

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

**ARABİDOPSİS' DE BAZI ABİYOTİK STRES
KOŞULLARI ALTINDA ENDOPLAZMİK
RETİKULUM STRESİ VE REAKTİF OKSİJEN
TÜRLERİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Rengin ÖZGÜR UZILDAY

Tez Danışmanı : Prof. Dr. İsmail TÜRKAN

Biyoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 401.01.00

Sunuş Tarihi : 30.04.2015

Bornova-İZMİR

2015

Rengin ÖZGÜR UZİLDAY tarafından DOKTORA tezi olarak sunulan “Arabidopsis’de, Bazı Abiyotik Stres Koşulları Altında Endoplazmik Retikulum Stresi ve Reaktif Oksijen Türleri Arasındaki İlişkinin Araştırılması” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 30.04.2015 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. İsmail TÜRKAN

.....

Raportör Üye: Doç. Dr. A.Hediye SEKMEN ESEN

.....

Üye : Doç. Dr. H. Çağlar KARAKAYA

.....

Üye : Doç. Dr. Okan ACAR

.....

Üye : Yard.Doç.Dr. Ceyda ÖZFİDAN KONAKÇI

.....

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi / Doktora Tezi olarak sunduğum “**Arabidopsis’de, Bazı Abiyotik Stres Koşulları Altında Endoplazmik Retikulum Stresi ve Reaktif Oksijen Türleri Arasındaki İlişkinin 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.

.... / / 20..

İmzası

Adı-Soyadı

ÖZET

ARABİDOPSİS'DE, BAZI ABİYOTİK STRES KOŞULLARI ALTINDA ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ VE REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZGÜR UZİLDAY, Rengin

Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Prof. Dr. İsmail TÜRKAN
Nisan 2015, 90 sayfa

Stres koşulları altında “Endoplazmik Retikulum (ER)” lümeni içerisinde katlanmamış proteinlerin oluşması ve bu tür proteinlerin şaperonlarca yok edilememesi “Endoplazmik Retikulum Stresi” ne neden olur. Bu stres, yapay olarak dışarıdan “tunikamisin” gibi, protein katlanmasını engelleyen ajanlar ilede oluşturulabilmektedir. ER stresi altında hücrede bazı genlerin ifadesi artmaktadır. Bu genlerin ifadesindeki artış, proteinlerin katlanmasını teşvik ederek, hücrenin ER stresine karşı koymasını sağlayan ve “Katlanmamış Protein Yanıtı” olarak isimlendirilen yanıtı başlatmaktadır. Proteinlerin doğru katlanmasını sağlamak için disülfid bağlarının oluşması, bu bağlarının oluşması için ise moleküler oksijenin kullanılması gerekmektedir. Bunun sonucunda ER’ de hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi reaktif oksijen türleri (ROS) oluşmaktadır. Başta H_2O_2 olmak üzere, ROS’ lar hücrede oksidatif hasara neden olmaktadır. Bitkiler ROS’ ların oluşturduğu oksidatif hasarı engellemek için enzimatik ve enzimatik olmayan sistemler geliştirmişlerdir. Son yıllarda ROS’ ların zararlı etkileri yanında, yararlı etkileri olduğunda bulunmuştur. Buna göre ROS’ lar belirli bir konsantrasyona kadar çevresel streslere karşı verilen yanıtlarda sinyal iletilici moleküller olarak iş görmektedirler. Çalışmada, ER stresinin antioksidan savunma sistemi ve redoks dengesi üzerine etkileri aydınlatılmış. Ayrıca kloroplast, mitokondri ve peroksizomlarda üretilen ROS’ ların ER stresi ile ilişkisi açığa çıkarılmıştır.

Anahtar Sözcükler: Endoplazmik Retikulum Stresi, Reaktif Oksijen Türleri, Tuzluluk, Antioksidan Savunma Sistemi, Redoks Dengesi, Arabidopsis.

ABSTRACT**AN INVESTIGATION ON THE RELATION BETWEEN
ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS AND REACTIVE
OXYGEN SPECIES IN ARABIDOPSIS UNDER SOME
ENVIRONMENTAL STRESSES**

ÖZGÜR UZİLDAY, Rengin

PhD in Biology

Supervisor: Prof. Dr. İsmail TÜRKAN

April 2015, 90 pages

Accumulation of unfolded proteins caused by inefficient chaperone activity in ‘Endoplasmic Reticulum’ under salinity and osmotic stresses is called ‘Endoplasmic Reticulum Stress’. Under normal condition, this stress can be induced by heavy secretory protein pathway load. On the other hand, exogenous application of antibiotic tunicamycin -which inhibits protein folding- can also induce ER stress artificially. Increase in gene expression due to ER stress induces a response called ‘Unfolded Protein Response’, which increases protein folding capacity and induces some responses that alleviate ER stress. Formation of disulfide bonds, which are produced by using molecular oxygen, is needed for correct protein folding. As a result of this process, reactive oxygen species (ROS) such as H_2O_2 is produced in ER. Increased production of ROS results in oxidative damage in cells. Plants have enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems to prevent oxidative damage which is produced by ROS. Considering this gap in the literature, we aimed to investigate the organaller production of ROS, in mitochondria, chloroplast and peroxisomes and the effect of this ROS on antioxidant defense system and redox state in these compartments during “ER stress” and “Unfolded Protein Response”.

Keywords: Endoplasmic Reticulum Stress, Reactive Oxygen Species, Salinity, Antioxidant Defence System, Redox Balance, Arabidopsis

TEŞEKKÜR

Bu Doktora tez çalışması, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 212T018 no'lu 1001 araştırma projesi ile desteklenmiştir.

Lisansüstü öğrenimim boyunca ve tez sürecimde engin bilgisini, deneyimini ve desteğini esirgemeyen tez danışmanım Sayın Prof. Dr. İsmail TÜRKAN'a teşekkür ederim. Laboratuvar deneyimi ve her türlü sorunla başa çıkmamda paylaşımcı tavrıyla yardımcı olan Sayın Doç. Dr. A. Hediye SEKMEN ESEN'e, ve tez izleme komitemde yer alarak tez sürecimde teknik ve teorik bilgilerini benimle paylaşan gerektiğinde lendi laboratuvar olanaklarından yararlanmamı sağlayan Doç. Dr. H. Çağlar KARAKAYA'ya teşekkürü bir borç bilirim.. Laboratuvar çalışmalarında ve ders dönemimde engin bilgilerinden yararlandığım hocalarım Sayın Prof. Dr. Filiz ÖZDEMİR ve Sayın Doç. Dr. Melike BOR'a teşekkürlerimi sunarım. Yüksek lisans sürecimden itibaren laboratuvar ve tez sürecimde her türlü yardımlarını esirgemeyen Yard.Doç.Dr. Ceyda ÖZFİDAN KONAKÇI' ya çok teşekkür ederim.

Tez sürecim boyunca gerek okulda gerekse özel hayatımızda bir aile olduğumuzu hissettiğim canım arkadaşlarım Seher YOLCU, Zehra Özgecan TANYOLAÇ, Ahmet DİNÇ, Tolga YALÇINKAYA, Esra ÇANCIOĞLU, Burcu ÇEBİ, Turgut Yiğit AKYOL, Azime GÖKÇE, Gönül DÜNDAR ve Elif EKEROĞLU'na herşey için çok teşekkür ederim. Ayrıca bilimsel merakımı paylaşan ve manevi desteklerini her zaman hissettiğim dostlarım Mukadder ARSLAN İHSANOĞLU, Neşe AKÇAY ve Dr. Özlem YILMAZ' a tüm samimiyetimle teşekkür ederim.

Öğrenim yaşamım boyunca beni her yönden destekleyen, eğitimimi herşeyden önde tutan, beni izlediğini her zaman bildiğim babam Adnan ÖZGÜR' e ve her daim yanımda olan annem Gülten ve kardeşim Rıza ÖZGÜR' e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Hayatımdaki büyük desteklerinden dolayı anneannem Muhlise ORUNDAŞ'a, dedem Süleyman ORUNDAŞ'a ve babaannem Zebibe ÖZGÜR' e çok teşekkür ederim. Yüksek lisans ve doktora dönemimin her anında varlığını hissettiğim, bu aşamaya gelmemde en büyük pay sahibi olan, en yakın arkadaşım, ve eşim Dr. Barış UZİLDAY' a tüm sevgimle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xviii
KISALTMALAR DİZİNİ	xix
1. GİRİŞ	1
1.1. Bitkilerde ER Stresi	4
1.1.1. Protein Katlanması ve N-Bağlı Glikolizasyon	10
1.1.2. ER kalite kontrol sistemi (ERQC)	11
1.1.3. ER ilişkili Parçalanma (ERAD)	12
1.1.4. Bitki Hücrelerinde Oksidatif Protein Katlanması	13
1.1.5. ER Stresine Adaptasyon Yanıtları	15
1.2. Diğer organaller ile ER' nin ilişkisi	16
1.3. Tuz stresi altında ikincil stres olarak oksidatif stres	17
1.3.1. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)	17
1.3.2. Antioksidan savunma mekanizması	19
2. MATERYAL VE METOD	24
2.1. Bitkilerin yetiştirilmesi	24
2.1.1. Tohumların temini	24
2.1.2. Tohum sterilizasyonu	24
2.1.3. Büyüme koşulları ve stres uygulamaları	24
2.2. Fizyolojik parametreler	26
2.2.1. Kök fenotipi analizleri	26
2.2.2. Bağlı su içeriği (RWC)	26
2.2.3. Yaprak ozmotik potansiyeli	27
2.2.4. Yaprak su kaybı	27
2.3. Biyokimyasal parametreler	27
2.3.1. Antioksidan enzim ekstraksiyonu ve aktivite analizleri	27
2.3.2. Antioksidan enzimlerin izoenzim tayini	29

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
2.3.3. Enzimatik olmayan antioksidanların ölçümü	31
2.3.4. Lipit peroksidasyonu	31
2.3.5. H ₂ O ₂ miktarı	31
2.3.6. Protein oksidasyonu	32
2.4. Gen ifadelerinin kantitatif real-time PCR (qRT-PCR) kullanılarak belirlenmesi	32
2.5. O ₂ ⁻ - ve H ₂ O ₂ ' nin NBT ve DAB ile histokimyasal boyanması.....	33
2.6. İstatistiksel Analizler.....	33
3. BULGULAR	35
3.1. Fizyolojik parametreler	35
3.1.1. Kök fenotipi.....	35
3.1.2. Ozmotik potansiyel	36
3.1.3. Bağlı su içeriği (RWC).....	37
3.1.4. Stoma iletkenliği belirteci olarak yaprak su kaybı	37
3.2. ER stresi ile ilişkili genlerin ifadesi	38
3.3. ER stresi – ROS sinyali ilişkisi (NADPH oksidaz ve H ₂ O ₂)	40
3.4. Antioksidan savunma sistemi.....	42
3.4.1. Superoksit dismutaz (SOD).....	42
3.4.2. Katalaz (CAT).....	44
3.4.3. Glutasyon redüktaz (GR).....	46
3.4.4. Askorbat peroksidaz (APX)	49
3.5. Oksidatif hasar	50
3.5.1. Lipid peroksidasyonu (TBARS) ve H ₂ O ₂ miktarı	50
3.5.2. Protein oksidasyonu	51
3.6. Organaller ROS oluşumunun ER stresi üzerine etkileri	52
3.6.1. Yaprakta ROS oluşumunun histokimyasal olarak gösterimi	52
3.6.2. Organaller ROS oluşumunun ER stresi ile ilişkili genler üzerien etkileri	53
4. TARTIŞMA	63
5. SONUÇLAR	70
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	71
ÖZGEÇMİŞ.....	90

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 BiP ATP hidrolizi ile katlanmamış proteinlere bağlanmaktadır.	5
1.2 ER stresiyle ilişkili cis-acting düzenleyici elementler.....	8
1.3 IRE1 faktörünün mayalar, memeliler ve bitkilerde çalışma prensipleri.....	9
1.4 ER kalite kontrol mekanizması (Alvim ve Sitia 2008' den değiştirilerek) ...	12
2.1 Su kültüründe yetiştirilen <i>Arabidopsis</i> bitkileri.....	25
3.1 Kontrol (K), 80 mM NaCl (T), tunikamisin (Tm) (0.1, 0.25, 1 µg ml ⁻¹) uygulanan grupların kök fenotipi verileri. A. Uygulama gruplarının resimleri, B. Ana kök uzunluğu, C. Yanal kök yoğunluğu.	36
3.2 Yaprak su ozmotik potansiyeli, K:Kontrol, T: Tuzluluk, Tm: Tunikamisin, Tm+T: Tuzluluk+ Tunikamisin.....	36
3.3 Yaprak Bağlı Su İçeriği, K:Kontrol, T: Tuzluluk, Tm: Tunikamisin, Tm+T: Tuzluluk+ Tunikamisin..	37
3.4 Yaprak Su Kaybı, K:Kontrol, T: Tuzluluk, Tm: Tunikamisin, Tm+T: Tuzluluk+ Tunikamisin.	38
3.5 ER stresi ile ilişkili <i>bZIP17</i> ve <i>bZIP28</i> genlerinin ifadeleri (K Kontrol, T: Tuzluluk, Tm: Tunikamisin, Tm+T: Tunikamisin+Tuzluluk).	38
3.6 ER stresi ile ilişkili <i>bZIP60</i> geninin ifadesi (K:Kontrol, T: Tuzluluk, Tm: Tunikamisin, Tm+T: Tuzluluk+ Tunikamisin.).	39
3.7 ER stresi ile ilişkili <i>TIN1</i> , <i>BIP1</i> ve <i>BIP3</i> genlerinin ifadesi (K Kontrol, T: Tuzluluk, Tm: Tunikamisin, Tm+T: Tunikamisin+Tuzluluk).	39
3.8 ER stresi ile ilişkili <i>ERO1</i> geninin ifadesi (K Kontrol, T: Tuzluluk, Tm: Tunikamisin, Tm+T: Tunikamisin+Tuzluluk).	40
3.9 Zamana bağlı (10,30,60 dakika ve 6,24 saat) NADPH oksidaz (NOX) enzim aktivitesindeki değişim. A. Yaprak, B. Kök. (K:Kontrol, T: Tuzluluk, Tm: Tunikamisin, Tm+T: Tuzluluk+ Tunikamisin.)	41
3.10 Zamana bağlı (10,30,60 dakika ve 6 saat) H ₂ O ₂ miktarındaki değişim A. inhibitör uygulanmamış ortam, B. NOX inhibitörü DPI uygulanmış ortam (K:Kontrol, T: Tuzluluk, Tm: Tunikamisin, Tm+T: Tuzluluk+ Tunikamisin.).....	42
3.11 Zamana bağlı (10,30,60 dakika ve 6 saat) <i>RBOHD</i> (A) ve <i>RBOHF</i> (B) genlerinin ifadelerindeki değişim (K:Kontrol, T: Tuzluluk, Tm: Tunikamisin, Tm+T: Tuzluluk+ Tunikamisin).	42

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
3.12 Yapraklarda süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi ve izoenzim deseni (K:Kontrol, T: Tuzluluk, Tm: Tunikamisin, Tm+T: Tuzluluk+ Tunikamisin).	43
3.13 Köklerde süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi ve izoenzim deseni (K:Kontrol, T: Tuzluluk, Tm: Tunikamisin, Tm+T: Tuzluluk+ Tunikamisin).	44
3.14 Yapraklarda Katalaz (CAT) aktivitesi ve izoenzim deseni. (K:Kontrol, T: Tuzluluk, Tm: Tunikamisin, Tm+T: Tuzluluk+ Tunikamisin).	45
3.15 Köklerde katalaz (CAT) aktivitesi ve izoenzim deseni. (K:Kontrol, T: Tuzluluk, Tm: Tunikamisin, Tm+T: Tuzluluk+ Tunikamisin).....	46
3.16 Yapraklarda Glutasyon (GSH) miktarıGlutasyon redüktaz (GR) aktivitesi ve izoenzim deseni (K:Kontrol, T: Tuzluluk, Tm: Tunikamisin, Tm+T: Tuzluluk+ Tunikamisin).....	47
3.17 Köklerde glutasyon (GSH) miktarı ve glutasyon redüktaz (GR) aktivitesi ve izoenzim deseni (K:Kontrol, T: Tuzluluk, Tm: Tunikamisin, Tm+T: Tuzluluk+ Tunikamisin).....	48
3.18 Yapraklarda askorbat peroksidaz (APX) aktivitesi (K:Kontrol, T: Tuzluluk, Tm: Tunikamisin, Tm+T: Tuzluluk+ Tunikamisin).....	49
3.19 Köklerde askorbat peroksidaz (APX) aktivitesi (K:Kontrol, T: Tuzluluk, Tm: Tunikamisin, Tm+T: Tuzluluk+ Tunikamisin)	49
3.20 Yapraklarda H ₂ O ₂ miktarı ve lipid peroksidasyonu (TBARS) miktarı (K:Kontrol, T: Tuzluluk, Tm: Tunikamisin, Tm+T: Tuzluluk+ Tunikamisin).....	50
3.21 Köklerde H ₂ O ₂ miktarı ve lipid peroksidasyonu (TBARS miktarı) (K:Kontrol, T: Tuzluluk, Tm: Tunikamisin, Tm+T: Tuzluluk+ Tunikamisin).....	51
3.22 Protein oksidasyonu (K: Kontrol, T: Tuzluluk, Tm: Tunikamisin, Tm+T:Tuzluluk+ Tunikamisin).	51
3.23 Kontrol, H ₂ O ₂ (10 µM, 100 µM, 1 mM, 10 mM), rotenone (ROT) (1 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM) , metil viyolojen (MV) (1 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM), DCMU (1 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM), 3- aminotriazol (3AT) (1 mM) ve tunikamisin (Tm) (0.5 µg/ml) uygulanan yapraklarda O ₂ ⁻ nin nitrobluetetrazolium (NBT) ile H ₂ O ₂ ' nin ise diaminobenzidin (DAB) ile histokimyasal olarak boyanması.	52

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
3.24 Kontrol, H ₂ O ₂ (10 µM, 100 µM, 1 mM, 10 mM), rotenone (ROT) (1 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM) , metil viyolojen (MV) (1 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM), DCMU (1 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM), 3- aminotriazol (3AT) (1 mM) ve tunikamisin (Tm) (0.5 µg/ml) uygulanan yapraklarda H ₂ O ₂ miktarının ferroz oksidasyon-xilenol orange (FOX) yöntemi ile belirlenmesi.....	53
3.25 H ₂ O ₂ , Rot, MV, DCMU, 3-AT ve Tm uygulanan yapraklarda <i>bZIP28</i> gen ifadesinin qRT-PCR ile belirlenmesi	54
3.26 H ₂ O ₂ , Rot, MV, DCMU, 3-AT ve Tm uygulanan yapraklarda <i>bZIP17</i> gen ifadesinin qRT-PCR ile belirlenmesi	54
3.27 H ₂ O ₂ , Rot, MV, DCMU, 3-AT ve Tm uygulanan yapraklarda <i>IRE1A</i> gen ifadesinin qRT-PCR ile belirlenmesi	55
3.28 H ₂ O ₂ , Rot, MV, DCMU, 3-AT ve Tm uygulanan yapraklarda <i>IRE1B</i> gen ifadesinin qRT-PCR ile belirlenmesi	56
3.29 H ₂ O ₂ , Rot, MV, DCMU, 3-AT ve Tm uygulanan yapraklarda <i>BiP1</i> gen ifadesinin qRT-PCR ile belirlenmesi.....	57
3.30 H ₂ O ₂ , Rot, MV, DCMU, 3-AT ve Tm uygulanan yapraklarda <i>BiP3</i> gen ifadesinin qRT-PCR ile belirlenmesi.....	58
3.31 H ₂ O ₂ , Rot, MV, DCMU, 3-AT ve Tm uygulanan yapraklarda <i>CNX</i> gen ifadesinin qRT-PCR ile belirlenmesi.....	58
3.32 H ₂ O ₂ , Rot, MV, DCMU, 3-AT ve Tm uygulanan yapraklarda <i>ERO1</i> gen ifadesinin qRT-PCR ile belirlenmesi.....	59
3.33 H ₂ O ₂ , Rot, MV, DCMU, 3-AT ve Tm uygulanan yapraklarda <i>HRD1</i> gen ifadesinin qRT-PCR ile belirlenmesi.....	60
3.34 H ₂ O ₂ , Rot, MV, DCMU, 3-AT ve Tm uygulanan yapraklarda <i>SEL1</i> gen ifadesinin qRT-PCR ile belirlenmesi.....	61
3.35 H ₂ O ₂ , Rot, MV, DCMU, 3-AT ve Tm uygulanan yapraklarda <i>DER1</i> gen ifadesinin qRT-PCR ile belirlenmesi.....	61
3.36 H ₂ O ₂ , Rot, MV, DCMU, 3-AT ve Tm uygulanan yapraklarda <i>UBC32</i> gen ifadesinin qRT-PCR ile belirlenmesi	62
4.1 ER stres ilişkili genlerin H ₂ O ₂ , Rot, MV, DCMU, 3AT uygulamaları sonrasında hiyerarşik sınıflandırılması	66

KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
ROS	Reaktif oksijen türleri
SOD	Süperoksit dismutaz
NOX	NADPH oksidaz
POX	Peroksidaz
CAT	Katalaz
APX	Askorbat peroksidaz
GR	Glutasyon redüktaz
PSI	Fotosistem I
PSII	Fotosistem II
GSH	Glutasyon
GSSG	Glutasyon disülfid
AsA	Askorbik asit
MDHA	Monodehidroaskorbik asit
DHA	Dehidroaskorbik asit
MDHAR	Monodehidroaskorbat redüktaz
DHAR	Dehidroaskorbat redüktaz
RWC	Bağıl su içeriği
MDA	Malondialdehit
TBARS	Tiyobarbuturik asit reaktif bileşikler

<u>Semboller</u>	<u>Açıklama</u>
A	Karbon asimilasyon hızı
C_i	İçsel CO ₂

1. GİRİŞ

Bitki hücrelerinde üretilen salgı proteinleri, görev yapacakları organellere ER’ de katlanarak taşınır. ER’ de pek çok protein (şaperonlar) bu katlanma ve birleşme işlevini gerçekleştirmektedir. Katlanma mekanizmalarının yetersiz kaldığı durumlarda, ER’ de proteinlerin yanlış katlanarak birikmesi veya çökmeleri “endoplazmik retikulum stresi” ne neden olmaktadır (Iwata ve Koizumi, 2010).

Bilindiği gibi hücrelerarası alana ya da salgı yolu organellerine hedeflenmiş olan proteinler, ER-bağlı ribozomlarda sentezlenir. Sonrasında ER lümeni içine taşınır ve burada doğal hallerine katlanırlar. Bütün bu katlanma yolağı boyunca, proteinlerin katlanması çeşitli kalite-kontrol sistemleri tarafından her aşamada denetlenir ve sadece düzgün katlanmış proteinler golgi aygıtına geçerek salgı yolağında ilerlemeye devam edebilir (Hurtley ve Helenius, 1989). Örneğin, hücre duvarı protein bileşenleri, plazma zarını oluşturan proteinlerin çoğu ve vakuollerde yer alan proteinlerin büyük bölümü salgı yolağı kaynaklı proteinlerdir (Sanderfoot ve Raikhel, 2003).

Salgı yolağına hedeflenmiş proteinlerin çoğu N-bağlı oligosakkaritlerin eklenmesiyle değişime uğrayan glikoproteinlerdir. Glikolizasyon olarak adlandırılan bu olay önemli bir translayon sonrası değişim olup proteinlerin denatürasyonunu ve proteolize uğramalarını engellemektedir. Ayrıca, bu değişim proteinlerin çözünürlüğünü de arttırmaktadır. Bunlara ek olarak glikolizasyon, ER içerisindeki kalite-kontrol mekanizması için bir “tanıma sinyali” olarak iş görmektedir (Liu ve Howell, 2007; Ceriotti et al., 1998; Ceriotti, 2011). Son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalarda tunikamisin isimli antibiyotiğin yukarıda sözü edilen N-glikolizasyonunu engelleyerek ER stresine neden olduğu bulunmuştur. Dolayısıyla tunikamisin hücrede oluşan ER stresine karşı verilen “katlanmamış protein yanıtı”nın teşvik edicilerinden biridir.

ER, redoks potansiyeli bakımından hücre dışı boşluk gibi okside bir ortam olup proteinlerin oksidatif katlanması için ideal bir ortam oluşturmaktadır. Sitosole göre, ER’deki yükseltgenmiş glutatyon/indirgenmiş glutatyon

(GSSG/GSH) oranı daha yüksek olsa ve glutatyon havuzu daha okside durumda gibi görünsede, ER' de disülfit bağ oluşumuna bağlı protein katlanması garanti altına alınamamıştır (Hwang et al.1992). ER' deki bu oksidatif ortamın sağlanmasında protein disülfid izomeraz(PDI)-endoplazmik retikulum oksidoredüktaz 1 (Ero1) sisteminin önemli rol oynadığı bilinmektedir. Ero1, moleküler oksijenin okside edici gücünü kullanarak disülfit bağ oluşturur. Bu disülfit bağları Ero1' den çözünebilir disülfit taşıyıcısı olan PDI' ya aktarılır. PDI doğrudan katlanmakta olan proteinlere bu disülfit bağını aktarabilmektedir. Bu reaksiyonlar sonucu Ero1 aktivitesine bağlı her bir disülfit bağ oluşumu ile bir molekül Hidrojen peroksit (H_2O_2) üretilmektedir. Bu nedenle bu yolda oluşan H_2O_2 ' nin sinyal mekanizmalarıyla ilişkisi de büyük önem taşımaktadır. Ayrıca, H_2O_2 başta olmak üzere, reaktif oksijen türlerinin (ROS) hücrede ikili rollerinin olduğu bilinmektedir. Bu moleküllerin hücrede zararlı etkilerinin yanında düşük düzeylerde, sinyal molekülü olarak da iş gördükleri ortaya konmuştur. ROS' ların sinyal rolleri aydınlatılmaya başlandıktan sonra hücre içi pek çok mekanizmada kilit rol oynadıkları anlaşılmıştır (Jaspers ve Kangasjarvi, 2010). Kuraklık, tuzluluk, sıcaklık gibi abiyotik stres faktörleri ER' de proteinlerin düzgün katlanmalarını engellemekte olduğu bilinsede bu engellenmenin hücrenin diğer organellerinde ve antioksidan savunma sistemi üzerindeki etkisi bilinmemektedir (Iwata ve Koizumi, 2005, Liu ve Howell, 2007).

Reaktif oksijen türleri (ROS), tekli oksijen (1O_2), süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), ve hidroksil radikali (OH.) gibi moleküllerden oluşur. ROS' lar, proteinler, DNA ve lipitleri oksitleyerek zarar oluşturan toksik moleküllerdir (Apel and Hirt, 2004). Optimum büyüme koşullarında, ROS'lar kloroplast, mitokondri ve peroksizomlar gibi organellerde ve apoplastta düşük düzeylerde üretilmekte, ancak, stres sırasında üretimlerinde önemli bir artış görülmektedir. ER stresi sonucu oluşan bu ROS artışının ise hasar ile hücre ölümüne mi yol açtığı yoksa sinyal mekanizmasını mı uyardıkları ve hangi düzeyde bu iki rolden birini üstlendikleri bilinmemektedir.

Bitkiler hücre içerisinde oluşan ROS' ları detoksifiye etmek için çeşitli enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar üretmektedirler. Askorbik asit (AsA) ve glutatyon (GSH) gibi enzimatik olmayan antioksidanlar ve süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz

(GPX) ve peroksiredoksinler (PRX) gibi ROS süpürücü enzimatik antioksidanlar gerek normal metabolizma gerekse stres sırasında ROS detoksifikasyonunda rol almaktadırlar (Takahashi and Asada 1988; Mittler et al., 2004; Dietz et al., 2006; Türkan ve Demiral, 2009, Demiral et al., 2011).

Bu çalışma iki ana kısımdan oluşmaktadır, bunlardan birincisi, tunikamisin uygulaması ile yaratılan ER stresinin, tuz stresinin ve ER stresi + tuz stresinin hücre içinde redoks dengesi, antioksidan savunma ve ROS sinyalleme üzerine etkisi araştırılmasıdır. İkincisi ise, kloroplast, mitokondri ve peroksizomlar gibi hücre bölmelerinde oluşan ROS' un ER stresi üzerine etkilerinin belirlenmesidir..

Bu amaçla, ilk kısımda, model bitki olan *Arabidopsis thaliana* yaban tipi (Col)' e sadece tunikamisin uygulanarak hücrede protein katlanmamasına bağlı ER stresi oluşturulmuştur. Böylece abiyotik stres uygulanmaksızın ER' de sadece protein katlanmamasına bağlı stres oluşturulmuş ve hücre, bu strese yanıt vermesi için uyarılmıştır ve antioksidan savunma sistemi ve redoks değişimi belirlenmiştir. İkinci olarak, tuzluluk stresi ER' deki protein katlanmasına etkisi belirlenecektir. Son olarak, tunikamisin uygulaması ile ER stresi oluşturulan bitkilere tuzluluk stresi uygulanmıştır. Böylelikle hem ER stresine hem de abiyotik strese bağlı yanlış protein katlanmasının, hücrede redoks dengesi üzerine olan etkisi ortaya konmuştur. *A. thaliana*' nın yapraklarında: ROS miktarı (H_2O_2 ve $O_2^{\cdot-}$), redoks dengesi [glutasyon (GSH)/ glutatyondisülfid (GSSG) oksidasyon miktarı], antioksidan enzimlerin [süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX), glutasyon redüktaz (GR)] aktiviteleri ve bu enzimlerin izoenzimleri belirlenmiştir. Ayrıca, ER stresi altında ifadesinin arttığı bilinen bazı ER stres genlerinin (*bZIP17*, *bZIP28*, *bZIP60*, *TIN1*, *BiP1*, *BiP3*, *ERO1*) abiyotik stres koşulları altında da ifade olma düzeyleride saptanmıştır. Bunun dışında, lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonu ölçülerek ER stresi, abiyotik stres, ve ER stresi + abiyotik stresin neden olduğu oksidatif hasarın derecesi belirlenmiştir.

İkincil olarak organellerde oluşan ROS' un ER stresi üzerine etkileri aydınlatılmıştır. Kloroplastlarda metil viyolojen, mitokondride rotenone, peroksizomlarda 3-AT uygulamaları ile ROS üretimi teşvik edilmiş ve ER stres algılayıcısı olarak iş gören *bZIP17*, *bZIP28*, *IRE1A*, *IRE1B*, *BiP1*, *BiP3* genlerinin

ifadeleri, protein katlanması sürecinde iş gören *CNX*, *ERO1* genlerinin ifadeleri, ERAD ilişkili *HRD1*, *SEL1*, *DER1*, *UBC32* genlerinin ifadelerindeki değişiklikler belirlenmiştir.

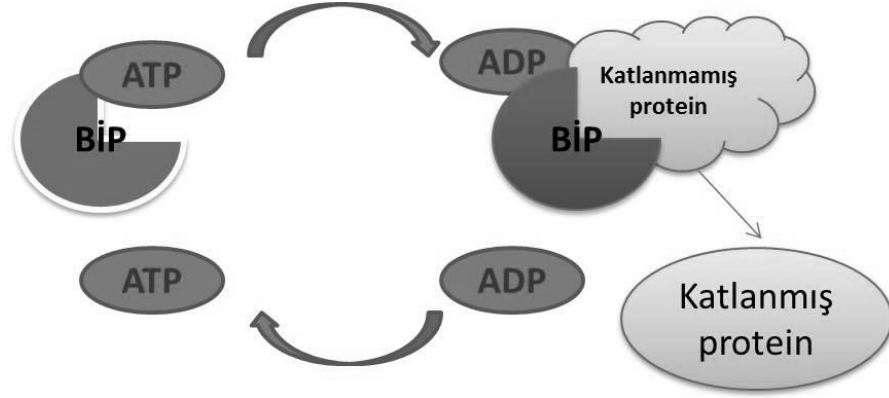
Bundan sonraki bölümlerde ER stresi, ER' de protein katlanması, ER kalite kontrol sistemi, ER ilişkili parçalanma sistemi, ER stresine adaptasyon yanıtları, tuz stresi altında ikincil stres olarak oksidatif stres başlıkları detaylı olarak anlatılacaktır.

