



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**OKSİDATİF STRES UYGULANMIŞ
Schizosaccharomyces pombe'DE
PROTEİN OKSİDASYONUNA KARŞI
DOĞAL ANTİOKSİDANLARIN KORUYUCU ETKİSİ**

**İsmail HAMAD
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı**

**Danışman
Prof. Dr. Nazlı ARDA**

Mayıs, 2007

İSTANBUL



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**OKSİDATİF STRES UYGULANMIŞ
Schizosaccharomyces pombe'DE
PROTEİN OKSİDASYONUNA KARŞI
DOĞAL ANTİOKSİDANLARIN KORUYUCU ETKİSİ**

**İsmail HAMAD
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı**

**Danışman
Prof. Dr. Nazlı ARDA**

Mayıs, 2007

İSTANBUL

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin T-326/03112003 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Doktora öğrenimim sırasında ve tez çalışmalarım boyunca gösterdiği her türlü destek ve yardımdan dolayı çok değerli hocam Prof. Dr. Nazlı ARDA'ya en içten dileklerle teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımı yapmış olduğum Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'ndeki tüm hocalarıma, başta Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Güler TEMİZKAN olmak üzere çok teşekkür ederim.

Deneyisel çalışmalarım sırasında deneyimleriyle bana katkıda bulunan, başta Yrd. Doç. Dr. Semain KARAER olmak üzere çalışma arkadaşlarım Murat PEKMEZ, Evren ÖNAY UÇAR ve Özlem EROL DAYI'ya çok teşekkür ederim.

Mayıs, 2007

İsmail HAMAD

İÇİNDEKİLER	
ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ	vi
KISALTMA LİSTESİ	vii
ÖZET	viii
SUMMARY	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR	5
2.1. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ	5
2.2. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİNİN OLUŞUMU VE YAPISI.....	6
2.2.1. Oksidatif Fosforilasyon.....	6
2.2.2. Reaktif Oksijen Türlerinin Biyokimyası ve Özellikleri.....	7
2.2.2.1. Süperoksit Anyonu ($O_2^{\cdot-}$).....	7
2.2.2.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	8
2.2.2.3. Hipoklorik Asit ($HOCl$).....	9
2.2.2.4. Hidroksil Radikali (OH).....	10
2.3. ANTİOKSİDANLAR.....	11
2.3.1. Antioksidan Enzimler.....	12
2.3.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD).....	12
2.3.1.2. Süperoksit Redüktaz (SOR).....	12
2.3.1.3. Katalaz (CAT).....	13
2.3.1.4. Peroksiredoksin (Prx).....	13
2.3.1.5. Glutasyon Peroksidaz ($GSH-Px$).....	14
2.3.2. Zincir Kıran Antioksidanlar.....	14
2.3.2.1. Glutasyon	14
2.3.2.2. C Vitamini	15
2.3.2.3. E Vitamini.....	15
2.3.2.4. Karotenoidler.....	16
2.3.2.5. Ubikinol.....	17

2.3.3. Metal Bağlayan Proteinler.....	17
2.4. OKSİDATİF HASARA UĞRAYAN HÜCRESEL YAPITAŞLARI.....	18
2.4.1. Zar Lipitleri.....	18
2.4.2. DNA.....	19
2.4.3. Proteinler.....	20
2.4.3.1. Amino Asit Yan Zincirlerinin Oksidasyonu.....	21
2.4.3.2. Protein-Protein Çapraz Bağlarının Oluşması.....	25
2.4.3.3. Protein Omurgasının Oksidasyonu ve Protein Fragmentasyonu..	25
2.5. PROTEİN MODİFİKASYONLARININ BİYOLOJİK SONUÇLARI.....	28
2.6. OKSİTLENMİŞ PROTEİNLERİN ORTADAN KALDIRILMASI:	
PROTEAZOMLAR	30
3. MALZEME VE YÖNTEM	31
3.1. ORGANİZMA	31
3.2. BESİ ORTAMLARI.....	31
3.3. ORGANİZMANIN ÜRETİMİ VE SAKLANMASI.....	31
3.4. <i>S. pombe</i> HÜCRELERİNDE ZAMANA BAĞLI ÜREMENİN İZLENMESİ.....	32
3.5. ÖRNEKLERİN HAZIRLANMASI.....	32
3.6. DENEY KOŞULLARINDA HÜCRE CANLILIĞININ BELİRLENMESİ	35
3.7. BESİ ORTAMINDAKİ H ₂ O ₂ DERİŞİMİNİN BELİRLENMESİ.....	35
3.8. HÜCRE İÇİ OKSİDASYON DÜZEYİNİN BELİRLENMESİ.....	35
3.9. HAM PROTEİN ÖZÜTÜNÜN HAZIRLANMASI.....	36
3.10. HAM ÖZÜTTEKİ PROTEİN DERİŞİMİNİN BELİRLENMESİ.....	36
3.11. KATALAZ AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ.....	37
3.12. PROTEİN KARBONİLLERİNİN ÖLÇÜMÜ.....	37
3.12.1. Spektrofotometrik belirleme.....	37
3.12.2. İmmünolojik belirleme	38
3.13. PROTEAZOM AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ.....	39
3.14. HÜCRE İÇİ PROTEİN YIKIMININ BELİRLENMESİ.....	40
3.15. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER.....	40
4. BULGULAR	41
4.1. <i>S. pombe</i> HÜCRELERİNDE ZAMANA BAĞLI ÜREME.....	41
4.2. DENEY KOŞULLARINDA HÜCRE CANLILIĞININ BELİRLENMESİ	42
4.3. BESİ ORTAMINDAKİ H ₂ O ₂ DERİŞİMİ.....	43
4.4. HÜCRE İÇİ OKSİDASYON DÜZEYİ.....	45

4.5. KATALAZ AKTİVİTESİ	46
4.6. PROTEİN KARBONİLLERİ	48
4.6.1. Spektrofotometrik Yöntemle Belirlenmiş Protein Karbonilleri.....	48
4.6.2. İmmunolojik Yöntemle Belirlenmiş Protein Karbonilleri.....	49
4.7. PROTEAZOM AKTİVİTESİ.....	51
4.8. HÜCRE İÇİ PROTEİN YIKIMI.....	52
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	54
KAYNAKLAR	60
ÖZGEÇMİŞ	72

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	: Mitokondrideki temel ROT kaynakları ve akışları.....	7
Şekil 2.2	: Glutasyonun kimyasal yapısı.....	15
Şekil 2.3	: C vitamininin kimyasal yapısı.....	15
Şekil 2.4	: α -Tokoferolün kimyasal yapısı.....	16
Şekil 2.5	: Bazı karotenoidlerin kimyasal yapıları.....	16
Şekil 2.6	: Ubikinonun ubikinole indirgenmesi.....	17
Şekil 2.7	: Metal bağlayan proteinlerin üç boyutlu yapıları.....	17
Şekil 2.8	: Lipit peroksidasyonunun mekanizması.....	18
Şekil 2.9	: DNA’da meydana gelen oksidatif hasarlar.....	19
Şekil 2.10	: Sistein (A) ve metionin (B) yan zincirlerinde meydana gelen oksidasyon ve redüksiyonlar.....	22
Şekil 2.11	: Protein glikasyonu ve Amadori düzenlenmesi.....	23
Şekil 2.12	: Arginil yan zincirinin karbonillenerek glutamik semialdehite dönüşümü ve bu türevin saptanmasında kullanılan reaksiyonun temeli.....	24
Şekil 2.13	: Polipeptid omurgasının oksidasyonu	26
Şekil 2.14	: Peptid bağının diamid veya α -amidasyon yolları ile kesilmesi	27
Şekil 2.15	: Proteazomlar ve işlevleri.....	30
Şekil 3.1	: Deney gruplarının şematik gösterimi.....	34
Şekil 4.1	: <i>S. pombe</i> (972h ⁻) yabani ırkının üreme eğrisi.....	42
Şekil 4.2	: <i>S. pombe</i> kültürlerinde canlı hücre sayılarının karşılaştırılması.....	43
Şekil 4.3	: Üreme ortamındaki H ₂ O ₂ derişimlerinin karşılaştırılması.....	44
Şekil 4.4	: <i>S. pombe</i> hücrelerinde hücre içi oksidasyon (ROT) düzeylerinin karşılaştırılması.....	46
Şekil 4.5	: <i>S. pombe</i> hücrelerinde katalaz aktivitelerinin karşılaştırılması.....	47
Şekil 4.6	: <i>S. pombe</i> hücrelerinde protein karbonil miktarlarının karşılaştırılması ..	49
Şekil 4.7	: <i>S. pombe</i> hücrelerinde total suda çözünür protein profillerini gösteren jel (A) ve oksitlenmiş (karbonillenmiş) proteinlerin saptandığı film (B) görüntüleri	50
Şekil 4.8	: <i>S. pombe</i> hücrelerinde proteazom aktivitelerinin karşılaştırılması.....	52
Şekil 4.9	: <i>S. pombe</i> kültürlerinde hücre içi protein yıkım değerlerinin karşılaştırılması.....	53

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1	: Reaktif oksijen türleri	6
Tablo 2.2	: Amino asit yan zincirlerinin oksidasyonu ile oluşan ürünler.....	21
Tablo 2.3	: İnsanda çeşitli dokularda saptanmış oksidatif protein modifikasyonları ve ilişkili oldukları bazı hastalıklar	29
Tablo 3.1	: Çalışmada kullanılan deney grupları ve içerikleri	33
Tablo 3.2	: Protein derişiminin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler	36
Tablo 4.1	: <i>S.pombe</i> (972h) yabancı ırkında zamana bağlı üremenin izlenmesi.....	41
Tablo 4.2	: <i>S. pombe</i> kültürlerinde canlı hücre sayıları	43
Tablo 4.3	: Başlangıçta ve uygulama süresi (30 dakika) sonunda besi ortamındaki H ₂ O ₂ derişimi	44
Tablo 4.4	: <i>S. pombe</i> hücrelerinde ROT düzeyi.....	45
Tablo 4.5	: <i>S. pombe</i> hücrelerinde katalaz aktivitesi	47
Tablo 4.6	: <i>S. pombe</i> hücrelerinde protein karbonil miktarı.....	48
Tablo 4.7	: <i>S. pombe</i> hücrelerinde 20S proteazom aktivitesi	51
Tablo 4.8	: <i>S. pombe</i> 'de hücre içi protein yıkımı	53

KISALTMA LİSTESİ

ALS	: amiyotropik lateral skleroz
AMC	: amino-4-metilkumarin
ATP	: adenzin trifosfat
BSA	: sığır serum albumin
CAT	: katalaz
Cu/Zn-SOD	: bakır/çinko süperoksit dismutaz
DCFH	: diklorofluoresein
DCFH-DA	: diklorofluoresein diasetat
DNP	: dinitrofenil hidrazin
ELISA	: “enzyme-linked immunosorbent assay”
Fe-SOD	: demir süperoksit dismutaz
GC-MS	: gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi
GSH-Px	: glutasyon peroksidaz
HNE	: 4-hidroksi-2-nonenal
HOCl	: hipoklorik asit
HPLC	: yüksek performanslı sıvı kromatografisi
IgG	: immünoglobulin G
LDL	: düşük yoğunluklu lipoprotein
MCO	: metal katalizli oksidasyon
MDA	: malondialdehit
MeSOX	: metionin sülfoksit
Mn-SOD	: mangan süperoksit dismutaz
NADH	: nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NO	: nitrik oksit
O₂⁻	: süperoksit anyonu
OH[•]	: hidroksil radikali
Prx	: peroksiredoksin
PUFA	: çoklu doymamış yağ asitleri
RAT	: reaktif azot türleri
ROT	: reaktif oksijen türleri
SOD	: süperoksit dismutaz
SOR	: süperoksit redüktaz
Suc-LLVY-AMC	: süksinoil-Leu-Leu-Val-Tyr-amino-4-metilkumarin
TCA	: trikloroasetik asit
YEA	: “yeast extract agar”
YEL	: “yeast extract liquid”

ÖZET

OKSİDATİF STRES UYGULANMIŞ *Schizosaccharomyces pombe*'DE PROTEİN OKSİDASYONUNA KARŞI DOĞAL ANTİOKSİDANLARIN KORUYUCU ETKİSİ

Bu çalışmada E vitamini türevi Trolox'un *Schizosaccharomyces pombe* maya türünde normal hücre metabolizması sırasında ve hücrelerin 30 dakika 1 mM hidrojen peroksitle işleme sokulması sonucunda indüklenen oksidatif hasarlara karşı koruyucu etkisi araştırıldı.

Hücre içi oksidasyon düzeyi, fluoresans indikatörü 2,7-diklorofluoresein ile spektrofotometrik olarak belirlendi. Protein karbonilleri 2,4-dinitrofenilhidrazin ile türevlendirildi ve spektrofotometrik olarak ölçüldü; ayrıca tek boyutlu elektroforezi takiben gerçekleştirilen Western emdirimi ile immünolojik olarak saptandı. Katalaz aktivitesi H₂O₂ yıkımının ölçülmesiyle ortaya konuldu. 20S proteazom aktivitesi fluorogenik peptid Suc-LLVY-AMC kullanılarak belirlendi. Hücre içi protein yıkımı spektrofotometrik yöntemle izlendi.

Maya hücrelerinin 1 mM Trolox ile ön işleme sokulması bağıl hücre canlılığını artırdı, hücre içi oksidasyon düzeyini düşürdü, katalaz aktivitesini indükledi ve protein karbonillerini baskıladı. Proteazom aktivitesi Trolox ile işlem görmüş hücrelerde, işlem görmemiş kontrole göre daha düşüktü. Bu durum protein karbonil düzeyindeki düşüşün proteazom aktivitesine bağlı olmadığını ortaya koydu.

Trolox aracılı korumanın H₂O₂ taşınmasındaki değişim, *in vitro* süpürücü aktivite veya antioksidan savunma sistemlerinin indüksiyonundan çok artan hücre içi süpürücü etkiden kaynaklandığı bulundu.

Bu çalışma Trolox uygulamasının maya hücrelerini hidrojen peroksitle indüklenen oksidatif hasarlardan, özellikle de protein oksidasyonundan koruduğunu ortaya koymaktadır.

SUMMARY

PROTECTIVE EFFECT OF NATURAL ANTIOXIDANTS AGAINST PROTEIN OXIDATION IN OXIDATIVELY STRESSED *Schizosaccharomyces pombe*

The protective effect of vitamin E derivative, Trolox against oxidative damages induced during the normal cell metabolism as well as by treating the cells with 1mM hydrogen peroxide for 30 minutes in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* was examined in this study.

Intracellular oxidation level was spectrofluorometrically determined by the fluorescence indicator 2,7-dichlorofluorescein. Protein carbonyls were derived with 2,4-dinitrophenylhydrazine and measured by spectrophotometric method as well as they were detected by one-dimensional electrophoresis followed by Western blot immunoassay. Catalase activity was evaluated by measuring the H₂O₂ decomposition. The 20S proteasome activity was determined using the fluorogenic peptide suc-LLVY-AMC. Intracellular protein degradation was monitored by the spectrofluorometric technique.

Pretreatment of the yeast cells with 1mM Trolox enhanced the relative cell viability, decreased intracellular oxidation level, induced catalase activity and suppressed the protein carbonyls. Proteasome activity was lower in Trolox-pretreated groups than untreated control. This indicated that decrease in protein carbonyl level was not due to activation of the proteasome.

Trolox-mediated protection was found to be due to increased intracellular scavenging effect rather than alteration in H₂O₂ transport, *in vitro* scavenging activity or induction of antioxidant defense system.

This study suggests that Trolox treatment protects yeast cells from oxidative damages, especially from protein oxidation induced by hydrogen peroxide.

1. GİRİŞ

Biyolojik sistemlerde meydana gelen oksidatif stres, hücrelerde birçok molekölü hasara uğratar. Bunlar arasında proteinlerin göreceği zarar normal hücresele işlevleri büyük ölçüde engellediğinden oldukça önemlidir. Proteinlerde meydana gelen oksidatif hasar, enzimlerin, reseptörlerin, taşıyıcı proteinlerin ve sinyal iletim yollarında iş gören proteinlerin işlevlerini doğrudan etkileyebileceği gibi, diğer moleköllerde de zarar verebilir. Örneğın, DNA onarım enzimlerinin zarar görmesi DNA'da oksidatif hasara ve mutasyon oranının artmasına neden olabilir; ya da örneğın, insanda oksitlenmiş proteinler bağışıklık sistemi tarafından yabancı olarak algılanabilir ve otoimmün hastalıklara yol açabilir. Proteinlerdeki hasar ya doğrudan reaktif oksijen veya azot türlerinin saldırısı sonucunda, ya da dolaylı olarak lipit peroksidasyonu ile oluşan malondialdehit (MDA), 4-hidroksi-2-nonenal (HNE) ve indirgeyici şekerler ile bunların oksidasyonu sonucu oluşan ketaminler, ketoaldehitler ve deoksiozonlar aracılığıyla meydana gelir. Bu zararlı partiküller nükleik asitlerin, proteinlerin, lipitlerin ve karbohidratların oksitlenmesine, hücre zarının zarar görmesine ve hücre içinde bazı önemli işlevlerin bozulmasına yol açar (Bekman ve Ames, 1998; Shacter, 2000; Halliwell ve Gutteridge, 2003).

Zarlarda yer alan lipidler reaktif oksijen türlerine karşı çok duyarlıdır. Lipit peroksidasyonunun zar üzerindeki hasarı doğrudan zarın işlevini değiştirmek, dolaylı olarak da protein ve DNA gibi diğer moleköllerde zarar veren reaktif yan ürünlerin açığa çıkmasına yol açmaktır (Sastre ve ark., 2003).

Hücrelerde oksidatif stresi önlemek ve verdiği zararları ortadan kaldırmak için çalışan moleköl mekanizmalar da vardır. Bunlar arasında süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimler, albumin, transferrin, ferritin gibi proteinler, E ve C vitamini, β -karoten, ürik asit, bilirubin gibi metabolitler, DNA onarım enzimleri ve metiyonin sülfoksit redüktaz gibi enzimler sayılabilir. Hücre içi bu önlemlere ek olarak dışarıdan alınan çeşitli katkıların (doğal ve sentetik antioksidanların) bu sistemlere yardımcı olduğu iyi bilinmektedir. Örneğın, elektron transfer zincirinin doğal bir elemanı olan

koenzim Q₁₀'nun insanlar tarafından belli bir oranda dışarıdan alındığında antioksidan aktivite gösterdiği ve özellikle dolaşım bozukluklarına bağlı kalp hastalıklarından koruduğu ileri sürülmektedir (Pepe ve ark., 2007).

Reaktif oksijen türlerinin proteinler üzerindeki etkileri 3 başlıkta toplanabilir (Berlett ve Stadtman, 1997):

- i) amino asit yan zincirlerinin oksidasyonu,
- ii) protein-protein çapraz bağlanmaları
- iii) proteinlerin parçalara ayrılması (fragmentasyon).

Bazı protein modifikasyonları canlı hücreler tarafından *in vivo* onarılabilir. Örneğin, glutatyon ve tiyoredoksin, proteinlerdeki okside olmuş sisteini, metiyonin sülfoksit redüktaz enzimi ise metiyonin sülfoksidi indirger. Ancak metiyoninin sülfonil ve karbonil türevleri proteinleri geri dönüşümsüz şekilde inaktif hale getirir. Dolayısıyla bu tip yapısal bozulmalar onarılamaz ve söz konusu proteinler yıkılmak üzere proteazom kompleksleri şeklinde biraraya getirilir ve proteolitik yollara yönlendirilir. Proteolitik yıkım, hayvan hücrelerinde lizozomlarda, bitki ve maya hücrelerinde ise vakuollerde gerçekleşir. Bazı okside olmuş proteinler ise ortadan kaldırılamaz ve bu yüzden bunların hücrelerde (örneğin yaşlanma sırasında ya da bazı hastalıklarda) biriktiği gözlenir.

Protein oksidasyonu çeşitli yöntemlerle saptanabilir. Örneğin, protein karbonil gruplarının belirlenmesinde spektrofotometrik-DNPH yöntemi (Levine ve ark., 1994), ELISA (Buss ve ark., 1997) ya da Western emdirimi ("blotting") (Robinson ve ark., 1999) kullanılır. Protein peroksitleri FOX yöntemiyle (Gay ve ark., 1999), ditirozin bakiyeleri HPLC ile (Giulivi ve Davies, 1994), arginin/prolin oksidasyonu HPLC veya GC-MS ile (Ayala ve Cutler, 1996), fenilalanin oksidasyonu GC-MS (Blount ve Duncan, 1997) ile belirlenmiştir.

Bu çalışmanın yürütüleceği maya türü olan *Schizosaccharomyces pombe* moleküler düzeyde yüksek organizasyonlu canlılara büyük benzerlik gösterir. Üretim koşulları ve diğer birçok metabolik özellikleri de oldukça iyi bilinen bu organizma özellikle memeliler

için model organizma olarak kabul edilmektedir (Yanagida, 2002).

S. pombe'de oksidatif stres ile ilgili çalışmaların sayısı sınırlıdır. Artan derişimlerde H₂O₂ uygulaması ile oksidatif strese uğrıtılan *S. pombe*'de katalaz aktivitesinin arttığı belirlenmiştir (Park ve ark., 2003). Bu tip hücrelerde, katalaz aktivitesine koşut olarak lipid peroksidasyon düzeyinin arttığı, indirgenmiş glutasyon düzeyinin ise belirgin şekilde azaldığı, Pekmez (2004) tarafından ortaya konulmuştur. *S. pombe*'de protein oksidasyonu ve antioksidanların koruyucu etkisi ilk kez bu çalışmada incelenmiştir. Oysa *S. pombe*'nin akrabası olan *S. cerevisiae*'de konuya ilişkin metabolik ve genetik çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin, yapılan bir çalışmada bazı anahtar metabolik enzimlerin H₂O₂ tarafından karbonilasyona teşvik edildiği bulunmuş ve oksidatif stres cevabının oluşturulmasında düzenleyici görevleri olan Yap1 ve Skn7 transkripsiyon faktörlerinin rolleri araştırılmıştır (Costa ve ark., 2002). Para-nonilfenol ile oksidatif stres uygulanmış *S. cerevisiae*'de bir E vitamini türevi olan Trolox ve β-karotenin koruyucu etkisi, sadece hücrelerin canlılık oranları düzeyinde gösterilmiştir (Okai ve ark., 2000).

Bu çalışmanın ana hedefi, gelişmiş ökaryotlarda oksidatif stres metabolizmasına ilişkin temel olaylardan biri olan protein oksidasyonu ve sonuçlarının aydınlatılmasına katkıda bulunmaktadır. Normal metabolizma veya oksidatif stres sırasında *S. pombe* hücrelerinin doğal antioksidan savunma mekanizmaları ve dışarıdan uygulanacak bir antioksidanın (E vitamininin suda çözünen türevi Trolox'un) protein oksidasyonuna karşı koruyucu etkileri değerlendirilecektir.

Trolox (6-hidroksi-2, 5, 7, 8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit), lipid peroksidasyonu reaksiyonlarını (hidroperoksitlerin oluşumunu ve bunların parçalanmasını) α-tokoferol (E vitamini)'e göre daha etkin bir şekilde inhibe etmektedir (Huang ve ark., 1996). İzole kalp (sıçan) sisteminde iskemi/reperfüzyon hasarına karşı *in vitro* ve *ex vivo* koruyucu etkisinin de E vitamininden yüksek olduğu bulunmuştur (Sagach ve ark., 2002).

Ayrıca bu maddenin lenfotik lösemi hücrelerinde (MOLT-4 hücreleri) iyonize radyasyonun yol açtığı apoptozu engellediği bildirilmektedir (McClein ve ark., 1995).

