



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



**Nitrosatif Stres Kökenli Nörodejeneratif Hastalıkların
Hücrel Sinyal Yolaklarının *Arabidopsis thaliana*
Kullanılarak Araştırılması**

Doktora Tezi

Azime GÖKÇE

Biyoloji Anabilim Dalı

İzmir

2023

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**Nitrosatif Stres Kökenli Nörodejeneratif
Hastalıkların Hücresel Sinyal Yolaklarının
Arabidopsis thaliana Kullanılarak Araştırılması**

Azime GÖKÇE

Danışman: Prof. Dr. A. Hediye ÇETİNEL

Biyoloji Anabilim Dalı

Genel Biyoloji Doktora Programı

İzmir

2023

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca ~~Yüksek Lisans~~ Tezi/Doktora Tezi olarak sunduğum “**Nitrosatif Stres Kökenli Nörodejeneratif Hastalıkların Hücresel Sinyal Yolaklarının *Arabidopsis thaliana* Kullanılarak Araştırılması**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

14/09/2023

Azime Gökçe

ÖZET

**NİTROSATİF STRES KÖKENLİ NÖRODEJENERATİF
HASTALIKLARIN HÜCRESEL SİNYAL YOLAKLARININ
ARABIDOPSIS THALIANA KULLANILARAK
ARAŞTIRILMASI**

GÖKÇE, Azime

Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. A. Hediye ÇETİNEL

Eylül 2023, 144 sayfa

1,6 milyar yıl önce insanlar ve *Arabidopsis thaliana* evrimsel olarak birbirinden ayrılmıştır. Buna rağmen insan genlerinin büyük kısmının Arabidopsis'te korunmuş ortologları vardır. Örneğin, insanlardaki nörodejeneratif hastalık genlerinin Arabidopsis'teki ortologlarıyla benzerlik oranı %71 iken insan kanser genleriyle benzerlik oranı %70 olarak bilinmektedir. Alzheimer (AD) ve Parkinson (PD) gibi nörodejeneratif hastalıkların daha iyi anlaşılması amacıyla yapılan son araştırmalar, bu alanda Arabidopsis'in önemini açıkça ortaya koymuştur. Bu araştırmalarda, AD ve PD hastalıklarına neden olan PreP ve DJ-1/PARK genlerindeki mutasyonun, bitkilerde de insanlardakine benzer oluşumlara neden olduklarını göstermiştir. Ancak, bu nörodejeneratif hastalıklar, sadece belirtilen genlerdeki mutasyonlardan kaynaklanmamaktadır. Son yıllarda yapılan araştırmalar insan beyin hücre zarındaki Glutamat Reseptörünün (NMDAR'ın; N-metil-D-aspartat reseptörü) aktivasyonundaki artışla, sitoplazmada aşırı biriken Ca^{2+} 'un tetiklediği, NO (nitrik oksit) birikiminin mitokondri ve endoplazmik retikulum (ER) stresine ve PDI (protein disülfid izomeraz) enziminde meydana getirdiği S-nitrosilasyonun (sistein tiolüne NO bağlanması) yol açtığı AD ve PD gibi nörodejeneratif hastalıklara neden olduğu bulunmuştur. GLR'ler, sadece memelilerde değil yaşamın üç domaininde de tanımlanmışlardır. Bitkiler üzerinde yapılan araştırmalarda, bitki GLR'lerinin; pek çok yolakta rol oynadıkları gösterilmiştir. Ancak bahsedilen GLR aracılı NO ilişkili nitrosatif stres ve oluşacak organellerdeki değişiklikler ile ilgili bir çalışma yoktur. Yapılan bu çalışmada, insanlarda nörodejeneratif hastalıklara neden olan bir hücresel yolakta görev alan gen ve proteinlerin, Arabidopsis'te benzer yolaklarının var olup olmadığı, bitkilerde hangi rol ve etki mekanizmasına sahip oldukları, GLR-aracılı NO birikiminin neden olduğu PDI enzimindeki etkisi ve organel stresinin oluşum mekanizması, ayrıca oluşan Reaktif Oksijen Türleri (ROS) ve Reaktif Azot Türlerinin (RNS) hücreden süpürülmesinde etkili antioksidan mekanizma ve hücrenin redoks dengesi arasındaki ilişki ilk kez aydınlatılmıştır.

Anahtar Sözcükler: Antioksidan sistem, Arabidopsis thaliana, Kalsiyum, ER, Glutamat Reseptörleri, Mitokondri, Nitrik Oksit, Nörodejeneratif Hastalıklar, Reaktif Oksijen Türleri



ABSTRACT

**INVESTIGATION OF CELLULAR SIGNALING
PATHWAYS OF NITROSATIVE STRESS-
INDUCED
NEURODEGENERATIVE DISEASES BY USING
OF *ARABIDOPSIS THALIANA***

GÖKÇE, Azime

PhD in Biology,

Supervisor: Prof. Dr. A. Hediye ÇETİNEL

September 2023, 144 pages

1.6 billion years ago, humans and *Arabidopsis thaliana* diverged evolutionarily. Despite this, there are conserved orthologs of human genes in Arabidopsis. For instance, the similarity rate between neurodegenerative disease genes in humans and their orthologs in Arabidopsis is known to be 71%, while the similarity rate with human cancer genes is 70%. Recent research aimed at better understanding neurodegenerative diseases such as Alzheimer's (AD) and Parkinson's (PD) has clearly demonstrated the importance of Arabidopsis in this field. In these studies, mutations in the PreP and DJ-1/PARK genes, which cause AD and PD diseases, have been shown to lead to similar formations in plants as in humans. However, these neurodegenerative diseases are not solely caused by mutations in the mentioned genes. Recent studies have found that an increase in the activation of the Glutamate Receptor (NMDAR) in the human brain cell membrane, triggering excessive accumulation of Ca^{2+} in the cytoplasm, leads to mitochondrial and endoplasmic reticulum (ER) stress caused by NO (nitric oxide) accumulation through S-nitrosylation of the protein disulfide isomerase (PDI) enzyme (binding of NO to cysteine thiol). This mitochondrial and ER stress has been found to be linked to neurodegenerative diseases like AD and PD. GLRs (Glutamate-like receptors) have been identified not only in mammals but also in all three domains of life. Studies on plants have shown that plant GLRs play roles in many pathways. However, there is no study on the GLR-mediated NO-related nitrosative stress and changes in organelles. In this study, we shed light on the roles and mechanisms of genes and proteins involved in a cellular pathway responsible for neurodegenerative diseases in humans, their orthologs in Arabidopsis, and the effects on the PDI enzyme caused by GLR-mediated NO accumulation. We also elucidate the mechanisms of organelle stress, as well as the relationship between Reactive Oxygen Species (ROS) and Reactive Nitrogen Species (RNS) and their effective antioxidant mechanisms in scavenging from cells, and the cell's redox balance. This study provides the first insights into these aspects.

Keywords: Antioxidant System, Arabidopsis thaliana, Calcium, ER, Glutamate Receptors, Mitochondria, Nitric Oxide, Neurodegenerative Diseases, Reactive Oxygen Species



ÖNSÖZ

Hayvanların aksine, bitkilerdeki davranışın geleneksel olarak tamamen ya genetik ya da çevresel olarak belirlendiği varsayılır. Bu sebeple, bitkiler genellikle bilişsel olmayan organizmalar olarak kabul edilir. Ancak, hayvanlara özgü olduğu varsayılan birçok karmaşık bilişsel yeteneğin bitkiler tarafından da sergilendiğini gösteren, giderek büyüyen bir alan ve bu alanda da pek çok çalışma mevcuttur. Bu alanların başında da bitki nörobiyolojisi gelmektedir. Bu sebeple tez çalışmamda farklı bakış açısı geliştiren, bitki ve insan hastalıkları ile ilişkili bir konuyu çalışmak heyecan verici olmuştur. Tez dönemim esnasında kanser tedavisi görmem, çalışmalarımın yavaşlamasına sebep olsa da devam etme isteğim ile iyileşir iyileşmez çalışmalar tekrar hız kazandı. Ancak tezimin son yılında annemi kaybetmiş olmamın verdiği acı ile çalışmamı bırakmayı düşünsem de her şeye rağmen tamamladığım çalışmaların, yani araştırmanın, öğrenmenin, bütünün parçası olmanın, bilimin kendisinin insan ruhunu iyileştirici bir yanı olduğunu açıkça göstermiştir.

Yaşanılan tüm zorluklara rağmen tamamlanan bu tez çalışması; beni gördüğünü, her zaman yanımda olduğunu bildiğim merhum annem **Kıymet GÖKÇE**'ye ithafen yazılmıştır.

İZMİR

14.09.2023

Azime GÖKÇE



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
İÇ KAPAK.....	i
KABUL ONAY SAYFASI.....	iii
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI.....	v
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
ÖNSÖZ.....	xi
İÇİNDEKİLER.....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvii
TABLolar DİZİNİ.....	xx
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xxi
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Nörodejeneratif Hastalıklar ile İlgili Genel Bilgiler.....	1
1.1.1 Oksidatif stres ve nörodejenerative.....	2
1.1.2 Alzheimer hastalığı.....	2
1.1.3 Parkinson hastalığı.....	4
1.1.4 Nörokoruma ve antioksidanlar.....	5
1.2 İnsan Hastalıklarının Araştırılmasında Model Organizma Olan <i>Arabidopsis thaliana</i>	6
1.3 Glutamat Reseptörleri.....	10
1.3.1 Bitki GLR'leri: evrimsel kimlik doğrulama.....	12
1.3.2 <i>Arabidopsis thaliana</i> 'nın glutamat reseptörlerinin yapısı.....	13
1.3.3 Glutamat reseptörlerinin aktivitesi.....	15
1.3.4 AtGLR genlerinin fonksiyon, ekspresyon ve uygulamaları.....	17
1.3.5 Çevresel strese yanıtta AtGLR genleri.....	22
1.4 GLR Aracılı NO Artışı.....	26
1.5 NO Sinyalinin Oluşumu ve Temeli.....	26

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
1.5.1 S-nitrosilasyon.....	26
1.5.2 Metal nitrosilasyonu.....	27
1.5.3 Tirozin nitasyonu.....	27
1.6 NO ve Ca^{2+} Arasındaki Etkileşim.....	29
1.7 Bitkilerde NO Sinyali.....	30
1.8 ROS ve RNS Arasındaki Etkileşim: Nitro-Oksidatif Stres.....	31
1.8.1 Stres koşullarında oluşan ROS ve RNS'nin düzenlenmesi.....	34
1.9 GLR ilişkili Nörodejeneratif Hastalıklarda Organellerin Rolü.....	38
1.9.1 Mitokondriyal stres ve nörodejeneratif hastalıklar.....	38
1.9.2 Endoplazmik retikulum stresi ve nörodejeneratif hastalıklar.....	42
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	50
2.1 Tohum Sterilizasyonu.....	50
2.3 Bitkilerin Yetiştirilmesi ve Stres Uygulamaları.....	50
2.4 NO ilişkili Yöntemler.....	52
2.4.1 NO miktarının belirlenmesi.....	52
2.4.2 NOS Enzim aktivitesinin belirlenmesi.....	52
2.4.3 SNO içeriğinin belirlenmesi.....	53
2.4.4 GSNOR enzim aktivitesinin belirlenmesi.....	53
2.5 ROS'ların Belirlenmesi ile İlgili Yöntemler.....	53
2.5.1 Hidrojen peroksit (H_2O_2) radikal miktarı.....	53
2.5.2 Hidroksil (OH) radikal miktarı.....	54
2.5.3 Süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) miktarının belirlenmesi.....	54
2.6 Antioksidan Enzim Ekstraksiyonu ve Aktivite Analizleri.....	54
2.6.1 NOX enzim aktivitesinin belirlenmesi.....	55

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.6.2 SOD enzim aktivitesinin belirlenmesi.....	55
2.6.3 CAT enzim aktivitesinin belirlenmesi.....	55
2.6.4 POX enzim aktivitesinin belirlenmesi.....	55
2.6.5 APX enzim aktivitesinin belirlenmesi.....	55
2.6.6 GR enzim aktivitesinin belirlenmesi.....	56
2.7 Redoks ilişkili enzim aktivite analizleri.....	56
2.7.1 GSH/GSSG oranının belirlenmesi.....	56
2.7.2 Askorbat miktarının belirlenmesi.....	56
2.7.3 GST ve GPX aktivitelerinin belirlenmesi.....	56
2.7.4 NAD/NADH oranının belirlenmesi	57
2.7.5 MDHAR Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	57
2.7.6 DHAR Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	57
2.8 Lipid Peroksidasyon (TBARS) Miktarı.....	57
2.9 Protein Oksidasyonu.....	58
2.10 RT-PCR ile Gen İfadelerinin Ölçülmesi.....	58
2.11 İstatistiksel Analizler.....	59
3. BULGULAR.....	60
3.1 NO ilişkili Bulgular.....	60
3.1.1 NO miktarı.....	60
3.1.2 NOS aktivitesi.....	61
3.1.3 SNO içeriği.....	62
3.1.4 GSNOR enzim aktivitesi.....	63
3.2 ROS'ların Belirlenmesi.....	64
3.2.1 H ₂ O ₂ miktarı.....	64
3.2.2 Hidroksil radikal (·OH) süpürme aktivitesi.....	65

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.2.3 Süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) miktarı.....	66
3.3 Antioksidan Enzim Aktivitesi.....	67
3.3.1 NOX enzim aktivitesi.....	67
3.3.2 SOD enzim aktivitesi	68
3.3.3 CAT enzim aktivitesi	69
3.3.4 POX enzim aktivitesi	70
3.3.5 APX enzim aktivitesi	71
3.3.6 GR enzim aktivitesi	72
3.4 Redoks İlişkili Enzim Aktivite Analizleri.....	73
3.4.1 GSH/GSSG oranı.....	73
3.4.2 Askorbat miktarı.....	74
3.4.3 GST enzim aktivitesi	75
3.4.4 GPX enzim aktivitesi	76
3.4.5 NAD/NADH Oranı.....	77
3.4.6 MDHAR enzim aktivitesi	78
3.4.7 DHAR enzim aktivitesi	79
3.5 Lipid Peroksidasyon (TBARS) Miktarı.....	80
3.6 Protein Oksidasyonu.....	81
3.7 Gen İfadelerinin Belirlenmesi.....	82
3.7.1 ER-İlişkili Genlerin Belirlenmesi.....	82
3.7.2 Mitokondri-İlişkili Genlerin İfadesi.....	88
4. TARTIŞMA.....	95
5. SONUÇ.....	112
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	114
Teşekkür Sayfası.....	144

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sekil

Sayfa

1.1 Glutamat Reseptör Ailesi.....	10
1.2 NMDAR ilişkili NO artışının Organellere Etkisi.....	48
2.1. Hidroponik ortamda yetiştirilen <i>A.thaliana</i> Col-0 ve GLR3.4 mutantları	51
3.1 Yabani tip <i>Arabidopsis thaliana</i> Col. ve atglr3.4 mutantlarına egzojen SNP, Tm, R, S+T, S+R ve cPTIO uygulamalarının NO içeriği üzerine etkisi.....	60
3.2 Yabani tip <i>Arabidopsis thaliana</i> Col.ve atglr3.4 mutantlarına egzojen SNP, Tm, R, S+T, S+R ve cPTIO uygulamalarının NOS aktivitesi üzerine etkisi.....	61
3.3 Yabani tip <i>Arabidopsis thaliana</i> Col.ve atglr3.4 mutantlarına egzojen SNP, Tm, R, S+T, S+R ve cPTIO uygulamalarının SNO içeriği üzerine etkisi.....	62
3.4 Yabani tip <i>Arabidopsis thaliana</i> Col.ve atglr3.4 mutantlarına egzojen SNP, Tm, R, S+T, S+R ve cPTIO uygulamalarının GSNOR aktivitesi üzerine etkisi.....	63
3.5 Yabani tip <i>Arabidopsis thaliana</i> Col.ve atglr3.4 mutantlarına egzojen SNP, Tm, R, S+T, S+R ve cPTIO uygulamalarının H ₂ O ₂ miktarı üzerine etkisi.....	64
3.6 Yabani tip <i>Arabidopsis thaliana</i> Col.ve atglr3.4 mutantlarına egzojen SNP, Tm, R, S+T, S+R ve cPTIO uygulamalarının 'OH miktarı üzerine etkisi.....	65
3.7 Yabani tip <i>Arabidopsis thaliana</i> Col.ve atglr3.4 mutantlarına egzojen SNP, Tm, R, S+T, S+R ve cPTIO uygulamalarının O ²⁻ içeriği üzerine etkisi.....	66
3.8 Yabani tip <i>Arabidopsis thaliana</i> Col.ve atglr3.4 mutantlarına egzojen SNP, Tm, R, S+T, S+R ve cPTIO uygulamalarının NOX aktivitesi üzerine etkisi.....	67
3.9 Yabani tip <i>Arabidopsis thaliana</i> Col.ve atglr3.4 mutantlarına egzojen SNP, Tm, R, S+T, S+R ve cPTIO uygulamalarının SOD aktivitesi üzerine etkisi.....	68
3.10 Yabani tip <i>Arabidopsis thaliana</i> Col.ve atglr3.4 mutantlarına egzojen SNP, Tm, R, S+T, S+R ve cPTIO uygulamalarının CAT aktivitesi üzerine etkisi.....	69
3.11 Yabani tip <i>Arabidopsis thaliana</i> Col.ve atglr3.4 mutantlarına egzojen SNP, Tm, R, S+T, S+R ve cPTIO uygulamalarının POX aktivitesi üzerine etkisi.....	70

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa No

3.12 Yabani tip <i>Arabidopsis thaliana</i> Col.ve atglr3.4 mutantlarına egzojen SNP, Tm, R, S+T, S+R ve cPTIO uygulamalarının APX aktivitesi üzerine etkisi.....	71
3.13 Yabani tip <i>Arabidopsis thaliana</i> Col.ve atglr3.4 mutantlarına egzojen SNP, Tm, R, S+T, S+R ve cPTIO uygulamalarının GR aktivitesi üzerine etkisi.....	72
3.14 Yabani tip <i>Arabidopsis thaliana</i> Col.ve atglr3.4 mutantlarına egzojen SNP, Tm, R, S+T, S+R ve cPTIO uygulamalarının total glutatyon içeriği üzerine etkisi.....	73
3.15 Yabani tip <i>Arabidopsis thaliana</i> Col.ve atglr3.4 mutantlarına egzojen SNP, Tm, R, S+T, S+R ve cPTIO uygulamalarının askorbat miktarı üzerine etkisi.....	74
3.16 Yabani tip <i>Arabidopsis thaliana</i> Col.ve atglr3.4 mutantlarına egzojen SNP, Tm, R, S+T, S+R ve cPTIO uygulamalarının GST aktivitesi üzerine etkisi.....	75
3.17 Yabani tip <i>Arabidopsis thaliana</i> Col.ve atglr3.4 mutantlarına egzojen SNP, Tm, R, S+T, S+R ve cPTIO uygulamalarının GPX aktivitesi üzerine etkisi.....	76
3.18 Yabani tip <i>Arabidopsis thaliana</i> Col.ve atglr3.4 mutantlarına egzojen SNP, Tm, R, S+T, S+R ve cPTIO uygulamalarının NAD/NADH içeriği üzerine etkisi.....	77
3.19 Yabani tip <i>Arabidopsis thaliana</i> Col.ve atglr3.4 mutantlarına egzojen SNP, Tm, R, S+T, S+R ve cPTIO uygulamalarının MDHAR aktivitesi üzerine etkisi.....	78
3.20 Yabani tip <i>Arabidopsis thaliana</i> Col.ve atglr3.4 mutantlarına egzojen SNP, Tm, R, S+T, S+R ve cPTIO uygulamalarının DHAR aktivitesi üzerine etkisi.....	79
3.21 Yabani tip <i>Arabidopsis thaliana</i> Col.ve atglr3.4 mutantlarına egzojen SNP, Tm, R, S+T, S+R ve cPTIO uygulamalarının TBARS miktarı üzerine etkisi.....	80
3.22 Yabani tip <i>Arabidopsis thaliana</i> Col.ve atglr3.4 mutantlarına egzojen SNP, Tm, R, S+T, S+R ve cPTIO uygulamalarının protein oksidasyonu üzerine etkisi.....	81
3.23 Yabani tip <i>Arabidopsis thaliana</i> Col.ve atglr3.4 mutantlarına egzojen SNP, Tm, R, S+T, S+R ve cPTIO uygulamalarının bZIP28 transkripsiyonu üzerine etkisi.....	82
3.24 Yabani tip <i>Arabidopsis thaliana</i> Col.ve atglr3.4 mutantlarına egzojen SNP, Tm, R, S+T, S+R ve cPTIO uygulamalarının bZIP60 transkripsiyonu üzerine etkisi.....	83

3.25 Yabani tip <i>Arabidopsis thaliana</i> Col.ve atglr3.4 mutantlarına egzogen SNP, Tm, R, S+T, S+R ve cPTIO uygulamalarının IRE1A transkripsiyonu üzerine etkisi.....	84
3.26 Yabani tip <i>Arabidopsis thaliana</i> Col.ve atglr3.4 mutantlarına egzogen SNP, Tm, R, S+T, S+R ve cPTIO uygulamalarının IRE1B transkripsiyonu üzerine etkisi.....	84
3.27 Yabani tip <i>Arabidopsis thaliana</i> Col.ve atglr3.4 mutantlarına egzogen SNP, Tm, R, S+T, S+R ve cPTIO uygulamalarının BIP3 transkripsiyonu üzerine etkisi.....	85
3.28 Yabani tip <i>Arabidopsis thaliana</i> Col.ve atglr3.4 mutantlarına egzogen SNP, Tm, R, S+T, S+R ve cPTIO uygulamalarının ERO1 transkripsiyonu üzerine etkisi.....	86
3.29 Yabani tip <i>Arabidopsis thaliana</i> Col.ve atglr3.4 mutantlarına egzogen SNP, Tm, R, S+T, S+R ve cPTIO uygulamalarının CNX transkripsiyonu üzerine etkisi.....	87
3.30 Yabani tip <i>Arabidopsis thaliana</i> Col.ve atglr3.4 mutantlarına egzogen SNP, Tm, R, S+T, S+R ve cPTIO uygulamalarının PDI5 transkripsiyonu üzerine etkisi.....	88
3.31 Yabani tip <i>Arabidopsis thaliana</i> Col.ve atglr3.4 mutantlarına egzogen SNP, Tm, R, S+T, S+R ve cPTIO uygulamalarının UPOX transkripsiyonu üzerine etkisi.....	89
3.32 Yabani tip <i>Arabidopsis thaliana</i> Col.ve atglr3.4 mutantlarına egzogen SNP, Tm, R, S+T, S+R ve cPTIO uygulamalarının AOX1 transkripsiyonu üzerine etkisi.....	90
3.33 Yabani tip <i>Arabidopsis thaliana</i> Col.ve atglr3.4 mutantlarına egzogen SNP, Tm, R, S+T, S+R ve cPTIO uygulamalarının UCP1 transkripsiyonu üzerine etkisi.....	91
3.34 Yabani tip <i>Arabidopsis thaliana</i> Col.ve atglr3.4 mutantlarına egzogen SNP, Tm, R, S+T, S+R ve cPTIO uygulamalarının SDH2E transkripsiyonu üzerine etkisi.....	92
3.35 Yabani tip <i>Arabidopsis thaliana</i> Col.ve atglr3.4 mutantlarına egzogen SNP, Tm, R, S+T, S+R ve cPTIO uygulamalarının COX5B transkripsiyonu üzerine etkisi.....	93
3.36 Yabani tip <i>Arabidopsis thaliana</i> Col.ve atglr3.4 mutantlarına egzogen SNP, Tm, R, S+T, S+R ve cPTIO uygulamalarının CI7B transkripsiyonu üzerine etkisi.....	94
5.1 atglr3.4.1 ve atglr3.4.2 yoksunluğunda NO ve ilişkili analizler, stres belirteçleri, ROS üretimi, ROS düzenlenmesi, Asc-GSH döngüsü, redoks enzimleri ve gen ifade analizlerinin (ER-ilşkili ve Mitokondri ilişkili) sonuçlarının şematik gösterimi.....	113

TABLolar DİZİNİ

2.1 Stres uygulamaları.....	51
-----------------------------	----



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
AD	Alzheimer hastalığı
APX	Askorbat peroksidaz
AsA	Askorbik asit
CAT	Katalaz
Col	<i>Arabidopsis thaliana</i> Columbia
DHAR	Dehidro askorbat redüktaz
GLR	Glutamat reseptörü
GPX	Glutasyon peroksidaz
GR	Glutasyon redüktaz
GSNOR	S-nitrosoglutation redüktaz
GSSG	Glutasyon disülfid
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
MDA	Malonaldehit
MDHAR	Monodehidro askorbat redüktaz
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NMDAR	N-Metil-D-Aspartat
NO	Nitrik oksit
NOS	Nitrik oksit sentaz
NOX	NDPH oksidaz
O ^{2.-}	Süperoksit
OH ⁻	Hidroksil

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
PD	Parkinson hastalığı
PDI	Protein disülfid izomeras
POX	Peroksidaz
RNS	Reaktif azot türleri
ROS	Reaktif oksijen türleri
SNP	Sodyumnitropirosit
SOD	Süperoksit dismutaz
SNO	S-nitrozotiyol



1 GİRİŞ

Dünya genelinde milyonlarca insanın hayatını olumsuz etkileyen Nörodejeneratif Hastalıklar, periferik sinir sistemi veya merkezi sinir sistemi hücrelerinin ilerleyici bir şekilde kaybıyla karakterize edilmiş, heterojen bir nörolojik bozukluklar grubudur (Wilson et al., 2023). Çoğu ülkede artan yaşam süresiyle birlikte Nörodejeneratif Hastalıkların yaygınlığının da artması beklenirken şu anda ise yaklaşık 50 milyon kişi bu hastalıklardan etkilenmektedir. Dünya sağlık örgütüne göre bu sayının 2050 yılına kadar 130 milyona çıkması tahmin edilmektedir (Prince et al., 2015).

Tüm dünyada giderek artan bir sağlık yükü oluşturmuş ve yaşlanan nüfusla birlikte daha büyük bir öneme sahip hale gelmiş olan Nörodejeneratif hastalıkların 600'den fazla çeşidi bulunmaktadır. Bunun dışında, aynı anda birden fazla dejeneratif bozukluk birlikte görülebilmektedir (Kurosinski et al., 2002). Örneğin Alzheimer hastalarında(AD), Parkinson hastalığı (PD) semptomları da saptanabilmektedir. Pek çok sebeple bu hastalıkların ortaya çıkabildiği görülmektedir. Bunların başında genetik mutasyonlar, metabolik bozukluklar ve çevresel faktörler gibi birçok etken gelmektedir. Ayrıca, birbirinden karmaşık hücresel mekanizmanın rol oynadığı bu hastalıkların tedavisinde kullanılabilecek etkin tedaviler henüz çok fazla geliştirilememiştir. Özellikle dejenerasyonun gelişimini durdurabilecek yöntemler ve erken teşhisin nasıl yapılabileceği bilinmemektedir. Ancak ortaya çıkan semptomları ortadan kaldırabilecek ilaçlar tedavide kullanılmaktadır (Pleasure, 2010). Bunun sebebi ise, nöronların yapısal ve fonksiyonel olarak işlevlerini yitirmeye başlaması ile nöron ölümüne yol açan, ilerleyici şekilde devam eden bozukluklar olarak bilinen, günümüzde tedavisinin henüz olmamasından kaynaklanmaktadır. Alzheimer hastalığı (AD) ve Parkinson hastalığı (PD) gibi birçok nörodejeneratif hastalık, bu nörodejenerasyon süreci ile oluşmaktadır. Bu sebeple nörodejenerasyonun altında yatan karmaşık mekanizmalar tam olarak aydınlatılması bu hastalıkların tedavisi için büyük önem taşımaktadır.

1.1 Nörodejeneratif Hastalıklar ile İlgili Genel Bilgiler

Bahsedildiği gibi farklı nörodejeneratif hastalıkların farklı beyin bölgelerinde geliştiği ve farklı etiyolojilere sahip oldukları gözlemlenmiş, ancak benzer hücresel ve moleküler süreçlere etki edebildikleri de bilinmektedir (Teleanu et al., 2022). Bu ortak süreçlerden biri ise, reaktif oksijen türlerinin (ROS) düzenlenmemiş üretiminden kaynaklanan oksidatif stresin gözlemlenmesidir (Barnham et al., 2004; Onose et al., 2022). ROS'un memeli, hayvan ve

bitkiler gibi pek çok canlıda hücresel mekanizmalar ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu moleküller aşırı üretildiğinde moleküllerin oksidatif bozulmasına neden olarak, yaşlanma, kanser, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklar gibi birçok bozukluğun ilerlemesinde rol oynayabilirler. Ayrıca, artan ROS üretimi, hücrenin redoks dengesini oksidatif duruma kaydırarak işlev bozukluğuna ve hatta ölümüne yol açabilir. Bununla birlikte, vücut doğal olarak bu sonuçlarını dengeleyebilecek birkaç mekanizmaya sahiptir. Bunlardan biri de antioksidanlardır. Bu antioksidanlar, ROS'u tespit edebilir ve etkilenen hücresel moleküllerin oksidasyonunu azaltabilir ve bozulmuş bir antioksidan sistemi hastalık patogenezinin eşit derecede katkıda bulunabilir (Misrani et al., 2021; Liu et al., 2018).

1.1.1 Oksidatif Stres ve Nöro-dejenerativite

Nörodejeneratif hastalıkların gelişiminde ROS'un rolünü belirlemek için pek çok çalışma yapılmış ve bu hastalıklarda tetikleyici bir faktör olmasa da, oksidatif hasar ve mitokondri ile etkileşimlerinden dolayı hastalığın ilerlemesini kötüleştirebileceğini göstermiştir (Liu et al., 2017; Kazakov et al., 2020). Eşleşmemiş iki elektronu nedeniyle oksijen, radikal oluşumuna yatkındır. Bu nedenle, ROS'lar oksijenden türetilen reaktif moleküllerin bir sınıfı olarak sınıflandırılırlar. Bu sınıfın üyeleri, kalan değerlik elektronları sebebiyle kısa ömre ve yüksek reaktiviteye sahiptir. Elektron eklenmesi yoluyla oksijenin indirgenmesi sonucunda birçok ROS oluşabilir. Tüm ROS türleri arasında, $\cdot\text{OH}$ en reaktif olanı ve sitotoksik etkiye sahip olanıdır. Hücresel ROS genellikle dışsal ve içsel kaynaklardan üretilmektedir (Kim et al., 2015; Balogun et al., 2021) (ilerleyen kısımlarda ROS'lar ve antioksidanlara daha detaylı bir şekilde değinilecektir). Ayrıca bu moleküller, lipitler, proteinler, RNA ve DNA gibi önemli hücresel makromoleküllerde de oksidatif değişikliklere neden olmaktadır. Protein oksidasyonu da, özellikle okside olmuş proteinlerin sitotoksik agregatlar oluşturarak toksik bir işlev kazanmasından dolayı giderek daha önemli hale gelmektedirler (Avery 2011; Shefali et al., 2021). Bu nedenle, farklı faktörlerin birikmiş etkileri, beyin için özellikle oksidatif hasara duyarlı hale getirilir ve bahsedilen nörodejeneratif hastalıklarda etkilidir (Cobley et al., 2018). Bu Nörodejeneratif hastalıkların en yaygın görüleni ve çalışılanları ise AD ve PD'dir.

1.1.2 Alzheimer Hastalığı

2018 Dünya Alzheimer Raporu'na göre, bu yıl içerisinde yaklaşık 50 milyon kişiye demans teşhisi koyulmuştur. Ayrıca bu rapor, küresel olarak her üç saniyede bir yeni bir demans vakası olacağını belirtmektedir (Ashrafi et al., 2020; Cheignon et al., 2018). AD,

bilişsel yeteneklerin kademeli bir şekilde kötüleşmesiyle tanımlanmaktadır. Sinapsların bozulması ve nöronların ölümü sonucunda hipokampus bölgesinde (duygular, öğrenme, mekânsal yönlendirme ve bellek oluşturmada sorumlu bölge) beyin atrofisine yol açmaktadır. AD'nin gelişimi için temel risk faktörü yaşlılıktır ve 85 yaşın üzerindeki bireylerin neredeyse yarısını etkilediği görülmüştür. Ayrıca, menopoza sırasında östrojen seviyelerinin düşmesi nedeniyle, kadınların erkeklere kıyasla AD geliştirme olasılığı daha yüksektir (Cheignon et al., 2018; Rahman et al., 2021).

AD'nin patolojisi, beta-amiloid ($A\beta$) gibi birikmiş peptitlerin özellikle anormal bir birikimi ve hücre içi tau nörofibriller düğümlerin (NFT) oluşumunu şekillendirir. Bu süreçler, başta oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengesizlik nedeniyle artan oksidanların neden olduğu oksidatif stres üretiminin artmasıyla gerçekleşir. Bunun nedeni ya serbest radikal artışı ya da antioksidan savunmanın azalması ile ilişkilidir (Huang et al., 2016; Angelova et al., 2018).

Oksidatif stresin AD ilerlemesine üç ana mekanizma ile aracılık ettiği gözlenmiştir. Bu mekanizmalar, hücre homeostazını etkileyen ROS üretimi, $A\beta$ ve p-tau oluşumunun upregülasyonlarıdır. Bunlar makromolekül peroksidasyonu, $A\beta$ metal iyon redoks potansiyeli ve mitokondriyal işlev bozukluğuna sebep olur (Cassidy et al., 2020). Ayrıca, AD beyinlerinin, sağlıklı bir kontrol beynine göre üç katına kadar artmış nöronal Cu^{2+} ve Zn^{2+} seviyeleri gösterdiği bildirilmiştir. Bu katyonlar, $A\beta$ peptitlerine bağlanabilir, redoks reaksiyona girebilir ve önemli miktarda ROS üretebilirler. Bu nedenle, artmış oksidasyon ve artmış ROS üretimi arasında pozitif bir geri besleme döngüsü oluşmaktadır (Cassidy et al., 2020). ROS indüklü oksidatif stres, AD patogeneğinde β -amiloid birikimi ve bu birikimle ilişkili olduğundan, hastalığın patogeneğinde önemli faktörlerden biri olarak kabul edilmektedir. Hastalığın erken evrelerinde bile, bu birikimin arttığı ve mitokondriyal işlev bozukluğuna yol açtığı gözlenmiştir. Çalışmaların sonuçları, Alzheimer hastalarında β -amiloid tarafından indüklenen oksidatif stres ile, antioksidanların savunma mekanizmaları ile ilgili kusurların yüksek düzeyde OS'ye yol açtığı ve bunun da β -amiloid üretimini ve birikimini artırdığı gözlenmiştir (Liu et al., 2017; Kim et al., 2015). Böylece yapılan çalışmalar ile nöronal bozukluk ve oksidatif dengesizliğin, AD'nin başlangıcı ve ilerlemesi açısından büyük öneme sahip olduğu gösterilmiştir. Aşırı ROS üretiminin işleyiş mekanizmasını anlamaya yönelik devam eden araştırmalar mevcuttur. Ayrıca AD hastalarında

bu durumun mitokondriyal işlev bozukluğuna yol açtığı belirlenmiştir (Liu et al., 2017; Kim et al., 2015).

1.1.3 Parkinson Hastalığı

Diğer nörodejeneratif bozukluklarla karşılaştırıldığında, Parkinson hastalığı (PD) 60 yaşın üzerindeki bireyleri etkileyen en ciddi iki hastalıktan biridir. İstatistiklere göre, PD'nin 50 yaşından önce görülmesi nadirdir. Ancak bu hastalıktan 65 yaşın üzerindeki bireylerin yaklaşık %2'si etkilenirken, bu oran 80 yaşın üzerindeki insanlarda iki katından fazladır (%5) (Liu et al., 2017; Kim et al., 2015; Rahman et al., 2020).

Beyindeki substantia nigra pars kompakta'da dopaminerjik nöron kaybının gözlemlendiği durum olarak tanımlanan PD, ROS'un aşırı üretimiyle ilişkilendirilmiştir. Bu birikimin bir nedeni, mitokondriyal işlev bozuklukları ve inflamasyonla ilişkilidir. ROS'un beyinde en çok üretildiği başlıca bölgeler, nöronlardaki mitokondri ve nöroglialardır (nöron olmayan ancak onları koruma görevindeki hücreler). Aşırı ROS üretimi ve bunun başlıca nedenleri nöro inflamasyon, mitokondriyal işlev bozukluğu, yaş, demir ve kalsiyum seviyelerinin yükselmesi ve dopaminin bozunması ile ilişkilidir. Ayrıca, çevresel olarak pestisit ve nörotoksinlere maruz kalındığında ROS üretim daha da artabilmektedir. Dopaminerjik nöron kaybını belirleyen kesin süreçler tam olarak aydınlatılamamıştır, ancak ROS'un bunun anahtar faktörlerinden biri olduğu öne sürülmektedir (Liu et al., 2017; Kim et al., 2015; Venkateshappa et al., 2012).

Ayrıca, nörodejenerasyon aracılı ROS üretimi nedeniyle lipid zarları ve hücresel proteinler hasar görebilir ve bunun sonucunda oksidatif strese yol açabilir. PD ile Mitokondriyal Kompleks I'in yokluğunun doğrudan ilişkili olduğu gözlemlenmiştir. Çünkü Kompleks I eksikliklerinin PD'ye özgü olan nöral apoptoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu kusur, mitokondriyal zar potansiyelini koruma ve oksidatif strese karşı koruyucu bir etkiye sahip olan belirli proteinlerin mutasyonuna bağlanmıştır. Bu mutasyonlar hastalığın başlangıcıyla ilişkilendirilmiş ve muhtemelen mitokondri aktivitesini etkileyerek ROS'un aşırı üretimine ve daha yüksek oksidatif strese maruz kalınmasına neden olabileceği düşünülmüştür (Liu et al., 2017; Venkateshappa et al., 2012).

Şu anda PD için etkili mevcut tedaviler bulunmamaktadır. Ancak, hastalığın evrimiyle ilişkili ROS mekanizmalarının anlaşılması aracılığıyla sağlanan bilgiler, semptomların

azaltılması için tedavilerin geliştirilmesine yardımcı olabileceği bilinmektedir (Liu et al., 2017). Ayrıca, devam eden klinik denemeler, PD patogenezinde ROS mekanizmalarının daha derin bir anlayışını yakın zamanda ortaya çıkarabilir ve uygun yönetimi için çözümler sunabilir olduğunu desteklemektedir (Teleanu et al., 2022).

1.1.4 Nöro koruma ve Antioksidanlar

Yukarıda da bahsedildiği gibi, oksidatif stresin nörodejeneratif bozukluklardaki rolünün önemi ve nöronal hasar ve ilişkili hücre ölümünün temel patolojik mekanizmalarından biri olduğu tespit edilmiştir. Antioksidanların biyolojik ortam içindeki oksidatif stresi değiştirebileceği ve nörodejeneratif bozuklukların semptomlarını azaltabileceği gözlenmiştir. Ayrıca, antioksidanların bu tür bozuklukların ilerlemesini önlemek, geciktirmek veya hafifletmek için etkili olduğu belirtilmiştir (Essa et al., 2019; Duhan et al., 2020). Antioksidan aktivitesi, tek bir bileşik ya da SOD, katalaz (CAT) veya glutatyon peroksidaz (GPX) gibi bir enzim tarafından sağlanabilir.

Hücre içi ROS dengesinin ayarlanmasında etkili antioksidanlar ile ilgili pek çok çalışma mevcuttur. Bunlardan biri olan Superoxide dismutase (SOD), bir enzimatik antioksidandır ve hücre içinde en güçlü antioksidan özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir. ROS'lara karşı koruyucu aktiviteye sahiptir. SOD, süperoksit anyonlarını daha az zararlı reaktif oksijen türlerine parçalamak ile görevlidir. Ancak, SOD eksikliği oldukça yaygındır. Çünkü yaşlanma ile büyük ölçüde ilişkili olan bu antioksidan enzimin yaşlanma ile birlikte seviyeleri azalırken, ROS miktarı artmaktadır. Bu nedenle, bu enzim, yaşlanmayı artıran birçok etkene ve hücre apoptozisine karşı hücre sağlığı için çok önemlidir (Ighodaro and Akinloye, 2018). Bu nedenle, AD (McLimans et al., 2019) ve PD (De Lazzari et al., 2018) dahil olmak üzere çeşitli hastalıklara karşı etkili mücadelede SOD'un önemli bir araç olduğu kanıtlanmıştır.

Katalaz (CAT), oksijen gerektiren tüm dokularda bulunabilen bir enzimatik antioksidandır. SOD ile birlikte H_2O_2 'yi H_2O ve moleküler O_2 'ye indirger. Bu özel antioksidan, hücrelerde yüksek seviyelerde bulunabilir ve sürekli olarak H_2O_2 moleküllerini arar. Etkinliği oldukça yüksektir, çünkü bir saniye içinde milyonlarca H_2O_2 molekülünü indirebilir. Hücrelerde bol miktarda bulunabilirken, fareler dışında mitokondri içinde bulunmaz. Hidrojen peroksit moleküllerinin mitokondriyal parçalanma süreci başka bir enzim olan glutatyon peroksidaz tarafından devam ettirilir. Bu enzimin eksikliği veya mutasyonunun, birçok nörodejeneratif bozuklukla doğrudan ilişkili olduğu gözlenmiştir. Katalazın AD'de ve PD'de önemli nöro koruyucu etkiler sağladığı bildirilmiştir (Haney et al.,

2018). Glutasyon peroksidazının (GPx) ana aktivitesi mitokondri içinde gerçekleşir ve vücudun çeşitli bölgelerinde bulunabilirler. Birçok çalışma, GPx aktivitesinin düşük olduğu hastalarda, disfonksiyonel bir antioksidan koruma aktivitesine sahip olduklarını ve bu durumun işlevsel proteinlerde oksidatif hasara neden olduğunu öne sürmüştür (Teleanu et al., 2022). Nörodejeneratif belirtileri azaltmada antioksidanların etkinliğini araştırmak için birçok çalışma yapılmış ancak kanıtlar henüz yetersizdir. Ayrıca ROS'un çeşitli nörodejeneratif durumlardaki tüm rollerini bulmak ve antioksidan temelli terapötik müdahaleler geliştirmek için daha kapsamlı araştırmalar çok büyük öneme sahiptir. Bu sebeple, nörodejeneratif hastalıkların moleküler mekanizmalarının aydınlatılmasında farklı pek çok çalışma ve farklı yöntemlerin kullanımı mevcuttur.

1.2 İnsan Hastalıklarının Araştırılmasında model Organizma Olan *Arabidopsis thaliana*

İnsan hastalığı araştırmaları çok karmaşık bir süreçtir. Bunun nedeni; genlerin ve proteinlerin karmaşık hücresel ağlarda nasıl etkileşime girdiği büyük fonksiyonel genomik girişimlerle açıklansa da, birçok kompleks hastalık, birden fazla genin ve bu genlerin birbirleriyle ve çevreleriyle etkileşiminin etkisi altında olmasından kaynaklanmaktadır. Bu nedenle, insan hastalıkları araştırmalarında, yeni tanılarının konulabilmesi, yeni hastalık teşhis araçlarının tasarısının yapılabilmesi ve tedavi stratejilerinde önemli keşiflerin yapılabilmesi araştırmalarda, sadece memeli hücre hattı ve insan doku örneklerinin değil *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster* ve *Caenorhabditis elegans* gibi birçok model sistemin de kullanılmasına bağlıdır (Xu and Moller, 2011). Son yıllarda, bu model sistemler arasına bitki biyologlarının model organizması olarak bilinen *Arabidopsis thaliana*'da eklenmiştir. İnsan hastalık oluşum mekanizmalarının araştırıldığı çalışmalarda bu model bitkinin kullanılması birçok hastalığın oluşum mekanizmasındaki eksiklikleri tamamlamıştır. *A. thaliana* ve insan genom dizilerinin tamamlanması, bu iki organizma arasındaki korunmuşluklar ve ayrılıkların DNA seviyesinde karşılaştırılmasını mümkün kılmıştır. İnsanlar ve *Arabidopsis*, 1,6 milyar yıl önce evrimsel olarak ayrılmasına rağmen insan genlerinin büyük çoğunluğunun, *Arabidopsis*'te korunmuş ortologları vardır (Xu and Moller, 2011). Bu durum, özellikle insan hastalıklarında rol oynadığı doğrulanan ya da farz edilen genlerin gerçekte öyle olup olmadıklarının kontrolü için oldukça önemlidir. Örneğin, *Arabidopsis*'in, insanlardaki nörodejeneratif hastalık genlerinin *Arabidopsis*'teki ortologlarıyla benzerlik oranı %71 iken insan kanser genleriyle benzerlik oranı %70'tir (Jones et al., 2008). İlginç olarak; bu oran, diğer model organizmalar olan *S. cerevisiae* (%41) ve *D. melanogaster* (%67)'in benzerliğinden daha yüksektir. (Jones et al., 2008). Bütün bunlara ek olarak *Arabidopsis* ve

insanların, fotobiyoloji, protein yıkımı, sirkadiyen saat, DNA metilasyonu, RNA susturulması ve G protein sinyalleme gibi evrensel hücre mekanizmalarına ait gen aileleri de yüksek oranda birbirine benzerdir (Jones et al., 2008). Genetik benzerliğin yanı sıra, Arabidopsis'in insan hastalığı araştırmaları için ideal bir tamamlayıcı model oluşturması için birçok özel avantaja sahiptir. Bu avantajlar (i) Düşük altyapı ve işletme maliyetleriyle basit yetiştirme ve bakım, (ii) transgenik yaklaşımlar için hızlı ve verimli dönüşüm protokolleri, (iii) büyük mutan koleksiyonları ve genomik kaynakların bulunması ve (iv) az sayıda etik kısıtlamaya tabi olmasıdır (Xu and Moller, 2011).

Son bulgular ve araştırma faaliyetleri temelinde Arabidopsis'in hastalık araştırmalarında bir tamamlayıcı model organizma olarak değerinin göz ardı edilmemesi gerekmektedir. Özellikle Alzheimer hastalığı ve Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili moleküler mekanizmaları aydınlatmak için Arabidopsis'in kullanımı söz konusudur.

Genetik çalışmalar, AD ile ilişkilendirilen bir dizi geni tanımlamıştır (Alikhani et al., 2009) ve bu genlerin yarısının Arabidopsis'te ortologlarının varlığı saptanmıştır. Bu da en azından kısmen, bu genlerin fonksiyonunun Arabidopsis ortologları aracılığıyla belirlenebileceğini göstermektedir. Son zamanlardaki çalışmalar, insan beyni mitokondrisinde A β 'yi parçalayan bir PITRM1 kodlu insan pre-sekans proteazı (hPreP) Alzheimer hastalığı ile ilişkilendirilmiştir (Alikhani et al., 2009) ve Arabidopsis'te de iki PITRM1 ortologu, AtPreP1 ve AtPreP2 belirlenmiştir. PreP, ilk olarak Arabidopsis'te mitokondriyal matriks ve kloroplast stroma metalloendopeptidaz olarak tanımlanmış ve karakterize edilmiştir (Glaser and Alikhani, 2010). PreP'in temel işlevi, kloroplast proteinlerinin serbest geçiş peptitlerini (TP) ve mitokondriyal proteinlerin pre-sekanslarını veya sinyal peptitlerini parçalamaktır (Stahl et al., 2000; Stahl et al., 2002). Kloroplast ve mitokondriyal proteinlerinin büyük çoğunluğu çekirdek tarafından kodlanır, sitozolde sentezlenir ve daha sonra TP'lerin veya pre-sekansların yönlendirmesiyle kloroplastlara ve mitokondrilere aktarılır. Ardından, TP'ler veya pre-sekanslar mitokondriyal işleme peptidazı (MPP) (Gabaldon and Huynen, 2004) veya stromal işleme proteazı (SPP) (Gomez et al., 2003) tarafından kesilir ve bu serbest geçiş peptitleri, potansiyel zararlı etkilerinden dolayı PreP tarafından uzaklaştırılmalıdır. Her iki proteaz da tercihen P1 konumunda küçük yüksüz amino asitleri veya serinleri ve P1'0 konumunda temel amino asitleri kesmeye yatkındır ve neredeyse sadece pre-sekansların alfa-helikal yapılarının uçlarına doğru parçalarlar. AtPreP1 ve AtPreP2 arasındaki yüksek dizi benzerliği ve kesim

özgüllüklerindeki benzerliklere rağmen, her iki proteazın kesim bölgesi tanınması farklılık gösterir (Stahl et al., 2005).

PreP homologları arkealar dışında tüm organizmalarda tanımlanmıştır. Başlangıçta insan metal proteazı 1 (hMp1) olarak tanımlanan insan pre-sekans proteazı hPreP, AtPreP'lere %48 oranında dizi benzerliği göstermektedir (Alikhani et al., 2009). hPreP proteini memelilerde mitokondriyal matrikste lokalize olur (Taylor et al., 2003) ve mitokondrilerde A β 'nin parçalanmasından sorumlu tek proteazdır (Falkevall et al., 2006). Cys90 ve Cys527, tüm memeli PreP dizilerinde korunur. Ayrıca hPreP, oksidatif koşullar altında disülfid köprü oluşumu nedeniyle A β 'ye karşı aktivitesini kaybeder. Bu durum, Alzheimer hastalığındaki artan mitokondriyal ROS seviyelerine cevapta hPreP'in inhibisyonu doğrudan fizyolojik öneme sahip olabildiğini göstermektedir (Alikhani et al., 2009). Ayrıca, A β 'nin mitokondriyal alkol dehidrogenazı ABAD ile de etkileşime girdiği ve artmış ROS üretimine ve hücre ölümüne neden olduğu (Lustbader et al., 2004) görülmüştür. Bunun dışında, mitokondriyal matriks proteini olan CypD ile etkileşime girdiği gösterilmiştir (Du et al., 2008). Bu nedenle, ABAD veya CypD ile ilişkili A β , hPreP tarafından parçalanamaz ve sonuçta Alzheimer hastalarının beyinlerinde plakların toksisitesine yol açmaktadır (Alikhani et al., 2009). Beklenildiği üzere, Arabidopsis'teki PreP ile insanlardaki PreP arasında farklılıklar bulunmaktadır. Ancak bitki PreP'leri üzerinde yapılan temel araştırmalar, substrat spesifikliğı, subseleler lokalizasyonu ve 3D yapısal analizler gibi konularda, insan PreP araştırmalarının yönünü şekillendirmiştir ve sonuç olarak Alzheimer hastalığı (AD) ile ilgili yeni bulguların elde edilmesine yol açmıştır.

AD sonra ikinci en yaygın nörodejeneratif bozukluktur PD'dir (de Lau and Breteler, 2006). PD ile ilişkilendirilen genetik lezyonlar tanımlanmıştır ve bunlar sürekli olarak genişlemektedir. İlginç bir şekilde, Arabidopsis'in, PARK1 ve PARK3 dışında tüm PD ile ilişkilendirilen genlerin ortologlarına sahip olduğu görülmüştür ve bu sebeple Arabidopsis'teki keşiflerin PD'nin moleküler mekanizmalarını anlamamıza katkıda bulunduğu belirtilmiştir. Ancak, şu ana kadar sadece bir DJ-1/PARK7 ortoloğı olan AtDJ-1a, PD mekanizmalarıyla ilişkilendirilmiştir (Biskup et al., 2008).

DJ-1 mutasyonları, otozomal resesif, erken başlangıçlı PD'ye neden olur (Lev et al., 2006). DJ-1, beyin dopaminerjik nöron hücre ölümü ile ilişkilendirilen oksidatif stres yanıtlarının bir parçasıdır. Ayrıca sitozoldeki redoks durumu ile düzenlendiğı bilinmekle birlikte (Lev et al., 2006), kesin çalışma mekanizması hala gizemini korumaktadır. DJ-1'in

İnsanlardan farklı olarak tek bir gen tarafından kodlanması yerine, Arabidopsis'te üç DJ-1/PARK7 homoloğu belirlenmiştir. Bunlardan ikisi (AtDJ-1b ve AtDJ-1c) kloroplastlara lokalize olurken, AtDJ-1a insan DJ-1 (hDJ-1) ile benzer şekilde gözlemlenen sitozol ve çekirdekte lokalize olur (Xu et al., 2010). Memelilerde DJ-1/PARK7'in yanlış ifadesi nöronal hücre ölümüne neden olmaktadır. Benzer şekilde, bitkilerde de AtDJ-1a kaybı apoptoza yol açmaktadır. AtDJ-1a, Arabidopsis'te sitozolik süperoksit dismutaz (SOD) olan CSD1 ve insan SOD1 ile bitki hücrelerinde etkileşime girmektedir. Ayrıca, insan hücrelerinde hDJ-1'in memelilerde SOD1 ile etkileşime girdiği gösterilmiştir (Xu et al., 2010). Benzer yaklaşımlar aynı zamanda bitki hücrelerinde AtDJ-1a ve memeli hücrelerinde hDJ-1'in Arabidopsis ve insan glutatyon peroksidazı (GPX2) ile etkileşime girdiğini de göstermiştir (Xu et al., 2010). Böylece Arabidopsis ve memelilerde aynı DJ-1/PARK7 etkileşim deseninin olduğunu ortaya koymuştur. Bununla birlikte, bazı farklılıklar da mevcuttur. Bunlardan birisi de Arabidopsis AtDJ-1a ile etkileşime giren H_2O_2 'nin süpürülmesinde yer alan askorbat peroksidaz memeli hücrelerinde eksiktir.

SOD aktivasyonu, DJ-1'in ROS detoksifikasyonundaki rolüne dair ipuçları sağlasa da, SOD sadece süperoksit anyonunu H_2O_2 'ye dönüştürür ve ardından H_2O_2 'nin GPX veya CAT tarafından H_2O 'ya detoksifiye edilmesi gerekmektedir. Yapılan çalışmalar ile AtDJ-1a ve hDJ-1 sırasıyla AtGPX2 ve GPX2 ile etkileşime girer. Ancak GPX2 aktivitesinde eşzamanlı bir artış olmadığı görülmüştür (Xu et al., 2010), bu da hücrel GPX2 aktivite seviyelerinin yeterli olduğunu veya DJ-1/PARK7'nin GPX2'yi sadece SOD'a bağlamak için bir çerçeve proteini olarak işlev görebileceğini düşündürmektedir. Benzer şekilde, Arabidopsis'teki ilk araştırmalara dayanarak, DJ-1'in bitkilerde ve insanlarda SOD, GPX ve muhtemelen APX1 veya CAT'ı bir araya getiren bir iskelet protein olarak hareket ettiğine dair kanıtlar bulunmaktadır. Bu sayede ROS temizlenmesini düzenlenmekte ve böylece kontrol edilerek, oksidatif stres kaynaklı hücre ölümünü önlemektedir (Xu and Moller, 2011).

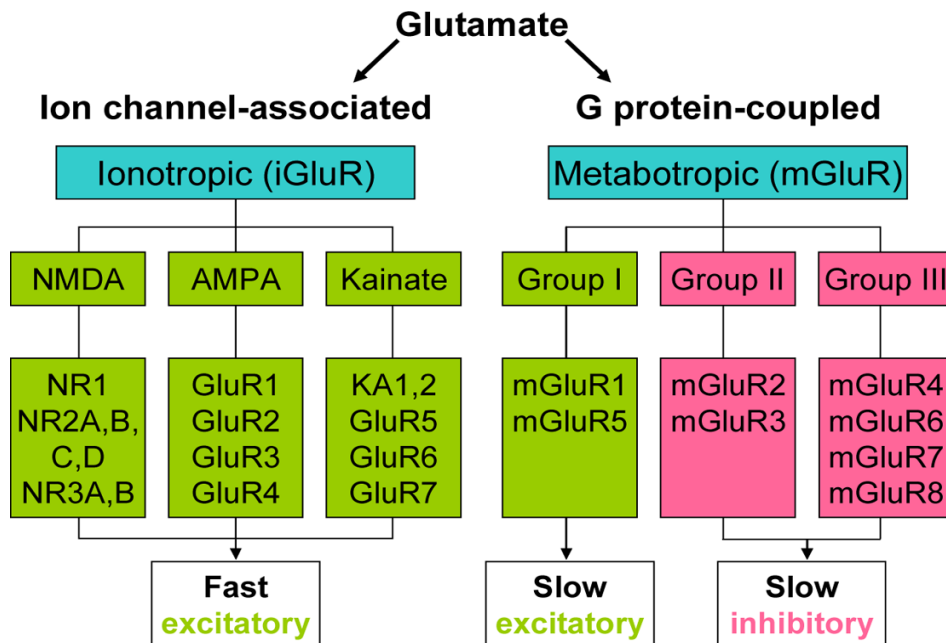
LRRK2 (PARK8), leucine zengin tekrar reseptör kinaz alt ailesinin bir üyesidir ve PD riskinin artmasıyla ilişkilendirilmiştir (Kumari and Tan, 2009). LRRK2 ilk kez AtBRI1 olarak Arabidopsis'te tanımlanmış (Li and Chory, 1997), bir brassinosteroid (BR) reseptörüdür. BR, insanlarda bulunmasa da, Arabidopsis'teki araştırmalar, reseptör kinaz aracılı sinyal iletimini anlamak için bir paradigma sunar ve ayrıca PD ile ilişkilendirilen genler ve hormonlar arasındaki olası ilişkiye dair anlayış geliştirilmesine katkı sağlamaktadır (Kim and Wang, 2010). Sonuç olarak, Arabidopsis geleneksel olarak insan hastalıklarını incelemek için bir

model sistem olarak görülmemesine rağmen, yüksek genetik korunma ve temel biyolojik süreçlerin benzerliği, Arabidopsis'in hastalık araştırmalarında henüz keşfedilmemiş ve tamamlayıcı bir kaynak olduğunu düşündürmektedir.

Bahsedilen bu nörodejeneratif hastalıkların giderek artıyor olması, farklı yollar ile altında yatan mekanizmalar aydınlatılmalıdır. Bu sebeple bahsedilen çalışmalara ilave olarak, son araştırmalar, sadece yukarıda belirtilen genlerde meydana gelen mutasyonların değil beyin hücre zarındaki bir Glutamat reseptörünün (NMDAR) aracılık ettiği Nitrik Oksit (NO) birikimi teşvikli Endoplazmik Retikulum (ER) Stresinin ve bu reseptörlerin aktivitesi sonucu oluşan mitokondriyal fonksiyon bozukluğunun da Alzheimer ve Parkinson'a neden olduğunu göstermektedir (Forrester et al., 2006).

1.3 Glutamat Reseptörleri

Glutamat, memeli sinir hücrelerinin normal fonksiyon göstermesi için gerekli olan en büyük uyarıcı nörotransmitterdir. Bir hücre, doku ya da organı uyarıp çalışmasını hızlandıran, artıran madde yani; eksitator olarak işlev göstermektedir. Memelilerde glutamat reseptörleri (GLR'ler), sinirsel iletim boyunca glutamatu algılamak için fonksiyon gösteren multimerik kanallardır (Armstrong et al., 1998). Bu reseptörlere glutamatın bağlanması ile transmembran kanallar açılır ve hücreye katyon girişi gerçekleşir. Bu kanallar, Ca^{2+} ve Na^{+} gibi katyonların taşınması için ligand-kapılı kanal olarak fonksiyon gösterdikleri görülmüştür (Scatton, 1993). Memelilerin merkezi sinir sisteminde, glutamat tarafından aktive edilen iyonotropik glutamat reseptörlerini (iGluR) ve metabotropik glutamat reseptörleri (ayrıca G-proteinine bağlı reseptörleri olarak da adlandırılır) olmak üzere iki ana grup bulunur (Asher and Nowak 1988; Collingridge and Lester 1989; Monaghan et al., 1989).



Şekil 1 Glutamat Reseptör Ailesi (Blackshaw et al., 2011)

iGluR'ler hızlı uyarıcı nörotransmisyonunda görevlidir ve öğrenme, sinaptik plastisite ve hafıza gibi daha yüksek beyin fonksiyonlarına katılmaktadırlar. Ayrıca, nöronların presinaptik veya postsinaptik membranları arasındaki hızlı uyarıcı sinyal iletiminde rol oynarlar. Bu iGluR'lerin büyük bir alt sınıfını oluşturan N-Metil-D-Aspartat (NMDA) reseptörleri, esansiyel ve modülatör alt birimlerin heterolog kompleksidir. Yedi NMDA reseptör alt birimi tanımlanmıştır ve bu reseptörlerin her biri spesifik etki sağlamaktadır. Bu heterolog yapı, bireysel biyolojik ve farmakolojik özellikler gösteren farklı heteromerlerle sinir sisteminin esnek modülasyonuna büyük bir potansiyel sağlamaktadır (Chaffey and Chazot, 2008). NMDA reseptörlerini içeren çalışmalar yoğun bir şekilde sürdürülmektedir. Bunun sebebi ise, sinapslarda uzun süreli değişimleri tetikleyerek, öğrenme ve hafıza gibi fizyolojik işlevlerde önemli rol oynamalarından kaynaklanmaktadır. Ancak, bu reseptörlerin aşırı uyarılması durumunda; Alzheimer, Parkinson, Huntington, amiotropik lateral sklerozis gibi istenmeyen nörodejeneratif hastalıklara da yol açmaktadır (Wu and Zhuo, 2009).

Bunun dışında, memelilerdeki iGluR'ler ilginç olarak yaşamın üç domaininde de tanımlanmışlardır. Örneğin, hayvanlarda bu reseptörlerin varlığı ktenoforlardan omurgalılara kadar görülmektedir. Ayrıca, iGluR'lerin hidra (Pierobon, 2012) gibi eski filumlarda nöronal sinyal verme, gelişme ve esneklik için temel oluşturduğu da görülmüştür ve daha gelişmiş nematod ve omurgalı filumlarında korunmuş olduğu düşünülmektedir. İlginç olarak, Chlamydomonas, klorofitler, yosunlar, eğrelti otları, gymnospermiler ve çiçekli bitkilerin genomlarında da glutamat reseptör benzeri kanallarda bulunmuştur (De Bortoli et al., 2016).

Sinir sistemi veya nöron benzeri elektriksel sinyalleşmeye izin veren herhangi bir yapıya sahip olmamasıyla karakterize edilen bitkilerde, GLR'lerin keşfi çok büyük yankı oluşturan beklenmedik bir keşif olarak görülmüştür (Lam et al., 1998). Keşfinden bu yana ve aşırı özelleşmiş hayvan akrabalarının aksine, bitki GLR'lerinin çeşitli hücresel süreçlerde ve hücre ve bitki fizyolojisinin farklı yönlerinde rol aldığı gösterilmiştir. Örneğin, GLR'ler bitki fizyolojisi ile ilişkili olarak pek çok yolak ile ilişkilendirilmiştir. Bunlara; absisik asit (ABA) biyosentezi ve sinyalleşme (Kang and Turano, 2003; Kang et al., 2004; Kong et al., 2015), karbon ve azot metabolizması (Kang and Turano, 2003; Kang et al., 2004), kök gravitropizması (Miller et al., 2010), yan kök başlatma (Vincill et al., 2013), kök gelişimi (Singh et al., 2016), su kaybı (Kang et al., 2004; Lu et al., 2014), doğuştan bağışıklık tepkileri

(Kang et al., 2004; Kwaaitaal et al., 2011; Li et al., 2013; Manzoor et al., 2013; Forde ve Roberts, 2014), stomatal kapanma (Cho et al., 2009), polen tüpü büyümesi (Michard et al., 2011; Wudick et al., 2018), yara sonucu yapraktan yaprağa elektriksel sinyalleşme (Mousavi et al., 2013), tohum çimlenmesi (Kong et al., 2015), yaprak biti beslenmesine tepki (Vincent et al., 2017) ve yosun sperm sinyalleşmesi (Ortiz-Ramírez et al., 2017) örnek verilebilir.

Model bitki *Arabidopsis thaliana*'nın genomunda insan iyonotropik glutamat reseptörleri (iGluR'ler) ile karşılaştırılabilir şekilde 20 glutamat reseptör geni: glutamat benzeri reseptörler (AtGLR'ler) tanımlanmıştır. Yukarıda bahsedilen pek çok bitki fizyolojisi ile ilişkili yolağın yanı sıra AtGLR'ler ligand bağlama aktivitesi ile ilişkilidir, bu da bitki ve hayvan glutamat reseptörleri arasındaki evrimsel ilişkiyi doğrular niteliktedir. Bununla birlikte, hayvan agonistlerinin ve antagonistlerinin *Arabidopsis* üzerindeki etkisi, bu iki organizmanın arasında bir ilişki olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca, bu glutamat reseptörlerinin (bitki/hayvan), nörodejeneratif hastalıkların erken teşhisinde önemli rol oynadıklarının düşünülmesi ile floresans rezonans enerji transferi (FRET) yaklaşımı kullanılarak belirlenmeye çalışılması da bir gösterge niteliğindedir. Ayrıca, bitki glutamat kanalları sadece plazma zarıyla sınırlı değil, aynı zamanda mitokondri, kloroplastlar ve vakuolar membranlarda bulunabilirler (Teardo et al., 2014). Bu sebeple de daha detaylı çalışmalara gerek duyulmuş ve farklı açılardan glutamat reseptörlerini ele alan bir dizi bilimsel laboratuvar ve enstitü bu alanlarda çalışmalarını sürdürmektedir. Ancak, bitki glutamat reseptörlerinin hayvan glutamat reseptörleriyle karşılaştırılabilir olduğuna dair birçok mevcut kanıt, araştırmacıların glutamat reseptörleri hakkında ilginç gerçekleri ortaya çıkarmak için uzun süredir çaba sarf etmesine neden olmuştur.

1.3.1 Bitki GLR'leri: Evrimsel Kimlik Doğrulama

Arabidopsis'e ait 20 AtGLR, üç evrimsel sınıfa ayrılmıştır (Chiu et al., 2002). Yapılan çalışmalar, amino asit dizilimi ve potasyum kanalları, glutamat/4-aminobutanoik asit (GABA) ve asetilkolin reseptörleri gibi çeşitli kanalların dizilimleri, bitki GLR'lerinin hayvan iyonotropik glutamat reseptörleriyle aynı olduğunu göstermiştir. Filogenetik bir ağaç kullanılarak elde edilen sonuçlar ile bitki ve hayvan GLR'lerinin ortak bir atadan türediği doğrulanmıştır (Chiu et al., 1999; Chiu et al., 2002). Ayrıca, *Arabidopsis* glutamat reseptörlerinin kalsiyum sensörü ve GABA protein reseptörleri gibi farklı türlerin glutamat reseptörleri arasındaki evrimsel ilişkiyi belirlemek için uzun N terminal bölgesi kullanılmıştır (Turano et al., 2002; Nagata, 2004). Price et al. (2012)'ye göre, evrimsel olarak bitki

GLR'leri, ökaryotik diğer GLR'lerden eski bir zaman diliminde ayrılmıştır. Bu nedenle, ortak literatür, bitki homolog GLR'lerinin, metazoan glutamat reseptörlerinden farklı bir evrimsel konuma yerleştirilmesi gerektiğini önermektedir.

