

Patates (*Solanum Tuberosum*) Bitkisindeki Aromatik Amino Asit Metabolik Yolağının Biyoinformatik Yaklaşımlarla İncelenmesi

Fırat KURT¹, Barış KURT², Nurettin BARAN^{3*}, Ertuğrul FİLİZ⁴, İhsan TUĞAL⁵, Yaşar KARADAĞ⁶, Fuat YETİŞİN⁷

^{1,3,6}Bitkisel Üretim ve Teknolojileri Bölümü, Uygulamalı Bilimler Fakültesi, Muş Alparslan Üniversitesi, 49000, Muş

²Matematik Bölümü, Eğitim Fakültesi, Muş Alparslan Üniversitesi, 49000, Muş

⁴Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü, Çilimli Meslek Yüksek Okulu, Düzce Üniversitesi, Çilimli, 81750, Düzce

⁵Bilgisayar Mühendisliği Bölümü, Mühendislik Fakültesi, Muş Alparslan Üniversitesi, 49000, Muş

⁷Organik Tarım Bölümü, Teknik Bilimler Meslek Yüksek Okulu, Muş Alparslan Üniversitesi, 49000, Muş

¹<https://orcid.org/0000-0003-0172-1953>

²<https://orcid.org/0000-0002-1406-0915>

³<https://orcid.org/0000-0003-2212-3274>

⁴<https://orcid.org/0000-0001-9636-6389>

⁵<https://orcid.org/0000-0003-1898-9438>

⁶<https://orcid.org/0000-0002-0523-9470>

⁷<https://orcid.org/0000-0001-6085-7610>

*Sorumlu yazar: n.baran@alparslan.edu.tr

Araştırma Makalesi

Makale Tarihiçesi:

Geliş tarihi: 20.06.2022

Kabul tarihi: 03.12.2022

Online Yayınlanma: 05.07.2023

Anahtar Kelimeler:

Aromatik amino asit yolağı

Patates

Biyoinformatik

ÖZ

Aromatik amino asitler (AAA) şikimat metabolik yolu ile elde edilirler ve protein sentezinden sonra çeşitli ikincil metabolitler olan pigmentler, alkaloidler, hormonlar ve hücre duvarı parçaları gibi öncü maddelerin sentezinde kullanılmaktadırlar. AAA olan L-Trp, L-Phe ve L-Tyr amino asitleri korizmatan şikimat metabolik yolunun sonunda meydana gelmektedirler. Bu amino asitler özellikle K1 ve B9 vitaminleri ile bitki savunma sisteminin önemli bir parçası olan salisilik asitin öncü maddeleridirler. AAA'ler hayvan hücrelerinde sentezlenemediğinden bitkisel kaynaklı yiyeceklerden karşılanması gerekmektedir. AAA ve türevlerinin bu önemli fonksiyonlarına rağmen, mikrobiyal çalışmalar dışında AAA metabolik yolu ve bu amino asitlerin bitkilerdeki düzenlenme mekanizması üzerine son derece sınırlı çalışmalar yapılmıştır. Bu nedenle bu çalışmada patates (*Solanum tuberosum*) bitkisinde AAA'lerin sentez mekanizmasında yer alan bazı genlerin hangi genlerle ilişkili olduğu dolayısıyla nasıl düzenlendiği biyoinformatik yaklaşımlarla incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda AAA yolağındaki en önemli gen olan korizmat geni ile patates bitkisinde yer alan yaklaşık 39000 gen arasındaki ilişki ko-ekspresyon ağı ile belirlenmeye çalışılmıştır. Çalışma sonuçları şikimat yolağının anlaşılmasına katkı sunmaktadır.

The Investigation of Aromatic Amino Acid Pathway in Potato (*Solanum tuberosum*) Using Bioinformatics Approaches

Research Article

Article History:

Received: 20.06.2022

Accepted: 03.12.2022

Published online: 05.07.2023

Keywords:

Aromatic amino acid pathway

ABSTRACT

AAA is produced by shikimate metabolic pathway and is used in the synthesis of various proteins, secondary metabolites, such as pigments, alkaloids, hormones and cell wall fragments. The amino acids L-Trp, L-Phe and L-Tyr AAA are synthesized from chorismate, a protein at the end of shikimate metabolic pathway. These amino acids are specific K1 and B9 vitamins and precursors of salicylic acid, an

important part of the plant defense system. AAA's cannot be synthesized in animal cells; therefore, they have to be taken from plant-derived foods. Despite these important functions of AAA and its derivatives, other than microbial studies, very few studies have been conducted on AAA metabolic pathway, and their regulation mechanism in the plants. Therefore, in this study, genes interacting with chorismate in AAA pathway was identified by correlating all genes within the genome. The results are of importance to contribute for understanding of shikimate pathway in potato.

To Cite: Kurt F., Kurt B., Baran N., Filiz E., Tuğal İ., Karadağ Y., Yetişsin F. Patates (*Solanum Tuberosum*) Bitkisindeki Aromatik Amino Asit Metabolik Yolağının Biyoinformatik Yaklaşımlarla İncelenmesi. Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 2023; 6(2): 1205-1220.

Giriş

Patates bitkisi patlıcangiller (*Solanaceae*) familyasına ait tek yıllık, heterozigot tetraploid ($2n=4x=48$)'dir. Bu bitki ilk olarak süs bitkisi sınıfından değerlendirilmiş olup daha sonrasında insanların temel beslenmesinde oldukça önemli bir yer edinmiştir (Çakır, 2005; Öztürk, 2010; Er ve ark., 2018; Oğuz ve Yücel, 2020; Dumanoglu ve Öztürk, 2021). Patates, dünya genelinde buğday, çeltik ve mısırdan sonra en fazla üretimi yapılan bitkidir (Arvas ve ark., 2018).

Patates yetiştiriciliği yapan üreticiler ilk olarak verim, taze pazar temini, kalite yükseltme, koruma ve depolama özelliklerine yoğunlaşmışlardır. Bu özellikler yapılmasının yanı sıra patates bitkisinde oluşan hastalıklara çözüm bulmak için çalışmalarda bulunmuşlardır. Bu bitkinin fazla sayıda yabancı türü bulunmasından dolayı kültürü yapılan çeşitlerde genetik çeşitlilik ve dayanıklılık ıslah çalışmaları ile karşılanmaktadır. Bu durum sonucunda fazla kaynak olmasıyla birlikte hastalık direnci ve yumru kalitesini artırmak gibi alanlarda olumlu yönde ilerlemeler kaydedilmiştir (Jansky, 2000).

Patates genomu 2011 yılında International Potato Genome Sequencing Consortium (PGSC) tarafından genom dizilemesi yapılarak kullanıma sunulmuştur. Bu çalışmanın bir sonucu olarak 39.031 genin tanımı yapılmış ve genomun %86'sı haritalanmıştır (SpudDB, 2018).

