



PROTEOMİK İLE HAŞHAŞTA MORFİN YOLAK ANALİZİ

Setenay AYKANAT

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TEMMUZ 2023

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Setenay AYKANAT

19/07/2023

PROTEOMİK İLE HAŞHAŞTA MORFİN YOLAK ANALİZİ
(Yüksek Lisans Tezi)

Setenay AYKANAT

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Temmuz 2023

ÖZET

Haşhaş (*Papaver somniferum* L.), birçok kullanım alanına sahip tıbbi ve endüstriyel bir bitki türüdür. En büyük önemi, kendisine özel ürettiği çok güçlü farmakolojik özelliklere sahip benzilizokinolin alkaloidlerden (BIA) kaynaklanmaktadır. Sekonder metabolitlerin yapısal olarak farklı bir grubunu oluşturan benzilizokinolin alkaloidleri (BIA), narkotik analjezik olarak kullanılan morfin ve kodein, anti-kanser ve anti-viral etki gösteren noskapin gibi birçok önemli alkaloidi içermektedir. Bu nedenle de haşhaş, ilaç endüstrisinde kullanılan doğal ürün kaynaklarından birisidir ve üzerine yapılacak çalışmalar büyük önem teşkil etmektedir. Günümüze kadar haşhaş bitkisi ile yapılan çalışmalar, belli bir aşama kaydetmiş olmasına rağmen haşhaşın farklı organlarındaki protein profillerinin, BIA metabolik yolları üzerine etkisi hakkında literatürde bir veri bulunmamaktadır. Bu çalışmada, Toprak Mahsulleri Ofisi tarafından geliştirilen yüksek morfin ve noskapin içeriğine sahip çeşitler ile kontrol çeşidi kullanılmış olup bitkinin gövdesinden ve kapsülünden protein izolasyonları yapılmıştır. Yapılan izolasyonlar sonucunda LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen protein profillerinin, gen ontolojileri ve yolak analizleri incelenmiş ardından biyoinformatik araçlar ile protein-protein etkileşimlerine bakılmıştır. Çalışmanın sonucunda BIA yollarında rol oynayan ortak ve farklı proteinler belirlenirken çeşitler arasındaki morfin ve noskapin içerik farklılıklarının farklı organlarda protein düzeyinde ne gibi değişiklikler meydana getirdiği ortaya çıkarılmıştır.

Bilim Kodu : 20309
Anahtar Kelimeler : Biyoinformatik, alkaloid, morfin, noskapin, proteomik
Sayfa Adedi : 193
Danışman : Prof. Dr. Mine TÜRKTAŞ

MORPHINE PATHWAY ANALYSIS IN POPPY WITH PROTEOMICS

(M. Sc. Thesis)

Setenay AYKANAT

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

July 2023

ABSTRACT

Poppy (*Papaver somniferum* L.) is a medicinal and industrial plant species with many uses. Its greatest importance is due to the benzylisoquinoline alkaloids (BIA) with very strong pharmacological properties which is produced specifically by poppy. Benzylisoquinoline alkaloids (BIA), which form a structurally different group of secondary metabolites, contain many important alkaloids such as morphine and codeine, which are used as narcotic analgesics, and noscapine, which have anti-cancer and anti-viral effects. For this reason, poppy is one of the natural product sources used in the pharmaceutical industry and studies on it are of great importance. Although studies with poppy plant have made a certain progress to date, there is no data in the literature about the effect of protein profiles in different organs of poppy on BIA metabolic pathways. In this study, cultivars with high morphine and noscapine content developed by Turkish Grain Board and control cultivar were used, and protein isolations were made from the stem and capsule of the plant. As a result of the isolations, gene ontologies and pathway analyzes of protein profiles obtained by LC-MS/MS method were examined and then protein-protein interactions were examined using bioinformatics tools. As a result of the study, while determining the common and different proteins that play a role in the BIA pathways, it was revealed what changes in the protein level in different organs were caused by the differences in morphine and noscapine content between the cultivars.

Science Code : 20309

Key Words : Bioinformatics, alkaloid, morphine, noscapine, proteomics

Page Number : 193

Supervisor : Prof. Dr. Mine Türkteş

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans sürecimin her aşamasında engin bilgi ve tecrübesiyle bana yol göstererek yardımlarını benden hiç esirgemeyen, değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Mine TÜRKTAS'a en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Laboratuvar çalışmalarında yardımını eksik etmeyen Arş. Gör. Zehra Kübra YILMAZ ve diğer tüm hocalarıma teşekkür ederim.

FYL-2022-7710 no'lu proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığına ve çalışmamızda kullandığımız haşhaş çeşitlerini bizlere temin ettiği için Toprak Mahsulleri Ofisi Genel Müdürlüğü, Haşhaş ve Alkaloid İşleri Dairesi Başkanlığına teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Hayatımın her anında benden desteğini ve sevgisini hiç esirgemeyen, babam Berhat AYKANAT'a, annem Nuray AYKANAT'a ve kardeşim Furkan AYKANAT'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xi
RESİMLERİN LİSTESİ	xvii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xviii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. Haşhaş (<i>Papaver somniferum</i> L.) ve Önemi.....	3
2.2. Benzilizokinolin Alkaloidleri (BIA)	4
2.3. Benzilizokinolin Alkaloidlerinin Biyosentezi	6
2.3.1. Morfin ve biyosentez yolağı	7
2.3.2. Noskapin ve biyosentez Yolağı.....	8
2.4. Omik Teknolojileri	8
2.4.1. Proteomik	9
2.4.2. Proteomik uygulamalar	9
2.5. Biyoinformatik.....	11
2.5.1. Proteomik verilerle biyoinformatik analizler	12
2.6. Haşhaş Bitkisinde Yapılmış Omik Çalışmalar	13
3. MATERYAL VE METOT.....	17
3.1. Bitki Materyali.....	17

	Sayfa
3.2. Protein İzolasyonu	18
3.3. LC-MS/MS Analizi	19
3.4. Biyoinformatik Analizler	19
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	21
4.1. Protein İzolasyonundan Elde Edilen Protein Miktarları	21
4.2. LC-MS/MS Analizi	22
4.3. Biyoinformatik Analiz Sonuçları	22
4.3.1. Farklılık gösteren proteinler	22
4.3.2. Karşılaştırmalı Analizler	23
4.3.3 Farklılık gösteren proteinlerin gen ontolojileri ve yolak analizleri	28
4.4. BIA Sentez Yolağında Görevli Proteinlerin İfade Düzeyleri.....	64
4.5. Protein-Protein Etkileşimleri	65
5. TARTIŞMA.....	73
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	85
KAYNAKLAR	87
EKLER.....	97
EK-1. Ofis 96 Gövde / Ofis 96 Kapsül Grubunun Ontoloji Analizinden Elde Edilen Terimler	98
EK-2. Ofis 96 Gövde / Ofis 96 Kapsül Grubunun Yolak Analizinden Elde Edilen Terimler	103
EK-3. Ofis 1 Gövde / Ofis 1 Kapsül Grubunun Ontoloji Analizinden Elde Edilen Terimler	106
EK-4. Ofis 1 Gövde / Ofis 1 Kapsül Grubunun Yolak Analizinden Elde Edilen Terimler	116
EK-5. Ofis NP Gövde / Ofis NP Kapsül Grubunun Ontoloji Analizinden Elde Edilen Terimler	121

Sayfa

EK-6. Ofis NP Gövde / Ofis NP Kapsül Grubunun Yolak Analizinden Elde Edilen Terimler.....	133
EK-7. Ofis 1 Gövde / Ofis 96 Gövde Grubunun Ontoloji Analizinden Elde Edilen Terimler.....	141
EK-8. Ofis 1 Gövde / Ofis 96 Gövde Grubunun Yolak Analizinden Elde Edilen Terimler	145
EK-9. Ofis NP Gövde / Ofis 96 Gövde Grubunun Ontoloji Analizinden Elde Edilen Terimler.....	147
EK-10. Ofis NP Gövde / Ofis 96 Gövde Grubunun Yolak Analizinden Elde Edilen Terimler.....	152
EK-11. Ofis 1 Gövde / Ofis NP Gövde Grubunun Ontoloji Analizinden Elde Edilen Terimler.....	155
EK-12. Ofis 1 Gövde / Ofis NP Gövde Grubunun Yolak Analizinden Elde Edilen Terimler.....	166
EK-13. Ofis 1 Kapsül / Ofis 96 Kapsül Grubunun Ontoloji Analizinden Elde Edilen Terimler.....	173
EK-14. Ofis 1 Kapsül / Ofis 96 Kapsül Grubunun Yolak Analizinden Elde Edilen Terimler.....	177
EK-15. Ofis NP Kapsül / Ofis 96 Kapsül Grubunun Ontoloji Analizinden Elde Edilen Terimler.....	179
EK-16. Ofis NP Kapsül / Ofis 96 Kapsül Grubunun Yolak Analizinden Elde Edilen Terimler.....	184
EK-17. Ofis 1 Kapsül / Ofis NP Kapsül Grubunun Ontoloji Analizinden Elde Edilen Terimler.....	187
EK-18. Ofis 1 Kapsül/Ofis NP Kapsül Grubunun Yolak Analizinden Elde Edilen Terimler	191
ÖZGEÇMİŞ	193

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.1. Protein İzolasyonundan Elde Edilen Protein Miktarları	21
Çizelge 4.2. Gen Ontoloji Analizleri ve Yolak Analizleri Sonuçlarının Genel Çerçevesi.....	28
Çizelge 4.3. Protein-Protein Etkileşim Ağlarında Ortaya Çıkan Etkileşim Çizgileri ve Açıklamaları	65
Çizelge 4.4. Protein-Protein Etkileşim Ağlarında Ortaya Çıkan Düğümler ve Açıklamaları	66
Çizelge 4.5. Ofis 1 Gövde / Ofis 96 Gövde Grubunun Protein-Protein Etkileşim Ağında Oluşturulan Kümeleri.....	68
Çizelge 4.6. Ofis NP Gövde / Ofis 96 Gövde Grubunun Protein-Protein Etkileşim Ağında Oluşturulan Kümeleri.....	70
Çizelge 4.7. Ofis 1 Gövde / Ofis NP Gövde Grubunun Protein-Protein Etkileşim Ağında Oluşturulan Kümeler	72

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1 Dünya Çapında Haşhaş Üretimi	4
Şekil 2.2. BIA Yolağı	6
Şekil 2.3. Morfin Alkaloidinin Kimyasal Yapısı	7
Şekil 2.3. Noskabin Alkaloidinin Kimyasal Yapısı	8
Şekil 4.1. Farklılık Gösteren Proteinlere Ait Heatmap	23
Şekil 4.2. Organ Kategorilerinde Farklılık Gösteren Protein Sayısı.....	24
Şekil 4.3. Çeşit Gruplarında Farklılık Gösteren Protein Sayısı	25
Şekil 4.4. Gruplarda Farklılık Gösteren Proteinlere Ait Heatmap.....	28
Şekil 4.5. Ofis 96 Gövde / Ofis 96 Kapsül Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Biyolojik Süreçlerine (BS) Ait Bazı Terimler	29
Şekil 4.6. Ofis 96 Gövde / Ofis 96 Kapsül Grubunda İfadesi Gövde ve Kapsülde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Biyolojik Süreç Terimleri.	29
Şekil 4.7. Ofis 96 Gövde / Ofis 96 Kapsül Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Moleküler Fonksiyonlarına (MF) Ait Bazı Terimler	30
Şekil 4.8. Ofis 96 Gövde / Ofis 96 Kapsül Grubunda İfadesi Gövde ve Kapsülde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Moleküler Fonksiyon Terimleri.....	30
Şekil 4.9. Ofis 96 Gövde / Ofis 96 Kapsül Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Hücrel Bileşenleri (HB) Ait Bazı Terimler	31
Şekil 4.10. Ofis 96 Gövde / Ofis 96 Kapsül Grubunda İfadesi Gövde ve Kapsülde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Hücrel Bileşen Terimleri	31
Şekil 4.11. Ofis 96 Gövde / Ofis 96 Kapsül Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Yolak Analizlerine Ait Bazı Terimler.....	32
Şekil 4.12. Ofis 96 Gövde / Ofis 96 Kapsül Grubunda İfadesi Gövde ve Kapsülde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Yolak Terimleri.....	32
Şekil 4.13. Ofis 1 Gövde / Ofis 1 Kapsül Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Biyolojik Süreçlerine(BS) Ait Bazı Terimler	33
Şekil 4.14. Ofis 1 Gövde / Ofis 1 Kapsül Grubunda İfadesi Gövde ve Kapsülde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Biyolojik Süreç Terimleri	33

Şekil	Sayfa
Şekil 4.15. Ofis 1 Gövde / Ofis 1 Kapsül Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Moleküler Fonksiyonlarına (MF) Ait Bazı Terimler	33
Şekil 4.16. Ofis 1 Gövde / Ofis 1 Kapsül Grubunda İfadesi Gövde ve Kapsülde Ayır Ayır Artan Proteinlerin Bazı Moleküler Fonksiyon Terimleri.....	34
Şekil 4.17. Ofis 1 Gövde / Ofis 1 Kapsül Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Hücreşel Bileşenleri (HB) Ait Bazı Terimler	34
Şekil 4.18. Ofis 1 Gövde / Ofis 1 Kapsül Grubunda İfadesi Gövde ve Kapsülde Ayır Ayır Artan Proteinlerin Bazı Hücreşel Bileşen Terimleri	35
Şekil 4.19. Ofis 1 Gövde / Ofis 1 Kapsül Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Yolak Analizlerine Ait Bazı Terimler	35
Şekil 4.20. Ofis 1 Gövde / Ofis 1 Kapsül Grubunda İfadesi Gövde ve Kapsülde Ayır Ayır Artan Proteinlerin Bazı Yolak Terimleri	36
Şekil 4.21. Ofis NP Gövde / Ofis NP Kapsül Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Biyolojik Süreçlerine (BS) Ait Bazı Terimler	36
Şekil 4.22. Ofis NP Gövde / Ofis NP Kapsül Grubunda İfadesi Gövde ve Kapsülde Ayır Ayır Artan Proteinlerin Bazı Biyolojik Süreç Terimleri	37
Şekil 4.23. Ofis NP Gövde / Ofis NP Kapsül Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Moleküler Fonksiyonlarına (MF) Ait Bazı Terimler	37
Şekil 4.24. Ofis NP Gövde / Ofis NP Kapsül Grubunda İfadesi Gövde ve Kapsülde Ayır Ayır Artan Proteinlerin Bazı Moleküler Fonksiyon Terimleri.....	38
Şekil 4.25. Ofis NP Gövde / Ofis NP Kapsül Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Hücreşel Bileşenleri (HB) Ait Bazı Terimler	38
Şekil 4.26. Ofis NP Gövde / Ofis NP Kapsül Grubunda İfadesi Gövde ve Kapsülde Ayır Ayır Artan Proteinlerin Bazı Hücreşel Bileşen Terimleri	39
Şekil 4.27. Ofis NP Gövde / Ofis NP Kapsül Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Yolak Analizlerine Ait Bazı Terimler	39
Şekil 4.28. Ofis NP Gövde / Ofis NP Kapsül Grubunda İfadesi Gövde ve Kapsülde Ayır Ayır Artan Proteinlerin Bazı Yolak Terimleri	40
Şekil 4.29. Ofis 1 Gövde / Ofis 96 Gövde Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Biyolojik Süreçlerine (BS) Ait Bazı Terimler	40
Şekil 4.30. Ofis 1 Gövde / Ofis 96 Gövde Grubunda İfadesi Çeşitlerde Ayır Ayır Artan Proteinlerin Bazı Biyolojik Süreç Terimleri	41

Şekil	Sayfa
Şekil 4.31. Ofis 1 Gövde / Ofis 96 Gövde Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Moleküler Fonksiyonlarına (MF) Ait Bazı Terimler.....	41
Şekil 4.32. Ofis 1 Gövde / Ofis 96 Gövde Grubunda İfadesi Çeşitlerde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Moleküler Fonksiyon Terimleri.....	42
Şekil 4.33. Ofis 1 Gövde / Ofis 96 Gövde Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Hücrel Bileşenleri (HB) Ait Bazı Terimler	42
Şekil 4.34. Ofis 1 Gövde / Ofis 96 Gövde Grubunda İfadesi Çeşitlerde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Hücrel Bileşen Terimleri.....	43
Şekil 4.35. Ofis 1 Gövde / Ofis 96 Gövde Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Yolak Analizlerine Ait Bazı Terimler.....	43
Şekil 4.36. Ofis 1 Gövde / Ofis 96 Gövde Grubunda İfadesi Çeşitlerde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Yolak Terimleri	44
Şekil 4.37. Ofis NP Gövde / Ofis 96 Gövde Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Biyolojik Süreçlerine (BS) Ait Bazı Terimler	44
Şekil 4.38. Ofis NP Gövde / Ofis 96 Gövde Grubunda İfadesi Çeşitlerde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Biyolojik Süreç Terimleri.....	45
Şekil 4.39. Ofis NP Gövde / Ofis 96 Gövde Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Moleküler Fonksiyonlarına (MF) Ait Bazı Terimler	45
Şekil 4.40. Ofis NP Gövde / Ofis 96 Gövde Grubunda İfadesi Çeşitlerde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Moleküler Fonksiyon Terimleri.....	46
Şekil 4.41. Ofis NP Gövde / Ofis 96 Gövde Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Hücrel Bileşenleri (HB) Ait Bazı Terimler	46
Şekil 4.42. Ofis NP Gövde / Ofis 96 Gövde Grubunda İfadesi Çeşitlerde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Hücrel Bileşen Terimleri.....	47
Şekil 4.43. Ofis NP Gövde / Ofis 96 Gövde Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Yolak Analizlerine Ait Bazı Terimler.....	47
Şekil 4.44. Ofis NP Gövde / Ofis 96 Gövde Grubunda İfadesi Çeşitlerde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Yolak Terimleri	48
Şekil 4.45. Ofis 1 Gövde / Ofis NP Gövde Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Biyolojik Süreçlerine (BS) Ait Bazı Terimler	48
Şekil 4.46. Ofis 1 Gövde / Ofis NP Gövde Grubunda İfadesi Çeşitlerde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Biyolojik Süreç Terimleri.....	49

Şekil	Sayfa
Şekil 4.47. Ofis 1 Gövde / Ofis NP Gövde Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Moleküler Fonksiyonlarına (MF) Ait Bazı Terimler	49
Şekil 4.48. Ofis 1 Gövde / Ofis NP Gövde Grubunda İfadesi Çeşitlerde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Moleküler Fonksiyon Terimleri	50
Şekil 4.49. Ofis 1 Gövde / Ofis NP Gövde Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Hücrel Bileşenleri (HB) Ait Bazı Terimler	50
Şekil 4.50. Ofis 1 Gövde / Ofis NP Gövde Grubunda İfadesi Çeşitlerde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Hücrel Bileşen Terimleri	51
Şekil 4.51. Ofis 1 Gövde / Ofis NP Gövde Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Yolak Analizlerine Ait Bazı Terimler.....	51
Şekil 4.52. Ofis 1 Gövde / Ofis NP Gövde Grubunda İfadesi Çeşitlerde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Yolak Terimleri	52
Şekil 4.53. Ofis 1 Kapsül / Ofis 96 Kapsül Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Biyolojik Süreçlerine(BS) Ait Bazı Terimler	52
Şekil 4.54. Ofis 1 Kapsül / Ofis 96 Kapsül Grubunda İfadesi Çeşitlerde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Biyolojik Süreç Terimleri.....	53
Şekil 4.55. Ofis 1 Kapsül / Ofis 96 Kapsül Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Moleküler Fonksiyonlarına (MF) Ait Bazı Terimler	53
Şekil 4.56. Ofis 1 Kapsül / Ofis 96 Kapsül Grubunda İfadesi Çeşitlerde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Moleküler Fonksiyon Terimleri.....	54
Şekil 4.57. Ofis 1 Kapsül / Ofis 96 Kapsül Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Hücrel Bileşenleri (HB) Ait Bazı Terimler	54
Şekil 4.58. Ofis 1 Kapsül / Ofis 96 Kapsül Grubunda İfadesi Çeşitlerde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Hücrel Bileşen Terimleri.....	55
Şekil 4.59. Ofis 1 Kapsül / Ofis 96 Kapsül Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Yolak Analizlerine Ait Bazı Terimler.....	55
Şekil 4.60. Ofis 1 Kapsül / Ofis 96 Kapsül Grubunda İfadesi Çeşitlerde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Yolak Terimleri	56
Şekil 4.61. Ofis NP Kapsül / Ofis 96 Kapsül Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Biyolojik Süreçlerine(BS) Ait Bazı Terimler.....	56
Şekil 4.62. Ofis NP Kapsül / Ofis 96 Kapsül Grubunda İfadesi Çeşitlerde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Biyolojik Süreç Terimleri	57

Şekil	Sayfa
Şekil 4.63. Ofis NP Kapsül / Ofis 96 Kapsül Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Moleküler Fonksiyonlarına (MF) Ait Bazı Terimler.....	57
Şekil 4.64. Ofis NP Kapsül / Ofis 96 Kapsül Grubunda İfadesi Çeşitlerde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Moleküler Fonksiyon Terimleri	58
Şekil 4.65. Ofis NP Kapsül / Ofis 96 Kapsül Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Hücrel Bileşenleri (HB) Ait Bazı Terimler	58
Şekil 4.66. Ofis NP Kapsül / Ofis 96 Kapsül Grubunda İfadesi Çeşitlerde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Hücrel Bileşen Terimleri	59
Şekil 4.67. Ofis NP Kapsül/Ofis 96 Kapsül Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Yolak Analizlerine Ait Bazı Terimler	59
Şekil 4.68. Ofis NP Kapsül / Ofis 96 Kapsül Grubunda İfadesi Çeşitlerde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Yolak Terimleri	60
Şekil 4.69. Ofis 1 Kapsül / Ofis NP Kapsül Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Biyolojik Süreçlerine(BS) Ait Bazı Terimler.....	60
Şekil 4.70. Ofis 1 Kapsül / Ofis NP Kapsül Grubunda İfadesi Çeşitlerde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Biyolojik Süreç Terimleri	61
Şekil 4.71. Ofis 1 Kapsül / Ofis NP Kapsül Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Moleküler Fonksiyonlarına (MF) Ait Bazı Terimler	61
Şekil 4.72. Ofis 1 Kapsül / Ofis NP Kapsül Grubunda İfadesi Çeşitlerde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Moleküler Fonksiyon Terimleri	62
Şekil 4.73. Ofis 1 Kapsül / Ofis NP Kapsül Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Hücrel Bileşenleri (HB) Ait Bazı Terimler	62
Şekil 4.74. Ofis 1 Kapsül / Ofis NP Kapsül Grubunda İfadesi Çeşitlerde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Hücrel Bileşen Terimleri	63
Şekil 4.75. Ofis 1 Kapsül / Ofis NP Kapsül Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Yolak Analizlerine Ait Bazı Terimler	63
Şekil 4.76. Ofis 1 Kapsül / Ofis NP Kapsül Grubunda İfadesi Çeşitlerde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Yolak Terimleri	63
Şekil 4.77. Farklılık Gösteren 1212 Proteinin Etkileşim Ağı	67
Şekil 4.78. Ofis 1 Gövde / Ofis 96 Gövde Karşılaştırmasının Protein-Protein Etkileşim Ağı	68

Şekil	Sayfa
Şekil 4.79. Ofis NP Gövde / Ofis 96 Gövde Karşılaştırmasının Protein-Protein Etkileşim Ağı.....	69
Şekil 4.80. Ofis 1 Gövde / Ofis NP Gövde Karşılaştırmasının Protein-Protein Etkileşim Ağı	71

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. Toprak Mahsulleri Ofisi (TMO) Afyon Alkaloidleri Tarlasında Haşhaşın Genel Görünümü.....	3
Resim 3.1. TMO Afyon Alkaloidleri Fabrikasının Haşhaş Tarlası.....	18
Resim 3.2. -80°C'den Alınan Örneklerin Sıvı Azot ile Toz Haline Getirilmesi.....	18

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklamalar

°C	Santigrat Derece
nm	Nanometre
ml	Mililitre
rpm	Dakikadaki devir sayısı
µl	Mikrolitre
mg	Miligram
µg	Mikrogram

Kısaltmalar

Açıklamalar

4'OMT	3'-Hidroksi-N-metilkoklaurin 4'-O-metiltransferaz (30-Hydroxy-N-methylcoclaurine 40 -hydroxylase)
6OMT	Norkoklaurin 6-O metiltransferaz (Norcoclaurine 6-O-methyltransferase)
AT1	1,13-Dihidroksi-N-metilkanadin 13-O-asetiltransferaz (1,13-Dihydroxy-N-methylcanadine 13-O-acetyltransferase)
BBE	Berberin Köprü Enzimi (Berbrine bridge enzyme)
BIA	Benzilizokinolin Alkaloid
BS	Biyolojik Süreç
CAS	Kanadin Sentaz (Canadine synthase)
CNMT	Koklaurin N-metiltransferaz (Coclaurine N-methyltransferase)
CODM	Kodein O-demetilaz (Codeine O-demethylase)
COR	Kodeinon Redüktaz (Codeinone reductase)
FASP	Filtre Destekli Numune Hazırlama
FDR	Yanlış Keşif Oranı (False Discovery Rate)
GO	Gen Ontolojisi

Kısaltmalar**Açıklamalar****HB**

Hücresel Bileşen

LC-MS/MS

Sıvı Kromatografisi/Kütle Spektrometresi

MF

Moleküler Fonksiyon

NCS

Norkoklaurin Sentaz (Norcoclaurine Synthase)

NISO

Neopinon izomeraz (Neopinone Isomerase)

NOS

Noskapin sentaz (Noscapine Synthase)

OMT2:OMT3

4'-O-desmetil-3-O-asetilpapaveroksin 4'-O-metiltransferaz (4' -O-desmethyl-3-O-acetyl-papaveroxine 4' -O-methyltransferase)

PMSF

Fenilmetilsülfonil Florür

SalAT

Salutaridinol 7-O-asetiltransferaz (Salutaridinol 7-O-acetyltransferase)

SalR

Salutaridin Redüktaz (Salutaridine Reductasei)

SalSyn

Salutaridin Sentaz (Salutaridine Synthase)

SOMT

Scoulerine 9-O-metiltransferaz (Scoulerine 9-O-methyltransferase)

T6ODM

Tebain 6-O-demetilaz (Thebaine 6-O-demethylase)

TMO

Toprak Mahsulleri Ofisi

TNMT

Tetrahidroprotoberberin N-metiltransferaz (Tetrahydroprotoberberine N-methyltransferase)

TYDC

Tirozin Dekarboksilaz (Tyrosine Decarboxylase)

1. GİRİŞ

Haşhaş (*Papaver somniferum L.*) Rhodales takımının ülkemizde 28 türü bulunan *Papaveraceae* familyasında yer alan ve günümüzde birçok farklı kullanım alanına sahip tıbbi ve endüstriyel bir bitki türüdür. Endüstriyel açıdan tohumlardan çıkartılan yağ gıdada, kalan küspesi hayvan yemi olarak kullanılırken kapsüllerinde bulunan alkaloidler tıbbi amaçlar için ilaç sanayisinde kullanılmaktadır. Dünyada haşhaş ekimi Birleşmiş Milletler Teşkilatı denetimi altındadır ve Türkiye, Hindistan, Fransa, Avustralya, İspanya, Macaristan olmak üzere 6 yasal ana üreticisi vardır. Türkiye, 13.500 hektarlık ekim alanıyla üreticiler arasında birinci sırada yer almaktadır (Bulut vd., 2020).

Dünya çapında ekonomik değeri yüksek olan haşhaşın en büyük önemi ürettikleri bitkilere özgü sekonder metabolitlerin yapısal olarak farklı bir grubunu oluşturan benzilizokinolin alkaloidlerinden (BIA) gelmektedir (Demirci, 2016).

Haşhaş, benzilizokinolin alkaloidleri (BIA) olarak bilinen narkotik analjezik etki gösteren morfin ve kodein, anti-mikrobiyal özellikleri olan sanguinarin, ağrı kesici olarak kullanılan tebain, anti-kanser ve anti-viral özelliği gösteren noskapin gibi birçok önemli alkaloid üretmektedir (Singh vd., 2019). Bu nedenlerle de haşhaş ilaç endüstrisi tarafından kullanılan en önemli doğal ürün kaynaklarından birisidir (Bulut vd. 2020).

Günümüze kadar haşhaş üzerine moleküler açıdan yapılan çalışmaların çoğu transkript seviyesinde olup birçok gen ve fonksiyon tespit edilmiştir. Fakat protein seviyesinde yapılan çalışmalar az sayıdadır. Protein üzerine yapılan bu çalışmalarda çoğunlukla hücre kültürü üzerine yapılmıştır (Decker vd., 2000, Desgagné-Penix vd., 2010, Gürkok vd., 2015, Zulak vd., 2009). Dolayısıyla direkt haşhaş bitkisinin protein içeriğine ait bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada kontrol grubu olarak morfin ve noskapin içeriği düşük *Papaver somniferum* Ofis 96 çeşidi, morfin içeriği yüksek Ofis 1 çeşidi ve noskapin içeriği yüksek Ofis NP çeşidine ait BIA biyosentezinin gerçekleştiği gövdeden ve alkaloidlerin depolandığı kapsülden örnekler alınarak protein izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen örneklerden LC-MS/MS tekniği ile proteom verileri elde edildikten sonra bu verilerin çeşitli

biyoinformatik araçlar ile yolak analizleri yapılmıştır.

Bu çalışmada haşhaş çeşitlerinin BIA içeriklerindeki farklılıkların protein seviyesine nasıl yansıdığı sorusuna cevap aranmıştır. İlk defa yapılan bu çalışmanın sonucunda BIA içerikleri üzerinde etkili olduğu belirlenen proteinlerin tespiti ile halen tam olarak çözümlenmemiş olan BIA yolağı aydınlatılmaya çalışılmıştır. Böylece daha ileri düzey fonksiyonel analizler gibi birçok farklı çalışma için de veri elde edilmiştir. Ayrıca ülkemiz tarafından geliştirilen bu çeşitlerin kullanımları ile ülke kaynaklarının değerlendirilmesi ve markalaşmasına da katkı sağlanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

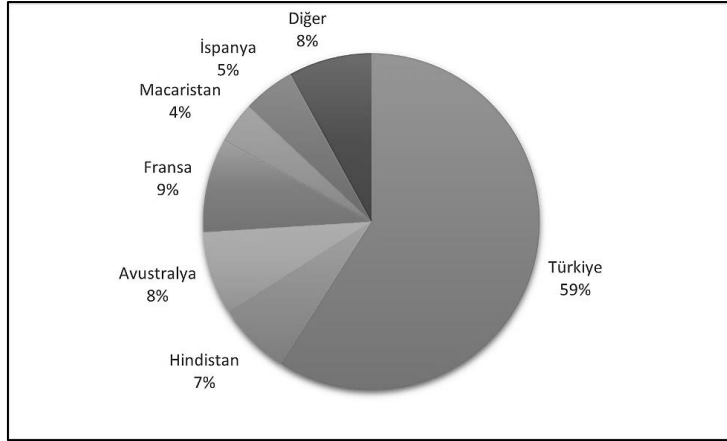
2.1 Haşhaş (*Papaver somniferum* L.) ve Önemi

Eski çağlardan beri bilinen Papaveraceae familyası, 28 cins ve teşhisi yapılmış yaklaşık 250 tür bitkiyi içine almaktadır. Bu familyaya ait bitkiler dünyada Kuzey Yarımkürenin ılıman ve subtropik bölgelerinde yayılım göstermektedir. Türkiye’de bu familyaya ait beş cins bulunmaktadır (Seçmen vd. 1995). Bu familyanın bir üyesi olup ülkemizin önemli bitkileri arasına giren haşhaş (*Papaver Somniferum* L.), 60-200 cm kadar uzayabilen, kapsülleri kapalı, mor ve beyaz renkte çiçekleri olan tek yıllık bir bitkidir (Eser vd., 2006).



Resim 2.1. Toprak Mahsulleri Ofisi (TMO) Afyon Alkaloidleri Tarlasında Yetişen Haşhaşın Genel Görünümü.

Geleneksel olarak tarımı yapılan haşhaşın ekimi Birleşmiş Milletler Teşkilatı denetimi altındadır. Yasal ana üreticileri Türkiye, Hindistan, Avustralya, Fransa, Macaristan ve İspanya’dır. Türkiye ve Hindistan Birleşmiş Milletler Teşkilatınca geleneksel haşhaş üreticisi ülkeler olarak kabul edilmektedir (Anonim, 2020). Dünyadaki haşhaş üretiminde ilk sırayı 59%’lük bir dağılımla Türkiye almaktadır (Şekil 2.2).



Şekil 2.1. Dünya çapında haşhaş üretimi (Kaynak: TMO 2019 Haşhaş raporu).

Ülkemizde haşhaş ekimi; 3298 sayılı Uyuşturucu Maddelerle İlgili Kanun ve Yönetmeliği çerçevesinde kontrollü ve çizilmemiş haşhaş kapsülü üretimi şeklinde yapılmaktadır. Fazla yağışlı Doğu Karadeniz ve fazla sıcak olan Güneydoğu Anadolu hariç birçok bölgede yetiştirilebilmektedir. Haşhaş yetiştiriciliği yapılan illerimiz Afyon, Amasya, Burdur, Çorum, Isparta, Denizli, Kütahya, Tokat, Uşak, Eskişehir, Balıkesir, Konya ve Manisa'dır (Anonim, 2020).

Tarihi M.Ö. 4000'li yıllarda Avrupa'ya, M.Ö. 5000'li yıllarda Mezopotamya'ya dayanan haşhaşın Anadolu'da Hititlerden bu yana tarımının yapıldığı bilinmektedir (İncekara, 1979, Ayhan vd., 2021). Kapsüllerindeki tohumlardan çıkartılan yağ gıdada, kalan küspesi hayvan yemi olarak kullanılırken kapsüllerinin içerdiği alkaloidler ilaç sanayisinde kullanılmaktadır. Çok yönlü bir kullanım alanına sahip olan haşhaşın en büyük önemi, ürettikleri sekonder metabolitlerin yapısal olarak farklı bir grubunu oluşturan benzilzokinolin alkaloidlerden (BIA) kaynaklanmaktadır.

2.2. Benzilzokinolin Alkaloidleri (BIA)

Benzilzokinolin alkaloidleri, çoğu güçlü farmakolojik özelliklere sahip olan 2.500'den fazla bileşikten oluşan çeşitli bir gruptur. Haşhaşta 80'den fazla alkaloid tanımlanmıştır ve bunların çoğu çok dallı, karmaşık bir yolun ara ürünleridir (Zulak vd., 2007).

Tıbbi açıdan önemli sekonder metabolitlerden olan bu alkaloidler, bitkilerin yaklaşık 20%'inde bulunmaktadır (Demirci, 2016). BIA narkotik analjezik etki gösteren morfin ve

kodein, anti-kanser ve anti-viral özelliği gösteren noskapin, ağrı kesici olarak kullanılan tebain, anti-mikrobiyal özellikleri olan sanguinarin gibi birçok önemli alkaloidi içermektedir (Singh vd., 2019). Bu nedenle de oldukça önemli, tıbbi bir bitki olarak ilaç endüstrisi tarafından kullanılan doğal ürün kaynaklarından birisidir (Bulut vd. 2020).

Benzilizokinolin alkaloidleri çoğunlukla *Papaveraceae*, *Ranunculaceae*, *Berberidaceae*, *Menispermaceae* familyalarında bulunurken; türler arasında da en çok *Papaver somniferum*, *Coptis japonica*, *Thalictrum flavum*, *Eschscholzia californica* türlerinde bulunur (Ziegler ve Facchini, 2008). BIA miktarı ve içeriği, bitkinin elde ediliş şartlarına, yetiştirildiği bölgeye ve iklime göre değişmekle birlikte organ bazında da farklılık göstermektedir (Facchini ve De Luca, 1995).

