T.C.

ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARKLI BIA İÇERİKLERİNE SAHİP HAŞHAŞ ÇEŞİTLERİNDE ÜÇ FARKLI GEN DÜZENLEYİCİ ELEMENTİN (TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ, miRNA, TRANSPOZON) İFADE ANALİZLERİ

Reyhan BAŞ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI

2020

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Reyhan BAŞ tarafından hazırlanan **''Farklı BIA İçeriklerine Sahip Haşhaş Çeşitlerinde Üç Farklı Gen Düzenleyici Elementin (Transkripsiyon Faktörü, miRNA, Transpozon) İfade Analizleri''** adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oy birliği ile Biyoloji Anabilim Dalı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Mine TÜRKTAŞ ERKEN

Jüri Üyeleri:

Başkan: Prof. Dr. Nur KOÇBERBER KILIÇ

Üye: Doç. Dr. Mine TÜRKTAŞ ERKEN

Üye: Doç. Dr. Melda DÖLARSLAN

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Enstitü Müdürü

…./…./….

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FARKLI BIA İÇERİKLERİNE SAHİP HAŞHAŞ ÇEŞİTLERİNDE ÜÇ FARKLI GEN DÜZENLEYİCİ ELEMENTİN (TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ, miRNA, TRANSPOZON) İFADE ANALİZLERİ

Reyhan BAŞ

Çankırı Karatekin Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mine TÜRKTAŞ ERKEN

Haşhaş (*Papaver somniferum* L.), benzilizokinolin alkaloitler (BIA), adını verdiğimiz kodein, morfin, narsein, sanguinarin, papaverin ve noskapin gibi farmasötik özelliklere sahip ekonomik ve tıbbı öneme sahip bir bitkidir. Bu tez çalışmasında TMO'dan elde edilen *P. Somniferum* L. morfin içeriği düşük Ofis 95, morfin içeriği düşük Ofis 96 çeşidi, morfin içeriği yüksek Ofis1 çeşiti, morfin içeriği yüksek olan Ofis 2 çeşidi, tebain içeriği yüksek olan Ofis-T çeşidi ve noskapin içeriği yüksek olan Ofis-NP çeşitleri kullanılmıştır. Haşhaş bitkisinde gen ifadesi düzenleyicilerin (Transkripsiyon Faktörü, miRNA, Transpozon) alkaloitler ile olan ilişkileri birlikte araştırılmıştır.

2020, 45 sayfa

Anahtar Kelimeler: Haşhaş (*Papaver somniferum* L.), *Opium poppy*, BIA (Benzilizokinolin), sekonder metabolit, Transkripsiyon Faktörü, miRNA, Transpozon

ABSTRACT

Master Thesis

İFADE ANALYSIS OF THREE DIFFERENT GENE REGULATORY ELEMENTS (TRANSCRIPTION FACTOR, miRNA, TRANSPOSON) IN POPPY CULTIVARS WITH DIFFERENT BIA CONTENTS

Reyhan BAŞ

Çankırı Karatekin University

Institute of Science

Department of Biology

Advisor: Assoc. Dr. Mine TÜRKTAŞ ERKEN

Poppy (*Papaver somniferum* L.), benzilisoquinoline alkaloids (BIA) is an economically and medically important plant with pharmaceutical properties such as codeine, morphine, narsein, sanguinarin, papaverine and noskapine. In this thesis study, *P. Somniferum* L. obtained from TMO has a low morphine content of Office 95, a low morphine content of Office 96, a high morphine content of Office1, a high morphine content of Office 2, a high level of tebain and a high content of noskapin. Office-NP types are used. Relationships of gene İfade regulators (Transcription Factor, miRNA, Transposon) with alkaloids in poppy plant were investigated together.

2020, 45 page

Keywords: Poppy (*Papaver somniferum* L.), *Opium poppy*, BIA (Benzilisoquinoline), secondary metabolite, Transcription Factor, miRNA, Transposon

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

‘‘Farklı BIA İçeriklerine Sahip Haşhaş Çeşitlerinde Üç Farklı Gen Düzenleyici Elementin (Transkripsiyon Faktörü, miRNA, Transpozon) İfade Analizleri’’adlı bu çalışma 2019-2020 yılları arasında Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsüne ‘‘Yüksek Lisans Tezi’’ olarak sunulmuştur. Bu çalışmanın amacı ülkemiz çiftçisinin hayatında önemli bir bitki olan haşhaş çeşitlerindeki alkaloitler ile gen ifadesi düzenleyici elementlerle (Transkripsiyon Faktörü, miRNA, Transpozon) olan ilişkisi açıklanmıştır.

Tez çalışma konumun belirlenmesinde, planlanmasında, araştırılmasında, yürütülmesinde ve oluşumunda ilgi ve desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren sayın hocam Doç. Dr. Mine TÜRKTAŞ ERKEN’e,

Gerek laboratuvar çalışmalarımda gerekse bilgi ve tecrübeleriyle yardımcı olan Gülsüm TANMAN’a,

Çalışmalarım esnasında manevi desteğini esirgemeyen her zaman yanımda olan annem Ayşen BAŞ ‘a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Reyhan BAŞ

Çankırı, Temmuz 2020

İÇİNDEKİLER

ÖZET……...iv
ABSTRACT…….....v
ÖNSÖZ……vi
SİMGELER DİZİNİ……viii
KISALTMALAR DİZİNİ……..ix
ŞEKİLLER DİZİNİ……x
ÇİZELGELER ve TABLOLAR DİZİNİ……xi
1. GİRİŞ……1
1.1. Sekonder Metabolitler……3
1.2. Benzilizokinolin (BIA) Alkaloitleri……...5
1.2.1. Benzilizokinolin Alkaloitlerinin Biyosentezi……..5
1.3. Traskripsiyon Faktörleri……...11
1.4. miRNA……13
1.5. Transpozonlar……...15
1.5.1. Birinci Sınıf Transpozonlar……16
1.5.2. İkinci Sınıf Transpozonlar ……17
1.6. QT-PZR (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ……18
2. **MATERYAL VE YÖNTEM……..20**
2.1. Bitki Materyali ……20
2.2. RNA İzolasyonu……...20
2.3. DNAase Uygulaması……...……21
2.4. cDNA Sentezi……..……22
2.5. miRNA‘lara özgü cDNA sentezi ……22
2.6. Primer Tasarımı……23
2.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ……..24
2.8. Gerçek Zamanlı PZR ……25
3. BULGULAR ……26
3.1.RNA İzolasyonu……26
3.2. 18S Primeri ile cDNA Kontrolü ……...27
3.3. Kantitatif PZR ……..28
3.4. Gerçek Zamanlı PZR İşleminde Gen İfade Düzeyleri ……32
4. TARTIŞMA VE SONUÇ……39
5. KAYNAKLAR ……46
ÖZGEÇMİŞ ……..54

SİMGELER DİZİNİ

°C	Santigrat
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
<	Küçük işareti
%	Yüzde

KISALTMALAR DİZİNİ

18s rRNA	18s ribozomalribonükleik asit
cDNA	Komplementer Deoksiribonükleik asit
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
qRT-PZR	Real Time (Eş zamanlı) PZR
BIA	Benzilizokinolin alkaloitleri
TF	Transkripsiyon Faktörü
4-OMT	4-O-metiltransferaz
7-OMT	7-O-metiltrenferazın
ALP 1	Actin Like Protein 1
C3H	Asetilen
CT	cycle threshold
H2O	Su molekülü
MgCl2	Magnezyum di klorür
Dntp	Deoxynucleotide
DTT	Ditiotreitol
TBE	Tris/Borate/EDTA
EtBr	Etityumbromür
tRNA	Taşıyıcı Ribonükleik Asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Haşhaş bitkisinin genel görünümü……1
Şekil 1.2. Haşhaş'dapapaverin, sanguinarin, noskapin ve morfin oluşumunu gösteren önemli benzilizokinolin yolları ……..7
Şekil 1.3. BIA biyosentez yolu ……9
Şekil 1.4. Alkaloitlerin biyosentez yolu ……10
Şekil 1.5. Transpozon……..16
Şekil 2.1. RNA izolasyon aşamalarına ait deney görselleri…….21
Şekil 3.1. Total RNA'ların %1'lik agoroz jel görüntüsü……26
Şekil 3.2. 18S cDNA %1'lik agaroz jel görüntüsü…….27
Şekil 3.3. Transkripsiyon faktörleri…….28
Şekil 3.4. miRNA…….29
Şekil 3.5. miRNA hedef genleri……..30
Şekil 3.6. Transpozonlar……..31

ÇİZELGELER ve TABLOLAR DİZİNİ

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan primerler……23
Tablo 3.1. Kantitatif ölçüm sonuçları…….27
Tablo 3.2. Gerçek zamanlı PZR da Ct değerleri…….32
Tablo 3.3. Gerçek zamanlı PZR da *BBR* TF Ct değerleri……33
Tablo 3.4. Gerçek zamanlı PZR da WRKY TF Ct değerleri……..33
Tablo 3.5. Gerçek zamanlı PZR da miR2161 Ct değerleri…….34
Tablo 3.6. Gerçek zamanlı PZR da miR13 Ct değerleri ……35
Tablo 3.7. Gerçek zamanlı PZR da miR13376 Ct değerleri……...35
Tablo 3.8. Gerçek zamanlı PZR da 4-OMT Ct değerleri……36
Tablo 3.9. Gerçek zamanlı PZR da SAT Ct değerleri…….36
Tablo 3.10. Gerçek zamanlı PZR da 7-OMT Ct değerleri……37
Tablo 3.11. Gerçek zamanlı PZR da ALP1 Ct değerleri…….37
Tablo 3.12. Gerçek zamanlı PZR da MAIN Ct değerleri……38
Tablo 3.13. Gerçek zamanlı PZR da HARBI Ct değerleri……..38

1. GİRİŞ

Haşhaş (*Papaver somniferum* L.) *Rhoedales* takımından, *Papaveraceae* familyasının bir üyesi olan haşhaş bitkisi ülkemizdeki çiftçilerin hayatında geleneksel ürün olarak tanımlanan, tohumlarından ve yağından gıda olarak faydalanmanın yanı sıra, çiçeklerinden ve kuru kapsüllerinden dolayı süs bitkisi olarakda değerlendirilmekte ve ayrıca küspesi hayvan yemi olarak kullanılan ve alkaloit içeren kapsülleri ve aynı zamanda ürettiği sekonder metabolitlerden dolayı da tıbbi amaç için kullanılan çok yönlü bir bitkidir. Eskiden beri tıbbi bir bitki olarak kullanılan haşhaş (*Papaver somniferum* L.), narkotik analjezik morfin, öksürük kesici kodein, antimikrobiyal sanguarin, kan damarlarını genişletici papaverin gibi farmasötik özelliklere sahip benzilizokinolin tipi alkaloitleri (BIA) bünyesinde bulundurmaktadır. *Papaveraceae* familyası 28 cins ve teşhis edilmiş yaklaşık 250 tür bitkiyi bünyesinde barındırmaktadır (Gürkök 2013). Bu familyadaki bitkiler dünyada Kuzey Yarımkürenin ılıman ve subtropik bölgelerinde yayılış göstermektedirler. Türkiye'de ise familyaya ait 5 cins bulunmaktadır. Bu cinslerden olan *Papaver L.* cinsinin dünyaya yayılmış yaklaşık olarak 110 türü olduğu bilinmektedir. Türkiye'de ise *Papaver L.* cinsinin teşhis edilmiş 36 türü bulunmaktadır (İpek 2011).



Şekil 1.1. Haşhaş bitkisinin genel görünümü (İpek 2011).

Ülkemiz çiftçisinin hayatında önemli bir bitki olan haşhaş (*Papaver somniferum* L.), gelincikgiller familyasından *Papaver* cinsinden olan tek yıllık bir kültür bitkisidir. Anadolu'da Hititlerden bu yana tarımının yapıldığı bilinmektedir. Türkiye çoğu bitkinin gen kaynağı olmakla beraber, haşhaş bitkisinin de anavatanıdır (Anonim 2013). Haşhaş, Türkiye'nin önemli kültür bitkilerinden birisi olup, tohumlarından elde edilen yağı ile

kapsüllerinden elde edilen morfin ve diğer alkaloitlerinden yararlanılmaktadır (Koç vd. 2006). Haşhaş (*P. somniferum* L.), 60-200 cm kadar boylanan, kapsülleri kapalı, mor ve beyaz renkte çiçekleri olan tek yıllık bir bitkidir. Sıcak, tropik bölgelerde ve ülkemizde yetişmektedir (Eser vd. 2006). Türkiye'de doğal olarak yetişen ve kültürü yapılan, tıbbi ve aromatik bitkiler açısından önemli bir katkıya sahiptir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün yapmış olduğu çalışmaya bakıldığında tüm dünyada 20.000 civarında bitki türünün tıbbi amaçla kullanıldığı belirtilmektedir (Arslan vd. 2011). Bu türlerden birisi olan haşhaş, tohumlarından ve yağından gıda olarak faydalanılan, küspesi hayvan yemi olarak kullanılan ve kapsüllerinin içerdiği alkaloitlerden, tıbbi olarak kullanılan çok yönlü olan bir bitkidir. Haşhaş üretimindeki temel amaç alkaloit elde etmektir. Haşhaşın meyve kabuğunun içerdiği 20 kadar alkaloit, tıbbi olarak yararlanılmaktadır (İncekara 1972). Yapısında alkaloit bulunan bitkinin her organında alkaloit olmayabilir. Haşhaş meyvesinde alkaloit bulunmasına karşın tohumlarında bulunmaz (Tanker vd. 2007). Haşhaş ülkemiz ekonomisine büyük katkı sağlamaktadır. Türkiye hem morfin ve türevleri ihracatı yönünden, hem de tohum ihracatı ile dünya pazarlarında daimidir.

Haşhaş, BIA adını verdiğimiz kodein, morfin, narsein, sanguinarin, papaverin ve noskapin gibi çeşitli benzilizokinolin alkaloitlerini içermektedir. BIA'ların biyosentez yolağı, pek çok enzimin etkili olduğu ve sentez mekanizması net olarak anlaşılmayan karmaşık bir yolaktır.

BIA biyosentezi ilk aşamada, tirozin amino asitinden türevlenen dopamine ve 4-hidroksifenilasetaldehit (4-HPAA)'in (NCS) norkoklaurinsentazenzimi ile (*S*)-norkoklaurin'e dönüşümüyle başlar. (*S*)-norkoklaurin, çeşitli enzimler aracılığıyla merkezi ara molekül olan (*S*)-retiküline dönüşür. (*S*)-retikülin ara molekülü ise farklı yolakları takip ederek sanguinarin, noskapin, berberin ve morfin alkaloitleri ile sonlanır. Ortaya çıkan benzilizokinolin alkaloitlerinden morfin, afyonda bulunan alkaloitten en önemlisi olup en yüksek miktarda olanıdır. *Papaver* türleri çeşitli alkaloitleri üretmesine rağmen morfin sadece *P. somniferum L.*ve *P.setigerum* authare üretilmektedir. Ham afyonun işlenmesi ile morfin elde edilir. Kapalı formülü $C_{17}H_{19}NO_3$ve molekül ağırlığı 285.34 $_{g/mol}$'dür. Suda ve alkolde çözünebilir (Demirci 2016).

Bitkiler yaşadıkları süre boyunca birçok biyotik ve abiyotik streslere maruz kalırlar. Bu sebepten dolayı hayatta kalabilmek için ise çeşitli adaptasyonlar ve savunma

mekanizmaları geliştirirler. Stres faktörlerine karşı ve stres faktörünün türüne göre en uygun savunma stratejilerini bulundururlar. Bitkiler, herbivorlara veya patojenlere karşı savunmada rol alan ve toksik etki gösterebilen çeşitli doğal ürün veya sekonder metabolit üretebilmektedirler (Gürkök 2013).

Sekonder metabolitler, fenolikler, azot, terpenler veya kükürt içeren bileşikler olmak üzere 4 temel gruptan oluşmaktadırlar. Alkaloitlerin yapısında azot içeren ve aminoasit türevli bileşikler bulunur, damarlı bitkilerin de yaklaşık %20'sinde bulunmaktadır ve özellikle de savunma amaçlı olarak üretilmektedirler (Gürkök 2013).

Bitkilerin ürettiği alkaloitler yüzyıllardır ilaç sanayinde değerlendirildiğinden dolayı büyük önem taşımaktadır. Bu sebepten dolayı sekonder metabolitlerin bu özellikleri fazla araştırılmasına rağmen halen bitkilerin hangi biyosentez mekanizmalarına sahip oldukları ve bitkilerin üzerlerindeki etkileri uzun süredir aktif olarak çalışılmaya devam etmektedir. Strese maruz kalan bitkiyi korumak için sentezlenen sekonder metabolitlerin biyosentez mekanizması ve regülasyonunu araştırmak için bitkiler farklı stres koşulları altında değerlendirilerek metabolomik, proteomik, ranskriptomik ve genomik çalışmalar yapılmaktadır (Gürkök 2013).

1.1. Sekonder Metabolitler

Bitkiler tarafından üretilen büyüme, fotosentez, ürün dönüşümü veya diğer primer fonksiyonlarındaki rolleri henüz keşfedilmemiş kimyasallardır. Sekonder metabolitlerin varyetesinin 100.000'den fazla olduğu tanımlanmıştır. Varyetelerdeki organik bileşiklerin sınıflarını, aliphatic, aromatik, hidroaromatik ve heterosiklik gibi benzersiz karbon iskeletleri ve fonksiyonel grupların çeşitliliği meydana getirmiştir. Yapılan çalışmalarda kompleks bileşiklerin organlardan organlara, bitki ve türleri arasında farklılık gösterdiği ve bunların da bazen bitki sınıflandırmasında taksonomik karakter olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (Alaca ve Arslan 2012).

Sekonder metabolitler, primer metabolitlerden biyosentetik yolla üretilmiş olup bitkiler âlemindeki dağılışı özel olan bir taksonomik grup (tür, cins, familya) ile

sınırlandırılmıştır. Sekonder metabolitlerin, tozlaşmada, çevresel koşullara uyum, mikroorganizma, böcek ve diğer predatörlere (avcılara) karşı kimyasal savunma, diğer bitkilerle yarışma rollerinde yer alır. Özelleşmiş hücre tiplerinde ve bitkinin farklı büyüme evrelerinde sentezlendiklerinden dolayı ekstraksiyonları ile saflaştırılmaları zordur (Akgül 2018).

