

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI**

**BCL-2 VE BCL-XL PROTEİNLERİNİN YAŞLANMAYA
BAĞIMLI OKSİDATİF STRESE KARŞI KORUYUCU
ETKİLERİNİN MAYA MODELİNDE İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

AYŞENUR GÜLER

DENİZLİ, MAYIS - 2025

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI**



**BCL-2 VE BCL-XL PROTEİNLERİNİN YAŞLANMAYA
BAĞIMLI OKSİDATİF STRESE KARŞI KORUYUCU
ETKİLERİNİN MAYA MODELİNDE İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

AYŞENUR GÜLER

DENİZLİ, MAYIS - 2025

Bu tez çalışması Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimleri (PAUBAP) tarafından 2022FEBE040 nolu proje ile desteklenmiştir.

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.

AYŞENUR GÜLER

ÖZET

BCL-2 VE BCL-XL PROTEİNLERİNİN YAŞLANMAYA BAĞIMLI OKSİDATİF STRESE KARŞI KORUYUCU ETKİLERİNİN MAYA MODELİNDE İNCELENMESİ

DOKTORA TEZİ

AYŞENUR GÜLER

PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI:DOÇ. DR. BERNA KAVAKCIOĞLU YARDIMCI)

DENİZLİ, MAYIS - 2025

Genetik ve çevresel faktörlerin etkisiyle moleküler, hücresel ve doku düzeyinde biriken hasarın bir sonucu olarak meydana gelen yaşlanma, karmaşık doğası nedeniyle en çok araştırılan fenomenlerden biri olmuştur. Maya yaşlanması, yüksek ökaryotik sistemlerle bazı benzerlikler taşısa da, basit ve iyi tanımlanmış genetik yapısı yaşlanma mekanizmalarının aydınlatılmasında önemli avantajlar sunmaktadır. Bu çalışmada, insan anti-apoptotik Bcl-2 ve Bcl-xL proteinlerinin oksidatif stres ve yaşlanma üzerindeki koruyucu etkileri, *Saccharomyces cerevisiae* maya modelinde detaylı bir şekilde incelenmiştir. Bulgular, her iki proteinin de oksidatif hasarı anlamlı bir şekilde azalttığını ve üreme hayatta kalım kapasitesini artırarak yaşlanma karşıtı etkiler gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu etkiler, yaşam ömrünün farklı aşamalarında hem pro- hem de antioksidan aktiviteler sergileyen bileşenlerin dinamik etkileşimi ile gerçekleşmiştir. Ayrıca, hem Bcl-2 hem de Bcl-xL proteinleri, yaşa bağlı hücre hasarı ve morfolojik deformasyonları kısmen engellemiştir. Özellikle, Bcl-xL eksprese eden maya hücreleri, yaşam ömürlerinin 8. gününde anahtar antioksidan enzim aktiviteleri ve toplam antioksidan içeriği maksimum seviyelere ulaştırmış ve böylece yaşlanma sürecinin ileri evrelerinde önemli bir koruma sağlamıştır. IR spektrumları kullanılarak gerçekleştirilen kemometrik veri analizinden elde edilen sonuçlar, biyokimyasal ve morfolojik analizlerin bulgularıyla tutarlılık göstermiştir. Bu bağlamda, Bcl-xL'nin maya hücrelerinde hücresel redoks dengesine etkisinin anlaşılması, bu proteinin yüksek ökaryotlarda sahip olduğu dolaylı antioksidan mekanizmalara dair yeni bilgiler sunabilir. Sonuç olarak, Bcl-2 ve Bcl-xL proteinlerinin yaşlanma ve oksidatif stresle mücadeledeki rolleri, potansiyel terapötik hedeflerin belirlenmesine yönelik yeni bir bakış açısı sunmaktadır.

ANAHTAR KELİMELE: *S. cerevisiae*, yaşlanma, oksidatif stres, anti-apoptotik Bcl-2 ailesi proteinleri, antioksidan sistem, biyokimyasal analiz.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE PROTECTIVE EFFECTS OF BCL-2 AND BCL-XL PROTEINS AGAINST AGE-DEPENDENT OXIDATIVE STRESS IN A YEAST MODEL

PH.D THESIS

AYŞENUR GÜLER

PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

CHEMISTRY DEPARTMENT

(SUPERVISOR: ASSOC. PROF. DR. BERNA KAVAKCIOĞLU

YARDIMCI)

DENİZLİ, MAY 2025

Aging, which occurs as a result of accumulated damage at the molecular, cellular, and tissue levels due to the influence of genetic and environmental factors, has become one of the most extensively studied phenomena due to its complex nature. Although yeast aging shares certain similarities with higher eukaryotic systems, its simple and well-characterized genetic structure provides significant advantages in elucidating aging mechanisms. In this study, the protective effects of human anti-apoptotic Bcl-2 and Bcl-xL proteins on oxidative stress and aging were investigated in detail using the *Saccharomyces cerevisiae* yeast model. The findings indicate that both proteins significantly reduced oxidative damage and exhibited anti-aging effects by enhancing reproductive survival capacity. These effects were mediated through the dynamic interaction of components exhibiting both pro- and antioxidant activities at different stages of lifespan. Additionally, both Bcl-2 and Bcl-xL proteins partially prevented age-related cellular damage and morphological deformations. Notably, Bcl-xL expressing yeast cells reached maximum levels of key antioxidant enzyme activities and total antioxidant content on the 8th day of their lifespan, thereby providing significant protection during the later stages of aging. The results obtained from the chemometric data analysis, which utilized IR spectra, showed consistency with the findings from both the biochemical and morphological analyses. In this context, understanding the impact of Bcl-xL on cellular redox balance in yeast cells could provide insights into its indirect antioxidant mechanisms in higher eukaryotes. Consequently, the roles of Bcl-2 and Bcl-xL in combating aging and oxidative stress offer a new perspective for identifying potential therapeutic targets.

KEYWORDS: *S. cerevisiae*, aging, oxidative stress, anti-apoptotic Bcl-2 family proteins, antioxidant system, biochemical assay.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vi
TABLolar LİSTESİ.....	ix
KISALTMALAR	x
ÖNSÖZ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	5
2.1 Model Organizma <i>S. cerevisiae</i> Mayasına Genel Bakış	5
2.1.1 Mayalarda Büyüme Şartları, Mediumu ve Genel Morfoloji.....	8
2.1.2 Mayalarda Hücresel Yapı ve Membran Fonksiyonları.....	9
2.1.3 Mayalarda Enerji Metabolizması.....	10
2.1.4 Mayalarda Yaşam Döngüsü.....	11
2.1.5 Mayalarda Büyüme Fazları.....	12
2.2 Yaşlanma Olgusu ve Yaşlanma Araştırmaları İçin Bir Model Olarak Maya: İki Yaşlanma Paradigması.....	13
2.2.1 Maya Hücrelerinin Anne Hücre Spesifik Replikatif Yaşlanması	16
2.2.2 Stasyonere Faz Maya Hücrelerinin Kronolojik Yaşlanması	20
2.3 Maya Yaşlanmasında Besin Algılayıcı Yolakların Kritik Rolü ve Uzun Ömürlülükte Genetik Belirleyicilere Genel Bakış	23
2.4 Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller	33
2.4.1 Oksidatif Etkiler ve Yaşlanma	45
2.5 Antioksidan Savunma Sistemleri	54
2.5.1 Enzimatik Antioksidan Sistemler	55
2.5.1.1 Süperoksit Dismutaz (SOD).....	56
2.5.1.2 Katalaz (CAT).....	62
2.5.1.3 Glutasyon Peroksidaz (GPx/GSHPx)	65
2.5.1.4 Glutasyon Redüktaz (GR)	68
2.5.1.5 Glutasyon-S-Transferaz (GST).....	70
2.5.1.6 Tioredoksin Redüktaz (TrxR)	72
2.5.2 Enzimatik Olmayan Antioksidan Sistemler.....	75
2.5.2.1 İndirgenmiş Glutasyon (GSH).....	76
2.5.2.2 Vitaminler	81
2.5.2.3 Polifenoller	83
2.5.2.4 Karotenoidler.....	83
2.5.2.5 Albümin	84
2.5.2.6 Bilirubin	85
2.5.2.7 Ürik Asit.....	85
2.5.2.8 Melatonin	86
2.6 Biyomoleküllerde Oksidatif Stres İndüklü Hasarlar	89
2.6.1 Lipitlerde Oksidatif Hasar	89
2.6.1.1 Lipid Peroksidasyonu.....	90
2.6.1.1.1 Lipid Peroksidasyon Ürünleri ve Hasar Tayini	93
2.6.2 Proteinlerde Oksidatif Hasar	95

2.6.2.1	Protein Karbonilasyonu.....	96
2.6.2.1.1	Karbonillenmiş Proteinlerin Tayini	98
2.6.3	DNA’da Oksidatif Hasar	99
2.6.3.1	Apuritik/Apirimidinik Bölgeler, Oksidatif DNA-Protein Çapraz Bağlar ve Onarım Mekanizmaları	102
2.7	Hücre Ölümü	105
2.7.1	Tip 1 Programlanmış Hücre Ölümü: Apoptoz.....	108
2.7.1.1	Apoptozun Moleküler Mekanizması: Anti-apoptotik ve Pro-apoptotik Bcl-2 Ailesi Proteinlerinin Rolü	111
2.7.1.1.1	Anti-apoptotik Bcl-2 Proteinlerinin Antioksidan Fonksiyonları.....	122
2.7.1.2	Maya Apoptozu.....	128
2.7.1.3	Apoptotik Hücrelerin Tespiti İçin Yöntemler	131
2.7.1.3.1	Fosfatidilserin Ekspozisyonu ve Annexin V-PI Flow Sitometrik Test	131
2.7.1.3.2	DNA Fragmentasyonu ve Kromatin Kondenzasyonunun Belirlenmesinde TUNEL Testi ve DAPI Boyama	133
2.8	Literatür Özetleri	136
2.9	Çalışmanın Amacı	136
3.	MATERYAL VE METOD	156
3.1	Materyal.....	156
3.2	Metod.....	156
3.2.1	Maya Suşları, Rutin Bakım, Büyüme ve Yaşlanma	156
3.2.2	Transforme <i>S. cerevisiae</i> Hücrelerinin Büyüme ve Morfolojik Değişimlerinin İncelenmesi: Spektrofotometrik ve FE-SEM Analizleri.....	159
3.2.3	Koloni Oluşturan Birim (CFU) Yöntemi ile Canlılık Tayini	159
3.2.4	Annexin V-FITC ve Propidyum İyodür (PI) Çift Boyama	160
3.2.5	Biyokimyasal Analizler İçin Hücre Lizis Prosedürü	161
3.2.6	Biyokimyasal Analizler	161
3.2.6.1	Toplam Antioksidan ve Oksidan Durum	161
3.2.6.2	Antioksidan Enzim Aktivite Tayinleri	163
3.2.6.2.1	GR Aktivite Tayini	163
3.2.6.2.2	GPx Aktivite Tayini.....	163
3.2.6.2.3	GST Aktivite Tayini	164
3.2.6.2.4	SOD Aktivite Tayini.....	164
3.2.6.2.5	TrxR Aktivite Tayini	165
3.2.6.3	Lipid Peroksidasyon (LPO) Seviyesi Tayini.....	166
3.2.6.4	Protein Karbonil Tayini.....	166
3.2.6.5	Total Protein Tayini	167
3.2.6.6	Transforme Maya Suşlarında İnsan Bcl-2 ve Bcl-xL Konsantrasyonlarının Kantitatif Tayini.....	167
3.2.7	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi ve Denetimsiz Kemometrik Analiz	168
3.2.8	Spektral Veri Analizi	169
3.2.8.1	Kemometrik Veri Analizi.....	169
3.2.9	İstatistiksel Analiz.....	169
4.	BULGULAR	170
4.1	Maya Suşlarının Büyüme Eğrileri	170
4.2	Yaşlanmaya Bağlı Oksidatif Stresin Maya Hücre Morfolojisi Üzerindeki Etkileri ve Bcl-2 ile Bcl-xL Proteinlerinin Koruyucu Rolü	171

4.3	Bcl-2 ve Bcl-xL Gen Ekspresyonlarının Yaşlı Maya Hücrelerinin Hayatta Kalımı Üzerine Etkisi.....	173
4.4	Yaşlanma İndüklü Oksidatif Strese Karşı Bcl-2 ve Bcl-xL'nin Koruyucu Rolünün Annexin V-PI Flow Sitometri ile Değerlendirilmesi.....	175
4.5	Erken Evre Pro-Oksidan, Geç Evre Antioksidan: Bcl-2 ve Bcl-xL Proteinlerinin Etkisi.....	176
4.6	Bcl-2 ve Bcl-xL Genlerinin Ekspresyonlarına Bağlı Olarak Yaşlı Maya Hücrelerinde Antioksidan Enzim Aktivitelerindeki Değişiklikler	177
4.7	Bcl-2 ve Bcl-xL Proteinlerinin Yaşlanma İndüklü Lipid Peroksidasyonu ve Protein Karbonilasyonuna Etkisi	180
4.8	Bcl-2 ve Bcl-xL Proteinlerinin İfade Düzeylerinin Belirlenmesi	182
4.9	Bcl-2 ve Bcl-xL Gen İfadesine Sahip Yaşlı Maya Hücrelerinin Biyokimyasal Bileşim Varyasyonları Açısından Boş Vektör Hücrelerinden ve Birbirlerinden Ayrılması	182
5.	TARTIŞMA	199
6.	KAYNAKLAR.....	207
7.	ÖZGEÇMİŞ.....	302

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1:	Ortolojinin doğası ile maya genlerinin standart laboratuvar büyüme koşullarında esansiyel olup olmadığına göre gruplandırılan ve insan-maya ortologlarının sayılarını gösteren Venn diyagramı.	7
Şekil 2.2:	15 KX büyütme ile doğal suş <i>S. cerevisiae</i> BY4741 hücrelerine ait taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüsü.....	9
Şekil 2.3:	<i>S. cerevisiae</i> 'nin homotallik yaşam döngüsü.....	12
Şekil 2.4:	Mayada büyüme fazları	13
Şekil 2.5:	Maya replikatif yaşam ömrünü modüle eden yolaklar	18
Şekil 2.6:	Maya hücre bölünmesi ve tomurcuk izi oluşumu.....	20
Şekil 2.7:	DHR (dihidrorodamin) ile boyanmış kronolojik olarak yaşlı anne maya hücrelerinin konfokal lazer taramalı floresan mikroskobundaki morfolojik görüntüsü.....	22
Şekil 2.8:	<i>S. cerevisiae</i> 'nin iki yaşlanma paradigması.....	23
Şekil 2.9:	Yaşlanmanın on iki belirteci	24
Şekil 2.10:	Maya ve memelide yaşam ömrü düzenleyici yolakların yan yana karşılaştırılması.....	29
Şekil 2.11:	TORC1/Sch9'un maya CLS uzamasını modüle ettiği başlıca mekanizmalara genel bir bakış.....	32
Şekil 2.12:	Moleküler oksijenin indirgenme süreci	36
Şekil 2.13:	Moleküler oksijenin enzimatik sistemler tarafından kullanımı, reaktif oksijen türlerinin üretimi ve downstream sonuçları	38
Şekil 2.14:	Endojen ve eksojen kaynaklar tarafından üretilen reaktif oksijen türleri, organizma üzerindeki etkileri ve antioksidan savunma mekanizmalarının etkisi	39
Şekil 2.15:	Mitokondriyal elektron transport zincirinin doğal yan ürünleri olan radikallerin üretimi	40
Şekil 2.16:	ROS'un ekzojen kaynakları	41
Şekil 2.17:	ROS/RNS'nin hücre ortamda oksidatif stresin biyobelirteçleri olarak kullanılan biyomoleküller (DNA, protein, lipid vb.) üzerindeki etkisi	44
Şekil 2.18:	Yaşlanmanın serbest radikal teorisinin temelini açıklayan şematik görünüm.....	46
Şekil 2.19:	Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonu ile ROS oluşumu	57
Şekil 2.20:	Ksenobiyotiklerin enzimatik biyotransformasyonları	70
Şekil 2.21:	Tiyoredoksin (Trx) tiyoredoksinredüktaz (TrxR) nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) sisteminin katalitik redoks döngüsü	73
Şekil 2.22:	Antioksidan savunma sistemleri	75
Şekil 2.23:	Glutasyon sentezi ve geri dönüşümü.....	77
Şekil 2.24:	Mayada glutasyon biyosentezi	79
Şekil 2.25:	Lipit peroksidasyon süreci	92
Şekil 2.26:	Karbonil gruplarının proteinlere eklendiği oksidatif yollar	98
Şekil 2.27:	Oksidatif DNA hasarı ve ilişkili hastalıklar.....	100

Şekil 2.28:	Oksidatif hasar biyobelirteçleri olan 8-OHdG ve 8-oxodG'nin oluşumu	102
Şekil 2.29:	<i>S. cerevisiae</i> 'daki spontan AP bölgelerinin orijini, onarımı ve biyolojik sonuçları	103
Şekil 2.30:	Apoptotik, nekrotik ve otofajik süreçlerin şematik gösterimi ..	107
Şekil 2.31:	Apoptoz sırasında hücrede meydana gelen morfolojik değişiklikler.....	110
Şekil 2.32:	Ekstrinsik yolak ve ekstrinsik yolağın aracılık ettiği intrinsik yolak.....	113
Şekil 2.33:	Bcl-2 ailesi proteinlerinin domain organizasyonuna göre sınıflandırılması	119
Şekil 2.34:	Bcl-2 protein ailesi üyeleri arasındaki muhtemel etkileşimlere dayalı bir model.....	122
Şekil 2.35:	Maya apoptozunda apoptotik proteinler ve yolaklar	130
Şekil 2.36:	Hücre ölümünün Annexin V bağlanması ve PI alımı yoluyla belirlenmesi	132
Şekil 2.37:	Terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) kullanılarak Br-dUTP ile DNA sarmal kırıkları etiketlemenin şematik gösterimi.....	133
Şekil 2.38:	Farklı konsantrasyonlarda bir antikanser ajan ile muamele edilen kanser hücrelerinde apoptoz indüksiyonunu gösteren DAPI boyama görüntüleri	135
Şekil 3.1:	pVT100U-mtGFP transforme BY4741 suşu vektör haritası	157
Şekil 3.2:	pVT100U-mtGFP-Bcl-2 haritası	158
Şekil 3.3:	pVT100U-mtGFP-Bcl-xL haritası.....	158
Şekil 3.4:	YPD plakalarında canlı maya hücre kolonilerinin sayımına yönelik CFU prosedürüne genel bakış	160
Şekil 4.1:	Boş vektör (kontrol grubu) maya suşunun büyüme eğrisi.....	170
Şekil 4.2:	Transforme maya hücrelerinin yaşam ömürlerinin farklı zamanlarında çekilen taramalı elektron mikrogramları (15 KX büyütme)	172
Şekil 4.3:	Transforme maya hücrelerinin yaşam ömürlerinin farklı zamanlarında CFU yöntemi ile canlılık tayini sonuçları.....	174
Şekil 4.4:	Transforme maya hücrelerinin yaşlanma periyodunun 6. gününde Annexin V-PI flow sitometrik test ile canlı, ölü ve apoptotik populasyon yüzdeleri	175
Şekil 4.5:	Transforme maya hücrelerinin yaşam ömürlerinin farklı zamanlarındaki TOS ve TAS seviyeleri.....	177
Şekil 4.6:	Transforme maya hücrelerinin yaşam ömürlerinin farklı zamanlarındaki GR, GPx, GST, SOD ve TrxR enzim aktiviteleri	179
Şekil 4.7:	Transforme maya hücrelerinin yaşam ömürlerinin farklı zamanlarındaki lipid peroksidasyonu ve protein karbonil seviyeleri	181
Şekil 4.8:	Yaşlanma periyodunun 2., 6. ve 10. günleri için boş vektör grubunun PCA skor ve HCA dendrogram grafikleri.....	185
Şekil 4.9:	Yaşlanma periyodunun 2., 6. ve 10. günleri için Bcl-2 transforme grubun PCA skor ve HCA dendrogram grafikleri ..	186
Şekil 4.10:	Yaşlanma periyodunun 2., 6. ve 10. günleri için Bcl-xL transforme grubun PCA skor ve HCA dendrogram grafikleri ..	187

Şekil 4.11:	Boş vektör (EV), Bcl-2 ve Bcl-xL transforme gruplar için yaşlanma periyodunun 2. gününe ait PCA skor ve HCA dendogram grafikleri.....	189
Şekil 4.12:	Boş vektör (EV), Bcl-2 ve Bcl-xL transforme gruplar için yaşlanma periyodunun 6. gününe ait PCA skor ve HCA dendogram grafikleri.....	190
Şekil 4.13:	Boş vektör (EV), Bcl-2 ve Bcl-xL transforme gruplar için yaşlanma periyodunun 10. gününe ait PCA skor ve HCA dendogram grafikleri.....	191
Şekil 4.14:	Boş vektör (EV) ve Bcl-2 grupları için yaşlanma periyodunun 2., 6. ve 10. günlerine ait PCA skorları ve HCA dendogram grafikleri.....	193
Şekil 4.15:	Boş vektör (EV) ve Bcl-xL grupları için yaşlanma periyodunun 2., 6. ve 10. günlerine ait PCA skorları ve HCA dendogram grafikleri.....	194
Şekil 4.16:	Yaşlanma periyodunun 2., 6. ve 10. günlerine ait PCA yükleme grafikleri. PC1, PC2 ve PC3 için; A) boş vektör (EV)-Bcl-2 transforme gruplar B) boş vektör (EV)-Bcl-xL transforme gruplar	196

TABLÖLAR LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1:	Mayada yaşlanma ile ilişkili genler ve hücresel fonksiyonları.....	25
Tablo 2.2:	Reaktif türler (ROS ve RNS) ve hedefleri.....	34
Tablo 2.3:	<i>S. cerevisiae</i> 'da önemli antioksidan savunma sistemleri.....	87
Tablo 2.4:	Apoptotik hücre ölümünün intrinsik yolağında rol oynayan proteinler ve işlevleri.....	115
Tablo 2.5:	İnsan apoptotik proteinler ve fonksiyonlarının mayadaki ortologları.....	129
Tablo 4.1:	Üç deney grubundaki Bcl-2 ve Bcl-xL protein seviyeleri.....	182
Tablo 4.2:	PCA yükleme grafiklerinden bantların IR bandı tanımlamaları ve PC1, PC2 ve PC3 için açıklanan varyansları	197

KISALTMALAR

•O ₂ ⁻	:	Süperoksit Radikali
•OH	:	Hidroksil Radikali
ABTS	:	2,2'-azino-bis(3-etilbenzoitazolin-6-sülfonik asit
ADH1	:	Alkol Dehidrogenaz 1
AIF	:	Apoptoz İndükleyici Faktör
ANOVA	:	Varyans Analizi
AP	:	Apürinik-Apirimidinik
APAF	:	Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör
ATP	:	Adenozin Trifosfat
BAD	:	Bcl-2 İlişkili Ölüm Destekleyici
BAG	:	Bcl-2 İlişkili Athanogen
BAK	:	Bcl-2 Antagonisti Öldürücüsü
BAX	:	Bcl-2 İlişkili X Proteini
Bcl-2	:	B Hücreli Lenfoma Proteini
Bcl-xL	:	B Hücreli Lenfoma-Ekstra Büyük
BER	:	Baz Eksizyon Onarımı
BH	:	Bcl-2 Homoloji
BID	:	BH3 Etkileşen Domaine Sahip Ölüm Agonisti
BIK	:	Bcl-2 Etkileşen Öldürücü
BIM	:	Bcl-2 Etkileşen Ölüm Mediatörü
CAD	:	Kaspaz Aktive Eden DNAaz
Caspase	:	Sisteinil Aspartik Asit Proteaz
CAT	:	Katalaz
CDNB	:	1-Kloro-2,4-Dinitrobenzen
CFU	:	Koloni Oluşturan Birim
CLS	:	Kronolojik Yaşam Ömrü
COX	:	Sitokrom C Oksidaz
CR	:	Kalori Kısıtlaması
Cyt c	:	Sitokrom C
DAPI	:	4',6-Diamidino-2-Fenilindol
DD	:	Ölüm Bölgesi
DISC	:	Ölüm İndükleyici Sinyal Kompleksi
DNPH	:	2,4-dinitrofenilhidrazin
dsDNA	:	Çift Sarmallı DNA
DTNB	:	5,5'-ditiyo-bis-(2-dinitrobenzoikasit)
ELISA	:	Enzim Bağlantılı Immunosorbent Analizi
ENDO G	:	Endonükleaz G
ETZ	:	Elektron Transport Zinciri
FADD	:	Fas İlişkili Ölüm Bölgesi Proteini
FADH	:	Flavin Adenin Dinükleotid (H)
FITC	:	Fluorescein İzotiyosiyanat
FTIR	:	Fourier Dönüşümlü Infrared Spektroskopisi
GPx	:	Glutasyon Peroksidaz
GR	:	Glutasyon Redüktaz
GS	:	Glutasyon Sentaz
GSH	:	Redükte Glutasyon
GSSG	:	Okside Glutasyon

GST	:	Glutasyon S Transferaz
H₂O₂	:	Hidrojen Peroksit
HCA	:	Hiyerarşik Küme Analizi
HR	:	Homolog Rekombinasyon
HRP	:	Horseradish Peroksidaz
HSP	:	Isı Şoku Proteini
IAP	:	Apoptoz İnhibitörü Protein
IMS	:	Membranlar Arası Boşluk
LPO	:	Lipid Peroksidasyonu
Mcl-1	:	Miyeloid Hücre Lösemisi-1
MDA	:	Malondialdehit
MOMP	:	Mitokondri Dış Membran Geçirgenleşmesi
NADPH	:	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat (H)
NER	:	Nükleotid Eksizyon Onarımı
OD	:	Optik Yoğunluk
ORF	:	Açık Okuma Çerçevesi
PBS	:	Fosfat Tamponlu Salin
PCA	:	Temel Bileşen Analizi
PCD	:	Programlanmış Hücre Ölümü
PCR	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PI	:	Propidyum İyodür
PKA	:	Protein Kinaz A
Prx	:	Peroxsiredoksin
PS	:	Fosfatidil Serin
RLS	:	Replikatif Yaşam Ömrü
RNS	:	Reaktif Azot Türleri
ROS	:	Reaktif Oksijen Türleri
RT	:	Reaktif Türler
SD	:	Sentetik Dekstroz
SEM	:	Taramalı Elektron Mikroskopu
SIR2	:	Sessiz Bilgi Düzenleyicisi 2
SOD	:	Süperoksit Dismutaz
TAS	:	Toplam Antioksidan Durum
TBA	:	Tiyobarbitürik Asit
TBARS	:	Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeler
TCA	:	Trikloroasetik Asit
TdT	:	Terminal Deoksinükleotidil Transferaz
TM	:	Transmembran
TNB	:	5-tiyo-2-nitrobenzoikasit
TNF	:	Tümör Nekroz Faktörü
TOR	:	Rapamisin Hedef Proteini
TOS	:	Toplam Oksidan Durum
TRADD	:	TNF Reseptörü İlişkili Ölüm Bölgesi Proteini
TRAIL	:	TNF İlişkili Apoptoz İndükleyici Ligand
TrxR	:	Tiyoredoksin Redüktaz
TUNEL	:	Terminal Deoksinükleotidil Transferaz dUTP Takılı Uç Etiketleme
U	:	Ünite
VDAC2	:	Voltaj Bağımlı Anyon Kanalı 2
YPDA	:	Maya Ekstrakt Pepton Dekstroz Agar
Δψ_m	:	Mitokondriyal Transmembran Potansiyeli

ÖNSÖZ

Doktora eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini paylaşıp yoluma ışık tutan, kıymetli zamanını ayırıp sabırla ve ilgiyle zihin dünyamda yeni ufuklar açan ve gelecekteki mesleki yolculuğumda da kattığı bilgi hazinesinden faydalanacağımı düşündüğüm kıymetli danışman hocam Doç. Dr. Berna KAVAKCIOĞLU YARDIMCI'ya,

Sundukları görüş ve fikirlerle tezimin şekillenmesini sağlayan Tez İzleme Komitesi Üyesi saygıdeğer hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Koray ŞARKAYA ve Doç. Dr. Aslı YILMAZ'a,

2022FEBE040 no'lu proje ile tezime katkı sağlayan Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne

Pamukkale Üniversitesi Kimya bölümündeki tüm kıymetli hocalarım ile sevgili arkadaşlarıma,

Ömrüm boyunca attığım her adımda büyük bir fedakârlıkla beni destekleyen sevgili babacığım Deniz KILIÇER'e, sevgili anneciğim Sevil KILIÇER'e, değerli ablam Semiha KORKMAZ ve ailesine,

Akademik yolculuğumda her zaman destek olan, sabır ve sevgiyle yanımda duran sevgili eşim Dr. Serdar GÜLER'e,

Bu tezin ardındaki en güçlü motivasyonum olan biricik oğlum Halil İbrahim GÜLER'e

Teşekkürlerimi sunarım.

1. GİRİŞ

Moleküler, hücresel, doku ve organizma düzeyinde artan fonksiyonel bozulma ile homeostatik kapasitede progresif bir azalma şeklinde karakterize edilen ve genetik olarak düzenlenen yaşlanma, çok faktörlü doğası nedeniyle hücrenin en karmaşık ve merak uyandıran fenomenlerinden biri olmaya devam etmektedir (Booth ve Brunet 2016, Mouton ve diğ. 2020, Cohen ve diğ. 2022). Son yıllarda, yaşlanmaya dair araştırmalar hızla ilerlemiş ve bu ilerlemeler büyük ölçüde omurgasız ökaryotik model organizmalardaki çalışmalara atfedilmiştir (Tyczevska ve diğ. 2023; Altintas ve diğ. 2016; Smith ve diğ. 2008; Kaeberlein ve diğ. 2007). Bu organizmalardan biri olan tek hücreli *Saccharomyces cerevisiae* mayası; kısa yaşam ömrü, eksiksiz genom dizisi verileri, genetik ve moleküler manipulasyonlara yatkın oluşu, kapsamlı moleküler araç ve tekniklerin mevcudiyeti sebebiyle hücrenin kompleks ve önemli fenomenlerinden biri olan yaşlanma genetiği ile prosesinin modellenmesinde tercih edilen popüler bir organizmadır (Orozco ve diğ. 2013; Kawai ve diğ. 2010; Parrella ve Longo 2008). İlk maya yaşlanma çalışması yaklaşık 60 yıl önce yayımlanmış ve bu çalışmada maya hücrelerinin sınırlı bir çoğalma kapasitesine sahip olduğu gösterilmiştir (Mortimer ve Johnston 1959). Günümüzde ise mayalarda, replikatif (RLS-eksponansiyal faz) ve kronolojik (CLS-stasyonier faz) olarak adlandırılan iki farklı hücresel yaşlanma modeli çalışılmaktadır (Arslan ve diğ. 2018; Burtner ve diğ. 2011). RLS, yaşlanma öncesi anne hücreler tarafından tamamlanan mitotik döngünün (yani, tek bir anne hücreden kaç tomurcuk hücrenin üretildiği) sayısı olarak ifade edilirken CLS ise hücrelerin hala canlı olduğu ancak üreme yeteneklerinin sınırlandırıldığı stasyonier faz sırasında bölünmeyen hücrelerin canlılıklarını sürdürdükleri zamanın uzunluğu olarak tanımlanmaktadır (Postnikoff ve diğ. 2017; Ocampo ve Barrientos 2011). Bu iki yaşlanma modeli, hem çoğalan hem de çoğalmayan hücrelerin yaşlanma süreçlerini basit bir tek hücreli organizmada karşılaştırma ve değerlendirme fırsatı sunması açısından önemlidir. Modele göre anne hücre, asimetrik olarak mitoz yoluyla bölündükçe moleküler hasar birikmekte ancak yavru hücreler genellikle anne hücreden böyle bir hasarı devralmamakta ve çoğalma kapasitelerini korumaktadırlar (Alugoju ve diğ. 2023). Ancak, bazı çalışmalar en az üç farklı türde hasar kalıtımı önermiştir, bunlar; nükleer

ekstrakromozomal ribozomal DNA (rDNA) daireleri, oksidatif hasar görmüş veya yanlış katlanmış sitoplazmik proteinler ve işlevsiz mitokondriyi içermektedir (Alujo ve diğ. 2023; Longo ve diğ. 2012). Yavru genç hücre kolonileri morfolojik olarak yuvarlak, oval, düz, pürüzsüz ve sağlıklı bir görünüme sahip olup hücrelerde deformasyon bulunmamaktadır (Kavakcıoğlu Yardımcı ve Mollaoğlu 2021). Fenotipik olarak yaşlı anne maya hücreleri ise yavru hücrelerden daha büyük boyutta olup mayanın replikatif yaşam ömrünü gösteren bir dizi tomurcuk izleri taşımaktadırlar. Yaşlı anne hücrelerde; aktin hücre iskeletinde bozulmalar, tomurcuk izlerine bağlı kitin içeriklerinde artış ile sert ve kalın hücre duvarı oluşumu, sitozolik pH değerlerinde yükselme, sfingolipit ve ergosterol biyosentezinden kaynaklı yaşlanmış plazma membran proteinlerinin hareketliliği ile geçirgenliğinde azalma, hücre döngüsü ve protein sentezinde yavaşlama, hücre iskeletinde çökme ve büzüşmeler, hücre yüzeyinde gevşek, kırıksık, pürüzlü bir görünüm ve en nihayetinde hücre lizisi gibi çarpıcı değişiklikler gözlenmektedir (Alujo ve diğ. 2023; Eigenfeld ve diğ. 2021; Leadsham ve diğ. 2010; Powell ve diğ. 2003; Laun ve diğ. 2001; Pichová ve diğ. 1997; Barker ve Smart 1996). Bunlara ek olarak durağan faz yaşlı maya hücrelerinde (CLS'de), mitokondriyal ROS seviyelerine bağlı hücre içi oksidatif strese artış gözlenmektedir (Longo ve Fabrizio 2012; Laun ve diğ. 2001). Yaşlanma oksidatif stresinin şiddetine bağlı olarak yaşlı anne maya hücrelerinde; fosfatidil serin eksternalizasyonu, kromatin kondenzasyonu, nükleer fragmentasyon gibi apoptoz (fizyolojik ölüm şekli) veya plazma membran rüptürü, subselüler yapılarda parçalanma, nükleer HMGB1 salınımı gibi nekrozun (patolojik ölüm şekli) biyokimyasal ve morfolojik belirteçleri Annexin V-PI, TUNEL (deoksinükleotidil transferaz aracılı dUTP son etiketleme), DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol dihidroklorür), elektron mikroskopisi gibi testler/yöntemler ile açığa kavuşturulmuş ve hücrelerin apoptotik ile nekrotik ölüm arasındaki ayrımı daha iyi yapılmaya çalışılmıştır (Carmona-Gutiérrez ve diğ. 2011; Carmona-Gutierrez ve diğ. 2010; Eisenberg ve diğ. 2010; Laun ve diğ. 2008; Fabrizio ve diğ. 2004; Herker ve diğ. 2004; Laun ve diğ. 2001). Ayrıca, mayaların yüksek ökaryotlar ile benzer apoptotik ve nekrotik yanıtlara girme yetenekleri olduğu da ifade edilmiş ve memeli apoptotik ve nekrotik proteinlerinin mayalardaki ortologları tanımlanmıştır (Carmona-Gutierrez ve diğ. 2010; Eisenberg ve diğ. 2010; Fröhlich ve diğ. 2007; Madeo ve diğ. 2004). Memelilerde apoptotik hücre ölümünün, intrinsik (mitokondriyal) ve ekstrinsik (ölüm reseptörü aracılı) olmak üzere iyi tanımlanmış temelde iki yolak

üzerinden yürüdüğü bilinmektedir (Kashyap ve diğ. 2021; Elmore 2007). Maya hücrelerinin memeli intrinsik apoptoz faktörlerinin çoğu homologlarına sahip olduğu ve çeşitli stressor faktörler nedeniyle apoptotik süreci deneyimledikleri bilinmesine rağmen ölüm reseptörleri ve bunların ligandları gibi ekstrinsik apoptotik düzenleyici yolun hiçbir bileşeni mayalarda tarif edilmemiştir, bu durum maya hücrelerinin memeli apoptotik sistemini tamamen tekrarlamadığını göstermektedir (Carmona-Gutierrez ve diğ. 2010; Almeida ve diğ. 2008). Apoptozun intrinsik yolağının merkezinde yer alan mitokondriyal dış membran permeabilizasyonu, Bcl-2 ailesi adı verilen bir protein grubu tarafından regüle edilmektedir (King ve diğ. 2023; Kalkavan ve Green 2018; Adams ve Cory 2018). Bcl-2 protein ailesi üyeleri günümüzde, BH (Bcl-2 homoloji) motiflerinin yapı ve fonksiyonlarına göre; i) anti-apoptotik (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-w, A1/BFL-1) ii) pro-apoptotik (Bax, Bak, Bok) iii) yalnızca BH3 motifi içerenler (Bid, Bim, Bik, Bad, Bmf, Hrk, Noxa, Puma) olmak üzere üç grupta sınıflandırılmaktadır ve hücrelerin yaşam/ölüm sürecine girmelerinden zıt fonksiyon gösteren bu protein ailesindeki etkileşimler sorumludur (Adams ve Cory 2018; Lomonosova ve Chinnadurai 2008). *S. cerevisiae* hücreleri memeli intrinsik apoptoz regülatörlerinden anti-apoptotik Bcl-2 ailesi proteinlerinin bariz homologlarına sahip olmamakla birlikte bu proteinlerin heterolog rekombinasyonlarının maya hücrelerinde aktivitelerini korudukları ve oksidatif stres indüklü koşullarda hücre ölümüne karşı direnç sağladıkları ifade edilmektedir (Polčic ve diğ. 2015; Chen ve diğ. 2003; Tao ve diğ. 1997). Bu durum familyanın etki mekanizmasının anlaşılmasında *S. cerevisiae* hücrelerini dikkat çekici bir model haline getirmiştir. Ayrıca, integral bir mitokondriyal membran proteini olan Bcl-2 protein familyasının anti-apoptotik fonksiyon gösteren üyelerinin apoptoz ve hücre kaderi üzerindeki ana düzenleyici rolünün yanı sıra, hücrel redoks durumu ile Bcl-2 ifadesi arasındaki yakın etkileşimi gösteren ikna edici deneysel kanıtlar bulunmaktadır. Buna göre; Bcl-2 overekspresyonlarının hücre hayatta kalımını teşvik eden pro-oksidan bir ortam oluşturmak üzere mitokondri redoks metabolizmasını modüle ettiği ancak oksidatif stres durumlarında ise aşırı ROS birikimini önlemek üzere antioksidan aktivite sergileyerek bir redoks deposu olarak işlev gösterdiği ifade edilmektedir (Pohl ve diğ. 2018; Gardner ve diğ. 1997; Hockenbery ve diğ. 1993; Kane ve diğ. 1993). Ayrıca maya hücrelerinin, ROS seviyeleri ve intraselüler redoks homeostazilerini sürdürebilmek için süperoksit dismutazlar (SOD1 ve SOD2), glutatyon peroksidazlar (GPX1, GPX2 ve GPX3), glutatyon redüktazlar (GLR1),

glutasyon S-transferazlar (GTT1, GTT2, GTO1, GTO2, GTO3, GRX1 ve GRX2) ve tiyoredoksin redüktazlar (TRX1, TRX2 ve TRX3) gibi enzimatik antioksidan savunma sistemleri geliştirdikleri bilinmektedir (Outten ve Culotta 2004; Collinson ve Grant 2003; Inoue ve diğ. 1999; Pedrajas ve diğ. 1999; Choi ve diğ. 1998; Gralla ve Kosman 1992; Gan 1991; Muller 1991).

Verilen bilgiler doğrultusunda bu çalışmanın temel amacı, insan anti-apoptotik Bcl-2 ve Bcl-xL proteinlerinin, yaşlanma sürecine bağlı olarak hücre içinde artış gösteren oksidatif stres koşullarına karşı olası koruyucu rollerini deneysel olarak araştırmaktır. Özellikle, hücresel yaşlanma süreçlerinin moleküler düzeyde daha iyi anlaşılabilmesi için genetik olarak iyi tanımlanmış ve manipülasyona uygun bir model organizma olan *Saccharomyces cerevisiae* kullanılmıştır. Bu amaç doğrultusunda, söz konusu insan genleri mayaya heterolog olarak aktarılmış ve bu proteinlerin ifade edildiği transforme hücrelerde, yaşlanmaya bağlı olarak gelişen oksidatif stres koşullarına karşı potansiyel biyokimyasal ve yapısal koruma etkileri detaylı olarak incelenmiştir. Araştırma, Bcl-2 ailesine ait bu iki önemli proteinin yaşlanma sırasında hücrede gelişen oksidatif dengesizlikle nasıl bir etkileşim içinde olduğunu ve hücresel antioksidan sistemlerin bu proteinlerin varlığında nasıl düzenlendiğini anlamaya yöneliktir. Aynı zamanda, bu çalışmada yaşlanma ile ilişkili moleküler değişikliklerin, Bcl-2 ve Bcl-xL proteinlerinin varlığında nasıl biçimlendiğini anlamak adına kapsamlı morfolojik, biyokimyasal ve biyomoleküler bileşim düzeyinde değerlendirmeler yapılması amaçlanmıştır. Bu bağlamda, maya hücrelerinde heterolog olarak ifade edilen anti-apoptotik Bcl-2 ve Bcl-xL proteinlerinin yaşlanma sürecindeki etkilerinin araştırılması, hücresel yaşlanmanın temel biyokimyasal süreçlerine dair evrensel ilkelerin anlaşılmasına katkı sağlarken, farklı organizmalar arasında bu proteinlerin koruyucu rollerini karşılaştırmalı olarak değerlendirebilecek yaşlanma biyolojisi çalışmalarına da önemli bir referans noktası oluşturabilir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Model Organizma *S. cerevisiae* Mayasına Genel Bakış

S. cerevisiae, fungus aleminde yer alan, tomurcuklanma ve askospor oluşturarak üreme özelliği gösteren fakültatif anaerobik tek hücreli bir maya türüdür. Şarap, ekmek, bira gibi ürünlerin yapımında binlerce yıldır kullanılan *S. cerevisiae* suşları ve türleri, su kaynaklarından, topraktan, olgunlaşmış meyvelerin yüzeylerinden, böceklerin ve sıcakkanlı hayvanların vücutlarının yüzey hatlarından ve sindirim kanallarından izole edilebilmektedir (Martini 1993).

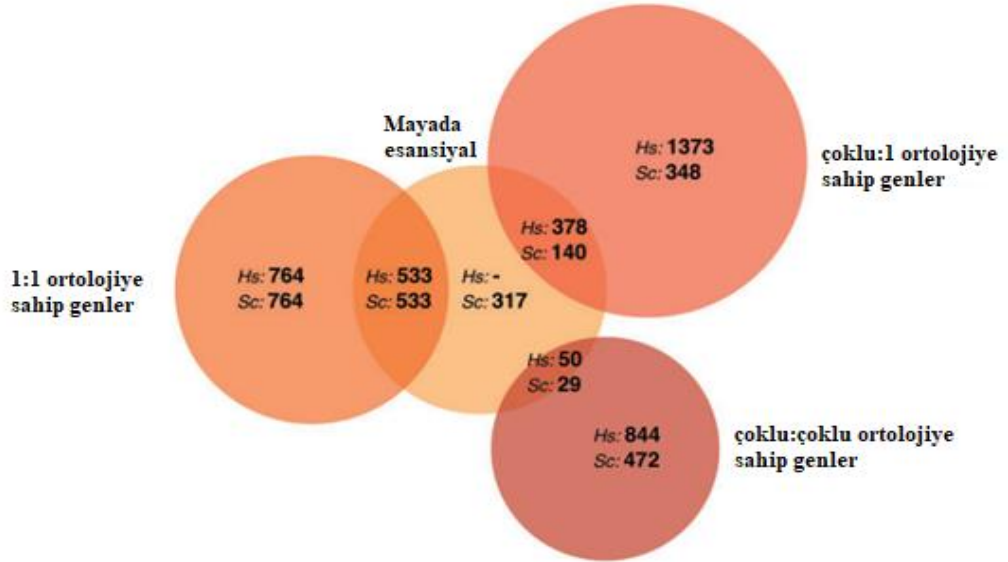
S. cerevisiae dahil her maya geni için; DNA ve protein sekansı, ekspresyon, regülasyon, interaksiyon, fenotipler, gen ontolojisi türünden bilgiler çevrimiçi bir veritabanı olan Saccharomyces Genome Database'de (SGD) toplanmış ve düzenlenmiştir (Cherry ve diğ. 2012).

12068 kilobaz (kb) genom boyutuna sahip 16 kromozomu bulunan *S. cerevisiae*'nin tüm genomunun %70'i protein veya protein ürünlerini kodlayan yaklaşık 6000 açık okuma çerçevesini (ORF) kapsamaktadır (Feldmann ve diğ. 2011; Goffeau ve diğ. 1996), ki bu da ökaryotik mikroorganizmalardan ve insandan (genomunun %5'i ORF'den oluşur) çok daha yoğun bir yapıdır. Yoğun ORF, *S. cerevisiae*'nin DNA dizilerinin çoğunun kodlama genlerini içerdiği anlamına gelmektedir. Böylece, bir geni tanımlamak, işlevini belirlemek ve benzer proteinleri DNA dizisi ve işlevi açısından araştırmak kolaydır (Dujon 1996). *S. cerevisiae* hücrelerinde toplamda 6464 gen bulunur; bunlardan 6418'i nükleer genomda, 46'sı ise mitokondriyal genomda yer almaktadır. Bu genlerin 18'i pseudogenlerdir ve geriye kalan 6016 gen işlevsel proteinlerin kodlanmasından sorumlu iken 430 gen ise çeşitli RNA moleküllerini kodlamaktadır (299 tRNA, 14 rRNA ve 117 diğer RNA molekülleri) (Engel ve diğ. 2014; Engel ve diğ. 2022). Genlerinin çoğunluğu açık kromatin formunda bulunan maya hücreleri aktif olarak kopyalanabilmekte ya da hızla indüklenebilmektedirler (Grunstein ve Gasser 2013).

Hinnen ve diğ. (1978) tarafından yapılan bir çalışmada *Escherichia coli* bakterisinde çoğaltılan bir plazmid ile mayanın başarılı transformasyonu yayınlandığında, maya hızla en yaygın kullanılan tek hücreli ökaryotik model organizma haline gelmiştir. Ayrıca, plazmid kullanımının yanı sıra, *S. cerevisiae*'nın etkili homolog rekombinasyon (HR) DNA onarım mekanizması ile DNA fragmentlerinin diğer organizmalara kıyasla çok daha yüksek bir verimlilikle belirli genomik lokuslara entegre edilmesine izin verdiği anlaşılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR) geliştirilmesiyle birleştiğinde, bu verimli HR süreci, araştırmacıların maya genomunu kolayca manipüle etmelerini sağlamış ve model organizma olarak mayanın kullanımını daha da pekiştirmiştir (Vanderwaeren ve diğ. 2022). Ayrıca araştırmalarda sıkça kullanılan bir *S. cerevisiae* suşunun genomu tamamen dizilenmiş olup bu suşun referans genom olarak kabul edildiği bilinmektedir ve bir ökaryottan tamamen dizilenen ilk genom olması açısından önemlidir (Engel ve diğ. 2014). *S. cerevisiae*'nın genetik ve biyokimyasal özellikleri iyi bilindiğinden dolayı, kültivasyonu ve genetik manipülasyonunun kolay olduğu çeşitli çalışmalarda ifade edilmektedir (Galagan ve diğ. 2005; Sherman 2002; Botstein ve diğ. 1997; Goffeau ve diğ. 1996).

İnsan biyolojisinin doğrudan araştırılması, pratik veya etik kaygılar nedeniyle genellikle sınırlı olsa da, araştırmacılara sunulan geniş model organizma yelpazesi, kendi moleküler işleyişimiz hakkında dikkate değer keşifler yapılmasına olanak sağlamaktadır. Çoğalma süreleri ve izlenebilirlikleri bakterilere benzeyen, ancak hücresel bileşenleri insanlarla çok daha fazla örtüşen ökaryotik mikroorganizmaların, insan biyolojisinin incelenmesinde özellikle yararlı olduğu kanıtlanmıştır. Bunların başında gelen tomurcuklanan maya *S. cerevisiae*, insan hücre işleyişinin ve hastalıklarının altında yatan temel biyolojinin çoğunu ortaya çıkarmak için paha biçilmez bir araç olmuştur (Laurent ve diğ. 2016). İnsan ve mayanın son ortak atasının yaklaşık bir milyar yıl önce yaşadığı tahmin edilmekte ve hala genetik materyalimizin önemli bir bölümü paylaşılmaktadır (Douzery ve diğ. 2004). 1987 yılında yapılan bir çalışmada, bir insan geninin hücre döngüsü kusurlu bir maya mutantını tamamlayabildiği gösterilmiştir (Lee ve Nurse 1987). Bu sonuç, hücre döngüsü kontrol mekanizmalarının maya ve insanlar arasında yüksek oranda korunduğunu göstermesi açısından bir dönüm noktasıdır. Maya ve insan arasında tüm genom genelinde ortalama %32 aminoasit özdeşliği tespit edilmiş ve ayrıca,

mayada esansiyel olan genlerin yaklaşık %50'sinin insan homologları ile değiştirilebilir olduğu ifade edilmiştir (Kachroo ve diğ. 2015). İnsan genomu yaklaşık 20.000 protein kodlayan gen içerirken, maya genomu yaklaşık 6000 gen içermektedir. Türler arasındaki genlerin ikili karşılaştırması, 2300 maya genini ve 3900 insan genini temsil eden yaklaşık 2100 ortolog grubunu ortaya koymaktadır (Remm ve diğ. 2001) (Şekil 2.1). Birçok ortak gen, her iki organizmada da önemli hücresel roller üstlenmekte ve bu genlerdeki bozulmalar, kanserden Mendelian hastalıklara kadar çeşitli insan hastalıklarına yol açmaktadır (Kachroo ve diğ. 2022). İnsanlar ve maya arasındaki homoloji ve mayanın doğal izlenebilirliği, araştırmacıların hem insan proteinlerinin heterolog ekspresyonu yoluyla hem de belirli aminoasitleri, proteinleri ve hatta tüm maya yollarını insanlaştırmak için maya hücrelerini doğrudan değiştirerek insan biyolojisi için bir model olarak kullanılabilirliğini genişletmelerini sağlamıştır (Laurent ve diğ. 2016). Tüm bu avantajları sayesinde *S. cerevisiae*, insan hastalıkları araştırmalarında model organizma olarak önemli bir rol üstlenmiştir (Karathia ve diğ. 2011). Ayrıca, hücre döngüsü regülasyonu, hücre içi transport ve protein katlanmasının düzenlenmesi gibi temel genetik ve hücresel süreçlerin keşfi *S. cerevisiae*'de yapılan çalışmalarla sağlanmıştır (Hartwell 2002; Nakano, 2004; Lindquist ve diğ. 2009).



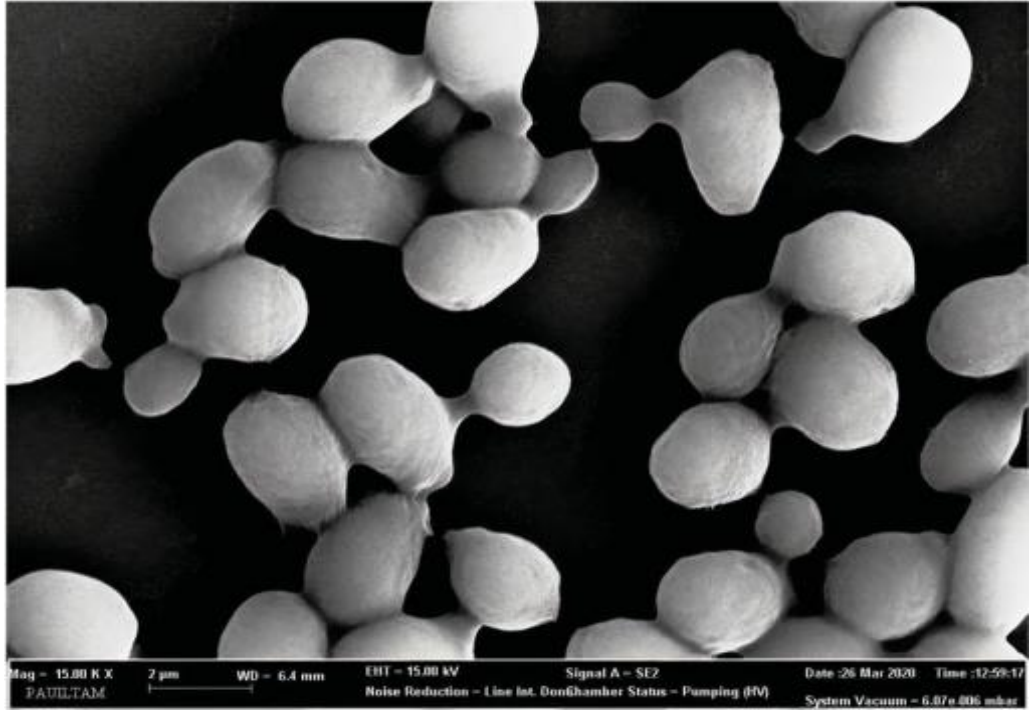
Şekil 2.1: Ortolojinin doğası (ortologların insan:maya içindeki sayılarının 1:1, çok:1 veya çok:çok olmasına göre sınıflandırılması) ile maya genlerinin standart laboratuvar büyüme koşullarında esansiyel olup olmadığına göre gruplandırılan ve insan-maya ortologlarının sayılarını gösteren Venn diyagramı (Hs: *Homo sapiens*, Sc: *Saccharomyces cerevisiae*) (Laurent ve diğ. 2016 tarafından yapılan çalışmadan alınmış ve düzenlenmiştir).

2.1.1 Mayalarda Büyüme Şartları, Mediumu ve Genel Morfoloji

S. cerevisiae, kültürlenme sürecinde pahalı ve özel besiyerlerine ihtiyaç duymamakta ve katı veya sıvı besiyerlerinde hızlı bir şekilde büyüebilmektedir. YEPD (Yeast Extract Peptone Dextrose) besiyeri ortamında, laboratuvar koşullarında, maya haploid suşlarının hücre sayısının 90 dakikada iki katına çıktığı, sentetik ortam koşullarında bu sürenin 140 dakikaya kadar uzadığı bilinmektedir (Sherman 2002).

YEPD mediumu; karbon (C), azot (N), vitaminler ve mineraller açısından zengin olan pepton ve maya özünden meydana gelmektedir. Bu medium, B vitamini kompleksi bakımından zengin olan ve bakteriyel büyümeyi teşvik eden faktörleri de ihtiva etmektedir (Jach ve diğ. 2021). Azot (N), kükürt (S), fosfor (P), demir (Fe), çinko (Zn), bakır (Cu) ve mangan (Mn) gibi bazı esansiyel elementlerin mayaların büyüme mediumlarına eklenmeleri zorunludur (Elmacı ve diğ. 2014). Kükürt ve fosfor elementleri inorganik sülfatlar ve fosfatlar şeklinde emilebilmektedir (Bekatorou ve diğ. 2006). Mayaların çoğunun amonyum iyonları ile üreyi doğrudan özümseyebildiği az sayıda maya türünün ise nitratları azot kaynağı olarak kullanabildiği bilinmektedir.

Mayalar yeterli besin kaynağı bulunduğu takdirde, 28-30°C sıcaklıkta, aerobik koşullar altında, hafif asidik veya nötr bir pH ortamında yetiştirilebilmektedirler (O'Kennedy ve Reid 2008). YEPD mediumunda, azami hücre yoğunluğu 2×10^8 hücre/ml'ye ulaşan kültürler 2-3 günlük gelişimin ardından gözlemlenebilmektedir. Meydana gelen maya hücre kolonileri parlak, pürüzsüz, düz, nemli, krem veya mat bir morfoloji sergilemektedir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: 15 K X büyütme ile doğal suş *S. cerevisiae* BY4741 hücrelerine ait taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüsü (Kavakcıoğlu Yardımcı ve Mollaoğlu 2021).

2.1.2 Mayalarda Hücresel Yapı ve Membran Fonksiyonları

Temel hücresel süreçleri membrana bağlı organeller üzerinden gerçekleşen mayalarda hücre zarı, hücre bileşenlerini dış ortamdan ayırırken, çekirdek zarı, genetik materyalin etrafını saran ve onu koruyan bir işlev görmektedir (Dickinson ve Schweizer 2004). Prokaryotik hücrelerle kıyaslandığında, *S. cerevisiae* hücreleri glukoz, N-asetilglukozamin, mannoproteinler ile glukan rezidülerinden oluşan, hücrelere şekil veren ve mekanik-termal koşullara karşı koruma sağlayan bir hücre duvarına sahiptir. Ek olarak hücre duvarı yapısı itibarıyla hücrenin turgor basıncına bağlı iç osmotik koşulları stabilize ederek lizisi önlemede ve membrana hasar verebilecek makromolekülleri elemeye yardımcı olmaktadır (Klis ve diğ. 2006; Kuranda ve Robbins 1991). Zorlu çevresel koşullar altında maya hücre duvarı, hücrenin hayatta kalmasını sağlamanın yanı sıra besin alımı, üreme ve çevresiyle iletişim kurma gibi önemli işlevleri yerine getirmektedir. Periplazmik boşlukta hücre membranına glukan ve kitin zincirleri ile bağlı olan hücre duvarı yapısı, maya metabolizmasını regüle eden çeşitli enzimleri de içermektedir (Kuranda ve Robbins

1991). *S. cerevisiae* membranları, yüksek ökaryotik hücrelerin membranlarına benzer bir yapıya sahiptir. Membranlara ait lipit çift tabaka, polar lipitler ve proteinleri içermekte ve hidrofilik moleküller için nispeten geçirimsiz bir engel oluşturmaktadır (Van der Rest ve diğ. 1995). Metabolik gereksinimleri karşılamak için maya hücreleri, özel proteinler vasıtasıyla membran boyunca şekerler, aminoasitler veya iyonların seçici olarak alımı ile salınımını regüle etmektedirler. Ökaryotlarda yüksek oranda bulunan sterol olan kolesterol yerine maya hücre zarları temelde ergosterol ihtiva etmektedir (Van der Rest ve diğ. 1995). Bitki hücreleri ve prokaryotik organizmalar ile benzerlik göstermelerine karşın maya hücreleri, metabolik süreçte protein sentezi için gerekli olan bazı enzimler ile aminoasitlerin depo edilmesinde, ayrıca metabolizmanın atık ürünlerinin bertaraf edilmesinde görev alan çok sayıda vakuol içermektedir (Alberts ve diğ. 2008).

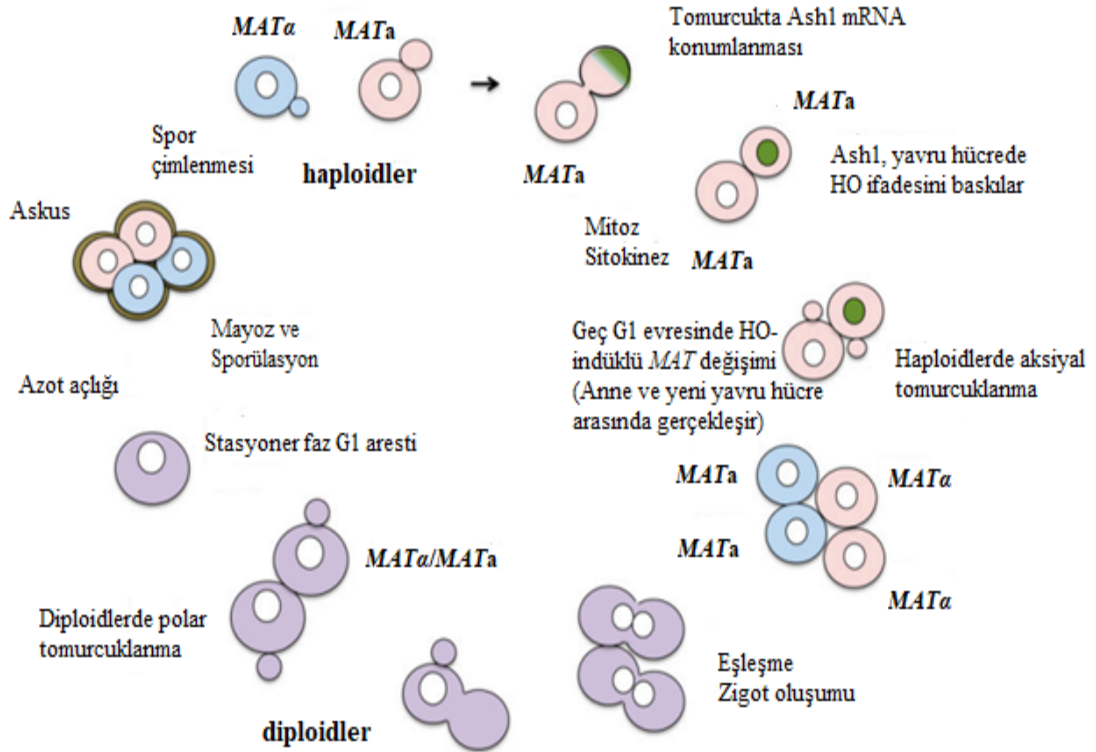
2.1.3 Mayalarda Enerji Metabolizması

Maya hücreleri, enerji kaynağı olarak organik bileşikleri kullanma ve büyüme için güneş ışığına ihtiyaç duymama gibi özellikleri nedeniyle kemoorganotrof canlılar olarak sınıflandırılmaktadırlar. *Saccharomyces* cinsi mayalar, glukoz ve fruktoz gibi heksoz şekerleri karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilmektedirler (Carlson 1987). Glikolitik yolak ve Krebs çevrimiyle ATP'ye dönüştürülebilen glukoz, temel karbon ve enerji kaynağıdır (Bekatorou ve diğ. 2006). *S. cerevisiae*, oksijenli ve oksijensiz ortamlarda hayatta kalma ve çoğalma kapasitesine sahip olduğu için fakültatif anaerob bir maya türüdür. Aerobik şartlarda glukoz, mitokondriyal elektron taşıma zinciri (ETZ) ve oksidatif fosforilasyon aracılığıyla enerjiye dönüştürülebilmektedir. Ancak, anaerobik koşullarda, alkol fermantasyonu sürecinde olduğu gibi mayalar etkin bir şekilde büyümemektedirler, çünkü enerji gereksinimi sadece glikolizden sağlanmakta ve şekerler genel itibariyle gliserol, CO₂ ve etanol gibi yan ürünlere dönüşmektedirler (Ishtar ve diğ. 2007; Bekatorou ve diğ. 2006). Sonraki adımlarda ise etanol yan ürünü O₂ bulunması durumunda, krebs döngüsü ve ETZ gibi süreçlerden geçerek tüketilmektedir. Bunun yanı sıra, *S. cerevisiae*'nin mediumdaki glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak solunum veya fermantasyon metabolizmalarından birini tercih etme eğiliminde olduğu da (Crabtree etkisi) bilinmektedir (Käppeli 1986).

2.1.4 Mayalarda Yaşam Döngüsü

S. cerevisiae mayası genelde diploid formda bulunmasına rağmen hem diploid ($2n$, her bir kromozomun iki homolog veya heterolog kopyası) hem de haploid (n) olmak üzere yaşam döngüsü iki farklı evreden oluşmaktadır (Landry ve diğ. 2006). Suşa veya büyüme evresine bağlı olarak, diploid ve haploid hücre boyutları değişiklik gösterebilmektedir. Büyüme süresi boyunca, haploid kültürler diploid kültürlerle kıyasla daha hızlı bir üreme eğilimindedirler. *S. cerevisiae*'nın üreme şekli hem vegetatif hem de cinsel olabilmektedir. Yeterli besin kaynağının mevcut olması halinde haploid ve diploid hücreler, tekrarlayan vegetatif büyüme ve mitoz döngülerini deneyimleyebilmektedir (Dickinson ve Schweizer 2004). Mayalarda vegetatif hücre bölünmesi, anne hücreden yeni hücrenin bir çıkıntı şeklinde başladığı tomurcuklanma evresiyle karakterize edilmektedir. Bu süreç, nükleer bölünmeyle devam etmekte ardından hücre duvarı oluşmakta ve son olarak hücreler ayrılmaktadır. Haploid hücrelerin tomurcukları, önceki hücreye yapışık bir morfoloji sergilerken, diploid hücrelerde ise zıt kutuplarda beliren tomurcuklar gözlenmektedir. Anne hücrelerin her birinin genel olarak 20-30 tomurcuktan fazlasını oluşturmadağı ve hücre duvarında meydana gelen tomurcuk izlerinin sayısından faydalanılarak hücrelerin yaşının belirlenebildiği bilinmektedir (Sherman 2002). Düşük azot içeriğine sahip ve sınırlı karbon kaynağı olan verimsiz ortam koşullarında (besin açlığı), diploid hücreler mayoz sporulasyona maruz kalarak ascus adı verilen yapıda dört haploid askospor üretmektedirler. Üretilen sporlar, zorlu çevresel koşullara karşı güçlü bir direnç geliştirme kapasitesine sahiptirler (Landry ve diğ. 2006). Yeterli besiyeri ortamına yerleştirildiklerinde bu sporlar, haploid formlarda gelişerek büyümeyi başlatabilmektedirler (Dickinson ve Schweizer 2004). Cinsel üremenin oldukça önemli olduğu maya biyolojisinde haploid sporlar, “MAT” lokusundaki allele ($MATa$ ve $MAT\alpha$) bağlı olarak a veya α olarak adlandırılan kendine özgü iki çiftleşme türünden birine ait olabilmektedir. a çiftleşme tipi haploidler, “ a ” faktör feromonu salgılayarak, α çiftleşme tipi haploidler ise “ α ” faktör feromonu salgılayabilmektedir (Dickinson ve Schweizer 2004; Herskowitz 1988). Farklı çiftleşme tipinde hücreler, aynı ortamda bulunduklarında birbirlerini algılamakta ve birleşmektedirler. Uygun koşullar altında farklı çiftleşme tipindeki feromon salgılayan haploid hücrelerin birleşmesi, $MATa/MAT\alpha$ diploidlerini oluşturmaktadır. Bu diploid hücreler çiftleşmemekte ancak mitotik olarak

çoğalabilmekte veya mayoz geçirerek haploid sporlar üretebilmektedirler (Şekil 2.3) (Duina ve diğ. 2014; Grunstein ve Gasser 2013; Haber 2012).

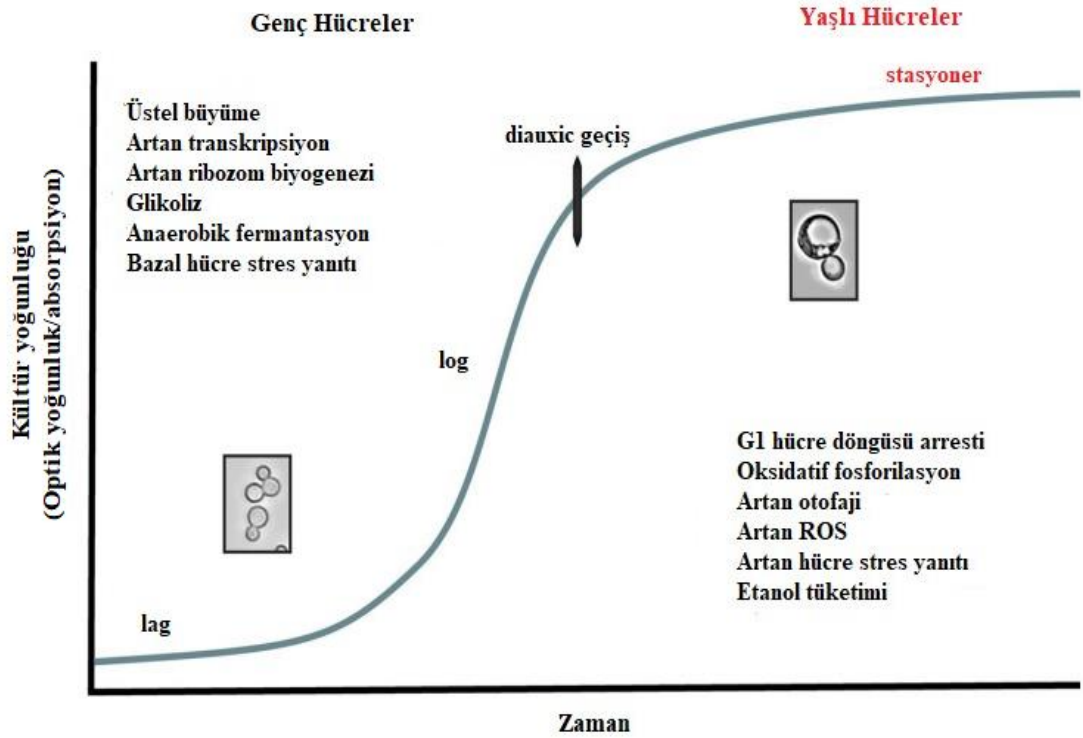


Şekil 2.3: *S. cerevisiae*'nin homotallik yaşam döngüsü (Haber 2012 tarafından yapılan çalışmadan alınmış ve düzenlenmiştir).

