



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN NİVERSİTESİ FEN
BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİNE
MARUZ BIRAKILAN *ARABIDOPSIS
THALIANA*'DA DIŞARIDAN UYGULANAN
KURKUMİNİN ANTİOKSİDAN
ENZİM/İZOZİM PROFİLLEMESİ ÜZERİNE
ETKİLERİ**

Merve YALÇINKAYA (CANKURT)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Ocak-2021
KONYA
Her Hakkı Saklıdır**

TEZ KABUL VE ONAYI

Merve YALÇINKAYA (CANKURT) tarafından hazırlanan “Endoplazmik Retikulum Stresine Maruz Bırakılan *Arabidopsis thaliana*’da Dışarıdan Uygulanan Kurkuminin Antioksidan Enzim/İzozim Profillemesi Üzerine Etkileri” adlı tez çalışması 26/01/2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan

Prof. Dr. Evren YILDIZTUGAY

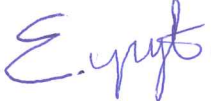
Danışman

Doç. Dr. Ceyda ÖZFİDAN KONAKÇI

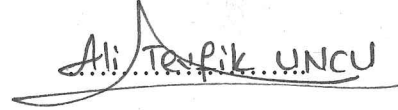
Üye

Dr. Öğr. Üyesi Ali Tefik UNCU

İmza


.....


.....


.....

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun/.../20.. gün ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. S. Savaş DURDURAN
FBE Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Merve YALÇINKAYA (CANKURT)

26/01/2021

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİNE MARUZ BIRAKILAN *ARABIDOPSIS THALIANA*'DA DIŞARIDAN UYGULANAN KURKUMİNİN ANTIOKSİDAN ENZİM/İZOZİM PROFİLLEMESİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Merve YALÇINKAYA (CANKURT)

Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ceyda ÖZFİDAN KONAKÇI

2021, 91 Sayfa

Doç Dr. Ceyda ÖZFİDAN KONAKÇI
Prof. Dr. Evren YILDIZTUGAY
Dr. Öğr. Üyesi Ali Tefvik UNCU

Endoplazmik retikulum (ER) stresi, bitki biyologları için oldukça önemlidir ve ER stresi, yanlış katlanmış proteinler tarafından aktive edilir. ER stresi bitkilerde hasarı tetikler ve ER ile muamele edilmiş bitkiler farklı savunma mekanizmalarını harekete geçirir. Bitki ikincil metabolizması doğrudan bitki iletişimi ve abiyotik streslere karşı savunma ile ilişkilidir. Kurkumin (Cur, ((1E, 6E) -1,7-bis (4-hidroksi3-metoksifenil)-1,6-heptadien-3,5-dion), süperoksit anyon ve hidroksil radikali gibi lipid peroksidasyonunu tetikleyen reaktif oksijen radikalleri (ROS) üzerinde süpürücü etkiye sahiptir. Kurkuminin bu antioksidan kapasitesi nedeniyle önemi son yıllarda artmıştır. Ancak ER stresine maruz kalan bitkilerde dışarıdan uygulanan kurkuminin etkileri hakkında bilgi bulunmamaktadır. Kurkuminin potansiyel olumlu cevaplarını göstermek için, farklı Cur konsantrasyonları (1 ve 10 μ M), tunikamisin ile uyarılmış ER stresine maruz kalan *Arabidopsis thaliana*'ya uygulandı. ER stresi, *Arabidopsis*'te bitki yaş ağırlığı, büyüme ve su içeriğinde ciddi düzeylerde azalmalara neden olmuştur. Diğer yandan dışarıdan uygulanan kurkuminin her iki konsantrasyonu da bu parametrelerdeki iyileşmeyi sağlamıştır. Bir ozmotik düzenleyici olarak rol alan prolin miktarı hem stres hem de stres ve kurkumin uygulamalarında artmıştır. ER stresi *Arabidopsis* fidelerinde SOD aktivitesini artırmıştır. Artan enzim aktivitesine bağlı olarak H_2O_2 miktarı artmıştır. *Arabidopsis*'te stres ile oluşturulan H_2O_2 miktarı, CAT, POX ve APX ile süpürülmeye çalışılmış, ancak yeterli düzeyde enzim aktivite olmadığından H_2O_2 miktarı azalmamış ve lipid peroksidasyonu (TBARS miktarı) artmıştır. Kurkumin stres ile birlikte uygulandığında ise SOD ve POX (sadece 10 μ M Cur ile) aktiviteleri artmıştır. Yüksek miktarda uygulanan kurkumin, H_2O_2 miktarını POX ile düşük düzeydeki kurkumin (1 μ M Cur) ise CAT, POX ya da APX dışındaki diğer antioksidan enzimlerince H_2O_2 'yi elimine etmiş olabilir. Her iki konsantrasyondaki kurkumin uygulaması, lipid peroksidasyonu azaltarak ER stresinin hasarını ortadan kaldırmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Arabidopsis thaliana*, Antioksidan enzim sistemi, Endoplazmik retikulum, Kurkumin, Tunikamisin

ABSTRACT

MS THESIS

THE EFFECTS ON ANTIOXIDANT ENZYME/ISOZYME PROFILING OF EXOGENOUS APPLICATION OF CURCUMIN IN *ARABIDOPSIS THALIANA* EXPOSED TO ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS

Merve YALCINKAYA (CANKURT)

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY THE DEGREE OF MASTER OF
SCIENCE

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Ceyda OZFIDAN KONAKCI

2021, 91 Pages

Assoc. Prof. Dr. Ceyda OZFIDAN KONAKCI

Prof. Dr. Evren YILDIZTUGAY

Assist. Prof. Dr. Ali Tevifk UNCU

Endoplasmic reticulum (ER) stress is of considerable interest to plant biologists and ER stress is activated by misfolded proteins. ER stress trigger the damages in plants and ER-treated plants activate the different defense mechanisms. Plant secondary metabolism is directly associated to plant communication and defenses to abiotic stresses. Curcumin (Cur, ((1E, 6E) -1,7-bis (4-hydroxy-3-methoxyphenyl) -1,6heptadiene-3,5-dione) has a scavenging effect on reactive oxygen radicals (ROS) such as superoxide anion, hydroxyl radical that trigger lipid peroxidation. Due to this antioxidant capacity of curcumin, its importance has increased in recent years. However, there is no information about the impacts of exogenously applied curcumin in ER-stress-exposed plants. To reveal the potential positive responses of curcumin, the different Cur concentrations (1 and 10 μM) were applied to *Arabidopsis thaliana* exposed to tunicamycin-induced ER stress. ER stress caused severe reductions in plant wet weight, growth and water content in *Arabidopsis*. On the other hand, both concentrations of curcumin applied externally provided improvement in these parameters. The amount of proline acting as an osmotic regulator increased in both stress and stress plus curcumin applications. ER stress increased SOD activity in *Arabidopsis* seedlings. The amount of H_2O_2 increased due to the increased enzyme activity. In *Arabidopsis*, H_2O_2 content, which occurred with stress, was tried to be scavenge with CAT, POX and APX, which accumulated with stress, but the amount of H_2O_2 did not decrease due to insufficient enzyme activity and lipid peroxidation (TBARS amount) increased. When curcumin was applied with stress, SOD and POX (with only 10 μM Cur) activities increased. High amount of curcumin (10 μM Cur) was eliminated H_2O_2 content by POX and low-level curcumin (1 μM Cur) was removed by other antioxidant enzymes other than CAT, POX or APX. Curcumin applications in both concentrations were able to eliminate the damage of ER stress by reducing lipid peroxidation.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, Antioxidant enzyme system, Curcumin, Endoplasmic reticulum, Tunicamycin

ÖNSÖZ

Bitkilerde büyük verim kayıplarına sebep olan biyotik ve abiyotik stres koşullarına toleransın/dayanıklılığın artırılması büyük önem taşımaktadır. Stres koşullarına dayanıklılıkta rol alan mekanizmaların belirlenmesi; strese toleransın artırılmasında, dayanıklı çeşit geliştirilmesinde, dayanıklı transgenik bitki elde edilmesinde, genetik düzeyde spesifik seleksiyona imkân sağlayacaktır. Endoplazmik retikulum (ER), bitkinin bağışıklık sistemini kontrol eden mekanizmadır ve stres durumunda bitkinin hızlı ve etkili bağışıklık tepkisi vermesi için hayati önem taşımaktadır.

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca desteklerini eksik etmeyen ve başarılarıma ön ayak olan, her konuda ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile örnek edindiğim değerli hocam sayın Doç. Dr. Ceyda ÖZFİDAN KONAKÇI'ya sonsuz ve içten teşekkürlerimi sunarım. Tezim hakkında değerli görüşlerinden yararlandığım ikinci danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Rengin ÖZGÜR UZİLDAY'a, tezimde yer alan denemelerin kurulması ve analiz süreçlerimde destek olan Dr. Öğr. Üyesi Barış UZİLDAY'a ve kimyasal temini konusunda desteklerinden dolayı Prof. Dr. Evren YILDIZTUGAY'a saygı ve şükranlarımı sunarım.

Hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini eksik etmeyen annem Sebahat YALÇINKAYA, ağabeylerim Abdulkadir ve Ramazan YALÇINKAYA ile sevgili eşim Fatih CANKURT' a bana inandıkları ve güvendikleri için teşekkür ederim.

Merve YALÇINKAYA (CANKURT)
KONYA-2021

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	4
2.1. Bitkilerde ER stresi	5
2.2. Protein Katlanma Yolağı	6
2.3. ER kalite kontrol sistemi (ERQC)	8
2.4. ER İlişkili Parçalanma (ERAD).....	9
2.5. Katlanmamış Protein Yanıtı (UPR)	9
2.6. Bitki Hücrelerinde Oksidatif Protein Katlanması	15
2.7. ER stresiyle birlikte radikal oluşumu ve oksidatif stres	16
2.8. Organel bazında ROS oluşumları	18
2.9. ROS oluşumlarına karşı savunma sistemi: Antioksidan mekanizma	21
2.9.1. Süperoksit dismutaz	21
2.9.2. Katalaz	22
2.9.3. Askorbat-glutatyon döngüsüyle ilişkili enzimatik/enzimatik olmayan moleküller	23
2.10. Bitki Materyali: <i>Arabidopsis thaliana</i>	25
2.11. Flavanoidler ve Kurkumin	27
3. MATERYAL VE YÖNTEM	34
3.1. Tohumların temini ve sterilizasyonu	34
3.2. Deneme Dizaynı	34
3.3. Kısmi büyüme oranı (RGR).....	36
3.4. Bağıl Su içeriğı (RWC).....	36
3.5. Enzim ve İzozim tayinleri için örneklerin homojenizasyonu	37
3.5.1. Süperoksit dismutaz izozim/enzim tayini	37
3.5.2. Katalaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	37
3.5.3. Peroksidaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	38
3.5.4. Askorbat peroksidaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	38
3.6. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) miktarının belirlenmesi	38
3.6.1. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) miktarının belirlenmesi	38
3.7. Lipit Peroksidasyonun Belirlenmesi	39
3.8. Prolin Miktarının Belirlenmesi	39
3.9. Total protein miktarının belirlenmesi	39

3.10. İstatistiksel Analizler	40
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	41
4.1. ER stresi ve/veya kurkumin gruplarında kısmi büyüme oranında oluşan değişimler.....	41
4.2. ER stresi ve/veya kurkumin gruplarında bağıl su içeriğinde oluşan değişimler..	45
4.3. ER stresi ve/veya kurkumin gruplarında antioksidan enzim/izozim sisteminde oluşan değişimler	46
4.3.3. ER stresi ve/veya kurkumin gruplarında total POX enzim/izozim aktivitesinde oluşan değişimler	50
4.3.4. ER stresi ve/veya kurkumin gruplarında total APX enzim aktivitesinde oluşan değişimler.....	52
4.4. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) miktarının belirlenmesi	53
4.4.1. ER stresi ve/veya kurkumin gruplarında hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) miktarında oluşan değişimler belirlenmesi	53
4.5. Lipit Peroksidasyonun Belirlenmesi	54
4.6. ER stresi ve/veya kurkumin gruplarında prolin içeriğinde oluşan değişimler.....	56
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	57
5.1 Sonuçlar	57
5.2 Öneriler	60
6. KAYNAKLAR	62
YAYINLAR.....	77

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 3.1. Denemede kullanılan gruplar ve tanımları.....	36

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Hücrelerde bulunan endoplazmik retikulum yapısı.....	5
Şekil 2.2. BiP proteini katlanmamış proteinlere bağlanırken enerjiye ihtiyaç duyar.....	7
Şekil 2.3 ER kalite kontrol mekanizması- ERQC.....	8
Şekil 2.4. IRE1 ile transkripsiyonun kontrolü.....	10
Şekil 2.5. Transkripsiyon faktörlerince katlanma basamaklarının kontrolü.....	11
Şekil 2.6. ATF6 ile transkripsiyonun kontrolü.....	12
Şekil 2.7. Transkripsiyon faktörlerince UPR genlerinin ifadesinin artışı.....	14
Şekil 2.8. Hatalı katlanan proteinlerin EDEM ile kontrolü.....	15
Şekil 2.9. Oksidatif protein katlanma yolu (PDI: protein disulfid izomeraz).....	16
Şekil 2.10. Stres koşullarında hücrelerde oluşan radikal türleri.....	17
Şekil 2.11. Stres altında kloroplastlarda ROS oluşumu ve süpürülmesi.....	19
Şekil 2.12. Mitokondrilerde oksijenli solunum esnasında ROS oluşumu.....	20
Şekil 2.13. Hüresel bölmelerde aktive edilen antioksidan sistemler.....	21
Şekil 2.14. Askorbat glutatyon döngüsü.....	24
Şekil 2.15. <i>A. thaliana</i> yabani ekotip columbia.....	25
Şekil 2.16. Flavonoid yapısı.....	27
Şekil 2.17. Kurkumin [(1E,6E)-1,7-bis (4-hidroksi-3-metoksifenil)- 1,6-heptadien-3,5-dion].....	28
Şekil 2.18. <i>Curcuma longa</i> bitkisi ve rizomları.....	29
Şekil 2.19. Kurkuminoidlerin kimyasal yapısı.....	30
Şekil 2.20. Kurkuminin bozunma ürünleri: (A) vanilin, (B) ferulik asit, (C) feruloilmetan, (D) vanillic asit, (E) ferulik aldehit, (F) 4-vinylguaiacol, (G) phidroksibenzaldehit, (H) p-hidroksibenzoik asit.....	30
Şekil 2.21. Kurkuminin hücreler üzerinde biyolojik etkileri.....	31
Şekil 2.22. Kurkuminoid biyosentez yolu.....	32
Şekil 3.1 MS ortamında yetiştirilen <i>Arabidopsis</i> bitkileri.....	34
Şekil 3.2. Ön deneme süresince yapılan deneme grupları.....	35

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.1. Tunikamisin (Tm, 0.15 µg ml ⁻¹) ile uyarılan ER stresine maruz kalan <i>Arabidopsis</i> fidelerinde kurkumin (1Cur; 1 µM ve 10Cur; 10 µM kurkumin) uygulandıktan sonra bitki yaş ağırlıklarında meydana gelen değişimler ve uygulamalara bağlı olarak <i>Arabidopsis</i> fidelerindeki fenotipik değişimler	42
Şekil 4.2. Tunikamisin (Tm, 0.15 µg ml ⁻¹) ile uyarılan ER stresine maruz kalan <i>Arabidopsis</i> fidelerinde kurkumin (1Cur; 1 µM ve 10Cur; µM 10 kurkumin) uygulandıktan sonra kısmi büyüme oranında (RWC) meydana gelen değişimler.....	44
Şekil 4.3. Tunikamisin (Tm, 0.15 µg ml ⁻¹) ile uyarılan ER stresine maruz kalan <i>Arabidopsis</i> fidelerinde kurkumin (1Cur; 1 µM ve 10Cur; 10 µM kurkumin) uygulandıktan sonra bağıl su içeriği (RWC) meydana gelen değişimler.....	45
Şekil 4.4. Tunikamisin (Tm, 0.15 µg ml ⁻¹) ile uyarılan ER stresine maruz kalan <i>Arabidopsis</i> fidelerinde kurkumin (1Cur; 1 µM ve 10Cur; 10 µM kurkumin) uygulandıktan sonra total SOD enzim aktivitesinde ve SOD izozimlerinin farklı tiplerinin bağıl bant yoğunluğunda meydana gelen değişimler.....	47
Şekil 4.5. Tunikamisin (Tm, 0.15 µg ml ⁻¹) ile uyarılan ER stresine maruz kalan <i>Arabidopsis</i> fidelerinde kurkumin (1Cur; 1 µM ve 10Cur; 10 µM kurkumin) uygulandıktan sonra total CAT enzim aktivitesinde ve CAT izozimlerinin farklı tiplerinin bağıl bant yoğunluğunda meydana gelen değişimler.....	49
Şekil 4.6. Tunikamisin (Tm, 0.15 µg ml ⁻¹) ile uyarılan ER stresine maruz kalan <i>Arabidopsis</i> fidelerinde kurkumin (1Cur; 1 µM ve 10Cur; 10 µM kurkumin) uygulandıktan sonra total POX enzim aktivitesinde ve POX izozimlerinin farklı tiplerinin bağıl bant yoğunluğunda meydana gelen değişimler.....	51
Şekil 4.7. Tunikamisin (Tm, 0.15 µg ml ⁻¹) ile uyarılan ER stresine maruz kalan <i>Arabidopsis</i> fidelerinde kurkumin (1Cur; 1 µM ve 10Cur; 10 µM kurkumin) uygulandıktan sonra total APX enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler.....	52
Şekil 4.8. Tunikamisin (Tm, 0.15 µg ml ⁻¹) ile uyarılan ER stresine maruz kalan <i>Arabidopsis</i> fidelerinde kurkumin (1Cur; 1 µM ve 10Cur; 10 µM kurkumin) uygulandıktan sonra H ₂ O ₂ miktarında meydana gelen değişimler.....	53

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.9. Tunikamisin (Tm, 0.15 µg ml ⁻¹) ile uyarılan ER stresine maruz kalan <i>Arabidopsis</i> fidelerinde kurkumin (1Cur; 1 µM ve 10Cur; 10 µM kurkumin) uygulandıktan sonra TBARS miktarında meydana gelen değişimler.....	55
Şekil 4.10. Tunikamisin (Tm, 0.15 µg ml ⁻¹) ile uyarılan ER stresine maruz kalan <i>Arabidopsis</i> fidelerinde kurkumin (1Cur; 1 µM ve 10Cur; 10 µM kurkumin) uygulandıktan sonra prolin miktarında meydana gelen değişimler.....	56

SİMGELER VE KISALTMALAR

Kısaltmalar

APX	Askorbat peroksidaz
AsA	Askorbik asit
CAT	Katalaz
Cur	Kurkumin
DHA	Dehidroaskorbik asit
DHAR	Dehidroaskorbat redüktaz
DTT	Ditiyotreitol
ER	Endoplazmik retikulum
GPX	Glutasyon peroksidaz
GR	Glutasyon redüktaz
GSH	Glutasyon
GSSG	Glutasyon disülfid
GST	Glutasyon S-transferaz
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
MDA	Malondialdehit
MDHA	Monodehidroaskorbik asit
MDHAR	Monodehidroaskorbat redüktaz
NOX	NADPH oksidaz
POX	Peroksidaz
PSI	Fotosistem I
PSII	Fotosistem II
ROS	Reaktif oksijen türleri
RWC	Bağıl su içeriği
SOD	Süperoksit dismutaz
TBARS	Tiyobarbuturik asit reaktif bileşikler
Tm	Tunikamisin

1. GİRİŞ

Genel olarak ökaryotik hücrelerde sentezlenen proteinler, görev yapacağı organelere ya da hücreSEL bölmeye gitmeden önce endoplasmik retikulumda (ER) katlanma mekanizmasına girer ve sonrasında ilgili yere taşınma gerçekleşir. Bu katlanma ve birleşme işlemi ER’de gerçekleşir ve bu olayda şaperonlar rol oynamaktadır. Katlanma basamaklarının yetersiz kaldığı koşullarda, ER’de proteinlerin yanlış katlanması, birikmesi/çökemeleri ER stresine neden olur (Iwata ve Koizumi, 2010).

Bağlı ya da serbest halde görev yapacak proteinler, granüllü ER olarak adlandırılan ER’de bulunan ribozomlarda sentezlenir. Sentezlendikten sonra ER’nin lümeni içerisine taşınır ve burada katlanma mekanizmasına katılır. Bu protein katlanma yolu süresince, çeşitli kalite kontrol sistemleri tarafından işlem her basamakta denetlenir ve yalnızca düzgün katlanan proteinler golgi organeline geçerek orada salgı yolağına devam eder (Hurtley ve Helenius, 1989). Hücre çeperinde bulunan protein bileşenleri, plazma zarını oluşturan proteinler ve vakuollerde bulunan proteinlerin büyük bir bölümü salgı yolağı kaynaklı proteinlerdir (Sanderfoot ve Raikhel, 2003).

Salgı yolağına hedeflenmiş proteinlerin çoğu glikoproteinlerdir ve N-bağlı oligosakkaritlerin eklenmesiyle değişime uğrarlar. Post-translasyonel olarak tanımlanan glikolizasyon, translasyon sonrası değişim olup bu aşama proteinlerin denatürasyonunu ve parçalanmasını engellemektedir. Ayrıca, bu değişim proteinlerin çözünürlüğünü de arttırmaktadır. Katlanma süreci içindeki glikolizasyon, ER içerisindeki kalite kontrol mekanizması için bir tanıma sinyali olarak rol oynar (Liu ve Howell, 2007; Ceriotti, 2011). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda sentetik bazı kimyasalların kullanımıyla birlikte bu basamaklarda engelleme yapılabilmektedir. Tunikamisın (Tm) gibi bazı antibiyotikler, N-glikolizasyonu engeller ve ER stresine neden olur. Dolayısıyla tunikamisın hücredeki ER stresine karşı verilen katlanmamış protein cevabın tetikleyicilerinden birisidir.

ER, redoks potansiyeli bakımından okside bir ortam oluşturabildiğinden, proteinlerin oksidatif katlanması için istenen bir ortam oluşturur. Sitoplazmaya göre, ER’de yüksek yükseltgenmiş glutatyon/indirgenmiş glutatyon (GSSG/GSH) oranı ve daha okside olan glutatyon havuzu bulunmaktadır. Bu koşullar, ER’de disülfid bağ oluşumuna bağlı olarak protein katlanması garanti altına alınamamıştır (Hwang ve ark., 1992). Protein disülfid izomeraz (PDI)-ER oksidoredüktaz 1 (Ero1) sistemi, ER’deki bu oksidatif ortamın sağlanmasında önemli rol oynamaktadır. Ero1, moleküler oksijenin

oksitleme gücü yardımıyla disülfid bağı meydana getirir. Ero1'den çözünebilir disülfid taşıyıcısı olan PDI'ya bu disülfid bağları aktarılır. PDI doğrudan katlanmakta olan proteinlere disülfid bağını aktarabilir. Bu reaksiyonlar sonucunda, Ero1 aktivitesine bağlı her bir disülfid bağı oluşumuyla hidrojen peroksit (H_2O_2) üretilir. Bu nedenle, bu yolda oluşan H_2O_2 'nin sinyal mekanizmalarıyla olan ilişkisi büyük önem kazanmaktadır. Çalışmalarda H_2O_2 başta olmak üzere, reaktif oksijen türlerinin (ROS) bitki hücrelerinde ikincil rollerinin olduğu rapor edilmiştir. Bu moleküllerin yüksek miktarlarının hücrede zararlı etkilerinin yanı sıra düşük düzeylerinde, sinyal molekülü olarak rol aldıkları ortaya konulmuştur. ROS'ların sinyal rolleri aydınlatılmaya başlandıktan sonra hücre içi birtakım mekanizmalarda kilit rol aldıkları izlenmiştir (Jaspers ve Kangasjarvi, 2010). Kuraklık, ağır metal, tuzluluk ve sıcaklık gibi birçok abiyotik stres faktörlerinin, ER'de gerçekleşen proteinlerin düzgün katlanmalarını engellediği rapor edilse de bu azalmanın hücrenin diğer organellerinde ve antioksidan savunma sistemi üzerindeki etkisine ait çok az bilgi bulunmamaktadır (Iwata ve Koizumi, 2005; Liu ve Howell, 2007).

Tekli oksijen (1O_2), süperoksit anyonu ($O_2^{\bullet-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH^{\bullet}) gibi bazı moleküller reaktif oksijen türlerini (ROS) oluşturmaktadır. ROS'lar, proteinler, DNA ve lipitleri oksitleme yeteneğine sahip olduğundan önemli organik moleküller üzerinde hasar oluşturabilmektedir (Apel ve Hirt, 2004). Normal büyüme koşullarında, ROS'lar kloroplast, mitokondri ve peroksizomlar gibi organellerde ya da apoplastta düşük düzeylerde üretilmektedir. Ancak, stres koşullarında birikimleri önemli bir düzeyde artış göstermektedir. ER stresi sonucu oluşan bu ROS birikiminin hasar sonucu hücre ölümüne mi neden olduğu yoksa sinyal mekanizmasını mı tetiklediği bilinmemektedir.

Bitkiler hücre içerisinde oluşan ROS'ların zararını ortadan kaldırmak için çeşitli enzimatik/enzimatik olmayan antioksidanlar üretmektedir. Askorbik asit (AsA), takoferol ve glutatyon (GSH) gibi bazı enzimatik olmayan antioksidanlar ve katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX), peroksiredoksinler (PRX) ve glutatyon peroksidaz (GPX) gibi ROS süpürücü enzimatik antioksidanlar gerek normal metabolizma gerekse stres sırasında ROS'ların elimine edilmesinde görev almaktadır (Mittler ve ark., 2004; Dietz ve ark., 2006).

Bir antioksidan gibi davranan fenoliklerin moleküler yapısı ve hücre içerisindeki görevleri bilimsel çalışmalarda oldukça fazla rapor edilmiştir. Fenoliklerin antioksidan aktivitesi sahip olduğu hidroksil gruplarının varlığına dayanmaktadır. Fenolikler üzerine

yapılan çalışmalar devam ettikçe bitkilerde bulunan sekonder metabolit yapısında olduğu kanıtlanmıştır. Fenolikler taşıdıkları gruplar gereğince lipofilik antioksidan olarak değerlendirilebilir. Fenolikler bu özelliği sayesinde zarin polar yüzüne yakın şekilde yerleşik durumdadır. Bu yerleşmeyle peroksil radikallerini kolayca yakalamasına neden olur ve süpürme aktivitesini daha etkili şekilde kullanmasına yol açar. Diğer yandan, enzimatik olmayan antioksidanlardan biri olan tokoferollerin azalmasını önleyerek savunma mekanizmasında etkili olmaktadır. Literatürde bu moleküllerin antiviral, antialerjik, anti-inflamatuvar etkileri oldukça fazla bahsedilmektedir. Bir fenolik bileşik olan kurkumin, ilk defa Vogel ve Pelletier (1815) tarafından elde edilmiştir. Kurkuminin özellikle anti-kanserojenik etkilerinden bahsedilse de strese karşı savunma yanıtları da önemli rolleri arasındadır. Ancak ER stresine karşı antioksidan savunma cevapları hakkında herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasıyla, kurkuminin bu rollerine ilişkin bilgi girdisi sağlanacaktır.

Bu tez çalışması, iki temel bölümden ana kısımdan oluşmaktadır: (i) uygulanacak tunikamisin miktarı ile oluşturulan ER stresinin *Arabidopsis* fidelerinde hücre içi antioksidan ve ROS birikimi arasındaki ilişkinin belirlenmesi (ii) ER stresi altında uygulanan kurkuminin stres yolunda rol alıp almadığı, antioksidan sistem üzerindeki etkileri ve büyüme ve su ilişkisi yönünden bağlantıların açıklanmasıdır.