Türkiye’de bulunan birçok haşhaş çeşidinde majör alkaloidlerin ortalama oranları morfin %0,53-0,58, kodein %0,02-0,08, noskapin %0,02-0,19, tebain %0,006-0,02, oripavin, %0,0005-0,005, papaverin %0,01-0,09 şeklindedir (Yazıcı vd., 2017).

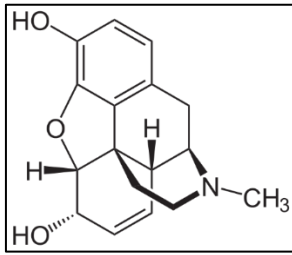
Tek üreticisi haşhaş olan morfinyan alkaloidleri en çok olgun kapsülde bulunurken (Facchini vd., 2005) BIA biyosentezi, gövdenin kalburlu borularında ve latisferlerinde gerçekleşmektedir (Onoyovwe vd., 2013).

2.3. Benzilizokinolin Alkaloidlerinin Biyosentezi

BIA biyosentezi, genel olarak tirozinin hem dopamin hem de 4-hidroksifenilasetaldehite tirozindekarboksilaz (TYDC) enzimi ile dekarboksilasyon, orto-hidroksilasyon ve deaminasyonu ile başlamaktadır. (Facchini, 2007). İzokinolin kısmının öncüsü dopamin iken tiraminin deaminasyonundan oluşan 4-hidroksifenilasetaldehit, benzil kısmının öncüsüdür (Facchini ve DeLuca, 2008).

2.3.1. Morfin ve biyosentez yolağı

Morfin tıpta çok etkili bir ağrı kesici olarak kullanılmaktadır. Morfin alkaloidi, kodein, etil-morfin, apomorfin, beta-4-morfoliniletilmorfin, benzilmorfin, diasetilmorfin, dihidromorfin, metopon, morfin-N-oksit, desomorfin ve N-alilnormorfin gibi maddelerin üretiminde de kullanılmaktadır. Kimyasal yapısı Şekil 2.3'te verilen morfinin kapalı formülü $C_{17}H_{19}NO_3$ olurken molekül ağırlığı 285.34 g/mol, erime noktası 255 °C'dir (Demirci, 2016).



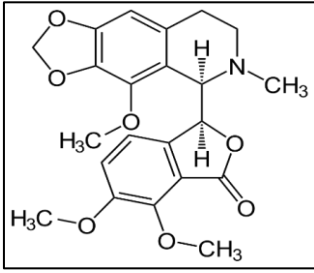
Şekil 2.3. Morfin alkaloidinin kimyasal yapısı.

Morfinin biyosentezi, (S)-retikülinin (R)-retiküline epimerizasyonu ile başlamaktadır (Şekil 2.4). (R)-retikülin, salutaridine sentaz (SalSyn) ile önce salutaridine dönüştürülür (Gesel vd., 2009). Devamında kısa zincirli bir dehydrogenase/reductase olan salutaridine reductase (SalR) ile salutaridinol'e dönüştürülür (Ziegler vd., 2006) ve salutaridinol 7-O-acetyltransferase (SalAT) enzimi aracılığıyla O-asetillenir (Demirci, 2016). Salutaridinol 7-O-acetate, pH 8-9 olduğunda kendiliğinden halkalanma göstererek ilk pentasiklik morfinyan alkaloid olan tebaine dönüşür (Fisinger vd., 2007).

Morfin yolağı bu kısımda iki kola ayrılır. İlk kolda tebain alkaloidi, 6-O-demetilaz (T6ODM) enzimi aracılığıyla kendiliğinden kodeinona dönüşür (Hagel ve Facchini 2010). Kodeinon, bir aldo-keto redüktaz olan kodeinon redüktaz (COR) (Unterlinner vd., 1999) enzimi ile kodeine indirgenir ve kodein O-demetilaz (CODM) enzimi aracılığıyla morfine dönüşür. İkinci bir alternatif yol ise, CODM aracılığıyla tebainin, oripavine 3-O-demetilasyonu ile başlar. Ardından T6ODM, oripavini, COR tarafından morfine indirgenen morfinona dönüştürür (Beaudoin ve Faccini, 2014).

2.3.2. Noskapin ve biyosentez yolağı

Narkotin olarak da bilinen noskapin, ilk olarak 1817 yılında haşhaştan izole edilmiştir. Haşhaşta morfinden sonra en bol bulunan alkaloid olan noskapin (İslam, 2021) Papaveraceae ve Menispermaceae familyalarının diğer üyelerinde de bulunmaktadır (Demirci, 2016). Noskapin, yapısal ve kimyasal olarak diğer alkaloidlerden farklıdır (İslam, 2021). Kimyasal yapısı Şekil 2.4’te verilen noskapin alkaloidinin kapalı formülü $C_{22}H_{23}NO_7$ olurken molekül ağırlığı 413.421 g/mol, erime noktası ise 176 °C’dir (Demirci, 2016). Öksürük baskılayıcı ve antikanser ajan olması sebebiyle (Mahmoudian vd., 2009) noskapin biyosentezi önemli bir çalışma alanı olsa da morfin gibi diğer alkaloidler kadar üzerine geniş araştırmalar yapılmamıştır (Demirci, 2016).



Şekil 2.4. Noskapin Alkaloidinin Kimyasal Yapısı.

Noskapin biyosentezi, (S)-retikülin ara molekülünden başlar. İlk olarak (S)-retikülin, berberin köprü enzimi (BBE) ile (S)-skoulerine dönüşür (Şekil 2.3). Noskapin sentezi bir dizi metilasyon ve hidroksilasyon reaksiyonlarını içermektedir (Demirci, 2016). (S)-skoulerine O-metiltransferaz (SOMT) enzimi, (S)-skoulerineden (S)-tetrahidrokolumbamin molekülüne dönüşümü gerçekleştirdikten sonra kanadin sentaz (CAS) enzimi ile (S)-kanadin oluşturulur. Sentezin sonunda narkotin hemiasetalden noskapin sentaz (NOS) aracılığıyla noskapin oluşmaktadır.

2.4. Omik Teknolojileri

“Tümü-hepsi” anlamına gelen “omik” terimi, latince kökenli bir kelimedir ve herhangi bir yapının bütünüyle çalışılması anlamına gelmektedir. RNA, proteinler ve ara metabolitler gibi moleküllerin tespit edilip tanımlanmasına dayanan yenilikçi tekniklere ise omik teknolojileri adı verilmektedir. Bu teknolojilerinin temel amacı, spesifik bir biyolojik

örnekte bulunan tüm gen ve gen ürünlerinin bütüncül bir yaklaşımla tanınmasının sağlanmasıdır. Günümüzde omik teknolojilerinden çokça yararlanılmaktadır. Omik teknolojileri adı altında, gen düzeyinde genomik, RNA düzeyinde transkriptomik, protein düzeyinde proteomik ve metabolit düzeyinde ise metabolomik yaklaşımlar gibi geniş bir araştırma yelpazesine sahiptir. (Boztok Özgermen vd., 2020). Her bir omik teknolojisi organizmaların yapı ve fonksiyonlarını anlamamız açısından önemli katkılar sağlamakla birlikte, proteomik analizler bir organizmayı genomik ya da transkriptomik çalışmalardan daha farklı boyutta ve hatta bazı açılardan daha iyi anlamamıza yardımcı olmaktadır (Cho, 2007).

2.4.1. Proteomik

Proteom, bir organizma, doku veya hücrede herhangi bir anda bulunan proteinlerin tümü için kullanılan bir ifadedir ve ilk kez 1994 yılında genom tarafından ifade edilen tüm proteinleri tanımlamak için kullanılmıştır (PROTein-genOME) (Deracinois vd., 2013).

Proteomik ise proteomların genel protein bileşimini, yapısını ve fonksiyonlarını araştırılmasını kapsayan bir yaklaşımdır. Proteinlerin spesifik özellikleri sebebiyle, yeni proteinlerin tespit edilmesi ve tanımlanması, miktarlarının belirlenmesi, post-translasyonel modifikasyonlarda protein yapısının ve fonksiyonlarının ortaya koyulması ve aralarındaki etkileşimlerin tespit edilerek haritalandırılması amacıyla kullanılmaktadır. Proteomik öncesinde yapılan çalışmalarda, genomun yanı sıra transkriptomik yaklaşımlar ile RNA seviyesindeki değişiklikler incelemektedir. Fakat mRNA'nın ifade seviyesindeki farklılıklar benzer şekilde protein seviyesinde görülememektedir. Bu nedenle, mRNA'nın ifade düzeyleri, proteinin fonksiyonlarına yönelik bilgi sağlamamaktadır ve post-translasyonel modifikasyonlar sonucu proteinde meydana gelen değişimler hakkında veri bulundurmamaktadır (Gezici, 2017).

2.4.2. Proteomik uygulamaları

Protein analizlerine yönelik birçok proteomik yöntem bulunmaktadır. İki-boyutlu jel elektroforezi (2D-PAGE), antikör-tabanlı western blot ve ELISA (Enzim Bağlantılı İmmüno-sorbent Deneyleri) gibi yöntemler düşük hacimli veri üreten tekniklerdir (Aslam vd., 2017). Artan taleplerle birlikte hızla gelişmekte olan proteomik yöntemler, ağırlığını

yüksek hacimli olan antikor dizini (array), kromatografi ve kütle spektrometrisi gibi proteomik yaklaşımlara bırakmıştır.

Kromatografi ve kütle spektrometrisi (MS) yüksek verimli proteomik çalışmalarda proteinleri tanımlamak ve ölçmek için kullanılan en yaygın tekniklerdir. Kütle spektrometrisi (MS), başlangıcı 20.yüzyıla uzanan analitik bir tekniktir. Bir molekülün kendine özgü bir özelliğini, yani kütlelerini çok yüksek hassasiyetle ölçtüğü ve bu nedenle çok geniş bir uygulama yelpazesinde kullanılmaktadır. Günümüzde kütle spektrometrisi, proteomik alanının temel bir unsuru haline gelerek büyük ölçekli proteomik projelerde protein tanımlaması için kullanılmaktadır. Diğer yandan da MS, bir proteinin moleküler ağırlığını ölçtüğü için, post-translasyonel modifikasyonların tespiti ve tanımlanması için tercih edilen bir yöntemdir. (Mann vd, 2001).

MS yönteminde kütle/yük oranı ölçülerek proteinlerin moleküler ağırlığı belirlenmektedir (Aslam vd., 2017). MS ile proteinlerin analizi üç ana adımda gerçekleşmektedir; protein iyonizasyonu, iyonların kütle/yük oranlarına göre ayrılması ve iyonların tespiti. Analiz kapasitesini daha da yükseltmek için peptitler çoklu kütle (MS/MS) analizine de tabi tutulabilirler. Analizde jel-bazlı ya da jel içermeyen teknikler bulunmaktadır (Chandramouli ve Quian, 2009). İzotop kodlu afinite etiketi (ICAT) ve Çok Boyutlu Protein Tanımlama Teknolojisi (MudPIT) gibi jel içermeyen yaklaşımlarda, örnekler doğrudan MS tarafından analiz edilirken (Chan vd., 2015; Schirmer vd., 2003), 2-DE gibi jel bazlı proteomiklerde, protein noktaları önce jelden çıkarılır ve ardından tripsin ile kesilir. Elde edilen peptitler ayrılır ya da doğrudan MS ile analiz edilir.

Proteomikte aşağıdan-yukarıya (Bottom up) ya da yukarıdan-aşağıya (Top down) olmak üzere farklı stratejiler kullanılmaktadır. Yukarıdan-aşağıya proteomikte, ilgili bir numunedeki proteinler proteolitik bir tepkimeye sokulmadan karakterize edilirler. Shutgun olarak da adlandırılan aşağıdan-yukarıya proteomikte ise numunedeki tüm proteinler önce peptitlere parçalanır ve daha sonra bu peptitler analiz edilir. Ortaya çıkan peptit dizileri de farklı algoritmalar kullanılarak mevcut veri tabanlarıyla karşılaştırılır. Yukarıdan-aşağı proteomik ile translasyon sonrası modifikasyonlarının tayini için avantajlı bir stratejidir fakat protein fraksiyonasyonu, protein iyonizasyonu ve gaz fazında parçalanma ile ilgili zorluklar yaşanmasından dolayı shutgun proteomikle kıyaslandığında önemli sınırlamalar bulunmaktadır. Yaklaşık 5-20 aminoasit uzunluğundaki kısa peptitlerin analiz edildiği

shotgun proteomik yaklaşımda ise bu aşamalarda bir zorluk yaşanmadığı için birçok çalışmada tercih edilmektedir (Zhang vd., 2013; Timp ve Tmp, 2020).

Yüksek verimli bir diğer teknik, kromatografik tekniklerdir. Çok geniş bir alanda kullanım imkânı sunan kromatografi; ölçüm, ayırıştırma ve saflaştırma gibi farklı amaçlar için kullanılmaktadır. Ana amacı numunenin ayrımı ve miktarının ölçümü olan bu yöntem, çeşitli maddelerin, hareketli bir faz yardımıyla, sabit bir faz üzerinde, değişik hızlarla hareket etmeleri veya sürüklenmeleri esasına dayanır. En önemli ve yaygın olarak kullanılan kromatografik teknikler, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ve sıvı kromatografi-kütle spektrometresi/kütle spektrometresidir (LC-MS/MS) (Eser ve Sepici Dinçel, 2011).

Sıvı kromatografi-kütle spektrometresi/kütle spektrometresi (LC-MS/MS) olarak adlandırılan tandem kütle spektrometrisiyle birleştirilmiş sıvı kromatografisi (LC), peptidlerin ve proteinlerin analizi için güçlü bir tekniktir. Yüksek miktarların yanı sıra düşük miktarlarda da biyolojik materyallerin verimli bir şekilde ayrılmasını ve kütle spektrometresi ile bireysel bileşenlerin hassas bir şekilde tanımlanmasını birleştirir (Mann vd, 2001). İkili kullanılan bu teknik, çevresel ve biyolojik kaynaklı karmaşık örneklerde yaygın olarak bulunan biyokimyasal, organik ve inorganik bileşikleri analiz etmek için kullanılabilir (Dass, 2007).

LC-MS/MS analizindeki iş akışı, numune hazırlama, protein ayırma, proteazlar ile kesim, yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) ile ayırma, MS ile kütle tayini ve veri analizi gibi adımlardan oluşmaktadır. _Martínez-Esteso vd., (2015) proteomik yaklaşımlar ile yapılan sekonder metabolitlere ait çalışmalarda özellikle analiz edilecek olan bitki örneğinin, seçilecek proteomik stratejinin ve tekniğin kritik öneme sahip olduğunu belirtmişlerdir.

2.5. Biyoinformatik

Biyolojik veriler, günümüzde büyük bir hızla artış gösterirken bu verilerin kullanılabilir hale getirilme ihtiyacı, bilgi teknolojisine dayanan ve oldukça geniş bir çalışma alanına sahip multidisipliner bir bilim dalının ortaya çıkmasını sağlamıştır. Biyoinformatik ve biyoloji çalışmaları, birçok biyolojik bilgiye kolay erişilmesini, bu bilgilerin verimli kullanımı ve yönetimi için gerekli bilgisayar yazılımlarının geliştirilmesini ve bu çalışmalar ile büyük

veri kümeleri içindeki ilişkilerin çeşitli algoritmalar ve biyoistatistiksel yöntemler ile açığa çıkarılmasını kapsamaktadır (Keklik vd., 2022).

Pauling ve Corey'in 1951 yılında proteinlerin sekonder yapılarının tahmin edilebilmesi için geliştirdikleri yaklaşım biyoinformatik için başlangıç kabul edilse de çağdaş anlamda biyoinformatik bilimi, bilgisayarın yoğun desteğine gereksinim duyduğundan, 1966 yılında Scientific American dergisinde yayımlanan bilgisayarla moleküler grafiklerin çizildiği ilk makale başlangıç olarak kabul edilebilir. Biyoinformatik terimi ise 1980'li yılların ortalarından sonra kullanılmaya başlanmıştır. En önemli görevi; tüm biyolojik türlerin genomlarına, protein dizilerine ve proteinlerin üç boyutlu yapılarına, metabolik yol veri tabanlarına ve hücre hattı bilgilerine ait niceleyici verilerin toplanmasıdır (Polat ve Karahan, 2009).

2.5.1. Proteomik verilerle biyoinformatik analizler

Proteomik yaklaşımlarla elde edilen bir proteom analizinin verilerinin işlevsel olarak yorumlanması için birçok yol bulunmaktadır. Bu yollardan biri, verilerin Gen Ontolojisi (GO) terimleriyle ilişkilendirmektir (<http://www.geneontology.org> , Ashburner vd., 2000). Gen Ontolojisi ile genler, benzersiz bir kimlik numarasına sahip "biyolojik süreç", "moleküler fonksiyon" veya "hücreSEL bileşen" olmak üzere üç ontoloji tanımlayan hiyerarşik olarak kümelenmiş fonksiyonel terimlerle ortaya çıkmaktadır (Schmidt vd., 2014). Terimleri oluşturulduktan sonra, veri setindeki belirli GO terimlerinin sıklığını, organizmadaki doğal sıklık veya bir referans veri seti ile karşılaştırmak için bir GO terimi zenginleştirme analizi yapılmaktadır (Malik vd., 2010). Bu adımlar, DAVID, Babelomics gibi birçok biyoinformatik araç ile gerçekleştirilebilmektedir. Özellikle DAVID, genlerin, yollara ve hastalıklara göre haritalanması ve ayrıca gelişmiş istatistikler için çok sayıda başka araç sunmakta ve çeşitli kullanım alanı sunmaktadır (Schmidt vd., 2014).

Proteomik ile biyoinformatik araçlar ile ontoloji analizlerinin yanı sıra yolak analizleri de yapılmaktadır. Yolaklar, hücrede gözlemlenebilir birçok biyolojik etkiye yol açan kimyasal reaksiyon adımlarını barındırır. Elde edilen biyolojik verilerden yolak tanımlarını çıkarmak için çok sayıda kaynak ve veri tabanı mevcuttur. Bunlar, KEGG, Reactome, Ingenuity Pathway Knowledge Base veya BioCarta gibi kapsamlı yolak veritabanları olmakla birlikte metabolizma veya sinyal yolları , genetik etkileşimler veya ilaç geliştirme çalışmaları gibi

hücre içi reaksiyonlardan kaynaklanabilecek çok sayıda verileri bünyelerinde bulundurmaktadır (Croft vd., 2011; Kanehisa vd., 2000; Kanehisa vd., 2012; Schmidt vd., 2014)

Bir başka araştırma alanı ise protein-protein etkileşim analizleridir. Proteinlerin çoğu bağımsız varlıklar olarak hareket etmezler. Proteinler, aktivite düzenleyen diğer proteinlerle geçici veya kararlı kompleksler oluştururlar. Oluşan komplekslerdeki protein etkileşimlerine ilişkin bilgilere, işlevsel olarak önemli oldukları biyolojik süreçle ilişkili MINT, BioGRID, IntAct veya HRPD gibi etkileşim veritabanlarından ulaşılmaktadır (Chatr-Aryamontri vd., 2007; Kerrien vd., 2012; Keshava Prasad vd., 2009; Schmidt vd., 2014; Stark vd., 2006). Protein etkileşimleri, genellikle yüksek derecede bağlanabilirliği ve karışık merkez proteinlerinin varlığını gösteren büyük etkileşim ağları olarak gösterilirler (Schmidt vd., 2014). Etkileşim verileri için yaygın olarak kullanılan, bir veritabanı olmasının yanı sıra diğer birçok veri kaynağına bağlanan ve dolayısıyla literatür madenciliği de yapabilen STRING ve iRefWeb araçları yaygın olarak kullanılmaktadır (Franceschini vd., 2012; Malik vd., 2010; Schmidt vd., 2014; Turner vd., 2010).

2.6. Haşhaş Bitkisinde Yapılmış Omik Çalışmalar

Omik yaklaşımlar ile haşhaş bitkisinin ürettiği sekonder metabolitlere ait yolları incelemek amacıyla birçok çalışma yapılmıştır. Haşhaşın farklı çeşitleri ile yapılan birçok transkriptom çalışması (Pathak vd., 2013; Yücebilgili Kurtoğlu, 2016; Zhao vd., 2019; Subramaniyam vd., 2020; Pei vd., 2021) ve proteom çalışması (Zulak vd. 2009; Oldham vd. 2010; Van Cutsem vd. 2011; Yang vd., 2014; Zhang vd. 2014; Zhao vd. 2014) olduğu bilinmektedir.

Yapılan bir çalışmada haşhaş çeşitlerinden Ofis 95 çeşidi kullanılmış ve Metil Jasmonat (MeJa) uygulaması ile alkaloid sentezi indüklenmiş örneklerde mikroarray kullanılarak SalR, NCS, CNMT, StySyn ve COR gibi BIA metabolizmasına özgü genlerin transkript analizi yapılmıştır (Gürkok vd. 2015). Yine başka bir çalışmada, elisitör uygulaması yapılan haşhaş örneklerinde RNA jel blot analizinden yararlanarak farklı dokularda üç enzimin (BBE, COR ve NMCH (CYP80B1)) gen transkriptleri izole edilmiştir (Huang ve Kutchan, 2000).

Başka bir çalışmada, morfin alkaloidi içeren haşhaş ve morfin içermeyen sekiz *Papaver* türünde morfinin karşılaştırmalı DNA makrodizi analizi yapılarak 4'OMT gen transkriptlerinin, haşhaşta yüksek gen ifade seviyelerine sahip olduğu bulunmuştur (Ziegler vd., 2005). Ardından aynı grup, aynı tekniği kullanarak SalR genini tanımlamıştır (Ziegler vd., 2006). Gesell ve ark. (2009), haşhaş alkaloidlerinin biyosentezinde görevli N7OMT (Pienkny vd., 2009) ve SalSyn'in gen transkriptlerini dizi tabanlı transkriptomikler kullanılarak tanımlamıştır.

Zulak ve ark. (2007), mantar elisitör tedavisi üzerine afyon haşhaşındaki sanguinarin alkaloidi birikiminin kapsamlı bir transkriptom analizi için bir DNA mikroarray çalışması yürütmüştür. Yine başka bir transkriptom çalışmasında haşhaş çeşitlerinden Ofis 8 ve Ofis NM'de transkriptom analizi ile morfinin biyosentez mekanizmasının araştırılması amaçlanmıştır (Yücebılgılı Kurtoğlu, 2016).

Transkriptom analizleri haşhaşta alkaloid üretiminde genlerin işleyişi hakkında birçok bilgi sunmakla birlikte, protein seviyesini net bir şekilde ortaya koyamadığı için bu alanda az sayıda da olsa bazı proteom çalışmaları mevcuttur.

Bir çalışmada haşhaş lateksi (öz suyu) iki boyutlu jel elektroforezi (2D-PAGE) ile analiz edilerek toplam 69 adet protein belirtilerek mikro dizileme yöntemi ile protein karakterizasyonu yapılmış ve morfin, tebain, kodein ve oripavinin lateks için ana bileşenler olduğu ve morfinin majör alkaloidlerden biri olduğu ortaya çıkarılmıştır (Decker vd. 2000). Bir diğer çalışmada ise tebain içeriklerinin saptanması için *P. somniferum* cv. *Marianne* çeşidine ait hücre süspansiyon kültürlerinin sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometresi (LC-MS/MS) ile birleştirilmiş iki boyutlu jel elektroforezi (2-DE), elisitör tedavisine yanıt olarak aktive edilen 219 protein tanımlamıştır (Zulak vd. 2009).

Desgagné-Penix ve ark. derin transkriptomik, proteomik ve hedeflenmiş metabolomikleri bir araya getirerek afyon haşhaş hücre kültürlerinde BIA metabolizmasının bileşenlerini ortaya çıkaran kapsamlı iki çalışma yayınlamıştır. İlk çalışmada, elisitör ile işlenmiş haşhaşın *P. somniferum* cv. *Marianne* çeşidine ait hücre süspansiyon kültürü kullanılmış, transkriptom ve LC-MS/MS ile SDS-PAGE kullanılarak proteom analizleri yapılmıştır. Analizler sonucunda ise yaklaşık bin peptit tanımlanırken sanguinarin üretiminde yer alan biyosentetik genlerin ekspresyonu doğrulanmış ve NCS, 6OMT, CNMT, NMCH, 4'OMT,

BBE, ve TNMT dahil olmak üzere BIA biyosentezinde yer alan hemen hemen tüm enzimler LC-MS/MS peptit analizi ile tanımlanmıştır. (Desgagné-Penix vd., 2010). Aynı grubun ikinci çalışmasında ise sekiz farklı afyon haşhaş çeşidi için derin transkriptom dizileri kullanılmış ve LC-MS/MS analizi ile her bir haşhaş çeşidinin alkaloit seviyeleri belirlenmiştir. Entegre kullanılan iki uygulama sonucunda ise noskapin gibi birçok alkaloid oluşumunda yer alan karakterize edilmemiş biyosentetik enzimleri kodlayan gen adayları tanımlanmıştır. Böylelikle bitkilerde BIA metabolizmasının anlaşılabilmesi için yol açılmıştır (Desgagné-Penix vd., 2012).

Başka bir çalışmada, haşhaşın *P. somniferum* cv *Roxanne* çeşidine ait olgunlaşmamış dönemdeki kapsülden SDS-PAGE tekniği ile izole edilen lateks ve gövdeye ait proteinler ayrılmış ve kütle spektrometresi (MS) yöntemiyle tanımlanmıştır (Onoyovwe vd., 2013).

Günümüze kadar haşhaş ile ilgili sayılı proteom çalışması yapılmıştır. Bu çalışmalar yukarıda da belirtildiği üzere elisatörle işlenmiş haşhaşın, hücre kültüründe sanguinarin alkaloidinin sentez yolağındaki enzimlerin tanımlanması üzerine olurken başka bir çalışma da haşhaşın olgunlaşmamış kapsüllerinde lateks proteinlerinin tanımlanmasına üzerine olmuştur (Desgagné-Penix vd., 2010; Onoyovwe vd., 2013). Bu bilgilerden yola çıkarak literatürde olgun haşhaşın farklı çeşitleri veya farklı organları üzerine bir proteom çalışması bulunmamaktadır.

3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Bitki Materyali

Bitki materyali olarak TMO tarafından uzun yıllar içinde klasik ıslah yöntemleri ile geliştirilmiş alkaloid içerikleri birbirlerinden farklı tescilli üç haşhaş çeşidi kullanılmıştır. Çalışmada TMO'dan elde edilen morfin içeriği yüksek *Papaver somniferum* Ofis 1 çeşidi (%1,8 morfin), noskapin içeriği yüksek Ofis NP çeşidi (%1,3 noskapin) ve kontrol olarak da Ofis 96 çeşidi (%0,6 morfin) kullanılmıştır. Kontrol grubu olan Ofis 96 çeşidi seleksiyon ile ıslah edilmiş ve 1996 yılında tescillenmiştir. Ofis NP ve Ofis 1 çeşitleri ise melezleme yolu ile ıslah edilmiş olup, sırasıyla 2014 ve 2016 yıllarında tescil edilmişlerdir. Ofis NP; TMO tarafından yarı yol materyali olarak alınmış ve geliştirilmiştir.

TMO ve Research Institute For Medicinal Plants-Macaristan arasında yapılan iş birliği kapsamında Macaristan tarafından melezlenmiş olarak gönderilen hat, TMO tarafından geliştirilmiştir. Ofis 1; M2xF13/6 ebeveynlerinin melezlenmesi ile TMO tarafından geliştirilmiştir. Tescile AAF3 çeşit adayı adı ile müracaat edilmiş tescil işlemi onaylanınca çeşit ismi Ofis 1 olarak belirlenmiştir.

Bitkiler TMO Afyon Alkaloidleri Fabrikası tarafından yetiştirilmiştir. Alkaloid üretiminin en yoğun olduğu dönem çiçeklenme dönemi olduğu için (Kim vd., 2018), TTSM (Tohumluk Tescil ve Sertifikasyon Merkez Müdürlüğü) haşhaş özellik belgesinde belirtilen 5. gelişme döneminde olan haşhaştan (*Papaver somniferum*) protein izolasyonunda kullanılmak üzere gövde ve kapsül örnekleri toplanmıştır. Bitkiler, Afyon Alkaloidleri Fabrikası İşletme Müdürlüğü'nün ekim alanından alınmış olup sıvı azot içinde dondurularak -80 °C'de saklanmıştır.



Resim 3.1. TMO Afyon Alkaloitleri Fabrikasının Haşhaş Tarlası

3.2. Protein İzolasyon

Protein izolasyonu, Plant Protein Extraction Kit (Solarbio, Çin) prosedürüne göre uygulanmıştır.

Yaklaşık 100 mg bitki örneği -80 °C'den alınarak sıvı azot içinde seramik havanda toz haline gelinceye kadar homojenize edilmiştir. Her bir örnek için 2 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine 1 ml Lizis Tamponu, 10 µl Proteaz inhibitörü ve 10 µl PMSF konulmuştur. Karışımın bulunduğu tüplere homojenize edilen bitki örnekleri eklenmiştir. Örnekler her 5 dakika da bir vortekslemek üzere 4° C'de 20 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında 30 dakika +4°C'de ve 14000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısımları yeni bir tüpe alınarak kullanılmak üzere -20 ° C'ye kaldırılmıştır.



Resim 3.2. -80°C'den alınan örneklerin sıvı azot ile toz haline getirilmesi

Örneklerin protein miktar tayinini yapmak için temel yöntemlerden biri olan Bradford Yöntemi uygulanmıştır.

Bu yöntemde ana stok olarak 3 ml saf suda 3 mg standart protein bulunduran sığır serum albümini kullanılmıştır. Standart grafiğin çıkartılabilmesi için 100 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$, 1000 $\mu\text{g/ml}$, 1500 $\mu\text{g/ml}$, 2000 $\mu\text{g/ml}$, 2500 $\mu\text{g/ml}$, 3000 $\mu\text{g/ml}$ standart protein konsantrasyonlarını içeren dilüsyon serisi, saf su ile toplam 500 μl hacime tamamlanmıştır. Standart protein içeren tüpler ve -20°C 'ye kaldırılan örneklerden 10 μl alınarak kuyucuklara konulmuştur. Üzerlerine 200 μl Bradford Reaktifi eklenerek bir süre renk değişimi gözlenmiştir. Ardından absorbansları 595 nm'de okutulmuştur.

Standart proteinlerin konsantrasyonları ile çıkan absorbans değerleri arasında standart protein grafiği çıkarılmıştır. Grafiğin oluşturulan denklemine göre örneklerin absorbans değerleri ile konsantrasyonları hesaplanarak miktarları belirlenmiştir.

Miktarları belirlenen örnekler, LC-MS/MS analizine kadar -80°C 'de saklanmıştır.

3.3. LC-MS/MS Analizi

LC-MS/MS analizi hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir. İzole edilmiş protein örneklerinin her birinden yaklaşık 150 μg Acıbadem Labmed firmasına gönderilmiştir. Firma tarafından örnek hazırlığı FASP (Filter Aided Sample Preparation) metoduyla yapılmıştır. LC-MS/MS analizi için Xevo-G2-Si-QTOF kullanılmış, Data Independent analiz tiplerinden biri olan SONAR metodu ile veri elde edilmiştir. Proteinlerin tanımlanması için Uniprot veri tabanında “papaver” anahtar kelimesi içeren 48.439 peptid taranmıştır (Erişim tarihi 12.10.2022). FDR (False Discovery rate) peptit doğruluğu %1 olacak şekilde değerlendirilmiştir. İşlem sonucunda firma tarafından cihaz parametrelerini içeren teknik rapor ve analiz edilen protein listesi tarafımıza gönderilmiştir.

3.4. Biyoinformatik Analizler

LC-MS/MS analizinden elde edilen ham verilerde örnekler arasında ifadesi farklılaşmış proteinlerin bulunması için örneklerin üç biyolojik replikasyonuna ait protein bolluklarının ortalaması alınmıştır. Karşılaştırılan örneklerin protein bolluklarına ait ortalamalar birbirilerine bölündükten sonra log2 tabanına çevrilmiştir. Ardından p değeri, $p < 0,05$ olacak şekilde hesaplandıktan sonra log2 değerleri, $\log_2 \geq 1$ şeklinde alınarak farklılık gösteren proteinler belirlenmiştir. Belirlenen proteinleri tanımlamak için Gen Ontolojisi (GO) analizi

kullanılmıştır (Ashburner vd., 2000). Bu süreçte biyolojik süreç (BS), hücresel bileşen (HB) ve moleküler fonksiyon (MF) olmak üzere üç alt ontolojisi incelenmiştir. Ontoloji analizleri, DAVID veri tabanı kullanılarak yapılmıştır (Dennis vd., 2003). Tanımlanan proteinlerin yolak analizleri, KEGG (Kanehisa vd., 2004) veri tabanından yapılmıştır. Protein ifade verilerinin hiyerarşik kümelenmesini görselleştirmek için *Base R* (Team, 2021) tarafından heatmap oluşturulmuştur. Ortaya çıkan proteinlerin, protein-protein etkileşim ağları ise String (Szklarczyk vd., 2015) aracılığıyla etkileşim puanı ≥ 0.4 olacak şekilde oluşturulmuştur.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Protein İzolasyonu

Total protein izolasyonu, her bir örnekte üçer biyolojik replikasyon şeklinde yapılmıştır ve iyi derecede protein miktarları elde edilmiştir. Deney sonucunda elde edilen protein miktarları Çizelge 4.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Protein İzolasyonundan Elde Edilen Protein Miktarları

KARŞILAŞTIRMALAR	TOPLAM PROTEİN MİKTARLARI ($\mu\text{g/ml}$)
Ofis 96 Gövde 1	4321
Ofis 96 Gövde 2	3828
Ofis 96 Gövde 3	4303
Ofis 96 Kapsül 1	5254
Ofis 96 Kapsül 2	7268
Ofis 96 Kapsül 3	6335
Ofis 1 Gövde 1	3851
Ofis 1 Gövde 2	4511
Ofis 1 Gövde 3	7150
Ofis 1 Kapsül 1	4817
Ofis 1 Kapsül 2	4814
Ofis 1 Kapsül 3	5296
Ofis NP Gövde 1	3677
Ofis NP Gövde 2	4061
Ofis NP Gövde 3	4392
Ofis NP Kapsül 1	5091
Ofis NP Kapsül 2	5051
Ofis NP Kapsül 3	5979

4.2. LC-MS/MS Analizi

Hizmet alımı ile gerçekleştirilen LC-MS/MS sonuçlarından elde edilen ham verilerden 1606 adet protein tanımlanmıştır ve erişim numaraları, peptit sayıları, eşsiz peptitler (unique peptit), protein tanımları ve normalize miktarlarına ulaşılmıştır.

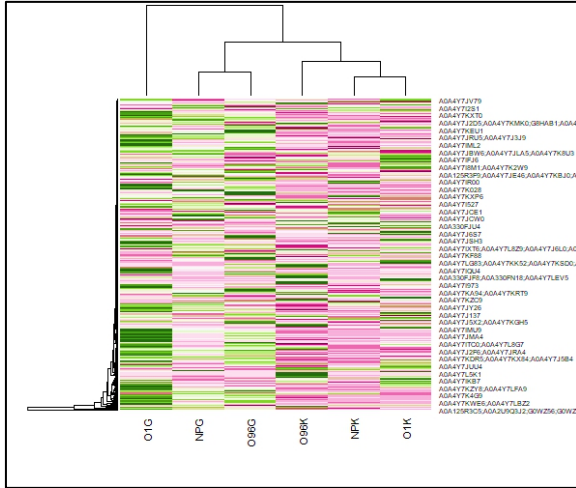
4.3. Biyoinformatik Analiz Sonuçları

Hizmet alımının sonucunda örneklere ait ham verilerden tespit edilen 1606 adet protein çeşit ve organ bazında olmak üzere farklı kriterlere göre biyoinformatik araçlarla karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

4.3.1. Farklılık gösteren tüm proteinler

Tespit edilen 1606 proteinden, örnekler arasında farklılık gösteren protein sayısını bulabilmek için, p değerleri $p < 0,05$ olarak hesaplandıktan sonra $\log$ değerleri $\log_2 \geq 1$ şeklinde alınmış ve protein listesi yeniden düzenlenmiştir. Bunun sonucunda tanımlanan 1606 proteinden 1212 tanesinin, dokuz karşılaştırmanın herhangi bir tanesinde olmak üzere farklılık gösterdiği ortaya çıkarılmıştır.

