	-4,469103142	
Cluster-237.0	Cluster-237.0	12,51422622	11,84987349	7,936149523	1,58E-14	1,65E-14	-4,470985098	
Cluster-215.0	Cluster-215.0	12,25404858	11,5352466	7,852185416	2,86E-14	2,91E-14	-4,471103983	
Cluster-232.0	Cluster-232.0	12,46891972	12,57582455	7,899257108	2,05E-14	2,12E-14	-4,472407793	
Cluster-97.0	Cluster-97.0	12,43080246	11,81265272	7,877503254	2,39E-14	2,47E-14	-4,47301985	
Cluster-123.0	Cluster-123.0	12,42642258	11,81013052	7,874447544	2,44E-14	2,51E-14	-4,473124758	
Cluster-141.0	Cluster-141.0	12,44733056	11,70780255	7,872747357	2,47E-14	2,53E-14	-4,473638228	
Cluster-118.0	Cluster-118.0	12,36509701	11,69479773	7,818798448	3,62E-14	3,65E-14	-4,47538383	
Cluster-250.0	Cluster-250.0	12,37036805	11,6566033	7,815602277	3,70E-14	3,71E-14	-4,475682171	
Cluster-34.0	Cluster-34.0	11,97669582	11,56240129	7,594878386	1,71E-13	1,71E-13	-4,481612019	

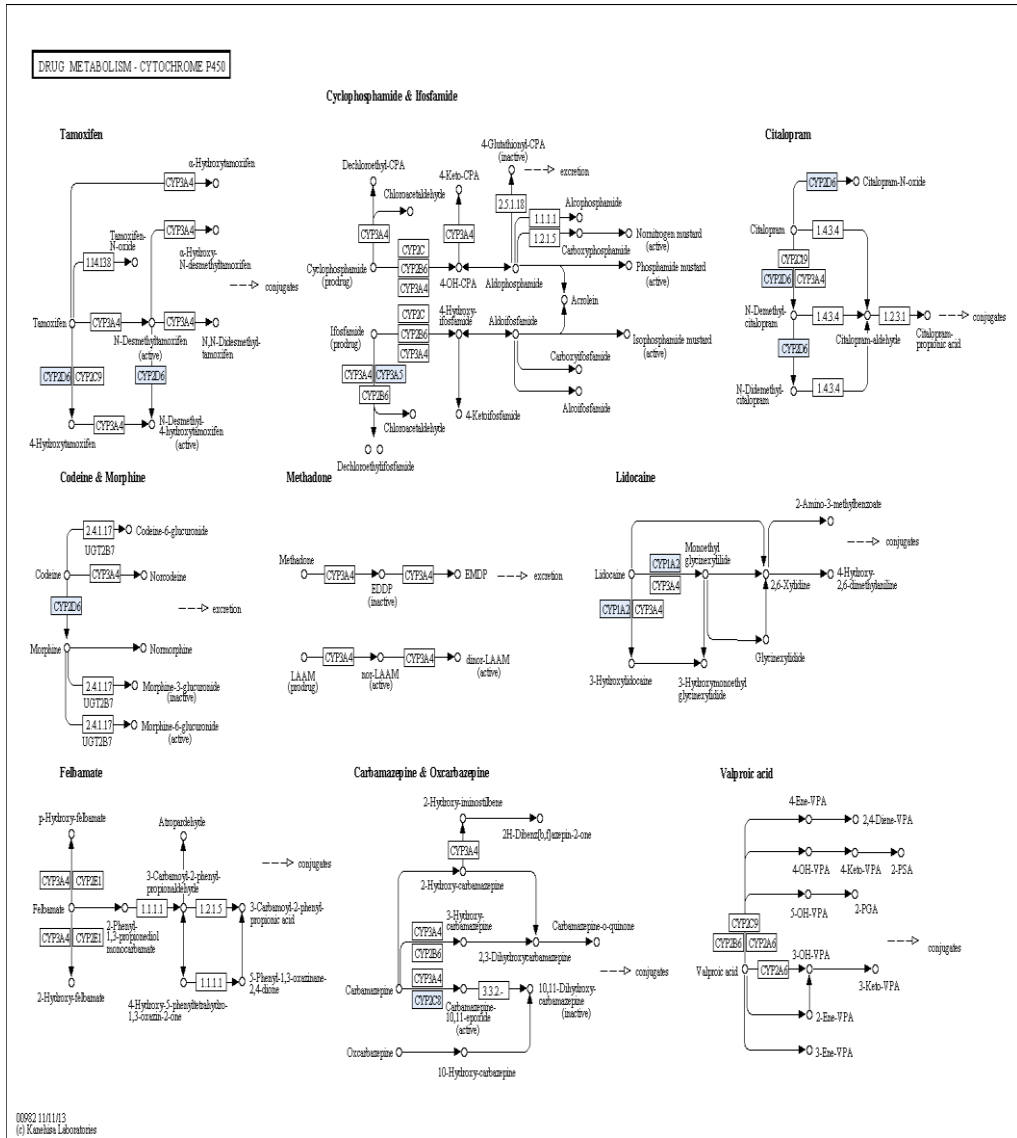
EK 3. 6USS' de kontrole karşı uygulama verilerine ait volcano plot grafiği