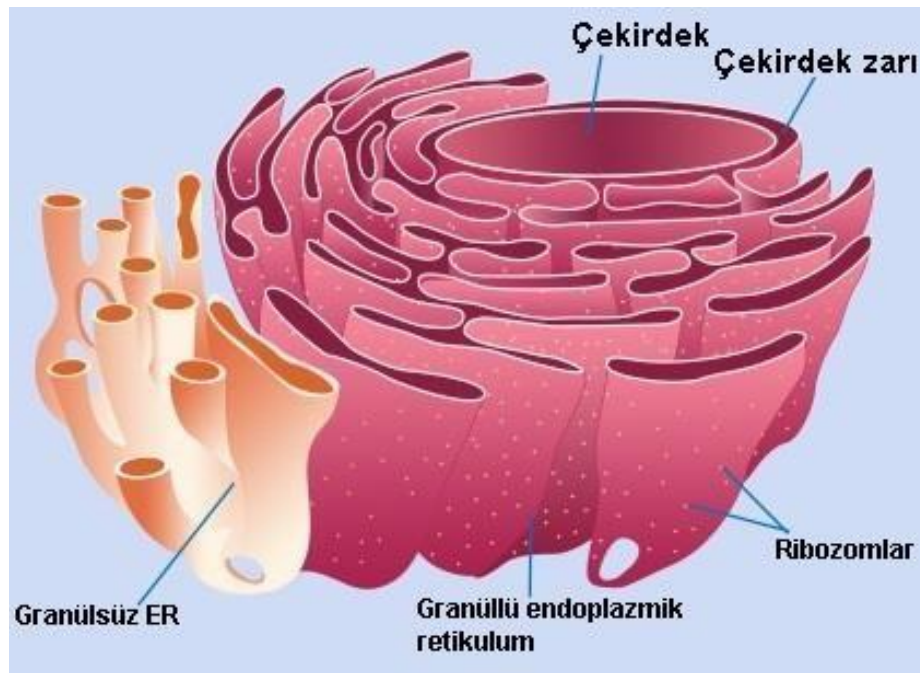
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Endoplazmik retikulum (ER), bazı araştırmacılar tarafından çekirdek etrafında bulunan, hücre hacminin yarısını kaplayabilen, birbirine ağ sistemi ile bağlantılı olan ve ürünlerini veziküllerle sitoplazmaya salan bir organel olarak tanımlanmıştır. ER, genç hücrelerde sisterna yapısından gelişmektedir. ER, tüm ökaryotik canlılarda nükleer zarf ile devamlı olmasına rağmen, memeli hücrelerinde hücre boyunca yer alırken, maya ve bitki hücrelerinde ise ER plazma zarına dağıtılır ve genel olarak kortikal ER olarak tanımlanır. Ökaryotik hücrelerde bulunan ER bitki ve hayvan hücrelerinde farklı bağlantılar oluşturabilir. Hayvanlardaki ER komşu hücreler arasındaki plazmodezma denilen köprülerin varlığı nedeniyle hücrelerin birbirine bağlanmasına izin verir. Diğer yandan, bitkilerde bulunan ER ise hücre içi uzantılarla zar sistemini oluşturur (Howell, 2013).

ER, bitkilerin bağışıklık sistemini kontrol etmektedir ve stres koşulları altında bitkide hızlı ve etkili cevap oluşturulması için çalışmaktadır. ER, bazı sentez ve salınım olaylarına katılmaktadır. Görevleri arasında proteinlerin sentezi, kalsiyum depolanması ve salınımı, proteinlerin translasyon sonrasındaki işleme basamakları, lipid ya da steroid özellikte olan hormonların sentezi ve ilaçların detoksifikasyonu sayılmaktadır. Bu rolleri arasında belki de önemli bir yere sahip olan çeşitli hücresel stres altında algılayıcı olarak görev yapmasıdır. Bu görevi esnasında hızlı transkripsiyonel yanıtlar oluşturur ve transkripsiyon faktörleri ve sinyal proteinlerinin bağlanması için bir zar bağlantı bölgeleri sağlamada iş görür (Kapoor ve Sanyal, 2009). ER, hücrede oluşturduğu kontrol sistemi nedeniyle, doğru olarak katlanmış proteinlerin ER'den çıkmasını tetiklerken, katlanmamış ya da yanlış katlanmış proteinlerin ER içinde tutulmasını ve kontrollü olarak parçalanmasını sağlar. Hücre dışına aktarılacak veya hücre zar yapısına katılacak olan proteinler ER'nin sitoplazmik yüzeyi üzerinde bulunan ribozomlar tarafından ER'nin lümen bölgesine ulaşmaktadır. ER'de sentezlenen proteinler sentez sonrasında, N-bağımlı glikolizasyon, disülfid bağların oluşumu, hidroksilasyon, lipidizasyon gibi translasyon sonrası modifikasyonlara uğrayarak katlanma gösterir. Proteinlerin her bir katlanma basamağının başarılı şekilde olması için protein katlanmasında görev oynayan moleküller bulunmaktadır. Bunlar; Grp78 ve Grp94 gibi moleküler şaperonlar, kalneksin ve kalretikulin gibi lektin benzeri proteinler ve foldazlardır (Körner ve ark., 2015).

ER, iki alt sınıfa ayrılmaktadır: granüllü ER ve granülsüz ER (Şekil 2.1). Granüllü ER'de ribozom bol miktarda bulunurken, granülsüz ER'de az miktarda ribozom

içermektedir. Granüllü ER'den daha kompleks olan granülsüz ER özellikle steroid sentezinin ve hayvanlarda ilaç toksisitesinin azaltıldığı karaciğer gibi bazı hücrelerde sayıca daha fazla bulunmaktadır. Aynı zamanda kas hücrelerinde bulunan granülsüz ER yapısında olan sarkoplazmik retikulum oldukça fazla miktarda yer almaktadır ve kasılma esnasında kontrollü kalsiyum salınımından sorumludur. Bu yönüyle dolaylı olsa da sinyalleme rolüne katkıda bulunmaktadır. Granüllü ER taşıdığı ribozomlardan dolayı yüksek düzeylerde protein sentezleyen hücrelerde bulunur (Lai ve ark., 2007).



Şekil 2.1. Hücrelerde bulunan endoplazmik retikulum yapısı

2.1. Bitkilerde ER stresi

Çevresel koşullar olumsuz olduğunda ve stres durumu olduğunda bitkilerde bulunan ER yukarıda bahsedilen fonksiyonlarında üst limite doğru ulaşır. Aşırı çalışma durumunda fizyolojik veya patolojik olarak anormal olan ve lümende katlanmamış/yanlış katlanmış protein birikimi oluşmaktadır. Bu durum terimsel olarak “ER stresi” olarak adlandırılmaktadır (Rutkowski ve Kaufman, 2004). Bitkilerdeki ER stresine neden olan çevresel stres kaynakları içsel ya da dışsal nedenleri bulunabilir: Ekzojen ya da endojen kaynaklı birçok ER stres nedeni vardır (Howell, 2013):

- N-bağlı glikozilasyon inhibisyonu
- Kalsiyum dengesinin bozulması

- Enfeksiyon (viral enfeksiyonlar)
- Genetik mutasyon (katlanma işlevinin gerçekleştirilmesinde görevli proteinlerdeki mutasyonlar)
 - Besin eksikliği
 - Hipoksi
 - Oksidatif stres
 - Ortamın sıcaklığı
 - Salgı proteinlerinin yüksek miktarda sentezlenmesi
 - Hatalı katlanmış proteinlerin fazla miktarda ifadesi
 - ER'deki Ca^{+2} seviyesindeki anormal değişimler
 - Tunikamisin (TM) ve ditiyotritol (DTT) gibi kimyasalların uygulanması

2.2. Protein Katlanma Yolağı

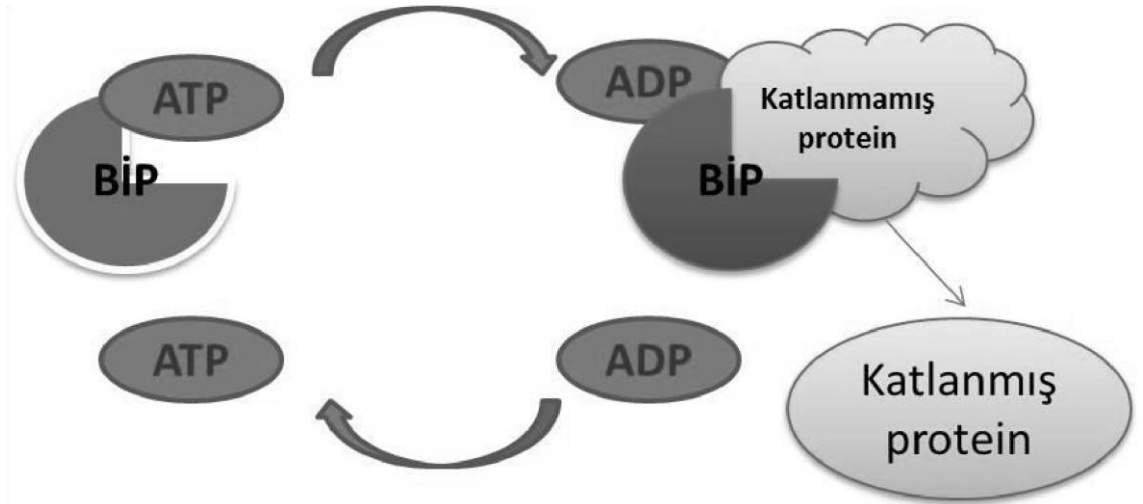
Sentezlenen proteinler ER lümenine giriş yapar ve iki katlanma yolundan birini tercih eder. Bu yollardan biri lümeninde yer alan bağlanma proteini BiP aktivitesidir, diğeri ise N glikan yoldur. ER'de yerleşim gösteren ısı şoku faktörü 40 proteini ERdj3 doğrudan henüz oluşmuş proteine bağlanır ve BiP'in bu komplekse bağlanmasını sağlar (Jin ve ark., 2009). N-glikan bağımlı yoldur ve kalneksin/kalretikulin protein katlanma döngüsü de bulunmaktadır. Proteinler oligosakkarit transferaz (OST) tarafından glikolizasyonu gerçekleştirmek için lipid bağlı oligosakkaritlere taşınır. TM gibi ER stresi uyarıcıları, OST tarafından katalizlenen lipid bağlı oligosakkarit üretimini engellerler ve N-bağılı glikolizasyonu engelleyerek ER stresine yol açar (Pattison ve Amtmann, 2009).

ER'de proteinlerin doğru katlanmasına yardımcı olan moleküllerden bir kısmı şaperon olarak tanımlanmaktadır. Ayrıca protein katlanmasına yardımcı olan bu moleküller kalsiyum tamponlayıcı proteinlerdir ve çalışmalarında kalsiyuma ihtiyaç duymaktadır (Buck ve ark., 2007). ER'de özellikle de granüllü ER'de yeni oluşturulmuş protein birtakım modifikasyonlara uğradıktan sonra katlanma göstermektedir. Bu işleme basamaklarından biri olan glikozilasyon, proteine hidrofilik özellik sağlayarak proteinin sudaki çözünürlüğünü artırır. Ayrıca bir çeşit şaperon olarak görev yapan oligosakkaritin neden olduğu özellikler sayesinde proteinin etrafında bulunan diğer proteinlerle etkileşimi engellenir (Schroder ve Kaufman, 2005). Peptid omurgayla etkileşen oligosakkarit, moleküler yapının kararlı olmasını sağlar. Şeker kalıntılarının eklenmesi

lektin mekanizması ile kontrol edilerek proteinin katlanması takip edilir ve kalite kontrol olarak değerlendirilebilir (Vitale ve Boston, 2008).

Protein katlanmasının kontrolü ve yanlış katlanma olduğunda düzeltilmesi gerekmektedir. Eğer bu durum düzeltilmezse yanlış katlanan proteinlerin yıkıma gönderilmesi ER tarafından gerçekleştirilir (Schroder ve Kaufman, 2005). ER stresine neden olan yukarıda da gösterilen dışsal ya da içsel faktörler hücrede ER'nin protein katlama durumunu azaltmaktadır ve katlanmamış proteinlerin birikimine neden olmaktadır. Kimyasal uygulamalarıyla oluşan ER stresinde, TM glikoproteinlerin katlanma sürecindeki N-bağlı glikosilasyonunu engeller (Iwata ve Koizumi, 2005). Diğer yandan, diğer bir kimyasal uygulaması olan DTT uygulamasıyla oksitleyici ortamın bozulması gerçekleşir ve bir indirgeyici ajan olarak DTT disülfür bağlarının beklenen şekilde katlanmasını engeller (Iwata ve Koizumi, 2012).

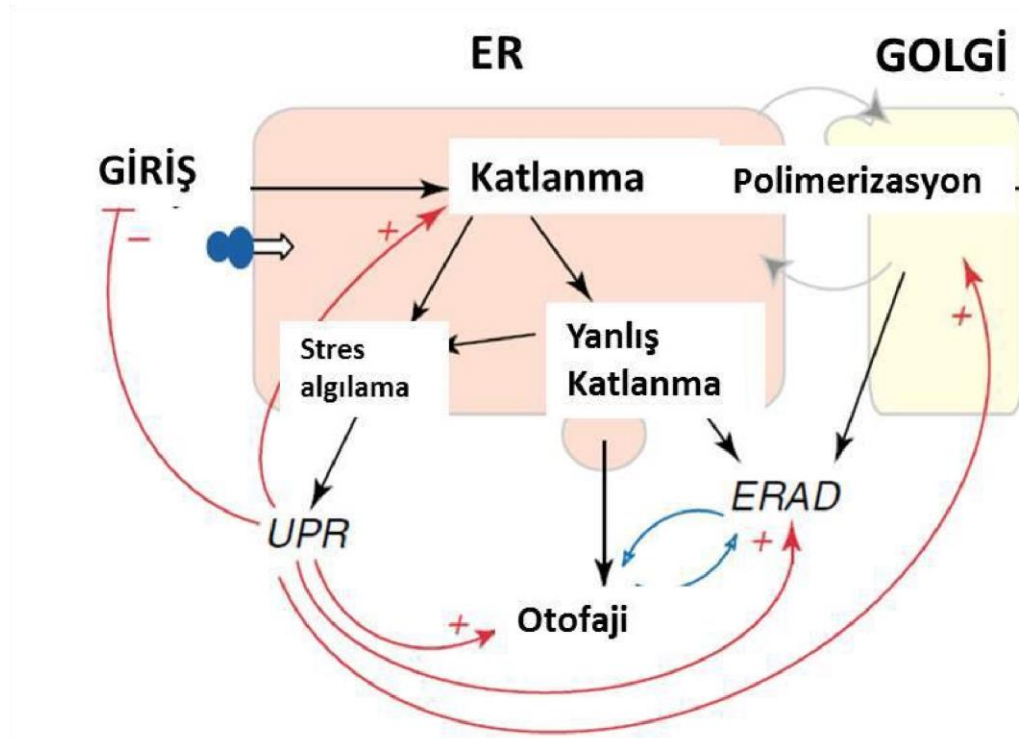
Moleküler şaperonlar ER'deki protein katlanmasında yer alan bir diğer faktördür. ER lümeni içerisinde en çok bulunan şaperonlardan birisi de bağlanma proteindir (Binding protein, BiP). BiP düzgün katlanmayan proteinlere bağlanır ve ER içerisinde bu proteinlerin çökelmelerini engeller. BiP bir çeşit ısı şoku70 (HSP70) proteindir. BiP'lerin katlanmamış proteinlere bağlanması enerji gerektiren bir durum olduğundan ATP hidrolizini uyarır (Yamamoto ve ark., 2008) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. BiP proteini katlanmamış proteinlere bağlanırken enerjiye ihtiyaç duyar.

2.3. ER kalite kontrol sistemi (ERQC)

Abiyotik stresler (ısı, kuraklık, tuz ve ağır metal stresi) gibi bazı olumsuz çevresel koşullar altında, hücre proteinlerin katlanma kapasitesi sınırın üzerine aşabilir ve katlanmamış/yanlış katlanmış proteinler hücrede birikme gösterebilir (Howell, 2013). Yoğun ya da uzun süreli gerçekleşen ER stresi, ER ve diğer hücresel bölmelere zarar verebilir, hatta bazı durumlarda hücre ölümüne bile yol açabilir. Karmaşık bir sisteme sahip olan ER, protein sentezledikten sonra hassas ve önemli bir ER kalite kontrol sistemine (ERQC) sahiptir (Tintor ve Saijo, 2014). Organizmalar çevresel streslere maruz kaldıklarında, yanlış katlanan proteinlerin düzeylerini ERQC sistemi sayesinde tanımaktadır (Kaufman, 2002; Lee, 2007). Bu tanınan ve yanlış katlanan proteinler, ER ile bağlantılı olan ERAD (ER associated degradation system) parçalama sistemi tarafından ayrılmaktadır (Şekil 2.3) (Hartl ve Hayer-Hartl, 2009).



Şekil 2.3 ER kalite kontrol mekanizması- ERQC

2.4. ER İlişkili Parçalanma (ERAD)

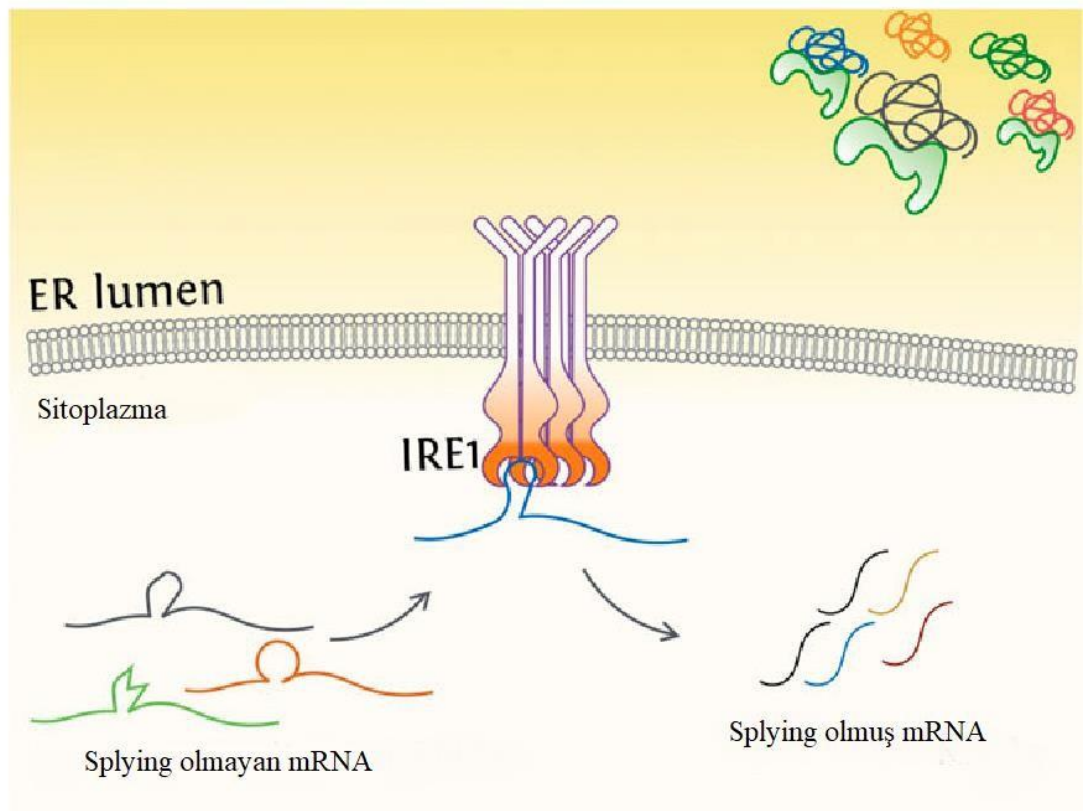
ERAD mekanizması, ER stresinin olduğu durumlarda dengenin yeniden sağlanması için yanlış katlanmış proteinlerin parçalanmasını içermektedir. Bu olayın temelinde yanlış katlanan proteinlerin işaretlenerek parçalanma mekanizmasına gönderilmesi yatmaktadır (Howell, 2013). ERAD mekanizmasında dört aşamada önem kazanmaktadır: tanımlama, ubikütinasyon (işaretleme), retrotranslokasyon ve parçalanmadır. Yanlış katlanan proteinler ER'den sitozole taşınır ve 26S proteozomu tarafından parçalanır. Katlanmayan proteinler bir lektin tipi olan OS9 tarafından tanınır ve bu proteinler SEL1/HRD3 (integral zar proteini) ve HRD1 (E3 ligaz) tarafından sitoplazmaya ulaştırılır. Taşınma esnasında proteinlere işaretleme amacıyla ubikutin bağlanması gerçekleşir ve ubikütinlenen proteinler 26S proteozom tarafından tanınarak parçalanır (Su ve ark., 2012).

2.5. Katlanmamış Protein Yanıtı (UPR)

ER stresi oluşuktan sonra, hücrede dengeyi yeniden sağlamak ve strese karşı koyabilmek amacıyla katlanmamış protein cevabı (UPR) denilen ve hücre içi sinyal yollarından oluşan olaylar dizisi aktifleşmektedir. UPR sistemiyle hücre yaşamının kararlılığı ve devamlılığı sağlanmaya çalışılır (Cho ve Kanehara, 2017). UPR yolağı ile protein katlanmasında ve taşınmasında önemli rolleri olan Ca^{+2} -bağımlı moleküler olan şaperon proteinlerinin ifadesini artırarak ya da translasyonu azaltarak katlanmamış/yanlış katlanmış proteinlerin ER'de birikimi engellenmektedir (Lee, 2007).

UPR mekanizması, bZIP28, bZIP17, IRE1 α ve IRE1 β gibi ER stres algılayıcı genler tarafından başlatılır. UPR'nin aktivasyonu ile translasyonun azalması, protein sentez yükünün azalması, ER'de katlanmamış proteinlerin birikiminin önlenmesi, ER şaperonları ve katlama enzimlerini kodlayan genlerin translasyonunun artırılması sağlanır ve tüm bu değişimler hücrede bir cevaba neden olur. UPR genellikle laboratuvar ortamında sentetik olarak TM veya DTT gibi ER stres ajanlarıyla da uyarılabilir. TM, oligosakkaritlerin yeni ER proteinlerine transferini engeller ve ER stresini uyarır. DTT ise proteinlerdeki disülfid köprülerinin oluşumu için gerekli indirgenme/yükseltgenme koşullarını bozar ve ER stresini tetikler. Her iki kimyasal uygulaması da ER'de katlanmamış/yanlış katlanmış protein birikimiyle sonuçlanır (Vitale ve Boston, 2008). Bitkilerde bulunan UPR sinyal yolu mekanizması, *Arabidopsis* sp. bitkisinden

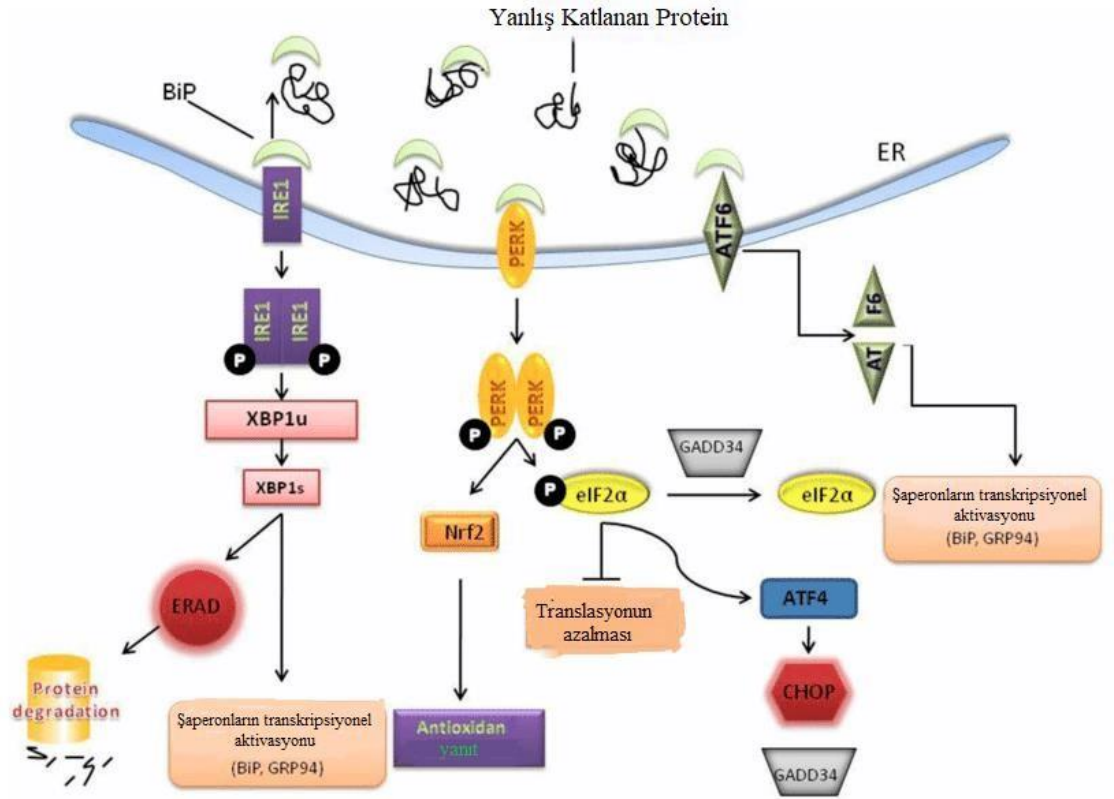
yararlanarak ortaya konulmuştur ve bitkilerdeki UPR mekanizmasının ilk cevapları mutasyona uğrayan mısır bitkilerinden elde edilmiştir. Bitkilerdeki bu sinyalizasyon yollarında, UPR sinyalizasyonundan sorumlu olan sensör moleküllerinden (IRE1, ATF6 ve PERK) yalnızca IRE1 (bZIP60) ve ATF6'nın homologunun (bZIP28 ve bZIP17) bulunduğu bildirilmiştir. ER stres sinyal yolağı ikiye ayrılmıştır; birinci yolak ER zarına bağlı ve katlanmamış/aşırı katlanmış proteinlerin işlenmesi ve toplanması için gerekli olan bZIP28 transkripsiyon faktörü ve diğer yolak ise zarla ilişkili protein kinaz ve ribonükleaz aktivitelere sahip inositol requiring enzyme 1 (IRE1)'dir (Şekil 2.4) (Deng ve ark., 2013).



Şekil 2.4. IRE1 ile transkripsiyonun kontrolü

ER stresine karşı sinyalin başlatılması ve iletilmesinde transkripsiyon faktörleri önemli bir rol oynar. Bu açıdan memelilerde üç farklı ER transkripsiyon faktörü bulunmaktadır (Walter ve Ron, 2011): İlki zarla bağlantılı transkripsiyon faktörleri, aktif olduklarında zardan serbest kalarak çekirdeğe doğru gider ve sonrasında UPR genlerinin ifade olmasını sağlar. İkincisi IRE1 ve üçüncüsü ise zarla bağlantılı protein kinaz benzeri

endoplazmik retikulum kinazdır (PERK). PERK, translasyon başlatıcı faktör eIF2a'ya fosfor grubu ekleyerek onu inaktif hale getirir ve böylece translasyon yavaşlar (Şekil 2.5).



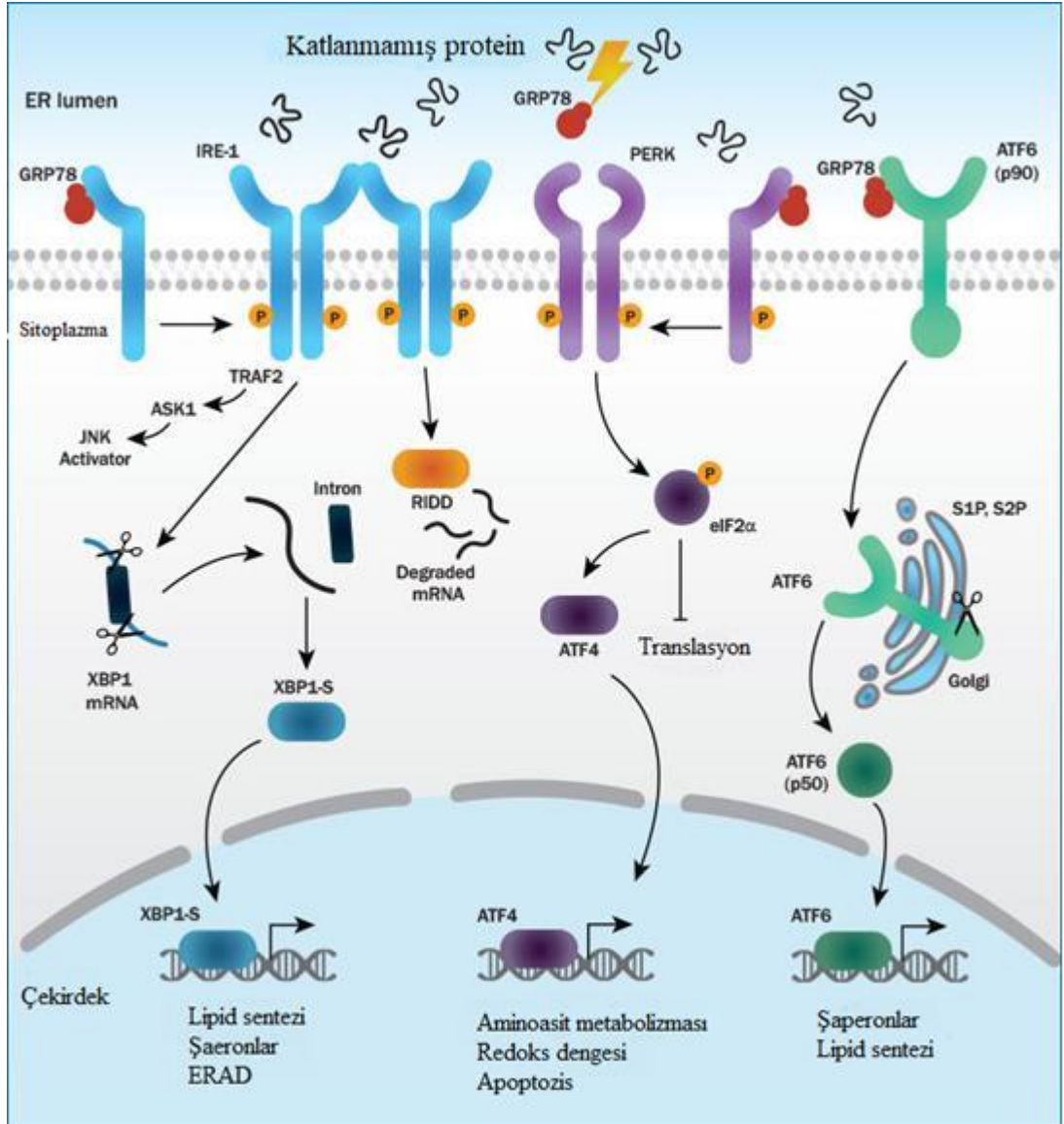
Şekil 2.5. Transkripsiyon faktörlerince katlanma basamaklarının kontrolü

Metazoada, memelilerde olduğu gibi, UPR sinyal yolağı üç ayrı bölüme sınıflandırılmıştır:

- ER zarla ilişkili aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6),
- İnositol gerektiren enzim 1 (IRE1)
- Protein kinaz RNA benzeri ER kinaz (PERK).