Sekonder ürünü birçok bitki tekrar primer metabolik materyale katabolize edilebilir. Daha önceleri sekonder ürünlerin tüm bitki yaşamı boyunca değişmeden biriken depo ürünleri ve inaktif atık olduğuna inanılmıştır. Sonradan tanenler, ligninler, kauçuk gibi polimerlerin dışında bütün sekonder ürünlerin dönüşebildiği anlaşılmıştır. Son dönemlerdeki araştırmalara göre farklı sekonder ürünler oluşumlarından belli bir süre sonra primer metabolik ürünlere indirgenip ve böylece C ve N enerji kaynağı olarak kullanılabilmektedir. Sekonder ürünlerin katabolize oluşunun kanıtı 2 tip araştırmaya konu olmuştur. Birinci araştırmada, birçok bitki sekonder ürün miktarı mevsimsel hatta günlük olduğu yönündedir. İkinci araştırma ise, sekonder ürünler radyoaktif yönünden etiketlendiğinde radyoaktivite birkaç saat veya birkaç gün sonra kaybolacağı yönündedir. Bu sebeple birçok primer metabolik gibi birçok sekonder ürün bitkide primer metabolik gibi görev alır (Ünay 2004).

Bitkiyi herbivor, bakteriyal ve fungal patojen saldırılarına karşı korur, aynı ortamdaki diğer bitkilerle rekabet güçlerini artırır. Tozlanmada faydalı organizmaları (özellikle böcekleri) çeker. Simbiyotik ilişkilerde görev alır. Bitkiyi sıcaklık değişimleri, su, ışık, ultraviyole ve mineral madde gibi abiyotik stres faktörlerine karşı korur. Hücre düzeyinde bitki büyüme düzenleyicileri, gen ekspresyon düzenleyicileri ve transdüksiyon mekanizmalarında görevlidirler (Akgül 2018).

Sekonder metabolitler, bitkinin fotosentez, ürün dönüşümü ve büyüme gibi gelişim faaliyetleriyle doğrudan ilişkili olarak değildirler. Bu bileşikler bitkide doku, organ ve gelişme bölümlerinde spesifik biyosentetik enzimler tarafından özgül yollarla sentezlenmektedir. Bitki organlarında yüksek konsantrasyonlarda depolanmaktadır (kuru ağırlıkta %1 ile %3 oranındadır). Sekonder metabolitler suda veya yağda çözünebilmektedirler (Alaca ve Arslan 2012).

Sekonder metabolitlerin bitkiler açısından önemi, bitkilerin değişen çevre koşullarına uyum sağlamasında önemli rol oynar ve oluşan stres etkilerini en aza indirmeye çalışırlar

Tüm sekonder metabolitler besin, ışık ve su gibi kaynak kısıtlılığına eşit derecede tepki göstermeyebilirler. Sekonder metabolitler bitkiler açısından savunma, cezbedici, caydırıcı ve tedavi edici özellikleri bakımından büyük öneme sahiptir (Edreva *et al.*2008).

1.2. Benzilizokinolin (BIA) Alkaloitleri

BIA'nın bilinen yaklaşık 2.500 üyesi bulunmaktadır ve potansiyel farmakolojik özelliklere sahiptirler. Diğer sekonder veya özelleşmiş metabolitler gibi bitkide normal büyüme ve gelişme için değil, diğer herbivor ve patojenlere karşı savunma görevi için üretilmektedirler (Gürkök vd. 2010).

BIA'ların insanlarda ve hayvanlardaki tıbbi uygulamaları ve farmasötik etkileri, onları üreten bitkilerdeki görevlerinden daha iyi anlaşılmış olma tezatlığıyla önümüzde durmaktadır. Morfin ve kodein güçlü analjezikler olup binlerce yıldır bilinmekte ve üretilmektedir. Farmasötik olarak kullanılan diğer BIA'lar antimikrobiyal ajanlar olan sanguinarin ve berberin, öksürük kesici ve güçlü antineoplastik (antikanserojen) noskapin, damar genişletici papaverin, kas gevşetici (+)-tubokurarindir. Tebain, morfin ve kodein için öncül molekül olup oksikodon, naltrekson ve buprenorfin gibi analjeziklerin sentezi için kullanılmaktadır ancak, bu bileşiklerin çoğu uygulanabilir değildir. Bu alkaloitler çoğunlukla *Papaveraceae, Ranunculaceae, Berberidaceae, Menispermaceae* familyalarında bulunurken; en çok araştırılan türler *Papaver somniferum, Eschscholziacalifornica, Thalictrumflavum, Coptisjaponica* authare türleridir (Ziegler and Facchini, 2008).

1.2.1. Benzilizokinolin Alkaloitlerinin Biyosentezi

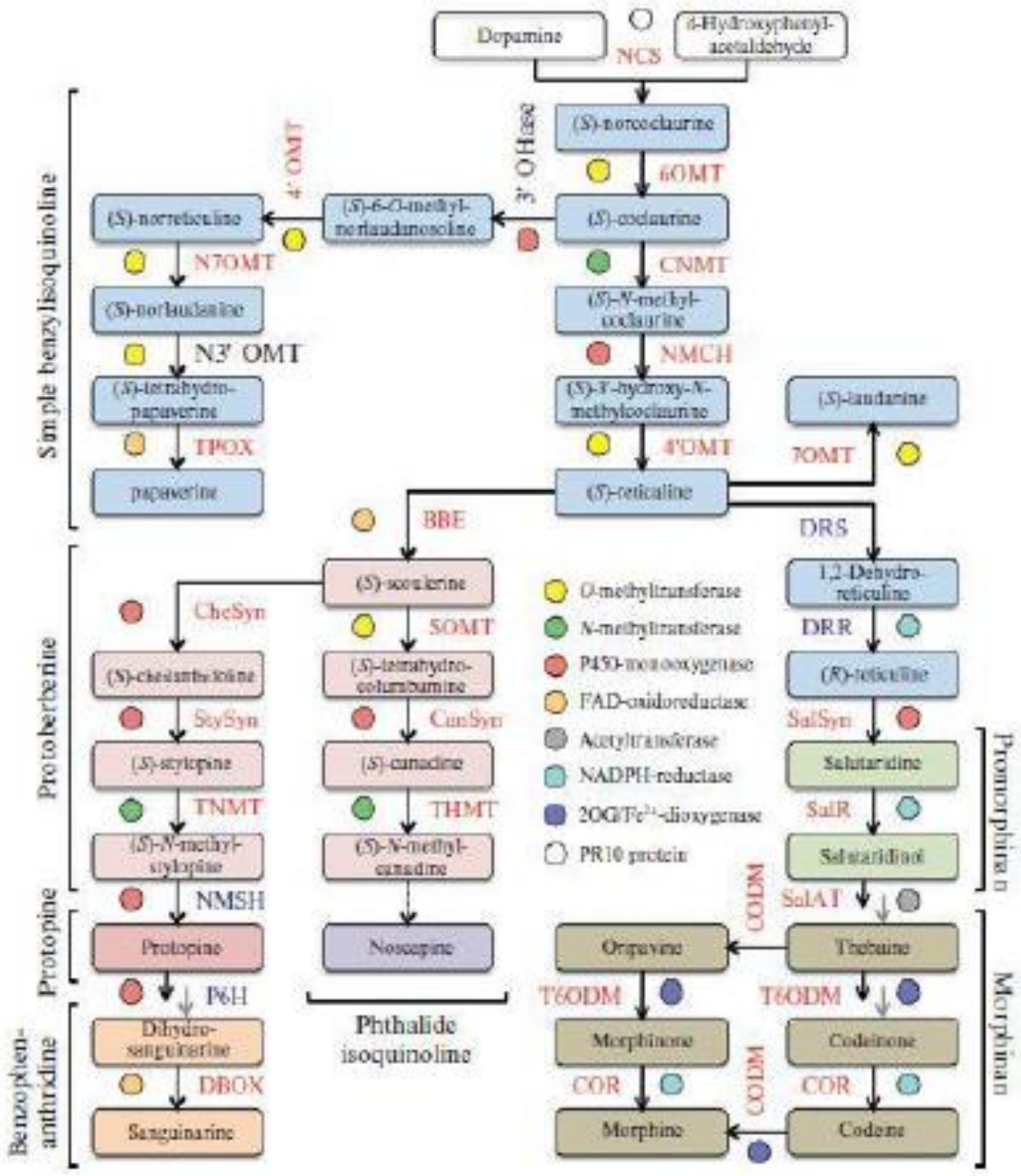
BIA biyosentezi, temel olarak tirozinin hem dopamin hem de 4-hidroksifenilasetaldehit molekülüne tirozin dekarboksilaz (TYDC) enzimi ile dekarboksilasyon, orto-hidroksilasyon ve deaminasyonu ile başlar (Facchini 2007). TYDC büyük bir gen ailesine

sahiptir; yaklaşık 15 üyesi haşhaşta bulunmaktadır. Dihidroksi fenilalanin ve tirozini kendilerine karşılık gelen aminlere dönüştüren TYDC enzimi saflaştırılmış ve cDNA'sı klonlanmıştır. Ayrıca TYCD7 enziminin promoter analizlerinde 5' ucundan -393 ve -287 arasındaki 155 nükleotitlik bölgenin promoter aktivitesi için gerekli olduğu da bulunmuştur (Gürkök vd. 2010).

Dopamin, izokinolin kısmının öncüsüyken tiraminin deaminasyonundan oluşan 4-hidroksifenilasetaldehit, benzil bileşeni olaraksisteme katılmaktadır. Monoterpenoitindol alkaloitleri (MIA) biyosentezinde meydana geldiği gibi BIA biyosentezi Pictet-Spengler tipi reaksiyondur ve sentez yolunun da kararlı ilk adımı norkoklaurin sentaz (NCS) ile katalizlenir (Samanani and Facchini 2001). NCS, dopamin ve 4-hidroksifenilasetaldehiti birleştirmek suretiyle (S)- Norkoklaurini oluşturmaktadır. (S)- Norkoklaurin bitkilerde tüm BIA sentezi için gerekli olan merkezi öncül moleküldür (*et al.* 1989). Kullanılan enzim *Thalictrum flavum*'dan saflaştırılmış ve cDNA' ları izole edilip fonksiyonel olarak haşhaş ve *Thalictrum flavum*'da tanımlanmıştır. NCS, patojen ilişkili protein (PR) 10 ve Bet v 1 allerjen protein aileleriyle akrabadır. Ayrıca haşhaştan alınan (PR)10 proteinlerinin homologları katalitik olarak aktif değillerdir (Gürkök vd. 2010).

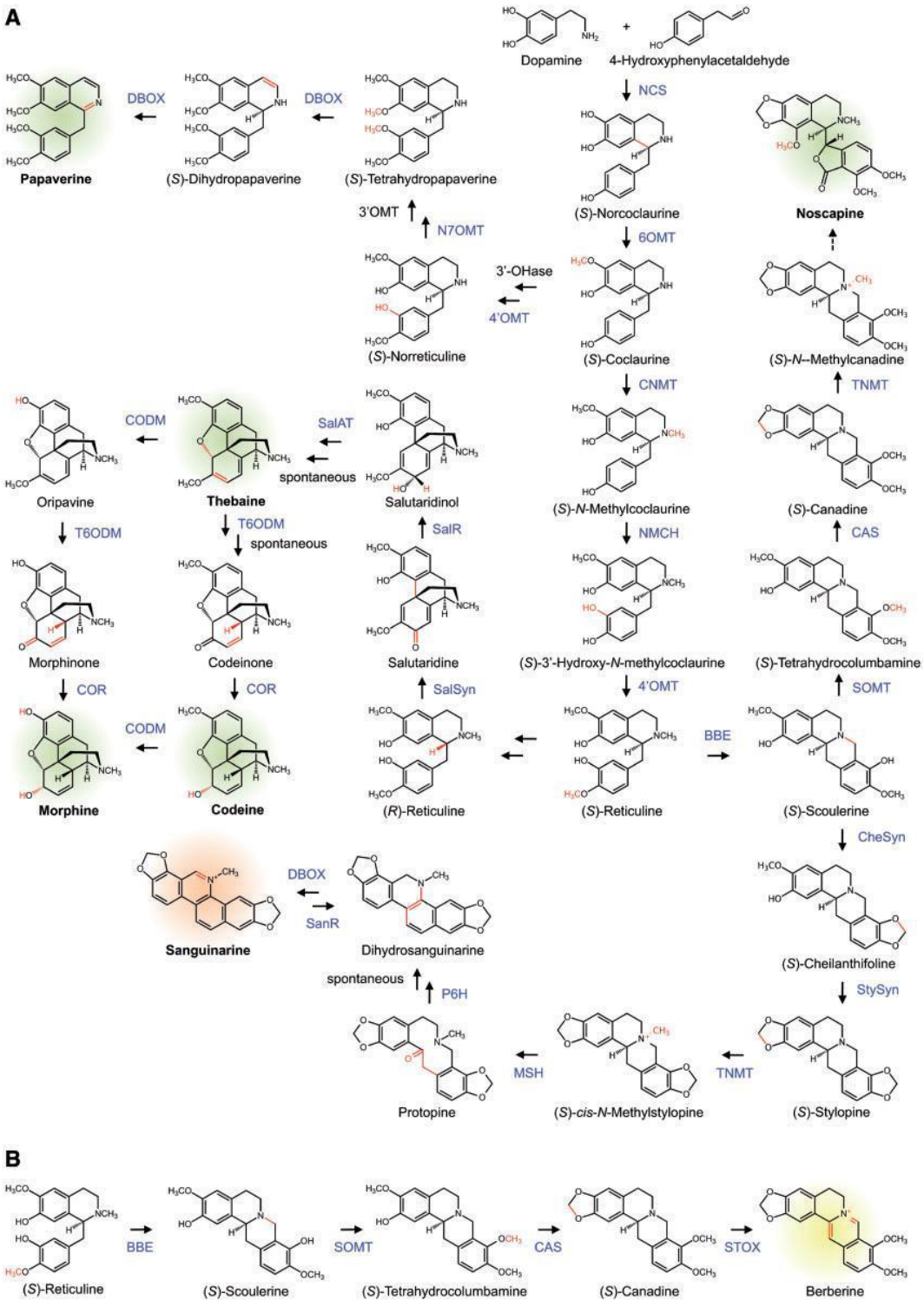
(S)-Norkoklaurinin (S)-retikuline dönüşümü 6. pozisyondaki O-metilasyon, N-metilasyon, 3'-hidroksilasyon ve ikinci bir 4-O-metilasyonu içerir. Norkoklaurin 6-O metiltransferaz (6OMT) ve 3-hidroksi-N-metilkoklaurin 4-O-metiltransferaz (4-OMT) II. sınıf O-metiltransferazlardır ve sıkı bir bölge spesifik özellik göstermektedirler. Her enzim için aynı kökenden gelen cDNA'lar haşhaş ve *Camellia Japonica*'dan elde edilmiştir (Morishige *et al.* 2000; Ziegler *et al.*2005).

(S)-retikulin, çoğu BIA yapısal tiplerinin oluştuğu sentez yolunda, merkezi ara üründür. Sadece dimerikbis benzilizokinolin alkaloitleri (S)-retikulin yoluyla üretilemezler. (S)-retikulinin ara ürün bileşiği olarak görev yapmadığı başka bir diğer biyosentez ise papaverin biyosentezidir (Gürkök vd. 2010).

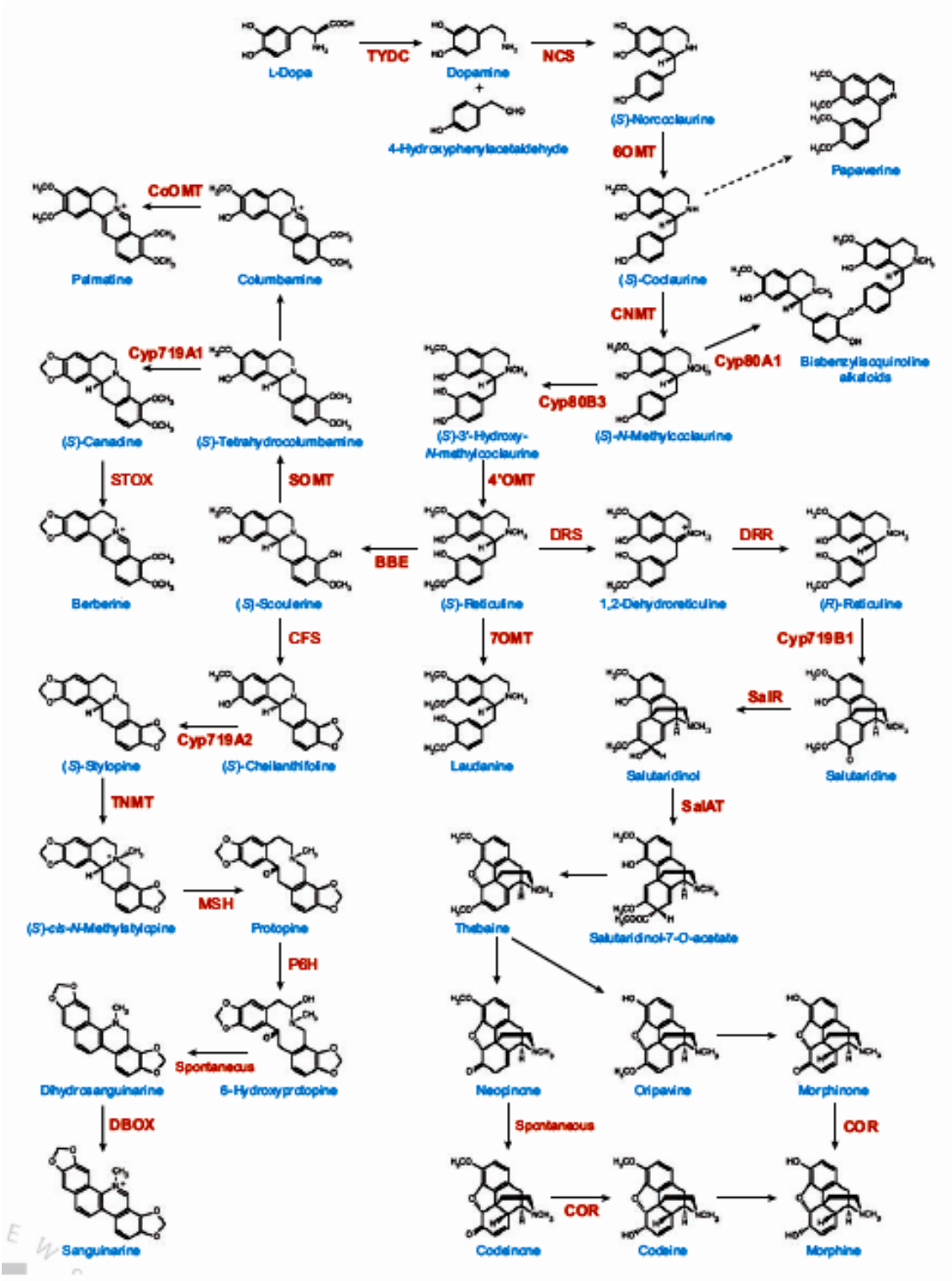


Şekil 1.2. Haşhaş'da papaverin, sanguinarin, noskapin ve morfin oluşumunu gösteren önemli benzilizokinolin yolları (Dang *et al.* 2012'den değiştirilerek alınmıştır). cDNA'ları izole edilmiş olan enzimler kırmızı renkte, biyokimyasal olarak karakterize edilmiş olanlar mavi renkte belirtilmiştir. Kutucuklarda bileşikler renklere göre alt gruplara ayrılmıştır. Mavi, basit benzilizokinolinler; pembe, protoberberinler; kırmızı, protopinler; turuncu, benzofenantridinler; mor, fitalideizokinolinler; yeşil, protomorfinler; kahverengi, morfinler. Enzim tipleri renkli dairelerle gösterilmiştir. Buna göre: sarı, O-metiltransferaz; yeşil, N-metiltransferaz; kırmızı, P450 monooksigenaz; turuncu, FAD-bağlı oksidoredüktaz; açık mavi, NADPH-bağımlı redüktaz; koyu mavi, 2OG/Fe2+-bağımlı dioksijenaz; gri, asetil-CoA-bağımlı asetiltransferaz; beyaz, patogenezle ilişkili PR10 proteinini göstermektedir.

