



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



***ARABİDOPSIS THALIANA*' DA ENDOPLAZMİK
RETİKULUM (ER)-FAJİ'NİN HÜCRE REDOKSU
İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Ferit ALTUNDAL

Biyoloji Anabilim Dalı

İzmir
2022

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

***ARABİDOPSIS THALIANA*' DA ENDOPLAZMİK
RETİKULUM (ER)-FAJİ'NİN HÜCRE REDOKSU
İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ferit ALTUNDAL

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Rengin Özgür UZİLDAY

Biyoloji Anabilim Dalı

Genel Biyoloji Yüksek Lisans Programı

**İzmir
Ağustos 2022**

Ferit ALTUNDAL tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak sunulan “*Arabidopsis thaliana*’ da Endoplazmik Retikulum (ER)-faji’nin Hücre Redoksu ile İlişkisinin Araştırılması” başlıklı bu çalışma Ege Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 29/08/2022 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Dr. Öğretim Üyesi Rengin ÖZGÜR UZILDAY

Raportör Üye : Prof.Dr. İsmail TÜRKAN

Üye : Prof.Dr. Hüseyin Çağlar KARAKAYA

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Ege Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Arabidopsis thaliana*’da Endoplazmik Retikulum (ER)-faji’nin Hücre Redoksu ile İlişkisinin Araştırılması” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

29.08.2022

Ferit ALTUNDAL

ÖZET

**ARABİDOPSIS THALIANA' DA ENDOPLAZMİK RETİKULUM
(ER)-FAJİ'NİN HÜCRE REDOKSU İLE İLİŞKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

ALTUNDAL, Ferit

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi: Dr. Öğr. Üyesi Rengin Özgür UZİLDAY

Ağustos 2022, 73 sayfa

Çevresel stres koşulları endoplazmik retikulum (ER) organelini etkileyerek proteinlerin yanlış katlanmasına veya katlanmamasına yol açar. Metabolik süreçlerle yok edilemeyip hücrede biriken bu proteinler ER stresi adı verilen bir soruna neden olur. ER'nin homeostazını sağlamak için hücrede birçok yol olup bunlardan son yıllarda üzerinde en çok çalışılanlarından biri ER'nin seçici bir şekilde yok edildiği ER-faji'dir. ER-faji hücredeki ER stresinin kapasiteyi aşmasıyla özellikle bazı genlerde meydana gelen ifadesel artışlar sonucu tetiklenen bir süreç olup bitkilerdeki mekanizması hakkında nispeten daha az şey bilinmektedir. Öte yandan ER'de proteilerin doğru katlanması için moleküler oksijen kullanılarak disülfid bağları oluşturulur. Ancak bu durum hücrede başta H₂O₂ (hidrojen peroksit) gibi reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşmasına neden olur ve ER'in redoks dengesini bozular. Hücreler bozulan redoks dengesinin tamiri için çeşitli antioksidan savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir. Metabolik olarak bu antioksidanlardan bazılarını daha fazla üreten mutantlar stresle mücadelede avantajlı konumdadırlar. Bu nedenle biz de çalışmamızda sitosolik olarak daha fazla H₂O₂ üreten apx1-2 mutantını kullandık. Literatürde apx mutantlarının ER stresine karşı verdiği yanıtlar ile ilgili herhangi bir bilgi bulunmamaktadır. Bu mutantların ER-faji ile ilişkisi ilk kez bu çalışmada rapor edilmiş, tunikamisin uygulamasıyla oluşturulan ER stresinde, ilişkili genlerin ifadelerinde meydana gelen değişimler ilk kez ortaya konmuştur.



ABSTRACT

**AN INVESTIGATION ON THE RELATION BETWEEN ER-PHAGY
AND CELL REDOX IN *ARABIDOPSIS THALIANA***

ALTUNDAL, Ferit

MSc in Biology

Supervisor: Dr. Öğr. Üyesi Rengin Özgür UZİLDAY

August 2022, 73 pages

Environmental stress conditions affect the endoplasmic reticulum (ER), cause production of misfolding or non-folding of polypeptides. These peptides lead to a problem called ER stress. There are many ways in the cell to maintain the homeostasis of the ER, and one of the most studied in recent years is ER-phagy, in which the ER is selectively destroyed. ER-phagy is a process triggered by ER stress in the cell exceeding its capacity, especially as a result of expression increases in some genes, and relatively little is known about its mechanism in plants. On the other hand, disulfide bonds are formed in the ER using molecular oxygen for the correct folding of proteins. However, this situation causes the formation of reactive oxygen species (ROS), such as H₂O₂, in the cell, and the redox balance of the ER is disrupted. Cells have developed various antioxidant defense mechanisms to repair the disrupted redox balance. Mutants that produce more of some of these antioxidants metabolically are in an advantageous position in the fight against stress. Therefore, we used the *apx1-2* mutant, which produces more H₂O₂ cytosolically in our study. There is no information in the literature about the responses of *apx* mutants to ER stress. The relationship of these mutants with ER-phagy was reported for the first time in this study, and changes in the expressions of related genes in ER stress induced by tunicamycin application were revealed for the first time.



ÖNSÖZ

Fen bilimleriyle uğraşan insanların çoğunlukla materyalist kişiliklere sahip olduklarından şiir veya roman yazmada yetersiz oldukları düşünülür. Bana göre fen bilimlerinde yazılan tezler, evren ve doğanın şiirselliğini ortaya koyan gerçeklere dayalı romanlardır.

Bilimle uğraşmanın ve bilimsel gelişmelere ufak da olsa katkı verebilmenin ayrıcalıklı bir iş olduğunun bilinciyle tez konumun belirlenmesinden tezimin tamamlanmasına kadar geçen tüm süreçte bu motivasyonla ilerlemeye çalıştım. Geriye dönüp baktığımda çok hızlı geçen bu dönemde yaşanan yorgunlukların tümünün tezin ortaya konmasıyla tatlı birer anıya dönüştüğünü görüyorum ve bunu tamamlayabilmenin mutluluğunu yaşıyorum.

İZMİR

29/08/2022

Ferit ALTUNDAL



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
İÇ KAPAK	i
KABUL ONAY SAYFASI	iii
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI	v
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ	xi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvi
KISALTMALAR DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ	1
1.1. ER Homeostazı	1
1.1.1. ER'nin kalite kontrolü (ERQC)	2
1.1.2. ER ile ilişkili bozunma (ERAD)	2
1.1.3. Katlanmamış protein yanıtı (UPR)	3
1.1.4. ER ilişkili programlanmış hücre ölümü	4
1.1.5. Otofaji	5
1.1.6. Endoplazmik retikulumun seçici otofajisi (ER-faji)	7
1.2. Hücre Redoksu	9

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
1.3. ER'de Oksidatif Protein Katlanması	11
2. MATERYAL ve METOD	14
2.1. Deneme Deseni ve Bitkilerin Yetiştirilmesi	14
2.2. Lipid Peroksidasyonu	14
2.3. Protein Miktarının Belirlenmesi	14
2.4. Askorbat Peroksidaz (APX) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	15
2.5. Gen İfadelerinin Belirlenmesi	15
2.5.1. Total RNA izolasyonu	15
2.5.2. Kantitatif real-time polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR)	15
2.6. İstatistik Analizler	16
3. BULGULAR	17
3.1. Fizyolojik Parametreler	17
3.1.1. Kök fenotipi	17
3.2. Lipid Peroksidasyonu	18
3.3. Askorbat Peroksidaz (APX) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	18
3.4. Gen İfadesinin Analizleri	19
3.4.1. ER stresinin algılanması ile ilişkili genlerin ifadeleri	19
3.4.2. ER ilişkili protein katlanmasının kalite kontrol yolları ilişkili genlerin ifadeleri	20

İÇİNDEKİLER (devam)**Sayfa**

3.4.3. Oksidatif protein katlanması ilişkili genlerin ifadeleri	21
3.4.4. ER’de protein parçalanmasıyla ilişkili genlerin ifadeleri	21
3.4.5. ER-faji ilişkili genlerin ifadeleri	22
3.4.6. Programlanmış hücre ölümü ilişkili genlerin ifadeleri	24
3.4.7. Antioksidan savunma yanıtı ilişkili genlerin ifadeleri	25
3.4.8. ROS’a yanıt veren genlerin ifadeleri	26
3.4.9. ROS sinyalleme ile ilgili genlerin ifadeleri	27
4. TARTIŞMA	29
5. SONUÇ	34
KAYNAKLAR DİZİNİ	35
TEŞEKKÜR	53
ÖZGEÇMİŞ	55

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.1 Col ve apx1-2 bitkilerinde kontrol ve 0,1 µg/ml Tunikamisin uygulanan grupların kök fenotipleri. (C: Kontrol, T: Tunikamisin)	17
3.2 Col ve apx1-2 bitkilerinde lipid peroksidasyonu (TBARS) miktarı (C: Kontrol, T: Tunikamisin)	18
3.3 Askorbat Peroksidaz (APX) Enzim Aktivitesi (C: Kontrol T:Tunikamisin)	19
3.4 ER stresinin algılanmasıyla ilişkili <i>bZIP60S</i> , <i>bZIP60U</i> , <i>IRE1A</i> , <i>IRE1B</i> ve <i>bZIP28</i> , genlerinin ifadeleri (C: Kontrol, T: Tunikamisin)	20
3.5 ER’de protein katlanmasındaki kalite kontrol yollarıyla ilişkili <i>BIP1</i> ve <i>BIP3</i> genlerinin ifadeleri (C: Kontrol, T: Tunikamisin)	21
3.6 Oksidatif protein katlanması ilişkili <i>ERO1</i> ve <i>CNX</i> genlerinin ifadeleri (C: Kontrol, T: Tunikamisin)	21
3.7 ER’de protein parçalanmasıyla ilişkili <i>DER1</i> , <i>HRD1</i> , <i>UBC32</i> ve <i>SEL1</i> genlerinin ifadeleri (C: Kontrol, T: Tunikamisin)	22
3.8 ER-faji ilişkili <i>ATG3</i> , <i>ATG6</i> , <i>ATG7</i> , <i>ATG8A</i> , <i>ATG8E</i> , <i>ATG18A</i> , <i>ATG18F</i> ve <i>NAC103</i> genlerinin ifadeleri (C:Kontrol,T:Tunikamisin) ..	24
3.9 Programlanmış hücre ölümü ilişkili <i>AGB1</i> , <i>NAC089</i> , <i>BI</i> genlerinin ifadeleri (C: Kontrol, T: Tunikamisin).....	25
3.10 Antioksidan savunma yanıtı ilişkili <i>MSD1</i> , <i>FSD1</i> , <i>CSD1</i> , <i>APXII</i> <i>CAT1</i> ve <i>GRI</i> genlerinin ifadeleri (C: Kontrol, T: Tunikamisin)	26
3.11 ROS’a yanıt veren <i>H₂O₂R1</i> , <i>H₂O₂R2</i> , <i>¹O₂R1</i> ve <i>¹O₂R2</i> genlerinin ifadeleri (C: Kontrol, T: Tunikamisin)	27
3.12 ROS Sinyallemesi ile İlgili <i>RBOHD</i> , <i>RBOHF</i> ve <i>ZAT12</i> genlerinin ifadeleri (C: Kontrol, T: Tunikamisin)	28

KISALTMALAR DİZİNİ**Kısaltmalar****Açıklama**

ER-faji	Endoplazmik retikulumun seçici otofajisi
ERQC	Endoplazmik retikulum kalite kontrolü
ERAD	Endoplazmik retikulumla ilişkili bozunma
UPR	Katlanmamış protein yanıtı
IRE1	İnositol gerektiren enzim 1
ATG	Otofaji ilişkili protein
ROS	Reaktif oksijen türleri
SOD	Süperoksit dismutaz
CAT	Katalaz
POX	Peroksidaz
APX	Askorbat peroksidaz
GSH	Glutasyon
GPX	Glutasyon peroksidaz
TM	Tunikamisin
DTT	Ditioeritritiol
TBARS	Tiyobarbuturik asit reaktif bileşikler



1. GİRİŞ

Bitkiler büyüme gelişme süreçlerinde yaşadıkları ortamlarda çevresel stres koşullarına maruz kalırlar. Bu stresler bitkilerin doğadaki coğrafi dağılımını etkileyen, tarımda bitki verimliliğini sınırlayan ve gıda güvenliğini tehdit eden başlıca çevresel faktörlerdir. Stres koşulları patojen enfeksiyonu gibi biyotik ya da sıcaklık, kuraklık, tuzluluk ve ağır metaller gibi abiyotik olarak sınıflandırılabilir (Zhu 2016). Bitkiler bu değişken çevre koşullarında hayatta kalmak için büyüme ve strese yanıt süreçlerini dengelemek zorundadır (Guo et al., 2018). Hücresel düzeyde bu denge, birden fazla organelin işbirliğini gerektirir. Endoplazmik retikulum (ER) iç zar organellerinin en büyüğüdür ve hemen hemen tüm diğer organellerle ilişki içerisindedir. Ribozomlar için tutunma yerleri sağlamanın yanında önemli bir protein ve lipid sentezi bölgesidir ve diğer iç zar organellerine katılacak olan zar bileşenlerinin üretildiği organeldir (Liu and Bassam, 2013). Ayrıca ER, salgı proteini üretiminin ve katlanmasının ana bölgesidir. ER'nin çevresel stres altındaki homeostazı, protein salgı yolunun korunması için hayati önem taşır.

ER'de homeostaz kaybı ve katlanmamış proteinlerin birikmesi ER stresi olarak adlandırılır (Ozgun et al., 2020). Bitkiler ER'nin dengesini korumak için çeşitli metabolik yolların işlevini gerektiren mekanizmalar geliştirmiştir. Bunlar; ER'nin kontrolü (ERQC), ER ile ilişkili bozunma (ERAD), katlanmamış protein yanıtı (UPR), ve bir seçici otofaji türü olan ER-fajisi olarak gruplandırılabilir (Howell 2013).

1.1. ER Homeostazı

Ökaryotik hücrelerde endoplazmik retikulumda sentezlenen salgı ve zar proteinleri, golgi yoluyla son hedeflerine transfer edilmeden önce ER'de karbonhidrat ilavesi ve disülfid bağı oluşumu gibi uygun katlanma ve modifikasyonlara uğrarlar (Lai et al., 2007). ER dışında sitozol ve mitokondri protein katlanmasında görev alır. Her organel özel bazı şaperon setlerine ve

katlanma enzimlerine sahiptir. Hücrenin kalabalık ortamında proteinlerin biriktirilmeden bu işlemin çok kısa sürede halledilmesi gerekmektedir (Anelli and Sitia, 2008). Ancak protein katlanması normal koşullarda bile çoğunlukla hatalara açık bir süreçtir. Stres koşullarında ise hatalı protein üretim ve birikme düzeyi dahada artmaktadır. Proteinlerin hücrenel faaliyetler için önemleri göz önünde bulundurulduğunda hataların denetimi ve düzeltilmesi hayati bir önem taşır.

1.1.1. ER'nin kalite kontrolü (ER quality control=ERQC)

Ökaryotik organizmalar, salgı ve zar proteinlerinin katlanma süreçlerini izlemek için ERQC adı verilen ve yüksek oranda korunmuş bir endoplazmik retikulum aracılı protein kalite kontrol mekanizması geliştirmişlerdir. Bu mekanizmaya göre ER'de eksik veya yanlış katlanma süreci çeşitli yöntemlerle sonlandırılır ve hatalı proteinler sıralı bazı kontrol noktalarında tutularak yalnızca doğru katlanmış proteinlerin fizyolojik hedeflerine aktarılmasına izin verilir (Chaudhari et al., 2014). Yanlış katlanmış proteinler ise ER ile ilişkili bir bozunma yolu olan ERAD'a aktarılır.

1.1.2. ER ile ilişkili bozunma (ER associated degradation= ERAD)

Yanlış katlanmış veya katlanmamış proteinler bitki hücrelerinde ya vakuola gönderilip burada vakuolar proteazlar tarafından parçalanabilir ya da ERAD adı verilen yolak ile sitozolde yıkılırlar (Brodsky and McCracken, 1999). ER tipik bir bozunma bölgesi olmadığı ve sınırlı bir dizi proteaz barındırdığı için, anormal proteinler çoğu durumda ERAD süreci için sitozole yönlendirilirler (Vembar and Brodsky, 2008).

Bugüne kadar ERAD hakkındaki bilgilerin çoğu mayalardan ve memelilerden elde edilmiştir. Bitkilerin ERAD mekanizmasıyla ilgili nispeten daha az şey bilinmektedir (Liu et al., 2011).

Genel olarak ERAD, ER ile ilişkili özelleşmiş bir ubiquitin/proteazom sistemi olup moleküler şaperonlar ve lektin benzeri proteinler ile yanlış katlanmış proteinlerin tanımlanmasını, E3 ubiquitin ligaz kompleksine taşınmasını, ER'den

sitozole translokasyonunu, poliubikütinasyonu ve son olarak 26S proteazomu tarafından bozunmayı içeren çok aşamalı bir işlemdir (Strasser 2020).

ERAD sırasında, SEL1/HRD3 (zar kapsayan bir protein) ve HRD1 (E3 ligaz) ile konjugasyon halinde çalışan bir lümen lektin OS9, katlanmamış/yanlış katlanmış proteinleri tanır. Bu proteinler, 26S proteazom tarafından parçalanmak üzere bu kompleks tarafından sitozole aktarılır (Su et al., 2011).

