



İnsan P53 Transkripsiyon Faktör Aktivitesinin Tersinir

Metiyonin Oksitlenmesi ile Düzenlenmesi

Yılmaz SUSUZ

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr Ahmet KOÇ

Yüksek Lisan Tezi-2020

T.C
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNSAN P53 TRANSKRİPSİYON FAKTÖR AKTİVİTESİNİN TERSİNİR
METİYONİN OKSİTLENMESİ İLE DÜZENLENMESİ

YILMAZ SUSUZ

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı

Prof.Dr.Ahmet KOÇ

MALATYA

2020

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	vi
ABSTRACT.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Serbest Radikaller.....	3
2.2. Oksidatif Stres	3
2.3. Endojen Kaynaklar	3
2.4. Eksojen Kaynaklar.....	4
2.5. Oksidatif Stresin Lipitler Üzerine Etkileri	5
2.6. Oksidatif Stresin DNA Üzerine Etkileri	5
2.7. Serbest Radikallerin Proteinler Üzerine Etkileri	6
2.8. Metiyonin Oksidasyonu	8
2.9. Metiyonin Sülfoksit Redüktazlar.....	10
2.10. Metiyonin Sülfoksit Redüktazlar Üzerine Yapılan Çalışmalar	12
2.11. P53 Proteinini ve Tarihçesi	13
2.12. P53 Proteinin Yapısı ve İşlevi	13
2.13. P53'ün Regülasyonu	15
3.MATERYAL VE METOD.....	18
3.1. Plazmidler	19
3.2. p53 İçin LR Reaksiyonu	21
3.3. Plazmid DNA Transformasyonu	22
3.4.Plazmid DNA İzolasyonu	23

3.5. PAG413 p53 plazmidi'nin PRS315 RE-Z plazmidine Klonlanması.....	24
3.6. P53'ü Jel Elektroforezinde Yürütme Deneyi	24
3.7. Maya Transformasyonu	25
3.8. β - Galaktosidaz Deneyi.....	26
3.9. Yeni Bir Vektör Yeni Bir Msr.....	27
4. BULGULAR.....	28
4.1. P53'ün Alt Klonlanması.....	28
4.2. MSR Mutantı Hücrelerin p53 Aktivasyon Durumları (WT ve mutantlar $-\Delta$ msra, Δ msrb, Δ msra Δ msrb)	28
4.3. MSR Genlerini Aşırı İfade Eden Yabani Tip Hücrelerdeki p53 Aktivasyonu.....	30
4.4. MSR Mutantı Hücrelerin Oksidatif Stres Altında p53 Aktivasyon Durumları.....	31
4.5. MSR Genlerini Aşırı İfade Eden Yabani Tip Hücrelerin Oksidatif Stres Altında p53 Aktivasyonu	32
5. TARTIŞMA	33
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	35
KAYNAKLAR	36
EKLER	41
EK.1. ETİK KURUL KARARI	41

TEŐEKKÜR

Tez çalıőmamda danıőmanlıęımı yapan, her konuda desteğini ve bilgisini esirgemeyen çok kıymetli hocam Prof. Dr. Ahmet KOÇ'a teőekkürlerimi sunarım.

Projemi gerçekleőtirme Őansı verdikleri için İnönü Üniversitesi Sağlık bilimleri enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyeleri değerli hocalarıma ve Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı bölüm arkadaşlarıma,

Laboratuvarda benimle beraber çalıőmalarını yürüten arkadaşlarım Kübra DURMUŞ, Salman KOÇ, Selcen SEZER ve Muhammed DÜNDAR'a teőekkür ederim.

Ayrıca, hayatım boyunca her zaman yanımda olan ailemin her ferdine, teőekkür ederim.

ÖZET

İnsan p53 Transkripsiyon Faktör Aktivitesinin Tersinir Metiyonin Oksitlenmesi ile Düzenlenmesi

Amaç: p53 insanda bulunan en önemli tümör baskılayıcı proteini olup, hücre döngüsünün durdurulmasında, DNA tamirinde ve apoptoz gibi birçok biyolojik fonksiyonda görev almaktadır. p53 aktivitesini kontrol eden birçok post-transasyonel mekanizma bilinmektedir fakat oksidatif stres ile kontrol edilmesi net bir şekilde bilinmemektedir. p53'ün yapısında bulunan metiyonin amino asitleri bir oksidasyon durumunda metiyonin sülfoksit gruplarını (metO) oluşturmakta ve bu da p53'ün işlevini bozmaktadır. Antioksidan grubu enzimler olan Metiyonin Sülfoksit Redüktazlar metiyonin sülfoksitleri indirgeyerek tekrar metiyonine indirgemektedirler. Bu projenin genel amacı p53 üzerindeki metiyonin oksidasyonu/Redüksiyonu ile Msr grubu enzimlerin rol aldığı bir aktivite kontrol mekanizmasının olup olmadığının tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metod: Msr enzimlerinin p53 aktivitesi üzerine olan etkisi, normal şartlar ve oksidatif stres şartları altında maya hücrelerinde incelenmiştir.

Bulgular: Metiyonin Sülfoksit Redüktaz genleri olmayan mutantların, p53'e bağlı Lac-Z aktivitesi kontrol hücrelere kıyasla daha yüksek çıkmıştır. Bununla birlikte MSR genlerinin aşırı ekspresyonu p53 aktivitesinde bir değişime neden olmamıştır. Mutantların 1mM hidrojen peroksit ile muamelesinde p53 aktivitesinde farklılıklar gözlenmiştir. Spesifik olarak hem MSRA hem MSRB genlerine sahip olmayan hücrelerin p53 aktivitesinin daha az olduğu görülmüştür.

Sonuç: Oksidatif streste p53'te meydana gelen aktivite kaybının Msr enzimleri tarafından korunduğu ve kontrol edildiği sonucu oluşmuştur.

Anahtar Kelimeler: Metiyonin Sülfoksit Redüktaz, Transkripsiyon, p53, Oksidatif Stres, Antioksidan Regülasyon

ABSTRACT

Regulation Of p53 Activity By Methionine Sulfoxide Reductases

Aim: p53 is the most crucial tumor suppressor protein in humans, and it is involved in many biological functions such as cell cycle arrest, DNA repair, and apoptosis. Many post-translational mechanisms controlling p53 activity are known, but its control by oxidative stress is not clearly known. The methionine amino acids in the structure of p53 form methionine sulfoxide groups (metO) in an oxidation state, which disrupts the function of p53. Methionine Sulfoxide Reductases, which are antioxidant group enzymes, reduce methionine sulfoxides back to methionine. The purpose of this project is to determine whether there is an activity control mechanism in which Msr group enzymes play a role by methionine oxidation / reduction on p53.

Material and Method: The effect of Msr enzymes on p53 activity has been studied in yeast cells under normal conditions and oxidative stress conditions.

Results: Mutants that lack methionine sulfoxide reductase genes had slightly higher p53 dependent LacZ activity than control cells. However, overexpression of MSR genes did not change p53 activity. The mutants had a different p53 activity pattern under oxidative stress when the cells treated with 1 mM of hydrogen peroxide. Specifically, the cells that lack both MSRA and MSRB genes showed less p53 activity.

Conclusion: The loss of activity occurring in p53 in the oxidative stress has resulted from the protection and control of Msr enzymes.

Keywords: Methionine Sulfoxide Reductase, Transcription, p53, Oxidative Stress, Antioxidant, Regulation

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

DNA	: Deoksiribonükleik asit
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
kDa	: Kilodalton
Met	: Metiyonin
ROT	: Reaktif oksijen türleri
MSRA	: Metiyonin-S-sülfoksit
MSRB	: Metiyonin-R-sülfoksit
MSRC	: Serbest metiyonin sülfoksit redüktaz
RAT	: Reaktif azot türleri
µl	: Mikrolitre
mM	: Milimolar
ONPG	: O-nitrofenilβ-D-galaktopironosit :Santigratderece
Dk	: Dakika
NaCO₃	: Sodyum karbonat
URA	: Urasil
HIS	: Histidin
Bç	: Baz çifti
p53	: Tümör protein 53
kb	: Kilo baz

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekiller No	Sayfa No
Şekil 2.1. Reaktif oksijen ve serbest radikaller ile etkileşime giren DNA baz ürünleri.....	6
Şekil 2.2. Proteinlerin serbest radikal bağımlı oksidasyonu.....	7
Şekil 2.3. Metiyonin oksidasyon sonunucu metiyonin sülfoksit oluşumu ve geri dönüşümsüz metiyonin sülfon oluşumu	9
Şekil 2.4. p53 Tetramerizasyon alanı 340. posisyonda metiyonin torusu yeşil, kükürt atomları sarı ve turuncu olanlar da 9 adet hidrofobik tortu renkleri ile işaretlenmiştir	10
Şekil 2.5. Metiyonin oksidasyonun proteinler üzerindeki etkileri.....	11
Şekil 2.6. p53'ün şematikyapısı ve amino asit dizileri	14
Şekil 2.7. DNA'ya bağlı bulunan p53 tetrameri.....	15
Şekil 2.8. p53'ün beş alanı	16
Şekil 3.1. pRS316 PGK p53 plazmidi'nin yapısı	20
Şekil 3.2. Prs315 RE-Z plazmidi'nin yapısı.....	21
Şekil 3.3. Gateway klonlamada BP ve LR aşamaları	22
Şekil 4.1. p53'ün jel elektroforez görüntüsü.....	28
Şekil 4.2. Yabani tip (BY4741) ve MSR mutantlarında (Δ msra, Δ msrb, Δ msra Δ msrb) p53 aktivasyon durumları.	29
Şekil 4.3. MSR genlerinin aşırı ifade edildiği yabani tip hücrelerin p53 aktivasyon durumları.....	30
Şekil 4.4. Yabani tip (BY4741) ve MSR mutantlarının oksidatif stres altında p53 aktivasyon durumları.....	31
Şekil 4.5. Msr enzimlerinin aşırı ifadesinde ve oksidatif stres altında p53 aktivasyon durumları.	32

TABLULAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 2.1. Hücresel serbest radikallerin etkilediği moleküller.	4
Tablo 2.2. Oksidasyona yatkın amino asitler ve oksidasyon ürünleri.	8



1. GİRİŞ

Oksijenli solunum yapan canlılarda metabolik faaliyetler sonucunda yan ürün olarak reaktif oksijen türleri(ROT), oluşmaktadır ve ROT'lar hücrel yapı taşlarını etkileyerek fonksiyonlarını bozmaktadır. Proteinlerin yapısında bulunan metiyonin ve sistein amino asitleri, kükürt atomu içerdiklerinden dolayı, oksitlenmeye karşı oldukça duyarlıdır. Sistemin metabolizması sonucu oluşan oksitlenme, hücre içi redoks faaliyetleri detaylı bir şekilde araştırılmıştır ancak metiyonin oksitlenmesinin oksidatif stres ya da normal fizyolojik faaliyetler bakımından önemi detaylı bir şekilde araştırılmamıştır.

Metiyonin hidrofobik bir aminoasit olup daha çok proteinlerin su ile temas etmeyen bölgelerinde yada lipidlerin daha çok bulunduğu bölgelerde bulunur. Proteinlerin yüzeylerinde bulun metiyoninlerin ROT'lar ile temas etmesi ve oksitlenme riski daha fazladır (1). Metiyonin aminoasitlerinin oksitlenmesi sonucunda metiyonin sülfoksitler(MetO) oluşmaktadır bu durumda MetO'lar metiyonine göre daha hidrofilik bir yapı kazanmış olurlar proteinlerin bu hidrofilik yapıya kavuşması da proteinlerinde işlev kaybına yol açmaktadır. Oksijenli solunum yapan canlıların daha güçlü oksidanlara maruz kalması durumunda daha ileri bir oksidasyon olan metiyonin sülfon oluşmakta ve metiyonin sülfonun geri dönüşümsüzdür ve tekrar indirgenmesi söz konusu değildir (2). Metiyonin sülfoksitlerde oksijenin bağlanacağı kükürt atomu kimerik yapıda olması nedeniyle farklı iki stereoizomer olan metiyonin R-sülfoksit (Met-RO) ve metiyonin S-sülfoksit(Met-SO) oluşmaktadır. Oksidasyon sonucu oluşan metiyonin sülfoksitler, antioksidan enzimler olan Metiyonin Sülfoksit Redüktaz(MSR) enzim sistemleri tarafından indirgenerek tekrar metiyonine dönüştürülmektedirler. MSRA enzimi Met-SO'ları MSRB enzimi ise Met-RO'ları indirgemektedir (3).

P53 bir tümör baskılayıcı proteindir ve insanda meydana gelen tümörlerin büyük çoğunluğunda mutasyona uğramış durumdadır. p53'ün tümörlerin çoğunda mutasyona uğramış olması durumundan dolayı en çok merak edilen ve çalışılan tümör baskılayıcı protein olmuştur. Normal hücrelerde p53 çok az miktarda bulunurken; DNA hasarı, hipoksi, telomeraz aktivitesinin kaybı, dNTP azlığı gibi hücrel stres yaratan durumlarda miktarı artmaktadır (4). p53 bu stres durumlarında uyarılmasıyla

aktif hale gelir ve hücre döngüsünü durdurarak oluşan bu hasarların tamiri için gerekli mekanizmaları aktive eder fakat oluşan hasarların tamir edilememesi durumunda hücreleri apoptoza götürür (5). p53 incelendiği zaman(World protein data bank) yapısında 12 metiyonin bulunmakta ve bunlardan 7 tanesinin yüzeyde olduğu görülmektedir. Bunlardan iki tanesi (m46 ve m48) transaktivasyon bölgesinde bir tanesi (m340) tetramerizasyon bölgesinde ve dört tanesi de (m160, m169, m243 ve 323) DNA bağlanma bölgesinde bulunmaktadır. p53 üzerinde yapılan in vitro çalışmada hidrojen peroksit ile oksidasyonu sonucu p53'ün tetramerizasyon bölgesinde bulunan metiyoninin (met340) oksitlenmiş, metO oluşmuş ve p53 tetramer yapısı kararlılığını kaybetmiştir (6). Yapılan bu çalışma metiyonin oksitlenmesi durumunda p53'ün inhibe olduğunu göstermiştir ama hücre içi ortamda MSR enzimlerini katarak metiyoninlerin oksitlenmesi durumu detaylı olarak çalışılmamıştır.

Bu çalışmamızın genel amacı p53 üzerindeki metiyonin oksidasyonu/Redüksiyonu ile MSR grubu enzimlerin rol aldığı bir aktivite kontrol mekanizmasının olup olmadığının araştırılmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Serbest Radikaller

Serbest radikal kavramı Denham Harman(1956)'nın yaptığı enzimatik bir çalışma sonucunda yan ürün olarak oksijen radikallerinin oluşumunu tespit etmesiyle ortaya atılmıştır. Bir veya birden fazla eşleşmemiş elektron bulunduran atom veya moleküllere serbest radikal denir (7). Eşleşmemiş elektron bulunduran kararsız atom veya moleküller kararlı bir yapıya kavuşmak için başka atom veya moleküllerden elektron alma eğilimine girer ve böylece memeli sistemlerde tüm vücudu dolaşp tehlikeli durumlar yaratabilir. Denham Harman serbest radikalleri bu tehlikelerinden dolayı Pandoranın felaketler kurusuna benzetmiştir (8).

2.2. Oksidatif Stres

Reaktif Oksijen Türleri(ROT) aerobik yaşam süren canlılarda hücrel metabolizma sonucu üretilir. Aerobik canlılarda genellikle ROT'un zararlı etkilerini engellemek için gerek enzimatik gerek enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemleri geliştirmişlerdir. Oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengenin oksidan lehine değişmesi sonucunda oksidatif stres oluşur (9). Memeli sistemlerde Reaktif azot türleri(RAT) de ROT'lara benzer mekanizmalarla meydana gelir. Aerobik organizmalarda ROT'ların çoğu mitokondri metabolizması sonucu oluşmaktadır (10). Oksidatif stres endojen ve eksojen kaynaklı olabilir.

