



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**OKSİDATİF STRES UYGULANMIŞ
SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE DE
MOLEKÜLER ÇALIŞMALAR**

Murat PEKMEZ

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

Danışman

Doç. Dr. Nazlı ARDA

Haziran, 2004

İSTANBUL

ÖNSÖZ

Oksidatif stres tüm canlıları olumsuz etkileyen, ancak yaşam sürecinde kaçınılmaz bir olaydır. Başta insan sağlığı olmak üzere çeşitli endüstriyel ve çevresel sorunlarla da ilişkili bu olay, temelde canlılardaki aerobik metabolizmanın doğal bir sonucudur ve dünyadaki olumsuz koşullar (çevresel kirleticiler, UV, kuraklık vb.) nedeniyle her geçen gün daha da büyük önem kazanmaktadır. Bu nedenlerle, doğal oksidasyon-antioksidasyon mekanizmalarının aydınlatılması, oksidatif stresin ölçülmesi ve yol açacağı sorunların giderilmesiyle ilgili bilimsel çalışmaların sayısı oldukça fazladır.

Bu tez kapsamında oksidatif strese uğratılmış *Schizosaccharomyces pombe* maya türünde oluşturulan bazı hücresel cevapların belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla besi ortamına artan derişimlerde H₂O₂ uygulanarak oksidatif stres yaratılmış ve hücreiçi oksidasyon düzeyleri belirlenen örneklerde artan stres koşullarının indirgenmiş glutatyon (GSH) düzeyini, katalaz aktivitesini ve lipid peroksidasyonunu nasıl etkilediği araştırılmıştır.

Bu çalışmada ele alınan oksidatif stres ölçütlerinin çoğu *S. pombe*'de ilk kez tanımlanmıştır. Elde edilen bulguların mayalarda ve memelilerde yürütülen benzer çalışmalara katkıda bulunmasını diler; Yüksek Lisans öğrenimim sırasında ve tez çalışmalarım boyunca gösterdiği her türlü destek ve yardımlardan dolayı danışmanım Doç. Dr. Nazlı ARDA'ya en içten dileklerle teşekkür ederim.

Bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, başta Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Başkanı Sayın Prof. Dr. Güler TEMİZKAN olmak üzere, tüm değerli Öğretim Üyelerine çok teşekkür ederim.

İ. Ü. Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı'nın laboratuvar olanaklarından yararlanmamı sağlayan Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Lale ERSOY'a ve yardımlarından dolayı Araş. Gör. Olcay SAĞIRLI'ya teşekkür ederim.

Bu çalışma boyunca yardımlarını esirgemeyen Araş. Gör. Evren UÇAR ÖNAY, Araş. Gör. Özlem EROL, İsmail HAMAD, Araş. Gör. Cenk KIĞ'a ve tüm desteklerinden dolayı Dr. Semian KARAER'e teşekkür ederim.

Tüm yaşamım boyunca bana sonsuz destek olan AİLEM'e teşekkürü bir borç bilirim.

Bu tez çalışması İstanbul Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliği (T-107/11112002) tarafından desteklenmiştir.

İstanbul 2004

Murat PEKMEZ

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ	iv
TABLO LİSTESİ	v
SEMBOL LİSTESİ	vi
ÖZET	vii
SUMMARY	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR	4
2. 1. Reaktif Oksijen Türleri ve Oluşum Yolları	4
2. 2. Antioksidanlar ve Savunma Sistemleri	7
2. 2. 1. Antioksidan Enzimler	8
2. 2. 2. Antioksidan Metabolitler	10
2. 3. Önemli Hücresel Bileşenlerin Oksidasyonu	13
2. 3. 1. Lipit Peroksidasyonu	13
2. 3. 2. Protein Oksidasyonu	15
2. 3. 3. DNA Oksidasyonu	15
2. 4. Mayalarda Oksidatif Stres	16
3. MALZEME VE YÖNTEM	20
3. 1. Organizma	20
3. 2. Besi Ortamları	20
3. 3. Organizmanın Üretimi ve Saklanması	20
3. 4. Üremenin İzlenmesi	21
3. 5. Oksidatif Stres Uygulaması	21
3. 6. Hücre Morfolojilerinin İncelenmesi	22
3. 7. Oksidatif Stres Koşullarında Canlılığın Belirlenmesi	22
3. 7. 1. Duyarlılık Testi	23
3. 7. 2. Koloni Sayımı	23
3. 8. Ham Özüt Hazırlanması	23

3. 9. Ham Özütteki Protein Derişiminin Belirlenmesi.....	24
3. 10. Hücreiçi Oksidasyon Düzeyinin Ölçülmesi.....	25
3. 11. Lipit Peroksidasyonunun Ölçülmesi.....	26
3. 12. İndirgenmiş Glutasyon (GSH) Düzeyinin Belirlenmesi.....	26
3. 13. Katalaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	27
4. BULGULAR	28
4. 1. <i>S. pombe</i> 'nin Üreme Eğrisi.....	28
4. 2. Oksidatif Stres Koşullarında Hücre Morfolojilerinin Karşılaştırılması.....	29
4. 3. Oksidatif Stres Koşullarında Canlılık	30
4. 3. 1. Duyarlılık Testi.....	30
4. 3. 2. Koloni Sayımları.....	31
4. 4. Ham Özütlerin Protein Derişimi.....	32
4. 5. Hücreiçi Oksidasyon Düzeyi.....	32
4. 6. Lipit Peroksidasyon Ürünlerinin Miktarı.....	33
4. 7. İndirgenmiş Glutasyon Düzeyi.....	35
4. 8. Katalaz Aktivitesi.....	36
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	38
6. KAYNAKLAR	42
7. ÖZGEÇMİŞ	49

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	: Reaktif oksijen türlerinin oluştuğu bazı hücresel dönüşümler.....	6
Şekil 2.2	: Glutasyon sentezi ve metabolizması.....	11
Şekil 2.3	: Lipit peroksidasyonunun aşamaları.....	14
Şekil 4.1	: <i>S. pombe</i> (972h) yabancı ırkının üreme eğrisi.....	29
Şekil 4.2	: H ₂ O ₂ uygulanmamış (kontrol) ve farklı derişimlerde H ₂ O ₂ uygulanmış (deney) <i>S. pombe</i> hücrelerinin mikroskop altındaki görünüşleri	29
Şekil 4.3	: Farklı derişimlerde H ₂ O ₂ uygulanmış <i>S. pombe</i> hücrelerinde üreme durumları	30
Şekil 4.4	: Farklı derişimlerde H ₂ O ₂ uygulanmış <i>S. pombe</i> hücrelerinde canlılık oranları.....	31
Şekil 4.5	: Farklı derişimlerde H ₂ O ₂ uygulanmış <i>S. pombe</i> hücrelerinde hücre içi oksidasyon düzeyleri	33
Şekil 4.6	: Belirli miktarlarda malondialdehit (MDA) içeren çözeltilerin 535 nm'deki absorbans değerlerine göre çizilen standart grafik.....	34
Şekil 4.7	: Farklı derişimlerde H ₂ O ₂ uygulanmış <i>S. pombe</i> hücrelerinde oluşan MDA miktarları	34
Şekil 4.8	: Belirli miktarlarda indirgenmiş glutasyon (GSH) içeren çözeltilerin 412 nm'deki absorbans değerlerine göre çizilen standart grafik.....	35
Şekil 4.9	: Farklı derişimlerde H ₂ O ₂ uygulanmış <i>S. pombe</i> hücrelerinde oluşan indirgenmiş glutasyon (GSH) miktarları	36
Şekil 4.10	: Farklı derişimlerde H ₂ O ₂ uygulanmış <i>S. pombe</i> hücrelerinde katalaz aktivitesi	37

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1	: Mayaların karşılaşabileceği bazı çevresel stres koşulları.....	16
Tablo 2.2	: Mayalarda yer alan temel antioksidan savunma sistemleri.....	17
Tablo 3.1	: Protein derişiminin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler.....	24
Tablo 3.2	: GSH düzeyinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler.....	27
Tablo 4.1	: <i>S.pombe</i> kültürlerinde zamana bağlı üremenin izlenmesi	28
Tablo 4.2	: Farklı derişimlerde H ₂ O ₂ uygulanmış <i>S.pombe</i> hücrelerinden hazırlanan özütlerdeki protein miktarları.....	32
Tablo 4.3	: Farklı derişimlerde H ₂ O ₂ uygulanmış <i>S.pombe</i> hücrelerinde katalaz enzimine ait aktivite değerleri.....	36

SEMBOL LİSTESİ

A	: Absorbans
α	: Alfa
γ	: Gamma
Δ	: Delta
μ	: Mikro
κ	: Kappa

ÖZET

OKSİDATİF STRES UYGULANMIŞ *SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE*'DE MOLEKÜLER ÇALIŞMALAR

Bu çalışmada, artan oksidatif stres koşullarında *Schizosaccharomyces pombe* maya hücrelerinin oluşturacağı moleküler cevap hakkında bazı ipuçları elde edilmesi hedeflendi. Bu amaçla öncelikle *S. pombe*'nin üreme eğrisi elde edildi ve oksidatif stres uygulaması için uygun zaman aralığı (hücre sayısının yaklaşık 2×10^7 hücre/ml değerine ulaştığı logaritmik evrenin ortalarına yakın bir aralık) belirlendi. Bu evrede her bir deney grubu, bir saat süreyle 0.2 mM, 1.0 mM, 2.0 mM ve 5.0 mM hidrojen peroksit (H_2O_2) ile işleme sokuldu.

Her gruptaki hücre canlılığı ve H_2O_2 duyarlılığı, sırasıyla koloni sayım yöntemi ve damla ekim deneyi ile belirlendi. Artan derişimlerdeki H_2O_2 'nin, dolayısıyla oksidatif stresin hücre sayısını belli oranda düşürdüğü ve en yüksek derişimdeki H_2O_2 'nin (5 mM) hücre üremesini % 50 oranında inhibe ettiği gözlemlendi. Işık mikroskopuyla gerçekleştirilen analizler bu çalışmada kullanılan stres koşullarının hücre morfolojisini etkilemediğini ortaya koydu.

Kontrol (H_2O_2 uygulanmamış) ve deney gruplarında hücre içi oksidasyon, lipit peroksidasyonu, indirgenmiş glutatyon (GSH) düzeyi ve katalaz aktivitesi gibi stres parametreleri spektrofotometrik ve spektrofotometrik yöntemlerle araştırıldı. 0.2 mM, 1.0 mM ve 2.0 mM H_2O_2 uygulamalarının *S. pombe*'de hücre içi oksidasyon ve lipit peroksidasyon düzeylerini artırdığı bulundu. 5.0 mM H_2O_2 uygulanan örnekte ise, bu iki göstergenin kontroldekilere göre yüksek, fakat diğer deney gruplarındakilere göre düşük olduğu belirlendi. Artan derişimlerdeki H_2O_2 tüm örneklerde GSH düzeyini kontrole göre belirgin şekilde düşürdü. Bu sonuç hücre sayıları dikkate alınarak değerlendirildiğinde, canlı hücre sayısı kontrole göre düşük olan 0.2 mM H_2O_2 uygulanmış grupta bir uyumluluk cevabının geliştirilmiş olabileceği düşünüldü. 0.2 mM ve 1.0 mM H_2O_2 uygulanmış örneklerde katalaz aktivitesinin yükseldiği, 2.0 mM ve 5.0 mM H_2O_2 uygulanmış örneklerde ise düştüğü gözlemlendi. Bu bulgularla birincil işlevi H_2O_2 'nin uzaklaştırılması olan bu enzimin *S. pombe*'de antioksidan savunma metabolizmasındaki rolüne ilişkin kapsamlı bir değerlendirme yapılamadı. Bu çalışmada ele alınan moleküler parametrelerden özellikle GSH düzeyinin, oksidatif stresin güvenilir bir göstergesi olarak kabul edilebileceği yargısına varıldı. Tüm bulgular canlılık oranları dikkate alınarak değerlendirildiğinde, *S. pombe*'de öldürücü etki yaratmayan, düşük dozda bir oksidatif stresin (örneğin, 0.2 mM'lık H_2O_2 uygulamasının) hücrelerdeki savunma mekanizmalarını uyardığı ve uyumluluğu artırdığı sonucuna varıldı.

Bu çalışmada *S. pombe*'deki bazı güvenilir oksidatif stres göstergeleri ilk kez tanımlandı ve *S. pombe*'nin ökaryotik hücrelerde meydana gelen oksidasyon/redüksiyon reaksiyonlarının moleküler mekanizmalarının aydınlatılması için uygun bir model sistem olduğu bir kez daha anlaşıldı. Elde edilen verilerin maya ve memeli hücrelerinde redoks dengesi ve bununla ilişkili süreçler konusunda ileride yapılacak çalışmalara temel oluşturacağı düşünülmektedir.

SUMMARY

MOLECULAR STUDIES ON *SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE* EXPOSED TO OXIDATIVE STRESS

This study was aimed to find out some evidences on the molecular response of *Schizosaccharomyces pombe* yeast cells in increased oxidative stress conditions.

For this purpose, primarily the growth curve of *S. pombe* was evaluated and the proper time (early mid-log phase that the cell number reached approximately 2×10^7 cell/ml) for oxidative stress treatment was determined. In this period, each experimental group was treated with 0.2 mM, 1.0 mM, 2.0 mM ve 5.0 mM hydrogen peroxide (H_2O_2) for one hour.

Cell viability and H_2O_2 sensitivity of each group was determined by colony counting method and spot assay, respectively. It was observed that increased H_2O_2 concentration, consequently oxidative stress lowered the cell number by a distinct ratio and the highest (5.0 mM) H_2O_2 concentration inhibited the cell growth by 50 %. Analyses performed with light microscope has revealed that oxidative stress conditions used in this study did not effect the cell morphology.

Some oxidative stress parameters such as intracellular oxidation, lipid peroxidation, reduced glutation (GSH) level and catalase activity were examined by spectrofluorometric and spectrophotometric methods in both control (not treated with H_2O_2) and test groups. It was found that 0.2 mM, 1.0 mM and 2.0 mM H_2O_2 treatments increased the intracellular oxidation and lipid peroxidation levels in *S. pombe*. These two parameters were lower in 5.0 mM H_2O_2 -treated sample then those of control, but higher then those of the other test groups. Increased H_2O_2 concentrations caused a significant decrease in GSH level for all samples compared to the control. When this finding was evaluated regarding with the cell numbers, it was estimated that an adaptive response could be progressed in 0.2 mM H_2O_2 -treated sample which has a lower cell viability respect to control group. Catalase activity increased with 0.2 mM or 1.0 mM H_2O_2 treatment, but decreased with 2.0 mM or 5.0 mM H_2O_2 treatment. An overall conclusion could not be done related with the role of this enzyme which primary function is decomposition of H_2O_2 on antioxidant defense metabolism in *S. pombe* with these findings. Among the parameters investigated in this study, particularly GSH level was approved as a reliable indicator of oxidative stress. When all findings were evaluated by taking note of cell viability, it was concluded that oxidative stress in a sublethal, low dose (for example treatment with 0.2 mM H_2O_2) stimulated the defence mechanisms in the cells and increased the adaptation in *S. pombe*.

In this study, some of the reliable indicators of oxidative stres in *S.pombe* were described for the first time and *S. pombe* has been reconsidered to represent a suitable model system for the elucidation of molecular mechanisms of oxidation/reduction reactions take place in eukaryotic cells. Data obtained here is expected to constitute a basis for the further studies on redox balance and related processes in yeast and mammalian cells.