1.1. Bitkilerde ER Stresi

Bitkilerde protein katlanması süreci çevresel koşullardan etkilenmektedir (Hartl and Hayer-Hartl, 2009). Protein katlanması, salgı proteinlerinin oluşmasında gerçekleşmekte ve katlanmamış polipeptidlerin ER lümenine girişi ile başlamaktadır. Protein katlanması ER içerisindeki katlanma faktörlerince gerçekleştirilir. Düzgün katlanmayan proteinler, ER kalite kontrol sistemi (ER quality control system= ERQC) tarafından tanınır ve ER ilişkili parçalama sistemi (ER associated degradation system=ERAD) tarafından parçalanır. Yanlış katlanmış proteinlerin birikimi bitki için zararlı olabilmektedir bu nedenle ERQC bitkilerde yüksek önem taşıyan bir sistemdir. En iyi koşullarda bile bazı proteinler yanlış katlanabilir. Stres koşullarında veya yüksek miktarda protein salgılanmasının olduğu koşullarda ise hücrenin protein katlanma kapasitesi ve parçalanma kapasiteleri aşılar ve yanlış katlanmış veya katlanmamış proteinlerin miktarında artış gözlenir. Bu durum bitkilerde ER stresine neden olmaktadır (Vitale and Boston, 2008; Howell, 2013)

ER stresi katlanmamış protein yanıtını (unfolded protein response= UPR) aktiveleştirir (Martinez et al., 2003; Kamauchi et al., 2005). UPR laboratuvar koşullarında ER stres ajanları kullanılarak da aktiveleştirilebilir. Bu ajanlardan biri de tunikamisindir. Tunikamisın, salgı glikoproteinlerinde N-bağlı glikolizasyonu engeller ve katlanmamış proteinler ER lümeninde birikmeye başlar. Dithiothreitol (DTT) gibi indirgeyici ajanlar da ER' deki yükseltgen ortamı indirgeyerek disülfid bağlarının oluşumunu engeller ve buna bağlı olarak protein katlanması da engellenir (Michalak et al., 2009; Howell, 2013). ER stres ajanları uygulamaları gibi abiyotik streslerde UPR' yi teşvik edebilirler (Liu and Howell, 2010).

ER’deki protein katlanmasında bir diğer faktör ise moleküler şaperonlardır. Binding protein (BiP), ER lümeni içerisinde en çok bulunan şaperonlardandır ve düzgün katlanmamış proteinlere bağlanarak ER içerisinde bu proteinlerin çökmelerini engellerler (Otero et al., 2010). BiP’ler ısı şoku 70 (HSP 70) proteinleridir ve ATP bağlarlar. J domaini içeren proteinlere bağlanarak iş görürler. J proteini BiP’ler ile beraber ATP hidrolizini uyarırlar ve BiP tarafından polipeptidlerin hızlı bir şekilde bağlanmasını sağlar (Yamamoto et al., 2008) (Şekil 1.1).



Şekil 1.1 BiP ATP hidrolizi ile katlanmamış proteinlere bağlanmaktadır.

ER stresine karşı ilk yanıtı ER stresin algılanması ve sinyalin iletilmesinde ER zarı üzerinde yer alan transkripsiyon faktörleri iş görmektedir.

Memelilerde UPR sinyal yolağının 3 dalı olan, 3 farklı sınıf ER transkripsiyon faktörü bulunmaktadır (Walter and Ron, 2011). İlk sınıf membran ilişkili transkripsiyon faktörleri, aktif olduklarında membrandan serbest kalarak nukleusa gider ve sonrasında UPR genlerinin ifade olmasını sağlarlar. İkinci sınıf, ikili işlevi olan protein kinaz/ ribonükleaz olan inositol-bağımlı enzim1 (IRE1)’i içermektedir. Üçüncü sınıf ise membran ilişkili protein kinaz RNA benzeri endoplazmik retikulum kinaz (PERK)’i içerir. PERK translasyon başlatıcı faktör eIF2a’ı fosforile eder ve inaktif hale getirir böylece translasyon yavaşlar. Bitkilerde şimdiye kadar ilk iki sınıfın varlığı ortaya konmuştur.

Memelilerde en çok çalışılan membran ilişkili stres iletilen transkripsiyon faktörlerinden biri basic leucine zipper (bZIP) faktör olan aktifleştirici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6) olarak adlandırılmaktadır. ATF6 tek geçişli transmembran motifi içeren bir tip II membran proteinidir. bZIP motifi sitosole

dönük olarak membran içinde yerleşmişken, site 1 proteaz (S1P) kesme bölgesi içeren C terminal kuyruğu ER lümeninde bulunmaktadır. Stres uygulaması sonrasında ATF6 hareketlenir ve ER' den dışarı çıkar ve Golgi cisimciklerine ilerler. Burada ATF6, Golgi ilişkili proteazlar tarafından (S1P ve S2P) kesilir. S1P çözünebilir lümenal bir proteazdır ve S2P ise membran ilişkili bir metalloproteazdır. S2P membranda ATF6' yı keser ve bZIP motifinde yer alan sitosolik bileşen serbest kalır ve bu bileşen nükleusa giderek hedef genlerin ifadesini başlatır (Howell, 2013).

Arabidopsis' de ATF6 homologu olan bZIP transkripsiyon faktörü gen ailesine ait 75 adet faktör tanımlanmıştır. Bunlardan 4 tanesinin tipII membran proteini olduğu düşünülmektedir. Bunlardan, yapısal olarak ATF6'ya benzer olanlar AtbZIP17-28-49' dur. Her üçünde sitosole bakan bir bZIP motifii ve tipik S1P kesme bölgesi içeren C terminal kuyruğu bulunmaktadır (Liu et al., 2007; Che et al., 2010).

Arabidopsis' de yapılan bir çalışmada bu proteinlerin ER stresi uyarını olup olmadığını kontrol etmek için, N terminallerinden GFP ile işaretlenmiş ve transgenik bitkilere aktarılmıştır ve transgenik bitkiler ER stres ajanları ve çevresel stres uyarılarına maruz bırakılmışlardır. Transgenik bitkilerde, ER stres ajanı ve yüksek tuz stresi uygulamasından sonra bZIP17, proteolitik olarak kesilmiştir. Proteolizis, fonksiyonel olarak S1P ve S2P' ye ihtiyaç duysada sadece S2P kesim ürünü gözlenmiştir. S1P kesimi ile S2P proteolizisinin başladığı ve S1P kesimi olduğu sırada hızlı bir şekilde S2P kesiminin gerçekleştiği böylece ara ürünlerin birikmesinin gerçekleşmediği düşünülmektedir. ER stres uygulaması sonrasında GFP işaretli bZIP17' lerin ER' den nükleusa hareket ettikleri belirlenmiştir (Shen et al., 2007).

bZIP28' de bZIP17 ile aynı şekilde ER stresi altında Golgi cisimciğine hareket eder ve S1P - S2P proteolizisini takiben nükleusa taşınır. Bu bZIP faktörlerinin bir organelden diğer organelle taşınımı Srivastava et al., (2012) tarafından basamak basamak incelenmiştir. Hayvanlarda ER' den Golgi'ye taşınım COPII vezikülleri ile sağlanır, bitkilerde ise bu yolak tam olarak bilinmemektedir. Bitkilerde birçok hareketli Golgi cisimciği bulunmaktadır ve taşınım için ara bir moleküle ihtiyaç olmayabileceği düşünülmektedir. Fakat ER' den Golgi' ye geçiş

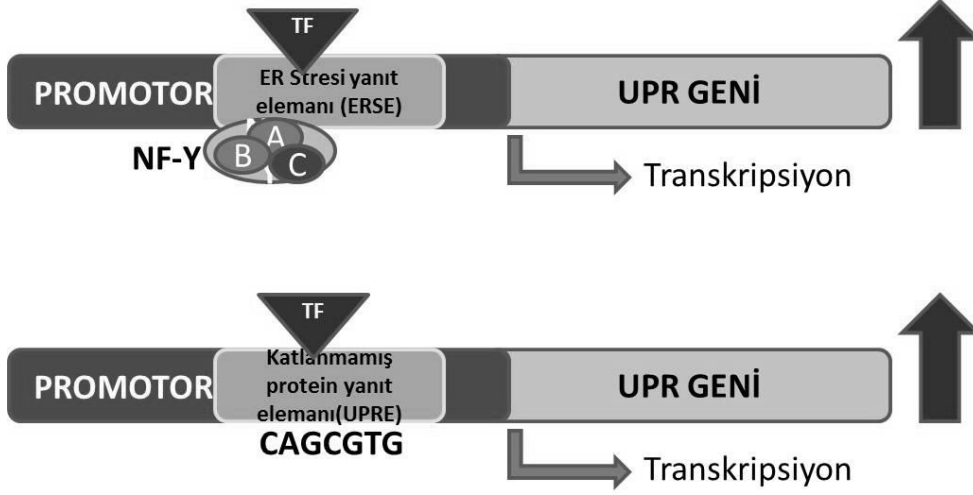
sırasında COPII mekanizmasının bitkilerde de varlığı üzerine çalışmalar devam etmektedir.

ER protein katlanma mekanizması içerisinde yer alan bazı genler bZIP28 transkripsiyon faktörünün iş görmesiyle ifade olabilmektedir. Bu genler BiP2, kalneksin, kalretiikulin, protein disulfide isomerase (PDI)' ıdır. Bu grupta yer alan çoğu genin promotorunda, ER stresine yanıt veren element (ERSE1) bulunmaktadır. ERSE1 iki altbirim içerir. Bunlardan CCACG bZIP dimerlerine bağlanırken, CCAAT altbirimi CCAAT-kutu-bağlanma faktörlerine bağlanır (Yoshida et al., 2001). CCAAT-kutu bağlanma faktörleri üç adet nükleer Y (NF-Y) altbiriminden oluşur. Bunlar NF-YA, NF-YB ve NF-YC' dir. *Arabidopsis* genomunda 36 adet NF-Y altbirimi kodlayan gen tanımlanmıştır. Bu altbirimlerin hangilerinin bZIP28 ile etkileştiği ve ER stresinde düzenleyici rolleri olduğu araştırılmaktadır (Siefers et al., 2009).

Liu ve Howell, (2010b) üçlü hibrid sistemi kullanarak bZIP28 ile etkileşen CCAAT-kutu faktörü alt birimlerini karakterize etmişlerdir. Hepsi beraber ifade olduğunda NF-YB3 ve NF-YC2' nin bZIP28 ile etkileştiği bulunmuştur. Üçüncü alt birim için ise mayalarda NF-YB3 ve NF-YC2 ile etkileştiği rapor edilen NF-YA4 olduğu test edilmektedir (Geisler et al., 2007). *Escherichia coli* ' de NF-YA4, NF-YB3 ve NF-YC2 alt birimleri bZIP28 ile beraber ERSE1 elementine bağlanabilen bir kompleks oluşturduğu *in vitro* koşullarda belirlenmiştir (Liu and Howell, 2010b).

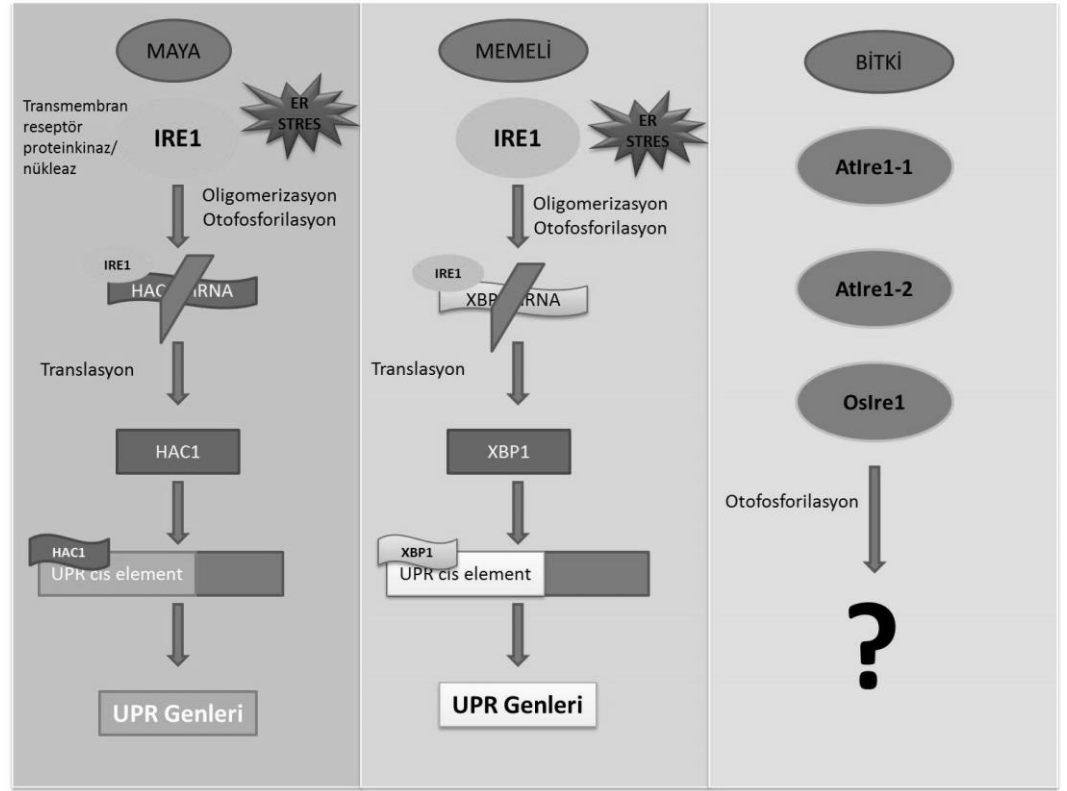
Siefers et al. (2009) promotor: raportör yapısını kullanarak NF-YA4 ve NF-YB3' ün *Arabidopsis* sürgünlerinde ifade olduğunu bildirmiştir. Liu ve Howell (2010b) ise çalışmalarında ER stres ajanı uygulamasıyla NF-YC2' nin ifadesinin arttığını ve bu artışın bZIP28' e bağımlı olduğunu göstermişlerdir. NF-YB3 ifadesi sürekli olsada, GFP işaretli NF-YB3 ifadesi stresli olmayan bitkilerde sitoplazmada belirlenmiştir. Stres uygulaması sonrasında ise NF-YB3' ün nukleusa taşındığı bulunmuştur. Sonuçta, stres uygulaması sonrasında bZIP28' in aktifleştiği ve *BIP3* ile *NF-YC2* gibi genlerin ifadesini arttırdığı önerilmektedir. *Arabidopsis* ' de NF-YC2 ifadesindeki artışın NF-YB3' ün nukleusa girişini yönlendirdiği düşünülmekteydi. Memelilerde, NF-YA importin β sistemi ile kendisine özel olarak, CCAAT kutu bağlanma faktörü ile beraber taşınmaktadır

(Kahle et al., 2005). Nukleusda bZIP28 ile etkileşimini takiben CCAAT kutu bağlanma faktörü bZIP28' in tekrar eski hale gelip tekrar kullanımını sağlamaktadır. Böylece, ER stres,, hem spesifik olarak bZIP28 transkripsiyon faktörünü hemde genel olarak CCAAT kutu bağlanma faktörlerini aktifleştirmektedir (Şekil 1.2).



Şekil 1.2 ER stresıyla ilişkili cis-acting düzenleyici elementler

Bitkilerde ER stres yanıtının ikinci yolağı, RNA splizing faktör IRE1' i içermektedir (Howell, 2013). Bu yolağın mayalarda, nematodlarda, sirke sineklerinde ve memelilerde korunduğu bilinmektedir. *Arabidopsis*' de de IRE1 kodlayan iki tane genin varlığı tespit edilmiştir (Koizumi et al., 2001) (Şekil 1.3).



Şekil 1.3 IRE1 faktörünün mayalar, memeliker ve bitkilerde çalışma prensipleri.

RNA splizing kolu, membran ilişkili bZIP60 transkripsiyon faktörünün ER stresi ile teşvik edilmesi araştırılırken ortaya çıkarılmıştır (Iwata and Koizumi, 2012). Iwata ve Koizumi (2005) bZIP60' ın aktif haldeki formunun UPR genlerinin ifadesini düzenlediğini rapor etmişlerdir. Aynı çalışmada bZIP60' ın proteolizis ile aktifleştiği yönünde görüş bildirmişlerdir.

bZIP60' ın proteolitik aktivasyonu konusundaki varsayımlar, ER stres ajanları uygulaması sonrasında daha kısa bir formunun bulunmasıyla desteklenmiştir. Tam boy bZIP60 mikrozomal membranlarda, kısa formu ise nukleusda yer almaktadır (Iwata et al., 2008).

Son çalışmalarda, bZIP60' ın aktif formunun, IRE1 aracılı bZIP60 mRNA' sının splicingi ile oluştuğu rapor edilmiştir (Deng et al., 2011; Nagashima et al., 2011). bZIP60 mRNA' sı IRE1 için RNA splicing hedefidir. IRE1 tanıma bölgesindeki bir bölge tam olarak bZIP60 mRNA' sının katlanma bölgesine denk gelmektedir.

Arabidopsis' de ER stresi altında *BIP3* gibi genlerin ifadesindeki artış, bZIP28 ve bZIP60' a bağlıdır (Howell, 2013). Moreno et al (2012) bakteri ile

enfekte edilmiş *Arabidopsis*' de IRE1a' nın sistemik kazanılmış direnç yanıtında rol aldığını rapor etmişlerdir. Salisilik asit uygulanan bitkilerde patojen ilişkili proteinlerin salgılanmasında IRE1a' ya gereksinim duyulmaktadır. *ire1a* mutantları bakteriyal patojenlere hassas iken, *ire1b* mutantlarında patojenlere karşı yanıtta herhangi bir değişiklik saptanmamıştır.

ER stres yanıtı yolağındaki transkripsiyon faktörlerinin rollerini açıkladıktan sonra bundan sonraki bölümde ER' de protein katlanması mekanizması ayrıntılı olarak açıklanacaktır.

1.1.1. Protein Katlanması ve N-Bağlı Glikolizasyon

Yanlış protein katlanması ER' de strese neden olan ana süreçtir ve protein katlanma mekanizmasının doğru çalışması hücre homeostasisi için kritik öneme sahiptir. Polipeptidler ER lümenine Sec61 translokon kompleksi aracılığıyla girerler ve iki protein katlanma yolağından birine katılırlar (Anelli and Sitia, 2008). Bu yolaklardan biri lümenal bağlanma proteini BiP' in çalışmasını içerir. Bu yolakta, ER' de lokalize olan ısı şoku faktörü 40 proteini ERdj3 doğrudan henüz oluşmuş proteine bağlanır ve BiP' in bu komplekse bağlanmasını sağlar (Jin et al., 2009).

Diğer katlanma mekanizması N-glikan bağımlıdır ve kalneksin/kalretikulin protein katlanma döngüsünü içermektedir. Nascent polipeptidler multialt birim oligosakkarit transferaz (OST) tarafından lipid bağlı oligosakkaritlere taşınırlar ve glikolizasyon gerçekleşir. Tunikamisin gibi ER stres ajanları, OST tarafından katalizlenen lipid bağlı oligosakkarit üretimini engellerler ve N-bağlı glikolizasyonu engelleyerek ER stresine yol açarlar (Pattison and Amtmann, 2009).

Koizumi et al., (1999) tunikamisinin OST' yi engelleyerek ER stresine yol açtığını rapor etmiştir. Arabisopsis' de tunikamisin direnci gösteren bitkilerde OST ifadesinin aşırı olduğu bulunmuştur. OST' nin bir alt birimindeki mutasyon yüksek tuz stresine karşı direnci azalttığı bilinmektedir ve ER stresine yol açtığı bulunmuştur (Koiwa et al., 2003). Tunikamisinin etkileri N-bağlı glikolizasyonun protein katlanma mekanizmasında ne kadar önemli olduğunun bir belirtecidir.

Monoglikolizasyonlanmış oligosakkarit lektin şaperonları olan ve ER protein katlanma mekanizmasının ana elemanlarından olan kalneksin (CNX) ve kalretikulin tarafından tanımlanır. Kalneksin membrana demirli bir proteindir ve kalretikulin lümenal proteindir. Bu iki proteinin oluşturduğu kompleks ER içerisinde proteinlerin düzgün katlanmasından sorumludur. Bu kompleksden dışarı çıkan yeni katlanmış proteinler UDP-glukoz: glikoprotein glikoziltransferaz (UGGT) tarafından kontrol edilir ve yanlış katlanmış protein tekrar kalneksin/kalretikulin tarafından düzenlenen katlanma mekanizmasının içine aktarılır. UGGT ER kalite kontrol mekanizmasında karar verici rolü oynamaktadır. Bu enzim, katlanmamış proteinlerdeki hidrofobik yüzey kalıntılarını tanıyarak iş görmektedir (Taylor et al., 2003).

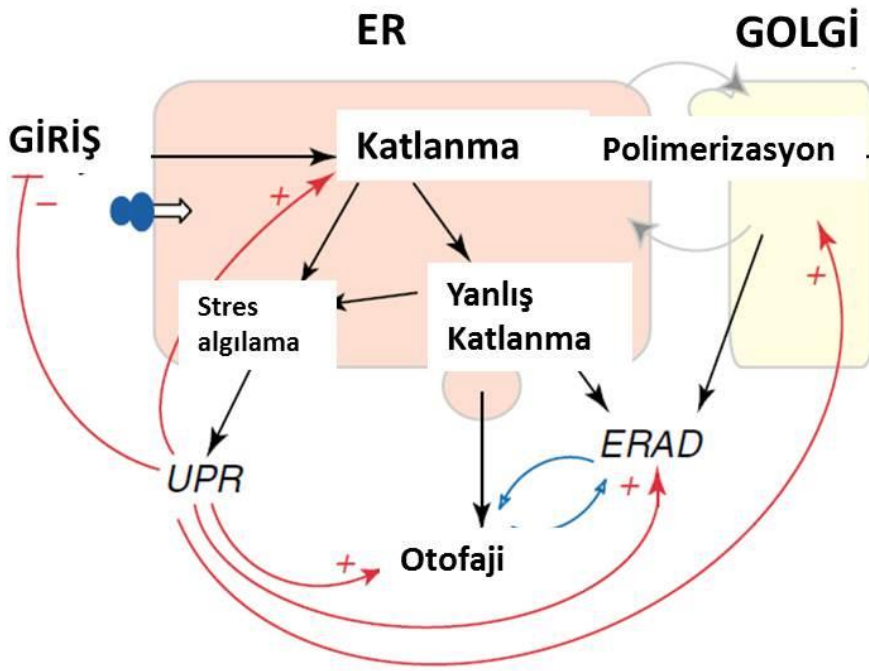
Mayalarda kalneksin/kalretikulin kompleksi ile bağlantılı proteinlerden bir diğeri de PDI'dır. PDI disülfid bağların oluşumundan sorumludur. Fakat yalnızca disülfid bağların oluşumundan değil, protein doğal konformasyonlarında gerekli olan izomerizasyon işleminde de rol almaktadır. *Arabidopsis* genomunda 12 adet PDI kodlanmaktadır ve bunlardan 9 tanesi ER ile ilişkili sinyal peptidleri içermektedir (Lu and Christopher, 2008). Mayalarda, disülfid bağ oluşumunda oksidasyon eşlenirliklerini üreten redoks elemanı ER oksidoredüktazdır (Ero1p) *Arabidopsis*' de AERO1 ve AERO2 olarak iki homologu bulunmaktadır (Banhegyi et al., 2012).

1.1.2. ER kalite kontrol sistemi (ERQC)

“ER kalite-kontrol mekanizması” ilk kez Hurtley ve Helenius (1989) tarafından, ER içerisindeki salgı ve zar proteinlerinin düzgün katlanmasını sağlayan sistem olarak tanımlanmıştır. Pek çok proteinin düzgün katlanması için disülfid bağı izomerizasyonu ve bazen indirgenme reaksiyonları gerekmektedir (Kaufman et al., 2002). Bu bağların varlıkları, proteinlerin doğal konformasyonunun kararlılığını artırırken, yoklukları ya da yanlış eşleşmeleri ve katlanmamış proteinlerin oluşumunu tetiklemektedir. Eğer ER aşırı indirgenirse protein disülfid bağı oluşumu engellenmektedir. ER lümenindeki aşırı okside ortam ise, proteinlerin yanlış disülfid bağ yapmasına ve çökelmelerine neden olabilmektedir (Molteni et al. 2004). Bu nedenle, disülfid bağ oluşumu, salgı proteinlerinin doğru şekilde katlanmasında, dolayısıyla kalite-kontrol

mekanizmalarında önemli bir rol oynamaktadır. ER kalite kontrol mekanizmasının bir sonraki aşaması yanlış katlanmış proteinlerin ER' den uzaklaştırılmalarıdır (Mori, 2000, Rutkowski ve Kaufman 2004).

Tuz stresine toleransta ERAD (ER ilişkili protein parçalanması=ERAD) mekanizmasına gereksinim duyulmaktadır. Ayrıca, ER kalite-kontrol mekanizmasının abiyotik stres toleransında önemli bir rol oynadığı saptanmıştır (Alvim et al., 2001) (Şekil 1.4).



Şekil 1.4 ER kalite kontrol mekanizması (Alvim ve Sitia 2008' den değiştirilerek)

1.1.3. ER İlişkili Parçalanma (ERAD)

ER stresine yanıt olarak homeostatik dengenin tekrar sağlanması yanlış katlanmış proteinlerin parçalanmasını içeren ERAD mekanizmasının işlerliği ile gerçekleşmektedir. Kalite kontrol mekanizmasında yanlış katlanmış olarak işaretlenen proteinler parçalanma mekanizmasına gönderilirler (Howell, 2013).

ERAD dört yapısal basamak içermektedir. Bunlar: (i) tanımlama, (ii) ubiquitinasyon, (iii) retrotranslokasyon, (iv) parçalanma dır.

Yanlış katlanmış proteinlerin ERAD sistemi ile tanımlanması tanımlama kapasitesi çok yüksek olan E3 ubiquitin ligazlar tarafından gerçekleştirilmektedir

(Smith et al., 2011). Mayalarda, ERAD substratları üç kategoride incelemektedir (Brodsky and Wojcikiewicz, 2009). ERAD-L çözünebilir lümenal proteinleri ya da ER lümeni içine uzanan kısımları bulunan membran proteinlerini izlemektedir. ERAD-M ise membrandaki yanlış katlanmış domainler ile ve membran proteillerini izlemektedir. ERAD-C ise sitosole uzanan kalıntıları olan membran proteinlerinin düzenlenmesinden sorumludur. HRD1 kompleksi de yeni oluşmaya başlamış glikoproteinlerden yanlış katlanmış proteinlerin ayırt edilmesinde görevlidir (Gauss et al., 2011).

1.1.4. Bitki Hücrelerinde Oksidatif Protein Katlanması

Oksidatif protein katlanmasının ana basamağı disülfid bağların oluşturulmasıdır. Proteinlerin mekanik ve termodinamik kararlılığı ile protein katlanmasını kontrol ederler (Molinari et al., 2007). Polipeptidler arasında disülfid bağların oluşması de novo disülfid oluşturan ERO1 enzimi ve disülfid taşıyıcı enzim olan PDI' nin beraber iş görmesiyle olur. PDI, ökaryotik hücrelerde bol bulunan tiyol-disülfid oksidoredüktazlarıdır ve disülfidleri doğrudan substrat proteinlere tiyol disülfid değişim reaksiyonları ile verirler. PDI' nin yükseltgenmiş formu ERO1 ile tekrar oluşturulur (Riemer et al., 2009). ERO1 moleküler oksijenden PDI' nin indirgenmiş formuna yükseltgenme gücünü aktarır. *A. thaliana*, *Oryza sativa*, *Glycine max*, *Zea mays* gibi yüksek bitkilerin genomu PDI protein ailesine ait tiyoredoksin (TRX) katlanma bölgelerinde farklılıklar gösteren 10-20 üyesini kodlamaktadır (Onda, 2013).

PDI' lar yükseltgenme, indirgenme, izomerizasyon reaksiyonlarını içeren tiyol-disülfid değişim reaksiyonları katalizleyen ve şaperon aktivitesi gösteren enzimlerdir (Hatahet and Ruddock, 2009). PDI' lar en az bir tanesi domain a olarak isimlendirilen redoks aktif TRX domaini olmak üzere multidomain proteinlerdir. Domain a' nın redoks aktif CxxC motifinin yükseltgenmiş formu substrata bir disülfid taşır ve indirgenmiş hale gelir. PDI' ların domain düzenlenmesi substrat özelleşmeleri için gerekli olan çeşitliliği sağlamaktadır (Onda, 2013).

Substrat proteinlere disülfidlerin girişi PDI' ların indirgenmesi ile gerçekleştirilebilir. İndirgenmiş PDI' nin bir sonraki döngü için hemen tekrar

yükseltgenmesi gerekmektedir. Daha öncede belirtildiği gibi, disülfid bağ oluşumu elektronların substrat proteinden PDI' ya sonrasında da de novo disülfid üreten enzime geçişiyle gerçekleşir (Riemer et al., 2009). Disülfid üreten enzimlere bir örnek de flavoenzim Ero1p' dir. Ero1 ilk olarak mayalarda sıcaklığa karşı hasas olan *ero1-1* mutant çalışmalarıyla keşfedilmiştir (Fränd and Kaiser, 1998). ERO1 ailesi mayalar, insanlar ve bitkiler gibi ökaryotik organizmalarda yüksek oranda korunmuştur. *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* genomlarının her birinde en az bir kopya *ERO1* geni bulunmaktadır (Onda, 2013). Daha yüksek canlılarda ve bitkilerde gen duplikasyonu gözlenmiştir. Örneğin, *Arabidopsis* (Dixon et al., 2003) ve mısırdaki (Aller and Meyer, 2013) 2 adet *ERO1* paralogu bulunmuştur. ERO1, PDI' ya disülfidi moleküler oksijenden aldığı yükseltgeyici gücü indirgenmiş PDI' ya ERO1 flavin kofaktörü aracılığıyla aktarması ile oluşur (Gross et al., 2006).

Mayalarda yapılan çalışmalarda Ero1 aktivitesinin ER' de ROS birikimine neden olduğu gösterilmiştir (Sevier and Kaiser, 2008). Bununla beraber, salgı proteini yükü yüksek hücrelerde Ero1 aktivitesi sonucu üretilen ROS' un protein sentezi sürecinde üretilen ROS' un %25' ini oluşturabileceği hesaplanmıştır (Tu and Weissman, 2004).

Oryza sativa (çeltik) *OsERO1*' in RNAi teşvikli knockdown mutantı tohumlarında OsERO1 üretimi çok azdır ve doğal disülfid bağların üretimi engellenmiştir (Onda et al., 2009).

ERO1 aktivitesi bir geri besleme düzenlemesi ile kontrol edilir ve böylelikle doğal disülfid bağ oluşumunu sağlayacak ER redoks ortamının oluşumu düzenlenir (Sevier et al., 2007).

ERO1 kaynaklı disülfid taşınımı sonucunda H_2O_2 üretilir (Onda, 2013). ERO1' in aşırı ifadesi ROS oluşumunda artışa neden olur ve ERO1 aktivitesindeki kısmi bir azalma ROS birikimini azaltır ve ER stresinin letal etkilerine karşı direncin artmasına neden olur (Gross et al., 2006). Çeltik endosperm hücrelerinde ER içinde H_2O_2 miktarındaki artış tohum depo proteinlerinin sülfidril gruplarının yükseltgenmesine neden olmuştur (Onda et al., 2009). Daha az sülfidril grubu içeren *em49* mutantında yaban tipe göre daha az H_2O_2 üretildiği ve tohum gelişimi sırasında daha çok oranda su biriktirdiği ve

mutant tohumlarda desikasyon ve olgunlaşmanın geciktiği bildirilmiştir. Endosperm hücrelerinde ER’ de disülfid bağların oluşumu sonucunda üretilen H_2O_2 ’ nin programlanmış hücre ölümünü teşvik ettiği önerilmektedir (Young and Gallie, 2000).

1.1.5. ER Stresine Adaptasyon Yanıtları

ER stresinin hızlı bir şekilde teşvik edilmesi farmokolojik ajanlar ile mümkündür. Bu kimyasal ajanların uygulamaları ile protein katlanması engellenir ve posttranslasyonel modifikasyonlarda değişiklikler gözlenir (Urade, 2007). Yukarıda bahsedildiği gibi, ER stresinin uzun sürdüğü durumlarda UPR kaynaklı apoptozis gözlenir. Kimyasal ajanlarla teşvik edilen ER stresinin etkileri hemen uygulamanın arkasından gözlenebilir. Bunun aksine, tek bir mutant proteinin birikimiyle teşvik edilen ER stresinde uzun dönemli ER hasarının etkileri incelenebilir (Vitale and Boston, 2008).

ER stresine uzun dönemde adaptasyon modellerinden birisi mısır endosperm mutantlarında ortaya konmuştur. *fluory-2 (fl2)*, *mucronate (mc)* ve *de-b30* mutantlarında, tohumların ana depo proteini olan zein proteinlerinin kodlanmasında eksiklik bulunmaktadır. Bu mutantlar tohum olgunlaşması sürecinde haftalar boyunca endosperme özel UPR gösterirler (Vitale and Boston, 2008).