2.3. Endojen Kaynaklar

- Aerobik solunum mitokondri'nin elektron transport sistemi tarafından üretilirler.
- Vücutta yangı durumunda sitokinlerin aşırı üretimi sonunda vücut savunmasında görev yapan makrofajlar ve nötrofiller tarafından üretilirler.
- Lipid peroksidasyonu sonucu üretilirler.
- İmmun sistem tarafından üretilirler.
- Aşırı vücut yorgunluğundan kaynaklanan oksidatif stres
- Hormonlar tarafından (kortizol, kateşolamin) oksidatif stres oluşabilir (11).

2.4. Eksojen Kaynaklar

- X-RAY,gamma ışınları,UV ışınları...gibi
- Organik maddelerin yakılması sonucu oluşabilir.
- Yangınlar volkanik faaliyetler.
- Temizlik ürünlerinde kullanılan kimyasal maddeler.
- Alkol sigara kullanımı
- Hava kirletici dumanlar (11).

Oksidatif stress oluşumuna neden olan endojen ve eksojen kaynaklar sonucunda; kanser, nörolojik hastalıklar, böbrek hastalıkları, kalp hastalıkları, hipertansiyon, diyabet, solunum sıkıntısı vb. gibi birçok hastalık oluşmaktadır (9).

Serbest radikaller hücrede birikimi sonucunda hücredeki DNA,protein ve lipid gibi biyomolekülleri etkileyerek ciddi oksidatif hasarlar oluştururlar (12).

Tablo 2.1. Hüresel serbest radikallerin etkilediği moleküller (12).

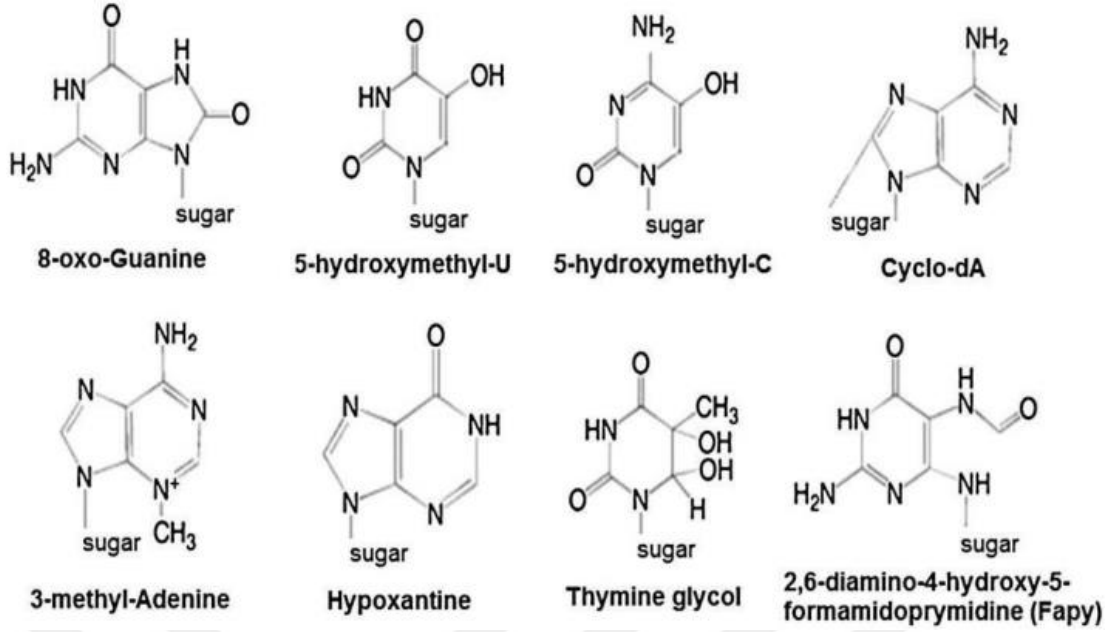
Etkilenen bileşikler	Sonuçlar
Doymamış amino asitler ve kükürt içeren amino asitler	Protein denatürasyonu Çapraz bağlanma Enzim inhibisyonu Organ ve hücre geçirgenliğinde değişimler
DNA	Baz modifikasyonları Zincirde kırılmalar
Proteinler	Peptit zincirinde kırılmalar Denatürasyon
Karbonhidratlar	Hücre yüzey reseptörlerinde değişiklik
Doymamış lipidler	Kolesterol ve yağ asitlerinin oksidasyonu
Hyaluronik asit	Sinovial sıvının viskozitesinde değişiklik
Kofaktörler	Nikotinamid ve flavin içeren kofaktörlerin aktifliğinde azalma Askorbat ve forforin oksidasyonu
Antioksidanlar	α - tokoferol ve β -karoten gibi antioksidanların aktifliğinin azalması

2.5. Oksidatif Stresin Lipitler Üzerine Etkileri

ROT'lar lipit peroksidasyonunu başlatabilir ve bu durum membran reseptörlerini ve enzimleri etkisiz hale getirir, membran çift tabaka yapısını bozar (9.13). Lipid peroksidasyonu hücre membran geçirgenliğini bozar, membran akışkanlığını azaltır ve iltihaplanmaya neden olur (10). Radikallerin lipid zarlarında reaksiyonları lipit peroksitler, lipit alkoller ve aldehit yapıda yan ürünlerin oluşumunu da sağlar (12).

2.6. Oksidatif Stresin DNA Üzerine Etkileri

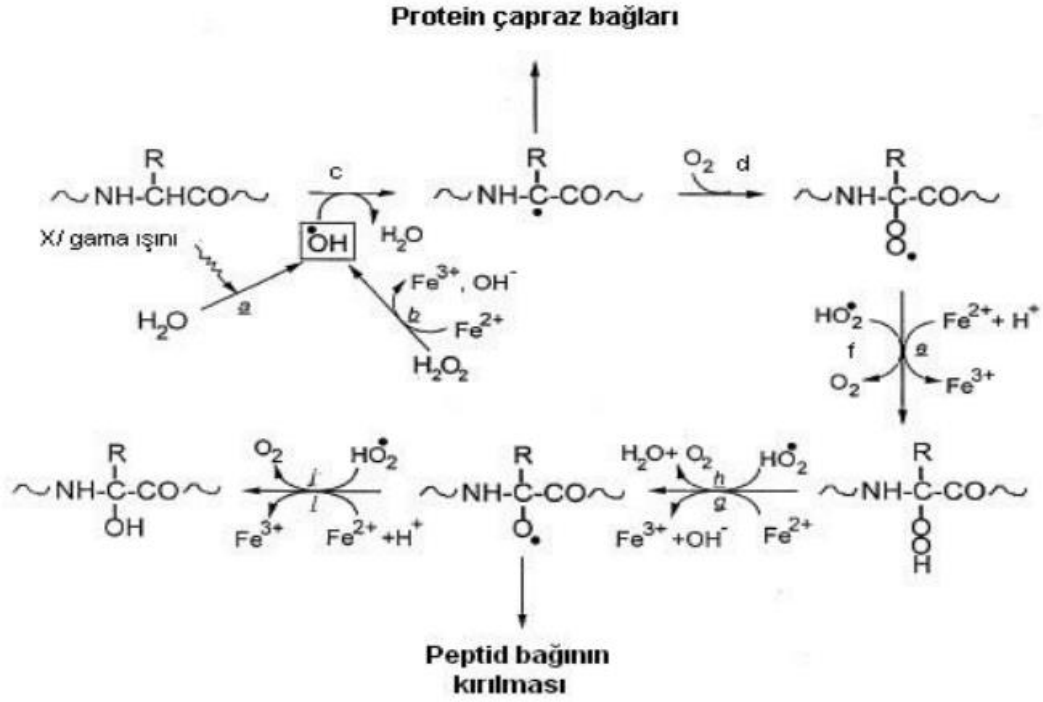
ROT, DNA' da baz bozulmalarına, tek yada çift iplikli DNA kayıplarına, pürin ve pirimidin modifikasyonlarına, şekere bağlı modifikasyonlara, mutasyonlara neden olabilir (9). Sigara dumanı ,organik maddelerin yanması sonucu oluşan dumanlar, serbest radikaller tiyol guruplarına bağlanarak yaşlanmaya ve kansere katkıda bulunur. Oksidatif stres yoluyla meydana gelen 8-OH-G en çok bilinen DNA hasarlarından ve kanser için bir belirteçtir(14). Genlerin promotor bölgeleri transkripsiyon faktörlerini içeren konsesus dizileri içermektedir. Konsesus diziler oksidan saldırılarına duyarlı GC açısından zengin bölgelerdir. Transkripsiyon faktörlerinin bağlanacağı bu bölgede 8OH-G DNA sını oluşumu transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını değiştirir. Oksidatif stress ayrıca DNA'da kısa tekrar bölgelerinde kararsızlığa neden olur. Redoks metalyonları, hidroksil radikalleri bu bölgenin stabilitesini artırır (15). Oksidatif stress tek ya da çift DNA kırılmalarına da neden olur. Çift sarmallı DNA kopmaları büyük tehlike arz etmekte ve hücre sağkalımı için oldukça önemlidir (16). DNA da CpG adalarında meydana gelen bir mutasyon genlerin susturulmasına neden olur. 5-MeCyt'nin 5-hidroksimetil urasil (5-OHMeUra)'ya oksidasyonu timinin veya 5-hidroksimetil sitozin ara maddelerinin oluşması yine oksidatif stres kaynaklıdır (17).



Şekil 2.9. Reaktif oksijen ve serbest radikaller ile etkileşime giren DNA baz ürünleri(9).

2.7. Serbest Radikallerin Proteinler Üzerine Etkileri

Serbest radikaller veya radikal olmayan atom veya moleküllerin proteinlerle etkileşimi protein modifikasyonlarına sebep olur (18). Protein modifikasyonlarının biyokimyasal sonuçları, yan zincir oksidasyonu, protein omurgasının fragmentasyonu, aşırı radikal oluşumu sonucuna bağlı olarak zincir reaksiyonlarının devam ettirilmesi, gerek proteinlerde gerek amino asitlerde dimerleşme, çökme, yapısal bozulmaya bağlı işlev kaybı, yine enzim gibi proteinlerde işlevsel kayıplar, proteinlerin katlanmasında sorun, gen ifadesinde ve düzenlenmesinde değişimler, hücre sinyal ileti yollarında meydana gelen modifikasyonlar, apoptozis ve nekrosizin uyarılması, yanlış katlanmalar, çapraz bağlanmalar ve proteolitik enzimlerde aktivite kaybı gibi sıralanabilir (18,19). Protein oksidasyonu (Şekil.2.2) de gösterildiği gibi amino asit α karbonundan bir H atomunun OH.e bağlanarak ayrılması ve H₂O oluşumuyla başlar. Reaksiyon Fe ve Cu aracılı da olabilir. H atomunun OH. a bağlanması ve ayrılması karbon merkezli bir radikal oluşturur oluşan bu radikal ortamda oksijen varsa etkileşimi sonucu peroksil radikaline dönüşür. Peroksil radikalinin de başka bir molekülden H atomu alması sonucu alkil peroksit oluşur. Alkil peroksit de HO₂. ile reaksiyonu sonucunda alkoksil radikaline dönüşür. Yine bundan sonraki reaksiyonlar oksijenin varlığına bağlı olarak değişebilir (14,15).



Şekil 2.10. Proteinlerin serbest radikal bağımlı oksidasyonu (20).

Proteinlerdeki amino asit yan zincirleri oksidasyona oldukça açıktır. Yan zincirlerde metal bağımlı ve serbest radikal bağımlı oksidasyon söz konusudur. Özellikle metiyonin ve sistein gibi kükürt içeren amino asitler oksidasyona en duyarlı amino asitlerdendir (18).

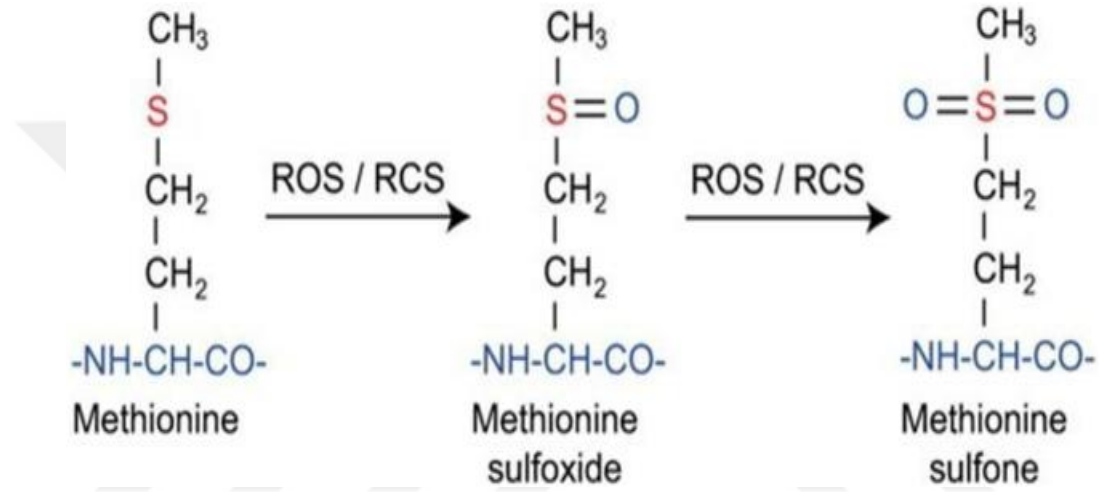
Tablo 2.2. Oksidasyona yatkın amino asitler ve oksidasyon ürünleri (18).

Amino asit	Oksidatif saldırı	Oksidasyon ürünleri
Metiyonin	HO , bir elektron oksidasyonu	Metiyonin sülfoksit, metiyonin sülfon
Sistein	HO , diğer hidrojen atomu çıkarıcı türler	Sistein disülfidler, süfenik asit
Triptofan	HO , bir elektron oksidasyonu	2-4-5-6-ve7- Hidroksitriptofan, nitrotriptofan, kinürenin, formil ve hihroksi kinürenin
Tirozin	HO ,RNT,HOCI	3,4 Hidroksifenilalanin, tirozin-tirozin çapraz bağları, Tyr- O-Tyr, çapraz bağlı nitrotirozin, 3klorotirozin, DOPA
Fenilalanin	HO , bir elektron oksidasyonu	2-3 Hidroksifenilalanin, 2-3-ve 4-hidroksifenilalanin
Histidin	HO , bir elektron oksidasyonu	2-Okso-histidin, aspartat, aspartilüre
Arginin	O ₂ varlığında HO	Glutamik semialdehit, 5-hidroksi-2-amino valerik asit
Lizin	O ₂ varlığında HO	Lizin hidroperoksitleri ve hidroksitleri, 2aminoadipik, semialdehit karbonil bileşiği
Glisin	α C dan hidrojen atomu çıkarılması	Amino manolik asit
Prolin	O ₂ varlığında HO	2-Pirrolidon, 4-ve5-hidroksiprolin, piroglutamik asit,glutamik semialdehit
Valin	O ₂ varlığında HO	Valin hidroperoksitleri ve hidroksitleri
Lösin	O ₂ varlığında HO	Lösin hidroperoksitleri(3-,4-,5-hidroksilösin) ve hidroksitleri, α ketoizokaproik asit, izovaleik asit ve aldehit
İzolösin	O ₂ varlığında HO	İzolösin hidroberoksitleri
Treonin	O ₂ varlığında HO	2-Amino-3-ketobütirik asit
Glutamik asit	O ₂ varlığında HO	Glutamik asit hidroperoksit