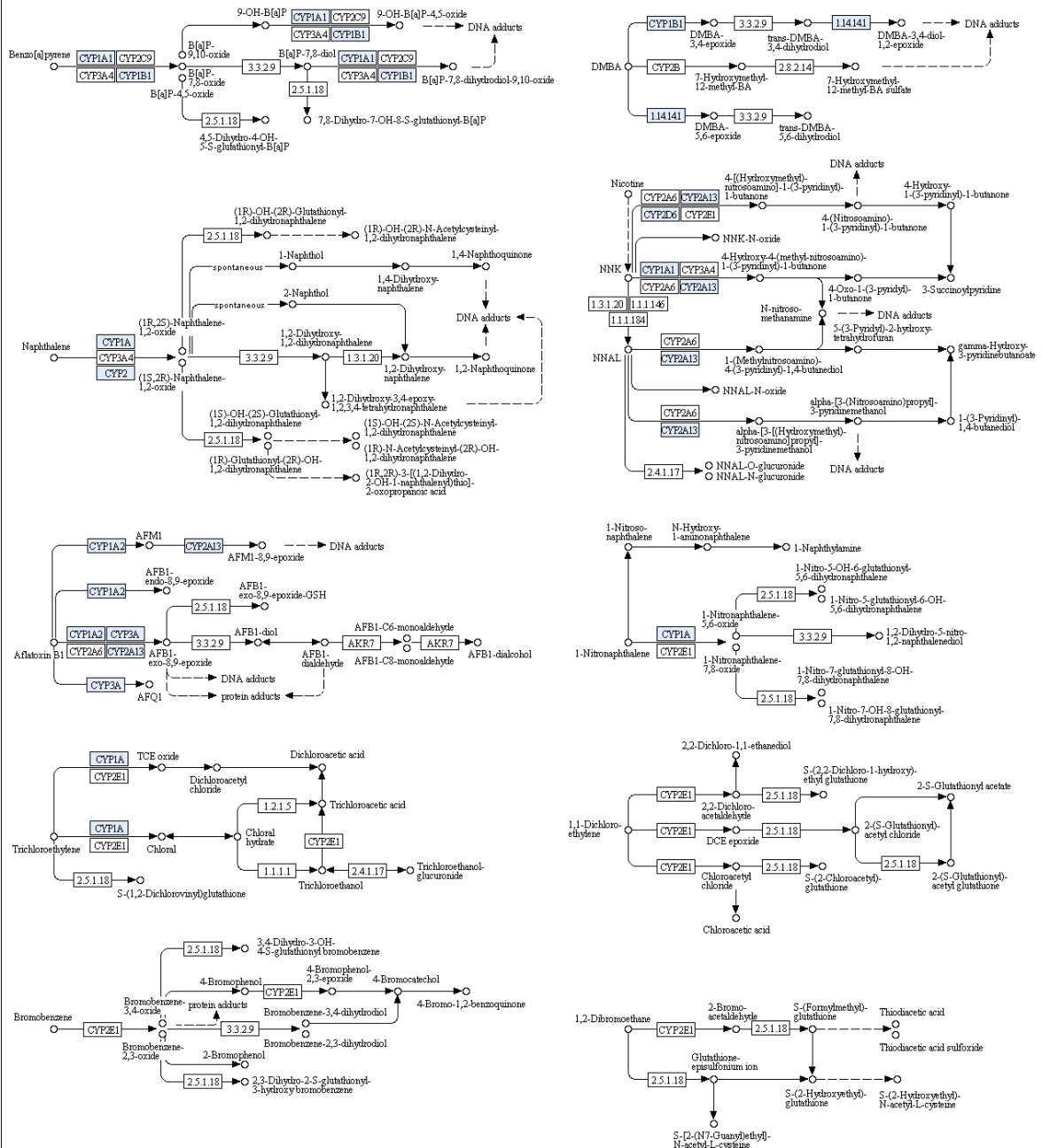
EK 4. 9USS' de kontrole karşı uygulama verilerine ait volcano plot grafiği



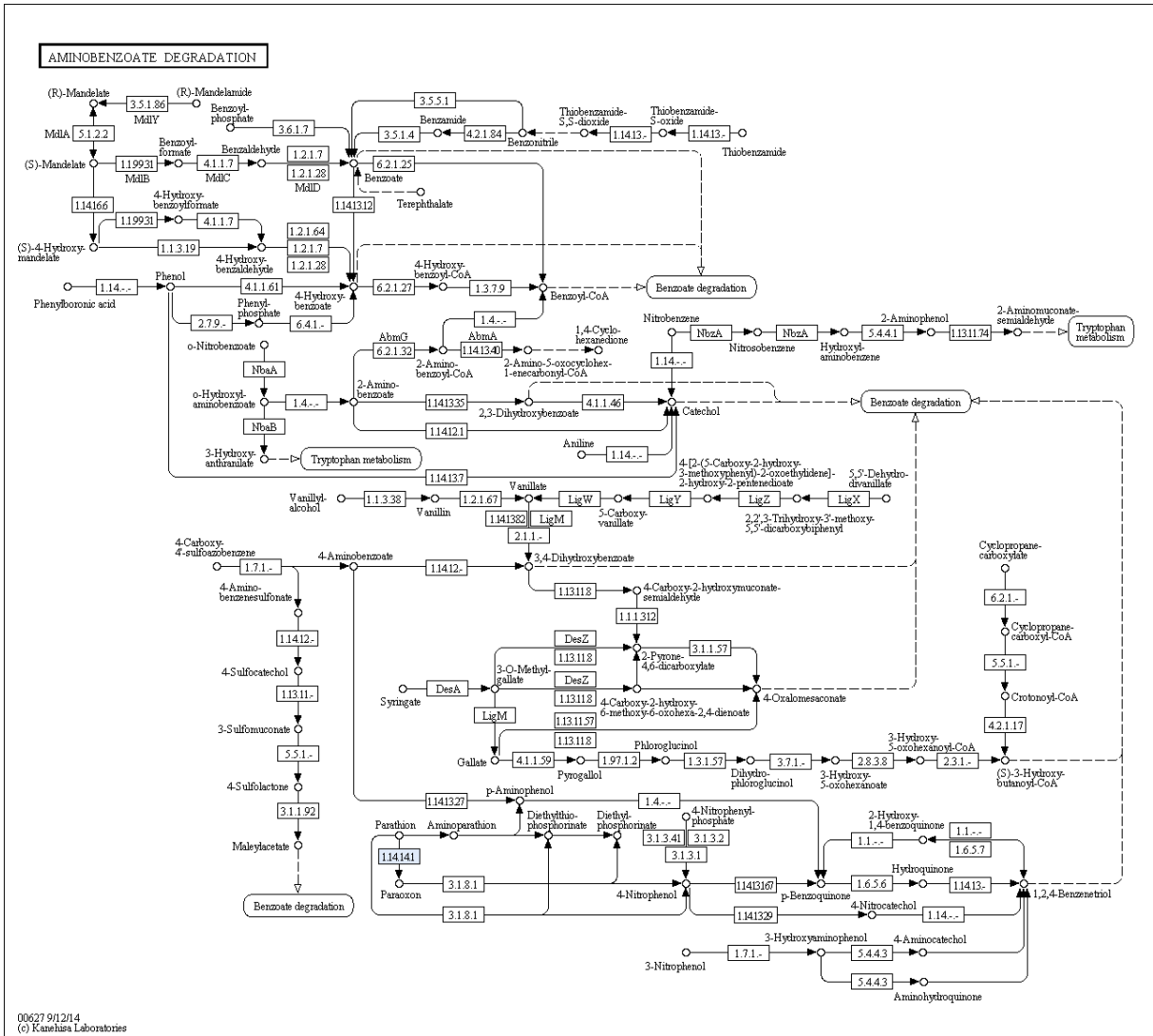
EK 5. 6USS kontrol verilerinden elde edilen yollar (Sayfa 147-156)