1.3.2 *Arabidopsis thaliana*'nın Glutamat Reseptörlerinin Yapısı

Hayvan glutamat reseptörleriyle benzer şekilde AtGLR'ler de 800-960 amino asit içeren ve her reseptör başına yaklaşık 100 kDa molekül ağırlığına sahip altı korunmuş alan içermektedir (Lam et al., 1998). Bu yapılar S1 ve S2 bölgelerine sahiptir ve ligandlara izin vererek M1'den M4'e kadar transmembran alanlara sahip bir por bölgesi (P) içerir. Böylece iyon geçişinin düzenlemesine yardımcı olur (Davenport, 2002). iGluR'lerde olduğu gibi, S1 ve S2 bölgeleri, ligandlar ona bağlandığında konformasyonel değişikliklere uğramaktadır (Sobolevsky et al., 2009). Hem bitki hem de hayvanların N-terminal bölgesi plazma zarının dışında yer almaktadır. Bu açıdan bakıldığında, bu reseptörlerin bitkilerde ve hayvanlarda benzer bir yol izlediği düşünülmektedir. Yapılan araştırmalardan birinde, NMDAR (NR 1, 2 ve 3) alt birimlerinin NMDA reseptörlerinin işlevsel olarak aktif olduğunu göstermiş (Ulbrich and Isacoff, 2008) ve reseptör kompleksleri endoplazmik retikulum içinde bir araya getirilerek bu reseptörlerin N-terminal bölgeleriyle etkileşime girdiği görülmüştür (Mah, 2005; Penn et al., 2008). Ayrıca, AtGLR'ler de tıpkı hayvan iGluR'lerinde olduğu gibi, N-terminal bölgesi aracılığıyla diğer glutamat reseptörleriyle etkileşim kurduğu bilinmektedir (Traynelis et al., 2010). Birçok çalışma, glutamat reseptörlerinin homo-/hetero-imerik şekilde var olduğunu göstermiştir. Stephens et al. (2008)'de yapılan bir çalışmada ise, heteromerik kanallar nedeniyle "A" kanallarının Glu uygulamasıyla, "B" kanallarının farklı (Ala, Cys, Gly ve Glu) amino asitlerle ve "C" kanallarının altı ligandla (Ala, Asn, Cys, Glu, Gly ve Ser) tetiklendiğini gösterilmiştir. Kanal aktivasyonunun doğası temelinde, en az bir alt ünitenin kanalın işlevi için önemli olduğu doğrulanmıştır. Çünkü kanallar "A", "B" ve "C" sırasıyla AtGluR-3.3, AtGluR-3.4 ve hem AtGluR-3.3/3.4 alt ünitelerini içeriyor ve bu nedenle, tüm kanallar Glu tarafından tetiklenip belki de AtGluR-3.3 önemli bir alt ünite olarak yorumlanmasına sebep olmuştur.

FRET yöntemleri kullanarak, AtGLR'lerin (3.2 ve 3.4) homo-/hetero-multimerizasyonunu bütün yapraklarında ifade olduğu gösterilmiştir (Vincill et al., 2012). Diğer yaklaşımlar, maya iki hibrit (Y2H) sistemi gibi, AtGluR'lerin plazma membranında homo-/heteromerik üretiminin etkileşimini doğrulamıştır (Price and Okumoto, 2013).

Başka bir çalışmada ise, glutamat reseptörlerinin korunmuş zar motiflerinin (M1'den M4'e) yanı sıra, membranın dış bölgesinde bulunan iki ayrı ligand bağlanma alanından oluştuğu gösterilmiştir (Lam et al., 1998). S1 ve S2, bir alanın iki varsayımsal substrat bağlama bölgesidir ve ligand bağlanmasında doğrudan rol alırlar (Lam et al., 1998; Traynelis et al., 2010). Literatür, ligand bağlandığında ligand bağlanma alanının konformasyonel değişiklikler gösterdiğini ortaya koymuştur. Örneğin, bir 'venüs-sineği tuzağı' benzeri bir hareket geçirirler. Bu nedenle, glutamat reseptörlerinin, özellikle agonistler için oldukça iyi çalıştığı görülmüştür (Mayer, 2016; Pohlsgaard et al., 2011; Twomey and Sobolevsky, 2018).

Evrimsel süreç temelinde, transmembran bölgeler ve ligand bağlanma bölgeleri bitkiler ve hayvanlar arasındaki ayrılmadan önce evrimleşmiştir. Glutamat reseptörleri üzerinde homoloji çalışmaları yapmış farklı bilim insanı grupları bitki ve hayvan glutamat reseptörleri arasında yaklaşık %50-60 benzerlik olduğunu göstermiş ve M2 bölgesinin M3 bölgesine göre daha düşük homoloji (%61) gösterdiğini belirlemişlerdir (Chiu et al., 2002; Nagata, 2004). Ayrıca, bir çalışma ile 20 AtGluR'un üç kladında M1, M2 ve M3 bölgelerinin yüksek düzeyde korunduğunu, S1 ve S2 bölgelerinin ise farklılıklar gösterdiğini bildirmişlerdir (Chiu et al., 2002). Bu sonuçlar, bu reseptörlerin, amino asitler veya diğer moleküller de dahil olmak üzere kendi ligandlarını bağlama kapasitesine sahip olduğunu göstermektedir.

AtGLR'ler tam olarak karakterize edilmemiş olmalarına rağmen (Forde and Roberts, 2014), birçok çalışma bitki glutamat reseptörlerine glutamat ve diğer amino asitlerin bağlanması sonucunda, hücre zarı depolarizasyonunun artan potansiyeline sahip olduğunu ortaya koymuştur. Bu durum iyon geçirgenliğinin artabileceğini ve bitkilerde amino asit kapılı kalsiyum iyon kanallarının varlığını göstermiştir (Vincill et al., 2012; Dennison and Spalding, 2000; Qi et al., 2006). Ayrıca Vincill et al. (2012)'de, bitki glutamat reseptörlerinin amino asit kapılı kanallar oluşturma yeteneğine sahip olduğu öne sürülmüş ve aspartik asit (Asn), glisin (Gly) ve serin (Ser)'in AtGluR-3.4 ile bağlandığını memeli hücrelerinde ifade edildiğinde kanıtlanmıştır. Birçok araştırma grubu bitki ligand bağlanma alanının (LBD) memeli LBD'si ile benzer olduğunu ortaya çıkarmak için aktif olarak çalışmaktadır. Tapken et al. (2013)'da, AtGLR-1.4'te amino asitler T501, R506 ve D499'da yapılan küçük bir değişikliğin, *Xenopus* yumurtalıklarında ifade edildiğinde ligand kapılı kanal aktivitesini baskıladığını gösterilmiş ve bunların AtGLR'lerde korunmuş amino asitler olduğunu açıkça ifade edilmiştir. Ayrıca, hayvan iGluR'lar gibi, alfa-amin ve karboksil primer amino asit gruplarının, bitki GLR'larında bağlanma için temel olduğu görülmektedir (Traynelis et al., 2010; Tapken et al., 2013).

Standley ve Baudry (2000) çalışmalarında, amino asit zincirinin glikolizasyonlarının, reseptör bağlanma fenomeninde değişikliklere neden olabileceği ve bitki ve hayvan glutamat reseptörlerinde benzer işlevlere sahip olabileceğini belirtmiştir.

1.3.3 Glutamat Reseptörlerinin Aktivitesi

Bitkilerde glutamat aktivitesini ilk kez, ışık koşullarında 6,7-dinitrokuinozalin-2,3-diyon (DNQX) adlı iGluR antagonisti kullanılarak hipokotil gelişiminde tespit edilmiştir (Lam et al., 1998). Glutamat ve glisin, hayvan-GluR ile benzer şekilde hipokotil gelişimini başarıyla kontrol etmişken, hayvan-GluR'lar inhibitörü DNQX, hipokotil uzamasını azaltmıştır (Dubos et al., 2003). Michard et al. (2011)'da yapılan çalışmalarda ise polen tüplerinde (pt) glutamat reseptörlerini doğrulamak amacıyla 6-siyano-7-nitrokuinozalin-2,3-diyon (CNQX), DNQX ve 2-amino-5-fosfonovalerat (AP5) antagonistlerini kullanılarak, tütün bitkisinin büyümesinde önemli bir azalma olduğunu bildirilmiştir. Ayrıca, D-Serin adlı agonist, tütün bitkisinde pt proliferasyonunu teşvik etmiştir. Meyerhoff et al. (2005)'a göre, glutamat bağımlı kalsiyum sinyalleri, *A. thaliana* mezofil hücrelerinde 5,7-dinitro-1,4-dihidro-2,3-kuinozalin-diyon (MNQX, DNQX ve CNQX) antagonistleri ile muamelesi nedeniyle azalmıştır.

Bu çalışmalar dışında, Teardo et al. (2010) tarafından ıspanakta yapılan biyokimyasal ve elektrofizyolojik deneyler, kloroplastlarda GluR'lar hakkında bilgi sağlamıştır. *A. thaliana*'da potansiyel bir glutamat ligandı ile GluR'ların etkileşimini ortaya koyulmuştur (Li et al., 2013). GluR'ın *A. thaliana*'daki rolünü belirlemek amacıyla yapılan başka bir çalışma ise, BMAA [S(+)-beta-metil-alfa, beta-diaminopropanoik asit] kullanılmış ve *A. thaliana* fidelerinde, kontrol bitkisine göre hipokotil uzaması ve kotiledon açılmasının engellenmesi tespit edilmiştir (Brenner et al., 2000). Birçok çalışma, amino asitlerin *A. thaliana* GLR'ları için özgülüğünü aydınlatmıştır. İlginç olarak, AtGLR-1.4, yedi amino asit (triptofan, metiyonin, fenilalanin, lösin, tirozin, asparajin ve treonin) ile çalışırken, AtGluR-3.4 üçüyle (Asn, Ser ve Gly) etkileşime girmiştir (Vincill et al., 2012; Tapken et al., 2013). Her reseptörün farklı bir amino asit ile çalışabileceği bu şekilde görülmüştür. Tapken et al. (2013)'da ise, AtGluR-1.4'ün seçici olmayan bir katyon kanalı olarak işlev gördüğünü ortaya koyulmuştur. Bir diğer ilginç çalışma ise, Vincill et al. (2012), AtGluR-3.4'ün Ca^{2+} geçirgenliğine yüksek hassasiyet göstermesi ortaya koyulmuştur. Tüm bu sonuçlar, hayvan GluR'larına benzer şekilde bitki glutamat reseptörlerinin de glutamat ve amino asitlerin

membran depolarizasyonuna ve Ca^{2+} akışına tam katılım sağladığını göstermektedir (Price et al., 2012).

AtGLR'ler ile ilgili literatürde yapılan çalışmalar, hayvan glutamat reseptörü agonistleri ve antagonistlerinin bitkiler üzerinde de tıpkı hayvanlardaki gibi neredeyse aynı etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Önceki çalışmalar değerlendirildiğinde, glutamatın özel bir agonist olduğu düşünülüyordu. Ancak Dubos et al. (2013) çalışmasında, glutamatın yanı sıra glisin de neredeyse tüm AtGLR'lerde etkili önemli bir bileşen olduğunu ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca aynı çalışmada, neredeyse tüm AtGLR'lerde glutamat bağlanması için yüksek derecede korunan treoninin (Thr) fenilalanin (Phe) ile yer değiştirebileceğini önermişlerdir. , AtGluR-1.1 üzerinde yapılan bir çalışma da antisens AtGluR-1.1'in yaban tip ile karşılaştırıldığında K^+/Na^+ 'ya karşı hiper duyarlı olmadığını, ancak yüksek Ca^{2+} konsantrasyonlarının kök gelişimini inhibe ettiğini göstermiştir (Kang and Turano, 2003). İlginç olarak, glutamatın gerçek bir ligand olmadığı, ancak BMAA'nın karbon ve azot algılama sürecine katılan AtGluR-1.1 ligandı olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca, Walch-Liu et al. (2006), dışarıdan uygulanan glutamatın *A. thaliana* kök gelişiminde önemli bir değişikliğe neden olduğunu göstermiştir.

AtGLR'lere agonist (BMAA) ve antagonist (DNQX) etkisi, antagonistin hipokotil uzamasını engellediğini ortaya koyarken (Lam et al., 1998), agonistin hipokotil uzamasını teşvik ettiğini göstermiştir (Lam et al., 1998; Brenner et al., 2000). Glu ve Gly dışında, bir dizi amino asidin (serin (Ser), metiyonin (Met), asparajin (Asn), alanin (Ala), glutatyon ve sistein (Cys)) AtGLR'ler üzerinde etkili olduğunu göstermektedir (Stephens et al., 2008; Vincill et al., 2012; Dennison and Spalding, 2000; Qi et al., 2006; Tapken et al., 2013; Li et al., 2013). Arabidopsis'te, agonist olan D-Ser, polen tüplerinde Ca^{2+} konsantrasyonunu artırmada en etkili amino asit olarak bulunmuş, ancak antagonist CNQX uygulandığında polen tüpü deformasyonu gözlemlenmiştir (Michard et al., 2011).

Ancak, AtGluR-1.3 üzerinde agonist/antagonist etkisi henüz tam olarak anlaşılmamıştır. Bunun dışında metiyonin, triptofan, tirozin, lösin ve fenilalanin gibi amino asitler tarafından indüklenen depolarizasyon, metiyoninin yalnızca bir azot molekülü olarak değil, aynı zamanda bir sinyalleşme molekülü olarak da düşünüldüğü olasılığını desteklemektedir (Tapken et al., 2013). DNQX, CNQX ve MK-801 (non-kompetitif NMDA reseptörü açık kanal blokörü) AtGluR-1.4 için antagonist olarak bildirilmiştir ve bu, hayvan antagonistleriyle benzerdir (Kang et al., 2004; Vatsa et al., 2011). Elektrofizyolojik kanıtlar, Met'in AtGluR-

3.1/3.5'te Ca^{2+} sağlamak için bir agonist olarak çalıştığını göstermiştir (Kong et al., 2016). Diğer AtGLR'lerde olduğu gibi, farklı amino asitlerin agonist olarak hizmet ettiği AtGluR-3.2 için de benzer bir etki gözlemlenmiştir ve D-serin en uygun agonist olarak bulunmuştur (Gangwar et al., 2021).

Bunlara ek olarak, Glu, GABA, aspartat ve malat AtGLR-3.4 üzerinde agonist olarak işlev göstermiştir. Antagonistlerin etkisini görmek için, farklı hayvan antagonistleri olarak DNQX, CNQX ve MNQ uygulanmış ve bu antagonistlerin Glu bağımlı Ca^{2+} akışı süreçlerinde duyarlı oldukları görülmüştür (Meyerhoff et al., 2005). Amino asitler dışında, diğer poliaminler ve kanamisin de glutamat reseptör agonistleri olarak kabul edilmektedir (Dubos et al., 2005). Tapken ve Hollmann'ın (2008) çalışması, AtGluR-1.1 por bölgelerinin Na^+ , Ca^{2+} ve K^+ iyon geçirgenliğine izin verdiğini göstermiştir. Bu akımlar, glutamat tetikli Ca^{2+} girişlerine uygunluk göstermiştir. BMAA ile ilgili durum farklıdır. Çünkü, hayvan iGL-rec'nin bir agonisti olarak işlev gördüğü için BMAA'nın uygulaması bazı çelişkiler gösterir, çünkü hem agonist (Brenner et al., 2000) hem de antagonist (Walch-Liu and Forde, 2007; Brenner et al., 2009) olarak benzer bir etkinlik sergilemektedir.

Ayrıca, agonist (L-glutamat) kök büyümesinin iyileştirilmesine yardımcı olur. Walch-Liu ve Forde (Walch-Liu and Forde, 2007; Brenner et al., 2009) farklı antagonistler (DNQX, AP-5 ve MK-801) kullanarak bitki büyümesi üzerinde herhangi bir etkinin gözlenmediğini göstermişlerdir. Bu da, Dubos et al. (2003), DNQX'in ligandın bağlanma bölgelerine bağlanarak Ap-5 benzeri bir şekilde L-glutamatın o bağlanma bölgesine bağlanmasını taklit edebileceğini ve büyümeyi durdurabileceğini göstermiştir. Ancak, DNQX, CNQX, memantin ve MK-801'in AtGLR üzerindeki etkilerini gözlemleyen birçok araştırma grubu vardır (Lam et al., 1998; Kang et al., 2004; Meyerhoff et al., 2005; Vatsa et al., 2011).

1.3.4 AtGLR Genlerinin Fonksiyon, Ekspresyon ve Uygulamaları

Yapılan ekspresyon çalışmaları ile, bitki glutamat reseptör genlerinin kökler, yapraklar ve üreme organları gibi bitki organlarında başarıyla ifade edildiğini göstermiştir (Chiu et al., 2002; Meyerhoff et al., 2005; Weiland et al., 2015). Önceleri Klad I ve III genlerin neredeyse tüm bitki kısımlarında ifade edildiği düşünülmüştür. Ancak daha sonra bu genlerin tam bitkilerde tanımlandığı gözlemlenmiştir (Pina et al., 2005). Ayrıca bu ifade ve fonksiyonel uygulamalar, birkaç araştırmacının gözlemleri temelinde açıklanmıştır.

Klad I

AtGLR-1.1

AtGluR-1.1 geninin, *A. thaliana*'da absisik asit (ABA) biyosentezini düzenlemede potansiyel aktivite rolü olduğu rapor edilmiştir (Kang et al., 2004). AtGluR-1.1 aynı zamanda bitki büyümesi için önemli olan C, N ve su dengesini de düzenlemektedir. GUS ifadesi ilk olarak 7 günlük Arabidopsis bitkilerinin stipüllerinde gözlemlenmiştir. Daha sonra yaprak kenarlarında ve yan kök hücrelerinde ifadesi bulunmuştur. Ancak, AtGluR-1.1 çiçeklerde ve üreme organlarında düşük bir ifade düzeyine sahip olsada varlığı belirlenmiştir (Chiu et al., 2002).

AtGLR-1.2 ve 1.3

Bir çalışmada, GluR-1.2 ve -1.3'ün soğuk stresi nedeniyle *A. thaliana*'da soğuğa dayanıklılığı düzenlediğini ve bu genlerin aynı zamanda soğuk stresi sırasında downstream CBF/DREB1 yolu üzerinde kritik bir rol oynadığını göstermişlerdir. GluR-1.2 ve -1.3 ile bir floresan etiketi bağlanarak *Nicotiana benthamiana*'nın plazma zarında artan bir floresan gözlemlendiği ve ifadesinin arttığı görülmüştür (Zheng et al., 2018).

AtGLR-1.4

GFP işaretli AtGluR-1.4'ün ifadesi, yaban tip *A. thaliana*'nın plazma zarında incelendi. Aynı zamanda kırmızı floresan protein (RFP) ile etiketlenmiş bir plazma zarı işaretleyicisi olan StREM1.3 de eş zamanlı olarak kullanılmıştır (Tapken et al., 2013). Ancak, Roy et al (2008)'da aynı bitkinin farklı hücrelerinde ve farklı bitkilerde AtGluR-1.4'ün farklı ifadesi tespit edilmiştir. Ayrıca, amino asit sinyaliyle yaprak hücrelerinde Ca^{2+} depolarizasyonunun oluşabileceği düşünülmektedir.

Klad II

AtGLR-2.1

Glutamat reseptörünün filogenetik ve ifade analizine dayanarak, bir clade-II geni olan GLR-2.1'in ifadesinin 5 günlük bitkilerin sürgününde ve GLR-1.1 ile benzerlik şekilde radikulada gözlemlendiği rapor edilmiştir (Chiu et al., 2002). Ayrıca, GLR-2.1, 3 günlük

tohumluğun kökünde, kök ucu dışındaki tüm hücrelerde ifade olmuştur. Bununla birlikte, üreme organlarında düşük bir ifade belirlenirken, siliqua veya çiçeklerde böyle bir ifade gözlemlenmemiştir. Roy et al. (2008)'da, AtGLR-2.1'in 4 haftalık yaprak dokusunda ifade olduğu bulunmuştur. Bitkilerde glutamat ön uygulaması, gen ifadesinin up-regülasyonunu ve amino asit birikimini artırmıştır (Qiu et al., 2020).

AtGLR-2.2

AtGLR-2.2 ifadesi kökte rapor edilirken, üreme organlarında ve yapraklarda gözlenmemiştir (Chiu et al., 2002). Benzer başka bir çalışmada, AtGLR-2.2'nin kökte ifade edildiği ancak bitkinin yaprak, gövde ve yaprak sapı kısmında bulunmadığı gözlemlenmiştir (Roy et al., 2008).

AtGLR-2.3

AtGLR-2.3 ifadesi oldukça farklıdır. Çünkü 8 haftalık bitkilerde sınırlıdır ve bu süreden sonra, kök dokusunda görülmüştür (Chiu et al., 2002). AtGLR-2.3, çiçeklerde ve siliquelarda ifade edilmezken, gelişmekte olan bitkinin yapraklarında eksik bir ifade tespit edilmiştir (Roy et al., 2008).

AtGLR-2.4

AtGLR-2.4 kökte ve siliquelarda ifade olmuş, ancak gövde, yaprak sapı ve yaprak dokularında ifade tamamen durmuştur (Chiu et al., 2002; Roy et al., 2008; Weiland et al., 2015).

AtGLR-2.5

mRNA ifade analizine dayanarak, AtGLR-2.5'in tüm bitki dokularında ifade edildiği rapor edilmiştir (Chiu et al., 2002).

AtGLR-2.6

Kökte ifade edilirken (Chiu et al., 2002), yaprak, gövde ve yaprak sapı kısmında olmadığı görülmüştür (Roy et al., 2008).

AtGLR-2.7

Çiçekler dışında tüm bitki kısımlarında AtGLR-2.7'nin daha yüksek ifade olduğu gözlemlenmiştir (Chiu et al., 2002; Gilliam et al., 2006).

AtGLR-2.8

Kök ve sürgünlerle birlikte, yaprakların içindeki vasküler demetler etrafındaki yaprak mezofil hücrelerinde yüksek bir ifade göstermiştir ve GUS boyama ve ifadesi yapraklarda yaşlanma ile birlikte artmıştır (Weiland et al., 2015; Gilliam et al., 2006).

AtGLR-2.9

Diğer Clade II reseptörlerine benzer şekilde, AtGLR-2.9 geni de kökte ifade olmuştur (Weiland et al., 2015). Ancak gen 2.9'un yapraklarda, daha düşük ifade edildiğini ya da tamamen durduğunu gözlemleyen bir çalışma yoktur (Roy et al., 2008).

Klad III

AtGLR-3.1

AtGLR-3.1'in ifadesini ve işlevini anlamak için Kong et al. (2016)'da AtGLR-3.1 ve 3.5 ile bir yeşil floresan protein (GFP) etiketi birleştirilmiş ve bu proteinlerin plazma zarında bulunduğu, ayrıca bekçi hücrelerinde de ifade edildiği belirlenmiştir. Ayrıca, bu reseptörlerin fidelerde de ifade edildiği bulunmuştur. Başka bir çalışmada ise, AtGLR-3.1'in bekçi hücrelerinde artan ifadeyi mezofil hücrelerinin takip ettiğini öne sürmüşlerdir (Cho et al., 2009). Ayrıca, AtGLR-3.1'in düzensiz ifadesinin, sitoplazmik Ca^{2+} 'yi etkilemeden stoma kapanmasını değiştirdiği gözlenmiştir.

AtGLR-3.2

Bu reseptörün ifadesi bitkinin tüm kısımlarında belirlenmiştir ve kök hücrelerinde yüksek oranda ifade olduğu görülmüştür (Vincill et al., 2012). Egzojen Ca^{2+} artışının, AtGLR-3.2'nin fonksiyonunu göstermiş ve aşırı ifade edilen AtGLR-3.2 transgenik bitkilerde indüklenen Ca^{2+} yoksun durumu düzeltmiştir.

AtGLR-3.3

Li et al. (2013) tarafından, dışarıdan uygulanan GSH'nin AtGluR-3.3'ü aktive ettiği ve yaprakların erken transkripsiyonel sürecine katıldığı belirlenmiştir. Ancak bu durumun altındaki genetik süreç ve genin bağımsız ifadesi henüz bilinmemektedir. Ayrıca, atglr-3.3 mutantlarında kök gravitropizminin amino asit tarafından düzenlenen Ca^{2+} sinyallemesinin azalmasına neden olabileceği düşünülmektedir (Miller et al., 2010).

AtGLR-3.4

Diğer AtGLR'lardan farklı olarak, AtGLR-3.4 özellikle bekçi hücrelerinde, iletim demetlerinde, köklerde, mezofil hücrelerinde ve gövdede güçlü bir şekilde ifade olduğu görülmüştür. AtGLR-3.4, soğuk ve dokunma gibi abiyotik uyaranlara karşı Ca^{2+} bağımlı bir şekilde tepki vermektedir. Farklı ifadenin yanı sıra korteks, kök epidermisi ve tüylerde de zayıf bir ifade gözlenir. Ancak, soğuk ifadesi lantanyum (Ca^{2+} kanal bloklayıcı) eklenerek durdurulmuştur. Dahası, AtGLR-3.4'teki bir mutasyon, ABA'ya karşı hassasiyeti artırmış ve tohum çimlenmesi üzerinde etkisi olduğu görülmüştür (Cheng et al., 2018).

AtGLR-3.5

AtGLR-3.5'in ifadesi çoğunlukla Arabidopsis tohumlarında çimlenme esnasında görülmüştür, bu esnada bu reseptör Ca^{2+} konsantrasyonunu artırmıştır. Ancak kuru ve olgun tohumlarda önemli bir ifade görülmemiştir. Ancak, AtGLR-3.5'teki baskılanma Ca^{2+} sinyallemesinin üzerinde etkili olmuştur ve ABA'ya karşı daha duyarlıdır, bu da tohum çimlenmesinde gecikmeye neden olmuştur. Bununla birlikte, AtGLR-3.5'in yüksek ifadesi ABA'ya karşı daha az hassas ve erken çimlenmeye neden olmuştur. AtGLR-3.5'in ifadesi, GUS geni ile transgenik bitki oluşturularak doğrulanmıştır ve çimlenen embriyonun kotiledonlarında ifade edildiği tespit edilmiştir (Kong et al., 2015).

AtGLR-3.6

AtGLR-3.6'nın ifadesinin köklerin gelişimsel evrelerinde arttığı gösterilmiştir. Singh et al. (2016)'da, olgun kök dokularından daha erken kök dokularına artan yüksek bir ifade düzeyi bildirilmiştir. Kök büyümesini AtGLR-3.6'nın aşırı ifadesi olması teşvik etmiştir. Ayrıca, KRP4 (kip ilişkili protein) AtGLR-3.1 ile ilişkili kök meristemini korumakta önemli

bir rol oynamıştır. Aynı zamanda ana ve yan köklerin oluşumunu hücre döngüsünü düzenleyerek etkilemiştir. Hatta, AtGLR-3.6/3.3'ün jasmonat yolları aracılığıyla yaprak yara sinyallemesinde rol oynayabileceği öne sürülmüştür. Diğer araştırmalar, AtGLR-3.6/3.3'ün, afitlerin beslenme bölgelerinde Ca^{2+} seviyelerini artırmada önemli bir rol oynadığını göstermiştir (Vincent et al., 2017).

AtGLR-3.7

Bu reseptör üzerine yapılan araştırmalar, muhtemelen her bitki hücresinde ifade edildiğini ve Arabidopsis'te önemli bir iyon taşıyıcı işlevi gördüğünü ortaya koymuştur (Roy et al., 2008). Daha ileri araştırmalar, AtGLR-3.7'nin tuz stresine kalsiyum sinyalleşmesi aracılığıyla tepki verdiğini ve tohum çimlenmesi ve düzenlemesinde rol oynadığını göstermiştir (Wang et al., 2019; Kwaaitaal et al., 2011). Ayrıca, AtGLR-3.7'nin aşırı ifadesi kök büyümesinde belirgin bir artışa neden olmuştur.

1.3.5 Çevresel Strese Yanıtta AtGLR Genleri

1.3.5.1 Tuz Stresi

Tuz stresi altında bitki davranışı ve adaptasyon mekanizmaları değişmektedir ve bu çoğunlukla Ca^{2+} sinyalleme ağı aracılığıyla gerçekleşmektedir (Meyerhoff et al., 2005; Sivaguru et al., 2003; Saddhe et al., 2019). Yapılan bir çalışmada, AtGLR-3.7'nin tuz stresi koşullarında tohum çimlenmesi sırasında önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (Cheng et al., 2016). Ayrıca, tuz stresinin Arabidopsis yabani tip ve mutant bitkiler üzerindeki etkisinin araştırıldığı çalışmada atglr-(3.4-1/2) mutant bitkilerinin çimlenmede yabani tip bitkilere göre daha hassas olduğunu göstermiştir (Chen et al., 2021). Yapılan çalışmada, NaCl'nin yaban tip bitki türünde Ca^{2+} akışı oluşturduğu ve bunun hayvan glutamat reseptör antagonisti (DNQX) eklenerek engellendiği gözlenmiştir. Ancak, NaCl tarafından tetiklenen Ca^{2+} artışı mutasyona uğramış AtGluR'ler (3.4-1/2) tarafından etkisiz hale getirilmiştir. Ayrıca, tuz stresine maruz bırakılan mutant tohumlarda daha fazla Na^+ birikimi gözlenmiş ve AtGLR-3.4'ün aşırı ekspresyonu, absisik aside karşı yüksek direnç göstermiştir (Chen et al., 2021). Wang et al. (2019) tarafından da, benzer şekilde, AtGLR-3.7 (14-3-3) gibi diğer proteinlerle birlikte tuz stresi altında Arabidopsis'te potansiyel bir rol oynadığı ve Ca^{2+} sinyal yolunu etkilediği bildirilmiştir. Bu bulgular sonucunda, tuz koşullarında tohum çimlenmesinin, AtGluR-3.4/3.7 tarafından modüle edilen Ca^{2+} girişi tarafından düzenlendiği ortaya çıkmıştır. Bu nedenle,

Clade III geni olan GluR-3.7, *A. thaliana*'da tuz stresinde önemli bir rol oynamaktadır (Hu et al., 2013).

1.3.5.2 Soğuk Stresi

Çevresel streslerden bir diğeri olan soğuk stresi de bitkileri olumsuz yönde etkileyen başka bir faktördür. 1999 yılındaki bir çalışmada, ıspanak ve Arabidopsis gibi ılıman iklim bölgelerine ait bitkilerin düşük sıcaklıklara maruz kaldıklarında soğuğa dayanıklılık gösterdikleri ilk kez bildirilmiştir (Thomashow, 1999). Bu fenomen soğuğa dayanıklılık olarak bilinmektedir. Plazma membranının yanı sıra kloroplast da düşük sıcaklıklarda bir algılama rolü oynar. Daha önce Meyerhoff et al. (2005)'da, Arabidopsis'te osmotik stres nedeniyle AtGLR-3.4'ün ABA bağımsız bir şekilde ifade edildiği ve hızlı sinyal iletiminde Ca^{2+} iyonu sağladığı öne sürülmüştür.

Transgenik bitkilerde, soğuk ve glutamat uygulamaları, antagonistler (DNQX/CNQX) tarafından engellenen Ca^{2+} iyon kanallarını indükleyebilmiştir. Hu et al. (2013)'da yapılan çalışmaya göre ise, soğuk stresi sırasında fitohormonların bitkilere karşı etkinliklerinin ve tepkilerinin değiştiği gösterilmiştir. Farklı pek çok araştırma, membran proteinlerinin soğuk stresini algıladığını ve muhtemelen Ca^{2+} sinyal iletim yollarını etkinleştirdiğini ortaya koymuştur. Bu sinyaller, transkripsiyonel düzenleme kaskadını aktive ederek soğuk stresine başa çıkmaya ve hayatta kalmalarına olanak tanır (Ding et al., 2018; Hasanuzzaman et al., 2019). Bu nedenle, soğuk sıcaklık koşullarına maruz kalan bitkiler soğuk koşullara dayanıklılık geliştirirken, gen ifadesinde ve Ca^{2+} sinyal iletim yollarında büyük bir değişiklik meydana gelir. Ayrıca, Zheng et al. (2018)'da AtGLR-1.2 ve -1.3 mutanlarının Arabidopsis'te soğuk stresine karşı pozitif bir rol oynadıkları ve bitki hormonu jasmonatın etkisiyle, AtGLR-1.2/-1.3 mutanlarının soğuk stresine olan etkinliklerinin azaldığı ortaya çıkartılmıştır. Ayrıca donma ortamında, bu mutanların C-repeat binding factor/DRE binding factor 1 (CBF/DREB1) transkripsiyonel düzenleyici yolundaki ifadesi, yabani tip bitkiye kıyasla daha düşüktür. Kısacası, Zheng et al. (2018)'da, AtGLR-1.2/1.3'ün endojen jasmonat birikimini tetikleyerek soğuğa dayanıklılığı artırabileceği öne sürülmüştür.

1.3.5.3 Biyotik Stres

Bitkiler, böcekler, zararlılar ve diğer otçullar gibi rakiplere karşı çeşitli savunma taktikleri geliştirerek kendilerini savunmaktadırlar. Bitkiler, otçulları tespit etmek için hem kimyasal hem de mekanik yöntemler kullanırlar. Son zamanlarda birçok çalışma, bitkilerin

otçul saldırılarından korunmak için oluşturdıkları erken savunma sinyallerine odaklanmış ve gerçek zamanlı sinyal izleme ve bitki-otçul etkileşimlerle yaygın olarak ilişkilendirilen iyon kanallarını modüle etmek için genetik olarak kodlanmış nanosensörler kullanılmıştır (Gandhi et al., 2021). Ayrıca, birçok çalışma, Glu reseptörlerinin bitkileri böcek yaralanmalarından koruduğunu göstermiştir. Böcek aktivitesi nedeniyle Glu reseptörleri Ca^{2+} akışını artırarak, bitkilerin hayatta kalması için savunma sinyallerini değiştirmiştir (Dennison and Spalding, 2000; Vatsa et al., 2011).

A. thaliana'nın tırtıl tarafından yaralandığı bir çalışmada, AtGLR-3.3'ün, tırtılların neden olduğu yüzey potansiyelini azaltmak için Ca^{2+} iyon akışını indüklediği ve bitkilerde savunma sinyalini değiştirmede potansiyel bir rol oynadığı bulunmuştur (Mousavi et al., 2013). Glu reseptörleri, yaralanma ile aktive edildiği için bitki savunma sinyallemede yer alırlar (Toyota et al., 2018). Ayrıca, son araştırmalar, GLR-3.3/3.6'nın bitkileri yara oluşturan organizmalara karşı savunmak için Ca^{2+} iyon akışını düzenlediğini göstermektedir (Gandhi et al., 2021; Shao et al., 2020). İlk olarak, Kang et al. (2006) tarafından yapılan araştırmalar, transgenik Arabidopsis bitkilerinde aşırı ifade edilen turp GLR'sinin, bazı savunma ile ilişkili genlerin artan ifadesiyle etkileşerek patojen mantarlara karşı direnci hızlandırdığını göstermiştir. Sonraki çalışmalar, iGluR antagonistlerinin *A. thaliana* fidelerinde (Kwaaitaal et al., 2011) ve tütün süspansiyon kültüründe (Vatsa et al., 2011) bağışıklık tepkisine katıldığını göstermiştir. atglr-3.3 mutantlarında, bakteriyel bir patojene (*Pseudomonas syringae*) karşı enfeksiyonla mücadelede savunma ile ilişkili gen ifadesi etkinliğinde eksik kalarak bağışıklığa duyarlılığı artırmıştır (Li et al., 2013). Hemen hemen tüm AtGLR genleri savunma mekanizmasına katkıda bulunsa da, AtGLR-3.3, bu enfeksiyonla mücadelede bağışıklığı artırmada etkili olduğunu göstermiştir (Qi et al., 2006). Başka bir çalışma ise, Ca^{2+} girişiyle ilişkili glutamat reseptörlerinin bitki savunmasında downstream sinyalleşme süreçlerini başlatmak için önemli olduğunu öne sürmüştür. AtGluR-3.3'ün, *Hyaloperonospora arabidopsis* (oomiset patojen) enfeksiyonuna karşı direnci sağlamada önemli olduğu bulunmuştur (Manzoor et al., 2013). Yapılan tüm bu çalışmalar ile, Clade III geninin, beslenen böcekler ve zararlılar tarafından mekanik yaralanmaya karşı savunma mekanizmasında tamamen rol oynadığı bulunmuştur (Mousavi et al., 2013; de Bruxelles and Roberts, 2001).

1.3.5.4 Kuraklık Stresi

Bitki verimliliği etkileyen çevresel engellerin başında kuraklık gelmektedir. Çünkü bu stres farklı fizyolojik süreçleri etkileyerek mahsul verimini azaltmaktadır (Laxa et al., 2019; Yoshida et al., 2016). Bitkilerde kuraklık boyunca morfolojik düzeyden moleküler düzeye kadar su kıtlığı gözlenmiştir. Kuraklık stresi bitkilerin fotosentetik yeteneklerini şiddetli bir şekilde etkiler ve metabolik aktiviteleri dengesizleştirmektedir. Stresle karşı karşıya kaldıklarında, bitkiler kurak koşullara karşı direnebilmek ve uyum sağlayabilmek için farklı stratejiler geliştirmişlerdir (Laxa et al., 2019; Yoshida et al., 2016). Stomaların kapanması konusunda yapılan birçok araştırma sonucunda, stomaların kuraklık stresine etkisi bulunmuştur. Stomaların hareketinin, su eksikliklerini ve stres sırasında gaz alışverişini kontrol etmek için ana faktörlerden biri olduğu kanıtlanmıştır. Bu hareketlerin ise, Ca^{2+} , H_2S (Hidrojen sülfür), ROS, ABA ve NO gibi farklı sinyal moleküllerinin koordinasyonu ile düzenlendiği bilinmektedir (Qiu et al., 2020; Laxa et al., 2019; Yoshida et al., 2016). Yoshida et al. (2016)'da, glutamat (Glu) adlı sinyal molekülünün, Arabidopsis ve Vicia faba'da stomaların kapanmasından sorumlu olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, glutamat ile stomaların kapanması arasındaki tam ilişkiyi ortaya koyabilmek için EGTA (hücre dışı Ca^{2+} bağlayıcı) ve BAPTA-AM (hücre içi bağlayıcı) gibi farklı Ca^{2+} şelatörleri kullanılmıştır. Bu şelatörlerin glutamat tarafından indüklenen stomaların kapanmasını engellediği ve bunun için sitozole Ca^{2+} akışının gerekliliğini gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca, Glu'ya bağımlı Ca^{2+} akışının Ca^{2+} bağımlı protein kinazı tetiklediği ve stomaların kapanmasını destekleyen SLAC aktivitesini aktive ettiği gözlenmiştir (Yoshida et al., 2016). Arabidopsis dışında, Brassica'da Glu uygulaması, Ca^{2+} sinyalini tetikleyerek, kuraklık stresine bağlı prolin birikimini artırmış ve kuraklığa toleransını desteklemiştir (La et al., 2019). Ayrıca, Philippe et al. (2019)'da, Medicago truncatula'da hayvan glutamat reseptör antagonistleri olan AP-5 ve DNQX kullanılarak, bu antagonistlerin NO birikimini azalttığı ve stomaların kapanması üzerinde etki sahibi oldukları bildirilmiştir. Ayrıca, pirinçten elde edilen iki glutamat reseptörü (GLR1 ve GLR2), Arabidopsis'te kuraklık toleransı göstermiştir (Lu et al., 2014).

Görüldüğü üzere bitki GLR'leri ile pek çok çalışma gerçekleştirilmiş ve farklı fizyolojik ve hücresel süreçlerde görev aldığı belirlenmiştir. Ayrıca yapılan son çalışmalar da memelilerde GLR'nin kalsiyum aracılığı ile NO birikimine neden olduğu gösterilmiştir.

1.4 GLR aracılı NO artışı

Beyindeki büyük uyarıcı nörotransmitter olan Glutamat'ın bir alt grubu olan NMDA-tip reseptörlerin aşırı aktivasyonu, reseptörle ilişkili kanal aracılığıyla sitoplazma içine aşırı Ca^{2+} girişine neden olmaktadır. Aşırı Ca^{2+} 'da, hücre ölümüyle sonuçlanan aşırı NO üretimine neden olur. (Bonfoco et al., 1995; Lafon-Cazal et al., 1993; Lipton et al., 1993). Hücrelerarası Ca^{2+} , kalmodulin (CaM)+ Ca^{2+} şeklinde, nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS) aktivitesiyle L-arginin'den NO'nin oluşumunu hedefler ve böylece NO üretiminde aşırı artış gözlenir. NMDA reseptör aktivitesinin aşırı artışı, nörotoksik olabilmektedir. Çünkü örneğin, PDI gibi proteinlerin S-nitrosilasyonu, nöronal hasar ve ölüme, hatta PDI'daki bu hasarda, Parkinson'a neden olmaktadır.

NO hem bitkilerde hem de insanlarda çok sayıda fizyolojik yolağı düzenleyen ve hücrel sinyal yollara aracılık eden bir moleküldür (Forrester et al., 2006; Barroso et al., 2006). NO, beyinde, nörotransmisyon, nöromodulasyon ve sinaptik plastisitede görev alırken bitkilerde tohum çimlenmesi, primer ve lateral kök büyümesi, çiçeklenme gibi fizyolojik yollarda sinyal molekülü olarak görev yapmaktadır (Shapiro, 2005). Ancak her iki organizmada da NO ve NO-kökenli reaktif azot türlerinin (RNS) aşırı üretimi veya kontrol edilemeyen sentezi, hücrede "Nitrosativ Stres" e neden olmaktadır (Barroso et al., 2006).

1.5 NO Sinyalinin Oluşumu ve Temeli

Son 20 yıl içinde hayvanlardaki NO sinyalizasyonu ile ilgili yapılan araştırmalar son derece verimli olmuş ve bilim insanlarını sinyal iletiminin yeni kavramlarını belirlemişlerdir. NO, nitrik oksit sentaz (NOS) enzimatik aktivitesi aracılığıyla L-arginin amino asitinden üretilmektedir. Bu üretim sonrası, NO, proteinlerin post-translasyonel modifikasyonları yoluyla çoğunlukla etki gösterir. Üç ana süreç tanımlanmıştır. Bunlar; S-nitrosilasyon, metal nitrosilasyon ve tirozin nitrasyon'dur. Bu NO'ya bağımlı post-translasyonel modifikasyonlara duyarlı yüzden fazla protein ve tüm önemli hücrel aktivitelerde yer alan proteinler tespit edilmiştir. Bitki ve hayvanlarda etkili olan yollardan bahsedilecektir.

1.5.1 S -nitrosilasyon

S-nitrosilasyon, NO'nun (veya türetilerinin) proteinlerin sistein sülfürleri ile kovalent olarak etkileşime girer ve S-nitrosotiyollerin oluştuğu bir süreçtir (Stamler et al., 2001; Hess et al., 2005). Ancak, NO'nun nasıl hedef proteinleri S-nitrosile ettiği tam olarak anlaşılamamıştır. Aday mekanizmalar arasında, nitrozonyum katyonunun (NO^+ , NO'nun oto-

oksidasyonundan kaynaklanan) tiyolat üzerinde elektrofilik bir saldırısı, NO'nun NAD⁺ gibi elektron alıcılarının varlığında tiyolat ile doğrudan etkileşimi ve NO'nun oto-indirgenmesi veya diazot trioksit ayrışması sonucu oluşan nitroksil anyonları ile karmaşık kimyasal süreçlerin olabileceği düşünülmektedir (Gow et al., 1997; Hanafy et al., 2001; Foster and Stamler, 2004). İlginç bir şekilde, S-nitrosilasyonu kolaylaştırabilecek birincil peptit dizileri tanımlanmıştır. Bunlar asidik/bazik motiflerin yanı sıra sistein arttığı çevreleyen hidrofobik motifleri içerir (Hess et al., 2005; Greco et al., 2006).

Metal nitrosilasyonla benzer şekilde, S-nitrosilasyon da post-translasyonel modifikasyonun geri dönüşümlü bir şeklidir. De-S-nitrosilasyon, kimyasal olarak enzimlerin yardımı olmadan veya tiyoredoxin ve tiyoredoxin redüktaz aracılığıyla enzimatik olarak gerçekleşir (Jaffrey et al., 2001; Benhar et al., 2008).

1.5.2 Metal nitrosilasyonu

NO, bir radikal olarak, elektron verebilme özelliğine sahiptir. Bu nedenle geçiş metalleri ile reaksiyona girer. NO'nun demir-kükürt kümelerinin, hem ve çinko parmak proteinlerinin merkezleri ile kovalent etkileşimi, protein aktivitesinde artış veya azalmaya neden olur. Metal nitrosilasyon yoluyla düzenlenen proteinler arasında NO için hedef olan, çözünür guanilat siklaz (sGC; Denninger and Marletta, 1999) olarak bilinir. sGC, GTP'yi pirofosfat ve 3',5'-siklik GMP (cGMP) olarak adlandırılan iyi tanımlanmış bir ikinci haberciye dönüştürür. NO'nun sGC hem ile etkileşimi, ferroz demiri ve enzimin histidin 105 arasındaki bağın açılmasına yol açar, böylece cGMP sentezinin katalizini birkaç yüz kat artıran konformasyonel bir değişikliği tetikler (Cary et al., 2006; Roy and Garthwaite, 2006). Oluşan cGMP, hedef proteinlere bağlanır: cGMP bağımlı protein kinazlar (PKG'ler), siklik-nükleotid-kapılı kanallar (cCNGC'ler) ve siklik-nükleotid fosfodiesterazlar, böylece hücreye özgü son çıktılar oluşturur (Beck et al., 1999). NO/cGMP sinyalizasyonu aracılığıyla düzenlenen fizyolojik tepkilerin örnekleri, sinir iletimi, gelişim, düz kasların gevşemesi ve kan basıncı düzenlemesi gibi bölümlerde görülebilmektedir (Denninger and Marletta, 1999; Krümenacker et al., 2004).

1.5.3 Tirozin nitrasyonu

Tirozin nitrasyonu, NO kaynaklı iki ana tür aracılığıyla gerçekleşir. Peroksinitrit (ONOO⁻), NO ve süperoksit (O²⁻) gibi reaktif oksijen türleri arasındaki hızlı reaksiyon sonucu oluşan bir türüdür ve nitroso-peroksokarboksilat (ONOOCO²⁻) ise fizyolojik konsantrasyonda

ONOO ile CO₂ arasındaki reaksiyon sonucu oluşan bir diğer türüdür (Radi, 2004). Nitrasyon, tirozin artıklarının fenolik halkasının hidroksil grubuna göre orto konumunda bulunan iki eşdeğer karbon atomundan birinde meydana gelir ve protein 3-nitrotirozin (3-NO₂-Tyr) oluşumuna yol açar (Radi, 2004). Başlangıçta 3-NO₂-Tyr astım gibi inflamatuvar hastalıklar sırasında NO'ya bağımlı oksidatif stresle ilişkilendirilmiştir (Schopfer et al., 2003). Gerçekten de, tirozin nitrasyonu genellikle protein fonksiyonlarının kaybı ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca hedef proteinler arasında Mn süperoksit dismutaz, sitokrom P450, tirozin hidroksilaz, glutamin sentaz, glutatyon redüktaz, aktin ve diğer sitoskeletonla ilişkili proteinler yer almaktadır (Greenacre and Ischiropoulos, 2001; Gow et al., 2004). Bu sürecin genellikle geri dönüşümsüz olduğu ve proteinlerin 20S proteazom tarafından parçalanma duyarlılığını artırabileceği kabul edilmektedir (Mannick and Schonhoff, 2002). Ancak, birkaç memeli dokusunda protein nitrasyonunu tersine çeviren denitraz aktivitelerinin tanımlanması, tirozin nitrasyonunun da geri dönüşümlü bir süreç olabileceğini göstermektedir (Gorg et al., 2007). Bu son bulgu, 3-NO₂-Tyr oluşumunun sinyal iletiminde rol oynayabileceği olasılığını ortaya çıkarmaktadır. Bu yönüyle, tirozin nitrasyonunun protein tirozin fosforilasyonu ile ilişkisi önemlidir. Aslında, yapılan birçok çalışmaya göre, tirozin nitrasyonunun hücre sinyalleme üzerindeki önemi, esas olarak tirozin artıklarının fosforilasyona uğramasının engellenmesinde ve/veya fosfatazların inhibisyonunda yatmaktadır. Bu da protein kinazlarının baskın bir şekilde aktive olmasına izin vermektedir (Minetti et al., 2002). ONOO⁻ tarafından c-Src tirozin kinazlarının aktive edilmesini açıklayan ilk mekanizma, in vitro olarak bir C-terminal tirozin arttığı nitrasyonunun normalde c-Src'nin inaktif bir konformasyona katlanmasına yardımcı olan fosforilasyonunu önleyebileceğidir (Klotz et al., 2002). Ancak şu anda, bu sürecin canlı organizmada gerçekleşip gerçekleşmeyeceği belirsizliğini korumaktadır.

Bahsedilenler doğrultusunda Nitrosativ stresin tüm canlılarda gözlenen belirteçlerinden biri “Protein Tirozin Nitrasyonu”dur (Corpas et al., 2006). Diğer bir deyişle, tirozin amionoasidinin aromatik halkasındaki ekivalent iki karbondan birine NO₂'nin bağlanmasıdır. Tirozin nitrasyonu”, proteinlerin konformasyonel yapısını ve enzimlerin katalitik aktivitesini değiştirebilir (Radi, 2004). Diğer yandan, sinyal iletim yollarını da etkileyebilir. Diğer belirteç ise “Protein S-nitrosilasyonu”dur. Bu post-transkripsiyonel modifikasyon, proteinin sistein (Cys) aminoasidine NO grubunun bağlanmasıyla oluşur ve tirozin nitrasyonuna benzer olarak proteinlerin fonksiyonunu değiştirir.

1.6 NO ve Ca^{2+} Arasındaki Etkileşim

Şu ana kadar yapılan çalışmalarda, NO'nun, Ca^{2+} homeostazının genel kontrolünü sağlayan temel habercilerden biri olarak kabul edildiği ve neredeyse tüm Ca^{2+} kanalları ve taşıyıcılarının kontrolü altında olduğu bilinmektedir. NO'nun Ca^{2+} kanalı ve taşıyıcılarının aktiviteleri üzerindeki etkileri, iki etki mekanizmasına ayrılabilir: cGMP'ye bağımlı olan ve cGMP'ye bağımlı olmayan mekanizmalar. cGMP'ye bağımlı yolun temelindeki moleküler mekanizmalar karmaşıktır ve en az üç süreç bildirilmiştir. İlk olarak, cGMP, döngüsel nükleotit bağlayıcı bölgelerine sahip CNGC'leri doğrudan aktive edebilir ve sitosolik serbest Ca^{2+} konsantrasyonunu ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$) artırabilir (Hanafy et al., 2001; Ahern et al., 2002). İkinci olarak, cGMP'nin etkileri PKG'lerin aktive edilmesi yoluyla iletilmiş olabilir (Clementi and Meldolesi, 1997; Clementi, 1998; Ahern et al., 2002). PKG'lerin intrasellüler Ca^{2+} üzerinde farklı etkileri vardır ve bu etkiler hedef kanal, uyaran ve hücre tiplerine bağlı olarak $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 'ı artırabilir veya azaltabilir. Örneğin, hepatositlerde PKG'lerin inositol 1,4,5-trifosfat (IP3) reseptörünü fosforile etmesi, IP3'e bağımlı Ca^{2+} salınımını potansiyalize ederken, düz kas hücrelerinde tersi bir etki gözlenir (Clementi, 1998; Murthy and Makhlof, 1998). PKG'ler tarafından modüle edilen diğer Ca^{2+} -geçirgen kanallar ve Ca^{2+} taşıyıcıları arasında voltaj-gated Ca^{2+} kanalları (L-, N-, P/Q- ve T-tipi), depo-operatörlü Ca^{2+} kanalları (SOCC'ler), mekano-duyarlı Ca^{2+} -geçirgen non-selektif katyon kanalları (MSNSC'ler), sarkoplazmik/endoplazmik retikulum Ca^{2+} -ATPaz (SERCA) ve plazma membranı Ca^{2+} pompası (PMCA) bulunur (Clementi, 1998; Wang et al., 2000; Chen et al., 2002; Yao and Huang, 2003; Grassi et al., 2004). Üçüncü olarak, PKG aktivasyonunun NO tarafından indüklenen siklik ADP-riboz (cADPR) sentezinde kritik bir adım olduğu bulunmuştur (Willmott et al., 1996; Reyes-Harde et al., 1999; Leckie et al., 2003). cADPR, öncülü NAD^+ tarafından ADP-ribozil siklaz tarafından sentezlenir ve bu da PKG tarafından indüklenen fosforilasyon yoluyla aktive edilebilir. cADPR, ryanodin reseptörleri (RyR'ler) aktivasyonu yoluyla hayvan hücrelerinin çeşitli tiplerinde endoplazmik retikulumdan Ca^{2+} salınımını teşvik eden bir Ca^{2+} mobilize ikinci habercidir (Fliegert et al., 2007). NO'nun cGMP'ye bağımlı olmayan etkisi, Ca^{2+} homeostazı üzerinde, Ca^{2+} kanallarının ve taşıyıcılarının doğrudan S-nitrosilasyonu yoluyla gerçekleşmektedir. Voltaj-gated Ca^{2+} kanalları, RyR'ler, NMDA reseptörleri, geçici reseptör potansiyel kanalları (TRPC) ve CNGC'ler, aktive edilme veya inhibisyonla sonuçlanan şekilde geri dönüşümlü olarak S-nitrosile edilebileceği gösterilmiştir (Yoshida et al., 2006; Tjong et al., 2007).

NO'nun gen ifadesi ve hem cGMP aracılı hem de doğrudan S-nitrosilasyon yollarının varlığı, Ca^{2+} -bağımlı sinyal iletim süreçlerini modüle etme olasılıklarını genişletir ve zenginleştirir (Peunova and Enikolopov, 1993). Ayrıca, NOS tarafından NO üretimi için $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 'nin artması gerektiği göz önünde bulundurulduğunda, NO'nun bazı Ca^{2+} kanallarının inhibisyonuyla Ca^{2+} girişini zayıflatma ve SERCA ve/veya PMCA'nın aktive edilmesiyle sitosolik serbest Ca^{2+} 'ın uzaklaştırılmasını başlatabilir. Böylece, hücreleri NO'nun zararlı etkilerinden korumaya yardımcı olur. Bu süreçlerin patofizyolojik önemi, nöronal uyarılabilirliğin veya hipertansiyonun modülasyonu gibi birkaç örnek üzerinde vurgulanmış olsa da, muhtemelen normal ve bozulmuş hücre fonksiyonları için yeni rollerin yolunu açmıştır. Mekanik açıdan bakıldığında, NO/ Ca^{2+} yollarının plastisitesi özellikle aynı kanallar üzerinde her iki yolun etkili olduğu durumlarda ilginçtir. cGMP bağımlı yolunun genellikle düşük NO seviyelerinde gerçekleştiğini, S-nitrosilasyonun ise daha yüksek NO seviyelerini gerektirdiğini ve cGMP ile indüklenen etkilere göre daha yavaş kinetiklerle ilerlediği birkaç çalışma ile desteklemiştir (Denninger and Marletta, 1999; Hanafy et al., 2001). Ancak, bu konu hala tartışmalıdır.

1.7 Bitkilerde NO sinyali

Son yıllarda, NO'nun çeşitli bitki fizyolojisi ile ilgili süreçlerde çok yönlü bir role sahip olarak tanındığı bilinmektedir. NO sentezi için çeşitli yollar önerilmiştir: nitrat redüktaz ve muhtemel NOS benzeri enzimleri içeren enzimatik olmayan yollar ve enzimatik yollar gibi (Kaiser and Huber, 2001; Crawford, 2006; Corpas et al., 2006; Besson-Bard et al., 2008; Wilson et al., 2008). Önemli ve hala net olarak açıklanamayan bir soru, NO'nun işaretlenme eylemlerinin moleküler mekanizmalarıdır. Yüzden fazla proteinin S-nitrosilasyon ve metal nitrosilasyonu yoluyla düzenlendiği iddia edilmiş ve dışarıdan NO uygulaması çalışmalarında mikroarray analizleri ile up ve down regüle olarak düzenlenen çok sayıda gen tanımlanmıştır. Ancak, birkaç istisna dışında, bu post-transkripsiyonel ve post-translasyonel değişikliklerin fizyolojik önemi henüz belirlenmemiştir. Bu yaklaşımlarla paralel olarak, son yıllarda bir dizi çalışmadan elde edilen kanıtlar, NO'nun etkilerinin bir kısmının serbest Ca^{2+} 'ın mobilizasyonu yoluyla, protein kinaz aktivitelerinin modülasyonu ile ve ROS ile etkileşime girerek gerçekleştiğini göstermiştir (Astier et al., 2012).

Pek çok sinyal, ışık, bitki hormonları, biyotik ve abiyotik streslerin de dahil olduğu, hücre içi $[\text{Ca}^{2+}]$ üzerinde geçici ve özgün değişikliklere neden olmaktadır. Son yıllarda, bu değişiklikleri yönlendiren bileşenlerin arasında NO'nun da yer aldığı giderek daha fazla

çalışma ile gösterilmektedir. Hatta, NO üretimi, hücre içi Ca^{2+} dalgalanmalarının kontrolü altında olduğundan, NO aynı zamanda bitkilerde hücre içi Ca^{2+} değişikliklerini çözümlemeye katkıda bulunan bir Ca^{2+} sensörü olarak da işlev görebilir (Astier et al., 2012).

Bahsedilen bu karmaşık sinyal yollarının yanı sıra ROS ve RNS'lerin, bitki hücrelerinde sinyal olarak birbirini etkilemesi de bu karmaşık etkileşim ağının en temelidir. ROS ve RNS arasındaki etkileşim, bitki hücrelerinin stres durumlarında daha hassas ve etkili bir savunma mekanizması geliştirmesini sağlar. Ayrıca, ROS ve NO'nun protein ve gen ifadesindeki değişiklikler üzerinde etkili olması, bitkilerin stresle başa çıkma yeteneğini artırabilir. ROS ve RNS arasındaki bu etkileşim, bitki biyolojisindeki temel araştırma alanlarından biridir ve bitkilerin sağlığı, büyümesi ve stresle başa çıkma mekanizmalarında etkili iki moleküldür.

1.8 ROS ve RNS arasındaki etkileşim: Nitro-oksidatif stres

Oksijen ve azot açısından zengin bir ortamın kaçınılmaz yan ürünleri ROS ve RNS'lerdir. Bitki biyolojisinde oksidatif stres kavramı, ROS üretimi ile antioksidan savunma mekanizmaları arasındaki dengesizlikten kaynaklanan hücresel hasarı açıklamak için yaygın olarak kullanılır. Bugüne kadar yapılan pek çok araştırma makalesi, stresi algılama, sinyal iletimi ve belirli antioksidanların stresle ilişkili genlerin ve antioksidan metabolitlerin ifadesini açıklığa kavuşturmak amacıyla yüksek bitkiler üzerinde etkilerini farklı perspektiflerden incelemiştir.

1990'ların sonlarında, bazı bitki araştırmacıları daha önce hayvan hücrelerinde enzimatik olarak üretildiği ve kardiyovasküler, immün ve sinir sistemlerinde geniş bir işlev yelpazesine katıldığı gösterilen NO molekülünü incelemeye başlamışlardır. Günümüzde NO'nun, fizyolojik ve stresle ilişkili süreçlere katılımıyla yüksek bitkilerde önemli işlevlere sahip olduğu kanıtlanmıştır. NO, ONOO-, azot dioksit (.NO_2), diazot trioksit (N_2O_3) ve S-nitrozoglütatyon (GSNO) gibi bir grup molekülle ilişkilendirilen serbest bir radikaldir ve bu moleküller farklı biyomoleküllerin, başta nitratlama (Corpas et al., 2013) ve proteinlerin S-nitrosilasyonu (Astier and Lindermayr, 2012; Astier et al., 2012) gibi post-translasyonel modifikasyonlarını düzenleyebilir.

ROS ve RNS metabolizması arasındaki etkileşim, bu iki molekül ailesinin, normal koşullar altında yüksek bitkilerin hücresel sinyalleşme süreçlerinde yer aldığı gösterilmiştir. Ancak olumsuz çevresel koşullar altında, bitki hücrelerinde bu moleküllerin aşırı üretimi ile karakterize olabilir ve bu moleküller DNA, RNA, Protein ve lipitler gibi biyomoleküllerde

hasar oluşturabilme yeteneğine sahiptir. En sık incelenenler arasında ise proteinler yer almaktadır. Aynı moleküllerin bir kısmı, bu hasarı azaltmak için sinyalleşme işlevine de sahip olabilir. Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) ile nitrik oksit arasındaki etkileşimle $ONOO^{\cdot}$, yani güçlü bir oksidanın oluşumu, ROS ve RNS arasındaki etkileşimin iyi bir örneği olarak verilebilir. Bu süreç yoluyla proteinlerin tirozin nitratlanmasını düzenleyebilir ve bu durum, yüksek bitkilerde nitrosatif stresin etkin bir biyobelirteci olabilir (Corpas et al., 2007). Sonraki çalışmalar, bu hipotezin daha önce hayvan sistemlerinde gözlemlendiği gibi doğrulandığını göstermiştir. Bu nedenle, farklı model bitkilerde çeşitli abiyotik/biyotik stres koşullarının, genellikle işlev kaybıyla sonuçlanan protein tirozin nitratlamasında bir artışa neden olduğu belirlenmiştir (Romero-Puertas et al., 2007; Valderrama et al., 2007; Cecconi et al., 2009; Corpas et al., 2011). Örneğin, fotosentez karbon assimilasyonunda yer alan ferredoksin-NADP redüktaz (FNR) ve karbonik anhidraz (CA) enzimleri, yüksek sıcaklık stresi altında tirozin nitratlanmasıyla her iki enzimin aktivitesi inhibe olmuştur (Chaki et al., 2011, 2013). Benzer şekilde, azot metabolizmasında yer alan NADP bağımlı izositrat dehidrogenaz enzimi, kök yaşlanması sırasında Tyr392'de nitratlama sonucu düzenlenir ve böylece antioksidatif sisteme NADPH sağlama işlevi azalır (Begara-Morales et al., 2013).

Ayrıca, diğer çalışmalar, sinyal işlevi olan bu süreçlerin içinde yer alan protein S-nitrosilasyonunun da göz önünde bulundurulması gerektiğini göstermektedir. Örneğin, sitoplazmik redoks durumu tarafından düzenlenen konformasyona sahip olan protein NPR1 (patojenlere karşı duyarsızlaştırılmış gen1'in ifadesinin eksikliği) ve transkripsiyon faktörü TGA1 (aynı zamanda bir DNA bağlayıcı protein olan TGA1 benzeri protein) sistematik kazanılmış direnç (SAR) sırasında salisilik asit bağımlı gen ifadesini düzenlemek için gerekli bileşenlerdir. Her iki öğe, GSNO tarafından S-nitrosile edilebilir ve böylece, NPR1'in varlığında TGA1'in DNA bağlama aktivitesini artırır (Tada et al., 2008; Lindermayr et al., 2010).

Ayrıca, antioksidan enzim peroksiseredoksinin de ROS ve RNS arasındaki bağlantıyı göstermektedir. Bu enzim $ONOO^{\cdot}$ -yi detoksifiye etme kapasitesine sahiptir, ancak S-nitrosilasyon süreciyle aktivitesi inhibe olabilmektedir (Romero-Puertas et al., 2007). Aynı şekilde, patojenlere yanıt olarak süperoksit radikalini üreten AtRBOHD olarak da bilinen Arabidopsis NADPH oksidazı ve Cys890'da S-nitrosilasyonla inhibe olabilmektedir (Yun et al., 2011).

Son zamanlarda elde edilen yeni veriler ise belirli çevresel stres koşullarında hem ROS hem de RNS metabolizmalarının oksidatif ve nitrosatif streslere neden olabileceğini göstermektedir (Valderrama et al., 2007; Molassiotis and Fotopoulos, 2011; Bai et al., 2011). Bu fenomen, pek çok çalışma ile desteklenmiştir. Örneğin, düşük sıcaklık (Airaki et al., 2012), arsenik (Leterrier et al., 2012), tuzluluk (Valderrama et al., 2007; Tanou et al., 2012) ve kuraklık (Signorelli et al., 2013) gibi stres koşulları altındaki bitkilerle ilgili olarak açıklanmıştır. Böylece, bazı streslerin hem oksidatif hem de nitrosatif stresi içerdiğini göstermiştir. Diğer durumlarda, NO ve ROS arasındaki üretim dengesi sonuçları belirleyebilir. Örneğin, soya fasulyesi hücre süspansiyonlarında, aşırı duyarlı hücre ölümünün oluşması için uygun bir dengenin (ROS olarak $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2) ve NO üretiminin gerektiği gözlenmiştir. Aslında yüksek seviyelerde NO gözlemlense bile, uygun bir oksidatif patlamaya sahip olmadan hücre ölümü gerçekleşmemiştir (Delledonne et al., 2001).

Ayrıca, ROS ve RNS metabolizmaları arasındaki etkileşimde önemli rol oynayabilecek anahtar unsurlar S-nitrosoglutathion (GSNO) ve onun parçalanmasını katalize eden S-nitrosoglutathion redüktaz (GSNOR) olabilir (Leterrier et al., 2011; Malik et al., 2011). GSNO, indirgenmiş glutatyon (GSH) ile NO'nun S-nitrosilasyon reaksiyonuyla oluşan ve hücre boyunca NO'nun taşıyıcısı olarak kabul edilir ve hücrel bir NO rezervi olarak görülür. Bu doğrudan bir reaksiyon değildir, N_2O_3 oluşumu yoluyla veya reaksiyon sırasında oluşan bir glutatyonil radikalinin NO'ya eklenmesi yoluyla gerçekleşiyor gibi görünmektedir (Keszler et al., 2010; Broniowska et al., 2013). Glutatyon, bitki hücrelerinde; temel, çözünür, düşük molekül ağırlıklı antioksidanlardan biri ve temel non-protein tiyoldür. Bu sebeple hücrenin redoks durumunun düzenleyicisidir. İndirgenmiş glutatyonun oksitlenmiş glutatyon (GSSG) oranı (GSH/GSSG), hücrenin fizyolojik durumunun etkin bir göstergesi olarak kabul edilir (Foyer and Noctor, 2011). Ayrıca genellikle bu oran oksidatif stres koşullarında azalmaktadır. Son veriler, GSNO içeriğinin oksitlenmiş glutatyon içeriği (GSSG) ile aynı düzeyde olduğunu göstermiştir (Airaki et al., 2011). Bu nedenle, GSH/GSNO oranı, hücrenin redoks durumunun dengeye katkıda bulunan yeni bir unsuru olarak kabul edilmiştir. Bu durum hem ROS hem de RNS metabolizması arasında net bir bağlantı olduğunu açıkça göstermektedir. Ayrıca bunun dışında GSNOR, GSNO'nun GSSG ve NH_3 'ye NADH bağımlı olarak indirgenmesini katalizler. Dolayısıyla bu enzim GSNO'nun hücrel düzeyini ve hücrelerde NO'nun etkilerini düzenler, bu da farklı pek çok çalışma tarafından desteklenmektedir (Feechan et al., 2005; Lee et al., 2008; Chaki et al., 2009; Yun et al., 2011; Espunya et al., 2012; Leterrier et al., 2012 gibi). Bu nedenle, son zamanlarda ROS ve RNS metabolizmalarının yüksek bitkilerde stres

durumlarında olan ilişkisini içeren bu karmaşık ve gelişmekte olan araştırma alanı için "nitro-oksидatif stres" terimi, daha uygun bir terim olarak kullanılmaya başlanmıştır. Ancak, bu moleküllerin bir kısmının açıkça sinyal işlevine sahip olduğunu unutmamak önemlidir.