2.8. Metiyonin Oksidasyonu

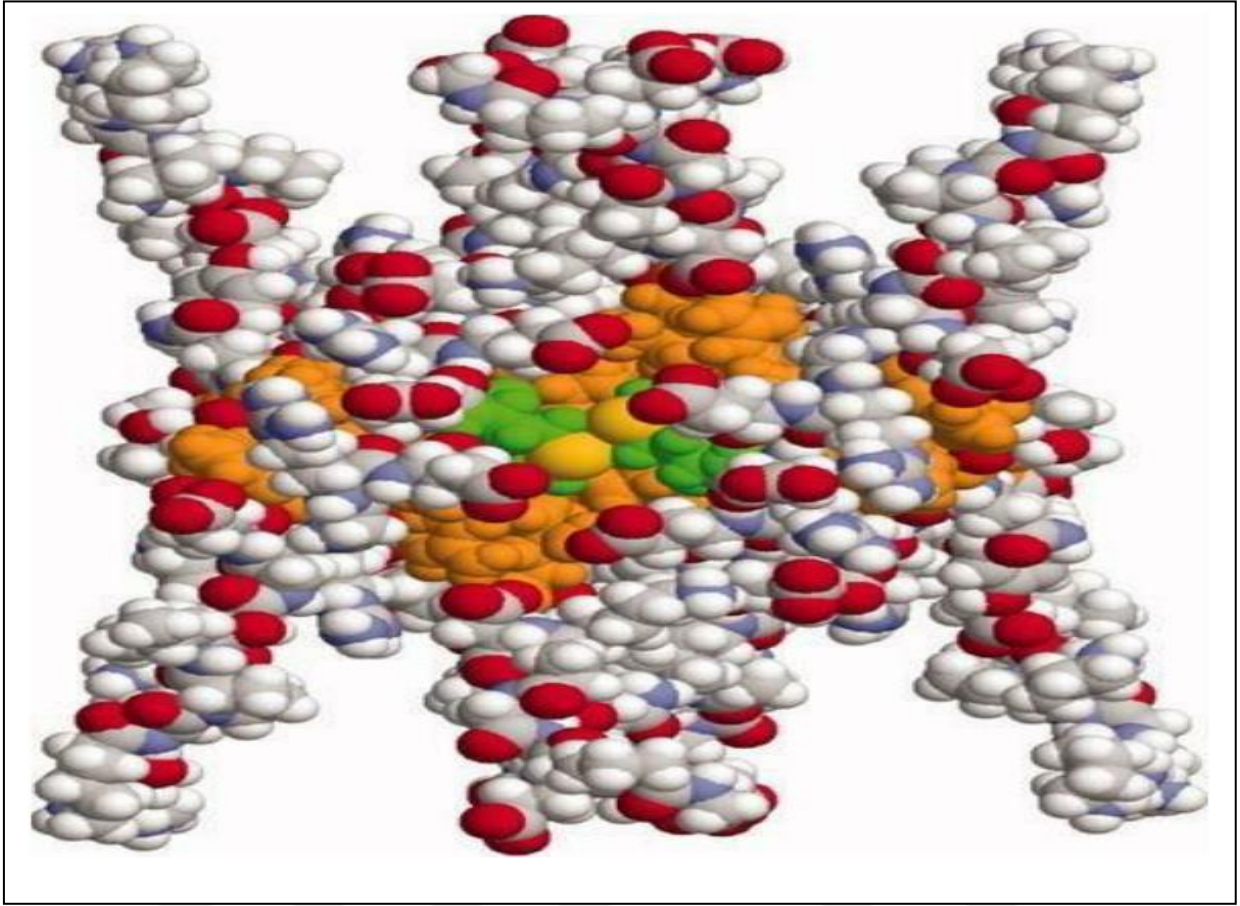
Reaktif oksijen türevleri ve reaktif azot türevleri proteinlerde olduğu gibi amino asitlerde de oksidasyona neden olur. Metiyonin ve sistein kükürt içerdiklerinden bu tür oksidasyonlara oldukça duyarlıdır. Bu oksidasyon durumu aerobik solunum yapan canlılarda kaçınılmaz bir sonuçtur. Metiyonin'in proteinlere bağlı oksidasyonu bir translasyon sonrası modifikasyondur ve modifikasyonlar

proteinlerin işlevlerini değiştirirler (21). Metiyonin hidrofobik bir amino asittir. Daha çok lipid çift tabaka ile etkileşim gösterirler ve proteinlerde hidrofobik çekirdekte bulunurlar. Bu konumdaki metiyoninler oksidasyondan daha iyi korunurken yüzeyde kalan metiyoninler oksidasyona daha açıktır (21,22). Metiyoninler oksidasyon sonucunda daha hidrofilik bir hal alır ve MET-SO (metiyonin sülfoksit) oluşur ve bu değişiklik proteinlerin yapısını etkiler fakat bu durum geri dönüşümlüdür. Metiyoninlerin daha ileri reaksiyonu da geri dönüşümsüz bir durum olan MET-SO₂ (metiyonin sülfon) oluşumuna neden olur (23).



Şekil 2.11. Metiyonin oksidasyon sonucunu metiyonin sülfoksit oluşumu ve geri dönüşümsüz metiyonin sülfon oluşumu (21).

Bütün polipeptid zincirleri başlangıç aminoasiti olan metiyonin ile başlar. Metiyonin 20 amino asitten biridir fakat proteinlerde miktar olarak daha fazla bulunduğu için ve metiyoninler de oksidasyona daha yatkın olduklarından dolayı protein oksidasyonunda metiyonin kalıntılarında daha fazla rastlamak mümkündür (24). İnsan tümör baskılayıcı proteini olan p53 ün yapısı incelendiği zaman veritabanlarındaki (worldwide protein data bank) p53 ün yapısında 12 metiyonin olduğu görülmektedir. Bu metiyoninlerden bir tanesi (Met340) p53 ün tetramerizasyon bölgesinde yer almaktadır. Bilim adamlarının yaptığı bir çalışmada (Nomuro vd. 2009) p53 ün tetramerizasyon alanındaki metiyonin (Met340) yaklaşık olarak 10 saat hidrojen peroksit ile oksidasyona bırakılmış ve oksidasyon sonucunda p53 ün tetramer bölgesinde bulunan metiyoninin oksitlendiği ve p53 ün tetramerik yapısının bozulduğu keşfedilmiştir (6).



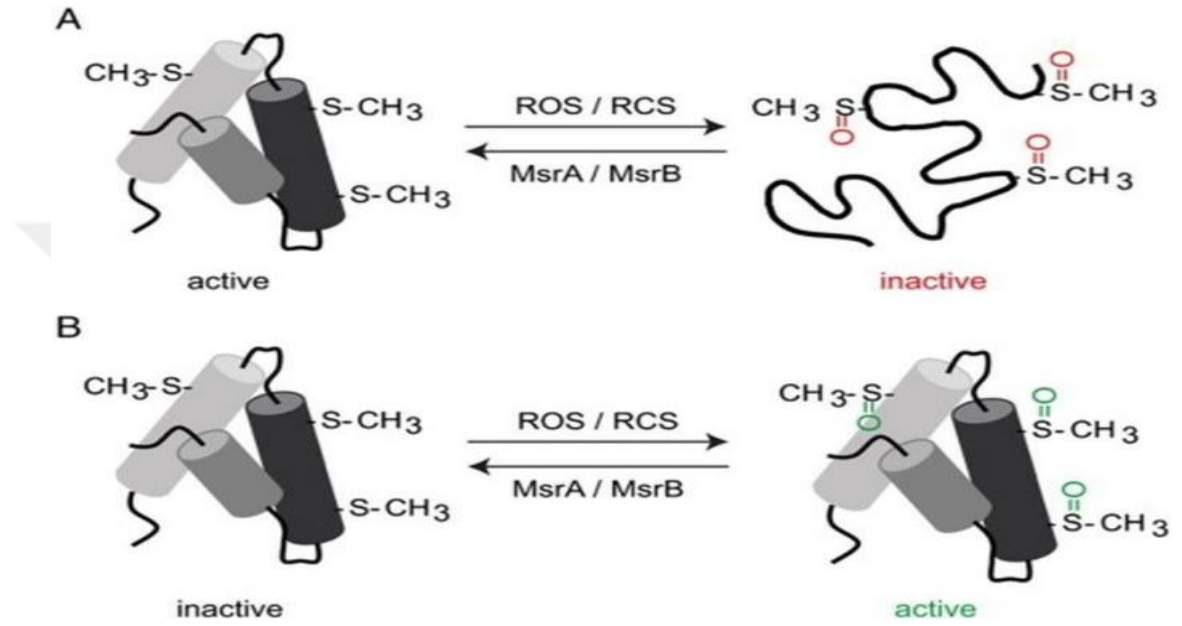
Şekil 2.12. p53 Tetramerizasyon alanı 340. pozisyonda metiyonin torusu yeşil, kükürt atomları sarı ve turuncu olanlar da 9 adet hidrofobik tortu renkleri ile işaretlenmiştir (6).

Şekil.2.4 de gösterilen bu çalışmada p53 üzerinde 340. Pozisyonda bulunan metiyonin'nin oksidasyonu p53 ün tetramerik yapısını bozmakta ve bu durumun p53 transkripsiyon fonksiyonunun inaktive eden mekanizmalardan biri olabileceği görüşüne varılmıştır.

2.9. Metiyonin Sülfoksit Redüktazlar

Proteinlerin yapısına katılan metiyonin amino asitleri aerobik koşullarda ROT' lar tarafından oksidasyona oldukça açıktır. Metiyoninin yapısında bulunan kükürt atomu oksidasyon sonucunda sülfoksite dönüşür ve böylece metiyonin metiyonin sülfoksite (Met-O)dönüşmüş olur (25). Oksitlenmiş olan metiyoninler metiyonin sülfoksit redüktazlar (MSR) denilen antioksidan enzimler tarafından onarılır (21,22,26-29). Metiyonin sülfoksitler oksijenin bağlandığı kükürt atomunun kimerik

yapısından dolayı iki farklı stereoizomer oluşur. Bunlar (met-SO) ve (met-RO) dur (3). Oksidasyona uğramış metiyoninler metiyonin-S-sülfoksit(msrA) tarafından ve metiyonin-Rsülfoksitler(msrB) tarafından onarılır (28,30). Metiyonin sülfoksit redüktaz enzim sistemleri yalnızca protein onarımında değil, proteinlerin redoks regülasyonunda, redoksa bağlı sinyal ileti yollarında, hücreleri oksidatif stresten koruma gibi görevleri de vardır (2).



Şekil 2.13. Metiyonin oksidasyonunun proteinler üzerindeki etkileri A) Metiyonin oksidasyonunun proteinlerdeki inaktivasyon mekanizması B) Protein oksidasyonunun MSR ler tarafından onarım mekanizması (21).

Maya hücrelerinde bir adet msrA ve bir adet msrB bulunmaktadır. Buna karşılık memelilerde şimdiye kadar keşfedilmiş bir adet msrA ve hücre içi lokalizasyonları farklı msrB1, msrB2 ve msrB3 olmak üzere üç adet msrB enzimi bulunmaktadır(31). msrB1, bir selenoprotein olup önceki ismi (selR) sitoplazma ve çekirdekte bulunmaktadır. msrB1 msr enzimleri içerisinde en önemli enzimlerdir çünkü aktif merkezinde selenosistein bulundurur ve katalitik olarak en aktif enzimdir. msrB2 mitokondride bulunur ve msrB3 enzimi ise endoplazmik retikulumda bulunur (32). msrA'nın molekül ağırlığı yaklaşık olarak 25 kDa'dır. msrB1, msrB2 ve msrB3'ün molekül ağırlıkları da sırasıyla 12 kDa, 20 kDa ve 20 kDa olan oldukça küçük proteinlerdir (31). msrA ökaryotlarda prokaryotlardan bazı bakterilerde ve çok az da arkebakterilerde bulunurken; msrB ökaryotlarda ve bazı bakterilerde bulunur (31). Bilim insanları msrA ve msrB antioksidan enzimlerinin kimliklerini

belirleyip daha iyi tanımlamak için 36 bakteri, 9 arkebakteri ve 5 ökaryot'ta dizilenmiş genom analizi yapmışlardır (3).

2.10. Metiyonin Sülfoksit Redüktazlar Üzerine Yapılan Çalışmalar

Antioksidan enzimler olan msrA ve msrB enzim sistemlerinin önemi anlaşıldıktan sonra bilim insanları bu enzim sistemlerini memelilerde, mayada, bakterilerde, insanda ve meyve sineği gibi birçok canlı üzerinde çalışmaya başlamışlardır. Bu çalışmalardan bazıları şunlardır: Tioeredoksin/Tioeredoksin redüktaz sistemini farelerde kalori kısıtlaması yöntemini uygulayarak farelerde yaşlanma sürecini geciktirdiği ortaya çıkmıştır (33). Tioeredoksin redüktaz sistemi aynı zamanda MSR'lerin de elektron donörüdür. Farelerde insan tioeredoksinin aşırı ekspresyonu oksidatif strese olan direnci artırır ve aynı zamanda fare ömrünün de uzamasını sağlar(34). Ruan ve arkadaşlarının msrA enzimini kullanarak meyve sineği (*Drosophila*) ile yapılan çalışmada msrA'nın aşırı ekspresyonu oksidatif strese direnç sağlamakla kalmayıp transgenik meyve sineğinin ömrünü %70 kadar artırdığı doğrudan gözlemlenmiştir (28). Öte yandan başka bir çalışmada memelilerde msrA'nın antioksidan savunmayı artırdığı ve memeli ömrünü düzenlediği gözlemlenmiştir (29). Diğer bir çalışmada selenyum diyeti uygulanan farelerde msrA diyet farelerinde metiyonin sülfoksit bağı protein karbonil seviyelerinde artış görülmüştür ve msrA seviyeleri selenyum diyeti uygulanan farelerde yaklaşık olarak iki kat olmasına rağmen diyet uygulanmayan farelere göre protein karbonil seviyelerinde yaşla birlikte eşit seviyede yükselmiştir. Ayrıca msrA farelerinde daha önce görülen ayak başparmağı yürüme davranışının gelişimi selenyum diyeti ile beslenmeleri durumunda daha önce meydana geldiği görülmüştür (35). İnsan fibroblast hücreleri ve fare organları üzerinde yapılan başka bir çalışmada msrA ve msrB2(cbs-1) antioksidan enzimleri kullanılmış ve yaşlı bireylerde genç bireylere oranla bu enzim seviyelerinde azalma görülmüştür ve bu düşüşü de yaşlanma ile birlikte oluşan oksitlenmiş protein birikimi ile ilişkilendirmişlerdir. Elde edilen bu sonuçlar bu iki enzimin yaşlılıkta fazla regülasyonu oksidatif stresten koruyacağı fikri oluşmuştur (36,37). Metiyonin oksidasyonu başka hastalıklar üzerinde de çalışılmıştır. Örneğin Alzheimer gibi nörodejeneratif bir hastalık üzerinde yapılan bir çalışmada Alzheimer olan tüm hastaların beyinlerinde okside protein seviyelerinde artış görülmüştür ve buna bağlı olarak msrA seviyelerinde aktivite kaybı gözlemlenmiştir (38). Diğer bir çalışma da insan T lenfositlerinde ve nöral hücrelerde yapılmış olup oksidatif

stresi indükleyen bir ortamda msrA'nın aşırı ekspresyonu hücreleri oksidatif stresten koruduğu ve hücrelerin de ömrünü uzattığı tespit edilmiştir (39). Yapılan tüm bu çalışmalar msrA ve msrB antioksidan enzimlerinin aşırı ekprese olması durumunda yaşlanmayı geciktirdiği, oksidatif stresten koruduğu ve birçok hastalıkta enzim seviyelerinin yeterli olması durumunda olumlu etkilerinin olduğu anlaşılmaktadır.