1. GİRİŞ

Aerobik canlılar yaşamak için moleküler oksijene gereksinim duyarlar. Ancak temel enerji üretim süreçlerinin mutlak elemanı olan bu molekül, yararlı işlevlerinin yanı sıra, hücre için zararlı bazı dönüşümlerin de uyarıcısıdır. Oksijenin olumsuz etkileri önemli biyomoleküllerin yapısını bozan ve reaktif oksijen türü (ROT) olarak adlandırılan atom ve moleküller oluşturabilme özelliğinden kaynaklanır (Packer, 1984). ROT'ların oluşumundan sorumlu tek molekül oksijen değildir. Diğer bazı etkenler (radyasyon, ultrason, yüksek sıcaklık, ozmotik ve iyonik stres, yaralanma, enfeksiyon, mutasyon) ve hücre içine giren yabancı maddeler (ksenobiyotikler) de ROT oluşturabilir (Mathews ve diğ., 2000). Gerek radikal gerekse radikal olmayan ROT'lar başta proteinler, lipitler ve DNA olmak üzere tüm biyomoleküllerin zarar görmesine ve böylece hücresel işlevlerin aksamasına yol açarlar. Enzimlerin iş göremez hale gelmesi, lipitlerin oksidasyonu sonucunda membranların bozulması, DNA'da kırıklar oluşması ve diğer birçok metabolitin oksitlenerek işlevini yitirmesi canlının metabolizmasında çok önemli bozukluklara ve sonu ölümle biten yıkım olaylarının başlamasına neden olur (Lee ve diğ., 1999). Canlılar böylesine zararlı etkileri olan oksidanlara karşı çeşitli antioksidan savunma sistemleri geliştirmişlerdir. Antioksidan etkiye sahip enzimlerinin yanı sıra sentezledikleri ve/veya dışarıdan aldıkları çeşitli maddelerle kendilerini korumaya ve zarar gören molekülleri onarmaya çalışırlar. İnsanda oksidatif stresle ilişkili en temel süreçlerin başında yaşlanma gelir. Ayrıca yetersiz antioksidan savunma ve olağandışı oksidan stres koşullarının kanser, nörodejeneratif hastalıklar ve dolaşım sistemi bozuklukları gibi ciddi patolojik olaylarla ilişkili olduğu bilinmektedir (Gate ve diğ., 1999). Cu, Mn, Zn, Se gibi eser elementlerin veya riboflavin gibi vitaminlerin yokluğu, antioksidan enzimlerin aktivitelerini kaybetmesine ve hastalıkla ilişkili oksidatif strese yol açar (Sipowicz ve diğ., 1997). Oksidatif hasarın insanda 100

kadar hastalığın gelişmesinde rolü vardır (Mathews ve diğ., 2000). Oksijen metabolizmasındaki bazı kusurlu genlerin Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS) ve Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıkları tetiklediği öne sürülmektedir. (Mathews ve diğ., 2000; Valentine, 2002).

Canlıların yaşam kalitesini bozan oksidatif stres, biyoteknolojik üretim süreçlerinde de sorun yaratır. Özellikle sistemdeki oksijen dengesini bozan ve mikroorganizma üremesini inhibe eden dozları büyük maddi kayıplara yol açabilir (Penninckx, 2000).

Gerek sağlık gerekse ekonomi açısından önem taşıyan bu konuyla ilgili bilimsel çalışmalar son yıllarda büyük ivme kazanmıştır. Oksidatif stresin zararlı etkilerini ortadan kaldırmak amacıyla başta insan olmak üzere, çeşitli canlı sistemlerinde oksidasyon-antioksidasyon mekanizmalarını aydınlatmaya, problemlerle ilişkilendirmeye ve çözümler üretmeye yönelik pek çok araştırma yürütülmektedir. Bunlar arasında insan ve diğer yüksek organizasyonlu ökaryotlar için uygun bir model olarak kabul edilen mayalar üzerinde yapılan araştırmalar da oldukça dikkat çekicidir.

Maya hücreleri makromoleküler düzeyde memeli hücreleriyle büyük benzerlikler gösterir (Costa ve Moradas-Ferreira, 2001). Bu nedenle oksidatif stresin yaşlanma (Droge, 2003), apoptosis (Mandavilli ve diğ., 2002) ve çeşitli hastalıklarla (Davies ve diğ., 1999) ilişkisi konusunda yürütülen çalışmalarda geniş çapta yer alır.

S.pombe kromozom sayısının az ($n=3$) olması, kolay işlenebilir ve dizisi tamamlanmış bir genoma sahip olması, moleküler yapısının yüksek organizasyonlu ökaryotlara, özellikle insana çok benzemesi (sinyal transdüksiyon yollarının bir çoğunun ve sahip olduğu bazı proteinlerin homoloji göstermesi) ve karşılaştırmalı çalışmalara elverişli olması nedeniyle çok iyi bir model organizma olarak literatüre geçmiştir (Wood ve diğ., 2004)

Bu çalışma *Schizosaccharomyces pombe* maya türünde oksidatif stres uygulamasının yol açacağı bazı biyokimyasal değişimleri inceleyerek mayanın bu strese vereceği cevaba ilişkin moleküler ipuçları elde etmeyi hedeflemektedir.

Bu amaçla *S.pombe* hücreleri artan derişimde H_2O_2 ile işleme sokulmuş ve oksidatif stresteki artışın bazı stres ölçütlerini nasıl etkilediği araştırılmıştır.

Stres ölçütü olarak:

- doğrudan hücreiçi oksidasyon düzeyi
- antioksidan bir metabolitin (indirgenmiş glutatyon, GSH) düzeyi
- antioksidan bir enzimin (katalaz) etkinliği
- lipid peroksidasyonu son ürünlerinden malondialdehitin düzeyi seçilmiştir.

Ayrıca uygulanan farklı derişimlerdeki H_2O_2 'nin canlı hücre sayısı üzerindeki etkisi incelenmiştir. Stres uygulanmış (deney grupları) ve uygulanmamış (kontrol grubu) hücreler için elde edilen tüm veriler karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiş ve artan derişimlerde H_2O_2 'nin, dolayısıyla oksidatif stresin *S.pombe* yabancı ırkında yol açtığı moleküler değişiklikler yorumlanmaya çalışılmıştır.

Çalışmada elde edilen verilerin, *S. pombe*'de oksidatif stres sonucunda indüklenen genlerin ve bunların ürünlerinin belirlenmesine yönelik olarak ileride yapılması planlanan diğer moleküler çalışmalara temel oluşturması beklenmektedir.

Kullanılan model organizma ile elde edilecek sonuçların oksidasyon-redüksiyon süreçlerinin önem taşıdığı değişik alanlarda (sağlık, gıda, kozmetik, çevre, fermentasyon uygulamaları vb.) yürütölen araştırmalara da katkıda bulunabileceği düşünölmektedir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ VE OLUŞUM YOLLARI

Moleküler oksijenin solunum sırasında tam olmayan redüksiyonu ve peroksizomlardaki lipit metabolizması ROT oluşumunda öncüdür. Ayrıca NADPH oksidaz, miyeloperoksidaz, ksantin oksidaz, glukoz oksidaz, sitokrom P450 enzimleri ve siklooksijenazlar gibi oksidoredüktazların aktivitesiyle oluşurlar (Mathews ve diğ., 2000). Reaktif oksijen türlerinin oluşumu, temel savunma mekanizmaları ve bunların birbiriyle ilişkisini gösteren metabolik süreçlerin bir özeti Şekil 2. 1’de verilmiştir.

En çok üretilen reaktif oksijen türleri süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$), hidroksil radikali (HO^{\bullet}) ve hidrojen peroksit (H_2O_2)’tir. Bunlardan ilk ikisi serbest radikal yapısındadır, yani ortaklanmamış elektron içerir; H_2O_2 ise radikal olmayan bir reaktif oksijen türüdür.

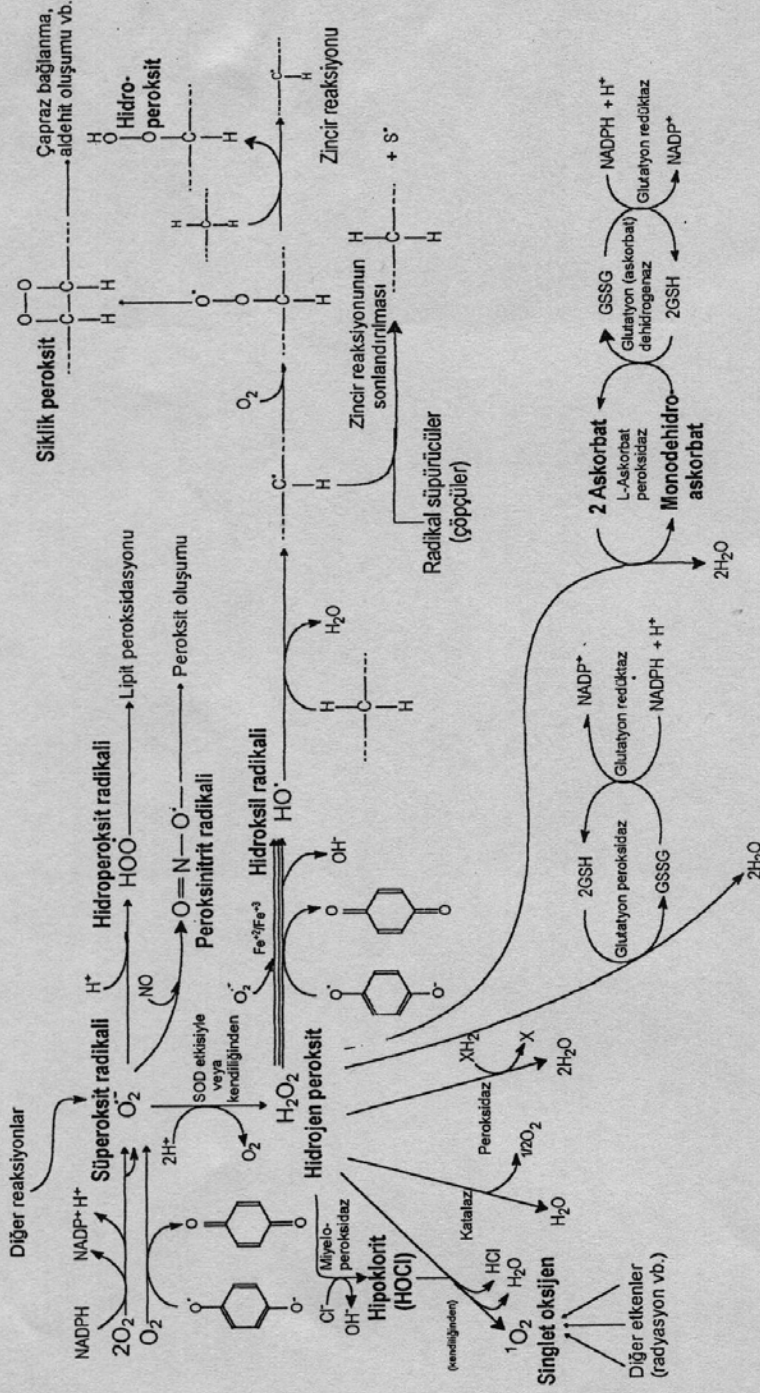
Oksidatif stres oluşturma kapasitesi yüksek süperoksit radikali moleküler oksijene (O_2) bir elektron katılmasıyla oluşur. Bazı oksidazların (örneğin, ksantin oksidaz), fotosentezde iş gören kompleks I’in, solunum zincirindeki elektron taşıyıcılarının (özellikle ubikinonun) katıldığı yan reaksiyonlarla ve semikinon ara ürünlerinden aktarımla (örneğin, endoplazmik retikulumdaki monooksijenaz reaksiyonları sırasında) meydana gelir (Michal, 1999). Ökaryotik hücrelerde süperoksit radikalinin çok büyük bir kısmı elektron taşıma zinciri kökenlidir. Bu radikal yüksek organizasyonlu canlılarda aktifleşmiş makrofajlar tarafından da üretilmektedir. İnflamasyon sırasında NADPH oksidaz içeren sitokrom b_{558} , $O_2^{\bullet-}$ oluşturur ve bunu süperoksit dismutaz (SOD) enzimi aracılığıyla H_2O_2 ’ye dönüştürür. Bu

bileşik de miyeloperoksidaz tarafından savunmada kullanılacak aşındırıcı hipoklorit (HOCl)'e çevrilir. Yüksek enerjili ışığa da $O_2^{\bullet-}$ oluşturur.

Süperoksit radikali en toksik ROT'tur. Biyolojik zarlardaki doymamış fosfolipitlerle reaksiyona girerek lipit peroksidasyonuna yol açar, tiyoller ve kateşoller gibi düşük molekül ağırlığına sahip indirgeyicileri oksitler; bazı enzimlerin aktivitesini ortadan kaldırır, nitrik oksit (NO) ile reaksiyona girerek güçlü bir oksidan bileşik olan peroksinitritin oluşumuna neden olur, demirin serbestleşmesine yol açarak Fenton reaksiyonunu (metal iyonları ve H_2O_2 'nin hidroksil radikali oluşturma reaksiyonu) indükler.

Eşleşmemiş elektrona sahip olmadığı için gerçekte bir radikal olmayan hidrojen peroksit (H_2O_2) çeşitli oksidazların (örneğin NADPH oksidaz, glukoz oksidaz) ürünü olarak oluşabileceği gibi, hemoproteinlerin ve flavoproteinlerin oto-oksidasyonu ile de meydana gelebilir (Michal, 1999).

Hidrojen peroksitin reaksiyona girme eğilimi süperoksitten daha az olmakla beraber, bu madde çok kolay yayılabilme ve plazma zarını kolaylıkla geçebilme özelliğine sahiptir. DNA'ya, lipitlere ve proteinlere bağlanır ve bunları oksitler (Kehler, 1989). H_2O_2 semikinonlarla reaksiyona girerek veya $O_2^{\bullet-}$ ile etkileşerek (Haber-Weiss reaksiyonu) veya serbest metallerle Fenton reaksiyonuna girerek çok zararlı hidroksil radikalini (HO^{\bullet}) oluşturur, ağır metal iyonlarıyla etkileşerek protein inhibisyonuna (özellikle hemoproteinler) yol açar. Bu etkilerinin bir özeti Şekil 2.1'de görülmektedir. H_2O_2 'nin O_2 ve H_2O 'ya ayrışımı katalaz ve çeşitli peroksidazlarla gerçekleşir.



Şekil 2.1: Reaktif oksijen türlerinin oluştuğu bazı hücresel dönüşümler

Hidroksil radikali (HO^\bullet) en reaktif, en kısa ömürlü ve özgünlüğü en düşük ROT'tur (Michal, 1999). Her moleküle saldırarak radikal zincir reaksiyonlarını başlatır ve biyomoleküllere büyük zarar verir. Bu radikal Fenton reaksiyonlarıyla da oluşabilir, fakat ana kaynağı H_2O_2 'nin semikinonlarla ve diğer indirgeyicilerle girdiği reaksiyonlardır. HO^\bullet çok hızlı bir şekilde komşu moleküllerle reaksiyona girer. Özellikle DNA'nın pürin ve primidin bazları ile etkileşir. Ayrıca tiyol grubu içeren biyolojik moleküllerden H atomu çıkarabilir ($\text{R-H} + \text{HO}^\bullet \rightarrow \text{RS}^\bullet + \text{H}_2\text{O}$). Sonuçta oluşan sülfür radikalleri ilginç kimyasal özelliklere sahiptir. Sülfür radikalleri, O_2 ile birleşerek RSO_2^\bullet ve RSO^\bullet gibi oksijen sülfür radikallerini oluşturur. Bunların birçoğu da başta proteinler olmak üzere tüm biyolojik moleküllerin yapısını bozar.

Peroksit radikalleri (ROO^\bullet), HO^\bullet ve $\text{O}_2^{\bullet-}$ radikallerinin saldırısıyla oluşmuş organik radikallerin O_2 ile kendiliğinden ve hızlı bir şekilde reaksiyona girmesi sonucu oluşurlar ve lipit peroksidasyonunun zincir reaksiyonlarına katılırlar. Singlet oksijen ($^1\text{O}_2$), moleküler oksijenin fizyolojik koşullarda uyarılmasıyla oluşur. Fotosentez, HOCl ile peroksinitritin enzimatik olmayan etkileşimi vb. olaylar sırasında oluşabilir (Michal, 1999). ROT'ların, fizyolojik olaylarda, özellikle regülasyonda önemli görevleri vardır.

Bazı ROT'lar sinyal dağıtımında görev alır. Örneğin, H_2O_2 'nin fizyolojik görevlerinden biri, belirli genlerin transkripsiyonunu sağlayan NF κ B transkripsiyon faktörünün nükleusa geçişini (nüklear translokasyon) aktive etmektir. Normal hücresel metabolizma oldukça yüksek oranda ROT üretir. Örneğin, insanda süperoksit anyonunun bir günde 1 hücre başına 0.02 pikomol (tüm vücutta ~ 0.15 mol) düzeyinde üretildiği öngörülmektedir (Mathews ve diğ., 2000).