Bitkilerde amino asit metabolizması karbonhidrat metabolizması, amonyum ve ikincil metabolitlerle sıkı bir şekilde ilişkilidir (Zandalidas ve ark., 2018). Amino asit biyosentezinde karbonhidrat metabolizmasında ve amino asitlerin parçalanmasından elde edilen bileşikler sitrik asit döngüsünde enerji kaynağı olarak kullanılacak çeşitli metabolitlerin oluşmasına neden olur (Zandalidas ve ark., 2018). Genel olarak glutamin (Glu-Q) sentezi inorganik azotun organik moleküller haline çevrildiği tek reaksiyondur. Bu bağlamda Glu ve onun muadili sayılabilecek glutamik asit (Glu-E) bütün azotlu bileşiklerin asimilasyonunda karşılaşılan ortak maddelerdir (Wykes ve ark., 1992). Baklagil olmayan bitkilerde azot asimilasyonu inorganik azotun, nitrat veya amonyum formunda topraktan alınmasıyla başlar. Nitrat şeklindeki azot alımı daha sonra amonyuma (NH_4^+) indirgenir. İndirgenme işleminde genellikle nitrat redüktaz ve nitrit redüktaz enzimleri görev alırlar. Meydana gelen amonyum, daha sonra glutamat veya glutamine şeklinde organik forma çevrilir. Glutamin amino asiti veya glutamin tuzu olan glutamat bitki bünyesinde bütün amino asitlerin sentezinde azot kaynağı olarak kullanılırlar (Oliveira ve ark., 2001).

Amino asit sentezinde kullanılan substratlar glikoliz, sitrik asit döngüsü ve pentoz fosfat metabolik yollarında ortaya çıkan ara ürünlerden sentezlenirler. Bu bağlamda, fosforibozilpirofosfat ve eritroz 4 fosfat, pentoz fosfat metabolik yolundan elde edilirler ve histidin (His, H) ile aromatik amino asitlerin (AAA) sentezinde (Fenilalanin-Phe-F, Tirozin-Tyr-Y ve Tiroptofan-Trp-W) kullanılırlar. Glikolizden elde edilen fosfoenol pürivat, aromatik amino asit sentezinde; pürivat, dallı-amino asit sentezinde (Valin-Val-V, Lösin-Leu-L) ve alanin (Ala-A) sentezinde kullanılırlar. Glikolizden elde edilen 3 fosfogliserat glisin, sistein ve serin (sırasıyla Gly-G, CyC, Ser-S) sentezinde kullanılırken; aspartik asitten (Asp-D) elde edilen asparjin, lizin, teronin, metionin ve izolisin (Asn-N, Lys-K, Thr-T, Met-M, and Ile-I) sentezinde kullanılmaktadır (Reeds, 2000). AAA olan L-Trp, L-Phe ve L-Tyr amino asitleri korizmattan şikimat metabolik yolunun sonunda meydana gelmektedirler. Hayvanlar (tek mideli çiftlik hayvanları ve insanlar dahil) AAA'ları sentezleyemez çünkü şikimate yolu metabolizmalarının bir parçası olmadığı için ama mantarlar, bakteri ve bitkiler AAA üretmektedir (Tohge ve ark., 2013). AAA'ların üretiminin ilk aşaması olan şikimat yolu, merkezi karbon metabolizmasını AAA'ların biyogenerasyonu ile ilişkilendirip yedi aşamalı bir reaksiyon yoluyla gerçekleşmektedir (Tzin ve Galili, 2010; Tohge ve ark., 2013; Filiz ve ark., 2019). AAA asitler ve türevleri çeşitli bitki türlerinin varlığını sürdürmeleri için antioksidant, böcek çekiciler ve savunma bileşikler olarak kullanılmaktadır (Rice-Evans ve ark., 1997). Bu bileşikler aynı zamanda endüstriyel ve eczacılık (izoquinolin, tropan aloloidleri) ürün üretiminde, besin elementleri olarak (E vitamini) sıklıkla kullanılmaktadır (Kutchan, 1995). AAA sentezi şikimat reaksiyonlarının bir sonucu olarak meydana gelir (Kaplan ve ark., 2004). Bu metabolik yolda fosfoenolpürivat (PEP) ve D-eritroz 4-fosfat (E4P) ve bunların glikolizdeki ara ürünleri pentoz fosfat metabolik yoluyla birlikte korizmata çevrilir. Korizmat, AAA'ların öncü maddesi olarak saptanmıştır (Bentley, 1990). Şikimat reaksiyonu ismin ilk tespit edildiği bitki olan *Illicium religiosum* (Japon yıldızı anasonu)'ndan almaktadır (Crone ve ark., 2005). 3-deoksi-D-arabino-heptülozanat 7-fosfat (DAHP) şikimat metabolik yolunda görev alır ve PEP ve E4P'ın DAHP'a çevrilmesi ile başlatır. Bu olayda görev yapan DAHP enzimeri Mn^{+2} veya Co^{+2} metal katyonlarına sahiptirler (Lightfoot ve ark., 1988). Bütün DAHP enzimleri β/α fiçı monomer yapısına sahiptirler (Hughes ve ark., 2004). Çevresel küçük domainlerinde geniş bir çeşitlilik gösterirler ve bu küçük domainler, AAA'lerin allosterik regülasyon ile düzenlenmesinden sorumludurlar. DAHP sentetazlar iki farklı grup altında (tip1 ve tip2) sınıflandırılmaktadırlar. Bu sınıfların sekans kimlikleri %10'dan daha azdır (Bentley, 1990). Bu iki farklı grup DAHP enzimleri farklı olarak AAA bağlanma domainleri ve merkezi fiçı yapısı içerirler (Webby ve ark., 2005).

AAA meydana gelme sürecindeki Şikimat metabolik yolundaki üçüncü ve dördüncü enzimatik reaksiyonlar 3- dehidrokinatın 3-dehidroşikimat dehidrasyonudur. Bu reaksiyon sonucunda NADPH kullanılarak 3-dehidroşikimatın tersinebilir indirgenmesi ve ilk çift bağın meydana gelmesi sağlanır. Böylece şikimat meydana gelir (Sieber ve ark., 2005). Şikimat kinaz (ŞK), şikimatın C3 hidroksil grubundaki fosforilasyonu kontrol etmektedir. Bu olay esnasında ATP kullanarak şikimat 3-fosfatı meydana getirmek için ayrıca ortak substrat olarak görev almaktadır. Şikimat kinazın aktif olabilmesi

için Mg⁺² veya Mn⁺²'ye ihtiyaç duyulmaktadır. Bu divalent iyonlar merkez, kapak, şikimat bağlanma ve nükleotid bağlanma domainlerinden meydana gelmektedir. Bahsi geçen bu domainler sayesinde şikimat ve ATP bağlanması, önemli konformasyonel değişikliklere neden olmaktadır (Doong ve ark., 1992). Şikimat kinaz genellikle enerji gerektiren şikimat metabolik yolunda ve hücrel enerji balanslarının bitkilerde sürdürülmesinde düzenleyici bağlantılar olarak görev almaktadırlar. Şikimat metabolik yolundaki sondan bir önceki basamak olan 5-enolpürivilşikimat 3-fosfat (EPSP)'in meydana gelmesi, EPSP sentaz enzimine bağlıdır. Bu reaksiyonda PEP'in enolpürivil fonksiyonel grubu, şikimat 3-fosfatın 5- hidroksil pozisyonuna transfer edilir. Sonunda C3 enolpürivil birimi, Phe ve Tyr amino asitlerinin yan zincirleri haline gelir ve Trp'nin biyosentezi sürecinde bu amino asitlerden ayrılır. (Schönbrunn ve ark., 2001). Şikimat 3-fosfat'ın EPSP'ye bağlanması sonucu bu enzimin konformasyonu değişir ve domainler arasında enzimin aktif bölgesi oluşur. Bu bölge genellikle geniş spektrumlu bir yabancı ot öldürücüsü olan ve ticari olarak Roundup denen glifosatin hedefidir (Schönbrunn ve ark., 2001).