Çalışmanın ilk aşamasında, oksidatif strese sokulmayan (I. Grup) ve H₂O₂ ile oksidatif strese sokulan (II. Grup) *S. pombe* kültürlerinde canlı hücre sayıları belirlendi. Besi ortamına eklenen H₂O₂'nin hücreler tarafından ne derece alındığı, eklemenin yapıldığı ilk anda ve deney sonunda besi ortamında kalan H₂O₂ derişimlerinin ölçülmesiyle ortaya konuldu. Ayrıca hücre içi oksidasyon düzeyleri karşılaştırıldı. Antioksidan savunma enzimlerinden katalaz aktivitesindeki değişim izlendi. Protein oksidasyonu sonucu oluşan protein karbonilleri, proteazom aktivitesi ve hücre içi protein yıkımı ölçüldü. Kültür ortamına farklı zamanlarda eklenen ve farklı sürelerde tutulan Trolox'un koruyucu etkisi ve antioksidan savunmaya katkısı bu parametreler ışığında değerlendirildi.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ

Bir veya birden fazla eşleşmemiş elektron çiftine sahip ve bağımsız olarak varlığını sürdürebilen atom ve moleküller **serbest radikal** olarak tanımlanmaktadır. Oksidatif stres sonucu oluşan çeşitli serbest radikaller ve singlet oksijen ile hidrojen peroksit gibi radikal olmayan ara ürünlere genel olarak **reaktif oksijen türleri (ROT)** denir (Halliwell ve Gutteridge, 2003) (Tablo 2.1). Süperoksit anyonu, hidroksil radikali ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türleri, aerobik metabolizmanın normal birer yan ürünü olarak veya radyasyon, ksenobiyotikler ve ağır metaller gibi dış faktörlerin etkisiyle üretilirler (Cadenas,1989). Hücre içinde ROT'lara ek olarak reaktif azot türleri (RAT) de benzer şekilde meydana gelir. ROT ve RAT derişiminin, DNA, proteinler ve lipitleri içeren biyomoleküller için toksik düzeye gelmesi sonucunda oksidatif stres ortaya çıkmaktadır. Oksidatif stres, hücre yapıtaşlarındaki oksidatif hasar artışına öncülük eden, normal "ROT/RAT homeostazisinin bozulması" olarak da tanımlanmaktadır (Costa ve Moradas-Ferreira, 2001). Sağlıklı bir hücrede, gereksinim fazlası ROT ve RAT, koruyucu antioksidan mekanizmalar (örneğin; katalaz, süperoksit dismutaz ve peroksidaz gibi antioksidan enzimler ve glutatyon, tiyoredoksin gibi moleküler süpürücüler tarafından ayrıştırılır (Halliwell ve Gutteridge, 2003). Oksidatif stres sonucunda meydana gelen moleküler hasarın, yaşlanma, Parkinson ve Alzheimer gibi yaşlanma ile ilişkili hastalıklarda ve mutagenezde önemli bir faktör olduğu saptanmıştır. Kanser, kardiyovasküler hastalıklar, Friedrich ataksia, romatoid artrit, otoimmün hastalıklar ve AIDS gibi çeşitli insan hastalıkları, oksidatif stres ile ilişkilidir(Halliwell, 1997).

Tablo 2.1 : Reaktif oksijen türleri

Radikaller	Radikal olmayanlar
Süperoksit anyonu, $O_2^{\cdot-}$	Hidrojen peroksit, H_2O_2
Hidroksil radikali, OH^{\cdot}	Hipoklorik asit, $HOCl^*$
Peroksil radikali, RO_2^{\cdot}	Ozon, O_3
Alkoksil radikali, RO^{\cdot}	Singlet oksijen,
Hidroperoksil radikali HO_2^{\cdot}	Peroksinitrit, $ONOO^{**}$

* reaktif klor türü olarak da adlandırılır.

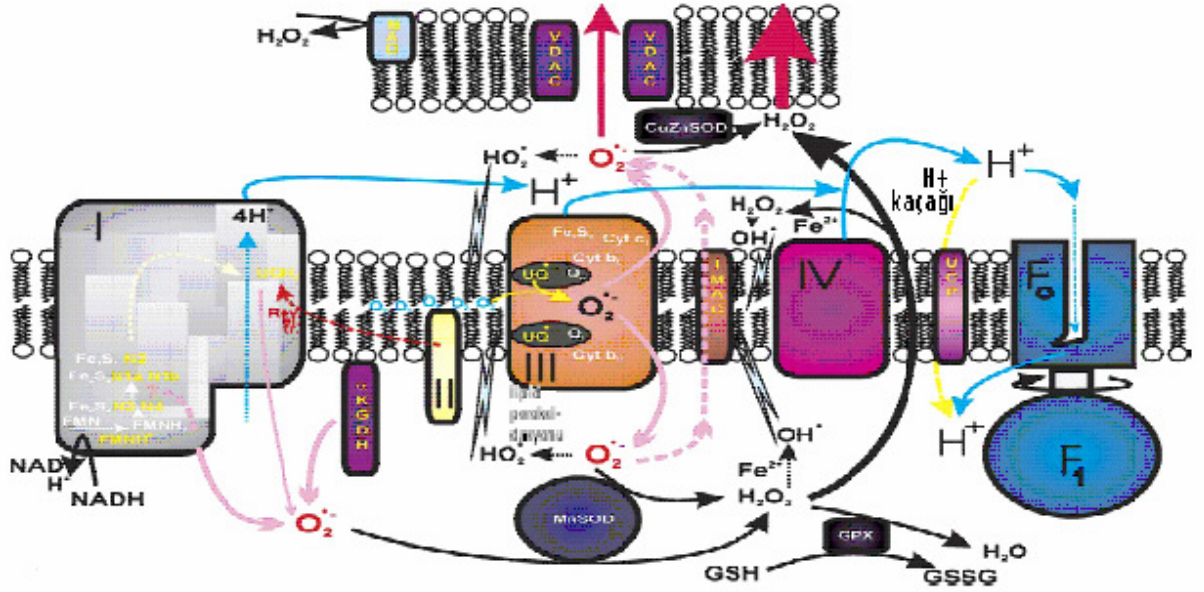
** reaktif azot türü olarak da adlandırılır.

2.2. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİNİN OLUŞUMU VE YAPISI

2.2.1. Oksidatif Fosforilasyon

Aerobik organizmalar oksidatif fosforilasyon sayesinde, anaerobik organizmalara kıyasla daha fazla enerji üretebilme yeteneğindedirler. Aerobik metabolizmanın en önemli olumsuzluğu hücre içinde ROT oluşumu için sürekli bir ortam yaratmasıdır.

Peter Mitchell, solunum zincirindeki ATP sentezinin esas olarak mitokondri iç zarı boyunca oluşan proton gradienti ile ilişkili olduğunu ilk öneren kişi olmuş ve öne sürdüğü kemiozmotik teori ile daha sonra Nobel ödülü kazanmıştır (Mitchell, 1961). Bu teoriye göre, solunum zincirinde yer alan kompleks I, III ve IV, mitokondriyal matriks dışına H^+ iyonlarını pompalayan proton pompaları olarak görev yaparlar (Şekil 2.1). Proton pompalanması için gerekli enerji, özel elektron taşıyıcılarının yardımıyla, daha pozitif redoks potansiyeline sahip olandan daha negatif redoks potansiyeline sahip olana doğru elektron transferi ile sağlanır. En son elektron alıcısı olan O_2 belli bir süre sonunda sitokrom oksidazdan tek bir elektron alır. Protonların matrikse geri akışı, ATP sentaz (aynı zamanda F_0-F_1 kompleksi veya kompleks V olarak isimlendirilir) ile sağlanırken, ATP sentazın F_1 alt biriminde ATP sentezi gerçekleşir. Özellikle kompleks I (NADH dehidrogenaz) ve III (ubisemikinon) O_2 'nin belli bir kısmını süperoksit anyonuna ($O_2^{\cdot-}$) dönüştürür (Jezek ve Hlavat, 2005). Dolayısıyla mitokondride gerçekleşen bu olay, hücre içi ROT oluşturan önemli bir kaynaktır.



Şekil 2.1 : Mitokondrideki temel ROT kaynakları ve akışları

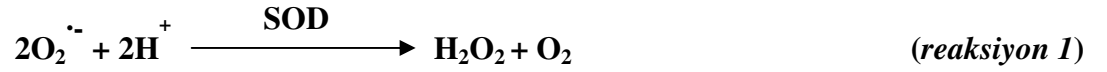
(pembe oklar mitokondri matrisine ve zarlar arası alana O₂^{•-} kaçışını, kırmızı oklar sitoplazmaya giden yolu, mavi ve sarı oklar ise protonların izlediği yolları göstermektedir)

2.2.2. Reaktif Oksijen Türlerinin Biyokimyası ve Özellikleri

2.2.2.1. Süperoksit Anyonu (O₂^{•-})

Oksidatif stres sonucu en çok oluşan ROT, süperoksit (O₂^{•-}) anyonudur. O₂^{•-} moleküler oksijenin tek elektron indirgenmesiyle meydana gelir. O₂^{•-} hem fizyolojik hem de patofizyolojik koşullarda çeşitli kaynaklardan oluşmaktadır. Mitokondri, hücre içi O₂^{•-} için temel kaynaktır. Solunum zincirindeki taşıyıcılardan sürekli elektron kaçıışı olmakta ve elektronlar doğrudan moleküler oksijene geçerek onu O₂^{•-}ye dönüştürmektedir. Normal

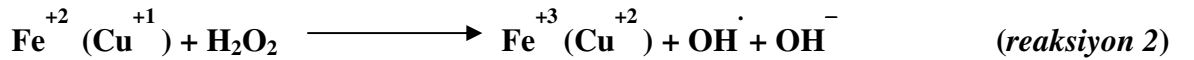
hücrelerde toplam oksijenin yaklaşık %1-5'i $O_2^{\cdot -}$ ye dönüştürülür (Turrens,1997). $O_2^{\cdot -}$ oluşumunda diğer içsel kaynaklar, peroksizomal enzim ksantin oksidaz (Kooij, 1994) ve makrofaj zarına bağlı NADPH oksidazdır (Babior, 2000). Sigara dumanı ve iyonize radyasyon ise $O_2^{\cdot -}$ oluşumuna yol açan en önemli dış etkenlerdir (Halliwell ve Gutteridge, 2003). Süperoksit anyonu tek başına reaktif bir ara ürün olarak kabul edilmez (Halliwell, 1996), çünkü zarlardan hızlı bir şekilde geçemez ve fizyolojik pH'da dismutasyona uğrar (*reaksiyon 1*):



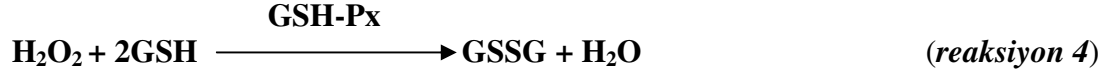
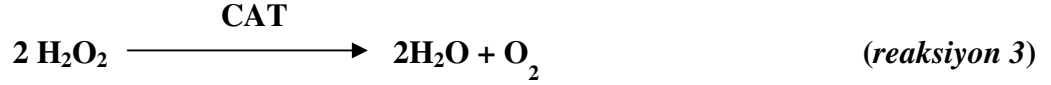
Süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından katalizlenen bu nötralizasyon reaksiyonu sonucunda hidrojen peroksit (H_2O_2) ve ardışık olarak da hidroksil radikali (OH^{\cdot}) gibi daha kuvvetli reaktif oksijen türleri açığa çıkmaktadır (bkz. *reaksiyon 2*) (Fridovich, 1995).

2.2.2.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

$O_2^{\cdot -}$ üreten herhangi bir sistem aynı zamanda H_2O_2 açığa çıkarır (Rosen ve ark., 1995). H_2O_2 genellikle, göreceli olarak zayıf bir ROT olarak görülür. H_2O_2 , Fe^{+2} veya Cu^{+1} gibi kısmen indirgenmiş metaller ile **Fenton reaksiyonu** adı verilen bir reaksiyona girme eğilimindedir (Wardman ve Candeias, 1996). Bu reaksiyon sonucunda oluşan hidroksil radikali (OH^{\cdot}) en reaktif ROT'tur ve hidrojen peroksidin toksisitesinden sorumlu radikaldir.



H_2O_2 'nin suya dönüşümü katalaz (CAT) tarafından (*reaksiyon 3*) veya glutatyon peroksidaz (GSH-Px) tarafından (*reaksiyon 4*) gerçekleştirilir.



2.2.2.3. Hipoklorik Asit (HOCl)

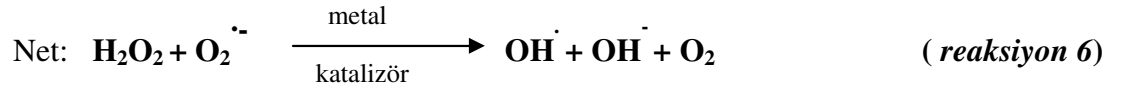
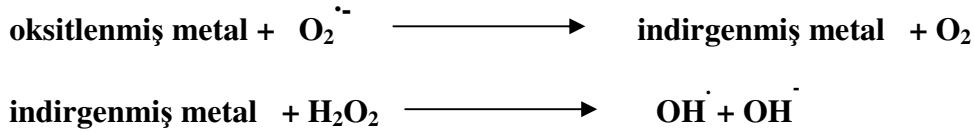
Bir hemoprotein olan miyeloperoksidaz, fagositlerde en çok bulunan proteinlerden biridir. Miyeloperoksidazın, nötrofil proteinlerinin %5'ini ve monosit proteinlerinin %1'ini temsil ettiği bilinmektedir (Tsuruta ve ark.,1999). Nötrofiller aktive olduğunda, miyeloperoksidaz hücre dışına salgılanır (King ve ark., 1997) ve H_2O_2 'yi potansiyel oksitleyici hipoklorik aside (HOCl) dönüştürür (*reaksiyon 5*).



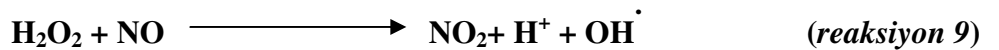
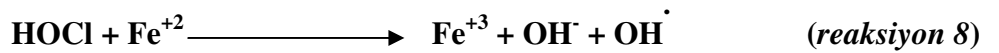
Hücre içinde çok sayıda biyokimyasal hedefi bulunan HOCl'nin $\text{O}_2^{\cdot -}$ veya H_2O_2 'den yaklaşık olarak 100-1000 kat daha toksik olduğu tahmin edilmektedir (Schraufstatter ve ark., 1990). Örneğin, plazma zarındaki tiyol gruplarını (SH) oksitleyebilir (Carr ve Winterbourn, 1997), belirli proteinlerin fonksiyonlarını etkileyebilir ve bazı hücre dışı matriks yapıtaşlarının bağlanma özelliklerini azaltabilir (Zavodnik ve ark., 2001). Bunlara ek olarak, HOCl'nin, hücre sel Zn^{+2} iyonlarının hareketi aracılığıyla endotelial iletkenliği artırdığı gözlenmiştir (Tatsumi ve Fliss, 1994). HOCl'yi nötralize eden bir enzim bilinmemektedir. Bu molekül albumin ve askorbik asit ile reaksiyona girerek hücreden uzaklaştırılmaktadır (Yan ve ark., 1996).

2.2.2.4. Hidroksil Radikali (OH^\cdot)

Bilinen en reaktif ROT hidroksil radikali (OH^\cdot)'dir (Halliwell ve Gutteridge, 2003). En önemli mitokondri enzimi olan piruvat dehidrogenazı inaktive eder (Tabatabaie ve ark., 1996). Ayrıca doğrudan DNA hasarı yaratır (Halliwell, 1999). OH^\cdot , temelde Fenton reaksiyonu (Halliwell ve Gutteridge, 2003) (bkz. *reaksiyon 2*) ile H_2O_2 'den veya metal (örneğin, demir) katalizli Haber-Weiss reaksiyonu (*reaksiyon 6*) ile $\text{O}_2^{\cdot-}$ 'den oluşmaktadır (Kehrer, 2000).



OH^\cdot 'nin inflamasyonla ilişkili yollarla da oluşabileceği gösterilmiştir. Bu yollar HOCl ve $\text{O}_2^{\cdot-}$ arasındaki etkileşimler (*reaksiyon 7*) (Candeias ve ark., 1993), HOCl ve indirgenmiş demir iyonları arasındaki etkileşimler (*reaksiyon 8*) (Candeias ve ark., 1994), H_2O_2 ve nitrik oksit (NO) arasındaki etkileşimler (*reaksiyon 9*) (Nappi ve Vass, 1998) olarak öne sürülmektedir. Cu-Zn SOD'un H_2O_2 tarafından inhibisyonu sırasında da OH^\cdot artışı olmaktadır (Yim ve ark., 1990).



Bugünkü bilgiler ışığında OH[·]'nin detoksifikasyonundan sorumlu bir enzim bulunmamaktadır. OH[·] tarafından indüklenen doku hasarı, geçiş grubu metal iyonlarının, albumin, seruloplazmin, ferritin, transferrin ve metallothionein gibi proteinler tarafından bağlanması ile önlenmektedir (Halliwell ve Gutteridge, 2003).

2.3. ANTIOKSİDANLAR

Oksitlenebilir substrata oranla daha düşük derişimde bulunan ve substratın oksidasyonunu önemli ölçüde geciktiren veya önleyen bileşikler “**antioksidan**” olarak tanımlanmaktadır. Oksitlenebilir substrat lipit, DNA, protein veya *in vivo* herhangi bir molekül olabilir. Antioksidanlar üç temel grupta ele alınabilir (Halliwell ve Gutteridge, 2003):

- i) **Antioksidan enzimler:** Serbest radikal türlerinin yıkımını katalizleyen süperoksit dismutaz (SOD), süperoksit redüktaz (SOR), katalaz (CAT), peroksiredoksin (Prx) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi enzimlerdir.
- ii) **Zincir kıran antioksidanlar:** Bir elektron alınması veya verilmesi ile zincirleme radikal reaksiyonlarını bozan glutatyon, C ve E vitaminleri, karotenoidler ve ubikinol gibi moleküllerdir.
- iii) **Metal bağlayan proteinler:** Metal iyonlarının serbest radikal oluşturmalarını engelleyen, metal bağlayan, transferrin, laktoferrin ve seruloplazmin gibi proteinlerdir.

Ayrıca oksidatif hasar gören moleküllerin onarımında görev alan enzimleri (örneğin, DNA onarım enzimlerini, proteinlerdeki metionin disülfid bağlarını indirgeyen metionin disülfid redüktazı) antioksidan molekül olarak kabul eden kaynaklar da vardır (Levine ve ark., 1996). Tek başına etki gösteren *in vivo* bir antioksidan yoktur. Antioksidanlar, etki edilecek serbest radikalın tipine ve buldukları hücresel ortama göre değişik etkileşimlerle birlikte iş görürler.

2.3.1. Antioksidan Enzimler

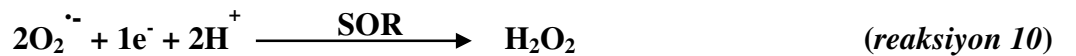
2.3.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz (SOD), ROT metabolize ettiği keşfedilmiş ilk enzimdir (McCord ve Fridovich, 1969). Ökaryotik hücrelerdeki $O_2^{\cdot -}$ radikali, metal içeren iki SOD izoenzimi (mitokondride bulunan, 80 kDa'luk tetramerik Mn-SOD ve sitozolik 32 kDa'luk dimerik Cu/Zn-SOD) ile metabolize edilir (Halliwell ve Gutteridge, 2003). Bakterilerde ise genelde Mn-SOD ve Fe-SOD bulunur (Yost ve Fridovich, 1973); aynı zamanda Cu/Zn-SOD içerenleri de vardır (Fridovich, 1997). SOD tarafından katalizlenen reaksiyon ile iki süperoksit molekülünden, hidrojen peroksit ve moleküler oksijen açığa çıkar. Dolayısıyla bu reaksiyon hücrel bir hidrojen peroksit kaynağı olarak sürekli işler (bkz. *reaksiyon 1*).

Sitozolik Cu/Zn-SOD, Mn-SOD'a göre daha az önem taşır ve bu enzim bakımından eksik transgenik hayvanlar normal genotipe sahip olacak şekilde adaptasyon gösterebilirler (Ohlemiller ve ark., 1999). İnsanda sitozolik SOD'un mutasyonu sonucunda peroksidaz aktivitesinde artış meydana gelir ve öldürücü bir nörodejeneratif hastalık olan amiyotropik lateral skleroz (ALS) gelişir. Hücre dışında, sitozolik formuna göre daha büyük ve farklı bir Cu/Zn-SOD bulunmaktadır (Rosen ve ark., 1993).

2.3.1.2. Süperoksit Redüktaz (SOR)

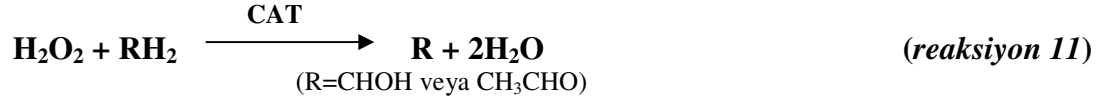
Süperoksitin doğrudan indirgenmesini katalizleyen süperoksit redüktaz (SOR) enzimlerinin keşfi oldukça yenidir. Demir içeren bu enzimler, süperoksit radikalının tek elektron alarak H_2O_2 'ye indirgenmesini katalizler (*reaksiyon 10*) ve şimdiye kadar sadece anaerobik sülfat indirgeyen bakterilerde (desülforedoksin), anaerobik arke *Pyrococcus furiosus*'da veya sifilis (bel soğukluğu) etmeni olan mikroaerofilik bakteri *Treponema pallidum*'da bulunmuştur. *T. pallidum*, SOD taşımaz ve süperoksit eliminasyonunu tamamen SOR ile gerçekleştirir. Şimdiye kadar hiçbir memelide SOR'a rastlanmamıştır (Adams ve ark., 2002).



2.3.1.3. Katalaz (CAT)

Temelde hidrojen peroksitin su ve moleküler oksijene dismutasyonunu (bkz. *reaksiyon 3*) katalizleyen katalaz enzimi hem grubu içeren tetramerik bir enzimdir (Aebi, 1974). Memeli hücrelerinde en çok peroksizomlarda bulunur.

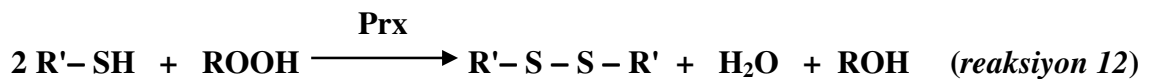
Katalazın aynı zamanda, fenoller ve alkoller gibi farklı substratları detoksifiye etme işlevi de vardır. Bu reaksiyon, hidrojen peroksidin indirgenmesi eşliğinde gerçekleşir (*reaksiyon 11*):



H₂O₂'yi bu şekilde tüketen katalaz, Cu⁺¹ ve Fe⁺² iyonları tarafından katalizlenen Fenton reaksiyonu ile H₂O₂'den hidroksil radikali oluşma riskini azaltarak da dolaylı bir antioksidan etkiye sahiptir (Halliwell,1999). Katalaz, enzimi inaktivasyondan koruyan ve etkinliğini artıran NADPH'a bağlanarak iş görür (Kirkman ve Gaetani, 1984). Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz eksikliğinde, olgun kırmızı kan hücrelerinde NADPH düzeyi düşük olacağından, glutatyon redüktaz/GSH-Px enzim aktiviteleri oranındaki azalma nedeniyle ortaya çıktığı düşünülen hemolizin katalaz aktivitesindeki düşüşten kaynaklandığı anlaşılmıştır (Kirkman ve ark., 1999).

2.3.1.4. Peroksiredoksin (Prx)

Peroksiredoksinler (Prx; tiyoredoksin peroksidazlar), hidrojen peroksit ve farklı alkil hidroperoksitler gibi peroksitlerin doğrudan indirgenmesini (*reaksiyon 12*) sağlayan enzimlerdir (Chae ve ark., 1999). Bugüne kadar, en az 13 memeli peroksiredoksini tanımlanmıştır (Butterfield ve ark., 1999).



2.3.1.5. Glutasyon Peroksidaz (*GSH-Px*)

Glutasyon peroksidaz (*GSH-Px*), glutasyonu substrat olarak kullanarak, H_2O_2 'nin indirgenmesini katalizler (**reaksiyon 13**). Bu enzimler aynı zamanda, diğer peroksitlerin (örneğin, hücre zarındaki lipit peroksitlerin ve alkil hidroperoksitlerin) de alkollere indirgenmesini sağlayabilirler (Forstrom ve ark.,1979) (**reaksiyon 14**). Memelilerde, her biri selenosistein içeren, en az dört farklı tipte *GSH-Px* (*GSH-Px* 1-4) bulunmaktadır. *GSH-Px1* ve *GSH-Px4* (veya fosfolipit hidroperoksit), birçok dokuda sıkça rastlanan sitozolik enzimlerdir (Ursini ve ark., 1995).

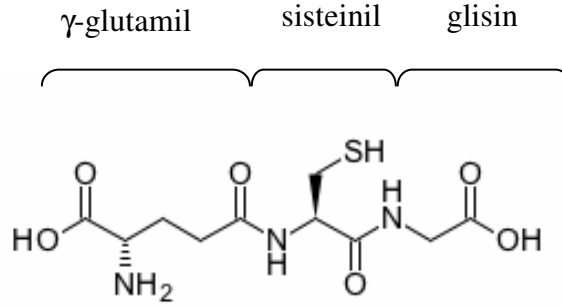
GSH-Px izoenzimlerinin antioksidan savunmadaki işlevleri tam olarak bilinmemekle birlikte kinetik özellikleri ve çok farklı dağılımları, *GSH-Px*'lerin oksidatif hasara karşı savunmada esas yapıtaşları olarak bulduklarını göstermektedir (Jones ve ark., 1981). Buna karşın *GSH-Px1*'den yoksun, "knock-out" farenin hem normal gelişimine devam edebildiği, hem de oksidatif strese dayanabildiği gözlenmiştir (Ho ve ark., 1997).