1.8.1 Stres Koşullarında Oluşan ROS ve RNS'nin Düzenlenmesi

Pek çok farklı stres faktörü tarafından indüklenen ROS birikimi antioksidanlar tarafından hücreden süpürülürler. Bunlar; süperoksit dismutaz (SOD), peroksidaz (POX), askorbat peroksidaz (APX), glutatyon peroksidaz (GPX), glutatyon redüktaz (GR), glutatyon-S- transferaz (GST) ve katalaz (CAT) gibi çeşitli süpürücülerin görev aldığı enzimatik antioksidan sistem ve askorbat (ASH), indirgenmiş glutatyon (GSH), karotenoidler, flavonoidler ve α -tocopherol gibi enzimatik olmayan düşük moleküler metabolitler tarafından hücreden temizlenmektedir (Mittler et al., 2004; Gill et al., 2011).

Metal içeren bir enzim olan SOD, süperoksit radikalının hidrojen peroksit ve oksijene dismutasyonunu katalizler. Oluşan bu H_2O_2 'ye dismutasyon, Fenton Reaksiyonu ile hidroksil radikalini oluşturur. SOD, metal kofaktörlerine göre (i)Cu/ZnSOD, (ii)MnSOD, (iii)FeSOD olmak üzere üç gruba ayrılmıştır. Bitkilerde başlıca sitosol ve kloroplastta bulunan Cu/ZnSOD, kofaktör olarak bakır ve çinkoyu kullanırlar. MnSOD ise, kofaktör olarak mangana sahiptir ve mitokondri ve peroksizomlarda bulunur. FeSOD ise, hayvanlarda bulunmamaktadır ve baskın bir şekilde kloroplastlarda bulunurlar. (Kliebenstein et al., 1998). Bahsedilen bu farklı SOD izoformlarının aktivitelerinin farklı düzenlenmesi ile bitkilerde süperoksit radikallerinin süpürülmesi gerçekleşmektedir (Wang et al., 2005). Farklı kompartmanlarda yer almalarının dışında SOD izozimleri ayrıca, KCN ve hidrojen peroksit karşı duyarlılıkta da farklılık gösterirler. MnSOD bu inhibitörlere direnç gösterir. Cu/ZnSOD ise, her ikisine de duyarlıdır. FeSOD farklı olarak, KCN ye dirençli ve hidrojen peroksit duyarlıdır (McKersie, 2000).

CAT enzimi, stres koşullarında ROS detoksifikasyonunu sağlamada görevli hem içeren tetramerik bir yapıdadır. H_2O_2 ' in, oksijen ve suya parçalanmasını sağlar (Matsumura et al., 2002). Bitkilerde üç izozimi belirlenen CAT enzimi; CAT1 ve CAT2 peroksizomlarda ve sitosolde H_2O_2 ' in süpürülmesinde işleve sahiptir. Ancak bunun dışında, CAT2 çoğunlukla vasküler dokularda bulunmaktadır. CAT3 ise, tohumlarda ve genç fidelerde bulunan mitokondriyal bir CAT izozimidir. Abiyotik stres boyunca peroksizomlarda yağ asitlerinin β -

oksidasyonu süresince, pürin katabolizmasında ve fotorespirasyonda H_2O_2 ' in süpürülmesinde bitki CAT'larının görevli olduğu görülmüştür (Willekens et al., 1995). Kloroplastlarda katalazın bulunmaması durumunda Calvin Döngüsündeki tiol bağlı enzimler zarar görebilmektedir. Ayrıca katalazın hidrojen peroksit'e karşı afinitesi diğer enzimlere göre daha düşüktür.

Bitki, hayvan ve mikroorganizmalarda bulunan Peroksidazlar (POX), hidrojen peroksit ile çeşitli indirgeyiciler arasında indirgenme ve yükseltgenme reaksiyonlarını katalizleyen enzim gurubudur. Askorbatperoksidaz ve sınıf3 bitki peroksidazları (guasiol tip peroksidazlar; GPX) antioksidan sistemle ilişkili önemli bitki peroksidazlarıdır.

APX, bitki hücrelerinin çoğunlukla sitosolünde ve kloroplastlarında bulunur. H_2O_2 'i süpürmekten sorumlu önemli enzimlerdir. Askorbatın H_2O_2 tarafından oksidasyonunu katalizler ve monodehidroaskorbat radikalini (MDA) oluştururlar. 4 farklı APX'in varlığı hücrede tespit edilmiştir. Bunlar: sitosolik (cAPX) ve glioksizom membranına (gmAPX) bağlı kloroplast stromasındaki çözünebilir (sAPX) ve tillakoide bağlı (tAPX) olan APX'tir (Campa, 1991). Oksidatif stresle başa çıkabilmek için askorbat-glutasyon döngüsü enzimleri büyük önem taşımaktadırlar. APX, askorbik asiti (Asc) elektron verici olarak kullanarak H_2O_2 'yi indirger (Bowler et al., 1992). Önemli bir diğer döngüde su-su döngüsüdür. Cu/ZnSOD, O^{2-} 'yi H_2O_2 'ye çevirmesinin ardından tAPX tarafından H_2O_2 su'ya dönüştürür (Asada, 2006). Bu döngü esnasında monodehidro askorbat redüktaz (MDHAR), NAD(P)H veya ferrodoksinin indirgeyici gücüyle (Miyake and Asada 1994; Rizhsky et.al., 2003), AsA'nın oksitlenmiş bir formu olan monodehidro askorbat (MDHA)'ı AsA'ya geri dönüştürür (Miyake and Asada, 1994; Sano et al., 2005; Asada, 2006; Rizhsky et. al., 2003). MDHA moleküllerinin AsA ya çevrilemeyenleri rastgele reaksiyona girerek bir AsA ve bir tane de dehidroaskorbat (DHA) oluşturmaktadır. Burada oluşan AsA ise redoks reaksiyonlarında kullanıma hazır hale gelir. Fakat, DHA'nın (AsA'nın en fazla oksitlenmiş formu) ise indirgenerek tekrar kullanılabilir hale gelmesi gerekir. Bu da dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) tarafından gerçekleşmektedir. DHAR bu reaksiyon boyunca indirgeyici güç olarak GSH'ı kullanmaktadır. Böylece hücrede en bol bulunan iki redoks çiftinin havuzları ROS' un süpürülmesi için birbirine bağlanmaktadır. GSH'ın oksitlenmiş formu olan GSSH, DHAR tarafından oluşturulmuştur ve glutasyon redüktaz (GR) enzimi ile NAD(P)H kullanılarak tekrar GSH'a geri dönüştürülmektedir.

Antioksidan mekanizmanın diğ er yarısını oluşturan enzimatik olmayan antioksidanlara ise GSH, AsA,  -tokoferol, karotenoidler, fenolikler, flavonoidler örnek verilebilir. Bu enzimatik olmayan antioksidanlar sadece hücreyi hasarlardan korumakla kalmaz aynı zamanda da bitki büyüme ve gelişmesinde hücre elongasyonu, mitoz, senesens ve hücre ölümü gibi olaylarda önemli rollere sahiptirler (de Pinto and De Gara, 2004).

Hücrenin sitosol, kloroplast, vakuol, endoplazmik retikulum ve mitokondri gibi birçok bölmesinde bulunan Glutatyon, sistein içeren bir tripep olmasından dolayı bitkilerdeki çok önemli metabolitlerden biridir (Jimenez et al., 1997). Hücrede redoks dengesinin korunmasında büyük öneme sahiptir. GSH'ın okside formu olan GSSG'nin GSH' a oranı H_2O_2 'nin parçalanması sırasında önemli rol oynamaktadır (Shao et al., 2008). Glutatyonun indirgenmiş formu potansiyel olarak hidrojen peroksidi, tekli oksijeni ve hidroksil radikali gibi diğ er radikalleri de s p rebilmektedir (Noctor and Foyer, 1998). Bunun dışında, AsA–GSH döngüsünde indirgenmiş AsA'nın yenilenmesinde GSH'ın rolü önemlidir (Halliwell and Foyer, 1976).

Askorbik asit (AsA), doğ al formda bol bulunan potansiyel bir oksidandır (Smirnoff, 2000). Suda çözünebilen bu molekül birçok hücre tipinde, organellerde ve apoplastta bulunur. AsA mitokondrilerde, hem L-galakton- -lakton dehidrogenaz ile hem de AsA'in okside formundan yenilenmektedir. Ayrıca, enzimatik ve enzimatik olmayan reaksiyonlarda elektron vericisi olduğu için en güçlü ROS süpürücü olarak kabul edilmektedir. AsA, doğrudan s peroksiti, hidroksil radikallerini ve tekli oksijeni baskılayabilir, bunun dışında da hidrojen peroksiti APX aracılı suya indirgeyebilmektedir (Foyer et al., 1997). Bu görevlerinin dışında AsA, prostetik geçişli metal iyonları taşıyan enzimlerin aktivitesinin korunmasında da önemli bir role sahiptir (Noctor and Foyer, 1998).

 -tokoferoller, tüm bitkilerde sentezlenen lipofilik antioksidanlardan biridir. Görevleri arasında membranları stabilize etmek, oksidatif stres ürünleriyle, çözünür lipidleri ve birçok ROS'u da süpürmek sayılabilir (Wang and Quinn, 2000). Bitkiler abiyotik strese maruz kaldıklarında fotosentetik bitki dokularında  -tokoferol seviyeleri artmaktadır (Munne–Bosch and Algere, 2003).

Plastidlerde fotosentetik ve fotosentetik olmayan bitki dokularında bulunan Karotenoidler, bir lipofilik antioksidandır. Sadece bitkilerde değ il mikroorganizmalarda da bulunurlar. Karotenoidler, antioksidan aktiviteleri ile LPO  retim reaksiyonu ile zincir

reaksiyonlarını sonlandırmak, sıcaklık ile üretilen $O_2^{\cdot-}$ 'nin süpürülmesi, uyarılmış klorofil (Chl^*) ve $3Chl^*$ reaksiyonu ile üretilen $O_2^{\cdot-}$ 'nin formasyonunu engelleyerek ve son olarak ksantofil döngüsü vasıtasıyla yüksek enerji ile uyarımının giderilmesi şeklinde fotosentetik mekanizmayı korurlar (Parihar et al., 2014).

Flavonoidler, çoğunlukla bitkilerin yapraklarında, çiçeğe ait organlarda ve polenlerde yaygın olarak bulunur. Flavonlar, flavonlar, izoflavonlar ve antosiyaninler olmak üzere yapılarına göre gruplandırılmışlardır. Flavonoidler, çiçeklerde pigmentasyon, meyve ve tohumda üreme ve gelişme, bitki patojenlerine karşı savunma, aşırı enerji ile uyarılma durumunda fotosentetik mekanizmayı hasara karşı koruma ve ikincil ROS süpürücü sistem olarak (Fini et al., 2011) süper oksit süpürülmesinde ve kloroplastik membranların dış zarlarında hasarı yatıştırmada görevlidirler (Agati et al., 2012).

Sonuç olarak tüm bu enzimatik ve non-enzimatik antioksidanlar ROS ve RNS moleküllerinin zararlı etkilerini ortadan kaldırmak için hücrenin pek çok farklı yerinde lokalize olarak farklı döngüler aracılığı ile işlev görürler. Bilindiği üzere eğer hücre içindeki ROS ve RNS gibi moleküllerin miktarı stres aracılığı ile artar ve antioksidanlar ile süpürülmez ve üretim ile süpürülme dengesi bozulmuş olursa tüm canlılarda hücre hasarlara neden olur. Bu moleküller proteinlerin, lipidlerin, karbohidratların ve DNA'nın hasarına yol açarak hücre ölümlerine neden olmaktadır. Bu moleküllerin nükleik asitlerin zarar görmesine, proteinlerin oksidasyonuna ve lipid peroksidasyonuna yol açması gibi birçok hücre fonksiyonu etkileyebildiği görülmüştür (Foyer and Noctor, 2005). Daha önce de bahsedildiği gibi memelilerde nörodejeneratif hastalıklar da bu şekilde ortaya çıkmaktadır.

Bu moleküllerin detoksifikasyonunun öneminin çok büyük olduğu böylece görülmektedir. ROS molekülleri ayrıca, mitokondri ve endoplazmik retikulum gibi farklı hücresel kısımların çeşitli metabolik yollarında yan ürün olarak da açığa çıkmaktadır (del Rio et al., 2006; Navrot et al., 2007). Bu sebeple ROS miktarının organellerde artışı ile de organel stresine yol açtığı bilinse de RNS'ler ile ilgili bilgiler henüz net değildir. Ancak NO'nin miktarının Glutamat Reseptörleri aracılığıyla Ca^{2+} 'nin artması sonucunda birikimi artan NO'nin teşvik ettiği mitokondri ve ER stresinin de Alzheimer ve Parkinson'a neden olduğu bulunmuştur (Forrester et al., 2006). Ancak bitkilerde NO artışı ile oluşan organel stresi ile ilgili literatürde bir bilgi bulunmamaktadır.

1.9 GLR İlişkili Nörodejeneratif Hastalıklarda Organellerin Rolü

İnsanlarda NO'nın aşırı üretiminin bir sonucu olarak özellikle ER'deki proteinlerin S-nitrosillenmesi, Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıkların patojenitesine neden olmaktadır (Uehara et al., 2006). S-nitrosillenen bu proteinlerden biri, protein disülfid izomeraz (PDI)'dır. PDI'nın ER içindeki görevi, ER ye bağlı ribozomlarda sentezlenen proteinlerin lümen içinde doğru katlanması için, katlanan proteinlere, disülfid bağı eklemektir. Ancak hücrede mitokondriyal hasar ya da nöronal glutamat reseptörü (NMDAR) aktivasyonundaki artışa bağlı nNOS aktivitesindeki artış, hücre içindeki NO üretimini artırır. Artan NO, PDI proteinin sistein-tiol grubuna bağlanır, enzimatik aktivitesini inhibe eder. Bu durum, ER'de polyubiquitinleşmiş proteinlerin birikimine neden olur. ER'de protein katlanması bozulur ve UPR (katlanmamış protein yanıtı) aktive olur. Son olarak nöronal hücre ölümüne bağlı PD hastalığı oluşur. Uehara et al. (2006)'da AD ve PD hastalarının beyinlerinde S-nitrosile olmuş PDI moleküllerinin biriktiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, ER'de, PDI proteininin NO-aracılı S-nitrosillenmesinin, insanlarda nörodejeneratif hastalıklara neden olduğunu göstermektedirler. Ancak bu mekanizma hala tam olarak aydınlatılmamıştır.

1.9.1 Mitokondriyal Stres ve Nörodejeneratif Hastalıklar

Nöronlar metabolik olarak aktif hücrelerdir ve bu sebeple yüksek miktarda enerjiye ihtiyaç duyarlar. Hücrenin enerji sentez merkezi olarak bilinen mitokondri, oksidatif fosforilasyon ile ATP sentezinde görevlidir. Ancak sadece enerji sentez merkezi değil; kalsiyum homeostazisi, hücre çoğalması, hücre büyümesi, aracı metabolizma ve apoptoz gibi birçok hücresel fonksiyon için kritik role sahiptir (Han et al., 2011). Mitokondriyal disfonksiyon sürecinde bahsedilen bu hücresel düzenler bozulur ve hücre apoptotik ya da nekrotik yola girer.

Enerji üretimi için gerekli olan oksidatif fosforilasyon mitokondrinin iç zarının iki tarafında bir potansiyel fark oluşturulması gerekir. Elektron taşıma sistemi (ETS), bu potansiyel farkı NADH ve FADH₂'nin verdiği yüksek enerjili elektronlardan enerji olarak protonları (H⁺) mitokondri matriksinden zarlar arası bölgeye taşır. Bunu gerçekleştiren ETS elemanları; kompleks I, kompleks II, kompleks III, kompleks IV ve kompleks V'dir. Herhangi bir sebeple bu komplekslerden birinin ç inhibe olması durumunda, mitokondriyal denge bozularak disfonksiyona uğramaktadır. Bu bozulma ise spesifik olarak belirli hastalıklarda gözlemlenmiştir.

ROS ve RNS'lerin aşırı miktarda oluşması birçok nörodejeneratif hastalıkta nöron hasarına ve ölümüne sebebiyet verebilmektedir. Nitrosatif stresin nöronal bozukluk ve ölüme sebebiyet veren önemli bir faktör olduğu görülmüştür (Lipton, 2006). Aslında son zamanlara kadar yapılan çalışmalarda nörodejeneratif hastalıklar için düşünülen en büyük risk faktörü yaşlanma olarak kabul görülmüştür (Evans et al., 1989). Bu süreçte mitokondrinin, mitokondriyal DNA'daki (mtDNA) mutasyonların ve ROS'ların birikmesi sonucu, yaşlanmanın gerçekleşmesini sağladıkları düşünülmektedir. Ayrıca bir çalışma ile beyindeki sitokrom oksidaz aktivitesinin, yaşlanmayla birlikte biriken mtDNA'daki nokta mutasyonlarıyla ters orantılı olduğunun keşfi mitokondriyal bozukluk ve nörodejenerasyonun birbiri ile ilişkili olduğunu gösteren başka bir kanıttır (Lin et al., 2002).

Daha önce de bahsedildiği gibi AD, temel olarak hiperfosforile tau proteinlerinin kümelenmesi ve amiloid-beta peptidlerden oluşan (A β) (Glennner and Wong 1984) ekstraselüler amiloid plaklar sonucu ortaya çıkan intraselüler nörofibriller düğümler ile karakterizedir (Nukina and Ihara 1986). Nöronal hücre ölümünün temel sebeplerinden en önemlisi; bozulmuş A β metabolizması, A β peptid agregasyonunun tetiklenmesi ve sinaptik zarara, nörofibriller düğümlere, inflamatuvar cevaba, artan oksidatif strese, hücre ölümüne ve sonuç olarak da AD'ye neden olur. Bu teori yerini giderek artan kanıtlar ile Ca²⁺ homeostazisinin bozulması, A β 'ların salgı yollarında birikmesi sonucunda mitokondriyal disfonksiyona neden olmasıdır. Bu mitokondride A β varlığı ve artan ROS gibi intraselüler lezyonlarla bağlantılı olduğu şeklindedir (Manfredi and Beal 2000; Reddy and Beal 2005; Reddy and Beal 2008). Bu yüzden AD ile mitokondri ilişkilendirilmiştir.

Beyin, nörotransmisyon için yüksek miktarda enerjiye ihtiyacı duymasından dolayı mitokondriler sinapslarda çok miktarda bulunmaktadır. Bu sebeple AD'li beyinlerde yapılan çalışmalarda mitokondri sayılarında azalma ve azalmış enerji metabolizması en erken teşhis edilen bozulmalar olarak görülmüştür (Hirai et al., 2001). Bunlara ek olarak AD'li kişilerin beyinlerinde alfa-ketoglutarat dehidrogenaz ve pirüvat dehidrogenazın (Sorbi et al., 1983; Gibson et al., 1998), ayrıca sitokrom c oksidazın da aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir. Literatürdeki sonuçların hepsi değerlendirildiğinde, tüm enzimlerin fonksiyonlarının A β varlığında bozunmaya uğraması sebebiyle, kademeli amiloid teorisi ve mitokondriyal disfonksiyon arasında bir ilişki olduğu önerilmiştir (Casley et al., 2002).

Dünya popülasyonunda en sık görülen ikinci nörodejeneratif hastalık olan PD'nin oluşumunda, substantia nigra pars kompakta olarak bilinen bölgedeki dopaminerjik nöronların

kaybı ve intrasitoplazmik inklüzyonlar olan, fibriller α -sinüklein'den oluşan Lewy cisimcikleri etkilidir (Spillantini et al., 1997). Yapılan çalışmalarda mitokondriyal disfonksiyonun PD ile bağlantılı olduğu görülmüştür (Chen and Chan, 2009). PD hastalarından alınan örneklerde mitokondrideki kompleks I'nin bozulduğu gösterilmiştir (Mann et al., 1994). Bu hastalık ile ilgili yapılan çalışmalarda α -sinüklein'deki mutasyonlar (Polymeropoulos et al., 1997) ve ardından da parkin mutasyonlarının (Kitada et al., 1998) belirlenmesi gerçekleşmiştir. Ayrıca α -sinüklein'in Lewy cisimciklerinin ana yapısını oluşturduğu tespit edilmiş, bu sebeple α -sinüklein'in agregat oluşumunda temel ve tek sebep olduğu düşünülmüş olsa da, daha sonra oksidatif stres ve α -sinüklein kümelenmesi arasında ciddi bir bağlantı olduğu görülmüştür (Convey et al., 2001). Ardından redoks sensörü olan DJ1'de, fosfataz ve tensin homologu indüklü kinaz 1'de (PTEN indüklü kinaz 1) gözlemlenen mutasyonların tespiti (Valente et al., 2004), oksidatif stresin ve mitokondriyal disfonksiyonun PD patogeneğinde öncül role sahip olduğu fikrini güçlendirmiştir. Ayrıca kompleks I'deki bozulma ile birlikte glutatyon azalmasının, kompleks I inhibisyonu ile oksidatif stresin birbiriyle alakalı ve eş zamanlı gerçekleşen olaylar olduğunu göstermiştir (Wood-Kaczmar et al., 2008). Bunun dışında, kompleks I'nin inhibisyonu sadece mitokondriyal ATP üretiminde düşüşe sebep olmakla kalmaz, lipid peroksidasyonuna ve süperoksit radikallerin oluşumuna da sebep olur. Oksijen radikalleri ve intraselüler ATP kaybının yapılan çalışmalarda görülmesi de bu durumun hücre ölümüne sebebiyet vermesini açıklar niteliktedir.

Bahsedilen mekanizmalar dışında son yıllarda mitokondriyal disfonksiyonun Glutamat Reseptörleri ile ilişkisi araştırılmasının gerekliliği vurgulanmaktadır. Nörodejenerasyon, oksidatif stres ve inflamasyonda mitokondriyal disfonksiyon çoğunlukla aydınlatılmışken, son zamanlarda, yapılan çalışmalar ile glutamat kaynaklı nörotoksositeye ilişkin çoklu mekanizmalar aydınlatılmaya çalışılmaktadır (Manucha, 2017).

Glutamat iletiminin, Ca^{2+} homeostazı ve mitokondriyal fonksiyona güçlü bir şekilde bağlı olduğu bilinmektedir (Samaili et al., 2011). Ayrıca, apoptoz normal hücrel beyin gelişimi ve/veya bakımı için bir düzenlenmiş süreçtir. Ancak nörodejenerasyonlu hastalarda mitokondriyal solunum (Brown and Vilalta, 2015) mekanizmasının açık bir şekilde deregüle olduğu ve oksidatif stresin arttığı gözlenmiştir. Bu sebeple, nörotoksosite için çeşitli hipotezler önerilmiştir. Bu hipotezler, glutamat aracılı uyarıcı toksositeye bağlı mitokondriyal işlev bozuklukları ve oksidatif stres içeren hipotezlerdir. Bu bağlamda, glutamat aracılı uyarıcı toksosite, oksidatif stres ve mitokondriyal işlev bozuklukları; serebral iskemi, travmatik beyin

yaralanması, PD, AD, Huntington hastalığı ve amiyotrofik lateral sklerozda nöronal ölüme yol açan ortak bileşenlerdir (Chabrier et al., 1999). Sorokina et al. (2010)'da yapılan çalışmada, NO'nun doymamış yağ asitlerini okside ettiği, serum albuminin hidrolitik olarak uzaklaştırıldıktan sonra onları bağlama yeteneği gösterilmiştir. Böylece serum albuminin, glutamat nörotoksitesini artırdığını ve nöronal membranlardaki diğer serbest radikallerin toksik etkilerinin kötüleşmesine sebep olduğunu öne sürmüşlerdir. Ayrıca, NO hem tek başına hem de süperoksit anyonu ve peroksinirit ile birlikte nörodejenerasyonun baskın bir etkileyicisi olarak ortaya çıkmaktadır (Chabrier et al., 1999). Bu sebeple, başlıca nörodejeneratif hastalıkların etiyolojisi hala tam olarak bilinmemekle birlikte, artan kanıtlar, bu hastalıkların temelinde yatan oksidatif stres sürecinde glutamat ve mitokondrilerin önemli rol oynadığını göstermektedir (Cassano et al., 2016). Ayrıca, elde edilen verilere ışığında özellikle dikkat çeken nokta, NO yollarının, glutamat tarafından indüklenen apoptozda mitokondriyal işlev bozukluğu ile ilişkilendirilmiş olmasıdır (Manucha, 2017).

Glutamatın nörotransmitter olarak rolü potansiyel olarak uyarıcı toksiktir. Birçok nörotransmitter potansiyel olarak uyarıcı toksik hücre hasarına neden olabilirken, glutamatın güçlü etkisi nedeniyle temel katkı sağlayan olarak kabul edilir. Çünkü iGluR aracılığıyla hücre içi kalsiyumu artar ve bu nedenle seviyelerini düzenlemek için karmaşık bir mekanizma etkindir. Bu bağlamda, özellikle merkezi sinir sisteminde NO'nun oynadığı merkezi rol, mevcut literatürde yerini almıştır (Krishnamurthy and Laskowitz, 2016). Merkezi sinir sisteminde NO'nun salınımı için en yüksek uyarı, glutamat tarafından NMDA reseptörlerinin aktivasyonu ile gerçekleşir. Dawson et al. (1991) tarafından yapılan bir çalışmada, glutamatın nörotoksitesinin NO aracılığıyla olduğu belirlenmiştir. Nörotoksite ile ilişkilendirilen serbest radikal oluşumunu ve NO'nun reaktif bir serbest radikal olduğunu bu çalışmada öne sürmüşlerdir. Son çalışmalar ile NO'nun mitokondriyal solunumu inhibe edebilmesi ve hücrelerin oksidatif stresle başa çıkma yeteneğini azaltabiliyor olması bunu kanıtlar niteliktedir. Özellikle yüksek konsantrasyonlarda NO, mitokondriyal solunum zincirinin kompleks I, II, III, IV ve V geri dönüşümsüz olarak inhibe ederken, fizyolojik düzeyde NO sitokrom oksidazı geri dönüşümlü olarak azaltmaktadır (Dai et al., 2013).

Nörotoksite mekanizmaları, glutamatın NMDA reseptörlerini aktive etmesi, nNOS ve iNOS tarafından NO'nun üretilmesi, DNA'ya oksidatif zarar verilmesi ve DNA hasar algılama enzimi olan poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) aktivasyonunu gerçekleştirmesi sürecini içermektedir. Bu bağlamda, mitokondrilerden çekirdeğe bir mitokondriyal protein olan

apoptoz indüksiyon faktörünün (AIF) transloke olması ile PARP aktivasyonuna bağlı olarak artan eksitotoksisite nedeniyle hücre ölümünde önemli bir rol oynar (Wang et al., 2003).

Ayrıca, mitokondriyal disfonksiyonun tetikleyicisi olarak Ca^{2+} 'nin mitokondrideki birikimi önemli bir role sahip olabilmektedir. Nöronlardaki aşırı Ca^{2+} artışı, glutamatın nörotoksisitesi ile ilişkili mitokondriyal kalsiyum alımına bağlı olsa da, mitokondriyal toksisite için NO üretimi de gereklidir. NMDA reseptör aktivasyonu tarafından sağlanan Ca^{2+} artışı böylece NO ile ilişkilidir ve böylece birlikte mitokondriyal membran potansiyelinin bozulmasına ve hücre ölümüne sebep olabilmektedir (Duchen, 2004).

Sonuç olarak, temel nörodejeneratif hastalıkların etiyolojisi halen bilinmemekle birlikte, son yapılan çalışmalar ile birlikte artan kanıtlar glutamat ve mitokondrilerin bu hastalıkların temelinde yatan oksidatif stres sürecinde önemli rol oynadığını göstermektedir. Ayrıca, mevcut bilgiye göre, mitokondriyal disfonksiyonla ilişkilendirilen NO yollarının nörotoksisiteden kaynaklanan apoptozda ortaya çıkan yeni rolü ise halen tartışılmaktadır. Tüm literatür değerlendirildiğinde, kanıtlar NO yollarının modülasyonunun apoptoz inhibitörü olarak nöronlarda oksidatif hasarı önleyebileceğini göstermektedir. Ancak, NO aracılı sinyalleme beyindeki ortaya çıkan yönleri ve bunların nörotoksisiteyle ve nörodejeneratif hastalıkların gelişimiyle nasıl ilişkili olabileceği konusunda tartışmalar uzun süre devam edecek gibi görünmektedir (Manucha, 2017).

1.9.2 Endoplazmik Retikulum Stresi ve Nörodejeneratif Hastalıklar

ER, salgılanmak üzere belirlenen, hücre zarı, golgi ve lizozomlar için sentez ve katlanma yeri olan proteinlerin yeridir (Oyadomari et al., 2002; Schröder and Kaufman, 2005). ER; yeni sentezlenen proteinlerin katlanması ve birleştirilmesi, glikolizasyon, disülfid bağlarının oluşumu gibi pek çok önemli işleve sahiptir. Proteinler doğru yapıya katlanmalı ve ER'de uygun şekilde düzenlenmelidir. Eğer proteinler katlanamaz veya yanlış katlanırsa golgiye ulaştırılamaz. Bu anormal proteinlerin ER'de birikir. Böylece ER fonksiyonu bozulur. Tüm bunların sonucu olarak hücrenin hayatta kalması tehdit altına girebilir. Stresli ortamlara uyum, hücrel protein üretiminin ve profilinin yeniden programlanmasını gerektirir (Kosová et al., 2011), bu da protein sentezi yükünü artırır. Bu tür koşullarda, katlanmamış veya hatalı katlanmış proteinler ER lümeninde birikerek ER stresine neden olur. ER stres, anormal/katlanmamış proteinlerin tanınması, protein katlama kapasitesinin indüksiyonu ve nihayetinde protein bozunum süreçlerini içeren katlanmamış protein yanıtı (UPR) tarafından algılanır (Iwata ve Koizumi, 2012; Howell, 2013). ER ayrıca hücrel Ca^{2+} depolama görevi

de üstlenir ve sarkoplazmik/endoplazmik retikulum Ca^{2+} -ATPazı (SERCA) aracılığıyla Ca^{2+} 'yi ER lümenine pompalar ve inositol 1, 4, 5-trisfosfat (inositol trifosfat [IP3] reseptörü ve/veya ryanodin reseptörü [RyR]) tarafından ise ER'den Ca^{2+} salarak, Ca^{2+} homeostazında önemli bir rol oynamaktadır (Oyadomari et al., 2002; Schröder and Kaufman,2005). Yeni sentezlenen proteinlerin katlanması ve disülfid bağlarının oluşumu gibi ER fonksiyonları için ER'deki bu yüksek Ca^{2+} konsantrasyonu gereklidir. Çünkü calretikulin, calneksin ve protein disülfid izomerazı gibi birkaç ER şaperonunun fonksiyonları yüksek Ca^{2+} konsantrasyonuna bağlıdır. Bu nedenle, ER'deki Ca^{2+} homeostazının bozulması ER'nin işlevini bozmaktadır (Schröder and Kaufman,2005). Ayrıca bunun dışında, fazla miktarda NO'nun ER'deki Ca^{2+} homeostazını bozduğu bildirilmiştir. ER'nin işlevini düzgün şekilde yerine getirebilmesi, hücrenin hayatta kalması için esastır ve işlevinin bozulması hücrel hasara ve apoptoza yol açmaktadır. ER'deki protein olgunlaşma süreçleri karmaşıktır ve çeşitli hücrel stresler tarafından kolaylıkla bozulabilmektedir. Sitosolik Ca^{2+} homeostazının bozulması da ER'deki Ca^{2+} homeostazını ve Ca^{2+} bağımlı protein katlanma süreçlerini etkiler. Pek çok hastalıkta, redoks düzenlemesinin bozulması veya artan ROS üretimi ER stresi yolunun aktive olmasında rol oynayabilir. Birçok sistein, S-S bağları oluşturmak için ER'de oksitlenir. Ancak bu reaksiyonda oluşan elektronlar moleküler oksijene aktarılır. Bu nedenle, bu reaksiyonlar hücrenin indirgeyici kapasitesini artırmaz. Ayrıca, yanlış katlanmış proteinlerin S-S bağları sitosole geri taşınmadan önce indirgenmesi gerekir. Bu nedenle, ER büyük miktarda indirgeyici kapasite tüketir ve ER fonksiyonları hücre içi redoks durumlarına bağlıdır. Oksidatif stresin hem ER stresini indükleyici hem de hızlandırıcı olduğu düşünülmektedir (Schröder and Kaufman,2005).

ER fonksiyonu bozulduğunda ve ER'de katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinler biriktiğinde, ER stres yanıtı yolu aktive olur (Credle et al., 2005). Ardından ER fonksiyonlarını düzeltmek veya sürdürmek için çalışır. ER zarında 3 adet ER stres sensörü bulunmaktadır (Ire1, ATF6 ve PERK) (Yoshida et al., 1998). Stres altında olmayan durumda, ER şaperonu BiP3, ER stres sensörünün ER lümen bölgesine bağlanmıştır. ER'de katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinler biriktiğinde, BiP ER stres sensörlerinden ayrılır ve o anormal proteinlere bağlanır (Bertolotti et al., 2000). BiP'nin ayrılması ER stres sensörlerinin aktive olmasını tetikler. Böylece, Ire1 ve PERK dimer oluşumuyla aktive olur, bunun ardından otofosforile olurlar ve ATF6'nın aktif olmayan formu (p90ATF6) golgiye taşınır. Site-1 proteaz (S1P) ve Site-2 proteaz (S2P) tarafından 2 basamaklı bir kesilmeyle aktive edilirler. Böylece ATF6 aktif formu (p50ATF6) oluşur. p50ATF6 aktif formu nükleusa

taşınır ve ER stresle ilişkili genlerin transkripsiyonel aktivatörü olarak işlev görürler (Shen et al., 2002). ER stres yanıtı evreleri 4 başlık altında toplanabilmektedir (Yoshida et al., 2003). İlk evre, PERK tarafından aktive edilen eIF-2 α (ökaryotik başlatma faktörü 2'nin α alt birimi) fosforilasyonu aracılığıyla yeni sentezlenen proteinlerin yükünün azaltılması sonucu translasyonel zayıflamayı içerir (Harding et al., 2000). İkinci evre, ER'deki katlanma aktivitesini artırmak için BiP gibi ER şaperonlarının indüksiyonunu içerir. Üçüncü evre, katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin sitozolde ubiquitin-proteazom sistemi aracılığıyla ER'de parçalanmasıdır. Bu sistem ER stresini ile ilişkili bozulma (ERAD) olarak adlandırılır. Eğer ER fonksiyonunu kurtarmak için uyarıcılar çok şiddetli ise, hasarlı hücreleri uzaklaştırmak için apoptoz yolları aktive olur. ER stres koşullarında, bu 4 yanıt evresi zamanla değişen bir geçiş gösterebilmektedir (Yoshida et al., 2003).

Eğer ER fonksiyonları ciddi şekilde bozulursa, hasarlı hücreleri ortadan kaldırarak bütün vücudu korumak amacıyla apoptozis yolları aktive olur. ER stres aracılı apoptozisin bilinen yolları; C/EBP homolog protein (CHOP) geninin transkripsiyonel aktivasyonu (Oyadomari and Mori, 2004), Ire1-TRAF2-ASK1-MAP kinaz yolağının aktive olması (Matsukawa et al., 2004) ve ER ile ilişkili caspase-12'nin aktive olması şeklinde gerçekleşir (Nakagawa et al., 2000).

NO'nun aşırı üretimi, pek çok hastalıkta NO aracılı apoptozun sıkça gözlemlendiği durumlarla ilişkilendirilmiştir. NO'nun proteinler ve nükleik asitlerle reaksiyonlara girerek apoptoza neden olan çeşitli sitotoksik etkileri olduğu bilinmektedir. Ancak hücre ölümü kaskadı tam olarak aydınlatılamamıştır. Genel olarak, NO'nun p53 indüksiyonu ve poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) aktivasyonu yoluyla hücre ölümüne yol açan DNA hasarını indüklediği düşünülmektedir (Harris and Levine, 2005). Stresiz koşullarda, p53 hızla parçalanır, hücrelerdeki p53 protein düzeyi çok düşüktür. DNA hasarına yanıt olarak p53, ciddi DNA hasarı durumunda programlanmış hücre ölümünü indükler. P53 birikimi tarafından indüklenen apoptoz, mitokondri yolları aracılığıyla gerçekleşir (Messmer and Brüne, 1996). Ancak, NO'nun p53-eksik mikrogliya hücre hatlarında bile apoptozu indüklediğini bulunmuştur. Ayrıca, pankreas β hücreleri ve makrofajlar gibi hücre tiplerinde bile şiddetli DNA hasarı oluşturmada da düşük konsantrasyonlardaki NO'nun apoptozu indüklediğini bulunmuştur (Oyadomari et al., 2001). ER stres yolu, en azından bazı hücre tiplerinde, NO tarafından indüklenen apoptozda rol oynamaktadır (Oyadomari et al., 2002).

NO'nun ER stres yolunu nasıl aktive ettiği hakkında bazı çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalarda grlmştş ki; Kalretiklin, Ca^{2+} bağlayıcı bir ER şaperonudur ve aşırı ekspresyonu ER'deki Ca^{2+} içeriğini artırır böylece hücreleri NO aracılı apoptozdan korur (Oyadomari et al., 2001). Daha önce belirtildiği gibi, protein katlanması için ER şaperonlarının bazıları Ca^{2+} bağımlı proteinlerdir, bu nedenle ER'deki Ca^{2+} homeostasisinin korunması büyük önem taşır. NO'nun, kanal benzeri alan içindeki tirozin nitratlama yoluyla SERCA'nın Ca^{2+} -ATPaz aktivitesini inhibe ettiği ve S-nitrosilasyon yoluyla RyR1 ve RyR2 aktivitelerini artırdığı rapor edilmiştir (Xu et al., 1999). Böylece NO, SERCA aracılığıyla sitozolden Ca^{2+} alımını inhibe ederek veya RyR aracılığıyla sitosole Ca^{2+} salınımını aktive ederek ER Ca^{2+} seviyesini azalttığı düşünülmektedir (Gotoh and Mori, 2006).

UPR sinyal yolağı memeli ve mayalarda yoğun olarak karakterize edilmiştir. BiP, IRE1, ATF6, Kalretikulin ve PDI gibi bazı yolak homologları bitkilerde de tanımlanmıştır (PERK'in homologuna bitkilerde rastlanmamıştır) (Lu and Christopher, 2008). ER'de aşırı miktardaki katlanmamış proteinler BiP'e bağlanır. BiP, dimerizasyonuna ve aktivasyonuna neden olan bir protein kinaz-ribonükleaz olan IRE1 hibrit lümen sensöründen serbest bırakılır. Memelilerde BiP'in serbest bırakılması UPR ile düzenlenmiş genlerin aktivasyonuna aracılık eden ATF6 transkripsiyon faktörünü de aktive eder (Lee et al., 2002). Bitkilerde ATF6 benzeri transkripsiyon faktörü olarak AtbZIP60 bulunmaktadır (Iwata ve Kouzumi, 2005). Ancak XBP1 transkripsiyon faktörü ve translasyonel düzenleyici PERK (Harding et al., 2000) Arabidopsis'te bulunmamaktadır.

ER stresi, hayvan sistemlerinde, çeşitli hastalıklarda rol oynadıkları için ROS metabolizması gibi diğer metabolik süreçlerle yoğun bir şekilde ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte, bitkilerde araştırmalar daha çok ER stresinin algılanma mekanizmasının aydınlatılmasına ve çeşitli UPR ve ERAD bileşenlerinin tanımlanmasına odaklanmıştır (Iwata and Koizumi, 2005; Liu ve Howell, 2010; Srivastava et al., 2013). Bitkilerde ROS-redoks düzenlemesinde ER stresi ile ilgili bilgiler, hayvan ve maya sistemleriyle karşılaştırıldığında henş başlangıç aşamasındadır. Hayvan sistemlerine benzer şekilde, bitkilerde de ER stresi oksidatif yükü artırır ve ER stresin şiddetine bağlı olarak oksidatif strese neden olabilir (Ozgur et al., 2014). Ayrıca, ER stresi, NADPH oksidaz aracılığıyla ROS sinyalleşmesini tetikler, antioksidan savunmayı indükler ve glutatyonun redoks durumunu değiştirir (Ozgur et al., 2014; Uzilday et al., 2018). Bunun dışında, özellikle mitokondri gibi farklı hücresel bölmelerde ROS birikiminin fazlalığı UPR'yi tetikleyebilir (Ozgur et al., 2015). Bu bulgular,

bitkilerde ER stresi ile ROS birikimi arasında karşılıklı bir ilişki olduğunu gösterir. Böylece bu durumun pozitif bir geri besleme mekanizması olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir.

Hayvanlarda, nitrosatif stres ve ER stresi arasındaki ilişkiye dair doğrudan kanıtlar mevcuttur. Diyabet hastalığına sahip bireylerin kalplerinde, hücrel metabolizmayı, oksidatif stresi ve immün homeostazı düzenleyen bir transkripsiyon faktörü, nitrosatif stres ve ER stresi yanıtlarını da iletmesi örnek olarak verilebilmektedir (Guo et al., 2014). Ayrıca, PDI'nin NO'nun bir tiolle S-nitrosilasyonunun artması, proteinin yanlış katlanmasını ve nörodejenerasyonu teşvik etmiştir (Uehara, 2007).

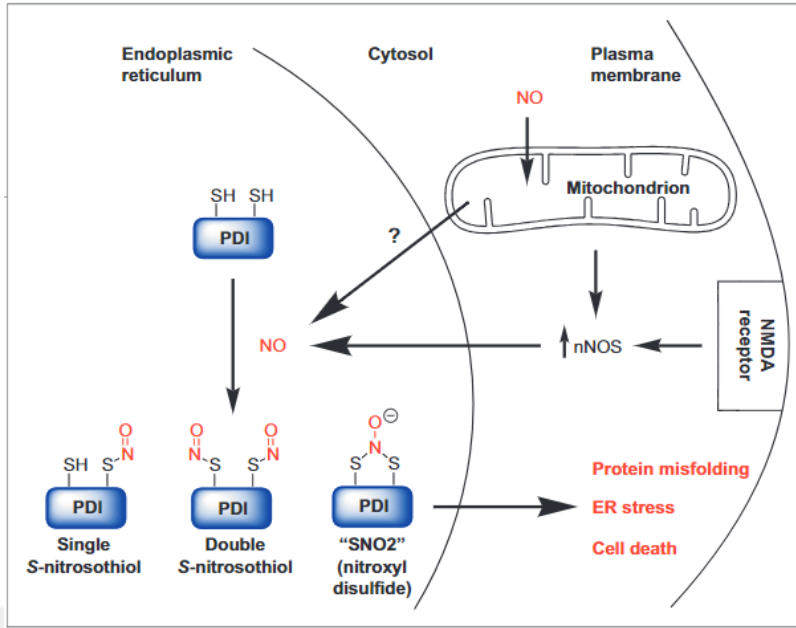
Bahsedildiği gibi fazla miktarda NO ve RNS, AD ve PD gibi nörodejeneratif bozuklukların (NDD) patogeneziyle de ilişkilendirilmektedir (Calabrese et al., 2000). Sonraki bulgular, apoptozun bu bozuklukların temel süreçlerinden biri olduğunu göstermiştir (Mattson, 2000). Uehara et al. (2007)'a göre, NO aracılı S-nitrosilasyonun PDI fonksiyonunu inhibe ettiği ve böylece de ER'de düzensiz protein katlanmasına neden olduğu, sonuç olarak ise nöronal hücre ölümünü teşvik eden ER stresine yol açtığı gösterilmiştir. Böylece, bu bulgular, NDD'de düzensiz protein S-nitrosilasyonunun (nitrosatif stresin) rolüne ilişkin kanıtlar sunmaktadır. Bu kanıtlar ER disfonksiyonunun NO kaynaklı hücrel stresi nörodejenerasyonla birleştiren kritik bir ortak faktör olarak hizmet edebileceğini göstermektedir.

NO aracılı nöromodülasyonu ve nörodejenerasyonda NMDAR, merkezi bir rol içermektedir. NMDAR'ların aktive edilmesi, Ca^{2+} akışını tetikler ve bunun sonucunda nöronlarda baskın NO sentezleyici enzim olan nNOS aktive olur (Dawson et al., 1991). Bu aktivite ile birçok protein S-nitrosile edilir (Jaffrey, et al., 2001) bu da nöronal hücre ölümünü kolaylaştırır.

Ayrıca, PD'nin en iyi kabul görmüş laboratuvar modeli, mitokondriyal kompleks I'in inhibitörleri olan rotenon veya 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP) ile mitokondriyal disfonksiyonun indüklenmesine dayanmaktadır (Zhang et al., 2006). Daha önce de bahsedildiği gibi ROS üretimi ve ATP tükenmesi sonucu ortaya çıkar. Rotenon veya MPTP ile kompleks I'in inhibisyonu, yalnızca ROS üretimine değil, aynı zamanda belirgin bir RNS artışına da yol açar (Chung et al., 2004; He et al., 2003). Bu artışın nedeni, nöronal depolarizasyon ve ATP tükenmesi ile tanımlanırken aynı zamanda voltaj bağımlı Ca^{2+} girişine

de bağılı olabilir (Abou-Sleiman et al., 2006). Ancak mitokondriler kendileri de hem kalsiyum hem de NO (NOS ve nitritten elde edilen) kaynakları olarak hizmet edebilir (Kozlov et al., 1999). NO'nun kendisi, S-nitrosilasyon yoluyla, kompleks 1'in iyi karakterize edilmiş bir inhibitörü olarak da etki gösterebilmektedir (Clementi et al., 1998). Bu olaylar, RNS üretimi, mitokondriyal disfonksiyon ve nihayetinde hücre ölümü için bir kısır döngü oluşturur. Böylece, mitokondriyal NO üretiminin düzenlenmemiş veya aşırı protein S-nitrosilasyonu ile (mitokondriyal ROS üretimi tarafından indüklenen protein oksidasyonuna ek olarak) nöronal hücre ölümüne katkıda bulunduğunu göstermektedir.

PDI'lar, tiol/disülfid oksidoreduktazların çeşitli bir ailesidir ve her biri iki tioredoksin (Trx) alanına sahiptir (Ellgaard and Ruddock, 2005). Uehara et al. (2007)'a göre, PDI'nın mitokondriyal disfonksiyonu (rotenon) veya NMDAR aktivasyonunu takiben S-nitrosile edildiği (SNO-PDI) ve SNO-PDI'nın tanımlanan işlevlerini yerine getirmediği belirlenmiştir. Nöronlarda PDI'nın S-nitrosilasyonu, synphilin katlanmasında (PD'nin bir özelliği) hatalı oluşumuna neden olur. Ayrıca, SNO-PDI molekülü ile ER stresi ve sonraki UPR yolunun aktivite olmasına neden olmaktadır. Bu bulgularla uyumlu olarak, PDI'nın aşırı ekspresyonu, NMDAR'a bağılı ER stresine, poliübükitinilasyona ve apoptoza karşı koruma sağlar. Bu koruma, PDI'nın aktif bölge sisteinlerine bağılıdır. Bu nedenle, NMDAR aktivasyonu ve mitokondriyal disfonksiyon gibi iki paradigmatic nörotoksik uyarı PDI'nın S-nitrosilasyonu ile bağılantılı hale getirmişlerdir (Uehara et al., 2007). Bu bulguların insan NDD etiyolojisi için doğrudan önemlidir. SNO-PDI'nın PD veya AD hastalarının beyinlerinde bulunduğu ve normal beyinlerde ise bulunmadığını göstererek kanıtlanmıştır. Ayrıca, PDI ve diğer birkaç redoks enzimi gibi çift sisteini bulanan proteinlerin NO tarafından modifikasyonunun bir nitroksil disülfide (SNO_2 ; Şekil 1) dönüşebileceği önerilmiştir (Uehara et al., 2007). Ayrıca, PDI'nın redoks döngüsünde sınırlayıcı bir adımı olan PDI'nın Ero1'e bağımlı oksidasyonu (Mezghrani et al., 2001; Molteni et al., 2004), SNO-PDI, katlanmayan protein ve Ero1 tarafından yeniden üretilmeyen bir durumda bağılı kalabilir. Bu analiz, ROS'un (oksidatif stres) ve RNS'nin (nitrosatif stres) ER'de önemli ölçüde farklı etkilere sahip olabileceğini düşündürmektedir. Bu durumun en büyük çıkarımı ise, PDI'nın ROS'a bağımlı oksidasyonu, muhtemelen aktif bölge disülfiti üretmesi ve böylece Ero1 için bir substrat olarak kalması şeklinde işlevsel olması iken, Nitrosatif stresin, ER stresinin daha olası bir nedeni olabileceğinin düşünülmesidir. Bu sebepler doğrultusunda, bu farklılıklara neden olan biyokimyasal ve hücresel özellikler, aynı zamanda ER'deki S-nitrosilasyonun rolleri, gelecekteki araştırmalar için ilgi çekici konular olarak araştırılmaya devam edecektir.



Şekil 2 NMDAR ilişkili NO artışının Organellere Etkisi (Forrester et al., 2006)

Daha önce de bahsedildiği gibi, bitki biyolojisinde yapılan araştırmalar bu hücrel yolakta görev alan bazı genlerin ve proteinlerin (NMDAR, PDI, BiP, IRE1, Kalretikulin gibi) ortologlarının Arabidopsis'te de bulunduğunu kanıtlamıştır. Bitkilerde Ca^{2+} kanalları ile ilgili pek çok çalışma bugüne kadar yapılmış olsa da GLR ile ilişkili çalışmalar henüz yenidir ve bahsedilen yolak ile ilgili bir çalışma literatürde yoktur. Bilindiği gibi, bitki gelişimi sırasında Ca^{2+} sinyallemesinin temel rolü ve (a)biyotik stres tepkileri, olası Ca^{2+} taşıma sistemlerinin moleküler yapısının keşfi ve karakterizasyonu onlarca yıldır çalışılmakta ve halen devam etmektedir. İlginç olarak, 2014 yılında ilk kez Forde ve Roberts tarafından bitki bağışıklık tepkileri sırasında Ca^{2+} akışına GLR'lerin etkisi araştırılmıştır. Şu ana kadar ki AtGLR'lerin fizyolojik sonuçları Ca^{2+} salınması ile bağlantılıdır. Benzer şekilde, bazı uyarıların Ca^{2+} aracılı bir yanıtı tetiklediği ve membran voltajındaki değişikliklerin hem sinyal verme (voltaj kapılı kanallar aracılığıyla) hem de yanıt (potansiyelin artması) sırasındaki süreçte önemli bir rol oynadığı görülmüştür (Hedrich, 2012). Bitkilerin, nöronlar gibi özel hücrelere sahip olmasalar da elektrik sinyalleri üretilip yayabilen, uyarılabilir hücreleri olduğu bulunmuştur (Gallé et al., 2015; Hedrich et al., 2016). Aslında, bitkilerdeki biyo-elektrik fenomeni, bir asırdan daha uzun bir süre önce yaygın bir şekilde karakterize edilmiştir. (Bose, 1913). Bitkilerdeki aksonlara en yakın yapı, elektrik sinyalleme için düşük dirençli bir yol sergileyen, simplastik bir doku olan floemdir. Bir çalışmada, tırtıl kaynaklı yaralanmadan sonra Arabidopsis yapraklarında, yanıt olarak floem boyunca bir elektrik sinyalini oluşturmak ve yaymak için AtGLR'lerin çok önemli rolü olduğu gösterilmiştir (Mousavi et al., 2013) Bu

sonuçlar, AtGLR'lerin elektrik sinyalinin şeklini ve yoğunluğunu düzenleyebileceğini, organlara yayılmasını kontrol edebildiğini, böylece nöronlarda olduğu kadar karmaşık olabilen AtGLR aracılı elektrik sinyallerinin düzenlemesini sağladığını göstermiştir (Wudick et al., 2018). Bu da bitki ve hayvanlar arasında pek çok ortak yolağın olduğunun kanıtıdır. En büyük kanıt olarak ise, Vatsa et al. (2011)'de yapılan çalışmada ilk kez GLR aracılı NO artışının bitkilerde de gerçekleştiği belirlenmiştir.

Özetle; bilindiği üzere *Arabidopsis thaliana* bitki biyolojisinin model organizması olarak pek çok çalışmada kullanılmaktadır. Bunun dışında, son yıllarda özellikle insan hastalıklarının temelini oluşturan moleküler mekanizmaların anlaşılmasında da çok değerli bir araç olarak gösterilmektedir. *A. thaliana* ve insan genomları karşılaştırıldığında, insan hastalıklarına neden olan genlerin yüksek yüzdesinin Arabidopsis'te de var olduğu tanımlanmıştır (Xu and Moller, 2011). Arabidopsis'in kullanıldığı bilimsel çalışmalardan elde edilen sonuçlarla, insanlardaki nörodejeneratif hastalıkların oluşumuna neden olan hücresel yollardaki eksiklikler tamamlanmaya çalışılmaktadır. Yapılan araştırmalar, PreP (Pre-sequence Proteaz) ve DJ-1/PARK (Parkinson ilişkili gen DJ-1) genlerindeki mutasyonların yanında beyin hücre zarındaki NMDAR (Glutamat reseptörü) aracılıklı NO birikiminin teşvik ettiği, PDI (Protein Disülfid İzomeras) enziminin inhibisyonu ile oluşan mitokondri ve endoplazmik retikulum (ER) stresinin insanlarda Alzheimer ve Parkinson'a neden olduğunu göstermiştir. (Uehara et al., 2006). Diğer yandan Lam et al., (1998) tarafından Arabidopsis hücre zarında da insanlardaki NMDAR-benzeri GLR reseptörlerinin olduğu keşfedilmiştir. Hatta bu reseptörlerden GLR3.4.1'in aktivasyon eksikliğine bağlı olarak sitosole giren Ca^{2+} miktarının azaldığı bulunmuştur (Cheng et al., 2018). Ancak GLR aktivasyonuna bağlı olarak NO miktarındaki değişimin hücre içi ROS-RNS üretimini ve antioksidan savunma sistemini nasıl etkilediği bilinmemektedir. Ayrıca bu reseptördeki aktivasyon kaybının, hücrede metabolik faaliyetlerin en yoğun olduğu iki organel olan mitokondri ve ER stresini üzerindeki etkilerinin de neler olduğu konusu henüz netlik kazanmamıştır. Bu nedenle araştırmamızda *A. thaliana*'daki GLR 3.4 reseptöründeki aktivasyon azalmasının, hücre içi ROS/RNS dengesi, antioksidan savunma sistemi ve ER/Mitokondri organel stresleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla araştırmamızda bitki materyali olarak AtGLR3.4 (atglr3.4-1 ve atglr3.4-2) olgun rozet yaprakları kullanılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

2.1 Bitki Materyali ve Temini

Bu çalışma da bitki materyali olarak *Arabidopsis thaliana* Col. (yabani tip) ve *Arabidopsis thaliana GLR3.4* (Glutamat reseptörü nakavt mutantları) kullanılmıştır. Bitki tohumları ABRC (Arabidopsis Biological Resource Center)'den temin edilmiştir. Bu mutantların kodları şu şekildedir; atglr3.4-1 (SALK_079842), atglr3.4-2 (SALK_016904). Bu mutant bitkilerin kullanım amacı; AtGLR3.4; diğer AtGLR'lere benzer şekilde, fidenin tüm dokularında ifade olmasıdır. Bir AtGLR3.4-GUS hattında, kotiledonlarda ve genç köklerde yüksek bir ekspresyon gösterirken, yetişkin bitkilerdeki ekspresyon, mezofil hücrelerine, vasküler demetlere ve gelişen yaprakların hidatodlarına kadar genişler. Kök dokularındaki (korteks, epidermis, kök tüyleri) AtGLR3.4 ekspresyonu, yaprak ve gövdelerdeki güçlü ekspresyonuna kıyasla daha zayıftır (Meyerhoff et al., 2005). Bununla birlikte, en yoğun GUS boyaması rozet yapraklarında gözlenmiştir (Manzoor et al., 2013). Bu sebeple de çalışmamızda *A. thaliana* GLR3.4 mutantlarının (atglr3.4-1 ve atglr3.4-2) olgun rozet yaprakları kullanılmıştır. Bunun dışında, mutantların bir diğer kullanılma nedeni bu mutantlarda, GLR aktivasyon eksikliğine bağlı olarak sitosole giren Ca^{2+} miktarlarının az olması ve buna bağlı olarak L-arginin kaynaklı ve kalmodulin bağımlı bir mekanizma ile üretilen NO miktarının az olmasıdır (Cheng et al., 2018 Adams et al., 2015).

2.2 Tohum Sterilizasyonu

Arabidopsis thaliana hem yaban tip hem de mutant tohumların yüzey sterilizasyonu için tohumlar 1 dk boyunca %70 etanolde bekletilmiş ve 5 kez steril deiyonize su ile yıkanmıştır. Ardından 10 dk boyunca %4 sodyum hipoklorit çözeltisi ile yüzey sterilizasyonuna bırakılmıştır. Sonrasında 5 kez steril deiyonize su ile yıkama gerçekleştirilmiştir.

2.3 Bitkilerin Yetiştirilmesi ve Stres Uygulamaları

Arabidopsis thaliana yabani tip ve atglr3.4 mutant tohumları hidroponik ortamda yarım kuvvet Hoagland çözeltisinde büyütülmüştür (Hoagland and Arnon, 1950). Her birinde 54 adet tohum yetiştirilebilen platformlara tohumlar ekilmiş ve hidroponik ortamda 16/8 saat (aydınlık/karanlık) fotoperiyotta, 25°C sıcaklıkta, %60-70 nem içeren ortamda 21 gün boyunca yetiştirilmiştir. Ardından 21 günlük bitkilere foliar olarak sprey ile uygulamalar yapılmıştır (Uygulamalar aşağıda verilen tablo.1'deki gibidir). Ardından hasadı gerçekleştirilen bitki örnekleri yapılacak analizler için -80°C'de saklanmıştır.



Şekil 2.1 Hidroponik ortamda yetiştirilen *A.thaliana* Col-0 ve atglr3.4 mutantları.

Tablo.1 Stres uygulamaları

Uygulanan kimyasallar	Uygulama Şekli	Uygulama Miktarı	Kullanılan Ekotipler	Uygulama grupları	Referans
Saf Su (C)	Spreyleme yöntemi (Diğer kimyasallar ile aynı sürede)	<u>Kontrol</u>	<i>A. thaliana Col</i> atglr3.4-1 atglr3.4-2	Col.C atglr3.4-1 C atglr3.4-2 C	Ahlfors et al., 2009
Sodyum Nitropürosit (SNP) (S)	Spreyleme yöntemi (3 saat boyunca)	<u>0,5 mM</u>	<i>A. thaliana Col</i> atglr3.4-1 atglr3.4-2	Col. S atglr3.4-1 S atglr3.4-2 S	Ahlfors et al., 2009
Rotenone (R)	Spreyleme yöntemi (10 saat boyunca)	<u>80 µM</u>	<i>A. thaliana Col</i> atglr3.4-1 atglr3.4-2	Col. R atglr3.4-1 R atglr3.4-2 R	Li et al., 2014
Tunikamisin (Tm)	Spreyleme yöntemi (10 saat boyunca)	<u>20 µg ml⁻¹</u>	<i>A. thaliana Col</i> atglr3.4-1 atglr3.4-2	Col. T atglr3.4-1 T atglr3.4-2 T	Beaugelin et al., 2020

SNP+Rotenon (S+R)	Spreyleme yöntemi (3 saat SNP uygulaması ardından 10 saat Rotenon)	<u>0,5 mM SNP+</u> <u>40 μM</u> <u>Rotenone</u>	<i>A. thaliana</i> <i>Col</i> atglr3.4-1 atglr3.4-2	Col. S+R atglr3.4-1 S+R atglr3.4-2 S+R	Ahlfors et al., 2009 Li et al., 2014
SNP+Tunika misin (S+Tm)	Spreyleme yöntemi (3 saat SNP uygulaması ardından 10 saat Tuniksmisin)	<u>0,5 mM SNP+</u> <u>20 μg ml⁻¹</u>	<i>A. thaliana</i> <i>Col</i> atglr3.4-1 atglr3.4-2	Col. S+R atglr3.4-1 S+R atglr3.4-2 S+R	Beaugelin et al., 2020 Ahlfors et al., 2009

2.4 NO İlişkili Yöntemler

2.4.1 NO Miktarının Belirlenmesi

NO içeriği Zhou et al., (2005)'e göre belirlenmiştir. 0,6 gr ağırlığındaki yaprak örneğinin homojenizasyonu, 3 ml, %4'lük çinko diasetat içeren pH:3,6 50 mM soğuk asetik asit ile yapılmıştır. +4 °C'de, 10000 g'de, 15 dakika süresince hazırlanan homojenatların santrifüjü gerçekleştirilmiş ve süpernatantlar alındıktan sonra pelletler, 1 ml ekstraksiyon tamponu ile tekrar yıkanmış ve santrifüj edilmiştir. 0,1 g charcoal toplanan süpernatantlara eklenmiştir. Sonrasında, süpernatantlar vortekslenmiş ve filtrasyonları gerçekleştirilmiştir. 1 ml Greiss reagent, süzülen 1 ml örneğe eklenmiş ve karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında, 30 dakika süreyle inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübe edilen örneklerin ölçümü, 540 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir.

2.4.2 NOS Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Sigma Nitrik Oksit Sentaz tanımlama sistemi adı verilen kit kullanımı ile NOS aktivitesi ölçülmüştür. İşleyiş olarak kit, radyometrik olmayan bir metotla hücrelerarası NO üretimini ölçer. Bu amaçla 4,5-diamino-floorescein (DAF-2DA)'i kullanır. DAF-2DA, hücrelerarası esterase aktivitesiyle DAF-2'ye hidrolize edildiği hücrelere hızla geçer. Sırasıyla floresan triazofloresen'i oluşturmak için NOS ile üretilmiş NO ile reaksiyona girmektedir. 450-495 nm (excitation) ve 505-550 nm (emission) dalga boyunda gerçekleştirilen ölçümler ile fluorescent ürünü belirlenmiştir.

2.4.3 SNO İçeriğinin Belirlenmesi

Lin et. al., (2012)'ye göre, Saville-Griess assay kullanılarak belirlenmiştir. Saville-Griess assay ile S-NO köprüleri merkürük klorid ile kırılması sağlanarak sülfanilamid ile salınan NO reaksiyona girecektir. Sıvı azottan geçirilmiş olan yapraklar 50 mM Tris-HCl pH:8, 1 mM proteaz inhibitör fenilmetanosülfonil florid (PMFS) ve 150 mM NaCl içeren ekstraksiyon tamponu kullanılarak homojenize edilmiş ve ardından 20 dakika boyunca buz üzerinde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında örnekler 10000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiş, alınan süpernatant %1'lik sülfanilamid ve % 0,1'lik etilendiamin ile 20 dakika süreyle karanlıkta inkübe edilmiştir. Son olarak ise, 540 nm dalga boyunda ölçümler gerçekleştirilerek SNO içeriği belirlenmiştir.

2.4.4 GSNOR Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Bitki yapraklarının homojenizasyonu 20 mM Tris-HCl (pH:7.5), 2 mM dithiothreitol (DTT), 0,2 mM NADH, 0,5mM EDTA, %0,2 Triton X-100 ve %10 gliserol içeren homojenizasyon tamponunun kullanımıyla gerçekleştirilmiştir. Elde edilen homojenatlar 27000g'de, 4°C'de, 25 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve ardından örnekler 0,4 mM GSNO eklenmesiyle reaksiyon başlatılmıştır. GSNOR aktivitesi, 340 nm'de NADH oksidasyonunun izlenmesiyle belirlenmiştir. Aktivite, 1 mg protein başına dakikada nmol olarak tüketilen NADH olarak ifade edilmiştir (Barroso et al., 2006).

2.5 ROS'ların Belirlenmesi ile İlgili Yöntemler

2.5.1 H₂O₂ radikal miktarı

H₂O₂ miktarı Cheeseman (2006)' ya göre bazı farklılıklara gidilerek belirlenmiştir. H₂O₂ analizinde 100 µM sorbitol, 250 µM ferrous amonyum sülfat ve 100 µM xilenol orange, 25 mM H₂SO₄ içinde çözülmemektedir. Farklı olarak, bu yöntemde ferrous amonyum sulphate/xilenol orange (FOX) tamponuna %1 etanol (EtOH) eklenerek hazırlanmıştır. Analiz edilecek örnekler sıvı azot içinde muhafaza edilmiştir. Soğuk aseton (-20 °C) ile hazırlanmış 25 mM H₂SO₄ kullanılarak 0,1 g ağırlığındaki yaprak örneğinin homojenizasyonu gerçekleştirilmiştir. Homojenatlar 4000 g'de, 4 °C'de, 5 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. 1 ml eFOX tamponu, elde edilen süpernatanttan alınan 50 µl örnek üzerine eklenmiştir. Oluşturulan karışım 30 dakikalık bekleme süresinin sonunda 550 ve 800 nm dalga boyunda ölçülmüş, absorbans farkı alınmış ve hesaplanmıştır.

2.5.2 Hidroksil radikal ($\cdot\text{OH}$) süpürme aktivitesi

Süpürme aktivitesinin belirlenmesi Chung et. al (1997)'a göre gerçekleştirilmiştir. Deoksiriboz ile Fe^{+3} /askorbat / EDTA/ H_2O_2 sisteminden üretilen $\cdot\text{OH}$ ve örnek arasındaki rekabetin ölçülmesiyle $\cdot\text{OH}$ süpürme aktivitesi belirlenmiştir. Reaksiyon karışımı; 0,30 ml 0,02 M sodyum fosfat tamponu (pH:7,0), 0,15 ml 10 mM FeSO_4 , 0,15 ml 10 mM H_2O_2 , 0,15 ml 10 mM 2-deoksiriboz, 0,15 ml 10 mM EDTA, 0,525 ml H_2O ve 0,075 ml örnek ile oluşturulmuştur ve elde edilen karışımın 37 °C'de 2 saat süreyle inkübasyonu gerçekleştirilmiştir. 750 ml % 2.8 trikloroasetik asit ve 50 mM NaOH içerisinde 0.75 ml % 1.0 TBA'nın test tüplerine ilave edilmesi ile oluşturulan karışım 20 dakika süreyle kaynatılmıştır. Karışım buzda soğutulduktan sonra ölçümler 520 nm'de gerçekleştirilmiştir.

2.5.3 $\text{O}_2^{\cdot-}$ miktarının belirlenmesi

Oracz et al., (2007)'ye göre süperoksit anyon radikal miktarı belirlenmiştir. 0,2 gr ağırlığındaki bitki örneği, 4 ml 50 mM Na-P tamponu (pH 7.8) kullanılarak, 4 °C' de homojenize edilmiştir ve elde edilen homojenatların 16000 g' de 15 dakika süreyle santrifüjü gerçekleştirilmiştir. Sonrasında alınan 1 ml süpernatantın; 25 °C'de, 30 dakika süreyle, 1mM hidroksilamin içeren 50 mM Na-P tamponunda inkübe olması sağlanmıştır. Oluşturulan reaksiyon karışımının 0,5 ml'sinin, 0,5 ml 7 mM 2-naphtylamine ve 0,5 ml 17 mM sülfanilamid kullanılarak, tekrar 25 °C'de ve 30 dakika boyunca inkübasyonu gerçekleştirilmiştir. Inkübasyonun ve takip eden (13000 g'de 10 dakika) santrifüjün ardından 540 nm'deki absorbansa göre ölçümler yapılmıştır. Süperoksit anyon miktarının hesaplanması, sodyum nitrit kullanılarak elde edilen kalibrasyon eğrisi kullanılarak, erişilen absorbanslar üzerinden gerçekleştirilmiştir.