Korizmat sentaz (CS) şikimat metabolik yolunun son reaksiyonudur. Bu metabolik yol, özellikle Trp, Phe, Tyr, salsilat, filokinon ve folat sentezleri için gereklidir. Bununla birlikte antralinat sentaz, izokorizmat sentaz, aminodeoksikorizmat sentaz ve korizmat mutaz belirtilen amino asit ve maddelerin üretiminde görev alırlar (Radwanski ve Last, 1995; Razal ve ark., 1996; Rippert ve Matringe, 2002). Bu amino asitler özellikle K1 ve B9 vitaminleri ile bitki savunma sisteminin önemli bir parçası olan salisilik asitin öncü maddeleridirler ve protein sentezinden çeşitli ikincil metabolitler olan pigmentler, alkaloidler, hormonlar ve hücre duvarı parçaları gibi öncü maddelerin sentezinde kullanılmaktadırlar. Ayrıca, AAA'ler hayvan hücrelerinde sentezlenemediğinden bitki kaynaklı yiyeceklerden karşılanması gerekmektedir. AAA ve türevlerinin bu önemli fonksiyonlarına rağmen, mikrobiyal çalışmalar dışında AAA metabolik yolu ve bu amino asitlerin bitkilerdeki düzenlenme mekanizması üzerine son derece sınırlı çalışmalar yapılmıştır. Mevcut çalışma ile patates (*Solanum tuberosum*) bitkisinde AAA'lerin sentez mekanizmasının düzenlenmesindeki en önemli gen olan korizmatın genom içerisindeki etkileşimi biyoinformatik yöntemlerle belirlenmiştir.

Materyal ve Metot

AAA yolağındaki dizilerin bulunması ve dizi analizleri

Aromatik amino asit yolağında bulunan antralinat sentaz, arogenat dehidrataz, arogenat dehidrogenaz, aromatik aminotransferaz, korizmat mutaz, korizmat sentaz ve triptofan sentaz genleri uniprot (<https://www.uniprot.org>) (Consortium, 2019) sitesinde aranmış ve *Arabidopsis* bitkisindeki karşılıkları bulunmuştur. Daha sonra karşılıkları bulunan bu genler Phytozome veritabanında bulunan patates bitkisindeki genlere karşı Blast edilmiştir (Goodstein ve ark., 2012). Ayrıca bu veritabanından enzimlerin hangi kromozom üzerinde yer aldıkları, dizi uzunlukları ve ekzon sayıları belirlenmiştir. Daha sonra bulunan dizilerin protein domainleri Pfam veritabanında (Sonnhammer ve ark., 1997) analiz edilerek protein domainleri bulunmuştur. Bunun yanısıra çalışmada kullanılacak genlerin

izoelektrik noktaları ve moleküler ağırlıkları tespit edilmiştir (Gasteiger ve ark., 2005). Hücre içerisinde AAA proteinlerinin lokalizasyonu WolfPsort sunucusu ile belirlenmiştir (Horton ve ark., 2007).

Protein modellerinin yapılması ve model kalitelerinin saptanması

AAA yolağında belirlenen genlerin modellenmesi MODELLER (Webb ve Sali, 2016) yazılımında yapılmıştır. Ancak bu işlemde HHPred server kullanılarak gerekli dosyalar oluşturulmuştur (Zimmerman ve ark., 2018). Daha sonra model kalitelerinin saptanması için Ramachandran çizelgeleri oluşturulmuş ve bu çizelgelere bağlı olarak peptit zincirindeki ikincil yapıların yüzdesel oranları VADAR (Willard ve ark., 2003) sunucusu üzerinde hesaplanmıştır.

Aromatik amino asit yolağı üzerindeki genlerin ko-ekspresyon haritalarının oluşturulması

Bu işlemin yapılabilmesi için Gene Expression Omnibus (GEO Datasets, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds>) adı verilen sitede dünyadaki bütün araştırmacıların kullanımına açılmış Patates Genom Dizilime Kosorsiyumu tarafından üretilen RNA-Seq verisi (Xu ve ark., 2011) kullanılmıştır. Patates genomunda yer alan 39000 genin analizi excel veya benzer bir programda mümkün olmadığından yazılım dili kullanılarak korelasyon matrisleri genomdaki her bir gen için ayrı ayrı oluşturulmuştur. Bu bağlamda genler Python (Piton) programında analiz edilmiştir (Rossum ve ark., 1995). Proje çerçevesinde satın alınan Workstation'da (192 RAM) bütün ilgilene genleri görüntülemek mümkün değildir. Belirtilen RAM değerinde bile yalnızca 1000-1500 genin görüntülenmesi ve analizi yapılabilmektedir. Bu nedenle analiz sonuçları içerisinde izlenen her bir gene ait data excel dosyasına aktarılmış ve daha sonra Cytoscape programı kullanılarak görselleştirilmesi sağlanmıştır (Shannon ve ark. 2003).

Protein KEGG yolaklarının bulunması

Amino asit yolağı üzerinde bulunan proteinlerin anotasyonları Ensembl-Biomart sunucusu kullanılarak yapılmıştır (Kinsella ve ark., 2011). Her bir gen patates bitkisinde yer alan genlerle eşleştirilmiş ve elde edilen sonuçlara göre gen kodları, gen tanımları ve varsa yer aldıkları KEGG yolakları belirlenmiştir.

Bulgular ve Tartışma

AAA yolağındaki dizilerin özellikleri

AAA yolağında yer alan genlerin belirlenmesinde son derece katı olan E=0 değeri kullanılmıştır. Bunun sonucu olarak antralinat sentaz (StAS), arogenat dehidrataz (StADT), arogenat dehidrogenaz (StTYRA), aromatik amino transferaz (StISS1), korizmat sentaz (StCS), korizmat mutaz (StCM) ve triptofan sentaz (StTS) proteinlerinin ortologları bulunmuştur.