ER stresinden etkilenen genlerin ifadesinde değişiklikler RNA profillemeye teknikleriyle belirlenmiştir. Şimdiye kadar azetidine-2 karboksilik asid (AZC), DTT ve tunikamisin ile *Arabidopsis*’ de, AZC ve tunikamisin ile soya fasülyesinde ve *fl2* ile *mc* mısır mutantlarında çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Kimyasal ajanlar ER stresinin akut teşvik edicileri olsa da , mutant çalışmalarında kronik teşvik çalışmalarının sonuçları rapor edilmiştir (Hunter et al., 2002; Martinez and Chrispeels, 2003; Irsigler et al., 2007).

Kimyasal ajanlarla teşvik edilen çalışmalarda beklendiği gibi protein katlanması, glikolizasyon, translasyon/translokasyon ve protein parçalanması ile ilişkili genlerin ifadelerinde değişiklikler belirlenmiştir (Hunter et al., 2002; Martinez and Chrispeels, 2003; Irsigler et al., 2007). *fl2* ve *mc* mısır mutantlarında ise protein katlanma ve parçalanma ile ilgili genlerin ifadeleri ortaya çıkmaktadır

(Hunter et al., 2002). Bu iki farklı veri setinde çakışan genlerin sayısı azdır. Bu yönde yapılan çalışmalarda kısa dönemli ve uzun dönemli UPR yanıtlarının neler olduğu konusunda çalışmalar devam etmektedir. (Vitale and Boston 2008)

1.2. Diğer organaller ile ER' nin ilişkisi

Maya ve memelilerde Golgi aygıtı hariç özellikle mitokondri ve plazma membranı gibi diğer organeller ile fizyolojik olarak önemli bir çok bağlantısının olduğu rapor edilmiştir. Fakat bitkilerde ER' nin diğer organeller ile bağlanma bölgeleriyle ilgili çalışmalar kısıtlıdır (Stefano et al., 2014).

Canlı hücre grnteleme denemelerinden elde edilen sonuçlar ER' nin Golgi' ye olduğu gibi kloroplastlarla da bağlantısı olduğunu göstermektedir (Staehelin, 1997). Golgi ve kloroplastların ER' den uzağa çekildiği bir çalışmada ER' nin uzantılarının bu organellere doğru uzadığı ve bağlantı sağladığı gösterilmiştir. ER ile kloroplastlar arasında gözlenen sıkı bağlantıların, plastide bağımlı öncüller ile ER' de gerçekleşen membran ve depo lipidlerinin sentezini düzenlemede etkin olduğu düşünülmektedir (Andersson et al., 2007). Plastidik metabolik yolağı (tokoferol ve karotenoid yolakları) alışmayan mutantlar, ER lümenine bu plastid enzimlerinin tekrar yönlendirilmesi ile tamamlanabilmektedir. Bu bulgular ER ve kloroplastlar arasında fonksiyonel bir bağın bulunduğu savını da destekler niteliktedir. Fakat bu bölgeler henüz tam olarak ortaya çıkarılmamıştır (Mehrshahi et al., 2013). ER-kloroplast arayüzünü dengeleyen özelleşmiş bir protein ağının var olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, kloroplastlarda özel plastid membran çıkıntıları olan stromllerin ER ile ilişkiyi sağladığı düşünülmektedir (Griffing, 2011).

Kloroplast stromllerine benzer olarak, peroksizomların çıkıntıları olan peroksllerinde oksidatif koşullar altında olduğu ve ER tübülleri boyunca uzadığı bilinmektedir (Sinclair et al., 2009). *Arabidopsis apm1/drp3a* mutantların tubuler peroksizomlarının ER ağının formu ile aynı olduğu rapor edilmiştir. Bu mutantların peroksizomlarında ve ER'lerinde gözlenen iki renk florasana protein ifadesi de iki organelin birbiriyle bağlantılı olduğuna işaret etsede kesin bir bilgi henüz literatürde yer almamaktadır (Stefano et al., 2014).

1.3. Tuz stresi altında ikincil stres olarak oksidatif stres

1.3.1. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

Aktif oksijen türleri (AOS) olarak ta adlandırılabilen reaktif oksijen türleri (ROS) bakterilerden memeli hücrelerine kadar tüm aerobik organizmalarda normal koşullar altında üretilmektedir ve aerobik metabolizmanın kaçınılmaz olarak oluşan yan ürünleridir (Bose et al., 2013). Hücrede temel olarak dört farklı tipte ROS bulunabilir, bunlar tekli oksijen ($^1\text{O}_2$), süperoksit anyon radikali (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve son olarak hidroksil radikalidir ($\text{HO}\cdot$). Bitki hücresinde ROS üretimi yoğun olarak peroksizomlar, kloroplastlar, mitokondriler, hücre zarı ve apoplastta gerçekleşmektedir. ROS düşük seviyelerde ikili role sahiptir ve hücresel sinyal yollarında ikincil mesajcı olarak görev alır, ancak tuz stresi ya da kuraklık stresi gibi çevresel streslere bağlı olarak yüksek miktarlarda biriktiğinde toksik etkiye sahiptir. Belirtildiği gibi, ROS' ların sinyal görevlerini gerçekleştirebilmeleri için hücrede düşük seviyede tutulmaları gerekmektedir ve bu durum hücrede ROS üretim ve detoksifikasyon mekanizmalarının hassas bir dengede tutulmasıyla sağlanır (Mittler et al., 2004; Lai et al., 2012). Ancak, ROS' ların kontrolsüz bir şekilde aşırı birikimi protein oksidasyonu, lipid peroksidasyonu, DNA ve RNA oksidasyonu gibi biyolojik moleküllerde hasara neden olabilir (Scandalios, 1993; Noctor and Foyer, 1998).

Normal koşullar altında bitkiler sürekli olarak hücrenin farklı bölmelerinde metabolik yan ürünler olarak ROS üretmektedir. Işık altında ROS üreten ana bölmeler kloroplastlar ve peroksizomlarken (Foyer and Noctor, 2003), karanlıkta ROS üretimi en fazla mitokondrilerde gerçekleşmektedir (Moller, 2001). Ayrıca ışık altında kloroplast ve peroksizomların mitokondrilere göre 20 kat daha fazla ROS ürettiği bulunmuştur (Rhoads et al., 2006). Bunlara ek olarak, ROS ayrıca NADPH oksidazlar, hücre duvarı bağlı peroksidazlar ve oksalat oksidazlar tarafından apoplastik boşlukta da üretilmektedir (Wrzaczek et al., 2013). Bundan sonraki bölümlerde diğer hücre bölmelerinde ROS' ların nasıl oluştuğu detaylı olarak anlatılacaktır.

1.3.1.1 Kloroplastlar

Kloroplastlarda ROS fotosistem I (PSI) ve fotosistem II (PSII) de üretilmektedir. Tuz ve kuraklık stresi gibi abiyotik stres koşulları sırasında stoma kapanmasına bağlı olarak içsel CO_2 'nin düşmesi kloroplastlarda ROS üretiminin ana nedenlerinden biridir. Normal koşullar altında elektron akışı uyarılan fotosistemlerden NADPH üretilmek üzere NADP^{+} ye yönlendirilir. Ancak elektron taşıma sistemi (ETS) aşırı yüklendiğinde bu elektronların bir kısmı ferrodoksinde O_2 'ye yönlendirilir ve böylece Mehler reaksiyonu adı verilen bir reaksiyonla $\text{O}_2^{\cdot-}$ üretilir. Diğer yandan, PSII' nin aşırı uyarılması sonucu triplet durumdaki klorofilden O_2 'ye enerji transferi $^1\text{O}_2$ üretimi gerçekleşir (Laloi et al., 2004). $^1\text{O}_2$ çok reaktif bir moleküldür ve karşılaştığı ilk biyomolekülle reaksiyona girer, bu nedenle hücre içinde difüzyon uzaklığı çok kısadır (100 nm~). Ayrıca, ışığa bağlı olarak PSII reaksiyon merkezinde aktivite kaybına neden olabilir (Wagner et al., 2004; Krieger-Liszkay et al., 2008). $^1\text{O}_2$ oluşumu ETS' yi rahatlatması nedeniyle Mehler reaksiyonu ile engellenebilir (Asada and Takahashi, 1987). Bu yolla ETS' den gelen elektronların $\text{O}_2^{\cdot-}$ üretilmesine ve bu $\text{O}_2^{\cdot-}$ 'nin detoksifiye edilerek tekrar suya dönüştürülmesine “su-su” döngüsü adı verilmiştir. Kloroplastlarda $\text{O}_2^{\cdot-}$ üretiminin gerçekleştiği bölge ise tillakoid membrana bağlı anten pigmentleridir. H_2O_2 diğer serbest radikallerle karşılaştırıldığında en istikrarlı ROS türüdür. Hücrede $^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\cdot-}$ ve $\text{HO}^{\cdot}$ nun yarı ömürleri 2-4 μs iken H_2O_2 'nin yarı ömrü dakikaya yakındır (Bhattacharjee, 2005; Pitzschke et al., 2006). Bahsedilen ROS' lar arasında sadece H_2O_2 üretildiği bölgeden başka bir bölgeye difüze olabilir. Hücrelerde H_2O_2 'nin aşırı birikimi oksidatif strese, nekroze ve hatta programlanmış hücre ölümüne neden olabilir (Quan et al., 2008). Bunlara ek olarak, H_2O_2 ayrıca proteinlerin tiyol gruplarını okside ederek enzim inaktivasyonuna neden olabilir (Gill et al., 2010).

1.3.1.2 Mitokondriler

Mitokondrilerde abiyotik stres altında kompleks I ve III' ten elektronların O_2 'ye aktarılması sonucunda $\text{O}_2^{\cdot-}$ üretilir. Üretilen $\text{O}_2^{\cdot-}$ SOD tarafından H_2O_2 'ye indirgenir. Üretilen bu H_2O_2 indirgenmiş Fe^{+2} ve Cu^{+2} ile reaksiyona girerek toksik bir molekül olan $\text{HO}^{\cdot}$ ortaya çıkmasına neden olur (Rhoads et al., 2006;

Sweetlove and Foyer, 2004). Mitokondriyal ETS' deki bu aşırı yüklenme enerji boşaltıcı sistemlerle önlenebilir. Buna örnek olarak mitokondrilerde sitokrom yoluna alternatif olarak bir elektron akışı sağlayan alternatif oksidazlar (AOX) verilebilir. Bu yolla elektronlar ubikinon havuzundan alınarak O_2 'ye transfer edilir ve H_2O oluşturulur, böylelikle ubikinon havuzunun redoks durumu düzenlenerek ROS oluşumu engellenebilir (Millar et al., 2011).

1.3.1.3 Peroksizomlar

Peroksizomlarda O_2^- normal metabolizma sonucu oluşmaktadır. Bu bölmede O_2^- oluşumu ksantin oksidaz aktivitesi sonucunda, ksantinin urik asite dönüşmesiyle gerçekleşir (Corpas et al., 2001). Bunun yanında peroksizomlarda H_2O_2 üretimi yağların β -oksidasyonu ya da fotorespirasyon sırasında glikolatın glioksilata dönüşümü sırasında gerçekleşebilir. Kloroplast ve mitokondriye benzer olarak peroksizomlar tarafından oluşturulan H_2O_2 ' nin de düşük miktarlarda sinyal görevi gördüğü düşünülmektedir (Master, 1996).

1.3.1.4 Diğer ROS kaynakları

ROS ayrıca apoplastik bölmede de oluşabilmektedir. Bu oluşum süreçleri özellikle ozon ya da patojen uygulamaları sırasında artmaktadır. Apoplastlardaki ROS kaynakları hücre duvarı peroksidazları, oksalat oksidazlar, amin oksidazlar ve glikolat oksidazdır (Kawano, 2003). Bunlara ek olarak, hücre zarındaki bir diğer ROS kaynağı NADPH oksidazlardır (Baxter et al., 2014). Özellikle RBOH (respiratory burst oxidase homologue) genleri tarafından kodlanan NADPH oksidaz genlerinin abiyotik ve biyotik stresler sırasında ROS sinyallerinin üretilmesinde ve iletilmesinde önemli roller oynadığı gösterilmiştir (Mittler et al., 2011).

1.3.2. Antioksidan savunma mekanizması

Bitkiler ROS' un olumsuz etkilerini savuşturmak için çeşitli antioksidan enzimler kullanmaktadır. Bu enzimler koordine bir şekilde çalışarak O_2^- ve H_2O_2 ' yi detoksifiye ederler. Yukarıda bahsedilen farklı ROS tiplerinden $HO\cdot$ ve 1O_2 enzimatik olarak detoksifiye edilemezler ve bu ROS' ların detoksifikasyonu tamamen enzimatik olmayan düşük molekül ağırlıklı antioksidanlarla gerçekleşir.

Tüm bitkilerde ROS üretim mekanizmaları ortak olsa da, bitki türüne bağlı olarak, antioksidan savunma mekanizmasının hücrede biriken ROS' u detoksifiye etmek için verdiği cevaplar farklılık göstermektedir. Bu bölümde bitkilerdeki antioksidan savunma mekanizmaları, tez çalışmasında kullanılan bitki *Arabidopsis thaliana* 'ya ağırlık verilerek anlatılacaktır.

1.3.2.1 Superoksit dismutaz

Antioksidan enzimler içinde SOD, $O_2^{\cdot-}$ yi detoksifiye edebilen tek enzim olması nedeniyle özel bir yere sahiptir. Görüldüğü üzere $O_2^{\cdot-}$ nin detoksifikasyonundaki ilk basamak SOD enzimi ile $O_2^{\cdot-}$ nin H_2O_2 ' ye dönüştürülmesidir. Bu nedenle SOD enzimi oksidatif strese karşı sıkça “ilk savunma hattı” olarak adlandırılmıştır. Hücrede ROS' un etkili şekilde ortadan kaldırılabilmesi için SOD ve diğer H_2O_2 detoksifiye edici enzimler arasında hassas bir dengenin korunması gerekmektedir. Eğer bir hücrede SOD aktivitesi H_2O_2 süpürücü enzimlerinkinden fazla ise H_2O_2 birikimi, daha az ise de $O_2^{\cdot-}$ birikimi gerçekleşerek hücrede oksidatif hasar oluşturabilir.

Fosfolipid zarların negatif yükü nedeniyle $O_2^{\cdot-}$ 'ye geçirgen olmadığı bilinmektedir (Takahashi and Asada, 1983). Bu nedenle bitki hücresinde bir bölmede üretilen $O_2^{\cdot-}$ nin aynı bölmede detoksifiye edilmesi gerekmektedir. Bunu gerçekleştirebilmek için bitkilerde birbirinden farklı bölmelerde görev alan farklı tipte SOD enzimleri bulunmaktadır. Bitkilerde metal kofaktörüne göre (Cu ve Zn, Fe ya da Mn) üç farklı SOD tipi bulunmaktadır ve bu izoformlar hücrede farklı bölmelerde bulunur. FeSOD' un bu izoformlar arasında Fe (II) bolluğu nedeniyle en eskiye dayanan izoform (FeSOD) olduğu düşünülmektedir (Bannister et al., 1991). Zamanla çevredeki O_2 derişiminin artmasına bağlı olarak mineraller okside olmaya başlamış ve kullanılabilir Fe (II) azalmış ve bu metal yerine SOD' un aktif bölgesinde Mn (III) kullanılmaya (MnSOD) başlamıştır. Benzer olarak atmosferdeki O_2 ' nin artması nedeniyle çözölemeyen formdaki Cu (I), çözölebilir formdaki Cu (II) ya dönüşmüş ve enzimin aktif bölgesinde Cu kullanılmaya (Cu/ZnSOD) başlanmıştır(Alscher et al., 2002).

FeSOD kloroplastlarda bulunurken, MnSOD ise mitokondrilerde bulunur. Cu/ZnSOD kloroplastlar ve sitosol ve peroksizomlar olmak üzere 3 farklı

bölmede gözlenebilir. *Arabidopsis*' te FeSOD' u kodlayan 3 gen (*FSD1*, *FSD2*, *FSD3*), Cu/ZnSOD' u kodlayan 3 gen (*CSD1*, *CSD2*, *CSD3*) ve MnSOD' u kodlayan 1 gen (*MSD1*) bulunmaktadır. CSD genleri içinde *CSD1* ve *CSD2* sitozolik ve kloroplastik izoformları, *CSD3* ise peroksizomal Cu/ZnSOD' u kodlar. Bu genler arasında *FSD1* ifadesinin diurnal ritme göre sirkadiyan ritim kontrolü altında olduğu, diğer genlerin ifadelerinin ise hücrenin oksidatif durumuna göre düzenlendiği gösterilmiştir (Kliebenstein et al., 1998).

1.3.2.2 Katalaz

Katalaz ilk olarak 1900 yılında Oscar Loew tarafından keşfedilmiş ve bulunan ilk antioksidan enzim olmuştur. Bu enzim Loew tarafından hidrojen peroksit üzerine katalitik aktivitesi nedeniyle katalaz olarak adlandırılmıştır (Loew, 1900). Katalaz iki molekül H_2O_2 'yi H_2O ve O_2 'ye dönüştürür. Bilinen tüm ökaryotik katalazlar hem grup içeren tetramer proteinlerdir (Regelsberger et al., 2002). Araştırmalar bu enzimin tüm angiospermelerde üç gen tarafından kodlandığını göstermektedir. Bu üç genin ürünlerinin hepsi 492 amino asitlik peptidler kodlamaktadır ve bu peptidler birbirlerine yüksek oranda benzerlik göstermektedir. *Arabidopsis*' te *CAT1* geni polen ve tohumlarda, *CAT2* geni fotosentetik dokularda, *CAT3* geni ise vasküler dokularda yoğun olarak ifade olmaktadır. Bu genlerden *CAT2* fotosentetik tip bir sirkadyan ritim izlerken, *CAT3* geni bunun tam tersi bir ritme sahiptir. *Arabidopsis*' te üç CAT geni ifade olsada, native-PAGE jellerinde farklı dokularda toplamda 7 adet CAT izoform tespit edilebilmektedir (Hu et al., 2010). Bu durum CAT proteinlerinin heterotetramerik doğasından kaynaklanmaktadır. Bu durumda, 3 CAT geninin tüm tetramerleri hesaplandığında 15 adet farklı izoform ortaya çıkabileceği görülmektedir (McClung, 1997). Ancak teorik olarak mümkün olan izoform sayısından daha az izoformun gözlenmesi tetramerlerin bazı alt birimleri arasında spesifik etkileşimler olabileceğini göstermektedir (McClung, 1997).

Bitkilerde CAT peroksizomlarda bulunmaktadır. Fotorespirasyon ve yağ asitlerinin β -oksidasyonu ile ortaya çıkan H_2O_2 ' nin detoksifiye edilmesinden sorumludur. *Arabidopsis*' de yaprak CAT aktivitesinin *cat2* ve *cat3* mutantlarında sırasıyla %80 ve %20 azaldığı, ancak *cat3* mutantında bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir. Buna ek olarak *cat2 cat1* ve *cat2 cat3* çift mutantlarının *cat2*

mutantına benzer CAT aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur (Bueso et al., 2007). 50-200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde yetiştirildiğinde *cat2* mutantlarının cüce fenotipe sahip olduğu ve bu fenotipin artan ışık şiddetiyle beraber daha şiddetli olarak gözlemlendiği gösterilmiştir. Artan ışığa bağlı oluşan bu fenotip bitkilerde H_2O_2 'nin yetersiz süpürülmesi ile ortaya çıkan redoks dengesindeki bozulmayı işaret etmektedir (Queval et al., 2007). *cat2* bitkilerinin aksine, *cat1* ve *cat3* bitkilerinde belirgin bir yaprak fenotipine rastlanmamıştır (Hu et al., 2010). Buna ek olarak, Hu et al. (2010) *cat* fenotipinin CAT2 promotörü kontrolü altında CAT2 ya da CAT3 proteininin ifade edilmesi ile iyileştirilebildiğini yani CAT2'nin fonksiyonunun transkriptomik seviyede düzenlendiğini göstermiştir.

1.3.2.3 Askorbat peroksidaz ve diğer askorbat-glutatyon döngüsü enzimleri

Askorbat peroksidazlar (APX) H_2O_2 'yi detoksifiye edebilmek için spesifik olarak askorbatı (Asc) elektron donörü olarak kullanan Class I bir peroksidazdır. Bu reaksiyon sırasında, iki Asc molekülü oksitlenerek iki adet monodehidroaskorbat (MDHA) oluşur ve H_2O_2 , H_2O ya çevrilir. Oluşan iki adet MDHA kendiliğinden bir Asc ve bir adet dehidroaskorbat (DHA)'a dönüşür. DHA, Asc'nin en okside halidir. MDHA ayrıca NADPH bağlı bir enzim olan MDHA redüktaz (MDHAR) aktivitesi ile direkt olarak Asc'ye dönüştürülebilir. Diğer yandan, okside DHA GSH'ı indirgeyici güç olarak kullanan DHA redüktaz (DHAR) enzimi tarafından tekrar Asc'ye dönüştürülür. Bu reaksiyonda okside olan GSH (GSSG) NADPH kullanılarak glutatyon redüktaz (GR) enzimi tarafından GSH'a geri dönüştürülür. Sonuç olarak, verimli çalışan bir Asc-GSH döngüsü tarafından desteklenen APX enzimi, gösterdiği aktivite ile hücrede toksik miktarda H_2O_2 'nin birikimini engellemektedir. Asc'nin geri dönüşümünü sağlayan bu mekanizma ayrıca sürüdülebilir APX aktivitesi için yüksek önem taşımaktadır. Ortamda Asc derişimi 20 μM 'ın altına düştüğünde APX aktivitesinin hızlı ve geri dönüşümsüz bir şekilde kaybedildiği gösterilmiştir. Bu inaktivasyon süreleri kloroplastik izoformlar için 30 sn iken sitoplazmik izoformlar için yaklaşık olarak 1 saat olarak belirlenmiştir (Leonardis et al., 2000).

Arabidopsis'de 9 adet farklı APX izoformu bulunmaktadır (Mittler et al., 2004). Bu izoformlardan üçü, lümen (APX4), stroma (sAPX) ve tilakoidler

(tAPX) olacak şekilde kloroplastın farklı bölmelerinde bulunmaktadır. Stromal APX aynı zamanda mitokondrilerde de görülebilmektedir (Chew et al., 2003). Bazı bitkilerde sAPX ve tAPX izoformları tek gen tarafından kodlanmakta ve farklı izoformlar alternatif splyaslama sonucu üretilmektedir. Ancak *Arabidopsis*'te bu iki izoform için iki ayrı gen mevcuttur (Shigeoka et al., 2002). Pek çok fotosentetik enzimin aktivitesinin tiyol gruplarının oksidasyonu ya da redüksyonu ile düzenlendiği bilinmektedir (Dietz and Pfannnschmidt, 2011), bu nedenle kloroplastlarda H_2O_2 miktarının kontrolü yüksek önem taşımaktadır ve APX enzimi bu düzenlenmenin sağlanmasında önemli rol oynamaktadır. Kloroplastik izoformlardaki çeşitliliğin aksine, *Arabidopsis*'de normal koşullarda sitoplazmada tek bir APX izoformu bulunmaktadır, ancak yüksek ışık altında ikinci bir izoform (APX2) uyarılmaktadır (Karpinski et al., 1999). Buna ek olarak peroksizomlarda da bir adet APX izoformu (APX3) bulunduğu rapor edilmiştir. APX' e benzer olarak, Asc-GSH döngüsü enzimleri birden fazla izoform halinde bulunmaktadır. *Arabidopsis*'de sitosol, kloroplast ve mitokondrilerde dağılmış şekilde 5 adet MDHAR, 5 adet DHAR ve 2 adet GR kodlayan gen mevcuttur. Stromal APX' e benzer olarak, *MDHAR1*, *DHAR1* ve *GRI*' in ürünleri hem kloroplast hem de mitokondrilere hedeflenmektedir.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Bitkilerin yetiştirilmesi

2.1.1. Tohumların temini

Araştırmamızda genom dizisi aydınlatılmış model bitki *Arabidopsis thaliana* yaban tipi (Col) kullanılmıştır. Tohumların ana stoğu NASC (European Arabidopsis Research Center)' dan sağlanmış olup, tohum elde etme çalışmaları laboratuvar koşulları altında gerçekleştirilmiştir.

2.1.2. Tohum sterilizasyonu

A. thaliana tohumları, %70 etanolde 1 dakika bekletildikten sonra steril distile suda 5 kez yıkanmıştır. Ardından 10 dakika %4 NaCl (sodyum hipoklorit) çözeltisinde tutulduktan sonra steril distile suda 5 kez yıkanarak sterilize edilecektir.

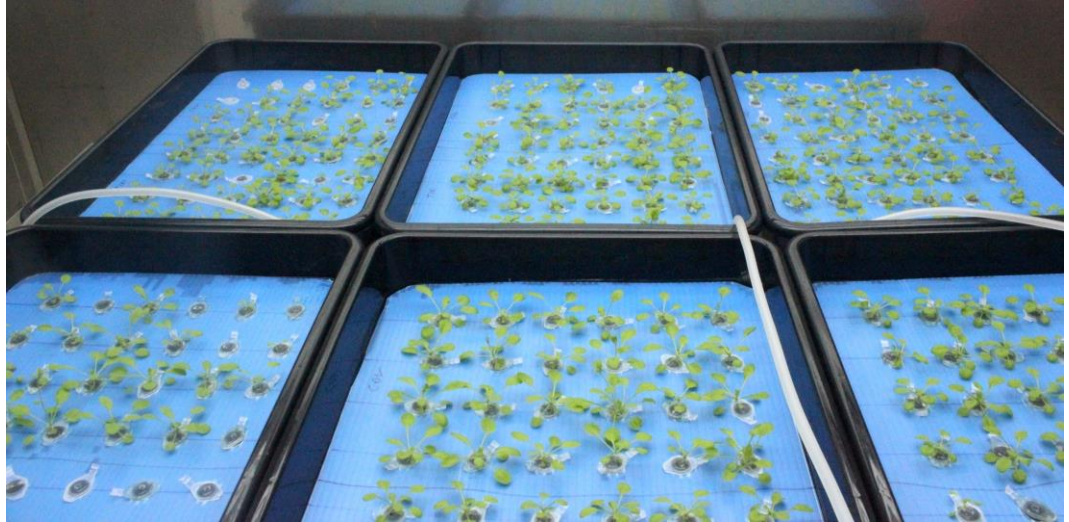
2.1.3. Büyüme koşulları ve stres uygulamaları

Bu çalışmada, *Arabidopsis thaliana* Col-0 ekotipi kullanılmıştır. Bitkiler iklimlendirme odasında kontrollü koşullarda (23 °C/21 °C gündüz ve gece sıcaklığı, %60 bağıl nem, 12 h/12 h ışık/karanlık, 200 µmol photons m⁻² s⁻¹ ışık şiddeti) ½ kuvvet Hoagland solusyonunda hidrofonik sistem kullanılarak büyütülmüştür. Denemeler için 21 gün yetiştirilmiş bitkilerin büyümesini tamamlamış yaprakları kullanılmıştır. ER stresini teşvik etmek için tunikamisin uygulaması (1 µg/ml), tuz stresi için 80 mM NaCl, hem tuz hem ER stresi için ise Tm+NaCl beraber uygulanmıştır. 48 saatlik uygulama sonunda bitkilerin kökleri ve yaprakları analizler için hasat edilmiştir. Çalışmalar için hasat edilen örnekler sıvı azotta dondurulmuş ve -80 °C' de analizlere kadar muhafaza edilmiştir.

NOX aktivitesinin ve H₂O₂ oluşumunun zamana bağlı olarak belirlenmesi için, bitkiler stres uygulamalarının ardından 10 dak., 30 dak., 60 dak., 6 saat ve 24 saat sonra hasat edilmiştir. NOX aktivitesinin inhibisyonu ile NOX bağımlı olmayan H₂O₂ miktarının ölçümü için bitkiler NOX inhibitörü olan 10 µM DPI

(di phenyl iodonium) içeren Hoagland solüsyonu içerisinde stres uygulamalarından önce 1 saat boyunca inkübe edilmişlerdir.

Organellere spesifik ROS oluşturmak için yapraklar bitkiden kesilmiş ve H_2O_2 (10 μ M, 100 μ M, 1 mM, 10 mM), rotenone (Rot; 1, 10, 25, 50 12 μ M), metil viyolojen (MV; 1, 10, 25, 50 μ M), DCMU (1, 10, 25, 50 μ M), 3-AT (1 mM) ve tunikamisin (0.5 μ g/ml) içeren solusyonlarda yüzdürülmüştür. Bu uygulama ilk olarak karanlıkta 2 saat, ardından ışık altında 2 saat olacak şekilde yapılmıştır. Kullanılan kimyasalların özellikleri Tablo 1’ de verilmiştir. ROS boyamaları taze yapraklarda yapılmıştır. Gen ifadesi çalışmaları için uygulama sonrasında yapraklar sıvı azotta dondurulmuş ve -80 °C’ de analizlere kadar muhafaza edilmiştir.



Şekil 2.1 Su kültüründe yetiştirilen *Arabidopsis* bitkileri

Uygulama	Konsantrasyon	Hücre Bölmesi	Fonksiyonu	ROS Birikimi
H ₂ O ₂	10µM-10 mM	-	-	-
Rotenone (Rot)	1 µM- 50 µM	Mitokondri	NAD(P)H dehidrogenazı inhibe eder.	O ₂ ^{•-}
Metil viyolojen (MV)	1 µM- 50 µM	kloroplast	PSI' den elektronları alır ve onları O ₂ ' e taşır	O ₂ ^{•-}
DCMU	1 µM- 50 µM	kloroplast	Fotosistem II' de plastokinonun bağlanma bölgesini bloklar	¹ O ₂
3-amino-triazol (3AT)	1 mM	peroksizom	Katalaz inhibitörü	H ₂ O ₂

Tablo 1 Organellerde ROS oluşturmak için kullanılan kimyasalların özellikleri

2.2. Fizyolojik parametreler

2.2.1. Kök fenotipi analizleri

Yüzey sterilizasyonu yapılmış olan *A. thaliana* tohumları ½ MS içeren ortamda çimlendirildikten sonra 80 mM NaCl, 0.1-0.25-1 µg/ml Tm ve kombinasyonlarını içeren ½ MS ortamlarına aktarılmışlardır. Bitkiler 6 gün boyunca dik olarak büyütülmüş ve sonrasında fotoğrafları taranmıştır. Fotoğraflardan EZ-Rhizo Software (Armengaud et al. 2009) ile ana kök uzunluğu ve yan kök yoğunluğu hesaplanmıştır. Her bir uygulama grubu için en az 6 adet bitki kullanılmıştır.

2.2.2. Bağlı su içeriği (RWC)

Stres uygulamasının ardından her bir gruptaki bitkilerden yaklaşık olarak eş boyutlarda yaprak örnekleri alınarak yaş ağırlıkları ölçülmüştür. Daha sonra yapraklar 6 saat boyunca düşük ışık altında 50 ml deiyonize su bulunan petrilere bekletilerek turgorlu hale geçmeleri sağlanmıştır. Bu süre sonunda yapraklar tartılmış ve turgorlu ağırlıkları belirlenmiştir. Tartılan yaprak örnekleri 70 °C'de 72 saat etüvde kurutulmuş ve kuru ağırlıkları belirlenmiştir. Her bir gruba ait

yaprak örneklerinin bağıl su içeriği aşağıdaki formüle göre % olarak hesaplanmıştır.

$$\text{Bağıl su içeriği (\%)} = [(Yas\ ağırlık - Kuru\ ağırlık) / (Turgorlu\ ağırlık - Kuru\ ağırlık)] \times 100$$

2.2.3. Yaprak ozmotik potansiyeli

Yaprak su potansiyeli ölçümünde Wescor Vapro 5520 ozmotik potansiyel ölçüm cihazı kullanılmıştır. Hasat sırasında, her gruptan 6 yaprak 2 ml'lik bir ependorfta cam baget yardımıyla ezilmiştir. Bunun ardından örnekler 5000 g'de 5 dk. santrifüj edilmiştir. Ependorfun dibinde biriken sıvının 10 µl'si yaprak ozmotik potansiyelinin ölçülmesi için kullanılmıştır. Ölçümler cihaz üreticisinin direktiflerine göre yapılmıştır.

2.2.4. Yaprak su kaybı

Stomatal iletkenliğin indikatörü olarak yaprak su kaybı kullanılmıştır. İlk olarak bitkilerden koparılan yaprakların ağırlıkları ölçülmüş ve ardından ölçümü yapılan yapraklar büyüme kabininde 10 dakika bekletilmiştir. Bekleme periyodundan sonra tekrar ağırlıkları ölçülmüştür. Bu işlem 3 kere tekrar edilmiştir. Yaprak su kaybı, ilk ağırlığın inkübasyon sonrasında ölçülen ağırlıklara oranı hesaplanarak belirlenmiştir. Her bir uygulama grubu için en az 6 adet bitki kullanılmıştır.