2.3.2. Zincir Kıran Antioksidanlar

2.3.2.1. Glutasyon

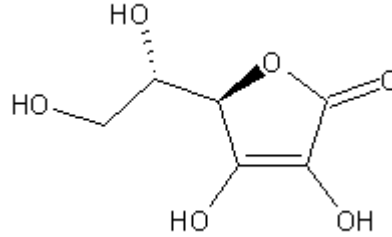
Glutasyon hücrede çok sayıda önemli işlevi bulunan ve tripeptit (L- γ -glutamil-L-sisteinil glisin) yapısında olan bir tiyol bileşiğidir (Şekil 2.2). Hücre içindeki derişimi milimolar düzeyinde olan glutasyonun, reaktif oksijen türlerinin ve ksenobiyotiklerin detoksifikasyonundaki rolleri çok iyi bilinmektedir (Therond ve ark., 2000). Ayrıca oksidatif strese karşı önemli koruyucu etkiye sahip olan glutasyon peroksidaz gibi çeşitli enzimlerin de koenzimi olarak görev yapar (Forstrom ve ark.,1979).



Şekil 2.2 : Glutatyonun kimyasal yapısı

2.3.2.2. C Vitamini

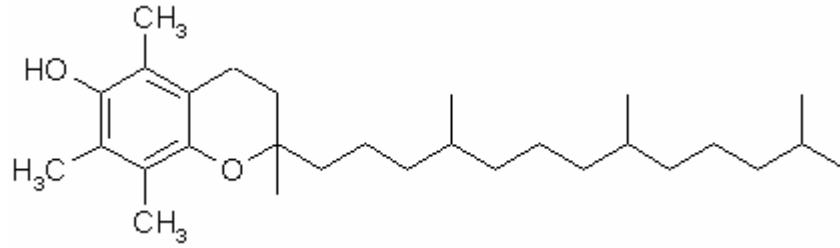
C vitamini (askorbik asit) suda çözünen, güçlü bir zincir kıran antioksidandır (Şekil 2.3). Süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil radikali, hipoklorik asit, peroksil radikalleri, singlet oksijen gibi birçok suda çözünen radikal ve oksidana elektron aktarma yeteneğine sahiptir. Askorbik asit ayrıca, sıvı-lipit ara yüzeyinde α -tokoferolün rejenerasyonunu sağlar (Halliwell ve Gutteridge, 2003).



Şekil 2.3 : C vitamininin kimyasal yapısı

2.3.2.3. E Vitamini

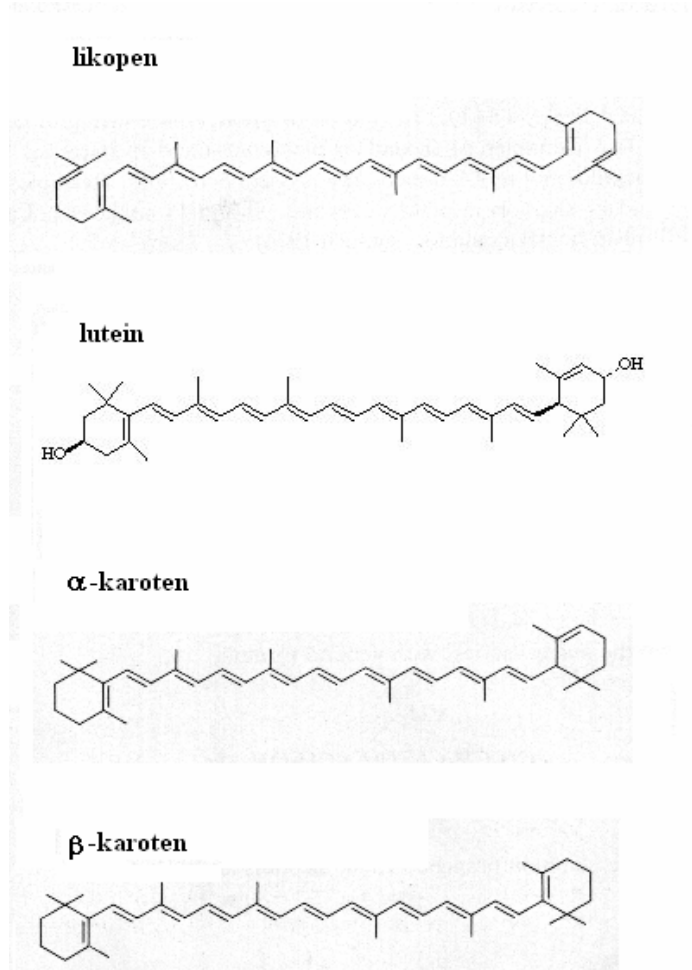
E vitamininin 8 formu bulunmaktadır: α , β , γ , δ -tokoferollar ve α , β , γ , δ - tokotrienoller. Tüm formlar, antioksidan işleve sahiptir, ancak α -tokoferol (Şekil 2.4), hücre zarlarında ve lipoproteinlerdeki en kuvvetli yağda çözünen zincir kıran antioksidan olarak bilinmektedir (Halliwell ve Gutteridge, 2003).



Şekil 2.4 : α -Tokoferolün kimyasal yapısı

2.3.2.4. Karotenoidler

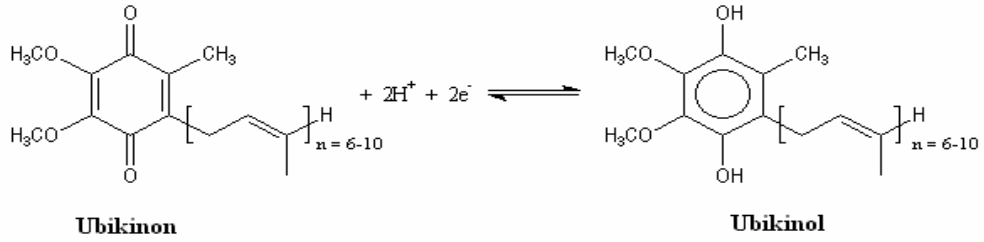
Bitkilerdeki farklı renkli pigmentleri içeren bu büyük grup, α -karoten, β -karoten, likopen, lutein gibi karotenoidleri kapsar (Şekil 2.5). Bugüne kadar, 600'den fazla karotenoid tanımlanmıştır. Yağda çözünen bu antioksidanlar, singlet oksijenin ve sadece düşük oksijen basıncında peroksil radikalının etkili radikal süpürücüleridir (Halliwell ve Gutteridge, 2003).



Şekil 2.5 : Bazı karotenoidlerin kimyasal yapıları

2.3.2.5. Ubikinol

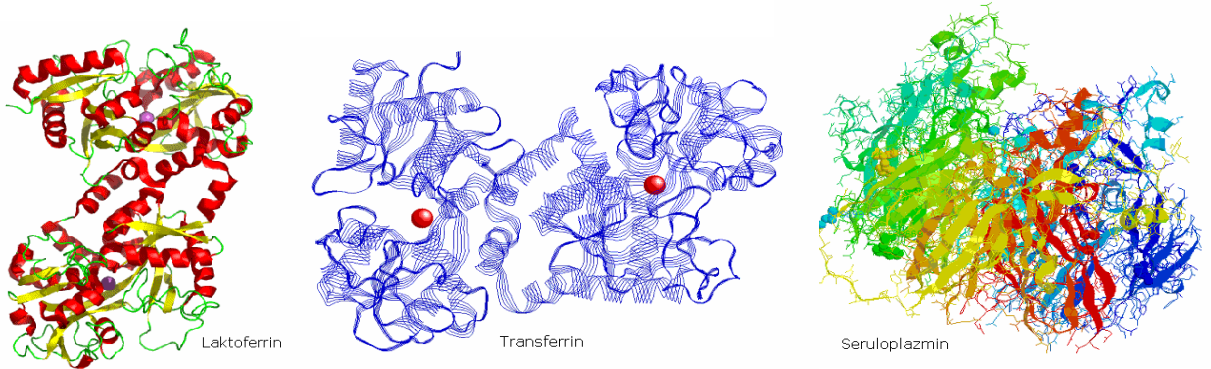
Ubikinonlar (koenzim Q10), mitokondrideki elektron taşıma zincirinin önemli yapıtaşlarıdır. Lipit peroksidasyonunun başlamasını ve ilerlemesini inhibe ettikleri bulunmuştur (Frei ve ark., 1990). Antioksidan form, ubikinonun indirgenme ürünü olan ubikinol (CoQ10H₂)'dür (Şekil 2.6) (Mohr ve ark., 1992). Doğrudan antioksidan etkilerine ek olarak, α -tokoferol gibi yağda çözünen diğer antioksidanların da rejenerasyonunda iş görmektedirler (Ernster ve ark., 1992).



Şekil 2.6 : Ubikinonun ubikinole indirgenmesi

2.3.3. Metal Bağlayan Proteinler

Bu grup, demir bağlayan proteinler olan transferrin ve laktoferrin ile bakır bağlayan protein seruloplazmini içermektedir (Şekil 2.7). Bunlar serbest halde bulunan geçiş grubu metal iyonlarını bağlayarak bu metal iyonlarının serbest radikal oluşumuna katılmalarını engellerler (Halliwell ve Gutteridge, 2003).

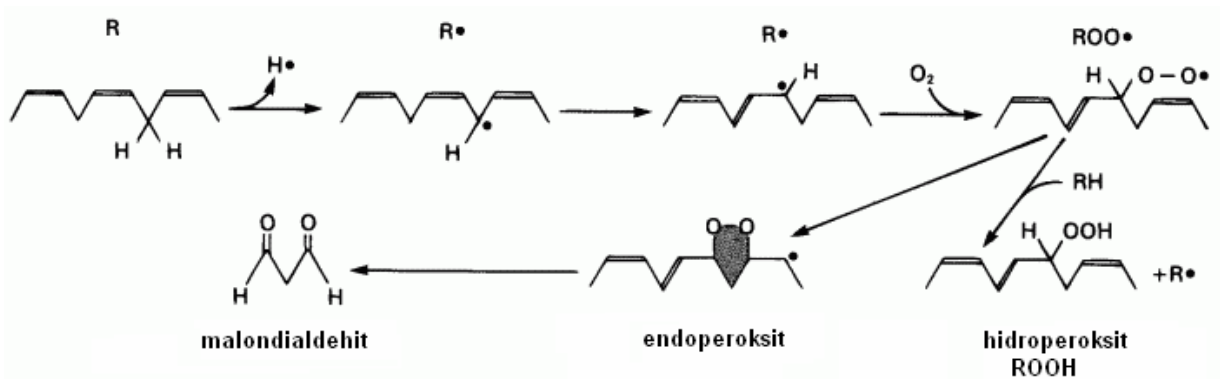


Şekil 2.7 : Metal bağlayan proteinlerin üç boyutlu yapıları

2.4. OKSİDATİF HASARA UĞRAYAN HÜCRESEL YAPITAŞLARI

2.4.1. Zar Lipitleri

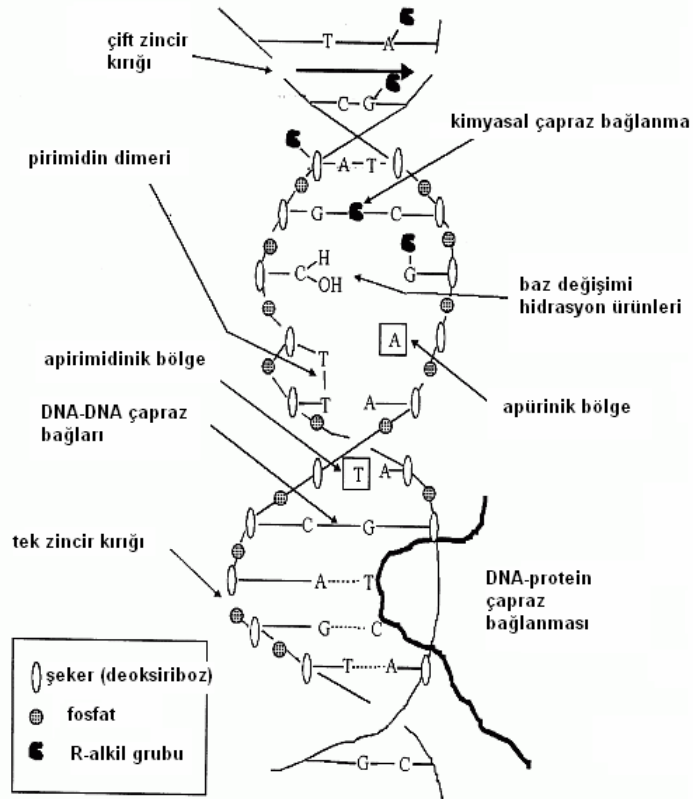
ROT'ların saldırısına uğrayan en önemli hedef moleküller, hücre zarındaki lipit çift tabakasında yerleşmiş bulunan çoklu doymamış yağ asitleridir (Halliwell ve Gutteridge, 2003). Bu çoklu doymamış yağ asitleri ("poly unsaturated fatty acids", PUFA), OH[•] radikali tarafından etkin bir şekilde hasara uğrattılır ve böylece lipit peroksidasyon süreci başlamış olur. Lipit peroksidasyon süreci başladıktan sonra, lipit hidroperoksitlerin ve aldehitlerin oluşumuna yol açan bir zincir reaksiyonu şeklinde ve birçok lipit molekülünü etkileyen tek bir oksidatif olay gibi devam eder (Şekil 2.8). Hücre zarındaki hidroperoksitlerin artışı, zarın akışkanlığını, transmembran (zar geçişli) enzimlerin aktivitesini, taşıyıcıların, reseptörlerin ve diğer zar proteinlerinin işlevini belirgin şekilde etkiler (Wagner ve ark., 1994). Sonuçta hücre zarının iletkenliği ve seçiciliği değişir, hücre hacmi homeostazisinde ve hücre metabolizmasında aksamalar meydana gelir (Chen ve ark., 1995). Ayrıca, hidroperoksitler ve aldehitler, hücre ve organeller üzerinde doğrudan toksik etki gösterebilir (Aw, 1998) ve sitokin üretimini düzenleyebilirler (Jayatilake ve Shaw, 1998). Hücre detoksifikasyon sistemlerinin, OH[•] ve özellikle H₂O₂ öncüllerini ortadan kaldırmada yetersiz kaldığı durumlarda lipit peroksidasyonunda büyük artış gözlenmektedir (Halliwell ve Gutteridge, 2003).



Şekil 2.8 : Lipit peroksidasyonunun mekanizması

2.4.2. DNA

Hem nükleer, hem de mitokondriyel DNA, çeşitli DNA modifikasyonları ile sonuçlanan ROT saldırılarına hedef olmaktadır (Henle ve Linn, 1997). En çok karşılaşılan hasarlar, adenozin trifosfat eksikliğine ve gen mutasyonlarına neden olan baz hidroksilasyonları ve zincir kırıklarıdır. Ayrıca çeşitli tipte baz ve şeker hasarları, DNA-protein çapraz bağları ve bazsız bölgelerin oluşması gibi modifikasyonlara uğrar (Şekil 2.9). Bu olaylar bazen hücre ölümü ile sonuçlanır (Yakes ve van Houten, 1997).



Şekil 2.9 : DNA'da meydana gelen oksidatif hasarlar

DNA modifikasyonlarının önemli bir kısmını, OH^\cdot radikalinin oluşturduğu düşünülmektedir (Takeuchi ve ark., 1996). H_2O_2 sitozoldeki nötralize edici enzimlerin etkisiyle yok edilmezse, nukleusa ulaşır, kromatine bağlı demir (veya oksidatif hasara uğramış Cu/Zn-SOD'tan açığa çıkan bakır) ile reaksiyona girerek, yakınındaki DNA

molekülüne saldıracak olan OH[·] radikalini oluşturur (Park ve Floyd, 1997). OH[·] tarafından meydana getirilen DNA hasarına karşı en önemli koruyucu etkiyi, tiyol bakımından zengin bir protein olan metallothionein sağlamaktadır. Metallothionein, sadece güçlü bir OH[·] radikali süpürücüsü olmayıp, hücre çevriminin belli aşamalarında başka işlevlere de sahiptir ve bu aşamalarda nukleustaki miktarı artmaktadır (Chubatsu ve Meneghini, 1993).

2.4.3. Proteinler

Protein oksidasyonunun yaşlanma, oksidatif stres ve birçok hastalık ile ilişkili olduğu iyi bilinmektedir (Linton ve ark., 2001).

Protein oksidasyonu, bir proteinin doğrudan reaktif oksijen türleri tarafından veya dolaylı olarak oksidatif stresin ikincil yan ürünleri tarafından kovalent modifikasyona uğratılması olarak tanımlanmaktadır. Proteinlerdeki bu yapısal değişiklikler, bağlanma ve enzim aktivitelerinin inhibisyonu, agregasyon ve proteolize karşı aşırı duyarlılık, hücre içine çeşitli maddelerin artan ya da azalan alımları, hücre immünogenetiğinin değişmesi gibi çok çeşitli işlevsel sonuçlar doğurabilir (Shacter, 2000). Protein oksidasyonuna yol açan ajanlar H₂O₂ (Garrison ve ark., 1962) ve hipoklorit (HOCl) (Handelman ve ark., 1998) gibi reaktifleri, parakuat (Korbashi ve ark., 1986), CCl₄ (Hartley ve ark., 1997) ve asetaminofen (Tirmenstein ve Nelson, 1990) gibi ksenobiyotikleri, sigara dumanını (Eiserich ve ark., 1995), Fe⁺² (Berlett ve Stadtman, 1997) ve Cu⁺¹ (Yan ve ark., 1997a) gibi indirgenmiş geçiş grubu metallerini, O₂ varlığında γ radyasyonunu (Davies ve Delsignore, 1987), aktive olmuş nötrofilleri (Oliver, 1987), ultraviyole ışığı (Hu ve Tappel, 1992), ozonu (Berlett ve ark., 1996), oksidoredüktaz enzimlerini (Fucci ve ark., 1983) ve lipid peroksidasyonu yan ürünlerini (Berlett ve Stadtman, 1997) içermektedir.

ROT'lar,

- i) amino asitlerin yan zincirlerinde oksidasyona,
- ii) protein-protein çapraz bağlantılarının oluşumuna,
- iii) protein fragmentasyonu ile sonuçlanan protein omurgası oksidasyonlarına neden olmaktadır (Berlett ve Stadtman, 1997; Stadtman, 2006).

2.4.3.1. Amino Asit Yan Zincirlerinin Oksidasyonu

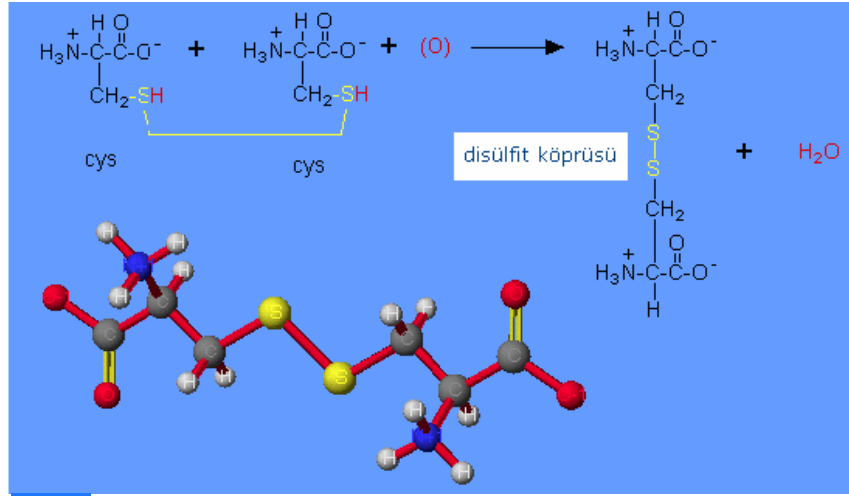
Proteinlerdeki amino asitlerin yan zincirleri oksidasyona çok açıktır. Oksitlenerek değişen amino asit yan zincirleri Tablo 2.2’de özetlenmiştir.

Tablo 2.2: Amino asit yan zincirlerinin oksidasyonu ile oluşan ürünler

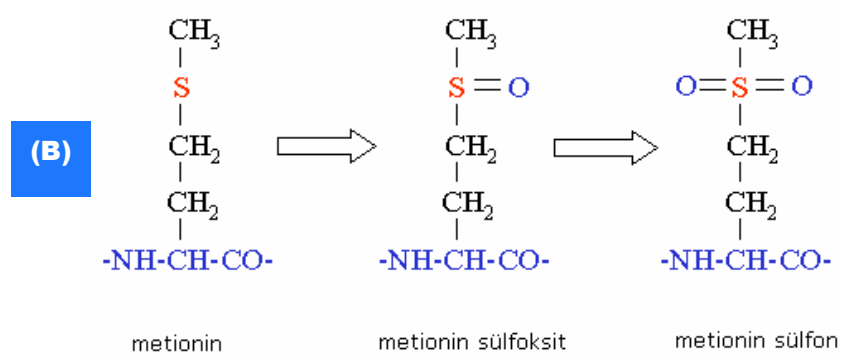
Amino asit	Ürünler
Arginin	Glutamik semialdehit*
Sistein	CyS-SCy; CyS-SG; CySOH; CySOOH; CyO ₂ H
Glutamik asit	Oksalik asit; piruvat katılma ürünü
Histidin	2-Oksohistidin; 4-OH-glutamat
Lösin	3-OH-Lösin; 4-OH-lösin; 5-OH-lösin
Lizin	α -Aminoadipiksemialdehit; Nc-(karboksimetil)lizin*
Metionin	Metionin sülfoksit; metionin sülfon
Fenilalanin	2-, 3- ve 4-Hidroksifenilalanin; 2,3-dihidroksifenilalanin
Prolin	Glutamilsemialdehit; 2-pirrolidon; 4- ve 5-OH-prolin*
Treonin	2-Amino-3-keto-butirik asit*
Triptofan	2-, 4-, 5-, 6- ve 7-OH-triptofan; formilkinurenin; 3-OH-kinurenin; nitrotriptofan
Tirozin	3,4-Dihidroksifenilalanin; tyr-tyr çapraz bağları; 3-nitrotirozin; 3-klorotirozin; 3,5-diklorotiroksin

* protein karbonilleri

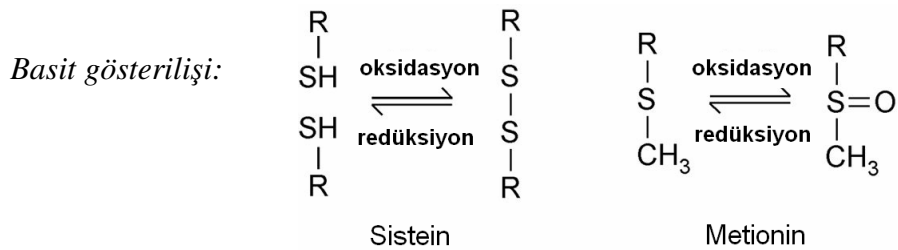
Sistein ve metionin gibi kükürt içeren amino asitler hemen tüm ROT’ların oksidatif saldırısına karşı daha duyarlıdır. Ilımlı koşullar altında bile, sistein yan zincirleri disülfidlere dönüştürülürken, metioninler metionin sülfoksitlere (MeSOX) çevrilir (Vogt, 1995) (Şekil 2.10). Birçok biyolojik sistem, sistein ve metioninin oksitlenmiş formlarını, normal formlarına dönüştüren disülfid redüktazlara ve MeSOX redüktazlara sahiptir. Proteinlerde onarılabilecek oksidatif modifikasyonlar sadece bunlardır. Levine ve ark., (1996) *E.coli*’de bazı metionin yan zincirlerinde gözlenen oksidasyon ve redüksiyon olaylarının, glutamin sentetaz enzimini daha ileri modifikasyonlardan koruyan bir mekanizma oluşturduğunu öne sürmektedir.