Yanlış katlanmış proteinler ERAD sistemi tarafından ortamdan uzaklaştırılırken diğer taraftan ER yükünü azaltmak için protein translasyonu durdurulur ve katlanmamış protein yanıtı (UPR) olarak adlandırılan bir mekanizma devreye girer. UPR mekanizması birçok işlevinin yanı sıra protein katlanmasına yardımcı olmak ve katlanmamış proteinlerin bozulmasını uyararak için ER şaperonlarının ve ERAD bileşenlerinin ifadelerini artırmak için de etkinleşebilir (Liu et al., 2011).

1.1.3. Katlanmamış protein yanıtı (Unfolded protein response = UPR)

ER stresi kapasiteyi aşmış ERAD yoluyla ortadan kaldırılamayacak düzeye ulaştığında, dengenin tekrar sağlanması için bu kez UPR yolu aktifleşir (Ron and Walter, 2007).

ER'de yerleşik transmembran proteinlerinden oluşan UPR stres sensörlerinin bitkilerde şimdiye kadar iki dalı tanımlanmıştır. Bunlardan ilki çoğu canlıda korunmuş bir yol olan inositol gerektiren enzim 1 (IRE1) yolu, diğeri ise hayvanlardakine kısmen benzeyen aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6) tarafından başlatılan bZIP17/bZIP28 yoludur (Ron and Walter, 2007). Bunlara ek olarak memeliler, RNA benzeri protein kinaz (PERK) tarafından aracılık edilen başka bir UPR sinyal yolağına sahiptirler. Ancak bu yol bitkilerde gözlenmemiştir (Pu ve Bassham 2013). Bu faktörler genel olarak hatalı proteinlere bağlanıp onların otofajik bozunma için vakuole yönlendirilmesini ve transkripsiyon faktörlerinin yeniden düzenlenerek hatalı protein üretiminin durdurulmasını sağlamaktadır (Liu 2016). UPR sensörleri ER'deki protein katlama ortamını

algılamak için luminal kısımlarını; transkripsiyon veya translasyon sensörleriyle etkileşime girmek için sitoplazmik kısımlarını kullanırlar (Ron and Walter, 2007).

Çoğu canlıda korunmuş bir yol olan IRE1 gen ailesinin Arabidopsis bitkisinde iki üyesi (IRE1a ve IRE1b) bulunmaktadır (Koizumi et al., 2001, Liu et al., 2012). IRE1b bir transkripsiyon faktörü olan unsplayed bZIP60'ı (bZIP60u) kodlayan mRNA'nın sitoplazmik eklenmesini katalizleyerek (splayslayarak) bZIP60S şeklinde nükleusa hedefler. Böylelikle otofajiyile ilişkili genler aktifleşebilir (Howell 2013). Ayrıca bitkilerde karşılığı tam olarak belirlenemese de yapılan araştırmalar memelilerde IRE1b'in salgı yolunda hasarlı protein üretmeye devam eden diğer mRNA'ları ortadan kaldırdığı ve stres durumunda hatalı protein birikiminin engellenmesine katkı verdiği tespit edilmiştir (Hollien and Weissman 2006). Bitkilerde IRE1b mutasyonunun hücre ölümünü arttırdığı ve salgı yolundaki proteinleri kodlayan mRNA'ların bozunmadığı tespit edilmiştir (Mishiba et al., 2013). UPR'nin memelilerdeki ATF6 kolunun bir benzeri bitkilerde ER membranı ile ilişkili transkripsiyon faktörleri bZIP17 ve bZIP28 aracılığıyla gerçekleşir. Stresiz koşullar altında, bu faktörler, BiP ile birleşerek ER'de tutulur. Strese yanıt olarak, ER'de yanlış katlanmış proteinlerin birikmesi ile BiP, bZIP28'den ayrılır (Srivastava et al., 2013). Serbest bırakıldıktan sonra, bZIP17 ve bZIP28 ER'den Golgi'ye yer değiştirir ve burada Golgi'de yerleşik iki proteaz olan, Site-1 ve Site-2 proteazlar (S1P ve S2P) tarafından parçalanırlar (Liu et al., 2007). Golgi zarında S2P ile parçalanma, bZIP17/bZIP28'in sitozole bakan bileşenlerini Golgi'den serbest bırakır ve stres tepki genlerinin ifadesini arttırmak için nükleusa taşınmalarını sağlarlar (Liu and Howell, 2010).

UPR başlangıçta bir hayatta kalma yolu olarak devreye girsede ER'de meydana gelen şiddetli bir hasar durumunda üretilen hatalı proteinlerin miktarı kapasiteyi aşarsa UPR, öncelikle ER'nin ortadan kaldırılmasını teşvik edebilir (Er-faji) veya hücre ölüm yollarını aktifleştirebilir (Yang et al., 2016)

1.1.4. ER ilişkili programlanmış hücre ölümü

ER stresi aracılı hücre ölüm yollarıyla ilgili bilinenleri özetleyecek olursak ER yerleşik transmembran proteini Bax inhibitörü-1 (BI-1), bitkilerde

programlanmış hücre ölümü düzenleyicilerindedir (Sanchez et al., 2000). Yakın zamanda, ER stresi sırasında bZIP28'in şiddetli stres koşullarında ER stresinin neden olduğu PCD'yi (programlı hücre ölümü) düzenlediği gösterilmiştir (Ruberti et al., 2018). BI-1, Arabidopsis'de ER stres aracılı PCD'yi düzenlemek için UPR yoluna paralel olarak hareket eder (Watanabe ve Lam, 2008). BI-1 aracılı hücre ölümü düzenlemesi, Ca^{+2} sinyalleme ve lipid metabolizmasının temel modülatörleri ile fiziksel etkileşimler tarafından aktifleştirilir (Ishikawa et al., 2011 ; Nagano et al., 2019). BI-1'in otofaji ve PCD'yi teşvik etmek için ATG6 ile etkileşime girebileceğini göstermiştir. Bitkiye özgü transaktivatör faktörler olarak, NAC'lar, genellikle uzun süreli ER stres koşulları ile ilişkili olan, ER stresinin neden olduğu hücre ölümü yanıtının altında yatan bitkiye özgü mekanizmalarda görev alırlar. Şiddetli ER stres koşulları altında, ER membran bağlantılı transkripsiyon faktörü NAC089, ER membranından Golgi'ye yer değiştirir ve burada henüz tanımlanmamış bir proteaz tarafından proteolitik parçalanmaya uğrar. Buna göre, transmembran alanı olmayan NAC089'un aşırı ifadesi PCD'yi teşvik etmektedir. Aynı zamanda NAC089 RNAi bitkilerinin ER stresine toleransının arttığı belirlenmiştir (Yang et al., 2014). Bitkilerde UPR ile ilişkili hücre ölümünü tetikleyen Arabidopsis AGB1'in etkisizleştirilmesinin, ER stresinin neden olduğu hücre ölümünü bozduğu ve yetiştirilen bitkilerde UPR'ye özgü hedef genlerin uyarılmasını azalttığı gösterilmiştir (Wang et al., 2007). Ayrıca agb1-1, agb1-2 ve agb1-3 eksik mutantların çimlenme sırasında ER stresine aşırı duyarlılık gösterdiği belirlenmiştir (Chen and Brandizzi, 2012).

1.1.5. Otofaji

“Kendi kendini yeme” anlamına gelen otofaji, hasarlı bileşenlerin veya organellerin bitkilerde litik vakuoller vasıtasıyla geri dönüştürüldüğü bir süreçtir. Otofaji, bitki stres toleransı, patojen savunması ve yaşlanma sırasında besinlerin yeniden mobilizasyonu için önemli olan bir yoldur ve hem otofagozom oluşumu için zarları oluşturan hem de ER stresi sırasında otofaji tarafından parçalanmış ER ile yakından ilişkilidir (Chen et al., 2019).

Bugüne kadar tüm canlılarda makrotofaji, mikrotofaji, şaperon aracılı otofaji ve megaotofaji olmak üzere dört tür otofaji tanımlanmıştır (Doorn and Papini, 2013). Bunlardan şaperon aracılı otofaji hedef proteinin bir şaperon protein tarafından doğrudan lizozoma alınıp bozulduğu bir yol olup bugüne kadar sadece maya ve hayvanlarda tanımlanmıştır (Orenstein et al., 2010). Megaotofaji ise sadece bitkilerde tanımlanmış bir otofaji türü olup vakuol zarının yırtılması veya geçirgenliğinin artmasıyla içeriğindeki hidrolazların serbest kalması ve bunun sonucunda da çoğunlukla hücre ölümünün gerçekleştiği bir otofaji türüdür (Doorn and Papini, 2013).

Makrotofaji, otofaji tipleri içinde en iyi çalışılmış olanıdır ve 40'tan fazla otofaji ile ilişkili proteinin (ATG) ökaryotlarda makrotofajiye katkıda bulunduğu tespit edilmiştir (Sienko et al., 2020). Bu otofaji türünde öncelikle sitoplazmanın bir bölümünde dönüştürülecek hücrel bileşenler veya organeller gibi kargoları çevrelemek için çift zarlı bir kesecik (otofagozom) oluşturulur. Daha sonra oluşturulan vezikülün dış zarıyla litik bir vakuolün dış zarı birleşir ve vakuoldeki hidrolitik enzimler zarla çevrili yükün içindeki bileşenleri sindirir. Son olarak da faydalı içerikler tekrar kullanım için sitoplazmik lümene salınır (Sienko et al., 2020).

Otofajide öncelikle otofajik veziküllerin oluşumunu düzenleyen bazı kinaz sensörleri vardır. Bu kinazlardan özellikle TOR'un (Rapamisin hedefi), otofajide negatif düzenleyici olarak görev yaptığı bilinmektedir. Yani TOR'un aktivasyonu otofajinin baskılanmasına, inaktivasyonu ise otofajinin başlamasına yol açmaktadır (Noda and Ohsumi 1998). Yapılan çalışmalarda TOR'un besin açlığı, tuz ve osmotik stresle teşvik edilen otofajide negatif düzenleyici olarak görev yaptığı bulunmuş, fakat oksidatif stres ve ER stresıyla indüklenen otofajide bir rolüne rastlanmamıştır. Bu durum bitkilerde henüz tam olarak açıklanamazda TOR'dan bağımsız yollar olabileceğini göstermektedir (Pu et al., 2017).

Otofaji aktive edildikten sonra otofagozom oluşumu ve kargonun vakuole iletimi için gerekli bir dizi gen ve protein kompleksleri vardır. Bunlar görev sırasıyla aşağıdaki gibidir:

(i) ATG1-ATG13 kompleksi, sinyalleri algılar ve otofagozom oluşumunu başlatır (Suttangkakul et al., 2011).

(ii) ATG9 ve ilişkili proteinler, bir otofagozom oluşturmak üzere genişleyen fincan şeklinde bir çift zarlı ayırma bölmesi olan fagoforun genişlemesi için lipidleri alır (Matoba et al., 2020).

(iii) Fosfoinositid 3-kinaz (PI3K) kompleksi, otofagozom çekirdeklenmesi için fosfatidilinositol 3-fosfat (PI3P) üretir (Leprince et al., 2015).

(iv) ATG5-ATG12-ATG16 kompleksi, ATG8 ve fosfatidiletanolamin (PE) konjugasyonunda bir E3 ligaz olarak görev yapar (Romanov et al., 2012)

(v) ATG8-PE, membran genişletme ve kargo seçimine katılır (Liu ve Bassham 2012). ATG8, ATG8 etkileşimli motifi (AIM) (Kalvari et al. 2014) veya yakın zamanda tanımlanmış ikinci bir farklı ubikuitin etkileşimli motif (UIM) aracılığıyla seçici otofaji reseptörlerini veya kargoyu tanıyabilen anahtar bir adaptördür.

Makrotofajinin bir çeşidi olan seçici mikrotofaji ise içeriklerin otofajik reseptörler ve proteinler ile belirlenerek otofagozom oluşmadan vakuole alındığı ve spesifik şekilde geri dönüştürüldüğü bir süreçtir. Bitkilerde, klorofaji (kloroplastların bozulması), retikülofaji (ER-faji) (endoplazmik retikulumun bozulması), mitofaji (mitokondrinin bozulması), peksofaji (peroksizomların bozulması), proteafaji (proteazomların bozulması), ribofaji (bozunması) gibi çeşitli seçici otofaji biçimleri bildirilmiştir (Chen et al., 2019).

1.1.6. Endoplazmik retikulumun seçici otofajisi (ER-faji)

Şiddetli ER stresi ortaya çıktığında, işlevsiz ER membranları, ER-faji olarak adlandırılan bir tür seçici otofaji tarafından parçalanır (Bao and Bassham 2020). ER-faji, UPR ile işbirliği içinde çalışarak ve ERAD yolunun desteğiyle ER homeostazının korunmasına katkıda bulunur (Bao and Bassham 2020). ER-faji, memelilerde ve mayalarda açıkça tanımlanmış ve birçok reseptörle karakterize edilmiştir, ancak bitkiler ER-faji ve reseptörleri hakkında nispeten daha az şey bilinmektedir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda ER-faji için daha önce

bahsettiğimiz UPR reseptörlerinden IRE1'in gerekli olduğu, fakat onun hedefi olan bZIP60'ın görev almadığı bilinmektedir (Liu et al., 2012). Arabidopsis bitkisinde IRE1 gen ailesinin ise iki üyesi bulunmaktadır. Yapılan araştırmalar, bu iki reseptörden IRE1b'nin ER-faji için gerekli olduğunu IRE1a'nin ise bitkilerde ER-faji'de görev almadığını ortaya koymuştur (Koizumi et al., 2001). IRE1b, hem RNaz hem de proteinkinaz olarak görev yapar. Ancak ER stresinin neden olduğu otofaji için kritik olan IRE1b'nin protein kinaz aktivitesi değil RNaz aktivitesidir (Bao et al., 2018). Ayrıca Arabidopsis IRE1b mutantının transkriptom analizinde, birkaç düzenlenmiş IRE1'e bağlı bozunma (RIDD) hedef bölgesi tanımlanmıştır. Bunlar normal koşullar sırasında potansiyel olarak otofajiyi baskılayan, ER stresi sırasında baskıyı serbest bırakmak için bozulurlar (Bao et al., 2018).

Maya Atg39 ve Atg40 genleri, bozunma için farklı ER alt etki alanlarını tanıyabilen Atg8 ile etkileşime giren ER-faji reseptörleridir (Mochida et al., 2015). Memelilerde ER-faji reseptörleri, ER alt alanlarını hedeflemedeki rollerine ve stres tepkilerindeki rollerine göre işlevsel olarak birbirlerinden ayrılırlar (Nthiga et al., 2020). Örneğin canlılardaki FAM134B, RTN3L, ATL3, TEX264 ve CALCOCO1 reseptörleri temel olarak açlık aracılı ER-fajide yer alırken, CCPG1, Sec62 ve Epr1 reseptörleri ER stresinin neden olduğu ER-fajide rol almaktadır. ER-faji reseptörleri bu nedenle farklı organizmalara özgüdür ve bitkilerde bu reseptörlerin bazılarının homologları bulunmamaktadır (Nthiga et al., 2020).

Bitkiye özgü ATG8-Etkileşimli (ATI) trans-membran proteinleri AT11 ve AT12, klorofaji olarak adlandırılan bir süreçte hasarlı kloroplastların hücreden uzaklaştırılmasında işlev görür (Honig et al., 2012). AT11 ayrıca ER'ye lokalize olur ve ER-lokalize ARGONAUTE1 (AGO1) ile etkileşime girer. Bu da AGO1'in seçici bir kargo reseptörü rolü olması ile açıklanabilir (Michaeli et al., 2019). Son çalışmalarda, ATI proteinlerinin, ER stresinden bağımsız olarak karanlık kaynaklı ER-faji'de yer aldığını göstermiştir (Wu et al. 2020).

ER'nin seçici bir şekilde otofajik yola girmesinde birçok ATG proteini iş görmektedir. ATG3, otofajide önemli bir adım olan ATG8'in fosfatidiletanolamin

(PE) ile konjugasyonuna aracılık eden ubikuitin benzeri bir proteindir. (Yang and Klionsky 2010). ATG6 proteinleri, otofajide ve fosfatidilinositol 3-fosfat sinyal yollarında işlev gören pleiotropik proteinlerdir. Arabidopsis ATG6, normal bitki büyümesini, polen gelişimini ve çimlenmesini ve biyotik/abiyotik streslere karşı bitki tepkilerini düzenler (Sláviková et al., 2005). ATG8a tüm dokularda baskın ATG8 izoformu olarak bulunmaktadır. ATG8e, ATG8 ailesinin bir üyesidir ve ATG8e'nin protein bozulmasını doğrudan etkilediği daha önce gösterilmiştir (Guan et al., 2022). Arabidopsis'de, ATG18a–h olarak sınıflandırılan sekiz ATG18 homologu vardır. Bazı ATG18 varyantlarının oksidatif stres, kuraklık ve tuz stresinde rol oynadığı daha önce gösterilmiştir (Xiong et al., 2005; Bassham et al., 2005; Xiong et al., 2007; Liu et al., 2009)

1.2. Hücre Redoksu

Tüm aerobik organizmalar gibi bitkilerde, oksitleyici bir atmosferde fizyolojileri ve gelişimleri için uygun redoks koşullarını sürdürme zorluğuyla karşı karşıyadırlar. PSII ışık enerjisini emdiğinde oluşan yüksek oranda oksitleyici türler, bitkilerin bir elektron kaynağı olarak suya erişmesine izin verir (Das and Roychoudhury, 2014). Böylece bitki hücreleri reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşturulabileceği bir yan ürün olarak oksijeni serbest bırakır. ROS; tekli oksijen, süperoksit, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali gibi molekülleri kapsayan bir terimdir. Bunlar, metabolik olaylar sırasında üretilen ve hücre fonksiyonunu çeşitli şekillerde etkileyebilen birçok basit reaktif türden birkaçıdır (Das and Roychoudhury, 2014). ROS'lar toksik etkilerinin yanı sıra bitki gelişiminde ve çevreye verilen tepkileri düzenleyen ağların işleyişinde çalışan sinyal molekülleridir. Ancak hücre içinde ve dışında birikimlerinin kontrol altında tutulması gerekir (Huang et al., 2016).