2.3. Biyokimyasal parametreler

2.3.1. Antioksidan enzim ekstraksiyonu ve aktivite analizleri

Protein ve enzim ekstraktlarının hazırlanması için 0,1 gr yaprak örneği ilk olarak sıvı azotta ezilerek toz haline getirilmiştir. Bunun ardından 0.5 ml ekstraksiyon tamponunda (50 mM Tris-HCl pH 7.8, 0,1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 0,2% (v/v) Triton-X100, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), and 2 mM dithiothreitol (DTT)) homojenize edilmiştir. Askorbat peroksidaz aktivitesi analizi için homojenizasyon tamponuna 5 mM askorbik asit eklenmiş ve DTT yerine %2 (w/v) PVPP kullanılmıştır. Homojenizasyonun ardından örnekler 14000 g'de 10 dk. santrifüj

edilmiştir. Bu aşamadan sonra elde edilen süpernatantlar protein miktarı ve enzim aktivitesi belirlenmesinde kullanılmıştır. Analizler sırasında örneklerin tekrar tekrar donup çözülmesini engellemek için elde edilen süpernatant ayrı ependorflara pay edilerek saklanmıştır.

2.3.1.1 Protein miktarının belirlenmesi

Protein miktarı Bradford (1976)'a göre belirlenmiştir. Ölçüm Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının asidik şartlarda proteine bağlandığında kırmızı ve/veya yeşil formundan maviye dönüşmesine dayanmaktadır. Bu mavi renk oluşumu 595 nm'de ölçülmüştür. Standart olarak bovine serum albumin (BSA) kullanılmıştır. Standart aralığı 0,02 – 0,2 mg/ml'dir. Bitki ekstraktlarının protein miktarları elde edilen bu standart ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır.

2.3.1.2 Katalaz (CAT) enzim aktivitesinin belirlenmesi

Katalaz (CAT (EC 1.11.1.6)) aktivitesi Bergmeyer (1970)'e göre H_2O_2 'nin süpürülmesinin 240 nm'de absorbansda yol açtığı azalmanın izlenmesi ile tespit edilmiştir. Reaksiyon karışımı 0.1 mM EDTA ve %3 H_2O_2 içeren 50 mM sodyum fosfat (pH 7,0) tamponudur. Enzimin, 1 mg total protein başına dakikada süpürdüğü $\mu\text{mol } H_2O_2$ miktarı, 1 U ($\mu\text{mol } H_2O_2 \text{ mg protein}^{-1} \text{ min}^{-1}$) olarak hesaplanmıştır.

2.3.1.3 Askorbat peroksidaz (APX) enzim aktivitesinin belirlenmesi

Askorbat peroksidaz (APX (EC 1.11.1.11)) aktivitesi Nakano and Asada (1981)'e göre belirlenmiştir. Ölçüm, askorbatın oksitlenmesine bağlı olarak 290 nm'deki absorbansın azalmasının izlenmesine dayanmaktadır. Reaksiyon karışımı 0,1 mM EDTA, 0,1 mM H_2O_2 ve 0,5 mM Askorbat içeren 50 mM potasyum fosfat tamponudur (pH 7,0). Oksitlenen askorbat miktarı, ekstinksiyon katsayısı $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ kullanılarak hesaplanmıştır. Enzimin, 1 mg total protein başına

dakikada oksitlediği askorbat miktarı, 1 U ($\mu\text{mol askorbat mg protein}^{-1} \text{ min}^{-1}$) olarak hesaplanmıştır.

2.3.1.4 Glutasyon redüktaz (GR) enzim aktivitesinin belirlenmesi

Glutasyon redüktaz (GR (EC 1.6.4.2)) aktivitesi Foyer and Halliwell (1976)'e göre ölçülmüştür. Yöntem GSSG'yi redüklemek için GR tarafından oksitlenen NADPH'ın izlenmesine dayanır. Reaksiyon karışımı 0,5 mM GSSG, 0,12 mM NADPH içeren 25 mM sodyum fosfat (pH 7.8) tamponudur. NADPH oksidasyonu 340 nm'de takip edilmiştir. Oksitlenen NADPH miktarı ekstinksiyon katsayısı $6.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ kullanılarak belirlenmiştir. Enzimin, 1 mg total protein başına dakikada oksitlediği NADPH miktarı, 1 U ($\mu\text{mol NADPH mg protein}^{-1} \text{ min}^{-1}$) olarak hesaplanmıştır.

2.3.1.5 NADPH oksidaz (NOX) aktivitesinin belirlenmesi

NADPH oksidaz aktivitesi Jiang and Zhang (2002)'ye göre belirlenmiştir. Reaksiyon karışımı 50 mM Tris-HCl tamponu (pH 7.5), 0.5 mM XTT, ve 100 μM NADPH içermektedir. 470 nm'de XTT'nin redüksiyonu izlenmiştir. Reaksiyon dışı oluşabilecek renk değişiminin belirlenmesi için 50 U SOD kullanılmıştır. O_2^- üretimini $2.16 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ekstinksiyon kat sayısı kullanılarak hesaplanmıştır.

2.3.2. Antioksidan enzimlerin izoenzim tayini

Örneklerden elde edilen protein ekstraktları denatürasyona sebep olmayan koşullarda (SDS içermeyen) poliakrilamid jel elektroforezinde (Native-PAGE) ayrılmış ve araştırılan enzimlere özel boya çözeltileriyle boyanmıştır. Örneklerin hazırlanmasında aktivite analizlerinde kullanılan ekstraksiyon prosedürü kullanılmıştır. Native-PAGE Laemmli (1970)'e göre SDS kullanılmadan yapılmıştır.

Jeller Vilbert Lourmat jel görüntüleme sisteminde görüntülenmiş ve Bio-Capt yazılımı kullanılarak bant yoğunlukları analiz edilmiştir.

2.3.2.1 Süperoksit dismutaz (SOD) izoenzim tayini

Örnekler %12.5'lik ayırma (separating) ve %4'lük sıkıştırma (stacking) jelinde elektroforetik ayırma maruz bırakılmıştır. Her kuyucuğa 50 µg protein yüklenmiştir. SOD boyaması, Beauchamp and Fridovich'e (1971) göre riboflavin ve nitrobluetetrazolium (NBT) boyası ile belirlenmiştir. Riboflavin ışıkla birlikte süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$) üretme özelliğine sahiptir, üretilen $O_2^{\cdot-}$ NBT'yi oksitleyerek mavi-mor renkte formazan oluşumuna sebep olur. Boyamanın prensibi jel üzerinde SOD lokalize olmuş bölgelerde NBT oksitlenmesinin inhibisyonu ile beyaz bantlar oluşmasının sağlanmasıdır. Jeller 60 dk karanlıkta boya solüsyonunda bekletildikten sonra ışık altında çalkalanarak bantların oluşması beklenmiştir.

SOD'un izoenzim tipleri Vitória et al. (2001)'a göre boya solüsyonuna inhibitörler eklenerek belirlenmiştir. Cu/ZnSOD inhibisyonu için 2 mM KCN, Cu/ZnSOD ve FeSOD inhibisyonu içinde 3 mM H_2O_2 kullanılmıştır. MnSOD aktivitesi her iki inhibitörden de etkilenmemektedir.

2.3.2.2 Katalaz (CAT) izoenzim tayini

CAT izozimleri Orendi et al. (2001)'e göre belirlenecektir. Proteinlerin ayırımı için %7.5'lik ayırma jeli kullanılmıştır. CAT bantlarının boyanması için jeller 5 dk. %0.01 H_2O_2 solusyonunda bekletilmiştir. Daha sonra %1 $FeCl_3$ ve %1 $K_3Fe(CN)_6$ den oluşan boya solusyonunda 2 dk bekletilmiştir. Bantların oluşmasının ardından jeller deiyonize suda yıkanmıştır.

2.3.2.3 Glutasyon redüktaz (GR) izoenzim tayini

GR izoenzimleri %7.5'lik ayırma jeli kullanılarak Hou et al. (2004)'a göre belirlenmiştir. Elektroforez tamamlandıktan sonra jeller, 4 mM GSSG, 1.5 mM NADPH Na_4 ve 2 mM DTNB (5,5-Dithiobis (2-nitro-benzoic acid) içeren 10 mM Tris-HCl pH 7.9 tamponunda 20 dk boyunca bekletilmiştir. Daha sonra jeller 1.2 mM MTT (Thiazolyl blue tetrazolium bromide), 1 mM DPIP (2,6-Dichloroindophenol) ve 1.6 mM PMS (N-Methylphenazonium methyl sulphate) içeren 50 mM Tris-HCl pH 7.9 tamponunda 5-10 dk bekletilerek GR izozimleri boyanmıştır.

2.3.3. Enzimatik olmayan antioksidanların ölçümü

GSH ve GSSG miktarları Queval ve Noctor (2007)'ye göre gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem için 0.1 g yaprak örneği 1 ml 2 N HCl ile homojenize edilmiştir. Homojenat 16000 g'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatanta (0.5 ml) nötralizasyon için 50 µl 0.2 M NaH₂PO₄ (pH 5.6) ve 0.4 ml 0.2 M NaOH eklenmiştir. Böylelikle pH 5-6 arasına ayarlanmıştır (pH sıvı içine daldırılan pH indikatör striplerle ölçülmüştür). Glutasyon içeriği 340 nm' de 2-vinilpiridinin derivatizasyonu kullanılarak belirlenmiştir.

2.3.4. Lipit peroksidasyonu

Yapraklardaki lipit peroksidasyonu Madhava Rao and Sresty (2000)'e göre malondialdehit (MDA) içeriği belirlenerek ölçülmüştür. Lipit peroksidasyonunun son ürünü olan MDA'nın miktarının belirlenmesi için thiobarbiturik asit (TBA) reaksiyonu kullanılmıştır. MDA konsantrasyonu 532 nm ve 600 nm'de ölçülen absorbans değerlerine göre hesaplanmıştır. 600 nm'de ölçülen absorbans spesifik olmayan turbiditedir ve 532 nm'de ölçülen absorbanstan çıkartılarak gerçek MDA miktarı belirlenir. MDA miktarı hesaplanırken ekstinksiyon katsayısı 155 mM⁻¹ cm⁻¹ kullanılmıştır.

2.3.5. H₂O₂ miktarı

H₂O₂ miktarı (Cheeseman, 2006)' ya göre eFOX bileşimi kullanılarak ölçülmüştür. Ekstraksiyon 25 mM H₂SO₄ içeren soğuk aseton ile gerçekleştirilmiştir. Sonrasında örnekler 5 dk. 3000g' de 4 °C' de santifüj edilmiştir. 950 µl eFOX çözeltisi (250 µM ferrous amonyum sülfat, 100 µM xilenol orange, 100 µM sorbitol, %1 etanol) ile 50 µl örnek karıştırılmış ve karışım 30 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Sonrasında absorbans 550-800 nm' lerde ölçülmüştür. H₂O₂ standart eğrisi kullanılarak miktar hesaplanmıştır.

2.3.6. Protein oksidasyonu

DPNH derivatizasyon metodu kullanılarak örneklerdeki protein karbonil grup seviyelerinin belirlenmesi esasına dayalı olarak Levine (1994)' e göre ölçülmüştür.

2.4. Gen ifadelerinin kantitatif real-time PCR (qRT-PCR) kullanılarak belirlenmesi

RNA 0.1 g taze örnek kullanılarak TRIzol (Invitrogen) kullanılarak üreticinin sağladığı protokole göre yapılmıştır. Total RNA DNaseI (Fermentas) ile muamele edilmiş ve genomik DNA kalıntıları ortadan kaldırılmıştır. Sonrasında reverse transkripsiyon, M-MuLV reverse transkriptaz (New England Biolabs) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen cDNA' lar qRT-PCR analizlerinde kullanılmıştır. Her reaksiyondaki RNA miktarı *A. thaliana Actin8* geni kullanılarak normalize edilmiştir. Kullanılan PCR programı: 95 °C 5 dk, 40 döngü- 94 °C 15s, 58 °C 15 s, 72 °C 30 s olarak oluşturulmuştur. Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Scientific) kullanılmıştır. Her bir deneme için 3 bağımsız deney grubu oluşturulmuştur. *A. thaliana* kontrol bitkileri referans noktası olarak relatid ifade seviyelerinin hesaplanmasında kullanılmıştır. Kullanılan primerler aşağıdaki tabloda belirtilmiştir (Tablo 2). Primer sentezi Sentromer DNA Teknolojileri (İstanbul, Türkiye) tarafından gerçekleştirilmiştir.

Gen numarası	Primer adı	Yön	Primer dizisi
AT1G72280	AtERO1	F R	TGGCGATGGCCTTTAGCGACT GGCCAGAATGGGCAGTCACACC
AT2G40950	AtBZIP17	F R	CAAGCTTGTGAAGATAGATGGGA TAGAGGCAGTGCAGGGGTAT
AT3G10800	AtBZIP28	F R	ATCCTAAGCCTGTCTCGAGTTGTA CGCCGACCATTAAAACCCTC
AT1G42990	AtBZIP60	F R	CGATGATGCTGTGGCTAAAA TCTCAAGCATTCTCTTTCGAGAT
AT2G17520	AtIRE1A	F R	GCGCTACAGGCGTTACAAATA TCGTCGAATCCTTCTGGAAC
AT5G24360	AtIRE1B	F R	AGTGGGGAAAAACCAGTTCC AACCAAGTCTCGGAAACAGTG
AT5G64510	AtTIN1	F R	AATATGCGCCTTTCTTACCAT GCACCATCTGCTAATATCACTTTC
AT5G28540	AtBiP1	F	TCAGTCCTGAGGAGATTAGTGCT

		R	TGCCTTTGAGCATCATTGAA
AT1G09080	AtBiP3	F	CGAAACGTCTGATTGGAAGAA
		R	GGCTTCCCATCTTTGTTCAC
AT5G61790	AtCNX	F	ATGAGACAACGGCAACTATT
		R	TTCCTGAGGACGGAGGTACT
AT1G65040	AtHRD1	F	TCTCTGTTGGGTTTATCTCTTTGGTT
		R	CGGACATGAGAGAGCAAAGTCA
AT1G18260	AtSEL1	F	TGATGGAAGAAGCAGTGGATGA
		R	CAGCTGCAAATTATGGTGAAG
AT4G29330	AtDER1	F	CGTAGAAGAGTGGTACAAGCAGATG
		R	ACCCGACGGTGGTGACTACA
AT3G17000	AtUBC32	F	CGAGGGCGGGATTTATCATGGG
		R	GTTGCCAATGCTCAGGGTGGTAG
AT5G47910	AtRBOHD	F	ATTACAAGCACCAAACCAG
		R	TTCTCCGACCATCTCACTA
AT1G64060	AtRBOHF	F	TCACAAATCAACGACGAGAGTT
		R	CCCATCTTCATTCTTGTTCCA
AT1G49240	AtAct8	F	TCAGCACTTTCCAGCAGATG
		R	ATGCCTGGACCTGCTTCAT

Tablo 2 Çalışmada kullanılan genler ve primerlerin tam listesi

2.5. $O_2^{\cdot -}$ - ve H_2O_2 ' nin NBT ve DAB ile histokimyasal boyanması

$O_2^{\cdot -}$ ve H_2O_2 ' nin in situ boyanması Dutilleul et al. (2003)' e göre yapılmıştır. $O_2^{\cdot -}$ nin belirlenmesi için uygulamaların ardından yapraklar 10 mM potasyum fosfat tamponunda (pH 7.8) hazırlanmış 0.5 mg/ml NBT ile vakum altında muamele edilmiştir. Örnekler 1 saat boyunca karanlıkta oda sıcaklığında inkübe edilmiş ve ardından klorofil kaybolana kadar %90 etanolde 70 °C' de bekletilmiştir.

H_2O_2 ' nin belirlenmesi için yapraklar 10 mM potasyum asetat tamponunda (pH 3.8) hazırlanmış 1mg/ml DAB ile vakum altında muamele edilmiştir. Örnekler 12 saat boyunca karanlıkta oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından örnekler 3:1:1 (v/v) etanol:asetik asit:gliserol karışıma aktarılmış ve klorofil kaybolana kadar 70 °C' de bekletilmiştir. NBT ve DAB ile boyanmış yapraklar %70 gliserol çözeltisinde incelenmiştir.

2.6. İstatistiksel Analizler

Denemeler iki kez tekrar edilmiştir ve her veri 3 teknik replikanın sonucudur ($n = 2 \times 3 = 6$). Sonuçlar ortalama olarak verilmiş ve standart sapmalar

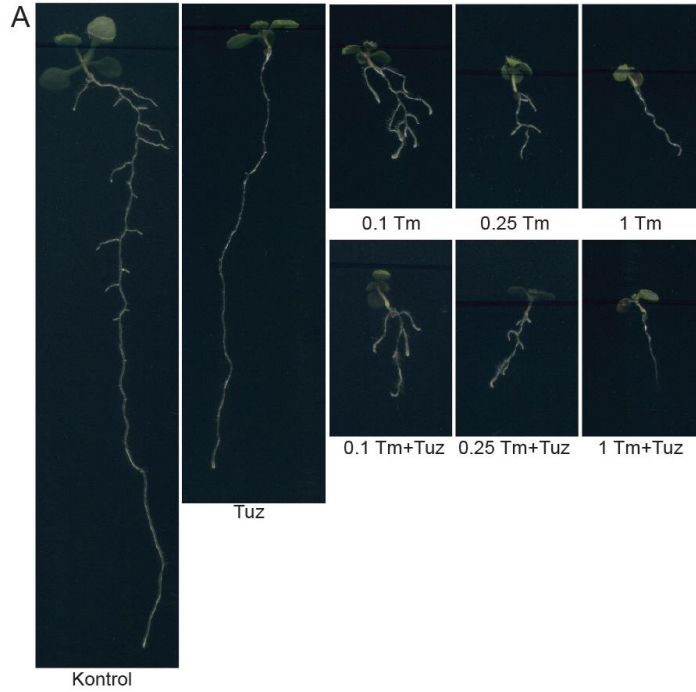
grafiklerde hata çubuklarıyla gösterilmiştir. Gruplar kendi aralarında “student’s t-test” kullanılarak GraphPad yazılımı ile karşılaştırılmıştır.

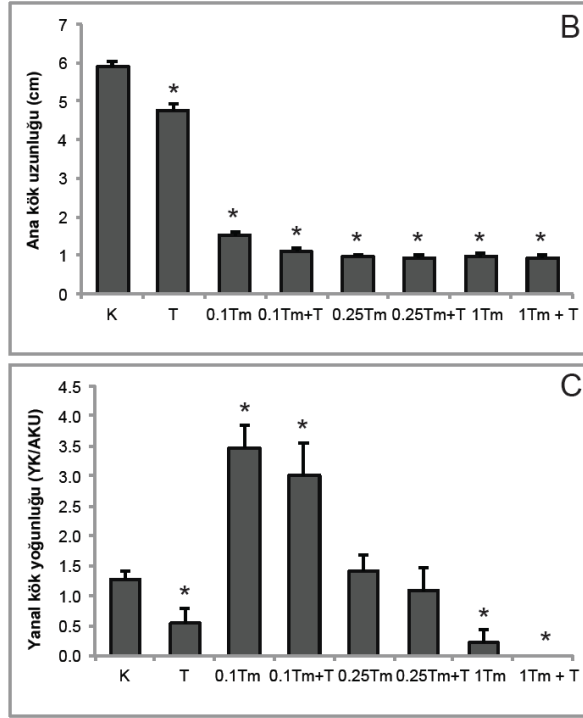
3. BULGULAR

3.1. Fizyolojik parametreler

3.1.1. Kök fenotipi

Tuz stresinin ER stresine beraber kök fenotiplerinin üzerine etkilerinin belirlenmesi amacıyla farklı Tm konsantrasyonlarında (0.1, 0.25, 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$) 80 mM NaCl' nin kök fenotip üzerine etkileri araştırılmıştır. Sadece tuz uygulanan bitkilerde ana kök uzunluğu %20 oranında azalırken, 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Tm uygulaması ile ana kök uzunluğunda %75 azalış belirlenmiştir. Tuz stresine yanıl kök yoğunluğu %59 oranında azalma göstermiştir. Fakat düşük konsantrasyonda Tm uygulamasının (0.1 $\mu\text{g ml}^{-1}$) yanıl kök yoğunluğunu kontrol bitkilerine göre 3.5 kat arttırdığı belirlenmiştir. Bunun aksine, yüksek konsantrasyondaki Tm uygulamaları ile yanıl kök oluşumu tamamen engellenmiştir (Şekil 3.1).

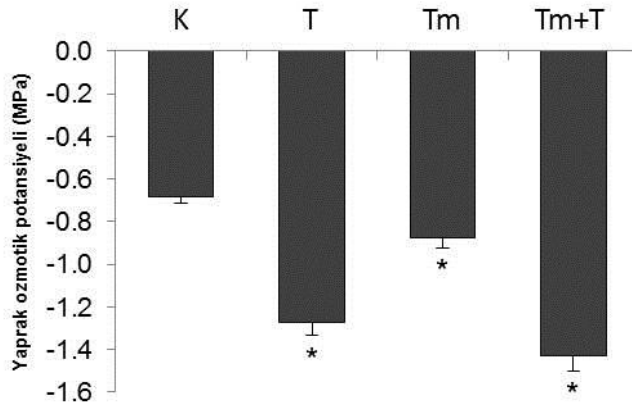




Şekil 3.1 Kontrol (K), 80 mM NaCl (T), tunikamisin (Tm) (0.1, 0.25, 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$) uygulanan grupların kök fenotipi verileri. A. Uygulama gruplarının resimleri, B. Ana kök uzunluğu, C. Yanal kök yoğunluğu.

3.1.2. Ozmotik potansiyel

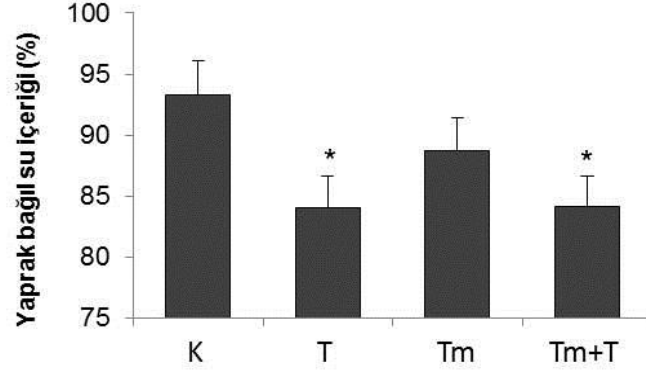
Yaprak ozmotik potansiyelindeki en yüksek düşüş tuz ve Tm uygulamalarının beraber yapıldığı Tm+T bitkilerinde gözlenmiştir. Sadece tuz uygulanan gruplarda %85 oranında azalış gözlenirken, sadece Tm uygulanan bitkilerin ozmotik potansiyelinde kontrole göre %28 düşüş gözlenmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 Yaprak su ozmotik potansiyeli, K:Kontrol, T: Tuzluluk, Tm: Tunikamisin, Tm+T: Tuzluluk+ Tunikamisin.

3.1.3. Bağlı su içeriği (RWC)

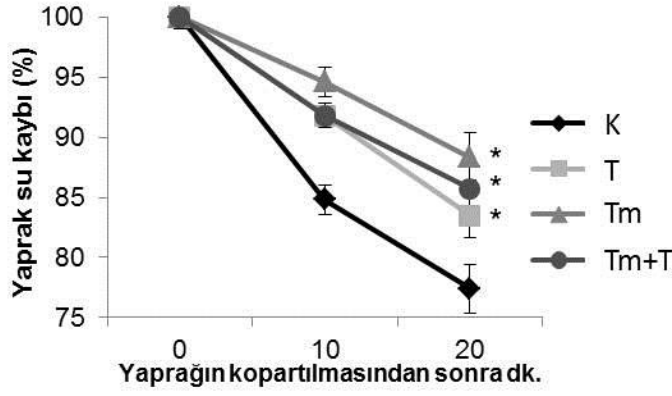
Bağlı su içeriği tuz uygulanan bitkilerde %9 oranında, sadece Tm uygulanan gruplarda ise %4 oranında azalmıştır. Tm+T grubunda da yaprak su içeriği kontrole göre %9 oranında düşmüştür (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 Yaprak Bağlı Su İçeriği, K:Kontrol, T: Tuzluluk, Tm: Tunikamisin, Tm+T: Tuzluluk+ Tunikamisin..

3.1.4. Stoma iletkenliği belirteci olarak yaprak su kaybı

Bitkiler su alınımlarını kısıtlayıcı koşullarda (ör: tuz ya da kuraklık stresi) hızlı su kaybını önlemek için stomalarını kapatırlar. Çalışmamızda stoma açıklığının bir indikatörü olarak koparılmış yapraklardan su kaybı hızı belirlenmiştir. Böylece ER stresinin stoma düzenlenmesi üzerine bir etkisi olup olmadığı araştırılmıştır. Kontrol bitkilerinin su kaybı stomaları açık olduğu için en fazlayken, stres uygulamaları sonucu su kaybı stomalar kapalı olduğu için azalmıştır (Şekil 3.4). Bu sonuçlar ER stresi uygulamasının da tuz stresi gibi stoma iletkenliğini azalttığını göstermektedir.

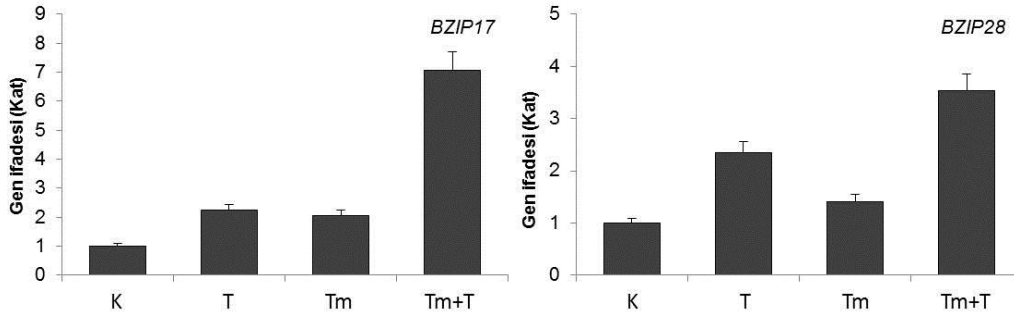


Şekil 3.4 Yaprak Su Kaybı, K:Kontrol, T: Tuzluluk, Tm: Tunikamisin, Tm+T: Tuzluluk+ Tunikamisin.

3.2. ER stresi ile ilişkili genlerin ifadesi

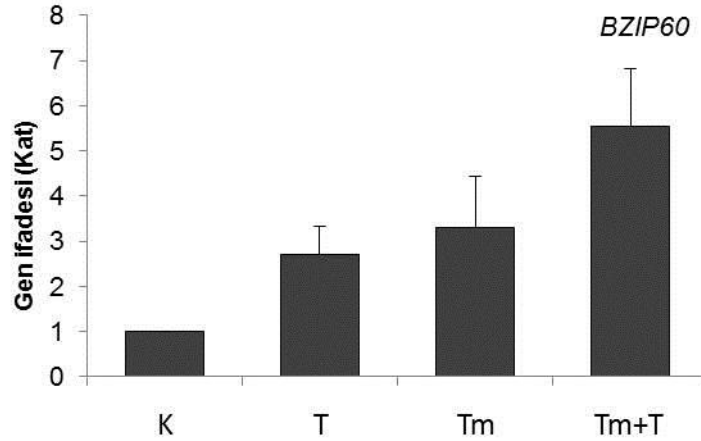
Tez kapsamında Col. ekotipinde *bZIP17*, *bZIP28*, *TIN1*, *BiP1*, *BiP3*, ve *ERO1* genlerinin ifadeleri Real-Time PCR ile belirlenmiştir

bZIP17 ve *bZIP28* ER stresi ile aktive olan transkripsiyon faktörlerinin kodlanmasından sorumludur. Bu çalışmada her iki genin ifadesinin de tuz uygulaması ile arttığı ve Tm+T gruplarında bu artışın daha da yüksek olduğu belirlenmiştir. (Şekil 3.5).



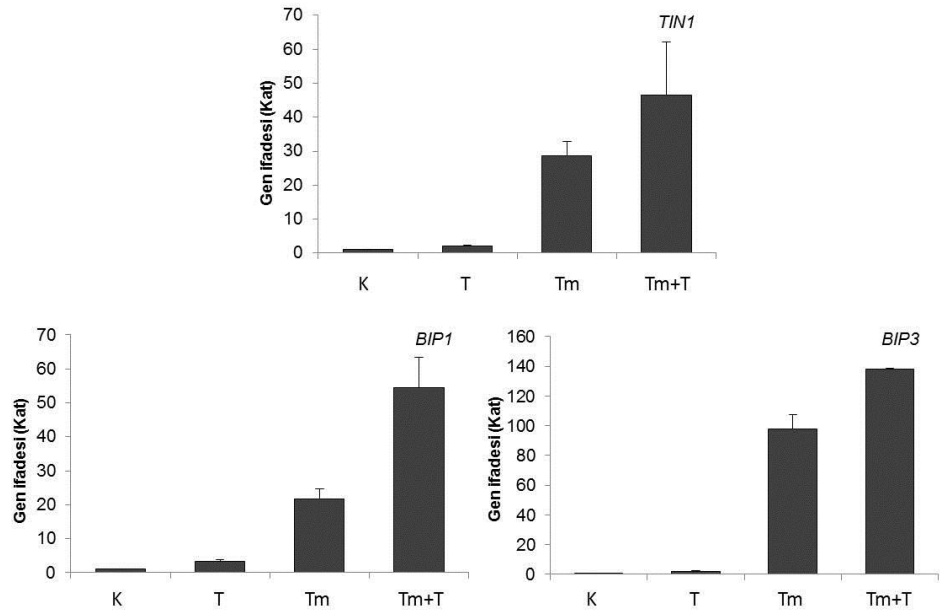
Şekil 3.5 ER stresi ile ilişkili *bZIP17* ve *bZIP28* genlerinin ifadeleri (K Kontrol, T: Tuzluluk, Tm: Tunikamisin, Tm+T: Tunikamisin+Tuzluluk).

bZIP60, ER stresi ile ilişkili genlerin transkripsiyonunu aktive etmektedir. Çalışmada her üç koşulda da *bZIP60* geninin ifadesinin arttığı gözlenmiştir. En yüksek artış kontrole göre 5.5 kat ile Tm+T grubunda gözlenmiştir (Şekil 3.6).



Şekil 3.6 ER stresi ile ilişkili *bZIP60* geninin ifadesi (K:Kontrol, T: Tuzluluk, Tm: Tunikamisin, Tm+T: Tuzluluk+ Tunikamisin.).

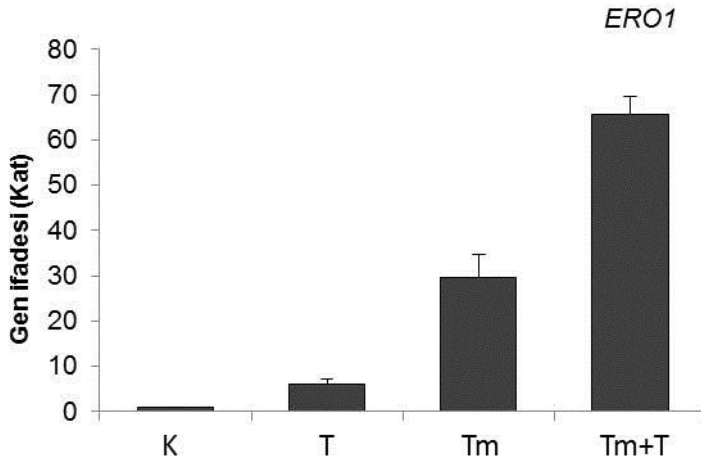
ER stresi indikatörleri olan *TIN1*, *BiP1* ve *BiP3* genlerinin ifadeleri tuz stresine duyarsızken, Tm uygulaması ile artmıştır. Her 3 geninde ifadesi de tuz ve Tm' nin beraber uygulandığı gruplarda sadece Tm uygulamasına göre artış göstermiştir (Şekil 3.7).



Şekil 3.7 ER stresi ile ilişkili *TIN1*, *BIP1* ve *BIP3* genlerinin ifadesi (K Kontrol, T: Tuzluluk, Tm: Tunikamisin, Tm+T: Tunikamisin+Tuzluluk).

ERO1, ER zarında lokalize olan disülfid bağ oluşumunu katalizleyen ve bunun sonucu olarak oluşturduğu her bir disülfid bağının karşılığı olarak 1 molekül H_2O_2 üreten bir enzimdir. *ERO1* geninin ifadesi sadece Tm uygulaması

ile 30 kat artarken, tuz uygulamasıyla beraber Tm uygulaması bu genin ifadesini kontrole göre 65 kat arttırmıştır (Şekil 3.8).