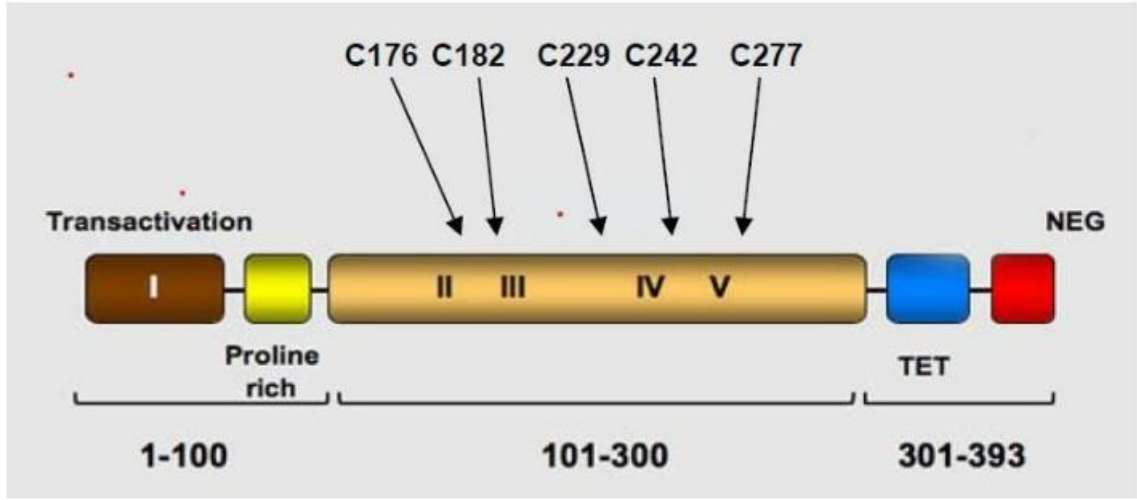
2.11. P53 Proteini ve Tarihçesi

p53 geni insan genomunda 17. kromozomun p kolunda (17P13.1) bulunan en önemli tümör baskılayıcı genlerden biridir. Bu gen insan p53 proteini kodlamaktadır. p53 proteini çeşitli araştırmacılar tarafından ilk olarak 1979 yılında SV40 virüsünde büyük T antijen bağlanma proteini olarak tanımlanmıştır ve molekül ağırlığı 53 Kda dur (40.41). Normal sağlıklı hücrelerde p53 düşük seviyelerde bulunurken; DNA hasarı, dNTP eksikliği, hücresel stres yaratan durumlar, telomerezyokluğu gibi durumlarda seviyesi en çok artan proteinlerdendir (4). p53 keşfedildiği dönemlerde bir onkogen olabileceği düşünülmüştür, fakat p53'ün keşfinden yaklaşık 10 yıl sonra (1989) Lane ve Benchemol yaptıkları deneysel bir çalışmada p53'ün kanser hücrelerinde aşırı eksprese olmasını bir mutasyona bağlı olduğunu bulmuşlardır ve bu deney sonucunda p53'ün bir anti-onkogen olabileceğini keşfetmişlerdir (40). p53 proteini oksidatif stres, DNA hasarı, kanser gibi bir durumda uyarıldığı zaman hücre siklusunun durmasını hasar onarım mekanizmalarının aktivasyonuna yol açar ve eğer hasar onarılamaz ise hücreleri apoptoza sürükler (42). p53 bir transkripsiyon faktör olarak da görev olmaktadır. p53 uyarıldığında konsantrasyonu artar spesifik olarak DNA'ya bağlanır ve birçok genin aktivitesini olumlu yada olumsuz olarak etkilemektedir. 100 den fazla genin aktivitesinin p53 tarafından düzenlendiği bilinmektedir. Biyoinformatik analizler p53'ün genomda 4000 den fazla bağlanma yerinin olduğunu göstermektedir (43).

2.12. P53 Proteinin Yapısı ve İşlevi

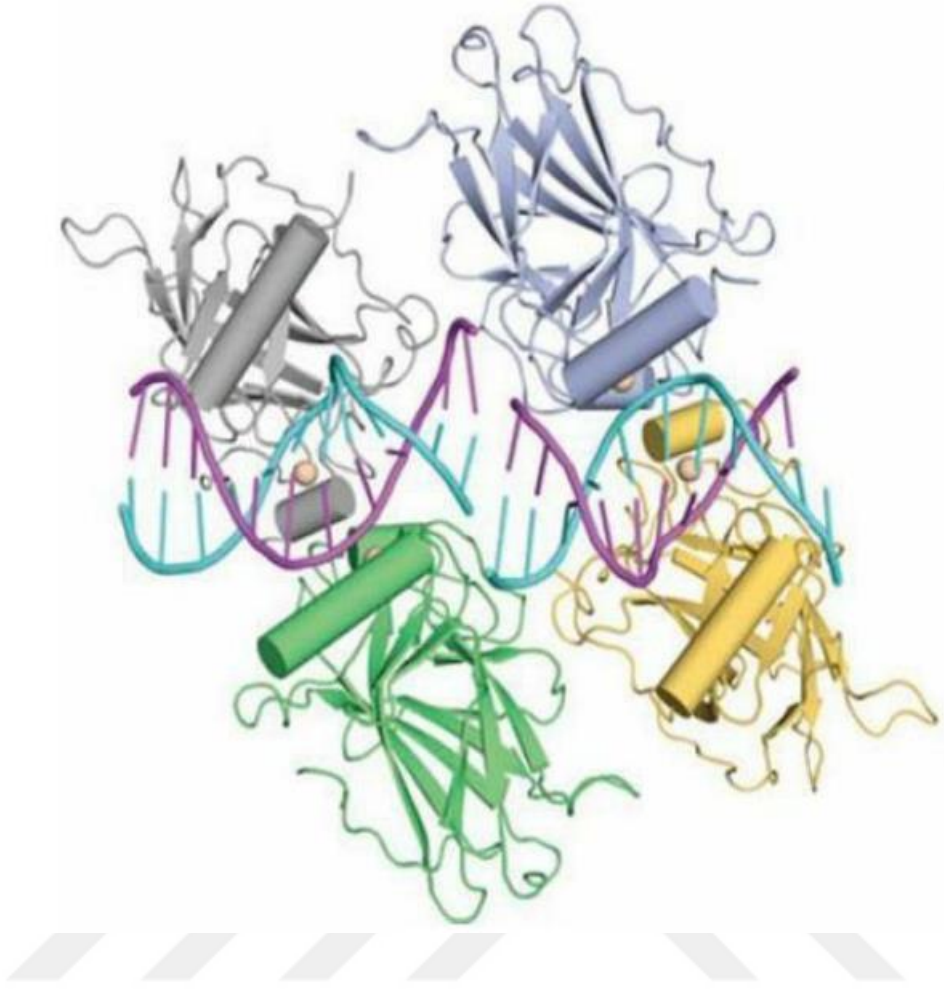
Bir transkripsiyon faktörü olan p53 proteini 393 amino asitten oluşmakta olan bir fosfoprotein kodlar ve 11 ekzon 10 introndan oluşan bir gen tarafından kodlanır (44). p53 proteini incelendiğinde yapı ve işlevleri farklı olan beş alandan oluşmakta olduğu görülmüştür ve bu alanlar sırasıyla transkripsiyonel işlemlerden sorumlu asidik Nterminal kısmı (1.ve 43.amino asitler arası), proline zengin bir alan (64-92. aminoasitler), p53 mutasyonlarının meydana geldiği DNA bağlanma alanı veya

merkezi kor bölgesi(100- 300.), protein tetramerizasyon bölgesi (320-360.) ve lizin amino asidince zengin bir C- terminali regülasyon alanı (360-393.)



Şekil 2.14. p53'ün şematik yapısı ve amino asit dizileri (45).

P53'ün transaktivasyon alanı proapoptotik genlerin transaktivasyonundan sorumludur. Transaktivasyon bölgesi ayrıca birçok transkripsiyon faktörü ile etkileşime girmektedir. Prolin bakımından zengin alan p53 proteinin stabilitesi ve aynı zamanda proapoptotik aktivitesi için önemlidir. Aktivasyon alanı apoptotik aktiviteden sorumlu iken tetramerizasyon alanı p53 aktivitesi açısından önemlidir. DNA bağlanma alanı ise p53'ün DNA'ya bağlanması için kritik önem arz etmektedir (46). p53 mutasyonlarının yaklaşık % 95'i DNA bağlanma alanında meydana geldiği bilinmektedir (4).

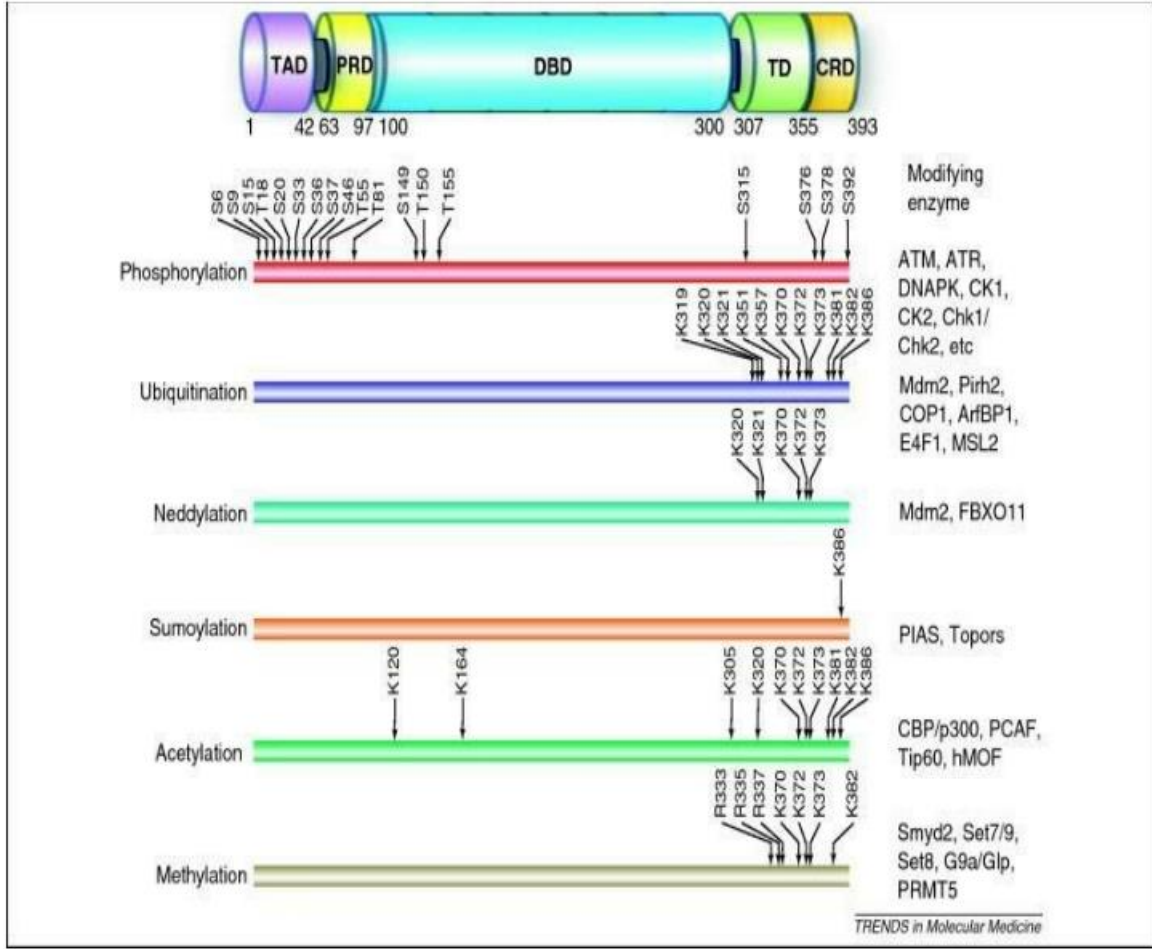


Şekil 2.15. DNA'ya bağlı bulunan p53 tetrameri(45)

P53 proteini çeşitli hücresel uyarılar sonucu aktive olmaktadır ve bir çok biyolojik sinyal ağında merkez görev üstlemektedir. p53 proteini bir transkripsiyon faktörü olarak görev aldığı için hücre döngüsünün durmasında, DNA onarımında, apoptozda hücresel yanıt bekleyen hedef genlerin transkripsiyonunda görev almaktadır (47).

2.13. P53'ün Regülasyonu

Tümör baskılayıcı protein p53 diziye özgü bir transkripsiyon faktördür ve hücre döngüsünde ve ilerlemesinde, apoptozda, DNA onarımı, hücresel stress yaratan durumlar, yaşlanma gibi durumlarda bir düzenleme görevi üstlenmiştir. P53'ün düzenlenmesi transkripsiyon faktörü dışında transasyonel, post-transasyonel olarak da düzenlenmektedir. Sitozol içerisindeki p53 transkripsiyondan bağımsız olarak metilasyon, ubikitinasyon, fosforilasyon, asetilasyon, sumilasyon ve nedlesyon olmak üzere çok sayıda post-transasyonel modifikasyonla da düzenlenebilmektedir(48).



Şekil 2.16. Şekilde daha önce açıkladığımız gibi p53'ün beş alanı gösterilmektedir ve bu alanlarda meydana gelen post-translasyonel modifikasyonlar görülmektedir. Ve yine şekilde p53'ün metilasyon, fosforilasyon, ubikitinasyon, nedlesyon, asetilasyon ve sumilasyon alanları çizilmiştir. Sağ tarafta bulunan enzimler ise her bir modifikasyondan sorumlu olan enzimlerdir ve ilgili modifikasyonun karşısında verilmiştir (48).

P53'ün yapısında meydana gelen translasyon sonrası modifikasyonlar bu proteinin aktivitesi ve stabilitesini düzenleme açısından önemlidir. p53'ün C terminalinde bulunan 6 lizin tortusu asetilasyon, nedlesyon, ubikitinasyon, metilasyon gibi çeşitli mekanizmalarla post-translasyonel olarak düzenlenebilir (48,49). Yapılan bir çalışmada p53'ün C terminalinin asetilasyonu p53'ün aktivitesini artırdığı gözlemlenmiştir (49). Yine başka bir çalışmada P53'ün fosforilasyon bölgelerinde serin ve treonin kalıntılarının olduğu tespit edilmiş olup, bu bölgelerin 17 farklı pozisyonda fosforilasyonu sonucu p53'ün DNA ya bağlanma yeteneğini artırdığı

tespit edilmiştir (50). p53'ün yapısında metilasyona duyarlı lizin ve arginin kalıntıları bulunmaktadır. Metilasyon p53 üzerinde olumlu ve olumsuz etkiler yaratabilir. Örneğin K772'nin SET7/9 ile monometile olması durumunda p53 hedef genlerinin transaktivasyonunu artırmıştır ve SET8'in K382 ile monometile olması durumunda ise p53'ün transaktivitesini baskıladığı bulunmuştur (51,52).

Ubikitinasyon da p53'ün aktivitesi açısından oldukça önemlidir. Bu modifikasyonda bir veya birden fazla ubiquitin molekülü p53 proteinine bağlanır. Monoubikitinasyon p53'ün sitoplazmik translokasyonundan sorumludur ve apoptozu tetikler otofajiyi inhibe eder (53). Hücreler herhangi bir stres altında olmadıkları zaman p53 Mdm2 diğer adı(Hdm2) tarafından tutulur ve p53 seviyesi düşüktür. Bu durumda Mdm2 p53'ü ubiquitine eder. Bunun dışında hücreler bir stres uyarısı alırsa Mdm2 aktivitesi inhibe olur, p53 ubiquitinasyondan kaçır. Herpes virüsüne bağlı ubiquitine spesifik proteozin(HAUSP) ubiquitin proteaz arasındaki denge ile p53'ün yarı ömrünü belirler (54).