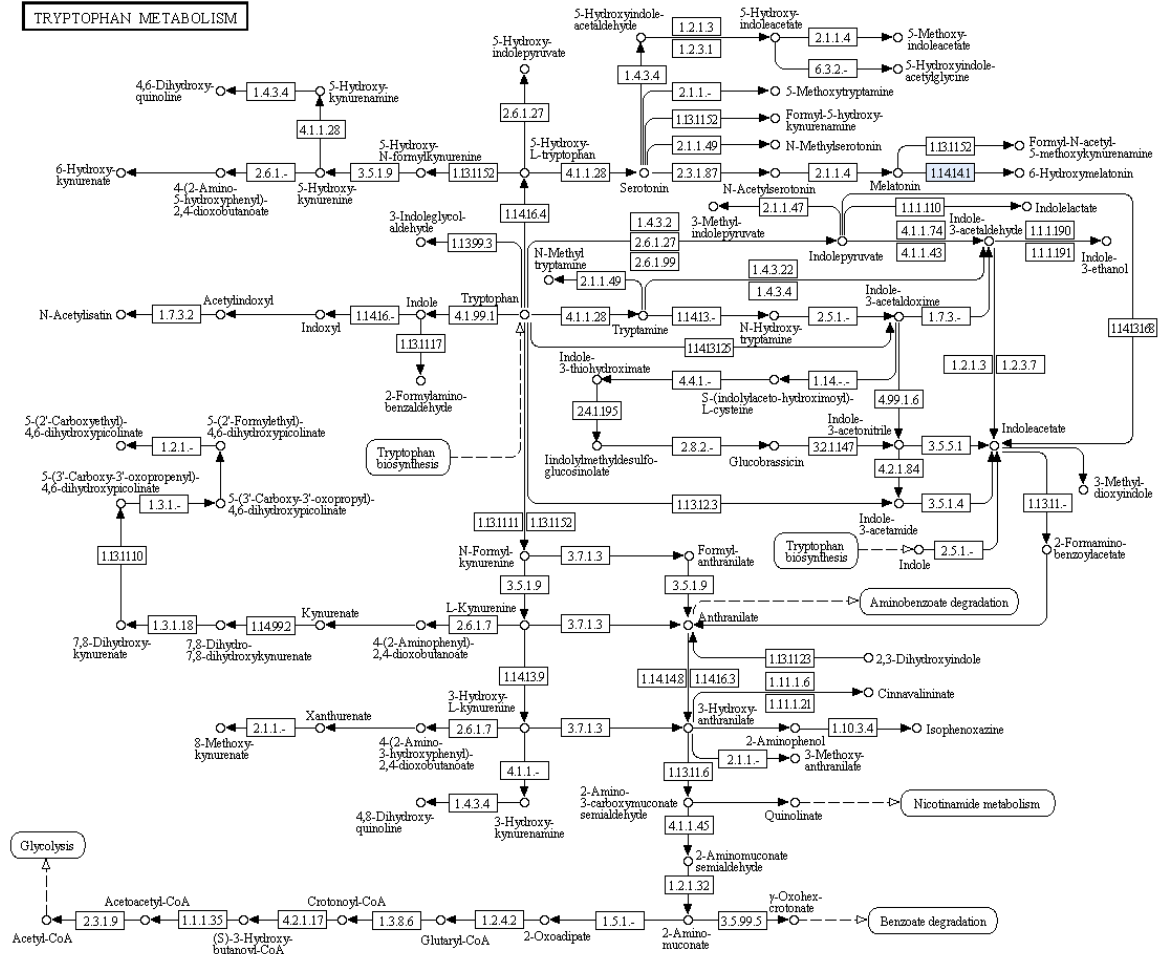
METABOLISM OF XENOBIOTICS BY CYTOCHROME P450