2.1.5 Mayalarda Büyüme Fazları

Maya hücreleri temelde, lag fazı (gecikme fazı), log fazı (üstel faz), diauxic geçiş, post-diauxic faz ve stasyonier faz (durgun faz) olarak adlandırılan farklı fazlarda büyümektedirler (Şekil 2.4) (Longo ve diğ. 2012). Bu büyüme fazları farklı metabolik profillere sahiptir. Maya hücreleri taze bir ortama inokule edildiklerinde başlangıçta lag fazı olarak bilinen bir büyüme gecikmesi yaşanmakta ve hücreler yeni ortama adapte olmaya çalıştıkları için bölünme gözlenmemektedir. Gecikme evresinden sonra ortama uyum sağlayan hücreler, log fazında hızla çoğalmakta ve yüksek glikoz derişimlerinde oksijen bulursa dahi fermantasyonu solunuma tercih ederek etanol üretmektedirler (Crabtree etkisi). Glukozun ortamda nadir hale geldiği diauxic geçiş aşamasında maya hücreleri, metabolik değişim sürecini başlatarak fermantasyondan solunuma geçmektedirler. Post-diauxic fazda ise maya hücreleri,

fermantasyon ile üretilen etanolü enerji kaynağı olarak kullanıp solunum sürecini deneyimlemektedirler (Matmati ve Hannun 2008). Post-diauxic fazı stasyoner faz izlemekte ve bu fazda maya hücreleri bölünmemektedir. Büyümenin platoya ulaştığı stasyoner fazda metabolik aktivite düşmektedir. Ayrıca, stasyoner fazda besin kaynakları sınırlanmakta, protein sentezi azalmakta, stres yanıt genleri aktive olmakta, hücre duvarı kalınlaşmakta ve stres direnci artmaktadır. Bu faz, kromozom kondenzasyonu ve otofajinin de gözlemlendiği bir süreç olarak karakterize edilmektedir (Gray ve diğ. 2004).



Şekil 2.4: Mayada büyüme fazları (Di Gregorio ve Duennwald 2018 tarafından yapılan çalışmadan alınmış ve düzenlenmiştir).

2.2 Yaşlanma Olgusu ve Yaşlanma Araştırmaları İçin Bir Model Olarak Maya: İki Yaşlanma Paradigması

Yaşlanma, zaman içinde doğurganlığın azalması ve ölüm oranının artması ile karakterize edilen bir süreçtir (Kirkwood ve Austad 2000) ve canlı sistemlerin evrimsel sürecinde kaçınılmaz olarak ortaya çıkan paradoksal bir olgudur. Öte yandan, yaşlanmayla bağlantılı olarak sağlığın bozulması ve nihai ölüm oranı,

binlerce yıldır insanların görünüşte kaçınılmaz olan bu ilerlemeyi engellemenin yollarını aramasına neden olmuştur. Yaşlanmaya ilişkin moleküler ve genetik çalışmalar geçtiğimiz yüzyılda hız kazanmış ve gelişen bir uğraş alanı haline gelmiştir. Memelilerde yaşlanma çalışmaları, yaygın model organizmaların uzun ömürlerinden dolayı sınırlıdır. Fareler ve sıçanlar 3-5 yıl, primatlar ise 40 yıla kadar yaşayabilmektedirler. Bununla birlikte, özellikle kemirgenlerde yapılan yaşlanma çalışmaları son derece bilgilendirici olmuş ve uzun yaşamı düzenleyen genetik faktörler ve çevresel koşulların anlaşılmasında büyük katkı sağlamıştır. Yaşlanma çalışmalarını hızlandırmak için ilk yaklaşım, insan veya fare primer hücrelerini kültür ortamında çalışmaktır. Bu hücreler (genellikle fibroblastlar seçilir) terminal hücre döngüsü durana kadar sınırlı bir çoğalma kapasitesine sahiptirler (Hayflick 1965). Kültürde yaşlanma son derece bilgilendirici olmuş ve hücre döngüsü kontrolü, farklılaşma ve kanser üzerine içgörüler sağlamıştır. Ancak, bu durumun organizmal yaşlanma ile ilişkisi hala yoğun tartışılan bir konudur (Campisi ve d'Adda di Fagagna 2007). Yaşlanma araştırmalarını önemli ölçüde hızlandıran ikinci bir yaklaşım, daha hızlı yaşlanan ve genetik ve çevresel manipülasyona yatkın olan omurgasız organizmaların kullanılmasıdır (Kaeberlein ve diğ. 2007; Houthoofd ve Vanfleteren 2007; Piper 2006; Olsen ve diğ. 2006; Helfand ve Rogina 2003).

Yaşlanma olgusu, doğal seçilimin öncelikle üreme ile ilişkili genleri ve özellikleri etkilediği için üretim sonrası dönemde azalmasına da bağlanmaktadır. Yani, bir organizma daha fazla yavru ürettikçe, doğal seçilimin üreme sonrası ortaya çıkan özellikler ve karşılık gelen genler üzerindeki etkisi azalmaya başlamaktadır (Wensink ve Cohen 2022; Flatt ve Partridge 2018). Bu durum, bakteri ve tek hücreli mantarlar da dahil olmak üzere mikroorganizmalar için de geçerlidir. Asimetrik olarak bölünen yani farklı büyüklükte bir anne ve yavru hücresi üreten bakteri ve maya türleri genellikle yaşlanma davranışı sergilemektedir (Bouklas ve Fries 2015; Ackermann ve diğ. 2003; Barker ve Walmsley 1999; Mortimer ve Johnson 1959).

Yuvarlak solucan *Caenorhabditis elegans*, meyve sineği *Drosophila melanogaster*, fare *Mus musculus* ile birlikte maya, yaşlanma çalışmalarında kapsamlı şekilde çalışılan basit model organizmalardan birini temsil etmektedir (Tissenbaum 2015; He ve Jasper 2014; Feng ve diğ. 2012; Gershon ve Gershon 2000). Başlangıçta mayanın memeli yaşlanmasını anlamak için uygun bir model

olacağı konusunda bazı şüpheler olsa da, yaşlanma çalışmaları için çok değerli bir araç olduğu kanıtlanmış ve türler arasında yaşlanma ile bağlantılı bir dizi yolağın ortaya çıkmasına katkıda bulunarak yaşlanmanın temel ilkelerine ilişkin anlayışımızı genişletmiştir (Longo ve diğ. 2012). Mayanın yaşlanma için bir model olarak kullanılmasını sağlayan en önemli faktör, aynı anda hem tek hücreli hem de bir organizma olmasıdır. Böylece, hücreler arası iletişim ve yaşlanmayı etkileyen hücre dışı otonom faktörler diğer organizmalarda olduğu gibi karışıklığa neden olmadığından, çözülmesi daha basit bir problemdir (He ve diğ. 2018). Yüksek çoğalma oranı gibi önemli bir avantaja sahip olan *S. cerevisiae*, gerontologlar tarafından en yaygın kullanılan maya olmasına rağmen, fisyon maya *Schizosaccharomyces pombe* de son zamanlarda yaşlanma araştırmaları için basit model sistemler grubuna katılmıştır (Roux ve diğ. 2009; Roux ve diğ. 2006). Günümüzde, çeşitli maya mutant suş koleksiyonları mevcuttur ve bu koleksiyonlar, uzun ömür genlerini keşfetmeyi amaçlayan genetik taramalar yapmak için kullanılmıştır (Novarina ve diğ. 2020; Campos ve DeLuna 2019).

S. cerevisiae'nin yaşam süresi ya bireysel anne hücrelerin çoğalma potansiyelinin izlenmesiyle (replikatif yaşam ömrü, RLS) ya da bölünmeyen hücre popülasyonlarının maksimum hayatta kalma sürelerinin belirlenmesiyle (kronolojik yaşam ömrü, CLS) ölçülürken, *S. pombe*'nin yaşam ömrü çoğunlukla kronolojik olarak ölçülmektedir (Roux ve diğ. 2009; Roux ve diğ. 2006). Tomurcuklanan maya *S. cerevisiae*'da anne ve yavru hücreler arasındaki belirgin boyut farkı, hücre bölünmesi durana kadar bireysel anne hücreler tarafından üretilen toplam yavru hücrenin sayılmasına olanak tanırken (Steinkraus ve diğ. 2008), *S. pombe*'de bölünme sonucu oluşan iki hücre arasında ince görsel farklılıklar gözlemlenebilmesine rağmen hayatta kalma testlerini RLS'ye dayandırmak zordur ve yaşam süresi çoğunlukla kronolojik olarak ölçülmektedir (Roux ve diğ. 2009; Roux ve diğ. 2006; Barker ve Walmsley 1999).

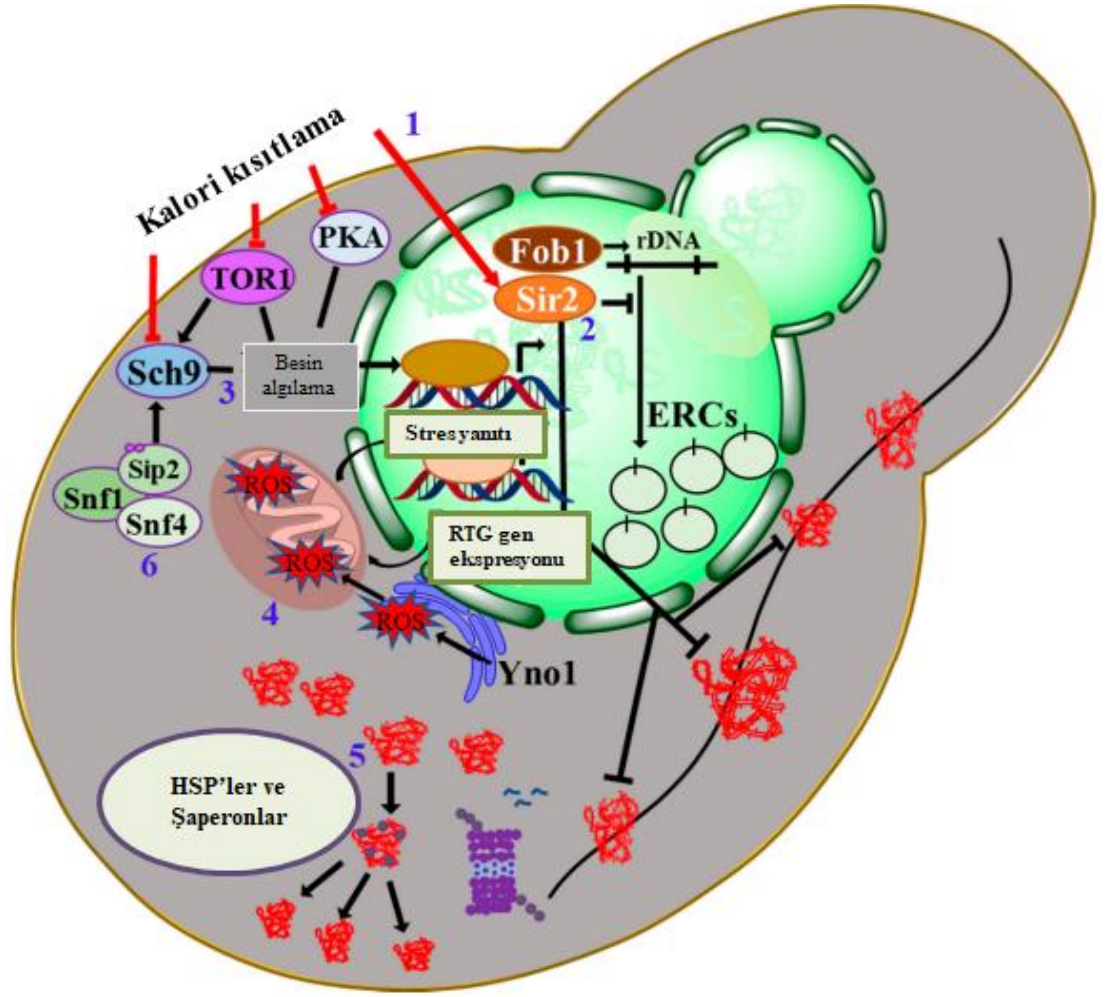
Maya, ökaryotik hücre yaşlanması için mükemmel bir model görevi görmektedir. Özellikle, maya RLS'si, fibroblastlar veya lenfositler gibi bölünen hücrelerde meydana gelen yaşlanma için bir model oluştururken, CLS olgun nöronlar ve kas hücreleri gibi postmitotik hücrelerin yaşlanması için bir model görevi görmektedir (Ruetenik ve Barrientos 2015; Longo ve diğ. 2012; Kaeberlein 2010).

Kısaca maya, her ikisi de memelilerdeki hücresel yaşlanma süreçleriyle benzerlik gösteren ancak ilgili genler açısından birbirleriyle çok az ilgisi olan iki bağımsız yaşlanma modeli sunmaktadır (Laun ve diğ. 2006).

2.2.1 Maya Hücrelerinin Anne Hücre Spesifik Replikatif Yaşlanması

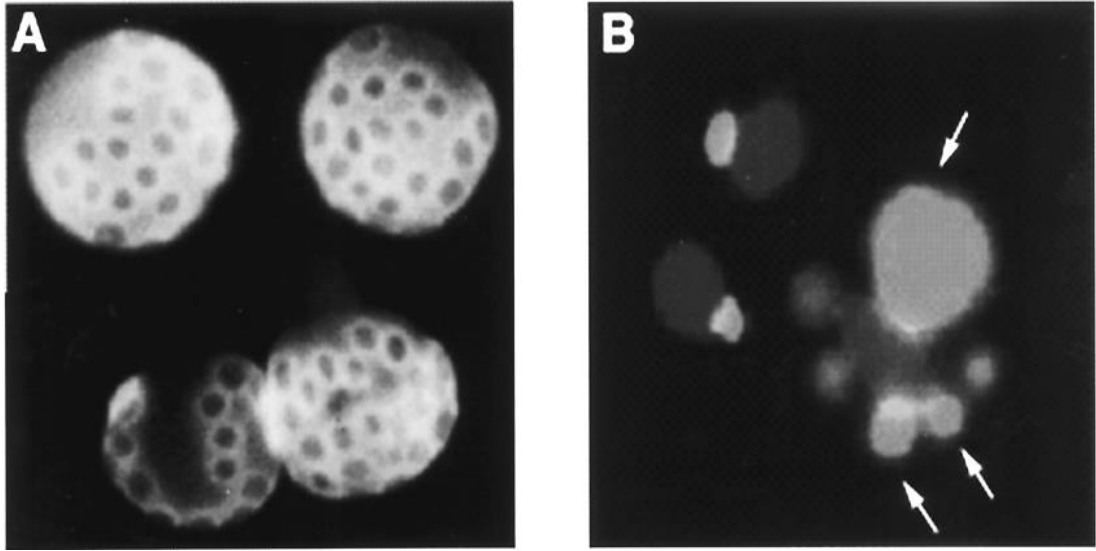
Besinler bol olduğunda, *S. cerevisiae* tipik olarak mitoz yoluyla ve tomurcuklanma olarak bilinen asimetrik bir süreçle çoğalmaktadır (Piper 2012). Asimetrik hücre bölünmesi, hücresel bileşenlerin asimetrik miras alınmasına yol açmakta ve yeni oluşan hücre, taze sentezlenmiş hücresel materyali almaktadır. Buna karşılık, anne hücre eski ve hasarlı hücresel bileşenlerin çoğunu bünyesinde tutmakta ve yavaş yavaş yeni tomurcuklar oluşturma kapasitesini kaybetmektedir. Bir hücrenin geri dönüşümsüz olarak durgun faza geçmeden önce geçirebileceği tomurcuklanma olaylarının sayısı, onun replikatif yaşam süresi (RLS) olarak tanımlanmaktadır. Maya yaşam ömrünü ölçmeye yönelik ilk girişim, Mortimer ve Johnston (1959) tarafından gerçekleştirilmiş ve anne hücrelerden yavru hücreleri mikrodiseke etmek için küçük bir iğne kullanılmıştır. Zengin agar ortamında yetiştirilen bir anne hücrenin yaşam ömrü boyunca sınırlı sayıda (ortalama 20-30) yavru hücre üretebildiği ifade edilmiştir (Mortimer ve Johnston 1959) ancak kesin sayı suşun genetik arka planına bağlıdır (Stumpferl ve diğ. 2012). Anne hücrelerin geçirebileceği sınırlı sayıda tomurcuklanma olayı (RLS) genellikle proteinlerin oksidasyon, agregasyon ve degradasyonunun biriken etkisine, vakuolar asidite kaybına ve buna bağlı olarak mitokondriyal fonksiyonun azalmasına ve ekstrakromozomal ribozomal DNA halkalarının (ERC'ler) ortaya çıkmasına bağlanmaktadır (Hughes ve Gottschling 2012; Kaeberlein 2010; Steinkraus ve diğ. 2008). RLS ile ilişkilendirilen başlıca sonuçlar arasında, ERC'lerin toksik türler olarak tanımlanması yer almaktadır. ERC'ler, ilk bildirilen yaşlanma faktörleridir ve asimetrik olarak miras alınan bir moleküler hasar şeklidir (Sinclair ve Guarente 1997). Anne ve yavru arasındaki septin bağımlı yan diffüzyon bariyeri nedeniyle annede biriken bir form olan ERC birikiminin maya replikatif yaşlanmasına neden olduğu ifade edilmektedir (Shcheprova ve diğ. 2008; Sinclair ve Guarente 1997). ERC'ler, ribozomal DNA (rDNA) bölgelerinde homolog rekombinasyon yoluyla oluşmakta ve kendi kendine çoğalan dairesel bir DNA molekülü meydana

gelmektedir (Kaeberlein 2010; Steinkraus ve diğ. 2008). ERC'lerin yaşlanmayı hızlandırma mekanizması tam olarak anlaşılamamış olsa da, bunların rDNA'yı istikrarsızlaştırarak ve transkripsiyon faktörleri ile rekabet ederek düzenli rDNA'ya müdahale ettiği düşünülmektedir (Kaeberlein 2010). Ayrıca; RTG2, LAG1 ve SIR2 gibi yaşam süresi düzenlemesiyle ilişkilendirilen birkaç genin tanımlanması da önem arz etmektedir (Steinkraus ve diğ. 2008; Borghouts ve diğ. 2004; D'Mello ve diğ. 1994). Sonuncusu olan SIR2 (Silent Information Regulator 2), en çok çalışılan gerontojenlerden biri haline gelmiştir ve yüksek ökaryotlarda korunan NAD bağımlı histon deasetilazı kodlamaktadır (Longo 2009; Longo ve Kennedy 2006; Kaeberlein ve diğ. 1999). Bu proteinin insanlardaki homologlarına ise sirtüinler adı verilmektedir ve hücre hayatta kalımı, metabolizma ve proliferasyon, DNA onarımı, hücre yaşlanması, apoptoz, kalori kısıtlaması gibi kilit metabolik yolları düzenlemektedirler (Brachmann ve diğ. 1995). Mayada Sir2 aktivitesinin, rDNA tekrarları arasındaki homolog rekombinasyonu azaltarak ve dolayısıyla ERC'lerin oluşumunu önleyerek replikatif yaşlanmayı engellediği bilinmektedir (Kaeberlein ve diğ. 1999). Bununla birlikte, Sir2'nin düşük seviyelerde histon 4 lizin 16 asetilasyonunu sürdürerek ve sonuç olarak telomerlerde ve subtelomerik bölgelerde susturmayı indükleyerek ERC oluşumundan bağımsız olarak RLS'yi uzatma işlevi gördüğü ifade edilmiştir (Dang ve diğ. 2009). Diğer çalışmalarda ise Fob1 proteininin (Fork Block Protein 1) rDNA instabilitesi ve yaşlanma üzerindeki etkileri mayada incelenmiştir (Şekil 2.5). Bu çalışmada rDNA rekombinasyonunu ve ERC oluşumunu azaltan FOB1 delesyonunun maya RLS'sini artırdığı ve ayrıca Sir2 mutant anne hücrelerinin kısa yaşam ömrü sergilemesini engellediği ifade edilmektedir (Longo ve diğ. 2012; Kaeberlein ve diğ. 1999).



Şekil 2.5: Maya replikatif yaşam ömrünü modüle eden yollar (1) Kalori kısıtlaması yaşlanma ile ilişkili zararlı değişiklikleri azaltır. CR (kalori kısıtlaması) aracılı RLS uzaması, hem SIR2 hem de büyüme metabolizması ve stres yanıtında önemli rol oynayan azalmış TOR/Sch9 ve Ras-PKA sinyal yolları tarafından modüle edilen Sir2'den bağımsız mekanizmalar tarafından yönlendirilir. (2) Sirtuin ailesinin bir üyesi olan SIR2 (NAD⁺ bağımlı bir deasetilaz aracılı yaşlanma yolu) maya yaşlanmasının ana oyuncusunu temsil eder. SIR2 overekspresyonu, rDNA instabilizasyonu yoluyla ERC oluşumunu baskılayarak maya RLS'sini uzatır. SIR2 delesyonu, oksidatif olarak hasar görmüş proteinlerin asimetrik olarak tutulumundaki bir kusurdan kaynaklanan yavru hücrelerin yaşam ömrünün kısılmasına yol açar. (3) Besin algılama, yaşlanma yollarını birçok yönden etkiler ve besin stresi tarafından inhibe edilen TOR sinyalini düzenler. (4) Mitokondriyal işlev bozuklukları yaşlanmayı düzenlemek için geriye dönük bir yanıt başlatabilir. Yno1 ROS birikimini modüle eder. (5) UPR mekanizması, yaşlanmaya eşlik eden kusurlu mekanizmaya yanıt olarak oluşan protein agregatlarının ortadan kaldırılmasına yardımcı olur. HSP'ler ve şaperon overekspresyonu, hasarlı protein agregatlarının uzaklaştırılmasına yardımcı olur. (6) Sch9, maya Snf1 kompleksinin bir bileşeni olan Sip2 asetilasyonu yoluyla Snf1 tarafından bağımsız olarak da düzenlenebilir. (Dahiya ve diğ. 2020 tarafından yapılan çalışmadan alınmış ve düzenlenmiştir).

Anne maya hücresinde stres yanıt genlerinin ekspresyonundaki değişiklikler gibi ilk yaşlanma belirtisi, ilk birkaç tomurcuğun oluşumundan sonra meydana geldiği ifade edilmektedir (Knorre ve diğ. 2018). Asimetrik bölünme nedeniyle gerçekleşen ve mitotik bölünme süreci olan RLS (Şekil 2.8) karmaşık besiyerinde yaklaşık 2-3 gün sürmektedir ve bu nedenle bilinen en hızlı yaşlanma süreçlerinden birisidir. Bir hücrenin yaşam ömrü nesiller (tomurcuklar, üretilen yavru hücreler) olarak sayılmakta ve süreç boyunca, anne hücre her nesilde daha büyük hale gelip tomurcuk izleri biriktirmektedir (Şekil 2.6) (Slaughter ve diğ. 2009). Maya hücreleri yaşlandıkça, gen ekspresyonu ve protein biyogenezi düzensiz hale gelmekte ve bu süreç, replikatif olarak yaşlı maya hücrelerinde vakuolar ATPaz gibi protein komplekslerinin alt birimleri arasında orantısızlığa yol açmaktadır (Janssens ve diğ. 2015). Ayrıca anne hücreler; hücre döngüsü kontrol noktası mekanizmalarının kaybı (Nestelbacher ve diğ. 2000), diploid hücrelerde heterozigotluk kaybı (McMurray ve Gottschling 2004) ve apoptoz (Laun ve diğ. 2001) ile karakterize edilen nihai bir yaşlanma durumuna ulaşana kadar döngü sürecinde (Egilmez ve Jazwinski 1989) ROS içeriği (Laun ve diğ. 2001) ve protein karbonil içeriği (Aguilaniu ve diğ. 2003) gibi diğer birçok biyokimyasal parametrede kademeli olarak değişime uğramaktadır. Öte yandan, annenin yaşlanıp sonunda replikatif kapasitesini kaybettiği bir süreçte anne hücrelerden doğan yavru hücreler kapasitelerini yenilemekte ve zamanlarını sıfırlayarak suşun klonal yaşlanmasını önlemektedirler (Klinger ve diğ. 2010; Egilmez ve Jazwinski 1989). Bu durum, koloninin yaşlanan anneleri ölse bile koloninin hayatta kalmasını sağlamaktadır. Yalnızca çok yaşlı annelerin yavruları "ölüm faktörünün" (hasarlı materyal) bir kısmını miras almakta ve biraz kısalmış bir yaşam süresi sergilemektedir (Kennedy ve diğ. 1994; Egilmez ve Jazwinski 1989).



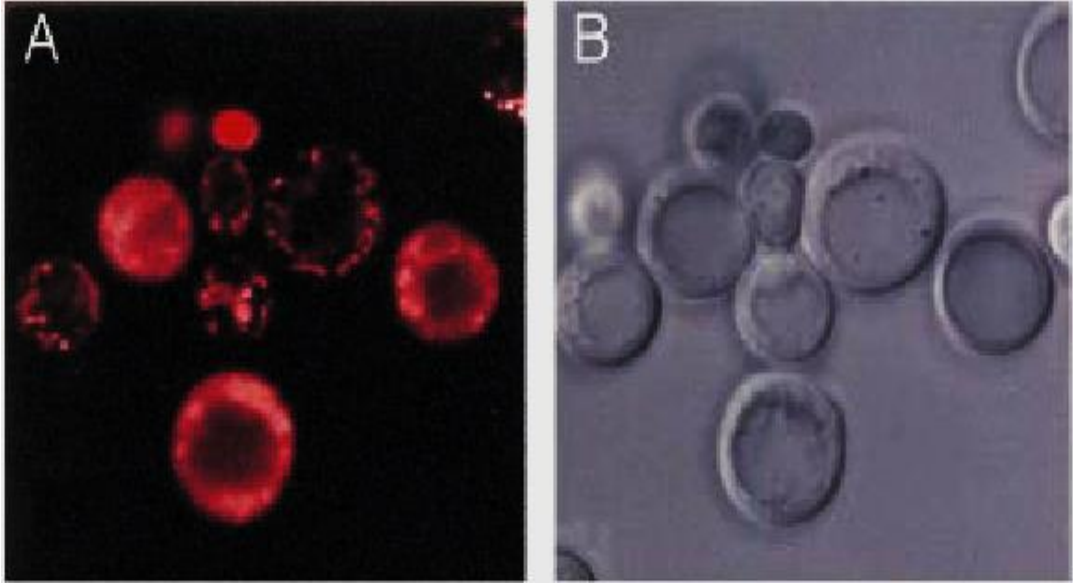
Şekil 2.6: Maya hücre bölünmesi ve tomurcuk izi oluşumu. (A) Her bir yavru hücrenin tomurcuklanması, anne hücrenin hücre duvarında tomurcuk izi olarak adlandırılan halka şeklinde bir kalıntı bırakır. Tomurcukların boynunda oluşan bu kitin içeren halkalar, floresan bir boya olan kalcoflor ile boyanabilir. Bu şekilde, bir anne hücrenin kaç kez bölündüğü, mevcut tomurcuk izlerinin sayısı sayılarak belirlenebilir. (B) Yaşlanmış bir maya çekirdeği, sol üst köşedeki iki genç hücrenin çekirdekçiklerinden farklı olarak genişlemiş ve parçalanmış bir çekirdekçik (oklarla gösterilen) içerir (Bitterman ve diğ. 2003 tarafından yapılan çalışmadan alınmıştır).

2.2.2 Stasyoner Faz Maya Hücrelerinin Kronolojik Yaşlanması

Son yıllarda, maya yaşam ömrünü belirleyebilmek için kronolojik yaşam ömrü (CLS) adı verilen farklı bir paradigma geliştirilmiştir (Ohtsuka ve diğ. 2021; Kaeberlein ve diğ. 2007). Teknik açıdan bakıldığında, CLS'yi izlemek son derece basit olmakla birlikte mikromanipülasyon gerektirmemekte ve genellikle milyonlarca maya kültürü kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Bu durum, uzun ömürlü mutantların taranmasını kolaylaştırmakta ve geniş bir genetik, genomik ve biyokimya analizlerinin gerçekleştirilmesine olanak sağlamaktadır (Fabrizio ve Longo 2007; Fabrizio ve diğ. 2005b). CLS'nin avantajlarından biri, bölünmeyen hücrelerin hayatta kalımının ölçülmesidir (Şekil 2.8) ve hem mitoz sonrası memeli hücrelerinde yaşlanmayı modellemek için bir sistem hem de organizmal yaşlanma için basit bir model olarak hizmet edebilmektedir.

Genel bir CLS protokolünde maya, besin tükenmesi hücre döngüsünün durmasını sağlayana kadar sentetik besiyerinde büyütülmektedir. Hücrelerin

çoğunluğu periyodun başlangıcından itibaren 2-3 gün içerisinde bölünmeyi durdurmaktadır ve üçüncü gün elde edilen koloni sayısı %100 hayatta kalma seviyesi olarak kabul edilmektedir. Bu değer, diğer zaman noktalarındaki hayatta kalmayı ölçmek için referans olarak kullanılmaktadır (Fabrizio ve Longo 2007). Sıvı besiyerinde belirli bir hücre yoğunluğuna kadar bölünen mayalar ardından, fermente edilemeyen karbon kaynaklarının daha fazla kullanımı ve yüksek solunum oranları ile karakterize edilen post-diauxic faza girmektedir. Bu koşulda tutulan kültürler, genetik arka plana bağlı olarak birkaç gün ile bir hafta arasında değişen bir süre boyunca yaşama yetisini korumaktadırlar. Post-diauxic faz kültürlerine benzer şekilde kronolojik olarak yaşlanan populasyonlar, tomurcuklanmış hücrelerin küçük bir kısmının sürekli varlığı ile karakterize edilmektedir. Çeşitli kanıtlar bu tomurcuklanmış hücrelerin S/G2'de arrest olabileceğini göstermektedir (açlık normalde G1 arrestini indükler) (Weinberger ve diğ. 2007; Allen ve diğ. 2006). Bununla birlikte, besin açlığına bağlı düşük pH, maya hücrelerinde yavaş bir büyümeye neden olsa da çok küçük bir yüzdesinin hala bölünebildiği ifade edilmektedir (Fabrizio ve diğ. 2004a). Bu koşullar altında, hücre bölünmesinin CLS ölçümlerini etkileme olasılığı çok düşüktür. Buna karşın, hücrelerin çoğunluğu öldükten sonra da kronolojik olarak yaşlanan kültürlerde hücre bölünmesinin meydana gelebildiği ifade edilmektedir (Fabrizio ve diğ. 2004a). Adaptif yeniden büyüme olarak tanımlanan bu populasyon büyümesi, mayanın ölü hücreler tarafından salınan besinleri tüketerek hücre döngüsüne yeniden girmesini sağlayan mutasyonlardan veya muhtemelen epigenetik değişikliklerden kaynaklanıyor gibi görünmektedir ve bakteriyel durağan fazda büyüme avantajı (GASP) fenotipi ile bazı benzerlikler paylaşmaktadır (Breitenbach ve diğ. 2011; Zinser ve Kolter 2004; Zambrano ve Kolter 1996; Zambrano ve diğ. 1993).

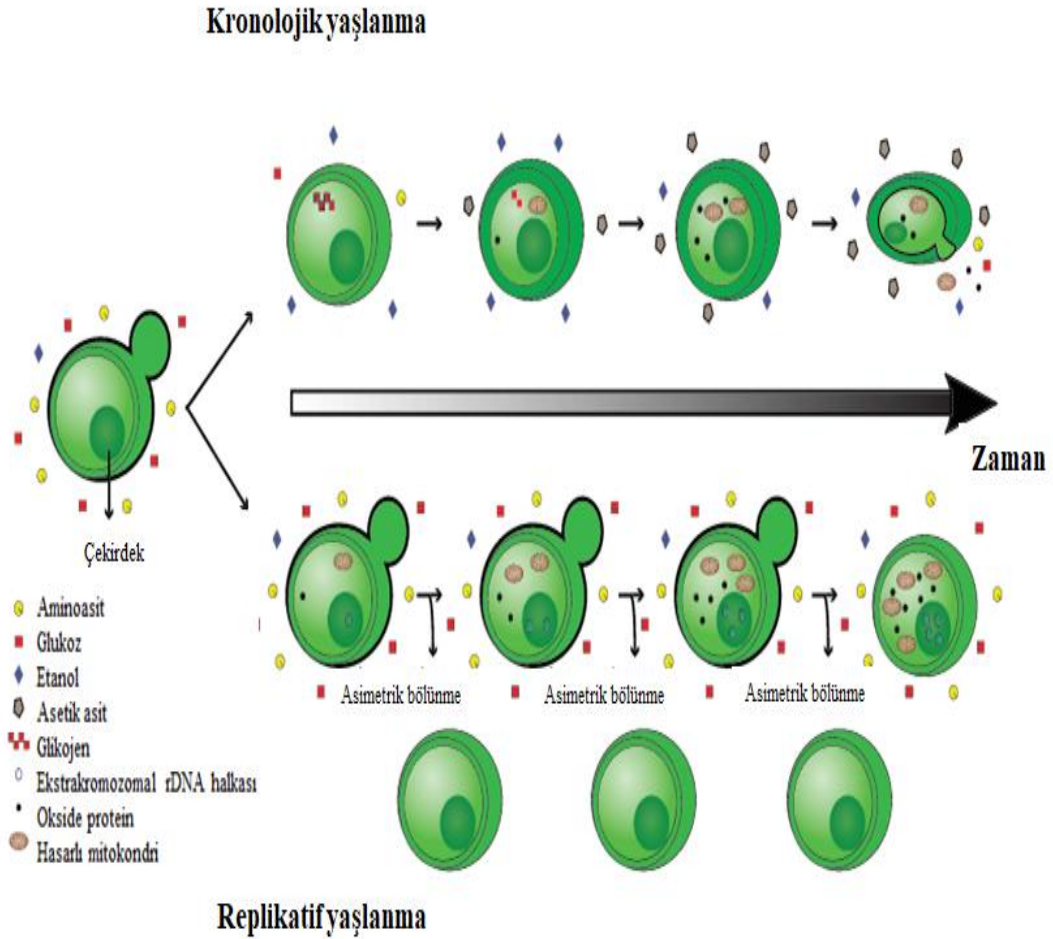


Şekil 2.7: DHR (dihidrorodamin) ile boyanmış kronolojik olarak yaşlı anne maya hücrelerinin konfokal lazer taramalı floresan mikroskobundaki morfolojik görüntüsü (Laun ve diğ. 2001).

Maya hücrelerinin bölünmeyen bir durumda ne kadar süre hayatta kalıp işlevselliklerini sürdürebileceklerini ölçen CLS yönteminde (Şekil 2.8) (Mirisola ve Longo 2022); pH, sıcaklık, mevcut besinlerin miktarı ve kalitesi, asetik asit konsantrasyonu ve genotip gibi parametrelerin de yaşam süresini etkilediği bilinmektedir (Morgunova ve diğ. 2017; Molon ve Zadrage-Tecza 2016; Mirisola ve Longo 2012). Sentetik dekstroza besiyerinde yetişen kültürlerin 2-3 gün sonra en yüksek hücre yoğunluğuna ulaştığı, ancak metabolik durumlarının ek olarak 4-6 gün daha yüksek kaldığı da ifade edilmektedir (Gray ve diğ. 2004). Bu nedenle, CLS'nin yavaş bir metabolizma veya açlık durumunu taklit ettiği düşüncesi yanlıştır; çünkü hücre kültürleri ölmeye başladığında, glikojen içeriği, ekstraselüler etanol ve diğer besinlerin hala mevcut olduğu keşfedilmiştir (Mirisola ve Longo 2022; Orlandi ve diğ. 2013; Samokhvalov ve diğ. 2004). Ancak, sonuçta hayatta kalan hücre popülasyonu, yaşamın devam edebileceği nispeten daha düşük bir metabolik hız olan durağan faza girmektedir (Şekil 2.7).

Mediumun başlangıç glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak CLS'yi etkileyen bir faktörün de ortam asitlenmesi olduğu öne sürülmektedir (Wasko ve diğ. 2013). Mayaların yaşam ömrünü sınırlayan birincil moleküler faktör olarak asetik asit teorisi önerilmektedir. Teoriye göre maya hücreleri, diauxic geçiş boyunca ikincil bir karbon kaynağı olarak etanol kullanmaya devam ederken, asetik asit ve diğer organik

asitler ekstraselüler ortama salgılanmakta ve büyüme ortamının asitlenmesine yol açmaktadır. Yaşlandırma kültürünün daha yüksek bir pH'a tamponlanması veya ortamdan asetik asidin uzaklaştırılmasının CLS'yi uzatmak için yeterli olduğu gözlemi, asetik asidin kronolojik yaşlanmaya neden olduğunu ifade etmesi açısından önemlidir (Burtner ve diğ. 2009).

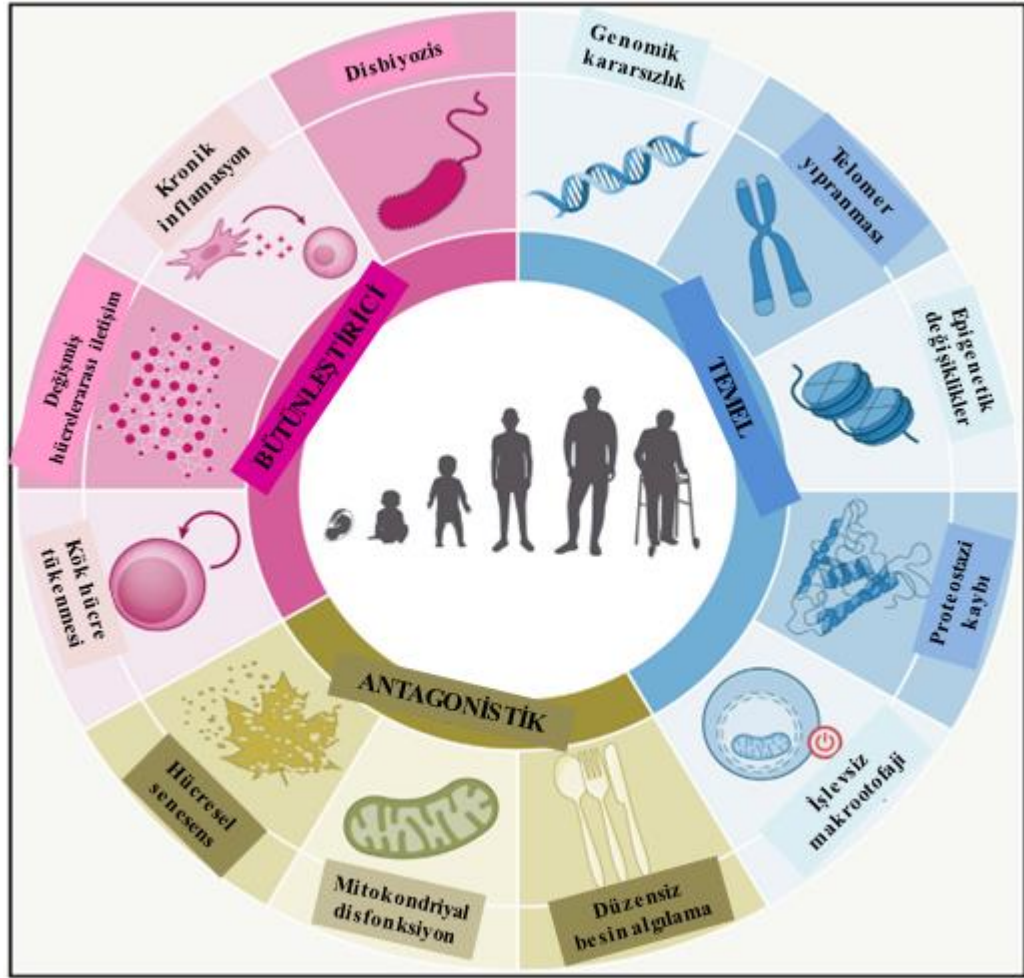


Şekil 2.8: *S. cerevisiae*'nın iki yaşlanma paradigması (Wauters ve diğ. 2021 tarafından yapılan çalışmadan alınmış ve düzenlenmiştir).

2.3 Maya Yaşlanmasında Besin Algılayıcı Yolakların Kritik Rolü ve Uzun Ömürlülükte Genetik Belirleyicilere Genel Bakış

Yaşlanma sürecindeki zamana bağlı işlevsel düşüşü tanımlayan on iki belirti; epigenetik değişiklikler, genomik istikrarsızlık, mitokondriyal disfonksiyon, telomer yıpranması, proteostazi kaybı, yetersiz makrootofaji, hücresel yaşlanma, düzensiz

besin algılama, kök hücre tükenmesi, disbiyoz, kronik inflamasyon ve değişmiş hücreler arası iletişimidir (Şekil 2.9) (López-Otín ve diğ. 2023). Tüm ökaryotlar arasında ve farklı deneysel bağlamlarda korunan uzun ömür yollarlarını belirlemek için, yaşlanmanın moleküler ve hücresel belirtilerini etkili bir şekilde kategorize etmek üzere pek çok adım atılmıştır (López-Otín ve diğ. 2013). Bu noktada yaşam ömrü ile ilişkili birçok gen varyantı tanımlanmış (Tablo 2.1) ve hücrelerin metabolik kontrolü ile bağlantılı olduğu bulunmuştur (Broer ve van Duijn 2015).



Şekil 2.9: Yaşlanmanın on iki belirteci (López-Otín ve diğ. 2023 tarafından yapılan çalışmadan alınmış ve düzenlenmiştir).

Tablo 2.1. Mayada yaşlanma ile ilişkili genler ve hücresel fonksiyonları (Dahiya ve diğ. 2020).

Gen	Tanımlama	Hücresel Fonksiyonlar	Boş Fenotipin Yaşam Ömrüne Etkisi	Referanslar
TOR1 SCH9	Rapamisin hedefinin sinyalizasyonunda rol oynayan Ser/Thr protein kinaz	Translasyonu düzenleyerek besinlere yanıt olarak büyümeyi kontrol eden TOR kompleksinin protein kinaz alt birimi.	Artmış	Fabrizio ve diğ. 2001; Kapahi ve diğ. 2010
SIR2	Sessiz bilgi düzenleyicisi	NAD-bağımlı Histon deasetilaz. HML, HMR, telomerler ve rDNA susturmada önemli rol oynar.	Azalmış	Wierman ve Smith 2014
RPL9A, RPL6B, RPL19A	Ribozomal 60S alt birim proteini L9A	Translasyonda rol oynayan ribozomun 60S alt biriminin yapısal bileşeni.	Artmış	Kaeberlein ve diğ. 2005; Chiocchetti ve diğ. 2007
ADH1	Alkol dehidrogenaz enzimi	Fermantasyon sırasında asetaldehidi etanole indirger, NADH oksidasyonunda rol oynar.	Artmış	Ralser ve diğ. 2012
COX4	Sitokrom c oksidaz	Sitokrom c oksidazın alt birimi IV; mitokondriyal iç membran ETC'de işlev görür.	Artmış	Miceli ve diğ. 2012
RPD3	Azalmış potasyum bağımlılığı	Histon deasetilaz, hem Rpd3S hem de Rpd3L komplekslerinin bir bileşenidir ve transkripsiyonu düzenler.	Artmış	Jiang ve diğ. 2002
DBP3	Dead box proteini	RNA-bağımlı ATPaz, rRNA işlenmesinde rol oynar.	Azalmış	Curran ve Ruvkun 2007
SGF73	SAGA-ilişkili faktör 73	SAGA ve SLIK'in DUB modülü alt birimi; de-ubikitinasyon aktivitesine katkıda bulunur.	Artmış	McCormick ve diğ. 2014
PDE1	Fosfodiesteraz	Düşük-afiniteli cAMP fosfodiesteraz.	Azalmış	Ma ve diğ. 1999
SGS1	Yavaş büyüme baskılayıcısı	ATP-bağımlı DNA helikaz.	Azalmış	McVey ve diğ. 2001
FOB1	Daha az çatal blokajı	rDNA replikasyon çatalı bariyer bölgesine bağlanan nükleolar protein; replikasyon	Artmış	Defossez ve diğ. 1999

		çatalı engellemesi için gereklidir.		
PKH2, HXK1, HXK2	Pkb-kinaz homoloğu	Sinyal kaskadında yer alan Serin/treonin-protein kinaz; glukoz metabolizması, endositoz ve hücre duvarı bütünlüğünde rol oynar.	Artmış	Liu ve diğ. 2013; Wang ve diğ. 2010
CDC25	Hücre bölünme döngüsü	Membrana bağlı guanin nükleotid değişim faktörü (GEF); adenilat siklazı düzenler.	Artmış	Mirisola ve Longo 2011
GPR1, GPA2, CYR1	G-protein bağlı reseptör	Beslenme sinyallerini algılar, entegre eder ve PKA ve cAMP sentezi yoluyla hücre kaderine karar verir.	Artmış	Jazwinski 2002
PHO84, CIT2	Fosfat metabolizması ve Sitrat sentaz	Yaşam ömrünün uzatılmasındaki geriye dönük yanıtın efektörü.	Azalmış	Jiang ve diğ. 2016; Lee ve diğ. 2007
SOV1	Var sentezi	Maya mitokondriyal translayon kontrol (MTC) modülünün üyesi.	Artmış	Caballero ve diğ. 2011
GCN4, GCN5	Baskılanamayan genel kontrol	Transkripsiyonel aktivasyondaki roller.	Azalmış	Mittal ve diğ. 2017; Kim ve diğ. 2004
ASF1	Susturmayı önleme işlevi	H3K56 asetilasyonundaki rol; kromatin ekleme ve ayırmayı içerir.	Azalmış	Feser ve diğ. 2010
YPT6	Maya protein two	Rab ailesi GTPaz, geriye dönük taşıma için gereklidir.	Artmış	Benjamin ve diğ. 2011
YNO1/AI M14	Maya NADPH oksidaz 1 / mitokondrinin değişmiş kalıtım oranı	Endoplazmik retikulum lokalize NADPH oksidaz.	Artmış	Yi ve diğ. 2018

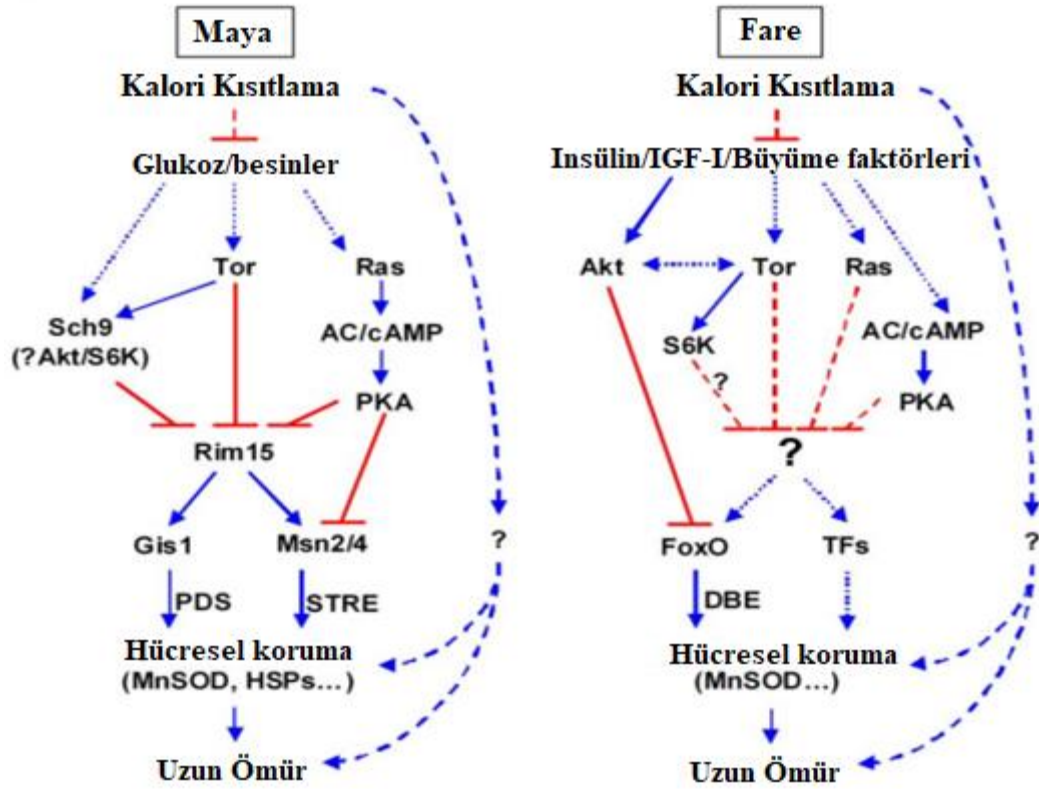
Mayalar, sinekler, solucanlar, balıklar, kemirgenler ve rhesus maymunları dahil olmak üzere çeşitli organizmaların yaşam ömrünü uzatan müdahalelerin çoğu, besin-sinyal yollarının aktivitesini azaltmaktadır. İki besin algılama yolağının (rapamisin hedefi (TOR)/serin-treonin kinaz Sch9 ve Ras/protein kinaz A (PKA)) aktivitesindeki bir azalmanın maya RLS ve CLS'sini uzattığı bilinmektedir (Şekil 2.10) (Kaeberlein ve diğ. 2005; Longo 2003; Fabrizio ve diğ. 2001; Lin ve diğ. 2000).

Mayada yaşlanmayı kontrol edebilen ilk ana yolak, Sch9'un (memeli S6 kinazın maya ortologu) yukarı akış yönünde hareket eden ve besine duyarlı bir serin-treonin protein kinaz olan TOR'dur (de Magalhães 2011; Urban ve diğ. 2007). Bu yolağın yaşlanmayı düzenlemedeki rolü solucanlarda ve sineklerde doğrulanmıştır (Polak ve Hall 2009; Kapahi ve diğ. 2004). Tor-S6K sinyal yolağı inhibisyonunun farelerin ömrünü uzattığı ve mTOR'un (mammalian target of rapamycin) genetik bozulmasının progeria fare modelinde hayatta kalmayı artırdığı ifade edilmektedir (Harrison ve diğ. 2009; Cabral ve diğ. 2021). Hem Sch9 hem de S6 kinaz besin-bağımlı translasyonel düzenleyicilerdir (Longo ve Fabrizio 2012). TOR ayrıca genel transkripsiyonel düzenlemede de yer almaktadır ve hedeflerinden biri olan Maf1 ise besin yoksunluğu durumunda DNA Pol III'ün aktivitesini inhibe ederek maya, solucan ve sineklerin yaşam ömrünü uzatmakta ve transkripsiyonel regülasyonda kritik bir rol oynamaktadır. Maf1 delesyonunun DNA Pol III konsantrasyonunu artırdığı ve yaşam ömrünü kısalttığı yapılan bir çalışma ile doğrulanmıştır (Noguchi ve diğ. 2021). Yaşlanma sırasında transkripsiyonel bozulmanın/düzensizliğin rolü, tek hücre gen ekspresyonu analiziyle doğrulanmış ve bu analiz yaşlanma sürecinde hücreler arası gen ekspresyonu heterojenitesinin arttığını göstermiştir (Carolina de Souza-Guerreiro ve diğ. 2021).

TOR1 veya SCH9 delesyonunun mayalarda hem CLS hem de RLS'de artışa neden olduğu bilinmektedir (Wei ve diğ. 2009; Powers ve diğ. 2006; Kaeberlein ve diğ. 2005; Fabrizio ve diğ. 2001). CLS'nin Sch9 tarafından regülasyonu, Sch9'un Pkh1/2 kinazlar tarafından spesifik olarak fosforile edilebildiği ve bu aktivitenin sfingolipid metabolizmasında bir ara madde olan fitosfingozin (PHS) tarafından düzenlendiği göz önüne alındığında, Tor1'den bağımsız olarak gerçekleşebilmektedir (Liu ve diğ. 2005). Sfingolipid sentezinin downregülasyonunun, maya CLS uzamasına neden olduğu ifade edilmekle birlikte bu durum Sch9'un maya CLS'sinin düzenlenmesi için hem besin hem de sfingolipid kaynaklı sinyallerin bir entegrasyon noktası olarak işlev görebileceğini göstermektedir (Swinnen ve diğ. 2014; Huang ve diğ. 2012). Sch9'un RLS'nin modülasyonuna katkısı, memeli AMPK kinazın maya ortologu olan Sükroz non-fermente protein (Snf1) kinazı içeren mekanizmalar yoluyla Tor1'den bağımsız olarak da gerçekleşebilmektedir (Lu ve diğ. 2011).

TOR aktivitesinin azaltılmasıyla CLS'nin uzatılması, Rim15 tarafından aktive edilen ve glikojen birikimi, gliserol birikimi, antioksidan enzimler ve proteostazinin korunması (ısı şoku proteinleri ve otofaji) ile ilgili mekanizmalar dahil olmak üzere birçok koruyucu sistemde artışa yol açan Gis1 ve Msn2/4 transkripsiyon faktörlerine bağlıdır (Şekil 2.10) (Fontana ve diğ. 2010). Tor1 inhibisyonu ile RLS uzaması da Msn2/4 transkripsiyon faktörlerine bağlıdır, ancak bu mekanizma bir sirtuin deasetilaz olan Sir2'ye bağlı gibi görünmektedir (Medvedik ve diğ. 2007).

Çok sayıda sinyalizasyon yolu, hücre dışı ve hücre içi uyarılara yanıt olarak hücrel büyüme ve hayatta kalma arasındaki karmaşık dengeyi koordine etmektedir. Maya yaşam ömrünün uzatılmasını sağlayan ikinci yolak cAMP-bağımlı PKA yolağıdır. Bu yolak mayadaki temel sinyalizasyon düğümünü temsil etmektedir ve öncelikle glikoz ve fermente edilebilir şeker seviyelerine yanıt vermektedir (Tamaki 2007). Glikoz ilavesi, cAMP seviyesinde geçici bir patlamayı tetikleyerek PKA aracılı bir fosforilasyon kaskadını ve transkripsiyonel yeniden programlamayı başlatmaktadır. PKA aktivitesinin azalması, her iki yaşlanma paradigmasında da maya yaşam ömründe bir artışa neden olmaktadır (Fabrizio ve diğ. 2003; Lin ve diğ. 2000). Bununla birlikte, PKA yolağının aktivasyonuna yol açan RAS1 ve RAS2'nin devre dışı bırakılması, maya replikatif ve kronolojik yaşam ömürleri üzerinde zıt etkilere yol açmaktadır. RAS1 geninin delesyonu RLS'yi artırıp CLS'de hafif bir azalma ile ilişkili iken RAS2 geninin delesyonu RLS'yi azaltmakta ancak ilginç bir şekilde CLS'yi uzatmaktadır (Kaeberlein ve diğ. 2005; Fabrizio ve diğ. 2003; Sun ve diğ. 1994). Ras/PKA'nın azalmasıyla Msn2/4 transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu, CLS ve RLS'nin uzaması için önemli bir olaydır (Medvedik ve diğ. 2007; Fabrizio ve diğ. 2001).



Şekil 2.10: Maya ve memelide yaşam ömrü düzenleyici yolların yan yana karşılaştırılması. Mayada, Sch9, Tor ve Ras tarafından kontrol edilen besin algılama yolları protein kinaz Rim15 üzerinde birleşmektedir. Buna karşılık, stres yanıt transkripsiyon faktörleri Msn2, Msn4 ve Gis1 stres yanıt genlerini transaktif olarak hücresel korumayı artırmakta ve bu da yaşam süresinin uzamasına yol açmaktadır. CR'nin uzun ömürlülük üzerindeki etkisinin büyük bir kısmına Ras ve Tor-Sch9 yollarının downregulasyonu ve bunun sonucunda Rim15 kontrollü Msn2/4 ve Gis1 koruma sisteminin aktivasyonu aracılık ediyor gibi görünse de, ek araçlar da söz konusudur. Farelerde, kısmen korunmuş insülin/IGF-I benzeri yollar, Sch9 homoloğu Akt aracılığıyla FoxO ailesi transkripsiyon faktörlerini negatif olarak düzenlemektedir. Ras ve Tor da IGF-I'nin aşağı akışında işlev görmektedir, ancak stres direnci ve yaşlanmanın düzenlenmesindeki rolleri pek anlaşılamamıştır (Wei ve diğ. 2008 tarafından yapılan çalışmadan alınmıştır).

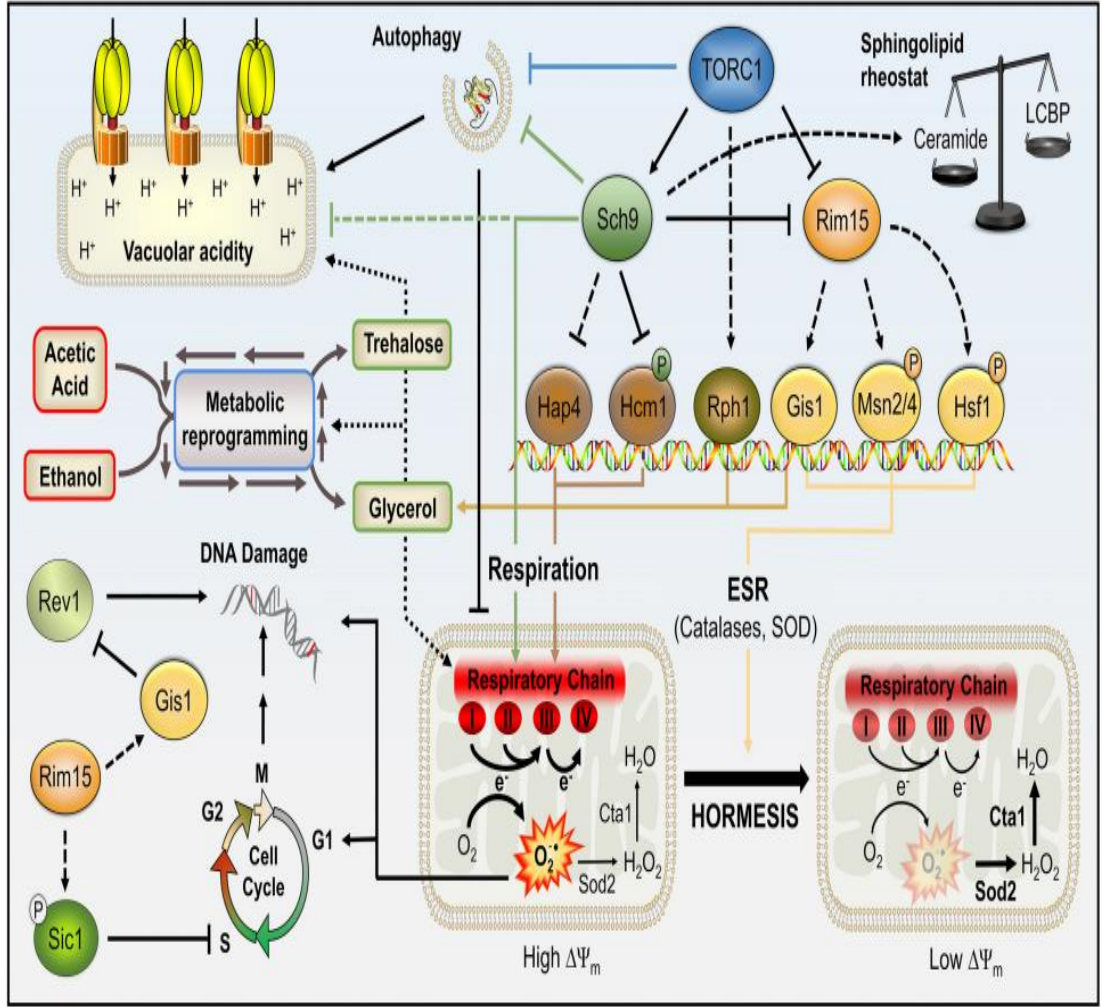
Genel olarak birçok çalışmanın sonuçları, besin algılama yolları tarafından maya yaşam ömrünün uzatılmasının, süperoksit anyonlarını temizleyen Mn-bağımlı süperoksit dismutaz (Sod2) başta olmak üzere, antioksidan enzimlerin up-regülasyonunu gerektirdiğini desteklemektedir (Weinberger ve diğ. 2010; Wei ve diğ. 2008). Bu durum aynı zamanda SCH9 veya RAS2 silinmiş hücrelerde tespit edilen yüksek Sod2 seviyeleri ve TOR yolağının inaktivasyonundan sonra gözlemlenen süperoksit anyon seviyelerindeki azalma ile de desteklenmektedir (Pan ve diğ. 2009; Bonawitz ve diğ. 2007; Fabrizio ve diğ. 2003). Bununla birlikte, besin algılama yollarının aktivitesini azaltarak genel bir stres tepkisinin

etkinleştirilmesine atfedilen uzun ömürlülük yanlısı etkiler, mitokondri işlevi ile de ilişkili görünmektedir. Mitokondriyal solunum eksikliğinin stasyonier faz hücrelerinin hayatta kalmasını ve dolayısıyla CLS'yi ciddi şekilde etkilediği ifade edilmektedir (Ocampo ve diğ. 2012; Aerts ve diğ. 2009). Buna ek olarak, TOR1 veya SCH9'un silindiği uzun ömürlü hücrelerde mitokondriyal protein ekspresyonunun yanı sıra solunumun da arttığı ve reaktif oksijen türleri de artarak muhtemelen CLS'yi uzatan adaptif bir yanıtı aktive ettiği belirtilmektedir (Ocampo ve diğ. 2012; Pan ve diğ. 2011; Lavoie ve Whiteway 2008; Powers ve diğ. 2006; Bonawitz ve diğ. 2007).

TOR/Sch9 ve Ras/PKA besin algılama yollarının inaktivasyonu, mayadan memelilere kadar çeşitli ökaryotik organizmaların ömrünü uzatan deneysel bir manipölasyon olan kalori kısıtlaması (CR) ile mümkündür (Şekil 2.10) (Wei ve diğ. 2009). Maya büyüme ortamındaki glukoz miktarının %2'den %0.5 veya daha düşük seviyelere düşürülmesi yaşam süresinde %30-40'a varan dramatik bir artışa yol açmaktadır (Lin ve diğ. 2000). Yetersiz beslenme veya temel besin maddelerinin azaltılması olmaksızın kalori alımının azaltıldığı bir diyet olarak tanımlanan CR müdahalelerinin mayalar dışında sinekler, solucanlar, fareler, sıçanlar ve rhesus maymunları da dahil olmak üzere geniş bir yelpazedeki organizmalarda da ömrü dramatik şekilde uzattığı bildirilmiştir (Anderson ve Weindruch 2012; Kennedy ve diğ. 2007). Dikkat çekici şekilde, maya hücrelerinin besin içeren ortamdan suya aktarımının, kronolojik yaşam ömürlerini iki katına çıkardığı belirtilmektedir (Wei ve diğ. 2008). CR'nin aynı zamanda fermentasyondan solunuma geçişi regüle ederek CLS'yi uzattığı ifade edilmektedir. Çünkü *S. cerevisiae* glukoz açısından zengin ortamda fermentasyonu solunuma tercih etmekte ve ekstrasellüler glukoz kısıtlaması CLS'yi artırmada solunumun tetiklenmesiyle sonuçlanmaktadır (Smith ve diğ. 2007; Barros ve diğ. 2004). Ek olarak CR, besin alımını azaltarak metabolik sistemlerde dengesizliğe yol açmakta buna karşılık, bu dengesizliğin üstesinden gelmek için hücreler dengeyi sağlamak üzere evrimsel olarak korunmuş çeşitli sinyal iletim yollarını başlatmaktadır. Kalori azaltımına yanıt olarak, hücreler verimli metabolik yolları ve hücre hasarına karşı savunma sağlayan yeniden yapılandırma mekanizmalarını aktif hale getirmektedirler ve bu sırada daha az verimli metabolik ve sentetik yollar bloke edilmektedir (Dahiya ve diğ. 2020). Bu denge mekanizması, büyümeyle ilişkili yollar olan insülin sinyalleşmesi (IGF1), Rapamisin Hedefi (TOR), AMP bağımlı kinazlar, mitokondriyal redoksun

iyileştirilmesi ve otofajinin düzenlenmesi gibi süreçlere yanıt vermektedir (Şekil 2.11). Bu noktada otofaji, yaşla birlikte büyük oranda azalan önemli bir protein dönüşüm yolunu oluşturmaktadır ve CR otofaji indüksiyonu için önemli bir uyarıcıdır (Escobar ve diğ. 2019). Ayrıca CR koşulları altında, mitokondriyal solunum daha erken bir zaman noktasında glikoz baskısından kurtulmakta ve mitokondriyal biyogenez ve işlev için önemli olan nükleer genler upregule edilmektedir. Daha da önemlisi, CLS'nin CR ile uzatılmasının eksponansiyal büyüme sırasında mitokondriyal solunumu gerektirdiği ve bunun da stres direncini artırarak stasyonier fazda solunum ihtiyacını ortadan kaldırdığı ifade edilmiştir (Ocampo ve diğ. 2012). Mayada CR mitokondriyal fonksiyonları geliştirmekte ve artan otofaji ve mRNA translasyonunda azalma ile birlikte çeşitli stres formlarına direnç kazanılmaktadır (Schleit ve diğ. 2012). CR koşulları altında Rim15 kinaz; Tor1, Sch9 ve Ras/PKA inhibisyonundan kurtulmakta ve süperoksit dismutazlar ve diğer oksidatif stres savunmaları Rim15'e kısmen bağımlı bir şekilde upregule edilmektedir (Wei ve diğ. 2008). CR'nin ayrıca Rim15'ten bağımsız bir şekilde uzun ömürlülük yanlısı etkileri desteklediği de ifade edilmektedir (Weinberger ve diğ. 2010; Mesquita ve diğ. 2010). Aynı çalışmalarda CR'nin veya katalazların inaktivasyonunun, Rim15-bağımsız bir yolak ile süperoksit dismutazları aktive ederek ve hücre içi süperoksit anyonlarının birikimini engelleyen yüksek seviyelerde hidrojen peroksit üreterek CLS'yi uzattığı da belirtilmektedir (Weinberger ve diğ. 2010; Mesquita ve diğ. 2010). Bu bulgular, yaşlanma sırasında hidrojen peroksit için hormetik (düşük dozlarda bir toksinin antioksidan etkisi olabileceği veya hücrel savunma mekanizmalarını aktive edebileceği) bir role işaret etmektedir. Bazı durumlarda uzun ömürlülüğün, oksidatif stres savunmalarının inaktivasyonu ile arttığı veya artan ROS ve oksidatif hasar ile ilişkili olduğu da ifade edilmektedir (Ludovico ve Burhans 2013). Pan ve diğ. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada, maya hücrelerinin büyümesi sırasında üretilen mitokondriyal ROS seviyelerinin artmasının, hayatta kalımın sonraki aşamalarında ROS birikimini azalttığı ve sonuç olarak uzun ömürlülüğü artırdığı ortaya konulmuştur. Aynı çalışmada ROS'un erken üretiminin TOR aktivitesinin inhibisyonuna bağlı CLS'nin uzamasına katkıda bulunduğu öne sürülmüştür (Pan ve diğ. 2011). Başka bir çalışmada hormesisin faydalı etkilerinin epigenetik değişiklikleri de içerdiği gösterilmekle birlikte memeli DNA hasar yanıt kinazları ATM ve Chk2'nin homologları olan maya DNA hasar yanıt kinazları Tel1 ve Rad53'ün, maya CLS'sini

uzatan hormetik bir mitokondriyal ROS uzun ömürlülük sinyaline aracılık ettiği belirtilmiştir (Schroeder ve diğ. 2013).



Şekil 2.11: TORC1/Sch9'un maya CLS uzamasını modüle ettiği başlıca mekanizmalara genel bir bakış. TORC1-Sch9 inhibisyonu, CLS'nin düzenlenmesinde rol oynayan birkaç anahtar transkripsiyon faktörünün aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır. İlk olarak; Msn2/4, Gis1 ve Hsf1 genel stres direncini artıran ve ROS detoksifikasyonunda yer alan enzimlerin upregülasyonuna yol açan ESR'yi (Çevresel Stres Tepkisi) aktive etmektedir. Gis1 ayrıca hataya yatkın DNA polimeraz alt birimi Rev1'in transkripsiyonunu baskılamakta ve Rph1 ile birlikte gliserol ve asetat metabolizmasını düzenlemektedir. İkinci olarak, Hcm1 ve Hap4 transkripsiyon faktörleri solunum genlerinin uygun transkripsiyonel indüksiyonunu sağlamakta ve bu da stasyonier fazda hormesis etkilere neden olmaktadır. Mitokondri tarafından üretilen süperoksit anyonları, doğrudan veya dolaylı olarak (G1 arrestinin inhibisyonu yoluyla) DNA hasarını indükleyerek yaşam süresini olumsuz etkilemektedir. Rim15 ayrıca besin tükenmesi durumunda Sic1'e bağımlı bir şekilde G1 arrestini stimüle etmekte ve böylece DNA hasarını azaltmaktadır. Üçüncüsü, TORC1-Sch9 sinyal yolağı, transkripsiyon seviyesinde seramidaz genleri YDC1 ve YPC1'in ifadesini baskılamakta ve bu şekilde sfingolipid rheostatına etki etmektedir. Ayrıca, TORC1-Sch9 sinyalini downregüle etmek, pro-yaşlanma karbon kaynakları etanol ve asetik asidin hızlı katabolizmasını ve gliserol biyosentezinin upregülasyonunu

teşvik eden alternatif bir metabolik durumu indükleyerek CLS'yi uzatmaktadır. Otofaji sadece hücreleri toksik metabolitlerden, yanlış katlanmış proteinlerden veya kusurlu mitokondrilerden temizlemekle kalmamakta, aynı zamanda vakuolar asitlenmeyi teşvik ederek yaşlanmaya bağlı mitokondri fonksiyonundaki düşüşü ve hayatta kalmayı artırmaktadır. Benzer şekilde Sch9, V-ATPaz düzenlenmesinde ve vakuolar asiditenin belirlenmesinde modulator bir rol oynamaktadır. Vakuolar pH homeostazının kaybı, mitokondriyal fonksiyonu ve dolayısıyla yaşam süresini olumsuz etkileyebilmektedir (Deprez ve diğ. 2018 tarafından yapılan çalışmadan alınmıştır).

