



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



**EKSOJEN AKROLEİN UYGULAMASININ
ARABİDOPSIS THALIANA GAMA-GLUTAMİL
TRANSFERAZ (GGT) MUTANTLARI (*ggt1*, *ggt2*,
ggt4, *ggt1/ggt2*) ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Sinem ERÇETİN

Biyoloji Anabilim Dalı

İzmir
2023

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**EKSOJEN AKROLEİN UYGULAMASININ
ARABİDOPSIS THALIANA GAMA-GLUTAMİL
TRANSFERAZ (GGT) MUTANTLARI (*ggt1*, *ggt2*,
ggt4, *ggt1/ggt2*) ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Sinem ERÇETİN

Danışman : Doç. Dr. Barış UZİLDAY

Biyoloji Anabilim Dalı
Genel Biyoloji Yüksek Lisans Programı

İzmir
2023

ÖZET

EKSOJEN AKROLEİN UYGULAMASININ *ARABİDOPSIS THALIANA* GAMA-GLUTAMİL TRANSFERAZ (GGT) MUTANTLARI (*ggt1*, *ggt2*, *ggt4*, *ggt1/ggt2*) ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ERÇETİN, Sinem

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Barış UZILDAY

Haziran 2023, 51 sayfa

Bitkilerde reaktif karbonil türlerinin (RCS) oluşumu reaktif oksijen türleri (ROS) ile doğrudan ilişkilidir. Stres koşullarında ROS seviyelerinin artmasıyla birlikte membran lipitleri oksitlenmektedir. Bunun sonucunda reaktif karbonil türleri (RCS) oluşmaktadır. RCS detoksifikasyonunda beş farklı enzim görevlidir. Glutasyon ise hem indirgenmiş formu olarak hem de RCS ile konjugat oluşturarak RCS detoksifikasyonuna katkı sağlamaktadır. Ancak glutasyon bu anlamda kullanıldığında havuz boyutu giderek küçülmektedir. Glutasyon katabolizmasında yer alan ekstrasitozolik bir enzim olan gama-glutamil transferaz (GGT) enziminin izozimleri, apoplastta GGT1 ve GGT2 okside glutasyonu parçalamakta görevli iken; vakuolde GGT4 enzimi glutasyon konjugatlarını parçalayarak detoksifikasyona katkı sağlamaktadır. Bu çalışmada, GGT enzimlerinin olmadığı mutantlara en toksik RCS olan akrolein dışarıdan verilerek bitkilerin bu koşullara karşı tepkisi karşılaştırılmıştır.

Anahtar Sözcükler: ROS, RCS, glutasyon, gama-glutamil transferaz (GGT), akrolein

ABSTRACT**INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF EXOGENOUS ACROLEIN
TREATMENT IN ARABIDOPSIS THALIANA GAMMA-GLUTAMYL
TRANSFERASE (GGT) MUTANTS (*ggt1*, *ggt2*, *ggt4* and *ggt1/ggt2*)**

ERÇETİN, Sinem

MSc in Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Barış UZILDAY

June 2023, 51 pages

The formation of reactive carbonyl species (RCS) in plants is directly related to reactive oxygen species (ROS). Membrane lipids are oxidized with the increase of ROS levels under stress conditions. As a result, reactive carbonyl species (RCS) are formed. Five different enzymes are involved in the detoxification of RCS. Glutathione, on the other hand, contributes to RCS detoxification both in its reduced form and by forming a conjugate with RCS. However, when this glutathione is used in this sense, the pool size is exhausted. While the isozymes of gamma-glutamyl transferase (GGT), an extracytosolic enzyme involved in glutathione catabolism, are responsible for breaking down oxidized glutathione in the apoplast, GGT1 and GGT2; In the vacuole, the GGT4 enzyme contributes to detoxification by breaking down the glutathione conjugates. In this study, the most toxic RCS, acrolein, was exogenously applied to mutants without GGT enzymes, and the response of plants to these conditions were investigated.

Keywords: ROS, RCS, glutathione, gamma-glutamyl transferase (GGT), acrolein



ÖNSÖZ

Bitkilerde stres koşullarında üretimi artan reaktif oksijen türlerinden (ROS) kaynaklanan oksidatif stres sonucunda lipid peroksidasyonu yoluyla reaktif karbonil türlerinin (RCS) üretilmesi ve bitkiler üzerindeki etkileri son yıllarda bilim dünyasının ilgisini çekmektedir. Glutasyon metabolizması RCS detoksifikasyonunda önemli rollere sahiptir. Ancak GGT yolağının bu süreçteki görevleri daha önce araştırılmamıştır. Bu nedenle bu tez çalışmasında model organizma olan *Arabidopsis thaliana* Col-0 ekotipinin ve γ -glutamil-transferaz mutantlarının akroleine verdiği yanıtları karşılaştırmalı olarak araştırılması ve stres yanıtlarının incelenmesi amacı ile “Eksojen akrolein uygulamasının *Arabidopsis thaliana* gama-glutamil transferaz (GGT) mutantları (*ggt1*, *ggt2*, *ggt4*, *ggt1/ggt2*) üzerindeki etkilerinin araştırılması” tez konusu olarak belirlenmiştir.

İZMİR

12/07/2023 Sinem ERÇETİN



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1 Reaktif Oksijen Türleri (ROS) ve Antioksidan Savunma Sistemi	5
2.2 Reaktif Karbonil Türleri (RCS).....	7
2.2.1 Reaktif Karbonil Türlerinin (RCS) Reaktif Oksijen Türleri (ROS) ile İlişkisi	9
2.2.2 Reaktif Karbonil Türlerinin (RCS) Oluşumu.....	10
2.2.3 Reaktif Karbonil Türlerinin (RCS) Detoksifikasyonu	12
2.3 Glutasyon	15
2.3.1 Glutasyon Metabolizması.....	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM	19
3.1 Bitkilerin Yetiştirilmesi ve Stres Uygulamaları	19
3.1.1 Tohumların Temini.....	19
3.1.2 Tohum Sterilizasyonu	19
3.1.3 Tohumların Ekimi.....	19
3.1.4 Akrolein Uygulaması.....	19
3.2 Fizyolojik Parametreler	20
3.2.1 Büyüme Parametreleri.....	20
3.2.2 Fotosentetik Verim.....	20
3.3 Gen İfadelerinin Kantitatif RT-PCR (qRT-PCR) ile Ölçümü.....	20
3.4 Biyokimyasal Parametreler	22
3.4.1 Antioksidan Enzim Ekstraksiyonu ve Aktivite Analizleri	22
3.5 Total Glutasyon Miktarının Belirlenmesi.....	24
3.6 İstatistiksel Analizler.....	24

4. BULGULAR.....	25
4.1 Fizyolojik Parametreler	25
4.1.1 Yaş Ağırlık.....	25
4.1.2 Fotosentetik Verim.....	25
4.2 Gen İfadeleri.....	26
4.2.1 ROS Sinyallemesinden sorumlu NADPH Oksidaz Genlerinin İfadeleri.....	26
4.2.2 Gama-Glutamil Transferaz Genlerinin İfadeleri	27
4.2.3 5-Oksoprolinaz Geninin İfadesi	27
4.2.4 Zinc Finger Protein 12 Geninin İfadesi	28
4.2.5 Glutasyon Biyosentezinden Sorumlu Genlerin İfadeleri.....	29
4.2.6 RCS Detoksifikasyonunda Görevli Genlerin İfadeleri	29
4.2.7 Glutasyon Transferaz Tau Sınıfı Genlerin İfadeleri.....	30
4.2.8 Glutasyon Peroksidaz Genlerinin İfadeleri	31
4.3 Enzim Aktiviteleri	32
4.3.1 Askorbat Peroksidaz (APX) Enzim Aktivitesi	32
4.3.2 Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesi	32
4.3.3 Peroksidaz (POX) Enzim Aktivitesi.....	33
4.3.4 Glutasyon Redüktaz (GR) Enzim Aktivitesi	34
4.3.5 Glutasyon Transferaz (GST) Enzim Aktivitesi	35
4.4 Total Glutasyon Miktarı	35
5. TARTIŞMA.....	37
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	41
KAYNAKLAR DİZİNİ	42
TEŞEKKÜR.....	51
ÖZGEÇMİŞ	52

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1 ROS oluşumu ve antioksidan savunma sistemi (Gill ve Tuteja, 2010'dan Türkçeye çevrildi).....	5
Şekil 2.2 RCS ve ilgili bileşiklerin örnekleri (Mano, 2012'den Türkçeye çevrildi).....	6
Şekil 2.2.2 Serbest radikaller veya 1O_2 aracılığıyla PUFA'dan RCS oluşumu. L•, lipid radikali; LO•, lipid alkoksi radikali; LOO•, peroksil radikali (Yalcinkaya vd., 2019'dan Türkçeye çevrildi)...	11
Şekil 2.3.1 Arabidopsis'te glutatyon biyosentezi ve degradasyonu. (Dorion vd., 2021'den değiştirilerek alınmıştır).....	17
Şekil 4.1.1 (a) Col-0, <i>ggt1</i> , <i>ggt2</i> , <i>ggt4</i> ve L5 bitkilerinin kontrol, 0,5 mM, 1,5 mM ve 3 mM akrolein yaş ağırlıkları üzerine etkisi (b) MS ortamında yetiştirilen deney grupları	24
Şekil 4.1.2 Col-0, <i>ggt1</i> , <i>ggt2</i> ve <i>ggt4</i> bitkilerine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki akroleinin fotosentetik verime olan etkisi	25
4.2.1 Col-0, <i>ggt1</i> , <i>ggt2</i> , <i>ggt4</i> bitkilerine uygulanan 1,5mM konsantrasyonundaki akroleinin (a) <i>RBOHD</i> ve (b) <i>RBOHF</i> genleri üzerine etkisi	25
Şekil 4.2.2 Col-0, <i>ggt1</i> , <i>ggt2</i> , <i>ggt4</i> bitkilerine uygulanan 1,5mM konsantrasyonundaki akroleinin (a) <i>AtGGT1</i> ve (b) <i>AtGGT2</i> genleri üzerine etkisi	26
Şekil 4.2.3 Col-0, <i>ggt1</i> , <i>ggt2</i> , <i>ggt4</i> bitkilerine uygulanan 1,5mM konsantrasyonundaki akroleinin <i>OXF1</i> geni üzerine etkisi.....	27
Şekil 4.2.4 Col-0, <i>ggt1</i> , <i>ggt2</i> , <i>ggt4</i> bitkilerine uygulanan 1,5mM konsantrasyonundaki akroleinin <i>ZAT12</i> geni üzerine etkisi	27
Şekil 4.2.5 Col-0, <i>ggt1</i> , <i>ggt2</i> , <i>ggt4</i> bitkilerine uygulanan 1,5mM konsantrasyonundaki akroleinin (a) <i>GSH1</i> ve (b) <i>GSH2</i> genleri üzerine etkisi	28
Şekil 4.2.6 Col-0, <i>ggt1</i> , <i>ggt2</i> , <i>ggt4</i> bitkilerine uygulanan 1,5mM konsantrasyonundaki akroleinin (a) <i>ALDH7B4</i> ve (b) <i>AKR4C9</i> genleri üzerine etkisi	29

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.2.7 Col-0, <i>ggt1</i> , <i>ggt2</i> , <i>ggt4</i> bitkilerine uygulanan 1,5mM konsanstrasyonundaki akroleinin (a) <i>GSTU2</i> ve (b) <i>GSTU3</i> (c) <i>GSTU4</i> ve (d) <i>GSTU5</i> genleri üzerine etkisi.....	29
Şekil 4.2.8 Col-0, <i>ggt1</i> , <i>ggt2</i> , <i>ggt4</i> bitkilerine uygulanan 1,5mM konsanstrasyonundaki akroleinin (a) <i>GPX1</i> ve (b) <i>GPX2</i> (c) <i>GPX3</i> (d) <i>GPX4</i> (e) <i>GPX5</i> (f) <i>GPX6</i> (g) <i>GPX7</i> ve (g) <i>GPX8</i> genleri üzerine etkisi.....	30
Şekil 4.3.1 Col-0, <i>ggt1</i> , <i>ggt2</i> , <i>ggt4</i> bitkilerine uygulanan farklı konsanstrasyonlardaki akroleinin APX enzimi aktivitesi.....	31
Şekil 4.3.2 Col-0, <i>ggt1</i> , <i>ggt2</i> , <i>ggt4</i> bitkilerine uygulanan farklı konsanstrasyonlardaki akroleinin CAT enzimi aktivitesi.....	32
Şekil 4.3.3 Col-0, <i>ggt1</i> , <i>ggt2</i> , <i>ggt4</i> bitkilerine uygulanan farklı konsanstrasyonlardaki akroleinin POX enzimi aktivitesi.....	33
Şekil 4.3.4 Col-0, <i>ggt1</i> , <i>ggt2</i> , <i>ggt4</i> bitkilerine uygulanan farklı konsanstrasyonlardaki akroleinin GR enzimi aktivitesi	33
Şekil 4.3.5 Col-0, <i>ggt1</i> , <i>ggt2</i> , <i>ggt4</i> bitkilerine uygulanan farklı konsanstrasyonlardaki akroleinin GST enzimi aktivitesi	34
Şekil 4.4 Farklı konsantrasyonlardaki akrolein uygulanan Col-0, <i>ggt1</i> , <i>ggt2</i> ve <i>ggt4</i> bitkilerinin toplam glutatyon miktarları.....	35

ÇİZELGELER DİZİNİSayfa

Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan genler ve primerlerin tam listesi.....	20
--	----





KISALTMALAR DİZİNİKısaltmalarAçıklama

ROS

Reaktif oksijen türleri

RCS

Reaktif karbonil türleri

LOOH

Lipit peroksitleri

PUFA

Çoklu doymamış yağ asitleri

MDA

Malondialdehit

ACR

Akrolein

GSH

İndirgenmiş glutatyon

GSSG

Oksitlenmiş glutatyon

GGT

Gama-glutamil transferaz

PCD

Programlanmış hücre ölümü

RBOH

Respiratory burst oksidaz
homoloğu

SOD

Süperoksit dizmutaz

APX

Askorbat peroksidaz

KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
CAT	Katalaz
GR	Glutasyon redüktaz
GPX	Glutasyon peroksidaz
MDAR	Monodehidroaskorbat redüktaz
DHAR	Dehidroaskorbat redüktaz
PRX	Peroksidaz tip II peroksiredoksin
MVK	Metilvinilketon
JA	Jasmonik asit
OPDA	12-okso-fitodienik asit
DNPH	Dinitrofenil hidrazin
LOX	Lipoksijenaz





1. GİRİŞ

İklim değışikliğı, Dünya'daki abiyotik ve biyotik bileşenleri etkileyen çevresel koşullardaki çok yönlü bir değışiklikler. İklim değışikliğıyle birlikte yüksek CO₂, tuzluluk, kuraklık, aşırı sıcaklık, metal toksisitesi, ultraviyole ışınlar ve pestisitlerin yanı sıra patojen enfeksiyonu gibi birçok abiyotik ve biyotik stres koşulunda reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi ciddi bir şekilde artarak bitkilerde oksidatif strese yol açmaktadır (Chaudhry ve Sidhu, 2022; Mittler, 2017).

Artan reaktif oksijen türleri lipit peroksitleri (LOOH) oluşturmak üzere hücre zarındaki lipitleri oksitler, LOOH'lerin bozunmasıyla birlikte reaktif karbonil türleri (RCS) üretilmektedir (Blée, 1998; Mano, 2012). Bitkilerde normal fizyolojik koşullarda da üretilen RCS, stres koşullarında üretimi artan ROS'un oksidasyon ürünleridir. Aşırı miktarda üretilen RCS'nin birikimi, bitkilerin oksidatif hasarına aracılık edebilecekleri için toksiktir (Biswas ve Mano, 2016; Srivastava vd., 2017). Aynı karbon zinciri uzunluğundaki RCS, doymuş karbonillerden daha toksiktir (Mano vd., 2009). RCS'nin biyolojik etkileri, karbonil türünün hücre içindeki konsantrasyonuna ek olarak kimyasal reaktivitesine de bağlıdır. Bu reaktivite nedeniyle MDA ve formaldehit gibi nispeten daha zayıf RCSler çok yüksek konsantrasyonlarda toksik olabilirken, akrolein (ACR) ve 4-hidroksi-trans-2-nonenal (HNE) gibi reaktivitesi yüksek türler hücre metabolizmayı çok daha düşük seviyelerde etkilemektedir (Mano, 2012). RCSler arasında en yüksek reaktiviteye dolayısıyla da en yüksek toksik etkiye sahip bileşik akroleindir (Esterbauer vd., 1991).

Mano vd. (2009) yaptığı bir araştırmada, canlı hücrede oluştuğı bilinen 17 aldehit türü seçilmiş ve bunların *Spinacia oleracea* L. yapraklarından izole edilen kloroplastlardaki fotosentetik reaksiyonlara karşı toksisitesi değerlendirilmiştir. Akrolein, stromada tiyol tarafından regüle edilen enzimleri inaktive ederek izole kloroplastlarda fotosentez için en yüksek inhibisyonu göstermiştir. Calvin döngüsünün, LOOH türevli aldehitlere tilakoid elektron taşıma zincirinden daha duyarlı olduğu belirtilmiştir. Kloroplastlara uygulanan akrolein muamelesinde plastidlerde glutatyon miktarının azalması enzim inaktivasyonundan daha hızlı

gerçekleşmiştir. Glutasyon (GSH) spesifik olarak akroleine karşı birincil savunma görevi göstermiştir. Sonuçta GSH, RCS detoksifikasyonunda kullanıldığı zaman toplam glutasyon havuzu (indirgenmiş ve oksitlenmiş formlar) azalmaktadır. GSH'nin redoks durumu hem GSH/GSSG oranına hem de havuz boyutuna bağlıdır. Tükenmesi durumunda tiyol redoks durumu değişmektedir (Foyer ve Noctor, 2011). GSH'nin savunma kapasitesindeki azalma, RCS ile modifikasyon yoluyla çeşitli hedef proteinlerin inaktivasyonunu daha da hızlandırmaktadır ve Calvin döngüsü, sitrik asit döngüsü ve fotorespirasyon gibi birincil metabolik yollar engellenmektedir. Bununla birlikte oksidatif strese bağlı hücrel hasar artmaktadır (Mano, 2012). İndirgenmiş glutasyonun oksitlenmiş glutasyon formuna tersinir dönüşümü GSH havuzunu hızla değiştirmektedir (Masi vd, 2002; Ferreti vd, 2009). Bazı ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcı proteinleri GSH konjugatlarını vakuole taşımaktadır (Rea, 2007). Bir kere vakuole taşındığı zaman, GSH'yi CysCly ve Glu'ya dönüştüren gama-glutamil döngüsü devreye girmektedir (Masi vd., 2015).

Bitkilerde gama-glutamil döngüsü, γ -glutamil-transferaz (GGT; E.C. 2.3.2.2) ve sis-gli dipeptidaz ile ekstra sitozolik (apoplastik ve vakuolar) glutasyon degradasyonunun metabolik bir yoludur. Bunu, GSH yıkımı sonucunda ortaya çıkan aminoasitlerin yeniden alımı, hücre içi yeniden sentez ve ekstrüzyon takip etmektedir (Ferretti vd., 2009). *Arabidopsis thaliana*'da GGT'ler dört gen tarafından kodlanmaktadır: *GGT1* (At4g39640), *GGT2* (At4g39650), *GGT3* (At1g69820) ve *GGT4* (At4g29210). *GGT1* ve *GGT2* izoformları apoplastta lokalizedir ve γ -glutamil döngüsüne katılmaktadır (Masi vd., 2015). *GGT1* ve *GGT2*, hücre dışı GSSG'yi Glu ve Cys-Gly'ye indirger. *GGT3* bir psödogen olarak kabul edilmektedir. Transkripti saptanmaktadır, ancak katalitik aktivite için bir dizi eksik olduğu için fonksiyonel bir GGT üretimi sağlayamamaktadır (Destro vd., 2011). *GGT4* izoformu ise, GST tarafından katalizlenen GSH konjugatlarının bozunmasını başlatarak detoksifikasyon işlemlerini desteklediği vakuolde bulunmaktadır (Grzam vd., 2007, Ohkama-Ohtsu vd., 2007).