2. 2. ANTİOKSİDANLAR VE SAVUNMA SİSTEMLERİ

Hücreler herhangi bir nedenle üretimi artan reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerinden korunmak için enzimatik ve enzimatik olmayan çeşitli antioksidan savunma sistemleri

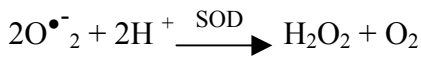
geliştirmişlerdir. Değişik canlı gruplarında farklı mekanizmalarla etkili olan bu sistemlerin başında süperoksit dismutaz, katalaz, peroksidaz, glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimler gelir. Ayrıca glutatyon, tiyoredoksin ve glutaredoksin sisteminin elemanları gibi tiyol bileşikleri ile taurin, hipotaurin, γ -lipoik asit, bilirubin, ürik asit, ubikinon, A vitamini (retinol), C vitamini (askorbik asit), E vitamini (α -tokoferol) ve çeşitli sekonder metabolitler (fenolik maddeler, flavonoidler, terpenler vb.) antioksidan aktiviteye önemli katkı sağlar (Gate ve diğ., 1999).

2.2.1. Antioksidan Enzimler

Hücrede yer alan ve oksidan molekülleri toksik olmayan moleküllere dönüştüren antioksidan enzimlerden en temel olanları Şekil 2.1’de gösterilmiştir. Ayrıca antioksidan bir molekül olarak iş gören indirgenmiş glutatyonun (GSH) çevrimini sağlayan glutatyon redüktaz ve yapısı bozulan moleküllerin onarımında görev alan bazı enzimler (örneğin, DNA onarım enzimleri, metiyonin sülfoksit redüktaz) de antioksidan savunmada dolaylı roller üstlenirler.

Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit radikal anyonunu daha az toksik olan hidrojen peroksite ve oksijene dönüştürür.



SOD’un iki tipi vardır:

- 1) Mangane içeren ve mitokondride bulunan Mn-SOD
- 2) Sitozolda yer alan ve bakır, çinko bağımlı SOD (Cu/Zn-SOD) (Halliwell ve Gutteridge, 1992).

Bu enzimler oksidatif strese karşı geliştirilen savunmanın ilk hattını oluştururlar.

Katalaz (CAT)

Hüresel detoksifikasyonda ikincil etkili enzim olan katalaz H_2O_2 'yi su ve oksijene çevirir. Katalaz iki işlevli bir enzimdir (Aebi, 1984).

1. Katalitik aktivite: H_2O_2 'nin su ve oksijene dönüştürülerek yıkılması.



2. Peroksidatif aktivite: Metanol, etanol, formik asit, fenoller gibi H vericilerinin 1 mol hidrojen peroksitle reaksiyona girerek oksitlenmesi.



Hangi reaksiyonun öncelikli olacağı H vericilerinin derişimine ve sistemde üretilen H_2O_2 'nin miktarına bağlıdır. Her iki durumda da önce aktif bir katalaz- H_2O_2 kompleksi (kompleks I) oluşur. İkinci H_2O_2 molekülünün kompleks I'e H vericisi olarak iş gördüğü H_2O_2 yıkım reaksiyonu, peroksidatif reaksiyona göre oldukça hızlı gerçekleşir.

Yapısında protoporfirin IX Fe (Hem) grubu bulunduğundan bir hemoprotein olarak kabul edilen katalaz, hemen tüm hayvan hücrelerinde ve aerobik mikroorganizmalarda bulunur. Mayalarda yer alan katalaz ilk olarak Seah ve Kaplan (1973) tarafından karakterize edilmiştir.

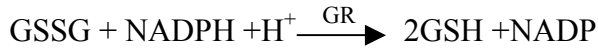
Glutasyon Peroksidaz (GSHPX)

H_2O_2 detoksifikasyonunda iş gören selenyum içeren glutasyon peroksidaz (GSHPX), indirgenmiş glutasyonu H_2O_2 ile oksitleyerek oksitlenmiş glutatona (GSSG) dönüştürür (Şekil 2. 1). Bu reaksiyon sırasında H_2O_2 de suya indirgenmiş olur.



Glutasyon Redüktaz (GR)

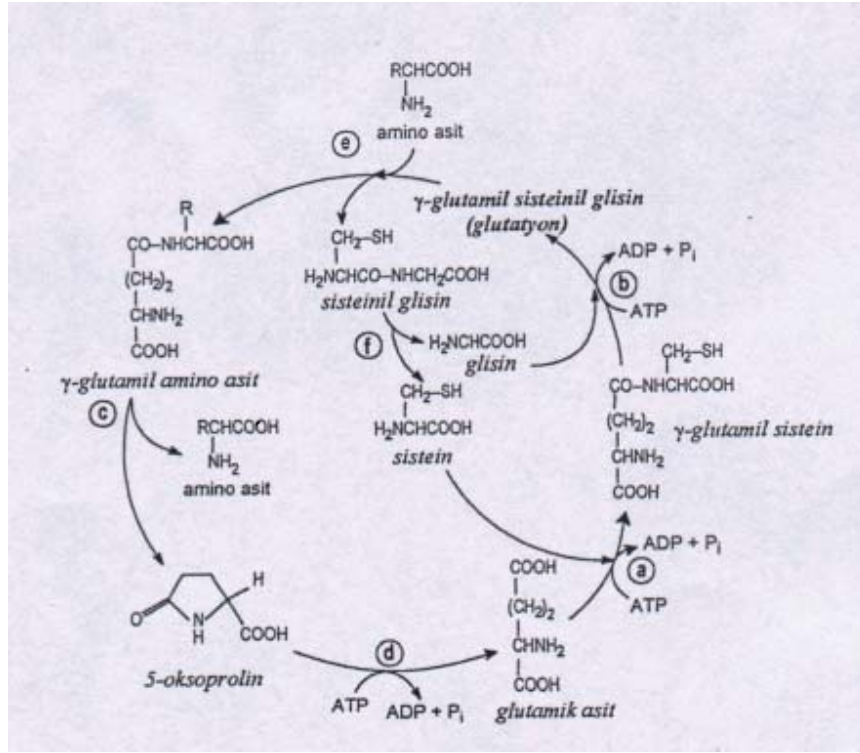
Bu enzim glutasyon metabolizmasının önemli bir elemanıdır ve NADPH'nin NADP⁺'ye çevrilmesiyle beraber GSSG'nin GSH'ye dönüşümünü sağlar. Bu reaksiyon GSH'nin *in vivo* varlığı için esastır.



2.2.2. Antioksidan Metabolitler

İndirgenmiş Glutasyon (GSH)

Ksenobiyotiklere ve doğal olarak ortaya çıkan serbest radikal ve hidroperoksitlere karşı hücrel savunmada görev alan bu tiyol bileşiği tripeptit (γ -Glu-Cys-Gly) yapısındadır. Hemen hemen tüm memeli dokularında bulunan bu moleküldeki aktif grup moleküldeki sistein amino asidinin tiyol (-SH) grubudur. Glutasyonun insan vücut sıvılarındaki derişimi çok düşük (mikromolar düzeyinde) olmakla beraber böbrek, karaciğer, akciğer gibi toksinlerin etkisine açık organlarda ve bağırsaklarda yüksek derişimde (milimolar düzeyinde) yer alır (De Leve ve Kaplowitz, 1991). Hücredeki sentezi γ -glutamilsistein sentetaz (GCS) ve glutasyon sentaz (GS) enzimlerinin görev aldığı altı kademeli bir reaksiyon serisiyle (**γ -glutamil çevrimi** adı verilir) gerçekleşir. Glutasyon sentezi ve metabolizması Şekil 2.2'de özetlenmiştir.



Şekil 2.2: Glutatyon sentezi ve metabolizması: (a) glutamil sistein sentetaz, (b) glutatyon sentetaz, (c) γ -glutamil siklotransferaz, (d) oksoprolinaz, (e) γ -glutamiltanspeptidaz (f) peptidaz (Pastore ve diğ., 2003)

GSH'nin toksik maddelerin uzaklaştırılmasında ve hücrenin korunmasında önemli rolleri vardır. Detoksifikasyondaki işlevleri aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

- peroksidaz reaksiyonlarıyla H_2O_2 'nin doğrudan veya dolaylı olarak uzaklaştırılması ve lipid hidroperoksitlerinin indirgenmesi,
- glutatyon-S transferaz aracılığıyla ksenobiyotiklere bağlanarak hidrofilik özelliğin artırılması ve ksenobiyotiğin hücreden atılımının kolaylaştırılması (Gate ve diğ., 1999),
- protein disülfid reaksiyonuyla proteinlerin (örneğin, insülin) yükseltgenme /indirgenme (redoks) düzeyinin ayarlanması (bu işlev insan, arke ve bakteride tanımlanmıştır).
- amino asitlerin hücre içine alınması,
- bazı bakterilerde ribonükleotitlerin indirgenmesi ve deoksiribonükleotitlerin oluşturulması.

- bazı biyosentez reaksiyonları için gerekli molekül çiftlerinin (konjugatların) oluşturulması (Michal 1999).

Glutasyon, koenzim A, çeşitli enzimler ve proteinler gibi birçok moleküle, sülfidril gruplarının sokulmasında rol oynayan transhidrojenasyon reaksiyonlarına da katılır.

GSH metabolizmasındaki aksamaların insanda birçok hastalıkla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Viral infeksiyonlar (Loguercio ve diğ., 1992; Shigesawa ve diğ., 1992; Staal ve diğ., 1992), solunum yolu hastalıkları (Pachter ve diğ., 1991; Grigg ve diğ., 1993), nörodejeneratif hastalıklar (örneğin Parkinson) (Jenner, 1994) ve dolaşım (Forman ve diğ., 1988) bozukluklarında GSH düzeyinin düştüğü bildirilmektedir.

Ayrıca GSSH'nin GSH'ye indirgenmesinde önemli rol oynayan NADPH'nin eksikliği çok büyük sorunlar yaratır. Mitokondri içermediği için NADPH rejenerasyonunun sadece glukoz-6- fosfat dehidrogenaz tarafından sağlandığı eritrositlerde, bu enzimin aktivitesinde X'e bağlı bir bozukluk taşıyan bireyler (100 milyondan fazla insanda görülmüştür) malaraya karşı geliştirilmiş bazı ilaçları aldıklarında veya bakla (*Vicia faba*) yediklerinde daha da ileri düzeyde etkilenecek hemolitik anemi sonucu hayatlarını kaybedebilirler (Michal, 1999).

Diğer Metabolitler

E vitamini (α -tokoferol) gibi **radikal süpürücüler**, radikal işlevini kendileri üstlenerek uzun ömürlü radikaller oluştururlar ve zincir reaksiyonlarını sonlandırırlar (bkz. Şekil 2.1) . Daha sonra da birbirleriyle veya diğer fizyolojik antioksidanlarla (örneğin, askorbat, ürik asit vb.) reaksiyona girerek yok edilirler (Zhang ve Omaye, 2001).

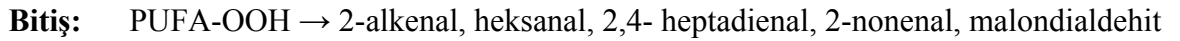
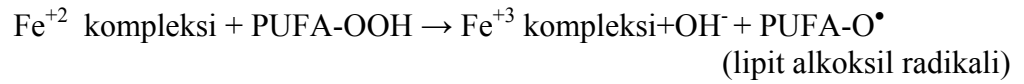
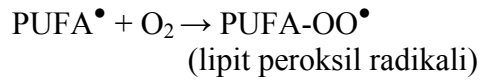
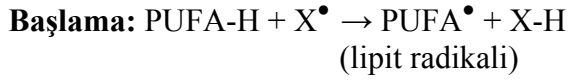
2.3. ÖNEMLİ HÜCRESEL BİLEŞENLERİN OKSİDASYONU

2.3.1. Lipit Peroksidasyonu

Reaktif oksijen türlerinin zar yapısı ve işlevleri üzerindeki zararlı etkileri en çok araştırılmış konulardan biridir. Hidroksil radikalının (HO^\bullet) neden olduğu en yaygın biyolojik hasar tipi lipit peroksidasyonudur. Lipit peroksidasyonu normal koşullar altında doğal bir süreçtir. Oksidatif stres uygulanması sonucunda lipitlerde oluşan hasarlar, temelde zar lipitlerinin başlıca yapıtaşı olan çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) otokatalitik bir süreçle oksidasyona uğramalarından kaynaklanır (Costa ve Ferreira, 2001). Bu süreçle birlikte yağ asitlerinin hidroperoksitleri oluşur ve bunlar da parçalanarak, epoksitler, aldehitler ve alkanlar gibi yan ürünlere dönüşür. Bu ürünlerden bazıları çok reaktiftir, DNA ve proteinleri hasara uğratarak başlangıç serbest radikal olaylarını artırır.

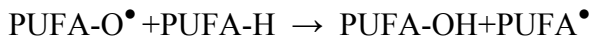
Lipit peroksidasyonu zardaki PUFA miktarı ile, lipit hidroperoksitlerinin toksisitesi ise koenzim Q ve glutatyon düzeylerindeki azalma ile ilişkilidir. Koenzim Q ve E vitamini gibi maddeler hücrelerdeki lipit peroksil radikallerini indirgeyerek koruma sağlarlar. Lipit hidroperoksitlerinin parçalanma ürünlerinden biri olan 4-hidroksi-2-nonenal'in, G_0/G_1 evresinde hücre bölünmesini inhibe ettiği bildirilmiştir. Hücre bölünmesinin yeniden başlaması için *de novo* glutatyon sentezinde artış olması gerekmektedir (Costa ve Ferreira, 2001).

Lipit peroksidasyon süreci başlama, uzama ve bitiş olmak üzere üç bölümden oluşur (Shewfat ve Purvis, 1995). Lipit peroksidasyonunun temel aşamaları ve bu sırada oluşan bazı toksik bileşikler Şekil 2. 3'te görülmektedir.



Şekil 2. 3: Lipit peroksidasyonunun aşamaları

Hidroksil radikalleri ve singlet oksijen PUFA'ların metilen grupları ile reaksiyona girerek konjuge dienler, lipit peroksil radikalleri ve hidroperoksitleri oluştururlar (Blokina ve diğ., 1995). Reaksiyona girme eğilimi oldukça yüksek olan peroksil radikali zincir reaksiyonlarını artırabilir. Oluşan lipit hidroperoksitleri (PUFA-OOH), indirgeyici metaller (Örneğin, Fe^{+2}) tarafından kesime uğratarak alkoksil radikallerine dönüştürülür ve bu radikal de ek zincir reaksiyonlarını başlatabilir (Buettner ve diğ., 1993).



Lipit hidroperoksitleri ve lipit yıkımının oksitlenmiş ürünleri sinyal transdüksiyon yolunda da görev alırlar (Tarchevski, 1992).

2.3.2. Protein Oksidasyonu

Proteinler, tüm reaktif oksijen türleri tarafından doğrudan oksitlenebileceği gibi, lipid peroksidasyonu ürünleriyle reaksiyona girerek de değişikliğe uğrayabilir. Süperoksit radikalleri özellikle enzimlerdeki 4Fe-4S kümelerini oksidasyona uğratarak demir açığa çıkarır ve enzimleri inaktive eder. Hidrojen peroksit, süperoksite göre daha zayıf bir oksidan olup proteindeki sistein amino asitlerinin aktif yerlerinde bulunan tiyol gruplarının oksidasyonunu gerçekleştirir ve bazı enzimlerin aktivitesini ortadan kaldırır. Tiyol gruplarının oksidasyonu, proteinlerdeki sistein bakiyeleri ile glutatyondaki tiyol grubu arasında kurulan kovalent bağlarla karmaşık disülfidlerin oluşumuna öncülük eder. Hidrojen peroksit aynı zamanda, proteindeki metiyonin amino asitlerini metiyonin sülfoksite veya sülfana oksitler.

Hidrojen peroksitin indirgenmesiyle oluşan hidroksil radikalleri en büyük zararı metal iyonlarının varlığında (Fenton reaksiyonu yoluyla) verir. Amino asit kalıntılarının karbonil türevlerine oksitlenmesi de hidrojen peroksitin önemli toksik etkilerinden biri olarak değerlendirilmektedir. Özellikle bazı amino asitlerin (arjinin, prolin, lizin ve histidin) karbonil oluşturma eğilimi yüksektir. Mayada H_2O_2 'nin uyardığı protein karbonilasyonunun özgün olduğu ve aktivitesini yitiren başlıca enzimlerin gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz ve bazı mitokondriyal enzimler olduğu bulunmuştur (Costa ve diğ., 2002). Peroksinitritin sinir hücrelerindeki bazı proteinlerin bozulmasına yol açtığı, bunun da MS ("multiple sclerosis") hastalığında önemli bir etken olduğu öne sürülmektedir (Davies, 1999).