(A)

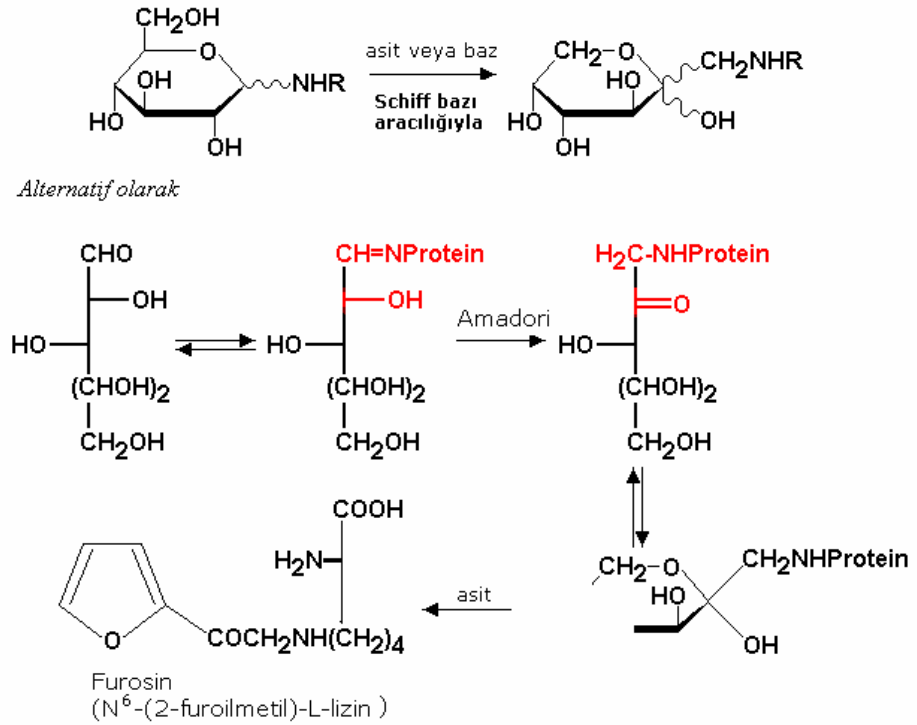


(B)



Şekil 2.10 : Sistein (A) ve metionin (B) yan zincirlerinde meydana gelen oksidasyon ve redüksiyonlar

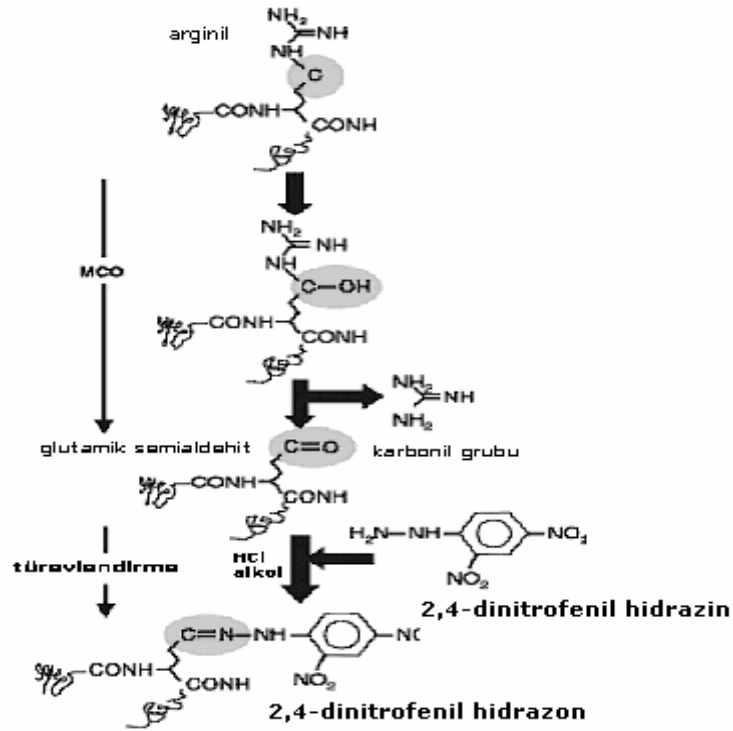
Buna ek olarak, Tablo 2.2’de görüldüğü gibi, lizin, arginin, prolin ve treonin yan zincirlerinin doğrudan metal katalizli oksidasyona (MCO) uğramaları, karbonil türevlerinin oluşumuna yol açmaktadır (Nyström, 2005). Ayrıca, lipid peroksidasyon süreci (bkz. Şekil 2.8) ürünlerinden 4-hidroksi-2-nonenal ve malondialdehit gibi aldehitlerin veya indirgeyici şekerler ve bunların oksidasyon ürünlerinin proteinlerdeki lizinle reaksiyonu (glükasyon ve gliksidasyon) (Şekil 2.11) sonucu oluşan reaktif karbonil türevlerinin (ketoaminler, ketoaldehitler, deoksizonlar) proteinlerle reaksiyona girmesi de proteinlerin karbonillenmesine yol açar (Dalle-Donne ve ark., 2003).



Şekil 2.11 : Protein glükasyonu ve Amadori düzenlenmesi

Amadori düzenlenmesi (Trost, 1991), amino asitler, peptidler ve proteinlerin, özellikle şekerlerle ısıtıldığında meydana gelen kompleks karamelizasyon reaksiyonunda önemli bir aşamadır (Martins ve van Boekel, 2003).

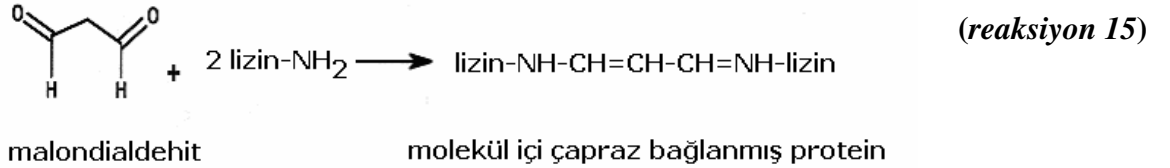
Karbonillenme reaksiyonları içinde en önemlisi argininin glutamik semialdehide dönüşümüdür (Şekil 2. 12). Arginil kalıntısının glutamik semialdehite dönüşümü metal katalizli oksidasyon (MCO) sonucunda meydana gelir. Karbonil grubunun saptanması için glutamik semialdehit, 2,4-dinitrofenil hidrazin ile türevlendirilir. Sonuçta oluşan proteinin 2,4-dinitrofenil hidrazon türevi spesifik antikorlarla saptanabilir (Levine, 2002). Proteinlerdeki karbonil grupları, ROT kaynaklı protein oksidasyonunun en güvenilir göstergelerinden biri olarak kabul edilir.



Şekil 2. 12 : Arginil yan zincirinin karbonillenerek glutamik semialdehide dönüşümü ve bu türevin saptanmasında kullanılan reaksiyonun temeli

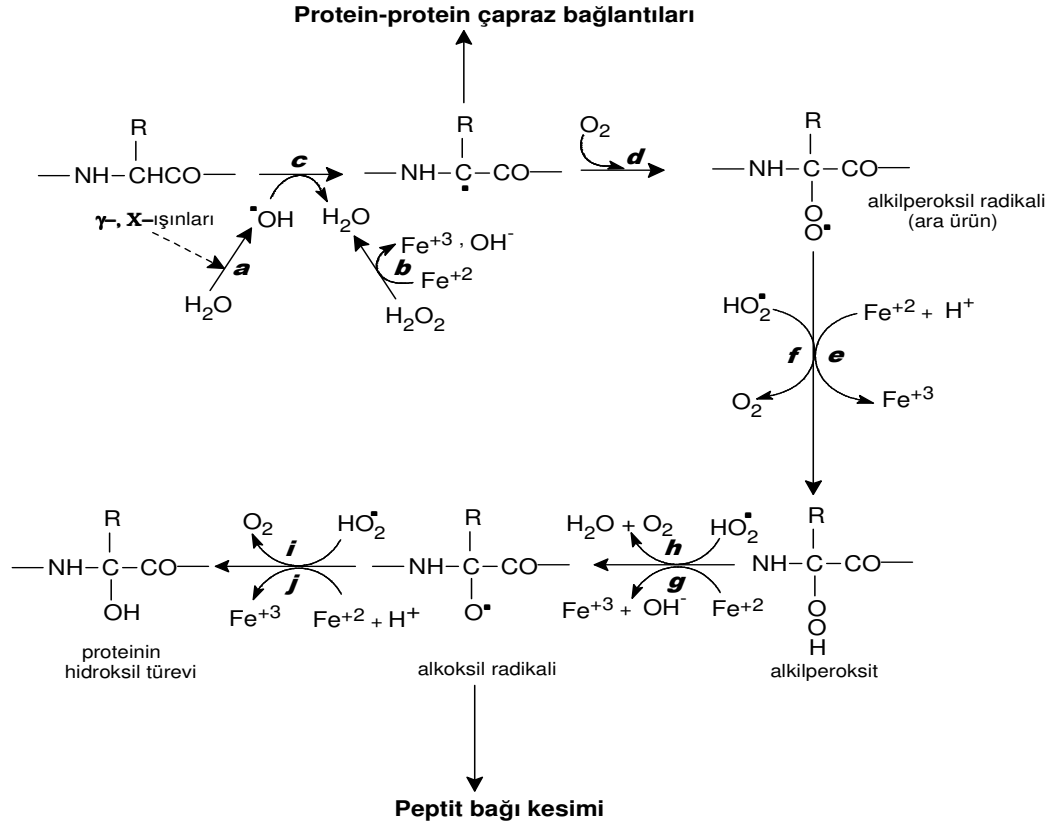
2.4.3.2. Protein-Protein Çapraz Bağlarının Oluşması

Lipit peroksidasyonunun son ürünlerinden malondialdehit (MDA, propandial) gibi aldehitler, proteinlerdeki lizinlerle kovalent bağ oluşturarak molekül içi çapraz bağların kurulmasına da yol açabilirler (**reaksiyon 15**) (Berlett ve Stadtman, 1997; Stadtman, 2006).

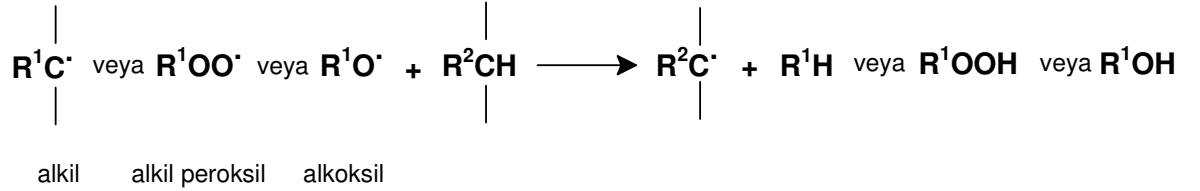


2.4.3.3. Protein Omurgasının Oksidasyonu ve Protein Fragmentasyonu

Polipeptit omurgasına yapılan oksidatif saldırı, bir amino asit kalıntısından bir hidrojen atomunun OH[•] bağı olarak çıkartılmasıyla başlar (Şekil 2.13c) ve karbon merkezli bir alkil radikali oluşur. Bu reaksiyon için gerekli olan OH[•], suyun radyolizi (Şekil 2.13a) veya H₂O₂'nin metal katalizli ayrıştırılması (Şekil 2.13b) ile sağlanır. Bu şekilde oluşan karbon merkezli radikal, hızlı bir şekilde O₂ ile reaksiyona girerek (Şekil 2.13d) bir alkilperoksil radikal ara ürün oluşturur. Bu ürün de alkilperoksit oluşumuna öncülük eder (Şekil 2.14f). Bunu alkoksil radikali oluşumu takip eder (Şekil 2.13h); bu radikal de proteinin hidroksil türevine dönüştürülebilir (Şekil 2.13j). Bu yol üzerinde, OH[•] ile etkileşim sonucu oluşan birçok adım, aynı zamanda Fe⁺² tarafından da katalizlenebilir (Şekil 2.13e, g ve i). Bu yoldaki, alkil, alkil peroksil ve alkoksil radikali ara ürünleri, **reaksiyon 16**'da belirtilen reaksiyonlara benzer şekilde reaksiyona girme yeteneğinde olan yeni karbon merkezli radikalleri oluşturacak şekilde, aynı veya farklı bir proteindeki diğer amino asit kalıntıları ile reaksiyona girebilir.

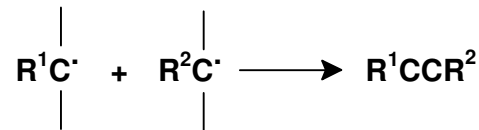


Şekil 2.13 : Polipeptid omurgasının oksidasyonu



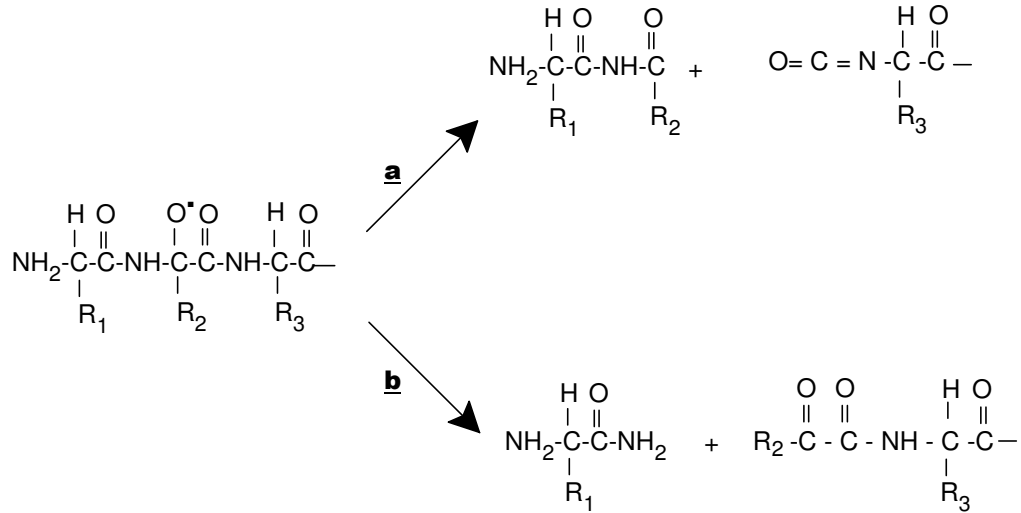
(reaksiyon 16)

Şekil 2.13'deki d reaksiyonu sadece oksijen varlığında gerçekleşir. Oksijen yokluğunda, karbon merkezli radikal, diğer bir karbon merkezli radikal ile reaksiyona girerek protein-protein çapraz bağlı bir türev oluşturur (reaksiyon 17).



(reaksiyon 17)

Alkoksil radikallerinin oluşumu (bkz. Şekil 2.13h, g), hem diamid hem de α -amidasyon yolları ile peptit bağı kesimine öncülük eder (Şekil 2.14). Diamid yolu ile kesim sırasında (Şekil 2.14a) proteinin N-ucundan türevlenen peptit parçası, C-uçta bir diamid yapıya sahiptir. Buna karşın; proteinin C-ucundan türevlenen peptit, N-uçta izosiyanat yapısına sahiptir. Bunun tersine, α -amidasyon ile kesim sırasında (Şekil 2.14b), proteinin N-ucundan türevlenen peptit parçası C-uçta bir amid grubuna sahipken, C-uçtan türevlenen parçanın N-ucundaki amino asit bir α -ketoasit türevidir (Berlett ve Stadtman, 1997: Stadtman, 2006).



Şekil 2.14 : Peptid bağının diamid veya α -amidasyon yolları ile kesilmesi
(**a**: diamid yoluyla, **b**: α -amidasyon yolu)

2.5. PROTEİN MODİFİKASYONLARININ BİYOLOJİK SONUÇLARI

Proteinlerin çok farklı ve kendilerine özgü biyolojik işlevlere sahip olmaları nedeniyle, geçirdikleri oksidatif modifikasyonlar çok çeşitli işlevsel kayıplara neden olabilir. Örneğin, bazı enzimlerin oksidatif modifikasyon sonucunda, aktivitelerini tamamen kaybettiği gösterilmiştir (Stadtman, 1990). Aktif bölge veya yakınında bir metal taşıyan enzimler metal katalizli oksidasyon tarafından gerçekleştirilen inhibisyona duyarlıdır (Fucci ve ark., 1983). Enzimlerin oksidatif modifikasyonu, değişime uğrayan moleküllerin yüzdesine ve modifikasyonun sürekliliğine bağlı olarak metabolizma üzerinde ılımlı veya ciddi etkilere sahiptir. Belirli enzimlerin yaşlanma sırasında oksidatif değişime uğradığı birçok araştırmacı tarafından gösterilmiştir (Oliver,1987). Yaşlanma sürecinde, artan bir şekilde oksitlenen enzimlerden bazıları glutamin sentetaz (Carney ve ark., 1991), mitokondriyal akonitaz (Yan ve ark., 1997b), adenin nükleotid translokaz (Yan ve Sohal, 1998) ve karbonik anhidrazdır (Cabiscol ve Levine, 1995).

Yapısal proteinlerdeki modifikasyonlara örnek olarak, plazma proteini fibrinojen verilebilir. Fibrinojenin demir/askorbat radikal oluşturucu sistem ile işleme sokulduğunda veya iyonize radyasyona maruz bırakıldığında, pıhtı oluşturma yeteneğini kaybettiği *in vitro* bir çalışmada ortaya konulmuştur. Pıhtılaşmanın inhibisyon derecesi, proteinde oluşan karbonil içeriği ile ilişkilidir (Shacter ve ark., 1995). İnsanda sinoviyal sıvıdaki immunoglobulinlerin oksidasyonu, romatoid artrit etiyolojisine katkıda bulunan agregasyon oluşumuna neden olmaktadır (Jasin, 1983; Lunec ve ark.,1985). Bir proteaz inhibitörü olan α -1 antitripsin, akciğer ve kıkırdak dokusundaki proteoliz inhibisyonundan birincil derecede sorumludur ve bu plazma proteininin kritik bir metionin kalıntısının oksidasyona uğraması, amfizemde doku hasarına ve işlev kaybına neden olur (Carp ve ark., 1982). Nötrofiller tarafından üretilen HOCl'nin bu modifikasyondan sorumlu birincil oksidan olduğu öne sürülmektedir (Matheson, 1979). Plazmadaki düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) birçok farklı tipte oksidatif modifikasyona uğradığı öne sürülmektedir (Esterbauer ve ark., 1989). Cu^{+1} iyonları içeren ortamda LDL'nin protein kısmı oksitlenerek karbonillenir (Yang ve ark., 1997) ve agregasyona uğrar (Hazell ve ark., 1994). Oksidatif değişime uğramış LDL aterosklerotik dokularda bulunduğu birçok araştırmacı tarafından

gösterilmiş, buna dayanarak da LDL oksidasyonunun ateroskleroz etiyolojisinde önemli bir role sahip olduğu savunulmuştur (Hazell ve ark., 1996). Benzer şekilde, göz merceğindeki kristalin proteinlerinin oksidasyonunun, katarakt oluşumunda önemli bir rol oynadığı ileri sürülmektedir (Fu ve ark., 1998). Diğer hastalık koşullarında da, okside olan proteinlerde genel bir artış bulunmuş, fakat birçok durumda spesifik proteinler tanımlanamamıştır. Tablo 2’de *in vivo* oksidatif protein modifikasyonları, bunların saptandığı proteinler ve ilişkili oldukları hastalıklardan örnekler verilmiştir.

Tablo 2.3 : İnsanda çeşitli dokularda saptanmış oksidatif protein modifikasyonları ve ilişkili oldukları bazı hastalıklar

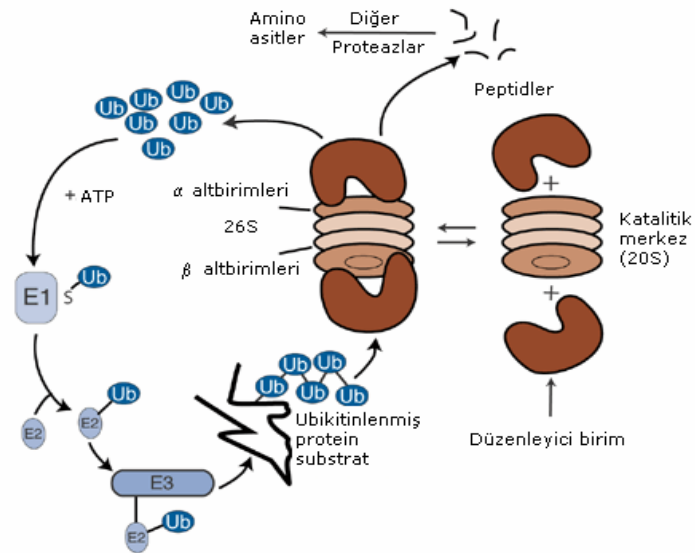
Modifikasyonlar ve Görüldüğü Proteinler	Hastalık/ Koşul
<i>Karboniller</i>	
Glutamin sentetaz	Alzheimer, iskemi / reperfüzyon, yaşlanma
IgG	Romatoid artrit
Böbrek proteinleri	Kronik östrojen yüksekliği
Akciğer proteinleri	Hiperoksia
Beyin proteinleri	İskemi / reperfüzyon
Göz merceği proteinleri	Katarakt
<i>Metiyonin sülfoksit</i>	
α -1 antitripsin inhibitörü	Alzheimer, bronşit, anfizem (özellikle sigara içenlerde)
<i>Lipit peroksidasyon katılma ürünleri</i>	
LDL	Ateroskleroz
<i>Glutatiyolasyon(SH oksidasyon)</i>	
Karbonik anhidraz III	Yaşlanma
<i>3-Klorotirozin, ditirozin</i>	
LDL	Ateroskleroz
<i>Agregasyon</i>	
IgG	Romatoid artrit
<i>Nitrotirozin</i>	
Bilinmeyen proteinler	Akut akciğer inflamasyonu, ateroskleroz, romatoid artrit
<i>Hidro(pero)ksilösin</i>	
Bilinmeyen proteinler	Katarakt

2.6. OKSİTLENMİŞ PROTEİNLERİN ORTADAN KALDIRILMASI: PROTEAZOMLAR

Proteazomlar, tüm ökaryot ve arkelerde, aynı zamanda bazı bakterilerde bulunan büyük protein kompleksleridir. Ökaryotlarda, nükleus ve sitoplazmada yerleşim gösteren proteazomların, 20S ve 26S olmak üzere iki temel formu vardır (Şekil 2.15).

20S proteazom, silindire benzeyen, multimerik yapıda proteolitik bir enzimdir; 26S proteazom ise iki adet 19S düzenleyici kompleks ve bir 20S proteazom birimi içeren bir komplekstir. 26S proteazom, ATP kullanımı ile ubiquitinlenmiş çeşitli tiplerdeki atık proteinlerin yıkımını gerçekleştirir. Bu proteazom, spesifik ubiquitin temelli proteoliz yoluyla hücre çevriminin düzenlenmesinde önemli rol oynar (Ciechanover, 1998).

Düzenleyici proteinlerin yıkımının yanısıra, proteazomların diğer bir işlevi de, okside olmuş ve hatalı (anormal) proteinlerin ortadan kaldırılmasıdır (Davies, 2001). Yaşlanma sırasında yüksek oranda oksitlenen ve çapraz bağlantılar oluşturan proteinlerde artış olur ve bunlar hücre içinde agregatlar oluşturur. Agregat oluşumu proteazom işlevinde azalma olduğunun bir göstergesidir (Stadtman, 2001).



Şekil 2.15 : Proteazomlar ve işlevleri

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. ORGANİZMA

Bu çalışmada İ.Ü. Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü kültür koleksiyonundan sağlanan, mantarların Ascomycota sınıfına ait *Schizosaccharomyces pombe* Linder *liquifaciens* maya türünün yabancı tipi (972h⁻) kullanıldı.

3.2. BESİ ORTAMLARI

Oksidatif stres uygulanacak hücreler % 0.5 (w/v) maya özütü ve % 3.0 (w/v) glukoz içeren sıvı besi ortamında (YEL) üretildi. Kültürdeki hücrelerin canlılığının belirlenmesinde ise, % 0.5 (w/v) maya özütü, % 3.0 (w/v) glukoz ve % 2.0 (w/v) agar içeren katı besi ortamı (YEA) kullanıldı. Hazırlanan tüm besi ortamları otoklavda 121°C'da (1 atmosfer basınç altında) 20 dakika tutularak steril edildi.

3.3. ORGANİZMANIN ÜRETİMİ VE SAKLANMASI

Çalışmada kullanılan *S. pombe* 972h⁻ ırkı Gutz ve ark. (1974)'nin önerdikleri standart yöntemlerle üretildi ve saklandı. 4 °C'da, silika jel içinde saklanan stoklardan alınan hücreler YEA besi ortamında 30 °C'da 3 gün üretildi. Buradan öze ile alınan örnekler YEA' ya tek koloni düşürme yöntemiyle ekildi. Tek düşen kolonilerden rasgele seçilen birkaç koloni eğri YEA besi ortamlarına aktararak 30 °C' da yaklaşık 3 gün tutularak saf kültürleri elde edildi. Saf kültürler 4°C' da saklandı ve çalışma boyunca 6 ayda bir saflık kontrolleri yapıldı.

Her deney bu tip taze hücrelerden hazırlanan sıvı kültürlerle başlatıldı. Bunun için, eğri YEA' daki hücreler 5 ml steril saf su eklendikten sonra tüp karıştırıcıda karıştırılarak süspansiyon haline getirildi. Bu süspansiyonun mililitresindeki hücre sayısı, uygun sulandırımından sonra, geliştirilmiş Neubauer lamı kullanılarak ve aşağıdaki formülden yararlanılarak hesaplandı.

$$\text{hücre/ml} = \text{hücre sayısı} \times 10^4 \times \text{sulandırım oranı}$$

Bu süspansiyondan YEL besi ortamına başlangıç hücre sayısı 10^6 hücre/ml olacak şekilde aktarılan hücrelerin 30 °C'da, 180 devir/dakika hızda çalkalamalı etüvde üremeleri sağlandı.

