

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

FARKLI EVRİMSEL BASAMAKLARDA
YER ALAN BİTKİ SINIFLARINDA
GAMMA AMİNOBÜTİRİK ASİDİN
(GABA) ÇEŞİTLİ ÖZELLİKLERİNİN
İNCELENMESİ

Seher YOLCU

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Filiz ÖZDEMİR

Biyoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 401.01.00
Sunuş Tarihi: 20.08.2010

Bornova-İZMİR

2010

SEHER YOLCU tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak sunulan “Farklı Evrimsel Basamaklarda Yer Alan Bitki Sınıflarında Gamma Aminobütirik Asidin (GABA) Çeşitli Özelliklerinin İncelenmesi” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 20.08.2010 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Filiz ÖZDEMİR
Raportör Üye : Doç. Dr. Melike BOR
Üye : Yrd. Doç. Dr. Okan ACAR

İmza

.....
.....
.....

ÖZET**FARKLI EVRİMSEL BASAMAKLARDA YER ALAN BİTKİ
SINIFLARINDA GAMMA AMİNOBÜTİRİK ASİDİN (GABA)
ÇEŞİTLİ ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ****YOLCU, Seher**

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Bölümü
Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Filiz ÖZDEMİR
Ağustos 2010, 55 sayfa

GABA (gamma aminobütirik asit) proteinlerin yapısına katılmayan bir amino asit olup tüm prokaryotik ve ökaryotik organizmalarda bulunmaktadır (Shelp et al., 1999; Kinnersley and Turano, 2000). GABA, fizyolojisi çok iyi belirlenmiş *Arabidopsis*, tütün ve domates gibi bitkilerde araştırılmış olmasına rağmen bitki sınıflarında evrimsel bir karşılaştırması yapılmamıştır.

Çalışmamızda doğadan toplanan farklı bitki cinslerinde, bir alg ve liken cinsinde GABA (gamma aminobütirik asit) yolunda yer alan iki enzimin aktiviteleri ve GABA miktarı belirlenmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda farklı bitki türleri, bir alg ve liken cinsi GABA özelliklerine göre karşılaştırılmıştır.

Anahtar sözcükler: Gamma aminobütirik asit, GABA

ABSTRACT

INVESTIGATION OF VARIOUS CHARACTERISTICS OF GAMMA AMINOBUTYRIC ACID (GABA) IN DIFFERENT PLANT SPECIES

YOLCU, Seher

Master in Biology Department

Supervisor: Filiz OZDEMIR

August 2010, 55 pages

GABA (Gamma aminobutyric acid) is a non-protein amino acid found all prokaryotic and eukaryotic organisms (Shelp et al., 1999; Kinnersley and Turano, 2000). Although characteristics of GABA in physiologically well known plants such as *Arabidopsis*, tobacco and tomato were investigated, evolutionary comparison of GABA among different plant classes has not performed.

In our study, we analyzed the activities of two enzymes involved in the GABA shunt and GABA concentrations in different plants species, one algae and lichen. According to the data, we compared the GABA characteristics of different plant species, one algae and lichen.

Keywords: Gamma aminobutyric acid, GABA

TEŞEKKÜR

Çalıőmam süresince değerli fikirleriyle bilimsel gelişimime katkıda bulunan ve laboratuvar çalıőmalarımnda birikimiyle her zaman destek veren değerli hocam Prof. Dr. Filiz ÖZDEMİR'e, laboratuvar çalıőmalarımnda tecrübelerinden faydalandığım, analizlerim süresince yanımda olan ve her konuda destek aldığım hocam Doç. Dr. Melike BOR'a yürekten teşekkür ederim.

Bilimsel çalıőmalarımnda beni sabırla ve sevgiyle destekleyen ve sonsuz manevi desteğiyle bana güç katan sevgili annem Fatmagül YOLCU'ya, sevgili babam Mahsut YOLCU'ya ve sevgili kardeőim Sezgin YOLCU'ya yürekten teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışma arkadaşlarımdan tezimin uygulama ve yazım süreçlerinde her zaman yanımda olan ve manevi desteğini esirgemeyen sevgili dostlarım Tuğba KARABUDAK'a, Neőe AKÇAY'a ve Rengin ÖZGÜR'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Analizlerim esnasında değerli katkılarını esirgemeyen Özge NOSTAR'a, Çaędaő Kera YÜCEL'e, Dilara YILDIZ'a, Levent SOYLU'ya, Ferhat Őirinyıldız'a ve Süleyman İLHAN'a çok teşekkür ederim. Değerli fikirleriyle bana destek veren sevgili dostum Ebru TEKİN'e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vii
TEŞEKKÜR.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xvii
KISALTMALAR DİZİNİ.....	xix
1. GİRİŞ.....	1
1.1. GABA'nın Genel Özellikleri.....	1
1.2. GABA Metabolizmasında Görev Alan Enzimler.....	2
1.3. GABA-Stres İlişkisi.....	6
1.4. GABA'nın Diğer Organizmalarla Etkileşimi.....	14
1.5. GABA ve Polen Tübü Gelişimi.....	14
1.6. GABA Reseptörleri.....	16
1.7. Tarım Ürünlerinde GABA Miktarının Arttırılması.....	17

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
1.8. GABA ve Meyve Gelişimi.....	19
2. MATERYAL VE METOD.....	22
2.1. Bitki Materyali.....	22
2.2. Total Protein Tayini.....	22
2.3. Glutamat Dehidrogenaz (GDH) Enzim Aktivitesi	
Ölçümü.....	22
2.4. Glutamat Dekarboksilaz (GAD) Enzim Aktivitesi	
Ölçümü.....	23
2.5. GABA Miktarının Belirlenmesi.....	24
3. SONUÇLAR.....	25
3.1. Glutamat Dehidrogenaz (GDH) Enzim Aktivitesi	
Sonuçları.....	25
3.2. Glutamat Dekarboksilaz (GAD) Enzim Aktivitesi	
Sonuçları.....	27
3.3. GABA Miktarı Sonuçları.....	29

İÇİNDEKİLER (devam)

4. TARTIŞMA.....	31
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	35
ÖZGEÇMİŞ.....	55

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Gamma aminobütirik asidin (GABA) kimyasal yapısı.....	2
1.2. GABA yolu. SSADH: Süksinik semialdehit dehidrogenaz; GABA-T: GABA transaminaz; GDH: L-glutamat dehidrogenaz.....	4
1.3. Sitolik H veya Ca seviyelerinin artmasıyla GABA sentezinin tetiklenmesi. Sitolik kalsiyumun girişi kalsiyum kanalları vasıtasıyla gerçekleşir.....	10
1.4. <i>Arabidopsis</i> pistillerindeki GABA gradiyenti polen tübünün gelişimi ve yönlendirilmesi için gereklidir. (a) Polen tanesinden çıkan polen tübü pistil içinde gelişir. Stigma ve stilus boyunca ilerleyerek ovüle ulaşır. (b) Polen tübünün yumurta hücresine doğru ilerlemesi. Dokulardaki GABA miktarı beyazdan kırmızıya doğru giden bir renk skalasında gösterilmiştir. Palanivelu et al.'dan (2003).....	16
3.1. 15 farklı cinsten belirlenen GDH aktiviteleri ($\text{mmol min}^{-1}\text{mg protein}^{-1}$).....	25

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Sayfa

3.2. 15 farklı cinste belirlenen GAD aktiviteleri ($\text{mmol min}^{-1}\text{mg protein}^{-1}$).....27

3.3. 15 farklı cinste belirlenen GABA miktarları ($\mu\text{mol g yaş ağırlık}^{-1}$).....29

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. GABA birikimini tetikleyen uygulamalar (Bown and Shelp'den, 1997).....	20
3.1. 15 örnekte belirlenen GDH spesifik enzim aktiviteleri ($\text{mmol min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$). Sütunlardaki hata çubukları \pm standart hata (S.E)'yi göstermektedir.....	26
3.2. 15 örnekte belirlenen GAD spesifik enzim aktiviteleri ($\text{mmol min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$).....	28
3.3. 15 örnekte belirlenen GABA miktarları. Sütunlardaki hata çubukları \pm standart hata (S.E)'yi göstermektedir.....	30

KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
GABA	Gamma aminobütirik asit
GABA-T	GABA transaminaz
GAD	Glutamat dekarboksilaz
GDH	Glutamat dehidrogenaz
SSADH	Süksinik semialdehit dehidrogenaz
CaM	Kalmodulin

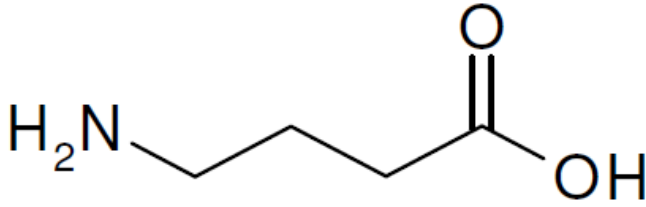
1. GİRİŞ

1.1. GABA'nın Genel Özellikleri

Gamma aminobütirik asit (GABA) son yıllarda üzerinde yoğun araştırmalar yapılan bir moleküldür. GABA 4- karbonlu, proteinlerin yapısında yer almayan bir amino asittir. γ -karbonunun üzerinde amino grubu taşımaktadır (Allan et al., 2009). GABA'nın kimyasal yapısı Şekil 1.1.'de gösterilmiştir (Kim'den 2009). Bitkiler, mantarlar, bakteriler ve memeliler gibi çok çeşitli canlı gruplarında sentezlenir (Bown and Shelp, 1989, 1997; Satyanarayan and Nair, 1990). Literatürdeki çalışmalarda daha çok GABA'nın biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri iyi tanınan bitkilerde (*Arabidopsis*, tütün, domates vb.) incelenmesine ağırlık verilmiştir. Proteinlerin yapısında bulunmayan bir amino asit olan ve bilim dünyasında ilgi çekici bir araştırma alanı oluşturan GABA bitkilerde soğuk, sıcaklık, yüksek tuz konsantrasyonu, oksijen eksikliği (hipoksiya), patojenler gibi biyotik ve abiyotik stres faktörlerine yanıtta rol almasının yanı sıra sinyal molekülü olarak da görev alır. GABA hemen hemen tüm bitki dokularında bulunur ve serbest amino asit havuzunun temel bileşenidir (Crawford et al., 1994). GABA'nın farklı bitki dokularındaki miktarı 0.03-32.5 $\mu\text{mol/g}$ yaş ağırlık aralığındadır (Kathiresan et al., 1997). GABA, flöem ve ksilem özsuyunda ve kök nodüllerinde bulunur (Bown and Shelp, 1989; Satya Narayan and Nair, 1990). İnsanlardaki ve hayvanlardaki rolleri ve çeşitli özellikleri bilinmesine rağmen, bitkilerdeki rolleri ve özellikleri henüz bilinmemektedir. Bu amino asidin bitkilerdeki temel görevleri pH'nın düzenlenmesi, büyüme ve gelişme, çevresel stres faktörlerine yanıt, böceklere ve hastalıklara karşı direnç, polen tübünün gelişimi, azot kaynağı olarak kullanılması ve sinyal molekülü olarak görev almasıdır.

GABA, hayvanlarda iyon kanallarının iletkenliğinde değişimler yaratan inhibisyon etkili bir nörotransmitterdir (Zhang and Jackson, 1993). Hayvanlarda GABA, embriyonik ve yetişkin nörogenezisinde hücreler arası sinyal molekülü olarak görev alır ve olgun sinirler için gerekli bir nörotransmitterdir (Chevrot et al., 2006). GABA, merkezi sinir sistemindeki anksiyeteyi ve beynin motor

merkezlerinden gelen stresle ilişkili mesajları önleyen inhibe edici temel bir nörotransmitterdir (Schousboe and Waagepetersen, 2007). Ayrıca kolon karsinoma hücrelerinin göçünü önlemesinin yanı sıra çeşitli kanser tiplerinin yayılmasını engelleyen veya geciktiren ajanların oluşumuna da katkı sağlar (Enna, 2001; Kowalski et al., 2007; Sarto-Jackson and Sieghart, 2008). GABA merkezi sinir sistemi dışında yumurtalıklarda, testiste ve pankreasın insülin üreten β -hücrelerinde de bulunur (Erdö and Wolff 1990; Tillakaratne et al., 1995; Chessler and Lernmark 2000).



Şekil 1.1. Gamma aminobütirik asidin (GABA) kimyasal yapısı (Kim'den 2009)

1.2. GABA Metabolizmasında Görev Alan Enzimler

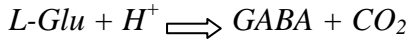
GABA metabolizmasında sitosolik glutamat dekarboksilaz (GAD), mitokondriyal süksinik semialdehit dehidrogenaz (SSADH), mitokondriyal GABA-transaminaz (GABA-T) enzimleri görev yapar. GABA yolundaki enzimler farklı organizmalarda farklı hücresel bölgelerde yer alır (Bouche et al., 2003). Örneğin mayada SSADH (süksinik semialdehit dehidrogenaz) sitosolde bulunur (Coleman et al., 2001). GABA metabolizmasını oluşturan bu enzimler prokaryotlarda (Metzer and Halpern, 1990), memelilerde (Tillakaratne et al., 1995) ve bitkilerde (Bown and Shelp, 1997) bulunur. GABA yolu Şekil 1.2.'de gösterilmiştir (Bown and Shelp'den). Glutamat dekarboksilaz enzimi (GAD) glutamatın GABA'ya dönüşmesini sağlarken GABA transaminaz enzimi GABA'nın süksinik semialdehite transaminasyonu reaksiyonunu gerçekleştirir.

Süksinik semialdehit dehidrogenaz ise süksinik semialdehidin geri dönüşümsüz NADP-bağımlı oksidasyonunu katalizleyerek süksinata dönüşmesini sağlar (Şekil 2). Omurgalılarda olduğu gibi bitkilerde de GABA, 2-okzoglutarattan sentezlenir. 2-okzoglutarat glutamat dehidrogenaz enzimi (GDH) vasıtasıyla glutamata dönüştürülür. Daha sonra glutamat, glutamat dekarboksilaz (GAD) enzimi yoluyla GABA'ya dekarboksillenir (Kathiresan et al., 1997). GABA, glutamatın dekarboksillenmesi ile oluşturulur ve mitokondride süksinik semialdehit yoluyla süksinata metabolize olur (Bidwell, 1963; Cleddening et al., 1952; Dixon et al., 1961; Naylor et al., 1956). Kofaktör NAD(P)H varlığında α -ketoglutaratın indirgeyici aminasyonunu gerçekleştirerek glutamat oluşumunu sağlayan (Turano et al., 1996) glutamat dehidrogenaz (GDH) enzimi kofaktör tercihinine ve hücre içi lokalizasyonuna göre çeşitli izoformlara sahiptir. NADH'a özgü GDH enziminin aktivitesi mitokondride saptanmışken NAD(P)H'a özgü enzim kloroplastlarda saptanmıştır. GDH izoformları gelişimsel ve çevresel koşullara bağlı olarak farklı bitki dokularında farklı oranlarda bulunabilir (Turano et al., 1996). Elektroforetik hareketliliklerine göre belirlenen üç GDH izoformu çiçeklenmeden 35 gün sonra elde edilen soya fasulyesi (*Glycine max*) tohumlarında keşfedilmiştir (McKenzie et al., 1981; McKenzie and Lees, 1981).

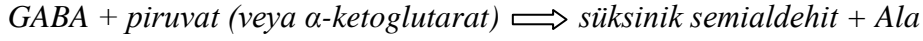
McKenzie and Lees (1981) tohum ve kökten ekstrakte edilen GDH enziminin mitokondride yer aldığını bulmuşlardır. GDH2 izoformu ise kloroplastta yer alır. Turano et al. (1996) çimlenen soya fasulyesi tohumlarında yaptıkları çalışmada üç farklı GDH izoformu (GDH1, GDH2, GDH3) tespit etmişlerdir. GDH izoformlarının organlara özgü dağılımının tespit edildiği çalışmada GDH1 ve GDH2 kotiledonlardan, GDH3 ise hipokotillerden ve köklerden elde edilen protein ekstraktlarında bulunmuştur (Turano et al., 1996). GDH izoformları farklı genler tarafından kodlanır. Örneğin *Arabidopsis* (Cammaerts and Jacobs, 1983) ve mısırdaki (Pryor, 1979; Goodman et al., 1980; Sakakibara et al., 1995) yapılan moleküler ve genetik çalışmalarda GDH izoformlarının iki farklı polipeptitten oluştuğu ve iki farklı lokus tarafından kodlandığı belirlenmiştir.