Literatürde bitkilerde karbonil türlerinin araştırılmasıyla ilgili birçok makale bulunmaktadır. Ancak glutasyonun RCS detoksifikasyonundaki etkisinden yola çıkılarak glutasyon metabolizmasında yer alan gama-glutamil döngüsüyle ilişkisine

dair yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasında model bitki *A. thaliana*'nın Col-0 ekotipinin ve γ -glutamil-transferaz mutantlarının akroleine verdiği yanıtlar karşılaştırmalı olarak ilk kez araştırılmış ve stres yanıtları incelenmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

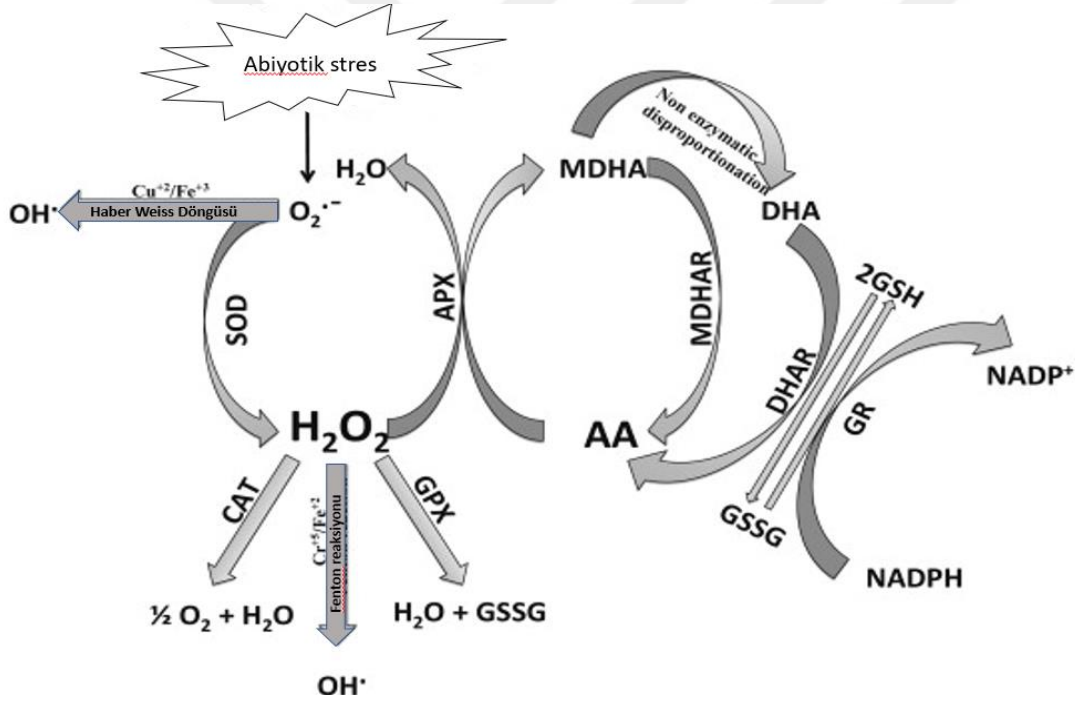
2.1 Reaktif Oksijen Türleri (ROS) ve Antioksidan Savunma Sistemi

Hücrelerde reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi, aerobik yaşamın kaçınılmaz sonucudur. ROS, süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$), peroksil radikalleri ($RO_2^{\cdot-}$), alkoksil radikalleri ($RO^{\cdot}$), hidsoksil radikali ($HO^{\cdot}$) gibi birkaç O_2 türevli radikal için kolektif bir terim olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, radikal olmayan singlet oksijen (1O_2) ve radikal olmayan hidrojen peroksit (H_2O_2) de ROSlar arasındadır (Ozgur vd., 2013). Normal koşullarda bitkilerde ROS'un; gelişme tetikleyici, savunma yanıtı veya programlanmış hücre ölümü (PCD) indükleyici ve nekroza neden olan ajan olmak gibi geniş bir fizyolojik rol yelpazesi vardır ve bunlar oksidatif sinyal olarak adlandırılmaktadır (Mano vd., 2017). Stres olmayan koşullarda ROS sinyali için hayati önem taşıyan kloroplast, mitokondri ve peroksizomlarda ROS üretim hızı oldukça düşüktür. Ancak stres koşullarında üretim hızları ciddi bir biçimde artmakta ve oksidatif strese yol açmaktadır (Mittler, 2017).

Bitkilerde respiratory burst oxidase homolog (RBOH) olarak adlandırılan genler hücre zarında bulunana ve apoplastta $O_2^{\cdot-}$ üretilmesinden sorulu NADPH oksidazları kodlamaktadır (Marino vd., 2012; Wang vd., 2020b). Yapılan araştırmalar, *RBOHC*'nin kök ucu büyümesi ve mekanosensör işlevinde, *RBOHD* ve *RBOHF*'nin patojenlere karşı savunma ve ABA sinyal iletiminde rol oynadığını göstermektedir (Foreman vd., 2003; Torres ve Dangl, 2005; Monshausen ve Gilroy, 2009). Ayrıca *RBOHD*'nin *Arabidopsis thaliana*'da çeşitli abiyotik stres koşullarında sistemik adaptasyonda hızlı bir şekilde ROS sinyalinin iletilmesine aracılık ettiği de gösterilmiştir (Miller vd., 2008). Hücrelerde en büyük ROS kaynakları; fotosentetik dokular için kloroplast, fotosentetik olmayan dokular için ise mitokondridir (Navrot vd., 2007; Takashi ve Murata, 2008). Üçüncü ROS kaynağı ise peroksizomlardır (Foyer ve Noctor, 2009). $HO^{\cdot}$ Gibi bazı ROSlar metabolik kaynakların yanı sıra redoks-aktif metallerin varlığıyla, Fenton reaksiyonları veya Haber-Weiss reaksiyonu ile üretilmektedir (Kehrer, 2000).

Bitkiler hem stres koşullarında aşırı ROS birikimini önlemek, hem de sinyalleşme için uygun ROS seviyelerini korumak için antioksidan savunma

sistemini kullanmaktadır. Antioksidan savunma sisteminde; süperoksit dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1), katalaz (CAT; EC 1.1.1.1.6), peroksidaz (POX; EC 1.1.1.1.7) ve askorbat peroksidaz (APX; EC 1.11.1.11) gibi enzimatik antioksidanlar ve askorbik asit, glutatyon, α -tokoferoller ve β -karotenler gibi enzimatik olmayan antioksidanlar bulunmaktadır. Askorbat-glutatyon döngüsü enzimleri olan monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR; EC 1.6.5.4), dehidroaskorbat redüktaz (DHAR; EC 1.8.5.1), glutatyon redüktaz (GR; EC 1.11.1.9), glutatyon peroksidaz (GPX; EC 1.11.1.9), glutatyon transferaz (GST; EC 1.8.1.7) ve tiyol peroksidaz tip II peroksiredoksin (PRX; EC 1.11.1.15) gibi redoks düzenleyici enzimler, antioksidan savunmanın önemli bileşenleridir. Bu enzimler hem kloroplastta hem de mitokondride ortak olarak ifade edilmektedir (Mittler, 2002).

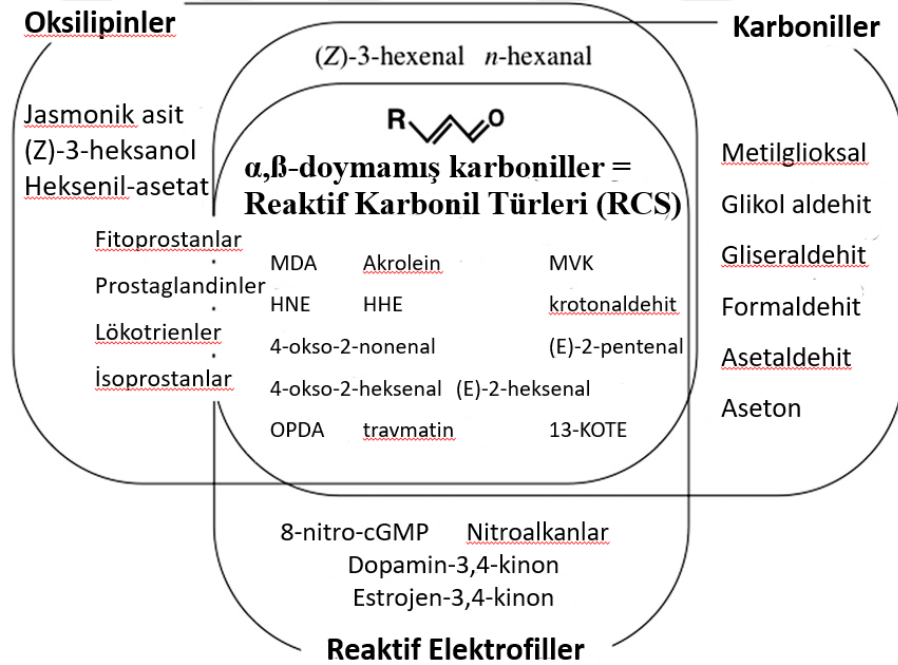


Şekil 2.1 ROS oluşumu ve antioksidan savunma sistemi (Gill ve Tuteja, 2010'dan Türkçeye çevrildi).

2.2 Reaktif Karbonil Türleri (RCS)

Canlı hücrelere yönelik oksidatif uyaranlar sonucunda oluşan lipit peroksitleri, görece kararsızdır. Lipit peroksitleri, oksilipinler adı verilen bileşiklere ayrışmakta veya metabolize edilmektedir. Oksilipinler; farklı karbon zinciri uzunluklarına ve doymamışlık derecelerine göre birçok aldehit ve keton (oksilipin karbonilleri) bulunmaktadır. Oksilipin karbonilleri arasında α,β -doymamış bağı olanlar, yüksek elektrofiliğe ve biyolojik aktiviteye sahip oldukları için reaktif karbonil türleri (RCS) olarak adlandırılır (Esterbauer vd., 1991; Farmer ve Mueller, 2013).

Bitkilerde bir düzineden fazla oksilipin karbonili mevcuttur (Schauenstein vd., 1977). Bitki dokularından hidrofilik RCS'lerin ekstraksiyonu için optimize edilmiş bir protokol ile en toksik RCS olan akrolein ve HNE dahil olmak üzere 19 çeşit karbonil belirlenmiştir (Mano ve Biswas, 2018). Yapraklar ve köklerde on dörtten fazla oksilipin karbonili belirlenmiş ve bunların stres uygulamalarına yanıt olarak önemli ölçüde arttığı gözlenmiştir (Mano vd., 2010; Yin vd., 2010).



Şekil 2.2 RCS ve ilgili bileşiklerin örnekleri (Mano, 2012'den Türkçeye çevrildi).

RCS, hücrelere eksojen olarak uygulandığında hem hayvanlarda hem de bitkilerde gen indüksiyonundan hücre ölümüne kadar çeşitli fizyolojik tepkiler verildiği bilinmektedir. Bitkilere uygulanan eksojen RCS konsantrasyonları

yüksek olduğu zaman toksik etki meydana gelmektedir. Reynolds (1977), marul tohumlarının çimlenmesini inhibe etme yeteneklerine göre çeşitli karbonil bileşiklerinin toksisitesini değerlendirmiş ve RCS'nin non-RCS karbonillerden daha yüksek toksisiteye sahip olduğunu göstermiştir. *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin akrolein (ACR) ve metilvinilketon (MVK) gibi uçucu bileşiklere maruz kalması, 15 saat içinde PSII aktivitesinde bir azalmaya neden olmuştur. Akrolein ile MVK, *A. thaliana* yapraklarına infiltrasyon yapıldığında patojenle ilişkili genler indüklenmiştir (Alm  ras vd., 2003). Benzer bir çalışmada, (E)-2-heksenal uygulanan bitkilerde 5 saat içinde PSII aktivitesi önemli ölçüde azalmıştır (Matsui vd., 2012). *A. thaliana* yapraklarına 20   M konsantrasyonunda HNE     ltisi infiltre edildiğinde, PSII 15 saat içinde inaktif olmuştur. Konsantrasyon mM düzeyine çıktığında ise nekroza neden olmuştur (Mano vd., 2005). Başka bir çalışmada, tütün bitkilerine eksojen olarak uygulanan HNE, kök uzamasını inhibe etmiştir. 2-alkenal redüktazın (AER; EC 1.3.1.74) aşırı ifade edildiği transgenik bitkilerde ise bu inhibisyonun hafifletildiği gözlenmiştir (Yin vd., 2010).   zole edilmiş kloroplastlar karanlık koşullarda akrolein ile muamele edildiğinde fotosentetik aktiviteleri kaybolmuştur, ancak fotosentetik elektron taşıma zinciri etkilenmemiştir (Mano vd., 2009). Öte yandan, *Synechocystis sp.* hücrelerine aydınlık koşullarda akrolein uygulanması PSII'yi inaktif etmiştir ve büyümeyi engellemiştir.   naktivasyon mekanizması, ışık altında oluşan hidroksil radikali ve akroleinin birleşik etkisi ile açıklanmaktadır (Shimakawa vd., 2013). *A. thaliana* bitkilerinin RCS ile fumigasyonu bir grup ışı şoku tepki genini indüklemiştir (Yamauchi vd., 2015). Bu sinyalleme etkisi C4-8 karbon zinciri uzunluğuna sahip RCS için gözlenmiş olsa da C3 RCS olan akrolein için gözlenmemiştir. Eksojen akrolein, HHE ve HNE'nin *A. thaliana*'da katalaz ve askorbat peroksidaz gibi çeşitli enzimatik antioksidanların aktivitesinde artışlara neden olmuştur. *A. thaliana*'ya yakın akraba olan ekstrem halofit *Eutrema parvulum*, bu RCS'lere benzer yanıtlar vermemiştir; enzim aktiviteleri artmamıştır (Yalcinkaya vd., 2019). *C. reinhardtii* hücrelerine akrolein uygulaması, *GSTS1* içeriğini artırarak hücrelerin 1O  'ye karşı toleransını artırmıştır (ppm cinsinden 600'e kadar). Transkriptomik analizlere dayanarak, akroleinin 1O   tarafından tetiklenen gen ifadesi sinyalini iletebileceği düşünülmektedir (Roach vd., 2018). Bir RCS olan OPDA, bir fitohormon ve jasmonik asidin (JA)   nc  s  d  r. *A.*

thaliana'ya eksojen olarak uygulandığında, OPDA, JA tarafından indüklenenlerden farklı bir savunma gen setini indüklemektedir (Taki vd., 2005). Ayrıca hücre döngüsünün düzenlenmesinde ve hücre büyümesinde yer alan genlerin ifadesini baskılamaktadır (Eckardt, 2008).

Hücrelerde potansiyel olarak oluşan çeşitli RCS'leri analiz etmek için, dinitrofenil hidrazin (DNPH) türevlendirme yöntemi kullanılarak ters fazlı HPLC analiz yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntemde hem RCS hem de RCS olmayan karboniller belirlenmiştir (Matsui vd., 2009). RCS olmayan karboniller arasında formaldehit, asetaldehit ve asetonun düzeyleri sub- μ mol/g taze ağırlık aralığındadır. RCS'ler arasında (E)-2-heksenal, (E)-2-pental, krotonaldehit, HNE, HHE ve akrolein gibi türler de μ M düzeylerinde bulunmuştur (Mano vd., 2010; Yin vd., 2010). MDA'nın reaktivitesinin HNE'nin onda biri olduğu göz önünde bulundurularak, MDA ve HNE'nin in vivo zararlı etkisi karşılaştırılabilir. Benzer şekilde, formaldehit ve akroleinin zararlı etkisi, formaldehitin akroleine göre 400 kat daha zayıf olduğu varsayımıyla 1:4 olacağı gösterilmiştir (Reynolds, 1977). Bu çalışmalar, RCS düzeyleri ile doku hasarının derecesi arasındaki yakın ilişkiyi göstermekte olup endojen olarak üretilen RCS'nin oksidatif stres altında hücre hasarının kritik nedenleri olduğunu kanıtlamıştır (Mano vd., 2019).

2.2.1 Reaktif Karbonil Türlerinin (RCS) Reaktif Oksijen Türleri (ROS) ile İlişkisi

RCS, ROS'ta olduğu gibi "iki ucu keskin kılıç" karakterine sahiptir, yani seviyeleri ve lokalizasyonları sınırlı olduğunda sinyal molekülleri olarak hareket etseler de seviyeleri hücrenin kontrolünün ötesine geçtiği zaman hücre üzerinde zararlı etkiler göstermektedirler. Bu nedenle bitki hücreleri, ROS için olduğu gibi RCS'yi birden fazla mekanizma ile kullanmak zorundadır. RCS süpürücü sistem için enzimatik ve enzimatik olmayan süpürücüler bulunmaktadır (Mano vd., 2019).

Oksidatif stres kavramı ilk oluşturulduğunda, araştırmacılar ROS'un zararlı etkilerine ve detoksifikasyon mekanizmalarının aydınlatılmasına odaklanmıştı

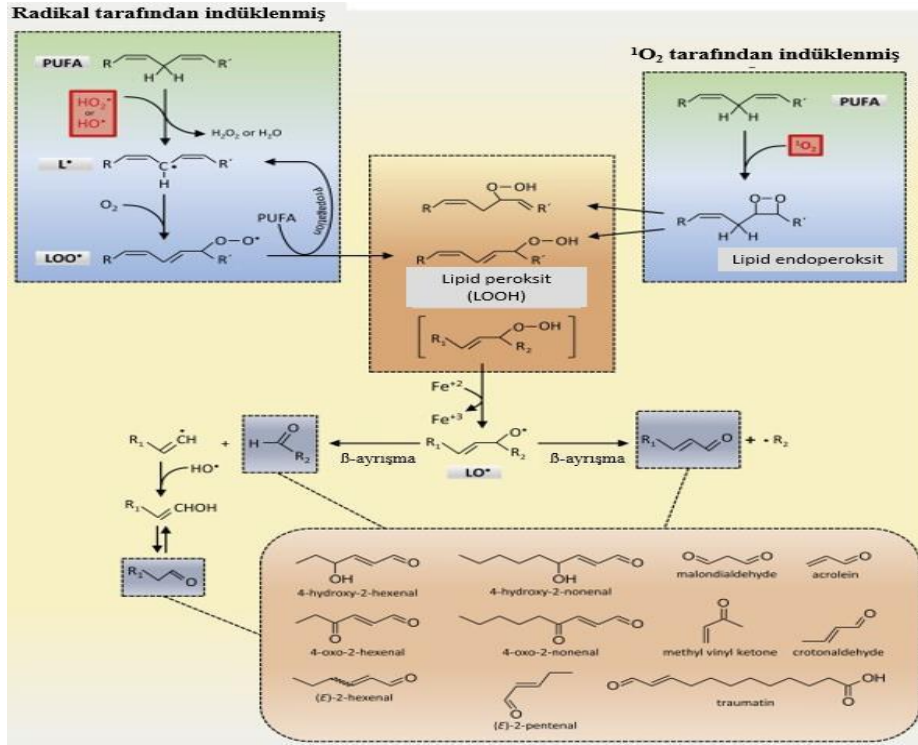
(Sies, 1986). Bitki NADPH oksidazlarının ve bitki tiyoredoksin/perosidoksin sistemlerinin keşfi ile abiyotik ve biyotik stres tepkilerine yanıt olarak ROS'un sinyal rolü desteklenmiştir (Sagi ve Fluhr, 2001; Dietz, 2003). RCS, ROS'un etkisiyle oluşan lipid peroksidlerinin (LOOH) parçalanma ürünleri olarak tanımlanmıştır. İlk başta, RCS de ROS gibi zararlı molekül olarak tanımlanmıştır ancak son gelişmeler ile RCS'nin stres tepkilerini ileten sinyal molekülleri olarak işlev görebileceği düşünülmektedir (Yalcinkaya vd., 2019).

RCS üretimini daha iyi açıklayabilmek için hücredeki ROS üretim mekanizmaları dikkate alınmalıdır (Mano, 2012). Kloroplastlar, mitokondriler ve peroksizomlar bitki hücrelerinde ROS'un asıl üretildiği yerlerdir (Mittler vd., 2004). ROS tarafından lipitlerin lokal üretimi ve oksidasyonunun yanı sıra, organeller arasındaki fiziksel etkileşimler de RCS üretiminde rol oynayabilecek olası bir ROS kaynağı olarak düşünülebilir. Oikawa vd. (2015)'e göre aydınlık ortamda peroksizomlar, kloroplastlar ve mitokondrilerin fotorespirasyon için metabolit alışverişinde bulunduğu gösterilmiştir. Çevresel stresler sırasında RCS detoksifikasyon kapasitesinin artması stres toleransı ile ilişkilidir. Dolayısıyla, yüksek miktarda RCS birikimi, ROS'un da artmasıyla birlikte bir stres olarak ortaya çıkmaktadır. Abiyotik streslerden kaynaklanan ikincil stres olan artan ROS üretimini yani oksidatif stresi takiben RCS birikimi üçüncül stres olarak adlandırmak uygun olacaktır. RCS üretimi ROS ile bağlantılı olduğu için, ROS ve RCS metabolizması yakından ilişkilidir. RCS üretimini sınırlamak ya da önlemek için, ROS üretimini dolayısıyla hücredeki oksidatif stresi sınırlamak olacaktır (Yalcinkaya vd., 2019).

2.2.2 Reaktif Karbonil Türlerinin (RCS) Oluşumu

Süperoksit radikali, hidrojen peroksit ve singlet oksijen gibi reaktif oksijen türlerinin oluşumu aerobik yaşama eşlik etmektedir. ROS genellikle membranların yakın çevresinde, kloroplastik ve mitokondriyal elektron taşıma zincirleri ve NADPH oksidaz homologları (RBOH) ile birlikte üretilmektedir. Membran lipitleri, ROS'un bazal oluşumundan ötürü yapısal olarak oksitlenmektedir (Mène-Saffrané vd., 2007). Hidroksil radikali (HO·) ve

süperoksit radikalinin protonlaşmış formu ($O_2H\cdot$) gibi yüksek oksitleyici ROS, linoleik asit (18:2) ve linoleik asit (18:3) gibi çoklu doymamış yağ asitlerinden (PUFA) bir hidrojen atomu çekmesi ile lipid molekülünün oksidasyonunu başlatmaktadır (Biswas ve Mano, 2021). PUFA'ya $1O_2$ eklenmesi sonucu, nispeten kararsız lipid peroksitler (LOOH) oluşmaktadır (Triantaphylidès vd., 2008). Reaktif karbonil türleri, LOOH'un oksidatif bozunmasıyla oluşmaktadır. LOOH iki farklı mekanizma tarafından üretilmektedir: lipidlerin enzimatik oksijenasyonu ve çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) ROS tarafından enzimatik olmayan oksidasyonu. Enzimatik lipid peroksidasyonu sürecinde, α -linolenik asit (α -LeA) gibi PUFA'ların oksidasyonunun temel enzimi olan lipoksijenaz (LOX), PUFA'ları 9- veya 13-hidroperoksi-oktadekatrienoik asitlere veya her ikisinin karışımına dönüştürmektedir. Karşılık gelen 9- ve 13-hidroperoksit liyazlar, sırasıyla 9- ve 13-hidroperoksitleri C6-C9 aldehitlere ve 9- ve 13-oksoasitlere, jasmonik asit ve 12-okso-fitodienik asit (OPDA) de dahil olmak üzere etki etmektedir (Matsui, 2006; Mosblech vd., 2009; Vincenti vd., 2009). OPDA, bir α,β -doymamış karbonil yapısına sahiptir, bu nedenle bir RCS'dir. 13-hidroperoksitin hidroperoksit liyaz-katalizli degradasyonunun birincil C6 ürünü olan (Z)-3-heksenal, bir izomeraz tarafından (E)-2-heksenale dönüştürülmektedir (Kunishima vd., 2016; Spyropoulou vd., 2017). Enzimatik olmayan süreçte ise, ısı altında lipidlerin bozulmasına ilişkin in vitro çalışmalarla açıklanmaktadır (Vliegenthart, 1979; Grosch, 1987).