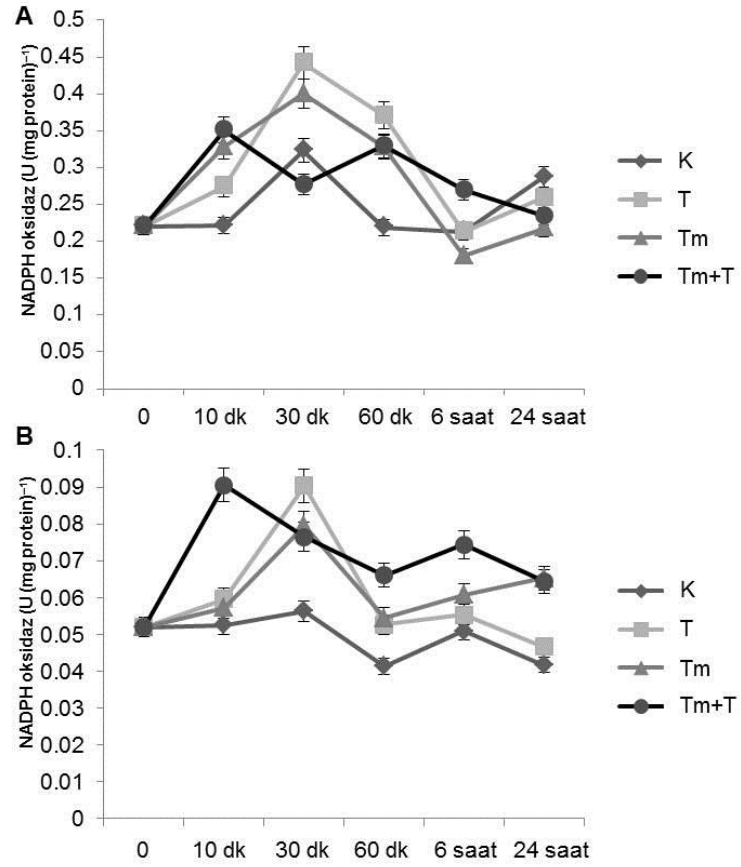


Şekil 3.8 ER stresi ile ilişkili *ERO1* geninin ifadesi (K Kontrol, T: Tuzluluk, Tm: Tunikamisin, Tm+T: Tunikamisin+Tuzluluk).

3.3. ER stresi – ROS sinyali ilişkisi (NADPH oksidaz ve H_2O_2)

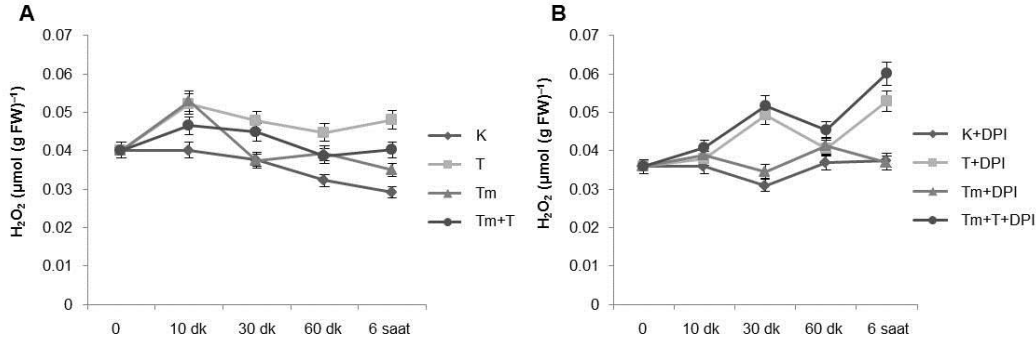
Tuz ve ER stresi uygulanan bitkilerden zamana bağlı olarak (10, 30, 60 dakika, 6 ve 24 saat) 5 ayrı hasat yapılmıştır. Hasat edilen bu örneklerde H_2O_2 miktarı, NADPH oksidaz (NOX) enzim aktivitesi ve ROS sinyallemede görev alan NADPH-oksidad (NOX) genleri *RBOHD* ve *RBOHF*' nin gen ifadeleri belirlenmiştir

Hem köklerde hem de yapraklarda tuz ve Tm uygulamaları NOX aktivitesinde 30. dakikada artışa neden olmuştur. Bu iki stresin beraber uygulandığı Tm+T grubu bitkilerinde ise NOX aktivitesindeki artış 10.dakikada gözlenmiştir. İki stresin beraber verildiği koşulda NOX kaynaklı ROS birikimi 20 dakika erken başlamaktadır (Şekil 3.9).



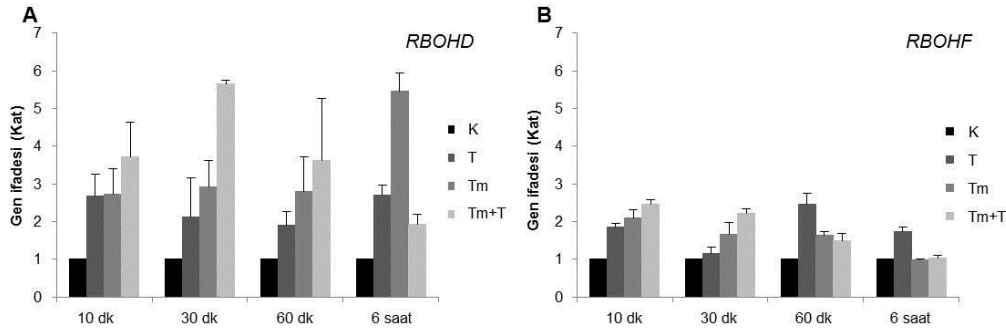
Şekil 3.9 Zamana bağlı (10,30,60 dakika ve 6,24 saat) NADPH oksidaz (NOX) enzim aktivitesindeki değişim. A. Yaprak, B. Kök. (K:Kontrol, T: Tuzluluk, Tm: Tunikamisin, Tm+T: Tuzluluk+ Tunikamisin.)

NOX kaynaklı H_2O_2 oluşumu ($O_2^{\cdot-}$ in detoksifikasyonu sonucu) miktarını belirlemek için *Arabidopsis* köklerine diphenyl iodonium (DPI) uygulanarak NOX inhibe edilmiş ve H_2O_2 miktarı 10,30,60 dakika ve 6.saat hasatlarında belirlenmiştir. Bu deneme sonucunda ilk 10 dakika boyunca köklerde H_2O_2 birikimi gözlenmiş ve bu birikim DPI uygulanan gruplarda belirlenmemiştir. Böylece ER stresi altında H_2O_2 birikiminin NOX/ RBOH ilişkili olduğu kanıtlanmıştır (Şekil 3.10)



Şekil 3.10 Zamana bağlı (10,30,60 dakika ve 6 saat) H_2O_2 miktarındaki değişim A. inhibitör uygulanmamış ortam, B. NOX inhibitörü DPI uygulanmış ortam (K:Kontrol, T: Tuzluluk, Tm: Tunikamisin, Tm+T: Tuzluluk+ Tunikamisin.).

RBOHD ve *RBOHF* genlerinin ifadeleri tüm uygulama gruplarında artmıştır. En yüksek *RBOHD* ifadesi Tm+T grubunda 30. dakikada ve sadece T grubunda 6. Saatte belirlenmiştir. *RBOHD*'nin ifadesi, *RBOHF*'ye göre, bir ER stresi ajanı olan Tm uygulamasına daha fazla yanıt vermektedir (Şekil 3.11).



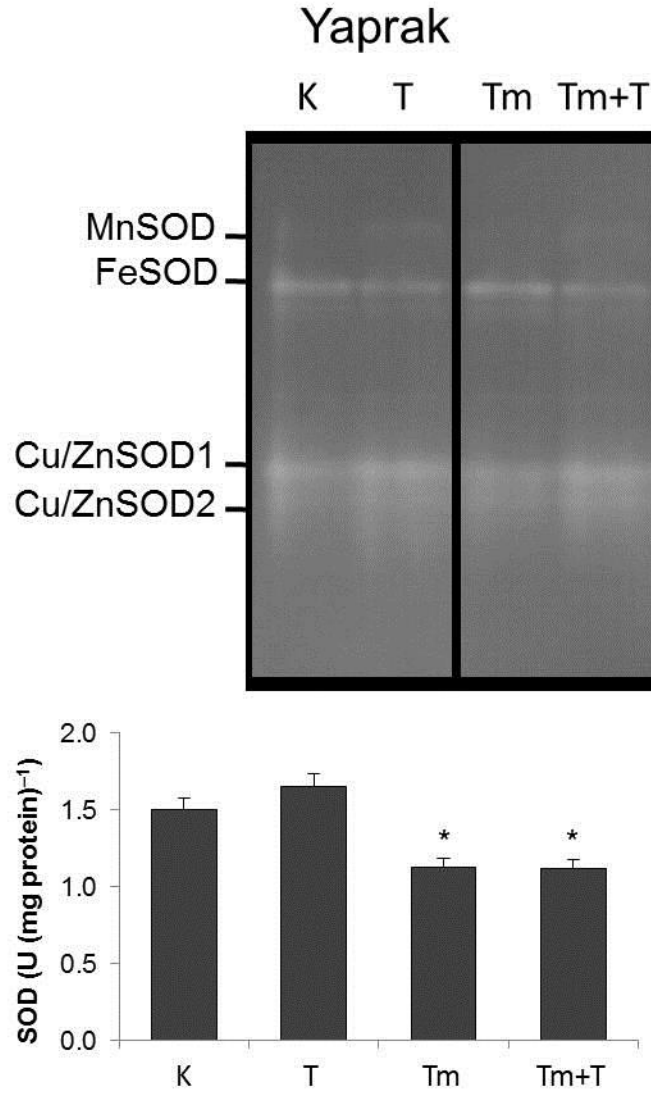
Şekil 3.11 Zamana bağlı (10,30,60 dakika ve 6 saat) *RBOHD* (A) ve *RBOHF* (B) genlerinin ifadelerindeki değişim (K:Kontrol, T: Tuzluluk, Tm: Tunikamisin, Tm+T: Tuzluluk+ Tunikamisin).

3.4. Antioksidan savunma sistemi

3.4.1. Superoksit dismutaz (SOD)

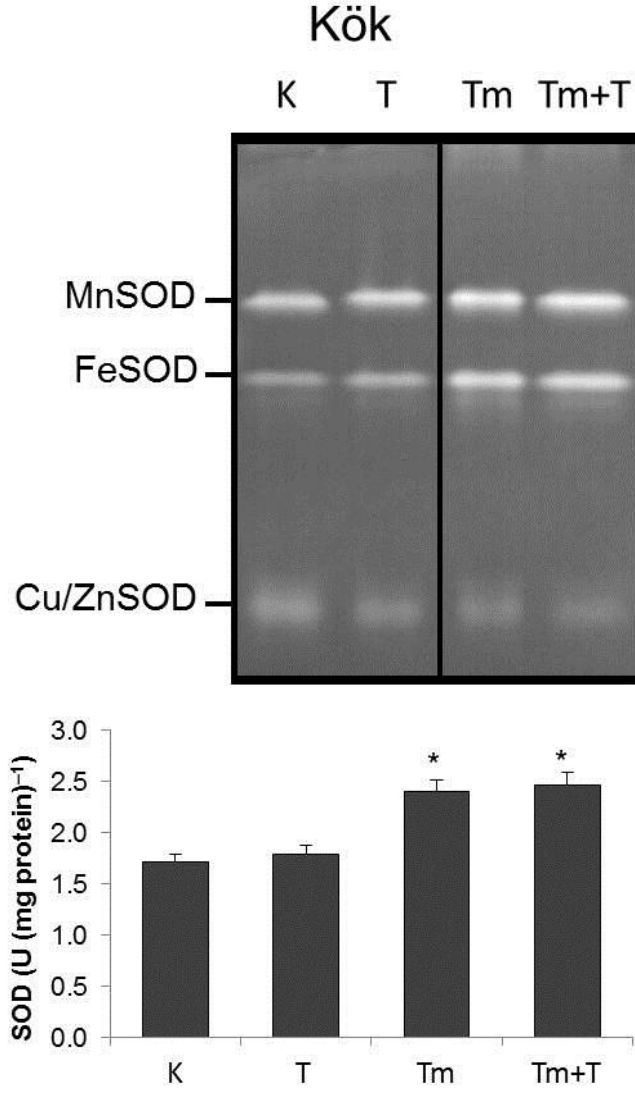
Tuzluluk SOD aktivitesinin yapraklarda %10 oranında arttırmış, Tm uygulaması ise %25 oranında azaltmıştır. Tuz ve Tm uygulanan gruplarda ise SOD aktivitesi %26 oranında azalmıştır.

Yapraklarda toplam dört SOD izoenzimi belirlenmiştir (MnSOD, FeSOD, 2 adet Cu/Zn SOD). FeSOD izoenzimi en çok Tm+T gruplarında azalmıştır (Şekil 3.12).



Şekil 3.12 Yapraklarda süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi ve izoenzim deseni (K:Kontrol, T: Tuzluluk, Tm: Tunikamisin, Tm+T: Tuzluluk+ Tunikamisin).

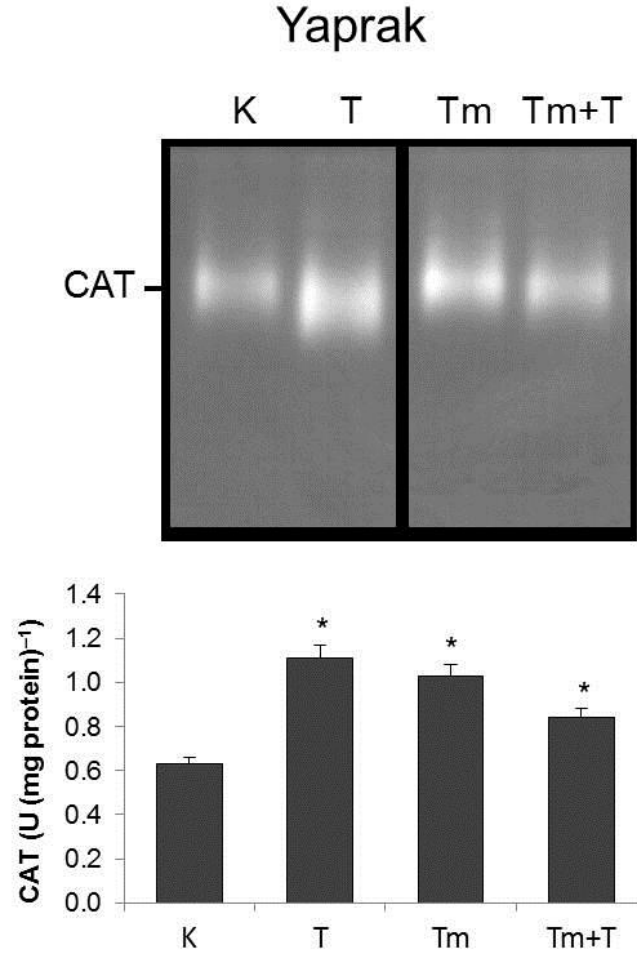
Tuz stresi köklerde SOD aktivitesini değiştirmezen, Tm uygulaması %40 oranında, tuz ve Tm birlikte uygulandığında ise %43 oranında arttırmıştır. Diğer yandan köklerde 3 ayrı SOD izoenzimi belirlenmiştir (MnSOD, FeSOD, Cu/ZnSOD). Tm uygulaması ve köklerde MnSOD ve FeSOD aktivitelerini artmıştır (Şekil 3.13).



Şekil 3.13 Köklerde süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi ve izoenzim deseni (K:Kontrol, T: Tuzluluk, Tm: Tunikamisin, Tm+T: Tuzluluk+ Tunikamisin).

3.4.2. Katalaz (CAT)

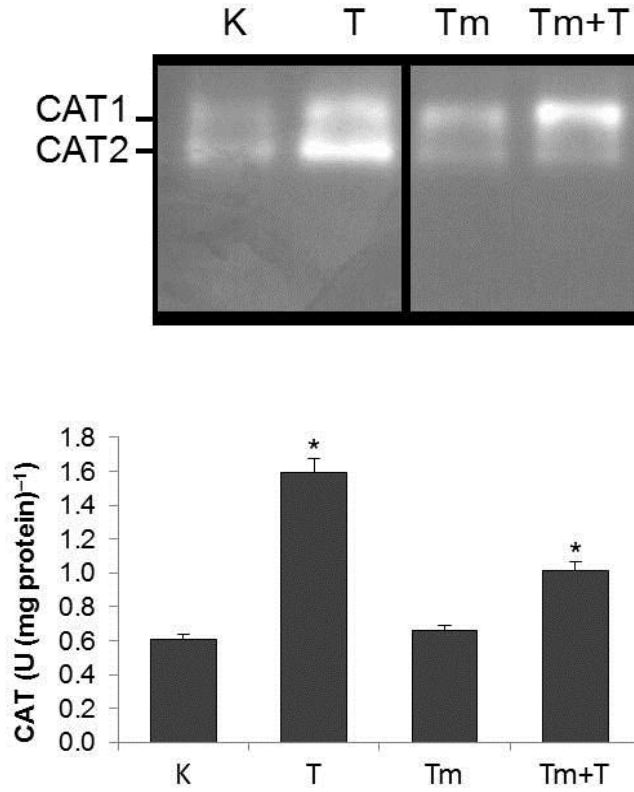
Yapraklarda tüm uygulamalar CAT aktivitesinde artışa neden olmuştur. Tuz uygulaması CAT aktivitesini %76 oranında, Tm uygulaması %63 oranında arttırmıştır. Tm+T uygulaması ise CAT aktivitesinde %32 oranında artışa neden olmuştur. Yapraklarda tek bir CAT izoenzimi gözlenirken, köklerde 2 adet (CAT1 ve CAT2) CAT izoenzimi belirlenmiştir (Şekil 3.14).



Şekil 3.14 Yapraklarda Katalaz (CAT) aktivitesi ve izoenzim deseni. (K:Kontrol, T: Tuzluluk, Tm: Tunikamisin, Tm+T: Tuzluluk+ Tunikamisin).

Köklerde ise Tm, CAT aktivitesinde değişikliğe neden olmazken, tuz stresi 1.6 kat artışa neden olmuştur. İki stresin birlikte uygulandığı gruplarda ise CAT aktivitesi %68 artmıştır. Köklerde en yüksek CAT aktivitesi artan CAT2 aktivitesine bağlı olarak tuz stresi uygulanan gruplarda gözlenmiştir. Tm uygulaması köklerde CAT2 aktivitesini azaltırken, CAT1 aktivitesinde bir değişikliğe neden olmamıştır (Şekil 3.15).

Kök



Şekil 3.15 Köklerde katalaz (CAT) aktivitesi ve izoenzim deseni. (K:Kontrol, T: Tuzluluk, Tm: Tunikamisin, Tm+T: Tuzluluk+ Tunikamisin).

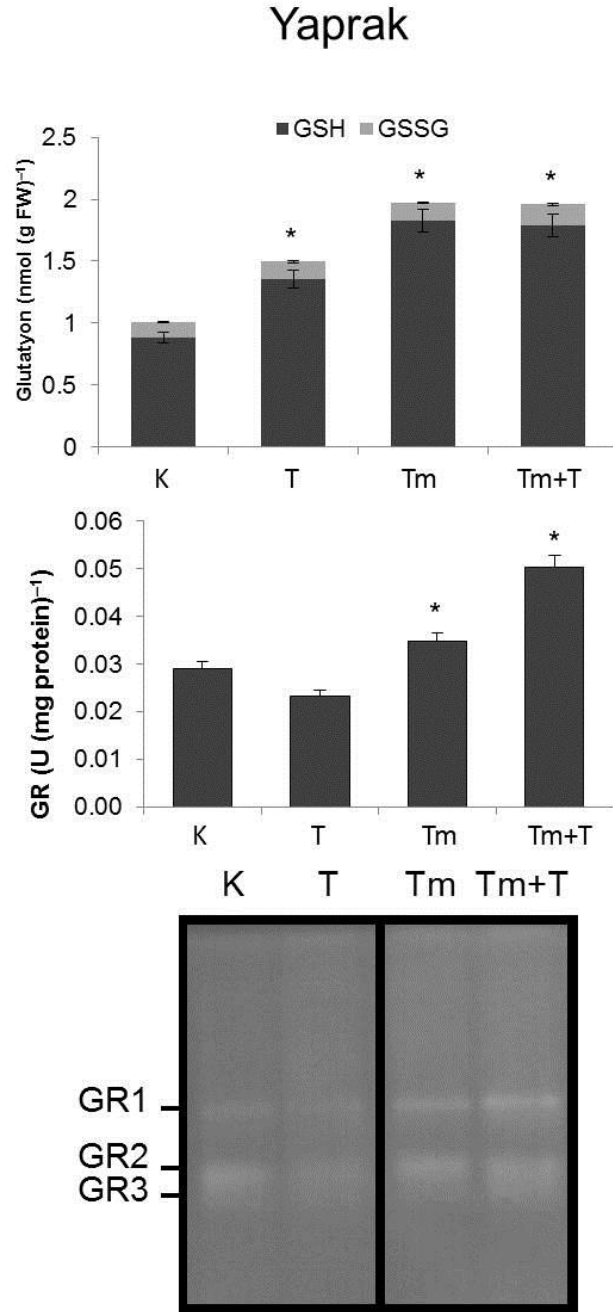
3.4.3. Glutasyon redüktaz (GR)

GR aktivitesi tuz uygulanan bitkilerin yapraklarında azalırken, Tm uygulamasıyla %17 artmıştır. Tuz ve Tm uygulanan bitkilerde ise GR enzim aktivitesi %72 artmıştır (Şekil 3.16).

Köklerde, GR aktivitesi tuz ve Tm uygulamalarıyla %51 artmıştır. Tuz ve Tm uygulanan Tm+T grubunda ise GR aktivitesi %41 oranında artmıştır.

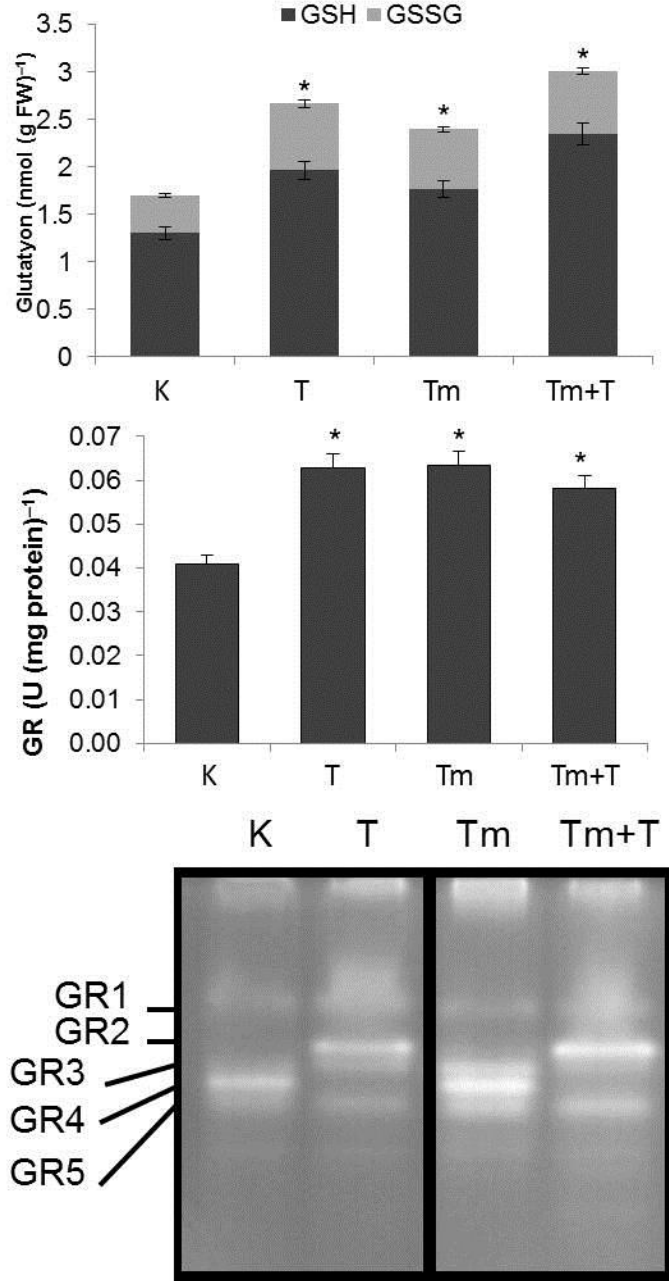
Yapraklarda 3 ayrı GR izoenzimi, köklerde ise 5 ayrı GR izoenzimi belirlenmiştir. GR2 aktivitesi sadece tuz uygulanan gruplarda gözlenmiş ve GR4 aktivitesi ise baskılanmıştır. ER stresi GR4' ün aktivitesini kontrolün 2 katına çıkarmıştır.

Stres altında yapraklarda toplam GSH havuzunda bir artış gözlenmiştir. Sadece tuz uygulanan grupların GSH içeriği kontrole göre %50 oranında artarken Tm ve Tm+T gruplarının GSH içeriği kontrole göre 2 katına çıkmıştır. Köklerde ise sadece tuz uygulaması %60 artışa neden olurken, Tm uygulaması %47, Tm+T uygulaması ise %76'lık bir artışa neden olmuştur (Şekil 3.17).



Şekil 3.16 Yapraklarda Glutatyon (GSH) miktarı, Glutatyon redüktaz (GR) aktivitesi ve izoenzim deseni (K: Kontrol, T: Tuzluluk, Tm: Tunikamisin, Tm+T: Tuzluluk+ Tunikamisin).

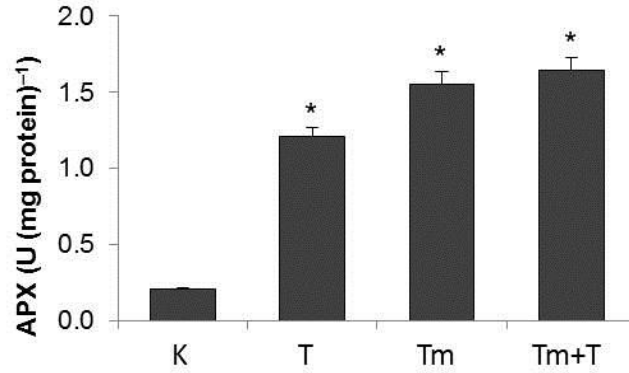
Kök



Şekil 3.17 Köklerde glutatyon (GSH) miktarı ve glutatyon redüktaz (GR) aktivitesi ve izoenzim deseni (K:Kontrol, T: Tuzluluk, Tm: Tunikamisin, Tm+T: Tuzluluk+ Tunikamisin).

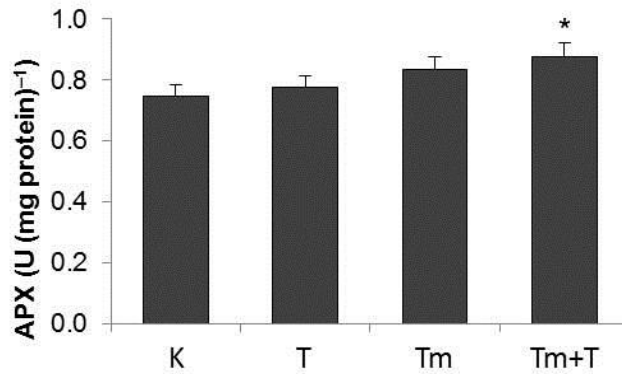
3.4.4. Askorbat peroksidaz (APX)

APX aktivitesi yapraklarda her üç grupta da artış göstermiştir. Bu artış tuz stresi uygulanan bitkilerde 6 kat, Tm uygulananlarda ise 7.8 kat olarak belirlenmiştir. Her iki stresin beraber uygulandığı Tm+T grubunda ise APX aktivitesi 8.2 kat artış göstermiştir (Şekil 3.18).



Şekil 3.18 Yapraklarda askorbat peroksidaz (APX) aktivitesi (K:Kontrol, T: Tuzluluk, Tm: Tunikamisin, Tm+T: Tuzluluk+ Tunikamisin)

Köklerde de APX aktivitesi stres sonucu artmıştır (Şekil 3.19) .

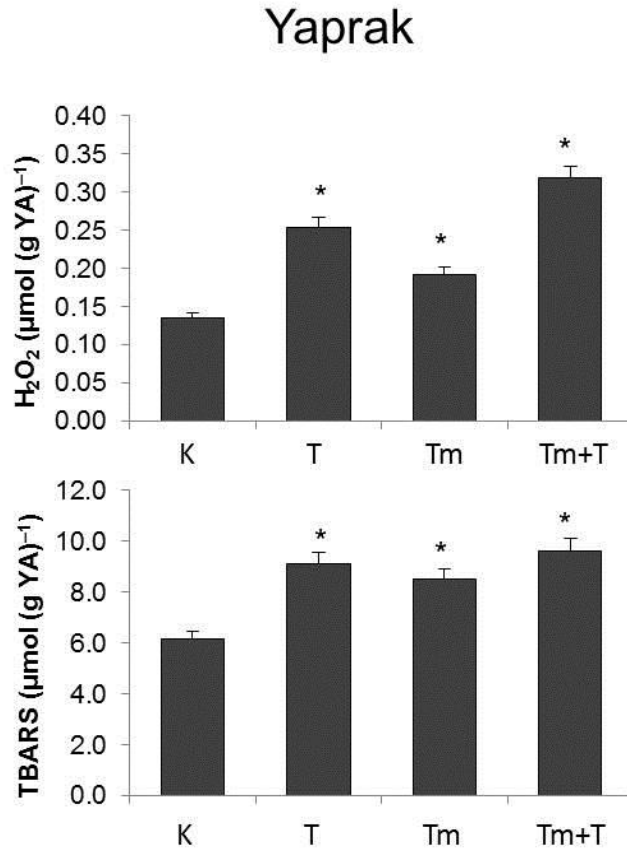


Şekil 3.19 Köklerde askorbat peroksidaz (APX) aktivitesi (K:Kontrol, T: Tuzluluk, Tm: Tunikamisin, Tm+T: Tuzluluk+ Tunikamisin)

3.5. Oksidatif hasar

3.5.1. Lipid peroksidasyonu (TBARS) ve H_2O_2 miktarı

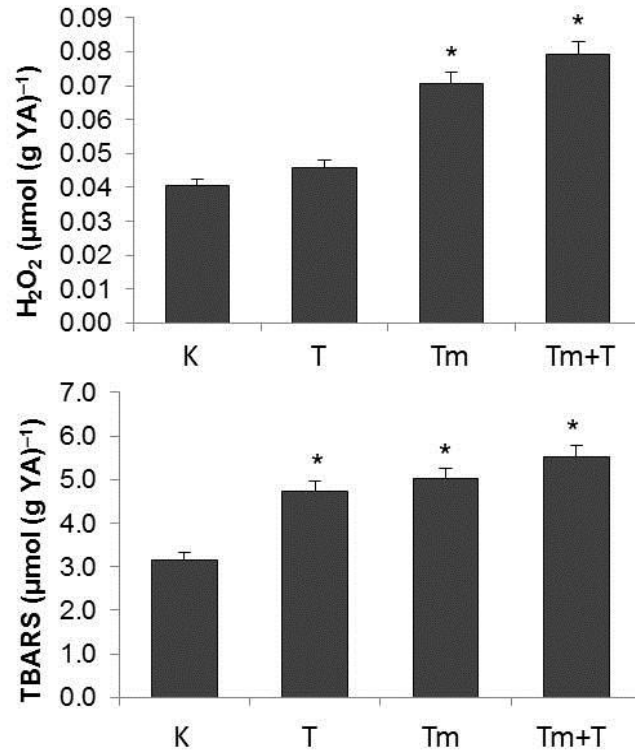
Yapraklarda tuz uygulaması H_2O_2 miktarını kontrole göre %92 oranında arttırırken, Tm uygulanan bitkilerde H_2O_2 miktarı %46 artmıştır. Ayrıca, Tm+T grubunda H_2O_2 miktarı 2.6 kat yükselmiştir. Yapraklarda, tuz uygulamasıyla TBARS içeriği %48 oranında artmıştır. Benzer şekilde, sadece Tm uygulaması %38 oranında artışa neden olmuştur. Tuz ve Tm uygulamaları ise kontrole göre lipid peroksidasyonunu %56 oranında arttırmıştır (Şekil 3.20).



Şekil 3.20 Yapraklarda H_2O_2 miktarı ve lipid peroksidasyonu (TBARS) miktarı (K:Kontrol, T: Tuzluluk, Tm: Tunikamisin, Tm+T: Tuzluluk+ Tunikamisin)

Köklerde de H_2O_2 miktarında strese bağlı artış gözlenmiştir. H_2O_2 miktarı Tm uygulaması ile %80 artmış, Tm+T uygulaması ile ise kontrolün 2 katına çıkmıştır. Köklerde TBARS içeriği tuzla beraber %49, Tm uygulamasıyla %58, Tm+T uygulaması ile ise %74 oranında artış göstermiştir (Şekil 3.21).