2.3.3. DNA Oksidasyonu

DNA'nın oksidasyonu temelde baz ve şeker gruplarına serbest radikal eklenmesi veya çıkarılmasıyla gerçekleşir (Dizdaroğlu ve diğ., 2002). Sonuçta; şeker ve bazlarda modifikasyonlar, tek ve çift zincir kırıkları, bazsız bölgeler ve DNA-protein çapraz bağları meydana gelir. Bu hasarlardan baz modifikasyonları öldürücü ve mutajenik etkilerinden

dolayı önemlidir. *S.cerevisiae*'de hidrojen peroksit ve süperoksit oluşturan bileşiklerin bazların oksidasyonunu uyardığı, zincir kırıklarına neden olduğu ve kromozom içi rekombinasyon sıklığını artırdığı bulunmuştur (Costa ve diğ., 2002).

2.4. MAYALARDA OKSİDATİF STRES

Maya hücreleri gerek doğal olarak, gerekse insanların yol açtığı çeşitli çevresel etkilerle oluşan bazı stres koşulları altında yaşamak zorunda kalırlar (Walker, 1998). Mayaların karşılaşılabileceği bazı çevresel stres koşulları Tablo 2.1'de özetlenmiştir. Metabolizma sırasındaki kimyasal stres, üreme ortamında bulunan bileşiklerden veya mayalar tarafından üretilen toksik metabolitlerden kaynaklanabilir. Bunlara ek olarak, bazı endüstriyel süreçler de [fermentörlerdeki mayaların asit ile yıkanması veya bazı yiyeceklere koruyucuların (örneğin, zayıf asitlerin) eklenmesi gibi] maya hücreleri üzerinde kimyasal stres yaratır. Maya hücrelerini etkileyen stres koşulları içinde oksidatif stresin de önemli bir yeri vardır.

Tablo 2.1 Mayaların karşılaşılabileceği bazı çevresel stres koşulları (Walker, 1998)

Fiziksel stres koşulları
Isı şoku
Ozmotik şok
Kurutma / susuzlaştırma
Yüksek su / gaz basıncı
Radyasyon
Kimyasal stres koşulları
Etanol ve diğer metabolitlerin toksisitesi
Besin sınırlaması / açlık
Oksidatif stres
pH şoku
Metal iyonu stresi
Kimyasal mutagenez
Biyolojik stres koşulları
Hücre yaşlanma
Genotipik değişimler (kromozom kaybı vb.)
Diğer organizmalar ile yarışma

Özellikle aerobik solunum sürecinde $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 ve OH^{\bullet} gibi reaktif oksijen türleri maya

hücrelerini hedef alır. Üreme ortamındaki çözülmüş oksijen derişimi artarsa veya iyonize radyasyon uygulanırsa, bu partiküllerin proteinler, lipitler ve DNA’da yol açacağı oksidatif hasar artar. Maya hücrelerinin oksidatif stres ile karşılaştıklarında, içerdikleri antioksidan moleküller ve enzimler aracılığıyla aktif oksijeni ortamdaki uzaklaştırmaya çalıştıkları bildirilmektedir (Walker, 1998). Mayalardaki antioksidan savunma sistemleri Tablo 2. 2’de özetlenmiştir.

Tablo 2.2 Mayalarda yer alan temel antioksidan savunma sistemleri (Walker, 1998)

Savunma enzimleri ve kimyasallar	İşlevi
Enzimler	
Cu/Zn süperoksit dismutaz	Süperoksit anyonun uzaklaştırılması (sitoplazma)
Mn süperoksit dismutaz	Süperoksit anyonun uzaklaştırılması (mitokondri)
Katalaz A	Hidrojen peroksitin parçalanması (peroksizom)
Katalaz T	Hidrojen peroksitin parçalanması (sitoplazma)
Sitokrom c peroksidaz	Hidrojen peroksitin indirgenmesi
Glutasyon redüktaz	Yükseltgenmiş glutasyonun indirgenmesi
Kimyasallar	
Glutasyon	Oksijen içermeyen radikallerin uzaklaştırılması
Metallotiyonein	Cu ⁺² bağlama, süperoksit ve hidroksil radikallerinin uzaklaştırılması
Tiyoredoksin	Proteinlerdeki disülfid bağlarının indirgenmesi
Poliaminler	Lipidlerin oksidasyondan korunması

Oksidatif stresin moleküler mekanizmasının aydınlatılmasına yönelik pek çok çalışma mayalarla gerçekleştirilmiştir.

S.cerevisiae’de konuya ilişkin çok sayıda metabolik ve genetik çalışma yapılmıştır. *S.cerevisiae*’de hücreiçi glutasyon düzeyinin H₂O₂’ye karşı oluşturulan oksidatif stres cevabındaki rolü araştırılmış ve γ -glutamilsistein sentetaz (GSH-I) inhibisyonu sonucunda H₂O₂’ye duyarlılığın arttığı ve H₂O₂’ye karşı oluşturulan uyumluluk cevabının baskılandığı görülmüştür (Izawa ve diğ., 1995). Buna benzer bir çalışmada, GSH I geni kusurlu (glutasyon sentezleme yetenekleri olmayan) mutantların üremelerini sürdürebilmeleri için üreme ortamına dışarıdan glutasyon ilavesine gereksinim duydukları belirlenmiştir (Grant ve diğ., 1996). Bu mutantlarda, ditiyotireyitol, β -merkaptotanol ve sistein gibi sulfidril grubu içeren indirgeyici ajanlar varlığında da üremenin sürdürülebildiği görülmüş, buna

göre GSH'nin normal hücreler sırasında sadece indirgeyici olarak rol oynadığı belirlenmiştir. GSH I geni kusurlu mutantlar kullanılarak yapılan diğer bir çalışmada, bu mutantların H₂O₂ ve süperoksit anyonlarına aşırı duyarlılık gösterdikleri, logaritmik ve durağan faz kültürleri kullanılarak gösterilmiştir (Stephen ve Jameison, 1996).

S. cerevisiae'de yapılan çalışmalarla, bazı anahtar metabolik enzimlerin H₂O₂ tarafından karbonilasyona teşvik edildiği bulunmuş ve oksidatif stres cevabının oluşturulmasında düzenleyici görevleri olan Yap 1 ve Skn 7 transkripsiyon faktörlerinin rolleri araştırılmıştır (Costa ve diğ., 2002). Diğer bir enzimatik çalışmada ise oluşturulan oksidatif stres cevabı sonucunda glutatyon peroksidazı şifreleyen genlerin analizi yapılmış; bu amaçla glutatyon peroksidaz homologu üç geni (GPX1, GPX2, GPX3) mutasyona uğratılmış, *gpx3* mutantlarının peroksitlere karşı duyarlı oldukları gözlenirken *gpx1* ve *gpx2* mutantları böyle bir fenotip ortaya koymamışlardır (Inoue ve diğ., 1999). *S. cerevisiae*'de antioksidan cevabı oluşturan enzimlerden süperoksit dismutazı ve katalazı şifreleyen genlerde mutasyon oluşturulmuş, glutatyon düzeyleri de düşürülmüş ve maya hücrelerinin peroksinitrit ve nitrit okside karşı oluşturduğu cevap incelenmiştir (Jakubowski ve diğ., 1999). SOD mutantları kullanılarak, oksidatif stres parametrelerine bakıldığı bu çalışmada SOD-1 delesyonlu suşlar kullanılmış, hücre içi oksidasyon düzeyi, lipid peroksidasyonu, glutatyon metabolizması incelenmiş ve hücrenin redoks potansiyelinde bir dengesizlik ortaya çıktığı belirlenmiştir. *S. cerevisiae*'de oksidatif stres cevabı DNA mikroarrayleri kullanılarak da gösterilmiştir, bu amaçla glukoz bakımından sınırlı kemostat kültürler kullanılarak üretilen maya hücreleri, yeni bir karbon kaynağına (oleat) geçişe zorlanmıştır, bunun sonucunda gen anlatımındaki değişimler DNA mikroarrayleri kullanılarak belirlenmiştir (Koerkamp ve diğ., 2002). Bu çalışmalara ek olarak *S. cerevisiae*'de bazı bileşiklerin ve enzimlerin koruyucu etkileri de araştırılmıştır: Selenyum bileşiklerinin ve vitamin A ile vitamin E'nin koruyucu etkileri incelenmiştir (Bronzetti ve diğ., 2001). Maya hücrelerinde H₂O₂'ye karşı lipoik asidin koruyucu etkileri incelenmiş, koruyucu etkinin daha iyi anlaşılabilmesi için süperoksit dismutaz geni delesyonlu bazı maya suşları kullanılmıştır ve lipoik asidin, mitotik bölünme sayısını ve canlılık oranlarını artırdığı bulunmuştur (Croce ve diğ., 2003). İyonize radyasyon uygulanmış *S. cerevisiae* hücrelerinde süperoksit dismutaz enziminin koruyucu etkileri araştırılmış, iyonize radyasyon uygulanmış yabancı tip ve SOD geni delesyonlu suşlar arasında karşılaştırmalar

yapıldığında canlılık oranları ve protein karbonil düzeyleri arasında belirgin farklılıklar gözlenmiştir (Lee ve diğ., 2001).

S. pombe'de yapılmış çalışmalar ise daha çok;

- hidrojen peroksitli ortamlara uyumluluk cevabının oluşumu (Mutoh ve diğ., 1995),
- çeşitli stres koşullarında selenosistein içermeyen glutatyon peroksidaz homologunun indüksiyonu (Yamada ve diğ., 1999)
- çeşitli kimyasal stres koşullarında katalaz geninin indüksiyonu (Nakagawa ve diğ., 1999),
- Mn-SOD'un karakterizasyonu ve kontrolü (Jeong ve diğ., 2001),
- Cu,Zn-SOD'un hücre çevrimindeki işlevinin kontrolü (Lee ve diğ., 2002),
- stres sonucu indüklenebilen bir genin (glutatyon S-transferaz) izolasyonu (Cho ve diğ., 2002), karakterizasyonu, anlatımı ve kontrolü (Shin ve diğ., 2002), oksidatif stres cevabının oluşturulmasındaki rolü (Veal ve diğ., 2002),
- tiyoredoksin kodlayan genin karakterizasyonu ve kontrolü (Cho ve diğ., 2001),
- artan H₂O₂ düzeylerinin belirli düzenleyici proteinleri kodlaması (Quinn ve diğ., 2002),

gibi konularda yoğunlaşmıştır. Bu çalışma ile yakından ilişkili literatürler incelendiğinde, *S. pombe*'de oksidatif stresle ilgili bazı önemli ipuçları elde edildiği görülmüştür. Buna göre *S. pombe* hücrelerinin öldürücü olmayan dozlarda H₂O₂ ile ön işleme sokulduğunda yüksek dozlardaki stres uygulamalarının (örneğin, H₂O₂, etanol, yüksek sıcaklık) öldürücü etkilerine karşı direnç kazandıkları bulunmuştur. Ayrıca hücrelerin H₂O₂ içeren ortamlara uyum sağlarken 15 kadar yeni polipeptit ürettiği ve katalaz aktivitesini 8 kata kadar artırabildiği bildirilmektedir (Mutoh ve diğ., 1995). *S. pombe* ile yapılan çalışmalar temel antioksidan savunmanın katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz gibi enzimler tarafından yapıldığını ortaya koymuştur (Mutoh ve diğ., 1995; Yamada ve diğ., 1999; Nakagawa ve diğ., 1999; Jeong ve diğ., 2001). Bununla beraber bu maya türünde oksidatif stresin biyokimyasal göstergelerine ilişkin bir çalışmaya rastlanmamıştır. Özellikle *S. cerevisiae*'de glutatyonun oksidatif strese dirençlilik oluşturmadaki rolü ayrıntılı biçimde araştırılmış olmasına (Izawa ve diğ., 1995; Grant ve diğ., 1996; Stephen ve Jameison, 1996) rağmen *S. pombe*'de bu metabolitle ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır.

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 olan *Schizosaccharomyces pombe* Linder *liquifaciens* maya türünün yabani ırkı (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 (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 diğ. (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. Gelişigüzel seçilen kolonilerden öze ile alınan örnek eğri YEA'ya ekilerek 30°C'da 3 gün üretildi. Her deney bu şekilde hazırlanan 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 Malassez lamı kullanılarak ve aşağıdaki formülden yararlanılarak hesaplandı.

$$\text{hücre/ml} = \text{ortalama hücre sayısı} \times 10^5 \times \text{sulandırım oranı}$$

Başlangıç hücre sayısı 10^6 hücre/ml olacak şekilde bu süspansiyondan YEL besi ortamına uygun hacimlerde ekim yapıldı ve hücrelerin 30°C 'da, 180 devir/dakika hızda çalkalamalı etüvde üremeleri sağlandı.

3.4. ÜREMENİN İZLENMESİ

Üremenin izlenmesi için Bölüm 3.3.'te belirtilen şekilde başlatılan kültürden belli zaman aralıklarında (iki saatte bir) alınan örneklerin 600 nm dalga boyundaki optik yoğunlukları spektrofotometrede (Shimadzu UV-160) belirlendi. Elde edilen değerler aynı hücre ırkına ait kültürün, mililitresindeki hücre sayısı bilinen çeşitli sulandırımınının 600 nm'de ölçülen OD değerlerine göre çizilen standart grafik yardımıyla hücre/ml şeklinde ifade edildi. 3 kez tekrarlanan deneylere ait ölçüm sonuçlarının ortalaması alındı ve hücre/ml değerlerinin zamanla değişimi, çizilen bir üreme eğrisiyle gösterildi.

3.5. OKSİDATİF STRES UYGULAMASI

Oksidatif stres uygulaması, logaritmik evrenin ortalarına yakın zaman aralığında, 12.-13. saatlerde (kültürdeki hücre sayısının $\sim 2 \times 10^7$ hücre/ml değerine ulaştığı zaman) gerçekleştirildi.

Bu amaçla, öncelikle 1 gecelik sıvı kültürler hazırlandı. Uygun hücre sayısına ulaşıldığında ($\sim 2 \times 10^7$), kültür ortamından her bir deney grubu için 10 ml alındı ve hücreler $3000 g$ 'de, 5 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Bu hücreler H_2O_2 içermeyen (kontrol) ve 0.2, 1.0, 2.0

veya 5.0 mM H₂O₂ içeren (deney grupları) 10 ml besi ortamlarında başlangıç hücre sayıları eşit (10⁷ hücre/ml) olacak şekilde yeniden süspansiyon edildi.

1 saat boyunca 30°C'da, 180 devir/dakika hızda çalkalamalı etüvde inkübasyona bırakılan hücreler bu süre sonunda santrifüj edilerek toplandı (3000 g, 5 dakika) ve 2 kez steril saf su ile yıkanarak tekrar santrifüjleme ile ayrıldı.

Bu hücrelerin bir kısmı taze YEL besi ortamında yeniden süspansiyon edilerek canlılık oranları belirlendi ve hücre morfolojileri incelendi. Diğer bir kısım hücre, glutatyon ve protein miktarı ile katalaz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla, 0.05 M, pH 7.8 fosfat tamponunda homojenize edildi. Bir kısmına ise hücre içi oksidasyon düzeyinin belirlenmesine yönelik işlemler uygulandı.

3.6. HÜCRE MORFOLOJİLERİNİN İNCELENMESİ

Farklı derişimlerde H₂O₂ içeren ortamlarda üretilen deney grubu hücrelerle H₂O₂'siz ortamda üretilen kontrol hücrelerinin morfolojilerini karşılaştırmak amacıyla kültürlerden hazırlanan lam\lamel arası preparatlar ışık mikroskopunda incelendi ve hücrelerin görünümü fotoğraf çekilerek belgelendi.

3.7. OKSİDATİF STRES KOŞULLARINDA CANLILIĞIN BELİRLENMESİ

Çalışmada uygulanan oksidatif stres koşullarında hücrenin canlılığını hangi oranda sürdürebildiğini belirlemek amacıyla duyarlılık testleri ve koloni sayımları yapıldı.

3.7.1. Duyarlılık Testi

Hücrelerin oksidatif stres yaratmak amacıyla besi ortamına eklenen H₂O₂'ye karşı duyarlılığını saptamak için, kontrol (H₂O₂ uygulanmamış) ve deney grubu (1 saat süreyle 0.2, 1.0, 2.0 ve 5.0 mM H₂O₂ uygulanmış) hücrelere, besi ortamına H₂O₂ eklenmeden önce ve sonra aşağıdaki işlemler uygulandı.

Başlangıç hücre sayıları eşit (10⁷ hücre/ml) olan örnekler 10⁻¹, 10⁻² ve 10⁻³ kez sulandırıldıktan sonra, YEA içeren petrilere eşit hacimde (10 µl), tek damla olacak şekilde yan yana uygulandı. 30°C'da 48 saat süreyle üretilen hücrelerin petrileredeki üreme durumları karşılaştırılarak farklı H₂O₂ derişimlerdeki duyarlılıkları görsel olarak değerlendirildi (Lee ve diğ., 1999) ve bulgular fotoğraf makinasıyla görüntülendi.