Memelilerde araştırılan zarla bağlantılı ve ER stresini iletilen transkripsiyon faktörlerinden birisi de aktifleştirici transkripsiyon faktörü 6'dır (ATF6). ATF6 tek geçişli transmembran motifi içeren bir zar proteindir. bZIP motifi sitoplamaya dönük olarak zar içinde bulunurken, site 1 proteaz (S1P) kesme bölgesi içeren C terminal kuyruğu ise ER lümeninde yer almaktadır. Stres uygulamasıyla birlikte ATF6 aktifleşir ve ER'den dışarı çıkar ve golgiye gelir. Burada ATF6, golgi ile bağlantılı proteazlar (S1P ve S2P) tarafından kesilir (Liu ve ark., 2007). S1P çözünebilir lümeninde bulunan bir

proteazdır ve S2P ise zarla ilişkili bir metalloproteazdır. S2P zarda ATF6'yı keser ve bZIP motifinde yer alan sitoplazmik bileşen serbest kalır ve bileşen çekirdeğe giderek hedef genlerin ifadesini başlatır (Howell, 2013) (Şekil 2.6).



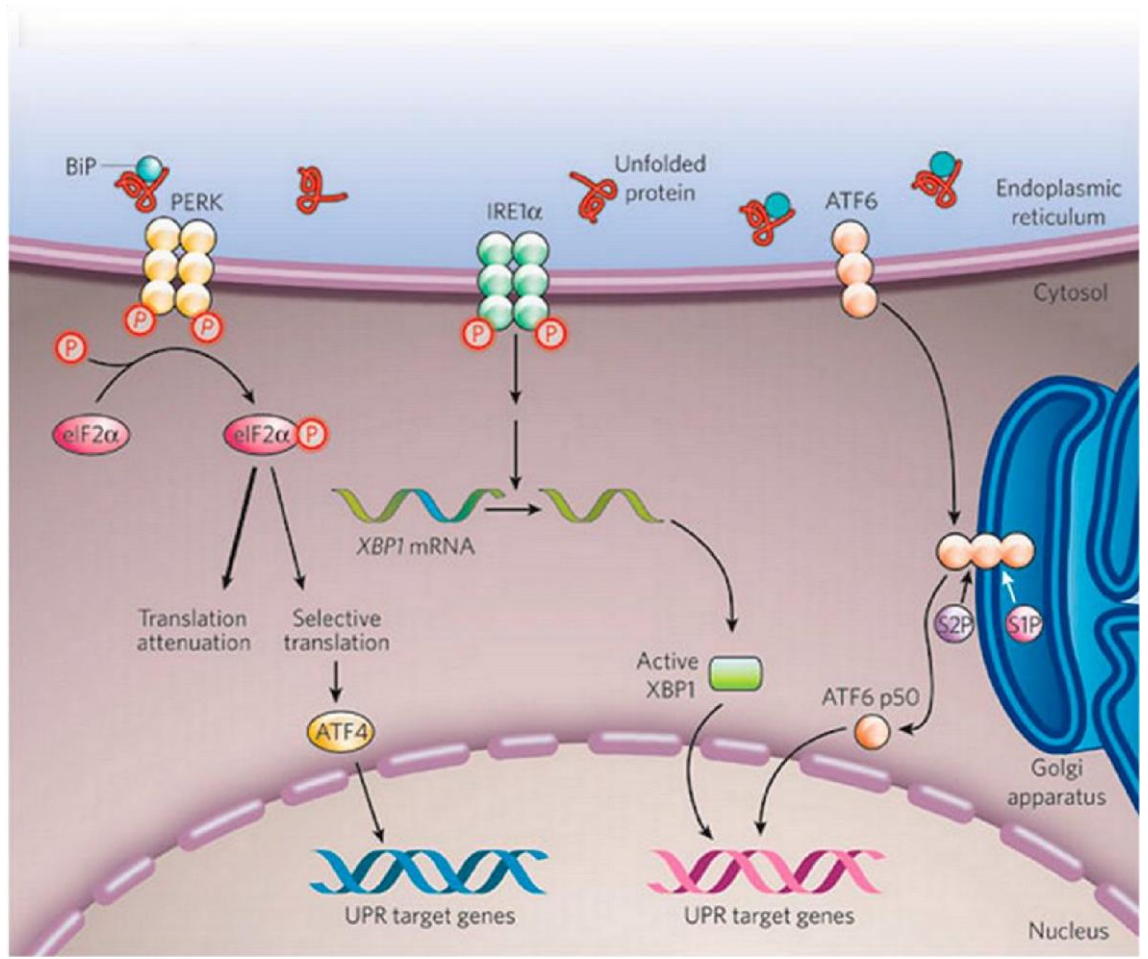
Şekil 2.6. ATF6 ile transkripsiyonun kontrolü

bZIP28 transkripsiyon faktörünün işlev görmesiyle beraber ER protein katlanma mekanizmasında yer alan bazı genler ifade olmaktadır. Bu genler arasında BiP2, kalretiikulin, kalneksin, protein disulfide isomerase (PDI) sayılabilmektedir. Bu grupta genlerin promotorunda, ER stresine yanıt veren element (ERSE1) bulunmaktadır. İki alt birime sahip olan ERSE1, CCACG ve CCAAT alt birimlerini içermektedir. CCACG alt birimi, bZIP dimerlerine bağlanırken, CCAAT alt birimi ise CCAAT kutusu bağlanma

faktörlerine bağlanır (Yoshida ve ark., 2001). CCAAT kutusu bağlanma faktörleri üç adet nükleer Y (NF-Y) alt biriminden oluşmaktadır. Bu alt birimler ise NF-YA, NF-YB ve NF-YC'dir.

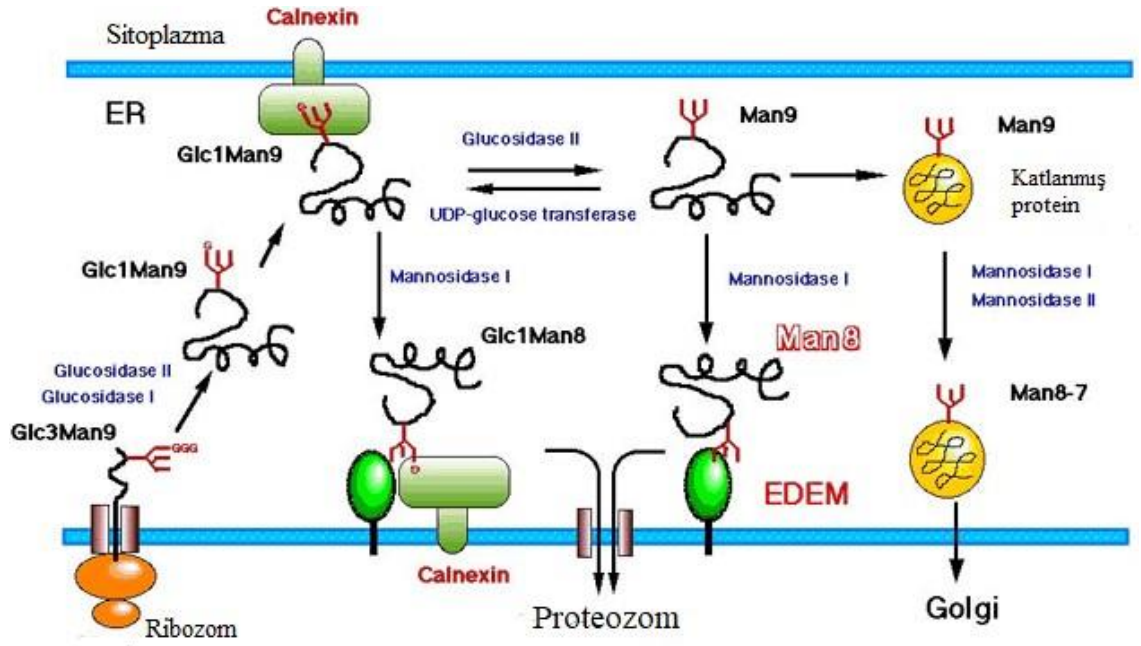
Arabidopsis'de IRE1 kodlayan iki adet gen rapor edilmiştir (Koizumi ve ark., 2001). IRE1'in sinyal mekanizması bZIP28'den biraz daha farklıdır. ER stresinin algılanması ile IRE1, bZIP60 mRNA'sını keserek (ribonükleaz aktivitesi) bZIP60'ın aktif formunun sentezlenmesine neden olur. Böylece bu transkripsiyon faktörü ER stres yanıtlarını uyarır. Ayrıca bZIP28 ve bZIP60'ın aktif formları heterodimer oluşturabilmektedir ve bu iki biyolojik yolun birleşebildiği de bilinmektedir (Nagashima ve ark., 2011).

ER'de stresten ya da kimyasal uygulamadan kaynaklı yanlış katlanmış bir protein ortaya çıkarsa, bu proteinlerin açıkta kalan hidrofobik yüzeyleri, Grp78 denilen proteinik yapıyı kendine doğru çeker. Grp78, bu hidrofobik kısımların çekim gücüne dayanamaz ve bulunduğu yerden ayrılarak yanlış katlanmış proteinlerin hidrofobik kısımlarına yapışır. Ancak Grp78'nin hatalı katlanmış bu proteinlere yapışması problemi çözmez. Diğer yandan, bu durum ER'de yanlış bir katlanmanın olduğunu ve yanlış katlananın hangi molekül olduğunu belirtmesi açısından önemlidir. Yanlış katlanan proteinler, Grp78'e bağlanması sayesinde, bu moleküllerin ER'den çıkarılmaları süreci başlatmaktadır. Eğer çıkarılma işleminde bir aksama olursa yanlış katlanan proteinler birbirlerine yapışarak daha büyük yapılar oluşturabilir ve ER'yi çalışamaz hale getirebilir. Grp78'deki bu değişim nedeniyle ER zarının üzerinde yer alan ve inaktif olarak bekleyen PERK, ATF6 ve IRE1 aktive olur (Şekil 2.7). Bu üç protein, translasyonu yavaşlatır ve fazla sayıda şaperon oluşumuna neden olarak ER stresini yönetir (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Transkripsiyon faktörlerince UPR genlerinin ifadesinin artışı

Hatalı katlanan proteinin dışarı çıkarılmasında son kontrolü yapan ve hatalı katlandığı için proteinden mannoz grubunu çıkartan EDEM (ER degradation–enhancing a-mannosidase–like protein) mekanizması da bulunmaktadır. ER stresine karşı verilen önemli yanıtlardan birisi ER lümeninde biriken ve yanlış katlanan proteinlerin sitoplazmaya taşınımı ve orada parçalanmasıdır (Su ve ark., 2011). Böylelikle, bu proteinlerin ER’de birikmeleri ve çökelmeleri engellenmiş olur. EDEM, ER’nin üzerindeki giriş çıkış kanalları olan translokonlara yakın bulunan zara bağlı bir enzimdir ve mannoz grubu çıkarılan proteinleri translokon vasıtasıyla ER’den sitoplazmaya çıkarır. Sitoplazmaya çıkan hatalı katlanmış proteinler sonrasında sitoplazmada übikitinasyon sistemine giriş yapar (Anelli ve Sitia, 2008). Übikitinasyon sistemi, yok edilmesi istenen proteinlere übikitin denilen küçük bir peptiti yapıştırarak onları etiketler ve sonrasında onları proteozomlarda parçalanmaktadır (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Hatalı katlanan proteinlerin EDEM ile kontrolü

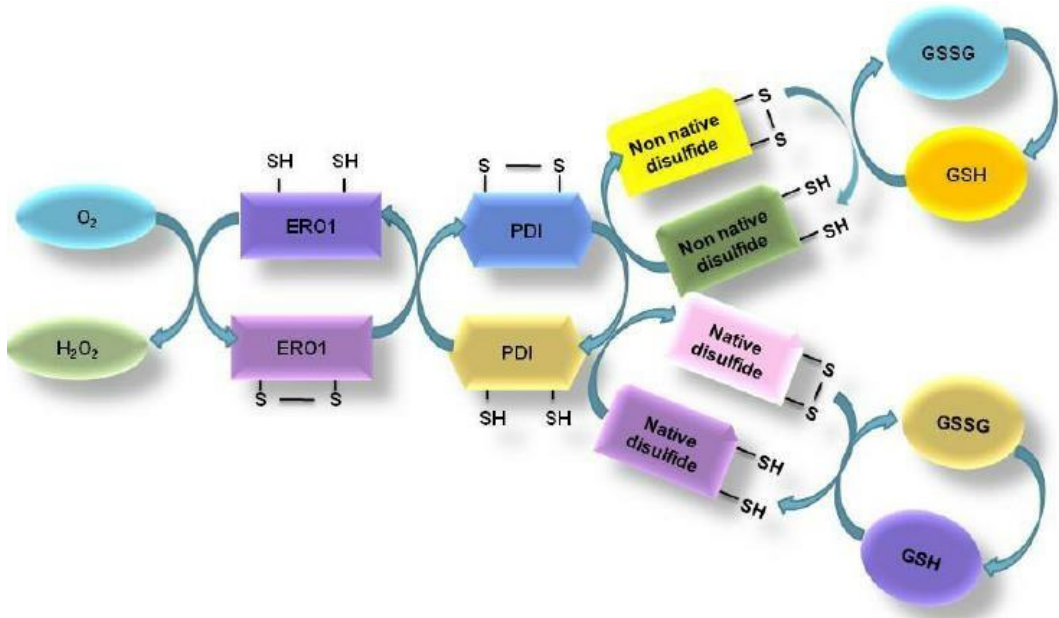
ER'de gerçekleşen protein katlanması ve protein degradasyon reaksiyonları enerji ya da diğer bir deyişle ATP gerektirmektedir (Marzec ve ark., 2012). Ancak,

ATP'nin kaynağı ER'de yoktur ve ATP kaynağının mitokondriden alınması gereklidir. Mitokondri, hücrede oluşan biyolojik tepkimeler için ATP kaynağı olarak işlev görür. Ancak, mitokondrilerin stres kaynaklı yapısal bozulmalarından dolayı ATP sentez kapasitesi azalabilmektedir. HSP70 benzeri proteinlerin ve BiP1 ve BiP3'ün ATPaz aktiviteleri vardır ve protein ligandlarını sadece ATP'nin varlığında serbest bırakabilir (Vitale ve Denecke, 1999). Benzer şekilde, proteinlerin ER'den sitoplazmaya gönderilmesinden sorumlu olan bir motor proteini olan CDC48, ATPaz aktivitesini de gösterir (Marshall ve ark., 2008).

2.6. Bitki Hücrelerinde Oksidatif Protein Katlanması

Oksidatif protein katlanmasının temel aşaması disülfid bağlarının oluşturulmasıdır. Bu bağlar, proteinlerin mekanik kararlılık ile protein katlanmasını kontrol eder (Molinari ve ark., 2007). Sentezlenen proteinler arasında disülfid bağlarının oluşmasında, ERO1 enzimi ve disülfid taşıyıcı enzim olan PDI birlikte rol alır. PDI, ökaryotlarda yer alan tiyol-disülfid oksidoredüktazdır ve disülfidleri doğrudan substrat proteinlere tiyol disülfid reaksiyonları ile verir. PDI'nın okside formu ERO1 ile yeniden

oluşturulur. ERO1 moleküler oksijenden PDI'nın indirgenmiş formuna yükseltgenme gücünü aktarır (Onda, 2013). Disülfid üreten enzimlere flavoenzim Ero1 örnek olarak verilebilir (Şekil 2.9). Ero1 ilk olarak mayalarda sıcaklığa karşı duyarlı olan ero1-1 mutant çalışmalarıyla bulunmuştur (Frand ve Kaiser, 1998). ERO1 ailesi mayalar, insanlar ve bitkiler gibi ökaryotik organizmalarda korunmuştur. Sevier ve Kaiser (2008) yayınladıkları raporda mayalarda Ero1 aktivitesinin ER organelinde radikal birikimine neden olduğu gösterilmiştir. Bununla beraber, protein salgılanan hücrelerde Ero1 aktivitesi sonucu üretilen radikalın protein sentezi sürecinde üretilen radikalın %25'ini oluşturabileceği hesaplanmıştır (Tu ve Weissman, 2004). Diğer bir çalışmada, ERO1 aşırı ifade olduğunda radikal üretiminde artışa neden olur ve ER stresinin ölümcül hasarlarına karşı toleransın artmasında etkilidir (Gross ve ark., 2006).

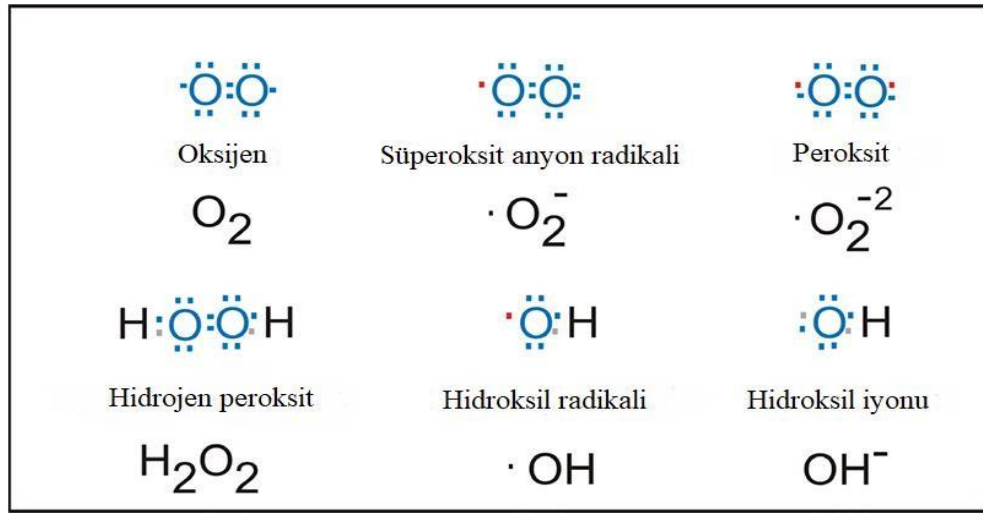


Şekil 2.9. Oksidatif protein katlanma yolu (PDI: protein disulfid izomeraz)

2.7. ER stresıyla birlikte radikal oluşumu ve oksidatif stres

Reaktif oksijen türleri (ROS) prokaryot olan bakterilerden ökaryot memeli hücrelerine kadar tüm aerobik organizmalarda normal koşullar altında metabolik olayla üretilmektedir ve aerobik metabolizma esnasında oluşan yan ürünleridir (Bose ve ark., 2013). Stres altındaki hücrede farklı tiplerde ROS'a rastlanabilir, bazıları tekli oksijen (¹O₂), süperoksit anyon radikali (O₂^{•-}), peroksit radikalleri, hidrojen peroksit (H₂O₂) ve

hidroksil radikali (OH^\bullet) (Şekil 2.10). Bitki hücresinde stresle tetiklenen ROS birikimi kloroplastlar, peroksizomlar, hücre zarı, mitokondriler ve apoplast gibi organel ya da hücrel bölmelerde gerçekleşmektedir. ROS'un düşük ya da yüksek miktarları farklı etkilere sahiptir, düşük seviyelerde hücrel sinyal yollarında sekonder mesajcı olarak rol alırken, streslere bağlı olarak yüksek miktarları önemli bileşikler üzerinde toksik etkiye sahiptir. Sinyal rollerini açıklamada önemli olan nokta, düşük düzeyde tutulmalarıdır ve buna karşılık ROS'ları elime eden sistemin denge halinde olmasıdır (Mittler ve ark., 2004; Lai ve ark., 2012). ROS'un bitki hücrelerinde kontrolsüz şekilde aşırı birikimi protein oksidasyonu, lipit peroksidasyonu, DNA ve RNA oksidasyonu gibi biyolojik moleküllerde hasara yol açabilir (Scandalios, 1993; Noctor ve Foyer, 1998).

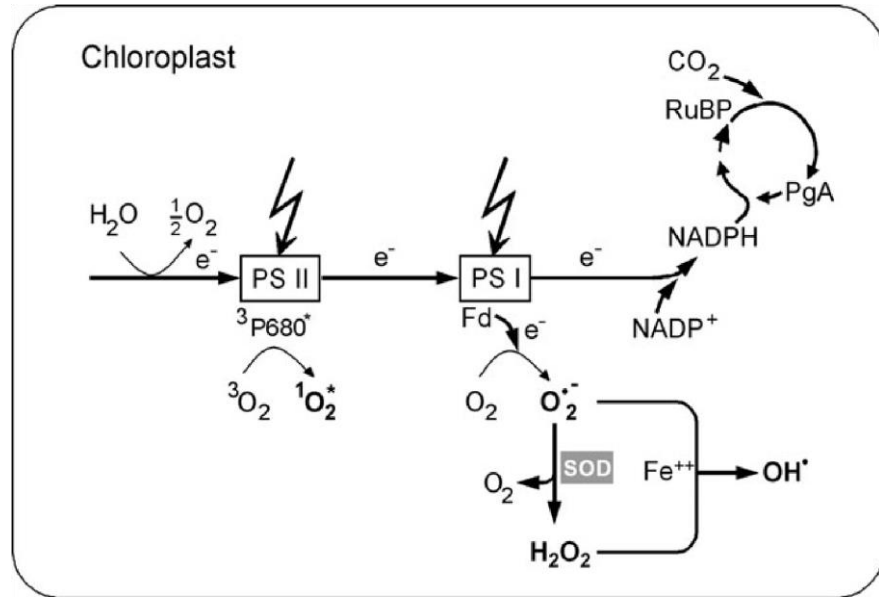


Şekil 2.10. Stres koşullarında hücrelerde oluşan radikal türleri

Bitkilerde hücrenin farklı bölgelerinde stressiz koşullarda metabolik yan ürün olarak ROS üretilmektedir. Işıklı ortam şartlarında kloroplastlar ve peroksizomlarda ROS üretilirken (Foyer ve Noctor, 2003), ışıksız ortamlarda ise mitokondrilerde ROS üretimi en üst düzeyde gerçekleşmektedir (Moller, 2001). Işıklı ortamda ROS üretimi 20 kat daha fazladır (Rhoads ve ark., 2006). Ayrıca ROS'un üretildiği farklı bir yerde apoplastik boşluklardır. Apoplastik boşluklarda üretimi sağlayan moleküller NADPH oksidazlar, hücre duvarı bağlı peroksidazlar ve oksalat oksidazlardır (Wrzaczek ve ark., 2013).

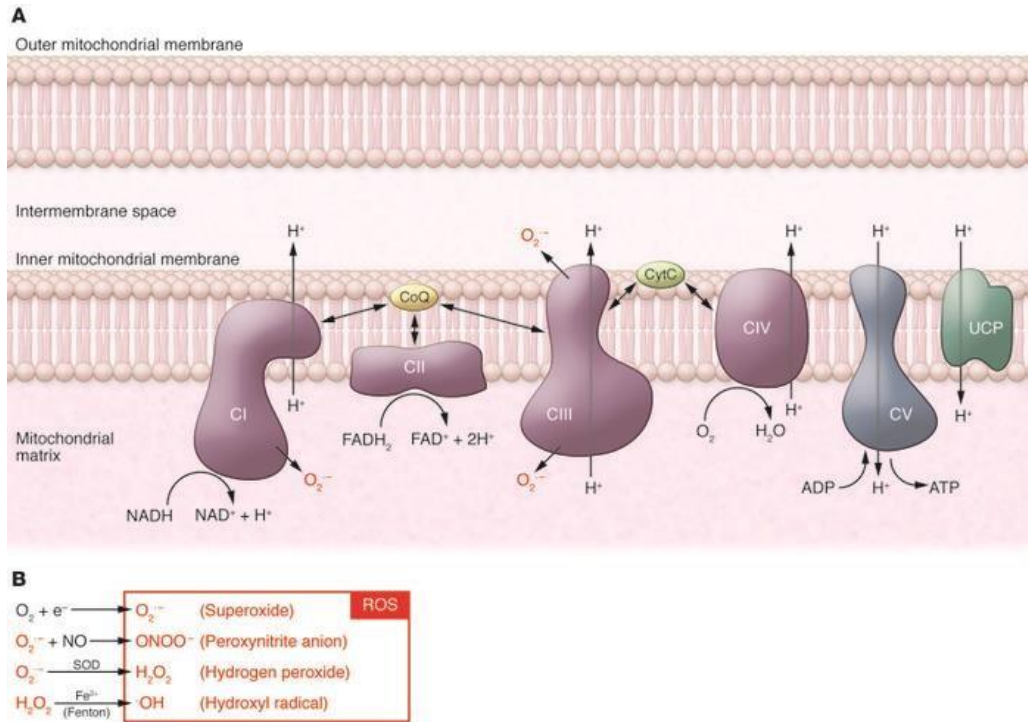
2.8. Organel bazında ROS oluşumları

ROS, kloroplastlarda fotosistem I (PSI) ve fotosistem II (PSII) de üretilmektedir. Tuz, kuraklık vb. abiyotik stres durumlarında stomalar kapanmasıyla içerdeki CO₂ miktarı düşer ve bu olay sonucunda ROS üretimi gerçekleşmektedir (Şekil 2.11). ROS üretiminin ana sebebi budur. NADPH'ın üretimi, fotosistemler uyarılıp elektronların NADP⁺'ye geçmesiyle olur. Eğer elektron taşıma sistemine (ETS) yüklenme olursa NADP⁺'ye gelen elektronlar ferrodoksenden oksijene gider ve bunun sonucunda O₂^{•-} üretilir. Bütün bu reaksiyonların tamamına Mehler reaksiyonu denir. Aşırı yüklenmenin sonucundan biride PSII çok fazla uyarıldığından triplet klorofilden O₂'ye enerji aktarılıp ¹O₂ üretilir (Laloi ve ark., 2004). ¹O₂, reaktif bir moleküldür. Karşılaştığı ilk biyomolekülle tepkimeye girer. Bundan dolayı hücre içinde ¹O₂'nin difüzyon uzaklığı yaklaşık 100 nm kadar kısadır. Bu durum PSII'de aktivite kaybına sebep olur (Wagner ve ark., 2004; Krieger-Liszkay ve ark., 2008). Mehler reaksiyonu ile ¹O₂ oluşumu engellenebilir (Asada ve Takahashi, 1987). Mehler reaksiyonu gerçekleştikten sonra ETS'de ki elektronlarla O₂^{•-} oluşturulup daha sonra da detoksifikasyonla O₂^{•-}'nin suya dönüştürülmesine "su-su döngüsü" denir. O₂^{•-}, kloroplastlarda tillakoid membrana bağlı anten pigmentlerinde üretilir. En kararlı ROS molekülü H₂O₂'dir. H₂O₂'nin yarı ömrü dakikaya yakınken ¹O₂, O₂^{•-} ve HO[•]'nin yarı ömürleri 2-4 µs'dır (Bhattachrjee, 2005; Pitzschke ve ark., 2006). Üretildiği yerden farklı yerlere geçen tek ROS molekülü H₂O₂'dir. Bunu da difüzyonla gerçekleştirir. Diğer ROS türlerinde böyle bir şey söz konusu değildir. H₂O₂'nin aşırı birikimi hücrelerde oksidatif strese, nekroze ve programlanmış hücre ölümüne neden olabilir (Quan ve ark., 2008). Ayrıca, proteinlerin tiyol gruplarını oksitleyerek enzimlerin inaktivasyonuna neden olabilir (Gill ve ark., 2010).



Şekil 2.11. Stres altında kloroplastlarda ROS oluşumu ve süpürülmesi

Abiyotik stres durumlarında mitokondriyal ETS'de O₂^{•-} üretilir. Kompleks I ve III'den gelen elektronların oksijene aktarılmasıyla O₂^{•-} üretilmiş olur (Şekil 2.12). SOD, O₂^{•-}'yi H₂O₂'ye indirger. İndirgenmiş H₂O₂, indirgenmiş Fe⁺² ve Cu⁺² ile tepkimeye girer. Sonucunda HO[•] ortaya çıkar. HO[•] toksik bir moleküldür (Rhoads ve ark., 2006; Sweetlove ve Foyer, 2004). Bu şekilde ETS'de aşırı yüklenme meydana gelir. Bunu önlemek için devreye enerji boşaltıcı sistemler girer. Bunlardan biri alternatif oksidazlardır (AOX). Mitokondrilerin sitokrom yolunda meydana gelen elektron akışının aynısını gerçekleştirir. Alternatif oksidaz sayesinde elektronlar ubikinondan oksijene geçer ve su oluşturulur. Böylelikle ubikinon havuzunun redoks durumu düzenlenerek ROS oluşumu engellenebilir (Miller ve ark., 2011).