Çok sayıda çalışmanın sonuçları, maya replikatif ve kronolojik yaşam sürelerinin belirleyicilerinin farklı olduğunu, ancak örtüştüğünü göstermektedir (Delaney ve diğ. 2013; Longo ve diğ. 2012). Hem replikatif hem de kronolojik yaşam sürelerinin CR'ye ve besin algılama yollarını azaltan diğer müdahalelere yanıt olarak uzaması, her iki maya yaşlanma paradigmasının da evrimsel olarak farklı çok hücreli organizmalardaki yaşlanma süreçleriyle korunmuş özellikleri paylaştığını göstermiştir (Longo ve diğ. 2012). Bununla birlikte, benzer downstream moleküler olayların her iki maya yaşlanma paradigması için ortak olup olmadığı belirsizliğini korumaktadır. Maya yaşlanma paradigmaları birbirine bağlıdır örneğin; bazı çalışmalarda kronolojik olarak yaşlı maya hücrelerinin RLS'de orantılı bir azalma gösterdiği bildirilmiştir (Murakami ve diğ. 2012; Piper ve diğ. 2006; Ashrafi ve diğ. 1999). Başka bir çalışmada ise, kalori kısıtlamasının (CR) kronolojik olarak yaşlanmış hücreleri RLS'de bir azalmadan koruduğu belirtilmekle birlikte stasyonier faz hücrelerinin metabolik durumu ve mitokondriyal fonksiyonlarının, onların büyüme koşullarına geçtiklerindeki replikatif potansiyellerini belirlediği ifade edilmektedir (Delaney ve diğ. 2013).

2.4 Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller

Dünya üzerinde yaşam, oksijenin varlığına kaçınılmaz bir şekilde bağlıdır. Aerobik süreçler, karbon içeren moleküllerin kontrollü bir şekilde oksidasyonu ve ardından enerji açığa çıkması için oksijene ihtiyaç duymaktadır. Ancak, her aerobik hücre sürekli olarak oksijen paradoksu ile karşı karşıya kalmaktadır (Sies 1993). Normal hücresel fonksiyonların sürdürülebilmesi için fizyolojik seviyelerde reaktif oksijen türleri (ROS) gerekli olduğundan, oksijen yaşamı sürdürmek için elzemdir (Makker ve diğ. 2009). Oksijen temelde reaktif bir molekül olmamasına rağmen O₂'den türeyen ROS gibi bozunma ürünleri hücresel fonksiyon ve hayatta kalma

açısından zararlı olabilmektedir (de Lamirande ve Gagnon 1995). Serbest radikaller, atomik orbitallerinde eşlenmemiş bir elektron içeren, bağımsız olarak var olan moleküler türlerdir ve bu nedenle son derece kararsız ve reaktiftirler. Kararsız olan bu yapıların diğer maddelerle kolaylıkla etkileşime girmesi sonucu kararlı hale geçiş sağlanmaktadır. Elektron verip alabildikleri için oksidan ve redüktan olarak işlev görebilmektedirler (Lobo ve diğ. 2010). Radikalik türler, yakınındaki biyomolekülleri okside ederek elektron kazanmak ve temel durumlarına geri dönmek için bir döngü oluşturabilmektedirler ve kendileri de serbest radikal haline geldikleri için komşu hücrelerin ve dokuların tahrip edilmesine neden olan bir döngüyü devam ettirmektedirler (Tablo 2.2).

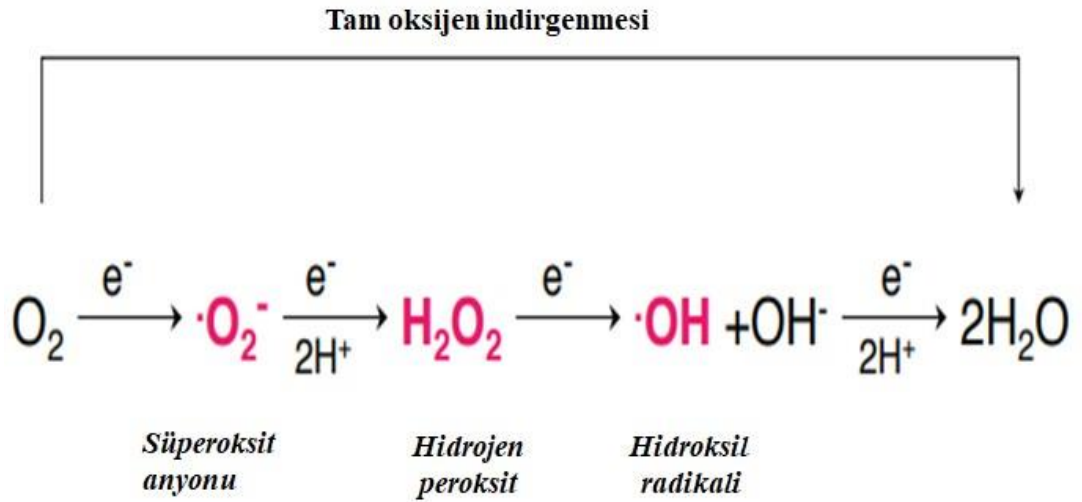
Tablo 2.2 Reaktif Türler (ROS ve RNS) ve hedefleri (Dawes ve Perrone 2020 tarafından yapılan çalışmadan alınmış ve düzenlenmiştir).

ROS veya RNS	Hedefleri
Birincil Türler	
Singlet oksijen 1O_2	Steroller dahil olmak üzere membran lipid peroksidasyonu (Böcking ve diğ. 2000), amino asitlerin foto-oksidasyonu ve DNA hasarı (Scandalios 1987), doymamış karbon bağları içeren bileşikler (örn. histidin ve triptofan), doymamış lipidler (Carmona-Gutierrez ve diğ. 2010), tiyoller ve aminler (Briviba ve diğ. 1997).
Süperoksit anyonu $\bullet O_2^-$	Fe-S proteinleri (Liu ve diğ. 1992), reaktif lipid radikalleri ve lipid hidroperoksitler oluşturmak üzere otokatalitik lipid peroksidasyonunu başlatan doymamış yağ asitleri (Gunstone 2012).
Hidrojen peroksit H_2O_2	Proteinlerde tersinir disülfid veya sülfenik asit kalıntılarına ya da tersinmez sülfenik veya sülfonik asit kalıntılarına yol açan reaktif tiyol oluşumu. DNA bazlarında mutasyon, intrakromozomal rekombinasyona yol açan hasarlar (Brennan ve diğ. 1994).
Nitrik oksit radikali $\bullet NO$	Proteinlerin S-nitrosilasyonu ve tirozin nitrasyonu (Foster ve diğ. 2009). Peroksinitrit oluşumu ($\bullet O_2^-$ ile reaksiyon).
İkincil Türler	
Hidroksil radikali $\bullet OH$	Nükleik asitler, proteinler, lipidler ve karbonhidratlar dahil olmak üzere en yakın komşu moleküllere verilen hasar. DNA hasarı, zincir kırılması ve baz değişikliklerini içerir (Evans ve diğ. 2006). Protein hasarı; çapraz bağlanma,

	fragmentasyon ve özellikle aromatik yan zincirler ile sistein içeren aminoasit rezidülerinin oksidasyonunu kapsar (Stadtman 1992). Doymamış yağ asidi hasarı reaktif hidroperoksitlerin ve hidroperoksi radikallerinin oluşumunu içerir (Gunstone 1996).
Hipoklorit OCl^-	Glutasyon ile hızlı şekilde reaksiyona girer (Ingram ve diğ. 2003). Proteinlerin, karbonhidratların, lipidlerin ve nükleik asitlerin oksidasyonu ile proteinlerin ve lipidlerin klorlanması (Kwolek-Mirek ve diğ. 2011).
Peroksinitrit ONOO^-	$\bullet\text{OH}$ 'a benzer ve proteinlerdeki aromatik aminoasit kalıntılarının nitrasyonunu sağlar (Beckman ve diğ. 1994). Oksidatif DNA hasarının bazı biyobelirteçleri (örn; 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG) ve 8-nitroguanin) peroksinitrit ve DNA arasındaki reaksiyondan (Wiseman ve Halliwell 1996), tiyollerin oksidasyonundan (Buchczyk ve diğ. 2000), doymamış yağ asitlerinin nitrasyonundan oluşur.
Azot dioksit $\bullet\text{NO}_2$	ONOO^- ile benzer etki.
Karbonat radikali $\bullet\text{CO}_3^-$	Proteinlerin karbonilasyonu, hidrojen peroksit indüklü protein hasarının uyarılması (Aljuhani ve diğ. 2013).
Protein hidroperoksitler	Modifiye aminoasitler, protein fragmentasyonu, çapraz bağlanma ve katlanma, aromatik aminoasitlerden fenoksi radikalleri de dahil olmak üzere çok sayıda serbest radikal üretimi (Gebicki ve diğ. 2002) (Fu ve diğ. 1995; Weber ve diğ. 2015). DNA-protein çapraz bağları, oksitlenmiş DNA bazları.
Lipid hidroperoksitler/ hidroperoksi radikalleri	Hücre membranları, DNA'da zincir kırılmaları ve oksitlenmiş bazlar, oksidasyon yoluyla ve reaktif aldehit parçalanma ürünlerinden kaynaklanan protein hasarı (Evans ve diğ. 1998).
Fenoksi radikalleri	
Malondialdehit, 4-hidroksinonenal, metilglioksal	Proteinlerin karbonilasyonu, mutasyona yol açan kovalent adduct oluşumu yoluyla DNA hasarı (Esterbauer ve diğ. 1991; Turton ve diğ. 1997; Evans ve diğ. 2006).

Kimyasal reaktif türlerin intraselüler kaynakları başlıca mitokondri, endoplazmik retikulum, lizozomlar, peroksizomlar, sitozol ve plazma membranıdır (Balaban ve diğ. 2005). ROS, moleküler oksijenin kimyasal indirgenmesinden kaynaklanmaktadır (Şekil 2.12) ve başlıcaları süperoksit anyon radikali ($\text{O}_2^{\bullet-}$), hidroksil radikali ($\bullet\text{OH}$) gibi serbest radikallerin yanı sıra hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hipokloröz asit (HClO) gibi radikal olmayan oksidanlardır (Schieber ve Chandel 2014). $\text{O}_2^{\bullet-}$ ve $\bullet\text{OH}$ son derece kararsızken H_2O_2 serbestçe yayılabilir ve nispeten uzun ömürlüdür. Ayrıca bu üç ROS birbirine dönüştürülebilmektedir. O_2 bir elektron

olarak $O_2^{\cdot-}$ 'ye dönüştürülebilmektedir. Buna karşılık antioksidan enzim süperoksit dismutaz (SOD) tarafından gerçekleştirilen dismutasyon reaksiyonu ile $O_2^{\cdot-}$ H_2O_2 'e dönüştürebilir ve bu da son olarak kısmen $\cdot OH$ 'a veya tamamen suya indirgenebilir. Reaktif türlerden olan RNS'ler (reaktif nitrojen türleri) arasında başlıcaları ise peroksinitrit radikali ($ONOO^{\cdot}$), nitrojen dioksit ($NO_2^{\cdot}$) ve nitrik oksittir ($\cdot NO$) (Ray ve diğ. 2012). Yeni tanımlanan RSS'ler (reaktif sülfür türleri) arasında tiyol radikali (RS) ve ROS ile tiyoller arasındaki reaksiyonla oluşan RSS bulunmaktadır. Benzer şekilde RSS; ($RSR^{\cdot}$), glutatyonil radikali ($GSSG^{\cdot}$) gibi radikal türleri ve reaktif sülfan türleri (RSR), reaktif sülfür maddeleri (SO_2 , SO_3) gibi radikal olmayan türleri içermektedir (Giles ve diğ. 2017; Ali ve diğ. 2020). Özellikle RSS, peptitler ve proteinler gibi sülfür içeren moleküller için özel bir tropizm ile hem oksidasyon hem de redüksiyon reaksiyonlarını tetikleyebilmektedir (Giles ve diğ. 2017; Ali ve diğ. 2020).



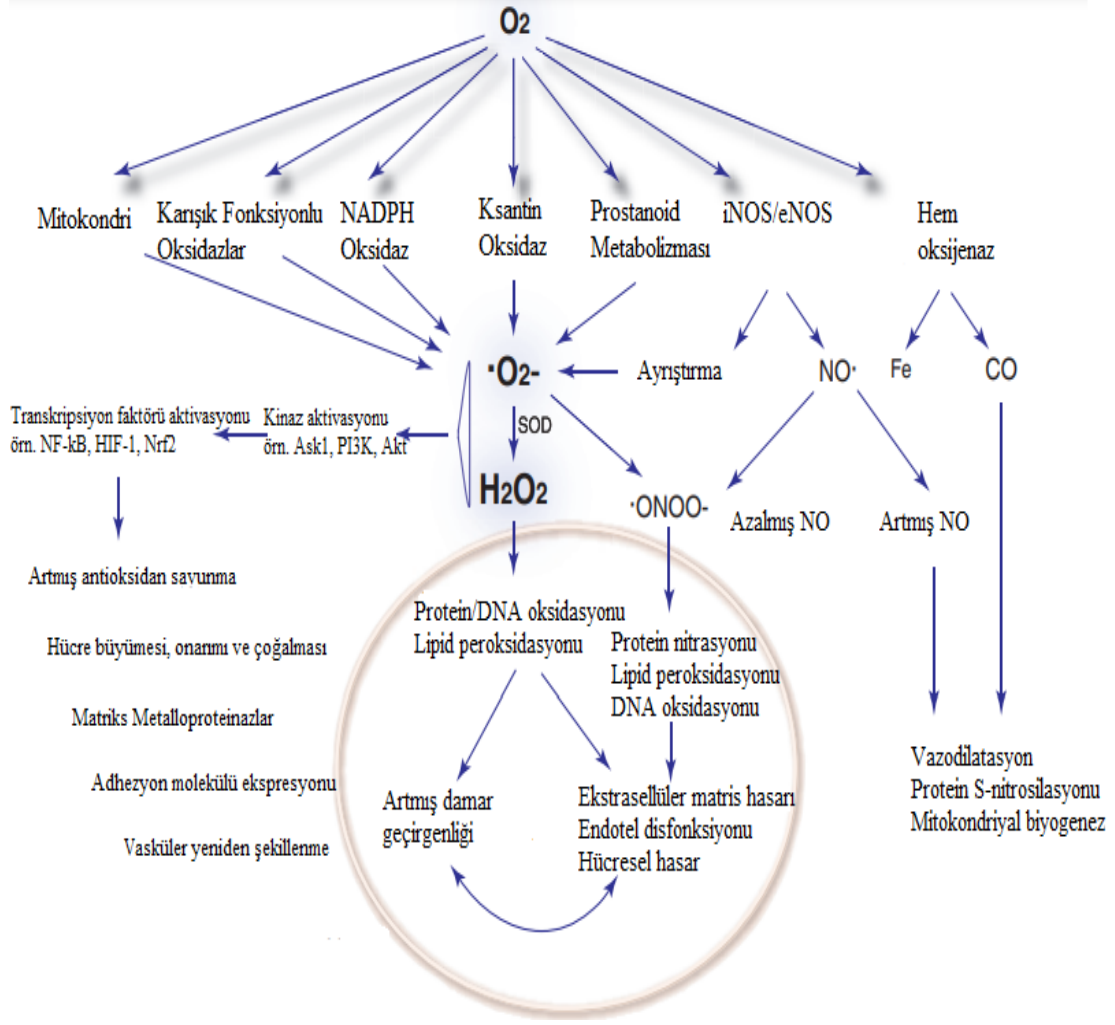
Tam olmayan oksijen indirgenmesi

Şekil 2.12: Moleküler oksijenin indirgenme süreci (Bartz ve Piantadosi 2010).

Oksidatif stres, canlı organizmalarda ROS üretimi ile bunları nötralize etme yeteneği arasındaki dengesizlikten kaynaklanmaktadır. Aşırı reaktif moleküller ve zayıf endojen savunma arasındaki uçurum; lipitler, proteinler, DNA gibi hücre yapıları ve moleküllerine zarar vermekte sonuçta geniş bir hastalık yelpazesinin patogeneze katkıda bulunmaktadır. Oksidatif stres ve inflamasyon yakından ilişkilidir ve oksidatif stres inflamasyona neden olabilmektedir. Bu durum oksidatif

stres üretimini indükleyerek hücre hasarına yol açan ve pro-inflamatuar bir ortamı teşvik eden bir kısır döngü oluşturmaktadır (Petrie ve diğ. 2018; Ishibashi ve diğ. 2013; Ng ve diğ. 2012). Literatür verileri, metabolik sendrom (Vona ve diğ. 2019), ateroskleroz (Violi ve diğ. 2017), kardiyovasküler hastalık (Majzunova ve diğ. 2013; Cai ve Harrison 2000), kanser (Klaunig 2018; Reuter ve diğ. 2010), nörodejeneratif bozukluklar (Singh ve diğ. 2019; Islam 2017), diyabet (Wang ve Wang 2017), infertilite (Noh ve diğ. 2020), böbrek hastalıkları (Ratliff ve diğ. 2016), gastrointestinal ve karaciğer hastalıkları (Puentes-Pardo ve diğ. 2020) gibi birçok farklı hastalığın etiyolojisinde oksidatif stresin kilit rolünü doğrulamaktadır.

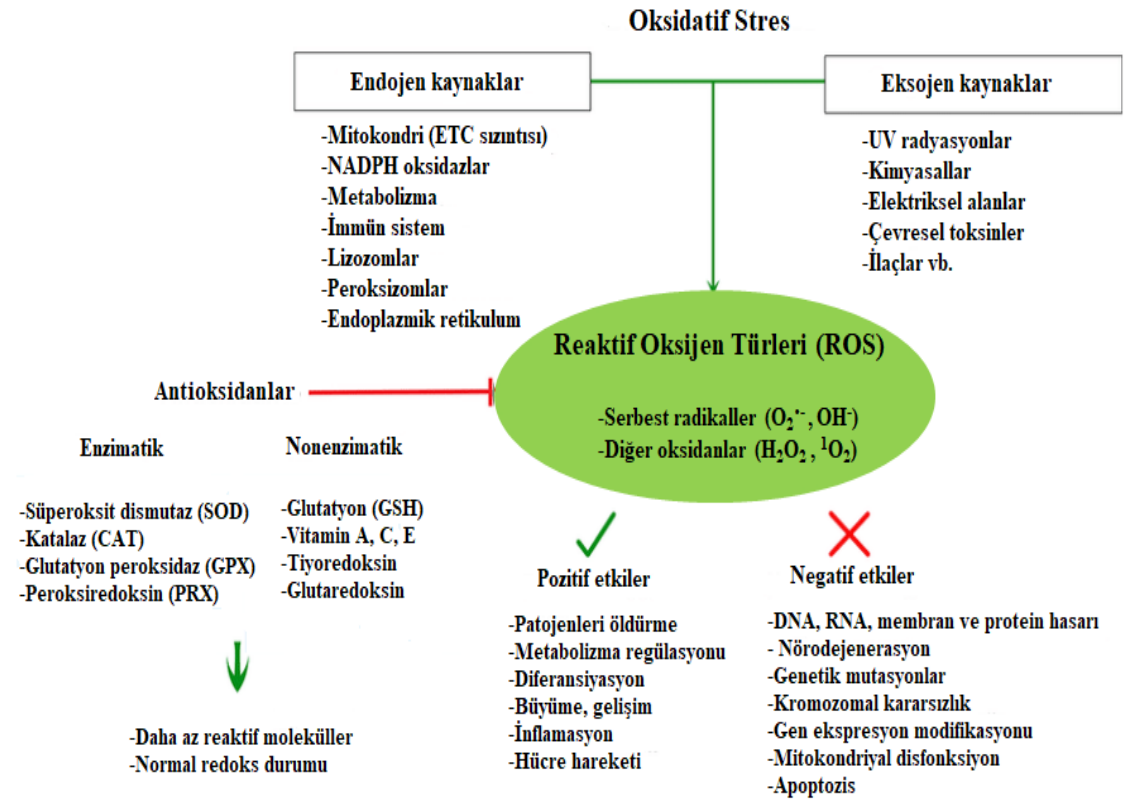
Uzun bir süre boyunca ROS'ların sadece toksik etkilere neden olduğu ve bu etkilerin çeşitli patolojilerle ilişkili olduğu düşünülmesine rağmen fizyolojik ROS konsantrasyonlarının hücresel proliferasyon, kök hücre yenilenmesi ve farklılaşma, fizyolojik işlev ve canlılığı destekleme, hücre sinyal iletim kaskadlarını düzenleme, genotoksik etkileri engelleme, transkripsiyon, fosforilasyon ve enzimatik özellikleri değiştirerek hücredeki metabolik akışları ve reaksiyonları değiştirme, immün sistem aktivasyonunu düzenleme, programlanmış hücre ölümü apoptoz gibi önemli hücresel süreçler üzerinde faydalı etkiler gösterdiği de ifade edilmiştir (Shields ve diğ. 2021; Mittler 2017).



Şekil 2.13: Moleküler oksijenin enzimatik sistemler tarafından kullanımı, reaktif oksijen türlerinin üretimi ve downstream sonuçları. Oksijen (O_2) sadece mitokondri ve mono-oksijenazlar tarafından süperoksit anyon radikali ($\cdot O_2^-$) üretimine yol açmakla kalmaz aynı zamanda önemli sinyal molekülleri olan nitrik oksit (NO) ve karbon monoksidin (CO) enzimatik üretimi için de gereklidir. H_2O_2 gibi bazı oksijen türevli reaktif oksijen ara ürünlerinin hücrede protein ve DNA oksidasyonu, lipid peroksidasyonu gibi zararlı etkilerinin yanı sıra antioksidan savunmaların güçlendirilmesi gibi yararlı ve adaptif etkileri de olabilir. Ask1: apoptoz-sinyalleme kinaz 1; Fe: demir; HIF-1: hipoksi indüklenebilir faktör 1; iNOS/eNOS: indüklenebilir nitrik oksit sentaz/endojen nitrik oksit sentaz; $ONOO^-$: peroksinitrit anyonu; PI3K: fosfoinositid 3-kinaz; SOD: süperoksit dismutaz. (Bartz ve Piantadosi 2010 tarafından yapılan çalışmadan alınmış ve düzenlenmiştir).

ROS kaynakları endojen ve eksojen olarak sınıflandırılabilir (Şekil 2.14). Endojen olarak ROS; hücre membranı, mitokondri, peroksizomlar ve endoplazmik retikulumda bulunan ksantin oksidaz, sitokrom P450 ve ayrıca NADPH oksidaz (NOX) enzim kompleksi gibi çeşitli enzimatik reaksiyonlar tarafından üretilmektedir (Şekil 2.13) (Holmström ve Finkel 2014). Ayrıca, nörotransmitter

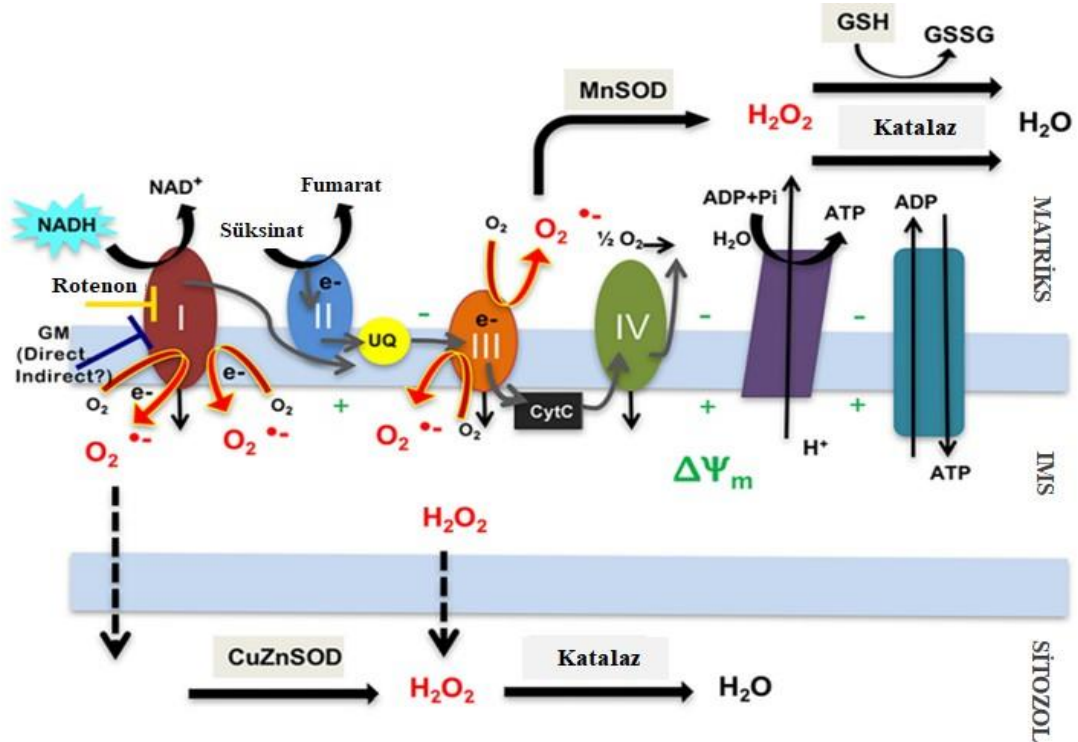
ve hormon olarak işlev gören katekolamin gibi endojen olarak üretilen küçük moleküllerin otooksidasyonu da ROS üretimiyle sonuçlanmaktadır. ROS üretiminin diğer potansiyel kaynakları ise nötrofiller, monositler ve makrofajlar gibi fagositik hücrelerdir (Klebanoff 1980). Bu hücreler, istilacı mikroorganizmalara karşı savunma sistemlerinin bir parçası olarak $O_2^{\bullet-}$ radikalini doğrudan üretmek üzere NADPH oksidaz enzimatik sistemini kullanmaktadırlar. Fizyolojik koşullarda NADPH oksidaz tarafından üretilen $O_2^{\bullet-}$ radikali fagositik fagolizozomlar tarafından kapsüllenerek mikroorganizmalara doğru yönlendirilmektedir. Endojen ROS üretimi ile sonuçlanan bir diğer olay ise HClO'nun $O_2^{\bullet-}$ radikali ile reaksiyona girmesiyle meydana gelen radikalın bağışıklık hücreleri tarafından bakterileri etkili bir şekilde yok ederek bağışıklık sistemini güçlendirmesidir (Winterbourn ve diğ. 2006).



Şekil 2.14: Endojen ve eksojen kaynaklar tarafından üretilen reaktif oksijen türleri, organizma üzerindeki etkileri ve antioksidan savunma mekanizmalarının etkisi (Akki ve diğ. 2020 tarafından yapılan çalışmadan alınmış ve düzenlenmiştir).

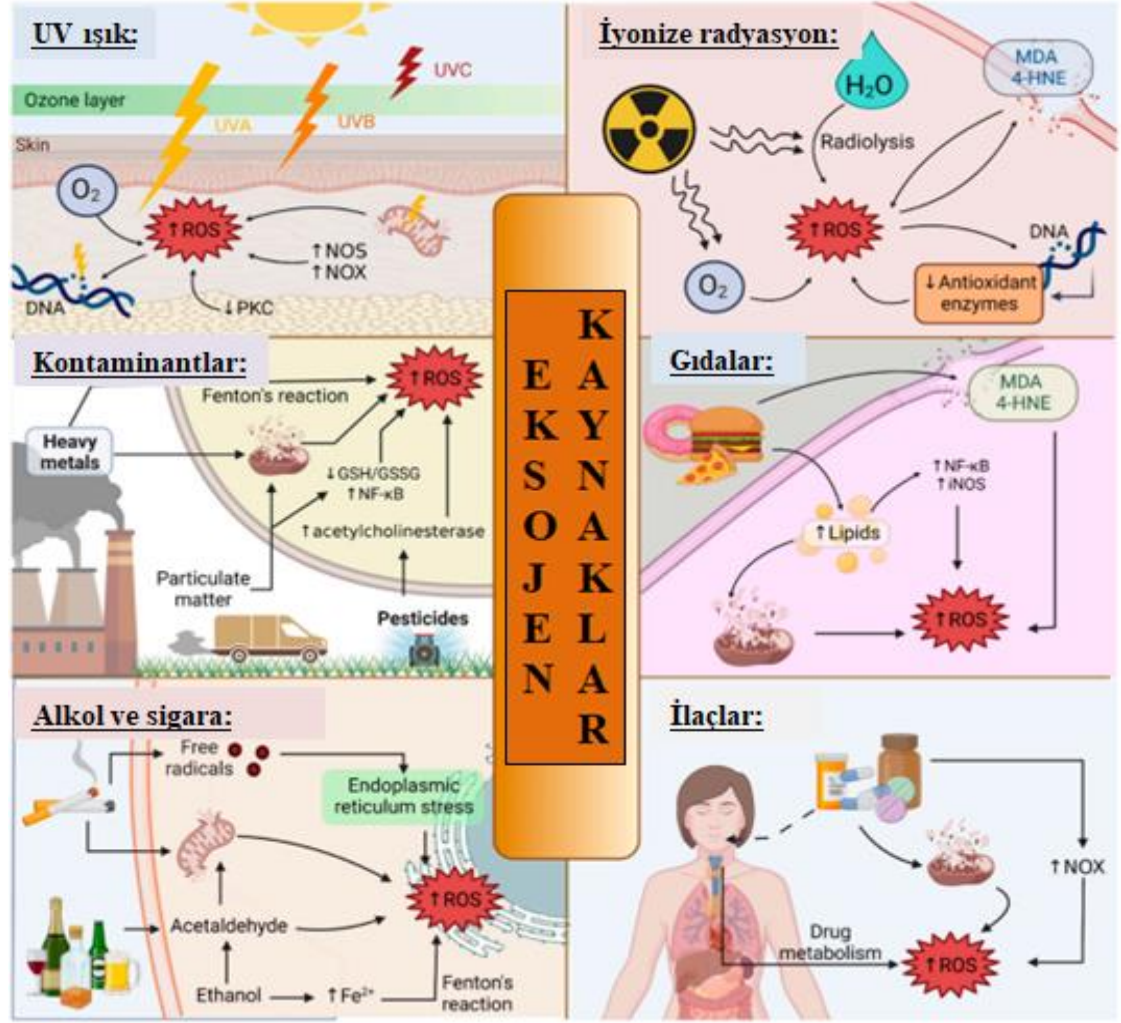
ROS üretiminin çoğu, mitokondrinin elektron transport zincirinde (ETC) gerçekleşmektedir (Sheu ve diğ. 2006). Bu süreçte, bir oksijen molekülü dört elektron alarak suya indirgenir; ancak süreç boyunca bazı elektronlar erken bir

aşamada elektron taşıyıcılardan oksijene sızarak ROS oluşumuna neden olur (Şekil 2.12) (Murphy 2009). Elektronlar sırasıyla kompleks I veya kompleks II'den kompleks III'e ve ardından kompleks IV'e transfer edilirken, protonlar mitokondriyal matrinden membranlar arası boşluğa taşınarak bir elektrokimyasal gradient oluşturur ve bu gradient ATP sentaz tarafından ATP sentezi için enerji olarak kullanılır (Şekil 2.15). Bu transport sırasında elektronlar, süperoksit (tek elektron transferi) veya hidrojen peroksit (çift elektron transferi) üretmek üzere doğrudan oksijene aktarılabilir (temelde ubikinonu alıcı olarak kullanan kompleks I, II ve III'te) (Brand 2016). Süperoksit, membranları geçemediği için üretildiği kompartıman içinde kalır ve süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından hızla hidrojen peroksite dönüştürülür (Herrero ve diğ. 2008). Süperoksit ayrıca daha yavaş bir hızda spontan dismutasyona da uğrayabilir (Abreu ve Cabelli 2010). Süperoksitin aksine, peroksit membranları geçebilir ve katalazlar veya peroksidazlar tarafından tamamen suya indirgenebilir. Alternatif olarak, peroksitler kısmen en reaktif ve tehlikeli radikal olan hidroksil radikaline indirgenebilir, ki bu da indirgenmiş demir veya bakırın varlığını gerektiren bir reaksiyondur (Herrero ve diğ. 2008). Hidroksil radikali aynı zamanda süperoksitler nitrik oksitler ile reaksiyona girdiğinde de oluşabilmektedir (Sheu ve diğ. 2006).



Şekil 2.15: Mitokondriyal elektron transport zincirinin doğal yan ürünleri olan radikallerin üretimi (Desa ve diğ. 2019).

Endojen kaynaklarla birlikte ROS üretiminde rol oynayan bir dizi ekzojenler ise ksenobiyotiklerin redoks döngüsü, kirleticiler, ilaçlar, sigara dumanı, tütün, alkol ve X-ışınları/ γ -ışınları gibi iyonlaştırıcı radyasyonlar, kemoterapötikler, enflamatuar sitokinler ve çevresel toksinleri (Şekil 2.16) içermektedir (Vitolo 2019; Babizhayev 2016; Devasagayam ve diğ. 2004).



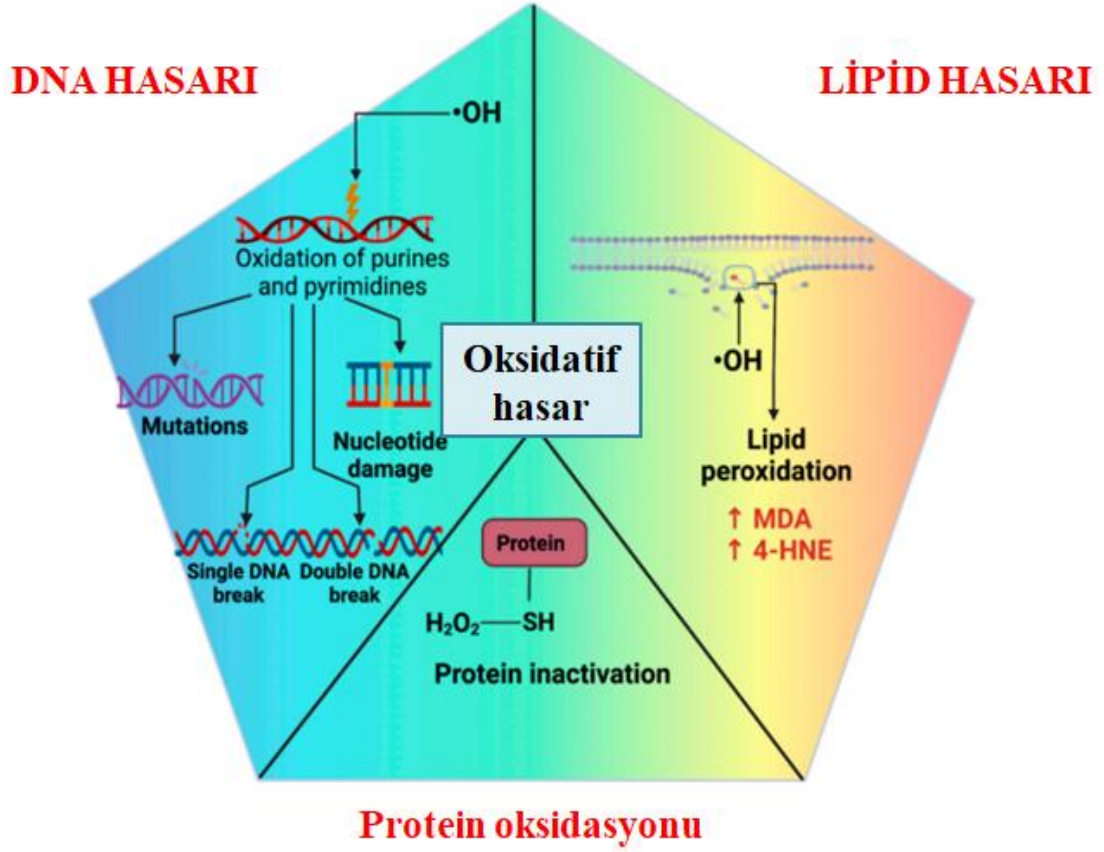
Şekil 2.16: ROS'un ekzojen kaynakları. Dış faktörler tarafından ROS üretim mekanizmaları arasında mitokondri hasarı, antioksidan enzimlerin aktivitesinde azalma ve glutatyon (GSH)/glutatyon disülfid (GSSG) oranı, nükleer faktör kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-kB) aktivasyonu, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz (NOX) ve nitrik oksit sentaz (NOS) gibi enzimlerin aktivitesinde artış, demir (Fe²⁺) gibi redoks-aktif metallerin konsantrasyonunda artış, moleküler oksijenin (O₂) eksik indirgenmesi ve suyun (H₂O) radyolizi bulunmaktadır (Aranda-Rivera ve diğ. 2022 tarafından yapılan çalışmadan alınmış ve düzenlenmiştir).

Endüstriyel, tarımsal, farmakolojik ve yaşam tarzı uygulamaları insanların maruz kaldığı ekzojen ajanların türlerini ve miktarlarını artırmıştır. Örneğin,

kadmiyumla kirletilmiş bölgelerde yaşayan insanlar bu ağır metali birkaç yüz mikrograma kadar biriktirebilmektedir. Kadmiyum alım yolları akciğerler, bağırsaklar ve cilt yoluyla gerçekleşmektedir (Jomova ve Valko 2011). Bu metalin kendisi doğrudan serbest radikal üretmese de, ferritin ve apoferritin gibi çeşitli sitoplazmik ve membran proteinlerinde demir ve bakırın yerini alabilmekte ve Fenton reaksiyonları yoluyla ROS üretimine dolaylı olarak katılabilmektedir (Price ve Joshi 1983). Bir başka örnek ise, insanların ROS üreten ozon ve sigara dumanı gibi ekzojen ajanlar ile çeşitli partiküllere (mesleki veya çevresel) maruz kalmaları sonucu ROS ile ilişkili mekanizmalar aracılığıyla çalışan TNF- α gibi mediatörlerin üretimi tetiklenmektedir. Partiküllerin akciğer epitel hücrelerinin yüzeyine adezyonu ve alımı sonucu inflamatuvar ve fibrojenik mediatör üretim seviyeleri artmaktadır (Churg 2003). Bir diğer çalışmada ise mitokondrinin çevresel ve mesleki asbest partiküllerine maruz kalan memeli hücrelerinde oksidatif stresin başlamasında rol oynayabileceği öne sürülmüştür (Huang ve diğ. 2012). Asbestin başlattığı kronik oksidatif stresin, maruz kalan hücrelerde oksidatif DNA hasarını teşvik ederek ve redoks sinyal yollarını düzenleyerek karsinogenez ve fibrozise katkıda bulunduğuna dair önemli kanıtlar bulunmaktadır (Huang ve diğ. 2011; Kamp ve Weitzman 1999; Shukla ve diğ. 2003; Toyokuni 2009; Xu ve diğ. 1999, Xu ve diğ. 2002). Asbest lifleri birden fazla mekanizma ile ROS üretimini başlatabilir. Asbest ile ilişkili yüzey demiri ya bir redoks reaksiyonu yoluyla ya da maruz kalan hücrelerde Fenton benzeri bir reaksiyonu katalize ederek hidroksil radikalleri üretmektedir (Pezerat ve diğ. 1989; Weitzman ve Graceffa 1984). Buna ek olarak, asbest liflerinin alımı, membranla ilişkili NADPH oksidaz yoluyla ekstraselüler ROS salınımı için fagositik hücreleri uyarabilir (Kamp ve diğ. 1992).

Endojen veya ekzojen kaynakların indüklediği oksidatif stres koşulları altındaki hücrelerde ROS, DNA iplikçik kırılmaları, mutasyonlara yol açan baz modifikasyonları, RNA ve protein sentezinin inhibisyonu, aminoasit bağları ve ayrıca çapraz bağlanmalarda bozulmalar dahil olmak üzere protein hasarı, membran fosfolipidlerinin oksidasyonu, lipid peroksidasyonu, membran iyon gradyanlarının bozulması ve hücresel işlev bozukluğuna yol açan hücresel ATP seviyelerinin tükenmesi gibi (Şekil 2.17) biyolojik sistemlerde hasarlar görülmektedir (Aranda-Rivera ve diğ. 2022). DNA'yı oluşturan deoksiribonükleotitler oksidatif stres nedeniyle zarar görerek modifiye edilmiş ürünler oluşturur. Nükleik asitlere

doğrudan zarar veren ROS, son derece reaktif olan hidroksil radikalidir ($\cdot\text{OH}$). $\cdot\text{OH}$ en reaktif türdür ve çevresindeki herhangi bir molekülle hemen etkileşime girerek o molekülden elektron alabilir, bu da molekülü serbest radikale dönüştürerek zincirleme reaksiyonlara yol açar. $\cdot\text{OH}$, DNA'nın pürin (adenin, guanin) veya pirimidin (sitozin, timin) bazlarının çift bağlarına eklenerek ve timinin metil grubundan ve 2-deoksiriboz şekerinin her bir CH bağından bir hidrojen atomu çekerek DNA ile reaksiyona girer (Chao ve diğ. 2013; Dizdaroglu ve Jaruga 2012; Cooke ve diğ. 2003). Bu reaksiyonlarla oluşan ürünler zincir hasarlarına, DNA'nın proteinlerle çapraz bağlanmasına, molekül içi siklizasyona veya kümelenmiş bölgelerin oluşmasına yol açabilir (Dizdaroglu ve Jaruga 2012). $\cdot\text{OH}$ 'nin tercihen DNA'nın guanin bazını oksitlediği ve öncelikle 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) oluşturduğu iyi bilinmektedir (Dizdaroglu ve Jaruga 2012; Cooke ve diğ. 2003). 8-OHdG, replikasyon ve transkripsiyon gibi mekanizmaları etkilemektedir (Gaillard ve diğ. 2015; Cooke ve diğ. 2003). $\cdot\text{OH}$ ayrıca lipidleri oksitleyerek, lipid peroksidasyon ürünleri olan 4-hidroksi-2-nonenal (4-HNE) ve malondialdehit (MDA) gibi aldehytler ve ketonlar üretir. Son derece reaktif olan bu ürünler DNA, proteinler veya diğer lipidler gibi biyomoleküllerle etkileşime girerek birçok biyolojik etkiye yol açar (Gianazza ve diğ. 2021; Ayala ve diğ. 2014; Bartsch ve Nair 2006). Süperoksit anyon radikali ($\text{O}_2^{\cdot-}$), $\cdot\text{OH}$ 'a kıyasla tek başına bu kadar reaktif değildir, ancak protonlanmış formunda lipid peroksidasyonunu başlatabilir veya belirli spesifik enzimleri inaktive edebilir. H_2O_2 ise düşük reaktiviteye sahiptir, daha kararlıdır ve bu nedenle çekirdeğe ulaşabilir ve lipidler gibi hücrel bileşenlerin yanı sıra nükleik asitler ve nükleer proteinler gibi önemli bileşenlerle de reaksiyona girebilir. H_2O_2 tarafından proteinlerin kükürt içeren aminoasitlerindeki sülfidril grubunun ($-\text{SH}$) sürekli oksidasyonu proteinlerin inaktive olmasına neden olur (Aranda-Rivera ve diğ. 2022). Tüm bunlara ek olarak ROS'un etkileri; ROS'un türü, miktarı, ROS'a maruz kalma süresi ve anına da bağlıdır (Griveau ve diğ. 1995; Aitken 1995; De Lamirande ve Gagnon 1992).



Şekil 2.17: ROS/RNS'nin hücresel ortamda oksidatif stresin biyobelirteçleri olarak kullanılan biyomoleküller (DNA, protein, lipid vb.) üzerindeki etkisi (Aranda-Rivera ve diğ. 2022).

Serbest radikaller ve antioksidan sistemler arasındaki dengesizliğin bir sonucu olarak endojen veya ekzojen olarak üretilen ROS'ların birikimine bağlı hücresel hasar, hücre fonksiyonlarının kaybına yol açmaktadır. Bu noktada, hücreler tüm organizmanın sağlığını korumak için kontrollü bir şekilde ölmelidir (Duke ve diğ. 1996). Apoptoz, nekroz ve otofaji gibi pek çok hücre ölümü tipi bulunmaktadır. Kontrollü hücre ölüm tipleri sayesinde ölü hücreler herhangi bir enflamasyona neden olmadan ve çevre hücrelere zarar vermeden spesifik bağışıklık sistemi hücreleri tarafından uzaklaştırılır. Hücre ölümleri arasında en önemli, etkili ve en çok araştırılan hücre ölüm tipi, oldukça karmaşık enerji bağımlı kontrol mekanizmalarını içeren apoptozdur (Elmore 2007). Öte yandan, hücre ölümü ve çoğalması arasındaki bir dengesizlik sonucu Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, kronik akciğer hastalığı, diyabet ve kanser gibi pek çok hastalık ortaya çıkmaktadır (Dong ve diğ. 2009).

2.4.1 Oksidatif Etkiler ve Yaşlanma

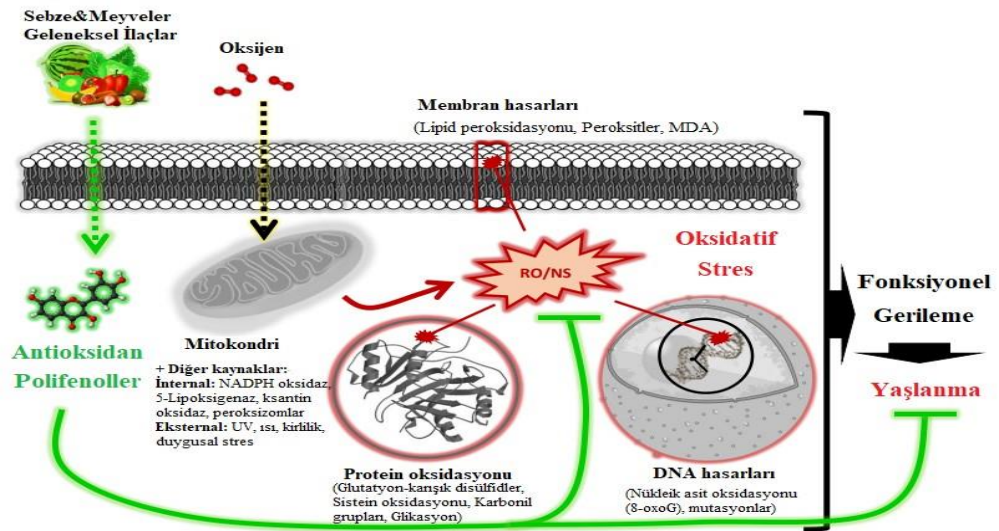
Yaşlanma, çok sayıda etkeni içeren ve çeşitli genetik ve/veya çevresel faktörlerden etkilenen dinamik ve karmaşık bir biyolojik süreçtir (Pomatto ve Davies 2018). Yaşlanma süreci boyunca, antioksidanlar azalır, oksidatif hasar artar ve dolayısıyla hastalık ve ölüm riski yükselir. Oksidatif stres, Alzheimer hastalığı (AD), Parkinson hastalığı (PD) ve amiyotrofik lateral skleroz (ALS) gibi yaşa bağlı hastalıkların ilerlemesinde rol oynamaktadır (Barnham ve diğ. 2004).

Yaşlanma sürecini açıklayabilmek için çeşitli teoriler öne sürülmüştür. Harman'ın, yaşlanmanın serbest radikallerin neden olduğu makromoleküler hasarların birikimiyle ortaya çıktığını öne süren serbest radikal teorisini önerdiğinden beri (Harman 1956) araştırmacılar ROS birikimi ile yaşlanma süreci arasındaki bağlantıyı bulmaya çalışmışlardır. Bu teori kapsamlı şekilde incelenmiş ve hala gözden geçirilmeye devam etmektedir ve şu ana kadar geçerliliğini koruyan bir teoridir (Harman 2003). Harman'ın teorisine uygun olarak, mitokondrilerden kaynaklanan ROS üretimi ve oksidatif hasarın biyokimyasal belirteçlerinin yaşla birlikte arttığı gözlemlenmiştir (Reverter-Branchat ve diğ. 2004; Aguilaniu ve diğ. 2003; Laun ve diğ. 2001; Sitte ve diğ. 2000). Bu gözlemler mayadan farelere ve hatta insan hücrelerine kadar doğruluk arz etmektedir.

2011 yılında, sağlıklı bireylerde yaşla ilgili oksidatif stres indekslerini değerlendiren farklı çalışmaların ana verilerini özetleyen bir derleme yayımlanmıştır (Del Valle 2011). Bu çalışmalarda, çeşitli milletlerden yüzlerce gönüllü analiz edilmiş ve sağlıklı bireyler yaşlarına göre sınıflandırılarak yukarıda bahsi geçen teori doğrulanmıştır. Ancak, bazı çalışmalarda, yaşlı insanlarda bulunan bazı antioksidan seviyeleriyle ilgili çelişkili ve tutarsız sonuçlar elde edilmiştir. Son yıllarda, bu teoriyi test etmek için genetik olarak modifiye edilmiş hayvanlar kullanılmıştır. Bazı çalışmalar, antioksidan enzimlerin overekspresyonunun yaşam süresini uzattığını bulmuş ve bu teoriyi doğrulamıştır, ancak diğer çalışmalar artan ROS seviyelerinin uzun ömürlülüğü artırdığını göstererek bu teoriyi sorgulamıştır (López-Otín ve diğ. 2013; Vina ve diğ. 2013). Stres koşullarına verilen yanıtta ROS'un hücre hayatta kalımı için kritik olan rolü dikkate alındığında, her iki yorumu da bağdaştırmak mümkündür (Reczek ve Chandel 2015). Fizyolojik konsantrasyonlarda ROS,

antioksidan savunmayı indüklemek, hücre koruması ve uzun ömürlülüğü artırmak için gereklidir. Ancak, eğer ROS seviyesi antioksidanların koruma kapasitesini aşarsa oksidatif hasar meydana gelecek, yaşlanmayı hızlandıracak ve hastalık riskini artıracaktır.

Oksidatif fosforilasyon sırasında, reaktif oksijen ve azot türleri (ROS/RNS) esas olarak mitokondrilerde oluşmaktadır ancak bu türler ek olarak endojen ve ekzojen faktörler tarafından da üretilmektedir. Endojen ve ekzojen antioksidanlardan oluşan bir ağ ROS/RNS'yi nötralize etmesine rağmen bazı ROS/RNS'ler bu savunma sistemlerinden kaçabilmektedir. Bu kaçan ROS/RNS'ler daha sonra lipidler, proteinler, nükleik asitler gibi hücresel bileşenlere oksidatif olarak zarar vermektedir (Davalli ve diğ. 2016). Oksidatif olarak hasar görmüş biyomoleküllerin onarımı için mekanizmalar mevcut olsa da, bazı hasarlar kalmaktadır. Bu gözlemden hareketle, yaşlanmada serbest radikal teorisi, ROS/RNS'nin oksidatif hasara yol açarak hücre fonksiyon bozukluğuna ve fizyolojik gerilemeye neden olduğunu, bunun da yaşlanmaya, dejeneratif hastalıkların ortaya çıkmasına ve nihayetinde ölüme yol açtığını varsaymaktadır (Şekil 2.18). Bu hipotez, ROS/RNS'yi etkili bir şekilde yok eden antioksidanların yaşlanma sürecini yavaşlatabileceğini öne sürmektedir (Hano ve Tungmunthum 2020; Harman 2003; Harman 1956).



Şekil 2.18: Yaşlanmanın serbest radikal teorisinin temelini açıklayan şematik görünüm. Mitokondriler ve diğer iç veya dış kaynaklar, oksidatif stres (ROS/RNS) üreterek çeşitli hücresel makromoleküllere (membran lipidleri, proteinler ve DNA) oksidatif olarak hasar vermekte ve bu durum fonksiyonel düşüslere, yaşlanmaya ve nihayetinde ölüme yol açmaktadır (Hano ve Tungmunthum 2020 tarafından yapılan çalışmadan alınmış ve düzenlenmiştir).

Maya hücreleri ve daha yüksek hücrelerin yaşlanmasıyla ilişkili "oksidatif stres" kavramı, güncel literatürde sıkça kullanılmaktadır. Bu kavram anlaşılır gibi görünse de, gerçekte tanımlaması zor ve nicelleştirilmesi daha da zordur. Bunun nedeni, hücrenin redoks-aktif metabolitlerinin termodinamik denge halinde olmaması ve bu metabolitlerin birbirleriyle ve farklı redoks potansiyellerine sahip alt hücrel bölmler arasındaki etkileşimleriyle redoks eşdeğerlerini ne oranda değiştirdiğinin genellikle belirsiz olmasıdır. Bu kavramın, *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans* ve fare gibi önemli yaşlanma modeli hayvanlarının organizmik yaşlanmasına uygulamak ise daha da zordur. Bunun nedeni, organlar ve dokuların da redoks potansiyelleri ve oksidatif stres yönetimi açısından farklılık göstermesidir (Breitenbach ve diğ. 2011). Oksidatif stres intraselüler redoks ortamının normal değerinden sapma periyodudur ve stres altında olmayan bir maya hücresinin sitoplazmasında redoks potansiyeli oldukça indirgendir. Maya hücrelerinde bu değer yaklaşık -310 mV olduğu gösterilmektedir (Ayer ve diğ. 2010) ve karmaşık homeostatik mekanizmalarla korunmaktadır.

S. cerevisiae'nin oksidatif stres tepkisi, ETC'deki ROS oluşum bölgeleri ve ana antioksidan enzimler de dahil olmak üzere memelilerinkine benzerdir (Herrero ve diğ. 2008). Mayada kompleks I yoktur, ancak mitokondriyal iç membran boşluğunda lokalize üç rotenon duyarsız NADH-ubikinin oksidoredüktaz, Ndi1, Nde1 ve Nde2 bulunmaktadır. Mitokondrial matriks NADH internal Ndi1 tarafından oksitlenirken, aktif bölgeleri mitokondrial intermembran boşluğa bakan Nde1 ve Nde2 eksternal NADH'ı okside eder. Memelilerdeki kompleks I gibi, Nde1 ve Nde2 de *S. cerevisiae* ETC'de önemli ROS kaynaklarıdır (Fang ve Beattie 2003).

Büyüme koşullarını manipüle ederek, maya hücreleri sadece fermantasyon veya solunum yoluyla hayatta kalabilir (Kayıkci ve Nielsen 2015). Yüksek glikoz konsantrasyonlarında (70 mM'ın üzerinde), *S. cerevisiae* sadece fermantasyon geçirebilir; bu nedenle ROS seviyeleri azalır. Sonuç olarak, hücre içi antioksidan savunma sistemi baskılanır ve hücreler oksidatif strese karşı oldukça hassastır. Bununla birlikte, maya hücreleri harici antioksidanlara veya orta düzeyde oksidan konsantrasyonlarına maruz kaldıklarında şiddetli oksidatif strese adapte olabilirler (Fernandes ve diğ. 2007). Dolayısıyla, bu strateji oksidatif strese tolerans kazanımı ve bunun dejeneratif süreçlerle korelasyonu ile ilgili süreçlere yardımcı olmaktadır.

Enerji elde etmek için solunuma bağımlı olan memeli hücreleri gibi diğer deneysel modellerde, ROS-yaşlanma korelasyonunu analiz etmek daha zordur.

S. cerevisiae yalnızca gliserol ve etanol gibi baskılayıcı olmayan karbon kaynaklarında büyürken solunum yapabilmektedir. Bu nedenle, maya hücrelerini glikoz veya gliserol içeren ortamlara yerleştirerek, ‘petite’ olarak bilinen solunum eksikliği olan mutant maya hücrelerin sıklığı belirlenebilmektedir (Mannarino ve diğ. 2008). Petiteler, dejeneratif hastalıklarla oldukça ilişkili bir süreç olan mitokondriyal disfonksiyona sahip oldukları için solunum yapamamaktadırlar (López-Otín ve diğ. 2013; Barnham ve diğ. 2004). Öte yandan, *S. cerevisiae* hayatta kalmak için yalnızca solunuma bağımlı olmadığından, mitokondriyal işlev bozukluğuna neden olan mutasyonlar bu model organizmada araştırılabilir (De Carvalho ve diğ. 2017).

Protein yanlış katlanması ve agregasyonu, yaşa bağlı hastalıkların, özellikle nörodejeneratif hastalıkların kilit özellikleri olarak geniş çapta kabul görmektedir (Hartl ve diğ. 2011; Saez ve Vilchez 2014). Son yıllarda tomurcuklanan maya *S. cerevisiae*, yaşa bağlı nörodejenerasyonun temelini oluşturan protein yanlış katlanmasını çözmek için önemli genel bilgiler sağlamıştır (Shrestha ve Megeney 2015). Ayrıca, nörodejenerasyonun maya modelleri, Parkinson hastalığı (Outeiro ve Lindquist 2003), Alzheimer hastalığı (Caine ve diğ. 2007; Vandebroek ve diğ. 2005), Huntington hastalığı (Willingham ve diğ. 2003; Krobitsch ve Lindquist 2000) ve Amyotrofik Lateral Skleroz (Bastow ve diğ. 2016; Johnson ve diğ. 2009) ile ilişkili proteinlerin birikmesini ve sonrasında ortaya çıkan toksisiteyi modüle eden hücresel faktörleri tanımlamıştır.

mtDNA'daki mutasyonlar ve mitokondriyal işlevin bozulması, yaşlanma ve oksidatif stresin kaçınılmaz bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Oksidatif fosforilasyona dahil olan nükleer ve mitokondriyal genlerdeki mutasyonların tümör oluşumunun gelişiminde önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Chandra ve Singh 2011) ve mitokondriyal disfonksiyon, kanser hücrelerinin önemli bir özelliği olarak kabul edilmektedir (Modica-Napolitano ve Singh 2004). Mitokondriyal biyomoleküller, hücre solunumu sırasında üretilen ROS'a doğrudan maruz kaldıkları için mitokondri oksidatif hasara karşı oldukça hassastır. Elektron taşıma zinciri (ETC) sırasında üretilen ROS, mitokondriyal lipidlere (örneğin, lipid peroksidasyonu) zarar verebilir ve bu da zar akışkanlığında ve geçirgenliğinde

değişikliklere yol açabilir, hücrede işlev kaybına ve metabolik yükün artmasına neden olabilecek şekilde proteinleri okside edebilir, mtDNA'ya doğrudan zarar vererek mtDNA tarafından kodlanan oksidatif fosforilasyon bileşenlerinin ekspresyonunda progresif kusurlara yol açabilir. ROS'un mtDNA'ya verdiği hasar, mtDNA'nın replikatif kapasitesini de bozabilir veya mitokondriyal yeniden yapılanma için gerekli olan füzyon ve fisyon olaylarına bile müdahale edebilir. ROS'un kümülatif üretimi, mitokondriyal yapı ve işlevi kademeli olarak tahrip eder; bunun bir sonucu olarak, hücrenin solunum kapasitesi bozulur (Van Remmen ve diğ. 2003). *S. cerevisiae* üzerinde yapılan çalışmalar, mtDNA hasarı ile çekirdekteki genomik kararsızlık arasında nedensel bir ilişki olduğunu göstermiştir (Doudican ve diğ. 2005; Rasmussen ve diğ. 2003). Bu çalışmalar, solunum bozulmasıyla ilişkili ROS'un neden olduğu mitokondriyal oksidatif hasarın, nükleusta genomik kararsızlığa ve doğrudan mutasyonlara yol açabileceğini destekleyen önemli veriler sağlamaktadır.

Oksidatif hasar nedeniyle mitokondriyal fonksiyonun progresif kaybının neden olduğu solunum fonksiyonu bozukluğu ile başa çıkmak için hücre, bozulmuş bir TCA, ETC veya oksidatif fosforilasyon varlığında metabolit ara ürünleri elde etmek amacıyla hücresel metabolizmayı yeniden düzenlemek için adaptif bir yanıt gerçekleştirebilmelidir. Mitokondriyal disfonksiyonu çekirdeğe sinyallendiren ve adaptif bir yanıt sağlanan ilk iyi karakterize edilmiş yolak *S. cerevisiae* üzerinde çalışılmış ve retrograd yolak (RTG) olarak adlandırılmıştır (Da Cunha ve diğ. 2015; Butow ve Avadhani 2004). Temelde, maya proteini Rtg2p, solunum disfonksiyonu ile ilişkili mitokondriden gelen homeostatik sinyallerdeki değişiklikleri algılar, bu da Rtg1-Rtg3p heterodimer kompleksinin çekirdeğe taşınması ve mitokondriyal disfonksiyona yanıt olarak gen ekspresyonunun aktivasyonu ile sonuçlanan bir dizi olayı başlatır. RTG yolağı mayanın kronolojik yaşam ömrünü uzatmada ve nükleer genom stabilitesini desteklemede önemli bir rol oynamaktadır (Hashim ve diğ. 2014; Borghouts ve diğ. 2004). Mayadaki bu yolak oksidatif yanıtta da görev almaktadır. RTG yolağı bozulmuş olan mutant hücreler, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi önemli antioksidan enzimlerde azalma göstererek oksidatif strese karşı daha savunmasız hale gelirler (Da Cunha ve diğ. 2015). Mitokondrilere yönelik ROS hasarı yaşlanmayla birlikte kademeli olarak artar ve sonuç olarak hücrenin solunum fonksiyonu giderek bozulur. Solunum fonksiyonundaki kayıpla başa çıkabilmek için

RTG yolağın aktivasyonu ile geçici bir metabolik yanıtın ekspresyonu tetiklenir. Bu yanıt, mitokontrol noktası (mitocheckpoint) gibi bir yolak tarafından mitokondriyal hasar onarılmaya kadar devam eder (Kulawiec ve diğ. 2009). Eğer mitokondri fonksiyonu geri kazanılırsa, hücre homeostatik metabolik durumuna geri döner. Ancak mitokondri hasarı ciddi ve onarılamaz ise retrograd yanıt kalıcı hale gelir ve bu durum hücrenin metabolik profilinde progresif bir değişime ve mayada genomik kararsızlığa yol açar (Doudican ve diğ. 2005).

Yaşlanmaya katkıda bulunabilecek birçok farklı çevresel stres türü bulunmaktadır. Bunlar arasında redoks stresi, endoplazmik retikulum (ER) stresi, replikasyon stresi, ozmotik stres, tuz stresi, hipertermal stres, beslenme/metabolik stres, pH stresinin yanı sıra metal iyonlarının veya toksik metaloidlerin ve arsenik bileşiklerinin neden olduğu gibi bir dizi toksik stres yer alır (Dawes ve Perrone 2020). Genel stres yanıtları sıkı şekilde birlikte regüle edilir, böylece mayadaki bir stres uyumlu bir genel stres tepkisine yol açar (Lee ve diğ. 2013; Gasch ve diğ. 2000). Protein kinaz A, PKC, TOR ve Hog1p yolakları ve mitokondri ile çekirdek arasındaki sinyalleşmede rol oynayan retrograd yanıt (RTG) yolağı dahil olmak üzere farklı stres yanıt yolakları arasında çapraz düzenleme olduğuna dair kanıtlar bulunmaktadır (Pascual-Ahuir ve diğ. 2019; Jazwinski 2015; Pascual-Ahuir ve Proft 2007; Park ve diğ. 2005) ve farklı streslere karşı hücrel transkripsiyonel tepkileri regüle eden transkripsiyon faktörleri arasında yüksek derecede bağlantı ve çapraz düzenleme vardır (Lee ve diğ. 2013). Transkripsiyon faktörleri arasında stres tepkisi transkripsiyon faktörleri Yap1p ve Msn2p, spesifik metabolik düzenleyiciler Gcn4p (nitrojen), Met4p (sülfür), Aft1p (demir), daha genel metabolik sistemleri kontrol edenler Sfp1p, Rpn4p (protein sentezi ve yıkımı) ve hücrel farklılaşmanın yönlerini kontrol eden Ste12p, Sok2p bulunmaktadır (Dawes ve Perrone 2020).

Tomurcuklanan mayanın incelenmesi, oksidatif stres, yaşlanma ve yaşa bağlı hastalıklar hakkındaki anlayışımıza büyük katkılar sağlamıştır (Kaeberlein 2010). Oksidatif stresin mayanın stasyoner yaşlanmasında rol oynadığı ve bu süreçte meydana gelen hücre ölümlerine katkıda bulunan önemli bir faktör olduğu gösterilmiştir (Zuin ve diğ. 2008; Almeida ve diğ. 2008; Favre ve diğ. 2008; Tahara ve diğ. 2007; Chen ve diğ. 2005; Jakubowski ve diğ. 2000). Hücre içi ROS birikimini artıran bazı koşullar yaşam süresini kısaltırken, hücre içi ROS'u azaltan

koşullar yaşam süresini uzatmaktadır. Öte yandan SOD'ların (süperoksit dismutaz) delesyonu ve oksijen maruziyetinin artmasının maya yaşam süresinin kısalmasına yol açtığı ifade edilmektedir (Unlu ve Koc 2007; Kaeberlein ve diğ. 2005a; Nestelbacher ve diğ. 2000; Barker ve diğ. 1999; Wawryn ve diğ. 1999). Ayrıca, katalazların ve SOD'ların overekspresyonunun çeşitli organizmalarda yaşam süresini uzattığı bilinmektedir (Dai ve diğ. 2009; Schriener ve diğ. 2005; Harris ve diğ. 2003). Yaşam süresi uzayan bazı mutantların oksidatif strese karşı dirençli olduğu da bulunmuştur (Lin ve diğ. 1998). Bununla birlikte, özellikle replikatif yaşam süresi için aksi yönde örnekler de bulunmaktadır (Mesquita ve diğ. 2010). Ayrıca herhangi bir dışsal stres faktörü olmaksızın hem kronolojik hem de replikatif olarak yaşlanmış maya hücrelerinde de hücre içi oksidatif stres ve ROS artışı tespit edilmiştir (Fabrizio ve diğ. 2004; Herker ve diğ. 2004; Laun ve diğ. 2001).

Maya tomurcuklanması sırasında anne hücreler oksidatif stresin neden olduğu hasarlı proteinleri tutmakta ve yavru hücrelerin biyolojik saati sıfıra ayarlanmaktadır (Aguilaniu ve diğ. 2003). Karbonillenmiş proteinlerin ve oksidatif olarak hasar görmüş protein formlarının seviyeleri anne hücrelerde yavru hücrelerden daha yüksek bulunmuştur (Klinger ve diğ. 2010; Aguilaniu ve diğ. 2003). Yaşlanma süresince oksidasyon için hedeflenen proteinlerin hem kronolojik hem de replikatif yaşlanmada benzer olduğu bulunmuştur (Reverter-Branchat ve diğ. 2004). Hem stres direnç proteinlerinin (Hsp60p ve Hsp70p) hem de glukoz metabolizmasında yer alan enzimlerin yaşlı hücrelerde ve yüksek glukoz konsantrasyonunda büyütülen hücrelerde karbonilasyona uğradığı da ifade edilmiştir (Aung-Htut ve diğ. 2012). Bu, oksidatif stresin neden olduğu hasarın yaşlanmanın bir nedeni olabileceği görüşünü desteklemektedir. İşlevsel bir aktin hücre iskeleti okside proteinlerin ve agregatların eşit olmayan dağılımı için önemlidir (Liu ve diğ. 2010; Erjavec ve diğ. 2007; Aguilaniu ve diğ. 2003) ve aktin dinamiklerindeki artış ROS'u azaltmakta ve yaşam süresini uzatmaktadır (Gourlay ve diğ. 2004). Hasarlı proteinlerin sınırlı dağılımına ek olarak, yavru hücreler de hasarla mücadele etmek için gelişmiş katalaz aktivitesi ile donatılmıştır (Erjavec ve Nystrom 2007). Genç hücrelere karşı yaşlı hücrelerin transkripsiyonel analizi de yaşlı hücrelerde metabolizmanın glikolizden glukoneogeneze kaydığını (Lesur ve Campbell 2004; Lin ve diğ. 2001) ve bazı stres ve hasara duyarlı genlerin ifadesinin arttığını göstermektedir (Lesur ve Campbell 2004). Protein karbonillerin ve diğer biyokimyasal hasar belirteçlerinin yaşlı

hücrelerde biriktiğine dair çeşitli gözlemler bulunmasına rağmen, hasarlı proteinlerin yaşlanmanın nedeni olduğuna dair hala yeterli bir kanıt yoktur (Muller ve diğ. 2007). Kronolojik olarak yaşlı hücrelerin, bu hücrelerin replikatif potansiyelini sınırlayabilen ölüm faktörlerini biriktirdiğinin ifade edilmesi de ilgi çekicidir (Piper ve diğ. 2006; Ashrafi ve diğ. 1999).

Daha önce bahsedildiği gibi, mitokondriler ROS'un ana kaynağıdır. Yetersiz/verimsiz solunum veya hatalı mitokondriyal aktivitenin, yaşlı hücrelerde artan ROS üretimine neden olabileceği de öne sürülmüştür (Terman ve diğ. 2003; Ermini 1976). Bununla birlikte, 10 jenerasyondan daha az yaşa sahip maya hücrelerinde yüksek seviyelerde ROS ve karbonillenmiş proteinler tespit edilmiştir (Lam ve diğ. 2011; Aguilaniu ve diğ. 2003). Ayrıca ROS'un, muhtemelen kronolojik yaşlanma sırasında yüksek glukoz metabolitleri tarafından tetiklenen mitokondriyal hasardan sonra ortaya çıktığı da tespit edilmiştir (Breitenbach ve diğ. 2011). Bu nedenle mitokondrinin yaşlanmadaki rolü hala tam olarak açık değildir.

