



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**PROTEOZOM İNHİBİSYONUNUN DOMATES ÜZERİNDEKİ
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Burcu KARPUZ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı


**DANIŞMAN
Doç. Dr. Özgür ÇAKIR**


Ocak, 2020

İSTANBUL

Bu çalışma, 23.01.2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoteknoloji ve Genetik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi


Doç. Dr. Özgür ÇAKIR(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi


Doç. Dr. Neslihan TURGUT KARA
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi


Doç. Dr. Özge KARAKAŞ METİN
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 33578 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Tez çalışmam boyunca benden hiçbir desteğini esirgemeyen ve çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum değerli danışmanım Doç. Dr. Özgür ÇAKIR'a tüm samimiyetimle teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarımda ve eğitimim sırasında bilgi ve deneyimleriyle her daim destek olan Doç. Dr. Neslihan TURGUT KARA hocama ve Araş. Gör. Burcu ARIKAN'a,

Dostluklarıyla her zaman yanımda olan Rabiya Merve CEYLAN, Seda YAŞAR, Wissem MHİRİ, Bekir ILGAR arkadaşlarıma ve İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümü hocalarıma ve arkadaşlarıma,

İstanbul Üniversitesi Alfred Heilbronn Botanik Bahçesi'nde yaptığım bitki yetiştirme çalışmalarımda büyük bir özveriyle destek olan Doç. Dr. Taylan KÖSESAKAL hocama,

Eğitim hayatım boyunca her zaman beni destekleyen ve varlıklarıyla daima beni mutlu eden başta annem Sevgi KARPUZ, babam Harun KARPUZ, abim Burak KARPUZ ve sevgili eşi Zehra KARPUZ'a sonsuz teşekkür ederim.

Ocak 2020

Burcu KARPUZ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
TABLO LİSTESİ.....	x
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xi
ÖZET.....	xv
SUMMARY.....	xvii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	4
2.1. <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.....	4
2.2. SERBEST RADİKALLER	7
2.2.1. Reaktif Oksijen Türleri (ROS).....	7
2.2.1.1. Süperoksit ($O_2^{\cdot-}$).....	8
2.2.1.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2).....	9
2.2.1.3. Singlet oksijen (1O_2).....	10
2.2.1.4. Hidroksil ($OH\cdot$).....	10
2.3. BİTKİLERDE STRES	11
2.3.1 Bitkilerde Oksidatif Stres.....	11
2.3.2. Bitkilerde Oksidatif Stresin Etkileri	12
2.3.2.1. ROS'ların lipitlere etkileri.....	12
2.3.2.2. ROS'ların proteinlere etkileri.....	13
2.3.2.3. ROS'ların DNA'ya etkileri	13
2.4. BİTKİLERDE ANTİOKSİDANLAR	14
2.4.1. Bitkilerde Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	14
2.4.1.2. Tokoferoller (Vitamin E).....	15
2.4.1.3. Karetonoidler.....	15
2.4.1.4. Glutatyon (GSH).....	16
2.4.1.5. Fenolik bileşikler	16
2.4.2. Bitkilerde Enzimatik Antioksidanlar	17
2.4.2.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) (EC 1.15.1.1).....	18

2.4.2.2. Çinko-Bakır Süperoksit Dismutaz (Cu/Zn-SOD) (EC 1.15.1.1).....	18
2.4.2.3. Manganez Süperoksit Dismutaz (Mn-SOD) (EC 1.15.1.1)	19
2.4.2.5. Askorbat Peroksidaz (APX) (EC 1.11.1.11)	20
2.4.2.6. Glutasyon Redüktaz (GR) (EC 1.6.4.2)	21
2.4.2.7. Katalaz (CAT) (EC 1.11.1.6)	21
2.4.2.8. Glutasyon S-Transferaz (GST) (EC 2.5.1.18).....	22
2.4.2.9. Glutasyon peroksidaz (GPX) (EC 1.11.1.12).....	23
2.4.2.10. Fosfolipit Hidroperoksit Glutasyon Peroksidaz (PhGPX) (EC 1.11.1.12).....	23
2.5. UBİKİTİN PROTEOZOM SİSTEMİ (UPS)	24
2.5.1. Ubikitin Proteini (Ub).....	25
2.5.2. Ubikitinasyon (Ubikitin Konjugasyonu)	26
2.5.3. 26S Proteozom Kompleksi	27
2.6. PROTEOZOM İNHİBİSYONU.....	30
2.6.1. MG132 Proteozom İnhibitörü.....	31
2.7. GEN ANLATIM ANALİZLERİ.....	33
2.7.1 Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (GZ PZR)	34
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	37
3.1. BİTKİ MATERYALİ	37
3.2. BİTKİ MATERYALİ ÇOĞALTIMI.....	37
3.3. BESİYERİ VE DOKU KÜLTÜRÜ KOŞULLARI.....	38
3.3.1. MS Besiyerinin Hazırlanması	38
3.3.2 Domates Tohumlarının Yüzey Sterilizasyonu	40
3.3.3 Domates Bitkilerinin Yetiştirilmesi.....	40
3.4. PROTEOZOM İNHİBİTÖRÜ UYGULAMASI.....	40
3.5. RNA İZOLASYONU	40
3.6. RNALARIN SAFLIK VE KONSANTRASYON ANALİZİ	41
3.6.1. Spektrofotometrik Ölçüm	41
3.6.2. Agaroz Jel Elektroforezi	41
3.7. CDNA SENTEZİ.....	42
3.8. GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU	43
3.8.1. Gen Anlatım Analizinde Kullanılan Genler ve Özellikleri	44
3.9. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	45
4. BULGULAR.....	46
4.1 DOMATES TOHUMLARININ ELDESİ.....	46

4.2. TOHUMLARIN ÇİMLENMESİ VE PROTEOZOM İNHİBİTÖRÜ UYGULANMASI.....	49
4.3 GEN ANLATIM ANALİZLERİ.....	51
4.3.1 RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi.....	51
4.3.2 Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizleri.....	52
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	59
KAYNAKLAR	67
ÖZGEÇMİŞ	86



ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 2.1: <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.....	5
Şekil 2.2: Bitkilerde ROS oluşumunun şematik gösterimi.....	8
Şekil 2.3: ROS'ların lipit, protein ve DNA'ya etkileri.....	12
Şekil 2.4: Ubikitin proteini ve poliubikitinasyon reaksiyonlarında rol oynayan lizin kalıntılarının modeli (Lippai ve Low, 2014).	26
Şekil 2.5: E1 (Ub aktive edici enzim), E2 (Ub konjuge edici enzim) ve E3 (Ub ligazı) enzimini içeren ubikitinasyon mekanizması (Jiang ve diğ., 2012).....	27
Şekil 2.6: 26S proteozomunun yapısı ve organizasyonu. 20S CP çekirdek proteazını, 19S RP düzenleyici partikülü ifade etmektedir (Vierstra, 2009).....	29
Şekil 2.7: Ubikitin proteozom sistemi (UPS).....	29
Şekil 2.8: MG132'nin kimyasal yapısı (Cvek, 2012).	32
Şekil 2.9: 26S proteozomunda MG132'nin bağlandığı bölge (Guo ve Peng, 2013).	32
Şekil 2.10: Reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu yoluyla MG132 ile indüklenen hücre ölümünün şematik diyagramı (Guo ve Peng, 2013).....	33
Şekil 2.11: Gerçek zamanlı PZR'de reaksiyon eğrisi üssel fazda Ct değerine ulaşılmasını, lineer fazda her döngüde ürün veriminin artışını, plato fazında ise PZR bileşenlerinin azalmasıyla verimin düşüşünü ifade eder (Nassiri ve diğ., 2018).	35
Şekil 2.12: DNA denatürasyonu sırasında serberst olan SYBR Green boyası forward ve reverse primerlerin bağlanmasıyla başlangıçta az ışımaya yapar. Ardından uzama sonrasında SYBR Green çift zincirli PZR ürününe bağlanır ve floresan ışımaya artar (Fraga, Meulia ve Fenster, 2014).....	36
Şekil 4.1: Bitki büyütme ve tohum eldesi işlemlerinin gerçekleştirilmesi için yetiştirilen domatesler.....	47
Şekil 4.2: Bahçeye aktarılan ve meyveleri toplanan <i>L. esculentum</i> bitkileri.....	48
Şekil 4.3: Cam petrielerde 24-48 saat boyunca kurutulan <i>L. esculentum</i> tohumları.	49
Şekil 4.4: MS besiyerindeki 7 günlük <i>Lycopersicon esculentum</i> tohumları.....	49
Şekil 4.5: 17 günlük <i>Lycopersicon esculentum</i> bitkileri.....	50

Şekil 4.6: Kontrol DMSO+dH ₂ O ve MG132 proteozom inhibitörü içeren <i>L. esculentum</i> dokuları.....	51
Şekil 4.7: Proteozom inhibisyonu yapılan <i>L. esculentum</i> dokularından izole edilen RNA'ların agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü.....	52
Şekil 4.8: GZ PZR analizleri sonucunda <i>L. esculentum</i> yaprak, kök ve gövde dokusunda 50 µM MG132 uygulaması sonrası <i>SLGR1</i> geninin anlatım düzeyi. Sütunlarda bulunan farklı harfler Tukey testine göre $p < 0.05$ olan sonuçları ve anlamlı değişimi ifade eder.	53
Şekil 4.9: GZ PZR analizleri sonucunda <i>L. esculentum</i> yaprak, kök ve gövde dokusunda 50 µM MG132 uygulaması sonrası <i>SLPhGPX</i> geninin anlatım düzeyi. Sütunlarda bulunan farklı harfler Tukey testine göre $p < 0.05$ olan sonuçları ve anlamlı değişimi ifade eder.	53
Şekil 4.10: GZ PZR analizleri sonucunda <i>L. esculentum</i> yaprak, kök ve gövde dokusunda 50 µM MG132 uygulaması sonrası <i>SLCAT1</i> geninin anlatım düzeyi. Sütunlarda bulunan farklı harfler Tukey testine göre $p < 0.05$ olan sonuçları ve anlamlı değişimi ifade eder.....	54
Şekil 4.11: GZ PZR analizleri sonucunda <i>L. esculentum</i> yaprak, kök ve gövde dokusunda 50 µM MG132 uygulaması sonrası SL-Fe-SOD geninin anlatım düzeyi. Sütunlarda bulunan farklı harfler Tukey testine göre $p < 0.05$ olan sonuçları ve anlamlı değişimi ifade eder.....	54
Şekil 4.12: GZ PZR analizleri sonucunda <i>L. esculentum</i> yaprak, kök ve gövde dokusunda 50 µM MG132 uygulaması sonrası <i>SLGPX</i> geninin anlatım düzeyi. Sütunlarda bulunan farklı harfler Tukey testine göre $p < 0.05$ olan sonuçları ve anlamlı değişimi ifade eder.....	55
Şekil 4.13: GZ PZR analizleri sonucunda <i>L. esculentum</i> yaprak, kök ve gövde dokusunda 50 µM MG132 uygulaması sonrası <i>SLCu/Zn-SOD</i> geninin anlatım düzeyi. Sütunlarda bulunan farklı harfler Tukey testine göre $p < 0.05$ olan sonuçları ve anlamlı değişimi ifade eder.....	55
Şekil 4.14: GZ PZR analizleri sonucunda <i>L. esculentum</i> yaprak, kök ve gövde dokusunda 50 µM MG132 uygulaması sonrası <i>SLcAPX</i> geninin anlatım düzeyi. Sütunlarda bulunan farklı harfler Tukey testine göre $p < 0.05$ olan sonuçları ve anlamlı değişimi ifade eder.....	56
Şekil 4.15: GZ PZR analizleri sonucunda <i>L. esculentum</i> yaprak, kök ve gövde dokusunda 50 µM MG132 uygulaması sonrası <i>SLGST</i> geninin anlatım düzeyi. Sütunlarda bulunan farklı harfler Tukey testine göre $p < 0.05$ olan sonuçları ve anlamlı değişimi ifade eder.....	56
Şekil 4.16: Yaprak, kök ve gövde dokusu için her genin anlatımını ifade eden şematik gösterim.	57

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: 2007 ve 2017 yılları dünya domates üretimi (FAOSTAT, 2017).	5
Tablo 2.2: 100 mg domates meyvesinin kimyasal bileşimi (Sanders, 1995).	6
Tablo 2.3: Bitkilerde çeşitli stres kaynaklı üretilen ROS atılımında önemli rol oynayan çeşitli antioksidan enzimler (Sharma ve diğ., 2012).	17
Tablo 3.1: MS besiyeri bileşenleri.	39
Tablo 3.2: MS temel tuz karışımı içeriği (Murashige ve Skoog, 1962).	39
Tablo 3.3: 1L 50X TAE hazırlamak için gerekli bileşenler ve konsantrasyonları.	42
Tablo 3.4: cDNA sentez reaksiyon bileşenleri.	42
Tablo 3.5: cDNA sentezi reaksiyon koşulları.	42
Tablo 3.6: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu bileşenleri.	43
Tablo 3.7: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu koşulları.	43
Tablo 3.8: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan primerler ve dizileri (Martinez ve diğ., 2018).	45
Tablo 4.1: Proteozom inhibitörü uygulanmış <i>L. esculentum</i> dokularından elde edilen RNA'ların spektrofotometrik değerleri.	52
Tablo 4.2: <i>L. esculentum</i> kök, gövde ve yaprak dokusunda 50 µM MG132 uygulaması sonrası <i>SLGR1</i> , <i>SLPhGPX</i> , <i>SLCAT1</i> , <i>SL-Fe-SOD</i> , <i>SLGPX</i> , <i>SLCu/Zn-SOD</i> , <i>SlcAPX</i> ve <i>SLGST</i> genlerinin aktin genine göre göreceli katsayıları. Aktin geninin katsayısı 1 olarak kabul edildiğinden, tablodaki değerler 1'e göre değişimi ifade eder.	58

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
%	: Yüzde
~	: Yaklaşık olarak
°C	: Derece Santigrat
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
atm	: Atmosfer
cm	: Santimetre
g	: Gram
L	: Litre
M	: Molar
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
U	: Ünite
V	: Volt
Ni	: Nikel
Cu	: Bakır
Co	: Kobalt
Zn	: Çinko
Mn	: Mangan
Fe	: Demir
Mo	: Molibden
Cr	: Krom
KNO ₃	: Potasyum Nitrat
NH ₄ NO ₃	: Amonyum Nitrat
MgSO ₄ .7H ₂ O	: Magnezyum Sülfat Heptahidrat
CaCl ₂ .2H ₂ O	: Kalsiyum Klorid Dihidrat
KH ₂ PO ₄	: Potasyum Dihidrojen Fosfat
MnSO ₄ .4H ₂ O	: Manganez Sülfat Tetrahidrat

KI	: Potasyum İyodür
H₃BO₃	: Borik Asit
ZnSO₄.7H₂O	: Çinko Sülfat Heptahidrat
CuSO₄.5H₂O	: Bakır Sülfat Pentahidrat
Na₂MoO₄.2H₂O	: Sodyum Molibdat Dihidrat
CoCl₂.6H₂O	: Kobalt Klorid Hekzahidrat
FeSO₄.7H₂O	: Demir Sülfat Heptahidrat
Kcal	: Kilokalori
Mb	: Megabaz
CO₂	: Karbondioksit
O₂	: Oksijen
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
O₂^{•-}	: Süperoksit
OH[•]	: Hidroksil
H	: Hidrojen
HCl	: Hidroklorik Asit
Cu	: Bakır
Zn	: Çinko
Mn	: Manganez
Ca²⁺	: Kalsiyum
NaOH	: Sodyum Hidroksit

Kısaltmalar

Açıklama

cDNA	: Komplementer DNA
DEPC	: Dietilpirokarbonat
dH₂O	: Distile Su
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dNTP	: Deoksiribonükleozid Trifosfat
EDTA	: Etilendiamintetraasetik Asit
EtBr	: Etidyum Bromür
g	: Rölatif Santrifüj Kuvveti, "RCF"
MS	: Murashige ve Skoog
MgCl₂	: Magnezyum Klorür

NaAc	: Sodyum Asetat
NaOH	: Sodyum Hidroksit
RNA	: Ribonükleik Asit
TAE	: Tris-asetat EDTA
UV	: Ultra Viyole
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
RNS	: Reaktif Azot Türleri
CAT	: Katalaz
GSH	: Glutasyon
GR	: Glutasyon Redüktaz
GPX	: Glutasyon Peroksidaz
SOD	: Süperoksit Dismutaz
PhGPX	: Fosfolipit Hidroperoksit Glutasyon Peroksidaz
MG132	: Proteozom İnhibitör
UPS	: Ubikitin Proteozom Sistemi
SOD	: Süperoksit Dismutaz
Zn/Cu-SOD	: Çinko-Bakır Süperoksit Dismutaz
Mn-SOD	: Manganaz Süperoksit Dismutaz
APX	: Askorbat Peroksidaz
Fe-SOD	: Demir Süperoksit Dismutaz
GST	: Glutasyon S-Transferaz
Ct	: Eşik Döngüsü
Rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı, 'Rotation per minute'
ETC	: Elektron Taşıma Zinciri
PSI	: Fotosistem I
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
XOD	: Ksantin Oksidaz
AA	: Askorbik Asit
GSSG	: Okside Disülfür
PSII	: Fotosistem II
UBA	: Ubikitin Aktive Edici Enzim
UBC	: Ubikitin-Konjüğe Edici Enzim
UBL	: Ubikitin Lijaz
Ub	: Ubikitin Proteini

CP	: Çekirdek Proteaz
RP	: Düzenleyici Partikül
ATP	: Adenozin Trifosfat
DUB	: Deubikitin Edici Enzimler
JNK	: C-Jun N-Terminal Kinazı
GZ PZR	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu



ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PROTEOZOM İNHİBİSYONUNUN DOMATES ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Burcu KARPUZ

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Özgür ÇAKIR

Bitkiler yaşam döngüleri boyunca büyüme ve gelişmelerini olumsuz yönde etkileyecek birçok abiyotik ve biyotik stres faktörleri ile karşılaşır. Bu stres koşullarının sonucu olarak reaktif oksijen türleri (ROS) üretirler ve oksidatif strese maruz kalırlar. Bitkiler oksidatif stres altında yaşamlarını devam ettirebilmek ve stresle başa çıkabilmek için ROS'un detoksifikasyonunu sağlayan çeşitli antioksidanlara sahiptir. Hücrede gen anlatımı düzenlenilerek antioksidan üretimi değiştirilir ve oksidatif stresin neden olduğu hasarların azaltılması sağlanır.

Ubikitin proteozom sistemi (UPS) bitkilerde hücre bölünmesi, gelişim, abiyotik ve biyotik strese yanıt oluşturma süreçlerinde rol oynayan önemli bir sistem olarak tanımlanmıştır. Hücrede hasarlı, yanlış katlanmış ve kısa ömürlü proteinleri parçalayarak veya işleyerek hücrel dengenin korunmasını sağlar.

Proteozom inhibitörleri, ubikitin proteozom sisteminin farklı biyolojik süreçlerde rolünü belirlemede temel araçlar olmuştur. MG132, çalışmalarda en çok kullanılan güçlü, geri dönüşümlü, sentetik peptid aldehit grubu proteozom inhibitörüdür. Yapılan çalışmalar proteozom inhibisyonundan etkilenen hücrelerde daha yüksek ROS üretimi olduğunu göstermiştir. Buna göre proteozomlar, bitkilerde ROS üretiminin doğrudan düzenleyici mekanizmasıdır. Proteozom inhibisyonu ve oksidatif stres ilişkisi maya ve memeli hücrelerinde

iyi tanımlanmıştır. Buna karşın bitkilerde proteozom inhibisyonunun sebep olduğu yanıt mekanizmaları hakkında bilgi sınırlıdır.

Bu tez çalışmasında İstanbul Üniversitesi Alfred Heilbronn Botanik Bahçesi'nde yabani tip *Lycopersicon esculentum* bitkisi yetiştirilmiştir ve elde edilen tohumları doku kültüründe kullanılmıştır. Kök, gövde ve yaprak dokularına 50 µM MG132 proteozom inhibitörü uygulaması sonucunda antioksidan mekanizmalarla ilişkili olduğu bilinen *SLGRI*, *SLPhGPX*, *SLCAT1*, *SLFe-SOD*, *SLGPX*, *SLCu/Zn-SOD*, *SLcAPX* ve *SLGST* genlerinin gen anlatım düzeyleri gerçek zamanlı PZR ile belirlenmiştir. Yapılan analiz sonucunda kök, gövde ve yaprak dokusunda *SLPhGPX*, *SLCAT1*, *SL-Fe-SOD* ve *SLcAPX* genlerinde anlamlı bir değişiklik olmadığı görülmüştür. Bunun yanında kök dokusunda *SLGRI* ve *SLGST* genlerinin anlatımları artmıştır. Yaprak dokusunda ise *SLGPX*, *SLCu/Zn-SOD* ve *SLGST* genlerinin anlatımı anlamlı düzeyde artmıştır. Gövde dokusunda, çalışılan genlerin anlatımında anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır.

Proteozom inhibisyonu oluşturularak domates kök, gövde ve yaprak dokularından elde edilen bu bilgilerin bitkilerde antioksidan sistem ile proteozom sistemi arasındaki ilişkinin anlaşılmasına yardımcı olacağı düşünülmektedir.

Ocak 2020, 104 sayfa.

Anahtar kelimeler: proteozom inhibisyonu, MG132, *Lycopersicon esculentum*, proteozom aktivite, antioksidan gen.

SUMMARY

M.Sc. THESIS

STUDIES ON THE EFFECTS OF PROTEASOME INHIBITION ON TOMATO

Burcu KARPUZ

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Özgür ÇAKIR

Plants encounter many abiotic and biotic stress factors that will adversely affect their growth and development throughout their life cycles. As a result of these stress conditions, they produce reactive oxygen species (ROS) and are exposed to oxidative stress. Plants have various antioxidants that provide detoxification of ROS in order to survive and cope with oxidative stress. By regulating gene expression in the cell, antioxidant production is altered and the damage caused by oxidative stress is reduced.

The ubiquitin proteasome system (UPS) has been identified as an important system that plays a role in the processes of cell division, development, and response to abiotic and biotic stress in plants. It protects the cellular balance by breaking or processing damaged, misfolded and short-lived proteins in the cell.

Proteasome inhibitors have been the main means of determining the role of ubiquitin in different biological processes of the proteasome system. MG132 is a strong, reversible, synthetic peptide aldehyde group proteasome inhibitor which is the most widely used in the studies. Studies have shown that cells affected by proteasome inhibition have higher ROS production. Accordingly, proteasomes are the direct regulatory mechanism of ROS production in plants. The relationship between proteasome inhibition and oxidative stress is well defined

in yeast and mammalian cells. However, there is limited information about the response mechanisms of proteasome inhibition in plants.

In this thesis study, *Lycopersicon esculentum* wild species were grown in Alfred Heilbronn Botanical Garden of Istanbul University and the seeds were used in tissue culture. Gene expression levels of *SLGR1*, *SLPhGPX*, *SLCAT1*, *SLFe-SOD*, *SLGPX*, *SLCu/Zn-SOD*, *SLcAPX* and *SLGST* genes which are known to be associated with antioxidant mechanisms, were determined by real-time PCR. As a result of the analysis, it was observed that there was no significant change in *SLPhGPX*, *SLCAT1*, *SL-Fe-SOD* and *SLcAPX* genes in root, stem and leaf tissues. In addition, expression of *SLGR1* and *SLGST* genes in root tissue was increased. In leaf tissue, expression of *SLGPX*, *SLCu/Zn-SOD* and *SLGST* genes increased significantly. There was no significant change in the expression of the genes studied in the shoot tissue.

It is thought that this information obtained from tomato root, stem and leaf tissues by creating proteasome inhibition will help to understand the relationship between antioxidant system and proteasome system in plants.

January 2020, 104 pages.

Keywords: proteasome inhibition, MG132, *Lycopersicon esculentum*, proteasomal activity, antioxidant gene.

1. GİRİŞ

Bitkiler, diğer canlılardan farklı olarak hareketsiz yaşam sürdürdükleri için çevresel uyaranlara hareket ederek cevap veremezler. Olumsuz çevre faktörlerinden kaçamayan bitkilerin büyüme, üreme, organ gelişimi veya mahsül verimliliği süreçleri olumsuz etkilenir. Bitki stresi, bir bitkinin metabolizmasını, büyümesini ve gelişimini etkileyen veya engelleyen olumsuz durumlar olarak tanımlanmıştır (Lichtenthaler, 1998). Doğal habitatlarında yaşayan bitkiler sürekli olarak mantar, bakteri, virüsler gibi biyotik ve kuraklık, tuzluluk, yüksek ışık yoğunluğu, donma ve ağır metaller gibi abiyotik stres faktörleriyle karşı karşıya kalırlar (Mantri ve diğ., 2012). Bu stres koşullarının sonucu olarak hücreyel reaktif oksijen türleri (ROS) seviyelerinin arttığı bilinmektedir. ROS konsantrasyonu hücre içinde kloroplast, mitokondri ve peroksizomlarda artarak oksidatif hasara yol açar (Prokai ve Simpkins, 2007). Oksidatif hasarın sonucu olarak da hücrede lipitler, nükleik asitler ve proteinler zarar görür (Sharma ve diğ., 2012). Bitkiler ROS toksik bileşenlerinin zararlı etkilerini azaltmak için çeşitli antioksidan savunma sistemleri kullanır (Mosa, Ismail ve Helmy, 2017). Antioksidanlar, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olmak üzere iki grupta incelenmektedir. Bitkilerde ROS detoksifikasyonunu sağlayan enzimatik antioksidanlar süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX), glutatyon peroksidaz (GPX) ve katalaz (CAT)'dır (Blokhina, Virolainen ve Fagerstedt, 2003).

Domates (*Lycopersicon esculentum* Mill.) dünyada kullanımı yaygın olan ve ticari olarak ekonomik değeri yüksek olan Solanaceae familyasına ait bir bitki türüdür. Son verilere göre ülkemiz, domates üretiminde dünyada önemli bir paya sahiptir (FAOSTAT, 2017). İyi bir antioksidan içeriğe sahip olduğu bilinen domates, genetik araştırmalarda da iyi çalışılmış bitki türlerinden biridir. Yaşam döngüsünün kısa olması ve üreme potansiyelinin yüksek olması sebebiyle laboratuvar çalışmalarında tercih edilen bir bitkidir. Bununla birlikte domatesin genomu yıllarca süren araştırmalar neticesinde 30 Mayıs 2012 tarihinde yayınlanmıştır ve buna göre domatesin bitki ve meyve gelişimi araştırmaları için model bitki olduğu kabul edilmiştir (Sato ve diğ., 2012).

Ubikitin proteozom sistemi (UPS), ökaryotik hücrelerde hasarlı, yanlış katlanmış, katlanmamış, kısa ömürlü ve oksitlenmiş proteinlerin yıkımını sağlar. UPS, bitkilerde tuzluluk, kuraklık,

soğuk stresi ve radyasyon gibi olumsuz çevre koşullarına yanıt oluşumunu ve adaptasyonu sağlayan önemli bir sistemdir (Kamauchi ve diğ., 2005). Proteinlerin UPS aracılı yıkılması temel olarak iki adımda gerçekleşir. İlk olarak hedeflenen hasarlı, yanlış katlanmış protein ubiquitin tarafından tanınarak etiketlenir. Ardından ubiquitin proteinleri lizin kalıntılarına kovalent olarak eklenerek poli-Ub zincirleri oluşturur. Bu olaya ubiquitinasyon denir. İkinci adımda Poli-Ub zincirleri, 26S proteozom adı verilen multikatalitik bir proteaz kompleksine yönlendirilir ve burada peptidlerine kadar yıkılır (Genschik ve diğ., 1998).

Proteozom sisteminin inhibisyonu, hücrede proteoliz aktivitesinin ve protein yıkımının azalması ile sonuçlanır (Rock ve diğ., 1994). Bununla birlikte hücreler DNA kırıkları, yüksek ROS üretimi ve hasarlı proteinlerin birikimiyle karşı karşıya kalır. Aynı zamanda proteozom sistemi oksitlenmiş proteinlerin yıkılmasından sorumlu olduğundan, sistemin inhibe olduğu durumda hücre içinde oksidatif stresin belirteci olan protein karbonil seviyeleri artar (Stadtman ve Berlett, 1998; Kim ve diğ., 2003). Buna karşın hücreler, antioksidan savunma sistemi sayesinde oksidatif stresle başa çıkabilirler (Llobet ve diğ., 2008). Proteozom inhibitörleri, ilaç uygulamaları ve laboratuvar deneylerinde proteozom aktivitesini inhibe etmek için kullanılan ticari maddelerdir (Kisselev ve Goldberg, 2001). İnhibitörler, ubiquitin proteozom sistemi enzimlerinin işlevlerinin anlaşılması için kullanılmıştır. Bununla birlikte proteozom sisteminin hücre içinde hangi proteinlerin yıkımından sorumlu olduğu ve diğer mekanizmalarla ilişkisinin anlaşılması proteozom inhibitörleri sayesinde mümkün olmuştur. Proteozom inhibe edildiğinde organizmada çeşitli anormal proteinler birikir. Ayrıca, bu tür katlanmamış ve anormal proteinlerin birikimi hücreyi ölüme kadar götürebilir (Meriin ve diğ., 1998). MG132, laboratuvar çalışmalarında en çok tercih edilen güçlü, geri dönüşümlü ve sentetik peptid aldehit grubu proteozom inhibitörüdür (Hayashi, Saito ve Kawashima, 1992). 26S proteozomun β alt birimlerine kovalent olarak bağlanarak 20S proteozom aktivitesini inhibe eder ve 26S proteozom kompleksinin proteolitik aktivitesini bloke eder (Guo ve Peng, 2013).

Bu tez çalışmasında İstanbul Üniversitesi Alfred Heilbronn Botanik Bahçesi'nde bitki ve meyve gelişimi çalışmaları için model bitki olarak kabul edilen yabancı tip *Lycopersicon esculentum* bitkisi yetiştirilmiştir ve meyvelerinden elde edilen tohumlar doku kültüründe kullanılmıştır. 50 μ M MG132 proteozom inhibitörü uygulanan kök, gövde ve yaprak dokularında antioksidan mekanizmalarla ilişkili olduğu bilinen *SLGRI*, *SLPhGPX*, *SLCAT1*, *SLFe-SOD*, *SLGPX*, *SLCu/Zn-SOD*, *SLcAPX* ve *SLGST* genlerinin gen anlatım düzeyleri

gerçek zamanlı PZR ile belirlenmiştir. Proteozom inhibisyonu sonucunda *SLPhGPX*, *SLCAT1*, *SL-Fe-SOD* ve *SLcAPX* genlerinin anlatımında kök, gövde ve yaprak dokularında anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. Ek olarak gövde dokusunda çalışılan genlerin anlatımında anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. Bunun yanında kök dokusunda *SLGR1* ve *SLGST* genlerinin anlatımında anlamlı bir artış belirlenmiştir. Yaprak dokusunda ise *SLGPX*, *SLCu/Zn-SOD* ve *SLGST* genlerinin anlatımı anlamlı düzeyde artmıştır.

Yapılan çalışmalarda proteozom inhibisyonunun sonucu olarak hücrelerde ROS üretiminin arttığı görülmüştür. Bununla birlikte proteozomların ROS üretiminin doğrudan düzenleyici mekanizması olarak işlev gördüğü düşünülmektedir. Proteozom inhibisyonu ve oksidatif stres ilişkisi maya ve memeli hücrelerinde iyi tanımlanmasına rağmen bitkilerde yanıt mekanizmaları hakkındaki bilgi sınırlıdır. Bu çalışmadan elde edilen verilerin bitkilerde antioksidan sistem yanıtı ve proteozom sistemi arasındaki bağlantının aydınlatılmasına kaynak oluşturabileceği düşünülmektedir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. *Lycopersicon esculentum* Mill.

Solanaceae familyası angiospermiler arasında ekonomik değeri en yüksek familyalardan biridir ve 3000'den fazla tür içerdiği bilinmektedir (Van der Hoeven ve diğ., 2002). Domates (*Lycopersicon esculentum* Mill.) dünyada kullanımı yaygın olan ve ekonomik değeri yüksek olan Solanaceae familyasına ait bir bitki türüdür. Patates, patlıcan, biber ve tütün gibi ticari açıdan önemli birçok bitki ile akrabadır (Jenkins, 1948; Bai ve Lindhout, 2007). Domatesin farklı fenotiplere sahip 13 farklı yabani türü vardır. Bu yabani türler çok küçük meyvelere sahiptir ve antik çağda zehirli olarak kabul edilmiştir, ancak 1820'de çiftçi R. G. Johansson, insanların domates meyvelerinin zehirli olmadığını anlamasını sağlamıştır. Anavatanı Güney Amerika (Peru) olduğu bilinen yabani domates türleri, ilk olarak Meksika'da kültürlenmiş ve buradan dünyaya yayılmıştır (Jenkins, 1948). Tropikal bir bitki olan domates, dünyanın neredeyse tüm iklim bölgelerine uyum sağlar (Foolad, 2007).