2.6 Antioksidan Enzim Ekstraksiyonu ve Aktivite Analizleri

Proteaz aktivitesinin minimum seviyede tutulması amacıyla analizler +4 °C' de gerçekleştirilmiştir. Protein ve enzim ekstraktları 0,1 gr bitki örneklerinin 0,5 ml ekstraksiyon tamponunda (50 mM Tris-HCl pH 7.8, 0,1 mM etilendaimin tetra asetik asit (EDTA), 0,2% (v/v) Triton-X100, 1 mM fenilmetilsulfonil florid (PMSF) ve %2 (w/v) PVPP) homojenize edilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Askorbat peroksidaz aktivitesi analizi için ise ayrıca homojenizasyon tamponuna 5 mM askorbik asit eklenmiştir. Sonrasında homojenizasyonu yapılan örnekler 14000 g' de 10 dk. santrifüj edilmiştir. Ardından elde edilen süpernatantlar protein miktarı ve enzim aktivitesi belirlenmede kullanılmıştır. Protein miktarı bovin serum albümin (BSA) standart olarak kullanılarak Bradford (1976)'a göre gerçekleştirilmiştir.

2.6.1 NOX Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

NADPH oksidaz aktivitesinin belirlenmesi Jiang ve Zhang (2002)'ye göre gerçekleştirilmiştir. 100 μ M NADPH ve 0,5 mM XTT içeren 50 mM Tris-HCl tamponu (pH 7,5) reaksiyon karışımı olarak kullanılmıştır. XTT'nin redüksiyonu 470 nm'de izlenmiştir. 50 U SOD, reaksiyon dışı oluşabilecek renk değişiminin belirlenmesi için kullanılmıştır. $2.16 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ekstinksiyon kat sayısı kullanılarak $\text{O}_2^{\cdot-}$ üretimi belirlenmiştir.

2.6.2 SOD İzozim ve Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Total SOD aktivitesi NBT'nin fotokimyasal redüksiyonu ile belirlenmiştir ve ölçümler 560 nm'de gerçekleştirilmiştir. SOD aktivitesini unit 25°C ' de 1 dakika 1 μ mol substratı ürüne dönüştüren enzim göstermektedir (Beauchamp ve Fridovich, 1971). SOD izozimlerinin belirlenmesi için ekstraktlar sabit akımla $+4^\circ\text{C}$ 'de (100 mA) %12,5'lik ayırma jeli ve %5'lik hizalama jeli ile elektroforetik olarak ayrılmıştır. SOD aktivitesi, Beauchamp ve Fridovich'e (1971) göre riboflavin ve nitrobluetetrazolium (NBT) boyası ile belirlenmiştir.

2.6.3 CAT Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Katalaz enzim aktivitesi ölçümleri Bergmeyer (1970)'e göre belirlenmiştir ve H_2O_2 'nin süpürülmesi 240 nm'de ölçülmüştür. 1 mmol H_2O_2 'yi 1 dakikada süpüren katalaz miktarı 1 U olarak hesaplanmıştır.

2.6.4 POX Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Peroksidaz (POX) aktivitesi Herzog ve Fahimi (1973) tarafından kullanılan metoda göre gerçekleştirilmiştir. 465 nm'deki absorbans 3 dakika boyunca gözlenmiş ve dakikada 1 mmol H_2O_2 'yi süpüren peroksidaz miktarı 1 U olarak hesaplanmıştır.

2.6.5 APX Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Askorbat peroksidaz (APX) aktivitesi Nakano ve Asada (1981)'ya göre gerçekleştirilmiştir. Ölçüm askorbatın azalmasına bağlı olarak 290 nm'deki absorbansta belirlenmiştir. Oksitlenen askorbat miktarı ekstinksiyon katsayısı $2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ kullanılarak hesaplanmıştır. Dakikada 1 mmol askorbatı oksitleyen APX miktarı 1 U olarak hesaplanmıştır.

2.6.6 GR Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Glutasyon redüktaz (GR) aktivitesi Foyer ve Halliwell (1976)'e göre ölçülmüştür. NADPH oksidasyonu 340 nm'de belirlenmiştir. Ekstinksiyon katsayısı $6.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ kullanılarak oksitlenen NADPH miktarı tespit edilmiştir. Dakikada 1 mmol NADPH oksitleyen GR miktarı 1 U olarak hesaplanmıştır.

2.7 Redoks İlişkili Enzim Aktivite Analizleri

2.7.1 GSH/GSSG Oranının Belirlenmesi

İndirgenmiş (GSH) ve okside olmuş (GSSG) glutasyon miktarı Griffith (1980)'e göre belirlenmiştir. 0,5 g ağırlığındaki yaprak örneği sıvı azot kullanılarak toz haline getirildikten sonra 2,5 M'lık HClO_2 (1 ml-soğuk) ile homojenize edilmiştir. 10 dakika boyunca 16000 g' de santrifüj edilen homojenata DTNB ve GR eklenmesi ile GSH ve GSSG, 412nm'deki değişim hesaplanarak belirlenmiştir.

2.7.2 Askorbat Miktarının Belirlenmesi

Fe^{+3} iyonlarının Fe^{+2} iyonlarına indirgenmesi esasına göre askorbat miktarı belirlenmiştir (Law et al., 1983). Bu amaç için 0,1g yaprak örneği %10'luk TCA içinde homojenize edilmiştir. Ardından santrifüj edilerek süpernatantlar kullanılmıştır. 400 μL süpernatant üzerine, 5 M NaOH, %10'luk TCA, 150 mM NaPO_4 tamponu (pH 7.4), 10 mM ditiotreitol, %44'lük H_3PO_4 , %0,5'lik N-etilmaleimid ve %3'lük FeCl_3 ilave edildikten sonra 37 °C'de 60 dakika inkübe edilen karışım 525 nm'de spektrofotometrik olarak absorbans ölçümü gerçekleştirilmiştir.

2.7.3 GST ve GPX Aktivitelerinin Belirlenmesi

Homojenatlar antioksidan enzim ekstraksiyonu ile elde edilmiştir ve her iki aktivite tayini de bu homojenatlar kullanılarak belirlenmiştir. Ölçümler Habig et al., (1974)'e göre yapılmıştır. GST enzim aktivitesinde hasat edilen örneklerde 0,1M Na-fosfat (pH 6.5), 1mM GSH, 1mM CDNB içeren reaksiyon karışımı kullanılmıştır. 0,2 mm NADPH, 1mM sodyum azid, 1 mm GSH, 1 U glutasyon redüktaz ve 2 mm H_2O_2 içeren reaksiyon karışımı ile GPX aktivitesi belirlenmiştir. Absorbanstaki azalma 340 nm'de ölçülmüştür. Bir GPX aktivitesi birimi, 1 mmol NADPH min^{-1} 'in oksidasyonunu katalize eden enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

2.7.4 NAD/NADH Oranının Belirlenmesi

Bu yöntem etanol varlığında diklorofenolindofenolünün (DCPIP) fenazin metasülfat (PMS)-ile indirgenmesi prensibine dayanmaktadır. 0.1M Hepes (pH:7.5) ve 2 mM EDTA'da taze olarak Alkol dehidrogenaz (ADH) çözündürülmüştür. 20µl nötralize süpernatant, 0,1 ml, 0,1 M Hepes (pH:7,5), 2 mM EDTA, 10 µL 20Mm PMS, 25 µL dH₂O, 20µL 1,2 mM DCPIP ve 10 µl ADH ile karıştırılmış ve 15 µL saf etanolün eklenmesiyle reaksiyon başlatılmıştır. Azalma, 600 nm'de takip edilmiştir. 0-40 pmol aralığında hazırlanan NAD⁺ ya da NADH standardına göre içerik hesaplanmıştır (Queval and Noctor, 2007).

2.7.5 MDHAR Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Arrigoni et al., (1981)'e göre enzim aktivitesi belirlenmiştir. Reaksiyon karışımı içerik olarak 50 mM Potasyum-Fosfat (K-P) tampon (pH 7), 1 mM Askarbik Asit (AsA), 0,2 mM NADH ve 1 unit Askorbat oksidaz (AO)'dan oluşmaktadır. Monodehidro Askorbat (MDA), Askorbat Oksidaz'ın Askorbatı kullanması ile oluşur ve sonrasında Monodehidro Askorbat Redüktaz, NADPH'ı kullanarak MDHA'ı, Askorbata dönüştürür. NADH ölçümü 340 nm'de gerçekleştirilmiştir. 6,2 mM⁻¹ cm⁻¹, NADH'in ekstinksiyon katsayısıdır.

2.7.6 DHAR Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Nakano ve Asada (1981)'ya göre Dehidroaskarboat Redüktaz (DHAR) enzim aktivitesi ölçülmüştür. 50 mM Potasyum-Fosfat (K-P) tampon (pH:7,0), 0,2 mM Dehidro askorbat, 2,5 mM Glutasyon (GSH) ve 0,1 mM EDTA içeren reaksiyon karışımı kullanılmıştır. Yöntem, DHAR enziminin Glutasyon kullanarak dehidroaskorbatı askorbata dönüştürmesine ve 265 nm'de askorbatın ölçülmesine dayanmaktadır. Askorbatın ekstinksiyon katsayısı 0,98 mM⁻¹ cm⁻¹'dir.

2.8 Lipid peroksidasyon (TBARS) Miktarı

Malondialdehit (MDA) içeriği, Madhava Rao ve Sresty (2000)'e göre ölçülmüştür. Lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA'nın miktarının belirlenmesi için tiobarbiturik asit (TBA) reaksiyonu kullanılmıştır. 532 nm'deki absorbanza göre MDA konsantrasyonu hesaplanmıştır. 600 nm'de non-spesifik türbidite ölçülmüştür ve 532 nm'deki absorbanstan çıkartılmıştır. Ekstinksiyon katsayısı 155 mM⁻¹ cm⁻¹ kullanılarak MDA konsantrasyonu hesaplanmıştır.

2.9 Protein Oksidasyonu

DNPH indirgenmesi metodu kullanılarak karbonil gruplarının seviyesinin belirlenmesi prensibi ile proteinler üzerindeki oksidatif hasar Levine (1994)'e göre ölçülmüştür. Spektrofotometrik ölçümler 370 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir.

2.10 RT-PCR ile Gen ifadelerinin Ölçülmesi

Kantitatif RT-PCR (Real Time Polymerase Chain Reaction) çalışmaları, farklı abiyotik stres koşulları altındaki genlerin ifadelerini karşılaştırmak üzere gerçekleştirilmiştir. Qiagen RNeasy® Plant Mini Kit kullanılarak stres grupları ve kontrol grubuna ait bitki dokuları üzerinden gerçekleştirilen total RNA izolasyonu aşağıdaki protokol doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

- 1- 0,2 gr ağırlığındaki kök ve yaprak doku örnekleri sıvı azot kullanılarak toz haline getirilmiş ve üzerine 450 µl RLT tamponu ilave edilerek vortekslenmiştir.
- 2- Spin kolon içeren tüp içerisine elde edilen homojenat yerleştirilmiş ve 2 dakika süreyle santrifüj edildikten sonra alınan süpernatantlar ayrı bir tüpe alınmıştır.
- 3- Üzerlerine 0,5 hacim etanol eklenmiş ve örnek RNAeasy mini spin kolona transfer edilmiştir.
- 4- 10.000 rpm'de 15 saniye boyunca santrifüjlenmiş ve biriken kısım atılmıştır.
- 5- 700 µL RW1 tamponu spin kolon üzerine eklenmiştir.
- 6- 10.000 rpm'de 15 saniye santrifüjlenmiş ve biriken kısım atılmıştır.
- 7- 500 µL RPE tamponu kolon üzerine ilave edilmiş ve 10.000 rpm'de 15 saniye boyunca santrifüjlenmiştir. Biriken kısım tekrar atılmıştır.
- 8- Spin kolon maksimum hızda santrifüjlenerek membran kurutulmuş ve üzerine RNaz içermeyen su eklenerek RNA kolondan santrifüj yapılarak alınmıştır.

Olası DNA kontaminasyonunu gidermek üzere elde edilen RNA'lara DNaseI (Fermentas) ile muamele edilmiştir. DNA'dan uzaklaştırılmış total RNA örneklerinin kalite (1.8-2.0) ve miktar tayinlerinin 260/280 nm'de spektrofotometrik olarak belirlenmesinin ardından cDNA sentezine geçilmiştir. cDNA sentezi üretici direktiflerine uygun bir şekilde Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Housekeeping gen olarak kullanılan Actin1 geni primeriyle klasik PCR yapılmıştır ve

hazırlanmış olan cDNA'ların sentezleri olup olmadığının kontrolü gerçekleştirilmiştir. %2'lik agaroz jelde PCR ürünleri ayrıştırılmış ve tüm örneklerin kontrolü sağlanmıştır.

Elde edilen cDNA'lardan farklı dilüsyonlar (1/50, 1/100, 1/200 vb.) hazırlanarak qRT-PCR çalışmasına geçilmiştir. Çalışmalara başlamadan önce, en iyi sonucu veren cDNA dilüsyonu qRT-PCR uygulamasıyla tespit edilmiştir. PCR'lar ABI Step-One Plus cihazı ile gerçekleştirilmiştir ve ABI-SYBR Green Master Mix kullanılarak da PCR reaksiyonları hazırlanmıştır. Stresle birlikte ifadesi değişmeyen housekeeping geni Actin1 (ACT1) ile her bir hedef genin normalizasyonu sağlanmış ve ifade seviyeleri karşılaştırılmıştır. qPCR analizleri için StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) kullanılmıştır. Ortaya koyulan data, cihazda bulunan StepOne™/StepOnePlus™Software v2.3 kullanılarak “comparative Ct” yöntemine göre değerlendirilmiştir ve gen ifadeleri bağıl olarak belirlenmiştir.

qRT-PCR İstatistik Analizi;

Kantifikasyon döngüsü (Cq) değerleri ölçüldükten sonra, “2- $\Delta\Delta C_q$ (Livak) Yöntemi” kullanılarak test örneğindeki hedef genlerin ekspresyon düzeyi, kontrol örneği baz alınarak belirlenmiştir. Amplifikasyon verimliliğinin hem hedef hem de housekeeping geninde %100 olmasına dikkat edilmiştir (Guénin et al., 2009). Her bir numunenin kendisi ve üç kopya ile üç farklı deney seti tüm testler için oluşturulmuştur.

2.11 İstatistiksel Analizler

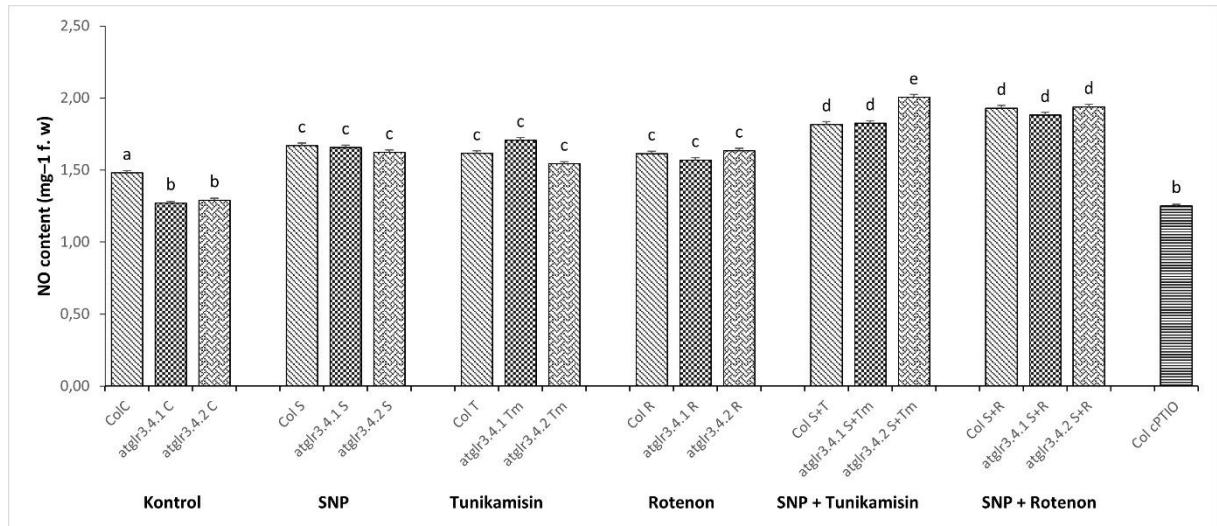
Deneyler iki kez tekrarlanmıştır ve tüm analizler için her deneyden üç biyolojik tekrar ($n = 6$) kullanılmıştır. Sonuçlar, mean $\pm$ standard error of the mean şeklinde ifade edilmiştir. Grupların normal dağılıma sahip olup olmadığı, Shapiro-Wilk testi ile test edilmiş ve ardından tek yönlü ANOVA analizi yapılmıştır. Gruplar arasındaki varyansın eşitliği-homojenliği, Levene's testi ile belirlenmiştir. Gruplar arasındaki farklar, varyanslar eşitse Tukey testi, eşit değilse Games-Howell testi kullanılarak belirlenmiştir. Gen ifadesi sonuçlarında her genotip kendi kontrolüne göre kıyaslanmıştır.

3 BULGULAR

3.1 NO İlişkili Bulgular

3.1.1 NO Miktarı

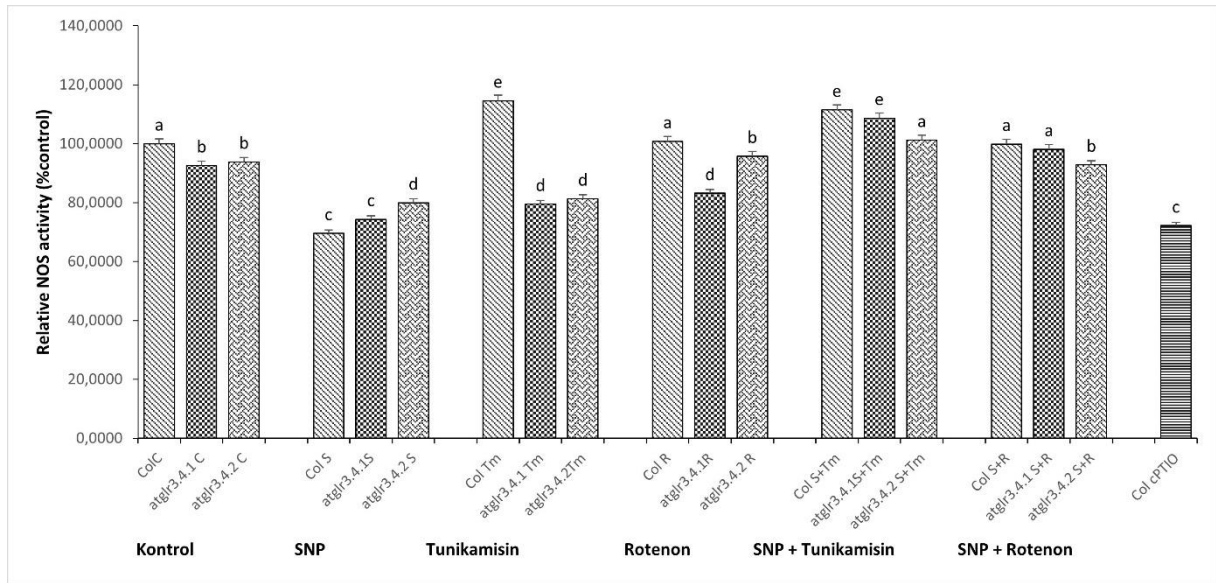
Normal koşullarda, GLR 3.4.1 geninin yoksunluğu NO miktarında %14, GLR 3.4.2 yoksunluğu ise %13 azalmaya neden olmuştur. NO donörü SNP'nin dışarıdan uygulanması (Nitrosatif Stres oluşturmak amacıyla), Col.'un NO miktarını, kontrole göre %13 artırmıştır. SNP-uygulanmış atglr3.4.1 ve atglr3.4.2 mutantlarının NO miktarları ise kontrollerine göre sırasıyla %30 ve %25 artmıştır. Tüm genotiplerin NO miktarları karşılaştırıldığında üç genotipin de NO miktarının aynı olduğu gözlenmiştir. ER stres indükleyicisi Tunikamisin (Tm)'nin dışarıdan uygulanması Col.'un NO miktarını, kontrole göre, %10 artırmıştır. Ancak aynı koşullar altında GLR 3.4.1 ve GLR 3.4.2 genlerinin yoksunluğu NO miktarında kayda değer bir değişikliğe sebep olmamıştır. SNP altında Tm uygulaması ise kontrole göre Col.'de NO miktarını %23 oranında artırmıştır. GLR 3.4.1 yoksunluğu NO miktarındaki bu artışı belirgin oranda etkilememiştir. Ancak bunun aksine GLR 3.4.2 yoksunluğu, S+Tm uygulanmış Col.'e göre NO miktarını ayrıca %10 daha artırmıştır. Oksidatif stres indükleyicisi rotenon (R)'un dışarıdan uygulanması Tm uygulamasına benzer olarak NO miktarını artırmıştır. Dışarıdan R uygulaması, kontrole göre, Col.'un NO miktarını %10 artırmıştır. GLR 3.4.1 ve GLR 3.4.2 yoksunluğu NO miktarındaki bu artışı etkilememiştir. SNP altında R uygulaması Col.'un NO miktarını %30 artırmıştır. GLR 3.4.1 ve GLR 3.4.2 yoksunluğu S+R teşvikli NO miktarındaki bu artışı değiştirmemiştir. cPTIO'nun dışarıdan uygulanması (NO süpürücüsü) ise Col. kontrole göre kıyaslandığında NO miktarı % 15 azalmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Yabani tip *Arabidopsis thaliana* Col. ve atglr3.4 mutantlarına egzogen SNP, Tm, R, S+Tm, S+R ve cPTIO uygulamalarının NO içeriği üzerine etkisi. Harfler istatistiksel anlamda fark belirtmektedir ($p<0,05$).

3.1.2 NOS Aktivitesi

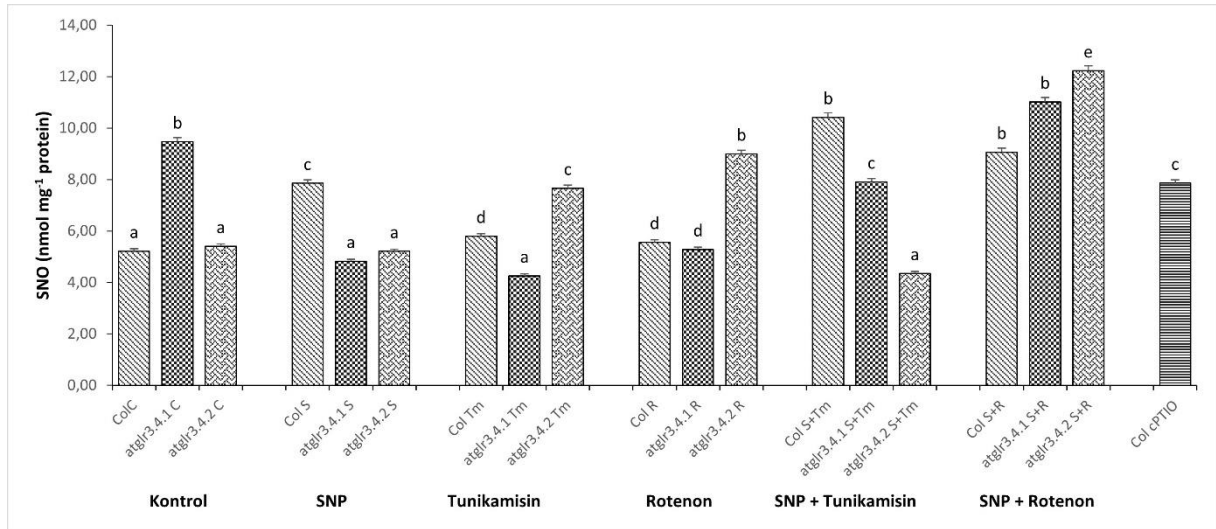
Kontrol koşulları altında, Col. ile karşılaştırıldığında, atglr3.4.1 ve atglr3.4.2 mutantlarında NOS aktivitesi %10 azalmıştır. Dışarıdan SNP uygulaması, Col.'un NOS aktivitesini kontrole göre %30 azaltmıştır. SNP'ye bağlı NOS aktivitesindeki bu azalmayı GLR3.4 1'in yoksunluğu değiştirmemiştir, ancak GLR3.4.2 geninin yoksunluğu NOS aktivitesini Col+SNP'ye göre %15 artmıştır. Dışarıdan Tm'nin uygulaması Col.'un NOS aktivitesini, kontrole göre, %14 artırmıştır. Col.'deki Tm-teşvikli bu artış, GLR3.4.1 ve GLR3.4.2 yoksunluğundan olumsuz etkilenmiştir. Ayrıca atglr3.4 mutantlarında NOS aktivitesi Col+Tm'ye göre %30 azalmıştır. SNP+Tm uygulaması ise kontrole göre Col.'un NOS aktivitesini %11 artırmıştır. Aynı koşullardaki GLR 3.4.1 yoksunluğu bu artış oranını değiştirmemiştir. Ancak GLR 3.4.2 yoksunluğu NOS aktivitesinde %10 azalmaya neden olmuştur (Col. S+Tm'ye göre). Dışarıdan R uygulaması, kontrole göre, Col.'un NOS aktivitesini sadece %6 artırmıştır. Col. ile karşılaştırdığımızda GLR 3.4.1 yoksunluğu NOS aktivitesini %20 azaltırken GLR 3.4.2 yoksunluğu ise yalnızca %8 azalmaya sebep olmuştur. SNP+R uygulaması Col.'un NOS aktivitesini kontrol ile aynı seviyede tutmuştur. GLR 3.4.1 yoksunluğu bu aktiviteyi değiştirmezken, GLR 3.4.2 yoksunluğu Col. SNP+R'ye göre NOS aktivitesini %7 azaltmıştır. cPTIO'nun dışarıdan uygulanması ise Col. kontrole göre kıyaslandığında NOS aktivitesini % 28 azaltmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 Yabani tip *Arabidopsis thaliana* Col ve atglr3.4 mutantlarına egzogen SNP, Tm, R, S+T, S+R ve cPTIO uygulamalarının NOS aktivitesi üzerine etkisi. Harfler istatistiksel anlamda fark belirtmektedir ($p<0,05$).

3.1.3 SNO İçeriği

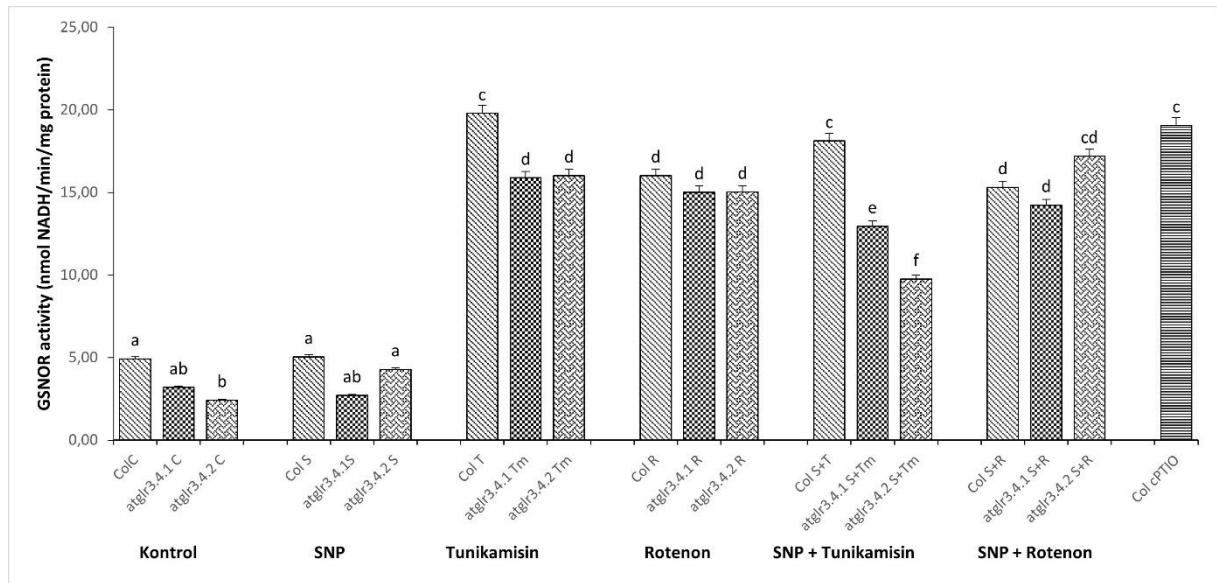
Normal koşullar altında, GLR 3.4.1 yoksunluğu, SNO miktarında %81'lik belirgin bir artışa sebep olurken GLR 3.4.2 yoksunluğu herhangi bir değişime neden olmamıştır. SNP'nin dışarıdan uygulanması, Col.'un SNO miktarını kontrole göre %50 artırmıştır. SNP'ye bağlı SNO miktarındaki bu artış, GLR3.4.1 geninin yoksunluğu ile %39 ve GLR3.4.2 yoksunluğunda %33 oranında azalmıştır. Tunikamisin'in dışarıdan uygulanması Col.'un SNO miktarını, kontrole göre, %11 artırmıştır. Ancak aynı koşullar altında GLR 3.4.1 geninin yoksunluğu bu artışı %26 azaltırken, GLR 3.4.2 yoksunluğu ise SNO miktarını %32 artırmıştır. SNP altında Tm uygulaması ise kontrole göre Col.'de SNO miktarında büyük oranda artışa sebep olmuştur. Bu oran %99 olarak belirlenmiştir. GLR 3.4.1 yoksunluğu SNO miktarındaki bu artışı %24 oranında azaltırken, GLR 3.4.2 yoksunluğu, S+Tm uygulanmış Col.'e göre SNO miktarını %58 oranında azaltmıştır. Rotenon'un dışarıdan uygulanması kontrole göre, Col.'un SNO miktarında sadece %6'lık bir artışa sebep olurken, GLR 3.4.1 yoksunluğu SNO miktarını değiştirmemiş, ancak GLR 3.4.2 yoksunluğu ise %61'lik bir artışa sebep olmuştur. SNP altında R uygulaması Col.'un SNO miktarını %73 artırmıştır. GLR 3.4.1 yoksunluğu S+R uygulanmış Col.'üne göre SNO miktarını %22 ve GLR 3.4.2 yoksunluğu da %35 artırmıştır. cPTIO'nun dışarıdan uygulanması ise Col. kontrole göre SNO miktarının %50 artmasına sebep olmuştur (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 Yabani tip *Arabidopsis thaliana* Col. ve atglr3.4 mutantlarına egzogen SNP, Tm, R, S+Tm, S+R ve cPTIO uygulamalarının SNO içeriği üzerine etkisi. Harfler istatistiksel anlamda fark belirtmektedir ($p < 0,05$).

3.1.4 GSNOR Enzim Aktivitesi

Herhangi bir uygulama yapılmayan koşullarda, GLR3.4.1 yoksunluğu, GSNOR aktivitesinde % 35 ve GLR 3.4.2 yoksunluğu ise %50 daha az aktiviteye sebep olmuştur. SNP'nin dışarıdan uygulanması ise Col.'un GSNOR aktivitesinde belirgin bir değişikliğe sebep olmazken, GLR3.4.1 yoksunluğu %46 azalmaya ve GLR 3.4.2 yoksunluğu ise GSNOR aktivitesinde %15 azalmaya sebep olmuştur. Dışarıdan Tunikamisin (Tm) uygulanması GSNOR aktivitesinde büyük artışlara neden olmuştur. Örneğin, Col.'un GSNOR aktivitesini kontrole göre 4 kat artırmıştır. Aynı koşullar altında GLR 3.4.1 ve GLR 3.4.2 genlerinin yoksunluğu ise GSNOR aktivitesinin %19 azalmasına sebep olmuştur. SNP altında Tm uygulaması ise kontrole göre Col.'ün GSNOR aktivitesinde 3,7 katlık bir artışa sebep olmuştur. Ancak GLR3.4.1 ve GLR 3.4.2 yoksunluğu, S+Tm uygulanmış Col.'e göre GSNOR aktivitesini sırasıyla %28,5 ve %46,5 azaltmıştır. Rotenon (R) un dışarıdan uygulanması Tm uygulamasına benzer olarak GSNOR aktivitesini belirgin şekilde artırmıştır. Dışarıdan R uygulaması, kontrole göre, Col.'un GSNOR aktivitesini 3,2 kat artırmıştır. GLR 3.4.1 ve GLR 3.4.2 yoksunluğu GSNOR aktivitesindeki bu artışı yaklaşık % 6 oranında azaltmıştır. SNP altında R uygulaması Col.'un GSNOR aktivitesini 3,1 kat artırmıştır. GLR 3.4.1 yoksunluğu S+R teşvikli GSNOR aktivitesindeki bu artışı değiştirmemiştir. Bunun aksine GLR 3.4.2 yoksunluğu S+R uygulanmış Col.'ününe göre GSNOR aktivitesini %12 daha fazla artırmıştır. cPTIO'nun dışarıdan uygulanması ise Col. kontrole göre GSNOR aktivitesini 4 kat artırmıştır (Şekil 3.4).

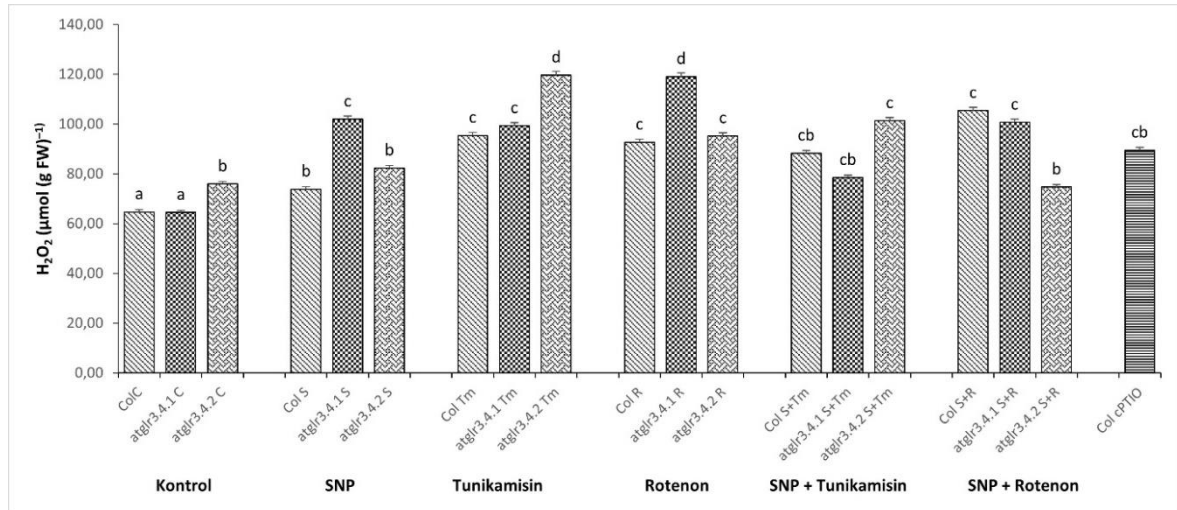


Şekil 3.4 Yabani tip *Arabidopsis thaliana* Col. ve atglr3.4 mutantlarına egzojen SNP, Tm, R, S+Tm, S+R ve cPTIO uygulamalarının GSNOR aktivitesi üzerine etkisi. Harfler istatistiksel anlamda fark belirtmektedir ($p<0,05$).

3.2 ROS'ların Belirlenmesi

3.2.1 H₂O₂ Miktarı

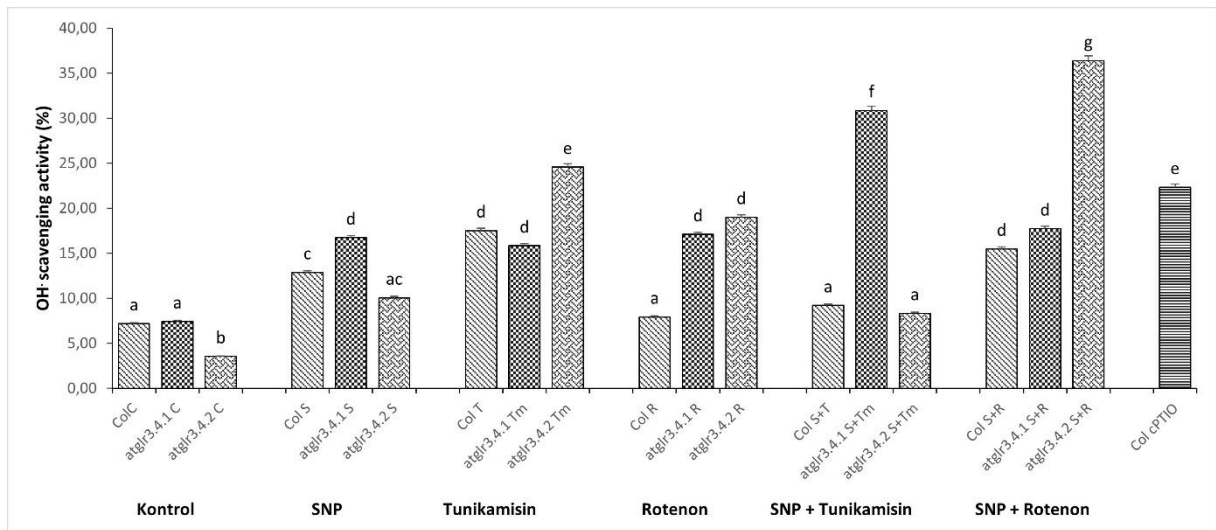
Normal koşullarda, GLR 3.4.1 yoksunluğu, H₂O₂ miktarında herhangi bir değişime neden olmazken GLR 3.4.2 yoksunluğu %17 artışa neden olmuştur. Dışarıdan SNP uygulanması, Col.'un H₂O₂ miktarını kontrole göre %14 artırmıştır. SNP'ye bağlı H₂O₂ miktarındaki bu artış, GLR3.4.1 geninin yoksunluğu ile daha çok artmıştır. Örneğin SNP uygulaması ile GLR 3.4.1 yoksunluğu H₂O₂ miktarını %38, GLR 3.4.2 yoksunluğu ise %11 daha fazla artırmıştır. Tunikamisin (Tm) uygulanması, Col.'un H₂O₂ miktarını, kontrole göre, %47 artırmıştır, ancak GLR 3.4.1 yoksunluğu bu artışı değiştirmezken, GLR 3.4.2 yoksunluğu H₂O₂ miktarını %25 artırmıştır. SNP altında Tm uygulaması ise kontrole göre Col.'de H₂O₂ miktarını %36 artırmıştır. GLR 3.4.1 yoksunluğu H₂O₂ miktarındaki bu artışı belirgin oranda etkilememiştir. Ancak GLR 3.4.2 yoksunluğu, S+Tm uygulanmış Col.'e göre H₂O₂ miktarını %15 artırmıştır. Rotenon uygulaması, kontrole göre, Col.'un H₂O₂ miktarını %43 artırmıştır. GLR 3.4.1 yoksunluğu % 28 daha fazla artışa sebep olurken GLR 3.4.2 yoksunluğundaki artış kayda değer değildir. SNP altında R uygulaması Col.'un H₂O₂ miktarını %63 artırmıştır. GLR 3.4.1 yoksunluğu S+R teşvikli H₂O₂ miktarındaki bu artışı değiştirmemiştir. Bunun aksine GLR 3.4.2 yoksunluğu S+R uygulanmış Col.'ününe göre H₂O₂ miktarını %29 azaltmıştır. cPTIO ise Col. kontrole göre H₂O₂ miktarını %38 artırmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.5 Yabani tip *Arabidopsis thaliana* Col. ve atglr3.4 mutantlarına egzojen SNP, Tm, R, S+Tm, S+R ve cPTIO uygulamalarının H_2O_2 miktarı üzerine etkisi. Harfler istatistiksel anlamda fark belirtmektedir ($p<0,05$).

3.2.2 Hidroksil Radikal ($\cdot OH$) Süpürme Aktivitesi

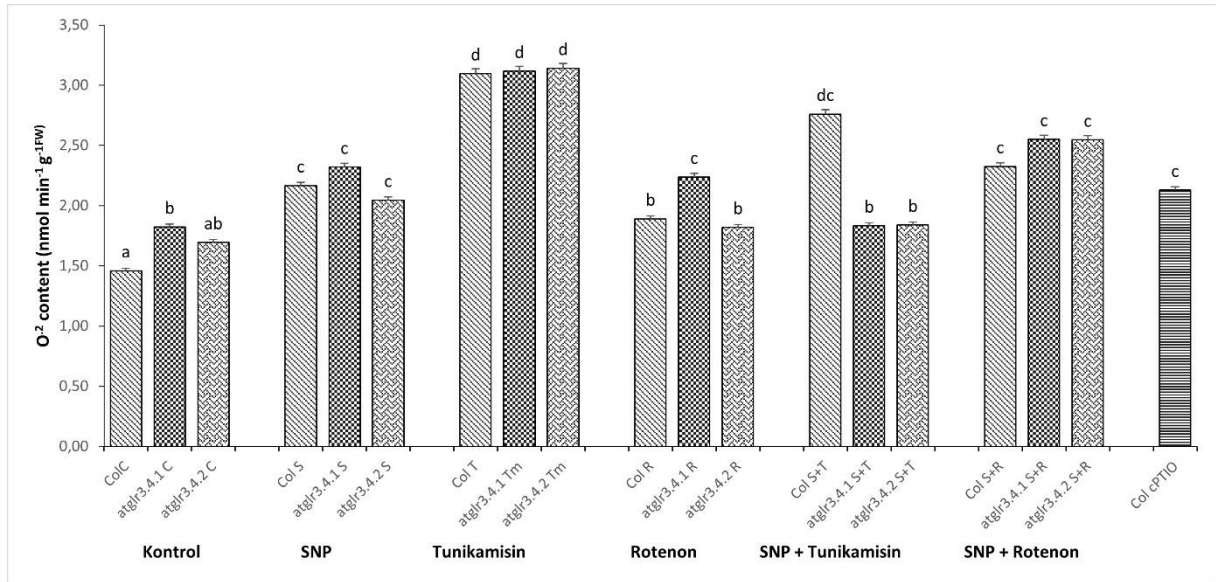
Normal koşullarda, GLR 3.4.1 yoksunluğu, $\cdot OH$ süpürme aktivitesinde herhangi bir değişime neden olmazken GLR 3.4.2 yoksunluğu %50 azalmaya neden olmuştur. Dışarıdan SNP uygulanması, Col.'un $\cdot OH$ süpürme aktivitesini kontrole göre %78 artırmıştır. SNP'ye bağlı $\cdot OH$ süpürme aktivitesindeki bu artış, GLR3.4.1 yoksunluğu ile %29 daha da artarken, GLR 3.4.2 yoksunluğu ile %21 azalmıştır. Tunikamisin (Tm)'nin dışarıdan uygulanması ise, Col.'un $\cdot OH$ süpürme aktivitesini kontrole göre 2,4 kat artırmıştır. Ancak, aynı koşullar altında GLR 3.4.1 geninin yoksunluğu $\cdot OH$ süpürme aktivitesini %10 azaltırken, GLR 3.4.2 geninin yoksunluğunda %40 artırmıştır. SNP altında Tm uygulaması ise kontrole göre Col.'de $\cdot OH$ süpürme aktivitesini %28 artırmıştır. S+Tm uygulanmış Col.'e göre, GLR 3.4.1 yoksunluğu $\cdot OH$ süpürme aktivitesini belirgin oranda etkilemiş ve 4,1 kat artırmıştır. Ancak GLR 3.4.2 yoksunluğu, S+Tm uygulanmış Col.'e göre $\cdot OH$ süpürme aktivitesini %10 azaltmıştır. Rotenon (R) un dışarıdan uygulaması, kontrole göre, Col.'un $\cdot OH$ süpürme aktivitesini %10 artırmıştır. GLR 3.4.1 yoksunluğu $\cdot OH$ süpürme aktivitesinde 2,5 katlık bir artışa sebep olurken GLR 3.4.2 yoksunluğu ise yaklaşık 3 kat artışa sebep olmuştur. SNP altında R uygulaması Col.'un $\cdot OH$ süpürme aktivitesini 2,1 kat artırmıştır. Ancak GLR 3.4.1 yoksunluğu S+R teşvikli $\cdot OH$ süpürme aktivitesinde %14 artış gösterirken GLR 3.4.2 yoksunluğu, S+R uygulanmış Col.'unkine göre, $\cdot OH$ süpürme aktivitesini yaklaşık 2,4 kat kadar artırmıştır. Benzer şekilde cPTIO uygulanması ise Col. kontrole göre $\cdot OH$ süpürme aktivitesini 3,1 kat artırmıştır (Şekil 3.6).



Şekil Yabani tip *Arabidopsis thaliana* Col. ve atglr3.4 mutantlarına egzojen SNP, Tm, R, S+Tm, S+R ve cPTIO uygulamalarının $\cdot\text{OH}$ miktarı üzerine etkisi. Harfler istatistiksel anlamda fark belirtmektedir ($p<0,05$).

3.2.3 Süper Oksit ($\text{O}_2^{\cdot-}$) Miktarı

Normal koşullarda, GLR 3.4.1 ve GLR 3.4.2 genlerinin yoksunluğu, $\text{O}_2^{\cdot-}$ miktarında sırasıyla %25 ve %16 artışa neden olmuştur. SNP uygulanması, Col.'un $\text{O}_2^{\cdot-}$ miktarını kontrole göre %48 artırmıştır. GLR3.4.1 ve GLR 3.4.2 genlerinin yoksunluğu ise SNP'ye bağlı $\text{O}_2^{\cdot-}$ miktarında belirgin bir değişikliğe sebep olmamıştır. Bunun dışında Tunikamisin (Tm) uygulaması ile Col.'un $\text{O}_2^{\cdot-}$ miktarı, kontrole göre, yaklaşık 2 kat artmıştır. Ayrıca, aynı koşullar altında $\text{O}_2^{\cdot-}$ miktarındaki bu artışta GLR 3.4.1 ve GLR 3.4.2 genlerinin yoksunluğu belirgin bir değişikliğe neden olmamıştır. SNP varlığında Tm uygulaması ise kontrole göre Col.'de $\text{O}_2^{\cdot-}$ miktarını %89 artırmıştır. Ancak GLR 3.4.1 ve GLR 3.4.2 yoksunluğu, S+Tm uygulanmış Col.'e göre $\text{O}_2^{\cdot-}$ miktarını %33 azaltmıştır. Dışarıdan Rotenon (R) uygulanması kontrole göre, Col.'ün $\text{O}_2^{\cdot-}$ miktarını %30 artırmıştır. Ancak, GLR 3.4.1 yoksunluğu $\text{O}_2^{\cdot-}$ miktarını % 22 artırırken GLR 3.4.2 yoksunluğu $\text{O}_2^{\cdot-}$ miktarını değiştirmemiştir. SNP varlığında R uygulaması Col.'un $\text{O}_2^{\cdot-}$ miktarını %59 artırmıştır. Ayrıca GLR 3.4.1 ve GLR 3.4.2 yoksunluğu S+R uygulanmış Col.'e göre $\text{O}_2^{\cdot-}$ miktarını %9 artırmıştır. Benzer şekilde cPTIO uygulanması ise Col. kontrole göre $\text{O}_2^{\cdot-}$ miktarını %45 artırmıştır (Şekil 3.7).

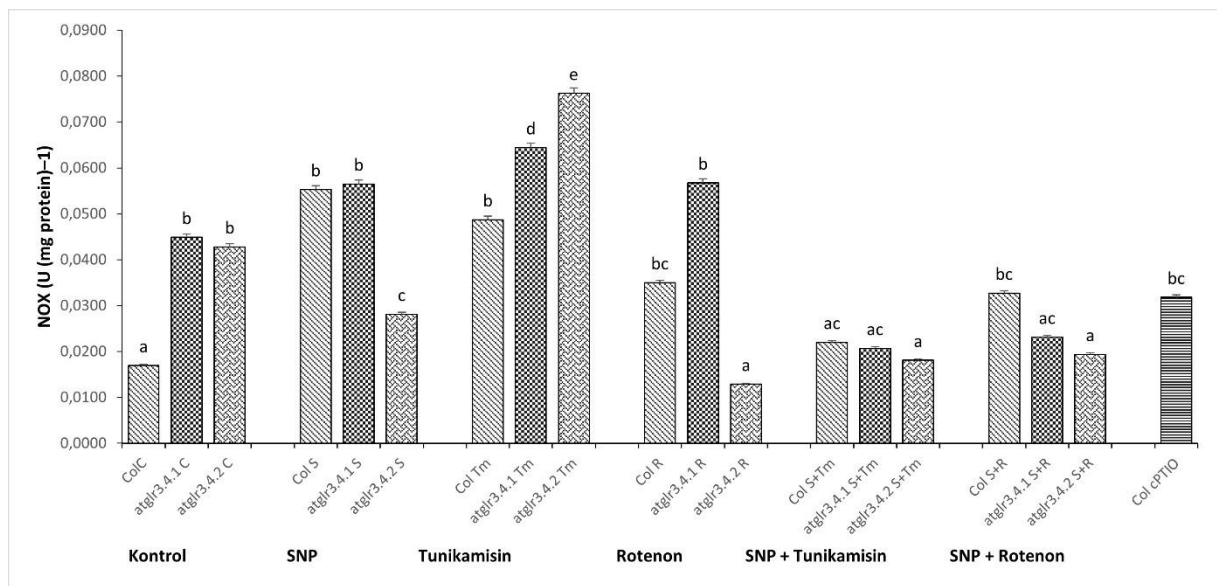


Şekil 3.7 Yabani tip *Arabidopsis thaliana* Col. ve atglr3.4 mutantlarına egzojen SNP, Tm, R, S+Tm, S+R ve cPTIO uygulamalarının $\text{O}_2^{\cdot-}$ içeriği üzerine etkisi. Harfler istatistiksel anlamda fark belirtmektedir ($p<0,05$).

3.3 Antioksidan Enzim Aktivitesi

3.3.1 NOX Enzim Aktivitesi

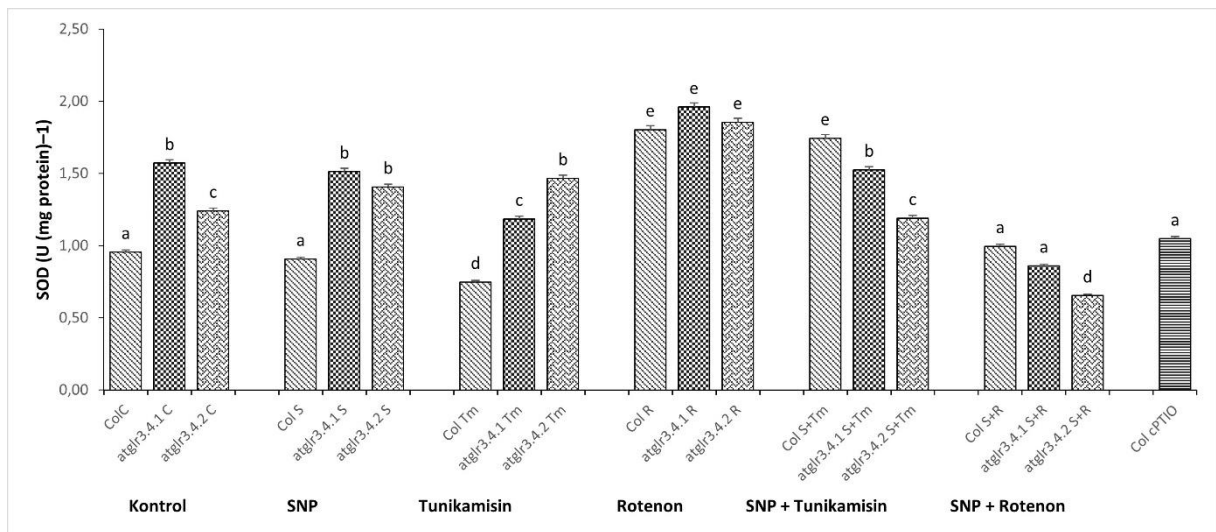
Kontrol koşullarında GLR 3.4.1 ve GLR 3.4.2 yoksunluğu NOX aktivitesinde yaklaşık 2,5 kat artışa neden olmuştur. Dışarıdan SNP uygulanan gruplarda ise Col.'un NOX aktivitesinde kontrole göre 3,2 katlık bir artış görülmüştür. SNP'ye bağlı NOX aktivitesinde, GLR3.4.1 yoksunluğu belirgin bir değişikliğe neden olmamıştır. Bunun aksine GLR 3.4.2 geninin yoksunluğu ise %49 azalışa neden olmuştur. Tunikamisin (Tm)'nin dışarıdan uygulanması Col.'un NOX aktivitesini, kontrole göre, 2,8 kat artırmıştır. Bu artış, aynı koşullar altında GLR 3.4.1'in yoksunluğu ile %32 artışa ve GLR 3.4.2 yoksunluğu ile de NOX aktivitesinin %56 artışına sebep olmuştur. SNP varlığında Tm uygulaması ise kontrole göre Col.'de NOX aktivitesini %29 artırmıştır. GLR 3.4.1 yoksunluğu NOX aktivitesinde belirgin bir farka neden olmamıştır. Ancak GLR 3.4.2 yoksunluğu, S+Tm uygulanmış Col.'e göre NOX aktivitesinde %18 azalmaya neden olmuştur. Dışarıdan R uygulaması, kontrole göre, Col.'un NOX aktivitesini yaklaşık 2 kat artırmıştır. GLR 3.4.1 yoksunluğunda ise NOX aktivitesinde, Col. R'nin üzerine, %62'lik bir artış daha görülürken, GLR 3.4.2 yoksunluğunda ise %63'lük bir azalma görülmüştür. SNP altında R uygulaması Col.'un NOX aktivitesini 2 kat artırmıştır. GLR 3.4.1 ve GLR 3.4.2 yoksunluğu S+R teşvikli NOX aktivitesini S+R uygulanmış Col.'ünkine göre sırasıyla %29 ve % 40 azaltmıştır. Bunun aksine cPTIO uygulanması ise Col. kontrole göre NOX aktivitesini %87 artırmıştır (Şekil 3.8).



Şekil 3.8 Yabani tip *Arabidopsis thaliana* Col. ve atglr3.4 mutantlarına egzogen SNP, Tm, R, S+Tm, S+R ve cPTIO uygulamalarının NOX aktivitesi üzerine etkisi. Harfler istatistiksel anlamda fark belirtmektedir ($p<0,05$).

3.3.2 SOD Aktivitesi

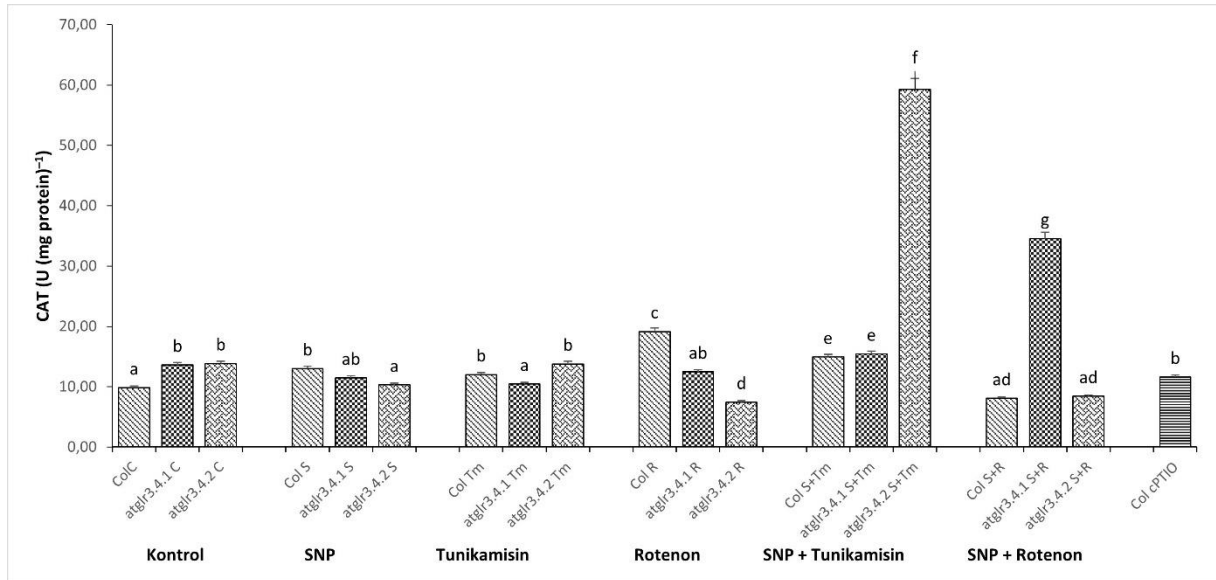
Kontrol koşullarında, GLR 3.4.1 yoksunluğu SOD aktivitesinde %64, GLR 3.4.2 yoksunluğu ise %30 artışa neden olmuştur. SNP'nin dışarıdan uygulanması Col.'un SOD aktivitesinde herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır. Ancak, GLR 3.4.1 yoksunluğu SOD aktivitesinde %66 azalmaya sebep olmuştur. Benzer şekilde GLR 3.4.2 yoksunluğu ise SOD aktivitesini %55 azaltmıştır. Tunikamisin (Tm)'nin dışarıdan uygulanması Col.'un SOD aktivitesini, kontrole göre, %22 azaltmıştır. Aynı koşullar altında GLR 3.4.1 yoksunluğu ise SOD aktivitesindeki bu azalışı %58 artırmıştır. Benzer şekilde GLR 3.4.2 yoksunluğu SOD aktivitesini %96 artırmıştır. SNP varlığında Tm uygulaması ise kontrole göre Col.'de SOD aktivitesini %80 artırmıştır. GLR 3.4.1 yoksunluğu SOD aktivitesini %12 azaltırken GLR 3.4.2 yoksunluğu, S+Tm uygulanmış Col.'e göre SOD aktivitesini %31 azaltmıştır. Dışarıdan R uygulaması, kontrole göre, Col.'un SOD aktivitesini %88 artırmıştır. Ancak, GLR 3.4.1 ve GLR 3.4.2 yoksunluğu SOD aktivitesinde belirgin bir artışa neden olmamıştır. SNP altında R uygulaması Col.'un SOD aktivitesinde herhangi bir değişikliğe sebep olmamıştır. Ancak GLR 3.4.1 yoksunluğu S+R teşvikli SOD aktivitesini % 13, GLR 3.4.2 yoksunluğu ise S+R uygulanmış Col.'unkine göre SOD aktivitesini %34 azaltmıştır. Bunun aksine cPTIO uygulanmasında Col. kontrole göre SOD aktivitesi %10 artmıştır (Şekil 3.9).



Şekil 3.9 Yabani tip *Arabidopsis thaliana* Col. ve atglr3.4 mutantlarına egzogen SNP, Tm, R, S+Tm, S+R ve cPTIO uygulamalarının SOD aktivitesi üzerine etkisi. Harfler istatistiksel anlamda fark belirtmektedir ($p<0,05$).

3.3.3 CAT Aktivitesi

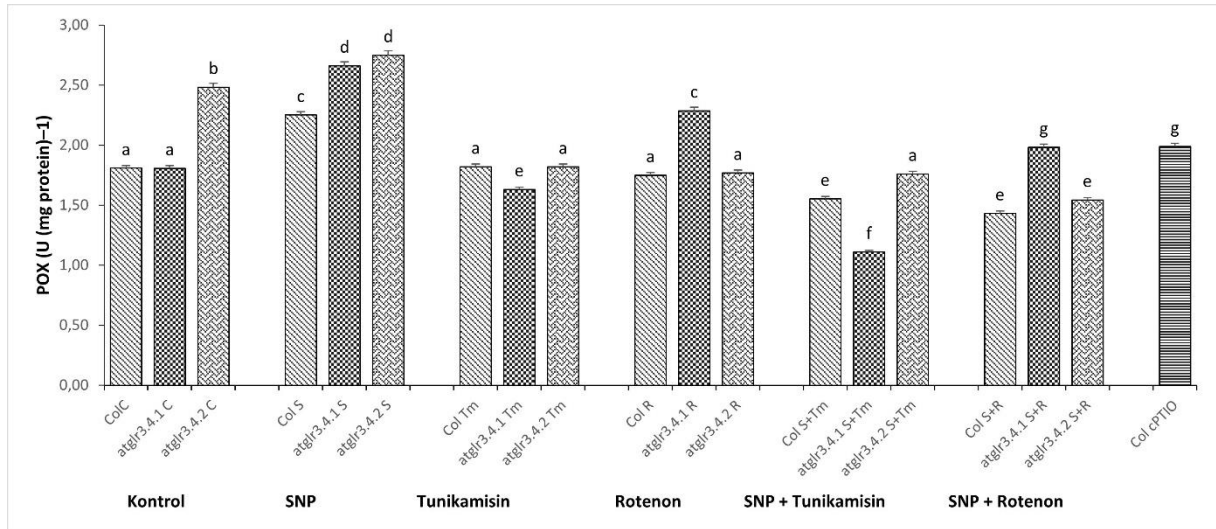
Normal koşullarda, GLR 3.4.1 yoksunluğu, CAT aktivitesinde %38 artış ve GLR 3.4.2 yoksunluğu da %40 artışa neden olmuştur. Dışarıdan SNP uygulanan gruplarda, Col.'un CAT aktivitesinde kontrole göre %32 artış görülmüştür. SNP'ye bağlı CAT aktivitesindeki bu artışı GLR3.4.1 ve GLR 3.4.2 genlerinin yoksunluğu sırasıyla %11 ve %20 azaltmıştır. Tunikamisin (Tm)'nin dışarıdan uygulanması Col.'un CAT aktivitesini, kontrole göre, %22 artırmıştır. Ancak aynı koşullar altında GLR 3.4.1'in yokluğu %13 azalışa neden olurken GLR 3.4.2 genlerinin yoksunluğu ise CAT aktivitesinde %14 artışa neden olmuştur. SNP varlığında Tm uygulaması ise kontrole göre Col.'de CAT aktivitesini %52 artırmıştır. Bunun dışında, GLR 3.4.1 yoksunluğu CAT aktivitesinde belirgin bir farka neden olmamıştır. Ancak GLR 3.4.2 yoksunluğu, S+Tm uygulanmış Col.'e göre CAT aktivitesinde yaklaşık 4 kat artışa neden olmuştur. Dışarıdan R uygulaması, kontrole göre, Col.'un CAT aktivitesini yaklaşık 2 kat artırmıştır. GLR 3.4.1 yoksunluğu CAT aktivitesinde sadece %34, GLR 3.4.2 yoksunluğunda %61 azalmaya sebep olmuştur. SNP altında R uygulaması Col.'un CAT aktivitesini %18 azaltmıştır. Bunun aksine GLR 3.4.1 geninin yoksunluğu S+R teşvikli CAT aktivitesini S+R uygulanmış Col.'unkine göre yaklaşık 3,2 kat artırırken GLR 3.4.2 yoksunluğu herhangi bir değişikliğe neden olmuştur. Bunun aksine cPTIO uygulanması ise Col. kontrole göre CAT aktivitesini %18 artırmıştır (Şekil 3.10).



Şekil 3.10 Yabani tip *Arabidopsis thaliana* Col. ve atglr3.4 mutantlarına egzogen SNP, Tm, R, S+Tm, S+R ve cPTIO uygulamalarının CAT aktivitesi üzerine etkisi. Harfler istatistiksel anlamda fark belirtmektedir ($p < 0,05$).

3.3.4 POX Aktivitesi

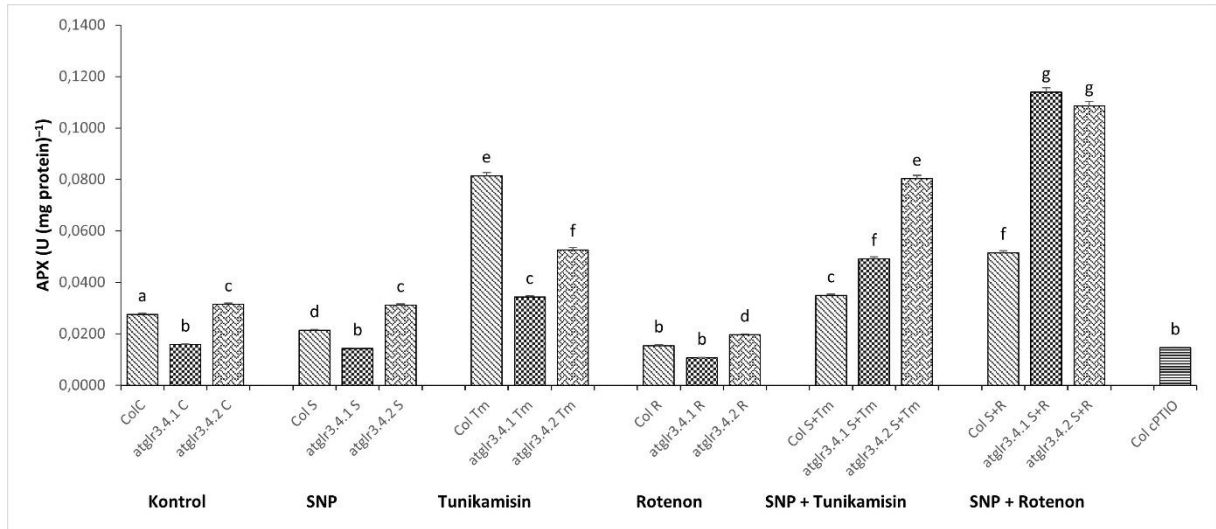
Normal koşullar altında, GLR 3.4.1 yoksunluğu POX aktivitesinde belirgin bir farklılık göstermemiştir. Ancak GLR 3.4.2 geninin yoksunluğu %37 daha yüksektir. SNP'nin dışarıdan uygulanması, Col.'un POX aktivitesini %24 artırmıştır. Bu artış, GLR 3.4.1 yoksunluğu ile %18 ve GLR 3.4.2 yoksunluğu ile de %22 oranında POX aktivitesini daha da artırmıştır. Tunikamisin (Tm)'nin dışarıdan uygulanması Col.'un POX aktivitesini kontrole göre değiştirmemiştir. Ancak aynı koşullar altında GLR 3.4.1 yoksunluğu %10 azalmaya sebep olurken, GLR 3.4.2 geninin yoksunluğu POX aktivitesini değiştirmemiştir. SNP varlığında Tm uygulaması ise kontrole göre Col.'de POX aktivitesini %14 azaltmıştır. Ancak GLR 3.4.1 yoksunluğu POX aktivitesindeki bu azalmayı %28 azaltırken, GLR 3.4.2 yoksunluğu S+Tm uygulanmış Col.'e göre POX aktivitesini %13 artırmıştır. Dışarıdan R uygulaması, kontrole göre, Col.'un POX aktivitesinde belirgin bir değişiklik göstermemiştir. Ancak GLR 3.4.1 geninin yoksunluğu POX aktivitesini %30 artırırken, GLR 3.4.2 yoksunluğu bir değişikliğe sebep olmamıştır. SNP altında R uygulaması Col.'un POX aktivitesinde %20 azaltmıştır. Ancak GLR 3.4.1 yoksunluğu S+R teşvikli POX aktivitesini %38 artırmıştır. GLR 3.4.2 yoksunluğu ise S+R uygulanmış Col.'unkine göre POX aktivitesini yalnızca %7 artırmıştır. Bunun aksine cPTIO uygulanması ise Col. kontrole göre POX aktivitesini %10 artırmıştır (Şekil 3.11).