İlgili proteinleri kodlayan genlerin genel olarak dördüncü, altıncı, yedinci ve 10. Kromozomların üzerinde yer aldıkları belirlenmiştir. AAA genlerinin ekzon sayıları büyük bir varyasyon göstermekte ve 1, 5, 6, 11, 13 ve 15 farklı ekzondan meydana geldikleri bulunmuştur. Peptit zinciri uzunluklarının ise 401-587 arasında değiştiği ve genel olarak izoelektrik özelliklerinin hafif asidik bir karakterde olduğu saptanmıştır. Bu bağlamda hafif alkali bir yapıya sahip olan korizmat sentazın diğer proteinlerden ayrıldığı gözlemlenmiştir. Hücre içerisindeki lokalizasyonları açısından AAA proteinleri sitoplazma, kloroplast veya mitokondri de yer almaktadırlar. Proteinlerin moleküler ağırlıklarının da peptit dizilerinin uzunluklarına paralel olarak 44717.94-65506.91 da arasında değişmektedir (Tablo 1). Elde edilen bu sonuçlara göre proteinlerin AAA metabolik yolağında yer aldıkları hücrel lokalizasyona ve etkileştikleri proteinlerin yer aldıkları spesifik yollarına göre farklı özelliklere sahip oldukları gözlenmiştir.

Tablo 1. Aromatik amino asit yolağında bulunan genlerinin özellikleri

UniProt Kodu	Patates Orthologları	Kromozom Numarası	AA	Ekon Sayısı	İzoelektrik Noktası	Moleküler Ağırlık (da)	Lokalizasyon	Pfam Kodu
P32068	PGSC0003DMT400010634 Anthranilate synthase alpha subunit	6	587	11	6.41	65506.91	Kloroplast	PF00425 PF04715
P32069	PGSC0003DMT400051367 Feedback-insensitive anthranilate synthase alpha-2 chain	6	535	9	6.02	60372.94	Kloroplast	PF00425 PF04716
Q9ZUY3	PGSC0003DMT400018339 Arogenate dehydratase	6	433	1	6.71	47245.75	Kloroplast	PF00800
P57720	PGSC0003DMT400062680 Chorismate synthase 1, chloroplastic	4	441	13	6.84	47759.08	Kloroplast	PF01264
	PGSC0003DMT400041351 Chorismate synthase 2, chloroplastic	4	435	13	7.59	47231.58	Kloroplast	PF01264
P14671	PGSC0003DMT400002722 (İz-1) Tryptophan synthase beta subunit	7	456	5	6.47	49617.61	Mitokondri	PF00291
	PGSC0003DMT400037303 (İz-2) Tryptophan synthase beta subunit	10	410	5	5.94	44717.94	Sitoplazma	PF00291
	PGSC0003DMT400002721 (İz-3) Tryptophan synthase beta subunit	7	401	5	6.02	43594.46	Mitokondri	PF00291
	PGSC0003DMT400029363 Tryptophan synthase beta chain	10	459	6	6.63	50013.3	Kloroplast	PF00291

*İz=İzomer

Aromatik amino asit yolağındaki genlerin tersiyer yapılarının oluşturulması ve model kalitelerinin belirlenmesi

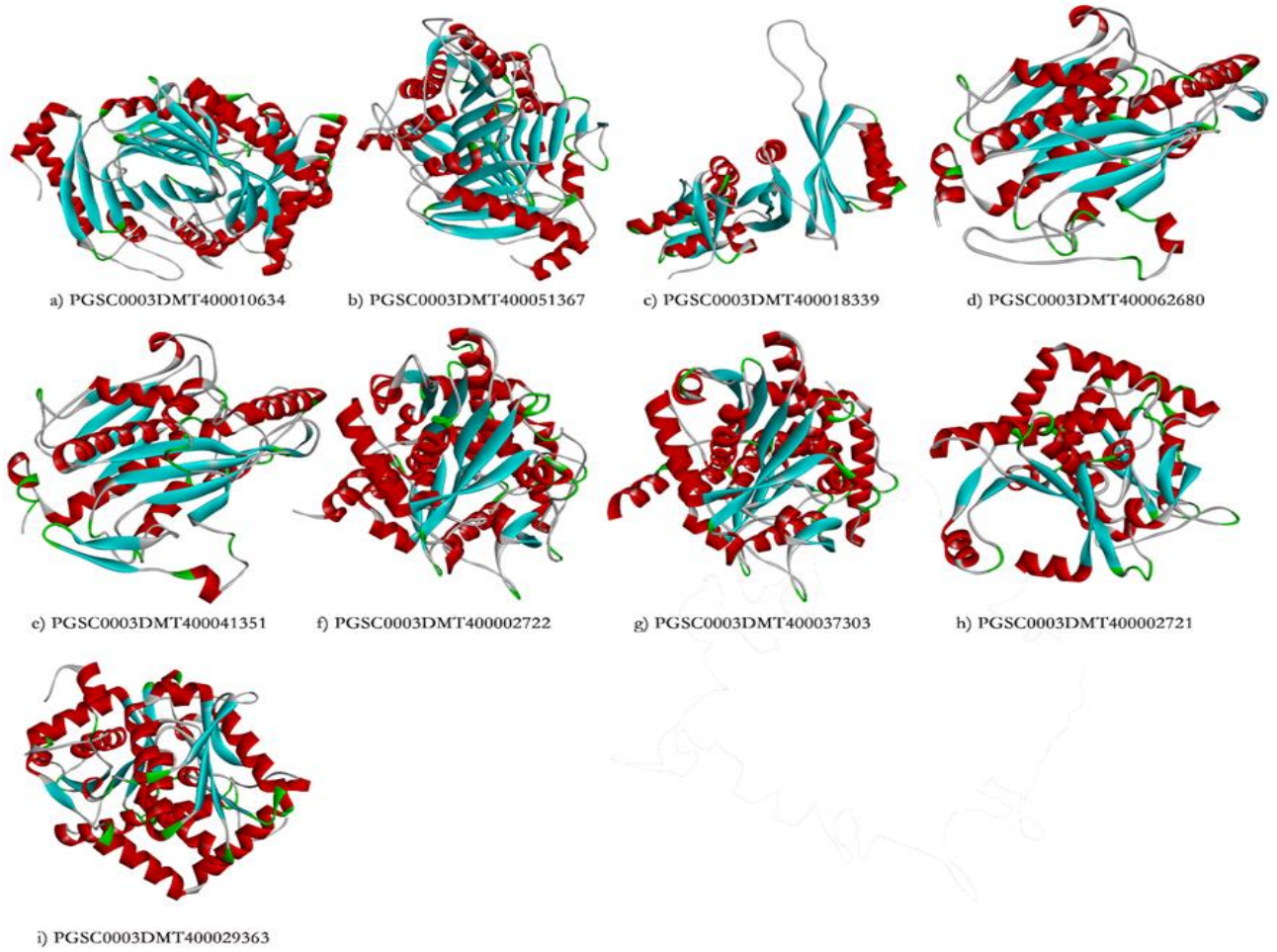
AAA yolağında belirlenen genlerin faşta formatı şeklindeki amino asit kodları modeller programı kullanılarak PIR dosyaları oluşturulmuş ve daha sonra bu dosyalar, PDB database (Webb ve Sali, 2016; Zimmerman ve ark., 2018) yer alan ve her bir gen ile maksimum blast skoru veren 3 boyutlu proteinler referans alınarak modellenmiştir. Modelleme işlemi bitirildikten sonra VADAR server kullanılarak proteinlerin ikincil yapılarında yer alan “ikincil elementler” yüzde olarak hesaplanmış ve model kaliteleri yüzde olarak belirlenmiştir. Buna göre AAA yolağındaki seçilmiş genlerin model kaliteleri Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. AAA proteinlerinin ikincil elementlerinin özellikleri ve tersiyer model kaliteleri

