

**ANADOLU ÜNİVERSİTESİ**



**BİLECİK ŞEYH EDEBALI  
ÜNİVERSİTESİ**

**Fen Bilimleri Enstitüsü  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

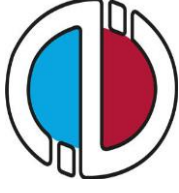
***XANTHORIA PARIETINA*'DA ALÜMİNYUM STRESİ  
ALTINDA FOTOSİSTEM II D1 PROTEİNİNİN GEN  
İFADESİ VE GLUTATYON REDÜKTAZ  
AKTİVİTESİNDE SPERMİDİNİN ROLÜNÜN  
ARAŞTIRILMASI**

**Gülseren TELATAR  
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı  
Yrd. Doç. Dr. Dilek ÜNAL ÖZAKÇA**

**BİLECİK, 2014**

**Ref. No: 10032331**



**ANADOLU ÜNİVERSİTESİ**



**BİLECİK ŞEYH EDEBALI  
ÜNİVERSİTESİ**

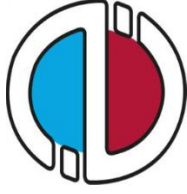
**Fen Bilimleri Enstitüsü  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

***XANTHORIA PARIETINA*'DA ALÜMİNYUM STRESİ  
ALTINDA FOTOSİSTEM II D1 PROTEİNİNİN GEN  
İFADESİ VE GLUTATYON REDÜKTAZ  
AKTİVİTESİNDE SPERMİDİNİN ROLÜNÜN  
ARAŞTIRILMASI**

**Gülseren TELATAR  
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı  
Yrd. Doç. Dr. Dilek ÜNAL ÖZAKÇA**

**BİLECİK, 2014**



**ANADOLU UNIVERSITY**



**BİLECİK SEYH EDEBALI  
UNIVERSITY**

**Graduate School of Sciences  
Department of Molecular Biology and Genetics**

**THE INVESTIGATE OF THE ROLE OF  
EXOGENOUS SPERMIDINE ON GENE OF  
PHOTOSYSTEM II D1 PROTEIN  
TRANSCRIPT AND GLUTATHIONE  
REDUCTASE ACTIVITY UNDER STRES OF  
ALUMINIUM IN LICHEN *XANTHORIA  
PARIETI'NA***

**Gülseren TELATAR  
Master's Thesis**

**Thesis Advisor  
Assist. Prof. Dilek ÜNAL ÖZAKÇA**

**BİLECİK, 2014**



BİLECİK ŞEYH EDEBALI  
ÜNİVERSİTESİ  
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS  
JÜRİ ONAY FORMU

Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 24/02/2014 tarih ve 11/9 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 14/03/2014 tarihinde tez savunma sınavı yapılan “*Xanthoria parietina*’da Alüminyum Stresi Altında Fotosistem II D1 Proteininin Gen İfadesi ve Glutasyon Redüktaz Aktivitesinde Spermidinin Rolünün Araştırılması” başlıklı tez çalışması Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

**JÜRİ**

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI)

: Yrd. Doç. Dr. Dilek ÖZAKÇA

ÜYE

: Prof. Dr. Ayşen TÜRK

ÜYE

: Doç. Dr. Cihan DARCAN

ÜYE

: Yrd. Doç. Dr. İnci TÜNEY

ÜYE

: Yrd. Doç. Dr. Hülya SİLAH

**ONAY**

Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ...../  
...../..... tarih ve ...../..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

## ÖZET

Bu çalışmada, *Xanthoria parietina* likeninde kısa dönem alüminyum toksisitesi ve spermidin uygulamasının fizyolojik ve transkripsiyonal seviyede etkileri araştırılmıştır. Sonuçlarımıza göre, alüminyum stresi doza bağlı olarak, alüminyumlu ve spermidin uygulaması yapılan örneklerde, lipid peroksidasyon oranı, klorofil içeriği, klorofil a yıkım oranı, total glutatyon içeriği ve glutatyon redüktaz'ın (EC 1.6.4.2) enzimatik aktivitesi gibi fizyolojik yanıtlarda farklılıklar göstermiştir. Fotosistem II D1 protein geninin (*psbA*) ekspresyonu yarı nicel RT-PCR ile belirlenmiştir. Alüminyum stresine maruz bırakılmadan önce spermidin uygulanan örneklerde, Total GSH, glutatyon redüktaz enzim aktivitesi ve *psbA* mRNA transkripsiyonunda gözle görülür bir artış tespit edilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları, spermidin uygulamasının *Xanthoria parietina*'nın tallusunda alüminyumun teşvik ettiği lipid peroksidasyonu ve klorofil yıkımını azaltarak, *psbA*'nın transkripsiyon seviyesini ve glutatyon redüktaz (GR) aktivitesini artırmış olabileceğini işaret etmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Alüminyum, Glutatyon redüktaz, *Psba* geni, Spermidin, *Xanthoria parietina*

## ABSTRACT

In this study, the effects of short-term aluminium toxicity and the application of spermidine on the lichen *Xanthoria parietina* were investigated at the physiological and transcriptional levels. Our results suggest that aluminium stress leads to physiological processes in a dose-dependent manner through differences in lipid peroxidation rate, chlorophyll content, rate of chlorophylla degradation, total glutathione (total GSH) content and glutathione reductase (EC 1.6.4.2) activity in aluminium and spermidine treated samples. The expression of the photosystem II D1 protein (*psbA*) gene was quantified using semi-quantitative RT-PCR. Increased total GSH content, glutathione reductase activity and *psbA* mRNA transcript levels were observed in the *X. parietina* thalli that were treated with spermidine before aluminium-stress. The results showed that the application of spermidine could mitigate aluminium-induced lipid peroxidation and chlorophyll degradation on lichen *X. parietina* thalli through an increase in *psbA* transcript levels and activity of glutathione reductase (GR) enzymes.

**Key Words:** Aluminium, Glutathione Reductase, *PsbA* Gene, Spermidine, *Xanthoria Parietina*

## TEŞEKKÜR

Tezimin oluşturulmasında değerli bilgilerini sonuna kadar açan, yol gösterici olan ve destekleyen danışman hocam **Sayın Yrd. Doç. Dilek Ünal ÖZAKÇA'ya;**

Tez çalışmamı gerçekleştirmede 2012-01-BIL-04-02 numaralı BAP projemizi destekleyen **Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri'ne;**

Çalışmalarım boyunca laboratuvar da yardımcı olan arkadaşım **Işıl Ezgi Eryılmaz'a;**

Arazi çalışmaların da örneklerimi toplamada yardımcı olan **Müslüm Süleyman İnal'a;**

Çalışmalarım sırasında yardımcı olan **Şeyma Akarsu'ya;**

Bu süreçte desteklerini esirgemeyen ve her yönden yardımcı olan dostlarım **Esra Demir ve Elif Uzun'a;**

Öğrenim hayatım boyunca maddi ve manevi hep yanımda olan **Aileme** ve yüksek lisansım boyunca desteğini eksik etmeyen **Eşime;**

Sonsuz teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Gülseren TELATAR

NİSAN, 2014

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
<b>ÖZET</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>iii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>iv</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	<b>vi</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>vii</b>
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>viii</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİ</b> .....	<b>3</b>
2.1. Likenlerin Genel Özellikleri .....	3
2.2. Poliaminler .....	4
2.2.1. Poliaminlerin biyosentezi ve katabolizması.....	4
2.2.2. Poliaminlerin fizyolojik etkileri .....	6
2.3. Stres Koşullarında Fotosentez.....	7
2.3.1. Genel kavramlar .....	7
2.3.2. D1 proteinin yapısı .....	8
2.3.3. Abiyotik stres koşullarında toleransda iş gören fotosentetik genler .....	10
2.4. Oksidatif Stres ve Antioksidan Savunma Sistemi.....	13
2.4.1. Oksidatif stres .....	13
2.4.2. Antioksidan savunma sistemi.....	16
2.4.3. Glutatyon döngüsü .....	16

2.5. Alüminyum .....	17
2.5.1. Fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	18
2.5.2. Toksik etkisi .....	18
2.6. Bu Çalışmada Hedeflenen Amaçlar .....	18
<b>3. MATERYAL ve METOD .....</b>	<b>19</b>
3.1. Materyal ve Deney Düzenegi.....	19
3.2. Glutasyon Redüktaz (GR) Aktivitesi.....	20
3.3. Toplam Glutasyon (GSH) Analizi .....	20
3.4. Lipit Peroksidasyonu.....	21
3.5. Klorofil Yıkım Tayini .....	21
3.6. RNA izolasyonu ve cDNA eldesi .....	21
3.7. Yarı Nicel RT-PCR Analizi .....	22
3.8. İstatistiksel Analizler.....	23
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>24</b>
4.1. Alüminyum Elementinin Klorofil a Yıkımı Üzerine Etkisi.....	24
4.2. Alüminyum Uygulaması Yapılan Örneklerde Lipid Peroksidasyon Sonuçları ..	25
4.3. Toplam Glutasyon İçeriği.....	26
4.4. Glutasyon Redüktaz (GR) Aktivitesi.....	27
4.5. Fotosistem II D1 Protein Geninin ( <i>psbA</i> ) mRNA Düzeyindeki Değişimleri.....	28
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>30</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>35</b>

## ÇİZELGELER DİZİNİ

### Sayfa No

<b>Çizelge 4. 1.</b> <i>X. parietina</i> türünde farklı konsantrasyonlarda alüminyum ve 1 mM Spd uygulanan örneklerin farklı zaman dilimine bağlı klorofil a, klorofil b ve klorofil yıkım oranı değerleri.....	24
---	----

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 2. 1. Poliamin biyosentez yolları.....	5
Şekil 2. 2. Fotosentez şeması .....	8
Şekil 2. 3. Yüksek bitkilerin fotosistem II süper kompleksinde yer alan çok sayıda alt birimden oluşan dimerik proteinin elektron mikroskobunda belirlenmiş yapısı.....	9
Şekil 2. 4. PSII reaksiyon merkezindeki D1 proteinin öngörülen katlanma biçimi.....	10
Şekil 2. 5. Fotosistem II tamir mekanizması.....	12
Şekil 2. 6. Mezofil hücrelerinin farklı hücresel bölmelerinde C3 fotosentezi sırasında oluşan reaktif oksijen türleri.....	15
Şekil 3. 1. <i>Xanthoria parietina</i> 'nın genel görünüşü.....	19
Şekil 4. 1. Farklı konsantrasyonlarda Al uygulanmış <i>X. parietina</i> tallusunda Al ve dışsal Spd uygulamasının 24 saat sonraki MDA içeriği üzerine etkisi .....	25
Şekil 4. 2. Farklı konsantrasyonlarda Al uygulanmış <i>X. parietina</i> tallusunda Al ve dışsal Spd uygulamasının 48 saat sonraki MDA içeriği üzerine etkisi.....	26
Şekil 4. 3. Spd ve Al stresinin <i>X. parietina</i> tallusunda toplam GSH içeriği üzerindeki 24 ve 48 saatlik etkisi .....	27
Şekil 4. 4. Spd ve Al stresinin <i>X. parietina</i> tallusunda GR enzim aktivitesi üzerindeki 24 ve 48 saatlik etkisi.....	27
Şekil 4. 5. GR enzim aktivitesi ve <i>psbA</i> geninin göreceli mRNA seviyesi arasındaki ilişki.....	28
Şekil 4. 6. Spd ve Al stresinin <i>X. parietina</i> tallusunda <i>psbA</i> geninin göreceli mRNA seviyesi üzerindeki 24 ve 48 saatlik etkisi.....	29

**SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ**

%	Yüzde
°C	Santigrad Derece
ADC	Arginin Dekarboksilaz
Agm	Agmatin
Al	Alüminyum
AlCl <sub>3</sub>	Alüminyum Klorid
AOX	Alternatif Oksidaz
APX	Askorbat Peroksidaz
APT	Amino Propil Transferaz
AS	Arginaz
Asc	Askorbat
ATP	Adenozin Tri Fosfat
BSA	Bovine Serum Albümin
Cad	Kadaverin
CAT	Katalaz
cDNA	Tamamlayıcı DNA
Cd	Kadmiyum
cm	Santimetre
CO <sub>2</sub>	Karbondioksit

Cu	Bakır
Cu-Zn SOD	Bakır-Çinko Süperoksit Dismutaz
dk	Dakika
DMSO	DimetilSülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
ETC	Elektron Transport Zinciri
FAD	Flavin Adenin Dinükleotid
Fd	Ferrodoksin
Fe-SOD	Demir Süperoksit dismutaz
FET	Fotosentetik Elektron Transport Zinciri
FNR	Ferrodoksin-NADP Redüktaz
g	Gram
GABA	Gamma-aminobütirik Asit
GR	Glutasyon Redüktaz
GSH	Glutasyon
GSSG	Oksitlenmiş Glutasyon
GST	Glutasyon-S-transferaz
GPx	Glutasyon peroksidaz
HDM	Hücre Dışı Matriks
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen peroksit
K	Kelvin

L.	Linnea
LHC	Işık Toplama Kompleksi
mM	Milimolar
ml	Mililitre
$\mu\text{M}$	Mikromolar
$\mu\text{l}$	Mikrolitre
MDA	Malondialdehit
MDHA	Monodehidroaskorbat
MDHAR	Monodehidroaskorbat Redüktaz
Mg	Miligram
mRNA	Mesajcı RNA
$\text{NAD}^+$	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Hidrojen Fosfat
nMol	Nanomol
ODC	Ornitin Dekarboksilaz
$\text{OH}\cdot$	Hidroksi Radikali
$\text{O}_2\text{H}\cdot$	Perhidroksi Radikali
$\text{O}_2\cdot^-$	Süperoksit Radikali
$^1\text{O}_2$	Singlet Oksijen
PA	Poliamin
PCR	Polimeraz Zincirleme Tepkimesi
PM	Plazma Membranı

PSI	Fotosistem I
PSII	Fotosistem II
Put	Putresin
ROS	Reaktif oksijen türleri
RNA	Ribonükleik asit
-SH	Sistein tiyol grubu
SOD	Süperoksit Dismutaz
sp.	Species
Spd	Spermidin
Spm	Spermin
SAM	S- Adenosil Metionin
SAMDC	S- Adenosil Metionin Dekarboksilaz
TBA	Tiyobarbütrik Asit
TBARS	Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeleri
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCA	Trikarboksilik Asit Döngüsü
tRNA	Taşıyıcı RNA
UV	Ultraviole
vb.	ve benzeri
Zn	Çinko

## 1. GİRİŞ

Likenler bir mantar (mikobiyont) ve en az bir alg veya siyonobakterinin (fotobiyont) bir araya gelmesi ile oluşan simbiyotik birimlerdir. Bu simbiyotik birliktelik, kuraklığın yüksek olduğu ve uzun sürdüğü çöllerde, UV ışınların yüksek olduğu alpin zonda, soğuk iklim koşullarının yaşandığı kutuplarda ve şiddetli rüzgarların aşındırıcı etkilerinin fazla olduğu dik yamaçlarda dahi sürdürebilmektedir. Likenlerin bu kadar farklı ekosistemlerde yaşamlarını sürdürebiliyor olmaları ise birçok araştırmacı için büyük bir merak konusudur.

Günümüzde likenlerin stres koşullarındaki davranışlarına ve fizyolojik mekanizmalarının aydınlatılmasına ilişkin çalışmalar çok sınırlıdır. Yapılan araştırmalar genellikle fotosentetik verim ölçümü (Garty vd., 2000; Dzubaj vd., 2008; Ünal vd., 2010; Garty vd., 1992), pigment maddelerindeki değişim (Branquinho vd., 1997; Chettri vd., 1988; Garty vd., 1992; Kappen vd., 1998; Ünal vd., 2010), liken asitlerindeki miktar ve içerik değişimlerinin belirlenmesi (Pawlik-Skowrońska ve Bačkor, 2011; Purvis vd., 1987; Takani vd., 2002), etilen üretimi (Kauppi vd., 1998; Garty vd., 2000), çeşitli stres koşullarına bağlı olarak poliamin metabolizması (Pirintsos vd., 2009; Pirintsos vd., 2004; Ünal vd., 2008a; Ünal vd., 2008b), antioksidan enzimlerin aktivitesindeki değişimler (Álvarez vd., 2012; Sanità Di Toppi vd., 2005; 2008; Kranner, 2002; Pawlik-Skowrońska vd., 2002; Bačkor vd., 2006) ve çok az sayıda ise DNA hasarı üzerindedir (Hall vd., 2003; Ünal ve Uyanıkgil, 2011).

Günümüzde, tüm canlılarda doğal olarak bulunan poliaminlerin (başlıca putresin, spermidin ve spermin) abiyotik strese karşı oluşturulan cevapta önemli roller üstlendikleri bilinmesine karşın, liken fizyolojisinde oynadıkları roller tam olarak hala anlaşılammıştır. Bununla birlikte, strese toleransta önemli bir rol oynayan fotosistem II tamir mekanizmasının likenlerde nasıl düzenlendiği, bu düzenlemede poliaminlerin herhangi bir rolü olup olmadığı bilinmemektedir.