3.4. *S. pombe* HÜCRELERİNDE ZAMANA BAĞLI ÜREMENİN İZLENMESİ

Oksidatif stres uygulamasının yapılacağı logaritmik evrenin belirlenmesi için, *S. pombe* hücrelerinin YEL besi ortamındaki üremesi, belirli zaman aralıklarında (2 saatte bir) alınan örneklerin bulanıklık ölçümleri ile izlendi. Spektrofotometrede 595 nm dalga boyundaki ışık kullanılarak belirlenen optik yoğunluk (OD) değerlerini hücre/ml cinsine çevirmek için, aynı hücreye ait kültürün, mililitresindeki hücre sayısı bilinen çeşitli sulandırımının 595 nm'de ölçülen OD değerlerine göre çizilen standart grafikten yararlanıldı. Üç kez tekrarlanan ölçümlerde ortalama OD değerleri ile zaman arasında çizilen grafik yardımıyla lag, log ve durağan evreler belirlendi.

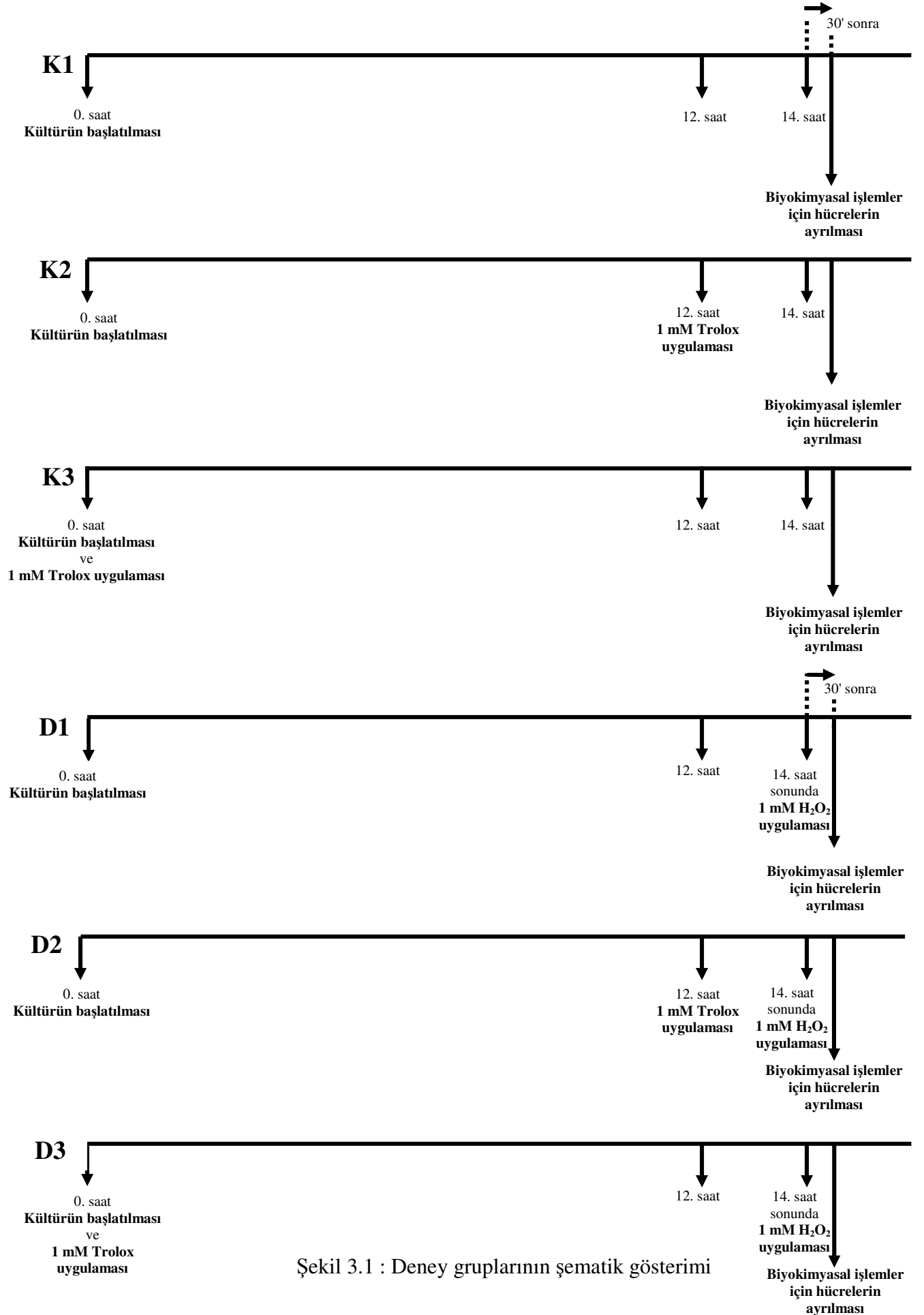
3.5. ÖRNEKLERİN HAZIRLANMASI

Çalışmada oluşturulan deney serileri Tablo 3.1'de verildi. **I. Grup** hücreler, normal hücre metabolizması sonucunda oluşan oksidatif hasarları ve Trolox'un koruyucu etkisini araştırmak için, **II. Grup** hücreler ise H₂O₂ varlığında oluşan oksidatif hasarları ve Trolox'un koruyucu etkisini araştırmak için kullanıldı.

Antioksidan (Trolox) uygulaması, besi ortamındaki son derişimi 1 mM olacak şekilde, kültürün 12. saatinden itibaren 2 saat süreyle (K2 ve D2) veya kültürün başlangıcından itibaren 14 saat süreyle yapıldı. Oksidatif stres (H₂O₂) uygulaması, besi ortamındaki son derişimi 1 mM olacak şekilde, kültürün 14. saatin sonundan itibaren 30 dakika süreyle yapıldı. Bu uygulamalar Şekil 3.1'de şematik olarak gösterildi. Her bir deney için her bir gruptan en az 3 seri hazırlandı ve biyokimyasal ölçümlerde kullanıldı.

Tablo 3.1 : Çalışmada kullanılan deney grupları ve içerikleri
(Trolox uygulamasının yapıldığı saat ve süreler parantez içinde verildi)

	Deney serileri	İçerik
I. Grup: Oksidatif strese sokulmayan (-H₂O₂) hücreler	K1	Hücreler - Trolox - H ₂ O ₂
	K2	Hücreler + 1 mM Trolox (12. saatte, 2 saat) - H ₂ O ₂
	K3	Hücreler + 1 mM Trolox (0. saatte, 14 saat) - H ₂ O ₂
II. Grup: Oksidatif strese sokulan (+H₂O₂) hücreler	D1	Hücreler - Trolox + H ₂ O ₂
	D2	Hücreler + 1 mM Trolox (12. saatte, 2 saat) + 1 mM H ₂ O ₂
	D3	Hücreler + 1 mM Trolox (0. saatte, 14 saat) + 1 mM H ₂ O ₂



Şekil 3.1 : Deney gruplarının şematik gösterimi

3.6. DENEY KOŞULLARINDA HÜCRE CANLILIĞININ BELİRLENMESİ

Çalışma koşullarında canlı hücre sayısını belirlemek amacıyla koloni sayımları yapıldı (Walker, 1988). 10^{-4} sulandırma getirilen her bir örnekten 100 μ l alınarak, YEA içeren petrilere yayma yöntemiyle ekildi. 30 °C’da 72 saat üremeleri sağlandı ve oluşan koloniler sayılarak c.f.u (“colony forming unit”)/ml birimiyle ifade edildi.

3.7. BESİ ORTAMINDAKİ H₂O₂ DERİŞİMİNİN BELİRLENMESİ

Oksidatif strese sokulan (+H₂O₂) deney gruplarına 30 dakika süreyle uygulanan 1 mM H₂O₂’nin, deney sonunda besi ortamında ne kadar kaldığını belirlemek için fenol-kırmızısı yöntemi kullanıldı (Pick ve Keisari, 1980). Bu amaçla hücre süspansiyonundan 500 μ l alındı ve üzerine 1 ml fenol-kırmızısı çözeltisi [40 mM NaCl, 10 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.0), 0.1 g/l fenol- kırmızısı, 8.5 ünite/ml yabanturpu peroksidazı] eklendi. Bu karışım 37 °C’da, 5 dakika bekletildikten sonra, 10 μ l 1 N NaOH eklendi ve oluşan mor renkli kompleksin 550 nm dalga boyundaki absorbansı belirlendi. Besi ortamındaki H₂O₂ derişimi, 1, 10, 100 ve 200 μ M derişimdeki H₂O₂ çözeltilerinin absorbans değerleriyle oluşturulan standart grafikten yararlanarak belirlendi.

3.8. HÜCRE İÇİ OKSİDASYON DÜZEYİNİN BELİRLENMESİ

Hücre içi oksidasyon düzeyi, reaktif oksijen türlerinin (ROT) ölçülmesine dayanan yöntemle belirlendi (Okai ve ark., 2000). Bu yöntemde reaktif olarak, hücre içine alındıktan sonra esterozlar tarafından kesime uğratarak diklorofloresein (DCFH) formuna dönüştürülen, diklorofluoresein diasetat (DCFH-DA) kullanıldı. Hücre içinde kalan DCFH, DCF’ye oksitlendikten sonra yaydığı fluoresans ile belirlendi. Fluoresans, spektrofluorometrede eksitasyon ve emisyon dalga boyları sırasıyla 480 ve 530 nm olacak şekilde ölçüldü. Hücreler deneyin sonunda santrifüjleme (1000xg, 4°C, 5 dakika) ile çöktürülerek toplandı ve steril saf su ile yıkandıktan sonra 40 μ M DCFH-DA içeren YEL besi ortamında, hücre sayısı 10^7 hücre/ml olacak şekilde yeniden süspanse edildi. DCFH-DA’nın absorpsiyonu için 30°C’da 1 saat süreyle inkübasyona bırakılan hücreler,

santrifüjleme ile ayrıldı ve 100 µl PBS (“phosphate buffered saline”) içinde yeniden süspanse edildi. Hücre süspanسیونunun floresans yoğunluğu, eksitasyon ve emisyon dalga boyları, sırasıyla 480 nm ve 530 nm’ye ayarlanmış, mikrokuyucuklu Bio-Tek FL 800 floresans okuyucu ile ölçüldü. Bağlı floresans yoğunluğu, au (“arbitrary unit”)/10⁷ hücre olarak ifade edildi.

3.9. HAM PROTEİN ÖZÜTÜNÜN HAZIRLANMASI

Çalışmanın çeşitli aşamalarında (protein karbonillerinin belirlenmesi, katalaz aktivitesinin ölçülmesi ve proteazomal aktivitenin saptanması), kontrol ve deney grubu hücrelerden ham protein özütleri hazırlandı. Şekil 3.1’deki düzene göre üretilen hücreler santrifüjlemeyle (1000xg, 4°C, 5 dakika) çöktürüldü, iki kez steril saf suyla yıkandı ve 20 mM parçalama tamponunda [50 mM Tris.Cl (pH 7.5), 150 mM NaCl, % 0.5 Nonidet, 5 mM EDTA ve 1 mM proteaz inhibitörleri] süspanse edilip eşit hacimde cam boncuk eklenerek vorteks yardımıyla parçalandı. Parçalanmış hücre kalıntıları, parçalanmamış hücreler ve cam boncuklar santrifüjlemeyle (27 000xg, 4°C, 15 dakika) çöktürüldükten sonra hücre içeriğinin yer aldığı üst sıvı ayrıldı (Forsburg ve Rhind, 2006). Elde edilen ham özütler, ileri aşamalarda kullanılmak üzere -70°C’da saklandı.

3.10. HAM ÖZÜTTEKİ PROTEİN DERİŞİMİNİN BELİRLENMESİ

Ham özütlerdeki protein derişimi Waterborg (2002)’a göre ölçüldü. Bu yöntemde kullanılan çözeltiler Tablo 3.2’de verildi.

Tablo 3.2: Protein derişiminin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler

Çözeltiler	İçerik
Baz çözeltisi	2 N NaOH
A	% 2 (w/v) Na ₂ CO ₃
B	% 1 (w/v) CuSO ₄ .5H ₂ O
C	% 2 (w/v) Na ₂ C ₄ H ₄ O ₆ . 2H ₂ O
Kompleks oluşturma reaktifi	100 ml A: 1 ml B: 1ml C
Folin belirteci	1 N Folin-Ciocalteau

Yöntemin duyarlılık sınırlarına (100-4000 µg/ml) uygun olarak hazırlanmış sığır serum albumin (BSA) standartları (250, 500, 1000, 2000, 4000 µg/ml), steril saf suda hazırlanmış ve 2 kez sulandırılmış ham özütler veya kör örnekten (20 mM parçalama tamponu) alınan 0.1 ml üzerine 0.1 ml baz çözeltisi eklendi. 10 dakika kaynar su banyosunda bekletilen karışımlar oda sıcaklığına gelene kadar soğutuldu, her birine 1'er ml kompleks oluşturma reaktifi eklendi ve oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Bu süre sonunda her bir örnek üzerine, tüp karıştırıcıda, hızla 100'er µl Folin belirteci eklenerek oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. Örneklerin 550 nm dalga boyundaki absorbans değerleri okundu ve standartların absorbans değerlerine göre oluşturulan grafikten yararlanılarak protein derişimleri belirlendi.

3.11. KATALAZ AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

Antioksidan savunma enzimlerinden biri olan katalazın aktivitesi, hidrojen peroksidin yıkımının, spektrofotometrik olarak, 240 nm'de izlenmesi temeline dayanan yöntemle belirlendi (Cho ve ark., 2000). 680 µl potasyum fosfat tamponundan (50 mM; pH 7.2) ve 480 µl H₂O₂ (40 mM) içeren reaksiyon karışımı 30°C'de 2.5 dakika inkübe edildi. Enzimatik reaksiyon 40 µl hücre özütünün eklenmesi ile başlatıldı. 240 nm'deki absorbans düşüşü 2 dakika izlendi ve katalaz aktivitesi $\Delta A_{240}/\text{dak}/\text{mg}$ protein şeklinde ifade edildi.

3.12. PROTEİN KARBONİLLERİNİN ÖLÇÜMÜ

S. pombe hücrelerindeki proteinlerin oksidasyonu sonucu yan zincirlerde oluşan karboniller iki farklı yöntemle belirlendi.

3.12.1. Spektrofotometrik Belirleme

Bu yöntem, yan zincirlerdeki karbonil grupları ile dinitrofenil hidrazin arasındaki reaksiyon sonucunda oluşan dinitrofenil hidrazon'un ölçülmesine dayanmaktadır. Dinitrofenil hidrazon, 370 nm'de UV ışığı absorplar ve molar ekstinksiyon katsayısı $22000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 'dir. Uygulamada önce protein özütü, içeriğindeki nükleik asitlerin çöktürülmesi için, son

konsantrasyonu %1 (w/v) olan streptomisin sülfat ile oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi. Bu süre sonunda 6000xg'de, 4°C'da 10 dakika santrifüjlemeyle elde edilen üst sıvı protein karbonillerinin ölçümünde kullanıldı. Üst sıvıdaki proteinler 10 hacim HCl-aseton [(3:100), (v/v)] ile çöktürüldükten sonra santrifüjlemeyle ayrıldı ve protein izolasyonunda kullanılan tamponda (400 µl) yeniden süspansiyon edildi. Bu süspansiyondan alınan 200'er µl örnek, iki adet mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Bunlardan birine 2.5 M HCl içinde hazırlanmış 10 mM dinitrofenilhidrazin (DNPH)'den 800 µl eklenirken, diğerine sadece 800 µl 2.5 M HCl eklendi. Her iki tüp de 1 saat süreyle karanlıkta inkübasyona bırakılırken, 15 dakikada bir tüp karıştırıcıda etkin bir şekilde karıştırıldı. Inkübasyon süresi sonunda her iki örneğe de 500'er µl % 30 (w/v) TCA eklenerek, buz üzerinde 5 dakika bekletildi. Bu süre sonunda santrifüj edilen (10, 000xg, 4°C, 10 dakika) örneklerden üst sıvı uzaklaştırıldı ve çökelti 1 ml %10'luk TCA içinde yeniden süspansiyon edildi. Buz üzerinde 10 dakika inkübasyonun ardından yeniden santrifüjlendi. Son santrifüj işlemi sonunda elde edilen çökeltiler, fazla DNPH'nin uzaklaştırılması amacıyla, 1 ml etanol-etil asetat [(1:1), (v/v)] ile iki kez yıkandı. Santrifüjleme sonunda ele geçen protein çökeltileri 1 ml 6 M guanidin-HCl (20 mM potasyum fosfat içinde hazırlanmış) içinde yeniden süspansiyon edildi. Spektrofotometrede, 360, 370, 380 ve 390 nm dalga boylarında ölçülen absorbans değerlerinin ortalaması alındı ve örneklerin karbonil içerikleri DNPH'nin bu dalga boylarındaki yaklaşık absorpsiyon katsayısı ($\epsilon=22.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) dikkate alınarak hesaplandı (Fagan ve ark., 1999). Elde edilen sonuçlar µM/mg protein birimiyle ifade edildi.

3.12.2. İmmünojenik Belirleme

Protein oksidasyonu sonucunda oluşan protein karbonillerinin saptanması için, proteine bağlanan dinitrofenilhidrazonların immünojenik olarak belirlenmesi temeline dayanan yöntem kullanıldı (Levine ve ark., 1990). Bu yöntemde, 2,4 dinitrofenilhidrazin ile reaksiyona giren karbonil grupları, poliakrilamid jel elektroforezinin ardından Western blot tekniği ile işaretlenmektedir.

Elektroforez uygulaması öncesinde her bir örnekten 5 µg alınarak 2,4-dinitrofenilhidrazin (2,4-DNPH) ile işleme sokuldu. Dinitrofenil (DNP)-protein kompleksi %10 poliakrilamid içeren SDS-PAGE (Walker, 2002) ile ayrıldıktan sonra proteinler, elektroemdirim ile nitrosellüloz membrana aktarıldı. İmmünojenik belirleme, OxyBlot kiti (Chemica) kullanılarak gerçekleştirildi. Bu amaçla önce süt tozu uygulaması ile bloke edilen membran, primer antikor (anti-DNP antikor) ile inkübasyona bırakıldı ve ardından sekonder antikor (yaban turpu peroksidazı ile işaretli konjuge antikor) uygulaması gerçekleştirildi. Karbonillenmiş proteinler “ECL Plus Western Blotting Detection Systems (Amersham)” kullanılarak röntgen filmi (Hyperfilm) üzerinde görüntülendi.

3.13. PROTEAZOM AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

S. pombe hücrelerindeki 20S proteazom aktivitesi Flood ve ark. (2005) tarafından önerilen yöntemle belirlendi. Bu yöntem, işaretli substrat süksinoil-Leu-Leu-Val-Tyr-amino-4-metilkumarin (Suc-LLVY-AMC)'in, proteazom tarafından kesilmesi sonucunda serbest kalan ve fluoresan özelliğe sahip amino-4-metilkumarin (AMC)'in belirlenmesi temeline dayanmaktadır. Serbest kalan AMC, spektrofotometrik olarak eksitasyon ve emisyon dalga boyları sırasıyla 390 nm ve 470 nm olacak şekilde saptanmaktadır.

Proteazom aktivitesinin belirlenmesi için, 50 µg protein ile 0.4 mM proteazom substratı Suc-LLVY-AMC, toplam hacmi 200 µl olan deney tamponunda (50 mM Tris, pH 7.8, 20 mM KCl, 5 mM MgOAc, 0.5 mM DTT), 37°C'da 2 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Reaksiyon, 200 µl etanol ve 1.6 ml 0.1 M sodyum borat tamponu (pH 9.0) eklenerek durduruldu. Proteazom aktivitesi sonucu oluşan AMC düzeyi, fluoresansın eksitasyon ve emisyon dalga boyları sırasıyla 380 nm ve 450 nm olacak şekilde ölçülmesi ile belirlendi. AMC düzeyleri, 0.2, 0.4, 0.8, 3.0 ve 8.0 nM AMC çözeltileriyle hazırlanan standart grafik yardımıyla belirlendi ve nM AMC/dak/mg protein birimi ile ifade edildi.

3.14. HÜCRE İÇİ PROTEİN YIKIMININ BELİRLENMESİ

Hücre içi protein yıkımının *in vitro* kantitatif analizi, fluorescaminin serbest α -amino grupları ile reaksiyona girerek yüksek floresan özellik gösteren bir ürün oluşturması temeline dayanan yöntemle gerçekleştirildi (Reinheckel ve ark., 2000).

Hücreler asitte yıkanmış cam boncuklar kullanılarak 0.25 M sukroz, 25 mM HEPES (pH 7.8), 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM DTT ve 1 mM PMSF içeren tamponda parçalandı. Hücre lizatları santrifüj edildikten (27 000xg, 4 °C, 30 dakika) sonra, protein derişimi aynı tamponla 8 mg/ml'ye ayarlandı. 50 μ l protein özütüne 450 μ l soğuk TCA (10%) eklendi ve proteinlerin çökmesi için 30 dakika buz üzerinde bekletildi. Örnekler, 3000xg hızda, 4°C'da, 10 dakika santrifüjlendikten sonra, elde edilen üst sıvının 250 μ l'si üzerine 1.25 ml 1 M HEPES tamponu (pH 7.8) katıldı. Her bir örneğe, tüp karıştırıcı üzerinde yavaş bir şekilde, 0.5 ml fluorescamine çözeltisi eklendi ve örnekler karanlıkta bekletildi. Eksitasyon dalga boyu 390 nm ve emisyon dalga boyu 475 nm'de fluoresans ölçümü yapıldı. Standart olarak 10, 5, 0.5 ve 0.25 mM derişimlerde hazırlanan glisin çözeltisi kullanıldı ve sonuçlar mM glisin eşdeğeri /mg protein şeklinde ifade edildi.

3.15. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Elde edilen sayısal data istatistiksel olarak değerlendirildi. Aritmetik ortalamalar (X) ve standart sapmalar (SD) bulundu. Gruplar arasındaki farkların anlamlı olup olmadığını belirlemek için ANOVA (tek yönlü varyans analizi; one-way ANOVA) testi ve ikili grupların kendi aralarında karşılaştırılması için Dunnett testi yapıldı. Anlamlılık sınırı olarak $P < 0.05$ kabul edildi. Bu istatistiksel işlemler GraphPad paket programı ile gerçekleştirildi.

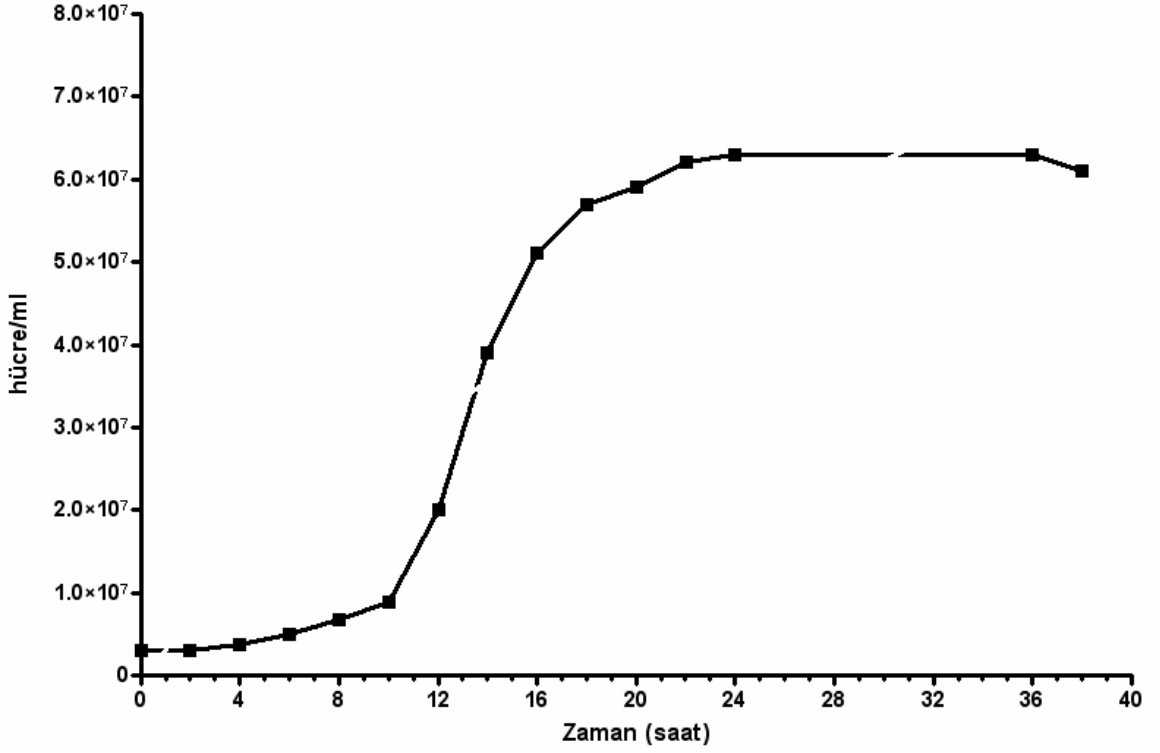
4. BULGULAR

4.1. *S. pombe* HÜCRELERİNDE ZAMANA BAĞLI ÜREME

S. pombe hücrelerinin YEL besi ortamındaki üreme durumu, Bölüm 3.4'te açıklanan yöntemle izlendi. Kültürdeki hücre sayısının zamana bağlı değişimini ifade eden OD₅₉₅ değerleri Tablo 4.1'de, bu verilere dayanarak çizilen üreme eğrisi Şekil 4.1'de verildi. Buna göre 12. saatte kültürün logaritmik fazın ortalarına yaklaştığı ve bu evrede hücre sayısının yaklaşık 2×10^7 'ye ulaştığı gözlemlendi.