Şekil 2.2.2 Serbest radikaller veya $^1\text{O}_2$ aracılığıyla PUFA'dan RCS oluşumu. $\text{L}^\bullet$, lipid radikali; $\text{LO}^\bullet$, lipid alkoksi radikali; $\text{LOO}^\bullet$, peroksil radikali (Yalcinkaya vd., 2019'dan Türkçeye çevrildi).

2.2.3 Reaktif Karbonil Türlerinin (RCS) Detoksifikasyonu

Bitkilerde, reaktif karbonil türlerini detoksifiye etmek için beş tip enzimatik reaksiyon bilinmektedir. 1- Elektron donörü olarak NAD(P)H kullanılarak bir RCS molekülündeki α,β -doymamış bağın indirgenmesi. Bu reaksiyonu 2-alkenal redüktaz (AER) ve alkenal/bir oksidoredüktaz (AOR) enzimleri katalize etmektedir (Mano vd., 2002, 2005; Yamauchi ve Sricholpech, 2012). 2- Katalizörü aldo-keto redüktaz (AKR) olan bir karbonil parçasının NAD(P)H kullanılarak bir alkole indirgenmesi (Oberschall vd., 2000). 3- Elektron alıcısı olarak NAD^+ kullanılarak bir aldehitin bir karboksilik aside oksidasyonu. Bu reaksiyon aldehit dehidrojenaz (ALDH) tarafından katalize edilmektedir (Kotchoni vd., 2006). 4- Aldehit oksidaz (AO) ile katalize edilen bir aldehitin oksidasyonu. Elektron alıcısı olarak O_2 kullanılmaktadır. 5- Glutasyon transferaz (GST) enzimi ile glutatyona bir RCS eklentisinin oluşumu (Yalcinkaya vd., 2019).

ALDH ve AKR enzimlerinin aktivitelerinin stres koşullarına karşı arttığını gösteren geniş bir literatür bulunmaktadır. Bu enzimlerin aşırı ifadesi, genellikle bitki stres toleransının artmasıyla ilişkilendirilmektedir (Rodrigues vd., 2006; Yang vd., 2015; Suekawa vd., 2016; Vemanna vd., 2017). Mutant bitkilerin ise daha duyarlı olduğu görülmüştür (Grzam vd., 2007; Narawongsanont vd., 2012; Islam vd., 2016, 2019). *Solanum lycopersicum* yaprak ve meyvelerinde *AKR4B* gen ekspresyonu tuz stresi koşullarında artmaktadır (Suekawa vd., 2016). Ayrıca, *AKR1* transgenik bitkilerinde daha yüksek antioksidan kapasite gözlenmiştir (Vemanna vd., 2017). Kuraklık, tuz ve soğuk gibi abiyotik stres faktörleri *AKR4C8* ve *AKR4C9* gen ifadelerini *A. thaliana* bitkisinde artırmıştır (Simpson vd., 2009). *AtAKR4C9*'u ifade eden transgenik arpa üzerinde yapılmış olan bir çalışmada, bitkinin oksidatif stres toleransı artmıştır (Éva vd., 2014). Auiyawong vd. (2017) tarafından yapılan araştırmada *A. thaliana* ve Thai yasemin pirincinde *AKR4C* enzimlerinin MDA ve MG üzerindeki metabolizma kapasiteleri karşılaştırılmıştır. MDA'yı en etkili şekilde metabolize eden enzimin *AKR4C15* olduğu gösterilmiştir. Benzer şekilde *AKR4C15* pirinçteki diğer enzimlere kıyasla MG'yi etkili bir şekilde metabolize etmiştir. En yüksek enzim aktivitesi, pirincin genç yapraklarında tespit edilmiştir. Transgenik *A. thaliana* bitkisinde ise daha düşük MG ve MDA düzeyleri gözlenmiştir. Üzüm yapraklarında, tuz stresinde *ALDH2B8* gen ekspresyonu artmıştır (Xu vd., 2013). *ALDH7* geninin aşırı ifadesi *A. thaliana* ve tütün bitkilerinde tuz ve oksidatif stres toleransını artırmıştır (Rodrigues vd., 2006). Bir *ALDH22* homolog geni olan *ZmALDH22A1*'i aşırı ifade eden tütün transgenik bitkileri, çeşitli abiyotik strese ve ABA uygulamalarına karşı yüksek tolerans göstermiştir (Huang vd., 2008).

2-alkenal redüktaz (AER), RCS'nin C-C çift bağının NADPH-bağımlı doymuş bir karbonil oluşturacak şekilde indirgenmesini katalizlemektedir. *A. thaliana*'da bu aktiviteyi gösteren iki enzim bulunmuştur: AER ve alkenal/bir oksidoredüktaz (AOR). AER, HNE ve 4-okso-2-neneale karşı; AOR ise 4-heksen-3-1 gibi α,β -doymamış ketonlara karşı yüksek afiniteye sahiptir (Mano vd., 2002; Yamauchi vd., 2011). Bu iki enzim, orta zincir redüktaz/dehidrojenaz süper ailesine dahildir. AER/AOR ile tepkimeye giren RCS'nin reaksiyon ürünleri hala karbonillere dahil olsa da reaktiviteleri önemli ölçüde azalmaktadır çünkü konjuge çift bağın

indirgenmesi bileşimin elektrofilitasını ve sitotoksitesini 10 katından fazla düşürmektedir. AER geninin ifadesi oksidatif stres ile indüklenmektedir (Babiychuk vd., 1995).

Enzimatik reaksiyonlara ek olarak, indirgenmiş glutatyon formu (GSH) da RCS detoksifikasyonunda önemlidir. GSH ile RCS'nin konjugasyonu, RCS'nin elektrofiliğine bağlıdır. Yüksek elektrofilik bir RCS olan akrolein reaksiyonu hızlı iken, HHE ve HNE için reaksiyon sırasıyla yaklaşık 70 ve 110 kat daha yavaştır (Esterbauer vd., 1991). Rastgele konjugasyonunun yanı sıra, glutatyon transferazlar (GST) bu reaksiyonu katalize etmektedir. Bitkilerde, birkaç GST izoformunun akrolein ve diğer RCS'leri (krotonaldehit, metakrolein, (E)-2-heksenal, HNE) substrat olarak tanıdığı bulunmuştur (Mano vd., 2014, 2019). Akrolein gibi RCS'lerin GSH ile konjugasyonu, detoksifikasyonunu sağlasa da GSH aracılığı ROS detoksifikasyonunda olduğu gibi sürdürülebilir değildir, çünkü RCS detoksifikasyonu sırasında GSH tükenmektedir (Mano vd., 2010; Biswas ve Mano, 2016). GSH'nin tükenmesi, H₂O₂'in detoksifikasyonu için hayati önem taşıyan Asada-Halliwell-Foyer döngüsü kapasitesini de azaltmaktadır (Asada, 2006). Ayrıca, GSH-RCS konjugatlarının akıbeti de önemlidir. Bazı ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcılarının, örneğin ABCC2'nin GSH konjugatlarını vakuole taşıma yeteneklerinin olduğu gösterilmiştir (Lu vd., 1998).

RCS detoksifikasyonundan sorumlu genleri ayırt edebilmek adına *A. thaliana* sürgün ve köklerinde biyotik ve abiyotik stres koşullarına *A. thaliana*'da kodlanan 14 ALDH, 4 AKR geni ve RCS detoksifikasyonunu katalizleyen 11 Tau sınıfı GST geni ile kümeleme analizi yapılmıştır. *AKR4C8* ve *AKR4C9* gen ifadeleri neredeyse her stres koşulunda artmıştır. *ALDH2C4* gen ifadesi *A. thaliana* köklerinde her stres koşulunda artmaktadır. *ALDH2B7*, *ALDH7B4*, *ALDH11A3* ve *ALDH12A1* gen ifadeleri ise osmotik ve tuz stresinde artmaktadır. *GSTU2*, *GSTU3*, *GSTU4*, *GSTU5* ve *GSTU24* olmak üzere beş GST geni, osmotik ve tuz stresinde ifadelerini artırırken *GSTU13* ve *GSTU17* ifadeleri aynı koşullarda bir değişim göstermemiştir. Yalnızca *GSTU28* ifadeleri, tüm stres koşullarında köklerde azalmıştır (Mano vd., 2019).

2.3 Glutasyon

Glutasyon (γ -glutamil-sisteinil-glisin), bitkinin hayatta kalması için çok önemli bir metabolittir. Bir mutasyon sonucu glutasyon üretemeyen *A.thaliana* embriyonik aşamada ölmektedir (Cairns vd., 2006). Glutasyon, serbest halde bulunabilir veya diğer moleküllere bağlı olabilir. Serbest glutasyon hücre içinde redoks homeostazını korumaya yardımcı olan iki tersinir durumda bulunmaktadır: Monomerik, indirgenmiş sülfhidril form (GSH) ve oksidasyonun ardından bir disülfid dimer form (GSSG) (Noctor vd., 2011). GSH ökaryotik organizmalarda en bol bulunan protein olmayan tiyoldür (Martin vd., 2007). Askorbat ile birlikte glutasyon, bitkilerde ROS seviyelerini kontrol eden mekanizmaların merkezinde yer almaktadır (Foyer ve Noctor, 2011; Gest vd. 2013). Akrolein uygulaması, tütün BY-2 hücrelerinde veya izole kloroplastlarda GSH'yi çok hızlı tüketirken askorbat tüketimi çok daha yavaştır (Mano vd., 2009; Biswas ve Mano, 2016). Bitki hücrelerinde daha yüksek GSH seviyesi, hem ROS hem de RCS seviyelerini baskılayarak stres toleransına katkıda bulunmaktadır (Yin vd., 2017). GSH, akroleine karşı ilk savunma hattıdır. Eskiden glutasyon S-transferaz olarak bilinen bitki GST'leri, elektrofilik ksenobiyotik substratların tripeptit glutasyon (GSH) ile konjugasyonunu katalize eden geniş ve çeşitli bir enzim grubudur (Dixon vd., 2010). Afinite kromatografisi ve iyon değişim kromatografisi adımlarıyla akrolein için özgülüğü olan glutasyon transferaz (GST-Acr) izozimleri ıspanaktan elde edilmiştir. GST-Acr akrolein için bilinen en düşük K_M değeri olan $93 \mu M$ 'ı göstermiştir. Peptit dizi homolojisi ile GST-Acr'nin bitkilere özgü bir sınıf olan tau sınıfı GST'ye ait olduğu ortaya çıkarılmıştır. Ispanak GST-Acr ile yakın dizi benzerliğine sahip olan *A. thaliana* GST Tau19 da akrolein için yüksek bir katalitik verimlilik göstermiştir (Mano vd., 2017). Birçok elektrofilik ksenobiyotiğin detoksifikasyonu, GSH ile reaksiyona girerek başlamaktadır. GST tarafından katalize edilen bu reaksiyonda ksenobiyotikler, GSH'nin sülfhidril grubuna kovalent olarak bağlanmaktadır (Dixon vd., 2002). Sitozoldeki konjugasyonun ardından, glutasyon S-konjugatları, degradasyon ürünlerinin geçici birikimi ile sonuçlanan daha fazla metabolizmaya uğramaktadır (Hatzios, 1997; Lamoureux ve Russness, 1993).

GSH, RCS detoksifikasyonu için kullanıldığında, toplam glutatyon havuz boyutu (GSH ve GSSG) azalmaktadır (Mano vd., 2009). Bu sadece hücre içi matrisin redoks potansiyelinin artmasına değil, aynı zamanda askorbat havuzunun kaybına da yol açmaktadır, çünkü dehidroaskorbat redüktaz reaksiyonu yoluyla askorbat rejenerasyonu baskılanmaktadır. GSH'nin savunma kapasitesindeki azalma, RCS ile modifikasyon yoluyla çeşitli hedef proteinlerin inaktivasyonunu daha da hızlandırmaktadır ve Calvin döngüsü, sitrik asit döngüsü ve fotorespirasyon gibi birincil metabolik yollar engellenmektedir. Sonuç olarak oksidatif stres hızlanmaktadır (Mano, 2012). İndirgenmişin oksitlenmiş forma geri dönüşümü GSH havuzunu hızla değiştirmektedir. Plazma membran reseptörlerinin ve bileşenlerinin düşük moleküler ağırlıklı tiyoller ve sisteinlerinin etkileşim ve değişim reaksiyonları, sinyali ikincil olarak yükseltebilir. Öte yandan, gama-glutamil döngüsü oksidatif strese yanıtta yer almaktadır (Masi vd., 2002; Ferretti vd., 2009).

2.3.1 Glutatyon Metabolizması

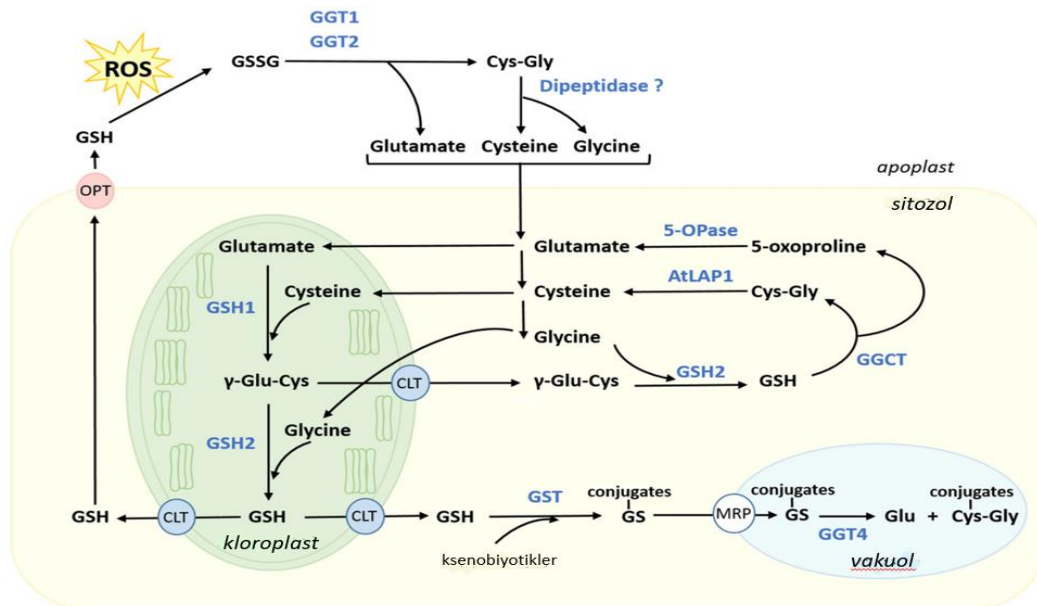
Bitkilerde GSH, üç amino asit bileşeninden iki ATP bağımlı enzim tarafından sıralı olarak sentezlenir: glutamat-sistein ligaz (GSH1; EC 6.3.2.2, eskiden γ -glutamil sistein sentetaz olarak adlandırılırdı) ve GSH sentaz (GSH2; EC 6.3.2.3) (Meister, 1995) (Şekil 2.3.1). İlk enzim olan GSH1, sistein ve glutamati birleştirerek γ -glutamil sistein dipeptidini oluşturmaktadır. GSH2 ise γ -glutamil sisteine, glisin ekleyerek GSH'ı oluşturan ikinci adımı katalizlemektedir. Transgenik kavak ağaçları ile yapılan bir çalışmada, GSH sentezi için GSH1'in hız sınırlayıcı bir enzim olduğu gösterilmiştir (Noctor vd., 1996). *Arabidopsis*'te GSH1 sadece plastitlerde bulunurken, alternatif transkripsiyon başlatma bölgeleri sonucunda GSH2 hem sitozolde hem de plastitlerde çift hedefli olarak bulunmaktadır (Wachter vd., 2005; Preuss vd., 2014). Ayrıca kloroplast fraksiyonlama analizleri, GSH1 ve GSH2'nin her ikisinin de kloroplast stromasında bulunduğunu göstermektedir (Preuss vd., 2014). *Arabidopsis*'te GSH1 veya GSH2 için knock-out hatları, sırasıyla embriyo ve erken fidanlık aşamasında ölümcül fenotiplere sahiptir, bu da bitki yaşamı için temel rollerini vurgulamaktadır (Cairns vd., 2006; Pasternak vd., 2008).

Glutasyon seviyeleri, kantitatif immün-elektron mikroskopu ve HPLC analizlerinin kombinasyonuyla yapılan çalışmalara göre, stres olmadığında glutasyon konsantrasyonları, vakuol ve apoplast hariç tüm sitoplazmik bölgelerde mM aralığındadır. En yüksek düzeyler mitokondri ve çekirdekte bulunur (Queval vd., 2011; Koffler vd., 2013). GSH sentezi sitozol ve plastit stromaya sınırlı olduğundan, hücresel altbirimler arasında glutasyon taşınmasının gerçekleştiği düşünülmektedir. Gerçekten de tonoplastta, GSSG ve farklı glutasyon konjugatlarını taşıyan çoklu ilaca dirençli proteinler (MRP'ler) gibi çeşitli glutasyon taşıyıcıları tanımlanmıştır. Plazma membranlarında ise, oligopeptid taşıyıcı (OPT), GSH taşınımını sağlamaktadır (Zhang vd., 2016).

Bitkilerde iki bağımsız glutasyon katabolizma yolu bulunmaktadır. Biri sitozolde bulunurken diğeri ekstrasitozolik (apoplast ve vakuolde) işlev göstermektedir. Sitozolik yol, glutasyonun ana parçalanma yolunu temsil etmektedir (Ohkama-Ohtsu vd., 2008). *Arabidopsis*'te, bu yol GGCT2;1 (At5g26220), GGCT2;2 (At4g31290) ve GGCT2;3 (At1g44790) tarafından kodlanan γ -glutamil siklotransferaz (GGCT, EC 4.3.2.9) alt ailesinden üç üye içerir. GGCT'ler özellikle GSH'yi bir sisteinil-glisin (Cys-Gly) dipeptidi ve Glu'nun siklize olmuş formu olan 5-oksoprolin şeklinde hidroliz eder (Paulose vd., 2013; Kumar vd., 2015). Bu ara parçalanma ürünleri daha sonra sırasıyla (i) *Arabidopsis*'te AtLAP1 tarafından kodlanan M17 metallopeptidaz ailesinden bir üye olan Leu aminopeptidaz 1 (EC 3.4.13.18) ve (ii) ATP bağımlı 5-oksoprolinaz (5-OPaz, EC 3.5.2.9) tarafından glutasyonun amino asit bileşenlerine ayrıştırılır (Ohkama-Ohtsu vd., 2008).

Apoplastik ve vakuolar glutasyon havuzları, γ -glutamil transferazlar (GGT; EC 2.3.2.2) tarafından glutasyon (GSH), GSSG ve GS-konjugelerinin γ -glutamil kısmının kesilmesiyle parçalanır (Martin ve Slovin, 2000; Storozhenko vd., 2002). *Arabidopsis*'te, GGT'ler dört gen ailesi tarafından kodlanır: *GGT1* (At4g39640), *GGT2* (At4g39650), *GGT3* (At1g69820) ve *GGT4* (At4g29210). *GGT1* ve *GGT2* izoformları her ikisi de apoplastta yer alır ve γ -glutamil döngüsüne katılır. Bu döngü, GSSG'nin apoplastta parçalanması ve amino asit bileşenlerinin sitoplazmada glutasyon sentezini yeniden oluşturmak için geri dönüşümünü içerir

(Masi vd., 2015). *GGT1* neredeyse bütün bitki dokularında ifade edilir ancak yaprak, iletim demetleri ve kökteki ifadesi önceliklidir. *GGT2*'nin ifadesi ise gelişmekte olan tohumlar, polen, trikomlar ve köklerle sınırlıdır ancak çok düşük düzeylerde ifade edilir. *GGT4* tüm dokularda ifade edilir ancak ifadesi köklerde daha yüksektir (Martin vd., 2007). Yabani tip *A. thaliana* ve *ggt1* mutantının farklı dokularında GGT aktivitesinin histokimyasal tespitinde, *GGT1* izoformunun tohumlar dışındaki tüm bitki dokularında toplam GGT aktivitesinin %80'den fazlasından sorumlu olduğunu göstermektedir; tohumlarda ise *GGT2* %50'lik bir aktiviteye sahiptir (Destro vd., 2011). *GGT1* ve *GGT2*, ekstraselüler GSSG'yi Glu ve Cys-Gly'e parçalar. Dipeptit daha sonra var olduğu düşünülen ancak henüz tanımlanmamış bir dipeptidaz tarafından Cys ve Gly'e ayrıştırılır. Bu amino asitler daha sonra protein sentezi veya glutatyonun yeniden sentezi için sitoplazmaya taşınır ve ardından apoplastta bir döngüde yeni bir tur ihracat/parçalanma gerçekleştirilir (Ferretti vd., 2009). *GGT3* bir pseudogen olarak kabul edilir. Transkripti tespit edilir, ancak katalitik aktivite için önemli bir dizi eksik olduğundan işlevsel bir GGT'nin üretimine katkıda bulunması olası değildir (Daestro vd., 2011). *GGT4* tarafından kodlanan izoform vakuolde bulunur ve herbisitler gibi toksik seviyelerde ksenoobiotiklere maruz kalmanın ardından glutatyon S-transferaz tarafından oluşturulan GSH konjugatlarının parçalanmasını başlatarak detoksifikasyon süreçlerini destekler (Grzam vd., 2007; Ohkama-Ohtsu vd., 2007). GSH konjugatları MRPlar tarafından sitoplazmadan vakuole taşınır (Lu vd., 1997; 1998).