	Heliks	Beta Tabaka	Büküm	Dönüş	Ramachandran
PGSC0003DMT400002721	44	24	31	72	98
PGSC0003DMT400002722	42	24	32	21	97
PGSC0003DMT400010634	31	37	30	10	96
PGSC0003DMT400018339	28	41	29	10	97
PGSC0003DMT400029363	44	25	30	14	98
PGSC0003DMT400037303	46	24	29	19	98
PGSC0003DMT400041351	30	27	42	17	95
PGSC0003DMT400051367	27	40	31	11	94
PGSC0003DMT400062680	28	27	43	16	98

Araştırma kapsamında incelenen aromatik amino asitlerin ikincil yapıları alfa heliks yapısı için 27-44 %, beta tabakalar için %24-40, bükümler için %29-43 ve dönüşler için % 10-72 arasında değiştiği görülmüştür. İkincil elementlerde görülen farklılıklar proteinlerin farklı metabolik işlevlerde görev aldığı göstermektedir.

Şekil 1’de AAA yolağında yer alan proteinlerin modelleri görülmektedir. Modeller yazılımı kullanılarak oluşturulan modellerin model kaliteleri Ramachandran çizelgesine göre ilgili proteinlerin üçüncül yapılarının kaliteleri %94-98 arasında değişmektedir. Bu durum protein model kalitelerinin oldukça yüksek olduğunu göstermektedir.



Şekil 1. AAA yolağında bulunan genlerin 3D modelleri. Antranilat sintaz alfa, antranilat sintaz alfa alt zincir 2, Arogenat dehidrogenaz, korizmat sintaz 1, korizmat sintaz 2, triptofan sintaz izoform 1, triptofan sintaz izoform 2, triptofan sintaz izoform 3, triptofan sintaz beta zinciri sırasıyla a, b, c, d, e, f, g, h ve i harfleriyle gösterilmiştir.

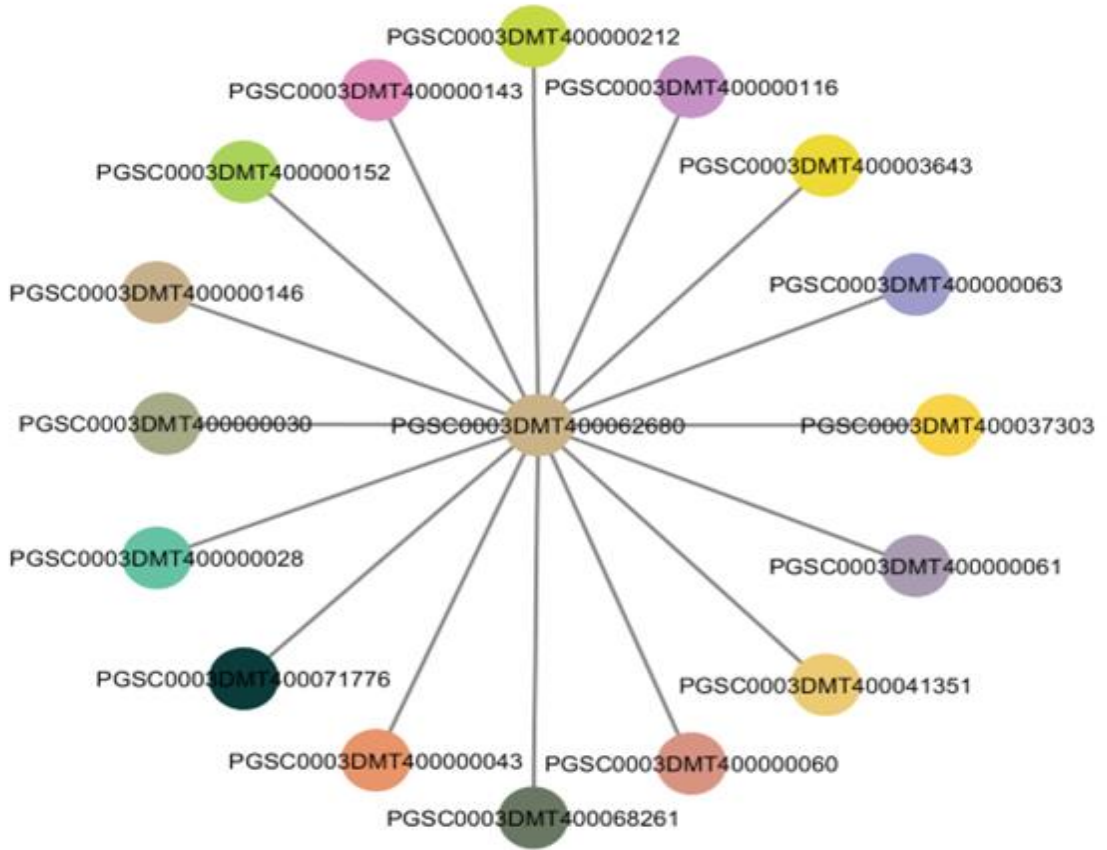
Korizmat genine ait ko-ekspresyon ağlarının oluşturulması

Bu işlemin yapılabilmesi için Gene Expression Omnibus (GEO Datasets. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds>) adı verilen sitede dünyadaki bütün araştırmacıların kullanımına açılmış Patates Genom Dizilime Kosorsiyumu tarafından üretilen RNA-Seq verisi (Xu ve ark., 2011) kullanılmıştır. Belirtilen data 3 farklı bölümden oluşmaktadır: Hormon uygulamaları (İndol Asetik Asit veya IAA, Giberellik Asit veya GA3, Absisik Asit veya ABA, 6-Benzil amino pürin veya BAP), abiyotik stres (kuraklık, tuzluluk ve sıcaklık stresi) ve son olarak β -aminobutrik asit veya BABA ve asibenzolar-s-methyl veya BTH). Mevcut datanın sadece hormon uygulaması ile ilgili olan kısmı araştırmada kullanılmıştır. Hormon uygulamasına tepki vermeyen 12.856 gen değerlendirmeye alınmamıştır. Geri kalan 26.145 gen Piton yazılımı kullanılarak korelasyon analizine tabi tutulmuştur (Rossum ve ark., 1995). Elde edilen sonuçlar, ilgilenilen genler için %99 düzeyinde seçilerek excel dosyası olarak kaydedilmiş ve Cytoscape programı kullanılarak görselleştirilmiştir (Shannon ve ark., 2003). Hormonlara bağlı olarak regüle olan genler araştırmanın kapsamında olmadığı için araştırmaya dahil edilmemiştir. Bu bağlamda korelasyon katsayısına bağlı olarak (%99) bulunan bütün genlerden

en yüksek korelasyon gösteren 15 genin AAA yolağı üzerinde seçilmiş olan genlerle korelasyonuna göre değerlendirme yapılmıştır.