Şekil 3.11 Yabani tip *Arabidopsis thaliana* Col. ve atglr3.4 mutantlarına egzogen SNP, Tm, R, S+Tm, S+R ve cPTIO uygulamalarının POX aktivitesi üzerine etkisi. Harfler istatistiksel anlamda fark belirtmektedir ($p < 0,05$).

3.3.5 APX Aktivitesi

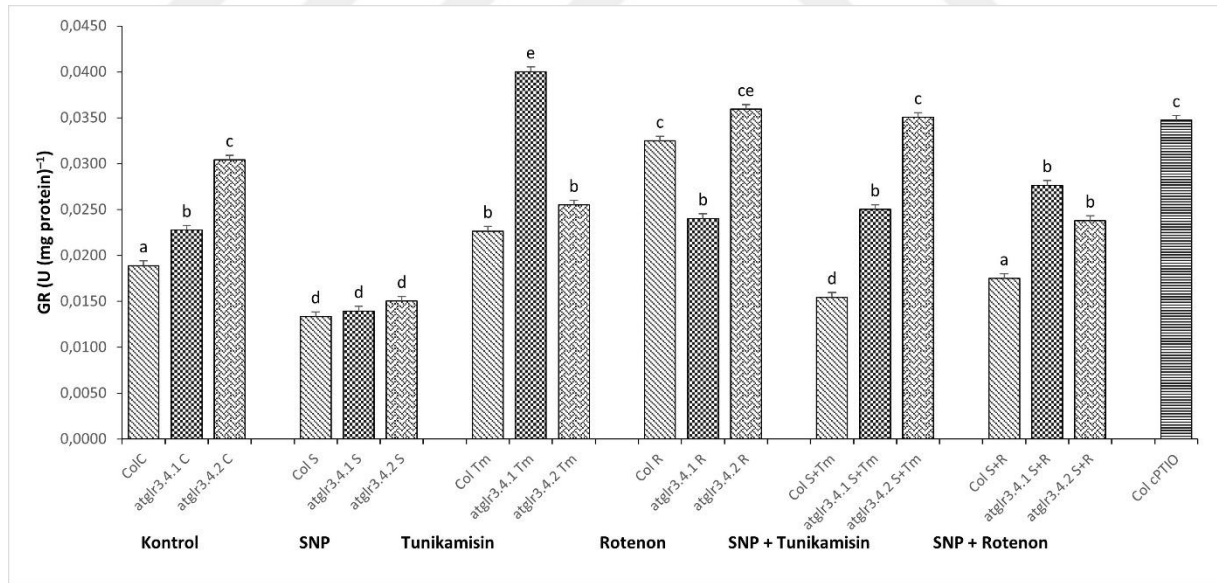
Kontrol koşullarında GLR 3.4.1 yoksunluğu APX aktivitesini %40 azaltırken bunun aksine GLR 3.4.2 geninin yoksunluğu %14 artırmıştır. SNP'nin dışarıdan uygulanması Col.'un APX aktivitesini %22 azaltmıştır. Bu azalış, GLR 3.4.1 yoksunluğu ile APX aktivitesinde %33 azalmaya sebep olurken, GLR 3.4.2 yoksunluğu ise %46 artışa neden olmuştur. Tunikamisin (Tm)'nin dışarıdan uygulanması Col.'un APX aktivitesini yaklaşık olarak 3 kat artırmıştır. Ancak, aynı koşullar altında GLR 3.4.1 ve GLR 3.4.2 genlerinin yoksunluğu APX aktivitesinin sırasıyla %57 ve %35 azalmasına sebep olmuştur. SNP varlığında Tm uygulaması ise kontrole göre Col.'de APX aktivitesini %27 artırmıştır. Benzer şekilde bu artış, GLR 3.4.1 yoksunluğu ile APX aktivitesini %40 artırırken en büyük artış S+Tm uygulanmış Col.'e göre APX aktivitesinin yaklaşık 3 kat arttığı GLR 3.4.2 yoksunluğunda belirlenmiştir. Dışarıdan R uygulaması, kontrole göre, Col.'un APX aktivitesinde %43 azalmaya sebep olmuştur. Benzer şekilde GLR 3.4.1 yoksunluğu bu azalışı %31 oranında daha da azaltmıştır. Ancak GLR 3.4.2 geninin yoksunluğu APX aktivitesini %27 artırmıştır. SNP altında R uygulaması Col.'un APX aktivitesinde %87 artışa sebep olmuştur. Ayrıca bu artış, hem GLR 3.4.1 hem de GLR 3.4.2 yoksunluğu ile S+R uygulanmış Col.'unkine göre APX aktivitesini yaklaşık 2 kat artırmıştır. Bunun aksine cPTIO uygulanması ise Col. kontrole göre APX aktivitesini %47 azaltmıştır (Şekil 3.12).



Şekil 3.12 Yabani tip *Arabidopsis thaliana* Col. ve atglr3.4 mutantlarına egzogen SNP, Tm, R, S+Tm, S+R ve cPTIO uygulamalarının APX aktivitesi üzerine etkisi. Harfler istatistiksel anlamda fark belirtmektedir ($p < 0.05$).

3.3.6 GR Aktivitesi

Normal koşullarda GLR 3.4.1 ve GLR 3.4.2 genlerinin yoksunluğu GR aktivitesini sırasıyla %20 ve %60 artırmıştır. SNP'nin dışarıdan uygulanması Col.'un GR aktivitesini %29 azaltmıştır. GLR 3.4.1 yoksunluğu GR aktivitesinde yalnızca %4, GLR 3.4.2 yoksunluğu ise %12 artışa neden olmuştur. Dışarıdan Tunikamisin (Tm) uygulanması Col.'un GR aktivitesini %20 artırmıştır. Aynı koşullar altında GLR 3.4.1 yoksunluğu GR aktivitesindeki bu artışı %76, GLR 3.4.2 yoksunluğu ise %12 daha fazla artırmıştır. SNP varlığında Tm uygulaması ise kontrole göre Col.'de GR aktivitesini %18 azaltmıştır. Ancak bu azalış, GLR 3.4.1 yoksunluğu ile GR aktivitesini %61 artırırken, yine S+Tm uygulanmış Col.'e göre GR aktivitesinin, GLR 3.4.2 yoksunluğunda yaklaşık 2,3 kat arttığı görülmüştür. Dışarıdan R uygulaması, kontrole göre, Col.'un GR aktivitesinde %72 artışa sebep olmuştur. Bu artış GLR 3.4.1 yoksunluğu ile %26 azalırken, GLR 3.4.2 yoksunluğu GR aktivitesini %10 artırmıştır. SNP altında R uygulaması Col.'un GR aktivitesinde %7 azalmaya sebep olmuştur. Ancak GLR 3.4.1 ve GLR 3.4.2 yoksunluğu S+R uygulanmış Col.'ünkine göre GR aktivitesini sırasıyla % 58 ve %36 artırmıştır. Bu artışlara benzer olarak cPTIO uygulanması ise Col. kontrole göre GR aktivitesini %83 artırmıştır (Şekil 3.13).

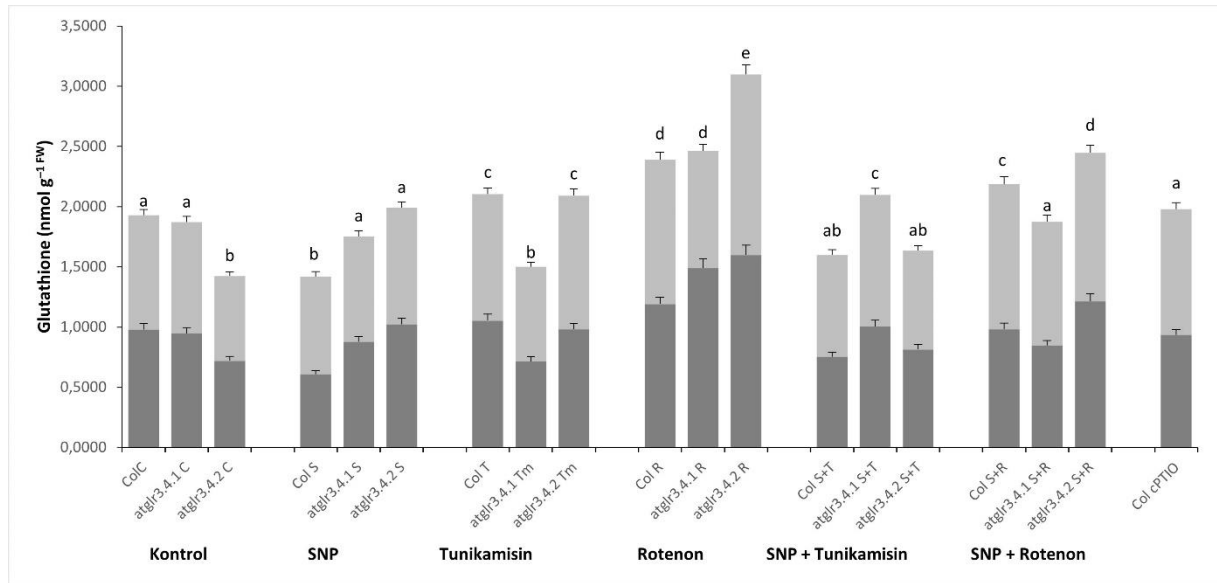


Şekil 3.13 Yabani tip *Arabidopsis thaliana* Col. ve atglr3.4 mutantlarına egzogen SNP, Tm, R, S+Tm, S+R ve cPTIO uygulamalarının GR aktivitesi üzerine etkisi. Harfler istatistiksel anlamda fark belirtmektedir ($p < 0,05$).

3.4 Redoks İlişkili Enzim Aktivite Analizleri

3.4.1 GSH/GSSG Oranı

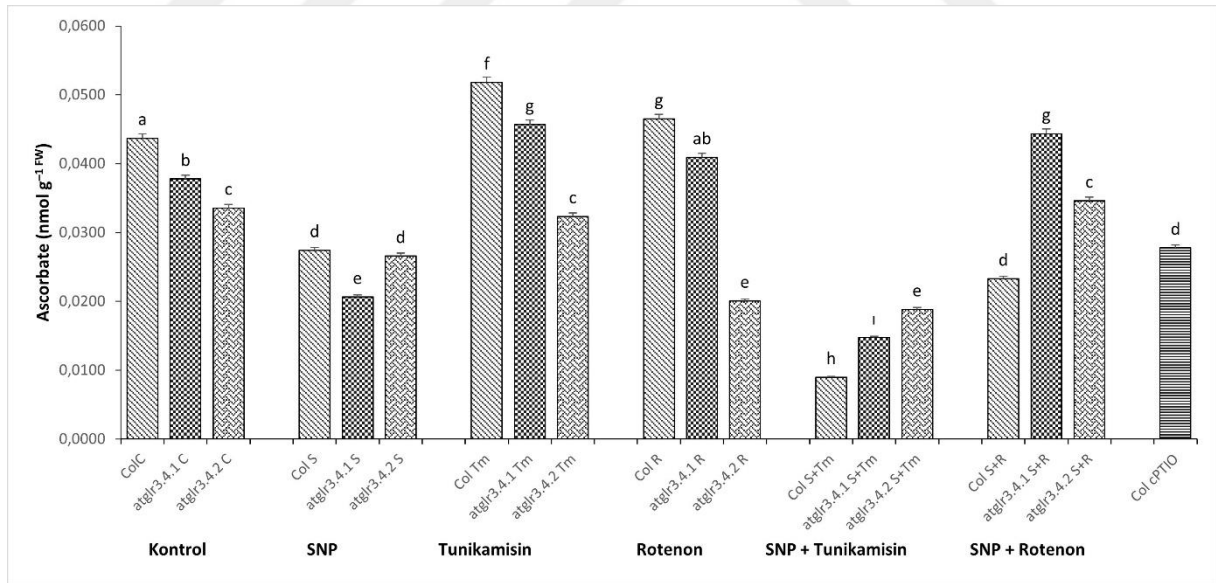
Total Glutasyon miktarı, kontrol koşullarında, GLR 3.4.1 geninin yoksunluğunda herhangi bir değişime neden olmazken GLR 3.4.2 geninin yoksunluğu %26 azaltmıştır. SNP'nin dışarıdan uygulanması Col.'un total Glutasyon miktarını %26 azaltmıştır. Bu azalış üzerinden de GLR 3.4.1 yoksunluğu ile %23, GLR 3.4.2 yoksunluğu ile de %40 artmıştır. Tunikamisin (Tm) uygulanması ise Col.'un total Glutasyon miktarını %10 artırmış ve GLR 3.4.1 yoksunluğu total Glutasyon miktarını %28 azaltırken GLR 3.4.2 yoksunluğu ise bir değişikliğe sebep olmamıştır. SNP varlığında Tm uygulaması ise kontrole göre Col.'de total Glutasyon miktarını %17 azaltmıştır. Bunun aksine, GLR 3.4.1 yoksunluğu total Glutasyon miktarındaki bu azalmayı %31 artırmış ancak S+Tm uygulanmış Col.'e göre GLR 3.4.2 geninin yoksunluğu ile de bir değişikliğe sebep olmamıştır. Dışarıdan R uygulaması, kontrole göre, Col.'un total Glutasyon miktarında %24 artışa sebep olmuştur. Bu artış GLR 3.4.1 geninin yoksunluğu ile değişmeyip kontrolü ile aynı seviyede kalırken, GLR 3.4.2 geninin yoksunluğu ile yaklaşık %30 artırmıştır. SNP altında R uygulaması Col.'un total Glutasyon miktarını %13 artışa sebep olmuştur. Ancak GLR 3.4.1 yoksunluğu %14 azalmaya sebep olurken GLR 3.4.2 yoksunluğu S+R uygulanmış Col.'üne göre total Glutasyon miktarını %12 artırmıştır. Dışarıdan cPTIO uygulanması ise Col. kontrole göre kıyaslandığında total Glutasyon miktarında kayda değer herhangi bir değişime yol açmamıştır (Şekil 3.14).



Şekil 3.14 Yabani tip *Arabidopsis thaliana* Col. ve atglr3.4 mutantlarına egzojen SNP, Tm, R, S+Tm, S+R ve cPTIO uygulamalarının total glutasyon içeriği üzerine etkisi. Harfler istatistiksel anlamda fark belirtmektedir ($p < 0,05$).

3.4.2 Askorbat Miktarı

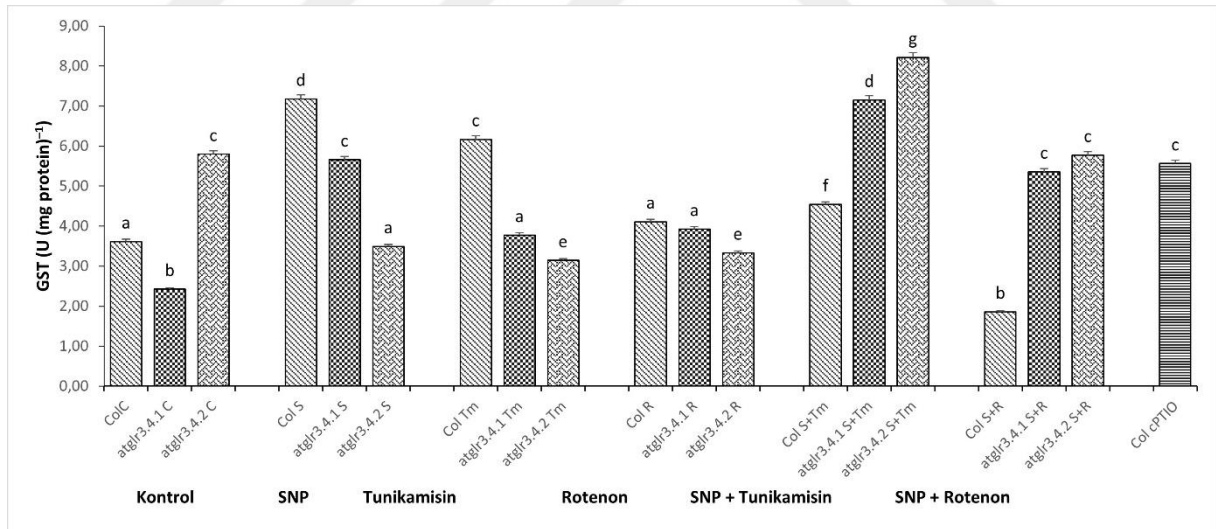
Normal koşullarda, GLR 3.4.1 geninin yoksunluğu askorbat miktarını %13 ve GLR 3.4.2 geninin yoksunluğu ise %23 azaltmıştır. Dışarıdan SNP uygulanması, Col.'de düşüşe sebep olmuştur. Col.'un askorbat miktarı %37 azalırken, bu azalma GLR 3.4.1 yoksunluğunda %37 üzerinden ayrıca %24'tür. Ancak GLR 3.4.2 yoksunluğu ile bir değişiklik tespit edilmemiştir. Tunikamisin (Tm) uygulanması Col.'un askorbat miktarını %18 artırmıştır. Aynı koşullar altında GLR 3.4.1 yoksunluğu askorbat miktarındaki bu artışı %11 azaltırken, GLR 3.4.2 yoksunluğu ile %37 azalmıştır. SNP varlığında Tm uygulaması kontrole göre Col.'de askorbat miktarını %80 azaltmıştır. GLR 3.4.1 yoksunluğu ile S+Tm uygulanmış Col.'e göre askorbat miktarını %64, GLR 3.4.2 geninin yoksunluğu ise yaklaşık 2 kat artırmıştır. Dışarıdan R uygulaması, kontrole göre, Col.'un askorbat miktarını sadece %6 artırmıştır. Bu artış, GLR 3.4.1 geninin yoksunluğu ile askorbat miktarı %12 oranında azalırken, GLR 3.4.2 geninin yoksunluğu ile %56 azalmıştır. SNP altında R uygulaması Col.'un askorbat miktarını %46 azaltmıştır. Ancak GLR 3.4.1 yoksunluğu askorbat miktarını %90 ve GLR 3.4.2 yoksunluğu ise %48 artırmıştır. Dışarıdan cPTIO uygulanması ise Col. kontrole göre kıyaslandığında askorbat miktarını %36 azaltmıştır (Şekil 3.15).



Şekil 3.15 Yabani tip *Arabidopsis thaliana* Col. ve atglr3.4 mutantlarına egzogen SNP, Tm, R, S+Tm, S+R ve cPTIO uygulamalarının askorbat miktarı üzerine etkisi. Harfler istatistiksel anlamda fark belirtmektedir ($p < 0.05$).

3.4.3 GST Aktivitesi

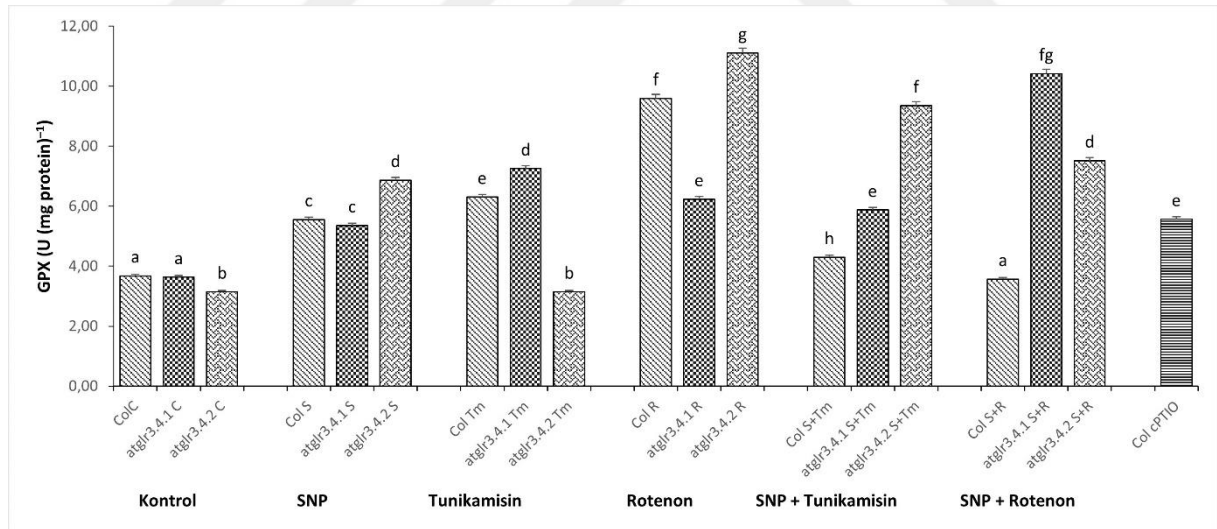
Normal koşullarda GLR 3.4.1 geninin yoksunluğu GST aktivitesini %33 azaltmıştır. Ancak GLR 3.4.2 geninin yoksunluğu %60 artırmıştır. Dışarıdan SNP uygulanması, Col.'un GST aktivitesi %98 artırmıştır. GST aktivitesindeki bu artış GLR 3.4.1 yoksunluğu ile %21 azalırken, GLR 3.4.2 yoksunluğu ile %51 azaltmıştır. Tunikamisin (Tm) uygulanması Col.'un GST aktivitesini %70 artırmıştır. Aynı koşullar altında bu artış, GLR 3.4.1 yoksunluğunda GST aktivitesini %38 ve GLR 3.4.2 yoksunluğu %50 daha da azaltmıştır. SNP varlığında Tm uygulaması ise kontrole göre Col.'de GST aktivitesini %25 artırmıştır. Bu artış GLR 3.4.1 yoksunluğu ile S+Tm uygulanmış Col.'e göre %57 iken, GLR 3.4.2 geninin yoksunluğu %81 daha da artmıştır. Dışarıdan R uygulaması, kontrole göre Col.'un GST aktivitesini %13 artırmıştır. Bu artış GLR 3.4.1 geninin yoksunluğu da değişmezken, GLR 3.4.2 geninin yoksunluğu GST aktivitesini %18 azaltmıştır. SNP altında R uygulaması Col.'un GST aktivitesini %48 azaltmıştır. Ancak GLR 3.4.1 ve GLR 3.4.2 yoksunluğu S+R uygulanmış Col.'unkine göre GST aktivitesini sırasıyla 2,9 ve 3,1 kat artırmıştır. Dışarıdan cPTIO uygulanması ise Col. kontrole göre kıyaslandığında GST aktivitesini %54 artırmıştır (Şekil 3.16).



Şekil 3.16 Yabani tip *Arabidopsis thaliana* Col. ve atglr3.4 mutantlarına egzojen SNP, Tm, R, S+Tm, S+R ve cPTIO uygulamalarının GST aktivitesi üzerine etkisi. Harfler istatistiksel anlamda fark belirtmektedir ($p < 0,05$).

3.4.4 GPX Aktivitesi

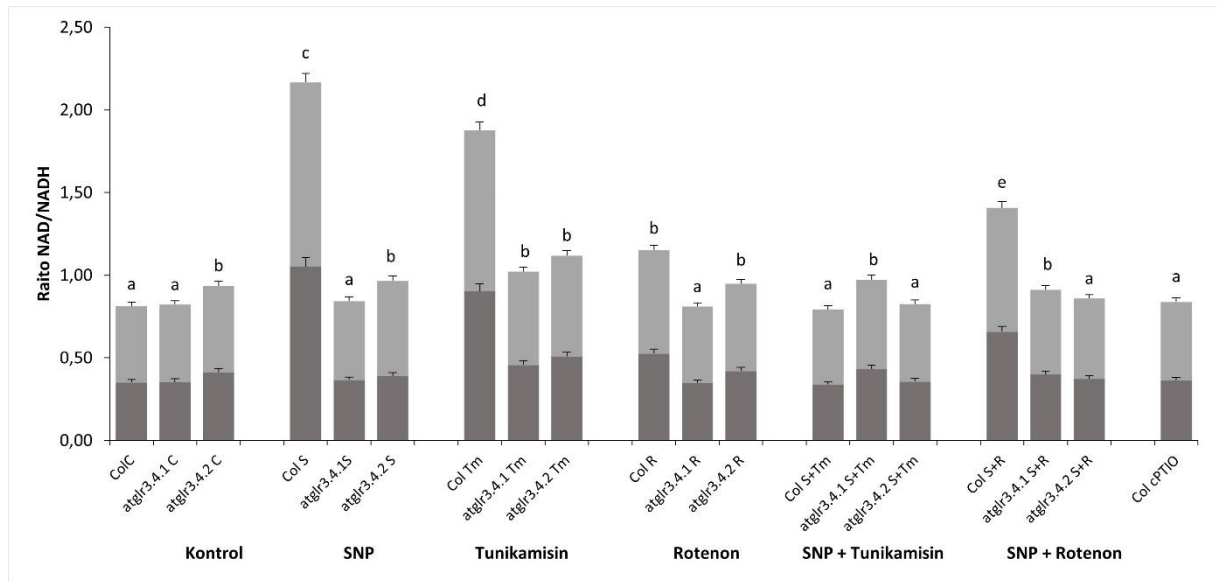
Kontrol koşullarında, GLR 3.4.1 geninin yoksunluğu ile GPX aktivitesi değişmemiştir. Ancak GLR 3.4.2 geninin yoksunluğu GPX aktivitesini %14 azaltmıştır. Dışarıdan SNP uygulanması Col.'un GPX aktivitesini %51 artırmıştır. GPX aktivitesindeki bu artış GLR 3.4.1 yoksunluğu ile değişmezken, GLR 3.4.2 yoksunluğu ile yaklaşık %23 artmıştır. Tunikamisin (Tm) uygulanması Col.'un GPX aktivitesini %71 artırmıştır. Aynı koşullar altında GLR 3.4.1 yoksunluğu bu artışı %15 daha da artırırken, GLR 3.4.2 yoksunluğu ise GPX aktivitesini %50 azaltmıştır. SNP varlığında Tm uygulaması ise kontrole göre Col.'de GPX aktivitesini %16 artırmıştır. Bu artış GLR 3.4.1 yoksunluğu ile S+Tm uygulanmış Col.'e göre %36 iken GLR 3.4.2 geninin yoksunluğu ile yaklaşık 2 kattır. Dışarıdan R uygulaması, kontrole göre, Col.'un GPX aktivitesini 2,6 kat artırmıştır. Ancak bu artış GLR 3.4.1 geninin yoksunluğu da %35 azalırken, GLR 3.4.2 geninin yoksunluğu ile GPX aktivitesi %15 daha da artmıştır. SNP altında R uygulaması Col.'un GPX aktivitesini değiştirmemiştir. Ancak GLR 3.4.1 ve GLR 3.4.2 yoksunluğu S+R uygulanmış Col.'unkine göre GPX aktivitesini sırasıyla 2,9 ve 2,1 kat artırmıştır. Dışarıdan cPTIO uygulanması ise Col. kontrole göre kıyaslandığında GPX aktivitesini %51 artırmıştır (Şekil 3.17).



Şekil 3.17 Yabani tip *Arabidopsis thaliana* Col. ve atglr3.4 mutantlarına egzogen SNP, Tm, R, S+Tm, S+R ve cPTIO uygulamalarının GPX aktivitesi üzerine etkisi. Harfler istatistiksel anlamda fark belirtmektedir ($p < 0,05$).

3.4.5 NAD/NADH Oranı

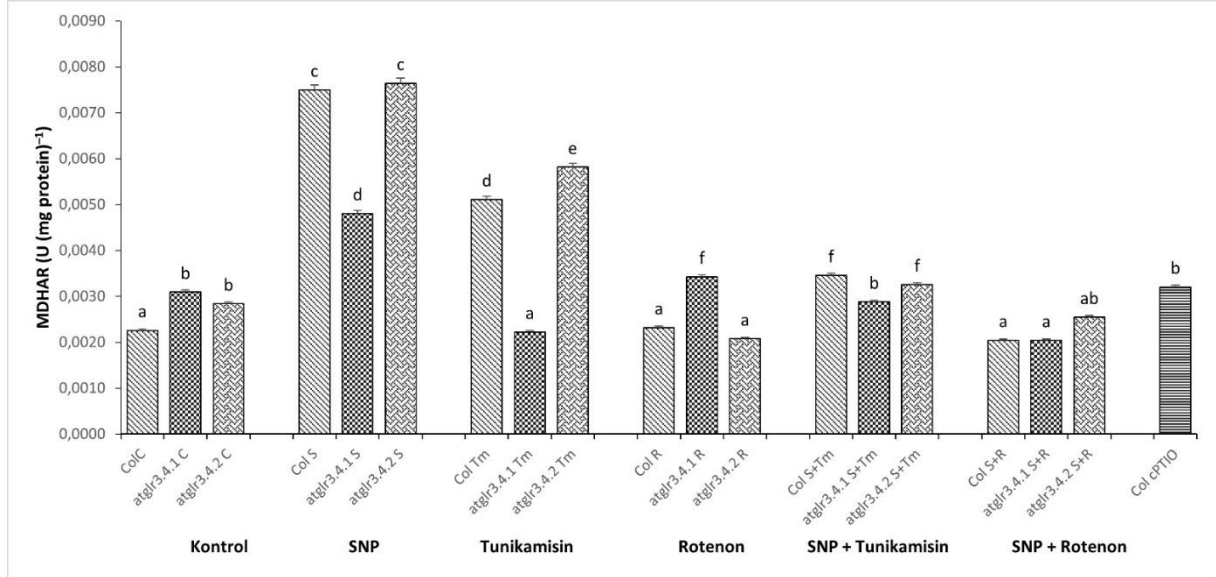
Normal koşullarda, GLR 3.4.1 geninin yoksunluğu ile NAD/NADH oranı değişmemiştir. Ancak GLR 3.4.2 geninin yoksunluğu ile bu oran %14 artmıştır. Dışarıdan SNP uygulanması, Col.'un NAD/NADH oranı 2,6 kat artırmıştır. Ancak NAD/NADH oranı GLR 3.4.1 yoksunluğu ile %61, GLR 3.4.2 yoksunluğu ile de %55 azalmıştır. Tunikamisin (Tm) uygulanması Col.'un NAD/NADH oranını 2,3 kat artırmıştır. Aynı koşullar altında NAD/NADH oranındaki bu artışı GLR 3.4.1 ve GLR 3.4.2 genlerinin yoksunluğu sırasıyla %45 ve %40 oranında azaltmıştır. SNP varlığında Tm uygulaması kontrole göre Col.'de NAD/NADH oranını değiştirmemiştir. GLR 3.4.1 yoksunluğu ile S+Tm uygulanmış Col.'e göre NAD/NADH oranı %22 artarken, GLR 3.4.2 geninin yoksunluğu Col. gibi bir değişikliğe sebep olmamıştır. Dışarıdan R uygulaması, kontrole göre, Col.'un NAD/NADH oranını %41 artırmıştır. Ancak GLR 3.4.1 yoksunluğu da bu artış %29 azalırken, GLR 3.4.2 yoksunluğu ile NAD/NADH oranında %17 azalma gözlenmiştir. SNP altında R uygulaması Col.'un NAD/NADH oranını %72 artırmıştır. Ancak GLR 3.4.1 ve GLR 3.4.2 yoksunluğunda, S+R uygulanmış Col.'e göre NAD/NADH aynı oranda, %38, azalmıştır. Dışarıdan cPTIO uygulanması ise Col. kontrole göre kıyaslandığında NAD/NADH oranını değiştirmemiştir (Şekil 3.18).



Şekil 3.18 Yabani tip *Arabidopsis thaliana* Col. ve atglr3.4 mutantlarına egzogen SNP, Tm, R, S+Tm, S+R ve cPTIO uygulamalarının NAD/NADH içeriği üzerine etkisi. Harfler istatistiksel anlamda fark belirtmektedir ($p < 0,05$).

3.4.6 MDHAR Aktivitesi

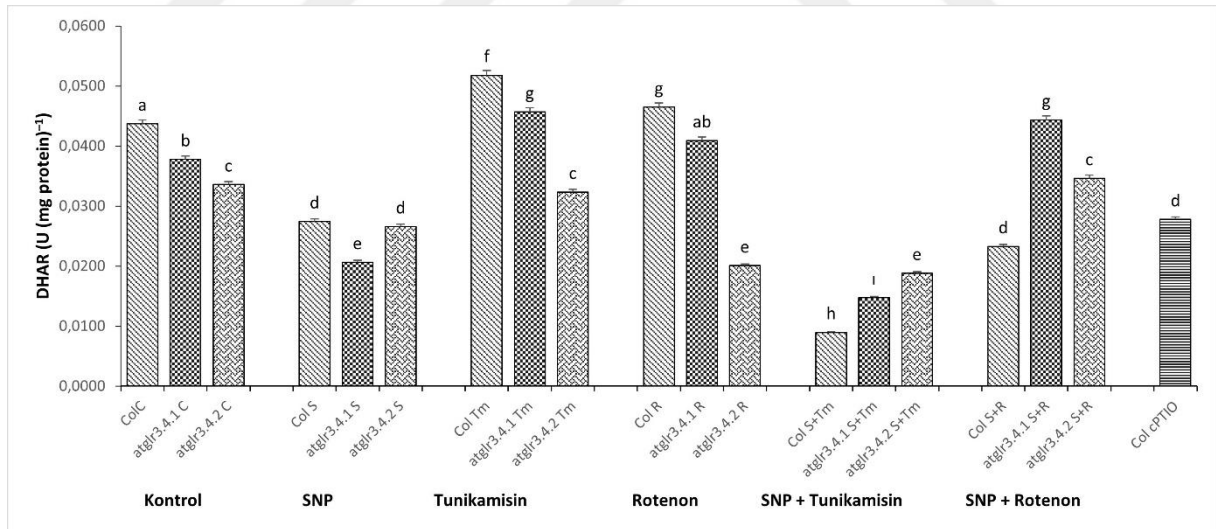
Kontrol koşullarında, GLR 3.4.1 geninin yoksunluğu MDHAR aktivitesini %36, GLR 3.4.2 geninin yoksunluğu ise %25 artırmıştır. Dışarıdan SNP uygulanması, Col.'un MDHAR aktivitesini 3,3 kat artırmıştır. Bu artış, GLR 3.4.1 yoksunluğu ile %35 azalırken, GLR 3.4.2 yoksunluğu ile değişmemiştir. Tm uygulanması Col.'un MDHAR aktivitesini 2,2 kat artırmıştır. Aynı koşullar altında GLR 3.4.1 yoksunluğu MDHAR aktivitesini %56 azaltırken GLR 3.4.2 yoksunluğu %13 artırmıştır. Kontrole göre, SNP varlığında Tm uygulaması Col.'de MDHAR aktivitesini %52 artırmıştır. GLR 3.4.1 yoksunluğu ile S+Tm uygulanmış Col.'e göre MDHAR aktivitesi %16 azalırken, GLR 3.4.2 geninin yoksunluğunda belirgin bir değişik görülmemiştir. Dışarıdan R uygulaması, kontrole göre, Col.'un MDHAR aktivitesini değiştirmemiştir. Ancak GLR 3.4.1 geninin yoksunluğu MDHAR aktivitesini %47 oranında artırırken, GLR 3.4.2 geninin yoksunluğu %10 azaltmıştır. SNP altında R uygulaması Col.'un MDHAR aktivitesini %10 azaltmıştır. Ancak GLR 3.4.1 yoksunluğu MDHAR aktivitesini değiştirmemiştir. Bunun aksine GLR 3.4.2 yoksunluğu MDHAR aktivitesini %24 artırmıştır. cPTIO uygulanması ise Col. kontrole göre kıyaslandığında MDHAR aktivitesi %41 artmıştır (Şekil 3.19).



Şekil 3.19 Yabani tip *Arabidopsis thaliana* Col. ve atglr3.4 mutantlarına egzogen SNP, Tm, R, S+Tm, S+R ve cPTIO uygulamalarının MDHAR aktivitesi üzerine etkisi. Harfler istatistiksel anlamda fark belirtmektedir ($p < 0,05$).

3.4.7 DHAR Aktivitesi

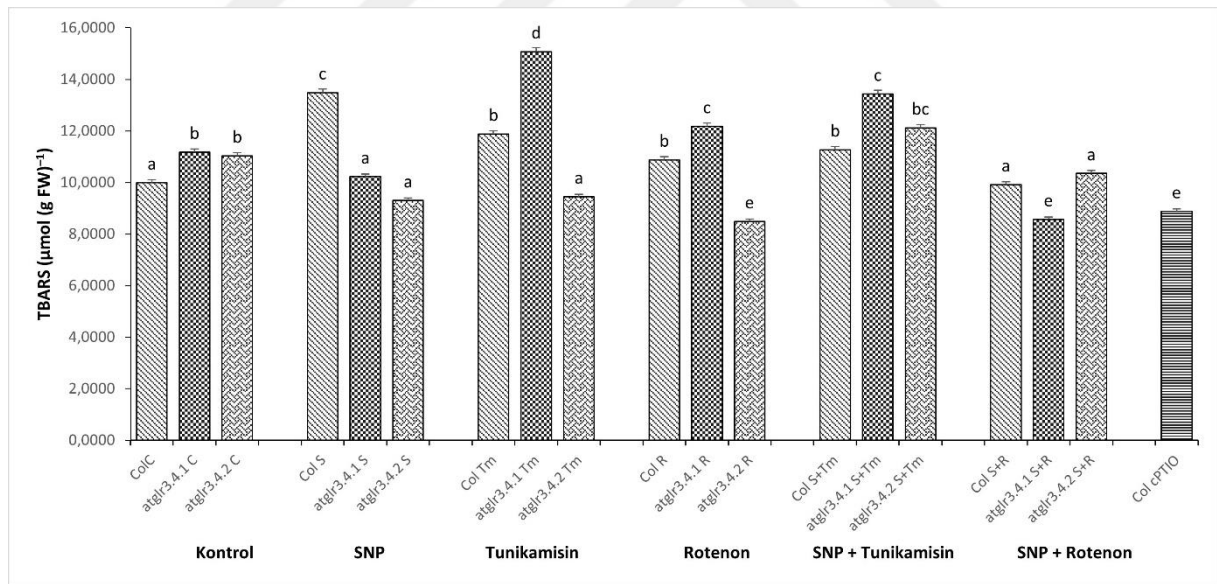
Normal koşullarda, GLR 3.4.1 geninin yoksunluğu DHAR aktivitesini %13 ve GLR 3.4.2 geninin yoksunluğu ise %23 azaltmıştır. Dışarıdan SNP uygulanması, Col.'de azalmaya sebep olmuştur. Col.'un DHAR aktivitesini %37 azalırken, SNP uygulanmış Col.'e göre, GLR 3.4.1 yoksunluğu ile azalım %24'tür. Ancak GLR 3.4.2 yoksunluğu ile bir değişiklik tespit edilmemiştir. Tunikamisin (Tm) uygulanması Col.'un DHAR aktivitesini %18 artırmıştır. Aynı koşullar altında GLR 3.4.1 yoksunluğu DHAR aktivitesindeki bu artışı %11 azaltırken GLR 3.4.2 yoksunluğunda ise %37 azalmıştır. SNP varlığında Tm uygulaması kontrole göre Col.'de DHAR aktivitesini %80 azaltmıştır. GLR 3.4.1 yoksunluğu ile S+Tm uygulanmış Col.'e göre DHAR aktivitesi %64, GLR 3.4.2 geninin yoksunluğu ise yaklaşık 2 kat artırmıştır. Dışarıdan R uygulaması, kontrole göre, Col.'un DHAR aktivitesini sadece %6 artırmıştır. GLR 3.4.1 geninin yoksunluğu ile %12 oranında DHAR aktivitesini azaltırken, GLR 3.4.2 geninin yoksunluğu ile %56 azalmıştır. SNP altında R uygulaması Col.'un DHAR aktivitesini %46 azaltmıştır. Ancak GLR 3.4.1 yoksunluğu DHAR aktivitesini %90 ve GLR 3.4.2 yoksunluğu ise %48 artırmıştır. Dışarıdan cPTIO uygulanması ise Col. kontrole göre kıyaslandığında DHAR aktivitesini %36 azaltmıştır (Şekil 3.20).



Şekil 3.20 Yabani tip *Arabidopsis thaliana* Col. ve atglr3.4 mutantlarına egzogen SNP, Tm, R, S+Tm, S+R ve cPTIO uygulamalarının DHAR aktivitesi üzerine etkisi. Harfler istatistiksel anlamda fark belirtmektedir ($p < 0.05$).

3.6 Lipid Peroksidasyon (TBARS) Miktarı

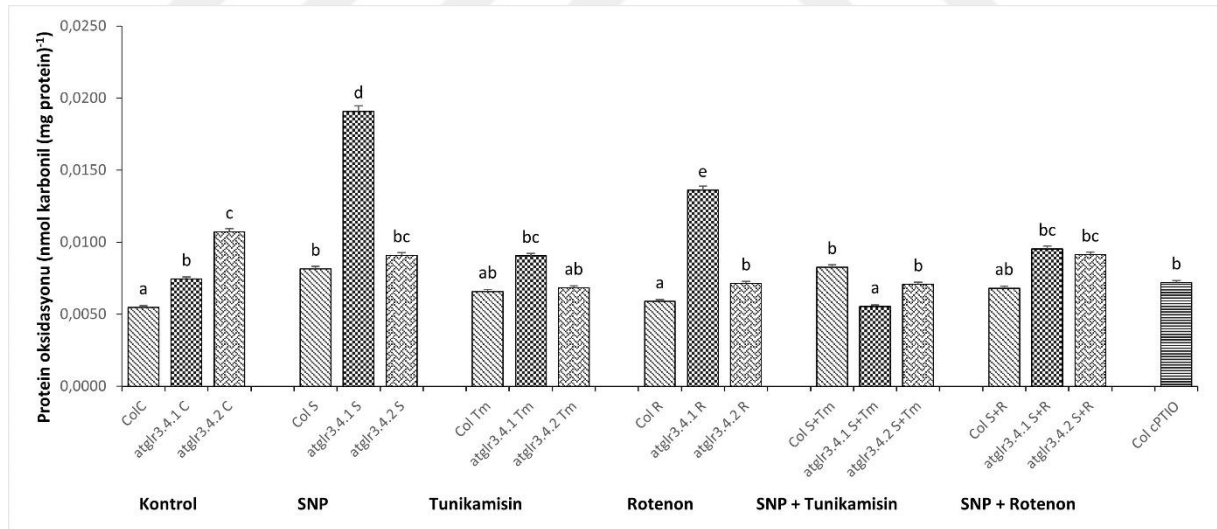
Normal koşullarda, GLR 3.4.1 ve GLR 3.4.2 geninin yoksunluğu TBARS miktarını %10 artırmıştır. Dışarıdan SNP uygulanması, Col.'un TBARS miktarını %34 artırmıştır. Ancak bu artış GLR 3.4.1 yoksunluğu ile %24 ve GLR 3.4.2 yoksunluğu ile de %31 azalmıştır. Tunikamisin (Tm) uygulanması Col.'un TBARS miktarını %18 artırmıştır. Aynı koşullar altında GLR 3.4.1 yoksunluğu TBARS miktarını %26 daha fazla artırırken GLR 3.4.2 yoksunluğu %20 azalmaya sebep olmamıştır. SNP varlığında Tm uygulaması kontrole göre Col.'de TBARS miktarını %12 artırmıştır. GLR 3.4.1 yoksunluğu ile S+Tm uygulanmış Col.'e göre TBARS miktarını %19, GLR 3.4.2 geninin yoksunluğu ise %7 artırmıştır. Dışarıdan R uygulaması, kontrole göre, Col.'un TBARS miktarını %11 artırmıştır. Ancak GLR 3.4.1 geninin yoksunluğu %12 oranında TBARS miktarını artırırken, GLR 3.4.2 geninin yoksunluğu ile de %22 azalmıştır. SNP altında R uygulaması Col.'un TBARS miktarını değiştirmemiştir. Ancak GLR 3.4.1 yoksunluğu TBARS miktarını %13 azaltmış ve GLR 3.4.2 yoksunluğu ise değiştirmemiştir. Dışarıdan cPTIO uygulanması ise Col. kontrole göre kıyaslandığında TBARS miktarı %11 azalmıştır (Şekil 3.21).



Şekil 3.21 Yabani tip *Arabidopsis thaliana* Col. ve atglr3.4 mutantlarına egzogen SNP, Tm, R, S+Tm, S+R ve cPTIO uygulamalarının TBARS miktarı üzerine etkisi. Harfler istatistiksel anlamda fark belirtmektedir ($p < 0,05$).

3.6 Protein Oksidasyonu

Normal koşullarda, GLR 3.4.1 ve GLR 3.4.2 geninin yoksunluğu protein oksidasyonunu sırasıyla %35 ve %95 artırmıştır. Dışarıdan SNP uygulanması, Col.'un protein oksidasyonunu %48 artırmıştır. Bununla birlikte bu artış GLR 3.4.1 yoksunluğu yaklaşık 3 kat daha ve GLR 3.4.2 yoksunluğu ile %11 daha fazla artışa sebep olmuştur. Tunikamisin (Tm) uygulanması Col.'un protein oksidasyonunu %20 artırmıştır. Aynı koşullar altında GLR 3.4.1 yoksunluğu protein oksidasyonunu %37 daha artırırken GLR 3.4.2 yoksunluğu ile değişiklik görülmemiştir. SNP varlığında Tm uygulaması kontrole göre Col.'de protein oksidasyonunu %51 artırmıştır. GLR 3.4.1 ve GLR 3.4.2 geninin yoksunluğu S+Tm uygulanmış Col.'e göre protein oksidasyonunu sırasıyla %32 ve %14 azaltmıştır. Dışarıdan R uygulaması, kontrole göre, Col.'un protein oksidasyonunu sadece %7 artırmıştır. Bu artış GLR 3.4.1 geninin yoksunluğu ile 1,5 kat daha artarken, GLR 3.4.2 geninin yoksunluğu ile %21 daha artmıştır. SNP altında R uygulaması Col.'un protein oksidasyonunu %24 artırmıştır. Ancak GLR 3.4.1 yoksunluğu protein oksidasyonunu %40 ve GLR 3.4.2 yoksunluğu %34 artırmıştır. Dışarıdan cPTIO uygulanması ise Col. kontrole göre kıyaslandığında protein oksidasyonunu %31 artırmıştır (Şekil 3.22).

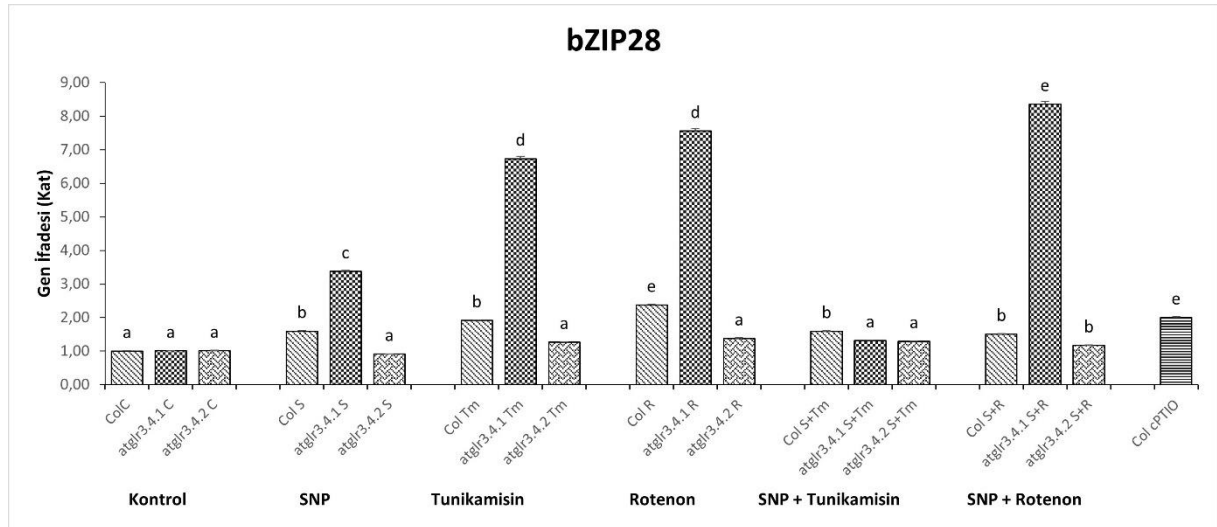


Şekil 3.22 Yabani tip *Arabidopsis thaliana* Col. ve atglr3.4 mutantlarına egzojen SNP, Tm, R, S+Tm, S+R ve cPTIO uygulamalarının protein oksidasyonu üzerine etkisi. Harfler istatistiksel anlamda fark belirtmektedir ($p < 0,05$).

3.7 Gen İfadelerinin Belirlenmesi

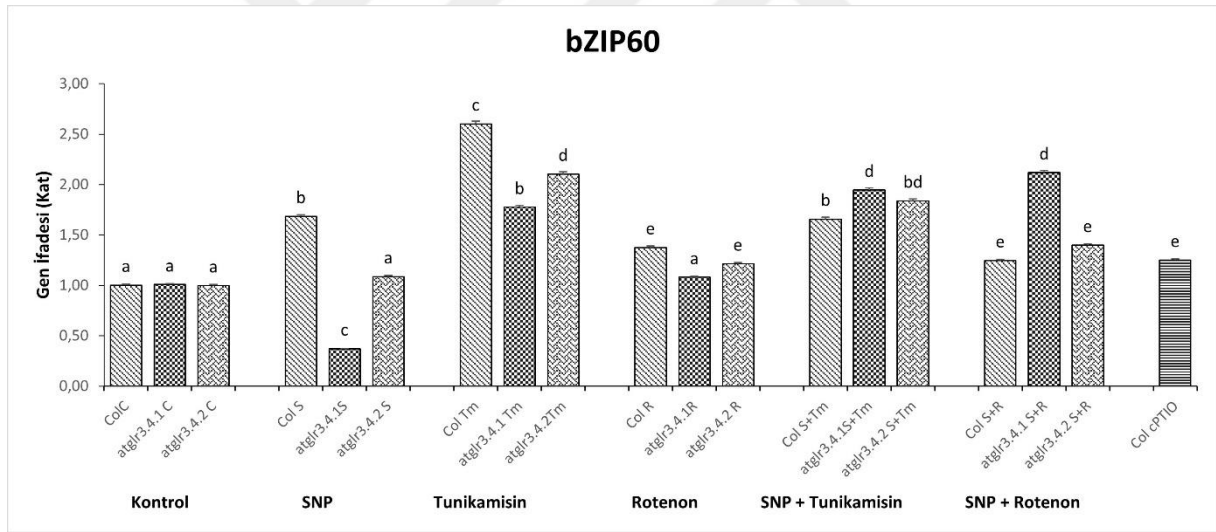
3.7.1 ER-İlişkili Genlerin Belirlenmesi

Normal koşullarda ile, dışarıdan SNP uygulanan gruplar kıyaslandığında, Col.'un bZIP28 transkripsiyonu 1,6 katına çıkmıştır. Bununla birlikte bZIP28 transkripsiyonu GLR 3.4.1 yoksunluğunda 1,5 kat daha artmıştır. Ancak GLR 3.4.2 yoksunluğu belirgin bir değişikliğe neden olmamıştır. Dışarıdan Tunikamisin (Tm) uygulanması Col.'un bZIP28 transkripsiyonunu yaklaşık 2 katına çıkarmıştır. Aynı koşullar altında GLR 3.4.1 yoksunluğu bu genin transkripsiyonunu 5 kat daha artırmış ancak GLR 3.4.2 geninin yoksunluğu değiştirmemiştir. SNP varlığında Tm uygulaması kontrole göre Col.'de bZIP28 transkripsiyonu 1,6 katına çıkarmıştır. GLR 3.4.1 ve GLR 3.4.2 geninin yoksunluğu S+Tm uygulanmış Col.'e göre benzer seviyede kalmıştır. Dışarıdan R uygulaması, kontrole göre, Col.'un bZIP28 transkripsiyonunu 2,3 katına çıkarırken, en büyük artış, GLR 3.4.1 geninin yoksunluğu ile yaklaşık 7,5 kattır. Ayrıca, GLR 3.4.2 geninin yoksunluğu bZIP28 transkripsiyonu 1,3 katına çıkarmıştır. SNP altında R uygulaması Col.'un bZIP28 transkripsiyonunu 1,5 katına çıkarırken, GLR 3.4.1 yoksunluğu bu genin transkripsiyonu S+R uygulanmış Col.'e göre yaklaşık 6 kat daha çıkarmıştır. GLR 3.4.2 yoksunluğu belirgin bir artışa sebep olmamıştır. Dışarıdan cPTIO uygulanması ise Col. kontrole göre kıyaslandığında bZIP28 transkripsiyonu 2 katına çıkarmıştır (Şekil 3.23).



Şekil 3.23 Yabani tip *Arabidopsis thaliana* Col. ve atglr3.4 mutantlarına egzogen SNP, Tm, R, S+Tm, S+R ve cPTIO uygulamalarının bZIP28 transkripsiyonu üzerine etkisi. Harfler istatistiksel anlamda fark belirtmektedir ($p < 0,05$).

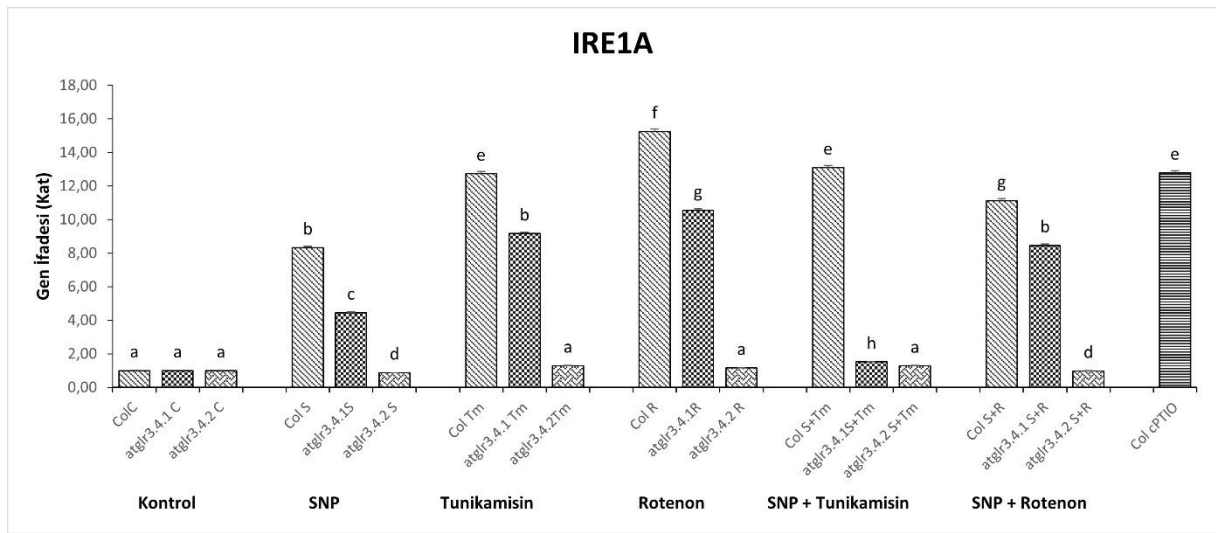
Dışarıdan SNP uygulaması, Col.'un bZIP60 transkripsiyonu 1,6 katına çıkarmıştır. Bununla birlikte GLR 3.4.1 yoksunluğunda bu genin ifadesi 6 kat azaltırken, GLR 3.4.2 yoksunluğu azalmaya neden olmamıştır. Dışarıdan Tunikamisin (Tm) uygulanması Col.'un bZIP60 transkripsiyonunu yaklaşık 2,6 katına çıkarmıştır. Aynı koşullar altında bu genin transkripsiyonunu GLR 3.4.1 ve GLR 3.4.2 yoksunluğu ile az azalmıştır. SNP varlığında Tm uygulaması kontrole göre Col.'de bZIP60 transkripsiyonu 1,6 katına çıkarmıştır. GLR 3.4.1 ve GLR 3.4.2 geninin yoksunluğu S+Tm uygulanmış Col.'e göre az miktarda artırmıştır. Dışarıdan R uygulaması, kontrole göre, Col.'un bZIP60 transkripsiyonunu 1,3 katına çıkartmış ve hem GLR 3.4.1 geninin yoksunluğu hem de GLR 3.4.2 geninin yoksunluğu bZIP60 transkripsiyonu Col.'e benzer seviyededir. SNP altında R uygulaması Col.'un bZIP60 transkripsiyonunu 1,2 katına çıkarırken, GLR 3.4.1 yoksunluğu bu genin transkripsiyonu S+R uygulanmış Col.'e göre yaklaşık 2 katına çıkarmış ancak GLR 3.4.2 yoksunluğu belirgin bir artışa sebep olmamıştır. Dışarıdan cPTIO uygulanması ise Col. kontrole göre kıyaslandığında bZIP60 transkripsiyonu 1,2 katına çıkarmıştır (Şekil 3.24).



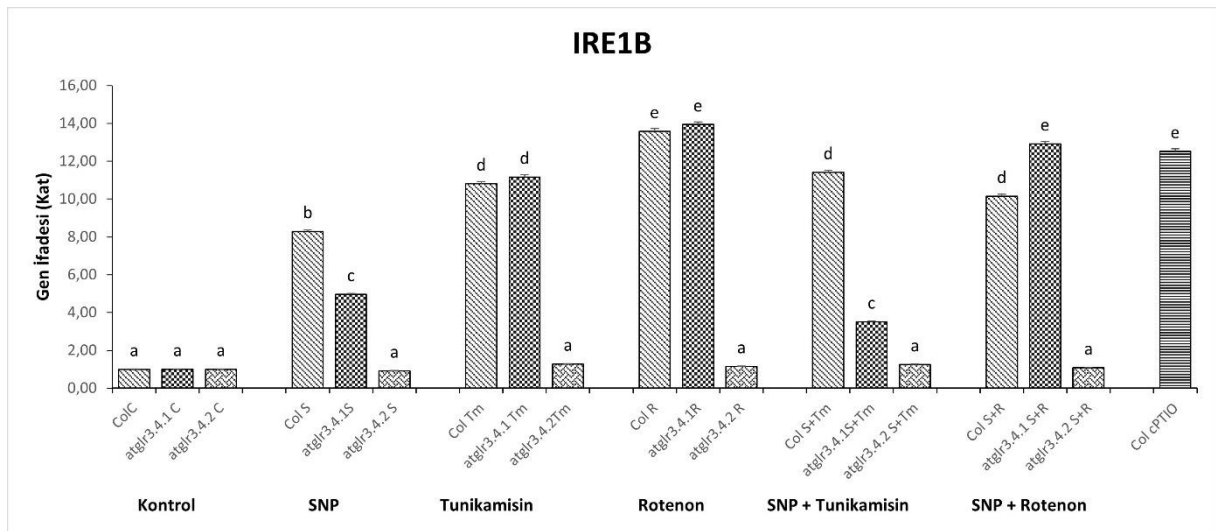
Şekil 3.24 Yabani tip *Arabidopsis thaliana* Col. ve atglr3.4 mutantlarına egzogen SNP, Tm, R, S+Tm, S+R ve cPTIO uygulamalarının bZIP60 transkripsiyonu üzerine etkisi. Harfler istatistiksel anlamda fark belirtmektedir ($p < 0,05$).

Dışarıdan SNP uygulaması, Col.'un IRE1A transkripsiyonunu 8 katına çıkarmıştır. Bu artış GLR 3.4.1 yoksunluğunda bu genin ifadesi 4 kat azaltmış ve GLR 3.4.2 yoksunluğu ile yaklaşık 10 kat azalmıştır. Dışarıdan Tunikamisin (Tm) uygulanması Col.'un IRE1A transkripsiyonunu yaklaşık 12 katına çıkarmıştır. Aynı koşullar altında bu genin transkripsiyonunu GLR 3.4.1 yoksunluğu ile 3 kat azalmış hatta, GLR 3.4.2 yoksunluğu ile de kontrol seviyesinde kalmıştır. SNP varlığında Tm uygulaması kontrole göre Col.'de IRE1A

transkripsiyonu 13 katına çıkarırken, GLR 3.4.1 ve GLR 3.4.2 geninin yoksunluğu S+Tm uygulanmış Col.'e göre azalırken kendi kontrolleri seviyesinde kalmıştır. Dışarıdan R uygulaması, kontrole göre, Col.'un IRE1A transkripsiyonunu 15 katına çıkarken, GLR 3.4.1 geninin yoksunluğu ile de azalmış, ancak GLR 3.4.2 geninin yoksunluğu değiştirmemiştir. SNP altında R uygulaması Col.'un IRE1A transkripsiyonunu 11 katına çıkarırken, GLR 3.4.1 yoksunluğu bu genin transkripsiyonunu S+R uygulanmış Col.'e göre 0,4 kat daha az artırmıştır. Dışarıdan cPTIO uygulanması ise Col. kontrole göre kıyaslandığında IRE1A transkripsiyonu 12 katına çıkarmıştır (Şekil 3.25). Yapılan uygulamalar ile IRE1B geninin transkripsiyonu IRE1A ile benzer artış ve azalışlara sebep olmuştur (Şekil 3.26).

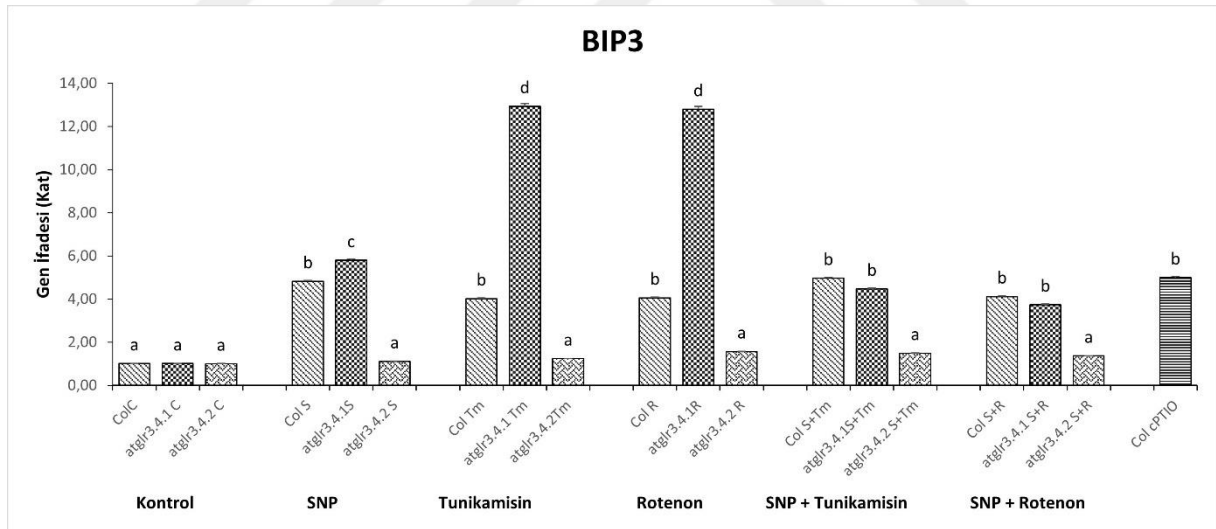


Şekil 3.25 Yabani tip *Arabidopsis thaliana* Col. ve atglr3.4 mutantlarına egzogen SNP, Tm, R, S+Tm, S+R ve cPTIO uygulamalarının IRE1A transkripsiyonu üzerine etkisi. Harfler istatistiksel anlamda fark belirtmektedir ($p < 0,05$).



Şekil 3.26 Yabani tip *Arabidopsis thaliana* Col. ve atglr3.4 mutantlarına egzogen SNP, Tm, R, S+Tm, S+R ve cPTIO uygulamalarının IRE1B transkripsiyonu üzerine etkisi. Harfler istatistiksel anlamda fark belirtmektedir ($p<0,05$).

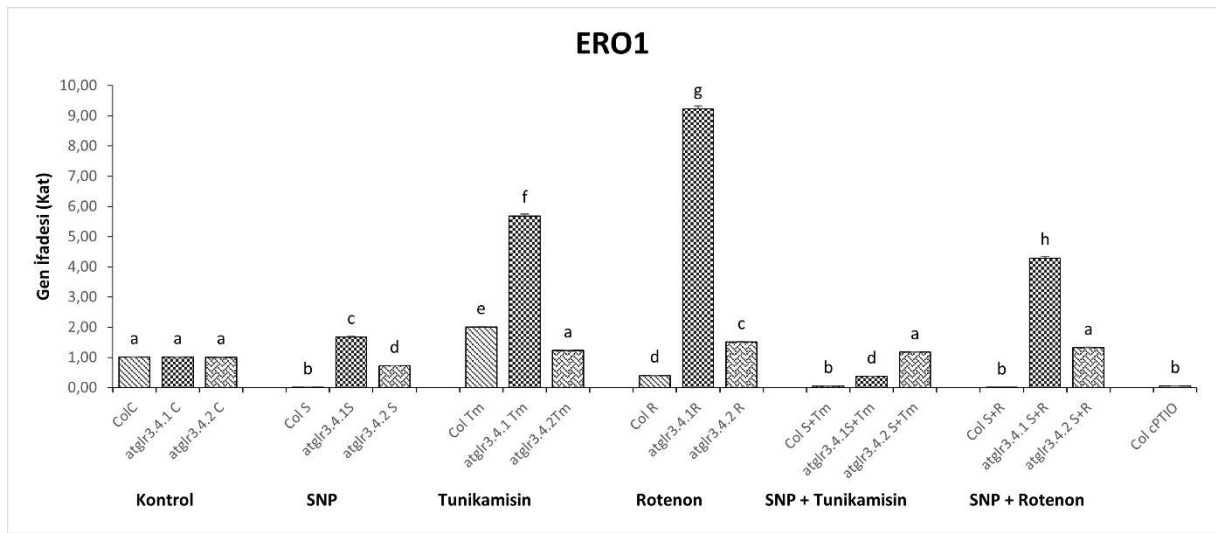
Dışarıdan SNP uygulaması, Col.'un BİP3 transkripsiyonunu 4,8 katına çıkarmıştır. GLR 3.4.1 yoksunluğunda bu genin ifadesi atarken, GLR 3.4.2 yoksunluğu belirgin bir değişikliğe neden olmamıştır. Tunikamisin (Tm) uygulanması Col.'un BİP3 transkripsiyonunu 4 katına çıkarmıştır. Aynı koşullar altında bu genin transkripsiyonunu GLR 3.4.1 yoksunluğu 3 kat daha attırmıştır ancak, GLR 3.4.2 yoksunluğu ile belirgin bir değişiklik olmamıştır. SNP varlığında Tm uygulaması kontrole göre Col.'de BİP3 transkripsiyonu 4 katına çıkmış, GLR 3.4.1 ile bu artış aynı seviyede iken GLR 3.4.2 geninin yoksunluğu S+Tm uygulanmış Col.'e göre 4 kat azalışa sebep olmuştur. Dışarıdan R uygulaması, Tm uygulaması ile benzer seviyelerde değişikliklere sebep olmuştur. SNP altında R uygulaması Col.'un BİP3 transkripsiyonunu 4 katına çıkarmıştır. GLR 3.4.1 yoksunluğu bu genin transkripsiyonunu S+R uygulanmış Col. ile benzer seviyede kalmasına sebep olmuştur. Dışarıdan cPTIO uygulanması ise Col. kontrole göre kıyaslandığında BİP3 transkripsiyonu 5 katına çıkarmıştır (Şekil 3.27).