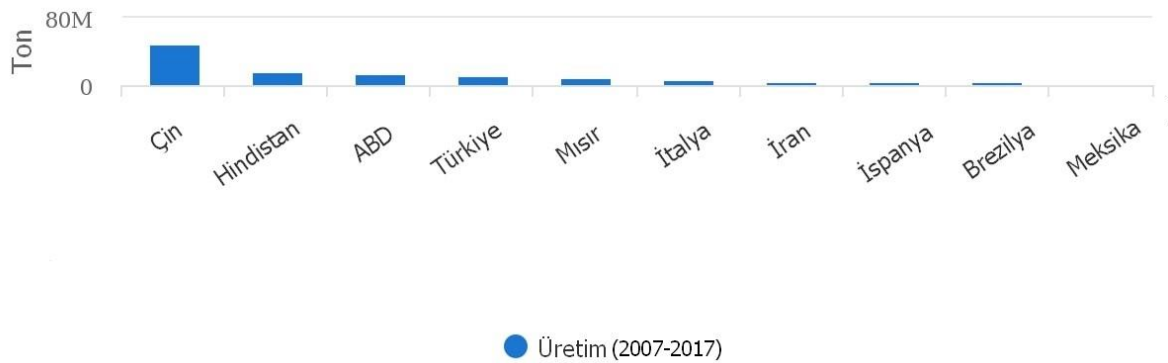
Kültürlenmiş domates türü on altıncı yüzyılda Avrupa'daki botanikçiler tarafından *Solanum* cinsi içerisinde dahil edilmiştir ve on yedinci yüzyıl boyunca yaygın olarak *S. pomiferum* olarak adlandırılmıştır (Luckwill, 1939). Tournefort kültürlenmiş domates türlerini ayrı bir cins (*Lycopersicon*) olarak tanımlayan ilk kişidir (Tournefort, 1694). Ancak Linnaeus, *Species Plantarum*'da domatesleri *Solanum* cinsinde sınıflandırmış ve *S. lycopersicum* ve *S. peruvianum* türlerini dahil etmiştir (von Linnaeus, 1753). Daha sonra Miller, Tournefort'u takip ederek *Lycopersicon* cinsini tanımlamıştır ve *Lycopersicon* ve *Solanum* cinslerini birleştirmiştir (Miller, 1754; Miller, 1807). Tournefort ve Miller'in çalışmalarının ardından birçok araştırmacı *Lycopersicon* cinsini tanımıştır (Peralta ve Spooner, 2000).



Şekil 2.1: *Lycopersicon esculentum* Mill.

Domates (Şekil 2.1), insan beslenmesinde önemli bir üründür. Bununla birlikte gıda sanayinde salça, ketçap, konserve, turşu gibi kullanım alanlarına sahiptir ve ekonomik açıdan önemlidir. Ülkemiz, domates üretiminde 2007 ve 2017 yılları arasında 11,427,992 ton üretim ile dünyada önemli bir paya sahiptir ve yıllar içerisinde üretimi sürekli olarak artış göstermiştir (Tablo 2.1).

Tablo 2.1: 2007 ve 2017 yılları dünya domates üretimi (FAOSTAT, 2017).



Domates, antioksidanlar bakımından zengin olan yenilebilir meyveleri nedeniyle çoğu ülkede yetiştirilmektedir ve iyi bir antioksidan kaynağıdır (Wang ve diğ., 1996). Antioksidan ve antikanser özelliklere sahip beta-karoten, likopen, fenolikler, C vitamini ve flavonoidler gibi

değerli bileşikler içermesi sebebiyle de üretimi ve tüketimi sürekli olarak artmaktadır (Giovannucci, 1999; Lenucci ve diğ., 2006; Raiola ve diğ., 2014; Abewoy Fentik, 2017). Tablo 2.2’de gösterildiği gibi domates meyve içeriğinde %95 oranında su bulunur ve geri kalan %5 ila %7 içeriği ise inorganik bileşikler, organik asitler, şekerler, karotenoidler ve lipidler oluşturur (Preedy, 2009). Aynı zamanda domates meyveleri mineraller, vitaminler, esansiyel amino asitler, şekerler ve diyet lifleri bakımından zengin olduğu için sağlıklı ve dengeli bir beslenmeye katkı sağlar (Obafemi ve diğ., 2019).

Tablo 2.2: 100 mg domates meyvesinin kimyasal bileşimi (Sanders, 1995).

Su	95%
Besin enerjisi	22 kcal
Protein	1 g
Yağ	0.2 g
Karbohidrat	4.7 g
Kalsiyum	13.0 mg
Lif	0.5 g
Sodyum	3.0 mg
Fosfor	27.0 mg
Magnezyum	17.7 mg
Potasyum	244.0 mg
Demir	0.50 mg
Çinko	0.20 mg
Bakır	0.01 mg
Vitamin A	900.0 IU
Vitamin E	0.40 mg
Vitamin C	23 mg
Tiamin	0.06 mg
Riboflavin	0.04 mg
Niasin	0.70 mg
Pantotenik asit	0.33 mg
Vitamin B	0.10 mg
Folik asit	39.00 µg
Biyotin	4.00 µg

Domates, tarımsal olarak değerli olması ve basit diploid genetik yapısı nedeniyle genetik araştırmalarda en iyi çalışılmış organizmalardan biridir (Cheema ve Dhaliwal, 2004). Bunun yanında farklı çevre koşullarında yetişmesi, kısa yaşam döngüsü, yüksek üreme potansiyeli, kontrollü tozlaşma ve düşük fotoperiyot hassasiyeti gibi özelliklerinden dolayı domates, hem temel hem de uygulamalı bitki araştırmaları için iyi bir organizmadır (McCormick ve diğ., 1986; Peterson, Pearson ve Stack, 1998). Domatesin yapısal genomu hakkındaki araştırmalar

farklı ülkelerin ortak bir çalışmasıyla 2005 yılında ökromatik bölgelerin dizilenmesi ile başlatılmıştır. Domates genomu, 14 ülkeden bilim insanının katılımıyla yıllarca süren çalışmaların ardından 30 Mayıs 2012 tarihinde Nature’da yayınlanmıştır (Sato ve diğ., 2012). 12 kromozomlu bir haploid set ve yaklaşık 35.000 protein kodlayan gen içeren küçük bir genoma (~900 Mb) sahiptir. Bu çalışmaya göre domates, bitki ve meyve gelişimi araştırmaları için model bitki olarak kabul edilmiştir (Sato ve diğ., 2012).

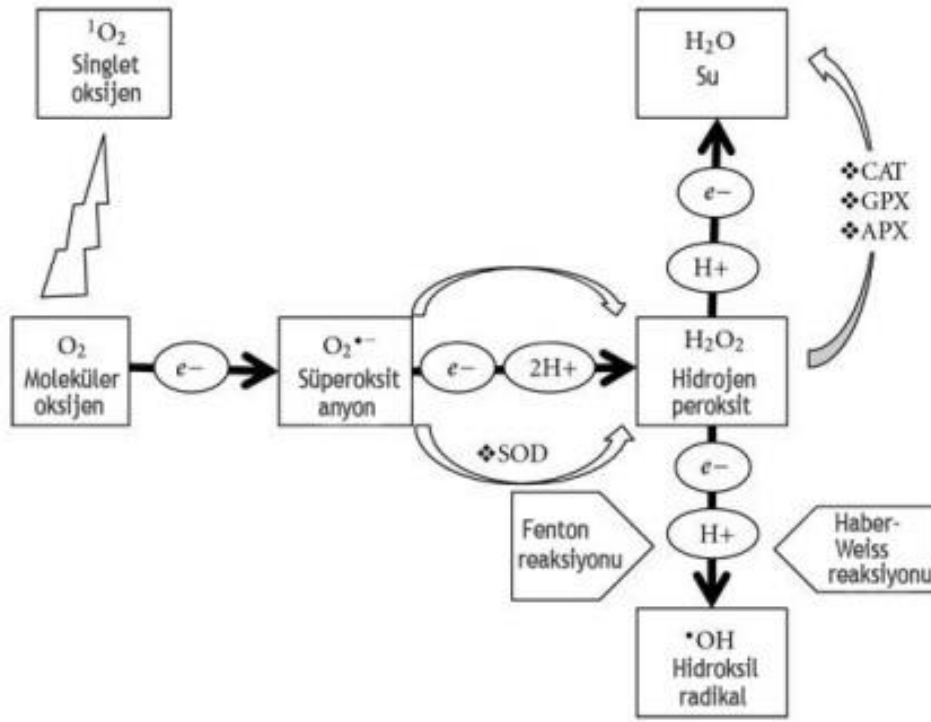
2.2. SERBEST RADİKALLER

Serbest radikaller, dış atomik yörüngelerinde bir veya birden fazla eşleşmemiş elektron bulunduran, kararsız, reaktif moleküller olarak tanımlanabilir. Bunlar farklı çevresel, fizyolojik koşullarda ve patolojik durumlarda üretilirler ve nötr, pozitif yüklü veya negatif yüklü olabilirler. Serbest radikaller reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif azot türleri (RNS) olarak iki ana gruba ayrılır. Hücrede DNA, proteinler, karbonhidratlar ve lipitler gibi önemli moleküllere saldırarak hücre hasarlarına ve homeostatik bozulmaya sebep olurlar. Nikel (Ni), bakır (Cu), kobalt (Co), çinko (Zn), mangan (Mn), demir (Fe), molibden (Mo) krom (Cr) elementleri de eşleşmemiş elektron bulundurur. Ancak bu elementler canlılarda oksijen kullanımını sağladıkları için serbest radikal grubuna dahil edilmezler ve geçiş metalleri olarak isimlendirilirler (Diplock, 1998).

2.2.1. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

Oksijen, biyolojik sistemlerde yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu ya da farklı fiziksel faktörlerin etkisiyle ROS’ların oluşumuna sebep olabilir. Bitkilerin tuzluluk, kuraklık gibi çeşitli çevresel stres koşullarında yaşamsal aktiviteleri yavaşlar ve topraktan su alımı azalır (Mittler, 2002). Bununla birlikte yapraklarda bulunan stomalar kapandığı için CO₂ alımı da azalır. Bu stres koşullarında elektronlar yüksek enerjiye sahip olur ve moleküler oksijene transfer edilerek ROS’ların oluşumuna sebep olurlar (Şekil 2.2).

ROS, bitki gelişimi için gereklidir ve hücre metabolizmasında ikincil haberci olarak hareket eder. Ancak yüksek konsantrasyonunun programlanmış hücre ölümünü tetiklediği bilinmektedir (Prasad ve diğ., 1994; Choudhury ve diğ., 2017). ROS homeostazını sağlayan ana moleküller ise enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlardır.



Şekil 2.2: Bitkilerde ROS oluşumunun şematik gösterimi.

O_2 , H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$ ve OH^{\cdot} oluşumuna neden olurken O_2 'ye elektron transferi ile 1O_2 oluşturulur. $O_2^{\cdot-}$, nonenzimatik olarak veya SOD ile enzimatik olarak H_2O_2 'ye dönüştürülür. Sonuç olarak H_2O_2 , katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPX) ve askorbat peroksidaz (APX) ile H_2O 'ya dönüştürülür. Sharma ve diğ. (2012)'den Türkçe'ye çevrilmiştir.

2.2.1.1. Süperoksit ($O_2^{\cdot-}$)

$O_2^{\cdot-}$, orta derecede reaktif, kısa ömürlü bir ROS'tur. Hem oksitleyici hem de indirgeyici özelliklere sahiptir. Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), genellikle elektron taşıma zinciri (ETC) sırasında fotosistem I (PSI)'de tilakoid membranlarda veya diğer hücre kısımlarında oluşturulur. Normal koşullarda hücrede O_2 , sitokrom c oksidaz ile reaksiyona girerek bir su molekülü meydana getirir. Ancak O_2 , H_2O üretmek için aynı anda dört elektronu alamaz. Böylece O_2 , farklı ETC bileşenleriyle reaksiyona girer. Denklem 2.1'de gösterildiği gibi bir molekülden bir elektron alarak indirgenir ve süperoksit $O_2^{\cdot-}$ radikali oluşturur (Halliwell ve Gutteridge, 1984).



Süperoksit radikali geçiş metallerinin reaksiyonlarındaki rolüyle ve H_2O_2 oluşumunun kaynağı olmasıyla tek başına bulunduğundan daha fazla etkiye sahiptir. Denklem 2.2'de gösterildiği

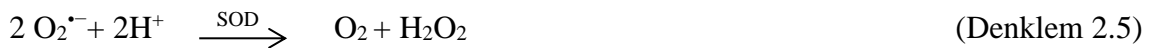
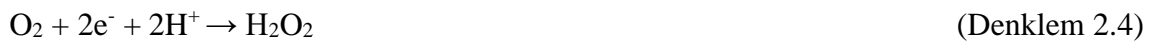
gibi Fe geçiş metalinin oto-oksidasyonu sonucu $O_2^{\bullet-}$ radikali oluşur. Süperoksit radikali oluşuktan sonra ROS ailesinin diğer üyelerini oluşturmak için farklı reaksiyonlara katılabilir. Örneğin kendinden daha reaktif ve toksik etkiye sahip olan $OH\cdot$ ve 1O_2 'ye dönüşerek membran lipid peroksidasyonuna neden olmaktadır (Valko, Morris ve Cronin, 2005).



2.2.1.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Hidrojen peroksit (H_2O_2), oksidatif stres sonucu oluşan reaktif oksijen türlerinin bir formudur ve hidroksil radikalının ($OH\cdot$) oluşum basamağında yer alır. Yüksek miktarda reaktif hidroksil radikalleri üreterek hücrelerin hızlıca ölmesine sebep olabilir. H_2O_2 eşleşmemiş elektronlara sahip değildir, diğer oksijen radikallerinin aksine, biyolojik membranları kolayca geçebilir, dolayısıyla olduğu bölgeden uzak bir bölgede oksidatif hasara neden olabilir (Sharma ve diğ., 2012). H_2O_2 kuraklık, soğuk, UV radyasyon, yoğun ışık, yaralanma ve patojen saldırıları gibi çok çeşitli stres koşulları altında hücrelerde üretilir. Kloroplast, mitokondri, endoplazmik retikulum ve plazma membranının elektron taşıma zinciri (ETC), yağ asidinin β -oksidasyonu bitki hücrelerinde H_2O_2 oluşumunun ana kaynaklarıdır (Neill, Desikan ve Hancock, 2002; Yan ve diğ., 2007). Ayrıca fotooksidasyon reaksiyonları, NADPH oksidaz ve ksantin oksidaz (XOD) bitkilerde H_2O_2 üretimine sebep olur (Mittler ve Zilinskas, 1991).

H_2O_2 biyolojik sistemlerde bulunabildiği gibi düşük konsantrasyonları çevre şartlarında bulunabilmektedir (Li ve Imlay, 2018). H_2O_2 toksisitesi birçok canlıda tanımlanmıştır. Örneğin *Arabidopsis*'te 1 mM H_2O_2 konsantrasyonu bitki büyümesini inhibe eder (Claeys ve diğ., 2014). Memelilerde ve mayada ise H_2O_2 toksisitesi çok düşük konsantrasyonlarda meydana gelebilmektedir (Nakamura, Purvis ve Swenberg, 2003; Semchyshyn ve Valishkevych, 2016). Hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit radikale ($O_2^{\bullet-}$) bir elektron eklenmesi (Denklem 2.3), O_2 'e iki elektron eklenmesi (Denklem 2.4) ya da süperoksit dismutaz (SOD) katalizli reaksiyon ile oluşturulabilir (Denklem 2.5).



2.2.1.3. Singlet oksijen (1O_2)

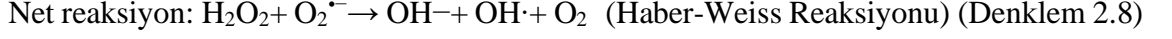
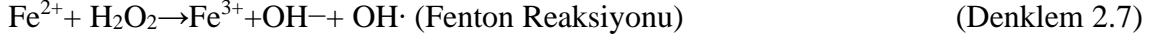
Kloroplastın tilakoid membranları arasında bulunan fotosistem, ışığın emilimini ve enerji transferinin elektronlar aracılığıyla yapan birimdir. Proteinleri, ışığı emen pigmentleri ve elektron alıcıları bulundurur. Her fotosistem birimi karetonoidleri ve klorofili içeren anten kompleksine ve klorofil a ile ilk elektron alıcısını içeren tepkime merkezine sahiptir. Işık, fotosisteme geldiğinde tepkime merkezine ulaşınca kadar anten kompleksindeki pigmentlerle birarada bulunur (Bassi ve diğ., 1987). Singlet oksijen (1O_2) diğer ROS'lerden farklı bir üretim modeline sahiptir. Tilakoid membranlar içinde bulunan fotosistemdeki anten kompleksi klorofillerinin O_2 ile reaksiyonu sonucunda meydana gelir. O_2 'ye elektron transferi söz konusu değildir (Das ve Roychoudhury, 2014).

Tuzluluk, kuraklık ve ağır metal gibi çevresel stresler hücre içi CO_2 konsantrasyonunu düşürerek stomaların kapanmasına neden olur. Bu durum, 1O_2 oluşumunu kolaylaştırır. Singlet oksijenin hücredeki artışıyla fotosistemler zarar görür ve proteinler, pigmentler, nükleik asitler ve lipidler gibi moleküllerde yıkıcı hasarlar meydana gelebilir. Bitkiler 1O_2 'yi, β -karoten, a-tokoferol antioksidanlar ile nötralize edebilir (Wagner ve diğ., 2004; Krieger-Liszka, Fufezan ve Trebst, 2008).

2.2.1.4. Hidroksil ($OH\cdot$)

Hidroksil ($OH\cdot$), tüm ROS'lar arasında biyolojik moleküllere zarar veren en reaktif radikaldir. Tek bir eşleşmemiş elektrona sahiptir ve oksijenle kolayca reaksiyona girebilir. Aynı zamanda $OH\cdot$ tüm biyolojik moleküllerle etkileşime girerek lipid peroksidasyonu, protein ve membran hasarları gibi hücresel bozulmalara sebep olur (Foyer ve diğ., 1997). Bununla beraber $OH\cdot$ 'nin aşırı üretimi sonucunda hücre ölümleri meydana gelebilir (Pinto ve diğ., 2003).

Hidroksil radikali, Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonu olarak bilinen iki mekanizma ile oluşur. $OH\cdot$ oluşumu hem H_2O_2 hem de $O_2^{\cdot-}$ 'ye bağlıdır. Fenton reaksiyonunda Fe^{3+} , süperoksit radikaliyle indirgenerek Fe^{2+} 'ye dönüşür ve 1O_2 oluşturulur (Denklem 2.6). Daha sonra Fe^{2+} , H_2O_2 ile reaksiyona girerek $OH\cdot$ radikalini meydana getirir (Denklem 2.7). Denklem 2.8'de verilen Haber-Weiss reaksiyonuyla $OH\cdot$ ürün olarak açığa çıkar ve bu net reaksiyon olarak bilinir (Halliwell, 2006; Haber ve Weiss, 1932).



2.3. BİTKİLERDE STRES

Bitkiler hareketsiz organizmalar olduğundan dolayı yaşam döngüleri boyunca büyüme ve gelişmelerini olumsuz yönde etkileyecek birçok stres faktörü ile karşılaşılırlar. Çevre kirliliği, küresel ısınma ve iklim değişikliği, biyotik ve abiyotik streslerin bitki büyümesi ve verimi üzerindeki etkisini artırmaktadır. Doğal habitatlarında yaşayan bitkiler sürekli ve aynı anda biyotik (biyotrofik ve nekrotrofik mantarlar, bakteri, fitoplazmalar, oomycetes ve nematodlar, patojenler, virüsler ve viroidler) ve abiyotik (kuraklık, tuzluluk, mekanik yaralar, yüksek ışık yoğunluğu, donma, ağır metaller ve metaloidler) stres faktörleriyle karşı karşıya kalırlar (Mantri ve diğ., 2012). Biyotik ve abiyotik stresler, doğal ekosistemin bir parçası olarak mahsul verimliliğini ciddi şekilde etkiler ve küresel gıda güvenliğini tehdit eder. Mahsul veriminde ortalama %50'den fazla azalmanın abiyotik stresler sebebiyle oluştuğu bilinmektedir (Wang, Mopper ve Hasenstein, 2001). Bitkilerde bu stres etkileşimleri sonucunda hücrelerin karşılaştıkları zorluklardan kaçınmasını sağlamak için moleküler ve hücresele seviyelerde çok çeşitli savunma reaksiyonları oluşturulur. Bitkiler, doğada çeşitli abiyotik streslere maruz kalır ve birçok morfolojik, hücresele, anatomik ve fizyolojik değişikliği içeren karmaşık tepkiler gösterir. Bitki stres yanıtı, stres yoğunluğuna ve stres süresine bağlı dinamik bir süreçtir.

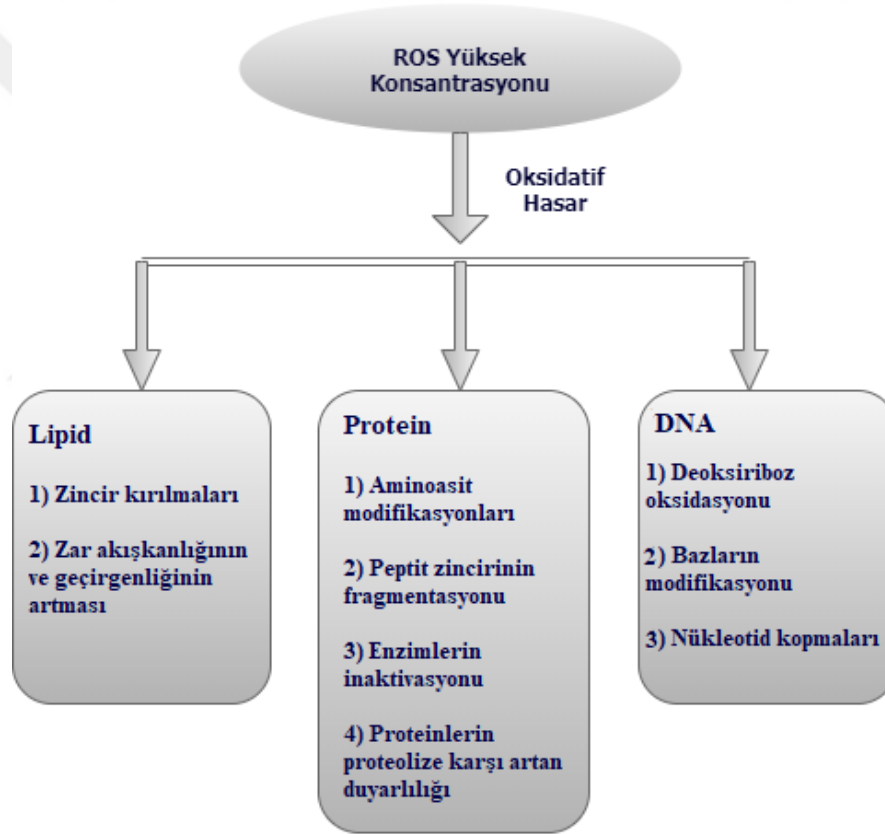
2.3.1 Bitkilerde Oksidatif Stres

Oksidatif stres, hücresele metabolizma sırasında oluşan moleküler oksijen (O_2), süperoksit radikali ($\text{O}_2^{\cdot-}$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi reaktif oksijen türlerinin (ROS) artışı ile onları detoksifiye eden, antioksidanların yetersizliği sonucu oksidatif dengenin bozulması olarak tanımlanır. Tuzluluk ve sıcaklık gibi tarımsal ürünlere zarar veren abiyotik stres faktörleri yüksek miktarda ROS üretilmesi ile ilişkilendirilmiştir (Foyer ve Noctor, 2005; Shi ve diğ., 2015). Stres sonucunda oluşan ROS konsantrasyonu, hücre içinde kloroplastlar, mitokondriler, peroksisomlarda artar ve sonuçta oksidatif hasara yol açar (Prokai ve Simpkins, 2007). Ayrıca, yüksek ROS konsantrasyonları, hücre membranlarının lipit peroksidasyonu, karbonhidrat oksidasyonuna, mitokondriyal ve nükleer DNA hasarları ve enzimatik aktivitenin bozulmasına sebep olabilir (Bose, Rodrigo-Moreno ve Shabala, 2014). Bu nedenle, oksijene bağımlı tüm

organizmalarda ROS üretimi ile detoksifikasyon arasındaki hassas dengenin kurulması önemlidir. Bitkiler bu olumsuz etkileri azaltmak veya engellemek amacıyla moleküler savunma mekanizmalarına sahiptir.

2.3.2. Bitkilerde Oksidatif Stresin Etkileri

Bitkilerde ROS üretimi ve atılması arasındaki denge, tuzluluk, kuraklık, yüksek ışık, metallere kaynaklanan toksisite, patojenler gibi stresli koşullar altında bozulmaktadır. Şekil 2.3'te gösterildiği gibi ROS'ların lipitler, proteinler, nükleik asitler ve enzimler gibi biyomoleküllere zarar verdiği bilinmektedir (Sharma ve diğ., 2012).



Şekil 2.3: ROS'ların lipit, protein ve DNA'ya etkileri.

2.3.2.1. ROS'ların lipitlere etkileri

Lipitler, hücrenin çevreye uyum sağlamasına yardımcı olan ve hücreyi dış etkilere karşı koruyan plazma membranının büyük bir bölümünü oluşturur. Lipit peroksidasyonu ROS'ların hücre membranlarındaki lipitlerden elektron alarak lipitlerin oksidatif bozulmasına ve sonuç olarak hücre hasarına yol açan süreçtir. Stres koşullarında ROS seviyesi artarak membran

bütünlüğünün bozulmasına sebep olur ve lipit peroksidasyonu zincir reaksiyonu mekanizması başlar. Bununla birlikte proteinlere ve DNA'ya zarar veren lipit radikalleri oluşur ve oksidatif stres daha da şiddetlendirilir (Lobo ve diğ., 2010). ROS'un membran fosfolipidlerinde iki ana hedefi vardır. Bunlar karbon (C) atomları arasındaki çift bağ ve gliserol ile yağ asitleri arasındaki ester bağlarıdır. Lipit peroksidasyonu sonucunda membran akışkanlığı artar. Böylece özel kanallar yoluyla hücreye giren, membran proteinlerine zarar veren, membran reseptörlerini, membranda bulunan enzimleri ve iyon kanallarını etkisiz hale getiren maddelerin hücreye girişi kolaylaşır (Smirnov, 2000).

2.3.2.2. ROS'ların proteinlere etkileri

Stres koşullarında üretilen ROS, genel olarak proteinlerin oksidasyonuna neden olur. Proteinler ROS etkisiyle doğrudan ya da dolaylı olabilen modifikasyonlara uğrar. Proteinlerin doğrudan modifikasyonları sırasında nitrozilasyon, karboksilasyon, disülfid bağ oluşumu ve glutatyonilasyon gibi farklı kimyasal modifikasyonların bir sonucu olarak protein aktivitesi değişir. Bunlardan protein karbonilasyonu sıklıkla protein oksidasyonunu değerlendirmek için bir belirteç olarak kullanılır (Møller, Jensen ve Hansson, 2007).

Proteinlerin dolaylı modifikasyonu ise lipit peroksidasyonu sonucu oluşan ürünler ile etkileşimin bir sonucu olarak ortaya çıkar. ROS konsantrasyonu artarak arjinin (Arg), lizin (Lys), prolin (Pro), treonin (Thr) ve triptofan (Trp) gibi amino asitlerin modifikasyonuna sebep olur ve proteolitik aktiviteye karşı duyarlılığı sağlar. Örneğin demir-kükürt aktif bölgeleri içeren enzimler, O₂ tarafından oksitlenerek geri dönüşümsüz inaktive edilir. Böylece okside olmuş proteinler, ubiquitinasyon aracılı proteozomal yıkılma için hazırlanarak proteolitik sindirim için daha iyi hedefler haline gelir (Møller, Jensen ve Hansson, 2007).

2.3.2.3. ROS'ların DNA'ya etkileri

Bitki nükleer DNA'sı ROS'lara karşı histonlar ve diğer proteinler tarafından iyi bir şekilde korunur. Mitokondri ve kloroplast DNA'sı ise, ROS üretim bölgelerine yakın olmalarının yanı sıra koruyucu histonların eksikliğinden dolayı ROS'lardan daha çok etkilenirler. ROS etkisiyle DNA'nın oksidatif hasarı, deoksiriboz şekerin oksidasyonu, nükleotitlerin modifikasyonu, nükleotid kopması ve DNA zincirinde kırılmalar meydana gelebilir. OH[•] ve H₂O₂ deoksiribozla ve bazlarla kolayca reaksiyona girer. OH[•], deoksiriboz şeker omurgasından hidrojen atomu çıkararak ve pürin-pirimidin bazlarının çift bağlarıyla reaksiyona girerek zarar verir. Kolayca

tamir edilemeyen bu hasarlar hücreyi ölüme kadar götürebilir (Willcox, Ash ve Catignani, 2004; Halliwell, 2006).

2.4. BİTKİLERDE ANTIOKSİDANLAR

Stres koşulları altında ROS sentezi ve detoksifikasyonundan sorumlu enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanların oluşumu strese karşı verilen moleküler cevaplardan biridir. Bitkiler oksidatif stres altında yaşamlarını devam ettirebilmek, stresle başa çıkabilmek için ROS'un kontrolü ve detoksifikasyonunu sağlayan çeşitli antioksidanlara sahiptirler. Bitki hücrelerinde kloroplastlar, mitokondriler ve peroksizomlar gibi farklı organellerde ROS üretimini ve detoksifikasyonunu sağlayan sistemler bulunur (Pang ve Wang, 2008). Antioksidanlar düşük konsantrasyonlarda oksidasyon yapabilen ve diğer bir substratın oksidasyonunu azaltan veya engelleyen, oksidasyona karşı mücadele eden maddelerdir. Antioksidanlar, enzimatik olmayan antioksidanlar ve enzimatik antioksidanlar olmak üzere iki kısımda incelenmektedir. Enzimatik olmayanlar, askorbik asit (AA), vitamin E, karotenoidler, glutatyon ve fenolik bileşiklerdir. Enzimatik antioksidanlar ise süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX), glutatyon peroksidaz (GPX) ve katalaz (CAT) olarak bilinmektedir. Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar hücrede buldukları yer ve rollerine göre farklılık göstermektedirler (Blokina, Virolainen ve Fagerstedt, 2003).

2.4.1. Bitkilerde Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

Bitkilerde enzimatik olmayan antioksidanlar arasında askorbik asit (Vitamin C), tokoferoller (Vitamin E), karotenoidler, glutatyon (γ -glutamil-sisteinil-glisin, GSH) ve fenolik bileşikler bulunur. Bu antioksidanlar çok sayıda hüresel bileşenle etkileşime girerler. Bazı enzimlerin kofaktörleri olmalarının yanı sıra mitoz ve hücre yaşlanmasından ölümüne kadar olan süreci kontrol ederek bitki büyümesini ve gelişimini etkiler (De Pinto ve De Gara, 2004). Enzimatik olmayan antioksidanlar bakımından mutant olan *Arabidopsis*'lerin stres faktörlerine karşı aşırı duyarlı olduğu görülmüştür (Gao ve Zhang, 2008; Semchuk ve diğ., 2009).

2.4.1.1. Askorbik Asit (Vitamin C)

Askorbat, ökaryotlarda indirgenmiş formu (askorbik asit) ve okside edilmiş iki formu (mono ve dehidroaskorbik asit) bulunan bir antioksidan moleküldür. Bitkilerde oksidatif strese karşı direnci sağlayan birincil faktör olarak çalışır (Conklin, 2001; Zechmann, 2011). Aynı zamanda

askorbat, fotosentez ve hücre duvarı gelişimi gibi çeşitli biyolojik reaksiyonlarda rol oynar (Wolucka ve Van Montagu, 2003). Direkt olarak reaktif oksijen türlerinin detoksifikasyonunu sağlar, gen anlatımının modülasyonuna katılır ve enzimatik aktiviteyi kontrol eder (Zechmann, 2011). Askorbat konsantrasyonu ışık yoğunluğu, yaş, bitki dokusu ve hücre tipi gibi birçok faktöre bağlı olarak değişmektedir ve bitki dokusundan kantitatif olarak miktar tayini yapılabilmektedir (Bartoli, Pastori ve Foyer, 2000; Tabata, Takaoka ve Esaka, 2002; Tamaoki ve diğ., 2003). *R. stylosa* 'da yapılmış bir çalışmada tuzluluk stresi altında yapraklarda yüksek konsantrasyonda askorbat tespit edilmiş ve süperoksit radikallerini temizlemedeki rolü öne sürülmüştür. Benzer şekilde *K. candel* ve *B. gymnorrhiza* 'da ağır metal stresi altında L-askorbik asit içeriğinde anlamlı bir artış olduğu bildirilmiştir (Huang ve diğ., 2010).