3.7.2. Koloni Sayımı

Duyarlılık testi uygulanan örneklerdeki hücrelerin üreme yeteneği koloni sayımı yöntemiyle belirlendi (Walker, 1998). Bu yöntemde H₂O₂ uygulanmadan önce ve sonra uygun oranlarda sulandırılan hücre süspansiyonları her bir petride 10² hücre (örneğin, 10³ hücre/ml'lik sulandırmadan 100 µl) olacak şekilde YEA besi ortamlarına yayma yöntemiyle ekildi, 30°C'da 48 saat üremeleri sağlandı ve oluşan koloniler sayıldı. Uygulama öncesi ve sonrasındaki sayılar göz önüne alınarak her bir H₂O₂ derişimi için canlılık oranı (%) hesaplandı. 3 kez tekrarlanan deneylere ait değerlerin ortalaması alındı ve oksidatif stresin canlılık üzerindeki etkisi, canlılık oranları (%) ile artan H₂O₂ derişimleri arasında çizilen grafiğe göre değerlendirildi.

3.8. HAM ÖZÜT HAZIRLANMASI

Sıvı besi ortamındaki hücrelerden ham özüt hazırlanmasında Jakubowski ve diğ. (2000) tarafından önerilen yöntem kullanıldı. Kontrol grubu ve H₂O₂ uygulanmış deney grubundaki hücreler, 3000 g²de 5 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Hücre çökeltisi, besi

ortamı kalıntılarında arındırılmak üzere 10 ml steril saf su ile 2 kez yıkandı. Daha sonra uygulanacak işlemlere göre %5 (v/v) oranındaki uygun bir çözücüde (tampon) veya deiyonize su ile süspanse edildi. Her bir örnek üzerine asit ile yıkanmış 1g cam boncuk (0.25-0.30 mm çapında) eklendikten sonra tüp karıştırıcıda 1 dakika karıştırma, 1 dakika buzda bekletme işlemleri tekrarlanarak parçalama gerçekleştirildi. Parçalama işleminin başarılı olup olmadığını kontrol etmek için, hücre homojenatı mikroskop altında incelendi ve hücrelerin ~% 90'ı parçalanana kadar (~20 dakika) parçalama işlemi sürdürüldü. Cam boncuklar, parçalanmış hücrelere ait zar kalıntıları ve parçalanmamış hücreler 3000 g'de, 5 dakika, 4°C'da santrifüjlenerek çöktürüldü. Üst sıvı mikropipet yardımıyla mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Santrifüjleme 4°C'da, 14.000 g'de , 10 dakika süreyle tekrarlanarak bulanıklık giderildi. Üst sıvı yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alındı. Elde edilen ham özütler deneylerde kullanılmak üzere -20°C'da saklandı.

3.9. HAM ÖZÜTTEKİ PROTEİN DERİŞİMİNİN BELİRLENMESİ

Ham özütlerdeki protein derişimi Waterborg (2002) tarafından modifiye edilmiş Lowry yöntemine göre belirlendi (Lowry ve diğ., 1951). Bu yöntemde kullanılan çözeltiler Tablo 3.1'de verildi.

Tablo 3.1: 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 I. reaktifi	100 ml A: 1 ml B: 1ml C
Folin belirteci	1 N Folin-Ciocalteau

Yöntemin duyarlılık sınırlarına (10-1000 µg/ml) uygun olarak hazırlanmış sığır serum albumin (BSA) standartları (10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 µg/ml), 0.05 M fosfat tamponunda (pH 7.8) hazırlanmış ve 2 kez sulandırılmış ham özütler veya kör örnekten (0.05 M fosfat tamponu, pH 7.8) 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.

3.10. HÜCREİÇİ OKSİDASYON DÜZEYİNİN ÖLÇÜLMESİ

Hücreiçi oksidasyon düzeyinin belirlenmesinde Pereira ve diğ. (2003) ile Inoue ve diğ. (1999) tarafından önerilen yöntemler modifiye edilerek kullanıldı.

Bu yöntemde öncelikle 10 ml'lik hücre süspansiyonunun 3000 g'de 5 dakika santrifüjlenmesiyle toplanan hücreler, 10 ml YEL besi ortamında yeniden süspanse edildi. Bu kültüre etanol içerisinde hazırlanmış 1 mM'lık stok karboksifluoresin diasetat (H₂DCFDA) çözeltisinden, son derişim 10 µM olacak şekilde eklendi ve 30°C'da 15 dakika bekletildi. Bu süre sonunda örnekler deneyde kullanılan derişimlerdeki H₂O₂ ile 1 saat işleme sokuldu. Tekrar santrifüj edilerek toplanan hücreler iki kez deiyonize su ile yıkandı. Her bir deney grubunda yer alan hücreler 500 µl deiyonize su içinde yeniden süspanse edildikten sonra, Bölüm 3.8'de belirtildiği şekilde parçalandı. Homojenatların santrifüjlenmesinden (14.000 g, 5 dakika) sonra elde edilen süpernatanttan 250 µl alındı, üzerine 2.5 ml deiyonize su eklendi ve serbest radikallerin etkisiyle oluşan diklorofluoresinin (DCF) yaydığı fluoresans, spektrofluorometrede (Shimadzu, RF-1501) eksitasyon ve emisyon dalga boyları sırasıyla 490 ve 524 nm olacak şekilde ölçüldü. Deney grupları için okunan fluoresans değerleri, kontrol grubuna göre bağıl olarak değerlendirildi.

3 kez tekrarlanan deneylere ait ölçüm sonuçlarının ortalaması alındı ve artan H₂O₂ derişimi ile bağıl fluoresans (%) değerleri arasındaki ilişki sütun şeklindeki bir grafikte gösterildi.

3.11. LİPİT PEROKSİDASYONUNUN ÖLÇÜLMESİ

Lipit peroksidasyonu tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyon veren bileşiklerin (TBARS, “thiobarbituric acid reactive substances”) belirlenmesine dayanan yöntemle ölçüldü (Aust, 1994). Bu amaçla her bir grup için çalkalamalı etüvde (30°C, 180 devir/dakika) üretilen bir gecelik sıvı kültürlerin 10’ar ml’lik kısımlarındaki hücreler santrifüj (3000 g, 5 dakika) edilerek toplandı. Hücreler aynı besi ortamı içinde yeniden süspanse edildi ve ortama deneyde kullanılan derişimlerde H₂O₂ eklendi. Çalkalayıcılı etüvde (30°C, 180 devir/dakika,) 3 saatlik inkübasyondan sonra süspansiyondan 0.5 ml’lik bir kısım alındı ve 1ml TBA reaktifi [0.25 M HCl; % 15 (w/v) trikloroasetik asit (TCA); % 0.375 (w/v) tiyobarbitürik asit (TBA)] ile karıştırıldı. Bu karışım 15 dakika kaynar su banyosunda bekletildi. Bu süre sonunda hücre kalıntılarında kurtulmak amacıyla santrifüjleme (3000 devir/dakika, 5 dakika) yapıldı. Sıvı fazın absorbansı 1 ml TBA reaktifi ve 0.5 ml distile deiyonize sudan oluşan kör örnek kullanılarak, 535 nm dalga boyunda ölçüldü. Örneklerin TBARS içeriği belirli miktarlarda (0.82, 1.23, 1.64, 2.46, 3.28 µg) malondialdehit (MDA, 1,1,3,3-tetrametoksipropan) içeren çözeltilerin deney sonundaki absorbans değerlerine göre çizilen standart grafik yardımıyla hesaplandı. Protein derişimleri Bölüm 3.9’da belirtildiği şekilde belirlendi. 3 kez tekrarlanan deneylere ait ölçüm sonuçlarının ortalaması alındı ve elde edilen sonuçlar µg MDA/mg protein birimiyle ifade edildi.

3.12. İNDİRGENMİŞ GLUTATYON (GSH) DÜZEYİNİN BELİRLENMESİ

İndirgenmiş glutatyon (GSH) düzeyini belirlemek için, ham özütteki serbest sülfidril gruplarının Ellman ayırıcı ile oluşturduğu kompleksin 412 nm dalga boyundaki absorbansı Beutler (1975) tarafından önerilen yöntemle ölçüldü. Kullanılan çözeltiler Tablo 3.2’de verildi.

Bölüm 3.8’de belirtildiği şekilde 0.05 M fosfat tamponu (pH 7.8) ile hazırlanan hücre homojenatının 0.5 ml’si üzerine 0.75 ml proteinsizleştirme çözeltisi eklendi. Karışım tüp karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra 5 dakika bekletildi, 2000 g’de 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatanttan 0.5 ml alınarak üzerine 2 ml fosfat çözeltisi ve 0.5 ml Ellman ayıracı eklendi. Ayıraç eklendikten sonraki 5 dakika içinde 412 nm’de okuma yapıldı. Bu değerlerin μg GSH karşılıkları belirli miktarlarda (5, 10, 12, 15, 17, 20, 22, 25, 30 μg) GSH içeren çözeltilerin 412 nm’deki absorbans değerlerine göre çizilen standart grafik yardımıyla hesaplandı. 3 kez tekrarlanan deneylere ait ölçüm sonuçlarının ortalaması alındı ve farklı örneklerin GSH içeriği protein derişimleri de hesaba katılarak $\mu\text{gGSH}/\text{mg}$ protein cinsinden ifade edildi ve histogramda karşılaştırıldı.

Tablo 3.2 GSH düzeyinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler

Kullanılan Çözeltiler	İçerik
Proteinsizleştirme çözeltisi	0.2 M Metafosforik asit (glasiyel fosforik asit) 2.7 mM EDTA-disodyum tuzu 5 M NaCl
Fosfat çözeltisi	0.3 M Na_2HPO_4
Ellman ayıracı	1 mM 5-5’-ditiobis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB) [%1’lik sodyum sitrat çözeltisi içinde hazırlanmış]

3.13. KATALAZ AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

Katalaz aktivitesi Jakubowski ve diğ. (2000) tarafından önerilen yöntemle belirlendi. Bölüm 3.8’de anlatıldığı şekilde hazırlanan ham özütten 100 μl alınarak, 333 μl H_2O_2 çözeltisi (54 mM) ve 567 μl fosfat tamponundan (0.05 M, pH 7.0) oluşan reaksiyon karışımına hızlı bir şekilde eklendi. Reaksiyon 1 dakika boyunca 240 nm’deki absorbans düşüşü ile izlendi. 3 kez tekrarlanan deneylere ait ölçüm sonuçlarının ortalaması alındı ve örneklerdeki katalaz aktivitesi $\Delta A_{240}/\text{dakika}/\text{ml}$ reaksiyon karışımı birimiyle ifade edildi.

4. BULGULAR

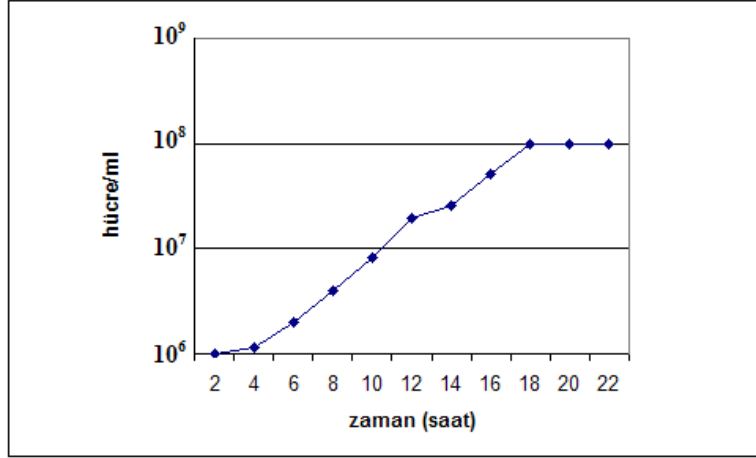
4.1. *S. POMBE*'NİN ÜREME EĞRİSİ

Oksidatif stres uygulaması, logaritmik evrenin ortalarına yakın bir zaman aralığında (hücre sayısı $\sim 2 \times 10^7$ hücre/ml değerine ulaştığında) gerçekleştirileceği için, öncelikle çalışmada kullanılan *S. pombe* (972h) yabancı ırkının üremesi Bölüm 3.4'te açıklanan yöntemle izlendi. Hücre sayısı bilinen belli hacimdeki süspansiyonların 600 nm'deki OD değerlerinden (Tablo 4.1) yararlanılarak çizilen üreme eğrisi Şekil 4.1'de verildi.

Tablo 4.1: *S. pombe* kültürlerinde zamana bağlı üremenin izlenmesi

Zaman (saat)	OD ₆₀₀	Hücre/ml
0	0.043	1×10^6
2	0.046	1×10^6
4	0.06	1.3×10^6
6	0.094	2×10^6
8	0.184	4×10^6
10	0.342	8×10^6
12	0.532	2×10^7
14	0.701	2.6×10^7
16	0.783	5.15×10^7
18	0.816	1×10^8
20	0.807	1×10^8
22	0.807	1×10^8

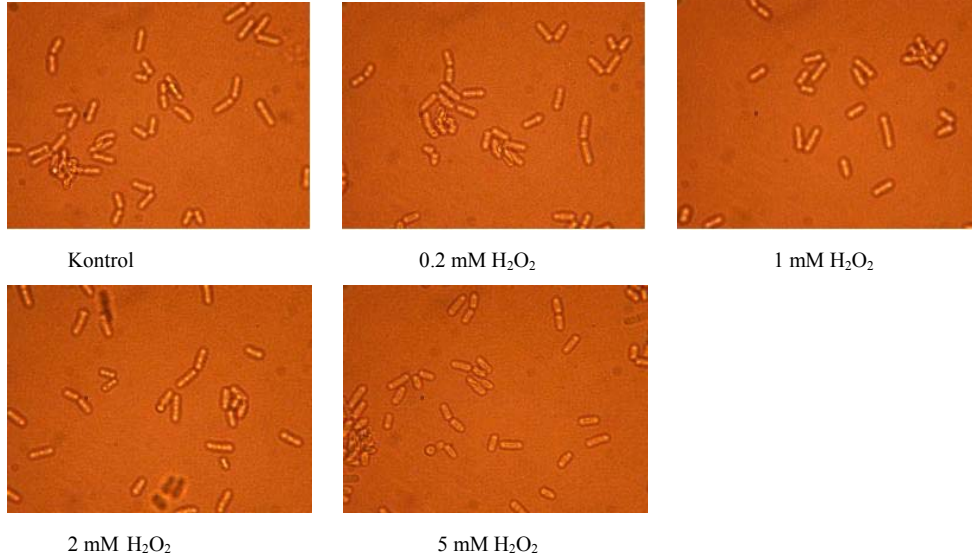
Buna göre kültürün 12.-13. saatlerinde logaritmik fazın ortalarına yaklaşıldığı ve bu evrede hücre sayısının yaklaşık 2×10^7 'ye ulaştığı gözlemlendi.



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

4. 2. OKSİDATİF STRES KOŞULLARINDA HÜCRE MORFOLOJİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Farklı derişimlerde H₂O₂ uygulanan örneklere ait hücrelerin mikroskopik incelemelerine ait bulgular Şekil 4.2’de verildi



Şekil 4.2: H₂O₂ uygulanmamış (kontrol) ve farklı derişimlerde H₂O₂ uygulanmış (deney)

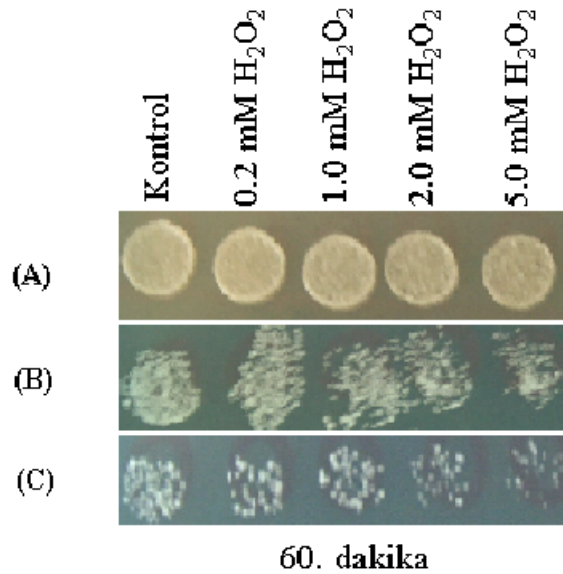
S. pombe hücrelerinin mikroskop altındaki görünüşleri (Büyütme x 600)

Fizyolojik koşulların hücre morfolojisini (örneğin, ortalama hücre hacmini) etkilediği bilindiğinden, metabolik çalışmalarda kültürdeki hücrelerin genel morfolojisi hakkında bilgi edinilmesi önerilmektedir (Walker, 1998). Bu çalışmada elde edilen veriler, deney gruplarına uygulanan farklı derişimlerdeki H_2O_2 'nin hücre morfolojisini etkilemediğini gösterdi.