Korizmat Sentaz 1 (PGSC0003DMT400062680)

Korizmat sentaz geni %90 düzeyinde 15097 gen ile pozitif etkileşimde bulunmaktadır. %99 düzeyinde 4391 genle ilişkili bulunmuştur. Bu gen kümesinde hedef gen ile en fazla korelasyon skoru gösteren 15 gene ait ekspresyon verisi ve korelasyon verisi kullanılarak Şekil 2'deki gibi aşağıda görülen ko-ekspresyon haritası çizilmiştir.



Şekil 2. Korizmat Sentaz 1 geninin ko-ekspresyon ağı

Korizmat Sentaz 1 geni ile etkileşen genlerin tanımları ve yer aldıkları olası enzim yolları Tablo 3'te görüldüğü gibi belirlenmiştir. Korizmat Sentaz 1 geninin AAA yolağında yer alan "giriş" geni olduğundan özellikle bu grup içerisinde yer alan genlerin enzim tanımlarının da diğer gruplara göre daha fazla yapıldığı gözlenmiştir. Bununla birlikte, ilgili genin en yüksek korelasyon skoru ile eşleştiği ilk üç genin yine AAA yolağındaki anahtar genler oldukları gözlenmektedir. Diğer ilginç bir ayrıntı ise söz konusu genin çeşitli transkripsiyon faktörü niteliğindeki genleri aktive edici göstermesidir. Bu durum muhtemelen AAA yolağında yer alan ve yolaktaki diğer genlerle etkileşimde bulunan genlerle eşgüdüm içerisinde çalışacak olan genlerdir. Spesifik olarak transkripsiyon faktörü olarak görev yapan bu genlerin gen susturma yöntemi ile susturulması bu genlerin olası hedefleri hakkında bilgi

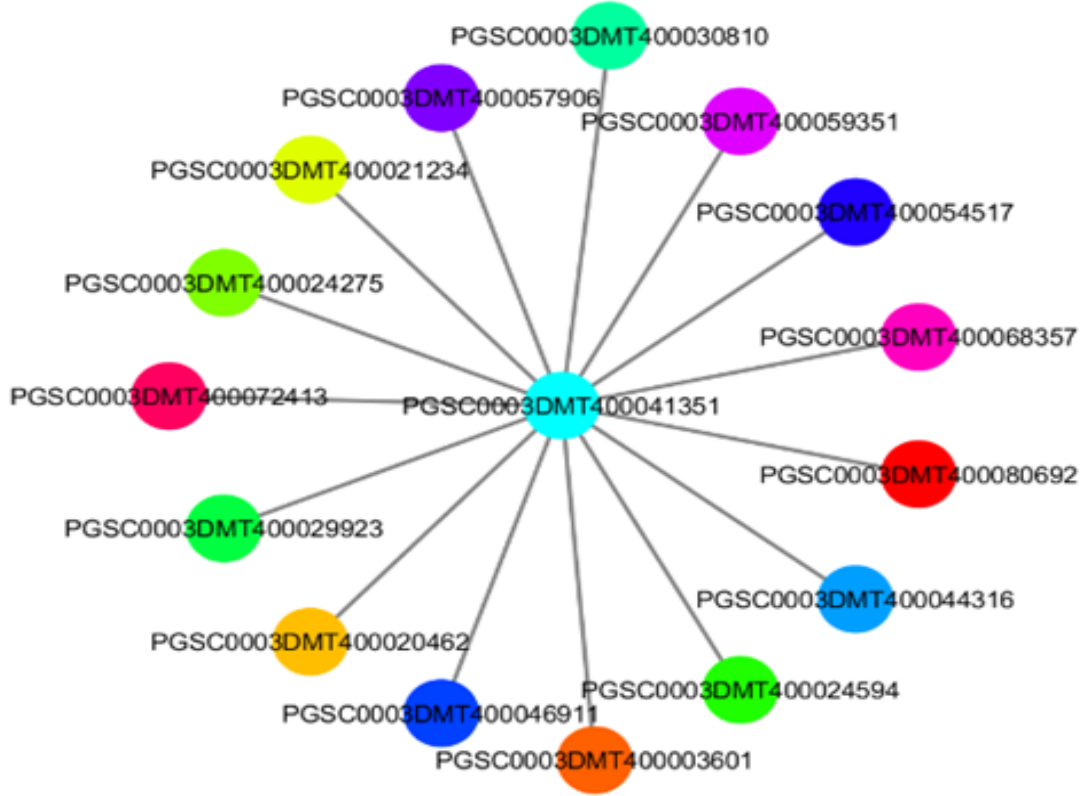
verecektir. Korizmat mutaz, triptofan sentaz beta alt ünite, korizmat sentaz 2 ve arogenat dehidrataz genlerinin hepsi fenilalanin, tirozin ve triptofan biyosentezi üzerinde yer almaktadır.

Tablo 3. Korizmat Sentaz 1 genin etkileştiği genler ve yolları

Gen Kodu	Gen Tanımı	KEGG Yolağı Tanımı
PGSC0003DMT400003643	Chorismate mutase 1	Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis
PGSC0003DMT400037303	Tryptophan synthase beta subunit	Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis; Glycine, serine and threonine metabolism
PGSC0003DMT400041351	Chorismate synthase 2,	Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis
PGSC0003DMT400068261	Arogenate dehydratase 3	Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis
PGSC0003DMT400071776	Aspartate aminotransferase	
PGSC0003DMT400000028	Transcription factor	
PGSC0003DMT400000030	Transcription factor	
PGSC0003DMT400000043	Enoyl-CoA-hydratase	
PGSC0003DMT400000060	Mosaic virus helicase domain-binding protein	
PGSC0003DMT400000061	Mosaic virus helicase domain-binding protein	
PGSC0003DMT400000063	Conserved gene of unknown function	
PGSC0003DMT400000116	Ulp1 protease family, C-terminal catalytic domain containing protein	
PGSC0003DMT400000143	RNA binding protein	
PGSC0003DMT400000146	Protein kinase; U box	
PGSC0003DMT400000152	GPAT	

Korizmat Sentaz 2 (PGSC0003DMT400041351)

Korizmat sentaz 2 geni %90 düzeyinde 14852 gen ile ilişkili bulunmuştur. %99 düzeyinde ise 4049 gen ile ilişkili bulunmuştur. Korizmat sentaz 2, korizmat mutaz gibi AAA yolağının anahtar genlerinden biridir. İlgili gen ile en yüksek pozitif korelasyon değerine sahip olan genler Şekil 3'te görüldüğü gibi Cytoscape programında korelasyon ağ haritası kurularak görselleştirilmiştir.