Bütünsel olarak bakıldığı zaman her bir çeşit kendine özgü ifade profili göstermekle birlikte tüm haşhaş çeşitlerinde kapsüllerin gövdelerden belirgin şekilde farklı ifade profili gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.1). Ek olarak Ofis 1 çeşidinin gövdesine ait proteinlerin de diğer iki çeşidin gövdesine ait proteinlerden daha farklı ifade profili gösterdiği ortaya çıkmaktadır.



Şekil 4.1. Farklılık Gösteren Proteinlere Ait Heatmap. Renkler pembeden yeşile doğru ifade düzeyindeki artışı göstermektedir.

4.3.2. Karşılaştırmalı analizler

Alkaloidlerin sentezi ve depolanması farklı organlarda gerçekleştiği için yolağın daha iyi anlaşılması açısından elde edilen proteinler farklı gruplar arasında karşılaştırılarak incelenmiştir. Bu gruplar organ ve çeşit bazında olmak üzere ikiye ayrılmaktadır.

Organ bazında;

- Ofis 96 Gövde/Ofis 96 Kapsül,
- Ofis 1 Gövde/Ofis 1 Kapsül
- Ofis NP Gövde/Ofis NP Kapsül

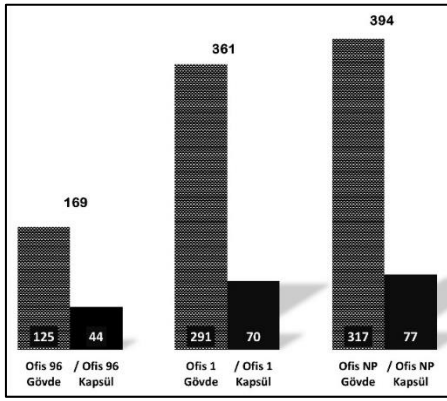
Çeşit bazında;

- Ofis 1 Gövde/Ofis 96 Gövde
- Ofis NP Gövde/Ofis 96 Gövde
- Ofis 1 Gövde/Ofis NP Gövde
- Ofis 1 Kapsül/Ofis 96 Kapsül
- Ofis NP Kapsül/Ofis 96 Kapsül
- Ofis 1 Kapsül/Ofis NP Kapsül

Karşılaştırmalar olabilecek tüm kombinasyonlar ile yapılmıştır ve protein dağılımları da iki başlık altında incelenmiştir.

Organ Bazında Farklılık Gösteren Proteinler

BIA biyosentezinin gerçekleştiği gövde ve depolandığı kapsül organlarına ait her bir çeşit için farklılık gösteren proteinlerin sayıları Şekil 4.2’de gösterilmiştir. Organ bazındaki karşılaştırmalarda farklı ifade edilen protein sayısının en fazla olduğu çeşit Ofis NP, en az olan çeşit ise Ofis 96’ dır. Organlardaki protein farklılıkları incelendiğinde her üç çeşitte de gövdelerde kapsüllere kıyasla daha fazla sayıda ifadesi artmış proteinin bulunduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4.2. Organ Kategorilerinde Farklılık Gösteren Protein Sayısı. Kolonların üstünde ilgili karşılaştırmada elde edilen toplam farklılık gösteren protein sayısı verilmiştir. Her bir kolonun altında ilgili örnekte ifadesi artan proteinlerin sayısı gösterilmiştir.

Organ karşılaştırmalarında bulunan ve farklılık gösteren proteinlerin dağılımları her bir çeşit için detaylı olarak incelenmiştir.

Ofis 96 Gövde / Ofis 96 Kapsül

Kontrol çeşidi olan Ofis 96’nın iki organına ait protein profili analiz edildiğinde toplam 169 adet proteinin farklılık gösterdiği bulunmuştur. Bu proteinlerin 125 tanesinin gövdede, 44 tanesinin ise kapsülde ifadelerinin arttığı ortaya çıkarılmıştır. Organ bazında yapılan incelemede diğer iki çeşide kıyasla en az sayıda farklılık gösteren protein sayısı bu çeşitte gözlenmiştir.

Ofis 1 Gövde / Ofis 1 Kapsül

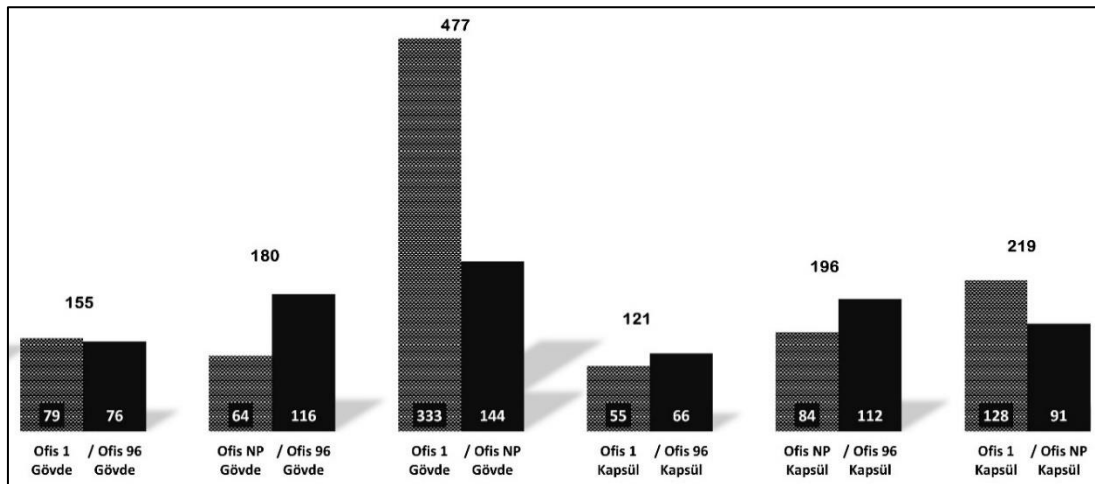
İki organına ait protein profilleri karşılaştırılan morfince zengin Ofis 1 çeşidinde farklılık gösteren toplam 361 protein bulunurken bu proteinlerin 291 tanesinin ifadesi gövdede, 70 tanesinin ifadesi de kapsülde artmıştır.

Ofis NP Gövde / Ofis NP Kapsül

Üç çeşit içerisinde organları arasında en çok sayıda farklılık gösteren protein bu grupta bulunmaktadır. Noskopince zengin olan Ofis NP çeşidinin gövdesinin kapsüle kıyasında ifadesi farklı toplam 394 adet protein bulunmuştur. Bu proteinlerin 317 tanesinin ifadesi gövdede artarken 77 tanesinin kapsülde arttığı ortaya çıkarılmıştır.

Çeşit Bazında Farklılık Gösteren Proteinler

Üç haşhaş çeşidi arasındaki protein farklılıklarını analiz etmek amacıyla hem gövde hem de kapsül için protein profilleri karşılaştırılmış ve protein sayılarının dağılımları Şekil 4.3'te gösterilmiştir. Grupların analizlerinde en az sayıda farklılık Ofis 1 Kapsül / Ofis 96 Kapsül karşılaştırmasından elde edilmiştir. En çok farklılık gösteren protein sayısı ise Ofis 1 Gövde / Ofis NP Gövde arasında bulunmuştur.



Şekil 4.3. Çeşit Gruplarında Farklılık Gösteren Protein Sayısı. Her bir kolon altında yazılan örneğin ifadesinin arttığını göstermektedir.

Çeşit karşılaştırmalarında bulunan ve farklılık gösteren proteinlerin dağılımları detaylı olarak altı başlık altında incelenmiştir.

Ofis 1 Gövde / Ofis 96 Gövde

Ofis 1 ve Ofis 96 çeşitlerinin gövde protein profillerinin karşılaştırmasında toplam 155 adet farklılık gösteren protein bulunmuştur. Bulunan bu proteinlerin 79 tanesinin ifadesi Ofis 1 çeşidinin gövdesinde artarken 76 tanesinin ifadesi ise Ofis 96 çeşidin gövdesinde arttığı gözlenmiştir. Bu iki çeşit arasındaki sayısal farklılık, diğer karşılaştırmalara göre daha az sayıdadır.

Ofis NP Gövde / Ofis 96 Gövde

Ofis NP çeşidi ile Ofis 96 çeşidinin gövdesi arasında toplam 180 tane farklılık gösteren protein bulunmuştur. Bu proteinlerin 64 tanesinin ifadesi Ofis NP'nin gövdesinde artarken, 116 tanesi Ofis 96'nın gövdesinde artmaktadır.

Ofis 1 Gövde / Ofis NP Gövde

Ofis 1 Gövde ve Ofis NP Gövde karşılaştırmasında toplam 477 adet farklılık gösteren protein bulunmuştur. Tespit edilen 477 proteinden 333 tanesinin ifadesi Ofis 1'in gövdesinde artarken 144 tanesi ise Ofis NP çeşidinin gövdesinde artmıştır. Hem kapsül hem de gövde bazında en çok bu iki çeşit arasında farklı düzeyde ifade olan protein tespit edilmiştir.

Ofis 1 Kapsül / Ofis 96 Kapsül

Çeşitler arası kapsül örneklerine ait protein karşılaştırmalarının arasında en az sayıda farklılık gösteren protein bu grupta gözlenmiş ve toplam 121 proteinin farklılık gösterdiği bulunmuştur. Proteinlerin 55 tanesi Ofis 1'de, 66 tanesinin de Ofis 96'da arttığı ortaya çıkarılmıştır.

Ofis NP Kapsül / Ofis 96 Kapsül

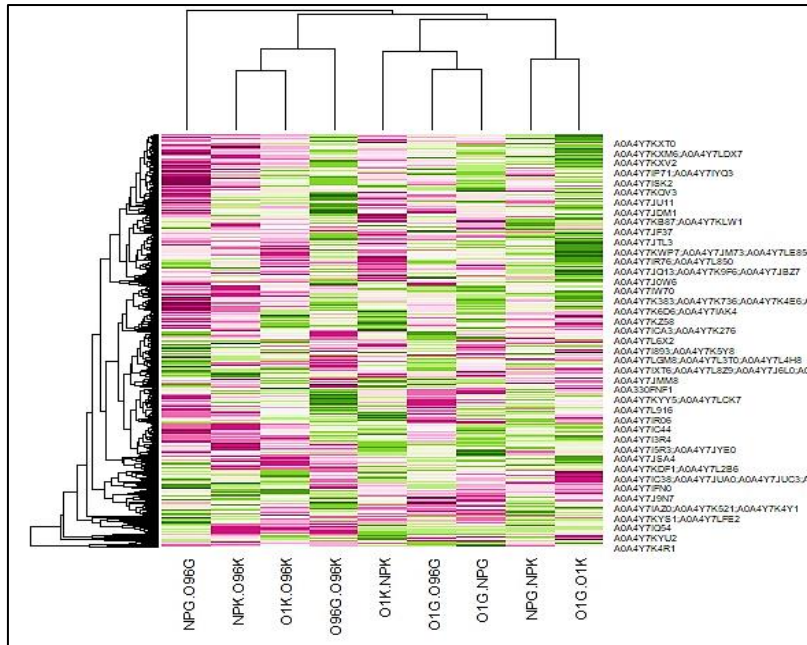
Ofis NP ile Ofis 96 çeşitlerinin kapsülleri karşılaştırıldığında 196 adet farklılık gösteren protein bulunmuştur. Bu proteinlerin 84 tanesinin ifadesi Ofis NP'nin kapsülünde artarken, 112 tanesinin Ofis 96'nın kapsülünde arttığı bulunmuştur.

Ofis 1 Kapsül / Ofis NP Kapsül

Ofis 1 Kapsül ile Ofis NP Kapsül örnekleri karşılaştırıldığında 219 adet proteinin farklılık gösterdiği bulunurken bu proteinlerden 128 tanesinin ifadesi Ofis 1'in kapsülünde, 91 tanesinin de Ofis NP'nin kapsülünde arttığı ortaya çıkarılmıştır. Çeşitler arasındaki kapsül karşılaştırmalarında en çok sayıda farklılık gösteren protein bu kıyaslamada görülmüştür.

Karşılaştırma Gruplarında Farklılık Gösteren Proteinlere Ait Heatmap

Yapılan dokuz karşılaştırmada farklılık gösteren proteinlere ait ifade profilleri Şekil 4.4'te gösterilmiştir. Genel olarak bakıldığında Ofis 1 Gövde / Ofis 1 Kapsül ve Ofis NP Gövde / Ofis NP Kapsül kıyasları, kontrol çeşidi olan Ofis 96'nın Gövde / Kapsül kıyasından daha farklı ifade profili gösterdiği ortaya çıkarılmıştır.



Şekil 4.4. Gruplarda Farklılık Gösteren Proteinlere Ait Heatmap. Renkler pembeden yeşile doğru ifade düzeyindeki artışı göstermektedir.

Karşılaştırmalardaki protein dağılımları detaylı bir şekilde incelendikten sonra proteinlerin gen ontolojileri ve yolak analizleri yapılmıştır.

4.3.3. Farklılık gösteren proteinlerin gen ontolojileri ve yolak analizleri

Örnekler arasında ifadesinin farklılık gösterdiği bulunan proteinlerin biyolojik süreç, moleküler fonksiyon ve hücresel bileşen kategorilerindeki ontoloji analizleri ve yolak analizleri yine organ ve çeşit bazında olmak üzere iki başlıkta incelenmiştir.

Analizlere ait çok sayıda tablo olduğu için gen ontolojilerinin ve yolak analizlerinin genel çerçevesi özet olarak Çizelge 4.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Gen Ontoloji Analizleri ve Yolak Analizleri Sonuçlarının Genel Çerçevesi

Proteinlerin Gen Ontolojileri ve Yolak Analizleri
Organ Bazında Ontoloji ve Yolak Analizleri
Ofis 96 Gövde / Ofis 96 Kapsül
Ofis 1 Gövde / Ofis 1 Kapsül
Ofis NP Gövde / Ofis NP Kapsül
Çeşit Bazında Ontoloji ve Yolak Analizleri
Ofis 1 Gövde / Ofis 96 Gövde
Ofis NP Gövde / Ofis 96 Gövde
Ofis 1 Gövde / Ofis NP Gövde
Ofis 1 Kapsül / Ofis 96 Kapsül
Ofis NP Kapsül / Ofis 96 Kapsül
Ofis 1 Kapsül / Ofis NP Kapsül

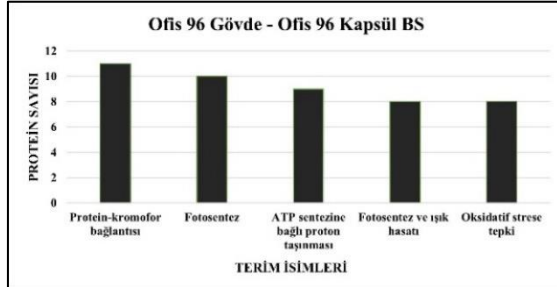
Organ Bazında Ontoloji ve Yolak Analizleri

Herbir çeşit için kapsül ve gövde organları arasında farklılık gösteren proteinlerin ontoloji ve yolak analizleri yapılmıştır.

Ofis 96 Gövde / Ofis 96 Kapsül

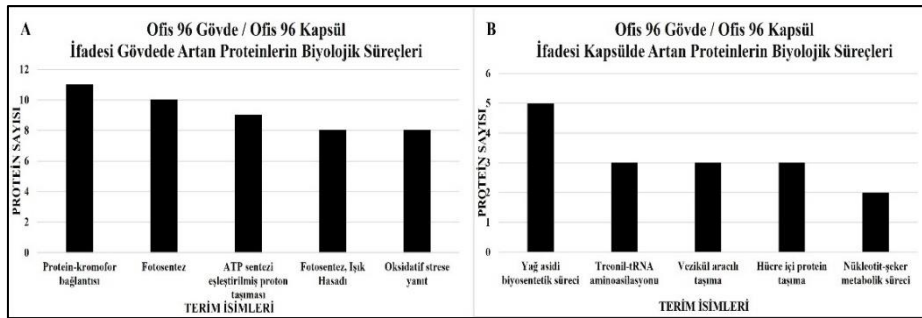
Kontrol bitkisi olan Ofis 96’nın gövde ve kapsül karşılaştırmasında farklılık gösteren proteinlerin biyolojik süreçlerine (BS) dair ontoloji analizi yapılmıştır. Toplamda 21 tane

biyolojik süreç terimi bulunmuştur (EK-1). Bu terimlerin içerisinde en çok bulunan beş terim Şekil 4.5'te gösterilirken şekle bakıldığında en fazla bulunan terimin protein-kromofor bağlantısı olduğu görülmektedir.



Şekil 4.5. Ofis 96 Gövde / Ofis 96 Kapsül Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Biyolojik Süreçlerine (BS) Ait En Çok Bulunan Terimler

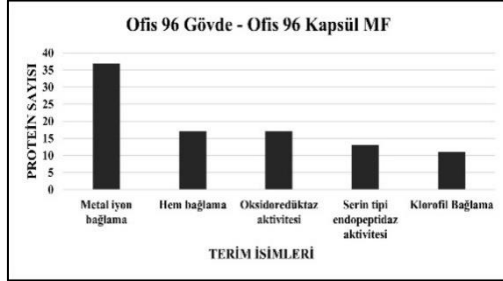
Biyolojik süreçlerin organlar arasında daha iyi incelenmesi için ifadesi Ofis 96'nın gövdesinde kapsüle göre artan proteinler ayrı analiz edilerek toplamda 18 tane biyolojik süreç terimi bulunurken kapsülünde gövdeye artan proteinlere bakıldığında toplamda yedi adet biyolojik süreç terimi ortaya çıkmıştır. Organların analizinde en çok bulunan beş terim Şekil 4.6'da gösterilmiştir. Terimlere bakıldığında bu karşılaştırmada; gövdede ifadesi artan proteinler için en çok bulunan terimin protein-kromofor bağlantısı, kapsül için ise yağ asidi biyosentetik sürecin olduğu görülmektedir.



Şekil 4.6. Ofis 96 Gövde / Ofis 96 Kapsül Grubunda İfadesi Gövde ve Kapsülde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Biyolojik Süreç Terimleri. (A) İfadesi Gövdede Artan Proteinlerin Biyolojik Süreçleri. (B) İfadesi Kapsülde Artan Proteinlerin Biyolojik Süreçleri.

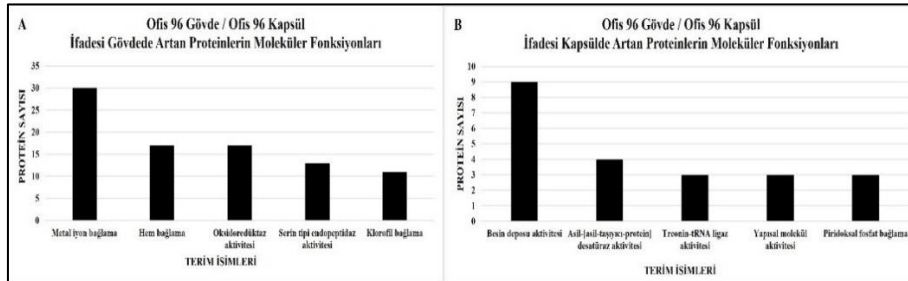
Aynı karşılaştırma grubu için ifadesi değişen proteinlerin moleküler fonksiyon kategorisi ontoloji analizi yapılmış ve proteinlerin toplam 34 moleküler fonksiyon terimine ait olduğu

ortaya çıkarılmıştır (EK-1). En çok bulunan beş terim Şekil 4.7’de gösterilmiştir. Bu terimler arasında metal iyon bağlamanın en fazla çıkan terim olduğu bulunmuştur.



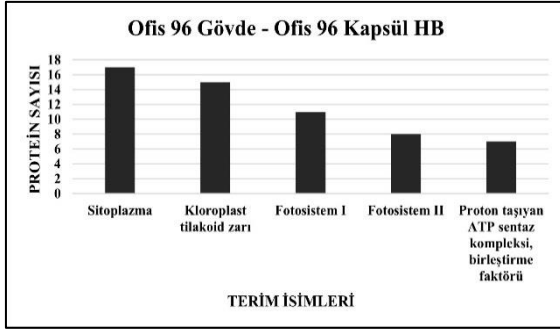
Şekil 4.7. Ofis 96 Gövde / Ofis 96 Kapsül Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Moleküler Fonksiyonlarına (MF) Ait Bazı Terimler

Moleküler fonksiyon ontoloji terimleri detaylı incelendiğinde; Ofis 96 çeşidinin gövdesinde kapsüle göre ifadesi artan proteinler için 26 moleküler fonksiyon terimi ortaya çıkarken, kapsülünde gövdeye göre artan proteinler için 12 moleküler fonksiyon terimi bulunmuştur. Her iki organ içinde en çok çıkan ilk beş terim Şekil 4.8’de gösterilmiştir. Gövdede en fazla çıkan terim, metal iyon bağlama iken kapsülde ise ilk sırayı besin deposu aktivitesi almıştır.



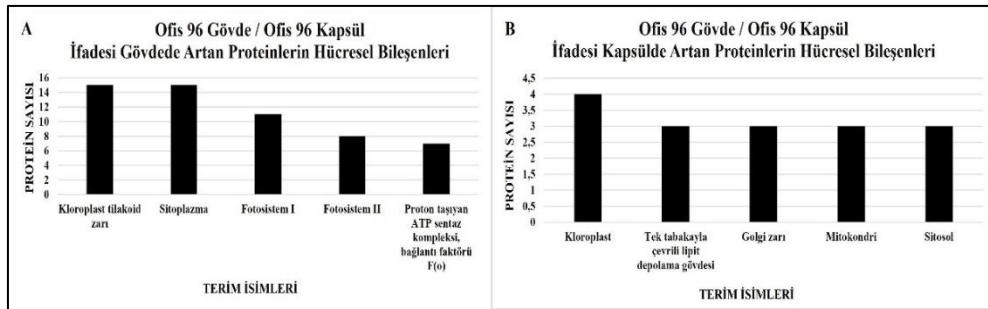
Şekil 4.8. Ofis 96 Gövde / Ofis 96 Kapsül Grubunda İfadesi Gövde ve Kapsülde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Moleküler Fonksiyon Terimleri. (A) İfadesi Gövdede Artan Proteinlerin Moleküler Fonksiyonları. (B) İfadesi Kapsülde Artan Proteinlerin Moleküler Fonksiyonları.

Ontoloji analizlerinden hücresel bileşenler kategorisi için aynı karşılaştırma grubunun farklılık gösteren proteinleri analiz edilmiş ve 18 adet hücresel bileşen terimi belirlenmiştir (EK-1). Bu analiz sonucunda ilk beş terim Şekil 4.9’da gösterilmiş olup en fazla çıkan terimin sitoplazma olduğu tespit edilmiştir.



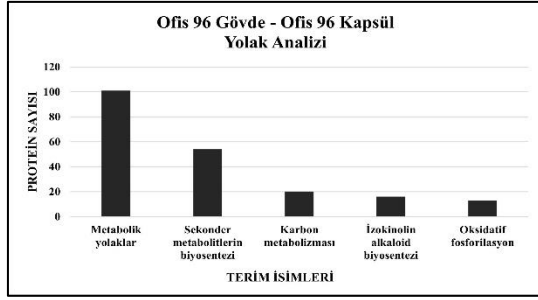
Şekil 4.9. Ofis 96 Gövde / Ofis 96 Kapsül Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Hücresel Bileşenleri (HB) Ait Bazı Terimler

Bu karşılaştırmanın hücresel bileşenleri ifade düzeylerine göre incelendiğinde ifadesi Ofis 96'nın gövdesinde artan proteinlerin 14 adet hücresel bileşen terimi olduğu bulunmuştur. Ardından kapsülünde ifadesi artan proteinlere bakıldığında ise 8 adet hücresel bileşen terimi ortaya çıkarılmıştır. Organlardan en çok çıkan beş terim Şekil 4.10'da gösterilmiştir. Bu terimlerin içerisinde en fazla çıkan terim, gövdede kloroplast tilakoid zarı olurken, kapsülde kloroplast olmuştur



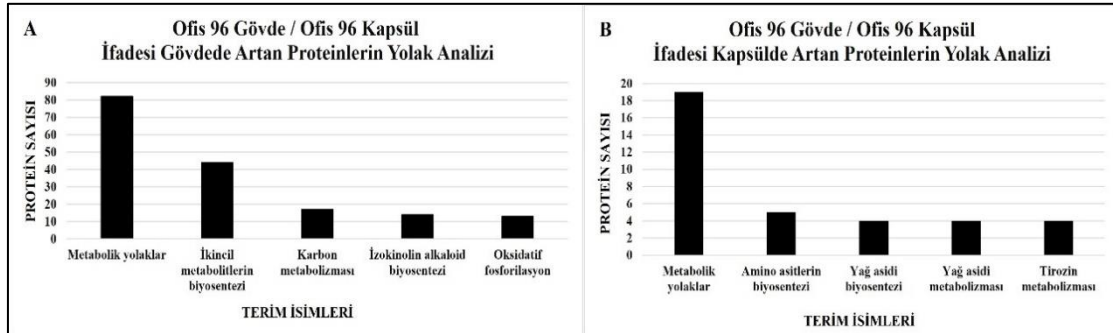
Şekil 4.10. Ofis 96 Gövde / Ofis 96 Kapsül Grubunda İfadesi Gövde ve Kapsülde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Hücresel Bileşen Terimleri. (A) İfadesi Gövdede Artan Proteinlerin Hücresel Bileşenleri. (B) İfadesi Kapsülde Artan Proteinlerin Hücresel Bileşenleri.

Ofis 96'nın Gövde / Kapsül karşılaştırmasının ontoloji analizlerinin ardından farklılık gösteren proteinlerin tümünün yolak analizine bakılmıştır. Analizler sonucunda toplam 17 terim bulunmuş (EK-2), en çok çıkan beş terim Şekil 4.11'de gösterilmiştir. Bu terimlerin arasında en fazla çıkan terim, metabolik yolaklar olmuştur.



Şekil 4.11. Ofis 96 Gövde / Ofis 96 Kapsül Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Yolak Analizlerine Ait Bazı Terimler

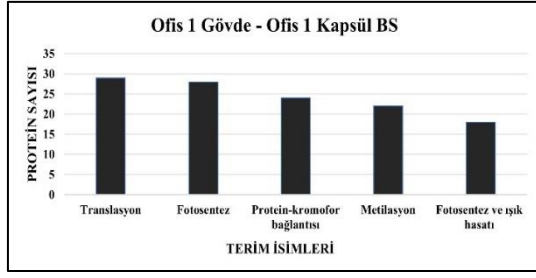
Ofis 96 Gövde / Ofis 96 Kapsül grubunda farklılık gösteren proteinlerden ifadesi gövdede ve kapsülde artan proteinlerin yolak analizine ayrı ayrı bakılmıştır. Analizler sonucunda gövdede toplam 11, kapsülde ise 10 yolak terimi bulunmuştur. Organlarda çıkan ilk beş yolak Şekil 4.12’de gösterilmiş olup bu terimlerin arasında gövdede ve kapsülde en fazla çıkan terim, metabolik yollar olmuştur.



Şekil 4.12. Ofis 96 Gövde / Ofis 96 Kapsül Grubunda İfadesi Gövde ve Kapsülde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Yolak Terimleri. (A) İfadesi Gövdede Artan Proteinlerin Yolak Analizi. (B) İfadesi Kapsülde Artan Proteinlerin Yolak Analizi.

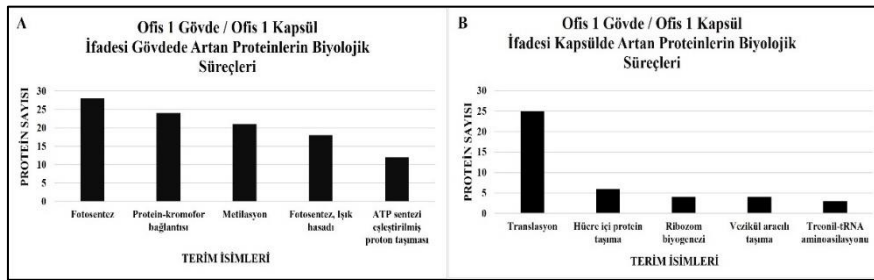
Ofis 1 Gövde / Ofis 1 Kapsül

Morfince zengin olan Ofis 1 çeşidinin Gövde / Kapsül karşılaştırmasında farklılık gösteren proteinlerin biyolojik süreçleri (BS) için ontoloji analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda 34 BS terimi elde edilmiştir (EK-3). En fazla çıkan ilk beş terim Şekil 4.13’te verilmiştir. Translasyon, içlerinde en çok çıkan terim olarak bulunmuştur.



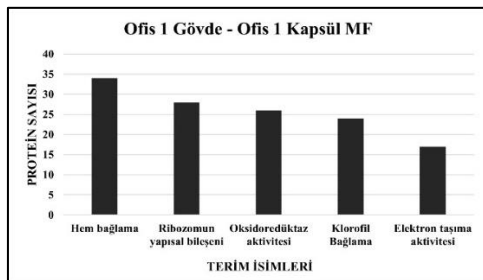
Şekil 4.13. Ofis 1 Gövde / Ofis 1 Kapsül Karşılaştırma Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Biyolojik Süreçlerine (BS) Ait Bazı Terimler

Ofis 1 çeşidinin Gövde / Kapsül karşılaştırmasına detaylı bakıldığında da Ofis 1'in gövdesinde toplamda 32 adet, kapsülünde ise yedi adet biyolojik süreç terimi bulunmuştur. Organlarda en çok bulunan ilk beş terim Şekil 4.14'te gösterilmiştir. En çok bulunan terimin gövdede fotosentez, kapsülde ise translasyon olduğu görülmektedir.



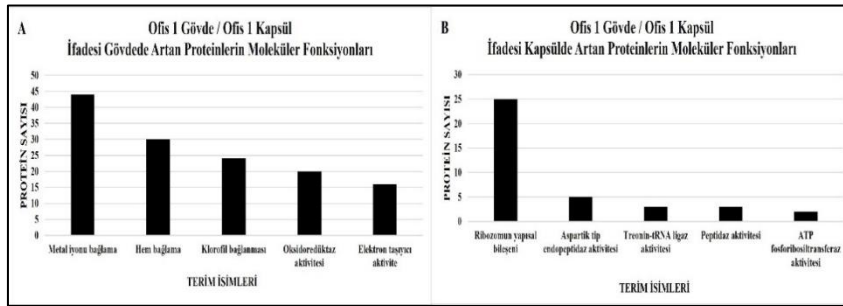
Şekil 4.14. Ofis 1 Gövde / Ofis 1 Kapsül Grubunda İfadesi Gövde ve Kapsülde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Biyolojik Süreç Terimleri. (A) İfadesi Gövdede Artan Proteinlerin Biyolojik Süreçleri. (B) İfadesi Kapsülde Artan Proteinlerin Biyolojik Süreçleri.

Aynı karşılaştırma grubunun moleküler fonksiyonları için ontoloji analizi yapılmış ve toplam 58 terim bulunmuştur (EK-3). En çok çıkan beş terim Şekil 4.15'te gösterilirken bu terimler arasında hem bağlama en fazla çıkan terim olmuştur.



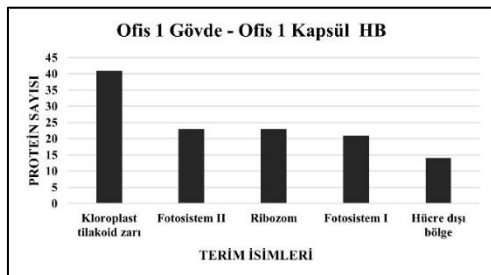
Şekil 4.15. Ofis 1 Gövde / Ofis 1 Kapsül Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Moleküler Fonksiyonlarına (MF) Ait Bazı Terimler

İfadesi Ofis 1 çeşidinin kapsüle göre gövdesinde artan proteinlerin moleküler fonksiyonları analiz edildiğinde toplam 58 moleküler fonksiyon terimi bulunmuştur. İfadesi gövdeye göre kapsülde artan proteinler analiz edildiğinde ise 10 tane moleküler fonksiyon terim ortaya çıkarılmıştır. Her iki organda karşılaştırmada en çok çıkan beş terim Şekil 4.16'da gösterilirken bu terimler arasında gövdede metal iyon bağlamanın, kapsülde ise ribozomun yapısal bileşeninin ilk sırayı aldığı görülmektedir.



Şekil 4.16. Ofis 1 Gövde / Ofis 1 Kapsül Grubunda İfadesi Gövde ve Kapsülde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Moleküler Fonksiyon Terimleri. (A) İfadesi Gövdede Artan Proteinlerin Moleküler Fonksiyonları. (B) İfadesi Kapsülde Artan Proteinlerin Moleküler Fonksiyonları.

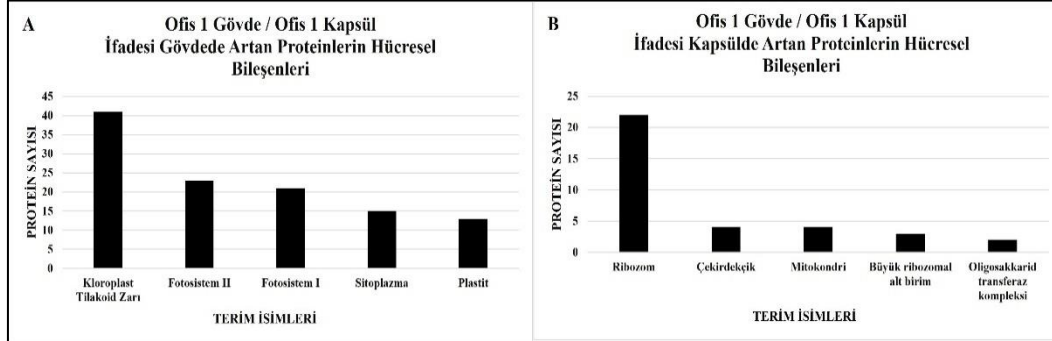
Aynı karşılaştırma grubunun ontoloji analizinde hücrel bileşenlerine ait 20 terim bulunmuştur (EK-3). En çok çıkan ilk beş terim Şekil 4.17'de gösterilmiştir. Bu terimlerin içerisinde en fazla çıkan terim, hem kloroplast tilakoid zarı olmuştur.



Şekil 4.17. Ofis 1 Gövde / Ofis 1 Kapsül Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Hücrel Bileşenleri (HB) Ait Bazı Terimler

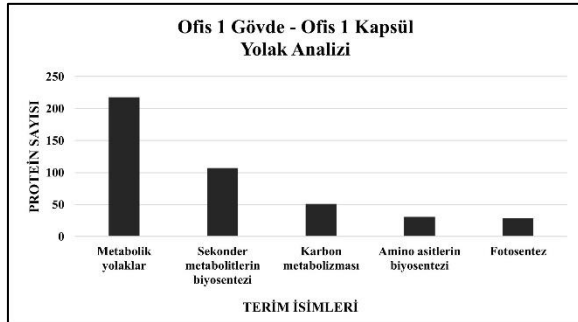
Bu karşılaştırmının hücrel bileşenleri organlara göre ayrı ayrı incelendiğinde ifadesi Ofis 1'de gövdesinde artan proteinlerin 24 adet hücrel bileşen terimi, kapsülde ise sekiz tane hücrel bileşen terimi olduğu bulunmuştur. Farklı organlarda en çok çıkan ilk beş terim ayrı

ayrı Şekil 4.18’de gösterilmiştir. Bu terimlerin içerisinde gövdede en fazla çıkan terim, kloroplast tilakoid zarı olurken kapsülde ribozom olduğu bulunmuştur.