Son yapılan çalışmalar maya ve hayvanlarda olduğu gibi bitkilerde de ER stresinin redoks metabolizması ve reaktif oksijen türleri (ROS) ile yakından ilişkili olduğunu göstermektedir (Ozgur et al., 2014; 2015; Uzilday et al., 2018). ROS'ların hücrede ikili rolü vardır. Bunlardan birincisi, düşük konsantrasyonlarda genellikle ikincil haberci şeklinde bir sinyal molekülü olarak hareket etmeleridir

(Mittler 2017). İkinci olarak ise, yüksek miktarlarda ROS birikimi, DNA hasarı, lipid peroksidasyonu, membran kararsızlığı ve protein oksidasyonu ile sonuçlanan oksidatif strese neden olmaktadır (Mittler et al., 2012). Aşırı ROS ayrıca proteinlerdeki düzenleyici tiyollerin aşırı oksidasyonuna neden olarak metabolik dengeyi bozabilir (Waszczak et al., 2015). Bir hücrede ROS birikimi, üretim ve temizleme hızı ile tanımlanır (Mittler 2017). ROS, enzimatik veya enzimatik olmayan antioksidanlar aracılığıyla temizlenebilir (Uzilday et al., 2015). Enzimatik antioksidanlar arasında süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), peroksidaz (POX), askorbat peroksidaz (APX) ve glutatyon peroksidaz (GPX) bulunurken, enzimatik olmayan başlıca antioksidanlar arasında tokoferoller, karotenoidler, askorbat ve glutatyon (GSH) bulunur (Mittler et al., 2004; Krieger-Liszkay et al., 2008). Bunların arasında AsA, GSH, APX, MDHAR, DHAR ve GR; AsA-GSH döngüsünü (askorbat-glutatyon döngüsü veya Asada Halliwell döngüsü) oluşturur. Askorbat, H_2O_2 'yi süpürmek için en güçlü substratlardan biridir. Arabidopsis genomunda dokuz APX geninin varlığı belirlenmiştir (Li et al., 2019). Sitosolik (APX1, APX2 ve APX6), kloroplastik (stromal sAPX ve thylakoid tAPX), peroksizomal (APX3 ve APX5) APX'ler Arabidopsis'te tanımlanmıştır. Sitosolik APX2'nin önemi, *apx2* ve *apx1/apx2* mutantları kullanılarak yüksek ışık, sıcaklık, tuzluluk ve kuraklık stresleri sırasında gösterilmiştir (Li et al., 2019). Glutatyon çeşitli metabolik fonksiyonları düzenler; bir antioksidan görevi görür. AsA-GSH döngüsü bileşenlerinin olumlu rolü, abiyotik streslerden etkilenen birçok bitkide rapor edilmiştir. AsA ve GSH'in ozmoregülasyon, bitki su durumu, su kullanım verimliliği, fotosentetik performansda iş gördükleri bilinmektedir. Dışarıdan AsA ve GSH uygulamalarının antioksidan savunmayı ve bitkilerin abiyotik streslere karşı genel toleransını arttırdığı bildirilmiştir (Hasanuzzaman et al., 2017a; Hasanuzzaman et al., 2017b). Buna göre, AsA-GSH döngüsünün enzimatik antioksidanları, ROS'un süpürülmesine katılmaktadır. Aynı zamanda sitozol ve organellerde homeostazı sürdürmek için antioksidan kapasiteyi arttırmak ve farklı abiyotik stresler tarafından indüklenen oksidatif strese azaltmak için görev almaktadırlar. AsA ve GSH, H_2O_2 'yi detoksifiye etmek için koordineli olarak çalışmaktadır (Hasanuzzaman et al., 2019).

Bunlar arasında, tiyol bazlı glutatyon/glutatyon disülfür (GSH/GSSG) redoks çifti, ER'de meydana gelen protein katlanması ile yakından ilişkilidir. Çünkü ER'de oksidatif protein katlanması yoluyla disülfid bağları oluşur (Aller and Meyer, 2013).

Bitki NADPH oksidazları (NOX), çok çeşitli işlevleri yerine getiren reaktif oksijen türleri (ROS) üretirler ve RBOHlar tarafından kodlanırlar. Arabidopsis'te bulunan 10 RBOH geninden ikisi olan RBOHD ve RBOHF, patojenlere yanıt da dâhil olmak üzere çeşitli fizyolojik süreçlere katılırlar. Arabidopsis'te oksidatif stres sırasında sitosolik askorbat peroksidaz-1 ifadesi için Zat12 transkripsiyon faktörünün iş görmesinin gerekli olduğu gösterilmiştir (Davletova et al., 2005). Zat12'nin redoks ve abiyotik stres sinyallemede ana rol oynayan protein olduğu bilinmektedir.

1.3. ER'de Oksidatif Protein Katlanması

ER protein katlanma olaylarıyla birlikte aynı zamanda translasyon sonrası modifikasyonların gerçekleştiği organeldir (Urade 2019). ER lümeninde meydana gelen ana translasyon sonrası modifikasyonlardan biri, tiyol (SH) gruplarının oksidasyonunu gerektiren disülfid bağlarının (RS-SR) oluşumudur. Disülfid bağlarının polipeptitlere dahil edilmesi, disülfid üreten enzim olan ER oksidoredüktaz 1 (ERO1) ve bir disülfid taşıyıcı proteinin (protein disülfid izomeraz (PDI) işbirliğiyle gerçekleşir (Urade 2019). Aynı zamanda buranın kalite kontrolünde görev alan kalneksin (CNX) şaperonu, kalretikulin (CRT) ile ortak çalışarak özellikle glikoproteinlerin katlanmasında rol oynar. Bu sistem (ERO1- PDI) ER lümeninde bir reaktif oksijen türü olan H₂O₂ oluşumuna neden olmaktadır. ER herhangi bir sebeple strese girdiğinde ve katlanmamış proteinler ER' de biriktiğinde yanlış disülfid bağlarının oluşma oranı artmaktadır (Tu ve Weissman 2004). Bu da ERO1 ve PDI'nin yeni disülfid bağları için daha fazla çalışmasına ve H₂O₂ oluşumunun arttırmasına yol açmaktadır (Tu ve Weissman 2004). ER stresi ve ROS arasındaki etkileşim anlamında, ER'nin bu işlevi doğrudan mekanik bir bağlantı sunar.

Bu fonksiyona uygun olarak, ER diğer hücrel kompartmanlarla karşılaştırıldığında daha oksitlenmiş bir ortama sahiptir. Redoks duyarlı yeşil flüoresan proteini (GFP) ile yapılan analizler, ER redoks potansiyelinin diğer hücrel bölmelerden daha yüksek olduğunu göstermiştir (Birk et al., 2013).

Glutasyon (GSH), bitki hücrelerindeki başlıca tiyol-disülfid redoks tamponudur. GSH/GSSG oranına ek olarak, bu molekülün belirli bir bölmedeki konsantrasyonu, redoks potansiyelini belirler. Hücrenin sitozol, kloroplastlar veya mitokondri gibi diğer bölümlerinde, indirgeme gücü kaynağı olan NADPH kullanılarak glutasyon redüktaz (GR) ile çok yüksek bir GSH/GSSG oranı korunabilir. Ancak ER, GR aktivitesinden yoksundur ve bu nedenle disülfid bağı oluşumu için daha uygun oksitlenmiş bir ortam yaratır (Shen et al., 2013).

Laboratuvar koşullarında bitkilerde ER stresini spesifik olarak teşvik etmek için tunikamisin (Tm) uygulanmaktadır (Martínez and Chrispeels, 2003; Iwata and Koizumi, 2005; Kamauchi et al., 2005). Salgı yolağına hedeflenmiş proteinlerin çoğu N-bağılı oligosakkaritlerin eklenmesiyle değişime uğrayan glikoproteinlerdir. Glikolizasyon olarak adlandırılan bu olay önemli bir translasyon sonrası değişim olup proteinlerin, denatürasyonunu ve proteolize uğramalarını engellemektedir. Ayrıca, bu değişim proteinlerin çözünürlüğünü de arttırmaktadır. Bunlara ek olarak glikolizasyon, ER içerisindeki kalite-kontrol mekanizması için bir “tanıma sinyali” olarak iş görmektedir (Ceriotti et al., 1998). Tunikamisin isimli antibiyotik de yukarıda sözü edilen N-glikolizasyonunu engelleyerek ER stresine neden olmaktadır. Arabidopsis'te, tunikamisin kaynaklı ER stresinin hücrede glutasyon birikimini indüklediği ve redoks durumunu da değiştirdiği bilinmektedir (Ozgun et al., 2014). Tunikamisin uygulaması Arabidopsis'te ayrıca glutasyon biyosentezini ve katabolizmasını düzenler, glutasyon ile ilgili bazı enzimlerin aktivitelerini teşvik eder (Uzilday et al., 2018).

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu oksidatif stres sonucu gelişen olumsuz büyüme koşulları altında, bitki hücrelerindeki çeşitli metabolik süreçlerin uyumsuzluğu, artan hidrojen peroksit (H_2O_2) ile sonuçlanabilir ve böylece bitki

hücrelerinde çeşitli tehditlere ve yaralanmalara neden olabilir. Askorbat peroksidaz (APX), bitkilerde H₂O₂'yi uzaklaştırmak için önemli bir enzimdir.

Yukarıda belirtilen bilgiler ışığında bu tez çalışmasında literatürde ilk defa ROS süpürme kapasitesi düşük *apx1-2* genotipinde ER stresi teşvik edilmiş ve bu genotipin özellikle katlanmamış protein yanıtı ve ER-faji ilişkisi araştırılmıştır. Bu amaçla yaban tip Col.0 ve *apx1-2* genotipinde 0.1 µg/ ml Tm uygulaması ile ER stresi teşvik edilmiş ve kök fenotipi ve lipid peroksidasyon seviyeleri belirlenmiştir. Aynı uygulama gruplarında ER stresinin algılanması ile ilişkili genlerin ifadeleri, ER ilişkili protein katlanmasının kalite kontrol yolları ile ilişkili genlerin ifadeleri, oksidatif protein katlanması ilişkili genlerin ifadeleri, ER'de protein parçalanması ilişkili genlerin ifadeleri, ER-faji ilişkili genlerin ifadeleri, programlanmış hücre ölümü ilişkili genlerin ifadeleri belirlenmiştir. Aynı zamanda redoks sinyalleme ile ilgili ilişkinin ortaya koyulması için antioksidan savunma yanıtı ilişkili genlerin ifadeleri, ROS'a yanıt veren genlerin ifadeleri, ROS sinyalleme ile ilgili genlerin ifadeleri kontrol ve ER stresi altında Col.0 ve *apx1-2* mutantlarında belirlenmiştir.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Deneme Deseni ve Bitkilerin Yetiştirilmesi

Denemede *Arabidopsis thaliana* (Col.0) ve *apx1-2* genotiplerinin tohumları kullanılmıştır. *A. thaliana* tohumları, %70 etanolde 1 dakika tutulduktan sonra distile suda 5 kez yıkanmıştır. Ardından 10 dakika %4 NaCl (sodyum hipoklorit) çözeltisinde tutulduktan sonra distile suda 7 kez yıkanarak sterilize edilmiştir. Tohumların yüzey sterilizasyonu steril kabinde gerçekleştirilmiştir. Tohumlar 4°C'de 72 saat bekletildikten sonra (stratifikasyon), %1 sakkaroz (w/v) ve % 0.7 agar içeren ve pH'ı 5.7 olan Murashige ve Skoog (MS) ortamını içeren petrilerde çimlendirilmiştir. Tohumları içeren petriler, 22 °C sıcaklık, 150 µmol m⁻²s⁻¹ ışık şiddeti ve %70 bağıl nem altında kontrollü büyüme odasına (16 saat ışık/8 saat karanlık) alınmıştır. Tohumlar fide aşamasına geldikten sonra ER' da N-glikalizasyonu engelleyerek spesifik olarak ER stresi oluşturmak için 5 gün boyunca tunikamisin (0.1 µg/ml) uygulamalarına tabi tutulmuştur ve hasat edilmiştir. Hasat edilen örnekler çalışmalar süresince -80°C'de saklanmıştır.

2.2. Lipid Peroksidasyonu

Rao ve Sresty (2000)'e göre lipid peroksidasyonu, tiyobarbitürik asit reaktif madde (TBARS) miktarı ölçülerek belirlenmiştir. İki absorbans değerlerinde (532 nm ve 600 nm) ölçülen sonuçlara göre TBARS konsantrasyonu belirlenmiştir. TBARS miktarını hesaplamak için ekstinksiyon katsayısı 155 mM⁻¹ cm⁻¹ olarak kullanılmıştır.

2.3. Protein Miktarının Belirlenmesi

Çalışmamızda protein miktarı ölçümleri, CBB G-250 boyasının protein bağlanması sonucu yeşil renkten maviye dönüşmesi esasına dayarak Bradford (1976)' ya göre gerçekleştirilmiştir. Protein standartı olarak bovin serum albümin kullanılarak gerçekleştirilen ölçümler 595nm' de alınan absorbans değerlerine göre belirlenmiştir. Protein miktarları hazırlanan standart eğrilere göre hesaplanmıştır.

2.4. Askorbat Peroksidaz (APX) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

APX (E.C. 1.11.1.11) enzim aktivitesi Nakano ve Asada (1981)'e göre ölçülmüştür. Örneklerin ekstraksiyonu için 0.1 g bitki sıvı azot kullanılarak toz haline getirilmiştir. Toz halindeki örnekler, 0.5 ml 50 mM Tris-HCl pH7.8, 0.1 mM EDTA, %0.2 Triton X100, 1 mM PMSF, 2 mM DTT, 5 mM askorbat içeren ekstraksiyon tamponu ile homojenize edilmiştir. Örnekler 10000g' de 10 dak. santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatantlar protein miktarı ve enzim aktivitelerinin ölçülmesinde kullanılmıştır. APX ölçümü için askorbatın oksitlenmesi 290 nm'de izlenmiştir. Reaksiyon karışımı 50 mM K-P pH7 tamponunda, 0.1 mM H₂O₂, 0.1 mM EDTA ve 0.5 mM askorbat içermektedir. Ekstinksiyon katsayısı 2.8 mM⁻¹ cm⁻¹ olarak hesaplanmıştır. 1 mg protein başına askorbat enzim aktivitesi 1 U (µmol mg/protein dk⁻¹) olarak hesaplanmıştır.

2.5. Gen İfadelerinin Belirlenmesi

2.5.1. Total RNA izolasyonu

Total RNA, üreticinin talimatlarına göre Qiagen RNeasy kiti kullanılarak 0.1 g örnek kullanılarak izole edilmiştir ve sonrasında, M-MuLV ters transkriptaz (New England Biolabs) kullanılarak revers transkripsiyon gerçekleştirilmiştir. RT için her uygulama grubundan 1 µg RNA kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen cDNA'lar, qRT-PCR için kalıp olarak kullanılmıştır.

2.5.2. Kantitatif real-time polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR)

Her bir reaksiyondaki RNA miktarı, *A. thaliana* ACTIN8 geni'ne normalize edilmiştir. qRT-PCR'ı gerçekleştirmek için Power SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) kullanılmıştır. Applied Biosystems StepOne Plus Sistemi ile qRT-PCR analizleri için üç bağımsız deney yapılmıştır. PCR koşulları: 5 dk 95°C'de, 40 döngü olarak 15 saniye 94°C, 15 saniye 60°C ve 30 saniye 72°C şeklinde uygulanmıştır. qRT-PCR veri analizi, StepOne Plus yazılımı ile yapılmıştır. Uygulama yapılmamış kontrol yaban tip Col.0 *A. thaliana* bitkileri

referans noktası olarak kullanılmış ve incelenen genler için bu referans değerine göre (1'e ayarlanmış) nispi ifade seviyeleri hesaplanmıştır.

2.6. İstatistiki Analizler

Denemeler iki kez tekrar edilmiş ve her veriye 3 teknik tekrar sonucunda ulaşılmıştır (n=6). Grafiklerde hata çubukları ortalamanın standart hatası'nı (SEM) göstermektedir. Gruplar arası farklılıklar students-*t* test ile karşılaştırılmış ve kontrole göre istatistiksel olarak farklı ($p < 0.05$) olan gruplar “*” ile işaretlenmiştir.