Şekil 3. Korizmat Sentaz 2 genin ko-ekspresyon ağı

Korizmat sentaz geni 2 geni ile etkileşen genlerin gen kodları ve tanımları, yer aldıkları enzim yolları ile birlikte Tablo 4’te verilmiştir. Korizmat sentaz 2 geni, belirtilen yolda en fazla kendisinin izomeri olan Korizmat sentaz 1 geni ile etkileşim göstermektedir. İlgili yolda karşılaşılan diğer önemli nokta ise özellikle bitkinin sıcak yaz aylarında yükselen kanopy sıcaklığına bağlı olarak hücrenin osmotik potansiyelin korunmasına yardımcı olan “heat shock” proteinlerinin korizmat sentaz ile ilişkili olmasıdır. Bunun yansıya ATP2-A13 geni özellikle protein işaretlenmesi olan protein etiketlenmesinde görev alan bir proteindir (Walley ve ark., 2007). TAFII21 protein heterodimerizasyon olayında, transkripsiyon bağlanma faktörü olarak transkripsiyon olayında ve DNA’nın transkripsiyon olayını sağlayan ilgili sekansa bağlanma olayında yer almaktadır (Lawit ve ark., 2007).

Tablo 4. Korizmat sentaz genin etkileştiği genler ve yolakları

Gen Kodu	Gen Tanımı	KEGG Yolağı Tanımı
PGSC0003DMT400041351	Chorismate synthase 1	
PGSC0003DMT400029923	TAFII21	
PGSC0003DMT400072413	ATPP2-A13	
PGSC0003DMT400046911	Emsy N terminus domain-containing protein	
PGSC0003DMT400024594	Heat shock protein 83	
PGSC0003DMT400080692	Metal ion binding protein	
PGSC0003DMT400054517	Lupus la ribonucleoprotein	
PGSC0003DMT400030810	Nucleotide binding protein	
PGSC0003DMT400021234	Heat shock factor protein HSF30	
PGSC0003DMT400024275	Conserved gene of unknown function	
PGSC0003DMT400057906	Protein FRIGIDA	
PGSC0003DMT400059351	Ribulose-phosphate 3-epimerase, cytoplasmic isoform	Carbon fixation in photosynthetic organisms; Pentose and glucuronate interconversions; Pentose phosphate pathway
PGSC0003DMT400068357	Conserved gene of unknown function	
PGSC0003DMT400044316	Translation initiation factor 2B beta subunit	Cysteine and methionine metabolism
PGSC0003DMT400003601	60S ribosomal protein L34	
PGSC0003DMT400020462	Signal recognition particle receptor alpha subunit	

Sonuç

Bu çalışmanın sonunda elde edilen ilk çıktı patates yolağı üzerinde yer alan bütün genlerin istatistiksel olarak belirlenmiş olması ve istenilen genin ko-ekspresyon ađ haritalarının oluşturabilir olmasıdır. Bu bağlamda çalışmada AAA yolağı üzerinde yer alan genlerin sadece bazıları için ilgili ko-ekspresyon ağları oluşturulmuştur. Çalışma patates genomundaki bütün genleri içine alacak şekilde yapıldığından, çalışma sonuçları AAA yolağı hakkında bilgiler sunmaktadır. Bildiğimiz kadarıyla patates bitkisinde bugüne dek bu şekilde bir çalışma yapılmamıştır. Ayrıca, elde edilen veriler ilk defa farklı hormon gruplarına bağlı olarak AAA yolağındaki genlerin ekspresyon seviyeleri hakkında bilgi sunmaktadır. Her ne kadar bu çalışmanın amacı olmasa bile, bitki hormonları ve bu hormonların AAA yolağı üzerindeki genlerle etkileşimleri net bir şekilde ortaya konmuştur. Ayrıca bu çalışma sadece AAA yolağındaki genler değil, patates bitkisinde yer alan herhangi bir genin etkileştiği genler net olarak belirlenmiştir. Ancak çalışmanın hedefi gereği sadece AAA yolağında seçilmiş genlerin birincil komşuları belirlenmiş ve gen tanımları yapılmıştır. Çalışmada konu ile ilgili yöntemin geliştirilmesi başarılı olduğundan her bir bitki için benzer çalışmalar büyük bir başarıyla uygulanabilecektir.

Bunun dışında çalışma özellikle diğer bitkilerde yer alan AAA metabolizmasındaki ortholog genlerin belirlenmesine katkı sunacaktır. Patates bitkisinde yapılan bu çalışma ile AAA yolağında yer alan her bir anahtar genin ko-ekspresyon haritalarında henüz fonksiyonu tam olarak belirlenmemiş çok sayıda gen bulunmuştur. İlgili genlerin AAA yolağı üzerinde yer almalarının bu çalışma ile saptanması bu genlerin ekspresyonu olan proteinlerin fonksiyonlarının belirlenmesi ve bu proteinlerin hangi biyolojik süreçlerde yer aldıklarının tahminin yapılmasına yardımcı olacaktır.

Teşekkür

Bu çalışma Muş Alparslan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından (Proje Numarası: BAP-18-UBF-4903-01) desteklenmiştir.

Çıkar Çatışması Beyanı

Yazarlar, herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan ederler.

Kaynakça

- Arvas YE., Aksoy HM., Kaya Y. Patates bitkisinde biyoteknolojik çalışmalar. *Life Science and Biotechnology*. 2018; 1(1): 37-47.
- Bentley R. The shikimate pathway—ametabolic tree with many branches. *Crit. Rev. Biochem.Mol. Biol.* 1990; 25: 307–384.
- Consortium TU. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res.* 2019; 47, D506–D515. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1049>.
- Crone MR., Van Spronsen FJ., Oudshoorn K., Bekhof J., Van Rijn G., Verkerk PH. Behavioural factors related to metabolic control in patients with phenylketonuria. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2005; 28, 627–637.
- Çakır E. First report of potato wart disease in Turkey. *Plant Pathology*. 2005; 54: 584.
- Doong R., Gander J., Ganson R., Jensen R. The cytosolic isoenzyme of 3-deoxy-o-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase in *Spinacia oleracea* and other higher plants: Extreme substrate ambiguity and other properties. *Plant Physiol.* 1992; 84: 351-360.
- Dumanoğlu Z., Öztürk G. A research on improving seed quality (Pelleting) in true potato of 101 (Nif) genotype. *Fresenius Environmental Bulletin*. 2021; 30(09): 10983-10968.
- Er C., Uranbey S., Başalma D. Nişasta ve şeker bitkileri. Ankara Üniversitesi Ziraat Fak. 2018; Yayınları. Yayın No: 1646, Ankara.