00980 11/11/13
© Kometani Laboratories

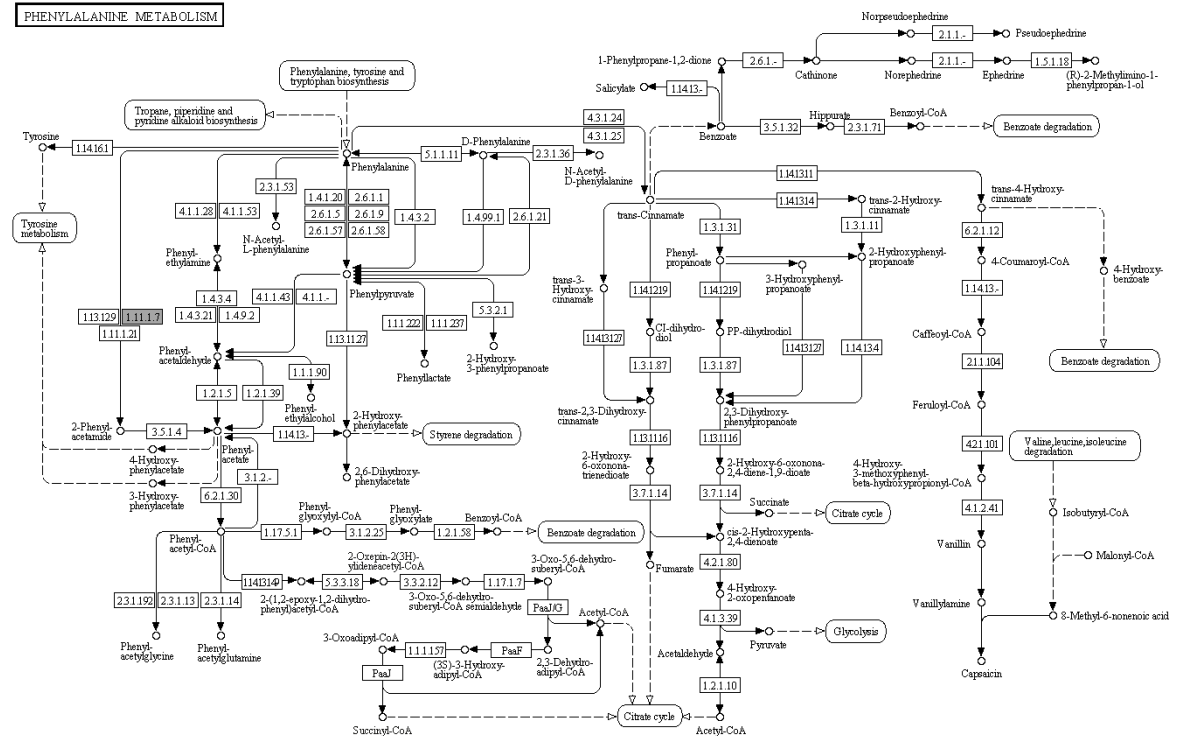


TRYPTOPHAN METABOLISM



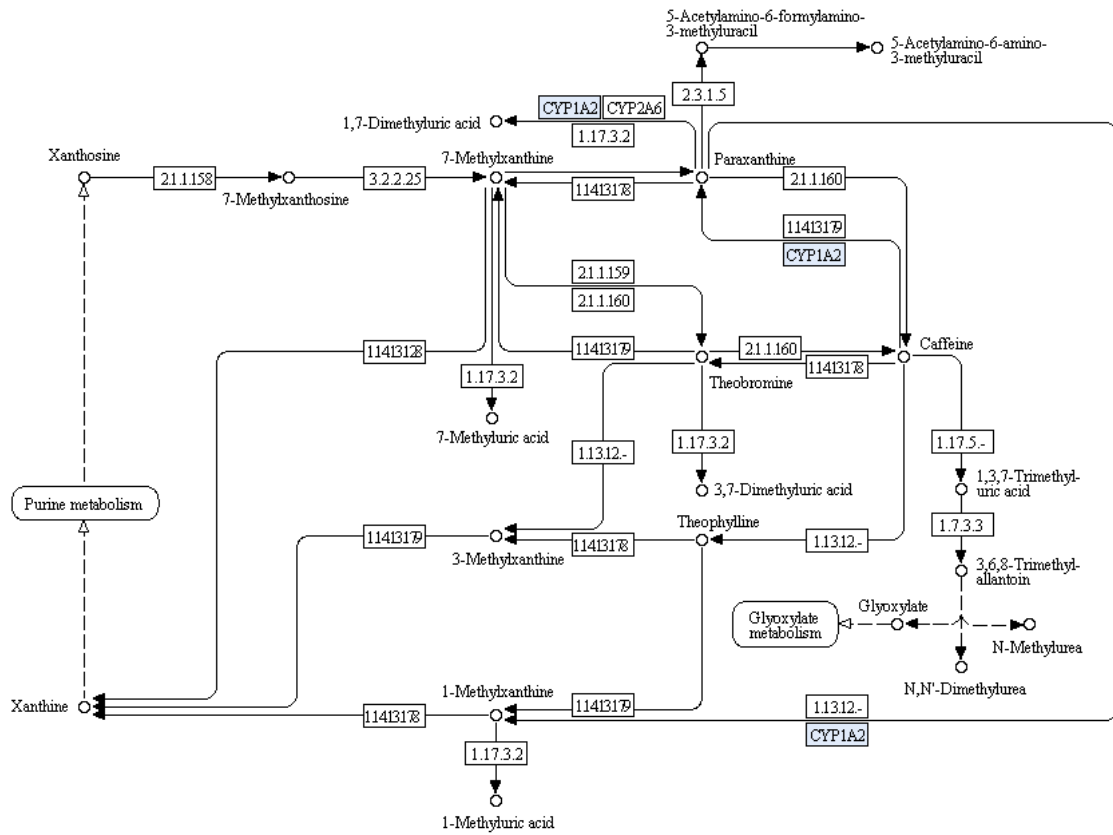
00380 6/3/14
(c) Kanehisa Laboratories

PHENYLALANINE METABOLISM



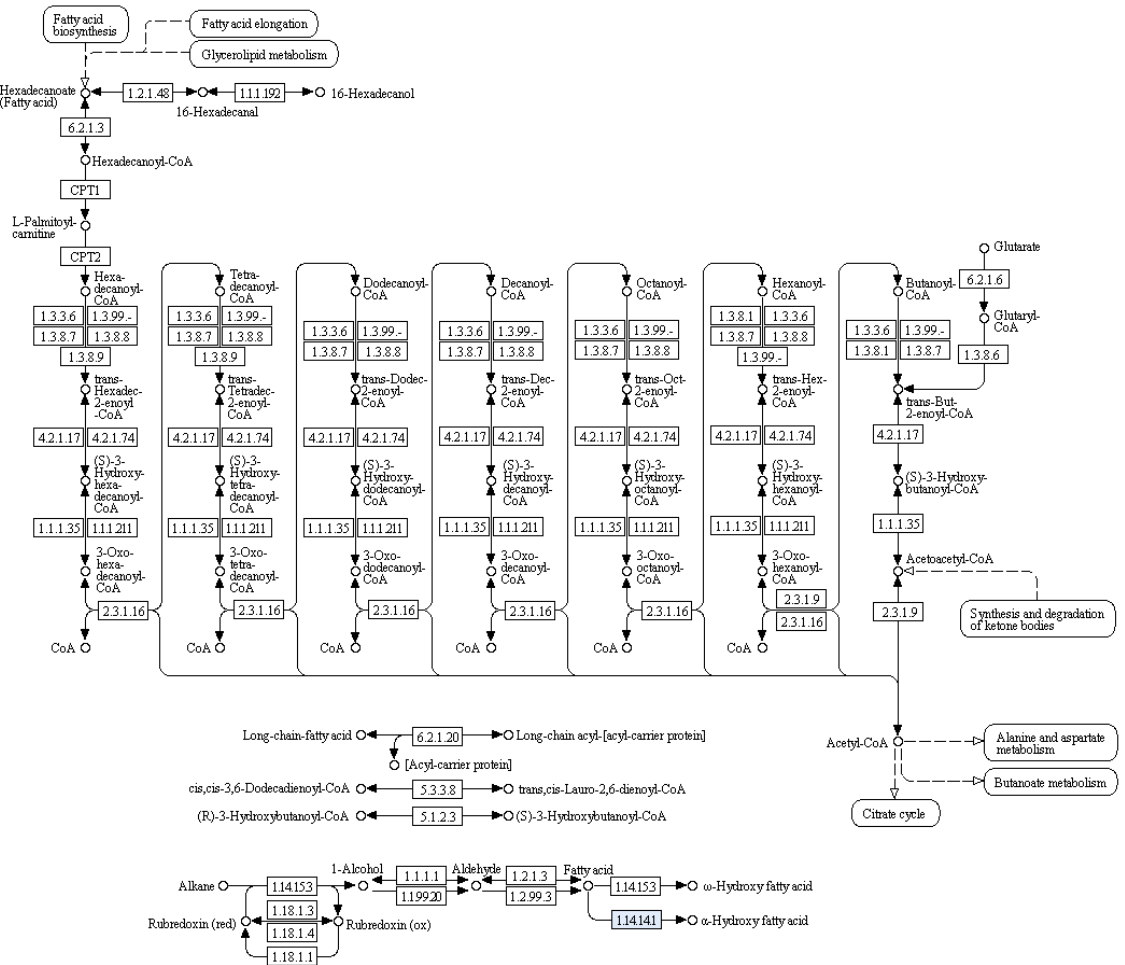
00360 7/8/14
(c) Kanehisa Laboratories

CAFFEINE METABOLISM



00232 10/22/13
 (c) Kanehisa Laboratories

FATTY ACID DEGRADATION



EK.6 MeJA uyguladıktan sonra 0USS ve 3USS bitkilerinde ToF-LC/MS analizi sonucu elde edilen alkaloid ölçümleri