Biyosentez yolu temel olarak tirozin amino asidinin hem dopamin hem de 4-hidroksifenilasetaldehit molekülüne tirozindekarboksilaz (TYDC) enzimi ile dekarboksilasyon, orto-hidroksilasyon ve deaminasyon basamakları ile başlar (Şekil 1.3) (Facchini 2007). TYDC, L-tirozinintiramine ve L-3,4-dihidroksi fenilalaninin dopamine dönüşümünü katalizler. BIA üreten bitkilerde tiramin 4- hidroksi fenilasetaldehite dönüşebilir (Ruefferand Zenk 1987). TYDC büyük bir gen ailesine sahiptir; yaklaşık 15 üyesi de haşhaşta bulunmaktadır (Facchini and De Luca 1994). Dihidroksi fenilalanin ve tirozini kendilerine karşılık gelen aminlere dönüştüren TYDC enzimi saflaştırılmış ve cDNA'sı klonlanmıştır (Facchini and De Luca 1994; Facchini *et al.* 2000). Ayrıca Park *et al.* 1999, TYDC7 enzimini klonlamışlardır. Bu enzimin haşhaşta TYDC2-benzeri alt aileye ait olduğunu, nükleotit ve amino asit seviyesinde %96 oranında benzerlik gösterdiğini belirlemişlerdir. Bunun yanı sıra TYDC7'nin promoter analizlerinde 5' ucundan -393 ve -287 arasındaki 155 nükleotitlik bölgenin promoter aktivitesi için gerekli olduğu da bulunmuştur (Gürkök vd. 2010).



Şekil 1.3. BIA biyosentez yolu (Hagel and Facchini 2013'ten değiştirilerek alınmıştır) (A) Haşhaşta temel alkaloit biyosentez yolları. (B) (S)-retikülinden berberin sentez yolu



Şekil 1.4. Alkaloitlerin biyosentez yolu. (Ziegler and Facchini 2008).

1.3. Traskripsiyon Faktörleri

Organizmanın özellikleri, üzerinde barındırdığı genetik bilgi ve genetik bilginin çevreye verdiği cevaplar sayesinde belirlenir. Genetik bilginin cevabı, transkripsiyon ve translasyon olmak üzere arka arkaya işlem gören basamağı içeren protein sentezi aracılığı sayesinde gerçekleşir. Bu basamaklardan birincisi, bilginin mRNA formunun RNA molekülü formuna dönüştürülmesidir. Transkripsiyon diye nitelendirdiğimiz bu olay RNA polimeraz enzimi tarafından gerçekleştirilir (Yıldırım vd. 2007). Transkripsiyon olayında; RNA replikaz enzimi içeren RNA virüsleri ve Retrovirüsler hariç, DNA ise şablon olarak çift zincirlerinden bir tanesini kullanılmasıyla tek zincirli RNA molekülüne aktarılmasına transkripsiyon denir. Başka bir ifadeyle, DNA kalıbındaki genetik yazılımın RNA zincirine aktarılmasına transkripsiyon, bunun sonucunda oluşan RNA molekülüne ise primer transkript adı verilmektedir (Lüleyap 2008).

Transkripsiyon, sadece protein sentezi için bilgi taşıyan mRNA üretmez, taşıyıcı RNA, ribozomal RNA ve katalitik ve yapısal fonksiyonları olan diğer RNA molekülleri için de bilgileri taşıyan mRNA'ları üretir. Transkripsiyonun mekanizması, DNA replikasyonuna oldukça benzerdir. Yalnız RNA ve DNA arasındaki farklılıkların yanı sıra, transkripsiyon ve replikasyon arasında da iki önemli fark bulunmaktadır. Birincisi, replikasyona göre transkripsiyonda oldukça küçük molekül üretilmektedir. İkincisi ise, bazı genler bir ipliği kullanırken, bazılarının iki ipliği de kullanmasına rağmen, transkripsiyonda DNA'nın sadece tek ipliği kopyalanır. Bu sebepten dolayı transkripsiyon, replikasyona göre çok daha basittir (Yıldırım vd. 2007). Kısacası transkripsiyon, kalıp DNA üzerinde RNA'nın enzimatik sentezidir ve gen ifadesi işleminin ilk basamağını oluşturmaktadır (Turner et al., 2004).
Sonuç olarak gen tarafından kodlanan proteinin sentezlenmesine sebep olur. Transkripsiyon, dsDNA kalıbına ve ribonükleotit öncülleri olan ATP, GTP, CTP ve UTP'ye ihtiyaç duyan RNA polimeraz tarafından katalizlenir (Turner *et al.* 2004)

Ökaryotlarda, gen regülasyonu için dış çevreden gelen sinyaller amplifiye edilerek, RNA polimeraz doğrudan promotöre bağlanmayarak transkripsiyonu özgün olarak başlatacak olan değişik proteinler (transkripsiyon faktörleri) aracılığıyla bağlanır. Transkripsiyon üzerindeki etkisinden dolayı düzenleyici rolü bulunan tüm proteinler, regülatör protein

olarak tanımlanmakla beraber bazı kaynaklarda regülatör proteinlerin yapı ve fonksiyonlarının birlikte ele alınmasından dolayı oluşan karmaşık bir sınıflandırma söz konusudur (Karoğlu 2012).

Genel olarak trans-etkili faktörler, transkripsiyon sürecinde cis-etkili bölgeler olarak ifade edilen regülatör bölgeleriyle etkileşime geçen proteinlerdir. Bu proteinler eğer promotör bölge üzerinden transkripsiyonda etki yaratıyorsa, bunlara Transkripsiyon Faktörleri denir (Karoğlu 2012). Transkripsiyon faktörleri, DNA bağlanma bölgesinden farklı olarak transkripsiyonu aktif eden bölgeler de içermektedirler. Bu bölgeler, 30 ile 100 amino asitlik bölümden meydana gelir, bölgede bulunan amino asitler, diğer transkripsiyon faktörleriyle doğrudan RNA polimeraz ile etkileşirler. Ökaryotlarda ise, transkripsiyon seviyesindeki gen regülasyonu karmaşık bir yapıya sahiptir. Gen regülasyonunda rol almasına rağmen transkripsiyonun baskılanması, transkripsiyon faktörleri tarafından gerçekleştirilen regülasyon genellikle pozitif regülasyondur (Turner *et al*. 2004; Yıldırım vd. 2007).

Alkaloid biyosentezi için ilgili düzenleyici faktörlerin tanımlanması önemlidir. İlk transkripsiyon faktörleri (TF'ler) tanımlanan AP2/ERF-domeni tipi oktadekanoidjasmonat duyarlı transkripsiyon faktörleri (ORCA1 ve ORCA2), Catharanthusroseus'tam onoterpenoidindol alkaloid (MIA) biyosentezi ailesine katılmıştır (Agarwal *et al*. 2016). Transkripsiyon faktörüyle ilişkili potansiyel metabolik ağın incelenmesi, genlerin var olan fonksiyonu için gen aileleri bilgiyi en üst düzeye çıkarmak için gerekli ve yararlı bir yöntemdir (Asif *et al*. 2009).

Transkripsiyon faktörleri, DNA'nın belli bölgelerine bağlanarak genin ifade seviyelerine etki ederler ve genlerin etkileşiminde oldukça önemlidirler. Evrim sürecinde etkili olduğu düşünülen transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgelerinde herhangi bir mutasyon ya da engelleyici bir varyasyon oluştuğunda, o genin ifadesi tamamen ortadan kalkarak gerekli olan protein sentezlenemez. Bu ortaya çıkan durum canlıda hem moleküler düzeyde hem de canlının fenotipinde köklü değişikliklere sebep olabilir (Tufan 2013).

1.4. miRNA

MikroRNA'lar (miRNA), ilk kez 1993 yılında Lee and *et al.* (1993) tarafından *Caenorhabditis elegans* solucanında keşfedilmiştir, yaklaşık olarak 22 nükleotid uzunluğunda tek zincire sahip RNA moleküllerinden oluşmaktadır. miRNA'lar gen ekspresyonunun düzenlenmesinde görev alırlar. miRNA'lara ait veriler miRBase adlı merkezi veri tabanında toplanırlar. Mayıs 2019 tarihi itibariyle veri tabanına giriş yapılan miRNA sayısı 38.589'a ulaşmıştır. miRNA'lar normal gelişim evresinde, kanserden inflamasyona kadar birçok hastalığın moleküler mekanizmasında görev üstlendiğinden potansiyel bir biyomarkerdır. miRNA'lar da DNA tarafından transkribe edilmektedir. Yalnız gen regülasyonunu proteine dönüşmeden gerçekleştirmektedir. miRNA'lar transkripsiyon sonrası mRNA'ların 3' transle olmamış bölgeleriyle (UTR-untransledregion) baz eşleşmesi sağlayarak mRNA'ların yıkımını meydana getirir ya da translasyonunu baskılamaktadır (Soyocak 2018).

miRNA molekülleri, protein üretmeyen, bitkilerde ve hayvanlarda yer alan, transkripsiyon esnasında ve transkripsiyon bitiminde gen ifadesinin düzenlenmesinde rol alan moleküllerdir ve 22nm uzunluğundadırlar. miRNA'lar DNA'lar tarafından kodlanarak, mRNA moleküllerinin dizilimleriyle eşleşip mRNA'nın gen ifadesinde artmalara veya azalmalara sebep olmaktadırlar. İnsan genomu 1000'den fazla miRNA kodlayabilmektedir. miRNA'lar memeli genlerinin %60'ını ve çoğu insan hücre tiplerinde fazlalık olan mRNA'ları hedef almaktadırlar. miRNA'lar, ökaryotik canlılarda fazlalıktır ve gen düzenlemesinin hayati, evrimsel antik bileşeni olarak düşünülmektedir. miRNA'ların temel bileşenleri, bitkilerde ve hayvanlarda ki gibi korunmuştur. Fakat iki türdeki miRNA fonksiyonları farklı olacak şekilde bağımsız evrimleşmiştir (Özcan 2013).

RNAi mekanizmasının temelini ise hücre içerisinde, genom tarafından RNA polimeraz enziminin katalizlediği reaksiyonla kodlanan çift zincirli miRNA'lar meydana getirmektedir. miRNA'lar hücre içindeki gen susturma kompleksi olan RNA ile indüklenen susturum kompleksini (RISC; RNA-induced silencing complex) aktif edebilecek özelliğe ulaşmak için birtakım aşamalardan geçerler. Birinci aşama, RNA bağımlı RNA polimeraz II, kalıp olarak endojen ya da ekzojen kaynaklı RNA'yı

kullanarak çift zincirli RNA molekülünü sentezlemektir. Meydana gelen yapı intron bölgelerinden saç tokası şeklinde kıvrılarak eşleşmektedir. Bu nedenlerden ötürü, transkripsiyon sonrası pri-miRNA olarak isimlendirilen ilk miRNA molekülü oluşmuştur. İlerleyen evrelerde RNaz III grubu endonükleaz olan Drosha, Pri-miRNA molekülüne etki ederek kıvrılmış RNA parçasını zincirin geri kalan bölümünden ayırarak pre-miRNA molekülünü meydana getirir. Pre-miRNA eksportin 5 (XPO5) aracılığıyla sitoplazmaya gelir. Bu aşamanın sonrasında miRNA ve siRNA aynı işlemlerden geçerler (Ecevit vd. 2013).

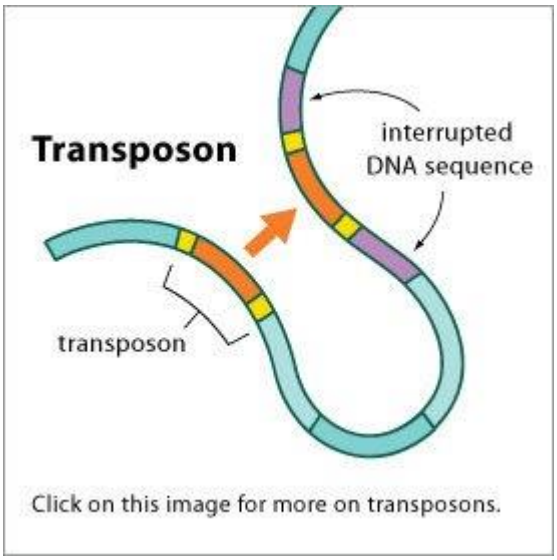
Sitoplazmada yer alan diğer RNaz III enzimi Dicer, ATP bağımlı etkileşimyle RNA'ya bağlanarak, önce RNA'nın ucundaki kıvrımlı bölümü koparır ve sonra dubleks RNA molekülünü helikazı aktif ederek açar ve 21-23 nükleotid uzunluğunda kısa RNA parçacıkları halinde keser. Dicer enzimi tarafından oluşturulan RNA'lar sonra tekrar ATP'ye bağımlı biçimde RISC'e aktarılırlar. Bu aşamada RISC'insubstrat seçiciliğinden sorumlu 'argonat' (AGO2; Argonaute) proteinleri önemli görev alırlar. Olgun siRNA ya da miRNA zincirinin mRNA ile etkileşimi RISC kompleksinin içinde oluşmaktadır. RISC yapısı içerisinde yer alan substrat siRNA ise, hedef mRNA dizisiyle birebir aynı olacak şekilde eşleşmektedir. mRNA molekülü eşleşme bölgelerinden endonükleazlar ile birlikte kesilmektedir. Eğer rehber miRNA dizisi hedef mRNA dizisiyle tamamen eşleşirse, AGO2'nin katalitik bölgesi, söz konusu olan mRNA'nın yıkımına ve genin susmasına neden olurlar. Ancak, tohum dizisinde eşleşme oluşmuş ise (seedsequence, miRNA'nın ilk 2-8 nükleotidi), translasyonel baskılama meydana gelir ve bu olay aynı zamanda diziye özgü olmayan, P cisimcikleri adı verilen yapıların meydana gelişiyle mRNA'ların degradasyonuna neden olurlar (Ecevit vd. 2013).

miRBase, miRNA'ları adlandırmaya yarayan merkezi kaynaktır. miRBase miRNA'lar için adlandırma dışında, miRNA'da algoritmasını kullanarak otomatikleştirilmiş miRNA hedef tahmin pipelinena sahiptirler. miRBase adlandırma ve deneysel olarak doğrulanmış miRNA genlerinin saklanması için kabul edilmiş veritabanı olmasına karşın, ek bilgi zenginliği sağlamamaktadır (Griffiths-Jones et al. 2008).

1.5. Transpozonlar

Viral vektör aracılı gen tedavisinin yanında, daha güvenilir gen tedavisi olan non-viral vektörler aracılığı ile hücrelerin değişimine yönelik olarak hem daha sabit genomik entegrasyonu hem de uzun süreli transgen ekspresyonunu sağlayan transpozonlar geliştirilmiştir. Uyuyan güzel olarak bilinen transpozon sistemi özellikle son 15 yıldaki gen tedavisi alanında önemli buluş olup her geçen gün daha fazla çalışmada kullanılmaktadır. Primer CD34+ hücrelerin modifiye olmasında kullanılan SB100X transpozonunun da geliştirilmesiyle, transpozonlar aracılığıyla genetik modifikasyon yapılabilecek klinik uygulama alanları artmıştır. Son gelinen noktada, SCA hastalarında β-globin geni ve SB100X transpozon sistemi kombinasyonu başarılı şekilde kullanılmaya başlanarak klinik denemeleri devam etmektedir (Bişgin vd. 2014).