- Filiz E., Cetin D., Akbudak MA. Aromatic amino acids biosynthesis genes identification and expression analysis under salt and drought stresses in *Solanum lycopersicum* L. *Sci Horti* (Amsterdam) 2019; 250, 127–137. <https://doi.org/10.1016/j.scienta>.
- Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins MR., Appel RD. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: Walker JM (ed) *The proteomics protocols handbook*. Humana, Louisville. 2005; 571–607.
- Goodstein DM., Shu S., Howson R., Neupane R., Hayes RD., Fazo J., Rokhsar DS. Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40: 1178–1186.
- Hughes EH., Hong SB., Gibson SI., Shanks JV., San KY. Metabolic engineering of the indole pathway in *Catharanthus roseus* hairy roots and increased accumulation of tryptamine and serpentine. *Metab. Eng.* 2000; 6, 268–276.
- Horton P., Park KJ., Obayashi T., Nakai K. Protein subcellular localization prediction with WoLF PSORT. In Jiang T., Yang UC., Chen YPP. (eds), *Proceedings of the 4th Annual Asia Pacific Bioinformatics Conference, APBC06*, Imperial College Press, London. 2007; pp. 39–48.
- Jansky S. Breeding for disease resistance in potato. *Plant Breeding Reviews*. 2000; vol. 19.
- Kaplan F., Kopka J., Haskell DW., Zhao W., Schiller KC., Gazke N., Yul-Sung D., Guy C. Exploring the temperature-stress metabolome of arabidopsis. *Plant Physiology*. 2004; 136, 4159–4168.
- Kinsella RJ., Kähäri A., Haider S., Zamora J., Proctor G., Spudich G., Almeida-King J., Staines D., Derwent P., Kerhornou A., Kersey P., Flicek PJ. A hub for data retrieval across taxonomic space. *Ensembl BioMarts. Database* (Oxford). Vol. 2011.
- Kutchan TM. Alkaloid biosynthesis—the basis for metabolic engineering of medicinal plants. *Plant Cell*. 1995; 7: 1059–1070.
- Lawit SJ., OGrady K., Gurley WB., Czarnecka-Verner E. Yeast two-hybrid map of Arabidopsis TFIID. *Plant Mol Biol.* 2007; 64(1-2): 73-87.
- Lightfoot DA. Green NK., Cullimore JV. The chloroplast located glutamine synthetase of *Phaseolus vulgaris* L. Nucleotide sequence, expression in different organs and uptake into isolated chloroplasts. *Plant Molecular Biology*. 1988; 11: 191-202.
- Oğuz Hİ., Yücel D. Nevşehir ilinde patates (*Solanum tuberosum* L.) yetiştiriciliğinin ekolojik ve sosyo ekonomik bakımdan araştırılması. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi* 2020; 7(4): 1159-1170.
- Oliveira IC., Brenner E., Chiu J., Hsieh M.H., Kouranov A., Lam HM., Shin MJ., Coruzzi G. Metabolite and light regulation of metabolism in plants: lessons from the study of a single biochemical pathway. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2001; 34: 567-575.
- Öztürk G. Tohumluk patates üretiminde kullanılan mini ve mikro yumruların tarla performanslarının karşılaştırılması. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Doktora Tezi, İzmir. 2010.

- Radwanski ER., Last RL. Tryptophan biosynthesis and metabolism: biochemical and molecular genetics. *Plant Cell*. 1995; 7: 921–934.
- Razal RA., Ellis S., Singh S., Lewis NG., Towers GHN. Nitrogen recycling in phenylpropanoid metabolism. *Phytochemistry* 1996; 41: 31–35.
- Reeds PJ. Dispensable and indispensable amino acids for humans. *Journal of Nutrition*. 2000; 130, 1835S–1840S.
- Rice-Evans C., Miller N., Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant*. 1997; 2: 152–159.
- Rippert P., Matringe M. Purification and kinetic analysis of the two recombinant arogenate dehydrogenase isoforms of *Arabidopsis thaliana*. *Eur. J. Biochem*. 2002; 269: 4753–4761.
- Rossum GV., Tutorial P. Centrum voor Wiskunde en Informatica (CWI), Amsterdam Technical Report. 1995; CS-R9526.
- Schönbrunn E., Eschenburg S., Shuttleworth WA., Schloss JV., Amrhein N. Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001; 98: 1376–1380.
- Shannon P., Markiel A., Ozier O., Baliga NS., Wang JT., Ramage D., Amin N., Schwikowski B., Ideker T. A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research*. 2003; 13(11): 2498-2504.
- Sieber SA., Marahiel MA. Molecular mechanisms underlying nonribosomal peptide synthesis: Approaches to new antibiotics. *Chem Rev*. 2005; 105: 715–738. doi:10.1021/cr0301191.
- Sonnhammer EL, Eddy SR, Durbin R. Pfam: a comprehensive database of protein domain families based on seed alignments. *Proteins*. 1997; 28:405–420.
- Spud DB, Potato genomics resource, <http://solanaceae.plantbiology.msu.edu>. 2018.
- Tohge T., Watanabe M., Hoefgen R., Fernie AR. Shikimate and phenylalanine biosynthesis in the green lineage. *Front. Plant Sci*. 2013; 4, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00062>.
- Tzin V., Galili G. New Insights into the shikimate and aromatic amino acids biosynthesis pathways in plants. *Mol. Plant*. 2010; 3, 956–972. <https://doi.org/10.1093/mp/ssq048>.
- Walley JW., Coughlan S., Hudson ME., Covington MF., Kaspi R., Banu G., Harmer SL., Dehesh K. Mechanical stress induces biotic and abiotic stress responses via a novel cis-element. *PLoS Genet*. 2007; 3(10): 1800-1812.
- Webb (y HARFÌ VAR MI KONT) B., Sali A. Comparative protein structure modeling using modeller. *Curr Protoc Protein Sci*. 2016; 54: 561-567. doi: 10.1002/cpbi.3.
- Webby CJ., Baker HM., Lott JS., Baker EN., Parker EJ. The structure of 3-deoxy-D-arabinoheptulosonate 7-phosphate synthase from *Mycobacterium tuberculosis* reveals a common catalytic scaffold and ancestry for type I and type II enzymes. *J. Mol. Biol*. 2005; 354: 927–939.

- Willard L., Ranjan A., Zhang H., Monzavi H., Boyko RF., Sykes BD., Wishart DS. VADAR: a web server for quantitative evaluation of protein structure quality. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31(13): 3316–3319.
- Wykes LJ., Ball RO., Menendez CE., Ginther DM., Pencharz, PB. Glycine, leucine, and phenylalanine flux in low-birth-weight infants during parenteral and enteral feeding. *Am. J. Clin. Nutr.* 1992; 55: 971-975.
- Xu X., Pan S., Cheng S. Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. *Nature.* 2011; 475: 189–195. <https://doi.org/10.1038/nature10158>.
- Zandalidas SI., Mittler R., Balfagon D., Arbona V., Gomez-Cadenas A. Plant adaptations to the combination of drought and high temperatures. *Physiologia Plantarum.* 2018; 162: 2–12.
- Zimmermann L., Stephens A., Nam SZ., Rau D., Kübler J., Lozajic M., Gabler F., Söding J., Lupas AN., Alva V. A completely reimplemented MPI bioinformatics toolkit with a new hhpred server at its core. *J. Mol Biol.* 2018; Jul 20. S0022-2836(17)30587-9.