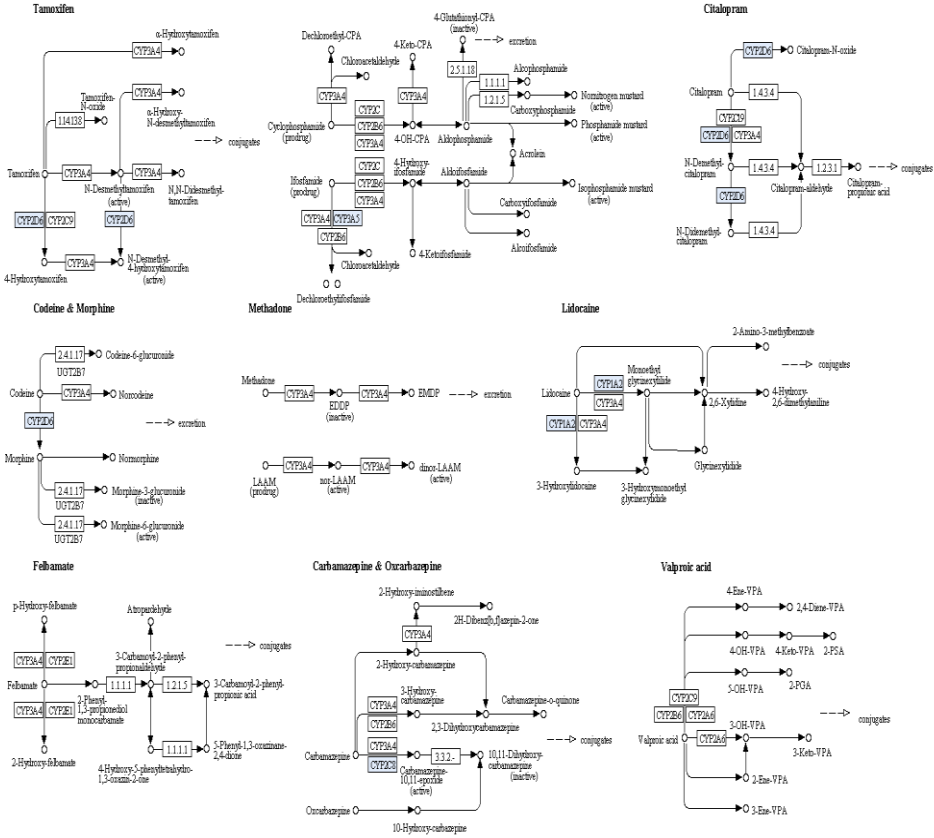
	Morfin	kodein	S- retikulün	tebain	laudanozin	noskapin	papaverin
TR_0h_K1	14,48	29,54	46,27	2535,51	29,80		
TR_0h_K2	607,84	126,78	65,39	1202,31	42,45	159,57	
TR_0h_K3	757,17	289,10	85,22	1163,41	23,72	314,72	
TR_0h_U1	606,30	135,24	85,72	1745,07	12,12	8,51	30,46
TR_0h_U2	442,62	118,04	13,82	16,89	18,00	10,53	
TR_0h_U3	989,54	239,54	101,81	1207,17	25,95	21,89	
	Morphine	Codeine	S- reticulün e	Thebain e	Laudanosin e	Noscapine	Papaverin e
TR_3h_K1	13,25	28,22	65,75	2329,28	38,29	8,04	
TR_3h_K2	86,46	69,74	0,00	14,89	3,35	260,33	103,53
TR_3h_K3	11,58	27,56	37,43	1710,55	26,01		
TR_3h_U1	189,71	61,35	0,00	293,50	21,32	7,63	
TR_3h_U2	204,31	84,89	19,00	58,37	3,14	445,35	
TR_3h_U3	13,30	29,40	23,08	1246,85	18,11	10,20	8,96
TR_3h_U4	59,52	62,32	10,78	237,75	8,50	312,27	

EK.7 9USS kontrol bitkisine ait okumalarda elde edilen elde edilen yolaklar (Sayfa 158-166)

Yolak	Dizi sayısı
Drug metabolism - cytochrome P450	43
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	43
Linoleic acid metabolism	43
Arachidonic acid metabolism	43
Aminobenzoate degradation	43
Steroid hormone biosynthesis	43
Caffeine metabolism	43
Fatty acid degradation	43
Tryptophan metabolism	43
Retinol metabolism	43
Galactose metabolism	23
Glycosaminoglycan degradation	23
Other glycan degradation	23
Glycosphingolipid biosynthesis - ganglio series	23
Sphingolipid metabolism	23
Oxidative phosphorylation	3
Glycine, serine and threonine metabolism	3
Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	3
Phenylalanine metabolism	1
beta-Lactam resistance	1
T cell receptor signaling pathway	1
Penicillin and cephalosporin biosynthesis	1
Phenylpropanoid biosynthesis	1