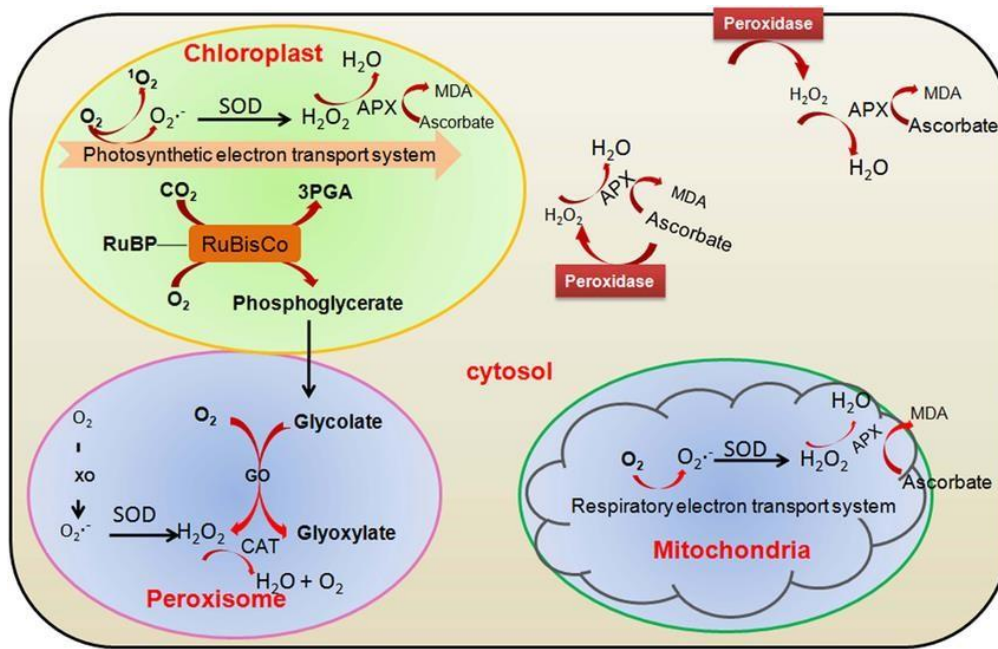
Şekil 2.12. Mitokondrilerde oksijenli solunum esnasında ROS oluşumu

Peroksizomlarda, $O_2^{\bullet-}$ oluşturulur. Ksantin oksidaz aktivasyonu ile ksantin ürik aside dönüşür. $O_2^{\bullet-}$ oluşturulur. Normal metabolik yolla $O_2^{\bullet-}$ elde edilir. Peroksizomlarda oluşturulan H_2O_2 az da olsa sinyal görevi görür. H_2O_2 , yağların β oksidasyonu ya da fotorespirasyon sırasında oluşur. Burada glikolatın glioksilata dönüşümü sırasında ortaya çıkar (Miller ve ark., 2010).

Bitkiler ozon veya patojen gibi stres durumlarına maruz bırakıldığında ROS üretilir. ROS, apoplastik bölgede de oluşabilmektedir. Buradaki ROS kaynakları hücre duvarı peroksidazları, oksalat oksidazlar, aminoksidazlar ve glikolat oksidazdır (Kawano, 2003). Hücre zarında ise NADPH oksidazlar ROS kaynağı olarak görev görür (Baxter ve ark., 2014). Herhangi bir abiyotik ve biyotik stres durumlarında özellikle RBOH (respiratory burst oxidase homologue) genlerinin kodladığı NADPH oksidaz genleri ROS sinyallerinin üretilmesinde ve iletilmesinde önemli roller oynar (Mittler ve ark., 2011).

2.9. ROS oluşumlarına karşı savunma sistemi: Antioksidan mekanizma

ROS üretimiyle meydana gelen sonuçlar bitkiyi olumsuz yönden etkiler. Bitkiler bu olumsuz etkileri yok etmek için hüresel bölmelerinde çeşitli antioksidan enzimler bulundurur (Şekil 2.13). Bu enzimler sayesinde $O_2^{\bullet-}$ ve H_2O_2 'yi detoksifiye ederler. Yalnız ROS'lardan HO^{\bullet} ve 1O_2 enzimatik olarak detoksifiye edilemediği için devreye düşük molekül ağırlıklı antioksidanlar girer ve detoksifikasyon gerçekleşir.



Şekil 2.13. Hüresel bölmelerde aktive edilen antioksidan sistemler

ROS bitkilerin hepsinde aynı yollarla üretilir. Fakat biriken ROS'un ortadan kaldırılması için hücrenin başvurduğu antioksidan savunma mekanizmaları bitkiden bitkiye farklılık göstermektedir.

2.9.1. Süperoksit dismutaz

SOD, bir antioksidan enzimleridir. $O_2^{\bullet-}$ 'yi detoksifiye edebilen tek enzimdir. Öncelikle SOD enzimi ile $O_2^{\bullet-}$ H_2O_2 'ye dönüştürülür. Oksidatif strese karşı gerçekleşen bu ilk tepkimeye "ilk savunma hattı" denir. Antioksidan enzimler ROS'u ortadan kaldırılabilmek için dengeli bir şekilde çalışırlar. SOD ve diğer H_2O_2 detoksifiye edici

enzimler arasında bu denge mevcuttur. Böyle bir denge olmasaydı hücrede antioksidan birikimi olurdu ve bu da oksidatif hasara sebep olurdu.

Bitki hücresinde, $O_2^{\bullet-}$ nerede üretiliyse yine orada detoksifiye edilmek zorundadır. Çünkü fosfolipid zarları negatif yüklüdür ve bu yüzden $O_2^{\bullet-}$ 'ye geçirgen değildir (Takahashi ve Asada, 1983). $O_2^{\bullet-}$ 'nin bu şekilde özel olarak parçalanmasını sağlayan bitkinin farklı bölmelerinde bulunan farklı tiplerde olan SOD enzimleridir. Bitkilerde üç çeşit SOD tipi vardır. Üç tane metal kofaktöre göre belirlenirler. Bunlar Cu ve Zn, Fe ya da Mn'dir ve bu izoformlar hücrede farklı bölmelerde bulunur. FeSOD'un bu izoformlar arasında Fe(II) bolluğu nedeniyle bilinen en köklü izoform (FeSOD) olduğu düşünülmektedir (Bannister ve ark., 1991). Zamanla çevredeki oksijen derişiminin artmasından dolayı mineraller okside olmaya başlamış ve kullanılabilir Fe (II) azalmış. Bu nedenle metal yerine SOD'un aktif bölgesinde Mn(III) kullanılmaya (MnSOD) başlamıştır. Benzer olarak atmosferdeki oksijenin artması nedeniyle çözülemeyen formdaki Cu(I), çözülebilir formdaki Cu(II) ya dönüşmüş ve bu nedenle enzimin aktif bölgesinde Cu kullanılmaya (Cu/ZnSOD) başlanmıştır (Alscher ve ark., 2002).

FeSOD kloroplastlarda, MnSOD ise mitokondrilerde bulunur. Cu/ZnSOD kloroplastlar ve sitosol ve peroksizomlarda bulunur. Arabidopsis'te FeSOD'u kodlayan genler FSD1, FSD2, FSD3, Cu/ZnSOD'u kodlayan genler CSD1, CSD2, CSD3 ve MnSOD'u kodlayan gen MSD1'dir. CSD genleri içinde CSD1 ve CSD2 sitozolik ve kloroplastik izoformları kodlarken CSD3 ise peroksizomal Cu/ZnSOD' u kodlar. Bu genler arasında FSD1 ifadesinin diurnal ritme göre sirkadiyan ritim kontrolü altındadır. Diğer genlerin ifadeleri ise hücrenin oksidatif durumuna göre düzenlenir gösterilmiştir (Kliebenstein ve ark., 1998).

2.9.2. Katalaz

Katalaz ilk antioksidan enzim olma özelliğine sahiptir. 1900 yılında Oscar Loew tarafından keşfedilmiştir. Loew, bu enzimin hidrojen peroksit üzerinde katalitik etkisinden dolayı katalaz ismini vermiştir (Loew, 1900). Katalaz iki molekül H_2O_2 'yi su ve oksijene dönüştürür. Tüm ökaryotik katalazlar hem grup içeren tetramer proteinlerdir (Regelsberger ve ark., 2002). Katalaz enzimi yapılan araştırmalarda tüm angiospermlerde üç gen tarafından kodlandığı bulunmuştur. Bu üç gen 492 amino asitlik peptidler kodlar. Bu amino asitler birbirine çok benzemektedir. Arabidopsis'te 3 CAT geni

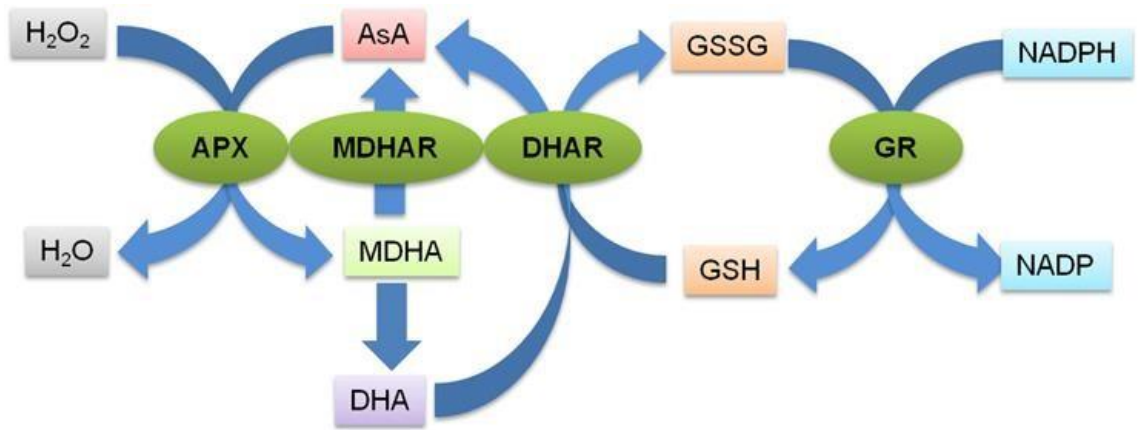
ifadelenmektedir. Bunlardan CAT1 geni polen ve tohumlarda, CAT2 geni fotosentetik dokularda, CAT3 geni ise vaskuler dokularda yoğun olarak ifadelenmektedir. Bu genlerden CAT2 fotosentetik tip bir sirkadyan ritim izlerken, CAT3 geni bunun tam tersi bir ritme sahiptir. Arabidopsis'te ifadelenen bu 3 genin yanı sıra native-PAGE jellerinde farklı dokularda toplamda 7 adet CAT izoformu tespit edilebilmektedir (Hu ve ark., 2010). Bu durum bize CAT proteinlerinin heterotetramerik yapıda olduğunu göstermektedir. 3 CAT geninin tüm tetramerleri hesaplandığında 15 adet farklı izoform ortaya çıkabilmektedir (McClung, 1997). Yalnız gerçekte teorik de hesaplanan ve mümkün olan bu izoform sayısından daha az izoformun gözlenmektedir. Bu da tetramerlerin bazı alt birimleri arasında spesifik etkileşimler olabileceğini göstermektedir (McClung, 1997).

Katalaz ezimini kodlayan genler (CAT) bitkilerde peroksizomlarda bulunmaktadır. Görevi fotorespirasyon ve yağ asitlerinin β -oksidasyonu ile ortaya çıkan H_2O_2 'nin detoksifiye edilmesidir. Arabidopsis'de yaprak CAT aktivitesinin *cat2* mutantında %80 ve *cat3* mutantında %20 azaldığı, ancak *cat3* mutantında bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir. İlâveten *cat2 cat1* ve *cat2 cat3* çift mutantlarının *cat2* mutantına benzer CAT aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur (Bueso ve ark., 2007). *cat2* mutantlarının; $50-200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde yetiştirildiğinde cüce fenotipe sahip olduğu ve bu fenotipin görülme olasılığı ışık şiddetine bağlı olarak artmıştır. Artan ışığa bağlı oluşan bu fenotip bitkilerde H_2O_2 'nin yeteri kadar süpürülmemesi ile ortaya çıkan redoks dengesindeki bozulmayı işaret etmektedir (Queval ve ark., 2007). *cat1* ve *cat3* bitkilerinde *cat2* bitkilerinde görülen belirgin bir yaprak fenotipine rastlanmamıştır (Hu ve ark., 2010). Buna ek olarak, bu *cat* fenotipinin CAT2 promotörü kontrolü altında CAT2 ya da CAT3 proteininin ifade edilmesi ile iyileştirilebilir. CAT2'nin fonksiyonu transkriptomik seviyede düzenlendiği gösterilmiştir (Hu ve ark., 2010).

2.9.3. Askorbat-glutasyon döngüsüyle ilişkili enzimatik/enzimatik olmayan moleküller

Askorbat peroksidazlar (APX) Class I bir peroksidazdır. APX, askorbatı (AsA) kullanarak elektron verir ve H_2O_2 'yi detoksifiye eder (Şekil 2.14). APX'in gerçekleştirdiği bu reaksiyon sırasında iki tane AsA molekülü oksitlenerek iki tane monodehidroaskorbat (MDHA) oluşturur ve H_2O_2 suya çevrilir. MDHA molekülü tekrar bir tane AsA ve bir tane dehidroaskorbatı (DHA) oluşturur. Bu sayede AsA'nin geri

dönüşümü ve sürdürülebilirliği sağlanmış olur. DHA, AsA'nin en okside halidir. MDHA redüktaz (MDHAR) enzimi MDHA'yı direkt AsA'ye dönüştürülebilir. MDHA redüktaz NADPH bağlı bir enzimdir. DHA redüktaz (DHAR) enzimi ise okside olmuş DHA'yı tekrar AsA'ye dönüştürür. DHA redüktaz (DHAR) indirgeyici olarak GSH'ı kullanır. AsA dönüşümüne bu şekilde katkı sağlamış olur. Diğer taraftan okside GSH (GSSG) NADPH'ı kullanarak glutatyon redüktaz (GR) enzimiyle tekrardan GSH'a dönüştürülür. AsA-GSH döngüsü sonucunda APX ortamda birikecek ve hücre için toksik olacak H₂O₂'yi ortamdan kaldırmış olur. Ayrıca AsA'nin de ortamda eksilmeden bulunması sağlanmış olur. Ancak ortamda AsA yoğunluğu 20 µM'ın altına düştüğünde APX aktivitesini hızlı ve geri dönüşümsüz bir şekilde kaybetmektedir. Kloroplastik izoformlarda bu inaktivasyon süreleri 30 sn, sitoplazmik izoformlar da ise yaklaşık 1 saat olarak belirlenmiştir (Leonardis ve ark., 2000).



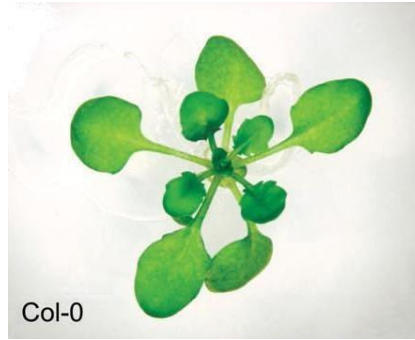
Şekil 2.14. Askorbat Glutatyon döngüsü

Arabidopsis'de 9 adet farklı APX izoformu bulunmaktadır (Mittler ve ark., 2004). Kloroplastta bulunan izoformlar farklı bölgelere yerleşmiştir. kloroplastta üç farklı izoform vardır. Kloroplastın lümeninde bulunan izoform APX4, stromada bulunan sAPX, tilakoidlerde bulunan tAPX olarak adlandırılır. Stromal APX aynı zamanda mitokondrilerde de görülebilmektedir (Chew ve ark., 2003). Bazı bitkilerde sAPX ve tAPX izoformları tek gen tarafından kodlanır. Bunların farklı izoformları alternatif splyaslama sonucu üretilmektedir. Ancak *Arabidopsis*'te bu durum söz konusu değildir. Farklı izoformlar için iki ayrı gen bulunur (Shigeoka ve ark., 2002). Fotosentetik enzimlerin aktivasyonu tiyol gruplarının oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları ile gerçekleşir. Bu nedenle kloroplastta H₂O₂ miktarının artmaması çok önemlidir (Dietz ve

Pfanncschmidt, 2011). Kloroplastlarda ki izoform çeşitliliğinin aksine *Arabidopsis*'de böyle bir şey söz konusu değildir. *Arabidopsis*'de normal koşullarda sitoplazmada tek bir APX izoform bulunmaktadır, ancak yüksek ışık altında ikinci bir izoform (APX2) uyarılmaktadır (Karpinski ve ark., 1999). Peroksizomlarda ise bir adet APX izoformu (APX3) rapor edilmiştir. Yukarıda bahsettiğimiz Asc-GSH döngüsü enzimlerinin de APX'e benzer birden fazla izoformu vardır. *Arabidopsis*'de sitosol, kloroplast ve mitokondrilere dağılmış şekilde 5 adet MDHAR, 5 adet DHAR ve 2 adet GR kodlayan gen mevcuttur. Bunlardan MDHAR1, DHAR1 ve GR1'in ürünleri hem kloroplast hem de mitokondrilere hedeflenmektedir.

2.10. Bitki Materyali: *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. dünyanın her yerinde rahatlıkla bulunabilen tek yıllık bir bitkidir. İngilizce adı mouse ear cress'dir. 19. yüzyılın başlarında önemi anlaşılmış olup dünyada model organizma olarak kullanılmaktadır (Şekil 2.15). Ekonomik değeri olmayan bir bitkidir. 1980 yılından sonra *Arabidopsis* ile ilgili çalışmalar büyük bir ivme kazanmıştır. Dünyanın dört bir yanından toplanmış çok büyük bir "ekotip koleksiyonu" mevcuttur. Laibach'nin (1951) sunduğu öneri sayesinde *Arabidopsis*'in koleksiyonu yapılmış ve genetik stoklar taranmıştır.



Şekil 2.15. *A. thaliana* yabani ekotip columbia

A. thaliana Brassicaceae familyasına aittir. Yaşam döngüsü kısa olmasına rağmen hızlı gelişim periyoduna sahiptir. Genomu küçüktür. Tek yıllıktır. *Arabidopsis*'te bir kere çiçeklenme olur ve yaşam süresi dolar. Yaşam döngüsünü ilkbahar yaz aylarında tamamlar. *Arabidopsis*, kuraklık stresine duyarlı bir glikofittir.

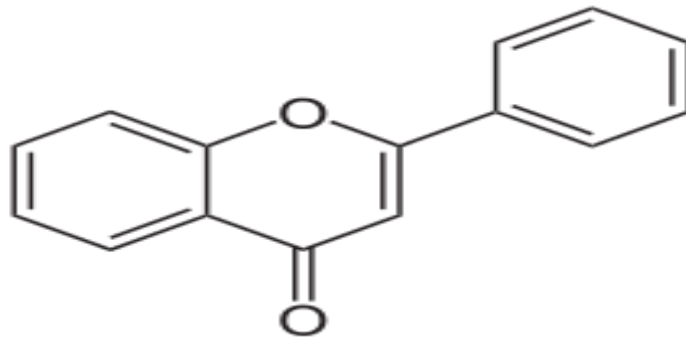
Arabidopsis, yaklaşık 26000 gen (100 Mb) içermektedir (Jithesh ve ark., 2006). *Arabidopsis*'i model organizma yapan özellikleri:

- Kromozom sayısı küçüktür ($2n=10$). Angiospermler arasında en küçük genomu sahip bir bitkidir (Leutwiler ve ark., 1984).
- Verimlidir. Tohum üretim miktarı çok yüksektir (yaklaşık 10 bin adet) (Davis, 1992).
- Hızlı yaşar. Yaşam döngüsünü 5 ile 8 hafta arasında tamamlar. Bu süre ortam koşullarına bağlı olarak değişir.
- Basit ortam koşullarında yaşayabilir. Petri kabı gibi çok küçük alanlarda kolay yetiştirilebilir.
- Çeşitliliği yüksektir. Ekotip koleksiyonunun sayısı yüksektir.
- Üretimi kolaydır. Ekotipler arasında melezleme kolay yapılır, melezleme sonucunda meydana gelen F1 genotipler tam üretkendir.
- Fiziksel, kimyasal ve biyolojik mutajenler kullanılarak mutant genotiplerin elde edilmesi kolaydır.

Arabidopsis'te ER stresi, reaktif oksijen türleri (ROS) sinyalizasyonu ve antioksidan savunması arasındaki ilişki araştırılmıştır. Tunikamisin (Tm) ER stres ajanıdır. NADPH kodlayan genler RBOHD ve RBOHF'dir. Bitki tunikamisine maruz bırakıldığında bu genler indüklenmiştir. ROS süpürücü enzimler aktive olmuştur. Hücrede redoks durumları değişmiştir (Ozgun ve ark., 2014). Bitkideki ROS üretim kaynakları kloroplast ve mitokondridir. Hayvanlarda ise ROS üretimi mitokondride gerçekleşir ve bu üretim ER stresine sıkıca bağlıdır (Berridge, 2002; Hotamisligil, 2010) ve bu stres mitokondriyal disfonksiyonu indükleyebilir. ER stresi ile ROS arasında karşılıklı diyalog mevcuttur. Bitkiler ROS' un olumsuz etkilerinden korunmak için hem enzimleri hem de enzim olmayan metabolitleri kullanırlar (Şekil 2). Bu enzimler süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), peroksidaz (POX), askorbat peroksidaz (APX) ve glutasyon redüktaz (GR) gibi enzimlerdir. Metabolitler ise glutasyon, askorbik asit, α -tokoferol ve karotenoid gibi enzimatik olmayan metabolitlerdir. Fenolik bileşikler hem antioksidan hem de pro-oksidan özelliklerine sahiptir. Stres altında oluşan singlet oksijen, serbest radikaller ve hidroksil radikallerini süpürürler.

2.11. Flavanoidler ve Kurkumin

Flavonoidler sekonder metabolitlerdir. Bitki ve mantarda bulunurlar. Yapı açısından flavonoidler 1,3-difenil propanın türevleridir (Sivam, 2002) (Şekil 2.16). Bunlar, düşük molekül ağırlıklı olup, C6-C3-C6 karbon iskelet ile tanımlanan flavan çekirdeğe dayanmaktadır (Peterson ve Dwyer, 1998). Genel yapısındaki üç halkalar A, B ve C (Pyran) halkaları olarak tanımlanmaktadır.



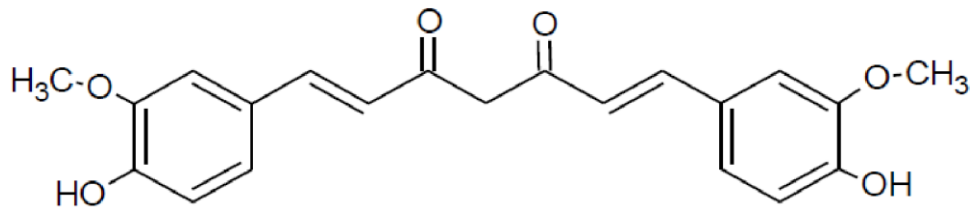
Şekil 2.16. Flavonoid yapısı

Flavonoidler genelde glikozit şeklinde (şeker molekülü ile beraber) bulunurlar. Fakat aglikon (şeker molekülünü içermeyen) şekilleri de mevcuttur. Flavonoidler; flavanonlar, flavonlar, izoflavonlar, antosiyaninler, flavonoller ve flavanlar olmak üzere altı ana grubuna ayrılmaktadır (Peterson ve Dwyer 1998). Flavanlar tek başına mono, bi ve triflavan oluşmaktadır. Flavonoidlerin yapılarının bu farklılığı, hidrogenasyon, hidroksilasyon, metilasyon, sulfanasyon ve glikosilasyon gibi polimerizasyon ve yerine geçme reaksiyonlarından kaynaklanmaktadır (Cook ve Samman, 1996).

Flavonoidler, bitkilerde bulunmaktadır. İnsan sağlığı üzerinde de olumlu etkileri kanıtlanmıştır. Molekül ağırlıkları düşük olup doğal olan bileşiklerdir (Feliccia ve ark., 1997). Flavonoidlerin farklı işlevleri mevcuttur. Örneğin, α -tokoferole Vitamin E'ye karşı lipofilik antioksidandır. Flavonoidler, α -tokoferole (Vitamin E) göre daha hidrofiliktir. Bunun sebebi hücre içerisindeki konumlarından kaynaklanmaktadır. α -tokoferolin (Vitamin E) kroman halkası zar fosfolipitlerin ester karbonil grupları arasında hidrojen bağı ile membranda bulunmaktadır. Flavonoidler ise membranın polar tarafına yakın yerleşmiştir. Bu sebeple flavonoidler daha hidrofiliktir. Bu sayede sulu ortamda daha hızlı hareket eder. Yüksek hidrofilikliği sayesinde sulu peroksil

radikallerini yakalayarak lipit peroksil radikallerine etki eder. Bu şekilde α -tokoferole (Vitamin E) tüketimi engellenmiş olur. Flavonoitlerin sahip olduğu antioksidan kapasitesi flavonoidlerin molekül yapısı tarafından belirlenmektedir. Serbest radikallerin süpürücü aktiviteleri hidroksil gruplarının konumuna bağlıdır. Bu moleküllerin antiviral, antialerjik, antikoagülan, anti-inflamatuar etkileri üzerinden terapötik potansiyelleri de vardır. Flavonoitler sahip oldukları anjiogenez ile hücre sinyal iletimi ve hücre döngüsünün kontrolü özelliğinden dolayı güçlü bir anti-kanser ajanlardır. Ayrıca antimutajenik ve antiproliferatif özellikleri de vardır. Bu sayede kansere karşı savaşan önemli bir moleküldür. Sadece bu kadar değil flavonoitlerin apoptozu tetikleme, hücre farklılaşmasını ve hücre döngüsünü düzenleme gibi özellikleri vardır. Flavonoidler, aynı zamanda bitkilerde bir takım biyolojik ve fizikokimyasal özellikleri belirlemede de görevlidirler. Örneğin antosiyaninler bitkilerde renk verici pigment olarak kullanılır. Bu sayede hayvanlar tarafından dikkat çekilmiş olur ve tozlanma, gübreleme ve tohumların yayılması gerçekleşmiş olur (Harborne, 1988). Flavonoidlerin bir diğer özelliği genç yapraklarda, antioksidanlarda, enzim inhibitörlerinde ve toksik maddelerin öncüllerinde zararlı UV ışınlarına karşı hafif bir ekran görevi görebilir ve patojenlere karşı direnç sağlayabilir. Buna ek olarak, flavonoidler fotosensitizasyon ve enerji aktarım bileşikleri olarak işlev görebilir.

Bitkiler üzerinde yapılan çalışmalar oldukça yoğundur. Bitkisel kaynaklı besinler ile bunların aktif bileşenleri üzerinde araştırmalar hızlandırılmıştır. Özellikle de günümüzün önemli sorunu olan ve tam olarak kesin çözümü bulunamayan kanser üzerinde bitkilerin etkileri araştırılmaktadır. Kurkumin (Şekil 2.17) kanseri baskılayıcı özelliği nedeniyle son yıllarda kanser araştırmalarında önem kazanmıştır. Antikanser bir ajan olarak; pek çok kanser türünde, tümör oluşumunu baskıladığı görülmüştür. Dünya sağlık örgütü tarafından günlük olarak 3 mg kg⁻¹'e kadar alınmasını önermektedir.



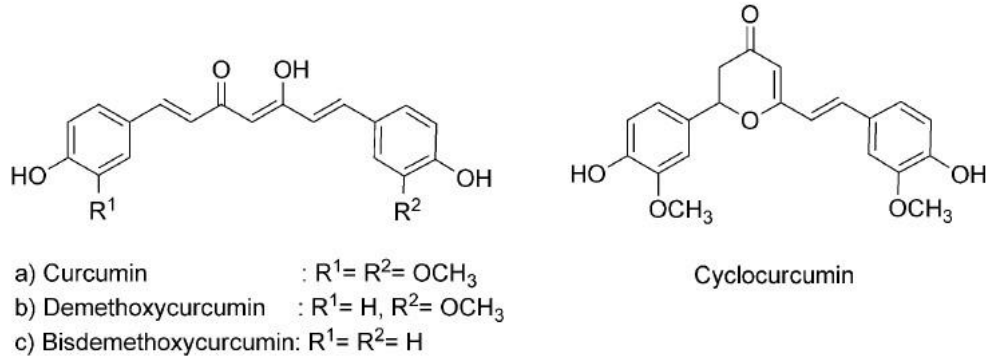
Şekil 2.17. Kurkumin [(1E,6E)-1,7-bis (4-hidroksi-3-metoksifenil)- 1,6-heptadien-3,5-dion]

Kurkumin Asya ülkelerinde bir baharat olarak kullanılan ve *Curcuma longa* (zerdeçal) ve diğer *Curcuma spp.* türlerinde bulunan sarı renkli bir bileşendir (Şekil 2.18). Sadece Asya ülkelerinde aynı zamanda Hindistan, Çin, Endonezya, Filipinler gibi tropikal kuşak boyunca lokalize olmuştur.