Bir çalışmada solunum zincirinin ortadan kaldırılmasının oksijen toksisitesini de önleyeceği varsayımının yanlış olduğu ortaya çıkarılmıştır. Solunum yetersizliği olan ρ^0 mutanlığı çalışması, oksijen toksisitesine yol açabilecek sitoplazmik oksijen bağımlı reaksiyonlar olduğunu göstermiştir (Rosenfeld ve Beauvoit 2003; Rosenfeld ve diğ. 2002) ve ρ^0 mutantının kronolojik yaşam ömrü yabanil tip (wild type) hücrelerinkinden daha kısadır (Fabrizio ve diğ. 2010). Ancak, ρ^0 mutantlarının replikatif yaşam ömrü, rho-plus yabanil tip hücrelerle karşılaştırıldığında geri dönüş yanıtı (retrograde response) (Jazwinski 2012) veya geri sinyalleşmeye (back-signaling) (Heeren ve diğ. 2009) bağlı olarak daha kısa (Powell ve diğ. 2000; Berger ve Yaffe 1998), eşit (Heeren ve diğ. 2009) veya daha uzun olabilir. Hem replikatif hem de kronolojik yaşlanmayı etkileyen delesyon mutantlarının analizi, her iki yaşlanma biçimi için solunum fonksiyonlarının önemini vurgulamıştır (Laun ve diğ. 2006). Solunum karbon kaynağına önceden adapte olmuş stasyonier faz hücrelerinin, adapte olmamış hücrelere kıyasla glukoz ortamında replikatif kapasitelerini korudukları da gösterilmiştir (Piper ve diğ. 2006).

ROS azaltılmadan yaşam ömrünün uzatılabileceği sonucuna götüren bazı tartışmalı sonuçlar da bulunmaktadır. Bazı maya mutantları intraselüler ROS'ları artmış olmasına rağmen daha uzun yaşamaktadır (Kharade ve diğ. 2005) ve ROS

üretimini inhibisyonu *Drosophila*'da yaşam süresini uzatmamıştır (Miwa ve diğ. 2004). Yapılan bir çalışma ile diyetle antioksidan sağlanmasının kemirgenlerde hücre sağkalımı ve bilişsel performans için faydalı olduğu gösterilmiştir (Floyd 1991). Buna ek olarak, biyolojik antioksidan glutatyonun da mayada yaşlanma sırasında kalori kısıtlamasının faydalı etkilerini sürdürmek için gerekli olduğu bulunmuştur (Mannarino ve diğ. 2008). Ayrıca, α -tokoferol ve koenzim Q10 antioksidanlarına maruz kalmak *S. cerevisiae*'nin replikatif yaşam ömrünü kısaltmaktadır. Bu durumun muhtemel nedeni α -tokoferol muamelesinin lipid peroksidasyonunda bir artışa yol açmasıdır (Lam ve diğ. 2010).

Yukarıdaki bilgilere ek olarak maya hücreleri oksidatif strese doz bağımlı bir şekilde de yanıt verebilmektedir. Hücre ölümü gerçekleşmeyecek seviyedeki düşük dozlarda, hücreler daha sonraki ölümcül olabilecek bir doza ve ayrıca bazı diğer oksidanlara karşı daha dirençli hale gelmek için uyum sağlarlar (Evans ve diğ. 1998; Turton ve diğ. 1997; Flattery-O'Brien ve diğ. 1993; Collinson ve Dawes 1992; Jamieson 1992). Daha yüksek dozlarda, hücreler hücre bölünmesini geciktirir (Alic ve diğ. 2001; Flattery-O'Brien ve Dawes 1998; Nunes ve Siede 1996; Lee ve diğ. 1996) ve antioksidan savunma ve onarım mekanizmalarını harekete geçirir (Dawes 2004; Gasch ve diğ. 2000). Çok yüksek dozlarda ise hücreler apoptozu başlatır (Madeo ve diğ. 2002; Madeo ve diğ. 1997).

ROS'un yaşlanmada birincil belirleyici faktör olup olmadığı hala kesinlik kazanmamıştır. Kısa ömürlü hücrelerin erken ölmesinin hızlanmış yaşlanma nedeniyle mi yoksa yaşlanmayla ilişkili olmayan kusurlar nedeniyle mi olduğu hala bilinmemektedir. Yaşlanma iyi programlanmış bir süreçtir. Ancak bu, yaşlanma programının evrimde pozitif bir şekilde seçildiği ve yaşlanma süreçlerinin türlerin evrim boyunca hayatta kalmasını sağlayan adaptif bir özellik olduğu anlamına gelmemektedir. Mevcut genetik verilere dayanarak, yaşlanma üzerine yapılan sayısız genetik çalışma aracılığıyla "yaşlanmanın genetik programı" olarak algılanan şeyin aslında stres tepkisinin genetik programı olduğu görüşü savunulmaktadır (Aung-Htut ve diğ. 2012). Parkinson ve Alzheimer gibi hastalıklar, yaşlanma sürecinde veya diyet ya da çevre yoluyla ROS birikiminden kaynaklanan erken hasarın bir sonucu olabilir (Campdelacreu 2014; Popa-Wagner ve diğ. 2013). Yaşlanma indüklü oksidatif hasar sonucu hücreler, okside lipitleri, proteinleri ve nükleotidleri

uzaklaştırmak, değiştirmek ve hasarı onarmak için çeşitli mekanizmalara sahiptir, ancak hasar hücrenin kapasitesini aşarsa, erken hücre ölümü kaçınılmaz olur. Bununla birlikte, yaşlanan hücrelerde oksidatif olarak zarar görmüş moleküllerin birikimi ve hücrelerin yaşlanma sürecinde bunlara verdiği yanıtlar, yaşa bağlı hastalıkların anlaşılması açısından faydalı olabilmektedir.

Son olarak hücre yaşlanmasında etkin olduğu düşünülen ROS, birçok organizmada apoptoz ve nekrozun aracıları olarak hareket etmektedir ve maya hücrelerinde programlanmış hücre ölümündeki rolleri kapsamlı bir şekilde incelenmiştir (Farrugia ve Balzan 2012; Carmona-Gutierrez ve diğ. 2010; Perrone ve diğ. 2008). Oksidatif stres, ayrıca mitofajinin regülasyonunda da önemli bir rol oynamaktadır (Deffieu ve diğ. 2009; Okamoto ve diğ. 2009).

2.5 Antioksidan Savunma Sistemleri

Serbest radikallerin neden olduğu hücre hasarı, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, katarakt, bağışıklık sistemi zayıflaması ve beyin fonksiyon bozukluğu gibi yaşlanmaya bağlı dejeneratif hastalıkların başlıca nedenidir (Sies ve diğ. 1992). Serbest radikallerin en az 50 hastalığın patogeneğinde rol oynadığı belirtilmektedir (Halliwell 2007). Serbest radikal oluşumu antioksidan olarak bilinen çeşitli faydalı bileşikler tarafından doğal olarak kontrol edilmektedir. Biyolojik antioksidan, bir substratın oksidasyonunu geciktirebilen veya engelleyebilen herhangi bir bileşiği ifade etmektedir (Godic ve diğ. 2014). "Süpürücüler" olarak da bilinen antioksidanlar, elektron vererek veya alarak radikallerle reaksiyona girmekte ve kendilerini daha az reaktif radikallere dönüştürmektedirler. Bu şekilde oluşan daha az reaktif radikaller, kolaylıkla elimine edilebilmektedir. Antioksidan mevcudiyeti sınırlı hale geldiğinde ise, ROS'un neden olduğu hasar kümülatif ve zayıflatıcı hale gelebilmektedir.

Antioksidanlar, serbest radikalleri hücrelere zarar vermeden önce stabilize etme veya etkisiz hale getirme yeteneğine sahiptir, bu da onları hücresel ve sistemik sağlığın korunmasında son derece kritik hale getirmektedir (Percival 1998). Antioksidanlar, ROS ve diğer ilgili reaktif türlerin neden olduğu hasarı i) ROS

oluşumunun engellenmesi, ii) oluşan ROS'un yok edilmesi ve iii) ROS indüklü hasarın onarılması gibi bilinen üç mekanizma ile önlemektedir.

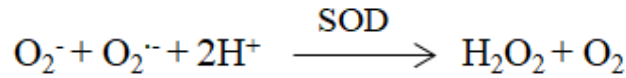
Serbest radikaller ve diğer reaktif oksijen türlerine karşı savunma için çeşitli mekanizmalar bulunmaktadır. Bu savunma sistemleri birbirini tamamlamakta ve farklı reaktif oksijen türlerine ya da hücrel kompartmanlara farklı şekillerde etki etmektedirler (Langseth 1995). İnsanlar, hücrelerini ve organ sistemlerini ROS'a karşı korumak için oldukça sofistike ve karmaşık bir antioksidan koruma sistemi geliştirmişlerdir. Bu sistem, serbest radikalleri nötralize etmek için etkileşimli ve sinerjik olarak işlev gören hem endojen hem de eksojen kaynaklı çeşitli bileşenleri içermektedir. Bu bileşenler; i) besin kaynaklı antioksidanlar: askorbik asit (C vitamini), tokoferoller-tokotrienoller (E vitamini), karotenoidler ve glutatyon ile lipoik asit gibi diğer düşük moleköl ağırlıklı bileşikler ii) antioksidan enzimler: süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz gibi serbest radikal sönmleme reaksiyonlarını katalize eden enzimler iii) metal bağlayıcı proteinler: oksidatif reaksiyonları katalize edebilen, serbest demir ve bakır iyonlarını bağlayarak etkisiz hale getiren ferritin, laktoferrin, albümin ve serüloplazmin gibi proteinler iv) bitkisel kaynaklı antioksidan fitonütrientler: çeşitli bitkisel gıdalarda bulunan çok sayıda antioksidan bileşikler içermektedir (Bisht 2018).

2.5.1 Enzimatik Antioksidan Sistemler

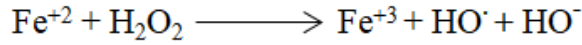
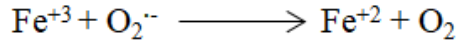
Serbest radikallere karşı korunma, bu radikallerin detoksifikasyonu ile ilgilenen ayrı bir grup altında yer alan antioksidan enzimler tarafından sağlanmaktadır (Jeeva ve diğ. 2015). Enzimatik antioksidan sistem tüm aerobik hücrelerde hayati bir role sahiptir. ROS'u katalitik olarak uzaklaştırma yetenekleri sayesinde hücrelerin ROS'a maruz kalma süresi büyük ölçüde azalmaktadır. GPx (glutatyon peroksidaz), hem peroksidaz, CAT (katalaz) ve SOD (süperoksit dismutazlar) gibi antioksidan enzimler oksidatif toksik ara ürünleri metabolize etmekte ve maksimum katalitik aktivite için selenyum, demir, bakır, çinko ve manganez gibi kofaktörlere ihtiyaç duymaktadır.

2.5.1.1 Süperoksit Dismutaz (SOD)

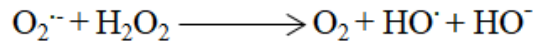
Süperoksit dismutaz (SOD) (EC 1.15.1.1), insan sağlığında önemli bir antioksidan rol oynayan bir grup metaloenzimdir. İnsanlarda sitozolik CuZn (SOD1), mitokondriyal Mn (SOD2) ve ekstrasellüler CuZn (SOD3) olmak üzere üç farklı SOD türü bulunmaktadır (Lei ve diğ. 2016; Johnson ve Giulivi 2005). SOD'lar, reaktif oksijen türlerine (özellikle de süperoksit anyonuna ($O_2^{\cdot-}$)) karşı antioksidan savunmanın ilk ve en önemli hattı olarak gösterilmektedir (Johnson ve Giulivi 2005; Zelko ve diğ. 2002). Reaksiyon, tüm aerobik organizmalarda oksijen metabolizmasının potansiyel olarak tehlikeli bir yan ürünü olarak bilinen $O_2^{\cdot-}$ 'nin enzimin okside formuna (sırasıyla Fe^{+3} , Cu^{+2} ve Mn^{+3}) bağlanması anlamına gelmektedir ve bu da bir proton elde edilmesi ve moleküler oksijenin serbest bırakılmasıyla sonuçlanmaktadır. Daha sonra, ikinci bir $O_2^{\cdot-}$ ve proton, enzimin indirgenmiş formuna (Fe^{+3} , Cu^{+} ve Mn^{+3}) bağlanmaktadır; bu da daha az reaktif bir tür olan H_2O_2 'in serbest kalmasına ve enzimin okside formuna geri dönmesine neden olmaktadır (Vucic ve diğ. 2006; Johnson ve Giulivi 2005). Oluşan peroksit, katalaz (CAT) veya glutatyon peroksidaz (GPX) reaksiyonlarıyla yok edilebilmektedir (Teixeira ve diğ. 1998; Fridovich 1981).



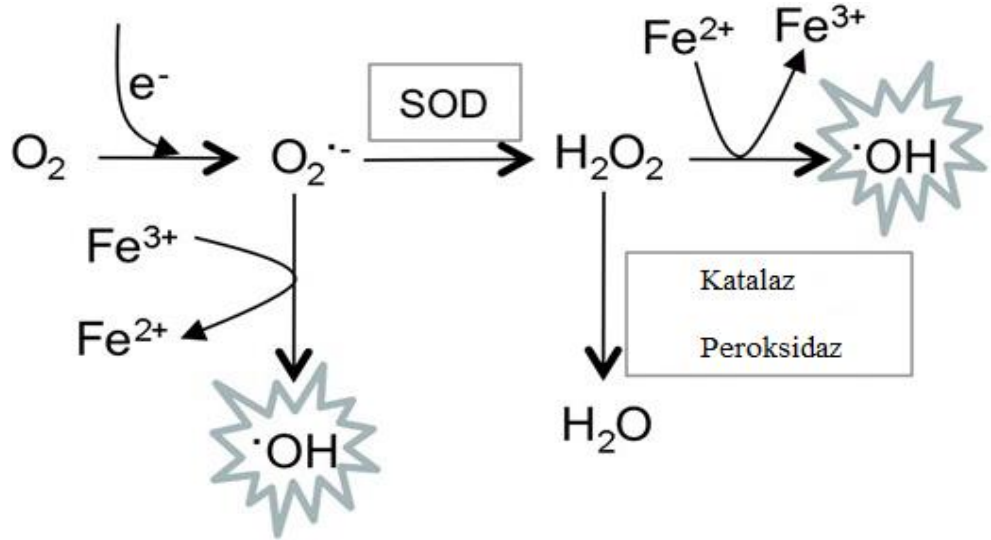
SOD'un ürettiği H_2O_2 , katalaz veya glutatyon peroksidaz gibi enzimler tarafından daha az zararlı ürünlere dönüştürülmediği sürece Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonlarını tetikleyebilmektedir (Şekil 2.19). SOD'un ürünlerinden biri olan H_2O_2 , hücrelerde metal iyonlarının varlığında Fenton reaksiyonuna girebilmektedir. Fenton reaksiyonu, hidrojen peroksitin Fe^{2+} iyonları ile reaksiyona girerek son derece reaktif hidroksil radikalleri ($\cdot OH$) üretmesiyle karakterizedir. Hidroksil radikalleri, DNA, lipitler ve proteinler dahil olmak üzere biyolojik makromoleküllere ciddi zarar verebilmektedir (Abe ve diğ. 2022; Halliwell ve Gutteridge 2015). Haber-Weiss reaksiyonu ise, SOD'un detoksifiye ettiği süperoksit radikallerinin varlığında gerçekleşebilmektedir. Bu reaksiyon, süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) ile hidrojen peroksitin etkileşimi sonucu hidroksil radikali ($\cdot OH$) üretilen bir süreçtir. Bu nedenle, SOD'un etkinliği, Haber-Weiss reaksiyonlarının ve dolayısıyla hidroksil radikali oluşumunun sınırlandırılmasında kritik öneme sahiptir (Dubois-Deruy ve diğ. 2020).



Fenton reaksiyonu



Haber-Weiss reaksiyonu



Şekil 2.19: Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonu ile ROS oluşumu. H_2O_2 , Fenton reaksiyonu ile demir (Fe^{+2}) tarafından indirgenerek oldukça reaktif hidroksil radikalini üretebilir. Haber-Weiss reaksiyonunda, süperoksit demire (Fe^{+3}) bir elektron vererek hidroksil radikali ve Fe^{+2} üretebilir, bu da hidrojen peroksiti daha da azaltabilir. Katalazlar ve peroksidazlar bu tür ROS oluşumunu önlemek için H_2O_2 'yi detoksifiye eder (Morano ve diğ. 2012 tarafından yapılan çalışmadan alınmış ve düzenlenmiştir).

SOD enzimlerinin farklı hücre altı lokalizasyonları vardır ve bu da farklı hücre kompartımanlarında ROS homeostazının sıkı bir şekilde kontrol edilmesi gerektiğini vurgulamaktadır. Bir kompartımanda SOD aktivitesindeki değişiklikler H_2O_2 konsantrasyon gradyanına, H_2O_2 akışının artmasına ve redoksa duyarlı hücre sinyal yolunun aktivasyonuna yol açabilmektedir (Holmström ve Finkel 2014). Hücre içinde süperoksit anyonu ($\text{O}_2^{\cdot-}$) çeşitli kaynaklar tarafından üretilmektedir. Örneğin, sitozolde $\text{O}_2^{\cdot-}$; NOX, ksantin oksidaz ve esasen endoplazmik retikulumda bulunan sitokrom p450 monooksijenazlar tarafından üretilmektedir. $\text{O}_2^{\cdot-}$; hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$) ve peroksinitrit (ONOO^-) gibi diğer yüksek reaktif RONS'leri üretmek için sitozole difüze olan H_2O_2 'ye dönüştürülebilmektedir. $\text{O}_2^{\cdot-}$ 'nin SOD'lar tarafından indirgenmesi diğer reaktif türlerin üretimini engelleyerek oksidatif stresi önlemektedir; ancak, H_2O_2 akışı azaltılarak redoksa duyarlı hücre sinyal yollarının kapanmasına neden olabilmektedir. Bu nedenle, SOD regülasyonu, hücresel hasar ile

hücreyel sinyel iletimi arasındaki bu ikili rolde RONS kontrolü açısından kritik öneme sahiptir (Aranda-Rivera ve diğ. 2022).

SOD'ların her üç formu da işlevleri için gerekli olan belirli metalleri içermektedir. SOD1 ve SOD3 katalitik merkezlerinde Cu ve Zn iyonları içerirken, SOD2 katalitik merkezlerinde Mn iyonları bulundurmaktadır (Lei ve diğ. 2016). SOD1, ökaryotlarda yaygın olarak eksprese edilen, bol miktarda bulunan bir enzimdir ve memeli hücrelerinin sitoplazmasında, nükleer kompartmanlarında, lizozomlarında ve mitokondriyal kompartmanlarında bulunmaktadır (Zelko ve diğ. 2002). SOD2; mitokondriyal matris içinde, elektron transport zincirinin serbest radikal üretiminin gerçekleştiği bölgede bulunan bir tetramer enzimdir (Flynn ve Melov 2013). Dolayısıyla SOD2, mitokondride bulunan ve solunum yapan hücreleri oksidatif hasardan korumak için gerekli olan temel antioksidan enzimdir (Cramer-Morales ve diğ. 2015). SOD3 ise, bu enzimi ekstrasellüler alanlara yönlendiren bir sinyel peptidi içermektedir. SOD3, belirli hücre tipleri ve dokular ile sınırlı bir dağılıma sahiptir ve bu bölgelerdeki aktivitesi, SOD1 ve SOD2'nin aktivitesini aşabilmektedir (Maksimenko ve Vavaev 2012; Zelko ve diğ. 2002).

Escherichia coli, sitozolik manganez içeren bir SOD kodlayan *sodA* (Touati 1983), sitozolik demir içeren bir SOD kodlayan *sodB* (Sakamoto ve Touati 1984) ve periplazmik bakır ve çinko içeren bir SOD kodlayan *sodC* (Imlay ve Imlay 1996) olmak üzere üç farklı SOD genine sahiptir. Bu enzimler, hücrenin oksidatif strese karşı dayanıklılığını artırmakta ve hücreyel dengeyin korunmasına yardımcı olmaktadır. Bazı bakteri türleri, örneğin *Bacillus cereus* ve *Streptococcus sanguis*, yalnızca FeSOD içermektedir (Halliwell ve Gutteridge 1999). FeSOD'lar bitkilerde de özellikle kloroplastlarda bulunmaktadır ve protozoalarda yaygındır. *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides gingivalis*, *Streptococcus mutans* ve *Propionibacterium shermanii* gibi bazı anaerobik bakterilerde SOD enzimlerine sahiptir. Nikel içeren farklı bir SOD türü ise, filamentli gram-pozitif bakteri *Streptomyces* türlerinde tespit edilmiştir (Kim ve diğ. 1996). Bu durum, SOD çeşitliliğinin ve organizmaların oksidatif strese karşı adaptasyon stratejilerinin geniş bir yelpazede olduğunu göstermektedir.

Mayalar ise, sitozolik bir CuZn-SOD (Sod1) ve mitokondriyal matriste bulunan bir Mn-SOD (Sod2) içermektedir. Bu enzimler oksidatif stres koşulları

sırasında farklı roller oynamaktadır (Culotta ve diğ. 2006). SOD1 geni tarafından kodlanan bakır ve çinko içeren bir süperoksit dismutaz (CuZnSOD), toplam SOD 1 aktivitesinin %90'ını (Sturtz ve diğ. 2001) ve fermantasyon ve solunum sırasında hücredeki çözünür proteinin yaklaşık %1'ini oluşturmaktadır (Park ve diğ. 1998; Scandalios 1997). CuZn-SOD'un öncelikle sitozolde bulunduğu düşünülmekle birlikte bir kısmının farklı maya türlerinin (Sturtz ve diğ. 2001) yanı sıra yüksek ökaryotik hücrelerin (Okado-Matsumoto ve Fridovich 2001) mitokondriyal intermembran boşluğunda bulunduğu da tespit edilmiştir. CuZn-SOD mitokondriyal ve sitozolik bileşenleri oksidasyondan korumakta ve solunum yapan mayanın uzun süre hayatta kalmasını sağlamaktadır (Sturtz ve diğ. 2001). Sitozolik SOD defekti, ısı şoku sonrası hücre içi oksidasyonun artmasına (Pereira ve diğ. 2003) ve stasyoner fazda hızlı ölüme yol açmaktadır (Longo ve diğ. 1996). SOD'ların önemi, SOD1 ve SOD2'de mutasyon taşıyan *S. cerevisiae* suşlarının oksijene karşı aşırı duyarlılığı ile gösterilmiştir. Her iki SOD'un eksikliği, çok sayıda mutasyon ile birlikte yavaş aerobik büyümeye ve redoks döngüsü ilaçlarına karşı özel bir duyarlılığa neden olmaktadır (Longo ve diğ. 1996; Gralla ve Valentine 1991). SOD1 geni silinen hücreler, paraquat gibi süperoksit üreten ajanlara karşı aşırı hassasiyet göstermektedir ve vakuol hasarı ile serbest demir konsantrasyonlarının artışı gibi oksidatif stresle ilişkili bir dizi fenotip sergilemektedir (Culotta 2001). Ayrıca, sod1 mutantlarında [4Fe-4S] küme enzimlerinin aerobik inaktivasyonu sonucu, bu mutantlar metiyonin ve lösin için oksotrofi göstermektedir (Wallace ve diğ. 2004; Slekar ve diğ. 1996). Sod1 ağırlıklı olarak sitozolik bir enzim olsa da mitokondri iç membran boşluğuna da lokalize olur ve burada solunum sırasında üretilen süperoksitin detoksifikasyonunda görev aldığı düşünülmektedir (Sturtz ve diğ. 2001). SOD2 silinmiş mutantlar, sod1 mutantlarına kıyasla büyüme ve stres duyarlılığından daha az etkilenmektedir, ancak solunum koşullarında büyüme kabiliyetinde azalma göstermektedir (Van Loon ve diğ. 1986). Sod2 özellikle stasyoner faz büyümesi sırasında gereklidir, bu da mitokondriyal solunumdan kaynaklanan süperoksit üretimiyle ilişkili olabilir (Longo ve diğ. 1996). SOD2 silinmiş hücreler, mitokondriyal elektron transport zincirini bozan mutasyonlar sonucunda hiperoksi koşullarında büyüebilmektedir; bu durum maya hücrelerinde solunumun ROS üretimindeki rolünü doğrular niteliktedir (Guidot ve diğ. 1993). Benzer şekilde, uzun süreli stasyoner faz inkübasyonu sırasında sod1sod2 mutantlarının canlılığı benzer mutasyonlar ile geri kazanılabilmektedir ve bu da mitokondriyal elektron transport

zincirinin mayadaki ana ROS kaynağı olduğunu göstermesi açısından önemlidir (Longo ve diğ. 1996).

Yüksek stabilitesi ile bilinen memeli CuZnSOD; ısı, proteoliz ve denatüre edici ajanlara (sodyum dodesil sülfat, guanidinyum klorür, üre gibi) karşı direnç göstermekte ve geniş bir pH aralığında inhibe olmamaktadır. Memeli CuZnSOD'un aksine, bakteriyel enzim proteazlara karşı son derece hassastır (Imlay ve Imlay 1996). Bu enzim, siyanid, dietilditiyokarbamat, azid ve H₂O₂ gibi maddeler tarafından inhibe edilmektedir. Ekstraselüler SOD ise yüksek stabiliteye sahiptir ve yüksek sıcaklıklara, ekstrem pH değerlerine, yüksek üre konsantrasyonlarına karşı önemli ölçüde direnç göstermektedir (Tibell ve diğ. 1996). CuZnSOD'a benzer şekilde siyanid, dietilditiyokarbamat, azid ve H₂O₂ tarafından inhibe edilmektedir (Marklund 1984). MnSOD ve FeSOD'lar kimyasal maddelere karşı daha düşük stabiliteleriyle bilinmektedirler. CuZnSOD ile karşılaştırıldığında, MnSOD ısıya ve deterjanlara karşı daha hassastır ancak siyanür, dietilditiokarbamat veya H₂O₂ tarafından inhibisyona uğramamaktadır. MnSOD'un aksine FeSOD ise, H₂O₂ tarafından inhibe edilebilmektedir.

SOD'ların işlev bozuklukları, birçok hastalığın gelişimiyle ilişkilidir. Amiyotrofik Lateral Skleroz (ALS), motor nöronların sürekli ölümü ile karakterize edilen ve hızlı kas kaybı ile felce neden olan ölümcül bir hastalıktır. ALS hastalarında SOD1 geninde 90'dan fazla mutasyon tanımlanmıştır (DiDonato ve diğ. 2003). Çeşitli araştırmalar, Ailesel Amiyotrofik Lateral Skleroz (FALS) vakalarının yaklaşık %20'sinin CuZnSOD'da meydana gelen 100'e yakın nokta mutasyonu ile ilişkili olduğunu ve bu mutasyonların motor nöronların ölümüne yol açtığını ortaya koymuştur (Naini ve diğ. 2002; Julien 2001; Rowland ve Shneider 2001; Cudkowicz ve diğ. 1997). Bir diğer çalışmada ise, serbest radikallerin şizofreninin patofizyolojisinde rol oynayabileceği bildirilmiştir (Reddy ve Yao 1996; Lohr 1991). Süperoksit radikallerinin detoksifikasyonu ve hücrel oksidatif stresin azaltılmasında kilit bir enzim olan SOD düzeylerinin, antipsikotik tedavi gören kronik şizofreni hastalarında yüksek, ancak antipsikotik tedavi görmemiş ilk epizod şizofreni hastalarında düşük olduğu rapor edilmiştir (Zhang ve diğ. 2001; Mukherjee ve diğ. 1996; Reddy ve diğ. 1992). Reaktif oksijen türleri ve nötrofil metabolitlerinin hiperoksik akciğer hasarının gelişiminde rol oynadığı da bilinmektedir. Süperoksit

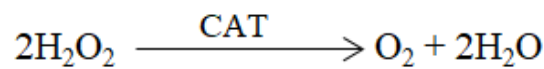
anyonlarını temizleyen SOD enzimi, çeşitli akciğer hasarlarını önlemek için potansiyel bir terapötik araç olarak önerilmiştir (Freeman ve diğ. 1983). Yamamoto ve diğ. (2000), sıçanlarda hiperoksik akciğer hasarının gelişimi üzerinde süperoksit dismutaz veya nötrofil elastaz inhibitörünün ayrı ayrı ve birlikte kullanımının koruyucu etkilerini incelemiştir. Sonuçlar hiperoksik akciğer hasarını önlemede etkili olduklarını göstermiştir. Bir diğer çalışmada ise, SOD aktivitesindeki artışın organizmaların hiperoksik strese adaptasyonu ile da ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (Richier ve diğ. 2003). Reperfüzyon hasarının omurgalıların çoğunda hücre nekrozuna yol açtığı (Saikumar ve diğ. 1998), SOD'ların ise reoksijenasyon hasarını baskıladığı ifade edilmiştir (McCord 1985). Sistemik lupus eritematozus (SLE); artrit, deri döküntüsü, vaskülit ve merkezi sinir sistemi, böbrek ile kardiyopulmoner tutulumu ile karakterize multifaktöriyel otoimmün bir hastalıktır. Kurien ve Scofield (2003) çalışmasında; SLE'de oksidatif hasar, SOD aktivitesi ve SOD'a karşı otoantikorlar incelenmiştir. Yazarlar SOD aktivitesinde azalma tespit etmiş ve SOD'un otoantikorlar tarafından inhibe edilmesinin kısmen bu hastalıkta görülen artmış serbest radikal hasarından sorumlu olduğunu öne sürmüşlerdir. SOD aktivitesinin tümör gelişimi ile ilgili araştırma sonuçları ise oldukça ilginçtir. Dionisi ve diğ. (1975); SOD'un tümör mitokondrisinde bulunmadığını bildirmiştir. Normal dokulara kıyasla tümör hücrelerinin sitozolünde düşük SOD aktivitesine işaret eden birçok rapor da bulunmaktadır. Hepatoma 27 mitokondrisinde (karaciğer mitokondrisine kıyasla) yalnızca mitokondriyal zarlar arası alanda lokalize olan sitoplazmik tip Cu-Zn enzim içeriğinin düşük olmasına bağlı olarak SOD aktivitesinde azalma gözlemlenmiştir (Peskin ve diğ. 1977). Güner ve diğ. (1996) çalışmasında; akciğer karsinomu dokularında bazı antioksidan enzimlerin aktivitesi değerlendirilmiş ve normal akciğer dokuları ile karşılaştırılmıştır. Yazarlar, kontrol akciğer dokularına kıyasla akciğer karsinomu dokularında SOD aktivitesinde önemli bir azalma gözlemlenmiş ve bu fenomeni, DNA ve hücre membranları gibi alt hücresel yapılarda hasara yol açan yüksek reaktif oksijen metabolitleri seviyeleri ile açıklamışlardır. Mondola ve diğ. (2002); CuZnSOD'un insan hepatokarsinom (HepG2) hücrelerinde kolesterol metabolizması üzerindeki etkisini incelemiştir. Sonuçlar, bu enzimin hem HMG-CoA redüktaz aktivitesini hem de protein seviyesini azaltarak kolesterol metabolizmasını etkileyebildiğini göstermiştir. Plymate ve diğ. (2003); insan meme ve prostat epitel hücre hatlarında mac25/insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein-1 (IGFBP-rP1) ekspresyonunun artmasının tümör

büyümesinin baskılanmasıyla sonuçlandığını gözlemlemiştir. SOD2'nin bir tümör baskılayıcı olduğu varsayılmıştır. M12 hücrelerinde SOD2'nin transfeksiyonunun tümör büyümesini, apoptozu, hücre döngüsünde G1 gecikmesini ve senesensle ilişkili betagalaktozidaz ekspresyonunu belirgin şekilde azalttığı ifade edilmiştir. Zhao ve diğ. (2005) ise; MnSOD overekspresyonunun bir deri karsinogenezi fare modelinde tümör insidansını azalttığını göstermiştir. Ancak, MnSOD geninin heterozigot knockout'u yoluyla MnSOD seviyesinin azaltılması, tümör insidansında bir artışa yol açmamıştır. Bunun nedeni, MnSOD'un azaltılmasının hem hücre proliferasyonunu hem de apoptozu artırmasıdır. Bu sonuçlar, kanser müdahalesi için antioksidan bir yaklaşıma yönelik yeni bir strateji ortaya koymaktadır.

SOD temel bir antioksidan enzim olmakla birlikte, bazı raporlar yüksek SOD dozlarının lipid peroksidasyonunu artırdığını, hidroksil radikali ürettiğini ve hücre ölümünü indüklediğini göstermiştir (McCord ve Edeas 2005; Yim ve diğ. 1998; Montagnier ve diğ. 1997). Dolayısıyla, SOD belirli koşullara bağlı olarak antioksidan ve/veya pro-oksidan olarak hareket edebilmektedir.

2.5.1.2 Katalaz (CAT)

Katalaz (EC 1.11.1.6), molekül başına dört ferriprotoporfirin prostetik grubuna sahip dört polipeptid zincirinden oluşan yüksek molekül ağırlıklı tetramerik bir enzimdir (Lubrano ve Balzan 2015). SOD enzim aktivitesinin ürünü olan H₂O₂; CAT, GPx ve diğer peroksidazlar dahil olmak üzere farklı enzimler tarafından parçalanabilmektedir. CAT, H₂O₂ ile reaksiyona girerek onu moleküler oksijen ile suya parçalayabilmektedir ve H₂O₂ indirgenmesinde oldukça etkin bir enzimdir. Çünkü bu enzim H₂O₂ seviyeleri tarafından doyurulamamaktadır (Aebi 1984). Bir katalaz molekülü saniyede bir milyondan fazla H₂O₂ molekülünü hidrolize ettiğinden, oldukça etkili bir enzim olarak kabul edilmektedir (Kaushal ve diğ. 2018; Lubrano ve Balzan 2015).



Katalazlar peroksidatif aktivitelerinin bir sonucu olarak, H₂O₂'nin eşlenik indirgenmesi yoluyla fenoller ve alkol gibi farklı substratların detoksifikasyonunda da işlev görmektedir (Nordberg ve Arnér 2001).



Katalazlar çeşitli aerobik ve anaerobik organizmalarda bulunmakta ve yapı ve işlevlerine göre üç gruba ayrılmaktadır (Kaushal ve diğ. 2018; Glorieux ve Calderon 2017). Birinci ve ikinci gruplar CAT ve CAT peroksidazlar olarak adlandırılan hem içeren enzimlerdir, üçüncü grup ise katalitik merkezlerinde Mn iyonları içermekte ve MnCAT olarak adlandırılmaktadır (Glorieux ve Calderon 2017). CAT-peroksidazların moleküler ağırlıkları 120 ile 340 kDa arasında değişmekle birlikte hem homodimer hem de homotetramer formları rapor edilmiştir. Pseudokatalaz olarak da adlandırılan MnCAT moleküler ağırlıkları yaklaşık 170 ila 210 kDa arasında olup, homopentamerler ve homoheksamerler gibi alışılmadık oligomerik yapılar oluşturabilmektedirler (Zámocký ve Koller 1999).

S. cerevisiae, CTA1 tarafından kodlanan peroksizomal katalaz A ve CTT1 tarafından kodlanan sitozolik katalaz T olmak üzere hem protein katalazın iki izoformunu içermektedir. Bu iki katalaz izoformu, ter-butyl hidroperoksit gibi daha büyük hidroperoksitlerle reaksiyona girme yeteneğine sahip değildir (Ruis 1992). CTA1 ekspresyonu, peroksizomal yağ asidi metabolizması ile koordine olarak düzenlenmektedir ve bu durum, Cta1'in yağ asidi β-oksidasyonundan üretilen H₂O₂'nin detoksifikasyonunda rol oynayabileceğini düşündürmektedir (Hiltunen ve diğ. 2003). Sitozolik katalaz T'nin fizyolojik rolü ise pek bilinmemektedir. Ctt1 ekspresyonu; ısı, ozmotik stres, açlık ve hidrojen peroksit stresi dahil olmak üzere çeşitli stres koşulları tarafından indüklendiğinden, oksidatif strese maruz kalma sırasında daha genel bir antioksidan olarak rol oynadığı düşünülmektedir (Martinez-Pastor ve diğ. 1996). Izawa ve diğ. (1996) tarafından yapılan çalışmada ise şaşırtıcı bir şekilde, her iki katalazdan yoksun maya mutantlarının, ekspanansiyal büyüme fazında hidrojen peroksit karşı toleransının değişmediği ve katalazın maya hücreleri için normal koşullarda hayati olmadığı ifade edilmiştir. Bu durum, maya hücrelerinde hidrojen peroksitin detoksifikasyonu için katalaz dışında başka savunma mekanizmalarının da devrede olduğunu veya daha baskın rol oynayabileceğini

göstermektedir. Bir diğer çalışmada, katalazların kaybı sonucu glutatyon mutantlarının peroksite olan ilgisinin arttığı ve glutatyon sisteminin katalaz mutantlarında hidrojen peroksite karşı oldukça duyarlı hale geldiği belirtilmiştir (Grant ve diğ. 1998). Hücrelerdeki antioksidan savunma sistemlerinin birden fazla mekanizmayı içermesi ve bu yedekliliğin (birden fazla savunma mekanizmasının aynı işlevi görebilmesi), H_2O_2 toleransında katalazların rolünün neden önemsiz görüldüğünü açıklayabilmektedir. Bununla birlikte, katalazların düşük dozlarda H_2O_2 ile yapılan ön muamele sonrasında adaptasyon sürecinde ve hücrelerin stasyonere faza geçişi sırasında peroksite direnç kazanılmasında kritik bir rol oynadığı ifade edilmektedir (Izawa ve diğ. 1996). Patojen maya katalazları üzerine yapılan çalışmalar, bu moleküllerin in vivo işlevlerini net bir şekilde ortaya koymamaktadır. *Cryptococcus neoformans*, alveolar makrofajlar içinde hayatta kalabilen fırsatçı bir mayadır. Bu organizmanın genomu, dört katalaz kodlayan gen içermektedir ve bunlardan CAT2 ve CAT4, sırasıyla *S. cerevisiae*'daki CTA1 ve CTT1 genlerinin ortologlarıdır (Giles ve diğ. 2006). Ancak, hem tekil hem de çoklu cat mutantlarının, vahşi tip hücrelere kıyasla oksidantlara karşı aşırı duyarlılık göstermediği veya bir fare kriptokokkozis modelinde virülanslarının azalmadığı gözlemlenmiştir (Giles ve diğ. 2006). Diploid *Candida albicans* genomunda görünüme göre tek bir katalaz geni (CAT1) bulunmaktadır; ancak bu genin her iki allelinin de elimine edilmesi, fare modelinde mantar enfeksiyonunun katalaza bağlı virülansını azaltmamaktadır (Nakagawa ve diğ. 2003). Bununla birlikte, CAT1 ekspresyonunun oksidatif stres altında in vitro olarak (Enjalbert ve diğ. 2003) ve ayrıca ex vivo modelde nötrofiller tarafından fagositoz sonrasında indüklendiği rapor edilmiştir (Enjalbert ve diğ. 2007).

Katalaz eksikliği, işlev bozukluğu veya gen mutasyonları; şizofreni, Alzheimer ve Parkinson hastalıkları, bipolar bozukluk, diyabet, hipertansiyon, anemi, vitiligo ve kanser gibi dejeneratif hastalıkların patogeneğinde rol oynamaktadır. Ayrıca, oksidatif stres; mutagenizasyon, inflamasyon ve apoptoz ile ilişkilendirildiğinden, katalaz bu süreçlerin önlenmesinde kritik bir enzim olarak kabul edilmektedir (Nandi ve diğ. 2019; Góth ve diğ. 2004). Mitokondriyal katalazın overeksprese edildiği farelerde arterioskleroz (Yang ve diğ. 2004) ve katarakt (Özmen ve diğ. 2002) prevalansının azaldığı ifade edilmiştir. Ek olarak, mitokondriyal DNA anormallikleri ve 8-hidroksideoksiguanozin gibi oksidatif stres biyobelirteçlerinde de belirgin

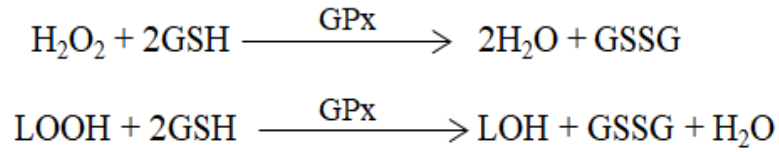
azalmalar gözlenmiştir (Schriner ve Linford 2006). Lei ve diğ. (2016) tarafından yapılan çalışmada ise; katalaz overekspresyonunun kardiyovasküler işlev bozukluklarına ve yaralanmalara karşı koruma sağladığı bildirilmiştir. Wu ve diğ. (2007) çalışmasında ise, overeksprese katalazın paraquat indüklü kardiyak disfonksiyon ve protein hasarı gibi yaşlanma belirtilerini hafiflettiği ifade edilmiştir. Ayrıca, farelerde katalaz overekspresyonunun, angiotensin yolunu restore ederek diyabetle ilişkili böbrek hasarının yavaşlatılmasında rol oynadığı belirtilmiştir (Shi ve diğ. 2013; Liu ve diğ. 2007). Vücutta katalaz enzimi eksikliği veya işlev bozukluğu ile karakterize nadir bir metabolik hastalık olan akatalazeminin, bireyleri diyabete yatkın hale getirdiği ve diyabet başlangıç yaşını düşürdüğü de bildirilmiştir (Goth ve Eaton 2000). Katalazın iyi bilinen antioksidan rolüne rağmen, UVB ışınımı altında ROS üretimini indüklediğinin belirtilmesi ise ilgi çekicidir (Heck ve diğ. 2003).

Siyanür, azid, sodyum dodesil sülfat, 2-merkaptetan, 3-aminotriazol, azo boyalar, krizoidin, fenilhidrazin, nitrit, bifendat gibi kimyasallar ve flavonoidler gibi bilinen bazı antioksidanların katalazı inhibe ettiği çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (Tehrani ve Moosavi-Movahedi 2018; Krych-Madej ve Gebicka 2017; Krych ve diğ. 2014; Krych ve Gebicka 2013; Wang ve diğ. 2013; Yang ve diğ. 2013; De Montellano ve Kerr 1983). Bazı çalışmalarda, çeşitli efektörler tarafından indüklenen konformasyonel değişikliklerin, substratın katalaz hem katalitik merkezine daha kolay erişimini sağlayarak enzimin aktivasyonunu destekleyebileceği öne sürülmüştür. Bu aktivatörler arasında sodyum n-dodesil sülfat (Jones ve diğ. 1987), kurkumin (Najjar ve diğ. 2017a, 2017b), kalsiyum/kalmodulin gibi sinyal yolları (Yang ve Poovaiah 2002) ve pioglitazon gibi ilaçlar (Yekta ve diğ. 2017) yer almaktadır. Aktivasyonun önemi büyüktür, çünkü kanserin olası tedavilerinin birçoğu, NF- κ B gibi çeşitli yollar aracılığıyla katalazın aktive edilmesine dayanmaktadır (Zhang ve diğ. 2016).

2.5.1.3 Glutasyon Peroksidaz (GPx/GSHPx)

83 ile 95 kDa arasında moleküler ağırlığa sahip, 22–23 kDa'lık eşdeğer alt birimlerin oluşturduğu bir tetramerden meydana gelen ve oksidatif stresle

mücadelede önemli rol oynayan GPx enzimi (EC 1.11.1.19), indirgenmiş glutatyonun (GSH) oksidasyonu yoluyla hidrojen peroksitin (H_2O_2) suya ve hidroperoksitlerin karşılık gelen alkollere indirgenmesini katalize etmektedir (Lubos ve diğ. 2011; Margis ve diğ. 2008). Tüm GPx enzimleri selenosistein içermemekte, ancak hepsi aktif bölgesinde indirgenmiş glutatyonu (GSH) kofaktör olarak kullanmaktadır. GSH, düşük moleküler ağırlıklı, tiyol içeren bir tripeptit olup, GPx'in substratıdır. GSH, genellikle hayvanlar, bitkiler ve birçok aerobik bakteride milimolar düzeylerde bulunurken, anaerobik bakterilerde nadiren bulunmaktadır. Reaksiyon, iki GSH molekülü arasında bir disülfid köprüsünün oluşumunu içermekte ve bu, okside bir GSH versiyonu olan GSH disülfidi oluşturmaktadır (Couto ve diğ. 2016; Margis ve diğ. 2008). GSH molekülü ROS'tan bir elektron aldığı anda özellikle tiyollere karşı reaktif hale gelmektedir. Hücrelerde en bol bulunan tiyoller genellikle diğer GSH molekülleridir ve böylece dimer oluşumu gerçekleşmektedir. Ayrıca, okside GSH'ın tekrar indirgenmiş formuna geri dönüşümü, FAD ve NADPH'ın katılımını gerektiren glutatyon redüktaz (GR) enzimi tarafından katalize edilmektedir (Couto ve diğ. 2016).



İnsanlarda, GPx1-GPx8 olmak üzere sekiz memeli GPx enzimi bulunmaktadır. Bunların çoğu, farklı hücre tiplerinde ifade edilen selenoproteinlerdir. GPx, sitozolde (GPx1), gastrointestinal sistemde (GPx2), membranlarda (GPx4), mitokondri ve ekstraselüler alanda (GPx3) bulunmaktadır (Flohé ve Brigelius-Flohé 2011). GPx5, GPx7 ve GPx8'de ise aktif bölgedeki selenosistein (Sec) kalıntısı, sistein (Cys) ile yer değiştirilmiştir. GPx-4, GPx-7 ve GPx-8 monomerik iken, diğerleri tetrameriktir. GPx, lipid hidroperoksitlerin ve diğer çözünebilir hidroperoksitlerin membran lipidlerinden salındıktan sonra indirgenmesi için gereklidir. Bu nedenle, GPx4 aktivitesi, lipid peroksil radikalleriyle ilişkili aldehitler/ketonlar (örneğin 4-HNE ve MDA) üreten, yüksek reaktif ROS'lar olan ve DNA hasarına yol açarak DNA adüktleri oluşturan lipidlerin indirgenmesinde anahtar bir enzimdir (Valko ve diğ. 2007). GPx4'ün, kanserle ilişkili rolü de vurgulanmaktadır. Örneğin, hepatoselüler karsinomda GPx4 ekspresyonu, hasta

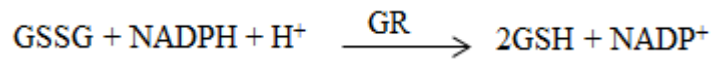
sağkalımı, azalmış hücre proliferasyonu, doku yeniden yapılanması ve immün yanıt ile ilişkilidir. Yazarlar ayrıca, farelerde GPx4 overekspresyonunun hücre proliferasyonunu azalttığını, anjiyogenezi bozduğunu ve IL-8 ile C-reaktif protein seviyelerini düşürdüğünü, bunun da tümör büyümesini engellediğini belirtmişlerdir (Rohr-Udilova ve diğ. 2018). Saunders ve diğ. (2007) tarafından yapılan çalışmada, GPx2 eksikliğinin ROS üretimini artırarak DNA mutasyonlarına yol açtığı ve bunun deri skuamöz hücreli karsinomları ile ilişkilendirildiği, bu sürecin ise onkogenlerin aktive edilmesine veya tümör baskılayıcı genlerin aktivasyonunun kaybolmasına neden olduğu ifade edilmiştir. GPx4'ün, lipid peroksidasyonunun yüksek seviyeleriyle ilişkilendirilen ferroptozu düzenleyip engellediği bilinmekle birlikte GPx4 eksikliğinin ferroptozu tetiklediği ve beyin hücrelerinin ölümüne yol açarak nörodejeneratif hastalıkların gelişmesine sebep olduğu da belirtilmektedir (Zhou ve diğ. 2022).

Memeli hücreleri, membran fosfolipid hidroperoksitlerini indirgeyebilen fosfolipid hidroperoksit Gpx'leri (PHGpx) içermektedir (Roveri ve diğ. 1994). Maya hücrelerinde ise klasik Gpx'ler bulunmamakla birlikte GPX1-3 genleri tarafından kodlanan üç PHGpx ekspresyonu mevcuttur (Avery ve Avery 2001; Inoue ve diğ. 1999b). Bu PHGpx enzimleri, fosfolipid hidroperoksitlerin yanı sıra fosfolipid olmayan hidroperoksitlerle de etkileşime girmekte ve membran lipidlerini peroksidasyona karşı koruyabilmektedir. PHGpx enzimlerinden yoksun maya mutantları, fosfolipid hidroperoksitler de dahil olmak üzere hidroperoksitlere karşı oldukça duyarlıdır ve bu duyarlılığın büyük ölçüde Gpx3'ün aktivitesine bağlı olduğu görülmektedir (Avery ve diğ. 2004; Avery ve Avery 2001). Bununla birlikte, Gpx3'ün oksidan toleransındaki rolü karmaşıktır, çünkü bu enzim ayrıca bir peroksit sensörü ve Yap1 aktivatörü olarak da işlev görmektedir (Delaunay ve diğ. 2002). Gpx1 geninin glikoz açlığı ile, Gpx2 geninin ise oksidatif stresle indüklendiği; buna karşılık, Gpx3'ün temel düzeyde ifade edildiği de bilinmektedir (Inoue ve diğ. 1999). Ek olarak bazı çalışmalarda, maya PHGpx'lerinin, katalitik döngülerinin bir parçası olarak intramoleküler bir disülfid bağı oluşturduğu ve bu bağı tiyoredoksin tarafından kesildiği göz önüne alındığında, atipik 2-Cys peroksiredoksinler olarak sınıflandırılmasının daha doğru olduğunu ortaya koymuştur (Ohdate ve diğ. 2010; Tanaka ve diğ. 2005; Delaunay ve diğ. 2002). Maya GPx aktivitesinin hem H₂O₂'e hem de organik hidroperoksitlere karşı etkili olduğu bilinmektedir. Bu aktivitelerin

her ikisinin de, anaerobik büyüme koşullarından aerobik büyüme koşullarına geçişle birlikte indüklenebilmesi dikkat çekicidir (Galiazzo ve diğ. 1987). Ayrıca, yüksek kopya sayısına sahip bir vektörde taşındığında, ter-bütil hidroperoksite ve H₂O₂'ye karşı direnci artıran ve GSH bağımlı peroksidaz aktivitesini yükselten bir gen (*OSR1*) izole edilmiştir (Inoue ve diğ. 1993). İlginç bir şekilde, *osr1* null mutasyonu, hücrel GSH seviyelerinin düşmesine neden olmuş ve bu proteinin GSH biyosentezini düzenleyebileceği olasılığını gündeme getirmiştir (Kobayashi ve diğ. 1996).

2.5.1.4 Glutasyon Redüktaz (GR)

Redoks homeostazı için glutasyon kullanan organizmalar, indirgenmiş glutasyonu sentezleyebilme yeteneğine sahip olmakla birlikte, aynı zamanda glutasyonu geri dönüştürme kapasiteleriyle de karakterizedirler. GSH, ROS ile reaksiyona girip oksitlenerek GSSG'ye dönüştüğünde, hücrel mekanizmalar bu okside formu indirgemekte ve GSH'ı yeniden oluşturmaktadır. Sağlıklı hücrelerde hücre içi redoks dengesini korumak için GSH/GSSG oranının yüksek olması gerekmektedir (Pastore ve diğ. 2003). NADPH bağımlı oksidoredüktaz ailesine ait olan Glutasyon redüktaz (GR) (EC 1.8.1.7), GSH'ın geri dönüşümünden sorumlu temel bir enzimdir ve hücrelerde en bol bulunan antioksidan olan GSH havuzunu indirgenmiş formda etkin bir şekilde koruyarak reaktif oksijen metabolitlerine karşı hücrel savunmada merkezi bir rol üstlenmektedir (Couto ve diğ. 2016; Anjum ve diğ. 2010; Contour-Ansel ve diğ. 2006). GR enzimi, GSSG'nin GSH'a indirgenmesinde FAD kofaktörü kullanmakta ve süreç sonunda iki molekül GSH elde edilmektedir (Lu 2013).



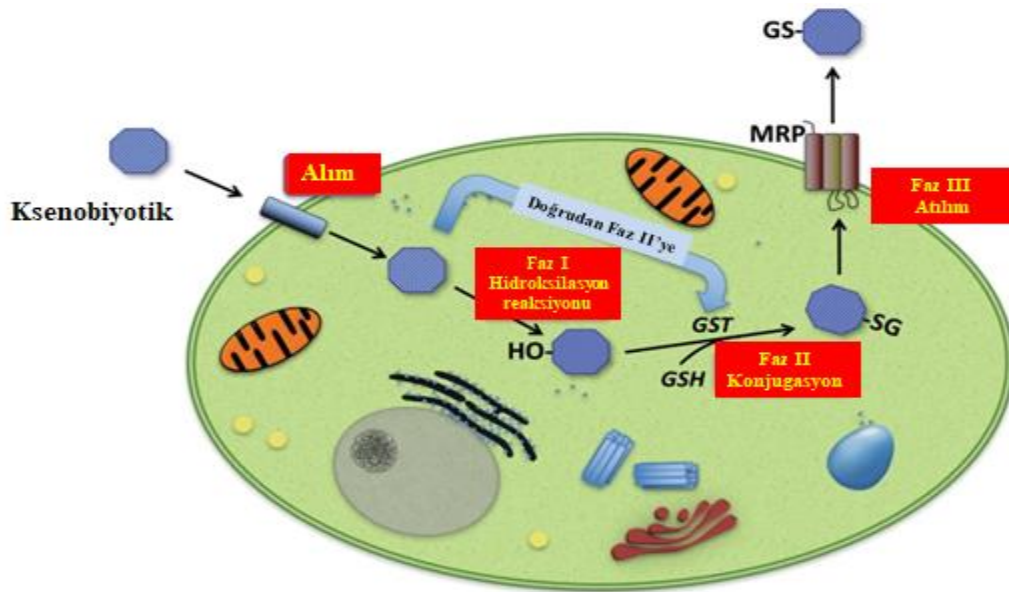
GR enzimi, doğada yüksek derecede korunmuş olup, *E. coli*, *S. cerevisiae* ve *Homo sapiens*'in üç boyutlu yapıları arasında yüksek benzerlik gösterilmiştir (Yu ve Zhou 2007; Mittl ve Schulz 1994; Karplus ve Schulz 1987). GR, reaktif türlerin üretildiği yüksek elektron akışına sahip hücrel bölgelerde birikme eğilimindedir. Prokaryotlarda, sitoplazmaya bakan iç membranla ilişkili periplazmik boşlukta bulunabilmekte ve hücre dışı ortama salınabilmektedir (Oliveira ve diğ. 2015; Couto

ve diğ. 2015). Ökaryotlarda ise, sitoplazma, çekirdek ve mitokondride bulunmaktadır (Ge ve diğ. 2014; Couto ve diğ. 2013; Outten ve Culotta 2004). Enzimin oksidoredüktaz aktivitesine ayrıca endoplazmik retikulumda ve lizozomlarda da rastlanmıştır (Chakravarthi ve diğ. 2006; Chiang ve Maric 2011). Lizozomlarda, okside glutatyonun indirgenmiş forma dönüşümünü gerçekleştiren bir tiyol redüktaz yakın zamanlarda tanımlanmıştır (Chiang ve Maric 2011). Bitkilerde ise GR enzimi, kloroplastlar gibi plastidlerde bulunmuştur (Ge ve diğ. 2014). Mitokondri ve kloroplastlar hücrenin diğer bölümlerinden bağımsız olarak kendi genetik materyallerini taşıyor olmalarına rağmen, bu kompartmanlarda de novo GSH sentezi gerçekleşmemekte ve okside glutatyon (GSSG) genellikle hücre dışına taşınmamaktadır (Ribas ve diğ. 2014; Schaedle ve Bassham 1977). Bu nedenle GR enziminin sitozolden organelere aktif şekilde taşınması gerekmektedir.

Önceki çalışmalar, maya GR'sini kodlayan GLR1 geninin, yüksek bir hücresel GSH/GSSG oranını korumak için gerekli olduğunu göstermiştir (Trotter ve Grant 2003; Muller 1996). *S. cerevisiae* GLR1 geninin enzimin hem mitokondriyal hem de sitozolik formlarını kodladığı ve proteinin bu kompartmanlarda yaklaşık eşit konsantrasyonlarda biriktiği bilinmektedir (Outten ve Culotta 2004). GLR1 geninin bozulması, maya hücrelerinin normal aerobik koşullar altında büyümelerini etkilememekte, ancak onları çeşitli oksidanlara karşı daha duyarlı hale getirmektedir (Grant ve diğ. 1996; Collinson ve Dawes 1995). GLR1 mutantları, vahşi tipten daha yüksek GSSG seviyelerine sahip olmakla birlikte, toplam glutatyon seviyeleri normalden biraz daha yüksektir, bu durum hücrelerin okside glutatyonu uygun bir konsantrasyonda tutabilmek için indirgenmiş glutatyon sentezleyebileceğini göstermektedir. Ayrıca, stasyoner faz büyümesi sırasında üstel faza kıyasla GLR aktivitesinin üç ila dört kat arttığı ve GLR1 geni silinmiş bir maya suşunun, stasyoner fazda H₂O₂'ye karşı artan duyarlılık gösterdiği de ifade edilmektedir (Grant ve diğ. 1996). Bu sonuçlar, hücrenin büyümeyi durdurup stasyoner faza girmesiyle birlikte GSH ihtiyacının arttığını göstermektedir.

2.5.1.5 Glutatyon-S-Transferaz (GST)

GST (EC 2.5.1.18), antibiyotikler gibi ksenobiyotikler ve endojen bileşiklerin metabolizmasıyla ilişkili Faz II biyotransformasyon ailesine ait bir enzimdir. Bu enzimler, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunu gerçekleştirdiği için, ksenobiyotiklerin arındırılmasıyla ilişkilendirilen bir organ olan karaciğerde bol miktarda bulunmaktadır. GST'ler toksik bir hem metaboliti olan bilirubinin taşınması ve detoksifikasyonu da ilişkili olmakla birlikte prostaglandinler ve lökotrienler gibi eikosanoidlerin biyosentezinde de rol oynamaktadır (Aranda-Rivera ve diğ. 2022). GST, sitozolik ve mikrozomal bir enzim olup metabolizmanın ikinci aşamasında görev almaktadır ve toksik elektrofilik bileşiklerin GSH ile konjugasyonundan sorumludur. Böylece hem endojen hem de eksojen reaktif elektrofillere karşı hücresel biyomoleküller korunmaktadır. Bu reaksiyonda GST'ler, GSH'nın SH grubunun, ksenobiyotikler gibi lipofilik bir ikinci substratın elektrofilik merkezine yaptığı nükleofilik saldırıyı katalizlemektedir (Şekil 2.20) (Forman ve diğ. 2009).



Şekil 2.20: Ksenobiyotiklerin enzimatik biyotransformasyonları. Toksik ajanlar, plazma zarından hücre içine girdiklerinde, Faz I metabolizması enzimleri (Sitokrom P450 ailesi üyeleri) tarafından hedeflenir. Bu enzimler, toksik maddelere polar gruplar ekleyerek veya çıkararak, bunları Faz II'ye hazırlar. Faz I ürünleri genellikle yeterince suda çözünür değildir ve metabolize edilmeleri gerekir. Faz II reaksiyonunda, modifiye toksik-hidrofobik yapılar, konjugasyon sonucu elektrofilik bölgelerin nötralize edilmesiyle suda çözünür hale gelir ve daha az toksiktir. Faz III'te, glutatyon konjugatları

daha ileri metabolizasyona uğrar ve transmembran pompalarla hücre dışına atılır (Allocati ve diğ. 2018 tarafından yapılan çalışmadan alınmış ve düzenlenmiştir).

GST'ler sitozol, mitokondri ve mikrozomlarda lokalizedir. Mitokondriyal ve sitozolik GST'ler çözünebilir enzimler iken, mikrozomal GST'ler membranlarla ilişkilidir ve eikosanoid ile GSH metabolizmasında rol oynamaktadırlar (Allocati ve diğ. 2018). GST'ler ayrıca hücre sağkalımı ve apoptoz süreçlerinde mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) sinyal yolu gibi hücre sinyal yollarını düzenlemektedir (Couto ve diğ. 2016). Bu nedenle, GST seviyesindeki azalma sinir sistemi fonksiyonlarını olumsuz etkilemekte ve şizofreni, diyabetik nefropati ve kanser gibi durumlara yol açabilmektedir (Singh ve Reindl 2021; Yan ve diğ. 2020; Tesauro ve diğ. 2015). Kanser bağlamında, GST'lerin detoksifikasyon süreçleriyle ilişkili olduğu ve kanserde overeksprese edilmelerinin kötü bir prognostik gösterge olduğu belirlenmiştir. Bunun nedeni, GST'lerin çoklu ilaç direncini çeşitli mekanizmalarla indüklemesidir. GST'ler, antikanser ilaçların hücrelerden uzaklaştırılmasını hızlandırmaktadır. Bu durum, çoklu ilaç direnci proteini 1 (MRP1) ve ATP-bağlayıcı kaset gibi dışa akış taşıyıcılarının overekspresyonu ile ilişkilidir. Bu taşıyıcıların artışı, antikanser ilaçların hücre dışına taşınmasını artırmaktadır. Sonuç olarak, GST'lerin ve bu taşıyıcı proteinlerin overekspresyonunun, antikanser ilaçların sitotoksik etkisine karşı direnç oluşmasına yol açtığı ifade edilmektedir (Allocati ve diğ. 2018).

Mayalarda GST aktivitesi hakkında oldukça sınırlı bilgiler bulunmaktadır. *S. cerevisiae*'da fonksiyonel GST'leri kodlayan, GTT1 ve GTT2 olarak adlandırılan iki gen tanımlanmıştır (Choi ve diğ. 1998). CDNB (1-kloro-2,4-dinitrobenzen), GST aktivitesini ölçmek için kullanılan model bir substrattır (Collinson ve Grant 2003). GTT1 ve GTT2'yi taşımayan suşlar, normal aerobik koşullarda büyümekte sorun yaşamamaktadırlar. Ayrıca, gtt1 gtt2 mutantı, Gtt1 ve Gtt2'nin CDNB'yi konjugasyon yoluyla detoksifiye etmesi beklenmesine rağmen, CDNB'ye karşı bir duyarlılık göstermemektedir. Bu bulgular, mayalarda CDNB detoksifikasyonu için hem GST bağımlı hem de bağımsız yolların mevcut olduğunu göstermektedir (Collinson ve Grant 2003; Choi ve diğ. 1998). Ayrıca mutant analizi, Grx1 ve Grx2'nin Gtt1 ve Gtt2 ile benzer bir işleve sahip olduğunu doğrulamıştır. Bu durumda, dört genin aynı anda kaybı, hücresel GST aktivitesini önemli ölçüde azaltmış ve ksenobiyotiklere, ısıya ve oksidanlara maruz kalma gibi stres koşullarına

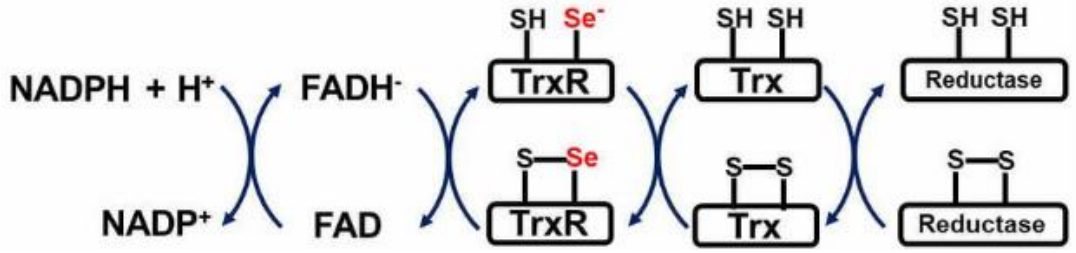
karşı duyarlılığı artırmıştır (Collinson ve Grant 2003; Collinson ve diğ. 2002). *S. cerevisiae* ayrıca GTO1, GTO2 ve GTO3 tarafından kodlanan üç omega sınıfı GST içermektedir (Barreto ve diğ. 2006; Garcerá ve diğ. 2006). Bu enzimler maya transkripsiyon faktörü Yap1 ve STRE yanıt elementleri kontrolünde oksidanlara cevap olarak indüklenmektedir. GTO1-3'den yoksun mutantlar, hidroperoksitlere ve tiyol oksidanlara karşı duyarlılık sergilemekte ve ayrıca gtt mutantlarıyla birlikte, kadmiyuma karşı güçlü duyarlılık göstermektedir (Barreto ve diğ. 2006; Garcerá ve diğ. 2006). Son olarak, azot katabolit baskılama transkripsiyonel düzenleyicisi olan Ure2'nin GST olarak görev yaptığı ve *S. cerevisiae*'yı ağır metal iyonları ve oksidan toksisitesine karşı koruduğu ifade edilmektedir (Rai ve Cooper 2005).

2.5.1.6 Tiyoredoksin Redüktaz (TrxR)

Memeli hücrelerinde tiyoredoksin (Trx), merkezi antioksidan sistemlerden birisidir ve aktif merkezinde ditiyol motifi içeren redoks aktif protein ailesinin korunmuş bir üyesidir. Tiyoredoksin sistem; hücrel redoks dengesinin korunması, oksidatif strese karşı savunma ve hücre içi sinyalleşmenin düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca, DNA sentezi, hücre içindeki proteinlerin indirgenmiş formda tutulması, transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu/inhibisyonu, apoptozun düzenlenmesi ve hücre dışında hem bir sitokin hem de kemokin gibi görev yaparak immunomodulasyonda görev almaktadır (Zhang ve diğ. 2017; Arnér ve Holmgren 2000). Tiyoredoksin sistemin temel bileşenleri; redoks proteini olan tiyoredoksin (Trx), tiyoredoksin redüktaz (TrxR1) ve NADPH'dır (Şekil 2.21) (Holmgren 2010). TrxR enzimi (EC 1.6.4.5), NADPH'a bağımlı olarak tiyoredoksin (Trx) ve diğer birçok fizyolojik açıdan önemli substratın indirgenmesini katalizleyen geniş dağılıma sahip bir flavoenzimdir (Zagrodzki 2002; Williams ve diğ. 2000).

TrxR, oksitlenmiş durumdaki Trx'yi hedef proteinlerini indirgemek suretiyle azaltarak, hücrel redoks ortamını düzenlemektedir. Memeli TrxR'leri, redoks katalitik bölgesinde -Cys-Val-Asn-Val-Gly-Cys- amino asit dizisini içeren selenyum piridin-disülfid oksidoredüktaz enzimleridir. TrxR'nin etki mekanizması, TrxSH₂'nin Trx-S₂'ye oksitlenmesi ve ardından Trx-S₂'nin TrxR flavoproteininin katalitik etkisiyle NADPH aracılığıyla indirgenmesi şeklinde işlemektedir (Aranda-Rivera ve

diğ. 2022). Bu reaksiyon mekanizması, hücre içi redoks dengesinin sağlanmasında TrxR ve TrxR/Trx sisteminin merkezi bir rol oynadığını göstermektedir.



Şekil 2.21: Tiyoredoksin (Trx)/tiyoredoksin redüktaz (TrxR)/nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) sisteminin katalitik redoks döngüsü (Zhang ve diğ. 2020).

TrxR'ler birçok farklı dokuda ve çekirdek de dahil olmak üzere hücrel kompartmanlarda yaygın olarak ifade edilmektedir (Sun ve diğ. 2001; Rozell ve diğ. 1988). Memeli TrxR'ları; sitozolik TrxR1, mitokondriyal TrxR2 ve testis spesifik tiyol düzenleyici TrxR3 olmak üzere üç farklı izoform olarak eksprese edilmektedir ve selenosistein kalıntısı içermektedirler (Uriğ ve Becker 2006). TrxR'nin bakteriyel ve memeli TrxR olmak üzere iki farklı formu bulunmaktadır. TrxR'ler moleküler ağırlıklarına göre, küçük TrxR'ler (yaklaşık 35 kDa) ve büyük TrxR'ler (yaklaşık 55 kDa) olarak sınıflandırılmaktadır (Bauer ve diğ. 2003; Gilberger ve diğ. 1998; Speranza ve diğ. 1973). Her iki grup da piridin nükleotid-disülfid oksidoredüktaz ailesine ait flavoproteinlerdir ve bir FAD prostetik grubuna, bir NADPH bağlanma bölgesine ve redoks-aktif bir disülfid içeren aktif bir bölgeye sahip homodimerler olarak işlev görmektedirler. Ancak, bu iki TrxR tipinin amino asit dizilimleri ve katalitik mekanizmaları birbirinden farklıdır (Williams ve diğ. 2000).