2.4.1.2. Tokoferoller (Vitamin E)

Tokoferoller, yağda çözünebilen, dört adet izomeri bulunan (α , β , γ ve tokotrienoller) birçok bitki, alg ve siyanobakteriler gibi fotosentetik organizmalar tarafından üretilen bir antioksidan grubudur (Peñuelas ve Munné-Bosch, 2005; Horvath ve diğ., 2006; Maeda ve DellaPenna, 2007). Bunlardan E vitamini olarak da bilinen α -tokoferol en yüksek antioksidan aktiviteye sahiptir. Membran lipit peroksidasyonunun inhibisyonu ve bazı reaktif oksijen türlerinin temizlenmesi ile ilişkilidir (Munné-Bosch ve Alegre, 2002b). Bitki dokusundaki tokoferol konsantrasyonu çok düşük (1 $\mu\text{g/g}$ kuru ağırlık) ile çok yüksek seviyelere (1 mg/g kuru ağırlık) kadar değişebilir (Munné-Bosch ve Alegre, 2002a). Tokoferol konsantrasyonunun, bitki türleri ve dokular arasında farklılık gösterdiği bilinmektedir (Grusak ve DellaPenna, 1999). Aynı zamanda fotosentetik organizmaların, kuraklık, ağır metaller, tuzluluk veya yüksek ışık gibi olumsuz çevresel koşullara maruz kaldığında tokoferol konsantrasyonunu değiştirdiği gözlemlenmiştir (Collakova ve DellaPenna, 2003; Ledford ve diğ., 2004). Aynı zamanda α -tokoferolün oksidatif stres koşulları altında süperoksit radikallerini temizlemedeki rolü bildirilmiştir (Cheeseman ve diğ., 1997).

2.4.1.3. Karotenoidler

Bitkilerdeki karotenoidler kloroplastlarda ve kromoplastlarda yüksek miktarlarda bulunmaktadır ve bitki karotenoidleri izoprenoid türevli bileşikler grubu içindedir (Fraser ve diğ., 2007). Kloroplastlarda bulunan karotenoidler fotosentetik membranlarla birleşiktir ve pigment-protein kompleksleri oluşturmak için klorofili bağlayan proteinlerle ilişkilidir (Lopez

ve diğ., 2008). Karotenoidler ve apo karotenoid türevleri, amiloplastlarda, elaioplastlarda, lökoplastlarda ve etiyooplastlarda da birikebilmektedir (Di Mascio, Murphy ve Sies, 1991; Howitt ve Pogson, 2006; Horner ve diğ., 2007). Karotenoidlerin, bitki metabolizmasında önemli işlev gördüğü bilinmektedir. Fotosentez için gereklidir ve çiçek, meyve ve tohumların pigmentasyonunu (kırmızı, turuncu ve sarı) sağlar. Ayrıca karotenoidlerin bitkilerde, yüksek sıcaklık altında biriktiği tespit edilmiştir ve stres faktörüne karşı belirteç olduğu ileri sürülmektedir (Smolikova, Laman ve Boriskevich, 2011).

2.4.1.4. *Glutasyon (GSH)*

Glutasyon (GSH), tüm aerobik organizmalardaki en önemli metabolitlerden biri olan düşük moleküler ağırlıklı bir tripeptittir (Gill ve Tuteja, 2010; Dubreuil-Maurizi ve Poinssot, 2012; Ramírez, Bartoli ve Lamattina, 2013). GSH hücre içerisinde sitozol, endoplazmik retikulum, vakuoller, mitokondri, kloroplastlar ve peroksizomlarda bulunur. GSH, ROS'u detoksifiye eden ve bitkileri oksidatif hasardan koruyan önemli antioksidanlardan biridir (Shan ve diğ., 2011). *B. gymnorrhiza* bitkisinin yapraklarıyla yapılmış bir çalışmada Cd^{2+} , Pb^{2+} ve Hg^{2+} gibi kombine ağır metal stresine yanıt olarak GSH miktarında önemli bir artış olduğu bildirilmiştir (Huang ve diğ., 2010). Başka bir çalışmada *B. parvitor* bitkisinde tuz stresi altında GSH seviyelerinde azalma olduğu ve GSH'ın oksidatif yolda antioksidan rolü ortaya koyulmuştur (Parida, Das ve Mohanty, 2004). Bitkilerde indirgenmiş (GSH) ve okside disülfür (GSSG) olarak iki formu bulunur. Normal koşullarda, yapraklarda GSH/GSSG oranı yaklaşık olarak 20:1 kadardır. ROS kaynaklı oksidatif stresi önlemek için bu formların (GSH/GSSG oranı) yüksek miktarda bulunması önemlidir (Noctor ve Foyer, 1998b; Mhamdi ve diğ., 2010).

2.4.1.5. *Fenolik bileşikler*

Fenolik bileşikler bitkilerde fenilpropanoid metabolizasyonu, şikimik asit ve pentoz-fosfat yolunda üretilen sekonder metabolitlerdir. Pentoz-fosfat yolu, organizma için gerekli olan NADPH veya pentozların üretimini sağlayan metabolik yoldur. Şikimik asit metabolik yolu ise, bitkilerde birçok fenolik bileşiğin biyosentezini sağlar. Fenolik bileşikler bir veya daha fazla benzen halkaları içerirler ve basit fenolik moleküllerden yüksek oranda polimerleşmiş bileşiklere kadar değişkenlik gösterirler. Doğal antioksidanlar olarak fenolik bileşikler, özellikle domates ve üzüm meyvelerinde ve sebzelerde bol miktarda bulunur (Heim, Tagliaferro ve Bobilya, 2002). Fenolik bileşiklerin bitkilerde ve tarımsal yan ürünlerde

antioksidan aktivitesi açıklanmıştır. Buna göre fenolik bileşikleri içeren meyve ve sebzelerin bol tüketimi insanlarda oksidatif hasara karşı bir koruma sağlayabilir. Bununla birlikte, farklı fenolik bileşik grupları farklı biyolojik özelliklere sahiptir (Balasundram, Sundram ve Samman, 2006). Birçok çalışma fenolik bileşiklerin, anti-aging, antiinflamatuvar, antioksidan ve antiproliferatif özelliklerini bildirmiştir (Shukitt-Hale, Lau ve Josep, 2008; Yang ve diğ., 2014; Moo-Huchin ve diğ., 2015).

2.4.2. Bitkilerde Enzimatik Antioksidanlar

Antioksidan savunma sisteminin enzimatik bileşenleri, Süperoksit Dismutaz (SOD), Çinko-Bakır Süperoksit Dismutaz (Cu/Zn-SOD), Manganez Süperoksit Dismutaz (Mn-SOD), Demir Süperoksit Dismutaz (Fe-SOD), Askorbat Peroksidaz (APX), Glutasyon Redüktaz (GR), Katalaz (CAT), Glutasyon S-Transferaz (GST), Fosfolipit Hidroperoksit Glutasyon Peroksidaz (PhGPX), ve Glutasyon peroksidaz (GPX) enzimleridir. Bu enzimler farklı hücre bölümlerinde çalışırlar ve hücreler oksidatif strese maruz kaldığında strese cevap oluştururlar (Noctor ve Foyer, 1998a). Tablo 2.3'te bitkilerde ROS atılımında önemli rol oynayan antioksidan enzimler ve çalışmalar verilmiştir.

Tablo 2.3: Bitkilerde çeşitli stres kaynaklı üretilen ROS atılımında önemli rol oynayan çeşitli antioksidan enzimler (Sharma ve diğ., 2012).

Stres	Antioksidan Enzimler	Bitki Türü	Referans
Kuraklık	SOD, GPX, APX, GR SOD, CAT, GPX SOD, APX, GR	<i>Oryza sativa</i> <i>Beta vulgaris</i> <i>Triticum sativum</i>	(Sharma ve Dubey, 2005) (Sayfzadeh ve diğ., 2011) (Sgherri, Stevanovic ve Navari-Izzo, 2004)
Tuzluluk	SOD, CAT, GPX, APX, GR CAT, SOD, GR	<i>Oryza sativa</i> <i>Olea europaea</i>	(Mishra, Bhoomika ve Dubey, 2013) (Valderrama ve diğ., 2006)
Soğuk	APX, GR, SOD	<i>Zea mays</i>	(Fryer ve diğ., 1998)
Nikel	SOD, GPX, APX	<i>Oryza sativa</i>	(Maheshwari ve Dubey, 2009)
Arsenik	SOD, GPX, APX	<i>Oryza sativa</i>	(Mishra, Jha ve Dubey, 2011)
Manganez	SOD, GPX, APX, GR	<i>Oryza sativa</i>	(Srivastava ve Dubey, 2011)
UV-B	SOD, APX, CAT, GPX GPX ve APX	<i>Picea asperata</i> <i>Arabidopsis thaliana</i>	(Han, Liu ve Yang, 2009) (Rao, Paliyath ve Ormrod, 1996)

2.4.2.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) (EC 1.15.1.1)

Süperoksit dismutaz (SOD), süperoksit radikalini (O_2^-) hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) katalizleyen enzimatik bir antioksidandır. Aerobik organizmalar için önemli bir enzimdir ancak bazı anaerobik organizmalarda da bulunduğu tespit edilmiştir (Fridovich, 1995). SOD'un üç farklı izoenzimi bulunur ve bu formlar enzim içeriğinde bulunan prostetik metale göre tanımlanmıştır. Bunlardan bakır (Cu) ve çinko (Zn) içeren süperoksit dismutaz (Cu/Zn-SOD) sitozolde, manganez (Mn) içeren süperoksit dismutaz (Mn-SOD) mitokondride ve Mn-SOD'a yapısal olarak benzeyen demir süperoksit dismutaz (Fe-SOD) ise kloroplast stromasında bulunur (Bannister, Bannister ve Rotilio, 1987). Bitkilerde üç farklı SOD izoenzimi de bulunmaktadır (Dreyer ve Schippers, 2019).

Süperoksit dismutaz, bitkilerde oksidatif yanıt olarak ortaya çıkan önemli bir enzimatik antioksidandır. Her üç enzimini de kodlayan SOD genlerinin, artan ROS oluşumunun bir sonucu olarak çevresel streslere duyarlı olduğu bilinmektedir. *Suaeda salsa* bitkisinde tuzluluk stresi altında Mn-SOD ve Fe-SOD aktivitesinde artış gözlenmiştir (Qiu-Fang ve diğ., 2005). Benzer şekilde *A. marina*'da tuzluluk stresi altında *Sod1* mRNA seviyelerinin değiştiği raporlanmıştır (Patel, Gupta ve Pandey, 2010). Farklı stres koşullarında (kuraklık, tuzluluk ve yüksek/düşük sıcaklık) farklı bitki türlerinde SOD aktivitesi üzerine yapılan çalışmalar, oksidatif stres hasarında farklı mekanizmaların rol oynayabileceğini göstermektedir (Yu ve Rengel, 1999). Örneğin *Triticum aestivum*'da su stresi SOD aktivitesini etkilememiştir ancak kuraklık stresi SOD aktivitesinde önemli bir artışa sebep olmuştur (Sairam, Deshmukh ve Saxena, 1998).

2.4.2.2. Çinko-Bakır Süperoksit Dismutaz (Cu/Zn-SOD) (EC 1.15.1.1)

Tüm organizmalar, mikro besinleri almak ve kendilerini toksisiteden korumak için çeşitli mekanizmalar geliştirmiştir. Bakır (Cu) gibi geçiş metal iyonları elektron transferi, dioksijen bağlanması ve kataliz gibi çeşitli fonksiyonları olan birçok protein için kofaktör olarak görev yapar (Holm, Kennepohl ve Solomon, 1996). SOD'lar hem prokaryotik hem de ökaryotik organizmalarda bulunurken Cu/Zn-SOD'lar çoğunlukla ökaryotlarda bulunur. Ökaryotlarda Cu/Zn-SOD'un üç farklı izoformu bulunmaktadır. Birinci izoform olarak bilinen Cu/Zn-SOD1, en eski formdur ve *Saccharomyces cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana* ve *Homo sapiens* türlerinde var olduğu bilinmekle beraber amino asit dizisi bakımından yüksek oranda

korunmuştur. İkinci CuZnSOD izoformu olan Cu/Zn-SOD2 sadece yüksek bitkilerde bulunur. Üçüncü Cu/Zn-SOD izoformu ise (Cu/Zn-SOD3) yalnızca çok hücreli ve karmaşık ökaryotlarda bulunur. Bitkilerde, Cu/Zn-SOD3 peroksizomlarda lokalizedir. Bununla birlikte, Cu/Zn-SOD3 'ün özellikle bitkilerdeki görevi belirsizdir (Dreyer ve Schippers, 2019). Cu/Zn-SOD'un üç formu da aynı bitkide hücrenin farklı bölgelerinde bulunabilir. Örneğin *Arabidopsis*'te Cu/Zn-SOD1 sitoplazma ve nükleusta, Cu/Zn-SOD2 kloroplastta, Cu/Zn-SOD3 ise peroksizomda lokalize olmuştur (Huang ve diğ., 2012).

Cu/Zn-SOD antioksidan enziminin bitkilerde stres koşullarında farklı aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Örneğin bezelye bitkisinde yapılan çalışmaya göre kuraklık ve metil viyolojen stresine maruz bırakılan bitkilerde Cu/Zn-SOD aktivitesinde artış gözlemlenmiştir (Iturbe-Ormaetxe ve diğ., 1998). Domates kloroplastik ve sitosolik Cu/Zn-SOD genleri patates bitkilerine aktarıldığında, patates bitkilerinde metil viyolojenlerin neden olduğu strese karşı tolerans seviyelerinde artış tespit edilmiştir (Alscher, Erturk ve Heath, 2002).

2.4.2.3. Manganez Süperoksit Dismutaz (Mn-SOD) (EC 1.15.1.1)

Mn-SOD izoformu tüm ökaryotlarda bulunur ve mitokondri içinde lokalize oldukları için enerji metabolizması ile bağlantılı olabilir (Alscher, Erturk ve Heath, 2002). Bitkilerde Mn-SOD, homotetramer yapıda bulunan ve her bir tetrameri Mn atomu içeren, yüksek oranda korunmuş bir enzimdir (Sevilla, López-Gorgé ve del Río, 1982; Gutteridge, J. M., Halliwell, B, 2000). Mn-SOD'un katalitik yan ürünü olarak üretilen H₂O₂, askorbat peroksidaz ve glutatyon ile H₂O'ya indirgenir (Navrot ve diğ., 2006). Mitokondride O₂, H₂O'ya indirgenirken toplam oksijen tüketiminin yaklaşık %1-2'si H₂O₂ ve O₂⁻ radikalleri oluşumuna sebep olur. Artan ROS konsantrasyonu mitokondriye zarar verir. Bununla beraber Mn-SOD ve GPX ile mitokondride oluşan O₂⁻ radikali yok edilir (Radi ve diğ., 1991).

Bitkilerde tuzluluk ve kuraklık streslerine yanıt olarak *Mn-SOD* gen anlatımının aşırı arttığı gösterilmiştir (Yau ve diğ., 1999). Metil viyolojene maruz bırakılan *Arabidopsis*'te ise mitokondriyal Mn-SOD enzim aktivitesinde artış gözlemlenmiştir (Alscher, Erturk ve Heath, 2002). Mn-SOD'un aynı zamanda bitki ve embriyo kesesi gelişimi sırasında ROS dengesinin korunmasında önemli rol oynadığı bildirilmiştir (Morgan ve diğ., 2008; Victoria Martin ve diğ., 2013).

2.4.2.4. Demir Süperoksit Dismutaz (Fe-SOD) (EC 1.15.1.1)

Fe-SOD, iki aynı 20 kDa alt ünite proteininden oluşan ve aktif merkezinde demir içeren bir homodimerdir ve *Escherichia coli*'den izole edilmiştir (Gregory, Yost ve Fridovich, 1973). Fe-SOD hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda bulunur. Ökaryotlarda ilk olarak *Euglena gracilis*'ten ve daha yüksek bitkilerden izole edilmiştir (Kanematsu ve Asada, 1979). Aynı zamanda domates ve fasülye gibi ticari bitkilerde bulunduğu bilinmektedir (Kwiatowski, Safianowska ve Kaniuga, 1985). Bitkilerde hücre içerisinde kloroplastlarda bulunduğu sonucuna varılmıştır (Salin ve Bridges, 1980). Hayvanlarda ise Fe-SOD'un bulunmaması, Fe-SOD geninin plastidlerden köken aldığı ve evrimsel süreçte nükleer genomlara taşındığı fikrini ortaya koymuştur. Bununla birlikte, Fe-SOD sadece kloroplastlarda bulunduğu için doğrudan fotosentez ile ilişkilendirilmiştir (Alscher, Erturk ve Heath, 2002). Kavak bitkisinde düşük karbondioksit stresi koşullarında Fe-SOD'un aşırı eksprese edildiği ve fotosistem II (PSII) üzerinde koruyucu bir etki gösterdiği bildirilmiştir (Arisi ve diğ., 1998). Başka bir çalışmada ise Fe-SOD transgenik *Medicago sativa* L. bitkilerinin yüksek fotosentetik aktivitesi ve su stresine dirençli olduğu gözlemlenmiştir (Rubio ve diğ., 2002).

2.4.2.5. Askorbat Peroksidaz (APX) (EC 1.11.1.11)

APX'in bitkilerde amino asit dizileri bakımından farklı olan beş izoenzimi farklı hücre kısımlarında bulunur. Bunlar sitozolik, stromal, tilakoidal, mitokondrial ve peroksizomal izoformlardır (Jiménez ve diğ., 1997; Madhusudhan ve diğ., 2003; Sharma ve Dubey, 2004). Organellerde bulunan APX, organellerde üretilen H₂O₂'yi, sitoplazmada bulunan APX ise sitoplazma, apoplast ve organellerden üretilen H₂O₂'yi temizler (Mittler ve Zilinskas, 1992). APX, bitki hücrelerinde en yaygın ve farklı hücre kısımlarına dağılmış antioksidan enzimlerden biri olarak kabul edilir. APX'in izoformları, H₂O₂ için CAT'a göre çok daha yüksek afiniteye sahiptir. Bundan dolayı APX, bitkilerde stres koşullarında H₂O₂'nin detoksifikasyonunu sağlayan en önemli antioksidan enzimlerden biridir (Wang, Zhang ve Allen, 1999).

Birçok çalışmada, kuraklık, tuzluluk, üreme, metal toksisitesi ve UV gibi abiyotik streslere yanıt olarak APX'in aktivitesinin arttığı gözlemlenmiştir (Boo ve Jung, 1999; Sharma ve Dubey, 2005, 2007; Han, Liu ve Yang, 2009). Benzer şekilde, tütün ve *Arabidopsis*'te *tApX* geninin aşırı anlatımı oksidatif strese toleransı arttırmıştır (Yabuta ve diğ., 2002).

2.4.2.6. *Glutasyon Redüktaz (GR) (EC 1.6.4.2)*

Glutasyon Redüktaz (GR) flavoenzimler grubuna ait bir enzimdir ve yapısında bir disülfid grubu içerir (Ghisla ve Massey, 1989). Kloroplast, sitoplazma, mitokondri ve peroksizomlarda bulunan formları olmasına rağmen, hücrede GR aktivitesinin yaklaşık %80'i kloroplastlarda bulunan izoformuna aittir. (Edwards, Rawsthorne ve Mullineaux, 1990). NADPH'ye bağlı bir enzim olan GR, oksidasyon redüksiyon döngülerine katılarak GSSG'nin GSH'ye indirgenmesini katalize eder ve hücrel GSH/GSSG oranının korunmasını sağlar. Aynı zamanda kloroplastlarda bulunan GSH ve GR'nin Mehler reaksiyonu ile üretilen H₂O₂ detoksifikasyonunda rol oynadığı bilinmektedir. Bazı çalışmalarda bitkilerde farklı çevresel streslere yanıt olarak GR aktivitesinin arttığı bildirilmiştir (Hernández ve diğ., 2001; Sharma ve Dubey, 2005; Maheshwari ve Dubey, 2009).

2.4.2.7. *Katalaz (CAT) (EC 1.11.1.6)*

Katalaz (CAT), hidrojen peroksiti (H₂O₂) su (H₂O) ve oksijene (O₂) dönüştüren, yaklaşık 200-340 kDa ağırlığında bir enzimdir. Bitkilerden memelilere kadar birçok organizmada bu enzimin varlığını açıklamıştır (Loew, 1900). CAT, dört protein alt birimden oluşan homotetramer yapıya sahip bir enzimdir. Bu alt birimlerden her biri bir NADPH molekülü ve hem grubu (hem b) içerir. Ayrıca bazı özel CAT tiplerinde hem d grubu bulunur (Kirkman ve Gaetani, 1984; Young ve Woodside, 2001). CAT, hücre içi organellerden genellikle peroksizomlarda yer alır, bir kısmının da endoplazmik retikulumda ve mitokondrilerde bulunduğu bilinmektedir. Oksijenli solunum yapan organizmalarda bulunur ve genellikle anaerobik bakterilerde CAT proteinleri bulunmaz.

Biyokimya alanındaki gelişmeler sayesinde, CAT enzimatik reaksiyonunun mekanizmaları hakkında birçok bilgiye ulaşılmıştır. 1950'li yıllarda yürütülen çalışmalarda, CAT ile H₂O₂'nin reaksiyonu sırasında ortaya çıkan bileşik I, II ve III'ün (Cpd I-II-III) oluşumu keşfedilmiştir. İlk reaksiyonda tek bir H₂O₂ molekülü ile CAT, Cpd I olarak bilinen oksoferril porfirin bir demir ara ürününe oksitlenir. Cpd I, oluştuktan sonra ikinci reaksiyonda başka bir H₂O₂ molekülü ile hızlı şekilde reaksiyona girer, H₂O ve O₂ oluşturur. Toplamda 2H₂O₂ molekülü, 2H₂O ve O₂'e dönüştürülür (Chance, 1948, 1950; Chance, Greenstein ve Roughton, 1952). H₂O₂ bir radikal değildir ve önemli moleküllerin çoğu ile reaksiyona girmez. Ancak Fenton reaksiyonu olarak bilinen reaksiyon sonucunda demir (Fe) ve bakır (Cu) iyonlarının katalizör

görevi görmesiyle en reaktif oksijen türü olan OH \cdot oluşumuna sebep olur (Larson, 1988). Genellikle abiyotik stres altında bitkilerde katalaz aktivitesi artar. Bununla birlikte bazı çalışmalarda bazı abiyotik stres koşulları altında kontrole kıyasla bitkilerdeki enzim aktivitesinde azalma görülmüştür. Bu nedenle, katalaz aktivitesini genel bir stres belirteci olarak kullanmak şüphelidir (Leung, 2018).

2.4.2.8. *Glutasyon S-Transferaz (GST) (EC 2.5.1.18)*

Bitki glutasyon S-transferazları iki polipeptit alt biriminden oluşan, moleküler ağırlıkları yaklaşık 50 kDa olan, çözüner proteinlerden meydana gelen ve büyük gen aileleri tarafından kodlanan çok fonksiyonlu enzimlerdir (McGonigle ve diğ., 2000; Wagner ve diğ., 2002). Bu iki alt birimin aktif merkezinin iki fonksiyonel bölgeden oluştuğu bilinmektedir. Birinci bölge, hidrofilik olan ve GSH'ye bağlanan G-bölgesi olarak adlandırılırken ikinci bölge elektrofilik substratların bağlanmasına yardımcı olan H bölgesidir (Frova, 2003). Bakteri ve mantarlar dahil olmak üzere tüm organizmalarda GST'nin varlığı tespit edilmiştir (Frova, 2006; Perperopoulou, Pouliou ve Labrou, 2018). Bitki GST'leri çoğunlukla sitoplazmada yer alır (Pascal ve Scalla, 1999).

GST'ler GSH ile birlikte hareket ederek enfekte dokularda biriken ROS ve lipid hidroperoksitleri ortadan kaldırmak için antioksidatif reaksiyonlara katılmaktadır (Wagner ve diğ., 2002). Bazı çalışmalarda GST seviyesinin patojen saldırısı gibi biyotik stresler, soğuk, kuraklık, ağır metal, tuzluluk ve H₂O₂ gibi abiyotik stres koşullarında arttığı tespit edilmiştir (Dubey ve diğ., 2010; Kim, Andaya ve Tai, 2011; Chen ve diğ., 2013; Xu ve diğ., 2015; Jia ve diğ., 2016).

GST genlerinin bitkilerde gelişimin farklı aşamalarında anlatımı bilinmektedir. GST'lerin antosiyaninler gibi bitki sekonder ürünlerinin metabolizmasında rol oynadığı ortaya konmuştur (Marrs, 1996). Bununla birlikte GST genlerinin anlatımının abiyotik ve biyotik stres koşullarında arttığı bilinmektedir (DeRidder ve diğ., 2002; Sappl ve diğ., 2009; Dixon, Sellars ve Edwards, 2011; Csiszár ve diğ., 2014). *Arabidopsis*'te *AtGSTF2* geninin aşırı anlatımının, bitkilerdeki fenol stresine karşı tolerans sağladığı görülmüştür (Xu ve diğ., 2017). Başka bir çalışmada, GST enzimlerini kodlayan genlerin anlatımının artmasıyla kloroplast antioksidan savunma sisteminin de arttığı gösterilmiştir (Le Martret ve diğ., 2011).

2.4.2.9. *Glutasyon peroksidaz (GPX) (EC 1.11.1.12)*

Glutasyon peroksidaz (GPX), dört protein alt biriminden oluşun ve alt birimleri selenyum atomu içeren, hücreleri oksidatif hasarlara karşı koruyan bir antioksidan enzimdir. Ana biyolojik rolü organizmayı oksidatif hasardan korumak olan peroksidaz aktivitesine sahip bir enzimdir. Özellikle mitokondri ve sitoplazmada bulunan H_2O_2 üzerine aktivite göstererek H_2O 'ya parçalar ve $OH\cdot$ 'nin oluşumunu engeller. Aynı zamanda GPX, GSH'den elektron alarak lipit hidroperoksitlerin yıkımını sağlar (Muller ve diğ., 2007; Sen ve Chakraborty, 2011).

Yapılan çalışmalara göre bitki GPX proteinlerinin, tuz, kuraklık, ısı, soğuk ve oksidatif stres gibi çeşitli abiyotik streslere karşı önemli roller oynadığı gösterilmiştir. Genellikle stres koşullarına yanıt olarak GPX genlerinin anlatımında veya aktivitesinde artış gözlemlenmiştir. Ancak, bazı organizmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. Örneğin, arpada (*Hordeum vulgare*) ozmotik ve metil viyolojen stresi altında iki GPX izoformunun anlatımı artarken, yine bu koşullar altında üçüncü GPX izoformunun anlatımının azaldığı belirlenmiştir (Churin, Schilling ve Börner, 1999).

2.4.2.10. *Fosfolipit Hidroperoksit Glutasyon Peroksidaz (PhGPX) (EC 1.11.1.12)*

Fosfolipit hidroperoksit glutasyon peroksidaz (PhGPX), glutasyon peroksidaz (GPX) ailesinin bir üyesi olan 23 kDa'lık bir monomerdur. Fosfolipit hidroperoksitler ve lipit katmanları içeren kompleks hidroperoksit lipitlerin biyolojik sistemlerde azaltımını sağlayan, oksidatif strese maruz kalan membranların korunmasında anahtar bir antioksidan enzimdir ve domates dahil çeşitli bitki türlerinde tanımlanmıştır (Depège, Drevet ve Boyer, 1998; Herbette ve diğ., 2002). Glutasyon ile hareket ederek lipit peroksitlerin lipit ve suya parçalanmasını sağlar. Böylece lipit peroksidasyonu ve yağ bütünlüğünün bozulması engellenir (Ursini, Maiorino ve Gregolin, 1985).

PhGPX'in farklı bitki dokularında bitki gelişiminin farklı evrelerinde aktivitesi bildirilmiştir (Mullineaux ve diğ., 1998; Yang, Dong ve Liu, 2006). Bununla birlikte, bitkilerde PhGPX'in ROS atılımını sağladığı, hücre ölümünü engellediği ve hücre döngüsü regülasyonunda görev aldığı bildirilmiştir (Chen ve diğ., 2004; Kadota ve diğ., 2005). *Arabidopsis*'te PhGPX'in H_2O_2 atılımı, sinyal iletimi ve fotooksidatif stres toleransında rol oynadığı gösterilmiştir (Miao ve diğ., 2006; Chang ve diğ., 2009). Ayrıca tuz, ağır metal ve oksidatif stres koşullarında PhGPX

mRNA seviyelerinin bitki dokularında arttığı gösterilmiştir (Sugimoto ve Sakamoto, 1997; Li ve diğ., 2000; Avsian-Kretchmer ve diğ., 2004).

2.5. UBİKİTİN PROTEOZOM SİSTEMİ (UPS)

Bitkiler, olumsuz koşulların neden olduğu zararlı etkileri azaltmak için dış uyaranları algılayabilmeli, yorumlayabilmeli ve yanıtlayabilmelidir. Stres yanıtı oluşturabilmek için gen anlatımındaki değişiklikler ile birlikte sinyal iletim yolları işlev görür. Bitkiler stres algısını, sinyalini ve tepkilerini düzenlemek için çeşitli transkripsiyonel ve posttranslasyonel mekanizmalar kullanır. Bitkiler, olumsuz büyüme koşullarına yanıt vermek, tolere etmek ve gerekli hücrel değişiklikleri kolaylaştırmak için ubiquitin proteozom sisteminden (UPS) yararlanır. UPS, ökaryotik hücrelerde birçok enzimin, yapısal ve düzenleyici proteinlerin parçalanmasından sorumlu ana proteolitik mekanizmadır. Hücrelerde sürekli olarak proteinler sentezlenmekte ve yıkılmaktadır. Ökaryotlarda yeni sentezlenmiş proteinler ilk olarak endoplazmik retikulum (ER) organelinde denetlenir. Proteinlerin katlanması ve modifikasyonu burada yapıldıktan sonra katlanmamış veya hatalı katlanmış proteinler ER'den hücre sitoplazmasına transfer edilir ve ubiquitin proteozom sisteminde parçalanır (Vembar ve Brodsky, 2008). UPS, hücre bölünmesi, bitki gelişimi, bitki hormonları ve abiyotik-biyotik uyaranlara yanıt oluşturma süreçlerinde sinyalleşmeyi sağlarken organel oluşumu, transkripsiyon, protein sentezi ve programlanmış hücre ölümü (PHÖ) gibi biyolojik mekanizmalarda rol oynayan proteinleri parçalayarak veya işleyerek hücrel dengenin korunmasını sağlar (Hilt ve Wolf, 1996; Samach ve diğ., 1999; Capron, Ökrész ve Genschik, 2003; Sullivan, Shirasu ve Deng, 2003; Yang ve diğ., 2004).

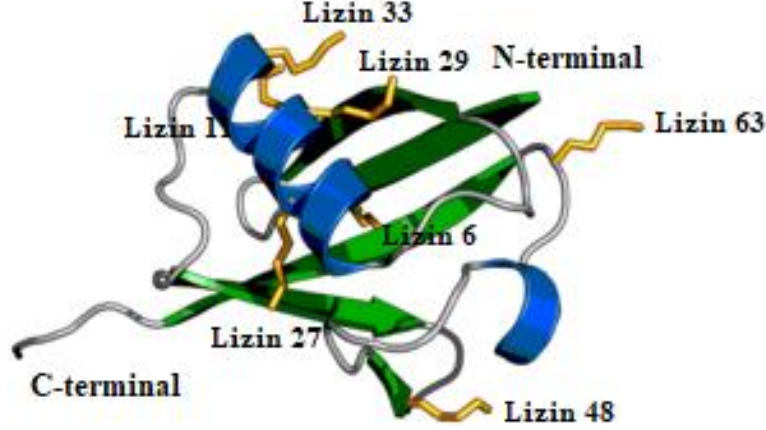
1980'li yılların başında ubiquitine bağımlı proteoliz memeli hücrelerinde keşfedilmiş ve protein yıkımının enerjiye bağımlı olduğu bulunmuştur (Etlinger ve Goldberg, 1977; Hershko, Ciechanover ve Rose, 1979). Sonraki çalışmalarda ubiquitin olarak tanımlanan küçük, ısıya dayanıklı olan bu proteinin, proteoliz için hedef substratlara bağlandığı gözlemlenmiştir (Ciechanover ve diğ., 1980; Hershko ve diğ., 1980). Daha sonra ubiquitin substrat proteinlerine konjuge edilmesinde rol oynayan E1 (ubikitin aktive edici enzim; UBA), E2 (ubikitin-konjuge edici enzim; UBC), ve E3 (ubikitin ligaz; UBL) enzimleri izole edilmiştir. UPS'nin çeşitli hücrel işlemlerde temel rolü ilk olarak memeli hücreleri ve mayada gösterilmiştir (Ciechanover, Finley ve Varshavsky, 1985). 2004 yılında Avram Hershko, Aaron Ciechanover

ve Irwin Rose'a UPS'nin keşfiyle ilgili Nobel Kimya Ödülü verilmiştir (Wilkinson, Urban ve Haas, 1980; Nandi ve diğ., 2006).