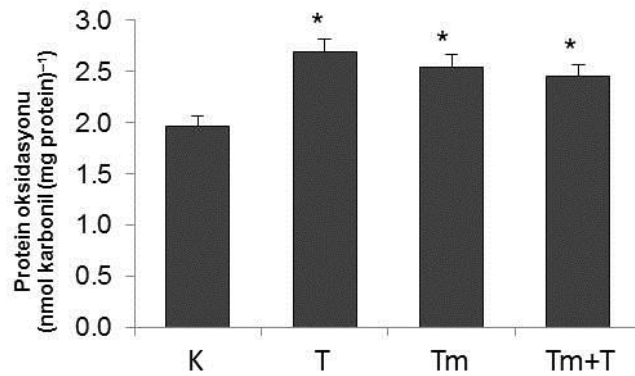
Kök



Şekil 3.21 Köklerde H_2O_2 miktarı ve lipid peroksidasyonu (TBARS miktarı) (K:Kontrol, T: Tuzluluk, Tm: Tunikamisin, Tm+T: Tuzluluk+ Tunikamisin)

3.5.2. Protein oksidasyonu

Yapraklarda tuz uygulaması ile protein oksidasyonunda %36 oranında artış gözlenmiştir. Sadece Tm uygulanan bitkilerde ise protein oksidasyonu kontrole göre %29 oranında artmıştır. Tm+T uygulama grubunda protein oksidasyonu ise %25 artmıştır (Şekil 3.22).

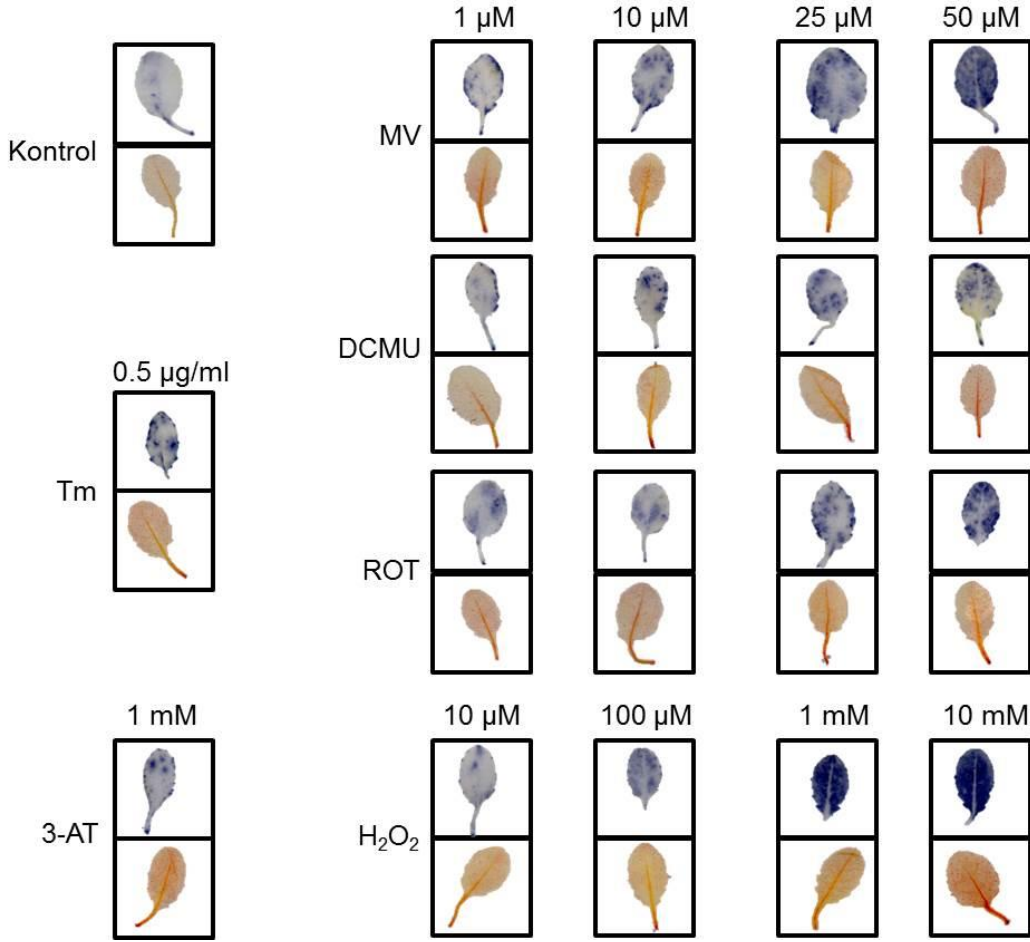


Şekil 3.22 Protein oksidasyonu (K: Kontrol, T: Tuzluluk, Tm: Tunikamisin, Tm+T:Tuzluluk+ Tunikamisin).

3.6. Organaller ROS oluşumunun ER stresi üzerine etkileri

3.6.1. Yaprakta ROS oluşumunun histokimyasal olarak gösterimi

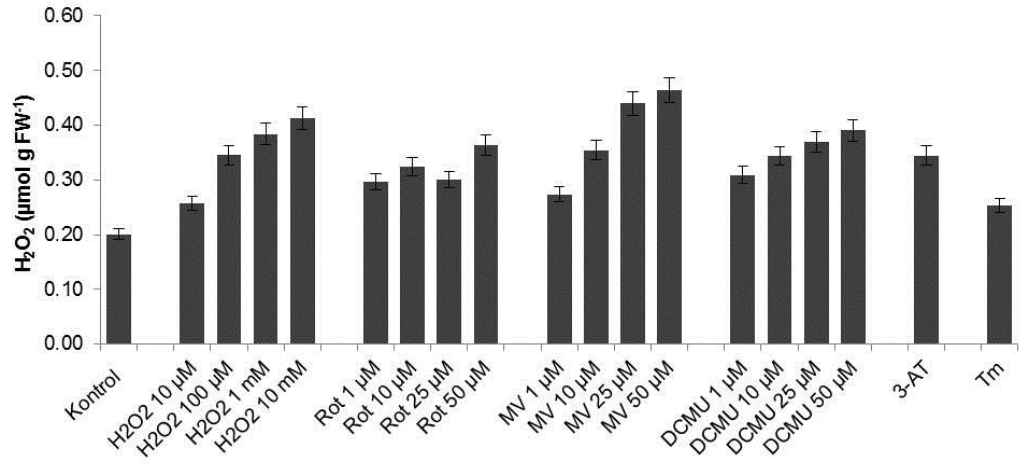
En yüksek H_2O_2 miktarı, H_2O_2 (1mM ve 10 mM) ve MV uygulanan gruplarda gözlenmiştir. O_2^- üretimi H_2O_2 , rotenone, MV, DCMU ve 3AT uygulamaları ile artmıştır (Şekil 3.23).



Şekil 3.23 Kontrol, H_2O_2 (10 μ M, 100 μ M, 1 mM, 10 mM), rotenone (ROT) (1 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M), metil viyolojen (MV) (1 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M), DCMU (1 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M), 3- aminotriazol (3AT) (1 mM) ve tunikamisin (Tm) (0.5 μ g/ml) uygulanan yapraklarda O_2^- ' nin nitrobluetetrazolium (NBT) ile H_2O_2 ' nin ise diaminobenzidin (DAB) ile histokimyasal olarak boyanması.

H_2O_2 uygulama gruplarında en yüksek H_2O_2 artışı 10 mM uygulama grubunda kontrolün 2 katı olarak ölçülmüştür. Rotenone uygulanan gruplarda ise

en yüksek H_2O_2 seviyesi 50 μM uygulama grubunda kontrol grubunun %85' i oranında artmıştır. MV uygulaması sırasında en yüksek H_2O_2 miktarı 50 μM MV uygulanan yapraklarda ölçülmüştür. Kontrolün yaklaşık 2 katı kadar artış göstermiştir. DCMU uygulanan yapraklarda en yüksek artış 50 μM grubunda belirlenmiştir. Kontrolün %95' i oranında daha fazladır. 3AT uygulanan grubun H_2O_2 miktarı kontrole göre %65 oranında fazladır. Tm uygulaması ile ise H_2O_2 miktarı kontrolün %20' si oranında artmıştır (Şekil 3.24).

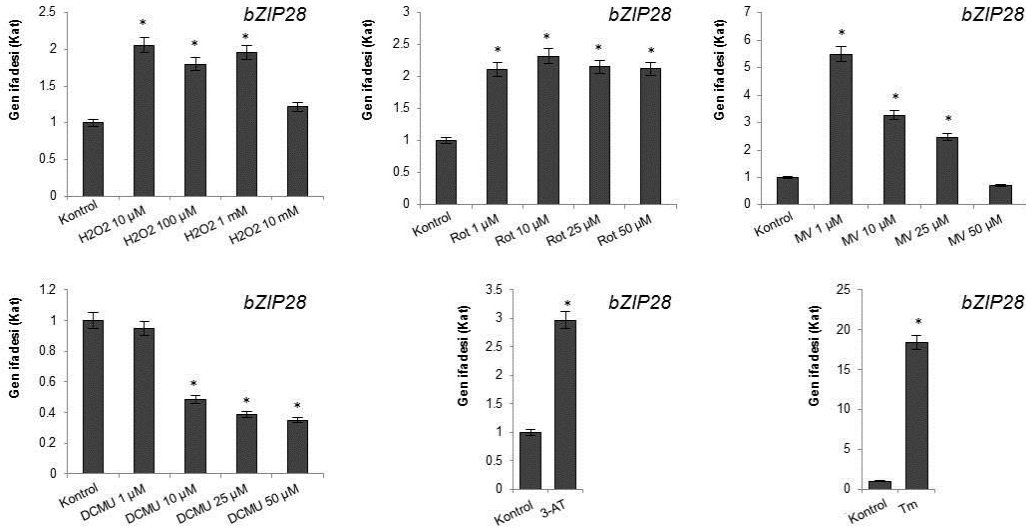


Şekil 3.24 Kontrol, H_2O_2 (10 μM , 100 μM , 1 mM, 10 mM), rotenone (ROT) (1 μM , 10 μM , 25 μM , 50 μM), metil viyolojen (MV) (1 μM , 10 μM , 25 μM , 50 μM), DCMU (1 μM , 10 μM , 25 μM , 50 μM), 3- aminotriazol (3AT) (1 mM) ve tunikamisin (Tm) (0.5 $\mu g/ml$) uygulanan yapraklarda H_2O_2 miktarının ferroz oksidasyon-xilenol orange (FOX) yöntemi ile belirlenmesi

3.6.2. Organaller ROS oluşumunun ER stresi ile ilişkili genler üzerien etkileri

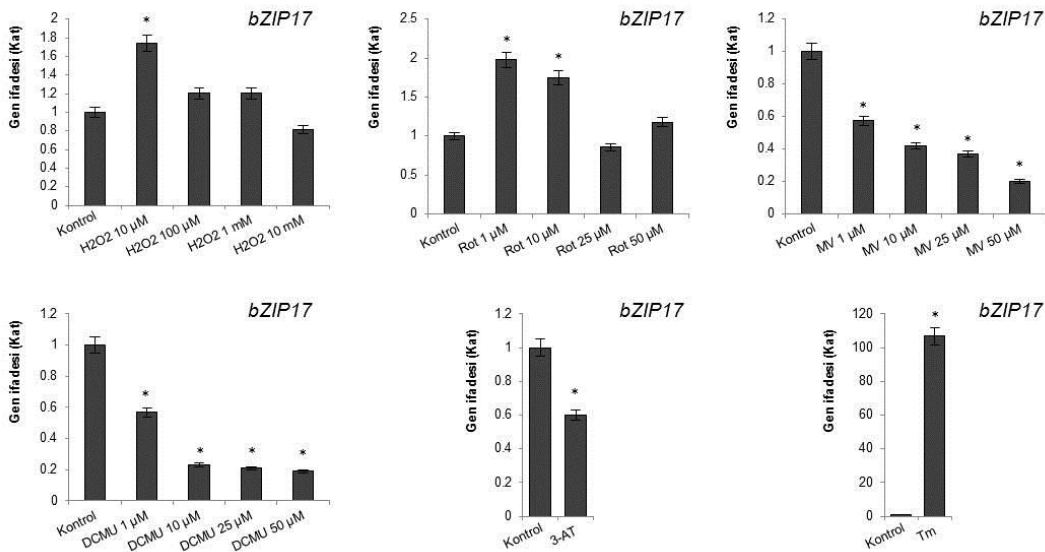
3.6.2.1 ER stresinin algılanması ile ilgili genlerin ifadesi

H_2O_2 ve rotenone uygulamaları, 10 mM H_2O_2 uygulanan grubun haricinde *bZIP28* transkripsiyonunda artışa neden olmuştur. 1 μM MV uygulaması *bZIP28* ifadesini 5.5 kat arttırırken, daha yüksek orandaki MV konsantrasyonları (10, 25, 50 μM) altında *bZIP28* ifadesi azalmıştır. Aynı zamanda, 1 μM DCMU uygulaması kontrole göre herhangi bir değişikliğe yol açmazken, 10, 25, 50 μM DCMU uygulamaları *bZIP28* ifadesinde azalmaya neden olmuştur. 3-AT uygulaması *bZIP28* ifadesini kontrole göre 3 kat arttırırken, Tm uygulaması 18 kat arttırmıştır (Şekil 3.25).



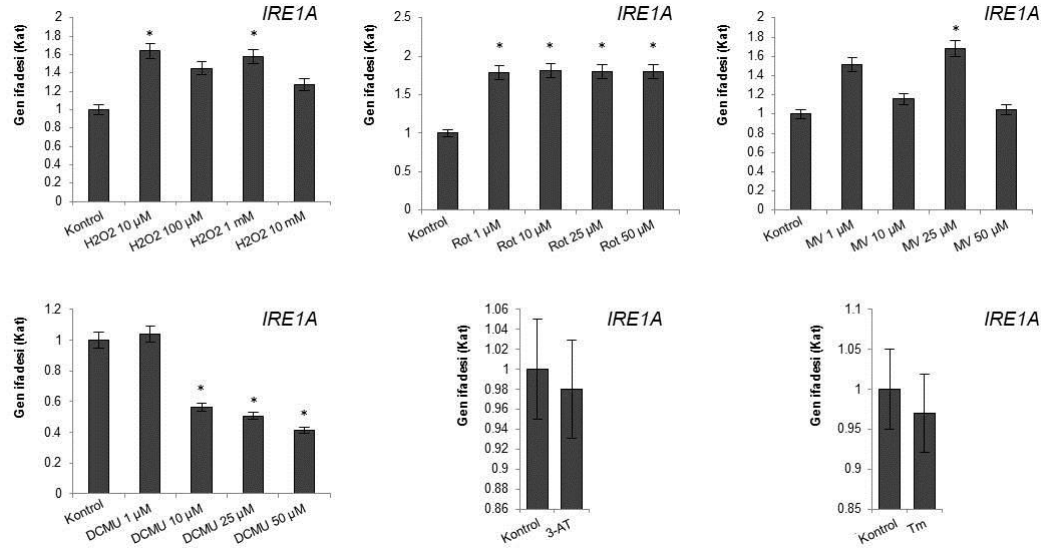
Şekil 3.25 H₂O₂, Rot, MV, DCMU, 3-AT ve Tm uygulanan yapraklarda *bZIP28* gen ifadesinin qRT-PCR ile belirlenmesi

Düşük konsantrasyonlardaki H₂O₂ (10 µM) uygulaması ve rotenone (1 µM ve 10 µM) *bZIP17* gen ifadesinde artışa neden olurken, bu iki uygulama grubunda diğer konsantrasyonlar *bZIP17* ifadesinde herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır. MV, DCMU ve 3-AT uygulamaları bu genin ifadesini azaltmıştır. Tm uygulaması *bZIP17* transkriptlerinin ifadesini kontrole göre yaklaşık 100 kat arttırmıştır (Şekil 3.26).



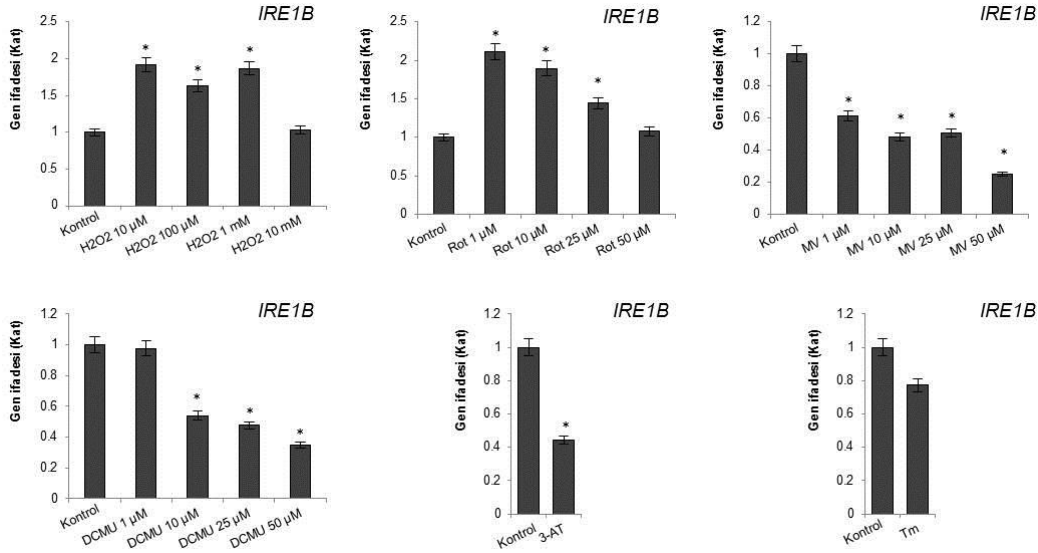
Şekil 3.26 H₂O₂, Rot, MV, DCMU, 3-AT ve Tm uygulanan yapraklarda *bZIP17* gen ifadesinin qRT-PCR ile belirlenmesi

IRE1A'nın ifadesi H_2O_2 , rotenone ve MV uygulamasıyla az da olsa artarken DCMU uygulamaları ile azalmıştır. 3AT ve Tm uygulamaları *IRE1A* ifadesinde değişikliğe yol açmamıştır (Şekil 3.27 H_2O_2 , Rot, MV, DCMU, 3-AT ve Tm uygulanan yapraklarda *IRE1A* gen ifadesinin qRT-PCR ile belirlenmesi Şekil 3.27).



Şekil 3.27 H_2O_2 , Rot, MV, DCMU, 3-AT ve Tm uygulanan yapraklarda *IRE1A* gen ifadesinin qRT-PCR ile belirlenmesi

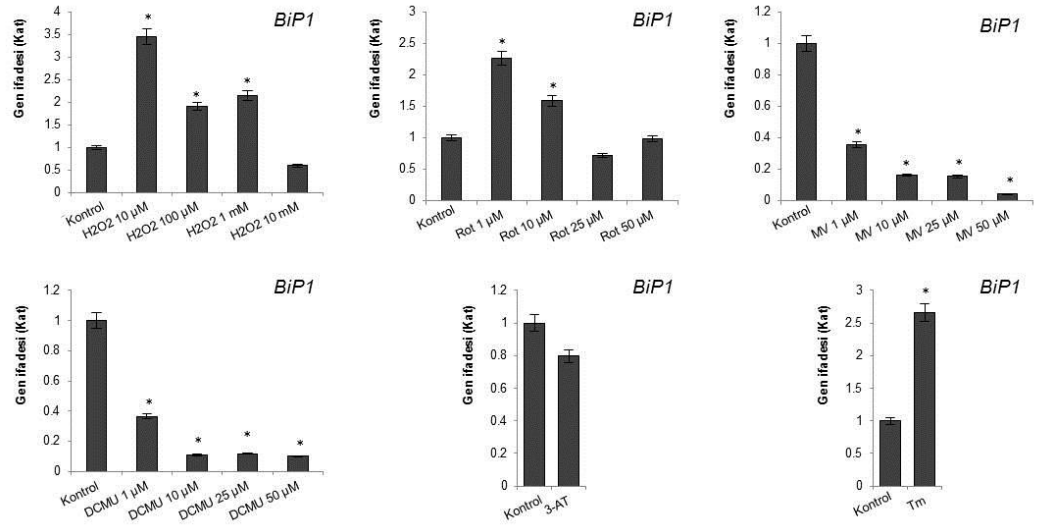
10 mM hariç diğer H_2O_2 konsantrasyonlarının hepsi *IRE1B* gen ifadesinde artışa neden olmuştur. Rotenone uygulamasında ise en yüksek ifade 1 μ M grubunda gözlenirken, artış gösteren uygulama konsantrasyon ifadede azalmaya yol açmıştır. MV uygulamaları ile *IRE1B* ifadesi azalmıştır. En düşük ifade 50 μ M uygulama grubunda gözlenmiştir. DCMU uygulamalarında konsantrasyon arttıkça *IRE1B* ifadesi azalmıştır. Tm uygulaması *IRE1B* ifadesinde azalmaya yol açmazken, 3AT uygulaması ile *IRE1B*'nin transkript yoğunluğu kontrole göre azalmıştır (Şekil 3.28).



Şekil 3.28 H₂O₂, Rot, MV, DCMU, 3-AT ve Tm uygulanan yapraklarda *IRE1B* gen ifadesinin qRT-PCR ile belirlenmesi

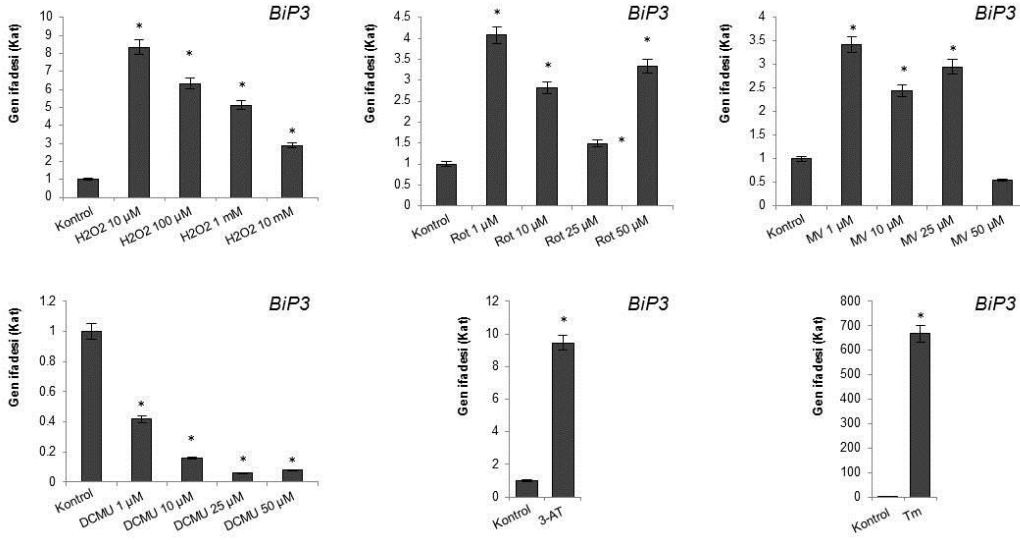
3.6.2.2 ER stresi sırasında ER stres yanıtına ve protein katlanmasına yardımcı olan genlerin ifadesi

BiP1 geninin ifadesi H₂O₂ uygulaması ile 2 ile 3.5 kat oranları arasında artmıştır. Sadece 10 mM H₂O₂ uygulanan grubun transkript seviyesi kontrole göre değişmemiştir. Aynı şekilde düşük konsantrasyonlardan uygulanan rotenone (1 ve 10 µM) *BiP1* ifadesinde artışa neden olurken daha yüksek konsantrasyonlar ifadede kontrole göre herhangi bir değişikliğin yaşanmamasına neden olmuştur. MV ve DCMU uygulamaları sonucunda tüm konsantrasyonlarda *BiP1* ifadesinde kontrole göre azalış belirlenmiştir. 3AT uygulaması herhangi bir değişikliğe yol açmazken, Tm uygulaması ile *BiP1* ifadesi 2.5 kat oranında artmıştır (Şekil 3.29).



Şekil 3.29 H₂O₂, Rot, MV, DCMU, 3-AT ve Tm uygulanan yapraklarda *BiP1* gen ifadesinin qRT-PCR ile belirlenmesi

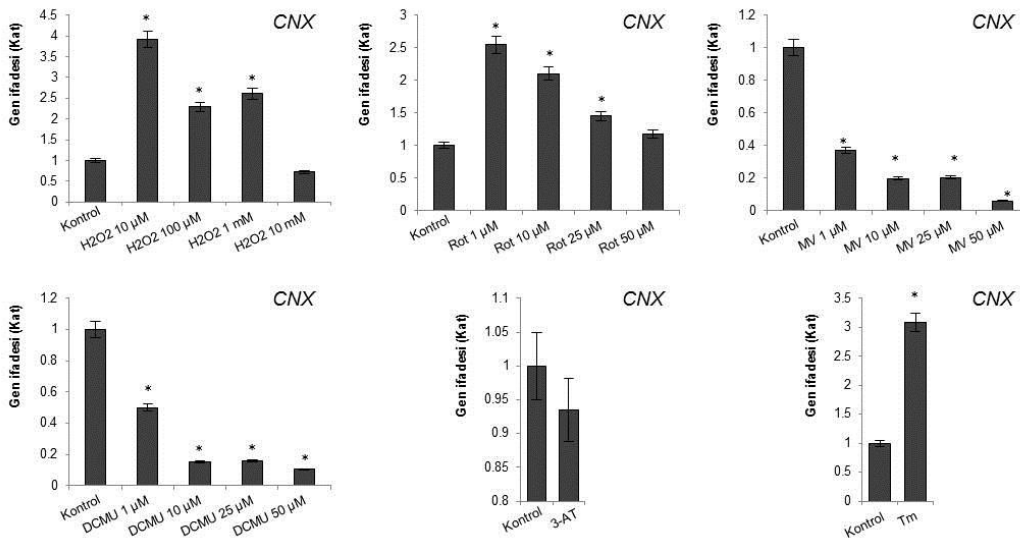
H₂O₂ uygulaması ile *BiP3* geninin ifadesi artmıştır. 10 µM H₂O₂ transkript yoğunluğunu 8 kat arttırırken, 100 µM H₂O₂ 6 kat, 1 mM H₂O₂ 5 kat, 10 mM H₂O₂ 3 kat arttırmıştır. Rotenone uygulamaları da *BiP3* geninin ifadesinde artışa neden olmuştur. En yüksek artış 1 µM rotenone uygulaması ile kontrole göre 4 kat olarak belirlemiştir. MV uygulamasında ise en yüksek artış 3.5 kat ile 1 µM MV uygulanan yapraklarda ölçülürken 50 µM MV uygulaması ile *BiP3* ifadesi kontrole göre değişmemiştir. DCMU *BiP3* ifadesinde azalmaya neden olmuştur. 3AT ise *BiP3* ifadesini 9 kat arttırmıştır. Tm uygulaması ise *BiP3* ifadesini kontrolün 660 katı oranında arttırmıştır (Şekil 3.30).



Şekil 3.30 H₂O₂, Rot, MV, DCMU, 3-AT ve Tm uygulanan yapraklarda *BiP3* gen ifadesinin qRT-PCR ile belirlenmesi

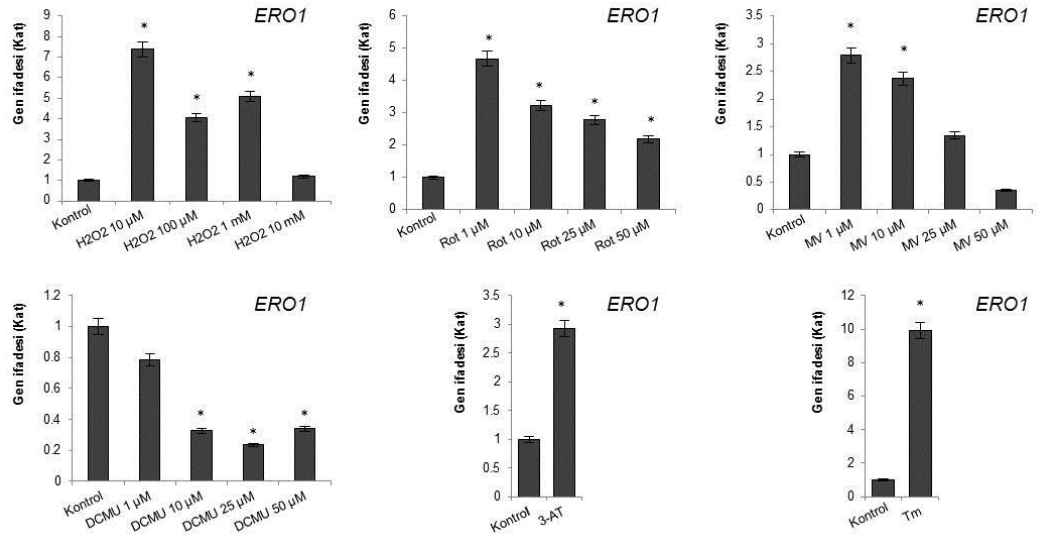
3.6.2.3 ER’de protein katlanma mekanizması elemanları olan *CNX* ve *ERO1*’ in gen ifadeleri

CNX ifadesi 10 mM H₂O₂ ve 50 µM Rot haricinde H₂O₂ ve rotenone uygulamaları ile artmıştır. Bu gruplarda en yüksek artış 10 µM H₂O₂ uygulanan yapraklarda kontrole göre 4 kat olarak belirlenmiştir. MV ve DCMU uygulamaları ise *CNX* ifadesinde azalmaya nedne olmuştur. 3AT uygulaması *CNX* ifadesinde değişikliğe yol açmazken, Tm uygulaması ile *CNX* transkript yoğunluğu kontrole göre 3 kat artmıştır (Şekil 3.31).



Şekil 3.31 H₂O₂, Rot, MV, DCMU, 3-AT ve Tm uygulanan yapraklarda *CNX* gen ifadesinin qRT-PCR ile belirlenmesi

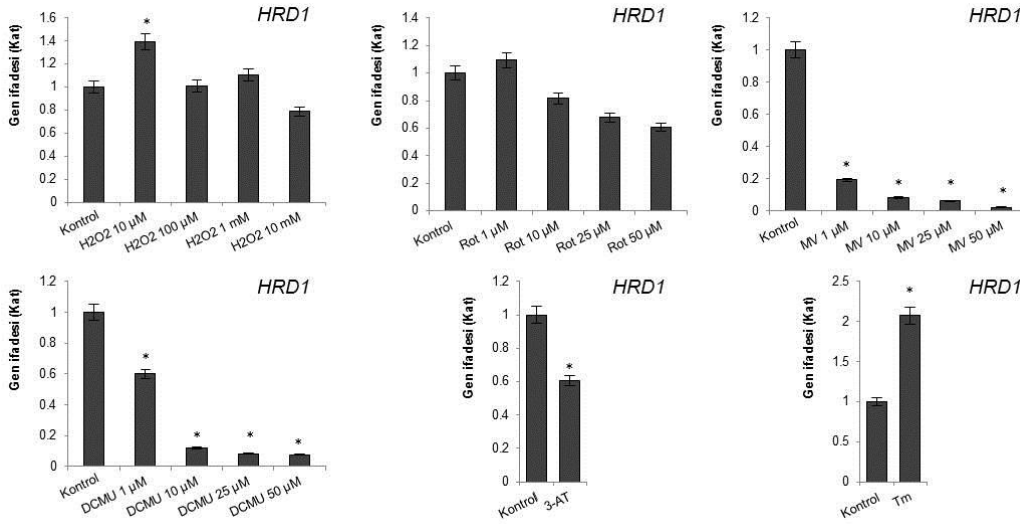
10 μM H_2O_2 uygulaması ile *ERO1* transkripleri 7 kat artmıştır. 100 μM H_2O_2 uygulaması *ERO1* ifadesini 4 kat arttırırken, 1 mM H_2O_2 5 kat artışa neden olmuştur. Rotenone uygulaması ile *ERO1* ifadesi 2 ile 4 kat arası artmıştır. MV uygulaması ile de 50 μM uygulanan grup haricinde *ERO1* ifadesi artarken en yüksek artış 2.5 kat ile 1 μM MV uygulanan yapraklarda belirlenmiştir. DCMU uygulaması *ERO1* ifadesinde azalmaya neden olmuştur. 3AT uygulaması *ERO1* transkript seviyesini kontrole göre 3 kat arttırırken, Tm uygulaması 10 kat arttırmıştır (Şekil 3.32).