Şekil 2.18. *Curcuma longa* bitkisi ve rizomları

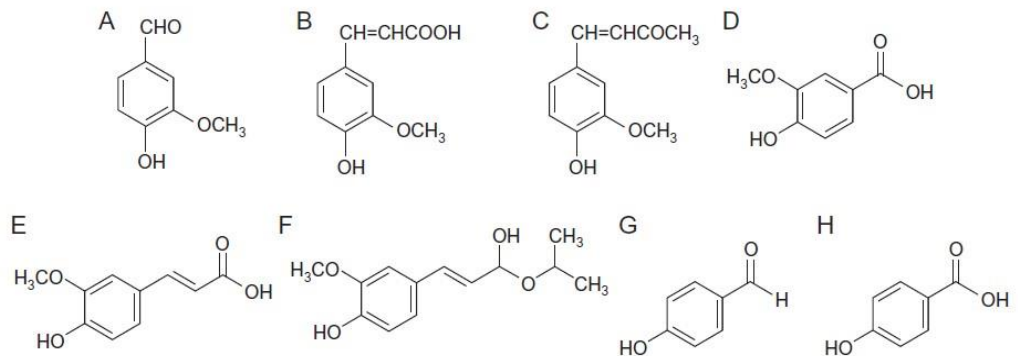
Ticari olarak satılan kurkuminin, demetoksikurkumin ve bis-demetoksikurkumin da içerir (Şekil 2.19). Bu bileşikler, diarilheptanoidler grubuna aittir ve birlikte kurkuminoid olarak adlandırılır. Kurkuminin yapısında iki fenolik halka bulunur, bunlar orto konumlarında birer metoksi eter içerir (Oetari ve ark., 1996). Kurkumin hidrofobik karakterde olup tautomerik bir bileşiktir. Enol formu alkali ortamlarda elektron verici olarak işlev görür ve bis-keto formu ise nötral ve asidik çözeltilerde güçlü bir proton verici rolündedir. Kurkuminin stabilitesi, pH değerlerine bağlıdır ve bu durum farklı pH değerlerinde kurkumin çözeltisinin renginin değişmesiyle kanıtlanmıştır. $pH < 1$ olduğunda, kurkumin çözeltileri protonlanmış formun varlığından dolayı kırmızı renktedir. Diğer yandan pH 1-7'de, kurkumin çözeltileri sarıdır ve moleküllerin çoğu nötr formdadır. 7.5'ten yüksek pH değerlerinde, kurkumin çözeltileri turuncu kırmızıya doğru bir renk değişikliği sergiler (Tonnesen ve Karlsen, 1985).



Şekil 2.19. Kurkuminoidlerin kimyasal yapısı

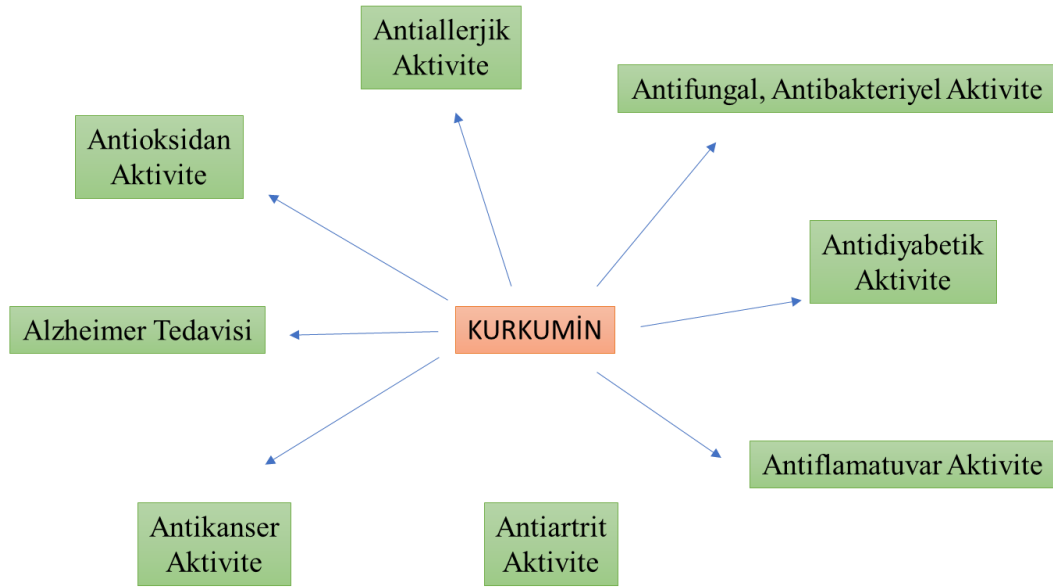
Zerdeçal, %3-5 kurkuminoid (%50-60 kurkumin) içerir ve %5 kadar da uçucu yağlar ve reçineler içermektedir. Zerdeçaldaki kurkuminoid içeriği, coğrafi koşullara bağlı olarak %2-9 arasında değişmektedir. Örneğin, *Curcuma longa* (1-2 mg g⁻¹) ve *Curcuma aromatica* (0.1 mg g⁻¹). İle karşılaştırıldığında, *Curcuma zedoaria* en yüksek kurkuminoid içeriğine (> 100 mg g⁻¹) sahiptir (Zhang ve ark., 2009).

0.1 M fosfat tamponu veya pH 7.2 ortam (her ikisi de 37°C'de) gibi biyolojik ortamda, kurkuminin %90'ı inkübasyondan sonraki 3 saat içinde hızla bozulmaktadır (Şekil 2.20). Kurkumin bozuluma uğradığında, üç ürüne dönüşmektedir, bunlar: vanilin, ferulik asit ve feruloil metan. Vanilin, ana bozunma ürünü olarak bulunmuştur ve inkübasyon süresi uzadıkça oluşum miktarı da artmaktadır. Ayrıca pH 7-10 ve 31.5°C sıcaklıkta kurkuminin birincil bozunma ürünleri FA ve feruloilmetan olmaktadır (Oetari ve ark., 1996).



Şekil 2.20. Kurkuminin bozunma ürünleri: (A) vanilin, (B) ferulik asit, (C) feruloilmetan, (D) vanillic asit, (E) ferulik aldehit, (F) 4-vinylguaiacol, (G) p-hidroksibenzaldehit, (H) p-hidroksibenzoik asit.

Kurkumin geleneksel tıpta yaygın olarak kullanılmaktadır. Son 30-40 yıl içerisinde kurkuminin anti-inflamatuar ve anti-kanser etkileri üzerinde durulmuştur. Günümüzde, yapılan kanser tedavilerine karşı ilaç direnci gelişmektedir ayrıca sitotoksosite ve genotoksosite gibi dezavantajları oluşmaktadır. Kurkuminin biyolojik etkileri çok geniş olup Şekil 2.21’de özetlenmiştir.



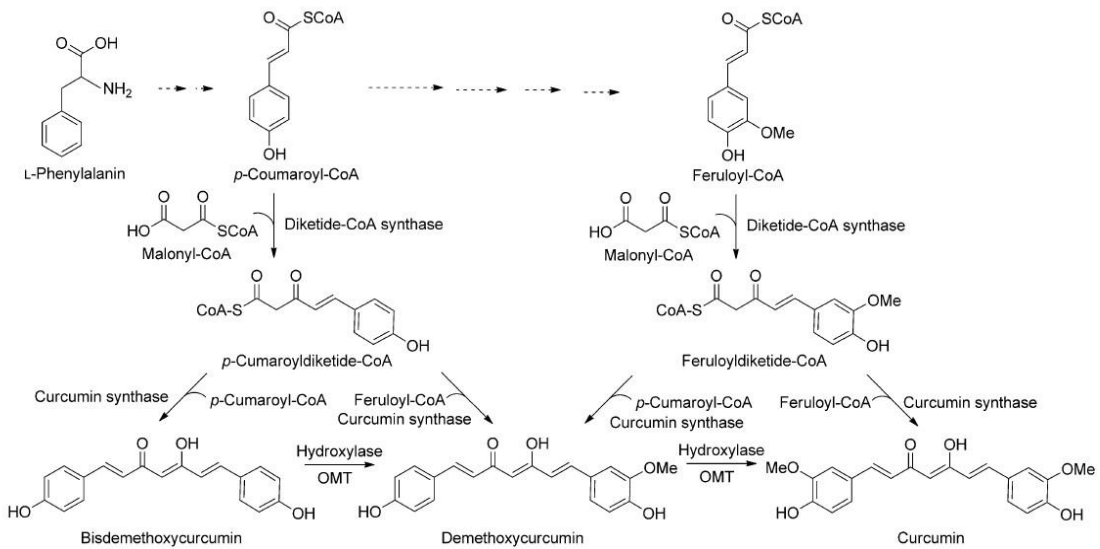
Şekil 2.21. Kurkuminin hücreler üzerinde biyolojik etkileri

Kurkuminin ışığa karşı stabilitesi ayrıca dört farklı organik çözücünde test edilmiştir: metanol, etil asetat, kloroform ve asetonitril. Test edilen bu çözücülerde, kurkuminin fotodegradasyonu, görünüşe göre birinci derece kinetiği takip etmektedir ve çözelti içindeki kurkuminin yarı ömrü, metanol>etil asetat>kloroform>asetonitril şeklindedir. Kurkuminin siklizasyon ürünü sadece metanol ve kloroform içinde tespit edildi (Tonnesen ve ark., 2005).

Yüksek doz kurkuminin herhangi bir yan etkisi yoktur. Yapısında bulunan çift bağlar emilimden sonra indirgenerek pek çok aktif metabolit oluşturur. Sonra bu indirgenmiş metabolitler ve kurkumin ve glukuronitlere ve sülfatlara dönüşmektedir. Kurkumin hidrofobik yapıda olduğu için biyoyararlanımı oldukça düşüktür. Hidrofobik olmasından dolayı sudaki çözünürlüğü sınırlıdır. Kurkuminden en yüksek derecede yararlanabilmek için fosfolipit, lipozom, nanopartikül formülasyonları gibi çeşitli yaklaşımlar ve farklı ajanlarla kombinasyonu denenmektedir. Bu denemelerin bir

sonucunda siklodekstrinler ile kurkumin kompleks oluşturduğunda sudaki çözünürlüğünün arttığı bildirilmiştir.

Kurkuminoid biyosentezi çok aşamalı bir süreçtir (Katsuyama ve ark., 2007). L-fenilalaninden üretilen p-kumaroyl-CoA ile Feruloyl CoA üzerinden sentezlenebilmektedir. Bu yollardan özellikle kumaroyl-CoA daha çok tercih edilir. p-kumaroyl-CoA, diketit CoA sentaz enzimi vasıtasıyla ve reaksiyona malonil CoA'nın katılmasıyla birlikte p-kumaroyldiketide CoA oluşur. Bu ürün farklı enzimlerin katalizlemesiyle bisdemetoksikurkumin ve demetoksikurkumin oluşur. Bisdemetoksikurkumin hidroksilaz enzimiyle de demetoksikurkumine dönüşebilir. Aynı şekilde feruloyl Co A üzerinden feruloyldiketide Co A oluşabilir ve bu ürün p-kumaroyl CoA kurkumin sentaz ya da kurkumin sentaz vasıtasıyla demetoksikurkumin ve kurkumin oluşturabilir (Şekil 2.22).



Şekil 2.22. Kurkuminoid biyosentez yolu

Çalışmamızda *Arabidopsis* fidelerinin bulunduğu ortama tunikamisin eklenip ER stresi uygulanmıştır. ER stresinin konsantrasyonu literatür bilgileri baz alınarak yapılacak ön denemelerle belirlenmiş ve $0.15 \mu\text{g ml}^{-1}$ tunikamisin uygulanmasına karar verilmiştir. Kurkuminin toksik olmayan miktarları deneme sonucu belirlenmiş ve 1 ve $10 \mu\text{M}$ uygulanmasına karar verilmiştir. Kurkumin hem kontrol hem de stres altındaki *Arabidopsis* fidelerine dışarıdan uygulanmıştır. Kurkuminin stres altındaki *Arabidopsis* fideleri üzerinde nasıl bir koruyucu rol oynadığı gözlemlenip fizyolojik ve biyokimyasal

analizlerle belirlenmeye çalışılmıştır. Fidelere stres uygulandıktan sonra belli dönemlerde fidelerden örnekleme yapılmış ve fidelerdeki ROS miktarı (H_2O_2) ve SOD, CAT, POX ve APX gibi antioksidan enzim veya izozim (Mn-SOD, Cu/Zn-SOD ve FeSOD) aktivite tayinleri ve total protein miktarı belirlenmiştir. Ayrıca kısmi büyüme oranı, bağıl su içeriği ve lipid peroksidasyonu gibi fizyolojik ve biyokimyasal parametreler de ölçülmüştür.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Tohumların temini ve sterilizasyonu

Yüksek lisans tezinde genom dizisi tamamlanmış olan model bitki *Arabidopsis thaliana* ekotip Columbia bitki materyali olarak seçilmiştir. Tohumların ana stoku NASC (European Arabidopsis Research Center)'dan temin edilmiş olup, tohumdan tohum üretme yapılarak tohum çoğaltılması sağlanmıştır. Tohum çoğaltma işlemleri laboratuvar ortamında kontrollü şartlarda ve MS ortamında (Murashige ve Skoog, 1962) tamamlanmıştır. Sterilizasyon aşamasında, *A. thaliana* tohumları %70 etanolde 1 dakika bekletilmiş ve ardından steril distile suda 5 kez yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra 10 dakika %4 NaCl (sodyum hipoklorit) çözeltisinde tutulmuş ve yeniden steril distile suda 5 kez yıkanarak sterilize edilmiştir. *A. thaliana* tohumlarının çimlendirildiği ve fide haline getirildiği ortam Şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1 MS ortamında yetiştirilen *Arabidopsis* bitkileri

3.2. Deneme Dizaynı

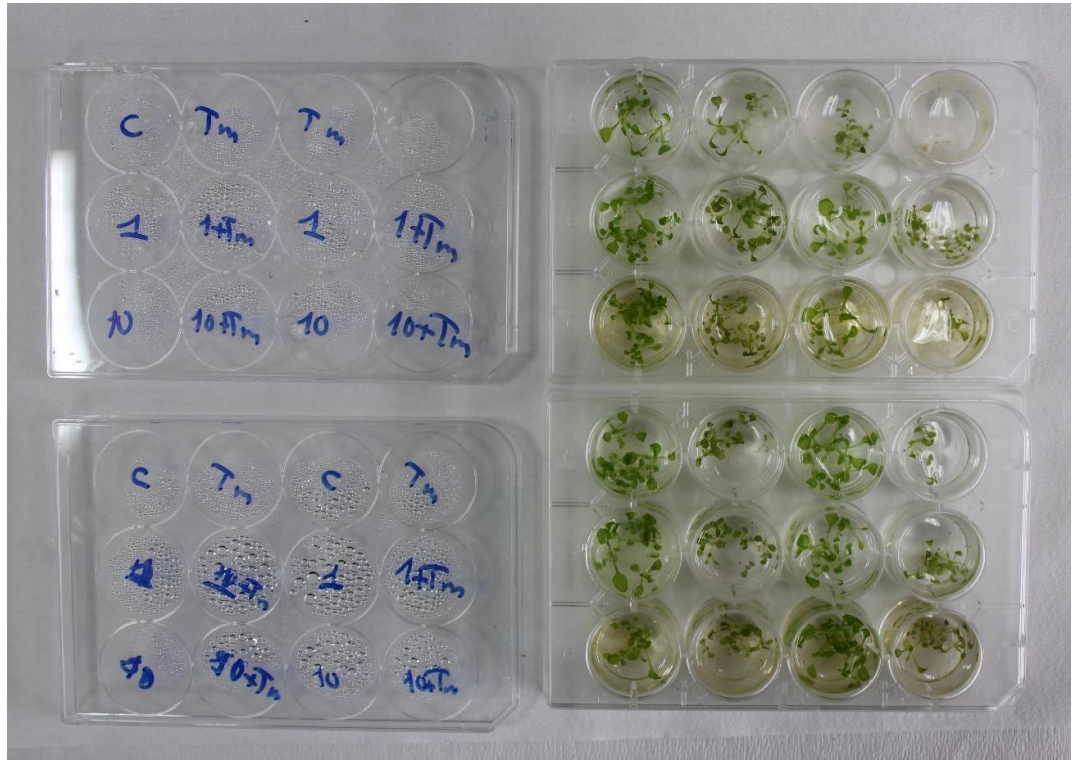
Çalışmada stres unsuru olan tunikamisin aracılı ER stresini oluşturabilmek için McCormack ve ark. (2015) tarafından verilen bitki uygulama yöntemleri kullanılmıştır. Bu araştırmacılar tarafından belirtilen yöntemde bitkiler, %0.6 sakkaroz ve %0.7 agar içeren Murashige ve Skoog (MS) ortamında yetiştirilmektedir (Murashige ve Skoog, 1962). MS ortamı kullanılmasının amacı ER stresi uygulaması sırasında bitkilere tunikamisinin eşit miktarda dağılması ve hasat ve uygulama zamanlarında bitkide oluşabilecek yaralanma etkilerinin azaltılmasıdır.

Uygulama, tohumlar çimlendikten 4 gün sonra yapılmış olup 4. günün sonunda tunikamisin ve kurkumin uygulamaları tamamlanmıştır. Uygulama süresi 7 gün süresince

devam etmiştir ve 7. Günün sonunda analizler için örnekleme yapılmıştır. ER stresini uyarmak için tunikamisin ($0.15 \mu\text{g ml}^{-1}$) ve kurkumin (1 ve $10 \mu\text{M}$) hem tek başına hem de birlikte uygulanmıştır (Şekil 3.2). Bu durumda çalışmamızda bulunan uygulama grupları aşağıdaki tablodaki gibi özetlenebilir (Çizelge 3.1):

Çizelge 3.1. Denemede kullanılan gruplar ve tanımları

Grup	Grubun tanımı
K	Kontrol grubu, herhangi bir uygulama yapılmamış grup
Tm	Kontrol koşulları altında sadece $0.15 \mu\text{g ml}^{-1}$ tunikamisin uygulaması yapılan grup
1Cur	Kontrol koşulları altında sadece $1 \mu\text{M}$ kurkumin uygulaması yapılan grup
10Cur	Kontrol koşulları altında sadece $10 \mu\text{M}$ kurkumin uygulaması yapılan grup
1Cur+Tm	$0.15 \mu\text{g ml}^{-1}$ tunikamisin ve $1 \mu\text{M}$ kurkumin uygulamaları yapılan grup
10Cur+Tm	$0.15 \mu\text{g ml}^{-1}$ tunikamisin ve $10 \mu\text{M}$ kurkumin uygulamaları yapılan grup



Şekil 3.2. Ön deneme süresince yapılan deneme grupları

Çalışmalar için hasat edilen örnekler sıvı azotta dondurulmuş ve -80°C' de analizlere kadar muhafaza edilmiştir. 4 günlük bitkiler, uygulamanın 7. gününde hasat edilmiş ve aşağıda belirtilen fizyolojik ve biyokimyasal parametreler ölçülmüştür:

- Kısmi büyüme oranı (RGR)
- Bağlı su içeriği (RWC)
- Antioksidan enzim/izozim aktivite tayinleri (SOD, CAT, POX, APX)
- ROS miktarı (H₂O₂ miktarı)
- Lipid peroksidasyonu (TBARS miktarı)
- Prolin analizi
- Protein miktarı

3.3. Kısmi büyüme oranı (RGR)

Uygulamaların sonunda örnekleme yapılan her bir gruptan alınan rastgele bitki fidelerinin uzunlukları ölçülmüştür. Bu örneklerin yaş ağırlıkları da belirlenmiştir. Örnekler 70°C'de 72 saat etüvde bekletildikten sonra kuru ağırlıkları kaydedilmiş ve Hunt ve ark. (2002) tarafından verilen formüle göre RGR değeri hesaplanacaktır. Hesaplama kullanılan formül aşağıda verilmiştir:

$$RGR = [\ln (DW2) - \ln (DW1)] / (t2 - t1)$$

Formülde yer alan DW1, uygulama yapılmadan önceki kuru ağırlığı, DW2 ise uygulama sonrasında 7. gününde örnekleme yapılan bitkinin kuru ağırlığı, t1 uygulama öncesindeki zamanı, t2 ise 7. günü temsil etmektedir.

3.4. Bağlı Su içeriği (RWC)

Örnekleme zamanında her bir uygulama grubundaki bitkilerden yaklaşık olarak eş boyutlarda yaprak örnekleri alınarak yaş ağırlıkları ölçülmüş ve değer FA olarak kaydedilmiştir. Daha sonra yapraklar 6 saat süresince düşük ışık altında 50 ml deiyonize su bulunan petrilere bekletilmiş ve turgorlu hale geçmeleri sağlanmıştır.

Turgorlu hale geçen yaprakların fazla suyu alınarak tartılmış ve ölçülen değer TA olarak kaydedilmiştir. Yaprak örnekleri 48 saat süreyle 65-70°C'de etüvde kurutulmuş ve kuru ağırlıkları (DA) tartılmıştır. Her bir gruba ait yaprak örneklerinin bağlı su içeriği (RWC) Smart ve Bingham (1974) tarafından verilen formüle göre % olarak hesaplanmıştır.

$$\text{RWC (\%)} = [(\text{Yaş ağırlık} - \text{Kuru ağırlık}) / (\text{Turgorlu ağırlık} - \text{Kuru ağırlık})] \times 100$$

3.5. Enzim ve İzozim tayinleri için örneklerin homojenizasyonu

Antioksidan enzimlerin ekstraksiyonu için derin dondurucuda saklanmış olan yapraklar, soğutulmuş havanda 0.1 g yaprak örnekleri sıvı azotta homojenizasyon tamponunda homojenize edilmiştir. Bu solüsyon, %2 polyvinylpyrrolidone (PVPP, w/v), 1 mM EDTA ve pH 7.8'de 50 mM Na-fosfat tamponundan oluşmaktadır. Filtrasyon sonrası +4°C'de, 14000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant, enzim ve izozim aktivitesi analizlerinde kullanılmıştır. Ekstraksiyon prosedürünün tümü +4°C'de gerçekleştirilmiştir.

3.5.1. Süperoksit dismutaz izozim/enzim tayini

Her bir kuyucuğa eşit miktarda protein içeren yaprak homojenatı yüklenerek Laemmli'ye göre (1970) native PAGE ile ayrılarak SOD izozim tayini yapılmıştır. Jele yüklenmeden önce taze yaprak örnekleri 4°C'de 9 mM Tris HCl (pH 6.8) ve %13.6 (v/v) gliserol ile homojenize edilmiştir. Homojenatlar 14000 g'de 5 dakika süresince 4°C'de santrifüj sonrasında elde edilen süpernatantlar enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Protein miktarı, standart olarak bovin serum albumin kullanılarak Bradford (1976) tarafından belirtilen yöntemle göre belirlenmiştir. Jele protein yüklemesi yapıldıktan sonra +4°C'de sabit akımla (120 mA) %12'lik seperating jel ve %5'lik sticking jelde (sticking jel için 60 mA, seperating jel için 120 mA) ayrılmıştır. Total SOD aktivitesi, Beauchamp ve Fridovich'e (1971) göre riboflavin ve nitrobluetetrazolium (NBT) boyası ile belirlenmiştir. Jeller 30 dakika kadar boya solüsyonunda bekletilmiş ve SOD izozim bantlarının densiyometrik analizi Bio-1D yazılım programında görüntüleme cihazı ile tayin edilmiştir.

3.5.2. Katalaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Katalaz (CAT) enzim aktivitesi, Bergmeyer'in (1970) tanımladığı metoda göre yapılmıştır. 0.1 mM EDTA, 50 mM Na-fosfat tamponu (pH 7.0), de-iyonize su, %0.3 H₂O₂ ve enzim ekstraktı, 1ml'lik kuvertlere konulmuştur. Analizde UV ışığı bölgesinde köre karşı 240 nm'de H₂O₂'nin azalma oranı temel alınarak CAT aktivitesi

belirlenmiştir. Bu enzim aktivitesi dakikada tüketilen $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ olarak ifade edilmiştir. Reaksiyon süresince absorbansta oluşan azalma üç dakika boyunca takip edilmiştir. CAT izozimlerinin tayin yönteminde Woodbury ve ark. (1971) tarafından tanımlanan metodu kullanılmıştır.

3.5.3. Peroksidaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Peroksidaz (POX) izozim ve enzim aktiviteleri, sırasıyla Seevers ve ark. (1971) ve Herzog ve Fahimi'nin (1973) tanımladığı metoda göre yapılmıştır. H_2O_2 varlığında okside olan DAB (3'-3'-diaminobenzidin tetrahidroklorit) oluşum miktarına bağlı olarak 3 dakika boyunca 465 nm'deki absorban değişimleri okunmuştur. DAB solüsyonu, %0.6'lık H_2O_2 , de-iyonize su ve enzim ekstraktı polistren küvetteki reaksiyon karışımını oluşturmuştur. Reaksiyon H_2O_2 'nin katılmasıyla başlatılmış ve dakikada gözlenen absorban artışı temel alınmıştır. Spesifik enzim aktivitesi dakikada tüketilen $\mu\text{mol/ml H}_2\text{O}_2$ olarak ifade edilmiştir.

3.5.4. Askorbat peroksidaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Total askorbat peroksidaz enzim aktivitesi için Nakano ve Asada (1981) tarafından belirtilen protokol kullanılmıştır. Askorbatın oksidasyonuna bağlı olarak gerçekleşen absorbanstaki düşüş 180 sn süresince takip edilmiştir.

3.6. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) miktarının belirlenmesi

3.6.1. Hidrojen peroksit (H_2O_2) miktarının belirlenmesi

H_2O_2 tayini Liu ve ark.'na (2010) göre yapılacaktır. 0.5 g yaprak örnekleri sıvı azotta öğütüldükten sonra -20°C 'de bekletilmiş asetonun 3 ml'si homojenize edilmiş ve 3000 g'de 4°C 'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. 1 ml süpernatanta 0.1 ml titanyum karışımı (%20 (v/v) titanyum tetraklorid içeren ve hidroklorik asit ile hazırlanan) eklenmiştir. Sonrasında titanyum-peroksit kompleksi, 0.2 ml amonyum hidroksit ile karıştırılmıştır. Reaksiyon karışımı 16000 g'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Pellet kısmı -20°C 'ye soğutulmuş aseton ile yıkanmıştır. Elde edilen pellet 1 M H_2SO_4 'ün 2 ml'si ile çözülmüştür. Solüsyonun absorbanı 410 nm'de su körüne karşı okunmuştur.

Örneklerdeki H₂O₂ miktarı, bilinen H₂O₂ miktarlarına göre hazırlanan standart eğim grafiğine göre hesaplanmıştır.

3.7. Lipit Peroksidasyonun Belirlenmesi

Lipit peroksidasyonunun belirlenmesi için TBAR reaksiyonu sonucu oluşan malondialdehit (TBARS) miktarı ölçülmüştür. Bu amaçla Rao ve Sresty'nin (2000) tanımladığı yöntem kullanılmıştır. 0.1 g yaprak örnekleri TCA (tiokloroasetik asit) ile homojenize edildikten sonra 10000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında, 1 ml'lik süpernatanta 4 ml TBA (2-Tiobarbitürik asit) ve TCA (Triokloroasetik asit) karışımını içeren reaksiyon karışımı eklenmiş ve tüm deney tüpleri 95°C'de 30 dakika ısıtılmıştır. Karışım 10.000 g'de 15 dakika santrifüjlenmiştir. Aktivite değeri için 532–600 nm aralığında absorbanans değişimleri incelenmiştir.

3.8. Prolin Miktarının Belirlenmesi

Yaprak örneklerindeki serbest prolin içeriği, Bates ve ark. (1973) tarafından gösterilen metoda göre yapılmıştır. Her bir uygulama grubundan 0.1 g yaprak örnekleri tartılmış ve %3'lük (w/v) sülfosalisilik asitle homojenize edilmiştir. Homojenat filtre kağıdından süzdürülmüştür. Asit ninhidrin ve glasiyal asetik asit eklendikten sonra oluşan karışım 100°C'de 1 saat su banyosunda bekletilmiştir. Tüp içerisindeki reaksiyon durdurmak amacıyla buz banyosu kullanılmıştır. Bu karışıma toluen ilave edilmiş, sıvı fazdan aspire edilen toluen fraksiyonunun 520 nm'deki absorbanansı spektrofotometreden okunmuştur. Prolin miktarı, kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplanmış ve µmol prolin g⁻¹ taze ağırlık olarak ifade edilmiştir.

3.9. Total protein miktarının belirlenmesi

Total protein miktarı, analizleri Bradford'a (1976) göre BSA (Bovine Serum Albumine) standartları kullanılarak yapılmıştır. İçerdiği protein miktarı, 50 µl örnek ve 1 ml Bradford boyası içeren son hacmi 1 ml olan polistren küvetlerde ölçülmüştür. Kör, 50 µl seyreltme tamponu ve 1 ml Bradford boyasından oluşmaktadır. Örnekler köre karşı

Shimadzu UV spektrofotometre cihazı ile 595 nm'de okunmuştur. Çözünebilen total protein miktarı mg yaş ağırlık olarak belirlenmiştir.