4. 3. OKSİDATİF STRES KOŞULLARINDA CANLILIK

4. 3. 1. Duyarlılık Testi

Besi ortamına H_2O_2 eklendikten sonra uygun şekilde sulandırılmış ve tek damla halinde YEA'ya uygulanmış örneklerin 48 saat, $30^\circ C$ 'da üretilmesinden sonra saptanan üreme durumları Şekil 4.3'te verildi. 10^{-1} ve 10^{-2} sulandırımli tüm örneklerin H_2O_2 uygulamasından sonra, sağlıklı bir karşılaştırma yapmaya elverişli olmadığı görüldü. Artan H_2O_2 derişiminin maya üremesini azalttığı en iyi 10^{-3} sulandırımli örneklerde gözlendi. H_2O_2 'nin hücre üremesi üzerindeki olumsuz etkisi özellikle 2.0 ve 5.0 mM'lık H_2O_2 uygulamalarında oldukça belirgindi. Bununla beraber 0.2 ve 1.0 mM H_2O_2 uygulanan hücrelerin üreme durumları çok belirgin bir farklılığı yansıtmadı (Şekil 4.3).

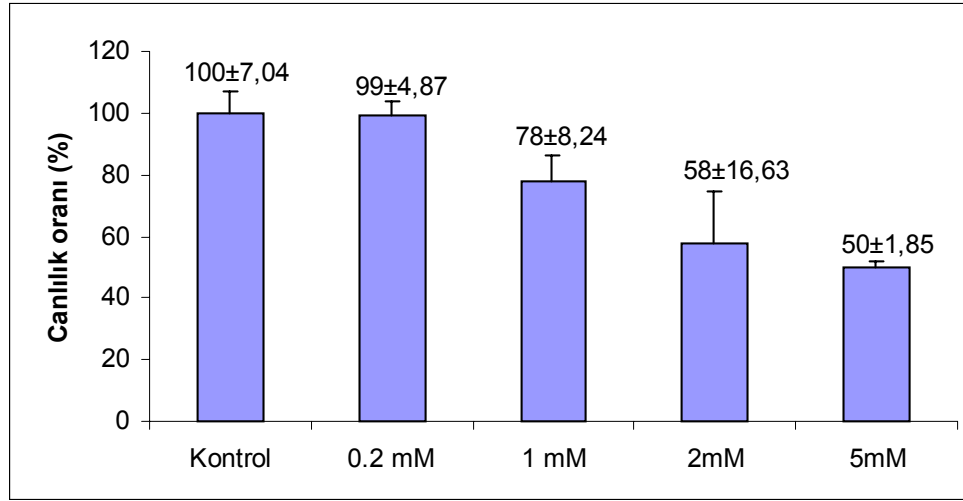


Şekil 4.3: Farklı derişimlerde H_2O_2 uygulanmış *S. pombe* hücrelerinde üreme durumları

Hücre sayıları (A)'da 10^4 , (B)'de 10^3 ve (C)'de 10^2 'dir.

4. 3. 2. Koloni Sayımları

H₂O₂ uygulaması öncesinde ve sonrasında belirlenen hücre sayılarına göre oluşturulan histogramda da görüldüğü gibi (Şekil 4.4), 0.2 mM H₂O₂ uygulanmış örnek hariç, tüm stres koşullarında canlılık oranının belirgin şekilde azaldığı gözlemlendi. Canlılık oranının kontrol grubunda % 100, 0.2 mM H₂O₂ uygulanmış örnekte ise %99 olduğu yani korunduğu; buna karşılık 1.0, 2.0 ve 5.0 mM H₂O₂ uygulanmış örneklerde azaldığı (sırasıyla %78, %58 ve %50) belirlendi.



Şekil 4.4: Farklı derişimlerde H₂O₂ uygulanmış *S. pombe* hücrelerinde canlılık oranları, dikey çizgiler standart sapma (\pm S.D.) değerlerini göstermektedir

Ancak 2mM ve 5mM uygulamaları \pm S.D. değerleri gözönüne alınarak karşılaştırıldığında, bu iki örnekteki canlılık oranının birbirine çok yakın olduğu gözlemlendi.

4. 4. HAM ÖZÜTLERİN PROTEİN DERİŞİMİ

Bu çalışmada GSH ve lipid peroksidasyonu bulguları, sırasıyla μg GSH/mg protein ve μg MDA/mg protein birimleriyle ifade edildiğinden, bu ölçümlerin yapıldığı hücrelerden hazırlanan ham özütlerdeki protein derişimleri Bölüm 3.9’da belirtildiği şekilde saptandı. Her bir deney grubu için ayrı ayrı belirlenen bu derişimler Tablo 4.2’de verildi.

Tablo 4.2: Farklı derişimlerde H_2O_2 uygulanmış *S. pombe* hücrelerinden hazırlanan özütlerdeki protein derişimleri

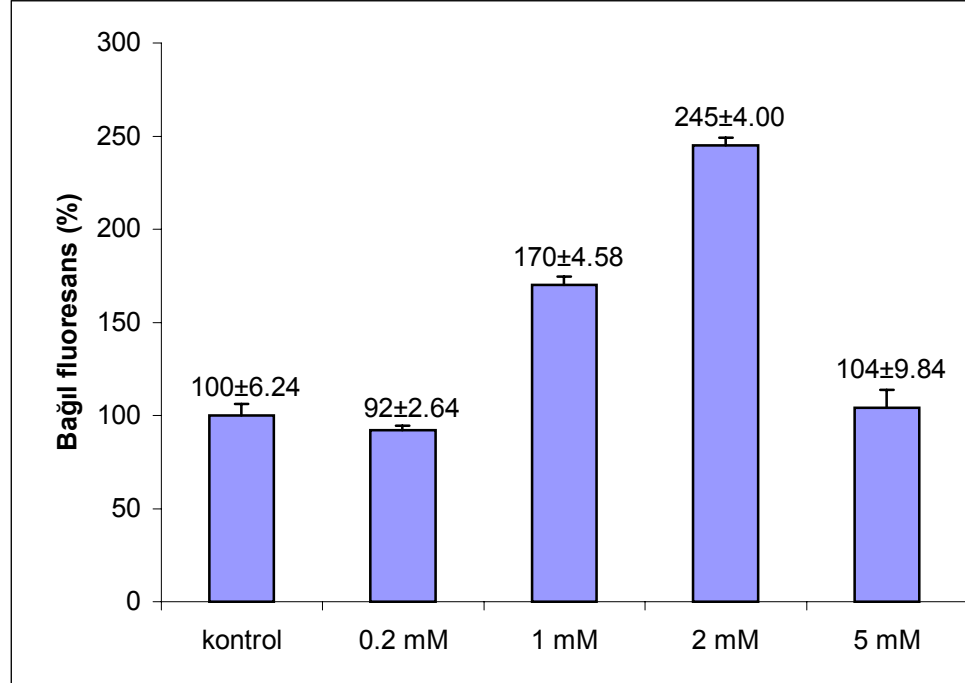
Örnekler	Protein Derişimi* (mg/ml)
Kontrol	3.033±0.546
0.2 mM	2.626±0.225
1.0 mM	2.406±0.578
2.0 mM	2.280±0.125
5.0 mM	1.505±0.575
* Protein ölçümleri mililitresinde 10^7 hücre içeren kültürlerle yapıldığından, elde edilen derişim değerleri miktar olarak mg protein/ 10^7 hücre’ye karşılık gelmektedir.	

Bu verilere göre protein miktarının kontrol grubunda ve 2.0 mM’a kadar olan deney gruplarında birbirine çok yakın olduğu; 5.0 mM H_2O_2 uygulanan örnekte ise protein miktarının diğer gruplara göre düşük olduğu belirlendi.

4. 5. HÜCREİÇİ OKSİDASYON DÜZEYİ

Bölüm 3.10’da belirtildiği şekilde ölçülen hücreiçi oksidasyonun ölçütü olarak kabul edilen floresans değerleri öncelikle örneklerdeki hücre sayısı dikkate alınarak değerlendirildi ve 10^6 hücrenin ortaya koyacağı floresans değerleri şeklinde ifade edildi. Daha sonra kontrol

grubu için bulunan hücre içi oksidasyon düzeyi % 100 kabul edildi ve deney gruplarındaki veriler kontrol grubuna göre bağıl olarak değerlendirildi (Şekil 4.5).



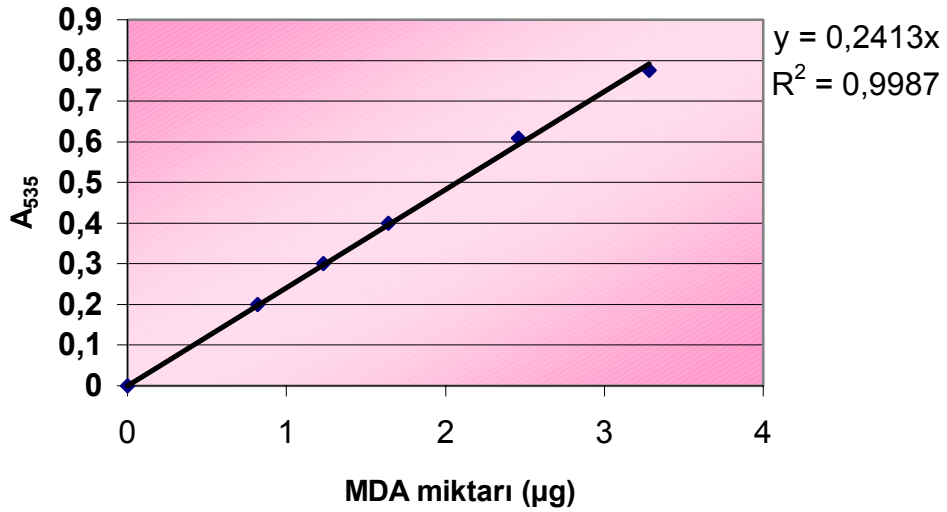
Şekil 4.5: Farklı derişimlerde H₂O₂ uygulanmış *S. pombe* hücrelerinde hücre içi oksidasyon düzeyleri, dikey çizgiler standart sapma (\pm S.D.) değerlerini göstermektedir

Buna göre artan H₂O₂ derişimlerinin bağıl floresansı, dolayısıyla hücre içi oksidasyon düzeyini değiştirdiği belirlendi. Canlılık oranları hemen hemen eşit olan kontrol ve 0.2 mM H₂O₂ grubu karşılaştırıldığında, 0.2 mM H₂O₂ uygulanmış grupta hücre içi oksidasyon düzeyinin kontrol grubuna göre önemli bir fark göstermediği gözlemlendi. 1.0 ve 2.0 mM H₂O₂ uygulamalarının ise hücre içi oksidasyon düzeyini belirgin şekilde (sırasıyla yaklaşık 1.7 ve 2.4 kat) artırdığı saptandı. 5 mM H₂O₂ uygulanmış örnekte ise hücre içi oksidasyon düzeyinde deney gruplarına göre şaşırtıcı bir düşüş olduğu ve bu grubun kontrol grubuna benzer bir hücre içi oksidasyon değerini ortaya koyduğu gözlemlendi.

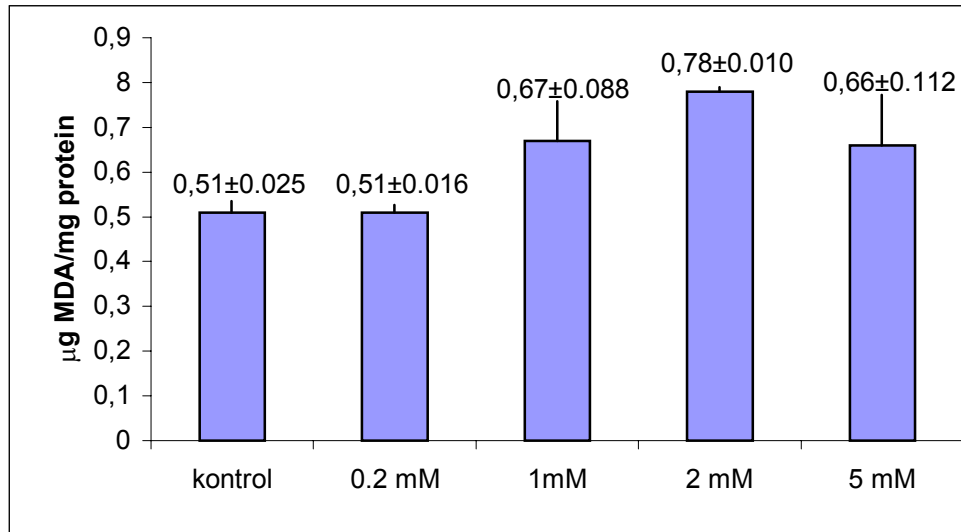
4. 6. LİPİT PEROKSİDASYON ÜRÜNLERİNİN MİKTARI

Örneklerde lipit peroksidasyonu sonunda oluşacak TBARS (tiyobarbitürik asit ile reaksiyon veren bileşikler) miktarı malondialdehit (MDA) temel alınarak hesaplandı. Bu amaçla

öncelikle MDA standart grafiği oluşturuldu (Şekil 4.6). Bu grafik yardımıyla uygulanan farklı derişimlerde H_2O_2 'nin lipid peroksidasyonuna yol açma kapasitesi araştırıldı. H_2O_2 derişimi arttıkça, belli bir derişime (2 mM) kadar lipid peroksidasyonunun arttığı gözlemlendi (Şekil 4.7). En yüksek MDA miktarı 2.0 mM H_2O_2 uygulanan örnekte saptandı. 5.0 mM H_2O_2 uygulanan örnekte ise lipid peroksidasyon düzeyinin kontrolden ve 0.2 mM H_2O_2 uygulanan örnekten yüksek, 1.0 mM uygulanan örnekle hemen hemen aynı ve 2.0 mM H_2O_2 uygulanan örnekten düşük olduğu görüldü.