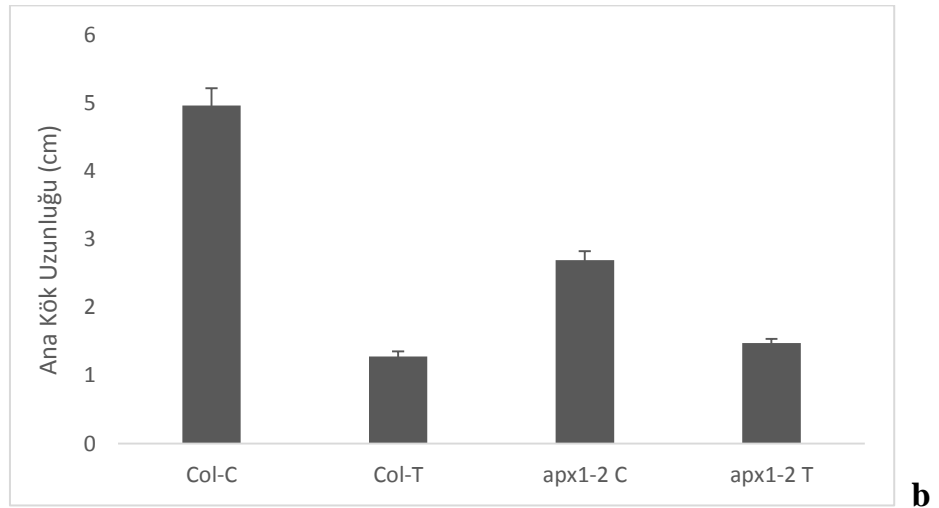
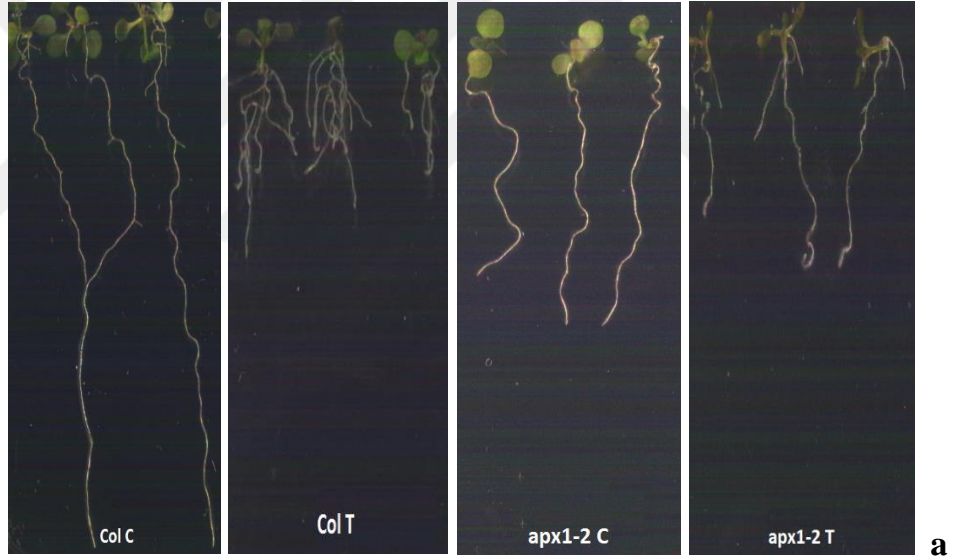


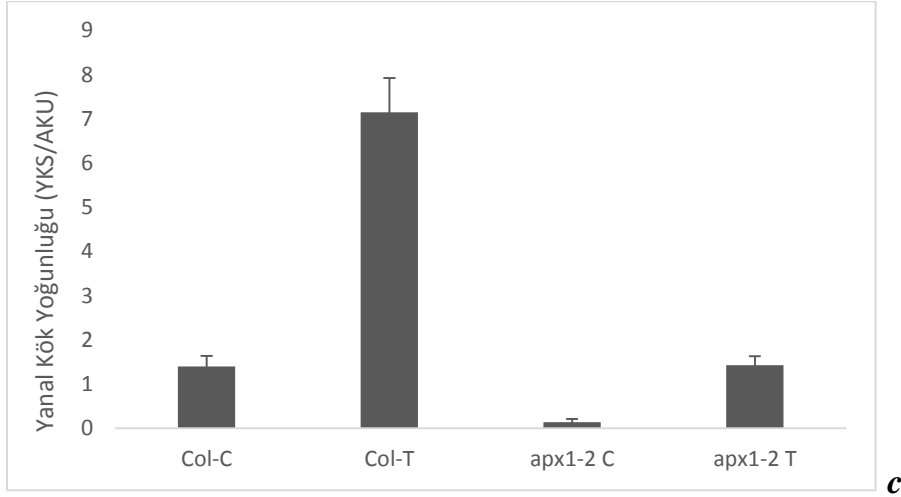
3. BULGULAR

3.1. Fizyolojik Parametreler

3.1.1. Kök fenotipi

Tunikamisin uygulamasının oluşturduğu ER stresinin kök fenotipi üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla bitkiler çimlendikten sonra 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Tm'li ortamlara transfer edilmiş ve 5 gün sonraki kök uzunlukları ölçülmüştür. Buna göre fenotipe bakıldığında tunikamisin uygulaması hem Col.0 hem de *apx1-2* bitkisinde boyca küçülmeye sebep olmuştur. Col.0 bitkilerinde ana kök uzunluğu Tm uygulamasıyla kontrole göre %74 oranında azalmışken, *apx1-2* bitkilerinde ise kontrole göre %45 azalmıştır. Her iki bitki grubunda da düşük oranlı (0,1 0,1 $\mu\text{g/ml}$) Tm uygulamalarının yanal kök yoğunluğunu belli oranlarda arttırdığı görülmüştür.

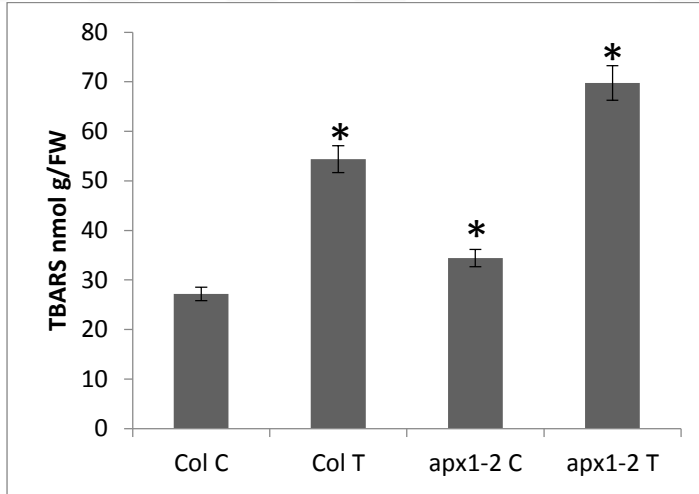




Şekil 3.1. Col ve *apx1-2* bitkilerinde kontrol ve 0,1 µg/ml Tunikamisın uygulanan grupların kök fenotipleri. a) Uygulama gruplarının fotoğrafları, b) Ana kök uzunluğu, c) Yanal kök yoğunluğu. (C: Kontrol, T: Tunikamisın)

3.2. Lipid Peroksidasyonu

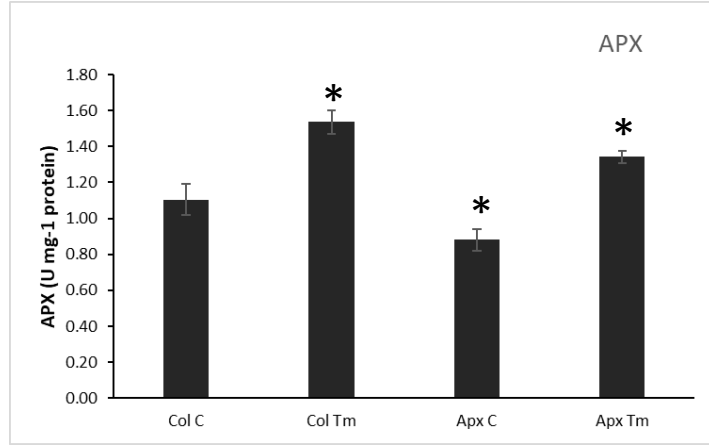
Lipid peroksidasyonu (TBARS) içeriği Tm uygulamasıyla Col ve *apx1-2* bitkilerinde kontrollere göre %100'lük bir artış göstermiştir.



Şekil 3.2 Bitkilerde lipid peroksidasyonu (TBARS) miktarı (C: Kontrol, T: Tunikamisın)

3.3. Askorbat Peroksidaz (APX) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

APX enzim aktivitesi *apx1-2* genotipinde kontrol koşullarında daha azdır ve ER stresi ile APX enzim aktivitesi artış göstermiştir.



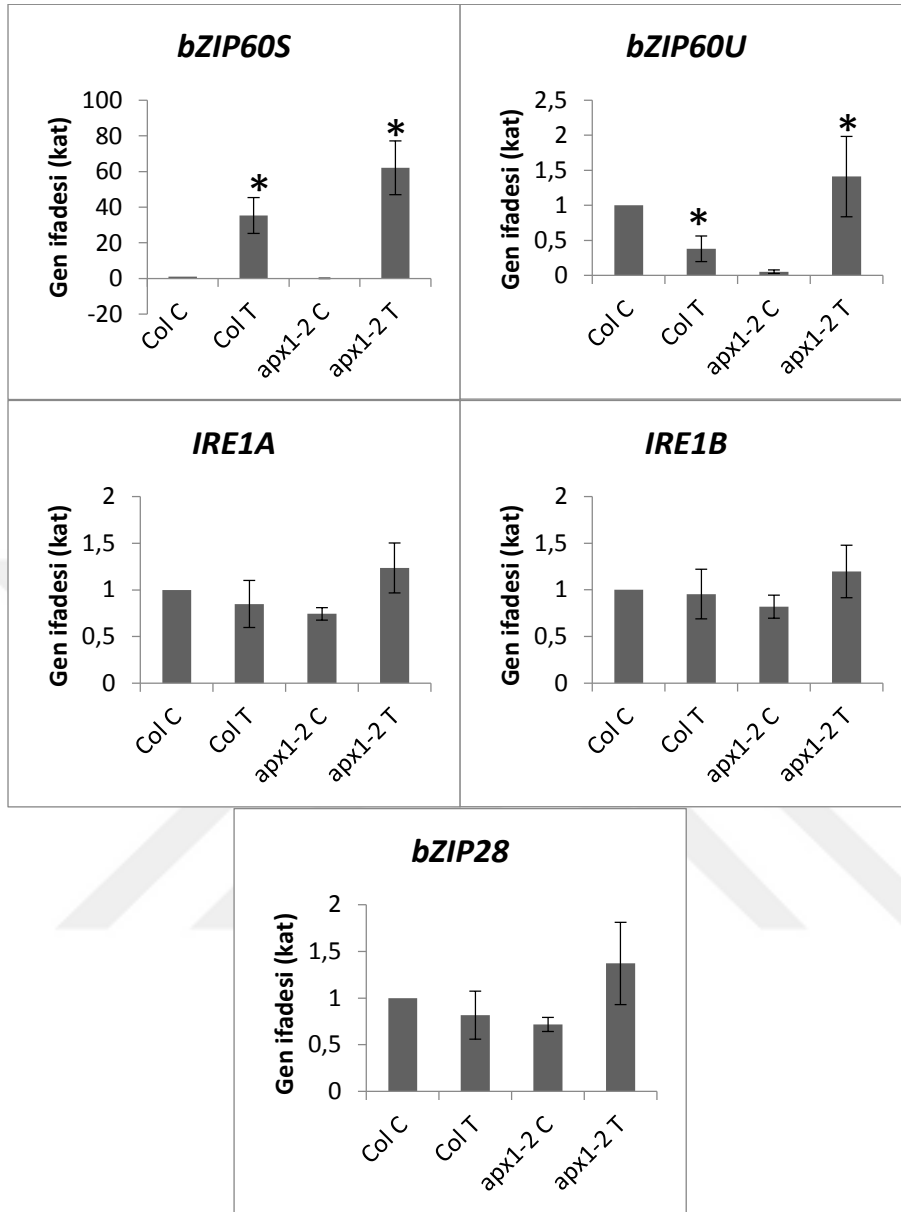
Şekil 3.3 Askorbat Peroksidaz (APX) Enzim Aktivitesi (C: Kontrol Tm:Tunikamisin)

3.4. Gen İfadesinin Analizleri

Col ve *apx1-2* eksik mutant genotipte 0.1 µg/ml Tm uygulaması sonrasında ER stresinin algılanması, protein katlanmasının kalite kontrol yolları, oksidatif protein katlanması, protein parçalanması, ER-faji, programlanmış hücre ölümü ile ilişkili genlerin ifadeleri belirlenmiştir. Ayrıca aynı deneme gruplarında antioksidan savunma yanıtı, ROS'a yanıt yolları ve ROS sinyalleme ile ilgili genlerin ifadeleri belirlenmiştir.

3.4.1. ER stresinin algılanması ile ilişkili genlerin ifadeleri

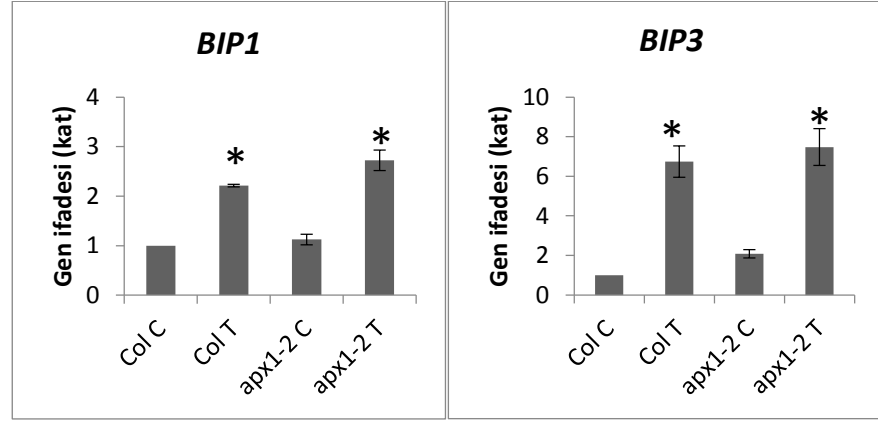
Tm uygulaması hem yaban tip hemde *apx1-2* bitkilerinde *bZIP60S* ifadelerinde artışa neden olmuştur. Bu artış Col'da 35 kat, *apx1-2*'de 62 kat olarak belirlenmiştir. *bZIP60U* ifadesi ise yaban tip bitkilerinde Tm uygulaması ile %70 azalmıştır. *apx1-2* kontrol bitkilerinde Col kontrole göre azalırken Tm uygulaması ile Col kontrole göre değişmemiş, *apx1-2* kontrole göre artış göstermiştir. ER stresinin algılanması ile ilgili genlerden *IRE1A*, *IRE1B* ve *bZIP28* ifadelerinde uygulama gruplarında Col kontrole göre istatistik olarak anlamlı bir değişiklik kaydedilmemiştir.



Şekil 3.4 ER stresinin algılanmasıyla ilişkili *bZIP60S*, *bZIP60U*, *IRE1A*, *IRE1B* ve *bZIP28* genlerinin ifadeleri (C: Kontrol, T: Tunikamisin).

3.4.2. ER ilişkili protein katlanmasının kalite kontrol yolları ilişkili genlerin ifadeleri

BIP1 ifadesi Tm uygulaması ile Col bitkilerinde 2.2 kat, *apx1-2* bitkilerinde 2.7 kat artmıştır. *BIP3* ifadesi ise Col bitkilerinde 6.7 kat artışa neden olurken, *apx1-2* bitkilerinde 7.5 kat artışa neden olmuştur.

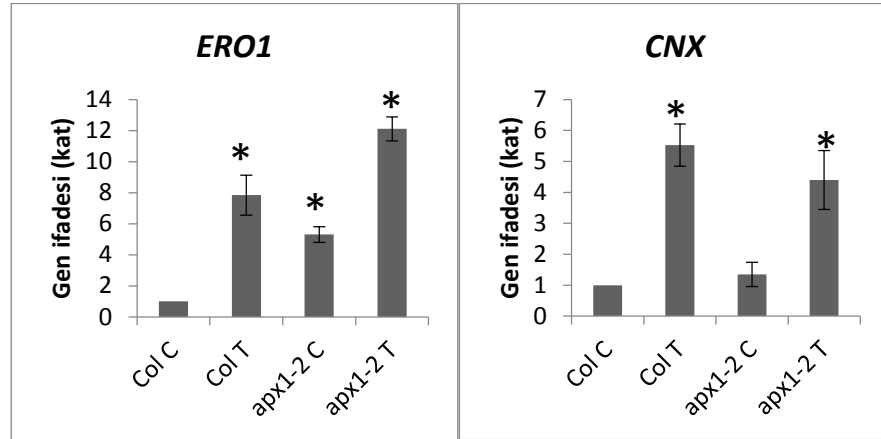


Şekil 3.5 ER ilişkili protein katlanmasının kalite kontrol yolları ilişkili *BIP1* ve *BIP3* genlerinin ifadeleri (C: Kontrol, T: Tunikamisin).