Yapılan literatür taramasında alüminyum stresi altında *Xanthoria parietina*'da dışsal spermidin uygulanmasının glutatyon redüktaz enzim aktivitesi ve fotosistem II

D1 proteinin gen ifadesindeki değişimlerinin belirlenmesi üzerine herhangi bir araştırmaya rastlanmadığı için bu konuya yönelinmiştir.

## 2. GENEL BİLGİ

### 2.1. Likenlerin Genel Özellikleri

Likenler bir mantar (mikobiyont) ve en az bir alg veya siyonobakterinin (fotobiyont) bir araya gelmesi ile oluşan simbiyotik birliklerdir. Şekil ve yaşayış bakımından kendilerini oluşturan alg ve mantarlardan tamamen ayrı bir yapı gösterirler. Günümüzde bilinen likenlerin mikobiyont üyelerinin yaklaşık %98'i *Ascomycetes*, %1,7'si *Deuteromycetes* ve % 0,3'ü *Basidiomycetes* gruplarındandır. Birçok fotobiyont ise, *Chloococcales* (%83), *Ulotrichales* (%9) ve *Cyanobacteria* (%8) gruplarına aittir (Nash III, 1996). Bazı likenler organizmalarında tüm üç tipi içermesine karşın, likenlerin büyük çoğunluğu fotobiyont olarak yeşil alg içerir. Bu yeşil alglerin çoğu ise *Trebouxiophyceae* sınıfına aittir.

Likenler yüksek bitkiler gibi kütikula içermezler, ksilem ve floem gibi vasküler dokulara sahip değildirler. Liken tallusunun yapısı basit olmakla birlikte mikobiyont ve fotobiyont tabakalarından meydana gelmektedir. Liken talusunun dış tabakasını oluşturan korteks hücreleri ince çeperli ve genel olarak jelatinleşmiş sert matriksle sıkıca paketlenmiştir. Tallus yapısı ve morfolojisine göre yapraksı, dalsı ve kabuksu olmak üzere 3 tipe ayrılmaktadır. Yapraksı likenlerde üst ve alt yüzey kolayca ayırt edilebilirken, dalsı likenler dik ya da asılı büyüyen, kesin ayrılmış üst ve alt yüzeyleri bulunmayan likenlerdir. Kabuksu likenler ise bir substratın üzerinde gelişen basit likenler olarak tanımlanmaktadır.

Likenler ışık, sıcaklık, gün uzunluğu ve su ihtiyaçları gibi farklı şartlarda hayatta kalabilme yeteneğine sahiptirler. Kök sistemleri olmadığından gelişimleri ve dağılımları topraktaki minerallere, elementlere ve toprak oluşumuna bağlı değildir. Ancak likenlerin fotosentezi ve büyümesi ışık, sıcaklık ve neme bağlı mevsimsel değişimler tarafından etkilenmektedir.

Likenler simbiyotik ilişkiye en mükemmel örnek olarak düşünülmesine karşın, mikobiyont ve fotobiyont arasındaki ilişki karmaşıktır. Bunun yanı sıra, mantar ve onun fotobiyontu arasındaki işbirliği evrimsel bir stratejidir ve ortaklara ekolojik olarak büyük avantajlar sağlamaktadır. Likenlerin çoğunda bulunan fotobiyontların tallus

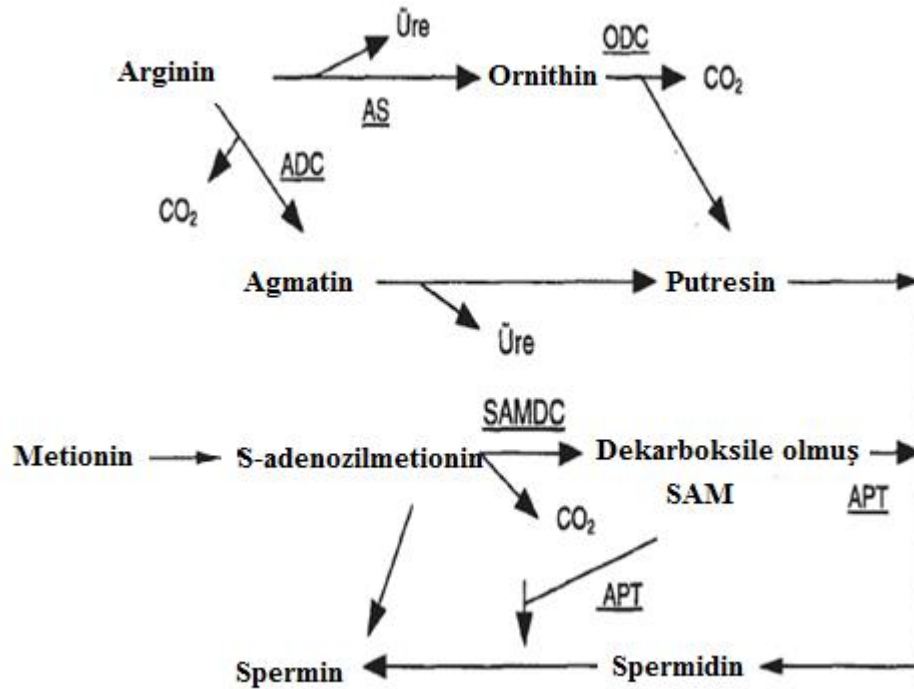
tabakası içindeki organizasyonları, fotosentetik verimleri en üst seviyede oluşturacak şekildedir. Fotobiyont klorofilleri, güneş ışığının varlığında, havanın karbondioksiti ve suyu kullanarak güneş enerjisini, enerjice zengin bileşiklere çevirerek şeker gibi karbonhidratları üretmektedir. Üretilen bu şekerler, kendi besinini üretemeyen mikobiyontta taşınmakta ve böylece mikobiyont ihtiyacı olan besin maddelerini karşılamaktadır. Mantara fotobiyont tarafından sağlanan bu şekerler simbiyotik ilişkide bulunan alg ya da siyonobakteri türlerine göre farklılık göstermektedir. Örneğin, siyonobakteriyal simbiyontlarda, mikobiyontta eritriol, ribitol ve sorbitol gibi polioller taşınmaktadır. Mikobiyont ise hücre duvarında suyu tutmak suretiyle fotobiyont için gerekli nemi sağlamaktadır. Likenler, çoğunlukla yüksek ışık yoğunluğuna sahip habitatlarda bulunurlar. Klorolikenler genellikle aşırı ışıktan zarar görmekte ve mantar tarafından sekonder bileşikler üretmektedir. Bu üretilen sekonder bileşikler alg tabakası için ışık kalkanı olarak rol oynadığından bu şekilde abiyotik strese karşı koruma görevi üstlenmektedir.

## **2.2. Poliaminler**

Son yıllarda, büyüme düzenleyici maddeler grubuna poliaminler (PA) olarak adlandırılan bir grup eklenmiştir. PA'lar tüm canlılarda doğal olarak bulunan ve yaşam için gerekli olan, çok fonksiyonlu, iki veya daha fazla amin grubu taşıyan bileşiklerdir. Bu bileşikler ilk olarak 17. Yüzyılda Van Leeuwenhoek tarafından insan seminal sıvısında spermin (Spm) fosfat kristalleri olarak keşfedilmesine rağmen, önemleri son 50 yıldır bilinmektedir (Ünsal-Palavan vd., 1990). Tüm ökaryotlarda başlıca putresin (Put), spermidin (Spd), kadaverin (Cad) ve spermin (Spm) olmak üzere milimolar konsantrasyonlarda 4 tip poliamin bulunmaktadır (Ünsal-Palavan, 1993).

### **2.2.1. Poliaminlerin biyosentezi ve katabolizması**

Poliaminlerin biyosentezi ve metabolizması kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Çok sayıda enzimin de görev aldığı ve birçok ara ürünün de olduğu poliaminlerin karmaşık görünen biyosentezi Şekil 2.1'de basitleştirerek şematize edilmiştir.



**Şekil 2. 1.** Poliamin biyosentez yolları. AS: **Arginaz**, ODC: **Ornithindekarboksilaz**, ADC: **Arginindekarboksilaz**, SAM: **S-adenosil metionin**, SAMDC: **S-adenosil metionin dekarboksilaz**, APT: **Aminopropil transferaz** (Tekin, 1996' dan tekrar düzenlendi).

Put ve Spm'nin biyosentetik yolu ilk olarak mantarlarda saptanmıştır. Put arginininden 2 yolla türevlenmektedir; ilk yol, arginin üre kaybederek ornithini ve daha sonra da ornithin ornithindekarboksilaz (ODC) enziminin yardımı ile CO<sub>2</sub> kaybederek Put'un oluşturduğu yoldur. İkinci yol ise, arginin arginindekarboksilaz (ADC) enzimi tarafından dekarboksile olarak agmatin ve bundan da Put'un oluşmasıdır. Bu ikinci yol daha çok bitkiler için geçerli olmaktadır. Spd ve Spm sentezinde bu metabolik yolların dışında metiyonin üzerinden oluşan bir biyosentetik yol iş görmektedir. Burada metiyoninden, S-adenozilmetiyonin (SAM), bundan da S-adenozilmetiyonin dekarboksilaz (SAMDC) enzimi katalizörlüğünde, dekarboksile olmuş SAM ve bundan da aminopropil transferaz (ATP) yardımı ile Spd ve Spm oluşmaktadır (Pegg, 1988).

Poliamin metabolizması için üç enzim önemlidir. Bunlar ODC, SAMDC ve APT'dir. Özellikle biyosentezde ilk basamakta yer alan ODC poliaminlerin oluşumunda

hız kısıtlayıcı enzimdir. Herhangi bir uyarı karşısında poliaminlerin oluşması bu enzimin aktivitesine bağlıdır.

Poliaminlerin katabolizmaları, Put üzerinden olmaktadır ve iki çeşit enzim görev alır. Put, bakır taşıyan bir enzim olan diaminoksidazla  $\gamma$ -aminobütiraldahide dönüşmektedir. Bu bileşik de sonra ya  $\gamma$ -aminobütirata (GABA) ya da siklik form olan  $\Delta^1$ -prolin'e dönüşmektedir. Put aynı zamanda diğer metabolik yollarla çeşitli alkoloidlere, çeşitli fenolik asit bileşiklerine ve protein bileşiklerine de dönüşebilmektedir. İkinci enzim ise Spd ve Spm'ye yüksek duyarlılığa sahip poliamin oksidazdır (Tekin, 1996).

### 2.2.2. Poliaminlerin fizyolojik etkileri

PA'lar hücrel pH değerlerinde polikasyon özellikte olduklarından, kolayca önemli hücrel polianyonlara, DNA, RNA, fosfolipidler, asidik proteinlere ve hücre çeperi bileşiklerine bağlanabilir (Thomas and Thomas, 2001; Ünsal-Palavan, 1993). Bu bağlanışın kuvveti ise Spm>Spd>Put şeklindedir. PA'lar DNA'nın çift sarmal ipliğini stabilize etmektedir. Bunu sarmallar arasında köprüler oluşturarak gerçekleştirirler. Bu köprülerde, fosfat grupları ile elektrostatik bağlar meydana getirerek olmaktadır (Ünsal-Palavan, 1993). Ayrıca, PA'lar DNA'nın şeklini değiştirmemektedir. RNA'yı katlayarak daha kompakt bir yapı haline getirme yetkisindedir (Thomas and Thomas, 2001). Spd ve Spm DNA'ya bağlı RNA polimerazı stimüle etme kabiliyetindedir. PA'lar RNA'nın DNA-RNA-enzim kompleksinden ayrılmasını kolaylaştırmaktadır. Rimozamal alt ünitelerin birleşmesini ve ayrıca aminoasit tRNA'nın ribozomlara bağlanmasını teşvik etmektedir. Bu şekilde, PA'lar mitoz ve mayozun kısmi basamaklarını, hücre zarı permeabilitesini, makromoleküllerin aktivitesini ve sentezini etkileyebilmektedir.

PA'lar yukarıda belirtilen özelliklerinden dolayı bir canlının optimum büyüme ve gelişmesi için gerekli olmaktadır. Bunun yanı sıra, PA'ların yüksek bitkilerde vasküler farklılaşma, kök inisyasyonu, gövde oluşumu, çiçek inisyasyonu ve gelişimi, meyve olgunlaşması, senesens ve doku kültüründe embriyo oluşumunda da önemli roller üstlendiği çeşitli araştırmacılar tarafından ortaya konmuştur. (Ünsal-Palavan vd., 1990).

PA'ların hücreSEL düzeyde önemli olan etkilerinden biri de antioksidan enzimler üzerindeki rolleridir. Özellikle araştırmalar PA'ların askorbat peroksidaz (APX) ve glutasyon redüktaz (GR) enzimleri ile olan ilişkileri eksenine kaymıştır. PA'ların içSEL antioksidan enzimlerin artışını sağladığı bilirse de gen ifadeleri üzerindeki etkileri ile ilgili çalışmalar günümüzde çok sınırlıdır.

### 2.3. Stres Koşullarında Fotosentez

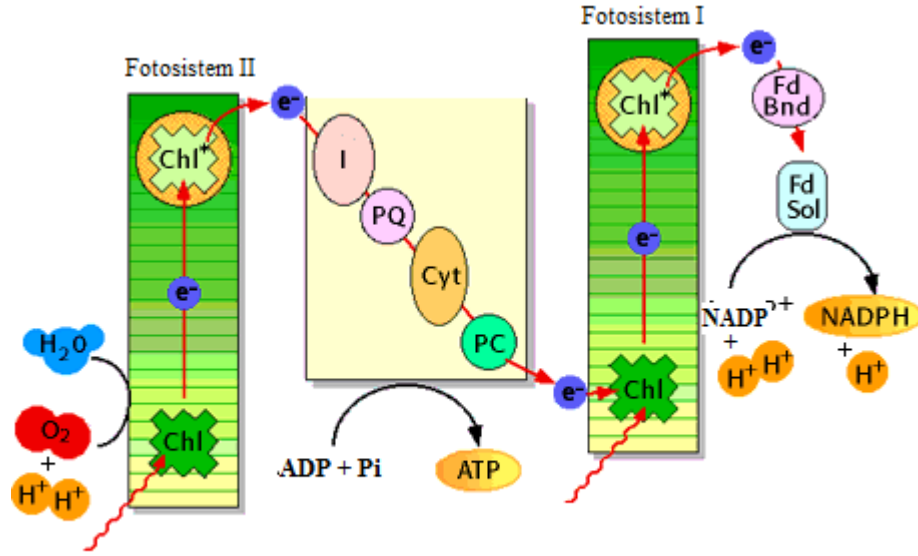
#### 2.3.1. Genel kavramlar

Fotosentez, kloroplastlarda ışık enerjisi kullanılarak suyu oksijene yükseltirken, havadan alınan karbondioksitin de daha büyük karbon moleküllerine (esasen şekerlere) indirgendiği kimyasal tepkimelerdir. Fotosentezin tilakoid reaksiyonları kloroplastın tilakoidler denilen özelleşmiş iç membranlarında gerçekteşir. Tilakoid reaksiyonlarının son ürünleri yüksek enerjili bileşikler olan ATP ve NADPH'dır. Işık enerjisi klorofillerde bulunan ışık toplama komplekslerinde (LHC) absorbe edildikten sonra klorofil a molekülü uyarılır ve bir dizi elektron transferi gerçekteşir.

Tüm ökaryotik fotosentetik organizmalarda **fotosistem I ve II** (PSI ve PSII) olmak üzere iki farklı fotosistem merkezi bulunur. Fotosistem I genel olarak kırmızı ışığın kızıl ötesine yakın bölgesindeki (> 680 nm) ışığı absorbe ederken, fotosistem II tercihen kırmızı ışığı (680 nm) absorbe eder. İki sistem arasındaki diğer bir fark fotosistem I kuvvetli bir redüktan (indirgeyici) ve zayıf bir oksidan üreterek NADP<sup>+</sup>'yi indirgerken, fotosistem II zayıf bir redüktan ve suyu oksidi edebilen oldukça kuvvetli bir oksidan üretir. PSII reaksiyon merkezi; klorofilleri ve bağlı elektron transfer zinciri ile grana lamellasında (tilakoid boşluğuna bakan) bulunur. PSI reaksiyon merkezi; bağlı pigmentleri, elektron transfer zinciri ve ATP sentaz sistemi stroma lamellasında (stromaya bakan tilakoid yüzeyi) konumlanmıştır.

Işıkla uyarılmış olan PSII, yapısındaki elektronu feofitine aktarır ve daha fazla elektron ile stabilize edilir. Daha sonra Q<sub>A</sub> ve Q<sub>B</sub> adı verilen plastokinonlara transfer edilir. Sitokrom b<sub>6</sub>f kompleksi çözünür bir protein olan plastosiyonine elektronu aktararak PSI'i uyarır. PSI stromada ferrodoksin (Fd) ve flavoprotein ferrodoksin-NADP redüktaz (FNR) yardımı ile NADP<sup>+</sup>'yi NADPH'ye indirger (Şekil 2.2).

Tirozin kalıntısı ve mangan içeren protein kompleksi PSII, suyu okside edebildiği gibi bu olaydan serbest elektron sağlar. Işık fotosentez için gerekli olmakla birlikte fazla absorblanmasına bağlı olarak fotosentetik aparatlar zarar görebilir (PSII gibi) ve ara ürünler meydana gelebilir.