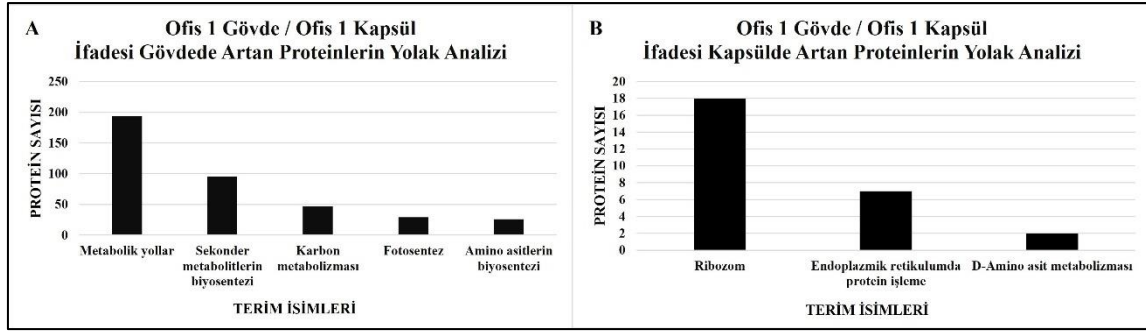
Şekil 4.18. Ofis 1 Gövde / Ofis 1 Kapsül Grubunda İfadesi Gövde ve Kapsülde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Hücresel Bileşen Terimleri. (A) İfadesi Gövdede Artan Proteinlerin Hücresel Bileşenleri. (B) İfadesi Kapsülde Artan Proteinlerin Hücresel Bileşenleri.

Ofis 1’in Gövde / Kapsül karşılaştırmasında elde edilen proteinlerin yolak analizi yapılmıştır. Analizler sonucunda toplam 21 yolak bulunmuş (EK-4), en çok çıkan ilk beş yolak Şekil 4.19’da gösterilmiştir. Farklılık gösteren proteinlerin en çok metabolik yolak, ikinci sırada da sekonder metabolitlerin biyosentezi yolağında bulundukları belirlenmiştir.



Şekil 4.19. Ofis 1 Gövde / Ofis 1 Kapsül Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Yolak Analizlerine Ait Bazı Yollar

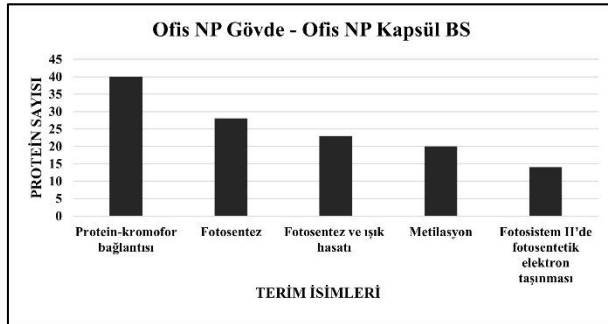
Ofis 1 Gövde / Ofis 1 Kapsül grubunda farklılık gösteren proteinlerden ifadesi gövdede ve kapsülde artan proteinlerin yolak analizine ayrı ayrı bakılmıştır. Analizler sonucunda gövdedeki proteinlere ait toplam 19 yolak terimi bulunurken kapsüldeki proteinlere ait toplam üç yolak terimi bulunmuştur. Her iki organ içinde en çok çıkan yollar Şekil 4.20’de gösterilmiştir. Bu terimlerin arasında gövdede en fazla çıkan terim, metabolik yolak olurken kapsülde ise ribozom terimi olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.20. Ofis 1 Gövde / Ofis 1 Kapsül Grubunda İfadesi Gövde ve Kapsülde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Yolak Terimleri. (A) İfadesi Gövdede Artan Proteinlerin Yolak Analizi. (B) İfadesi Kapsülde Artan Proteinlerin Yolak Analizi.

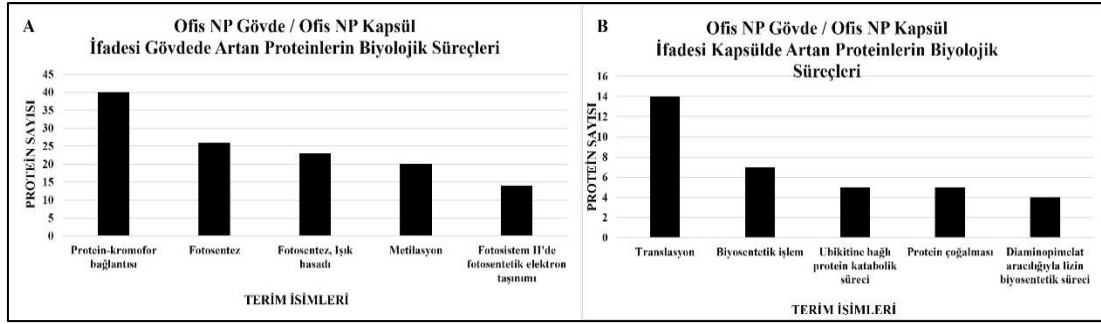
Ofis NP Gövde / Ofis NP Kapsül

Noskapince zengin olan Ofis NP çeşidinin proteinlerinin gövde ve kapsül arasında karşılaştırmasında farklılık gösteren proteinlerin biyolojik süreçleri için ontoloji analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda 39 terim çıkarılmıştır (EK-5). En fazla çıkan ilk beş terim Şekil 4.21’de verilmiştir. Protein-kromofor bağlantısı, içlerinde en çok çıkan terim olarak bulunmuştur.



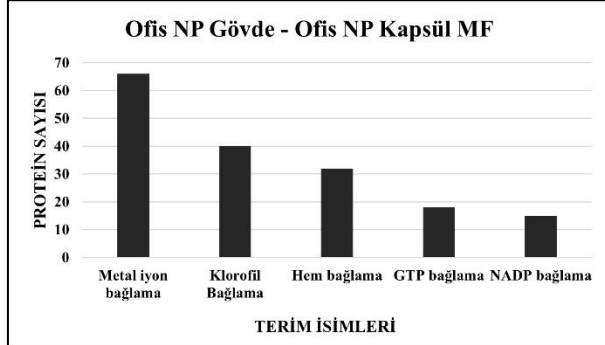
Şekil 4.21. Ofis NP Gövde / Ofis NP Kapsül Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Biyolojik Süreçlerine (BS) Ait Bazı Terimler

Farklılık göstererek ifadesi Ofis NP’nin gövdesinde kapsüle göre artan proteinler analiz edildiğinde toplamda 37 tane biyolojik süreç terimi bulunurken kapsülünde gövdeye göre artan proteinlere bakıldığında ise toplamda dokuz adet biyolojik süreç terimi bulunmuştur. Her iki organda da en çok bulunan ilk beş terim Şekil 4.22’de gösterilmiştir. Gövdede en çok bulunan terim protein-kromofor bağlantısı iken kapsülde ilk sırayı translasyon almaktadır.



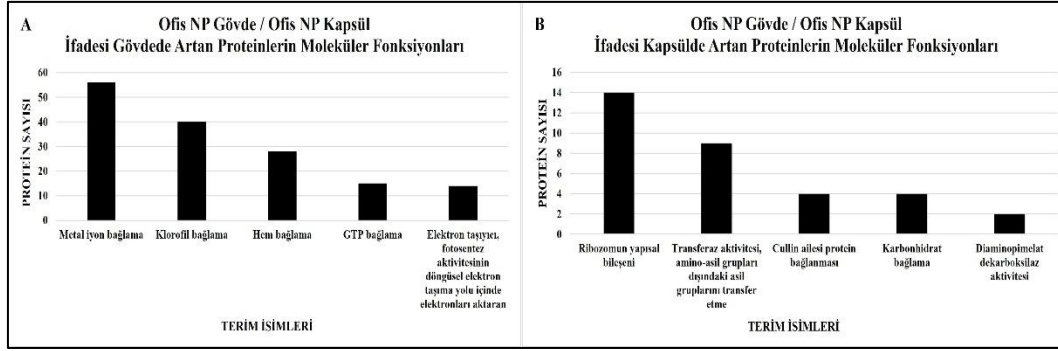
Şekil 4.22. Ofis NP Gövde / Ofis NP Kapsül Grubunda İfadesi Gövde ve Kapsülde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Biyolojik Süreç Terimleri. (A) İfadesi Gövdede Artan Proteinlerin Biyolojik Süreçleri. (B) İfadesi Kapsülde Artan Proteinlerin Biyolojik Süreçleri.

Aynı karşılaştırma grubunun moleküler fonksiyonları için ontoloji analizi yapılmış ve toplam 61 terim bulunmuştur (EK-5). En çok çıkan beş terim Şekil 4.23'te gösterilirken bu terimler arasında metal iyon bağlamanın en fazla çıkan moleküler fonksiyon olduğu ortaya çıkarılmıştır.



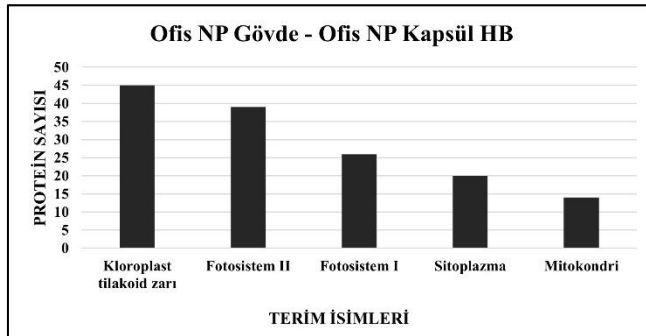
Şekil 4.23. Ofis NP Gövde / Ofis NP Kapsül Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Moleküler Fonksiyonlarına (MF) Ait Bazı Terimler

Ofis NP'nin organlarında artan ifade düzeyleri ayrı ayrı incelendiğinde, gövdede ifadesi artan proteinlere ait toplam 60 adet, kapsüldeki proteinlere ait 15 moleküler fonksiyon terimi ortaya çıkarılmıştır. Gövde ve kapsül için en çok çıkan beş terim ayrı ayrı Şekil 4.24'te gösterilmiştir. Bu terimler arasında en fazla çıkan terimler, gövdede metal iyon bağlama, kapsülde ise ribozomun yapısal bileşeni olmuştur.



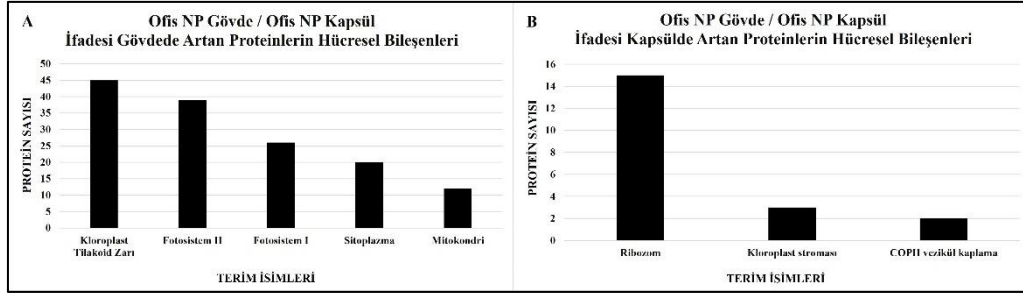
Şekil 4.24. Ofis NP Gövde / Ofis NP Kapsül Grubunda İfadesi Gövde ve Kapsülde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Moleküler Fonksiyon Terimleri. (A) İfadesi Gövdede Artan Proteinlerin Moleküler Fonksiyonları. (B) İfadesi Kapsülde Artan Proteinlerin Moleküler Fonksiyonları.

Ofis NP Gövde / Ofis NP Kapsül karşılaştırmasının ontoloji analizinde hücresel bileşenlerine ait 24 terim bulunmuştur (EK-5). En çok çıkan beş terim Şekil 4.25'te gösterilmiştir. Bu terimlerin içerisinde kloroplast tilakoid zarı en fazla çıkan terim olarak bulunmuştur.



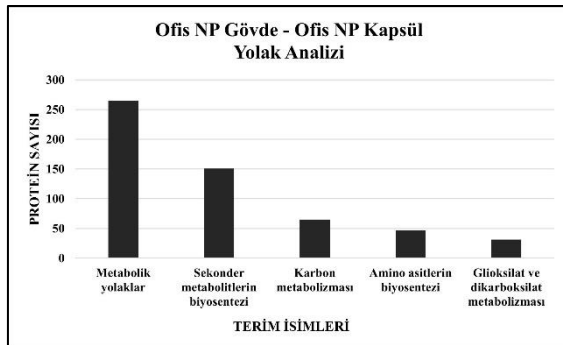
Şekil 4.25. Ofis NP Gövde / Ofis NP Kapsül Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Hücresel Bileşenleri (HB) Ait Bazı Terimler

Ofis NP Gövde / Ofis NP Kapsül karşılaştırmasının hücresel bileşenleri organlardaki ifade düzeylerine göre incelendiğinde ifadesi Ofis NP'de gövdesinde artan proteinlerin 23 adet, kapsülünde artan proteinlerin ise üç adet hücresel bileşen terimi olduğu bulunmuştur. En çok çıkan terimler Şekil 4.26'da gösterilmiştir. Gövdede kloroplast tilakoid zarı, kapsülde ise ribozom bu terimlerin içerisinde en fazla çıkan terim olmuştur.



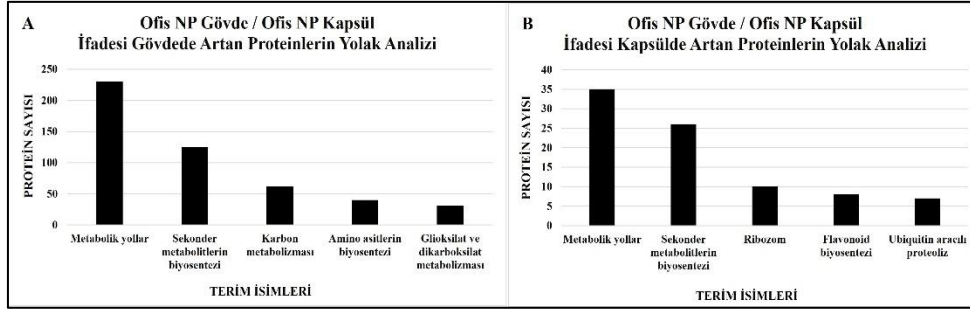
Şekil 4.26. Ofis NP Gövde / Ofis NP Kapsül Grubunda İfadesi Gövde ve Kapsülde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Hücresel Bileşen Terimleri. (A) İfadesi Gövdede Artan Proteinlerin Hücresel Bileşenleri. (B) İfadesi Kapsülde Artan Proteinlerin Hücresel Bileşenleri.

Ofis NP'nin Gövde / Kapsül karşılaştırma grubundaki proteinlerin yolak analizi sonucunda toplam 29 terim bulunmuş (EK-6), en çok çıkan beş yolak Şekil 4.27'de gösterilmiştir. Metabolik yollar en fazla çıkan yolak olmuştur.



Şekil 4.27. Ofis NP Gövde / Ofis NP Kapsül Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Yolak Analizlerine Ait Bazı Terimler

Ofis NP Gövde / Ofis NP Kapsül karşılaştırmasında farklılık göstererek ifadesi gövdede ve kapsülde artan proteinlerin yolak analizlerine ayrı ayrı bakılmıştır. Analizler sonucunda gövdede toplam 29 terim, kapsülde ise 12 yolak terimi ortaya çıkarılmıştır. Organlarda en çok çıkan beş yolak Şekil 4.28'd gösterilmiştir. Bu terimlerin arasında iki organda da en fazla çıkan terim, metabolik yollar olmuştur.



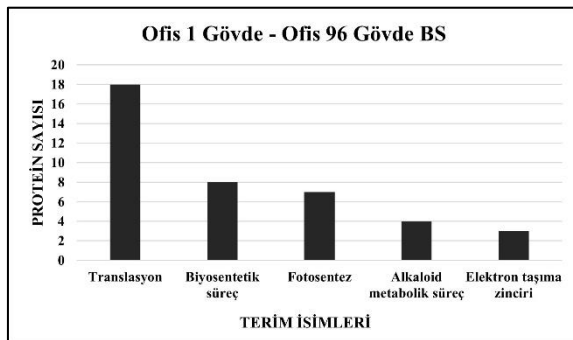
Şekil 4.28. Ofis NP Gövde / Ofis NP Kapsül Grubunda İfadesi Gövde ve Kapsülde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Yolak Terimleri. (A) İfadesi Gövdede Artan Proteinlerin Yolak Analizi. (B) İfadesi Kapsülde Artan Proteinlerin Yolak Analizi.

Çeşit Bazında Ontoloji ve Yolak Analizleri

Farklı çeşitlerin gövdeleri ve kapsülleri arasında ifadesi farklılık gösteren proteinlerin ontoloji ve yolak analizleri yapılmıştır.

Ofis 1 Gövde / Ofis 96 Gövde

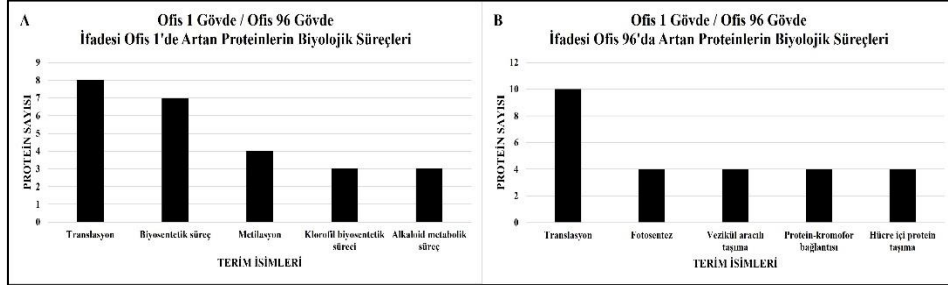
Morfince zengin olan Ofis 1'in gövdesinin kontrol bitkisi olan Ofis 96'nın gövdesi arasında farklılık gösteren proteinlerin ontoloji analizinde toplamda 14 tane biyolojik süreç terimi bulunmuştur (EK-7). En çok bulunan beş terim Şekil 4.29'da gösterilmiştir. Proteinlerin en fazla sayıda translasyon terimine sahip oldukları bulunmuştur.



Şekil 4.29. Ofis 1 Gövde / Ofis 96 Gövde Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Biyolojik Süreçlerine (BS) Ait Bazı Terimler

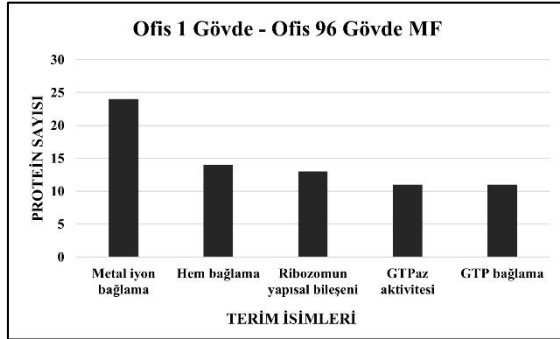
Bu karşılaştırmada farklılık göstererek ifadesi artan proteinler iki çeşitte de ayrı ayrı analiz edilmiştir. Bunun sonucunda Ofis 1'e ait toplam 10 adet biyolojik süreç terimi bulunurken Ofis 96'ya ait 12 tane biyolojik süreç terimi bulunmuştur. Çeşitlerde en çok bulunan ilk beş

terim Şekil 4.30’da ayrı ayrı gösterilmiştir. Şekle bakıldığında her iki çeşit içinde en çok bulunan terimin translayon olduğu görülmektedir.



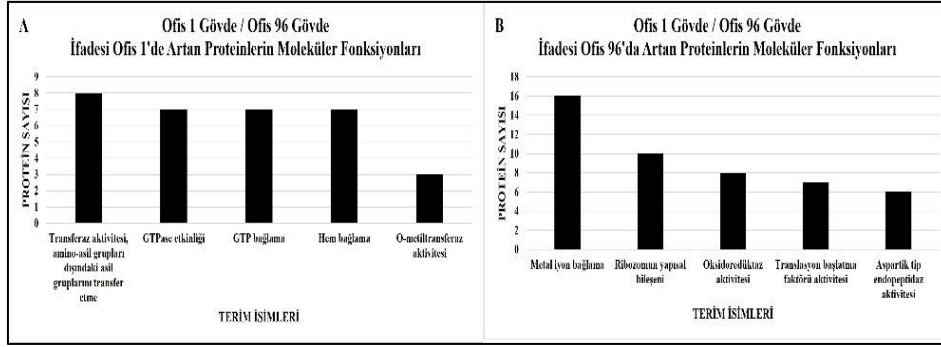
Şekil 4.30. Ofis 1 Gövde / Ofis 96 Gövde Grubunda İfadesi Çeşitlerde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Biyolojik Süreç Terimleri. (A) İfadesi Ofis 1’de Artan Proteinlerin Biyolojik Süreçleri. (B) İfadesi Ofis 96’da Artan Proteinlerin Biyolojik Süreçleri.

Aynı karşılaştırma grubunun moleküler fonksiyonları için ontoloji analizi yapılmış ve toplam 22 terim bulunmuştur (EK-7). Çıkan ilk beş terim Şekil 4.31’de gösterilirken bu terimler arasında en fazla çıkan terim, metal iyon bağlama yapısal bileşenidir.



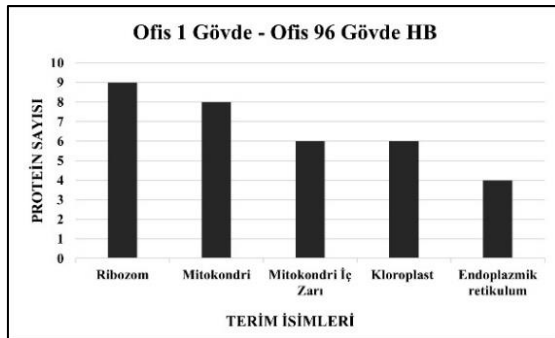
Şekil 4.31. Ofis 1 Gövde / Ofis 96 Gövde Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Moleküler Fonksiyonlarına (MF) Ait Bazı Terimler

Ofis 1 ile Ofis 96 çeşitlerinin gövde karşılaştırmasında farklılık göstererek ifadesi Ofis 1’de artan proteinlere ait toplam 12 moleküler fonksiyon terimi ortaya çıkarılmıştır. Ofis 96’da artan proteinler de analiz edilmiş ve 15 moleküler fonksiyon terimi ortaya çıkarılmıştır. İki çeşitte de en çok çıkan beş terim Şekil 4.32’de ayrı ayrı gösterilmiştir. Bu terimler arasında ilk sırayı, Ofis 1’de transferaz aktivitesi, amino-asil grupları dışındaki asil gruplarını transfer etme alırken Ofis 96’da metal iyon bağlama almıştır.



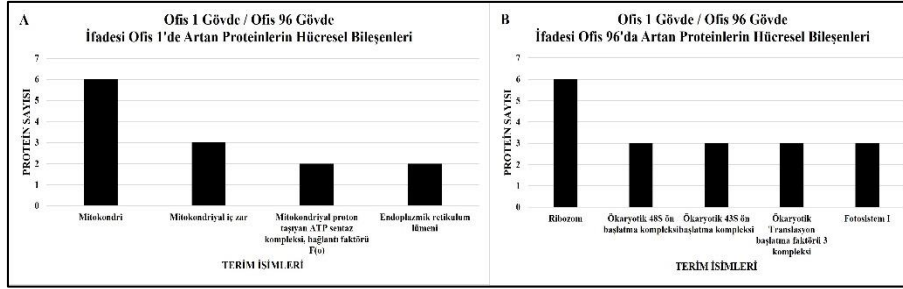
Şekil 4.32. Ofis 1 Gövde / Ofis 96 Gövde Grubunda İfadesi Çeşitlerde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Moleküler Fonksiyon Terimleri. (A) İfadesi Ofis 1'de Artan Proteinlerin Moleküler Fonksiyonları. (B) İfadesi Ofis 96'da Artan Proteinlerin Moleküler Fonksiyonları.

Ofis 1 Gövde / Ofis 96 Gövde karşılaştırmasının ontoloji analizi yapılmış ve hücresel bileşenlere ait 18 terim bulunmuştur (EK-7). Çıkan ilk beş terim Şekil 4.33'te gösterilmiştir. Bu terimlerin içerisinde ribozom en fazla çıkan terim olarak bulunmuştur.



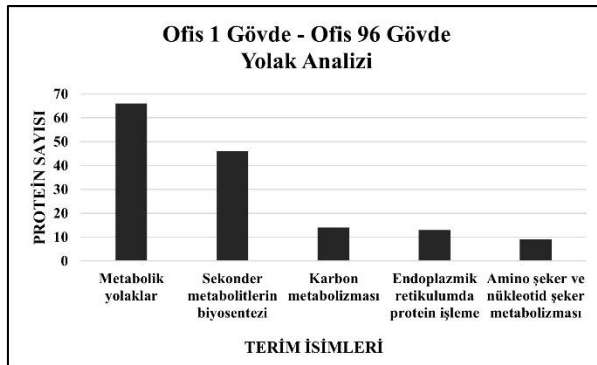
Şekil 4.33. Ofis 1 Gövde / Ofis 96 Gövde Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Hücresel Bileşenleri (HB) Ait Bazı Terimler

Aynı karşılaştırmada farklılık göstererek ifadesi farklı çeşitlerde artan proteinler analiz edilmiştir. Analiz sonucunda Ofis 1'e ait dört hücresel bileşen terimi, Ofis 96'ya ait ise 11 hücresel bileşen terimi ortaya çıkarılmıştır. Çeşitlerde en çok çıkan ilk beş terim Şekil 4.34'te ayrı ayrı gösterilmiştir. Bu terimlerin içerisinde en fazla çıkan terim, Ofis 1'de mitokondri, Ofis 96'da ribozom olmuştur.



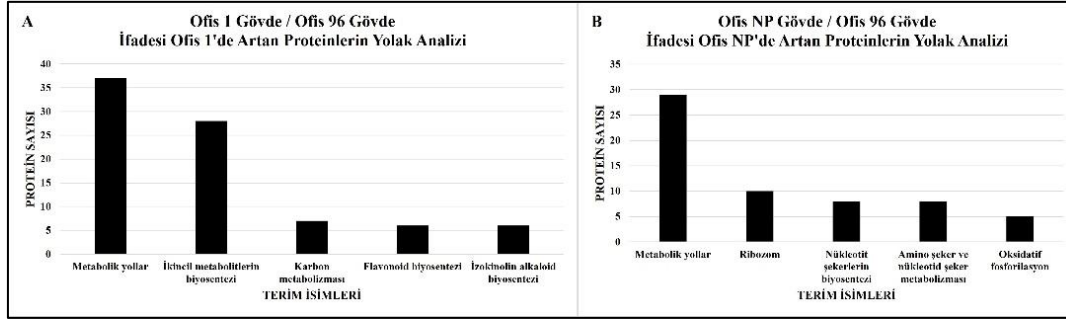
Şekil 4.34. Ofis 1 Gövde / Ofis 96 Gövde Grubunda İfadesi Çeşitlerde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Hücresel Bileşen Terimleri. (A) İfadesi Ofis 1'de Artan Proteinlerin Hücresel Bileşenleri. (B) İfadesi Ofis 96'da Artan Proteinlerin Hücresel Bileşenleri.

Ofis 1 Gövde / Ofis 96 Gövde karşılaştırmasının yolak analizi sonucunda toplam 15 terim bulunmuş (EK-8), en çok çıkan ilk beş yolak Şekil 4.35'te gösterilmiştir. Bu terimlerin arasında en fazla çıkan terim, metabolik yollar olmuştur.



Şekil 4.35. Ofis 1 Gövde / Ofis 96 Gövde Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Yolak Analizlerine Ait Bazı Terimler

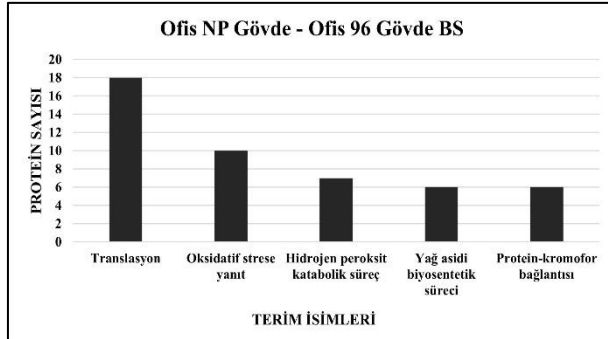
Bu karşılaştırmadaki tüm farklılık gösteren proteinlerin yolak analizinden sonra Ofis 1'de ve Ofis 96'da ifadesi artan proteinlerin yolak analizi ayrı ayrı yapılmıştır. Ofis 1 gövdede artan protein ifadelerine göre toplam dokuz yolak terimi bulunurken Ofis 96'da artan proteinlere ait toplam beş yolak terimi ortaya çıkarılmıştır. İki çeşitte de en çok çıkan ilk beş yolak Şekil 4.36'da gösterilmiştir. Bu terimlerin arasında en fazla çıkan terimler, Ofis 1'de metabolik yollar, Ofis 96'da ise ribozom olmuştur.



Şekil 4.36 Ofis 1 Gövde / Ofis 96 Gövde Grubunda İfadesi Çeşitlerde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Yolak Terimleri. (A) İfadesi Ofis 1'de Artan Proteinlerin Yolak Analizi. (B) İfadesi Ofis 96'da Artan Proteinlerin Yolak Analizi.

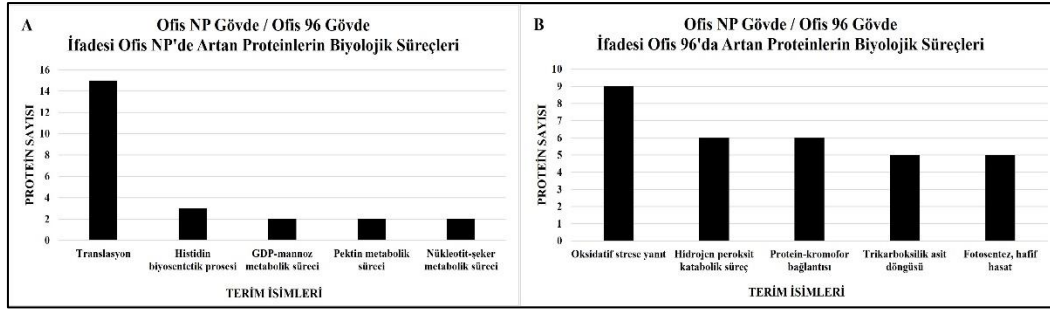
Ofis NP Gövde / Ofis 96 Gövde

Noskapince zengin olan Ofis NP / Ofis 96 çeşitlerinin gövde proteinlerinin karşılaştırmasında farklılık gösteren proteinlerin ontoloji analizi yapılmış olup biyolojik süreçlere ait 23 terim bulunmuştur (EK-9). En çok bulunan ilk beş terim Şekil 4.37'de gösterilmiştir. Bu terimlerin içerisinde en fazla translasyon terimi bulunmuştur.



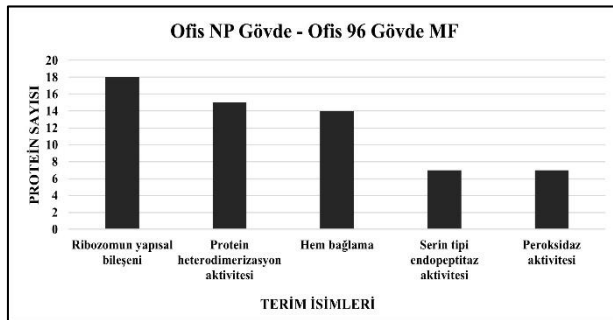
Şekil 4.37. Ofis NP Gövde / Ofis 96 Gövde Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Biyolojik Süreçlerine (BS) Ait Bazı Terimler

Ofis NP ile Ofis 96 çeşitlerinin gövde karşılaştırmasında farklılık göstererek ifadesi artan proteinler çeşitlerin ikisinde de ayrı ayrı analiz edilmiştir. Yapılan analiz sonucunda Ofis NP'ye ait sekiz adet biyolojik süreç terimi bulunurken Ofis 96'da ifadesi artan proteinlerle 17 biyolojik süreç terimi bulunmuştur. Analiz sonrası çeşitlerde en fazla bulunan ilk beş terim Şekil 4.38'de ayrı ayrı gösterilmiştir. Şekle bakıldığında Ofis NP çeşidinde en çok bulunan terim, translasyon olurken Ofis 96 çeşidinde oksidatif strese yanıt olduğu görülmektedir.



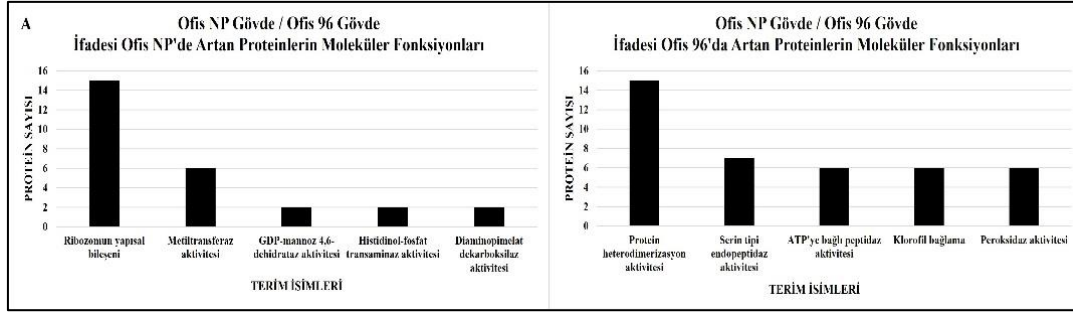
Şekil 4.38. Ofis NP Gövde / Ofis 96 Gövde Grubunda İfadesi Çeşitlerde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Biyolojik Süreç Terimleri. (A) İfadesi Ofis NP'de Artan Proteinlerin Biyolojik Süreçleri. (B) İfadesi Ofis 96'da Artan Proteinlerin Biyolojik Süreçleri.

Benzer şekilde aynı karşılaştırma grubuna ait proteinlerin moleküler fonksiyonları için ontoloji analizi yapılmıştır ve toplam 40 terim ortaya çıkarılmıştır (EK-9). En çok çıkan ilk beş terim Şekil 4.39'da gösterilmiştir. Bu terimler arasında en fazla çıkan terim, ribozomun yapısal bileşeni olmuştur.



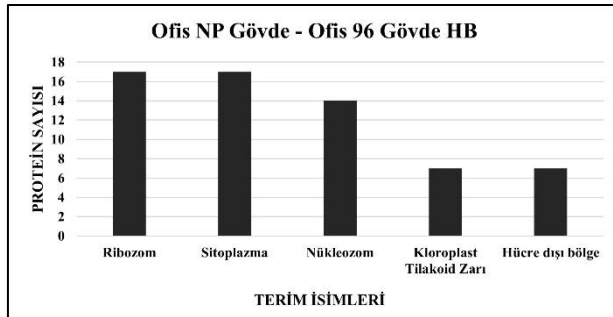
Şekil 4.39. Ofis NP Gövde / Ofis 96 Gövde Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Moleküler Fonksiyonlarına (MF) Ait Bazı Terimler

Ofis NP ile Ofis 96 çeşitlerinin gövde proteinlerinin karşılaştırmasında farklılık göstererek ifadesi Ofis NP'de artan proteinlere ait toplam 10 moleküler fonksiyon terimi ortaya çıkarılmıştır. Ofis 96'da ifadesi artan proteinler için ise toplam 39 moleküler terim ortaya çıkarılmıştır. İki çeşit içinde en çok çıkan ilk beş terim Şekil 4.40'ta gösterilmiştir. Bu terimler arasında en fazla çıkan moleküler fonksiyon terimi, Ofis NP'de ribozomun yapısal bileşeni, Ofis 96'da ise protein heterodimerizasyon aktivitesi olmuştur.