S. cerevisiae, çoğu ökaryot gibi, oksidatif strese karşı koruma sağlayan bir sitoplazmik tiyoredoksin sistemine sahiptir. Bu sistem, iki tiyoredoksin (TRX1 ve TRX2) ve bir tiyoredoksin redüktazdan (TRR1) oluşmaktadır (Gan 1991). Trx1 ve Trx2 delesyonunun, hücre döngüsünü etkileyerek (S fazında uzama, G1 aralığında kısalma) DNA sentez hızını azalttığı, vakuoler inheritansı engellediği, hücre boyutu ve generation süresini artırdığı, hücreleri metiyonin/sistein için oksotrofik hale getirdiği çeşitli çalışmalarda ifade edilmektedir (Pedrajas ve diğ. 1999; Xu ve Wickner 1996; Muller 1995; Muller 1994; Muller 1991). Çoğu organizmada olduğu gibi maya tiyoredoksinleri antioksidan olarak aktif olup ROS tarafından indüklenen

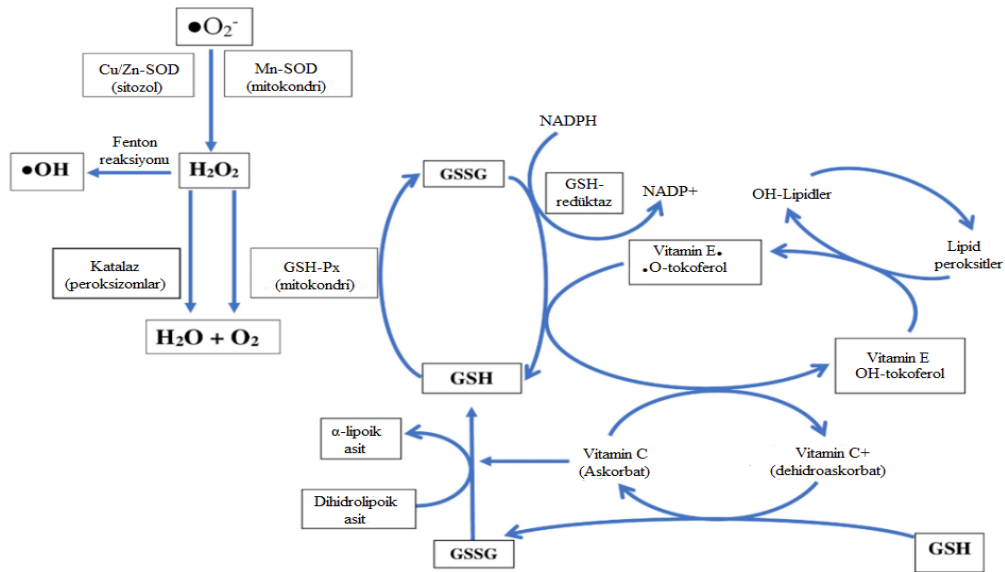
oksidatif strese karşı korumada kritik roller oynamaktadır (Izawa ve diğ. 1999; Kuge ve Jones 1994). Tioredoksinlerin antioksidan işlevlerinin büyük bir kısmı peroksiredoksinler (Prx'ler) aracılığıyla gerçekleşmektedir. Trx2, antioksidan olarak önemli bir rol oynamaktadır. TRX2 genini taşıyan ancak TRX1'den yoksun mutantlar oksidatif strese karşı normal direnç gösterirken, TRX2 eksikliği hidroperoksitlere karşı aşırı duyarlılık oluşturmakta ve bu durum TRX2'nin oksidatif stresle mücadeledeki temel işlevini ortaya koymaktadır (Garrido ve Grant 2002). Sonuç olarak, TRX2 ekspresyonunun oksidatif stres koşullarına yanıt olarak belirgin şekilde arttığı, TRX1'in ise daha çok yardımcı veya yedek bir rol oynayarak, TRX2'nin antioksidan savunma sağlamada yetersiz kaldığı durumlarda devreye girdiği belirtilmektedir (Garrido ve Grant 2002). Maya, bir tioredoksin (Trx3) ve bir tioredoksin redüktaz (TrxR2) içeren tam bir mitokondriyal tioredoksin sistemi de bulundurmaktadır (Pedrajas ve diğ. 1999). Sitoplazmik ve mitokondriyal tioredoksin sistemlerinin redoks durumları birbirinden bağımsız olarak korunmakta ve hücreler her iki sistemin yokluğunda da hayatta kalabilmektedir (Trotter ve Grant 2005). Mayadaki mitokondriyal tioredoksin sistemi, solunum metabolizması sırasında oluşan oksidatif strese karşı korunmada önemli bir rol oynamaktadır. Bununla birlikte, mitokondriyal tioredoksin redüktazın, tioredoksininden bağımsız bir antioksidan rolü olduğu bulunmuştur. Deneysel bulgulara göre, TrxR2 genini taşıyan mutantlar, Trx3 mutantlara kıyasla oksidatif strese daha duyarlı hale gelirken, Trx3 mutantları oksidanlara karşı normal direnç göstermektedir. Bu bulgu, TrxR2'nin tioredoksininden bağımsız olarak oksidatif strese karşı koruma sağladığını göstermektedir (Trotter ve Grant 2005; Pedrajas ve diğ. 2000). Bir diğer çalışmada ise; ağır metal iyonları içeren ortamda Trx ve TrxR gibi proteinlerin yapımının arttığı ve bu proteinlerin *S. cerevisiae* hücresel savunma mekanizmasında esansiyel olduğu bildirilmiştir (Vido ve diğ. 2001).

Son yıllarda, TrxR'nin tümör gelişiminin başlatılmasından büyüme, invazyon ve metastaza kadar olan farklı aşamalarını inhibe ettiği fikrini destekleyen kanıtlar bulunmaktadır (Hellfritsch ve diğ. 2015; Shinozaki ve diğ. 2006; Khan ve Luduen 1991). İlginç bir şekilde, TrxR'nin aşırı aktivasyonu veya disfonksiyonu, kardiyovasküler hastalıklar, nörolojik bozukluklar, tip 2 diyabet, HIV enfeksiyonu ve kanser gibi çeşitli hastalıkların başlangıcı ile de ilişkilidir (Holmgren ve Lu 2010; Arnér 2009; Kondo ve diğ. 2006; Gladyshev ve diğ. 1999). TrxR seviyelerinin ve

aktivitesinin azaltılması, kanser tedavisinde potansiyel bir yaklaşım olarak değerlendirilebilir; zira TrxR overekspresyonu, antikanser tedavilere karşı direnç gelişimiyle ilişkilendirilmektedir (Patwardhan ve diğ. 2022). Bu nedenle, TrxR inhibitörleri oksidatif stresi indükleyerek hücre döngüsünü durdurma ve apoptoza yol açma potansiyeline sahip antitümör etkiler gösterebilir. Trx1 ise yalnızca bir antioksidan olarak değil, aynı zamanda miyokard enfarktüsü sonrası ventriküler yeniden şekillenmeyi engelleyen ve sinyal yollarını diğer küçük moleküllerle etkileşim yoluyla düzenleyen önemli bir hücresel işlev üstlenmektedir (Wande 2020).

2.5.2 Enzimatik Olmayan Antioksidan Sistemler

Enzimatik olmayan antioksidanlar, serbest radikal zincir reaksiyonlarını yakalayıp ve sonlandırarak çalışmaktadır (Şekil 2.22) (Mirończuk-Chodakowska ve diğ. 2018). Bu antioksidanların bazıları suda çözünüp sitozolde veya sitoplazmik matrikste yer alırken, diğerleri yağda çözünüp hücre zarlarında bulunmaktadır (Moussa ve diğ. 2019). Enzimatik olmayan antioksidanlara örnek olarak glutatyon (GSH), ürik asit, bilirubin, koenzim Q, melatonin ve diğerleri verilebilmektedir (Janciauskiene 2020).



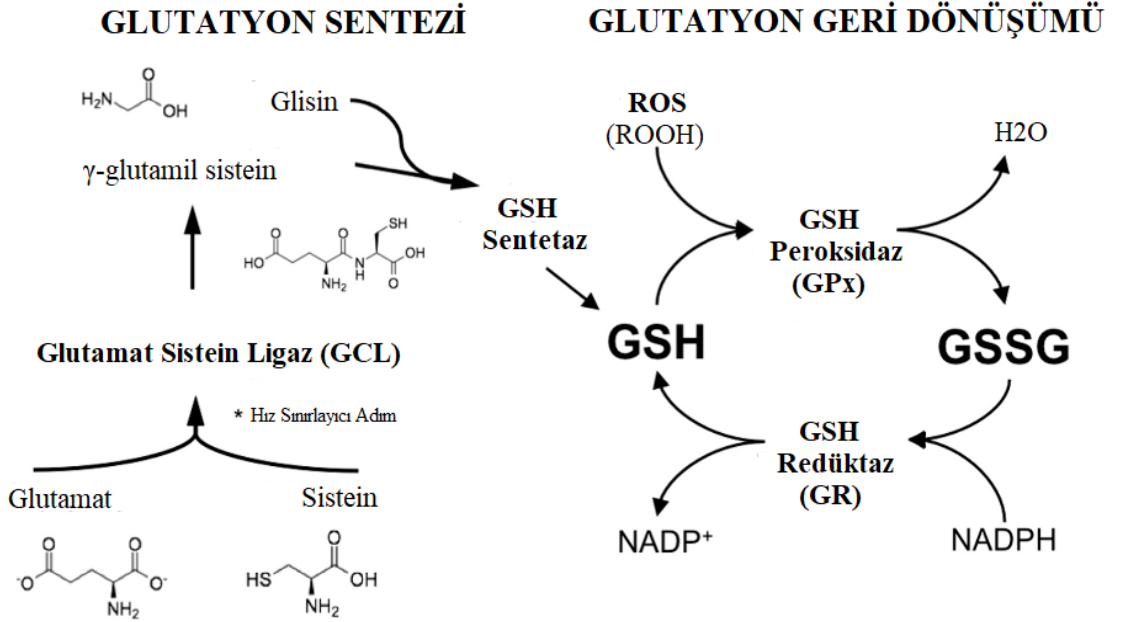
Şekil 2.22: Antioksidan savunma sistemleri. Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan sistemler birbirleriyle uyumlu ve sinerjik şekilde çalışarak hücreleri serbest radikal hasarına karşı korur (Sindhu ve diğ. 2022 tarafından yapılan çalışmadan alınmış ve düzenlenmiştir).

2.5.2.1 İndirgenmiş Glutasyon (GSH)

Glutasyon ilk olarak Hopkins (1925) ile Kendall ve Loewen (1928) tarafından tanımlanan, antioksidan sistemde en bol bulunan hücre içi antioksidanlardan birisidir ve tiyol grupları içermektedir. Moleküldeki iki karboksil ve bir amin grubu, glutasyonun sulu çözeltiler ve polar çözücüler içinde çözünmesini sağlamaktadır. Ayrıca, sistein birimine bağlı olan tiyol grubu, glutasyonun biyolojik aktivitesine katkıda bulunmaktadır. Bu tiyol grubunun sağladığı antioksidan özellik sayesinde glutasyon, hücrel redoks dengesini korumak için önemli bir redoks tamponu olarak işlev görmektedir ve tiyol-disülfid dengesinin korunmasına katkıda bulunmaktadır. Düşük moleküler ağırlıklı çözünebilir antioksidan olan GSH; sistein, glutamik asit ve glisin kalıntılarından oluşan bir tripeptittir ve tüm hücrelerde yaygın olarak bulunmaktadır (Noctor ve diğ. 2011). GSH, farklı dokularda sentezlenmekle birlikte, karaciğerdeki sentezi daha yoğundur (Lu 2013; Forman ve diğ. 2009). Glutasyon, kendisini oluşturan iki ana amino asitten (sistein ve glutamat) sentezlenmektedir ve bu işlem γ -glutamil sistein ligaz (γ -GCL) (diğer adıyla glutamat sistein ligaz) ile glutasyon sentaz (GS) enzimleri tarafından ardışık iki aşamada gerçekleştirilmektedir (Şekil 2.23). Her iki aşamada da ATP tüketilmektedir (Zhao ve diğ. 2011). İlk aşamada, γ -GCL katalizörlüğünde öncül amino asitler olan sistein ve glutamat birleştirilerek bir dipeptid oluşturulmaktadır. Bu işlem sentez için hız sınırlayıcı adım olarak kabul edilmektedir. İkinci aşamada ise bu dipeptid, GS katalizi altında GSH oluşturmak üzere glisin ile birleştirilmektedir (Deneke ve Fanburg 1989). Glutasyon homeostazı, glutasyonun sentezi ve yıkımı arasındaki denge ile sağlanmaktadır. Bu nedenle GSH geri dönüşüm sürecine girererek γ -glutamil transpeptidaz ve dipeptidaz gibi enzimlerin aktivitesiyle parçalanıp tekrar kullanıma hazır hale gelmektedir. γ -glutamil transpeptidaz enzimi, hem ökaryotlarda hem de prokaryotlarda bulunmakla birlikte GSH'ı sistein, glisin ve γ -glutamat olarak ayrıştırmaktadır (Verma ve diğ. 2015).

GSH (glutasyon), indirgenmiş tiyol (GSH) ve oksitlenmiş disülfid (GSSG) olmak üzere iki redoks formunda bulunabilmektedir (Giustarini ve diğ. 2017). Normal koşullarda, indirgenmiş form ağırlıklı olarak toplam glutasyonun %98'inden fazlasını oluşturmaktadır (Ballatori ve diğ. 2009). Glutasyonun her iki formu da sitoplazma ve mitokondriyal membranda yer almaktadır. GSH ve GSSG arasındaki

denge GPx ve GR enzim aktiviteleriyle ilişkilidir. GPx, H_2O_2 veya diğer organik hidroperoksitlerin detoksifikasyonu sırasında GSH'ı GSSG'ye oksitlerken GSSG, GR enzimi ve NADPH varlığında yeniden GSH'a indirgenebilmektedir (Iskusnykh ve diğ. 2022).



Şekil 2.23: Glutasyon sentezi ve geri dönüşümü (Stewart ve diğ. 2022 tarafından yapılan çalışmadan alınmış ve düzenlenmiştir).

Glutasyon (GSH), çeşitli işlevlere sahiptir; ancak bunlar arasında en önemlisi, bir antioksidan olarak görev yapmasıdır. GSH'nin antioksidan işlevi, enzimatik ve enzimatik olmayan reaksiyonlar ile oluşan reaktif oksijen türlerini azaltmaya yöneliktir (Korge ve diğ. 2015). Ayrıca, C ve E vitaminleri gibi diğer antioksidanları rejenere etmekte, oksidatif hasara uğramış biyomoleküllerin onarımına katkıda bulunmakta ve proteinlerin sülfidril gruplarının indirgenmiş durumda kalmasını sağlamaktadır (Tram ve diğ. 2021; Alli ve diğ. 2014; Chatterjee 2013). Bununla birlikte, GSH'ın ROS ile ilgili olmayan başka işlevleri de bulunmaktadır. Örneğin, GST enzimi aracılığıyla GSH'ın ksenobiyotik bileşiklerle konjugasyonu detoksifikasyonu sağlamaktadır (Lushchak 2012). Ek olarak, GSH, prostaglandin ve lökotrien metabolizmasına katılmakta, aminoasitlerin taşınmasında yer almakta ve başta demir ve selenyum olmak üzere mikronutrientlerin bağırsaklardan emilimini desteklemektedir (Layrisse ve diğ. 1984; Christ-Hazelhof ve Nugteren 1979). Ayrıca hücre farklılaşması ve çoğalmasının modülasyonu, apoptoz, enzim aktivasyonu,

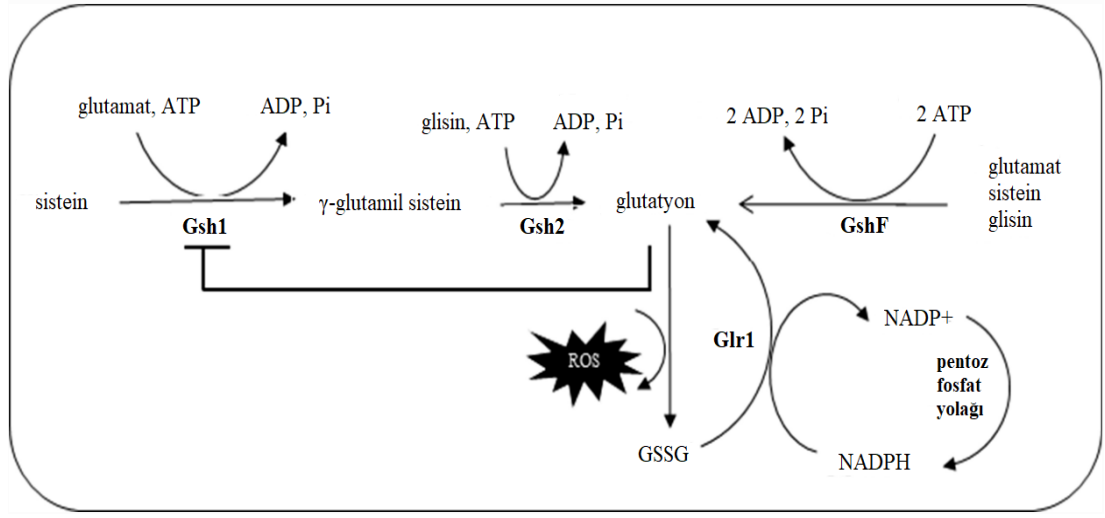
nörotransmisyon ve protein sentezi sırasında sistein kaynağı olarak da işlev görmektedir (Gu ve diğ. 2015; Schafer ve Buettner 2001).

Literatürde GSH'ın; besin takviyeleri, kozmetik, ilaç ve gıda endüstrileri gibi farklı alanlardaki uygulamalarına da vurgu yapılmaktadır (Do ve diğ. 2021; Schmachet ve diğ. 2017). GSH, kimyasal ve biyolojik reaktiflerin pigmentlerini stabilize etmek, çevresel kirlilik belirteci olarak, et ve meyvelerin raf ömrünü uzatmak için bir gıda katkı maddesi olarak ve kapsül formunda bir gıda takviyesi olarak kullanılabilir (Ilyasov ve diğ. 2020; Pellegrini ve diğ. 2020).

Glutasyon eksikliği, hücrel oksijen tüketimini doğrudan veya dolaylı olarak bozarak, hem oksijen taşıma kapasitesini hem de enerji üretimini olumsuz etkilemektedir. İnsanlarda GSH eksikliği; karaciğer sirozu, gastrointestinal ve pankreatik inflamasyon, diyabet, akciğer hastalıkları, nörodejeneratif hastalıklar, yaşlanmaya bağlı rahatsızlıklar, kanser, kistik fibrozis, Alzheimer ve Parkinson gibi çok sayıda hastalıkla ilişkilendirilmektedir (Santos ve diğ. 2022; Goschorska ve diğ. 2019; Farhat ve diğ. 2018; Gaucher ve diğ. 2018; Pompella ve diğ. 2007; Wu ve diğ. 2004).

Mayada glutasyon biyosentezi, Gsh1 ile Gsh2 enzimlerinin katalizlediği ve sistein, glutamat, glisin aminoasitleri ile iki ATP molekülünü içeren iki aşamalı bir süreçtir (Şekil 2.24). Bazı bakterilerde ise bu biyokonversiyon, GshF adı verilen iki işlevli bir enzim tarafından tek aşamalı bir yolla gerçekleştirilmektedir. Bakterilerde ürünün feedback inhibisyonu bulunmazken, maya hücrelerinde GSH, Gsh1 enzim aktivitesini inhibe edebilmekte ve glutasyonun aşırı birikimi engellenmektedir. ROS'un etkisizleştirilmesi süresince, GSH okside olarak GSSG'ye dönüşmektedir. Okside GSSG, glutasyon redüktaz (Glr1) enzimi tarafından NADPH bir kofaktör olarak kullanılarak yeniden GSH'a indirgenmektedir. Aktif şekilde büyüyen hücrelerde, pentoz fosfat yolağı NADPH sağlamaktadır (Raghavendran ve diğ. 2020). Maya GLR1 geni normal aerobik büyüme için gerekli değildir, ancak oksidatif strese maruz kalma sırasında ve açlık koşullarını takiben canlılık için gereklidir (Grant ve diğ. 1996a,b). GSH ökaryotlarda temel bir metabolittir ve GSH biyosentezi eksik olan fareler hızla ölmektedir (Shi ve diğ. 2000). Benzer şekilde maya hücrelerinde de GSH esansiyel bir metabolittir ve normal büyüme koşullarında indirgen olarak gereklidir (Grant ve diğ. 1996c). *S. cerevisiae* vahşi tip

hücrelerindeki GSH konsantrasyonu 1-10 mM aralığında veya daha da yüksek olabilmektedir (Drakulic ve diğ. 2005; Østergaard ve diğ. 2004; Grant ve diğ. 1996).



Şekil 2.24: Mayada glutatyon biyosentezi (Raghavendran ve diğ. 2020 tarafından yapılan çalışmadan alınmış ve düzenlenmiştir).

Mayada GSH1 geni silinmiş mutantlar, eksojen GSH yokluğunda büyüememekte, ancak sınırlı sayıda hücre bölünmesine uğramaktadırlar ve bu süreçte, daha önce biriktirdikleri GSH depolarını kullanmaktadırlar (Lee ve diğ. 2001; Spector ve diğ. 2001). Bu durum, gsh1 mutantlarının eksojen GSH yokluğunda strese duyarlılığını inceleyerek oksidatif stres koşullarında GSH'ın rolünü belirlemeyi amaçlayan çalışmalarda yaygın olarak kullanılmasını sağlamıştır. Elde edilen sonuçlar, GSH1'den yoksun mutantların peroksitler, süperoksit anyonu, lipid hidroperoksitler ve bunların yıkım ürünleri ile ağır metaller gibi oksidanlara genel olarak duyarlı olduğunu göstermiştir (Thorsen ve diğ. 2009; Evans ve diğ. 1998; Turton ve diğ. 1997; Grant ve diğ. 1996c).

Izawa ve diğ. (1995) tarafından yapılan bir başka çalışmada, diğer büyüme evrelerindeki hücrelere kıyasla çeşitli çevresel streslere karşı daha dirençli olduğu bilinen stasyonier faz *S. cerevisiae* S288C hücrelerinin hücre içi GSH içeriğinin, log fazına kıyasla yaklaşık 3 kat daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Öte yandan, Madeo ve diğ. (1999), gsh1 delesyon mutantlarının glutatyon bulunmayan bir ortamda büyütülmesi sonucunda apoptotik hücre ölümünün tetiklendiğini gözlemlemiştir.

Bir diğerk önemli çalışmada, *Saccharomyces cerevisiae* yüksek afiniteli glutatyon taşıyıcısı Hgt1/Opt1'in overekspresyonunun, hücre içi GSH seviyelerini birkaç kat artırdığı ifade edilmiştir. Ancak bu durum, bu suşun parental suşa kıyasla eksojen glutatyon varlığına karşı hassasiyetinin artmasına neden olmuştur. GSH toksisitesi bu suşta GSH birikiminin bir sonucu olarak ortaya çıkmıştır (Srikanth ve diğ. 2005).

Yap1 ve Met4, maya hücrelerinde temel biyolojik süreçlerde yer alan transkripsiyon faktörleridir ve hücrenel metabolizmayı ve gen ekspresyonunu düzenlemede kritik rollere sahiptir. Yap1 ve Met4, sülfür asimilasyon yolları ve ayrıca GSH1 geninin düzenlenmesinden sorumludur. Yap1'in transkripsiyonel aktivitesi, oksidatif strese yanıt olarak hücre içinde belirli lokalizasyonlara taşınmasıyla düzenlenmektedir. Oksidatif stres sırasında Yap1, hücre çekirdeğine taşınmakta ve burada stres yanıtını tetikleyen genlerin ekspresyonunu artırmaktadır. Bu süreç, hücrenin oksidatif hasara karşı savunmasını güçlendiren bir mekanizmadır. Oksidatif stres altında Yap1, intramoleküler bir disülfid bağı oluşturmakta ve *Saccharomyces cerevisiae*'da GSH2 geninin düzenlenmesinde de rol oynamaktadır. Met4 ise sülfür metabolizmasını düzenleyen bir transkripsiyon aktivatörüdür ve özellikle metiyonin ve sistein biyosenteziyle ilişkili genlerin kontrolünde rol oynamaktadır. Böylece Met4, glutatyon biyosentezinde dolaylı olarak görev almaktadır. Özetle, mayada GSH biyosentezi, Yap1 ve/veya Met4'e bağımlı bir mekanizma ile düzenlenmektedir (Kurylenko ve diğ. 2019; Orumets ve diğ. 2012; Suzuki ve diğ. 2011; Wheeler ve diğ. 2003).

Glutatyon biyosentezinin diğerk bir düzenleme mekanizması, substrat düzeyinde reglasyondur. Bu konuda yapılan çalışmalar, özellikle glutatyonun öncül amino asitlerinin maya kültür ortamına eklenmesinin, hücre içi GSH konsantrasyonunun artırılmasına yardımcı olduğunu göstermektedir. Wen ve diğ. (2006), sisteinin glutatyon biyosentezi için temel sınırlayıcı bileşen olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca, Liang ve diğ. (2008) ve Wang ve diğ. (2007) tarafından yapılan araştırmalar, kültür ortamına sistein eklenmesinin hücre içi glutatyon konsantrasyonunu önemli ölçüde artırdığını desteklemektedir.

Son olarak, *S. cerevisiae*'da glutatyon homeostazının, glutatyon degradasyonu ile etkili bir şekilde düzenlendiği gösterilmiştir. Bu kapsamda, -GT (-glutamil transferaz) yolağı ile sisteinilglisin peptidaz içeren DUG yolağının mayalarda

GSH'nin degradasyonundan sorumlu olduğu ifade edilmektedir (Baudouin-Cornu ve diğ. 2012).

2.5.2.2 Vitaminler

Askorbik asidin (vitamin C) L-enantiomeri, insanlar için hayati öneme sahip, suda çözünebilen bir vitamindir. İndirgeme ajanı olarak görev yapan ve doku bütünlüğü, kollajen biyosentezi, nöroproteksiyon, hematopoez, lökosit fonksiyonu gibi önemli biyolojik süreçlerde yer alan vitamin C, ROS'u ortadan kaldırmakta ve serbest radikal temizleyici olarak işlev görmektedir (Njus ve diğ. 2020; Pisoschi ve Pop 2015). İnsanlar C vitaminini endojen olarak sentezleyememekte ve bu nedenle diyet ile alımı gerekmektedir (Carr ve Vissers 2013; Valdés 2006).

Vitamin C, hücrelerin sulu fazında bulunan yaygın bir antioksidandır ve mükemmel elektron verme yeteneği sayesinde serbest radikalleri kararlı hale getirmektedir (Pisoschi ve diğ. 2021; Aziz ve diğ. 2019). Askorbik asit, askorbil radikali ve dehidroaskorbik asit üretmek için bir ve iki elektronlu oksidasyonlara uğramaktadır (Carr ve Vissers 2013). Tek hidrojen atomu donörü olarak görev yapan askorbik asit bu özelliği sayesinde birçok serbest radikali indirgeyebilmekte ve ara ürün olan monodehidroaskorbat esasen radikallerle reaksiyona girmektedir (Njus ve diğ. 2020).

Askorbik asit yüksek konsantrasyonlarda pro-oksidan etkiler de gösterebilmektedir. Ayrıca, bu pro-oksidan aktivitesi, indirgenmelerini katalize ederek ROS oluşumuna neden olması nedeniyle sıklıkla metal iyonlarıyla ilişkilendirilmektedir (Kaźmierczak-Barańska ve diğ. 2020; Njus ve diğ. 2020; Chakraborty ve diğ. 2014). Hücre proteinleri, karbonhidratlar ve nükleik asitlerin otoksidasyona oldukça duyarlı olduğu bilinmektedir. Ancak, askorbik asit ve ürik asit gibi bileşenlerin bu tür oksidasyonlara karşı önemli bir koruma sağladığı vurgulanmıştır (Machlin ve Bendich 1987). Vitamin C, vitamin E ile işbirliği yaparak, membranlarda ve lipoproteinlerde α -tokoferol radikalinden α -tokoferolün yeniden oluşumuna katkı sağlamaktadır (Pryor 2000). Ayrıca, hücre içi glutatyon seviyelerini artırarak protein tiyol gruplarını oksidasyona karşı korumada önemli bir rol oynamaktadır (Naziroğlu ve Butterworth 2005).

S. cerevisiae'nin anlamlı miktarda L-askorbik asit üretmediği, bunun yerine D-eritroaskorbik asit üretiminin L-askorbik asitten daha fazla olduğu bilinmektedir (Spickett ve diğ. 2000). Eritroaskorbat biyosentezinde son adımı katalize eden ALO1 geninin silindiği suşların, hidrojen peroksit ve süperoksit anyonuna karşı duyarlı olduğu gösterilmiştir (Huh ve diğ. 1998). Sonuç olarak, askorbik asidin maya metabolizmasında az ya da hiç rol oynamadığı söylenebilmektedir.

Vitamin E (α - tokoferol) genellikle yağda çözünebilen ve sekiz izoformu bulunan bir vitamindir. Vitamin E'nin aktif formu olan α - tokoferol, hücre tarafından lipid peroksidasyonundan korunmak için kullanılan güçlü bir membran bağlı antioksidandır (Hensley ve diğ. 2004; Pryor 2000). α - tokoferol, antioksidan bir molekül olarak işlevini yerine getirebilmek için, bir lipide veya lipid peroksil radikale bir hidrojeni vererek kendisini α - tokoferol radikale dönüştürmektedir (Kojo 2004). Bu dönüşüm, α - tokoferolün, oksidatif hasar oluşturan serbest radikalleri etkisiz hale getirme işlevi için gereklidir.

α - tokoferol ile askorbatın sinerjik etkileşimi, lipid peroksidasyonunun inhibe edilmesinde oldukça etkilidir (Packer ve diğ. 1979). Bu sinerjik etkileşimin, sadece homojen çözeltide değil, miseller, membranlar ve lipoproteinler gibi heterojen sistemlerde de lipid peroksidasyonunu inhibe etmede oldukça etkili olduğu belirtilmektedir (Niki ve Noguchi 2004). α - tokoferol ve askorbat kombinasyonu, lipoproteinler ve plazmanın oksidasyonunu engelleyebilmektedir. Ancak askorbatın bulunmadığı durumlarda α - tokoferol, ' tokoferol aracılı peroksidasyon' mekanizmasıyla pro-oksidan bir etki göstermektedir (Bowry ve diğ. 1992). Buna karşılık, α - tokoferolün ubikinol veya çeşitli polifenolik antioksidanlarla kombinasyonu oksidasyonun sinerjik bir şekilde inhibe edilmesine olanak sağlamaktadır (Bowry ve diğ. 1995).

E vitamininin çözünebilir formu olan Trolox'un, maya hücrelerinde hidrojen peroksit ve süperoksit seviyelerini azalttığı, enzimatik antioksidanların aktivitesini artırdığı bilinmektedir (Raspor ve diğ. 2005). Ayrıca, E vitamininin antioksidan enzimlerin sentezini indüklemeye düzenleyici etkileri olduğu ifade edilmektedir (Bronzetti ve diğ. 2001).

2.5.2.3 Polifenoller

Fenoller, bitki kökenli gıdalarda yaygın olarak bulunan kimyasal bileşiklerdir. Bitkiler, bunları ikincil metabolizma ürünleri olarak büyük miktarlarda sentezlemektedir ve bazıları bitkinin fizyolojik işlevleri için hayati öneme sahipken, diğerleri ise çevresel uyaranlar ve strese karşı savunma işlevlerine katılmaktadır (Bravo 1998). Polifenollerin ana grupları fenolik asitler, stilbenler, lignanlar, fenolik alkoller ve flavonoidlerdir (Bravo 1998). Fenolik bileşiklerin antioksidan aktivitesi, çoğunlukla yapılarına bağlıdır ve bu yapılar onları metabolik oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarına katılmaya uygun hale getirmektedir (Zeb 2020). Yapıları, serbest radikal substratlara proton transferi yoluyla hidrojen atomu veya elektron transferi yaparak, çoğu oksitleyici türü temizlemelerine olanak tanımakta ve böylece radikal olmayan substratlar üretilmektedir. Polifenoller, çoklu hidroksil ve karbonil grupları ile metal kompleksleri oluşturarak metal iyonlarının alımı yoluyla antioksidan olarak hareket edebilmektedirler (Santos-Buelga ve diğ. 2019). Ayrıca, iNOS (indüklenebilir nitrik oksit sentaz) aktivitesini engelleyerek NO• tarafından oluşturulan oksidatif strese karşı müdahale edebilmektedirler. Bunun yanı sıra, XO (ksantin oksidaz) ve NOX (NADPH oksidaz) gibi ROS üreten enzimlerin aktivitelerini inhibe edebilmekte ve SOD, CAT ve GPx gibi antioksidan enzimlerin aktivasyonunu artırabilmektedirler (Shen ve diğ. 2022; Orallo ve diğ. 2002; Nijveldt ve diğ. 2001; Shoskes 1998).

2.5.2.4 Karotenoidler

Bitkilerde ve mikroorganizmalarda bulunan renkli pigmentler olan karotenoidler, eşleşmemiş elektronları delokalize ederek ve tekli oksijeni bozunma olmadan sönmüleyerek işlev görmektedir (Mortensen ve diğ. 2001). Birçok epidemiyolojik çalışmada karotenoid açısından zengin diyetlerin çeşitli dejeneratif hastalıklar, özellikle kanser, kardiyovasküler hastalıklar ve oftalmolojik hastalıkların riskini azalttığı ifade edilmektedir (Mayne 1996). Karotenoidlerin bu koruyucu etkileri, hücreleri ve dokuları oksidatif hasardan koruyan antioksidan aktiviteleri ile ilişkilendirilmektedir (Sies ve Stahl 1995). Hücresel sinyalleşmeyi etkileyebildikleri

ve redoks-duyarlı düzenleyici yolları tetikleyebildikleri de bilinmektedir (Stahl ve diğ. 2002).

Organizmada oksidatif koşullar altında oluşan çeşitli radikaller arasında, peroksil radikalleri karotenoidler ile en etkili şekilde reaksiyona giren türlerdendir. Bu radikaller, lipit peroksidasyonu sürecinde oluşmaktadır ve bu türlerin temizlenmesi, lipofilik bölgelerde hasara neden olan reaksiyon dizisini kesintiye uğratmaktadır. Lipofilik özellikleri ve peroksil radikallerini temizleme yetenekleri sayesinde, karotenoidlerin hücrel membranlar ve lipoproteinleri oksidatif hasara karşı korumada önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (Sies ve Stahl 1995).

Karotenoidlerin antioksidan aktivitesinin, sistemdeki oksijen basıncına bağlı olduğu bilinmektedir (Palozza 1998; Burton ve Ingold 1984). Fizyolojik koşullar altında çoğu dokuda bulunan düşük kısmi oksijen basınçlarında β -karotenin oksidasyonu inhibe ettiği ancak, yüksek oksijen basıncında pro-oksidan etkiler göstermeye başladığı ifade edilmektedir. Ayrıca, β -karotenin pro-oksidan etkilerinin, yüksek dozda β -karoten takviyeleri sırasında gözlemlenen olumsuz etkilerle ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Stahl ve Sies 2003).

2.5.2.5 Albümin

Plazmanın redoks durumunun korunmasından sorumlu ana hücre dışı protein olan albüminin çok sayıda fizyolojik işlevi bulunmaktadır (Quinlan ve diğ. 2005). Bu işlevler arasında osmotik basıncın düzenlenmesi, vücut bölmeleri arasındaki sıvı dağılımı, safra pigmentleri, kolesterol, yağ asitleri ve ilaçların taşınması yer almaktadır (Mirończuk-Chodakowska ve diğ. 2018). Düşük albümin konsantrasyonu, ROS etkisi ve oksidan-antioksidan dengesizliği ile ilişkili olan yaşlanma süreci ve kronik hastalıkların gelişimi ile ilgilidir (Gomi ve diğ. 2007; Visser ve diğ. 2005).

Albümin çeşitli molekül ve iyonlara bağlanarak ROS üretimini engellemek suretiyle antioksidan etki göstermektedir. Örneğin, serbest demir ve bakır iyonları albümine bağlanarak Fenton reaksiyonunda katalizör görevi görmeleri ve $\bullet$ OH üretmeleri engellenmektedir (Mirończuk-Chodakowska ve diğ. 2018; Lloyd ve Phillips 1999). Ayrıca albümin, metiyonin ve sistein gibi sülfür içeren aminoasitleri

aracılığıyla serbest radikalleri doğrudan nötralize etmektedir (Di Simplicio ve diğ. 1991). Bu rezidüler, albüminin toplam antioksidan aktivitesinin %40 ila %80'ini oluşturmaktadır (Otagiri ve Chuang 2009). Albüminin bilirubin ve doymamış yağ asitlerine bağlanarak bu bileşiklerin oksidasyonunu önlemesi sebebiyle dolaylı antioksidan etkiler gösterdiği de bilinmektedir (Roche ve diğ. 2008).

2.5.2.6 Bilirubin

Bilirubin, mononükleer fagosit sistem tarafından hemoglobin ve diğer hem proteinlerinin (miyoglobin, sitokromlar, CAT) parçalanması sonucu ortaya çıkan oldukça hidrofobik, suda çözünmeyen bir tetrapirrol türevidir (Nocentini ve diğ. 2022; Sticova ve Jirsa 2013). Birçok çalışma, yüksek seviyelerde bilirubinin yenidoğanlarda toksik olabileceğini ve hatta hiperbilirubineminin ağır beyin hasarına ve ölüme yol açabileceğini ortaya koymaktadır (Bhutani ve diğ. 2016; Lin ve diğ. 2005). Bununla birlikte, orta düzeylerdeki bilirubin konsantrasyonları, antioksidan ve anti-inflamatuar özelliklerle ilişkilendirilmiştir (Zibera ve diğ. 2016; Zhou ve diğ. 2016). Bilirubinin antioksidan özellikleri arasında, 1O_2 'yi yüksek verimlilikle yakalaması, $O_2^{\bullet-}$ ve peroksil radikalleriyle reaksiyona girmesi ve H_2O_2 veya organik hidroperoksitlerde peroksidazlar için indirgeyici bir substrat görevi görmesi yer almaktadır (Liu ve Hu 2002).

2.5.2.7 Ürik Asit

Ürik asit, purin yıkım yoluyla tarafından üretilen düşük moleküler ağırlıklı organik bir bileşiktir. Ürik asit konsantrasyonları normalin çok üzerine çıktığında, obezite, insülin direnci ve hiperürisemiye tetikleyebilmektedir (Fabbrini ve diğ. 2014; Klein ve diğ. 2002). Öte yandan, ürik asit hidrofilik bir antioksidandır ve kan serumunda serbest radikal temizleme aktivitesinin yaklaşık %60'ını oluşturmaktadır (Lippi ve diğ. 2008; Ames ve diğ. 1981). Bu organik bileşik, $ONOO^-$, 1O_2 , $\bullet OH$, H_2O_2 ve lipid peroksitler gibi reaktif türleri temizleyebilmektedir (Stinefelt ve diğ. 2005). Ürik asit H_2O_2 ile reaksiyona girdiğinde, diğer serbest radikallerden daha düşük oksitleme potansiyeline sahip urat radikalleri meydana gelmektedir ve bu

radikaller, askorbik asit ile reaksiyona girerek ürik asidi yeniden oluşturabilmektedir (Bowman ve diğ. 2010). Ürik asit ayrıca, demir ve bakır iyonlarıyla stabil kompleksler oluşturmakta ve Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu gibi serbest radikal reaksiyonlarını engellemektedir (Stinefelt ve diğ. 2005). SOD1 ve SOD3 gibi antioksidan enzimlerin fizyolojik seviyelerini koruyup modüle ettiği de bilinmektedir (Hink ve diğ. 2002). Son olarak ürik asitin, vitamin C'ye kıyasla daha etkili bir antioksidan özellik sergilediği de ifade edilmiştir (Mahajan ve diğ. 2009).

2.5.2.8 Melatonin

Melatonin, triptofandan türetilen ve karanlıkta epifiz bezinden salgılanan düşük molekül ağırlıklı endojen bir hormondur. Uzun bir süre, yalnızca omurgalı hayvanlara özgü bir hormon olarak kabul edilmelerine rağmen son zamanlarda bakterilerde, alglerde, yüksek bitkilerde ve omurgasızlarda da bulunduğu tespit edilmiştir (Arnao ve diğ. 2023). Melatonin; uyku, sirkadiyen ritim, bağışıklık, üreme ve kan basıncı kontrolü gibi farklı biyolojik fonksiyonları düzenlemekten sorumlu olan bir hormondur (Quera Salva ve diğ. 2011; Pandi-Perumal ve diğ. 2008).

Melatoninin anti-inflamatuar ve antioksidan özelliklere sahip olduğu da bilinmektedir. Melatoninin serbest hidroksil radikallerini doğrudan nötralize etmek, antioksidan enzimlerin aktivitesini artırmak, mitokondriyal oksidatif fosforilasyon verimliliğini artırmak ve elektron sızıntısını azaltarak ROS üretimini düşürmek ve diğer antioksidanların etkinliğini artırmak gibi antioksidan işlevleri bulunmaktadır (Reiter ve diğ. 2018; Miller ve diğ. 2010; Reiter ve diğ. 2003). Ayrıca, küçük moleküler boyutu ile spesifik kimyasal yapısı nedeniyle, melatonin biyolojik zarları geçip hücre bileşenleriyle reaksiyona girebilmekte ve böylece hücre ortamında antioksidan koruma sağlayabilmektedir (Othman ve diğ. 2008). Hücre zarında veya hücre içi organellerde bulunan reseptörleri aracılığıyla da antioksidan işlevlerini yerine getirdiği bilinmektedir (Wang ve diğ. 2011; Dubocovich ve diğ. 2010). Son olarak melatonin salgılanmasındaki azalma erken yaşlanma ile ilişkilendirilirken, bu molekülün yeterli konsantrasyonunun kalp hastalığı, nörodejeneratif hastalıklar ve diyabet gibi çeşitli hastalıklar üzerinde faydalı etkileri bulunmaktadır (Reiter ve diğ.

2018; Devore ve diğ. 2016; Navarro-Alarcon ve diğ. 2013; Bonnefont-Rousselot ve Collin 2010).

S.cerevisiae suşları ile yapılan bir çalışmada, melatonin varlığında katalaz aktivitesinin hafifçe arttığı ifade edilmiştir. Melatonin varlığında büyütülen hücreler, H₂O₂ ile indüklenen oksidatif strese maruz bırakıldığında, tüm test edilen suşlarda daha düşük ROS birikimi ve lipid peroksidasyonu gözlemlenmiştir. Bu nedenle, oksidatif stresin bir sonucu olarak artan katalaz aktivitesinin, melatonin varlığında daha düşük olduğu belirtilmiştir (Vázquez ve diğ. 2018).

Tablo 2.3 *S. cerevisiae*'da önemli antioksidan savunma sistemleri (Perrone ve diğ. 2008 tarafından yapılan çalışmadan alınmış ve düzenlenmiştir).

İsim	Gen(ler)	Konum	Fonksiyon
Antioksidan metabolitler			
Glutasyon		Genel	Redoks tamponu, ksenobiyotiklerin atılımı
Ubikinon		Mit, ER, Mem	Lipitte çözünen antioksidan, solunum zinciri bileşeni
D-eritroaskorbat		Sit?	Suda çözünen antioksidan
Enzimler			
Katalaz	CTT1,CTA1	Sit,Per	H ₂ O ₂ dismutasyonu
Süperoksit dismutaz	SOD1	Sit, Mit, Nük?	O ₂ ⁻ dismutasyonu
SOD şaperonu	SOD2 CCS1	Mit Sit	Sod1p'ye bakır yükleme
Tiyoredoksinler	TRX1,TRX2	Sit	Deoksiribonükleotid sentezi, sülfat asimilasyonu, bazı peroksidazlar için kofaktör, redoks kontrolü
Ditiyol glutaredoksinler	GRX1,GRX2	Sit, Nük	Çoğu enzimatik işlevde tiyoredoksinler ile örtüşme ve glutasyon peroksidaz aktivitesi
Monotiyol glutaredoksinler	GRX3,GRX4, GRX5	Nük, Mit matriks	Hücreleri redoks hasarından koruyan Fe/S küme oluşumu
Peroksiredoksinler	AHP1, PRX1	Sit, Mit	Alkil peroksitlerin indirgenmesi
Tiyoredoksin peroksidaz	TSA1	Sit	Peroksiredoksin aktivitesi,

			tiyoredoksin peroksidaz aktivitesi
Sülfiredoksin	SRX1	Sit, Nük	Sistein-sülfonik asit rezidülerini indirgeme
Glutasyon peroksidaz	GPX1,GPX2	Sit,Mem	Okside lipid hidroperoksitlerin indirgenmesi
Fosfolipid hidroperoksit	GPX3/ORP1	Sit	Tiyoredoksin peroksidaz aktivitesi
Sitokrom c peroksidaz	CCP1	Mit iç zar boşluğu	Mitokondride H ₂ O ₂ indirgenmesi
Glutasyon sentezi	GSH1,GSH2	Sit	GSH'ın aşamalı sentezi
Glutasyon redüktaz	GLR1	Sit	GSSG'nin GSH'a indirgenmesi
Pentoz fosfat yolağı enzimleri	ZWF1, GND1 TAL1,TKL1,2, RPE1,	Sit	Okside glutasyon, glutaredoksinler ve tiyoredoksinlerin dönüşümü için NADPH üretimi
	ALO1, ARA2	Mit dış zar?	D-eritroaskorbat sentezi
<i>Transkripsiyon faktörleri, düzenleyiciler</i>			
Yap1p	YAP1	Sit/Nük	Oksidatif stres, ksenobiyotikler, kadmiyuma direnç
Skn7p	SKN7	Nük	Yardımcı transkripsiyon faktörü, oksidatif stres koşullarında Yap1p ile çalışır ve ayrıca ozmoregulasyonda rol oynar
Msn2/4	MSN2,MSN4	Sit/Nük	Isı, açlık, osmotik ve oksidatif strese yanıt
Yap1p-bağlayıcı protein	YBP1	Sit	Yap1p'nin çekirdek lokasyonuna yönlendirilmesinde yer alır
Hem aktive protein	HAP1,2,3,4,5	Nük	Solunum fonksiyonlarının düzenlenmesi
Metal-bağlayıcı aktivatör	MAC1	Nük	Bakır iyonu homeostazında ve H ₂ O ₂ 'in CTT1'i indüklemesinde yer alan genlerin düzenleyicisi

*Sit: Sitoplazma; Mit: Mitokondri; ER: Endoplazmik retikulum; Per: Peroksizom; Nük: Nükleus; Mem: Membran.

2.6 Biyomoleküllerde Oksidatif Stres İndüklü Hasarlar

Önemli fizyolojik işlevlere sahip olan reaktif türler düzenli şekilde belirli miktarlarda üretilmelerine rağmen bu üretim dengesinin bozulması toksik oksidatif strese yol açmaktadır. Oksidatif stres, redoks sinyalleşmesini değiştirmekle birlikte hücrelerde DNA, lipitler, proteinler gibi biyomoleküllere zarar verip hücrelerin normal işlevlerinin bozulmasına neden olmaktadır. Membran lipitleri, yapısal proteinler, enzimler ve nükleik asitlerdeki bu hasarlar anormal hücre fonksiyonlarının sergilenmesine yol açmaktadır (Forman ve Zhang 2021; Sies ve diğ. 2017).

2.6.1 Lipitlerde Oksidatif Hasar

Hücre zarlarının temel bileşeni olan lipidler hücrelerin işlevlerini düzenlemede kritik öneme sahiptir. Hücre zarındaki fosfolipitlerin oksidatif değişikliklere duyarlılığı, membran çift tabakasının fiziksel ve kimyasal özellikleri ile membranı oluşturan yağ asitlerinin kimyasal reaktivitesi olmak üzere iki temel özelliğe dayandırılmaktadır (Hulbert ve diğ. 2007). İlk özellik, oksijen ve serbest radikallerin sulu çözeltilerde olduğundan daha fazla çözünebileceği lipid çift tabakasının varlığı ile ilgilidir. Bu durum, membranlarda oksijenin yoğunlaşabileceği bir iç organik fazın bulunmasına yol açmaktadır. Bu nedenle, organik bölgeler sulu bölgelerden daha fazla serbest radikal içerebilmekte (Gamliel ve diğ. 2008; Moller ve diğ. 2005) ve bu da membran lipidlerini oksidatif hasar için birincil hedef haline getirmektedir. İkinci özellik ise, fosfolipitlerin çoklu doymamış yağ asidi kalıntılarının oksidasyona karşı son derece hassas olmasıdır. Her membran fosfolipidi, gliserol grubunun 2. hidroksil grubuna esterleşmiş bir doymamış yağ asidi kalıntısı içermektedir. Bu yağ asitlerinin çoğu çoklu doymamış olup, iki çift bağ arasındaki metilen grubunun varlığı, bu yağ asitlerinin ROS tarafından indüklenen

hasara duyarlılığını artırmaktadır. Yağ asitlerinin oksidasyona duyarlılığı, her yağ asidi molekülündeki çift bağ sayısına göre üssel olarak artmaktadır (Bielski ve diğ. 1983; Holman 1954).

Reaktif oksijen türleri (ROS), kısa yarı ömürleri ve yüksek reaktiviteleri nedeniyle in vivo ve in vitro olarak doğrudan ölçülmeleri oldukça zordur. Bunun yerine, ROS oksidasyonu sonucu oluşan ürünler, daha kararlı yapıları ve oksidatif stresin şiddetini gösterebilmeleri nedeniyle biyolojik örneklerde daha sık incelenmektedir (Shulaev ve Oliver 2006). ROS indüklü lipid peroksidasyonu, lipid çift tabakanın geçirgenliği, akışkanlığı ve hücre bütünlüğünü önemli ölçüde değiştirebildiğinden hasar parametrelerinin değerlendirilmesinde bir gösterge olarak kullanılmaktadır (Dix ve Aikens 1993). Lipid peroksidasyonunun, proteinlerin membranlardaki konumu nedeniyle membran proteinlerine de zarar verebildiği bilinmektedir (Catalá 2009).

Lipid peroksidasyonunun makul seviyelerde gerçekleşmesi hücre sinyalleşmesi, bağışıklık tepkileri ve apoptoz gibi fizyolojik süreçlerde önemli roller oynasa da, aşırı lipid peroksidasyonu hücresel oksidatif stresle ilişkilidir ve kalp hastalıkları (Siegel ve diğ. 2014), nörodejeneratif bozukluklar (Reed 2011), kanser (Clemente ve diğ. 2020), diyabet (Arora ve diğ. 2013), katarakt (Babizhayev ve diğ. 1988) gibi patolojik durumlara neden olabilmektedir.

2.6.1.1 Lipid Peroksidasyonu

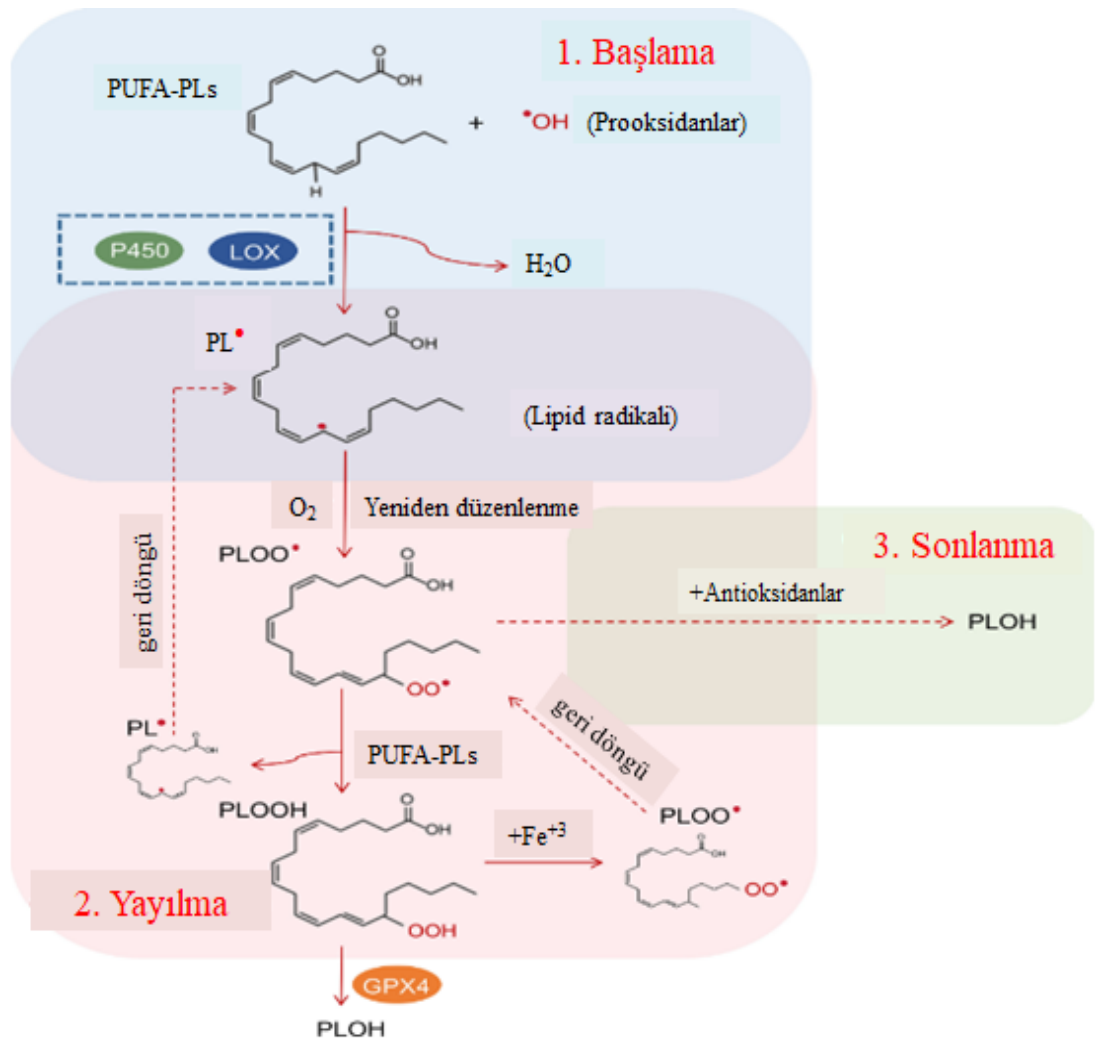
Lipid peroksidasyonu genel olarak, serbest radikaller veya radikal olmayan türler gibi oksidanların karbon-karbon çift bağ(lar) içeren lipidlere, özellikle de bir karbondan hidrojen çıkarılmasını içeren çoklu doymamış yağ asitlerine (PUFA'lar) saldırdığı ve sonuç olarak sisteme oksijenin girmesi ile peroksil radikalleri ve hidroperoksitlerin oluştuğu bir süreç olarak tanımlanabilmektedir (Yin ve diğ. 2011). Glikolipidler, fosfolipidler ve kolesterol de zarar verici peroksidatif aktivitenin iyi bilinen hedefleridir.

Bir yağ asidinin genel yapısı, bir uçta karboksil grubu, diğer uçta ise metil grubu bulunan bir hidrokarbon zincirinden oluşmaktadır. Açıl zincirinde tek bağ

bulunduran yağ asitleri doymuş yağ asitleri ve iki veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitleri ise 'çoklu doymamış yağ asitleri' (PUFA) olarak adlandırılmaktadır (Calder 2005). Doymuş yağ asitleri, fizyolojik koşullarda genellikle peroksidasyona uğramamaktadırlar. Bunun temel sebebi, doymuş yağ asitlerinin karbon zincirlerinde çift bağ içermemesi ve dolayısıyla serbest radikal saldırılarına karşı daha dirençli olmalarıdır. Doymuş yağ asitlerinde karbon-hidrojen bağlarının enerjisi yüksektir ve bu bağlardan hidrojen atomunun koparılması oldukça zordur. Bu nedenle, ROS gibi oksidatif ajanlar, doymuş yağ asitlerini oksitlemekte zorlanmaktadır. Buna karşın, PUFA'lar, karbon zincirlerindeki çift bağların varlığı nedeniyle oksidasyona daha yatkındır (Hajeyah ve diğ. 2020). Bu çift bağlar, hidrojen atomunun koparılması için gereken enerjiyi düşürerek lipid peroksidasyonunun başlamasını kolaylaştırmaktadır (Kavakcıoğlu Yardımcı 2017).

LPO sürecinin mekanizmaları tam olarak anlaşılamamış olup, hem enzimatik hem de enzimatik olmayan yollarla katalize edildiği düşünülmektedir (Şekil 2.25) (Jiang ve diğ. 2021; Ayala ve diğ. 2014). Enzimatik yolda, lipoksijenazlar (LOX) ve P450 oksidoredüktazlar bu sürece dâhil edilmektedir (Jiang ve diğ. 2021; Kagan ve diğ. 2017). PUFA peroksidasyonunun enzimatik olmayan serbest radikal mekanizması ise üç aşamada gerçekleşmektedir (Yin ve diğ. 2011; Girotti 1998; Porter ve diğ. 1995; Kanner ve diğ. 1987) (Şekil 2.25). Başlangıç aşaması, hidroksil radikalleri ($\bullet\text{OH}$) veya peroksil radikalleri ($\text{ROO}\bullet$) gibi prooksidanlar tarafından lipid substratının metilen karbonundan bir allilik hidrojen atomunun uzaklaştırılmasıyla başlamaktadır ve bu süreç, yüksek derecede reaktif karbon merkezli bir lipid radikali ($\text{L}\bullet$) üretmektedir (Kelly ve diğ. 1998). Yayılma aşamasında, moleküler oksijen, $\text{L}\bullet$ ile hızla reaksiyona girerek lipid peroksil radikali ($\text{LOO}\bullet$) oluşturulmaktadır. $\text{LOO}\bullet$ radikali antioksidanlar veya inhibitörlerin yokluğunda, başka bir lipid molekülünden hidrojen atomu kopararak zincir reaksiyonunu devam ettiren yeni bir $\text{L}\bullet$ oluşturmakta ve birincil oksidasyon ürünü olan lipid hidroperoksit (LOOH) üretilmektedir. Aktif LOOH , glutatyon peroksidaz 4 (GPX4) varlığında stabilize lipid alkolüne (LOH) dönüştürülebilmektedir (Jiang ve diğ. 2021; Maiorino ve diğ. 2018). Sonlanma aşamasında ise α -tokoferol (E vitamini) gibi antioksidanlar hidrojen atomu vericileri olarak $\text{LOO}\bullet$ türüne hidrojen atomu vererek LOOH oluşturulmakta ve nispeten inaktif α -tokoferol fenoksil radikali üretilmektedir (Cedrowski ve diğ. 2016). Bu E vitamini radikali ise başka bir $\text{LOO}\bullet$ ile reaksiyona girerek radikal olmayan ürünler

oluşturmaktadır. Ayrıca, lipid hidroperoksitler (LOOH), demir veya diğer metal katalizörlerin varlığında kararsızdır çünkü LOOH, reaktif alkoksi radikallerinin oluşumuna yol açan Fenton reaksiyonuna katılabilmektedir. Bu nedenle, demir varlığında, zincir reaksiyonlar sadece yayılmakla kalmamakta aynı zamanda amplifiye edilmektedir (Abd El 2012). Son olarak, yayılma aşamasında oluşan LOOH'lar, antioksidanlar veya GPX4 tarafından sonlandırılmadığında kararsız hale gelebilmekte ve malondialdehit (MDA), 4-hidroksinonenal (4-HNE) gibi ikincil ürünler ile diğer reaktif aldehytlerin oluşumuna neden olabilmektedir (Gentile ve diğ. 2017; Ayala ve diğ. 2014).



Şekil 2.25: Lipit peroksidasyon süreci. Başlama aşamasında, çoklu doymamış fosfolipitler (PUFA-PLs) ile hidroksil radikalleri ($\bullet\text{OH}$) gibi prooksidanların etkileşimi sonucunda karbon merkezli fosfolipit radikali (PL $\bullet$) oluşur. Bu süreç, lipoksijenazlar (LOX) ve P450 oksidoredüktaz tarafından katalize edilebilir. Yayılma aşamasında, fosfolipit radikali (PL $\bullet$) hızla oksijenle reaksiyona girerek yeniden düzenlenir ve fosfolipit peroksi radikali (PLOO $\bullet$) oluşur. PLOO $\bullet$, başka bir PUFA-PL

molekülünden hidrojen çekerek yeni bir PL• ve fosfolipit hidroperoksiti (PLOOH) üretir. Oluşan yeni PL•, doğrudan yayılma aşamasına geri dönerek zincir reaksiyonunu sürdürür. Ancak GPX4 enzimi, aktif PLOOH'ı stabilize fosfolipit alkolüne (PLOH) dönüştürerek bu zincir reaksiyonunu durdurabilir. Sonlanma aşamasında, antioksidanlar PLOO• ile reaksiyona girerek PLOH oluşumunu sağlar ve zincir reaksiyonu sonlandırır (Xiao ve diğ. 2024 tarafından yapılan çalışmadan alınmış ve düzenlenmiştir).

2.6.1.1.1 Lipid Peroksidasyon Ürünleri ve Hasar Tayini

Doymamış lipidlere oksidanların saldırısı sonucunda meydana gelen lipid peroksidasyonunun lipoperoksidasyon ürünleri arasında 4-hidroksi-2-nonenal (4-HNE), malondialdehit (MDA), akroleinler, oksilipinler, izoprostanlar ve oksisteroller gibi bileşikler bulunmaktadır (Gianazza ve diğ. 2021). Son derece reaktif olan bu ürünler DNA, proteinler veya diğer lipidler gibi biyomoleküllerle etkileşime girerek birçok biyolojik etkiye yol açmaktadır (Gianazza ve diğ. 2021; Bartsch ve Nair 2006). MDA, LPO'nun en mutajenik yan ürünü iken 4-HNE en toksik olanıdır (Li ve diğ. 2022).

4-HNE, çoklu doymamış yağ asidi (PUFA) n-6 zincirleri içeren oksitlenmiş fosfolipitlerin enzimatik ve enzimatik olmayan oksidatif yollarla parçalanması sonucu oluşan başlıca lipid oksidasyon ürünlerinden biridir (Spickett 2013). Tiyoller ve amino gruplarıyla hızlı reaksiyona girmesi nedeniyle toksik özellik gösteren 4-HNE; lipidler, proteinler ve nükleik asitlerde kovalent adüktler oluşturarak önemli biyolojik komplikasyonlara yol açtığı bilinmektedir (Schaub 2003). Yüksek reaktivitesi sayesinde 4-HNE, hem bir sinyal molekülü hem de lipid peroksidasyonunun zararlı bir ürünü olarak çift fonksiyona sahiptir (Ayala ve diğ. 2014). 4-HNE'nin; ROS oluşumu ve inflamasyona yol açabildiği, hücre sinyalleşme mekanizmalarını değiştirebildiği ve hücrelere zarar vererek ölüme (apoptoz) neden olabildiği bilinmektedir (Ayala ve diğ. 2014). 4-HNE, biyolojik etkilerini düşük mikromolar konsantrasyon aralıklarında göstermektedir (Esterbauer ve diğ. 1991). Yapılan çalışmalar, 4-HNE'nin belirli durumlarda kemotaktik proteinleri ve sitokin ifadesini indükleyebileceğini, bağışıklık yanıtını tetikleyebileceğini ve sonuç olarak redoks dengesini bozarak doku hasarını artırabileceğini göstermiştir (Breitzig ve diğ. 2016; Shoeb ve diğ. 2014; Ayala ve diğ. 2014).

Lipid peroksidasyonunun bir diğer ürünü olan MDA, araşidonik asitin enzimatik oksijenasyonunun bir ürünü olarak veya n-3 ve n-6 yağ asitleri oksidasyonunun son ürünü olarak oluşabilmektedir (Ayala ve diğ. 2014). MDA da oldukça reaktif bir molekül olup hücrelerin yapısını, işlevini ve yanıtını değiştirebilecek çapraz bağlanma ürünlerinin oluşumu bu molekül için tipiktir (Gianazza ve diğ. 2021; Ayala ve diğ. 2014). MDA'nın, DNA'da deoksiadenozin ve deoksiguanozin ile etkileşime girerek mutajenik DNA adüktlerinin oluşumuna yol açabileceği bilinmektedir (Feng ve diğ. 2006; Niedernhofer ve diğ. 2003). Ratlarda kanserojen olduğu tespit edilen MDA'nın, bakteri ve memeli hücreleri üzerinde yapılan deneylerde mutajenik etkiler gösterdiği rapor edilmiştir (Caliskan-Can ve diğ. 2010; Niedernhofer ve diğ. 2003). Ayrıca, MDA adüktlerinin proteinler üzerinde birikmesi sonucu lipofuskin oluşumu meydana gelmektedir (Pamplona 2008). Lipofuskin, hücrelerde biriken ve genellikle yaşlanma veya oksidatif stres ile ilişkili olan bir tür yaşlanma pigmentidir (Gray ve Woulfe 2005). Lipoksidatif reaksiyonlar yoluyla oluşan lipofuskin, parçalanamayan bir intralizozomal floresan pigment özellik göstermektedir (Terman ve Brunk 2004).

MDA ve 4-HNE'ye ek olarak oksilipinler, PUFA'lardan oto-oksidasyon, siklooksijenaz, lipoksijenaz, sitokrom P450, 15-hidroksiprostaglandin dehidrogenaz ve çözünür epoksit hidrolaz enzimleri yoluyla türetilen biyolojik olarak aktif lipid metabolitlerdir. Oksilipinlerin inflamasyon, ağrı yanıtı, hücre adezyonu, apoptoz, anjiyogenez, kan pıhtılaşması ve damar geçirgenliği gibi hem olumlu hem de olumsuz etkiler gösterebildiği bilinmektedir (Ağagündüz ve diğ. 2024; Dyll ve diğ. 2022; Shipelin ve Sidorova 2020).

HODE (hidroksioktadekadienoik asit) ve okso-ODE (okso-oktadekadienoik asit) ise, linoleik asit (LA) oksidasyonunun biyolojik olarak aktif ürünleridir. Vücuttaki LA rezervleri ve oksidatif stresin, HODE ve okso-ODE gibi oksitlenmiş LA metabolitlerini (OXLAM) artırdığı ifade edilmektedir (Schuster ve diğ. 2018; Ramsden ve diğ. 2012). LA tüketimi arttıkça, OXLAM oluşum potansiyelinin arttığı ve OXLAM'ların, kardiyovasküler hastalıklar, kanser ve Alzheimer hastalığı gibi çeşitli hastalıklarla bağlantılı olduğu vurgulanmaktadır (Mercola ve D'Adamo 2023).

Lipid peroksidasyonundan türeyen aldehytler, radikallerin aksine, membranlara kolaylıkla difüze olabilmekte ve üretildikleri alanlardan uzakta dahi sitoplazmayı ve

çekirdekdeki herhangi bir proteini değiştirebilmektedir (Negre-Salvayre ve diğ. 2008). Bu noktada, biyolojik numuneler ve gıda ürünlerindeki oksidatif hasarı tespit etmek için kullanılan en yaygın yöntem, MDA ile tiyobarbitürik asitin (TBA) reaksiyona girerek oluşturduğu kırmızı-mor renkli kompleksin spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayanan tiyobarbitürik asit reaktif maddeler (TBARS) testidir. Kompleksteki renk yoğunluğu, örnekteki MDA miktarını yansıtmakta ve yüksek MDA seviyesi daha yoğun bir renk oluşumuna yol açmaktadır (Papastergiadis ve diğ. 2012; Schmedes ve Hölmer 1989). TBARS testi, kolay ve ekonomik bir yöntem olduğu için klinik laboratuvarlarda MDA'nın rutin analizi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, TBARS testinin duyarlılık ve özgüllük eksikliği nedeniyle kullanımı tartışmalıdır. Bunun nedeni, TBA'nın şekerler, aminoasitler, bilirubin ve albümin gibi çeşitli kimyasal olarak reaktif karbonil grubu içeren bileşiklerle reaksiyona girme olasılığıdır. Bu durum, kolorimetrik ve fluorimetrik MDA ölçümlerinde hataya neden olmaktadır (Ito ve diğ. 2019). TBARS testinin özgüllüğü, HPLC, GC-MS, GC-MS/MS ve LC-MS/MS ile önemli ölçüde artırılmaktadır (Ito ve diğ. 2019; Tsikas 2017; Young ve Trimble 1991; Louis ve diğ. 1986). Ayrıca, MDA'yı tespit etmek için ELISA kitleri ve TBARS kitleri de kullanılmaktadır (Ito ve diğ. 2019; Jakovljevic ve diğ. 2012; Bevan ve diğ. 2003).