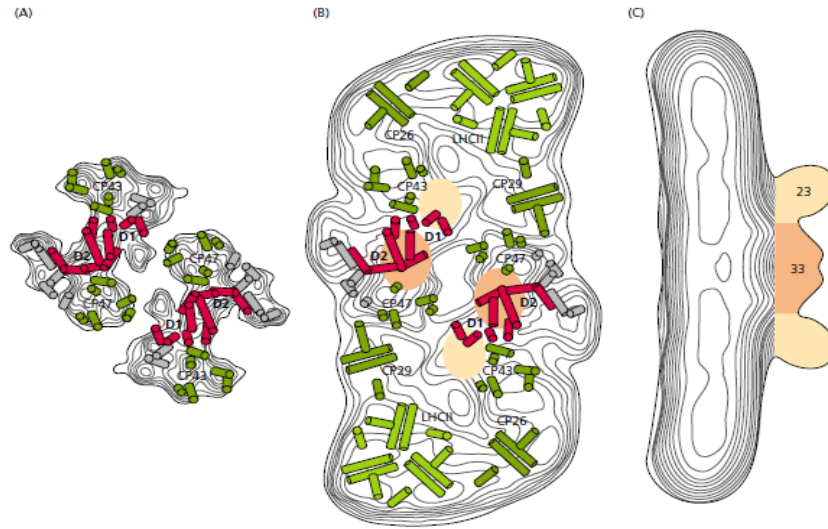


Şekil 2. 2. Fotosentez şeması.

([http://www.biology.arizona.edu/biochemistry/problem\\_sets/photosynthesis\\_1/03t.html](http://www.biology.arizona.edu/biochemistry/problem_sets/photosynthesis_1/03t.html))

### 2.3.2. D1 proteinin yapısı

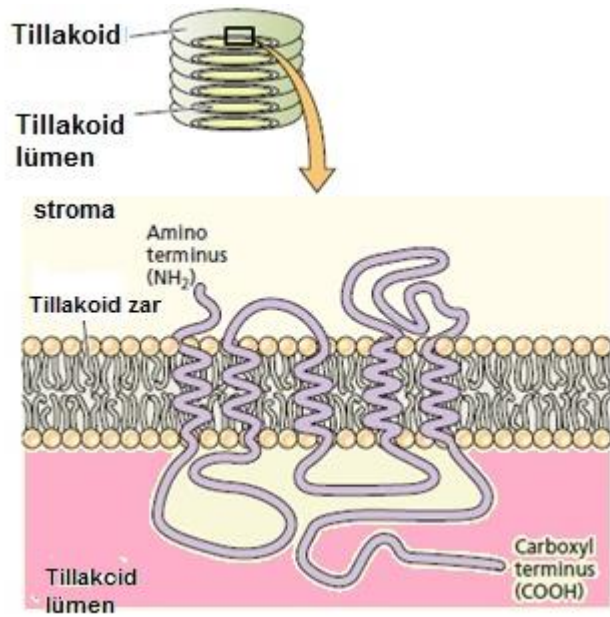
Fotosistem II çok sayıda alt birimden oluşan bir protein süperkompleksi içermektedir (Şekil 2.3) (Barber vd., 1999). Yüksek bitkilerde bu süperkompleks iki tam reaksiyon merkezi ve birkaç anten kompleksinden oluşur. D<sub>1</sub> ve D<sub>2</sub> olarak bilinen iki zar proteini, reaksiyon merkezinin ortasında diğer proteinlerle birlikte bulunur (Zouni vd., 2001). Birincil elektron verici klorofil (P680), diğer klorofiller, karotenoidler, feofitinler ve plastokinonlar D1 ve D2 zar proteinlerine bağlanmıştır.



**Şekil 2. 3.** Yüksek bitkilerin fotosistem II süper kompleksinde yer alan çok sayıda alt birimden oluşan dimerik proteinin elektron mikroskobunda belirlenmiş yapısı (Barber vd., 1999; Taiz ve Zeiger, 2006).

Bir siyanobakteri olan *Synechococcus elongatus*'da PSII reaksiyon merkezinin 3.8 Å düzeyinde çözünmüş yapısı belirlenmiştir. Bu yapının reaksiyon merkezlerinin ortasında D1 ve D2 proteinlerini, CP43 ve CP47 anten proteinlerini, sitokrom b559 ve c550'yi, dışsal 33 kDa'lık oksijen oluşturan protein, yani *PsbO*'yu, pigmentleri ve diğer kofaktörleri içerdiği tanımlanmıştır. D1 proteini PSII'nin fotokimyasal reaksiyon merkezindeki bir proteindir ve parçalandığında bu protein 23 kDa'lık parçalar verir.

P680 kompleksine ait olan D1 ve D2 proteini kodlayan genler sırasıyla *psbA* ve *psbB* olarak adlandırılmaktadır. D1 proteini kodlayan *psbA* geni kloroplast genomunda bulunur ve birçok ökaryotik organizmada tek kesilmemiş kopyası mevcuttur. Genin lokalizasyonu ve farklı türler arasındaki nükleotid dizileri yüksek (<90) ölçüde korunmuştur (Zurawski vd., 1982; Trivedi vd., 1994). *PsbA* geni bakterilere benzer promotor consensus dizisi (-10/-35 dizisi) ile kontrol edilmektedir. *PsbA* geninin sentezlediği D1 proteini hidrofobik amino asit kalıntılarınınca zengin peptid zinciri içeren transmembran bir proteindir. Bu peptid zincirleri, zarın hidrofobik kısmını beş kere geçecek şekilde tilakoid zarlarda yer alır. Ayrıca D1 proteini, tilakoid zarlarda asimetrik olarak düzenlenmiştir. Amino (NH<sub>2</sub>) ucu zarın stroma, karboksil (COOH) ucu ise lümen tarafında yer almaktadır.



**Şekil 2. 4.** PSII reaksiyon merkezindeki D1 proteinin öngörülen katlanma biçimi (Taiz ve Zeiger, 2006).

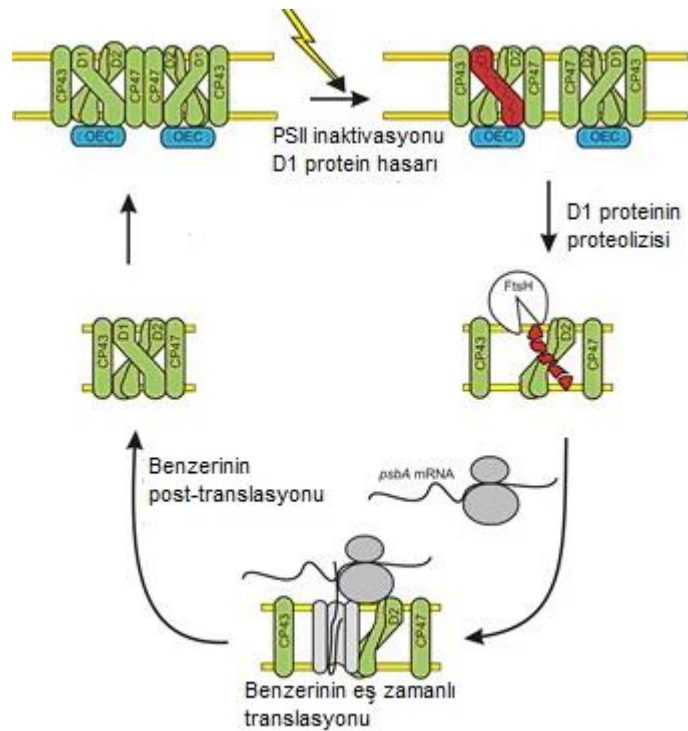
### 2.3.3. Abiyotik stres koşullarında toleransda iş gören fotosentetik genler

Fotosentetik süreçler abiyotik ve biyotik streten yoğun bir şekilde etkilenmektedir. Birçok araştırmacı, fotosentetik organizmalarda farklı stres koşullarına bağlı olarak fotosistem I ve fotosistem II üzerindeki etkiler ortaya konmuştur (Deng vd., 1987; Ellis, 1981; Gallagher ve Ellis, 1982; Klein ve Mullet, 1987; Margulies vd., 1987; Qian vd., 2009a; 2009b). Son zamanlarda moleküler biyolojideki tekniklerin gelişmesi ve kloroplast genlerinin dizi analizleri ile belirlenmesiyle çalışmalar fotosistem I ve fotosistem II’de rol oynayan genlerin ifadelerinin araştırması eksenine kaymıştır (Dewez vd., 2005; Qian vd., 2009a; 2009b). Qian vd. (2009a) bir yeşil alg olan *Chlorella vulgaris*’de yaptıkları araştırmada bakır ve kadmiyum elementlerinin fotosentez ile ilgili genlerin transkripsiyonları arasındaki ilişkiyi açıklamışlardır. Elde ettikleri sonuçlara göre PSI’de iş gören *psaB* geninin metal stresine bağlı olarak artış gösterdiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca, buna bağlı olarak da organizmanın strese karşı adaptasyonunu döngüsel elektron aktarımını arttırarak sağladığını rapor etmişlerdir (Jeanjean vd., 1998; Howitt vd., 2001). Benzer şekilde, tuz stresine maruz bırakılmış siyanobakteriler üzerinde yapılan çalışmalarda, PSI aktivitesindeki artışın strese uyum sürecinde önemli bir etmen olduğu gösterilmiştir.

Fotosentetik bir organizmada abiyotik stresin fotosentez üzerindeki ilk etkisi fotosistem II (PSII) aktivitesinin hızla düşmesidir. (Berry and Björkman, 1980; Adams and Demmig- Adams, 1992). PSII inaktivasyonunda (fotoinhibisyon) öncül hedef ise *psbA* geni tarafından kodlanan PSII major proteini D1'in yıkımıdır (Mulo vd., 2009). Normal koşullarda fotosentetik organizmalar hızlı ve etkin PSII tamir mekanizmalarını kullanarak bu toksik etkilerin üstesinden gelebilmektedir (Aro vd., 1993). Stres koşullarında oluşan reaktif oksijen türevleri (ROS), doğrudan fotohasar oluşturmamakta fakat; D1 protein sentezini baskılayarak hasarlı PSII tamirini inhibe etmektedir (Qian vd., 2009a; Murata vd., 2007). Dolayısıyla hücre içi *psbA* transkript seviyelerinde değişim olmaktadır.

Bitkiler bu zararın ortadan kalkması için farklı mekanizmalar geliştirmiştir. Karotenoidler klorofilin uyarılmış halini hızla yatıştırarak ışıktan koruyucu ajanlar olarak iş görmelerinin yanında, ksantofil döngüsü de fazla enerjinin dağılmasına katkıda bulunurlar. Bunun yanı sıra PSI'deki elektron akışının sağlıklı işleyebilmesi ve D1 proteini traslasyonunun tamamlanabilmesi için antioksidan enzimler önemli rol almaktadır (Allakhverdiev ve Murata, 2004; Yang vd., 2007; Karpinski vd., 1997; Nishiyama vd., 2001).

Reaktif oksijen türevlerinin PSII'nin tamir mekanizması üzerindeki etkileri *Synechocystis sp.*'de belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar, hücre içi seviyesinde hidrojen peroksit miktarındaki artışın PSII'nin tamirinin inhibizasyonuna bağlı olarak PSII'nin fotoinhibizasyonuna belirgin bir şekilde etki ederken, bu fotohasarın oluşum hızını etkilemediğini ortaya koymuştur. *PsbA* geninin transkripsiyonu, traslasyonu ve D1 proteinin işlenmesinin ROS ile olan ilişkileri northenblot ve immunoblotlama analizleriyle gösterilmiştir. Bu çalışmalardan elde edilen verilere göre, ROS'un ana hedefi *psbA*'nın traslasyon adımları ve uzama faktörleridir. Öncü D1 proteini sentezi, yüksek bitkilerde traslasyonel seviyede düzenlenirken, alglerde ve siyanobakterilerde transkripsiyonel ve traslasyonel seviyededir. *Chlamydomonas sp.*'de *psbA*'nın traslasyonun başlaması, redoks-aktif proteinler tarafından aktive edilir. Yüksek bitkilerde ise *psbA*'nın traslasyon aşamasında polipeptit zincirinin uzaması redoks sinyalleri ile düzenlenmektedir ve bu düzenlenme elektron taşıma sistemine bağlıdır. Ispanak yapraklarında yapılan bir çalışmada *psbA*'nın mRNA traslasyonunun etkinleşmesi için ATP sentezinin gerekli olduğu ortaya konmuştur.



**Şekil 2. 5.** Fotosistem II tamir mekanizması (Mulo vd., 2009).

Poliaminlerin günümüzde özellikle fotosistem II üzerinde önemli etkilere sahip olduğu bilinmektedir. Sfichi vd. (2004), bir *Scenedesmus* türünde yaptıkları çalışmada tilakoid zarlar üzerinde bulunan bağlı poliaminlerin UV stresine karşı fotosentetik aparatın korunmasında rol alabileceğini ortaya koymuşlardır. Ünal vd. (2008c) UV-A stresi altında liken *Physcia semipinnata*'da dışarıdan poliamin uygulamasının klorofil yıkımını engellediğini göstermişlerdir. Ayrıca Legocka ve Zajchert (1999) yaptıkları bir çalışmada sperminin Işık Toplayıcı Kompleksin stabilizasyonunda iş gördüğünü tespit etmişlerdir.

Son yıllarda yapılan araştırmalar poliaminlerin fotosentetik membranda veya yakınındaki proton havuzlarını etkilediğini ortaya koymaktadır. Özellikle ATP üretimi PSII'nin tamir mekanizmasında önemli süreçlerden biridir. Kloroplastlarda Put seviyesi ile ATP seviyesinin düzenlenmesi arasındaki ilişki birçok araştırmacının ilgisini çekmektedir. Bunun yanı sıra, D1 ve D2 proteinlerinin transkripsiyonunun dışsal spermidin uygulaması ile arttığı tespit edilmiştir (Kuznetsov vd., 2006).

## 2.4. Oksidatif Stres ve Antioksidan Savunma Sistemi

### 2.4.1. Oksidatif stres

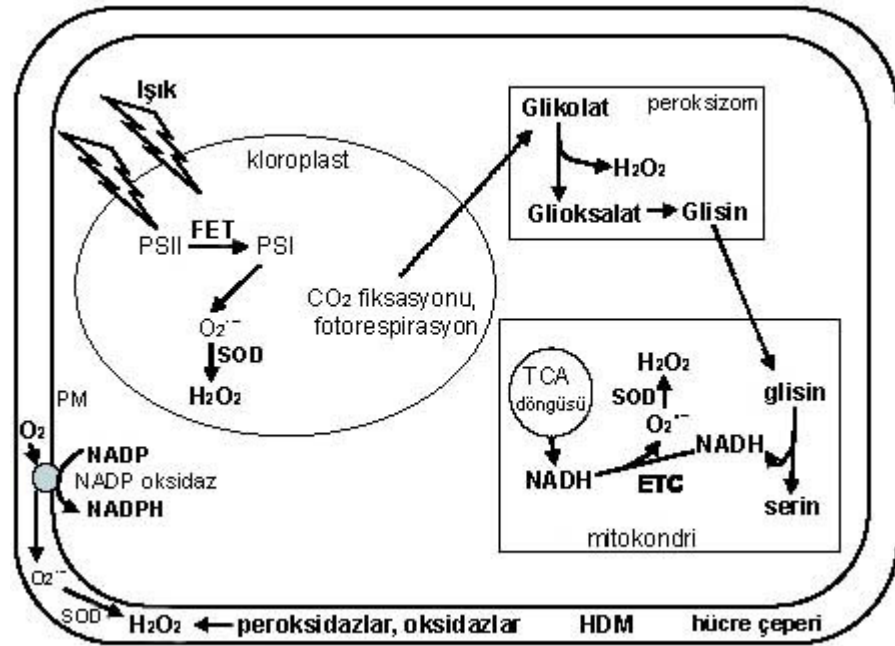
Oksidatif stres hücrede, kendisine zarar veren ya da hücreleri öldüren Reaktif Oksijen Türevlerinin (ROS) hücrelerde oluşması sonucunda meydana gelir. Oksidatif strese neden olan çevresel koşullar; ağır metal, yüksek ışık, kuraklık, tuz stresi aşırı sıcaklık (yüksek veya düşük), hava kirleticileri, ozon ve abiyotik etmenlerdir. Moleküler oksijenin canlılardaki toksik etkisinin gerçek nedeni oksijenin aktif türevleri olan serbest oksijen radikalleridir. Serbest oksijen türevleri bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül kütlesi düşük ve çok etkin moleküller olarak tanımlanır (Beckett vd., 2005). Normal fizyolojik koşullar altında, moleküler oksijenin indirgenmesiyle (redüksiyon) hücrede ROS üretilir fakat stres ile bu üretim artar (Boscolo vd., 2003; Mittler, 2002). Bunlar singlet oksijenin oluşumu ( $^1O_2$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), süperoksit anyon ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroksi radikali ( $OH^{\cdot}$ ) ve perhidroksi radikali ( $O_2H^{\cdot}$ ) gibi fotosentetik faaliyet ve solunum elektron transportu gibi süreçlerin toksik sonuçlarıdır (Agarwal vd., 2005). ROS belirli bir kapasiteye ulaştığında ise hücrede proteinlerin, lipidlerin ve nükleik asitlerin yapısına zarar verir (Halliwell ve Gutteridge, 1989).