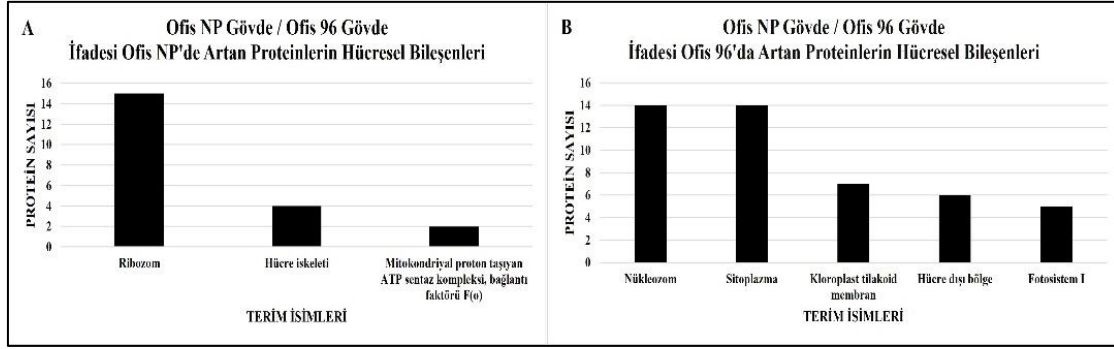
Şekil 4.40. Ofis NP Gövde / Ofis 96 Gövde Grubunda İfadesi Çeşitlerde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Moleküler Fonksiyon Terimleri. (A) İfadesi Ofis NP'de Artan Proteinlerin Moleküler Fonksiyonları. (B) İfadesi Ofis 96'da Artan Proteinlerin Moleküler Fonksiyonları.

Aynı karşılaştırma grubunun proteinlerinin ontoloji analizinde hücresel bileşenlerine ait 16 terim bulunmuştur (EK-9). En çok çıkan ilk beş terim Şekil 4.41'de gösterilmiştir. Bu terimlerin içerisinde ribozom en fazla çıkan terimdir.



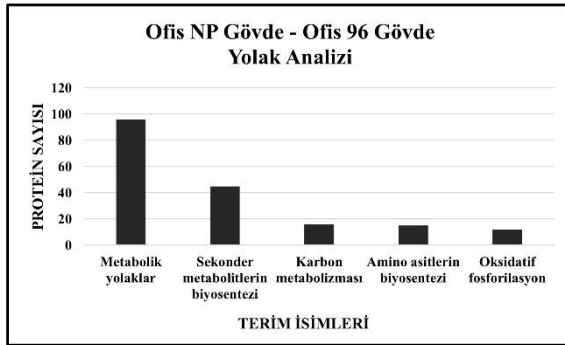
Şekil 4.41. Ofis NP Gövde / Ofis 96 Gövde Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Hücresel Bileşenleri (HB) Ait Bazı Terimler

Bu grupta farklılık gösteren proteinler çeşitler bazında ayrı ayrı analiz edilmiştir. Analiz sonucunda Ofis NP'de artan proteinler için ait üç hücresel bileşen terimi, Ofis 96'da artan proteinler için ise 12 hücresel bileşen terimi ortaya çıkarılmıştır. Çeşitlerde en çok çıkan terimler Şekil 4.42'de ayrı ayrı gösterilmiştir. Bu terimlerin içerisinde en fazla çıkan terim, Ofis NP'de ribozom, Ofis 96'da nükleozom olmuştur.



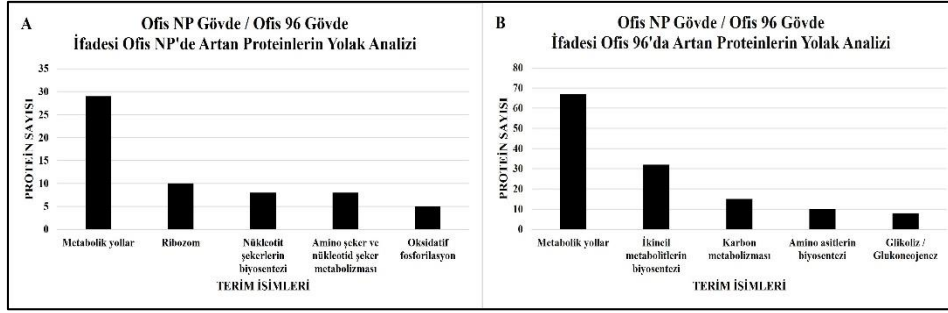
Şekil 4.42. Ofis NP Gövde / Ofis 96 Gövde Grubunda İfadesi Çeşitlerde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Hücresel Bileşen Terimleri. (A) İfadesi Ofis NP'de Artan Proteinlerin Hücresel Bileşenleri. (B) İfadesi Ofis 96'da Artan Proteinlerin Hücresel Bileşenleri.

Ofis NP Gövde / Ofis 96 Gövde karşılaştırma grubunun proteinlerinin yolak analizi yapılmıştır. Analizler sonucunda toplam 24 terim bulunmuş (EK-10), en çok çıkan beş yolak Şekil 4.43'te gösterilmiştir. Bu terimlerin arasında en fazla bulunan yolak metabolik yolaklardır.



Şekil 4.43. Ofis NP Gövde / Ofis 96 Gövde Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Yolak Analizlerine Ait Bazı Terimler

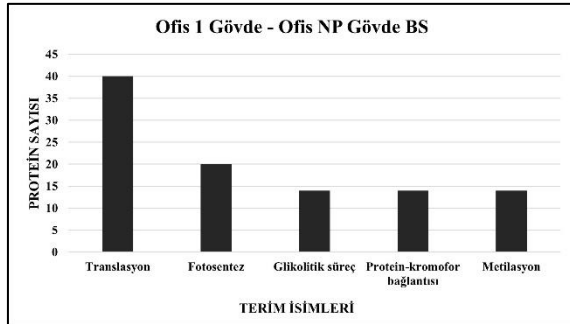
İfadesi Ofis NP'de artan proteinlerin yolak analizi sonucunda toplam dokuz yolak terimi bulunurken Ofis 96'da ifadesi artan proteinlere ait de toplam 19 yolak terimi bulunmuştur. Çeşitlerde en çok çıkan ilk beş yolak Şekil 4.44'te ayrı ayrı gösterilmiştir. Bu terimlerin arasında çeşitlerin ikisinde de en fazla çıkan terim metabolik yolaklar olmuştur.



Şekil 4.44. Ofis NP Gövde / Ofis 96 Gövde Grubunda İfadesi Çeşitlerde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Yolak Terimleri. (A) İfadesi Ofis NP'de Artan Proteinlerin Yolak Analizi. (B) İfadesi Ofis 96'da Artan Proteinlerin Yolak Analizi.

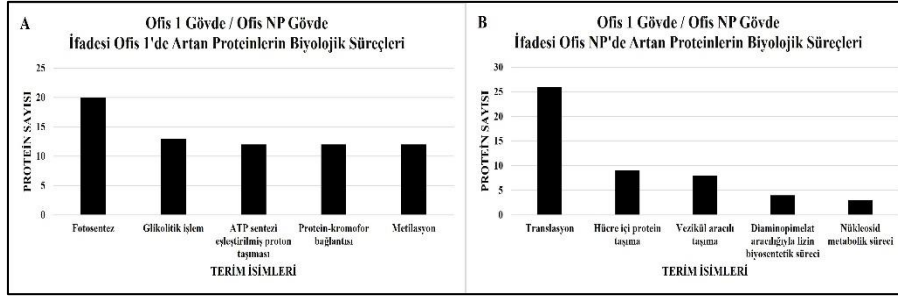
Ofis 1 Gövde / Ofis NP Gövde

Ofis 1 gövde proteinlerinin Ofis NP gövde proteinleri ile karşılaştırılmasında farklılık gösteren proteinlerin ontoloji analizi yapılmıştır ve toplamda 40 tane biyolojik süreç terimi bulunmuştur (EK-11). En çok bulunan ilk beş terim Şekil 4.45'te gösterilmiştir. Bu terimlerin içerisinde en fazla bulunan translasyon terimi olmuştur.



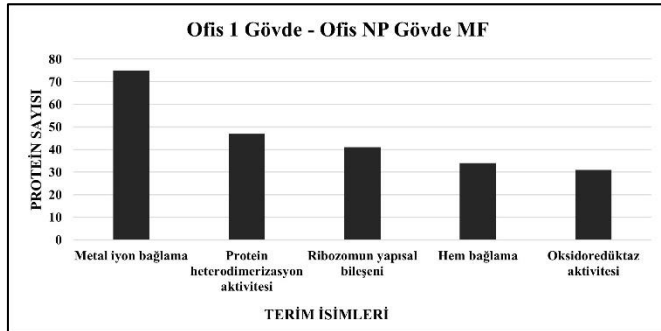
Şekil 4.45. Ofis 1 Gövde / Ofis NP Gövde Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Biyolojik Süreçlerine (BS) Ait Bazı Terimler

Ofis 1 Gövde / Ofis NP Gövde karşılaştırma grubunda farklılık göstererek ifadesi değişen proteinler çeşitlerin ikisinde ayrı ayrı analiz edilmiştir. Yapılan analiz sonucunda Ofis 1'de ifadesi artan proteinlere ait 29 biyolojik süreç terimi bulunurken Ofis NP'de ifadesi artan proteinler için 14 biyolojik süreç terimi bulunmuştur. Analiz sonrası çeşitlerde en fazla bulunan ilk beş terim Şekil 4.46'da ayrı ayrı gösterilmiştir. Ofis 1 çeşidinde en çok bulunan terim fotosentez olurken Ofis 96 çeşidinde translasyon olduğu görülmektedir.



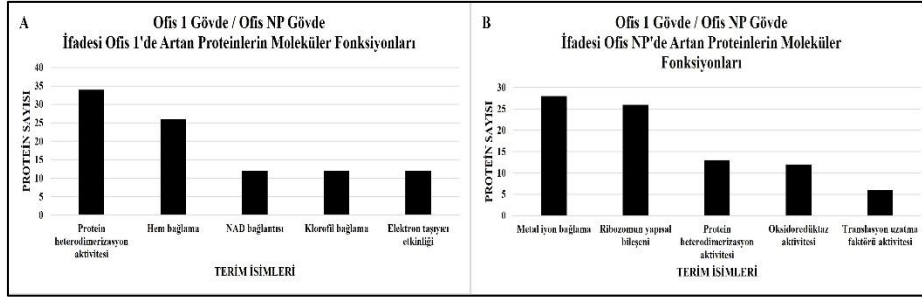
Şekil 4.46. Ofis 1 Gövde / Ofis NP Gövde Grubunda İfadesi Çeşitlerde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Biyolojik Süreç Terimleri. (A) İfadesi Ofis 1'de Artan Proteinlerin Biyolojik Süreçleri. (B) İfadesi Ofis NP'de Artan Proteinlerin Biyolojik Süreçleri.

Aynı karşılaştırma grubundan elde edilen proteinlerin moleküler fonksiyonları için ontoloji analizi yapılmıştır ve toplam 64 terim çıkarılmıştır (EK-11). En çok çıkan ilk beş terim Şekil 4.47'de gösterilmiştir. Bu terimler arasında en fazla çıkan terim metal iyon bağlama olmuştur.



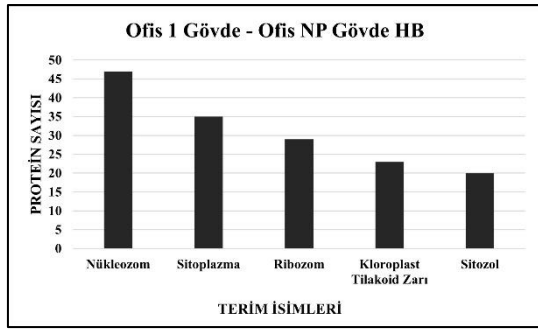
Şekil 4.47. Ofis 1 Gövde / Ofis NP Gövde Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Moleküler Fonksiyonlarına (MF) Ait Bazı Terimler

Ofis 1 ile Ofis NP çeşitlerinde farklılık göstererek ifadesi Ofis 1'de artan proteinlere ait toplam 51 moleküler fonksiyon terimi ortaya çıkarılmıştır. Ofis NP'de artan proteinlerin analizinde ise 25 moleküler fonksiyon terimi ortaya çıkarılmıştır. İki çeşitte de en çok çıkan ilk beş terim Şekil 4.48'de ayrı ayrı gösterilmiştir. Bu terimler arasında ilk sırayı Ofis 1 için protein heterodimerizasyon aktivitesi alırken Ofis NP'de metal iyon bağlama almıştır



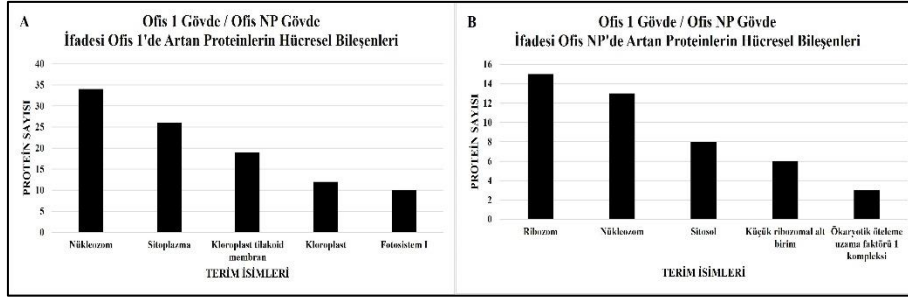
Şekil 4.48. Ofis 1 Gövde / Ofis NP Gövde Grubunda İfadesi Çeşitlerde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Moleküler Fonksiyon Terimleri. (A) İfadesi Ofis 1'de Artan Proteinlerin Moleküler Fonksiyonları. (B) İfadesi Ofis NP'de Artan Proteinlerin Moleküler Fonksiyonları.

Ofis 1 Gövde / Ofis NP Gövde protein karşılaştırmasının ontoloji analizinde hücrenel bileşenlerine ait 33 terim bulunmuştur (EK-11). En çok çıkan ilk beş terim Şekil 4.49'da gösterilmiştir. Bu terimlerin içerisinde nükleozom en fazla çıkan terim olmuştur.



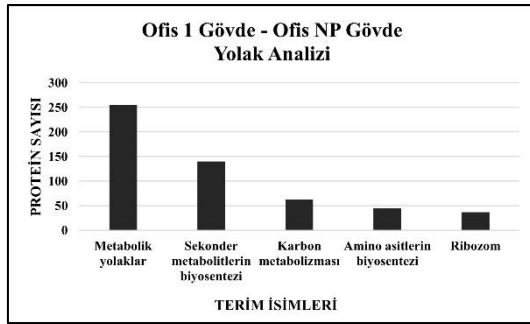
Şekil 4.49. Ofis 1 Gövde / Ofis NP Gövde Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Hücrenel Bileşenleri (HB) Ait Bazı Terimler

Bu karşılaştırmada farklılık göstererek ifadesi her iki çeşitte ayrı ayrı artan proteinler analiz edilmiştir. Yapılan analiz sonucunda Ofis 1'de ifadesi artan proteinler için 21 hücrenel bileşen terimi, Ofis NP'de ifadesi artan proteinler için ise 13 hücrenel bileşen terimi bulunmuştur. Çeşitlerde en çok çıkan terimler Şekil 4.50'de ayrı ayrı gösterilmiştir. Bu terimlerin içerisinde en fazla çıkan terim Ofis 1 için nükleozom, Ofis NP için ribozom olmuştur.



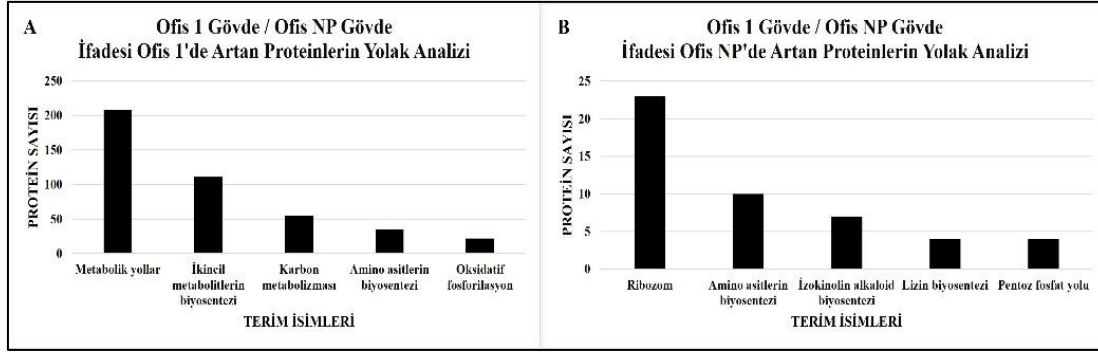
Şekil 4.50. Ofis 1 Gövde / Ofis NP Gövde Grubunda İfadesi Çeşitlerde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Hücresel Bileşen Terimleri. (A) İfadesi Ofis 1'de Artan Proteinlerin Hücresel Bileşenleri. (B) İfadesi Ofis NP'de Artan Proteinlerin Hücresel Bileşenleri.

Bu karşılaştırma grubunun yolak analizi sonucunda toplam 27 terim bulunmuştur (EK-12). En çok çıkan ilk beş yolak Şekil 4.51'de gösterilirken bu terimlerin arasında en fazla çıkan terim metabolik yollar olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.51. Ofis 1 Gövde / Ofis NP Gövde Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Yolak Analizlerine Ait Bazı Terimler

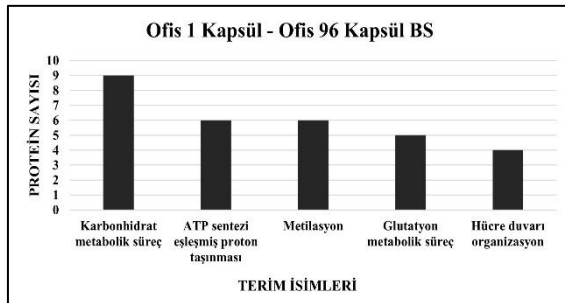
İfadesi Ofis 1 gövdede ve Ofis NP gövdede artan proteinlerin yolak analizleri ayrı ayrı yapılmış ve analiz sonucunda Ofis 1'deki ifadesi artan proteinlere ait toplam 25 yolak bulunurken Ofis NP'de ifadesi artan proteinlere ait altı yolak bulunmuştur. Çeşitlerde en çok çıkan ilk beş yolak Şekil 4.52'de ayrı ayrı gösterilmiştir. Gövdede en fazla sayıda metabolik yolak bulunurken kapsülde en çok ribozom bulunmuştur.



Şekil 4.52. Ofis 1 Gövde / Ofis NP Gövde Grubunda İfadesi Çeşitlerde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Yolak Terimleri. (A) İfadesi Ofis 1'de Artan Proteinlerin Yolak Analizi. (B) İfadesi Ofis NP'de Artan Proteinlerin Yolak Analizi.

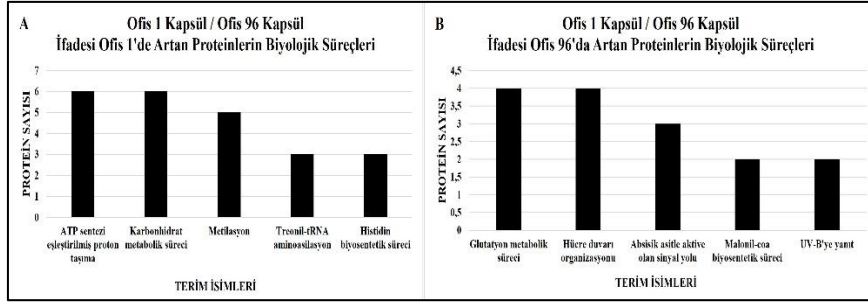
Ofis 1 Kapsül / Ofis 96 Kapsül

Ofis 1 kapsül ve Ofis 96 kapsülü arasında farklılık gösteren proteinlerin ontoloji analizi yapılmıştır ve toplamda 17 tane biyolojik süreç terimi bulunmuştur (EK-13). En çok bulunan ilk beş terim Şekil 4.53'te gösterilmiştir. Bu terimlerin içerisinde en fazla karbonhidrat metabolik süreç terimi bulunmuştur.



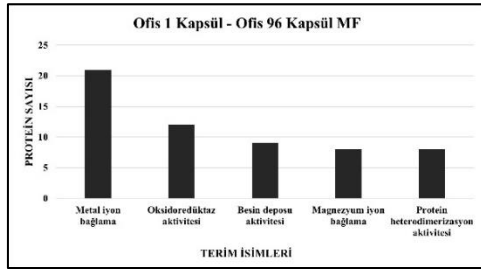
Şekil 4.53. Ofis 1 Kapsül / Ofis 96 Kapsül Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Biyolojik Süreçlerine(BS) Ait Bazı Terimler

Bu karşılaştırmada farklılık göstererek ifadesi artan proteinler iki çeşitte ayrı ayrı analiz edilmiştir. Bunun sonucunda Ofis 1'de ifadesi artan proteinlerin 11 adet biyolojik süreçte görev aldıkları, Ofis 96'da ifadesi artan proteinlerin ise sekiz biyolojik süreçte görev aldıkları bulunmuştur. Çeşitlerde en çok bulunan ilk beş terim Şekil 4.54'te ayrı ayrı gösterilmiştir. Ofis 1 çeşidi için en çok bulunan terim, ATP sentezi eşleştirilmiş proton taşınması olurken Ofis 96 çeşidi için glutatyon metabolik süreci olduğu görülmektedir.



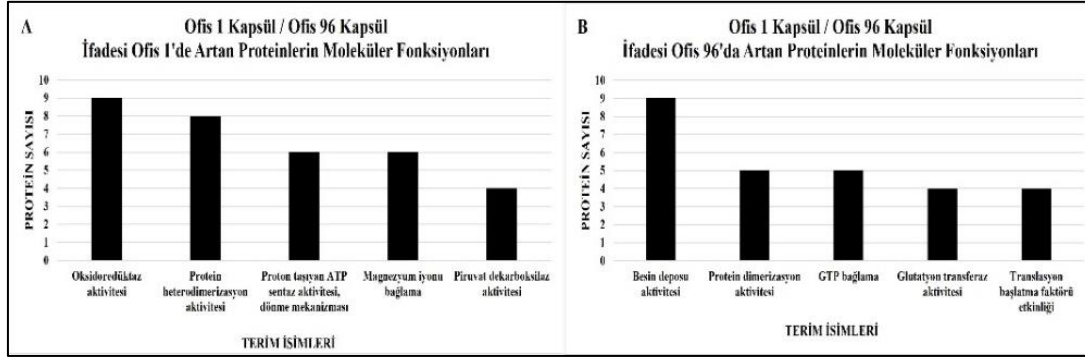
Şekil 4.54. Ofis 1 Kapsül / Ofis 96 Kapsül Grubunda İfadesi Çeşitlerde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Biyolojik Süreç Terimleri. (A) İfadesi Ofis 1'de Artan Proteinlerin Biyolojik Süreçleri. (B) İfadesi Ofis 96'da Artan Proteinlerin Biyolojik Süreçleri.

Ofis 1 Kapsül / Ofis 96 Kapsül karşılaştırma grubunun moleküler fonksiyon terimleri için ontoloji analizi yapılmıştır ve toplam 31 terim ortaya çıkarılmıştır (EK-13). En çok çıkan ilk beş terim Şekil 4.55'te gösterilmiştir. Bu terimler arasında en fazla çıkan terim metal iyon bağlama olmuştur.



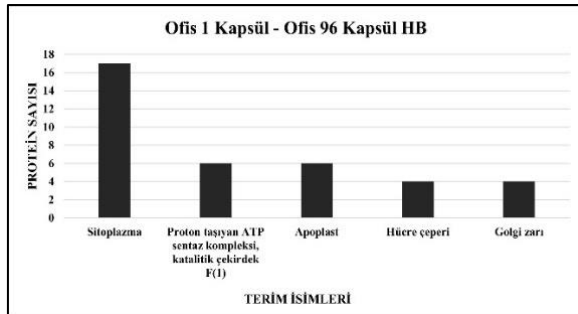
Şekil 4.55. Ofis 1 Kapsül / Ofis 96 Kapsül Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Moleküler Fonksiyonlarına (MF) Ait Bazı Terimler

Ofis 1 ile Ofis 96 çeşitlerinin kapsül karşılaştırmasında farklılık göstererek ifadesi Ofis 1'de artan proteinlere ait toplam 19 moleküler fonksiyon terimi bulunurken Ofis 96'da artan proteinler için 16 terim ortaya çıkarılmıştır. İki çeşitte de en çok çıkan ilk beş terim Şekil 4.56'da gösterilmiştir. Bu terimler arasında ilk sırayı Ofis 1'de oksidoredüktaz aktivitesi alırken Ofis 96'da besin deposu aktivitesi almıştır.



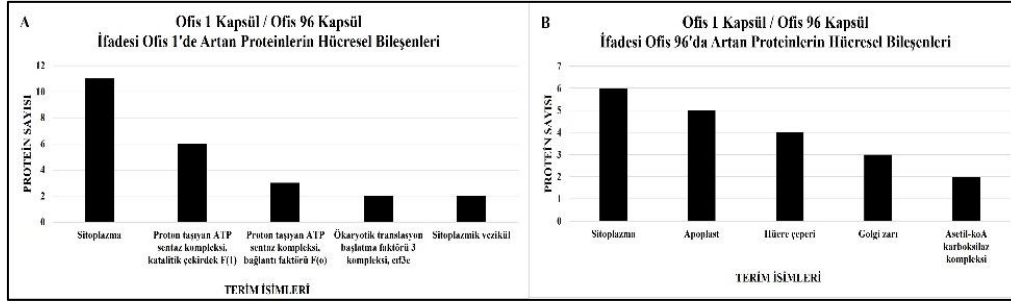
Şekil 4.56. Ofis 1 Kapsül / Ofis 96 Kapsül Grubunda İfadesi Çeşitlerde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Moleküler Fonksiyon Terimleri. (A) İfadesi Ofis 1'de Artan Proteinlerin Moleküler Fonksiyonları. (B) İfadesi Ofis 96'da Artan Proteinlerin Moleküler Fonksiyonları.

Aynı karşılaştırma grubunun ontoloji analizinde hücresel bileşenlere ait 13 terim bulunmuştur (EK-13). En çok çıkan ilk beş terim Şekil 4.57'de gösterilmiştir. Bu terimlerin içerisinde sitoplazma en fazla çıkan terim olarak bulunmuştur.



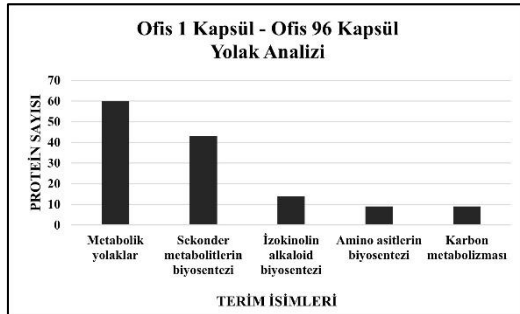
Şekil 4.57. Ofis 1 Kapsül / Ofis 96 Kapsül Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Hücresel Bileşenleri (HB) Ait Bazı Terimler

Ofis 1 ile Ofis 96 çeşitlerinin kapsül karşılaştırmasında farklılık göstererek ifadesi çeşitlerde ayrı ayrı artan proteinler analiz edilerek hücresel bileşenler ortaya çıkarılmıştır. Analiz sonucunda Ofis 1'e ait yedi hücresel bileşen terimi, Ofis 96'ya ait ise yine yedi hücresel bileşen terimi ortaya çıkarılmıştır. Çeşitlerde en çok çıkan ilk beş terim Şekil 4.58'de arı ayrı gösterilmiştir. Her iki çeşit içinde en çok bulunan terimin sitoplazma olduğu görülmektedir.



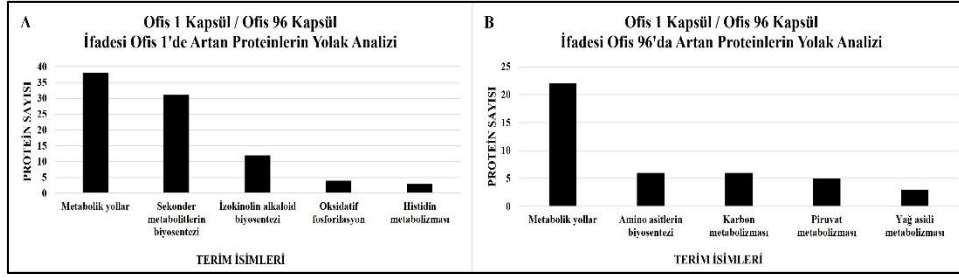
Şekil 4.58. Ofis 1 Kapsül / Ofis 96 Kapsül Grubunda İfadesi Çeşitlerde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Hücresel Bileşen Terimleri. (A) İfadesi Ofis 1'de Artan Proteinlerin Hücresel Bileşenleri. (B) İfadesi Ofis 96'da Artan Proteinlerin Hücresel Bileşenleri.

Ofis 1 Kapsül / Ofis 96 Kapsül karşılaştırma grubunda elde edilen proteinlerin yolak analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda toplam 12 terim bulunmuş (EK-14), en çok çıkan ilk beş yolak Şekil 4.59'da gösterilmiştir. Bu terimlerin arasında en fazla çıkan terim metabolik yollar olmuştur.



Şekil 4.59. Ofis 1 Kapsül / Ofis 96 Kapsül Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Yolak Analizlerine Ait Bazı Terimler

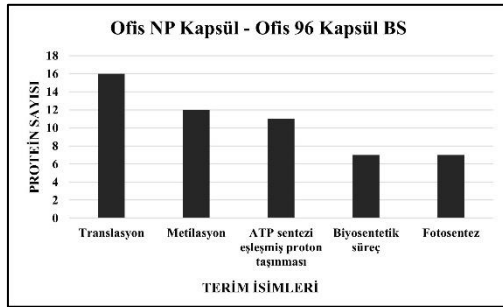
Kapsülleri karşılaştırılan Ofis 1 ve Ofis NP'de ifadesi artan proteinlerin yolak analizlerine ayrı ayrı bakılmıştır. Analizler sonucunda Ofis 1'deki ifadesi artan proteinlere ait toplam sekiz yolak terimi bulunurken Ofis 96'da ifadesi artan proteinlere ait yedi yolak terimi bulunmuştur. Çeşitlerde en çok çıkan ilk beş yolak Şekil 4.60'ta ayrı ayrı gösterilmiştir. Bu terimlerin arasında çeşitlerin ikisinde de en fazla çıkan terim metabolik yollar olmuştur.



Şekil 4.60. Ofis 1 Kapsül / Ofis 96 Kapsül Grubunda İfadesi Çeşitlerde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Yolak Terimleri. (A) İfadesi Ofis 1'de Artan Proteinlerin Yolak Analizi. (B) İfadesi Ofis 96'da Artan Proteinlerin Yolak Analizi.

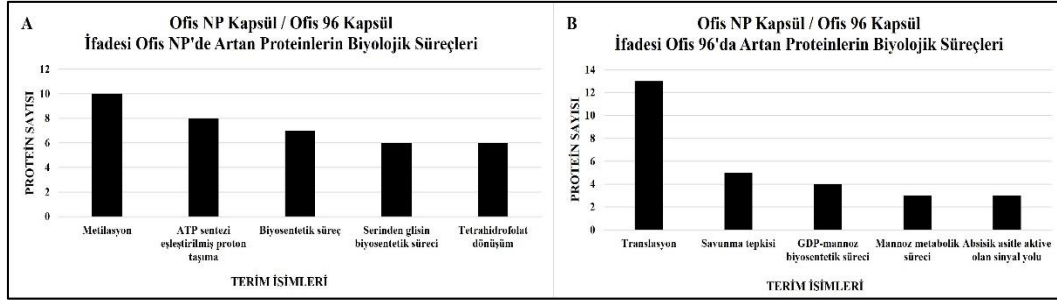
Ofis NP Kapsül / Ofis 96 Kapsül

Ofis NP'nin kapsülünün Ofis 96'nın kapsülüne karşılaştırmasında farklılık gösteren proteinlerin ontoloji analizi yapılmıştır ve toplamda 20 tane biyolojik süreç terimi bulunmuştur (EK-15). En çok bulunan ilk beş terim Şekil 4.61'de gösterilmiştir. Bu terimlerin içerisinde en fazla translasyon terimi bulunmuştur.



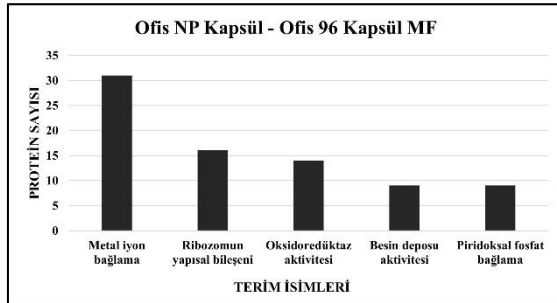
Şekil 4.61. Ofis NP Kapsül / Ofis 96 Kapsül Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Biyolojik Süreçlerine (BS) Ait Bazı Terimler

Ofis NP ile Ofis 96 çeşitlerinin kapsül karşılaştırmasında farklılık göstererek ifadesi artan proteinler çeşitlerinin ikisinde de ayrı ayrı analiz edilmiştir. Yapılan analiz sonucunda Ofis NP'de ifadesi artan proteinler için 17 adet biyolojik süreç terimi bulunurken Ofis 96'da ifadesi artan proteinler için dokuz biyolojik süreç terimi bulunmuştur. Çeşitlerde en fazla bulunan ilk beş terim Şekil 4.62'de ayrı ayrı gösterilmiştir. Ofis NP çeşidinde en çok bulunan terim metilasyon olurken Ofis 96 çeşidinde translasyondur.



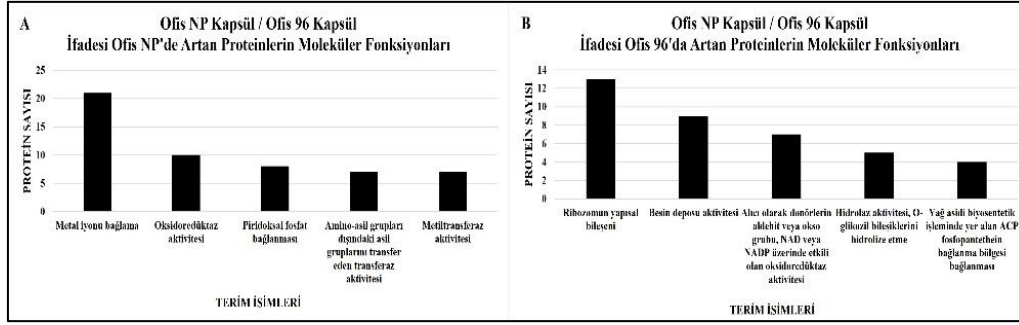
Şekil 4.62. Ofis NP Kapsül / Ofis 96 Kapsül Grubunda İfadesi Çeşitlerde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Biyolojik Süreç Terimleri. (A) İfadesi Ofis NP'de Artan Proteinlerin Biyolojik Süreçleri. (B) İfadesi Ofis 96'da Artan Proteinlerin Biyolojik Süreçleri.

Ofis NP Kapsül / Ofis 96 Kapsül kıyaslamasından elde edilen proteinlerin moleküler fonksiyon ontoloji analizi yapılmıştır ve toplam 33 terim ortaya çıkarılmıştır (EK-15). En çok çıkan ilk beş terim Şekil 4.63'te gösterilmiştir. Bu terimler arasında en fazla çıkan terim metal iyon bağlama olmuştur.



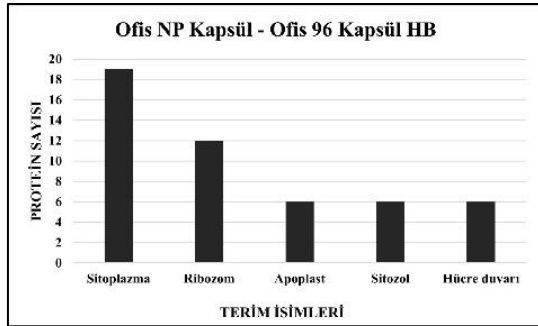
Şekil 4.63. Ofis NP Kapsül / Ofis 96 Kapsül Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Moleküler Fonksiyonlarına (MF) Ait Bazı Terimler

Ofis NP ile Ofis 96 çeşitlerinin kapsül karşılaştırmasında farklılık göstererek ifadesi Ofis NP'de artan proteinlere ait toplam 22 moleküler fonksiyon terimi ortaya çıkarılmıştır. Ofis 96'da ifadesi artan proteinler analiz edilerek toplam 21 moleküler terim ortaya çıkarılmıştır. İki çeşit içinde en çok çıkan ilk beş terim Şekil 4.64'te gösterilmiştir. Bu terimler arasında en fazla çıkan moleküler fonksiyon terimi Ofis NP'de metal iyon bağlama, Ofis 96'da ise ribozomun yapısal bileşeni olmuştur.