Şekil 3.32 H_2O_2 , Rot, MV, DCMU, 3-AT ve Tm uygulanan yapraklarda *ERO1* gen ifadesinin qRT-PCR ile belirlenmesi

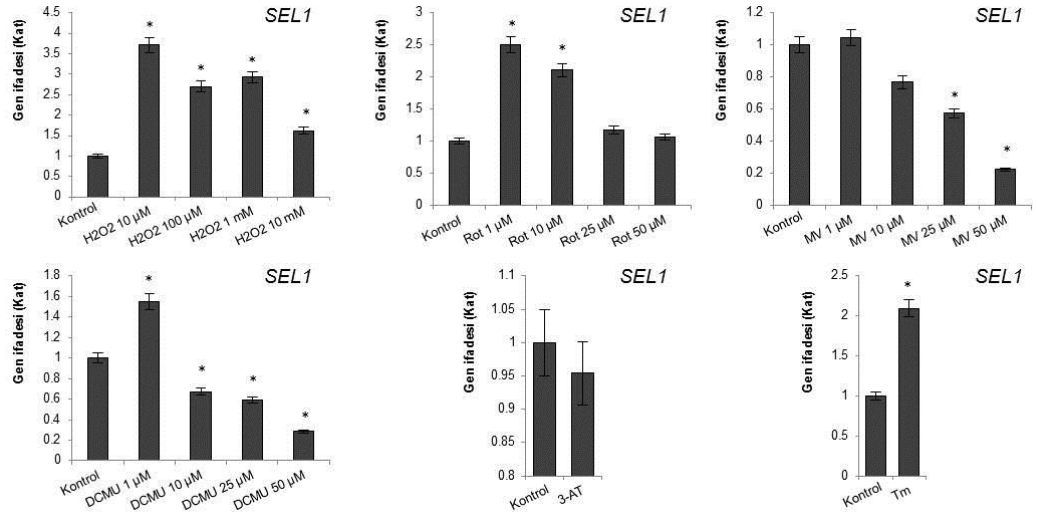
3.6.2.4 ER ilişkili protein parçalanması (ERAD) ile ilgili genlerin ifadesi

10 μM H_2O_2 uygulaması *HRD1* ifadesinde az da olsa artışa neden olurken diğer H_2O_2 konsantrasyonları ifadede değişikliğe yol açmamıştır. Rotenone uygulaması ise *HRD1* ifadesinde azalmaya neden olmuştur. MV, DCMU ve 3AT uygulamaları da *HRD1* ifadesini azaltmıştır. Tm uygulaması ise *HRD1* transkript seviyesini kontrole göre 2 kat arttırmıştır (Şekil 3.33).



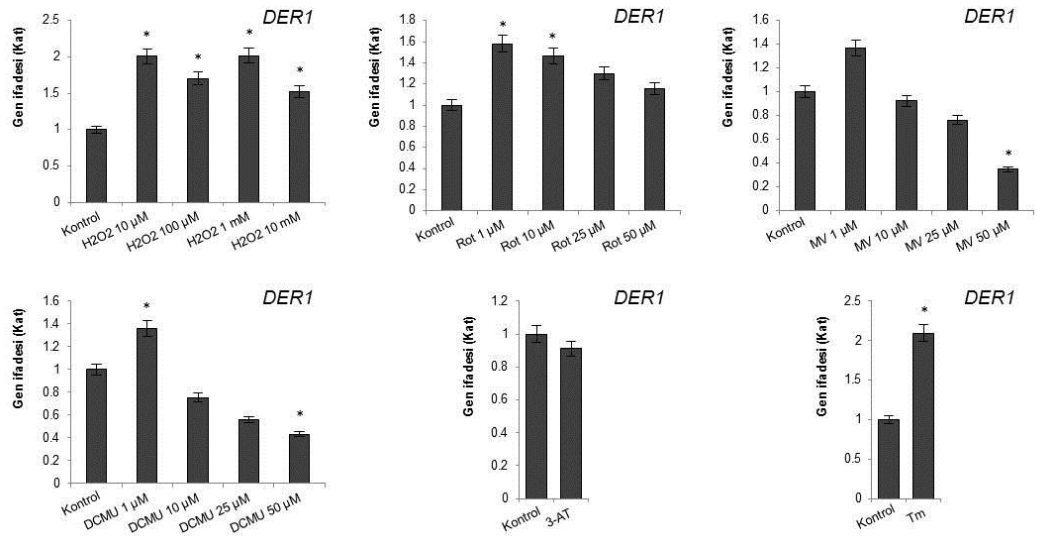
Şekil 3.33 H₂O₂, Rot, MV, DCMU, 3-AT ve Tm uygulanan yapraklarda *HRD1* gen ifadesinin qRT-PCR ile belirlenmesi

SEL1 transkripsiyonu H₂O₂ uygulamaları ile artmıştır. En yüksek artış 3.7 kat ile 10 μM H₂O₂ uygulanan yapraklarda belirlenmiştir. Rotenone uygulamalarında ise düşük konsantrasyonlar *SEL1* ifadesini arttırmıştır. Bu artış 1 μM konsantrasyonunda 2.5 kat 10 μM konsantrasyonunda ise 2 kat olarak ölçülmüştür. Öte yandan, 10 μM üzerindeki MV uygulaması *SEL1* ifadesinde azalmaya neden olmuştur. 1 μM DCMU *SEL1* ifadesini arttırırken diğer konsantrasyonlar azalmaya neden olmuştur. 3AT uygulaması *SEL1* ifadesinde herhangi bir değişikliğe yol açmamıştır. Tm uygulaması ise *SEL1* ifadesini 2 kat arttırmıştır (Şekil 3.34).



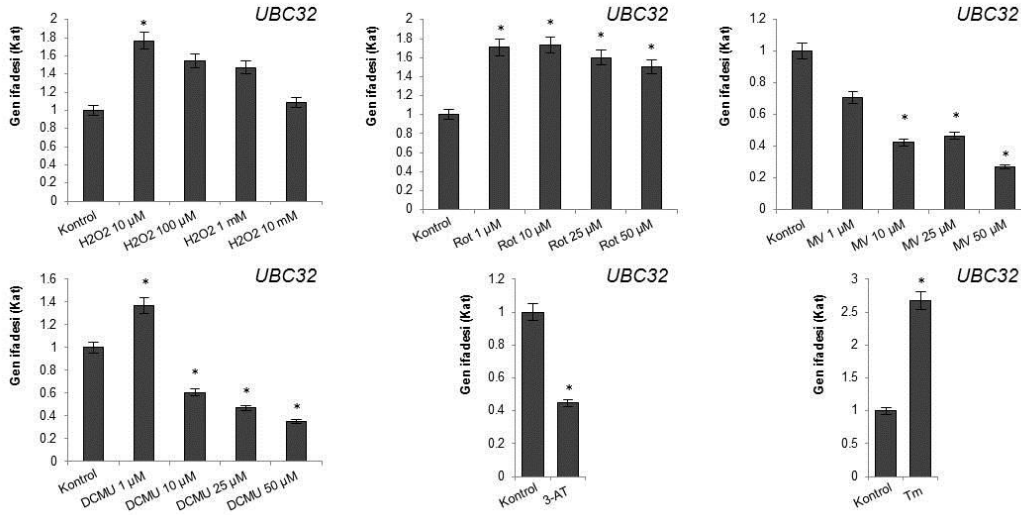
Şekil 3.34 H₂O₂, Rot, MV, DCMU, 3-AT ve Tm uygulanan yapraklarda *SEL1* gen ifadesinin qRT-PCR ile belirlenmesi

H₂O₂ uygulaması ile *DER1* ifadesi artmıştır. Rotenone uygulamaları da az da olsa *DER1* ifadesinde artışa neden olmuştur. 50 µM MV uygulaması ise *DER1* ifadesinin azalmasına neden olmuştur. DCMU uygulaması ile 1 µM konsantrasyon *DER1* ifadesini arttırırken, 50 µM konsantrasyon ifadeyi azalmıştır. 3AT uygulaması ile *DER1* ifadesinde herhangi bir değişiklik belirlenmezken, Tm uygulaması ile ifade 2 kat artmıştır (Şekil 3.35).



Şekil 3.35 H₂O₂, Rot, MV, DCMU, 3-AT ve Tm uygulanan yapraklarda *DER1* gen ifadesinin qRT-PCR ile belirlenmesi

10 μM H_2O_2 uygulaması ve rotenone uygulamaları *UBC32* transkript seviyesinde artışa nedne olmuştur. MV uygulamaları ise *UBC32* ifadesini azaltmıştır. 1 μM DCMU uygulaması ile *UBC32* ifadesi artarken diğer konsantrasyonlar ifadeyi azaltmıştır. 3-AT uygulaması da *UBC32* ifadesini azaltmıştır. Öte yandan Tm uygulaması ile *UBC32* ifadesi 2.5 kat artmıştır (Şekil 3.36)



Şekil 3.36 H_2O_2 , Rot, MV, DCMU, 3-AT ve Tm uygulanan yapraklarda *UBC32* gen ifadesinin qRT-PCR ile belirlenmesi

4. TARTIŞMA

Bu çalışmanın ilk amacı ER stres ilişkili oksidatif stres ve antioksidan savunma yanıtının ve ER kaynaklı ROS' un stres sinyalleme görevini *A. thaliana*' da ortaya koymaktır.

ER, hücrede salgı proteinlerinin katlanma merkezidir (Urade, 2007). Daha öncede belirtildiği gibi, katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin ER içerisinde birikmesi ER stresine neden olur ve UPR' yi tetikler. UPR özelleşmiş ER stres genlerinin ifadesinin artmasıyla karakterize edilir (Iwata and Koizumi, 2012). ER protein katlanma mekanizması disülfid bağların oluşturulmasını gerektirir ve bu sırada ER lümeni içinde ERO1 tarafından H_2O_2 üretimi katalizlenir (Sevier and Kaiser, 2008). H_2O_2 ' nin hücre içinde iki görevi bulunmaktadır. Bu görevlerden biri, stres koşulları altında antioksidan savunma yanıtını düzenleyen bir ikincil mesajcı olarak rol almasıdır (Gechev et al., 2002). Diğer görevi ise aşırı miktarda biriken H_2O_2 'nin hücre ölümüne yol açmasıdır (Gechev et al., 2006). Bu etkilerin yanısıra, ER kaynaklı H_2O_2 ' nin görevleri bilinmemektedir (Jaspers and Kangasjarvi, 2010). Bu çalışmada, tunikamisin ile teşvik edilen ER stresinin sonucunda enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanların aktivitelerinde artış olduğu ve ER kaynaklı H_2O_2 ' nin antioksidan savunma sistemini uyarak ROS sinyal mekanizmasını tetiklediği anlaşılmaktadır.

Kök büyümesi ile ER stres arasındaki ilişkinin açıklanması için ana kök uzunluğu ve lateral kök yoğunluğu belirlenmiştir. Bulgular ER stresi ile kök gelişimi arasında kesin bir bağın bulunduğunu göstermektedir. Tm uygulaması ile ana kök uzunluklarında azalma gözlenmiştir (Şekil 3.1). Aynı şekilde, Watanabe and Lam (2008)' da, *Arabidopsis*' de Tm teşvikli ER stresinin kök büyümesinde azalışa neden olduğunu bulmuştur.

Çalışmada Tm uygulaması ile yapraklarda su kaybının gerçekleştiği bulunmuştur. Benzer olarak, Zhang et al., (2008), glikolizasyon yapamayan dolayısıyla protein katlanmasını gerçekleştiremeyen *lew1* mutantında stomatal iletkenliğin ve yaprak su kaybının yaban tip bitkilere göre daha düşük oranlarda bulunduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada ER kaynaklı H_2O_2 ' nin stomatal iletkenliğin düzenlenmesinde rol aldığını göstermektedir.

bZIP17 ve bZIP28 *Arabidopsis*' de ER stres yanıtını düzenleyen transkripsiyon faktörleridir (Tajima et al., 2008). Ayrıca bZIP60' da ER stresi ilişkili *BiP1* ve *BiP3* gibi genlerin ifadelerinin düzenlenmesinden sorumludur (Iwata and Koizumi, 2005; Howell, 2013). *TIN1* gen ifadesinde, Tm uygulamasına yanıt olarak ortaya çıkar ve ER stresinin bir indikatörüdür (Iwata et al., 2010). Bu çalışmada, Tm tarafından oluşturulan ER stresinin transkripsiyon seviyesinde UPR aktivasyonunu gerçekleştirdiği bulunmuştur. Tuz stresinin hücre içinde kloroplast ve mitokondride H_2O_2 üretimine neden olduğu bilinmektedir (Miller et al., 2010). Fakat, tuz stresinin ER içerisinde H_2O_2 üretimine neden olup olmadığı bilinmemektedir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, tuz stresinin ER stresine yanıt veren *ERO1* geninin ifadesini arttırdığını ve H_2O_2 üretimine neden olduğunu göstermektedir.

ROS sinyalleme kalsiyum, protein fosforilasyonu ve lipid sinyallemesini düzenlemektedir (Suzuki et al., 2011). NOX, oksidatif sinyalleme sürecinde ana ROS üreticisidir ve *Arabidopsis*' in sinyal üretiminde ve alımında önemli görevleri bulunmaktadır (Wrzaczek et al., 2013). Bu çalışmada, tuz ve ER stresi ajanlarının NOX aktivitesini 30. dakikada arttırdığı bulunmuştur. Bu iki stresin beraber uygulandığı gruplarda ise NOX aktivitesi, 10'uncu dakikada artış göstermeye başlamıştır. *A. thaliana*' da 10 adet NOX geni tanımlanmıştır ve üç tanesinin ifade olduğu bilinmektedir (Dwyer et al., 1996; Keller et al., 1998). Her RBOH isoformunun bitki organlarında özelleşmiş görevleri bulunmaktadır (Suzuki et al., 2011). Örneğin, *A. thaliana*' da RBOHC tarafından üretilen ROS' un, Ca kanallarını aktive ederek kök ucu tüylerinin gelişiminde rol aldığı bilinmektedir (Foreman et al., 2003). RBOHD ve RBOHF hücre dışı H_2O_2 ' nin oluşmasında görevlidir (Torres et al., 2005). Tuz stresinin *A. thaliana*' da *RBOHD* ifadesinde değişikliğe neden olduğu bilinmektedir (Xie et al., 2011). Ayrıca, aynı çalışmada tuz stresinin *RBOHF*' nin de ifadesini arttırdığı belirtilmiştir. Bu çalışmada ise Tm uygulamasının tek başına bu genlerin ifadesini arttırdığı bulunmuştur. Ayrıca tuz stresi ve Tm uygulamalarının beraber yapıldığı bitkilerde *RBOHD*' nin ifadesi daha yüksek oranda artmıştır. Bu sonuçlara ek olarak, NOX aktivitesinin erken ortaya çıkması da *RBOHD* ve *RBOHF*'nin ifadesinin iki stresin beraber uygulandığı gruplarda daha erken olmasıyla ilişkilidir (Şekil 3.11). Tm uygulaması ile, NOX' un katalizlediği ROS birikimi, DPI tarafından inhibe

edilebilmektedir. Ayrıca, NOX tarafından meydana getirilen ROS, UPR ve antioksidan sistemin indüklenmesinde rol oynamaktadır. NOX aktivitesinin bekçi hücrelerde stoma kapanmasını da düzenlediği bilinmektedir (Kwak et al., 2003). Bu durumda, Tm uygulanan bitkilerde su kaybının daha düşük olması, NOX aktivitesinin artmasıyla oluşan ROS sinyallemeyle ilişkili olduğu söylenebilir.

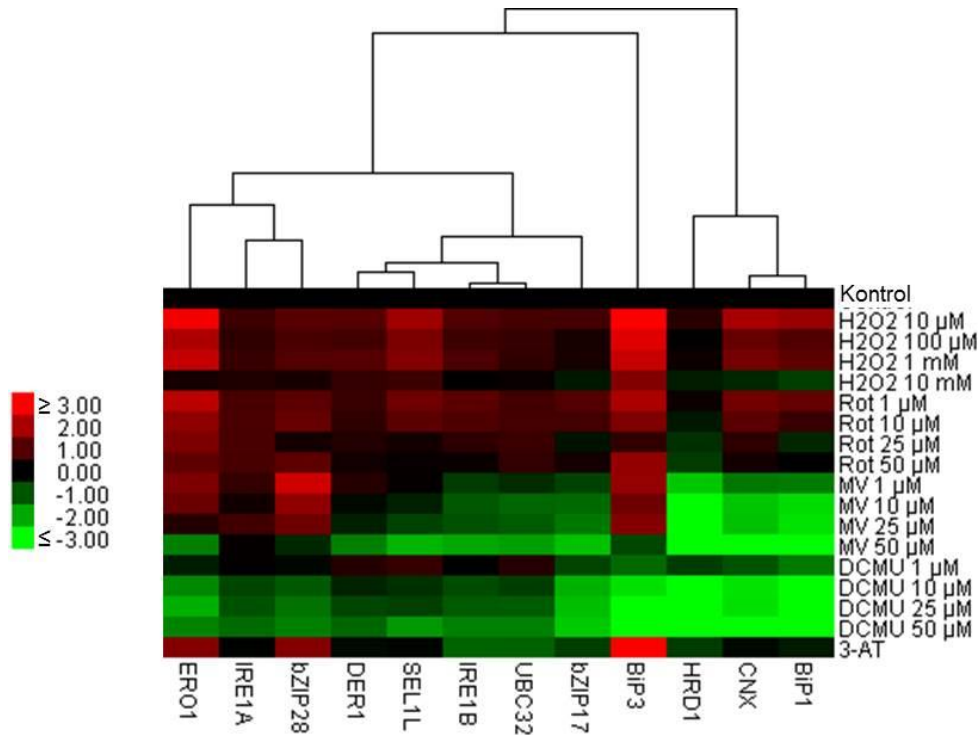
Tuzluluk ve kuraklık gibi çevresel stres koşulları antioksidan savunma mekanizmasını teşvik eder (Turkan ve Demiral, 2009). SOD, APX ve CAT ana ROS süpürme enzimleridir ve hücreyi oksidatif dengede tutarlar (Mittler 2002). SOD hücrede $O_2^{\cdot-}$ nin H_2O_2 'ye dönüşümünü katalizler ve CAT' da H_2O_2 'nin süpürücüsüdür (Mittler, 2011). Bu çalışmada, ER stresi ile köklerde SOD aktivitesi artış göstermiştir ve bu durum ER stresi ilişkili oksidatif denge ile ilişkilendirilebilir. Fakat Tm uygulaması sonrasında, yapraklarda SOD aktivitesinde bir artış belirlenmemiştir. CAT aktivitesinde ise artış gözlenmiştir. Yanlış katlanmış ya da katlanmamış proteinlerin parçalanması için gerekli olan ATP yükünün fazla olması mitokondride elektron taşıma yükünde fazla olmasına neden olmaktadır ve bu durum $O_2^{\cdot-}$ miktarında artışa neden olabilir. Bu durum Tm uygulaması sırasında köklerde mitokondride yerleşmiş olan MnSOD aktivitesindeki artışa neden olmuştur.

Tm uygulaması ile, ER' de katlanmamış proteinlerin artmış ve UPR aktifleşmiş, *ERO1* gen ifadesinde artış gözlenmiştir (Şekil 3.8). ER lümeninde yanlış disülfid bağların kurulmasının önlenmesi için GSH kullanılmaktadır (Tu and Wiesman, 2004). ER' de, GSH' ın azalmasını durdurmak için Tm uygulanan bitkilerde GR aktivitesinde artış gözlenmiştir böylece hücre içi GSH miktarı sabit tutulabilmiştir. Ayrıca, Tm uygulaması ile GR izozim deseninde gözlenen değişim de ER stresi sırasında yeni bir dizi GR izoziminin iş gördüğünü göstermektedir. APX hücre içinde özellikle kloroplast ve sitoplazma içerisinde önemli H_2O_2 süpürücülerinden bir tanesidir (Asada, 2006). Stres ilişkili ROS üretimi ile çevresel stres koşulları altında APX aktivitesi artmaktadır (Miller et al. 2010). ER stresi altında, yapraklarda, APX aktivitesi en çok yükseliş gösteren enzim olmuştur. APX' in substratı olan askorbat GSH havuzu ile dehidroaskorbat redüktaz aracılığıyla bağlantılıdır. ER stresi altında GSH üretimindeki artış APX' in ROS süpürme kapasitesiyle uyumlu olarak gerçekleşmektedir.

Stres sonucunda H_2O_2 birikimi ROS teşvikli lipid peroksidasyonuna yol açmaktadır (Mittler, 2002). Tm uygulaması da lipidlerde oksidatif hasara yol açmıtır. Lipid peroksidasyonu gibi protein karbonil gruplarında oksidatif işaretler olduğu bilinmektedir (Levine et al. 1994). ER’ de katlanmamış proteinlerin varlığı polipeptidlerin oksidatif modifikasyonlara daha açık olmasına neden olmaktadır. Tm uygulaması ile hücrede protein oksidasyon seviyelerinde de artış gözlenmiştir.

Bu çalışmanın ikincil amacı yukarıda belirtildiği üzere uyarılmış organellar (mitokondri, kloroplast ve peroksizom) ROS üretiminin *A. thaliana* bitkisinde ER stresi cevapları üzerine etkilerinin belirlenmesidir.

Daha önceki transkriptomik çalışmalarda gösterildiği gibi, hücrenin farklı bölmelerinden kaynaklanan ROS’ un bitkinin strese verdiği yanıtlar üzerine farklı etkileri vardır (Gadjev et al., 2006; Laloi et al., 2007; Sewelam et al., 2014). Buna uygun olarak, bu çalışmada rotenone uygulamasıyla incelenen 12 genden 11’i, MV uygulamasıyla 5’i ve DCMU uygulamasıyla 3’ünün ifadesinde artış gözlenmiştir. Şekil 4.1’ den de görülebileceği üzere mitokondri, kloroplast ve peroksizomlardan üretilen ROS, ER stresi yanıtları üzerinde belirgin farklılıklar yaratmıştır.



Şekil 4.1 ER stres ilişkili genlerin H_2O_2 , Rot, MV, DCMU, 3AT uygulamaları sonrasında hiyerarşik sınıflandırılması

ER' de meydana gelen protein katlanması, proteinlerin parçalanması gibi reaksiyonların ATP gerektirdiği bilinmektedir (Marzec et al., 2012). Ancak ER' de herhangi bir ATP kaynağı yoktur ve burada gerçekleşen reaksiyonlarda harcanan ATP sitosolden sağlanmak zorundadır. Hücrenin ATP kaynağının mitokondriler olduğu düşünüldüğünde, mitokondrilerde ROS oluşumunun tetiklenmesinin mitokondriyal homeostasisi bozarak hücredeki mevcut ATP miktarını etkilemesi kaçınılmazdır. BiP1 ve BiP3 gibi HSP70 benzeri proteinler ATPaz aktivitesine sahiptir ve sadece ATP varlığında protein ligandlarından ayrılabilirler (Vitale and Denecke, 1999). Buna benzer olarak, ER' den sitozole proteinlerin parçalanmak için taşınmasından sorumlu bir motor protein olan CDC48 de ATPase aktivitesine sahiptir (Marshall et al., 2008). Bu bilgiler ışığında, mitokondriyal ROS tarafından ER stresi yanıtlarının uyarılmasının ER' de ATP kıtlığı nedeniyle protein katlanma ve ERAD mekanizmalarının yetersiz çalışmasına bağlı olarak gerçekleşmiş olabileceği düşünülebilir.

Özellikle kloroplastik ROS üretiminin ER stresi ve protein katlanması ile ilişkili genlerin ifadelerini azaltması hücrede protein sentezinin yavaşlamasını işaret edebilir. Literatürde daha önce kuraklık gibi çevresel etkenlerle protein sentezinin inhibe olduğu gösterilmiştir (Dhindsa and Cleland, 1975; Cramer et al., 2011). Diğer streslere benzer olarak kuraklık stresi, kullanılabilir CO₂ miktarını düşürerek ve ROS miktarını artırarak kloroplast metabolizmasının dengesini bozmaktadır. Kuraklık stresine yanıt karmaşık bir süreç olsa da, MV ve DCMU uygulamalarının kloroplastlarda kuraklığa benzer sonuçlara neden olmaktadır. Yukarıda anlatılanlara bağlı olarak, fotosenteze bağlı olarak, amino asitler ve proteinlerin sentezi için gerekli karbon iskeletinin azalması protein sentez hızını yavaşlatmış ve protein katlama mekanizması üzerindeki yükü azaltmış olabilir.

UPR, ER stres algılayıcıları ve sinyal iletilicileri olan *bZIP28*, *bZIP17*, *IRE1A* ve *IRE1B* gibi genlerin ifadelerinin uyarılması ile başlamaktadır. Liu et al. (2007) *Arabidopsis* ' de tuz stresine tolerans için *bZIP17* ' ye ihtiyaç olduğunu bulmuştur. *bZIP17* ' nin aktivasyonu tuza yanıt veren genlerin ifadelerini arttırmıştır ve bu bulgular tuz stresi ile UPR arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir. Ayrıca, sıcaklık stresinde *bZIP17* ve *bZIP28* ifadelerini uyarmıştır ve bu genlerin tekli mutantlarının sıcaklık stresine duyarlı olduğu gösterilmiştir (Gao et al., 2008; Che et al., 2010). *BiP1*, *BiP3* ve *CNX* gibi bazı ER stresi ile ilişkili genlerin

ifadelerinin bZIP28' e bağı olduğu bilinmektedir (Liu and Howell, 2010). Bu çalışmada, H₂O₂ uygulamasının ve mitokondriyal ROS üretiminin hem *bZIP17*' yi hem de *bZIP28*' i uyardığı, peroksizomal ROS' un ise sadece *bZIP28*' i uyardığı gösterilmiştir.

Günümüze kadar *Arabidopsis*' de 3 BiP geni tespit edilmiştir (Maruyama et al., 2014). Bunların arasından *BiP3*' ün ifadesi sadece ER stresi altında tespit edilmiştir (Noh et al., 2003). Önceki çalışmalar, tütün bitkisinde BiP gen ifadesinin artırılmasının kuraklık toleransına tolerans sağladığını göstermiştir (Alvim et al., 2001). *BiP1* ve *BiP3*' ün bZIP28 tarafından aktiveleştirilen UPR' nin düzenleyicileri olduğu bilinmektedir (Srivastava et al., 2013). *BiP3* ifadesinin uyarılması ER stresi sırasında UPR'nin uyarılmasında anahtar rol oynamaktadır. Ayrıca, *BiP3* ifadesinin uyarılmasının, *IRE1B* aktivitesine bağı olduğu da bilinmektedir (Deng et al. 2011). Bu çalışmada ise, H₂O₂ uygulaması ve mitokondriyal ROS birikimi, *BiP1* ve *BiP3*' ün ifadelerini arttırmıştır. Bunun aksine, peroksizomal ROS' lar ise sadece *BiP3*' ün ifadesini arttırmıştır. Kloroplastik ROS üretimi incelendiğinde ise MV ve DMCU uygulamalarının *BiP1* ifadesini azalttığı ancak sadece MV' nin *BiP3* ifadesinin uyardığı gözlenmektedir. Bu sonuçlar, *BiP3*' ün *BiP1*' e göre organel kaynaklı ROS' a daha fazla yanıt verdiğini göstermektedir.

ER' de bulunan kalneksin (CNX) kalretikulin ile ortak çalışarak özellikle glikoproteinlerin katlanmasında rol oynar. Pek çok çalışma, ER stresi uyarıcıları olan Tm ve DTT gibi kimyasalların bu genin ifadesini arttırdığını göstermiştir (Kamauchi et al., 2005). Benzer olarak, soya fasülyesinde farklı abiyotik streslerin CNX ifadesinin değiştirdiği bulunmuştur (Nouri and Komatsu, 2010). Ayrıca, Sarwat ve Naqvi (2013), tütün bitkisinde kuraklık stresinin CNX ifadesini arttırdığını göstermiştir. Yakın zamanda, de la Garma et al. (2015) tuz stresi altında tütün BY-2 hücrelerinin mitokondrilerinde ROS oluşumu gözlendiğini ve bunun ER stresini uyarabileceğini göstermiştir. Ayrıca, tütünde yapılan bu çalışmada, CNX ve kalretükulin ifadelerinin arttığı ve ER' nin yapısında değişiklikler gözlendiği belirtilmiştir. Ancak CNX ifadesinin ROS uygulamaları ile nasıl değiştiği bilinmemektedir. Çalışmamızda, CNX ifadesinin H₂O₂ ve mitokondriyal ROS üretimi ile arttığı, ancak kloroplastik ROS ile artmadığı

gösterilmiştir. Çalışmamızda mitokondriyal ROS ile *CNX* ifadesinin uyarılması de la Garma et al. (2015)' un bulguları ile örtüşmektedir.

ERO, ER' nin redoks durumunu düzenler ve katlanmamış proteinlere yanıt verir (Dixon et al., 2003; Onda et al., 2009). Daha önce *ERO1* ifadesinin tuz stresi altında arttığı tarafımızca gösterilmiştir (Ozgur et al., 2014). Ancak bu çalışmada ROS tarafından *ERO1* ifadesinin uyarılmasının $^1\text{O}_2$ 'ye değil ancak H_2O_2 ' ye bağlı olarak gerçekleştiği gösterilmiştir.

Dikkate değer şekilde, *BiP3* ve *ERO1* ifadelerinin uyarılmasının H_2O_2 ya da O_2^- gibi H_2O_2 ' ye dönüştürülebilir bir ROS ile ilişkili olduğu gözlenmiştir. H_2O_2 üretiminin hangi bölmede olduğuna bağlı olmaksızın *BiP3* ve *ERO1* genlerinin ifadelerinde artış gözlenmiştir. DCMU tarafından üretilen ROS, $^1\text{O}_2$ ' dir ve bu ROS tarafından verilen hasar kloroplast ile sınırlıdır. $^1\text{O}_2$, reaktivitesi nedeniyle, kısa difüzyon mesafesine sahiptir ve bu özelliğine bağlı olarak sadece oksidasyon ürünleri ile sinyalleme yapabilmektedir. Bu bulgular H_2O_2 ' nin, ER' nin redoks düzenleyicisi olan *ERO1*' in ifadesini uyarabilme özelliği olduğunu göstermektedir.

Liu et al. (2011), tuz stresinin *Arabidopsis*' de ERAD kapasitesini arttırdığını göstermiştir. Tuz stresi ve diğer olumsuz çevresel etkenler ER' de katlanmamış ya da yanlış katlanmış proteinlerin birikmesine neden olmakta ve bu proteinler ERAD tarafından ortadan kaldırılmaktadır (Howell, 2013). Bir ERAD elemanı olan HRD3 yoksunu *Arabidopsis* bitkilerinin tuz stresine daha duyarlı olduğu bulunmuştur. Bu bitkilerin parakuat uygulaması altında yabancı tiplere göre daha fazla ROS biriktirdiği gözlenmiştir (Liu et al., 2011). SEL1, HRD3 ile bir kompleks oluşturur ve bu kompleks DER1 ile beraber ERAD' ı aktiveleştirir (Su et al., 2011). Bitkilerde gözlenen bu ERAD mekanizması mayalardan insanlara kadar pek çok organizmada korunmuştur (Kaneko and Nomura, 2003). Çalışmamızda, peroksizomal ROS oluşumunun ERAD üzerine etkisi olmadığı gözlenmiştir. Ancak, DCMU tarafından kloroplastlarda üretilen $^1\text{O}_2$ ' nin *SEL1*, *DER1* ve *UBC32*' yi uyardığı bulunmuştur. Bu bulgular ile ROS ile ERAD' ın uyarıldığı ilk kez gösterilmiştir.

5. SONUÇLAR

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar ile *Arabidopsis*' de, Tm teşvikli H₂O₂ üretiminin, antioksidan savunma sistemini ve hücre içi redoks durumunu düzenleyen bir sinyal olduğu bulunmuştur. Ayrıca antioksidan savunma sistemi ile UPR arasında bir ilişkinin varlığı ortaya konmuştur.

NOX' dan elde edilen sonuçlar ile ER stresi sonucu oluşan ROS sinyalleşmesinin UPR' nin uyarılmasında rol oynadığı ve stoma kapanmasını etkilediği bulunmuştur. Bu sonuçlar, ER stresi ile oksidatif stres arasındaki ilişkinin antioksidan savunma ve ROS sinyalleşmesi ile ilişkisinin belirlenmesi açısından bitkilerde yapılan ilk çalışmadır.