Hücre içinde meydana gelen birçok reaksiyon sonunda ROS doğal olarak meydana gelmektedir. Fotosentetik organizmalarda ROS'un ana kaynağı fotosentetik sistemdeki tilakoid zarıdır (Asada, 1996; Asada vd., 1998). ROS türevleri belli redoks tepkimeleri sırasında oluşabildiği gibi mitokondirilerde suyun yükseltgenmesi ya da kloroplastlarda elektron aktarımı anında da meydana gelir. Ayrıca kloroplastlarda elektronlar doğrudan PSI'den oksijene aktarıldığı zaman süperoksit anyonlar oluşur.

Kloroplastlarda yer alan fotosentetik elektron taşınım zinciri bileşenleri, kendi kendine okside olma özelliğindedir ve NADP miktarının düşük olduğu koşullar altında süperoksit anyon radikalleri oluşabilir (Dat vd., 2000; Foyer and Noctor, 2000). Mehler (1951) oksijenin kloroplastlarda ışıkla indirgenmesini (fotoredüksiyon) *in vitro* olarak tanımlamış ve reaksiyon ürünü olarak  $H_2O_2$ 'nin oluştuğunu göstermiştir. Daha sonra  $O_2^{\cdot-}$ , tilakoidlerde oksijenin ışıkta indirgenmesinin başlıca ürünü olarak tanımlanmıştır (Asada and Takahashi, 1987). Kloroplastlarda en temel ROS kaynağı 'Mehler Reaksiyonu'dur ve  $O_2$ 'nin ışıkta indirgenme miktarı çevresel koşullara bağlı olarak

değişir (Asada and Takahashi, 1987; Mullineaux and Karpinski, 2002; Logan vd., 2006).

Kloroplastlarda  $H_2O_2$  üretimi aktif merkezinde bakır/çinko (Cu/Zn- SOD) veya demir (Fe-SOD) taşıyan SOD formları tarafından katalizlenir (Alscher vd., 2002).  $O_2^{\cdot-}$ 'in askorbat (Asc) tarafından indirgenmesinin ve indirgenmiş glutatyon (GSH)'un, kloroplastlarda  $H_2O_2$  üretimine fazla katkısı olmaz (Asada and Takahashi, 1987). PSII'de suyun oksidasyonu ve PSI'de  $O_2$ 'nin univalent fotoredüksiyonu (Mehler reaksiyonu), askorbat peroksidaz (APX) tarafından  $H_2O_2$ 'nin üretimi ve parçalanmasıyla ilişkilidir. Son reaksiyon, monodehidroaskorbat (MDHA)'dan monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR) aracılığı ile askorbatın üretilmesidir. Elektronların  $H_2O$ 'dan  $H_2O$ 'ya olan bu transferine Mehler-peroksidaz döngüsü (Foyer and Noctor, 2000) veya su-su döngüsü denir. Ayrıca PSII'de mangan içeren, oksijen oluşturan komplekste suyun kısmen oksidasyonu da  $H_2O_2$  oluşabilir (Fine and Frasch, 1992).



**Şekil 2. 6.** Mezofil hücrelerinin farklı hücresel bölmelerinde C3 fotosentezi sırasında oluşan reaktif oksijen türleri. (Kloroplastlar ve peroksizomlar arasındaki  $H_2O_2$  üretim oranı 1:2,5 iken kloroplast/peroksizomların mitokondrideki  $H_2O_2$  üretimine oranı 35:1'dir (Foyer and Noctor, 2000). Fotosentetik bakımdan aktif hücrelerde hücre dışı matriksin (HDM)  $H_2O_2$  üretimine katkısı henüz belirlenmemiştir. HDM: hücre dışı matriks; ETC elektron transport zinciri; FET: fotosentetik elektron transport zinciri; PM: plazma membranı; PSI ve PSII: fotosistem I ve fotosistem II; SOD: süperoksit dismutaz; TCA: trikarboksilik asit döngüsü. (Şlesak vd., (2007)'den modifiye edilmiştir).

Hücrenin reaktif oksijen türevlerine karşı en hassas bölümünü membran lipitleri oluşturur. Membran yapısında bulunan doymamış yağ asitleri serbest radikallerle çok kolay bir şekilde reaksiyona girer ve yağ asitlerinin oksidatif yıkımı ile lipit peroksidasyonu meydana gelir. Hücre zarı lipitlerinin peroksidasyonu, membranların fonksiyonu ve bütünlüğünü olumsuz etkilemekte ve hücre fonksiyonunda geri dönüşümsüz zarara neden olabilmektedir. Bu yağ asitlerinin peroksidasyonunun bir sonucu olarak ortaya çıkan malondialdehit (MDA) gibi sitotoksik aldehytler DNA ve proteinler üzerinde önemli zararlara neden olmaktadır. MDA içeriği, lipit peroksidasyonunun bir indeksi olarak kabul edilmekte ve yüksek seviyede MDA birikimi aşırı lipit peroksidasyonunu göstermektedir (Panda vd., 2003).

### 2.4.2. Antioksidan savunma sistemi

Serbest oksijen radikallerinin meydana getirdiği bu zararlı etkilerin giderilmesi için organizmalar tarafından geliştirilen bir savunma sistemi mevcuttur. Antioksidan savunma sistemi adı verilen sistem, fizyolojik veya çevresel olarak meydana getirilen serbest oksijen radikallerini ortadan kaldırmaktadır.

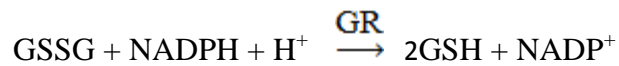
Likenlerde de ROS oluşumuna yanıt olarak geliştirilen gelişmiş bir savunma sistemleri mevcuttur. Antioksidan savunma sistemi süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon redüktaz (GR), glutatyon-S-transferaz (GST), glutatyon peroksidaz (GPx), askorbat peroksidaz (APX) ve katalaz (CAT) gibi antioksidan enzimlerini ve glutatyon (GSH), vitaminler (A, C, E), melatonin, flavonoidler, poliaminler gibi enzim olmayan antioksidanları içermektedir (Kacar vd., 2002). Katalazlar, yüksek miktardaki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi uzaklaştırmada iş görürken APX'ler hücre içi kompartmanlarda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye daha yüksek afinite gösteren bölgelerdeki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi temizlemede iş görmektedir (Foyer vd., 1994; Dat vd., 2000; Breusegem vd., 2001).

### 2.4.3. Glutatyon döngüsü

Glutatyon,  $\gamma$ -L-glutamil-L-sisteinil-glisilin'dir. Fotosentetik organizmalarda yüksek miktarda bulunan, düşük moleküler ağırlıkta bir tripeptit tiyolüdür. Hüresel metabolizmada önemli rol almaktadır. İndirgenmiş glutatyon ve oksitlenmiş glutatyon paralel olarak bulunur. Reaktif oksijen türevlerine karşı savunmada önemli bir intraselüler antioksidan olmasından dolayı, likenlerde metal toleransında merkezi bir rol oynadıkları yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur (Sanità Di Toppi, 2005)

Glutatyon (GSH) bu antioksidan görevini HO<sup>-</sup> ve singlet oksijen gibi reaktif oksijen türevlerini savuşturarak yapmaktadır. Ayrıca serbest radikal ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korumaktadır. Bunun dışında protein yapısındaki -SH gruplarını ve demiri indirgenmiş (Fe<sup>2+</sup>) halde tutulmasını sağlayarak pek çok proteinin ve enzimin inaktivasyonunu engeller. GSH, aynı zamanda elektrofilik bileşiklerin detoksifikasyonunda GST aracılığında bir kofaktör görevi görmektedir (Blokhina, 2002; Garcia, 2001; Yalçın, 1998).

Glutasyon redüktaz enzimi, hidrojen peroksit ve organik peroksitlerin indirgenmesi sırasında glutasyon peroksidaz enzimi tarafından yükseltgenen glutasyonun indirgenmesi reaksiyonunu katalizler. Böylece organizmada sınırlı miktardaki glutasyon tekrar kullanıma hazır hale gelmiş olur. Fakat bu reaksiyonun gerçekleşmesi için NADPH'a gereksinim duyulmaktadır. Gerekli olan NADPH pentoz fosfat yolundan elde edilir (Akkuş, 1995; Çiftci vd., 2000; Keha ve Küfrevioğlu, 2004).



Glutasyon redüktaz enzimi daha çok sitozole lokalize olmuş dimer yapıda bir enzimdir. Her bir alt ünitesinde birer FAD bulunmaktadır. NADPH, FAD'ı indirgemekte, FAD'daki elektronlar da okside glutatyondaki (GSSG) disülfür köprüsüne aktarılmaktadır.

Normal hücrelerde GSH / GSSG oranı son derece yüksektir. Glutasyon redüktaz bu oranın yüksek kalmasını sağlamakla görevlidir. Glutasyon redüktaz aktivitesi hücrenin redoks durumu tarafından düzenlenir. Aktivitenin yüksek ya da düşük olması oksidatif stresin şiddetine bağlıdır (Farber vd., 1998; Halliwell and Gutteridge, 1989). Çevresel strese maruz kalma sonucunda özellikle GSH hücre içi antioksidan düzeyinde değişikliklere neden olur. GSH birçok yönden antioksidan gibi iş görebilir, ROS ile kimyasal reaksiyonlara girebilir ve bu nedenle serbest radikal toplayıcısı olarak işlev yapabilir. Aynı zamanda, lipid peroksidasyon reaksiyonları ile oluşturulan peroksitleri kaldırarak zar yapısını stabilize edebilir.

## 2.5. Alüminyum

Alüminyum (Al) yer kabuğunda çok fazla oranda bulunan elementlerden biridir. Dünyamızın oksijen ve silisyumdan sonra en çok bulunan üçüncü elementidir (Sevinç, 2003). Doğada feldsparlar, kaolinler, kil mineralleri ve yaprak kayaçlarında bulunur. Adını ilk kez bulunduğu Alp'lerdeki bir yerleşim alanı olan Baukslar'dan alan alüminyum, yer kabuğunda çok fazla bulunmasına karşın elde etme yöntemleri sınırlıdır (Petrucci, 1985; Kacar, 1972; Sevinç, 2003).

### 2.5.1. Fiziksel ve kimyasal özellikleri

Atom Numarası: 13

Atom Kütlesi: 26,98154 g/mol

Oda Koşullarında (25°C 298 K): Gümüş renkli katı

Yumuşak ve hafif, amfoter ve aktif olması, yüksek elektrik ve ısı iletkenliği, ömrünün uzunluğu, dış etkenlere (korozyon vb.) ve değişik iklim şartlarına karşı dayanıklılığı, kolay şekillendirilebilmesi, düşük bakım maliyetleri, renklendirilebilmesi ve teknolojik açıdan ürün çeşitliliği alüminyumun alternatif özellikleridir.

### 2.5.2. Toksik etkisi

Yeryüzü topraklarının %30' u asidik özellik gösterir. Alüminyum toksisitesi özellikle bu tip topraklarda yeterli miktarda ürün almayı sınırlayan etkidir. Alüminyum organik asitlere, fosfatlara, proteinlerdeki sülfatlara ve nükleik asitlere bağlanarak hücre zarının görevlerinde bozukluklara neden olur (Horst, 1995; Nichol vd., 1993; Haynes and Mokolobate, 2001). Yüksek bitkilerde alüminyum toksisitesini gösteren ilk ve en önemli kanıt bitkiye alüminyum alınmasını takip eden 5 dk içinde kök uzamasının durmasıdır.

Alüminyum toksisitesinin yüksek miktarda ROS'un üretilmesine neden olduğu birçok araştırmayla ortaya konulmuştur (Çakmak ve Horst 1991; Küçükakyüz, 2002). Alüminyum tarafından oksidatif stresin teşvik edilmesiyle meydana gelen bu serbest radikallerin fotosentez ve CO<sub>2</sub> özümlemesini inhibe ettiği rapor edilmiştir (Pietraszewska-Mossor, 2001). Ayrıca lipit peroksidasyonuna sebep olduğu (Matsomoto, 2000) ve diğer bir araştırmada da alüminyumun DNA yapısına bağlanmasıyla DNA eşleşmesini engellediği tespit edilmiştir (Foy C.D., 1992).

### 2.6. Bu Çalışmada Hedeflenen Amaçlar

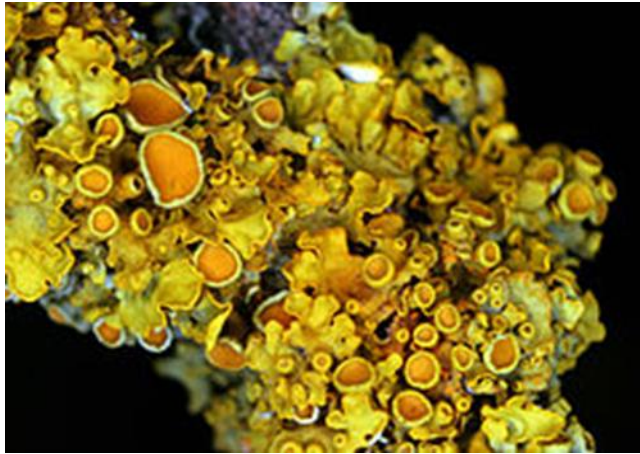
Yapılan bu çalışmada, *Xanthoria parietina* türünde alüminyum 4 farklı konsantrasyonlarda ve 2 farklı zaman diliminde PSII'nin *psbA* geni, toplam GSH ve GR aktivitesi üzerinde etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bunun yanı sıra spermidinin alüminyum toksisitesine karşı korumada ne gibi roller üstlenebildiği ortaya konmaya çalışılmıştır.

### 3. MATERYAL ve METOD

#### 3.1. Materyal ve Deney Düzenegi

Bu çalışmada kullanılan *Xanthoria parietina* (L) Th. Fr. liken türü Gülümbe / Bilecik, Türkiye (N 40 ° 11,526 'E 029 ° 57.962') *Pinus sp.* kabuklarından toplanmıştır.

Kingdom	:	<i>Fungi</i>
Division	:	<i>Ascomycota</i>
Class	:	<i>Lecanoromycetes</i>
Order	:	<i>Teloschistales</i>
Family	:	<i>Teloschistaceae</i>
Genus	:	<i>Xanthoria</i>
Species	:	<i>Xanthoria parietina</i> (L.) Th. Fr. (1860)



Şekil 3. 1. *Xanthoria parietina*'nın genel görünüşü.

Örnekler, yabancı maddelerden temizlenmiş, plastik torbalar içinde laboratuara aktarılmış ve yüzeydeki tozlarından arındırmak için distile su ile üç kez yıkanmıştır. *Xanthoria parietina* tallus örneklerine 30 dakika süre ile 4 farklı konsantrasyonda (0,1,

0,25, 0,5, 1mM) 50 ml AlCl<sub>3</sub> çözeltileri uygulanmıştır. Hiç uygulama yapılmayan kontrol grubu ile birlikte 5 farklı deneme kurulmuştur. Kontrol ve uygulama yapılan *Xanthoria parietina* tallusları petri kapları içerisinde oda koşullarında 24 saat ve 48 saat bekletilmiştir. 48 saatin sonunda örnekler distile su ile 5 saniye boyunca 3 kez durulanmıştır. Spermidin rolünü incelemek için ise 30 dakika 1.0 mM Spd (Fluka, Lot#85578) uygulanmış ve daha önce belirlediğimiz şekilde Al stresine maruz bırakılmıştır.

### **3.2. Glutatyon Redüktaz (GR) Aktivitesi**

Glutatyon redüktaz aktivitesi, Glutatyon Redüktaz Enzim İmmün Kiti (Lot# fr.19.30442) protokolüne göre analiz edilmiş ve numuneler 3 kez çalışılmıştır.

#### **Protokol:**

0,1 gr tartılan örneklerin üzerine 2 ml 0,05M PBS ilave edilmiştir ve 13,000 rpm de, +4°C'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısımdan 10 ml alınarak dilüent buffer ile 1:25 seyreltme yapılmış ve 200µl'si spektro küvetlerine alınmıştır. Ölçüm yapılmadan önce 200µl GSSH, 200µl NADPH ve 500 µl distile su ilave edilmiştir ve 340 nm Eliza Reader (Thermo scientific) 1 dakika aralıklarla 5 dakika boyunca ölçüm yapılmıştır. Tüm analizler normal koşullar altında gerçekleştirilmiştir.

### **3.3. Toplam Glutatyon (GSH) Analizi**

Toplam GSH analizi; OxiSelect Total Glutathione (GSSG/GSH) Assay Kiti (Cat No: STA-312) protokolüne göre analiz edilmiştir.