Şekil 3.27 Yabani tip *Arabidopsis thaliana* Col. ve atglr3.4 mutantlarına egzogen SNP, Tm, R, S+Tm, S+R ve cPTIO uygulamalarının BİP3 transkripsiyonu üzerine etkisi. Harfler istatistiksel anlamda fark belirtmektedir ($p<0,05$).

Dışarıdan SNP uygulaması, Col.'un ERO1 transkripsiyonunda normal koşullara göre büyük oranda azalış belirlenmiştir. Ancak GLR 3.4.1 yoksunluğunda bu genin ifadesi 1,6 kat artırırken, GLR 3.4.2 yoksunluğu ile de artmıştır. Tunikamisin (Tm) uygulanması Col.'un

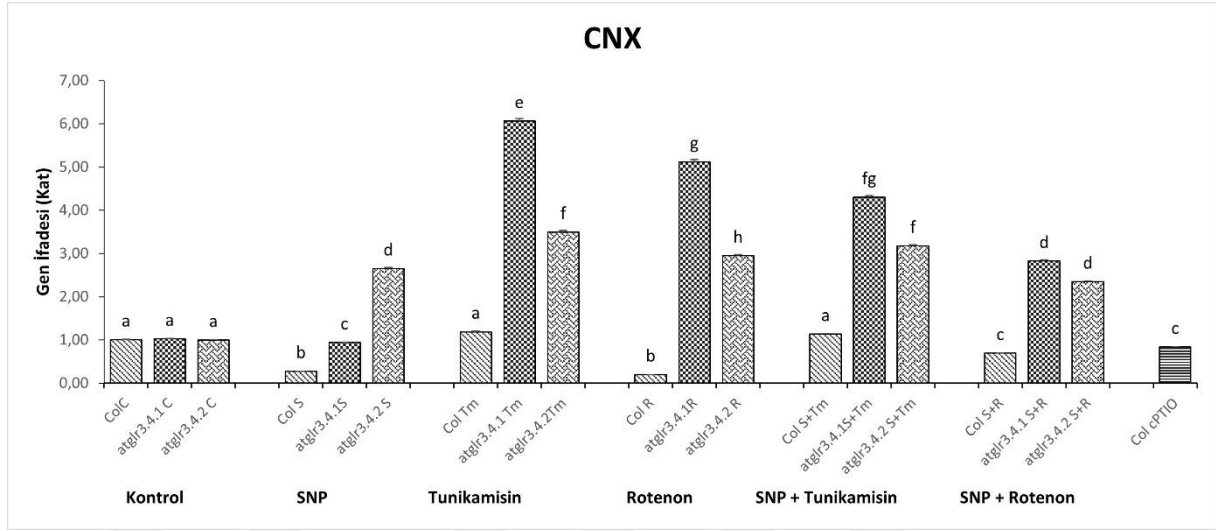
ERO1 transkripsiyonunu 2 katına çıkarmıştır. Aynı koşullar altında bu genin transkripsiyonunu GLR 3.4.1 yoksunluğu ile 2,5 katına çıkarmıştır ancak, GLR 3.4.2 yoksunluğu ile 2 kat azalmıştır. SNP varlığında Tm uygulaması kontrole göre sadece Tm uygulaması ile benzer şekilde değiştirmiştir. Dışarıdan R uygulaması, kontrole göre, Col.'un ERO1 transkripsiyonunu azaltırken, GLR 3.4.1 geninin yoksunluğu ile yaklaşık 9 katına ve GLR 3.4.2 geninin yoksunluğu ile de 4 katına çıkmıştır. SNP altında R uygulaması ERO1 transkripsiyonunu dışarıdan sadece R uygulaması ile benzer şekilde değiştirmiştir. Dışarıdan cPTIO uygulanması ise Col. kontrole göre kıyaslandığında ERO1 transkripsiyonu azaltmıştır (Şekil 3.28).



Şekil 3.28 Yabani tip *Arabidopsis thaliana* Col. ve atglr3.4 mutantlarına egzogen SNP, Tm, R, S+Tm, S+R ve cPTIO uygulamalarının ERO1 transkripsiyonu üzerine etkisi. Harfler istatistiksel anlamda fark belirtmektedir ($p < 0,05$).

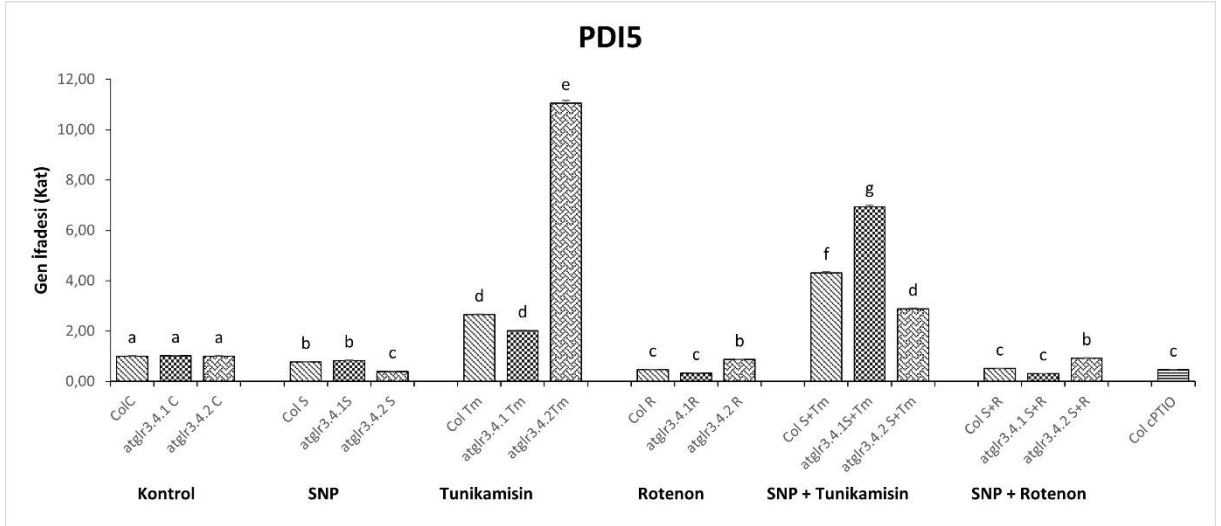
Dışarıdan SNP uygulaması, Col.'un CNX transkripsiyonunu yaklaşık 8 kat azaltmıştır. Bu azalış GLR 3.4.1 geninin yoksunluğu ile CNX transkripsiyonunda 4 kat artışa sebep olmuştur. Ancak GLR 3.4.2 yoksunluğunda bu genin ifadesi 2,6 kat artırmıştır. Tunikamisin (Tm) uygulanması Col.'un CNX transkripsiyonunu 1,2 katına çıkarmıştır. Aynı koşullar altında bu genin transkripsiyonunu GLR 3.4.1 yoksunluğu ile 6 katına ve GLR 3.4.2 yoksunluğu ile 3 katına çıkarmıştır. SNP varlığında Tm uygulaması kontrole göre Col.'de 1,13 artmıştır. GLR 3.4.1 geninin yoksunluğu Col. S+Tm'ye göre 4 katına ve GLR 3.4.2 geninin yoksunluğu ile de 3 katına çıkarmıştır. Dışarıdan R uygulaması, kontrole göre, Col.'un CNX transkripsiyonunu azaltırken, GLR 3.4.1 ve GLR 3.4.2 geninin yoksunluğu ile artışa sebep olmuştur. SNP altında R uygulaması kontrole göre, Col.'un CNX transkripsiyonunu azaltırken, GLR 3.4.1 ve GLR 3.4.2 yoksunluğu bu genin transkripsiyonunu S+R uygulanmış

Col.'e göre yaklaşık 2 katına çıkarmıştır. Dışarıdan cPTIO uygulanması ise Col. kontrole göre kıyaslandığında CNX transkripsiyonunu azaltmıştır (Şekil 3.29).



Şekil 3.29 Yabani tip *Arabidopsis thaliana* Col. ve atglr3.4 mutantlarına egzogen SNP, Tm, R, S+Tm, S+R ve cPTIO uygulamalarının CNX transkripsiyonu üzerine etkisi. Harfler istatistiksel anlamda fark belirtmektedir ($p < 0,05$).

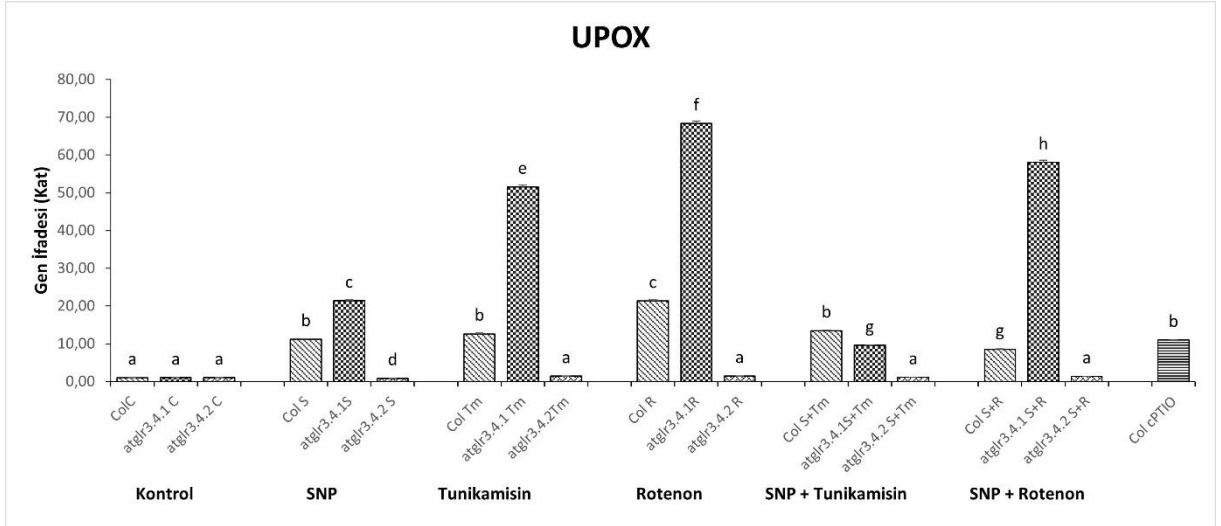
Dışarıdan SNP uygulaması, Col.'un, GLR 3.4.1 ve GLR 3.4.2 geninin yoksunluğu PDI5 transkripsiyonunda normal koşullara göre azalmaya sebep olmuştur. Tunikamisin (Tm) uygulanması Col.'un PDI5 transkripsiyonunu 2,6 artırırken, GLR 3.4.1 yoksunluğu değişikliğe sebep olmazken, bu artış GLR 3.4.2 yoksunluğu ile yaklaşık 5 kat daha artmıştır. SNP varlığında Tm uygulaması kontrole göre Col.'de PDI5 transkripsiyonunda 4 katına çıkarken, GLR 3.4.1 geninin yoksunluğu Col. S+Tm'ye göre 1,5 katına çıkartırken, GLR 3.4.2 geninin yoksunluğu ile de yaklaşık 2 kat azalmıştır. Dışarıdan R uygulaması, kontrole göre, Col.'un PDI5 transkripsiyonunda azalma görülmüştür. SNP altında R uygulaması PDI5 transkripsiyonunda R uygulaması ile benzer şekilde azalmıştır. Dışarıdan cPTIO uygulanması ise Col. kontrole göre kıyaslandığında PDI5 transkripsiyonunu azaltmıştır (Şekil 3.30).



Şekil 3.30 Yabani tip *Arabidopsis thaliana* Col. ve atglr3.4 mutantlarına egzogen SNP, Tm, R, S+Tm, S+R ve cPTIO uygulamalarının PDI5 transkripsiyonu üzerine etkisi. Harfler istatistiksel anlamda fark belirtmektedir ($p < 0,05$).

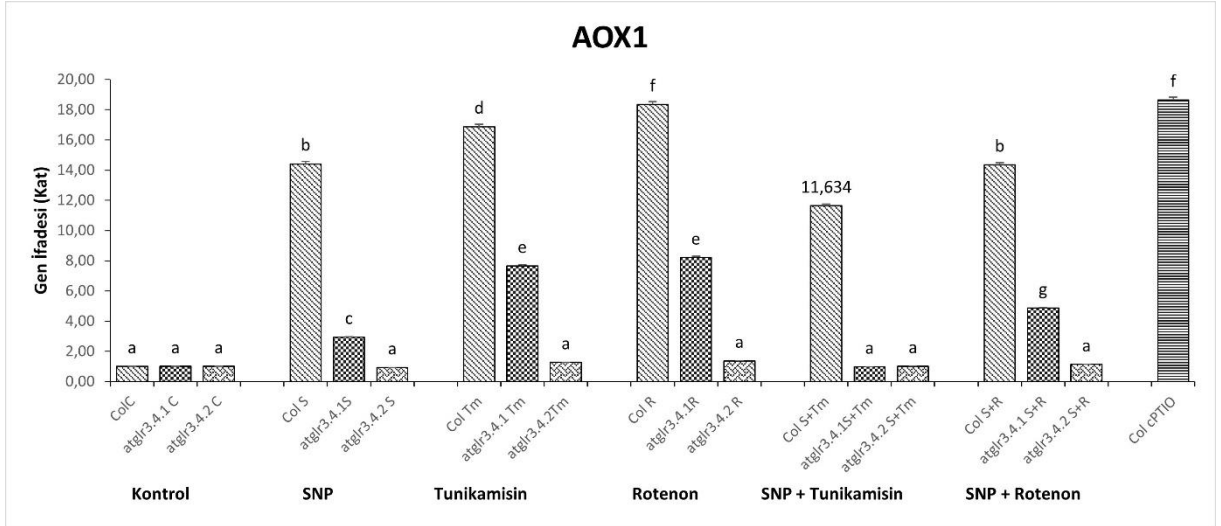
3.7.2 Mitokondri-İlişkili Genlerin İfadesi

Dışarıdan SNP uygulaması, Col.'un, UPOX transkripsiyonunu 11 katına çıkarmıştır. Bu artış, GLR 3.4.1 geninin yoksunluğu ile 2 katına çıkarmıştır. GLR 3.4.2 geninin yoksunluğu ile UPOX transkripsiyonunda yaklaşık 10 kata kadar azaltmıştır. Tunikamisin (Tm) uygulanması Col.'un UPOX transkripsiyonunu 12 kat artırırken, GLR 3.4.1 yoksunluğu Tm uygulanmış Col.'e göre 4 katına çıkarmıştır. GLR 3.4.2 yoksunluğu ise değişikliğe sebep olmamıştır. SNP varlığında Tm uygulaması kontrole göre Col.'de UPOX transkripsiyonunda 13 katına çıkartırken, GLR 3.4.1 geninin yoksunluğu ile azalırken, GLR 3.4.2 geninin yoksunluğu ile bir değişiklik gözlenmemiştir. Dışarıdan R uygulaması, kontrole göre, Col.'un UPOX transkripsiyonunda 21 kat artışa sebep olurken, GLR 3.4.1 geninin yoksunluğu Col. S+R'ye göre yaklaşık 3 kat artmış ancak GLR 3.4.2 ile kontrol seviyesinde kalmıştır. SNP altında R uygulaması UPOX transkripsiyonunda 8 kat artışa sebep olmuştur. Ancak GLR 3.4.1 geninin yoksunluğu Col. S+R'ye göre yaklaşık 6 katına çıkmış, GLR 3.4.2 ile kontrol ile aynı seviyede kalmıştır. Dışarıdan cPTIO uygulanması ise Col. kontrole göre kıyaslandığında UPOX transkripsiyonunu 10 katına çıkarmıştır (Şekil 3.31).



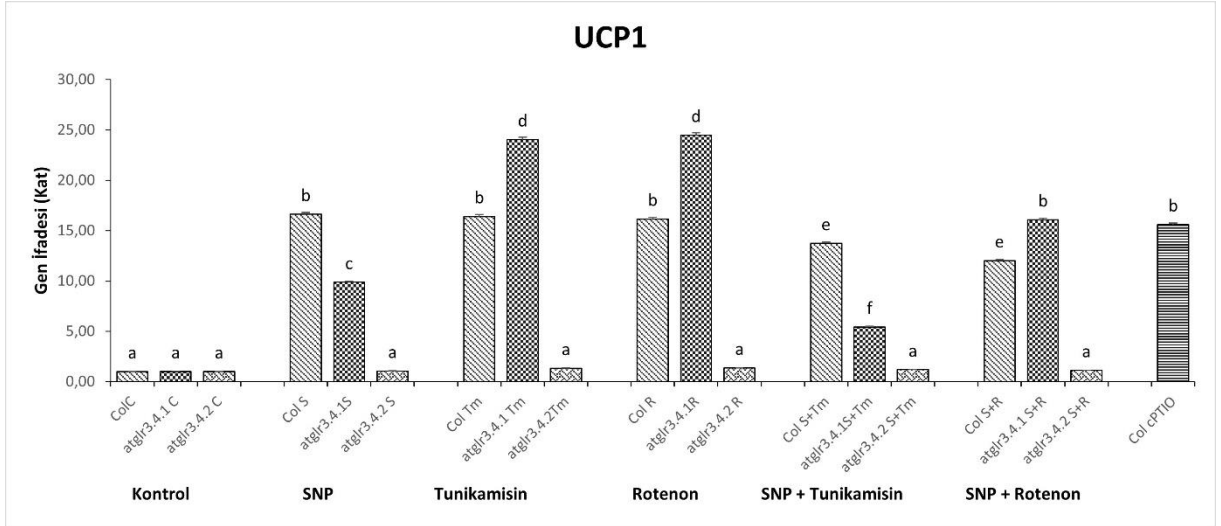
Şekil 3.31 Yabani tip *Arabidopsis thaliana* Col. ve atglr3.4 mutantlarına egzojen SNP, Tm, R, S+Tm, S+R ve cPTIO uygulamalarının UPOX transkripsiyonu üzerine etkisi. Harfler istatistiksel anlamda fark belirtmektedir ($p < 0,05$).

Dışarıdan SNP uygulaması, Col.'un, AOX1 transkripsiyonunu 14 katına çıkarmıştır. Bu artış GLR 3.4.1 geninin yoksunluğunda yaklaşık 7 kat azalmıştır. Ancak, GLR 3.4.2 geninin yoksunluğu AOX1 transkripsiyonunda normal koşullara göre değişikliğe sebep olmamıştır. Tunikamisin (Tm) uygulanması Col.'un AOX1 transkripsiyonunu 16 kat artırırken, kontrole göre GLR 3.4.1 yoksunluğu Tm uygulanması ile yaklaşık 2,5 kat azalmış ancak GLR 3.4.2 yoksunluğu ile azalarak kontrol seviyesinde kalmıştır. SNP varlığında Tm uygulaması kontrole göre Col.'de AOX1 transkripsiyonunda 11 katına çıkartırken, GLR 3.4.1 ve GLR 3.4.2 yoksunluğu ile yaklaşık 10 kat azalarak kontrol seviyesinde kalmıştır. Uygulamalar arasında en büyük artış dışarıdan R uygulaması ile, kontrole göre, Col.'un AOX1 transkripsiyonudur. Bu artış 18,5 kattır. GLR 3.4.1 geninin yoksunluğu ise bu artışı yaklaşık 2,5 kat azaltmış ancak GLR 3.4.2 yoksunluğu AOX1 transkripsiyonunu azaltarak kontrol seviyesine getirmiştir. SNP altında R uygulaması AOX1 transkripsiyonunda 14 kat artışa sebep olmuştur. Ancak bu artış GLR 3.4.1 geninin yoksunluğu ile yaklaşık 2,5 kat azalırken, azalarak kontrol seviyesinde kalmıştır. Dışarıdan cPTIO uygulanması ise Col. kontrole göre kıyaslandığında AOX1 transkripsiyonunu 18 katına çıkarmıştır (Şekil 3.32).



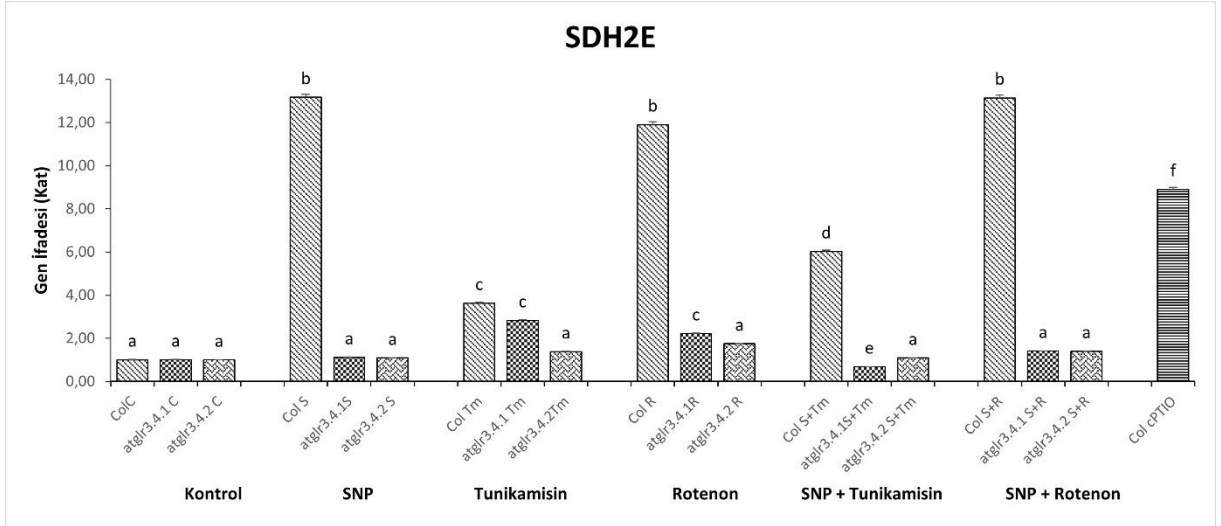
Şekil 3.32 Yabani tip *Arabidopsis thaliana* Col. ve atglr3.4 mutantlarına egzojen SNP, Tm, R, S+Tm, S+R ve cPTIO uygulamalarının AOX1 transkripsiyonu üzerine etkisi. Harfler istatistiksel anlamda fark belirtmektedir ($p < 0,05$).

Dışarıdan SNP uygulaması, Col.'un, UCP1 transkripsiyonunu 16 katına çıkarmıştır. Bu artış GLR 3.4.1 geninin yoksunluğu ile yaklaşık 1,5 kat azalırken, GLR 3.4.2 geninin yoksunluğu UCP1 transkripsiyonunu azaltarak kontrol seviyesine getirmiştir. Tunikamisin (Tm) uygulanması Col.'un UCP1 transkripsiyonunu 16 kat artırırken, bu artış GLR 3.4.1 yoksunluğu ile 1,6 kat daha da artırmış ancak GLR 3.4.2 yoksunluğu ise azaltarak kontrol seviyesine getirmiştir. Dışarıdan R uygulaması ile tunikamisin uygulamasında artışlar tüm gruplar da aynı şekilde belirlenmiştir. SNP varlığında Tm uygulaması kontrole göre Col.'de UCP1 transkripsiyonunda yaklaşık 14 katına çıkartırken, bu artış GLR 3.4.1 yoksunluğu ile 2,6 kat azalmasına sebep olurken GLR 3.4.2 yoksunluğu ise bu artışı azaltarak kontrol seviyesine getirmiştir. SNP altında R uygulaması UCP1 transkripsiyonunda 12 kat artışa sebep olmuştur. GLR 3.4.1 geninin yoksunluğu ile bu artış 1,3 katına çıkmış ancak GLR 3.4.2 yoksunluğu ile azaltarak kontrol seviyesinde kalmıştır. Dışarıdan cPTIO uygulanması ise Col. kontrole göre kıyaslandığında UCP1 transkripsiyonunu 15 katına çıkarmıştır (Şekil 3.33).



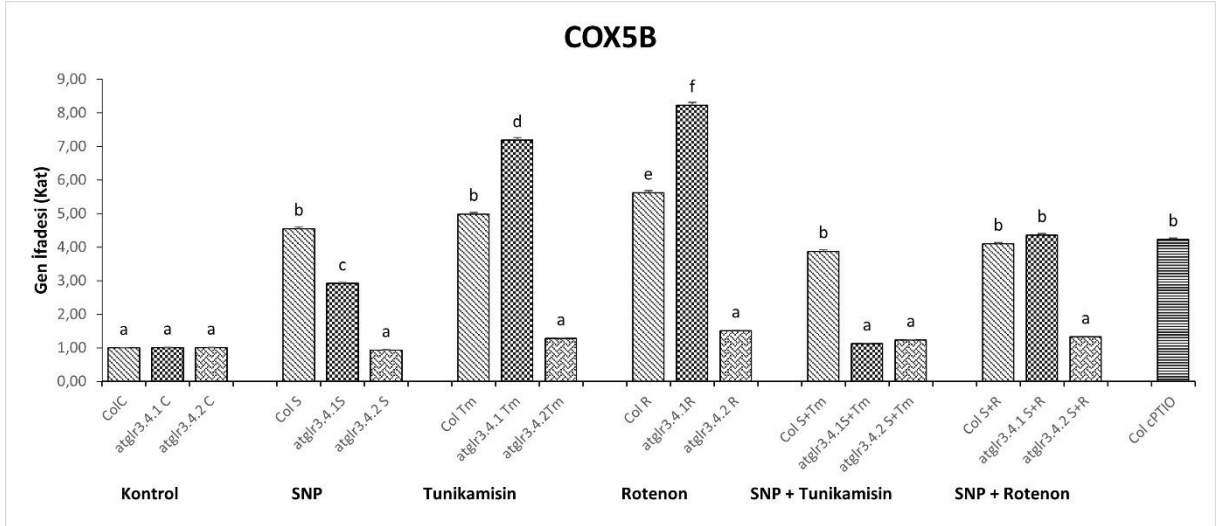
Şekil 3.33 Yabani tip *Arabidopsis thaliana* Col. ve atglr3.4 mutantlarına egzojen SNP, Tm, R, S+Tm, S+R ve cPTIO uygulamalarının UCP1 transkripsiyonu üzerine etkisi. Harfler istatistiksel anlamda fark belirtmektedir ($p < 0,05$).

SNP uygulaması, Col.'un, SDH2E transkripsiyonunu 13 katına çıkarmıştır. GLR 3.4.1 ve GLR 3.4.2 geninin yoksunluğu SDH2E transkripsiyonunu azaltarak kontrol seviyesine kalmasına sebep olmuştur. Tunikamisin (Tm) uygulanması Col.'un SDH2E transkripsiyonunu yaklaşık 4 kat artırırken, bu artış GLR 3.4.1 yoksunluğu ile yaklaşık 2 kat azalmış ve GLR 3.4.2 yoksunluğu ile azaltarak kontrol seviyesinde kalmıştır. SNP varlığında Tm uygulaması kontrole göre Col.'de SDH2E transkripsiyonunu yaklaşık 6 katına çıkartırken, kontrole göre GLR 3.4.1 ve GLR 3.4.2 yoksunluğu azaltarak kontrol seviyesine gelmiştir. Dışarıdan R uygulaması, kontrole göre, Col.'un SDH2E transkripsiyonunda 12 kat artışa sebep olurken, GLR 3.4.1 geninin yoksunluğu ile bu artış yaklaşık 5 kat azalırken GLR 3.4.2 geninin yoksunluğu SDH2E transkripsiyonunu azaltarak kontrol seviyesine gelmiştir. SNP altında R uygulaması SDH2E transkripsiyonunda 13 kat artışa sebep olmuştur. GLR 3.4.1 ve GLR 3.4.2 geninin yoksunluğu ile bu artış azaltarak kontrol seviyesine gelmiştir. Dışarıdan cPTIO uygulanması ise Col. kontrole göre kıyaslandığında SDH2E transkripsiyonunu 9 katına çıkarmıştır (Şekil 3.34).



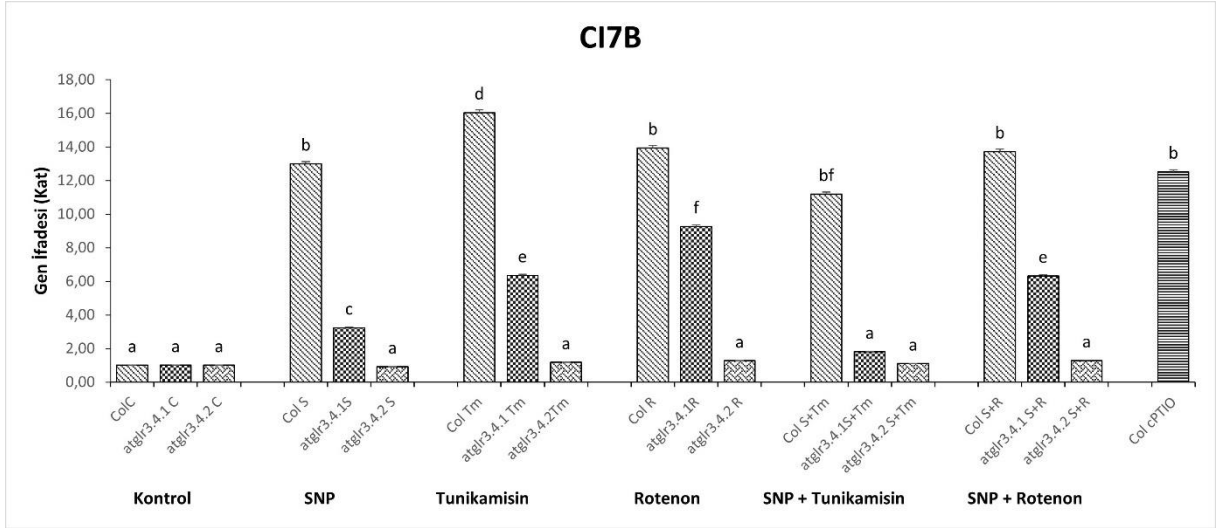
Şekil 3.34 Yabani tip *Arabidopsis thaliana* Col. ve atglr3.4 mutantlarına egzojen SNP, Tm, R, S+Tm, S+R ve cPTIO uygulamalarının SDH2E transkripsiyonu üzerine etkisi. Harfler istatistiksel anlamda fark belirtmektedir ($p < 0,05$).

Dışarıdan SNP uygulaması, Col.'un, COX5B transkripsiyonunu 4 katına çıkarmıştır. Bu artış, GLR 3.4.1 geninin yoksunluğu ile yaklaşık 1,5 kat azalmasına sebep olmuştur. GLR 3.4.2 geninin yoksunluğu ise COX5B transkripsiyonunu 4 kat azaltarak kontrol seviyesine getirmiştir. Tunikamisin (Tm) uygulanması Col.'un COX5B transkripsiyonunu yaklaşık 5 kat artırırken, kontrole göre GLR 3.4.1 yoksunluğu Tm uygulanması ile yaklaşık 7 kat artırmış ve bu artış GLR 3.4.2 yoksunluğu ile yaklaşık 1,4 kat daha artırmıştır. SNP varlığında Tm uygulaması kontrole göre Col.'de COX5B transkripsiyonunu yaklaşık 4 katına çıkartırken, bu artışı GLR 3.4.1 ve GLR 3.4.2 yoksunluğu azaltarak kontrol seviyesine getirmiştir. Dışarıdan R uygulaması, kontrole göre, Col.'un COX5B transkripsiyonunda 6 kat artışa sebep olurken, GLR 3.4.1 yoksunluğu kontrole göre 8 katına çıkarmış ancak GLR 3.4.2 geninin yoksunluğu kontrole göre değişmemiştir. SNP altında R uygulaması COX5B transkripsiyonunda 4 kat artışa sebep olmuştur. Bu artışı GLR 3.4.1 yoksunluğu 1,5 kat daha fazla artırmış, ancak GLR 3.4.2 geninin yoksunluğu azaltarak kontrol seviyesine getirmiştir. Dışarıdan cPTIO uygulanması ise Col. kontrole göre kıyaslandığında COX5B transkripsiyonunu 4 katına çıkarmıştır (Şekil 3.35).



Şekil 3.35 Yabani tip *Arabidopsis thaliana* Col. ve atglr3.4 mutantlarına egzojen SNP, Tm, R, S+Tm, S+R ve cPTIO uygulamalarının COX5B transkripsiyonu üzerine etkisi. Harfler istatistiksel anlamda fark belirtmektedir ($p < 0,05$).

Dışarıdan SNP uygulaması, Col.'un, CI7B transkripsiyonunu 13 katına çıkartmıştır. Ancak bu artış, GLR 3.4.1 geninin yoksunluğu ile 4 kat azaltmıştır. Bunun dışında, GLR 3.4.2 geninin yoksunluğu CI7B transkripsiyonunu azaltarak kontrol seviyesine getirmiştir. Tunikamisin (Tm) uygulanması Col.'un CI7B transkripsiyonunu 16 kat artırırken, bu artış GLR 3.4.1 yoksunluğu ile yaklaşık 3 kat azaltmış, GLR 3.4.2 yoksunluğu ile de azaltarak kontrol seviyesine inmiştir. SNP varlığında Tm uygulaması kontrole göre Col.'de CI7B transkripsiyonunu yaklaşık 11 katına çıkartırken, GLR 3.4.1 ve GLR 3.4.2 yoksunluğu ile bu artış azaltarak kontrol seviyesine inmiştir. Dışarıdan R uygulaması, kontrole göre, Col.'un CI7B transkripsiyonunda 14 kat artışa sebep olurken, bu artış GLR 3.4.1 yoksunluğu kontrole göre azalmış ancak GLR 3.4.2 geninin yoksunluğu ile azaltarak kontrol seviyesine getirmiştir. SNP altında R uygulaması CI7B transkripsiyonunda 13 kat artışa sebep olmuştur. GLR 3.4.1 yoksunluğu ile bu artış 2 kat azalmaya sebep olurken GLR 3.4.2 geninin yoksunluğu ile azaltarak kontrol seviyesine getirmiştir. Dışarıdan cPTIO uygulanması ise Col. kontrole göre kıyaslandığında COX5B transkripsiyonunu 12 katına çıkarmıştır (Şekil 3.36).



Şekil 3.36 Yabani tip *Arabidopsis thaliana* Col. ve atglr3.4 mutantlarına egzojen SNP, Tm, R, S+Tm, S+R ve cPTIO uygulamalarının CI7B transkripsiyonu üzerine etkisi. Harfler istatistiksel anlamda fark belirtmektedir ($p < 0,05$).

4. TARTIŞMA

Bilindiği üzere *Arabidopsis thaliana* bitki biyolojisinin model organizması olarak pek çok çalışmada kullanılmaktadır. Bunun dışında, son yıllarda özellikle insan hastalıklarının temelini oluşturan moleküler mekanizmaların anlaşılmasında da çok değerli bir araç olarak gösterilmektedir. *A. thaliana* ve insan genomları karşılaştırıldığında, insan hastalıklarına neden olan genlerin yüksek yüzdesinin *Arabidopsis*'te de var olduğu tanımlanmıştır (Xu and Moller, 2011). *Arabidopsis*'in kullanıldığı bilimsel çalışmalardan elde edilen sonuçlarla, insanlardaki nörodejeneratif hastalıkların oluşumuna neden olan hücresel yollardaki eksiklikler tamamlanmaya çalışılmaktadır. Yapılan araştırmalar, PreP (Pre-sequence Proteaz) ve DJ-1/PARK (Parkinson ilişkili gen DJ-1) genlerindeki mutasyonların yanında beyin hücre zarındaki NMDAR (Glutamat reseptörü) aracılıklı NO birikiminin teşvik ettiği, PDI (Protein Disülfit İzomeras) enziminin inhibisyonu ile oluşan mitokondri ve endoplazmik retikulum (ER) stresinin insanlarda Alzheimer ve Parkinson'a neden olduğunu göstermiştir. (Uehara et al., 2006). Diğer yandan Lam et al., (1998) tarafından *Arabidopsis* hücre zarında da insanlardaki NMDAR-benzeri GLR reseptörlerinin olduğu keşfedilmiştir. Hatta bu reseptörlerden GLR3.4.1'in aktivasyon eksikliğine bağlı olarak sitosole giren Ca^{2+} miktarının azaldığı bulunmuştur (Cheng et al., 2018). Ancak GLR aktivasyonuna bağlı olarak NO miktarındaki değişimin hücre içi ROS-RNS üretimini ve antioksidan savunma sistemini nasıl etkilediği bilinmemektedir. Ayrıca bu reseptördeki aktivasyon kaybının, hücrede metabolik faaliyetlerin en yoğun olduğu iki organel olan mitokondri ve ER stresi üzerindeki etkilerinin de neler olduğu konusu henüz netlik kazanmamıştır. Bu nedenle araştırmamızda *A. thaliana*'daki GLR 3.4 reseptöründeki aktivasyon azalışının, hücre içi ROS/RNS dengesi, antioksidan savunma sistemi ve ER/Mitokondri organel stresleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla araştırmamızda bitki materyali olarak AtGLR3.4 (atglr3.4-1 ve atglr3.4-2) olgun rozet yaprakları kullanılmıştır.

GLR 3.4 reseptörlerinin hücre içi NO miktarı üzerindeki etkisi:

Çalışmamızda, GLR3.4.1 ve GLR3.4.2 yoksunluğu NO miktarında belirgin bir azalmaya neden olmuştur. Benzer olarak NO süpürücüsü olan cPTIO uygulanması da pek çok çalışmada olduğu gibi (ör: Xiong et al., 2009; Perlikowski et. al., 2022) NO miktarını azaltmıştır. Hatta bu azalma oranının, GLR3.4.1 ve GLR3.4.2 yoksunluğuna bağlı NO miktarındaki azalma oranına benzer oranda olması dikkat çekicidir. Ayrıca, SNP-teşvikli nitrosatif stres, Tunikamisin-teşvikli ER stresi ve Rotenon-teşvikli mitokondriyal stres Col.'un NO miktarında yaklaşık %13 artışa neden olmuştur. Bu stresler altındaki atglr3.4.1 ve atglr3.4.2 mutantlarının NO miktarı ise, Col.'ünkiyle benzer orandadır. Dolayısıyla GLR 3.4

aktivasyonun azalması nitrosatif, ER ve mitokondriyal strese bağılı NO miktarındaki azalmayı değiştirmemiştir. Diğer yandan bu çalışmada, tek başına streslerle (nitrosatif, ER, mitokondriyal stresler) karşılaştırıldığında nitrosatif+ER stresi ve nitrosatif+mitokondriyal stresin birlikte uygulanması, Col.'de NO miktarını daha çok artırmıştır. Bununla birlikte NO miktarındaki bu artış oranının, Col.'de ve atglr3.4 mutantlarında da aynı olduğu tespit edilmiştir.

Bitki sistemlerinde NO etimi nitrat bağımlı yolak ve L-arginin bağımlı yolak ile gerçekleşir. NO'nun temel olarak memeli hücrelerinde NOS enzimleri ailesi aracılığıyla üretildiği bilinmektedir. NOS enzimi, L-arginin'den NO'nun üretimini katalize eder (Domingos et al., 2015). Bitkilerde NOS varlığı veya benzer enzimler hakkında daha az kanıt vardır, ancak Guo et al., (2003) *Arabidopsis thaliana*'da memelilere benzer şekilde AtNOS1 geninin varlığını tanımlamıştır. AtNOS1, nitrik oksit ilişkili-1 geni olarak adlandırılmıştır (Crawford et al., 2006). Çalışmamızda, GLR3.4.1 ve GLR3.4.2 yoksunluğu, kontrol koşullarında NOS aktivitesinin azalmasına sebep olmuştur. Bu durum normal koşullar altında GLR mutantlarındaki NO miktarındaki azalmanın nedeni olabilir. Benzer şekilde, kontrol koşulları ile karşılaştırıldığında, nitrosatif stres altında NOS aktivitesi tüm genotiplerde azalmıştır. Sonuçlarımıza paralel olarak Xiong et al. (2009)'da SNP uygulaması ile NOS aktivitesinin azaldığı belirtilmiştir. Bilindiği gibi NOS tarafından başlatılan NO etimi sonucu artan NO seviyesi, NOS aktivitesini geri besleme yoluyla düzenlenmektedir. Artan NO düzeyleri NOS aktivitesini inhibe eder. Bu geri besleme mekanizması, hücresel NO seviyelerinin dengelenmesine ve kontrol edilmesine yardımcı olur. Bu sebeple, alışmamızda SNP verilmesi ile artan NO miktarının NOS aktivitesinin azalmasına sebep olabileceğini göstermektedir. Hem bitkilerde hem de memelilerde yapılan çalışmalar ile bu geri besleme mekanizması açıkça görülmüştür (Assreuy et al., 1993; Ravi et al., 2003; Xiong et al., 2009).

Nitrosatif stres ile karşılaştırdığımızda, ER stresi ve mitokondriyal stres altındaki Col. genotipinde NOS aktivitesi belirgin olarak artmıştır. Aksine, Col. genotipi ile karşılaştırıldığında atglr3.4.1 ve atglr3.4.2 mutantlarında NOS aktivitesi belirgin olarak azalmıştır. Yine literatür ile uyumlu olarak (Xiong et al., 2009) cPTIO uygulaması da NOS aktivitesini azaltmıştır. Iova et al., (2023)'de bahsedildiği gibi, Col.'deki ER stresi, fonksiyonlarda bozulmaya ve dolayısıyla Ca^{2+} salınımına yol açarak NO seviyesini düzenlemek amacıyla NOS'u aktive etmiş olabilir, bu da NO miktarındaki artışın nedeni olabilir. Col.'n aksine GLR mutantlarındaki NOS aktivitesindeki azalmaya karşılık NO miktarındaki artış, ER stresi altındaki atglr3.4.1 ve atglr3.4.2 mutantlarındaki farklı bir NO

sentez yolağının (nitrat redüktaz gibi) aktif olabileceğini göstermektedir. Diğer yandan sıçanlarda yapılan bir çalışmada ise, mtNOS'un kompleks I ile fonksiyonel olarak ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada, Kompleks I aktive olduğunda mtNOS yüksek aktivite göstermiştir (Parihar et al., 2007). Bu bağlamda, çalışmamızda mitokondriyal stres altında gözlenen NOS aktivitesindeki azalma, rotenonun Kompleks I üzerindeki inhibe edici etkisinden kaynaklanabilir. ER stresine benzer olarak, mitokondriyal stres altındaki mutantlarda gözlenen NOS aktivitesindeki azalmaya rağmen, NO miktarında meydana gelen artış, mutantlarda aktif hale gelen başka bir NO sentez yolağının olduğunu gösterebilir.

S-Nitrosoglutasyon (GSNO), NO'nun depolanma ve taşınma şeklidir. Bu şekilde NO sinyalini diğer proteinlere aktarabildiğinden (trans-nitrosilasyon) NO sinyallemede çok önemli bir işleve sahiptir. GSNO seviyesi ve dolayısıyla S-nitrosillenmiş proteinlerin seviyesi, GSNO-redüktaz (GSNOR) tarafından düzenlenir. GSNOR, memelilerde, mayalarda ve bitkilerde oldukça korunmuş bir enzimdir ve nitrosatif stres altındaki hücreleri korumak için gereklidir (Corpas et al., 2011). Bu enzim, S-nitrozotiol (SNO) seviyesini düzenler ve NO sinyalinin ayarlanmasında dengeleyici bir rol oynamaktadır (Lindermayr, 2018). NO in vivo ortamda çok kısa bir yarı ömre sahipken, SNO'lar genellikle daha karardır. SNO'lar da NO'nun taşınması ve depolanması yanı sıra, hücre sinyallemede ve stres koşullarında yer alan posttranslasyonel modifikasyonlarda rol alabilir (Lindermayr and Durner, 2009). Bu çalışmada, kontrol koşulları altında GLR3.4.2 yoksunluğu SNO miktarını değıştirmezken GLR3.4.1 noksanlığı ise SNO miktarını yaklaşık 2 kat artırmıştır. Bunun aksine aynı koşullarda GSNOR aktivitesi GLR3.4.2 yoksunluğunda değışmezken, GLR3.4.1 yoksunluğunda ise azalmıştır. Normal koşullarda, hücreler arası SNO içeriğinin GSNOR aktivitesi ile ters ilişkili olduğu daha önce birçok çalışmada ifade edilmiştir (Rusterucci et al., 2007; Lee et al., 2008). Bu bağlamda GLR mutantlarında NO dengesinin sürdürülebilirliğinde GSNOR aktivitesi ile SNO miktarı arasındaki antagonist ilişkinin önemli rol oynadığı söylenebilir. Beklenilenin aksine, atglr3.4.1 mutantında, nitrosatif, ER ve mitokondriyal stres koşullarının sebep olduğu GSNOR aktivitesi azalmasına rağmen SNO miktarı da azalmıştır. Burada GSNOR ve SNO arasında stres koşulları altında pozitif bir korelasyonun olduğu görölmüştür. Benzer bir sonuç Frungillo et al. (2013) tarafından da besin stresi altındaki *A. thaliana*'da elde edilmiştir. Ancak ilginç bir şekilde, adı geçen stres koşulları altındaki atglr3.4.2 mutantlarında SNO ve GSNOR arasında negatif bir ilişki tespit edildi. Örneğin bu mutant ER stres altında SNO miktarını artırırken GSNOR miktarını belirgin olarak azalttı. Bu azalmanın nedeni ER stres altındaki atglr3.4.2 mutantlarındaki aşırı H₂O₂ birikimi

olabilir. Paraquat-teşvikli oksidatif stres altındaki *A. thaliana*'da, H_2O_2 miktarındaki artış GSNOR aktivitesinde azalmaya neden olmuştur (Kovacs et al., 2016). Benzer olarak Bai et al. (2012)'da soğuk stresi altındaki *Burmese grape*'de GSNOR aktivitesindeki azalış H_2O_2 miktarındaki artışla ilişkilendirmiştir. Bununla birlikte *Saccharomyces cerevisiae*'deki alkol dehidrogenaz (YADH1)'da spesifik sistein (Cys) aminoasitlerinin oksidatif modifikasyonlarından dolayı H_2O_2 tarafından inhibe edilir. Bu enzim yapısal olarak GSNOR ile ilişkilidir. H_2O_2 uygulamasından sonra YADH1'in Cys43 ve Cys153 oksitlenir. YADH1'in bu sisteinleri, *A. thaliana* GSNOR'unda sırasıyla Cys47 ve Cys177'e karşılık gelmektedir (Men and Wang, 2007). Bu bilgiler atglr3.4.2 mutantlarındaki GSNOR üzerinde H_2O_2 'nin inhibe edici etkisi olabileceği hipotezini desteklemektedir.

ROS'ların belirlenmesi:

AtGLR3.4, glutamat reseptör benzeri kanallar, Ca^{2+} 'a geçirgenlikleri ile dikkat çekmektedir (Vincill et al. 2012). Bilindiği gibi Ca^{2+} birçok hücrel fonksiyonun düzenlenmesinde ikincil mesajcı olarak rol oynamaktadır (Berridge, 2012). Ca^{2+} , ROS'larla birlikte diğer birçok sistem ve yolak ile iş birliği içindedir. Dolayısıyla hücre içindeki Ca^{2+} miktarındaki değişiklik bu sistem ve yolakların fonksiyonlarında da değişikliklere neden olmaktadır (Ermak and Davies, 2002). Örneğin, ROS sinyali ve Ca^{2+} sinyali arasında çift yönlü bir etkileşim vardır. Ca^{2+} sinyali ROS üretimi için gerekli iken ROS'larda kalsiyum sinyalini düzenleyebilirler. Bunun için Ca^{2+} 'un artmış seviyesi ROS-oluşturan enzimleri ve serbest radikallerin oluşumunu aktive eder (Görlach et al. 2015). Ca^{2+} 'a ek olarak, NO'nun da bitkilerde H_2O_2 üretimi için gerekli olduğu, bununla birlikte H_2O_2 'nin de özellikle stoma kapanmasında NO sentezini teşvik ettiği bilinmektedir (Lu et al., 2009; Liao et al.2012). Bu nedenle H_2O_2 ve NO arasındaki etkileşim bitkilerdeki birçok fizyolojik ve biyolojik cevabın hedefi olabilir. Çalışmamızda, Col. ile karşılaştırıldığında, normal koşullarda atglr3.4.1 ve atglr3.4.2 mutantlarında; özellikle H_2O_2 ve O^{2-} miktarlarında belirgin bir artış gözlenmiştir. Bu mutantların aynı koşullar altındaki NOX aktivitesinde de benzer bir artışın gözlenmesi, O^{2-} radikalindeki artışın NOX aracılı olduğu ve buna paralel olarak H_2O_2 miktarındaki artışın da NOX aktivitesine bağlı olduğu söylenebilir. Diğer yandan, mutant bitki hücrelerindeki bu aşırı ROS birikiminin diğer bir sebebi, mutantlardaki GLR 3.4.1 ve GLR 3.4.2 reseptörlerinin aktivitesindeki azalmaya bağlı meydana gelen olası kalsiyum miktarındaki azalmaya bağlı olabileceği, NO miktarındaki azalmanın ROS birikiminin diğer bir sebebi olabileceği söylenebilir.

Nitrosatif stres altında tüm genotiplerin H_2O_2 miktarı artsa da en yüksek artış atglr3.4.1 mutantında gözlenmiştir. Benzer olarak Recalde et al., (2018)'da nitrosatif strese maruz bırakılan buğdayda H_2O_2 miktarının arttığı bulunmuş ve bu artış, SNP uygulanmasına bağlı NO miktarındaki artış ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, nörodejeneratif hastalıklarda oksidatif stresin etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, NMDAR reseptörlerinin aktivitesindeki artışa bağlı olarak hücredeki aşırı NO birikiminin nöronlarda ROS birikimine sebep olduğu gösterilmiştir (Singh et al. 2019). Bu bağlamda, çalışmamızda NMDAR benzeri glutamat reseptörlerinden GLR3.4.1 VE GLR3.4.2'nin yoksunluğuna karşılık dışarıdan SNP uygulamasına bağlı aşırı NO birikiminin bu reseptörlerin mutantlarında aşırı ROS birikimine sebep olabileceği söylenebilir.

Nitrosatif stresle karşılaştırıldığında ER stresi ve mitokondriyal stres, tüm genotiplerin H_2O_2 miktarını daha fazla artırmıştır. Bu stresler altındaki genotipler birbirleriyle karşılaştırıldığında, en yüksek H_2O_2 miktarı, ER stresi altında atglr3.4.2 mutantlarında elde edilmiştir. Mitokondriyal streste ise atglr3.4.1'de elde edilmiştir. Özellikle ER stresi altında H_2O_2 miktarındaki artış, ER protein katlanma esnasında disülfid bağların oluşturulmasına bağlı ER lümenindeki ERO1 tarafından katalizlenen H_2O_2 üretimiyle ya da NOX-bağlı NO miktarındaki azalmayla ilişkilendirilebilir (Sevier and Kaiser, 2008). Bu sonucu atglr 3.4.2'nin ERO1 genini aşırı ifadesi de desteklemektedir. Ayrıca Choy et al., (2017), farelerde ER stresi ile artan O_2 radikalinin NO ile tepkimeye girerek ONOO- oluşturduğunu, bu durumunda NOS aktivitesinde artışa sebep olduğunu bulmuştur. Bu durum, bizim çalışmamızdaki ER stres teşvikli $O^{\cdot-2}$ radikal miktarındaki artış ile, aynı koşullardaki NOS aktivitesini ve NO miktarındaki artışı da açıklamaktadır.

H_2O_2 'e benzer olarak mitokondriyal stres altında tüm genotiplerin $O^{\cdot-2}$ radikal miktarı artmıştır. Özellikle mitokondriyal streste atglr 3.4.1'in hem H_2O_2 hem de $O^{\cdot-2}$ radikal miktarının diğer genotiplerden daha fazla olması dikkat çekicidir. Çalışmamızda, Rotenon uygulamasıyla ETS bileşenlerinden NADH dehidrogenaz kompleksi (Kompleks I) inhibe edilmiştir (Newhouse et al., 2004; Radad et al., 2006). Kompleks I mitokondrilerdeki ROS'ların ana kaynağıdır ve aktivitesinin manipülasyonu canlıların ömürlerini değiştirebilir. Normal şartlar altından kompleks I içindeki elektronlar Koenzim-Q aracılığıyla Kompleks III'e taşınır. Ancak bazı koşullar altında Ubiquinol'den Kompleks I'e taşınır ki bu durum Ters Elektron Taşınımı olarak bilinir ve ROS oluşumuna neden olur. Rotenon, Kompleks I'i inaktive ederek ters elektron akışına, dolayısıyla da hücre içindeki ROS miktarının artışına

neden olur. Rotenon uygulanmış tüm genotiplerde radikal miktarlarındaki artışın sebebi budur. Diğer GLR mutantlarıyla karşılaştırıldığında özellikle atglr3.4.1 mutantının daha fazla radikal biriktirmesi, bu mutantın Kompleks I'inin rotenona daha duyarlı olduğunu gösterebilir. Benzer durum nitrosatif stresin mitokondriyal ve ER stresi ile birlikte uygulandığı gruplarda da gözlenmiştir.

Hidroksil radikali, neredeyse bütün makromoleküller ile etkileşime girerek yapısal değişimlere neden olduğu için oksidatif hasardan sorumlu en önemli ROS'lardan biridir. Bu çalışmada, R uygulaması ile OH[•] süpürülme aktivitesinin yeterli olmadığı görülmektedir. Bir çalışmada, Kompleks-I'in rotenon ile inhibisyonu sonucu O₂ miktarının artması ile OH[•] oluşması görülmüş ve rotenon indüklü stresin NOS inhibitörü ile azaldığı belirlenmiştir (Madathil et al., 2013). Bu bağlamda çalışmamızda artan NOS aktivitesi OH[•] süpürme aktivitesinin azalmasına sebep olmuş olabilir. NO miktarının az olduğu atglr3.4 mutantlarında ise bu süpürülme aktivitesinin çok yüksek olması bu durumu desteklemektedir. Benzer durum ER stresli koşullarda da söz konusudur.

Antioksidan enzim aktiviteleri:

Pek çok farklı stres faktörü tarafından indüklenen ROS birikimi, antioksidanlar tarafından hücreden süpürülür. Bunlar; SOD, POX, APX, GR ve CAT gibi çeşitli süpürücülerin görev aldığı enzimatik antioksidan sistemleridir ve askorbat, glutatyon gibi enzimatik olmayan düşük moleküler metabolitler tarafından hücreden temizlenmektedirler. Böylece oksidatif denge de sağlanır (Mittler et al., 2004; Gill et al., 2011). SOD, hücrede O₂^{•-}'nin H₂O₂'ye dönüşümünü sağlar ve CAT'da H₂O₂'yi süpürür (Mittler, 2011). POX, H₂O₂ ile çeşitli indirgeyiciler arasında indirgenme ve yükseltgenme reaksiyonlarını katalizler ve APX, hücre içindeki, özellikle kloroplast ve sitoplazmadaki, önemli H₂O₂ süpürücülerindendir (Asada, 2006). Antioksidan enzimler, oksidatif stresi azaltmak ve hücre bileşenlerini serbest radikal hasarına karşı korumak için bir dizi koordineli mekanizma üzerinden etkileşebilirler.

NOX, oksidatif sinyal boyunca sinyal iletim ve algılanmasından sorumlu ana ROS üreticilerinden biridir. Normal koşullar altında, GLR3.4.1 ve GLR3.4.2 yoksunluğunun NOX aktivitesinde önemli bir artışa sebep olduğu görülmektedir. *A. thaliana*'da tanımlanan NOX genlerinden özellikle RBOHC tarafından üretilen ROS'ların, Ca²⁺ kanallarını aktive ettiği bilinmektedir. (Foreman et al., 2003). Bu bağlamda, çalışmamızda GLR3.4.1 ve GLR3.4.2 yoksunluğuna bağlı sitoplazmik Ca²⁺ miktarındaki azalmanın telafi edilmesi amacıyla bu

mutantlarda NOX aktivitesi artırılarak Ca^{2+} kanallarının aktivitesi artırılmış olabilir. Aynı koşullar altında NOX aktivitesindeki artışa bağlı olarak üretilen süperoksit radikal miktarındaki artış, tüm genotiplerde bu radikalın süpürücüsü olan SOD aktivitesinin artmasına neden olmuştur. Hatta en yüksek SOD aktivitesi, NOX aktivitesinin de en yüksek olduğu atglr3.4.1 ve atglr3.4.2 mutantlarında gözlenmiştir. Mutantlardaki SOD aktivitesindeki bu artışın nedeni, bu enzimde meydana gelen SNO aracılı S-nitrosilasyon ve tirozin nitrasyonu gibi bir posttranslasyonel modifikasyon olabilir ki GLR mutantlarının SNO miktarlarının Col.'den fazla olması bu hipotezi desteklemektedir.

Oksidatif sinyalleme sürecinde ana ROS üreticisi olarak bilinen NADPH oksidaz (NOX), Arabidopsis'in sinyal üretiminde önemli görevlere sahiptir (Wrzaczek et al., 2013). Nitrosatif stres altında Col. ve atglr3.4.1'in NOX aktivitesinin arttığı görülmüştür. Benzer şekilde Tewari et al. (2008)'da SNP uygulamasının, *Panax ginseng* bitkisinde NOX aktivitesini artırdığı ve bu artışın NO süpürücüsünün dışarıdan uygulanması ile azaldığı bulunmuştur. Buna göre çalışmamızda adı geçen genotiplerdeki SNP'ye bağlı NO'deki artışın bir prooxidant olan NOX'u uyardığı söylenebilir. Ancak ATGLR3.4.2 yoksunluğunda, SNP teşvikli NO üretimi artmasına rağmen diğer genotiplere benzer şekilde NOX aktivitesi uyarılmamış, aksine inhibe olmuştur. SNP uygulamasına cevapta Col.'un SOD ve CAT enzim aktiviteleri değişmezken, APX, GR, DHAR enzim aktiviteleri azalmıştır. Hatta Col.'de antioksidan olan askorbat ve glutatyon seviyeleri de azalmıştır. Bu durum H_2O_2 üretilmesinden ve süpürülmesinden sorumlu bu enzimlerin ya da antioksidanların NO ile aktive olan POX ve MDHAR enzimleri ile ilişkili olmadığını göstermektedir. Benzer şekilde, dışarıdan SNP uygulamasına bağlı olarak kabak bitkisinin genç yapraklarında SOD, DHAR ve MDHAR aktiviteleri değişmemiş, ancak CAT, APX ve POX aktiviteleri artmıştır (Kim et al., 2015). Yapılan diğer çalışmalarda, in vitro koşullarda SNP-bağlı NO üretimindeki artışın CAT'ın hem nitratlanmasına, hem S-nitrosillenmesine, hem de tirozin nitrasyonuna neden olacağı, bunlarında CAT aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir (Clark et al., 2000; Ortega-Galisteo et al., 2012; Martí et al., 2011; Chaki et al., 2015). Başka bir çalışmada, yine bizim çalışmamıza benzer olarak artan konsantrasyonlarda SNP'nin GR aktivitesini azalttığı görülmüştür (Astaneh et al., 2022). Jain and Bhatla (2018) ise ayçiçeği fidelerinin kotiledonlarında NO uygulaması ile tirozin nitrasyonunun sitoplazmik peroksidazın aktivitesinde bir artışa neden olduğunu göstermiştir. NO aracılı Post-Translasyonel Modifikasyonların (PTM) farklı SOD izoformları üzerindeki etkisini analiz etmek için yapılan çalışmalarda ise, S-nitrozilasyon SOD aktivitelerini etkilemezken, nitrasyon ile Mn-SOD1,

Fe-SOD3 ve CuZn-SOD3 aktivitesini farklı derecelerde inhibe etmiştir (Holzmeister et al., 2015). Bu durum APX'te de görülmüştür. Tirozin nitrasyonu ile APX'in azaldığı bulunmuştur (Begara-Morales et al., 2014). Bu bağlamda, Col. genotipinde SNP-bağlı NO miktarındaki artış sonucu antioksidan enzimlerde meydana gelebilecek olası tirozin nitrasyonu, S-nitrosilasyon gibi post transkripsiyonel modifikasyonlar, antioksidan enzimlerin aktivitelerini baskılamış ya da aksine artırmış olabilir. Nitrosatif stres koşulları altındaki Col.'un SNO miktarındaki artış da bu hipotezimizi desteklemektedir. Diğer yandan, çalışmamızda Col.'e benzer olarak nitrosatif stres altında atglr3.4.1 ve atglr3.4.2 mutantlarında da POX ve MDHAR aktiviteleri artmıştır. Ancak diğer tüm antioksidan enzim aktiviteleri ve antioksidanların miktarları ya değişmemiş ya da azalmıştır. Diğer bir deyişle Col. gibi GLR mutantlarında da aşırı NO üretimine bağlı olarak antioksidan savunma sistemi baskılanmıştır. Bununla birlikte, çalışmamızda ilginç olarak özellikle atglr3.4.2 ve Col.'ün askorbat glutatyon döngü bileşenlerinden APX, MDHAR, DHAR enzim aktiviteleri ile askorbat miktarları birbirine benzerdir. Ancak atglr3.4.1 mutantında adı geçen tüm bileşenlerin aktiviteleri ya da miktarları Col. ve atglr3.4.2'den daha düşüktür. Bu durum, atglr3.4.1'in SNP-bağlı NO üretimine karşı askorbat-glutatyon döngüsünün baskılanmasında rolü olabileceğini gösterebilir.

Çalışmamızda, Tm-teşvikli ER stresi Col.'de NOX aktivitesini artırarak NOX aracılı ROS birikimine sebep olmuştur. Ozgur et al. (2014)'da dışarıdan Tm uygulamasının *Arabidopsis thaliana*'nın hem NOX aktivitesini artırdığı hem de bu enzimin kodlanmasından sorumlu RBOHD ve RBOHF genlerinin ifadesinde artışa neden olduğu bulunmuştur. Çalışmamızda, Tm teşvikli ER stresi ile Col.'un CAT aktivitesinde artış gözlenirken SOD aktivitesinde belirgin bir değişim gözlenmemiştir. Bunun aksine GLR mutantlarında Col.'e göre daha yüksek SOD ve CAT aktivitesi gözlenmiştir. Bu durum mitokondrinin elektron taşınımında bozulmaya neden olan yanlış ya da katlanmamış proteinlerin proteolitik parçalanması için gerekli daha yüksek ATP gereksiniminin neden olduğu süperoksit radikal üretiminden kaynaklı olabilir. Özellikle Col.'de görüleceği gibi, Tm teşvikli ER stresi APX aktivitesi üzerinde belirgin bir etkiye sahiptir. Hatta Tm uygulanmış Col.'un APX aktivitesi diğer antioksidan enzimlerden daha yüksek bir aktiviteye sahiptir. Benzer olarak GLR mutantlarındaki APX aktivitesi de diğer H₂O₂ süpürücü enzimlerin aktivitesinden daha yüksektir. Tüm genotiplerde ER stresiyle APX aktivitesi artmış olsa da ER stres teşvikli en yüksek APX aktivitesi Col.'de gözlenmiştir. Ayrıca ER stresi altında APX'in substratı olan askorbatın yenilenmesi bilindiği gibi DHAR aracılı GSH havuzuna bağlıdır. Ve

çalışmamızda, Tm teşvikli ER stresiyle birlikte Col.'de Askorbatın belirgin miktarda arttığı, buna paralel olarak da DHAR, MDHAR ve total glutatyon miktarlarının arttığı bulunmuştur. Bu bağlamda, çalışmamızda, Col.'de ER stresi boyunca APX'in ROS süpürme aktivitesi, artan GSH sentezi ve GR aktivitesi ile desteklendiği açıkça görülmektedir. Col. genotipine benzer şekilde mutantlarda da GR aktivitesi, buna bağlı olarak GSH sentezi artmış ve askorbatın yenilenmesi için de DHAR aktivitesi ve total glutatyon miktarı artmıştır. Ancak mutantlarda gözlenen bu artışların hiçbiri Col.'de gözlenen kadar olmamıştır. Bu durum, GLR mutantlarında daha fazla katlanmamış ya da yanlış katlanmış protein birikimine, diğer bir deyişle daha şiddetli bir ER stresine işaret ediyor olabilir. Hatta GLR mutantlarındaki katlanmamış/yanlış katlanmış proteinlerin birikiminden dolayı aktif olan ERO1 geninin ifadesindeki artış da bu hipotezimizi desteklemektedir. Bununla birlikte ER stresinin bir sonucu olarak, proteinlerdeki yanlış disülfid bağlarını yeniden düzenlemek veya indirgemek için glutatyon ihtiyacı vardır. Bu ihtiyacın yüksekliğine bağlı olarak, GSH tükenmesini engellemek için de glutatyon havuzu dolu olmalıdır (Tu ve Wiesman, 2004). Çalışmamızda, diğer genotiplerle kıyaslandığında ER stresi altındaki Col.'un, hem GR aktivitesi hem de toplam GSH miktarının belirgin olarak daha çok artması, GSH tükenmesinin büyük oranda Col.'de daha fazla engellendiğini göstermektedir.

Çalışmamızda, rotenon-teşvikli mitokondriyal strese hem ETS bileşenlerinden kompleks I'nin inhibe edilmesi hem de NOX aktivitesinin artması tüm genotiplerde belirgin bir $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 birikimine sebep olmuştur. Bunun sonucu olarak $O_2^{\cdot-}$ miktarının süpürülmesinden sorumlu SOD enzimi tüm genotiplerde artmıştır. Bu reaksiyonun sonunda açığa çıkan H_2O_2 molekülünün aşırı birikiminin engellenmesinden sorumlu enzimin Col.'de CAT, atglr3.4.1 mutantında ise POX olduğu gözlenmiştir. atglr3.4.2 mutantlarında ise H_2O_2 süpürücü tüm enzimlerin aktivitesi ya azalmış ya da hiç değişmemiştir. Dolayısıyla iki mutant hücre, mitokondriyal stres sırasındaki H_2O_2 birikimine karşı farklı cevaplar vermişlerdir. ROS süpürücüsü antioksidanlar olan askorbat ve glutatyon miktarları incelendiğinde hem bir antioksidan hem de APX'in substratı olarak askorbatın rejenerasyonu için Col.'de DHAR ve GR aktivitesinin arttığı, atglr3.4.1 mutantında ise bu enzimlere (DHAR ve GR) ek olarak MDHAR aktivitesinin de arttığı gözlenmiştir. Özellikle DHAR ve GR enzimlerinin, bitki hücrelerinin askorbat ve glutatyon havuzunun redoks durumunun korunmasında ve stres toleransında hayati rol oynadığı bilinmektedir (Noctor et al. 2012). Buna karşılık, çalışmamızda Col. ve atglr3.4.1'in aksine atglr3.4.2 mutantlarında benzer bir durumun gözlenmemesi, aksine tüm antioksidan enzim ve antioksidanlarda belirgin bir inhibisyonun

gözlenmesi, Rotenon-teşvikli mitokondriyal streste antioksidan savunma sistemi ile AtGLR3.4.2 reseptörünün arasında bir ilişki olabileceğini gösterebilir. Bununla birlikte hücrede redoks dengesinin korunmasında, GSH'ın okside formu olan GSSG'nin GSH'a oranı H_2O_2 'nin parçalanması sırasında önemli rol oynamaktadır (Shao et al., 2008). Ayrıca, GSH'ın indirgenmiş AsA'nın yenilenmesinde de önemli rol oynadığı bilinmektedir (Halliwell and Foyer, 1976). Buna göre, çalışmamızda hem Col. hem de atglr3.4.1 mutantında rotenon teşvikli mitokondriyal stres sırasındaki GSH tükenmesini engellemek için, DHAR ve GR aktivitesindeki artışa paralel olarak, total glutatyon miktarı artırılmıştır. Ancak atglr3.4.2 mutantında DHAR, MDHAR, GR ve askorbat miktarı azalarak glutatyon havuzunun dolması engellenmiş ve buna bağlı olarak hücrenin redoks dengesinin bozulmasına neden olmuştur. Bu durumun, AtGLR3.4.2 reseptörünün rotenon-teşvikli oksidatif stres altında hücrede aşırı ROS birikiminin engellenmesinde ve hücre içi redoks dengesinin sağlanmasında önemli rol oynadığı söylenebilir.