3.MATERYAL VE METOD

Kullanılan Cihazlar

Marka ve Modeli

Derin dondurucu (-80)	Thermo Scientific
Derin dondurucu (-20)	Uğur UDF6 SLNF
Buz dolabı(+4)	Vestel
Buz dolabı(4)	Arçelik
Kar buz yapım cihazı	
Distile su cihazı	Direct-o 5UV
Digital su banyosu	Nuve NB 20
Hassas terazi	Ohaus PA214C
İnkübatör	Nuve EN 120
Çalkalamalı inkübatör	Daihan Scientific
Mikropipet	
Otoklav	Nuve
PH metre	Mettler Toledo
Santrifüj(mini)	Sigma
Santrifüj	Nuve NF 800 R
Vorteks mini karıştırıcı	DlabDX-S
Elektroforez sistemi	Biyo-Rad
Spektrofotometre	Denovix DS-11 FX
Jel görüntüleme cihazı	Syngene
Otomatik pipet	
Çeker ocak	ESCO Class
96' lık well plate cihazı	Allsheng
Mikrodalga	Arçelik
Isıtıcı	Termo scientific

Kullanılan Kimyasallar ve Biyolojik Malzemeler

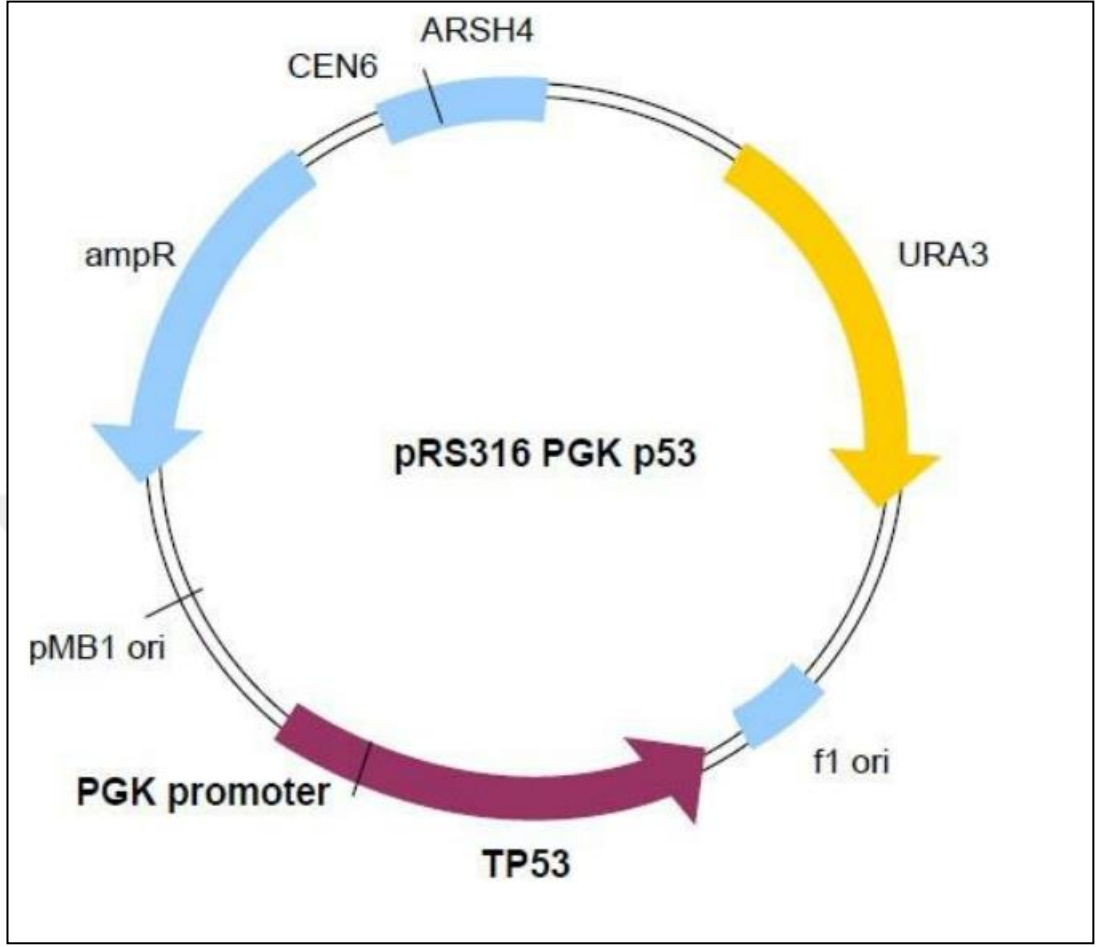
LB Klonaz enzimi

Proteinaz-K
RNA-ase-A süspansiyon
Elotion buffer
Tango buffer
X bal
Evor-V
Lizis solüsyon
Nötralizasyon solüsyon
Wash solüsyon
Agar
Etidyum bromür
LiOA-C (Lityum asetat)
SSDNA
PEG- mix
ONPC (O-nitrofenil β -D-galaktopironosit)
H₂O₂(Hidrojen Peroksit)
Z buffer
NaCO₃ (Sodyum Karbonat)
Metiyonin amino asidi
Histidin aminoasidi
Urasil amino asidi

3.1. Plazmidler

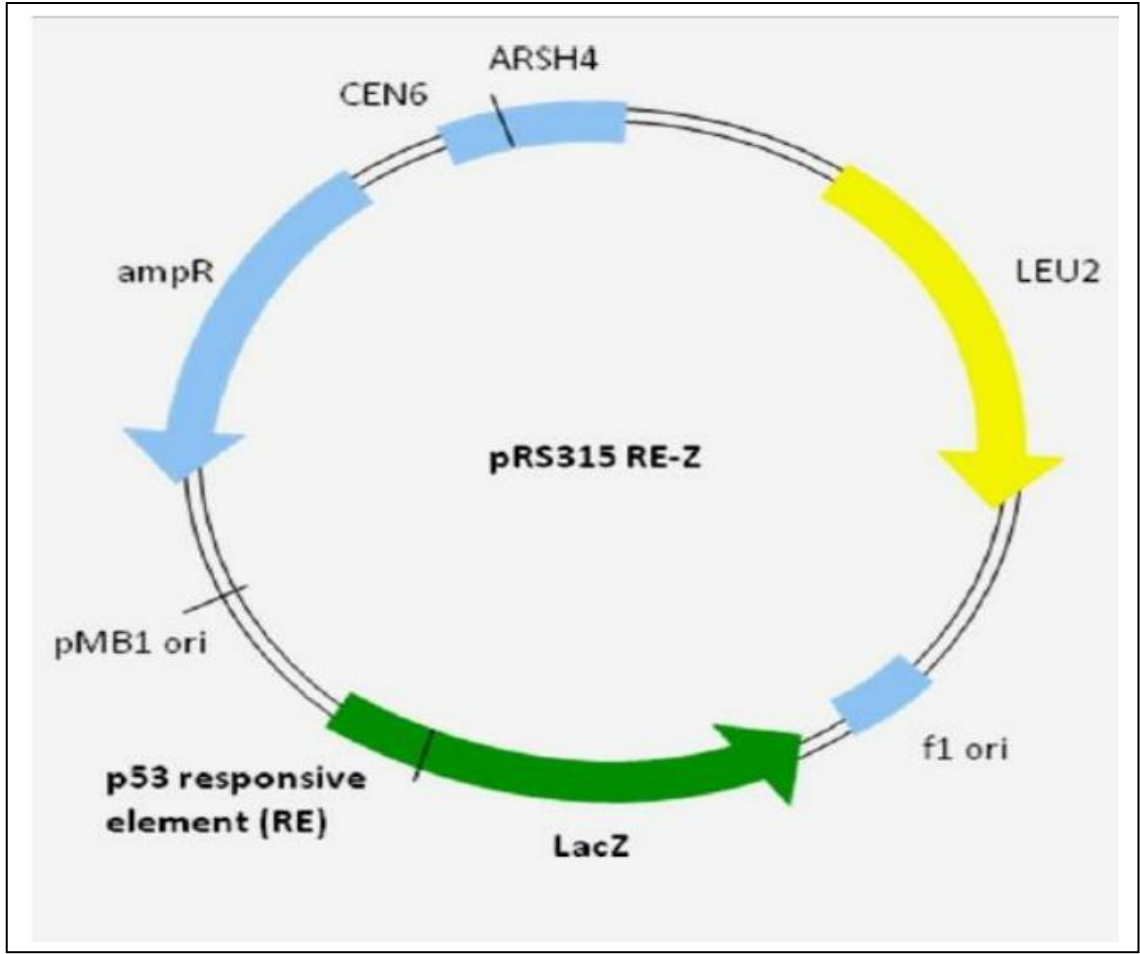
Çalışmamızda pRS315 RE-Z ve pRS316PGK p53 plazmidleri kullanıldı. Bu vektörler hem maya hücrelerinde hem bakteri hücrelerinde replike olabilen mekik türü vektörlerdir. Bu plazmidler düşük kopya özelliğine sahiptir.

pRS316 PGK p53 plazmidi, maya fosfoglukokinaz enziminin promotorü kontrolünde ifade olabilen insan p53 genini içermektedir. URA3 geni bu plazmidin oksotrofik markır genidir (Şekil.3.1).



Şekil 3.1. pRS316 PGK p53 plazmidi'nin yapısı (45)

pRS315 RE-Z plazmidi,p53 proteinin bir transkripsiyon faktörü olarak bağlanabileceği spesifik bir DNA dizisi kontrolünde ifade olunabilecek Lac-Z genini içermektedir.LEU2 geni plazmidin oksotrofik markır genidir (Şekil.3.2)



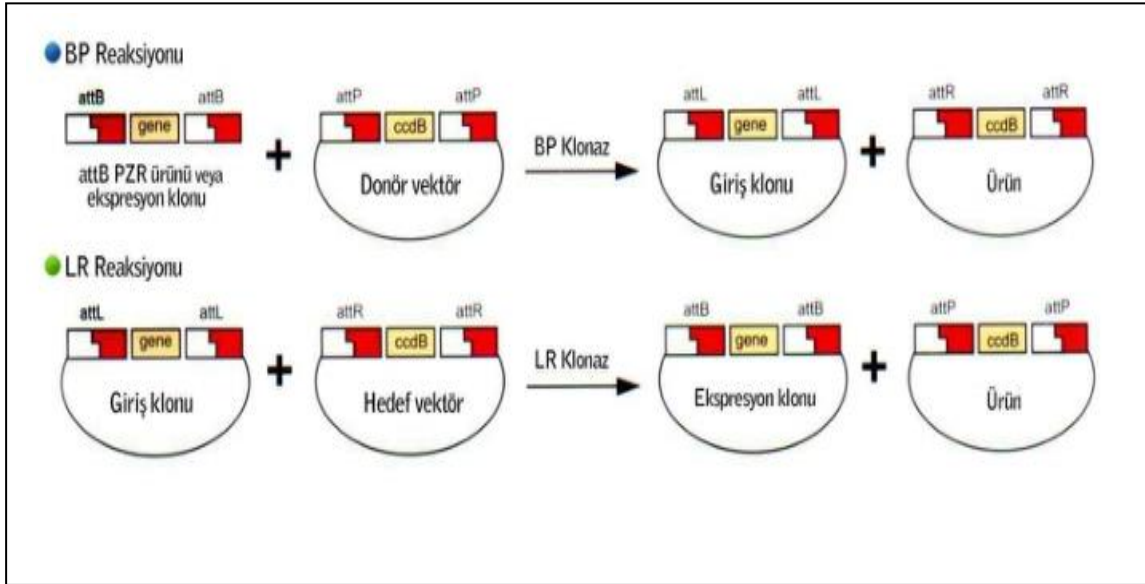
Şekil 3.2. Prs315 RE-Z plazmidi'nin yapısı (45)

Çalışmamızda kullandığımız plazmidler Dr. Gray merrill (55) tarafından sağlanmıştır.

3.2. p53 İçin LR Reaksiyonu

İnsan p53 proteininin yüksek kopyasını oluşturmamız için ve boş bir vektör olan PAG413 p53 vektörü kullanıldı. PAG413 p53 aynı zamanda MSR'ler için de kullanacağımız vektördür. LR reaksiyonu Gateway klonlama teknolojisi (56) kullanılarak kuruldu. Gateway kolonlama teknolojisi James Hartley, Dominic Espasito ve Mike Brasch isimli araştırmacılar tarafından bulunmuştur (56). Gateway klonal sistem iki aşamadan oluşmaktadır. Birinci aşama BP aşamasıdır ve bu aşamada attB içeren bir PCR ürününün attP içeren uygun bir donör vektörle BP klonaz enzimi vasıtasıyla birleştirilerek attL içeren bir giriş klonu elde edildiği aşamadır. İkinci

aşama ise BP aşamasında elde edilen giriş klonunun attR içeren hedef bir vektörle LR klonaz enzimi vasıtasıyla transfer edildiği ve attB içeren hedef klon elde edildiği LR aşamasıdır (56).



Şekil 3.3. Gateway klonlamada BP ve LR aşamaları (56)

LR reaksiyonu kısaca şu şekilde kurulmuştur: P Donör PRS316 p53 (yüksek kopya özelliğine sahip bir DNA zinciri)=1µl ,PAG413 p53 vektör=1µl, LR Klonaz enzimi=1µl ve Buffer =2µl toplam karışım 5µl olacak şekilde hazırlandı ve numuneler bir eppendorf tüpüne alınarak iyice karıştırıldı. Bu karışım 1-2 saat oda sıcaklığında inkübe edildi; daha sonra üzerine 1µl proteinaz -K (peptid bağlarının yıkılması için) eklenerek vortekslendi ve 10 dakika 37 de inkübe edildikten sonra transformasyona hazırlandı.

3.3. Plazmid DNA Transformasyonu

PAG413 P53 plazmidini çoğaltmak için Escherichia coli bakterisine transformasyonu sağlandı. Transformasyonda kullandığımız bu plazmid Ampisilin direnç geni barındırmaktadır. E coli de bu antibiyotiğe duyarlıdır. Dolayısıyla PAG413 p53 plazmidini bakteride çoğaltabilmesi için besiyeri olarak Ampisilinli besiyeri kullandık. Transformasyon deneyinde izlediğimiz prosedür şöyledir: -80 de TOP10 kompetent hücrelerinin üzerine daha önce hazırladığımız LR

reaksiyonu eklendi. 15-20 dk buz içerisinde bekletildi ve her 5dk da bir nazikçe vortekslendi. 42 de 2 dk inkübasyon yapıldı. Bu karışımın üzerine 100µl LB eklendi ve pipetasyon ile karıştırıldı. (LB besiyeri E .coli nin gelişimini destekleyecek şekilde hazırlanmıştır.) Daha sonra 37 1 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra Ampisilinli petrilere yayılarak 37 de bir gün inkübasyonda kalması sağlandı.

3.4.Plazmid DNA İzolasyonu

Plazmid DNA yı E.coli de çoğaltma işleminden sonra çoğaltılan bu plazmid'in saf olarak elde edilebilmesi amacıyla izolasyon deneyi yapıldı. İzolasyon deneyini hazır aldığımız bir kit ile yaptık. Bu kitlerin içerisinde özel solüsyonlar bulunmakta ve DNA 'yı tutmak için spin kolonlar bulunmaktaydı. Kullanılan bu özel solüsyonlar DNA'nın fiziksel olarak çözünmesini sağlarken; kolonlar DNA'da tutmak için kullanılmıştır. Kolonlarda matriks tabakası bulunmaktadır. DNA dışındaki maddeler matrikse tutunamadığı için ortamdan uzaklaştırılır. İşlem sonunda DNA'yı matriksten uzaklaştırmak için elüsyon aşaması vardır ve bu aşama ile DNA matriksten ayrılmış olup son halini alır.

Plazmid DNA izolasyon deney yönteminin esası şöyledir:

Transformasyon sonucu petride büyüyen koloniler LB ampisilinli sıvı besiyerinde bir gün 37 de 150 rpm de inkübasyonda bırakılmıştır. Kültür tüpleri daha sonra 3.500 rpm de santrifüj edilerek çökmesi sağlandı. Kültür tüplerinin dip kısmında biriken bakteri yoğunluğu alınarak eppendorf tüplere aktarıldı. Eppendorf tüplerinin üzerine RNA ase-A resüpsansiyon solüsyonundan 250 µl eklendi ardından 250 µl lizis solüsyonu eklenerek vortekslendi ve 5 dk kadar beklendi. Bu karışımın üzerine 350 µl nötralisasyon sıvısı eklenerek 5 dk boyunca 10.000 rpm de santrifüj edildi ve ardından çöken kısımları almadan kolonlara transfer ettik. Ardından kolonlar 1 dk yavaş (5.000) rpm 1 dk hızlı (10.000) rpm de santrifüj edildikten sonra 500µl alkol eklenmiş wash solüsyonundan eklenerek 1 dk kadar beklendi. DNA dışındaki maddeleri ortamdan uzaklaştırmak için yıkama işlemi iki sefer yapıldı. Yıkama işlemi bittikten sonra DNA 'yı matriksten ayırmak için 50µl elution buffer eklendi ve 2 dk bekleddikten sonra 2 dk santrifüj edildi ve plazmid DNA elde edilmiş oldu.