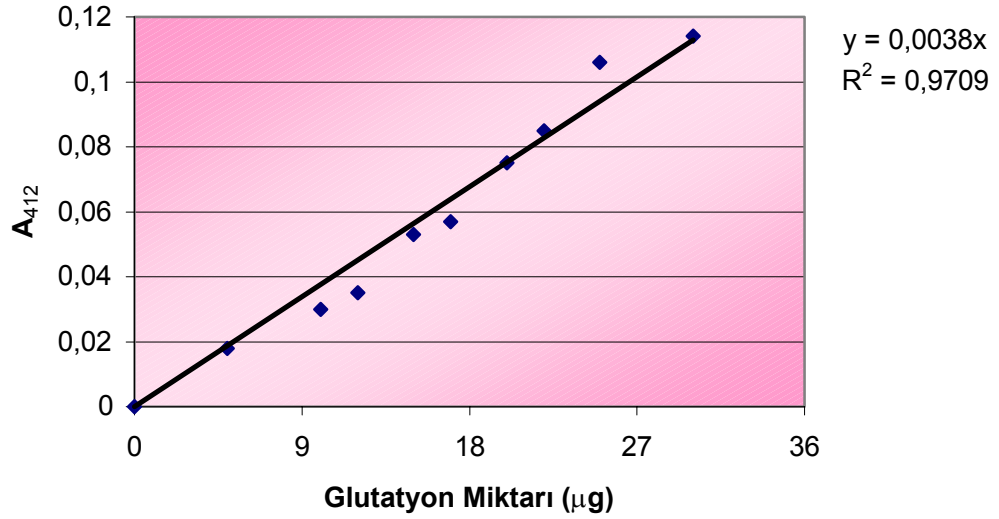
Şekil 4.6: Belirli miktarlarda malondialdehit (MDA) içeren çözeltilerin 535 nm'deki absorbans değerlerine göre çizilen standart grafik



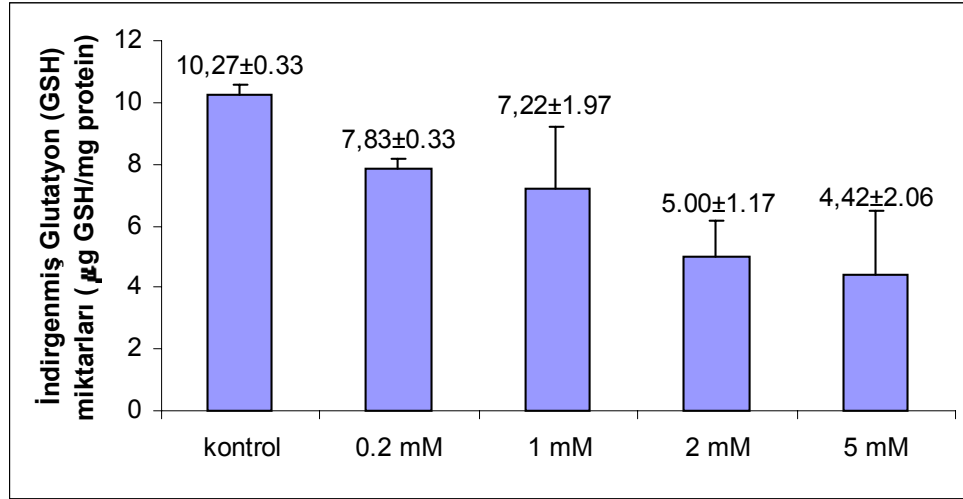
Şekil 4.7: Farklı derişimlerde H_2O_2 uygulanmış *S. pombe* hücrelerinde oluşan MDA miktarları dikey çizgiler standart sapma (\pm S.D.) değerlerini göstermektedir

4. 7. İNDİRGENMİŞ GLUTATYON DÜZEYİ

Farklı derişimlerde H₂O₂ uygulanmış örneklerde spektrofotometrik yöntemle belirlenen indirgenmiş glutatyon (GSH) içerikleri, GSH standart grafiği (Şekil 4.8) yardımıyla µg GSH/ml protein şeklinde ifade edildi ve değerler Şekil 4.9’da verilen histogramda karşılaştırıldı. Buna göre artan H₂O₂ derişimlerinin GSH düzeyini düşürdüğü gözlemlendi. GSH düzeyini kontrole göre en yüksek oranda (% 57) düşüren H₂O₂ uygulamasının 5.0 mM olduğu belirlendi. 2.0 mM uygulamasının da buna yakın bir düşüşe yol açtığı gözlemlendi.



Şekil 4.8: Belirli miktarlarda indirgenmiş glutatyon (GSH) içeren çözeltilerin 412 nm’deki absorbans değerlerine göre çizilen standart grafik



Şekil 4.9: Farklı derişimlerde H₂O₂ uygulanmış *S. pombe* hücrelerinde oluşan indirgenmiş glutasyon (GSH) miktarları, dikey çizgiler standart sapma (\pm S.D.) değerlerini göstermektedir

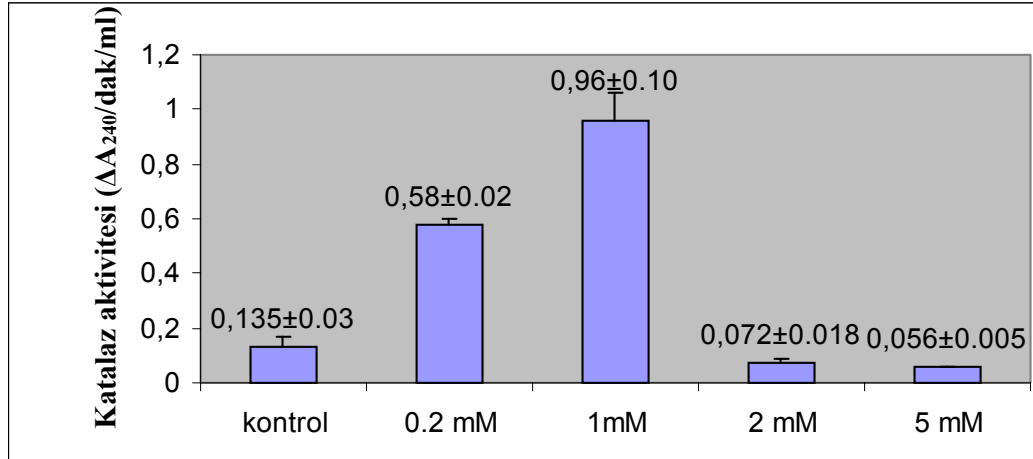
4. 8. KATALAZ AKTİVİTESİ

Kontrol ve deney gruplarındaki katalaz aktivitesi, ölçüm sırasında reaksiyon ortamına katılan H₂O₂'nin ayrışmasıyla, 240 nm'deki absorbans düşüşünün 1 dakika boyunca izlenmesine dayalı yöntemle belirlendi (Beer ve Sizer, 1952). Aktivite değerleri $\Delta A_{240}/\text{dak/ml}$ birimiyle ifade edildi ve Tablo 4.2'de verildi.

Tablo 4.3: Farklı derişimlerde H₂O₂ uygulanmış *S. pombe* hücrelerinde katalaz enzimine ait aktivite değerleri

Örnekler	Katalaz Aktivitesi ($\Delta A_{240}/\text{dak/ml}$)
Kontrol	0.135±0.03
0.2 mM	0.580±0.02
1.0 mM	0.960±0.10
2.0 mM	0.072±0.018
5.0 mM	0.056±0.005

Bu değerlere göre, 0.2 mM ve 1.0 mM H₂O₂ uygulanmış rneklelerde kontrol grubuna göre belirgin bir artış, 2.0 ve 5.0 mM H₂O₂ uygulanmış rneklelerde ise duşuş olduğu görüldü. Değerlendirme sonuçları şekil 4.10'da verildi.



şekil 4.10: Farklı deşişimlerde H₂O₂ uygulanmış *S. pombe* hücrelerinde katalaz aktivitesi, dikey çizgiler standart sapma (± S.D.) değerlerini göstermektedir

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, üreme ortamlarına farklı derişimlerde eklenen H₂O₂ ile oksidatif stres uygulanmış *S. pombe* hücrelerinde hücreiçi oksidasyon, indirgenmiş glutatyon (GSH) ve lipit peroksidasyon düzeyleri ile katalaz aktivitesi belirlenmiştir. Uygulanan farklı oksidatif stres koşullarının incelenen tüm parametreler açısından maya metabolizmasını değişikliğe uğrattığı gözlenmiştir.

Artan stres koşullarına karşı oluşacak hücrenel cevaplara ilişkin önemli ipuçlarından biri oksitlenmiş moleküllerin bir göstergesi olan hücreiçi oksidasyon düzeyidir. Bu çalışmada bir saat boyunca 1.0 mM H₂O₂ uygulanan *S. pombe* hücrelerinde hücreiçi oksidasyon düzeyinin kontrole göre ~1.7 kat arttığı belirlenmiştir. Jakubowski ve Bartosz (1997) da *S.cerevisiae*'deki oksidatif stres ile ilgili çalışmalarında benzer bir sonuç rapor etmektedirler. Bu araştırmacılar 1 saat boyunca 1.0 mM H₂O₂ uygulanmış hücrelerde hücreiçi oksidasyon düzeyinin kontrole göre yaklaşık iki kat arttığını bildirmektedirler. Bu çalışmada ek olarak denenen 0.2 mM, 2.0 mM ve 5.0 mM'lık H₂O₂ uygulamaları içinde en yüksek oksidasyon düzeyi 2.0 mM uygulanan örnekte bulunmuştur. 0.2 mM H₂O₂ uygulanmış örnekte hücreiçi oksidasyon düzeyi kontrole göre düşük çıkmıştır. Bu örnekteki canlılık oranı kontrol grubu ile aynı olduğundan, hücreiçi oksidasyon düzeyindeki bu düşüş hücrelerin öldürücü olmayan bu düşük derişimde H₂O₂ ve dolayısıyla hafif bir oksidatif stres koşuluna uyumluluk cevabı oluşturduğunu düşündürmektedir. Mutoh ve diğ. (1995)'de 1 saat süreyle 0.3 mM H₂O₂

içeren ortamda tutulan *S.pombe* hücrelerine yüksek dozda (0.3 M) H₂O₂ uygulandığında en azından 10 dakika boyunca hücrelerin canlılık oranında bir değişme olmadığına dikkat çekmektedirler. Bu araştırmacılar düşük dozda bir H₂O₂ uygulamasının oksidatif strese adaptasyonu sağladığı görüşündedirler. Bu çalışmada denenen 5.0 mM H₂O₂ uygulamasında ise çok daha yüksek bir oksidasyon düzeyi beklenirken, kontrole yakın bir değer (104 ± 9.84 bağlı fluoresans) belirlenmiştir. Bu değer canlı hücre sayısı bakımından benzerlik gösteren 2.0 mM uygulanan örneklerde belirlenen hücreiçi oksidasyon düzeyi

(245 ± 4 bağıl fluoresans) ile karşılaştırıldığında daha da anlamlı hale gelmektedir. Bu sonuç, eğer deneysel bir hatadan kaynaklanmıyorsa, oldukça ilginçtir. Bu doz uygulandığında canlı hücre sayısı % 50 oranında azaldığından, canlılığını sürdüren hücrelerdeki oksidasyon düzeyini yansıtan bu değer, bu hücrelerde farklı bir savunma mekanizmasının devreye girmesinden kaynaklanıyor olabilir.

S.pombe'de lipit peroksidasyonu ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu açıdan *S.pombe*'de oksidatif stresin yol açtığı lipit peroksidasyonu ilk kez bu çalışmada incelenmiştir. Lipit peroksidasyon düzeyinin ölçüldüğü deneylere ait bulgular, 1.0 mM, 2.0 mM ve 5.0 mM H₂O₂ uygulamalarının lipit peroksidasyonunu kontrole göre artırdığını ortaya koymuştur. 0.2 mM H₂O₂ uygulaması ise kontrole eşit oranda lipit peroksidasyon ürünü oluşturmuştur. 2.0 mM ve 5.0 mM H₂O₂ uygulaması sonucunda oluşan MDA düzeyleri, canlılık oranları dikkate alınarak hesaplandığında birbirine yakın (sırasıyla 0.1263 ve 0.1289 µg MDA/10⁶ canlı hücre) oldukları görülmüştür. Bu bulgu Nguyên-nhu ve Knoop (2002)'un *S.cerevisiae* için rapor ettikleri değerlerle uyumludur. Bu araştırmacılar *S.cerevisiae*'nin yabancı ırklarına 2.0 mM ve 4.0 mM H₂O₂ uyguladıklarında lipit peroksidasyon düzeylerinin birbirlerine yakın ve kontrole göre yüksek olduğunu bulmuşlardır.

Mayalarda glutatyon sentezinin ilk kademesinde görev alan enzimi kodlayan geni kusurlu olan mutantların (*gsh1*) ve glutatyon redoks oranı değiştirilmiş mutantların (*glr1*) H₂O₂'ye daha duyarlı hale geçmeleri mayalarda GSH'nin H₂O₂'ye karşı temel savunma antioksidanı olarak iş gördüğünü ortaya koymaktadır (Grant ve diğ., 1996).

Oksidatif stres koşullarında GSH düzeyinin 4 ana süreçle değişebileceği öngörülmüştür (Grant ve diğ., 1998):

- 1-GSH'nin GSSG'ye oksidasyonu (çevrim glutatyon redüktaz tarafından katalizlenir)
- 2-GSH'nin proteinlerle birleşerek karışık disülfitler oluşturması
- 3-Glutatyon transferazların katalizlediği konjugasyon reaksiyonlarından sonra hücre dışına aktif olarak pompalanması

4-Glutamil transpeptidazların etkisiyle GSH yıkımının başlaması

Bu çalışmada artan H_2O_2 derişimlerinin GSH düzeyini düşürdüğü gözlenmiştir ve GSH düzeyini kontrole göre en yüksek oranda (%57) düşüren H_2O_2 uygulamasının 5 mM olduğu belirlenmiştir. Grant ve diğ. (1998) de *S. cerevisiae*'da 4 mM H_2O_2 uygulamasıyla benzer bulgular elde etmişlerdir. *S. pombe*'de yapılan bir çalışmada ise GSH'ın bazı hücreiçi metabolitlere bağlanarak bunları vakuol aracılığıyla hücre dışına pompaladığı ve bu olayda maya kadmiyum faktör proteininin (Ycfl) rol oynadığı gösterilmiştir (Li ve diğ. 1996). Ycfl mutantlarıyla yürütülen çalışmada peroksit uygulamasının ardından hücre dışı GSH miktarının arttığı bildirilmektedir. Bu çalışmada hücre dışı GSH düzeyi ölçülmediğinden bu tip bir detoksifikasyon yolunun çalışıp çalışmadığı hakkında bir öngörude bulunulamamıştır.

Katalaz aktivitesiyle ilgili bulgular 0.2 ve 1.0 mM H_2O_2 uygulanmış örneklerde kontrol grubuna göre belirgin bir artış olduğunu, buna karşın 2.0 mM ve 5.0 mM H_2O_2 uygulanmış örneklerde belirgin bir aktivite düşüşü olduğunu ortaya koymaktadır. H_2O_2 içermeyen besi ortamındaki kontrol grubuna ait aktivitenin doğal metabolik süreçlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Yüksek derişimlerde H_2O_2 'nin SOD (süperoksit dismutaz) aktivitesini inhibe ettiği, süperoksit radikalının hücre içinde biriktiği ve bu radikallerin de katalazı inhibe ettiği bildirilmektedir (Shimizu ve diğ. 1984). Bu çalışmada da 2.0 mM ve 5.0 mM H_2O_2 uygulanmış örneklerdeki katalaz aktivitesinde gözlenen düşüş bu olaydan kaynaklanıyor olabilir. Elde edilen aktivite değerleri canlı hücre sayıları ele alınarak değerlendirildiğinde ise, 2.0 mM ve 5.0 mM H_2O_2 uygulanmış örneklerin katalaz aktivitesinin hemen hemen kontrol grubuyla aynı olduğu gözlenmiştir. Park ve diğ. (2003), yaptıkları çalışmada 40 dakika süresince 0.3 mM ve 10.0 mM H_2O_2 uyguladıkları *S.pombe* yabani ırkında katalaz aktivitesinin birbirine yakın (sırasıyla 7.15 ve 9.6 U/mg protein) olduğunu bildirmektedirler. Ancak bu araştırmacılar 10.0 mM H_2O_2 uygulanmış hücrelerin canlılık oranının % 80 olduğunu öne sürmektedirler. Bu çalışmada elde edilen canlılık oranları ve aktivite bulguları Park ve diğ. (2003)'nin bulgularıyla paralellik göstermemektedir. 1 saat süreyle 5.0 mM H_2O_2 uygulandığında hücre üremesinin % 50

oranında inhibe olduğu görülmüştür. Bu durum üreme koşulları ve stres uygulama süresindeki farklılıktan kaynaklanıyor olabilir.

S.pombe'de oksidatif stres parametrelerinden hücreiçi oksidasyon düzeyi, lipit peroksidasyonu ve indirgenmiş glutatyon düzeyinin ilk kez belirlendiği bu tez çalışmasının mayalarda ve memeli hücrelerinde redoks dengesinin aydınlatılmasına katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

AEBI, H., 1984, Catalase *in vitro* in "Oxygen Radicals in Biological Systems", Edited by Lester Packer, pp. 121-126, Academic Press Inc., Orlando, Florida, USA, 0-12-182005-X.

AUST, S.D., 1994, Thiobarbituric acid assay reactants, *Methods of Toxicology*, 1B, 367-374.

BALZAN, R., AGIUS, D.R., BANNISTER, W.H., 1999, Cloned prokaryotic iron superoxide dismutase protects yeast cell against oxidative stress depending on mitochondrial location, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 256, 63-67.

BEER, R. F., SIZER, I. W., 1952, A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase, *The Journal of Biological Chemistry*, 195,133-140.

BEUTLER, E., 1975, Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods, 2nd ed., Grune&Stratton, New York.

BLOKHINA, O., VIROLAINEN, E., FAGERSTEDT, K.V., 2002, Antioxidants oxidative damage and oxygen deprivation stress, *Annals of Botany*, 91, 179-194.

BRONZETTI, G., CINI, M., ANDREOLI, E., CALTAVUTURO, L., PANUNZIO, M., CROCE, C.D., 2001, Protective effects of vitamins and selenium compounds in yeast, *Mutation Research*, 496, 105-115.

BUETTNER GR, KELLEY EE, BURNS CP., 1993, Membrane lipid free radicals produced from L1210 murine leukemia cells by Photofrin photosensitization: An EPR spin trapping study, *Cancer Research*, 53: 3670-3673.