Transpozonlar, tek bir hücrenin içerisinde bulunan ve sıklıkla bulundukları yerden koparak farklı bölgelere "sıçrayan" gen parçalarıdır. Transpozonal sıçramalar, transpozonal bölgelerin kendilerini önce kopyalayıp daha sonra bu kopyaların sıçraması tarzında veya gen parçalarının bütün halinde bulundukları yerden koparak yeni bir yere yerleşmeleri şeklinde de olabilmektedir. Transpozonal sıçramalar önemli bir evrim mekanizmasıdır, Çünkü hem fenotipi kökten değiştirebilecek etkilere sahiptir, hem de genom büyüklüğünün değişmesini sağlayabilmektedir. Ökaryotik hücrelerde, genom büyüklüğü üzerinde ciddi etkileri vardır. Bir transpozon, kendini kopyalayarak hem kendisini, hem de kopyasını DNA üzerinde farklı bölgelere yapıştırabilmektedir. Bu şekilde, genomun büyümesine neden olurlar. Şayet bu değişim, canlıya avantaj sağlayacak olursa, gelecek nesillere de aktarılırlar. Şekil 1.5’de, sarı-turuncu-sarı renklerle gösterilen transpozonal element, kendisini kopyalayarak karşı tarafa sıçramış ve normalde birleşik olan mor gen diziliminin ortasına yapışmıştır (Bakırcı 2019).



Şekil 1.5. Transpozon (Bakırcı 2019).

Transpozonlar, hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda spontan mutasyon ajanlardır (Öner vd. 2011). Ökaryotik hücre kromozomlarında, bakteri, virüs ve plazmidlerde bulunabilmektedirler. Genom içerisinde, plazmid ile genom arasında ve plazmidler kendi arasında hareket ederek yer değiştirebilen DNA segmentleridir. Bir bölgeden başka bir bölgeye geçişi sağlayacak bilgi transpozon tarafından gerçekleşmektedir. Transpozonlar iki sınıfa ayrılır (Bakırcı 2011).

1.5.1. Birinci Sınıf Transpozonlar

Birinci Sınıf Transpozonlar, ya da diğer ismiyle Retrotranspozonlar, kendilerini kopyalayabilirler ve bu kopyalar DNA üzerinde diğer bir noktaya sıçrayıp yapışabilirler. Bu işlemi yapabilmesi için öncelikle DNA'dan transkripsiyon mekanizmasıyla küçük DNA segmentleri üretilir; daha sonra bu DNA kullanılarak, geri transkripsiyon yöntemiyle DNA sentezlenir. Üretilen retrotranspozonlar, tıpkı retrovirüsler gibi davranabilirler, DNA'dan kopabilirler, DNA üzerindeki farklı bir bölgeye yapışabilirler ve hatta bazı durumlarda hücrenin dışına çıkarak diğer bir hücrenin DNA'sına yapışabilirler. Bu durumda da plazmid gibi davranabilirler (Bakırcı 2011). Retrotranspozonların da üç alt grubu keşfedilmiştir:

1. Viral Retrotranspozonlar, RNA'dan DNA sentezleyecek "geri transkriptaz" enzimlerini kodlarlar. Genetik yapılarında long terminal repeat (uzun bitiş tekrarları) bulunur. Retrovirüslere benzerler. Yaklaşık 100-5000 baz çifti uzunluğundadırlar. İnsan genomunun yaklaşık %8'i ve fare genomunun da yaklaşık olarak %10'unu oluşturmaktadırlar. Bu alt gruba ait iki tip keşfedilmiştir: alglerde, kapalı tohumlu bitkilerde ve açık tohumlu bitkilerde olmak üzere pek çok canlıda bulunan Ty1-copia retrotranspozonları ile yine çok sayıda canlıda bulunan Ty3-gypsy retrotranspozonları keşfedilmiştir (Bakırcı 2011).
2. LINE: Long Interspersed Nucleotide Elements (Uzun Serpiştirilmiş Nükleotid Elementleri) adlı grupta, tam boyda olanlarında geri transkriptaz enzimleri bulunarak RNA'dan DNA sentezlemektedirler. Ayrıca hemen hepsinde endonükleaz enzimleri taşıyarak çoklu nükleotit dizilerinin orta bölgelerindeki fosfodiester bağlarını kırmaktadırlar. Yalnız uzun bitiş kodlarını taşımazlar ve RNA polimeraz II enzimi aracılığıyla çoğalırlar. İnsan genomunda yaklaşık 500.000 farklı LINE bulunur, bu da genomun %17'sini oluşturmaktadır. Bunlardan yaklaşık 7.000 tanesi tam boydadır ve geri transkripsiyon yapabilirler (Bakırcı 2011).
3. SINE: Short Interspersed Nucleotide Elements (Kısa Serpiştirilmiş Nükleotid Elementleri) ise 500 baz çiftinden kısa boya sahip transpozonlardır. RNA polimeraz III enzimiyle salgılanan tRNA, rRNA gibi parçaların geri transkripsiyonuyla üretilirler (Bakırcı 2011).

   Üzerlerinde fonksiyonel geri transkriptaz enzimleri yoktur ve sadece farklı bölgelere sıçrayarak, orada salgılanmış enzimleri kullanıp kendilerini kopyalayabilirler (Bakırcı 2011).

1.5.2. İkinci Sınıf Transpozonlar

İkinci Sınıf Transpozonlar, ya da diğer ismiyle DNA transpozonları, Retrotranspozonların tersine kendilerini kopyalamazlar ve oldukları gibi yer değiştirirler. Bu Transpozonların sıçramaları transpozaz enzimiyle sağlanmaktadır. Bu enzimlerin bir bölümü, transpozonların DNA'nın sadece belirli bölgelerine bağlanmasını sağlarken, bir

diğer kısmı ise DNA'nın hemen her bölgesine bağlanmayı sağlamaktadırlar (Bakırcı 2011).

1.6. QT-PZR (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Geliştirdiği ilk yıllardan bu yana takip edilmesi oldukça zor olan ve sürekli güncellemeler, geliştirilen sistemlerle ve kullanımı sürekli yaygınlaşan PZR tabanlı sistemler, genel olarak geleneksel ve Real-Time (RT) tabanlı sistemler olmak üzere 2 grup altında değerlendirilmektedirler. Geleneksel PZR tabanlı testler, çoklu kompleks basamaklar, uzmanlaşmış kişilere ihtiyaç duyulan ve örneklerin dışarıdan başka DNA'larla kontaminasyon riskini artıran açık reaksiyon sistemleridir. Bu testlerin kompleksliliğine bir de maliyetin yüksekliği eklenmektedir. PZR reaksiyonundan sonra oluşan PZR ürününü izleyebilmemiz için, agaroz jel elektroforezis, sourthernblot ve ELISA benzeri sistemlerden yararlanılması gerekebilmektedir (Kahya vd. 2014). Bu sistemler yeterli ölçüde sonuçlar verseler bile PZR sonrası oluşan ürünü ortaya koyabilmek için yapılan işlemlerin yoruculuğu, iş gücü kaybı ve artan kontaminasyon riski kaçınılmazdır. Aynı zamanda, aynı büyüklükte non-spesifik amplifikasyon ürünleri pozitif sonuçlar çıkararak yanlış sonuç elde edilmesine sebep olabilmektedir (Cockerill and Smith 2002; Mackay 2004; Evans *et al.* 2009).

Bu nedenlerle PZR sonrası ortaya çıkan ürünlerin özgünlüğünü artırmak adına proba dayalı southern ya da mikropleyt hibridizasyon teknikleri kullanılmaktadır. Bu teknikler, ancak büyük miktarlardaki örneklerle kolay ve hızlı sonuç sağlamaktadırlar. Ayrıca metotların bazıları, amplifikasyon ve deteksiyonun aynı yerde bulunmasından ötürü doğan kontaminasyon riski taşımaktadırlar. PZR uygulamalarının en temel problemlerinden biri de farklı kaynaklardan geçebilecek kontaminasyonlardan kaynaklanan yanlış pozitif sonuçlar oluşturmasıdır (Mackay 2004; Valasek and Repa 2005; Evans *et al.* 2009). PZR'ın sonuç çıkarma limitinin kültür ve geleneksel PZR metotlarına göre 10-1000 kat daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Çalışılan örneklerde aranan etkenin, birçok nedenden kaynaklanabilecek az miktarda olması durumu, RT PZR yüksek sonuç çıkarma limiti ile doğru sonuçlar vermektedir. Bu ve buna benzer birçok neden, kullanılması gereken ek malzemeler, zaman kaybı ve iş gücü kaybı gibi daha pek

çok neden geleneksel tabanlı PZR testlerinin kaçınılmaz dezavantajlarındandır (Kahya vd. 2014).

qRT PZR, 1980 yılında Karry Mullis tarafından geliştirilerek, araştırmacılara istenilen genin spesifik bölgesinin 1 milyondan fazla çoğaltılmasını olanak sağlayan PZR'ın, yeni ve önemli bir versiyonudur (Bustin 2000; Valasek and Repa 2005). RT PZR sistemleri, amplifikasyonunu ve amplikon (amplifiye olmuş ürünün) kontrolünü benzer kapalı sistemlerde gerçekleştirerek ve amplikonun da görüntülenmesini sağlayan, gıdalardan, memeli genomuna, genetik olarak geliştirilmiş organizmalardan, insan ve veteriner mikrobiyoloji alanlarında çeşitlilik gösterebilen çoğu örneklerden nükleik asitlerin aranmasında kullanılmaya devam edilmektedir (Mhlanga and Malmberg 2001; Ahmed 2002; Klein 2002).

1966'dan bu yana etidyumbromürün nükleik asitlere bağlandığı zaman floresanını artırdığı bilinmektedir. Bu floresan kimyası PZR'la ve gerçek zamanlı videografiyle birleşince 1990'ların ilk çeyreğinde qRT PZR'ın ortaya çıkmasını sağlamıştır (Bustin 2000; Gibson *et al.* 1996). Bu aletler, sıcaklık değişimini konvansiyonel termocyclerlara nazaran çok daha hızlı şekilde gerçekleştirirler. Her PZR siklusu sonucunda, hedef DNA'ya nükleik problar veya floresan boyaların bağlanmasından sonra açığa çıkan floresanı tespit eden sistemlere sahiptirler. EtBr ya da SG I gibi DNA bağlayan boyalar, hidroliz problar, hibridizasyonproblar, moleküler beaconlar, sunrise ve scorpionprimerler ve peptit nükleik asit light-upproblar gibi çeşitli sistemlere sahiptirler. Bu sistemlerin hepsi oluşan ürünün her siklusta analizini sağlamaktadırlar (Valasek and Repa 2005).

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Bitki Materyali

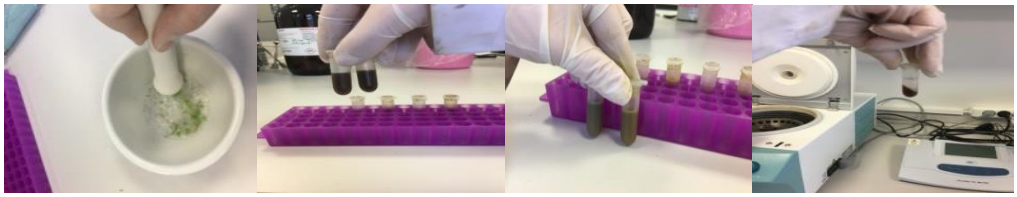
Bitki materyali olarak TMO'dan elde edilen morfin içeriği düşük *P. somniferum* Ofis 95, morfin içeriği düşük Ofis 96 çeşiti, morfin içeriği yüksek Ofis1 çeşiti, morfin içeriği yüksek olan Ofis 2 çeşiti, tebain içeriği yüksek olan Ofis-T çeşidi ve noskapin içeriği yüksek olan Ofis-NP çeşitleri kullanılmıştır. Bitki materyallerinin konsantrasyonları Ofis 95- Ofis 96 morfin %0.6, tebain <%0.02, noskapin <%0.02, Ofis 1-Ofis 2 morfin %1.8, Ofis NP noskapin %1.29, Ofis-T tebain %1.8'dir. Tohumlar viyole ekilmiştir. Ardından gelişen fideler, saksılara, son olarak da kasalara alınarak 20ºC/18ºC de 16/8 saatlik (aydınlık/karanlık) fotoperiyotta sera şartlarında yetiştirilmiştir. Gelişim gösteren bitkilerden yaprak örnekleri toplanmıştır. Örnekler toplandıktan sonra -80 °C'de saklanmıştır.

2.2. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu yapılabilmesi için örnekler toplandıktan hemen sonra sıvı azot içine alınmış ve kullanılıncaya kadar -80 °C'de saklanmıştır. Deneyin yapılış aşamasına ait görseller Şekil 2.1'de verilmiştir.

-80 °C'den alınan örnekler sıvı azot içinde toz haline gelinceye kadar ezilmiştir. 100 mg örnek için 1ml trizol (Ambion Life Technologies) bulunan ependorf tüplerine alınıp 20 dakika inkübe edilmiştir. 0,2 ml chloroform (Sigma- Aldrich) ekleyip 5 dakika inkübe edilmiştir. +4°C'de 20 dakika 14000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Tüpün üzerindeki şeffaf kısım mikro pipetle alınıp 0,5 µl propan-2-ol (Carlo Erba) eklenip 10 dakika inkübe edilmiştir. Kimyasallar dökülmüştür. 1ml %75'lik etil alkol (C_2H_5OH) eklendi. 8000 rpm'de 5 dk. santrifüj edilmiştir. Alkol dökülmüştür.

Her bir örneğe 50µl double distile su eklenip 65 °C'de 2dk bekletilmiştir. Örnekler kullanılıncaya kadar -80 °C'de saklanmıştır.



a) **b)** **c)** **d)** (Orijinal 2019)

Şekil 2.1. RNA izolasyon aşamalarına ait deney görselleri. (a) -80℃' de alınan örnekler sıvı azot içinde toz haline getirilmiştir. (b) 0,2 ml chloroform ekleyerek 5 dk inkübe ediliyor. (c) +4℃' de 20 dk 14000rpm' de santrifüj edilmiştir. (d) Tüpün üzerindeki şeffaf kısım alınarak 0,5 µl propan-2-ol eklenerek 10 dk inkübe edilip kimyasallar dökülmüştür.

Kantitatif ölçüm yapmak için; nanodrop spektrometreye örneklerden 1 µl yüklenmiştir. Her bir örnekten 5 µl alınarak, üzerlerine 3 µl 6x DNA Loading (Thermo scientific) eklenmiştir. Elektroforez için jel hazırlanmıştır; 1,3 g agoroz jel tarttırılmıştır. 130 ml 1xTBE buffer ekleyip karıştırılmıştır ve mikrodalgada kaynatılmıştır. Elektroforez tepsisine 1 mm ve 1,5 mm' lik tarakları takılmış ve jeli dökülmüştür. Oda ısısında dondurulmuştur. Elektroforez için 200 ml 1xTBE buffer 2000 ml ye distile suyla tamamlanmıştır. Elektroforeze aktarılmıştır. Jel elektroforeze aktarılmıştır ve her bir örnekten 8 µl yüklenmiştir. 90 volt 'da 30 dakika yürütülmüştür. Kalitatif olarak ölçüm yapılmıştır.

2.3. DNase Uygulaması

10x buffer (Thermo Scientific) 1 µl, (1U/µl) DNase 1 µl, H_2O 3,5 µl, DNA 4,5 µl ayrı ayrı hazırlanmıştır. 37 °C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Sonra (50 mM) EDTA 1 µl eklenmiştir. 65 °C'de 10 dk. PZR cihazına işleme alındıktan hemen sonra buza gömülmüştür ve 2 dk. buzda bekletilmiştir.

2.4. cDNA Sentezi

cDNA elde etmek için Fermentas kiti kullanılmıştır. cDNA ile aynı oranda RNA elde edebilmek için her bir tüpe 4 µl5x buffer, 1µl RNA, 1µl SSII, 1 µl DTT hazırlanmış ve örneklerin üzerine eklenmiştir. Hazırlanan karışım 50 °C'de 60 dakika PZR cihazına konulmuş ve 70 °C'de 15 dakika inkübe edilmiş ve -20 °C'de saklamak için reaksiyon sona erdirilmiştir. Ardından oluşturulan tüm cDNA' lar, 18S rRNA primerleriyle PZR optimizasyonu yapılarak cDNA' ların oluşup oluşmadığının kontrolü için %1' lik agaroz jel üzerinde yürütülerek tespit edilmiştir.

2.5. miRNA'lara özgü cDNA sentezi

miRNA'lara özgü cDNA sentezlemek amacıyla ''sap-ilmik'' denilen yapıyı da içinde barındıran ve miRNA'nın 3'ucundaki son 6 nükleotide eşlenik olan diziye sahip primerler tasarlanmıştır. RNA 4 µl, primer 1µl, dNTP mix (10mM) 1µl, H_2O 8,5 µl hazırlanmıştır. Bu karışım 65°C 5 dakika, 1 dakika buzda inkübe edilmiştir.

Ardından 5x RT Buffer 4 µl, RNase off (40U/ µl) 0,5 µl, SSII (200U/ µl) 1 µl karışımı hazırlanarak, önceki karışıma eklenmiştir. Reaksiyon sıcaklıkları aşağıda verilmiştir.

30°C 16 dakika

30°C 30 saniye
42°C 30 saniye } 60 siklus
50°C 1 saniye

85°C 5 dakika inkübe edilmiştir.

2.6. Primer Tasarımı

Çalışmada ALP1, MAIN, HARBI transpozonları, C3H, BBR/BPC, WRKY transkripsiyon faktörü, miR2161, miRt0013376, miR13 miRNA'ları ve onların hedeflediği 4-OMT (4-O-metiltransferaz, GenBankaccession FJ156103), SAT (salutaridinol-7-O-acetyltransferase, GenBankaccessionFJ200354) ve 7-OMT (7-O-metiltransferaz, GenBankaccession AY217334) genlerinin ifade seviyelerine bakılmıştır. Daha önce Transpozonların sekonder metabolitle ilişkileriyle ilgi çalışma yapılmamıştır. WRKY TF'lerin *Papaver somniferum* L. tüm organlarda varlığını açıklamıştır (Kakeshpour *et al.* 2015). C3H Papaverin biyosentezinde önemli rol oynamaktadır (Agarwal *et al.* 2015). miR13, miR2161, miRt0013376 BIA biyosentezinde görevli miRNA'lardır (Boke *et al.* 2015).