Şekil 2.3.1 Arabidopsis'te glutatyon biyosentezi ve degradasyonu. (Dorion vd., 2021'den değiştirilerek alınmıştır).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Bitkilerin Yetiştirilmesi ve Stres Uygulamaları

3.1.1 Tohumların Temini

Tez çalışmamızda kullanılan *A. thaliana* Col-0 ekotipi ve gama-glutamil transferaz (GGT) mutantlarının tohumları Padova Üniversitesi öğretim üyesi Doç. Dr. Antonio Masi'den temin edilmiştir.

3.1.2 Tohum Sterilizasyonu

Tohumlar, %70 konsantrasyona sahip Etanol ile 30 saniye çalkalandıktan sonra 3 kez steril deiyonize su ile yıkanmıştır. Ardından %4 konsantrasyona sahip Hipoklorik asit (NaOCl) içerisinde 10 dakika bekletildikten sonra 5 kez steril deiyonize su ile durulanmıştır. Tohumlar stratifikasyon için +4°C'ye kaldırılmıştır.

3.1.3 Tohumların Ekimi

+4°C'de 48 saat stratifikasyonu yapılan tohumlar 9 cm çaplı polistiren petrilerde %1 süktroz ve %0,8 agar içeren pH 5.7 ½Murashige&Skoog (MS) ortamına ekilmiştir. Petriler, 22/20°C gündüz/gece sıcaklık, 12/12 saat aydınlık/karanlık ve %60 bağıl nem koşullarına büyüme odasına yerleştirilmiştir.

3.1.4 Akrolein Uygulaması

2 gün çimlenen *Arabidopsis thaliana* tohumları, petrilerde 5 gün daha büyütüldükten sonra her genotipe ait petriden homojen boyutlara sahip 6 toplamda 30 bitki ½ MS ortamına aktarılmıştır. Bitkilerin aktarılması tamamlandıktan sonra köklerine 0,5 mM, 1,5 mM ve 3 mM Akrolein (ACR) solüsyonu (suda hazırlanmış) uygulanmıştır. 2 gün sonunda akrolein solüsyonu uygulanmış bitkiler biyokimyasal ve moleküler analizler için sıvı azotta dondurularak hasat edilmiş ve -80 °C'de saklanmıştır.

3.2 Fizyolojik Parametreler

3.2.1 Büyüme Parametreleri

Kontrol koşulları altında ve 0,5; 1,5; 3 mM akrolein uygulanmış *A. thaliana* Col-0 ve ggt mutantları, uygulamanın 2. gününde fotoğrafları çekilmiş ve hasat edilirken yaş yaş ağırlıkları kaydedilmiştir.

3.2.2 Fotosentetik Verim

Kontrol koşulları altında ve 0,5; 1,5; 3 mM akrolein uygulanmış *A. thaliana* Col-0 ve ggt mutantlarının yapraklarındaki Fotosistem II'nin maksimum fotokimyasal veriminin (F_v/F_m) ölçülmesi Flourpen1890 ile yapılmıştır. Yaprakların karanlığa adaptasyonu için ölçümden 30 dakika öncesinde bitkiler karanlıkta bırakılmışlar daha sonra ölçüm gerçekleştirilmiştir.

3.3 Gen İfadelerinin Kantitatif RT-PCR (qRT-PCR) ile Ölçümü

RNA'lar 0,05 gram taze örneklerden NORGEN Total RNA Purification Plus Kit kullanılarak, üreticinin protokolü üzerine izole edilmiştir. Total RNA DNase I (Fermentas) ile muamele edilerek genomik DNA'nın ayrılması sağlanmıştır. Elde edilen RNA ile Xpert cDNA sentez kiti (GRiSP Research Solutions) ve oligo(dT)₂₀ primerler kullanılarak cDNA sentezlenmiştir. Tüm reaksiyonlarda bulunan RNA miktarları *A.thaliana* ACTIN8 geninde çalışması üzerine tasarlanmış primerler ile normalleştirilmiştir. Elde edilen cDNA'lar qRT-PCR analizlerinde kullanılmıştır. PCR programı: 95°C 5 dk, 45 döngü 95°C 15sn, 60°C 15sn, 72°C 30sn olarak oluşturulmuştur. qRT-PCR analizleri ABI SYBR Green Master Mix kullanılarak yapılmıştır. qRT-PCR analizleri StepOne Plus yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır. Referans örneği kontrol grubu olarak seçilmiştir ve her genin ifade düzeyi hesaplanırken kontrol grubu değerleri 1 kabul edilmiştir.

Gen Numarası	Primer Adı	Yön	Oligonükleotid Dizisi (5'-3')
AT1G49240	AtAct8	F	TCAGCACTTTCCAGCAGATG
		R	ATGCCTGGACCTGCTTCAT
AT5G47910	AtRBOHD	F	ATTAACAAGCACCAAACCAG
		R	TTCTCCGACCATCTCACTA
AT1G64060	AtRBOHF	F	TCACAAATCAACGACGAGAGTT
		R	CCCATCTTCATTCTTGTCCA
AT4G39640	AtGGT1	F	TCCTCGAAAAGGAGGGTTCC
		R	TCATCACAAAAGTTCGGTTCAA
AT4G39650	AtGGT2	F	CCGTAACCCGAAATTGGCTGAT
		R	GTTGTACCGGCGATGATGTACA
AT5G37830	AtOXP1	F	TTGGAGGTTTGGCCATTTTCA
		R	GCCAAAAAAGTCTTGGACCAGCA
AT4G23100	AtGSH1	F	GAAGCCACATATGGACAGACACT
		R	CTCAAACCCAAAAGAGTCATC
AT5G27380	AtGSH2	F	ATTGGCTAAAGCTTGGTTGGAGTA
		R	CGTTCTTCTGGCTGTACAATT
AT5G59820	AtZAT12	F	GAGTGGAGTTTCCGATGGGAC
		R	AGCGCGTGTAACCAGCGCGCC
AT1G54100	ALDH7B4	F	TTTGCTGTTGGTTTGAGCCG
		R	CGGTGTAGTTGGAGCACCTT
AT2G37770	AKR4C9	F	CTGAGATTGAACAGGCTAGG
		R	ATCAGAGAGAGAAACCTAGCTC
AT2G29480	AtGSTU2	F	GGCGAAGAAAGAAGAGAGTGTG
		R	ACTAGGGGCATGAAGCCAAC
AT2G29470	AtGSTU3	F	GCCGAGAAAGAAGAGGGTGT
		R	AGTAGCAACGGGCTCTTGAC
AT2G29460	AtGSTU4	F	AGAGCCCTTTGCTTCTCCAG
		R	CCCTTCTCTGCTTTTGCCAC
AT2G29450	AtGSTU5	F	TGGCAAGAGCAGACGAGAAA
		R	CCGGCGACAAAGTCCAAGAA
AT2G25080	AtGPX1	F	GTCTCCGGTAACCAAAAATG
		R	GACGAGAAAGGTTGCTGAGG
AT2G31570	AtGPX2	F	AAACTGCGTTGGGACAGG
		R	CCCATGAAAAGACATCGAATAC
AT2G43350	AtGPX3	F	GGGTCAATCAGCGAGCTAC
		R	CGATGGCGAAGAAGGGTATC
AT2G48150	AtGPX4	F	GGGAAAGTCCTCCTCATCGTC
		R	GTGCCGGGCTCCTGGTATA
AT3G63080	AtGPX5	F	CAAAACGCTGCACCAGTC
		R	GACCATCTTTGCCGACCAAG
AT4G11600	AtGPX6	F	GCTCTTTGGAGACGGCATT
		R	AGGTGAGGTAGTTGGTGCGA
AT4G31870	AtGPX7	F	TCGGCCCATCATTGAGATTC
		R	CTGCAGCCCTTGCATAGAC
AT1G63460	AtGPX8	F	GAAAGGCAAATGGGGAATC
		R	CAGCTTGACCGTTTTTGTC

Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan genler ve primerlerin tam listesi

3.4 Biyokimyasal Parametreler

3.4.1 Antioksidan Enzim Ekstraksiyonu ve Aktivite Analizleri

0,1 gram bitki örneği protein ve enzim ekstraktlarının hazırlanması için sıvı azotta ezilerek toz haline getirilmiştir. Ardından 50mM Tris-HCl pH7.8, 0,1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 0,2% (v/v) Triton-X100 ve %2PVPP içeren 500µL ekstraksiyon tamponunda homojenize edilmiştir. Tüm işlemler proteaz aktivitesini minimum seviyede tutmak için buz üzerinde gerçekleştirilmiştir. Askorbat peroksidaz (APX) enzim aktivitesi analizi için homojenizasyon tamponuna ayrıca 5mM L-askorbik asit eklenmiştir. Homojenizasyonu tamamlanan örnekler, 10000g'de 5dk +4°C'de santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatantlar protein miktarı ve enzim aktivitesi belirlenmesinde kullanılmıştır.

3.4.1.1 Protein Miktarının Belirlenmesi

Protein miktarının belirlenmesi Bradford (1976)'a göre yapılmıştır. Buna göre ölçüm Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının asidik şartlar altında proteine bağlanarak kırmızı ve/veya yeşil formundan maviye dönüşmesine dayanmaktadır. Spektrofotometrede mavi renk oluşumu 595 nm'de ölçülmüştür. Bovin Serum Albumin (BSA) standart olarak kullanılmıştır. Standart aralığı 0,02 – 0,2 mg/ml'dir. Bitki ekstraktlarının protein miktarları elde edilen bu standart ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır.

3.4.1.2 Askorbat Peroksidaz (APX) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Askorbat peroksidaz (APX (EC 1.11.1.11)) enzim aktivitesi Nakano ve Asada (1981)'e göre belirlenmiştir. Enzim aktivitesinin ölçümünde, askorbatın oksitlenmesine bağlı olarak 290 nm'deki absorbansın azalması izlenmektedir. Reaksiyon karışımı 1 mM EDTA, 1 mM H₂O₂ ve 5 mM Askorbat içeren 50 mM potasyum fosfat tamponudur (pH 7,0). Oksitlenen askorbat miktarı, ekstinksiyon katsayısı 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹ kullanılarak hesaplanmıştır. Enzimin, 1

mg total protein başına dakikada oksitlediği askorbat miktarı, 1 U (μmol askorbat mg protein-1 min-1) olarak hesaplanmıştır.

3.4.1.3 Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Katalaz (CAT (EC 1.11.1.6)) enzim aktivitesi Bergmeyer (1970)'e göre belirlenmiştir. Enzim aktivitesinin ölçülmesinde H_2O_2 'nin süpürülmesinin 240 nm'de absorbansta yol açtığı azalma izlenmektedir. 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 μmol H_2O_2 miktarı, 1 U (μmol H_2O_2 mg protein-1 min-1) olarak hesaplanmıştır.

3.4.1.4 Peroksidaz (POX) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Peroksidaz (POX (EC 1.11.1.7)) aktivitesi Herzog ve Fahimi (1973)'e göre belirlenmiştir. Enzim aktivitesinin ölçümü reaksiyon karışımındaki 3,3'-diaminobenzidine-tetra hidroklorid dihidrat (DAB)'ın ekstrakttaki peroksidazlar tarafından H_2O_2 'yi süpürmek için substrat olarak kullanılması ve buna bağlı renk oluşumuna dayanır. Reaksiyon karışımı DAB, %0,2 (w/v) jelatin, %0,6 H_2O_2 içeren 200 mM sodyum fosfat sitrat tamponudur (pH 4,4). 465 nm' deki absorbans 60 saniye boyunca gözlenerek enzim aktivitesi ölçülmüş, enzimin, 1 mg total protein başına dakikada oksitlediği DAB miktarı, 1 U (μmol DAB mg protein-1 min-1) olarak hesaplanmıştır.

3.4.1.5 Glutasyon Redüktaz (GR) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Glutasyon redüktaz (GR (EC 1.6.4.2)) enzim aktivitesi Foyer ve Halliwell (1976)'e göre ölçülmüştür. Bu yöntem GSSG'yi redüklemek için GR tarafından oksitlenen NADPH'ın izlenmesine dayanmaktadır. Reaksiyon karışımı 5 mM GSSG, 1,2 mM NADPH içeren 25 mM sodyum fosfat (pH 7.8) tamponudur. NADPH'ın oksitlenmesi 340 nm absorbanstaki düşüş ile izlenmiştir. Oksitlenen NADPH miktarı ekstinksiyon katsayısı 6.2 mM-1 cm -1 kullanılarak

belirlenmiş ve enzimin, 1 mg total protein başına dakikada oksitlediği NADPH miktarı, 1 U ($\mu\text{mol NADPH mg protein}^{-1} \text{ min}^{-1}$) olarak hesaplanmıştır.

3.4.1.6 Glutasyon Transferaz (GST) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Glutasyon Transferaz (GST (EC 2.5.1.18)) enzim aktivitesi Habig vd. (1974)'e göre ölçülmüştür. Enzim aktivitesinin ölçümü 1-kloro 2,4 dinitrobenzen (CDNB)'nin indirgenmiş glutasyon (GSH)'a bağlanmasına dayanır. Reaksiyon karışımı 1mM GSH, 1mM CDNB içeren 0,1M Sodyum fosfat tamponudur (pH 6,5). 340nm'deki absorbans 60 saniye boyunca gözlenerek enzim aktivitesi ölçülmüştür.

3.5 Total Glutasyon Miktarının Belirlenmesi

0,1 gram bitki örneği sıvı azotta ezilmiştir. 1 ml 0,2N HCl homojenata eklenmiştir. 16000 g 10 dk +4°C'de santrifüj sonrası süpernatantı nötralize etmek için yavaşça 0,2M NaOH eklenmiştir. Reaksiyon karışımı; 6,3mM Na₂-EDTA, 0,3 mM NADPH, 6mM DTNB ve 50 μ M GR içeren 125mM Na-P tamponudur (pH 7,5). 412 nm'de 60 saniye boyunca gözlenerek ölçülmüştür.

3.6 İstatistiksel Analizler

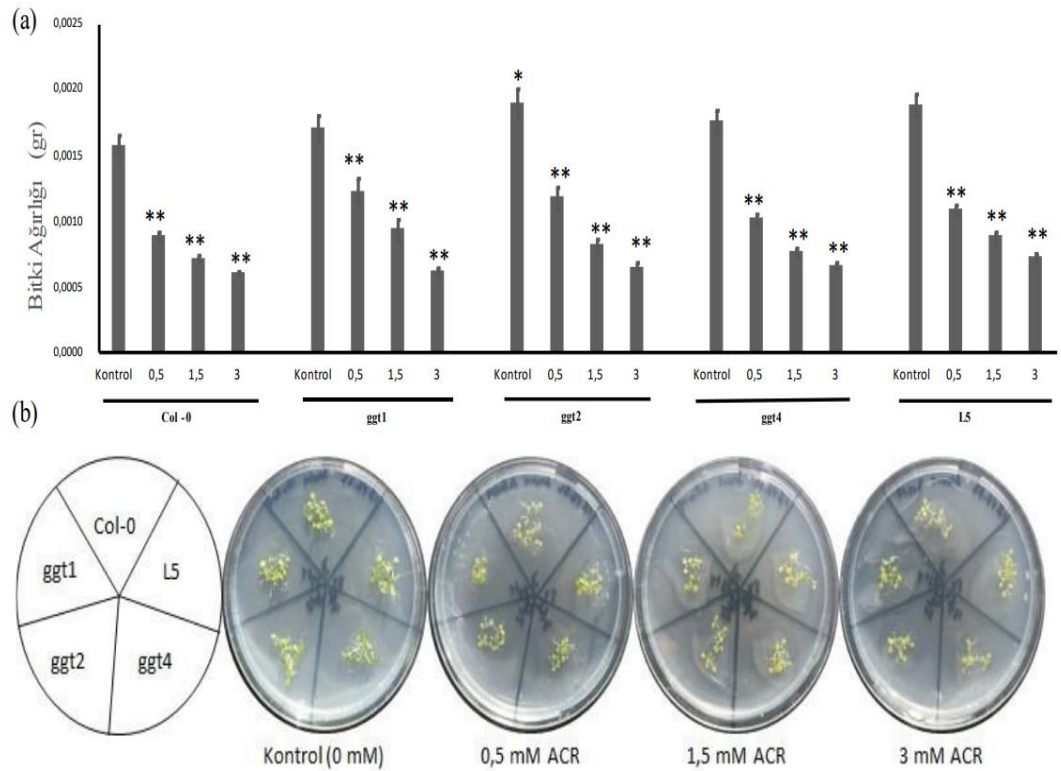
Her deneme 3 kez tekrar edilmiştir. Elde edilen veriler one-way ANOVA analiziyle değerlendirilecek ve uygulama gruplarının istatistiksel olarak birbirine olan farkını ölçmek için TUKEY post-test uygulanmıştır. Bu karşılaştırma sonucu $p < 0.05$ değerine sahip gruplar * ile, $p < 0.005$ değerine sahip gruplar ** ile gösterilerek birbirinden istatistiksel olarak farklı olarak değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1 Fizyolojik Parametreler

4.1.1 Yaş Ağırlık

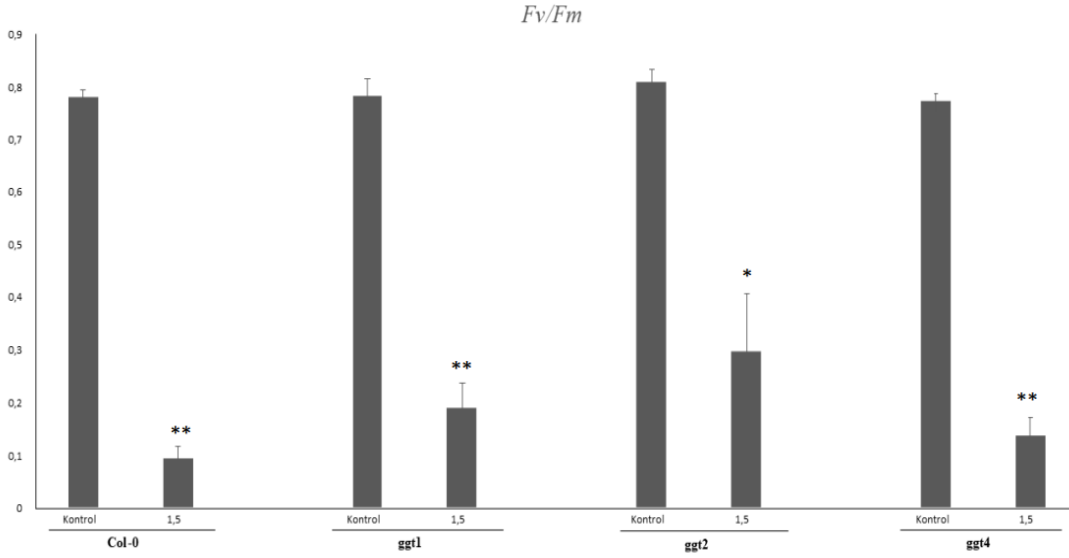
Eksojen akrolein uygulaması yapılan *A.thaliana* Col-0 ve ggt mutant bitkilerinde, artan akrolein konsantrasyonlarında bitkilerin yaş ağırlıklarının azaldığı görülmüştür. 0,5mM, 1,5mM ve 3mM akrolein uygulamaları bitkilerin yaş ağırlıkları kontrole göre; Col-0 için sırasıyla %44, %55 ve %62; *ggt1* için %28, %45 ve %64; *ggt2* için %38, %57 ve %66; *ggt4* için %42, %56 ve %63; L5 için ise sırasıyla %43, %53 ve %62 oranlarında azalmıştır. Uygulama sonrası bitkilerin genel görünümü şekil 4.1.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1.1 (a) *Col-0*, *ggt1*, *ggt2*, *ggt4* ve L5 bitkilerinin kontrol, 0,5 mM, 1,5 mM ve 3 mM akrolein yaş ağırlıkları üzerine etkisi (b) MS ortamında yetiştirilen deney grupları

4.1.2 Fotosentetik Verim

A. thaliana Col-0 ve ggt mutant bitkilerinin yapraklarının klorofil floresans parametreleri ölçülmüştür. Fotosistem II’nin maksimum fotokimyasal verimini belirlemek amacıyla yapılan ölçümlerde 1,5 mM ACR uygulanan Col-0, *ggt1*, *ggt2* ve *ggt4* bitkilerinin *Fv/Fm* oranları kontrol bitkilerine göre sırası ile %88, %76, %63 ve %82 oranlarında azalmaktadır.