Plazmid DNA 'nın miktar ve saflığını belirlemek için spektrofotometrede 260/230 ve 260/280 dalga boylarında ölçüm yapıldı ve elde edilen sonuçlar kayıt altına alındı.

3.5. PAG413 p53 plazmidi'nin PRS315 RE-Z plazmidine Klonlanması

Plazmit DNA'nın klonlanması işleminden sonra p53 transkripsiyon faktör geminin doğru bir şekilde klonlandığını test etmemiz için aşağıda yazılı enzimlerle kesim reaksiyonu tamamlanıp, jel elektroforezinde yürütme işlemi gerçekleştirildi.

Kesim reaksiyonu şu şekilde yapıldı:

Plazmid DNA = 5µl, 10X Tango buffer (kesim enzimleri için optimum reaksiyon koşulları sağlar) = 2µl, EcoRV (*Escherichia coli*'nin RY13 suşundan ilk identifiye edilen) = 0.5µl XbaI = 1 µl, ve su = 1.5 µl toplam karışım 10 µl olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu karışım vortekslenip santrifüj edildikten sonra 37'de 2 saat inkübe edildi.

3.6. P53'ü Jel Elektroforezinde Yürütme Deneyi

Jel elektroforezi proteinleri, nükleik asitleri büyüklük, elektriksel yük gibi özelliklere göre ayıran bir yöntemdir. Moleküller elektrik varlığında hareket ederek molekül büyüklüğüne göre karşı tarafa ilerleme gösterirler. p53 geninin doğru bir şekilde klonlandığından emin olmak için jelde yürütüp molekül büyüklüğüne bakarak karar vermemiz gerekiyordu.

Jel şu şekilde hazırlanmıştır: 0.5 gr Agaroz tartılarak üzerine 50 ml TAE 1Xbuffer (elektroforez tamponu) eklenerek karıştırıldı. 2 dk kadar mikrodalgada bekletilerek agarın çözünmesi sağlandı, mikrodalgada buhardan dolayı eksilen su kadar distile su eklendi. Mikrodalgadan çıkartılan agar biraz soğuduktan sonra 2µl Etidyum bromür (EtBr) eklendi. (EtBr DNA zincirleri arasına girebilen floresan bir boyadır böylece jelde bulunan moleküller mor ötesi ışık altında görüntülenebilirler) daha sonra jel tanka dökülüp donduktan sonra yükleme yapıldı.

1. kuyuya marker gen (1 kb) 2. kuyuya PAG413 p53 3. kuyuya PAG413 P53 eklendi.

2. ve 3. Kuyulara ayrıca 2µl DNA binding buffer (DNA bağlanma tamponu) eklendi ve elektroforez'e başlandı. p53 geni jel yürütme cihazında 90 voltta 1 saat yürütüldü. Elektroforezde moleküller (-) kutuptan (+) kutuba doğru yürütme yapılır. p53 geninin büyüklüğünü ölçmek için daha önce büyüklüğünü bildiğimiz ve marker gen

denilen DNA parçasından yararlandık. p53 için beklediğimiz sonuç 1200+656 bp büyüklüğünde bir gen bölgesidir.

3.7. Maya Transformasyonu

Maya transformasyonunda kullandığımız mutant maya hücreleri *Saccharomyces cerevisiae*'nin BY4741 suşudur ve genetiği (MATa his3 leu2 ura3 met15)dir. Mutant maya hücreleri ve oksidatif strese insan p53 aktivitesini ölçmekte kullandığımız ve aynı zamanda antioksidan enzimler olarak kullanılan msra tekli msrb tekli ve msra ve msrb çiftli mutantları daha önceki çalışmalarda kullanıldığı için laboratuvarında mevcuttu (23).

Maya transformasyon deneyi şu şekilde yapılmıştır:

YPD besiyerinde(% 1 maya ekstraktı % 2 pepton % 2 dekstroz veya 0.05 mg/ml gerekli amino asitler) büyüyenBY474 mutant maya hücreleri 30°C'de 150 rpm de bir gün çalkalamalı inkübasyonda büyütülmüştür. Büyüyen maya hücrelerini canlandırmak amacıyla üzerine tekrar YPD sıvı besiyeri ve gerekli amino asitler eklenerek 2-3 saat kadar daha inkübasyonu sağlanmıştır. Bu süre sonunda büyüyen maya hücrelerini eppendorf tüplere(4 adet) alıp 1dk boyunca 5000 rpm de santrifüj ederek çökmesi sağlandı. Çöken maya hücrelerini 1xLiOAC-TE(lityum asetat) solüsyonu ile yıkama(1000 µl) işlemine tabii tutuldu. Tekrar santrifüj ederek üst kısımda biriken solüsyonu atıldı. Lityum asetat ile yıkama işlemini iki kez tekrarlandı. Tekrar üzerine 1xLiAC-TE tan 100µl alınarak mutant maya hücrelerinin üzerine pipetlendi ve 30 °C'de 1 saat inkübe edildi. Inkübasyondan sonra 1.tüpe 2µl plazmid DNA +5µl SSDNA eklendi. 2. tüpe 2µl plazmid DNA +5µl SSDNA ve msra tekli geni (5µl) eklendi, 3. tüpe 2µl plazmid DNA +5µl SSDNA ve msrb tekli geni (5µl) ve 4.tüpe 2µl plazmid DNA +5µl SSDNA ve msra ve msrb çiftli mutant genleri(5µl) eklendi. Ardından tüpler 30 °C'de 30 dk inkübe edildi.(5µl Salmon sperm DNA 5 dk 100 °C 'de ısıtılmış ve kısa bir süre buzda bekletildi) inkübasyonun ardından tüm tüplere 700 µl PEG mix eklenerel karıştırıldı ve 30°C'de 1 saat inkübe edildi. İşlemin ardından 42 °C' de su banyosunda 15 dk bekletip 5000 rpm de 2 dk santrifüjden sonra tüplerdeki PEG solüsyonu uzaklaştırıldı. Tüplerin üzerine 100µl saf su ekledikten sonra YNB(maya azot bazı) besiyerlerine ekim yapılarak 30°C ' de 3 gün transforme olmuş kolonilerin büyümesi için beklendi. Maya hücrelerinde birden

fazla plazmidin ve genin büyümesi yavaş olduğundan uzun bir süre inkübasyonda kalması gerekmektedir.

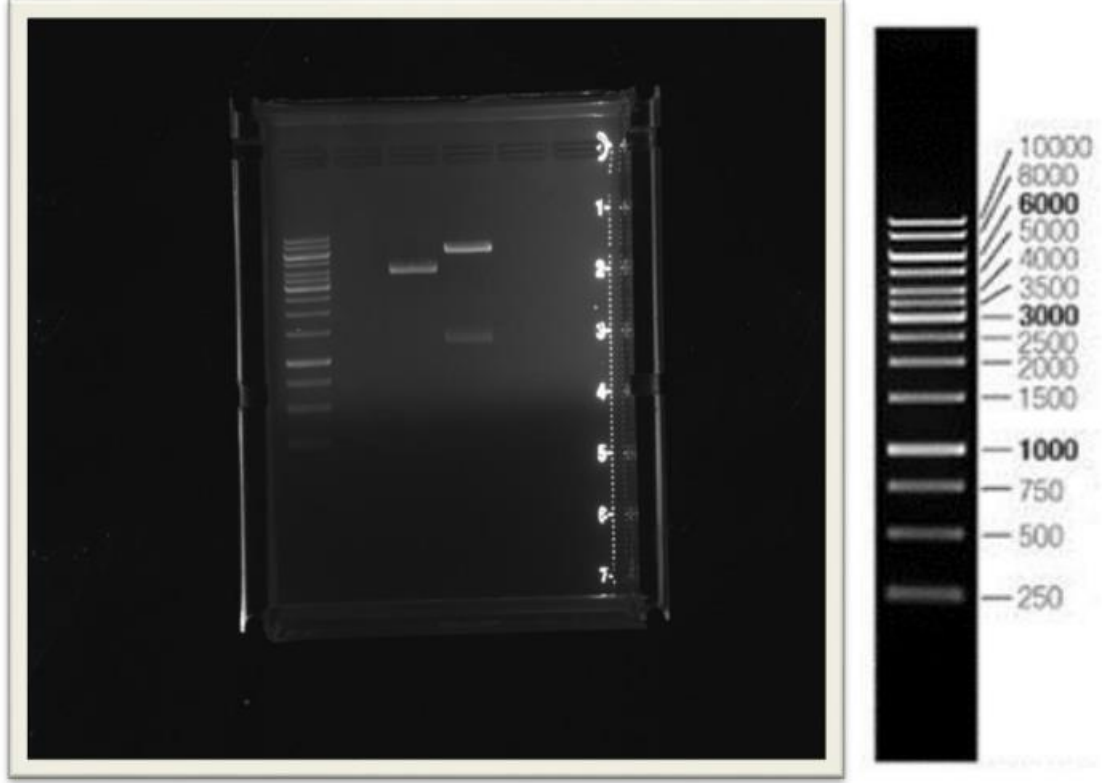
3.8. β - Galaktosidaz Deneyi

Maya transformasyon deneyi sonucunda YNB katı besiyerinde büyüyen BY4741 hücrelerinden her besiyeri için en az üç koloni alınarak ve uygun amino asitler de besiyerine eklendikten sonra YNB besiyerine tekrar ekim yapıldı. Amacımız besiyerini belli bir süre taze tutmaktır. Ve artık son durumda elimizde BY4741 REZ-p53, BY4741 REZ-p53 msra, BY4741 REZ-p53 msrb ve BY4741 REZ-p53 msrab transformantları bulunmaktaydı. Maya hücrelerinde β galaktosidaz aktivitesini nicel olarak ölçmek için Kippert'in yöntemini kullandık(57). Deneyin esası şöyleydi: β galaktosidaz deneyine başlamak için maya hücrelerindeki transformant hücrelerden her besiyerinden birer koloni alındı ve YNB sıvı besiyerinde 30 °C'de 150 rpm de bir gece çalkalamalı inkübasyonda bırakıldı. Aynı işlem oksidatif stres oluşturulacak hücreler için de yapıldı. Transformasyona uğramış maya hücrelerinde oksidatif stres oluşturmak için H₂O₂ kullanıldı. Bir gece inkübatörde büyüyen bütün maya hücreleri OD600'de ölçüldü ve 0.20.3 aralığında seyreltildi ve tekrar 30 °C'de 2 saat inkübasyonda bırakıldı. 2 saat sonra oksidatif stres oluşturulacak hücrelere H₂O₂ eklenip(1mM) inkübasyona bırakıldı. Tekrar OD600'de ölçüm yapıldı ve 0.7-0.8 aralığında tutuldu. Her bir hücre kültüründen 3'er replika alınarak eppendorf tüplere alındı ve 100 μ l hücre kültürü 400 μ l Z buffer tamponundan(60mM Na₂HPO₄, 40mM NaH₂PO₄, 10mM KCl, 1mM Mg₂SO₄, 50 mM B-merkaptotanol) eklendi (57) ve 30°C' de 30 dk inkübe edildi ve her 10 dk da bir çıkarılıp vortekslendi. Z tamponuna ayrıca maya hücrelerini uygun bir şekilde parçalamak için 3 mg loril sarkosinat eklendi böylece β galaktosidaz enzimi aktivitesini ölçmek için kullanacağımız ONPC (o-nitrofenil- β -D-galaktopironosit) maya hücrelerinin içine girebilecekti. Daha sonra ONPC 4 mg kadar tartıldı ve Z tamponunda çözülmesi sağlandı. Ardından her tüpe 150 μ l ONPC eklenerek 30°C'de inkübasyona bırakılıp tüplerde sarı renk oluşana kadar beklendi. Deneyimizde yaklaşık olarak 20 dk sonra sarı renk oluştu. Sarı renk oluştuğundan sonra reaksiyonu durdurmak için 400 μ l NaCO₃ (sodyum karbonat) eklendi. Sonra 96 lık well plate'de 420 ve 450 nm de ölçüm yapıldı.

3.9. Yeni Bir Vektör Yeni Bir Msr

Oksidatif stres durumunda p53 aktivitesini msra tekli msrb tekli ve msrab çiftli mutantlarla maya sisteminde test ettikten sonra test etmediğimiz msrc enzimiyle de test etmek istedik. Maya sisteminde yeni durumda pRS315 RE-Z ve pRS316 PGK p53 plazmidleri ile msra tekli msrb tekli ve msrc tekli mutantları vardı. Maya sisteminde bunu çalışabilmemiz için boş vektör olarak p423-GPD vektörü kullanıldı. Kullanacağımız plazmid ve msr'lerin hepsi bakteri hücrelerinde daha önce yöntemini açıkladığımız bakteri transformasyonu ve plazmid DNA izolasyonu ile çoğaltılıp saf bir şekilde elde edildi ve konsantrasyonları ölçüldü. Bundan sonraki maya transformasyonu ve β galaktosidaz deney prosedürü yine daha önce takip ettiğimiz prosedür ile aynıydı.

4. BULGULAR



Şekil 4.1. p53'ün jel elektroforez görüntüsü

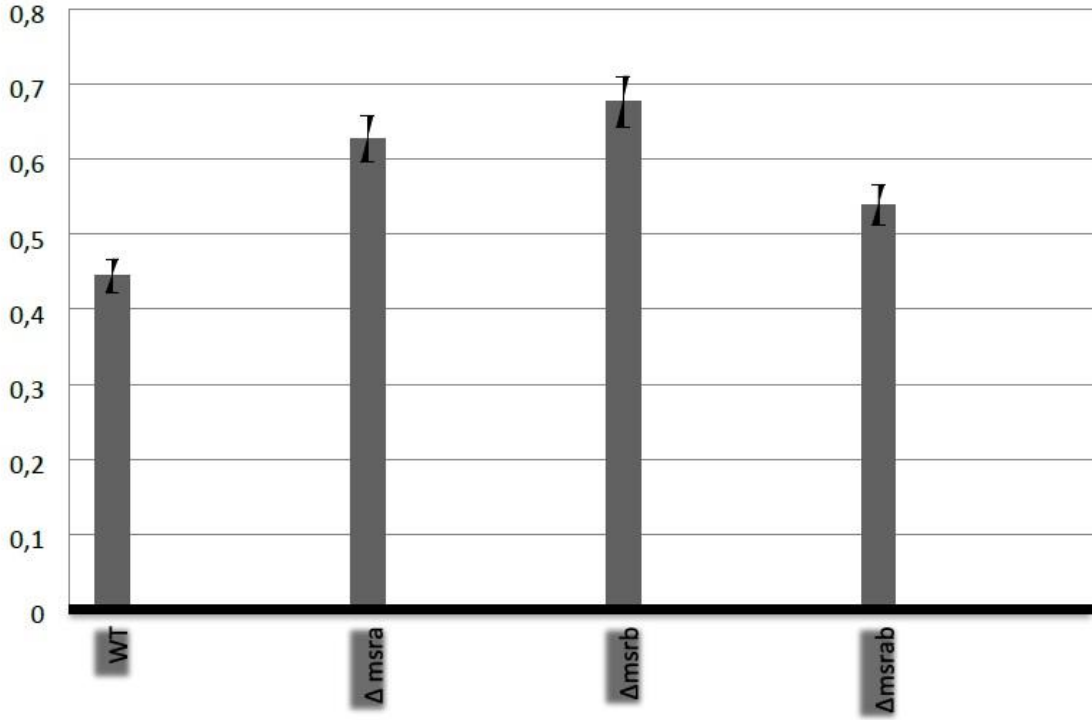
4.1. P53'ün Alt Klonlanması

P53'ün doğru bir şekilde klonlandığından emin olabilmemiz için yaptığımız jel elektroforezi deneyi bize doğru sonucu verecekti. Jel elektroforezi deneyinde jelde yürütülen p53'ün beklenen molekül büyüklüğü yaklaşık olarak 1200+656 bp idi. P53'ün molekül ağırlığı beklenen aralıkta olduğundan dolayı doğru bir şekilde klonlandığından emin olduk.