#### **Protokol:**

Liken tallusları soğuk %5'lik Metafosforik asit (1mL/100mg) ile havanda homojenize edilmiştir. 4°C'de 15 dakika boyunca 12,000 rpm de santrifüj edilmiştir ve süpernatant alınmıştır. Daha sonra her bir numune 1X Glutatyon Redüktaz çözeltilisinden 25 µl ve 1X NADPH çözeltilisinden 25µl ilave edilmiştir. Hazırlanan glutatyon standartlarından ve numunelerden 100 µl ilave edilmiştir. Son olarak da 1X Chromogen ilave edilmiştir ve hızlı bir şekilde 1'er dakika ara ile 10 dakika boyunca 405 nm de Eliza Reader (Thermo scientific) okuma yapılmıştır. İşlemler 3 kez tekrarlanmıştır.

### 3.4. Lipit Peroksidasyonu

Lipid peroksidasyon analizi için; lipid peroksidasyonunun göstergesi olan malondialdehit (MDA) miktarı ölçülmüştür. Heath ve Packer, (1968) tarafından gösterilen yöntem ile çalışma yapılmıştır.

#### **Protokol:**

1 gr liken tallusu sıvı azot ile toz haline getirilmiş ve 5 mL % 0,1'lik trikloroasetik asit (TCA) ile homojenize edilmiştir. 7400 g'de 20 dk santrifüj edilmiş ve süpernatanttan 1200 µl alınarak üzerine 4800 µl tiyobarbütrik asit (TBA) ilave edilmiştir. 100°C'de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra 532 ve 600 nm'de ölçüm alınmış ve her bir grup için üç tekrar yapılmıştır.

MDA (nmol cm<sup>-1</sup>) = 1000[(Abs 532 - Abs 600)/155] formül yardımı ile hesaplamalar yapılmıştır.

### 3.5. Klorofil Yıkım Tayini

Klorofil analizi Wellburn (1994) tarafından açıklanan yöntem kullanılarak belirlenmiştir.

#### **Protokol:**

100 mg liken tallusu 1 mL DMSO (Dimetilsülfoksit) ile çözülmüştür. Üzerine 3 mL DMSO ilave edilerek çözülme işlemi tamamlanmıştır. Daha sonra 65°C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra soğutma işlemi tamamlanmış ve ekstraktların ölçümü 665.1 ve 649.1 nm dalga boylarında UV- Spektrofotometre (Perkin Elmer)'de yapılmıştır. Bütün işlemler karanlık ortamda gerçekleştirilmiş ve 3 kez tekrarlanmıştır.

$$\text{Chla (mg/L)} = 12.19 A_{665} - 3.45A_{649}$$

$$\text{Chlb (mg/L)} = 21.99 A_{649} - 5.32A_{665}$$
 formülleri ile hesaplama yapılmıştır.

### 3.6. RNA izolasyonu ve cDNA eldesi

RNA ekstraksiyonu için sıvı azot ile toz haline getirilmiş, 0,1 gr liken tallusu 1ml TRİZOL ile havanda homojenize edilmiştir. Üzerine 200 µl kloroform ilave edilmiş, 15 saniye şiddetli bir şekilde vortekslenmiş ve 2-3 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Örnekler 4°C'de 15 dakika 12,000 g'de santrifüj edilmiş ve süpernatant kısımdaki RNA yeni bir ependofa alınarak 0,5 ml izoproponal ile çöktürülmüştür. 10

dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmış ve daha sonra 4°C’de 10 dakika 12,000 g’de tekrar santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak pelletteki RNA 1ml % 75’lik etanol ile 2 kez yıkanmış ve vorteksleme yapıldıktan sonra 4°C’de 5 dakika 7500 g’de santrifüj edilmiştir. Pellette bulunan izole edilmiş RNA 5-10 dakika hava ile kurutulmuştur. A260/A280 saflık değerini verir ve RNA için 2’ye yakın olması beklenir. RNA’dan cDNA elde etmek için Intron He High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Invitrogen, Cat No: 4398814) kullanılmıştır.

**Protokol:**

Elde edilen RNA’dan 10 µl ve oligo (dT) primerden (70 µM) 2 µl ependorfa ilave edilmiş ve dikkatlice karıştırılmıştır. 70°C sıcaklıkta 5 dakika bıraktıktan sonra hemen buza alınmıştır. Buzun üzerindeyken 5X RT Bufferdan 8 µl, dNTP (2mM)’ dan 2 µl ve dH<sub>2</sub>O’dan 19 µl eklenmiştir. 37°C’de 5 dakika inkübasyona bırakılmış ve daha sonra 1µl Reverse Transcriptase ilave edilmiştir. 42°C’de 60 dakika inkübasyona bırakılmış ve 70°C’de 10 dakika inkübe edilerek enzim inhibe edilmiştir.

**3.7. Yarı Nicel RT-PCR Analizi**

PCR reaksiyonları, *gapdh* primerleri kullanılarak gerçekleştirilmiş ve aşağıdaki primer dizileri *psbA* için kullanılmıştır:

Sentez 5’-CACTAATCCGTGAACTACT-3’

Antisentez 5’-TAATCGTCCAAAGTAACCGTG-3’

**Protokol:**

PCR için 1µl cDNA, 2,5 µl 10X PCR buffer Mg<sup>++</sup>, 0,65 µl 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µl 10 mM dNTP karışımı, 0,6 µl BSA (Bovine Serum Albümin), 0,5 µl her biri 10 µM olan primer ve 0,4 µl rekombinant Taq DNA polimeraz (Fermentas) kullanılmıştır.

Thermal cycle (Biorad) DNA’yı denatüre etmek için 5 dakika boyunca 95°C de başlatılmıştır. PCR analizi 95°C’de 1 dakika denatürasyon (ilk döngü hariç: 95°C’de 5 dakika) 53°C’de 1,15 dakika annealing, 72 °C’de 1,15 dakika sentez (son döngü hariç 72 °C ‘de 10 dakika) içeren 34 döngü ile gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyon 72 °C ‘de 10 dakika sonucunda ürünler elde edilmiş ve -20°C de saklanmıştır. Elde edilen PCR ürünleri 0,5 µg ml<sup>-1</sup> etidyum bromid içeren %2’lik agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür (jel 1X TBE (Tris-Borat-EDTA) buffer kullanılarak hazırlanmıştır).

### **3.8. İstatistiksel Analizler**

Bu çalışmada istatistiksel analizler Windows için SPSS, one-way analizi (ANOVA) da dahil olmak üzere ve Tukey ikili karşılaştırmaları kullanılarak yapılmıştır.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Alüminyum Elementinin Klorofil a Yıkımı Üzerine Etkisi

Bu çalışmada farklı konsantrasyonlarda Al uygulaması yapılan örneklerde farklı zaman dilimlerine bağlı olarak klorofil a yıkım oranı (kl a/b) belirlenmiş ve bu veriler Çizelge 4.1’de gösterilmiştir. 0,1 ve 0,25 mM Al uygulaması yapılan örnekler kontrol ile karşılaştırıldığı zaman kl a/b oranında istatistiksel olarak anlamlı bir değişimin olmadığı saptanmıştır. Buna karşın, 0,5 ve 1 mM Al uygulanan örneklerde kl a/b oranında 24 ve 48 saat içinde önemli bir azalma tespit edilmiştir ( $p<0.05$ ).

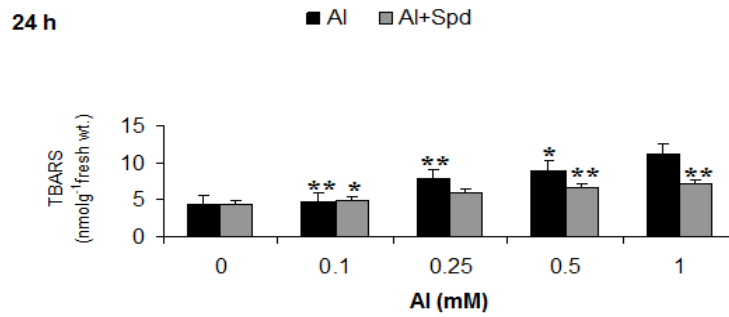
**Çizelge 4. 1.** *X. parietina* türünde farklı konsantrasyonlarda Al ve 1 mM dışsal Spd uygulanan örneklerin farklı zaman dilimine bağlı klorofil a, klorofil b ve klorofil yıkım oranı değerleri.

	N	Kla (mg/g)		Klb(mg/g)		Kla/b	
		24 saat	48 saat	24 saat	48 saat	24 saat	48 saat
Kontrol	3	22.78±0.03	22.19±0.12	6.68±0.28	6.17±0.24	3.41±0.08	3.59±0.12
0.1 mM AlCl <sub>3</sub>	3	22.85±0.19	21.91±0.14	6.96±0.05	6.83±0.04	3.28±0.2	3.21±0.04
0.25 mM AlCl <sub>3</sub>	3	19.41±0.12	18.62±0.09	6.58±0.08	6.98±0.01	2.95±0.06	2.66±0.08
0.5 mM AlCl <sub>3</sub>	3	15.42±0.09	14.55±0.18	7.77±0.23	8.18±0.07	1.98±0.05	1.78±0.08
1 mM AlCl <sub>3</sub>	3	14.46±0.14	11.49±0.03	9.25±0.26	8.74±0.22	1.56±0.11	1.33±0.07
0.1mM Al+Spd	3	25.30±0.08	24.21±0.06	6.47±0.01	6.74±0.11	3.91±0.12	3.60±0.11
0.25mMAl+Spd	3	22.37±0.06	21.68±0.03	6.82±0.07	7.19±0.08	3.28±0.08	3.013±0.08
0.5mM Al+Spd	3	20.73±0.12	19.90±0.01	7.52±0.26	7.94±0.08	2.76±0.02	2.48±0.03
1 mM Al+Spd	3	19.23±0.05	18.32±0.09	8.14±0.18	8.53±0.23	2.36±0.08	2.17±0.07
ANOVA							
<i>F</i> istatistik		0.88	1.18	4.12	92746.1	90769.25	20396496.74
<i>P</i>		0.5537	0.3643	0.0060	<0.0001	<0.0001	<0.0001

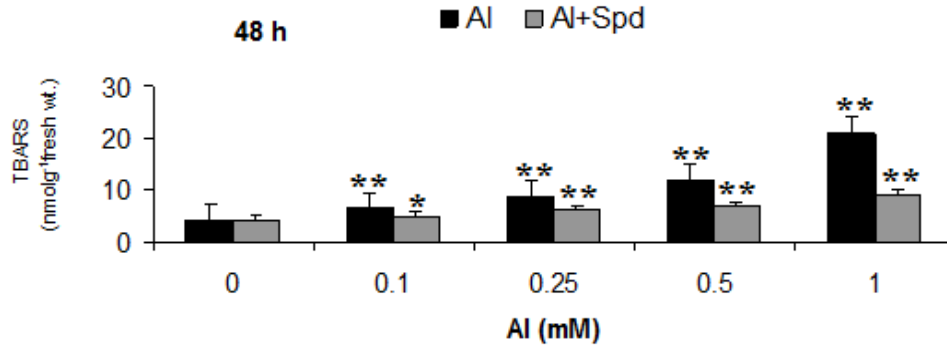
Spd uygulaması yapılan deney gruplarında 0,1 ve 0,25 mM Al uygulanan liken talluslarında kl a/b oranında önemli bir değişim gözlenmezken, 0,5 ve 1 mM Al uygulaması yapılan örneklerde bu oranın Spd uygulanmayan örneklere göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir ( $p<0.05$ ). Spermidinli 0,5 ve 1 mM Al uygulanmış örneklerin 48 saatteki kl a/b oranı Çizelge 4.1’de gösterildiği gibi sırası ile 2,48 ve 2,17 mg/g’dır. Kl a/b oranı spermidinli gruplarda 0,5 ve 1 mM Al uygulanan örneklerde her ne kadar kontrole göre düşüş gözlemlense de kl a/b değeri 4-2 arasındadır.

#### 4.2. Alüminyum Uygulaması Yapılan Örneklerde Lipid Peroksidasyon Sonuçları

Bu çalışmada Al stresine maruz bırakılmış ve spermidin uygulaması yapılmış örnekler de, farklı zaman dilimine bağlı olarak Malondialdehit içeriğini belirleyerek *X. parietina* tallusunda strese bağlı oluşan lipid peroksidasyon oranı gözlenmiştir. Al uygulaması 0,5 ve 1 mM konsantrasyonlardaki 48. saatteki örneklerde MDA içeriğinin önemli bir derecede artmasına (sırasıyla 19,5 ve 30,1 nmol/g taze ağırlık) neden olmuştur (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2). Spd uygulanan örneklerde lipid peroksidasyon oranının Spd uygulanmayan gruplara göre istatistiksel açıdan anlamlı bir düşüş gösterdiği tespit edilmiştir. 1 mM Spd ile muamele edilmiş 0,5 ve 1 mM Al uygulanan 48 saatlik gruplarda MDA içeriği sırasıyla 6,8 ve 8,21 nmol/g taze ağırlık olarak belirlenmiştir.



**Şekil 4. 1.** Farklı konsantrasyonlarda Al uygulanmış *X. parietina* tallusunda Al ve dışal Spd uygulamasının 24 saat sonraki MDA içeriği üzerine etkisi (istatistiksel olarak \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

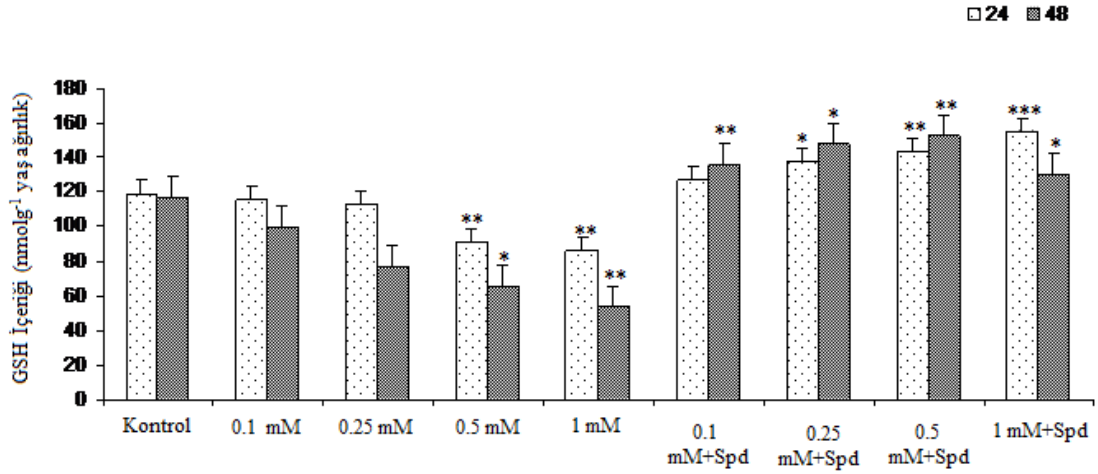


**Şekil 4. 2.** Farklı konsantrasyonlarda Al uygulanmış *X. parietina* tallusunda Al ve dışsal Spd uygulamasının 48 saat sonraki MDA içeriği üzerine etkisi (istatistiksel olarak \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

### 4.3. Toplam Glutasyon İçeriği

Farklı konsantrasyonlardaki Al ve dışsal Spd uygulaması yapılmış gruplardaki toplam glutasyon içeriklerindeki değişimler şekil 4.3'te gösterilmiştir. 24 saatlik gruplarda, 0,1 ve 0,25 mM Al uygulanan örneklerin toplam GSH içeriğinde önemli bir değişim saptanmazken, 0,5 ve 1 mM Al uygulanan liken talluslarında toplam GSH miktarlarında istatistiksel açıdan önemli bir düşüş tespit edilmiştir (kontrole göre sırasıyla 1,3 ve 1,9 kat azalmıştır). 0,1 ve 0,25 mM Al uygulaması yapılan 48 saatlik gruplarda ise toplam GSH miktarı kontrole göre 1,2 ve 1,09 kat artış gösterirken, 0,5 ve 1 mM Al uygulaması yapılan örneklerde sırasıyla 1,41 ve 2,2 katlık bir düşüş belirlenmiştir.

Spd uygulaması yapılan gruplarda ise toplam GSH miktarı tüm uygulama grupların da kontrole göre daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. 24 saatlik uygulama zamanına ait gruplarda, 0,5 ve 1 mM Al uygulanan örnekler de toplam GSH seviyesi kontrole göre sırasıyla 1,34 ve 1,25 kat daha yüksek bulunmuştur (Şekil 4.3).