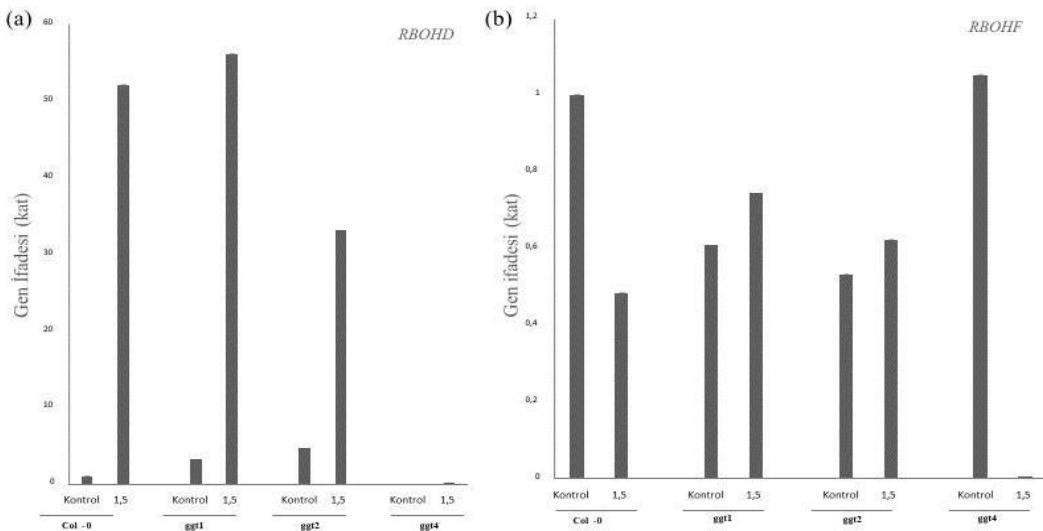


Şekil 4.1.2 Col-0, *ggt1*, *ggt2* ve *ggt4* bitkilerine uygulanan 1,5mM konsantrasyonundaki akroleinin fotosentetik verime olan etkisi

4.2 Gen İfadeleri

4.2.1 ROS Sinyallemesinden sorumlu NADPH Oksidaz Genlerinin İfadeleri

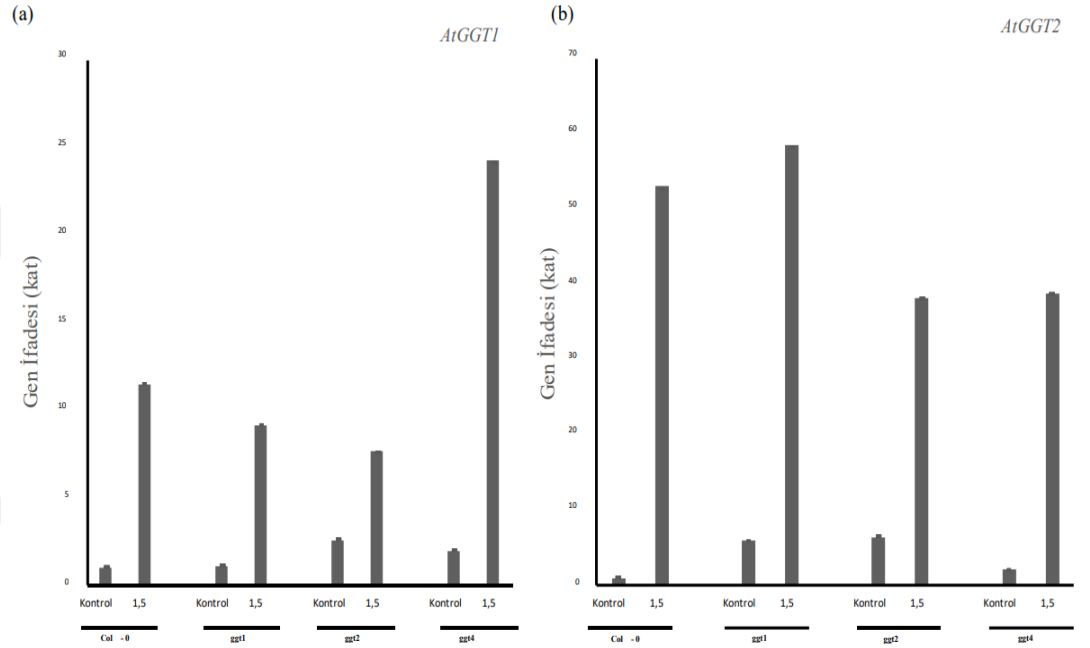
A. thaliana Col-0, *ggt1*, *ggt2* ve *ggt4* bitkilerine uygulanan 1,5 mM akrolein konsantrasyonunda *RBOHD* ve *RBOHF* ifadelerinde artışlar söz konusudur. *RBOHD* ifadesi sırasıyla 52; 17,6; 7,1 ve 78,2 kat artmıştır. *RBOHF* ifadesinde ise akrolein uygulaması, kontrol gruplarına kıyasla *ggt1* ve *ggt2* bitkilerinde sırasıyla 1,22 ve 1,17 kat artış gözlenirken Col-0 ve *ggt4* bitkilerinde sırasıyla 2,07 ve 246 kat azalma gözlenmiştir.



4.2.1 Col-0, *ggt1*, *ggt2*, *ggt4* bitkilerine uygulanan 1,5mM konsantrasyonundaki akroleinin (a)*RBOHD* ve (b)*RBOHF* genleri üzerine etkisi

4.2.2 Gama-Glutamil Transferaz Genlerinin İfadeleri

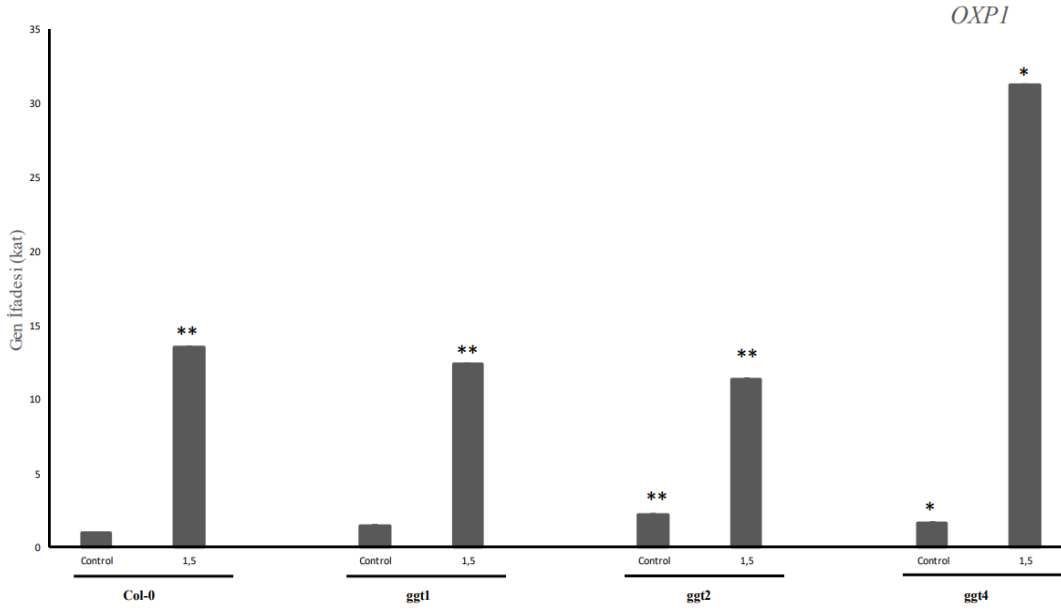
Akrolein uygulaması ile kontrole göre hem *AtGGT1* hem de *AtGGT2* genlerinin ifadelerinde artış gözlemlenmiştir. *AtGGT1* geninin ifadesindeki en düşük artış *ggt2* genotipinde 2,96 kattır. Col-0, *ggt1* ve *ggt4* genotipleri için sırasıyla 11,45; 8,30 ve 12,44 kat artış olmuştur. *AtGGT2* geninin ifadesindeki en yüksek artış Col-0 genotipinde 52,81 kat olarak belirlenmiştir. Akrolein uygulaması *ggt1*, *ggt2* ve *ggt4* genotipleri için sırasıyla 9,75; 5,94 ve 18,44 kat artışa neden olmuştur.



Şekil 4.2.2 Col-0, *ggt1*, *ggt2*, *ggt4* bitkilerine uygulanan 1,5mM konsantrasyonundaki akroleinin (a)*AtGGT1* ve (b)*AtGGT2* genleri üzerine etkisi

4.2.3 5-Oksoprolinaz Geninin İfadesi

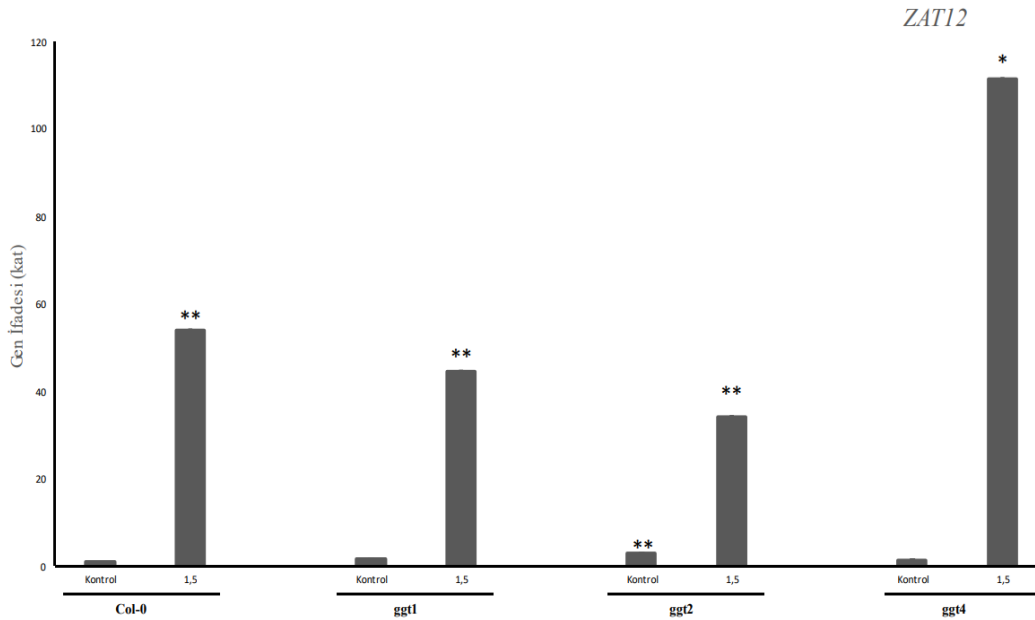
Kontrol gruplarına göre akrolein uygulaması *OXP1* geninde Col-0, *ggt1*, *ggt2* ve *ggt4* genotiplerinde sırasıyla 13,5; 8,52; 5,15 ve 19,43 kat artış belirlenmiştir.



Şekil 4.2.3 Col-0, *ggt1*, *ggt2*, *ggt4* bitkilerine uygulanan 1,5mM konsantrasyonundaki akroleinin *OXP1* geni üzerine etkisi

4.2.4 Zinc Finger Protein 12 Geninin İfadesi

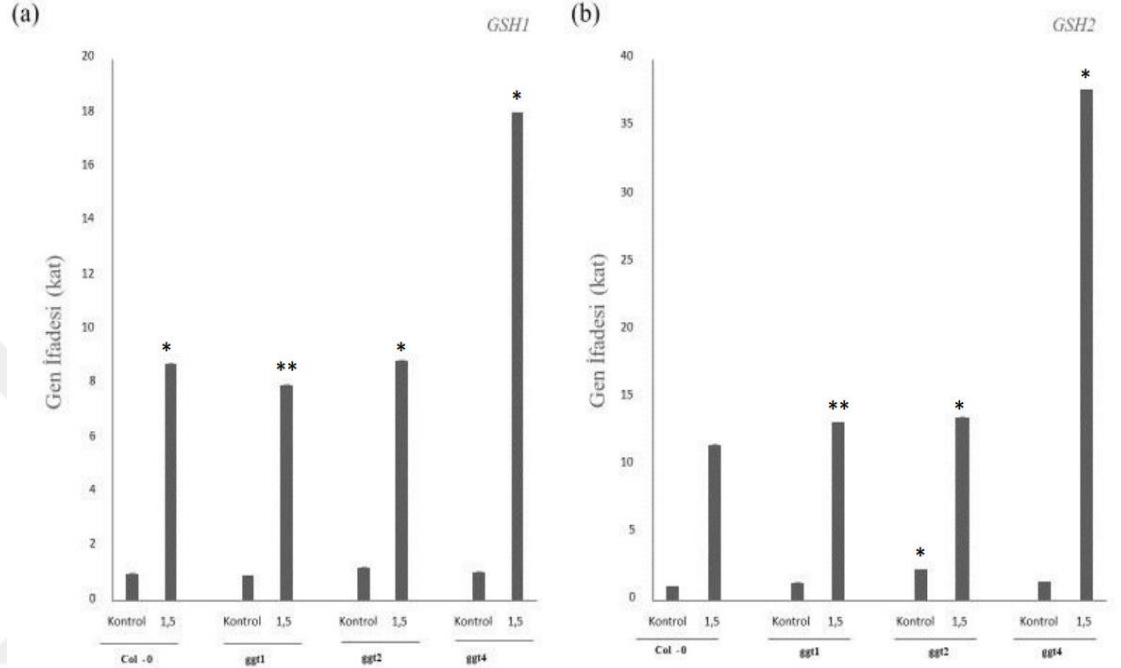
ZAT12 geninin ifadesindeki en yüksek artış *ggt4* genotipinde 78,78 kat olarak belirlenmiştir. Col-0 ekotipi 53,98 kat; *ggt1* genotipi 27,15 kat ve *ggt2* genotipi ise 12,05 kat artmıştır.



Şekil 4.2.4 Col-0, *ggt1*, *ggt2*, *ggt4* bitkilerine uygulanan 1,5mM konsantrasyonundaki akroleinin *ZAT12* geni üzerine etkisi

4.2.5 Glutasyon Biyosentezinden Sorumlu Genlerin İfadeleri

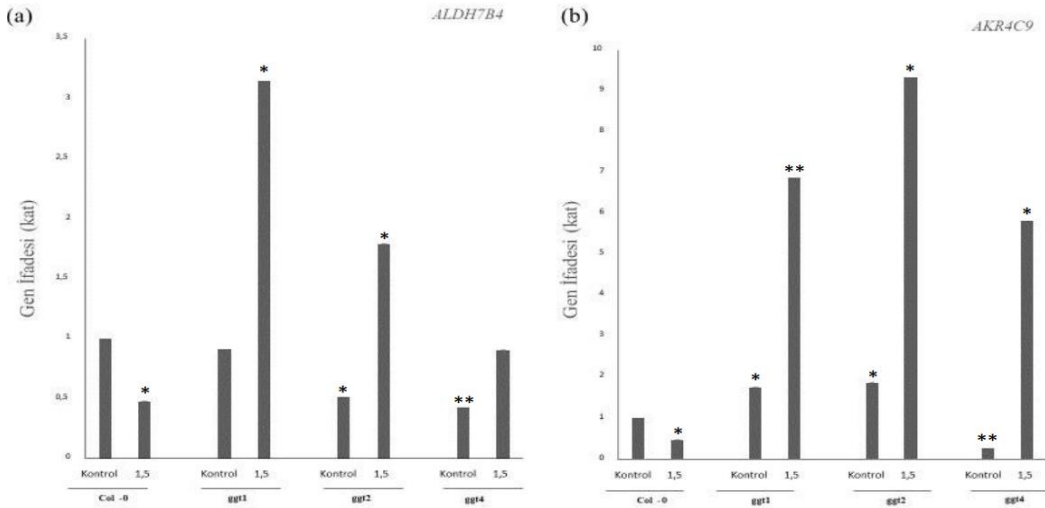
GSH1 ve *GSH2* genlerinin akrolein uygulamasındaki ifade değişimlerine bakıldığında, bütün genotiplerde kontrole kıyasla artış olduğu gözlemlenmiştir. *GSH1* ve *GSH2* ifadeleri sırasıyla Col-0 için 8,77 ve 10,5 kat; *ggt1* için 8,65 ve 10,09 kat; *ggt2* için 7,25 ve 6 kat; *ggt4* için 17,13 ve 28,72 kat artış belirlenmiştir.



Şekil 4.2.5 Col-0, *ggt1*, *ggt2*, *ggt4* bitkilerine uygulanan 1,5mM konsantrasyonundaki akroleinin (a)*GSH1* ve (b)*GSH2* genleri üzerine etkisi

4.2.6 RCS Detoksifikasyonunda Görevli Genlerin İfadeleri

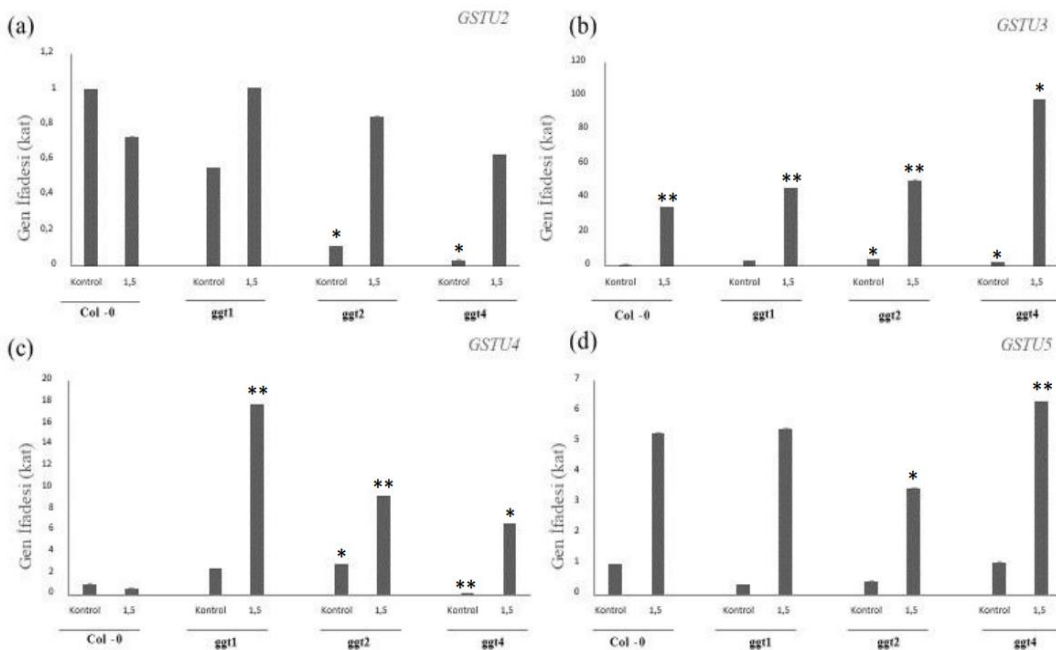
Col-0 ekotipi hariç diğer genotiplerde akrolein uygulamasıyla birlikte *ALDH7B4* ve *AKR4C9* genlerinin ifadelerinde artış gözlenmiştir. *ALDH7B4* ve *AKR4C9* için sırasıyla Col-0'da 2,09 ve 2,10 kat azalma izlenirken *ggt1*'de 3,45 ve 3,9 kat; *ggt2*'de 3,51 ve 4,98 kat; *ggt4*'de ise 2,13 ve 22,83 kat artış belirlenmiştir.