Primerler oligo nükleotid sentez raporunda belirtildiği gibi 100 µM stok-µl TE için her bir primer için farklı sulandırma miktarlarına göre seyreltilmiştir ve -20°C' de saklanmıştır. Primer dizileri Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1 Çalışmada kullanılan primerler. Sonu RT olarak adlandırılan primerler sap-ilmek cDNA sentezinde kullanılan primerlerdir.

Primer Adı	Baz Dizisi 5'-3'	PZR Sıcaklığı
pso-miR2161-F	GCGGCGGGAAAACTGTTGTAA	53°C
pso-miR2161-RT	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAG GTATTCGCACCAGAGCCAACTCCC GT	53°C
pso-miR t0013376-F	CGGCGGAAAGGAAAACATGGG	53°C
pso-miR t0013376-RT	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAG GTATTCGCACCAGAGCCAACTCCC GT	53°C
pso-miR13-F	CGGCGGTGATGGAGGAGAAG	57°C
pso-miR13-RT	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAG GTATTCGCACCAGAGCCAACTCTT CT	57°C
pso-miR2161 Target-F	GTAACGGCGGAGTTGAGAAG	53°C

pso-miR2161 Target-RT	GCCTAGTATCATCGGCACCA	53°C
pso-miR13 Target-F	TGGAACCGTTCAAGTAACAGAG	57°C
pso-miR13 Target-RT	ATATGCCACGGAGCAAACA	57°C
pso-miR t0013376 Target-F	CAACAAGGGTTGAGGTGGTT	53°C
pso-miR t0013376 Target-RT	TGGTGGGTCCATTTTCTTTC	53°C
C3H-F	CCGAACTGAAACAAGACCGTAAGCC	55°C
C3H-RT	CGCCGCGAGGGCGGTTATAG	55°C
BBR/BPC-F	CTGACTCATCTTCCGTCCAGCTATC	55°C
BBR/BPC-RT	TCCTGTCTGCTCATGTACTG	55°C
WRKY-F	CCACTGGCACTTGGGTCTCCTTCG	55°C
WRKY-RT	TGGGTGGGTGGCGGCGTT	55°C
ALP1-F	TGTTGCTGAAGGAAGGTGAA	55°C
ALP1-RT	ATGCATGCCATATCCACAAA	55°C
MAIN-like-F	CAAACGAAGGAGAGGATGGA	55°C
MAIN-like-RT	GCATTGTTTGGGAAAAGGAA	55°C
HARBI1-F	ATCAGTGGTTTTGGCATGGT	55°C
HARBI1-RT	AACCCTTGTCGTAGCTGTGG	55°C
18S_papaver-F	AACGACTCTCGGCAACGGATATC	55°C
18S_papaver-RT	AACTCGATGGTTCACGGGATTC	55°C
Universal Reverse	GTGCAGGGTCCGAGGT	57°C

2.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Reaksiyon için hazırlanan cDNA'lar 1/10 şeklinde saf su ile dilue edilmiştir. cDNA'ların çalışıp çalışmadığı ise ilk olarak 18S primer ile yapılan PZR ile kontrol edilmiştir.

Ardından her bir primer için uygun çalışma koşulu aşağıda belirtilen şekilde belirlenmiştir.

Transpozon primerleri (ALP1, MAIN-like, HARBI1) 55°C'de, transkripsiyon faktörleri (C3H, BBR/BPC, WRKY) 55°C'de, miR13 57°C'de, miR2161 ve miRt0013376 53°C'de PZR gerçekleştirilmiştir. 10X PZR (Invitrogen) 2µl, 10mM dNTP mix (Thermo Scientific) 0,6µl, 50mM MgCl2 (Invitrogen) 0,8 µl, 10 pmol ileri primer 1 µl, 10 pmol Geri primer 1 µl, 5U/µl Taq DNA polymerase (Invitrogen) 0,3 µl, H2O 12,3 µl, 1/10 cDNA 2µl eklenmiştir. Her bir örnek için PZR reaksiyon programı aşağıdaki gibi uygulanmıştır.

94°C 1 dakika

94°C 30 saniye
55°C 30 saniye } 35 siklus
72°C 1 dakika

72°C 10 dakika

2.8. Gerçek Zamanlı PZR

Çalışmamızda Roche Fast Start Universal SYBER Green Master karışımı kullanılarak RocheLightCycler 480 Real-Time cihazında gerçekleştirilmiştir. miRNA analizi için çizelge 2.1'de belirtilen 'universal reverse' ve forward' primerleri, transpozon, transkripsiyon faktörü ve hedef genler için ise ileri (F) ve geri (R) primerler uygun sıcaklıklarda kullanılmıştır. Deneysel teknik hataları en aza indirmek için her örnekten 3'lü tekrar yapılmıştır. 2X SYBER Green Master 12,5 µl, 10 pmol ileri primer 1,5 µl, 10 pmol geri grimer 1,5µl, cDNA 4 µl, H_2O 5,5 µl hazırlanmıştır. PZR işlemi için bir 96'lik plakalar kullanılmış ve kuyucuklara örnekler yüklenmiştir. Plakanın üzeri özel plaka bantı ile kapatılarak LightCycler 480 (Roche) cihazına yerleştirilmiştir. Her bir

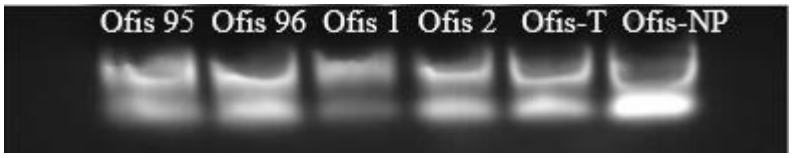
transkripsiyon faktörü, miRNA ve transpozon primerleri için en uygun bağlama sıcaklığı Çizelge 2.1' de verilmiştir. Sonuçlar LightCycler 480 Software aracılığı ile analiz edilmiştir.

Eş zamanlı PZR işleminde elde edilen verilerin analizi için "threshold" (Ct)değeri alınarak gen ifade düzeyleri yorumlanmıştır. 18S primeri ile araştırılan gen bölgesinin arasındaki Ct değer farklılığı "housekeeping" gen ile normalize edilip ΔΔCt oranı hesaplanarak bulunmuştur. [(delta)(delta) Ct = [delta] Ct, örnek- [delta] Ct,referans] Bu formüle göre; [delta] Ct,örnek ilgilenilen örneğe ait Ct değeriile housekeeping genin Ct değer farklılığı hesaplanarak, [delta] CT,referans ise kalibratör ya da kontrole ait Ct değeri ile housekeeping genin Ct değer farklılığı hesaplanarak bulunmuştur. Ct metoduna göre gen ifade düzeyleri, elde edilen bu değerlerin $2^{-[\text{delta}]\ [\text{delta}]\ Ct}$ formülünde yerine konulması ile hesaplanmıştır. Ct değerleri Tablo 3.2 de verilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. RNA İzolasyonu

Bitkilerden alınan örnekler ile total RNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen RNA'ların ND-2100c (Thermo Scientific) nanodrop cihazında saflık ve konsantrasyon tayinleri yapılmış ve %1' lik agaroz jelde RNA bütünlükleri analiz edilmiştir (Şekil 3.1 ve Tablo 3.2).



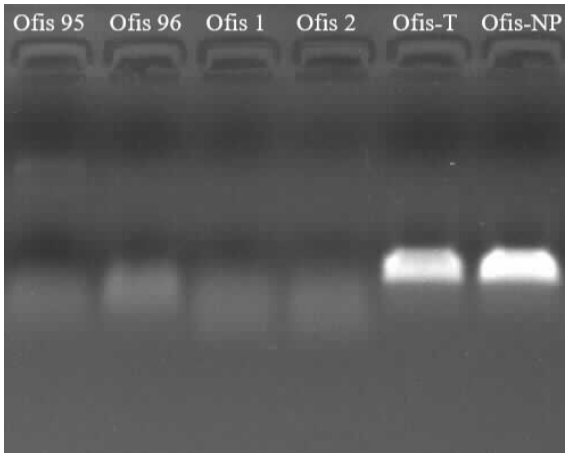
Şekil 3.1. Total RNA'ların %1'lik agoroz jel görüntüsü (Orijinal 2019)

Tablo 3.1. Kantitatif ölçüm sonuçları

Haşhaş Çeşitleri	A260/A280	A260/A230	mg/ml
Ofis 95	1,99	1,84	486,6
Ofis 96	2,02	1,61	581,4
Ofis 1	1,93	0,63	368,7
Ofis 2	1,97	0,91	519,8
Ofis-T	2,04	1,72	716,1
Ofis-NP	1,99	1,40	1034,5

3.2. 18S Primeri ile cDNA Kontrolü

18S RNA primerleriyle PZR optimizasyonu yapılarak cDNA' ların oluşup oluşmadığının kontrolü için %1' lik agaroz jel üzerinde yürütülerek tespit edilmiştir.



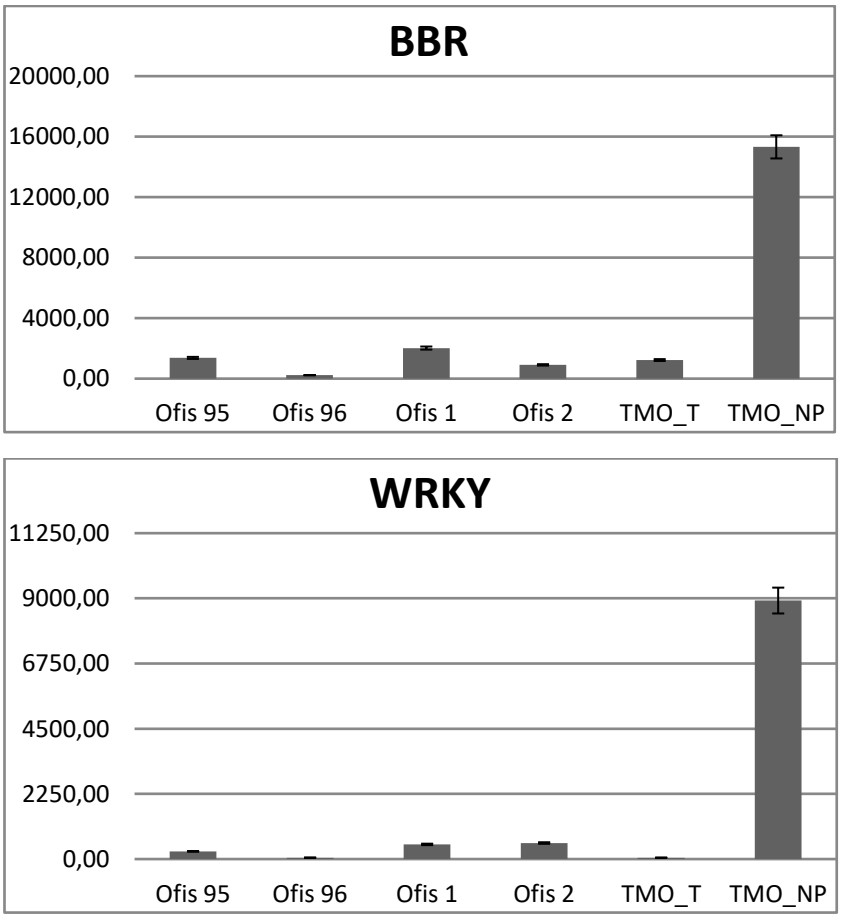
Şekil 3.2. 18S cDNA %1'lik agaroz jel görüntüsü (Orijinal 2019)

3.3. Kantitatif PZR

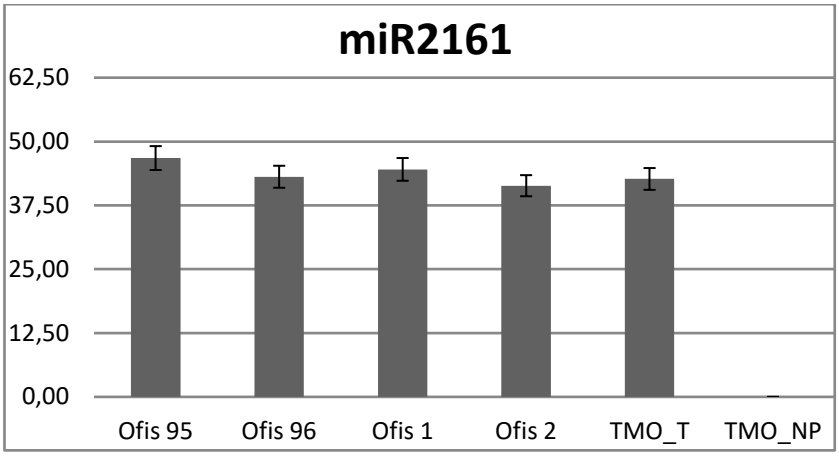
İzole edilen RNA'lar cDNA'ya çevrildikten sonra qRT-PZR ile elde edilen transkripsiyon faktörlerinin verileri ile Transpozonların ve miRNA'ların çıkan verileri sonucunda tablolar elde edilmiştir. Çalışmada ALP1, MAIN, HARBI transpozonları, C3H, BBR/BPC, WRKY transkripsiyon faktörü, miR2161, miRt0013376, miR13 miRNA'ları ve onların hedeflediği 4-OMT (4-O-metiltransferaz, GenBank accession FJ156103), SAT (salutaridinol-7-O-acetyltransferase, GenBank accessionFJ200354) ve 7-OMT (7-O-metiltransferaz, GenBank accession AY217334) genlerinin ifade seviyelerine bakılmış olup C3H transkripsiyon faktörü birçok optimizasyon yapılmasına rağmen çalıştırılamamıştır. Yapmış olduğumuz deneyin sonucunda elde ettiğimiz veriler doğrultusunda çıkan sonuçlar Şekil 3.3, Şekil 3.4, Şekil 3.5 ve Şekil 3.6' de verilmiştir.

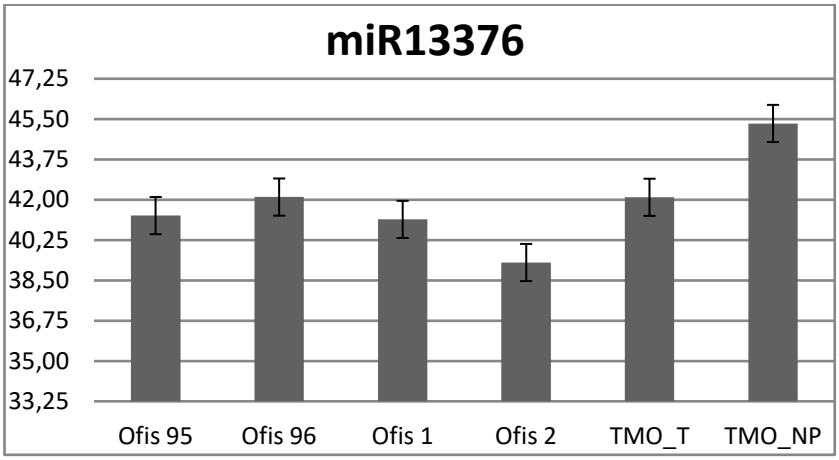
Kantitatif PZR sonuçlarına ait ifade düzeyi grafikleri. Standart sapma değerleri her bir kolonun üzerinde verilmiştir.