3.10. İstatistiksel Analizler

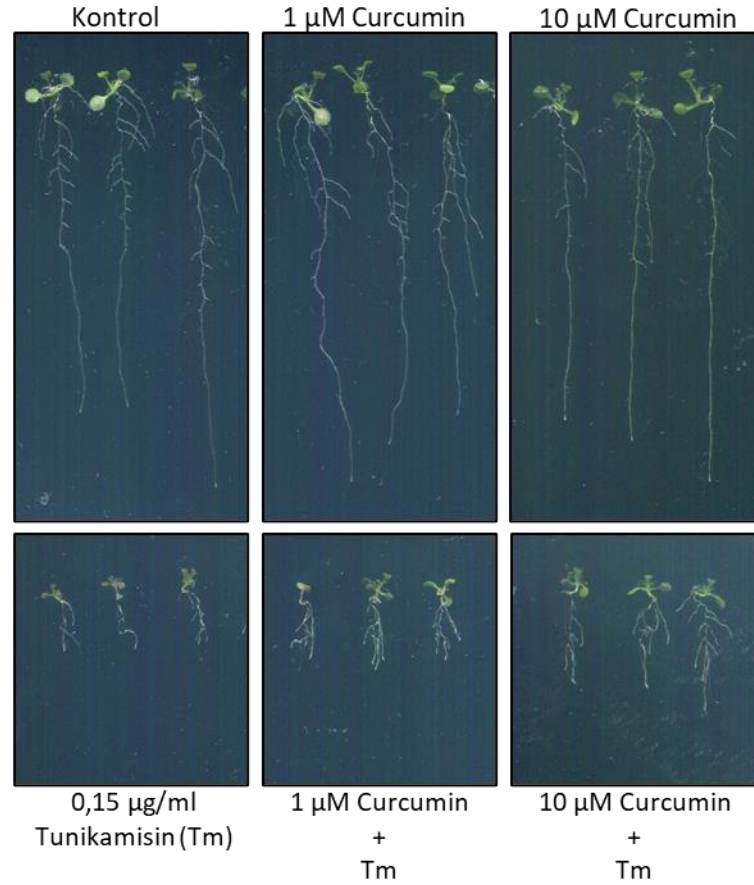
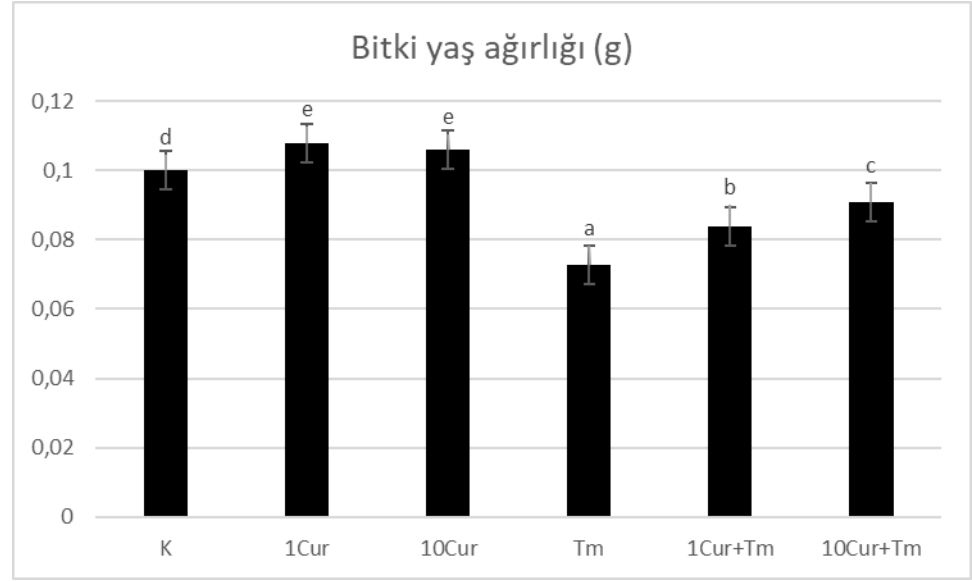
Bağımsız olarak her bir deneme üç kez tekrar edilmiş ve elde edilen sonuçlar one-way ANOVA analiziyle (tek yönlü varyans analizi) değerlendirilmiştir. Uygulama gruplarının istatistiksel olarak birbirine olan farkını ölçmek için TUKEY post-test uygulanmıştır. Bu karşılaştırma sonucunda $P < 0.05$ değerine sahip uygulama grupları birbirinden istatistiksel olarak farklı olarak değerlendirilmiştir. İstatistiksel analizler SPSS yazılımı (versiyon 23.0) ile gerçekleştirilmiştir. Tez metni içinde yer alan çizelgelerdeki hata çubukları ortalama standart hatayı göstermektedir ve grafiklerdeki değerler ortalama olarak verilmiştir.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında amaç tunikamisin ile uyarılan ER stresi altında *A. thaliana* fidelerinde dışarıdan uygulanan kurkuminin fizyolojik ve biyokimyasal cevaplarının belirlenmesidir. Bu amaçla yapılan analizlerin sonuçları ve değerlendirilmesi aşağıda verilmiştir.

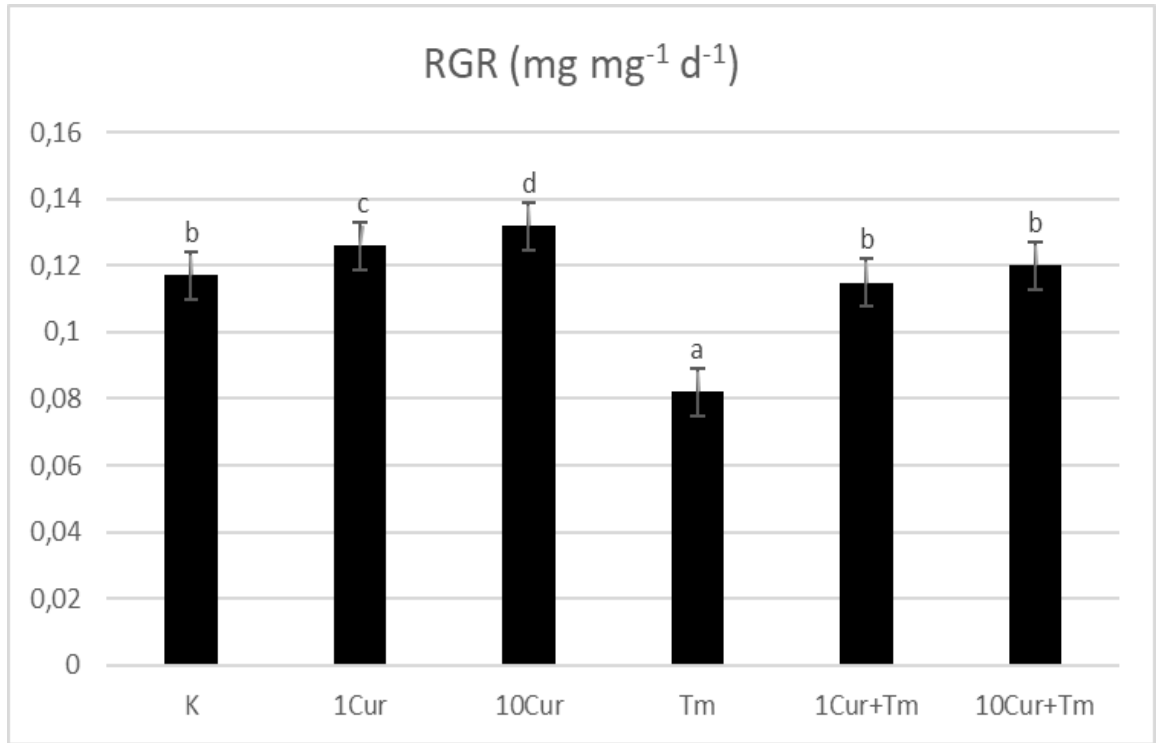
4.1. ER stresi ve/veya kurkumin gruplarında kısmi büyüme oranında oluşan değişimler

ER stresinin ve kurkuminin büyüme üzerine etkilerini göstermek için *A. thaliana* fidelerindeki fenotipik değişimler, bitki yaş ağırlığı (Şekil 4.1) ve yapraklarında kısmi büyüme oranları (RGR) (Şekil 4.2) analiz edilmiştir.



Şekil 4.1. Tunikamisin (Tm, $0,15 \mu\text{g ml}^{-1}$) ile uyarılan ER stresine maruz kalan *Arabidopsis* fidelerinde kurkumin (1Cur; $1 \mu\text{M}$ ve 10Cur; $10 \mu\text{M}$ kurkumin) uygulandıktan sonra bitki yaş ağırlıklarında meydana gelen değişimler ve uygulamalara bağlı olarak *Arabidopsis* fidelerindeki fenotipik değişimler

Arabidopsis fidelerinin köklerindeki strese bağılı inhibisyon net olarak görülmektedir (Şekil 4.1). ER stresi altındaki *Arabidopsis* fidelerinin yaş ağırlığında da azalma izlenmiştir. Diğer yandan, bitki yaş ağırlıklarındaki ER stresıyla birlikte gözlenen bu azalma, kurkumin uygulaması ile önlenmiştir. Strese maruz kalan *Arabidopsis* fidelerine kurkumin uygulaması, sadece stres uygulanan gruba göre yaş ağırlığında artma sağlamıştır ve bu değişim 10 µM kurkumin uygulamasında daha bariz olarak izlenmiştir. Bu etki uygulama sonrasında yapılan bitki fotoğraflarında da izlenmiştir. Kurkuminin stres altındaki büyümeye olan etki daha önce de çalışılmıştır ve arsenik stresine maruz bırakılan *Vigna radiata* fidelerinde büyümenin arttırıldığı rapor edilmiştir (Upadhyay ve ark., 2014). Bu çalışmada kurkumin uygulaması ile toplam karetenoid miktarının total klorofil miktarından daha fazla olduğunu ve kurkumin aracılı karetenoid miktarındaki artışın stresin neden olduğu fotosentetik hasarın iyileştirilmesinde etkili olduğu bildirilmiştir. Fotosentezdeki bu iyileşme, organik moleküllerin artan yapımıyla ilişkili olduğundan çalışmamızda büyüme parametresindeki artışın nedeni olarak açıklanabilir. Kurkumin ER stresinin membranlar üzerindeki negatif etkilerini de ortadan kaldırarak büyümede iyileşme sağlamış olabilir. Kurkuminin büyümedeki bu yanıtı sadece stres altında değil, aynı zamanda kontrol koşulları altında da uygulanan kurkumin miktarları ile sağlanabilmiştir.



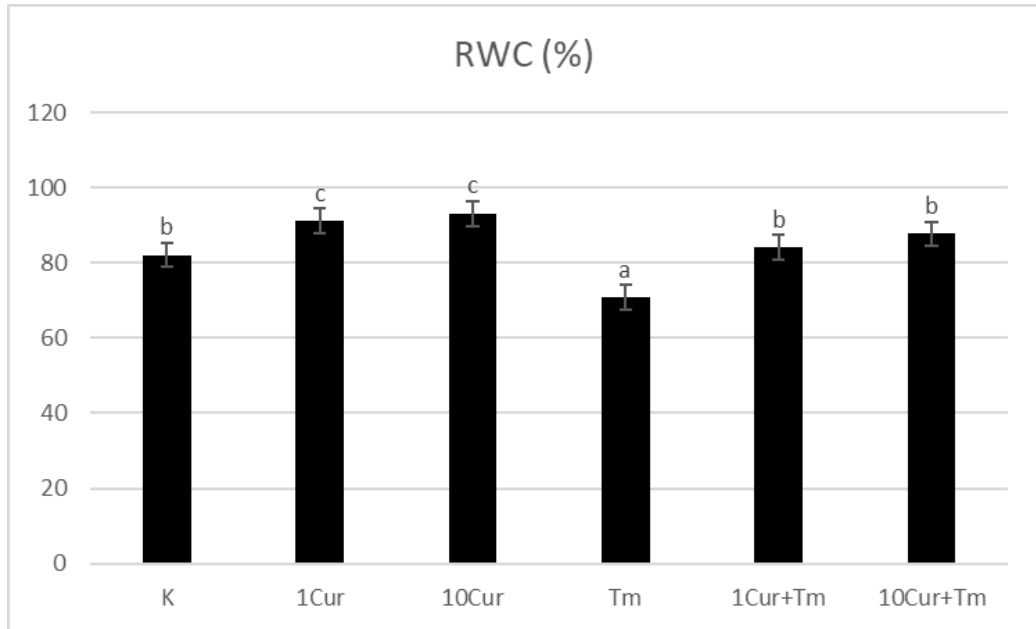
Şekil 4.2. Tunikamisin (Tm, 0.15 µg ml⁻¹) ile uyarılan ER stresine maruz kalan *Arabidopsis* fidelerinde kurkumin (1Cur; 1 µM ve 10Cur; 10 µM kurkumin) uygulandıktan sonra kısmi büyüme oranında (RWC) meydana gelen değişimler

ER stresi oluşturulan *A. thaliana* bitkilerinde RGR değerleri deneme süresince ciddi şekilde azalmıştır. Tunikamisin ile uyarılan ER stresi altında *Arabidopsis* fidelerinde ve köklerinde azalmalar daha önce yapılan çalışmalarla da gösterilmiştir (Ozgur ve ark., 2014). ER stresi kaynaklı bu azalmanın nedeni, Watanabe ve Lam (2008) tarafından da belirtildiği gibi hücrelerin nükleus değişimlerine bağlı olarak hücre ölümlerinin artışıyla ilgili olabilir. Daha önce yapılan başka bir çalışmada ise (Reinhardt ve ark., 2003) tunikamisin ile uyarılan ER stresinin büyümedeki azalması oksin taşınımını azaltan glutasyon tüketimine bağlı olduğu gösterilmiştir. ER stresi ve oksin arasındaki etkileşimi gösteren Irsigler ve ark. (2007) çalışmasında ER stresinin öksinamidohidrolaz prekürsörünü baskıladığını göstermişlerdir. Diğer yandan, ER stresine maruz bırakılan *Arabidopsis* fidelerinin büyüme parametrelerinde sadece stres uygulanan gruba göre artışlar izlenmiştir. Bu artışlar aynı zamanda stres koşulları altında yetiştirilmeyen fidelere kurkumin uygulaması ile de gözlenmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda dışarıdan uygulanan flavanoid konsantrasyonuna göre büyümedeki cevapların değiştiği gösterilmiştir. Örneğin, bir flavanoid olan naringenin 0.4 mM gibi yüksek konsantrasyonlarında *Arabidopsis* ve soya fasulyesinin büyümesinde azalmalara neden

olduğu rapor edilmiştir (Hernandez ve ark., 2012). Buna zıt olarak 0.1 mM naringenin uygulamasının ise stres altında büyümede artışlara neden olduğu bildirilmiştir (Mucciarelli ve ark., 2000). Bu artışın nedeni, düşük flavanoid miktarının oksin gibi etki göstererek hücre genişlemesini uyarması ve hücrelerde mitotik aktiviteyi tetiklemesi gösterilmiştir. Maloney ve ark. (2014) tarafından yapılan diğer bir çalışmada ise flavanol miktarı ile yanal kök oluşumu arasındaki ilişki gösterilmiştir. Bu tez çalışmasında da hem stressiz hem de stres koşulları altında kurkumin uygulamasıyla artan büyüme değerleri, bölünme sayının artışına veya su taşınımında yer alan taşıyıcıların korunmasına bağlanabilir.

4.2. ER stresi ve/veya kurkumin gruplarında bağıl su içeriğinde oluşan değişimler

ER stresinin ve kurkuminin su miktarı üzerine etkilerini göstermek için *A. thaliana* yapraklarında bağıl su içeriği (RWC) analiz edilmiş ve Şekil 4.3'de gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Tunikamisin (Tm, 0.15 $\mu\text{g ml}^{-1}$) ile uyarılan ER stresine maruz kalan *Arabidopsis* fidelerinde kurkumin (1Cur; 1 μM ve 10Cur; 10 μM kurkumin) uygulandıktan sonra bağıl su içeriği (RWC) meydana gelen değişimler

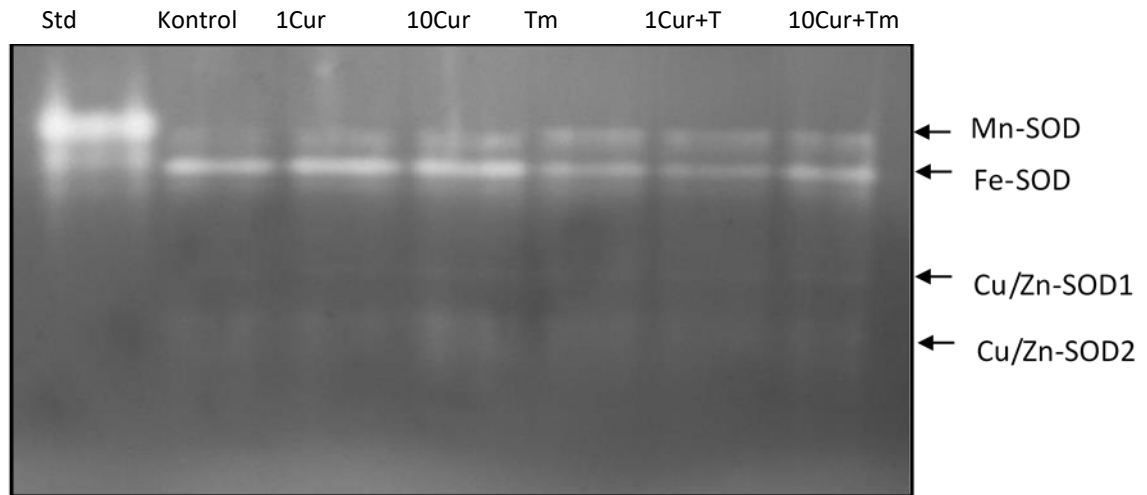
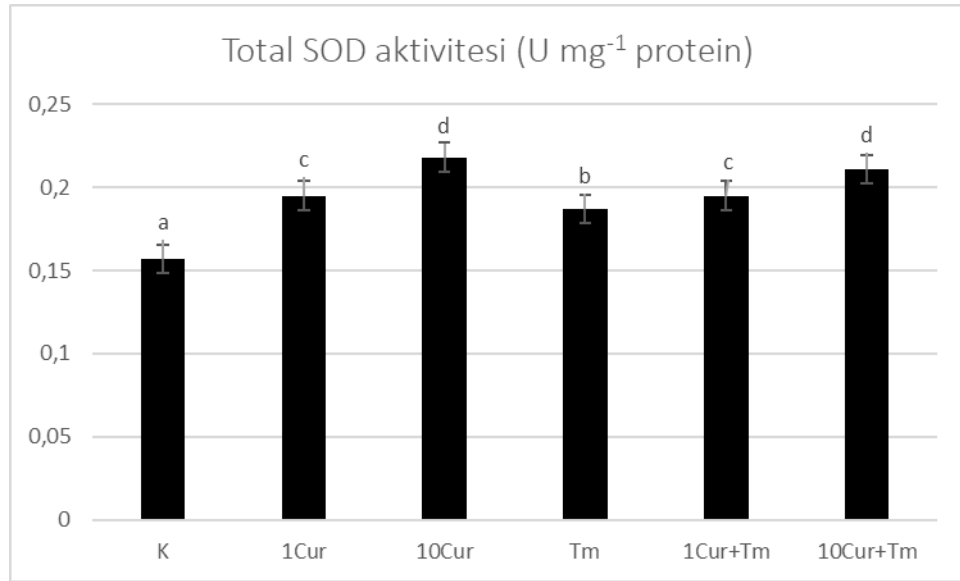
Arabidopsis fidelerine Tm uygulaması *Arabidopsis* yapraklarında bağıl su içeriğinde (RWC) azalmaya neden olmuştur. Stresle RWC'de oluşan bu azalmanın oranı

%13.6'dır. Ozgur ve ark. (2014) *Arabidopsis* fidelerine tunikamisin uygulamasından sonra daha fazla su kaybını bildirmişlerdir. Ayrıca yapılan diğer bir çalışmada ise protein katlanması süreci bozulan *lew1 Arabidopsis* mutantlarında, yabancı tiplere göre stoma iletkenliği daha düşüktür ve su kaybı daha fazladır (Zhang ve ark., 2008). Diğer yandan kurkumin uygulanması, *Arabidopsis* yapraklarındaki su içeriğinde bir artışa neden olmuştur. Kurkuminin, strese maruz kalan *Arabidopsis* fidelerinde su içeriğindeki artışlara neden olması, ozmotik düzenleme yapan prolin gibi moleküllerle olan bağlantısına dayandırılabilir. Çalışmamızda dışarıdan kurkumin uygulaması, kontrol ya da stres koşulları altında yetiştirilen *Arabidopsis* fidelerinde içsel prolin miktarında artışa neden olmuştur. Buna paralel olarak, dışarıdan uygulanan fenolik bileşiklerin stres altında hücre prolin miktarını arttırdığına dair çalışmalar mevcuttur (Kaur ve ark., 2017). Stres altındaki RWC düzeylerindeki kurkumin teşvikli artışı, stressiz ortamlarda kurkumin uygulanması ile de görülmüştür. Bu anlamda kurkumin ve su alınımındaki artış hem stres hem de stres olmayan ortamlarda uyarılmaktadır. Bu artış, kurkuminin su kanallarını uyarması sonucundan da kaynaklanabilir.

4.3. ER stresi ve/veya kurkumin gruplarında antioksidan enzim/izozim sisteminde oluşan değişimler

4.3.1. ER stresi ve/veya kurkumin gruplarında total SOD enzim/izozim aktivitesinde oluşan değişimler

ER stresinin ve kurkuminin antioksidan sistem üzerine etkilerini göstermek için *A. thaliana* yapraklarında total SOD aktivitesi ve SOD izozim profillemesi analiz edilmiş ve Şekil 4.4'de gösterilmiştir.



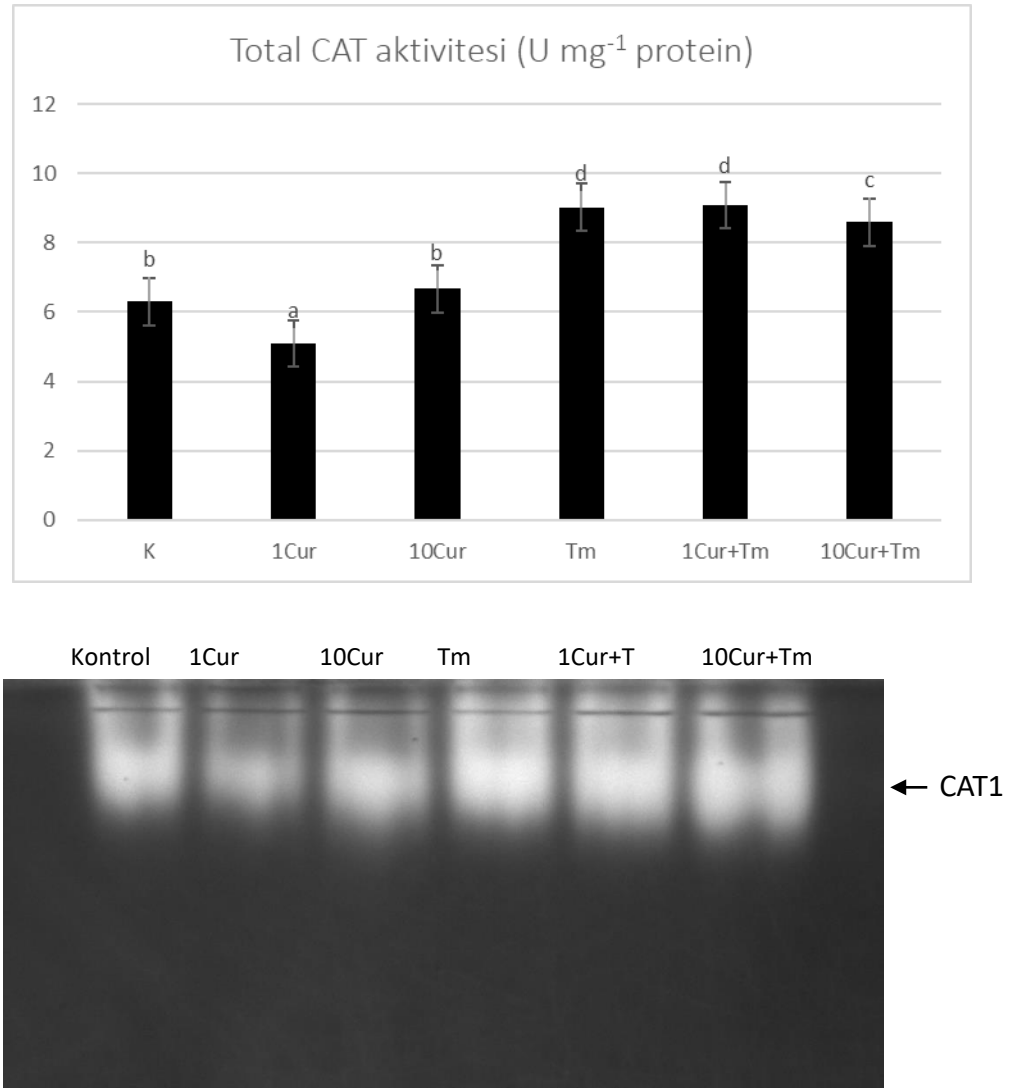
Şekil 4.4. Tunikamisin (Tm, 0.15 $\mu\text{g ml}^{-1}$) ile uyarılan ER stresine maruz kalan *Arabidopsis* fidelerinde kurkumin (1Cur; 1 μM ve 10Cur; 10 μM kurkumin) uygulandıktan sonra total SOD enzim aktivitesinde ve SOD izozimlerinin farklı tiplerinin bağlı bant yoğunluğunda meydana gelen değişimler

SOD izozim aktivitesine ait jel analizleri toplam dört bandın varlığını göstermektedir. Yükleme yapılan grupların başında yer alan kuyucuya 0.5 ünite SOD standartı yüklenmiştir. Bunlar, bir Mn-SOD, bir Fe-SOD ve iki Cu/Zn-SOD bantlarıdır. Tunikamisine bağlı olarak uyarılan ER stresi *Arabidopsis* fidelerinde total SOD aktivitesi artmıştır. SOD izozim enzimlerinin densiyometrik analizlerine bakıldığında, total SOD aktivitesiyle paralellik gösterecek şekilde Mn-SOD ve Cu/Zn-SOD2 bantlarının yoğunluğunda artışlar izlenmiştir. Çalışmamızda, stresle artan radikal birikimini önlemek amacıyla SOD'un hem enzim hem de izozim aktivitesinde artış gösterilmiştir. Bu durum, Ozgur ve ark. (2018) tarafından yapılan çalışmada da gösterilmiştir. Ayrıca, stres

uygulamasıyla birlikte uygulanan kurkumin, total SOD aktivitesini sadece ER stresi uygulanan gruba göre arttırmıştır. Bu artış tüm izozim bantlarının artan yoğunluğuyla da desteklenmiştir. Özellikle Mn-SOD ve Fe-SOD izozim artışları çok belirgindir. Kontrol koşulları altında uygulanan kurkumin tüm SOD izozim yoğunluklarını arttırmıştır. Bu grupta, stres ve Tm uygulanan grupta olduğu gibi, hem Mn-SOD hem de Fe-SOD önemli düzeyde uyarılmıştır. Bu sonuca paralel olacak şekilde sadece kurkumin uygulamasında (1 ve 10 μ M Cur) total SOD aktivitesinde sırasıyla %24 ve %39 oranında artış saptanmıştır (Şekil 4.4). Bu izozimlerin hücrede özellikle kloroplast ve mitokondride bulunmasından dolayı, kurkuminin bu iki organel üzerinde stres bağlı oluşan hasarların giderilmesinde önemli etkilerinin olduğunu söyleyebiliriz.

4.3.2. ER stresi ve/veya kurkumin gruplarında total CAT enzim/izozim aktivitesinde oluşan değişimler

ER stresinin ve kurkuminin antioksidan sistem üzerine etkilerini göstermek için *A. thaliana* yapraklarında total CAT aktivitesi ve CAT izozim profillemesi analiz edilmiş ve Şekil 4.5’de gösterilmiştir.