Redoks ilişkili enzim aktiviteleri:

Glutatyon, sistein içeren bir tripeptittir. Hücrenin sitosol, vakuol, kloroplast, endoplazmik retikulum ve mitokondri gibi birçok bölmesinde bulunmasından dolayı çok önemli metabolitlerden biridir (Jimenez et al., 1997). Hücrede redoks dengesinin korunmasında, GSH'ın okside formu olan GSSG'nin GSH'a oranı, H_2O_2 'nin parçalanması sırasında önemli rol oynamaktadır (Shao et al., 2008). Hücrede glutatyonu substrat olarak kullanan enzimler de önemli fonksiyonlara sahiptirler. Bu enzimler daha önce bahsedilen DHAR ve GR enzimleri ile birlikte GST ve GPX enzimleridir. Bu enzimler doğrudan glutatyon ile ilişkili ve oksidatif stres ile mücadelede etkin bileşenlerdir. Bu çalışmamızda hem Tunikamisin kaynaklı ER stresinde hem de nitrosatif stres altında Col.'un GST aktivitesi artmıştır. Benzer olarak, aynı koşullarda GLR mutantlarının da GST aktivitesi artmıştır. Ancak her iki stres koşulunda da en yüksek GST aktivitesi Col.'de gözlenmiştir. Bu sonuçlar AtGLR 3.4.1 ve AtGLR 3.4.2 reseptörlerinin ER ve mitokondriyal stres koşullarındaki glutatyon ilişkili hücre içi redoks dengesinin korunmasında rol oynadıklarına işaret edebilir. Rotenon teşvikli mitokondriyal streste ise her üç genotipin GST'sinde de belirgin bir değişime rastlanmamıştır. Diğer yandan memelilerde yapılan araştırmalarda GST'lerin S-glutanilasyon ile PDI'ların aktivitesini düzenlediklerini ve bu nedenle GST ile ER stresi arasında yakın bir ilişki olduğu bilinse de bitkilerde bu anlamda henüz yeterince çalışma olmadığı için henüz böyle bir ilişkinin bulunabileceğini söylemek güçtür.

Glutasyon ilişkili enzimlerden bir diğeri olan GPX'ler yalnızca hücre içindeki glutasyon dengesinin sağlanmasında değil, aynı zamanda bir substrat olarak, H_2O_2 için CAT ile rekabet ederek oksidatif strese karşı koruyucudur (Dixon et al., 1998). Çalışmamızda GST enzimine benzer olarak GPX enzimi de hem nitrosatif stres hem ER stresi ve hem de mitokondriyal stres koşulları altındaki Col.'de artmıştır. Benzer olarak, aynı koşullarda GLR mutantlarında da GPX aktivitesi artmıştır ancak nitrosatif ve mitokondriyal streste en yüksek GPX aktivitesi atglr3.4.2 mutantında, ER stresi altında ise en yüksek aktivitenin atglr3.4.1 mutantında olduğu gözlenmiştir. Col.'deki ER stres teşvikli GPX aktivitesindeki artış sonucuna paralel olarak Uzilday et al. (2018)'da GPX'i kodlayan bazı GPX genlerinin (GPX 2,3,4,5,6,8) ifadelerinin tunikamisin-teşvikli ER stresi altında arttığını bulmuşlardır. Molina-Jimenez et al., (2005)'da yapılan çalışmada da bizim sonuçlara paralel olarak GPX aktivitesinin Rotenon uygulaması ile arttığı bulunmuştur. Çalışmamızda, Tm-teşvikli ER stresi altında, özellikle atglr3.4.1 mutantında GPX aktivitesinin fazla olması, bu mutanttaki daha yüksek ERO1 aktivitesi kaynaklı ER stresi boyunca üretilen H_2O_2 miktarının fazla olması olabilir. Bu mutantta H_2O_2 süpürücüsü CAT aktivitesinin diğer genotiplerden düşük olması bu mutantın H_2O_2 süpürücüsü olarak GPX'i kullandığını işaret edebilir. Bununla birlikte, rotenon uygulamasıyla atglr3.4.2 mutantlarındaki GPX aktivitesi, rotenon uygulaması sonrası oluşan artmış ROS miktarı ile ilişkilendirilebilir. Rotenon uygulaması sonrasında tüm genotiplerde artan GPX, tüm genotiplerde artan H_2O_2 'yi göstermektedir.

Nicotinamide adenin dinukleotit (NAD), ROS süpürülmesi ve oluşumu ile sinyalde ve çevresel streslere adaptasyonu kontrol eden sistemde hayati öneme sahiptir ve yaşayan birçok canlı organizmadaki temel metaboliti temsil eder (Berger et al., 2004; Noctor et al., 2006). Son yıllarda NAD biyosentetik genlerinin karakterizasyonu, çeşitli gelişimsel yollarda NAD biyosentezinin önemine dikkat çekmiştir (Hunt et al., 2007). Mitokondri solunum kapasitesi azaldığında, enerji elde edimindeki başarısızlığı telafi etmek için ikincil pentoz fosfat yolu ve alternatif alkolik fermantasyon etkinleştirilebilir. NAD tüketen bu olayların ise biyotik ve abiyotik stres yanıtlarında rol oynadığı iyi bilinmektedir. Azalan NAD tüketimi bitki metabolizmasını etkileyebilir. Bu nedenle, NAD homeostazisinin bozulması streslere verilen yanıtta etki gösterir. Örneğin çalışmamızda da ER stresine bağlı mitokondrinin elektron taşınımında bozulmaya neden olan yanlış ya da katlanmamış proteinlerin proteolitik parçalanması için gerekli daha yüksek ATP gereksiniminden dolayı tüm genotiplerin NAD/NADH oranı kontrolleriyle kıyaslandığında artmıştır. Ancak en yüksek artış Col.'de gözlenmiştir. Buna karşın GLR mutantları Col. ile karşılaştırıldığında daha düşük

NAD/NADH oranına sahiplerdir. Bu durum ER stresinin enerji metabolizması üzerindeki etkisini gösterdiği gibi ER-stres ilişkili daha farklı prosesleri desteklemek için oluşturulan enerjinin aktif ve daha iyi kullanılabilirliğini de işaret etmektedir.

Bununla birlikte NAD'ın, mitokondriyal abiyotik strese maruz kalan bitkilerdeki redoks durumunun kontrolünde önemli rol oynadığı bilinmektedir (Kasimova et al. 2006; Schwarzländer et al. 2009). Mitokondrilerde NADH dehidrogenazların devreye girmesi NADH'dan verimli ATP'nin üretilmesine neden olur. Çalışmamızda, mitokondriyal stres amacıyla uygulanan rotenonun, ETS bileşenlerinden Kompleks I'ı inhibe etmesinin ATP üretimi için gerekli NADH'ın ortamda birikimine neden olduğu bilinmektedir. Buna göre bizim çalışmamızda da Col. genotipinin NADH miktarı mitokondriyal stres koşulları altında artmıştır. Ancak mutantlarda benzer bir artış gözlenememiştir. Bu durum, Douce ve Neuburger (1989) tarafından da daha önce belirtildiği gibi, mutantlarda kompleks I'den bağımsız olarak NADH'ı oksitleme kapasitesi olan alternatif enzimlerin devreye girmiş olabileceğini düşündürmektedir. Sonuç olarak GLR mutantlarında Col.'e göre NAD/NADH oranında belirgin azalmaya neden olan NAD tüketimi elde edilmiştir. NAD'ın belirgin tüketimi, NAD/NADH oranının daha da azalmasına neden olmaktadır. Bu durum, bu mutantlarda NAD üretiminin yanı sıra bunların uygun şekilde kanalize edilmesi veya tüketilmesinin, bitkilerin bu streslere toleransının sağlanmasından sorumlu farklı mekanizmaların etkinleştirilmesi açısından önemli olduğunu düşündürmektedir. Tüm bu bahsedilen durumlar nitrosatif stres altında da benzer şekilde değişim göstermiştir.

Hem lipid peroksidasyonu (TBARS) (Mittler, 2002) hem de protein oksidasyonu (Levine et al. 1994), oksidatif stres sonucu ortaya çıkan önemli stres belirteçleridir. Serbest radikaller hem lipitlerde hem de proteinlerde oksidatif hasara neden olabilir. Bunun dışında, lipid peroksidasyonu ile oluşan ürünler, proteinlerin oksidatif modifikasyonlarını artırabilmektedir. Böylece, lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonu hücre içi redoks dengesizliği ve oksidatif stresin göstergeleri olarak kabul edilmektedir. Bu çalışmada da stres koşulları altında protein oksidasyonunun arttığı tespit edilmiştir. Stres altındaki gruplarda bizim çalışmamız ile benzer şekilde, ER stresinin katlanmamış proteinlerin oksitlenmesine sebep olmasından dolayı protein oksidasyon seviyelerinde artış olduğu gözlenmiştir (Ozgur et al., 2014). Ayrıca, Barreiro et al., (2005), nitrosatif stres altında proteinlerin oksitlendiğini göstermiştir. Bilindiği gibi, ROS sinyalleme ile Ca^{2+} akışları düzenlenmektedir (Suzuki et al., 2011). Daha önce de bahsedildiği gibi, ROS ve Ca^{2+} sinyalleri arasında çift yönlü bir

etkileşim vardır. Ca^{2+} sinyali ROS üretimi için gerekli iken, ROS'larda Ca^{2+} sinyalini düzenleyebilirler. (Görlach et al. 2015). Ca^{2+} 'a ek olarak NO'nin de bitkilerde H_2O_2 üretimi için gerekli olduğunu, bununla birlikte H_2O_2 'nin de özellikle stoma kapanmasında NO sentezini teşvik ettiği bilinmektedir (Lu et al., 2009; Liao et al.2012). Çalışmamızda, TBARS miktarı normal koşullar altında GLR3.4 yoksunluğu ile artmıştır. atglr3.4.1 ve atglr3.4.2 mutantlarında Ca^{2+} eksikliğinin olması, ROS miktarının artması ve ROS süpürücü antioksidan enzim aktivitelerinin yeterli olmaması ile ilişkili olabilir. Çalışmamızda, benzer çalışmalarda olduğu gibi, TBARS miktarı nitrosatif stres altında (Antonioni et al., 2013; Rolly et al., 2019) artmıştır. Ancak GLR3.4 yoksunluğunda ise azalmıştır NO'nin dışarıdan verilmesi gerekli olan NO miktarını sağlamakta yeterli olduğundan olabilmektedir. Çalışmamızda, rotenon-teşvikli mitokondriyal streste ve ER stresi altında da TBARS miktarı artmış ve bu artış GLR3.4.1 yoksunluğunda artarken GLR3.4.2 yoksunluğu ile azalmıştır. Pek çok çalışmada ise Tm (Ozgur et al., 2014) ve R uygulaması ile TBARS miktarının (Tamilselvan et al., 2013; Gonzalez-Burgos et al., 2017) arttığı bilinmektedir. Bu artışlarda ise GLR3.4.2'nin etkili olabileceği düşünülmektedir. Çalışmamızda, stresin önemli belirteci olan TBARS miktarı, ROS süpürücü antioksidan enzim aktivitelerinin ROS süpürülmesinde yeterli olmamasından kaynaklı olarak ROS miktarının yükselişi nedeniyle artmıştır.

ER ilişkili gen ifadeleri:

Gen ifadesi analizlerine gelindiğinde ilk olarak ER ilişkili genlerden bahsedilecektir. ER stresi sinyalinin algılanması, ardından bu sinyalin iletilmesinden sorumlu iki ayrı yol bilinmektedir. Bunlar; IRE1-bZIP60 ve bZIP28 yollarıdır (Deng et al., 2013; Iwata and Koizumi, 2005). Katlanmamış proteinlerin ER lümeninde birikmesi sonucu BIP proteinleri IRE1'den ayrılır ve IRE1'in otofosforile olarak aktif hale gelir. Bu durumda IRE1 bZIP60 mRNA'sının splayzlanmasını sağlar ve aktif bZIP60 üretimi gerçekleşir (Nagashima et al., 2016). Ayrıca bZIP60'ın ER stresi ile ilişkili *BiP3* gen ifadesinin düzenlenmesinden sorumlu olduğu bilinir (Iwata and Koizumi, 2005; Howell, 2013). bZIP28 ise *Arabidopsis* 'te ER stres yanıtını düzenleyen transkripsiyon faktörüdür (Tajima et al., 2008). Çalışmamızda, ER stresi ile birlikte bZIP28 ve bZIP60 transkripsiyonunun daha önceki çalışmalara (Ozgur et al., 2014; 2015) benzer şekilde arttığı görülmüştür. Tüm stres koşullarında arttığı görülen bZIP28, GLR.3.4.1 yoksunluğu ile daha da artmıştır. Benzer şekilde ortamdan NO'nin süpürülmesi ile de artmıştır. Bu sebeple bZIP28 transkripsiyonundan GLR.3.4.1'in sorumlu olabileceğinden söz edilebilmektedir. bZIP60 transkripsiyonunda ise uygulanan stresler ile birlikte artan

ifadenin GLR.3.4 yoksunluğu ile azaldığı bu azalışın özellikle GLR.3.4.1 yoksunluğu ile olduğu görülmüştür. Ancak nitrosatif stres altında Tm ve R uygulamasının bZIP60 transkripsiyonunun GLR.3.4.1 yoksunluğu ile daha da arttığı görülmüştür. bZIP60 transkripsiyonunda GLR.3.4.1 yoksunluğu etkilidir.

Arabidopsis’ de bilinen, 3 BiP geni tespit edilmiştir (Maruyama et al., 2014). Çalışmalardan birinde, tütün bitkisinde BiP gen ifadesinin artırılması ile kuraklığa tolerans sağladığı göstermiştir (Alvim et al., 2001). Ayrıca bu genlerden BiP3’ ün sadece ER stresi altında ifade olduğu görülmüştür (Noh et al., 2003). Bunun dışında, bZIP28 tarafından aktiveleştirilen UPR’nin düzenleyicileri arasında BiP3’ün de olduğu bilinmektedir (Srivastava et al., 2013). Yapılan çalışmalar ile ER stresi altında Arabidopsis’te BiP3 ifadesindeki artışın, bZIP28 ve bZIP60’a bağlı olduğu belirlenmiştir (Howell, 2013). Benzer şekilde bu çalışmada da BiP3 aktivitesi bZIP28 ve bZIP60 gibi stres altında artmıştır. Nitrosatif stres, ER ve mitokondriyal stres altında artan BiP3 ifadesindeki artışın, GLR.3.4.1 yoksunluğu ile çok daha fazla arttığı görülmüştür. Benzer şekilde organel kaynaklı ROS’a BiP3’ün daha fazla yanıt verdiği görülmüştür (Ozgur et al., 2015). Ayrıca GLR.3.4.1 yoksunluğu ile daha da artan BiP3 ifadesinin, GLR.3.4.2 yoksunluğu ile de kontrol seviyesinde kaldığı görülmüştür. Nitrosatif stres altında T ve R uygulaması ile artan bu genin ifadesinde GLR.3.4.1 yoksunluğu etkili değilken GLR.3.4.2 yoksunluğu ile azalmıştır. GLR.3.4.1 ve GLR.3.4.2 yoksunluğunun bu genin ifadesi üzerinde farklı etkiye sahip olduğu söylenebilmektedir.

Bahsedildiği gibi, ER stresi altında BiP3 ifadesinin uyarılması UPR’nin uyarılmasında anahtar rol oynamaktadır. Ayrıca, BiP3 ifadesinin uyarılması, IRE1B aktivitesine bağlıdır (Deng et al. 2011). Böylece UPR, sinyal ileticileri olan bZIP28, IRE1A ve IRE1B gibi genlerin ifadelerinin uyarılması ile başlamaktadır. IRE1A ve IRE1B’nin transkripsiyonu benzer şekilde tüm stresler altında büyük oranda artmıştır. IRE1A ve IRE1B’nin transkripsiyonu, özellikle ER ve mitokondriyal strese büyük oranda artmıştır. Benzer şekilde ortamdan NO’in süpürülmesi de bu gende artışa sebep olmuştur. IRE1, mayalar, bitkiler ve metazoalarda homologları bulunan en korunmuş UPR dalı olduğu için stres altında hem memelilerde (Cheng et al., 2014) hem de bitkilerde (Ozgur et al., 2017) ifadesinin arttığı bilinmektedir. Ancak, IRE1A ve IRE1B’nin transkripsiyonundaki bu büyük artış GLR.3.4 yoksunluğu ile azalmıştır. Bu azalmaya en büyük etki GLR.3.4.2 yoksunluğudur. ER ve mitokondriyal stres altında IRE1B’nin transkripsiyonu, IRE1A’dan farklı olarak GLR.3.4.1 yoksunluğu ile değişmemiştir. Hatta nitrosatif stres altında R uygulaması ile GLR.3.4.1

yoksunluğu IRE1B'nin transkripsiyonunun artmasına sebep olmuştur. Böylece görülmektedir ki IRE1 transkripsiyonundaki değişikliklerde GLR.3.4 yoksunluğu önemli bir etkiye sahiptir.

Bu genlerin dışında ER stresi ile ilişkili genlerden, CNX'in ifadesinin bZIP28' e bağlı olduğu bilinmektedir (Liu and Howell, 2010). ER' de bulunan kalneksin (CNX) kalretikulin ile ortak çalışarak özellikle glikoproteinlerin katlanmasında rol oynar. Yapılan çalışmalar, ER stresi oluşturan Tm ve DTT aracılı bu genin ifadesinin artırdığını göstermiştir (Kamauchi et al., 2005). Ayrıca, abiyotik streslerin CNX ifadesinin değiştirdiği bilinmektedir (Nouri and Komatsu, 2010). Bunun dışında, karaciğer hücrelerinde yapılan bir çalışma ER stresi ile CNX'in azaldığını göstermiştir (Robin et al., 2018). Ayrıca, başka bir çalışmada, BiP1'in çok yüksek ifade olduğu tohumlarda, düşük CNX ifadesi görülmüştür ve indüklenmiş bir ER stresi yanıtı göstermiştir (Wakasa et al., 2010). Çalışmamızda ise, ER stresi ve nitrosatif stres altında T uygulaması CNX transkripsiyonunun kontrol ile aynı seviyede kalmasına neden olmuştur. Nitrosatif stres, mitokondriyal stres ve nitrosatif stres altında R uygulaması ise CNX transkripsiyonunun azalmasına sebep olmuştur. Ayrıca NO süpürülmesi de bu genin ifadesini azaltmıştır. Ancak tüm stres koşullarında GLR.3.4 yoksunluğu, CNX transkripsiyonunun artmasına sebep olmuştur. Bu artışta özellikle GLR.3.4.1 yoksunluğunun rolü yüksektir.

CNX/CRT kompleksi ile bağlantılı proteinlerden PDI, disülfid bağların oluşumundan sorumludur. Ayrıca, en önemlisi de proteinlerin doğal konformasyonlarında katlanması için gerekli olan izomerizasyon işleminde rol almasıdır. Arabidopsis genomunda 12 adet PDI kodlandığı ve bunlardan 9 tanesinin ER ile ilişkili sinyal peptidleri içerdiği bulunmuştur (Lu and Christopher, 2008). Yapılan pek çok çalışmada, ER stresi ile PDI transkripsiyonunun arttığı belirlenmiştir (Lu and Christopher, 2008; Ozgur et al., 2017). Benzer şekilde bu çalışmada da ER stresi ve nitrosatif stres altında T uygulaması PDI5 transkripsiyonunu artırmıştır. ER stresi altında PDI5 transkripsiyonundaki artışı GLR.3.4.1 yoksunluğu değiştirmezken, GLR.3.4.2 yoksunluğu bu artışı çok daha fazla artırmıştır. Bunun aksine, nitrosatif stres altında T uygulamasında PDI5 transkripsiyonundaki artışı GLR.3.4.1 yoksunluğu artırırken, GLR.3.4.2 yoksunluğu azaltmıştır. Bu sebeple GLR.3.4 yoksunluğu farklı koşullarda farklı etkilere sahiptir.

ER içindeki protein katlama ve disülfid bağlarının düzenlenmesi süreçlerinde PDI ve ERO1 arasında kritik bir iş birliği mevcuttur. PDI'ların disülfid bağlarının oluşturmaya ERO1 yardımcıdır (Gross et al., 2006). Mayalarda yapılan çalışmada, disülfid bağ oluşumunda

oksidasyonda görevli redoks elemanı ER oksidoredüktazdır ve Arabidopsis'te iki homologu mevcuttur (Banhegyi et al., 2012). ERO, ER'nin redoks durumunu düzenler ve katlanmamış proteinlere yanıt verir (Dixon et al., 2003; Onda et al., 2009). Bu sebeple ER stresi altında ERO1'in arttığı görülmüştür (Ozgur et al., 2015). Benzer şekilde bu çalışmada da ER stresi altında ERO1 transkripsiyonu artmıştır. Ancak bu artış, GLR.3.4.1 yoksunluğu ile daha da artmaktadır. Mitokondriyal stres ile azalan ERO1 transkripsiyonu yine GLR.3.4.1 yoksunluğu ile artmıştır. Nitrosatif stres altında R uygulamasında da benzer durum görülmüştür.

Mitokondri ilişkili gen ifadeleri:

Mitokondriyal stres ile ilişkili olarak, elektron taşıma zinciri ve oksidatif fosforilasyon ile hücrel enerji üretimini sağlayan protein-kofaktör komplekslerinin (Kompleks I, II, III ve IV) önemi bilinmektedir. Bu sebeple çalışmamızda; AOX1, UPOX, UCP, SDH2E, COX5b ve CI76 gen ifadeleri belirlenmiştir. Mitokondriyal stres ile ilişkili genlerin başında en çok çalışılan AOX gelmektedir. Bitkilerde mitokondriyal solunum, sitokrom yolu ve AOX olarak adlandırılan alternatif bir yol mevcuttur (Juszczuk and Rychter, 2003). Eğer AOX miktarında azalma görülürse, bitkilerin oksidatif strese hassasiyetini artmıştır (Maxwell et al., 1997). AOX, Krebs döngüsünün sürdürülmesi veya oksidatif strese karşı hücrelerin korunmasında önemli role sahiptir (Vanlerberghe et al., 1997). Ayrıca AOX1a ile indüklenmiş olduğu gözlemlenen, mitokondriyal protein kodlayan gen (Clifton et al., 2006); oksidatif stres tarafından up-regüle olan UPOX'tur. Bu iki genin transkripsiyonunun Cd gibi (Keunen et al., 2013) abiyotik streslerle ya da rotenon uygulaması ile arttığı belirlenmiştir (Ho et al., 2008). Bu çalışmada da benzer şekilde, tüm stres koşulları altında özellikle rotenon uygulaması ile ve nitrosatif stres altında R uygulaması ile AOX1 transkripsiyonu artmıştır. Ancak, GLR.3.4 yoksunluğu bu transkripsiyonun azalmasına sebep olmuştur. Özellikle GLR.3.4.2 yoksunluğu ile kontrol seviyesine inmiştir. Ortamdan NO'nin süpürülmesi de bu genin transkripsiyonu artmıştır. Benzer koşullarda, UPOX transkripsiyonu da benzer oranda artmıştır. Ancak, GLR.3.4.1 yoksunluğu AOX transkripsiyonundaki bu artışı daha da artırarak bu artışta görevli olduğunu göstermiştir. SDH2E transkripsiyonu ise stres koşullarında AOX ile benzer şekilde artmıştır. Mitokondriyal stres, nitrosatif stres ve ikisinin birlikte uygulandığı koşullarda ifade büyük oranda artmıştır. Ancak bu artış hem GLR.3.4.1 hem de GLR.3.4.1 yoksunluğunda azalmıştır. CI76 transkripsiyonu da tüm stres koşullarında artmış ve hem GLR.3.4.1 hem de GLR.3.4.2 yoksunluğunda azalmıştır. Ancak GLR.3.4.2 yoksunluğunda kontrol

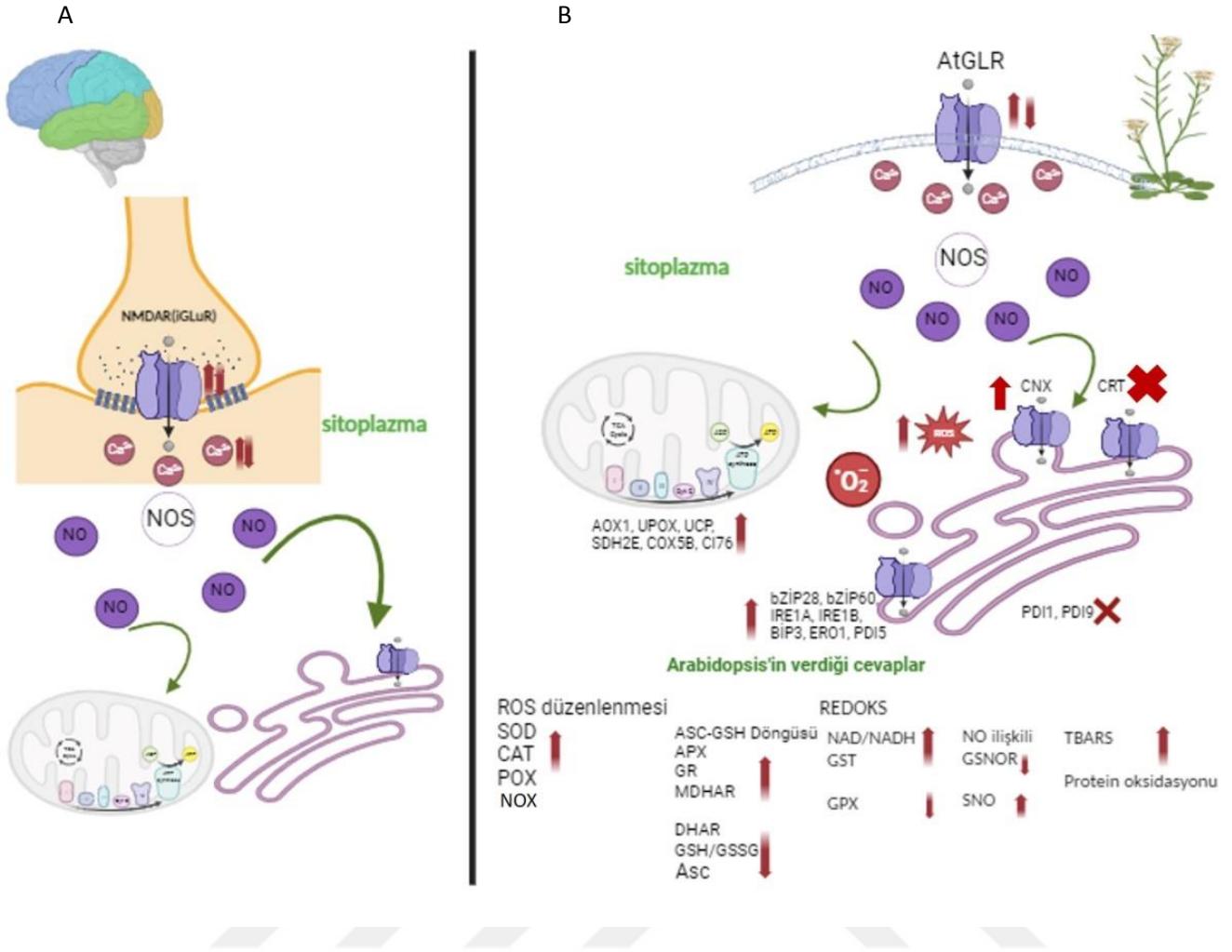
seviyesindedir. Pek çok çalışma da mitokondriyal strese ve abiyotik streslerde benzer şekilde bu genlerin transkripsiyonu da artışlar belirlenmiştir.

COX5b transkripsiyonu stres uygulamaları ile artmıştır. En büyük artış mitokondriyal stres ile gerçekleşmiştir. Bitki ya da hayvanlar ile yapılan pek çok çalışmada rotenon uygulaması COX geninin artışına sebep olduğu belirlenmiştir (Lee et al., 2008; Wang et al., 2022). Bu genin nitrosatif stres altında artışı GLR.3.4 yoksunluğu ile azalmıştır. Ancak hem ER hem de mitokondriyal streste GLR.3.4.1 yoksunluğu COX5b transkripsiyonunda artışa sebep olmuştur. NO'nin süpürülmesi ise bu genin ifadesini artırmıştır. Nitrosatif stres altında T uygulaması ile artan COX5b transkripsiyonu GLR.3.4 yoksunluğu ile azalmış, R uygulaması ile sadece GLR.3.4.2 yoksunluğu ile azalmıştır. Bu durumda GLR.3.4 yoksunluğu farklı koşullarda farklı etkilere sebep olmuştur.

Bu genler dışında Uncoupling proteins (UCP), mitokondriyal iç zarda proton elektrokimyasal gradyanı dağıtan proton sızıntısını katalizler. Bu şekilde ATP sentaz kompleksini ve böylece oksidatif fosforilasyonu kısaltır (Vercesi et al., 2006). Yapılan bir çalışmada ise *A. thaliana*'da UCP gen ailesinin altı olası üye üyesinin genomik yapısını ve ifade profillerini belirlenmiştir (Borecky' et al., 2006). Ayrıca, hem AOX (Maxwell et al., 1999) hem de UCP (Pastore et al., 2007), mitokondriyal ROS oluşumunun riskini azalttığı görülmüştür. Cd stresi ile UCP transkripsiyonunun arttığı belirlenmiştir (Keunen et al., 2013). Ayrıca memeli hücre hatlarında da mitokondriyal stres altında transkripsiyonunun arttığı belirlenmiştir (Hirschenson et al., 2022; Hwang et al., 2014). Bu çalışmada da ER, mitokondriyal stres ve nitrosatif stres altında R uygulamasının UCP transkripsiyonunu artırdığı ve bu artışın GLR.3.4.1 yoksunluğu ile daha da arttığı belirlenmiştir. Bu sebeple, UCP transkripsiyonunun ifade olmasında GLR.3.4.1'in rol oynadığı söylenebilir.