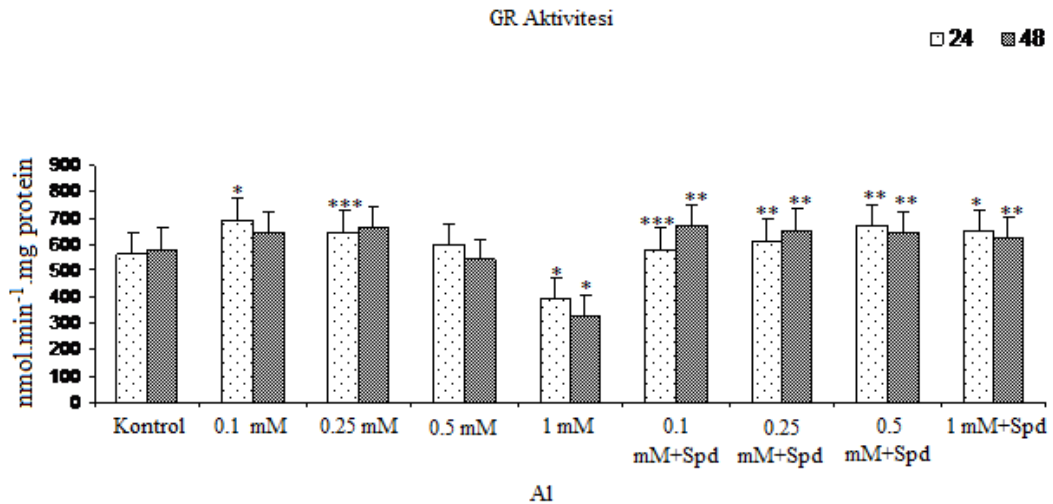


Al

Şekil 4. 3. Spd ve Al stresinin *X. parietina* tallusunda toplam GSH içeriği üzerindeki 24 ve 48 saatlik etkisi (istatistiksel olarak \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

#### 4.4. Glutasyon Redüktaz (GR) Aktivitesi

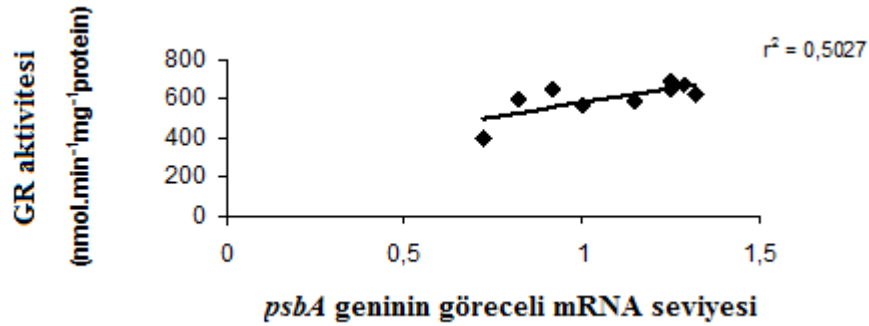
Şekil 4.4'te gösterildiği gibi GR enzim aktivitesinde gruplar arasında önemli değişimler saptanmıştır. GR enzim aktivitesi 0,1, 0,25 ve 0,5 mM Al uygulanmış 24 saatlik örneklerde artar iken, 1 mM Al uygulanmış 48 saatlik gruplarda kontrole göre %55'lik ( $327,57 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ) bir azalış göstermiştir.



Al

Şekil 4. 4. Spd ve Al stresinin *X. parietina* tallusunda GR enzim aktivitesi üzerindeki 24 ve 48 saatlik etkisi (istatistiksel olarak \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ )

Spd uygulanan örneklerde GR aktivitesi hem 24 saat hem de 48 saatlik tüm uygulama ve kontrol gruplarından istatistiksel açıdan anlamlı bir şekilde yüksektir ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  ve  $p < 0.001$ ). Spd uygulaması yapıldıktan sonra Al stresine maruz bırakılmış 48 saatlik örneklerde, GR aktivitesi %15,66, %16,34, %11,00 ve %7,39 oranında artış göstermiştir (Şekil 4.4). Bunun yanı sıra, GR enzim aktivitesindeki artış ve azalışların, *psbA* geninin göreceli mRNA seviyesi ile pozitif korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.5).



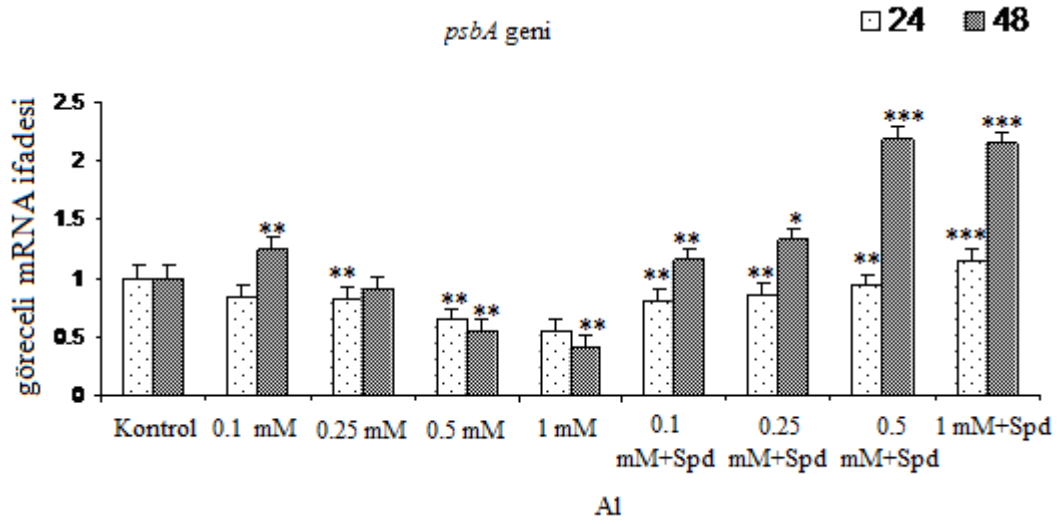
**Şekil 4. 5.** GR enzim aktivitesi ve *psbA* geninin göreceli mRNA seviyesi arasındaki ilişki

#### 4.5. Fotosistem II D1 Protein Geninin (*psbA*) mRNA Düzeyindeki Değişimleri

Fotosistem II D1 protein geninin mRNA seviyesi farklı Al konsantrasyonu ve Spd uygulamasına bağlı olarak değişim göstermiştir (Şekil 4.6). *PsbA* geninin göreceli mRNA seviyesi 24 saatlik tüm Al uygulanan gruplarda sırası ile 0,35, 0,17, 0,45 ve 0,15 kat düşmüştür. 48 saatlik zaman dilimindeki örneklerde ise 0.1 mM Al uygulanan örneklerde mRNA seviyesinde kontrole göre 1,25 kat artış gözlemlenirken, 0,25, 0,5 ve 1 mM Al uygulanan örneklerde sırasıyla 0,92, 0,82 ve 0,72 katlık bir azalış saptanmıştır.

Spd uygulanan gruplar ile uygulanmayan gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı değişimler gözlemlenmiştir. Spd uygulanmış Al stresine maruz bırakılan *X. parietina* talluslarının *psbA* geninin mRNA seviyeleri kontrole göre karşılaştırıldığında, 1 mM Al uygulanan grup dışında diğer tüm uygulama gruplarındaki *psbA* geninin mRNA seviyesinde istatistiksel açıdan önemli bir farklılık olmadığı ortaya konmuştur.

Buna karşın, *psbA* geninin göreceli mRNA seviyesinde, 48 saatlik uygulama gruplarında kontrole göre tüm gruplarda sırası ile 1,15, 1,32, 2,19 ve 2,15 katlık bir artış olduğu saptanmıştır.



**Şekil 4. 6.** Spd ve Al stresinin *X. parietina* tallusunda *psbA* geninin göreceli mRNA seviyesi üzerindeki 24 ve 48 saatlik etkisi (istatistiksel olarak \*  $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Likenlerde metal toksisitesi üzerindeki çalışmalar genellikle bakır (Cu), çinko (Zn), kurşun (Pb), mangan (Mn), alüminyum (Al) ve krom (Cr) elementleri üzerinde yoğunlaşmıştır (Bačkor vd., 2003; Branquinho vd., 1997; Chettri vd., 1988; Garty, 2000; Bačkor ve Fashelt, 2004; Sanità Di Toppi vd., 2008). Buna karşın likenlerde alüminyumun fotosentetik birimler üzerindeki etkileri hala tam olarak anlaşılammıştır. Alüminyum toksisitesi fizyolojik, hücrel ve moleküler biyolojik yaklaşımlarla geniş ölçüde tanımlanmış, reaktif oksijen türevlerinin oluşumuna ve fotosentezin engellenmesine neden olabileceği ortaya konmuştur (Kochian 1995, Ohki 1986).

Fotosentetik ökaryotik organizmalarda, klorofil fotooksidasyon gibi stresi başlatan oksitleyici işlemlere çok duyarlıdır. Klorofil a'nın aldehit II halkası üzerindeki metil grubunun oksidasyonu ile klorofil b oluşturulur (Chettri vd., 1988) ve klorofil a / b oranı, klorofil a + b'ye göre modifikasyona daha hassastır. Yüksek bitkilerde anten genişliği, ışık toplama klorofil a/b protein kompleksinin miktarı ile (Tanaka ve Tanaka, 2006) belirlenmektedir. Anten genişliği ayrıca poliaminler ve transglutaminler ile de ilişkilidir (Ioannidis vd., 2012). Klorofil a'nın klorofil b ye çevrimi sadece klorofil a/b oranını göstermez aynı zamanda klorofil yıkımının da önemli bir belirteçidir. Sağlıklı bir fotosentetik organizmada klorofil a/b oranı 4-2 arasında olması gerektiği önceki çalışmalarda ortaya konulmuştur (Chettri vd., 1988). Bu çalışmada klorofil a/b oranlarının yüksek konsantrasyonlarda ikinin altına düştüğü ve klorofil yıkımının olduğu görülmektedir. Benzer şekilde, Nguyen vd. (1992) *Eucalyptus camaldulensis* bitkisinde alüminyumun neden olduğu oksidatif strese yanıt olarak klorofil yıkımının gerçekleştiğini göstermişlerdir.

Stres koruyucu bileşik olduğu bilinen polikatyonik yapıdaki poliaminlerin, farklı stres koşulları altında klorofil yıkımını önlenmesinde önemli roller üstlendikleri bilinmektedir. Besford vd. (1993)'da Spd ve Spm uygulamasının osmotik şoka maruz bırakılmış yulaf yapraklarında klorofil-protein kompleksinin bulunduğu alandaki tilakoid zarları koruduğunu ve klorofil kaybını engellediğini tespit etmişlerdir. Benzer

şekilde, çalışmamızda da dışsal Spd uygulaması ile alüminyum stresine maruz kalmış *X. parietina* fotobiyontunda klorofil yıkımı engellenmiştir.

Araştırmamızda alüminyumun konsantrasyonunun artışına bağlı olarak lipid peroksidasyonunun başlıca ürünü olan MDA birikiminin arttığı saptanmıştır. Metal toksisitesi fotosentetik organizmalarda lipid peroksidasyonu teşvik etmektedir. Çeşitli yüksek bitkilerde yapılan önceki çalışmalarda saptandığı gibi bunun sebebi hücre zarlarının yapısının bozulmasını sağlayan ROS'un yüksek oranda üretimi olabilir (Shah vd., 2001). Lipid peroksidasyonu en başta zarın yapısına zarar vererek, membranın seçici geçirgenliğini olumsuz etkilemektedir. Turton (1997) biyolojik sistemlerde zar hasarının belirteci olan MDA'nın bulunmasını yapısal hücre zarlarındaki doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu ile ilişkili olabileceğini öne sürmüştür. Ünal vd. (2010) benzer şekilde Cr(VI)'nın konsantrasyonuna ve zamana bağlı olarak MDA içeriğini arttırdığını göstermişlerdir.

Bitki fizyolojisi alanında yapılan araştırmalar, poliaminlerin asit nötralize bileşik olarak davrandığını ve reaktif oksijen türevlerini savuşturarak farklı çevresel koşullarda lipid peroksidasyonunu azaltmak suretiyle zarların stabilitesinde iş gördüklerini öne sürmektedir (Borrell vd., 1997; Bouchereau vd., 1999). Benzer şekilde, Borrell vd. (1997) osmotik strese maruz bırakılmış yulaf yapraklarında Spd ve Spm'nin MDA seviyesini düşürdüğünü tespit etmişlerdir. Groppa vd. (2007) Cd ve Cu stresi uygulanmış buğday yapraklarında yaptıkları araştırmada dışsal Spm uygulamasının lipid peroksidasyon oranını azalttığını rapor etmişlerdir. Çalışmamızda lipid peroksidasyon sonuçlarımıza göre, her ne kadar alüminyum uygulanan gruplarda MDA içeriği yüksek olsa da, dışsal Spd uygulaması yüksek düzeyde lipid peroksidasyonun gerçekleşmesini engellediği görülmüştür. Bu sonuçlar, polikationik özellikte olan spermidinin hücre zarlarına bağlanarak oksidatif strese bağlı lipid peroksidasyonun engellenmesinde iş görebileceğini göstermektedir.

Likenlerde, günümüzde metal stresine tolerans mekanizmasına ilişkin kabul gören en önemli kavramlardan biri Sanitá di Toppi vd., (2008)'nin ortaya attığı "ilk bariyer" ve ikinci bariyer" mekanizmalarıdır. İlk bariyer mekanizmasında, liken asitleri, fitoşelatinler ve GSH gibi tiyoller bulunur. İkinci bariyer mekanizmasında ise özellikle GR gibi antioksidan enzimler ve stres proteinleri yer almaktadır.

Glutasyon, bitki dokularında en yaygın bulunan düşük molekül ağırlıklı tiyoldür. İndirgenmiş sülfürün taşınmasında ve sülfür metabolizmasında önemli rolleri mevcuttur. Aynı zamanda, GSH ROS'un uzaklaştırılmasında etkili bir indirgendir. Stres koşullarında GSH'ın redoks durumu önemli role sahiptir. Okside glutasyon glutasyon-askorbat döngüsünde dehidroaskorbatın askorbata dönüşmesi için gereklidir. Yüksek bitkilerde, oksitlenmiş glutasyon (GSSG) genellikle farklı stres koşullarında artar. Vrábliková vd. (2005) *Umblicaria antarctica* ve *Lasallia pustulata* türlerinde yaptıkları araştırmada GSSG miktarının toplam GSH yüzdesinin yüksek bir kısmını oluşturacak şekilde arttığını tespit etmişlerdir. Stres olmayan koşullarda yüksek bitkilerde daha çok GSH'ın indirgenmiş formu bulunmaktadır. Araştırmamızda alüminyum uygulaması, konsantrasyona bağlı olarak toplam glutasyon içeriğinde azalma meydana gelmiştir. Sanitá di Toppi vd. (2008) fotobiyont *Trebouxia impressa* hücrelerinde yaptıkları araştırmada kadmiyum uygulamasının toplam GSH seviyesini düşürdüğünü tespit etmişlerdir.

İkinci bariyer mekanizmasına ait antioksidan enzimlerinden biri glutasyon redüktaz enzimidir. Stres koşullarında yaygın olarak GR aktivitesinde artış görülmektedir (Marschner, 1986; De Vos vd., 1991). GR, glutasyon-askorbat döngüsünde okside olmuş glutasyonun indirgenmesinde iş görmektedir. Bu çalışmada, GR aktivitesi yüksek konsantrasyonlarda kontrole göre azalma göstermesine karşın, alüminyuma toleranslı olduğu konsantrasyon aralıklarında ise daha yüksek değerlerde olduğu saptanmıştır. Álvarez vd. (2012) *Ramalina farinacea* türüne ait fotobiyontun iki farklı türünde (TR1 ve TR9 olarak adlandırılan *Trebouxia* türleri) kurşun toleransı üzerine yaptıkları çalışmada, GR aktivitesindeki değişimlerin tolerans kapasitesi ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Yine liken *Dermatocarpon luridum*'da bakır stresi altında GR enzim aktivitesinde azalma tespit edilmiştir (Monnet vd., 2006).

Poliaminlerin farklı çevresel stres koşullarında koruyucu rolleri geniş ölçüde çalışılmasına rağmen, bu üstlendikleri rolleri nasıl gerçekleştirdikleri hala tartışılmaktadır. Shen vd., (2000) Spm, Spd ve Put gibi poliaminlerin NADPH oksidaz (EC 1.6.3.1) aktivitesini engelleyerek ROS oluşumunu direkt olarak azaltabileceğini savunmuşlardır. Poliaminlerin koruyucu rolleri ile ilişkili literatürdeki birçok çalışma genellikle Spm üzerinde yoğunlaşmıştır (Groppa vd., 2001). Shu vd. (2011) dışsal Spm uygulamasının glutasyon redüktaz aktivitesini önemli ölçüde artırdığını göstermişlerdir.

Verma ve Mishra (2005) putresinin antioksidan enzimler üzerindeki etkisini sırasıyla APX>GR>CAT>SOD>POD olduğunu rapor etmişlerdir. Benzer şekilde, bu çalışmada dışsal Spd uygulanan alümiyum stresine maruz bırakılmış *X. parietina* talluslarında kontrole göre GR aktivitesinde önemli derecede artış bulunmuştur. Elde ettiğimiz bu sonuçlar, Spd uygulamasının GR enzim aktivitesini artırmak suretiyle, birinci bariyer ve ikinci bariyer savunma mekanizmalarını güçlendirerek, *X. parietina* tallusunun alümiyuma daha toleranslı olmasını sağlamış olabileceğini işaret etmektedir.