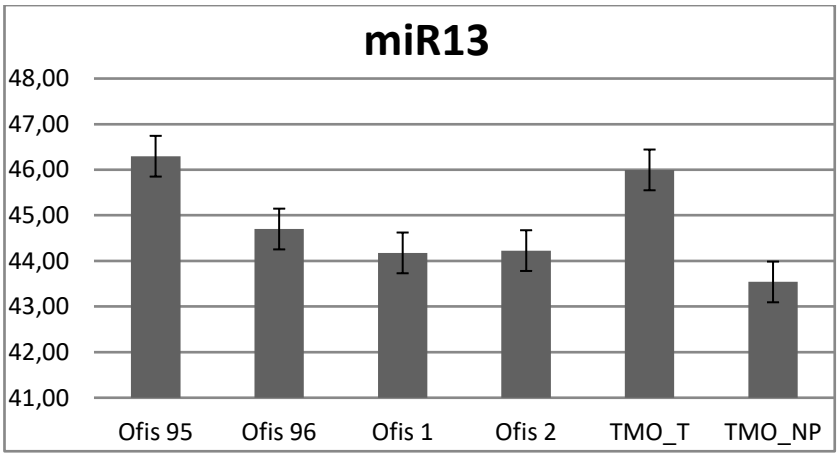
Şekil 3.3. Transkripsiyon faktörleri



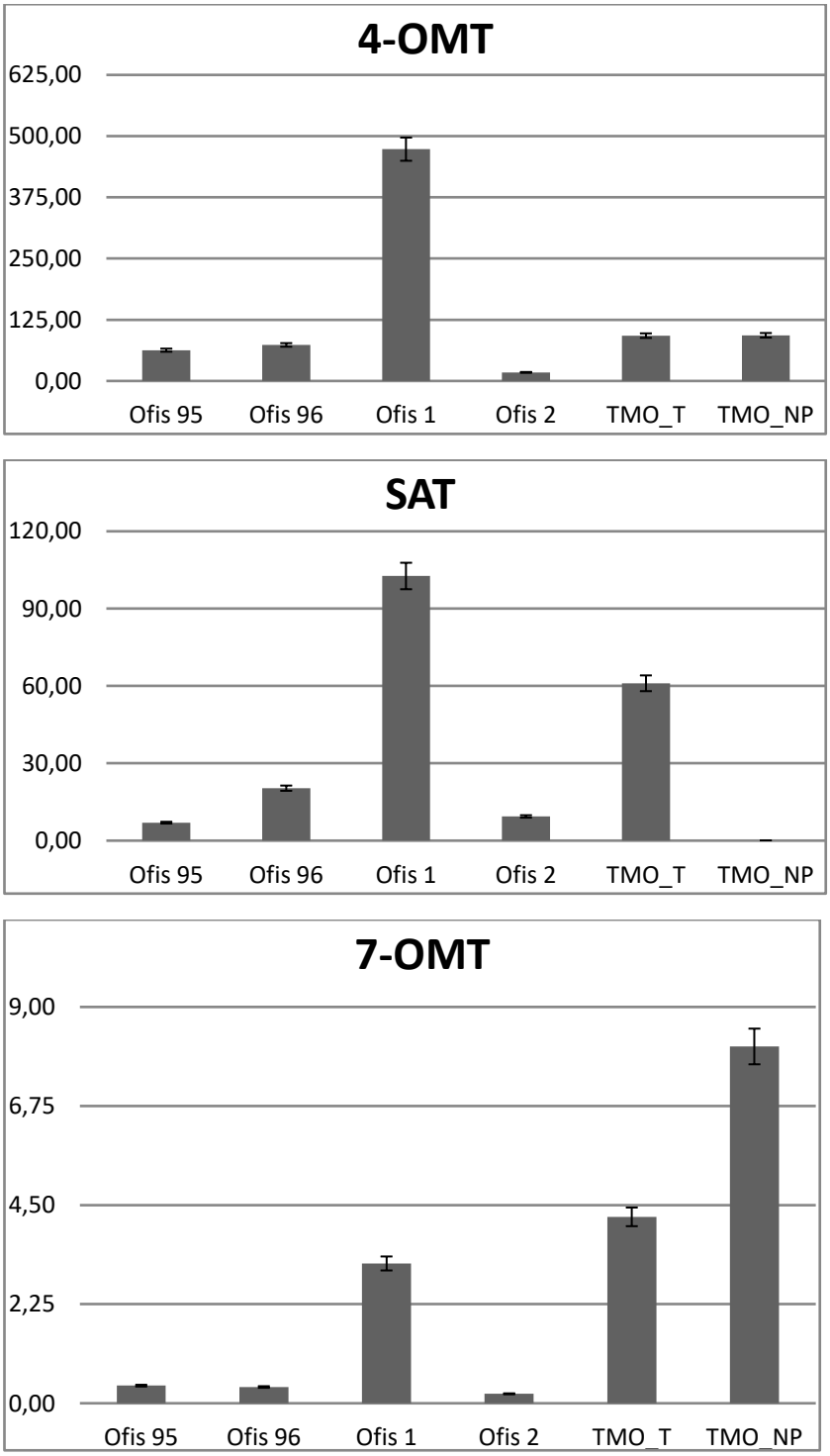
Şekil 3.4. miRNA



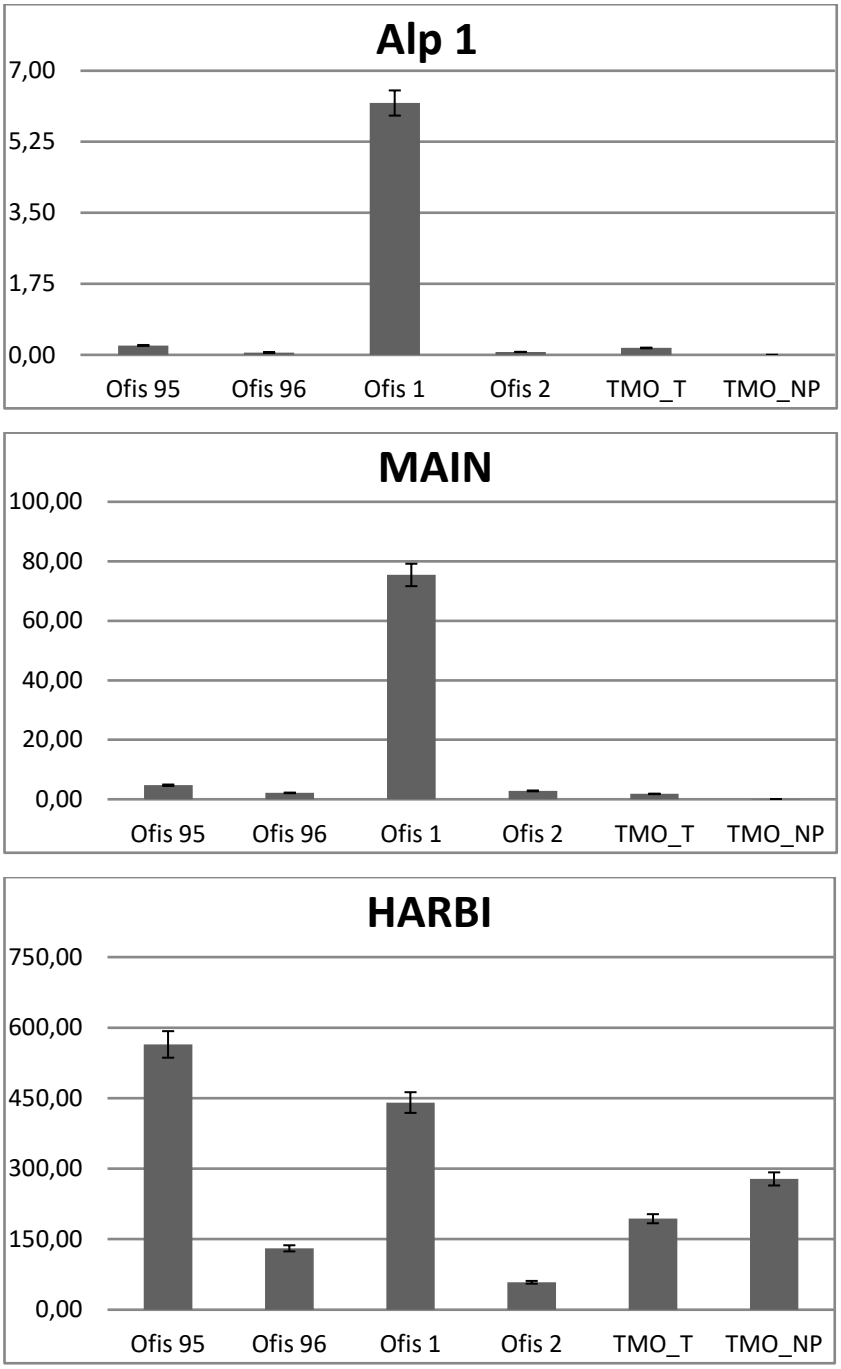




Şekil 3.5. miRNA hedef genleri



Şekil 3.6. Transpozonlar



3.4. Gerçek Zamanlı PZR İşleminde Gen İfade Düzeyleri

İzole edilen RNA'lar cDNA' ya çevrildikten sonra qRT-PZR ile elde edilen transkripsiyon faktörlerinin verileri ile transpozonların ve miRNA'ların çıkan verileri sonucunda tablolar elde edilmiştir. Yapmış olduğumuz deneyin sonucunda elde ettiğimiz gerçek zamanlı PZR da Ct değerleri Tablo 3.2, Tablo 3.3, Tablo 3.4, Tablo 3.5, Tablo 3.6, Tablo 3.7, Tablo 3.8, Tablo 3.9, Tablo 3.10, Tablo 3.11, Tablo 3.12 ve Tablo 3.13'de verilmiştir.

Tablo 3.2. Gerçek zamanlı PZR da Ct değerleri

18S				
Haşhaş Çeşitleri	**Cp**	**Ortalama**	**SD**	**%**
Ofis 95	19,44	19,25	0,16	0,84
Ofis 95	19,16			
Ofis 95	19,16			
Ofis 96	16,74	16,93	0,42	2,47
Ofis 96	17,41			
Ofis 96	16,64			
Ofis 1	20,55	19,95	0,56	2,83
Ofis 1	19,87			
Ofis 1	19,43			
Ofis 2	18,61	18,65	0,06	0,31
Ofis 2	18,72			
Ofis 2	18,63			
TMO_T	17,91	18,02	0,19	1,06
TMO_T	17,91			
TMO_T	18,24			
TMO_NP	21,92	22,41	0,44	1,94
TMO_NP	22,76			
TMO_NP	22,54			

Tablo 3.3. Gerçek zamanlı PZR da *BBR* TF Ct değerleri

BBR							
Haşhaş Çeşitleri	**Cp**	**Ortalama**	**SD**	**%**		**İfade**	**İfade**
Ofis 95	33,3	32,47	0,90	2,78	-12,83	0,00	1370,19
Ofis 95	31,51						
	32,61						
Ofis 96	31,87	32,95	0,95	2,87	-15,41	0,00	229,15
Ofis 96	33,33						
	33,64						
Ofis 1	33,67	33,45	1,22	3,66	-12,27	0,00	2022,37
Ofis 1	33,22						
	31,49						
Ofis 2	34,97	33,69	1,23	3,66	-13,42	0,00	910,28
Ofis 2	33,6						
	32,51						
TMO_T	32,56	31,80	0,71	2,25	-12,99	0,00	1229,19
TMO_T	31,71						
	31,14						
TMO_NP	32,6	32,79	0,36	1,11	-9,35	0,00	15323,91
TMO_NP	32,56						
	33,21						

Tablo 3.4. Gerçek zamanlı PZR da WRKY TF Ct değerleri

WRKY							
Haşhaş Çeşitleri	**Cp**	**Ortalama**	**SD**	**%**		**İfade**	**İfade**
Ofis 95	34,63	34,84	0,66	1,88	-15,20	0,00	265,06
Ofis 95	34,32						
	35,58						
Ofis 96	40,88	35,21	0,04	0,10	-17,67	0,00	47,90
Ofis 96	35,18						
	35,23						
Ofis 1	35,42	35,44	2,07	5,83	-14,27	0,00	506,18
Ofis 1	37,52						
	33,39						
Ofis 2		34,41	1,33	3,86	-14,14	0,00	553,91

Ofis 2	33,47						
	35,35						
TMO_T	39,31	36,53	2,54	6,96	-17,71	0,00	46,53
TMO_T	35,94						
	34,33						
TMO_NP	33,57	33,57	2,60	7,73	-10,13	0,00	8924,14
TMO_NP	37,24						
	47,12						

Tablo 3.5. Gerçek zamanlı PZR da miR2161 Ct değerleri

miR2161				
Haşhaş Çeşitleri	**Cp**	**Ortalama**	**SD**	**%**
Ofis 95	46,76	46,76	0,00	0,00
Ofis 95				
Ofis 96	43,1	43,10	0,00	0,00
Ofis 96	38,41			
Ofis 1	44,54	44,54	0,00	0,00
Ofis 1				
Ofis 2	41,35	41,35	0,00	0,00
Ofis 2				
TMO_T	42,67	42,67	0,00	0,00
TMO_T				
TMO_NP	0	0,00	0,00	0,00
TMO_NP				

Tablo 3.6. Gerçek zamanlı PZR da miR13 Ct değerleri

miR13				
Haşhaş Çeşitleri	**Cp**	**Ortalama**	**SD**	**%**
Ofis 95	43,34	46,30	2,79	6,03
Ofis 95	46,66			
Ofis 95	48,89			
Ofis 96	43,49	44,70	1,10	2,46
Ofis 96	44,97			
Ofis 96	45,64			
Ofis 1	45,38	44,18	1,05	2,37
Ofis 1	43,48			
Ofis 1	43,67			
Ofis 2	42,33	44,23	1,68	3,80
Ofis 2	44,82			
Ofi s2	45,53			
TMO_T	44,49	46,00	1,55	3,36
TMO_T	47,58			
TMO_T	45,92			
TMO_NP	44,14	43,54	0,85	1,95
TMO_NP	42,94			
TMO_NP	51,94			

Tablo 3.7. Gerçek zamanlı PZR da miR13376 Ct değerleri

miR13376				
Haşhaş Çeşitleri	**Cp**	**Ortalama**	**SD**	**%**
Ofis 95	41,23	41,31	0,11	0,27
Ofis 95	41,39			
Ofis 96	42,32	42,12	0,29	0,69
Ofis 96	41,91			
Ofis 1	40,45	41,15	0,98	2,39
Ofis 1	41,84			
Ofis 2	39,26	39,28	0,02	0,05
Ofis 2	39,29			
TMO_T	42,02	42,11	0,12	0,29
TMO_T	42,19			
TMO_NP	45,67	45,31	0,51	1,12
TMO_NP	44,95			

Tablo 3.8. Gerçek zamanlı PZR da 4-OMT Ct değerleri

4-OMT							
Haşhaş Çeşitleri	**Cp**	**Ortalama**	**SD**	**%**		**İfade**	**İfade**
Ofis 95	36,89	37,07	0,25	0,69	-17,28	0,00	62,84
Ofis 95	37,25						
Ofis 96	36,4	36,19	0,30	0,84	-17,05	0,00	73,61
Ofis 96	35,97						
Ofis 1	34,45	34,41	0,06	0,16	-14,37	0,00	473,37
Ofis 1	34,37						
Ofis 2	37,91	37,85	0,08	0,22	-19,13	0,00	17,47
Ofis 2	37,79						
TMO_T	37,41	37,05	0,52	1,39	-16,72	0,00	92,53
TMO_T	36,68						
TMO_NP	40,56	39,97	0,84	2,11	-16,71	0,00	93,28
TMO_NP	39,37						

Tablo 3.9. Gerçek zamanlı PZR da SAT Ct değerleri

SAT							
Haşhaş Çeşitleri	**Cp**	**Ortalama**	**SD**	**%**		**İfade**	**İfade**
Ofis 95	41,96	40,24	2,43	6,04	-20,45	0,00	6,98
Ofis 95	38,52						
Ofis 96	38,5	38,04	0,65	1,71	-18,91	0,00	20,35
Ofis 96	37,58						
Ofis 1	38,72	36,62	2,98	8,13	-16,57	0,00	102,67
Ofis 1	34,51						
Ofis 2	38,87	38,75	0,18	0,46	-20,02	0,00	9,39
Ofis 2	38,62						
TMO_T	37,63	37,65	0,02	0,06	-17,32	0,00	61,05
TMO_T	37,66						
TMO_NP	0	0,00	0,00	0,00	23,26	0,00	0,00
TMO_NP	0						

Tablo 3.10. Gerçek zamanlı PZR da 7-OMT Ct değerleri

7-OMT							
Haşhaş Çeşitleri	**Cp**	**Ortalama**	**SD**	**%**		**İfade**	**İfade**
Ofis 95	44,75	44,37	0,54	1,23	-24,58	0,00	0,40
Ofis 95	43,98						
Ofis 96	44,22	43,83	0,56	1,27	-24,69	0,00	0,37
Ofis 96	43,43						
Ofis 1	41,49	41,63	0,20	0,48	-21,59	0,00	3,18
Ofis 1	41,77						
Ofis 2	44,2	44,20	#####	#####	-25,48	0,00	0,21
Ofis 2	31,08						
TMO_T	39,5	41,50	2,82	6,80	-21,17	0,00	4,23
TMO_T	43,49						
TMO_NP	39,92	43,49	#####	0,00	-20,24	0,00	8,10
TMO_NP	43,49						

Tablo 3.11. Gerçek zamanlı PZR da ALP1 Ct değerleri

Alp1							
Haşhaş Çeşitleri	**Cp**	**Ortalama**	**SD**	**%**		**İfade**	**İfade**
Ofis 95	44,45	44,62	0,23	0,52	-25,36	0,00	0,23
Ofis 95	44,78						
Ofis 96	44,37	44,28	0,65	1,47	-27,35	0,00	0,06
Ofis 96	43,59						
	44,88						
Ofis 1	42,42	40,57	1,74	4,29	-20,62	0,00	6,21
Ofis 1	40,33						
	38,96						
Ofis 2	47,73	45,70	2,53	5,53	-27,05	0,00	0,07
Ofis 2	42,87						
	46,51						
TMO_T	44,45	43,83	0,91	2,08	-25,81	0,00	0,17
TMO_T	44,25						
	42,78						
TMO_NP	0	0,00	0,00	0,00	22,41	0,00	0,00
TMO_NP	0						
	0						

Tablo 3.12. Gerçek zamanlı PZR da MAIN Ct değerleri

MAIN							
Name	**Cp**	**Ortalama**	**SD**	**%**		**İfade**	**İfade**
Ofis 95	40,32	40,27	0,34	0,85	-21,01	0,00	4,72
Ofis 95	40,58						
	39,9						
Ofis 96	38,99	39,08	0,25	0,65	-22,15	0,00	2,14
Ofis 96	39,37						
	38,89						
Ofis 1	37,34	36,97	0,33	0,90	-17,02	0,00	75,42
Ofis 1	36,7						
	36,86						
Ofis 2	40,24	40,41	0,19	0,46	-21,76	0,00	2,82
Ofis 2	40,61						
	40,38						
TMO_T	40,47	40,42	1,10	2,72	-22,40	0,00	1,81
TMO_T	39,29						
	41,49						
TMO_NP	51,38	51,83	0,64	1,23	-29,42	0,00	0,01
TMO_NP	52,28						

Tablo 3.13. Gerçek zamanlı PZR da HARBI Ct değerleri

HARBI							
Name	**Cp**	**Ortalama**	**SD**	**%**		**İfade**	**İfade**
Ofis 95	32,4	33,37	0,84	2,51	-14,11	0,00	564,24
Ofis 95	33,8						
	33,9						
Ofis 96	30,44	33,16	0,26	0,79	-16,23	0,00	130,55
Ofis 96	33,34						
	32,97						
Ofis 1	34,38	34,42	0,08	0,23	-14,47	0,00	440,65
Ofis 1	34,37						
	34,51						
Ofis 2	36,67	36,04	1,31	3,65	-17,39	0,00	58,36
Ofis 2	34,53						
	36,92						
TMO_T	32,95	33,68	0,68	2,01	-15,66	0,00	193,59
TMO_T	33,79						

	34,29						
TMO_NP	44,68	37,54	####	#####	-15,13	0,00	278,24
TMO_NP							
	37,54						

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Haşhaş ülkemiz ve dünya için önemli bir bitkidir. İçinde üretmiş olduğu BIA'lar bunun önemini sağlayan sekonder metabolitlerdir. Haşhaş, BIA adını verdiğimiz kodein, morfin, narsein, sanguinarin, papaverin ve noskapin gibi çeşitli benzilizokinolin alkaloitlerini içermektedir. Alkaloitlerin içeriği, çevre koşulları ve bulundukları dokuya göre değişiklik gösterebilmektedir. Spesifik bitki türleri izokinolin alkol üretir. İzokinolin alkaloitlerin dağılımı analjezik morfin, anti-tussive (öksürük baskılayıcı) kodein, kas gevşetici papaverin, antimikrobiyal berberin ve belirli bitki aileleri *Magnoliaceae, Ranunculaceae, Papaveraceae* ve *Berberidaceae* ile sınırlıdır. Biyosentezin moleküler mekanizmasının nasıl düzenlendiği büyük ölçüde bilinmemektedir (Yamada *et al.* 2013). Dolayısıyla bu mekanizmanın aydınlatılarak öneminin vurgulanması oldukça önemlidir. Bu çalışmada biz, ülkemizin dünyadaki ana yetiştiricilerinden birisi olduğu ve üretmiş olduğu alkaloitler sebebiyle ekonomik değeri yüksek olan haşhaş (*Papaver somniferum* L.) bitkisinde, genlerin regülasyonunda önemli 3 farklı elementlerin (Transpozon, Transkripsiyon Faktörü, miRNA) ifade analizleri qRT-PZR yöntemiyle ilk kez araştırılmış olup düzenleyici görev yaptıkları tespit edilmiştir.