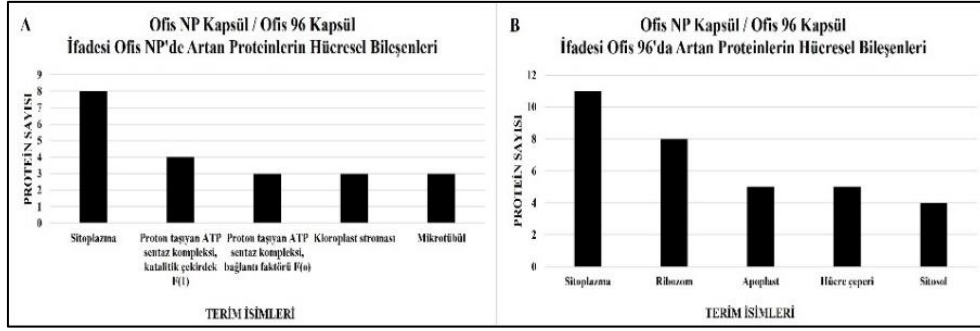
Şekil 4.64. Ofis NP Kapsül / Ofis 96 Kapsül Grubunda İfadesi Çeşitlerde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Moleküler Fonksiyon Terimleri. (A) İfadesi Ofis NP'de Artan Proteinlerin Moleküler Fonksiyonları. (B) İfadesi Ofis 96'da Artan Proteinlerin Moleküler Fonksiyonları.

Aynı karşılaştırmanın ontoloji analizinde hücresel bileşenlerine ait 18 terim bulunmuştur (EK-15). En çok çıkan ilk beş terim Şekil 4.65'te gösterilmiştir. Bu terimlerin içerisinde en fazla çıkan terim sitoplazma olmuştur.



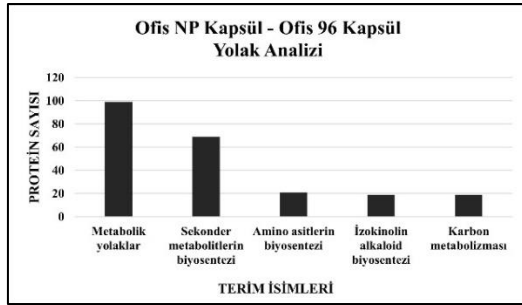
Şekil 4.65. Ofis NP Kapsül / Ofis 96 Kapsül Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Hücresel Bileşenleri (HB) Ait Bazı Terimler

Ofis NP Kapsül / Ofis 96 Kapsül karşılaştırmasında farklılık göstererek ifadesi çeşitlerde artan proteinler ayrı ayrı analiz edilmiş ve hücresel bileşenlerine bakılmıştır. Analiz sonucunda ifadesi Ofis NP'de artan proteinler için yedi hücresel bileşen terimi, Ofis 96'da ifadesi artan proteinler için ise 13 hücresel bileşen terimi ortaya çıkarılmıştır. Çeşitlerde en çok çıkan ilk beş terim Şekil 4.66'da ayrı ayrı gösterilmiştir. Her iki çeşit içinde en çok bulunan terimin sitoplazmadır.



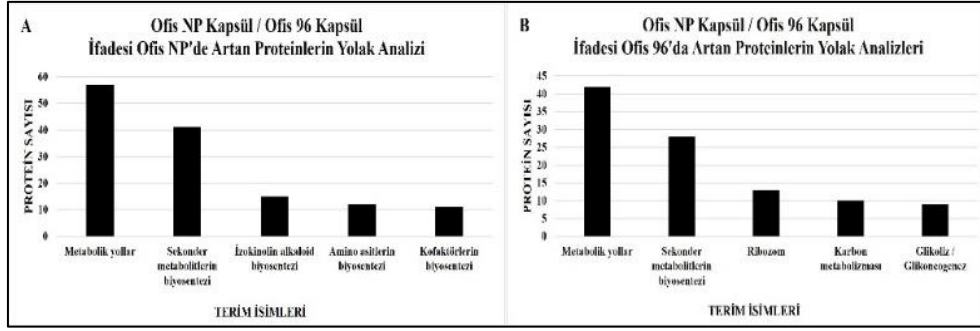
Şekil 4.66. Ofis NP Kapsül / Ofis 96 Kapsül Grubunda İfadesi Çeşitlerde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Hücresel Bileşen Terimleri. (A) İfadesi Ofis NP'de Artan Proteinlerin Hücresel Bileşenleri. (B) İfadesi Ofis 96'da Artan Proteinlerin Hücresel Bileşenleri.

Karşılaştırma grubundan elde edilen proteinlerin yolak analizi sonucunda toplam 20 terim bulunmuştur (EK-16) ve en çok çıkan ilk beş yolak Şekil 4.67'de gösterilmiştir. Bu terimlerin arasında en fazla sayıda metabolik yollar bulunmuştur.



Şekil 4.67. Ofis NP Kapsül / Ofis 96 Kapsül Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Yolak Analizlerine Ait Bazı Terimler

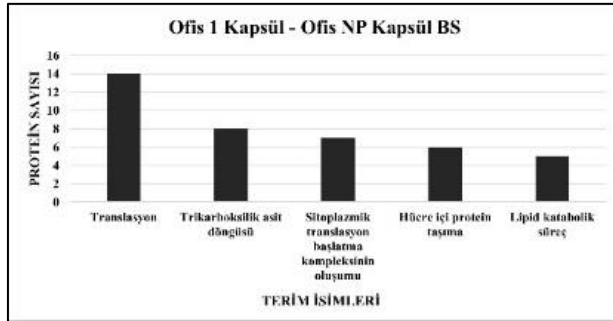
Karşılaştırmada Ofis NP'de ve Ofis 96'da ifadesi ayrı ayrı artan proteinlerin yolak analizi yapılmıştır. Ofis NP gövdede ifadesi artan proteinler için toplam 19 yolak terimi bulunurken Ofis 96'da artan proteinlere ait toplam 12 yolak terimi ortaya çıkarılmıştır. İki çeşitte de en çok çıkan ilk beş yolak Şekil 4.68'de gösterilmiştir. Bu terimlerin arasında çeşitlerin ikisinde de en fazla çıkan terim metabolik yollar olmuştur.



Şekil 4.68. Ofis NP Kapsül / Ofis 96 Kapsül Grubunda İfadesi Çeşitlerde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Yolak Terimleri. (A) İfadesi Ofis NP'de Artan Proteinlerin Yolak Analizi. (B) İfadesi Ofis 96'da Artan Proteinlerin Yolak Analizi.

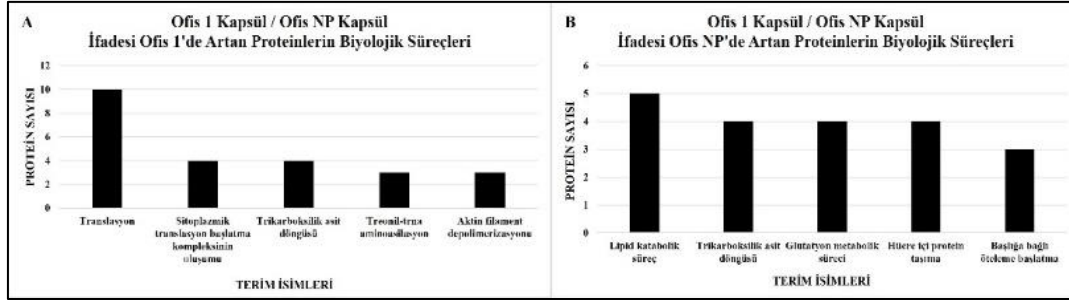
Ofis 1 Kapsül / Ofis NP Kapsül

Ofis 1'in kapsülünün Ofis NP'nin kapsülüne karşılaştırmasında farklılık gösteren proteinlerin ontoloji analizi yapılmıştır ve toplamda 17 tane biyolojik süreç terimi bulunmuştur (EK-17). En çok bulunan ilk beş terim Şekil 4.69'da gösterilmiştir. Bu terimlerin içerisinde en fazla bulunan terim translasyon olmuştur.



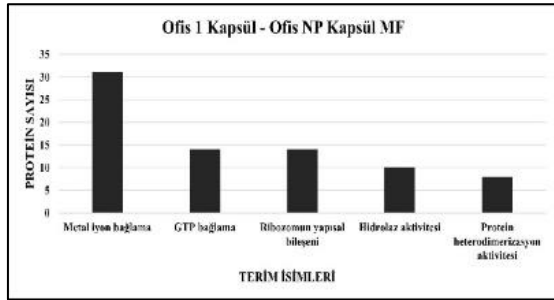
Şekil 4.69. Ofis 1 Kapsül / Ofis NP Kapsül Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Biyolojik Süreçlerine(BS) Ait Bazı Terimler

Kapsülleri karşılaştırılan iki çeşitte de biyolojik süreç terim ontolojisi çeşit bazında ayrı ayrı analiz edilmiştir. Bunun sonucunda Ofis 1'de ifadesi artan proteinlere ait toplam 11 adet biyolojik süreç terimi bulunurken Ofis NP'de ifadesi artan proteinlere ait 14 tane biyolojik süreç terimi bulunmuştur. Çeşitlerde en çok bulunan ilk beş terim Şekil 4.70'te ayrı ayrı gösterilmiştir. Ofis 1 çeşidinde en çok bulunan terim translasyon olurken Ofis NP çeşidinde lipid katabolik süreçtir.



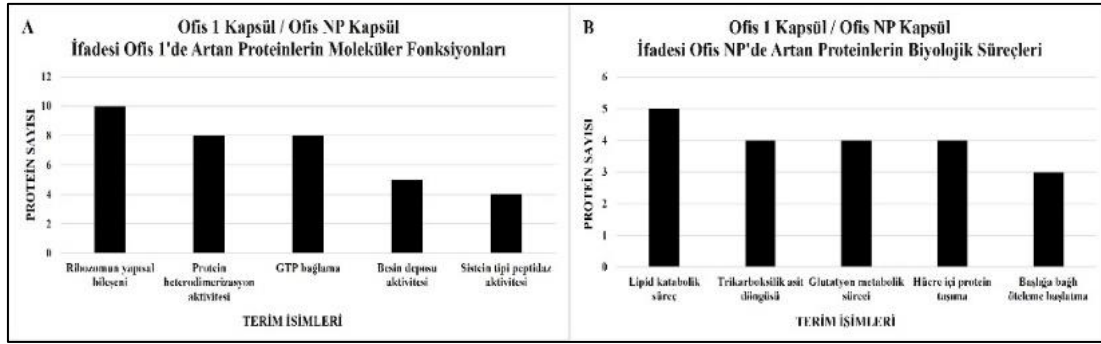
Şekil 4.70. Ofis 1 Kapsül / Ofis NP Kapsül Grubunda İfadesi Çeşitlerde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Biyolojik Süreç Terimleri. (A) İfadesi Ofis 1'de Artan Proteinlerin Biyolojik Süreçleri. (B) İfadesi Ofis NP'de Artan Proteinlerin Biyolojik Süreçleri.

Ofis 1 Kapsül / Ofis NP Kapsül karşılaştırmasının moleküler fonksiyonları için ontoloji analizi yapılmıştır ve toplam 26 terim ortaya çıkarılmıştır (EK-17). En çok çıkan ilk beş terim Şekil 4.71'de gösterilmiştir. Bu terimler arasında en fazla çıkan terim metal iyon bağlama olmuştur.



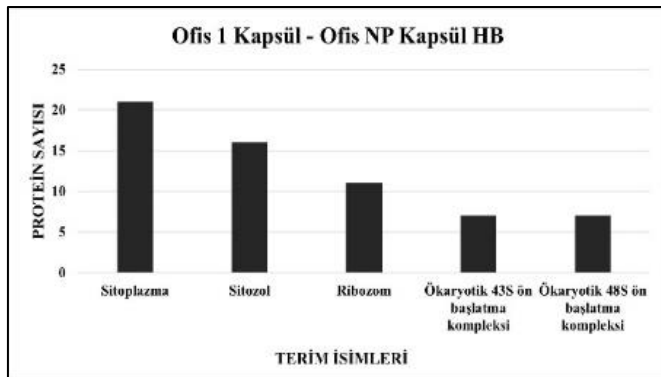
Şekil 4.71. Ofis 1 Kapsül / Ofis NP Kapsül Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Moleküler Fonksiyonlarına (MF) Ait Bazı Terimler

Ofis 1 ile Ofis NP çeşitlerinin kapsül karşılaştırmasında farklılık göstererek ifadesi Ofis 1'de artan proteinlere ait toplam 18 moleküler fonksiyon terimi ortaya çıkarılmıştır. Ofis NP'de artan proteinlerin analizinde ise 16 moleküler fonksiyon terimi bulunmuştur. İki çeşitte de en çok çıkan ilk beş terim Şekil 4.72'de ayrı ayrı gösterilmiştir. Bu terimler arasında ilk sırayı Ofis 1 için ribozomun yapısal bileşeni alırken Ofis NP'de metal iyon bağlama almıştır.



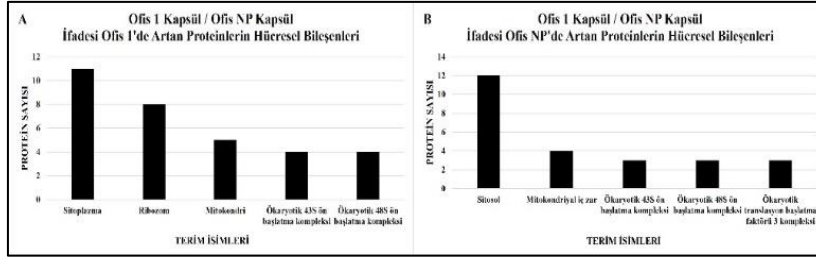
Şekil 4.72. Ofis 1 Kapsül / Ofis NP Kapsül Grubunda İfadesi Çeşitlerde Aynı Aynı Artan Proteinlerin Bazı Moleküler Fonksiyon Terimleri. (A) İfadesi Ofis 1'de Artan Proteinlerin Moleküler Fonksiyonları. (B) İfadesi Ofis NP'de Artan Proteinlerin Moleküler Fonksiyonları.

Ofis 1 Kapsül / Ofis NP Kapsül karşılaştırmasının ontoloji analizinde hücresel bileşenlerine ait 19 terim bulunmuştur (EK-17). En çok çıkan ilk beş terim Şekil 4.73'te gösterilmiştir. Bu terimlerin içerisinde en fazla çıkan terim sitoplazma olmuştur.



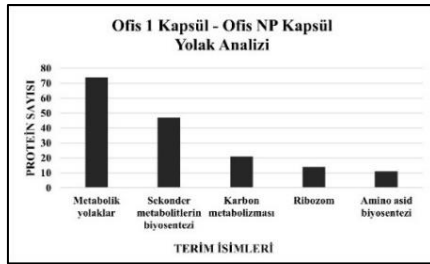
Şekil 4.73. Ofis 1 Kapsül / Ofis NP Kapsül Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Hücresel Bileşenleri (HB) Ait Bazı Terimler

Ofis 1 ile Ofis NP çeşitlerinin kapsül karşılaştırmasında farklılık göstererek ifadesi çeşitlerde ayrı ayrı artan proteinler analiz edilerek hücresel bileşenler ortaya çıkarılmıştır. Analiz sonucunda Ofis 1'de ifadesi artan proteinlere ait 12 hücresel bileşen terimi, Ofis NP'de ifadesi artan proteinlere ait sekiz hücresel bileşen terimi ortaya çıkarılmıştır. Çeşitlerde en çok çıkan ilk beş terim Şekil 4.74'te ayrı ayrı gösterilmiştir. Bu terimlerin içerisinde en fazla çıkan terim Ofis 1'de sitoplazma, Ofis NP'de sitosol olmuştur.



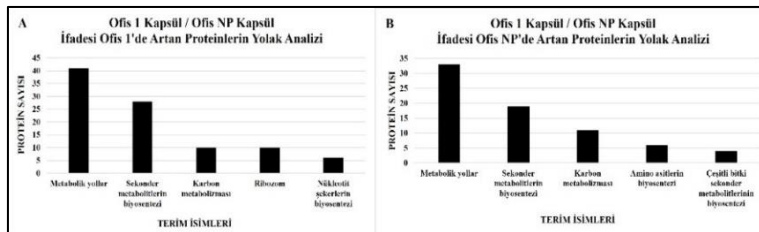
Şekil 4.74. Ofis 1 Kapsül / Ofis NP Kapsül Grubunda İfadesi Çeşitlerde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Hüresel Bileşen Terimleri. (A) İfadesi Ofis 1'de Artan Proteinlerin Hüresel Bileşenleri. (B) İfadesi Ofis NP'de Artan Proteinlerin Hüresel Bileşenleri.

Bu karşılaştırmanın yolak analizi sonucunda toplam 18 terim bulunmuştur (EK-18) ve en çok çıkan ilk beş yolak Şekil 4.75'te gösterilmiştir. Bu terimlerin arasında en fazla çıkan terim metabolik yollar olmuştur.



Şekil 4.75. Ofis 1 Kapsül / Ofis NP Kapsül Grubunda Farklılık Gösteren Proteinlerin Yolak Analizlerine Ait Bazı Terimler

Ofis 1 kapsül / Ofis NP kapsül karşılaştırmasında farklılık göstererek ifadesi çeşitlerde ayrı ayrı artan proteinlerin yolak analizleri yapılmıştır. Analizler sonucunda Ofis 1'de ifadesi artan proteinler için toplam dokuz terim, Ofis NP'de ifadesi artan proteinler için ise 10 yolak terimi ortaya çıkarılmıştır. En çok çıkan ilk beş yolak Şekil 4.76'te gösterilmiştir. Bu terimlerin arasında iki organda da en fazla çıkan terim metabolik yollar olmuştur.



Şekil 4.76. Ofis 1 Kapsül / Ofis NP Kapsül Grubunda İfadesi Çeşitlerde Ayrı Ayrı Artan Proteinlerin Bazı Yolak Terimleri. (A) İfadesi Ofis 1'de Artan Proteinlerin Yolak Analizi. (B) İfadesi Ofis NP'de Artan Proteinlerin Yolak Analizi.

4.4. BIA Sentez Yolağında Görevli Proteinlerin İfade Düzeyleri

BIA yolağında rol oynayan bazı proteinler literatürde tanımlanmıştır ve bu proteinlerden bazıları TMO haşhaş çeşitleri ile yapılan proteom analizinde bulunmuştur. BIA yolağında ana ara ürün olan S-retikulini sentezleyen 3' -hidroksi-N-metilkoklaurine 4' - O-metiltransferaz (4'OMT), Norcoclaurine synthase (NCS), Scoulerine 9-O-methyltransferase (SOMT), Neopinone isomerase (NISO), morfin yolağında bulunan salutaridin sentaz (SalSyn), salutaridiol 7- O -asetiltransferaz (SalAT) ve tebain 6-O-dimetilaz (T6ODM), ayrıca da noskapin yolağında bulunan 1,13-Dihidroksi-N-metilkanadin 13-O-asetiltransferaz (AT1) proteinleri çalışmada tespit edilmiş olup bu proteinlerin ifade düzeyleri analiz edilmiştir.

NCS proteininin, Ofis 96 Gövde / Ofis 96 Kapsül ile Ofis 1 Gövde / Ofis 1 Kapsül karşılaştırmalarında gövdede ifadesi artarken; Ofis 1 Gövde / Ofis 96 Gövde ve Ofis 1 Gövde / Ofis NP Gövde karşılaştırmalarında Ofis 1 çeşidinde ifadesinin arttığı görülmüştür.

4'OMT proteininin, Ofis 1 Gövde / Ofis 1 Kapsül ile Ofis NP Gövde / Ofis NP Kapsül karşılaştırmalarında gövdede ifadesi artarken; Ofis 1 Gövde / Ofis 96 Gövde ve Ofis 1 Gövde / Ofis NP Gövde gruplarında Ofis 1 çeşidinde ifadesinin arttığı görülmüştür.

SalSyn proteininin, Ofis 1 Gövde / Ofis 1 Kapsül grubunda gövdede ifadesi artarken; Ofis 1 Gövde / Ofis 96 Gövde ve Ofis 1 Gövde / Ofis NP Gövde karşılaştırmalarında Ofis 1 çeşidinde ifadesinin arttığı görülmüştür.

SalAT proteininin, Ofis 96 Gövde / Ofis 96 Kapsül, Ofis 1 Gövde / Ofis 1 Kapsül ile Ofis NP Gövde / Ofis NP Kapsül gruplarında gövdelerinde ifadesi artmıştır.

T6ODM proteininin, Ofis 1 Gövde / Ofis 1 Kapsül ile Ofis 96 Gövde / Ofis 96 Kapsül karşılaştırmalarının gövdelerinde ifadesi artarken; Ofis 1 Kapsül / Ofis 96 Kapsül grubunda Ofis 1'de; Ofis NP Kapsül / Ofis 96 Kapsül grubunda Ofis NP'de ifadesi artmıştır.

AT1 proteininin, Ofis 1 Gövde / Ofis NP gövde karşılaştırmasında Ofis 1’de; Ofis 1 Gövde / Ofis 96 Gövde karşılaştırmasında Ofis 96’da ve Ofis NP Kapsül / Ofis 96 Kapsül grubunda Ofis NP’de ifadesi artmıştır.

NISO proteininin ifadesi, Ofis 1 Gövde / Ofis NP Gövde grubunun Ofis 1 çeşidinde artmıştır. SOMT proteininin, Ofis 1 Gövde / Ofis 1 Kapsül karşılaştırmasında gövdede ifadesi artarken Ofis 1 Kapsül / Ofis NP Kapsül karşılaştırmasında Ofis 1’de; Ofis NP Kapsül / Ofis 96 Kapsül grubunda ise Ofis 96’da ifadesinin arttığı görülmüştür.

4.5. Protein-Protein Etkileşimleri

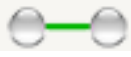
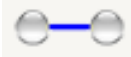
Örnekler arasında farklılık gösteren proteinlerin birbirleri ile olan etkileşimlerini *in silico* olarak belirlemek için String analiz yapılmıştır (<https://string-db.org/>; Erişim Tarihi: 28.04.2023). Ağdaki protein düğümlerinin renkleri ve içerikleri Çizelge 4.3’te açıklanmıştır. Her düğüm, tek bir protein kodlayan gen lokusu tarafından üretilen proteinleri temsil etmektedir.

Çizelge 4.3. Protein-Protein Etkileşim Ağlarında Ortaya Çıkan Düğümler ve Açıklamaları

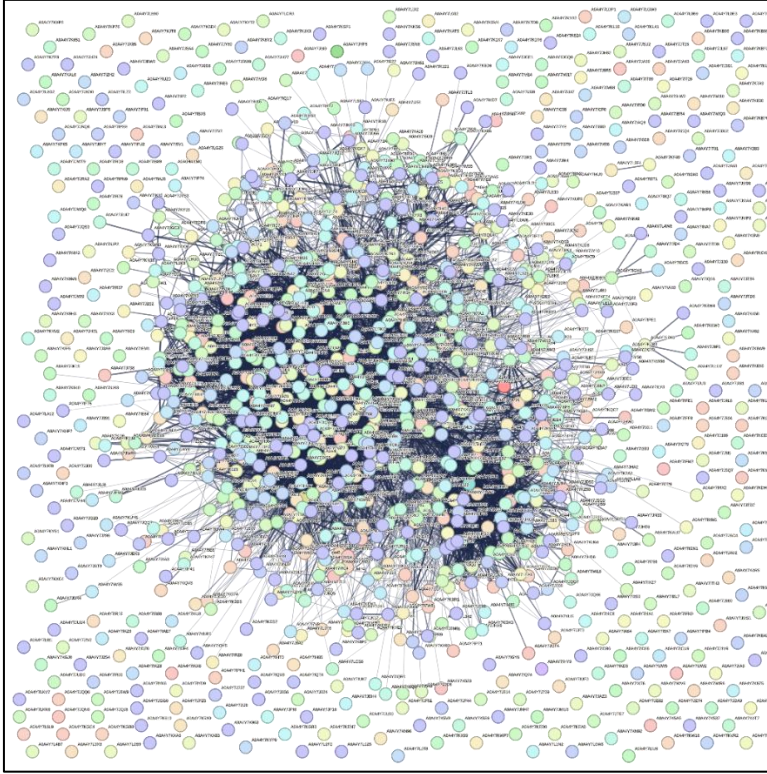
DÜĞÜMLER			AÇIKLAMALAR
DÜĞÜM RENGİ		Renkli Düğümler	Sorgulanan proteinler ve etkileşimlerin ilk göstergesi
		Beyaz Düğümler	Etkileşimlerin ikinci göstergesi
DÜĞÜM İÇERİĞİ		Boş Düğümler	Bilinmeyen üç boyutlu yapıya (3B) sahip proteinler
		Dolu Düğümler	Tahmin edilen veya bilinen bazı 3B yapılı proteinler

Ağdaki etkileşim çizgileri olarak bilinen bağlantılar Çizelge 4.4’te açıklanmıştır (<https://string-db.org/>; Erişim Tarihi: 30.04.2023). İki protein arasındaki etkileşim çizgisi, proteinlerin ortak işlevlerini göstermek için kullanılmaktadır.

Çizelge 4.4. Protein-Protein Etkileşim Ağlarında Ortaya Çıkan Etkileşim Çizgileri ve Açıklamaları

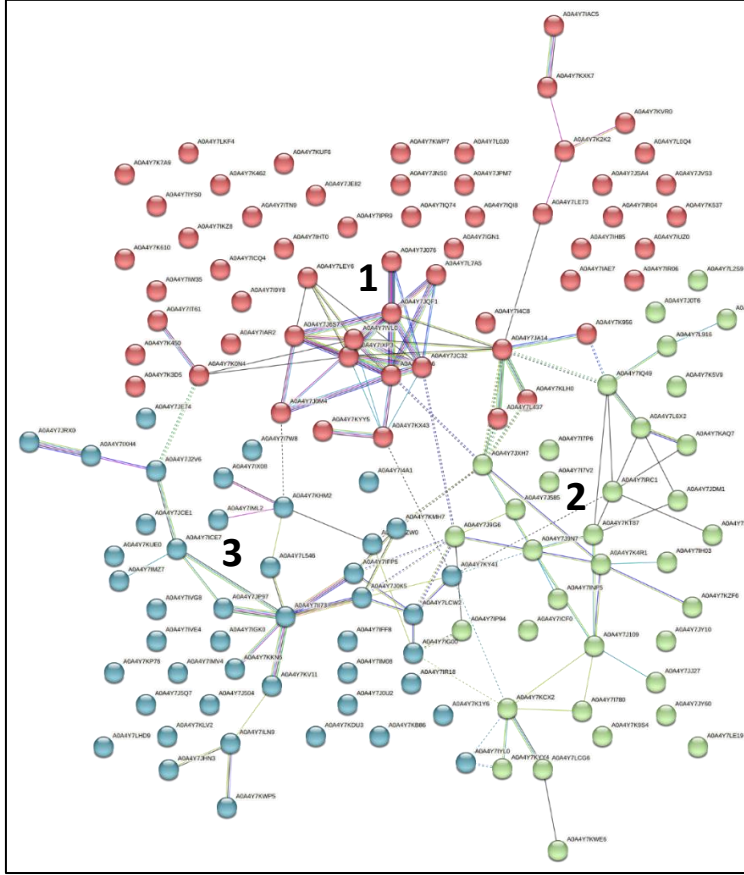
ETKİLEŞİM ÇİZGİLERİ		AÇIKLAMALAR
BİLİNER ETKİLEŞİMLER		Veri Tabanından Derlenen Proteinler
		Deneylerle Belirlenen Proteinler
TAHMİN EDİLEN ETKİLEŞİMLER		Komşu Genler (İşlevsel olarak ilişkili proteinler)
		Füzyon Genler (Çeşitli sebeplerle, iki ayrı gen veya parçalarının bir araya gelmesiyle oluşan hibrid genler)
		Genlerin Birlikte Oluşumu
DİĞER ETKİLEŞİMLER		Metin Madenciliği (Proteinler ve protein-protein etkileşimlerinin tahmini için literatür ve biyolojik veri tabanlarının analiz edilmesi)
		Ortak İfade (Ortak ifadeye sahip proteinler)
		Protein Homolojisi

Oluşturulan protein-protein etkileşim ağında tüm örnekler arasında ifadesi farklılık gösteren toplam 1212 protein analiz edilmiş ve 1137 protein arasında 8926 bağlantı bulunmuştur. Analiz sonucunda ortaya çıkan etkileşim ağı Şekil 4.77’de gösterilmiştir. Oldukça fazla etkileşime sahip olan proteinlerin özellikle metabolik yollar, sekonder metabolitlerin biyosentezi, karbon metabolizması, amino asit biyosentezi, fotosentetik organizmaların karbon fiksasyonu, ribozom, oksidatif fosforilasyon gibi süreçlerde fonksiyon gösterdikleri görülmektedir.



Şekil 4.77. Farklılık Gösteren 1212 Proteinin Etkileşim Ağı

Protein-protein etkileşimlerinin daha detaylı analizi için üç farklı çeşidin BIA biyosentezi ile görevli olan gövde proteinlerinin karşılaştırmaları incelemeye alınmıştır. Bu karşılaştırmalar; Ofis 1 Gövde / Ofis 96 Gövde, Ofis NP Gövde / Ofis 96 Gövde, Ofis 1 Gövde / Ofis NP Gövde olurken öncelikle Ofis 1 Gövde / Ofis 96 Gövde grubunda farklılık gösteren proteinler ele alınmıştır ve yapılan inceleme sonucunda 137 protein düğümünün aralarında 125 bağlantı oluşturduğu bulunmuş ve Şekil 4.78'deki etkileşim ağı ortaya çıkarılmıştır.



Şekil 4.78. Ofis 1 Gövde / Ofis 96 Gövde Karşılaştırmasının Protein-Protein Etkileşim Ağı. (1) Kırmızı Renkli Birinci Küme. (2) Yeşil Renkli İkinci Küme. (3) Mavi Renkli Üçüncü Küme.

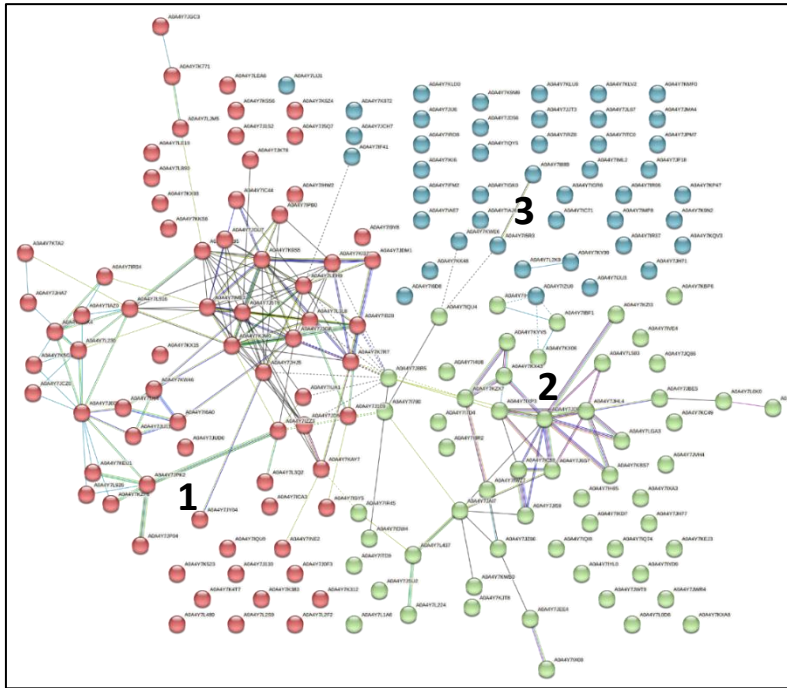
Ofis 1 Gövde / Ofis 96 Gövde grubunda oluşturulan bu etkileşim ağının daha iyi anlaşılabilmesi için proteinler üç küme altında incelenmiştir (Şekil 4.78, Çizelge 4.2). Birinci kümede, 57 protein düğümü, 47 bağlantı oluşturarak en çok etkileşime sahip küme olduğu bulunmuştur. İkinci kümede 35 protein düğümü, 31 bağlantı oluştururken üçüncü kümede ise 45 protein düğümünün 27 bağlantı oluşturduğu gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.5. Ofis 1 Gövde / Ofis 96 Gövde Grubunun Protein-Protein Etkileşim Ağında Oluşturulan Kümeleri

Kümeler	Protein Düğümü	Bağlantı Sayısı
Küme 1 (Kırmızı)	57	45
Küme 2 (Yeşil)	35	31
Küme 3 (Mavi)	45	27

Ofis 1 Gövde / Ofis 96 Gövde grubunun bağlantı sayısı en fazla olan birinci kümedeki proteinler incelendiğinde etkileşimi fazla sekiz proteinin ribozom yolağı ile bağlantılı olduğu bulunmuştur. Bağlantı sayısının daha düşük olduğu ikinci ve üçüncü kümede ise en çok öne çıkan, metabolik yolak ve sekonder metabolitlerin biyosentezi terimi olmuştur. Kalan proteinlerin, karakterize edilmediği veya karbon metabolizması, endoplazmik retikulumda protein işleme gibi farklı yollara ait olduğu ortaya çıkarılmıştır.

Protein-protein etkileşimine bakılan diğer karşılaştırma grubu Ofis NP Gövde / Ofis 96 Gövde olmuştur ve oluşturulan etkileşim ağı Şekil 4.79’da gösterilmiştir. Ağda 173 protein düğümü ortaya çıkarılırken aralarında 196 bağlantı oluşturduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4.79. Ofis NP Gövde / Ofis 96 Gövde Karşılaştırmasının Protein-Protein Etkileşim Ağı. (1) Kırmızı Renkli Birinci Küme. (2) Yeşil Renkli İkinci Küme. (3) Mavi Renkli Üçüncü Küme.