Fotohasar görmüş PSII'nin tamiri; (i) hasarlı D1 proteinin yıkımı, (ii) D1 proteinin sentezi, (iii) sentezlenmiş D1 proteinin PSII içine dahil edilmesi gibi pek çok adım gerektirir. Daha önce yapılan çalışmalarda da tuz stresi (Allakhverdiev ve Murata, 2004) ve oksidatif stresin (Nishiyama vd., 2004) *psbA* gen transkripsiyonunu ve translasyonunu inhibe ederek fotohasar görmüş PSII'nin onarımını önlediği bildirilmiştir. Qian vd., (2009b) *C. vulgaris*'te bakır ve kadminyumun transkripsiyonel seviyede *psbA* ve *rbcl* ekspresyonunu inhibe ettiğini göstermiştir. Bu çalışmada *X. parietina psbA* geninin ekspresyonu, iç kontrol olarak *GAPDH* kullanılarak yarı-nicel RT-PCR ile analiz edilmiştir. Elde edilen veriler, Al uygulaması ile *psbA* geninin mRNA seviyesinin düşük olduğunu göstermektedir. *PsbA* mRNA transkriptlerinin azaltılması, klorofil içeriğindeki bir azalmayı takiben PSII aktivitesini ve elektron transfer oranlarını azaltabilir.

Daha önce yapılan araştırmalar, dışarıdan uygulanan poliaminlerden özellikle spermidinin, PSII'ye ait D1 ve D2 proteinlerinin transkriptlerinde ki azalmayı bastırdığı ve bu proteinlerin oksidatif strese bağlı hasar görmesini engellediğini işaret etmektedir (Duan vd., 2009). Hamdani vd. (2011) poliaminlerin PSII'nin D1 ve D2 proteinlerinin stabilitesini koruduğunu ve stres koşulları altında belirgin bir şekilde bu proteinlerin yıkımını geciktirdiğini öne sürmüştür. Çalışmamızın da her ne kadar *psbA* gen ifadesinde Al ile muamele sonucunda azalma meydana gelse de, Spd uygulaması ile bu genin ifadesinde önemli bir artış tespit edilmiştir.

*PsbA* geni, yeni D1 proteinin tekrar sentezlenmesinden sorumlu olmakla beraber, stres direnci boyunca D1 proteinin çevriminde önemli bir rol oynamaktadır (Mulo vd., 2009). D1 proteinin yenilenmesi de fotosentetik birimlerde meydana gelen ROS düzeyinin kontrolü ve antioksidan savunma mekanizmasının kapasitesine bağlıdır.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlarımıza dayanarak, dışsal spermidin uygulamasının antioksidan kapasite ile ilişkili glutasyon redüktaz enziminin aktivitesini artırmasına bağlı olarak, yeni D1 proteinin sentezlenmesini sağladığını ve bu şekilde alüminyum stresine karşı toleransı artırdığını düşünmekteyiz.

Sonuç olarak alüminyum stresinin, likenlerde stres belirteci olan klorofil a yıkımına sebep olarak fotosentetik aparatlara zarar verdiği ve reaktif oksijen türlerinin oluşmasını arttırıp, fotosentez tamir mekanizmasını inhibe ederek fotosentezi inaktive ettiği görülmüştür. Bununla beraber ise dışsal spermidinin klorofil a yıkımını ve lipit peroksidasyonunu azalttığı, güçlü bir antioksidan olan glutasyon redüktaz aktivitesini arttırdığı, buna bağlı olarak da fotosistem II tamir mekanizmalarını aktive ettiği bulunmuştur.

## KAYNAKLAR

- Adams, W. W. III and Demmig-Adams, B., “Operation of the Xanthophyll Cycle in Higher Plants in Response to Diurnal Changes in Incident Sunlight”, *Planta*, 186: 390–398 (1992).
- Agarwal, S., Sairam, R. K., Srivastava, G. C. and Meena, R. C., “Changes in Antioxidant Enzymes Activity and Oxidative Stress by Abscisic Acid and Salicylic Acid in Wheat Genotypes”, *Biologia Plantarum*, 49 (4): 541-550 (2005).
- Akkuş, I., “Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri”, *Mimoza Yayınları*, Konya, 1995.
- Allakhverdiev, S. I. and Murata, N., “Environmental Stress Inhibits the Synthesis de Novo of Proteins Involved in the Photodamage-Repair Cycle of Photosystem II in *Synechocystis* sp. PCC 6803”, *Biochim. Biophys. Acta*, 1657: 23–32 (2004).
- Alscher, R. G., Ertürk, N. and Heath, L. S., “Role of Superoxide Dismutases (SODs) in Controlling Oxidative Stress in Plants”, *Journal of Experimental Botany*, 53(372): 1331-1341 (2002).
- Álvarez, R., Del Hoyo, A., Garcia-Breijo, F., Reig-Arminana, J., Del Campo, E. M., Guera, A., Barreno, E. and Casano L.M., “Different Strategies to Achieve Pb-Tolerance by the Two *Trebouxia* Algae Coexisting in the Lichen *Ramalina farinacea*”, *Journal of Plant Physiology*, 169: 1797–1806 (2012).
- Aro, E. M., Virgin, I. and Andersson, B., “Photoinhibition of Photosystem II Inactivation, Protein Damage and Turnover”, *Biochim Biophys Acta*, 1143: 113-134 (1993).
- Asada, K. and Takahashi, M., “Production and Scavenging of Active Oxygen in Photosynthesis, In Photoinhibition”, *Kyle D.J., Osmond B.J., Arntzen C. J.*, eds, Elsevier, Amsterdam, 227-287 (1987).
- Asada, K., “Radical Production and Scavenging in Chloroplasts”, *In Photosynthesis and the Environment*, 123–150 (1996).

- Asada, K., Endo, T., Mano, J. and Miyake, C. "Molecular Mechanisms for Relaxation of Protection from Light Stress", *In: Satoh, K. and Murata, N.* eds, Elsevier Science B.V., Amsterdam (1998).
- Bačkor M. and Fahselt, R. "Using EDX-microanalysis and X-ray Mapping to Demonstrate Metal Uptake by Lichens", *Biologia*, Bratislava 59: 39-45 (2004).
- Bačkor M., Fahselt D., Davidson R. and Wu C. T., "Effects of Copper on Wild and Tolerant Strains of the Lichen Photobiont *Trebouxia erici* and Possible Tolerance Mechanisms", *Arch Environ Contam Toxicol*, 45: 159-167 (2003).
- Bačkor, M., Gibalová, A., Bud'ová, J., Mikeš, J. and Solár, P., "Cadmium-Induced Stimulation of Stress-Protein Hsp70 in Lichen Photobiont *Trebouxia erici*", *Plant Growth Regul.*, 50:159-164, (2006).
- Barber, J., Nield, J., Morris, E. P. and Hankamer, B., "Subunit Positioning in Photosystem II Revisited", *Trends Biochem Sci*, Vol. 24: (2) 43-45 (1999).
- Beckett, R. P., Minibayeva, F. V. and Laufer, Z., "Extracellular Reactive Oxygen Species Production by Lichens", *Lichenologist*, 37:397-407 (2005).
- Berry, J. A. and Björkman, O., "Photosynthetic Response and Adaptation to Temperature in Higher Plants", *Annu Rev Plant Physiol*, 31: 491-543 (1980).
- Besford, R. T., Richardson, C. M., Campos, J. L. and Tiburcia, A. F., "Effect of Polyamines on Stabilization of Molecular Complexes in Thylakoid Membranes of Osmotically Stressed Oat Leaves", *Planta*, 189: 201-206 (1993).
- Blokhina, O. Virolinen, E. and Fagerstedt, K. V., "Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: A Review", *Annals of Botany*, 91: 179-194 (2002).
- Borrell, A., Carbonell, L., Farras, R., Pung-Parallada, P. and Tiburcio, A. F., "Polyamines Inhibit Lipid Peroxidation in Senescing Oat Leaves", *Physiol. Plant.* 99: 385-390 (1997).
- Boscolo, P. R. S., Menossi, M. and Jorge, R. A., "Aluminum-induced Oxidative Stress in Maize", *Phytochemistry*, 62: 181-189 (2003).
- Bouchereau, A., Aziz, A., Larher, F. and Martin-Tanguy, J., "Polyamines and Environmental Challenges: Recent Developments", *Plant. Sci.* 140: 103-125 (1999).

- Branquinho, C., Brown, D. H. and Catarino, F., “The Cellular Location of Cu in Lichens and its Effects on Membrane Integrity and Chlorophyll Fluorescence”, *Environ. Exp. Bot.*, 38: 165-179 (1997).
- Breusegem, F. V., Vranova, E., Dat, J. F. and Inze D., “The Role of Active Oxygen Species in Plant Signal Transduction”, *Plant Science*, 161: 405–414 (2001).
- Chettri, M. K., Cook, C. M., Vardaka, E., Sawidis, T. and Lanaras, T., “The Effect of Cu, Zn, and Pb on the Chlorophyll Content of Lichens *Cladonia convolute* and *Cladonia rangiformis*”, *Environ. Exp. Bot.*, 39: 1-10 (1988).
- Çakmak, I. and Horst, J. H., “Effects of Alüminum on Lipid Peroxidation, Superoxide Dismutase, Catalase and Peroxidase Activities in Root Tips of Soybean (*Glycine max*)”, *Physiol. Plant.*, 83: 463-468 (1991).
- Çiftçi, M., Küfrevioğlu, O. I., Gündoğdu, M., Ozmen, I., “Effects of Some Antibiotics on Enzyme Activity of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from Human Erythrocytes”, *Pharmacol Res.*, 41(1): 109-113 (2000)
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé, D. and Breusegem F. V., “Dual Action of the Active Oxygen Species During Plant Stress Responses”, *Cell Mol. Life Sci.*, 57: 779–795 (2000).
- De Vos, C. H. R., Schat, H., De Waal, M. A. M., Voojs, R., Ernst, W. H. O., “Increased Resistance to Copper-Induced Damage of Root Cell Plasmalemma in Copper Tolerant *Silene cucubalus*”, *Physiologia Plantarum* 82: 523-528 (1991).
- Deng, X. W., Stern, D. B., Tonkyn, J. C. and Gruissem, W., “Plastic Run-on Transcription Application to Determine the Transcriptional Regulation of Spinach Plastid Genes”, *J.Biol. chem.*, 262, 9641-9648 (1987).
- Dewez, D., Geoffroy, L., Vernet, G. and Popovic, R., “Determination of Photosynthetic and Enzymatic Biomarkers Sensitivity Used to Evaluate Toxic Effects of Copper and Fludioxonil in Alga *Scenedesmus obliquus*”, *Aquat. Toxicol.*, 74: 150-159 (2005).
- Duan, J. J., Guo, S. R., Kang, Y. Y., Zhou, G. X. and Liu, X. E., “Effects of Exogenous Spermidine on Active Oxygen Scavenging System and Bound Polyamine Contents in Chloroplasts of Cucumber Under Salt Stress”, *Acta Ecol. Sinica* 29, 0653–0661 (2009).

- Dzubaj, A., Bačkor, M., Tomko, J., Peli, E., Tuba, Z., “Tolerance of the Lichen *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr. to metal stress”, *Ecotoxicol. Environ Safe*, 70: 319–326 (2008).
- Ellis, R. J., ”Chloroplast Proteins: Synthesis, Transport and Assembly”, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 32: 111-137 (1981).
- Farber, P. M., Arscott, L. D., Williams, C. H., Becker, K., Schirmer, R. H., “Recombinant Plasmodium Falciparum Glutathione Reductase is Inhibited by the Antimalarial Dye Methylene Blue”, *FEBS Letters*, 422: 311-314 (1998).
- Fine, P. L. and Frasch, W. D., “The Oxygen-Evolving Complex Requires Chloride To Prevent Hydrogen Peroxide Formation”, *Biochemistry*, 31: 12204-12210 (1992).
- Foy C. D., “Soil Chemical Factors Limiting Plant Root Growth”, In: Hatfield J.L., Stewart BA, eds., Limitations to plant root growth, *New York: Springer Verlag*, 97–149 (1992).
- Foyer, C. H. and Noctor, G., “Oxygen Processing in Photosynthesis: Regulation and Signaling”, *New Phytologist*, 146: 359-388 (2000).
- Foyer, C. H., Lelandais, M. and Kunert, K. J., “Photooxidative Stress in Plants”, *Physiol Plantarum*, 92: 696-717 (1994).
- Gallagher, T. F. and Ellis, R. J., “Light-stimulated Transcription of Genes for Two Chloroplast Polypeptides in Isolated Pea Leaf Nuclei”, *EMBO J.*, 1: 1493-1498 (1982).
- García, P. C., Rivero, R. M., López-Lefebvre, R., Sánchez, E., Ruiz, J. M. and Romero, L., “Response of Oxidative Metabolism to the Application of Karbendazim Plus Poron in Tobacco”, *Australian Journal of Plant Physiology*, 28(8)10: 1071/PP00098: 801-806 (2001).
- Garty, J., Karary, Y. and Harel, J., “Effect of Low pH, Heavy Metals and Anions on Chlorophyll Degradation in the Lichen *Ramalina duriaei*”, *Bagl. Environ. Exp. Bot.*, 32: 229-241 (1992).
- Garty, J., Weismann L., Tamir, O., Beer, S., Cohen, Y., Karnieli, A. and Orlovsky, L., “Comparison of Five Physiological Parameters to Assess the Vitality of the Lichen *Ramalina lacera* Exposed to Air Pollution”, *Physiol. Plantarum*, 109: 410-418 (2000).

- Groppa, M. D., Tomaro, M. L. and Benavides, M. P., “Polyamines and Heavy Metal Stress; the Antioxidant Behaviour of Spermine in Cadmium- and Copper-Treated Wheat Leaves”, *BioMetals* 20, 185–195 (2007).
- Groppa, M. D., Tomaro, M. L. and Benavides, M. P., “Polyamines as Protectors Against Cadmium or Copper-Induced Oxidative Damage in Sunflower Leaf Discs”, *Plant. Sci.*, 161, 481-488 (2001).
- Hall, R. S. B., Paulson, M., Duncan, K., Tobin, A. K., Widell, S. and Bornman, J. F., “Water- and temperature- Dependence of DNA Damage and Repair in the Fruticose Lichen *Cladonia arbuscula* ssp. *Mitis* Exposed to UV-B Radiation”, *Physiol. Plantarum*, 118: 371-379 (2003).
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M., “Free Radicals in Biology and Medicine”, 2th Edition. *Oxford, Clarendon Press. England.*, 125 (1989).
- Hamdani, S., Gauthier, A., Msilini, N. and Carpentier, R., “Positive Charges of Polyamines Protect PSII in Isolated Thylakoid Membranes During Photoinhibitory Conditions”, *Plant Cell Physiol.*, 52, 866–873 (2011).
- Haynes, R. J. and Mokolobate, M. S., “Amelioration of Al Toxicity and P Deficiency in Acid Soils by Additions of Organic Residues: A Critical Review of the Phenomenon and the Mechanisms Involved”, *Nutr. Cycl. Agroecosyst.*, 59: 47–63 (2001).
- Heath, R. L. and Packer, L., “Photoperoxidation in Isolated Chloroplast: 1. Kinetics and Stoichiometry of Fatty Acid Peroxidation”, *Arch. Biochem. Biophys.*, 125: 189-198 (1968).
- Horst, W. J., “The Role of The Apoplast in Aluminum Toxicity and Resistance of Higher”, *Plants Bodenk.*, 158: 419-428 (1995).
- Howitt, C. A., Cooley, J. W., Wiskich, J. T. and Vermaas, W. F., “A Stain of *Synechocystis* sp. PCC 6803 Without Photosynthetic Oxygen Evolution and Respiratory Oxygen Consumption: Implications For The Study of Cyclic Photosynthetic Electron Transport”, *Planta*, 214: 46-56 (2001).
- Ioannidis, N. E., Lopera, O., Santos, M., Torne, J. M. and Kotzabasis, K., “Role of Plastid Transglutaminase in LHClI Polyamination and Thylakoid Electron and Proton Flow”, *Plos One*, 7 (7): e41979 (2012).

- Jeanjean, R., Bedu, S., Havaux, M., Matthijs, H. C. P. and Joset, F., “ Salt Induced Photosystem I Cyclis Elekctron Transfer Restores Growth on Low Inorganic Carbon in a Type I NAD(P)H Dehydrogenase Deficient Mutant of *Synechocystis* PCC 6803”, *FEMS Microbial. Lett.*, 167: 131-137 (1998).
- Kacar, B., “Bitki ve Toprağın Kimyasal Analizler: III, Bitki Analizleri”, *Ankara Üniv., Bizim Büro Basımevi*, Ankara, Türkiye, 543-581 (1972).
- Kacar, B., Katkat, V. and Öztürk, Ş., “Stres Fizyolojisi” Bitki Fizyolojisi, *Nobel Yayıncılık*, Ankara, Türkiye, 517-521 (2002).
- Kappen, L., Schroeter, B., Green, T. G. A. and Seppelt, R. D., “Chlorophyll a Fluorescence and CO<sub>2</sub> Exchange of Umblicaria Aprina Under Extreme Light Stress in the Cold”, *Oecologia*, 113: 325-331 (1998).
- Karpinski, S., Escobar, C., Karpinska, B., Creissen, G. and Mullineaux, P. M., “Photosynthetic Electron Transport Regulates the Expression of Cytosolic Ascorbate Peroxidase Genes in *Arabidopsis* During Excess Light Stres”, *Plant Cell*, 9: 627-640 (1997).
- Kauppi, M., Kauppi, A. and Garty, J., “Ethylene Produced by the Lichen *Cladonia stellaris* Exposed to Sulphur and Heavy Metal Containing Solutions Under Acidic Conditions”, *New Phytol.*, 139: 537-547 (1998).
- Kaur-Sawhney, R., Flores, H. E. and Galston, A. W., “Polyamine Induced DNA Synthesis and Mitosis in Oat Leaf Protoplasts; *Plant Physiol.* 65(2): 368-71 (1980).
- Keha, E. and Küfrevioğlu, Ö. D., “*Biyokimya*”, 3. Baskı, *Aktif Yayınevi*, Erzurum, 642 (2004).
- Klein, R. R. and Mullet, J. E., “Control of Gene Expression During Higher Plant Chloroplast Biogenesis. Protein Synthesis and Transcript Levels of *psbA*, *psaA-psaB* and *rbcL* in Dark-grown and Illuminated Barley Seedlings”, *J. Biol. Chem.*, 262: 4341-4348 (1987).
- Kochian, L. V., “Cellular Mechanisms of Alüminum Toxicity and Resistance in Plants”, *Physiol Plant Mol. Biol.*, 46: 237-260 (1995).
- Kranner, I., “ Glutathione Sttus Correlates with Different Degrees of Desiccation Tolerance in Three Lichens”, *New Phytologist*, 154:451–460 (2002).