Bulut 2020, çalışmasında TMO tarafından tescillenmiş Afyon yöresinde yaygın olarak ekimi yapılan morfin içeriği düşük Ofis 95, Ofis 96 ve morfin içeriği yüksek Ofis 1 ve Ofis 2 çeşitleri 21 farklı MSAP markörü kullanılarak aralarındaki DNA metilasyon seviyeleri metilasyona duyarlı amplifikasyon polimorfizmi (MSAP) tekniği kullanılarak karşılaştırılmış olup bizim çalışmamızda da qRT-PZR tekniği kullanılarak, bitki materyali olarak TMO'dan elde edilen morfin içeriği düşük *P. somniferum* Ofis 95, morfin içeriği düşük Ofis 96 çeşiti, morfin içeriği yüksek Ofis1 çeşiti, morfin içeriği yüksek olan Ofis 2 çeşiti, tebain içeriği yüksek olan Ofis-T çeşidi ve noscapin içeriği yüksek olan Ofis-NP çeşitleri kullanılmıştır.

Transkripsiyon faktörü genlerin transkripsiyonunu düzenlemek için DNA üzerinde belli bir diziye bağlanabilen bir proteindir. Bunlar diziye özgün DNA bağlanma proteini olarak da adlandırılır. Transkripsiyon faktörleri tek başına veya bir komplekste yer alan başka proteinlerle beraber, RNA polimeraz tarafından bir genin transkripsiyonunu ya bir aktivatör olarak kolaylaştırırlar veya bir represör olarak engeller. Çalışmamızda BBR ve WRKY transkripsiyon faktörleri kullanılmıştır. WRKY alkaloit biyosentezinde tanımlanmış ilk transkripsiyon faktörüdür (Yamada *et al.* 2019). WRKY tüm haşhaş çeşitlerinde bulunan transkripsiyon faktörüdür (Agarwal *et al.* 2015). Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler sonucunda transkripsiyon faktörleri transpozonlara kıyasla ifade seviyeleri daha yüksek olduğu görülmüştür. Zaten literatür taramasında da görülüyor ki; transkripsiyon faktörünün aktivitesi fazla olup transpozonların aktiviteleri çok daha düşük olması beklenen bir sonuçtur. Agarwal *et al.* (2015) tarafından yapılan çalışmada WRKY'nin noskapin biyosentezinde önemli rol oynadığını açıklamışlardır. Bizim çalışmamızda da BBR ve WRKY'de noskapin içeriği yüksek olan TMO-NP bitkisinde çok fazla ifade olduğu görülürken, diğer haşhaş çeşitlerimizde az miktarda ve birbirlerine yakın seviyede artış olduğu görülmüştür. *BBR* ve WRKY transkripsiyon faktörlerinde morfin içeriği düşük olan Ofis 95 ve Ofis 96 bitkilerinin verilerine bakacak olursak ifade seviyeleri genetik farklılıktan dolayı aynı değildir. WRKY'de tebain içeriği yüksek TMO-T yok denilecek kadar az ifade olurken, BBR'de WRKY'e göre daha fazla ifade olduğu görülmüştür. Genel olarak bütün haşhaş çeşitlerinde ifade seviyeleri BBR'de WRKY'ye göre daha yüksektir. WRKY'de morfin içeriği yüksek olan Ofis 1 ve Ofis 2'nin ifade seviyeleri birbirine çok yakın olup BBR'de morfin seviyesi düşük Ofis 95 ve tebain içeriği yüksek TMO-T'nin ifade seviyeleri yakındır.

Lorenz *et al.* (2011) tarafından yapılan çalışmada, çam köklerindeki kuraklık tepkisinin düzenlenmesi için bir transkripsiyon faktörü olan hem kuraklık stresi hem de kuraklık iyileşmesinde etkili WRKY geni belirlemişlerdir. WRKY yaralanma, enfeksiyon ve abiyotik strese olumlu yanıt veren ve gelişimsel ve metabolik yollarda birden fazla rol oynayan geniş korunmuş transkripsiyon faktörüdür. WRKY transkripsiyon faktörü kuraklık stresinde ve bu stresle mücadele eden bitkilerde daha aktif ve fazla gözükmektedir (Lorenz *et al.* 2011). Bizim çalışmamızda kuraklık stresi söz konusu olmadığı halde WRKY TF oldukça fazla ifade olduğu görülmüş olup WRKY TF'lerin

yüksek seviyede ifade olmasında kuraklık stresine ihtiyaç olmadığı aynı zamanda BIA biyosentezinde görev aldığı çalışmamızla belirlenmiştir.

Yamada ve Sato (2013) tarafından yapılan çalışmada ise; AP2 / ERF, WRKY ve bHLH transkripsiyon faktörleri veya MAP kinazlar gibi düzenleyici faktörler, her bir alkaloitin biyosentezinde tanımlanmıştır. Oysaki bu faktörler; gen ekspresyonunu pozitif ve negatif olarak düzenler ve biyosentezde görevlidirler, fenilpropanoide karışan transkripsiyon faktörleri ile karşılaştırma biyosentez, sekonder metabolitler arasındaki benzerlikleri ve farklılıkları ortaya çıkarmıştır. MeJa bitkisinde WRKY TF'nin nikotin alkaloit biyosentezinin düzenlenmesinde rol oynadığı tespit edilmiştir. Bizim çalışmamıza baktığımızda TMO-NP haşhaş çeşidinde noskapin miktarında WRKY TF'nin ifadesi oldukça fazladır. Özellikle TMO-NP'de WRKY TF'nin noskapin üzerinde önemli rol oynadığı görülmektedir. Yamada ve Sato (2013) çalışmasında Meja bitkisinde WRKY TF'nin nikotine etki ederken, bizim çalışmamızda kullandığımız haşhaş bitkisinde WRKY TF'nin noskapin üzerinde de etki etmiştir. Literatür taramaları sonucunda WRKY TF sadece kuraklıkta ve nikotin içerikli bitkilerde etkilidir diyemeyiz.

Agarwal *et al.* (2016) BIA biyosentez yolağındaki gözlemler sonucunda WRKY TF'nin önemli bir role sahip olduğunu göstermiştir. Son zamanlarda, haşhaştaki BIA biyosentez yolağının WRKY transkripsiyon faktörü tarafından düzenlendiğini ileri sürmüşlerdir. Agarwal ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmanın sonucunda WRKY'nin noskapin biyosentezinde önemli rol oynadığı dile getirilerken; çalışmalarımız sonucunda elde ettiğimiz veriler doğrultusunda sadece WRKY'nin değil, BBR ve WRKY transkripsiyon faktörlerinin ikisi birden noskapin biyosentezinde önemli rol oynamaktadır.

MikroRNA'lar (miRNA), ilk kez 1993 yılında Lee *et al.* tarafından *Caenorhabditis elegans* solucanında bulunmuştur ve yaklaşık olarak 22 nükleotid uzunluğunda tek zincire sahip RNA molekülleri olarak tespit edilmiştir. miRNA'lar bir çok gen ifadesinin düzenlenmesinde, bitki büyümesi ve gelişmesi gibi biyolojik süreçlerde, biyotik ve abiyotik stres tepkilerinde, kuraklık ve metabolik yollarda önemli rol oynar. Bazı bitki miRNA'ları keşfedilmiş ve karakterize edilmiştir, düzenleyici rollerini de ortaya koymuştur (Eldem vd. 2013). Mastakani *et al.* (2018), bitki türlerindeki olgun miRNA'lar evrimsel olarak korunur, ancak öncü miRNA'lar korunmaz ve bitki krallığındaki türden türe değişir. Kümelenmiş miRNA'ların türün çeşitli fizyolojik süreçlerinde önemli rol

oynayacağı düşünülmektedir. miRNA'ların bitki gelişimindeki fonksiyonları ve çeşitli stresleri tarif edilmiştir (Eldem vd. 2012; Yanik *et al.* 2013; İnal vd. 2014; Seefried *et al.* 2014). Son yıllarda miRNA'lar bitki türlerinde farklı ifade olmasına rağmen *Opium poppy*'de alkaloit biyosentezi ve miRNA arasındaki olası ilişki açıklanmış olup; Boke ve arkadaşları 2015, haşhaşta alkaloitle ilişkili miRNA'lara ek olarak potansiyel 11 yeni miRNA tespit etmişlerdir. Bu 11 miRNA'dan bir tanesi olan miR13 bu çalışmada da alkaloitle ilişkili olduğu açıklanmıştır. miR13, miR2161, miR0013376 BIA biyosentezinde görevli miRNA'lardır. Haşhaş miRNA'ları karakterize eder.

Yaptığımız çalışmamızda miR2161 geni TMO-NP'de ifade olmazken, diğer haşhaş çeşitlerinde birbirlerine yakın seviyede ifade oldukları görülmüştür. miR2161 geni noskapin biyosentezinde bulunan gene etki etmediği için ifade olmamaktadır. Yani genin susturulmasından kaynaklı bir durum ortaya çıkmıştır. miR0013376 geninde bütün haşhaş çeşitlerinde yakın seviyelerde ifade olurken, TMO-NP'de biraz daha fazla ifade olduğu görülmektedir. miR13 geninde ise Ofis 1 ve Ofis 2 morfin içeriği yüksek haşhaş çeşitleri aynı seviyede ifade olurken, Ofis 96 morfin içeriği düşük haşhaş çeşidinde yakın seviyede, Ofis 95 morfin içeriği düşük haşhaş çeşidinde ve TMO-T'de tebain içerikli daha fazla ifade olduğu, TMO-NP noskapin değeri diğerlerinden daha az seviyede ifade olduğu görülmüştür. miR13376 geni ve miR13 geni TMO-NP'de ifade olduğu görülmüş olup miR13376 geninde en yüksek ifade seviyesine sahip haşhaş çeşidi TMO-NP'dir.

Boke ve arkadaşları (2015) yaptıkları çalışmada, miRNA'yı incelemek için miRNA mikrodizileri kullanmışlardır. Haşhaş bitkisinin dokularında ekspresyon araçları olarak; kök, gövde, yaprak ve üç biyolojik kopyaya sahip genç kapsül dokularını miRNA ekspresyon seviyeleri için karşılaştırmışlardır. Toplam 12 miRNA melezleme ve veri analizleri için parçalar hazırlamışlardır. Farklı dokularda elde edilen miRNA verileri elde etmişlerdir. Yaprak için miR2911, miR156c, miR164a ve miR167 genleri genellikle genç kapsül dokularında ifade edilmiş olup miRNA yaprakta diğer dokulardan daha fazla gözlemlenmiş ve miRNA'nın ekspresyon seviyeleri yaprak ve kök dokusu arasında farklı şekilde düzenlenmiştir. Haşhaş bitkisinde pso-miR13 miRNA'sının ifadesi qRT-PZR ile ölçülmüş ve tüm dokulardaki varlığı ayrıca doğrulanmıştır.

Boke ve arkadaşları (2015) tarafından yapılan çalışmada haşhaş bitkisinde alkaloit biyosentezinin miRNA tarafından düzenlendiğini açıklamışlardır. Biyosentetik yolda

alkaloite katılan potansiyel miRNA'lar olarak pso-miR13, pso-miR2161 ve pso-miR408 genlerini tespit etmişlerdir. pso-miR2161 geninin miRNA'yı hedefleyerek adenosil-L-metiyonini kodlayan gen olarak 30-hidroksi-N-metilklaurin 4-O-metiltransferaz 2 (4 OMT), S-norkoklaurini S-retikuline dönüştüren enzim, BIA ara molekül biyosentezidir. Benzer şekilde pso-miR13 geni 7-O-metiltrenferazın miRNA'sını hedefleyerek S-retikulini dönüştüren (7 OMT) geni morfinan alkaloitleridir. pso-miR408, S-retikulini (S) -sülulerine dönüştüren retikulin oksidaz benzeri proteinin mRNA'sını BIA yolunda sentezler. 7-OMT hedef geninin ifadesi ile pso-miR13 geni kök dokusunda kapsülde olduğundan daha fazla bastırılmıştır. 4- OMT'de ise kapsülde bulunan pso-miR2161 geni saptan daha yüksek seviyede çıkmıştır.

Gürkök ve arkadaşları (2013) tarafından yapılan çalışmada farklı alkaloit tiplerinin organa özgü biyosentezi ile ilişkili olarak BIA genlerinin farklı ekspresyonu daha önce bildirilmiştir. Kapsüllerin alkaloit birikme yerleri olduğu ve biyosentez bölgelerine kaynak olduğu öne sürülmüştür. Biyosentezde görev alan genlerin fazla ekspresyonu ve genlerin susturulması alkaloitteki miktarı dokuya göre farklılılık gösterecek tarzda etkilemiştir. Morfin içeriğinin gen susturulmasıyla azalttığını, fazla gen ekspresyonunun morfin içeriğini arttırdığını tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda yapraktan elde ettiğimiz miR2161 geni noskapin içerikli TMO-NP bitkisinde hiç ifade olmazken Boke ve arkadaşlarının (2015) yaptığı çalışmada kapsülde daha fazla seviyede ifade olmuştur. miR13 geni noskapin bakımından zengin içerikli TMO-NP bitkisinde en düşük seviyede olduğu gözlenmiştir. Boke ve arkadaşlarının (2015) çalışmasında haşhaş bitkisinin bütün dokuları kullanılmasına rağmen kullanılan genler genelde kapsülde daha etkili olduğu ifade edilmişken, bizim çalışmamızda yaprak dokusundan elde ettiğimiz genler etkili olmuştur.

miRNA hedef genlerinde 4-OMT geninde diğer haşhaş çeşitlerinde aynı seviyede ifade olurken Ofis 1' de diğerlerine oranla çok daha fazla ifade olduğu görülmüştür. SAT geni TMO-T bitkisinde Ofis 1'den daha az seviyede ifade olurken, en fazla Ofis 1'de etkili olduğu ve TMO-NP'de hiç ifade olmadığı görülmüştür. Diğer hedef genimiz 7-OMT geninde ise en az seviyelerde ifade olan Ofis 95, Ofis 96 ve Ofis 2 haşhaş çeşidiyken, Ofis 1'de daha fazla ifade olmuş olup ifade seviyeleri diğerlerinden farklı ve fazla miktarda artış olan TMO-T ve TMO-NP haşhaş çeşitleridir. 7-OMT geninin diğerlerine oranla en fazla ifade olduğu haşhaş çeşidi TMO-NP'dir. Ofis 1 haşhaş çeşidi 3 hedef

genimizde de yakın seviyede ifade olurken TMO-NP'nin en fazla ifade olduğu gen 7-OMT'dir. Gen ifadesini düzenleyiciler gen ekspresyonunu dokuya özgü etkileyerek farklı ifade profilini oluştururlar.

Transpozonlar, hücrenin genomunda farklı yerlere, transpozisyon olarak adlandırılan süreçle hareket edebilen DNA dizileridir. Bu süreçle birlikte mutasyonlara ve genomdaki DNA miktarının değişmesine sebep olurlar. Retrotranspozon ve DNA transpozon diye iki tip transpozon vardır. Retrotranspozon RNA ara ürün kullanarak kendini kopyalayarak hareket ederken, DNA transpozon RNA ara ürün kullanmaz. Transpozonlar genlerin regülasyonunu etkilerler. Transpozonlar özellikle gen tedavisi alanında önemli bir buluştur ve çok fazla çalışmada da kullanılmaktadır. Transpozonlar tek hücre içerisinde bulunan ve bulundukları yerden sıklıkla koparak farklı bölgelere sıçrayan gen parçalarıdır. Transpozonlar canlılardaki DNA'yı değiştirmek için kullanılan bir araçtır.

Transpozonal sıçramalar, transpozonal bölgelerin önce kendilerini kopyalayıp, sonra bu kopyaların sıçaraması şeklinde olabileceği gibi, bulundukları yerden koparak yeni bir yere yerleşmesi şeklinde de meydana gelebilmektedir. Transpozonal sıçramalar, gerçekte çok önemli bir evrim mekanizmasıdır. Çünkü hem fenotipi kökten değişecek etkilere sahiptir, hem de genom büyüklüğünün değişmesini sağlayabilirler. Özellikle ökaryot hücrelerde genom büyüklüğü üzerindeki etkileri çok ciddidir. Çünkü bir transpozon, kendini kopyalayıp hem kendisini hem de kopyasını DNA üzerinde farklı bölgelere yapıştırabilirler. Bu durumda genom büyüyecektir. Eğer bu değişim, canlıya avantaj sağlayacaksa gelecek nesillere de aktarılır. Genel değerlendirmede bu noktaya ağırlık vermek doğru olacaktır. Yeniden tarif etmek gerekirse, transpozonlar tek bir hücrenin içerisinde var olan ve sıklıkla bulundukları yerden koparak, farklı bölgelere sıçrayan gen parçalarıdır.

Çalışmamızda ALP 1, MAIN ve HARBI transpozonları kullanmıştır. Bu çalışmada haşhaş çeşitlerinde bulunan alkaloitler bakımından transpozonlara dair ilk kez veriler elde edilmiştir. ALP 1 ve MAIN transpozonlarında diğer haşhaş çeşitlerinde birbirine yakın olmakla birlikte özellikle morfin içeriği yüksek olan Ofis 1 bitkisinde çok fazla artış olduğu, yine morfin içeriği yüksek olan Ofis 2 bitkimizde ise neredeyse yok denebilecek kadar az ifade olduğu görülmüştür. Elde ettiğimiz verilere bakacak olursak her iki bitkimizde de morfin içeriği yüksek olmasına rağmen ifade seviyeleri aynı değildir.