Tablo 4.1: *S. pombe* yabancı ırkında zamana bağlı üremenin izlenmesi

zaman (saat)	OD ₅₉₅	hücre/ml
0	0.041	3.0×10^6
2	0.041	3.0×10^6
4	0.044	3.7×10^6
6	0.058	4.9×10^6
8	0.080	6.7×10^6
10	0.105	8.8×10^6
12	0.242	2.0×10^7
14	0.458	3.9×10^7
16	0.607	5.1×10^7
18	0.673	5.7×10^7
20	0.704	5.9×10^7
22	0.742	6.2×10^7
24	0.751	6.3×10^7
36	0.750	6.3×10^7
38	0.725	6.1×10^7



Şekil 4.1 : *S.pombe* (972h⁻) yabani ırkının üreme eğrisi

4.2. DENEY KOŞULLARINDA HÜCRE CANLILIĞININ BELİRLENMESİ

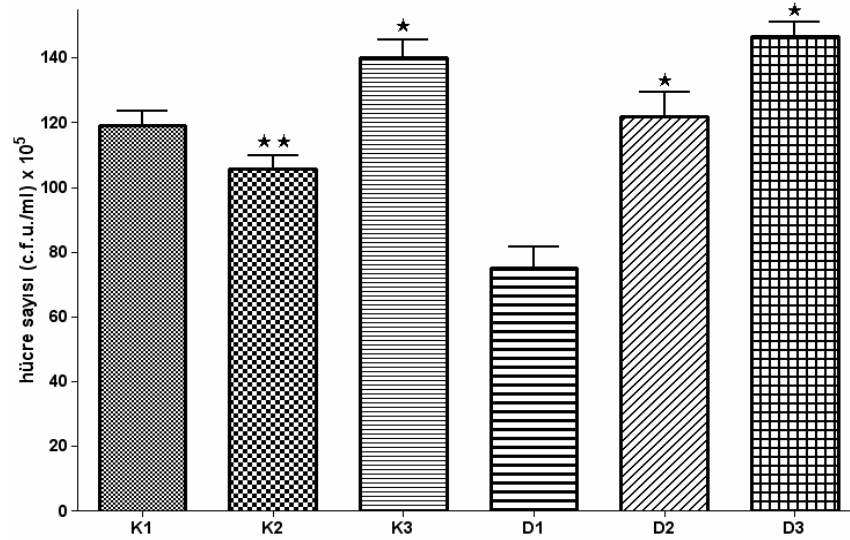
Kısa süreli (2 saat) ve uzun süreli (14 saat) Trolox uygulaması yapılmış *S. pombe* kültürlerinde, H₂O₂ (oksidatif stres) yokluğunda veya varlığında belirlenen canlı hücre sayıları (c.f.u./ml) Tablo 4.2’de verildi ve grafik üzerinde karşılaştırıldı (Şekil 4.2). Buna göre, oksidatif strese sokulmayan hücrelerde 2 saatlik Trolox uygulaması, canlı hücre sayısında kontrole göre fark yaratmadı ($P > 0.05$). Buna karşın 14 saatlik uygulama koloni sayısında yaklaşık % 18’lik bir artışa yol açtı ($P < 0.05$).

Trolox içermeyen besi ortamında üretilen ve 30 dakika süreyle 1 mM H₂O₂ etkisinde bırakılarak oksidatif strese sokulan kültürdeki (D1) canlı hücre sayısı, strese sokulmayan kültürdekinden (K1) yaklaşık %37 oranında azaldı. Kısa ve uzun süreli Trolox uygulamaları, bu grupta canlılık oranını belirgin düzeyde artırdı (Şekil 4.2) ($P < 0.01$).

Tablo 4.2 : *S. pombe* kültürlerinde canlı hücre sayıları

	Deney serileri	Canlı hücre sayısı (c.f.u./ml x 10 ⁵) ± SD*
I. Grup	K1 [- Trolox - H ₂ O ₂]	119 ± 7.94
	K2 [+ Trolox (2 saat) - H ₂ O ₂]	106 ± 7.02
	K3 [+ Trolox (14 saat) - H ₂ O ₂]	140 ± 10.00
II. Grup	D1 [- Trolox + H ₂ O ₂]	75 ± 11.36
	D2 [+ Trolox (2 saat) + H ₂ O ₂]	122 ± 13.11
	D3 [+ Trolox (14 saat) + H ₂ O ₂]	146 ± 7.64

* Bulgular en az 3 deneyin ortalamasıdır. SD: Standart Sapma

Şekil 4.2 : *S. pombe* kültürlerinde canlı hücre sayılarının karşılaştırılması

Kolonların üzerinde yer alan dikey çizgiler standart sapma ($\pm SD$) değerlerini göstermektedir. ** $P > 0.05$, * $P < 0.01$

4.3. BESİ ORTAMINDAKİ H₂O₂ DERİŞİMİ

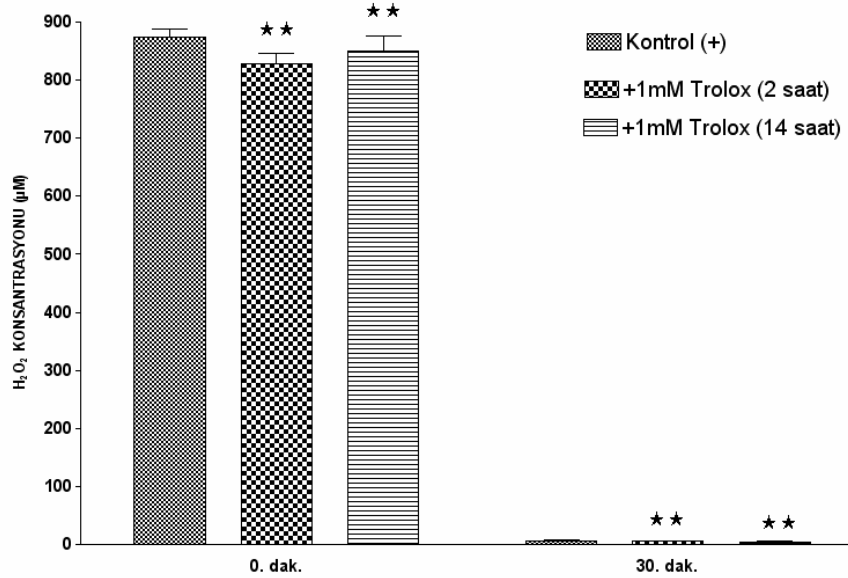
Deney grubu hücreleri (D1-D3) oksidatif strese sokmak amacıyla kültürün 14. saatinin sonunda besi ortamına katılan H₂O₂ (1 mM)'nin deney sonundaki derişim değerleri spektrofotometrik yöntemle saptandı (Tablo 4.3) ve grafik üzerinde karşılaştırıldı (Şekil

4.3). Ortama katılan H₂O₂'nin başlangıç derişimi (1000 µM), olduğu halde kullanılan yöntemle bu değer 850 µM olarak bulundu. Bu derişimin tüm gruplarda 30. dakikada ortalama 14.83 µM'a düştüğü gözlemlendi. Buna göre uygulanan H₂O₂'nin % 98.25'sinin 30 dakika sonunda hücrelere girdiği ve Trolox uygulamalarının ortamın H₂O₂ derişimini etkilemediği kabul edildi.

Tablo 4.3 : Başlangıçta ve uygulama süresi (30 dakika) sonunda besi ortamındaki H₂O₂ derişimi

Deney serileri	Başlangıç H ₂ O ₂ derişimi (µM) ± SD*	30. dakika H ₂ O ₂ derişimi (µM) ± SD*
D1	873.3 ± 25.17	17.67 ± 5.5
D2	826.7 ± 32.15	13.00 ± 2.00
D3	850.0 ± 43.59	13.83 ± 3.25

* Bulgular en az 3 deneyin ortalamasıdır. SD: Standart Sapma



Şekil 4.3. Üreme ortamındaki H₂O₂ derişimlerinin karşılaştırılması
Kolonların üzerinde yer alan dikey çizgiler standart sapma (±SD) değerlerini göstermektedir. ** P > 0.05

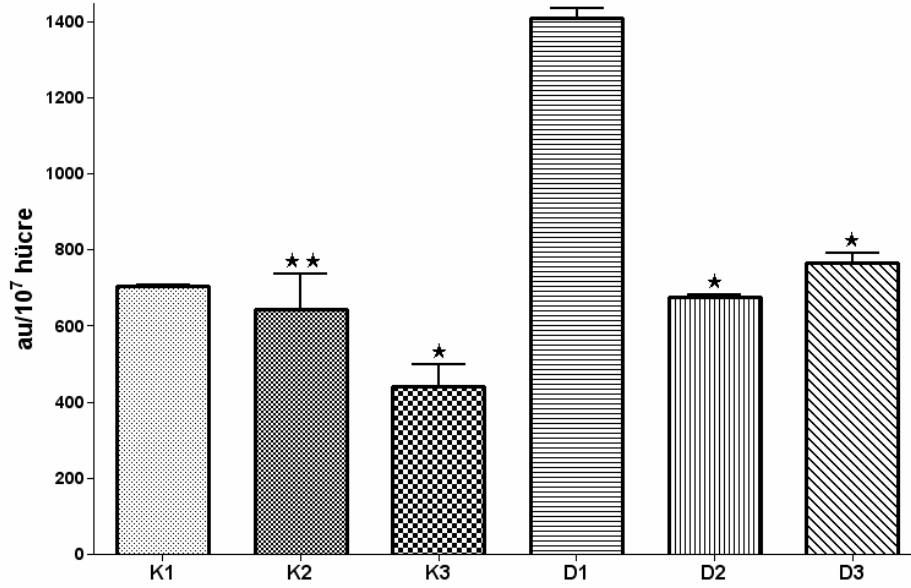
4.4. HÜCRE İÇİ OKSİDASYON DÜZEYİ

Farklı ortam koşullarında yetiştirilen hücrelerde, hücre içi oksidasyon düzeyleri, ROT'lara ait bağıl floresans yoğunluğunun ($\text{au}/10^7$ hücre) deney sonunda ölçülmesi ile belirlendi ve bulgular Tablo 4.4'te verildi. *S. pombe*'de normal metabolik faaliyetler sonucunda 10^7 hücre başına 703.5 ± 6.36 au ROT oluştuğu gözlenirken, oksidatif stres koşulunda ROT düzeyi yaklaşık 2 kat arttı (Tablo 4.4 ve Şekil 4.4). Çalışmada ele alınan her iki grup (oksidatif strese sokulmuş ve sokulmamış) hücrede Trolox'un ROT oluşumunu baskıladığı belirlendi. Oksidatif strese sokulmamış hücrelerde kısa süreli (2 saat) Trolox uygulaması anlamlı bir etki oluşturmazken, uzun süreli (14 saat) Trolox uygulaması yaklaşık % 37 oranında bir baskılama yarattı. Stres altındaki hücrelerdeki ROT üretimi, her iki Trolox uygulaması ile de belirgin düzeyde (yaklaşık % 50 oranında) azaldı ($P < 0.01$).

Tablo 4.4 : *S. pombe* hücrelerinde ROT düzeyi

	Deney serileri	Bağıl floresans ($\text{au}/10^7$ hücre) \pm SD*
I. Grup	K1 [- Trolox - H_2O_2]	703.5 ± 6.4
	K2 [+ Trolox (2 saat) - H_2O_2]	643.6 ± 132.4
	K3 [+ Trolox (14 saat) - H_2O_2]	441.5 ± 80.8
II. Grup	D1 [- Trolox + H_2O_2]	1408.0 ± 45.0
	D2 [+ Trolox (2 saat) + H_2O_2]	675.3 ± 10.3
	D3 [+ Trolox (14 saat) + H_2O_2]	766.8 ± 40.5

* Bulgular en az 3 deneyin ortalamasıdır. SD: Standart Sapma



Şekil 4.4 : *S. pombe* hücrelerinde hücre içi oksidasyon (ROT) düzeylerinin karşılaştırılması
 Kolonların üzerinde yer alan dikey çizgiler standart sapma ($\pm SD$) değerlerini göstermektedir.
 ** $P > 0.05$, * $P < 0.01$

4.5. KATALAZ AKTİVİTESİ

Normal metabolizma sırasında veya oksidatif stres koşulunda, antioksidan (Trolox) varlığında veya yokluğunda *S. pombe* hücrelerinde belirlenen katalaz aktiviteleri Tablo 4.5'te verildi. Oksidatif strese sokulmayan hücrelerdeki (K1-3) katalaz aktivitesi, genel olarak, oksidatif strese sokulan hücrelerdekine (D1-3) göre daha düşüktü. En düşük aktivite bu grupta yer alan ve Trolox uygulanmayan hücrelerde (K1) belirlendi. $\Delta A/\text{dak}/\text{mg}$ protein birimi ile ifade edilen katalaz aktivitesi 0.042 ± 0.012 olan bu grup hücrelerde, 2 ve 14 saatlik Trolox uygulamaları katalaz aktivitesinde anlamlı bir değişikliğe yol açmadı ($P > 0.05$) (Tablo 4.5 ve Şekil 4.5).

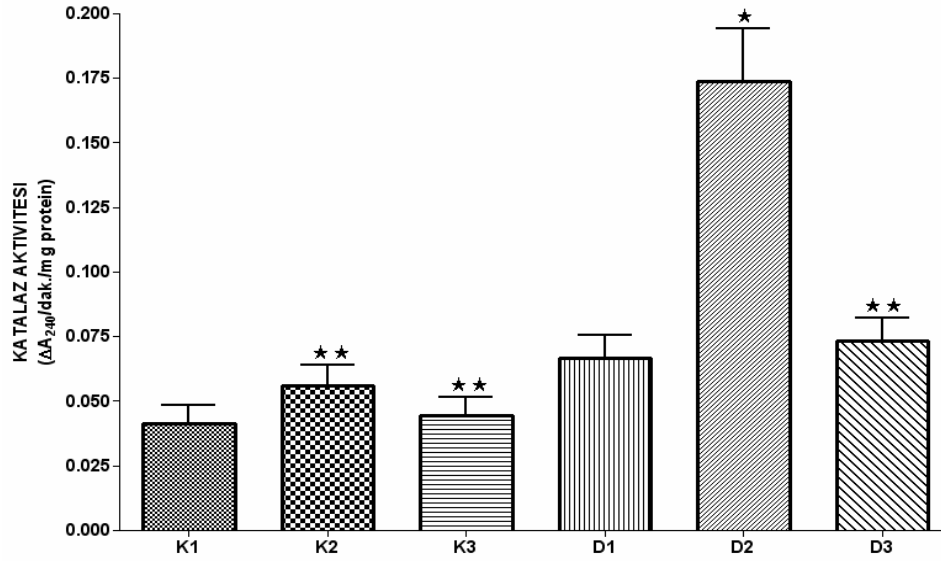
Oksidatif strese sokulan, ancak Trolox uygulanmayan hücrelerdeki (D1) katalaz aktivitesi, H_2O_2 uygulanmamış kontrol grubuna (K1) göre yaklaşık 1.5 kat yüksek bulundu. Bu grup hücrelerin Trolox ile 2 saat işleme sokulması, katalaz aktivitesini çok belirgin oranda (yaklaşık 3 kat) artırdı ($P < 0.01$); ancak uzun süreli (14 saat) uygulama aktivitede

istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmadı ($P > 0.05$) (Tablo 4.5 ve Şekil 4.5).

Tablo 4.5 : *S. pombe* hücrelerinde katalaz aktivitesi

Deney serileri	Katalaz aktivitesi ($\Delta A_{240}/\text{dak}/\text{mg protein}$) \pm SD*
K1 [- Trolox - H ₂ O ₂]	0.042 \pm 0.0121
I. Grup	
K2 [+ Trolox (2 saat) - H ₂ O ₂]	0.056 \pm 0.014
K3 [+ Trolox (14 saat) - H ₂ O ₂]	0.044 \pm 0.013
II. Grup	
D1 [- Trolox + H ₂ O ₂]	0.067 \pm 0.015
D2 [+ Trolox (2 saat) + H ₂ O ₂]	0.174 \pm 0.035
D3 [+ Trolox (14 saat) + H ₂ O ₂]	0.073 \pm 0.015

* Bulgular en az 3 deneyin ortalamasıdır. SD: Standart Sapma



Şekil 4.5 : *S. pombe* hücrelerinde katalaz aktivitelerinin karşılaştırılması
Kolonların üzerinde yer alan dikey çizgiler standart sapma (\pm SD) değerlerini göstermektedir.
** $P > 0.05$, * $P < 0.01$.

4.6. PROTEİN KARBONİLLERİ

4.6.1. Spektrofotometrik Yöntemle Belirlenmiş Protein Karbonilleri

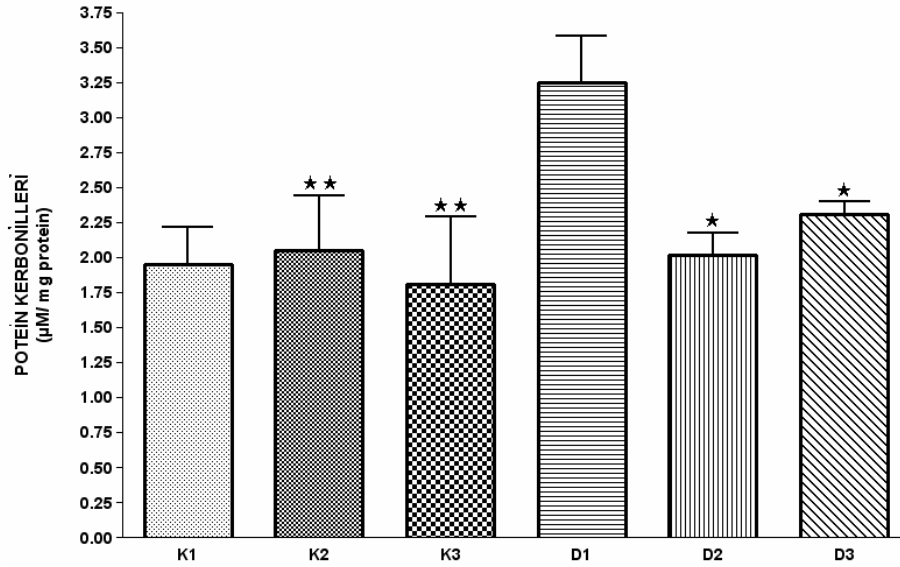
Bu çalışmada oluşturulan deney koşullarında proteinlerin oksidasyon derecelerini belirlemek amacıyla, *S. pombe* hücrelerindeki protein karbonilleri ölçüldü. Ham özütlerde gerçekleştirilen spektrofotometrik analizler sonunda elde edilen veriler Tablo 4.6 ve Şekil 4.6'da verildi. İncelenen örnekler içinde en düşük karbonil düzeyi ($1.95 \pm 0.4613 \mu\text{M}/\text{mg}$ protein) oksidatif strese sokulmamış ve Trolox uygulaması yapılmamış hücelere (K1) aitti. Bu tip hücrelerin Trolox ile 2 saat veya 14 saat şleme sokulması protein karbonil düzeyinde anlamlı bir değişikliğe yol açmadı ($P > 0.05$) (Tablo 4.6 ve Şekil 4.6).

Oksidatif strese sokulan ancak Trolox uygulanmayan hücrelerdeki (D1) protein karbonil düzeyi, stres altında olmayan normal hücrelerdekinden (K1) belirgin oranda (yaklaşık 1.6 kat) yüksekti. 2 saat Trolox uygulaması (D2) bu değeri, normal hücrelerdeki düzeye indirdi. 14 saat Trolox uygulaması (D3) ise protein karbonil düzeyinde, 2 saatlik uygulama kadar olmasa bile, anlamlı bir düşüş sağladı (Tablo 4.6 ve Şekil 4.6).

Tablo 4.6 : *S. pombe* hücrelerinde protein karbonil miktarı

	Deney serileri	Protein karbonilleri ($\mu\text{M}/\text{mg}$ protein) \pm SD*
I. Grup	K1 [- Trolox - H ₂ O ₂]	1.95 \pm 0.46
	K2 [+ Trolox (2 saat) - H ₂ O ₂]	2.05 \pm 0.68
	K3 [+ Trolox (14 saat) - H ₂ O ₂]	1.81 \pm 0.84
II. Grup	D1 [- Trolox + H ₂ O ₂]	3.25 \pm 0.56
	D2 [+ Trolox (2 saat) + H ₂ O ₂]	2.02 \pm 0.28
	D3 [+ Trolox (14 saat) + H ₂ O ₂]	2.31 \pm 0.16

* Bulgular en az 3 deneyin ortalamasıdır. SD: Standart Sapma



Şekil 4.6 : *S. pombe* hücrelerinde protein karbonil miktarlarının karşılaştırılması
Kolonların üzerinde yer alan dikey çizgiler standart sapma ($\pm SD$) değerlerini göstermektedir. ** $P > 0.05$, * $P < 0.05$

4.6.2. İmmunolojik Yöntemle Belirlenmiş Protein Karbonilleri

S. pombe hücrelerindeki protein oksidasyonunun göstergesi olan protein karbonilleri, SDS-PAGE ve “Western blotting” işlemlerinin ardından immunolojik olarak işaretlendi. İncelenen tüm hücrelerdeki (K1-3 ve D1-3) total suda çözünür proteinler, % 10 akrilamid içeren SDS jellerde, gümüş nitrat ile boyanarak, oksidatif hasara uğramış (karbonillenmiş) proteinler ise nitroselüloz membrana aktarıldıktan sonra OxyBlot kiti kullanılarak film üzerinde saptandı (Şekil 4.7).

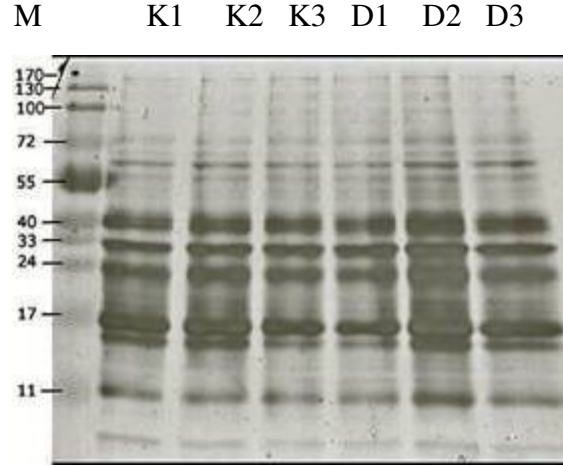
Deney ve kontrol hücrelerinden izole edilen total suda çözünür proteinler, uygulanan elektroforez koşullarında birbirine benzer dağılım gösterdi (Şekil 4.7A). Tüm örnekler için jelde saptanan proteinlerin molekül ağırlıklarının 11-170 kDa arasında değiştiği belirlendi.

Protein karbonillerinin dağılımında ise nitel açıdan belirgin farklar olduğu gözlemlendi (Şekil 4.7 B). I.Grupta yer alan oksidatif strese sokulmamış *S. pombe* hücrelerinin 2 saat veya 14

saat Trolox ile işleme sokulması proteinlerin uğradığı oksidatif hasarı azaltmadı.

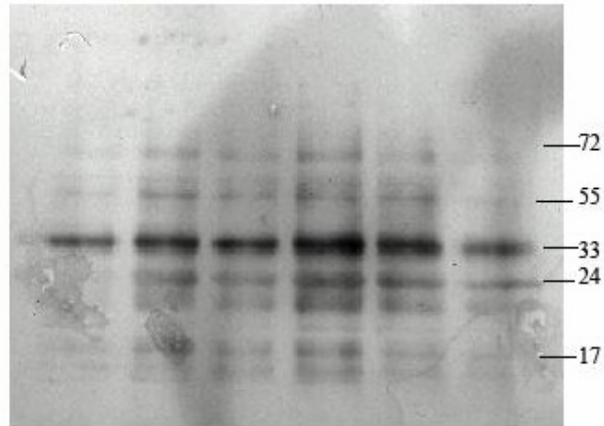
II. Grupta yer alan oksidatif stres altındaki hücrelerde ise Trolox uygulaması, protein karbonil miktarını gözle görülür oranda azalttı. Protein karbonillerinin oluşumunu baskılama açısından, 14 saatlik Trolox uygulaması 2 saatlik uygulamaya göre daha etkindi.