5. SONUÇ

GLR; memelilerde (iGluR'ler), hafıza ve öğrenme gibi bilişsel süreçlerde görev aldıkları gibi, faaliyetlerindeki aşırılık ya da azlık, depresyona psikoz patolojisine ve hatta nörodejeneratif hastalıklara neden olmaktadır. GLR'ler, sadece memelilerde değil yaşamın üç domaininde de tanımlanmışlardır. Bitkiler üzerinde yapılan araştırmalarda, bitki GLR'lerinin; karbon ve azot metabolizmasından, tohum çimlenmesine kadar pek çok yolda rol oynadıkları gösterilmiştir. Ayrıca, GLR'lerin, Ca^{2+} taşıyan ilk moleküler mekanizmalardan biri olduğu bulunmuştur. Model bitki *Arabidopsis thaliana*'da yapılan araştırmalar, bazı (a)biyotik stres faktörlerinin Ca^{2+} aracılı bir yanıtı tetiklediği membran voltajında değişikliklere neden olduğu ve böylece hem stres sinyali oluşturma (voltaj kapılı kanallar aracılığıyla) hem de strese yanıt verme (su potansiyelinin artması) süreçlerinde önemli bir rol oynadığı görülmüştür. Bu da, bir elektrik sinyalini oluşturmak ve iletmek için GLR'lerin çok önemli olduğunu göstermiştir. Son yıllarda insanlarda yapılan bir dizi çalışmada ilk defa beyin hücre zarındaki iGluR'ler aracılığıyla hücre içine Ca^{2+} girişinin arttığı ve bunun NO (nitrik oksit) birikimine neden olduğu bulunmuştur. Hücrede NO değişiminin ise ER'de strese neden olduğu belirlenmiştir. Ancak, bahsedilen bu GLR-aracılı yolağın bitkilerde var olup olmadığı henüz bilinmemektedir. Bu çalışma ile GLR-aracılı NO miktarının eksikliğinin ya da birikiminin, hücredeki ROS ve RNS düzenlenmesi ile hücre redoks dengesi üzerindeki etkisi ilk defa araştırılmıştır. Bununla birlikte GLR-aracılı bu değişimin ER ve mitokondride strese neden olup olmadığı da ilk kez bu çalışma ile belirlenmiştir. Şekil 5.1'de araştırmanın temel sonuçları memeli hücrelerindeki yolağ ile karşılaştırılarak şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 5.1 AtGLR3.4 yoksunluğunda hücre içindeki RNS sentezi, ROS üretimi, ROS düzenlenmesi, Asc-GSH döngüsü, Redoks dengesinin korunması ve Endoplazmik retikulum ve mitokondrideki stres ile ilişkili gen ifadelerinin şematik gösterimi. (A) Memeli beyin hücre membranında lokalize olan ve sitoplazmaya Ca^{+2} girişinden sorumlu olan NMDAR glutamat reseptörlerinin ifadesindeki artış, hücre içi Ca^{+2} miktarını artırarak NOS aracılı NO miktarında artışa neden olur. Artan NO, ER üzerindeki Ca^{+2} kanallarının inaktivasyonuna neden olarak katlanmamış/yanlış katlanmış protein kaynaklı ER ve mitokondride stres meydana gelir. Bu durum insanlarda nörodejenaratif hastalıklara yol açar. (B) Bitkilerde 20 glutamat reseptöründen biri hem memelilerdeki NMDAR glutamat reseptörüne benzemektedir hem de NMDAR lar gibi hücre içi Ca^{+2} sinyalinde görev almaktadır: AtGLR3.4. Bu reseptörün yoksunluğu, hücre içi Ca^{+2} miktarını azaltır buna bağlı olarak aktivitesi azalan NOS daha az NO üretir. Azalan NO, ER'deki Ca^{+2} kanallarından CNX (kalneksin)'in ifadesini artırır. Bunun sonucu olarak ER ve sitoplazma içindeki Ca^{+2} dengesizliği, ER ve mitokondri stres genlerinin ifadelerindeki artıştan da anlaşılacağı üzere bu iki organelde strese neden olur. Buna karşın atglr3.4 mutanları SOD, CAT, POX, GPX ve Askorbat/Glutatyon döngü enzimlerinin aktivitelerini artırarak ROS miktarlarını düzenler. Diğer yandan glutatyon ve askorbat havuzlarını doldurarak ve NAD/NADH oranını artırarak hücre içi redoks dengesini korurlar.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abou-Sleiman, P.M., Muqit, M.M. and Wood, N.W.**, 2006, Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease, *Nat. Rev. Neurosci.*, 7, 207–219 pp.
- Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S. and Tattini, M.**, 2012, Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance, *Plant Science*, 196, 67–76pp.
- Ahern, G.P., Klyachko, V.A. and Jackson, M.B.**, 2002, cGMP and S-nitrosylation: two routes for modulation of neuronal excitability by NO, *Trends Neurosci*, 25, 510–517 pp.
- Ahlfors, R., Brosche, M., Kollist, H. and Kangasjarvi, J.**, 2009, Nitric oxide modulates ozone-induced cell death, hormone biosynthesis and gene expression in *Arabidopsis thaliana*, *The Plant Journal*, 58, 1–12 pp.
- Airaki, M., Sanchez-Moreno, L., Leterrier, M., Barroso, J.B., Palma, J.M. and Corpas, F.J.**, 2011, Detection and quantification of S-nitrosoglutathione (GSNO) in pepper (*Capsicum annuum* L.) plant organs by LC-ES/MS, *Plant Cell Physiology*, 52, 2006–2015 pp.
- Alikhani, N., Ankarcrona, M. and Glaser, E.**, 2009, Mitochondria and Alzheimer's Disease: amyloid-beta peptide uptake and degradation by the presequence protease, hPreP. *J Bioenerg Biomembr*, 41(5), 447–451 pp.
- Alvim, F.C., Carolino, S.M., Cascardo, J.C., Nunes, C.C., Martinez, C.A., Otoni, W.C. and Fontes, E.P.**, 2001, Enhanced accumulation of BiP in transgenic plants confers tolerance to water stress, *Plant Physiology*, 126(3), 1042–1054 pp.
- Angelova, P.R., Abramov, A.Y.**, 2018, Role of mitochondrial ROS in the brain: from physiology to neurodegeneration, *FEBS Lett.*, 592(5), 692–702 pp.
- Antoniou, C., Filippou, P., Mylona, P., Fasoula, D., Ioannides, I., Polidoros, A. and Fotopoulos, V.**, 2013, Developmental stage-and concentration-specific sodium nitroprusside application results in nitrate reductase regulation and the modification of nitrate metabolism in leaves of *Medicago truncatula* plants, *Plant Signaling & Behavior*, 8(9), e25479 p.
- Armstrong, N., Sun, Y., Chen, G.Q. and Gouaux, E.**, 1998, Structure of a glutamate-receptor ligand-binding core in complex with kainate, *Nature*, 395, 913–917 pp.
- Arrigoni, O., Dipierro, S. and Borraccino, G.**, 1981, Ascorbate free-radical reductase, a key enzyme of the ascorbic-acid system, *FEBS lett.*, 125, 242–244 pp.
- Asada, K.**, 2006, Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions, *Plant Physiology*, 141(2):391–396 pp.
- Asher, P. and Nowak, L.**, 1988, The role of divalent cations in the N-methyl-D-aspartate responses of mouse central neurons in culture, *J. Physiol. Lond.*, 399(1), 247–296 pp.
- Ashrafi, H., Azadi, A., Mohammadi-Samani, S. and Hamidi, M.**, 2020, New candidate delivery system for Alzheimer's Disease: deferoxamine nanogels, *Biointerface Res. Appl. Chem.*, 10(6), 7106–7119 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Astaneh, R.K., Bolandnazar, S. and Nahandi, F.Z.**, 2022, Exogenous nitric oxide protect garlic plants against oxidative stress induced by salt stress, *Plant Stress*, 5, 100101 p.
- Astier, J. and Lindermayr, C.**, 2012, Nitric oxide-dependent posttranslational modification in plants: an update, *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 15193–15208 pp.
- Astier, J., Besson-Bard, A., Wawer, I., Parent, C., Rasul, S., Jeandroz, S., Dat, J.F. and Wendehenne, D.**, 2010, Nitric Oxide Signalling in Plants: Cross-Talk With Ca^{2+} , Protein Kinases and Reactive Oxygen Species, *Annual Plant Reviews*, 42, 147–170 pp.
- Astier, J., Kulik, A., Koen, E., Besson-Bard A., Bourque, S., Jeandroz, S., Lamotte, O. And Wendehenne, D.**, 2012, Protein S-nitrosylation: what's going on in plants?, *Free Radical Biology and Medicine* 53: 1101–1110 pp.
- Avery, S.V.**, 2011, Molecular targets of oxidative stress, *Biochem. J.*, 434(2):201–210 pp.
- Bai, X., Yang, L., Yang, Y., Ahmad, P., Yang, Y. and Hu, X.**, 2011, Deciphering the protective role of nitric oxide against salt stress at the physiological and proteomic levels in maize, *Journal of Proteome Research*, 10, 4349–4364 pp.
- Bai, X.G., Chen, J.H., Kong, X.X., Todd, C.D., Yang, Y.P. and Hu, X.Y.**, 2012, Carbon monoxide enhances the chilling tolerance of recalcitrant *Baccaurea ramiflora* seeds via nitric oxide-mediated glutathione homeostasis, *Free Radic. Biol. Med.*, 53(4), 710–720 pp.
- Balogun, O., Abolaji, A.O., Adedara, A.O., Akinsanmi, A.O. and Alemika, T.E.**, 2021, Ameliorative role of *Plectranthus esculentus* on 4-vinylcyclohexene monoepoxide-induced oxidative stress in *Drosophila melanogaster*, *Biointerface Res. Appl. Chem.*, 11(2), 9432–9442 pp.
- Bánhegyi, G., Margittai, E., Szarka, A., Mandl, J. and Csala, M.**, 2012, Crosstalk and barriers between the electron carriers of the endoplasmic reticulum. *Antioxidants & redox signaling*, 16(8), 772–780 pp.
- Barnham, K.J., Masters, C.L. and Bush, A.I.**, 2004, Neurodegenerative diseases and oxidative stress, *Nature Reviews Drug Discovery* 3(3), 205–214 pp.
- Barroso, J.B., Corpas, F.J., Carreras, A., Rodríguez-Serrano, M., Esteban, F.J., Fernández-Ocaña, A., Chaki, M., Romero-Puertas, M.C., Valderrama, R., Sandalio, L.M. and del Río, L.A.**, 2006, Localization of S-nitrosoglutathione and expression of S-nitrosoglutathione reductase in pea plants under cadmium stress, *Journal of Experimental Botany*, 57, 1785–1793 pp.
- Beaugelin, I., Chevalier, A., D'Alessandro, S., Ksas B. and Havaux, M.**, 2020, Endoplasmic reticulum-mediated unfolded protein response is an integral part of singlet oxygen signalling in plants, *The Plant Journal*, 102, 1266–1280 pp.
- Beck, K.F., Eberhardt, W., Frank, S., Huwiler, A., Messmer, U.K., Muhl, H. and Pfeilschifter, J.**, 1999, Inducible NO synthase: role in cellular signalling, *J. Exp. Biol.*, 202, 645–653 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Begara-Morales, J.C., Chaki, M., Sanchez-Calvo, B., Mata-Perez, C., Leterrier, M., Palma, J.M., Barroso, J.B. and Corpas, F.J.,** 2013, Protein tyrosine nitration in pea roots during development and senescence, *Journal of Experimental Botany*, 64, 1121–1134 pp.
- Begara-Morales, J.C., Sánchez-Calvo, B., Chaki, M., Mata-Pérez, C., Valderrama, R., Padilla, M.N., López-Jaramillo, J., Luque, F., Corpas F.J. and Barroso, J.B.,** 2015, Differential molecular response of monodehydroascorbate reductase and glutathione reductase by nitration and S-nitrosylation, *Journal of Experimental Botany*, 66(19), 5983–5996 pp.
- Begara-Morales, J.C., Sánchez-Calvo, B., Chaki, M., Valderrama, R., Mata-Pérez, C., López-Jaramillo, J., Padilla, M.N., Carreras, A., Corpas F.J. and Barroso, J.B.,** 2014, Dual regulation of cytosolic ascorbate peroxidase (APX) by tyrosine nitration and S-nitrosylation, *Journal of Experimental Botany*, 65(2), 527–538 pp.
- Benhar, M., Forrester, M.T., Hess, D.T. and Stamler, J.S.,** 2008, Regulated protein denitrosylation by cytosolic and mitochondrial thioredoxins, *Science*, 320, 1050–1054 pp.
- Bergmeyer, N.,** 1970, *Methoden der enzymatischen Analyse*, Akademie Verlag, 1:636–647 pp.
- Berridge, M.J.,** 2012, Calcium signalling remodelling and disease, *Biochem. Soc. Trans.*, 40, 297–309 pp.
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L.M., Harding, H.P. and Ron, D.,** 2000, Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response, *Nat. Cell Biol.*, 2, 326–332 pp.
- Besson-Bard, A., Pugin, A. and Wendehenne, D.,** 2008, New insights into nitric oxide signaling in plants, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 21–39 pp.
- Biskup S., Gerlach M., Kupsch A., Reichmann H., Riederer P., Vieregge P., Wullner U. and Gasser T.,** 2008, Genes associated with Parkinson syndrome. *J Neurol.*, 255, 8–17 pp.
- Bonfoco, E., Krainc, D., Ankarcrona, M., Nicotera, P. and Lipton, S.A.,** 1995, Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures, *PNAS*, 92(16), 7162–7166 pp.
- Borecký, J., Nogueira, F.T., De Oliveira, K.A., Maia, I.G., Vercesi, A.E. and Arruda, P.,** 2006, The plant energy-dissipating mitochondrial systems: depicting the genomic structure and the expression profiles of the gene families of uncoupling protein and alternative oxidase in monocots and dicots, *Journal of Experimental Botany*, 57(4), 849–864 pp.
- Bose, J.C.,** 1913, Researches on the irritability of plants, *Science*, 39(1005):511–513 pp.
- Bowler, C., Van Camp, W., Van Montagu, M. and Inze, D.,** 1994, Superoxide dismutases in plants, *Crit. Rev. Plant Sci.*, 13, 199–218 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bradford, M.M.**, 1976, A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of the protein-dye binding, *Anal. Biochem*, 72:248–254 pp.
- Brandes, R.P., Weissmann, N. and Schröder, K.**, 2014, Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation, *Free Radic. Biol. Med.*, 76:208–26 pp.
- Brenner, E.D., Feinberg, P., Runko, S. and Coruzzi, G.M.**, 2009, A mutation in the proteosomal regulatory particle AAA-ATPase-3 in *Arabidopsis* impairs the light-specific hypocotyl elongation response elicited by a glutamate receptor agonist, *BMAA, Plant Mol. Biol.*, 70, 523–533 pp.
- Brenner, E.D., Martinez-Barboza, N., Clark, A.P., Liang, Q.S., Stevenson, D.W. and Coruzzi, G.M.**, 2000, *Arabidopsis* mutants resistant to S(+)-beta-methyl-alpha, beta-diaminopropionic acid, a cycad-derived glutamate receptor agonist, *Plant Physiol.*, 124, 1615–1624 pp.
- Broniowska, K.A., Diers, A.R. and Hogg, N.**, 2013, S-Nitrosoglutathione, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830, 3173–3181 pp.
- Brown, G.C. and Vilalta, A.**, 2015, How microglia kill neurons, *Brain Res.*, 1628, 288–297 pp.
- Calabrese, V., Bates, T.E. and Stella, A.M.**, 2000, NO synthase and NO-dependent signal pathways in brain aging and neurodegenerative disorders: the role of oxidant/antioxidant balance, *Neurochem. Res.*, 25, 1315–1341 pp.
- Cary, S.P., Winger, J.A., Derbyshire, E.R. and Marletta, M.A.**, 2006, Nitric oxide signaling: no longer simply on or off, *Trends Biochem Sci*, 31, 231–239 pp.
- Casley, C.S., Canevari, L., Land, J.M., Clark, J.B. and Sharpe, M.A.**, 2002, Beta-amyloid inhibits integrated mitochondrial respiration and key enzyme activities, *J. Neurochem.*, 80(1), 91–100 pp.
- Cassano, T., Pace, L., Bedse, G., Lavecchia, A.M., De Marco, F. and Gaetani, S.**, 2016, Glutamate and mitochondria: two prominent players in the oxidative stress-induced neurodegeneration, *Curr. Alzheimer Res.*, 13, 185–197 pp.
- Cassidy, L., Fernandez, F., Johnson, J.B., Naiker, M., Owoola, A.G. and Broszczak, D.A.**, 2020, Oxidative stress in Alzheimer's Disease: A review on emergent natural polyphenolic therapeutics, *Complementary Ther. Med.*, 49, 102294 p.
- Cecconi, D., Orzetti, S., Vandelle, E., Rinalducci, S., Zolla, L. and Delledonne, M.**, 2009, Protein nitration during defense response in *Arabidopsis thaliana*, *Electrophoresis*, 30, 2460–2468 pp.
- Chabrier, P.E., Demerlé-Pallardy, C. and Auguet, M.**, 1999, Nitric oxide synthases: targets for therapeutic strategies in neurological diseases, *Cell Mol. Life Sci.*, 55, 1029–1035 pp.
- Chaffey, H. and Chazot, P.L.**, 2008, NMDA receptor subtypes: Structure, function and therapeutics, *Current Anaesthesia & Critical Care*, 19(4), 183–201 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Chaki, M., Carreras, A., Lopez-Jaramillo, J., Begara-Morales, J.C., Sanchez-Calvo, B., Valderrama, R., Corpas, F.J. and Barroso, J.B.,** 2013, Tyrosine nitration provokes inhibition of sunflower carbonic anhydrase (b-CA) activity under high temperature stress, *Nitric Oxide*, 29, 30–33 pp.
- Chaki, M., de Morales, P.A., Ruiz, C., Begara-Morales, J.C., Barroso, J.B., Corpas, F. J. And Palma, J.M.,** 2015, Ripening of pepper (*Capsicum annuum*) fruit is characterized by an enhancement of protein tyrosine nitration, *Annals of Botany*, 116(4), 637–647 pp.
- Chaki, M., Fernandez-Ocana, A.M., Valderrama, R., Carreras, A., Esteban, F.J., Luque, F., Gomez-Rodriguez, M.V., Begara-Morales, J.C., Corpas, F.J. and Barroso J.B.,** 2009, Involvement of reactive nitrogen and oxygen species (RNS and ROS) in sunflower–mildew interaction, *Plant Cell Physiology*, 50, 265–279 pp.
- Chaki, M., Valderrama, R., Fernandez-Ocana, A.M., Carreras, A., Gomez-Rodriguez, M.V., Lopez-Jaramillo, J., Begara-Morales, J.C., Sanchez-Calvo, B., Luque, F. And Leterrier, M.,** 2011, High temperature triggers the metabolism of S-nitrosothiols in sunflower mediating a process of nitrosative stress which provokes the inhibition of ferredoxin-NADP reductase by tyrosine nitration, *Plant, Cell & Environment*, 34, 1803–1818 pp.
- Chakraborty, S., Datta, S. and Ghosh, S.,** 2019, Cell Signal Induction of autophagy under nitrosative stress: A complex regulatory interplay between SIRT1 and AMPK in MCF7 cells, *Cellular Signalling*, 64, 109411 p.
- Cheeseman, J.M.,** 2006, Hydrogen peroxide concentrations in leaves under natural conditions, *Journal of Experimental Botany*, 57, 2435–2444 pp.
- Cheignon, C., Tomas, M., Bonnefont-Rousselot, D., Faller, P., Hureau, C. and Collin, F.,** 2018, Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's Disease, *Redox Biol.*, 14, 450–464 pp.
- Chen, H. and Chan, D.C.,** 2009, Mitochondrial dynamics-fusion, fission, movement, and mitophagy—in neurodegenerative diseases, *Hum. Mol. Genet.*, 18, 169–176 pp.
- Chen, J., Daggett, H., De Waard, M., Heinemann, S.H. and Hoshi, T.,** 2002, Nitric oxide augments voltage-gated P/Q-type Ca^{2+} channels constituting a putative positive feedback loop, *Free Radic. Biol. Med.*, 32, 638–649 pp.
- Chen, P.Y., Hsu, C.Y., Lee, C.E. and Chang, I.F.,** Arabidopsis glutamate receptor GLR3.7 is involved in abscisic acid response. *Plant Signal. Behav.* 2021, 16, 1997513 p.
- Cheng, X., Liu, H., Jiang, C.C., Fang, L., Chen, C., Zhang, X.D. and Jiang, Z.W.,** 2014, Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy through IRE1/JNK/beclin-1 in breast cancer cells, *International Journal of Molecular Medicine*, 34, 772-781 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Cheng, Y., Zhang, X., Sun, T., Tian, Q. and Zhang, W.H.**, 2018, Glutamate receptor homolog3.4 is involved in regulation of seed germination under salt stress in Arabidopsis, *Plant Cell Physiol.*, 59, 978–988 pp.
- Chiu, J., DeSalle, R., Lam, H.M., Meisel, L. and Coruzzi, G.**, 1999, Molecular evolution of glutamate receptors: A primitive signaling mechanism that existed before plants and animals diverged, *Mol. Biol. Evol.*, 16, 826–838 pp.
- Chiu, J.C., Brenner, E.D., DeSalle, R., Nitabach, M.N., Holmes, T.C., Coruzzi, G.M.**, 2002, Phylogenetic and expression analysis of the glutamate-receptorlike gene family in Arabidopsis thaliana, *Mol. Bio. Evol.*, 19(7), 1066–1082 pp.
- Cho, D., Kim, S.A., Murata, Y., Lee, S., Jae, S.K., Nam, H.G. and Kwak, J.M.**, 2009, De-regulated expression of the plant glutamate receptor homolog AtGLR3.1 impairs long-term Ca^{2+} -programmed stomatal closure, *The Plant Journal*, 58(3), 437–449 pp.
- Choy, K.W., Lau, Y.S., Murugan, D. and Mustafa, M.R.**, 2017, Chronic treatment with paeonol improves endothelial function in mice through inhibition of endoplasmic reticulum stress-mediated oxidative stress, *PLOS ONE*.
- Chung, K.K., Thomas, B., Li, X., Pletnikova, O., Tron-coso, J.C., Marsh, L., Dawson, V.L. and Dawson, T.M.**, 2004, S-nitrosylation of parkin regulates ubiquitination and compromises parkin's protective function, *Science* 304, 1328–1331 pp.
- Chung, S.K., Osawa, T. and Kawakishi, S.**, 1997, Hydroxyl radical-scavenging effects of spices and scavengers from brown mustard (*Brassica nigra*), *Biosci. Biotech. Bioch.*, 61(1), 118–123 pp.
- Clark, D., Durner, J., Navarre, D.A. and Klessig, D.F.**, 2000, Nitric oxide inhibition of tobacco catalase and ascorbate peroxidase, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13(12), 1380–1384 pp.
- Clementi, E. and Meldolesi, J.**, 1997, The cross-talk between nitric oxide and Ca^{2+} : a story with a complex past and a promising future, *Trends Pharmacol Sci*, 18, 266–269 pp.
- Clementi, E.**, 1998, Role of nitric oxide and its intracellular signalling pathways in the control of Ca^{2+} homeostasis, *Biochem. Pharmacol.*, 55:713–718 pp.
- Clementi, E., Brown, G.C., Feelisch, M. and Moncada, S.**, 1998, Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95, 7631–7636 pp.
- Clifton, R., Millar, A.H. and Whelan, J.**, 2006, Alternative oxidases in Arabidopsis: a comparative analysis of differential expression in the gene family provides new insights into function of non-phosphorylating bypasses, *Biochimica et Biophysica Acta Bioenergetics*, 1757(7), 730–741 pp.
- Cobley, J.N., Fiorello, M.L. and Bailey, D.M.**, 2018, 13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress, *Redox Biol.*, 15, 490–503 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Collingridge, G.L. and Lester, R.A.**, 1989, Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system, *Pharmacol. Rev.*, 41(2), 143–210 pp.
- Conway, K.A., Rochet, J.C., Bieganski, R.M. and Lansbury, P.T. Jr.**, 2001, Kinetic stabilization of the α -synuclein protofibril by a dopamine- α -synuclein adduct, *Science*, 294, 1346–1349 pp.
- Corpas, F.J., Barroso, J.B., Carreras, A., Valderrama, R., Palma, J.M., Leon, A.M., Sandalio, L.M. and del Rio, L.A.**, 2006, Constitutive arginine-dependent nitric oxide synthase activity in different organs of pea seedlings during plant development, *Planta*, 224, 246–254 pp.
- Corpas, F.J., del Rio, L.A. and Barroso, J.B.**, 2007, Need of biomarkers of nitrosative stress in plants, *Trends in Plant Science*, 12, 436–438 pp.
- Corpas, F.J., Leterrier, M., Valderrama, R., Airaki, M., Chaki, M., Palma, J.M. and Barroso, J.B.**, 2011, Nitric oxide imbalance provokes a nitrosative response in plants under abiotic stress, *Plant Science*, 181, 604–611 pp.
- Corpas, F.J., Palma, J.M., del Rio, L.A. and Barroso, J.B.**, 2013, Protein tyrosine nitration in higher plants grown under natural and stress conditions, *Frontiers in Plant Science*, 4, 29 p.
- Crawford, N.M.**, 2006, Mechanisms for nitric oxide synthesis in plants, *J. Exp. Bot.*, 57:471–478 pp.
- Credle, J.J., Finer-Moore, J.S., Papa, F.R., Stroud, R.M. and Walter, P.**, 2005, Inaugural Article: On the mechanism of sensing unfolded protein in the endoplasmic reticulum, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 102, 18773–18784 pp.
- Dai, Z., Wu, Z., Yang, Y., Wang, J., Satterfield, M.C. and Meininger, C.J.**, 2013, Nitric oxide and energy metabolism in mammals. *Biofactors.*, 39, 383–391 pp.
- Davenport, R.**, 2002, Glutamate receptors in plants, *Ann. Bot.*, 90(5):549–557 pp.
- Dawson, V. L., Dawson, T. M., London, E. D., Bredt, D. S. and Snyder, S. H.**, 1991, Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88, 6368–6371 pp.
- De Bortoli, S., Teardo, E., Szabò, I., Morosinotto, T. and Alboresi, A.**, 2016. Evolutionary insight into the ionotropic glutamate receptor superfamily of photosynthetic organisms, *Biophysical Chemistry*, 218, 14–26 pp.
- De Bruxelles, G.L. and Roberts, M.R.**, 2001, Signals regulating multiple responses to wounding and herbivores, *Cri. Rev. Plant Sci.*, 20, 487–521 pp.
- De Lau, L.M. and Breteler, M.M.**, 2006, Epidemiology of Parkinson's disease, *Lancet Neurol.*, 5(6), 525–535 pp.
- De Lazzari, F., Bubacco, L., Whitworth, A.J. and Bisaglia, M.**, 2018, Superoxide radical dismutation as new therapeutic strategy in Parkinson's disease, *Aging Dis.*, 9(4), 716–728 pp.
- De Pinto M.C. and De Gara, L.**, 2004, Changes in the ascorbate metabolism of apoplastic and symplastic spaces are associated with cell differentiation, *Journal of Experimental Botany*, 55(408), 2559–2569 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Del Rio, L.A., Corpas, F.J., Sandalio, L.M., Palma, J.M., Gomez, M. and Barroso, J.B.,** 2002, Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes, *J. Exp. Bot.*, 53, 1255–1272 pp.
- Delledonne, M., Zeier, J., Marocco, A. and Lamb, C.,** 2001, Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response, *Proceedings of the Nat. Academy of Sciences*, 98, 13454–13459 pp.
- Demidchik, V., Cuin, T.A., Svistunenko, D., Smith, S.J., Miller, A.J., Shabala, S., Miller, A.J. and Yurin, V.,** 2010, Arabidopsis root K⁺-efflux conductance activated by hydroxyl radicals: single-channel properties, genetic basis and involvement in stress-induced cell death, *Journal of cell science*, 123(9), 1468–1479 pp.
- Deng, Y., Srivastava, R. and Howell, S.H.,** 2013, Endoplasmic reticulum (ER) stress response and its physiological roles in plants, *Int. J. Mol. Sci.*, 14, 8188–8212 pp.
- Deng, Y., Humbert, S., Liu, J.X., Srivastava, R., Rothstein, S.J. and Howell, S.H.,** 2011, Heat induces the splicing by IRE1 of a mRNA encoding a transcription factor involved in the unfolded protein response in Arabidopsis, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 108, 7247–52 pp.
- Denninger, J.W. and Marletta, M.A.,** 1999, Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway, *Biochim. Biophys. Acta*, 1411, 334–350 pp.
- Dennison, K.L. and Spalding, E.P.,** 2000, Glutamate-gated calcium fluxes in Arabidopsis, *Plant Physiol.*, 124(4), 1511–1514 pp.
- Ding, Y., Shi, Y. and Yang, S.,** 2019, Advances and challenges in uncovering cold tolerance regulatory mechanisms in plants, *New Phytol.*, 222, 1690–1704 pp.
- Dixon, D.P., Cummins, I., Cole, D.J. and Edwards, R.,** 1998, Glutathione-mediated detoxification systems in plants. *Current opinion in plant biology*, 1(3), 258–266 pp.
- Du, H., Guo, L., Fang, F., Chen, D., Sosunov, A.A., McKhann, G.M., Yan, Y., Wang, C., Zhang, H. and Molkentin, J.D.,** 2008, Cyclophilin D deficiency attenuates mitochondrial and neuronal perturbation and ameliorates learning and memory in Alzheimer's disease, *Nat. Med.*, 14, 1097–1105 pp.
- Dubos, C., Huggins, D., Grant, G.H., Knight, M.R. and Campbell, M.M.,** 2003, A role for glycine in the gating of plant NMDA-like receptors, *Plant J.*, 35, 800–810 pp.
- Dubos, C., Willment, J., Huggins, D., Grant, G.H. and Campbell, M.M.,** 2005, Kanamycin reveals the role played by glutamate receptors in shaping plant resource allocation, *Plant J.*, 43, 348–355 pp.
- Duchen, M.R.,** 2004, Roles of mitochondria in health and disease, *Diabetes*, 53:96–102 pp.
- Duhan, N., Barak, S. and Mudgil, D.,** 2020, Bioactive lipids: chemistry & health benefits, *Biointerface Res. Appl. Chem.*, 10(6), 6676–6687 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ellgaard, L. and Helenius, A.**, 2003, Quality control in the endoplasmic reticulum, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 4, 181–191 pp.
- Ermak G. and Davies, K.J.**, 2002, Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death, *Mol. Immunol.*, 38, 713–721 pp.
- Espunya, M.C., De Michele, R., Gomez-Cadenas, A., Martinez, M.C.**, 2012, S-Nitrosoglutathione is a component of wound- and salicylic acid-induced systemic responses in *Arabidopsis thaliana*, *Journal of Experimental Botany*, 63, 3219–3227 pp.
- Essa, M.M., Moghadas, M., Ba-Omar, T., Walid Qoronfleh, M., Guillemin, G.J., Manivasagam, T., Justin-Thenmozhi, A., Ray, B., Bhat, A. and Chidambaram, S.B.**, 2019, Protective effects of antioxidants in Huntington's Disease: An extensive review, *Neurotox. Res.*, 35(3), 739–774 pp.
- Evans, D.A., Funkenstein, H.H., Albert, M.S., Scherr, P.A. and Cooki N.R.**, 1989, Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older persons higher than previously reported, *JAMA*, 262, 2551–2556 pp.
- Falkevall, A., Alikhani, N., Bhushan, S., Pavlov, P.F., Busch, K., Johnson, KA, Eneqvist, T., Tjernberg, L., Ankarcrona, M. and Glaser, E.**, 2006, Degradation of the amyloid beta-protein by the novel mitochondrial peptidosome, *Pre, P.J Biol Chem*, 281(39), 29096–29104 pp.
- Fares, A., Rossignol, M. and Peltier, J.B.**, 2011, Proteomics investigation of endogenous S-nitrosylation in *Arabidopsis*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 416(3–4), 331–336 pp.
- Feechan, A., Kwon, E., Yun, B.W., Wang, Y., Pallas, J.A. and Loake, G.J.**, 2005, A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102, 8054–8059 pp.
- Fini, A., Brunetti, C., Di Ferdinando, M., Ferrini, F. and Tattini, M.**, 2011, Stress-induced flavonoid biosynthesis and the antioxidant machinery of plants, *Plant Signaling & Behavior*, 6, 709–711 pp.
- Fliegert, R., Gasser, A. and Guse, A.H.**, 2007, Regulation of calcium signalling by adenine-based second messengers, *Biochem. Soc. Trans.*, 35, 109–114 pp.
- Forde, B.G. and Roberts, M.R.**, 2014, Glutamate receptor-like channels in plants: a role as amino acid sensors in plant defence?, *Prime Reports*, 6, 37 p.
- Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J.H., Mylona, P., Miedema, H., Torres, M.A., Linstead, P., Costa, S., Brownlee, C., Jones, J.D.G., Davies J.M. and Dolan, L.**, 2003, Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth, *Nature*, 422(6930), 442–446 pp.
- Forrester, M.T., Benhar, M. and Stamler, J.S.**, 2006, Nitrosative stress in ER: A new role for S-Nitrosylation in neurodegenerative diseases, *ACS Chemical Biology*, 1(6), 355–358 pp.
- Foster, M.W. and Stamler, J.S.**, 2004, New insights into protein S-nitrosylation. Mitochondria as a model system, *J. Biol. Chem.*, 279, 25891–25897 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Foyer, C.H. and Halliwell, B.,** 1976, The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*, 133, 21–25 pp.
- Foyer, C.H. and Noctor, G.,** 2011, Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub, *Plant Physiology*, 155, 2–18 pp.
- Frungillo, L., de Oliveira, J.F.P., Saviani, E.E., Oliveira, H.C., Martínez, M.C. and Salgado I.,** 2013, Modulation of mitochondrial activity by S-nitrosoglutathione reductase in *Arabidopsis thaliana* transgenic cell lines, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, 1827, 239–247 pp.
- Frungillo, L., Skelly, M.J., Loake, G.J., Spoel, S.H. and Salgado, I.,** 2014, S-nitrosothiols regulate nitric oxide production and storage in plants through the nitrogen assimilation pathway, *Nat. Commun.*, 5, 5401 p.
- Gabaldón, T. and Huynen M.A.,** 2004, Prediction of protein function and pathways in the genome era, *Cell Mol. Life Sci.*, 61, 930–944 pp.
- Gallé, A., Lautner, S., Flexas, J. and Fromm, J.,** 2015, Environmental stimuli and physiological responses: the current view on electrical signalling, *Environmental and Experimental Botany*, 114, 15–21 pp.
- Gandhi, A., Kariyat, R., Harikishore, A., Ayati, M., Bhunia, A. and Sahoo, N.,** 2021, Deciphering the Role of Ion Channels in Early Defense Signaling against Herbivorous Insects, *Cells*, 10, 2219 p.
- Gangwar, S.P., Green, M.N., Michard, E., Simon, A.A., Feijó, J.A. and Sobolevsky, A.I.,** 2021, Structure of the *Arabidopsis* glutamate receptor-like channel GLR3.2 ligand-binding domain, *Structure*, 29, 161–169 pp.
- Gao, H.M., Liu, B. and Hong, J.S.,** 2003, Critical Role for Microglial NADPH Oxidase in Rotenone-Induced Degeneration of Dopaminergic Neurons, *J. Neurosci.*, 23(15), 6181–6187 pp.
- Gibson, G.E., Zhang, H., Sheu, K.F., Bogdanovich, N., Lindsay, J.G., Lannfelt, L., Vestling, M. and Cowburn, R.F.,** 1998, α -ketoglutarate dehydrogenase in alzheimer brains bearing the APP670/671 mutation, *Ann. Neurol.*, 44(4), 676–681 pp.
- Gill, S.S. and Tuteja, N.,** 2010, Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants, *Plant Physiol. Biochem.*, 48(12), 909–930 pp.
- Gilliam, M., Campbell, M., Dubos, C., Becker, D. and Davenport, R.,** 2006, The *Arabidopsis thaliana* glutamate-like receptor family (AtGLR), *Communication in Plants*, 187–204 pp.
- Glaser, E. and Alikhani, N.,** 2010, The organellar peptidasome, PreP: a journey from *Arabidopsis* to Alzheimer's disease, *Biochim. Biophys. Act.*, 1797(6–7), 1076–1080 pp.
- Glenner, G.G. and Wong, C.W.,** 1984, Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein, *Biochem. Biophys. Res. Commun* 120(3), 885–890 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Goldstein, S., Meyerstein, D. and Czapski, G.,** 1993, The Fenton reagents, *Free Radical Biology and Medicine*, 15(4), 435–445 pp.
- Gomez, S.M., Bil, K.Y., Aguilera, R., Nishio, J.N., Faull, K.F. and Whitelegge, J.P.,** 2003, Transit peptide cleavage sites of integral thylakoid membrane proteins, *Mol. Cell Proteomics*, 2(10), 1068–1085 pp.
- González-Burgos, E., Fernández-Moriano, C., Lozano, R., Iglesias, I. and Gómez-Serranillos, M. P.,** 2017, Ginsenosides Rd and Re co-treatments improve rotenone-induced oxidative stress and mitochondrial impairment in SH-SY5Y neuroblastoma cells, *Food and Chemical Toxicology*, 109, 38–47 pp.
- Gorg, B., Qvartskhava, N., Voss, P., Grune, T., Haussinger, D. and Schliess, F.,** 2007, Reversible inhibition of mammalian glutamine synthetase by tyrosine nitration, *FEBS. Lett.*, 581, 84–90 pp.
- Gotoh, T. and Mori, M.,** 2006, Nitric Oxide and Endoplasmic Reticulum Stress, *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.*, 26, 1207–1214 pp.
- Gow, A.J., Buerk, D.G. and Ischiropoulos, H.,** 1997, A novel reaction mechanism for the formation of S-nitrosothiol in vivo, *J. Biol. Chem.*, 272, 2841–2845 pp.
- Gow, A.J., Farkouh, C.R., Munson, D.A., Posencheg, M.A. and Ischiropoulos, H.,** 2004, Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 287, 262–268 pp.
- Görlach, A., Bertram, K., Hudecova, S. and Krizanová, O.,** 2015, Calcium and ROS: A mutual interplay, *Redox Biology*, 6, 260–271 pp.
- Grassi, C., D'Ascenzo, M. and Azzena, G.B.,** 2004, Modulation of Cav1 and Cav2.2 channels induced by nitric oxide via cGMP-dependent protein kinase, *Neurochem. Int.*, 45, 885–893 pp.
- Greco, T.M., Hodara, R., Parastatidis, I., Heijnen, H.F., Dennehy, M.K., Liebler, D.C. and Ischiropoulos, H.,** 2006, Identification of S-nitrosylation motifs by site-specific mapping of the S-nitrosocysteine proteome in human vascular smooth muscle cells, *Proc Natl Acad Sci*, 103, 7420–7425 pp.
- Greenacre, S.A. and Ischiropoulos, H.,** 2001, Tyrosine nitration: localisation, quantification, consequences for protein function and signal transduction, *Free Radic. Res.*, 34, 541–581 pp.
- Griffith, O.W.,** 1980, Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine, *Analytical Biochemistry*, 106:207–212 pp.
- Guo, W., Jiang, T., Lian, C., Wang, H., Zheng, Q. and Ma, H.,** 2014, QKI deficiency promotes FoxO1 mediated nitrosative stress and endoplasmic reticulum stress contributing to increased vulnerability to ischemic injury in diabetic heart, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 75, 131–140 pp.
- Habig, W.H., Pabst, M.J. and Jakoby, W.B.,** 1974, Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation, *J. Biol. Chem.*, 249(22):7130–7139 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Halliwell, B. and Foyer, C.H.**, 1976, Ascorbic acid, metal ions and the superoxide radical, *Biochemical Journal*, 155(3), 697–700 pp.
- Han, X.X., Tomizawaa, K., Fujimura, A., Ohmori, I., Nishiki, T.I., Matsushita, M. and Matsui, H.**, 2011, Regulation of Mitochondrial Dynamics and Neurodegenerative Diseases, *Acta Med. Okayama*, 65, 1–10 pp.
- Hanafy, K.A., Krumenacker, J.S. and Murad, F.**, 2001, NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction, *Med Sci Monit*, 7, 801–819 pp.
- Haney, M.J., Klyachko, N.L., Zhao, Y., Kabanov, A.V. and Batrakova, E.V.**, 2018, Extracellular vesicles as drug delivery vehicles for potent redox enzyme catalase to treat Parkinson's disease, *Free Radic. Biol. Med.*, 128, 18 p.
- Harding, H.P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M. and Ron, D.**, 2000, Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells, *Mol. Cell*, 6, 1099–1108 pp.
- Harris, S.L. and Levine, A.J.**, 2005, The p53 pathway: positive and negative feedback loops, *Oncogene*, 24:2899–2908 pp.
- Hasanuzzaman, M., Alam, M.M., Nahar, K., Mohsin, S.M., Bhuyan, M.B., Parvin, K., Hawrylak-Nowak, B. and Fujita, M.**, 2019, Silicon-induced antioxidant defense and methylglyoxal detoxification works coordinately in alleviating nickel toxicity in *Oryza sativa* L., *Ecotoxicology*, 28, 261–276 pp.
- He, Y., Imam, S.Z., Dong, Z., Jankovic, J., Ali, S. F., Appel, S.H. and Le, W.**, 2003, Role of nitric oxide in rotenone-induced nigro-striatal injury, *J. Neuro-chem.*, 86, 1338–1345 pp.
- Hedrich, R.**, 2012, Ion channels in plants, *Physiological Reviews*, 92:1777–1811 pp.
- Hedrich, R., Salvador-Recatalà, V. and Dreyer, I.**, 2016, Electrical wiring and long-distance plant communication, *Trends in Plant Science*, 21, 376–387 pp.
- Herzog, V. and Fahimi, H.**, 1973, Determination of the activity of peroxidase, *Anal. Biochem.*, 55, 554–562 pp.
- Hess, D.T., Matsumoto, A., Kim, S.O., Marshall, H.E. and Stamler, J.S.**, 2005, Protein S-nitrosylation: purview and parameters, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6, 150–166 pp.
- Hirai, K., Aliev, G., Nunomura, A., Fujioka, H., Russell, R.L., Atwood, C.S., Johnson, A.B., Kress, Y., Vinters, H.V., Tabaton, M., Shimohama, S., Cash, A.D., Siedlak, S.L., Harris, P.L., Jones, P.K., Petersen, R.B., Perry, G. and Smith, M.A.**, 2001, Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease, *Journal of Neuroscience*, 21(9), 3017–3023 pp.
- Ho, L.H.M., Giraud, E., Uggalla, V., Lister, R., Clifton, R., Glen, A., Thirkettle-Watts, D., Van Aken, O. and Whelan, J.**, 2008, Identification of regulatory pathways controlling gene expression of stress-responsive mitochondrial proteins in *Arabidopsis*, *Plant Physiology*, 147, 1858–1873 pp.
- Hoagland, D.R. and Arnon, D.I.**, 1950, The water culture method for growing plants without soil, *Calif. Agric. Exp. Stn. Circ.*, (347), 1–32 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Holmström, K.M. and Finkel, T.,** 2014, Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 15,411–421 pp.
- Holzmeister, C., Gaupels, F., Geerlof, A., Sarioglu, H., Sattler, M., Durner, J. and Lindermayr, C.,** 2015, Differential inhibition of Arabidopsis superoxide dismutases by peroxynitrite-mediated tyrosine nitration, *Journal of Experimental Botany*, 66(3), 989–999 pp.
- Howell, S.H.,** 2013, Endoplasmic reticulum stress responses in plants, *Annual Review of Plant Biology*, 64:477–499 pp.
- Hu, Y., Jiang, L. and Wang, F., Yu, D.,** 2013, Jasmonate regulates the inducer of cbf expression–C-repeat binding factor/dre binding factor1 Cascade and Freezing Tolerance in Arabidopsis, *Plant Cell*, 25, 2907–2924 pp.
- Huang, W.J., Zhang, X. and Chen, W.W.,** 2016, Role of oxidative stress in Alzheimer’s Disease, *Biomed. Rep.*, 4(5), 519–522 pp.
- Ighodaro, O.M. and Akinloye, O.A.,** 2018, First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid, *Alex. J. Med.*, 54(4), 287–293 pp.
- Iwata, Y. and Koizumi, N.,** 2005, An Arabidopsis transcription factor, AtbZIP60, regulates the endoplasmic reticulum stress response in a manner unique to plants, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(14), 5280–5285 pp.
- Iwata, Y. and Koizumi, N.,** 2012, Plant transducers of the endoplasmic reticulum unfolded protein response, *Trends in Plant Science*, 17, 720–727 pp.
- Jaffrey, S.R., Erdjument-Bromage, H., Ferris, C.D., Tempst, P. and Snyder, S.H.,** 2001, Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide, *Nat. Cell Biol.*, 3, 193–197 pp.
- Jain, P. and Bhatla, S.C.,** 2018, Tyrosine nitration of cytosolic peroxidase is probably triggered as a long distance signaling response in sunflower seedling cotyledons subjected to salt stress, *PLOS One*, 13(5), e0197132 p.
- Jiang, M. and Zhang, J.,** 2002, Involvement of plasma membrane NADPH oxidase in abscisic acid-and water stress-induced antioxidant defense in leaves of maize seedlings, *Planta*, 215, 1022–30 pp.
- Jimenez, A., Hernandez, J.A., del Rio, L.A. and Sevilla, F.,** 1997, Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves, *Plant Physiology*, 114(1), 275–284 pp.
- Jones, A.M., Chory, J., Dangel J.L., Estelle, M., Jacobsen, S.E., Meyerowitz, E.M., Nordborg, M. and Weigel, D.,** 2008, The impact of Arabidopsis on human health: diversifying our portfolio. *Cell*, 133(6), 939–943 pp.
- Kaiser, W.M. and Huber, S.C.,** 2001, Post-translational regulation of nitrate reductase: mechanism, physiological relevance and environmental triggers, *J. Exp. Bot.*, 52, 1981– 1989 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kamauchi, S., Nakatani, H., Nakano, C. and Urade, R.,** 2005, Gene expression in response to endoplasmic reticulum stress in *Arabidopsis thaliana*, *The FEBS journal*, 272(13), 3461–3476 pp.
- Kang, J. and Turano, F.J.,** 2003, The putative glutamate receptor 1.1 (AtGLR1.1) functions as a regulator of carbon and nitrogen metabolism in *Arabidopsis thaliana*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(11), 6872–6877 pp.
- Kang, J., Mehta, S. and Turano, F.J.,** 2004, The putative glutamate receptor 1.1 (AtGLR1.1) in *Arabidopsis thaliana* regulates abscisic acid biosynthesis and signaling to control development and water loss, *Plant and Cell Physiology*, 45(10), 1380–1389 pp.
- Kato, H., Takemoto, D. and Kawakita, K.,** (2013). Proteomic analysis of S-nitrosylated proteins in potato plant, *Physiologia Plantarum*, 148(3), 371–386 pp.
- Kazakov, Y., Tarasov, A., Alyoshina, L. and Brainina, K.,** 2020, Interplay between antioxidant activity, health and disease, *Biointerface Res. Appl. Chem.*, 10(1), 4893–4901 pp.
- Keszler, A., Zhang, Y. and Hogg, N.,** 2010, Reaction between nitric oxide, glutathione, and oxygen in the presence and absence of protein: how are S-nitrosothiols formed?, *Free Radical Biology and Medicine*, 48, 55–64 pp.
- Keunen, E., Jozefczak, M., Remans, T., Vangronsveld, J. and Cuypers, A.,** 2013, Alternative respiration as a primary defence during cadmium-induced mitochondrial oxidative challenge in *Arabidopsis thaliana*, *Environmental and Experimental Botany*, 91, 63–73 pp.
- Keunen, E.L.S., Peshev, D., Vangronsveld, J., Van Den Ende, W.I.M. and Cuypers, A.N.N.,** 2013, Plant sugars are crucial players in the oxidative challenge during abiotic stress: extending the traditional concept, *Plant, Cell & Environment*, 36(7), 1242–1255 pp.
- Kim, G.H., Kim, J.E., Rhie S.J. and Yoon, S.,** 2015, The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases, *Exp. Neurobiol.*, 24(4), 325–340 pp.
- Kim, T.W. and Wang, Z.Y.,** 2010, Brassinosteroid signal transduction from receptor kinases to transcription factors, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 61, 681–704 pp.
- Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y. and Shimizu, N.,** 1998, Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism, *Nature*, 392, 605–608 pp.
- Kliebenstein, D.J., Monde, R.A. and Last, R.L.,** 1998, Superoxide dismutase in *Arabidopsis*: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization, *Plant Physiol.*, 118(2), 637–650 pp.
- Klotz, L.O., Schroeder, P. and Sies, H.,** 2002, Peroxynitrite signaling: receptor tyrosine kinases and activation of stress-responsive pathways, *Free Radic. Biol. Med.*, 33, 737–743 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kong, D., Hu, H.C., Okuma, E., Lee, Y., Lee, H.S., Munemasa, S., Cho, D., Ju, C., Pedoeim, L. and Rodriguez, B.,** 2016, L-Met Activates Arabidopsis GLR Ca^{2+} channels upstream of ROS production and regulates stomatal movement. *Cell Rep.*, 17, 2553–2561 pp.
- Kong, D., Ju, C., Parihar, A., Kim, S., Cho, D. and Kwak, J.M.,** 2015, Arabidopsis glutamate receptor homolog3.5 modulates cytosolic Ca^{2+} level to counteract effect of abscisic acid in seed germination, *Plant Physiology*, 167(4), 1630–1642 pp.
- Kosová, K., Vítámvás, P., Prášil, I.T. and Renaut, J.,** 2011, Plant proteome changes under abiotic stress—contribution of proteomics studies to understanding plant stress response, *Journal of Proteomics* 74, 1301–1322 pp.
- Kovacs, I., Holzmeister, C., Wirtz, M., Geerlof, A., Fröhlich, T., Römling, G., Gitto, T. K., Linster, E., Hell, R., Arnold, G. J., Durner, J. and Lindermayr, C.,** 2016, ROS-Mediated Inhibition of S-nitrosoglutathione Reductase Contributes to the Activation of Anti-oxidative Mechanisms, *Front. Plant Sci.*, 7, 1669 p.
- Kozlov, A.V., Staniek, K. and Nohl, H.,** 1999, Nitrite reductase activity is a novel function of mammalian mitochondria, *FEBS Lett.* 454, 127–130 pp.
- Krishnamurthy, K., Laskowitz, D.T.,** 2016, Cellular and molecular mechanisms of secondary neuronal injury following traumatic brain injury, CRC Press/Taylor and Francis Group, Boca Raton.
- Krumenacker, J.S., Hanafy, K.A. and Murad, F.,** 2004, Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase, *Brain Res. Bull.*, 62, 505–515 pp.
- Kumari, U. and Tan, E.K.,** 2009, LRRK2 in Parkinson's disease: genetic and clinical studies from patients, *FEBS. J.*, 276(22), 6455–6463 pp.
- Kurosinski, P., Guggisberg, M. and Götz, J.,** 2002 Alzheimer's and Parkinson's Disease overlapping or synergistic pathologies?, *Trends in Molecular Medicine*, 8(1), 3–5pp.
- Kwaaitaal, M., Huisman, R., Maintz, J., Reinstädler, A., Panstruga, R.,** 2011, Ionotropic glutamate receptor (iGluR)-like channels mediate MAMP-induced calcium influx in Arabidopsis thaliana, *Biochemical Journal*, 440(3), 355–365 pp.
- La, V.H., Lee, B.R., Islam, M.T., Park, S.H., Jung, H.I., Bae, D.W., Kim, T.H.,** 2019, Characterization of salicylic acid-mediated modulation of the drought stress responses: Reactive oxygen species, proline, and redox state in Brassica napus, *Environ. Exp. Bot.*, 157, 1–10 pp.
- Lafon–Cazal, M., Pietri, S., Culcasi, M. and Bockaert, J.,** 1993, NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity, *Nature*, 364, 535–537 pp.
- Lam, H.M., Chiu, J., Hsieh, M.H., Meisel, L., Oliveira, I.C., Shin, M. And Coruzzi, G.,** 1998, Glutamate-receptor genes in plants, *Nature*, 396, 125–126 pp.
- Law, M.Y., Charles, S.A. and Halliwell, B.,** 1983, Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts: the effect of hydrogen peroxide and of paraquat, *Biochem. J.* 210, 899–903 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Laxa, M., Liebthal, M., Telman, W., Chibani, K. and Dietz, K.J.**, 2019, The role of the plant antioxidant system in drought tolerance, *Antioxidants*, 8, 94 p.
- Lee, J., Huang, M.S., Yang, I.C., Lai, T.C., Wangd, J.L., Pang, V.F., Hsiao, M. and Kuo, M.Y.P.**, 2008, Essential roles of caspases and their upstream regulators in rotenone-induced apoptosis, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 371, 33–38 pp.
- Lee, K., Tirasophon, W., Shen, X., Michalak, M., Prywes, R., Okada, T., Yoshida, H., Mori, K. and Kaufman, R.J.**, 2002, IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response, *Genes Dev.*, 16, 452– 466 pp.
- Lee, U., Wie, C., Fernandez, B.O., Feelisch, M. and Vierling ,E.**, 2008, Modulation of nitrosative stress by S-nitrosoglutathione reductase is critical for thermotolerance and plant growth in Arabidopsis, *Plant Cell*, 20, 786–802 pp.
- Leterrier, M., Airaki, M., Palma, J.M., Chaki, M., Barroso, J.B. and Corpas, F.J.**, 2012, Arsenic triggers the nitric oxide (NO) and S-nitrosoglutathione (GSNO) metabolism in Arabidopsis, *Environmental Pollution*, 166, 136–143 pp.
- Leterrier, M., Chaki, M., Airaki, M., Valderrama, R., Palma, J.M., Barroso, J.B. and Corpas, F.J.**, 2011, Function of S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR) in plant development and under biotic/abiotic stress, *Plant Signaling&Behaviour* 6, 789–793 pp.
- Lev, N., Ickowicz, D., Barhum, Y., Blondheim, N., Melamed, E. and Offen D.**, 2006, Experimental encephalomyelitis induces changes in DJ-1:implications for oxidative stress in multiple sclerosis, *Antioxid. Redox Signal*, 8(11–12), 1987–1995 pp.
- Lev, N., Roncevic, D., Ickowicz, D., Melamed, E. and Offen, D.**, 2006, Role of DJ-1 in Parkinson's disease. *J Mol Neurosci*, 29, 215–225 pp.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R. and Lamb, C.**, 1994, H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response, *Cell*, 79(4), 583–593 pp.
- Levine, R.L., Williams, J.A., Stadtman, E.R. and Shacter E.**, 1994, Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins, *Methods in Enzymology* 233, 346–357 pp.
- Li, F., Wang, J., Ma, C., Zhao, Y., Wang, Y., Hasi, A. and Qi, Z.**, 2013, Glutamate receptor-like channel3.3 is involved in mediating glutathione-triggered cytosolic calcium transients, transcriptional changes, and innate immunity responses in Arabidopsis, *Plant Physiol.*, 162, 1497–1509 pp.
- Li, J. and Chory, J.**, 1997, A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell* 1997, 90, 929–938 pp.
- Li, L., Hu, L., Han, L.P., Ji, H., Zhu, Y., Wang, X., Ge, J., Xu, M., Shen, D. and Dong, H.**, 2014, Expression of turtle riboflavin-binding protein represses mitochondrial electron transport gene expression and promotes flowering in Arabidopsis, *BMC Plant Biology*, 14, 381 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lin, M.T., Simon, D.K., Ahn, C.H., Kim, L.M. and Beal, M.F.,** 2002, High aggregate burden of somatic mtDNA point mutations in aging and Alzheimer's disease brain, *Hum. Mol. Genet.*, 11, 133–145 pp.
- Lindermayr, C., Sell, S., Muller, B., Leister, D. and Durner, J.,** 2010, Redox regulation of the NPR1-TGA1 system of *Arabidopsis thaliana* by nitric oxide, *Plant Cell* 22: 2894–2907 pp.
- Lipton, S.A, Choi, Y.B., Pan, Z.H., Lei, S.Z., Chen, H.S., Sucher, N.J., Loscalzo, J., Singel, D.J. and Stamler, J.S.,** 1993, A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds, *Nature*, 364, 626–632 pp.
- Liu, J.X. and Howell, S.H.,** 2010, bZIP28 and NF-Y transcription factors are activated by ER stress and assemble into a transcriptional complex to regulate stress response genes in *Arabidopsis*, *The Plant Cell*, 22, 782–796 pp.
- Liu, J.X. and Howell, S.H.,** 2010, Endoplasmic reticulum protein quality control and its relationship to environmental stress responses in plants, *The Plant Cell*, 22(9), 2930–2942 pp.
- Liu, Z., Ren, Z., Zhang, J., Chuang, C.C., Kandaswamy, E., Zhou, T. and Zuo, L.,** 2018, Role of ROS and nutritional antioxidants in human diseases, *Front. Physiol.*, 9, 477 p.
- Liu, Z., Zhou, T., Ziegler, A.C., Dimitrion, P. and Zuo, L.,** 2017, Oxidative stress in neurodegenerative diseases: from molecular mechanisms to clinical applications, *Oxidative Med. Cell. Longev.*, 2525967 p.
- Lu, D.P. and Christopher, D.A.,** 2008, Endoplasmic reticulum stress activates the expression of a sub-group of protein disulfide isomerase genes and AtbZIP60 modulates the response in *Arabidopsis thaliana*, *Molecular Genetics and Genomics*, 280, 199–210 pp.
- Luna, C.M., González, C.A. and Trippi, V.S.,** 1994, Oxidative damage caused by an excess of copper in oat leaves. *Plant and Cell Physiology*, 35(1), 11–15 pp.
- Lustbader, JW, Cirilli, M, Lin, C, Xu, HW, Takuma, K, Wang, N, Caspersen, C, Chen, X, Pollak, S. and Chaney, M.,** 2004, ABAD directly links Abeta to mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease, *Science*, 304(5669), 448–452 pp.
- Madathil, K.S., Karuppagounder, S.S., Haobam, R., Varghese, M., Rajamma, U. and Mohanakumar, K.P.,** 2013, Nitric oxide synthase inhibitors protect against rotenone-induced, oxidative stress mediated parkinsonism in rats, *Neurochemistry International*, 62(5), 674–683 pp.
- Madhava Rao, K.V. and Sresty, T.V.S.,** 2000, Antioxidative parameters in the seedlings of pigeon pea (*Cajanus cajan* L. Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses, *Plant Sci.*, 157, 113–128 pp.
- Mah, S.J.,** 2005, Glutamate receptor trafficking: Endoplasmic reticulum quality control involves ligand binding and receptor function, *J. Neurosci.*, 25(9), 2215–2225 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Malik, S.I., Hussain, A., Yun, B.W., Spoel, S.H. and Loake, G.J.,** 2011, GSNOR-mediated denitrosylation in the plant defence response, *Plant Science*, 181, 540–544 pp.
- Manfredi, G. and Beal, M.F.,** 2000, The Role of Mitochondria in the Pathogenesis of Neurodegenerative Diseases, *Brain Pathol.*, 10(3), 462–472 pp.
- Mann VM, Cooper JM, Daniel SE, Srai K, Jenner P, Marsden CD and Schapira AH.,** 1999, Complex 1, iron, and ferritin in Parkinson's disease substantia nigra, *Ann. Neurol.*, 46, 598–605 pp.
- Mannick, J.B. and Schonhoff, C.M.,** 2002, Nitrosylation: the next phosphorylation? *Arch. Biochem. Biophys.*, 408, 1–6 pp.
- Manucha, W.,** 2017, Mitochondrial dysfunction associated with nitric oxide pathways in glutamate neurotoxicity, *Clin. Investig. Arterioscler.*, 29(2):92–97 pp.
- Manzoor, H., Kelloniemi, J., Chiltz, A., Wendehenne, D., Pugin, A., Poinssot, B. and Garcia-Brugger, A.,** 2013, Involvement of the glutamate receptor AtGLR3.3 in plant defense signaling and resistance to *Hyaloperonospora arabidopsidis*, *The Plant Journal*, 76, 466–480 pp.
- Martí, M. C., Florez-Sarasa, I., Camejo, D., Ribas-Carbó, M., Lázaro, J.J. and Sevilla, F.,** 2011, Response of the mitochondrial antioxidant redox system and respiration to salinity in pea plants, *J. Exp. Bot.*, 62(11), 3863–3874 pp.
- Maruyama, D., Sugiyama, T., Endo, T. and Nishikawa, S.I.,** 2014, Multiple BiP genes of *Arabidopsis thaliana* are required for male gametogenesis and pollen competitiveness, *Plant and Cell Physiology*, 55(4), 801–810 pp.
- Matsukawa, J., Matsuzawa, A., Takeda, K. and Ichijo, H.,** 2004, The ASK1-MAP kinase cascades in mammalian stress response, *J. Biochem.*, 136, 261–265 pp.
- Mattson, M. P.,** 2000, Apoptosis in neurodegenerative disorders, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 1:120–129 pp.
- Maxwell, K., Borland, A.M., Haslam, R.P., Helliker, B.R., Roberts, A. and Griffiths, H.,** 1999, Modulation of Rubisco activity during the diurnal phases of the crassulacean acid metabolism plant *Kalanchoedaigremontiana*, *Plant Physiology*, 121(3), 849–856 pp.
- Maxwell, K., von Caemmerer, S. and Evans, J.R.,** 1997, Is a low internal conductance to CO₂ diffusion a consequence of succulence in plants with crassulacean acid metabolism?, *Functional Plant Biology*, 24(6), 777–786 pp.
- Mayer, M.L.,** 2016, Structural biology of glutamate receptor ion channel complexes, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 41, 119–127 pp.
- McKersie, B.D., Murnaghan J.J., K., S. and Bowley Stephen R.,** 2000, IronSuperoxide Dismutase Expression in Transgenic Alfalfa Increases Winter Survival without a Detectable Increase in Photosynthetic Oxidative Stress Tolerance, *Plant Physiol.*, 122, 1427–1438 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- McLimans, K.E., Clark, B.E., Plagman, A., Pappas, C., Klinedinst, B., Anatharam, V., Kanthasamy, A. and Willette, A.A.,** 2019, Is cerebrospinal fluid superoxide dismutase 1 a biomarker of tau but not amyloid-induced neurodegeneration in Alzheimer's disease?, *Antioxid. Redox Signal.*, 31(8), 572–578 pp.
- Men, L. and Wang, Y.,** 2007, The oxidation of yeast alcohol dehydrogenase-1 by hydrogen peroxide in vitro, *J. Proteome Res.*, 6(1), 216–225 pp.
- Messmer, U.K. and Brüne, B.,** 1996, Nitric oxide-induced apoptosis: p53-dependent and p53-independent signalling pathways, *Biochem J.*, 319, 299–305 pp.
- Meyerhoff, O., Müller, K., Roelfsema, M.R.G., Latz, A., Lacombe, B., Hedrich, R., Dietrich, P. and Becker, D.,** 2005, AtGLR3.4, a glutamate receptor channel-like gene is sensitive to touch and cold, *Planta*, 222, 418–427 pp.
- Michard, E., Lima, P.T., Borges, F., Silva, A.C., Portes, M.T., Carvalho, J.E., Gilliam, M., Liu, L.-H., Obermeyer, G. and Feijo, J.A.,** 2011, Glutamate receptor-like genes form Ca^{2+} channels in pollen tubes and are regulated by pistil D-serine, *Science*, 332(6028), 434–437 pp.
- Miller, N.D., Durham Brooks, T.L., Assadi, A.H. and Spalding, E.P.,** 2010, Detection of a gravitropism phenotype in glutamate receptor-like 3.3 mutants of *Arabidopsis thaliana* using machine vision and computation, *Genetics*, 186(2), 585–593 pp.
- Minetti, M., Mallozzi, C. and Di Stasi, A.M.,** 2002, Peroxynitrite activates kinases of the src family and upregulates tyrosine phosphorylation signaling, *Free Radic. Biol. Med.*, 33, 744–754 pp.
- Misrani, A., Tabassum, S. and Yang, L.,** 2021, Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Alzheimer's Disease, *Front. Aging. Neurosci.*, 13, 617588 p.
- Mittler, R.,** 2002, Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance, *Trends in Plant Science*, 7(9):405–410 pp.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. and Van Breusegem, F.,** 2004, Reactive oxygen gene network of plants, *Trends in Plant Science*, 9(10), 490–498 pp.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G.A.D., Tognetti, V.B., Vandepoele, K., Gollery, M., Shulaev V. and Van Breusegem, F.,** 2011, ROS signaling: the new wave?, *Trends in Plant Science*, 16(6), 300–309 pp.
- Miyake, C. and Asada, K.,** 1994, Ferredoxin-dependent photoreduction of monodehydroascorbate radicals in spinach thylakoids, *Plan and Cell Physiology*, 35, 539–549 pp.
- Molassiotis, A. and Fotopoulos, V.,** 2011, Oxidative and nitrosative signaling in plants: two branches in the same tree?, *Plant Signaling & Behaviour*, 6, 210–214 pp.
- Molina-Jiménez, M.F., Sánchez-Reus, M.I., Cascales, M. Andrés, D. and Benedí, J.,** 2005, Effect of fraxetin on antioxidant defense and stress proteins in human neuroblastoma cell model of rotenone neurotoxicity. Comparative study with myricetin and N-acetylcysteine. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 209(3), 214–225 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Monaghan, D.T., Bridges, R.J., Cotman, C.W.,** 1989, The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 29, 365–402 pp.
- Mousavi, S.A., Chauvin, A., Pascaud, F., Kellenberger, S. and Farmer, E.E.,** 2013, GLUTAMATE RECEPTOR-LIKE genes mediate leaf-to-leaf wound signalling, *Nature*, 500, 422–426 pp.
- Munné-Bosch, S. and Alegre, L.,** 2003, Drought-induced changes in the redox state of α -tocopherol, ascorbate, and the diterpene carnosic acid in chloroplasts of labiatae species differing in carnosic acid contents, *Plant Physiology*, 131(4), 1816–1825 pp.
- Murthy, K.S. and Makhlouf, G.M.,** 1998, cGMP-mediated Ca^{2+} release from IP₃-insensitive Ca^{2+} stores in smooth muscle, *Am. J. Physiol.*, 274, 1199–1205 pp.
- Nagashima, Y., Iwata, Y., Mishiba, K.I. and Koizumi, N.,** 2016, Arabidopsis tRNA ligase completes the cytoplasmic splicing of bZIP60 mRNA in the unfolded protein response, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 470(4), 941–946 pp.
- Nagata, T.,** 2004 Comparative analysis of plant and animal calcium signal transduction element using plant full-length cDNA data, *Mol. Biol. Evol.*, 21:1855–1870 pp.
- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B.A. and Yuan, J.,** 2000, Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- β , *Nature*, 403, 98–103 pp.
- Nakano, Y. and Asada, K.,** 1981, Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts, *Plant Cell Physiol.*, 22, 867–880 pp.
- Newhouse, K., Hsuan, S.L., Chang, S.H., Cai, B., Wang, Y. and Xia Z.,** 2004, Rotenone-Induced Apoptosis Is Mediated By p38 And JNK MAP Kinases In Human Dopaminergic SH-SY5Y Cells, *Toxicological Sciences*, 79(1), 137–146 pp.
- Noctor, G. and Foyer, C.H.,** 1998, Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control, *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49, 249–279 pp.
- Noh, S.J., Kwon, C.S., Oh, D.H., Moon, J.S. and Chung, W.I.,** 2003, Expression of an evolutionarily distinct novel BiP gene during the unfolded protein response in *Arabidopsis thaliana*, *Gene*, 311, 81–91 pp.
- Nouri, M.Z. and Komatsu, S.,** 2010, Comparative analysis of soybean plasma membrane proteins under osmotic stress using gel-based and LC MS/MS-based proteomics approaches, *Proteomics*, 10, 1930–1945 pp.
- Nukina, N., Ihara, Y.,** 1986, One of the antigenic determinants of paired helical filaments is related to tau proteins, *J. Biochem.* 99(5), 1541–1544 pp.
- Onose, G., Anghelescu, A., Blendea, D., Ciobanu, V., Daia, C., Firan, F.C., Oprea, M., Spinu, A., Popescu, C. and Ionescu, A.,** 2022, Cellular and Molecular Targets for Non-Invasive, Non-Pharmacological Therapeutic/Rehabilitative Interventions in Acute Ischemic Stroke, *Int. J. Mol. Sci.*, 23(2), 907 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Oracz, K., El-Maarouf Bouteau, H., Farrant, J.M., Cooper, K., Belghazi, M., Job, C., Job, D., Corbineau, F. and Bailly, C.,** 2007, ROS production and protein oxidation as a novel mechanism for seed dormancy alleviation, *The Plant Journal*, 50, 452–65 pp.
- Ortega-Galisteo, A. P., Rodríguez-Serrano, M., Pazmino, D. M., Gupta, D. K., Sandalio, L. M. and Romero-Puertas, M. C.,** 2012, S-Nitrosylated proteins in pea (*Pisum sativum* L.) leaf peroxisomes: changes under abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*, 63(5), 2089–2103 pp.
- Ortiz-Ramírez, C., Michard, E., Simon, A.A., Damineli, D.S.C., Hernández-Coronado, M., Becker, J.D., Feijó, J.A.,** 2017, GLUTAMATE RECEPTORLIKE channels are essential for chemotaxis and reproduction in mosses, *Nature*, 549, 91–95 pp.
- Oyadomari, S. and Mori, M.,** 2004, Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress, *Cell Death Differ.*, 11, 381–389 pp.
- Oyadomari, S., Araki, E. and Mori, M.,** 2002, Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in pancreatic-cells, *Apoptosis*. 7, 335–345 pp.
- Oyadomari, S., Takeda, K., Takiguchi, M., Gotoh, T., Matsumoto, M., Wada, I., Akira, S., Araki E. and Mori, M.,** 2001, Nitric oxide-induced apoptosis in pancreatic cells is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway, *Proc. Natl. Acad Sci.*, 98, 10845–10850 pp.
- Ozawa, K., Tsumoto, H., Wei, W., Tang, C.H., Komatsubara, A.T., Kawafune, H., Shimizu, K., Liu, L. and Tsujimoto, G.,** 2012, Proteomic analysis of the role of S-nitrosoglutathione reductase in lipopolysaccharide-challenged mice, *Proteomics*, 12(12), 2024–2035 pp.
- Ozgur, R., Turkan, I., Uzilday, B. and Sekmen, A.H.,** 2014, Endoplasmic reticulum stress triggers ROS signalling, changes the redox state, and regulates the antioxidant defence of *Arabidopsis thaliana*, *Journal of Experimental Botany*, 65(5), 1377–1390 pp.
- Ozgur, R., Uzilday, B., Sekmen, A.H. and Turkan, I.,** 2015, The effects of induced production of reactive oxygen species in organelles on endoplasmic reticulum stress and on the unfolded protein response in *Arabidopsis*, *Annals of Botany*, 116(4), 541–553 pp.
- Ozgur, R., Uzilday, B., Turkan, I. and Sekmen, A.H.,** 2017, The effects of melatonin on transcriptional profile of unfolded protein response genes under endoplasmic reticulum stress in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Molecular Biology Reporter*, 35, 188–202 pp.
- Parihar, P., Singh, S., Singh, R., Singh, V.P. and Prasad, S.M.,** 2014, Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 22, 4056–4075 pp.
- Pastore, D., Trono, D., Laus, M.N., Di Fonzo, N. And Flagella, Z.,** 2007, Possible plant mitochondria involvement in cell adaptation to drought stress: a case study: durum wheat mitochondria, *Journal of Experimental Botany*, 58(2), 195–210 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Penn, A.C. Williams, S.R. and Greger, I.H.**, 2008, Gating motions underlie AMPA receptor secretion from the endoplasmic reticulum, *EMBO J.*, 27(22), 3056–3068 pp.
- Pérez-Torres, I., Manzano-Pech, L., Rubio-Ruíz, M.E., Soto, M.E. and Guarner-Lans, V.**, 2020, Nitrosative stress and its association with cardiometabolic disorders, *Molecules*, 25(11), 2555 p.
- Peunova, N. and Enikolopov, G.**, 1993, Amplification of calcium-induced gene transcription by nitric oxide in neuronal cells, *Nature*, 364, 450–453 pp.
- Pierobon, P.**, 2012, Coordinated modulation of cellular signaling through ligand-gated ion channels in *Hydra vulgaris* (Cnidaria, Hydrozoa), *International Journal of Developmental Biology*, 56:551–565 pp.
- Pina, C., Pinto, F., Feijo, F.A. and Becker, J.D.**, 2005, Gene family analysis of the *Arabidopsis* pollen transcriptome reveals biological implications for cell growth, division control, and gene expression regulation, *Plant Physiol.*, 138, 744–756 pp.
- Pleasure S.J.**, (2010) Therapeutic Progress in Neurodegenerative Disease: Neurodegenerative Disease Therapy: What the Future Holds. *Medscape Neurology & Neurosurgery*.
- Polymeropoulos, M.H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S.E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E.S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos T., Johnson, W.G., Lazzarini, A.M., Duvoisin, R.C., Di Iorio, G., Golbe, L.I. and Nussbaum, R.L.**, 1997, Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease, *Science*, 276, 2045–2047 pp.
- Price, M.B. and Okumoto, S.**, 2013, Inter-subunit interactions between glutamate-like receptors in *Arabidopsis*, *Plant Signal. Behav.*, 8(12), e27034 p.
- Price, M.B., Jelesko, J. and Okumoto, S.**, 2012, Glutamate receptor homologs in plants: Functions and evolutionary origins, *Front. Plant Sci.*, 3, 235 p.
- Prince, M., Wimo, A., Guerchet, M., Ali, G.C., YuTzu W. and Prina, M.**, 2015, The global impact of dementia: an analysis of prevalence, incidence, cost and trends, *World Alzheimer Report*.
- Puyaubert, J., Fares, A., Rézé, N., Peltier, J.B. and Baudouin, E.**, 2014, Identification of endogenously S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis* plantlets: effect of cold stress on cysteine nitrosylation level, *Plant Science*, 215, 150–156 pp.
- Qi, Z., Stephens, N.R. and Spalding, E.P.**, 2006, Calcium entry mediated by GLR3.3, an *Arabidopsis* glutamate receptor with a broad agonist profile, *Plant Physiol.*, 142(3), 963–971 pp.
- Qiu, X.M., Sun, Y.Y., Ye, X.Y. and Li, Z.G.**, 2020, Signaling role of glutamate in plants, *Front. Plant Sci.*, 10, 1743 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Queval, G. and Noctor, G.**, 2007, A plate reader method for the measurement of NAD, NADP, glutathione, and ascorbate in tissue extracts: Application to redox profiling during Arabidopsis rosette development, *Analytical Biochemistry*, 363(1), 58–69 pp.
- Radad, K., Gille, G., Liu, L. and Rausch, W.D.**, 2006, Use of ginseng in medicine with emphasis on neurodegenerative disorders, *Journal of Pharmacological Sciences*, 100(3), 175–186 pp.
- Radi, R.**, 2004, Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 101:4003–4008 pp.
- Rahman, M.R., Islam, T., Shabjam, M., Rana, M.H.K., Holsinger, R.M.D., Quinn, J.M.W., Gov, E. and Moni, M.A.**, 2021, Genome-wide integrative analysis reveals common molecular signatures in blood and brain of Alzheimer's Disease, *Biointerface Res. Appl. Chem.*, 11(2), 8686–8701 pp.
- Ramming, T., Hansen, H.G., Nagata, K., Ellgaard, L. and Appenzeller-Herzog, C.**, 2014, GPx8 peroxidase prevents leakage of H₂O₂ from the endoplasmic reticulum, *Free Radical Biology and Medicine*, 70, 106–116 pp.
- Recalde L., Vázquez, A., Groppa, M.D. and Benavides, M.P.**, 2018, Reactive oxygen species and nitric oxide are involved in polyamine-induced growth inhibition in wheat plants, *Protoplasma*, 255, 1295–1307 pp.
- Recalde, L., Vázquez, A., Groppa, M.D. and Benavides, M. P.**, 2018, Reactive oxygen species and nitric oxide are involved in polyamine-induced growth inhibition in wheat plants, *Protoplasma*, 255, 1295–1307 pp.
- Reddy, P.H. and Beal, M.F.**, 2005, Are mitochondria critical in the pathogenesis of Alzheimer's disease?, *Brain Res. Rev.*, 49(3)618–632 pp.
- Reddy, P.H. and Beal, M.F.**, 2008, Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease, *Trends Mol. Med.*, 14(2), 45–53 pp.
- Reyes-Harde, M., Potter, B.V., Galione, A. and Stanton, P.K.**, 1999, Induction of hippocampal LTD requires nitric-oxide-stimulated PKG activity and Ca²⁺ release from cyclic ADP-ribose-sensitive stores, *J. Neurophysiol.*, 82, 1569–1576 pp.
- Rizhsky, L., Liang, H. and Mittler, R.**, 2003, The water–water cycle is essential for chloroplast protection in the absence of stress, *Journal of Biological Chemistry*, 278, 38921–38925 pp.
- Rolly, N.K., Lee, S.U., Imran, Q.M., Hussain, A., Mun, B.G., Kim, K.M. and Yun, B.W.**, 2019, Nitrosative stress-mediated inhibition of OsDHODH1 gene expression suggests roots growth reduction in rice (*Oryza sativa* L.), *3 Biotech*, 9, 1–14 pp.
- Romero-Puertas, M.C., Laxa, M., Matte, A., Zaninotto, F., Finkemeier, I., Jones, A.M., Perazzolli M., Vandelle, E., Dietz, K.J. and Delledonne, M.**, 2007, S-Nitrosylation of peroxiredoxin II E promotes peroxynitrite-mediated tyrosine nitration, *Plant Cell*, 19, 4120–4130 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Roy, B. and Garthwaite, J.**, 2006, Nitric oxide activation of guanylyl cyclase in cells revisited, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 103, 12185–12190 pp.
- Roy, S.J., Gilliam, M., Berger, B., Essah, P.A., Cheffings, C., Miller, A.J., Davenport, R.J., Liu, L.H., Skynner, M.J. and Davies, J.M.**, 2008, Investigating glutamate receptor-like gene co-expression in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell Environ.*, 31, 861–871 pp.
- Rustérucci, C., Espunya, M.C., Díaz, M., Chabannes, M. and Martínez, M.C.**, 2007, S-nitrosoglutathione reductase affords protection against pathogens in *Arabidopsis*, both locally and systemically, *Plant Physiol.*, 143(3), 1282–1292 pp.
- Rychter, A. and Juszczuk, I.**, 2003, Regulation and role of alternative oxidase in higher plant respiration, *Acta Biochimica Polonica*, 50(Supplement 1) pp.
- Saddhe, A.A., Malvankar, M.R., Karle, S.B. and Kumar, K.**, 2019, Reactive nitrogen species: Paradigms of cellular signaling and regulation of salt stress in plants, *Environ. Exp. Bot.*, 161, 86–97 pp.
- Sanchez-Reus, M.I., del Rio, M.A.G., Iglesias, I., Elorza, M., Slowing, K. and Benedi J.**, 2007, Standardized *Hypericum perforatum* reduces oxidative stress and increases gene expression of antioxidant enzymes on rotenone-exposed rats, *Neuropharmacology*, 52, 606–616 pp.
- Sanchez-Reus, M.I., Del Rio, M.G., Iglesias, I., Elorza, M., Slowing, K. and Benedi, J.**, 2007, Standardized *Hypericum perforatum* reduces oxidative stress and increases gene expression of antioxidant enzymes on rotenone-exposed rats, *Neuropharmacology*, 52(2), 606–616 pp.
- Sano S., Tao, S., Endo, Y., Inaba, T., Hossain, M.A., Miyake, C., Matsuo, M., Aoki, H., Asada, K. and Saito, K.**, 2005, Purification and cDNA cloning of chloroplastic monodehydroascorbate reductase from spinach, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 69, 762–772 pp.
- Scatton, B.**, 1993, The NMDA receptor complex, *Fundamental Clinical Pharmacology*, 7:389–400 pp.
- Schopfer, F.J., Baker, P.R. and Freeman, B.A.**, 2003, NO-dependent protein nitration: a cell signaling event or an oxidative inflammatory response?, *Trends Biochem. Sci.*, 28, 646–654 pp.
- Schröder, M. and Kaufman, R.J.**, 2005, The mammalian unfolded protein response, *Annu. Rev. Biochem.*, 74, 739–789 pp.
- Sevier, C.S. and Kaiser, C.A.**, 2008, Ero1 and redox homeostasis in the endoplasmic reticulum, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1783(4), 549–556 pp.
- Shao, Q., Gao, Q., Lhamo, D., Zhang, H. and Luan, S.**, 2020, Two glutamate- and pH-regulated Ca^{2+} channels are required for systemic wound signaling in *Arabidopsis*, *Sci. Signal.*, 13(640), 1453 p.
- Shao, Y., Sui, J., Yin, G. and Gao, Y.**, 2008, Nitrogen-doped carbon nanostructures and their composites as catalytic materials for proton exchange membrane fuel cell, *Applied Catalysis B: Environmental*, 79(1), 89–99 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Shapiro, A.D.**, 2005, Nitric oxide signaling in plants, *Vitam. Horm.*, 72:339–398 pp.
- Sharma, S. and Deswal, R.**, 2023, N-Linked Glycoproteome Analysis of *Dioscorea alata* Tuber Shows Atypical Glycosylation and Indicates Central Role of Glycosylated Proteins in Tuber Maturation, *The Protein Journal*, 42(1), 78–93 pp.
- Shefali, Sankhla, M.S., Kumar, R. and Sonone, S.S.**, 2021, Phytomicrobiome studies for combating the abiotic stress, *Biointerface Res. Appl. Chem.*, 11(3), 10493–10509 pp.
- Shen, J., Chen, X. and Hendershot, L.**, 2002, Prywes R. ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals, *Dev. Cell*, 3, 99–111 pp.
- Signorelli, S., Corpas, F.J., Borsani, O., Barroso, J.B. and Monza, J.**, 2013, Water stress induces a differential and spatially distributed nitro-oxidative stress response in roots and leaves of *Lotus japonicus*, *Plant Science*, 201–202, 137–146 pp.
- Singh, S.K., Chien, C.T. and Chang, I.F.**, 2016, The Arabidopsis glutamate receptor-like gene GLR3.6 controls root development by repressing the Kip-related protein gene KRP4, *J. Exp. Bot.*, 67, 1853–1869 pp.
- Sivaguru, M., Pike, S., Gassmann, W. and Baskin, T.I.**, 2003, Aluminum rapidly depolymerizes cortical microtubules and depolarizes the plasma membrane. Evidence that these Responses are Mediated by a Glutamate Receptor, *Plant Cell Physiol.*, 44, 667–675 pp.
- Smaili, S.S., Ureshino, R.P., Rodrigues, L., Rocha, K.K., Carvalho, J.T. and Oseki, K.T.**, 2011, The role of mitochondrial function in glutamate dependent metabolism in neuronal cells, *Curr. Pharm. Des.*, 17, 3865–3877 pp.
- Smirnoff N.**, 2000, Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-facetted molecule, *Current Opinion in Plant Biology*, 3:229–235 pp.
- Sobolevsky, A.I., Rosconi, M.P. and Gouaux, E.**, 2009, X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor. *Nature*, 462, 745–756 pp.
- Sorbi, S., Bird, E.D. and Blass, J.P.**, 1983, Decreased pyruvate dehydrogenase complex activity in Huntington and Alzheimer brain, *Ann. Neurol.*, 13(1), 72–78 pp.
- Sorokina, E.G., Reutov, V.P., Pinelis, V.G., Vinskaya, N.P., Vergun, O.V. and Khodorov, B.I.**, 2000, The mechanism of potentiation of the glutamate induced neurotoxicity by serum albumin. A possible role of nitric oxide, *Membr. Cell Biol.*, 13, 389–396 pp.
- Spillantini, M.G., Schmidt, M.L., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., Jakes, R. and Goedert, M.**, 1997, Alpha-synuclein in Lewy bodies, *Nature*, 388, 839–840 pp.
- Srivastava, R., Deng, Y., Shah, S., Rao, A.G. and Howell, S.H.**, 2013, BINDING PROTEIN is a master regulator of the endoplasmic reticulum stress sensor/transducer bZIP28 in Arabidopsis. *The Plant Cell* 25, 1416–1429 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Stahl, A., Moberg, P., Ytterberg, J., Panfilov, O., Von Lowenhielm, H.B, Nilsson, F. and Glaser, E.,** 2002, Isolation and identification of a novel mitochondrial metalloprotease (PreP) that degrades targeting presequences in plants, *J. Biol. Chem.*, 277(44), 41931–41939 pp.
- Stahl, A., Nilsson, S., Lundberg, P., Bhushan, S., Biverstahl, H., Moberg, P., Morisset, M., Vener, A., Maler, L. and Langel, U.,** 2005, Two novel targeting peptide degrading proteases, PrePs, in mitochondria and chloroplasts, so similar and still different, *J. Mol. Biol.*, 349(4), 847–860 pp.
- Stahl, A., Pavlov, P.F., Szigyarto, C. and Glaser, E.,** 2000, Rapid degradation of the presequence of the f1beta precursor of the ATP synthase inside mitochondria, *Biochem. J.*, 349(3), 703–707 pp.
- Stamler, J.S., Lamas, S. and Fang, F.C.,** 2001, Nitrosylation. the prototypic redox-based signaling mechanism, *Cell*, 106, 675–683 pp.
- Standley, S. and Baudry, M.,** 2000, The role of glycosylation in ionotropic glutamate receptor ligand binding, function, and trafficking, *Cell Mol. Life Sci.*, 57, 1508–1516 pp.
- Stephens, N.R., Qi, Z. and Spalding, E.P.,** 2008, Glutamate receptor subtypes evidenced by differences in desensitization and dependence on the GLR3.3 and GLR3.4 genes, *Plant Physiol.*, 146(2), 529–538 pp.
- Tada, Y., Spoel, S.H., Pajerowska-Mukhtar, K., Mou, Z., Song, J., Wang, C., Zuo, J. and Dong, X.,** 2008, Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via Snitrosylation and thioredoxins, *Science* 321: 952–956 pp.
- Tajima, H., Iwata, Y., Iwano, M., Takayama, S. and Koizumi, N.,** 2008, Identification of an Arabidopsis transmembrane bZIP transcription factor involved in the endoplasmic reticulum stress response, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 374(2), 242–247 pp.
- Tamilselvam, K., Braid, N., Manivasagam, T., Essa, M.M., Prasad, N.R., Karthikeyan, S., Thenmozhi, A.J., Selvaraju, S. and Guillemin, G.J.,** 2013, Neuroprotective effects of hesperidin, a plant flavanone, on rotenone-induced oxidative stress and apoptosis in a cellular model for Parkinson's disease, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013.
- Tanou, G., Filippou, P., Belghazi, M., Job, D., Diamantidis, G., Fotopoulos, V. And Molassiotis, A.,** 2012, Oxidative and nitrosative-based signaling and associated post-translational modifications orchestrate the acclimation of citrus plants to salinity stress, *Plant Journal*, 72, 585–599 pp.
- Tapken, D. and Hollmann, M.,** 2008, Arabidopsis thaliana glutamate receptor ion channel function demonstrated by ion pore transplantation, *J. Mol. Biol.*, 383(1), 36–48 pp.
- Tapken, D., Anschütz, U., Liu, L., Huelsken, T., Seeböhm, G., Becker, D. and Hollmann, M.,** 2013, A plant homolog of animal glutamate receptors is an ion channel gated by multiple hydrophobic amino acids, *Sci. Signal.*, 6(279), ra47 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Taylor, S.W., Fahy, E., Zhang, B., Glenn, G.M., Warnock D.E., Wiley, S., Murphy, A.N., Gaucher, S.P., Capaldi, R.A. and Gibson, B.W.,** 2003, Characterization of the human heart mitochondrial proteome, *Nat. Biotechnol.*, 21, 281–286 pp.
- Teardo, E., Carraretto, L., De Bortoli, S., Costa, A., Behera, S., Wagner, R., Lo Schiavo, F., Formentin, E. and Szabo, I.,** 2014, Alternative splicing-mediated targeting of the Arabidopsis glutamate receptor 3.5 to mitochondria affects organelle morphology, *Plant Physiol.*, 167(1), 216–22 pp.
- Teardo, E., Segalla, A., Formentin, E., Zanetti, M., Marin, O., Giacometti, G.M., Lo Schiavo, F., Zoratti, M. and Szabò, I.,** 2010, Characterization of a plant glutamate receptor activity, *Cell Physiol. Biochem.*, 26, 253 pp.
- Teleanu, D.M., Niculescu, A.G., Lungu, I.I., Radu, C.I., Vladăcenco, O., Roza, E., Costăchescu, B., Grumezescu, A.M. and Teleanu, R.I.,** 2022, An Overview of Oxidative Stress, Neuroinflammation, and Neurodegenerative Diseases, *J. Mol. Sci.*, 23(11), 5938 p.
- Tewari, R.K., Horemans, N. and Watanabe, M.,** 2021, Evidence for a role of nitric oxide in iron homeostasis in plants, *Journal of Experimental Botany*, 72(4) 990–1006 pp.
- Thomashow, M.F.,** 1999, Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms, *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mole. Biol.*, 50:571–599 pp.
- Tjong, Y.W., Jian, K., Li, M., Chen, M., Gao, T.M. and Fung, M.L.,** 2007, Elevated endogenous nitric oxide increases Ca^{2+} flux via L-type Ca^{2+} channels by Snitrosylation in rat hippocampal neurons during severe hypoxia and in vitro ischemia, *Free Radic. Biol. Med.*, 42, 52–63 pp.
- Toyota, M., Spencer, D., Sawai-Toyota, S., Jiaqi, W., Zhang, T., Koo, A.J., Howe, G.A. and Gilroy, S.,** 2018, Glutamate triggers long-distance, calcium-based plant defense signaling, *Science*, 361, 1112–1115 pp.
- Traynelis, S.F., Wollmuth, L.P., McBain, C.J., Menniti, F.S., Vance, K.M., Ogden, K.K., Hansen, K.B., Yuan, H., Myers, S.J. and Dingledine, R.,** 2010, Glutamate receptor ion channels: Structure, regulation and function, *Pharmacol. Rev.*, 62, 405–496 pp.
- Turano, F.J., Muhitch, M.J., Felker, F.C. and McMahon, M.B.,** 2002, The putative glutamate receptor 3.2 from Arabidopsis thaliana (AtGLR3. 2) is an integral membrane peptide that accumulates in rapidly growing tissues and persists in vascular-associated tissues, *Plant Sci.*, 163(1), 43–51 pp.
- Twomey, E.C. and Sobolevsky, A.I.** 2018, Structural mechanisms of gating in Ionotropic glutamate receptors, *Biochem.*, 57(3), 267–276 pp.
- Uehara, T.,** 2007, Accumulation of misfolded protein through nitrosative stress linked to neurodegenerative disorders, *Antioxidants and Redox Signaling*, 9:597–601 pp.
- Uehara, T., Nakamura, T., Yao, D., Shi, Z.Q., Gu, Z., Ma, Y., Masliah, E., Nomura, Y. and Lipton, S.A.,** 2006, S-Nitrosylated protein-disulphide isomerase links protein misfolding to neurodegeneration, *Nature* 441, 513–517 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ulbrich, M.H. and Isacoff, E.Y.**, 2008, Rules of engagement for NMDA receptor subunits, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 105(37), 14163–14168 pp.
- Uzilday, B., Ozgur, R., Sekmen, A.H. and Turkan, I.**, 2018, Endoplasmic reticulum stress regulates glutathione metabolism and activities of glutathione related enzymes in Arabidopsis, *Functional Plant Biology*, 45, 284–296 pp.
- Valderrama, R., Corpas, F.J., Carreras, A., Fernandez-Ocana, A., Chaki, M., Luque, F., Gomez-Rodriguez, M.V., Colmenero-Varea, P., del Rio, L.A. and Barroso, J.B.**, 2007, Nitrosative stress in plants, *FEBS Letters*, 581, 453–461 pp.
- Valente, E.M., Abou-Sleiman, P.M., Caputo, V., Muqit, M.M., Harvey, K., Gispert, S., Ali, Z., Del Turco, D., Bentivoglio, A.R., Healy, D.G., Albanese, A., Nussbaum, R., González-Maldonado, R., Deller, T., Salvi, S., Cortelli, P., Gilks, W.P., Latchman, D.S., Harvey, R.J., Dallapiccola, B., Auburger, G. and Wood, N.W.**, 2004, Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1, *Science*, 304(5674), 1158–1160 pp.
- Vanlerberghe, G.C., Vanlerberghe, A.E. and McIntosh, L.**, 1997, Molecular genetic evidence of the ability of alternative oxidase to support respiratory carbon metabolism, *Plant physiology*, 113(2), 657–661 pp.
- Vatsa, P., Chiltz, A., Bourque, S., Wendehenne, D., Garcia-Brugger, A. and Pugin, A.**, 2011, Involvement of putative glutamate receptors in plant defence signaling and NO production, *Biochimie*, 93, 2095–2101 pp.
- Venkateshappa, C., Harish, G., Mythri, R.B., Mahadevan, A., Srinivas Bharath, M.M. and Shankar, S.K.**, 2012, Increased oxidative damage and decreased antioxidant function in aging human substantia nigra compared to striatum: implications for Parkinson's Disease, *Neurochem. Res.*, 37(2), 358–369 pp.
- Vercesi, A.E., Borecký, J., Maia, I.D.G., Arruda, P., Cuccovia, I.M. and Chaimovich, H.**, 2006, Plant uncoupling mitochondrial proteins, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 383–404 pp.
- Vincent, T.R., Avramova, M., Canham, J., Higgins, P., Bilkey, N., Mugford, S.T., Pitino, M., Toyota, M., Gilroy, S., Miller, A.J.**, 2017, Interplay of Plasma Membrane and Vacuolar Ion Channels, Together with BAK1, Elicits Rapid Cytosolic Calcium Elevations in Arabidopsis during Aphid Feeding, *Plant Cell*, 29(6), 1460–1479 pp.
- Vincill, E.D., Bieck, A.M. and Spalding, E.P.**, 2012, Ca^{2+} conduction by an amino acid-gated ion channel related to glutamate receptors, *Plant Physiology*, 159(1), 40–46 pp.
- Walch-Liu, P. and Forde, B.G.**, 2007, L-Glutamate as a novel modifier of root growth and branching: what's the sensor?, *Plant Signal. Behav.*, 2, 284–286 pp.
- Walch-Liu, P., Liu, L.H., Remans, T., Tester, M. and Forde, B.G.**, 2006, Evidence that L-glutamate can act as an exogenous signal to modulate root growth and branching in Arabidopsis thaliana, *Plant Cell Physiol.*, 47, 1045–1057 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wang, C., El-Shetehy, M., Shine, M. B., Yu, K., Navarre, D. and Wendehenne, D.,** 2014, Free radicals mediate systemic acquired resistance, *Cell Rep.*, 7, 348–355 pp.
- Wang, F.Z., Wang, Q.B., Kwon, S.Y., Kwak, S.S. and Su, W.A.,** 2005, Enhanced drought tolerance of transgenic rice plants expressing a pea manganese superoxide dismutase, *Journal of Plant Physiology*, 162, 465–472pp.
- Wang, H., Huo, M., Jin, Y., Wang, Y., Wang, X., Yu, W. and Jiang, X.,** 2022, Rotenone induces hepatotoxicity in rats by activating the mitochondrial pathway of apoptosis, *Toxicology Mechanisms and Methods*, 32(7), 510–517 pp.
- Wang, H., Shimoji, M., Yu, S.W., Dawson, T.M. and Dawson, V.L.,** 2003, Apoptosis inducing factor and PARP-mediated injury in the MPTP mouse model of Parkinson's disease, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 991, 132–139 pp.
- Wang, P.H., Lee, C.E., Lin, Y.S., Lee, M.H., Chen, P.Y., Chang, H.C. and Chang, I.F.,** 2019, The Glutamate Receptor-Like Protein GLR3.7 Interacts With 14-3-3! and Participates in Salt Stress Response in *Arabidopsis thaliana*, *Front. Plant Sci.*, 10, 1169 p.
- Wang, X. and Quinn, P.J.,** 2009, The location and function of vitamin E in membranes (Review), *Molecular Membrane Biology*, 17(3), 143–156 pp.
- Wang, Y., Wagner, M.B., Joyner, R.W. and Kumar, R.,** 2000, cGMP-dependent protein kinase mediates stimulation of L-type calcium current by cGMP in rabbit atrial cells, *Cardiovasc. Res.*, 48, 310–322 pp.
- Waszczak, C., Carmody, M. and Kangasjärvi, J.,** 2018, Reactive oxygen species in plant signaling, *Annual Review of Plant Biology*, 69, 209–236 pp.
- Weiland, M. Mancuso, S. and Baluska, F.,** 2015, Signalling via glutamate and GLRs in *Arabidopsis thaliana*, *Funct. Plant Biol.*, 43, 1–25 pp.
- Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Schraudner, M., Langebartels, C. and Van Montagu, M.,** 1997, Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C3 plants, *EMBO J.*, 16, 4806–4816 pp.
- Willmott, N., Sethi, J.K., Walseth, T.F., Lee, H.C., White, A.M. and Galione, A.,** 1996, Nitric oxide-induced mobilization of intracellular calcium via the cyclic ADP-ribose signaling pathway, *J. Biol. Chem.*, 271, 3699–3705 pp.
- Wilson, D.M., Cookson, M.R., Van Den Bosch, L., Zatterberg, H., Holtzman, D.M. and Dewachter, I.,** 2023, Hallmarks of neurodegenerative diseases, *Cell*, 186(4), 693–714pp.
- Wilson, I.D., Neill, S.J. and Hancock, J.T.,** 2008, Nitric oxide synthesis and signalling in plants, *Plant Cell Environ.*, 31, 622–631 pp.
- Wood-Kaczmar, A., Gandhi, S., Yao, Z., Abramov, A.Y., Miljan, E.A., Keen, G., Stanyer, L., Hargreaves, I., Klupsch, K., Deas, E., Downward, J., Mansfield, L., Jat, P., Taylor, J., Heales, S., Duchen, M.R., Latchman, D., Tabrizi, S.J. and Wood, N.W.,** 2008, PINK1 is necessary for long term survival and mitochondrial function in human dopaminergic neurons, *PloS One* 3, e2455 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wrzaczek, M., Brosche, M. and Kangasjärvi, J.,** 2013, ROS signaling loops—production, perception, regulation, *Current Opinion in Plant Biology*, 16(5), 575–582 pp.
- Wu L.J. and Zhuo, M.,** 2009, Targeting the NMDA Receptor Subunit NR2B for the Treatment of Neuropathic Pain, *NeuroTherapeutics*, 6(4), 693–702 pp.
- Wudick, M.M., Portes, M.T. and Michard, E.,** 2018, CORNICHON sorting and regulation of GLR channels underlies pollen tube Ca^{2+} homeostasis, *Science*, 360(6388), 533–536 pp.
- Xu, W., Liu, L., Charles, I.G. and Moncada, S.,** 2004, Nitric oxide induces coupling of mitochondrial signalling with the endoplasmic reticulum stress response, *Nat. Cell Biol.*, 6, 1129–1134 pp.
- Xu, X.M. and Moller, S.G.,** 2011, The value of Arabidopsis research in understanding human disease states, *Current Opinion in Biotechnology*, 22(2), 300–307 pp.
- Xu, X.M., Lin, H., Maple, J., Bjorkblom, B., Alves, G., Larsen, J.P. and Møller S.G.,** 2010, The Arabidopsis DJ-1a protein confers stress protection through cytosolic SOD activation. *J Cell Sci.*, 123(10), 1644–1651 pp.
- Yao, X. and Huang, Y.,** 2003, From nitric oxide to endothelial cytosolic Ca^{2+} : a negative feedback control, *Trends Pharmacol. Sci.*, 24, 263–266 pp.
- Yoshida, H., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T. and Mori, K.,** 1998, Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors, *J. Biol. Chem.*, 273, 33741–33749 pp.
- Yoshida, H., Matsui, T., Hosokawa, N., Kaufman, R.J., Nagata, K. and Mori, K.,** 2003, A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response, *Dev. Cell*, 4, 265–271 pp.
- Yoshida, R., Mori, I.C., Kamizono, N., Shichiri, Y., Shimatani, T., Miyata, F., Honda, K. and Iwai, S.,** 2016, Glutamate functions in stomatal closure in Arabidopsis and fava bean, *J. Plant Res.*, 129, 39–49 pp.
- Yun, B.W., Feechan, A., Yin, M., Saidi, N.B., Le Bihan, T., Yu, M., Moore, J.W., Kang, J.G., Kwon, E. and Spoel, S.H.,** 2011, S-Nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity, *Nature* 478, 264–268 pp.
- Zhang, K. and Kaufman, R.J.,** 2006, The unfolded protein response: a stress signaling pathway critical for health and disease, *Neurology*, 66, 102–109 pp.
- Zheng, Y., Luo, L., Wei, J., Chen, Q., Yang, Y., Hu, X. and Kong, X.,** 2018, The glutamate receptors AtGLR1.2 and AtGLR1.3 increase cold tolerance by regulating jasmonate signaling in Arabidopsis thaliana, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 506, 895–900 pp.
- Zhou, B., Guo, Z., Xing, J. and Huang, B.,** 2005, Nitric oxide is involved in abscisic acid-induced antioxidant activities in *Stylosanthes guianensis*, *Journal of Experimental Botany*, 56(422), 3223–3228 pp.

TEŞEKKÜR

Bu Doktora tez çalışmasının bir kısmı, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 123z098 no'lu araştırma projesi 1002 B Modülü kapsamında ve 18FEN035 no'lu araştırma projesi Ege Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

Lisansüstü eğitimimin her sürecinde, sadece akademik açıdan değil ayrıca, her sevincimde ve yaşadığım her olumsuzlukta yanımda olan, tüm zor zamanları hep birlikte aştığımız, hiçbir konuda bilgisini ve deneyimini eksik etmeyen başta değerli tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Aşkım Hediye ÇETİNEL ve eşi değerli abim Dr. Barbaros ÇETİNEL olmak üzere, sadece bilgi ve tecrübeleri ile değil, her zaman destek olan değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. İsmail TÜRKAN'a, ve Sayın Prof. Dr. Melike BOR'a, ayrıca tez izleme komitemde yer alarak tez sürecimde desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. H. Çağlar KARAKAYA'ya;

Tüm çalışmalarım süresince gece gündüz demeden her an yanımda olan, hem okul hem de özel hayatımda desteklerini esirgemeyen, pek çok zorluğu birlikte aştığımız ekip arkadaşlarımdan, en baştan beri dostluğunu eksik etmeyen, hep yanımda olan Zülal AKBA'ya, ekibe sonradan dahil olmasına rağmen her zaman gösterdiği özveri ve desteği için Efe DALLI'ya, tüm bu desteklerine ek olarak, ayrıca bu süreci tamamlamam esnasında da çok büyük desteği olan, beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan Umut BAĞCI'ya;

Şu an aramızda olmasa da hem okul hem de özel hayatımda hep yanımda olan, aslında hiç gitmemiş gibi her sözü ve tavrı ile hep aklımızda ve kalbimizde olan merhum ekip arkadaşımız Cemre TATLI ŞEN'e,

Ve son olarak, hayatımın her alanında ve aşamasında yanımda olan, her konuda bana destek olan, ailem oldukları için kendimi hep şanslı hissettiğim, yazılabilecek kelimelerin yetersiz olduğu en kıymetlilerim; babam İsmail GÖKÇE'ye, tez sürecim esnasında maddesel dünyaya gözlerini yuman ancak beni hep izlediğini bildiğim varlığını hep yanımda hissettiğim merhum annem Kıymet GÖKÇE'ye, çok büyük zorlukları aşmamda, hayatıma yön vermemde büyük etkisi olan, fikirlerine büyük önem verdiğim, maddi manevi desteklerini hiç eksik etmeyen, yeniden hayata dönüş mücadelemde hep yanımda olan ablalarım Muradiye GÖKÇE'ye, Fatma GÖKÇE ÖZ'e ve değerli eniştem Süleyman ÖZ'e, son olarak sıcacık sevgileri ile hep içimi ısıtan sevgili yeğenlerim İsmail Baha ÖZ ve Sümeyye ÖZ'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

14 / 09 / 2023

İmzası

Adı-Soyadı