BIP1 ve

3.4.3. Oksidatif protein katlanması ilişkili genlerin ifadeleri

Oksidatif protein katlanması ilişkili genlerden *ERO1* ve *CNX* ifadeleri Tm uygulamaları altında belirlenmiştir. *ERO1* ifadesi Tm altında Col bitkilerinde 7.8 kat artmıştır. *apx1-2* kontrol bitkilerinde *ERO1* ifadesi 5.3 kat, Tm uygulaması ile ise 12.1 kat yükselmiştir. Tm uygulaması altında *CNX* ifadesi Col bitkilerinde 5.5 kat, *apx1-2* bitkilerinde ise 4.4 kat artış göstermiştir.

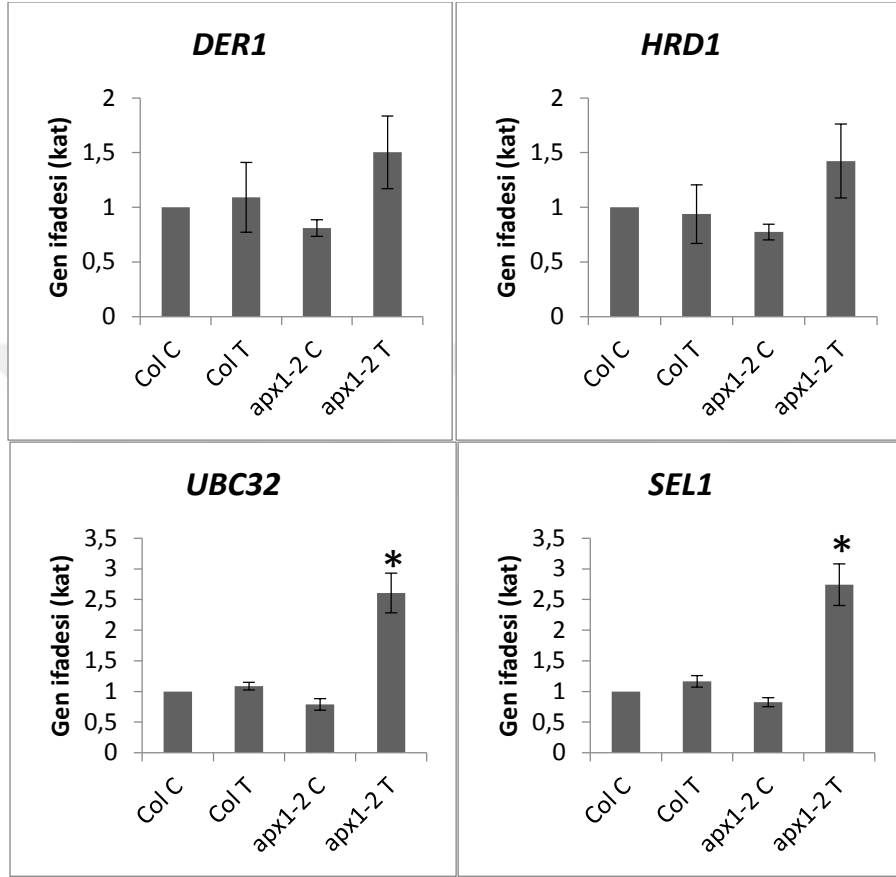


Şekil 3.6 Oksidatif protein katlanması ilişkili *ERO1* ve *CNX* genlerinin ifadeleri (C: Kontrol, T: Tunikamisin).

3.4.4. ER'de protein parçalanmasıyla ilişkili genlerin ifadeleri

ER'de protein parçalanması ile ilişkili genlerden *DER1* ve *HRD1* ifadelerini uygulama gruplarında istatistiki olarak anlamlı bir değişikliğe yol açmamıştır.

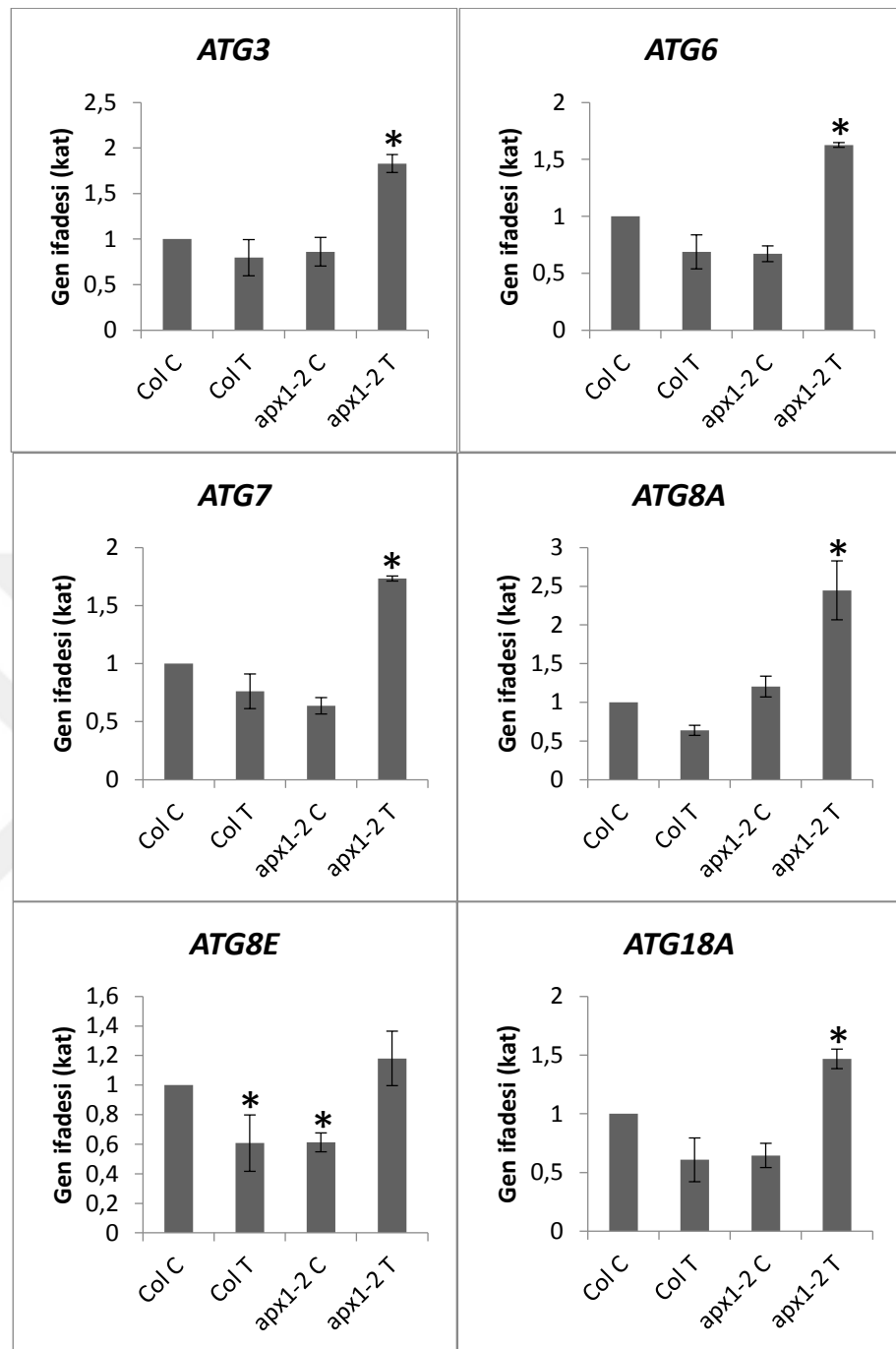
UBC32 ve *SEL1* genlerinin ifadelerinde sadece *apx1-2* genotipinde Tm uygulaması ile anlamlı bir değişiklik gözlenmiştir. Tm uygulaması ile *apx1-2* de *UBC32* ifadesi 2.6 kat, *SEL1* ifadesi 2.7 kat artmıştır.

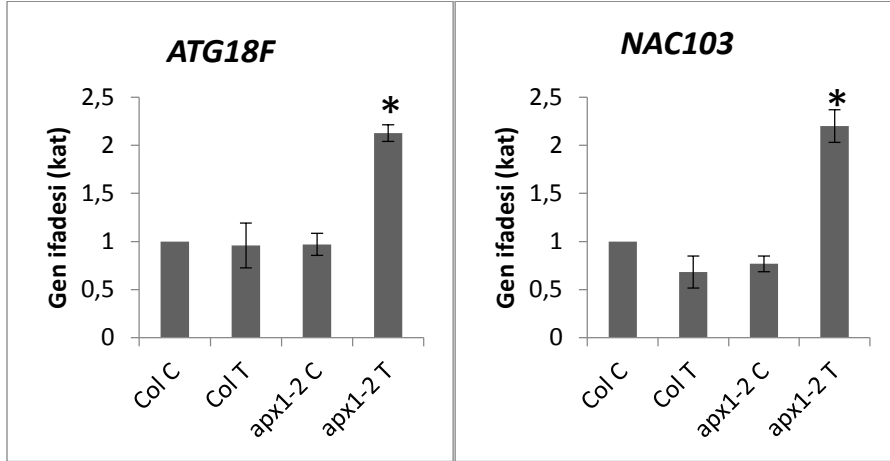


Şekil 3.7 ER’de protein parçalanmasıyla ilişkili *DER1*, *HRD1*, *UBC32*, *SEL1*, genlerinin ifadeleri (C: Kontrol, T: Tunikamisin).

3.4.5. ER-faji ilişkili genlerin ifadeleri

ER-faji ilişkili genlerden *ATG3*, *ATG6*, *ATG7*, *ATG8A*, *ATG8E*, *ATG18A*, *ATG18F* ve *NAC103* ifadeleri Col ve *apx1-2* genotiplerinde Tm uygulaması altında belirlenmiştir. Tm uygulaması *apx1-2* genotipinde *ATG3*, *ATG6*, *ATG7* ve *ATG8A* ifadelerini Col kontrole göre istatistiki olarak anlamlı bir şekilde sırasıyla 1.8, 1.6, 1.7 ve 2.4 kat arttırmıştır. *ATG8E* ifadesi ise TM uygulaması ile Col’ de %40 azalmaya neden olurken, *apx1-2* kontrol grubunda da %40 azalma gözlenmiştir. *ATG18F* ifadesi *apx1-2* bitkilerinde Tm uygulaması ile 2 kat artarken, *NAC103* ifadesi ise 2.2 kat artmıştır.

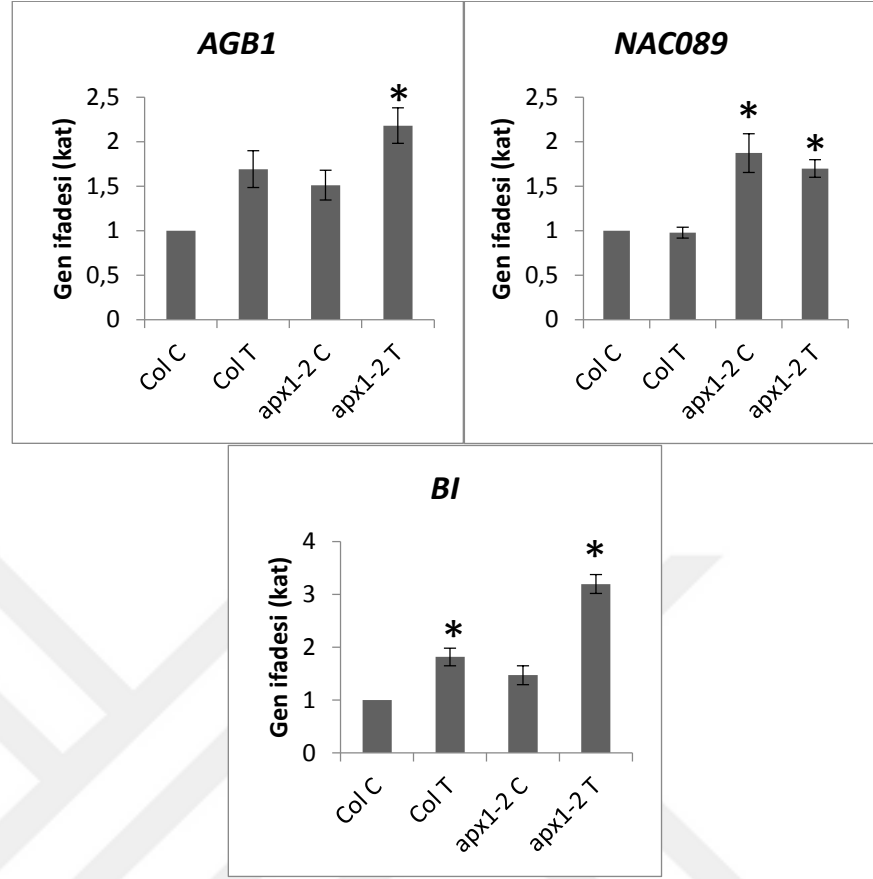




Şekil 3.8 ER-faji ilişkili *ATG3*, *ATG6*, *ATG7*, *ATG8A*, *ATG8E*, *ATG18A*, *ATG18F* ve *NAC103* genlerinin ifadeleri (C: Kontrol, T: Tunikamisin).

3.4.6. Programlanmış hücre ölümü ilişkili genlerin ifadeleri

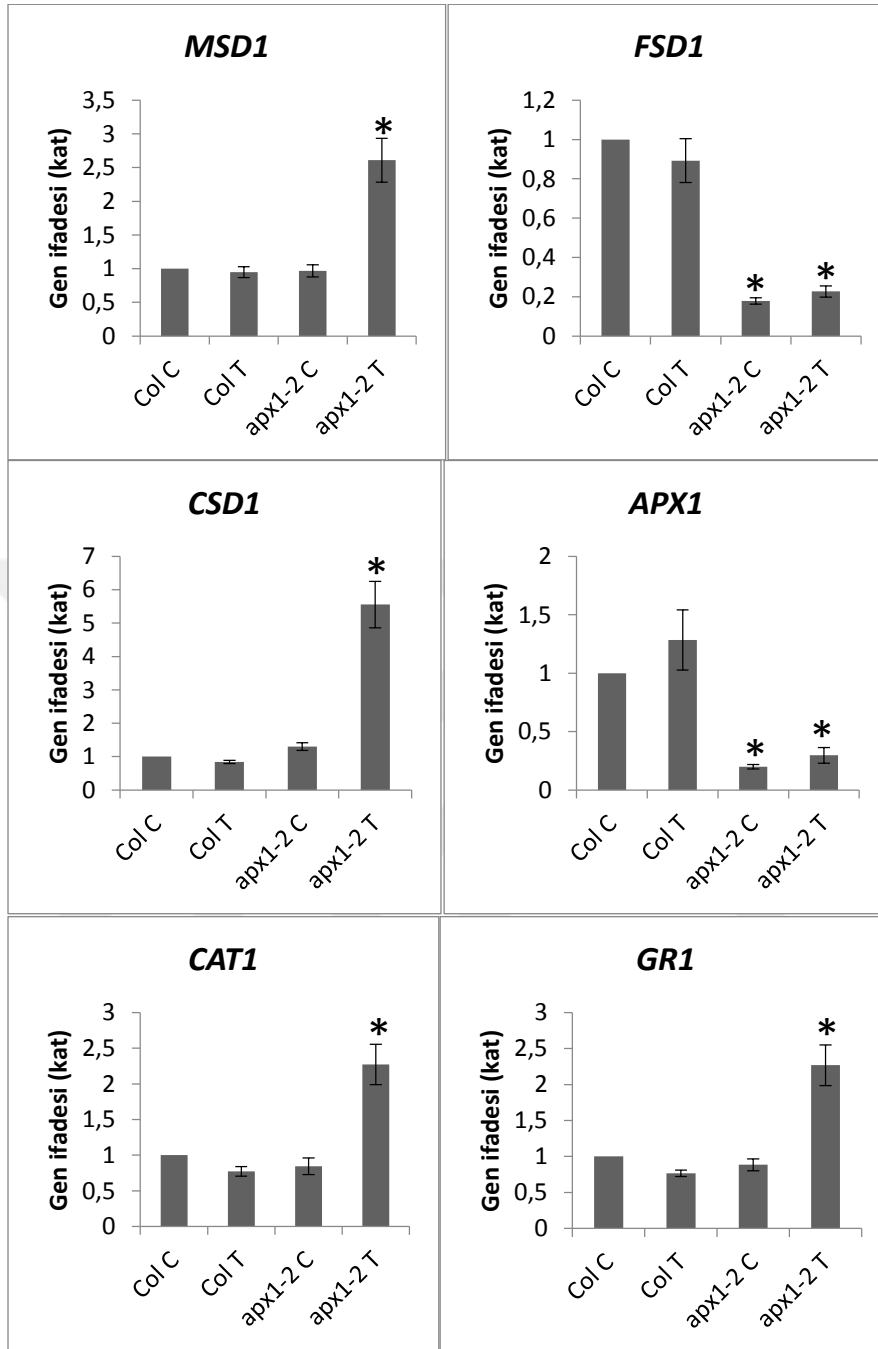
Tm uygulamasıyla *apx1-2* mutantının AGB1 geninin ifadesinde 2,7 katlık bir artış görülmüştür. *NAC089* geninin ifadesi *apx1-2* kontrolde Col kontrole göre %87'lik bir artış göstermişken yine *apx1-2*'de Tm uygulaması *NAC089* ifadesini *apx1-2* kontrole göre azalmıştır. BI gen ifadesi Col bitkilerinde Tm uygulaması ile 1.8 kat, *apx1-2* bitkilerinde ise Tm uygulaması ile 3 kat artmıştır.