- Kuznetsov, V. V., Radyukhia, N. L. and Shevyakova, N. I., “Polyamines at Stress Biological Role, Metabolism and Regulation”, *Russ. J. Plant Physiol.*, 53: 658-684 (2006).
- Küçükakyüz, K., “Alüminyum ( $Al^{3+}$ )’a Dayanıklı (Tam 202) ve Duyarlı (Tam 105) Buğday (*Triticum aestivum* L.) Çeşitlerinin Köklerinde Al’un Toksik Etkilerinin Karşılaştırılması”, Doktora tezi, *Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İzmir, (2002).
- Legocka, J. and Zajchert I., “Role of Spermidine in the Stabilization of the Apoprotein of the Light-harvesting Chlorophyll a/b-protein Complex of Photosystem II During Leaf Senescence Process”, *Acta Physiol. Plant.*, 21: 127-132 (1999).
- Logan, B. A., Korniyev, D., Hardison, J., Holaday, A. S., “The Role of Antioxidant Enzymes in Photoprotection.”, *Photosynth Res*, 88: 119–132 (2006).
- Margulies, M. M., Tiffany, H. L. and Hattori, T., “Photosystem I Reaction Center Polypeptides of Spinach are Synthesized-bound Ribosomes”, *Arch. Biochem. Biophys.*, 254: 454-461 (1987).
- Marschner, H., “Mineral Nutrition of Higher Plants”, *Academic Press Inc. San Diego.*, 674 (1986).
- Matsomoto, H., “Cell Biology of Aluminum Toxicity and Tolerance in Higher Plants”, *Int Rev Cytol*, 200: 1–46 (2000).
- Mittler, R., “Oxidative Stress, Antioxidants and Stress Tolerance”, *Trends in Plant Science*, 7: 405-410 (2002).
- Monnet, F., Bordas, F., Deluchat, V., Baudu, M., “Toxicity of Copper Excess on the Lichen *Dermatocarpon luridum*: Antioxidant Enzyme Activities”. *Chemosphere (in press)*, DOI 10: 1016 (2006).
- Mullineaux, P. M. and Karpinski, S., “Signal Transduction in Response to Excess Light: Getting Out of the Chloroplast”, *Current Opinion in Plant Biology*, 5: 43-48 (2002).
- Mulo, P., Sicora, C. and Aro, E. M., “Cyanobacterial *psbA* Gene Family: Optimization of Oxygenic Photosynthesis”, *Cell. Mol. Life. Sci.*, 66: 3697-3710 (2009).
- Murata, N., Takahashi, S., Nishiyama, Y., Allakhverdiev, S., “Proinhibition of Photosystem II Under Environmental Stress”, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1767: 1408-1411(2007).

- Nash III, T. H., "Lichen Biology", *Cambridge University Press*, New York, 171 (1996).
- Nguyen, M. L. and Goh, K. M., "Status and Distribution of Soil sulphur Fractions, Total Nitrogen and Organic Carbon in Camp and Non-camp Soils of Grazed Pastures Supplied With Long-term Superphosphate", *Biol. Fertil. Soils*, 14: 181–190 (1992).
- Nichol, B., Oliveria, L. A., Glass, A. D. M. and Siddiqi, M. Y., "The Effects of Aluminium on the Influx of Calcium, Potassium, Ammonium, Nitrate and Phosphate in an Aluminium-Sensitive Cultivar of Barley (*Hordeum vulgare* L.)", *Plant Physiol.*, 101: 1263-1266 (1993).
- Nishiyama, Y., Allakhverdiev, S. I., Yamamoto, H., Hayashi, H. and Murata, N., "Singlet Oxygen Inhibits the Repair of Photosystem II by Suppressing Translation Elongation of the D1 Protein in *Synechocystis* sp. PCC 6803", *Biochemistry*, 43: 11321-11330 (2004).
- Nishiyama, Y., Yamamoto, H., Allakhverdiev S. I., Inaba, M., Yokota, A. and Murata, N., "Oxidative stress inhibits the Repair of Photodamage to the Photosynthetic Machinery", *EMBO J*, 20: 5587-5594 (2001).
- Ohki, K., "Photosynthesis, Chlorophyll, and Transpiration Responses in Aluminium Stressed Wheat and Sorghum". *Crop Sci.* 26, 572–575 (1986).
- Panda, S. K., Chaudhury, I. and Khan M. H., "Heavy Metals Induce Lipid Peroxidation and Affects Antioxidants in Wheat Leaves", *Biol. Plant.*, 46: 289-294 (2003).
- Pawlik-Skowrońska, B. and Bačkor, M., "Zn/Pb Tolerant Lichens With Higher Content of Secondary Metabolites Produce Less Phytochelatins Than Specimens Living in Unpolluted Habitats", *Environmental and Experimental Botany - ENVIRON EXP BOT*, 72: 64-70 (2011).
- Pawlik-Skowrońska, B., Sanità di Toppi, L., Favali, M.A., Fossati, F., Pirszel, J. and Skowroński, T., "Lichens Respond to Heavy Metals by Phytochelatin Synthesis", *New Phytol.*, 156: 95-102, (2002).
- Pegg, A. E., "Polyamine Metabolism and its Importance in Neoplastic Growth and a Target for Chemotherapy", *Cancer Res.*, 15; 48(4): 759-74 (1988).
- Petrucci, R. H., "General Chemistry", *Macmillian Publishing Company*, New York, USA 685-689 (1985).

- Pietraszewska-Mossor, T., “Effect of Aluminium on Plant Growth and Metabolism”, *Acta Biochimica Polonica*, Vol. 48, No. 3: 673-686 (2001).
- Pirintsos, S. A., Kotzabasis, K. and Loppi, S., “Polyamine Production in Lichens Under Metal Pollution Stress”, *J. Atmos. Chem.*, 49: 303-315 (2004).
- Pirintsos, S. A., Munzi, S., Loppi, S. and Kotzabasis, K., “Do Polyamines Alter the Sensitivity of Lichens to Nitrogen Stress?”, *Ecotox. Environ*, 72: 1331-1336 (2009).
- Purvis, O. W., Elix, J. A., Broomhead, J. A. and Jones, G. C., “The Occurrence of Copper-Norstictic Acid in Lichens from Cupriferous Substrata”, *Lichenologist*, **19**: 193–203 (1987).
- Qian, H., Chen, W., Sun, L., Jin, Y., Liu, W. and Fu, W., “Inhibitory Effects of Paraquat on Photosynthesis and the Response to Oxidative Stress in *Chlorella vulgaris*”, *Ecotoxicology*, 18: 537-543 (2009a).
- Qian, H., Li, J., Sun, L., Chen, W., Sheng, G. D., Liu, W. and Fu, Z., “Combined Effect of Copper and Cadmium on *Chlorella vulgaris* Growth and Photosynthesis-related Gene Transcription”, *Aquat. Toxicol.* 94: 56-61 (2009b).
- Sanità Di Toppi, L., Musetti, R., Vattuone, Z., Pawlik-Skowrońska, B., Fossati, F., Bertoli, L., Badiani, M., Favali, M. A., “Cadmium Distribution and Effects on Ultrastructure and Chlorophyll Status in Photobionts and Mycobionts of *Xanthoria parietina*”, *Microsc Res Tech.*, 66 (5): 229-238 (2005).
- Sanità Di Toppi, L., Pawlik-Skowronska, B., Vurro, E., Vattuone, Z., Kalinowska, R. and Restivo, F.M., “First and Second Line Mechanisms of Cadmium Detoxification in the Lichen Photobiont *Trebouxia impressa* (Chlorophyta)”, *Environ. Pollut.*, 151(2): 280–286 (2008).
- Sevinç, M., “ Kimyasal Analiz Yöntemleri”, *Beril Yayinlari*, Istanbul ,Türkiye, 54-60 (2003).
- Sfichi, L., Loannidis, N. and Kotzabasis K., “Thylakoid-associated Polyamines Adjust the UV-B Sensitivity of the Photosynthetic Apparatus by Means of Light-harvesting Complex II Changes”, *Phytpchem. Photobiol.*, 80: 499-506 (2004).
- Shah, K., Kumar, R. G., Verma, S. and Dubey, R. S., “Effect of Cadmium on Lipid Peroxidation, Superoxide Anion Generation and Activities of Antioxidant Enzymes in Growing Rice Seedlings”, *J. Plant Sci.*, 161: 1135–1144 (2001).

- Shen, W., Nada, K. and Tachibana, S., "Involvement of Polyamines in the Chilling Tolerance of Cucumber Cultivars", *Plant Physiol.*, 124: 431–439 (2000).
- Shu, D. F., Wang, L. Y., Duan, M., Deng, Y. S. and Meng, Q. W., "Antisense-mediated Depletion of Tomato Chloroplast Glutathione Reductase Enhances Susceptibility to Chilling Stress", *Plant Physiol. Biochem.* 49: 1228-1237 (2011).
- Ślesak I., Libik M., Karpinska B., Karpinski S. and Miszalski Z., "The Role of Hydrogen Peroxide in Regulation of Plant Metabolism and Cellular Signalling in Response to Environmental Stresses", *Acta Bioch. Polonica*, 54(1): 39-50 (2007).
- Taiz, L., and E. Zeiger. "Stress physiology." *Plant physiology* 4, Sinauer Associates, M. A. Sunderland, 764 (2006).
- Takani, M., Takani, M., Yajima, T., Masuda, H. and Yamauchi, O., "Spectroscopic and Structural Characterization of Copper(II) and Palladium(II) Complexes of a Lichen Substance Usnic Acid and its Derivatives Possible Forms of Environmental Metals Retained in Lichens", *Journal of Inorganic Biochemistry*, 91: 139-150 (2002).
- Tanaka, A. and Tanaka, R., "Chlorophyll II Metabolism; A Review", *Curr. Opin. Plant Biol.*, 9: 248-255 (2006).
- Tekin, F., "*Helianthus annuus* L. Tohumlarının Çimlenmesi ve Fide Gelişimi Üzerine Tuz ve Ekzojen Poliaminlerin Etkisi", Bilim Uzmanlığı Tezi, *Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 1996.
- Thomas, T. and Thomas T. J., "Polyamine in Cell Growth and Cell Death: Molecular Mechanisms and Therapeutic Applications", *Cell Mol Life Sci.*, 58: 244–258 (2001).
- Trivedi, P. K., P. Nath, and P. V. Sane, "Characterization of the *PsbA* gene from chloroplasts of *Populus deltoides*", *J. Plant Biochem. Biotechnol.*, 3:97–102 (1994).
- Turton, T. E., "*Saccharomyces cerevisiae* Exhibits a yAP-1 Mediated Adaptive Response to Malondialdehyde", *J. Bacteriol.*, 179: 1096–1101 (1997).
- Ünal, D., Şenkardeşler, A. and Sukatar, A., "Abscisic Acid and Polyamine Contents in the Lichen *Pseudevernia furfuracea* and *Ramalina farinacea*", *Russian J. Plant Physiol.*, 55: 115-118 (2008a).
- Ünal, D. and Uyanıkgil, Y., "UV-B Induces Cell Death in *Physcia Semipinnata*", *Turk. J. Biol.*, 35: 137-144 (2011).

- Ünal, D., Işık, N. O. and Sukatar, A., “Effects of Chromium VI Stress on Photosynthesis, Chlorophyll Integrity, Cell Viability And Proline Accumulation in Lichen *Ramalina farinacea*”, **Russ. J. Plant Physiol.**, 57: 664-669 (2010).
- Ünal, D., Tuney İ., Dereboylu-Esiz, A. and Sukatar, A., “The Effect of UV-A (352nm) Stress on Chlorophyll Fluorescence, Chlorophyll a Content, Thickness of Upper Cortex and Determinate DNA Damage in *Physcia semipinnata*”, **J. Photochem. Photobiol.**, 94:71-76 (2008c).
- Ünal, D., Tuney, İ. and Sukatar, A., “The Role of External Polyamines on Photosynthetic Responses, Lipid Peroxidation, Protein and Chlorophyll a Content Under the UV-A (352 nm) Stress in *Physcia semipinnata*”, **J Phytochem. Phtobiol. B.**, 90: 64-68 (2008b).
- Ünsal-Palavan, N., “Bitki Büyüme Maddeleri”, **İstanbul Üniversitesi Yayınları**, İstanbul, (1993).
- Ünsal-Palavan, N., Zehir, Z. and Sağlam, S., “Inhibiton of Alpha-amylase Release from Germinating Wheat Embryos by Abciscic Acid and Cyclohexylammonium, Polyamines and Ethylene: Biochemistry, Physiology and Interaction”, H.E. Flores, R.N. Arteca, J.C. Shannon, eds, **American Society of Plant Physiologists**, Copyright, 353-357 (1990).
- Verma, S. and Mishra, S. N., “Putrescine Alleviation of Growth in Salt Stressed Brassica Juncea by Inducing Antioxidative Defense System”, **J. Plant. Physiol**, 162: 69-677 (2005).
- Vráblíková, H., Barták, M. and Wonisch, A., “Changes in Glutathione and Xanthophyll Cycle Pigments in the High Light-Stresses Lichens *Umbilicaria antarctica* and *Lasalia pustulata*”, **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 79: 35-41 (2005).
- Wellburn, A. R., “The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as Well as Total Carotenoids, Using Various Solvents With Spectrophotometers Of Different Resolutions”, **J. Plant. Physiol.**, 144: 307-313 (1994).
- Yalçın, A. S., “Antioksidanlar”, **Klinik Gelişim**, 11: 342-346 (1998).
- Yang, X. H., Wen, X. G., Gong H. M., Lu, Q. T., Yang Z. P., Liang Z. and Lu C. M., “Genetic Engineering of the Biosynthesis of Glycinebetaine Enhances

Thermotolerance of Photosystem II in Tobacco Plants”, *Planta*, 225: 719-733 (2007).

Zouni, A., Witt, H. T., Kern J., Fromme P., Krauss N., Saenger W. and Orth P., “Crystal Structure of Photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å Resolution”, *Nature*, 409:739-743 (2001).

Zurawski, G., Bottomley, W. and Whitfeld, P. R., “Structures of The Genes for the  $\beta$  and  $\epsilon$  Subunits of Spinach Chloroplast Atpase Indicates a Dicistronic mRNA and an Overlapping Translation Stop/Start Signal”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79 6260-6264 (1982).

[http://www.biology.arizona.edu/biochemistry/problem\\_sets/photosynthesis\\_1/03t.html](http://www.biology.arizona.edu/biochemistry/problem_sets/photosynthesis_1/03t.html), 2014.

## ÖZGEÇMİŞ



### Kişisel Bilgiler

Adı soyadı : Gülseren ŞEN TELATAR  
Doğum Yeri ve Tarihi : SÖĞÜT/ 1989

### Eğitim Durumu

Lisans öğrenimi : Gazi Üniversitesi – Biyoloji Bölümü-2010

### Bilimsel Faaliyetler

:VII. İÜGEN Molecular Biology and Genetic Student Winter School on February 19th-21st-2010,Istanbul.

Uraz, G., Özdemir, P., Şen, G. and Yılmaz, E., “Determination of Brucella Presence Using, Spectrofotometrer and Comparison to Milk Ring Test”, ESCMID, 2010,Makedonya.

Şen, G., Eryılmaz, I. E. and Özakça, D., “The Effect of Alüminium and Exogenous Spermidine on, Chlorophyll Degradation, Glutathione Reductase Activity and The Photosystem II D1 Protein Gene (*PsbA*) Transcript Level in Lichen *Xanthoria parietina*”, Phytochemistry, Volume 98 :54–59 (2014).

### İş Deneyimleri

Stajlar :Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı- 2009

### Çalıştığı Kurumlar

:Bilecik Halk Sağlığı Laboratuvarı/ 2011-2012

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Teknik Bilimler Meslek Yüksek Okulu/ Uzman /2012-2013

### İletişim

E-Posta Adresi : gulseren\_sen\_hotmail.com

Tarih:

İmza