Hedef proteinlerin UPS aracılı yıkılması temel olarak iki adımda gerçekleşir. İlk olarak hedeflenen hasarlı, yanlış katlanmış protein ubiquitin proteini tarafından tanınır ve konjugasyon gerçekleşir. Ardından ubiquitin proteinleri lizin kalıntılarına art arda eklenerek poli-Ub zincirleri oluşturur. Bu olaya ubiquitinasyon denir ve hedef proteinin etiketlenmesi sağlanmış olur. İkinci adımda Poli-Ub zincirleri 26S proteozom kompleksine yönlendirilir ve burada peptidlerine kadar parçalanırlar.

2.5.1. Ubikitin Proteini (Ub)

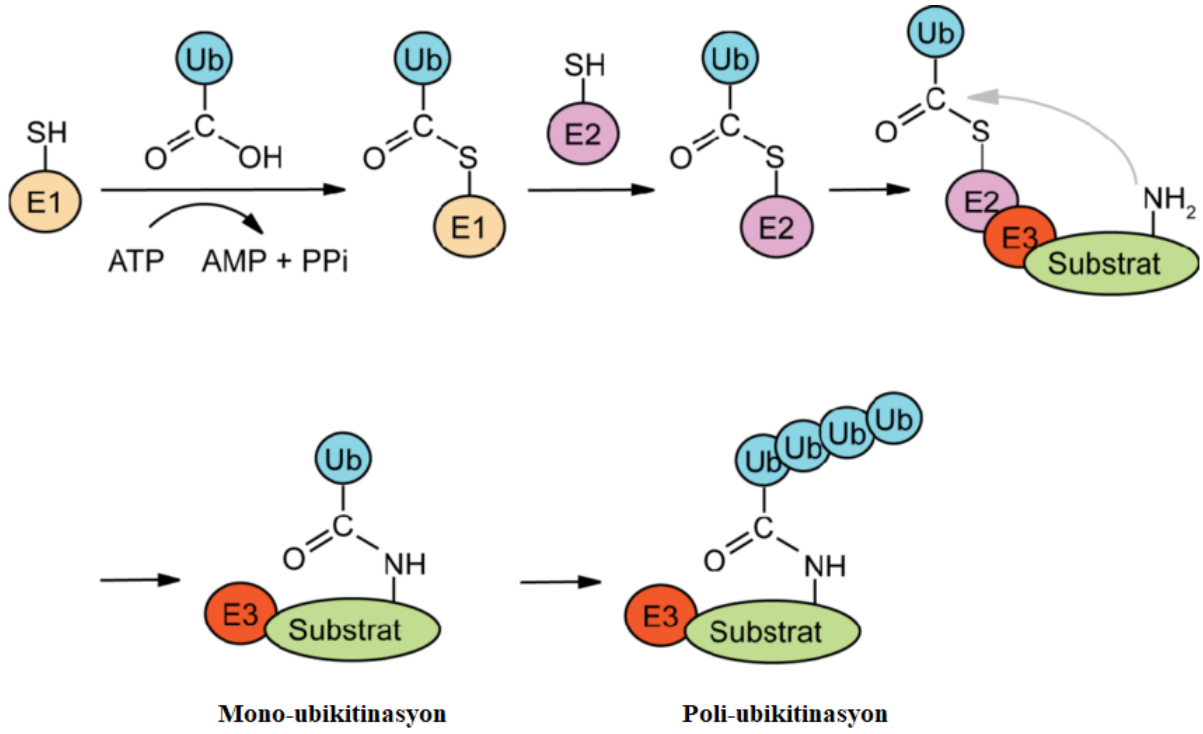
Ubikitin, tüm ökaryotik organizmalarda ve dokularda bulunan, yüksek oranda korunmuş ve hücrenin her bölgesinde eksprese edilen küçük, globüler bir proteindir (Goldstein ve diğ., 1975). Bitki türleri arasında ubiquitin, amino asit dizisi bakımından aynıdır ve maya ile insan ubiquitini arasında sadece iki veya üç amino asit fark olduğu bilinmektedir (Callis, Raasch ve Vierstra, 1990). Hedef proteinin düzenlenmesinin yanı sıra proteinlere konjuge olması ve kolayca poliubikitin zincirleri üretmesinden dolayı fonksiyoneldir (Hershko ve Ciechanover, 1998). Ubikitin, 'Ub katlanma' karakteristik yapısını oluşturabilmek için bir α -heliks ile beş zincirli karışık bir β -tabakayla kompakt yapıya sahiptir (Vierstra, 1996). Yapısında çok sayıda hidrojen bağı içerir. Bu da konjugasyon ve degradasyon işlemleri sırasında yüksek stabilite sağlar. Ub'nin esnek karboksil ucu (C-terminal), Ub katlanmasının dışında yer alır ve bir glisin aminoasiti ile sonlanır. Bu glisinli karboksil grubunun Ub'nin substratlara kovalent bağlanması için bir başlangıç yeri olarak işlev gördüğü bilinmektedir. Ub gen ailesi üyeleri (UBQ'lar) Ub polimerleri sentezler (Callis ve diğ., 1995). Şekil 2.4'te gösterildiği gibi ubiquitin, Lys6, Lys11, Lys27, Lys29, Lys33, Lys48 ve Lys63 olarak bilinen yedi lizin (Lys) kalıntısı içerir (Lippai ve Low, 2014). Proteozom tarafından yıkılacak olan substratları hedeflemek için Lys48 ile ubiquitin zincirleri (poli-Ub) yapılırlar. Hücrede yedi Ub lizini arasında Lys48 ile bağlanan poli-Ub zincirleri daha fazla bulunur ve proteozom hedefleme/tanıma sinyali oluşmasını sağlar (Pickart ve Fushman, 2004). Proteozom iletim sinyalinin sağlanabilmesi için ise en az dört ubiquitin parçasının (tetra-ubikitin) poli-Ub zincirleri gereklidir (Thrower, 2000).



Şekil 2.4: Ubikitin proteini ve poliubikitinasyon reaksiyonlarında rol oynayan lizin kalıntılarının modeli (Lippai ve Low, 2014).

2.5.2. Ubikitinasyon (Ubikitin Konjugasyonu)

Ubikitinasyon veya ubikitin konjugasyonu ATP'ye bağımlı üç ubikitin enziminin (E1-E2-E3) ardışık hareket ettiği, enzim konjugasyon kaskadıyla devam eden çok aşamalı bir süreçtir. Ubikitinasyon ilk olarak Ub'nin E1 (Ub aktive edici enzim) ile aktivasyonu ile başlar. E1, ATP ile Ub'nin C-terminal glisin karboksil grubu arasında bir açıl fosfoanhidrit bağının oluşumunu katalizler. Aktive edilmiş Ub daha sonra tiyolester bağlantısı ile doğrudan bir E1 sisteinine bağlanarak kararlı bir ara madde oluşturur. Bu aktifleştirilmiş Ub, transesterifikasyon yoluyla E1'den E2'ye (Ub-konjüge edici enzim) aktarılır. Daha sonra E2-Ub ara maddesi Ub'yi bir E3 (Ub ligazı) kullanarak substrat alıcı lizin kalıntısına iletir. E3 enzimleri, substratların tanınmasını sağlar veya Ub'nin substratlara E2'den doğrudan aktarımını gerçekleştirir ya da aktarımdan önce E3-Ub ara maddesi oluşturur. Son ürün olarak substrattaki Ub C-terminal glisin ve lizil e-amino grubu arasında bir izopeptid bağı içeren bir Ub-protein konjugatı oluşur (monoubikitinasyon). Bu olay ubikitinasyon olarak adlandırılır ve ana özelliği ubikuitinin, proteinlerin lizin kalıntıları ile birleşerek etiketlenmesidir. Daha sonra diğer bir ubikitin molekülü aynı süreçten geçerek ilk bağlanmış olan ubikitin 48. pozisyonundaki lizin amino asidine eklenir. Poliubikitinasyon olarak bilinen bu süreç tekrar ederek poliubikitin zinciri oluşturulur (Şekil 2.5). Poliubikitine proteinler daha sonra ökaryotik hücrelerdeki ana proteoliz mekanizması olan 26S proteozomu tarafından hızla yıkılır (Chau ve diğ., 1989).



Şekil 2.5: E1 (Ub aktive edici enzim), E2 (Ub konjuge edici enzim) ve E3 (Ub ligazı) enzimini içeren ubiquitasyon mekanizması (Jiang ve diğ., 2012).

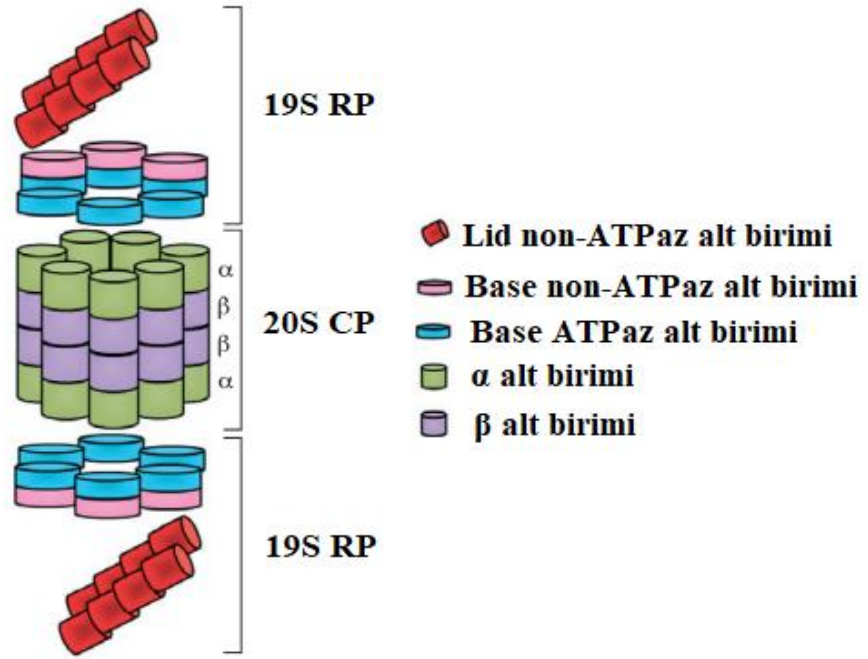
2.5.3. 26S Proteozom Kompleksi

26S proteozom, ubiquitin ile işaretlenmiş substratları parçalayan, ATP'ye bağımlı proteoliz kompleksidir. Proteozom kompleksin ilk modellemesi maya ve memelilerde yapılırken, pirinç ve *Arabidopsis* bitkileri üzerine yapılan sonraki çalışmalarda da benzer kompleks yapısı bildirilmiştir (Fu ve diğ., 1998). 26S proteozomu, 20S çekirdek proteaz (CP) ve 19S düzenleyici partikül (RP) olmak üzere iki alt komplekse ayrılmıştır ve 31 alt birim içerir. Şekil 2.6'da çekirdek proteazının ve düzenleyici partikülün altbirimleri gösterilmiştir.

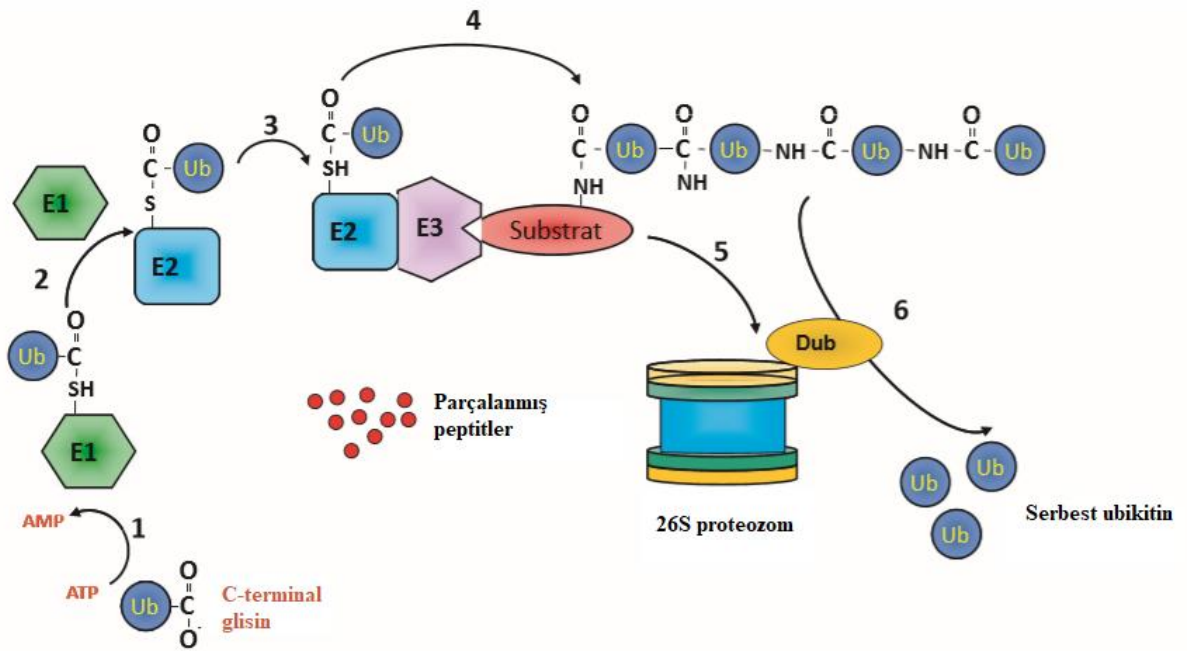
Çekirdek proteaz (CP), dört heptamerik halkanın birleşmesiyle silindirik bir yapıya sahip olan, ATP'ye ve Ub'ye bağımlı olmayan bir proteaz olarak işlev görür. Periferik halkalar yedi α -alt birimlerinden oluşurken merkezi halkalar $\alpha_{1-7} \beta_{1-7} \beta_{1-7} \alpha_{1-7}$ konfigürasyonuna sahip yedi β -alt birimlerinden meydana gelir (Şekil 2.6). Buradaki iki β halkanın her biri $\beta 1$ (kaspaz benzeri), $\beta 2$ (tripsin benzeri) ve $\beta 5$ (kimotripsin benzeri) olmak üzere üç proteolitik bölgeden oluşur. (Heinemeyer ve diğ., 1997; Jäger ve diğ., 1999). Mayada CP ile ilgili yapılan ilk çalışmalar $\beta 1$, $\beta 2$ ve $\beta 5$ alt birimlerinin katkıda bulunduğu proteaz aktif bölgeleri olan geniş bir merkezi

halkanın varlığını göstermiştir. Bu üç proteaz peptit bağının kırılmasını sağlar (Wolf ve Hilt, 2004).

CP bölmesinin girişini, yedi α -alt birimi tarafından sarılan bir halka oluşturmuştur. Giriş bölgesi dar bir yapıya sahip olduğundan proteinlerin katlanmasını gerektirir ve her bir α -alt birimdeki esnek uzantılar substrat girişini kontrol eder. Düzenleyici partikül (RP), Lid ve Base olarak bilinen iki alt kompleksi oluşturan 17 alt birimden meydana gelir. Base, doğrudan CP α -ring kanalı üzerinde oturur ve altı AAA-ATPaz (RPT1–6) ve üç non-ATPaz alt biriminden (RPN1, 2 ve 10) oluşan halkaya sahiptir (Hartmann-Petersen, Seeger ve Gordon, 2003). RP iki alt kompleksi ile birlikte Lys48 işaretli poli-Ub zincirlerinin tanınmasını, kovalent bağlı Ub bölgelerinin çıkarılmasını, hedeflenen substratların katlanmasını, kanalın çevrelenmesini ve proteozoma substrat transferini sağlar. RPN11 alt birimi, substratların parçalanması sırasında Ub zincirlerini parçalayan veya geri dönüştüren poli-Ub hidroliz (deubikitinasyon) aktivitesine sahiptir ve Ub uçlarının serbest bırakılmasını sağlar (Verma ve diğ., 2002). Diğer RP alt birimleri ise poli-Ub proteinleri ve spesifik E3 ligaz kompleksleri için reseptör olarak işlev görür (Hartmann-Petersen ve Gordon, 2004).



Şekil 2.6: 26S proteozomunun yapısı ve organizasyonu. 20S CP çekirdek proteazımı, 19S RP düzenleyici partikülü ifade etmektedir (Vierstra, 2009).



Şekil 2.7: Ubikitin proteozom sistemi (UPS).

(1) Ubikitin, E1 enzimi ile ATP'ye bağımlı olarak aktive olur. Aktive edilmiş Ub, terminal glisindeki bir karboksil grubundan tiyolester bağlantısı yoluyla E1'deki korunmuş bir sisteine bağlanır. (2) Ub, E1'den ayrılarak ubikitin konjugasyon enzimine (E2) aktarılır. (3) E2 enzimi, aktive edilmiş ubikitini hedef proteinde bir lizin kalıntısına transferi kolaylaştıran ubikitin ligazına (E3) taşır. (4) Poli-Ub zincirinin oluşturulması için diğer ubikitinler art arda bağlanır. (5) Lys 48 kalıntıları ile bağlantılı poli-Ub zincirlerinin hedef proteini 26S proteozoma aktarılır. (6) Poli-Ub zincirleri ise 19S RP'deki proteozom ile ilişkili deubikitinasyon aktivitesi (DUB) ile ayrıştırılır ve Ub parçaları serbest bırakılır.

Ub'nin substratlara bağlanması tersine çevrilebilir bir olaydır ve Ub ile tüm peptit bağları deubikitin edici enzimler (DUB) ile etkili bir şekilde ayrılır. DUB enzimleri, Ub-proteozom yolağında birkaç önemli işlevi yerine getirir. DUB'lar proteolize uğramış ürünlerden öncü ubikitini geri kazanmak ve proteozom düzenleyici partiküle (RP) bağlı olarak poli-Ub zincirlerini geri dönüştürmek için işlev görür. İki durumda da DUB enzimleri ubikitin öncülerini peptit bağının kırılması yoluyla dönüştürmüş olur. Maya, hayvan ve bitki proteozomunda, poli-Ub'nin parçalanmasına ve geri dönüştürülmesine aracılık eden DUB aktivitesi bildirilmiştir (Amerik ve Hochstrasser, 2004). Ub metabolizmasındaki rolünün yanında DUB'lar aynı zamanda protein yıkımını negatif olarak düzenlerler. Hedeflenen proteinlerin geri kazanılmasına sebep olarak proteozom sistemi için uygun olmayan şekilde işlev görebilir ve protein yıkımına engel olabilir (Lam ve diğ., 1997).

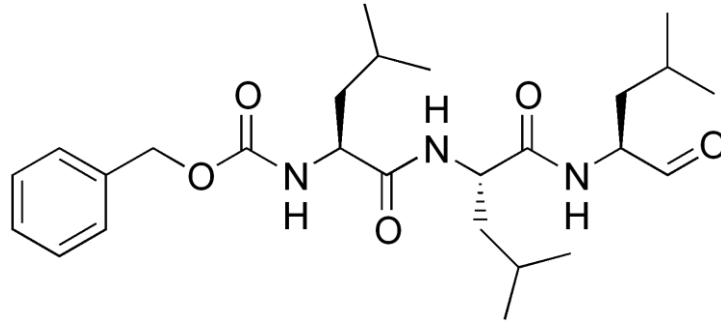
2.6. PROTEOZOM İNHİBİSYONU

Proteozom inhibisyonunun ilk etkisi proteoliz aktivitesinin ve dolayısıyla protein yıkımının azalmasıdır (Rock ve diğ., 1994). Bununla birlikte proteozom sistemi inaktive olarak hücre içinde yanlış katlanmış ve/veya katlanmamış proteinlerin birikmesine neden olur (Obeng ve diğ., 2006). Proteozom fonksiyonun bozulmasının bitki hücrelerinde programlanmış hücre ölümüne yol açtığı gösterilmiştir. Ayrıca etkilenen hücrelerde DNA kırıkları ve 10 kat daha yüksek reaktif oksijen türü üretimi olduğu görülmüştür. Buna göre proteozomlar bitkilerde programlanmış hücre ölümünün ve reaktif oksijen türü üretiminin doğrudan düzenleyici mekanizması olarak işlev görmektedir (Kim ve diğ., 2003). Ayrıca, proteozom sisteminin oksitlenmiş proteinlerin ayrıştırılmasından sorumlu olduğu ve proteozom inhibisyonunun oksidatif protein hasarının genel bir belirteci olan hücre protein karbonil seviyelerini arttırdığına dair bilgiler edinilmiştir (Grune ve diğ., 1998; Stadtman ve Berlett, 1998). Buna karşılık antioksidanlar, proteozom inhibisyonu tarafından oluşturulan programlanmış hücre ölümünü (PHÖ) bloke edebilir (Llobet ve diğ., 2008).

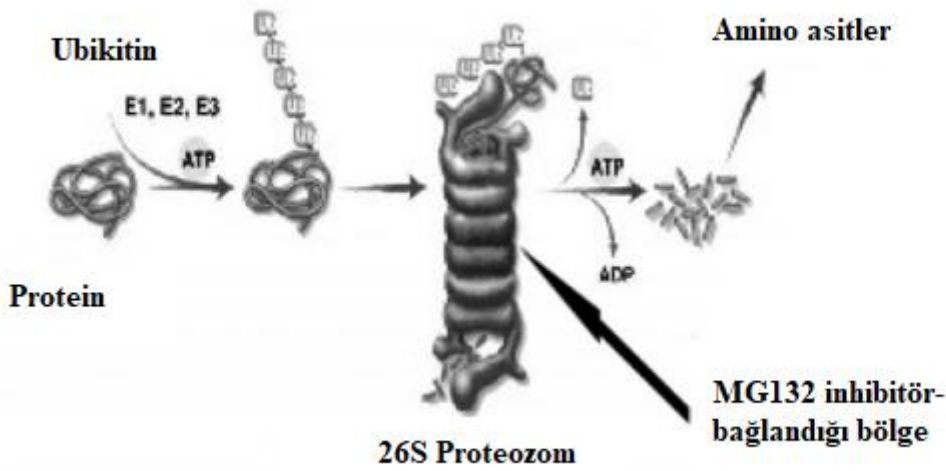
2.6.1. MG132 Proteozom İnhibitörü

Proteozom, hücrel mekanizmaların ayrılmaz bir parçasıdır. Proteozom inhibitörleri, kanser gibi hastalıklara karşı terapötik ilaç uygulamaları ve laboratuvar deneylerinde proteozom aktivitesini inhibe etmek için kullanılır (Kisselev ve Goldberg, 2001). Proteozom inhibitörleri, ubikitin proteozom sisteminin substratlarının keşfinde ve farklı biyolojik süreçlerde rolünü belirlemede temel araçlar olmuştur. Hücreler, proteozom inhibitörlerine kısa süre maruz kalınca zarar görmezken, uzun süre maruz kalınca hemen hemen toksisite meydana gelir ve hücre programlanmış hücre ölümüne (PHÖ) kadar gidebilir. Bununla birlikte, inhibitörlerin konsantrasyonu ve uygulanan hücre tipi PHÖ ve proteoliz süresini değiştirebilir (An ve diğ., 1998; Kumeda ve diğ., 1999). Birçok çalışmada, çoğalan hücrelerin ve canlı dokuların proteozom inhibitörlerine daha duyarlı olduğu gösterilmiştir (Drexler, 1997; An ve diğ., 1998; Orłowski ve diğ., 1998). Proteozom inhibitörleriyle karşılaştıktan sonra hücrelerin 4-48 saat içinde etkilendiği ve ölebileceği bildirilmiştir (Lopes ve diğ., 1997; Rockwell ve diğ., 2000). Proteozom inhibe edildiğinde organizmada çeşitli anormal proteinler birikir. Ayrıca, bu tür katlanmamış ve anormal proteinlerin tek başına birikimi bile programlanmış hücre ölümü kaskadının oluşmasına sebep olan c-Jun N-terminal kinazı (JNK) aktive edebilir (Meriin ve diğ., 1998).

Proteozom inhibitörleri arasında karbobenzoksi-L-leusil-L-leusil-L-leusinal ve Z-LLL-CHO olarak da adlandırılan MG132, çalışmalarda en çok kullanılan güçlü, geri dönüşümlü ve hücre geçirgen, sentetik peptid aldehit grubu proteozom inhibitörüdür (Ito ve diğ., 1975; Hayashi, Saito ve Kawashima, 1992). MG132, β alt birimlerinin aktif bölgesine kovalent olarak bağlanarak 20S proteozom aktivitesini inhibe eder ve 26S proteozom kompleksinin proteolitik aktivitesini etkili bir şekilde bloke eder (Şekil 2.9). MG132'nin kimyasal yapısı Şekil 2.8'de verilmiştir.



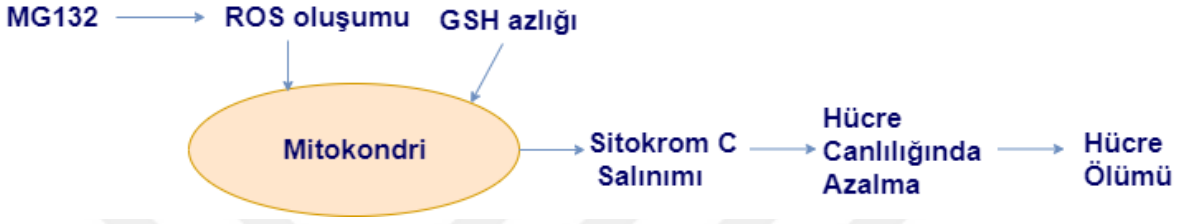
Şekil 2.8: MG132'nin kimyasal yapısı (Cvek, 2012).



Şekil 2.9: 26S proteozomunda MG132'nin bağlandığı bölge (Guo ve Peng, 2013).

Yapılan çalışmalarda MG132'nin 1, 10, 25, 50 μM konsantrasyonlarda 1 ila 10 gün arasında değişen uygulamasını bildirilmiştir (Kam ve Quaranta, 2009; Yamagishi ve diğ., 2010; Ahuja ve diğ., 2017). Kullanım olarak DMSO (10 mg/ml) veya metanol (1 mg/ml) içerisinde çözdürülmeli ve -20 veya -80°C 'de saklanmalıdır. MG132, proteazların ve kalpainlerin farklı tiplerini inhibe eden peptit aldehittir. MG132 ve diğer peptit aldehitlerin çoklu peptidaz aktivitesi ile proteozomları güçlü bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir (Tsubuki ve diğ., 1996). MG132 uygulanmış polenlerde ubiquitine proteinlerin moleküler kütle artışı, proteozom fonksiyonunun etkili bir şekilde bozulduğunu göstermiştir (Speranza ve diğ., 2001). Ayrıca MG132, programlanmış hücre ölümünü başlatan c-Jun N-terminal kinazı (JNK) aktive eder. MG132'nin, ROS oluşumu yoluyla programlanmış hücre ölümünü indüklediği bilinmektedir. Ek olarak, proteozom inhibitörü kaynaklı olarak ROS oluşumu ve glutatyon (GSH) miktarının azalmasıyla mitokondriyal bozulma meydana gelebilir. Bununla beraber Şekil 2.10'da

gösterildiği gibi hücre canlılığının azalmasına yol açan sitokrom salınımı oluşabilir (Han ve Park, 2010). Hücrede oksidatif stresin artmasıyla ve mitokondri fonksiyonundaki bozukluklar sebebiyle programlanmış hücre ölümünün indüklendiği bildirilmiştir. Oksidatif hücre hasarıyla birlikte mitokondrilerin membran geçirgenliği artar. Mitokondriyal geçirgenliğinin artmasıyla, membran potansiyeli depolarizasyonu, Ca^{2+} ve sitokrom c'nin salınımı hücreyi ölüme götüren süreçtir (Drexler, 1997).



Şekil 2.10: Reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu yoluyla MG132 ile indüklenen hücre ölümünün şematik diyagramı (Guo ve Peng, 2013).

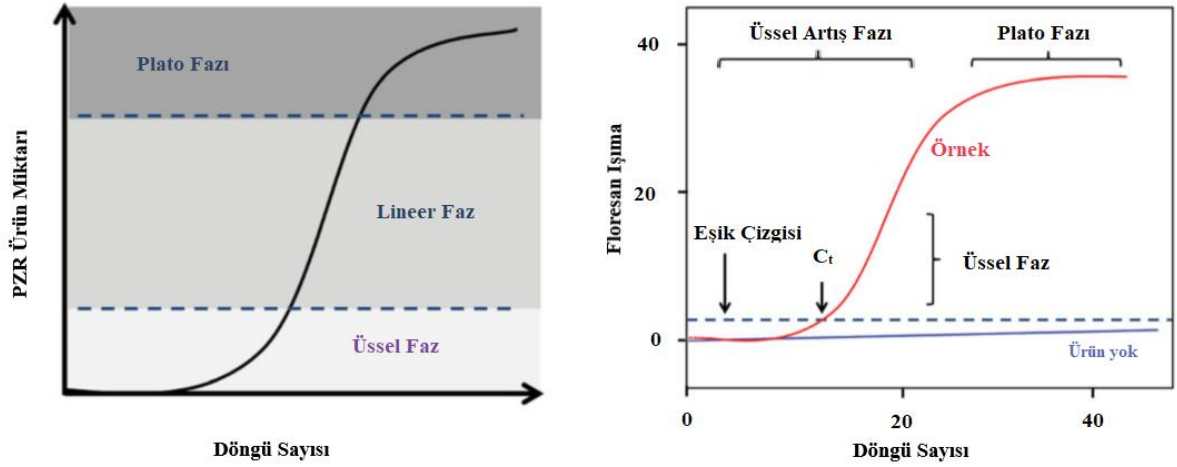
2.7. GEN ANLATIM ANALİZLERİ

Gen anlatım analizleri, herhangi bir genin mRNA seviyesinin saptanmasını ve ölçülmesini sağlar ve çeşitli deneysel uygulamalarla moleküler biyoloji laboratuvarının temelini oluşturmuştur. Birçok genin anlatım seviyeleri hücreden hücreye veya çeşitli deneysel koşullar sırasında önemli ölçüde değişebilmektedir. Hücrede, farklılaşma veya gelişim sırasında, kimyasal bir maddeye maruz kalındığında veya stres koşullarında gen anlatımında değişiklikler meydana gelebilir. RNA tabanlı gen anlatım çalışmaları, 1969 yılında Gall ve Pardue ve John ve diğ. birbirlerinden bağımsız olarak in situ hibridizasyonu geliştirmeleriyle başlamıştır (Gall ve Pardue, 1969; John, Birnstiel ve Jones, 1969). Ancak bu teknik Coghlan tarafından aradan yaklaşık 20 yıl geçtikten sonra 1984 yılında kullanılmıştır (Coghlan ve diğ., 1984). Alwine ve diğerleri tarafından 1977 yılında “Northern Blot” tekniğini kullanılarak gen anlatım çalışmalarının geliştirilmesi sağlanmıştır (Alwine, Kemp ve Stark, 1977).Günümüzde gen anlatımı analizi için en yaygın kullanılan teknikler, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (GZ PZR), DNA mikrodizilim (DNA “microarray”) ve yeni nesil dizileme teknolojisi olan RNA dizilemesi (“RNAseq”)’dir (Segundo-Val ve Sanz-Lozano, 2016).