GABA yolu (mekîği) olarak adlandırılan reaksiyonlar dizisi aşağıda gösterildiği gibidir (Bown and Shelp, 1997):

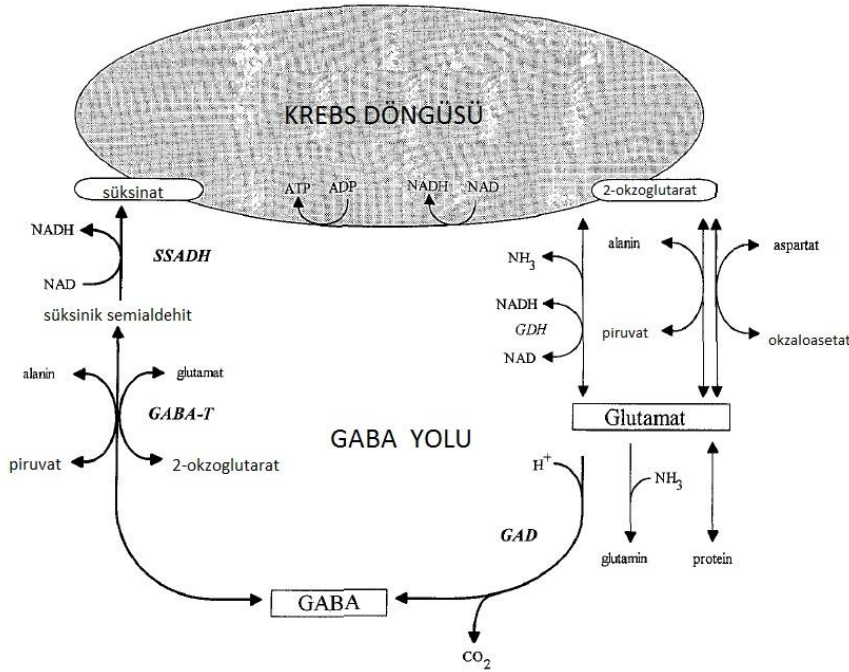
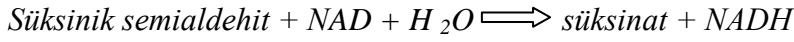
1. Glutamat dekarboksilaz (GAD) tarafından gerçekleştirilen reaksiyon:



2. GABA transaminaz (GABA-T) tarafından katalizlenen transaminasyon reaksiyonu:



3. Süksinik semialdehit dehidrogenaz (SSADH) tarafından gerçekleştirilen reaksiyon:



Şekil 1.2. GABA yolu (mekikiği). SSADH: Süksinik semialdehit dehidrogenaz;

GABA-T: GABA transaminaz; GDH: L-glutamat dehidrogenaz

(Bown and Shelp'den 1997).

GABA'nın sentezlenmesinde görev alan glutamat dekarboksilaz enzimi (GAD), bitkilerde Ca^{2+} /kalmodulin bağımlı bir enzim olarak tanımlanır (Baum et al., 1993; Snedden et al., 1996) ve asidik pH'da aktif hale gelir. GAD enziminin kalmoduline (kalsiyum düzenleyici protein) bağlanması dimerizasyonu uyararak enzimin aktivitesini arttırmaya yöneliktir (Yuan and Vogel, 1998; Snedden et al., 1996).

Glutamat dekarboksilaz enzimi *Escherichia coli* bakterisinden saflaştırılmıştır (Strausbauch and Fisher, 1970). Memelilerde ise insan beyninden izole edilmiştir (Blindermann et al., 1978). Glutamat dekarboksilazın (GAD) hayvanlardaki fizyolojik rolü insüline-bağlı diyabet ile bağlantılıdır. GAD, insülin üreten pankreatik β hücrelerinin otoimmün yıkımı sonucunda açığa çıkan antikorlarla reaksiyona giren bir otoantijendir (Sukhareva and Mamaeva, 2002). Bitkilerde ise bu enzim ilk defa *Lilium auratu*'nun poleninde keşfedilmiştir (Okunuki, 1937). Kalmodulinle (CaM) düzenlenen GAD aktivitesinin kaybı durumunda bitkilerde gelişim anormallikleri ortaya çıkar. Transgenik tütün bitkilerinde gerçekleştirilen bir çalışmada CaM bağlı domaini bulunmayan GAD enziminin etkileri araştırılmış ve gövdenin kısılması, korteks parankima hücrelerinin uzayamaması, yüksek GABA seviyesi ve düşük glutamat seviyesi gibi anormallikler gözlenmiştir (Baum et al., 1996). Glutamat dekarboksilaz enziminin (GAD) düzenlenmesi bitkilerin büyümesinde, gelişiminde (Baum et al., 1996) ve meyvelerin olgunlaşmasında (Gallego et al., 1995) rol oynar. Hücre içi asitliğinin artışıyla birlikte glutamat dekarboksilaz enzimi aktivitesinin uyarılmasıyla GABA seviyesinin arttığı görülmüştür (Crawford et al., 1994). GAD enziminin C-ucunda, kalmodulin-bağlayan bölgenin sadece bitkilere özgü olduğu tespit edilmiştir (Baum et al., 1993; Arazi et al., 1995; Gallego et al., 1995).

Akihiro et al. (2008) α -ketoglutarata bağımlı GABA transaminaz aktivitesinin piruvata-bağımlı GABA transaminaz aktivitesinden daha yüksek olduğunu bulmuşlardır. Amino asit alıcısı olarak α -ketoglutarata veya piruvata bağımlı olmak üzere iki tip GABA transaminaz tanımlanmıştır (Bouche and Fromm, 2004). Memelilerde sadece α -ketoglutarata bağımlı GABA transaminaz (GABA-TK) bulunurken bitkilerde her iki tip GABA transaminaz aktivitesi de bulunur (Streeter and Thompson 1972, Reggiani et al., 1988, Wallace et al., 1984, Shelp et al., 1995, Cauwenberghe et al., 2002). *Arabidopsis*'de piruvata bağımlı GABA transaminaz enzimini kodlayan genler izole edilmiştir (Cauwenberghe et al., 2002). α -ketoglutarata bağımlı GABA transaminaz (GABA-TK) aktivitesi soya fasulyesi tohumları, pirinç kökleri, tütün yaprakları, turp yaprakları, domates yaprakları ve patates yumrularında tespit edilmiştir (Streeter and Thompson. 1972,

Reggiani et al., 1988, Wallace et al., 1984, Shelp et al., 1995). Ancak Clark ve arkadaşlarının (2009) sitosolde ve plastidde GABA transaminaz izoformları tespit etmeleri Akihiro'nun sonuçlarını olanaksız hale getirmiştir.

1.3. GABA - Stres İlişkisi

GABA'nın varlığı ilk olarak 1949 yılında patates yumrularında tespit edilmiştir (Steward et al., 1949). Ozmotik strese maruz kalmış buğday fidelerinde yüksek oranda GABA bulunmuştur (Bartyzel et al., 2003). Susam (*Sesame indicum*) bitkisine kuraklık, tuz, ağır metal ve yüksek sıcaklık stresleri uygulandığında GABA seviyesinin arttığı tespit edilmiştir (Bor et al., 2009). 150 mM tuz uygulanan bitki gruplarında GABA seviyesinin uygulamanın 7. ve 21. günlerinde % 9-18 oranında arttığı rapor edilmiştir. Tuz uygulamasının dışında ağır metal uygulaması da GABA seviyesini 7. günde % 35, 21. günde ise % 53 oranında arttırmıştır (Bor et al., 2009). Susam bitkilerinde yüksek sıcaklık uygulamasının (50 °C 'de 2 saat) ardından GABA seviyesi % 13-21 oranında artmıştır. Çevresel uyaranlar vasıtasıyla biriken GABA'nın etilen üretimine neden olabileceğine ilişkin araştırmalar da yapılmıştır. Kathiresan et al.'un (1997) ayçiçekleri üzerine yaptığı çalışmada dışarıdan bitki dokusuna verilen GABA'nın yaklaşık 12 saat sonra etilen üretim hızında 14-katlık bir artışa neden olduğu tespit edilmiştir. GABA ile etilen üretimi arasındaki ilişkinin araştırıldığı bu çalışmada dokuların mekanik olarak yaralanmasının ardından 30 saniye içinde GABA birikimi gerçekleşirken etilen birikiminin 20 dakika içinde gerçekleştiği tespit edilmiştir. Bitkilerde etilen üretimi 1-aminosiklopropan-1-karboksilik asit (ACC) vasıtasıyla gerçekleşir (Adams and Yang, 1979). GABA molekülünün ACC'yi taklit ederek ilgili proteinler üzerindeki bağlanma noktalarını paylaşıyor olabileceği düşünülmektedir (Kathiresan et al., 1997). GABA ile etilen üretimi arasındaki ilişkinin çözümlenmesinde GABA'nın etilen üretimini arttırmadığı veya etilen üretiminde öncül molekül olarak görev alıp almadığı olasılıkları incelenmiştir. 100 mM'in üzerindeki GABA miktarlarında etilen üretiminin arttığı gözlenmiştir. Etilen üretiminin glutamat yoluyla değil de GABA yoluyla tetiklendiği anlaşılmıştır. Bu durumda glutamat dekarboksilaz (GAD) enziminin GABA yolundaki önemi bir kez daha karşımıza çıkmaktadır

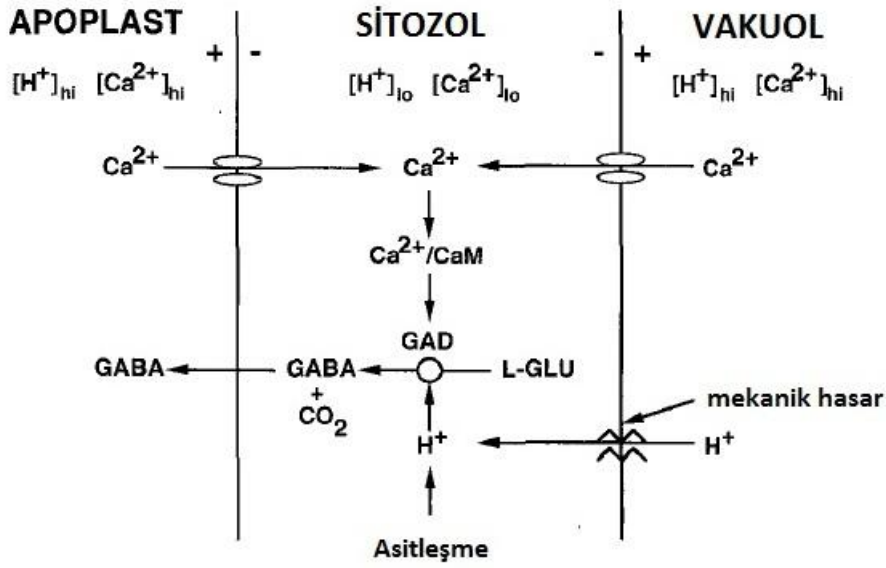
(Kathiresan et al., 1997). GABA, etilen sentezini ACC sentaz ve oksidaz transkriptlerinin birikimini tetikleyerek arttırmaktadır (Kathiresan et al., 1997). Farklı miktarlarda tuz uygulanan soya fasulyesi fidelerinde yapılan bir çalışmada ise poliaminlerle GABA arasında bir ilişkinin olup olmadığı araştırılmıştır. Tuz stresi ile muamele edilen bitkilerde GABA içeriğinin arttığı, poliaminlerin azaldığı ve poliaminleri parçalayan diamin oksidaz aktivitesinin arttığı tespit edilmiştir (Xing et al., 2007). Bu çalışmada diamin oksidazı inhibe eden aminoguanidin (AG) maddesi kullanılmıştır. Aminoguanidin ile muamele edilen soya fasulyesinde diamin oksidazların inhibisyonuyla bağlantılı olarak endojen poliaminlerin seviyesinde artış, GABA seviyesinde azalış gözlenmiştir. Tuz stresinin 1/2 Hoagland çözeltisi ile iyileştirilmesinin ardından diamin oksidazların azalmasıyla endojen poliamin seviyesinde yükselme ve GABA seviyesinde düşme görülmüştür. Bu veriler GABA birikimi ile diamin oksidaz aktivitesindeki değişimlerin birbiriyle bağlantılı olduğunu gösterir. GABA ile diamin oksidaz aktivitesi arasındaki ilişkiyi doğrulayan diğer bir kanıt da 12 gün boyunca tuz stresi uygulanan bitkilerde diamin oksidaz seviyesinin daha yüksek bir noktada seyrederken GABA seviyesinin daha düşük bir seyir izlemesidir. Tüm bu sonuçlar tuz stresi esnasında poliaminlerin fonksiyonlarını GABA oluşumu yolu ile gerçekleştirdiklerini gösterir (Xing et al., 2007).

Glutamatın oksidasyonu teorik olarak piruvata göre daha az enerji üretir. Çünkü 2-okzoglutarat dehidrogenaz ve süksinil-CoA ligaz adımlarında 1 mol NADH ve ATP üretilir. Ancak GABA yolundaki SSADH (süksinik semialdehit dehidrogenaz) aşamasında sadece 1 mol NADH üretilir (Allan et al., 2009). Stres koşulları NADH'nin oksidasyonunu kısıtlayarak TCA (trikarboksilik asit) döngüsündeki araçları ve enzimleri inhibe eder. Bu durumda TCA döngüsü GABA yoluna kayar. Örneğin oksijen eksikliği mitokondriyal elektron taşıma zinciri yoluyla NADH oksidasyonunu inhibe eder ve glutamat seviyesini azaltır, GABA ve alanin seviyelerini arttırır (Shelp et al., 1995; Myashita and Good, 2008). NAD-bağımlı izositrat dehidrogenaz veya akonitaz gibi TCA döngüsü enzimlerinde yapılan manipülasyonlar GABA yolu aktivitesini değiştirir (Nunes-Nesi et al., 2007; Studart-Guimaraes, et al., 2007). GABA yolu, aktivitesi azalan süksinil CoA ligaz ifadesini tamamlar (Studart-Guimaraes et al., 2007). GABA

yolu, 2-okzoglutarat metabolizmasının veya glutamat deaminasyon/transaminasyonu süreçlerinin yavaşlaması sonucunda devreye girmez (Shelp et al., 1995; Tuin and Shelp, 1996). Çünkü 2-okzoglutarat metabolizması NAD gerektirir ve ADP tarafından düzenlenir (Wiskich, 1980). Oksijen eksikliği gibi solunumu ve NAD/NADH oranını düşüren stres koşullarında süksinat üretimi sınırlandırılabilir. Bu tür bir stres süksinik semialdehitin süksinata oksidasyonunun indirgenmesiyle GABA birikimini destekleyebilir. Stresli koşulun ortadan kalkmasının hemen ardından GABA Krebs döngüsüne substrat sağlar (Wallace et al., 1984). Bouche ve arkadaşları 2003 yılında *Arabidopsis*'de süksinik semialdehit dehidrogenazın T-DNA knockout mutantını analiz etmişler ve GABA yolunun reaktif oksijen araçlarını ve hücre ölümünü engellediğini ortaya çıkarmışlardır. SSADH-null mutantları (*ssadh*) özel bir GABA-T inhibitörü ile muamele edildiğinde reaktif oksijen türevlerinin ve GHB'nin (gamma hidroksibütirik asit) birikimi engellenmiştir (Fait et al., 2005). Anlaşılacağı üzere, GABA yolu bitkinin normal gelişiminin gerçekleşmesi açısından önemlidir. GABA-piruvat transaminaz enziminin pirinçteki yaprak dökülmesi sürecinde amino asit ve azot geri çevriminde rol oynadığı tespit edilmiştir (Ansari and Chen, 2009). GABA-piruvat transaminaz enzimini ifade eden *Osl2* geni pirinçte yaprak dökülmesi esnasında sentezlenir. *E. coli*'de ifade edilen rekombinant Osl2 proteini ile yapılan bir araştırmada GABA-piruvat transaminaz enziminin pirincin yaprak dökülmesi (senesens) sürecinde azot metabolizmasında kilit role sahip olduğu anlaşılmıştır (Ansari and Chen, 2009). Yaprak dökülmesi (senesens) sırasında pek çok amino asitte yer alan amid grupları α -ketoglutarata transfer edilebilir. α -ketoglutarata amid gruplarının transfer edilmesinin ardından α -ketoglutarat transaminaz ile glutamata dönüştürülür. Glutamatın bir kısmı glutamin sentetaz enzimi ile glutamine dönüştürülürken kalan kısmı GABA yoluna katılır. GABA-piruvat transaminaz, GABA'nın geri dönüşümlü bir şekilde süksinik semialdehite dönüşmesini sağlar (Ansari and Chen, 2009).