Şekil 4.5. Tunikamisin (Tm, 0.15 µg ml⁻¹) ile uyarılan ER stresine maruz kalan *Arabidopsis* fidelerinde kurkumin (1Cur; 1 µM ve 10Cur; 10 µM kurkumin) uygulandıktan sonra total CAT enzim aktivitesinde ve CAT izozimlerinin farklı tiplerinin bağlı bant yoğunluğunda meydana gelen değişimler

Uygulamaları takiben native page analizinde *Arabidopsis* fidelerinde sadece bir CAT bandı (CAT1) izlenmiştir. Tm uygulamasında bağlı olarak uyarılan ER stresi total katalaz (CAT) aktivitesinde artışa neden olmuştur. Strese bağlı CAT aktivitesindeki bu artışın oranı yaklaşık %20'dir. Bu artış, CAT izoziminde gözlenen bant yoğunluğunun artışıyla da desteklenmiştir. Çalışmamızda Tm uygulaması yapılan *Arabidopsis* fidelerinde SOD aktivitesi ile oluşturulan H₂O₂ miktarı, artan CAT aktivitesiyle süpürülmeye çalışılmıştır. Buna benzer sonuç, farklı stres uygulamalarında da saptanmıştır. Örneğin, kadmiyum stresine maruz kalan buğdayda ya da bor stresi uygulanan domates bitkilerinde strese bağlı olarak artan CAT aktivitesi izlenmiştir (Kaya ve Ashraf, 2015; Guo ve ark., 2019). Kurkumin ve stres uygulaması yapılan *Arabidopsis*

fidelerinde CAT aktivitesi sadece stres uygulanan gruba göre ya değişmemiş ya da azalma göstermiştir. Bu sonuca zıt olarak tuzluluk stresine maruz bırakılan *Cucumis sativus* bitkisinde bir sekonder bileşik olan 5-aminolevulinik asit uygulaması sonucunda CAT aktivitesinde artış izlenmiştir (Wu ve ark., 2019). Diğer yandan, sadece kurkumin uygulaması düşük konsantrasyonda (1 µM Cur), CAT aktivitesini azaltırken, yüksek miktardaki kurkumin uygulamasında (10 µM Cur) CAT aktivitesinde istatistiksel olarak herhangi bir değişime neden olmamıştır.

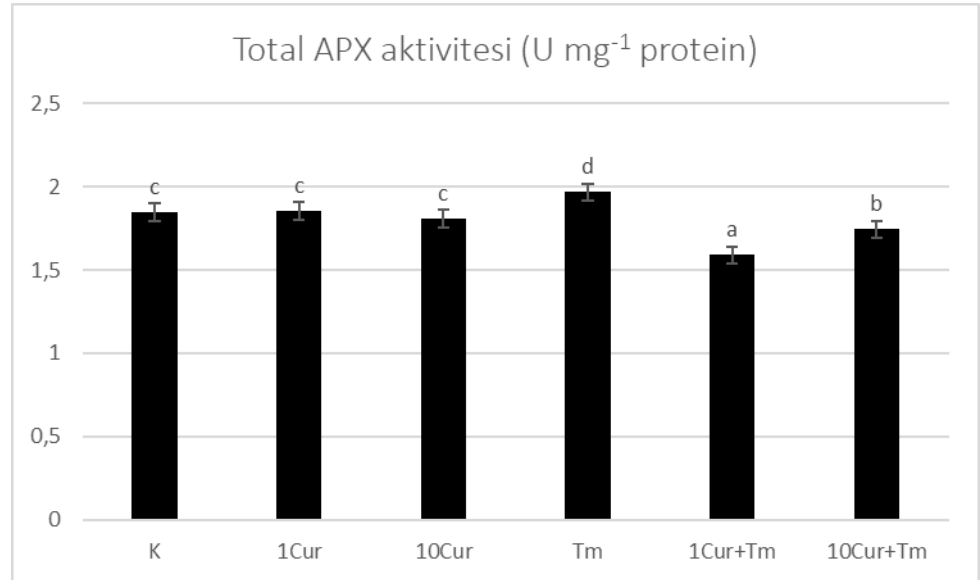
4.3.3. ER stresi ve/veya kurkumin gruplarında total POX enzim/izozim aktivitesinde oluşan değişimler

ER stresinin ve kurkuminin antioksidan sistem üzerine etkilerini göstermek için *A. thaliana* yapraklarında total POX aktivitesi ve POX izozim profillemesi analiz edilmiş ve Şekil 4.6'da gösterilmiştir.

düzeylede mısır bitkilerine uygulanmasıyla birlikte kök ve gövdede yüksek POX aktivitesi saptanmıştır (AbdElgawad ve ark., 2020). Stresle birlikte kurkumin uygulandığında ise total POX aktivitesi sadece yüksek konsantrasyondaki kurkumin (10 μ M kurkumin) ile %9 oranında bir artış gösterebilmiştir. Kontrol koşulları altında uygulanan kurkumin, *Arabidopsis*'in POX aktivitesinde kontrol grubuna göre herhangi bir değişime neden olmamıştır. Ayrıca, POX bant yoğunlukları da kurkumin uygulanan grup ile kontrol grubu arasında önemli bir farklılık bulunmamaktadır. 10 μ M kurkumin ve tunikamisin uygulanan grupla ile benzer olarak, *Moringa oleifera* bitkisine tuz stresi altında bir sekonder bileşik olan salisilik asit uygulandığında POX aktivitesinin arttığı bildirilmiştir (Faheed ve ark., 2020).

4.3.4. ER stresi ve/veya kurkumin gruplarında total APX enzim aktivitesinde oluşan değişimler

ER stresinin ve kurkuminin antioksidan sistem üzerine etkilerini göstermek için *A. thaliana* yapraklarında total APX aktivitesi analiz edilmiş ve Şekil 4.7'de gösterilmiştir.



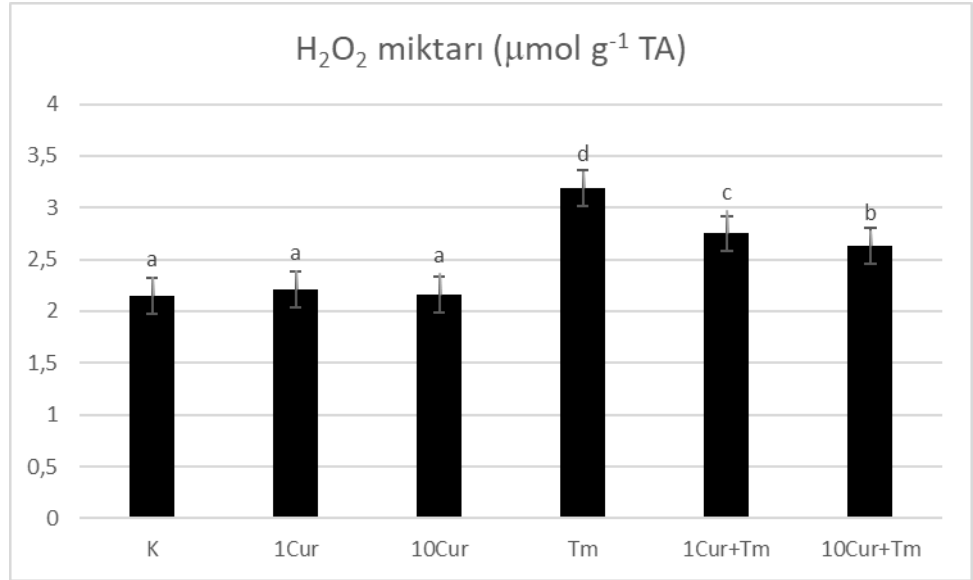
Şekil 4.7. Tunikamisin (Tm, 0.15 μ g ml⁻¹) ile uyarılan ER stresine maruz kalan *Arabidopsis* fidelerinde kurkumin (1Cur; 1 μ M ve 10Cur; 10 μ M kurkumin) uygulandıktan sonra total APX enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler

ER stresi *Arabidopsis* fidelerinde total APX aktivitesini artırmıştır. Bu sonucumuza paralel şekilde tuz ve PEG'in birlikte uygulandığı *Glycyrrhiza uralensis* bitkisinde artan APX aktivitesi bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2017). Stres koşulu olmadan uygulanan kurkumin konsantrasyonları, total APX aktivitesinde herhangi bir değişim oluşturmamıştır. Diğer yandan Tm stresine maruz kalan *Arabidopsis* fidelerine kurkumin uygulandığı durumda sadece Tm stresi uygulanan gruba göre total APX aktivitesi azalmıştır. Sonuçlarımıza zıt olarak, Ghaffari ve ark. (2019) kuraklık stresi ve dışarıdan prolin uygulamaları yapılan şeker pancarında APX aktivitesinde artışı izlemiştir.

4.4. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) miktarının belirlenmesi

4.4.1. ER stresi ve/veya kurkumin gruplarında hidrojen peroksit (H₂O₂) miktarında oluşan değişimler belirlenmesi

ER stresinin ve kurkuminin ROS birikimi üzerine etkilerini göstermek için *A. thaliana* yapraklarında H₂O₂ miktarı analiz edilmiş ve Şekil 4.8'de gösterilmiştir.



Şekil 4.8. Tunikamisin (Tm, 0.15 µg ml⁻¹) ile uyarılan ER stresine maruz kalan *Arabidopsis* fidelerinde kurkumin (1Cur; 1 µM ve 10Cur; 10 µM kurkumin) uygulandıktan sonra H₂O₂ miktarında meydana gelen değişimler

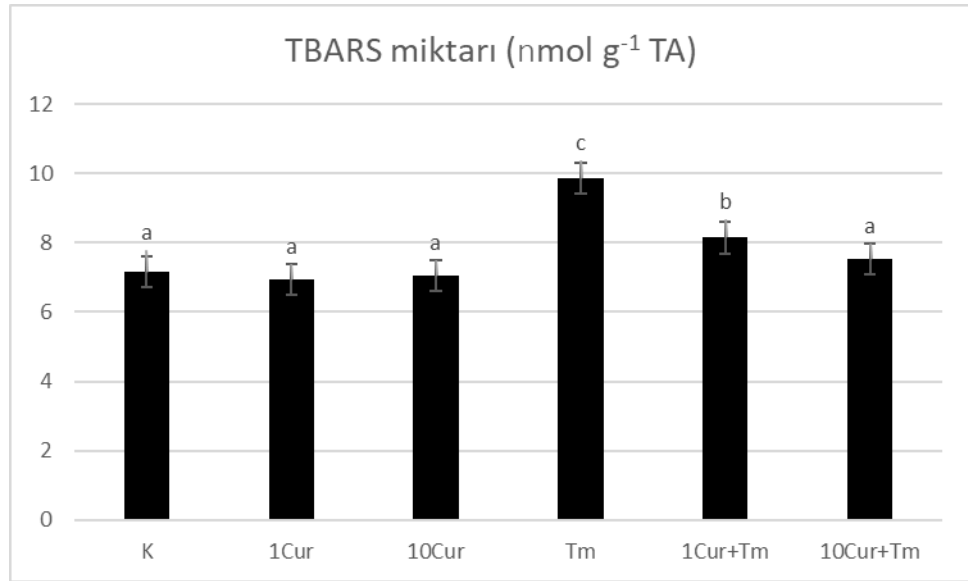
Tm uygulamasıyla birlikte oluşan ER stresi H₂O₂ miktarını önemli düzeyde artırmıştır. Bu artışın oranı yaklaşık %48 düzeyindedir. Stres altında H₂O₂ artışına bağlı

ROS birikimleri birçok çalışmada gösterilmiştir. Örneğin, soğuk stres altında yetiştirilen domates bitkilerinde artan H₂O₂ miktarları izlenmiştir (Liu ve ark., 2020). Ancak, dışarıdan uygulanan kurkumin, *Arabidopsis* fidelerinde stresle biriken H₂O₂ miktarını ciddi düzeyde azaltmıştır. Diğer yandan, kurkumin uygulaması kontrol koşulları altında yapıldığında H₂O₂ miktarında istatistik olarak önemli bir değişime neden olmamıştır. Sekonder bileşiklerden olan ve kurkuminin bozulma ürünlerinden olan vanilik asit foliar olarak domates bitkilerine uygulanmıştır (Parwin ve ark., 2020). Bu çalışmada stres olmadan yapılan vanilik asit uygulamalarında H₂O₂ miktarı azalma gösterirken, NaCl stresiyle birlikte uygulanması durumunda ise sadece stres uygulamasına göre H₂O₂ miktarının azaldığı gösterilmiştir. Bu sonuç, çalışmamızda izlediğimiz stres altındaki kurkumin uygulamasındaki H₂O₂ düşüşleri ile paraleldir.

4.5. Lipit Peroksidasyonun Belirlenmesi

4.5.1. ER stresi ve/veya kurkumin gruplarında TBARS miktarında oluşan değişimler belirlenmesi

ER stresinin ve kurkuminin lipid peroksidasyonu üzerine etkilerini göstermek için *A. thaliana* yapraklarında TBARS miktarı analiz edilmiş ve Şekil 4.9'da gösterilmiştir.

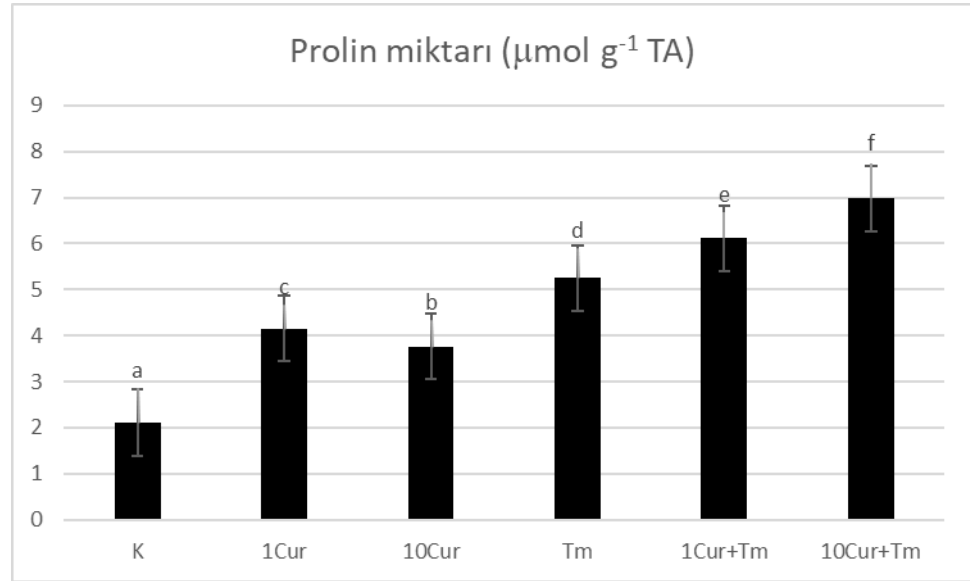


Şekil 4.9. Tunikamisin (Tm, 0.15 µg ml⁻¹) ile uyarılan ER stresine maruz kalan *Arabidopsis* fidelerinde kurkumin (1Cur; 1 µM ve 10Cur; 10 µM kurkumin) uygulandıktan sonra TBARS miktarında meydana gelen değişimler

Strese maruz kalan bitkilerde stresle oluşan hasarın en büyük göstergesi lipid peroksidasyonunun tanımlanmasıdır. Lipid peroksidasyonu son ürünü olan TBARS (Tiobarbitürik asit reaktif maddeler) miktarının ölçümü ile peroksidasyon indeksi belirlenir. ER stresi lipid peroksidasyon düzeyini gösteren TBARS miktarını artırmıştır. TBARS miktarındaki birikim *Arabidopsis* hücrelerinde ER stresinin hasar oluşturduğunun belirtisidir. Tm uygulaması TBARS miktarında *Arabidopsis* fidelerinde yaklaşık 1.3 kat bir artışa neden olmuştur. Stres altında lipid peroksidasyonunu gösteren TBARS miktarındaki artış yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Singh ve ark., 2017; Parwin ve ark., 2020). Ancak kurkumin uygulaması stres altında uyarılan TBARS miktarındaki artışı önlemiştir ve stresle birlikte uygulanan kurkumin, sadece stres uygulanan gruba göre TBARS miktarında bir azalma sağlamıştır. Bu azalma, stres altında 10 µM kurkumin uygulamasında daha bariz olarak gözlenmiştir. Diğer yandan, stres koşulları olmayan ortamlarda kurkumin uygulaması *Arabidopsis* fidelerinin lipid ya da proteinlerinin üzerinde peroksidasyona ya da oksidasyona neden olmamıştır. Bu nedenle bu gruplarda kurkumin, TBARS düzeylerinde istatistiki olarak önemli bir değişim oluşturmamıştır. Benzer şekilde, kurkumin üzerinde dönüştürülen ve sekonder metabolit olan vanilik asit çeltik fidelerinde stresin tetiklediği TBARS miktarında %50'den fazla azalmalara neden olmuştur (Xuan ve Khang, 2018).

4.6. ER stresi ve/veya kurkumin gruplarında prolin içeriğinde oluşan değişimler

ER stresinin ve kurkumin'in ozmolit değişimleri üzerine etkilerini göstermek için *A. thaliana* yapraklarında prolin miktarı analiz edilmiş ve Şekil 4.10'da gösterilmiştir.



Şekil 4.10. Tunikamisin (Tm, 0.15 µg ml⁻¹) ile uyarılan ER stresine maruz kalan *Arabidopsis* fidelerinde kurkumin (1Cur; 1 µM ve 10Cur; 10 µM kurkumin) uygulandıktan sonra prolin miktarında meydana gelen değişimler

ER stresi prolin miktarında (kuarterner amin) önemli bir düzeyde artışa (2.48 kat artışla) neden olmuştur. Mourato ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada stresle prolin miktarında artışı rapor etmişlerdir. Bu artışın bitkilerin korunmasında, stresle biriken ROS bileşenlerinin süpürülmesinde ve zar bütünlüğünün düzenlenmesinde rol aldığını bildirmişlerdir. Stres uygulamasıyla artan prolin miktarı kurkumin uygulamasıyla daha da artmıştır. Prolin miktarındaki bu artış, 10 µM kurkumin uygulamasıyla en yüksek düzeye (%40) ulaşmıştır. Aynı şekilde, sadece kurkumin uygulanan *Arabidopsis* fidelerinde kontrol grubu ile kıyaslandığında prolin miktarında artış izlenmiştir. Bu artışın oranı 1 µM kurkumin uygulanan gruplarda en yüksek düzeydedir. Puniran-Hartley ve ark. (2014) yaptıkları çalışmayla da uyumlu olarak kurkuminin stres altında *Arabidopsis* fidelerinde oluşturduğu prolin miktarındaki artışlar su absorpsiyonundaki iyileşmelerle de bağlantılı olabilir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

Endoplamik retikulum (ER), hücrenin yapı taşlarının çoğunun sentezi, modifikasyonu ve kalite kontrolü için tüm sekretuar yolun ağ geçididir. Aynı zamanda, peroksizomlar ve otofajik cisimler gibi diğer hücre yapılarının doğrudan biyogenezi dahil olmak üzere, hayati hücresel süreçlerin başarılı bir şekilde gerçekleşmesi için gerekli olan bir kalsiyum depolama organeli ve zar kaynağıdır. Bitki hücrelerinde, ER büyük olasılıkla statik noktalardan plazma membranına bağlanır ve hücrenin gövdesinde transvakuolar iplikçiklerden geçer. Bitkilere özgü bir özellik, hücre bölünmesi sırasında hücre plakasına neden olan ve aynı zamanda plazmodesmata oluşumuna izin veren fragmoplast içindeki ER'nin karmaşık düzenidir.

Bilindiği gibi hücrelerarası alana ya da salgı yolu organellerine hedeflenmiş olan proteinler, ER-bağlı ribozomlarda sentezlenir. Sonrasında ER lümeni içine taşınır ve burada doğal hallerine katlanırlar (Schröder ve Kaufman, 2005). Bu katlanma yolağı boyunca, proteinlerinin katlanması çeşitli kalite-kontrol sistemleri tarafından her aşamada denetlenir ve sadece düzgün katlanmış proteinler golgi aygıtına geçerek salgı yolağında ilerlemeye devam eder (Iwata ve Koizumi, 2012). Örneğin hücre duvarı protein bileşenleri, plazma zarını oluşturan proteinlerin çoğu ve vakuollerde yer alan proteinlerin büyük bölümü salgı yolağı kaynaklı proteinlerdir (Iwata ve Kouzumi, 2010). Bu yanıt proteinlerin katlanmasında (şaperonlar, katlanma yardımcıları) ve katlanamayan proteinlerin ortadan kaldırılmasında rol alan mekanizmaları uyarır (Liu ve Howell, 2016).

Zerdeçal (Turmerik) bitkisinin ana etken maddesi olan kurkuminin sağlık alanındaki değeri sahip olduğu antioksidan kapasitesinin anlaşılmasıyla daha da artmıştır. Antioksidan aktivitesi sahip olduğu üç metiyonin grubundan ileri geldiği düşünülmektedir. Kurkumin süperoksit dizmutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz gibi antioksidan enzimlerinin fonksiyonlarını düzenleyerek radikallerin ortadan kaldırılmasında etkili olduğu bildirilmiştir (Sreejayan ve Rao, 1994). Özellikle son dönemde ülkemiz ve dünyada yaşanan pandemi nedeniyle insanlar üzerinde kurkuminin bağışıklığı artırıcı rolleri daha da değerli hale gelmiştir. Daha önceki çalışmalarda tıpta kalp hastalıkları ve kanser üzerine olumlu rolleri rapor edilmiştir (Jitoe ve ark., 1993).

Stres altında bitki büyümesinin belirlenmesinde birim kütle büyümesini ifade eden kısmi büyüme oranları (RGR) kullanılmaktadır (Kartika ve ark., 2018). Tez çalışmamızda da ER stresi altında *Arabidopsis* fidelerinde gözlenen RGR'deki düşüşler

fizyolojik olarak büyümede verilen cevabın göstergesidir. Kurkumin, stres altında *Arabidopsis*'te bozulan hücresel işleyişini yeniden düzenleyebilmiş ve büyüme indeksini iyileştirmiştir.

ER stresinin büyümedeki azalmalara ek olarak ayrıca strese maruz kalan *Arabidopsis*'te su iletimi ve etkin su kullanımının bozulmasına neden olmaktadır. Bu etki çalışmamızda azalan RWC değerleri ile gösterilmiştir. Stres koşulları bitkilerde ozmotik bozukluklara neden olmaktadır. ER stresi altında *Arabidopsis* köklerde su taşınım mekanizmasındaki taşıyıcıların bozulması gerçekleşmiş olabilir ve bu durum içsel su miktarını da azaltmış olabilir. Kurkumin bu olumsuz durumun engellenmesinde RWC değerlerini artırarak görev yapmış olabilir. Ozmotik düzenleme süreçlerinde prolin önemli bir kuarterner amindir ve hücre çeperinin bileşeni olarak yer alan bir aminoasittir. Prolin, antioksidan göreviyle stresle oluşan radikallerin ortadan kaldırılmasında ve zar bütünlüğünün ve kararlılığının korunmasında yer almaktadır (Emamverdian ve ark., 2015). Radikaller üzerine bu rolü sayesinde stresin uyardığı hasara karşı verilen enzimatik olmayan bir yanıt olarak düşünülebilir. *Arabidopsis* ER stresi altında fidelerinde prolin miktarını artırarak ozmotik düzenleme yapmaya çalışmıştır. Ancak prolin içeriğindeki bu indüklenme ER stresi altında su dengesinin korunmasında yeterli olmamıştır ve RWC değerleri düşüş göstermiştir. Diğer yandan, kurkumin hem stres hem de kontrol koşulları altında prolin içeriğini uyararak ER stresinin membranlar üzerindeki hasarını ve su durumunu iyileştirebilmiştir.

ER stresi, hücre için önemli bir role sahip proteinlerin katlanma sürecince bozulmalara neden olan olabilir. Bu katlanmadaki bozulmalar, fotosentezde elektron taşıma sisteminde görevli proteinlerde ya da mitokondride oksijenli solunum olayında rol alan dört kompleksi oluşturan protein yapılarında gerçekleşebilir. Bu durumda ER stresi bitkilerde reaktif oksijen türleri olarak adlandırılan ROS radikallerin birikimine neden olmaktadır (Ozgur ve ark., 2015). Bu radikallerden süperoksit anyon radikalinin toksisitesinin azaltılmasında yer alan ilk adımdaki enzim, SOD enzimidir. Bu enzim süperoksit anyon radikalini H_2O_2 'ye dönüştürmektedir (Mittler ve ark., 2011). SOD enziminde yer alan aktif bölgesinde taşınan metal kofaktörüne göre farklı tipleri mevcuttur, bunlar: Mn-SOD, Fe-SOD ve Cu/Zn-SOD. Bu SOD izozimlerin hücre içinde bulunma yerleri de farklılık gösterebilir. Mn-SOD çoğunlukla hücre içinde mitokondri ve peroksizomda, Fe-SOD prokaryot hücrelerde, alglerde ve bitki hücrelerinin kloroplastlarında ve Cu/Zn-SOD ise sitoplazma ve kloroplastlarda (genellikle tillakoyidlerde) lokalize olmaktadır. Çalışmamızda *Arabidopsis* fidelerinde ER stresi

altında artan SOD aktivitesiyle H₂O₂ oluşumu tetiklenmiştir. ER stresi altında SOD aktivitesi Mn-SOD ve Cu/Zn-SOD izozimlerinin band yoğunluklarının artışıyla desteklenmiştir. Bu da bize ER stresinden özellikle *Arabidopsis* fidelerinin mitokondri ve kloroplastlarının olumsuz anlamda etkilendiğini göstermektedir. Bu sonuçla, analizlerimizde ER stresinde H₂O₂ miktarındaki artışın nedeni artan SOD aktivitesi olabilir. Ayrıca stres koşullarında SOD dışında NADPH oksidaz, aminoksidaz, glikolat oksidaz, glukoz oksidaz ya da sülfid oksidazlar da H₂O₂ kaynağı olarak değerlendirilebilir (Mittler ve ark., 2011). Çalışmamızda ER stresi altında *Arabidopsis* fidelerinde artan H₂O₂ miktarına NOX aktivitesi de katkı sağlamış olabilir. ER stresıyla birlikte uygulanan kurkumin de artan SOD aktivitesiyle H₂O₂'nin uyarılmasında etkin rol oynamıştır. Stres altında kurkumin uygulamasında, SOD aktivitesinin artışından, Mn-SOD ve Fe-SOD izozimlerin artan yoğunlukları sorumludur. Bu durumda kurkuminin, mitokondri ve kloroplast organelleri üzerindeki stresle oluşan hasarların iyileştirilmesinde etkili olduğu sonucunu çıkarabiliriz. Hücrelerde H₂O₂ çift yönlü olarak görev yapmaktadır, yüksek miktarlarda biriktiği takdirde toksiteye neden olurken, düşük miktarlarda H₂O₂ birikimleri hücrede sinyal rolü oynayarak savunma cevaplarının tetiklenmesinde yer almaktadır (Zhou ve ark., 2018). Bu nedenle yüksek oranda H₂O₂ miktarının elimine edilmesinde CAT, POX, glutatyon peroksidaz (GPX), glutatyon S-transferaz (GST) ve askorbat-glutatyon döngüsünde yer alan APX, GR, MDHAR ve DHAR gibi enzimler rol oynamaktadır. Bu enzim sistemine ayrıca askorbat veya glutatyon gibi enzimatik olmayan antioksidanlar da katılır (Gill ve Tuteja, 2010). Bu enzim sistemindeki CAT, H₂O₂'yi suya ve oksijene dönüştürerek stresin hasarını azaltmaktadır. CAT ile aynı görevde yer alan POX ise H₂O₂'yi dönüştürmede fenolik bileşik ya da antioksidan gibi yardımcı substratların oksidasyonunu kullanır. POX sadece radikal süpürmede değil aynı zamanda peroksidatif ve hidrosilik aktiviteleri sayesinde büyümede de rol oynayabilir. Özellikle POX çeperdeki lignin biyosentezinde görev almasıyla birlikte büyüme ve gelişmede önemli katkılar sağlayabilir (Passardi ve ark., 2005). POX hücre çeper yapısı içinde kovalent ya da iyonik olarak bağlanmış şekilde yer almaktadır. Bulunduğu konum itibarıyla çeperdeki çapraz bağlanmaları katalize edip sert hücre çeper yapısını oluşturabilir ya da bağlantıları gevşeterek çeper yapısını daha gevşek hale getirebilir. Çalışmamızda ER stresine maruz bırakılan *Arabidopsis* fidelerinde CAT, POX ve APX aktivitelerinde artışlar izlenmiştir. Stres altında bu antioksidan enzimlerde artışın izlenmesine rağmen H₂O₂ miktarı yine de yüksek seviyededir. Bu sonuç, bize ER stresi altındaki *Arabidopsis*'de indüklenen antioksidan enzim sisteminin yeterli düzeyde

olmadığını göstermektedir. Bu radikalın birikimi membranlardaki hasarı tetikleyerek TBARS miktarının yüksek düzeylerde tutulmasına neden olmuştur. Diğer yandan, her iki konsantrasyondaki kurkumin uygulaması (1 ve 10 μM Cur), CAT ve APX aktivitesinde herhangi bir artışı uyarmamıştır. ER stresi altındaki *Arabidopsis*'te analizi yapılan antioksidan enzim aktivitelerinde yalnızca 10 μM kurkumin uygulaması ile POX aktivitesinde gözlenmiştir. Buna karşın kurkumin toksik düzeylerde H_2O_2 miktarını engellemiştir. Bu sonuç, düşük düzeylerde uygulanan kurkuminin (1 μM Cur) CAT, POX ve APX enzimlerinin dışında yer alan H_2O_2 süpürülmesinde görev alan GST ya da GPX enzimleri tarafından yapılabileceğini düşündürmektedir. Daha yüksek kurkumin konsantrasyonu uygulamasında ise POX aktivitesinin etkili olduğu söylenebilir. Yine de bu uygulama grubunda da GST ya da GPX aktiviteleri yer alabilmektedir. Bu etkin antioksidan aktivite sayesinde kurkumin H_2O_2 miktarına düşümlere dolayısıyla TBARS miktarında azalmalara neden olmuştur.