2.6.2 Proteinlerde Oksidatif Hasar

Proteinler; oksidasyon, metilasyon, fosforilasyon, asetilasyon, ubiquitinasyon, glikozilasyon gibi çeşitli post-translasyonel modifikasyonların hedefidir. Biyosentez sonrası bu kimyasal modifikasyonlar, proteinlerin yapılarını ve işlevlerini çeşitlendirmekte ve nihayetinde biyolojik işlevlerinde değişikliklere yol açmaktadır. Reaktif oksijen, azot ve halojen türleri dahil olmak üzere birçok reaktif tür, proteinlerin aminoasit kalıntıları (sistein, metiyonin, tirozin, lizin, arginin) oksidatif olarak modifiye edebilmekte ve bu durum bir dizi oksidatif ürünün oluşmasına yol açmaktadır (Gonos ve diğ. 2018; Møller ve diğ. 2011; Chakravarti ve Chakravarti 2007; Davies 2005; Stadtman ve Levine 2003). Reaktif türler ile antioksidan savunma arasındaki dengesizlik, prooksidanların etkisiyle proteinlerin oksidatif post-translasyonel modifikasyonunu kolaylaştırmaktadır (Wall ve diğ. 2012; Stadtman ve Levine 2003). Bu durum proteinlerin aktivitesini düşürmekle birlikte hücre

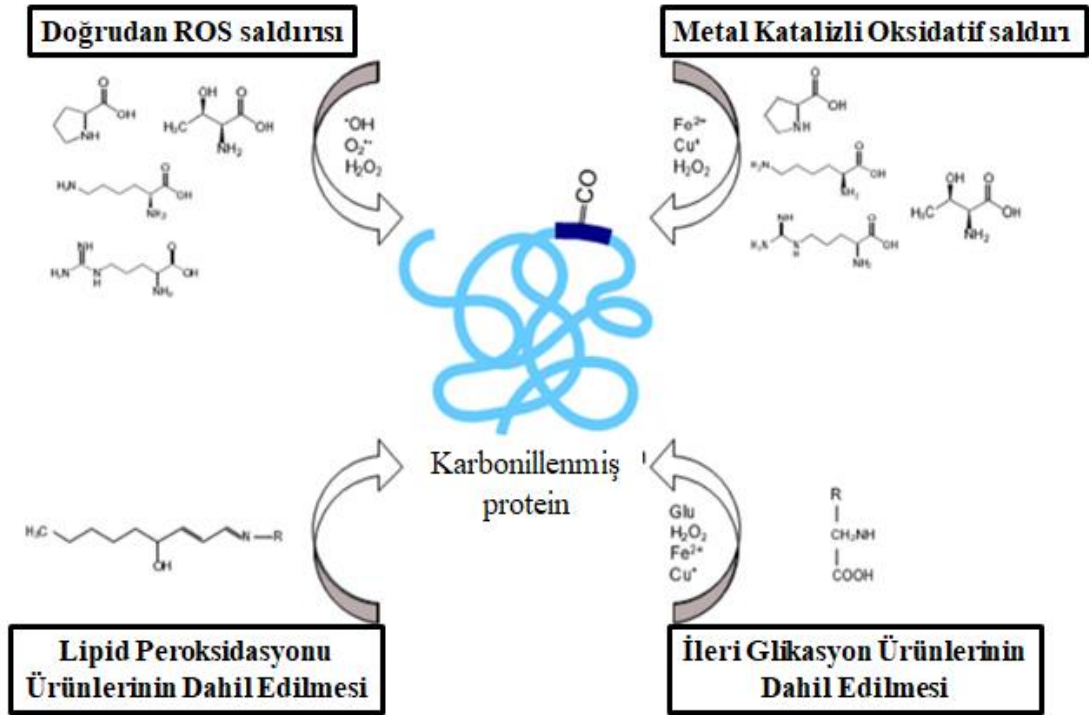
fizyolojisi üzerinde zararlı etkilere neden olabilmektedir. Proteinlerin oksidatif modifikasyonu ve modifiye proteinlerin birikimi, yaşlanma ve çeşitli hastalıkların gelişimi ile ilişkilendirilmektedir. Bu hastalıklar arasında ateroskleroz, kronik akciğer hastalığı, kronik böbrek yetmezliği, diyabet, nörodejeneratif hastalıklar ve sepsis yer almaktadır (Gianazza ve diğ. 2021; Krisko ve Radman 2019; Dalle-Donne ve diğ. 2003). Öte yandan, bazı reaktif türler, sistein gibi belirli aminoasit kalıntılarıyla reaksiyona girerek hücre sinyalleşmesini tetiklemekte ve fizyolojik ve patolojik süreçlere katılmaktadır (Wall ve diğ. 2012; Winterbourn ve Hampton 2008).

2.6.2.1 Protein Karbonilasyonu

Proteinler; reaktif oksijen türleri, lipid peroksidasyon türevi aldehitler ve indirgen şekerler dahil olmak üzere çok sayıda reaktif tür tarafından oksidatif olarak modifiye edilmektedir. Farklı oksidatif modifikasyonlar arasında, proteinlerin aminoasit yan zincirlerine aldehit, keton ve laktam gibi karbonil gruplarının eklenmesi, proteinlere yönelik oksidatif hasarın başlıca işareti olup buna 'protein karbonilasyonu' adı verilmektedir (Fedorova ve diğ. 2014; Bollineni ve diğ. 2013). Enzimatik olmayan geri dönüşümsüz bir post-translasyonel modifikasyon olarak da tanımlanan protein karbonilasyonu, polipeptit zincirinde konformasyonel değişikliklere yol açarak protein fonksiyonunun kaybına neden olmaktadır (Hecker ve Wagner 2018; Dalle-Donne ve diğ. 2006).

Karbonil gruplarının proteinlere dahil edildiği çeşitli oksidatif yollar bulunmaktadır (Şekil 2.26). Bunlardan ilki, karbonil gruplarının proteinlerin aminoasit yan zincirlerine ROS'lar veya oksitlenmiş polifenoller tarafından doğrudan oksidasyon yoluyla eklenmesidir (Ishii ve diğ. 2010; Stadtman ve Levine 2003; Stadtman 1990). Bu noktada proteinlere yönelik oksidatif hasarın en önemli mekanizması metal katalizli oksidasyondur ve proteinlere bağlı karbonil oluşumunun bir kaynağı olarak gösterilmektedir (Stadtman 1993; Stadtman 1990). Süreç, H_2O_2 'nin üretilmesi ve Fe^{3+} ile Cu^{2+} gibi geçiş metallerinin uygun bir elektron donörü tarafından indirgenmesini içermektedir. İndirgenmiş metal iyonları proteinlerdeki spesifik metal bağlanma bölgelerine bağlanmaktadır ve H_2O_2 ile Fenton reaksiyonu

yoluyla son derece reaktif hidroksil radikalleri oluşturulmaktadır. Radikal oluşumu ise, aminoasit yan zincirlerinin oksidasyonuna, proteinler arası çapraz baē oluşumuna ve protein omurgasının oksidasyonuna yol açarak protein parçalanmasıyla sonuçlanabilmektedir (Stadtman ve Levine 2003; Stadtman ve Berlett 1991). Hidroksil radikalının bazı aminoasit yan zincirlerine saldırısı ile yan zincirlerin aldehit veya ketonlara okside olması sonucu en yaygın oluşan karbonil ürünleri arasında, lizinden türeyen α -aminoadipik semialdehit ve arjinin ile prolinden türeyen γ -glutamik semialdehit bulunmaktadır (Müller ve diē. 2011; Chavez ve diē. 2010; Requena ve diē. 2001). Karbonil grupları ayrıca, hidroksil radikali saldırısından sonra α -amidasyon yoluyla protein omurgasının hidrolizi sonucu da oluşabilmektedir (Stadtman ve Berlett 1991). Proteinlerde karbonil gruplarının oluřtuēu ikinci oksidatif yol ise, doymamış lipidler ve indirgenmiş şekerler gibi moleküllerin oksidatif yan ürünleri ile proteinlerin kovalent modifikasyonudur (Henning ve Glomb 2016; Uchida 2000). Oksidatif stresin tetiklediēi bir süreç olan ve LPO sonucu oluşan aldehitlerin (4-hidroksi-2-nonenal (HNE), malondialdehit (MDA), akrolein gibi) proteinlerle reaksiyonu, proteinlere karbonil gruplarının eklenmesine, çapraz baēlanmalara, oligomerizasyon ve agregasyon süreçlerine yol açmaktadır (Moldogazieva ve diē. 2019). Bu süreçler, hücre içi hasar, bozulmuş hücresel işlevler ve nihayetinde hücre ölümüne neden olarak yaşlanma ve çeşitli yaşa baēlı kronik hastalıklara katkıda bulunmaktadır (Moldogazieva ve diē. 2019; Castro ve diē. 2017). Protein karbonilasyonu glikasyon/glikoksidasyon yoluyla da gerçekleşebilmektedir. Glikasyon (glikoz veya fruktoz gibi indirgen şekerlerin karbonil grupları ile lizin veya arginin gibi aminoasit yan zincirlerinin amino gruplarının enzimatik olmayan reaksiyonu) ile Amadori ve/veya Hynes rnleri oluşmaktadır. Glikasyon sürecine oksidatif stresin eklenmesiyle gerçekleşen glikoksidasyon reaksiyonunda ise, glikatlanmış kalıntılar, ROS tarafından daha da ayrıştırılarak karbonillenmiş bileşikler taşıyan ileri glikasyon son ürünlerine (AGE) dönüştürülmektedir (Fedorova ve diē. 2014). Bu türevler; diyabet, üremi, katarakt, karaciēer sirozu, ateroskleroz, osteoartrit ve çeşitli nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok kronik hastalıēın patogenezi ile yakından ilişkilendirilmektedir (Arena ve diē. 2014). Son olarak, hücre dışı matris proteinlerindeki lizin kalıntılarının lizil oksidaz tarafından enzimatik karbonilasyonu da bilinen bir modifikasyondur (Csiszar 2001).



Şekil 2.26: Karbonil gruplarının proteinlere eklendiği oksidatif yollar (Ciacka ve diğ. 2020 tarafından yapılan çalışmadan alınmış ve düzenlenmiştir).

2.6.2.1.1 Karbonillenmiş Proteinlerin Tayini

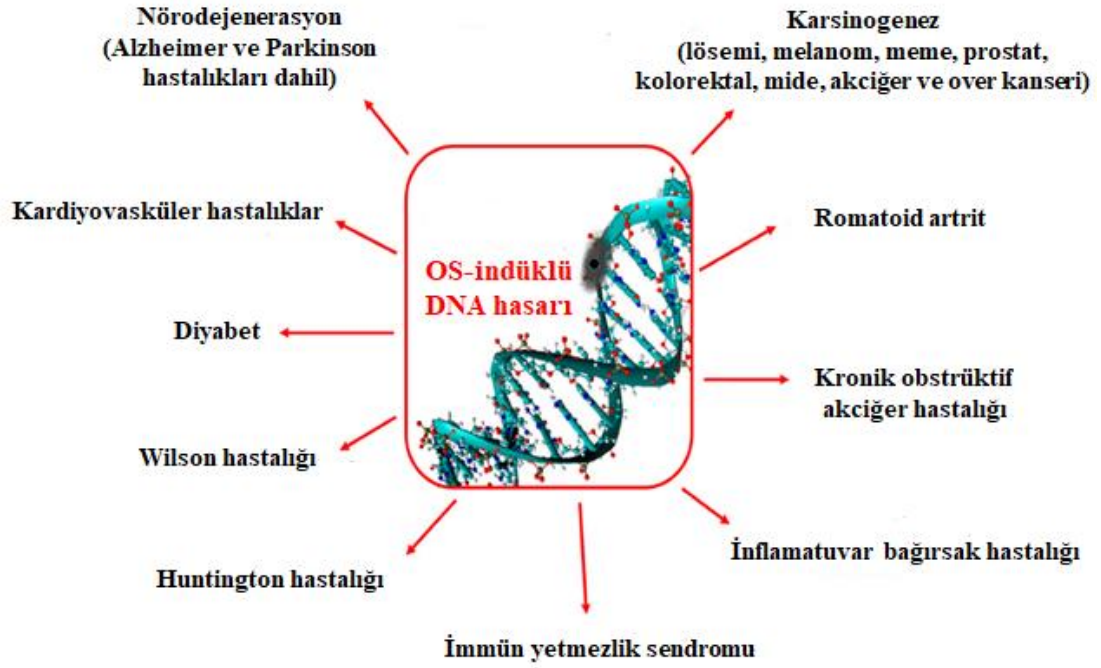
Karbonile aminoasitler ve bunların asit hidrolizi sırasında indirgenmiş ürünlerinin modifikasyonu ve tahribi gibi kimyasal zorluklar, protein karbonillerin miktarının belirlenmesini engellemektedir (Requena ve diğ. 2001; Ayala ve Cutler 1996). Ayrıca, protein karboniller ayırt edici bir UV-visible absorpsiyon veya floresans özelliği taşımadığından, içerikleri doğrudan spektrofotometrik olarak ölçülememektedir. Bu nedenle, protein karbonillerinin tespiti ve miktar tayini yalnızca karbonil gruplarına özgü kimyasal problemler kullanılarak gerçekleştirilebilmektedir (Yan ve Forster 2011).

Karbonillenmiş proteinler genellikle aminoasit yan zincirlerinin karbonil gruplarıyla reaksiyona girerek kararlı 2,4-dinitrofenil (DNP) hidrazonlar oluşturan ve 365–375 nm'de karakteristik maksimum absorbans gösteren 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) kullanılarak ölçülebilmektedir (Dalle-Donne ve diğ. 2003; Levine ve diğ. 1994). DNP-protein adüktleri spektrofotometrik analiz ve yüksek performanslı sıvı

kromatografisi (HPLC) ile belirlenebilmektedir (Malik ve Mukherjee 2022; Yang ve diğ. 2006). Ticari olarak temin edilebilen, DNP'ye karşı yüksek özgülüğe sahip monoklonal antikorlar kullanılarak geliştirilen immünokimyasal testler, dokulardaki karbonillenmiş proteinleri belirlemek için kullanılmaktadır. Biyolojik örneklerdeki DNP-protein adüktlerin tespiti, enzim bağlı immünosorbent testi (ELISA), tek boyutlu veya iki boyutlu elektroforez ve ardından Western blotlama yöntemleri ile yüksek hassasiyetle gerçekleştirilebilmektedir (Dalle-Donne ve diğ. 2003; Buss ve diğ. 1997; Levine ve diğ. 1994). Ayrıca bahsi geçen yöntemler kullanılarak karbonil türevlerinin, yaşlanma (Cabiscol ve diğ. 2014), diyabet (Telci ve diğ. 2000), nörodejeneratif hastalıklar (Choi ve diğ. 2005; Floor ve Wetzel 1998), romatoid ve osteoartrit (Mantle ve diğ. 1999) gibi çeşitli hastalıkların gelişiminde doku proteinlerinde biriktiği gösterilmiştir.

2.6.3 DNA'da Oksidatif Hasar

Temel genetik materyal olan DNA, endojen ve eksojen reaktif türler tarafından birçok kimyasal modifikasyona uğrayan son derece dinamik bir moleküldür. Nükleik asitlerin oksidatif olarak hasara uğraması, biyomoleküller arasında gözlemlenen en tehlikeli modifikasyonlardır ve genetik bilginin yorumlanmasını ve iletimini etkileyebilen fizikokimyasal değişiklikleri içermektedir (Auboeuf 2020). Reaktif türlerin neden olduğu DNA hasarının yaşlanma (Bertram ve Hass 2008), nörodejeneratif hastalıklar (Coppedè ve Migliore 2015), kanser (Zhao ve diğ. 2023) ve romatoid artrit (Altındag ve diğ. 2007) gibi çeşitli patolojik durumlarda yaygın olarak görülmesi, ROS ve DNA arasındaki bağlantıya olan ilginin artmasına yol açmıştır (Şekil 2.27).

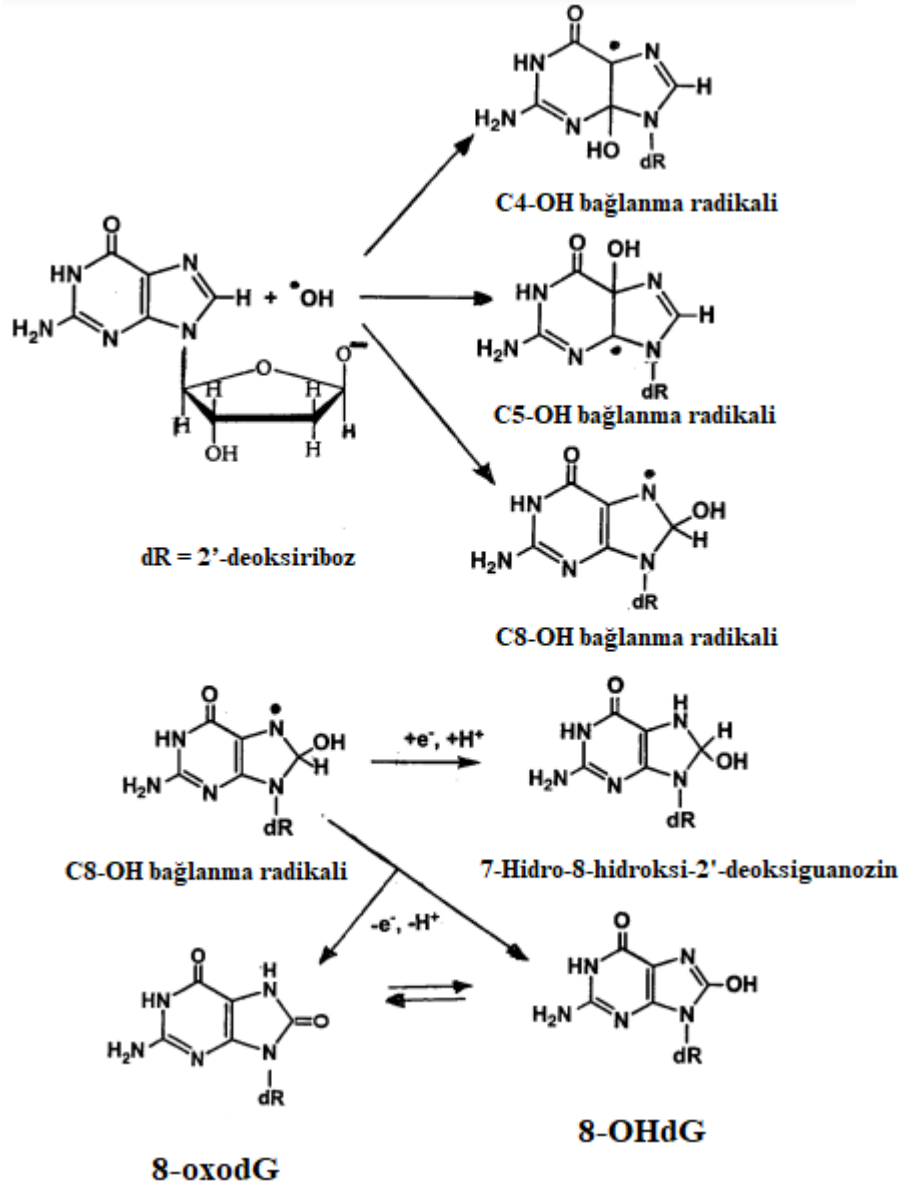


Şekil 2.27: Oksidatif DNA hasarı ve ilişkili hastalıklar (Galano ve diğ. 2018 tarafından yapılan çalışmadan alınmış ve düzenlenmiştir).

DNA'da reaktif türler, azotlu bazlar ve deoksiriboz ile etkileşime girerek ciddi oksidatif reaksiyonlara neden olmaktadır. Nükleik asitlere doğrudan zarar veren ROS, oldukça reaktif olan $\bullet\text{OH}$ radikalidir. $\bullet\text{OH}$, DNA'nın pürin veya pirimidin bazlarının çift bağlarına eklenerek ve timinin metil grubundan ya da 2-deoksiriboz şekerinin CH bağlarının her birinden bir hidrojen atomunun çıkarılması yoluyla DNA ile reaksiyona girmektedir (Chao ve diğ. 2013; Dizdaroglu ve Jaruga 2012; Cooke ve diğ. 2003). Reaktif türlerle etkileşimler sonucunda, bazların yapısında değişim, zincir içi ve zincirler arası çapraz bağların oluşumu, DNA'nın proteinlerle çapraz bağlanması, DNA zincirinde tek/çift zincir kırılmaları, kromozom fragmentlerinin delesyonu veya translokasyonu, intramoleküler siklizasyon veya kümelenmiş bölgelerin oluşumu meydana gelmektedir (Cannan ve Pederson 2016; Tretyakova ve diğ. 2015; Dizdaroglu ve Jaruga 2012; Jena 2012; Lee ve Pervaiz 2011; David ve diğ. 2007; Jena ve Mishra 2005). Bu tür hasarların birikmesi, genetik bilginin değişmesine ve sonuç olarak mutagenез ve hücre apoptozuna yol açabilmektedir (Ba ve Boldogh 2018).

DNA'daki tüm bazlar arasında guanin en düşük oksidasyon potansiyeline sahip olup bu durum onun farklı reaktif türlerin sürekli saldırısına uğramasına neden

olmaktadır (Psciuk ve diğ. 2012). Oksidasyon, nitrasyon, halojenasyon ve alkilasyon ile oluşan guanin modifikasyonları, ölümcül lezyonların sebepleridir (Jena ve Mishra 2012). Farklı guanin lezyonları, DNA zincirleri ve proteinlerle çapraz bağlar yapabilmekte ve DNA zinciri yapısını ve transkripsiyonunu etkileyebilmektedir (Niles ve diğ. 2006; Abdalnur ve Flurry 1976). •OH'nin tercihen DNA'daki guanin bazını oksitlediği ve birçok guanin oksidasyon ürünleri arasında öncelikle 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) oluşturduğu iyi bilinmektedir (Cooke ve diğ. 2003; Dizdaroglu ve Jaruga 2012). Nükleer ve mitokondriyal DNA'da, 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) veya 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin (8-oxodG), serbest radikal indüklü oksidatif lezyonların baskın formlarından biridir ve bu nedenle oksidatif stres için bir biyobelirteç olarak kullanılmaktadır (Valavanidis ve diğ. 2009). 2'-deoksiguanozinin hidroksil radikalleriyle tepkimesi sonucunda radikal adüktler oluşmaktadır. Bu adüktler indirgenerek 7-hidro-8-hidroksi-2'-deoksiguanozine dönüşmekte ve oksidasyon ile 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) veya onun tautomeri olan 8-okso-7-hidro-2'-deoksiguanozin (8-oxodG) meydana gelmektedir (Şekil 2.28) (Valavanidis ve diğ. 2009). Transkripsiyon faktörü bağlanma bölgelerinde bulunan GC açısından zengin diziler, hasara karşı en duyarlı olanlardır. Bu bölgelerde 8-oxoG modifikasyonunun oluşması, ilgili genlerin ekspresyonunu değiştirmektedir (Ghosh ve Mitchell 1999). 8-oxoG'ye ek olarak 5-hidroksimetilurasil (5-OHMeUra) veya 8,5'-siklo-2'-deoksiadenozin (siklo-dA) gibi başka DNA lezyonları da gözlemlenmektedir (Birben ve diğ. 2012). İlk lezyon, 5-metilsitozin (5-MeCyt) oksidasyonu sonucunda meydana gelmekte ve yanlış DNA metilasyon modellerine neden olabilmektedir. Bu durum, gen susturulmasına, kromatin organizasyonunda bozulmalara ve hatalı DNA onarım mekanizmalarına yol açmaktadır (Song ve Pfeifer 2016; Birben ve diğ. 2012). TATA dizisinde meydana gelen siklo-dA ise, bu dizinin proteinlerle etkileşimini sınırlamakta ve gen transkripsiyonunun inhibisyonuna neden olmaktadır (Marietta ve diğ. 2002).

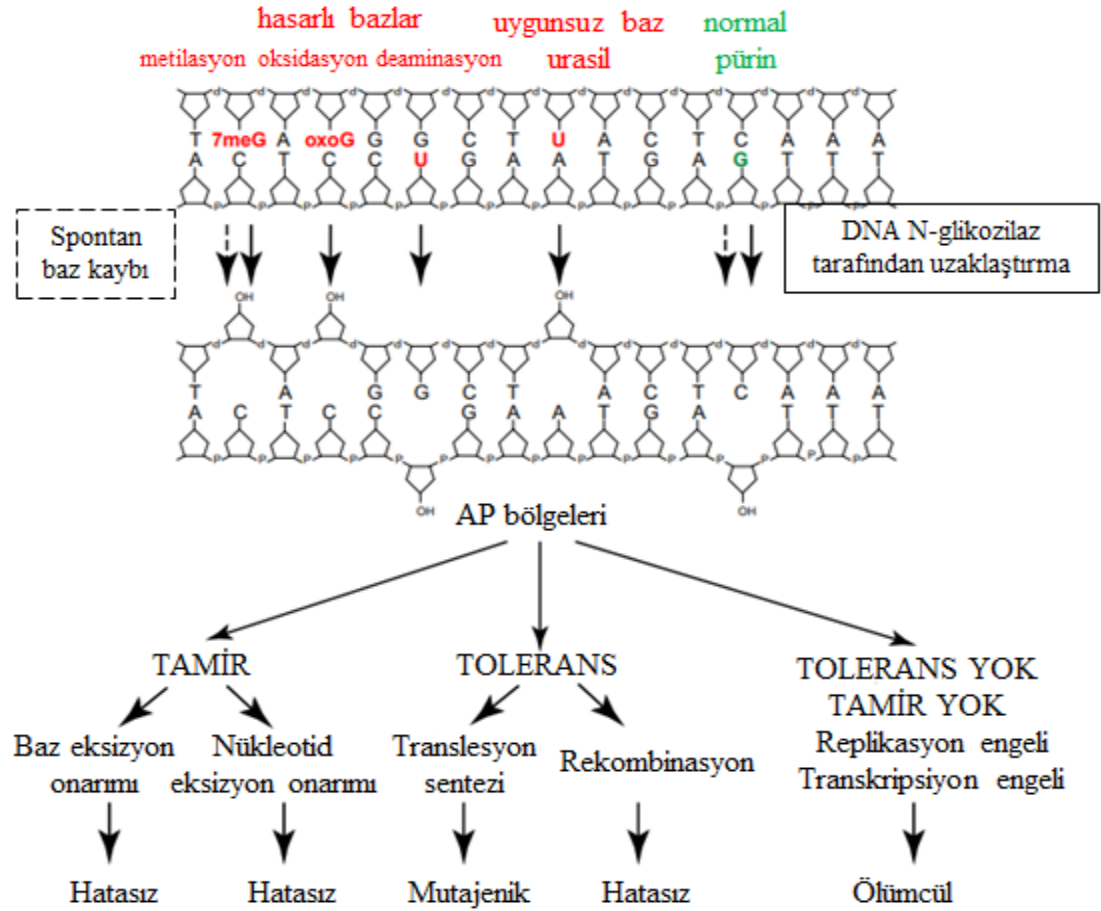


Şekil 2.28: Oksidatif hasar biyobelirteçleri olan 8-OHdG ve 8-oxodG'nin oluşumu (Valavanidis ve diğ. 2009 tarafından yapılan çalışmadan alınmış ve düzenlenmiştir).

2.6.3.1 Apurinik/Apirimidinik Bölgeler, Oksidatif DNA-Protein Çapraz Bağlar ve Onarım Mekanizmaları

Genomda DNA hasarının yaygın formları abazik bölge olarak da bilinen apurinik/apirimidinik (AP) bölgelerdir (Şekil 2.29) (Lindahl 1993; Lindahl ve Andersson 1972). AP bölgeleri, ya su aracılı depürinasyon/depirimidinasyon yoluyla spontan olarak oluşmakta ya da oksitlenmiş ve modifiye olmuş bazların DNA glikozilazlar tarafından uzaklaştırılması sonucu meydana gelmektedir (Lindahl

1993). Bu genetik kod veremeyen AP bölgeleri mutajeniktir ve DNA replikasyonu ve transkripsiyonunu engelleyebilmektedir (Tornaletti ve diğ. 2006; Loeb ve Preston 1986). Memeli ve maya hücrelerinde AP bölgelerini onaran birincil enzim, baz eksizyon onarım (BER) yolu aracılığıyla işlev gören AP endonükleazdır (Li ve Wilson 2014; Tell ve diğ. 2009; Boiteux ve Guillet 2004). AP endonükleazlar, DNA onarım işlevinin yanı sıra, birçok transkripsiyon faktörünün redoks aktivatörü ve birçok genin doğrudan transkripsiyonel düzenleyicisi olarak işlev görmektedir (Kelley ve diğ. 2012; Bhakat ve diğ. 2009).



Şekil 2.29: *S. cerevisiae*'daki spontan AP bölgelerinin orijini, onarımı ve biyolojik sonuçları. DNA'da AP bölgeleri, normal purinlerin veya hasar görmüş bazların N-glikozidik bağlarının spontan hidrolizi ile ve normal, uygunsuz ve hasar görmüş bazların DNA N-glikozilazları tarafından eksizyonu ile oluşur. Bu hasarların onarımı, baz eksizyon onarımı (BER), nükleotid eksizyon onarımı (NER) ve rekombinasyon gibi mekanizmalarla yapılır. Bu onarım yolları, hatasız bir şekilde AP bölgelerini düzeltir. AP bölgeleri ayrıca çoğunlukla mutajenik olan TLS (Translesyon DNA Sentezi) yoluyla tolere edilebilir ve böylece onarım yapılmasa da DNA replikasyonu devam ettirilebilir. Son olarak, onarılmayan AP bölgeleri hücre ölümüne neden olabilir (Boiteux ve Guillet 2004 tarafından yapılan çalışmadan alınmış ve düzenlenmiştir).

DNA ve proteinler arasındaki etkileşimler, hücresel işlevlerin düzgün bir şekilde sürdürülmesi için hayati öneme sahiptir. Oksidatif DNA-protein çapraz bağları (DPC) ise, proteinlerin DNA zincirlerine kovalent olarak bağlanmasıyla oluşmakta ve DNA replikasyonu ve gen transkripsiyonunu durdurabilmeleri sebebiyle tehlike arz etmektedir (Reingruber ve Pontel 2018). Bu tür olaylar, ultraviyole ışık, iyonize radyasyon, krom, nikel ve arsenik gibi metaller, cisplatin, melfalan ve mitomisin C gibi önemli kemoterapötik ilaçlar dahil olmak üzere çeşitli sitotoksik, mutajenik ve kanserojen ajanlara hücrelerin maruz kalması sonucu meydana gelmektedir (Barker ve diğ. 2005). Ayrıca, DPC'ler genellikle aldehitlerle etkileşim ve farklı enzimatik ara ürünlerin DNA'ya bağlanması sonucu oluşmakla birlikte zamanında onarılmadıklarında ciddi mutasyonlara ve hücre ölümlerine neden olabilmektedir (Moon ve diğ. 2023). DPC onarımı homolog rekombinasyon ve nükleotid eksizyonu içermekle birlikte onarım yollarındaki eksiklikler Ruijs-Aalfs sendromu ve Fanconi anemisi ile ilişkilendirilmektedir (Reingruber ve Pontel 2018; Nakano ve diğ. 2007).

DNA'nın karşılaştığı bu hasar türleriyle başa çıkabilmek için hücreler, çeşitli onarım stratejileri geliştirmiştir (Roos ve Kaina 2006). Bu stratejiler, hasarın ciddiyetine göre farklılaşmaktadır. Örneğin, DNA hasarının şiddeti belirli bir eşiği aştığında hücrelerin ölüm yoluyla popülasyondan uzaklaştırılması, bu durumla başa çıkmanın bir yoludur (Roos ve Kaina 2006). Ancak, çoğu durumda hücreler, DNA hasarlarını onarım mekanizmaları aracılığıyla tamir etmeyi veya tolere etmeyi tercih etmektedirler. Oksidatif stres kaynaklı hasarlarla mücadele eden başlıca DNA onarım yolları arasında baz eksizyon onarımı (BER), nükleotid eksizyon onarımı (NER), yanlış eşleşme eksizyon onarımı (MMR) ve çift iplik kırılma onarımı (DSBR) yer almaktadır (Ambekar ve diğ. 2017). DNA onarım mekanizmaları; i) DNA hasarına neden olan reaksiyonun doğrudan tersine çevrilmesi ve ii) hasar görmüş bazların çıkarılarak yerine yeni sentezlenen DNA'nın yerleştirilmesi olmak üzere iki temel prensiple çalışmaktadır (Sancar ve diğ. 2004; Hoeijmakers 2001; Jaruga ve Dizdaroglu 1996). Bu onarım mekanizmalarının etkinliği, genetik bütünlüğün korunması ve hücresel sağlığın sürdürülmesi açısından kritik bir rol oynamaktadır.

2.7 Hücre Ölümü

Hücre ölümü, organizmaların gelişim süreci, homeostazi ve savunma mekanizmalarının düzenlenmesinde temel bir rol oynayan, ancak patolojik süreçler ve yaşlanma ile de yakından ilişkili karmaşık bir biyolojik olaydır. Tek hücreli organizmalar için yaşamın sonu olan hücre ölümü, çok hücreli organizmalarda fizyolojik büyüme ve gelişim için vazgeçilmez bir süreçtir. Hücre ölümü, morfolojik görünümü (apoptotik, nekrotik, otofajik veya mitozla ilişkili), enzimolojik kriterlere (nükleazlar veya kaspazlar, kalpainler, katepsinler ve transglutaminazlar gibi farklı proteaz sınıflarının katılımıyla veya katılımı olmaksızın), fonksiyonel yönleri (programlı veya rastlantısal, fizyolojik veya patolojik) ya da immünolojik özelliklere (immünojenik veya immünojenik olmayan) bağlı olarak sınıflandırılabilir (Kroemer ve diğ. 2009). Hücre Ölümü Adlandırma Komitesi (NCCD), farklı hücre ölümü morfolojilerini ve hücre ölümü ile ilgili terminolojileri ana hatlarıyla belirlemiştir (Kroemer ve diğ. 2009). Ancak 2012'de, NCCD, morfolojik özelliklere odaklanmayı azaltarak, hücre ölümünün biyokimyasal ve genetik analizlerindeki ilerlemeler nedeniyle hücre ölüm modalitelerinin moleküler tanımlarını önermiştir (Galluzzi ve diğ. 2012). Komitenin tanımlamaları, hem in vivo hem de in vitro hücre ölümü ortamlarına uygulanabilir niteliktedir ve hücre ölümünün fonksiyonel sınıflandırması; i) ekstrinsik apoptoz, ii) kaspaz bağımlı veya bağımsız intrinsik apoptoz, (iii) düzenlenmiş nekroz, (iv) otofajik hücre ölümü ve (v) mitotik yıkımı içermektedir (Grogan ve diğ. 2015). Bu hücre ölüm türleri kendilerine özgü morfolojik özellikler sergilemekte ve belirli sinyal yollarını aktive etmektedirler. Uyarıcıların türlerinin yanı sıra, konsantrasyonları da hangi hücre ölümünün gerçekleşeceğini etkileyebilmektedir.

Fizyolojik koşullarda apoptoz, gelişim ve yaşlanma süreçlerinde dokulardaki hücre popülasyonunu regüle eden homeostatik bir mekanizmadır (Elmore 2007). Aynı zamanda, sağlıklı hale gelen veya zararlı etkenler tarafından hasar gören hücrelerde ve bağışıklık tepkilerinde bir savunma mekanizması olarak görev yaparak hastalık patogeneze katkıda bulunabilmektedir. Hem fizyolojik hem de patolojik olarak apoptozu indükleyen geniş bir uyarıcı yelpazesi bulunmasına rağmen, aynı uyarıcılarla karşılaşıldığında tüm hücrelerin aynı şekilde etkilenmediği

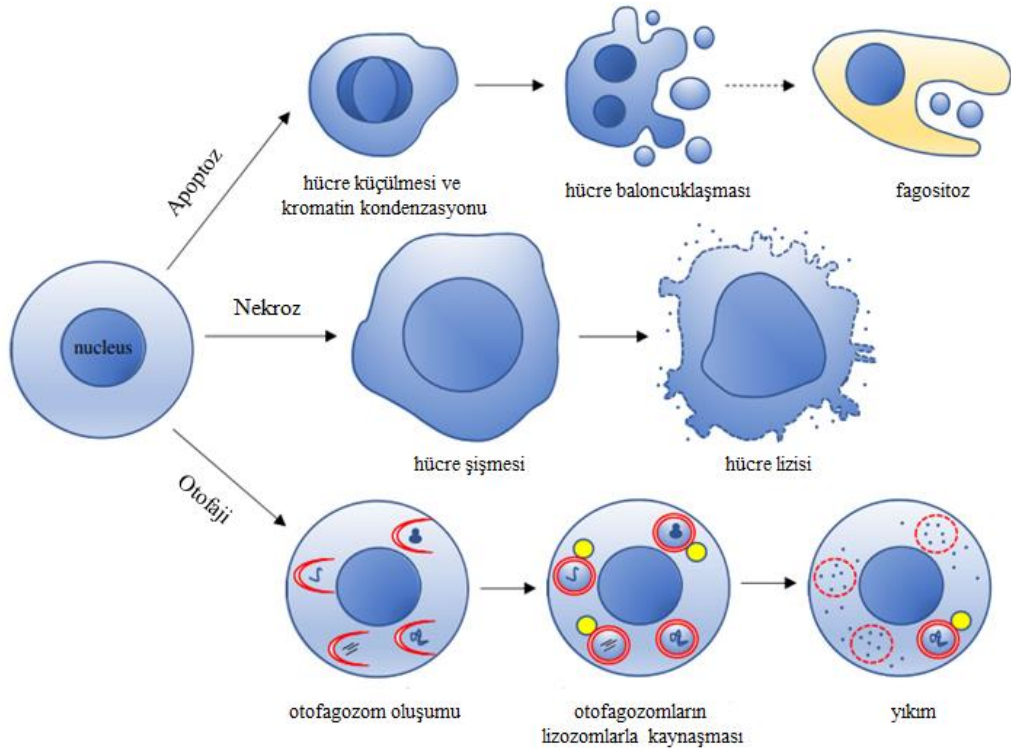
gözlemlenmiştir (Fulda ve diğ. 2010; Kalogeris ve diğ. 2012). Bu ölüm şekli, ilerleyen bölümlerde daha ayrıntılı olarak ele alınmıştır.

Apoptozun aksine nekroz; akut, kazara veya fizyolojik olmayan yaralanmalardan kaynaklanan enerji bağımsız, patolojik ve kontrolsüz bir hücre ölüm türüdür (Kroemer ve diğ. 2009; Galluzzi ve diğ. 2007; Fink ve Cookson 2005; Majno ve Joris 1995). Bu hücre ölüm türü, apoptotik belirteçler ve otofajik vakuolizasyon olmaksızın hücre organellerinin şişmesi, plazma zarının yırtılması ve ardından hücre içeriğinin hücre dışı alana sızması sonucunda hücre lizisi ile ilişkilidir. Bu durum, lokal inflamasyona ve çevre dokuda hasara yol açabilmektedir (Khalid ve Azimpouran 2020). Nekroz ve apoptozun mekanizmaları ve morfolojileri farklı olsa da, bu iki süreç arasında örtüşme vardır. Kanıtlar nekroz ve apoptozun “apoptoz-nekroz sürekliliği” olarak tanımlanan ortak bir biyokimyasal ağın morfolojik ifadelerini temsil ettiğini göstermektedir (Zeiss 2003). Bazı durumlarda, hücre ölümü apoptoz olarak başlasa da çeşitli faktörler nedeniyle nekroza dönüşebilmektedir. Örneğin, devam eden bir apoptotik süreçte kaspazların ve hücre içi ATP seviyesinin azalması, nekrotik ölüm sürecine neden olabilmektedir (Denecker ve diğ. 2001; Leist ve diğ. 1997). Bir hücrenin nekroz veya apoptoz yoluyla ölmesi, kısmen hücre ölüm sinyalinin doğasına, doku tipine, dokunun gelişim aşamasına ve fizyolojik ortama bağlıdır (Zeiss 2003; Fiers ve diğ. 1999).

Programlanmış hücre ölümünün diğer bir mekanizması olan otofaji ise, hasar görmüş organeller, proteinler ve diğer sitoplazmik bileşenleri içeren çift katmanlı bir vezikül olan otofagozomların oluşumu ile karakterizedir. Otofagozomlar, hücresel makromolekülleri ve organelleri parçalayarak hücreler için yenilenebilir enerji ve metabolitler üretmek amacıyla lizozomlarla kaynaşmaktadır (He ve Klionsky 2009). Otofaji, hayatta kalmaya yönelik bir mekanizma olarak işlev görmekle birlikte, otofajik hücre ölümünü de tetikleyebilir; ki bu ikili rolü, hücre ölümü çalışmalarında aktif bir araştırma alanıdır (Marino ve diğ. 2014; Gump ve Thorburn 2011). Otofaji, hücre ölümünü indükleyebilse de, bir hücre ölüm biçimi olmaktan ziyade bir bozunma mekanizması olarak da tanımlanmaktadır (Gump ve Thorburn 2011). Genel olarak otofaji süreci; i) indüksiyon, ii) otofagozom oluşumu, iii) lizozom veya vakuol ile kaynaşma, iv) otofajik cisimciklerin parçalanması ve geri dönüşümü olmak üzere dört adıma ayrılmaktadır. Moleküler detaylar hala aydınlatılmakta olsa da, bu sürecin

düzenlenmesi çeşitli kinazlar, fosfatazlar ve GTPazlar aracılığıyla gerçekleşmektedir (Elmore 2007). Sürecin hem protein sentezi hem de ATP'ye bağımlı olduğu bilinmekle birlikte mitokondrinin, hem otofajiyi hem de apoptozu düzenleyen merkezi bir organel olduğu belirtilmektedir (Rambold ve Lippincott-Schwartz 2011; Elmore ve diğ. 2001). Son olarak, otofajinin moleküler mekanizmalarına ilişkin bilgiler, maya araştırmalarından başlamaktadır. Özellikle otofajiye özgü proteinler (Atg proteinleri) olmak üzere, otofaji düzenleyici bir dizi molekül genetik tarama ile maya hücrelerinde tanımlanmıştır (Chen ve diğ. 2018).

Hücre ölümü türleri arasında otofaji en yüksek sağkalım üstünlüğüne sahiptir, bunu apoptoz takip eder, nekroz ise en düşük sağkalıma sahiptir. Otofaji, hücreler stresle uyarıldığında içgüdüsel olarak apoptozdan önce indüklenmekte ve otofaji inhibe edildiğinde veya etkisiz hale geldiğinde nekroz yerine apoptoz tetiklenmektedir (Alers ve diğ. 2012; Luo ve Rubinsztein 2010; Declercq ve diğ. 2009; He ve Klionsky 2009; Wang ve diğ. 2008). Dolayısıyla, hücreler belirli uyarılara maruz kaldığında iki veya üç tip hücre ölümü aynı anda veya art arda indüklenebilmektedir (Şekil 2.30).



Şekil 2.30: Apoptotik, nekrotik ve otofajik süreçlerin şematik gösterimi (Tettamanti ve Casartelli 2019 tarafından yapılan çalışmadan alınmış ve düzenlenmiştir).

2.7.1 Tip 1 Programlanmış Hücre Ölümü: Apoptoz

Apoptoz terimi, ilk kez 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie tarafından yayınlanan bir makalede, morfolojik olarak belirgin bir hücre ölümü türünü tanımlamak için kullanılmış ve tanımlandığı günden bu yana embriyonik gelişim ve patolojik süreçlerdeki kritik rolü nedeniyle önemli bir araştırma alanı haline gelmiştir. Apoptoz; çok hücreli organizmaların gelişimi, sağlıklı şekilde hayatlarına devamı, ihtiyaç duyulmayan veya anormalleşmiş hücrelerin elimine edilmesi gibi durumlarda gerekli olan koordineli bir hücresel intihar programı olarak tanımlanabilmektedir.

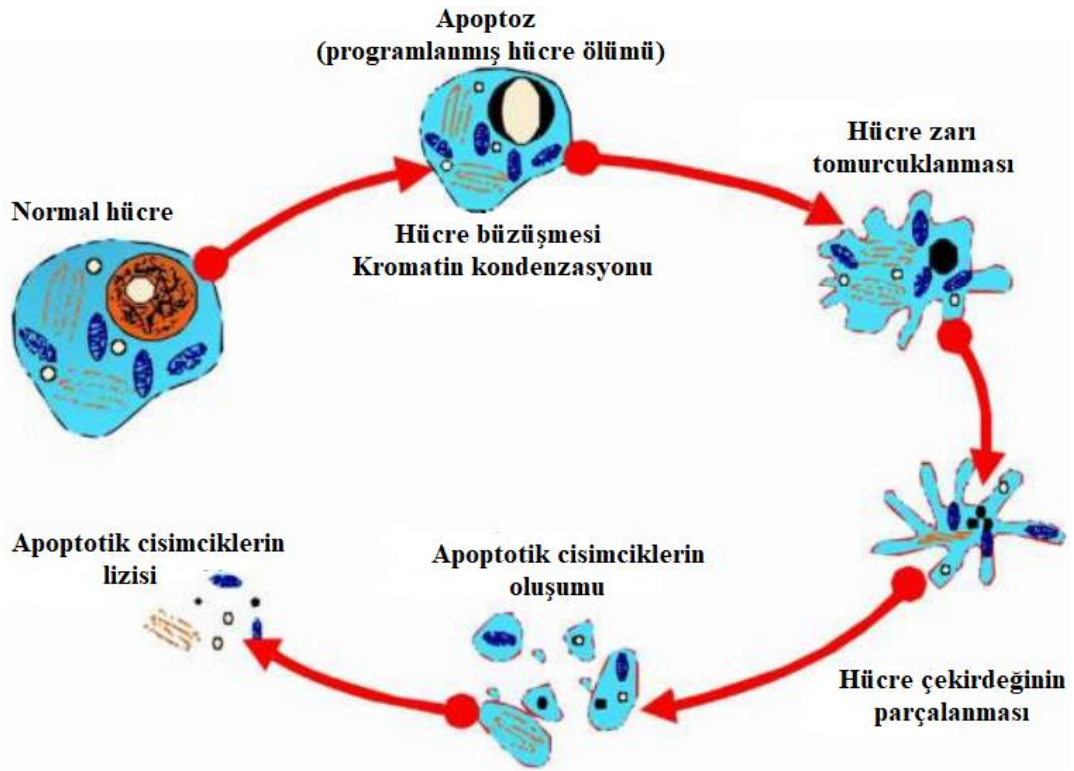
Apoptoz, hücrelerin yaşam ömrü boyunca yapım ve yıkım süreçlerini düzenleyerek organizmanın genel dengesinin korunmasına katkı sağlamaktadır. Örneğin, kemik iliğinde sürekli olarak yeni hücreler üretilirken, her gün yaklaşık 5×10^{11} kan hücresi apoptotik mekanizma ile ortadan kaldırılmaktadır. Ayrıca, bağırsak epitellerinin rejenerasyonu, kanserli veya virüsle enfekte olmuş hücrelerin eliminasyonu, menstruasyon sürecinde endometriyumun yeniden şekillenmesi, embriyonik gelişim sırasında parmaklar arasındaki dokunun giderilmesi ve kurbağaların metamorfozu sırasında kuyruklarının kaybolarak yetişkin forma geçmeleri, apoptoz gibi hücresel ölüm süreçlerinin önemli örneklerindendir (Akşit ve Bildik 2008). Apoptozun yetersizliği kanser, otoimmün hastalıklar ve viral enfeksiyonlarla, aşırılığı ise iskemik kalp hastalığı, inme, nörodejeneratif hastalıklar, sepsis ve çoklu organ yetmezliği sendromu ile ilişkilendirilmektedir (Kam ve Ferch 2000).

Apoptotik hücreler, sağlıklı ve nekrotik hücrelerden belirgin morfolojik özellikleriyle ayrılmaktadır. Apoptotik hücre ölümü sırasında; hücre yuvarlaklaşması, psödopodların geri çekilmesi, hücre hacminde azalma, sitoplazma yoğunluğunda artış, kromatin kondenzasyonu, piknoz, çekirdek parçalanması (karyoreksis), sitoplazmik organellerde çok az veya hiç değişiklik olmaması, plazma membranında kabarcıklaşma, hücre yüzeyinde mikrovilli kaybı gibi belirgin morfolojik değişiklikler gözlenirken, sürecin ileri aşamalarına kadar plazma membran bütünlüğünün korunduğu belirtilmelidir (Şekil 2.31) (Kroemer ve diğ.

2005). Işık ve elektron mikroskobu görüntüleri, apoptoz sırasında her hücrede aynı tür morfolojik değişimlerin meydana geldiğini göstermiştir (Häcker 2000).

Apoptotik hücre ölümünün erken evresinde hücre küçülmesi, apoptozun uyarıcıdan bağımsız olarak neredeyse tüm durumlarında meydana gelen en yaygın hücre ölüm özelliklerinden biridir. Hücre hacminin birincil belirleyicisi sudur ve bu da K^+ , Na^+ ve Cl^- gibi osmotik olarak aktif iyonlardaki değişikliklerle kontrol edilmektedir. Fizyolojik koşullarda iyon gradyanları çeşitli iyon kanalları ve pompalar aracılığıyla korunmaktadır. Apoptozun başlangıcında, hücre küçülmesini başlatan ve erken sinyal olaylarını kontrol ettiği görülen geçici bir Na^+ artışı gözlemlenmiştir (Bortner ve Cidlowski 2003). Hücre küçüldükçe hem Na^+ hem de K^+ iyonlarının kaybı olmakta ve Na^+/K^+ -ATPaz ve Ca^{2+} -bağımlı potasyum kanallarının inhibisyonu bu küçülme olayını azaltmaktadır (McCarthy ve Cotter 1997). Apoptozun erken evresinde hücre küçülmesi ve kromatin kondenzasyonu ışık mikroskobu ile gözlemlenebilmektedir (Kerr ve diğ. 1972). Hücreler küçüldüğünde boyutu azalmakta, sitozol yoğunlaşmakta ve organeller daha sıkı paketlenmektedir. Hücre çekirdeğinin küçülmesi olarak tanımlanan piknoz ise, kromatin yoğunlaşmasının bir sonucudur ve apoptotik hücre ölümünün en karakteristik özelliğidir (Savill ve Fadok 2000). Hematoksilin-eosin ve Giemsa (metilen mavisi, eosin ve azure B karışımı) gibi boyama yöntemleri kullanıldığında apoptotik hücreler yuvarlak veya oval kütleler olarak görünmektedir. Bu hücreler, daha koyu renkli eosinofilik (eosin boyasını tutan) sitoplazma ve parçalanmış nükleer materyali işaret eden yoğun mor renkli kromatin ile tanımlanmaktadır. Boyama yöntemleriyle yapılan histolojik incelemeler, apoptotik hücre ölümünün tek hücrelerde veya küçük hücre kümelerinde gerçekleştiğini göstermektedir (Banfalvi 2017). Öte yandan, elektron mikroskobu, hücrenin iç yapısındaki değişiklikleri daha ayrıntılı şekilde gözlemlemeye olanak sağlamaktadır. Kromatin yoğunlaşmasının erken evresinde, nükleer materyal tipik olarak nükleer zarın altında toplanmakta ve homojen yoğun çekirdekler oluşmaktadır. Kromatin yoğunlaşması, apoptozun erken evrelerinde başlasa da, DNA'nın parçalanması ve nükleozomların oligozomlara ayrılması, daha çok apoptozun ilerleyen aşamalarında meydana gelmektedir (Banfalvi 2017). Süreç boyunca, plazma zarında meydana gelen kabarcıklanmayı (blebbing) takiben karyoreksis gerçekleşmekte ve hücre parçaları, tomurcuklanma adı verilen bir süreçle apoptotik cisimciklere ayrılmaktadır (Elmore 2007). Apoptotik cisimcikler, nükleer

parçaları içeren veya içermeyen, sıkıca paketlenmiş organellerin bulunduğu sitoplazmadan oluşmaktadır (Majno ve Joris 1995). Bu noktada, organellerin bütünlüğünün korunduğu ve tüm yapının sağlam bir plazma zarıyla çevrelendiği bilinmektedir. Apoptotik cisimcikler daha sonra makrofajlar, parenkimal veya neoplastik hücreler tarafından fagosite edilip fagolizozomlarda parçalanmaktadır (Elmore 2007). Apoptoz sürecinde ve apoptotik hücrelerin uzaklaştırılması sırasında inflammatuar bir reaksiyon gözlenmemektedir. Bu durum, apoptotik hücrelerin içeriklerini çevredeki dokuya salmamaları, hızla fagosite edilerek ikincil nekrozun önlenmesi ve fagositik hücrelerin anti-inflammatuar sitokin üretmemesinden kaynaklanmaktadır (Kurosaka ve diğ. 2003; Savill ve Fadok 2000).



Şekil 2.31: Apoptoz sırasında hücrede meydana gelen morfolojik değişiklikler (Szymanek ve diğ. 2012 tarafından yapılan çalışmadan alınmış ve düzenlenmiştir).

Apoptotik hücrelerde protein yıkımı, DNA parçalanması ve ardından gelen fagositik bozunma gibi koşulların tümü biyokimyasal bir süreçle gerçekleşmektedir (Obeng 2020). Bu süreçte, son gerçekleştirme aşamasının tamamen kaspazlara bağlı olduğu görülmektedir. Kaspazlar, aktive edildiklerinde aspartik asit kalıntılarını parçalamaktan sorumlu sistein proteazlardır. İnaktif proenzim formunda bulunan kaspazlar bir kez aktive edildiklerinde diğer prokaspazları aktifleştirerek bir proteaz

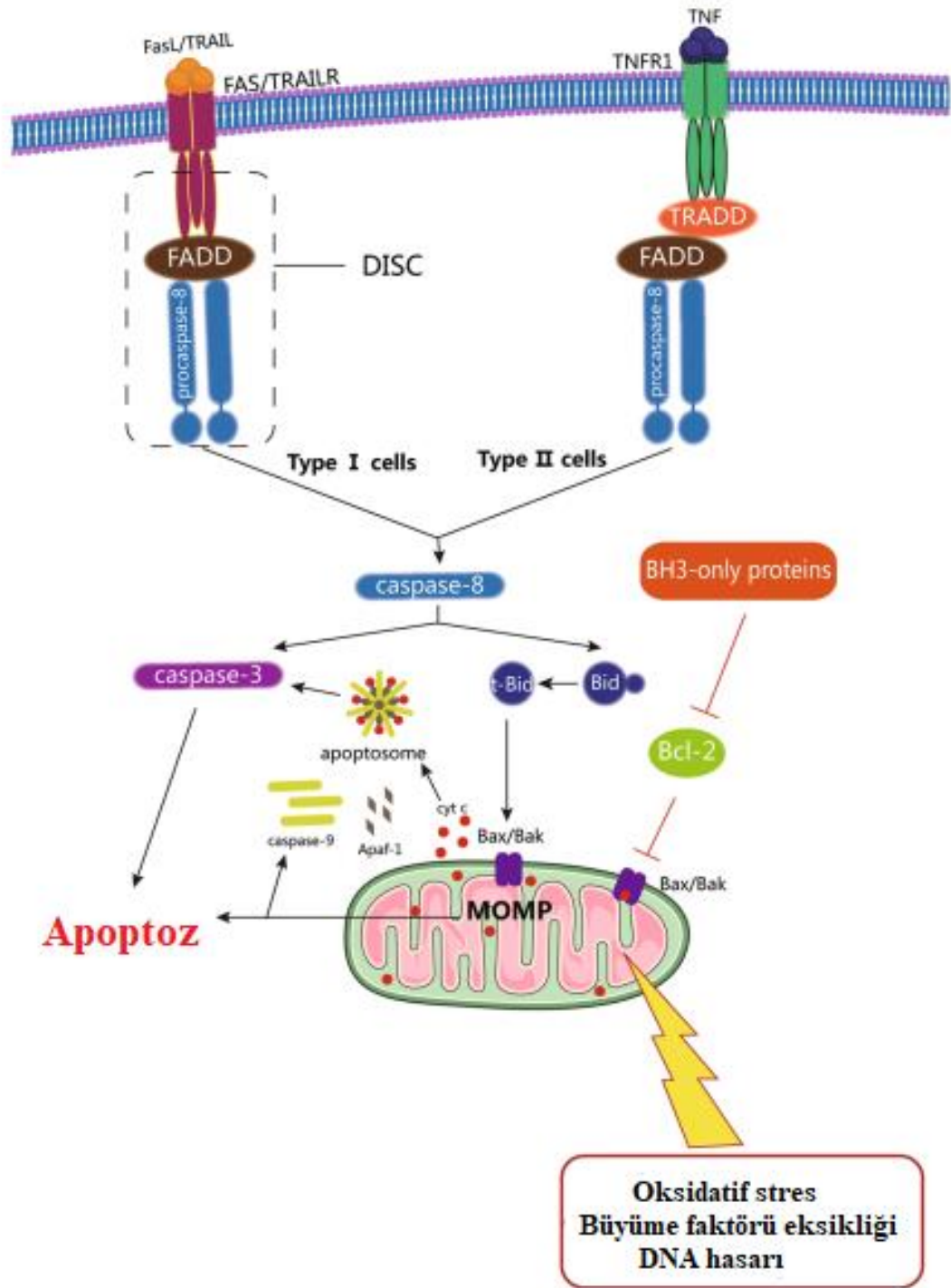
kaskadını başlatmaktadır. Prokaspazların birbirini aktive ettiği proteolitik kaskad, hızlı hücre ölümüne yol açan apoptotik sinyal yolunu tetiklemektedir (Schneider ve Tschopp 2000). Kaspazlar bir kez aktive edildiğinde, hücre ölümü için geri dönüşü olmayan bir süreç başlamaktadır. Bugüne kadar 18 farklı kaspaz tanımlanmıştır. Bunlardan temel olanlar; başlatıcı kaspazlar (kaspaz-2, -8, -9, -10), efektör veya uygulayıcı kaspazlar (kaspaz-3, -6, -7) ve inflamatuvar kaspazlar (kaspaz-1, -4, -5) olarak gruplandırılmaktadır (Rai ve diğ. 2005; Cohen 1997). Bunların dışında kaspaz-11, -12, -13 ve -14 gibi her biri farklı işlevlere sahip kaspazlar da bulunmaktadır. Kaspaz-11 ve -12'nin sırasıyla sitokin olgunlaşmasını ve sitotoksiteyi düzenleyerek septik şok sırasında işlev gördüğü kanıtlanmıştır ve her ikisi de apoptozda rol oynamaktadır. Kaspaz 13, kaspaz 8'in aktivasyonu üzerine apoptozu gerçekleştirebilen sığır kökenli bir gen olarak hizmet etmektedir. Ayrıca, hayatta kalma için önemli olan bazı proteinleri inaktive etmede gerekli olduğu bilinmektedir. Kaspaz-14 ise epidermal farklılaşmada rol oynamaktadır (Fink ve Cookson 2005; Kang ve diğ. 2002; Koenig ve diğ. 2001; Nakagawa ve diğ. 2000).

2.7.1.1 Apoptozun Moleküler Mekanizması: Anti-apoptotik ve Pro-apoptotik Bcl-2 Ailesi Proteinlerinin Rolü

Farklı moleküler mekanizmalar tarafından oldukça hassas bir şekilde regüle edilen, karmaşık ve enerji bağımlı apoptotik hücre ölümü, iki ana yolak ile ilişkilendirilmektedir (D'arcy 2019). Bunlardan ilki; hücre zarındaki ölüm reseptörlerinin aktive olması ile gerçekleşen ekstrinsik (dışsal) yolak ve esasen Bcl-2 protein ailesi tarafından düzenlenen intrinsik (içsel/mitokondriyal) yolaktır (Şekil 2.32). Yolaklar birbiriyle bağlantılı olmakla birlikte bir yolakta aktif hale gelen faktör diğer yolağı etkileyebilmektedir (Elmore 2007; Igney ve Krammer 2002; Hengartner 2000; Saikumar ve diğ. 1999). Ekstrinsik ve intrinsik yolakların yanı sıra, hücre ölümünü indükleyen bir diğer yolak perforin/granzim yolağıdır ve başlık kapsamında bu yolağın ayrıntılarına değinilmemiştir. Hücre ölümüne yol açan süreçte birleşen bu yolaklar genellikle kaspaz-3 enziminin aktivasyonu ile başlamakta ve ardından DNA parçalanması, hücre iskeleti ve nükleer proteinlerin yıkımı, proteinlerin çapraz bağlanması, apoptotik cisimciklerin oluşumu, fagositik hücre reseptör ligandlarının hücre yüzeyinde ifade edilmesi ve sonunda apoptotik

cisimciklerin fagositik hücreler tarafından elimine edilmesi gibi olaylarla tamamlanmaktadır (Kar ve Sivamani 2015).

Ekstrinsik yolakta, hücreyi ölüme sürükleyecek olan sinyal, hücre zarında bulunan reseptörler aracılığıyla hücre içine iletilmektedir. Başka bir deyişle, hücre zarı yüzeyindeki ölüm reseptörleri olarak bilinen moleküller, ölüm sinyallerini algılayarak ekstrinsik apoptotik yolağı başlatmaktadır (Elmore 2007; Danial ve Korsmeyer 2004; Hengartner 2000). Ölüm reseptörleri, tümör nekroz faktörü adı verilen ailenin üyeleridir ve en iyi bilinen ölüm reseptörleri Fas, TNF ve TRAIL'dir (Guicciardi ve Gores 2009; Baetu ve Hiscott 2002). Ölüm reseptörleri, bir ucu hücre dışına, diğer ucu ise hücre içine bakan ve hücre içi kısmında prokaspaz-8'in aktifleşmesini sağlayan, iyi korunmuş bir "ölüm bölgesi" (death domain) taşıyan yüzey reseptörleridir ve bugüne kadar bu reseptörlerin 8 üyesi tanımlanmıştır (Elmore 2007; Jin ve El-Deiry 2005; Saikumar ve diğ. 1999; Kerr ve diğ. 1972). Membrandaki bu reseptörlere ligandlar bağlandığında, reseptörlerde konformasyonel değişiklikler meydana gelmekte ve bu değişiklik sonucunda aktifleşen reseptörler, hücre içindeki bazı moleküllerle etkileşerek, ölüm indükleyici sinyal kompleksi (DISC) adı verilen protein kompleksini oluşturmaktadır (Jin ve El-Deiry 2005; Hengartner 2000; Chinnaiyan ve diğ. 1995). FADD (Fas ilişkili ölüm bölgesi) ve TRADD (TNF reseptör ilişkili ölüm bölgesi) adaptör proteinlerini de içeren ligand-reseptör-adaptör protein kompleksi DISC, prokaspaz-8'i hidrolize ederek aktif kaspaz-8'i ortaya çıkarmaktadır. Aktif kaspaz-8 ise apoptoz sinyalini ya kaspaz-3'ün aktivasyonu ile ya da Bid'in (ekstrinsik ve intrinsik yolakları birbirine bağlayan protein) kesilerek aktif Bid (tBid) haline getirilmesiyle iletmektedir (Chen ve diğ. 2018; Li ve diğ. 2022; Wang ve Tjandra 2013). tBid, intrinsik yolağı başlatmak üzere mitokondriye geçerek proapoptotik proteinler olan Bax ve Bak'ta konformasyonel değişikliklere yol açmakta ve bu proteinlerin dış mitokondriyal membranda por oluşumu için oligomerleşmesini sağlamaktadır (Şekil 2.32) (Wang ve Tjandra 2013; Fan ve diğ. 2005).



Şekil 2.32: Ekstrinsik yolak ve ekstrinsik yolağın aracılık ettiği intrinsik yolak (Chen ve diğ. 2018 tarafından yapılan çalışmadan alınmış ve düzenlenmiştir).

Büyük ölçüde mitokondri tarafından düzenlenen intrinsik yolak ise DNA hasarı, hatalı katlanmış proteinler, büyüme faktörü ve sitokin noksanlığı, metabolik bozukluklar ve hücre döngüsü bozuklukları, UV radyasyonu, c-myc, c-FOS, p53, PTEN gibi onkogenlerin ve tümör supresor genlerin ekspresyonundaki değişiklikler, hipoksi, ısı şok, oksidatif stres gibi çeşitli stres indükleyiciler tarafından aktive

edilebilmektedir (Obeng 2020; McIlwain ve diğ. 2013; Favaloro ve diğ. 2012; Altunkaynak ve Özbek 2008; Elmore 2007; Klener ve diğ. 2006). Apoptozun intrinsik indüksiyonu, kaspaz aktivitesini içeren veya içermeyen çoklu aktif yürütücü mekanizmalarla birlikte biyoenerjetik ve metabolik çöküşü içermektedir (Tablo 2.4). Genel olarak intrinsik apoptoz, mitokondri dış membran geçirgenliğinin (MOMP) artmasıyla gerçekleşmekte ve mitokondri transmembran potansiyelinin kaybı, mitokondri iç membran boşluğu (IMS) proteinlerinin sitozole salınımı ve solunum zincirinin inhibisyonu ile birlikte görülmektedir (Grogan ve diğ. 2015). İntrinsik apoptozda kaspaz aktivitesi, MOMP'nin oluşması, mitokondriden sitozole geçen sitokrom c'nin APAF1 ve dATP ile etkileşerek apoptozom oluşturması ve kaspaz-9 ile kaspaz-3'ü içeren proteolitik kaskadın tetiklenmesiyle ilişkilendirilmektedir (Hassan ve diğ. 2014; Kroemer ve diğ. 2007; Li ve diğ. 1997). Kaspazlardan bağımsız olarak, apoptoz indükleyici faktör (AIF) ve endonükleaz G (EndoG), DNA fragmentasyonuna aracılık etmek üzere mitokondriden sitozole ve oradan da çekirdeğe taşınmaktadır (Büttner ve diğ. 2007; Joza ve diğ. 2001; Li ve diğ. 2001). Sitokrom c, AIF ve Endo G'nin yanısıra mitokondriden sitozole salınan diğer proapoptotik proteinler ise SMAC/DIABLO (Kaspazların ikincil mitokondriyal aktivatörü/Düşük pI'ya sahip direkt IAP bağlayıcı protein) ve serin proteaz Omi/HtrA2'dir. Her iki protein de apoptozun başarılı şekilde gerçekleşmesi için IAP'lerin (apoptoz inhibe edici protein) etkilerinin ortadan kaldırılması ve kaspazların aktive edilmesine yardımcı olmaktadır (Basri ve diğ. 2018; Yang ve diğ. 2003).

Tablo 2.4 Apoptotik hücre ölümünün intrinsik yolağında rol oynayan proteinler ve işlevleri (Elmore 2007 tarafından yapılan çalışmadan alınmış ve düzenlenmiştir).