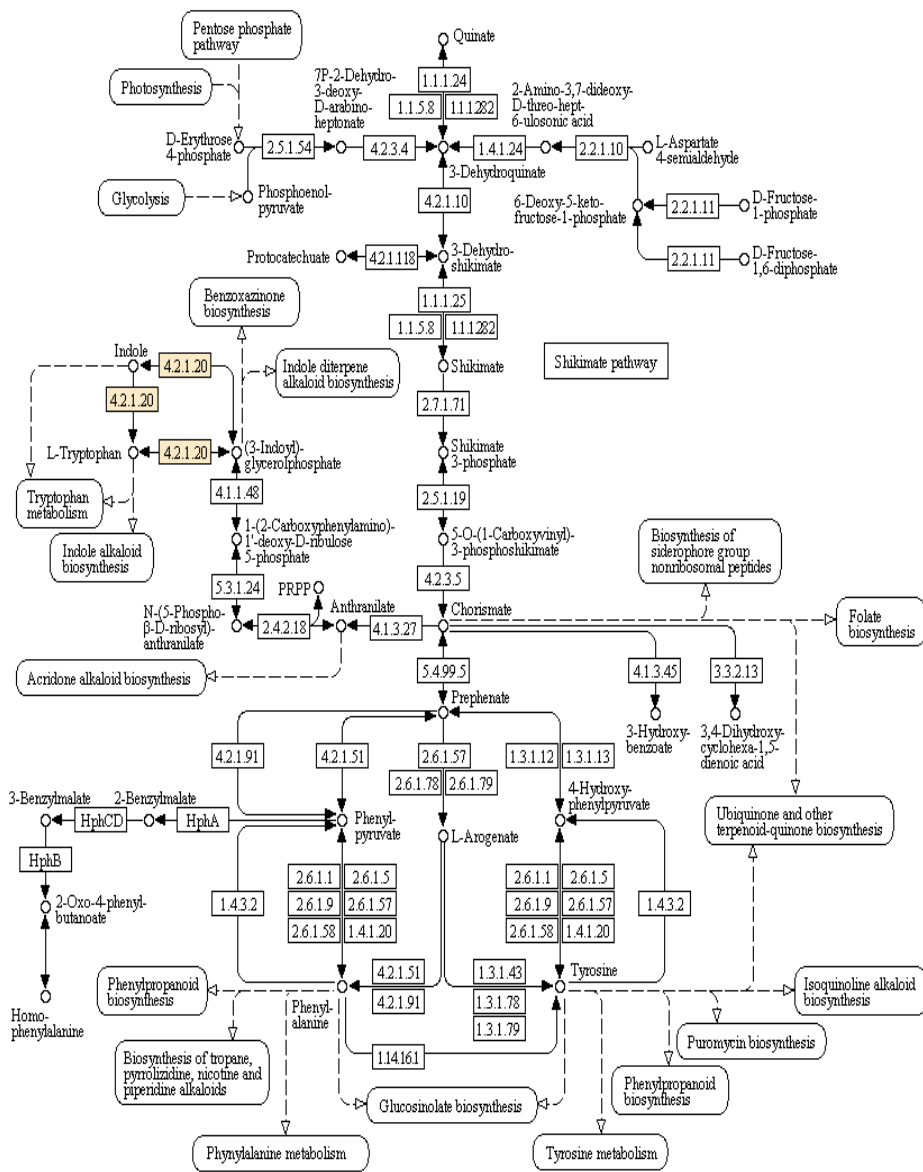
DRUG METABOLISM - CYTOCHROME P450

Cyclophosphamide & Ifosfamide



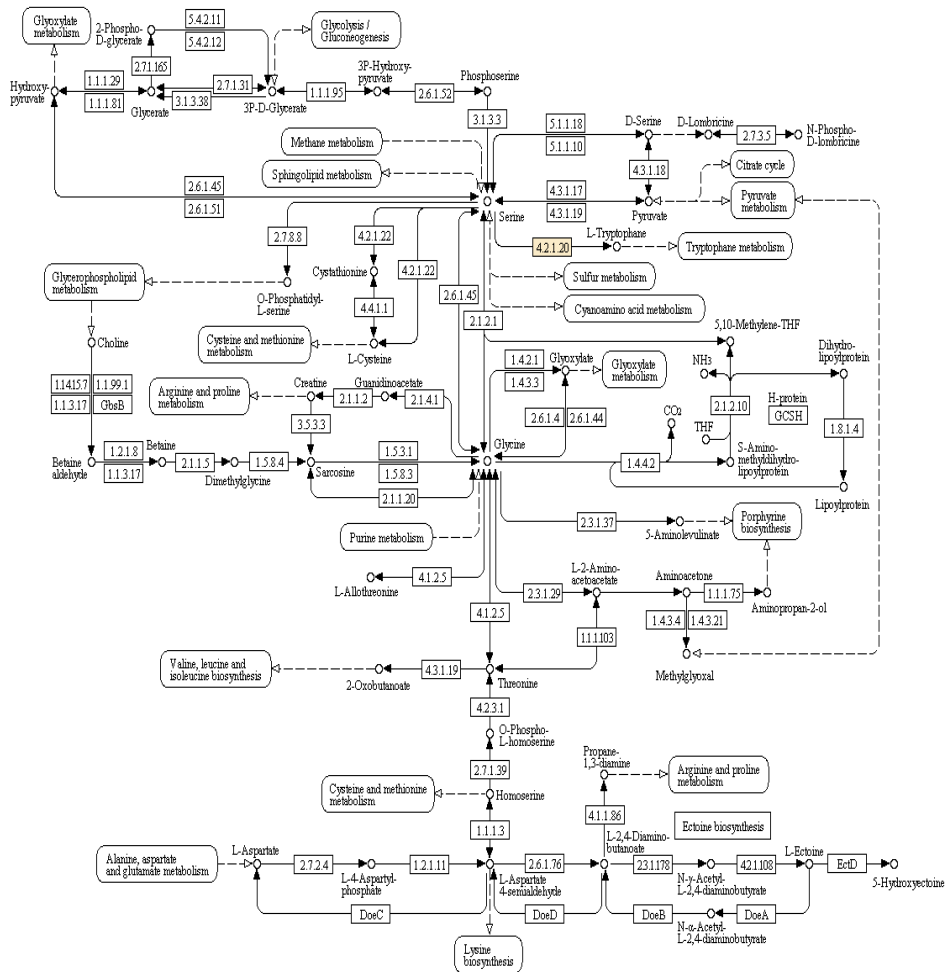
0092.111112
© Canadian Laboratories

PHENYLALANINE, TYROSINE AND TRYPTOPHAN BIOSYNTHESIS



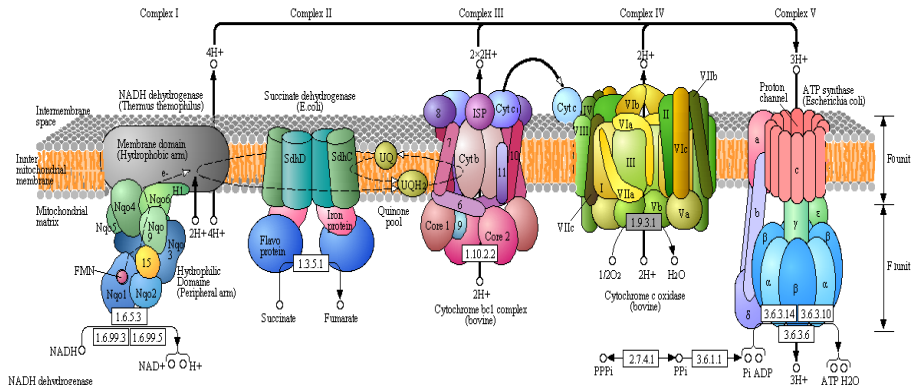
00400 7/3/14
 (c) Kanehisa Laboratories

GLYCINE, SERINE AND THREONINE METABOLISM



00260 3/6/14
 (c) Kanehisa Laboratories

OXIDATIVE PHOSPHORYLATION



NADH dehydrogenase

E	ND1	ND2	ND3	ND4	ND4L	ND5	ND6
E	Ndub1	Ndub2	Ndub3	Ndub4	Ndub5	Ndub6	Ndub7
B/A	NuoA	NuoB	NuoC	NuoD	NuoE	NuoF	NuoG
B/A	NdhC	NdhK	NdhJ	NdhH	NdhA	NdhI	NdhG
E	Ndau1	Ndau2	Ndau3	Ndau4	Ndau5	Ndau6	Ndau7
E	Ndub1	Ndub2	Ndub3	Ndub4	Ndub5	Ndub6	Ndub7