Hücre zarlarını tahrip eden yaralanma, donma veya ısı stresleri vakuol içeriğinin sitosole akmasına neden olur veya protonları sitosolden vakuole veya apoplasta pompalayan ATPaz enzimlerini inhibe eder. Bu durumda sitosolik pH

düşer ve GAD aktivitesi tetiklenir (Allan et al., 2009). Tütün, *Arabidopsis* ve soya fasulyesinde oksijen eksikliğinin sitosolik pH'yı 0.3-0.6 pH birimi azalttığı ve GABA birikimine neden olduğu anlaşılmıştır (Shelp et al., 1995; Allan et al., 2003; Miyashita and Good, 2008; Roberts et al., 1992). Sitosolik H veya Ca seviyelerinin artmasıyla GABA sentezinin tetiklenmesi Şekil 1.3.'de gösterilmiştir (Bown and Shelp'den, 1997). Crawford et al. (1994), butirat veya diğer zayıf asitlerin eklenmesiyle hücrel asitliği sağlamış ve pH'yı 0.6 birim azaltmışlardır. Butirat ilavesiyle gerçekleştirilen asit yükü [¹⁴C]butirat alınımı tespit edilerek ölçülmüştür. Butirat GABA seviyesini 15 saniye içinde % 200-300 oranında arttırmıştır. Ancak 45 saniye sonra GABA birikiminin daha düşük bir hızda gerçekleştiği gözlenmiştir. Petunya bitkisindeki GAD enziminin CaM bağlı bölgesi *E. coli'de* üretilmiş ve rekombinant GAD enzimi elde edilmiştir. Hücrede pH'nın 7.0-7.5 olduğu ve kalsiyumun ve kalmodulinin olmadığı koşullarda rekombinant GAD enziminin inaktif olduğu tespit edilmiştir. Ne kalsiyum ne de kalmodulin tek başına GAD enziminin aktivitesi üzerinde etkili değildir (Snedden et al., 1996). GAD'ın Ca²⁺/CaM aktivasyonu ile ilgili *in vivo* kanıtlar Ca engelleri ve CaM antagonistleri ile yapılan denemeler sonucunda elde edilmiştir (Bown and Shelp, 1997). Bu ajanlarla 1 saat muamele edilen pirinç (*Oryza sativa*) köklerinde 3 saatlik anoksiyada bırakılan bitkilerde olduğu gibi GABA birikimi engellenmiştir (Aurisano et al., 1995b). Düşük pH değerlerinin GABA seviyesini arttırması GAD enziminin aktivitesinin tetiklenmesi ile ilişkilidir. Düşük pH değerleri malat ve glutamat gibi metabolitlerin H⁺-tüketen dekarboksilasyonunu tetikler (Guern et al., 1986; Mathieu et al., 1986; Reggiani et al., 1988; Menegus et al., 1989; Snedden et al., 1992). *Asparagus sprengeri* mezofil hücrelerinde H⁺/L-Glu simportu üzerine yapılan çalışmalarda L- [U- ¹⁴C]Glu metabolizmasının temel ürününün GABA olduğu anlaşılmıştır (Crawford et al., 1994).



Şekil 1.3. Sitosolik H veya Ca seviyelerinin artmasıyla GABA sentezinin tetiklenmesi. Sitosole kalsiyumun girişi kalsiyum kanalları vasıtasıyla gerçekleşir (Bown and Shelp'den 1997).

Elsholtzia splendens bitkisinde yapılan bir çalışmada bakır ile muamele edilen bitkide glutamat seviyesinin hızla azaldığı ve bu azalmanın glutamatın GABA'ya dönüşümünden kaynaklandığı tespit edilmiştir (Satyanarayan and Nair, 1990; Scott-Taggart et al., 1999). Fasulye köklerinden saflaştırılan GAD enziminin aktivitesi 100 μM Ca^{2+} ve 100 nM CaM ilave edilmesiyle tetiklenmiştir (Ling et al., 1994). Glutamat dekarboksilazın (GAD) yapraklarda, çiçeklerde ve çimlenen tohumlardaki ifadesi transkripsiyonel veya transkripsiyon sonrası süreçler tarafından kontrol edilir (Chen et al., 1994). Bir protonun harcanması sonucu glutamatın GABA'ya dekarboksillenmesi stres faktörlerine maruz kalan bitkinin sitozolik pH'yı kararlı halde tutmasını sağlar (Snedden et al., 1992; Crawford et al., 1994). Bir floresan pH probu ve GABA analizleri ile sitozolik pH değişimleri ve Asparagus'ta (*Asparagus sprengeri*) GABA birikimi araştırılmıştır (Crawford et al., 1994).

Ramputh and Bown'a (1996) göre soya fasulyesi yapraklarının mekanik stresle muamele edilmesinin ardından 1-4 dakika içerisinde GABA miktarında 10-

25 katlık bir artış olduğu gözlenmiştir. Soya fasulyesi yapraklarının soğuk ve mekanik stresle muamele edilmesinin ardından GABA seviyesinin büyük bir hızla arttığı gözlenmiştir (Wallace et al., 1984). Aniden düşük sıcaklığa transfer edilen soya fasulyesi yapraklarında 5 dakika içinde GABA çarpıcı bir şekilde artmış ve glutamat seviyesi de azalmıştır. Kabak (*Cucurbita maxima*) ile yapılan çalışmalarda GAD enziminin aktivitesini 70 °C gibi yüksek sıcaklıklarda % 85 oranında kaybettiği tespit edilmiştir. Bu enzimin aktivite gösterdiği optimum sıcaklık 60 °C'dir (Matsumoto et al., 1986). *Arabidopsis thaliana*'da keşfedilen beş GAD homologu genden *GAD1* daha çok köklerde ifade olurken *GAD2* tüm organlarda ifade olur (Miyashita et al., 2007). *Arabidopsis*'de bulunan beş GAD geninden birinin susturulması kökün gelişimini yavaşlatır ve GABA seviyesini düşürür (Bouche, Fait, Zik and Fromm, yayınlanmamış veri). GABA yolu enzimlerinin oksijen eksikliğinde aldığı rolleri tanımlamak amacıyla *GAD1* ve *GABA-T1* genleri kusurlu olan *Arabidopsis* mutantları kullanılmıştır (Miyashita et al., 2007). *gad1* mutantlarında GAD aktivitesi köklerde önemli ölçüde azalırken gövdede önemli bir değişiklik gözlenmemiştir. *gaba-t1* mutantında ise GAD aktivitesi hem köklerde hem de gövdede önemsiz ölçüde düşüş göstermiştir. Bu mutantların köklerinde oksijen eksikliği ile tetiklenen alanin birikiminin inhibisyonu GABA yolunun oksijen eksikliği koşullarında alanin birikiminden sorumlu olduğunu gösterir (Miyashita et al., 2007). Oksijen eksikliğinde GABA ve alanin amino asitlerinin görevi karbon ve azot depolamaktır (Sato et al., 2002; Ricoult et al., 2005). Stresli dokularda ozmotik potansiyeli koruyan bu amino asitlerin bir diğer işlevi de hücrel karbohidrat seviyelerinin düşüşünü engellemek olabilir (Reggiani et al., 1988, 2000; Aurisano et al., 1995a). Düşük oksijen seviyelerinde *GABA-T1* ve *GAD* genlerinin tetiklenmesi % 5 O₂ ile muamele edilen 17 günlük bitki köklerinden ekstrakte edilen total RNA ile gözlenmiştir (Miyashita et al., 2007). Stres uygulamasından 8 ve 24 saat sonra beş GAD homologunun içinde en fazla ifade olan gen *GAD4* genidir. Köklerde oksijen eksikliği ile uyarılan alanin birikimi iki aşamada gerçekleşir. İlk aşamada oksijen eksikliği uygulamasından 4 saat sonra hızlı bir birikim, ikinci aşamada ise yavaş bir birikim gerçekleşir. *gaba-t1* ve *gad1* mutantlarında alaninin ikinci aşamadaki birikimi inhibe olmuştur. Bu sonuç, GABA yolunun köklerde alaninin yavaş birikiminden sorumlu olabileceğini gösterir (Miyashita et al., 2007). Pirinç

genom projesinde pirinçte 5 *GAD* geninin olduğu tespit edilmiştir. *OsGAD2* geni bu beş genden biridir ve Ca/CaM bağlama özelliği yoktur (Akama et al., 2001). *OsGAD2* enziminin ifadesi hücrelerde yüksek seviyede GABA birikimine neden olur (Akama and Takaiwa, 2007). Yüksek seviyede GABA birikiminin görüldüğü bu transgenik pirinç taneleri hipertansiyon hastası sıçanlara verilmiş ve tansiyonlarının düştüğü gözlenmiştir (Akama et al., 2009). *Saccharomyces cerevisiae*'da yapılan bir araştırmada L-glutamat metabolizmasının oksidatif strese toleransta görev aldığı anlaşılmıştır (Coleman et al., 2001). *S. cerevisiae*'da yer alan glutamat dekarboksilaz (*GAD1*) enziminin hidrojen peroksit ve diamid oksidantlarına karşı dayanıklılığı arttırdığı ortaya çıkmıştır. Bitkilerde bulunan glutamat dekarboksilaz enziminin mayada bulunan *GAD* enzime yapısal olarak benzediği bilinmektedir (Coleman et al., 2001). *S. cerevisiae*'da GABA azot kaynağı olarak kullanılır (Vissers et al., 1990; Talibi et al., 1995). Glutamat dekarboksilazdan başlayan enzimatik reaksiyonun genetik olarak ortadan kaldırılması hücreleri oksidatif strese karşı çok daha hassas hale getirir (Coleman et al., 2001).

Domates meyvesinin gelişiminin son aşamasında (kırmızı meyve) CO₂ ile muamele edilen ve edilmeyen meyvelerde GABA miktarı artmıştır. Sonraki süreçte CO₂ ile muamele edilen meyvede GABA miktarı artarken CO₂ ile muamele edilmeyen meyvelerde GABA miktarının azaldığı tespit edilmiştir (Deewatthanawong et al., 2010). *GAD1* geninin ifadesi CO₂ uygulamasından etkilenmezken *GAD2* ve *GAD3* genlerinin ifadesinin kontrol gruplarına göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Deewatthanawong et al., 2010). CO₂ ile muamele edilen kırmızı olgunluk seviyesindeki domateste GABA-transaminaz aktivitesi düşük çıkmıştır. Bu çalışmada α -ketoglutarata ve pirüvata bağımlı GABA transaminaz aktivitelerinde farklılıklar saptanmıştır. Olgun yeşil domatesin % 20 CO₂ ile 3 gün muamele edilmesinin ardından olgunlaşmayla-düzenlenen ısı şoku proteini ve *GAD* genlerinin ifadesinde ani bir artış gözlenmiştir. Ancak meyvenin CO₂ ile muamelesi sona erdirildiğinde genlerin ifadesinde azalma görülmüştür (Rothan et al., 1997). Bu veriler domateste GABA ve yüksek CO₂ stresi arasında bir ilişkinin var olduğuna işaret etmektedir. Makino et al. (2008) 30 °C'de % 11

O₂ ve % 9 CO₂ ile muamele edilen domatestede GABA birikiminin olduğunu gözlemişlerdir (Makino et al., 2008).

Arabidopsis'de *SSADH* geninin susturulması bitki çevresel strese maruz kaldığında reaktif oksijen türevlerinin birikmesiyle nekrotik hücre ölümüne neden olur (Bouche et al., 2003). *Arabidopsis*-*SSADH* mutanları hidrojen peroksidin uzaklaştırılmasında etkisiz kalmaktadır (Bouche et al., 2003). Çünkü, GABA yolunun son basamağı solunum zincirine NADH ve süksinat sağlar. UV ve ısı stresleriyle muamele edilen *ssadh* mutantlarında hidrojen peroksit seviyesi artmış ve bu da hücre ölümüne neden olmuştur. UV ve ısı stresine maruz bırakılan mutant bitkilerde yabancı tip bitkilere nazaran yaprak nekrozisi oranı çok daha fazladır (Bouche et al., 2003). Bu çalışmada *ssadh* mutantlarında trikomların da strese karşı aşırı duyarlı olduğu açığa çıkartılmıştır. Trikomların detoksifikasyon süreçlerine katıldığı ve yüksek seviyede glutatyon içerdiği bilinmektedir (Gutierrez-Alcala et al., 2000). İnsanlarda yapılan bir çalışmada *SSADH* eksikliğinin nörolojik bozukluklara ve beyinde γ -hidroksibutirat (GHB) birikimine neden olduğu tespit edilmiştir (Gibson et al., 1997).

GABA aynı zamanda bitki gelişiminde azot kaynağı olarak da görev alır (Barnes and Naylor, 1959). Leguminosae familyası üyelerinin azot fikse eden nodüllerinin kuru ağırlığının % 6'sından fazlasını GABA oluşturur (Larher et al., 1983). Amonyum asimilasyonu sitozolik pH'da geçici bir düşüşe neden olurken glutamat dekarboksilaz aktivitesi ve buna bağlı olarak da GABA birikimi artar (Carroll et al., 1994). Ayrıca *Arabidopsis*'in GABA'nın azot kaynağı olarak kullanıldığı besin ortamında verimli bir şekilde büyüebildiği kanıtlanmıştır (Breitkreuz et al., 1999).

GABA bakterilerde karbon ve azot metabolizmasında görev alır. Azot eksikliğinde veya süksinat karbon kaynağı olarak glisinini yerini aldığı GABA-yolu genlerinin ifadesinde artış görülmüştür (Metzer and Halpern, 1990). *Arabidopsis* *SSADH* (süksinik semialdehit dehidrogenaz) geni ilk defa 1999 yılında klonlanmıştır (Bush and Fromm, 1999). Bu çalışmada *SSADH* enziminin NADH/NAD⁺ oranı değişimlerinden etkilendiği anlaşılmıştır. Oksijen eksikliği

gibi stres koşullarında mitokondriyal metabolizma etkilenir ve NADH ve ADP oranları artar. NADH ve ADP oranının yükselmesi SSADH enzimini inhibe eder.

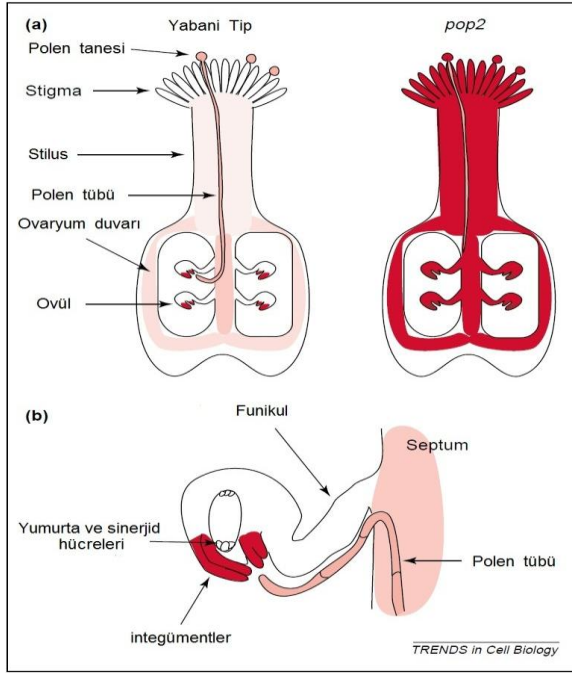
1.4. GABA'nın Diğer Organizmalarla Etkileşimi

Bitkilerde bulunan GABA diğer bitkiler, hayvanlar, funguslar ve bakterilerle etkileşim halindedir (Shelp et al., 2006). Örneğin tütün yapraklarında yürüyen *Heliothis virescens* güvesi ve soya fasulyesi yapraklarını saran *Choristoneura rosaceana* 5-10 dakika içerisinde yapraktaki GABA miktarının 4-12 kat artmasını sağlar (Bown et al., 2002). Böceğin sinir sisteminde ve hemolimfide yer alan nörotransmitterler arasında herhangi bir engel bulunmaz (Shelp et al., 2006). Bu durumda yüksek GABA miktarı nöromuskular bağlantılardaki klorür kanallarını aktifleştirir ve böylece omurgasız canlının fizyolojik ve gelişimsel süreçleri zarar görür (Bown et al., 2006). Böcek tarafından sindirilen GABA, böceğin normal gelişim sürecine zarar verir (Snedden and Fromm, 1999; Shelp et al., 1999). Yüksek GABA seviyesine sahip olan transgenik tütün bitkisi kök nematoduna ve tütün güvesi larvalarına karşı dayanıklıdır (McLean et al., 2003; MacGregor et al., 2003). GABA, domates ve *Cladosporium fulvum* fungusu arasındaki etkileşimde de yer alır (Oliver and Solomon, 2004). *C. fulvum* hifleri domates hücresinin apoplastına giremez. *C. fulvum* ile enfekte olan domates bitkisinin apoplastında sitosolün asitleşmesiyle kalsiyumun artışı sonucunda GAD enzimi tetiklenir ve GABA konsantrasyonu artar (Solomon and Oliver, 2001).