4.2. MSR Mutantı Hücrelerin p53 Aktivasyon Durumları (WT ve mutantlar – Δ msra, Δ msrb, Δ msra Δ msrb)

Metiyonin sülfoksit redüktaz enzimleri olmayan hücrelerde p53 proteinin yapısındaki metiyoninlerin oksitlenmesi ve geri indirgenememesi sonucu aktivite bozukluğu (azalması) olacağı hipotez edilmektedir. Bu hipotezi test etmek için MSR genleri çıkartılmış maya hücrelerinde p53 bağımlı LacZ aktivitesi incelendi. Bir plazmit üzerinden ifade edilen p53 proteini diğer plazmitteki

hedef genlerden p21 in promotoru altında bulunan LacZ geminin ifadesini sağlamaktadır. İfade olan LacZ ise ONPG substratını parçalayarak spektrofotometre ile kantitatif olarak ölçülebilecek bir substat oluşturmaktadır. Böylece hücrelerdeki p53 proteinlerinin aktiflik durumları test edilebilmektedir.

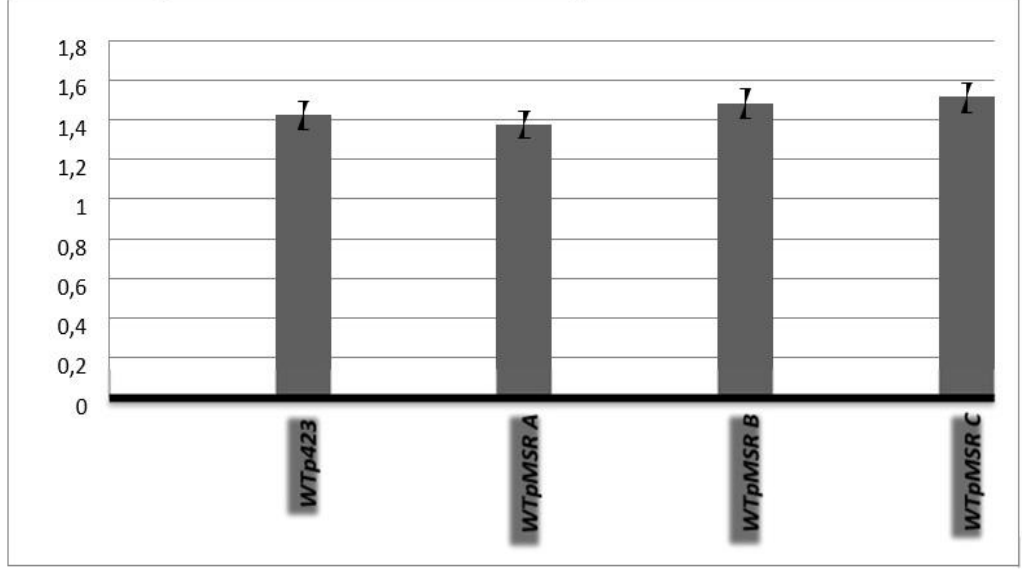


Şekil 4.2. Yabani tip (BY4741) ve MSR mutantlarında ($\Delta msra$, $\Delta msrb$, $\Delta msra\Delta msrb$) p53 aktivasyon durumları. p53 aktivitesi p53 bağımlı Lac-Z enzim aktivitesini ölçerek bulunmuştur. Barlar üç deneyin ortalama değerini göstermektedir.

Bu çalışmamızda(Şekil 4.2.) Msr enzimlerinin bulunmadığı hücrelerde p53'ün aktivitesinde meydana gelen azalma test edildi ve elde ettiğimiz bulgular şu şekildedir: Msra enziminin bulunmadığı hücrelerde kontrol grubuna kıyasla p53 aktivitesinde % 40 artma görülmüştür. Msrb enziminin bulunmadığı hücrelerde p53 aktivitesinde kontrol grubuna kıyasla % 52 artma tespit edilmiştir. MsraMsrb çiftli mutantlarının bulunmadığı hücrelerde kontrol grubuna kıyasla p53 aktivitesinde % 20 artma tespit edilmiştir.

4.3.MSR Genlerini Aşırı İfade Eden Yabani Tip Hücrelerdeki p53 Aktivasyonu

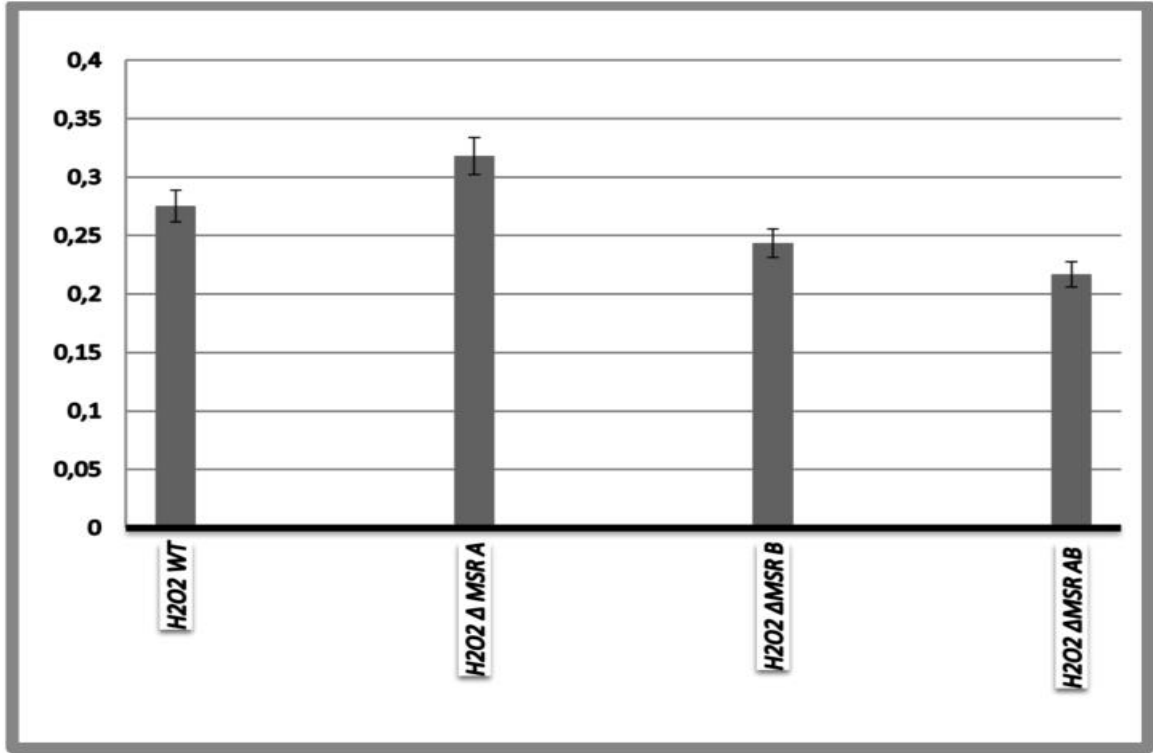
MSR genlerini aşırı ifade eden hücrelerde p53 aktivitesi belirlendi.



Şekil 4.3. MSR genlerinin aşırı ifade edildiği yabani tip hücrelerin p53 aktivasyon durumları. Barlar üç deneyin ortalama değerini göstermektedir.

MSR enzimlerinin aşırı ifadesinde eden hücrelerde kontrol plazmite kıyasla msra enziminin bulunduğu hücrelerde p53 aktivitesi % 3 azalma gösterdiği tespit edildi. Msrb enziminin aşırı ifadesinde kontrol plazmite oranla p53 aktivitesinde % 3 artış gözlemlenmiş olup msrc enziminin aşırı ifadesinde ise kontrole kıyasla p53 aktivitesinde % 5 artış tespit edilmiştir.

4.4. MSR Mutantı Hücrelerin Oksidatif Stres Altında p53 Aktivasyon Durumları

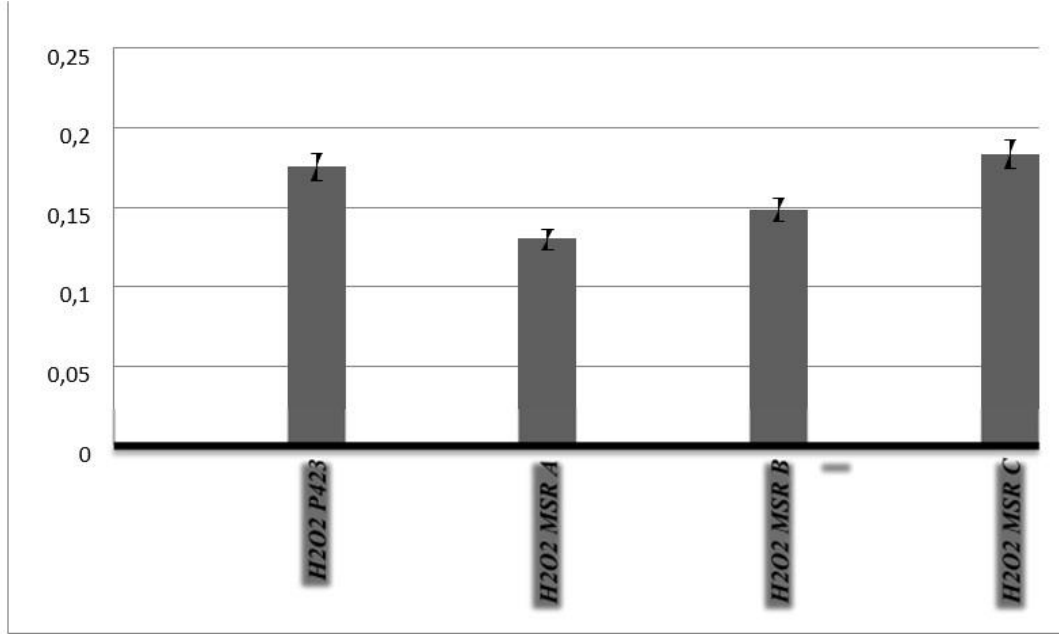


Şekil 4.4. Yabani tip (BY4741) ve MSR mutantlarının oksidatif stres altında p53 aktivasyon durumları

Dışarıdan oksidatif strese neden olan bir ajan uygulayarak ve hücre içini daha oksidatif bir hale getirerek Msr enzimlerinin p53 aktivitesi üzerindeki etkileri tekrar incelendi. Hücrelerde oksidatif stres oluşturmak için 1 mM H₂O₂ verildi.

Kontrol grubuna kıyasla oksidatif stres durumunda Msra enziminin bulunmadığı hücrelerde p53 aktivitesinde % 14 artış görülmüştür. Kontrol grubuna kıyasla Msrb enziminin oksidatif streste bulunmaması durumunda p53 aktivitesinde % 11 azalma tespit edildi. Son olarak Msra Msrb çiftli mutantların bulunmadığı oksidatif stres durumunda p53 aktivitesinde % 22 azalma tespit edilmiştir.

4.5.MSR Genlerini Aşırı İfade Eden Yabani Tip Hücrelerin Oksidatif Stres Altında p53 Aktivasyonu



Şekil 4.5. Msr enzimlerinin aşırı ifadesinde ve oksidatif stres altında p53 aktivasyon durumları.

MSR genlerini aşırı ifade eden hücrelerin oksidatif stres altında p53 aktivasyon durumlarına bakıldı. Kontrol plazmite kıyasla msra enziminin aşırı ifade edildiği hücrelerde oksidatif stres altında % 29 azalma tespit edildi. Msrb enziminin aşırı ifadesinde p53 aktivitesinde % 17 azalma tespit edildi. Son olarak Msrc aşırı ifadesinde oksidatif stres altında p53 aktivitesinde ise % 5 azalma tespit edilmiştir. Her iki deneyde elde ettiğimiz sonuçların aktivite kontrolünü yapabilmek için istatistiksel analiz yapmamız gerekiyordu. Tüm grupların test sonuçlarını gruplar normal dağılım göstermediğinden KRUSKAL WALLİS testi ile analiz ettik ve ($p < 0.05$) olduğundan dolayı test edilecek gruplar arasında anlamlı bir farklılık olduğu tespit edilmiştir ve ayrıca gruplar arasındaki ikili kıyas için de CONOVER testi ile analizi yapıldı ve gruplar arasındaki ikili kıyasta da anlamlı farklılıklar gözlemlenmiştir.

5. TARTIŞMA

P53 bir tümör baskılayıcı proteindir ve başka genlerin de ifade edilmesini düzenleyerek hücre döngüsünü, gelişimini ve farklılaşmasını uyaran tetramer yapıda bir proteindir. p53'ün tetramer yapıda olması tümör baskılayıcı fonksiyonu için önemlidir (47). p53 sağlıklı hücrelerde düşük seviyelerde tutulurken, DNA hasarı, dNTP azlığı, hücrel stres yaratan durumlar, telomeraz yokluğu gibi durumlarda seviyesi oldukça artmaktadır (4). Proteinler, vücutta çok önemli biyolojik etkiye sahiptir fakat oksidatif strese oldukça duyarlıdır. Özellikle metiyonin amino asitleri oksidasyona oldukça açıktır. p53'ün yapısında 12 metiyonin amino asidi bulunduğu göre oksidatif stres durumunda p53'ün yapısındaki metiyonin amino asitleri kolaylıkla oksitlenip p53'ün işlevinin bozulmasına neden olacaktır. Metiyonin amino asitleri bir oksidasyona maruz kaldığında metiyonin sülfoksit (metO) oluşmakta ve bu durum proteinlerde işlev kaybına neden olmaktadır. Daha önce yapılan bir çalışmada p53'ün tetramerizasyon bölgesinde bulunan metiyonin (met340) H₂O₂ ile oksidasyona uğratılmış, metiyoninler metiyonin sülfoksit dönüşmüş ve p53 tetramer yapısının bozulduğu ve proteinde aktivite kaybı olduğu tespit edilmiştir (6). Yapılan bu çalışma p53'ün yapısındaki metiyoninin oksitlenmesi durumunda p53 proteinin inhibe olabileceğini önermiştir fakat buna p53'ün yapısındaki diğer metiyoninler ve metiyonin sülfoksit redüktazlar da dahil edilerek detaylı bir çalışma yapılmamıştır. Metiyonin sülfoksit redüktazlar tüm ökaryotlarda bulunan anti-oksidan enzimlerdir. Metiyonin amino asitlerinin oksidasyonu sonucu metiyonin sülfoksitler oluşmakta ve metiyonin sülfoksitler de metiyonin sülfoksit redüktaz enzimleri tarafından tekrar metiyonine indirgenmektedir. Metiyonin sülfoksit redüktazlar birçok organizma üzerinde çalışılmış olup bu organizmalarda ömür uzaması üzerinde olumlu etkileri tespit edilmiştir (23). Anti-oksidan enzimler olan metiyonin sülfoksit redüktazlar oksidatif strese karşı korumada da önemli roller üstlenmiştir. Projemizde oksidatif streste p53'ün aktivitesini metiyonin sülfoksit redüktazlar tarafından kontrol edilmesi vardı. Bunu gerçekleştirebilmek için maya sisteminde çalışmamızı gerçekleştirdik. Maya sistemine p53 ve metiyonin sülfoksit redüktazları uygun bir sistemle transformasyonundan sonra test edilecek transformantları hem normal ortamda hem de oksidatif stres altında beta-gal aktivitelere maya sisteminde çalışarak analiz ettik. İlk önce uygun bir vektöre test edeceğimiz insan p53 geni ve

antioksidan enzimler olan Msra, Msrb, tekli ve Msrab çiftli mutantları maya sisteminde normal koşullar ve oksidatif stres koşullarında çalışıp Lac-Z aktivitesine bakıldı. İkinci bir çalışmayı da aynı yöntemle çalışarak yine maya sisteminde insan p53 geni ve Msra tekli, Msrb tekli ve Msrc tekli mutantları yine maya sisteminde normal koşullar ve oksidatif stres koşulları altında Lac-Z aktivitesine bakıldı. Lac-Z aktivitesine paralel olarak sarı renk oluşumu gözlemlendikten sonra kantitatif ölçüm için ONPG substratı kullanılarak Beta-galaktosidaz aktivite analizi gerçekleştirildi. Örneklerimizin OD405/OD600 verileri alınarak analiz edildi. Verilerimiz normal dağılım göstermediği için KRUSKAL WALLİS testi yapılmıştır. Gruplar arasında ($p < 0.05$) olduğundan dolayı anlamlı bulunmuştur. Yani hedef transformatlar ile kontrol transformatlar arasında anlamlı bir farklılık gözlemlenmiştir. Gruplar arasındaki ikili karşılaştırmalar ise CONOVER testi ile analiz edilmiştir. Burada kontrol gruplarına kıyasla normal şartlar ve oksidatif şartlar altında yapılan analizde yine ikili gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlemlenmiştir. Daha önceki çalışmalar p53'ün tetramer bölgesindeki metiyonin'in (met340) oksidatif stres altında kolayca oksitlendiğini göstermişti ve böylece p53'ün tetramer yapısı fonksiyonunu kaybetmişti. Bu veriler yaptığımız deney verileri ile uyumaktadır. Yani p53'ün yapısında bulunan metiyonin amino asitleri oksidasyona açıktır ve kolaylıkla oksitlenebilir. Deneyde kullandığımız metiyonin sülfoksit redüktazlar metiyonin oksidasyonunu geri çevireceğinden dolayı bu enzimler oksidatif stres durumunda p53 aktivitesini kontrol etmede önemli kriter olabilir. Bundan sonraki çalışmalarda düşük oksidatif streste, güçlü oksidatif streste ve normal şartlar altında p53 aktivitesi metiyonin sülfoksit redüktazlar kullanılarak ve p53'ün yapısındaki tüm metiyonin amino asitleri kullanılarak tekrar test edilebilir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