Succinate dehydrogenase / Fumarate reductase

E	SDHC	SDHD	SDHA	SDHB
B/A	SdhC	SdhD	SdhA	SdhB
E	FrbA	FrbB	FrbC	FrbD

Cytochrome c oxidase

E	COX10	COX3	COX1	COX2	COX4	COX5A	COX5B	COX6A	COX6B	COX6C	COX7A	COX7B	COX7C	COX8	COX11	COX12	COX17
B/A	CyoE	CyoD	CyoC	CyoB	CyoA	CoxD	CoxC	CoxA	CoxB	QoxD	QoxC	QoxB	QoxA				

00190 5/1/14
© Maxis Laboratories

Cytochrome b_l complex (bovine)

E	ISP	Cytb	Cyt1
B/A	Cor1	QCR2	QCR6
E		QCR7	QCR8

F₁-type ATPase (Bacteria)

alpha	beta	gamma	delta	epsilon
a	b	c		

F₁-type ATPase (Eukaryotes)

alpha	beta	gamma	delta	epsilon
a	b	c	d	e
f	g	h	j	k

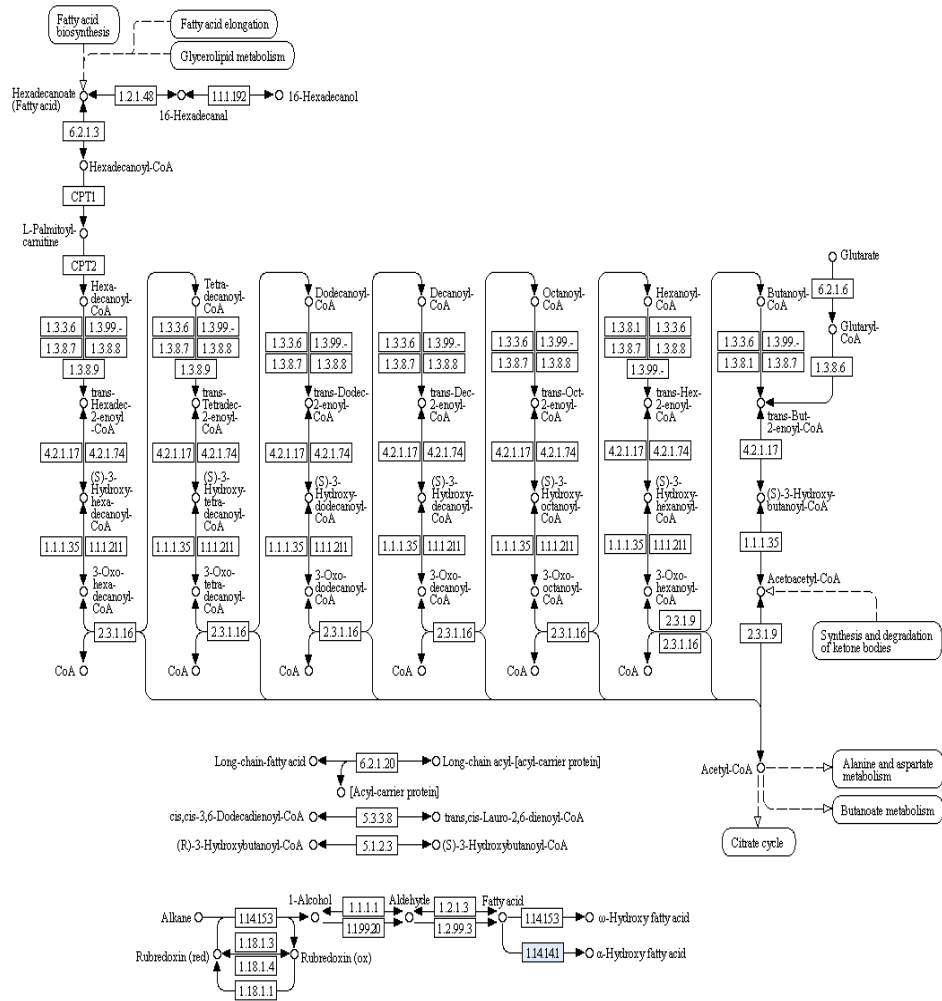
V₁/A-type ATPase (Bacteria, Archaea)

A	B	C	D	E	F	G/H
I	K					

V₁-type ATPase (Eukaryotes)