Ayrıca bu çalışmada, bir bitki sisteminde ilk defa organel (kloroplast, mitokondri, peroksizom) kaynaklı ROS' un ER stresi üzerine etkileri gösterilmiştir. Dışarıdan uygulanan H₂O₂' nin UPR ve ERAD genlerinin uyardığı ancak yüksek konsantrasyonda (10 mM H₂O₂) bu etkinin oluşmadığı gözlenmiştir. Genel olarak, düşük konsantrasyonda ROS ER stresi ile ilişkili genlerin ifadesini uyarmıştır, bu durum ROS' ların ikincil mesajcı olarak ER stres yanıtının uyarılmasında rol oynadığını göstermektedir. Mitokondri kaynaklı ROS bir ölçüde incelenen bütün genlerin ifadelerini arttırmıştır. Ayrıca, *ERO1* ve *BiP3* ifadelerinin H₂O₂ ile uyarıldığı gösterilmiştir. Bunlara ek olarak, mitokondri ve kloroplast kaynaklı ROS' un ER stresi cevaplarını uyarmada farklı rollere sahip olduğu gösterilmiştir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Aller, I., and Meyer, A. J.** 2013, The oxidative protein folding machinery in plant cells. *Protoplasma*, 250(4), 799-816 pp.
- Alscher, R.G., Erturk, N., and Heath, L.S.** 2002, Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of experimental botany* 53, 1331-1341 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.
- Andersson, M. X., Goksör, M., and Sandelius, A. S.** 2007, Optical manipulation reveals strong attracting forces at membrane contact sites between endoplasmic reticulum and chloroplasts. *Journal of Biological Chemistry*, 282(2), 1170-1174 pp.
- Anelli, T., and Sitia, R.,** 2008. Protein quality control in the early secretory pathway. *EMBO Journal*, 27, 315–27 pp
- Apel, K., and Heribert, H.,** 2004, Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55, 373-99 pp.
- Armengaud, P., Zambaux, K., Hills, A., Sulpice, R., Pattison, R. J., Blatt, M. R., and Amtmann, A.** 2009, EZ-Rhizo: integrated software for the fast and accurate measurement of root system architecture. *The Plant Journal*, 57(5), 945-956 pp.
- Asada K.** 2006, Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology* 141, 391-396 pp.
- Asada, K. and Takahashi, M.** 1987, Production and scavenging of active oxygen in chloroplasts. In: Kyle DJ, Osmond CB, Arntzen CJ, eds. *Photoinhibition*. Amsterdam: Elsevier, 227–287 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bánhegyi, G., Margittai, É., Szarka, A., Mandl, J., and Csala, M.** 2012, Crosstalk and barriers between the electron carriers of the endoplasmic reticulum, Antioxidants and redox signaling, 16(8), 772-780 pp.
- Bannister, W.H., Bannister, J.V., Barra, D., Bond, J., and Bossa, F.** 1991, Evolutionary aspects of superoxide dismutase: the copper/zinc enzyme. Free Radical Research 12, 349-361 pp.
- Baxter A, Mittler R, and Suzuki N** 2014, ROS as key players in plant stress signalling. Journal of Experimental Botany 65, 1229-1240 pp.
- Beauchamp, C., and Fridovich, I.,** 1971, Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Analytical Biochemistry, 44, 276-287 pp.
- Bergmeyer N.** 1970 Methoden der enzymatischen Analyse, vol. 1, Akademie Verlag, Berlin, pp. 636–647
- Bhattacharjee, S.** 2005, Reactive oxygen species and oxidative burst: roles in stress, senescence and signal transduction in plant, Curr. Sci., 89, 1113-1121 pp.
- Bose, J., Rodrigo-Moreno, A., and Shabala, S.** 2014, ROS homeostasis in halophytes in the context of salinity stress tolerance. Journal of Experimental Botany, doi:10.1093/jxb/ert430.
- 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.
- Brodsky, J. L., and Wojcikiewicz, R. J.** 2009, Substrate-specific mediators of ER associated degradation (ERAD). Current opinion in cell biology, 21(4), 516-521 pp.
- Bueso, E., Alejandro, S., Carbonell, P., Perez-Amador, M.A., Fayos, J., Bellés, J.M, Serrano, R.,** 2007, The lithium tolerance of the Arabidopsis cat2 mutant reveals a cross-talk between oxidative stress and ethylene. The Plant Journal 52, 1052-1065 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ceriotti, A.**, 2011, Waste disposal in the endoplasmic reticulum, ROS production and plant salt stress response, *Cell research*, 21(4), 555-557 pp.
- Ceriotti, A., Duranti, M., and Bollini, R.**, 1998, Effects of N-glycosylation on the folding and structure of plant proteins, *Journal of Experimental Botany*, 49(324), 1091-1103 pp.
- Che, P., Bussell, J.D., Zhou, W., Estavillo, G.M., Pogson, B.J., and Smith, S.M.**, 2010, Signaling from the endoplasmic reticulum activates brassinosteroid signaling and promotes acclimation to stress in *Arabidopsis*. *Science Signaling* 3, ra69.
- Cheeseman, J. M.**, 2006, Hydrogen peroxide concentrations in leaves under natural conditions. *Journal of Experimental Botany* 57, 2435-2444 pp.
- Chew, O., Whelan, J., and Millar, A.H.**, 2003, Molecular definition of the ascorbate-glutathione cycle in *Arabidopsis* mitochondria reveals dual targeting of antioxidant defenses in plants. *Journal of Biological Chemistry* 278, 46869-46877 pp.
- Corpas, F.J., Barroso, J.B., and del Río, L.A.** 2001, Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends in Plant Science* 6, 145–150 pp.
- Cramer GR, Urano K, Delrot S, Pezzotti M, Shinozaki K.** 2011. Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC plant biology* 11, 163 pp.
- De Leonardis, S, Dipierro, N, and Dipierro, S.**, 2000, Purification and characterization of an ascorbate peroxidase from potato tuber mitochondria. *Plant Physiology and Biochemistry* 38, 773-779 pp.
- Demiral, T., Turkan, I., and Hediye Sekmen, A.** 2011, Signalling strategies during drought and salinity, recent news. *Advances in Botanical Research*, 57, 294 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- 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. USA 108, 7247–52 pp.
- Dhindsa, R.S., and Cleland, R.E.,** 1975, Water stress and protein synthesis I. Differential inhibition of protein synthesis. Plant physiology 55, 778-781 pp.
- Dietz, K. J., Jacob, S., Oelze, M. L., Laxa, M., Tognetti, V., de Miranda, S. M. N. et al. and Finkemeier, I.** 2006, The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism. Journal of Experimental Botany, 57(8), 1697-1709 pp.
- Dietz, K.J. and Pfannschmidt, T.,** 2011, Novel regulators in photosynthetic redox control of plant metabolism and gene expression. Plant Physiology 155, 1477-1485 pp.
- Dixon, D. P., van Lith, M., Edwards, R., and Benham, A.** 2003, Cloning and initial characterization of the Arabidopsis thaliana endoplasmic reticulum oxidoreductins. Antioxidants and Redox Signaling, 5(4), 389-396 pp.
- Dutilleul, C., Garmier, M., Noctor, G., Mathieu, C., Chétrit, P., Foyer, C. H., and De Paepe, R.** 2003, Leaf mitochondria modulate whole cell redox homeostasis, set antioxidant capacity, and determine stress resistance through altered signaling and diurnal regulation. The Plant Cell Online, 15(5), 1212-1226 pp.
- Dwyer, S.C., Legendre, L., Low, P.S. and Leto, T.L.,** 1996, Plant and human neutrophil oxidative burst complexes contain immunologically related proteins. Biochimica Biophysica Acta 1289, 231–237 pp.
- Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J.H.F., Mylona, P., Miedema, H., Torres, M.A., Linstead, P., Costa S, Brownlee C, Jones JDG, Davies JM, Dolan L.** 2003, Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. Nature, 422, 442-446 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Foyer C.H., and Noctor G.** 2003 Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria, *Physiol. Plant.* 119, 355-364 pp.
- 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.
- Frand, A. R., and Kaiser, C. A.,** 1998, The ERO1 gene of yeast is required for oxidation of protein dithiols in the endoplasmic reticulum. *Molecular cell*, 1(2), 161-170 pp.
- Gadjev, I., Vanderauwera, S., Gechev, T.S., Laloi, C., Minkov, I.N., Shulaev, V., and Van Breusegem, F..** 2006. Transcriptomic footprints disclose specificity of reactive oxygen species signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 141, 436-445 pp.
- Gao, H., Brandizzi, F., Benning, C., and Larkin, R.M.,** 2008. A membrane-tethered transcription factor defines a branch of the heat stress response in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 16398-16403 pp .
- Garcia de la Garma, J., Fernandez - Garcia, N., Bardisi, E., Pallol, B., Asensio - Rubio, J. S., Bru, R., and Olmos, E.** 2015, New insights into plant salt acclimation: the roles of vesicle trafficking and reactive oxygen species signalling in mitochondria and the endomembrane system. *New Phytologist*, 205(1), 216-239 pp.
- Gauss, R., Kanehara, K., Carvalho, P., Ng, D. T., and Aebi, M.,** 2011, A complex of Pdi1p and the mannosidase Htm1p initiates clearance of unfolded glycoproteins from the endoplasmic reticulum. *Molecular cell*, 42(6), 782-793 pp.
- Gechev, T.S., Gadjev, I., Van Breusegem, F., Inzé, D., Dukiandjiev, S., Toneva, V. and Minkov I.** 2002, Hydrogen peroxide protects tobacco from oxidative stress by inducing a set of antioxidant enzymes. *Cellular and Molecular Life Sciences* 59, 708-714 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gechev, T.S., Van Breusegem, F., Stone, J.M., Denev, I., and Laloi, C.,** 2006, Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *Bioessays* 28, 1091-1101 pp.
- Geisler-Lee, J., O'Toole, N., Ammar, R., Provart, N. J., Millar, A. H., and Geisler, M.** 2007, A predicted interactome for Arabidopsis. *Plant physiology*, 145(2), 317-329 pp.
- Gill, F., and Tuteja, N.** 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48, 909-930 pp.
- Griffing, L. R.,** 2011, Laser stimulation of the chloroplast/endoplasmic reticulum nexus in tobacco transiently produces protein aggregates (boluses) within the endoplasmic reticulum and stimulates local ER remodeling. *Molecular plant*, 4(5), 886-895 pp.
- Gross, E., Sevier, C. S., Heldman, N., Vitu, E., Bentzur, M., Kaiser, C. A., ... and Fass, D.** 2006, Generating disulfides enzymatically: reaction products and electron acceptors of the endoplasmic reticulum thiol oxidase Ero1p. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(2), 299-304 pp.
- Hartl, F.U. and Hayer-Hartl, M.** 2009, Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 574–581 pp.
- Hatahet, F., and Ruddock, L. W.** 2009, Protein disulfide isomerase: a critical evaluation of its function in disulfide bond formation. *Antioxidants and redox signaling*, 11(11), 2807-2850 pp.
- Hou, W.C., Liang, H.J., Wang, C.C., and Liu, D.Z.,** 2004, Detection of glutathione reductase after electrophoresis on native or sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 25, 2926-2931 pp.
- Howell, S. H.** 2013, Endoplasmic reticulum stress responses in plants, *Annual review of plant biology*, 64, 477-499 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hu, Y.Q., Liu, S., Yuan, H.M., Li, J., Yan, D.W., Zhang, J.F., Lu, Y.T.** 2010, Functional comparison of catalase genes in the elimination of photorespiratory H₂O₂ using promoter-and 3'-untranslated region exchange experiments in the Arabidopsis cat2 photorespiratory mutant. *Plant, cell and environment* 33, 1656-1670 pp.
- Hunter, B. G., Beatty, M. K., Singletary, G. W., Hamaker, B. R., Dilkes, B. P., Larkins, B. A., and Jung, R.** 2002, Maize opaque endosperm mutations create extensive changes in patterns of gene expression. *The Plant Cell Online*, 14(10), 2591-2612 pp.
- Hurtley, S. M. and Helenius, A.,** 1989, Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum. *Annual Review of Cell Biology*, 5(1), 277-307 pp.
- Hwang, C. J. S. A., Sinskey, A. J., and Lodish, H. F.** 1992, Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum, *Science*, 257(5076), 1496-1502 pp.
- Irsigler, A. S., Costa, M. D., Zhang, P., Reis, P. A., Dewey, R. E., Boston, R. S., and Fontes, E. P.,** 2007, Expression profiling on soybean leaves reveals integration of ER-and osmotic-stress pathways. *BMC genomics*, 8(1), 431 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 of the United States of America*, 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.
- Iwata, Y., Fedoroff, N. V., and Koizumi, N.,** 2008, Arabidopsis bZIP60 is a proteolysis-activated transcription factor involved in the endoplasmic reticulum stress response. *The Plant Cell Online*, 20(11), 3107-3121 pp.
- Jaspers, P., and Kangasjärvi, J.,** 2010, Reactive oxygen species in abiotic stress signaling. *Physiologia Plantarum*, 138(4), 405-413 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- 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, 1022-1030 pp.
- Jin, Y., Zhuang, M., and Hendershot, L. M.** 2008, ERdj3, a luminal ER DnaJ homologue, binds directly to unfolded proteins in the mammalian ER: identification of critical residues†. *Biochemistry*, 48(1), 41-49 pp.
- Kahle, J., Baake, M., Doenecke, D., and Albig, W.** 2005. Subunits of the heterotrimeric transcription factor NF-Y are imported into the nucleus by distinct pathways involving importin β and importin 13. *Molecular and cellular biology*, 25(13), 5339-5354 pp.
- Kamauchi, S., Nakatani, H., Nakano, C.,and Urade, R.** 2005. Gene expression in response to endoplasmic reticulum stress in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Journal*, 272, 3461–7346 pp.
- Kaneko, M., and Nomura, Y.** 2003, ER signalling in unfolded protein response. *Life Sciences* 74, 199-205 pp.
- Karpinski, S., Reynolds, H., Karpinska, B., Wingsle, G., Creissen, G., and Mullineaux, P.** 1999, Systemic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. *Science* 284, 654-657 pp.
- Kaufman, R. J.;** 2002, Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *The Journal of clinical investigation*, 110, 1389-1398 pp .
- Kawano, T.**, 2003, Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction. *Plant Cell Reports* 21, 829–837 pp.
- Keller, T., Damude, H.G., Werner, D., Doerner, P., Dixon, R.A. and Lamb, C.**, 1998.A plant homolog of the neutrophil NADPH oxidase gp91phox subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca^{2+} binding motifs. *Plant Cell* 10, 255–266 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- 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 physiology*, 118, 637-650 pp.
- Koiwa, H., Li, F., McCully, M. G., Mendoza, I., Koizumi, N., Manabe, Y., ... and Hasegawa, P. M.** 2003, The STT3a subunit isoform of the Arabidopsis oligosaccharyltransferase controls adaptive responses to salt/osmotic stress. *The Plant Cell Online*, 15(10), 2273-2284 pp.
- Koizumi, N., Martinez, I. M., Kimata, Y., Kohno, K., Sano, H., and Chrispeels, M. J.** 2001, Molecular characterization of two Arabidopsis Ire1 homologs, endoplasmic reticulum-located transmembrane protein kinases. *Plant Physiology*, 127(3), 949-962 pp.
- Koizumi, N., Ujino, T., Sano, H., and Chrispeels, M. J.,** 1999, Overexpression of a gene that encodes the first enzyme in the biosynthesis of asparagine-linked glycans makes plants resistant to tunicamycin and obviates the tunicamycin-induced unfolded protein response. *Plant physiology*, 121(2), 353-362 pp.
- Krieger-Liszkay, A., Fufezan, C., and Trebst, A.,** 2008, Singlet oxygen production in photosystem II and related protection mechanism. *Photosynthesis Research*, 98(1-3), 551-564 pp.
- Kwak, J.M., Mori, I.C., Pei, Z.M., Leonhardt, N., Torres, M.A., Dangl, J.L., and Schroeder, J.I.,** 2003, NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in Arabidopsis. *The EMBO journal* 22, 2623-2633 pp.
- Laemmli, U.K.** 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685 pp.
- Lai, A.G., Doherty, C.J., Mueller-Roeber, B, Kay S.A., Schippers, J.H., and Dijkwel ,P.P.,** 2012, CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED 1 regulates ROS homeostasis and oxidative stress responses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109,17129-17134 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Laloi, C., Stachowiak, M., Pers-Kamczyc, E., Warzych, E., Murgia, I., and Apel, K.,** 2007, Cross-talk between singlet oxygen-and hydrogen peroxide-dependent signaling of stress responses in *Arabidopsis thaliana*. Proceedings of the National Academy of Sciences 104, 672-677 pp.
- Laloi, C., Apel, K., and Danon, A.** 2004, Reactive oxygen signalling: the latest news. Current Opinion in Plant Biology, 7, 323–328 pp.
- Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, and Shacter E.**1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. Methods in Enzymology 233, 346-357 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.
- Liu, J.X., Srivastava, R., Che, P., and Howell, S.H.,** 2007, Salt stress responses in *Arabidopsis* utilize a signal transduction pathway related to endoplasmic reticulum stress signaling. The Plant Journal 51, 897-909 pp.
- Liu, L., Cui, F., Li, Q., Yin, B., Zhang, H., Lin, B., Wu, Y., Xia, R., Tang, S., and Xie, Q.,.** 2011, The endoplasmic reticulum associated degradation is necessary for plant salt tolerance. Cell Research 21, 957- 969 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 Online, 22(3), 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, Plant Cell, 22, 2930–2942 pp.
- Loew, O.,** 1900, A new enzyme of general occurrence in organisms. Science, 701-702 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- 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(3), 199-210 pp.
- Madhava Rao, K.V., and Sresty, T.V.S.,** 2000. Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses. *Plant Science* 157, 113-128 pp.
- Marshall, R.S., Jolliffe, N.A., Ceriotti, A., Snowden, C.J., Lord, J.M., Frigerio, L., and Roberts, L.M.,** 2008, The role of CDC48 in the retro-translocation of non-ubiquitinated toxin substrates in plant cells. *Journal of Biological Chemistry* 283, 15869-15877 pp.
- Martinez, I.M. and Chrispeels, M.J.** 2003. Genomic analysis of the unfolded protein response in *Arabidopsis* shows its connection to important cellular processes, *Plant Cell*, 15, 561–576 pp.
- Martínez, I. M., and Chrispeels, M. J.** 2003, Genomic analysis of the unfolded protein response in *Arabidopsis* shows its connection to important cellular processes. *The Plant Cell Online*, 15(2), 561-576 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*, pcu018.
- Marzec, M., Eletto, D., and Argon, Y.,** 2012, GRP94: An HSP90-like protein specialized for protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1823, 774-787 pp.
- Masters, C.J.,** 2001, Cellular signalling: the role of the peroxisome. *Cell Signal* 8, 197–208 pp.
- McClung, C.R.,** 1997, Regulation of catalases in *Arabidopsis*. *Free Radical Biology and Medicine* 23, 489-496 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mehrshahi, P., Stefano, G., Andaloro, J. M., Brandizzi, F., Froehlich, J. E., and DellaPenna, D.**, 2013, Transorganellar complementation redefines the biochemical continuity of endoplasmic reticulum and chloroplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(29), 12126-12131 pp.
- Michalak, M., Groenendyk, J., Szabo, E., Gold, L.I., and Opas, M.** 2009. Calreticulin, a multi-process calciumbuffering chaperone of the endoplasmic reticulum, *Biochem. Journal*, 417, 651–666 pp.
- Millar, A.H., Whelan, J., Soole, K.L., and Day, D.A.** 2011, Organization and regulation of mitochondrial respiration in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 62, 79–104 pp.
- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S., and Mittler, R.**, 2010, Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell and environment* 33, 453-467 pp.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki N, Miller G, Tognetti VB, Vandepoele K, and Van Breusegem, F.** 2011, ROS signaling: the new wave? *Trends in Plant Science* 16, 300-309 pp.
- Mittler, R.**, 2002, Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7, 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, 490–498 pp.
- Molinari, M.** 2007, N-glycan structure dictates extension of protein folding or onset of disposal. *Nature chemical biology*, 3(6), 313-320 pp.
- Moller, I.M.** 2001, Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species, *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 52, 561-591 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Molteni, S. N., Fassio, A., Ciriolo, M. R., Filomeni, G., Pasqualetto, E., Fagioli, C., and Sitia, R.,** 2004; Glutathione limits Ero1-dependent oxidation in the endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry*, 279(31), 32667-32673 pp.
- Moreno, A. A., Mukhtar, M. S., Blanco, F., Boatwright, J. L., Moreno, I., Jordan, M. R., ... and Pajeroska-Mukhtar, K. M.** 2012, IRE1/bZIP60-mediated unfolded protein response plays distinct roles in plant immunity and abiotic stress responses, *PLoS One*, 7(2), e31944.
- Mori, K.** 2000, Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell*, 101(5), 451-454 pp.
- Nagashima, Y., Mishiba, K. I., Suzuki, E., Shimada, Y., Iwata, Y., and Koizumi, N.** 2011, Arabidopsis IRE1 catalyses unconventional splicing of bZIP60 mRNA to produce the active transcription factor. *Scientific reports*, 1.
- Nakano, Y., and Asada K.** 1981, Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* 22, 867-880 pp.
- Noctor, G., and Foyer, C.H.** 1998, Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review 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.
- Onda, Y., Kumamaru, T., and Kawagoe, Y.** 2009, ER membrane-localized oxidoreductase Ero1 is required for disulfide bond formation in the rice endosperm. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(33), 14156-14161 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Orendi, G., Zimmermann, P., Baar, C., and Zentgraf, U.** 2001, Loss of stress-induced expression of catalase3 during leaf senescence in *Arabidopsis thaliana* is restricted to oxidative stress. *Plant Science*, 161(2), 301-314 pp.
- Otero, J.H., Lizak, B., and Hendershot, L.M.** 2010, Life and death of a BiP substrate, *Semin. Cell Dev. Biol.* 21, 472–478 pp.
- Ozgun, 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, 1377-1390 pp.
- Pattison, R. J., and Amtmann, A.** 2009, N-glycan production in the endoplasmic reticulum of plants. *Trends in plant science*, 14(2), 92-99 pp.
- Pitzschke, A., Forzani, C., and Hirt, H.** 2006, Reactive Oxygen Species Signaling in Plants. *Antioxidants and Redox Signalling*, 8, 1757-1764 pp.
- Quan, L.J., Zhang, B., Shi, W.W., Li, H.Y.** 2008, Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network, *J. Integrat. Plant Biol* 50, 2-18 pp.
- 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, 58-69 pp.
- Queval, G., Issakidis-Bourguet, E, Hoeberichts FA, Vandorpe M, Gakière B, Vanacker H, and Noctor, G.,** 2007, Conditional oxidative stress responses in the *Arabidopsis* photorespiratory mutant *cat2* demonstrate that redox state is a key modulator of daylength-dependent gene expression, and define photoperiod as a crucial factor in the regulation of H₂O₂-induced cell death. *The Plant Journal* 52, 640-657 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Regelsberger, G., Jakopitsch, C., Plasser, L., Schwaiger, H., Furtmüller, P.G., Peschek, G.A., Obinger, C.,** 2002, Occurrence and biochemistry of hydroperoxidases in oxygenic phototrophic prokaryotes (cyanobacteria). *Plant Physiology and Biochemistry* 40, 479-490 pp.
- Rhoads, D.M., Umbach, A.L., Subbaiah, C.C., and Siedow, J.N.** 2006, Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling. *Plant Physiol*, 141, 357-366 pp.
- Riemer, J., Bulleid, N., and Herrmann, J. M.** 2009, Disulfide formation in the ER and mitochondria: two solutions to a common process. *Science*, 324(5932), 1284-1287 pp.
- Rutkowski, D. T., and Kaufman, R. J.** 2004, A trip to the ER: coping with stress. *Trends in cell biology*, 14(1), 20-28 pp.
- Sanderfoot, A. A., and Raikhel, N. V.,** 2003, The secretory system of Arabidopsis, *The Arabidopsis Book*, 1-24 pp.
- Sarwat M, Naqvi AR.** 2013. Heterologous expression of rice calnexin (OsCNX) confers
- Scandalios, J.G.** 1993, Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiology* 101, 7–12 pp.
- Sevier, C.S., and Kaiser, C.A.,** 2008. Ero1 and redox homeostasis in the endoplasmic reticulum. *Biochimica et Biophysica Acta* 1783, 549-556 pp.
- Sewelam, N., Jaspert, N., Van Der Kelen, K., Tognetti, V.B., Schmitz, J., Frerigmann, H., and Maurino, V.G.,** 2014. Spatial H₂O₂ Signalling Specificity: H₂O₂ from Chloroplasts and Peroxisomes Modulates the Plant Transcriptome Differentially. *Molecular Plant*, ssu070.
- Shen, J., Snapp, E.L., Lippincott-Schwartz, J., and Prywes, R.,** 2005. Stable binding of ATF6 to BiP in the endoplasmic reticulum stress response. *Mol. Cell. Biol.* 25, 921–932 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Shigeoka, S., Ishikawa, T., Tamoi, M., Miyagawa, Y., Takeda, T., Yabuta, Y., and Yoshimura K,** 2002, Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany* 53, 1305-1319 pp.
- Siefers, N., Dang, K. K., Kumimoto, R. W., Bynum, W. E., Tayrose, G., and Holt, B. F.** 2009, Tissue-specific expression patterns of Arabidopsis NF-Y transcription factors suggest potential for extensive combinatorial complexity. *Plant physiology*, 149(2), 625-641 pp.
- Sinclair, A. M., Trobacher, C. P., Mathur, N., Greenwood, J. S., and Mathur, J.** 2009, Peroxule extension over ER-defined paths constitutes a rapid subcellular response to hydroxyl stress. *The Plant Journal*, 59(2), 231-242 pp.
- Smith, M. H., Ploegh, H. L., and Weissman, J. S.** ,2011, Road to ruin: targeting proteins for degradation in the endoplasmic reticulum. *Science*, 334(6059), 1086-1090 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.
- Srivastava, R., Chen, Y., Deng, Y., Brandizzi, F., and Howell, S.H.** 2012, Elements proximal to and within the transmembrane domain mediate the organelle-to-organelle movement of bZIP28 under ER stress conditions, *Plant Journal*, 70, 1033–1042 pp.
- Staehelin, L. A.** 1997, The plant ER: a dynamic organelle composed of a large number of discrete functional domains. *The Plant Journal*, 11(6), 1151-1165 pp.
- Stefano, G., Hawes, C., and Brandizzi, F.** 2014, ER—the key to the highway. *Current opinion in plant biology*, 22, 30-38 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Su, W., Liu, Y., Xia, Y., Hong, Z., and Li, J.,** 2011, Conserved endoplasmic reticulum-associated degradation system to eliminate mutated receptor-like kinases in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 870-875 pp.
- Suzuki, N., Miller, G., Morales, J., Shulaev, V., Torres, M.A., and Mittler, R.,** 2011, Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 14, 691-699 pp.
- Sweetlove, L.J., and Foyer, C.H.** 2004, Roles for reactive oxygen species and antioxidants in plant mitochondria. in: D.A. Day, A.H. Millar, J. Whelan (Eds.), *Plant Mitochondria: From Genome to Function, Advances in Photosynthesis and Respiration*, vol. 1. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands, 307-320 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, 242-247 pp.
- Takahashi, M., and Asada, K.** 1988, Superoxide production in aprotic interior of chloroplast thylakoids. *Archives of biochemistry and biophysics*, 267(2), 714-722 pp.
- Takahashi, M.A., and Asada, K.** 1983, Superoxide anion permeability of phospholipid membranes and chloroplast thylakoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 226, 558-566 pp.
- Taylor, S. C., Thibault, P., Tessier, D. C., Bergeron, J. J., and Thomas, D. Y.,** 2003, Glycopeptide specificity of the secretory protein folding sensor UDP-glucose glycoprotein: glucosyltransferase. *EMBO reports*, 4(4), 405-411 pp.
- Torres, M.A., Jones, J.D., and Dangl, J.L.,** 2005, Pathogen-induced, NADPH oxidase-derived reactive oxygen intermediates suppress spread of cell death in Arabidopsis thaliana. *Nature Genetics*, 37, 1130-1134 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tu, B.P., and Weissman, J.S.** 2004, Oxidative protein folding in eukaryotes mechanisms and consequences. *The Journal of Cell Biology* 164, 341-346 pp.
- Türkan, I., and Demiral, T.** 2009, Recent developments in understanding salinity tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, 67(1), 2-9 pp.
- Urade, R.,** 2007, Cellular response to unfolded proteins in the endoplasmic reticulum of plants. *Febs Journal*, 274(5), 1152-1171 pp.
- Vitale, A., and Denecke, J.,** 1999. The endoplasmic reticulum—Gateway of the secretory pathway. *The Plant Cell Online* 11, 615-628 pp.
- Vitale, A. and Boston, R.S.** 2008, Endoplasmic reticulum quality control and the unfolded protein response: insights from plants, *Traffic*, 9, 1581-1588 pp.
- Wagner, D., Przybyla, D., den Camp, R., Kim, C., Landgraf, F., Lee, K.P., Wursch, M., Laloi, C., Nater, M., Hideg, E., and Apel K.,** 2004, The genetic basis of singlet oxygene induced stress responses of *Arabidopsis thaliana*, *Science* 306, 1183-1185 pp.
- Walter, P., and Ron, D.,** 2011, The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic, *Regulation, Science*, 334, 1081–1086 pp.
- Watanabe, N. and Lam, E.,** 2008. BAX inhibitor-1 modulates endoplasmic reticulum stress-mediated programmed cell death in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* 283, 3200-3210 pp.
- Wrzaczek, M., Brosche, M. and Kangasjarvi, J.** 2013, ROS signaling loops — production, perception, regulation. *Current Opinion in Plant Biology*, 16, 575–582 pp.
- Xie, Y. J., Xu, S., Han, B., Wu, M. Z., Yuan, X. X., Han, Y., ... and Shen, W. B.** 2011, Evidence of *Arabidopsis* salt acclimation induced by up-regulation of HY1 and the regulatory role of RbohD-derived reactive oxygen species synthesis. *The Plant Journal*, 66(2), 280-292 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yamamoto M, Maruyama D, Endo T, and Nishikawa S.** 2008, *Arabidopsis thaliana* has a set of J proteins in the endoplasmic reticulum that are conserved from yeast to animals and plants. *Plant Cell Physiol*, 49, 1547–1562 pp
- Yoshida, H., Okada, T., Haze, K., Yanagi, H., and Yura, T.,** 2001, Endoplasmic reticulum stress induced formation of transcription factor complex ERSF including NF-Y (CBF) and activating transcription factors 6α and 6β that activates the mammalian unfolded protein response. *Mol. Cell. Biol*, 21, 1239–1248 pp.
- Young, T. E., and Gallie, D. R.,** 2000, Programmed cell death during endosperm development. In *Programmed Cell Death in Higher Plants* (pp. 39-57). Springer Netherlands.
- Zhang, H., Ohyama, K., Boudet, J., Chen, Z., Yang, J., Zhang, M., and Gong, Z.,** 2008, Dolichol biosynthesis and its effects on the unfolded protein response and abiotic stress resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 20, 1879-1898 pp.

ÖZGEÇMİŞ

Rengin Özgür Uzilday, 15.12.1984'de İzmir'de doğmuştur. 2002'de İzmir Atatürk (Anadolu) Lisesi'nde orta öğrenim hayatını bitirmiştir. Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Çevre Biyolojisi Opsiyonundan 2006 yılında mezun olmuştur. 2006 yılında lisansüstü eğitimine, Prof. Dr. İsmail Türkan danışmanlığında, Ege Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Genel Biyoloji A.B.D.'de başlamıştır. 2006-2007 yıllarında bir yıl süresince 2214 nolu TÜBİTAK bursunu almıştır. Ekim 2007 ile Mart 2010 tarihleri arasında Japonya Devlet Bursu (MEXT) bursuyla Kumamoto Üniversitesi, Bitki Moleküler Biyolojisi Laboratuvarında Prof. Dr. Susumu Takio'nun danışmanlığında "Differential Expression of a Bromoperoxidase-Like Gene between Sporophytes and Gametophytes of a Red Alga, *Porphyra yezoensis*" isimli yüksek lisans tezini tamamlamıştır. Yüksek lisans çalışması 2015 yılında Marine Biotechnology dergisinde yayınlanmıştır (Cilt 17, sayfa: 199-210). Mayıs- Ekim 2014 tarihleri arasında Finlandiya Devlet Bursu (CIMO) ile Helsinki Üniversitesi, Bitki Biyolojisi laboratuvarında Prof.Dr. Jaakko Kangasjarvi gözetiminde çalışmalarda bulunmuştur. Doktora eğitimi süresince "Uyarılmış Endoplazmik Retikulum Stresinin *Arabidopsis thaliana* (Col ve Tin1)'nın Bazı Hücre Organelleri Ve Apoplastında Ros Miktarı, Redoks Dengesi ve Antioksidan Savunma Sistemi Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması" isimli, TÜBİTAK 1001 projelerinde bursiyer olarak çalışmıştır. Bu doktora tez çalışmasından elde edilen veriler 2014 yılında "Journal of Experimental Botany" dergisinde "Endoplasmic reticulum stress triggers ROS signalling, changes the redox state, and regulates the antioxidant defence of *Arabidopsis thaliana*" (cilt no: 65, sayfa 1377-1390) ve 2015 yılında Annals of Botany dergisinde basımı kabul edilen "The effects of induced organellar reactive oxygen species (ROS) production on endoplasmic reticulum (ER) stress and unfolded protein response (UPR) in *Arabidopsis*" isimli iki makale olarak yayınlanmıştır.