Kısaltma	ProteinAdı	Fonksiyonu
Smac/DIABLO	Kaspazların ikincil mitokondriyal aktivatörü	Apoptozis esnasında sitozole salınan ve nükleusta kodlanan mitokondriyal proteindir. Apoptotik uyarı sonucu sitokrom c smac protein ile birlikte mitokondriden salınarak kaspazları harekete geçirir.
HtrA2/Omi	Yüksek sıcaklık gereksinimi	Kaspaz aktivatörü şeklinde tanımlanır. Omi mitokondriyal zarlar arasında bulunur ve sağlıklı hücrelerde proteolitik hasarı önler. Apoptotik uyarı sonrası mitokondriyal bütünlüğün bozulması ile sitozole translokasyone olur ve kaspaz-9 ile XIAP etkileşimini bozar.
IAP	Apoptozis protein inhibitörü	Kaspazların endojen inhibitörleridir ve aktif kaspazların degradasyonunu teşvik ederek veya kaspazları substratlarından uzak tutarak kaspaz aktivitesini inhibe edebilirler.
Apaf-1	Apoptotik proteaz aktive edici faktör	CARD (Caspase recruitment domain) domaini içeren bir adaptör proteindir. Yine CARD domaini içeren prokaspaz-9 ile etkileşerek aktif kaspaz-9 oluşumunu sağlar.
Caspase-9	Sisteinil aspartik asit proteaz-9	Apoptotik sürecin başlamasından sorumlu başlatıcı kaspazdır.
AIF	Apoptozis indükleyici faktör	Apoptotik uyarı sonucu mitokondriden ayrılarak nükleusta kromatin yoğunlaşması ve DNA fragmentasyon sürecini başlatır.
CAD	Kaspaz aktive eden DNAaz	CAD, apoptotik sinyal ile çekirdek DNA'sının hızlı şekilde nükleozomal fragmentlere ayrılmasını sağlar. Normal hücrelerde ICAD'a (kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörü) bağlı inaktif halde bulunur fakat hücreler tarafından apoptotik sinyalin alınmasıyla kaspaz-3 tarafından aktive edilir.
Bcl-2	B-hücre lenfoma protein 2	Bcl-2 ailesi apoptotik kaskadın kontrolünde en önemli protein grubudur. Bu proteinlerin bir kısmı

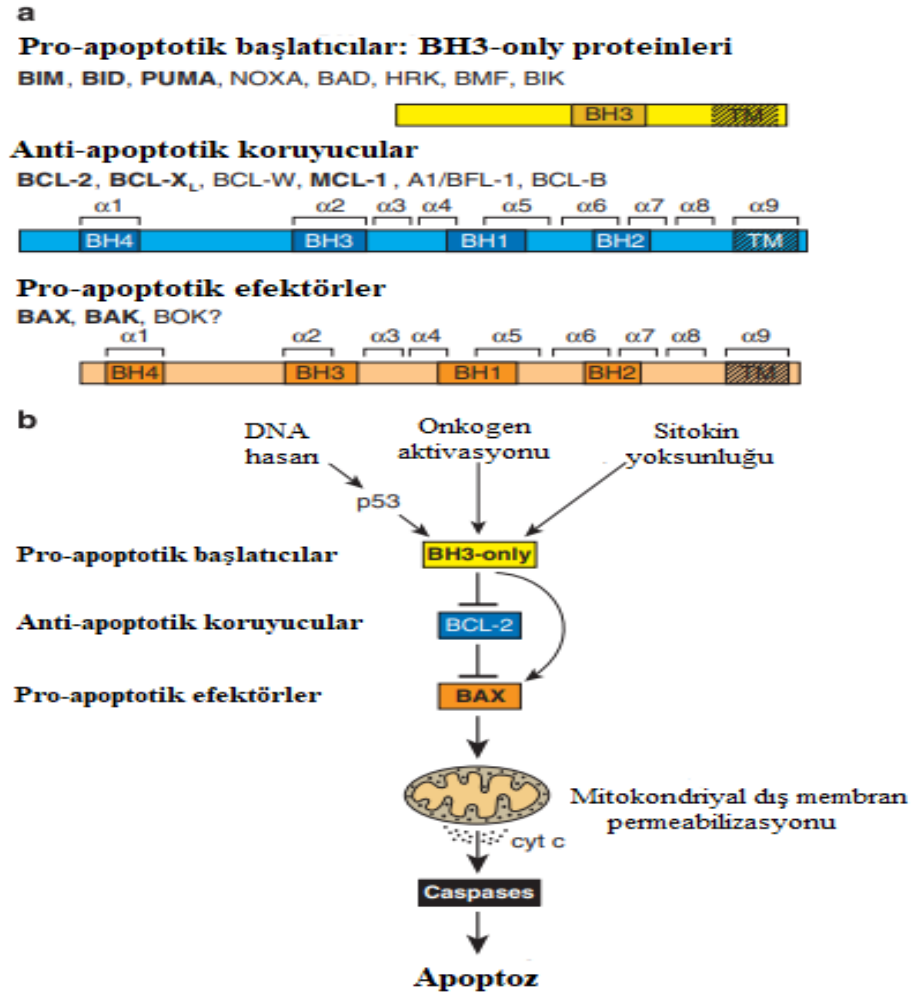
		apoptotik aktivitenin öncülleri iken (Bax ve Bad gibi), diğer kısmı antiapoptotik (Bcl-2 ve Bcl-xL) proteinlerdir. Hücrenin yaşamını sürdürmesi veya ölümü bu proteinlerin seviyelerine bağlıdır. Antiapoptotik Bcl-2 proteini güçlü bir ölüm inhibitörüdür ve etki yeri mitokondrilerdir. Sitokrom c'nin mitokondriden sitozole translokasyonunu engellemede rol oynar. Bcl-2 mitokondri membranı haricinde, endoplazmik retikulum ve nükleer membranda bulunur.
Bcl-x	BCL-2 benzeri protein	Bcl-2 ailesinin bir üyesi olan Bcl-x, antiapoptotik protein Bcl-xL ve proapoptotik protein Bcl-xS adı verilen iki alternatif izoforma sahiptir.
Bcl-XL	BCL-2 bağlantılı protein, uzun izoform	Mitokondriyal membran dışında lokalize durumdadır. Bcl-xL, Bcl-2 ile birlikte mitokondri membranının geçirgenliğini engeller. Bax ve Bad gibi proapoptotik proteinleri inhibe ederek apoptozu engeller. Kaspazların aktivasyonunu, Apaf-1 üzerinden önler.
Bcl-XS	BCL-2 bağlantılı protein, kısa izoform	Proapoptotik proteindir. Farklı uyaranlar tarafından indüklenen apoptozdan hücreleri korumak için Bcl-2 veya Bcl-xL'yi inhibe etme yeteneğine sahiptir.
Bcl-w	BCL-2 benzeri protein	Bcl-w, Bcl-xL ile dizi benzerliği paylaşan antiapoptotik proteindir.
BAG	BCL-2 ilişkili athanogen	BAG ailesi; bitki, hayvan ve mayalarda korunmuş olan ve apoptoz, tümörigenez, sinyalleşme, hücre proliferasyonu, otofaji gibi hücredeki önemli süreçlerde rol oynayan, çok fonksiyonlu proteinlerden meydana gelir. Normal ve stres altındaki koşullarda hücre dengesinde etkili Hsp70/Hsc70 gibi moleküler şaperonlar ile etkileşebilmeleri, bu protein ailesini önemli kılar. BAG ailesinin önemli bir üyesi olan BAG-1 antiapoptotik proteini; sinyal molekülleri, ısı şok proteinleri, moleküler şaperonlar ile

		etkileşime girebilir.
Bcl-10	B-hücre lenfoma protein 10	Proapoptotik proteindir.
BAX	BCL-2 ilişkili X proteini	Sağlıklı hücrelerde sitozolde inaktif monomer olarak bulunur. Apoptotik uyarı sonucu sitozolik Bax mitokondriye transloke olur. Kalsiyum bağımlı proteolitik bir enzim olan kalpain tarafından uyarılarak sitokrom-c salınımına neden olur.
BAK	BCL-2 antagonisti öldürücü hücre	Mitokondriyal dış zara yerleşen, apoptozu indüklemeye özelliğine sahip bir transmembran proteindir. Apoptotik uyarının alınması ile monomerik haldeki Bak proteinleri mitokondriyal dış membranda bir araya gelip homodimer oluştururlar ve mitokondriyal dış membranın geçirgenliğini bozarak sitokrom c'nin sitozole transloke olmasını sağlarlar.
BID	BH3 etkileşen domaine sahip ölüm agonisti	Proapoptotik Bcl-2 üyesidir. Sitozolde serbest olarak bulunur. Alınan apoptotik uyarıyı diğer Bcl-2 üyelerine iletebilen bir sinyal molekülü gibi davranır.
BAD	BCL-2 hücre ölüm antagonisti	Proapoptotik Bcl-2 üyesidir. Antiapoptotik Bcl-2 üyelerine bağlanarak bu proteinlerin apoptozu inhibe etme özelliklerini ortadan kaldırır ve apoptoz mekanizması indükler.
BIM	BCL-2 etkileşen hücre ölümü mediatörü	Sağlıklı hücrelerde mikrotübüllere bağlı olarak bulunan proapoptotik bir Bcl-2 üyesidir. Apoptotik uyarının alınması ile mikrotübüllerden salınan Bim proteini, mitokondri dış membranına taşınarak Bax ve Bak proteinlerine bağlanır ve onların aktifleşmesinde rol oynar.
BIK	BCL-2 etkileşen öldürücü	Proapoptotik proteindir.
Puma	BCL-2 bağlayıcı komponent 3	Tüm antiapoptotik Bcl-2 üyelerini bağlayarak etkisini gösteren proapoptotik proteindir. p53 aracılı apoptozda önemli rol oynar ve in vitro overekspresyonu mitokondri zar potansiyelinde azalma, sitokrom c'nin salınması, Bax ekspresyonunun artışı ile sonuçlanır.

Noxa	Forbol-12-miristat-13-asetat indüklenen protein 1	Antiapoptotik Bcl-2 üyelerinden bazılarını bağlayarak etkisini gösteren proapoptotik proteindir. p53 aracılı apoptozda aday mediatördür. Antiapoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri ile etkileşim içinde olmaları kaspaz 9'un aktifleşmesi ile sonuçlanır.
Myc	Onkogen Myc	Transkripsiyon düzenleme faktörü olan c-myc proteini, ortamda bazı faktörlerin bulunmasına bağlı olarak hücrenin çoğalması veya apoptoza uğramasına sebep olur. C-myc protoonkogeni bir hücrenin büyümesini programlar. Eğer hücrede c-myc ve büyüme faktörleri yok ise büyüme durur, ikisi de var ise çoğalma olur.

Mitokondriyal apoptotik yolak, mitokondri dış ve iç membranları arasında yer alan moleküllerin mitokondri dış membran permeabilizasyonu (MOMP) yoluyla sitozole salınmasıyla ilerlemekte ve bu süreç, Bcl-2 protein ailesine ait moleküller tarafından düzenlenmektedir (Şekil 2.33) (Gross ve diğ. 1999). İlk kez B-hücreli foliküler lenfomalarda keşfedilen Bcl-2 ailesi proteinleri Bcl-2 homoloji (BH) motiflerinin yapısına ve işlevlerine göre; i) pro-apoptotik, ii) anti-apoptotik ve iii) yalnızca BH3 motifi içeren proteinler olmak üzere üç ana gruba ayrılmakta ve üyeler arasındaki dengenin modülasyonu, hücrelerin yaşam veya ölüm süreçlerini deneyimlemelerinde belirleyici olmaktadır (Cory ve diğ. 2003; Kluck ve diğ. 1997). Tüm Bcl-2 ailesi üyeleri, 4 Bcl-2 homoloji alanının (BH) en azından birini içermesi ile karakterizedir. Bu alanlar BH1, BH2, BH3, BH4 olarak ifade edilmekte ve α -heliks segmentlerine karşılık gelmektedir. Anti-apoptotik Bcl-2 proteinleri (Bcl-2, Bcl-w, Bcl-xL, A1, MCL-1) BH1-4 bölgelerini içermekte ve genellikle dış mitokondriyal zar içinde yer almaktadır. Ancak sitozolik, endoplazmik ve nükleer zar lokalizasyonlarına da rastlanmaktadır. Bu proteinler, pro-apoptotik Bcl-2 proteinlerini doğrudan bağlayıp inhibe ederek dış mitokondriyal zarı koruma işlevi görmektedirler (Opferman ve Kothari 2018; Chipuk ve Green 2008). Pro-apoptotik proteinler işlevsel olarak iki sınıfa ayrılmaktadır. Efektör moleküller (BAK, BAX), BH1-3 bölgelerine sahip olup dış mitokondriyal zar üzerinde proteolipit gözenekleri (por) oluşturarak sitokrom c salınımını indüklemektedirler. Yalnızca BH3 bölgesi taşıyan BH3-only proteinleri (BAD, BID, BIK, BIM, BMF, bNIP3, HRK, Noxa,

PUMA) ise belirli hücresel stres yollarında işlev görmekte ve diğer Bcl-2 ailesi üyeleriyle (anti-apoptotik proteinler veya efektör moleküller) protein-protein etkileşimleri aracılığıyla hücresel stres sinyallerini iletmektedirler (Singh ve diğ. 2019; Mukherjee ve diğ. 2010; Chipuk ve Green 2008). BH3-only pro-apoptotik proteinleri, mitokondriyal membran geçirgenliğini indüklemekle yeteneğinden yoksundur ve anti-apoptotik üyelerle bağlanarak veya Bak ya da Bax'ın oligomerleşmesini tetikleyerek işlev göstermektedir (Mukherjee ve diğ. 2010).



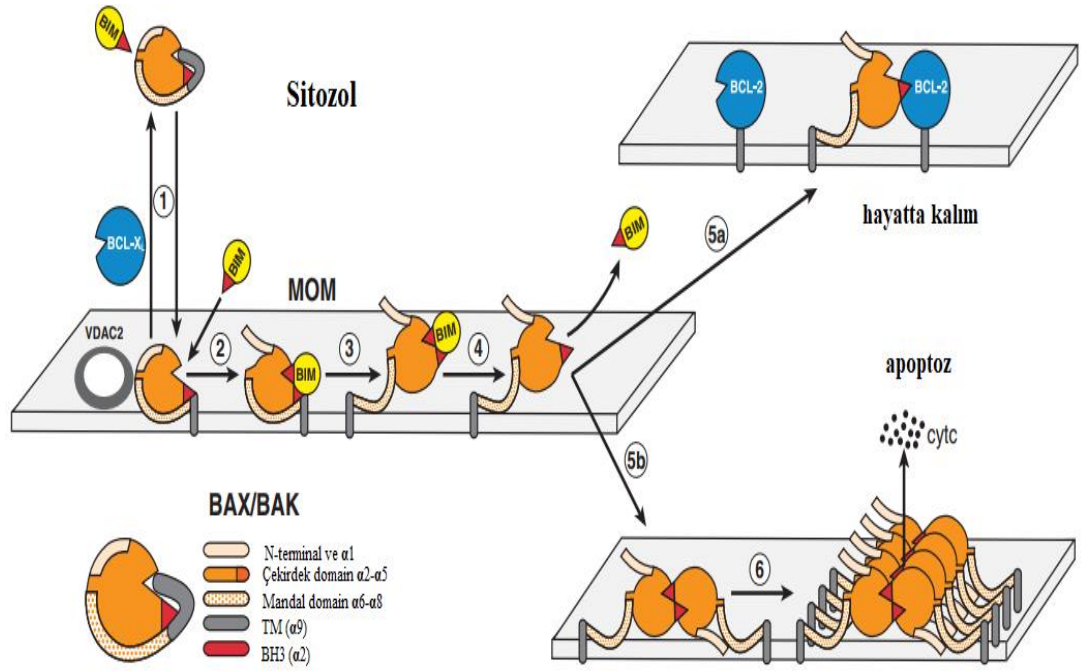
Şekil 2.33: Bcl-2 ailesi proteinlerinin, domain organizasyonuna göre sınıflandırılması. (a) Ailenin başlatıcı, koruyucu ve efektör bölümleri. BCL-2 Homoloji (BH) alanları ve çoklu-BH alanına sahip üyelerdeki dokuz α -heliks gösterilmektedir. BOK, yalnızca özel koşullarda apoptozu uyarmaktadır (Kalkavan ve Green 2018). Apoptozun kontrolünde en önemli olan bölüm üyeleri kalın harflerle belirtilmiştir. Tüm çoklu-BH alanı üyeleri ve bazı BH3-only proteinleri (BIM, BID, BIK, HRK), mitokondriyal dış zar (MOM) üzerinde tutunabilmek için C-terminal transmembran (TM) alanına sahiptir. (b) Bcl-2 protein ailesinin hücre hayatta kalım ve ölümünü nasıl kontrol ettiği gösterilmektedir. Sağlıklı hücrelerde, BAX ve BAK'ın aktivasyonu, hayatta kalmayı destekleyen koruyucu anti-apoptotik proteinler tarafından engellenmektedir. Bu koruyucular, BAX ve BAK

monomerlerinin BH3 bölgesine ($\alpha 2$) bağlanarak bunların aktifleşmesini engellemektedir. Çeşitli stres sinyalleri, BH3-only proteinlerini aktive etmekte ve bu proteinler, anti-apoptotik proteinlere sıkı bir şekilde bağlanarak, BAX ve BAK'ın (pro-apoptotik proteinler) anti-apoptotik proteinler tarafından baskılanması engellenmektedir. Bazı BH3-only proteinleri (özellikle BIM, aktif (kesilmiş) BID ve muhtemelen PUMA), doğrudan BAX ve BAK proteinlerini aktive edebilmektedir. Aktivasyon sonrası BAX ve BAK proteinleri, homomerik yapılar oluşturarak mitokondriyal dış zarın geçirgenliğini artırmaktadır. Geçirgenlik artışı, mitokondriden sitokrom c salınımına yol açmaktadır ve bu durum kaspazları aktive ederek hücrenin ölümünü başlatmaktadır. (Adams ve Cory 2018 tarafından yapılan çalışmadan alınmış ve düzenlenmiştir).

2018 yılında Adams ve Cory tarafından yapılan güncel bir çalışmada anti-apoptotik ve pro-apoptotik Bcl-2 ailesi proteinlerinin etkileşimlerine bağlı olarak mitokondriyal dış membran (MOM) üzerinde hayatta kalım/ölüm kararlarını nasıl regüle ettiğini göstermeye yönelik bir model önerilmiştir (Şekil 2.34). Bu noktada Bcl-2 ailesinin pro-survival (hayatta kalmayı destekleyen) üyelerinin BAX ve BAK proteinlerini nasıl engellediği ve BH3-only proteinlerinin (örneğin BIM'in) bu proteinleri nasıl aktive ettiği açıklanmaktadır. Sağlıklı hücrelerde, anti-apoptotik ve pro-apoptotik çoklu alan proteinleri sitozol ve hücre içi zarlar arasında dağıtılmıştır. Bu proteinlerin ana düzenleyici merkezi, apoptozu kontrol eden mitokondriyal dış zardır. Bcl-2 ve BAK, genellikle MOM'a entegre proteinlerdir. BAX ise esasen sitozolde bulunmaktadır ve BAX'ın hidrofobik kuyruğu ($\alpha 9$), kendi yüzey oluğunda kısmen gizlenmiştir (Suzuki ve diğ. 2000). Apoptotik sinyaller, bu $\alpha 9$ 'un serbest bırakılmasına yol açmakta ve BAX'ın MOM'a yönlendirilmesine neden olmaktadır. Ancak, Bcl-xL gibi anti-apoptotik proteinler, BAX'ı MOM'dan sitozole geri taşıyabilmektedir (Edlich ve diğ. 2011). BAK ise BAX'a benzer bir davranış sergilemekle birlikte BAK'ın dengesi büyük ölçüde MOM'a yerleşmeyi desteklemektedir (Todt ve diğ. 2015). BAX ve BAK, başlangıçta MOM üzerinde, besin ve iyon taşınmasında görevli olan voltaj bağımlı anyon kanalı (VDAC2) ile büyük bir kompleks oluşturmaktadır (Ma ve diğ. 2014; Roy ve diğ. 2009; Cheng ve diğ. 2003). Sağlıklı hücrelerde monomerik BAX, sitozol ile MOM arasında gidip gelirken VDAC2, hem BAX hem de BAK için bir reseptör görevi görmektedir. Apoptotik sinyaller alındığında, çok sayıda BAX'ın sitozolden MOM'a yönelmesi sağlanırken, BAK moleküllerinin büyük çoğunluğu halihazırda MOM üzerinde bulunmaktadır (Adım 1). Aktivasyon süreci, BIM gibi bir BH3-only proteininin BAX'ın arka bölgesine ($\alpha 1$ ve $\alpha 6$ helikslerini içeren) geçici olarak bağlanmasıyla

başlamaktadır (Gavathiotis ve diğ. 2010; Gavathiotis ve diğ. 2008). Bu etkileşim, BAX'ın C-terminal trans-membran (TM) domaininin ($\alpha 9$) yüzey oluşundan serbest bırakılarak MOM'a bağlanmasını sağlamaktadır. Bu adım sonrasında, yüzey oluşunda açılan boşluğa aktivatör Bim proteininin yeniden bağlanması, Bax'ın N-terminal ve $\alpha 1$ domainlerinin serbest bırakılmasını sağlayarak sonraki aktivasyon süreçlerini başlatmaktadır (Adım 2). Ardışık aktivasyon basamakları içinde en dikkat çekici değişiklik, Bax ve Bak proteinlerinin mandal domaininin ($\alpha 6$ - $\alpha 8$) çekirdek domaininden ($\alpha 2$ - $\alpha 5$) ayrılarak katlanmamış bir form kazanmasıdır (Brouwer ve diğ. 2014; Czabotar ve diğ. 2013) (Adım 3). Bu süreç, BH3-only aktivatörünü (BIM) dışarı itmekte ve BAX veya BAK'ın BH3 bölgesini ($\alpha 2$) açığa çıkarmaktadır (Adım 4). Mevcut durumda hücre kaderini belirleyen iki olasılık bulunmaktadır. İlk olasılık, hayatta kalımı destekleyen anti-apoptotik proteinlerin açığa çıkan BH3 bölgesine bağlanması halinde apoptozun engellenmesidir (Adım 5a). İkinci olasılık ise, hayatta kalımı destekleyen anti-apoptotik proteinlerin BH3-only proteinleri tarafından bağlanması/meşgul edilmesi sonucu katlanmamış BAX veya BAK monomerlerinin çekirdek bölgelerinde bulunan BH3/oluk etkileşimleri aracılığıyla homodimerler oluşturmalarıdır (Brouwer ve diğ. 2014; Czabotar ve diğ. 2013; Dewson ve diğ. 2012; Dewson ve diğ. 2008). (Adım 5b). Ancak, bu dimerlerin nasıl birleşip oligomer oluşturdıkları (Adım 6) ve bu oligomerlerin dış mitokondriyal zarı nasıl geçirgenleştirdiği konusunda kesin bir bilgi bulunmamaktadır.

BH3-only proteinlerinin, BAX ve BAK ile doğrudan etkileşime girerek bu proteinlerin aktivasyonunu tetikleyebileceği kanıtlanmış olmasına rağmen bu etkileşimin, zorunlu bir gereklilikten ziyade katalitik bir mekanizma ile gerçekleşiyor olabileceği düşünülmektedir. Zira, Bcl-2 anti-apoptotik proteinlerinden ve BH3-only proteinlerinden yoksun şekilde tasarlanmış bir memeli hücre hattında, BAX ve BAK kendiliğinden dış mitokondriyal zara bağlanmış, oligomerleşmiş ve apoptozu indüklemiştir (O'Neill ve diğ. 2016). Bu durum, BAX ve BAK'ın hücre ölümünü indükleme kapasitesinin doğal olarak mevcut olduğunu, ancak bu sürecin hayatta kalımı destekleyen proteinler tarafından sıkı bir şekilde kontrol altında tutulması gerektiğini göstermektedir. Anti-apoptotik proteinlerin bu kontrol mekanizması, gereksiz ve istenmeyen hücre ölümünü engellemede kritik bir öneme sahiptir.



Şekil 2.34: Bcl-2 protein ailesi üyeleri arasındaki muhtemel etkileşimlere dayalı bir model. Dış mitokondriyal zar (MOM) üzerindeki hayat/ölüm kararlarını açıklayan bu model, hayatta kalmayı destekleyen protein ailesinin BAX ve BAK proteinlerini nasıl kontrol ettiği ve BH3-only proteinlerinin (burada BIM) bu proteinlerin aktivasyonunu nasıl başlattığını ortaya koymaktadır (Adams ve Cory 2018 tarafından yapılan çalışmadan alınmış ve düzenlenmiştir).

2.7.1.1.1 Anti-apoptotik Bcl-2 Proteinlerinin Antioksidan Fonksiyonları

Başta Bcl-2 proteini olmak üzere Bcl-2 protein familyasının anti-apoptotik fonksiyon gösteren üyelerinin hücreyi aşırı oksidatif stresten korumak için antioksidan etki gösterdiği yaklaşık son 30 yıldır yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. 1993 yılında Hockenbery ve diğ. tarafından yapılan bir çalışmada, anti-apoptotik Bcl-2 proteininin, hücre içinde mitokondri, endoplazmik retikulum ve nükleer membran gibi serbest radikal üretiminin yoğun olduğu bölgelere lokalize olduğu ve hidrojen peroksit (H_2O_2) ile menadion gibi oksidatif stres kaynaklı hücre ölümlerine karşı koruma sağladığı belirtilmiştir. Ancak Bcl-2, serbest radikal üretimini tamamen engellememiş, bunun yerine bu radikallerin hücresel bileşenlere zarar vermesi önlenmiştir. Çalışmada, Bcl-2'nin serbest radikal üretimi ile bu radikallerin hücre zarları gibi hayati hücresel bileşenlere zarar vermesi arasındaki kritik bir noktada devreye girdiği ve bu etkisini bir antioksidan yolak üzerinden gerçekleştirdiği rapor edilmiştir. Özellikle Bcl-2 overekspresyonunun lipid peroksidasyonunu önleyerek

hücrel zar bütünlüğünü koruduğu ve aynı zamanda DNA hasarını da engellediği tespit edilmiştir. Aynı yıl yapılan bir diğer çalışmada (Kane ve diğ. 1993), Bcl-2 proteininin apoptoz ve nekroz üzerindeki koruyucu etkileri araştırılmış ve özellikle, glutatyona bağımlı bir mekanizma incelenerek hücrelerin oksidatif strese karşı nasıl korunduğu değerlendirilmiştir. Hücrel oksidatif hasara karşı korunmada kritik rol oynayan glutatyonun (GSH) sentezini azaltan ajanlar (bütiyonin sülfoksimin (BSO), dietil maleat (DEM)) kullanıldığında, Bcl-2 ekspresyonu olmayan hücrelerin hızla öldüğü gözlenmiştir. Bu noktada GSH eksikliği lipid peroksidasyonuna neden olmuş ve bu süreç hücre ölümüne yol açmıştır. Ancak Bcl-2'nin overeksprese edilmesi ROS artışı ile ilişkili lipid peroksidasyonunu tamamen baskılamış, hücrel zar bütünlüğü korunmuş ve apoptotik ve nekrotik nöral hücre ölümü engellenerek sağkalım sağlanmıştır. Böylece Bcl-2'nin bir antioksidan protein olarak işlev gördüğü ve serbest radikalleri temizlemek yerine onların zararlı etkilerini düzenlediği ortaya konmuştur. Ellerby ve diğ. (1996) tarafından yapılan çalışmada, Bcl-2 proteininin hücrel oksidasyon-redüksiyon potansiyelini nasıl etkilediği ve apoptoz ile nekroz üzerindeki koruyucu etkileri incelenmiştir. Çalışma, özellikle glutatyon metabolizması, ROS regülasyonu ve antioksidan enzim aktiviteleri üzerinde Bcl-2'nin rolünü anlamayı hedeflemiştir. Bu noktada, *PC12* ve *GT1-7* nöral hücre hatlarında, Bcl-2 overekspresyonunun hücrel redoks potansiyeli ve enerji metabolizmasını daha indirgenmiş bir duruma kaydırıldığı ve oksitlenmiş glutatyonun (GSSG) toplam glutatyona (GSH+GSSG) oranı ile NAD⁺/NADH oranını düşürdüğü ifade edilmiştir. *GT1-7* hücre hattında Bcl-2 ekspresyonunun antioksidan enzim aktivitelerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmazken, *PC12* hücre hattında katalaz ve süperoksit dismutaz aktivitelerinde artışı indüklediği belirtilmiştir. Ayrıca, serum çekilmesiyle indüklenen apoptoz sırasında, kontrol hücrelerinin hayatta kalım oranı önemli ölçüde azalırken, Bcl-2 overekspresyonu hücrelerin %80-90 oranında hayatta kalmasını sağlamıştır. Bu proteinin apoptozun yanı sıra nekroz üzerinde de koruyucu bir etki göstererek, geniş bir hücrel ölüm mekanizmasına müdahale ettiği görülmüştür. Lee ve diğ. (2001) tarafından yapılan çalışmada, Bcl-2'nin anti-apoptotik özelliklerinin ötesinde, hücrel oksidatif stres, nitrik oksit üretimi ve proteazom fonksiyonları üzerindeki düzenleyici etkileri incelenmiştir. Bu amaçla Bcl-2 overeksprese NT-2/D1 ve SK-N-MC nöral hücre hatlarında, yalnızca vektör içeren kontrol hücreleri ile karşılaştırmalı olarak antioksidan savunma parametreleri ve oksidatif hasar incelemesi yapılmıştır. Bcl-2 transfektanları, H₂O₂'e karşı direnç

göstermiş, hücrel antioksidan savunma sistemlerini güçlendirmiş ve özellikle, GSH ile Cu/Zn-süperoksit dismutaz (SOD1) aktivitesinde bir artış gözlemlenmiştir. Ancak, Bcl-2'nin etkisi, bazı antioksidan enzimlerin aktivitelerinde (Mn-süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz) bir değişiklik yaratmamıştır, bu da Bcl-2'nin sadece belirli hücrel savunma yollarını etkileyebileceğini göstermiştir. Ancak, Bcl-2 overekspresyonu, oksidatif DNA hasarı ve lipid peroksidasyonu gibi temel hücrel hasar biçimlerinde anlamlı bir azalma sağlamamakla birlikte 3-nitrotirozin ve protein karbonil seviyelerini düşürüp proteazom aktivitelerini artırmıştır. Toplu olarak bu sonuçlar, Bcl-2'nin hücrel antioksidan savunma durumunu artırdığını, ancak bu artışın DNA ve lipidlerdeki oksidatif hasarın seviyelerinde bir azalmaya yol açmadığını göstermektedir. Ayrıca, Bcl-2'nin peroksinitrit ve diğer reaktif azot türlerinin oluşumunu azaltabileceği ve hücrel homeostazı koruyarak protein onarımında rol oynayabileceği ifade edilebilir. Gupta ve diğ. (2003) tarafından yapılan çalışmada ise, arsenik trioksit (As_2O_3) normal periferik kan T hücrelerinde apoptozu başlatıp başlatmadığı, oksidatif stresin bu süreçteki rolü ve Bcl-2'nin bu etkileri nasıl düzenlediği incelenmiştir. Çalışmada, As_2O_3 'ün klinik olarak uygulanabilir konsantrasyonlarında periferik kan T hücrelerinde apoptozu indüklediği ve bunu oksidatif stresi artırarak gerçekleştirdiği gösterilmiştir. As_2O_3 indüklü apoptoz; mitokondriyal transmembran potansiyelinin ($\Delta\psi_m$) azalması, ROS artışı, GSH seviyelerinin düşmesi, mitokondriden sitokrom c ve AIF salınımı, kaspaz aktivasyonu, Bcl-2 ve Bcl-xL'in down-regülasyonu ve Bax ekspresyonunun up-regülasyonu ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, eksojen olarak eklenen GSH hücreleri As_2O_3 indüklü apoptozdan korumuştur. Bcl-2 özelinde bu proteinin overekspresyonu, As_2O_3 indüklü apoptozu inhibe etmiş ve $\Delta\psi_m$ 'nin depolarizasyonunu, ROS üretimini ve sitokrom c ile AIF salınımını engellemiştir. Bu sonuç, Bcl-2'nin hücrel oksidatif hasarı engelleyerek hücrenin hayatta kalmasını sağlamada dolaylı olarak antioksidan işlev gördüğünü gösteren önemli bir bulgudur. Aynı yıl yapılan bir başka çalışmada (Saitoh ve diğ. 2003), Bcl-2 geninin tert-bütill hidroperoksit (t-BuOOH) indüklü hücre sitotoksitesine karşı koruyucu rolü araştırılmıştır. Çalışmada, özellikle Bcl-2'nin lipid peroksidasyonunu baskılama, askorbat (C vitamini) alımını artırma ve apoptozla ilişkili moleküler mekanizmalar üzerindeki olası etkileri incelenmiştir. Bu amaçla, Rat1 hücreleri t-BuOOH'a maruz bırakıldığında mitokondriyal disfonksiyon, lipid peroksidasyonu ve apoptoz indüksiyonu gözlemlenmiştir. Buna karşılık, Bcl-

2'nin eksprese edildiği b5 hücrelerinde t-BuOOH'ın neden olduğu lipid peroksidasyonu, kaspaz-3 aktivasyonu ve DNA fragmentasyonu baskılanmıştır. İlginç bir şekilde, Bcl-2'nin hücre içi ROS üretimi ve kaspaz-1 aktivasyonu üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığı bulunmuştur. Bu bulgu, Bcl-2'nin savunma mekanizmasının spesifik olarak lipid peroksidasyonunu hedef aldığını göstermektedir. Ayrıca, Bcl-2 ekspresyonunun, hücre içi askorbat alımını önemli ölçüde artırdığı ifade edilmiştir. Bu bulgu, hücrenin antioksidan kapasitesini artırmaya yönelik bir mekanizma olarak değerlendirilebilir. 2007 yılında Chen ve Pervaiz tarafından yürütülen bir çalışmada ise, Bcl-2'nin tümör hücrelerinde mitokondriyal solunum üzerindeki etkisi ve bu etkinin hücresel oksidatif stresle ilişkisi detaylı bir şekilde incelenmiştir. Araştırmacılar, Bcl-2'nin oksijen tüketimini artırarak hücre içi pro-oksidan bir ortam oluşturduğunu ve bunun hücre hayatta kalımı üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Bu amaçla insan lösemi hücre hattı (CEM) ile rahim ağzı kanseri hücreleri (HeLa) kullanılmış ve ayrıca Bcl-2'nin overeksprese edildiği (CEM/Bcl-2) ve kontrol hücre hatları (CEM/Neo) oluşturulmuştur. Bcl-2'nin overeksprese edildiği hücrelerde oksijen tüketimi ve sitokrom oksidaz (COX) aktivitesi artmıştır. Bcl-2'nin mitokondriyal solunumu destekleyerek süreçte pro-oksidan bir ortam oluşturduğu ve enerji metabolizmasını optimize ettiği gözlenmiştir. Bcl-2, mitokondriyal solunumu artırarak hücre içi ROS seviyelerinde bir miktar artışa yol açmasına rağmen hücrelerde ciddi oksidatif hasara neden olmamış; aksine ROS seviyelerini kontrollü bir şekilde düzenleyerek tümör hücrelerinin hayatta kalımına katkı sağlamıştır. Bu bulgular, Bcl-2'nin hem apoptozu önleyen anti-apoptotik bir protein olarak hem de mitokondriyal respirasyonu artırarak pro-oksidan ortam oluşturan bir düzenleyici olarak görev yapan ikili rolüne işaret etmektedir. Aynı yıl yapılan bir diğer çalışmada (Zimmermann ve diğ. 2007) ise, Bcl-2'nin mitokondriyal glutatyon (GSH) havuzunu düzenlemedeki rolü ve bunun hücresel antioksidan savunma mekanizmalarına nasıl katkıda bulunduğu araştırılmıştır. Çalışmada Bcl-2, BH3 bölgesi aracılığıyla GSH ile doğrudan bağlanmış ve bu durum mitokondriyal membran üzerinde lokalize bir antioksidan savunma sağlamıştır. Ayrıca, bu etkileşim, mitokondriyal proteinlerin oksidasyonunu önleyerek apoptozu geciktirmiştir. BH3 mimetikleri ise, GSH ile bağlanmayı doz bağımlı şekilde inhibe edip mitokondriyal oksidatif stresi artırarak hücre ölümünü hızlandırmıştır. Sonuç olarak bu çalışma, Bcl-2'nin anti-apoptotik rolünün yanı sıra mitokondriyal glutatyon düzenlenmesi yoluyla oksidatif stresi azaltarak hücresel antioksidan savunmada

önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Métrailler-Ruchonnet ve diğ. (2007) tarafından yürütülen çalışmada, Bcl-2 proteininin hücreleri hiperoksi (yüksek oksijen konsantrasyonlarına maruz kalma) indüklü apoptoza karşı nasıl koruduğunu araştırmayı amaçlamıştır. Özellikle, Bcl-2'nin mitokondriyal apoptotik yolağın inhibisyonu ve hücre içi antioksidan kapasitenin artırılması yoluyla koruma sağladığı hipotezi test edilmiştir. Bu amaçla fare fibroblast hücre hattı olan L929 hücreleri kullanılmış ve Bcl-2'nin overeksprese edildiği ve kontrol hücre hatları oluşturulmuştur. Hücreler %95 oksijen konsantrasyonuna (hiperoksi) maruz bırakılarak oksidatif stres indüklenmiştir. Bcl-2'nin overeksprese edildiği hücrelerde hiperoksi indüklü apoptoz belirgin şekilde azalırken, kontrol hücrelerinde apoptozun sıkça görüldüğü tespit edilmiştir. Bcl-2, yalnızca kaspaz bağımlı mekanizmalarla değil, aynı zamanda kaspazdan bağımsız yollarla da apoptozu engellemiştir. Bu protein, hiperoksiye maruz kalan hücrelerde hücre içi glutatyon seviyelerini artırarak oksidatif stresin azaltılmasına da katkıda bulunmuş ve bu şekilde dolaylı olarak antioksidan savunma mekanizmalarını desteklemiştir. Porcelli ve diğ. (2008) tarafından yapılan çalışmada ise, solunum kompleksi I enziminde defekt taşıyan insan tiroid karsinoma hücre hatlarında Bcl-2 proteininin antioksidan işlevi, sitoskeletal stabiliteyi koruma ve oksidatif stresin etkilerini hafifletme kapasitesi incelenmiştir. Glikoliz inhibe edilip enerji üretimi yalnızca oksidatif fosforilasyona bırakıldığında, bu hücreler kaspazdan bağımsız bir hücre ölüm yolunu tetiklemiş ve süreç, glutatyon homeostazındaki ciddi bir dengesizlik ile aktin sitoskeletonunun parçalanmasıyla sonuçlanmıştır. Bcl-2'nin overekspresyonu, hücrelerde oksidatif stres seviyelerini belirgin şekilde azaltmış ve bu etki özellikle glutatyon homeostazının korunması ile ilişkilendirilmiştir. Solunum kompleksi I'nin bozulması, oksidatif stresin artmasına ve hücre iskeletin (aktin ve mikrotübül yapıları) parçalanmasına yol açarken, Bcl-2'nin varlığı bu yapıları korumuştur. Ayrıca, Bcl-2, hücrelerin adezyon yeteneğini artırmış ve bu durum hücrelerin çevresel streslere karşı direncini güçlendirmiştir. Bu protein hücre yapısını koruma ve oksidatif stresin etkilerini azaltma işlevine rağmen, hücre canlılık üzerinde anlamlı bir iyileşme sağlayamamıştır.

Anti-apoptotik Bcl-2 ailesinin bir diğer üyesi olan Bcl-xL'nin, homoloğu Bcl-2 gibi, çeşitli endojen ve ekzojen oksidanlara karşı doğrudan veya dolaylı olarak antioksidan etkiler göstererek hücreleri koruduğu ve hücre direnci artırdığı, sınırlı

sayıda çalışmada ifade edilmektedir. Gottlieb ve diğ. (2000) tarafından yürütülen bir çalışmada, Bcl-xL proteininin TNF- α veya harici oksidanlarla indüklenen apoptoz sırasında hücrel redoks durumu ve mitokondriyal işlevler üzerindeki etkisi incelenmiştir. Bu kapsamda, TNF- α ve H₂O₂ ile muamele edilen fare hibridoma hücre hattı (2B4), apoptotik bir sinyale yanıt olarak hücrelerin redoks durumunun düzenlenmesinde Bcl-xL'nin rolünü incelemek için hücrel bir model olarak kullanılmıştır. TNF- α ile apoptoza yönlendirilen hücrelerde, TNF- α , önce mitokondriyal zar potansiyelinde ($\Delta\Psi_m$) kısmi bir düşüşe, ardından yüksek seviyelerde ROS üretimine neden olmuştur. Bcl-xL ekspresyonu ise, TNF- α muamelesi sonrasında $\Delta\Psi_m$ 'deki başlangıç düşüşünü ve sonrasındaki ROS üretimini engellemiştir. Ayrıca, bu hücreler H₂O₂ gibi oksidanlarla yapılan muamele sonrası $\Delta\Psi_m$ 'deki ilk düşüşü engelleyememiş, ancak sonrasında mitokondriyal zar potansiyeli geri kazanılabilmektedir. Bu veriler, Bcl-xL'nin doğrudan bir antioksidan gibi davranmadığını, ancak ROS üretimi ve mitokondriyal zar potansiyelini düzenleyerek mitokondrilerin regülasyonunda rol oynadığını göstermektedir. Saez-Atienzar ve diğ. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada ise, Parkinson ve Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklarla ilişkilendirilen Lösin Zengin Tekrar Kinaz 2 (LRRK2) enziminin seçici inhibitörü GSK2578215A ile indüklenen mitokondriyal dinamikler ve otofaji süreçleri üzerinde Bcl-xL proteininin etkilerini incelemek amacıyla dopaminerjik SH-SY5Y hücre hattı kullanılmıştır. Bu çalışmada, GSK2578215A'nın hücre toksisitesine yol açtığı ve bunun mitokondriyal morfolojiyi bozarak reaktif oksijen türlerinde dengesizlik oluşturduğu gözlemlenmiştir. Bcl-xL overekspresyonunun, ROS üretimini azalttığı, tübülün hiperasetilasyonunu ortadan kaldırdığı, mitokondriyal zar potansiyelini koruduğu, Bax ve Drp-1 translokasyonunu engellediği ve buna bağlı olarak GSK2578215A ile indüklenen mitokondriyal fizyonu inhibe ettiği, ayrıca otofagozom-lizozom füzyonunu yeniden sağladığı bulunmuştur. Özetle, bu çalışmada, Bcl-xL'nin LRRK2 inhibisyonunun neden olduğu mitokondriyal değişiklikleri engelleyerek ve ROS temizleme işleviyle mitokondriyal homeostazı koruyarak hücre sağkalımını artıran önemli bir antioksidan fonksiyon sağladığı gösterilmiştir.

2.7.1.2 Maya Apoptozu

Mayalar, oksidatif stresin yanı sıra bunun programlanmış hücre ölümü (PCD) ve yaşlanma üzerindeki etkilerini incelemek için en çok tercih edilen deneysel modellerden biri haline gelmiştir. Tomurcuklanan maya türü *S. cerevisiae* ve bölünen maya türü *S. pombe*, diğer deneysel modellere göre çeşitli avantajlar sunmaktadır. Örneğin, bu mayalar kısa bir yaşam döngüsüne sahip olmakla birlikte genetik olarak kolayca manipüle edilebilmektedirler. Bu özellikleriyle bakterilere benzeseler de, aynı zamanda ökaryotlara özgü temel hücresel süreçleri de barındırmaktadırlar (Carmona-Gutierrez ve diğ. 2010). En önemlisi, önceki çalışmalar, apoptoz gibi programlanmış hücre ölümünün temel unsurlarının mayalarda da korunduğunu (Büttner ve diğ. 2007; Fahrenkrog ve diğ. 2004; Wissing ve diğ. 2004; Madeo ve diğ. 2002; Fröhlich ve Madeo 2001; Madeo ve diğ. 1999; Madeo ve diğ. 1997) ve ROS birikiminin bu süreçlerde önemli bir rol oynadığını ortaya koymuştur (Jeon ve diğ. 2002; Madeo ve diğ. 1999). *S. cerevisiae*, fosfatidilserin eksternalizasyonu, DNA fragmentasyonu, kromatin yoğunlaşması, mitokondriden sitokrom c salınımı ve mitokondriyal transmembran potansiyelinin kaybı gibi apoptozun tanısal özellikleriyle hücre ölümüne uğrayabilmekle birlikte hem kaspaz-bağımlı hem de kaspaz-bağımsız hücre ölüm yürütücülerinin maya hücre ölümüne katıldığı gözlemlenmektedir (Madeo ve diğ. 2009). Bu nedenle, maya, apoptotik veya nekrotik hücre ölümüne yol açan filogenetik olarak korunan yolları açıklığa kavuşturmak için mükemmel bir model organizmadır.

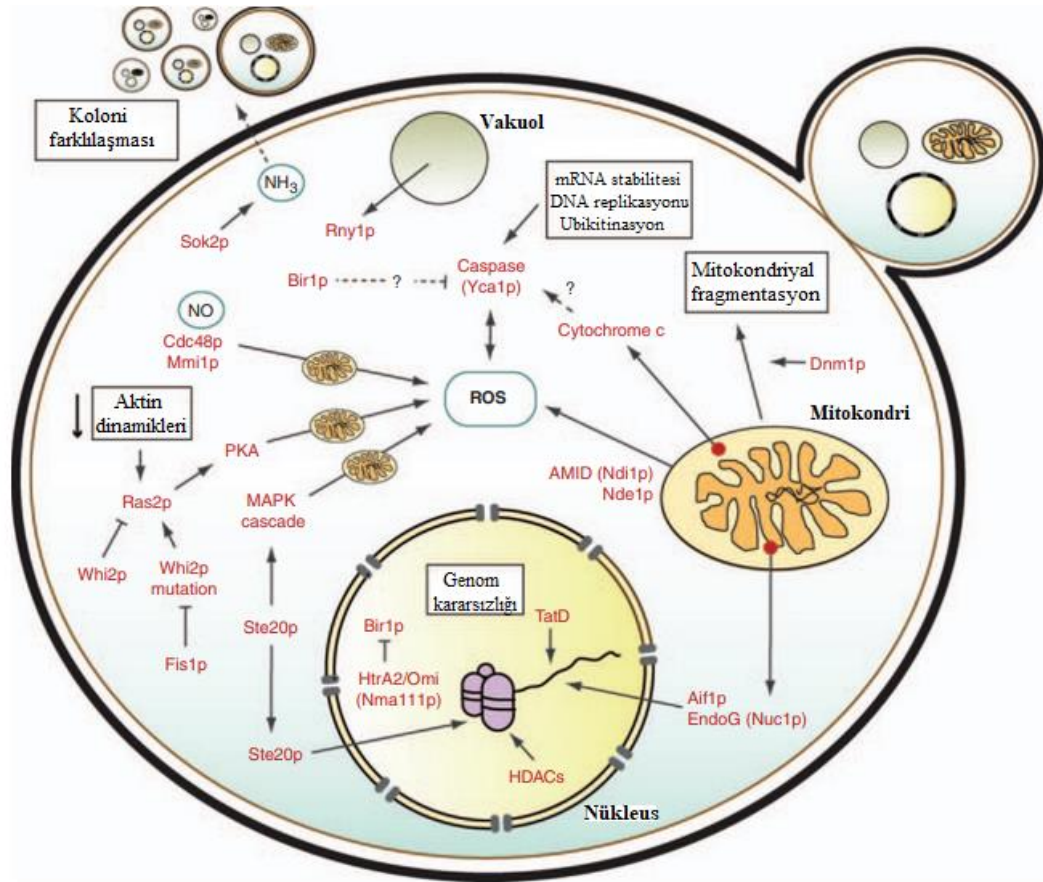
Mayaların, yüksek ökaryotlar ile ciddi anlamda benzerlik derecesine sahip içsel apoptotik yanıtlara girme yetenekleri olduğu gösterilmesine rağmen (Madeo ve diğ. 2004), ölüm reseptörleri ve bunların ligandları gibi dışsal apoptotik düzenleyici yolun hiçbir bileşeni mayalarda tarif edilmemiştir, bu durum maya hücrelerinin memeli apoptotik sistemini tamamen tekrarlamadığını göstermektedir (Fröhlich ve diğ. 2007). Maya apoptozu üzerine yapılan araştırmalara olan ilginin artmasıyla birlikte, memeli hücrelerindeki homolog proteinleri ifade eden birçok gen bulunmuş ve Tablo 2.5’de sunulmuştur. Bu proteinlerden bazıları metakaspaz (Yca1/Mca1) (Madeo ve diğ. 2002), htra2/OMI homologu Nma111 (Fahrenkrog ve diğ. 2004), AIF/AMID’in iki farklı homologu Aif1 ve Ndi1 (Wissing ve diğ. 2004), Apoptoz İnhibitör Proteinleri (IAP) homologu Bir1p ve proapoptotik Endo G homologu

Nuc1'dir (Büttner ve diğ. 2007). Bu yolağın görsel bir şeması Şekil 2.35'de gösterilmiştir.

Tablo 2.5: İnsan apoptotik proteinler ve fonksiyonlarının mayadaki ortologları (Kavakcıoğlu Yardımcı 2007 tarafından yapılan çalışmadan alınmış ve düzenlenmiştir).

İnsan	<i>S. cerevisiae</i>	Fonksiyonu (www.yeastgenome.org)
VCP	CDC48/YDL126C	ER ile ilişkili ubiquitin bağımlı protein bozunma sisteminin bir parçası olan poliubikitinlenmiş proteinlerin salınmasında yer alan çeşitli multiprotein ATPaz kompleksinin bir bileşenidir. Ayrıca mitotik iği ayırma, otofaji, ER membran füzyonu, hücre boyunca lokalize protein transportunun bozulmasında rol oynar.
Sitokrom c (Cyt c)	CYC1/YJR048W	Sitokrom c'nin mitokondriyal salınımı sonucu kaspaz aktivasyonu tetiklenerek apoptoz başlatılır.
Endonükleaz G (Endo G)	NUC1/YJL208C	RNAz, DNA endo- ve ekzonükleolitik aktivitelere sahip majör mitokondriyal nükleazdır. Mitokondriyal rekombinasyon, apoptoz, poliploidinin sürdürülmesindeki roller, programlanmış nükleer yıkım (PND) sırasında genomik DNA'nın parçalanmasında görevli memeli EndoG ortoloğunu kodlar.
Apoptozis İndükleyici Faktör (AIF)	AIF1/YNR074C	Apoptotik uyarılara cevaben çekirdeğe transloke olan mitokondriyal hücre ölüm etkinleştiricisidir. Redüktaz olarak kabul edilen memeli apoptozis indükleyici faktör homologudur.
Apoptozis protein inhibitörü (IAP)	BIR1/YJR089W	Bir1p genellikle apoptozis inhibitörü proteinlerinde bulunan bir protein motifi olan üç bakulovirüs IAP tekrar bölgesi içermektedir. Bir1p, kromozom stabilitesi ve apoptozda bağımsız roller oynuyor gibi görünmektedir.
Serin proteaz (HtrA2/Omi)	NMA111/YNL123W	Serin proteaz ve genel moleküler şaperonlar apoptozun gelişimi ve ısı stresine yanıt vermede rol oynarlar. Lipid

		homeostazisine katkıda bulunabilirler.
Apoptozis İndükleyici Faktör (AIF)-Homoloğu ve Mitokondri ilişkili Protein	NDI1/YML120C	NADH:ubikinin oksidoredüktaz; elektronları solunum zincirinde NADH'den ubikinona aktarır. Ancak daha yüksek ökaryotik çok alt birimli solunum kompleksi 1'in aksine proton pompalamaz. Apoptotik stres üzerine mitokondride N-terminal bölünmesi ile aktive edilir, ardından apoptozu indüklemek için sitoplazmaya transloke olur.
Kaspazlar	MCA1/YOR197W	Apoptozis esnasında önemli rol oynayan Ca^{2+} -bağımlı sistein proteazdır. Strese cevaben spesifik substratlara bağlanır. H_2O_2 muamelesi üzerine apoptozu düzenler. Hücre döngüsü dinamikleri ve yaşam süresinin ayarlanmasını içeren otokatalitik işlemlere uğraması açısından memeli kaspazlarına benzerdir.



Şekil 2.35: Maya apoptozunda apoptotik proteinler ve yollar (Carmona-Gutierrez ve diğ. 2010 tarafından yapılan çalışmadan alınmış ve düzenlenmiştir).

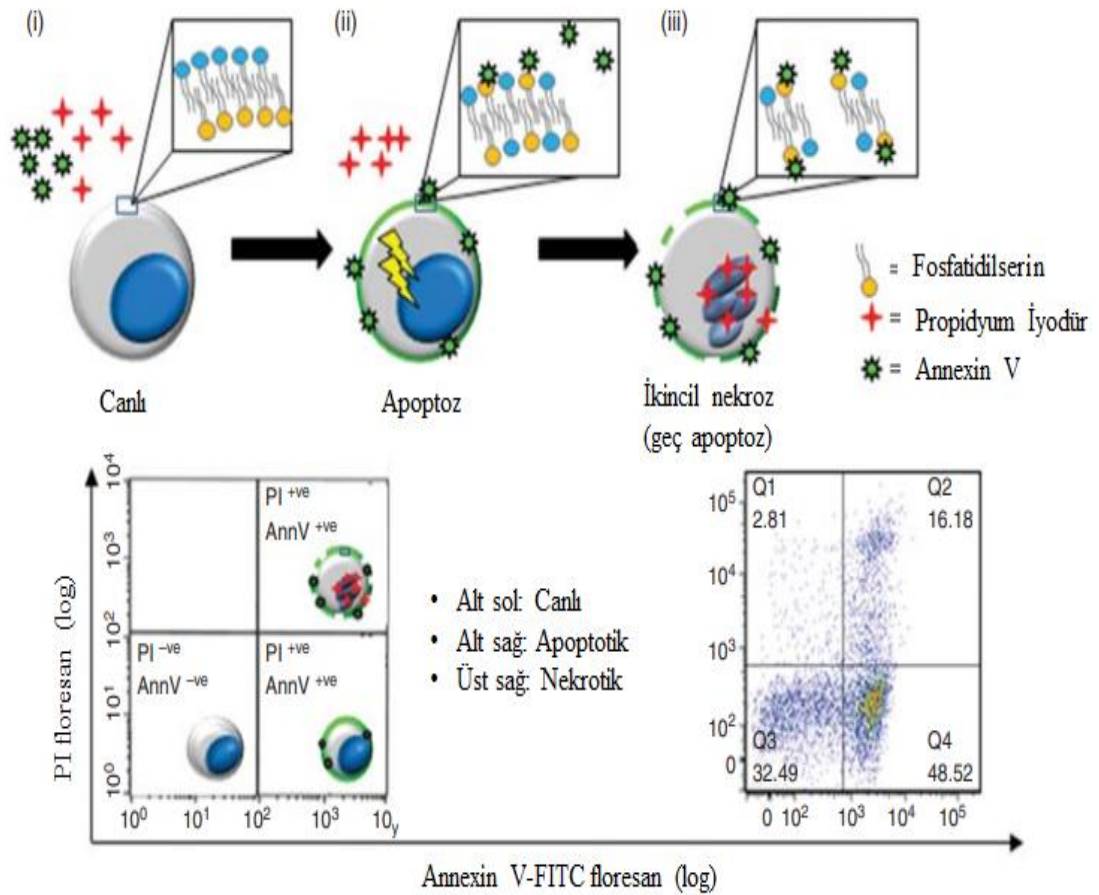
Son olarak yapılan çalışmalar, memeli Bcl-2 proteinlerinin homologlarının *S. cerevisiae* mayasında bulunmamasına rağmen, homolog veya heterolog ekspresyonları ile aktivitelerinin korunabildiğini göstermektedir (Rouchidane Eyitayo ve diğ. 2021; Polic ve diğ. 2015; D Silva ve diğ. 2011). Örneğin, nematod ced-9, insan bcl-2 ve tavuk bcl-xl genlerini eksprese eden maya suşlarının, vahşi tipe kıyasla çeşitli oksidatif stres faktörlerine karşı daha yüksek tolerans gösterdiği, apoptoza bağlı karakteristik özellikler sergilemediği ve vahşi tür için ölümcül olan koşullarda hayatta kalabildiği belirlenmiştir (Chen ve diğ. 2003). Bu durum, Bcl-2 ailesinin etki mekanizmasının anlaşılmasında *S. cerevisiae* hücrelerini önemli bir model haline getirmiştir.

2.7.1.3 Apoptotik Hücrelerin Tespiti İçin Yöntemler

2.7.1.3.1 Fosfatidilserin Ekspozisyonu ve Annexin V-PI Flow Sitometrik Test

Sağlıklı hücrelerin yüzeyi, plazma zarının i ve dış tabakasında asimetrik olarak dağılan lipidlerden oluşmaktadır. Fosfatidilserin (PS), hücrelerin plazma zarlarında baskın olarak bulunan dört ana fosfolipidden biridir. Lipid ift tabakanın yapısına katkıda bulunan PS sağlıklı hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzeyinde (i tabakasında) bulunmaktadır. PS'nin plazmanın dış zar yaprağına translokasyonu ile zarın lipid asimetrisinin bozulması apoptoza uğrayan hücrelerin önemli bir özelliğidir ve apoptozun erken bir belirtcidir (Fadok ve diğ. 2001; Martin ve diğ. 1995; Fadok ve diğ. 1992). Makrofajlar, apoptoz sürecinde yüzeyde açığa çıkan PS'yi tanıyan bir PS reseptörü içermektedir (Fadok ve diğ. 2000). Bu reseptörler, hücrelerin nekrotik hale gelip içeriklerini çevresel dokulara yaymadan ve inflamasyona neden olmadan önce ortadan kaldırılmasını indüklemektedir (Zwaal ve diğ. 2005). 36 kDa ağırlığındaki kalsiyum bağlayıcı bir protein olan Annexin V, PS'ye yüksek afinitesi sonucu bağlanmakta ve bu nedenle, yeşil floresanla işaretlenmiş Annexin V apoptoz halindeki hücrelerin dış yüzeyinde açığa çıkan PS'yi tespit etmek için kullanılabilir. Annexin V nekrotik hücreleri de boyayabilmektedir çünkü bu hücreler Annexin V'ın tüm plazma membranına

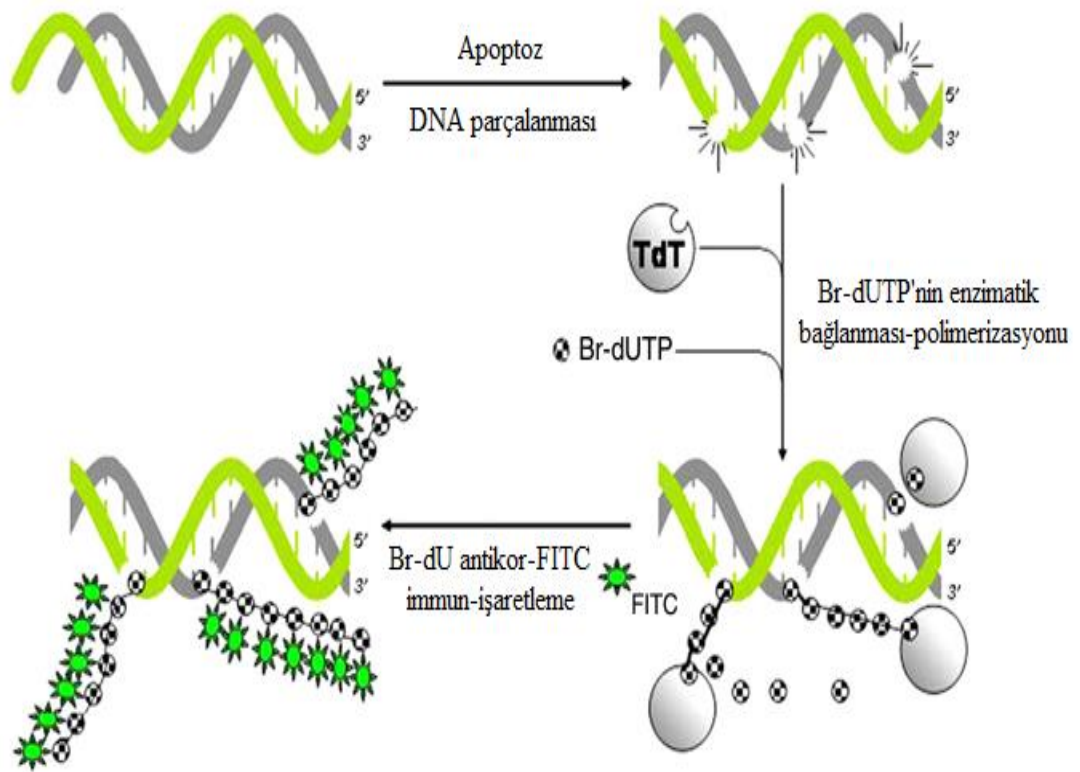
erişimine izin veren yırtılmış (rüptüre) membranlara sahiptirler. Ek olarak, apoptoz halindeki hücreler nekrotik hücrelerden kırmızı floresan ile boyayan propidyum iyodür (PI) kullanılarak ayırt edilebilmektedir. PI ölü veya hasar görmüş nekrotik hücrelerin zarlarından geçebilirken apoptoz halindeki hücreler tarafından dışlanmaktadır (Crowley ve diğ. 2016). Hayatta olduğu düşünülen hücrelerde hem Annexin V hem de PI negatif, erken apoptoz aşamasındaki hücrelerde Annexin V pozitif ve PI negatif, geç apoptoz aşamasındaki veya zaten ölü olan hücrelerde ise hem Annexin V hem de PI pozitifdir. Sonuç olarak, hücre canlılığı için bir dışlama boyası olarak PI ile birlikte bir fluoresein izotiyosiyanat (FITC) konjugatı olarak Annexin V'ın kullanımı, apoptotik hücreleri tespit edebilmekte ve apoptoz ile nekroz arasında ayırım yapabilmektedir (Şekil 2.36) (Hertveldt ve diğ. 1997; Vermes ve diğ. 1995; Koopman ve diğ. 1994).



Şekil 2.36: Hücre ölümünün Annexin V bağlanması ve PI alımı yoluyla belirlenmesi (Crowley ve diğ. 2016 tarafından yapılan çalışmadan alınmış ve düzenlenmiştir).

2.7.1.3.2 DNA Fragmentasyonu ve Kromatin Kondenzasyonunun Belirlenmesinde TUNEL Testi ve DAPI Boyama

Hem erken hem de geç apoptoz evrelerinin biyokimyasal bir göstergesi, çift sarmallı genomik DNA'nın endonükleazlar (örneğin, kaspaz-aktif DNaz [CAD] veya DNA Fragmentasyon Faktörü 40 [DFF40]) tarafından parçalanmasıdır. Bu süreç, serbest 3'-OH grupları taşıyan küçük nükleozomal fragmentlerin oluşumuna yol açmaktadır. Apoptoza uğrayan hücrelerde bu tür DNA fragmentlerinin tespiti için yaklaşık 30 yıl önce TUNEL (Terminal deoksinükleotidil transferaz [TdT] aracılı dUTP Nick End Labeling) yöntemi geliştirilmiştir (Şekil 2.37) (Gavrieli ve diğ. 1992; Gorczyca ve diğ. 1992). Bu testte, atipik bir DNA polimeraz olan TdT'nin, serbest 3'-OH ucuna sahip tek sarmallı DNA dizilerine şablondan bağımsız olarak işaretlenmiş deoksinükleotid trifosfatları (genellikle dUTP analogları) ekleme özelliğinden yararlanılmaktadır. dUTP, ışık mikroskobu, floresan mikroskobu veya akış sitometrisi ile tespit edilebilecek çeşitli problemlerle işaretlenebilmektedir (Elmore 2007).

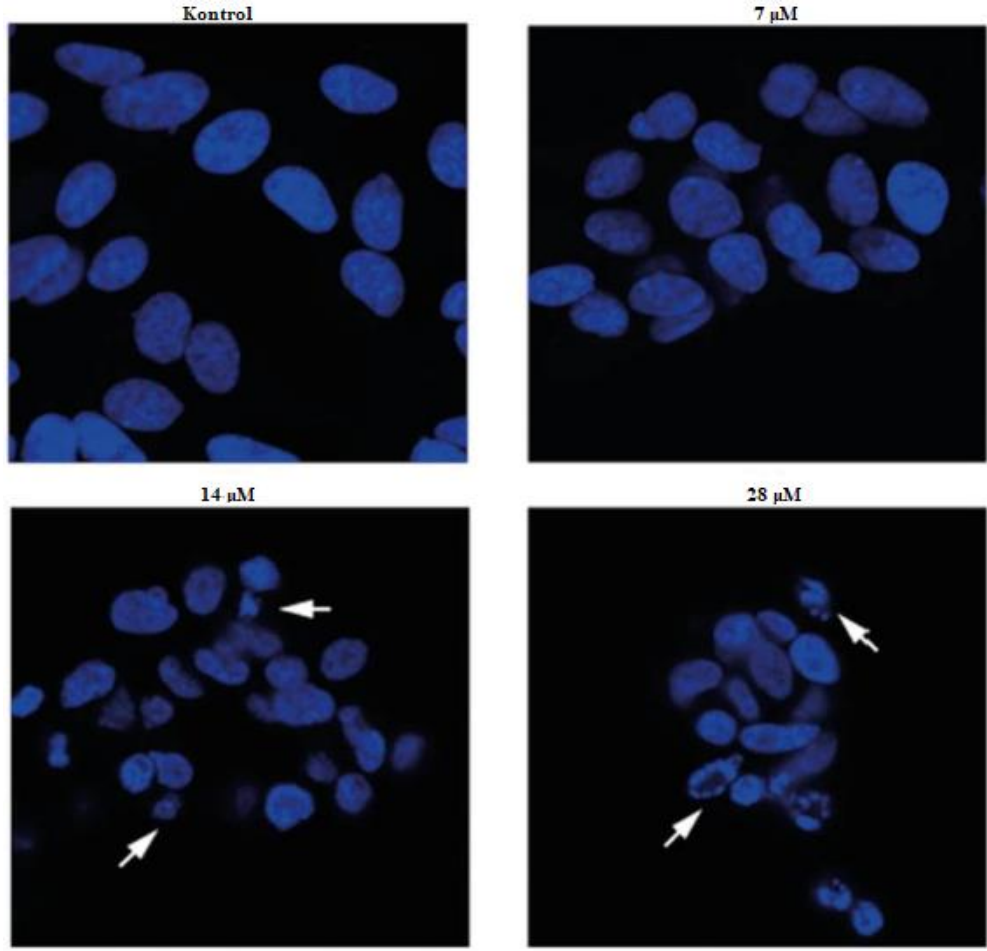


Şekil 2.37: Terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) kullanılarak Br-dUTP ile DNA sarmal kırıkları etiketlemenin şematik gösterimi (Darzynkiewicz ve diğ. 2008 tarafından yapılan çalışmadan alınmış ve düzenlenmiştir).

TUNEL testinin hücre ölümü ile ilgili çalışmalarda kullanımına dair bazı avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır (Mirzayans ve Murray 2020; Elmore 2007). Avantajları arasında; i) diğer apoptoz testleriyle kıyaslandığında görece kolay uygulanabilirlik ve ii) hücre kültürlerinde tek hücre analizleri, hücre popülasyonlarının akış sitometrik analizleri, doku kesitlerinin ve parafine gömülü örneklerin histokimyasal ve floresan analizleri gibi çeşitli uygulamalar için TUNEL test kitlerinin mevcut olması gibi özellikler bulunmaktadır. Bu özelliklerinden dolayı TUNEL testi, çeşitli laboratuvar, hayvan modeli ve klinik çalışmalarda apoptozun değerlendirilmesi için tercih edilen bir yöntem olmuştur. Ancak, TUNEL testinin apoptozla ilişkili hücre ölümünün değerlendirilmesinde bazı potansiyel dezavantajları da bulunmaktadır (Lawrence ve diğ. 2013; Loo 2011; Baima ve Sticherling 2002; Kanoh ve diğ. 1999). Loo ve diğ. (2011) tarafından yapılan çalışmada belirtildiği gibi TUNEL boyaması, bu uçların oluşmasına yol açan moleküler mekanizmalardan bağımsız olarak tüm serbest 3'-OH uçlarını etiketleyebileceğinden spesifik değildir. Bu nedenle, TUNEL boyaması nekrotik dejenere hücreler, DNA onarımı yapan hücreler, mekanik kuvvetlerle zarar görmüş hücreler ve hatta aktif gen transkripsiyonu gerçekleştiren hücreler gibi apoptotik olmayan hücreleri de tespit edebilmektedir.

Apoptoz veya nekroz sırasında, fragmentleşmiş, kondanze olmuş veya deforme olmuş çekirdekler gibi nükleer değişikliklerin DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) boyama ile de görselleştirilebildiği bilinmektedir (Şekil 2.38) (Atale ve diğ. 2013). Bu boya, hem canlı hem de hasar görmüş hücre zarlarından geçebilmekle birlikte hücre zarının durumuna bağlı olarak geçirgenlik oranı değişebilmektedir. DAPI, adenin-timin açısından zengin bölgelere güçlü bir şekilde bağlanarak tercihen çift sarmallı DNA'yı (dsDNA) boyayan mavi floresan bir boyadır. Bu boyanın bağlanması, hem DAPI'den hem de DNA'nın küçük oluşundan su moleküllerinin yer değiştirmesi nedeniyle artmış bir floresans üretmektedir. Bununla birlikte, adenin-urasil dinükleotid-seçici interkalasyonu içeren farklı bir bağlanma modunda, RNA'ya da bağlanabilmektedir (Atale ve diğ. 2014). DAPI/RNA kompleksi, DAPI/dsDNA kompleksine göre daha uzun dalga boyunda floresans emisyonu sergilemektedir (Gomes ve diğ. 2013; Hoff 1988). DNA'ya bağlandığında, 358 nm (ultraviyole) dalga boyunda absorpsiyon maksimumuna sahip olup, emisyon maksimumu ise 461 nm (mavi) civarındadır. Bu nedenle floresan mikroskopisi için DAPI, ultraviyole

ışıkla uyarılmakta ve DAPI'nin yaydığı floresan ışık mavi renkte olduğu için mavi bir filtre aracılığıyla tespit edilmektedir.



Şekil 2.38: Farklı konsantrasyonlarda bir antikanser ajan ile muamele edilen kanser hücrelerinde apoptoz indüksiyonunu gösteren DAPI boyama görüntüleri (Yu ve diğ. 2019 tarafından yapılan çalışmadan alınmış ve düzenlenmiştir).

2.8 Literatür Özetleri

- García-Trejo ve diğ. (2024) çalışmasında, kurkuminin D-galaktoz ile indüklenen hücresel yaşlanma, oksidatif stres ve endoplazmik retikulum stresi üzerindeki koruyucu etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Domuz böbrek hücre hattı (LLC-PK1) ve insan böbrek proksimal tübül hücre hattı (HK-2) üzerinde yapılan deneylerde, D-galaktoz (300 mM, 120 saat) uygulamasının oksidatif stres, reaktif oksijen türleri (ROS) ve yaşlanma belirteçlerini artırdığı gözlenmiştir. Kurkumin muamelesi, LLC-PK1 hücrelerinde yaşlanma ile ilişkili (SA)- β -D-galaktozidaz boyamasında pozitif olan hücrelerin sayısını ve oksidatif DNA hasarını azaltırken, hücre çekirdeğinin yapısal bütünlüğünü gösteren Lamin B1 seviyelerini artırmıştır. HK-2 hücrelerinde ise proliferatif hücre nükleer antijeni (PCNA) ve yaşlanmayı önleyici protein Klotho seviyeleri artmış, katalaz aktivitesi yükselmiştir. Her iki hücre hattında da kurkumin, ROS üretimini azaltmıştır. Bu bulgular, kurkuminin oksidatif stresi azaltarak ve hücresel yaşlanma belirtilerini hafifleterek böbrek hücrelerinde koruyucu etkiler sağladığı ve yaşlanma ile ilişkili hastalıklarda terapötik bir potansiyele sahip olabileceğini göstermiştir.
- Cheng ve diğ. (2024) çalışmasında, insan göbek kordonu mezenkimal kök hücrelerinin (HUCMSC), foto yaşlanma karşıtı özellikler gösterme potansiyelinin hem in vitro hem de in vivo olarak incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışma, konsantre HUCMSC süpernatantının (CHS), UVB ışıınımlı ile hasar gören hücrelerin canlılık, göç, yaşlanma, apoptoz ve otofaji üzerindeki etkilerini araştırmıştır. İnsan keratinosit hücre hattı (HaCaT) ve fotoyaşlandırılan dişi Kunming fareleri kullanılarak yapılan deneylerde, CHS'nin konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığı ile göçünü artırdığı, yaşlanma ve apoptoz oranlarını azalttığı ve otofajiyi aktive ederek hücresel hasarı iyileştirdiği tespit edilmiştir. Farelerde UVB ışıınımlının yol açtığı cilt yaşlanmasına bağlı cilt kırışıklıkları, kolajen kaybı ve bağışıklık fonksiyonlarındaki azalma, CHS ile düzelmiştir. Sonuç olarak CHS, cildin fotoyaşlanmasını önlemede etkili bir terapötik ajan olarak öne çıkmıştır.
- Li ve diğ. (2024) çalışmasında, yaşlanma ile ilişkilendirilen Alzheimer hastalığının (AD) patogenezinde önemli bir rol oynayan oligomerik A β 42'nin

neden olduğu nörotoksisiteye karşı Chromofungin'in (CgA türevli bir peptit) koruyucu etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışma, Chromofungin'in hücresel yaşlanma ve oksidatif stres üzerindeki etkilerini inceleyerek AD tedavisi için olası bir ajan olarak kullanılabilirliğini değerlendirmiştir. Bu amaçla, oligomerik A β 42'nin neden olduğu nörotoksisite ve hücresel yaşlanma çalışmalarında insan kaynaklı bir nöron hücre hattı olarak M17 kullanılmıştır. A β 42; telomeraz ve telomerazla ilişkili genlerin ifadeleri ile SOD aktivitelerini azaltırken ROS seviyeleri, COX-2 ekspresyonu ve PGE2 üretimini artırmıştır. Chromofungin muamelesi ise, A β 42'nin neden olduğu bu etkileri doz bağımlı şekilde tersine çevirmiş ve hücresel yaşlanmayı önlemiştir. Ayrıca COX-2'nin over-ekspresyonu, Chromofungin'in koruyucu etkilerini zayıflatmış ve bu durum Chromofungin'in etkilerinin COX-2'nin baskılanmasıyla ilişkili olduğunu göstermiştir. Sonuç olarak Chromofungin, oligomerik A β 42'nin neden olduğu nöronal hücresel yaşlanmayı ve oksidatif stresi baskılayarak koruyucu etkiler göstermiştir. Bu etkiler, COX-2'nin inhibisyonu ve telomeraz aktivitesinin artırılmasıyla sağlanmıştır.