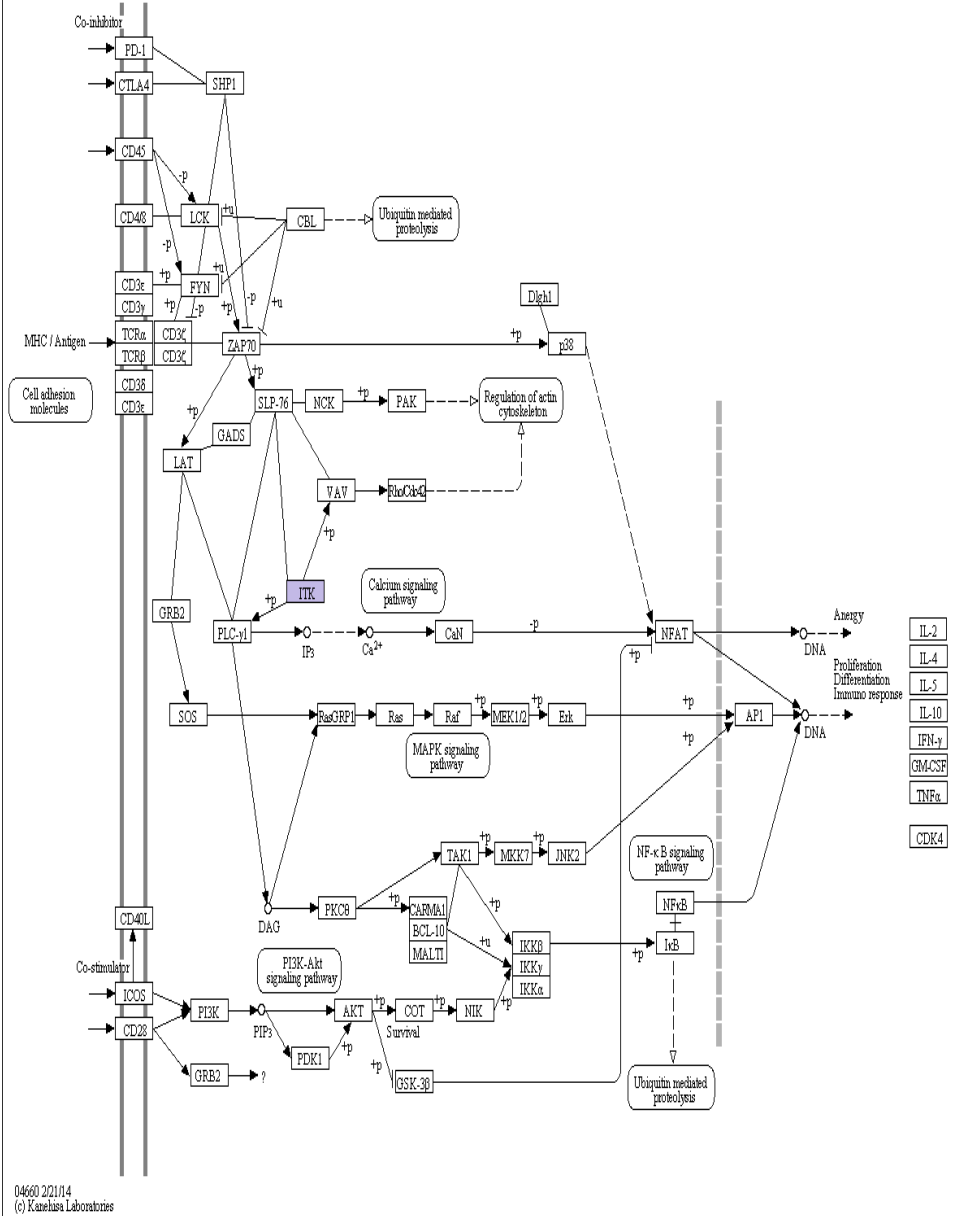
A	B	C	D	E	F	G	H
a	c	d	e	S1			

FATTY ACID DEGRADATION

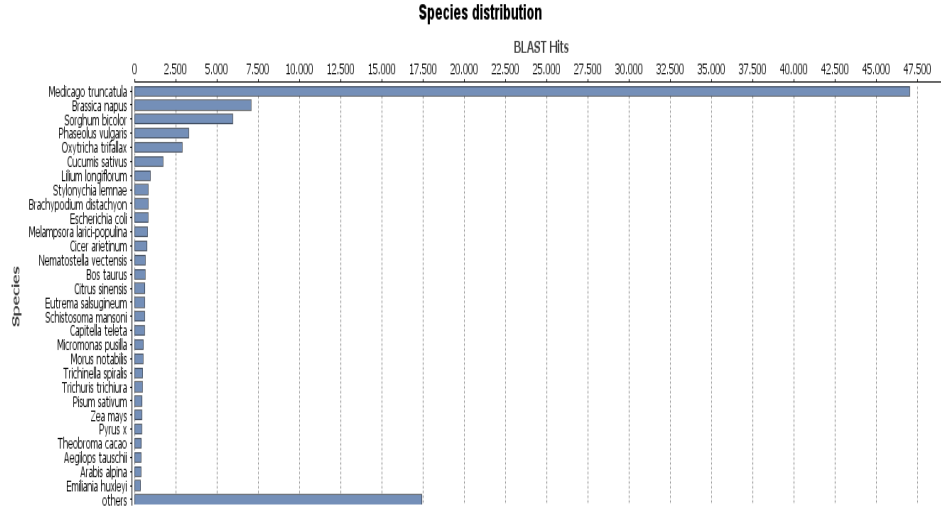


00071 5/13/14
© Kanehisa Laboratories

T CELL RECEPTOR SIGNALING PATHWAY



EK.8 9USS okumaların blast sonucunda benzerlik gösterdiği türler



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Behcet İNAL

Doğum Yeri: Şırnak

Doğum Tarihi: 01.01.1985

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu

Lise: Şırnak YDA Lisesi

Lisans: Akdeniz Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü-2009

Yüksek Lisans: Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü-2011

Doktora: Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü-2015

Yayınlar

1. Behcet Inal, Mine Turktas, Hakan Eren, Emre Ilhan, Sezer Okay, Mustafa Erayman, Turgay Unver Genome-Wide Fungal Stress Responsive miRNA Expression in Wheat (2014) 240 (6): 1287-1298 Planta
2. Cengiz Baloglu, Behcet Inal, Musa Kavas, Turgay Unver Diverse expression pattern of wheat transcription factors against abiotic stresses in wheat species (2014) 15;550(1):117-22 Gene
3. Mine Turktas, Behcet Inal, Sezer Okay, Emine Gulden Erkilic, Ekrem Dundar, Pilar Hernandez, Gabriel Dorado, Turgay Unver “Nutrition metabolism plays an important role in the alternate bearing of the olive tree (*Olea europaea* L.)” Plos One. 2013v.

Uluslararası ve ulusal kongrelerde sunulan poster bildirileri

1. Inal, B. and Toker C.(2010). Ecogeography and distribution of wild *Pisum* species in Turkey 5th International Food Legumes Research Conference (IFLRC V) and 7th European Conference on Grain Legumes (AEP VII). April, Antalya, Turkey.
2. Huriye Yanık, Behcet İNAL, Hatice Böke, Ekrem Dündar, Şakir Akgün, Turgay Ünver, Zeytinde Periyodisite ile ilişkili miRNA ların Yüksek Verimli Dizileme

- Metodu İle Ortaya Konulması. 2. Ulusal moleküler biyoloji ve biyoteknoloji kongresi Antalya, 2012
3. Mortaza Hajyzadeh, Aysun Çavuşoğlu, Melekber Sülüsoğlu, Huriye Yanık, Behcet İnal, Emine Gülten Erkılıç, Turgay Ünver KARAYEMİŞ (*Laurocerasus officinalis* Roemer Syn: *Prunus laurocerasus* L.) Tiplerinin SSR Tekniği İle Akrabalıklarının Ortaya Çıkarılması. 2. Ulusal moleküler biyoloji ve biyoteknoloji kongresi Antalya, 2012
 4. Turgay Ünver, Emine Gülten Erkılıç, Esmâ Özhüner, Huriye Yanık, Hatice Böke, Mortaza Hajyzadeh, Behcet İnal, Vahap Eldem İskender Parmaksız, Arif İpek, Sebahattin Özcan İşlevsel Genomün Yeni Oyuncusu; Bitki MikroRNA'ları. 2. Ulusal moleküler biyoloji ve biyoteknoloji kongresi Antalya, 2012
 5. İnal, B., Karaca, M., Aydın, A., İnce, A.G., 2012. Çeşitli Biyoenfimatik Araçlar Kullanılarak ITS1 ve ITS2 Gen Bölgelerine Ait Substitüsyon Modellerinin Belirlenmesi. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi (Uluslararası katılımlı). 3-7 Eylül, Ege Üniversitesi, İzmir-Türkiye.
 6. Demirhan, S., Hajyzadeh M., Beyaz R., Erkılıç E.G., İnal B., Yanık H., Böke H., Eldem V., Alagöz Y., Ünver T. (2011). *Agrobacterium* ile Bitkilere Gen transferi. Fatih Üniversitesi 2. Ulusal Biotek Öğrenci Kongresi İstanbul, Türkiye
 7. 2010 Ulusal Biyoloji Kongresi (Katılımcı)