Şekil 4.2.6 Col-0, *ggt1*, *ggt2*, *ggt4* bitkilerine uygulanan 1,5mM konsantrasyonundaki akroleinin (a)*ALDH7B4* ve (b)*AKR4C9* genleri üzerine etkisi

4.2.7 Glutasyon Transferaz Tau Sınıfı Genlerin İfadeleri

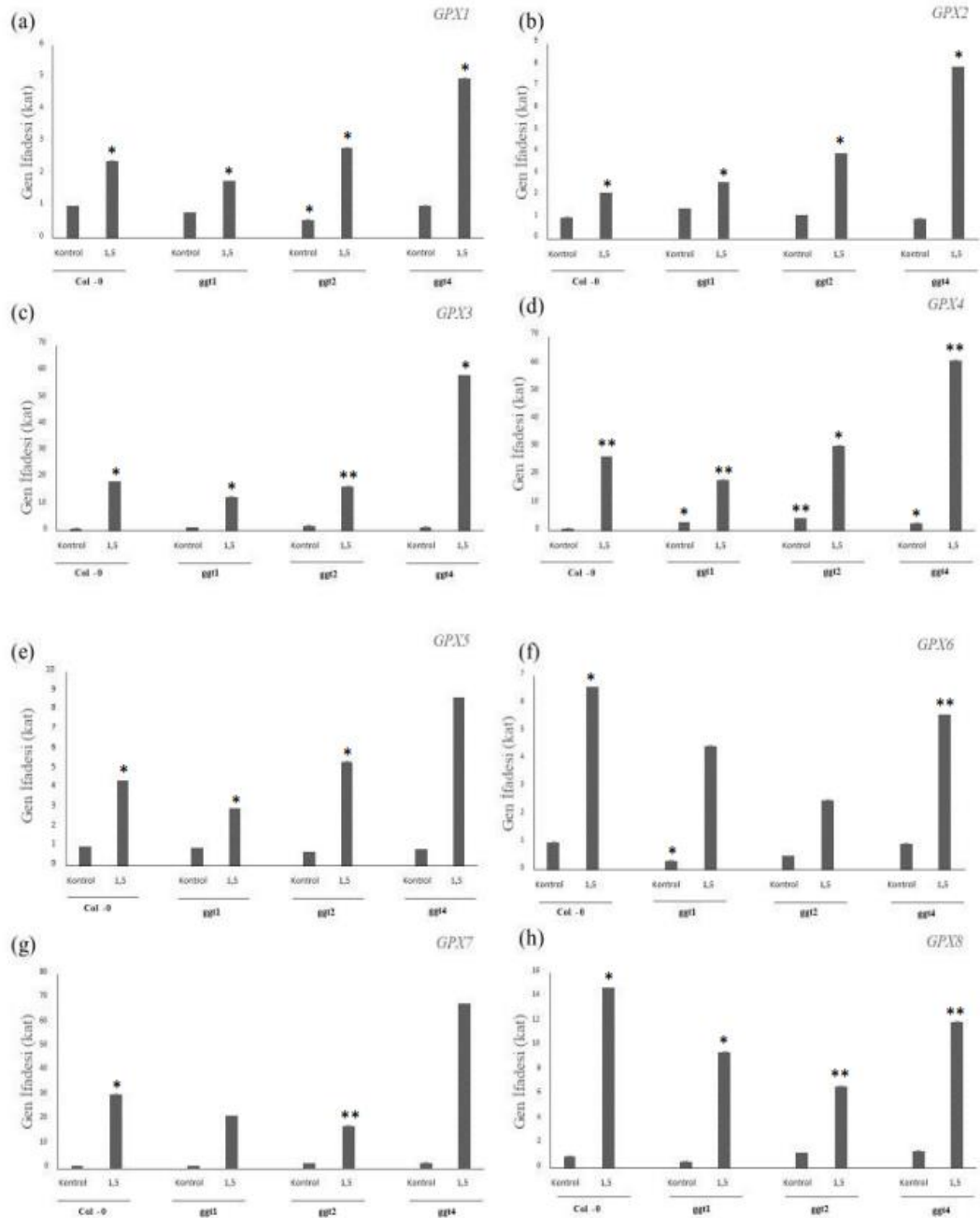
Total bitkide *GSTU2* geninin ifadesine bakıldığında akrolein uygulanan grupların, kontrol gruplarına kıyasla yalnızca Col-0 ekotipinde 1,37 kat azalma meydana geldiği görülmektedir. Diğer genotiplerde ise, *ggt1* 1,81; *ggt2* 7,65; *ggt4* 18,61 kat arttığı belirlenmiştir. Akrolein uygulamasına yanıt olarak *GSTU3* geninin ifadesinde kontrol gruplarına göre bütün genotiplerde artış gözlenmiştir. Col-0 34,67; *ggt1* 15,57; *ggt2* 13; *ggt4* 45,29 kat artmış. *GSTU4* geni Col-0 1,77 azalmış, *ggt1* 7,32; *ggt2* 3,29; *ggt4* 410,25 kat artmış. *GSTU5* geni Col-0 5,3; *ggt1* 17,28; *ggt2* 7,69; *ggt4* 5,98 kat artmıştır.



Şekil 4.2.7 Col-0, *ggt1*, *ggt2*, *ggt4* bitkilerine uygulanan 1,5mM konsantrasyonundaki akroleinin (a)*GSTU2* ve (b)*GSTU3* (c)*GSTU4* ve (d)*GSTU5* genleri üzerine etkisi

4.2.8 Glutasyon Peroksidaz Genlerinin İfadeleri

GPX1 Col-0 2,42; *ggt1* 2,23; *ggt2* 4,85; *ggt4* 4,83 kat artmış. *GPX2* Col-0 2,12; *ggt1* 1,87; *ggt2* 3,59; *ggt4* 8,54 kat artmış. *GPX3* Col-0 18,44; *ggt1* 9,84; *ggt2* 8,70; *ggt4* 42,39 kat artmış. *GPX4* Col-0 26,6 kat; *ggt1* 5,79; *ggt2* 6,80; *ggt4* 22,47 kat artmış. *GPX5* Col-0 4,41; *ggt1* 3,21; *ggt2* 7,60; *ggt4* 10,44 kat artmış. *GPX6* Col-0 6,59; *ggt1* 13,43; *ggt2* 5,15; *ggt4* 5,82 kat artmış. *GPX7* Col-0 30,43; *ggt1* 22,78; *ggt2* 8,85; *ggt4* 30,81 kat artmış. *GPX8* Col-0 14,74; *ggt1* 16,31; *ggt2* 5,29; *ggt4* 8,29 kat artmıştır.

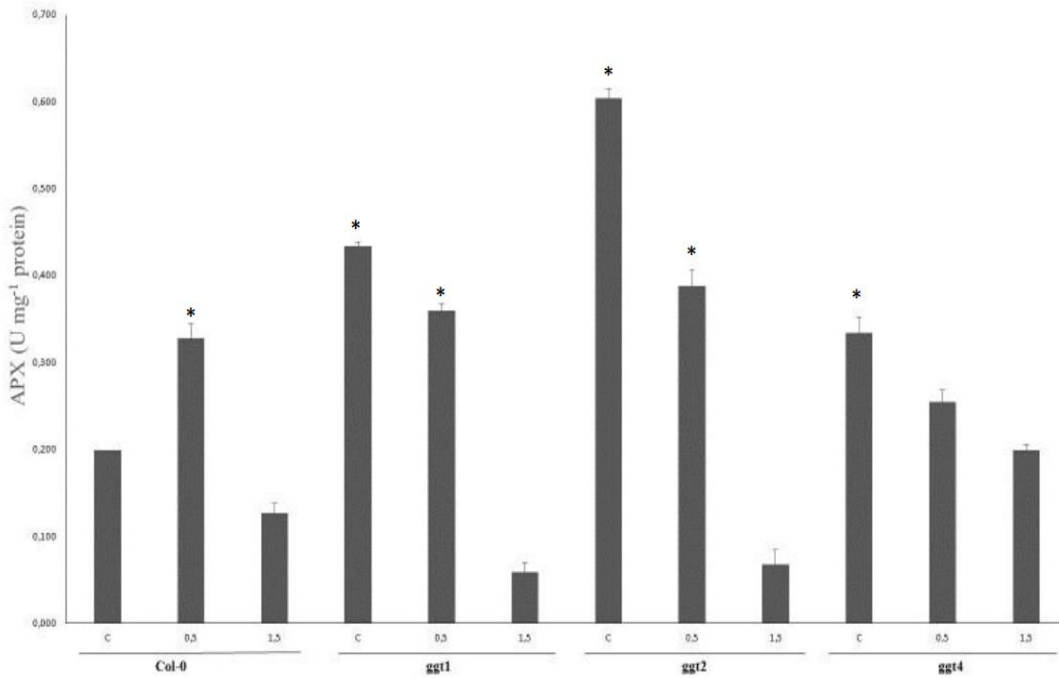


Şekil 4.2.8 Col-0, *ggt1*, *ggt2*, *ggt4* bitkilerine uygulanan 1,5mM konsantrasyonundaki akroleinin (a)*GPX1* ve (b)*GPX2* (c)*GPX3* (d)*GPX4* (e)*GPX5* (f)*GPX6* (g)*GPX7* ve (h)*GPX8* genleri üzerine etkisi

4.3 Enzim Aktiviteleri

4.3.1 Askorbat Peroksidaz (APX) Enzim Aktivitesi

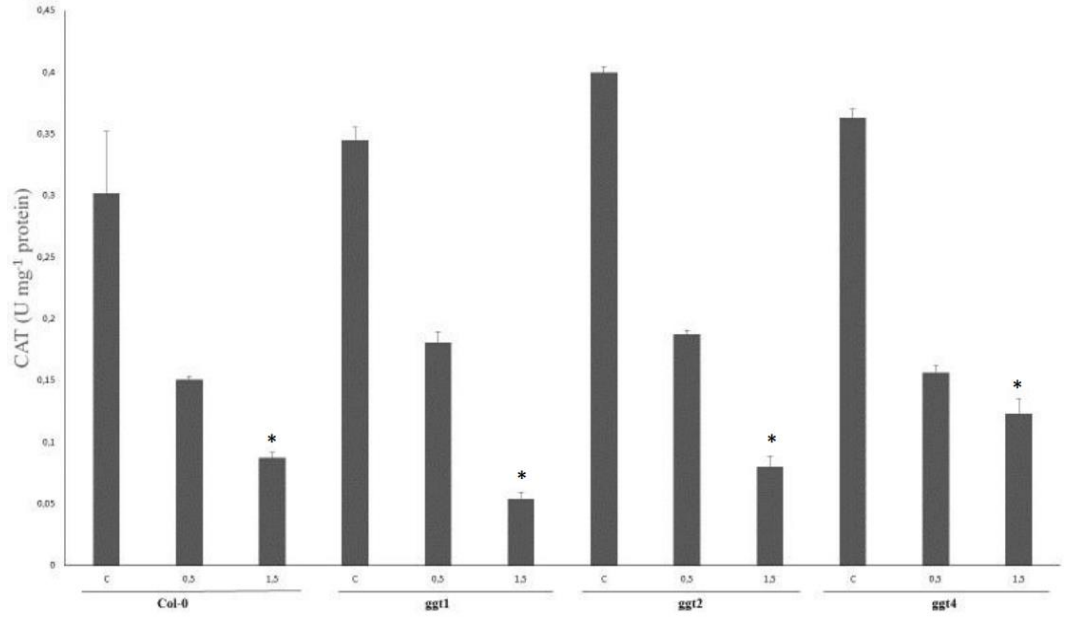
Askorbat peroksidaz (APX) aktivitesi, *Arabidopsis thaliana* Col-0 ekotipinin 0,5mM ACR uygulama grubu hariç tüm mutantlarda ve uygulama gruplarında azalmıştır. Col-0 ekotipinde kontrol grubuna kıyasla 0,5mM ACR grubunda enzim aktivitesi %64 oranında artarken 1,5mM ACR grubunda %36 oranında azalmıştır. *ggt1* mutantında enzim aktivitesi 0,5mM ACR grubunda %16 1,5mM ACR grubunda %86 oranında azalmıştır. *ggt2* mutantında enzim aktivitesi 0,5mM ve 1,5mM ACR gruplarında sırasıyla %36 ve %89 oranlarında azalmıştır. *ggt4* mutantında enzim aktivitesi 0,5mM ACR grubunda %23 ve 1,5mM ACR grubunda %30 oranında azalmıştır.



Şekil 4.3.1 Col-0, *ggt1*, *ggt2*, *ggt4* bitkilerine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki askorbat peroksidaz (APX) enzim aktivitesi

4.3.2 Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesi

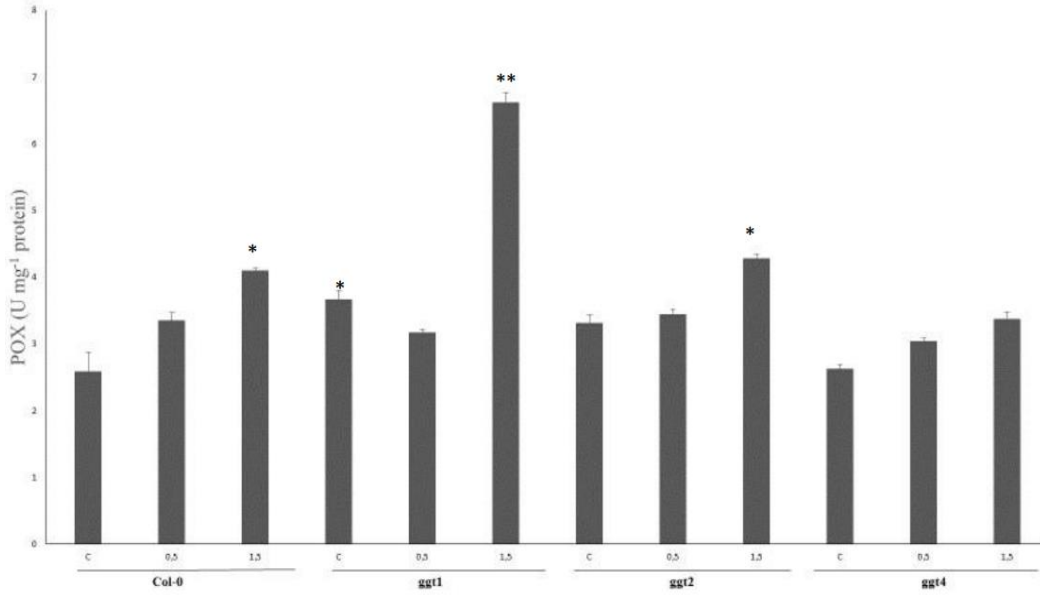
Katalaz (CAT) enzim aktivitesi ACR uygulamasıyla *Arabidopsis thaliana*'nın tüm *ggt* mutantlarında ve Col-0 ekotipinde düşmüştür. 0,5mM ve 1,5mM ACR uygulamaları Col-0 ekotipinde enzim aktivitesini sırasıyla %51 ve %71 oranlarında, *ggt1* mutantında sırasıyla %57 ve %84 oranlarında, *ggt2* mutantında sırasıyla %53 ve %81, *ggt4* mutantında sırasıyla %57 ve %66 oranlarında azaltmıştır.



Şekil 4.3.2 Col-0, *ggt1*, *ggt2*, *ggt4* bitkilerine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki akroleinin CAT enzimi aktivitesi

4.3.3 Peroksidaz (POX) Enzim Aktivitesi

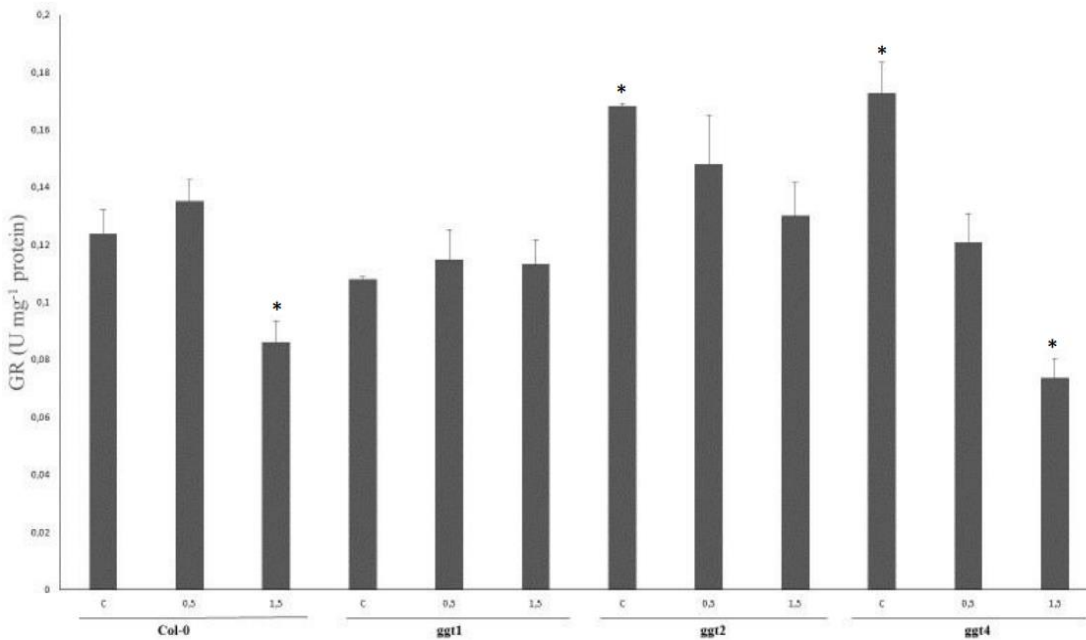
Peroksidaz aktivitesi, *ggt1* mutanıtı 0,5mM ACR grubu hariç tüm *Arabidopsis thaliana* *ggt* mutanıtlarında ve Col-0 ekotipinde artış göstermiştir. Col-0 ekotipinde enzim aktivitesi 0,5mM ACR grubunda %30 1,5mM ACR grubunda %59 oranında artmıştır. *ggt1* mutanıtında enzim aktivitesi 0,5mM ACR grubunda %13 oranında azalmış 1,5mM ACR grubunda %80 oranında artmıştır. *ggt2* mutanıtında 0,5mM ve 1,5mM ACR grubunda enzim aktivitesi sırasıyla %4 ve %29 oranlarında artmıştır. *ggt4* mutanıtında enzim aktivitesi 0,5mM ACR %16 oranında 1,5mM ACR grubunda %28 oranında artmıştır.



Şekil 4.3.3 Col-0, *ggt1*, *ggt2*, *ggt4* bitkilerine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki akroleinin POX enzimi aktivitesi

4.3.4 Glutasyon Redüktaz (GR) Enzim Aktivitesi

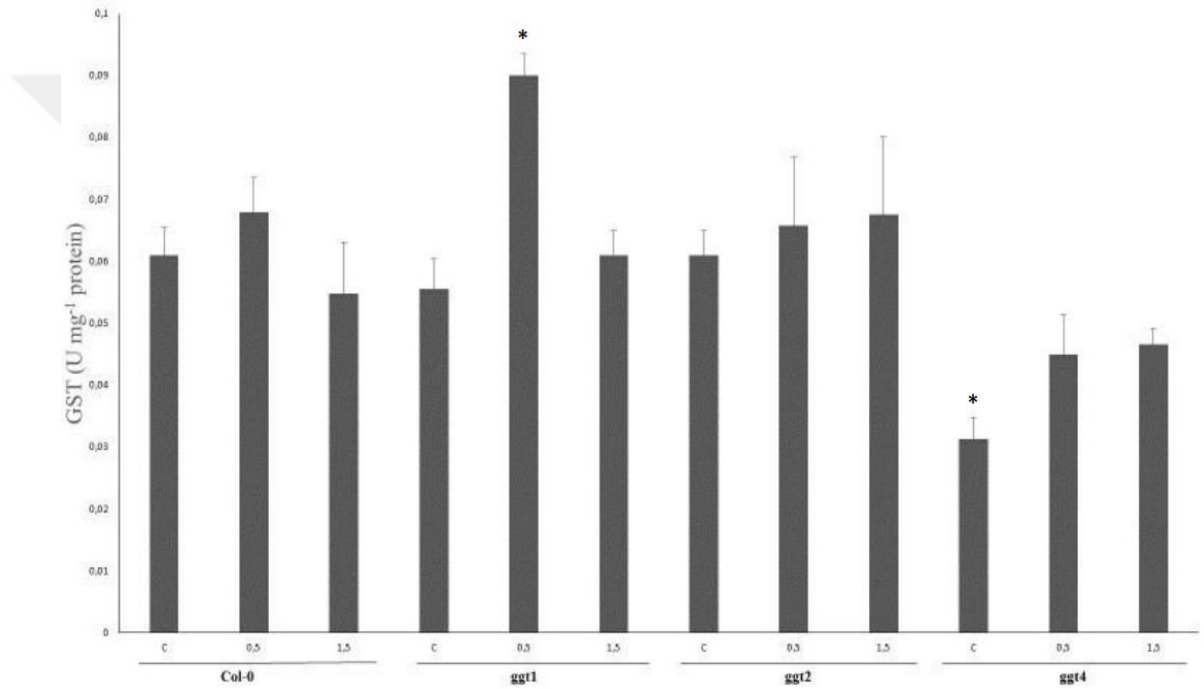
Glutasyon redüktaz (GR) aktivitesi *Arabidopsis thaliana* Col-0 ekotipinde 0,5mM ACR uygulamasında %9 artmış ancak 1,5mM ACR uygulamasında %30 azalmıştır. *ggt1* mutantında hem 0,5mM hem 1,5mM ACR grubunda sırasıyla %6 ve %5 oranında artmıştır. *ggt2* ve *ggt4* mutantlarında tüm uygulama gruplarında enzim aktivitesi 0,5mM ACR grubunda sırasıyla %12 ve %30 oranında 1,5mM ACR grubunda ise sırasıyla %23 ve %57 oranında azalmıştır.



Şekil 4.3.4 Col-0, *ggt1*, *ggt2*, *ggt4* bitkilerine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki akroleinin GR enzimi aktivitesi

4.3.5 Glutasyon Transferaz (GST) Enzim Aktivitesi

Glutasyon transferaz (GST) enzim aktivitesi *Arabidopsis thaliana* Col-0 ekotipinin 1,5mM ACR uygulama grubu hariç tüm mutantların uygulama gruplarında artış göstermiştir. Col-0 ekotipinde 0,5mM ACR grubunda enzim aktivitesi %13 oranında artmış anca 1,5mM ACR grubunda %11 oranında azalmıştır. 0,5mM ACR ve 1,5mM ACR uygulama gruplarında enzim aktivitesi *ggt1* mutantında sırasıyla %62 ve %10 oranında, *ggt2* mutantında sırasıyla %7 ve %10 oranında, *ggt4* mutantında sırasıyla %43 ve %48 oranında artmıştır.