1.5. GABA ve Polen Tübü Gelişimi

GABA'nın tozlaşmadaki rolü GABA transaminazı kodlayan *POP2* geni üzerine yapılan çalışmalarla ortaya koyulmuştur (Palanivelu et al., 2003). Polen tübünün gelişimini düzenleyen *POP2* geni *Arabidopsis thaliana*'da keşfedilmiştir (Palanivelu et al., 2003). Transaminaz enzimini kodlayan *Arabidopsis POP2* geni GABA'yı parçalayarak stigma, stilus, ovaryum duvarı, septum ve integüment hücrelerinde bir GABA gradiyenti oluşumunu sağlar. Böylece polen tübünün normal bir şekilde gelişimi sağlanır. Transaminaz enzimini kodlayan genin susturulduğu *pop2* mutantlarıyla yapılan çalışmalarda polen tübünün septuma

doğru ilerleyebildiği ancak ovule ulaşamadığı anlaşılmıştır (Yang, 2003). Polen túbü gelişimi hücre içi ve hücre dışı Ca^{2+} gradiyentine ve pH değişimlerine bağlıdır (Holdaway-Clarke et al., 2003). GABA'nın bitki hücrelerindeki sentezinin Ca^{2+} ve H^+ seviyelerine bağlı olması (Bown and Shelp, 1997), polen túbü gelişimiyle GABA seviyesinin ilişkide olduğu bir mekanizmanın varlığına işaret eder. Polen túbünün gelişimi esnasında enerji tüketimi oldukça yoğundur ve polen túbünün büyüdüğu bölgede mitokondri sayısı fazladır (Mascarenhas, 1993). POP2 tarafından katalizlenen reaksiyonun ardından GABA'nın sentezi süksinatın oluşturulmasında alternatif bir yoldur. *pop2* mutasyonu GABA'nın süksinata akışını engelleyerek polendeki enerji üretimini kısıtlıyor olabilir (Ma, 2003). Verimlilik ve GABA içeriği arasında bir ilişki mevcuttur. *pop2* mutantlarında çiçeklerde daha fazla GABA birikimi ve daha az sayıda tohum üretimi meydana gelir. Yabani bitkilerde GABA miktarı polen túbü boyunca farklılık gösterir. Örneğin stigmada 20 μM , stilusta 60 μM , ovaryum duvarlarında 110 μM , septumda 160 μM ve integüment hücrelerinde 500 μM olduğu tespit edilmiştir (Shelp et al., 2006). *Arabidopsis* pistillerindeki GABA gradiyenti Şekil 1.5'de gösterilmiştir. GABA'yı paralayamayan GABA transaminaz mutantlarında ovül ve pistildeki GABA miktarları aynıdır ve polen túbünün gelişimi engellenir. Düşük GABA konsantrasyonlarında (1-10 mM) polen túbü uzayabilirken yüksek GABA konsantrasyonlarında polen túbü uzamasının inhibe olduğu tespit edilmiştir (Shelp et al., 2006). Hücre dışından sağlanan GABA'nın, plazma zarından hücre içine geçişini sağlayan sistemler veya reseptörlerle polen túbünün gelişimini etkileyip etkilemediği bilinmemektedir (Meyer et al., 2006; Bouche et al., 2003). GABA, mikropile yakın i integüment hücrelerinde oluşturulur ve düfüzyonla yayılarak ovül-septum arasında konsantrasyon farkını yaratır. Konsantrasyon farkı sadece difüzyonla ilişkili değildir. Hücre içi POP2 aracılığıyla GABA'nın parçalanması septum-stigma gradiyentinin devamlılığını sağlayan unsurlardan biridir (Yang, 2003). *In vivo'da* GABA gradiyentinin polen túbünü yönlendirdiği ve yüksek seviyede GABA'nın polen túbünün gelişimini inhibe ettiği bilinmesine rağmen GABA'nın bu tür bir rolü nasıl gerçekleştirdiği tam olarak bilinmemektedir (Ma, 2003).



Şekil 1.4. *Arabidopsis* pistillerindeki GABA gradiyenti polen túbünün gelişimi ve yönlendirilmesi için gereklidir. (a) Polen tanesinden çıkan polen túbü pistil içinde gelişir. Stigma ve stilus boyunca ilerleyerek ovüle ulaşır. (b) Polen túbünün yumurta hücresine doğru ilerlemesi. Dokulardaki GABA miktarı beyazdan kırmızıya doğru giden bir renk skalasında gösterilmiştir. Palanivelu et al.'dan (2003).

1.6. GABA Reseptörleri

GABA'nın en çok merak edilen ve henüz tam olarak aydınlatılmayan bir diğer görevi de sinyal yollarını aktifleştiren bir sinyal molekülü olmasıdır. Eğer GABA sinyal yollarını aktifleştirebiliyorsa reseptörlerinin bulunması muhtemeldir. Hayvanların sinir sisteminde GABA'nın bağlandığı iyonotropik ve metabotropik olmak üzere iki tip reseptör bulunur. GABA, iyon kanallarının aktivitesini düzenleyen 'iyonotropik reseptörler' denen yüzey reseptörlerine ($GABA_A$, $GABA_C$ reseptörleri) bağlanır (Watanabe et al., 2002). İyonotropik reseptörler ligand-kapılı iyon kanallarıdır. Metabotropik reseptörler ($GABA_B$) ise

G-proteinlerine bağlıdır. *Arabidopsis*'in genom dizisinde hayvanlardaki GABA reseptörlerine benzer homolog reseptörler açığa çıkartılmamıştır. Hayvanlarda G-protein-bağlı 'metabotropik' GABA reseptörleri bulunurken (Watanabe et al., 2002) etkileşimleri tam olarak anlaşılmasa da G-protein-bağlı reseptörlerin ve G-proteinlerinin homologları bitkilerde de tespit edilmiştir (Ma, 1994; Colucci et al., 2002). Yu et al. (2006) tütün bitkisinin hücre zarında GABA_B reseptörlerini tespit etmişlerdir. Tütün somatik ve polen hücrelerinin protoplast zarlarında GABA-bağlı bölgeler bulunmuş ve bu bölgelerin içsel kalsiyum seviyesinin düzenlenmesinde rol oynadığı tespit edilmiştir (Yu et al., 2006). Beuve' et al. (2004) GABA'nın floemde yer değiştirdiğini buldular. Azot eksikliğinde floemdeki GABA'da meydana gelen değişimler nitrat alınımıyla pozitif olarak ilişkilidir. Ayrıca hücre dışından verilen GABA plazma zarında yer alan nitrat taşıyıcısını tetikler ve ¹⁵NO₃'ün kök sisteminden alınmasını sağlar (Beuve' et al., 2004).

1.7. Tarım Ürünlerinde GABA Miktarının Arttırılması

GABA esmer pirinç, şarap, çikolata (Akihiro et al., 2008) ve laktik asit bakterileri tarafından üretilen peynir (Nomura et al., 1998) ve yoğurt (Aoki et al., 2003) gibi fermente besinlerde bulunur. GABA'nın insan sağlığı üzerindeki olumlu etkilerinden dolayı pirinçte GABA seviyesinin arttırılmasına yönelik çalışmalar yapılmıştır. Bunun için biyoteknolojik yöntemler kullanılarak GAD enzimi transfer edilmiş (Park and Oh 2006), glutamik asidin GABA'ya dönüştürülmesi için fermentasyon yolları (Kono and Himeno 2000; Su et al., 2003; Chen et al., 2006; Huang et al., 2007) ve çimlendirme yöntemleri (Oh and Choi 2001; Komatsuzaki et al., 2007; Xing et al., 2007) denenmiştir. GABA birikimini sağlayan çimlendirme yönteminde pirinç taneleri kontrollü sıcaklıklarda (30 °C) 72 saat suda bekletildikten sonra çimlendirilir (Varayanond et al., 2005; Komatsuzaki et al., 2007). GABA seviyesinin ekimden sonra 20-30 gün içinde en yüksek seviyeye ulaştığı tespit edilmiştir (Jannoey et al., 2010b). Soya fasulyesi (Oh and Choi, 2001) ve buğdayda (Nagaoka, 2005) yapılan çalışmalarda da ıslatılarak çimlendirilen tohumlarda GABA seviyesinin arttığı gösterilmiştir. Çimlenme esnasında su emilimiyle birlikte pirinç tanesi içindeki amino asitler

parçalanarak taşınabilir amidlere dönüşerek pirinç fidesinin büyüyen kısımlarına taşınır. Bu esnada GAD enziminin aktivitesinin artmasıyla glutamat GABA'ya dönüştürülür (Kono and Himeno 2000; Ueno 2000; Su et al., 2003; Komatsuzaki et al., 2007). Ayrıca tohumun çimlenmesi esnasında GABA miktarındaki artış, GABA'nın bu süreçte azot kaynağı olarak kullanıldığını ve Krebs döngüsüne katıldığını gösterir (Mayer and Poljakoff-Mayber, 1982). Ueno et al. (2010) soya fasulyesinde yaptıkları çalışmada suda bekletilmiş soya fasulyesi kotiledonlarının yüksek hidrostatik basınca maruz bırakıldıklarında hücre yapısında kısmi bir parçalanma yaşandıktan sonra enzim aktivitesinin arttığını ve GABA seviyesinin yükseldiğini gözlemişlerdir. Fermentasyon yönteminde ise kırmızı pirinç üretimi için *Monascus sp.* kullanılır. Fermentasyon uygulamasında GABA üretiminin artmasını sağlayan etken *M. purpureus* mayasından gelen GAD enzimi ile glutamatın GABA'ya dönüşmesidir (Jannoey et al., 2010a). *Monascus* türlerinden *M. purpureus*, *M. ruber* ve *M. pilosus* Doğu Asya'da binlerce yıldır kullanılır (Hawksworth and Pitt 1983). Wang et al. (2003) *Monascus purpureus* NTU 601'i karbon, azot kaynakları ve yağ asidi içeren ortama ekerek GABA miktarını arttırmayı başarmışlardır. Beyaz pirinç esmer pirince nazaran çok daha az miktarda GABA içerir. Pirincin beyazlatılması işlemi esnasında kepeğinden arındırılması GABA içeriğini düşürür (Ohtsubo et al., 2005). GABA seviyesinin arttırıldığı esmer pirincin lösemi hücrelerinin çoğalmasını engellediği ve kanser hücrelerinin apoptozisini tetiklediği bilinmektedir (Oh, 2004).

Genetik çalışmalar GABA konsantrasyonundaki modifikasyonların insan ve bitkilerin gelişiminde çeşitli sonuçlara neden olduğunu göstermiştir. İnsanlarda *GABA-T* ve *SSADH* genlerinin susturulması fizyolojik sınırlarda nörotransmitterlerin birikimine neden olur (Medina-Kauwe et al., 1999; Chambliss et al., 1998).

1.8. GABA ve Meyve Gelişimi

GABA, meyve gelişimi sırasında sitoplazmanın pH dengesini sağlar (Rolin et al., 2000) veya meyve gelişiminin erken aşamasında geçici azot deposu olarak görev yapar (Satya Narayan and Nair, 1990).

Inaba et al.'a göre (1980), GABA ve glutamat domates meyvesinde en bol bulunan amino asitlerdir. Gallego et al. (1995) domates meyvesinin ilk olgunlaşma aşamasında kalmodulin bağlı GAD transkriptlerinde artış olduğunu tespit etmişlerdir. Aminobütirik asidin α , β , ve γ olmak üzere üç izomeri vardır. Bu izomerlerin patojenle muamele edilmiş domates yapraklarına spreyleneceği sonucunda patojenle-ilişkili proteinlerin biriktiği gözlenmiştir (Cohen et al., 1994). α ve γ aminobütirik asitlerin patojenle-ilişkili proteinlerin birikimine çok az katkıda bulunduğu tespit edilmiştir.

Money maker, çeri ve Kyouryoku-toukou cinsi domateslerde çiçeklenmenin ardından GABA içeriği artar. GABA seviyesi domatesin yeşil olduğu evrede en yüksek seviyeye ulaşırken domates yüzeyinin % 10'unun pembeleştiği aşamadan sonra hızla azalır (Inaba et al., 1980, Rolin et al., 2000, Carrari et al., 2006).

Çizelge 1.1. GABA birikimini tetikleyen uygulamalar (Bown and Shelp'den, 1997).

Uygulama	Doku	Kaynak
Mekanik Uyarı	Soya fasulyesi yaprakları	Wallace et al., 1984
Mekanik Hasar	Soya fasulyesi yaprakları	Ramputh and Bown, 1996
Soğuk Şoku	Soya fasulyesi yaprakları Asparagus mezofil hücreleri	Wallace et al., 1984 Cholewa et al., 1997
Isı Şoku	Börülce hücre kültürleri	Mayer et al., 1990
Oksijen Eksikliği	Çay yaprakları Pirinç kökleri	Tsushida and Murai, 1987 Reggiani et al., 1988; Aurisano et al., 1995a
Sitozolik Asitleşme	Asparagus mezofil hücreleri Havuç hücre süspansiyonları	Crawford et al., 1994 Carroll et al., 1994
Su Stresi	Domates yaprakları ve kökleri	Bolarin et al., 1995
Fitohormonlar	Kök kültürleri	Ford et al., 1996

Çalışmamızda GABA yolundaki glutamat dehidrogenaz (GDH) ve glutamat dekarboksilaz (GAD) enzim aktiviteleri ve GABA miktarı belirlenerek bitki, alg ve liken cinsleri arasında karşılaştırma yapılmıştır. Projemiz kapsamında tüm canlılarda bulunan GABA'nın farklı evrimsel basamaklarda yer alan bitki sınıflarına ait gruplarda incelenmesinin bitkilerdeki evrim ile ilgili çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Zararlı böceklere, hastalıklara ve çevresel stres faktörlerine yanıtta rol oynayan GABA'nın farklı bitki sınıflarında evrimsel olarak karşılaştırılması kuraklık, yüksek sıcaklık, düşük sıcaklık gibi önemli çevresel sorunlarda insanlığın yararına yönelik uygulamaların yapılmasına katkıda bulunabilir. Farklı evrimsel basamaklara ait bitki sınıflarının evrimsel süreçte olumsuz çevre koşullarına nasıl uyum sağladığının bilinmesi çevre sorunlarının çözümünde çok büyük kolaylıklar getirmektedir. Projemizin tarımsal uygulamalara getirmesi düşünülen kolaylıklardan biri de olumsuz çevre

koşullarına uyum sağlayabilen bitkilerin yetiştirilebilmesinde önemli bir bilimsel adımı oluşturmıştır.

2. MATERİYAL VE METOD

2.1. Bitki Materyali

Doğadan toplanan alg, eğrelti, liken, gimnosperm ve angiosperm gruplarına ait örnekler yıkandıktan sonra analizlere kadar -80 °C'de saklandı. Analizlerde kullanılan bitki, alg ve liken cinsleri şunlardır: *Ulva lactuca*, *Pseudevernia furfuracea*, *Polypodium sp.*, *Ginkgo biloba*, *Pinus pinea*, *Magnolia sp.*, *Nymphaea sp.*, *Portulaca sp.*, *Malva sp.*, *Rosa sp.*, *Lavandula sp.*, *Washingtonia filifera*, *Avena sp.*, *Iris sp.* Bu örneklerle glutamat dehidrogenaz (GDH) ve glutamat dekarboksilaz (GAD) enzim aktiviteleri ve GABA miktarı belirlendi.

2.2. Total Protein Tayini

Örneklerdeki total protein miktarı Bradford'a (1976) göre BSA (bovin serum albumin) standartları kullanılarak belirlendi. Örneklerdeki total protein miktarı 1 ml.'lik polistren küvetlere son hacim 1 ml. olacak şekilde 50 µl örnek ve reaksiyon karışımı (Coomassie Brilliant Blue protein boyası içeren) eklendi. Oda sıcaklığında 10 dk. bekletilen örneklerden 595 nm.'de absorbans alındı. BSA standartları ile oluşturulan kalibrasyon eğrisinden faydalanılarak çözünebilir total protein miktarı mg yaş ağırlık olarak belirlendi. Spektrofotometrik ölçüm Shimadzu UV-1600 cihazı ile yapıldı (Shimadzu, Japan).

2.3. Glutamat Dehidrogenaz (GDH) Enzim aktivitesi Ölçümü

Örneklerdeki glutamat dehidrogenaz (GDH) enzim aktivitesi ölçümü için önce Akihiro et al. (2008)'a göre ekstraksiyon gerçekleştirildi. -80 °C'de saklanan 1 g. yaprak örnekleri havanda sıvı azot ile masere edildikten sonra % 1 (w/v) polivinilpolipirrolidon (PVPP) içeren pH=7.5 ekstraksiyon tamponunda (0.1 M Tris HCl pH=7.5, 10 mM ditiyotritol (DTT), 5mM EDTA, 1 mM piridoksal-5-fosfat) ekstrakte edildi. 1 g. yaprak örneği için 3.5 ml ekstraksiyon tamponu kullanıldı. Ekstraktlar +4 °C 'de 10.000 g'de 15 dk. santrifüjlendikten sonra elde edilen süpernatantlar 1.5 ml' lik ependorf tüplerine aktarıldı. Süpernatantlar tuzlardan arındırılmak üzere Sephadex G-25 (PD-10 Desalting column)

kolonlarından geçirildi. Sephadex G-25 kolonlarından geçirilen ekstraktlardan üç fraksiyon elde edildi. Elde edilen fraksiyonlar konsantratöre (Amicon ultra-centrifugal filter devices) pipetlendi ve 25 °C'de 4000 g'de 15 dk. santrifüjlendi. Konsantratöre uygulanan ekstraktların hacmi 1/4 oranında azaldı ve filtre üzerinde kalan ekstraktlar ependorf tüplerine aktarıldı. GDH aktivitesi Turano et al. (1996)'a göre spektrofotometrik olarak ölçüldü. GDH aktivitesi ölçümünde aminasyon reaksiyonu kullanıldı. Aminasyon reaksiyonu için pH=8.0 olan 100 mM Tris-HCl tamponu içinde hazırlanan reaksiyon karışımı (100 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 13 mM α -ketoglutarat, 0.25 mM NADPH, 1 mM CaCl_2) kullanıldı. Reaksiyon karışımında belirtilen tüm kimyasallar ayrı ayrı tüplerde stoklar halinde her ölçümden önce taze stoklar halinde hazırlandı. 1 ml.'lik kuvars küvetlere her bir kimyasaldan ve protein ekstraktından 200' er μl pipetlendi. GDH aktivitesi 340 nm.'de spektrofotometrik olarak 1 dk. içinde absorbansta gözlenen düşüş ile belirlendi. Bir birim GDH aktivitesi, 30 °C'de dakikada 1 mmol koenzimin (NADPH) oksidasyonu olarak tanımlandı.