Şekil 3.9 Programlanmış hücre ölümü ilişkili *AGB1*, *NAC089*, *BI* genlerinin ifadeleri (C: Kontrol, T: Tunikamisin).

3.4.7. Antioksidan savunma yanıtı ilişkili genlerin ifadeleri

MDS1 ve *CSD1* ifadesi Tm altında *apx1-2*' de sırasıyla 2.6 kat ve 5.5 kat artış göstermiştir. *FSD1* ifadesi ise *apx1-2* kontrol bitkilerinde Col kontrole göre %87, Tm uygulaması ile ise %80 azalmıştır. *APX1* ifadesi *apx1-2* bitkilerinde anlamlı olarak azdır. Tm uygulaması *apx1-2* bitkilerinde *CAT1* ifadesinde 2.3 kat, *GRI* ifadesinde ise 2.6 kat artışa neden olmuştur.

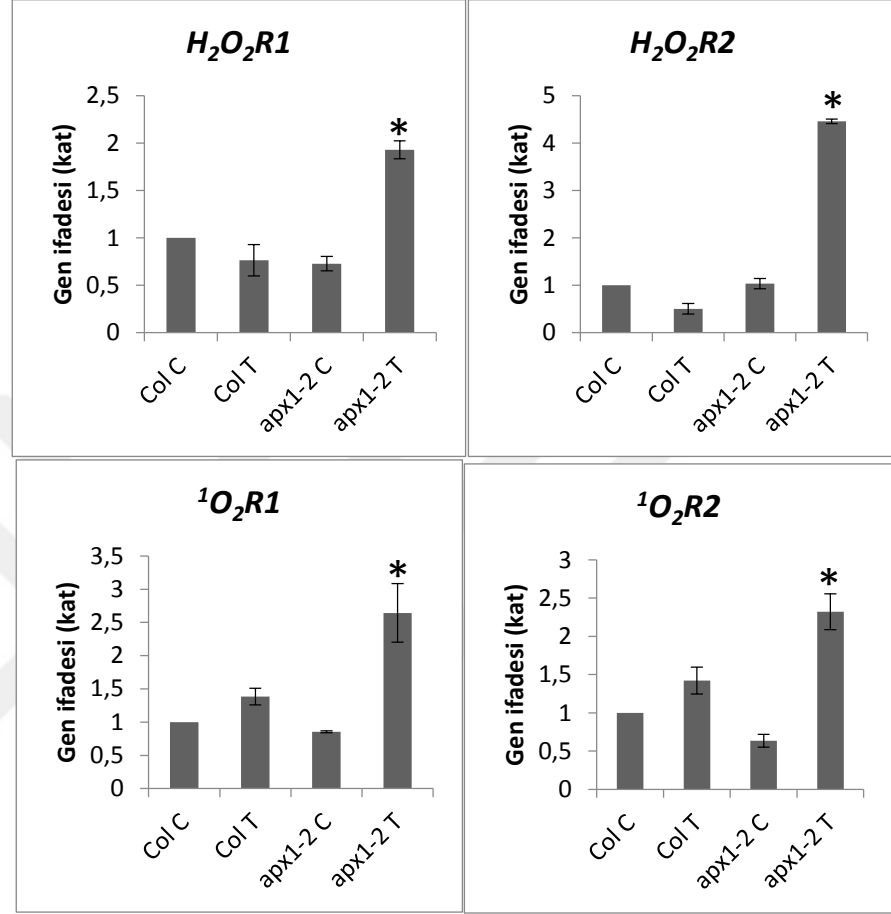


Şekil 3.10 Antioksidan savunma yanıtı ilişkili *FSD1*, *MSD1*, *CSD1*, *CAT1*, *GR1* ve *APX1* genlerinin ifadeleri (C: Kontrol, T: Tunikamisin).

3.4.8. ROS'a yanıt veren genlerin ifadeleri

H₂O₂R1 ve *H₂O₂R2* genlerinin ifadeleri *apx1-2* genotipinde Tm uygulaması ile istatistik olarak anlamlı şekilde artmıştır. Bu artışlar *H₂O₂R1* geni için 1.9 kat,

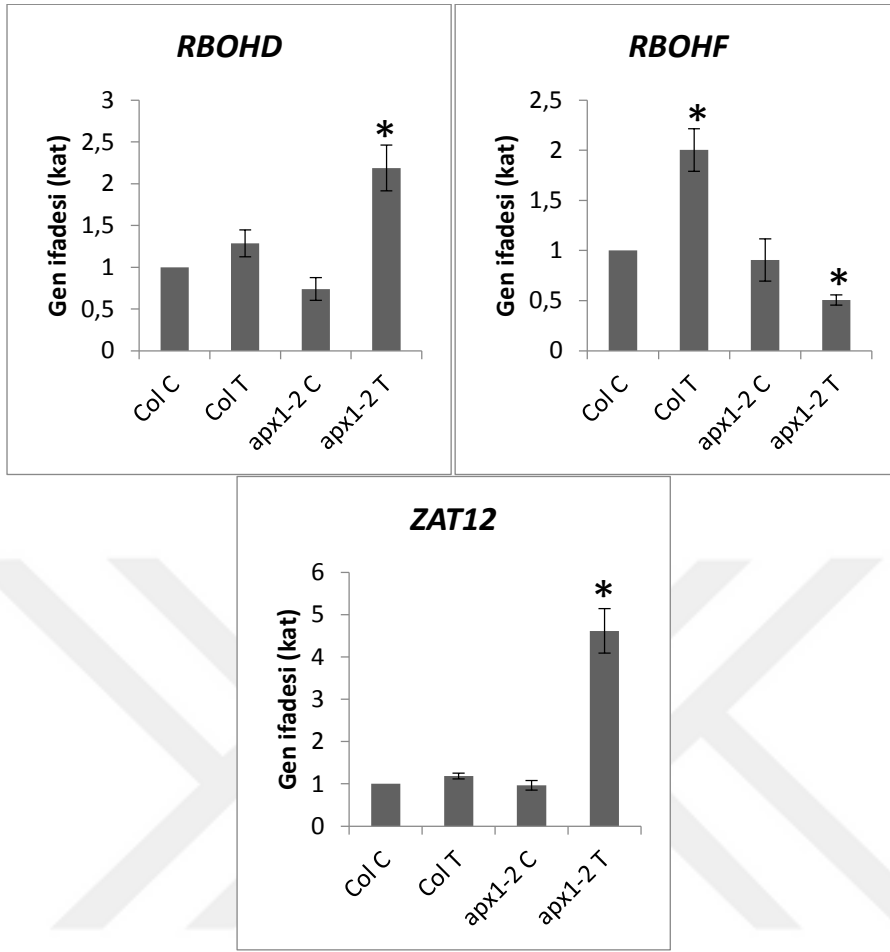
H_2O_2R2 geni için ise 4.4 kat olarak belirlenmiştir. Tm uygulaması ile *apx1-2* genotipinde 1O_2R1 gen ifadesi 2.6 kat, 1O_2R2 gen ifadesi ise 2.3 kat artmıştır.



Şekil 3.11 ROS'a yanıt veren H_2O_2R1 , H_2O_2R2 , 1O_2R1 ve 1O_2R2 genlerinin ifadeleri (C: Kontrol, T: Tunikamisin).

3.4.9. ROS sinyalleme ile ilgili genlerin ifadeleri

RBOHD ve *ZAT12* genlerinin ifadeleri *apx1-2* genotipinde Tm uygulaması ile sırasıyla 2.2 ve 4.6 kat artış göstermiştir. *RBOHF* gen ifadesi ise Col bitkilerin Tm uygulaması ile 2 kat artarken, *apx1-2* bitkilerinde Tm uygulaması ile %50 azalmıştır.



Şekil 3.12 ROS Sinyallemesi ile İlgili *RBOHD*, *RBOHF* ve *ZAT12* genlerinin ifadeleri (C: Kontrol, T: Tunikamisin).

3. TARTIŞMA

Çevresel stres koşulları ER lümeninde proteinlerin yanlış katlanmasına veya katlanmadan birikmesine yol açar ve istenmeyen polipeptidlerin aşırı birikimi ER stresi olarak adlandırılır (Howell 2013). ER stresi hücre içerisinde özelleşmiş bir yanıt olan katlanmamış protein yanıtını (UPR) tetikler. UPR, ER stresinin algılanması, katlanmamış proteinlerin tanımlanması, yanlış katlanmış proteinlerin yıkımını içermektedir (Ruberti et al. 2018). Katlanmamış proteinlerin parçalanması ile ER stresinin hafifletilemediği durumlarda ise ER ilişkili seçici otofaji yani ER-faji tetiklenmektedir.

Bitkilerde ER stresi dışarıdan uygulanan kimyasallar ile de yapay olarak oluşturulabilmektedir. Tunikamisin, DTT ve azetidin literatürde ER stresi oluşturmak için en çok kullanılan maddelerdir (Howell 2013). Özellikle tunikamisin N-glikalizasyonu engelleyerek spesifik olarak ER stresi oluşturduğundan bu çalışmada da tercih ettiğimiz uygulama olmuştur. ER aynı zamanda oksidatif protein katlanmasının gerçekleştirildiği organeldir. Disülfid bağların oluşması ve oksidatif katlanma sırasında çalışan ERO1- PDI sistemi ER lümeninde bir reaktif oksijen türü olan H₂O₂ oluşumuna neden olmaktadır (Ozgun et al. 2018).

Katlanmamış proteinlerin ER' de birikmesi ile yanlış disülfid bağlarının oluşma oranı da artmaktadır (Tu ve Weissman 2004). ERO1 ve PDI'nin daha fazla çalışması ile ER lümeninde protein katlanma kapasitesi artmakta ve disülfid bağ oluşumunda da artış görülmektedir. ERO1-PDI sisteminin aktivitesindeki artış H₂O₂ oluşumunu da arttırmaktadır (Onda et al. 2009). Oksidatif protein katlanması sırasında indirgeniş glutatyon (GSH) tarafından yanlış disülfid bağlarının yıkımı gerçekleştirilir. GSH'ın fazla kullanımı ile ER içerisinde GSH havuzunu azaltmakta ve bu durum ER'nin redoks durumunu değiştirmektedir (Uzilday et al. 2018). Bu durum GSH' ın ER içerisinde doğru protein katlanması için önemini ortaya koymaktadır. Yani GSH metabolizması ER stresi altında düzgün protein katlanmasının düzenlenmesi için gereklidir. Glutatyon havuzu aynı zamanda askorbatın rejenerasyonu içinde kullanılmaktadır. APX1, H₂O₂

seviyesinin düzenlenmesinde ve H_2O_2 sinyallemesinde anahtar rol oynamaktadır. Arabidopsis’de APX1 ve APX2 sitoplazmada bulunmaktadır. APX1 mRNA’sı birçok bitki dokusunda herhangi bir stres olmayan koşullarda bile gösterilmiştir. APX2 mRNA’sı ise özellikle yüksek ışık, sıcaklık ve yaralanma gibi stres koşulları altında gözlenmiştir. APX1 ve APX2’ nin ifadeleri kloroplastlarda yer alan fotosentetik elektron taşıma zincirinin redoks durumu tarafından düzenlenen sinyallere bağlıdır. Sitoplazmik lokalizasyonuna rağmen APX1 kloroplastların ROS’lara karşı korunmasında gerekli bir proteindir. APX1’i aşırı ifade eden mutantların parakuat teşvikli fotooksidatif stres ve nitrik oksit teşvikli hücre ölümüne karşı daha dirençli olduğu rapor edilmiştir (Murgia et al. 2002).

Askorbat peroksidazlar, askorbatı indirgeyici ajan olarak kullanan ve H_2O_2 ’nin suya dönüşümünü katalizleyen enzimlerdir ve bu reaksiyon sonucunda askorbat monodehidroaskorbata yükseltgenir (Foyer ve Noctor 2011). Monodehidroaskorbat redüktaz ise NADPH’ı $NADP^+$ ’ya dönüştürerek tekrar askorbat oluşumunun indirgenmesini sağlar. Farklı stres koşullarının total APX aktivitesinde artışa neden olduğu bilinmektedir (Koussevitzky et al. 2008). Daha önce yapılan çalışmalarda ER stresi ilişkili ROS oluşumunun sinyal görevleri olduğu ve antioksidan sistemi düzenlediği gösterilmiştir (Ozgun et al. 2014, Angelos ve Brandizzi 2018). ER stresinin ve katlanmamış protein yolağının tunikamisin teşvikli ER stresinin APX enzim aktivitesini arttırdığı rapor edilmiştir (Ozgun et al. 2014).

Aşırı miktarda üretilen ROS özellikle stres koşulları altında hücre zarında lipid peroksidasyonuna neden olur (Mittler 2017). Tm teşvikli ER stresinin lipid peroksidasyonunu arttırdığı daha önce gösterilmiştir (Ozgun et al. 2014). Çalışmamızda da Tm uygulamaları ile hem Col.0 hemde *apx1-2* bitkilerinde lipid peroksidasyonu artış göstermiştir.

Literatürde *apx* mutantlarının ER stresine karşı verdiği yanıtlar ile ilgili herhangi bir bilgi bulunmamaktadır. Ayrıca bu mutantların ER-faji ile ilişkisi de ilk kez bu çalışmada rapor edilmiştir. *apx1-2* mutantına Tm uygulanması ile ER stresini algulama ve protein katlanması ile ilişkili genlerden *bZIP60S*, *BIP1* ve

BIP3 ifadeleri artmıştır. Literatürde özellikle *BIP3* ifadesinin ER stresi koşullarında en fazla artış gösteren gen olduğu gösterilmiştir (Ozgun et al. 2015). Elde edilen sonuçlar *apx1-2*'in ER stresinin algılanması ve katlanmamış protein yanıtının düzenlenmesinde önemli role sahip olduğunu göstermektedir.

Oksidatif protein katlanması hücre içi redoks değişikliklerinden en çok etkilenen metabolik olaylardan birtanesidir. Tuz stresi gibi çevresel streslerin ER stresini teşvik ederek protein katlanması ile ilgili genlerin ifadelerinin düzenledikleri bilinmektedir (Ozgun et al. 2014, Ozgun et al. 2015).. Çalışmamızda da protein katlanması ilişkili genlerden *ERO1* ve *CNX* ifadelerinde Tm uygulaması ile artış gözlenmiştir.

ER stresi ilişkili parçalanma yolağı yüksek sıcaklık, tuzluluk ve biyotik stres koşullarında aktifleşmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda tuz stresinin ERAD ile ilişkili genlerin ifadelerini düzenlediği gösterilmiştir (Ozgun et al. 2014) Çalışmamızda *apx1-2* mutantında Tm uygulaması ile *SEL1*, *UBC32* ifadelerinde gözlenen artışlar APX yoksunluğunda ER stresine maruz kalan bitkilerde parçalanma yolaklarının aktifleştiğini literatürde ilk kez rapor etmektedir.

ATG proteinleri ER'nin seçici otofajisinde görev almaktadır. Örneğin, ATG3, ATG8'in fosfatidiletanolamin (PE) ile konjugasyonuna aracılık eder (Yang and Klionsky 2010). Arabidopsis ATG6'sının, normal bitki büyümesini, polen gelişimini ve çimlenmesini ve biyotik/abiyotik streslere karşı bitki tepkilerini düzenlediği rapor edilmiştir (Sláviková et al., 2005). ATG8a tüm dokularda baskın ATG8 izoformu olarak bulunmaktadır. ATG8e'nin protein bozulmasını doğrudan etkilediği daha önce gösterilmiştir (Guan et al., 2022). Bazı ATG18 varyantlarının oksidatif stres, kuraklık ve tuz stresinde rol oynadığı daha önce gösterilmiştir (Xiong et al., 2005; Bassham et al., 2005; Xiong et al., 2007; Liu et al., 2009). Elde edilen verilerden görüldüğü üzere ER stresi altında ER-faji ile ilişkili genlerin çoğu sadece *apx1-2* genotipinde aktifleşmiştir. Bu durum, APX yoksunluğunun getirdiği hücre içi H₂O₂ yükünün artmasının ER-faji ilişkili genlerin ifadelerini düzenlediğini göstermektedir.

ER membranında yer alan G β -G γ heterodimer proteininin UPR ilişkili hücre ölümünü tetikleyen sinyalleme yolağında yer aldığı bilinmektedir (Wang, et al., 2007). Heterotrimerik G proteininin G β altbirimi olan AGB1'in inaktifleşmesinin tunikamisin teşvikli hücre ölümüne karşı bitki hücrelerini koruduğu bildirilmiştir. AGB1'in işlevinin ortadan kaldırıldığı mutant bitkilerin ise ER stresine karşı aşırı hassas oldukları rapor edilmiştir (Chen ve Brandizzi. 2012). Çalışmamızda ER stresi teşvik edilen *apx1-2* mutantlarında *AGB1*, *NAC089* ve *BI* gen ifadelerinde artışlar belirlenmiştir ve *apx1-2*'nin ER ilişkili hücre ölümünü düzenlediği ortaya konmuştur.