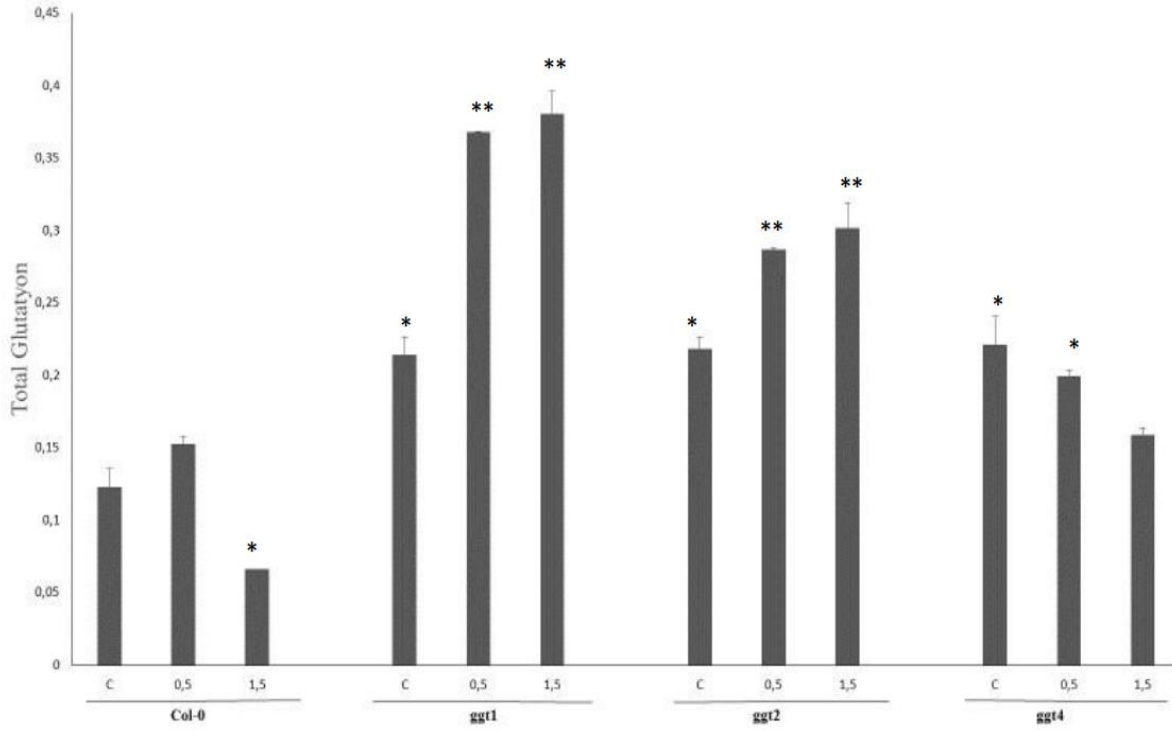


Şekil 4.3.5 Col-0, *ggt1*, *ggt2*, *ggt4* bitkilerine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki akroleinin GST enzimi aktivitesi

4.4 Total Glutasyon Miktarı

Bitkideki toplam glutasyon (GSH+GSSG) miktarı *Arabidopsis thaliana* Col-0 ekotipinin 1,5mM ACR ve *ggt4* mutantının ACR uygulama grupları hariç tüm uygulama gruplarında kontrole göre artış göstermiştir. Col-0 ekotipinde 0,5mM ACR grubunda enzim aktivitesi %25 oranında artmış ancak 1,5mM ACR grubunda %46 oranında azalmıştır. 0,5mM ACR ve 1,5mM ACR uygulama gruplarında enzim aktivitesi *ggt1* mutantında sırasıyla %72 ve %77 oranında, *ggt2* mutantında

sırasıyla %31 ve %38 oranında artmış, *ggt4* mutantında ise sırasıyla %10 ve %28 oranında azalmıştır.



Şekil 4.4 Farklı konsantrasyonlardaki akrolein uygulanan Col-0, *ggt1*, *ggt2* ve *ggt4* bitkilerinin toplam glutatyon miktarları

5. TARTIŞMA

Stres durumlarında bitkilerde artan ROS üretimi oksidatif strese neden olmaktadır (Mittler, 2017). Oksidatif stres, lipid peroksidasyonunu arttırarak akrolein (ACR) gibi RCS üretiminin de artmasına neden olmaktadır (Yalcinkaya ve ark, 2019). Bitkiler ROS'ların yanı sıra RCS'leri de detoksifiye edebilmek için çeşitli enzimatik ve enzimatik olmayan süpürücü sistemleri kullanırlar (Mano ve ark., 2019). Akrolein (ACR) gibi RCS'ler, bitkide bitki süpürücü sistemleri tarafından yeterince süpürülemez ise stres kaynaklı programlanmış hücre ölümü (PCD) tetiklenir (Biswas ve Mano, 2016). Bitkiler bu RCS'lerin birikimini önlemek ve süpürebilmek için antioksidan savunma sistemlerini devreye sokarlar. Çalışmamızda yapılan analizlerin amacı *Arabidopsis thaliana*'nın Col-0 ekotipi ve gama-glutamil transferaz (GGT) enzimlerinin mutantları kullanarak, en toksik RCS olan ACR'nin (Esterbauer ve diğerleri, 1991) dışarıdan uygulanmasıyla antioksidan savunma mekanizmasını uyarıp uyarmadığını belirlemek ve GGT'lerin RCS'ye toleransındaki rollerini ortaya koymaktır.

Bitkilerde antioksidan savunma sistemleri ROS ve RCS gibi zararlı bileşiklerin süpürülmesi için önemlidir. Çalışmamızda yüksek konsantrasyonlarda akrolein uygulamasıyla bitkide H₂O₂'in süpürülmesi için görevli CAT, POX ve APX antioksidan enzimlerinin dengesi bozulmuştur ve buna bağlı olarak aktivitelerinde farklılıklar gözlenmiştir. Yapılan bir çalışmada katalaz aktivitesi, *Caenorhabditis elegans*'ta ACR konsantrasyonuna bağlı olarak düşmüştür (Hong ve ark, 2022). Çalışmamızda da ACR konsantrasyonu arttıkça tüm genotiplerde CAT aktivitesinin düştüğü gözlenmektedir. Katalaz aktivitesine ek olarak Askorbat Peroksidaz (APX) aktivitesinde de benzer durum söz konusudur. *Arabidopsis thaliana* Col-0 ekotipinin 0,5 mM akrolein uygulama grubu hariç diğer tüm genotiplerde akrolein konsantrasyonuna bağlı olarak düşüş söz konusudur. CAT ve APX'in aksine *ggt1* mutantının 0,5 mM akrolein uygulama grubu hariç diğer tüm genotiplerde Peroksidaz (POX) aktivitesinde artış gözlenmektedir. Yalcinkaya vd. (2019)'da yaptığı araştırmada, RCS uygulanan *A. thaliana*'da düşük konsantrasyonlarda CAT, POX ve APX aktivitesi indüklenmişken konsantrasyon yükseldikçe aktivitede düşüş gözlemlenmiştir. Aynı çalışmada, GR aktivitesi ACR uygulanan

bütün gruplarda düşmüştür. Bu çalışmada ise, APX aktivitesi Col-0 ekotipinde düşük konsantrasyonda artmış, diğer bütün gruplarda düşüş gözlenmiştir. POX aktivitesi, *ggt1* mutantının düşük konsantrasyonu hariç bütün gruplarda artmıştır. GR aktivitesi ise, Col-0'ın düşük konsantrasyonunda artmış, *ggt1*'de anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. *ggt2* ve *ggt4* genotiplerinde ise uygulama gruplarının hepsinde düşüş gözlenmiştir. Akrolein gibi RCS türevlerinin yüksek konsantrasyonlarda uygulanması bitki antioksidan savunma mekanizmasını bozup enzimleri bozduğu görülmektedir.

Zhou vd. (2015)'te yaptığı araştırmaya göre PSII'nin (*Fv/Fm*) maksimum kuantum verimliliği domates yapraklarında yüksek sıcaklık altında düşmüştür. Aynı şekilde Hong vd. (2009)'da yaptığı araştırmada da benzer bir düşüş gözlemlenmiştir. Bizim çalışmamızda da literatüre uygun olarak akrolein uygulaması yapılan Col-0 ve *ggt* mutantlarının PSII fotokimyasal verimliliği olumsuz etkilenmiştir.

Bir reaktif karbonil türü (RCS) olan akrolein'in yüksek konsantrasyonlarda ROS sinyallemeyle ilişkisini aydınlatmak adına strese duyarlı RBOH (*RBOHD* ve *RBOHF*) genlerinin ifadeleri incelenmiştir. Akroleinin düşük konsantrasyonda ve bitki türüne bağlı olarak *RBOHD* ve *RBOHF* ifadesinde farklı ifadelerle yol açtığı bildirilmiştir (Yalcinkaya et al.,2019). Ancak çalışmamızda 1,5mM akrolein yüksek konsantrasyonu farklı *Arabidopsis thaliana* mutantları ve Col-0 ekotipinde RBOH ifadelerinde tam tersi bir etki göstermiş. *Arabidopsis thaliana* Col-0 ekotipinde 1,5mM ACR konsantrasyonu, *RBOHD* ifadesini 52 kat arttırırken *RBOHF* ifadesini 0,48 kat azaltmıştır. *ggt4* mutantındaki hem *RBOHD* hem *RBOHF*'deki gen ifadesinin azalması hariç tüm *ggt* mutantlarında RBOH ifadelerinin arttığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlardan *RBOHD*'nin RCS sinyallemesinde görev alabileceğini göstermektedir.

Yüksek akrolein konsantrasyonunun RCS detoksifikasyona etkisini incelemek için RCS detoksifiye edici ALDH ve AKR genlerinin ifadeleri (Oberschall ve ark., 2000, Kotchoni ve ark., 2006) incelenmiştir. *ALDH7B4* ifadesinin tuz stresi, ABA ve dehidrasyon ile *Arabidopsis thaliana* tohumlarında ve herbisit direncinde artış

gösterdiği bildirilmiştir (Missihoun ve ark, 2014; Gil-Monreal ve ark, 2017). Ayrıca, Zhao vd. (2017)'ye göre *ALDH7B4* gen ifadesi *A. thaliana*'da sıcaklık stresiyle birlikte artmıştır. Ancak çalışmamızda ilginç olarak tüm ggt mutantlarında genin ifadesi artış gösterirken Col-0 ekotipinde 2,1 kat azalmıştır. Saito ve ark (2013)'ün yaptığı çalışmada *AKR4C9* ifadesinin artan akrolein konsantrasyonlarına bağlı olarak azaldığını tespit etmişlerdir. Çalışmamızda Col-0 ekotipinde 1,5mM akrolein konsantrasyonu literatürle tutarlı olarak *AKR4C9* ifadesi 2,1 kat azalmıştır ancak ilginç olarak tüm ggt mutantlarında gen ifadesinde artış gözlenmektedir. Bu sonuçlardan, Col-0 ekotipinin yüksek ACR konsantrasyonunda RCS detoksifikasyonu için başka enzimler kullanabileceğini göstermektedir.

GSH, akrolein'e karşı ilk savunma hattı Dixon ve ark (2010) olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda 1,5mM yüksek akrolein konsantrasyonunun GSH metabolizmasına etkisi incelenmiştir. GSH biyosentezinden sorumlu GSH1 ve GSH2 ifadeleri oksidatif strese neden olan yüksek ışık koşullarında *Chlamydomonas reinhardtii*'de arttığı bildirilmiştir (Lin ve ark, 2018). Çalışmamızda tutarlı olarak 1,5mM akrolein konsantrasyonunda tüm *Arabidopsis thaliana* ggt mutantları ve Col-0 ekotipinde GSH1 ve GSH2 ifadeleri ortalama 10 artmıştır. Çalışmamızda Col-0 ekotipinde GSH degradasyonu, GGT enzimi ile ekstra sitozolik olarak aktivite gösterirken ggt mutantları yalnızca sitozolik yoldan bu degradasyonu sağlamaktadır. GSH'ın parçalanması GGCT ve 5OPaz (OXP1) ile sağlandığı Noctor ve ark., (2011) tarafından belirlenmiştir. Haskirli vd. (2021) yaptığı araştırmada, UV-B stresine maruz bırakılan *Arabidopsis thaliana*'da GSH katabolizmasındaki değişiklikleri gözlemlemek için 5-oksoprolinaz ve gama-glutamil transpeptidazın genleri olan *OMP1* ve *GGT1* genlerinin ifadelerine bakılmıştır. UV-B stresi, *GSH1* ve *GGT1* gen ifadelerini anlamlı olarak etkilemezken *OMP1* ve *GSH2* gen ifadelerinde azalmaya neden olmuştur. Bu çalışmada ise *OMP1*, *GGT1* ve *GGT2* gen ifadelerinde akrolein uygulanan bütün gruplarda artış gözlemlenmiştir. Çalışmamızda *OMP1* gen ifadesi ggt mutantlarında ortalama 7 kat artmıştır.

Mano vd. (2017)'ye göre akrolein varlığında çeşitli bitkilerde GST enzim aktivitesi artmaktadır. Bu çalışmada ise, Col-0'da yüksek ACR konsantrasyonu

hariç bütün gruplarda artış olmuştur. *GSTU2*, *GSTU3*, *GSTU4* ve *GSTU5* genlerinin ifadelerine bakıldığında ise aynı grubun *GSTU2* ve *GSTU4* genleri dışındaki bütün grupların gen ifadelerinde artış gözlemlenmiştir. Glutasyon peroksidaz (GPX), GSH kullanarak lipid peroksitleri ve serbest H_2O_2 'yi karşılık gelen alkollere ve suya indirgeyerek bitkileri oksidatif strese koruyan bir antioksidan enzimdir (Zhai vd., 2013). Li vd. (2021)'de yaptığı araştırmada *Brassica napus* bitkisinin BnGPX genleri çok sayıda dokuda farklı şekilde ifade edilmiştir. Çeşitli abiyotik strese yanıt olarak gen ekspresyon profillemesinin sonucu olarak birkaç BnGPX geninin stres yanıtlarına ve hormon sinyal yollarına katkıda bulunabileceğini keşfetmişlerdir. Bu çalışmada da akrolein uygulaması yapılan bütün gruplarda *GPX1*, *GPX2*, *GPX3*, *GPX4*, *GPX5*, *GPX6*, *GPX7* ve *GPX8* genlerinin ifadelerinde artış olduğu görülmüştür. Roach vd. (2018) araştırmasında *C. reinhardtii*'ye eksojen akrolein uygulanmıştır. Toplam glutasyon miktarı, 600 ppm akroleine yanıt olarak arttığı gözlemlenmiştir. Bu çalışmada ise, Col-0 ekotipinde yüksek akrolein konsantrasyonunda ve *ggt4* mutantında düşüş gözlenirken *ggt1* ve *ggt2* mutantlarında artış gözlenmiştir.

Kaur vd. (2023) yaptığı araştırmaya göre transgenik buğday hatlarının sıcaklık stresi altında daha yüksek *ZAT12* gen ifadesi gösterdiğini ortaya çıkarmışlardır. Benzer şekilde, Davletova vd. (2005) de *ZAT12*'nin stres toleransında önemli bir rol oynadığını ve bir ROS süpürücüsü olarak hareket ettiğini bildirmiştir. Rizhsky vd. (2004) ise *ZAT12* gen ekspresyonunun ROS metabolizması ile kesin bir şekilde bağlantılı olduğunu göstermiştir. Bizim çalışmamızda da literatüre uygun olarak akrolein uygulanan bütün gruplarda *ZAT12* gen ifadesi kontrole kıyasla artmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, bitkilerdeki RCS detoksifikasyonunda görevli olan glutatyon degradasyonunun ekstrasitozolik enzimi olan GGT enzimlerinin RCS detoksifikasyonundaki rolü daha iyi anlaşılmıştır. Arabidopsis thaliana Col-0 ekotipi ve *ggt* mutantlarının köklerine eksojen olarak akrolein uygulanmıştır. Yapılan analizlerin sonucunda *ggt1* mutantının akroleine karşı yüksek toleransa sahip olduğu ortaya çıkmıştır. Ayrıca elde edilen fenotipik bulgular vakuolar GGT4 enziminin akrolein detoksifikasyonu üzerine etkilerinin sınırlı olduğunu göstermektedir.