2.4. Glutamat Dekarboksilaz (GAD) Enzim Aktivitesi Ölçümü

Glutamat dekarboksilaz enzim aktivitesi ölçümü için Bartyzel et al. 'un (2003) yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde göre dekarboksilasyon, 0,4 ml. hacimde 3 mM L-glutamat, 20 μM pridoksal fosfat (PLP), 50 mM K-fosfat tamponu (pH: 5,8) ve 100 μl örnek içeren reaksiyon karışımında gerçekleştirildi. Örnek, önce 10 dk. 30 °C'de glutamat içermeyen reaksiyon karışımı ile inkübe edildi. Reaksiyon, glutamat eklenmesiyle başlatıldı ve 0,5 M HCl'den 0,1 ml. eklenerek 60 dk. sonra durduruldu. Karışımlar 10 dk. 12.500 g'de santrifüjlendi. Santrifüj sonrasında örnekler ninhidrin reaktifi ile türevlendirilerek, reaksiyon sonucu oluşan GABA miktarları belirlendi. Ninhidrin çözeltisi 0,35 % (w/v) etanolde çözülerek hazırlandı. Örnekler 1:5 oranında ninhidrin çözeltisi eklendi ve 10 dk 80 °C'de inkübasyon yapıldı. Oda sıcaklığına getirilen örneklerin, 570 nm de spektrofotometrede absorbans değerleri belirlendi. Aynı koşullarda absorbans değerleri bilinen GABA standartları ile karşılaştırılarak örneklerdeki GABA miktarı saptandı. GAD aktivitesi enzim birimi olarak dakikada oluşan mmol GABA şeklinde hesaplandı.

2.5. GABA Miktarının Belirlenmesi

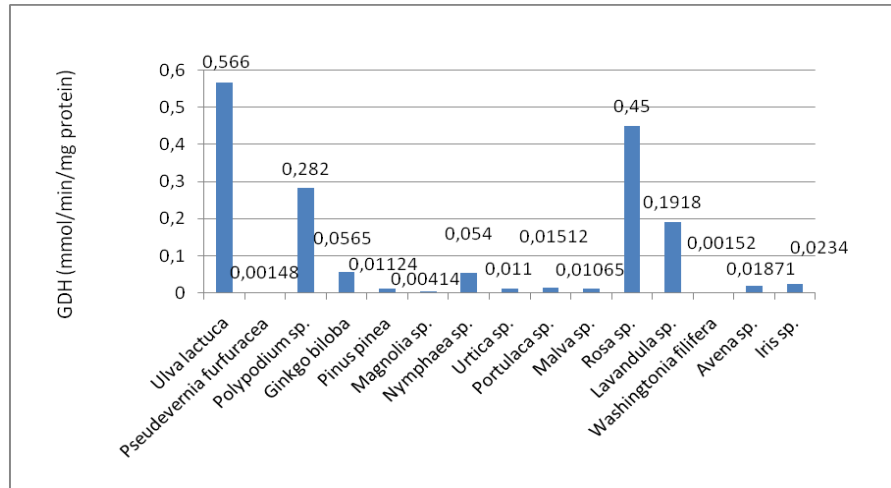
Örneklerdeki GABA miktarı HPLC (Shimadzu-VP101, Japan) cihazı ile belirlenmiştir. GABA ekstraksiyonu Baum ve ark.'na (1996) göre, HPLC analizi ise Khuhwar ve Rajper ve ark.'na (2003) göre yapıldı. Bitki örnekleri (0,5 g) sıvı azotta masere edildi ve üzerine 1 mL su: kloroform: metanol (3:5:12 v/ v/ v) solüsyonu eklendikten sonra örnekler 2 dakika süre ile 10000 rpm 4 °C'de santrifüj edildi. Süpernatant üzerine 100 µL ddH₂O, 150 µL Borax tamponu (pH= 8) ve 250 µL 2-hydroxynaphthaldehyde (HN) (0,3 % w/v) eklendi. Karışım 20 dakika süre ile 80 °C'lik su banyosunda bekletildikten sonra hacmi metanol ile 1mL'ye tamamlandı ve örnek filtresinden geçirildikten sonra HPLC kolonuna uygulandı. HPLC koşulları; enjeksiyon hacmi 20 µL, Kolon Supelco LC18 (250 X 4.6 mm, 5 µ), akış hızı 1 mL min⁻¹, Mobil faz metanol: su (62:38 v/v) ve dedeksiyon 330 nm UV şeklinde uygulandı. Örneklerdeki GABA miktarı aynı koşullarda yürütülen standartlarla karşılaştırılarak belirlendi.

3. SONUÇLAR

3.1. Glutamat Dehidrogenaz (GDH) Enzim Aktivitesi

Sonuçları

GDH enzim aktivitesi sonuçları Çizelge 3.1 ve Şekil 3.1'de gösterilmiştir. GDH enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak 14 farklı cinsten belirlendikten sonra aralarında karşılaştırma yapıldı. Çalışmamızda kullanılan her bir materyalin GDH spesifik enzim aktivitesi değerleri $\text{mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}$ olarak hesaplandı. Buna göre *Ulva lactuca*, *Rosa sp.*, ve *Polypodium sp.* organizmalarında GDH enzim aktivitesinin diğer cinslere göre belirgin oranda yüksek olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 3.1). GDH enzim aktivitesi grafikte gösterildiği gibidir. GDH spesifik enzim aktivitesi *Ulva lactuca*, *Polypodium sp.*, *Ginkgo biloba*, *Pinus pinea* gibi ilkel gruplarda çok daha yüksek değerlerde bulunmuştur. Buna göre bu ilkel gruplarda spesifik enzim aktivitesinin 2,2 kat daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Monokotillerden *Washingtonia filifera*, *Avena sp.*, *Iris sp.* diğer cinslerle karşılaştırıldığında spesifik enzim aktivitesinin birbirine yakın değerlerde ve düşük düzeylerde seyrettiği anlaşılmaktadır.



Şekil 3.1. 15 farklı cinsten belirlenen GDH aktiviteleri ($\text{mmol min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$).

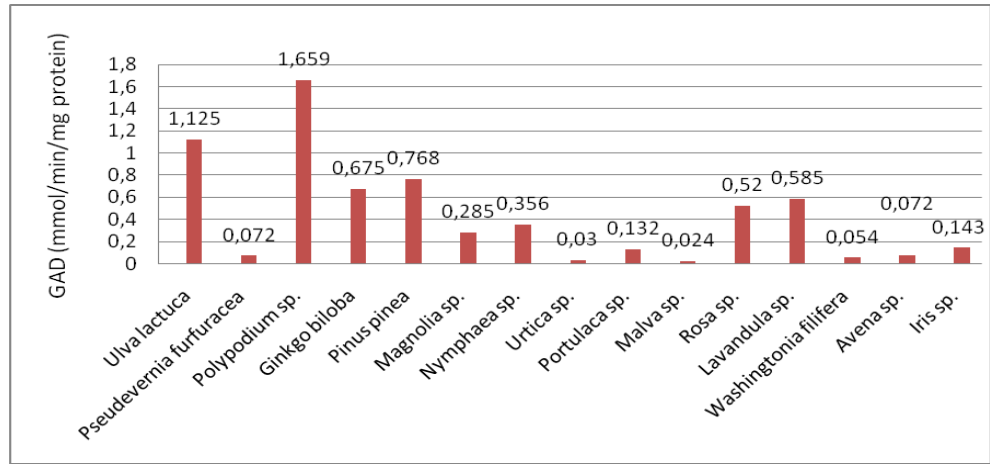
Çizelge 3.1. 15 örnekte belirlenen GDH spesifik enzim aktiviteleri ($\text{mmol min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$). Sütunlardaki hata çubukları \pm standart hata (S.E)'yi göstermektedir.

Organizma	Protein miktarı (mg)	Spesifik Enzim Aktivitesi ($\text{mmol min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$)
<i>Ulva lactuca</i>	0,035	0,566 \pm 0,00
<i>Pseudevernia furfuracea</i>	0,55	0,00148 \pm 0,34
<i>Polypodium sp.</i>	0,023	0,282 \pm 0,00
<i>Ginkgo biloba</i>	0,060	0,0565 \pm 3,72
<i>Pinus pinea</i>	0,097	0,01124 \pm 5,27
<i>Magnolia sp.</i>	0,13	0,00414 \pm 3,19
<i>Nymphaea sp.</i>	0,174	0,054 \pm 3,74
<i>Urtica sp.</i>	0,011	0,011 \pm 6,05
<i>Portulaca sp.</i>	0,36	0,01512 \pm 1,14
<i>Malva sp.</i>	1,57	0,01065 \pm 13,03
<i>Rosa sp.</i>	0,084	0,45 \pm 0,00
<i>Lavandula sp.</i>	0,068	0,1918 \pm 4,82
<i>Washingtonia filifera</i>	0,81	0,00152 \pm 0,00
<i>Avena sp.</i>	0,56	0,01871 \pm 11,10
<i>Iris sp.</i>	0,60	0,0234 \pm 6,8

3.2. Glutamat Dekarboksilaz (GAD) Enzim Aktivitesi

Sonuçları

GAD enzim aktivitesi sonuçları Çizelge 3.2 ve Şekil 3.2'de gösterilmiştir. Çalışmamızda kullanılan her bir materyalin glutamat dekarboksilaz (GAD) spesifik enzim aktivitesi değerleri $\text{mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}$ olarak hesaplandı. Glutamat dekarboksilaz (GAD) enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak belirlendikten sonra 14 farklı cins arasında karşılaştırma yapıldı. Buna göre *Polypodium sp.* ve *Ulva lactuca* cinslerinde diğer cinslere oranla enzim aktivitesinin çok daha yüksek olduğu anlaşıldı. GAD enzimi spesifik aktivitesi, organizmalar arası evrimsel ilişki düşünülerek değerlendirildiğinde *Ulva lactuca*, *Polypodium sp.*, *Ginkgo biloba*, *Pinus pinea* gibi ilkel türlerde GAD aktivitesinin Angiosperm gruplarına oranla 4 kat daha yüksek olduğu belirlendi. Monokotillerden *Washingtonia filifera*, *Iris sp.* ve *Avena sp.* cinslerinin spesifik enzim aktiviteleri 0,05-0,1 $\text{mmol/min/mg protein}$ değerleri arasında birbirine yakın düzeydedir.



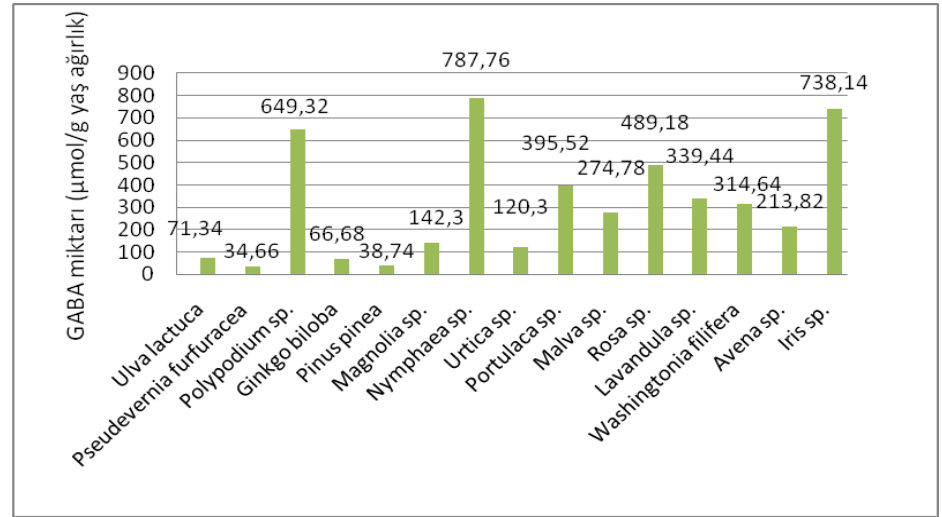
Şekil 3.2. 15 farklı cinste belirlenen GAD aktiviteleri ($\text{mmol/min/mg protein}$).

Çizelge 3.2. 15 örnekte belirlenen GAD spesifik enzim aktiviteleri(mmol min⁻¹ mg protein⁻¹).

Organizma	GAD aktivitesi (mmol min⁻¹ mg protein⁻¹)
<i>Ulva lactuca</i>	1,125
<i>Pseudevernia furfuracea</i>	0,072
<i>Polypodium sp.</i>	1,659
<i>Ginkgo biloba</i>	0,675
<i>Pinus pinea</i>	0,768
<i>Magnolia sp.</i>	0,285
<i>Nymphaea sp.</i>	0,356
<i>Urtica sp.</i>	0,03
<i>Portulaca sp.</i>	0,132
<i>Malva sp.</i>	0,024
<i>Rosa sp.</i>	0,52
<i>Lavandula sp.</i>	0,585
<i>Washingtonia filifera</i>	0,054
<i>Avena sp.</i>	0,072
<i>Iris sp.</i>	0,143

3.3. GABA Miktarı Sonuçları

GABA miktarı sonuçları Çizelge 3.2'de ve Şekil 3.3'de gösterilmiştir. En yüksek GABA değerleri *Nymphaea sp.*, *Iris sp.* ve *Polypodium sp.* ve *Rosa sp.* cinsi bitkilerde tespit edildi. *Polypodium sp.* cinsinde glutamat dehidrogenaz (GDH) ve glutamat dekarboksilaz (GAD) enzim aktiviteleri de GABA miktarına paralel şekilde yüksektir. *Ulva lactuca*, *Pseudevernia furfuracea*, *Polypodium sp.*, *Ginkgo sp.*, *Pinus pinea* gibi ilkel gruplarda Angiosperm gruplarına oranla GABA miktarı 2.3 kat daha düşüktür.



Şekil 3.3. 15 farklı cinsten belirlenen GABA miktarları ($\mu\text{mol g}$ yaş ağırlık⁻¹).

Çizelge 3.3. 15 örnekte belirlenen GABA miktarları. Sütunlardaki hata çubukları \pm

standart hata (S.E)'yi göstermektedir.

Organizma	GABA Miktarı ($\mu\text{mol g yaş}$ ağırlık^{-1})
<i>Ulva lactuca</i>	71,34 \pm 0,08
<i>Pseudevernia furfuracea</i>	34,66 \pm 0,01
<i>Polypodium sp.</i>	649,32 \pm 0,32
<i>Ginkgo biloba</i>	66,68 \pm 0,06
<i>Pinus pinea</i>	38,74 \pm 0,02
<i>Magnolia sp.</i>	142,3 \pm 0,05
<i>Nymphaea sp.</i>	787,76 \pm 0,75
<i>Urtica sp.</i>	120,3 \pm 0,16
<i>Portulaca sp.</i>	395,52 \pm 0,1
<i>Malva sp.</i>	274,78 \pm 0,09
<i>Rosa sp.</i>	489,18 \pm 0,11
<i>Lavandula sp.</i>	339,44 \pm 0,18
<i>Washingtonia filifera</i>	314,64 \pm 0,12
<i>Avena sp.</i>	213,82 \pm 0,38
<i>Iris sp.</i>	738,14 \pm 0,5

4. TARTIŞMA

Çalışmamızda farklı bitki cinslerinin yanı sıra ilkel gruplardan bir alg ve liken cinsinin GABA miktarları ile glutamat dehidrogenaz (GDH) ve glutamat dekarboksilaz (GAD) enzim aktiviteleri karşılaştırıldı.

Ortak bir atadan türevlenen (monofiletik) bitkiler aleminin kökeni çok eskilere dayanır. Bitki evriminde yer alan filogenetik dalların ortak atasının yeşil bir alg olduğu düşünülmektedir. Bu yüzden çalışmamızda ilkel bir grup olduğu düşünülen *Ulva lactuca* yeşil algi de kullanıldı.