Stres koşulları altında redoks ve antioksidan savunma yanıtı ile ilgili genlerin ifadelerinde artışlar hem Arabidopsis'de hemde buğday, çeltik gibi tahıl bitkilerinde gösterilmiştir (Cuypers et al. 2011, Ranjeet et al. 2012, Paul ve Roychoudhury, 2018). ER stresi teşvik edilen *apx1-2* mutant bitkilerinde özellikle *MSD1*, *CSD1*, *CAT1*, *GRI* ifadelerinde gözlenen artışlar litaretür ile uyumlu olarak bitki antioksidan savunma sisteminin ER stresi ile doğrudan ilişkisini göstermesi açısından önem taşımaktadır. Ayrıca bu artışların *apx1-2* genotipinde daha şiddetli olması antioksidan savunmanın APX1 eksikliğini giderebilmek amacıyla daha şiddetli uyarılabileceğini göstermektedir.

H₂O₂ sinyal molekülü olarak gen ifadesi düzenlemesine katılmaktadır (Mittler et al., 2011). Arabidopsis'in mikroarray verileri gözönüne alındığında transkriptomun %1-2'sinin ve transkripsiyon faktörlerinin 1/3'ünün H₂O₂ uygulaması ile düzenlendiği görülmektedir (Desikan et al. 2001, Gadjev et al. 2006). Çalışmamızda elde edilen veriler ER stresinin *apx1-2* mutantlarında H₂O₂'ye yanıt veren genlerden *H₂O₂R1* ve *H₂O₂R2*'nin ifadelerini büyük oranda arttırdığını göstermektedir. Aynı zamanda *apx1-2* mutantında Tm teşvikli ER stresinin *H₂O₂R2* ifadesinde de artışa neden olduğu gösterilmiştir. Bu gen ifadelerindeki artışlar hücrede ROS aracılı sinyal yollarının *apx1-2* genotipinde yabancı tipe göre daha aktif olduğunu ortaya koymaktadır.

Bitkilerin çevresel streslere karşı verdikleri yanıtlar düzenleyici gen kompleksleri tarafından kontrol edilir. Çoğu sinyalleme ve düzenleyici gen strese özeldir fakat ZAT12 (Zinc finger protein) birçok abiyotik ve biyotik stres koşuluna yanıt vermektedir. ZAT12' nin Arabidopsis'de soğuk stresi ve oksidatif stres sinyallemesinde iş gördüğü de bilinmektedir. Aynı zamanda ZAT12'nin transkripsiyonel seviyesinin yüksek ışık ve oksidatif stres altında artış gösterdiği de bilinmektedir. ZAT12'nin bu özellikleri nedeniyle Arabidopsis'de reaktif oksijen türlerinin düzenlenmesi için ana düzenleyici transkripsiyon faktörü olduğu düşünülmektedir. Çalışmamızda *apx1-2* mutantında ER stresinin ZAT12 ifadesinde artışa neden olduğu yani hücrenin oksidatif stresle mücadele etmek için savunma sistemlerini aktive ettiği bulunmuştur.

4. SONUÇ

ER hücrede proteinlerin işlenmesi ve katlanmasının gerçekleştiği ana bölmedir. Ayrıca birçok sinyal iletim yolu ve metabolik yolda görev almaktadır. ROS'lar redoks durumu ve stres yanıtında yer alan çok önemli sinyal görevleri olan moleküllerdir. Abiyotik ve biyotik stres faktörleri ER'de katlanmamış ve yanlış katlanmış proteinlerin birikimine yol açmakta ve bu durum ER stresi olarak adlandırılmaktadır. Son yıllarda ROS ve redoks metabolizmasının ER stresi ile ilişkisini ortaya koyan çalışmalar yapılmış, ER stresinin ROS üretimine ve oksidatif strese neden olduğu ortaya konmuştur. ER stresi aynı zamanda NADPH oksidaz ilişkili ROS sinyallemede ve GSH redoks havuzunun homeostazisi sırasında da artış göstermektedir. Çalışmamızda litaretürde ilk kez *apx1-2* mutantında ER stresi tunikamisin uygulaması ile teşvik edilmiş, ER stresi ile ilişkili katlanma ve algılama proteinlerini kodlayan genlerin ifadelerinde artışlar belirlenmiştir. *apx1-2*'nin ER stresi altında ER ilişkili parçalanma yolları ile ilişkisi ilk kez ortaya konmuştur. ER ilişkili hücre ölümü ve ER-faji elemanlarının ifadelerinin *apx1-2* yokluğunda kontrol gruplarına göre çok yüksek miktarda artış göstermesi ise *apx1-2*'in özellikle otofaji ilişkili hücre ölümünde ER stresi altındaki düzenleyici rolünü göstermesi açısından önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Aller, I., Meyer, A. J.**, 2013, The oxidative protein folding machinery in plant cells, *Protoplasma*, 250(4):799-816 pp.
- Anelli, S., Sitia, R.**, 2008, Protein quality control in the early secretory pathway, *The EMBO Journal*, 27:315-327 pp.
- Angelos, E., Brandizzi, F.**, 2018, NADPH oxidase activity is required for ER stress survival in plants, *The Plant Journal*, 96(6), 1106-1120 pp.
- Bao, Y., Bassham D.C.**, 2020, ER-Phagy and Its Role in ER Homeostasis in Plants, *Plants*, 9(12):1771p.
- Bao, Y., Pu, Y., Yu, X., Gregory, B. D., Srivastava, R., Howell, S. H., Bassham, D. C.** 2018, IRE1B degrades RNAs encoding proteins that interfere with the induction of autophagy by ER stress in *Arabidopsis thaliana*, *Autophagy*, 14(9):1562-1573 pp.
- Bassham, DC., Laporte, M., Marty, F., Moriyasu, Y., Ohsumi, Y., Olsen, L.J., Yoshimoto, K.**, 2006, Autophagy in Development and Stress Responses of Plants, *Autophagy*, 2, 2–11 pp.
- Bhaskara, R. M., Grumati, P., Garcia-Pardo, J., Kalayil, S., Covarrubias-Pinto, A., Chen, W., Kudryashev, M., Dikic, I., Hummer, G.**, 2019, Curvature induction and membrane remodeling by FAM134B reticulon homology domain assist selective ER-phagy, *Nature communications*, 10(1):1-13 pp.
- Birk, J., Meyer, M., Aller, I., Hansen, H. G., Odermatt, A., Dick, T. P., Meyer, A. J., Appenzeller-Herzog, C.**, 2013, Endoplasmic reticulum: reduced and oxidized glutathione revisited. *Journal of cell science*, 126(7):1604-1617 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Bouteiller, N., De C.,** 2019, The viral F-box protein P0 induces an ER-derived autophagy degradation pathway for the clearance of membrane-bound AGO1, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(45):22872-22883 pp.
- Bradford, M. M.,** 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254 pp.
- Brodsky, J. L., McCracken, A. A.,** 1999, ER protein quality control and proteasome-mediated protein degradation, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 10(5):507-13 pp.
- Bu, F., Yang, M., Guo, X., Huang, W., Chen, L.,** 2020, Multiple Functions of ATG8 Family Proteins in Plant Autophagy, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8(466).
- Ceriotti, A., Duranti, M., Bollini, R.,** 1998, Effects of N-glycosylation on the folding and structure of plant proteins. *Journal of Experimental Botany*, 49(324):1091-1103 pp.
- Chaudhari, N., Talwar, P., Parimisetty, A., Lefebvre, H. C., Ravanan, P.,** 2014, A Molecular Web: Endoplasmic Reticulum Stress, Inflammation, and Oxidative Stress, *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, 213.
- Chen, Y., and Brandizzi, F.,** 2012, AtIRE1A/AtIRE1B and AGB1 independently control two essential unfolded protein response pathways in Arabidopsis, *Plant J.*, 69, 266–277 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Chen, Q., Shinozaki, D., Luo, J., Pottier, M., Havé, M., Marmagne, A., Reisdorf-Cren, M., Chardon, F., Thomine, S., Yoshimoto K., Masclaux-Daubresse, C.,** 2019, *Autophagy and Nutrients Management in Plants, Cells*, 8(11):1426p.
- Cuypers, A., Karen, S., Jos, R., Kelly, O., Els, K., Tony, R., Jaco, V.,** 2011, The cellular redox state as a modulator in cadmium and copper responses in *Arabidopsis thaliana* seedlings, *Journal of plant physiology*, 168(4), 309-316 pp.
- Davletova, S., Schlauch, K., Coutu, J., & Mittler, R.,** 2005, The zinc-finger protein Zat12 plays a central role in reactive oxygen and abiotic stress signaling in *Arabidopsis*, *Plant physiology*, 139(2), 847-856 pp.
- Das, K., Roychoudhury, A.,** 2014, Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants, *Frontiers in environmental science*, 2, 53 P.
- Desikan, R., A.-H.-Mackerness, S., Hancock, J. T., Neill, S. J.,** 2001, Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress, *Plant physiology*, 127(1), 159-172 pp.
- Doorn, W.G., Papini, A.,** 2013, Ultrastructure of autophagy in plant cells: a review, *Autophagy*, 9(12):1922-36 pp.
- Drerup, M. M., Schlucking, K., Hashimoto, K., Manishankar, P., Steinhorst, L., Kuchitsu, K., Kudla, J.,** 2013, The Calcineurin B-like calcium sensors CBL1 and CBL9 together with their interacting protein kinase CIPK26 regulate the *Arabidopsis* NADPH oxidase RBOHF. *Mol. Plant*, 6:559–569.
- Foyer, C. H., Noctor, G.,** 2011, Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub, *Plant physiology*, 155(1), 2-18 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Gadjev, I., Vanderauwera, S., Gechev, T. S., Laloi, C., Minkov, I. N., Shulaev, V., Van Breusegem, F.,** 2006, Transcriptomic footprints disclose specificity of reactive oxygen species signaling in Arabidopsis, *Plant physiology*, 141(2), 436-445 pp.
- Gilroy, S., Bialasek, M., Suzuki, N., Górecka, M., Devireddy, A. R., Karpiński, S., Mittler, R.,** 2016, ROS, calcium, and electric signals: key mediators of rapid systemic signaling in plants, *Plant physiology*, 171(3):1606-1615 pp.
- Guan, B., Xue, H. W.,** 2022, Arabidopsis AUTOPHAGY-RELATED3 (ATG3) facilitates the liquid–liquid phase separation of ATG8e to promote autophagy, *Science Bulletin*, 67(4), 350-354 pp.
- Guo, K., Wang, W., Fan, W., Wang, Z., Zhu, M., Tang, X., Wu, W., Yang, X., Shao, X., Sun, Y., Zhang, W., Li, X.,** 2018, Arabidopsis GAAP1 and GAAP3 Modulate the Unfolded Protein Response and the Onset of Cell Death in Response to ER Stress, *Frontiers in Plant Science*, 16(9):348p.
- Guo, Q., Major, I.T., Howe, G.A.,** 2018, Resolution of growth-defense conflict: mechanistic insights from jasmonate signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 44:72-81 pp.
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Hossain, M.S., Mahmud, J.A., Rahman, A., Inafuku, M., Oku, H., Fujita, M.,** 2017, Coordinated actions of glyoxalase and antioxidant defense systems in conferring abiotic stress tolerance in plants, *Int. J. Mol. Sci.*, 18, 200 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Hasanuzzaman, M., Mahmud, J.A., Nahar, K., Anee, T.I., Inafuku, M., Oku, H., Fujita, M.,** 2017, Responses, adaptation, and ROS metabolism in plants exposed to waterlogging stress. In *Reactive Oxygen Species and Antioxidant Systems in Plants: Role and Regulation under Abiotic Stress*; Khan, M.I.R., Khan, N.A., Eds.; Springer: New York, NY, USA.
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M. B., Anee, T. I., Parvin, K., Nahar, K., Mahmud, J. A., & Fujita, M.,** 2019, Regulation of ascorbate-glutathione pathway in mitigating oxidative damage in plants under abiotic stress, *Antioxidants*, 8(9), 384 p.
- Hollien, J., Weissman, J. S.,** 2006, Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response, *Science*, 313(5783), 104-107.
- Hollien, J., Lin, J. H., Li, H., Stevens, N., Walter, P., Weissman, J. S.,** 2009, Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells, *The Journal of Cell Biology*, 186(3):323–331 pp.
- Honig, A., Avin-Wittenberg, T., Ufaz, S., Galili, G.,** 2012, A new type of compartment, defined by plant-specific Atg8-interacting proteins, is induced upon exposure of Arabidopsis plants to carbon starvation. *The Plant Cell*, 24(1):288-303 pp.
- Howell, S.H.,** 2013, Endoplasmic Reticulum Stress Responses in Plants, *Annual Review of Plant Biology*, 64:477-499 pp.
- Hu, S., Ye, H., Cui, Y., Jiang, L.,** 2019, AtSec62 is critical for plant development and is involved in ER-phagy in Arabidopsis thaliana, *Journal of Integrative Plant Biology*, 62(2):181-200 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Huang, S., Van Aken, O., Schwarzländer, M., Belt, K., Millar, A. H.,** 2016, The roles of mitochondrial reactive oxygen species in cellular signaling and stress response in plants. *Plant physiology*, 171(3):1551-1559 pp.
- Imogen A. S., Paul R. H., Christian P. C., James N., Lynne M. R., Chris H., Emanuela P., Lorenzo F.,** 2008, Overexpression of a Plant Reticulon Remodels the Lumen of the Cortical Endoplasmic Reticulum but Does not Perturb Protein Transport, *Traffic*, 9(1):94-102 pp.
- Ishikawa, T., Watanabe, N., Nagano, M., Kawai-Yamada, M., Lam, E.,** 2011, Bax inhibitor-1: a highly conserved endoplasmic reticulum-resident cell death suppressor, *Cell Death Differ*, 18, 1271–1278 pp.
- Iwata, Y., Koizumi, N.,** 2005, An Arabidopsis transcription factor, AtbZIP60, regulates the endoplasmic reticulum stress response in a manner unique to plants, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(14):5280-5285 pp.
- Kalvari, I., Tsompanis S., Mulakkal, N. C., Osgood, R., Johansen, T., Nezis, I. P., Promponas, V. J.,** 2014, iLIR: A web resource for prediction of Atg8-family interacting proteins, *Autophagy*, 10(5):913-25 pp.
- Kamauchi, S., Nakatani, H., Nakano, C., Urade, R.,** 2005, Gene expression in response to endoplasmic reticulum stress in Arabidopsis thaliana, *The FEBS journal*, 272(13):3461-3476 pp.
- Koizumi, N., Martinez, I. M., Kimata, Y., Kohno, K., Sano, H., Chrispeels, M. J.,** 2001, Molecular characterization of two Arabidopsis Ire1 homologs, endoplasmic reticulum-located transmembrane protein kinases, *Plant Physiology*, 127(3):949-62 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Koussevitzky, S., Suzuki, N., Huntington, S., Armijo, L., Sha, W., Cortes, D., Mittler, R.**, 2008, Ascorbate peroxidase 1 plays a key role in the response of *Arabidopsis thaliana* to stress combination. *Journal of Biological Chemistry*, 283(49), 34197-34203 pp.
- Krieger-Liszkay, A., Fufezan, C., Trebst, A.**, 2008, Singlet oxygen production in photosystem II and related protection mechanism. *Photosynthesis Research*, 98(1):551-564 pp.
- Lai, E., Teodoro, T., Volchuk, A.**, 2007, Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response, *News in Physiological Sciences*, 22:193-201pp.
- Leprince, A-S., Magalhaes, N., De Vos, D., Bordenave, M., Crilat, E., Clement, Gi., Meyer, C., Munnik, T., Savoure, A.**, 2015, Involvement of Phosphatidylinositol 3-kinase in the regulation of proline catabolism in *Arabidopsis thaliana*, *Frontiers in Plant Science*, 5, 772.
- Li, Z. Q., Li, J. T., Bing, J., & Zhang, G. F.**, 2019, The role analysis of APX gene family in the growth and developmental processes and in response to abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*, *Yi Chuan= Hereditas*, 41(6), 534-547 pp.
- Liu, J. X., Srivastava, R., Che, P., Howell, S. H.**, 2007, An Endoplasmic Reticulum Stress Response in *Arabidopsis* Is Mediated by Proteolytic Processing and Nuclear Relocation of a Membrane-Associated Transcription Factor, bZIP28, *Plant Cell*, 19(12):4111–4119 pp.
- Liu, Y., Xiong, Y., Bassham, D.C.**, 2009, Autophagy Is Required for Tolerance of Drought and Salt Stress in Plants, *Autophagy*, 5, 954–963 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Liu, J.-X., Howell, S. H.**, 2010, bZIP28 and NF-Y Transcription Factors Are Activated by ER Stress and Assemble into a Transcriptional Complex to Regulate Stress Response Genes in Arabidopsis, *The Plant Cell*, 22(3):782–796 pp.
- Liu, L., Cui, F., Li, Q., Yin, B., Zhang, H., Lin, B., Wu, Y., Xia, R., Tang, S., Xie, Q.**, 2011, The endoplasmic reticulum-associated degradation is necessary for plant salt tolerance, *Cell Research*, 21:957–969 pp.
- Liu, Y., Bassham, D. C.**, 2012, Autophagy: Pathways for Self-Eating in Plant Cells, *Annual Review of Plant Biology*, 63:215-237 pp.
- Liu, Y., Burgos, J. S., Deng, Y., Srivastava, R., Howell, S. H., Bassham, D. C.**, 2012, Degradation of the Endoplasmic Reticulum by Autophagy during Endoplasmic Reticulum Stress in Arabidopsis, *The Plant Cell*, 24(11):4635-4651 pp.
- Liu, Y., Bassham, D.C.**, 2013, Degradation of the endoplasmic reticulum by autophagy in plants. *Autophagy*, 9(4):622-623 pp.
- Liu, J. X., Howell, S. H.**, 2016, Managing the protein folding demands in the endoplasmic reticulum of plants, *New Phytologist*, 211(2):418-428 pp.
- Martínez, I. M., Chrispeels, M. J.**, 2003, Genomic analysis of the unfolded protein response in Arabidopsis shows its connection to important cellular processes, *The Plant Cell*, 15(2):561-576 pp.
- Matoba, K., Kotani, T., Tsutsumi, A., Tsuji, T., Mori, T., Noshiro, D., Noda, N. N.**, 2020, Atg9 is a lipid scramblase that mediates autophagosomal membrane expansion. *Nature structural & molecular biology*, 27(12), 1185-1193 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Mishiba, K.-i., Nagashima, Y., Suzuki, E., Hayashi, N., Ogata, Y., Shimada, Y., Koizumi, N.,** 2013, Defects in IRE1 enhance cell death and fail to degrade mRNAs encoding secretory pathway proteins in the Arabidopsis unfolded protein response, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(14):5713-5718 pp.
- Michaeli, S., Clavel, M., Lechner, E., Viotti, C., Wu, J., Dubois, M., Hacquard, T., Derrien, B., Izquierdo, E., Lecorbeiller, M., Genschik, P.,** 2019, The viral F-box protein P0 induces an ER-derived autophagy degradation pathway for the clearance of membrane-bound AGO1, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(45), 22872-22883 pp.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Van Breusegem, F.,** 2004, Reactive oxygen gene network of plants, *Trends in plant science*, 9(10):490-498 pp.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G. A. D., Tognetti, V. B., Vandepoele, K., Van Breusegem, F.,** 2011, ROS signaling: the new wave?, *Trends in plant science*, 16(6), 300-309 pp.
- Mittler, R., Finka, A., Goloubinoff, P.,** 2012, How do plants feel the heat?, *Trends in biochemical sciences*, 37(3):118-125 pp.
- Mittler, R.,** 2017, ROS are good, *Trends in plant science*, 22(1):11-19 pp.
- Mochida, K., Oikawa, Y., Kimura, Y., Kirisako, H., Hirano, H., Ohsumi, Y., Nakatogawa, H.,** 2015, Receptor-mediated selective autophagy degrades the endoplasmic reticulum and the nucleus, *Nature*, 522(7556):359-62 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Morales, J., Kadota, Y., Zipfel, C., Molina, A., Torres, M. A.,** 2016, The Arabidopsis NADPH oxidases RbohD and RbohF display differential expression patterns and contributions during plant immunity, *Journal of Experimental Botany*, 67(6), 1663-1676 pp.
- Matoba, K., Kotani, T., Tsutsumi, A., Tsuji, T., Mori, T., Noshiro, D., Noda, N. N.,** 2020, Atg9 is a lipid scramblase that mediates autophagosomal membrane expansion, *Nature structural & molecular biology*, 27(12), 1185-1193 pp.
- Murgia, I., Delledonne, M., Soave, C.,** 2002, Nitric oxide mediates iron-induced ferritin accumulation in Arabidopsis, *The Plant Journal*, 30(5), 521-528 pp.
- Nagano, M., Kakuta, C., Fukao, Y., Fujiwara, M., Uchimiya, H., Kawai-Yamada, M.,** 2019, Arabidopsis Bax inhibitor-1 interacts with enzymes related to very-long-chain fatty acid synthesis, *J. Plant Res*, 132, 131–143 pp.
- Nakano, Y., & Asada, K.,** 1981, Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts, *Plant and cell physiology*, 22(5), 867-880 pp.
- Nakatogawa, H.,** 2020, Atg9 is a lipid scramblase that mediates autophagosomal membrane expansion, *Nature Structural and Molecular Biology*, 27:1185–1193 pp.
- Noda, T., Ohsumi, Y.,** 1998, Tor, a Phosphatidylinositol Kinase Homologue, Controls Autophagy in Yeast, *Journal of Biological Chemistry*, 273(7):3963-3966 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Nthiga, T. M., Shrestha, B. K., Sjøttem, E., Bruun, J-A., Larsen, K. B., Bhujabal, Z., Lamark, T., Johansen, T.,** 2020, CALCOCO1 acts with VAMP-associated proteins to mediate ER-phagy, *The EMBO Journal*, 39(15).
- Onda, Y., Kumamaru, T., Kawagoe, Y.,** 2009, ER membrane-localized oxidoreductase Ero1 is required for disulfide bond formation in the rice endosperm, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(33), 14156-14161 pp.
- Orenstein, S. J., Cuervo, A. M.,** 2010, Chaperone-mediated autophagy: Molecular mechanisms and physiological relevance, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 21(7):719-726 pp.
- Ozgur, R., Turkan, I., Uzilday, B., Sekmen, A. H.,** 2014., Endoplasmic reticulum stress triggers ROS signalling, changes the redox state, and regulates the antioxidant defence of *Arabidopsis thaliana*, *Journal of experimental botany*, 65(5):1377-1390 pp.
- Ozgur, R., Uzilday, B., Sekmen, A. H., Turkan, I.,** 2015, The effects of induced production of reactive oxygen species in organelles on endoplasmic reticulum stress and on the unfolded protein response in *Arabidopsis*, *Annals of Botany*, 116(4):541-553 pp.
- Ozgur, R., Uzilday, B., Bor, M., Türkan, İ.,** 2020, The involvement of gamma-aminobutyric acid shunt in the endoplasmic reticulum stress response of *Arabidopsis thaliana*, *Journal of Plant Physiology*,