2.7.1 Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (GZ PZR)

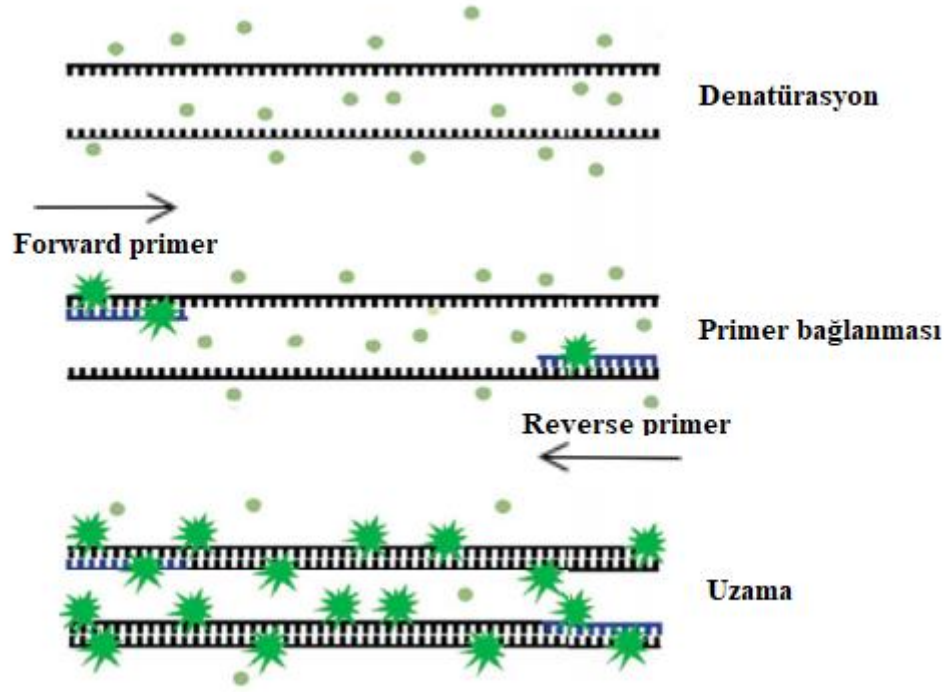
Kantitatif PZR olarak da adlandırılan gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (GZ PZR), nükleik asit tespiti için kesin, etkili ve hızlı bir yöntem olarak geliştirilmiştir. GZ PZR ilk defa 1993 yılında Higuchi ve diğ. (1993) tarafından kullanılmıştır ve günümüze kadar geliştirilerek kullanımı çeşitlendirilmiştir (Higuchi ve diğ., 1993). Bu yöntem sayesinde mRNA'nın ters transkripsiyonu (RT PZR) ile elde edilen cDNA, florokromlu bir prob kullanılarak istenilen gene özgü primerler varlığında PZR ile amplifiye edilir ve oluşan sinyal PZR işlemi sırasında ölçülür. Sadeliği, özgülüğü, hassasiyeti ve yüksek verim potansiyeli sayesinde referans teknoloji haline gelmiştir. GZ PZR, gen anlatım analizi, mikroRNA ve non-coding RNA analizi, genetik varyasyon, genotipleme, SNP ("single nucleotide polymorphism") analizi ve mutasyon tespiti gibi çok sayıda analiz için kullanılabilir (Kubista ve diğ., 2006).

Bu teknoloji, bir DNA hedefinin amplifikasyonu sırasında eş zamanlı olarak üretilen floresan sinyalinin saptanmasına dayanır. PZR reaksiyonunun her döngüsü sırasında amplifikasyon ürünlerinin üretimini izlemek için floresan moleküller kullanılır (Higuchi ve diğ., 1993). Böylece amplifikasyon ve saptamayı tek bir adımda birleştirir. Amplifikasyon ürünlerini saptamak için jel elektroforez ihtiyacını ortadan kaldırarak kolaylık sağlar. Nükleik asit amplifikasyonu ve tespitini bir adımda birleştirmesi ve klasik PZR'den daha az miktarda başlangıç malzemesine ihtiyaç duyması sayesinde kullanımı yaygınlaşmıştır (Stanton, 2001). Sabit sayıda döngüden sonra oluşan DNA miktarına bakmak yerine, gerçek zamanlı olarak PZR ürününün amplifikasyonu ilk tespit edildiğinde, döngü sırasındaki zaman noktası belirlenir. Zaman noktası, boya emisyon yoğunluğunun arka plan gürültüsünün üzerine düştüğü döngü sayısı ile belirlenir. Bu değer, floresan yoğunluğunun arka plan floresanstaki daha yüksek olduğu eşik döngüsü ("cycle treshold", C_t) olarak adlandırılır. C_t , PZR reaksiyonunun üssel fazında belirlenir ve hedefin kopya sayısı ile ters orantılıdır. Bu nedenle nükleik asit hedefinin başlangıç kopya sayısı ne kadar yüksek olursa, floresanstaki artış o kadar çabuk gözlenir ve C_t o kadar düşük olur. Şekil 2.11'de gösterildiği gibi amplifikasyon eğrisi üssel, lineer ve plato fazı olmak üzere üç fazdan oluşur. Üssel fazda, amplifikasyonun katlanarak artışı ifade eder. PZR'nin bu aşamasında, verimlilik %100'e yakınsa ürünlerin her döngü sırasında iki katına çıkacağı anlamına gelir. Lineer fazda amplifikasyon verimi azalmaya başlar ve PZR bileşenlerinin tükenmesiyle plato fazında minimum seviyeye düşer (Nassiri ve diğ., 2018).



Şekil 2.11: Gerçek zamanlı PZR'de reaksiyon eğrisi üssel fazda C_t değerine ulaşılmasını, lineer fazda her döngüde ürün veriminin artışı, plato fazında ise PZR bileşenlerinin azalmasıyla verimin düşüşünü ifade eder (Nassiri ve diğ., 2018).

PZR ürünlerinin görüntülenebilmesi için çalışılan diziye özel floresan işaretli prob veya özgül olmayan boyalar kullanılabilir. GZ PZR'da amplifikasyon sırasında oluşan ürün miktarının ve varlığının saptanması için en sık kullanılan yöntem çift zincirli DNA'nın boyanmasını sağlayan ve özgül olmayan SYBR Green boyasıdır. SYBR Green yönteminde kullanılan floresan boya yalnızca çift zincirli DNA'ya bağlanır. Böylece reaksiyon sırasında çoğalan DNA miktarı, okunan floresan miktarıyla GZ PZR cihazında eş zamanlı olarak görüntülenebilir. SYBR Green ve diğer boya bazlı yöntemler, diziye özgü problara kıyasla daha ekonomiktir ve optimize edilmesi daha kolaydır. Reaksiyon başlangıcında karışım içerisinde ve SYBR Green boyası, az miktarda çift zincirli DNA ve primerler bulunmaktadır. Şekil 2.12'de gösterildiği gibi primerlerin bağlanmasıyla uzama sırasında floresan boya çift zincirli DNA'nın arasına yerleşir ve ışımaya yapar (Fraga, Meulia ve Fenster, 2014).



Şekil 2.12: DNA denatürasyonu sırasında serbest olan SYBR Green boyası forward ve reverse primerlerin bağlanmasıyla başlangıçta az ışımaya yapar. Ardından uzama sonrasında SYBR Green çift zincirli PZR ürününe bağlanır ve floresan ışımaya artar (Fraga, Meulia ve Fenster, 2014).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. BİTKİ MATERYALİ

Dr. Bilgin Candar Çakır'ın izniyle, Hollanda Genetik Kaynaklar Merkezi'nden temin edilen (CGN; Centre for Genetic Resources the Netherlands, Wageningen University and Research Center) *Lycopersicon pimpinelli*, *Lycopersicon perivianum*, *Lycopersicon pennellii*, *Lycopersicon esculentum* (tomatillo), *Lycopersicon esculentum* ve *Solanum chilense* yabancı domates türlerinin tohumları 09.01.2018 tarihinde İstanbul Üniversitesi Alfred Heilbronn Botanik Bahçesi'nde yetiştirilmek üzere kullanıldı.

Alem: Plantae

Sınıf: Dicotyledonae

Alt Sınıf: Sympetale

Takım: Personatae

Familiya: Solanaceae

Cins: *Lycopersicon*

Tür: *Lycopersicon esculentum* Mill.

3.2. BİTKİ MATERYALİ ÇOĞALTIMI

L. pimpinelli, *L. perivianum*, *L. pennellii*, *L. esculentum* (tomatillo), *L. esculentum* ve *S. chilense* domates tohumlarının çoğaltımı hedeflenerek İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Botanik Anabilim Dalı'nda bitki büyütme ve tohum eldesi işlemleri gerçekleştirildi. Öncelikle tohumlar ekilmeden bir gün önce su içine bırakıldı ve şişmeleri sağlandı. Daha sonra perlit içeren fide viyölü, torf toprak içeren saksılar içerisine ekildi. Bitki büyütme odasında (16 saat aydınlık, 8 saat karanlık, 20°C) bahçeye ekilmeye uygun büyüklüğe ulaşana kadar yetiştirildi ve çiçek oluşumu başladıktan sonra kendine tozlaşmayı sağlamak için her türe ait fidelerin çiçekli kısımları naylon poşetler ile sarıldı. Daha sonra fideler bahçeye taşınarak periyodik olarak sulandı ve meyvelenmeleri sağlandı. Uygun büyüklükte olan ve olgunlaşan meyvelerin tohumları bistüri ve pens yardımı ile çıkarılarak kurutma kağıtları

üzerinde oda sıcaklığında 24-48 saat boyunca kurutuldu. Daha sonra tohumlar 50 ml'lik falkon tüplere koyulup etiketlendi ve kullanılana kadar 4°C'de muhafaza edildi.

3.3. BESİYERİ VE DOKU KÜLTÜRÜ KOŞULLARI

L. pimpinelli, *L. perivianum*, *L. pennellii*, *L. esculentum* (tomatillo), *L. esculentum* ve *S. chilense* tohumları MS besiyerine ekilerek çimlenme durumları kontrol edildi.

Besiyeri dökme, tohum sterilizasyonu ve tohum ekimi çalışmaları laminar flow steril kabinde (Telstar Bio II Advance, EN-12469) yapıldı. Çimlendirme ve bitki büyütme çalışmaları için bitki büyütme kabini (1400 lux Sanyo, MLR-352H) kullanıldı. Doku kültüründe kullanılan süzgeç, pens ve kurutma kağıdı kullanılmadan önce alüminyum folyo ile paketlenerek pastör fırında 185 °C'de 2 saat steril edildi.

3.3.1. MS Besiyerinin Hazırlanması

Domates bitkisinin doku kültürü çalışmalarında Murashige ve Skoog (MS) besiyeri kullanıldı (Murashige ve Skoog, 1962). MS besiyeri hazırlamak için gerekli bileşenler ve konsantrasyonları Tablo 3.1'de, besiyeri hazırlanırken kullanılan MS temel tuz karışımı içeriği ise Tablo 3.2'de verilmiştir.

500 ml besiyeri hazırlamak için 2,2 g MS tuz karışımı ve karbon kaynağı olarak 15 g sukroz distile su içerisinde çözdürüldükten sonra çözeltinin pH'ı 5N NaOH (Merck, 1.06462.1000) ile 5.7-5.8'e ayarlandı. Son olarak besiyerinin katılaşmasını sağlamak için çözeltiliye 4,5 g agar eklendi. Hazırlanan besiyeri 121 °C'de, 1.2 atm basınçta 15 dakika otoklavlanarak (Nüve, OT 012) steril edildi. Otoklavlanan besiyeri 45-50 °C'ye soğutulduktan sonra 500 µl MS vitamini çözeltisi eklendi ve 9 cm çaplı Petri kaplarına döküldü. Besiyeri, Petri içerisinde donduktan sonra kullanılana kadar 4 °C'de muhafaza edildi.

Tablo 3.1: MS besiyeri bileşenleri.

4,4 g/L MS temel tuz karışımı (Sigma, M5519)
30 g/L sukroz (Sigma, 84097)
9 g/L agar (Sigma, A1296)
1000X MS vitamin çözeltisi (Sigma, M3900)

Tablo 3.2: MS temel tuz karışımı içeriği (Murashige ve Skoog, 1962).

Komponentler	Konsantrasyon (mg/L)
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
KH ₂ PO ₄	170
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3
KI	0.83
H ₃ BO ₃	6.2
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8
Na ₂ EDTA	37.3
Nikotinic Asit	0.5
Pridoksin-HCl	0.5
Thiamin-HCl	0.1
myo-inositol	100
Glisin	2.0
Sakkaroz	30000

3.3.2 Domates Tohumlarının Yüzey Sterilizasyonu

Domates tohumlarının yüzey sterilizasyonu için yaklaşık 50 tohum steril süzgeç yardımıyla 15-20 saniye %70 etil alkolden (Sigma, 32221) geçirildi. Ardından %20'lik, sodyum hipoklorit içeriği %15-16 m/v olan ticari çamaşır suyunda 8-10 dakika bekletildi. Yıkama işlemi için tohumlar 3 kez 10 dakika distile su içerisinde bekletilerek temizlendi. Daha sonra tohumlar steril kurutma kağıdı üzerinde bir süre kurutuldu.

3.3.3 Domates Bitkilerinin Yetiştirilmesi

Yüzey sterilizasyonu yapılmış olan domates tohumları daha önce hazırlanan MS besiyeri içeren 9 cm çaplı Petri kaplarına ekilip 25°C'de 16 saat ışık/8 saat karanlık periyoduna sahip bitki büyütme kabiniinde çimlendirildi. Dördüncü yaprağı çıkana kadar 17 gün boyunca büyütülen domates bitkileri deneylerde kullanıldı ve deneyler 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi.

3.4. PROTEOZOM İNHİBİTÖRÜ UYGULAMASI

Domates dokularında proteozom inhibisyonu MG132 proteozom inhibitörü (EMD Millipore, 474787) ile yapıldı. 50 µM MG132 proteozom inhibitörü solüsyonu hazırlamak için çözücü olarak dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma-Aldrich, PHR1309) kullanıldı. 17 gün boyunca bitki büyütme kabiniinde yetiştirilen bitkilerin kök, gövde ve yaprak dokuları bistüri ve pens yardımıyla parçalanarak her dokudan 100 mg olacak şekilde tartıldı ve 1,5 ml'lik eppendorf tüplere aktarıldı. Daha sonra tüplerin üzerine 1 ml 50 µM MG132 proteozom inhibitörü çözeltisi ilave edildi ve 24 saat oda sıcaklığında bekletildi. MG132 içermeyen DMSO içerisinde bekletilen dokular kontrol grubu olarak kabul edildi. Proteozom inhibisyonu oluşturulan dokular moleküler analiz için dondurulmadan taze olarak kullanıldı.

3.5. RNA İZOLASYONU

Proteozom inhibisyonu gerçekleştirilen domates dokularından RNA izolasyonları Trizol (Invitrogen, 15596026) solüsyonu üreticisinin önerdiği protokole uygun olarak yapıldı. Her bir örnek için 100 mg bitki dokusu, önceden 121 °C'de, 1.2 atm basınçta 30 dakika otoklavlanarak steril edilmiş ve soğutulmuş havanlarda sıvı azot ile parçalanarak toz haline getirildi. Daha sonra 1 ml Trizol eklenerek 1,5 ml'lik eppendorf tüplere alındı. Oda sıcaklığında yaklaşık 5

dakika inkübe edilen örneklerin üzerine 200 µl kloroform eklendi ve 15 saniye kadar hafifçe altüst edildi. Daha sonra yine oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edilen örnekler 4°C’de 12.000 x g’de 20 dakika santrifüj (NÜVE, NF800R) edildi. Oluşan üst faz yeni steril eppendorf tüplere alındı ve 500 µl izopropanol eklenerek hafifçe altüst edildi. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilen örnekler 4°C’de 12.000 x g’de 10 dakika santrifüj edilerek pellet oluşumu sağlandı. Pelletler 1 ml %75 etanol ile yıkandı ve 4°C’de ve 5000 x g’de 6 dakika santrifüj edildi. Daha sonra etanol dökülerek oda sıcaklığında pelletlerin kuruması sağlandı. Ardından RNA pelletlerinin üzerine 40-50 µl nükleaz bulundurmeyen dH₂O eklendi. Isıtıcı blok (Biosan, TS-100C) yardımıyla 37 °C’de yaklaşık 15 dakika RNA pelletleri tamamen çözdürüldü.

3.6. RNALARIN SAFLIK VE KONSANTRASYON ANALİZİ

3.6.1. Spektrofotometrik Ölçüm

RNA’ların nanodrop spektrofotometre (Thermo Scientific, Nanodrop 2000) cihazında 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbans değerleri ölçülerek saflıkları ve konsantrasyonları belirlendi. RNA örneklerinin saflıklarının belirlenmesi için A_{260}/A_{280} oranı kullanıldı. A_{260}/A_{280} oranı ≈ 2.0 olan RNA’lar saf olarak kabul edildi. RNA örneklerinin konsantrasyonu ise denklem 3.1’e göre µg/µl cinsinden hesaplandı. Saflığı ve konsantrasyonu uygun bulunan RNA’lar kullanılana kadar -80°C’de muhafaza edildi.

$$\text{RNA } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = A_{260} \times \text{sulandırma katsayısı} \times 40 \quad (\text{Denklem 3.1})$$

Absorbansın 1 değeri 1 cm³ alanda 40 µg/µl miktarında tek zincirli RNA’yı temsil ettiğinden katsayı 40 kabul edilir.

3.6.2. Agaroz Jel Elektroforezi

RNA’ların konsantrasyon ve saflıkları belirlendikten sonra bütünlüklerinin değerlendirilmesi için %1,2’lik agaroz jel kullanıldı. Agaroz jel hazırlamak ve RNA örneklerinin jelde yürümesi için tampon olarak 50X Tris-asetat-EDTA (TAE) tamponundan seyreltilerek elde edilen 1X TAE tamponu kullanıldı. 50X TAE tamponunun bileşenleri ve konsantrasyonları Tablo 3.3’te verildi.

Agaroz jel, Sambrook ve diğ. (1989) tarafından verilen yönteme uygun olarak yapıldı. %1.2’lik agaroz jel hazırlamak için 0,48 g agaroz hassas terazide tartıldıktan sonra üzerine 40 ml 1X

TAE tamponu eklendi. Hazırlanan karışım mikrodalga fırında ısıtılarak homojenize hale getirildi. Bir süre soğutulan çözeltinin üzerine 3,2 µl EtBr (10 mg/ml) eklendi. 6x9 cm jel kasetine (Thermo, EC 320) uygun tarak yerleştirildi ve jel döküldü. Jel karışımı polimerize hale gelmesi için soğutuldu. Daha sonra 1X TAE tamponu ile doldurulan tankın içine polimerize olan jel aktarıldı. RNA örneğinden 5 µl, 1 µl 6X yükleme boyası (Thermo Fisher, R0611) ile karıştırıldı ve kuyucuklara yüklendi. Daha sonra RNA örnekleri 75 V güçte 25 dakika boyunca yürütüldü ve UV görüntüleme sisteminde (Avegene-Xlite 30R) jel görüntüsü alındı.

Tablo 3.3: 1L 50X TAE hazırlamak için gerekli bileşenler ve konsantrasyonları.

Bileşen	Konsantrasyon
37.2 g EDTA (Merck, 324503)	50 mM
242 g Tris-base (Sigma, T-8524)	2 mM
57.1 ml Glasiyel asetik asit (Merck, 101830)	1 mM
ddH ₂ O	1000 ml'ye tamamlanır.

3.7. cDNA SENTEZİ

Bitki dokularından izole edilen RNA'lar kullanılarak High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit ile (Applied Biosystem, 00709629) Thermal Cycler (BIORAD, T100) cihazında cDNA sentezi yapıldı. Öncelikle Tablo 3.4'te verilen bileşenler kullanılarak sentez için hazırlanan reaksiyon toplam 20 µl hacimde oluşturuldu. cDNA sentezi yapılırken kullanılan reaksiyon koşulları Tablo 3.5'te verildi.

Tablo 3.4: cDNA sentez reaksiyon bileşenleri.

cDNA Reaksiyon Bileşenleri	Hacimleri
10X RT Random Primers	2 µl
MultiScribe® Reverse Transcriptase (50 U/µL)	1 µl
10X RT Buffer	2 µl
25X dNTP Mix (100 mM)	0,8 µl
RNA (1000 ng)	10 µl
Nükleaz içermeyen dH ₂ O	4,2 µl
Toplam Hacim	20 µl

Tablo 3.5: cDNA sentezi reaksiyon koşulları.

Sıcaklık	Zaman
25 °C	10'
37 °C	120'
85 °C	5'

3.8. GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (GZ PZR) gerçekleştirilerek genlerin anlatım analizleri yapıldı. Kontrol grubu ve inhibitör uygulanan bitki dokularından elde edilen cDNA'lar kalıp olarak kullanıldı. Reaksiyon oluşturulurken kullanılan bileşenler ve hacimleri Tablo 3.6'da, reaksiyon koşulları ise Tablo 3.7'de verildi.

Tablo 3.6: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu bileşenleri.

Reaksiyon bileşenleri	Hacimleri
SYBR Green Master Mix (2x)	10 µl
10 µM Primer (forward ve reverse)	1 µl
cDNA	2 µl
Nükleaz içermeyen dH ₂ O	6 µl
Toplam Hacim	20 µl

Tablo 3.7: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu koşulları.

Sıcaklık	Zaman
95°C	10'
95°C	15''
60°C (<i>SLGR, SLPhGPX, SLCAT1, SLFe-SOD, SLGPX, SLCu/Zn-SOD, Aktin</i>)	1'
62°C (<i>SLGST, Aktin</i>)	1'
57,5°C (<i>SLcAPX, Aktin</i>)	1'
72°C	30''
60°C	5''

x45 döngü

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu çalışmaları BIORAD CFX96 cihazı ile yapıldı ve elde edilen C_t değerleri ile Denklem 3.2'ye göre $\Delta\Delta C_t$ değerleri belirlendi. Ardından $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülü kullanılarak genlerin anlatım katsayıları hesaplandı.

$$\Delta\Delta C_t: [C_t(\text{uygulama})-C_t(\text{aktin})]-[C_t(\text{kontrol})-C_t(\text{aktin})] \quad (\text{Denklem 3.2})$$

3.8.1. Gen Anlatım Analizinde Kullanılan Genler ve Özellikleri

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile bitkilerde antioksidan mekanizmalarla ilgili olduğu bilinen Glutasyon Redüktaz (*SLGRI*), Fosfolipit Hidroperoksit Glutasyon Peroksidaz (*SLPhGPX*), Katalaz (*SLCAT1*), Demir Süperoksit Dismutaz (*SLFe-SOD*), Glutasyon Peroksidaz (*SLGPX*), Bakır-Çinko Süperoksit Dismutaz (*SLCu/Zn-SOD*), Sitolik Askorbat Peroksidaz (*SLcAPX*) ve Glutasyon-S-transferaz (*SLGST*) genlerinin anlatım analizi gerçekleştirildi. Referans gen olarak ise aktin seçildi. Anlatım analizinde kullanılan primerler ve dizileri Tablo 3.8'de verildi.

Tablo 3.8: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan primerler ve dizileri (Martinez ve diğ., 2018).

Primer	Erişim numaraları (SGN)	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
<i>SLGRI</i>	Solyc09g091840	TTGGTGG AACGTGTGTTCTT	TTCATTC ACTTCCCATCCA
<i>SLPhGPX</i>	Solyc06g073460	TGGCTTGAGCACTACAGGTG	TTTCGTAGGCAGGGAAGAAG
<i>SLCATI</i>	Solyc12g094620	TGATCGCGAGAAGATACCTG	CTCCACGTTTCATGGACAAC
<i>SLFe-SOD</i>	Solyc06g048410	GGAGAACCCAAAAGAAACAATTTGG	TGAGGCTCCAAAGCATCCAT
<i>SLGPX</i>	Solyc08g080940	CTCGCGTTCTTCTCATCCCA	GGTAAACTGTTCCGGATCGGC
<i>SLCu/Zn-SOD</i>	Solyc11g066390	GGCCAATCTTTGACCCTTTA	AGTCCAGGAGCAAGTCCAGT
<i>SLcAPX</i>	Solyc06g005160	TCTGAATTGGGATTTGCTGA	CGTCTAACGTAGCTGCCAAA
<i>SLGST</i>	Solyc01g086680	AGCTCAAATGCACAATAAGCAGG	TCCTGGCAGGCATTTTGTCT
<i>SLActin</i>	Solyc03g078400	CCTCAGCACATTCCAGCAGA	CAGACAGGACACTCGCACTT

3.9. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Gen anlatım analizlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi için Graphpad Prism programında One-Way-ANOVA Tukey testi yapıldı ve $P < 0.05$ olan sonuçlar anlamlı kabul edildi. Gen anlatım deneyleri 3 biyolojik, 3 teknik tekrarlarla yapıldı.

4. BULGULAR

4.1 DOMATES TOHUMLARININ ELDESİ

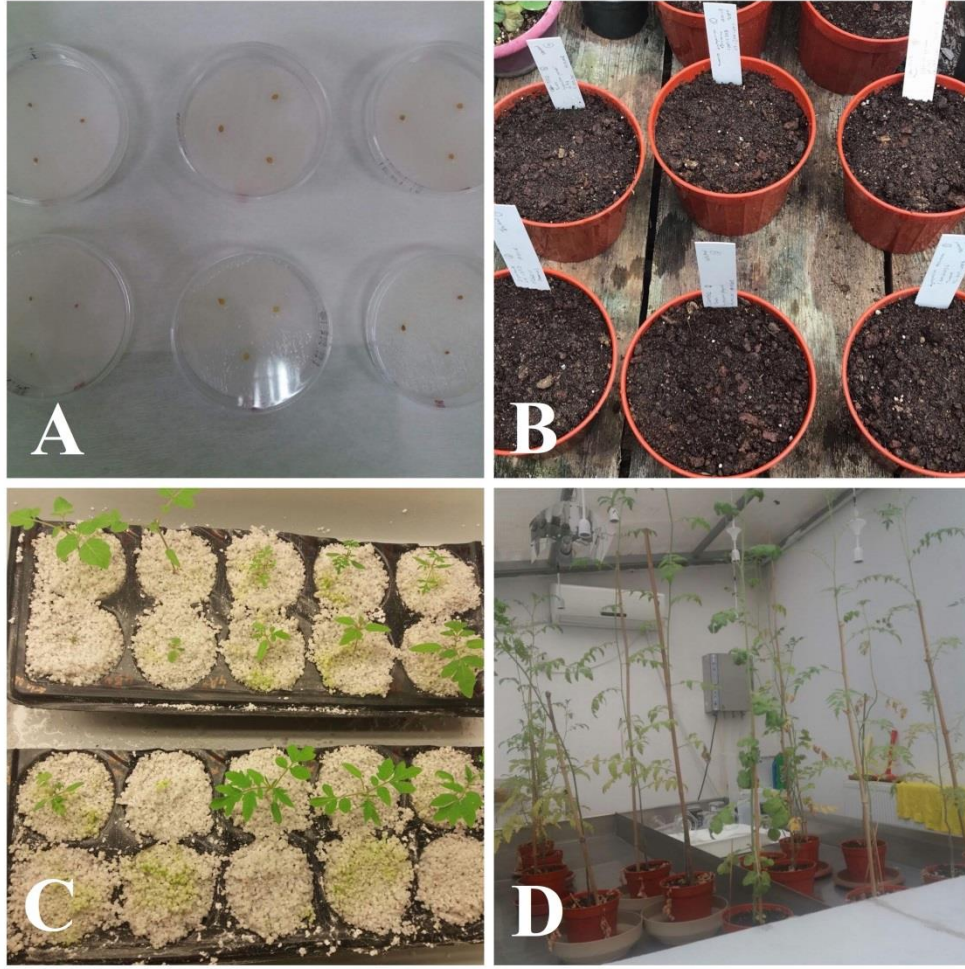
Domates tohumları bir gün önceden su içinde tutulup şişmeleri sağlandıktan sonra perlit içerisine ekildi. Perlitler bitki büyüme odasında 20°C 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık koşullarda yaklaşık 3 hafta boyunca büyütüldü. Uygun büyüklüğe ulaşan sağlıklı fideler saksılara aktarıldı ve 2 ay boyunca periyodik olarak sulandı Fidler daha sonra aynı koşullara sahip serada büyütüldü (Şekil 4.1). Daha sonra bahçeye aktarılan fiderlerden yaklaşık 3 aylık süreçte meyve toplama işlemi gerçekleştirildi (Şekil 4.2). Sağlıklı olan meyvelerden çıkarılan tohumlar cam petrilerde, kurutma kağıtları üzerinde 24-48 saat boyunca kurutuldu (Şekil 4.3). Ardından 50 ml'lik falkon tüplere aktarılıp etiketlenerek 4°C'de muhafaza edildi. Tohumlar kurutulduktan sonra doku kültüründe çimlenmeleri kontrol edildi ve yalnızca *L. esculentum* tohumları başarıyla çimlendirildiği için deneylerde kullanıldı.

Takım: Solanales

Familya: Solanaceae

Cins: *Lycopersicon*

Tür: *Lycopersicon esculentum* Mill.



Şekil 4.1: Bitki büyütme ve tohum eldesi işlemlerinin gerçekleştirilmesi için yetiştirilen domatesler.

A, *L. pimpinelli*, *L. perivianum*, *L. pennellii*, *L. esculentum* (tomatillo), *L. esculentum* ve *S. chilense* tohumlarının suda şişirilmesini; B, tohumların saksılara ekimini; C, tohumların perlit içerisine ekilmesini; D ise iklim odasında yetiştirilen domates fidelerini temsil etmektedir.



Şekil 4.2: Bahçeye aktarılan ve meyveleri toplanan *L. esculentum* bitkileri.

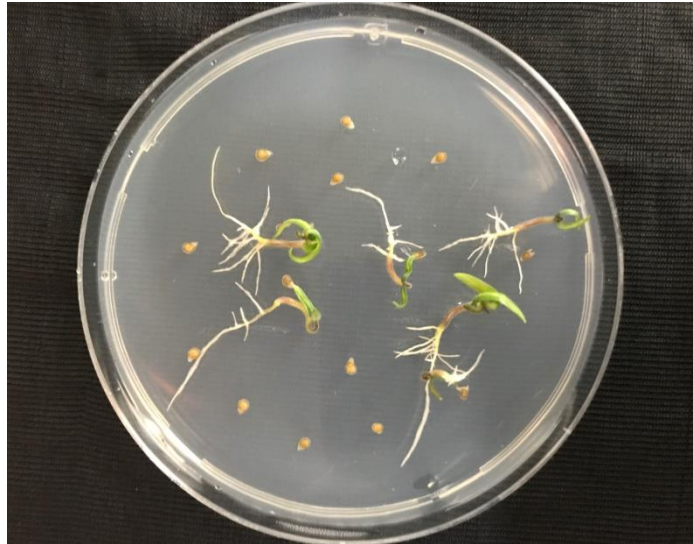
A, bahçeye aktarımı sağlanan domates fidelerini; B, olgunlaşmamış meyveleri; C, kızarılarak olgunlaşmış meyveleri; D ise olgunlaşan meyvelerin toplanmasını temsil etmektedir.



Şekil 4.3: Cam petrilerde 24-48 saat boyunca kurutulan *L. esculentum* tohumları.

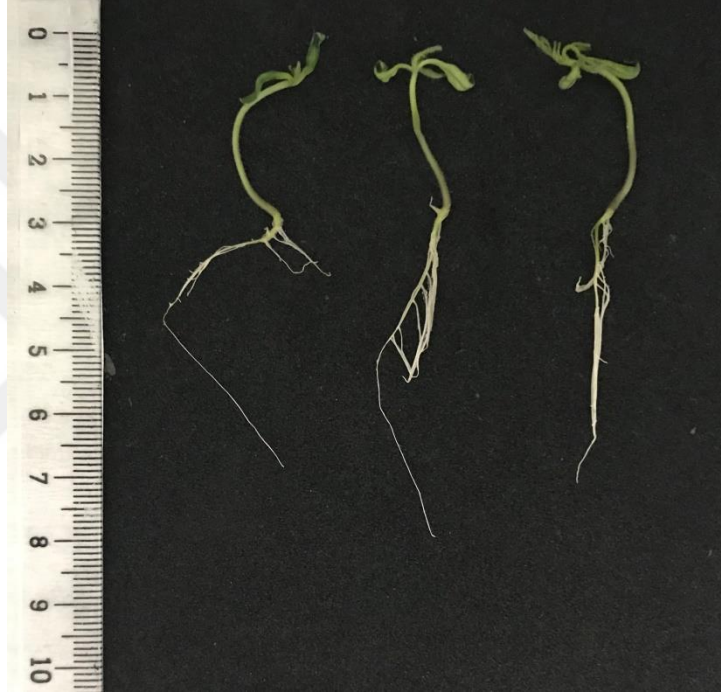
4.2. TOHUMLARIN ÇİMLENMESİ VE PROTEOZOM İNHİBİTÖRÜ UYGULANMASI

Lycopersicon esculentum tohumları yüzey sterilizasyonu yapıldıktan sonra MS besiyeri içeren Petri kabına ekildi ve bitki büyütme kabinde çimlenmeye bırakıldı. Tohumlar ekildikten yaklaşık 7 gün sonra çimlenmeye başladı (Şekil 4.4).