Bitkilerde, bakterilerde, funguslarda ve memelilerde sentezlenen GABA ve GABA yolunu oluşturan enzimler evrimsel öneme sahiptir. Yüksek bitkilerde GAD enzimi Ca^{2+}/CaM ve asidik pH olmak üzere iki yolla tetiklenir. Her organizmada GAD enzimi için optimum pH farklılık gösterir. Örneğin *E. coli* bakterisinde GAD enzimi için optimum pH'nın 3.8 (Shukuya and Schwert, 1960), funguslarda 5.0 (Hao and Schmit, 1991), bitkilerde 5.8 (Snedden et al., 1996; Johnson et al., 1997) ve memelilerde 7.0 (Wu et al., 1973) olduğu rapor edilmiştir. Çeşitli canlılarda GAD enziminin uyarıldığı optimum pH değerlerine bakıldığında evrimsel süreçte GAD'ın asidik pH ile uyarılması özelliğinin kaybolduğu görülür (Kinnersley and Turano, 2000). Bunun nedeni bitkilerde görülen güçlü seçim baskıları olabilir. Bitkilerde bulunan GAD enzimini kodlayan gen dizilerinin hayvanlarda bulunan gen dizilerinden çok bakterilerde bulunanlara benzemesi, bitkiler arası evrimsel ilişkinin araştırılmasını ilginç hale getirir (Baum et al., 1993). Kinnersley and Tuano'ya (2000) göre bitkilerde pH'ya bağlı GAD enziminin aktivasyonu konusunda iki evrimsel görüş mevcuttur. Bunlardan ilkinde göre, GAD enziminin pH'ya bağlı olarak aktivasyonu prokaryot atalardan gelen evrimsel bir kalıntıdır. İkinci görüşe göre ise bitkilerde bulunan GAD enziminin aktivasyonu için Ca^{2+}/CaM ve asidik pH olmak üzere iki farklı yol evrimleşmiştir. GAD enziminin alt birimleri omurgalılarda 555-594 amino asit artığı içerirken *Drosophila*'da 510, yüksek bitkilerde 496-502, mayalarda 585 ve bakterilerde 460-475 amino asit artığı içerir (Sukhareva and Mamaeva, 2002). Arkeaların

Crenarchaeota kingdomunda GAD alt birimleri sadece 454 amino asit artığı ile bitkilerdeki ve bakterilerdeki enzimlerle yakın akrabadır. Arkeaların *Euryarchaeota* filumunda ise GAD alt birimleri 355-396 amino asit artığı bulundurulur. Bu durumda evrim sürecinde enzimin amino asit zinciri uzamış olabilir. GAD enziminin aktif merkezinde yer alan PLP bölgesi de evrim sürecinde korunmuştur. Enzim alt birimlerinin amino asit dizilerinin analizi ile glutamat dekarboksilazın filogenetik ağacı oluşturulmuştur. Buna göre bakterilerden, hayvanlardan, bitkilerden ve arkealardan elde edilen veriler birbirleriyle karşılaştırıldığında bitki ve bakteri enzimlerinin yapısal homoloji gösterdiği anlaşılmıştır (Sukhareva and Mamaeva, 2002).

Çalışmamızda GAD enziminin spesifik aktivitesi bitki evrimindeki farklı grupları temsil eden cinsler kullanılarak belirlendi. Buna göre *Ulva lactuca*, *Polypodium sp.*, *Ginkgo biloba*, *Pinus pinea* gibi ilkel gruplarda enzim aktivitesinin Angiosperm gruplardan 4 kat daha yüksek olduğu belirlendi. Çalışmamızda kullanılan tüm gruplar karşılaştırıldığında en yüksek GAD enzim aktivitesi 1,12 ve 1,65 mmol min⁻¹ mg protein⁻¹ değerlerle *Ulva lactuca* ve *Polypodium sp.* cinslerine aittir. Ayrıca GAD enzim aktivitesinin evrimsel olarak birbirine yakın gruplarda benzer değerlere sahip olduğu görülür. Örneğin Gimnosperm grubuna ait bitkilerden *Ginkgo biloba* ve *Pinus pinea* enzim aktiviteleri sırasıyla 0,67 ve 0,76 mmol min⁻¹ mg protein⁻¹ olarak belirlendi. *Rosa sp.* ve *Lavandula sp.* cinslerinde ise bu değerler sırasıyla 0,52 ve 0,58 mmol min⁻¹ mg protein⁻¹ olarak belirlendi. Kabak bitkisinde GAD6 spesifik enzim aktivitesi 0.09 mmol min⁻¹ mg protein⁻¹ olarak belirlenmiştir (Matsumoto et al., 1986, 1990, 1996). Çalışmamızdan elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldığında *Cucurbitacea* familyasına dahil olan kabak bitkisi GAD enzim aktivitesi ile *Portulaca sp.* bitkisinde gözlenen GAD aktivitesinin (0.13 mmol min⁻¹ mg protein⁻¹) yakın değerlerde olduğu görülür.

2-okzoglutarattan glutamatın sentezlenmesi reaksiyonunu gerçekleştiren glutamat dehidrogenaz enzimi de evrimsel öneme sahiptir. Glutamat dehidrogenaz (GDH) enzimini kodlayan *GDH* geni *Kluyveromyces marxianus* mayasının moleküler tanımlanmasında ve filogenetik analizinde kullanılmıştır (Pereira da Silva-Jr et al., 2006). *Chlorella* yeşil alginde yapılan bir çalışmada düşük nitrat ve

yüksek amonyumun olduğu koşullarda NADPH-bağımlı GDH aktivitesinin oldukça yüksek olduğu belirlendi (Kretovich et al., 1970). *Caulerpa simpliciuscula* yeşil alginde yapılan çalışmada da aynı şekilde düşük amonyum konsantrasyonunda GDH enziminin aminasyon aktivitesi gösterdiği anlaşılmıştır (Gayler and Morgan, 1976). Bu çalışmada Diaflo UM20E ile konsantre edilen ekstraktların GDH spesifik enzim aktivitesi $0,056 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. İlginçtir ki amonyum miktarının istenilen düzeyin üzerinde olması da GDH enzim aktivitesini tetikler. Çalışmamızda *Ulva lactuca* yeşil alginin GDH enzim aktivitesi $0,56 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$ olarak belirlendi. *Chlorella* yeşil alginde GDH enzim aktivitesinin yüksek oluşunun ortam koşullarına (azot miktarına, kirlilik yüküne, mevsime) bağlı olduğu anlaşılmıştır. Çalışmamızda *Ulva lactuca* alginin GDH enzim aktivitesinin yüksek olması da toplandığı bölgenin kirlilik yüküne, amonyum ve nitrat miktarına bağlı olabilir. *Ulva lactuca* yeşil alginin GDH enzim aktivitesi çarpıcı bir şekilde yüksek iken GAD enzim aktivitesi de yüksektir. Buna rağmen GABA seviyesi $34,66 \mu\text{mol g yaş ağırlık}^{-1}$ değerle diğer gruplara oranla daha düşüktür. GDH ve GAD enzim aktiviteleri sonucu GABA oluşumunun artması beklenir. Bu sonuç, *Ulva lactuca* alginde GABA'nın başka yollarla tüketildiğini gösterir. GABA, süksinata dönüşerek Krebs döngüsüne karbon ve NADH sağlar. *Ulva lactuca*'nın GABA'yı azot kaynağı olarak kullandığı da söylenebilir. GABA miktarı organizmanın gelişim aşaması, çevresel streslerin tipi, süresi, şiddeti gibi faktörlerden etkilenir. Amonyum belirli bir seviyeye geldiğinde GDH enzimi aminasyon reaksiyonunu gerçekleştirir. Bitkinin büyümesi ve gelişimi süreçlerinde özellikle NAD(H) bağımlı GDH enzimi kilit role sahiptir.

GDH ve GAD izoenzimlerinin farklı organlarda sentezlenmesi, evrim sürecinde bu enzimlerin seçilim baskıları altında farklı görevler üstlenmek üzere evrimleştiğini gösterir. Farklı organizmalarda GDH ve GAD izoenzimlerinin farklı organellerde ve farklı dokularda işlev görmesi enzim aktivitelerindeki farklılığı açıklayabilir.

GABA yolunda yer alan glutamat dehidrogenaz (GDH) ve glutamat dekarboksilaz (GAD) enzimlerinin spesifik aktivitelerinin ilkel gruplarda (*Ulva lactuca*, *Polypodium sp.*, *Ginkgo biloba*, *Pinus pinea*) çok daha yüksek olması

dikkat çekicidir. Angiosperm dikotil bitki gruplarından *Rosa sp.* ve *Lavandula sp.* cinslerinin GDH, GAD enzim aktiviteleri ve GABA miktarları birbirine paralel şekilde yüksektir. Aynı şekilde *Polypodium sp.* cinsi bitkide GDH, GAD enzim aktiviteleri ve GABA miktarları ortalamanın çok üzerindedir.

Özellikle kök farklılaşmasına sahip olmayan *Ulva lactuca* yeşil alginde enzim aktivitelerinin diğer gruplara oranla daha yüksek olması GABA ile ilişkili mekanizmaların bitkilerin ve alglerin çeşitlenmesinden önce ortaya çıkmış olabileceğini düşündürür. Bu hipotez enzim aktiviteleri ve GABA miktarları dışında GABA yolu enzimlerini kodlayan genlerin filogenetik analizi yapıldıktan sonra tekrar yorumlanacaktır. Yüksek bitkilerde ve ilkel gruplarda GDH, GAD, SSADH enzimlerini kodlayan genlerin nükleotid dizilerinde görülebilecek farklılıklar aynı filogenetik ağaç üzerinde değerlendirilmelerini imkansız hale getirir. Bu durumda Angiospermlerden monokotil ve dikotil grupların kendi arasında değerlendirilmesi daha sağlıklı bir karşılaştırma olanağı sağlayacaktır.

Çalışmamızda çeşitli canlı gruplarında bulunan ve evrimsel öneme sahip olan GDH ve GAD enzim aktivitelerinin ve GABA miktarlarının farklılığı bu enzimlerin ve GABA'nın farklı canlı gruplarında farklı görevler üstlenmek üzere evrilmiş olabileceği düşüncesini destekler niteliktedir. Çalışmamız sonucunda GABA'nın sadece stresle muamele edilen organizmalarda arttığına ilişkin hipotezin geçerli olmadığı kanıtlanmıştır. GABA miktarı, GDH ve GAD enzim aktiviteleri evrimsel gelişmişlik düzeyine, ortam koşullarına, büyüme aşamasına bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. GDH ve GAD izoenzimlerinin farklı canlılarda farklı organlara dağılması enzim aktivitelerinin farklılığını açıklayabilir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Adams, D.O Yang, S.F., 1979**, Ethylene biosynthesis: identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene, *Proc Natl Acad Sci USA*. 76:170-174.
- Akama, K., Akihiro, T., Kitagawa, M., Takaiwa, F., 2001**, Rice (*Oryza sativa*) contains a novel isoform of glutamate decarboxylase that lacks an authentic calmodulin-binding domain at the C-terminus, *Biochim Biophys Acta* 1522: 143–150.
- Akama, K., Takaiwa, F., 2007**, C-Terminal extension of rice glutamate decarboxylase (OsGAD2) functions as an autoinhibitory domain and overexpression of a truncated mutant results in the accumulation of extremely high levels of GABA in plant cells, *J Exp Bot* 58:2699–2707.
- Akama, K., Kanetou, J., Shimosaki, S., Kawakami, K., Tsuchikura, S., Takaiwa, F., 2009**, Seed-specific expression of truncated OsGAD2 produces GABA-enriched rice grains that influence a decrease in blood pressure in spontaneously hypertensive rats, *Transgenic Res* 18:865–876.
- Akihiro, T., Koike, S., Tani, R., Tominaga, T., Watanabe, S., Iijima, Y., Aoki, K., Shibata, D., Ashihara, H., Matsukura, C., Akama, K., Fujimura, T., Ezura, H., 2008**, Biochemical mechanism on GABA accumulation during fruit development in tomato, *Plant Cell Physiol.* 49, 1378–1389.
- Allan, W.L., Clark, S.M., Hoover, G.J., and Shelp, B.J., 2009**, Role of plant glyoxylate reductases during stress: a hypothesis, *Biochem. J.* 423, 15–22.
- Allan, W. L., Peiris, C., Bown, A. W., and Shelp, B. J., 2003**, γ - Hydroxybutyrate accumulates in green tea leaves and soybean sprouts in response to oxygen deficiency, *Can. J. Plant Sci.* 83, 951–953.
- Ansari, M.I., and Chen, S-C. G., 2009**, Biochemical characterization of gamma aminobutyric acid (GABA): pyruvate transaminase during rice leaf senescence, *International Journal of Integrative Biology* Vol.6, No. 1, 27.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ansari, M.I., and Chen, S-C. G., 2009**, Biochemical characterization of gamma aminobutyric acid (GABA): pyruvate transaminase during rice leaf senescence, *International Journal of Integrative Biology* Vol.6, No. 1, 27.
- Aoki, H., Uda, I., Tagami, K. et al., 2003**, Production of a new Tempeh like fermented soybean containing a high level of gamma aminobutyric acid by anaerobic incubation with *Rhizopus*, *Biosci Biotechnol Biochem* 67: 1018-1023.
- Arazi, T., Baum, G., Snedden, W.A., Shelp, B.J., Fromm, H., 1995**, Molecular and biochemical analysis of calmodulin interactions with the calmodulin-binding domain of plant glutamate decarboxylase, *Plant Physiol* 108: 551-561.
- Aurisano, N., Bertani, A., Regianni, R., 1995a**, Anaerobic accumulation of 4-aminobutyrate in rice seedlings: causes and significance, *Phytochemistry* 38: 1147-1150.
- Aurisano, N., Bertani, A., Regianni, R., 1995b**, Involvement of calcium and calmodulin in protein and amino acid metabolism in rice roots under anoxia, *Plant Cell Physiol* 36: 1525-1529.
- Barnes, R.L., Naylor, A.W., 1959**, Effect of various nitrogen sources on growth of isolated roots of *Pinus serotina*, *Physiol Plant.* 12: 82-89.
- Bartyzel, I., Pelczar, K., Paszkowski, A., 2003**, Functioning of the gamma-aminobutyrate pathway in wheat seedlings affected by osmotic stress. *Biol Plant* 47(2):221–225.
- Baum, G., Chen, Y., Arazi, T., Takatsuji, H., Fromm, H., 1993**, A plant glutamate decarboxylase containing a calmodulin binding domain. *J Biol Chem* 268: 19610-19617.
- Baum, G., Lev-Yadun, S., Fridmann, Y., Arazi, T., Katsnelson, H., Zik, M., Fromm, H., 1996**, Calmodulin binding to glutamate decarboxylase is required for regulation of glutamate and GABA metabolism and normal development in plants. *EMBO J.* 15 (12): 2988-2996.

- Aurisano, N., Bertani, A., Regianni, R.,** 1995a, Anaerobic accumulation of 4-aminobutyrate in rice seedlings: causes and significance, *Phytochemistry* 38: 1147-1150.
- Aurisano, N., Bertani, A., Regianni, R.,** 1995b, Involvement of calcium and calmodulin in protein and amino acid metabolism in rice roots under anoxia, *Plant Cell Physiol* 36: 1525-1529.
- Barnes, R.L., Naylor, A.W.,** 1959, Effect of various nitrogen sources on growth of isolated roots of *Pinus serotina*, *Physiol Plant.* 12: 82-89.
- Bartyzel, I., Pelczar, K., Paszkowski, A.,** 2003, Functioning of the gamma-aminobutyrate pathway in wheat seedlings affected by osmotic stress. *Biol Plant* 47(2):221–225.
- Baum, G., Chen, Y., Arazi, T., Takatsuji, H., Fromm, H.,** 1993, A plant glutamate decarboxylase containing a calmodulin binding domain. *J Biol Chem* 268: 19610-19617.
- Baum, G., Lev-Yadun, S., Fridmann, Y., Arazi, T., Katsnelson, H., Zik, M., Fromm, H.,** 1996, Calmodulin binding to glutamate decarboxylase is required for regulation of glutamate and GABA metabolism and normal development in plants. *EMBO J.* 15 (12): 2988-2996.
- Beuve, N., Rispaill, N., Laine, P., Cliquet, J-B., Ourry, A., Le Deunff, E.,** 2004, Putative role of γ -aminobutyric acid as a long-distance signal in upregulation of nitrate uptake in *Brassica napus L.* *Plant Cell Environ* 27: 1035-1040.
- Bidwell, R. G. S.,** 1963, Pathways leading to the formation of amino acids and amides in leaves. *Can. J. Bot.* 41: 1623-1638.
- Blindermann, J.M., Maitre, M., Ossola, L., and Mandel, P.,** 1978, *Eur. J. Biochem.*, 86, 143.
- Bolarin, M.C., Santa-Cruz, A., Cayuela, E., Perez-Alfocea, F.,** 1995, Short-term solute changes in leaves and roots of cultivated and wild tomato seedlings under salinity. *J Plant Physiol* 147: 463-468.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bor, M., Seckin, B., Ozgur, R., Yılmaz, O., Ozdemir, F., Turkan, I., 2009,** Comparative effects of drought, salt, heavy metal and heat stresses on gamma-aminobutyric acid levels of sesame (*Sesamum indicum L.*) *Acta Physiol Plant.* 31:655–659.
- Bouche, N., Fait, A., Bouchez, D., Moller, S.G., Fromm, H., 2003,** Mitochondrial succinic semialdehyde dehydrogenase of the gamma-aminobutyrate shunt is required to restrict level of reactive oxygen intermediate in plants. *Proc. Natio. Acad. Sci.* 100: 6843-6848.
- Bouche, N., Lacombe, B., Fromm, H., 2003,** GABA signalling: a conserved and ubiquitous mechanism. *Trends Cell Biol* 13: 607–610.
- Bouche, N., and Fromm, H., 2004,** GABA in plants; Just a metabolite? *Trends in Plant Sci.* 9:110-115.
- Bown, A.W., and Shelp, B.J., 1997,** The metabolism and functions of γ -aminobutyric acid. *Plant Physiol.* Vol 115: 1-5.
- Bown, A.W., Hall, D.E., MacGregor, K.B., 2002,** Insect footsteps on leaves stimulate the accumulation of 4-aminobutyrate and can be visualized through increased chlorophyll fluorescence and superoxide production. *Plant Physiol* 129: 1430–1434.
- Bown, A.W., and Shelp, B.J., 1989,** The metabolism and physiological roles of 4-aminobutyric acid. *Biochem. (Life Sci. Adv.)* 8,21-25.
- Bown, A.W., MacGregor, K.B., Shelp, B.J., 2006,** Gamma-aminobutyrate: defense against invertebrate pests? *Trends Plant Sci* 11: 424–427.
- Bradford, M. M., 1976,** A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Breitkreuz, K.E., Shelp, B.J., Fischer, W.N., Schwacke, R., Rentsch, D., **1999,** **Identification and characterization GABA, proline and quaternary ammonium compound transporters from *Arabidopsis thaliana*, *FEBS Lett.* 450, 280–284.**