5.2 Öneriler

Bitkiler için stres unsurlarına karşı savunma mekanizmasının anlaşılması büyük önem taşımaktadır. Bu tür stres faktörleri bitki bazında ürün kaybına neden olduğu gibi ayrıca ekosistemde yer alan ben zinciri yoluyla diğer canlıların da bu stresin zararlarından etkilenmesi söz konusudur.

Strese maruz kalan bitkilerde kendi savunma mekanizması uyarılabildiği gibi bazı durumlarda kimyasal bileşenlerle de bu savunma hattı uyarılabilmektedir. Bu önemli bileşiklerden birisi de flavanoidlerdir. Flavanoid grubu içinde yer alan kurkumin, taşıdığı antioksidan kapasitesi sayesinde hem bitkiler üzerinde hem de sağlık alanında insanlar üzerinde olumlu etkilere sahiptir. Bu bileşenin sahip olduğu etkiler; antioksidan, antimikrobiyal, antidepresan, antikanser, antidiyabetik, anti-enflamatuvar, nörodejeneratif hastalıklar üzerine etkiler olarak özetlenebilir. Bu kadar geniş etki alanına sahip kurkuminin, strese maruz kalan bitkilerdeki hasarın iyileştirilmesinde önemli katkıları vardır. Ancak tunikamisin ile uyarılan ER stresi altındaki bitkilerde savunma ilişkisi ve antioksidan aktivitesi üzerine çalışmalar bulunmamaktadır. Çalışmamızda yer alan ER stresi bitkiler için çok önemli biyokimyasal reaksiyonlar üzerine olumsuz etkiler oluşturmaktadır. Tezden elde edilen verileri değerlendirdiğimizde, bu etkilerin iyileştirilmesinde kurkuminin belirgin etkilerini görmekteyiz. Bu çalışmadan elde edilen

sonuçların yayın haline getirilmesi, literatürdeki bilgi boşluğunu doldurulmasına önemli katkılar sağlayacaktır.

6. KAYNAKLAR

- Abdelgawad, H., Zinta, G., Hamed, B.A., Selim, S., Beemster, G., Hozzein, W.N., Wadaan, M.A.M., Asard, H. and Abuelsoud, W., 2020, Maize roots and shoots show distinct profiles of oxidative stress and antioxidant defense under heavy metal toxicity, *Environ. Pollution*, 258, 113705.
- Alscher, R.G., Erturk, N. and Heath, L.S., 2002, Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants, *Journal of Experimental Botany*, 53, 1331-1341.
- Anelli, T., and Sitia, R., 2008, Protein quality control in the early secretory pathway, *The EMBO JJournal*, 315-327.
- Apel, K and Hirt, H., 2004, Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction, *Annual Review of Plant Biology*, 373-399.
- Bannister, W.H., Bannister, J.V., Barra, D., Bond, J. and Bossa, F., 2009, Evolutionary Aspects of Superoxide Dismutase: The Copper/Zinc Enzyme, *Free Radical Research Communications*, 349-361.
- Bates, L., Waldren, R. and Teare I., 1973, Rapid determination of free proline for waterstress studies, *Plant and Soil*, 39, 205-207.
- Baxter, A., Mittler, R. and Suzuki N., 2014, ROS as key players in plant stress signalling, *Journal of Experimental Botany*, 1229-1240.
- Beauchamp, C. and Fridovich, I., 1971, Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels, *Analytical Biochemistry*, 44, 276-287.
- Bergmeyer, H.U., 1970, Methoden der enzymatischen Analyse. 2, Verlag Chemie.
- Berridge, M.J., 2002, The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle, *Cell Calcium*, 235-249.

- Bhattacharjee, S., 2005, Reactive oxygen species and oxidative burst: Roles in stress, senescence and signal transduction in plants, *Current Science Associatio*, 11131121.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Bueso, E., Alejandro, S., Carbonell, P., Perez-Amador, M.A., Fayos, J., Belles, J.M., Rodriguez, P.L. and Serrano, R., 2007, The lithium tolerance of the *Arabidopsis* cat2 mutant reveals a cross-talk between oxidative stress and ethylene, *The Plant Journal*, 48.
- Cerioti, A., 2011, Waste disposal in the endoplasmic reticulum, ROS production and plant salt stress response, *Cell Research*, 555–557.
- Chew, O., Whwlans, J. and Millar, A.H., 2003, Molecular definition of the ascorbateglutathione cycle in *Arabidopsis* mitochondria reveals dual Targeting of antioxidant defenses in plants, *Journal of Biological Chemistry*, 21, 46869-77.
- Cho, Y. and Kanehara, K., 2017, Endoplasmic reticulum stress response in *Arabidopsis* roots, *Front Plant Sci*, 8, 144.
- Cook, N.C. and Samman, S., 1996, Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources, *J Nutr Biochem*, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 66-76.
- Deng, Y., Srivastaya, R. and Howell S.H., 2013, Endoplasmic reticulum (ER) stress response and its physiological roles in plants, *Internentional Journal of Molecular Sciences*, 8188-8212.
- Dietz, K.J. and Pfannschmidt, T., 2011, Novel Regulators in Photosynthetic Redox Control of Plant Metabolism and Gene Expression, *Plant Physiology*, 155, 1477–1485.

- Emamverdian, A., Ding, Y., Mokhberdorran, F., and Xie, Y., 2015, Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response, *Scientific World Journal*. 18.
- Faheed, F.A., Hassanein, A.M., Salem, J. and El-nagish, A., 2020, Salicylic acid mediated salt stress tolerance by mitigation of the oxidative effects in Moringa. *Journal of Environmental Studies*, 20, 7-20.
- Felicia, V.S., Guthrie, N., Chambers, A.F. and Carroll, K.K., 1997, Inhibition of proliferation of estrogen receptor-positive MCF-7 human breast cancer cells by flavonoids in the presence and absence of excess estrogen, *Cancer Lett.*, 112, 127133.
- Frand, AR. and Kaiser, CA., 1998, The ERO1 gene of yeast is required for oxidation of protein dithiols in the endoplasmic reticulum, *Molecular Cell*, 161–170.
- Ghaffari, H., Tadayon, M.R., Nadeem, M., Cheema, M. and Razmjoo, J., 2019. Proline mediated changes in antioxidant enzymatic activities and the physiology of sugar beet under drought stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 41:23.
- Gill, S. S., and Tuteja, N., 2010, Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 909–930.
- Gleason, C., Huang, S., Thatcher, L.F., Foley, R.C., Anderson, C.R., Carroll, A.J., Millar, A.H. and Singh, K.B., 2011, Mitochondrial complex II has a key role in mitochondrial-derived reactive oxygen species influence on plant stress gene regulation and defense, *National Acad Sciences*, 10768-10773.
- Gross, E., Sevier, CS., Heldman, N., Vitu, E., Bentzur, M., Kaiser, CA., Thorpe, C. and Fass, D., 2006, Generating disulfides enzymatically: reaction products and electron acceptors of the endoplasmic reticulum thiol oxidase Ero1, *National Acad Sciences*, 299-304.

- Guo, J., Shiyu, Q., Rengel, Z., Gao, W., Nie, Z., Hongen, L., Chang, L. and Zhoa, P., 2019, Cadmium stress increases antioxidant enzyme activities and decreases endogenous hormone concentrations more in Cd-tolerant than Cd-sensitive wheat varieties. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 172, 380-387.
- Harborne, J.B. and R.J. Gryer, 1988, The Flavonoids, *Advances in Research Since 1980*. Chapman and Hall, CRC Press, Boca Raton, New York.
- Hart, F.U. and Hayer, M., 2009, Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo, *Nature Structural & Molecular Biology*, 574-581.
- Hernández, M.L., Whitehead, L., He, Z., Gazda, V., Gilday, A., Kozhevnikova, E., Vaistij, F.E., Larson, T.R. and Graham, I.A., 2012, A cytosolic acyltransferase contributes to triacylglycerol synthesis in sucrose-rescued Arabidopsis seed oil catabolism mutants, *Plant Physiology*, 160 (1), 215-225.
- Herzog, V. and Fahimi, H., 1973, Determination of the activity of peroxidase, *Analytical Biochemistry*, 55, e62.
- Hotamisligil, G.S., 2010, Endoplasmic Reticulum Stress and the Inflammatory Basis of Metabolic Disease, *Cell*, 900-917.
- Howell, S. H., 2013, Endoplasmic reticulum stress responses in plants, *Annual Review of Plant Biology*, 477-499.
- Hunt, R., Causton, D. R., Shipley B., and Askew, A. P., 2002, A modern tool for classical plant growth analysis, *Annals of Botany-London*, 90, 485-488.
- Hurtley, S. M. and Helenius, A., 1989, Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum, *Annual Review of Cell Biology*, 277-307.
- Irsigler, A.S., Costa, M.D., Zhang, P., Reis, P.A., Dewey, R.E., Boston, R.S., and Fontes, E.P., 2007, Expression profiling onsoybean leaves reveals integration of ER- and osmotic-stress pathways. *BMC Genomics*, 8, 431.

- Iwata, Y. and Koizumi, N., 2005, Unfolded protein response followed by induction of cell death in cultured tobacco cells treated with tunicamycin, *Planta*, 804-807.
- Iwata, Y., Kouzumi, N., 2012, Plant transducers of the endoplasmic reticulum unfolded protein response, *Trends in Plants Science*, 17, 720-727.
- Iwata, Y., Sakiyama, M., Lee, M. and Koizumi, N., 2010, Transcriptomic response of *Arabidopsis thaliana* to tunicamycin-induced endoplasmic reticulum stress, *Plant Biotechnology*, 161-171.
- Iwata, Y., Sakiyama, M., Lee, M.H. and Koizumi, N., 2010, Transcriptomic response of *Arabidopsis thaliana* to tunicamycin-induced endoplasmic reticulum stress, *Plant Biotechnology*, 27, 161-171.
- Jantschko, W., Furtmüller, P.G., Allegra, M., Livrea, M.A., Jaopitsch, C., Regelsberger, G. and Obinger, C., 2002, Redox Intermediates of Plant and Mammalian Peroxidases: A Comparative Transient-Kinetic Study of Their Reactivity Toward Indole Derivatives, *Archives of Biochemistry*, 12-22.
- Jaspers, P. and Kangasjärvi, J., 2010, Reactive oxygen species in abiotic stress signaling, *Physiologia Plantarum*, 138, 405-413.
- Jin, H., Hong, Z., Su, W., and Li, J., 2009, A plant-specific calreticulin is a key retention factor for a defective brassinosteroid receptor in the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 13612–13617.
- Jithesh, M.N., Prashanth, S.R., Sivaprakash, K.R. and Parida, A.K., 2006, Antioxidative response mechanisms in halophytes: their role in stress defiance, *J. of Genetics* 85, 1–14.
- Jitoe, A., Masuda, T., and Nakatani, N., 1993, Phenylbutenoid dimers from the rhizomes of *Zingiber cassumunar*, *Phytochemistry*, 32, 357-363.

- Jitoe, A., Masuda, T., Tengah, I.G.P., Suprpta, D.N., Gara, I.W. and Nakatani, N. 1992, Antioxidant activity of tropical ginger extracts and analysis of the contained curcuminoids, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 1337-1340.
- Kapoor, A. and Sanyal, A.J., 2009, Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response, *Clinics in Liver Disease*. 13, 581-590.
- Karpinski, S., Reynolds, H., Karpinska, B., Wingsle, G., Creissen, G. and Mullineaux, P., 1999, Systemic Signaling and Acclimation in Response to Excess Excitation Energy in Arabidopsis, *Science*, 654-657.
- Kartika, K., Lakitan, B., Wijaya, A., Kadir, S., Widuri, L.I., Siaga, E. and Meihana, M., 2018, Effects of particle size and application rate of rice-husk biochar on chemical properties of tropical wetland soil, rice growth and yield, *Australian Journal of Crop Science*, 12(5), 817-826.
- Katsuyama, Y., Funa, N., Horinouchi, S., 2007, Precursor-directed biosynthesis of stilbene methyl ethers in *Escherichia coli*, *Biotechnology*, 1286–1293.
- Kaufman, R.J., 2002, Orchestrating the unfolded protein response in health and disease, *Antioxidants & redox signaling*, 1389-1398.
- Kaur, D., Grewal, S., Kaur, J. and Singh, S., 2017, Differential proline metabolism in vegetative and reproductive tissues determine drought tolerance in chickpea. *Biol Plant*, 61(2), 359–366.
- Kaur, H., Bhardwaj, R. and Grewal, S., 2017, Mitigation of salinity-induced oxidative damage in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings by exogenous application of phenolic acids, *Acta Physiologiae Plantarum*, 39, 221.
- Kaya C. and Ashraf M., 2015. Exogenous application of nitric oxide promotes growth and oxidative defense system in highly boron stressed tomato plants bearing fruit. *Scientia Horticulturae*, 185, 43-47.

- Kliebenstein, D.J., Monde, R.A. and Last, R.L., 1998, Superoxide Dismutase in Arabidopsis: An Eclectic Enzyme Family with Disparate Regulation and Protein Localization, *Plant Physiology*, 118, 637-650.
- Koizumi, N., Martínez, I.M., Kimata, Y., Kohno, K., Sano, H., and Chrispeels, M.J., 2001, Molecular characterization of two Arabidopsis Ire1 homologs, endoplasmic reticulum-located transmembrane protein kinases. *Plant Physiology*, 127, 949–962.
- Kørner, C.J., Du, X., Vollmer, M.E. and Pajerowska-Mukhtar, K.M., 2015, Endoplasmic reticulum stress signaling in plant immunity – at the crossroad of life and death, *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 26582–26598.
- Laemmli, U.K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680-685.
- Lai, E.D., Teodoro, T., Volchuk, A., 2007. Endoplasmic reticulum stress: Signaling the unfolded protein response. *Physiology*, 22, 193-201.
- Laloi C., Apel K. and Danon A., 2004, Reactive oxygen signalling: The latest news, *Current opinion in plant biology*, 323-328.
- Lee, A.S., 2007, GRP78 induction in cancer: Therapeutic and prognostic implications, *Cancer Research*, 3496-3499.
- Leonardis, S., Dipierro, N. and Dipierro, S., 2000, Purification and characterization of an ascorbate peroxidase from potato tuber mitochondria. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38, 773–779.
- Leutwiler, L.S., Hough-Evans, B.R., Meyerowitz, E.M., 1984, The DNA of *Arabidopsis thaliana*, *Molecular and General Genetics*, 194, 15–23.
- Liszakay, A.K., Fufezan, C. and Trebst, A., 2008, Singlet oxygen production in photosystem II and related protection mechanism, *Photosynthesis Research*, 551564.

- Liu, J. X., Srivastava, R., Che, P., Howell, S. H., 2007, An endoplasmic reticulum stress response in Arabidopsis is mediated by proteolytic processing and nuclear relocation of a membrane-associated transcription factor, bZIP28, *The Plant Cell*, 4111-4119.
- Liu, J.X., and Howell, S. H., 2010, Endoplasmic reticulum protein quality control and its relationship to environmental stress responses in plants. *Plant Cell*, 22, 2930–2942.
- Liu, T., Ye, X.L., Li, M., Li, J.M., Qi, H.Y. and Hu, X.H., 2020, H₂O₂ and NO are involved in trehalose-regulated oxidative stress tolerance in cold-stressed tomato plants, *Environmental and Experimental Botany*, 171, 103961.
- Liu, Z.J. Guo, Y.K., and Bai, J.G., 2010, Exogenous hydrogen peroxide changes antioxidant enzyme activity and protects ultrastructure in leaves of two Cucumber ecotypes under osmotic stress, *Journal of Plant Growth Regulation*, 29, 171-183.
- Lloyd, AM., Walbot, V. and Davis, RW., 1992, Arabidopsis and Nicotiana anthocyanin production activated by maize regulators R and C1, *Science*, 1773-1775.
- Loew, O.,1900, A new enzyme of general occurrence in organisms, *Science*, 701-702.
- Maloney, G.S., DiNapoli, K.T. and Muday G.K., 2014, The anthocyanin reduced tomato mutant demonstrates the role of flavonols in tomato lateral root and root hair development, *Plant Physiology*, 166 (2), 614-631.
- Marshall, R.S., Jolliffe, N.A., Ceriotti, A., Snowden, C.J., Lord, J.M., Frigerio, L. and Roberts, L.M., 2008, The role of CDC48 in the retro-translocation of nonubiquitinated toxin substrates in plant cells. *Journal of Biological Chemistry*. 283, 15869–15877.
- Marzec, M., Eletto, D. and Argon, Y., 2012, GRP94: An HSP90-like protein specialized for protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1823, 774–787.

- McCormack, M.L., Dickie, I.A., Eissenstat, D.M., Fahey, T.J., Fernandez, C.W., Guo, D., Helmisaari, H.S., Hobbie, E.A., Iversen, C.M. and Jackson, R.B., 2015, Redefining fine roots improves understanding of below-ground contributions to terrestrial biosphere processes, *New Phytologist*, 207, 505-518.
- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S. and Mittler R., 2010, Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses, *Plant, Cell and Environment*, 33, 453-467.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Shulaev, V. and Van Breusegem, F., 2004, Reactive oxygen gene network of plants, *Trends in Plant*, 490-498.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V.B., Vandepoele, K., Gollery, M., Shulaev, V. and Van Breusegem, F., 2011, ROS signaling: the new wave?, *Trends in Plant*, 300-39.
- Molinari, H.B.C., Marur, C.J., Daros, E., De Campos, M.K.F., De Carvalho, J.F.R.P., Pereira, L.F.P. and Vieira, L.G.E., 2007, Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress, *Physiologia Plantarum*, 130, 218-229.
- Møller, I.M., 2001, Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species, *Annual Review of Plant Biology*, 561-591.
- Moshel, Y., Rhoads, R.E. and Barash, I., 2006, Role of amino acids in translational mechanisms governing milk protein synthesis in murine and ruminant mammary epithelial cells, *Journal of Cellular*, 47.
- Mourato, M., Reis, R. and Martins, L.L., 2012. Characterization of plant antioxidative system in response to Abiotic stresses: A focus on heavy metal toxicity. *Advances in selected plant physiology aspects*. Ed. G. Montanaro, Rijeka, Croatia.

- Mucciarelli, M., Gallino, M., Maffei, M. and Scannerini S., 2000, Effects of 3,4-dihydroxybenzoic acid on tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) cultured in vitro. Growth regulation in callus and organ cultures, *Plant Biosyst*, 134 (2), 185-192.
- Murashige, T. and Skoog, F.A., 1962, Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v. 15, 473-479.
- Nagashima, Y., Mishiba, K., Suzuki, E., Shimada, Y., Iwata, Y. and Koizumi, N., 2011, Arabidopsis IRE1 catalyses unconventional splicing of bZIP60 mRNA to produce the active transcription factor. *Scientific Reports*, 1, 29.
- Nakano, Y. and Asada, K., 1987, Purification of Ascorbate Peroxidase in Spinach Chloroplasts; Its Inactivation in Ascorbate-Depleted Medium and Reactivation by Monodehydroascorbate Radical, *Plant and Cell Physiology*, 131-140.
- Noctor, G. and Foyer, C.H., 2003, Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria, *Physiologia Plantarum*, 791.
- Noctor, G. and Foyer, C.H., Ascorbate and glutathione, *Plant Physiology*, 249-279.
- Oetari, S., Sudibyo, M., Commandeur, J.N.M., Samhoedi R. and Vermeulen, N.P.E., 1999, Effects of curcumin on cytochrome P450 and glutathione-S-transferase activities in rat liver, *Biochemical Pharmacology*, 51, 39-45
- Onda, Y., 2013, Oxidative protein-folding systems in plant cells, *International Journal of Cell Biology*, 585431.
- Ozgur, R., Turkan, I., Uzilday, B. and Sekmen, A.H., 2014, Endoplasmic reticulum stress triggers ROS signalling, changes the redox state, and regulates the antioxidant defence of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 65, 1377–1390.
- Ozgur, R., Uzilday, B., Iwata, Y., Koizumi, N. and Turkan, I., 2018 Interplay between unfolded protein response and reactive oxygen species: a dynamic duo, *Journal of Experimental Botany*, 69, 3333–3345.

- Ozgur, R., Uzilday, B., Sekmen, A.H. and Turkan, I., 2015, The effects of induced production of reactive oxygen species in organelles on endoplasmic reticulum stress and on the unfolded protein response in Arabidopsis, *Annals of Botany*, 116(4), 541-553.
- Parvin, K., Nahaar, K., Hasaanuzzaman, M., Bhuyan, B., Mohsin, S. M., and Fujita, M., 2020, Exogenous vanillic acid enhances salt tolerance of tomato: insight into plant antioxidant defense and glyoxalase systems. *Plant Physiology and Biochemistry*, 150, 109-120.
- Passardi, F., Cosio, C., Penel, C. and Dunand, C., 2005, Peroxidases have more functions than a Swiss army knife, *Plant Cell Reports*, 24, 255–265.
- Pattison, R.J. and Amtmann, A., 2007, N-glycan production in the endoplasmic reticulum of plants, *Trends in Plant Science*, 751-761.
- Peterson, J. and Dwyer, J., 1998, Taxonomic Classification Helps Identify Flavonoid-Containing Foods on a Semiquantitative Food Frequency Questionnaire, *Journal of the American Dietetic Association*, 98, 677-685.
- Pitzschke, A., Forzani, C., Hirt, H., 2006, Reactive Oxygen Species Signaling in Plants, *Journal of Botany*, 1757-1764.
- Puniran-Hartley, N., Hartley, J., Shabala, L. and Shabala, S., 2014, Salinity-induced accumulation of organic osmolytes in barley and wheat leaves correlates with increased oxidative stress tolerance: in planta evidence for cross-tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry*, 83, 32–39.
- Quan, L.J., Zhang, B., Shi, W.W. and Li, H.Y., 2008, Hydrogen Peroxide in Plants: a Versatile Molecule of the Reactive Oxygen Species Network, *Journal of Integrative Plant*, 316.

- Queval, G., Issakidis-Bourguet, E., Hoeberichts, F.A., Vandenabeele, M., Gakiere, B., Vanacker, H. and Miginiac-Maslow, M., 2007, Conditional oxidative stress responses in the Arabidopsis photorespiratory mutant *cat2* demonstrate that redox state is a key modulator of daylength-dependent gene expression, and define photoperiod as a crucial factor in the regulation of H₂O₂-induced cell death, *The Plant Journal*, 241
- Rao, K.M. and Sresty, T., 2000, Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses, *Plant Science*, 157, 113-128.
- Reinhardt, D., Pesce, E., Stieger, P., Mandel, T., Baltensperger, K., Bennett, M., Traas, J., Friml, J. and Kuhlemeier, C., 2003, Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport, *Nature*, 426, 255–260.
- Rutkowski, D.T. and Kaufman, R.J., 2004. A trip to the ER: Coping with stress. *Trends Cell Biology*, 14, 20-28.
- Sahar, S.B. and Amit, V., 2013, Bone tissue engineering using 3D printing, *Materials Today*, 496-504.
- Scandalios, J.G., 1993, Oxygen Stress and Superoxide Dismutases, *Plant Physiology*, 712.
- Schröder, M. and Kaufman, R.J., 2005, The mammalian unfolded protein response, *Annual Review of Biochemistry*, 74, 739-789.
- Shigeoka, S., Ishikawa, T., Tamoi, M., Miyagawa, Y., Takeda, T., Yabuta and Y., Yoshimura K., 2002, Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes, *Journal of Experimental Botany*, 1305-1319.
- Singh, R, Parihar, P., Singh, M., Bajguz, A., Kumar, J., Singh, S., Singh, V.P. and Prasad, S.M., 2017, Uncovering potential applications of Cyanobacteria and algal metabolites in biology, agriculture and medicine: current status and future prospects. *Frontiers in Microbiology*, 8, 515.

- Sivam, G., 2002, Analysis of Flavonoids, Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals, CRC Press, Boca Raton, London, New York.
- Smart R.E. and Bingham, G.E., 1974, Rapid estimates of relative water content, *Plant Physiology*, 53, 258-260.
- Sreejayan, N., and Rao, M.N.A., 1994, Curcunoids as potent inhibitors of lipid peroxidation, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 46, 1013-1016.
- Su T., Xu J., Li Y., Lei L., Zhao L., Yang H., Feng J., Liu G. and Ren D., 2011, Glutathione-indole-3-acetonitrile is required for camalexin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell*, 364-380.
- Sweetlove, L.J. and Foyer, C.H., 2004, Roles for Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Plant Mitochondria, *Plant mitochondria: from genome to function*, 307-320.
- Takahashi K.A., Asada, K., 1983, Superoxide anion permeability of phospholipid membranes and chloroplast thylakoids, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 558-566.
- Tintor, N. and Saijo, Y., 2014, ER-mediated control for abundance, quality, and signaling of transmembrane immune receptors in plants, *Frontiers in Plant Science*, 5, 65.
- Tonnesen, H.H. and Karlsen, J., 1988. Studies on curcumin and curcuminoids. XL stabilization of photolabile drugs in serum samples by addition of curcumin, *International Journal of Pharmaceutics*, 41, 75-81.
- Tonnesen, J., Pryds, A., Larsen, E.H., Paulson, O.B., Hauerberg, J. and Knudsen, G.M., 2005, Laser Doppler flowmetry is valid for measurement of cerebral blood flow autoregulation lower limit in rats, *Experimental Physiology*, 90, 349-355.
- Tu, B.P. and Weissman, J.S., 2004, Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences, *Journal of Cell Biology*, 341-346.

- Upadhyay, H., Shome, S., Roy, D. and Bhattacharya, M.K., 2014, Arsenic Induced Changes in Growth and Physiological Responses in *Vigna radiata* Seedling: Effect of Curcumin Interaction, *American Journal of Plant Sciences*, 5, 36093618.
- Vitale, A. and Boston, R.S., 2008, Endoplasmic reticulum quality control and the unfolded protein response: Insights from plants. *Traffic*, 9, 1581–1588.
- Vitale, A. and Denecke, J., 1999, The endoplasmic reticulum- Gateway of the Secretory Pathway, *The Plant Cell*, 11, 615-628.
- Wagner, D., Przybyla, D. and Op den Camp, R., 2004, The genetic basis of singlet oxygen-induced stress responses of *Arabidopsis thaliana*, *Science*, 306, 1183–1185.
- Walter, P. and Ron, D., 2011, The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*, 1081–1086.
- Watanabe N. and Lam, E., 2008, BAX Inhibitor-1 Modulates Endoplasmic Reticulum Stress-mediated Programmed Cell Death in Arabidopsis, *The journal of biological chemistry* 283, 3200–3210.
- Wrzaczek, M., Brosche, M. and Kangasjarvi, J., 2013, ROS signaling loops-production, perception, regulation, *Current opinion in plant biology*, 575-582.
- Yamamoto, M., Maruyama, D., Endo, T., and Nishikawa, S.I., 2008, Arabidopsis thalianahas a set of J proteins in the endoplasmicreticulum that are conserved from yeast to animals and plants, *Plant Cell Physiol*, 49, 1547–1562.
- Yang, S., Wang, L. and Li S., 2007, Ultraviolet-B irradiation-induced freezing tolerance in relation to antioxidant system in winter wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves, *Environmental and Experimental Botany*, 60(3), 300-307.

- Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T. and Mori, K., 2001, XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor, *Cell*, 881-891.
- Zhang, H.C., Liu, J.M., Lu, H.Y. and Gao, S.H., 2009. Enhanced flavonoid production in hairy root cultures of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch by combining the overexpression of chalcone isomerase gene with the elicitation treatment, *Plant Cell Reports*, 28, 1205-1213.
- Zhang, W., Xie, Z., Wang, L., Lang, D. and Zhang, X., 2017, Silicon alleviates salt and drought stress of *Glycyrrhiza uralensis* seedling by altering antioxidant metabolism and osmotic adjustment, *J. Plant Res.*, 130, 611-624.
- Zhang, Y., Feng, S., Chen, F., Chen, H., Wang, J., McCall, C., Xiong, Y. and Deng, X., 2008, Arabidopsis DDB1-CUL4 ASSOCIATED FACTOR1 Forms a Nuclear E3 Ubiquitin Ligase with DDB1 and CUL4 That Is Involved in Multiple Plant Developmental Processes, *The Plant Cell*, 20, 1437–1455.
- Zhao, Q., Zhou, L., Liu, J., Cao, Z., Du, X. and Huang, F., 2018, Involvement of CAT in the detoxification of HT-induced ROS burst in rice anther and its relation to pollen fertility. *Plant Cell Rep.* 37, 741–757.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Merve YALÇINKAYA
Uyruğu : TC **Doğum Yeri ve Tarihi** : Yunak 20/01/1995
Telefon : 05449330401
Faks :
e-mail : merveyalkaya@gmail.com

EĞİTİM

Derece Adı, İlçe, İl Bitirme Yılı Cemal KARACAN Anadolu Lisesi,
Yunak, Konya Üniversite : Necmettin ERBAKAN Üniversitesi, Konya
2017
Lise : **2013**
Yüksek Lisans :
Doktora :

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
-----	-------	--------

UZMANLIK ALANI

YABANCI DİLLER

BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER

YAYINLAR