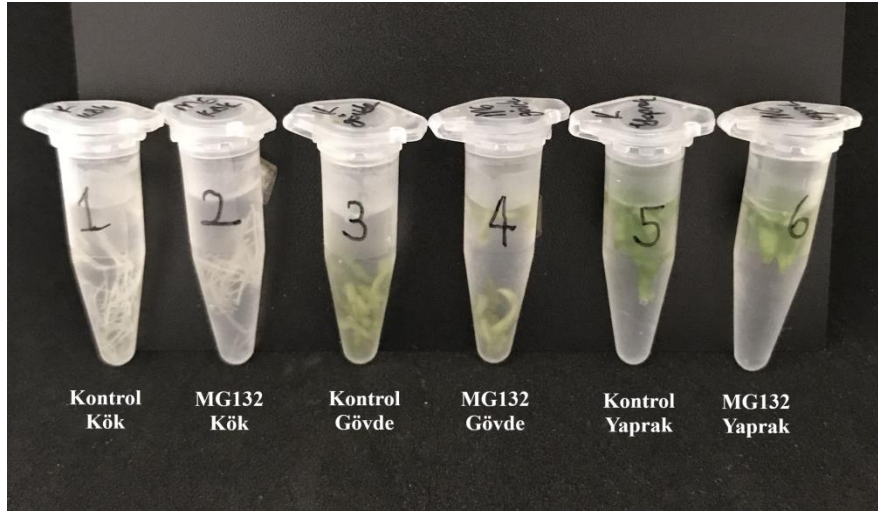


Şekil 4.4: MS besiyerindeki 7 günlük *Lycopersicon esculentum* tohumları.

17 gün boyunca MS besiyerinde yetiştirilen bitkiler pens yardımıyla çıkarıldı ve besiyerinden arındırmak için iki kere dH₂O ile yıkandı (Şekil 4.5). Daha sonra bitkinin kök, gövde ve yaprak dokuları birbirinden ayrılarak parçalar halinde 1,5 ml'lik eppendorf tüplere aktarıldı. Dokularda proteozom inhibisyonu oluşturmak amacıyla her tüpe 50 µM MG132 proteozom inhibitörü solüsyonundan 1 ml eklendi. Kontrol gruplarına ise az miktar proteozom inhibitörü çözücüsü olan DMSO solüsyonu ve dH₂O karışımından 1 ml eklendi. Hazırlanan kontrol ve uygulama tüpleri 24 saat oda sıcaklığında bırakıldı (Şekil 4.6).



Şekil 4.5: 17 günlük *Lycopersicon esculentum* bitkileri.



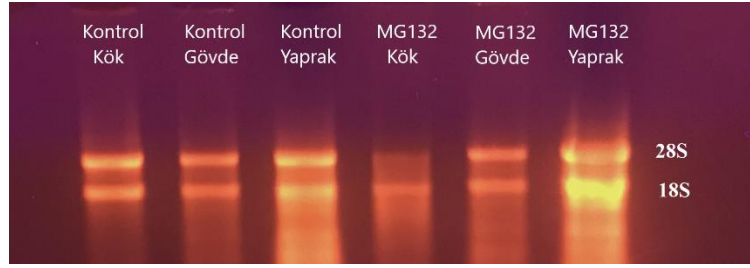
Şekil 4.6: Kontrol DMSO+dH₂O ve MG132 proteozom inhibitörü içeren *L. esculentum* dokuları.

4.3 GEN ANLATIM ANALİZLERİ

L. esculentum bitki kök, gövde ve yaprak dokuları kullanılarak antioksidan mekanizmalarda rol oynadığı bilinen *SLGR1*, *SLPhGPX*, *SLCAT1*, *SLFe-SOD*, *SLGPX*, *SLCu/Zn-SOD*, *SLcAPX* ve *SLGST* genlerinin proteozom inhibisyonu sonrası gen anlatım düzeyleri analiz edildi.

4.3.1 RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

Gen anlatım analizinin gerçekleştirilebilmesi için proteozom inhibisyonu oluşturulan kök, gövde ve yaprak dokularından RNA izolasyonları yapıldı ve bütünlükleri agaroz jel elektroforezinde kontrol edilerek fotoğraflandı (Şekil 4.7). Spektrofotometrik analiz sonucu elde edilen konsantrasyon ve saflık değerleri Tablo 4.1’de verildi ve A_{260}/A_{280} oranı ≈ 2.0 olan RNA’lar saf olarak kabul edildi. Agaroz jel elektroforezinde bütünlüğü belirlenen ve saf olduğu bilinen RNA’lardan GZ PZR reaksiyonlarında kullanılmak üzere cDNA sentezlendi.



Şekil 4.7: Proteozom inhibisyonu yapılan *L. esculentum* dokularından izole edilen RNA'ların agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü.

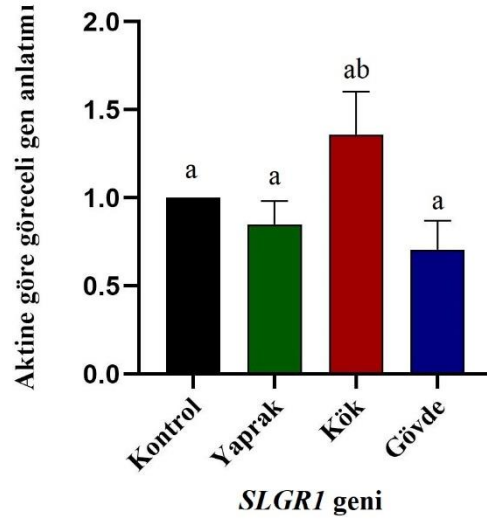
Tablo 4.1: Proteozom inhibitörü uygulanmış *L. esculentum* dokularından elde edilen RNA'ların spektrofotometrik değerleri.

Deney Grupları		Konsantrasyon (ng/µl)	A260/280
Kontrol Kök	1.tekrar	223,9	2,02
	2.tekrar	560,6	1,99
	3.tekrar	113,9	2,01
Kontrol Gövde	1.tekrar	205,9	1,94
	2.tekrar	272,3	1,90
	3.tekrar	183,6	2,07
Kontrol Yaprak	1.tekrar	1040,9	2,10
	2.tekrar	1226,5	2,08
	3.tekrar	1690,8	2,07
50 µM MG132 Kök	1.tekrar	222,1	1,96
	2.tekrar	120,9	1,95
	3.tekrar	156,6	2,02
50 µM MG132 Gövde	1.tekrar	232,2	2,02
	2.tekrar	300,7	2,02
	3.tekrar	208,9	2,08
50 µM MG132 Yaprak	1.tekrar	1442,3	2,12
	2.tekrar	888,5	2,04
	3.tekrar	592,9	2,08

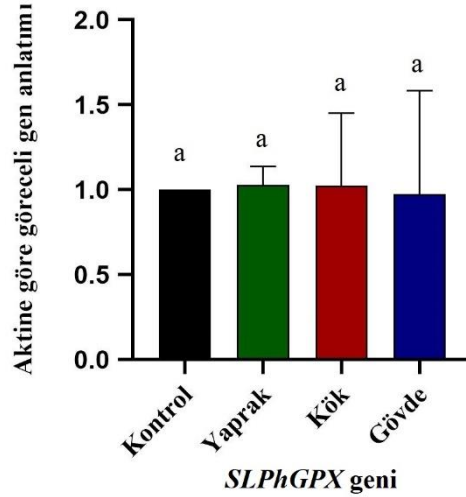
4.3.2 Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizleri

Proteozom inhibitörüyle muamele edilen *L. esculentum* bitki kök, gövde ve yaprak dokuları kullanılarak *SLGRI*, *SLPhGPX*, *SLCAT1*, *SLFe-SOD*, *SLGPX*, *SLCu/Zn-SOD*, *SLcAPX* ve *SLGST* genlerinin anlatım analizleri GZ PZR reaksiyonu ile gerçekleştirildi. GZ PZR sonucu elde edilen gen anlatım düzeylerini gösteren grafikler sırasıyla Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.15 'de verilmiştir. Çalışılan tüm genlerin anlatımı Şekil 4.16'da, 50 µM MG132 uygulaması sonrası göreceli anlatım katsayıları ise Tablo

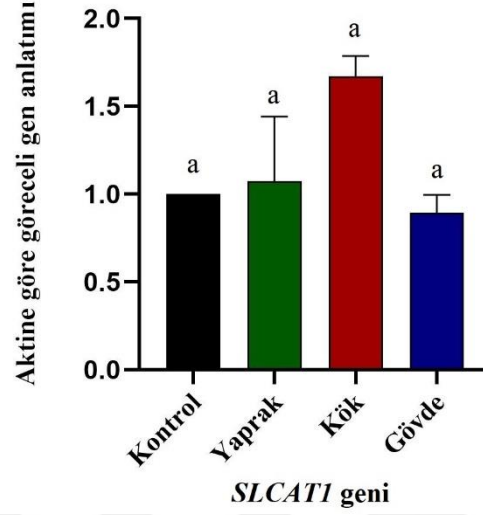
4.2’de verilmiştir. Grafiklerdeki çubuklar 3 tekrarlı olarak yapılan deneylerdeki standart hatayı (\pm SH) göstermektedir.



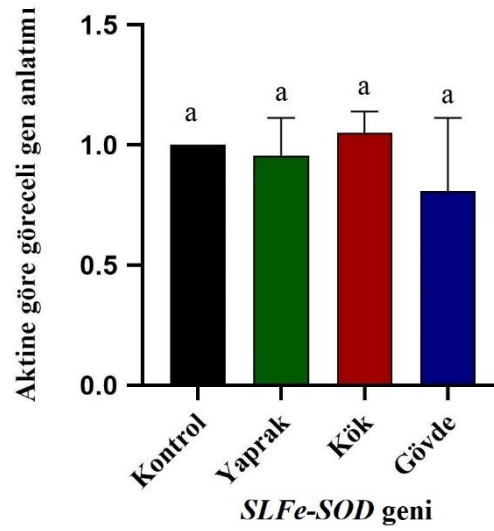
Şekil 4.8: GZ PZR analizleri sonucunda *L. esculentum* yaprak, kök ve gövde dokusunda 50 μ M MG132 uygulaması sonrası *SLGR1* geninin anlatım düzeyi. Sütunlarda bulunan farklı harfler Tukey testine göre $p < 0.05$ olan sonuçları ve anlamlı değişimi ifade eder.



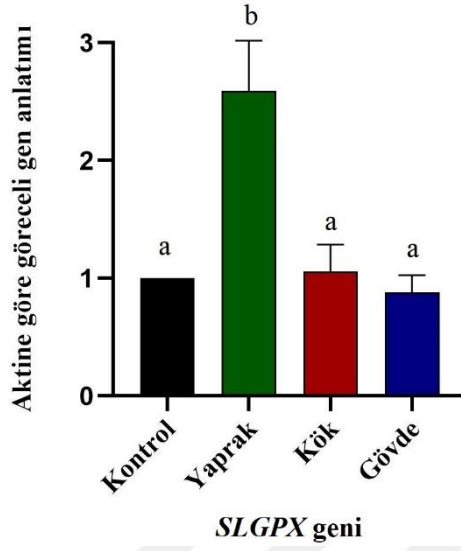
Şekil 4.9: GZ PZR analizleri sonucunda *L. esculentum* yaprak, kök ve gövde dokusunda 50 μ M MG132 uygulaması sonrası *SLPhGPX* geninin anlatım düzeyi. Sütunlarda bulunan farklı harfler Tukey testine göre $p < 0.05$ olan sonuçları ve anlamlı değişimi ifade eder.



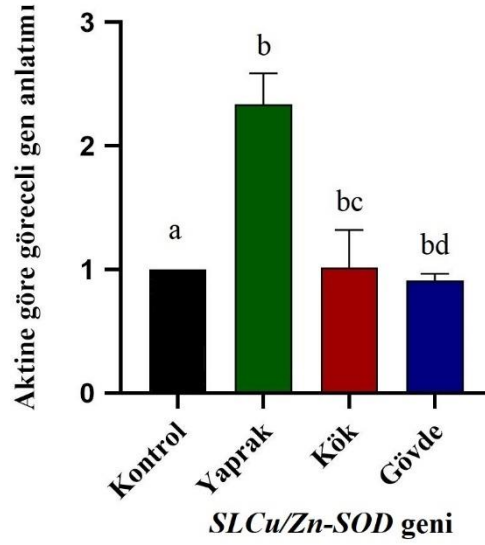
Şekil 4.10: GZ PZR analizleri sonucunda *L. esculentum* yaprak, kök ve gövde dokusunda 50 µM MG132 uygulaması sonrası *SLCAT1* geninin anlatım düzeyi. Sütunlarda bulunan farklı harfler Tukey testine göre $p < 0.05$ olan sonuçları ve anlamlı değişimi ifade eder.



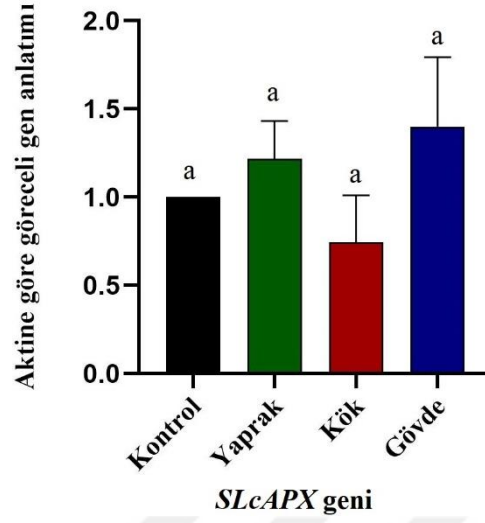
Şekil 4.11: GZ PZR analizleri sonucunda *L. esculentum* yaprak, kök ve gövde dokusunda 50 µM MG132 uygulaması sonrası SLFe-SOD geninin anlatım düzeyi. Sütunlarda bulunan farklı harfler Tukey testine göre $p < 0.05$ olan sonuçları ve anlamlı değişimi ifade eder.



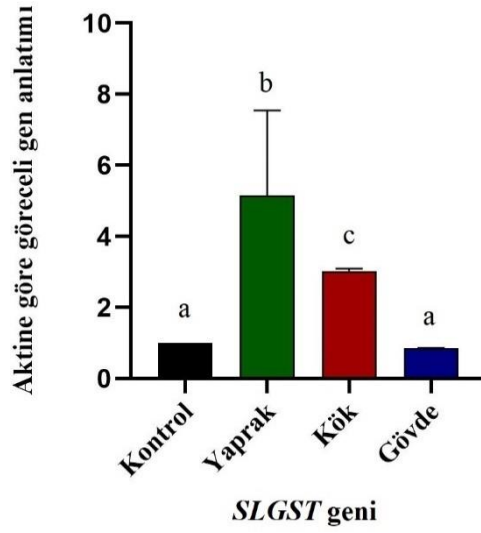
Şekil 4.12: GZ PZR analizleri sonucunda *L. esculentum* yaprak, kök ve gövde dokusunda 50 µM MG132 uygulaması sonrası *SLGPX* geninin anlatım düzeyi. Sütunlarda bulunan farklı harfler Tukey testine göre $p < 0.05$ olan sonuçları ve anlamlı değişimi ifade eder.



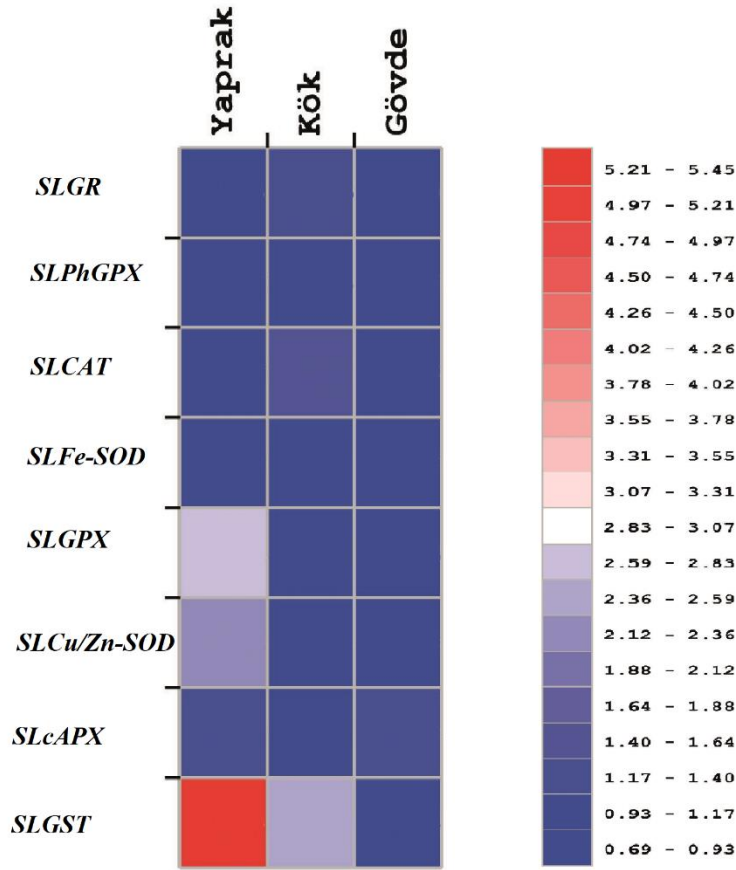
Şekil 4.13: GZ PZR analizleri sonucunda *L. esculentum* yaprak, kök ve gövde dokusunda 50 µM MG132 uygulaması sonrası *SLCu/Zn-SOD* geninin anlatım düzeyi. Sütunlarda bulunan farklı harfler Tukey testine göre $p < 0.05$ olan sonuçları ve anlamlı değişimi ifade eder.



Şekil 4.14: GZ PZR analizleri sonucunda *L. esculentum* yaprak, kök ve gövde dokusunda 50 µM MG132 uygulaması sonrası *SLcAPX* geninin anlatım düzeyi. Sütunlarda bulunan farklı harfler Tukey testine göre $p < 0.05$ olan sonuçları ve anlamlı değişimi ifade eder.



Şekil 4.15: GZ PZR analizleri sonucunda *L. esculentum* yaprak, kök ve gövde dokusunda 50 µM MG132 uygulaması sonrası *SLGST* geninin anlatım düzeyi. Sütunlarda bulunan farklı harfler Tukey testine göre $p < 0.05$ olan sonuçları ve anlamlı değişimi ifade eder.



Şekil 4.16: Yaprak, kök ve gövde dokusu için her genin anlatımını ifade eden şematik gösterim.

L. esculentum kök, gövde ve yaprak dokusunda proteozom inhibisyonunun *SLPhGPX*, *SLCAT1*, *SLFe-SOD* ve *SLcAPX* genlerinin anlatımları üzerine etkisi sırasıyla Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11 ve Şekil 4.14'te verilmiştir. 50 μ M MG132 proteozom inhibitörü uygulamasının bu genlerin anlatımını aktin genine göre değiştirmedığı görülmüştür.

L. esculentum kök, gövde ve yaprak dokusunda 50 μ M MG132 proteozom inhibitörü uygulamasının *SLGR1* geninin anlatımı üzerine etkisi Şekil 4.8'de verilmiştir. Buna göre *SLGR1* geninin anlatımı kök dokusunda 1.30 kat artarken, yaprak ve gövde dokusunda anlamlı bir değişiklik olmadığı görülmüştür.

L. esculentum kök, gövde ve yaprak dokusunda 50 μ M MG132 proteozom inhibitörü uygulamasının *SLGPX* geninin anlatımı üzerine etkisi Şekil 4.12'de verilmiştir. Buna göre *SLGPX* geninin anlatımı yaprak dokusunda 2.71 kat artarken, kök ve gövde dokusunda anlamlı bir değişiklik olmadığı görülmüştür.

L. esculentum kök, gövde ve yaprak dokusunda 50 μ M MG132 proteozom inhibitörü uygulamasının *SLCu/Zn-SOD* geninin anlatımı üzerine etkisi Şekil 4.13'te verilmiştir. Buna göre *SLCu/Zn-SOD* geninin anlatımı yaprak dokusunda 2.43 kat artış, kök ve gövde dokularında ise yaprak dokusuna göre azalış görülmüştür. Ancak kök ve gövde dokusunda aktin genine göre anlamlı bir değişim görülmemiştir.

L. esculentum kök, gövde ve yaprak dokusunda 50 μ M MG132 proteozom inhibitörü uygulamasının *SLGST* geninin anlatımı üzerine etkisi Şekil 4.15'te verilmiştir. Buna göre *SLGST* geninin anlatımı yaprak dokusunda 5.45, kök dokusunda 2.63 kat artarken; gövde dokusunda anlamlı bir değişim görülmemiştir.

Tablo 4.2: *L. esculentum* kök, gövde ve yaprak dokusunda 50 μ M MG132 uygulaması sonrası *SLGRI*, *SLPhGPX*, *SLCAT1*, *SL-Fe-SOD*, *SLGPX*, *SLCu/Zn-SOD*, *SLcAPX* ve *SLGST* genlerinin aktin genine göre göreceli katsayıları. Aktin geninin katsayısı 1 olarak kabul edildiğinden, tablodaki değerler 1'e göre değişimi ifade eder.

	<i>SLGRI</i>	<i>SLPhGPX</i>	<i>SLCAT1</i>	<i>SL-Fe-SOD</i>	<i>SLGPX</i>	<i>SLCu/Zn-SOD</i>	<i>SLcAPX</i>	<i>SLGST</i>
Yaprak 50 μM MG132	0.75	1.02	1.05	0.94	2.71	2.43	1.37	5.45
Kök 50 μM MG132	1.30	0.99	1.58	1.04	1.04	1.03	0.70	2.63
Gövde 50 μM MG132	0.69	0.86	0.96	0.77	0.86	0.93	1.43	0.86

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Lycopersicon esculentum (domates), dünyada tarımsal öneme sahip olması ve basit genetik yapısı nedeniyle genetik araştırmalarda tercih edilmektedir. Bunun yanında kısa sürede kültürlenebilme, yüksek üreme potansiyeli ve farklı çevre koşullarında yetişebilmesi farklı çalışmalarda kullanılmasını mümkün kılar. Aynı zamanda iyi bir antioksidan kaynağıdır. Meyvelerinin içerdiği çeşitli bileşiklerin antioksidan ve antikanser özelliklere sahip olduğu bildirilmiş ve sağlık çalışmalarında kullanılmıştır (Giovannucci, 1999; Lenucci ve diğ., 2006; Raiola ve diğ., 2014; Abewoy Fentik, 2017). Bununla birlikte bitki ve meyve gelişimi çalışmaları için model bitki olduğu kabul edilmiştir.

Bitkiler, ürün verimliliğini azaltan ve sınırlayan çok çeşitli çevresel streslere maruz kalmaktadır. Bitkiler abiyotik stres ve biyotik stres olarak sınıflandırılabilir iki tür çevresel stresten etkilenirler. Radyasyon, tuzluluk, sel, kuraklık, aşırı sıcaklık, ağır metal, radyasyon gibi koşullar abiyotik stresi ifade ederken mantarlar, bakteriler, nematodlar ve çeşitli patojenlerin saldırıları biyotik stresleri ifade eder (Gull, Ahmad Lone ve Ul Islam Wani, 2019). Bitkiler doğada hareketsiz bulduklarından bu olumsuz çevresel koşullardan kaçamazlar. Ancak biyotik ve abiyotik stres faktörlerine karşı çeşitli mekanizmalar geliştirmişlerdir. Dış ortamı algırlar, uyarılırlar ve hücresel yanıt oluştururlar. Hücre yüzeyinde ve sitoplazmada bulunan reseptörler yoluyla algılanan bilgi, bitkinin strese karşı toleranslı olmasını sağlayan transkripsiyonel değişikliklere yol açar. Stres faktörünü algılamak ve uygun biyokimyasal-fizyolojik yanıt oluşturmak bitki gelişimi, büyümesi ve canlılığı için önemlidir.

Bitkilerde tuzluluk, kuraklık, yüksek ışık ve metallere kaynaklanan toksisite hücre içerisindeki reaktif oksijen türü (ROS) üretimini artırır. Oksijen, yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu ya da farklı fiziksel faktörlerin etkisiyle ROS'ların oluşumuna sebep olabilir. Bitkiler çeşitli abiyotik stres koşullarında topraktan yeterli suyu alamazlar (Mittler, 2002). Bununla birlikte stomaların kapanmasıyla CO₂ alımı da azalır. Bu stres koşullarında elektronlar yüksek enerjiye sahip olduğundan moleküler oksijene transfer edilirler ve hidrojen peroksit (H₂O₂), süperoksit (O₂•-), hidroksil (OH•) ve singlet oksijen (¹O₂) ROS'larının oluşumuna sebep olurlar (Sharma ve diğ., 2012). ROS'lar oksidatif stres oluşturarak biyolojik makromoleküller olan lipitler, karbonhidratlar, proteinler ve nükleik asitlerin bozulmasına neden olurlar. Organizmada ROS homeostazını sağlayan ana moleküller ise enzimatik ve

enzimatik olmayan antioksidanlardır. Bitkilerde bulunan ve ROS detoksifikasyonunu sağlayan başlıca enzimatik antioksidanlar süperoksit dismutaz (SOD), demir süperoksit dismutaz (Fe-SOD), bakır çinko süperoksit dismutaz (Cu/Zn-SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPX) fosfolipit hidroperoksit glutatyon peroksidaz (PhGPX), askorbat peroksidaz (APX), glutatyon-S transferaz (GST) ve glutatyon redüktaz (GR)'dir.

Organizmalarda büyüme, gelişme, protein sentezi ve organel biyogenezi süreçlerinde proteoliz mekanizmasının önemli olduğu bilinmektedir. Bu süreçlerde rol oynayan proteinlerin yıkılması hücrel dengeyi sağlar. Bitkilerde çimlenme, morfogenez, yaşlanma ve programlanmış hücre ölümü (PCD) gibi gelişim aşamalarında protein yıkılması rapor edilmiştir (Huffaker, 1990; Beers, Woffenden ve Zhao, 2000). Ökaryotlarda sitoplazma ve nükleustan transfer edilen proteinlerin, yıkıldığı ana mekanizma ubiquitin-proteozom mekanizmasıdır (Bolwell, 2001).

Proteozom inhibitörleri, laboratuvar deneylerinde proteozom aktivitesini inhibe etmek için kullanılır (Kisselev ve Goldberg, 2001). Bu inhibitörler proteozom sistemini çeşitli alt birimlere bağlanarak inhibe ederler. İnhibitörlerin kullanımı ubiquitin proteozom sisteminin substratlarının keşfiyle beraber proteozom enzimlerinin işlevlerini açıklamak için önemli araçlardır. Aynı zamanda proteozom sisteminin inhibisyonu hücre içinde hasarlı, yanlış katlanmış ve kısa ömürlü proteinler birikir. Bununla birlikte DNA kırıkları ve yüksek seviyede ROS'lar üretilir. Proteozom inhibisyonu sonucunda hücre içi karbonil seviyeleri de arttığından proteozom sisteminin oksitlenmiş proteinlerin yıkılmasından sorumlu olduğu anlaşılmıştır (Stadtman ve Berlett, 1998; Kim ve diğ., 2003). Üretilen ROS'ların detoksifikasyonu için de antioksidan enzimler işlev görür. Bu çalışmada güçlü, geri dönüşümlü ve sentetik peptid aldehit grubu proteozom inhibitör olan MG132 kullanılmıştır. MG132, 26S proteozomun β alt birimlerine kovalent olarak bağlanır ve proteolitik aktiviteyi engeller (Guo ve Peng, 2013).

Bu tez çalışmasında İstanbul Üniversitesi Alfred Heilbronn Botanik Bahçesi'nde bitki ve meyve gelişimi çalışmaları için model bitki olarak kabul edilen yabancı tip *Lycopersicon esculentum* bitkisi yetiştirilmiştir ve meyvelerinden elde edilen tohumlar doku kültüründe kullanılmıştır. 24 saat süreyle 50 μ M MG132 proteozom inhibitörü uygulanan taze kök, gövde ve yaprak dokularından RNA izole edilerek antioksidan mekanizmalarla ilişkili olduğu bilinen *SLGR1*, *SLPhGPX*, *SLCAT1*, *SLFe-SOD*, *SLGPX*, *SLCu/Zn-SOD*, *SLcAPX* ve *SLGST* genlerinin gen anlatım düzeyleri gerçek zamanlı PZR ile belirlenmiştir. İnhibitör uygulanan

dokular, MG132 proteozom inhibitörünün geri dönüşümlü etki yapması sebebiyle dondurulmadan deneylerde kullanılmıştır.

Genel olarak bitki katalazları CAT1, CAT2 ve CAT3 olarak bilinen üç izoenzim grubuna ayrılır ve bu izoenzimler sırasıyla *Cat1*, *Cat2* ve *Cat3* yapısal genleri tarafından kodlanmıştır. (Zámocký ve diğ., 2012). Katalaz (CAT), hidrojen peroksiti (H_2O_2) su (H_2O) ve oksijene (O_2) dönüştüren, yaklaşık 200-340 kDa ağırlığında bir enzimdir. Son yapılan araştırmalar çoklu abiyotik stres koşullarında katalaz aktivitesinde artış bildirmiştir. Örneğin, salatalık bitkisinde katalaz aktivitesi ısı, soğuk, ozmotik ve tuzluluk stresine yanıt olarak artmıştır (Zhou ve diğ., 2017). Bunun yanında 7 günlük *Brassica napus* L. yapraklarına kadmiyum (Cd) ağır metali stresi uygulanması yapılan biyokimyasal analiz sonucuna göre Cd ile muamele edilen bitkilerin yapraklarında katalaz aktivitesinin, kontrol grubuna göre daha düşük olduğu bulunmuştur (Karam ve diğ., 2017). Benzer şekilde krom (Cr) ile muamele edilen hardal fidelerinde katalaz aktivitesi azalmıştır (Mahmud ve diğ., 2017). *A. thaliana*'da, katalazın *cat1-3* olarak adlandırılan üç gen üyesi olan küçük bir gen ailesi tarafından kodlandığı belirlenmiştir (Li ve diğ., 2015). Üç genin anlatımının, farklı abiyotik streslere verdiği yanıtların farklı olduğu gözlemlenmiştir. Örneğin, Pb stresi altında *Arabidopsis* fidelerinde üç farklı katalaz geni üyesinden sadece *cat2* anlatımının değişerek azaldığı görülmüştür (Corpas ve Barroso, 2017). *A. thaliana*'da yapılan farklı bir çalışmada ise *cat3* geninin aşırı anlatımı kuraklık stresini tolere etmeyi sağlamıştır (Zou ve diğ., 2015). Bu çalışmada ise *L. esculentum* CAT1 izoformunu kodlayan *SLCAT1* geninin anlatımında kök, gövde ve yaprak dokusunda anlamlı bir değişiklik olmadığı görülmüştür. Katalaz enziminin asıl görevi H_2O_2 'nin detoksifikasyonunu yaparak hücreleri oksidatif hasarlardan korumaktır. Fakat CAT'ın hücreleri H_2O_2 'den koruma etkinliği oldukça sınırlıdır. Bunun sebebi, CAT'ın H_2O_2 'ye karşı ilgisinin diğer enzimlere göre daha düşük olması ve ışık varlığında inaktivasyona uğramasıdır (Prasad, 1997). Bu bilgilere göre katalaz enziminin aktivitesini veya katalaz genlerindeki değişimi bitkilerde stres belirteci olarak görmek şüphelidir. Katalaz genlerinin stres faktörleriyle ilişkisini belirlemek için diğer genler ile bağlantısını çözümlenmeye ve daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Bu çalışmada da proteozom inhibisyonu kaynaklı oksidatif strese yanıt olarak *SLCAT1* geninde anlamlı bir değişiklik olmaması, katalazın H_2O_2 'ye ilgisinin daha az olmasından dolayı olabileceğini düşündürmüştür.

SOD'un izoformlarından biri olan Fe-SOD, hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda bulunan bir antioksidan enzimdir. *A. thaliana*'da SOD enzim aktiviteleri ve protein seviyeleri 16. yüzyıldan bu yana bilinmektedir. Transgenik kavak bitkisinde yapılan bir çalışmaya göre düşük karbondioksit koşullarında Fe-SOD'un aktivitesinin arttığı ve bunun da fotosistem II (PSII) üzerinde koruyucu bir etki gösterdiği bildirilmiştir (Arisi ve diğ., 1998). *Arabidopsis*'te yapılan bir çalışmada oksidatif stres koşullarında *FSD1*, *FSD2* ve *FSD3* olarak belirtilen üç Fe-SOD geninden yüksek ışığa tepki olarak *FSD2* gen anlatımı artmıştır. Buna karşın *FSD2* geninin anlatımında ozon stresine karşı değişiklik olmadığı bildirilmiştir (Kliebenstein, Monde ve Last, 1998). Avcı Duman ve diğ. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada ise Fe-SOD aktivitesinin artan H₂O₂ tarafından inhibe olduğu bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında yapılan analiz sonucunda *SLFe-SOD* geninin anlatımında kök, gövde ve yaprak dokusunda anlamlı bir değişiklik olmadığı görülmüştür. Bu sonuçlar, *L. esculentum*'da proteozom inhibisyonuyla oluşturulan oksidatif strese yanıt olarak Fe-SOD aktivitesinin etkili olmadığını veya diğer çalışmalarla uyumlu olarak artan H₂O₂ seviyesinin Fe-SOD inaktivasyonuna sebep olabileceğini ifade edebilir.