KAYNAKLAR DİZİNİ

- Alméras, E., Stolz, S., Vollenweider, S., Reymond P. Mène-Saffrané L. and Farmer, E. E.,** 2003, Reactive electrophile species activate defense gene expression in *Arabidopsis*, *The Plant Journal*, 34(2), 205-216.
- Asada, K.,** 2006, Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions, *Plant Physiology*, 141(2), 391-396.
- Auiyawong, B., Narawongsanont, R., and Tantitadapitak, C.,** 2017, Characterization of AKR4C15, a Novel Member of Aldo–Keto Reductase, in Comparison with Other Rice AKR (s), *The Protein Journal*, 36, 257-269.
- Babiychuk, E., Kushnir, S., Belles-Boix, E., Van Montagu, M., and Inzé, D.,** 1995, *Arabidopsis thaliana* NADPH oxidoreductase homologs confer tolerance of yeasts toward the thiol-oxidizing drug diamide, *Journal of Biological Chemistry*, 270(44), 26224-26231.
- Biswas, M. S., and Mano, J. I.,** 2016, Reactive carbonyl species activate caspase-3-like protease to initiate programmed cell death in plants. *Plant and Cell Physiology*, 57(7), 1432-1442.
- Biswas, M. S., and Mano, J. I.,** 2021, Lipid peroxide-derived reactive carbonyl species as mediators of oxidative stress and signaling. *Frontiers in Plant Science*, 12, 720867.
- Blée, E.** (1998). Phytooxylipins and plant defense reactions. *Progress in lipid research*, 37(1), 33-72.
- Cairns, N. G., Pasternak, M., Wachter, A., Cobbett, C. S., and Meyer, A. J.,** 2006, Maturation of *Arabidopsis* seeds is dependent on glutathione biosynthesis within the embryo. *Plant physiology*, 141(2), 446-455.
- Chaudhry, S., and Sidhu, G. P. S.,** 2022, Climate change regulated abiotic stress mechanisms in plants: A comprehensive review. *Plant Cell Reports*, 41(1), 1-31.
- Destro, T., Prasad, D., Martignago, D., Lliiso Bernet, I., Trentin, A. R., Renu, I. K., ... and Masi, A.,** 2011, Compensatory expression and substrate inducibility of γ -glutamyl transferase GGT2 isoform in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of experimental botany*, 62(2), 805-814.
- Dietz, K. J.,** 2003, Redox control, redox signaling, and redox homeostasis in plant cells. *Int Rev Cytol*, 228, 141-193.
- Dorion, S., Ouellet, J. C., and Rivoal, J.,** 2021, Glutathione metabolism in plants under stress: Beyond reactive oxygen species detoxification. *Metabolites*, 11(9), 641.
- Eckardt, N. A.,** 2008, Oxylipin signaling in plant stress responses.
- Esterbauer, H., Schaur, R. J., and Zollner, H.,** 1991, Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free radical Biology and medicine*, 11(1), 81-128.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Éva, C., Zelenyánszki, H., Tömösközi-Farkas, R., and Tamás, L.,** 2014, Transgenic barley expressing the Arabidopsis AKR4C9 aldo-keto reductase enzyme exhibits enhanced freezing tolerance and regenerative capacity. *South African Journal of Botany*, 93, 179-184.
- Farmer, E. E., and Mueller, M. J.,** 2013, ROS-mediated lipid peroxidation and RES-activated signaling. *Annual review of plant biology*, 64, 429-450.
- Ferretti, M., Destro, T., Tosatto, S. C. E., Rocca, N. L., Rascio, N., and Masi, A.,** 2009, Gamma-glutamyl transferase in the cell wall participates in extracellular glutathione salvage from the root apoplast. *New Phytologist*, 115-126.
- Ferretti, M., Destro, T., Tosatto, S. C. E., Rocca, N. L., Rascio, N., and Masi, A.,** 2009, Gamma-glutamyl transferase in the cell wall participates in extracellular glutathione salvage from the root apoplast. *New Phytologist*, 115-126.
- Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J. H., Mylona, P., Miedema, H., Torres, M. A., and Davies, J. M.,** 2003, Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth, *Nature*, 422(6930), 442.
- Foyer, C. H., and Noctor, G.,** 2011, Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant physiology*, 155(1), 2-18.
- Foyer, C. H., and Noctor, G.,** 2009, Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications, *Antioxidants and redox signaling*, 11(4), 861-905.
- Grosch, W.,** 1987, Reaction of hydroperoxides — products of low molecular weight. In *Autoxidation of Unsaturated Lipids*. Ed. H. W.-S. Chan. Academic Press, London, pp. 95–139.
- Grzam, A., Martin, M. N., Hell, R., and Meyer, A. J.,** 2007, γ -Glutamyl transpeptidase GGT4 initiates vacuolar degradation of glutathione S-conjugates in Arabidopsis. *FEBS letters*, 581(17), 3131-3138.
- Huang, W., Ma, X., Wang, Q., Gao, Y., Xue, Y., Niu, X., ... and Liu, Y.,** 2008, Significant improvement of stress tolerance in tobacco plants by overexpressing a stress-responsive aldehyde dehydrogenase gene from maize (*Zea mays*). *Plant molecular biology*, 68, 451-463.
- Islam, F., Wang, J., Farooq, M. A., Yang, C., Jan, M., Mwamba, T. M., ... and Zhou, W.,** 2019, Rice responses and tolerance to salt stress: deciphering the physiological and molecular mechanisms of salinity adaptation. In *Advances in rice research for abiotic stress tolerance* (pp. 791-819). Woodhead Publishing.
- Islam, F., Yasmeen, T., Arif, M. S., Ali, S., Ali, B., Hameed, S., and Zhou, W.,** 2016, Plant growth promoting bacteria confer salt tolerance in *Vigna radiata* by up-regulating antioxidant defense and biological soil fertility. *Plant growth regulation*, 80, 23-36.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ji, M., Torii, Y., Si, H., Takimoto, K., Matsui, K., Nakamura, K., ... and Asada, K.,** 2002, The NADPH: Quinone Oxidoreductase P1- ζ -crystallin in Arabidopsis Catalyzes the α , β -Hydrogenation of 2-Alkenals: Detoxication of the Lipid Peroxide-Derived Reactive Aldehydes. *Plant and Cell Physiology*, 43, 1445-1455.
- Kehrer, J. P.,** 2000, The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*, 149(1), 43-50.
- Koffler, B. E., Bloem, E., Zellnig, G., and Zechmann, B.,** 2013, High resolution imaging of subcellular glutathione concentrations by quantitative immunoelectron microscopy in different leaf areas of Arabidopsis. *Micron*, 45, 119-128.
- Kotchoni, S. O., Kuhns, C., Ditzer, A., KIRCH, H. H., and Bartels, D.,** 2006, Over-expression of different aldehyde dehydrogenase genes in Arabidopsis thaliana confers tolerance to abiotic stress and protects plants against lipid peroxidation and oxidative stress. *Plant, cell and environment*, 29(6), 1033-1048.
- Kumar, S., Kaur, A., Chattopadhyay, B., and Bachhawat, A. K.,** 2015, Defining the cytosolic pathway of glutathione degradation in Arabidopsis thaliana: role of the ChaC/GCG family of γ -glutamyl cyclotransferases as glutathione-degrading enzymes and AtLAP1 as the Cys-Gly peptidase. *Biochemical Journal*, 468(1), 73-85.
- Kunishima, M., Yamauchi, Y., Mizutani, M., Kuse, M., Takikawa, H., and Sugimoto, Y.,** 2016, Identification of (Z)-3:(E)-2-hexenal isomerases essential to the production of the leaf aldehyde in plants. *Journal of Biological Chemistry*, 291(27), 14023-14033.
- Lu, H. P., Xun, L., and Xie, X. S.,** 1998, Single-molecule enzymatic dynamics. *Science*, 282(5395), 1877-1882.
- Lu, Y. P., Li, Z. S., Drozdowicz, Y. M., Hörtensteiner, S., Martinoia, E., and Rea, P. A.,** 1998, AtMRP2, an Arabidopsis ATP binding cassette transporter able to transport glutathione S-conjugates and chlorophyll catabolites: functional comparisons with AtMRP1. *The Plant Cell*, 10(2), 267-282.
- Lu, Y. P., Li, Z. S., and Rea, P. A.,** 1997, AtMRP1 gene of Arabidopsis encodes a glutathione S-conjugate pump: isolation and functional definition of a plant ATP-binding cassette transporter gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(15), 8243-8248.
- Mano, J. I.,** 2012, Reactive carbonyl species: their production from lipid peroxides, action in environmental stress, and the detoxification mechanism. *Plant Physiology and Biochemistry*, 59, 90-97.
- Mano, J. I., Belles-Boix, E., Babiychuk, E., Inzé, D., Torii, Y., Hiraoka, E., ... and Kushnir, S.,** 2005, Protection against photooxidative injury of tobacco leaves by 2-alkenal reductase. Detoxication of lipid peroxide-derived reactive carbonyls. *Plant Physiology*, 139(4), 1773-1783.
- Mano, J. I., Ishibashi, A., Muneuchi, H., Morita, C., Sakai, H., Biswas, M. S., ... and Kitajima, S.,** 2017, Acrolein-detoxifying isozymes of glutathione transferase in plants. *Planta*, 245, 255-264.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mano, J. I., Kanameda, S., Kuramitsu, R., Matsuura, N., and Yamauchi, Y.,** 2019, Detoxification of reactive carbonyl species by glutathione transferase tau isozymes. *Frontiers in plant science*, 10, 487.
- Mano, J. I., Miyatake, F., Hiraoka, E., and Tamoi, M.,** 2009, Evaluation of the toxicity of stress-related aldehydes to photosynthesis in chloroplasts. *Planta*, 230, 639-648.
- Mano, J. I., Nagata, M., Okamura, S., Shiraya, T., and Mitsui, T.,** 2014, Identification of oxidatively modified proteins in salt-stressed *Arabidopsis*: a carbonyl-targeted proteomics approach. *Plant and Cell Physiology*, 55(7), 1233-1244.
- Mano, J. I., Tokushige, K., Mizoguchi, H., Fujii, H., and Khorobrykh, S.,** 2010, Accumulation of lipid peroxide-derived, toxic α , β -unsaturated aldehydes (E)-2-pentenal, acrolein and (E)-2-hexenal in leaves under photoinhibitory illumination. *Plant biotechnology*, 27(2), 193-197.
- Mano, J., and Biswas, M. S.,** 2018, "Analysis of reactive carbonyl species generated under oxidative stress," in *Plant Programmed Cell Death: Methods and Protocols*, eds L. De Gara and V. Locato (New York, NY: Springer), 117–124. doi: 10.1007/978-1-4939-7668-3_11
- Mano, J., Biswas, M.S. and Sugimaoto, K.,** 2019, Reactive carbonyl species: A missing link in ROS signaling. *Plants*, 8(10), 391.
- Mano, J., Tokushige, K., Mizoguchi, H., and Khorobrykh, S. A.,** 2010, Accumulation of lipid peroxide-derived, toxic α , β -unsaturated aldehydes (E)-2-pentenal, acrolein and (E)-2-hexenal in leaves under photoinhibitory illumination. *Plant Biotechnol.* 27, 193–197.
- Marino, D., Dunand, C., Puppo, A., and Pauly, N.,** 2012, A burst of plant NADPH oxidases. *Trends in plant science*, 17(1), 9-15.
- Martin, M. N., and Slovin, J. P.,** 2000, Purified γ -glutamyl transpeptidases from tomato exhibit high affinity for glutathione and glutathione S-conjugates. *Plant Physiology*, 122(4), 1417-1426.
- Masi, A., Trentin, A. R., Agrawal, G. K., and Rakwal, R.,** 2015, Gamma-glutamyl cycle in plants: a bridge connecting the environment to the plant cell?. *Frontiers in Plant Science*, 6, 252.
- Matsui K., Sugimoto K., Kakumyan P., Khorobrykh S.A., and Mano J.,** 2009, Volatile Oxylipins and Related Compounds Formed Under Stress in Plants. *Lipidomics*, 580, 17-28.
- Matsui, K.** (2006). Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism. *Current opinion in plant biology*, 9(3), 274-280.
- Matsui, K., Sugimoto, K., Mano, J. I., Ozawa, R., and Takabayashi, J.,** 2012, Differential metabolisms of green leaf volatiles in injured and intact parts of a wounded leaf meet distinct ecophysiological requirements. *PLoS One*, 7(4), e36433.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Meister, A.**, 1995, [1] Glutathione metabolism. *Methods in enzymology*, 251, 3-7.
- Mène-Saffrané, L., Davoine, C., Stolz, S., Majcherczyk, P., and Farmer, E. E.**, 2007, Genetic removal of tri-unsaturated fatty acids suppresses developmental and molecular phenotypes of an *Arabidopsis* tocopherol-deficient mutant: Whole-body mapping of malondialdehyde pools in a complex eukaryote. *Journal of Biological Chemistry*, 282(49), 35749-35756.
- Miller, G., Shulaev, V., and Mittler, R.**, 2008, Reactive oxygen signaling and abiotic stress, *Physiologia Plantarum*, 133(3), 481-489.
- Mittler, R.**, 2002, Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science*, 7(9), 405-410.
- Mittler, R.**, 2017, ROS are good. *Trends in plant science*, 22(1), 11-19.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., and Van Breusegem, F.**, 2004, Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in plant science*, 9(10), 490-498.
- Monshausen, G. B., and Gilroy, S.**, 2009, Feeling green: mechanosensing in plants, *Trends in cell biology*, 19(5), 228-235.
- Mosblech, A., Feussner, I., and Heilmann, I.**, 2009, Oxylipins: structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(6), 511-517.
- Narawongsanont, R., Kabinpong, S., Auiyawong, B., and Tantitadapitak, C.**, 2012, Cloning and characterization of AKR4C14, a rice aldo-keto reductase, from Thai Jasmine rice. *The protein journal*, 31, 35-42.
- Navrot, N., Rouhier, N., Gelhaye, E., and Jacquot, J. P.**, 2007, Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. *Physiologia Plantarum*, 129(1), 185-195.
- Neta, N. D. A. S., dos Santos, J. C. S., de Oliveira Sancho, S., Rodrigues, S., Gonçalves, L. R. B., Rodrigues, L. R., and Teixeira, J. A.**, 2012, Enzymatic synthesis of sugar esters and their potential as surface-active stabilizers of coconut milk emulsions. *Food Hydrocolloids*, 27(2), 324-331.
- Noctor, G., Strohm, M., Jouanin, L., Kunert, K. J., Foyer, C. H., and Rennenberg, H.**, 1996, Synthesis of glutathione in leaves of transgenic poplar overexpressing [gamma]-glutamylcysteine synthetase. *Plant Physiology*, 112(3), 1071-1078.
- Oberschall, A., Deák, M., Török, K., Sass, L., Vass, I., Kovács, I., ... and Horváth, G. V.**, 2000, A novel aldose/aldehyde reductase protects transgenic plants against lipid peroxidation under chemical and drought stresses. *The Plant Journal*, 24(4), 437-446.
- Ohkama-Ohtsu, N., Oikawa, A., Zhao, P., Xiang, C., Saito, K., and Oliver, D. J.**, 2008, A γ -glutamyl transpeptidase-independent pathway of glutathione catabolism to glutamate via 5-oxoproline in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 148(3), 1603-1613.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ohkama-Ohtsu N., Radwan S., Peterson A., Zhao P., Badr A. F., Xiang C. and Oliver, D. J.,** 2007, Characterization of the extracellular γ -glutamyl transpeptidases, GGT1 and GGT2, in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 49(5), 865-877.
- Ohkama-Ohtsu N., Zhao P., Xiang, C., and Oliver, D. J.,** 2007, Glutathione conjugates in the vacuole are degraded by γ -glutamyl transpeptidase GGT3 in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 49(5), 878-888.
- Oikawa, T., Maeda, H., Oguchi, T., Yamaguchi, T., Tanabe, N., Ebana, K., ... and Izawa, T.,** 2015, The birth of a black rice gene and its local spread by introgression. *The Plant Cell*, 27(9), 2401-2414.
- Ozgur, R., Uzilday, B., Sekmen, A. H., and Turkan, I.,** 2013, Reactive oxygen species regulation and antioxidant defence in halophytes. *Functional Plant Biology*, 40(9), 832-847.
- Pasternak, M., Lim, B., Wirtz, M., Hell, R., Cobbett, C. S., and Meyer, A. J.,** 2008, Restricting glutathione biosynthesis to the cytosol is sufficient for normal plant development. *The Plant Journal*, 53(6), 999-1012.
- Paulose, B., Chhikara, S., Coomey, J., Jung, H. I., Vatamaniuk, O., and Dhankher, O. P.,** 2013, A γ -glutamyl cyclotransferase protects Arabidopsis plants from heavy metal toxicity by recycling glutamate to maintain glutathione homeostasis. *The Plant Cell*, 25(11), 4580-4595.
- Preuss, M. L., Cameron, J. C., Berg, R. H., and Jez, J. M.,** 2014, Immunolocalization of glutathione biosynthesis enzymes in Arabidopsis thaliana. *Plant physiology and biochemistry*, 75, 9-13.
- Queval, G., Jaillard, D., Zechmann, B., and Noctor, G.,** 2011, Increased intracellular H₂O₂ availability preferentially drives glutathione accumulation in vacuoles and chloroplasts. *Plant, Cell and Environment*, 34(1), 21-32.
- Rea, P.A.,** 2007, Plant ATP-binding cassette transporters. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58, 347-375.
- Reynolds, T. (1977).** Comparative effects of aliphatic compounds on inhibition of lettuce fruit germination. *Annals of Botany*, 41(3), 637-648.
- Roach, T., Stöggel, W., Baur, T., and Kranner, I.,** 2018, Distress and eustress of reactive electrophiles and relevance to light stress acclimation via stimulation of thiol/disulphide-based redox defences. *Free Radical Biology and Medicine*, 122, 65-73.
- Sagi, M., and Fluhr, R.,** 2001, Superoxide production by plant homologues of the gp91phox NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiology*, 126(3), 1281-1290.
- Schauenstein, E., Esterbauer, H., and Zollner, H.,** 1977, Aldehyde in Biological Systems: Their Natural Occurrence and Biological Activities. London: Pion, 589-590.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Shimakawa, G., Iwamoto, T., Mabuchi, T., Saito, R., Yamamoto, H., Amako, K., ... and Miyake, C.,** 2013, Acrolein, an α , β -unsaturated carbonyl, inhibits both growth and PSII activity in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 77(8), 1655-1660.
- Sies, H.,** 1986, Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 25(12), 1058-1071.
- Simpson, P. J., Tantitadapitak, C., Reed, A. M., Mather, O. C., Bunce, C. M., White, S. A., and Ride, J. P.,** 2009, Characterization of two novel aldo-keto reductases from *Arabidopsis*: expression patterns, broad substrate specificity, and an open active-site structure suggest a role in toxicant metabolism following stress. *Journal of molecular biology*, 392(2), 465-480.
- Spyropoulou, E. A., Dekker, H. L., Steemers, L., van Maarseveen, J. H., de Koster, C. G., Haring, M. A., ... and Allmann, S.,** 2017, Identification and characterization of (3 Z):(2 E)-hexenal isomerases from cucumber. *Frontiers in plant science*, 8, 1342.
- Srivastava, S., Sinha, P., and Sharma, Y. K.,** 2017, Status of photosynthetic pigments, lipid peroxidation and anti-oxidative enzymes in *Vigna mungo* in presence of arsenic. *Journal of Plant Nutrition*, 40(3), 298-306.
- Storozhenko, S., Belles-Boix, E., Babiychuk, E., Hérouart, D., Davey, M. W., Slooten, L., ... and Kushnir, S.,** 2002, γ -Glutamyl transpeptidase in transgenic tobacco plants. Cellular localization, processing, and biochemical properties. *Plant Physiology*, 128(3), 1109-1119.
- Suekawa, M., Fujikawa, Y., Inada, S., Murano, A., and Esaka, M.,** 2016, Gene expression and promoter analysis of a novel tomato aldo-keto reductase in response to environmental stresses. *Journal of plant physiology*, 200, 35-44.
- Takahashi, S., and Murata, N.,** 2008, How do environmental stresses accelerate photoinhibition?. *Trends in plant science*, 13(4), 178-182.
- Taki, N., Sasaki-Sekimoto, Y., Obayashi, T., Kikuta, A., Kobayashi, K., Ainai, T., ... and Ohta, H.,** 2005, 12-oxo-phytodienoic acid triggers expression of a distinct set of genes and plays a role in wound-induced gene expression in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 139(3), 1268-1283.
- Torres, M. A., and Dangl, J. L.,** 2005, Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development, *Current opinion in plant biology*, 8(4), 397-403.
- Triantaphylides, C., Krischke, M., Hoeberichts, F. A., Ksas, B., Gresser, G., Havaux, M., ... and Mueller, M. J.,** 2008, Singlet oxygen is the major reactive oxygen species involved in photooxidative damage to plants. *Plant physiology*, 148(2), 960-968.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Vemanna, R. S., Babitha, K. C., Solanki, J. K., Reddy, V. A., Sarangi, S. K., and Udayakumar, M.,** 2017, Aldo-keto reductase-1 (AKR1) protect cellular enzymes from salt stress by detoxifying reactive cytotoxic compounds. *Plant Physiology and Biochemistry*, 113, 177-186.
- Vincenti, S., Mariani, M., Alberti, J. C., Jacopini, S., Brunini-Bronzini de Caraffa, V., Berti, L., and Maury, J.,** 2019, Biocatalytic synthesis of natural green leaf volatiles using the lipoxygenase metabolic pathway. *Catalysts*, 9(10), 873.
- Vliegthart, J. F.,** 1979, Enzymic and non enzymic oxidation of polyunsaturated fatty acids. *Chemistry and Industry*, 241-251.
- Wachter, A., Wolf, S., Steininger, H., Bogs, J., and Rausch, T.,** 2005, Differential targeting of GSH1 and GSH2 is achieved by multiple transcription initiation: implications for the compartmentation of glutathione biosynthesis in the Brassicaceae. *The Plant Journal*, 41(1), 15-30.
- Wang, W., Chen, D., Liu, D., Cheng, Y., Zhang, X., Song, L., ... and Shen, F.,** 2020, Comprehensive analysis of the *Gossypium hirsutum* L. respiratory burst oxidase homolog (Ghrboh) gene family. *BMC genomics*, 21(1), 1-19.
- Wu, A., Luo, W., Zhang, Q., Yang, Z., Zhang, G., Li, S., and Yao, K.,** 2013, Aldehyde dehydrogenase 1, a functional marker for identifying cancer stem cells in human nasopharyngeal carcinoma. *Cancer letters*, 330(2), 181-189.
- Yalcinkaya, T., Uzilday, B., Ozgur, R., and Turkan, I.,** 2019, The roles of reactive carbonyl species in induction of antioxidant defence and ROS signalling in extreme halophytic model *Eutrema parvulum* and glycophytic model *Arabidopsis thaliana*. *Environmental and Experimental Botany*, 160, 81-91.
- Yalcinkaya, T., Uzilday, B., Ozgur, R., Turkan, I., and Mano, J. I.,** 2019, Lipid peroxidation-derived reactive carbonyl species (RCS): Their interaction with ROS and cellular redox during environmental stresses. *Environmental and Experimental Botany*, 165, 139-149.
- Yamauchi M., Sricholpech M.,** 2012, Lysine post-translational modifications of collagen. *Essays Biochem* 52: 113– 133.
- Yamauchi, T., Rajhi, I., and Nakazono, M.,** 2011, Lysigenous aerenchyma formation in maize root is confined to cortical cells by regulation of genes related to generation and scavenging of reactive oxygen species. *Plant signaling and behavior*, 6(5), 759-761.
- Yamauchi, Y., Kunishima, M., Mizutani, M., and Sugimoto, Y.,** 2015, Reactive short-chain leaf volatiles act as powerful inducers of abiotic stress-related gene expression. *Scientific Reports*, 5(1), 1-8.
- Yang, Y., Han, X., Liang, Y., Ghosh, A., Chen, J., and Tang, M.,** 2015, The combined effects of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and lead (Pb) stress on Pb accumulation, plant growth parameters, photosynthesis, and antioxidant enzymes in *Robinia pseudoacacia* L. *PloS one*, 10(12), e0145726.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Yin, L., Mano, J. I., Wang, S., Tsuji, W., and Tanaka, K., 2010, The involvement of lipid peroxide-derived aldehydes in aluminum toxicity of tobacco roots. *Plant physiology*, 152(3), 1406-1417.

Zhang, Z., Xie, Q., Jobe, T. O., Kau, A. R., Wang, C., Li, Y., ... and Schroeder, J. I., 2016, Identification of AtOPT4 as a plant glutathione transporter. *Molecular plant*, 9(3), 481-484.



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğretimim ve tez çalışmam sürecinde, alanındaki uzmanlık ve engin bilgisiyle ilerlememi sağlamasıyla, desteğini her zaman gösteren tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Barış UZİLDAY'a teşekkürü bir borç bilirim.

Laboratuvar çalışmalarımda her daim engin bilgilerinden yararlandığım Sayın Doç. Dr. Rengin ÖZGÜR UZİLDAY'a, bitki biyolojisi alanına ilerlememi sağlayan, engin bilgileri ile ufkumu genişleten Sayın Prof. Dr. İsmail TÜRKAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans sürecim boyunca, samimi dostluklarını esirgemeyen laboratuvar arkadaşlarım; Dok. Öğr. Nil DEMİRCAN, Dok. Öğr. Gülçin SEVİM, Dok. Öğr. Buse PINAR, Dok. Öğr. Özlem GÜMÜŞ, Yük. Lis. Öğr. Oktay ÇETİN ve Yük. Lis. Öğr. Elif İLHAN'a; ayrıca lisans dönemimden bu yana yanımda olan akademik alandan özel hayatıma kadar her noktada yanımda hissettiğim dostlarım Dok. Öğr. Sevim AYDEMİR ve Yük. Lis. Öğr. Neval KÖKLÜ'ye tüm samimiyetimle teşekkür ederim. Bu süreçte manevi desteğini her zaman hissettiğim Alhan ESEN'e tüm sevgimle teşekkür ederim.

Öğrenim hayatım boyunca beni her yönden destekleyen, eğitimimi her şeyden önde tutan ve beni cesaretlendiren babam Mehmet ERÇETİN'e, annem Zuhale ERÇETİN'e ve ablam Ecem GARBELLA TAVERNİN ve eniştem Fulvio GARBELLA TAVERNİN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Hayatımın neşeleri Muffin ve Loki'ye çok teşekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ

Sinem ERÇETİN, Selma Yiğitalp Anadolu Lisesi'nde orta öğretimini 2015 yılında tamamlamıştır. Ege Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Çevre Biyolojisi Opsiyonundan 2020 yılında mezun olmuştur. 2020 yılında Doç. Dr. Barış UZİLDAY danışmanlığında Ege Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Genel Biyoloji Anabilim dalında lisansüstü eğitimine başlamıştır. 2023 yılında “Eksojen Akrolein Uygulamasının *Arabidopsis thaliana* Gama- Glutamil Transferaz (GGT) Mutantları (*ggt1*, *ggt2*, *ggt4*, *ggt1/ggt2*) Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması” isimli yüksek lisans tezi ile mezun olmuştur.