CHO, Y.W., PARK, E.H., FUCHS, J.A., LIM, C.J., 2002, A second stress-inducible glutathione S-transferase gene from *Schizosaccharomyces pombe*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1574, 399-402.

CHO, Y.W., SHIN, Y.H., KIM, Y.T., KIM, H.G., LEE, Y.J., PARK, E.H., FUCHS, J.A., LIM, C.J., 2001, Characterization and regulation of *Schizosaccharomyces pombe* gene encoding thioredoxin, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1518, 194-199.

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, 217-246.

- COSTA, V.M.V., AMORIM, M.A., QUINTANILHA, A., MODORAS-FERREIRA, 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 Biology and Medicine*, 33 (11), 1507-1515.
- CROCE, C.D., BRONZETTI, G., CINI, M., CALTAVUTURO, L., POI, G., 2003, Protective effect of lipoic acid against hydrogen peroxide in yeast cells, *Toxicology in Vitro*, 17, 753-759.
- CRYNE, L., MARTINS, L., FERNANDES, L., MARINHO, H.S., 2003, Regulation of antioxidant enzymes gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* during stationary phase, *Free Radical Biology and Medicine*, 34 (3), 385-393.
- DAVIES, M.J., FU, S., WANG, H., DEAN, R.T., 1999, Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease, *Free Radical Biology and Medicine*, 27(11-12), 1151-1163.
- DE LEVE, L.D., KAPLOWITZ, N., 1991, Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity, *Pharmacology and Therapeutics*, 52, 287-305.
- DİZDAROĞLU, M., JARUGA, P., BİRİNCİOĞLU, M., RODRIGUEZ, H., 2002, Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement, *Free Radical Biology and Medicine*, 32 (11), 1102-1115.
- DROGE, W., 2003, Oxidative stress and aging, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 543, 191-200.
- FORMAN, M.B., PUETT, D.W., CATES, C.U., MC CROSKEY, D.E., BECKMAN, J.K., GREENE, H.L., 1988, Glutathione redox pathway and perfusion injury, *Circulation*, 78, 202-203.
- GATE, L., PAUL, J., NGUYEN BA, G., TEW, K.D., TAPIERO, H., 1999, Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants, *Biomedical and Pharmacotherapy*, 53, 169-180.
- GRANT, C.M., MacIVER, F.H., DAWES, I.W., 1996, Glutathione is an essential metabolite required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Current Genetics*, 29, 511-515.
- GRANT, C.M., PERRONE, G., DAWES, I.W., 1998, Glutathione and catalase provide overlapping defenses for protection against hydrogen peroxide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 253, 893-898.
- GRIGG, J., BARBER, A., SIVERMAN, M., 1993, Bronchoalveolar lavage fluid glutathione in incubated premature infants, *Archives of Disease in Childhood*, 69, 49-51.

GUTZ, H., HESLOT, H., LEUPOLD, U., LOPRIENO, N. Edited by KING, R.C., 1974, Handbook of Genetics. Plenum Press, 1-395-446.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C., 1992, Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now?, *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 119, 598-620.

INOUE, Y., MATSUDA, T., SUGIYAMA, K., IZAWA, S., KIMURA, A., 1999, Genetic analysis of glutathione peroxidase in oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*, *The Journal of Biological Chemistry*, 274 (38), 27002-27009.

IZAWA, S., INOUE, Y., KIMURA, A., 1995, Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEBS Letters*, 368, 73-76.

JAKUBOWSKI, W., BARTOSZ, G., 1997, Estimation of oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* with fluorescent probes, *Int J Biochem Cell Biol*, 29 (11), 1297-1301.

JAKUBOWSKI, W., BARTOSZ, G., 2000, 2,7-Dichlorofluorescein oxidation and reactive oxygen species: what does it measure?, *Cell Biology International*, 24 (10), 757-760.

JAKUBOWSKI, W., BILINSKI, T., BARTOSZ, G., 1999, Sensitivity of antioxidant-deficient yeast *Saccharomyces cerevisiae* to peroxynitrite and nitric oxide, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1472, 395-398.

JENNER, P., 1994, Oxidative damage in neurodegenerative disease, *Lancet*, 344, 796-798.

JEONG, J.H., KWON, E.S., ROE, J.H., 2001, Characterization of the manganese-containing superoxide dismutase and its gene regulation in stress response of *Schizosaccharomyces pombe*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 283, 908-914.

KEHLER, J.P., 1989, Free radicals as mediators of tissue injury and disease, *Critical Review Toxicology*, 23, 21-27.

KOERKAMP, M.G., REP, M., BUSSEMAKER, H.J., HARDY, G.P.M.A., MUL, A., PIEKARSKA, K., SZIGYARTO, C.A.K., MATTOS, J.M.T., TABAK, H.F., 2002, Dissection of transient oxidative stress response in *Sachharomyces cerevisiae* by using DNA microarrays, *Molecular Biology of the Cell*, 13 (8), 2783-2794.

LEE, J., KWON, E.S., KIM, D.W., CHA, J., ROE, J.H., 2002, Regulation and the role of Cu,Zn-containing superoxide dismutase in cell cycle progression of *Schizosaccharomyces pombe*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 297, 854-862.

- LEE, J., SPECTOR, D., GODON, C., LABARRE, J., TOLEDANO, M.B., 1999, A new antioxidant with alkyl hydroperoxide defense properties in yeast, *Journal of Biological Chemistry*, 274(8), 4537-4544.
- LEE, J.H., CHOI, I.Y., KIL, I.S., KIM, S.Y., YANG, E.S., PARK, J.W., 2001, Protective role of superoxide dismutases against ionizing radiation in yeast, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1526, 191-198.
- LI, Z., SZCZYPKA, M., LU, Y., THIELE, D.J., REA, P.A., 1996, The yeast cadmium factor protein (YCF1) is a vacuolar glutathione S-conjugate pump, *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology*, 271 (11), 6509-6517.
- LOGUERCIO, C., DELVECCHIO BLANCO, C., COLTORTI, M., NARDI, G., 1992, Alteration of erythrocyte glutathione, cysteine and glutathione synthetase in alcoholic and non- alcoholic cirrhosis, *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 52, 207-213.
- LORD-FONTAINE, S., AVERILL-BATES, D.A., 2002, Heat shock inactivates cellular antioxidant defenses against hydrogen peroxide: protection by glucose, *Free Radical Biology and Medicine*, 32 (8), 752-765.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., RANDALL, R. S., 1951, Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275.
- MANDAVILLI, B.S., SANTOS, J.H., VAN HOUTEN, B., 2002, Mitochondrial DNA repair and aging, *Mutation Research*, 509, 127-151.
- MATHEWS, C.K., van HOLDE, K.E., AHERN, K.G., 2000, Biochemistry, 3rd ed., Addison Wesley Longman, San Francisco, 0-8053-3066-6.
- MICHAL, G., 1999, Biochemical pathways: an atlas of biochemistry and molecular biology, Wiley, New York, 0-471-33130-9.
- MUTOH, N., NAKAGAWA, C.W., HAYASHI, Y., 1995, Adaptive response of *Schizosaccharomyces pombe* to hydrogen peroxide, *FEMS Microbiology Letters*, 132, 67-72.
- NAKAGAWA, C.W., YAMADA, K., MUTOH, N., 1999, Identification of the catalase gene promoter region involved in superinduction in *Schizosaccharomyces pombe* caused by cycloheximide and hydrogen peroxide, *FEMS Microbiology Letters*, 173, 373-378.
- NGUYEN-NHU, N.T., KNOOPS, B., 2002, Alkyl hydroperoxide reductase 1 protects *Saccharomyces cerevisiae* against metal ion toxicity and glutathione depletion, *Toxicology Letters*, 135, 219-228.

PACHTER, P., TIMERMAN, A.P., LYKENS, M.G., MEROLA, A.J., 1991, Deficiency of alveolar fluid glutathione in patients with sepsis and the adult respiratory distress syndrome, *Chest*, 100, 1397-1403.

PACKER, L., 1984, *Oxygen Radicals in Biological Systems*, Academic Press Inc., Orlando, Florida, USA, 0-12-182005-X.

PARK, Y.D., KANG, W.H., YANG, W.S., SHIN, K.S., BAE, K.S., PARK, H.M., 2003, LAMMER kinase homolog, *Lkh1*, is involved in oxidative-stress response of fission yeast, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 311, 1078-1083.

PASTORE, A., FEDERICI, G., BERTINI, E., PIEMONTE, F., 2003, Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification, *Clinica Chimica Acta*, 333, 19-39

PENNINCKX, M., 2000, A short review on the role of glutathione in response of yeasts to nutritional, environmental, and oxidative stresses, *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 737-742.

PEREIRA, M.D., HERDEIRO, R.S., FERNANDES, P.N., ELEUTHERIO, E.C.A., PANEK, A.D., 2003, Targets of oxidative stress in yeast *sod* mutants, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1620, 245-251.

QUINN, J., FINDLAY, V.J., DAWSON, K., MILLAR, J.B.A., JONES, N., MORGAN, B.A., TOONE, W.M., 2002, Distinct regulatory proteins control the graded transcriptional response to increasing H₂O₂ levels in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, *Molecular Biology of the Cell*, 13, 805-816.

SEAH, T.C.M., KAPLAN, J.G., 1973, Purification and properties of the catalase of Bakers' yeast, *The Journal of Biological Chemistry*, 248 (8), 2880-2893.

SHACTER, E., 2000, Quantification and significance of protein oxidation biological samples, *Drug Metabolism Reviews*, 32 (3-4), 307-326.

SHEWFAT, R.L. AND PURVIS, A.C., 1995, Toward a comprehensive model for lipid peroxidation in plant tissue disorders, *Hort. Science* 30(2): 213-218.

SHIGESAWA, T., SATO, C., MARUMO, F., 1992, Significance of plasma glutathione determination in patients with alcoholic and non-alcoholic liver disease, *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 7, 7-11.

SHIMIZU, N., KOBAYASHI, K., HAYASHI, K., 1984, The reaction of superoxide radical with catalase, *The Journal of Biological Chemistry*, 259 (7), 4414-4418.

SHIN, Y.H., PARK, E.H., FUCHS, J.A., LIM, C.J., 2002, Characterization, expression and regulation of a third gene encoding glutathione S-transferase from the fission yeast, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1577, 164-170.

SIPOWICZ, M.A., CHOMARAT, P., DIWAN, B.A., ANVER, M.A., AWASTHY, Y.C., WARD, J.M., 1997, Increased oxidative DNA damage and hepatocyte overexpression of specific cytochrome P450 isoforms in hepatitis of mice infected with *Helicobacter hepaticus*, *American Journal of Pathology*, 4, 933-941.

STAAL, F.J.T., ROEDERER, M., ISRAELSKI, M., DUBP, J., MOLE, L.A., MC SHANE, D., 1992, Intracellular glutathione levels in T-cell subsets decrease in HIV-infected individuals, *AIDS Res Hum Retroviruses*, 8, 305-311.

STEPHEN, D.W.S, JAMEISON, D.J., 1996, Glutathione is important antioxidant molecule in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Microbiology Letters*, 141, 207-212.

TARCHEVSKI, I.A., 1992, Regulatory role of degradation of biopolymers and lipids, *Fiziologiya Rastenii*, 39, 1215-1223.

TRAN, L.T., MIKI, T., KAMAKURA, M., IZAWA, S., TSUJIMOTO, Y., MIYABE, S., INOUE, Y., KIMURA, A., 1995, Oxidative stress response in yeast: induction of glucose-6-phosphate dehydrogenase by lipid hydroperoxide in *Hansenula mrakii*, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 80 (6), 606-609.

VALENTINE, J.S., 2002, Do oxidatively modified proteins cause ALS?, *Free Radical Biology and Medicine*, 33 (10), 1314-1320.

VEAL, E.A., TOONE, W.M., JONES, N., MORGAN, B.A., 2002, Distinct roles for glutathione S-transferases in the oxidative stress response in *Schizosaccharomyces pombe*, *Journal of Biological Chemistry*, 277 (38), 35523-35531.

WALKER, G.M., 1998, *Yeast Physiology and Biotechnology*, John Wiley & Sons, England, 0-471-964468.

WATERBORG, J.H., 2002, *The Protein Protocols Handbook*, Humana Press, Totowa New Jersey, 0-89603-941-2.

WOOD, V., GWILLIAM, R., RAJANDREAM, M.A., LYNE, M., LYNE, R., STEWART, A., SGOUROS, J., PEAT, N., HAYLES, J., BAKER, S., BASHAM, D., BOWMAN, S., BROOKS, K., BROWN, D., BROWN, S., CHILLINGWORTH, T., CHURCHER, C., COLLINS, M., CONNOR, R., CRONIN, A., DAVIS, P., FELTWELL, T., FRASER, A., GENTLES, S., GOBLE, A., HAMLIN, N., HARRIS, D., HIDALGO, J., HODGSON, G., HOLROYD, S., HORNSBY, T., HOWARTH, S., HUCKLE, E.J., HUNT, S., JAGELS, K., JAMES, K., JONES, L., JONES, M., LEATHER, S., MCDONALD, S., MCLEAN, J., MOONEY, P., MOULE, S., MUNGALL, K., MURPHY, L., NIBLETT, D., ODELL, C.,

OLIVER, K., O'NEIL, S., PEARSON, D., QUAIL, M.A., RABBINOWITSCH, E., RUTHERFORD, K., RUTTER, S., SAUNDERS, D., SEEGER, K., SHARP, S., SKELTON, J., SIMMONDS, M., SQUARES, R., SQUARES, S., STEVENS, K., TAYLOR, K., TAYLOR, R.G., TIVEY, A., WALSH, S., WARREN, T., WHITEHEAD, S., WOODWARD, J., VOLCKAERT, G., AERT, R., ROBBEN, J., GRYMOPREZ, B., WELTJENS, I., VANSTREELS, E., RIEGER, M., SCHAFFER, M., MULLER-AUER, S., GABEL, C., FUCHS, M., FRITZC, C., HOLZER, E., MOESTL, D., HILBERT, H., BORZYM, K., LANGER, I., BECK, A., LEHRACH, H., REINHARDT, R., POHL, T.M., EGER, P., ZIMMERMANN, W., WEDLER, H., WAMBUTT, R., PURNELLE, B., GOFFEAU, A., CADIEU, E., DREANO, S., GLOUX, S., LELAURE, V., MOTTIER, S., GALIBERT, F., AVES, S.J., XIANG, Z., HUNT, C., MOORE, K., HURST, S.M., LUCAS, M., ROCHET, M., GAILLARDIN, C., TALLADA, V.A., GARZON, A., THODE, G., DAGA, L., CRUZADO, L., JIMENEZ, J., SANCHEZ, M., del REY, F., BENITO, J., DOMINGUEZ, A., REVUELTA, J.L., MORENO, S., ARMSTRONG, J., FORSBURG, S.L., CERRUTTI, L., LOWE, T., MCCOMBIE, W.R., PAULSEN, I., POTASHKIN, J., SHPAKOWSKI, G.V., USSERY, D., BARRELL, B.G., NURSE, P., 2002, The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*, *Nature*, 415, 871-880.

YAMADA, K., NAKAGAWA, C.W., MUTOH, N., 1999, *Schizosaccharomyces pombe* homologue of glutathione peroxidase, which does not contain selenocysteine, is induced by several stresses and works as an antioxidant, *Yeast*, 15, 1125-1132.

ZHANG, P., OMAJE, S.T., (2001), Antioxidant and prooxidant roles for β -carotene, α -tocopherol and ascorbic acid in human lung cells, *Toxicology in Vitro*, 15, 13-24.

7. ÖZGEÇMİŞ

15.05.1980'de İstanbul'da doğdum. Ortaokul ve lise öğrenimimi Üsküdar Özel Doğan Lisesi'nde tamamladıktan sonra 1997 yılında İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü'ne kayıt oldum. Bu bölümden 2001 yılında mezun oldum ve aynı yıl İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü'nde Moleküler Biyoloji Yüksek Lisans programına girmeye hak kazandım.

Bilimsel Etkinlikleri:

Pekmez M., Önay E., Arda Nazlı., (2002) Ökseotunun (*Viscum album* ssp. *album*) Pigment İçeriği Üzerinde Konakçı Ağaçların Etkisi. XVI.Ulusal Biyoloji Kongresi, 4-7 Eylül, Malatya

Pekmez M., Arda N., Temizkan G., *Schizosaccharomyces pombe*'de Antioksidasyon Mekanizmaları Üzerine Çalışmalar. XIII. Biyoteknoloji Kongresi 25-29 Ağustos 2003 Çanakkale