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Busch, K.B., and Fromm, H.,** 1999, Plant Succinic Semialdehyde Dehydrogenase. Cloning, Purification, Localization in Mitochondria, and Regulation by Adenine Nucleotides. *Plant Physiology*, Vol. 121, pp. 589–597.
- Cammaerts, D., Jacobs, M.,** 1983, A study of the polymorphism and the genetic control of the glutamate dehydrogenase isoenzymes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci Lett* 31: 65-73.
- Carrari, F., Baxter, C., Usadel, B., Urbanczyk-Wochniak, E., Zanon, M., Nunes-Nesi, A., Nikiforova, V., Centero, D., Ratzka, A., Pauly, M., Sweetlove, L.J., and Fernie, A.R.,** 2006, Integrated analysis of metabolite and transcript levels reveals the metabolic shifts that underlie tomato fruit development and highlight regulatory aspects of metabolic network behavior, *Plant Physiol.* 142:1380-1396.
- Carroll, A. D., Fox, G. G., Laurie, S., Phillips, R., Ratcliffe, R. G., and Stewart, G. R.,** 1994, Ammonium Assimilation and the Role of γ -Aminobutyric Acid in pH Homeostasis in Carrot Cell Suspensions. *Plant Physiol.* 106: 513-520.
- Cauwenberghe, O.R.V., Makhmoudova, A., McLean, M.D., Clark, S.M., and Shelp, B.J.,** 2002, Plant pyruvate-dependent gamma-aminobutyrate transaminase: identification of an *Arabidopsis* cDNA and its expression in *Escherichia coli*. *Can. J. Bot.* 80:933–941.
- Chambliss, K.L., Hinson, D.D., Trettel, F., Malaspina, P., Novelletto, A., Jakobs, C., Gibson, K.M.,** 1998, Two exon-skipping mutations as the molecular basis of succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency (4-hydroxybutyric aciduria), *Am. J. Hum. Genet.* 63, 399–408.
- Chen, Y., Baum, G., and Fromm, H.,** 1994, The 58-kilodalton calmodulin binding glutamate decarboxylase is a ubiquitous protein in petunia organs and its expression is developmentally regulated. *Plant Physiol.*, 106, 1381-1387.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Chen, Y.L., Hwang, I.E., Lin, M.C., Chen, C.C., Yuan, G.F.,** 2006, *Monascus purpureus* mutants and their use in preparing fermentation products having blood pressure lowering activity, *US Patent* 7067304:1–10.
- Chessler, S.D., Lernmark, A.,** 2000, Alternative splicing of GAD67 results in the synthesis of a third form of glutamic-acid decarboxylase in human islets and other non-neural tissues. *J Biol Chem* 275:5188–5192.
- Chevrot, R., Rosen, R., Haudecoeur, E., Cirou, A., Shelp, B.J., Ron, E., and Faure, D.,** 2006, GABA controls the level of quorum-sensing signal in *Agrobacterium tumefaciens*. *PNAS* vol. 103 no. 19. 7460–7464.
- Chiu, J., DeSalle, R., Lam, H.M., Meisel, L., Coruzzi, G.,** 1999, Molecular Evolution of Glutamate Receptors: A Primitive Signaling Mechanism that Existed Before Plants and Animals Diverged. *Mol. Biol. Evol.* 16(6):826–838.
- Cholewa, E., Cholewinski, A.J., Shelp, B.J., Snedden, WS., Bown, A.W.,** 1997, Cold shock-stimulated γ -aminobutyric acid synthesis is mediated by an increase in cytosolic Ca^{2+} , not by an increase in cytosolic H^+ . *Can J Bot* 75: 375-382.
- Clark, S.M., Leo, R.D., Van Cauwenberghe, O.R., Mullen, R.T., Shelp, B.J.,** 2009, Subcellular localization and expression of multiple tomato gamma-aminobutyrate transaminases that utilize both pyruvate and glyoxylate. *J. Exp. Bot.* 60, 3255–3267.
- Clendenning, K. A., Waygood, E.R., and Weinberger, P.,** 1952, The carboxylases of leaves and their role in photosynthesis. *Can. J. Bot.* 30: 395-409.
- Cohen, Y., Niderman, T., Mosinger, E., Fluhr, R.,** 1994, [beta]-Aminobutyric Acid Induces the Accumulation of Pathogenesis-Related Proteins in Tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) Plants and Resistance to Late Blight Infection Caused by *Phytophthora infestans*, *Plant Physiol.* 104: 59-66.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Coleman, S.T., Fang, T.K., Rovinsky, S.A., Turano, F.J., and Moye-Rowley, W.S.**, 2001, Expression of a glutamate decarboxylase homologue is required for normal oxidative stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 276: 244-250.
- Colucci, G., Apone, F., Alyeshmerni, N., Chalmers, D., and Chrispeels, M.J.**, 2002, *GCR1*, the putative *Arabidopsis* G protein-coupled receptor gene is cell cycle-regulated, and its overexpression abolishes seed dormancy and shortens time to flowering. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 4736-4741.
- Crawford, L.A., Bown, A.W., Bretkreuz, K.E., Guine, F.C.**, 1994, The Synthesis of γ -Aminobutyric Acid in Response to Treatments Reducing Cytosolic pH. *Plant physiol.* 104: 865-871.
- Deewatthanawonga, R., Rowell, P., Watkins, C.B.**, 2010, γ -aminobutyric acid (GABA) metabolism in CO₂ treated tomatoes. *Postharvest Biology and Technology* 57: 97–105.
- Dixon, R. O. D., and Fowden, L.**, 1961, γ -Aminobutyric acid metabolism in plants. 2. Metabolism in higher plants. *Ann. Bot.* 25: 513-530.
- Enna, S.J.**, 2001, A GABA(B) mystery: the search for pharmacologically distinct GABA(B) receptors. *Mol. Interv.* 1: 208-218.
- Erdö, S.L., Wolff, J.R.**, 1990, γ -Aminobutyric acid outside the mammalian brain. *J Neurochem* 54:363–372.
- Fait, A., Yellin, A. and Fromm, H.**, 2005, GABA shunt deficiencies and accumulation of reactive oxygen intermediates: insight from *Arabidopsis* mutants. *FEBS letters.* 579: 415-420.
- Ford, Y-Y., Ratcliffe, R.G., Robins, R.J.**, 1996, Phytohormone-induced GABA production in transformed root cultures of *Datura stramonium*: an in vivo - ¹⁵N NMR study. *J Exp Bot* 47: 811-818.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gallego, P.P., Whotton, L., Picton, S., Grierson, D., Gray, J.E.,** 1995, A role for glutamate decarboxylase during tomato ripening: the characterisation of a cDNA encoding a putative glutamate decarboxylase with a calmodulin-binding site. *Plant Mol Biol* 27:1143-1151.
- Gayler, K.R., and Morgan, W.R.,** 1976, An NADP-dependent Glutamate Dehydrogenase in Chloroplasts from the Marine Green Alga *Caulerpa simpliciuscula*. *Plant Physiol.* 58, 283-287.
- Gibson, K. M., Christensen, E., Jakobs, C., Fowler, B., Clarke, M. A., Hammersen, G., Raab, K., Kobori, J., Moosa, A., Vollmer, B., Rossier, E., Iafolla, A.K., Matern, D., Brouwer, O.F., Finkelstein, J., Aksu, F., Weber, H-S., Bakkeren, J.A.J.M., Gabreels, F.J.M., Bluestone, D., Barron, T.F., Beauvais, P., Rabier, D., Santos, C., Umansky R., Lehnert, W.,** The clinical phenotype of succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency (4-Hydroxybutyric aciduria): Case reports of 23 new patients, 1997, *Pediatrics* 99, 567–574.
- Goodman, M.M., Stuber, C.A., Newton, K., Weissinger, H.H.,** 1980, Linkage relationships of 19 loci in maize. *Genetics* 96: 697-710.
- Guern, J., Mathieu, Y., Pean, M., Pasquier, C., Beloeil, J., Liallemand, J.,** 1986, Cytoplasmic pH regulation in *Acer pseudoplatanus* cells. I. A 31P NMR description of acid-load effects. *Plant Physiol* 82:840-845.
- Gutierrez-Alcala, G., Gotor, C., Meyer, A. J., Fricker, M., Vega, J. M. & Romero, L. C.,** 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 11108–11113.
- Hao, R., Schmit, J.C.,** 1991, Purification and characterization of glutamate decarboxylase from *Neurospora crassa* conidia, *J. Biol Chem* 266(8): 5135-9.
- Hawksworth, D.L., Pitt, J.I.,** 1983, A new taxonomy for *Monascus* species based on cultural and microscopical characters, *Aust J Bot* 31:51–61.
- Holdaway-Clarke T. L., Hepler, P.K.,** 2003, Control of pollen tube growth: role of ion gradients and fluxes, *New Phytologist* 159: 539-563.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Huang, J., Mei, L.H., Wu, H., Lin, D.Q.,** 2007, Biosynthesis of gamma aminobutyric acid (GABA) using immobilized whole cells of *Lactobacillus brevis*, *World J Microbiol Biotechnol* 23:865–871.
- Inaba, A., Yamamoto, T., Ito, T., Nakamura, R.,** 1980, Changes in the concentrations of free amino acids and soluble nucleotides in attached and detached tomato fruits during ripening. *J Jpn SOC Horti Sci* 49: 435441.
- Jannoey, P., Niamsup, H., Lumyong, S., Suzuki, T., Katayama, T., Chairote, G.,** 2010a, Comparison of gamma-aminobutyric acid production in Thai rice grains. *World J Microbiol Biotechnol.* 26:257–263.
- Johnson, B.S., Singh, N.K., Cherry, J.H., and Locy, R.D.,** 1997, Purification and characterization of glutamate decarboxylase from cowpea, *Phytochemistry* 46: 39-44.
- Jannoey, P., Niamsup, H., Lumyong, S., Tajima, S., Nomura, M., and Chairote, G.,** 2010b, γ -Aminobutyric Acid (GABA) Accumulations in Rice During Germination. *Chiang Mai J. Sci.* 37(1) : 124-133.
- Kathiresan, A., Tung, P., Chinnappa, C.C., and Reid, D. M.,** 1997, γ -Aminobutyric acid stimulates ethylene biosynthesis in Sunflower. *Plant Physiol.* 11 5: 129-135.
- Khuhawar, M.Y., Rajper, A.D.,** 2003, Liquid chromatographic determination of gamma-aminobutyric acid in cerebrospinal fluid using 2-hydroxynaphthaldehyde as derivatizing reagent. *J. Chrom.* 788: 413-418.
- Kim, Y.K., Xu, H., Park, N.I., Boo, H.O., Lee, S.Y., and Park, S.U.,** 2009, Amino acid and GABA content in different cultivars of *Momordica charantia*. L. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 3(11), pp. 897-900.
- Kinnersley, A.M., Turano, F.J.,** 2000, γ -Aminobutyric acid (GABA) and plant responses to stress. *Crit. Rev. Plant Sci.* 19, 479–509.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Komatsuzaki, N., Tsukahara, K., Toyoshima, H., Suzuki, T., Shimizu, N., Kimura, T.,** 2007, Effect of soaking and gaseous treatment on GABA content in germinated brown rice *J Food Microbiol* 78:556–560.
- Kono, I., Himeno, K.,** 2000, Change in gamma-aminobutyric acid content during beni-koji making., *Biosci Biotechnol Biochem* 64:617–619.
- Kowalski, A., Rebas, E., Zyliska, L.,** 2007, Gamma-aminobutyric acid metabolism and its disorders, *Postepy Biochem.* 53: 356-360.
- Kretovich, W. L., Eustigneeva, Z.G., AND Tomova, N.G.,** 1970, Effect of nitrogen source on glutamate dehydrogenase and alanine dehydrogenase of *Chlorella*, *Can. J. Bot.* 48: 1179-1183.
- Lam, H. M., Chiu, J., Hsieh, M.H., Meisel L., Oliveira I.C., Shin M., and Cooruzzi G.,** 1998, Glutamate receptor genes in plants. *Nature* 396:125–126.
- Lange, D.L., Kader, A.A.,** 1997, Elevated carbon dioxide exposure alters intracellular pH and energy charge in avocado fruit tissue. *J.Am.Soc. Hortic. Sci.* 122, 253–257.
- Larher, F., Goas, G., Le Ruddier, D., Gerard, J., Hamelin, J.,** 1983, Bound 4-aminobutyric acid in root nodules of *Medicago sativa* and other nitrogen fixing plants. *Plant Sci Lett* 29: 315-326.
- Ling, V., Snedden, W.A., Shelp, B.J., Assman, S.M.,** 1994. Analysis of a soluble calmodulin binding protein from fava bean roots: identification of glutamate decarboxylase as a calmodulin-activated enzyme. *Plant Cell* 6: 1135-1143.
- Ma, H,** 1994, GTP-binding regulatory proteins in plants: New members of an old family. *Plant Mol. Biol.* 26, 1611-1636.
- Ma, H.,** 2003, Plant Reproduction: GABA Gradient, Guidance and Growth. *Current Biology*, Vol. 13, R834–R836.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- MacGregor, K.B., Shelp, B.J., Peiris, S., Bown, A.W.,** 2003, Overexpression of glutamate decarboxylase in transgenic tobacco plants deters feeding by phytophagous insect larvae, *Journal of Chemical Ecology*, 29:2177-2182.
- Makino, Y., Soga, N., Oshita, S., Kawagoe, Y., Tanaka, A.,** 2008, Stimulation of gamma-aminobutyric acid production in vine-ripe tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruits under modified atmospheres, *J. Agric. Food Chem.* 56, 7189–7193.
- Mascarenhas, J.P.,** 1993, Molecular mechanisms of pollen tube growth and differentiation, *Plant Cell* 5, 1303-1314.
- Mathieu, Y., Guern, J., Pean, M., Pasquier, C., Beloeil, J., Lallemand, Y.,** 1986, Cyttoplasmic pH regulation in *Acer pseudoplatanus* cells. 11. Possible mechanisms involved in pH regulation during acid load, *Plant Physiol.* 82 846-852.
- Matsumoto, T., Yamaura, I., and Funatsu, M.,** 1986, Purification and Properties of Glutamate Decarboxylase from Squash, *Agric. Biol. Chem.*, 50 (6) 1413-1417.
- Matsumoto, T., Yamaura, I., Funatsu, M.,** 1990, *Agric. Biol. Chem.* 54. 3001.
- Matsumoto, T., Yamaura, I., Funatsu, M.,** 1996, *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 60. 889.
- Mayer, A.M., and Poljakoff-Mayber, A.,** 1982, Metabolism of Germinating Seeds; in Wheaton, A. and Exeter Co. Ltd., 3rd ed., The germination of seed, Great Britain: Pergamon Press Ltd. pp. 85-130.
- Mayer, R., Cherry, J., Rhodes, D.,** 1990, Effect of heat shock on amino acid metabolism of cowpea cells. *Plant Physiol* 94: 7964310.
- McKenzie, E.A., Copeland, L., Lees, E.M.,** 1981, Glutamate dehydrogenase activity in developing soybean seed: kinetic properties of three forms of the enzyme, *Arch Biochem Biophys* 212: 298-305.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- McKenzie, E.A., Lees, E.M.,** 1981, Glutamate dehydrogenase activity in developing soybean seed: isolation and characterization of three forms of the enzyme. *Arch Biochem Biophys* 212: 290-297.
- McLean, M.D., Yevtushenko, D.P., Deschene, A., Cauwenberghe, O.R.V., Makhmoudova, A., Potter, J.W., Bown, A.W., Shelp, B.J.,** 2003, Overexpression of glutamate decarboxylase in transgenic tobacco plants confers resistance to the northern rootknot insect larvae, *J. Chem. Ecol.* 29, 2177-2182.
- Medina-Kauwe, L.K. Tobin, A.J., De Meirleir, D., Jaeken, J., Jakobs, C., Nyhan, W.L., Gibson, K.M.,** 1999, 4-Aminobutyrate aminotransferase (GABA-transaminase) deficiency, *J. Inherit. Metab. Dis.* 22, 414–427.
- Menegus, F., Cattaruzza, L., Chersi, A., Fronza, G.,** 1989, Differences in the anaerobic lactate-succinate production and in the changes of cell sap pH for plants with high and low resistance to anoxia, *Plant Physiol:* 90 29-32.
- Metzer, E., Halpern, Y.S.,** 1990, In vivo cloning and characterization of the gabCTDP gene cluster of *Escherichia coli* K-12, *J Bacteriol* 172: 3250–3256.
- Meyer, A., Eskandari, S., Grallath, S., Rentsch, D.,** 2006, AtGAT1, a high affinity transporter for g-aminobutyric acid in *Arabidopsis thaliana*, *J Biol Chem* 281: 7197–7204.