Yüksek bitkiler, algler, kamçılılar gibi birçok organizmada ROS'a karşı gerçekleştirilen savunmada önemli role sahip olduğu düşünülen APX enzimleri tAPX, gmAPX, sAPX, cAPX gibi en az beş farklı izoformdan oluşur. APX, bitkilerde stres koşullarında H₂O₂'nin detoksifikasyonunu sağlayan en önemli antioksidan enzimlerden biridir (Wang, Zhang ve Allen, 1999). Bezelye yapraklarında yapılan bir çalışmada metil viyolojen stresine yanıt olarak yüksek APX ve GR enzim aktivitesi bildirilmiştir (Donahue ve diğ., 1997). Transgenik domates bitkilerinde (*Lycopersicon esculentum* L.) yapılan çalışmada, sitozolik APX geninin aşırı anlatımının, soğuk ve tuz stresi ile oluşturulan oksidatif hasarı iyileştirdiği görülmüştür (Wang ve diğ., 2005). Bunun yanında bazı çalışmalarda APX'in stres koşullarında aktivitesinin azaldığı gözlemlenmiştir. Örneğin, *A. thaliana*'da kloroplastlarda tilakoide bağlı (tAPX) ve çözünür (sAPX) olmak üzere iki askorbat peroksidaz (APX) formu vardır. tAPX ve sAPX'in ağır metal toksisitesi veya şiddetli kuraklık gibi ciddi stres koşullarında inaktivasyonu bildirilmiştir (Liu ve diğ., 2008; Kitajima, 2008). Başka bir çalışmada tuz stresi ile *Gossypium hirsutum* bitkisinin yapraklarında APX aktivitesinin azaldığı bildirilmiştir (Zhang ve diğ., 2014). Kuraklık stresi uygulanan *L. esculentum* ve *L. peruvianum* bitkilerinde ise APX aktivitesinin kontrol grubuna kıyasla azaldığı bildirilmiştir (Ünyayar ve diğ., 2005). Bu çalışmada da *L. esculentum* APX izoformu olan sitozolik *SLcAPX* geninin anlatımında kök,

gövde ve yaprak dokusunda anlamlı bir değişiklik olmadığı görülmüştür. Yapılan çalışmalar bitkilerde stresin uygulanma zamanına, şiddetine ve bitkinin türüne göre enzim aktivitelerinin ve gen anlatımlarının değiştiğini göstermektedir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre APX'in *L. esculentum*'da proteozom inhibisyonu sonucu oluşan ROS temizlenmesinde etkili olmadığı veya Liu ve diğ. (2008) yaptığı çalışmayla benzer şekilde şiddetli stres koşulunda inaktive olmuş olabileceğini düşündürmüştür.

Bitki GPX'leri farklı bitki dokularında ve gelişim aşamalarında her yerde bulunan enzimlerdir. Bitkilerde ve model olarak *Arabidopsis*'te de tanımlanan sekiz adet GPX formu bulunur. GPX1-4 ve GPX6 selenyum içerirken GPX5, 7 ve 8 sistein içerir ve yapısal olarak farklı olmalarının yanı sıra önemli biyolojik süreçlerde rol oynarlar. GPX4, PhGPX olarak da adlandırılır. Bitkilerde bir GPX izoformu olan PhGPX'in rolü büyük ölçüde bilinmemesine karşın abiyotik ve biyotik stresler koşullarında ROS detoksifikasyonu ve lipit hidroperoksitlerin atılımını sağladığı bildirilmiştir. Gen anlatım analizlerine göre patojen enfeksiyonları, ağır metal, oksidatif stres gibi biyotik ve abiyotik streslere maruz kalan çeşitli bitki türlerinde PhGPX mRNA seviyelerinde genel olarak artış bildirilmiştir (Criqui ve diğ., 1992; Sugimoto ve Sakamoto, 1997; Avsian-Kretchmer ve diğ., 1999). Ayçiçeęi bitkisinde yapılan bir çalışmaya göre NaCl stresine yanıt olarak PhGPX'in aktivitesinde artış gözlemlenmiştir. Ancak fide büyümesinin erken aşamasında bildirilen bu artış PhGPX'in gelişimin erken aşamasında aktifleşebileceğini düşündürmüştür (Jain ve Bhatla, 2014). Gerçek Zamanlı PZR analizleri sonucunda *S�PhGPX* geninin anlatımında kök, gövde ve yaprak dokusunda anlamlı bir değişiklik olmadığı görülmüştür. Bu sonuçlar *L. esculentum*'da PhGPX enziminin proteozom inhibisyonu kaynaklı ROS detoksifikasyonunda etkili olmadığını göstermektedir.

Antioksidan enzim aktivitelerinin değişiminin olmamasının veya azalmasının açıklaması olarak antioksidan savunma sistemlerinin stres koşullarına verecekleri cevapların tamamen bitki ve stres koşuluna ve stresin uygulanma süresine bağlı olduğu söylenebilir. Aynı zamanda hücre içi toksisitenin protein oksidasyonuna ve enzim inhibisyonuna neden olabilen yüksek ROS üretimini ve birikimini indükleyebileceği bildirilmiştir (Mittler, 2002).

GR enziminin bitki hücrelerinde kloroplast, sitoplazma, mitokondri ve peroksisomlarda yerleşim gösteren izoformları bulunur ve aktivitesinin yaklaşık %80'i kloroplastlarda bulunan izoformuna aittir (Edwards, Rawsthorne ve Mullineaux, 1990). GR enziminin H₂O₂ detoksifikasyonunda rol oynadığı bilinmektedir. GR'nin aşırı anlatımının *N. tabacum* ve *Populus* bitkilerinde oksidatif strese karşı toleransın artmasını sağladığı görülmüştür (Foyer ve diğ., 1995; Van Camp ve diğ., 1996). Salatalık (*Cucumis sativus* L.) bitkisinde yapılan bir çalışmaya göre soğuk stresinin GR aktivitesinin seviyelerinde önemli bir artışa neden olduğu gösterilmiştir (Lee ve Lee, 2000). Benzer şekilde, GR aktivitesi *Triticum aestivum*'da sıcaklık stresinde, yonca bitkisinde su stresinde ve pamuk bitkisinde NaCl stresinde belirgin seviyede artmıştır (Keleş ve Öncel, 2002; Naya ve diğ., 2007; Vital ve diğ., 2008). Kuraklık stresi ile ortaya çıkan oksidatif stresin sonucunda *Lycopersicon esculentum*, *L. notabilis*, *Cucumis sativus* bitkilerinde GR aktivitesinin kontrol grubuna göre arttığı bildirilmiştir (Ünyayar ve Çekiç, 2005; Liu ve diğ., 2009). Bitkilerdeki GR aktivitesindeki bu artış, glutasyon (GSH) miktarının da artmasını sağlar ve sonuç olarak bitkilere tolerans kazandırır. Bu tez çalışmasında literatür ile uyumlu olarak kök dokusunda mitokondride lokalize olmuş GR formunu kodlayan *SLGR1* gen anlatımının kontrole kıyasla 1.30 kat arttığı belirlenmiştir. Bu artışın sebebi olarak *L. esculentum* kök dokusunda proteozom inhibisyonu sonucunda hücrelerde artan ROS'ların temizlenebilmesi için bir antioksidan yanıt olduğunu düşündürmüştür.

GST'ler bitkilerde büyük ve çeşitli bir gen ailesi tarafından kodlanır. Bunlar, temel olarak phi, tau, teta, zeta ve lambda sınıflarına ayrılır. GST'lerin hormon biyosentezi, tirozin yıkımı ve peroksit yıkımı süreçlerinde rol oynadığı ve bitki gelişiminin farklı aşamalarında anlatım yaptığı bilinmektedir (Oakley, 2011). Yapılan çalışmalar, GST'lerin bitkileri ağır metal stresi ve UV radyasyonu dahil olmak üzere farklı çevresel streslerden koruyabildiğini göstermektedir (Liu ve Li, 2002; Ding ve diğ., 2017). Bunun yanında GST'lerin bitkilerde çeşitli dokularında soğuk, kuraklık H₂O₂ ve tuz gibi streslere karşı aktivitelerinin arttığı bildirilmiştir (Levine ve diğ., 1994; Kim, Andaya ve Tai, 2011; Xu ve diğ., 2015; Jia ve diğ., 2016). Transkripsiyonel seviyede GST'lerin stres yanıtını incelemek için *Arabidopsis* hücre süspansiyon kültürü üzerinde kapsamlı bir çalışma yapılmıştır. Analiz sonucunda GST genlerinin anlatımında oksidatif stres toleransını sağlayan değişiklikler olduğu ileri sürülmüştür. Ayrıca *Arabidopsis*'te bir GST geni olan *AtGSTF2*'nin aşırı ekspresyonunun bitkilerde fenol stresine karşı tolerans sağladığı bildirilmiştir (Sappl ve diğ., 2009). Başka bir çalışmada ise tütün bitkisinde GST enzimlerini kodlayan genlerin artan anlatımı nedeniyle kloroplast antioksidan savunma

sisteminin de arttırıldığı raporlanmıştır (Le Martret ve diğ., 2011). GST'lerin oksidatif stres metabolizmasının düzenlenmesine yardımcı olan antioksidan enzimlerin en önemlilerinden biri olduğu kabul edilmiştir. Benzer şekilde, transgenik tütün bitkilerinde anlatımı sağlanan *GmGSTU4* geninin tuz stresi ve herbisit stresine karşı tolerans sağladığı gözlemlenmiştir (Kissoudis ve diğ., 2015). GST enzimleri temel olarak GSH ile hareket ederek lipid peroksidleri ve hücrede biriken ROS'ları ortadan kaldırır. Bu tez çalışmasında literatürle uyumlu olarak *L. esculentum* kök dokusunda proteozom inhibisyonuna yanıt olarak teta sınıfına ait olan *SLGST* geninin anlatımı 2.63 kat, yaprakta ise *SLGST* geninin anlatımının 5.45 kat arttığı gözlemlenmiştir. Bu anlamlı artışların sebebi olarak *L. esculentum* kök ve yaprak dokusunda oksidatif stres metabolizmasının en önemli antioksidan enzimlerinden biri olan GST aktivitesinin artırılarak proteozom inhibisyonunun sebep olduğu ROS'ların detoksifikasyonunu sağladığı söylenebilir.

GPXle-1, glutasyon peroksidaz aktivitesi gösteren, mitokondri ve sitoplazmada bulunan antioksidan protein yapıda bir GPX izoformudur. GPXle-1 diğer GPX formlarına benzer şekilde oksidatif stres yanıtıyla ilişkilendirilmiştir. Yapılan çalışmalar, bitki GPX'lerinin, tuz, kuraklık, ısı, soğuk ve oksidatif stres gibi çeşitli abiyotik streslere karşı bitki yanıtlarını düzenlemede önemli roller oynadığını göstermiştir. Çeşitli organizmalarda GPX mRNA seviyesinin stres koşullarından etkilendiği bilinmektedir (Sugimoto ve Sakamoto, 1997). Arpada (*Hordeum vulgare*) ozmotik veya metil viyolojen kaynaklı stres altında iki GPX izoformunun anlatımı artmıştır (Churin, Schilling ve Börner, 1999). Yapılan başka bir çalışmada *Arabidopsis*'te sekiz GPX geni tanımlanmıştır. Bunların çoğu sadece *Arapidopsis* (WT) bitkilerinde değil, aynı zamanda *atgpx* mutantlarında da tuz ve kuraklık streslerine karşı farklı derecelerde düzenlenmiştir (Islam ve diğ., 2015; Bela ve diğ., 2018). *Pennisetum glaucum*'da ise *PgGPX* gen anlatımı, tuzluluk ve kuraklık streslerine yanıt olarak belirgin şekilde artmıştır (Islam, Manna ve Reddy, 2015). GPX enzimlerinin H₂O₂ üzerine aktivite göstererek oksidatif hasara karşı yanıt oluşturduğu bilinmektedir. Aynı zamanda GSH ile hareket ederek lipid hidroperoksidlerin yıkımını sağlar ve hücrel hasarın engellenmesinde rol oynar (Muller ve diğ., 2007; Sen ve Chakraborty, 2011). GPX genlerinin anlatımı veya antioksidan aktivitesi genellikle strese tepki olarak artar. Bu tez çalışmasında *L. esculentum*'da bulunan ve GPXle-1 izoformunu kodlayan *SLGPX* geninin anlatımı yaprak dokusunda literatürle uyumlu olarak 2.71 kat artmıştır. Bu artışın sebebinin proteozom inhibisyonu sonucu oluşan H₂O₂ ve lipid hidroperoksidlerinin yıkımını sağlamak olduğu düşünülmektedir.

Bitkilerde abiyotik ve biyotik stres koşullarında genel olarak *SLCu/Zn-SOD* geninin artışı bildirilmiştir. *Arabidopsis*'te yapılan bir çalışmada tuz stresine maruz kalan kök ve yapraklarda *SLCu/Zn-SOD* geninin anlatımının arttığı gözlemlenmiştir (Wu ve diğ., 2016). Bunun yanında çeşitli SOD izoformlarının aşırı anlatımının oksidatif strese ve diğer çevresel streslere karşı toleransı arttırdığı *Arabidopsis*, yonca, pirinç, patates, kavak ve tütün gibi birçok bitki türünde bildirilmiştir (Van Camp ve diğ., 1994). Başka bir çalışmada transgenik tütün bitkilerinde yeni bir Cu/Zn-SOD geni olan *SiCSD*'nin aşırı anlatımı kuraklık, donma ve oksidatif streslere tolerans sağlayarak katalaz aktivitesini de arttırdığı gözlemlenmiştir (Zhang ve diğ., 2017). Cu/Zn-SOD enzimi yalnızca ökartotlarda bulunur ve bitkilerde çeşitli formları bilinmektedir. Bu tez çalışmasında *L. esculentum*'da Cu/Zn-SOD3 formunu kodlayan *SLCu/Zn-SOD* geni çalışılmıştır. Proteozom inhibisyonu sonucunda literatürle uyumlu olarak yaprak dokusunda *SLCu/Zn-SOD* gen anlatımının 2.43 kat arttığı gözlemlenmiştir. Cu/Zn-SOD enzimi oksidatif stres sonucu oluşan süperoksit radikalini H_2O_2 ve moleküler oksijene dönüşüm reaksiyonunu katalizler. Daha sonra oluşan H_2O_2 'nin, APX ve CAT enzimleriyle oksijen ve suya dönüşümünü sağlamış olur. Bu çalışmada da proteozom inhibisyonunun sonucu olarak hücrelerde artan süperoksit radikalinin dönüşümü için *SLCu/Zn-SOD* gen anlatımının artarak antioksidan savunma yanıtı oluşturduğu söylenebilir.

Yapılan çalışmalarda proteozom inhibisyonunun sonucu olarak hücrelerde ROS üretiminin arttığı görülmüştür. Proteozom inhibisyonu stresi sonucunda oluşan ve yüksek düzeylere ulaşan ROS'u zararsız bileşiklere dönüştüren antioksidan enzim aktiviteleri, bitkilerde oksidatif strese karşı etkili olan en önemli dayanım mekanizmaları olarak işlev görmektedir. Bununla birlikte proteozomların ROS üretiminin doğrudan düzenleyici mekanizması olarak işlev gördüğü düşünülmektedir. Bu çalışmadan elde edilen verilerin bitkilerde antioksidan sistem yanıtı ve proteozom sistemi arasındaki bağlantının aydınlatılmasına kaynak oluşturabileceği ve daha sonra yapılacak çalışmalara yön verebileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abewoy Fentik, D. (2017) "Review on Genetics and Breeding of Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill)", *Advances in Crop Science and Technology*, 5(5): 306.
- Ahuja, J. S. ve diğ. (2017) "Control of meiotic pairing and recombination by chromosomally tethered 26S proteasome", *Science*, 355(6323):408-411.
- Alscher, R. G., Erturk, N. ve Heath, L. S. (2002) "Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants", içinde *Journal of Experimental Botany*, 53, 1331–1341.
- Alwine, J. C., Kemp, D. J. ve Stark, G. R. (1977) "Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes.", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12): 5350–5354.
- Amerik, A. Y. ve Hochstrasser, M. (2004) "Mechanism and function of deubiquitinating enzymes", *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1695(1-3):189-207.
- An, B. ve diğ. (1998) "Novel dipeptidyl proteasome inhibitors overcome Bcl-2 protective function and selectively accumulate the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 and induce apoptosis in transformed, but not normal, human fibroblasts", *Cell Death and Differentiation*, 5(12):1062-75.
- Arisi, A. C. M. ve diğ. (1998) "Overexpression of iron superoxide dismutase in transformed poplar modifies the regulation of photosynthesis at low CO₂ partial pressures or following exposure to the prooxidant herbicide methyl viologen", *Plant Physiology*, 117(2): 565–574.
- Avcı Duman, Y., Acemi, A., Toygar, H., Yüzügüllü, Y., Özen, F. (2016) Investigation of Antioxidant Enzymes of *Amsonia orientalis* in the Presence of Salt Stress and BAP/Tuz Stresi ve BAP Varlığında *Amsonia orientalis*'in Antioksidan Enzimlerinin İncelenmesi. *Celal Bayar University Journal of Science*, 12 (3), 543-551.
- Avsian-Kretchmer, O. ve diğ. (1999) "Regulation of stress-induced phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase expression in citrus", *Planta*, 209: 469-477.
- Avsian-Kretchmer, O. ve diğ. (2004) "The salt-stress signal transduction pathway that activates the gpx1 promoter is mediated by intracellular H₂O₂, different from the pathway induced by extracellular H₂O₂", *Plant Physiology*, 135(3): 1685–1696.
- Bai, Y. ve Lindhout, P. (2007) "Domestication and breeding of tomatoes: What have we gained and what can we gain in the future?", *Annals of Botany*, 100(5): 1085–1094.
- Balasundram, N., Sundram, K. ve Samman, S. (2006) "Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses", *Food Chemistry*, 99(1):191-203.
- Bannister, J. V., Bannister, W. H. ve Rotilio, G. (1987) "Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase", *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular*

Biology, 22, 111-180.

Bartoli, C. G., Pastori, G. M. ve Foyer, C. H. (2000) "Ascorbate biosynthesis in mitochondria is linked to the electron transport chain between complexes III and IV", *Plant Physiology*, 123:335–343.

Bassi, R. ve diğ. (1987) "Chlorophyll-proteins of the photosystem II antenna system.", *The Journal of biological chemistry*, 262(27):13333-41.

Beers, E. P., Woffenden, B. J. ve Zhao, C. (2000) "Plant proteolytic enzymes: Possible roles during programmed cell death", *Plant Molecular Biology*, 44:399–415.

Blokhina, O., Virolainen, E. ve Fagerstedt, K. V. (2003) "Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review", *Annals of Botany*, 91:179-94.

Boo, Y. C. ve Jung, J. (1999) "Water deficit - Induced oxidative stress and antioxidative defenses in rice plants", *Journal of Plant Physiology*, 155:255-261.

Bose, J., Rodrigo-Moreno, A. ve Shabala, S. (2014) "ROS homeostasis in halophytes in the context of salinity stress tolerance", *Journal of Experimental Botany*, 65(5):1241-57.

Callis, J. ve diğ. (1995) "Structure and evolution of genes encoding polyubiquitin and ubiquitin- like proteins in *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia", *Genetics*, 139(2):921-39.

Callis, J., Raasch, J. A. ve Vierstra, R. D. (1990) "Ubiquitin extension proteins of *Arabidopsis thaliana*. Structure, localization, and expression of their promoters in transgenic tobacco", *Journal of Biological Chemistry*, 265(21):12486-93.

Van Camp, W. ve diğ. (1996) "Enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants overproducing Fe-superoxide dismutase in chloroplasts", *Plant Physiology*, 112(4):1703-1714.

Capron, A., Ökrész, L. ve Genschik, P. (2003) "First glance at the plant APC/C, a highly conserved ubiquitin-protein ligase", *Trends in Plant Science*, 8 (2): 83-89.

Chance, B. (1948) "The enzyme-substrate compounds of catalase and peroxides", *Nature*, 161:914–917.

Chance, B. (1950) "The Properties of the Enzyme-Substrate Compounds of Lactoperoxidase", *Journal of the American Chemical Society*, 72 (4): 1577-1583.

Chance, B., Greenstein, D. S. ve Roughton, F. J. W. (1952) "The mechanism of catalase action. I. Steady-state analysis", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 37(2):301–321.

Chang, C. C. C. ve diğ. (2009) "*Arabidopsis* chloroplastic glutathione peroxidases play a role in cross talk between photooxidative stress and immune responses", *Plant Physiology*, 150(2): 670–683.

Chau, V. ve diğ. (1989) "A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein", *Science*, 243(4898): 1576-83.

Cheema, D. S. ve Dhaliwal, M. S. (2004) "Hybrid tomato breeding", *Journal of New Seeds*, 6(2):1-14.

Cheeseman, J. M. ve diğ. (1997) "Photosynthesis and photoprotection in mangroves under field conditions", *Plant, Cell and Environment*, 20(5):579-588.

Chen, I. H. ve diğ. (2013) "The glutathione transferase of *Nicotiana benthamiana* NbGSTU4 plays a role in regulating the early replication of Bamboo mosaic virus", *New Phytologist*, 199: 749–757.

Chen, S. ve diğ. (2004) "Tomato phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits cell death induced by bax and oxidative stresses in yeast and plants", *Plant Physiology*, 135(3): 1630–1641.

Choudhury, F. K. ve diğ. (2017) "Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination", *Plant Journal*, 90(5):856-867.

Churin, Y., Schilling, S. ve Börner, T. (1999) "A gene family encoding glutathione peroxidase homologues in *Hordeum vulgare* (barley)", *FEBS Letters*, 459: 33-38.

Ciechanover, A. ve diğ. (1980) "ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation.", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(3): 1365–1368.

Ciechanover, A., Finley, D. ve Varshavsky, A. (1985) "Mammalian cell cycle mutant defective in intracellular protein degradation and ubiquitin-protein conjugation.", *Progress in clinical and biological research*, 180: 17-31.

Claeys, H. ve diğ. (2014) "What Is Stress? Dose-response effects in commonly used in vitro stress assays", *Plant Physiology*, 165: 519–527.

Coghlan, J. P. ve diğ. (1984) "Hybridization histochemistry: Use of recombinant DNA for tissue localizations of specific mRNA populations", *Clinical and Experimental Hypertension*, 6 (1-2):63-78.

Collakova, E. ve DellaPenna, D. (2003) "The Role of Homogentisate Phytlyltransferase and Other Tocopherol Pathway Enzymes in the Regulation of Tocopherol Synthesis during Abiotic Stress", *Plant Physiology*, 133(2): 930–940.

Conklin, P. L. (2001) "Recent advances in the role and biosynthesis of ascorbic acid in plants", *Plant, Cell and Environment*, 24: 383-394.

Criqui, M. C. ve diğ. (1992) "Isolation and characterization of a plant cDNA showing homology to animal glutathione peroxidases", *Plant Molecular Biology*, 18: 623–627.

Csiszár, J. ve diğ. (2014) "Glutathione transferase supergene family in tomato: Salt stress-regulated expression of representative genes from distinct GST classes in plants primed with salicylic acid", *Plant Physiology and Biochemistry*, 78: 15-26.

Das, K. ve Roychoudhury, A. (2014) "Reactive oxygen species (ROS) and response of

antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants”, *Frontiers in Environmental Science*, 53: (2) 1-11.

Depège, N., Drevet, J. ve Boyer, N. (1998) “Molecular cloning and characterization of tomato cDNAs encoding glutathione peroxidase-like proteins”, *European Journal of Biochemistry*, 253(2): 445-451.

DeRidder, B. P. ve diğ. (2002) “Induction of glutathione S-transferases in *Arabidopsis* by herbicide safeners”, *Plant Physiology*, 130(3): 1497–1505.

Dixon, D. P., Sellars, J. D. ve Edwards, R. (2011) “The *Arabidopsis* phi class glutathione transferase AtGSTF2: Binding and regulation by biologically active heterocyclic ligands”, *Biochemical Journal*, 438(1):63-70.

Drexler, H. C. A. (1997) “Activation of the cell death program by inhibition of proteasome function”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(3): 855–860.

Dreyer, B. H. ve Schippers, J. H. M. (2019) “Copper-Zinc Superoxide Dismutases in Plants: Evolution, Enzymatic Properties, and Beyond”, içinde *Annual Plant Reviews online*, 2, 1–36.

Dubey, S. ve diğ. (2010) “Transcriptomic and metabolomic shifts in rice roots in response to Cr (VI) stress”, *BMC Genomics*, 11(1).

Dubreuil-Maurizi, C. ve Poinssot, B. (2012) “Role of glutathione in plant signaling under biotic stress”, *Plant Signaling and Behavior*, 7(2): 210–212.

Edwards, E. A., Rawsthorne, S. ve Mullineaux, P. M. (1990) “Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.)”, *Planta*, 180(2):278-84.

Etlinger, J. D. ve Goldberg, A. L. (1977) “A soluble ATP dependent proteolytic system responsible for the degradation of abnormal proteins in reticulocytes”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(1): 54–58.

FAOSTAT, F. (2017) “Available online: <http://www.fao.org/faostat/en/>”, *QC* (accessed on Oct 17, 2019).

Foolad, M. R. (2007) “Genome mapping and molecular breeding of tomato”, *International Journal of Plant Genomics*, 2007: 64358.

Foyer, C. H. ve diğ. (1995) “Overexpression of glutathione reductase but not glutathione synthetase leads to increases in antioxidant capacity and resistance to photoinhibition in poplar trees”, *Plant Physiology*, 109: 1047-1 057.

Foyer, C. H. ve diğ. (1997) “Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling”, *Physiologia Plantarum*, 100(2): 241-254.

Foyer, C. H. ve Noctor, G. (2005) “Redox homeostasis and antioxidant signaling: A metabolic interface between stress perception and physiological responses”, *Plant Cell*, 17(7):1866-75.

- Fraga, D., Meulia, T. ve Fenster, S. (2014) "Real-Time PCR", *Current Protocols in Essential Laboratory Techniques*, 8(1): 10.3.1-10.3.40.
- Fraser, P. D. ve diğ. (2007) "Manipulation of phytoene levels in tomato fruit: Effects on isoprenoids, plastids, and intermediary metabolism", *Plant Cell*, 19(10): 3194-211.
- Fridovich, I. (1995) "Superoxide Radical and Superoxide Dismutases", *Annual Review of Biochemistry*, 64(1):97-112.
- Frova, C. (2003) "The plant glutathione transferase gene family: Genomic structure, functions, expression and evolution", *Physiologia Plantarum*, 119(4): 469-479.
- Frova, C. (2006) "Glutathione transferases in the genomics era: New insights and perspectives", *Biomolecular Engineering*, 23(4):149-169.
- Fryer, M. J. ve diğ. (1998) "Relationship between CO₂ Assimilation, Photosynthetic Electron Transport, and Active O₂ Metabolism in Leaves of Maize in the Field during Periods of Low Temperature", *Plant Physiology*, 116: 571-580.
- Fu, H. ve diğ. (1998) "Molecular organization of the 20S proteasome gene family from *Arabidopsis thaliana*", *Genetics*, 149(2): 677-692.
- Gall, J. G. ve Pardue, M. L. (1969) "Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations.", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 63(2): 378-383.
- Gao, Q. ve Zhang, L. (2008) "Ultraviolet-B-induced oxidative stress and antioxidant defense system responses in ascorbate-deficient vtc1 mutants of *Arabidopsis thaliana*", *Journal of Plant Physiology*, 165(2):138-148.
- Genschik, P. ve diğ. (1998) "Cell cycle-dependent proteolysis in plants: Identification of the destruction box pathway and metaphase arrest produced by the proteasome inhibitor MG132", *Plant Cell*, 10: 2063-2075.
- Ghisla, S. ve Massey, V. (1989) "Mechanisms of flavoprotein-catalyzed reactions", *European Journal of Biochemistry*, 22: 6807-6816.
- Gill, S. S. ve Tuteja, N. (2010) "Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants", *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12): 909-30.
- Giovannucci, E. (1999) "Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: Review of the epidemiologic literature", *Journal of the National Cancer Institute*, 91(4): 317-331.
- Goldstein, G. ve diğ. (1975) "Isolation of a polypeptide that has lymphocyte differentiating properties and is probably represented universally in living cells", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(1): 11-15.
- Gregory, E. M., Yost, F. J. ve Fridovich, I. (1973) "Superoxide dismutases of *Escherichia coli*: intracellular localization and functions", *Journal of Bacteriology*, 115(3): 987-991.

- Grune, T. ve diğ. (1998) "Peroxynitrite increases the degradation of aconitase and other cellular proteins by proteasome", *Journal of Biological Chemistry*, 273: 10857-10862.
- Grusak, M. A. ve DellaPenna, D. (1999) "Improving The Nutrient Composition Of Plants To Enhance Human Nutrition and Health", *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50: 133-161.
- Guo, N. ve Peng, Z. (2013) "MG132, a proteasome inhibitor, induces apoptosis in tumor cells", *Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology*, 9: 6–11.
- Haber, F. ve Weiss, J. (1932) "Über die Katalyse des Hydroperoxydes", *Die Naturwissenschaften*, 20: 948–950.
- Halliwell, B. (2006) "Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life", *Plant Physiology*, 141(2):312-22.
- Halliwell, B. ve Gutteridge, J. M. C. (1984) "Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease", *Biochemical Journal*, 219(1): 1–14.
- Han, C., Liu, Q. ve Yang, Y. (2009) "Short-term effects of experimental warming and enhanced ultraviolet-B radiation on photosynthesis and antioxidant defense of *Picea asperata* seedlings", *Plant Growth Regulation*, 58(2): 153–162.
- Han, Y. H. ve Park, W. H. (2010) "MG132, a proteasome inhibitor decreased the growth of Calu-6 lung cancer cells via apoptosis and GSH depletion", *Toxicology in Vitro*, 24: 1237–1242.
- Hartmann-Petersen, R. ve Gordon, C. (2004) "Protein degradation: Recognition of ubiquitinated substrates", *Current Biology*, 14: 754–756.
- Hartmann-Petersen, R., Seeger, M. ve Gordon, C. (2003) "Transferring substrates to the 26S proteasome", *Trends in Biochemical Sciences*, 28: 26-31.
- Hayashi, M., Saito, Y. ve Kawashima, S. (1992) "Calpain activation is essential for membrane fusion of erythrocytes in the presence of exogenous Ca^{2+} ", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 182(2):939-946.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R. ve Bobilya, D. J. (2002) "Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships", *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10): 572-584.
- Heinemeyer, W. ve diğ. (1997) "The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing", *Journal of Biological Chemistry*, 272: 25200-25209.
- Herbette, S. ve diğ. (2002) "Two GPX-like proteins from *Lycopersicon esculentum* and *Helianthus annuus* are antioxidant enzymes with phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and thioredoxin peroxidase activities", *European Journal of Biochemistry*, 269(9):2414-2420.

Hernández, J. A. ve diğ. (2001) “Antioxidant systems and $O_2\cdot^-/H_2O_2$ production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins”, *Plant Physiology*, 127(3): 817–831.

Hershko, A. ve diğ. (1980) “Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis.”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(4):1783-1786.

Hershko, A. ve Ciechanover, A. (1998) “The Ubiquitin System”, *Annual Review of Biochemistry*, 7:425-479.

Hershko, A., Ciechanover, A. ve Rose, I. A. (1979) “Resolution of the ATP dependent proteolytic system from reticulocytes: A component that interacts with ATP”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(7): 3107–3110.

Higuchi, R. ve diğ. (1993) “Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions”, *Bio/Technology*, 11(9):1026-30.

Hilt, W. ve Wolf, D. H. (1996) “Proteasomes: Destruction as a programme”, *Trends in Biochemical Sciences*, 21(3): 96-102.

Van der Hoeven, R. ve diğ. (2002) “Deductions about the number, organization, and evolution of genes in the tomato genome based on analysis of a large expressed sequence tag collection and selective genomic sequencing”, *Plant Cell*, 14(7):1441-56.

Holm, R. H., Kennepohl, P. ve Solomon, E. I. (1996) “Structural and functional aspects of metal sites in biology”, *Chemical Reviews*, 96(7): 2239-2314.

Horner, H. T. ve diğ. (2007) “Amyloplast to chromoplast conversion in developing ornamental tobacco floral nectaries provides sugar for nectar and antioxidants for protection”, *American Journal of Botany*, 94(1):12-24.

Horvath, G. ve diğ. (2006) “Differential distribution of tocopherols and tocotrienols in photosynthetic and non-photosynthetic tissues”, *Phytochemistry*, 67(12): 1185-1195.

Howitt, C. A. ve Pogson, B. J. (2006) “Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues”, *Plant, Cell and Environment*, 29: 435-445.