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Paul, S., Banerjee, A., Roychoudhury, A.,** 2018, Role of polyamines in mediating antioxidant defense and epigenetic regulation in plants exposed to heavy metal toxicity. *In Plants under metal and metalloids stress Springer, Singapore, 229-247 pp.*
- Pu, Y., Bassham D. C.,** 2013, Links between ER stress and autophagy in plants, *Plant Signaling & Behavior, 8(6).*
- Pu, Y., Luo, X., Bassham, D.C.,** 2017, TOR-Dependent and –Independent Pathways Regulate Autophagy in Arabidopsis thaliana, *Frontiers in Plant Science, 8, 1204.*
- Ranjeet, R. K., Suneha, G., Sushil, K. S., Khushboo, S., Kritika, A. G., Narender, K., Raj, D. R.,** 2012, Protection against heat stress in wheat involves change in cell membrane stability, antioxidant enzymes, osmolyte, H₂O₂ and transcript of heat shock protein, *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry, 4(4), 83-91 pp.*
- Rao, K. M., & Sresty, T. V. S.,** 2000, Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses, *Plant science, 157(1), 113-128 pp.*
- Reggiori, F., Molinari, M.,** 2022, ER-phagy: mechanisms, regulation, and diseases connected to the lysosomal clearance of the endoplasmic reticulum, *Physiological reviews, 102(3), 1393-1448 pp.*
- Riemer, J., Bulleid, N., Herrmann, JM.,** 2009, Disulfide formation in the ER and mitochondria: two solutions to a common process, *Science, 324(5932):1284–1287 pp.*

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Romanov, J., Walczak, M., Ibiricu, I., Schüchner, S., Ogris, E., Kraft, C., Martens, S.,** 2012, Mechanism and functions of membrane binding by the Atg5–Atg12/Atg16 complex during autophagosome formation, *The EMBO Journal*, 31(22):4304–4317 pp.
- Ron, D., Walter, P.,** 2007, Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8, 519–529pp.
- Ruberti, C., Lai, Y., Brandizzi, F.,** 2018, Recovery from temporary endoplasmic reticulum stress in plants relies on the tissue-specific and largely independent roles of bZIP28 and bZIP60, as well as an antagonizing function of BAX-inhibitor 1 upon the pro-adaptive signaling mediated by bZIP28, *Plant J.*, 93, 155–165 pp.
- Sanchez, P., de Torres Zabala, M., and Grant, M.,** 2000, AtBI-1, a plant homologue of Bax inhibitor-1, suppresses Bax-induced cell death in yeast and is rapidly upregulated during wounding and pathogen challenge, *Plant J.*, 21, 393–399 pp.
- Shen, J., Zeng, Y., Zhuang, X., Sun, L., Yao, X., Pimpl, P., Jiang, L.,** 2013, Organelle pH in the Arabidopsis endomembrane system, *Molecular plant*, 6(5):1419-1437 pp.
- Sienko, K., Poormassalehgoo, A., Yamada, K., Goto-Yamada, S.,** 2020, Microautophagy in Plants: Consideration of Its Molecular Mechanism, *Cells*, 9(4):887p.
- Sies, H., Berndt, C., Jones, D. P.,** 2017, Oxidative Stress, *Annual Review of Biochemistry*, 86:715-748 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Sláviková, S., Shy, G., Yao, Y., Glzman, R., Levanony, H., Pietrokovski, S., et al.**, 2005, The autophagy-associated Atg8 gene family operates both under favourable growth conditions and under starvation stresses in Arabidopsis plants, *J. Exp. Bot.* 56, 2839–2849 pp.
- Srivastava, R., Deng, Y., Shah, S., Rao, A. G., Howell, S. H.**, 2013, BINDING PROTEIN Is a Master Regulator of the Endoplasmic Reticulum Stress Sensor/Transducer bZIP28 in Arabidopsis, *The Plant Cell*, 25(4):1416–1429 pp.
- Stephani, M., Picchianti, L., Gajic, A., Beveridge, R., Skarwan, Emilio., Hernandez, V., Mohseni, A., Clavel, M., Zeng, Y., Naumann, C., Matuszkiewicz, M., Turco, E., Loeffke, C., Li, B., Dürnberger, G., Schutzbier, M., Chen, H. T., Abdrakhmanov, A., Savova, A., Chia, K-S., Djamei, A., Schaffner, I., Abel, S., Jiang, L., Mechtler, K., Ikeda, F., Martens, S., Clausen, T., Dagda, Y.**, 2020, A cross-kingdom conserved ER-phagy receptor maintains endoplasmic reticulum homeostasis during stress, *Elife*.
- Strasser, R.**, 2020, Protein Quality Control in the Endoplasmic Reticulum of Plants, *Annual Review of Plant Biology*, 69, 147–172p.
- Su, W., Liu, Y., Xia, Y., Hong, Z., Li, J.**, 2011, Conserved endoplasmic reticulum-associated degradation system to eliminate mutated receptor-like kinases in Arabidopsis, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108:870–875 pp.
- Suttangkakul, A., Li, F., Chung, T., Vierstra, R. D.**, 2011, The ATG1/ATG13 Protein Kinase Complex Is Both a Regulator and a Target of Autophagic Recycling in Arabidopsis, *The Plant Cell*, 23(10):3761–3779 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Tolley, N., Sparkes, I. A., Hunter, P. R., Craddock, C. P., Nuttall, J., Roberts, L. M., Hawes, C. Pedrazzini, E., Frigerio, L.,** 2008, Overexpression of a plant reticulon remodels the lumen of the cortical endoplasmic reticulum but does not perturb protein transport. *Traffic*, 9(1):94-102 pp.
- Trotter, E. W., Grant, C. M.,** 2002, Thioredoxins are required for protection against a reductive stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Molecular microbiology*, 46(3):869-878 pp.
- Tu, B. P., Weissman, J. S.,** 2004, Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences. *The Journal of cell biology*, 164(3), 341-346 pp.
- Urade, R.,** 2019, Oxidative protein folding in the plant endoplasmic reticulum, *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 83(5), 781-793 pp.
- Uzilday, B., Ozgur, R., Sekmen, A. H., Turkan, I.,** 2015, Redox regulation and antioxidant defence during abiotic stress: what have we learned from *Arabidopsis* and its relatives?. In *Reactive oxygen species and oxidative damage in plants under stress*, Springer, Cham, 83-113 pp.
- Uzilday, B., Ozgur, R., Sekmen, A. H., Turkan, I.,** 2017, Endoplasmic reticulum stress regulates glutathione metabolism and activities of glutathione related enzymes in *Arabidopsis*, *Functional Plant Biology*, 45(2), 284-296 pp.
- Van Doorn, W. G., Papini, A.,** 2013, Ultrastructure of autophagy in plant cells: a review, *Autophagy*, 9(12):1922-36 pp.
- Vembar, S. S., Brodsky, J. L.,** 2008, One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(12):944-957 pp

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Wang, S., Narendra, S., Fedoroff, N.,** 2007, Heterotrimeric G protein signaling in the Arabidopsis unfolded protein response, *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.* 104, 3817–3822 pp.
- Waszczak, C., Akter, S., Jacques, S., Huang, J., Messens, J., Van Breusegem, F.,** 2015, Oxidative post-translational modifications of cysteine residues in plant signal transduction, *Journal of experimental botany*, 66(10):2923-2934 pp.
- Watanabe, N., and Lam, E.,** 2008, BAX inhibitor-1 modulates endoplasmic reticulum stress-mediated programmed cell death in Arabidopsis, *J. Biol. Chem.*, 283, 3200–3210 pp.
- Winnay, J. N., Kahn, C. R.,** 2011, Chapter Nine - PI 3-Kinase Regulatory Subunits as Regulators of the Unfolded Protein Response, *Methods in Enzymology*, 490:147-158 pp.
- Wu, J., Michaeli, S., Galili, G., Peled-Zehavi, H.** 2020, ATG8-interacting (ATI) 1 and 2 define a plant starvation-induced ER-phagy pathway and serve as MSBP1 (MAPR5) cargo-receptors. *BioRxiv*.
- Xiong, Y., Contento, A.L., Bassham, D.C.,** 2005, AtATG18a Is Required for the Formation of Autophagosomes during Nutrient Stress and Senescence in Arabidopsis Thaliana, *Plant J.*, 42, 535–546 pp.
- Xiong, Y., Contento, A.L., Nguyen, P.Q., Bassham, D.C.,** 2007, Degradation of Oxidized Proteins by Autophagy during Oxidative Stress in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 143, 291–299 pp.
- Yang, Z., Klionsky, D.J.,** 2010, Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation, *Curr Opin Cell Biol*, 22 124-131 pp.23

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Yang, Z. T., Wang, M. J., Sun, L., Lu, S. J., Bi, D. L., Sun, L., et al.,** 2014, The membrane-associated transcription factor NAC089 controls ER-stress-induced programmed cell death in plants, *PLoS Genet*, 10:e1004243.
- Yang, X., Srivastava, R., Howell, S. H., Bassham, D. C.,** 2016, Activation of autophagy by unfolded proteins during endoplasmic reticulum stress, *The Plant Journal*, 85(1):83-95 pp.
- Zhang, X., Ding, X., Marshall, R. S., Paez-Valencia, J., Lacey, P., Vierstra, R. D., Otegui, M. S.,** 2020, Reticulon proteins modulate autophagy of the endoplasmic reticulum in maize endosperm, *Elife*,
- Zhu, J.K.,** 2016, Abiotic stress signaling and responses in plants, *Cell*, 167(2):313-324pp.
- Zhu, M., Tang, X., Wang, Z., Xu, W., Zhou, Y., Wang, W., Li, X., Li, R., Guo, K., Sun, Y., Zhang, W., Xu, L., Li, X., Raines, C.,** 2019, Arabidopsis GAAPs interacting with MAPR3 modulate the IRE1-dependent pathway upon endoplasmic reticulum stress, *Journal of Experimental Botany*, 70(21):6113-6125 pp.



TEŞEKKÜR

Lisansüstü öğrenimim boyunca bilgi ve birikimleriyle bizleri aydınlatan ve yardımcı olan bölümümüzün kıymetli hocalarına, motivasyonlarını benden hiç esirgemeyen arkadaşlarıma ve her daim yanımda olan aileme teşekkürlerimi sunarım.





ÖZGEÇMİŞ

Ferit ALTUNDAL ortaöğretimi Buca Şirinyer Lisesi'nde tamamladıktan sonra lisans öğrenimini Mustafa Kemal Üniversitesi Biyoloji bölümünde, Tezsiz yüksek lisansını da Ege Üniversitesi Fen ve Matematik Alanları Öğretim Programında tamamlamıştır. 2017 yılından beri MEB'de biyoloji öğretmenliği yapmaktadır. 2020 yılı Eylül ayında Ege Üniversitesi Genel Biyoloji biriminde Dr. Öğretim Üyesi Rengin Özgür Uzilday danışmanlığında başladığı tezli yüksek lisansını “*Arabidopsis thaliana*'da Endoplazmik Retikulum (ER)-faji'nin Hücre Redoksu ile İlişkisinin Araştırılması” konusunda tamamlamıştır.