Bunun sebebi ise; genetik farklılıktan kaynaklanmaktadır. ALP 1 ve MAIN transpozonlarının kullandığımız bitki çeşitlerinde benzer şekilde düzenleyici görev üstlendiği görülmüştür. Oysa ki HARBI transpozonunda da Ofis 1 de artış gözlenirken, Ofis 95 bitkisinin morfin içeriği düşük olmasına karşın seviyesinin Ofis 1'den fazla olduğu görülmektedir. ALP 1 ve MAIN transpozonlarında Ofis 95, Ofis 96, Ofis 2, TMO-T ve TMO-NP haşhaş çeşitlerinde ifade seviyeleri birbirine yakın ve az iken, HARBI transpozonunda ifade seviyelerinde değişkenlik ve artış olduğu görülmüştür. HARBI transpozununda TMO-NP' de çok fazla artış görülürken, MAIN transpozununda neredeyse yok denecek şekilde bir artış gözlenmiştir. Bunun yanı sıra ALP 1 transpozununda noskapin biyosentezinde etkili olan genlerin susturulmasıyla noskapin miktarlarında hiçbir ifade görülmemiştir. Bu veriler sonucunda gösteriyor ki noskapin içeriği yüksek TMO-NP bitkisi spesifik regülasyona sahiptir. Çalışmamız sonucunda genellikle bütün gen ifadesi düzenleyicilerde noskapin artarken; morfin azalmış, morfin artarken; noskapin azalmıştır. Bu durum BIA yolağında noskapin ve morfinin farklı kollarda görev almasından kaynaklanmaktadır.

Çalışmamızda farklı BIA içeriklerine sahip haşhaş çeşitlerinde üç farklı gen düzenleyici elementin (Transkripsiyon Faktörü, miRNA, Transpozon) ve 6 farklı haşhaş çeşidinin (Ofis 95, Ofis 96, Ofis1, Ofis 2, Ofis-T, Ofis-NP) bir arada çalışıldığı ve ifade analizlerinin yapıldığı ilk çalışmayı temsil etmektedir. Alkaloitler bakımından transpozonlara ait ilk kez veri elde edilmesine imkân sağlamıştır. Bahsedilen çalışmalara rağmen araştırmamızda ortaya çıkan transpozonların alkaloitlerle ilişkisine dair yapılan literatür taramasında, herhangi bir veriye bu sebepten dolayı rastlanılmamıştır. Araştırmamız bu açıdan bir ilktir. Konunun ayrıntılı bir şekilde araştırılması ve geliştirilmesi gerektiği düşünülmektedir.

5. KAYNAKLAR

Agarwal, P. Pathak, S. Lakhwani, D. Gupta, P. Asif, M.H. and Trivedi, P.K. 2016. Comparative analysis of transcription factor gene families from Papaver somniferum: identification of regulatory factors involved in benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis. Protoplasma. 253:857–871.

Ahmed, F.E. 2002. Detection of genetically mo-dified organisms in foods. Trends in Biotechno-logy, 20, 215-223.

Akgül, N. 2018. Sekonder Metabolitler. https://slideplayer.biz.tr/slide/12415949/. Erişim Tarihi: 17.02.2020.

Alaca, F. Ve Arslan, N. 2012. Sekonder Metabolitlerin Bitkiler Açısından Önemi. Ankara Üniversitesi. Ziraat Fakültesi. Tarla bitkileri Bölümü. Ziraat Mühendisliği. 358: 48-55. Ankara.

Anonim. 2013. Toprak Mahsülleri Ofisi Genel Müdürlüğü, [http://www.tmo.gov.tr/Upload/Document/raporlar/HashasRaporu2012.pdf]. Erişim Tarihi: 18.02.2020.

Arslan, N. İpek, A. Rahimi, A. ve İpek, G. 2011. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Haşhaş (*Papaver somniferum* L.) Genetik kaynakların Morfin ve Bazı Özellikler Yönünden Değerlendirilmesi, Bursa Tarım Kongresi, II. Cilt: 1185-1190.

Asif, MH. Pathak, N. Solomos, T. Trivedi, P.K. 2009. Effect of lowoxy gen, tempera türe and 1-methylcyclopropene on the İfade of genes regulatin gethylene biosynthesis and perception durin gripening in apple, 75:137–144.

Bakırcı, Ç.M. 2011. [https://evrimagaci.org/evrim-mekanizmalari-10-transpozonlar-247]. Erişim Tarihi: 18.02.2020.

Bakırcı, Ç.M. 2019. Evrim Mekanizmaları 10: Transpozonlar. [https://evrimagaci.org/evrim-mekanizmalari-10-transpozonlar-247]. Erişim Tarihi: 17.02.2020.

Bişgin, A. Ay, İ.E. Sezgin, G. 2014. Hemoglobinopatilerde Genetik Modifiye Hematopoetik Kök Hücre Tedavisi. Çukurova Üniversitesi. Tıp Fakültesi. Tıbbi Genetik Anabilim Dalı. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi, 23(1):14-25.

Boke, H. Özhüner, E. Türktaş, M. Parmaksız, İ. Özcan, S. ve Ünver, T. 2015. Regulation of the alkaloid biosynthesis by miRNA in opium poppy. Plant Biotechnology Journal, 13: 409–420.

Bulut, B. 2020. Epigenetik Düzenlemelerin Haşhaş (*Papaver Somniferum* L.) Bitkisinde Morfin Yolağı Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi. Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Biyoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi. Çankırı.

Bustin, S.A. 2000. Absolute quantificatication of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. Journal of Mo-lecular Endocrinology, 25, 169-193.

Cockerill, F.R. Smith, T.F. 2002. Rapid-cycle real-time PCR: A revolution for clinical microbi-ology. American Society for Microbiology News, 68, 77-83.

Dang, T.T. Facchini, P.J. 2012. Characterization of Three O-Methyltransferases Involved in Noscapine Biosynthesis in *Opium Poppy*. Plant Physiology, 159,618–631.

Demirci, Y. 2016. Morfin ve Noskapin içeriği yüksek haşhaş (*Papaver somniferum* L.) genotiplerinde RNA kütüphanelerinden transkripsiyon faktörlerinin tespiti ve ifade analizi, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi. Ankara.

Ecevit, H. Motor, S. İzmirli, M. 2013. Genden Tedaviye Yeni Yaklaşımlar: Kodlamayan Nükleik Asitler. Mustafa Kemal Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Moleküler Biyokimya ve Genetik AD ve Tıbbi Biyokimya AD, Mustafa Kemal Üniv. Tıp Derg, Cilt 4, Sayı 13. Hatay.

Edreva, A. Velikova, V. Tsonev, T. Dagnon, S. Gürel, A. Aktaş, L. Gesheva, E. 2008. Stress-Protective Role of Secondary Metabolites: Diversity of Functions and Mechanisms. Gen. Appl. Plant Physology. Special İssue, 34(1-2): 67-78.

Eldem, V. Akcay, U.C. Özhüner, E. Bakır, Y. Uranbey, S. ve Ünver, T. 2012. Genome-wide identification of miRNAs responsive to drought in peach (Prunus persica) by high-throughput deep sequencing. PLoS ONE, 7, e50298.

Eldem, V. Okay, S. ve Ünver, T. 2013. Plant microRNAs: new players in functional genomics. Turk. J. Agric. For, 37, 1–21.

Eser, B. Saygılı, H. Gökçöl, A. ve İlker, E. 2006. Tohum Bilimi ve Teknolojisi. Ege Üniversitesi Tohum Teknolojisi Uygulama ve Araştırma Merkezi Yayınları, Cilt:1. İZMİR.

Evans, J.D. Thornton, D.L. Branton, S.L. 2009. Diagnosis of Mycoplasma gallisepticum from broiler breeder flock: comparision of three diag-nostic methods. İnternational Journal of Poultry Science, 8, 104-107.

Facchini, P.J. and De Luca, V. 1994. Differential and tissuespecific expression of a gene family for tyrosine/dopa decarboxylase in *Opium poppy*. The Journal of Biological Chemistry, 269,16684–26690

Facchini, P.J. Huber-Allanach, K.L. Tari, L.W. 2000. Plant aromatic L-amino acid decarboxylases, evolution, biochemistry, regulation, and metabolic engineering applications. Phytochemistry, 54,121–138.

Facchini, P.J. 2007. *Opium poppy*, blueprint for an alkaloid factory Phytochem Rev, 6,97–124.

Gibson, U.E. Heid, C.A. Williams, P.M. 1996. A novel method for real-time quantitative RT-PCR. Genome Research, 6, 995-1001.

Griffiths-Jones, S. Saini, H.K. van Dongen, S. and Enright. A.J. 2008. miRBase: tools for microRNAgenomics. Nucl. Acids Res, 36:154-158. [https://www.academia.edu/22799900/MicroRNA_Analizi_ve_Saklanmas%C4

%B1nda_Hesaplamaya_Dayal%C4%B1_Yakla%C5%9F%C4%B1mlar]. Erişim Tarihi: 18.02.2020

Gürkök, E. Parmaksız, İ. Boztepe, G. Kaymak, E. 2010, Haşhaş (*Papaver somniferum* L.) Bitkisinde Alkaloit Biyosentez Mekanizması. Gaziosmanpaşa Üniversitesi. Fen Edebiyat Fakültesi. Biyoloji Bölümü. Biyoteknoloji Elektronik Dergisi, 1(2): 2010 (31-45). Tokat.

Gürkök, T. 2013. Morfin İçeriği İndüklenmiş Haşhaş (*Papaver somniferum* L.) Bitkisinde Genom Düzeyinde Transkriptom Analizi. Gaziosmanpaşa Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Biyoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi. Tokat.

Hagel J.M. ve Facchini P.J.,2013. Benzylisoquinoline Alkaloid Metabolism,A Century of Discovery and a Brave New World. Plant Cell Physiology, 1–26.

İpek, G. 2011. Seçilmiş Yüksek Morfinli Haşhaş (*Papaver somniferum* L.) Hatlarının Bazı Bitkisel ve Tarımsal Özellikleri Üzerine Araştırmalar. Ankara Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Tarla Bitkileri Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi. Ankara.

İnal, B. Türktaş, M. Eren, H. İlhan, E. Okay, S. Atak, M. Erayman, M. ve Ünver, T. 2014. Genome-wide fungal stress responsive miRNA İfade in wheat. Planta, 240, 1287–1298.

İncekara, F. 1972. Endüstri Bitkileri ve Islahı. Yağ Bitkileri ve Islahı. Cilt 2, Ege Üniversitesi Matbaası, S. 198, İzmir.

Kahya, S. Yılmaz, Ö. Carlı, K.T. 2014. Enfeksiyöz Hayvan Hastalıklarının Teşhisinde Gerçek Zamanlı (Real-Time) PCR'ın Geleneksel PCR'a göre Avantajları. Uludağ Üniv. J. Fac. Vet. Med, 32 (2013), 2: 39-44. Bursa.

Kakeshpour, T. Nayebi, S. Monfared, S.R. Moieni, A. and Karimzadeh, G. 2015. Identification and expression analyses of MYB and WRKY transcription factor genes in *Papaver somniferum* L. Physiol Mol Biol Plants, 21(4): 465–478.

Karoğlu, Z. 2012. Karpuzda (*Citrulluslanatus* L.) İzole Edilmiş ERF Transkripsiyon Faktör Genlerinin Karakterizasyonu Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.

Klein, D. 2002. Quantification using real-time PCR technology: Applications and limitations. Trends in Molecular Medicine, 8, 257-260.

Koç, H. Camcı, H. Kadiroğlu, A. ve Gür, K. 2006. Seçilmis Bazı Hashas Hatlarının Morfin Oranları Yönünden Değerlendirilmesi Üzerine Bir Arastırma. Bitkisel Arastırma Dergisi, 1:31-35.

Lee, R.C. Feinbaum, R.L. Ambros, V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin, 14. Cell, 75, 843-854.

Lorenz, R. Bernhart, S.H. Siederdissen, C.Hzu. Tafer, Hakim. Flamm, C. Stadler, P.F. Hofacker, İ. 2011. ViennaRNA Package 2.0. Algorithms Mol Biol, 6, 26. https://doi.org/10.1186/1748-7188-6-26.

Lüleyap Ü. 2008. Moleküler Genetiğin Esasları. Adana Nobel Kitapevi, [www.nobelkitabevi.com.tr]. ISBN: 978-605-397-005-7.Erişim Tarihi: 18.02.2020.

Mackay, I.M. 2004. Real time PCR in the micro-biology laboratory. Clinical Microbiology and Infection, 10, 190-212.

Mastakani, F.D. Pagheh, G. Monfared, S.R. and Bakhsh, M.S. 2018. Identification and İfade analysis of a microRNA cluster derived from pre-ribosomal RNA in *Papaver somniferum* L. and *Papaver bracteatum* L. PLoS One, 13(8): e0199673.

Mhlanga, M.M. Malmberg, L. 2001. Using Mo-lecular beacons to detect single-nucleotide poly-morphisms with real-time PCR. Methods, 25, 463-471.

Morishige, T. Tsujita, T. Yamada, Y. Sato, F. 2000. Molecular characterization of the S-adenosyl-L-methionine,3_-hydroxy-N-methylcoclaurine4-O-methyltransferase

involved in isoquinoline alkaloid biosynthesis in Coptis japonica. The Journal of Biological Chemistry, 275,23398–405.

Okutucu, B. Ve Pehlivan, S. 2003. Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) ve Uygulama Alanları. Ege Üniversitesi. Fen Fakültesi. Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Bölümü. 12:138. İzmir.

Öner, C. Sümer, S. Öner, R. Öğüş, A. Açık, L. 2011 Genetik Kavramlar Palme Yayıncılık.

Özcan, G.S. 2013. Bütünleştirici Modül Ağlarıyla Gen Düzenleme Analizi. Başkent Üniversitesi. Bilgisayar Mühendisliği Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi. Anakara.

Park, S.U. Johnson, A.G. Penzes-Yost, C. Facchini, P.J. 1999. Analysis of promoters from tyrosine/dihydroxyphenylalanine decarboxylase and berberinebridge enzyme genes involved in benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy. Plant MolecularBiology, 40,121–131.

Rueffer, M. Zenk, M.H. 1987. Distant precursors of benzylisoquinoline alkaloids and their enzymatic formation. Z. Naturforsch, 42,319–332.

Samanani, N. Facchini, P.J. 2001. Isolation and partial characterization of norcoclaurine synthase, the first committed step in benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis, from opium poppy. Planta, 213,898–906.

Seefried, W.F. Willmann, M.R. Clausen, R.L. and Jenik, P.D. 2014. Global regulation of embryonic patterning in Arabidopsis by microRNAs. Plant Physiol, 165, 670–687.

Soyacak, A. 2018. MikroRNA Polimorfizmleri ve Kanser. İstanbul Aydın Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD. Tıp Fakültesi Klinikleri, 1(1):1-18. İstanbul.

Stadler, R. Kutchan, T.M. Loeffler, S. Nagakura, N. Cassels, B. Zenk, M.H. 1987. Revision of the early steps of reticuline biosynthesis. Tetrahedron Letters, 28,1251–1254.

Stadler, R, Kutchan, T.M. Zenk, M.H. 1989. Norcoclaurine is the central intermediate in benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis.Phytochemistry, 28,1083–1086.

Tanker, N. Koyuncu, M. ve Coşkun, M. 2007. Farmasötik Botanik II (III. Baskı). Ankara Ünv. Ecz. Fak. Yay. Yay, No:93, 397s, Ankara.

Tufan, T. 2013. Transkripsiyon Faktörleri ve Evrim**.** **[https://evrimagaci.org/transkripsiyon-faktorleri-ve-evrim-1637].** Erişim Tarihi: 17.02.2020.

Turner, P.C. McLennan, A.G. Bates, A.D. White, M.R.H. 2004. Moleküler Biyoloji. Önemli Notlar. Editör: M. Konuk.2. Baskıdan çeviri. Nobel Yayınları.

Ünay, A. 2004. Ürün Fizyolojisi Ders Notları. Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın.

Valasek, M.A. Repa, J.J. 2005. The power of real-time PCR Advances in Physiology Educa-tion, 29, 151-159.

Yamada, Y. Sato, F. 2013. Transcription Factors in Alkaloid Biosynthesis. Department of Plant Gene and Totipotency, Graduate School of Biostudies, Kyoto University, Kitashirakawa, Sakyo, Kyoto, International Review of Cell and Molecular Biology, Volume 305. ISSN 1937-6448. Japan.

Yanik, H. Turktas, M. Dundar, E. Hernandez, P. Dorado, G. and Unver, T. 2013. Genome-wide identification of alternate bearing-associated microRNAs (miRNAs) in olive (Olea europaea L.). BMC Plant Biol, 13, 10–31.

Yıldırım, A. Bardakçı, F. Karataş, M. Tanyolaç, B. 2007. Moleküler Biyoloji. Protein Sentezi ve Yıkımı. Nobel Yayınları. Fen ve Biyoloji Yayınları Dizisi, 39. ISBN 978-9944-77-184-9. Ankara.

Ziegler, J. Diaz-Ch´avez, M.L. Kramell, R. Amer, C. Kutchan, T.M. 2005. Comparative macroarray analysis of morphine containing Papaver somniferum and eight morphine free Papaver species identifies an O-methyltransferase involved in benzylisoquinoline biosynthesis. Planta, 222,458–71.

Ziegler, J. and Facchini, P. 2008. Alkaloid Biosynthesis,Metabolism and Trafficking Annual Review of Plant Biology, 59,735–69.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Reyhan BAŞ

Doğum Tarihi ve Yeri: 1989/ ÇANKIRI

Yabancı Dili: İngilizce

Telefon: 05412551818

e-mail: reyhanbas89@gmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilimi, Moleküler Biyoloji	2020
Lisans	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü	2018
Önlisans	Başkent Üniversitesi SHMYO Patolojik Anatomi	2010
Lise	Çankırı Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi	2008

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2015-……..	Çankırı Devlet Hastanesi	Patoloji Teknikeri
2011-2015	Konya Eğitim Araştırma Hastanesi	Patoloji Teknikeri