Huang, C. H. ve diğ. (2012) “Copper chaperone-dependent and -independent activation of three copper-zinc superoxide dismutase homologs localized in different cellular compartments in *Arabidopsis*”, *Plant Physiology*, 158(2): 737–746.

Huang, G. Y. ve diğ. (2010) “The effect of multiple heavy metals on ascorbate, glutathione and related enzymes in two mangrove plant seedlings (*Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorrhiza*)”, *Oceanological and Hydrobiological Studies*, 39(1): 11-25.

Huffaker, R. C. (1990) “Proteolytic activity during senescence of plants”, *New Phytologist*, 116(2): 199-231.

Ito, A. ve diğ. (1975) “Synthetic Study of Peptide Aldehydes”, *Chemical and Pharmaceutical*

Bulletin, 23(12): 3106–3113.

Iturbe-Ormaetxe, I. ve diğ. (1998) “Oxidative damage in pea plants exposed to water deficit or paraquat”, *Plant Physiology*, 116: 173–181.

Gutteridge, J. M., Halliwell, B. (2000) “Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future”, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899(1):136 - 147.

Jäger, S. ve diğ. (1999) “Proteasome β -type subunits: Unequal roles of propeptides in core particle maturation and a hierarchy of active site function”, *Journal of Molecular Biology*, 291(4):997-1013.

Jenkins, J. A. (1948) “The origin of the cultivated tomato”, *Economic Botany*, 2: 379–392.

Jia, B. ve diğ. (2016) “Overexpression of *GsGSTU13* and *SCMRP* in *Medicago sativa* confers increased salt-alkaline tolerance and methionine content”, *Physiologia Plantarum*, 156(2):176-189.

Jiang, X. ve diğ. (2012) “Ubiquitin-Induced Oligomerization of the RNA Sensors RIG-I and MDA5 Activates Antiviral Innate Immune Response”, *Immunity*, 36(6): 959-73.

Jiménez, A. ve diğ. (1997) “Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves”, *Plant Physiology*, 114: 275-284.

John, H. A., Birnstiel, M. L. ve Jones, K. W. (1969) “RNA-DNA hybrids at the cytological level”, *Nature*, 223: 582–587.

Kadota, Y. ve diğ. (2005) “Cell-cycle-dependent regulation of oxidative stress responses and Ca^{2+} permeable channels NtTPC1A/B in tobacco BY-2 cells”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 336(4):1259-1267.

Kam, Y. ve Quaranta, V. (2009) “Cadherin-bound β -catenin feeds into the Wnt pathway upon adherens junctions dissociation: Evidence for an intersection between β -catenin pools”, *PLoS ONE*, 4(2): e4580.

Kamauchi, S. ve diğ. (2005) “Gene expression in response to endoplasmic reticulum stress in *Arabidopsis thaliana*”, *FEBS Journal*, 272: 3461–3476.

Kanematsu, S. ve Asada, K. (1979) “Ferric and manganic superoxide dismutases in *Euglena gracilis*”, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 195(2): 535-545.

Kim, M. ve diğ. (2003) “Activation of the programmed cell death pathway by inhibition of proteasome function in plants”, *Journal of Biological Chemistry*, 278: 19406-19415.

Kim, S. I., Andaya, V. C. ve Tai, T. H. (2011) “Cold sensitivity in rice (*Oryza sativa* L.) is strongly correlated with a naturally occurring I99V mutation in the multifunctional glutathione transferase isoenzyme GSTZ2”, *Biochemical Journal*, 435 (2): 373–380.

Kirkman, H. N. ve Gaetani, G. F. (1984) “Catalase: A tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United*

States of America, 81(14): 4343–4347.

Kisselev, A. F. ve Goldberg, A. L. (2001) “Proteasome inhibitors: From research tools to drug candidates”, *Chemistry and Biology*, 8(8): 739-758.

Kitajima S. Hydrogen peroxide-mediated inactivation of two chloroplastic peroxidases, ascorbate peroxidase and 2-cys peroxiredoxin. *Photochem. Photobiol*, 84(6): 1404-9.

Krieger-Liszkay, A., Fufezan, C. ve Trebst, A. (2008) “Singlet oxygen production in photosystem II and related protection mechanism”, *Photosynthesis Research*, 98(1-3):551-64.

Kubista, M. ve diğ. (2006) “The real-time polymerase chain reaction”, *Molecular Aspects of Medicine*, 27(2-3):95-125.

Kumeda, S. I. ve diğ. (1999) “Induction of G1 arrest and selective growth inhibition by lactacystin in human umbilical vein endothelial cells”, *Anticancer Research*, 19(5): 3961-8.

Kwiatowski, J., Safianowska, A. ve Kaniuga, Z. (1985) “Isolation and characterization of an iron-containing superoxide dismutase from tomato leaves, *Lycopersicon esculentum*”, *European Journal of Biochemistry*, 146(2): 459-466.

Lam, Y. A. ve diğ. (1997) “Editing of ubiquitin conjugates by an isopeptidase in the 26S proteasome”, *Nature*, 385: 737–740.

Larson, R. A. (1988) “The antioxidants of higher plants”, *Phytochemistry*. 27(4): 969-978.

Le Martret, B. ve diğ. (2011) “Tobacco chloroplast transformants expressing genes encoding dehydroascorbate reductase, glutathione reductase, and glutathione-s-transferase, exhibit altered anti-oxidant metabolism and improved abiotic stress tolerance”, *Plant Biotechnology Journal*, 9(6):661-73.

Ledford, H. K. ve diğ. (2004) “Comparative profiling of lipid-soluble antioxidants and transcripts reveals two phases of photo-oxidative stress in a xanthophyll-deficient mutant of *Chlamydomonas reinhardtii*”, *Molecular Genetics and Genomics*, 272(4): 470-479.

Lenucci, M. S. ve diğ. (2006) “Antioxidant composition in cherry and high-pigment tomato cultivars”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(7): 2606-2613.

Leung, D. W. M. (2018) “Studies of catalase in plants under abiotic stress”, içinde *Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plants*, 2018: 27-39.

Li, W. J. ve diğ. (2000) “Molecular cloning and expression of a phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase homolog in *Oryza sativa*”, *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*, 1493(1-2): 225-30.

Li, X. ve Imlay, J. A. (2018) “Improved measurements of scant hydrogen peroxide enable experiments that define its threshold of toxicity for *Escherichia coli*”, *Free Radical Biology and Medicine*, 120: 217–227.

Lichtenthaler, H. K. (1998) “The stress concept in plants: An introduction”, içinde *Annals of*

the New York Academy of Sciences, 851(1): 187-198.

Linnaeus, C. (1753) "Linnaeus", *Species Plantarum*, 1753: 561-1200.

Lippai, M. ve Low, P. (2014) "The role of the selective adaptor p62 and ubiquitin-like proteins in autophagy", *BioMed Research International*. doi: 10.1155/2014/832704, (1):832704.

Liu K.L., Shen L., Wang J.Q., Sheng J.P. Rapid inactivation of chloroplastic ascorbate peroxidase is responsible for oxidative modification to Rubisco in tomato (*Lycopersicon esculentum*) under cadmium stress. *J. Integr. Plant Biol*, 50(4): 415–426.

Liu, Z.J., Zhang, X.L., Bai, J.G., Suo, B.X., Xu, P.L., Wang, L. (2009). "Exogenous paraquat changes antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in drought-stressed cucumber leaves", *Scientia Horticulturae*, 121(2): 138-143.

Llobet, D. ve diğ. (2008) "Antioxidants block proteasome inhibitor function in endometrial carcinoma cells", *Anti-Cancer Drugs*, 19(2):115-24.

Lobo, V. ve diğ. (2010) "Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health", *Pharmacognosy Reviews*, 4(8): 118–126.

Loew, O. (1900) "A New Enzyme Of General Occurrence In Organisms", *Science*, 249(11): 701-702.

Lopes, U. G. ve diğ. (1997) "p53-dependent induction of apoptosis by proteasome inhibitors", *Journal of Biological Chemistry*, 272: 12893-12896.

Lopez, A. B. ve diğ. (2008) "Effect of the cauliflower or transgene on carotenoid accumulation and chromoplast formation in transgenic potato tubers", *Journal of Experimental Botany*, 59(2):213-23.

Luckwill, L. C. (1939) "Observations on heterosis in *Lycopersicum*", *Journal of Genetics*, 37: 421.

Madhusudhan, R. ve diğ. (2003) "Characterization of an ascorbate peroxidase in plastids of tobacco BY-2 cells", *Physiologia Plantarum*, 117(4): 550-557.

Maeda, H. ve DellaPenna, D. (2007) "Tocopherol functions in photosynthetic organisms", *Current Opinion in Plant Biology*, 10(3):260-265.

Maheshwari, R. ve Dubey, R. S. (2009) "Nickel-induced oxidative stress and the role of antioxidant defence in rice seedlings", *Plant Growth Regulation*, 59: 37–49.

Mantri, N. ve diğ. (2012) "Abiotic Stress Responses in Plants: Present and Future", *Abiotic Stress Responses in Plants*, 2011: 1-19.

Marrs, K. A. (1996) "The functions and regulation of glutathione s-transferases in plants", *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47:127-158.

Martinez, V. ve diğ. (2018) "Tolerance to Stress Combination in Tomato Plants: New Insights in the Protective Role of Melatonin", *Molecules*, 23(3): 535.

- Di Mascio, P., Murphy, M. E. ve Sies, H. (1991) "Antioxidant defense systems: The role of carotenoids, tocopherols, and thiols", in *American Journal of Clinical Nutrition*, 53(1): 194-200.
- McCormick, S. ve diğ. (1986) "Leaf disc transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens*", *Plant Cell Reports*, 5(2): 81-84.
- McGonigle, B. ve diğ. (2000) "A genomics approach to the comprehensive analysis of the glutathione S-transferase gene family in soybean and maize", *Plant Physiology*, 124(3): 1105-1120.
- Meriin, A. B. ve diğ. (1998) "Proteasome inhibitors activate stress kinases and induce Hsp72. Diverse effects on apoptosis", *Journal of Biological Chemistry*, 273(11):6373-9.
- Mhamdi, A. ve diğ. (2010) "*Arabidopsis* Glutathione Reductase1 plays a crucial role in leaf responses to intracellular hydrogen peroxide and in ensuring appropriate gene expression through both salicylic acid and jasmonic acid signaling pathways", *Plant Physiology*, 153(3):1144-60.
- Miao, Y. ve diğ. (2006) "An *Arabidopsis* glutathione peroxidase functions as both a redox transducer and a scavenger in abscisic acid and drought stress responses", *Plant Cell*, 18(10): 2749-2766.
- Miller, P. (1754) *The Gardeners Dictionary*, London, UK.
- Miller, P. (1807) *The gardener's and botanist's dictionary*, posthumous edition. ed. *Thomas Martyn. F.C. and J. Rivington*, London.
- Mishra, P., Bhoomika, K. ve Dubey, R. S. (2013) "Differential responses of antioxidative defense system to prolonged salinity stress in salt-tolerant and salt-sensitive Indica rice (*Oryza sativa* L.) seedlings", *Protoplasma*, 250(1): 3-19.
- Mishra, S., Jha, A. B. ve Dubey, R. S. (2011) "Arsenite treatment induces oxidative stress, upregulates antioxidant system, and causes phytochelatin synthesis in rice seedlings", *Protoplasma*, 248(3):565-77.
- Mittler, R. (2002) "Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance", *Trends in Plant Science*, 7(9): 405-10.
- Mittler, R. ve Zilinskas, B. A. (1991) "Purification and characterization of pea cytosolic ascorbate peroxidase", *Plant Physiology*, 97(3): 962-8.
- Mittler, R. ve Zilinskas, B. A. (1992) "Molecular cloning and characterization of a gene encoding pea cytosolic ascorbate peroxidase", *Journal of Biological Chemistry*, 267(30): 21802-7.
- Møller, I. M., Jensen, P. E. ve Hansson, A. (2007) "Oxidative Modifications to Cellular Components in Plants", *Annual Review of Plant Biology*, 58(1): 459-81.

- Moo-Huchin, V. M. ve diğ. (2015) “Antioxidant compounds, antioxidant activity and phenolic content in peel from three tropical fruits from Yucatan, Mexico”, *Food Chemistry*, 1;166: 17-22.
- Morgan, M. J. ve diğ. (2008) “Decrease in manganese superoxide dismutase leads to reduced root growth and affects tricarboxylic acid cycle flux and mitochondrial redox homeostasis”, *Plant Physiology*, 147(1): 101–114.
- Mosa, K. A., Ismail, A. ve Helmy, M. (2017) “Introduction to Plant Stresses”, Issn: 2193-4746, 1-19.
- Muller, F. L. ve diğ. (2007) “Trends in oxidative aging theories”, *Free Radical Biology and Medicine*, 43: 477–503.
- Mullineaux, P. M. ve diğ. (1998) “Identification of cDNAs encoding plastid-targeted glutathione peroxidase”, *Plant Journal*, 13(3): 375-379.
- Munné-Bosch, S. ve Alegre, L. (2002a) “Interplay between ascorbic acid and lipophilic antioxidant defences in chloroplasts of water-stressed *Arabidopsis* plants”, *FEBS Letters*, 524(1-13): 145-148.
- Munné-Bosch, S. ve Alegre, L. (2002b) “The function of tocopherols and tocotrienols in plants”, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21(1), 31–57.
- Murashige, T. ve Skoog, F. (1962) “A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures”, *Physiologia Plantarum*, 15(3): 473-497.
- Nakamura, J., Purvis, E. R. ve Swenberg, J. A. (2003) “Micromolar concentrations of hydrogen peroxide induce oxidative DNA lesions more efficiently than millimolar concentrations in mammalian cells”, *Nucleic Acids Research*, 31(6):1790-1795.
- Nandi, D. ve diğ. (2006) “The ubiquitin-proteasome system”, *Journal of Biosciences*, 31(1):137-55.
- Nassiri, M. ve diğ. (2018) “Evaluation of different statistical methods using SAS software: an in silico approach for analysis of real-time PCR data”, *Journal of Applied Statistics*, 45(2): 306-319.
- Navrot, N. ve diğ. (2006) “Plant glutathione peroxidases are functional peroxiredoxins distributed in several subcellular compartments and regulated during biotic and abiotic stresses”, *Plant Physiology*, 142(4):1364-79.
- Neill, S., Desikan, R. ve Hancock, J. (2002) “Hydrogen peroxide signalling”, *Current Opinion in Plant Biology*, 5(5):388-395.
- Noctor, G. ve Foyer, C. H. (1998a) “Ascorbate And Glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control”, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49:249-279.
- Obafemi, Y. D. ve diğ. (2019) “Isolation of polygalacturonase-producing bacterial strain from tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.)”, *International Journal of Microbiology*, 2019(4):

1-9.

Obeng, E. A. ve diğ. (2006) “Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells”, *Blood*, 107(12): 4907–4916.

Orlowski, R. Z. ve diğ. (1998) “Tumor growth inhibition induced in a murine model of human Burkitt’s lymphoma by a proteasome inhibitor”, *Cancer Research*, 58(19): 4342-8.

Pang, C.-H. ve Wang, B.-S. (2008) “Oxidative Stress and Salt Tolerance in Plants”, Issn: 0340-4773, 231-245.

Parida, A. K., Das, A. B. ve Mohanty, P. (2004) “Investigations on the antioxidative defence responses to NaCl stress in a mangrove, *Bruguiera parviflora*: Differential regulations of isoforms of some antioxidative enzymes”, *Plant Growth Regulation*, 42(3): 213–226.

Pascal, S. ve Scalla, R. (1999) “Purification and characterization of a safener-induced glutathione S-transferase from wheat (*Triticum aestivum*)”, *Physiologia Plantarum*, 106: 17-27.

Patel, N. T., Gupta, A. ve Pandey, A. N. (2010) “Salinity tolerance of *Avicennia marina* (Forssk.) Vierh. from Gujarat coasts of India”, *Aquatic Botany*, 93(1): 9-16.

Peñuelas, J. ve Munné-Bosch, S. (2005) “Isoprenoids: An evolutionary pool for photoprotection”, *Trends in Plant Science*, 10(4):166-9.

Peralta, I. ve Spooner, D. (2000) “Classification of wild tomatoes: a review”, *Kurtziana*, 28 (1): 45-54.

Perperopoulou, F., Pouliou, F. ve Labrou, N. E. (2018) “Recent advances in protein engineering and biotechnological applications of glutathione transferases”, *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(4): 511-528.

Peterson, D. G., Pearson, W. R. ve Stack, S. M. (1998) “Characterization of the tomato (*Lycopersicon esculentum*) genome using in vitro and in situ DNA reassociation”, *Genome*, 41(3): 346-356.

Pickart, C. M. ve Fushman, D. (2004) “Polyubiquitin chains: Polymeric protein signals”, *Current Opinion in Chemical Biology*, 8(6): 610-616.

Pinto, E. ve diğ. (2003) “Heavy metal-induced oxidative stress in algae”, *Journal of Phycology*, 39(6):1008 - 1018.

De Pinto, M. C. ve De Gara, L. (2004) “Changes in the ascorbate metabolism of apoplastic and symplastic spaces are associated with cell differentiation”, *Journal of Experimental Botany*, 55(408): 2559-69.

Prasad, T. K. ve diğ. (1994) “Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide”, *Plant Cell*, 6(1):65-74.

Preedy, V. R. (2009) “Tomatoes and Tomato Products: Nutritional, Medicinal and Therapeutic

Properties Tomatoes and Tomato Products: Nutritional, Medicinal and Therapeutic Properties”, *Nutrition & Food Science*, 39(6): 702-702.

Prokai, L. ve Simpkins, J. W. (2007) “Structure-nongenomic neuroprotection relationship of estrogens and estrogen-derived compounds”, *Pharmacology and Therapeutics*, 114(1):1-12.

Qiu-Fang, Z. ve diğ. (2005) “NaCl enhances thylakoid-bound SOD activity in the leaves of C3 halophyte *Suaeda salsa* L.”, *Plant Science*, 168(2):423-430.

Radi, R. ve diğ. (1991) “Detection of catalase in rat heart mitochondria”, *Journal of Biological Chemistry*, 266(32):22028-34.

Raiola, A. ve diğ. (2014) “Enhancing the health-promoting effects of tomato fruit for biofortified food”, *Mediators of Inflammation*, 2014(5):139873.

Ramírez, L., Bartoli, C. G. ve Lamattina, L. (2013) “Glutathione and ascorbic acid protect *Arabidopsis* plants against detrimental effects of iron deficiency”, *Journal of Experimental Botany*, 64(11): 3169–3178.

Rao, M. V., Paliyath, G. ve Ormrod, D. P. (1996) “Ultraviolet-B- and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*”, *Plant Physiology*, 110(1):125-36.

Rock, K. L. ve diğ. (1994) “Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules”, *Cell*, 78(5): 761-771.

Rockwell, P. ve diğ. (2000) “Proteasome inhibition in neuronal cells induces a proinflammatory response manifested by upregulation of cyclooxygenase-2, its accumulation as ubiquitin conjugates, and production of the prostaglandin PGE2”, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 374(2): 325-33.

Rubio, M. C. ve diğ. (2002) “Effects of water stress on antioxidant enzymes of leaves and nodules of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutases”, *Physiologia Plantarum*, 115(4): 531-540.

Sairam, R. K., Deshmukh, P. S. ve Saxena, D. C. (1998) “Role of antioxidant systems in wheat genotypes tolerance to water stress”, *Biologia Plantarum*, 41: 387–394.

Salin, M. L. ve Bridges, S. M. (1980) “Isolation and characterization of an iron-containing superoxide dismutase from a eucaryote, *Brassica campestris*”, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 201(2):369-374.

Samach, A. ve diğ. (1999) “The Unusual Floral Organs gene of *Arabidopsis thaliana* is an F-box protein required for normal patterning and growth in the floral meristem”, *Plant Journal*, 20(4):433 - 445.

Sanders, T. A. B. (1995) “Foods and nutrition encyclopedia, 2nd edn, Vols 1 and 2 A. H. Ensminger, M. E. Ensminger, J. E. Konlande & J. R. K. Robson CRC Press, Boca Raton, Florida, 1994, 2415 pp ISBN 0–8493–8980-1 (set)”, *Journal of the Science of Food and*

Agriculture, 67(2): 282-282.

Sappl, P. G. ve diğ. (2009) “The *Arabidopsis* glutathione transferase gene family displays complex stress regulation and co-silencing multiple genes results in altered metabolic sensitivity to oxidative stress”, *Plant Journal*, 58(1): 53-68.

Sato, S. ve diğ. (2012) “The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution”, *Nature*, 485(7400): 635-41.

Sayfzadeh, S. ve diğ. (2011) “Response of antioxidant enzyme activities and root yield in sugar beet to drought stress”, *International Journal of Agriculture and Biology*, 13(3): 357-362.

Segundo-Val, I. S. ve Sanz-Lozano, C. S. (2016) “Introduction to the gene expression analysis”, içinde *Methods in Molecular Biology*, 1434: 29-43.

Semchuk, N. M. ve diğ. (2009) “Inactivation of genes, encoding tocopherol biosynthetic pathway enzymes, results in oxidative stress in outdoor grown *Arabidopsis thaliana*”, *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(5): 384-390.

Semchyshyn, H. M. ve Valishkevych, B. V. (2016) “Hormetic effect of H₂O₂ in *Saccharomyces cerevisiae*: Involvement of TOR and glutathione reductase”, *Dose-Response*, 14(2): 1559325816636130.

Sen, S. ve Chakraborty, R. (2011) “The role of antioxidants in human health”, *ACS Symposium Series*, 1083:1-37.

Sevilla, F., López-Gorgé, J. ve del Río, L. A. (1982) “Characterization of a Manganese Superoxide Dismutase from the Higher Plant *Pisum sativum*”, *Plant Physiology*, 70(5):1321-6.

Sgherri, C., Stevanovic, B. ve Navari-Izzo, F. (2004) “Role of phenolics in the antioxidative status of the resurrection plant *Ramonda serbica* during dehydration and rehydration”, *Physiologia Plantarum*, 122(4): 478-485.

Shan, C. Juan ve diğ. (2011) “Effects of exogenous hydrogen sulfide on the ascorbate and glutathione metabolism in wheat seedlings leaves under water stress”, *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(6): 2533-2540.

Sharma, P. ve diğ. (2012) “Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions”, *Journal of Botany*, 2012: 1-26.

Sharma, P. ve Dubey, R. S. (2004) “Ascorbate peroxidase from rice seedlings: Properties of enzyme isoforms, effects of stresses and protective roles of osmolytes”, *Plant Science*, 167(3):541-550.

Sharma, P. ve Dubey, R. S. (2005) “Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings”, *Plant Growth Regulation*, 46(3): 209-221.

Sharma, P. ve Dubey, R. S. (2007) “Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defense system in growing rice seedlings exposed to toxic concentrations of aluminum”, *Plant*

Cell Reports, 26(11): 2027-2038.

Shi, H. ve diğ. (2015) “Comparative physiological, metabolomic, and transcriptomic analyses reveal mechanisms of improved abiotic stress resistance in bermudagrass [*Cynodon dactylon* (L.) Pers.] by exogenous melatonin”, *Journal of Experimental Botany*, 66(3): 681-94.

Shukitt-Hale, B., Lau, F. C. ve Josep, J. A. (2008) “Berry fruit supplementation and the aging brain”, içinde *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(3): 636-41.

Smirnoff, N. (2000) “Ascorbic acid: Metabolism and functions of a multi-faceted molecule”, *Current Opinion in Plant Biology*, 3: 229-235.

Smolikova, G. N., Laman, N. A. ve Boriskevich, O. V. (2011) “Role of chlorophylls and carotenoids in seed tolerance to abiotic stressors”, *Russian Journal of Plant Physiology*, 58(6): 817–825.

Speranza, A. ve diğ. (2001) “Inhibition of proteasome activity strongly affects kiwifruit pollen germination. Involvement of the ubiquitin/proteasome pathway as a major regulator”, *Plant Physiology*, 126(3): 1150–1161.

Srivastava, S. ve Dubey, R. S. (2011) “Manganese-excess induces oxidative stress, lowers the pool of antioxidants and elevates activities of key antioxidative enzymes in rice seedlings”, *Plant Growth Regulation*, 8: 272.

Stadtman, E. R. ve Berlett, B. S. (1998) “Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease”, *Drug Metabolism Reviews*, 30(2): 225-43.

Stanton, L. W. (2001) “Methods to profile gene expression”, *Trends in Cardiovascular Medicine*, 11(2): 49-54.

Sugimoto, M. ve Sakamoto, W. (1997) “Putative phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase gene from *Arabidopsis thaliana* induced by oxidative stress”, *Genes and Genetic Systems*, 72(5): 311-316.

Sullivan, J. A., Shirasu, K. ve Deng, X. W. (2003) “The diverse roles of ubiquitin and the 26S proteasome in the life of plants”, *Nature Reviews Genetics*, 4: 948–958.

Tabata, K., Takaoka, T. ve Esaka, M. (2002) “Gene expression of ascorbic acid-related enzymes in tobacco”, *Phytochemistry*, 61(6): 631-635.

Tamaoki, M. ve diğ. (2003) “Light-controlled expression of a gene encoding L-galactono- γ -lactone dehydrogenase which affects ascorbate pool size in *Arabidopsis thaliana*”, *Plant Science*, 164(6): 1111-1117.

Thrower, J. S. (2000) “Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal”, *The EMBO Journal*, 19: 94-102.

Tsubuki, S. ve diğ. (1996) “Differential inhibition of calpain and proteasome activities by peptidyl aldehydes of di-leucine and tri-leucine”, *Journal of Biochemistry*, 119(3): 572–576.

Ursini, F., Maiorino, M. ve Gregolin, C. (1985) "The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase", *BBA - General Subjects*, 839(1): 62-70.

Ünyayar, S., Çekiç, F. Ö. (2005). "Changes in antioxidative enzymes of young and mature leaves of tomato seedlings under drought stress", *Turkish Journal of Biology*, 29: 211- 216.

Ünyayar, S., Çekiç, F.Ö., Keleş, Y. (2005). "The antioxidative response of two tomato species with different drought tolerances as a result of drought and cadmium stress combinations", *Plant Soil Environment*, 51: 57-64.

Valderrama, R. ve diğ. (2006) "The dehydrogenase-mediated recycling of NADPH is a key antioxidant system against salt-induced oxidative stress in olive plants", *Plant, Cell and Environment*, 29(7): 1449-59.

Valko, M., Morris, H. ve Cronin, M. (2005) "Metals, Toxicity and Oxidative Stress", *Current Medicinal Chemistry*, 12(10): 1161-208.

Vembar, S. S. ve Brodsky, J. L. (2008) "One step at a time: Endoplasmic reticulum-associated degradation", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(12): 944-57.

Verma, R. ve diğ. (2002) "Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome", *Science*, 298(5593): 611-5.

Victoria Martin, M. ve diğ. (2013) "Oiwa, a female gametophytic mutant impaired in a mitochondrial manganese-superoxide dismutase, reveals crucial roles for reactive oxygen species during embryo sac development and fertilization in *Arabidopsis*", *Plant Cell*, 25(5): 1573-91.

Vierstra, R. D. (1996) "Proteolysis in plants: Mechanisms and functions", *Plant Molecular Biology*, 32: 275–302.

Vierstra, R. D. (2009) "The ubiquitin-26S proteasome system at the nexus of plant biology", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(6): 385-97.

Wagner, D. ve diğ. (2004) "The genetic basis of singlet oxygen-induced stress response of *Arabidopsis thaliana*", *Science*, 306: 1183-118.

Wagner, U. ve diğ. (2002) "Probing the diversity of the *Arabidopsis* glutathione S-transferase gene family", *Plant Molecular Biology*, 49(5): 515-32.

Wang, H., Cao, G. ve Prior, R. L. (1996) "Total antioxidant capacity of fruits", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(3): 701-705.

Wang, J., Zhang, H. ve Allen, R. D. (1999) "Overexpression of an *Arabidopsis* peroxisomal ascorbate peroxidase gene in tobacco increases protection against oxidative stress", *Plant and Cell Physiology*, 40(7): 725–732.

Wang, Y., Mopper, S. ve Hasenstein, K. H. (2001) "Effects of salinity on endogenous ABA, IAA, JA, and SA in *Iris hexagona*", *Journal of Chemical Ecology*, 27: 327–342.

- Wilkinson, K. D., Urban, M. K. ve Haas, A. L. (1980) "Ubiquitin is the ATP-dependent proteolysis factor I of rabbit reticulocytes", *Journal of Biological Chemistry*, 255(16):7529-32.
- Willcox, J. K., Ash, S. L. ve Catignani, G. L. (2004) "Antioxidants and prevention of chronic disease", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(4): 275-95.
- Wolf, D. H. ve Hilt, W. (2004) "The proteasome: A proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal", *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1695(1-3): 19-31.
- Wolucka, B. A. ve Van Montagu, M. (2003) "GDP-Mannose 3',5'-Epimerase Forms GDP-L-gulose, a Putative Intermediate for the de Novo Biosynthesis of Vitamin C in Plants", *Journal of Biological Chemistry*, 278: 47483-47490.
- Xu, J. ve diğ. (2015) "Transgenic *Arabidopsis* plants expressing tomato glutathione S-transferase showed enhanced resistance to salt and drought stress", *PLoS ONE*, 10(9): e0136960.
- Xu, J. ve diğ. (2017) "Enhancement of phenol stress tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants overexpressing glutathione S-transferase", *Plant Growth Regulation*, 82(1): 37-45.
- Yabuta, Y. ve diğ. (2002) "Thylakoid membrane-bound ascorbate peroxidase is a limiting factor of antioxidative systems under photo-oxidative stress", *Plant Journal*, 32(6): 915-25.
- Yamagishi, Y. ve diğ. (2010) "Two histone marks establish the inner centromere and chromosome bi-orientation", *Science*, 330(6001): 239-43.
- Yan, J. ve diğ. (2007) "Reactive oxygen species and nitric oxide are involved in ABA inhibition of stomatal opening", *Plant, Cell and Environment*, 30: 1320–1325.
- Yang, G. ve diğ. (2014) "Caffeic acid directly targets ERK1/2 to attenuate solar UV-induced skin carcinogenesis", *Cancer Prevention Research*, (10): 1056-66.
- Yang, P. ve diğ. (2004) "Purification of the *Arabidopsis* 26 S proteasome: Biochemical and molecular analyses revealed the presence of multiple isoforms", *Journal of Biological Chemistry*, 279(8): 6401-13.
- Yang, X. D., Dong, C. J. ve Liu, J. Y. (2006) "A plant mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase: Its precise localization and higher enzymatic activity", *Plant Molecular Biology*, 62(6): 951–62.
- Yau, Y. Y. ve diğ. (1999) "Journal of Applied Horticulture.", *Journal of Applied Horticulture*, 8(1): 2006.
- Young, I. S. ve Woodside, J. V. (2001) "Antioxidants in health and disease", *Journal of Clinical Pathology*, 54(3): 176–186.
- Yu, Q. ve Rengel, Z. (1999) "Waterlogging influences plant growth and activities of superoxide dismutases in narrow-leafed lupin and transgenic tobacco plants", *Journal of Plant Physiology*, 155(3): 431-438.

Zámocký, M., Gasselhuber, B., Furtmüller, P. and Obinger, C. (2012). Molecular evolution of hydrogen peroxide degrading enzymes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 525(2): 131-144.

Zechmann, B. (2011) “Subcellular distribution of ascorbate in plants”, *Plant Signaling and Behavior*, 19(4): 360-363.

Zhang, L., Ma, H., Chen, T., Pen, J., Yu, S., Zhao, X. (2014). “Morphological and physiological responses of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plants to salinity”, *Plos One*, 9(11): e112807.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Burcu KARPUZ
Doğum Yeri	Üsküdar
Doğum Tarihi	03.01.1995
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
Telefon	05384204642
E-Posta Adresi	Burcukarpuz01@gmail.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Gazi Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Biyoloji
Mezuniyet Yılı	01.06.2017

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik
Programı	Moleküler Biyoloji ve Genetik

Makale ve Bildiriler	
<p>Isin S., Arikan B., <u>Karpuz B.</u>, Igar B.A., Gunaydin K., Cakir O. (2018). Optimization of <i>Ammi visnaga</i> Tissue Culture [Poster]. <i>International Eurasian Conference on Biological and Chemical Science</i>, Ankara.</p>	
<p><u>Yasar S.</u>, Hatipoglu D., Karpuz B., Cakir O. (2019). Determination of The Effect of Curcumin on Superoxide Dismutase And Catalase Activity in Tomato [Poster]. <i>7th International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey</i>, Istanbul.</p>	
<p><u>Arikan B.</u>, Karpuz B., Turgut Kara N., Cakir O. (2019) miRNA expression analysis Under Salt Stress in H2274 <i>Solanum lycopersicum</i> [Poster]. <i>2nd International Conference on Plant and Molecular Biology</i>, Amsterdam, Netherlands.</p>	