(A)



(B)

K1 K2 K3 D1 D2 D3 M



Şekil 4.7 : *S. pombe* hücrelerinde total suda çözümlü protein profillerini gösteren jel (A) ve oksitlenmiş (karbonillenmiş) proteinlerin saptandığı film (B) görüntüleri

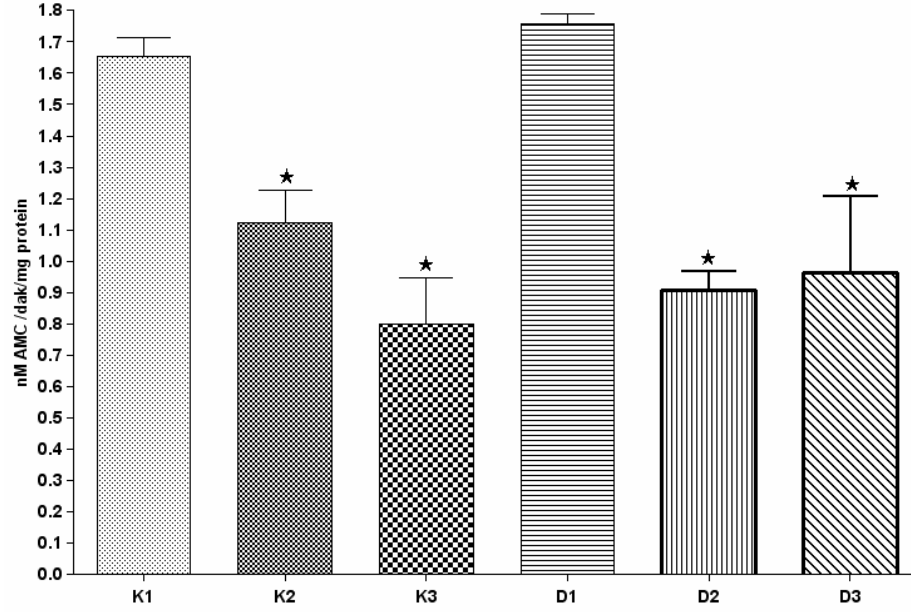
4.7. PROTEAZOM AKTİVİTESİ

Hasarlı proteinlerin ortadan kaldırılmasında iş gören proteazom aygıtının işleyişi hakkında bilgi edinmek amacıyla *S. pombe* hücrelerinde fluorometrik olarak saptanan bağıl proteazom aktiviteleri (nM/dak/mg protein) Tablo 4.7’de verildi ve bu değerler Şekil 4.7’deki grafik üzerinde karşılaştırıldı. Oksidatif strese sokulmayan ve Trolox uygulanmayan *S. pombe* hücrelerinde (K1), 1.65 ± 0.11 düzeyinde 20S proteozom aktivitesi saptandı. Trolox uygulanmayan, ancak oksidatif strese sokulan hücrelerdeki (D1) proteozom aktivitesi de buna yakın bir değerde (1.756 ± 0.05469) idi. Trolox uygulamaları gerek normal metabolizma sürecinde, gerekse oksidatif strese sokulmuş hücrelerde proteazom aktivitesini belirgin düzeyde düşürdü. Stres altındaki hücrelerde 2 ve 14 saatlik antioksidan uygulaması proteazom aktivitesinde yaklaşık %50’lik bir düşüşe yol açarken, normal metabolizmada 14 saatlik Trolox uygulaması bu etkiyi gösterdi.

Tablo 4.7 : *S. pombe* hücrelerinde 20S proteazom aktivitesi

	Deney serileri	Bağıl proteazom aktivitesi (nM AMC eşdeğeri/dak/mg protein) \pm SD*
I. Grup	K1 [- Trolox - H ₂ O ₂]	1.65 ± 0.11
	K2 [+ Trolox (2 saat) - H ₂ O ₂]	1.12 ± 0.18
	K3 [+ Trolox (14 saat) - H ₂ O ₂]	0.80 ± 0.25
II. Grup	D1 [- Trolox + H ₂ O ₂]	1.76 ± 0.055
	D2 [+ Trolox (2 saat) + H ₂ O ₂]	0.91 ± 0.11
	D3 [+ Trolox (14 saat) + H ₂ O ₂]	0.96 ± 0.42

* Bulgular en az 3 deneyin ortalamasıdır. SD: Standart Sapma



Şekil 4.8 : *S. pombe* hücrelerinde proteazom aktivitelerinin karşılaştırılması
Kolonların üzerinde yer alan dikey çizgiler standart sapma ($\pm SD$) değerlerini göstermektedir. * $P < 0.05$

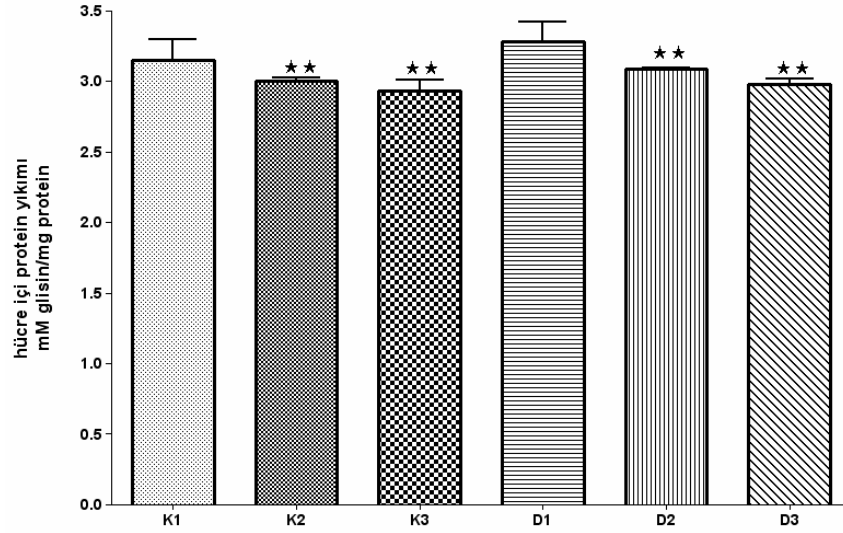
4.8. HÜCRE İÇİ PROTEİN YIKIMI

S. pombe hücrelerinde yıkıma uğrayan proteinlerin düzeyini karşılaştırmak amacıyla uygulanan deneyler sonucunda elde edilen hücre içi protein yıkımı değerleri (mM/mg protein) Tablo 4.8.'de verildi ve bu değerler Şekil 4.9.'deki grafik üzerinde karşılaştırıldı. Test edilen tüm örneklerde hücre içi protein yıkımının birbirine çok yakın düzeyde (ortalama 3.072 mM glisin eşdeğeri/mg protein) gerçekleştiği belirlendi. Bu çalışmada seçilen Trolox uygulamaları, hücre içi protein yıkımı üzerinde anlamlı bir etki yaratmadı.

Tablo 4.8 : *S. pombe*'de hücre içi protein yıkımı

	Deney serileri	hücre içi protein yıkımı (mM glisin eşdeğeri/mg protein) \pm SD*
I. Grup	K1 [- Trolox - H ₂ O ₂]	3.15 \pm 0.26
	K2 [+ Trolox (2 saat) - H ₂ O ₂]	3.00 \pm 0.04
	K3 [+ Trolox (14 saat) - H ₂ O ₂]	2.93 \pm 0.14
II. Grup	D1 [- Trolox + H ₂ O ₂]	3.28 \pm 0.25
	D2 [+ Trolox (2 saat) + H ₂ O ₂]	3.08 \pm 0.02
	D3 [+ Trolox (14 saat) + H ₂ O ₂]	2.98 \pm 0.06

* Bulgular en az 3 deneyin ortalamasıdır. SD: Standart Sapma



Şekil 4.9 : *S. pombe* kültürlerinde hücre içi protein yıkım değerlerinin karşılaştırılması
Kolonların üzerinde yer alan dikey çizgiler standart sapma (\pm SD) değerlerini göstermektedir. ** $P > 0.05$.

5.TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışma, *S. pombe*'de normal metabolizma ve oksidatif stres koşullarında proteinlerin oksidasyon düzeyini belirlemek ve E vitamininin suda çözünen türevi Trolox'un protein oksidasyonuna karşı koruyucu etkilerini araştırmak amacıyla gerçekleştirildi.

Çalışmalar üçer alt grup içeren iki büyük grup üzerinde yürütüldü. Birinci grup hücreler sadece besi ortamı ve değişik sürelerle (2 ve 14 saat) 1 mM Trolox içeren besi ortamlarında üretildi. İkinci grup hücreler ise 30 dakika süreyle besi ortamına uygulanan 1 mM H₂O₂ ile oksidatif strese sokuldu. Bu grupta da 2 ve 14 saat Trolox uygulanan alt gruplar oluşturuldu.

Oksidatif stres etmeni H₂O₂'nin dozu, benzer çalışmalarda (Cabiscol ve ark., 2000; Costa ve ark., 2002; Pekmez, 2004) önerilen farklı dozlar ve süreler denendikten sonra seçildi. Besi ortamına farklı sürelerle uygulanan 0.2-5.0 mM H₂O₂ ile yapılan ön denemelerden sonra 30 dakika 1 mM H₂O₂ uygulamasının çalışma için elverişli olduğuna karar verildi.

Pro-oksidan ve genotoksik özellik taşımayan Trolox'un, hücre içi ROT oluşumuna karşı terapötik bir ajan olarak kullanılabileceği öne sürülmektedir (Raspor ark., 2005). *S. pombe*'de antioksidan-koruyucu etkisi araştırılan Trolox'un hücreler üzerinde toksik olmayan dozunu belirlemek amacıyla, benzer çalışmalardan (Polsak ve ark., 2006) da yararlanarak, 0.005-1 mM derişimdeki çözeltilerle ön denemeler yürütüldü. En uygun Trolox derişiminin 1mM olduğu belirlendikten sonra, kısa (2 saat) ve uzun (14 saat) olmak üzere iki farklı uygulama süresinin denenmesine karar verildi. Farklı uygulama süreleri, hücre canlılığı üzerinde farklı etkiler yarattı. Hücre dışı oksidatif stres yokken (normal metabolizma sırasında) Trolox uygulaması ancak uzun süreli (14 saat) yapıldığında canlı hücre sayısında küçük (yaklaşık %18'lık) bir artışa yol açarken, stres koşulunda kısa süreli (2 saatlik) uygulama yaklaşık %63'lik, uzun süreli (14 saatlik) uygulama yaklaşık % 95'lik bir artış sağladı.

Hücre sayılarındaki bu farklılık, a) H_2O_2 taşınmasındaki değişim, b) H_2O_2 'nin hücre içine girmeden Trolox'un *in vitro* süpürücü aktivitesi ile veya başka bir etkiyle bozunması, c) katalaz indüksiyonu ve/veya d) Trolox'un *in vivo* süpürücü etkisinden kaynaklanabilir. Bu olasılıklardan ilk ikisini araştırmak için besi ortamındaki H_2O_2 derişimleri ölçüldü.

Başlangıçta besi ortamına 1 mM (1000 μ M) derişimde eklenen H_2O_2 'nin ne kadarının hücreler tarafından alındığını saptamak üzere, deney sonunda aynı ortamda H_2O_2 derişimi belirlendi. Teorik olarak 1000 μ M olan başlangıç derişimi, besi ortamındaki bileşenlerle etkileşim, bozunma ve yöntemin duyarlılığı gibi faktörlerin etkisiyle pratikte 850 μ M olarak bulundu. Deney sonunda tüm hücrelerde ortalama 14.83 μ M'a düşen bu değer, uygulama sırasında H_2O_2 'nin yaklaşık % 98.25'sinin hücreler tarafından alındığını işaret etti. Farklı sürelerde Trolox uygulanan hücreler için de benzer sonuçların elde edilmesi Trolox'un H_2O_2 alımı üzerinde herhangi bir etkisi olmadığını göstermektedir. Bu çalışmada 30 dakikalık uygulama canlı hücre sayısının yaklaşık % 36 oranında düşmesine yol açtı. Bu sonuçlara göre, Trolox'un koruyucu etkisinin H_2O_2 taşınmasındaki değişimden ve/veya *in vitro* süpürücü aktiviteden kaynaklanmadığı anlaşıldı.

Deney ve kontrol gruplarındaki canlı hücre sayılarının değişmesine yol açabilecek üçüncü olasılık, H_2O_2 'nin ortadan kaldırılmasında iş gören katalaz enziminin Trolox tarafından indüklemesidir. Bu olasılığı test etmek için tüm hücre gruplarında katalaz aktivitesi tayin edildi.

Oksidatif strese sokulmayan ($-H_2O_2$) hücrelerde katalaz aktivitesi oldukça düşüktü. Trolox uygulamaları katalaz aktivitesinde anlamlı bir fark yaratmadı. Bu grup hücreler için katalaz aktivitesi ortalama 0.047 ($\Delta A_{240}/\text{dak}/\text{mg}$ protein) idi. Glukoz içeren besi ortamlarında SOD, katalaz ve peroksidaz gibi antioksidan enzim aktivitelerinin çok düşük olduğu bilinmektedir. Bunun nedeni glukozun söz konusu enzimleri şifreleyen genler üzerindeki baskılayıcı etkisidir (Costa ve Moradas-Ferreira, 2001).

Oksidatif strese sokulmuş (+H₂O₂) hücrelerde ise katalaz aktivitesi % 59.5 arttı. Bu grupta Trolox, katalaz aktivitesini şaşırtıcı bir şekilde etkiledi. 2 saatlik Trolox uygulaması katalaz aktivitesini yaklaşık 2.5 kat artırırken, 14 saatlik uygulama hemen hiç bir değişikliğe yol açmadı. Benzer bir sonuç Susa ve ark. (1996)'nın sıçan hepatositlerinde yaptıkları çalışmada da elde edilmiştir. Bu çalışmada Cr(VI) ile indüklenen oksidatif stres koşulunda 20 saat süreyle uygulanan 0.5 mM E vitamininin süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidazı içeren antioksidan enzim aktiviteleri ve indirgenmiş glutatyon düzeyi üzerinde etkili olmadığını bulunmuştur. Uzun süreli Trolox uygulamaları, katalaz gibi antioksidan enzim aktivitelerinin normal düzeye inmesine yol açıyor olabilir.

E vitamininin hem biyosentezi üzerine düzenleyici etki gösterdiği ve katalaz enzimi ile E vitamini düzeyi arasındaki ilişki olduğu hayvan deneyleriyle ortaya konulmuştur (Nair, 1972). Katalaz aktivitesinin düşük olması, hücre içi H₂O₂ düzeyinin de düşük olduğunu gösterir. Bu çalışmada da, hücrelere 2 saat Trolox ile işlemden sonra H₂O₂ uygulanması, katalaz aktivitesinde ani bir yükselişe yol açtı. 14 saat gibi uzun bir süre Trolox ile işlemin ardından H₂O₂ uygulanması katalaz aktivitesinde anlamlı bir artışa yol açmadı. Bunun nedeni H₂O₂ ve bozunma ürünlerinin Trolox tarafından *in vivo* süpürülmesi olabilir. Bunu ortaya koymak için hücre içi ROT düzeyleri karşılaştırıldı. *In vivo* ve *ex vivo* oksidatif stresin en önemli göstergelerinden biri hücre içi ROT düzeyinin yükselmesidir. Bu parametre antoksidan aktivite testlerinde de geniş kullanım alanı bulur (Okai ve ark., 2000), çünkü antioksidan maddeler doğrudan ROT'ları ortadan kaldıracak bir etki gösterebilir. Bu çalışmada da farklı oksidatif stres koşullarındaki *S. pombe* hücrelerinde hücre içi ROT düzeyleri belirlenerek karşılaştırıldı ve Trolox'un ROT'lar üzerindeki etkisi değerlendirildi.

H₂O₂ uygulaması hücrelerdeki ROT düzeyini yaklaşık 2 kat artırdı. 2 saat Trolox uygulaması normal hücre metabolizması sırasında ortaya çıkan ROT'ları baskılamazken, 14 saatlik uygulama, ROT düzeyinde % 37.2'lik bir düşüş sağladı. Oksidatif strese sokulmuş hücrelerde bu etki çok daha belirgindi. Bu örneklerde kısa ve uzun süreli uygulama % 49'luk bir azalma sağladı. Bu bulgu, Peus ve ark. (2001)'nin insan keratinositleriyle yaptıkları bir çalışmada elde ettikleri sonuçlarla uyumludur. Trolox hücre

içi ROT oluşumunu doza bağlı şekilde azaltmaktadır. Bu çalışmada ise, aynı doz (1 mM) farklı sürelerde uygulandı. Stres koşulunda kısa süreli uygulamanın daha etkin olduğu görüldü.

Normal metabolizma sürecinde ROT'ların oluşumunu azaltan Trolox'un biyomoleküllerin uğrayacağı hasarı da azaltması beklenir. Bu çalışmada proteinlerin uğrayacağı hasarların göstergesi olarak protein karbonilleri kullanıldı. Protein karbonilleri çok çeşitli mekanizmalar sonucunda ortaya çıkar ve oksidatif hasarı saptamada duyarlı bir markır olarak geniş çapta kullanılır (Dalle-Donne ve ark., 2003)

Normal metabolik faaliyetler sırasında meydana gelen protein hasarı Trolox uygulamasından etkilenmedi. Her üç alt grupta da (K1, K2 ve K3) protein karbonil düzeyi birbirine yakın (ortalama 1.94 $\mu\text{M}/\text{mg}$ protein) bulundu.

Oksidatif stres uygulaması, protein karbonillenmesini % 66.6 oranında artırdı. 2 ve 14 saatlik Trolox uygulamaları, H_2O_2 ile indüklenen protein hasarlarını benzer oranda (yaklaşık % 33) azalttı.

Cabiscol ve ark. (2000), *S. cerevisiae*'de oksidatif stresin spesifik olarak protein hasarına (protein karbonilleri) neden olduğunu göstermişlerdir. H_2O_2 veya menadion uygulaması ile oksidatif strese sokulan *S. cerevisiae*'de karbonillenen esas hedef proteinler mitokondriyel piruvat dehidrogenaz ile gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz, fosfogliserat mutaz, trioz fosfat izomeraz ve piruvat dehidrogenaz gibi sitozolik proteinlerdir. Bu proteinlerin yaklaşık teorik molekül ağırlıkları piruvat dehidrogenaz için 32.116, gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz için 31.954, trioz fosfat izomeraz için 23.175, fosfogliserat mutaz için 25.969 kDa'dır (Sanchez ve ark., 1996). Bu çalışmada SDS-PAGE'yi takiben Western emdirimi yöntemiyle saptanan protein karbonillerinin molekül ağırlıklarının 17-33 kDa arasında olduğu belirlendi. Molekül ağırlıkları 17 ve 24 olanlarda karbonillenme 14 saat Trolox uygulaması ile belirgin şekilde azaldı.

S. cerevisiae'de oksidatif hasara uğramış (karbonillenmiş) proteinlerin yıkımında esas olarak 20S proteazom'un görevli olduğu bilinmektedir (Inai ve Nishikimi, 2002). *S. pombe*'de bu konu ile ilgili bir çalışmaya rastlanmadı. *S. pombe* hücrelerine uygulanan oksidatif stresin proteazomal aktiviteyi nasıl etkilediği ve bu aktivitenin Trolox ile nasıl değiştiği ilk kez bu çalışmada incelendi. Protein karbonil düzeyinin nispeten düşük ($1.95 \pm 0.46 \mu\text{M}/\text{mg}$ protein) olduğu, H_2O_2 uygulanmamış hücrelerdeki (K1) proteazomal aktivitenin, karbonil düzeyinin yüksek ($3.25 \pm 0.56 \mu\text{M}/\text{mg}$ protein) olduğu, H_2O_2 ile oksidatif strese sokulmuş, fakat Trolox uygulanmamış grup (D1) ile hemen hemen aynı çıkması, sadece hücre içi stresin söz konusu olduğu durumlarda (örneğin, buradaki K1 hücrelerinde) proteazomun ortadan kaldırdığı hasarlı proteinlerin karbonillenme dışında modifikasyonlar taşıyabileceğini düşündürdü. Proteazomal aktivitenin sağlıklı bir şekilde irdelenebilmesi için karbonillenme dışındaki protein hasarlarının da incelenmesi gerektiği sonucuna varıldı. Trolox uygulanmış örneklerde hem protein karbonilleri hem de proteazom aktiviteleri düşük çıktı. Bu durum protein karbonillerinin proteazomal aktivite ile ortadan kaldırılmadığını göstermektedir.

Bu çalışmada seçilen yöntemle Trolox'un hücre içi protein yıkımı ile ilişkisi ortaya konulamadı. Trolox'un proteazom indüksiyonundan çok hücre içi radikal süpürücü aktivitesiyle etkili olduğu sonucuna varıldı.

Sonuç olarak

- Trolox, hücre içi ROT düzeyini düşürerek, enzimatik antioksidanlardan katalazın aktivitesini artırarak ve protein karbonillerini ortadan kaldırarak, *S. pombe* hücrelerini H₂O₂ tarafından indüklenen oksidatif hasara karşı etkin bir şekilde korumaktadır. Protein karbonil düzeyindeki düşüş, 20S proteazom aktivasyonu ile ilişkili gözükmemektedir.
- Normal metabolizma sırasında Trolox tarafından oluşturulan koruyucu etki, H₂O₂ taşınmasındaki değişim, *in vitro* süpürücü aktivite veya katalaz etkisinden çok artan hücre içi süpürücü aktiviteden kaynaklanmaktadır.
- Bu çalışma, memeli hücreleri için iyi bir model sistem olan *S. pombe*'de Trolox'un, *ex vivo* H₂O₂ etkisiyle oluşturulan oksidatif protein hasarlarına karşı etkin bir süpürücü ve koruyucu olarak iş gördüğünü ortaya koymuştur. Elde edilen veriler, insanlar tarafından antioksidan olarak kullanılan E vitamininin suda çözünen türevi Trolox'un etki mekanizmalarının aydınlatılmasına katkıda bulunacaktır.

KAYNAKLAR

- ADAMS, M.W., JENNEY, E.F.JR., CLAY, M.D., JOHNSON M.K., 2002, Superoxide reductase: fact or fiction?, *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 7 (6), 647–652.
- AEBI, H. (1974) Catalase. Bergmeyer, H. U. eds. *Methods of Enzymatic Analysis* 2nd ed. 1974:673-684 Verlag Chemie Weinheim, Germany.
- AW, T.Y., 1998, Determinants of intestinal detoxification of lipid hydroperoxides, *Free Radical Research*, 28 (6), 637–646.
- AYALA, A., CUTLER, R.G., 1996, The utilization of 5-hydroxyl-2-amino valeric acid as a specific marker of oxidized arginine and proline residues in proteins. *Free Radical in Biology & Medicine*, 21 (1), 65–80.
- BABIOR, B.M., 2000, Phagocytes and oxidative stress, *American Journal of Medicine*, 109 (1), 33–44.
- BEKMAN, K.B., AMES B.N., 1998. The free radical theory of aging matures. *Physiological Reviews*, 78 (2), 547-581.
- BERLETT B.S., STADTMAN E.R., 1997, Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 272(33), 20313–20316.
- BERLETT, B.S., LEVINE, R.L., STADTMAN, E.R., 1996, Comparison of the effects of ozone on the modification of amino acid residues in glutamine synthetase and bovine serum albumin, *Journal of Biological Chemistry*, 271 (8), 4177–4182.
- BLOUNT, B.C., DUNCAN, M.W., 1997, Trace quantification of the oxidative damage products, meta and ortho-tyrosine, in biological sample by gas Chromatography-electron capture negative ionization mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 244 (2), 270-276.
- BUSS, H., CHAN, T.P., SLUIS. K.B., DOMIGAN N.M., WINTERBOURN C.C., 1997, Protein carbonyl measurement by sensitive ELISA method, *Free Radical in Biology & Medicine*, 23 (3), 361–366.
- BUTTERFIELD, L.H., MERINO, A., GOLUB, S.H., SHAU, H., 1999, From cytoprotection to tumor suppression: the multifactorial role of peroxiredoxins. *Antioxidants and redox signaling*, 1 (4), 385–402.
- CABISCOL E., LEVINE, R.L., 1995, Carbonic anhydrase III. Oxidative modification in vivo and loss of phosphatase activity during aging, *Journal of Biological Chemistry*, 270 (24), 14742– 14747.