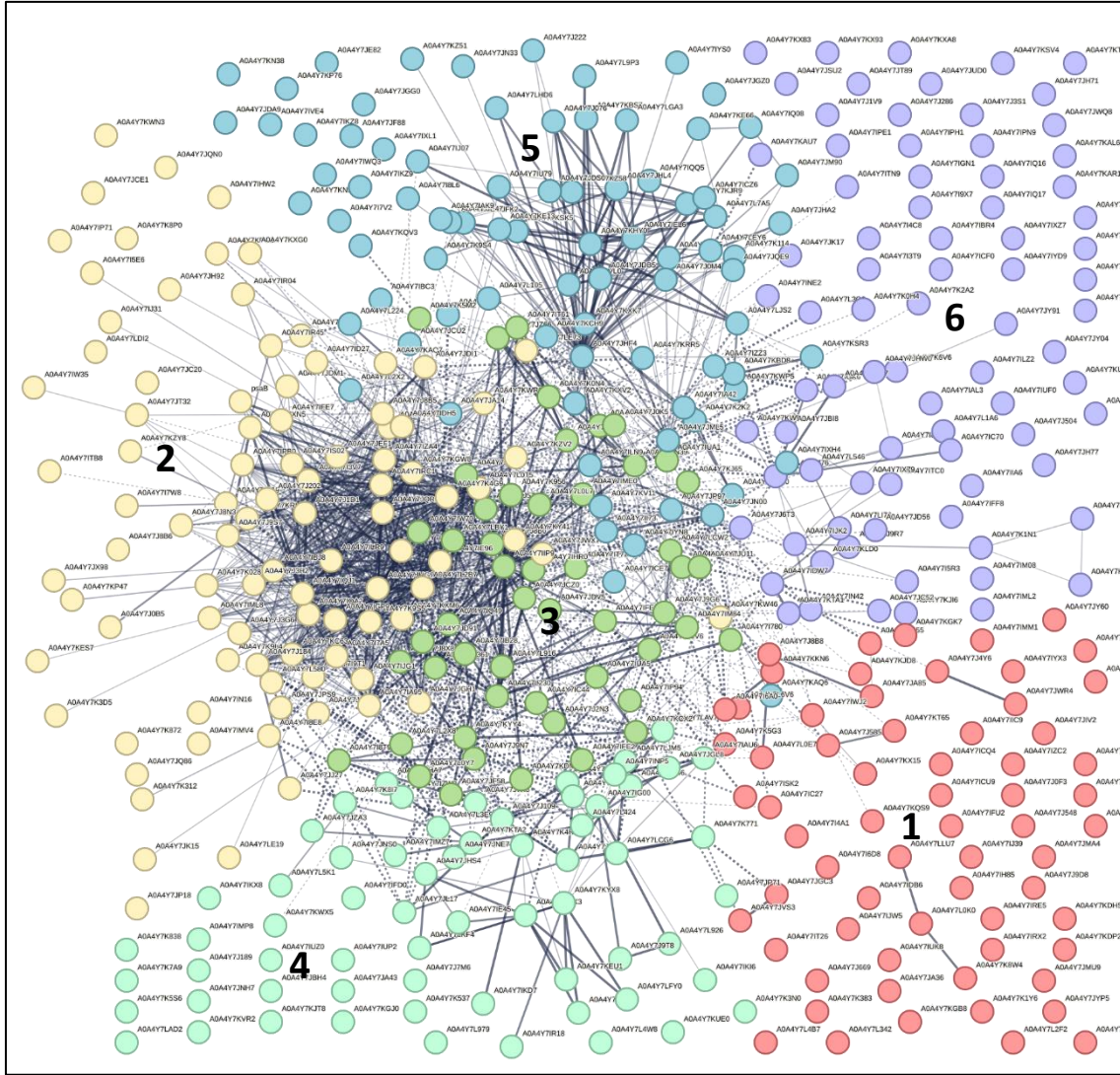
Ofis NP Gövde / Ofis 96 Gövde grubunda oluşturulan etkileşim ağının daha iyi anlaşılabilmesi için proteinler üç küme altında incelenmiştir (Şekil 4.79, Çizelge 4.3). Birinci kümede 72 protein düğümü 130 bağlantı kurarak en çok etkileşime sahip küme olduğu bulunmuştur. İkinci kümede 57 protein düğümü 45 bağlantı oluştururken üçüncü kümede 44 protein düğümünün iki bağlantı oluşturduğu gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.6. Ofis NP Gövde / Ofis 96 Gövde Grubunun Protein-Protein Etkileşim Ağında Oluşturulan Kümeleri

Kümeler	Protein Düğümü	Bağlantı Sayısı
Küme 1 (Kırmızı)	57	45
Küme 2 (Yeşil)	35	31
Küme 3 (Mavi)	45	27

Ofis NP Gövde / Ofis 96 Gövde grubunun bağlantı sayısı en fazla olan birinci kümede öne çıkan ilk üç yolak metabolik yollar, sekonder metabolitlerin biyosentezi ve karbon metabolizması olmuştur. İkinci kümede ise metabolik yollar ve sekonder metabolitlerin biyosentezinin yanı sıra ribozom terimi öne çıkan yollar arasındadır. Bağlantı sayısı en az olan üçüncü kümede ortaya çıkan tek yolak ise diğer kümelerin ilk sırasını alan metabolik yollar olmuştur.

Gövde karşılaştırmalarının incelenmesinde son grup farklı alkaloidler yönünden zengin olan Ofis 1 Gövde / Ofis NP Gövde grubu olmuştur. Bu karşılaştırmada tanımlanan proteinler, analiz edilerek ağda 438 protein düğümü ortaya çıkmış ve aralarında 1771 bağlantı kurduğu bulunarak gruplar arasında en öne çıkan grup olmuştur. Analiz ile proteinlerden oluşturulan protein-protein etkileşim ağı Şekil 4.80’de gösterilmiştir.



Şekil 4.80. Ofis 1 Gövde / Ofis NP Gövde Karşılaştırmasının Protein-Protein Etkileşim Ağı. (1) Kırmızı Renkli Birinci Küme. (2) Sarı Renkli İkinci Küme. (3) Yeşil Renkli Üçüncü Küme. (4) Mavi Renkli Dördüncü Küme. (5) Koyu Mavi Renkli Beşinci Küme. (6) Mor Renkli Altıncı Küme.

Ofis 1 Gövde / Ofis NP Gövde grubundaki etkileşim ağının daha iyi anlaşılabilmesi için proteinler Şekil 4.80 ve Çizelge 4.4' de gösterildiği üzere altı küme altında incelenmiştir. Birinci kümede 65 protein düğümü aralarında 10 bağlantı kurarken ikinci kümenin 95 protein düğümü ile 568 bağlantı kurarak en çok bağlantı kuran küme olduğu bulunmuştur. Devamında üçüncü küme 51 protein düğümü ile 159 bağlantı, dördüncü küme 64 protein düğümü ile 57 bağlantı, beşinci kümede 83 protein düğümü ile 185 bağlantı oluşturulurken altıncı kümenin de 80 protein düğümü ile aralarında 26 bağlantı kurduğu ortaya çıkarılmıştır

Çizelge 4.7. Ofis 1 Gövde / Ofis NP Gövde Grubunun Protein-Protein Etkileşim Ağında Oluşturulan Kümeleri

Kümeler	Protein Düğümü	Bağlantı Sayısı
Küme 1 (Kırmızı)	65	10
Küme 2 (Sarı)	95	568
Küme 3 (Yeşil)	51	159
Küme 4 (Mavi)	64	57
Küme 5 (Koyu Mavi)	83	185
Küme 6 (Mor)	80	26

Birinci kümede metabolik yollar, sekonder metabolitlerin biyosentezi ve glutatyon metabolizması yolağı ortaya çıkarken ikinci kümede ve üçüncü kümede metabolik yollar, sekonder metabolitlerin biyosentezi ve karbon metabolizması, çıkan ilk üç yolk olmuştur. Dördüncü kümede metabolik yollar, sekonder metabolitlerin biyosentezi ve fenilpropanoid biyosentezi yolları ortaya çıkarken beşinci kümede ise ribozom, endoplazmik retikulumda protein işleme gibi yollar öne çıkmıştır. Altıncı kümede ise tek çıkan yolk metabolik yollar olmuştur.

Çeşitli alanlarda görevli proteinlerin bazıları karakterize edilmediği için bir yolkta görevli olduğu bulunamazken birbirleriyle bağlantı kurarak yolklarda ortaya çıkan görevli proteinler kümeler halinde incelenmiştir. Analizlerde ortaya çıkan metabolik yollar ve sekonder metabolit biyosentezi, karşılaştırmalardaki proteinlerin en çok ilişki kurduğu yollar olmuştur.

5. TARTIŞMA

Haşhaş, birçok farklı kullanım alanına sahip, tıbbi ve endüstriyel bir bitki türüdür. Tohumlardan çıkartılan yağ gıdada, kalan küspesi hayvan yemi olarak kullanılırken kapsüllerinde bulunan alkaloidler tıbbi amaçlar için ilaç sanayisinde kullanılmaktadır (İncekara, 1972). Haşhaşın en büyük önemi, bitkilere özgü sekonder metabolitlerin yapısal olarak farklı bir grubunu oluşturan benzilizokinolin alkaloidlerinden gelmektedir (Demirci, 2016). Morfin, noskapin, kodein gibi birçok alkaloidi kapsayan BIA'ların biyosentezi ve birikimi ile ilgili biyolojik süreçlerin aydınlatılması yönünde çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu alandaki araştırmaların yapılması için transkriptomik ve proteomik yaklaşımlar, alkaloid yolağındaki adımları aydınlatmada büyük önem taşımaktadır (Labanca vd., 2018). Bu çalışma kapsamında, üretmiş olduğu alkaloidler nedeniyle ekonomik değeri yüksek olan haşhaşın, TMO tarafından geliştirilmiş alkaloid içerikleri farklı üç çeşidi kullanılmıştır. Alkaloid biyosentezinin yapıldığı gövde ve alkaloidin depolandığı kapsül organlarında proteomik bir yaklaşım olan LC-MS/MS ile tüm örnekler analiz edilmiş ve biyoinformatik araçlar kullanılarak olgun haşhaş bitkisinde farklı organlarda morfin ve noskapin içeriğindeki farklılıkların protein seviyesine nasıl yansıdığı ilk kez araştırılmıştır.

Proteom analizi ile her bir örnek için çok sayıda protein elde edilmiştir. Tanımlanan toplam 1606 proteinden 1212 tanesinin örnekler arasında farklı ifade gösterdiği saptanmıştır. Elde edilen proteinlerin ifade düzeyleri heatmap aracılığı ile incelendiğinde protein profillerinin organ bazında ayırım gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.1). Her üç haşhaş çeşidine ait kapsül örneklerinin proteinleri gövde örneklerinden net bir şekilde ayrılmıştır. Ayrıca Ofis 1 çeşidine ait gövde proteinleri de diğer iki çeşidin gövdesine ait protein profilinden farklılık göstermektedir. Her iki organın biyosentez ve depolamayı içine alan görev ve işlev farklılıklarına sahip olmasından kaynaklı protein ifade düzeylerindeki organ bazlı farklılık beklenen bir durumdur. Literatürde haşhaştaki BIA'ların biyosentezinde ve depolanmasında, arkadaş hücre, elek elemanları ve latisiferler olmak üzere üç farklı hücre tipinin görev aldığı bulunmuştur (Bird vd., 2003; Samanani vd., 2006; Onoyovwe vd., 2013). Bird ve ark. 2003 yılında yaptıkları çalışmada haşhaştaki alkaloid biyosentezinin hücresel lokalizasyonunu belirlemek için immünofloresan etiketleme ve yerinde hibridizasyon tekniği kullanarak ana alkaloid sentez enzimlerinin ve gen transkriptlerinin floem hücre tipi olan elek elemanları ve arkadaş hücrelerde bulunduğu ortaya çıkarılmış ve biyosentezin floemde başladığı gösterilmiştir. Beaudoin ve Facchini tarafından 2014 yılında

yapılan bir diğer çalışmada ise elek elemanlarında sentezlenen alkaloidlerin, büyük sitoplazmik veziküllerde depolanmak üzere latisferlere taşındığı bulunmuştur. Latisferler, olgun bir bitkinin tüm organlarında floeme eşlik eden hücrelerdir ve ikincil metabolit barındıran lateksin depolandığı yerdir (Fairbairn ve Kapoor, 1960). Lal tarafından 2022 yılında yayımlanan bir başka çalışmada ise ikincil metabolit olan alkaloidlerin, bitkinin hayatta kalması, büyümesi ve bakımı için bir faydası olmadığından, güvenli saklama için kapsüle taşındığı düşünülmektedir. Bu sebeple lateks, yapraklar ve tohumlar hariç her bitki organında sentezlense de kapsül, maksimum lateks konsantrasyonunun bulunduğu tek yerdir. Dolayısıyla BIA yolağında gövde ve kapsülün birbirlerinden sentez ve depolama olmak üzere farklı görevleri bulunduğu ve bunu doğrular nitelikte gövde ve kapsülün farklı protein profillerine sahip oldukları Şekil 4.1'deki heatmap ile gösterilmiştir.

Çeşitlerin gövde ve kapsül organlarının karşılaştırmalarında farklılık gösteren proteinlerin ontoloji analizine ait biyolojik süreç terim incelemesinde protein-kromofor bağlantısının ve fotosentezin en çok çıkan terimler olduğu bulunmuştur. Daha detaylı analizlerde bu terimlerin özellikle gövde organında kapsüle göre daha fazla ifade edilen proteinlere ait oldukları görülmüştür. Hatta fotosentez terimi alkaloid yönünden zengin hem Ofis 1 hem de Ofis NP çeşitlerinin gövde/kapsül organlarının karşılaştırmalarında daha da fazla sayıda çıkmıştır. Bitkide ışığın emilmesi sürecinde görevli protein-kromofor bağlantısı ise Ofis 96 Gövde / Ofis 96 Kapsül karşılaştırmasında 11 protein ile oluşurken Ofis 1 Gövde / Ofis 1 Kapsül'de 24 protein, Ofis NP Gövde / Ofis NP Kapsül karşılaştırmasında ise 40 protein ile ortaya çıkmaktadır.

Bitkiler fotoreseptör adı verilen ışığa duyarlı bir dizi protein kullanarak ışığa yanıt verirler (Kong ve Okajima, 2016). Kromoforlar, bu fotoreseptörlere ışığı emme kapasitesi kazandıran kısımlardır (Weller, 2017). Bitkide emilen ışık, elektronları uyararak daha yüksek bir enerji seviyesine geçmelerine sebep olur. Bu da güneşten gelen enerjinin kimyasal enerjiye dönüştürülmesini yani fotosentezi oluşturur.

Fotosentez temel olarak ışığa bağımlı evre ile ışıktan bağımsız evre olmak üzere iki bölümden meydana gelmektedir. Işığa bağımlı evrede elektronlar iki ayrı fotosistem üzerinde aktarılacak sonunda adenosin trifosfat (ATP) ve hidrojenin bağlandığı nikotin adenin dinükleotid fosfat (NADPH) moleküllerinin oluşmasını sağlar. Işığa bağımlı olmayan ikinci evre ise kloroplastın sıvı kısmı olan stroma bölümünde gerçekleşir. İlk aşamada güneş

enerjisinden elde edilen ve ATP ile NADPH molekülleri bünyesinde biriken kimyasal enerji, bu aşamada glikoz molekülünün üretiminde kullanılır ve bu tepkimelere Kelvin döngüsü denir. Kelvin döngüsü ise güneşten elde edilen enerji ile karbondioksit moleküllerinden glikozun sentezlendiği döngüsel bir tepkimeler zinciri olarak bilinir. Süreç sonunda bitkilerin temel besin kaynağı olan glikoz üretilir. Böylece Güneş'ten gelen ışık enerjisi, glikoz molekülü bünyesinde kimyasal enerji olarak depolanmaktadır (Sezer, 2020).

Işık enerjisinin kimyasal enerjiye dönüştüğü ve bitkinin yaşamını devam ettirebilme şartlarından biri olan fotosentezin alkaloid sentezi ile ilişkisi değerlendirildiğinde bulgularımızı destekler nitelikte literatür bilgileri olduğu görülmüştür. Vuran ve Turker tarafından 2021 yılında yapılan bir çalışmada ışığın kalitesinin, şiddetinin ve uygulama periyodunun doku kültüründe sekonder metabolit sentezini etkilediğinden söz edilmiştir. Benzer şekilde bir diğer çalışmada da ışığın *Melastoma malabatricum* bitkisinin hücre kültürlerinde bir sekonder metabolit olan antosiyanin üretimine etkisi araştırılmış ve deneylerde hücre kültürüne uygulanan 10 günlük sürekli aydınlatmanın, antosiyanin üretimini arttırdığı bulunmuştur (Chan vd., 2010). Keskin ve Kunter'ın 2007 yılında yaptığı bir çalışmada ise resveratrol isimli sekonder metabolit içeren Erciş üzüm çeşidinin kallus dokularında UV ışığının etkisi ile yüksek resveratrol birikimi elde edildiği ortaya çıkarken UV ışığının, kallus kültürleri için oldukça etkili bir uyarıcı olduğu tespit edilmiştir. Sun ve ark. (2022) tarafından yapılan bir çalışmada ise lotus bitkisinin değişen ışık miktarına bağlı olarak alkaloid oranında değişime uğradığı ve karanlıkta bekletilen lotus bitkisinin aydınlığa oranla alkaloid miktarında %18,4 azalma tespit edildiği bulunmuştur.

Öte yandan Sampaio ve ark. (2018) tarafından yapılan bir çalışmada *Ruta graveolen* bitkisinden izole edilen alkaloidlerin fotosentez inhibitörleri olarak değerlendirilmesi yapılmıştır. Bu kapsamda *Ruta graveolen* bitkisinden sekiz alkaloid izole edilmiştir ve bu alkaloidlerin *Spinacea oleracea* L. bitkisinden elde edilen kloroplastlardaki fotosentezin ışık fazında ATPaz aktivitesini inhibe ettiği ve fotosistemler arasında enerji transferi ile elektron taşınmasını da durdurduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu gibi çalışmalar, bazı alkaloid çeşitlerinin fotosentez ile negatif bir korelasyon kurduğunu belirtirken Kara ve Baydar'ın 2021 yılında yaptığı bir çalışmada haşhaş çeşitlerinin daha fazla alkaloid sentezlemek için yüksek düzeyde fotosentetik asimilasyon ve enerji kullandığından söz etmiştir. Bu da alkaloid çeşitlerinin fotosentez ile aralarındaki ilişkilerin birbirinden farklı olduğu göstermektedir. Ralphs ve ark. (1998) yaptığı bir çalışmada, larkspur bitkisindeki alkaloid ile fotosentez inhibisyonu

arasındaki ilişki incelenmiş olup ışık şiddetinin azaldığı ve fotosentez inhibisyonunun gerçekleştiği koşullarda alkaloid konsantrasyonun da azaldığı belirtilmiştir. Srivastava ve Sharma (1990), yaptıkları bir çalışma ile haşhaşa fotosentezin ışığa bağımlı evresinde görevli klorofil içeriğindeki artışın, morfin içeriği ile önemli ölçüde ilişkili olduğundan söz edilmiştir. Sharafzadeh ve Ordookhani tarafından 2011 yılında yapılan başka bir çalışmada yüksek CO₂ seviyesinin, fotosentezin karanlık evresinde görevli Rubisco enziminin aktivitesindeki artışı nedeniyle artan net fotosentez oranlarına yol açtığı ve bununda ikincil metabolitlerin birikimini değiştirebildiği söylenmiştir. Böylelikle yabani haşhaş (*Papaver setigerum*) bitkisinde CO₂ seviyesinin artması ile morfin, kodein, papaverin ve noskapin gibi tüm alkaloidlerin miktarının bitki bazında önemli ölçüde arttığı bulunmuştur.

Tüm bu sonuçlar ışığında ve literatür bilgilerinin de desteğiyle çalışmamızda fotosentezin haşhaşa morfin ve noskapin alkaloidleri için sentezin yapıldığı gövde ve depolamadan sorumlu kapsül organları için başlıca ayırt edici faktörlerden olduğu ve alkaloid biyosentezinde fotosentezin en etkin süreçlerden birisi olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızda biyolojik süreç terimleri verilerini destekler nitelikte her üç çeşidin kapsül ve gövde organlarında farklılık gösteren proteinlerin hücresel bileşen terimleri incelendiğinde de kloroplast tilakoid zarı, fotosistem I ve fotosistem II' nin en fazla sayıdaki terimler olduğu görülmektedir.

Tez kapsamındaki çalışmalarda gövde/kapsül organları arasında farklılık gösteren proteinler çoğunlukla fotosentez biyolojik süreci ile ilişkili olmakla beraber, alkaloid bakımından zengin çeşitlerde (Ofis 1 ve Ofis NP) metilasyonun da çok bulunan terimlerden olduğu bulunmuştur. Ofis 1 ve Ofis NP'nin organ bazında yapılan karşılaştırmalarında metilasyon en çok çıkan dördüncü biyolojik süreç ontoloji terimidir. Metilasyon aynı zamanda alkaloid içeriği zengin çeşitlerin kontrol örneğine (Ofis 96) ait kapsül karşılaştırmalarında da görülmektedir. Ofis 1 Kapsül / Ofis 96 Kapsül'de altı protein ile üçüncü sırada, Ofis NP Kapsül / Ofis 96 Kapsül 12 protein ile ikinci sırada yer almaktadır.

GO:0032259 kimlik numaralı metilasyon biyolojik süreci terimi bir metil grubunun bir moleküle kovalent olarak bağlandığı işlem olarak tanımlanmaktadır (https://www.informatics.jax.org/vocab/gene_ontology/GO:0032259). Metilasyon gen ifadesinin denetlenmesi, protein işlevlerinin denetlenmesi gibi işlevlerde yer alır. Metilasyon, enzimler tarafından katalizlenmektedir ve bu süreçte görev alan en önemli

enzim metil grubunu farklı bileşiklere transfer eden metiltransferaz enzimidir. Metiltransferaz enzimi, protein metiltransferazlar, DNA/RNA metiltransferazlar, doğal ürün metiltransferazlar ve S -Adenosil metionin (SAM) bağımlı olmayan metiltransferazlar olmak üzere birkaç gruba ayrılmaktadır (Lennard ve Wang, 2018). Bu bağlamda proteom analizinde elde edilen profiller incelendiğinde O-metiltransferaz proteininin ifadesinin bazı örnekler arasında farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Ofis 1 Gövde / Ofis 1 Kapsül karşılaştırmasında 12 protein, Ofis NP Gövde / Ofis NP Kapsül karşılaştırmasında ise dokuz protein MF terimi olan O-metiltransferaz aktivitesini oluşturmaktadır. Ofis 1 ve Ofis NP çeşitlerinin organ bazında yapılan bu karşılaştırmalarında O-metiltransferaz aktivitesinin çıkması ise BIA biyosentezinde görevli 6OMT, 4'OMT, SOMT gibi enzimlerin O-metiltransferaz enzimi olmaları ve molekülün oksijenine metil grubu ekleyerek BIA sentezini devam ettirmeleri olarak açıklanabilmektedir (Dastmalchi vd., 2018). Çalışmada ortaya çıkan BIA sentez yolağında görevli proteinlerin ifade düzeylerine bakıldığında 4'OMT enziminin, Ofis 1 Gövde / Ofis 96 Gövde ve Ofis 1 Gövde / Ofis NP Gövde karşılaştırmalarının Ofis 1 çeşidinde ifadesi artması, SOMT enziminin de Ofis 1 Gövde / Ofis 1 Kapsül, Ofis NP Gövde / Ofis NP Kapsül karşılaştırmalarının gövdelerinde ifadesinin artması haşhaşın alkaloidce zengin çeşit ve organlarında metilasyonun etkin olduğunu göstermektedir.

Epigenetik açıdan metilasyon ise gen aktivasyonu, baskılanması gibi genlerin aktivitesini düzenleyerek çeşitli mekanizmalar ile regüle edilmektedir. Bu mekanizmalar, DNA metilasyonu, protein (histon) metilasyonu, kodlama yapmayan RNA olurken (Zhang vd., 2018) DNA metilasyonu, epigenetik mekanizmalardan en iyi bilinen ve en yaygın olanıdır. Bulut ve ark. (2020) tarafından yapılan bir çalışmada farklı BIA içeriklerine sahip haşhaş çeşitleri arasındaki DNA metilasyon seviyelerini incelenmek amacıyla metilasyona duyarlı amplifikasyon polimorfizmi (MSAP) profillemesi tekniği kullanılmıştır. Çalışmada haşhaş çeşitlerinin kapsül ve gövde organlarında ortaya çıkan farklı metilasyon profilleri bu epigenetik mekanizmanın BIA biyosentezi üzerinde etkili olabileceğini göstermiştir. Dolayısıyla metilasyonun haşhaşta BIA biyosentezinde önemli bir rolü olduğu proteomik veriler ile de gösterilmiştir.

Çalışmada organlar arasında farklılık gösteren proteinler çoğunlukla fotosentez süreçlerinde görevli iken, çeşitler arasında farklılık gösteren proteinlerin çoğunlukla translasyon sürecinde görev aldıkları bulunmuştur. Translasyon terimi Ofis 1 Gövde / Ofis 96 Gövde ve

Ofis NP Gövde / Ofis 96 Gövde karşılaştırmalarında 18 protein, Ofis 1 Gövde / Ofis NP Gövde grubunda 40 protein, Ofis NP Kapsül / Ofis 96 Kapsül karşılaştırmasında 16 protein ve Ofis 1 Kapsül / Ofis NP Kapsül karşılaştırmasında 14 protein ile biyolojik süreç terimlerinde ilk sırayı almıştır.

GO:0006412 kimlik numaralı translasyon terimi ribozomda gerçekleşen bir polipeptit zincirindeki amino asitlerin dizisini belirlemek için olgun bir mRNA'nın veya circRNA (dairese RNA) molekülünün dizisini kullanan bir proteinin oluşturulduğu hücre metabolik bir süreç olarak tanımlanır. Translasyon, aminoasillenmiş başlatıcı metiyonin tRNA, GTP ve başlatma faktörü 2 arasında üçlü bir kompleksin oluşumuyla başlar ve sonrasında ribozomun küçük alt birimi, bir mRNA veya circRNA ile birleşir (<https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/term/GO:0006412>). Ardından da ribozomdan bir polipeptit zincirinin salınmasıyla protein sentezi sona erer.

Translasyonun öncelikli çıktığı karşılaştırma gruplarının moleküler fonksiyon anotasyon terimlerine bakıldığında biyolojik süreç bilgilerini destekler nitelikte ribozomun yapısal bileşeni terimi ve hücre metabolik bileşen terimlerinde de ribozom en çok karşılaşılan terimlerdir. Translasyon ile alkaloid sentezi arasındaki ilişki değerlendirildiğinde literatürde az sayıda bilgi bulunmaktadır. Haşhaşın hücre kültüründe yetiştirildiği bir çalışmada protein sentez inhibitörlerinden sikloheksimid ve yüksek puromisin varlığının morfin ve kodein alkaloidlerinin miktarında azalmaya neden olduğu bulunmuştur (An-Fei HSU, 1981). Korcz ve ark. (1986) tarafından yapılan bir çalışmada lüpin bitkisinin ribozomlarında bulunan alkaloidlerin, translasyon sürecinin birkaç adımına katıldığı belirtilirken Bu'Lock ve Barr tarafından 1968 yılında yapılan bir başka çalışmada ise ergot alkaloidlerinin üretimini sürdürmek için sürekli protein sentezinin gerekli olduğu vurgulanmıştır.

Translasyon ontoloji terimi protein sentezinin hem pozitif hem negatif regülasyonunu kapsamaktadır (<https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/term/GO:0006412>). Negatif bir regülasyon olan ribozom durdurulması veya duraklatılmasının translasyon ile ilgili bir süreç olduğu Lu tarafından 2022 yılında yapılan bir çalışmada belirtilmiştir. Cyznska ve ark. (2021) yaptığı başka bir çalışmada da translasyonun uzama fazı sırasında ribozomu geçici veya kalıcı olarak duraklatılabildiği bildirilmiştir. Buna bağlı olarak yapılan literatür çalışmalarında bazı alkaloid türlerinin ökaryot hücrelerde translasyonu durduğu görülmüştür. Bu çalışmalardan biri, 1992 yılında Wink ve ark. tarafından yapılmış ve protein biyosentezi

üzerine *in vitro* deneyler yaparak bazı alkaloidlerin translasyonu inhibe ettiği bulunmuştur. Jimenez ve ark. (1975) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise narsiklasin, pretazettin gibi bazı *Amaryllidaceae* alkaloidlerinin translasyonun peptit bağı oluşum basamağını inhibe ederek ökaryotik hücrelerde protein sentezini durdurduğu belirtilmektedir. Benzeri bir diğer çalışmada da *Cephalotaxus* bitkisinin alkaloidlerinin, ökaryot hücrelerdeki 60-S ribozom alt birimi üzerindeki alıcı bölgeye substrat bağlanması önleyerek translasyonun uzama fazını engellediğini ve dolayısıyla aminoasil-tRNA bağlanmasını ve peptit bağı oluşumunu bloke ettiği bulunmuştur (Fresno vd., 1977). Horst ve ark. (2019) bazı metabolitlerin mRNA’da bulunan ve akış yukarı ağık okuma çerçevesi (uORF) bölgesine bağlanarak ribozomun baskılanmasına neden olduğu ve böylelikle protein sentezini durduğu bildirilmiştir. Benzeri bir başka çalışma 2017 yılında Yamashida ve ark. tarafından yapılırken çalışmada *Arabidopsis* bitkisindeki bir metabolitin yine uORF bölgesine bağlanarak translasyonu baskıladığı bulunmuştur.

Tez çalışmasında translasyon terimi tüç çeşitlerin gövde karşılaştırmalarında ve ayrıca kapsül karşılaştırmalarında en çok bulunan terimdir. Özellikle Ofis NP çeşidinde diğer çeşitlere göre ifadesi artan proteinler en çok oranda translasyon ontolojisine sahiptir. Ayrıca hem Ofis 96 hem de Ofis 1 çeşitlerinin gövde ve kapsüllerine kıyasla Ofis NP’de protein ifadelerinin genellikle baskılanması (bakınız Şekil 4.3) noskapin alkaloidinin ribozomun durdurulması veya duraklatılması üzerine bir etkisi olabileceğini düşündürmektedir.

Noskapin ve sentetik türevlerinin potansiyel bir anti-kanser etkiye sahip olduğu yapılan çalışmalar ile görülmüştür (Lopus and Naik 2015). Bu çalışmalardan biri Nambiar ve ark. tarafından 2020 yılında yapılmış ve noskapinin NPN türevlerinin hücre yapısının korunmasında görevli olan tubulinlere bağlanabileceğini ve proteinin üçüncül yapısını bozarak kanserleşmiş hücrelerde anti kanser özelliği gösterebileceğini belirtmiştir. Yine başka bir çalışma, 2021 yılında Rahmanian-Devin ve ark. tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada noskapin alkaloidinin, tirozin proteini yapılı, hücre yüzeyinde bulunan epidermal büyüme faktörü reseptörünün (EGFR) çok çalışması sonucunda oluşan kanser hücrelerinin büyüme ve çoğalmasını inhibe ettiğini bulmuştur. Noskapinin anti-kanser özelliği ve inhibe edici etkisi çalışmamızda elde edilen veriler ile de birlikte değerlendirildiğinde noskapinin ribozomun durdurulması veya duraklatılmasında bir etkisi olabileceği düşünölmektedir.

Ribozomun duraklatılması sonucunda hatalı olarak kalan proteinlerin parçalanmasında veya sentez sonucunda protein birikimi sebebiyle duran translasyon sonrası proteinlerin taşınmasında ise hücreler arası protein taşınması görevlidir. Hücreler arası protein taşınması ontoloji terimi Ofis 1 Gövde / Ofis NP Gövde karşılaştırmasının Ofis NP çeşidinde en çok çıkan ikinci terim olmuştur. Hücreler arası protein taşınmasına dahil olan yanlış katlanmış protein taşıma sistemi, proteini parçalayarak protein sayısındaki azalmanın sebebi olabilmektedir (Karamyshev ve Karamysheva, 2018.) Bu da çalışmada noskapin alkaloidinin zengin olarak bulunduğu Ofis NP'nin tüm karşılaştırmalarda en az protein sayısına sahip olmasıyla bağlantılı olduğunu düşündürmektedir. Çeşitler arasındaki bu farklılıklar ile yukarıda verilen bilgiler doğrultusunda noskapinin inhibe edici etki yarattığı ve BIA yolağındaki bazı proteinlerin sentezini durdurduğu ve dolayısıyla morfin ve noskapinin iki ayrı yoldan sentezlenmesinin sebeplerinden birisi olabileceği görüşü oluşmuştur. Elde edilen veriler ışığında ve ileri fonksiyonel analizler ile bu geliştirilen hipotezin yeni bir araştırma konusu olabileceği de düşünülmektedir.

Ofis 1 Gövde / Ofis NP Gövde karşılaştırmasının proteom verileri incelendiğinde translasyon Ofis NP Gövdede ifadesi artan proteinler için ilk sırayı alırken, Ofis 1 Gövdede ifadesi artan proteinlerde en çok yine fotosentez terimi bulunmuştur. Ofis 1 Gövdede artan proteinlerin aynı zamanda glikozun pirüvik aside parçalandığı glikoliz sürecinde de görev aldıkları belirlenmiştir. KEGG yolak verileri incelendiğinde de önceki verileri destekler nitelikte Ofis 1 Gövdede ifadesi artan proteinlerin birçoğunun karbon metabolizmasında rol oynadığı bulunmuştur. Karbon metabolizması yolak haritası glikoliz, pentoz fosfat yolu, sitrat döngüsü gibi karbon kullanım yolaklarını kapsamaktadır (https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?pathway+hsa01200; Erişim Tarihi: 28.06.2023). Ofis NP gövdesinde artan proteinlerin KEGG analizleri ise bu proteinlerin özellikle ribozom ve amino asit biyosentezi yolaklarında görev aldığını göstermiştir. Dolayısıyla elde edilen veriler iki farklı koldan sentezlenen morfin ve noskapin alkaloidlerinin gövdede sentezinde fotosentez ve translasyonun etkili olduğunu, ancak fotosentezin özellikle morfin biyosentezinde daha aktif olduğunu, protein sentezi ve transportu sürecinin ise noskapin biyosentezinde baskın rolü olduğunu göstermektedir.

Alkaloid üretimi ile karbonhidrat arasındaki bağlantı incelendiğinde Acem lalesi olarak bilinen *Eschscholzia californica* bitkisinin süspansiyon kültürlerinde de belirlenmiş ve sukroz konsantrasyonunun %8 oranında artırılmasının bir alkaloid olan benzofenantridin

verimini 10 kat arttırdığı bulunmuştur (Berlin vd., 1983). Yine başka bir çalışmada sükrozun farklı konsantrasyonlarda kullanımı ile yaratılan ozmotik stresin üzümün (*Vitis vinifera*) süspansiyon kültüründe antosiyanin üretimini etkilediği belirtilmiştir (Do ve Cormier, 1990). Ayrıca basit şekerlerden glikoz, sükroz ve fruktozun, *Artemisia annua* bitkisinin kültürlerinde artemis alkaloidinin üretimi üzerine etkisi araştırılmış ve glikozun diğer iki şekere göre artemisin üretimini daha çok uyardığı tespit edilmiştir (Wang ve Weathers, 2007). Karbonhidrat ve alkaloid üretimi arasındaki bu bağlantılar eşliğinde gövde karşılaştırmalarındaki fotosentez teriminin de morfin yönünden zengin olan Ofis 1 çeşidinde yoğun çıkması, morfin üretiminde besin ihtiyacının noskapin üretiminden daha fazla olduğunu da işaret etmektedir.

Moleküler fonksiyon terimlerinde çok çıkan bir diğer terim hem bağlama terimi olmuştur. Hem bağlama organ karşılaştırmalarının gövde kısımlarında ve çeşitlerin gövde karşılaştırmalarında çok çıkarken bunun sebebinin yolaklarda görevli sitokrom P453 enzimi olduğu düşünülmektedir. Sitokrom P453 enzimi, hem grubuna ait bir enzimdir ve bir çok yolun ara maddesi olan S-retikülün için kilit bir enzim görevi görerek S-retikülünün R-retiküline epimerizasyonu sırasında görev almaktadır. Hem bağlama teriminin çok çıkması, bu şekilde ortaya çıktığı düşünülmektedir (Winzer vd., 2015).

Proteinlerin büyük bir çoğunluğunun yalnız çalışmadığı ve protein komplekslerinde aktif olabildiği bilinmektedir (Berggård vd., 2007). Bu sebeple protein-protein etkileşimlerinin analizi proteinlerin hücre içindeki fonksiyonlarını anlamak için önemli bir bilgi kaynağıdır (Altuntaş vd., 2020). Hücrenin metabolik süreçleri, hücreler arası iletişimi gibi birçok biyolojik süreci kapsamaktadır (Braun ve Gingras, 2012). Oluşan protein-protein etkileşimleri, zincirler arasındaki kovalent olmayan temaslar ile oluşmaktadır (Yan vd., 2008). Fonksiyonları daha önce tanımlanmış bir proteinin tanımlanmamış bir protein ile etkileşiminin tespit edilmesi ile bilinmeyen fonksiyonların tahmin edilebileceği de düşünülmektedir (Altuntaş vd., 2020). Bu sebeple proteinler arası etkileşimlerin analizi birçok açıdan önemli bilgiler sunmaktadır. Bu çalışmada da ifadesi örnekler arasında farklılık gösteren proteinlerin birbirileri ile olan etkileşimleri protein-protein etkileşim ağları oluşturularak incelenmiştir. Protein etkileşimi en çok Ofis 1 Gövde / Ofis NP Gövde karşılaştırma grubunda bulunmuştur. Ofis 1 ve Ofis NP çeşitlerinin ortak özelliği alkaloid yönünden zengin olmalarıdır. Dolayısıyla bu iki alkaloidce zengin çeşidin gövde proteinleri incelendiğinde çok sayıda proteinin farklı anlatım göstermesi dolayısıyla çok sayıda

etkileşme sahip protein elde edilmesi beklenen bir sonuçtur. Etkileşim ağlarında bazı protein kümelerinin daha yoğun etkileşim gösterdiği belirlenmiştir. Bu kümeler incelendiğinde ilk iki sırayı metabolik yolak ve sekonder metabolitlerin biyosentezinde görevli proteinlerin aldığı gözlemlenmiştir. Ardından ise karbon metabolizması, ribozom, amino asit biyosentezi gibi süreçler takip etmektedir. Tüm bu sonuçlar ontoloji analizleri ile elde edilen verileri de doğrulamaktadır.