- Miyashita, Y., and Good, A.G.,** 2007, Contribution of the GABA shunt to hypoxia-induced alanine accumulation in roots of *Arabidopsis thaliana*, *Plant and Cell Physiology Advance Access published*. Published by Oxford University Press on behalf of Japanese Society of Plant Physiologists.
- Miyashita, Y., and Good, A. G.,** 2008, Contribution of the GABA shunt to hypoxia induced alanine accumulation in roots of *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell Physiol.* 49, 92-102.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Miyashita, Y., Diferus, R., Ismond, K.P., and Good, A.G.,** 2007, Alanine aminotransferase catalyses the breakdown of alanine after hypoxia in *Arabidopsis thaliana*, *Plant J.* 49: 1108- 1121.
- Nagaoka, H.,** 2005, Treatment of Germinated Wheat to Increase Levels of GABA and IP6 Catalyzed by Endogenous Enzymes, *Biotechnol. Prog.*, 21: 405-410.
- Naylor, A. W., and Tolbert N.E.,** 1956, Glutamic acid metabolism in green and etiolated barley leaves, *Physiol. Plant.* 9: 220-229.
- Nomura, M., Kimoto, T., Someya, Y., Frukawa, S., Suzuki, I.,** 1998, Production of gamma aminobutyric acid by cheese starters during cheese ripening, *J Dairy Sci* 81:1486–1491.
- Nunes-Nesi, A., Sweetlove, L. J., and Fernie, A. R.,** 2007, Operation and function of the tricarboxylic acid cycle in the illuminated leaf. *Physiol. Plant.* 129, 45–56.
- Oh, S.H., and Choi, W.G.,** 2001, Changes in the Levels of Gamma-Aminobutyric Acid and Glutamate Decarboxylase in Developing Soybean Seedlings, *J. Plant research.*, 114: 309-313.
- Oh, C.H., and Oh, S.H.,** 2004, Effects of Germinated Brown Rice Extracts with Enhanced Levels of GABA on Cancer Cell Proliferation and Apoptosis, *J. Med Food.* 7(1): 19-23.
- Ohtsubo, K., Suzuki, K., Yasui, Y., and Kasumi, T.,** 2005, Bio-Functional Components in the Processed Pre-Germinated Brown Rice by a Twin-Screw Extruder, *J Food Compost Anal*, 18: 303-316.
- Okunuki, K.,** 1937, Uber ein neues enzym glutaminocarboxylase, *Bot Mag Tokyo* 51, 270-278.
- Oliver, R.P., Solomon, P.S.,** 2004, Does the oxidative stress used by plants for defence provide a source of nutrients for pathogenic fungi?, *Trends Plant Sci* 9: 472–473.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Palanivelu, R., Brass, L., Edlund, A.F., Preuss, D.,** 2003, Pollen tube growth and guidance is regulated by POP2, an Arabidopsis gene that controls GABA levels, *Cell* 114, 47–59.
- Park, K.B., Oh, S.H.,** 2006, Enhancement of gamma-aminobutyric acid production in chungkukjang by applying a *Bacillus subtilis* strain expressing glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis*, *Biotechnol Lett* 28:1459–1463.
- Pereira da Silva-Jr., A. H., Francisco de Paula, M., Brasileiro, B.T.R.V., and Antonio de Moraes- Jr, M.,** 2006, The use of the GDH gene for molecular identification and phylogenetic analysis of the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 22:959–965.
- Pryor, A.J.,** 1979, Mapping of glutamate dehydrogenase (*Gdh*) on chromosome 1, 20.1 recombination units distal to *Adhl* Maize, *Genetics Cooperative News Letter* 53: 25-26.
- Ramputh, A., Bown, A.,** 1996, Rapid γ -aminobutyric acid synthesis and the inhibition of the growth and development of obliquebanded leaf-roller larvae., *Plant Physiol* 111: 1349-1352.
- Reggiani, R., Cantu, C.A., Brimbilla, I., Bertani, A.,** 1988, Accumulation and interconversion of amino acids in rice roots under anoxia, *Plant Cell Physiol* 29: 981-987.
- Reggiani, R., Nebuloni, M., Mattana, M. and Brambilla, I.,** 2000, Anaerobic accumulation of amino acids in rice roots: role of the glutamine synthetase/glutamate synthase cycle, *Amino acids*. 18: 207-217.
- Ricoult, C., Cliquet, J-B. and Limami, A.M.,** 2005, Stimulation of alanine amino transferase (*AlaAT*) gene expression and alanine accumulation in embryo axis of the model legume *Medicago truncatula* contribute to anoxia stress tolerance, *Physiol Plant*. 123: 30-39.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Roberts, J. K. M., Hooks, M. A., Miaullis, A. P., Edwards, S. and Webster, C.**, 1992, Contribution of malate and amino acid metabolism to cytoplasmic pH regulation in hypoxic maize root tips studied using nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Plant Physiol.* **98**, 480–487.
- Rolin, D., Baldet, P., Just, D., Chevalier, C., Biran, M., Raymond, P.**, 2000, NMR study of low subcellular pH during the development of cherry tomato fruit., *Aust. J. Plant Physiol.* **27**, 61–69.
- Rothan, C., Duret, S., Chevalier, C., Raymond, P.**, 1997, Suppression of ripening associated gene expression in tomato fruits subjected to a high CO₂ concentration, *Plant Physiol.* **114**, 255–263.
- Saito, T., Matsukura, Sugiyama, C., Watahiki M., Ohshima A., Iijima, I., Konishi Y., Fujii C., Inai T., Fukuda S., Nishimura N., Ezura, S. H.**, 2008, Screening for γ -aminobutyric acid (GABA)-rich tomato varieties. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* **77**, 242–250.
- Sakakibara, H., Fujii, K., Sugiyama, T.**, 1995, Isolation and characterization of a cDNA that encodes maize glutamate dehydrogenase, *Plant Cell Physiol* **36**: 789-797.
- Sanders, D., Pelloux, J., Brownlee, C., Harper, J.F.**, 2002, Calcium at the crossroads of signaling, *Plant Cell* **14**, S401–S417.
- Sarto-Jackson, I., Sieghart, W.**, 2008, Assembly of GABA-A receptors, *Mol. Membr. Biol.* **25**:302-310.
- Sato, T., Harada, T., and Ishizawa, K.**, 2002, Stimulation of glycolysis in anaerobic elongation of pondweed (*Potamogeton distinctus*) turions, *J Exp Bot.* **53**: 1847-1856.
- Satyanarayan, V., Nair, P.M.**, 1990, Metabolism, enzymology and possible roles of 4- aminobutyrate in higher plants., *Phytochemistry*, **29**:367-375.
- Schousboe, A., Waagepetersen, H.S.**, 2007, GABA: homeostatic and pharmacological aspects, *Prog. Brain Res.* **160**:9-19.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Scott-Taggart, C.P., Cauwenberghe, V.O.R., McLean, M.D., Shelp, B.J.,** 1999, Regulation of gama-aminobutyric acid synthesis in situ by glutamate availability, *Physiologia Plantarum*, 106:363-369.
- Shelp, B.J., Bown, A.W., and Faure, D.,** 2006, Extracellular g-Aminobutyrate Mediates Communication between Plants and Other Organisms. *Plant Physiology*, Vol. 142, pp. 1350–1352.
- Shelp, B.J., Walton, C.S., Snedden, W.A., Tuin, L.G., Oresnik, I.J., Layzell, D.B.** 1995, Gaba shunt in developing soybean seeds is associated with hypoxia, *Physiol Plant* 94: 219-228.
- Shelp, B.J., Bown, A.W., McLean, M.D.,** 1999, Metabolism and functions of gamma aminobutyric acid. *Trends Plant Sci.* 4, 446–452.
- Shukuya, R., Schwert, G.W.,** 1960, Glutamic acid decarboxylase. I. Isolation procedures and properties of the enzyme, *J Biol Chem.* 235:1649–1652.
- Siriphanich, J., Kader, A.A.,** 1986, Changes in cytoplasmic and vacuolar pH in harvested lettuce tissue as influenced by CO₂, *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 111, 73–77.
- Snedden, W.A., Chung, I., Pauls, R.H., Bown, A.W.** 1992, Proton/L-glutamate symport and the regulation of intracellular pH in isolated mesophyll cells, *Plant Physiol.* 99: 665-671.
- Snedden, W.A., Koutsia, N., Baum, G., Fromm, H.,** 1996, Activation of a recombinant petunia glutamate decarboxylase by calcium/calmodulin or by a monoclonal antibody which recognizes the calmodulin binding domain, *J Biol Chem* 271: 4148-4153.
- Snedden, W.A., and Fromm, H.,** 1999, Regulation of the gamma-aminobutyrate-synthesizing enzyme, glutamate decarboxylase, by calcium–calmodulin: a mechanism for rapid activation in response to stress. In *Plant Responses to Environmental Stresses: From Phytohormones to Genome Reorganization* (Lerner, H.R., ed.), pp. 549–574, Marcel Dekker.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Solomon, P.S., Oliver, R.P.**, 2001, The nitrogen content of the tomato leaf apoplast increases during infection by *Cladosporium fulvum*, *Planta* 213: 241–249.
- Sprengel, R., and Seeburg, P.H.**, 1995, Iontropic glutamate receptors. Pp. 213–263 in R. A. NORTH, eds. Handbook of receptors and channels: ligand- and voltage-gated ion channels. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Steward, F.C., Thompson, J.F., Dent, C.E.**, 1949, γ -Aminobutyric acid: a constituent of potato tubers? *Science* 110:439-440.
- Strausbauch, P.H., and Fisher, E.H.**, 1970, Structure of the binding site of pyridoxal 5'-phosphate to *Escherichia coli* glutamate decarboxylase, *Biochemistry* 9, 226.
- Streeter, J.G., and Thompson, J.F.**, 1972, In Vivo and In Vitro Studies on γ -Aminobutyric Acid Metabolism with the Radish Plant (*Raphanus sativus* L.), *Plant Physiol.* 49, 579-584.
- Studart-Guimaraes, A., Fait, A., Nunes-Nesi, A., Carrari, F., Usadel, B. and Fernie, A. R.**, 2007, Reduced expression of succinyl-coenzyme A ligase can be compensated for by up-regulation of the γ -aminobutyrate shunt in illuminated leaves, *Plant Physiol.* 145, 626–639.
- Su, Y.C., Wang, J. J., Lin, T. T. Pan T.M.**, 2003, Production of the secondary metabolites gamma-aminobutyric acid and monacolin K by *Monascus*, *J Ind Microbiol Biotechnol* 30:41–46.
- Sukhareva, B. S., and Mamaeva, O. K.**, 2002, Glutamate Decarboxylase: Computer Studies of Enzyme Evolution, *Biochemistry (Moscow)*, Vol. 67, No. 10 pp. 1180-1188.
- Talibi, D., Grenson M., and Andre, B.**, 1995, Cis- and trans-acting elements determining induction of the genes of the gamma-aminobutyrate (GABA) utilization pathway in *Saccharomyces cerevisiae*, *Nucleic Acids Res.* 23:550-557.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tillakaratne, N.J., Medina-Kauwe, L., Gibson, K.M.,** 1995, Gamma aminobutyric acid (GABA) metabolism in neural and nonneural tissues, *Comp Biochem Physiol A Physiol* 112:247–263.
- Tsushida, T., Murai, T.,** 1987, Conversion of glutamic acid to γ -aminobutyric acid in tea leaves under anaerobic conditions, *Agric Biol Chem* 51: 2805-2871.
- Tuin, L.G., Shelp, B.J.,** 1996, *In situ* [14C] glutamate metabolism by developing soybean cotyledons. The importance of glutamate decarboxylation, *J Plant Physiol* 147: 714-720.
- Turano, F.J., Dashner, R., Upadhyaya, A., and Caldwell, C.R.,** 1996, Purification of Mitochondrial Glutamate Dehydrogenase from Dark-Grown Soybean Seedlings, *Plant Physiol.* 11 2: 1357-1 364.
- Ueno, H.,** 2000, Enzymatic and structural aspect on glutamate decarboxylase, *J Mol Catal B* 10:67–79.
- Ueno, S., Shigematsu, T., Watanabe, T., Nakajima, K., Murakami, M., Hayashi, M., and Fujii, T.,** 2010, Generation of Free Amino Acids and γ -Aminobutyric Acid in Water-Soaked Soybean by High-Hydrostatic Pressure Processing., *J. Agric. Food Chem.*, 58, 1208–1213.
- Varayanond, W., Tungtrakul, P., Surojanametakul, V., Watanasiritham, L., Wang, L.,** 2005, Effect of water soaking on gamma-aminobutyric acid (GABA) in germ of different Thai rice varieties, *J Kasetsart (Nat. Sci)* 39:411–415.
- Visser, S., Andre, B., Muyldermans, F., and Grenson, M.,** 1990, Induction of 4-aminobutyrate and urea catabolic pathways in *Saccharomyces cerevisiae*: specific and common transcriptional regulators, *Eur.J. Biochem* 187:611-616.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wallace, W., Secor, J., Schrader, L.E.**, 1984, Rapid accumulation of 4-aminobutyric acid and alanine in soybean leaves in response to an abrupt transfer to lower temperature, darkness, or mechanical manipulation. *Plant Physiol*, 75 170-175.
- Wang, J.J., Lee C.L., Pan, T.M.**, 2003, Improvement of monacolin K, gamma-aminobutyric acid and citrinin production ratio as a function of environmental conditions of *Monascus purpureus* NTU 601, *J Ind Microbiol Biotechnol* 30:669–676.
- Watanabe, M., Maemura, K., Kanbara, K., Tamayama, T. and Hayasaki, H.**, 2002, GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs, *Int. Rev. Cytol.* 213, 1-47.
- Wheeler, R.M., Mackowiak, C.L., Stutte, G.W., Yorio, N.C., Berry, W.L.**, 1997, Effect of elevated carbon dioxide on nutritional quality of tomato, *Adv. Space Res.* 20, 1975–1978.
- Wiskich, J.T.**, 1980, Control of the Krebs cycle. In DD Davis, ed, *The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise, Vol 2, Metabolism and Respiration*. Academic Press, Toronto, pp 243-278.
- Wu, J.-Y., Matsuda, T., and Roberts, E.**, 1973, Purification and characterization of glutamic acid decarboxylase from mouse brain, *J. Biol. Chem.* 248: 3029-3034.
- Xing, S.G., Jun, Y.B., Hau, Z.W. Liang, L.Y.**, 2007, Higher accumulation of gamma-aminobutyric acid induced by salt stress through stimulating the activity of diamine oxidase in *Glycine max (L.) Merr.* roots, *J Ind Microbiol Biotechnol* 45:560–566.
- Yang, Z.**, 2003, GABA, a New Player in the Plant Mating Game. *Developmental Cell*, Vol. 5, 185–192.
- Yu, G., Liang, J., He, Z., Sun, M.**, 2006, Quantum dot-mediated detection of γ -aminobutyric acid binding sites on the surface of living pollen protoplasts in tobacco. *Chem Biol* 13: 723–731.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Yuan, T., and Vogel, H. J., 1998, Calcium-Calmodulin-induced Dimerization of the Carboxyl-terminal Domain from Petunia Glutamate Decarboxylase. A novel calmodulin-peptide interaction motif, *J. Biol. Chem.* 273, 30328–30335.

Zhang, S.J., Jackson, M.B., 1993, GABA-activated chloride channels in secretory nerve endings. *Science* 259 531-534.

ÖZGEÇMİŞ

14.01.1984 yılında İzmir'de doğan Seher Yolcu 2002 yılında Narlıdere Mehmet Seyfi Eraltay Lisesi'nden birincilikle mezun olmuştur. 2002-2006 yılları arasında Ege Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nde eğitimini Bölüm İkincisi olarak tamamladıktan sonra Ege Üniversitesi Genel Biyoloji Anabilim Dalı'nda Prof.Dr. Filiz Özdemir danışmanlığında yüksek lisansa başlamıştır. 2008-2009 eğitim öğretim yılında Japonya-Kumamoto Üniversitesi Öğrenci Değişim Programı (1 yıl) JASSO bursunu kazanmıştır. Kumamoto Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik laboratuvarında Prof. Dr. Susumu Takio danışmanlığında '*Suaeda maritima* Halofitinin Filogenetik Analizi' başlıklı projede görev almıştır. Seher Yolcu halen yüksek lisans öğrenimine devam etmektedir.