İnsan p53 tümör supresör proteininin kanserli hücrelerin büyük çoğunluğunda mutasyona uğramış olmasından dolayı üzerinde en çok çalışılan ve merak edilen proteinlerden biri haline gelmiştir. Oksidatif stress p53'ün aktivasyonunayol açmaktadır. Aktive olan p53 hücre siklusu'nun kontrolü ve durdurulmasında, DNA onarımında, apoptozdan sorumlu hedef genlerin ifadesini kontrol etmede ve kanser oluşumu ve ilerlemesini baskılama gibi bir çok fonksiyonu üstlenmiştir. Daha önce yapılan bir çalışma p53 proteinin oksidatif stres altında tetramer bölgesindeki metiyonin amino asitinin (met340) kolaylıkla oksitlendiğini ve p53 fonksiyonunun bozulduğu ve tetramerik yapının kararlılığını kaybettiği sonucuna ulaştırmıştır(6). Bu sonuçlar p53'ün yapısında bulunan metiyoninlerin oksidatif streste oksidasyona açık olduğunu gösterdi. Biz de deneyimizde maya sisteminde oksidatif şartlar altında insan p53 protein aktivitesinin antioksidan enzimler olan metiyonin sülfoksit redüktazlarla kontrol edilip edilemeyeceğini test etmek istedik. Deney sonuçlarımıza baktığımızda MSR genleri olmayan mutantların, p53'e bağlı Lac-Z aktivitesi kontrol hücrelere kıyasla daha yüksek çıkmıştır. Bununla birlikte MSR genlerinin aşırı ekspresyonu p53 aktivitesinde bir değişime neden olmamıştır. Mutant hücrelerde 1mM hidrojen peroksit ile oksidasyonu p53 aktivitesinde farklılıklar göstermiştir. Spesifik olarak hem MSRA hem MSRB genlerine sahip olmayan hücrelerde daha az p53 aktivitesi gözlemlendi. Maya ikili belirteç sisteminde normal şartlar ve oksidatif şartlar altında p53'ün aktivitesini ölçmek için yaptığımız deney analizlerinde gruplar normal dağılım göstermediğinden KRUSKAL WALLİS testi yapılmış olup ($p<0.05$) hedef transformantlar ile kontrol transformantlar arasında anlamlı bir farklılık olduğu tespit edilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Shechter Y, Burstein Y, Patchornik A. Selective Oxidation of Methionine Residues in Proteins. *Biochemistry*. 1975,14(20):4497-503.
2. Davies MJ. The oxidative environment and protein damage. *Biochim Biophys Acta-Proteins Proteomics*. 2005,1703(2):93-109.
3. Kryukov GV, Kumar RA, Koc A, Sun Z, Gladyshev VN. Selenoprotein R is a zinc-containing stereo-specific methionine sulfoxide reductase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002,99(7):4245-50.
4. Vousden KH, Lu X. Live or let die: The cell's response to p53. *Nat Rev Cancer*. 2002,2(8):594-604.
5. Biegging KT, Mello SS, Attardi LD. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat Rev Cancer*. 2014,14(5):359-70.
6. Nomura T, Kamada R, Ito I, Chuman Y, Shimohigashi Y, Sakaguchi K. Oxidation of methionine residue at hydrophobic core destabilizes p53 tetrameric structure. *Biopolymers*. 2009,91(1):78-84.
7. Hamad İ, Oksidatif Stres Uygulanmış Schizosaccharomyces pombe'de protein oksidasyonlarına karşı doğal antioksidanların koruyucu etkisi: 2008:1-79.
8. Heilig ML. United States Patent Office. *Acm Siggraph Comput Graph*. 1994,28(2):131-4
9. Leverage X. Oxidative, stress and antioxidants? *Cah Nutr Diet*. 2009;44(5):219-24.
10. Karabulut H, Şükrü GM. Adresi, Y. Gör Hayrullah, KA. هرحلا روجلا. *MAKÜ Sag Bil Enst Derg*. 2016, 4(41): 50-9.
11. Mustafa DA. Serbes Radikalleri Biyoloji Etkileri. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*. 1995,48(2):1.
12. Süleyman H, Gül V, Erhan E. Oksidatif Stres ve Doku Hasarı. *Erzincan Tıp Dergisi*. 2018,(1):1-4.
13. Ghosh R, Mitchell DL. Effect of oxidative DNA damage in promoter elements on transcription factor binding. *Nucleic Acids Res*. 1999,27(15):3213-8.
14. Jackson AL, Chen R, Loeb LA. Induction of microsatellite instability by oxidative DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998,95(21):12468-73.
15. Caldecott KW. Protein-protein interactions during mammalian DNA singlestrand break repair. *Biochem Soc Trans*. 2003,31(1):247-51.

16. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* 2003,17(10):1195-214.
17. Science K, Journal E. Protein Oksidasyonun Biyokimyasal ve Moleküler Mekanizması Biochemical and Molecular Mechanism of Protein Oxidation. *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi* .2013,3(1):40-51.
18. Hawkins CL, Davies MJ. Generation and propagation of radical reactions on proteins. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg.* 2001,1504(2-3):196-219.
19. Berlett BŞÇ, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem.* 1997,272(33):20313-16.
20. Drazic A, Winter J. The physiological role of reversible methionine oxidation. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics.* 2014,1844(8):1367-82.
21. Levine RL, Berlett BS, Moskovitz J, Mosoni L, Stadtman ER. Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage. *Mech Ageing Dev.* 1999,107(3):323-32.
22. Koc A, Gasch AP., Rutherford JC, Kim HY, Gladyshev VN. Methionine sulfoxide reductase regulation of yeast lifespan reveals reactive oxygen species dependent and -independent components of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004,101(21):7999-8004.
23. Le D, Liand X, Femenko D, Raza A, Chong C, Carlson B, Hatfield D, Gladyshev V. NIH Public Access. *Bone*. Analysis of Methionine/Selenomethionine Oxidation and Methionine Sulfoxide Reductase Function Using Methionine-Rich Proteins and Antibodies against Their Oxidized Forms. 2012,23(1):1-7.
24. Ezraty B, Gennaris A, Barras F, Collet JF. Oxidative stress, protein damage and repair in bacteria. *Nat Rev Microbiol.* 2017,15 (7): 385-96.
25. Romsang A, Atichartpongkul, S, Trinachartvanit W., Vattanaviboon P, Mongkolsuk S. Gene expression and physiological role of *Pseudomonas aeruginosa* methionine sulfoxide reductases during oxidative stress. *J Bacteriol.* 2013,195(15):3299-308.
26. Sreekumar PG. Methionine sulfoxide reductase A: Structure, function and role in ocular pathology. *World J Biol Chem.* 2011,2(8):184.
27. Abhilash KR, Koc A, Cerny RL, Gladyshev VN. Reaction mechanism, evolutionary analysis, and role of zinc in *Drosophila* methionine-R-sulfoxide reductase. *J Biol Chem.* 2002,277(40):37527-35.

28. Moskovitz J, Bar-Noy S, Williams WM, Requena J, Berlett BS, Stadtman ER. Methionine sulfoxide reductase (MsrA) is a regulator of antioxidant defense and lifespan in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001,98(23):12920-25.
29. Etienne F, Spector D, Brot N, Weissbach H. A methionine sulfoxide reductase in *Escherichia coli* that reduces the R enantiomer of methionine sulfoxide. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003,300(2):378-82.
30. Mary J, Vouquier S, Picot CR, Perichon M, Petropoulos I, Friguet B. Enzymatic reactions involved in the repair of oxidized proteins. *Exp Gerontol*. 2004,39(8):1117-23.
31. Helfand BT, Mendez MG, Pugh J, Delsert C, Goldman RD. Maintaining the Shape of Nerve Cells. *Mol Biol Cell*. 2003,14 (December): 5069-81.
32. Cho CG, Kim HJ, Chung SW. et al. Modulation of glutathione and thioredoxin systems by calorie restriction during the aging process. *Exp Gerontol*. 2003,38(5):539-48.
33. Liebert MA, Mitsui A, Hamuro J, Nakamura H, Kondo N, Hirabayashi Y, Koizumi S, Hirakawa T, Inoue T, Yodoi J. Controls Oxidative Stress and Life Span Introduction. *Experimental Gerontology* 2002,4(4):693-6.
34. Moskovitz J, Stadtman ER. Selenium-deficient diet enhances protein oxidation and affects methionine sulfoxide reductase (MsrB) protein level in certain mouse tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003,100 (13): 7486-90.
35. Picot CR, Perichon M, Cintrat JC, Friguet B, Petropoulos I. The peptide methionine sulfoxide reductases, MsrA and MsrB (hCBS-1), are downregulated during replicative senescence of human WI-38 fibroblasts. *FEBS Lett*. 2004,558(1-3):74-8.
36. Petropoulos I, Mary J, Perichon M, Friguet B. Down-Regulation of Gene Expression and Enzyme Activity During Aging. *Biochemical Journal*. 2001,362:819-25.
37. Gabbita SP, Aksenov MY, Lovell MA, Markesbery WR. Decrease in peptide methionine sulfoxide reductase in Alzheimer's disease brain. *J Neurochem*. 1999,73(4):1660-6.
38. Moskovitz J, Flescher E, Berlett BS, Azare J, Poston JM, Stadtman ER. Overexpression of peptide-methionine sulfoxide reductase in *Saccharomyces cerevisiae* and human T cells provides them with high resistance to oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998,95(24):14071-75.

39. Lane DP. Benchimol Oncogene or anti-oncogene? *Genes Dev.*1990;4(1):1-8.
40. Kres M, May E, Cassingena R, May P. Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum. *J Virol.* 1979,31(2):472-83.
41. Hainaut P, Hollstein M, Human, C. The First Ten Thousand Mutations. *Adv Cancer Res.* 1999,77(C):81-6.
42. Lu X. A heavily dictated dictator of life and death. *Curr Opin Genet Dev.*2005,15(1):27-33.
43. Varley JM, Evans DGR, Birch JM. Li-Fraumeni syndrome - A molecular and clinical review. *Br J Cancer.* 1997,76(1):1-14.
44. Ataç B. Redox regulation of human p53 tumor suppressor gene activity: identification of redox genes that play role in human p53 reporter gene activity. Izmir Institute of Technology. Master's Thesis. İzmir:2008
45. Zhang Q, Zeng SX, Lu H. Targeting p53-MDM2-MDMX loop for cancer therapy. *Subcell Biochem.* 2014,85:281-319.
46. Kamada R, Toguchi Y, Nomura T, Imagawa T, Sakaguchi K. Tetramer formation of tumor suppressor protein p53: Structure, function, and applications. *Biopolymers.* 2016,106(4):598-612.
47. Dai C, Gu W. P53 post-translational modification: Deregulated in tumorigenesis. *Trends Mol Med.* 2010,16 (11): 528-36.
48. Feng L, Lin T, Uranishi H, Gu W, Xu Y. Functional Analysis of the Roles of Posttranslational Modifications at the p53 C Terminus in Regulating p53 Stability and Activity. *Mol Cell Biol.* 2005,25(13):5389-95.
49. Bode AM, Dong Z. Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer.* 2004,4(10):793-805.
50. Huang J, Perez-Burgos L, Placek BJ. et al. Repression of p53 activity by Smyd2mediated methylation. *Nature.* 2006,444(7119):629-32.
51. Shi X, Kachirskaia I, Yamaguchi H. et al. Modulation of p53 Function by SET8Mediated Methylation at Lysine 382. *Mol Cell.* 2007,27(4):636-46.
52. Marchenko ND, Moll UM. The role of ubiquitination in the direct mitochondrial death program of p53. *Cell Cycle.*2007,6(14):1718-23.
53. Meulmeester E, Maurice MM, Boutell C. et al. Loss of HAUSP-mediated deubiquitination contributes to DNA damage-induced destabilization of Hdmx and Hdm2. *Mol Cell.* 2005,18(5):565-76.


54. Pearson GD, Merrill GF. Deletion of the *Saccharomyces cerevisiae* TRR1 gene encoding thioredoxin reductase inhibits p53-dependent reporter gene expression. *J Biol Chem*. 1998,273(10):5431-4.
55. Method AC. Gateway Klonlama Teknolojisine Genel Bakış :Daha Hizli , Daha Kolay, Daha Etkin Bir Klonlama General View on Gateway Cloning Technology: Faster, Easier, More. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*. 2010,67(1):45- 51.
56. Hartley JL, Temple GF, Brasch MA. DNA Cloning Using In Vitro Site-Specific Recombination. *Genom Research*. 2000,10(11):1788-95.
57. Kippert F. A rapid permeabilization procedure for accurate quantitative determination of β -galactosidase activity in yeast cells. *FEMS Microbiol Lett*. 1995,128(2):201-6.



EKLER

EK.1. ETİK KURUL KARARI

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÖNETİM KURULU KARARI

OTURUM TARİHİ	OTURUM SAYISI	TOPLANTI SAYISI
21.11.2018	50	2018/50-09-01
<p>Enstitümüz Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı yüksek lisans programı öğrencilerinden tez konuları belirlenen Kübra DURMUŞ, Yılmaz SUSUZ ile Salman KOÇ'un tez çalışmaları için etik kurul onayına gerek olmadığına ilişkin Anabilim Dalı Başkanlığının 06.11.2018 tarih ve E.84999 sayılı teklif yazısı ile 31.10.2018 tarihli ortak doktora tez sınav tutanağı görüşüldü.</p> <p>Yapılan görüşmelerden sonra; Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı yüksek lisans programı öğrencilerinden Kübra DURMUŞ, Yılmaz SUSUZ ile Salman KOÇ'un tez çalışmalarında, etik kurul kararı gerektirecek insan yada hayvan unsurları içermediğinden etik kurul onayına gerek olmadığına ilişkin tekliflerin kabulüne, konunun ilgili Anabilim Dalı Başkanlığına bildirilmesine oybirliği ile karar verildi.</p>		
		

BAŞKAN	Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ Enstitü Müdürü	İmza
--------	--	------

ÜYELER

Dr. Öğr. Üyesi Zekeriya ÇALIŞKAN Müdür Yardımcısı	İmza	Prof.Dr. Rukuye AYLAZ Üye	İmza
Dr. Öğr. Üyesi Mustafa CANBOLAT Müdür Yardımcısı	İmza	Dr. Öğr. Üyesi Narin SADIKOĞLU Üye	İmza
Prof. Dr. Davut ÖZBAĞ Üye	İmza	RAPORTÖR Sullan ÖZKAN Enstitü Sekreter V.	İmza