- CABISCOL, E., PIULATS, E., ECHAVE, P., HERRERO, E., ROS, J., 2000, Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Biological Chemistry*, 275 (35), 27393-8.
- CADENAS, E., 1989, Biochemistry of oxygen toxicity, *Annual Review of Biochemistry*, 58, 79-110.
- CANDEIAS, L.P., PATEL, K.B., STRATFORD M.R., WARDMAN P., 1993, Free hydroxyl radicals are formed on reaction between neutrophil-derived species superoxide anion and hypochlorous acid, *FEBS Letters*, 333 (1-2), 151-153.
- CANDEIAS, L.P., STRAFFORD, M.R., WARDMAN, P., 1994, Formation of hydroxyl radicals on reaction of hypochlorous acid with ferrocyanide, a model iron (II) complex, *Free Radical Research*, 20 (4), 241-249.
- CARNEY, J.M., STARKE-REED, P.E., OLIVER, C.N., LANDUM, R.W., CHENG, M. S., WU, J.F., FLOYD, R.A., 1991, Reversal of age-related increase in brain protein oxidation, decrease in enzyme activity, and loss in temporal and spatial memory by chronic administration of the spin-trapping compound N-tert-butyl-a-phenylnitron, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88 (9), 3633-3636.
- CARP, H., MILLER, F., HOIDAL, J.R., JANOFF, A., 1982, Potential mechanism of emphysema: Alpha 1-proteinase inhibitor recovered from lungs of cigarette smokers contains oxidized methionine and has decreased elastase inhibitory capacity, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79 (6), 2041-2045.
- CARR, A.C., WINTERBOURN, C.C., 1997, Oxidation of neutrophil glutathione and protein thiols by myeloperoxidase-derived hypochlorous acid. *Biochemical Journal*, 327 (1), 275-281.
- CHAE, H.Z., KANG, S.W., RHEE, S.G., 1999, Isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in presence of thioredoxin. *Methods in Enzymology*, 300, 219-226.
- CHEN, J.J., BERTRAND, H., YU, B.P., 1995, Inhibition of adenine nucleotide translocator by lipid peroxidation products, *Free Radical in Biology & Medicine*, 19 (5), 583-590.
- CHO, Y.W., PARK, E.H., LIM, C.J., 2000, Catalase, glutathione S-transferase and thioltransferase respond differently to oxidative stress in *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 33 (4), 344-348.
- CHUBATSU LS, MENEGHINI R. 1993, Metallothionein protects DNA from oxidative damage, *Biochemical Journal*, 291 (1), 193-8.

- CIECHANOVER, A., 1998, The ubiquitin–proteasome pathway: on protein death and cell life, *EMBO Journal*, 17 (24), 7151–7160.
- COSTA, V., MORADAS-FERREIRA, P., 2001, Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Molecular Aspects of Medicine*, 22 (4–5), 217–246.
- COSTA, V.M., AMORIM, M.A., QUNITANILHA, A., MODORAS-FERRERIA, P., 2002, Hydrogen peroxide-induced carbonylation of key metabolic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*: the involvement of the oxidative stress response regulators Yap1 and Skn7, *Free Radical in Biology & Medicine*, 33 (11), 1507–1515.
- DALLE-DONNE, I., ROSSI, R., GIUSTARINI, D., MILZANI, A., COLOMBO, R., 2003, Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress, *Clinica Chimica Acta*, 329 (1-2), 23–38.
- DAVIES, K.J., 2001, Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. *Biochimie*, 83 (3–4), 301–310.
- DAVIES, K.J., DELSIGNORE, M.E., 1987, Protein damage and degradation by oxygen radicals. III. Modification of secondary and tertiary structure, *Journal of Biological Chemistry*, 262 (20), 9908–9913.
- EISERICH, J.P., VAN DER VLIET, A., HANDELMAN, G.J., HALLIWELL, B., CROSS, C.E., 1995, Dietary antioxidants and cigarette smoke-induced biomolecular damage: A complex interaction, *American Journal of Clinical Nutrition*, 62 (6), 1490S–1500S.
- ERNSTER, L., FORSMARK, P., NORDENBRAND, K., 1992, The mode of action of lipid-soluble antioxidants in biological membranes: relationship between the effects of ubiquinol and vitamin E as inhibitors of lipid peroxidation in submitochondrial particles, *Biofactors*, 3 (4), 241–248.
- ESTERBAUER, H., STRIEGL, G., PUHL, H., ROTHENEDER, M., 1989, Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein, *Free Radical Research Communication*, 6 (1), 67–75.
- FAGAN, J.M., SLECZKA, B.G., SOHAR, I., 1999, Quantitation of oxidative damage to tissue proteins, *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 31 (7), 751–757.
- FLOOD, F., MURPHY, S., COWBURN, R.F., LANNFELT, L., WALKER, B., JOHNSTON, J.A., 2005, Proteasome-mediated effects on amyloid precursor protein processing at the γ -secretase site *Biochemical Journal*, 385 (2), 545–550.

- FORSBURG, L.S., RHIND, N., 2006, Basic methods for fission yeast. *Yeast*, 23 (3), 173–183.
- FORSTROM, J.W., STULTS, F.H., TAPPEL, A.L., 1979, Rat liver cytosolic glutathione peroxidase: reactivity with linoleic acid hydroperoxide and cumene hydroperoxide. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 193 (1), 51–55.
- FREI B, KIM C.M., AMES N.B., 1990, Ubiquinol-10 is an effective lipid-soluble antioxidant at physiological concentrations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87 (12), 4879–4883.
- FRIDOVICH, I., 1995, Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry*, 64, 97–112.
- FRIDOVICH, I., 1997, Superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$), superoxide dismutases, and related matters. *Journal of Biological Chemistry*, 272 (30), 18515–18517.
- FU, S., DEAN, R., SOUTHAN, M., TRUSCOTT. R., 1998, The hydroxyl radical in lens nuclear cataractogenesis, *Journal of Biological Chemistry*, 273 (44), 28603–28609.
- FUCCI, L., OLIVER, C.N., COON, M.J., STADTMAN, E.R., 1983, Inactivation of key metabolic enzymes by mixed-function oxidation reactions: Possible implication in protein turnover and ageing, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80 (6), 1521–1525.
- GARRISON, W.M., JAYKO, M.E., BENNETT, W., 1962, Radiation-induced oxidation of protein in aqueous solution, *Radiation Research*, 16, 483–502.
- GAY, C., COLLINS, J., GEBICKI, J.M., 1999, Hydroperoxide assay with the ferric-xylenol orange complex, *Analytical Biochemistry*, 273, (2), 149-155.
- GIULIVI, C., DAVIES, K.J., 1994, Dityrosine: a marker for oxidatively modified proteins and selective proteolysis. *Methods in enzymology*, 233, 363–371.
- GUTZ, H., HESLOT, H., LEUPOLD, U., LOPRIENO, N., 1974, *Handbook of Genetics*. Plenum press, 1–395–446.
- HALLIWELL B. 1996, Antioxidants in human health and disease, *Annual Review of Nutrition*, 16, 33–50.
- HALLIWELL, B. and GUTTERIDGE J.M.C., 2003, *Free Radicals in Biology And Medicine*, 3rd ed: Oxford University Press.
- HALLIWELL, B., 1997, Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutrition Review*, 55, 44–49.

- HALLIWELL, B., 1999, Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radical Research*, 31 (4), 261–272.
- HANDELMAN, G.J., NIGHTINGALE, Z.D., DOLNIKOWSKI, G.G., BLUMBERG, J. B., 1998, Formation of carbonyls during attack on insulin by submolar amounts of hypochlorite, *Analytical biochemistry*, 258 (2), 339–348.
- HARTLEY, D.P., KROLL, D.J., PETERSEN, D.R., 1997, Prooxidant-initiated lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes: Detection of 4-hydroxynonenal- and malondialdehyde- protein adducts, *Chemical Research in Toxicology*, 10 (8), 895–905.
- HAZELL, L.J., ARNOLD, L., FLOWERS, D., WAEG, G., MALLE, E., STOCKER, R., 1996, Presence of hypochlorite-modified proteins in human atherosclerotic lesions, *Journal of Clinical Investigation*, 97 (6), 1535–1544.
- HAZELL, L.J., VAN DEN BERG, J.J., STOCKER, R., 1994, Oxidation of low-density lipoprotein by hypochlorite causes aggregation that is mediated by modification of lysine residues rather than lipid oxidation, *Biochemical Journal*, 302 (1), 297–304.
- HENLE, E.S., LINN, S., 1997, Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide, *Journal of Biological Chemistry*, 272 (31), 19095–19098.
- HO, Y.S., MAGNENAT, J.L., BRONSON, R.T., CAO, J., GARGANO, M., SUGAWARA, M., FUNK, C.D., 1997, Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia, *Journal of Biological Chemistry*, 272 (26), 16644–16651.
- HU, M.L., TAPPEL, A.L., 1992, Potentiation of oxidative damage to proteins by ultraviolet- A and protection by antioxidants, *Photochemistry Photobiology*, 56 (3), 357–363.
- HUANG, S.W., HOPIA, A., SCHWARZ, K., FRANKEL, E. N., GERMAN, J.B., 1996, Antioxidant Activity of α -Tocopherol and Trolox in Different Lipid Substrates: Bulk Oils vs Oil-in-Water Emulsions, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44 (2); 444-452.
- INAI, Y., NISHIKIMI, M., 2002, Increased degradation of oxidized proteins in yeast defective in 26S proteasome assembly. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 404 (2), 279–284.
- JASIN, H.E., 1983, Generation of IgG aggregates by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide system, *Journal of Immunology*, 130 (4), 1918–1923.

- JAYATILLEKE, A., SHAW, S., 1998, Stimulation of monocyte interleukin-8 by lipid peroxidation products: a mechanism for alcohol-induced liver injury. *Alcohol*, 16 (2), 19–23.
- JEZEK, P., HLAVAT, L., 2005, Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37 (12), 2478–2503.
- JONES, D. P., EKLOW, L., THOR, H., ORRENIUS, S., 1981, Metabolism of hydrogen peroxide in isolated hepatocytes: relative contributions of catalase and glutathione peroxidase in decomposition of endogenously generated H₂O₂. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 210 (2), 505–516.
- KEHRER, J.P., 2000, The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*, 149 (1), 43–50.
- KING, C.C., JEFFERSON, M.M., THOMAS, E.L., 1997, Secretion and inactivation of myeloperoxidase by isolated neutrophils, *J Leukocyte Biology*, 61 (3), 293–302.
- KIRKMAN, H.N., GAETANI, G.F., 1984, Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81 (14), 4343–4347.
- KIRKMAN, H.N., ROLFO, M., FERRARIS, A.M., GAETANI, G.F., 1999, Mechanisms of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stoichiometry. *Journal of Biological Chemistry*, 274 (20), 13908–13914.
- KOOIJ, A., 1994, A re-evaluation of the tissue distribution and physiology of xanthine oxidoreductase, *Histochemical Journal*, 26(12), 889–915.
- KORBASHI, P., KOHEN, R., KATZHENDLER, J., CHEVION, M., 1986, Iron mediates paraquat toxicity in *Escherichia coli*, *Journal of Biological Chemistry*, 261 (27), 12472–12476.
- LEVINE, R.L., 2002, Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging and disease. *Free Radical Biology & Medicine*, 32 (9), 790–796.
- LEVINE, R.L., GARLAND, D., OLIVER, C.N., AMICI, A., CLIMENT, I., LENZ, A.G., AHN, B.W., SHALTIEL, S., STADTMAN, E.R., 1990, Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, 186, 464–78.
- LEVINE, R.L., MOSONI, L., BERLETT, B.S., STADTMAN, E.R. 1996, Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93 (26), 15036–15040.

- LEVINE, R.L., WILLIAMS, J.A., STADTMAN, E.R., SHACTER, E., 1994, Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins, *Methods in Enzymology*, 233, 346–57.
- LINTON, S., DAVIES, M.J., DEAN, R.T., 2001, Protein oxidation and ageing, *Experimental Gerontology*, 36 (9), 1503–1518.
- LUNEC, J., BLAKE, D.R., MCCLEARY, S.J., BRAILSFORD, S., BACON, P.A., 1985, Self-perpetuating mechanisms of immunoglobulin G aggregation in rheumatoid inflammation, *Journal of Clinical Investigation*, 76 (6), 2084–2090.
- MARTINS, S.I., van BOEKEL, M.A., 2003, Kinetic modelling of Amadori N-(1-deoxy-D-fructos-1-yl)-glycine degradation pathways. *Carbohydrate Research*, 338 (16), 1665–1678.
- MATHESON, N.R., WONG, P.S., TRAVIS, J., 1979, Enzymatic inactivation of human alpha-1-proteinase inhibitor by neutrophil myeloperoxidase, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 88 (2), 402–409.
- MCCLAIN, D.E., KALINICH, J.F., RAMAKRISHNAN, N., 1995, Trolox inhibits apoptosis in irradiated MOLT-4 lymphocytes, *FASEB Journal*, 9 (13), 1345–1354.
- MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. 1969, Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*, 244 (22), 6049–6055.
- MITCHELL, P., 1961, Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*, 8 (191), 144–148.
- MOHR, D., BOWRY, V.W., STOCKER, R., 1992, Dietary supplementation with coenzyme Q10 results in increased levels of ubiquinol-10 within circulating lipoproteins and increased resistance to human low-density lipoprotein to the initiation of lipid peroxidation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1126 (3), 247–254.
- NAIR, P.P, 1972, Vitamin E and metabolic regulation. *Annals of the New York Academy of Sciences*; 203, 53–61.
- NAPPI, A.J., VASS, E., 1998, Hydroxyl radical formation resulting from the interaction of nitric oxide and hydrogen peroxide, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1380 (1), 55–63.
- NYSTRÖM, T., 2005, Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence, *EMBO Journal*, 24 (7), 1311–1317.

- OHLEMILLER, K.K., MCFADDEN, S.L., DING, D.L., FLOOD, D.G., REAUME, A.G., HOFFMAN, E.K, SCOTT, R.W., RIGHT, J.S., PUTCHA, G. V., SALVI, R.J.,1999, Targeted deletion of the cytosolic Cu/Zn-superoxide dismutase gene (Sod1) increases susceptibility to noise-induced hearing loss, *Audiology & Neurotology*, 4 (5), 237–246.
- OKAI, Y., HIGASHI-OKAI, K., MACHIDA, K., NAKAMURA, H., NAKAYAMA, K., FUJITA, K., TANAKA, T., OTANI, S., TANIGUCHI, M., 2000, Protective effect of antioxidants against *para*-nonylphenol-induced inhibition of cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters* 185 (1) 65-7.
- OLIVER, C.N., 1987, Inactivation of enzymes and oxidative modification of proteins by stimulated neutrophils, *Archives of Biochemistry & Biophysics*, 253 (1), 62–72.
- PARK J.W., FLOYD, R.A., 1997, Glutathione/Fe³⁺/O²-mediated DNA strand breaks and 8-hydroxydeoxyguanosine formation - Enhancement by copper, zinc superoxide dismutase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1336 (2), 263–268.
- PARK, Y.D., KANG, W.H., YANG, W.S., SHIN, K.S., SOOK BAE, K.,PARK, H.M., 2003, LAMMER kinase homolog Lkh1, is involved in oxidative stress response of the fission yeast, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 311 (4), 1078-1083.
- PEKMEZ, M., 2004, *Oksidatif stres uygulanmış Schizosaccharomyces pombe’de moleküler çalışmalar*. Yüksek lisan tezi, İstanbul University.
- PEPE, S., MARASCO, F. S., HAAS, J. S., SHEERAN, L.F., KRUM, H., ROSENFELDT L. F., 2007, Coenzyme Q10 in Cardiovascular Disease accepted manuscript, *Mitochondrion*.
- PEUS, D., MEVES, A., POTT, M., BEYERLE, A., PITTELKOW, M.R., 2001, Vitamin E analog modulates UVB-induced signaling pathway activation and enhances cell survival, *Free Radical Biology & Medicine*, 30 (4), 425-432.
- PICK, E., Y. KEISARI, A., 1980, simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture, *Journal of Immunological Methods*, 38 (1-2),161-70.
- POLJSAK, B., GAZDAG, Z., PESTI, M., FILIPIC, M., FUJS, S., FARKAS, N., PLESNICAR, S., RASPOR, P., 2006, Role of the vitamin E model compound Trolox in the prevention of Cr(VI)-induced cellular damage, *Toxicological & Environmental Chemistry*, 88 (1),141–157.

- RASPOR, P., PLESNICAR, S., GAZDAG, Z., PESTI, M., MIKLAVCIC, M., LAH, B., LOGAR-MARINSEK, R. POLJSAK, B., 2005, Prevention of intracellular oxidation in yeast: the role of vitamin E analogue, Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylkroman-2-carboxyl acid, *Cell Biology International*, 29 (1), 57–63.
- REINHECKEL, T., GRUNE, T., DAVIES, K.J., 2000, Stress response, methods and protocols, Humana Press, New Jersey, 0-89603-611-1.
- ROBINSON, C.E., KASHAVARZIAN, A., PASCO, D.S., FROMMEL, T.O., WINSHOP, D.H., HOLMES, E.W., 1999, Determination of protein carbonyl groups by immunoblotting, *Analytical Biochemistry*, 266, (1) 48–57.
- ROSEN, D.R., SIDDIQUE, T., PATTERSON, D., FIGLEWICZ, D.A., SAPP, P., HENTATI, A., DONALDSON, D., GOTO, J., O'REGAN, J.P., DENG, H.X., 1993, Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362,59–62.
- ROSEN, G.M., POU, S., RAMOS, C.L., COHEN, M.S., BRITIGAN, B.E., 1995, Free radicals and phagocytic cells. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 9 (2), 200–209.
- SAGACH, V.F., SCROSATI, M., FIELDING, J., ROSSONI, G., GALLI, C., VISIOLI, F., 2002, The water-soluble vitamin E analogue Trolox protects against ischaemia/reperfusion damage in vitro and ex vivo. A comparison with vitamin E. *Pharmacological Research*, 45 (6), 435–439.
- SANCHEZ, J.C., GOLAZ, O., FRUTIGER, S., SCHALLER, D., APPEL R.D., BAIROCH A., HUGHES G.J., HOCHSTRASSER D.F., 1996, The yeast SWISS-2DPAGE database, *Electrophoresis*, 17,556-565.
- SASTRE, J., PALLARDO, F. V., VINA, J., 2003, The role of mitochondrial oxidative stress in aging. *Free Radical in Biology & Medicine*, 35 (1), 1–8.
- SCHRAUFSTATTER, I.U., BROWNE, K., HARRIS, A., HYSLOP, P.A., JACKSON, J.H., QUEHENBERGER, O., COCHRANE, C.G., 1990, Mechanisms of hypochlorite injury of target cells, *Journal of Clinical Investigation*, 85 (2), 554–562.
- SHACTER, E., 2000, Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metabolism Reviews*, 32 (3), 307-326.
- SHACTER, E., WILLIAMS, J.A., LEVINE, R.L., 1995, Oxidative modification of fibrinogen inhibits thrombin-catalyzed clot formation, *Free Radical Biology & Medicine*, 18 (4), 815–821.

- STADTMAN E.R., 2001, Protein oxidation in aging and age-related diseases, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 928, 22-38.
- STADTMAN E.R., 2006, Protein oxidation and aging, *Free Radical Research*, 40(12), 1250–1258.
- STADTMAN, E.R., 1990, Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: Biochemical mechanism and biological consequences, *Free Radical in Biology & Medicine*, 9 (4), 315–325.
- SUSA, N., UENO, S., FURUKAWA, Y., SUGIYAMA, M., 1996, Protective effects of vitamin E on chromium(VI)-induced cytotoxicity and lipid peroxidation in primary cultures of rat hepatocytes, *Archives of toxicology*, 71 (1-2) 20-24.
- TABATABAIE, T., POTTS, J.D., FLOYD, R.A., 1996, Reactive oxygen species mediated inactivation of pyruvate dehydrogenase, *Archives of Biochemistry & Biophysics*, 336 (2), 290–296.
- TAKEUCHI, T., NAKAJIMA, M., MORIMOTO, K., 1996, Relationship between the intracellular reactive oxygen species and the induction of oxidative DNA damage in human neutrophil-like cells, *Carcinogenesis*, 17 (8), 1543–1548.
- TATSUMI T, FLISS H. 1994, Hypochlorous acid and chloramines increase endothelial permeability: possible involvement of cellular zinc. *American Journal of Physiology*, 267 (2)1597–1607.
- THEROND, P., BONNEFONT-ROUSSELOT, D., DAVIT-SPRAUL, A, CONTI, M., LEGRAND, A., 2000, Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach, *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 3 (5), 373-384.
- TIRMENSTEIN, M.A., NELSON, S.D., 1990, Acetaminophen-induced oxidation of protein thiols. Contribution of impaired thiol-metabolizing enzymes and the breakdown of adenine nucleotides, *Journal Biological Chemistry*, 265 (6), 3059–3065.
- TROST B.M., 1991 *Comprehensive organic synthesis*, 1st ed., Pergamon Press, Oxford, 0-08-035929-9.
- TSURUTA, T., TANI, K., HOSHIKA, A., 1999, Myeloperoxidase gene expression and regulation by myeloid growth factors in normal and leukemic cells. *Leukemia and Lymphoma*, 32 (3-4), 257–67.
- TURRENS, J.F., 1997, Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Bioscience Reports*, 17 (1), 3–8.

- URSINI, F., MAIORINO, M., BRIGELIUS-FLOHE, R., AUMANN, K. D., ROVERI, A., SCHOMBURG, D., FLOHE, L., 1995, Diversity of glutathione peroxidases. *Methods in Enzymology*, 252, 38–53.
- VOGT, W., 1995, Oxidation of methionyl residues in proteins: Tools, targets, and reversal. *Free Radical Biology & Medicine*, 18 (1), 93–105.
- WAGNER, B.A., BUETTNER, G.R., BURNS, C.P., 1994, Free radical-mediated lipid peroxidation in cells : oxidizability is a function of cell lipid bis-allylic hydrogen content, *Biochemistry*, 33(15), 4449-4453.
- WALKER, G.M., 1988, *Yeast Physiology And Biotechnology*, John Wiley & Sons, England, 0-471-964468.
- WALKER, J.M., 2002, *The Protein Protocols Handbook*, 2nd edition. Humana Press, New Jersey ,0-89603-940-4.
- WARDMAN, P., CANDEIAS, L.P., 1996, Fenton chemistry: an introduction. *Radiation Research*, 145 (2), 523–31.
- WATERBORG, J.H., 2002, The Lowry method for protein quantification, *The Protein Protocols Handbook*, J.M. Walker ed., 2nd ed. Humana Press, New Jersey, 0-89603-940-4, pp. 7–9.
- YAKES, F.M., van HOUTEN, B., 1997, Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94 (2), 514–9.
- YAN, L.J., LEVINE, R.L., SOHAL, R.S., 1997 (b), Oxidative damage during aging targets mitochondrial aconitase, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94 (21), 11168–11172.
- YAN, L.J., LODGE, J.K., TRABER, M.G., MATSUGO, S., PACKER, L., 1997 (a), Comparison between copper-mediated and hypochlorite-mediated modifications of human low density lipoproteins evaluated by protein carbonyl formation, *Journal of Lipid Research*, 38 (5), 992–1001.
- YAN, L.J., SOHAL, R.S., 1998, Mitochondrial adenine nucleotide transferase is modified oxidatively during aging, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 12896–12901.

- YAN, L.J., TRABER, M.G., KOBUCHI, H., MATSUGO, S., TRITSCHLER, H.J., PACKER, L., 1996, Efficacy of hypochlorous acid scavengers in the prevention of protein carbonyl formation, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 327 (2), 330–334.
- YANAGIDA, M., 2002, The model unicellular eukaryote, *Schizosaccharomyces pombe*. *Genome Biology* 3 (3), 2003,1–2003,4.
- YANG, C.Y., GU, Z.W., YANG, H.X., YANG, M., GOTTO, A.M.JR., SMITH, C.V., 1997, Oxidative modifications of poB-100 by exposure of low density lipoproteins to HOCl in vitro, *Free Radical in Biology & Medicine*, 23 (1), 82–89.
- YIM M.B., CHOCK P.B., STADTMAN E.R., 1990, Copper, zinc superoxide dismutase catalyzes hydroxyl radical production from hydrogen peroxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87,5006–5010.
- YOST, F.J., FRIDOVICH, I., 1973, An iron-containing superoxide dismutase from *Escherichia coli*. *Journal Of Biological Chemistry*, 248 (14), 4905–4908.
- ZAVODNIK, I.B., LAPSHINA, E.A., ZAVODNIK, L.B., BARTOSZ, G., SOSZYNSKI, M., BRYSEWSKA, M., 2001, Hypochlorous acid damages erythrocyte membrane proteins and alters lipid bilayer structure and fluidity. *Free Radical in Biology & Medicine*, 30 (4), 363–369.

ÖZGEÇMİŞ

1970 yılında Kahire’da doğdum. Orta ve lise öğrenimimi sırasıyla Mustafa Kamil Orta Öğretim Okulu ve Ahmet Orabe Lisesi’nde tamamladıktan sonra 1989 yılında kaydımı yaptırmış olduğum Ain Shams Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü’nden (Mısır) 1993 yılında mezun oldum. 1994 yılında Upper Nile Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Bölümü’nde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya başladım. 1995-1997 yılları arasında Aligarh Muslim Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü’nde (Hindistan) Yüksek lisans yaptım. 2002 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik programında Doktora eğitimine başladım.