Ofis 1 Gövde / Ofis 96 Gövde karşılaştırmasından elde edilen proteinlerin etkileşim ağında etkileşimin en çok olduğu kümede 40S ribozomal protein, RNA bağlayıcı alan içeren protein, ribozomal protein L19 gibi ribozomal bağlantılı fonksiyonlara sahip proteinlerin olduğu bulunmuştur. Ofis NP / Ofis 96 ve Ofis 1 / Ofis NP çeşitlerinin gövde karşılaştırmalarında etkileşimin çok olduğu iki küme incelenmiş ve yine ribozomal L18 c alanı içeren protein gibi veya karakterize olmayan ama ribozom ilişkili proteinlerin bulunduğu fonksiyonlar ortaya çıkarılmıştır. Protein sentezinin başlamasını kolaylaştırmak için başlatma faktörlerini bağlayan 40S ribozomal protein gibi protein sentezinde ve ribozom oluşumunda fonksiyon kazanan proteinler görülmektedir (Rabl vd., 2011). Bu verileri destekler nitelikte olan ve alkaloidlerin protein sentezi ile ilişkisi yukarıda da belirtilmiştir (Grollman, 1966; An-Fei HSU, 1981; Bu'Lock ve Barr, 1986; Korcz vd., 1986; Wink vd., 1992).

Gövdeleri karşılaştırılan grupların kümelerinde en çok çıkan metabolik yollar bitkinin her türlü anabolizma ve katabolizma tepkimelerini içine alan metabolizma sebebiyle beklenen bir terim olurken en çok çıkan bir diğer terim olan sekonder metabolitlerin biyosentezi de çeşitlerin BIA yönünden zengin olması sebebiyle sentez süreci beklenen terimlerdenidir. Gövde karşılaştırmalarındaki kümelerde genel olarak en çok çıkan üçüncü süreç ise karbon metabolizması olmuştur. Fotosentez sürecinde CO₂ kullanarak karbon metabolizmasına dahil olurken (Sezer, 2020) aynı zamanda bitkinin biyolojik metilasyon reaksiyonları için metil gruplarının bağlanması ile karbon metabolizması sürecine dahil olduğu bilinmektedir (Yiğit ve Güneş, 2018). Bu bilgi dikkate alındığında ana alkaloid yolağında metil grubunu transfer eden 6'OMT, T6ODM, CNMT, 4'OMT, SOMT, TNMT, OMT2:OMT3 enzimlerinin, içinde karbon bulundurduğu metil grubunun transferiyle karbon metabolizması sürecinde etkili olduğu düşünülmektedir. Çalışmada ortaya çıkan BIA sentez yolağında görevli proteinlerin ifade düzeylerine bakıldığında yine 4'OMT enziminin gövde karşılaştırmalarında çıkması, SOMT enziminin de organ bazında yapılan

karşılaştırmalarının gövdelerinde çıkması karbon metabolizmasına dahil olduğunu düşünülmektedir. Ayrıca kümelerdeki proteinlerin, sitrat sentaz, asetil koenzim A, katalaz, fruktoz-bifosfat aldolaz, fosforibulokinaz gibi fonksiyonlara sahip olduğu ve enerji yollarında görevli oldukları bulunmuş, bu enerji yollarında kullanılan pirüvat, okzaloasetat, α -ketoglutarat, asetil – koenzim A gibi moleküller, amino asitlerin karbon iskeletlerinin katabolizması sonucu olduğu ortaya çıkarılmıştır (Rodwell, 1988).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Hititlerin döneminden bu zamana kadar Anadolu’da yetiştirilen haşhaş, ülkemizin en önemli tıbbi ve endüstriyel amaçlı kullanılan bitki türüdür (İpek, 2016). Tohumu %20–30 protein ve %45–54 yağ içermesi nedeniyle gıda, kozmetik ve boya sanayinde kullanılırken, kapsülünde bulunan morfin, noskapin gibi alkaloidleri bulundurması sebebiyle de tıbbi amaçlı olarak kullanılmaktadır (Demirci, 2016). Çeşitli kullanım alanlarına sahip haşhaşın, bu çalışmada TMO tarafından geliştirilmiş ve alkaloid içeriği farklı üç çeşidi kullanılmıştır. Ofis 1, Ofis NP ve Ofis 96 olmak üzere üç çeşidin gövde ve kapsül organlarından protein izolasyonları yapıldıktan sonra proteomik bir yaklaşım olan LC-MS/MS ile analiz edilmiş ve çeşitli biyoinformatik araçlar ile morfin ve noskapin yolağındaki farklılıkların protein seviyesine nasıl yansıdığı bitki bazında ilk kez araştırılmıştır.

Çalışmanın elde edilen ham verilerinden oldukça çok sayıda protein tanımlanırken 1212 tanesinin farklılık gösterdiği saptanmış, çeşitler ve organlar arasında dağılımı incelenmiştir. İncelemelerde gövde ve kapsülün birbirlerinden çok farklı protein profiline sahip olduğu bulunmuştur ve gövdede, kapsülden daha fazla sayıda proteinin ifadesinin değiştiği ortaya çıkarılmıştır. Proteinlerin, haşhaşın morfin ve noskapin yolaklarındaki işlevlerinin ortaya çıkarılması için gen ontolojisi ve yolak analizleri yapılmış olup organ bazında yapılan karşılaştırmalarda genellikle protein-kromofor bağlantısı ortaya çıkarken ikinci sırayı da fotosentezin aldığı bulunmuştur. Çeşitler arasındaki karşılaştırmalarda ise translasyonun da öne çıktığı analizler sonucunda ortaya çıkarılmıştır. Dolayısıyla BIA biyosentezi için fotosentez çok önemli bir süreç olmakla beraber morfin ve noskapin biyosentezinde farklılıklar olduğu görülmüştür. Noskapin biyosentezinde protein sentezi ve transportu öne çıkarken, morfin biyosentezi için fotosentez ve buna bağlı olarak karbon metabolizması daha öncelikli süreçler olarak görülmektedir.

Farklılık gösteren proteinlerin protein-protein etkileşimleri için ağlar oluşturulmuş ve proteinlerin fonksiyonları incelenmiştir. İnceleme sonucunda ontoloji analizlerini destekler nitelikte metabolik yolak, sekonder metabolitlerin biyosentezi, karbon metabolizması gibi yolakların karşılaştırmalarda öne çıktığı bulunmuştur.

BIA içeriği üzerinde etkili olduğu belirlenen bu proteinlerin tespiti ile daha ileri düzey fonksiyonel analizler gibi birçok farklı çalışma için veriler elde edilmiş ve literatürdeki veri

eksikliğini gidermeye kaynak olmuştur. Yapılan çalışma farklı BIA içeriklerine sahip haşhaş çeşitlerinin gövde ve kapsül organlarının bir arada analiz edildiği ve olgun haşhaş bitkisinin kullanıldığı ilk proteomik çalışmadır. Tez kapsamında elde edilen veriler ileri dönemlerde farklı disiplinlerin de katkılarıyla gerçekleştirilecek olan yüksek BIA içerikli haşhaş çeşitlerinin geliştirilme çalışmalarına temel olabilecek nitelikte olup Türkiye tarafından geliştirilen çeşitlerin analizi ile bu alanda ülkemizin küresel pazardaki rekabet gücünü arttırarak üretim ve verimliliğe katkı sağlama potansiyeline sahip olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Alaca, F. (2015). *Farklı haşhaş tiplerinde alkaloidler yönünden morfolojik ve ontogenetik varyabilite*, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Altuntaş, V., Murat, G.Ö.K. (2020). Protein–protein etkileşimi tespit yöntemleri, veri tabanları ve veri güvenilirliği. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 19, 722-733.
- TMO. (2020). *Haşhaş Raporu 2019*. Toprak Mahsülleri Ofisi Genel Müdürlüğü, Ankara.
- Ashburner, M., Ball, C.A., Blake, J.A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J.M., Davis, A.P., Dolinski, K., Dwight, S.S., Eppig, J.T., Harris, M.A., Hill, D.P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J.C., Richardson, J.E., Ringwald, M., Rubin, G.M., Sherlock, G. (2000). Gene Ontology: Tool For The Unification Of Biology. The Gene Ontology Consortium, *Nature Genetics*, 25(1), 25-29.
- Ayhan, A.E., Yıldırım, M.U., (2021). Sonbahar ve ilkbahar ekimlerinin haşhaşın (*Papaver somniferum* L.) verim ve morfin içeriği üzerine etkisi, *Mustafa Kemal Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 26(2), 412-420.
- Beaudoin, G.A.W., Facchini, P.J. (2014). Benzyloquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy, *Planta*, 240(1), 19-32.
- Berggard, T., Linse, S., James, P. (2007). Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions. *Proteomics*, 7(16), 2833-2842.
- Berlin, J., Forche, E., Wray, V., Hammer, J., Hösel, W. (1983). Formation of benzophenanthridine alkaloids by suspension cultures of *Eschscholtzia californica*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 38(5), 346-352.
- Bird D.A, Franceschi V.R, Facchini P. J. (2003). A tale of three cell types: alkaloid biosynthesis is localized to sieve elements in opium poppy. *Plant Cell*, 15(11), 2626-2635.
- Boztok Özgermen, D.B., Kahraman, H.A., Yenilmez, F., Bozkır S. (2020). *Hayvancılık Alanında Akademik Başarılar*. Ankara: İksad Yayınevi, 111.
- Böke, H., (2013). *Haşhaş (Papaver Somniferum L.) Mikro-RNA'larının (miRNA) Tanımlanması ve miRNA Hedef Gen Ekspresyon Analizlerinin Belirlenmesi*, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara.
- Bu'Lock, J.D., Barr, J.G. (1968). Regulation mechanism linking tryptophan uptake and synthesis with ergot alkaloid synthesis in *Claviceps*. *Lloydia*, 31, 342-354.
- Bulut, B., Aydın, Z., Türktaş-Erken, M. (2020). MSAP Analysis Reveals Diverse Epigenetic Status in Opium Poppy Varieties with Different Benzyloquinoline Alkaloid Content. *Turkish Journal of Biology*, 44, 103-109.

- Chan, J.C.Y., Zhou, L., Chan, E.C.Y. (2015). The Isotope-Coded Affinity Tag Method for Quantitative Protein Profile Comparison and Relative Quantitation of Cysteine Redox Modifications, *Current Protocols in Protein Science*, 82(1), 23-2.
- Chan, L.K., Koay, S.S., Boey, P.L. ve Bhatt, A. (2010). Effects of abiotic stress on biomass and anthocyanin production in cell cultures of *Melastoma malabathricum*. *Biological Research*, 43(1), 127-135.
- Chandramouli, K., Qian, P-Y. (2009). Proteomics: Challenges, Techniques and Possibilities to Overcome Biological Sample Complexity, *Human Genomics and Proteomics*, 2009, 239204.
- Chatr-Aryamontri, A., Ceol, A., Palazzi, L.M., Nardelli, G., Schneider, M.V., Castagnoli, L., Cesareni, G. (2007). MINT: the Molecular INTERaction database. *Nucleic acids research*, 35, 572-574.
- Cho, W.C.S. (2007). Proteomics Technologies and Challenges, *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 5(2), 77-85.
- Chyżyńska, K., Labun, K., Jones, C., Grellscheid, S.N., Valen, E. (2021). Deep conservation of ribosome stall sites across RNA processing genes. *NAR Genomics and Bioinformatics*, 3(2), 1-13.
- Croft, D., O'Kelly, G., Wu, G., Haw, R., Gillespie, M., Matthews, L., Caudy, M., Garapati, P., Gopinath, G., Jassal, B., Jupe, S., Kalatskaya, I., Mahajan, S., May, B., Ndegwa, N., Schmidt, E., Shamovsky, V., Yung, C., Birney, E., Hermjakob, H., D'Eustachio, P., Stein, L. (2011). Reactome: a database of reactions, pathways and biological processes. *Nucleic Acids Research*, 39, 691-697.
- Dang, T.T.T.O.A, Farrow, S. C., Facchini, P. J. (2012). Functional biochemical genomics as a gene discovery platform in benzyloquinoline alkaloid biosynthesis, *Methods in Enzymology*. 515, 231-66.
- Dass, C. (2007). *Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry*, Hoboken: John Wiley & Sons, 151-194.
- Decker, G., Wanner, G., Zenk, M.H., Lottspeich, F. (2000). Characterization of Proteins In Latex Of The Opium Poppy (*Papaver somniferum*) Using Two-Dimensional Gel Electrophoresis And Microsequencing, *Electrophoresis*, 21(16), 3500-3516.
- Demirci, Y. (2016). *Morfin ve Noskapin İçeriği Yüksek Haşhaş (Papaver Somniferum L.) Genotiplerinde RNA Kütüphanelerinden Transkripsiyon Faktörlerinin Tespiti ve İfade Analizi*, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara.
- Dennis, G., Sherman, B.T., Hosack, D.A., Yang, J., Gao, W., Lane, H.C., and Lempicki, R. A. (2003). DAVID: Database For Annotation, Visualization, And Integrated Discovery, *Genome Biology*, 4(9), 1-11.

- Deracinois, B., Flahaut, C., Duban-Deweere, S., Karamanos, Y. (2013). Comparative and quantitative global proteomics approaches: an overview, *Proteomes*, 1(3), 180-218.
- Desgagné-Penix, I., Farrow, S.C., Cram, D., Nowak, J., Facchini, P.J. (2012). Integration of deep transcript and targeted metabolite profiles for eight cultivars of opium poppy, *Plant molecular biology*, 79(3), 295-313.
- Desgagné-Penix, I., Khan, M.F., Schriemer, D.C., Cram, D., Nowak, J., Facchini, P. (2010). Integration of Deep Transcriptome And Proteome Analyses Reveals The Components Of Alkaloid Metabolism In Opium Poppy Cell Cultures, *BMC Plant Biology*, 10(1), 1-17.
- Do, C.B., Cormier, F. (1990). Accumulation of anthocyanins enhanced by a high osmotic potential in grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspensions. *Plant Cell Reports*, 9(3), 143-146.
- Eser, B., Saygılı, H., Gökçöl, A., İlker, E. (2006). Tohum Bilimi ve Teknolojisi, *Ege Üniversitesi Tohum Teknolojisi Uygulama ve Araştırma Merkezi Yayınları*, 1.
- Eser, B., Sepici Dinçer, A. (2018). Kromatografiye giriş, yüksek performanslı sıvı kromatografi kullanımında basit ipuçları, *Sağlık Hizmetleri ve Eğitimi Dergisi*, 2(2), 51-57.
- Facchini, P.J. (2007). Opium poppy, blueprint for an alkaloid factory, *Phytochem Reviews*, 6(1), 97-124.
- Facchini, P.C., Bird, D.A., Bourgault, R., Hagel, J.M., Liscombe, D.K., MacLeod, B.P., Zulak, K.G. (2005). Opium Poppy: A Model System to Investigate Alkaloid Biosynthesis in Plants, *Canadian Journal of Botany*, 83(10), 1189-1206.
- Facchini, P.J., De Luca, V. (1995). Phloem-Specific Expression of Tyrosine/Dopa Decarboxylase Genes and the Biosynthesis of Isoquinoline Alkaloids in Opium Poppy, *Plant Cell*, 7(11), 1811-1821.
- Facchini P.J., De Luca V. (2008). Opium poppy and Madagascar periwinkle: model non-model systems to investigate alkaloid biosynthesis in plants, *The Plant Journal*, 54(4), 763- 84.
- Fairbairn, J., Kapoor, L. (1960). The Laticiferous Vessels of *Papaver somniferum* L., *Planta Medica*, 8(01), 49-61.
- Fisinger, U., Grobe, N., Zenk, M.H. (2007). Thebaine synthase: a new enzyme in the morphine pathway in *Papaver somniferum*. *Natural Product Communications*, 2(3), 249-53.
- Franceschini, A., Szklarczyk, D., Frankild, S., Kuhn, M., Simonovic, M., Roth, A Lin, J., Minguez, P., Bork, P., Mering, C.V., Jensen, L.J. (2012). STRING v9. 1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. *Nucleic acids research*, 41(1), 808-815.

- Fresno, M., Jimenez, A., Vazquez, D. (1977). Inhibition of Translation in Eukaryotic Systems by Harringtonine. *European Journal of Biochemistry*, 72(2), 323-330.
- Gesell, A., Rolf, M., Ziegler, J., Chávez, M.L.D., Huang, F.C., Kutchan, T.M. (2009). CYP719B1 is salutaridine synthase, the CC phenol-coupling enzyme of morphine biosynthesis in opium poppy. *Journal of Biological Chemistry*. 284(36), 24432-42.
- Gezici, S. (2017). *Karşılaştırmalı Proteomiks ve Biyoinformatik Analizler ile Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanserlerinde Protein Biyomarkırların Belirlenmesi*, Doktora Tezi, Gaziantep Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gaziantep.
- Grollman, A.P. (1966). Structural basis for inhibition of protein synthesis by emetine and cycloheximide based on an analogy between ipecac alkaloids and glutarimide antibiotics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 56(6), 1867-1874.
- Gürkök, T. (2013). *Morfin İçeriği İndüklenmiş Haşhaş (Papaver somniferum L.) Bitkisinde Genom Düzeyinde Transkriptom Analizi*. Doktora Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat.
- Gurkok, T., Ozhuner, E., Parmaksız, I., Ozcan, S., Turktas, M., Ipek, A., Demirtaş I., Okay S., Unver, T. (2016). Functional Characterization of 4'OMT and 7OMT Genes in BIA Biosynthesis. *Frontiers in Plant Science*, 7(98).
- Gurkok, T., Turktas, M., Parmaksız, I., Unver, T. (2015). Transcriptome Profiling of Alkaloid Biosynthesis in Elicitor Induced Opium Poppy. *Plant Molecular Biology Reporter*, 33, 673-688.
- Haab, B.B. (2006). Applications of antibody array platforms. *Current Opinion in Biotechnology*, 17(4), 415-421.
- Hagel, J.M., Facchini P.J. (2010). Dioxygenases catalyze the O-demethylation steps of morphine biosynthesis in opium poppy. *Nature Chemical Biology*. 6(4), 273-5.
- Huang, F.C., Kutchan, T.M. (2000). Distribution of morphinan and benzo [c] phenanthridine alkaloid gene transcript accumulation in *Papaver somniferum*. *Phytochemistry*, 53(5), 555-564.
- İncekara, F. (1972). Endüstri Bitkileri ve Islahı, Yağ Bitkileri ve Islahı. Ege Üniversitesi, *Ziraat Fakültesi Yayınları*, 2(33), 83.
- İpek, G. (2016). *Noskapin ve morfin oranları yüksek melez haşhaş (Papaver somniferum L.) hatlarının bazı tarımsal ve bitkisel özellikleri*. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- İslam, İ. (2021). *A549 Akciğer Kanseri Hücre Hattında Noskapin'in Apoptotik ve Antianjiyogenik Etkiliğinin Değerlendirilmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Uşak Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Uşak.
- İzmirli, M., Tufan, T., Alptekin, D. (2012). DNA metilasyonu. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 21(4), 274-282.

- Jimenez, A., Santos, A., Alonso, G., Vazquez, D. (1976). Inhibitors of protein synthesis in eukaryotic cells: comparative effects of some Amaryllidaceae alkaloids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis*, 425(3), 342-348.
- Kanehisa, M. (2000). Goto S: Kyoto encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 27-30.
- Kanehisa, M., Goto, S., Kawashima, S., Okuno, Y., Hattori, M. (2004). The KEGG Resource For Deciphering The Genome, *Nucleic Acids Research*, 32, 277-280.
- Kanehisa M., Goto S., Sato Y., Furumichi M., Tanabe M. (2012). “KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular datasets”. *Nucleic Acids Research*. 2012, 40 (1), 109-114.
- Kara, N., Baydar, H. (2021). The alkaloid content of poppy (*Papaver somniferum* L.) varieties in Turkey by their correlation and path coefficient relationships. *International Journal of Agriculture Environment and Food Sciences*, 5(4), 450-455.
- Karamyshev, A.L., Karamysheva, Z.N. (2018). Lost in translation: ribosome-associated mRNA and protein quality controls. *Frontiers in genetics*, 9, 431.
- Keklik, G. Özcan, B.D. (2022). Multidisipliner Bir Bilim Dalı Olarak Biyoinformatiğe Genel Bir Bakış . *Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 5 (2) , 1082-1091.
- Kerrien, S., Aranda, B., Breuza, L., Bridge, A., Broackes-Carter, F., Chen, C., Duesbury, M., Dumousseau, M., Feuermann, M., Hinz, U., Jandrasits, C., Jimenez, R.C., Khadake, J., Mahadevan, U., Masson, P., Pedruzzi, I., Pfeifferberger, E., Porras, P., Raghunath, A., Roechert, B., Orchard, S., Hermjakob, H. (2012). The IntAct molecular interaction database in 2012. *Nucleic acids research*, 40(1), 841-846.
- Keshava Prasad, T.S., Goel, R., Kandasamy, K., Keerthikumar, S., Kumar, S., Mathivanan, S., Telikicherla, D., Raju, R., Shafreen, B., Venugopal, A., -Balakrishnan, L., Arivusudar Marimuthu, A., Sutopa Banerjee, S., Devi S. Somanathan, D.S., Sebastian, A., Rani, S., Ray, S., Kishore, C.J.H. , Kanth, S., Ahmed, M., Kashyap, M.K., Mohmood, R., Ramachandra, Y.L., Krishna, V., Rahiman, B.A., Mohan, S., Ranganathan, P., Ramabadran, S., Chaerkady, R., Pandey, A. (2009). Human protein reference database-2009 update. *Nucleic acids research*, 37, 767-772.
- Kim, D., Jung, M., Ha, J.J., Lee, M.Y., Lee, S-G., Shin, Y., Subramaniam, S., Oh, J. 2018. Transcriptional Profiles of Secondary Metabolite Biosynthesis Genes and Cytochromes in the Leaves of Four Papaver Species. *Data*, 3, 55.
- Weller, J.L. (2017). Phytochromes and Other Photoreceptors. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*, 1, 455-459.
- Winzer, T., Kern, M., King, A.J., Larson, T.R., Teodor, R.I., Donniger, S.L., Graham, I. A. (2015). Morphinan biosynthesis in opium poppy requires a P450-oxidoreductase fusion protein. *Science*, 349(6245), 309-312.

- Keskin, N., Kunter, B. (2007). Ercis üzüm çeşidinin kallus kültürlerinde UV ışını etkisiyle resveratrol üretiminin uyarılması. *Journal of Agricultural Sciences*, 13(04), 379-384.
- Kong, S.G., Okajima, K. (2016). Diverse Photoreceptors and Light Responses in Plants. *Journal of Plant Research*, 129 (2), 111–114.
- Lal, R.K. (2022). The opium poppy (*Papaver somniferum* L.): Historical perspectives recapitulate and induced mutation towards latex less, low alkaloids in capsule husk mutant: A review, *Journal of Medicinal Plants*, 10(3), 19-29.
- Lopus, M., Naik, P.K. (2015). Taking aim at a dynamic target: Noscapinoids as microtubule-targeted cancer therapeutics. *Pharmacological Reports*, 67, 56-62.
- Lu, B. (2022). Translational regulation by ribosome-associated quality control in neurodegenerative disease, cancer, and viral infection. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10, 970654.
- Mahmoudian, M., Rahimi-Moghaddam, P. (2009). The Anti-Cancer Activity of Noscapine: A Review. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 4(1), 92-97.
- Malik, R., Dulla K., Nigg E., Körner R, (2010). From proteome lists to biological impact - tools and strategies for the analysis of large MS data sets. *Proteomics*, 10, 1270-1283.
- Mann, M., Hendrickson, R.C., Pandey, A. (2001). Analysis of Proteins and Proteomes by Mass Spectrometry. *Annual Review of Biochemistry*, 70(1), 437-473.
- Martínez-Esteso, M.J., Martínez-Márquez, A., Sellés-Marchart, S., Morante-Carriel J.A., Bru-Martínez R. (2015). The Role Of Proteomics In Progressing Insights Into Plant Secondary Metabolism, *Frontiers in Plant Science*, 6, 504-504.
- Mulder-Krieger, T.H., Verpoorte, R., Svendsen, A.B., Scheffer, J.J.C. (1988). Production of essential oils and flavours in plant cell and tissue cultures. A review. *Plant cell, tissue and organ culture*, 13(2), 85-154.
- Nambiar, N., Nagireddy, P.K.R., Pedapati, R., Kantevari, S., Lopus, M. (2020). Tubulin-and ROS-dependent antiproliferative mechanism of a potent analogue of noscapine, N-propargyl noscapine. *Life Sciences*, 258, 118238.
- Oldham, J.T., Hincapie, M., Rejtar, T., Wall, P.K., Carlson, J.E., Lee-Parsons, C.W. (2010). Shotgun Proteomic Analysis of Yeast-Elicited California Poppy (*Eschscholzia californica*) Suspension Cultures Producing Enhanced Levels of Benzophenanthridine Alkaloids. *Journal of Proteome Research*, 9, 4337-4345.
- Onoyovwe, A., Hagel, J.M., Chen, X., Khan, M.F., Schriemer, D.C. and Facchini, P.J., (2013). Morphine biosynthesis in opium poppy involves two cell types: sieve elements and laticifers, *The Plant Cell*, 25(10), 4110-4122.

- Pienkny, S., Brandt, W., Schmidt, J., Kramell, R. and Ziegler, J. (2009). Functional characterization of a novel benzyloquinoline O-methyltransferase suggests its involvement in papaverine biosynthesis in opium poppy (*Papaver somniferum* L), *The Plant Journal*, 60(1), 56-67.
- Polat, M., Karahan A. G. (2009). Multidisipliner yeni bir bilim dalı; biyoinformatik ve tıpta uygulamaları, *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 16(3), 41-50.
- Rahmanian-Devin, P., Baradaran Rahimi, V., Jaafari, M.R., Golmohammadzadeh, S., Sanei-Far, Z., Askari, V.R. (2021). Noscapine, an emerging medication for different diseases: a mechanistic review. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2021.
- Ralphs, M.H., Manners, G.D., Gardner, D.R. (1998). Influence of light and photosynthesis on alkaloid concentration in larkspur. *Journal of Chemical Ecology*, 24(1), 167-182.
- Samanani, N., Alcantara, J., Bourgault, R., Zulak, K.G., Facchini, P.J. (2006). The role of phloem sieve elements and laticifers in the biosynthesis and accumulation of alkaloids in opium poppy. *Plant J*, 47(4), 547-563.
- Sampaio, O., Vieira, L., Belleste, B., King-Diaz, B., Lotina-Hennsen, B., da Silva, M., Veiga, T. (2018). Evaluation of Alkaloids Isolated from *Ruta graveolens* as Photosynthesis Inhibitors. *Molecules*, 23(10), 2693.
- Sanchez-Carbayo, M. (2006). Antibody Arrays: Technical Considerations and Clinical Applications in Cancer, *Clinical Chemistry*, 52(9), 1651-1659.
- Schirmer, E.C., Yates, JR. 3rd, Gerace, L. (2003). MudPIT: A powerful proteomics tool for discovery. *Discover Medication*, 3(18), 38-9.
- Schmidt, A., Forne, I., Imhof, A. (2014). Bioinformatic analysis of proteomics data. *BMC Systems Biology*, 8(2), S3.
- Seçmen, Ö., Gemici, Y., Görk, G., Bekar, L. Leblebici, E., (1995). Tohumlu Bitkiler Sistematığı, *Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Ders Kitapları Serisi*, 116, 396-396.
- Sezer, İ. Ç. (2020). Fotosentez. *Bilim ve Teknik*, 633.
- Singh, A., Menendez-Permodo, I.M., Facchini, P.J. (2019). Benzyloquinoline Alkaloid Biosynthesis in Opium Poppy: An Update, *Phytochemical Reviews*, 18, 1457-1482.
- Sharafzadeh, S., Ordookhani, K. (2011). Influence of carbon dioxide enrichment on accumulation of secondary metabolites in plants. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(11), 1681-1686.
- Snel, B., Lehmann, G., Bork, P., Huynen, M.A. (2000). STRING: a web-server to retrieve and display the repeatedly occurring neighbourhood of a gene. *Nucleic acids research*, 28(18), 3442-3444.

- Srivastava, N.K, Sharma, S. (1990). Triacontanol'ün afyon haşhaşında (Papaver Somniferum L.) fotosentez, alkaloit içeriği ve büyüme üzerindeki etkisi. *Bitki Büyüme Yönetmeliği*, 9, 65-71.
- Sun, H., Song, H., Deng, X., Liu, J., Yang, D., Zhang, M., Wang, Y., Xin, J., Chen, L., Liu, Y., Yang, M. (2022). Transcriptome-Wide Characterization of Alkaloids and Chlorophyll Biosynthesis in Lotus Plumule. *Frontiers in Plant Science*, 13, 885503-885503.
- Stark, C., Breitkreutz, B.J., Regul, T., Boucher, L., Breitkreutz, A., Tyers, M. (2006). BioGRID: a general repository for interaction datasets. *Nucleic acids research*, 34, 535-539.
- Szklarczyk, D., Gable, A.L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N.T., Morris, J.H., Bork, P., Jensen, L.J., Mering, C. (2019). STRING v11: Protein-Protein Association Networks With Increased Coverage, Supporting Functional Discovery In Genome-Wide Experimental Datasets, *Nucleic Acids Research*, 47, 607-613.
- Team, R.D.C. (2021). R: A language and environment statistical computing, *Avusturya: R Foundation for Statistical Computing*, 275-286.
- Timp, W., Timp, G. (2020). Beyond Mass Spectrometry, The Next Step In Proteomics, *Science Advances*, 6(2), 8978.
- Turner, B., Razick, S., Turinsky, A.L., Vlasblom, J., Crowdy, E.K., Cho, E., Morrison, K, Donaldson, I., Wodak, S.J. (2010). iRefWeb: interactive analysis of consolidated protein interaction data and their supporting evidence. *Database*, 2010.
- Unterlinner, B., Lenz, R., Kutchan, T.M. (1999). Molecular cloning and functional expression of codeinone reductase: the penultimate enzyme in morphine biosynthesis in the opium poppy Papaver somniferum. *The Plant Journal*, 18(5), 465-75.
- Van Cutsem, E., Simonart, G., Degand, H., Faber, A.M., Morsomme, P., Boutry, M. (2011). Gel-Based And Gel-Free Proteomic Analysis of Nicotiana Tabacum Trichomes Identifies Proteins Involved In Secondary Metabolism And In The (A)Biotic Stress Response. *Proteomics*, 11, 440-454.
- Van der Horst, S., Filipovska, T., Hanson, J., Smeekens, S.C.M. (2019). Metabolite Control of Translation by Conserved Peptide uORFs: The Ribosome as a Metabolite Multi-sensor. *Plant Physiology*, 00940.2019.
- Wang, Y., Weathers, P.J. (2007). Sugars proportionately affect artemisinin production. *Plant cell reports*, 26(7), 1073-1081.
- Wink, M., Twardowski, T. (1992). Allelochemical properties of alkaloids. Effects on plants, bacteria and protein biosynthesis. *Allelopathy: basic and applied aspects*, 129-150.

- Yamashita, Y., Takamatsu, S., Glasbrenner, M., Becker, T., Naito, S., Beckmann, R. (2017). Sucrose sensing through nascent peptide-mediated ribosome stalling at the stop codon of Arabidopsis bZIP 11 uORF 2. *FEBS letters*, 591(9), 1266-1277.
- Yang, D., Du, X., Yang, Z., Liang, Z., Guo, Z., and Liu, Y. (2014). Transcriptomics, Proteomics, And Metabolomics To Reveal Mechanisms Underlying Plant Secondary Metabolism. *Engineering in Life Sciences*, 14, 456-466.
- Yazıcı, L., Yılmaz, G., Gökalp, S. (2017). Bazı Haşhaş (*Papaver somniferum* L.) Çeşit ve Genotiplerinin Alkaloid ve Yağ Oranlarının Belirlenmesi, *KS Doğa Bilimleri Dergisi*, 20, 313-317.
- Yiğit, A., Güneş, F. (2018). Epigenetik ve Tek Karbon Metabolizması: Folat ve B12 Vitamini'nin Rolü. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 3(3), 95-101.
- Yücebilgili Kurtoğlu, K. (2016). *Transcriptome Analysis Of Morphine Biosynthesis In Opium Poppy (Papaver somniferum L.)*, Doktora Tezi, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Zhang, H., Lang, Z., Zhu, J.K. (2018). Dynamics and function of DNA methylation in plants. *Nature Review Molekul Cell Biology*, 19, 489–506.
- Ziegler, J., Diaz-Chávez, M.L., Kramell, R., Ammer, C. and Kutchan, T.M. (2005). Comparative macroarray analysis of morphine containing *Papaver somniferum* and eight morphine free *Papaver* species identifies an O-methyltransferase involved in benzyloquinoline biosynthesis. *Planta*, 222(3), 458-471.
- Ziegler, J., Facchini, P.J. (2008). Alkaloid Biosynthesis, *Metabolism and Trafficking Annual Review of Plant Biology*, 59, 735-769.
- Ziegler J., Facchini P.J., Geißler R., Schmidt, J., Ammer, C., Kramell, R., Voigtländer S., Gesell A., Pienkny S., Brandt, W. (2009). Evolution of morphine biosynthesis in opium poppy. *Phytochemistry*, 70(15), 1696-707.
- Ziegler, J., Voigtländer, S., Schmidt, J., Kramell, R., Miersch, O., Ammer, C., Gesell A., Kutchan, T.M. (2006). Comparative transcript and alkaloid profiling in *Papaver* species identifies a short chain dehydrogenase/reductase involved in morphine biosynthesis. *The Plant Journal*, 48(2), 177-192.
- Zhang, L., Zhu, W., Zhang, Y., Yang, B., Fu, Z., Li, X., Tian, J. (2014). Proteomics analysis of *Mahonia bealei* leaves with induction of alkaloids via combinatorial peptide ligand libraries. *Journal of Proteomics*, 110, 59-71.
- Zhao, X., Si, J., Miao, Y., Peng, Y., Wang, L., Cai, X. (2014). Comparative Proteomics Of *Euphorbia kansui* Milky Sap At Two Different Developmental Stages. *Plant Physiology and Biochemistry*, 79, 60-65.

- Zulak, K.G., Cornish, A., Daskalchuk, T.E., Deyholos, M.K., Goodenowe, D.B., Gordon, P. M. K., Klassen, D., Pelcher, L.E., Sensen, C.W., Facchini, P.J. (2007). Gene Transcript and Metabolite Profiling of Elicitor-Induced Opium Poppy Cell Cultures Reveals The Coordinate Regulation of Primary and Secondary Metabolism. *Planta*, 225, 1085-1106.
- Zulak, K.G., Khan, M.F., Alcantara, J., Schriemer, D.C., Facchini, P.J. (2009). Plant Defense Responses in Opium Poppy Cell Cultures Revealed by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Proteomics, *Molecular and Cellular Proteomics*, 8(1), 86-98.

EKLER

(Ekler Tezin arka kapağında CD ortamında verilmiştir.)



Gazili Olmak Ayrıcalıktır