- Zhen ve diğ. (2024) çalışmasında, havada bulunan PM2.5 partiküllerinin insan keratinosit hücre hattında (HaCaT) neden olduğu yaşlanma süreçlerine karşı, güçlü bir antioksidan olan Astaksantin'in (ATX) koruyucu etkileri araştırılmıştır. PM2.5'in, aşırı ROS üretimine yol açarak oksidatif stres yarattığı, hücre çekirdeğinde NRF2 (nükleer faktör eritroid 2-ilişkili faktör 2) transkripsiyon faktörü seviyelerini düşürerek antioksidan savunmayı zayıflattığı ve DNA hasarına, hücre döngüsü durmasına ve yaşlanma fenotiplerinin artmasına neden olduğu ifade edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre ATX, NRF2 aktivasyonunu artırarak ROS üretimini baskılamış, antioksidan enzim seviyelerini geri kazandırmış, DNA hasarını azaltmış, hücre döngüsü durmasını tersine çevirmiş ve en önemlisi yaşlanma belirteçlerini (interlökin-1 β , matris metalloproteinazlar, β -galaktosidaz gibi) ve hücresel yaşlanmayı azaltmıştır. Sonuç olarak ATX'in antioksidan ve yaşlanma karşıtı etkiler sergilediği ifade edilmiştir.
- Shang ve diğ. (2024) çalışmasında, Erzhi Wan (EZW) adlı geleneksel bir Çin tıbbi formülasyonunun D-galaktoz ile yaşlandırılmış normal sıçan böbrek (NRK) hücreleri üzerindeki anti-aging etkileri değerlendirilmiş ve bu etkilere ilişkin metabolomik ve lipidomik mekanizmalar açıklanmıştır. Ayrıca,

EZW'nin yaşı NRK hücreleri üzerindeki etkisini anlamak için BRL (Buffalo sıçan karaciğeri) hücreleri kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre EZW, yaşlanmış NRK hücrelerini koruyarak oksidatif stresi azaltmıştır. Bu etki, özellikle amino asit metabolizması, enerji metabolizması ve fosfolipid biyosentez yollarını düzenleyerek yaşlanma karşıtı işlevlerini ortaya koymuştur. Böylece, EZW'nin klinik uygulamalarda yaşlanma karşıtı ajan olarak kullanımına yönelik teorik bir temel sunulmuştur.

- Zhu ve diğ. (2024) çalışmasında, bir Anti-Aging Formülünün (AAF), ciltte oksidatif strese bağlı yaşlanmayı önleme etkileri ve bu etkileri düzenleyen moleküler mekanizmaların incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, insan deri fibroblast hücreleri (HSF) ve fare cilt hücreleri kullanılmıştır. UV ışınları kullanılarak farelerde oksidatif stres kaynaklı cilt yaşlanma modeli oluşturulmuştur. In vitro bulgulara göre AAF uygulaması, UV ışınlarının neden olduğu deri kuruluğunu ve kırışıklık oluşumunu önemli ölçüde azaltmıştır. Ayrıca, deri elastikiyeti ile kollajen miktarı artmış ve melanin birikimi azalmıştır. AAF muamelesiyle cilt dokularında yaşlanma proteinleri olan P16 ve P21'in ekspresyonu azaltılarak yaşlanma belirtileri hafifletilmiştir. In vitro bulgular ise, AAF'nin yaşlanma belirteçlerini ve DNA hasarını azalttığını, hücresel proliferasyonu artırdığını göstermiştir. CXCR2 geninin baskılanmasıyla, P38/P53 yollarının aktivitesi inhibe edilmiş, oksidatif hasar azaltılmış ve hücresel yaşlanma süreci geciktirilmiştir. Sonuç olarak bu bulgular, AAF'nin cilt yaşlanmasına karşı koruyucu bir ajan olarak potansiyelini ortaya koymuştur.
- Miao ve diğ. (2024) çalışmasında, Astragalus polisakkaritleri (APS)'nin, yaşı sıçanların aort endotel hücrelerinde oksidatif stres ve yaşlanma üzerindeki etkileri in vitro ve in vivo olarak araştırılmış ve potansiyel moleküler hedefler belirlenmiştir. Bu amaçla, sıçan aort endotel hücreleri (RAEC'ler) kullanılmıştır. 20 aylık sıçanlarda üç ay süresince APS muamelesi, aort duvar kalınlığını azaltmış, vasküler elastik dokuyu yenilemiş, vasküler endotel fonksiyonu iyileştirmiş, oksidatif stres düzeylerini azaltmış, Sirtuin 1 (SIRT-1) protein ekspresyonunu artırmış ve yaşlanma belirteçleri olan p53, p21, p16 protein seviyelerini düşürmüştür. APS, ayrıca H₂O₂ ile indüklenen hücresel yaşlanmayı yavaşlatmış ve H₂O₂'nin mitokondriyal zar potansiyeli ve toplam antioksidan kapasite üzerindeki olumsuz etkilerini tersine çevirmiştir. SIRT-

l'in susturulması ise, APS'nin yaşlanma ve antioksidan kapasite üzerindeki koruyucu etkilerini zayıflatmış, p53 ve p21 protein seviyelerini artırmıştır. Sonuç olarak APS'nin, sıçan aort endotel hücrelerinde oksidatif stres ve yaşlanmayı SIRT-1/p53 sinyal yolları aracılığıyla azaltabileceği vurgulanmıştır.

- Shi ve diğ. (2024) çalışmasında, melatoninin optik sinir hasarı (ONC) sonrası retinal ganglion hücreleri (RGC) üzerindeki yaşlanma ve apoptoz etkileri incelenmiş ve bu süreçte SIRT1 sinyal yolunun rolü araştırılmıştır. RGC hücreleri optik sinir hasarına uğratılmış farelerin retinasından elde edilmiştir. Melatoninin bu hücreler üzerindeki yaşlanma ve apoptozu önleyici etkileri değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, melatonin, ONC sonrası SIRT1 seviyelerini artırarak P53/P21 yollarını baskılamış, RGC sayısını ve gangliyon hücre kompleksi kalınlığını iyileştirmiş, yaşlanma süreçlerini yavaşlatmış ve apoptoz oranını azaltmıştır. SIRT1 inhibitörü EX-527 muamelesi ise melatoninin koruyucu etkilerini tersine çevirmiştir. Sonuç olarak melatonin, SIRT1 bağımlı bir yolak aracılığıyla retinal ganglion hücrelerini hasardan koruyarak yaşlanma ve apoptozu azaltma potansiyeli göstermiştir.
- Cavalier ve diğ. (2024) çalışmasında, apigeninin yaşlanmayla ilişkili bilişsel işlev bozukluğunu önlemedeki mekanizmalarının anlaşılması amaçlanmıştır. Apigeninin, hücrel yaşlanma süreçlerini inhibe eden ve yaşa bağlı bilişsel bozukluklara karşı koruma sağlayabilecek biyoaktif bir bileşik olduğu ifade edilmiştir. Çalışmada, genç (6 aylık) ve yaşlı (27 aylık) farelerde öğrenme ve hafıza performansı değerlendirilmiş, beyin transkriptomu analiz edilmiştir. Yaşlı farelerde artan inflamasyon ve bilişsel bozukluklar gözlenirken, apigenin uygulaması tanıma indeksini iyileştirmiş, öğrenme ve hafıza performansını artırmış, yaşlanma ile ilişkili gen ifadelerini tersine çevirmiştir. İnsan astrositleri üzerinde yapılan deneylerde apigenin, inflamatuvar genleri baskılamış, yaşlanma göstergelerini azaltmış ve nöronal işlev ile hücrel homeostazla ilişkili genlerin ekspresyonunu artırmıştır. Çalışma, apigeninin nöroinflamasyonu baskılayarak bilişsel işlevleri iyileştirme ve yaşlanmaya bağlı nörodejenerasyona karşı terapötik bir seçenek olabileceğini göstermiştir.

- Wang ve diğ. (2023) çalışmasında, ginseng bitkisinden elde edilen Ginsenoside Rg1 (G-Rg1) bileşiğinin *S. cerevisiae* (BY4742 suşu) modelinde kronolojik yaşlanmayı nasıl geciktirdiği ve bu etkinin arkasındaki moleküler mekanizmaların incelenmesi amaçlanmıştır. Sonuçlara göre, G-Rg1 muamelesi, maya hücrelerinin hayatta kalma sürelerini uzatmış, koloni büyüme hızlarını artırmış, yaşlanmaya bağlı yüzey kırışıklıkları ve hücre yırtılmasını engelleyerek morfolojik değişiklikleri stabilize etmiştir. Ayrıca, yüksek sıcaklık, yüksek tuz ve asidik strese karşı direnci artırmış, apoptozu geciktirmiş, lipid peroksidasyonu ile ilişkili MDA seviyelerini azaltmış, antioksidan enzimle ilgili genlerin mRNA seviyelerini (SOD2, YAP1, GSH1, CTT1 ve GLR1 gibi) yükseltmiş ve enzim aktivitelerini iyileştirmiştir. G-Rg1, CDC19 (piruvat kinaz) ve SDH2 (süksinat dehidrogenaz subunit 2) gibi enerji metabolizmasıyla ilişkili genlerin ekspresyonunu düzenleyerek hücresel enerji metabolizmasını dengelemiş, glikoliz enzimlerini kodlayan genlerin ekspresyonunu inhibe etmiştir. Ayrıca, ROS ve RNS üretimini anlamlı derecede azaltıp, hücresel antioksidan enzimlerin (POD, SOD, CAT, TrxR, GSH gibi) aktivitesini artırmıştır. G-Rg1 muamelesi, mitokondriyal fonksiyonları koruyarak yaşlanma sürecini olumlu yönde etkilemiş ve mitokondriyal zar potansiyelinin ($\Delta\Psi_m$) korunmuş olduğu gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, bu çalışmada, G-Rg1'in maya hücrelerinde mitokondriyal fonksiyonlar, enerji metabolizması ve antioksidan savunmalar üzerindeki olumlu etkileri sayesinde yaşlanma sürecine karşı koruyucu bir rol oynadığını göstermiştir.
- Xu ve diğ. (2023) çalışmasında, dut ağacından (*Morus alba* L.) elde edilen prenilat flavonlar olan morusin ve mulberrin bileşiklerinin *S. cerevisiae*, *C. elegans* (nematod) ve insan HeLa modellerindeki yaşlanma karşıtı etkileri incelenmiş ve bu etkilerin besin algılayıcı yollar üzerinden nasıl gerçekleştiği anlaşılmak istenmiştir. Elde edilen sonuçlar göre, morusin ve mulberrin, *S. cerevisiae* ve *C. elegans* modellerinde yaşam ömrünü anlamlı şekilde uzatmış ve bu bileşiklerin etkisi, besin bağımlı mekanizmalar aracılığıyla gerçekleşmiştir. Özellikle glikoz seviyesi düşürüldüğünde veya temel aminoasitler azaldığında, bu bileşiklerin yaşam ömrünü uzatma etkisinin kaybolduğu ifade edilmiştir. Sch9, maya modellerinde morusin ve mulberrinin yaşam ömrünü uzatma etkilerinde kritik bir protein olarak

tanımlanmış ve bu bileşikler, Sch9'un fosforilasyonunu inhibe ederek ribozom biyogenezi ve hücrel yaşlanmayı kontrol etmiştir. Aynı bileşiklerin, *C. elegans* üzerinde de yaşlanmayı geciktirdiği ve bu etkinin akt-1 ve akt-2 genlerinin tam fonksiyonlarına bağlı olduğu bulunmuştur. İnsan HeLa hücre modelinde ise morisin ve mulberrin, mTORC1 yolunun bir alt hedefi olan p70S6K1 proteinine bağlanarak fosforilasyonunu engellemiş, otofajiyi indüklemiş ve yaşlanma karşıtı etkiler göstermişlerdir. Sonuç olarak, bu bulgular, morisin ve mulberrin gibi prenilatlı flavonların, besin algılama yolları aracılığıyla yaşlanmayı geciktirici etki gösteren potansiyel bileşikler olduğunu ortaya koymuştur.

- Pawelczak ve diğ. (2022) çalışmasında, 4-N-Furfurilsitozin (FC) adlı bir sitozin türevi kullanılarak *S. cerevisiae* (BY4741 suşu) modelinde anti-aging etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla, FC'nin hücre yaşam ömrü üzerindeki etkisi, mitokondriyal aktivite ve hücre içi ROS seviyeleri analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre FC, hücrelerin yaşlanma sürecinde hayatta kalma oranını doza bağlı olarak artırmıştır. Yaşlanma periyodunun 19. gününde, 1.0 mM FC ile takviye edilmiş ortamda büyüyen maya hücrelerinin sayısının, kontrol grubuna kıyasla %50 daha yüksek olduğu gözlenmiştir. FC ile muamele edilen hücrelerde, konfokal mikroskopla yapılan incelemede daha az sayıda yaşlı hücre tespit edilmiş ve hücre boyutlarında bir azalma gözlemlenmiştir. Ayrıca, hücrelerin mitokondriyal zar potansiyeli korunmuş ve solunum etkinliği artmıştır. Bu durum, FC muamelesinin maya hücrelerinde oksidatif fosforilasyona yönelik bir metabolik geçişe yol açtığını, mitokondriyal kapasitede belirgin bir artış sağladığını ve enerji metabolizmasını iyileştirdiğini göstermiştir. Ek olarak FC muamelesinin hücrel ROS seviyesini doz bağımlı olarak azalttığı da gösterilmiştir. Gen ekspresyon analizleri ise, FC'nin TORC1 sinyal yolunu baskıladığını ve mitokondriyal metabolizmayı destekleyen genlerin ekspresyonunu artırdığını göstermiştir. Bu bulgular, FC'nin anti-aging özelliklere sahip olduğunu ve mitokondriyal fonksiyonu iyileştirerek ve ROS seviyelerini azaltarak maya hücrelerinin yaşlanma sürecini geciktirebileceğini göstermiştir.
- Kavitate ve diğ. (2022) çalışmasında, *Weissella confusa* bakteri suşu (KR780676) tarafından üretilen galaktan ekzosakkaritin (EPS), antioksidan,

anti-apoptotik ve yaşlanma karşıtı etkileri, *S. cerevisiae* maya modeli kullanılarak hem in vitro hem de in vivo yöntemlerle değerlendirilmiştir. Bu çalışmada, yabanıl tip BY4741 maya hücreleri ile birlikte antioksidan (sod1Δ, sod2Δ, tsalΔ, cta2Δ, ctt1Δ), anti-apoptotik (pep4Δ ve fis1Δ) ve yaşlanma ile ilişkili (sod2Δ, tsalΔ, ctt1Δ) gen silme mutantları kullanılmıştır. 300 µg/mL veya daha yüksek galaktan konsantrasyonlarıyla muamele edilen hücrelerde büyüme oranının belirgin şekilde arttığı, bu durumun galaktanın maya büyümesini uyarıcı bir etkisi olduğunu gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca galaktan EPS, konsantrasyona bağlı olarak DPPH ve NO süpürücü aktivite sergileyerek güçlü bir in vitro antioksidan aktivite göstermiştir. Galaktanın bu güçlü antioksidan aktivitesini takiben, hücreler galaktan ile ön muamele sonrası H₂O₂'ye maruz bırakılmıştır. Bu muamele sonucunda, ROS seviyelerinde ve lipid peroksidasyonunda (MDA seviyesi) düşüş, antioksidan ve anti-apoptotik mutantların hayatta kalma oranında ise artış tespit edilmiştir. Ayrıca galaktanın, kromatin kondenzasyonu ve çekirdek parçalanmasını azaltarak H₂O₂'nin indüklediği apoptotik hücre ölümüne karşı maya mutantlarını koruduğu ifade edilmiştir. Sonuç olarak, bu çalışma galaktan EPS'nin doğal bir antioksidan olarak güçlü bir potansiyele sahip olduğunu ve oksidatif stres kaynaklı yaşlanma ile hücresel hasara karşı koruyucu etkiler sağlayabileceğini göstermiştir.

- Hemagirri ve Sasidharan (2022) tarafından yapılan çalışmada, polifenolce zengin *Polyalthia longifolia* yapraklarından elde edilen metanolik ekstraktın (PLME), *S. cerevisiae* (BY611 suşu) hücrelerinde yaşlanma karşıtı etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. PLME'nin oksidatif stres üzerindeki etkileri, antioksidan savunma mekanizmaları ve yaşlanma ile ilişkili gen ve proteinlerin ekspresyonu incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre PLME, maya hücrelerinin büyümesini artırmış ve kronolojik yaşam ömürlerini muamele edilmeyen gruba kıyasla anlamlı şekilde uzatmıştır. Ayrıca, H₂O₂ ile indüklenen oksidatif strese karşı hücreleri korumuş ve ROS seviyelerini düşürüp hücrelerdeki GSH içeriğini artırarak oksidatif stresi azaltmıştır. Bunun yanı sıra, serbest radikallerin temizlenmesi ve uzun ömür ile ilişkilendirilen SOD ile SIRT1 genlerinin ekspresyonunu artırmış ve bu proteinlerin aktivitelerini yükseltmiştir. Sonuç olarak, PLME, antioksidan özellikleri sayesinde oksidatif stresi azaltmış, GSH seviyelerini artırmış ve

SOD ile SIRT1 gen/protein ekspresyonunu indükleyerek *S. cerevisiae* hücrelerinde belirgin bir yaşlanma karşıtı ajan potansiyeline sahip olmuştur.

- Tungmunnithum ve diğ. (2022) çalışmasında, flavonoid açısından zengin *Nelumbo nucifera* (kutsal lotus) stamen özütünün (LSE) *S. cerevisiae*'da (DBY746 yabancı tip suşu) yaşlanmayı geciktirme potansiyeline sahip olup olmadığı değerlendirilmiş ve bu süreçte oksidatif stres ve metabolizma üzerindeki etkileri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre LSE, maya hücrelerinde kronolojik yaşlanmayı, muamele edilmeyen kontrol grubuna kıyasla geciktirdiğini ortaya koymuştur. Ayrıca LSE'nin yaşam ömrünü uzatma etkisinin resveratrolün (pozitif kontrol) etkisiyle benzer olduğu ifade edilmiştir. Bu etkinin, LSE'nin yüksek konsantrasyondaki antioksidan flavonoid içeriğinden kaynaklanabileceği belirtilmiştir. LSE, ROS/RNS üretimini düzenleyerek lipid membran hasarının biyobelirteci olan malondialdehit (MDA), protein karbonil ve DNA oksidasyonu biyobelirteci olan 8-okso-guanin seviyelerini düşürmüştür. Resveratrolün kullanımı da bu antioksidan etkiyi desteklemiştir. LSE ile mitokondri zar potansiyeli de korunmuş ve NAD ve ATP seviyelerinin artırılmasıyla hücresel enerji metabolizması desteklenmiştir. Bunun yanı sıra, LSE'nin merkezi metabolizma, gen ifadeleri (*SIR2* ve *SOD2*) ve enzim düzenlemeleri (*SIRT* ve *SOD* enzim aktiviteleri) üzerinde etkili olduğu da belirlenmiştir. Bu sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, LSE'nin anti-aging etkiler sunabileceği ve etkilerinin yalnızca basit bir antioksidan aktiviteyle sınırlı olmayıp, normal mitokondriyal fonksiyonların, özellikle metabolik fonksiyonların korunmasını içeren daha karmaşık bir süreçle ilişkili olabileceği ve LSE'nin oksidatif ve yaşa bağlı hastalıkların tedavisi için kullanılmak üzere ilginç bir aday olabileceği düşünülmüştür.
- Stępień ve diğ. (2020) çalışmasında, kurkuminin antioksidan ve yaşlanma karşıtı etkilerinin, yabancı tip ve mutant *S. cerevisiae* suşları üzerinde araştırılması amaçlanmıştır. Kurkumin, düşük konsantrasyonlarda (200 µM) yabancı tip (BY4741) hücrelerde yaşlanmayı geciktirmiş ve hücre ömrü ile çoğalma süresini uzatmıştır. Ancak SOD genleri silinmiş (*sod1Δ* ve *sod2Δ*) ve DNA tamir mekanizmaları devre dışı bırakılmış (*rad52Δ*) mutant hücrelerde, kurkumin oksidatif stresi önemli ölçüde artırmış ve replikatif ve kronolojik yaşlanmayı hızlandırmıştır. Sonuç olarak, kurkuminin yaşlanma

karşıtı potansiyelinin konsantrasyona, hücrese bağlama ve genetik yapıya bağılı olarak değışebileceğı gösterilmiştir.

- Czachor ve diğ. (2020) çalışmasında, kahvenin, özellikle kahve bileşenlerinin (flavonoidler, polifenoller gibi) *S. cerevisiae* hücrelerinde oksidatif stres ve DNA hasarına karşı koruma sağlayarak yaşam süresini nasıl uzattığı incelenmiştir. Araştırmacılar, Arabica ve Robusta kahvelerinin antioksidan kapasitesini karşılaştırmış ve kahvenin yaşlanma üzerindeki potansiyel faydalarını değerlendirmişlerdir. Bu amaçla, BY4741 suşun yanı sıra antioksidatif korumadan yoksun (SOD1 ve SOD2 gen silme) ve DNA hasarı tamir yeteneğı olmayan (RAD52) mutant suşlar kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, Robusta kahvesi Arabica'ya göre daha yüksek kafein ve polifenol içeriğine sahip olup, daha güçlü bir antioksidan aktivite sergilemiştir. Ayrıca, kafeinin antioksidan etkisinin olmadığı ve yüksek antioksidan aktiviteye sahip örneklerin daha fazla polifenol içerdiği ifade edilmiştir. Kahve infüzyonları, tüm maya suşlarında yaşlanmayı geciktirirken, Arabica infüzyonlarının yabancı tip ve SOD1/SOD2 mutantları üzerinde, Robusta'nın ise RAD52 mutanı üzerinde daha güçlü etkiler gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca, kahve infüzyonları, hücreleri serbest radikallere karşı korumuş, DNA hasarını azaltmış ve metabolik aktiviteyi düşürerek (rad52Δ suşu hariç) yaşlanmayı yavaşlatmıştır.
- Tungmunnithum ve diğ. (2020) çalışmasında, badem kabuğı ekstraktı (AE) ve klorojenik asidin (CHL), *S. cerevisiae* hücrelerinde (DBY746 suşu) kronolojik yaşlanmayı geciktirmedeki potansiyel anti-aging etkilerinin değerlendirilmesi ve bu bileşiklerin oksidatif stresle başa çıkma yeteneklerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, AE ve CHL takviyeleri, maya hücrelerinin kronolojik yaşam ömrünü anlamlı derecede uzatmış ve hücre içi ROS ve RNS seviyelerini düşürerek oksidatif stresi azaltmıştır. AE ve CHL, yaşlanma sürecinde mitokondriyal membran potansiyelini koruyarak mitokondriyal fonksiyonların devamlılığını sağlamıştır. Oksidatif stres direnci ile ilişkili SOD2 ve SIR2 genlerinin ekspresyonu ve ilgili enzim aktiviteleri artmış, bu da hücrelerin oksidatif strese karşı direncini artırmıştır. Ayrıca, AE ve CHL, UV-C indüklü oksidatif stres altında maya hücrelerinin hayatta kalmasına katkıda bulunmuş ve bu durum lipid peroksidasyonu (MDA), protein karbonil içeriğı ile DNA'daki 8-

okso-guanin oluşumunun azalmasıyla kanıtlanmıştır. Bu bulgular, badem kabuğu ekstraktı ve klorojenik asidin maya hücrelerinde yaşlanmayı geciktirici ve oksidatif stres yanıtını iyileştirici etkileri olduğunu göstermiştir.

- Dakik ve diğ. (2020) çalışmasında, *S. cerevisiae* (BY4742) model organizması kullanılarak geroprotektif (yaşlanmayı geciktirici) etkileri olan bitki özleri belirlenmiş ve bu özlerin hücresel yaşlanma süreçleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. Araştırmacılar, geleneksel Çin tıbbı, Akdeniz diyeti gibi geleneksel kaynaklardan elde edilen 53 bitki özünü test etmiş ve bunlardan on beşinin, kalori kısıtlaması uygulanmayan koşullarda maya hücrelerinin kronolojik yaşam ömrünü nasıl uzattığını anlamayı hedeflemişlerdir. Bu 15 bitki özütünden kısaca PE'ler şeklinde bahsedilmiş ve bilimsel adları *Serenoa repens* (*Serenoa palmyra*), *Hypericum perforatum* (Sarı kantaron), *Ilex paraguariensis* (Mate çayı), *Ocimum tenuiflorum* (Tulsi/kutsal fesleğen), *Solidago virgaurea* (Altınbaşak), *Citrus sinensis* (Tatlı portakal), *Humulus lupulus* (Şerbetçiotu), *Vitis vinifera* (Üzüm), *Andrographis paniculata* (Brahmi otu), *Hydrastis canadensis* (Kanada altın kökü), *Trigonella foenum-graecum* (Çemen otu), *Berberis vulgaris* (Kızılcık), *Crataegus monogyna* (Alıç), *Taraxacum erythrospermum* (Karahindiba) olarak ifade edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, bu bitkiler maya hücrelerinin kronolojik yaşlanma sürecini yavaşlatmış ve hormetik bir stres yanıtını (düşük dozda fayda, yüksek dozda zarar) indüklemiştir. Bitki özlerinin, kalori kısıtlaması uygulanmayan koşullarda bile, kalori kısıtlaması diyetinin ömrü uzatan, strese karşı koruyucu, metabolik ve fizyolojik etkilerini taklit ettiği bulunmuştur. Bu geroprotektif bitki özleri mitokondriyal solunumun artışı, hücresel makromoleküllerin oksidatif hasardan korunması (protein, lipid, DNA hasarından) ve uzun süreli oksidatif ve termal streslere karşı dirençte yaşa bağlı artış gibi, ömrü belirleyen hücresel süreçler üzerinde koruyucu etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular, belirli bitki ekstraktlarının yaşlanma karşıtı tedavilerde potansiyel olarak kullanılabileceğini göstermiştir.
- Guo ve diğ. (2019) çalışmasında, neohesperidin ve diğer narenciye flavonoidlerinin (naringin, hesperedin, hesperitin) *S. cerevisiae* BY4742 suşunun kronolojik yaşam ömrü (CLS) üzerindeki anti-aging potansiyeli ve bu bileşiklerin olası sinerjik etkileşimlerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu

bileşiklerin maya hücrelerinin CLS'si üzerindeki etkileri tek başlarına ve kombinasyon halinde incelenmiştir. Flavonoidlerin ROS temizleme kapasiteleri, in vitro antioksidan aktiviteleri ve hücre dışı pH üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre neohesperidin, maya hücrelerinin CLS'sini konsantrasyona bağlı olarak uzatmıştır. Neohesperidin'in, maya hücrelerinin CLS'sini hem tek başına hem de hesperetin ile sinerjik bir etkileşim içerisinde uzatma konusunda yüksek bir potansiyele sahip olduğu tespit edilmiştir. Dört flavonoid bileşiği, belirgin bir ROS temizleme kapasitesine sahip olsa da, neohesperidin, maya hücrelerindeki ROS birikimini azaltmada en güçlü etkiyi göstermiştir. Ayrıca, neohesperidin'in in vitro antioksidan kapasitesinin görece zayıf olduğu ortaya konmuş ve bu durum, neohesperidin'in maya hücrelerinde CLS uzatma işlevinin, doğrudan in vitro antioksidan aktivitesine bağlı olmadığını göstermiştir. 10 µM konsantrasyonda naringin, hücrelerin yaşam ömrünü etkileyen ekstraselüler asidifikasyon hızını yavaşlatmış, diğer flavonoidler ise aynı konsantrasyonda bu etkiyi göstermemiştir. Sonuç olarak bulgular, neohesperidin'in potansiyel bir anti-aging narenciye flavonoidi olduğunu ve diğer flavonoidlerle birlikte kullanıldığında maya hücrelerinin yaşam ömrünü uzatmada sinerjik etkiler gösterebileceğini ortaya koymuştur.

- Sjö ve diğ. (2019) çalışmasında, *S. cerevisiae* modelinde, astaksantin adlı doğal bileşiğin antioksidan, anti-apoptotik ve yaşlanma karşıtı etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla yabanıl tip (BY4741), antioksidan eksik mutantlar (*sod1Δ*, *sod2Δ*, *cta1Δ*, *ctl1Δ*, *tsa1Δ*) ve anti-apoptotik eksik mutant (*fis1Δ*, *pep4Δ*) suşlar kullanılmış ve çalışmalar eksponansiyel büyüme fazında gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, astaksantin'in ROS seviyelerini azalttığını, lipid peroksidasyonunu baskıladığını ve GSH ile SOD seviyelerini artırdığını göstermiştir. Antioksidan eksik mutantlarda bile, H₂O₂ gibi oksidatif stres etmenlerinin zararlı etkileri belirgin şekilde azaltılmıştır. *pep4Δ* ve *fis1Δ* mutantları gibi apoptoza duyarlı hücrelerde, astaksantin asetik asit ve hidrojen peroksit kaynaklı hücre ölümüne karşı mutantları koruyarak apoptoz oranını düşürmüş ve hücre hayatta kalma oranlarını artırmıştır. Bu durum astaksantin'in anti-apoptotik özellik taşıdığını ortaya koymuştur. Astaksantin, hem yabanıl tip hücrelerde hem de mutantlarda kronolojik yaşam ömrünü uzatmış ve bu

etkiler, ROS'un temizlenmesi ve antioksidan savunma mekanizmalarının indüklenmesiyle sağlanmıştır. Sonuç olarak bu bulgular, astaksantin, yaşlanma, oksidatif stres ve hücre ölümüyle mücadelede potansiyel bir tedavi ajanı olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

- Sunthongkun ve diğ. (2019) çalışmasında, kırmızı ve siyah pirinç kepeği özütlerinin antioksidan özellikleri ve *S. cerevisiae* (BY4742 suşu) modelinde yaşlanmayı geciktirici etkilerinin incelenmesi hedeflenmiştir. Özellikle, Hom Dang (kırmızı) pirinç kepeği özütü ve içerdiği biyoaktif bileşikler olan kuersetin ve protokateşik asidin, reaktif oksijen türleri ve yaşam ömrü üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Hom Dang pirinç kepeği özütü, yüksek fenolik asit ve flavonoid içeriğiyle test edilen diğer özütten üstün bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre, Hom Dang pirinç kepeği özütü kuersetin ve protokateşik asit gibi biyobileşenleri sayesinde maya hücrelerinde yaşam ömrünü anlamlı şekilde uzatmıştır. Bu özütler, hücre içi ROS seviyelerini düşürerek oksidatif stresin neden olduğu zararlardan korunma sağlamış ve membran hasarını önlediği gösterilmiştir. Ayrıca, yaşlanma ve antioksidan sistemlerinde önemli genleri eksik olan maya delesyon suşları (SOD1, SOD2, GPX1, GPX2, TOR1, SIR2, RIM15, MSN2/4, ASG1, SCH9) H₂O₂'e maruz bırakılmadan önce özütlerle ön işleme tabi tutulduğunda ROS seviyeleri aynı kalmış veya daha düşük seviyelere gerilemiştir. Böylece özütler, yaşlanmayı düzenleyen genetik mekanizmalarla ilişkilendirilmiş ve antioksidan aktiviteler göstererek yaşam ömrünü uzatıcı etkiler sağlamıştır. Sonuç olarak, kırmızı pirinç kepeği özütünün antioksidan özellikleri sayesinde potansiyel bir anti-aging ajan olarak değerlendirilebileceği ortaya konmuştur.
- Arlia-Ciommo ve diğ. (2018) çalışmasında, bir safra asidi olan litokolik asitin (LCA) *S. cerevisiae*'da (BY4742 suşu) hücresel süreçlerin dinamiklerini düzenleyerek yaşlanmayı nasıl geciktirdiği kalori kısıtlaması (CR) koşullarında araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, LCA'nın mitokondri morfolojisi ve işlevselliğini değiştirerek yaşlanmayı geciktirici bir hücresel düzen oluşturduğunu ortaya koymuştur. Bunun yanı sıra, LCA'nın lipid metabolizmasını modüle ederek yaşlanma ile ilişkili hücre ölüm riskini azalttığı görülmüştür. Özellikle, LCA'nın triaçilgliserol (TAG) sentezini hızlandırması ve lipolizini yavaşlatması, yaşlanma sırasında lipid

damlacıklarının sayısında bir artışa neden olmuştur. Ayrıca, serbest yağ asidi konsantrasyonunu düşürerek yaşlanmayı geciktirici etkisini daha da güçlendirmiştir. LCA'nın mitokondri füzyonunu artırarak yaşlanma ile ilişkili mitokondriyal parçalanmayı azalttığı tespit edilmiştir. Mitokondriyal morfolojinin korunması, hücrelerin enerji metabolizmasını optimize ederek yaşlanmayı geciktiren bir mekanizma oluşturmuştur. Bu süreçte, mitokondri sayısında azalma gözlemlenmesine rağmen boyutlarının büyüdüğü kaydedilmiştir. Ayrıca, LCA, hücrelerin apoptoz ve liponekroz gibi ölüm modlarına karşı direncini artırmış ve bu sayede yaşam ömrünü uzatmıştır. Hücrelerin plazma membran bütünlüğünü kaybetmesini geciktirmiş ve apoptotik olaylara neden olan fosfatidilserin eksternalizasyonu ile çekirdek parçalanmasını geciktirmiştir. Son olarak, gen silme çalışmaları, LCA'nın yaşlanma üzerindeki etkilerini doğrulamış ve özellikle TAG sentezi ile lipoliz süreçlerinde hangi yolların kritik olduğunu ortaya koymuştur. Elde edilen bulgular, litokolik asidin, yaşlanma ile ilişkili hücre ölüm riskini azaltarak ve yaşlı hücrelerin hayatta kalma şansını artırarak maya hücrelerinde kronolojik yaşam ömrünü uzattığını göstermiştir. Böylece, kalori kısıtlamasının faydalı etkilerini taklit eden ve hücresel süreçleri düzenleyerek yaşlanmayı geciktiren bir mekanizma sunulmuştur.

- Alugoju ve diğ. (2018) çalışmasında, kuersetinin *S. cerevisiae*'nin oksidatif strese duyarlı ve kısa yaşam ömrüne sahip pep4Δ mutantı üzerinde koruyucu etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Kuersetinin, bu mutantlarda yaşam ömrünü uzatıcı etkilerinin olup olmadığı ve oksidatif ve apoptotik stres indüklü hücre ölümünü önleyip önleyemediği değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, kuersetin, pep4 mutant hücrelerinin hayatta kalma oranını artırmış ve bu hücreler, H₂O₂ indüklü oksidatif stres ve asetik asit indüklü apoptotik stres gibi yaşlanma sürecindeki streslere karşı daha fazla direnç göstermiştir. Asetik asitin, maya pep4Δ hücrelerinde apoptoza yol açtığı ifade edilmiş ve kuersetin bu hücrelerde kromatin kondenzasyonunu azaltarak ve mitokondriyal zar bütünlüğünü koruyarak apoptotik hücre ölümüne karşı direnç sağlamıştır. Sonuç olarak kuersetin, pep4Δ mutant hücrelerde oksidatif stres ve apoptozu baskılayarak, hücrelerin yaşlanma sürecinde yaşam ömrünü ve dirençlerini artıran bir bileşik olarak tanımlanmıştır. Bu durum, kuersetinin antioksidan ve yaşlanmayı geciktirici özelliklerini ortaya koymuştur.

- Wang ve diğ. (2017) çalışmasında, Shenzhou bal şeftalisi meyvesinden izole edilen seskiterpen glikozitlerinin *S. cerevisiae* (BY4741 ve K6001 suşu) hücrelerinde yaşlanma karşıtı etkileri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, bu glikozitlerin maya replikatif yaşam ömrünü artırdığını göstermiştir. Daha sonra, bu bileşiklerin etkisini anlamak amacıyla SZMT01 üzerine antioksidan deneyler yapılmış ve resveratrol pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. SZMT01 ile muamele edilen mayaların H₂O₂ ile oksidatif stres altında sağkalım oranının arttığı gözlemlenmiştir. Bu sonuç, SZMT01'in anti-oksidatif aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca, SOD geninin SZMT01'in yaşam ömrü uzatma aktivitesinde rol alıp almadığını belirlemek için, K6001 arka planına sahip sod1 ve sod2 maya mutantları kullanılarak SZMT01'in replikatif yaşam ömrü üzerindeki etkileri incelenmiştir. Sod1 ve sod2 mutantlarının yaşam ömürleri, K6001 maya suşlarından daha kısa olup, SZMT01, bu mutantların replikatif yaşam ömrünü etkilememiştir. Bu bulgular, SOD geninin SZMT01'in yaşlanma karşıtı etkisinde rol oynadığını göstermiştir.
- Lutchman ve diğ. (2016) çalışmasında, altı farklı bitki özütünün (PE4, PE5, PE6, PE8, PE12, PE21) *S. cerevisiae* yaşlanmasını nasıl geciktirdiği ve bu süreçte rol oynayan sinyal yollarının araştırılması hedeflenmiştir. Bu bitki özütleri sırasıyla PE4: *Cimicifuga racemosa*, PE5: *Valeriana officinalis* L., PE6: *Passiflora incarnata* L., PE8: *Ginkgo biloba*, PE12: *Apium graveolens* L., PE21: *Salix alba* olarak ifade edilmiştir. Çalışmada, yabanıl tip maya suşlarının yanı sıra belirli genlerin silindiği mutant suşlar da kullanılmıştır. Bu mutant suşlar, yaşlanma ile ilişkili olan TORC1, PKA, PKH1/2 gibi pro-aging ve SNF1, ATG, Rim15 gibi anti-aging sinyal yollarının etkilerini analiz etmek üzere tasarlanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre bu özütler yaşlanmayı şu şekillerde yavaşlatmıştır: 1) PE4, yaşlanmayı indükleyen TORC1'in yaşlanmayı geciktiren SNF1 üzerindeki baskılayıcı etkisini azaltarak; 2) PE5, yaşlanmayı indükleyen PKA yolağının iki dalını zayıflatarak; 3) PE6, bilinen sinyal yolları/protein kinazları ağında yer almayan süreçleri koordine ederek; 4) PE8, yaşlanmayı indükleyen PKA'nın yaşlanmayı geciktiren SNF1 üzerindeki baskılayıcı etkisini zayıflatarak; 5) PE12, yaşlanmayı geciktiren Rim15 protein kinazını aktive ederek; 6) PE21, yaşlanmayı indükleyen PKH1/2'ye duyarlı Sch9 formunu inhibe ederek

geroprotektif etki göstermiştir. Bu sonuçlar, bitki özütlerinin farklı sinyal yolları ve protein kinazlar üzerinden maya yaşlanmasını yavaşlatabileceğini ve yaşlanma ile ilişkili hastalıkların tedavisinde potansiyel taşıyabileceğini göstermiştir.

- Wang ve diğ. (2015) çalışmasında, sıtma tedavisinde kullanılan ve artemisin adı verilen bir etken maddenin, kalori kısıtlamasına (KK) benzer etkileriyle maya hücrelerinde hücresel yaşlanmayı nasıl geciktirdiğinin anlaşılması amaçlanmıştır. Bu amaçla *S. cerevisiae* BY4743 suşu kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre artemisin muamelesi KK'yı taklit eden bir çift aşamalı yanıt modunu tetiklemiştir. İlk aşama, mitokondriyal fonksiyonun güçlendirilmesiyle karakterize olup antioksidatif aktivasyonu içerdiği ve mitokondriyal sağlığı artırdığı ifade edilmiştir. İkinci aşama ise, mitokondriyal iyileşme sonrası sistemik metabolizmanın modülasyonu olarak tanımlanmıştır. Çalışma, artesunat (artemisininin yarı sentetik türevi) ile hem proteinleri arasında bir bağlantı olduğunu, nitrik oksit-hem etkileşimiyle fonksiyonel olarak benzerlik gösterdiği ve bunun sitokrom c oksidaz aktivasyonu ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Bu etkileşim, KK'nın yaşlanma karşıtı etkileriyle benzerlik göstermiştir. Ayrıca, ekzojenik H₂O₂ de KK'yı taklit ederek antioksidatif yanıtları tetiklemiş ve hücresel solunum ritimlerini etkilemiştir. Bu durum, H₂O₂'nin yaşam ömrünü uzatmada rol oynadığını göstermiştir. Böylece artesunat, KK'nın tetiklediği nitrik oksit ve H₂O₂'yi taklit ederek, reaktif oksijen türlerini temizlemek ve oksidatif stresi hafifletmek amacıyla antioksidatif ağlar başlatmıştır. Bu süreç metabolik dönüşümü anabolizmadan katabolizmaya kaydırmış ve hücresel fonksiyonların sürdürülebilirliği artırılarak maya hücrelerinde yaşam ömrü uzatılmıştır. Artesunat ve H₂O₂ yaşam ömrünü doz-bağımlı şekilde uzatmıştır. Sonuç olarak bu çalışma, artemisininin potansiyel olarak yaşlanmayı geciktirici ve ömür uzatıcı özelliklere sahip olduğunu ortaya koymuş ve bu etkilere ilişkin moleküler mekanizmaları aydınlatmıştır.
- Mendes ve diğ. (2015) çalışmasında, polifenolik bileşikler olan mirisetin, pirogallol ve floroglusinol'ün *S. cerevisiae* yaşam ömrü üzerindeki etkileri değerlendirilmiş ve oksidatif stres direncini artırıcı etkileri incelenmiştir. Bu amaçla, yabanıl BY4741 suşunun yanı sıra, oksidatif stres savunmasında kritik rol oynayan SOD genlerini taşımayan (sod1Δ ve sod2Δ) mutantlar da

çalışmaya dahil edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, SOD2 eksikliği olan hücrelerin yüksek ROS seviyeleri nedeniyle oksidatif strese karşı duyarlı olduğu belirtilmiş, mirisetinin ise ROS seviyelerini azaltarak *sod2Δ* mutantların yaşam ömrünü uzattığı ve protein karbonilasyonunu azalttığı gösterilmiştir. Bu noktada, pirogallol sınırlı bir koruyucu etki gösterirken, floroglusinol etkisiz kalmıştır. Ayrıca, maya hücreleri üssel fazdayken bu üç bileşikle ayrı ayrı muamele edildikten sonra H₂O₂ stresine maruz bırakıldığında, mirisetin ve pirogallol hücrelerin hayatta kalma oranını artırmıştır. Bu bileşikler, H₂O₂'ye bağlı reaktif oksijen türlerini ve protein karbonilasyonunu anlamlı ölçüde azaltmış, ancak bu etkiyi SOD ve katalaz aktivitelerini artırmadan gerçekleştirmişlerdir. Buna karşın, floroglusinol koruyucu bir etki göstermemiştir. Ayrıca, mirisetin GSSG/GSHT oranını düşürerek redoks dengesini korumuş, pirogallol ve floroglusinol ise bu etkiyi göstermemiştir. Özetle, mirisetin ve pirogallol gibi bileşiklerin, yaşlanma ve oksidatif stresle mücadele eden güçlü antioksidan özelliklere sahip olduğu görülmüştür.

- Wu ve diğ. (2014) çalışmasında, 144 bitki materyalinin yaşlanma karşıtı aktiviteleri incelenmiş ve en yüksek aktiviteyi gösteren adaçayı (*Salvia miltiorrhiza*) bitkisinden izole edilen tanshinon bileşiklerinden özellikle kriptotanshinon'un, *S. cerevisiae* (yabanıl tip BY4742 ve Sch9, Tor1, Gcn2, Sod2 genleri silinmiş mutantlar) üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, kriptotanshinon, maya hücrelerinin yaşam ömrünü konsantrasyon ve zamana bağlı olarak 2.5 kata kadar uzatmıştır. Veriler, tanshinonların yalnızca hücreler durağan faza geçerken uygulandığında CLS'yi uzattığını, ancak hücreler durağan faza girdikten sonra uygulandığında bu etkinin görülmediğini ortaya koymuştur. Tanshinonların yaşam ömrünü uzatma etkisinin, aminoasit ve glikoz gibi besinlerin varlığına bağlı olduğu ve özellikle esansiyel aminoasitlerin bu etkide kritik rol oynadığı belirtilmiştir. Ayrıca, kriptotanshinon'un CLS'yi uzatma etkisinin Tor1 ve Sch9 gibi besin algılama proteinlerinin varlığına bağlı olduğu ifade edilmiştir. Gcn2 proteini ise, aminoasit homeostazını düzenleyerek kriptotanshinon'un CLS'yi uzatma etkisine katkıda bulunmuştur. Kriptotanshinon, SOD2 eksikliği olan mutantlarda da yaşam ömrünü uzatmış ancak bu etki ROS seviyelerindeki düşüşle ilişkili olmamıştır. Sonuç olarak

kriptotanshinon'un düşük konsantrasyonlarda etkili olması ve birçok modelde benzer mekanizmalarla çalışması, onu umut verici bir yaşlanma karşıtı bileşik olarak öne çıkarmıştır.

- Wu ve diğ. (2013) çalışmasında, metionin ve glutamik asit aminoasitlerinin *S. cerevisiae* (BY4742 suşu) modelinde yaşam ömrü üzerindeki bağımsız ve aditif etkileri incelenmiş ve besin kompozisyonunun maya yaşlanması üzerindeki etkileri ile aminoasitlerin yaşam ömrünü nasıl uzatabileceği araştırılmıştır. Çalışmada yabancı tipin yanı sıra çeşitli gen delesyon mutantları da (SOD2, GCN2 ve SCH9 gibi yaşlanma ve stres direnci ile ilişkili genlerin mutantları) kullanılmıştır. İlk olarak maya hücreleri yaşlandırılarak yaşam ömürleri incelenmiş ve glikoz seviyeleri (normal ve kalori kısıtlanmalı koşullar) ile aminoasit seviyelerinin yaşam ömrü üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Ayrıca, besin ortamlarının pH seviyeleri ve asetik asit üretimi ölçülerek yaşlanma sürecine etkileri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, maya için temel olmayan aminoasitler olan metiyonin ve glutamik asidin, maya kronolojik yaşam ömrü uzamasına en büyük etkiyi yaptığı (çalışmada incelenen diğer aminoasitlere göre) ve metiyonin kısıtlaması, glutamik asit artışı ve glikoz kısıtlaması gibi faktörlerin uygulanmasının, yaşlanma ortamlarında düşük asetik asit üretimi ve asidifikasyona bağlı olmadan uzun ömre yol açtığını göstermiştir. Ayrıca, bu üç faktör birlikte uygulandığında yaşam ömrü üzerinde aditif bir etki gözlemlenmiştir. Delesyon mutantları kullanılarak yapılan çalışmalar ise, glutamik asit eklemesi ile metiyonin ve glukoz kısıtlamasının mayaların yaşlanma sürecini farklı mekanizmalarla geciktirdiğini göstermiştir. Özellikle, SOD2, Sir2 ve TOR1 genlerinin silinmesi, bu aminoasitlerin etkisiyle yaşlanma sürecinde önemli değişikliklere yol açmamıştır. Ancak, Gcn2 geninin silinmesi bu aminoasitlerin yaşlanma sürecini uzatma etkisini engellemiştir. Bu sonuç, Gcn2'nin aminoasit metabolizmasını düzenlemede anahtar bir rol oynadığını göstermiştir. Sch9 geninin etkisiyle yaşlanma süresi, metiyonin kısıtlaması altında uzamamış, ancak glutamik asit ile uzatılabilmiştir.
- Palermo ve diğ. (2010) çalışmasında, Asetil-L-karnitin (ALC) maya hücrelerindeki yaşlanma ve apoptoz süreçlerini nasıl etkilediği anlaşılmak istenmiştir. ALC'nin hücrel yaşlanma, oksidatif stres ve mitokondriyal işlevler üzerindeki koruyucu etkileri incelenmiştir. Bu amaçla, hem yabancı

tip (CML39-11A ve BY4741) hem de spesifik genetik mutasyonlara sahip (*yca1*, *rho0*, *lsm4Δ1*) maya suşları kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar ALC'nin, maya hücrelerinin stasyonier fazda kronolojik yaşlanma süreçlerini uzatabildiğini göstermiştir. Ancak bu etki, *yca1* mutantları ve *rho0* suşlarında önemli ölçüde azalmıştır. Bu durum, ALC'nin koruyucu etkilerinin Yca1 kaspazı ve mitokondriyal fonksiyonlar aracılığıyla gerçekleştiğini göstermiştir. ALC, pro-apoptotik mutantlarda apoptozu önlemiş ve mitokondriyal fonksiyonların yaşlanma ve apoptoz üzerindeki düzenleyici rolünü desteklemiştir. Ayrıca, ALC yaşlı maya hücrelerinde mitokondriyal fizyonu baskılayarak yaşlanma süresince mitokondriyal tübüler ağı korumuştur. Hidrojen peroksit ile yapılan oksidatif stres deneylerinden elde edilen sonuçlar ise ALC'nin iki yabancı tip suşu oksidatif hasardan ve hücre ölümünden koruduğunu göstermiştir. Sonuç olarak bu çalışma, ALC'nin yaşlanma ve apoptoz üzerinde etkili mekanizmalarını açıklamış ve bilinen antioksidan etkilerinin yanı sıra mitokondriyal morfoloji üzerinde de koruyucu etkiler gösterebileceğini ortaya koymuştur.

- Owsiak ve diğ. (2010) çalışmasında, *S. cerevisiae*'nin stasyonier faz yaşlanması sırasında ortaya çıkan oksidatif stres ve bu sürecin antioksidanlarla nasıl azaltılabileceğinin araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla yabancı tip SP-4 suşu ve sitozolik SOD-1'i bulunmayan mutant suşu DSCD1-1C kullanılmıştır. Ayrıca, askorbik asit (20 mM), glutatyon (1 mM) ve melatonin (100 µM) gibi antioksidanlar kullanılarak, bu maddelerin hücresel yaşlanma sürecinde ortaya çıkan biyokimyasal değişimler üzerindeki etkileri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, stasyonier fazda hücrelerde süperoksit üretimi, oksidatif hasar belirteçleri (aldehitler ve protein karbonil grupları) ve canlılık kaybının arttığını göstermiş ve bu artış, SOD-1 eksik mutantlarda yabancı tipe göre daha belirgin olmuştur. Ayrıca, tiyol düzeyleri ve hücresel antioksidan kapasite zamanla azalmış ve bahsi geçen antioksidanlar ise bu biyokimyasal parametrelerdeki olumsuz değişiklikleri hafifleterek hücre hayatta kalma oranlarını artırmıştır. Katalaz aktivitesi yabancı tipte yaşlanma sırasında artarken, SOD-1 eksik mutantlarda azalmış ve glutatyon ile melatonin bu azalmayı kısmen dengelemiştir. Glutatyon S-transferaz aktivitesine gelindiğinde, yabancı tipte azalma görülürken, SOD-1 eksik suşta bu azalma önemli oranda gerçekleşmemiştir. Bu noktada,

glutasyon ve melatoninin koruyucu etkisi dışında, belirgin bir antioksidan etki gözlemlenmemiştir. Sonuç olarak bahsi geçen antioksidanlar, hücre yaşlanmasını yavaşlatmada sınırlı ama anlamlı bir koruma sağlamıştır.

- Eisenberg ve diğ. (2009) çalışmasında, doğal bir poliamin olan spermidinin, maya (*S. cerevisiae*), sinek (*D. melanogaster*), solucan (*C. elegans*), fare ve insan hücre modellerinde (PBMC ve HeLa hücreleri) otofajiyi indükleyerek yaşlanmayı nasıl yavaşlattığı ve yaşam ömrünü nasıl uzattığı incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, spermidin uygulamasının, maya, sinek, solucan ve insan hücrelerinde yaşam ömrünü uzatırken, yaşlanan farelerde oksidatif stresi güçlü bir şekilde baskılamıştır. Bu bulgular, spermidinin özellikle mayalarda hem kronolojik yaşlanmayı yavaşlattığını hem de replikatif olarak yaşlanmış hücreleri gençleştirdiğini ortaya koymuştur. Yaşlanmakta olan maya hücrelerine spermidin uygulaması, histon asetiltransferazların (HAT) inhibisyonu yoluyla histon H3'ün epigenetik olarak deasetilasyonunu indüklemiş ve bu süreç oksidatif stresin ve nekrozun baskılanmasını sağlayarak yaşlanmaya karşı koruma sağlamıştır. Bunun aksine, endojen poliamin eksikliği (SPE1 geninin eksik olduğu Δ spe1 maya kullanılarak), hiperasetilasyona, reaktif oksijen türlerinin artışına, erken nekrotik hücre ölümüne ve yaşam ömrünün kısalmasına yol açmıştır. Kromatinin değişen asetilasyon durumu, otofaji ile ilişkili çeşitli gen transkriptlerinin önemli ölçüde up-regülasyonuna neden olmuş ve maya, sinek, solucan ve insan hücrelerinde otofajiyi indüklemiştir. Otofaji için kritik olan ATG7 geninin delesyonu, spermidinin yaşam ömrü uzatma etkisini büyük ölçüde ortadan kaldırmıştır. Sonuç olarak, otofajinin artışının, maya, sinek ve nematodlarda poliamin aracılı yaşam ömrü uzatılmasında kritik bir role sahip olduğu ortaya konulmuştur.
- Patil ve diğ. (2003) çalışmasında, flavonoidlerin (apigenin-7-glukozit ve kuersetin), yaşlanma ve lipopolisakkarit (LPS) ile indüklenen bilişsel bozulmalara karşı koruyucu etkileri incelenmiştir. Alzheimer hastalığı modeli olarak kullanılan yaşlı ve LPS ile muamele edilen farelerde bilişsel bozulma ve öğrenme ile hafıza testlerinde düşük performans gözlenmiştir. Flavonoidlerin doz bağımlı şekilde bilişsel bozulmayı tersine çevirdiği, apigenin-7-glukozitin kuersetinden daha etkili olduğu ve bu etkinin siklooksijenaz-2 (COX-2) ve nitrik oksit sentaz (iNOS) enzimlerini daha

güçlü baskılamasıyla ilişkili olduğu belirtilmiştir. Genç farelerde flavonoid uygulaması etkili bulunmamıştır. Flavonoidlerin anti-inflamatuvar ve antioksidan özellikleri sayesinde yaşlanma ve Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklarda terapötik potansiyele sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

2.9 Çalışmanın Amacı

Tez çalışması kapsamında, hücresel yaşlanma sonucu meydana gelen oksidatif hasara karşı anti-apoptotik Bcl-2 ve Bcl-xL proteinlerinin olası koruyucu etkilerinin *S. cerevisiae* maya hücre modeli kullanılarak araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaç doğrultusunda, Bcl-2 ve Bcl-xL proteinlerini kodlayan genlerin heterolog rekombinasyonu yoluyla elde edilen transforme maya hücreleri kullanılmıştır. Bu hücrelerin ROS üretimine neden olduğu bilinen yaşlanma indüklü oksidatif stres karşısında gösterdikleri direnç üzerindeki etkiler; canlılık, hücre yüzeyi morfolojisindeki değişiklikler, temel antioksidan enzim aktivitelerindeki farklılıklar, lipid ile protein hasar parametreleri açısından fonksiyonel olarak analiz edilmiş ve elde edilen sonuçlar kontrol grubu olarak kullanılan boş vektör taşıyan transforme suş ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca, biyokimyasal analizleri desteklemek amacıyla biyokimyasal kompozisyondaki değişiklikler kemometrik veri analizleri ile değerlendirilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda, her iki proteinin de ökaryotik hücre modeli olan *S. cerevisiae*'da yaşlanmaya karşı güçlü koruyucu etkiler sergileyip sergilemediği belirlenmeye çalışılmıştır. Literatür taramasına göre bu çalışma, yaşlanma indüklü oksidatif strese maruz bırakılan *S. cerevisiae* hücre modelinde anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerinin koruyucu etkilerinin farklı yöntemlerle belirlenmeye çalışıldığı ilk çalışmadır.

3. MATERİYAL VE METOD

3.1 Materyal

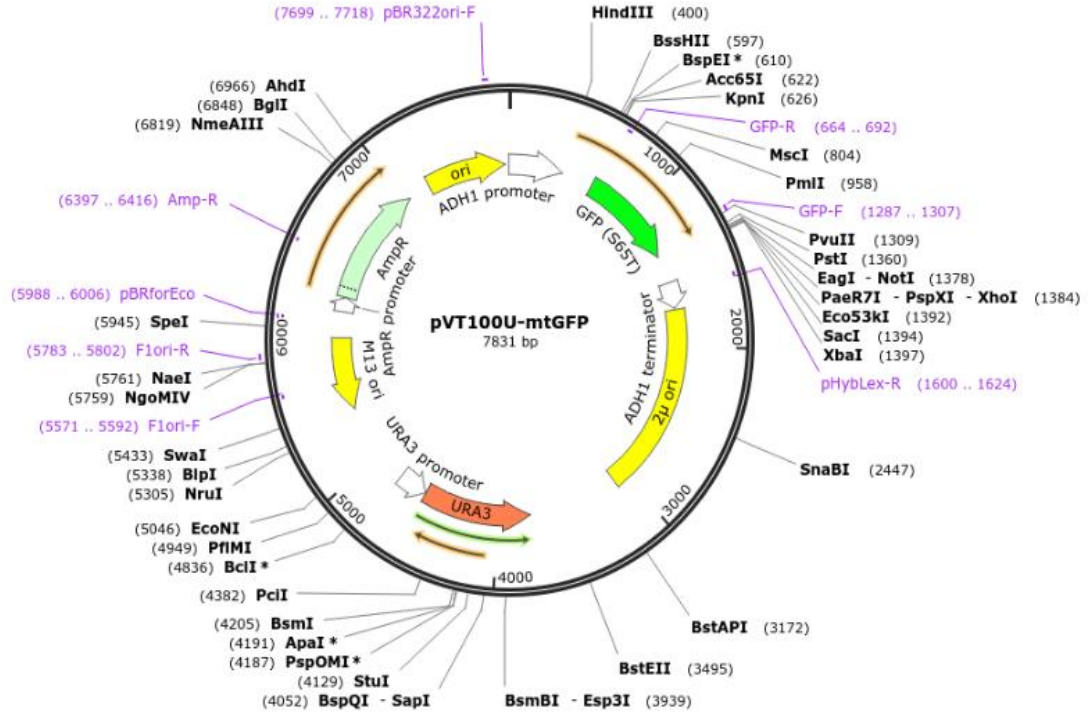
Kullanılan tüm bileşikler aksi belirtilmedikçe analitik veya daha yüksek saflık kalitesinde olup, Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, ABD) firmasından temin edilmiştir. Biyokimyasal analizler için gerekli kitler Elabscience Biotechnology (Wuhan, Çin) ve Cayman Chemical Company (ABD) tarafından sağlanmıştır. Transforme *S. cerevisiae* BY4741 suşları ise TOP Gene Technologies (Montreal, Kanada) firmasından temin edilmiştir.

3.2 Metod

3.2.1 Maya Suşları, Rutin Bakım, Büyüme ve Yaşlanma

Çalışma kapsamında *S. cerevisiae* BY4741 suşu (MATa his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0) plazmid DNA'larla (boş vektör, Bcl-2 plazmid DNA ve Bcl-xL plazmid DNA) transformasyon için kullanılmıştır. Yüksek kopya sayılı replikatif vektör pVT100U-mtGFP, sırasıyla insan Bcl-2 ve Bcl-xL genlerini içeren hibrit vektörlerin elde edilebilmesi için kullanılmıştır (Şekil 3.1, Şekil 3.2, Şekil 3.3). Bcl-2 ve Bcl-xL genleri pVT100U-mtGFP vektörünün PstI ve XhoI bölgelerine yerleştirilmiştir. Bcl-2 ve Bcl-xL genlerinin pVT-100U'daki ifadesi ADH1 promotörünün yapısal kontrolü altında gerçekleştirilmiştir. Seçicilik, pVT100U-mtGFP vektörünün bir oksotrofik markerı olan URA3 ile sağlanmıştır. Rutin bakım için suşlar, 30°C'de 48 saat boyunca sentetik dekstrozu (SD) agar ortamında (6.7 g/L aminoasitsiz azot bazlı maya özütü, 0.87 g/L urasil içermeyen maya sentetik drop-out karışımı, 20 g/L glukoz ve 20 g/L bakteriyolojik agar) yetiştirilmiştir. Transgen ifadesini değerlendirmek için, her maya genotipinden rastgele üç koloni seçilmiş ve Bcl-2 ve Bcl-xL protein seviyeleri ELISA testleri ile analiz edilmiştir. Büyüme ve yaşlandırma çalışmaları için maya hücreleri SD ortamında (6.7 g/L aminoasitsiz azot

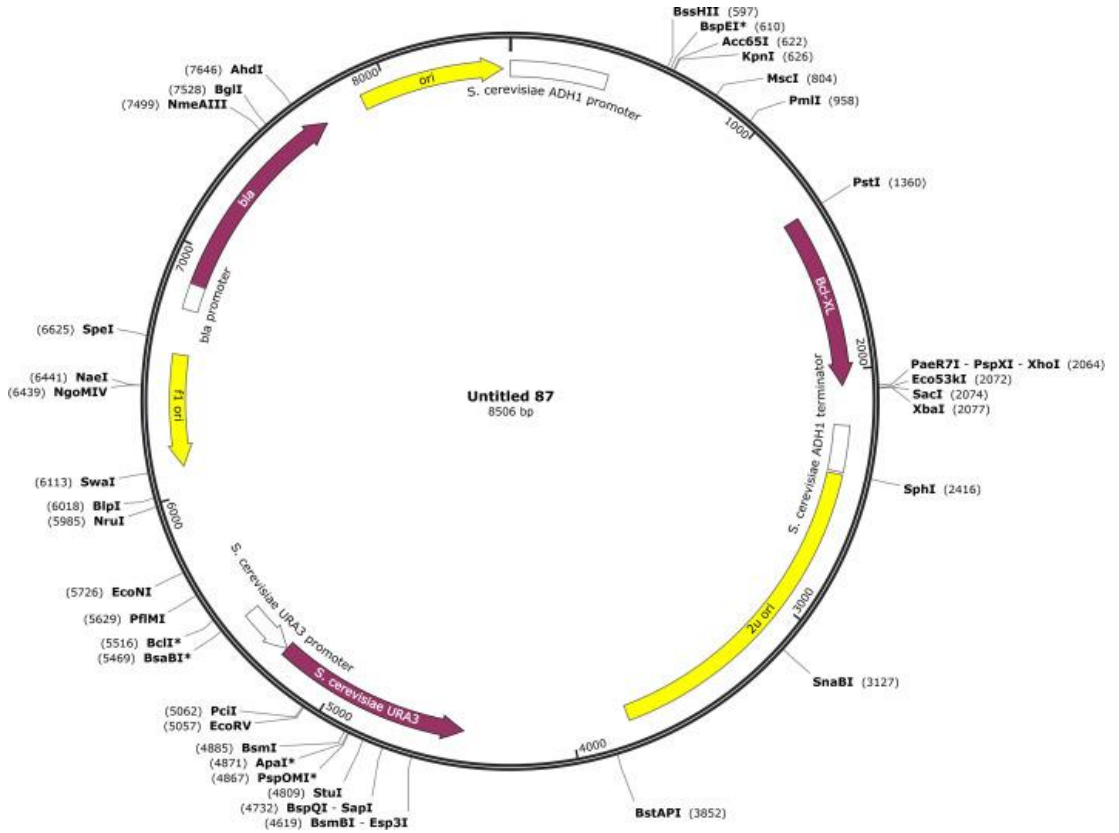
bazlı maya özütü, 0.87 g/L urasil içermeyen maya sentetik drop-out karışımı, 20 g/L glukoz) 30°C'de ve 180 rpm ajitasyonda 10 gün boyunca kültürlenmiştir. Biyokimyasal analizler için numuneler yaşlanma periyodunun 2., 3., 6., 8. ve 10. günlerinde eksponansiyal ve stasyoner faz boyunca toplanmıştır.



Şekil 3.1: pVT100U-mtGFP transforme BY4741 suşu vektör haritası (Addgene plazmit 45054).



Şekil 3.2: pVT100U-mtGFP-Bcl-2 haritası.



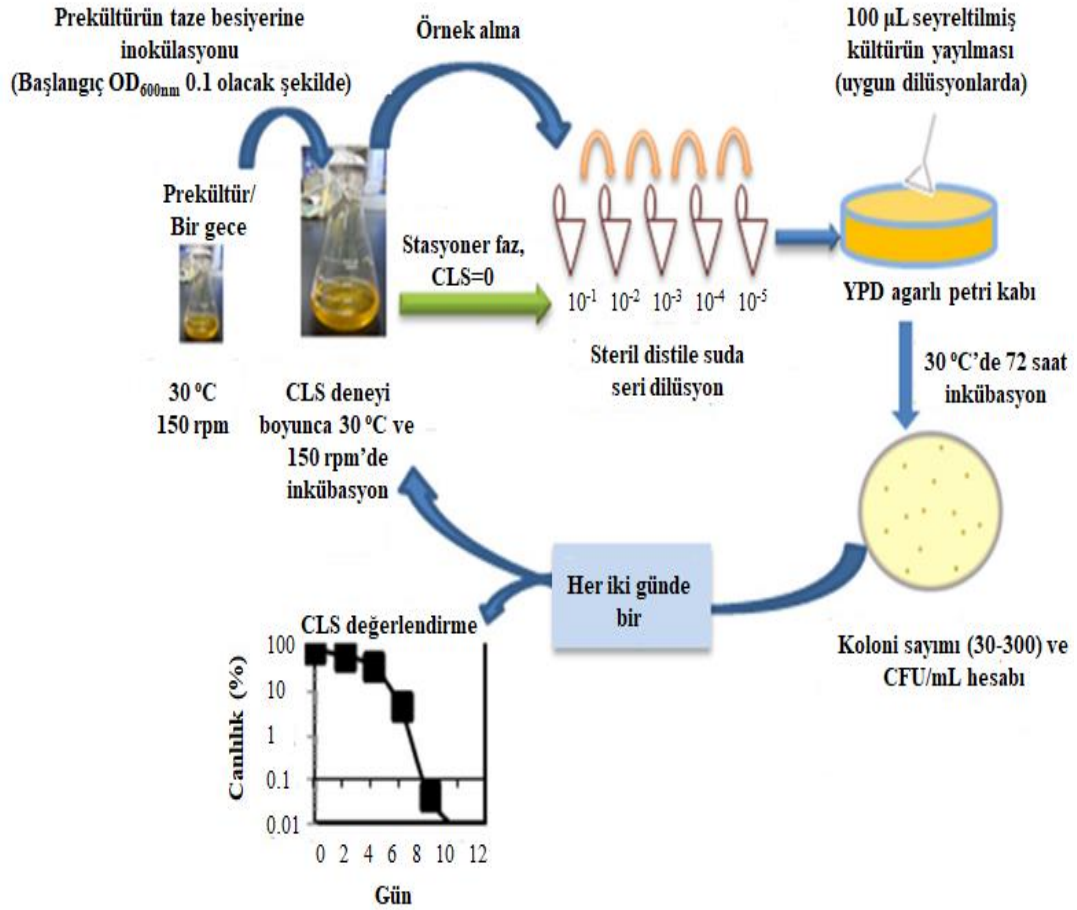
Şekil 3.3: pVT100U-mtGFP-Bcl-xL haritası.

3.2.2 Transforme *S. cerevisiae* Hücrelerinin Büyüme ve Morfolojik Değişimlerinin İncelenmesi: Spektrofotometrik ve FE-SEM Analizleri

10 günlük inkübasyon periyodu boyunca büyütülen transforme *S. cerevisiae* hücreleri toplanmış ve OD_{660nm} optik yoğunluk değerleri spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değerlerine göre suşlara ait büyüme grafikleri çizilerek eksponansiyal ve stasyoner fazları belirlenmiştir. Ayrıca, yaşlanma periyodunun 2., 6. ve 10. günleri için transforme maya hücrelerinin alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu (FE-SEM) görüntüleri alınarak meydana gelen morfolojik değişiklikleri değerlendirilmiştir. Bu işlem için Liu ve diğ. (2010) tarafından tanımlanan protokol, küçük değişikliklerle uygulanmıştır. Yönteme göre, 3×10^7 hücre/ml yoğunluğunda hücre süspansiyonu hazırlanmış ve 50 µl'lik miktarı poli-L-lizin kaplı lamellere aktarılıp 40 dk boyunca havada kurutulmuştur. Sonrasında, hücreler %2.5 glutaraldehit çözeltisi ile 1 gece boyunca sabitletme sürecine bırakılmıştır. Fiksasyon sonrası PBS ile 2 kere yıkanan örneklerin dehidrasyonu için %30, 50, 70, 95 ve 100'lük artan etanol serilerinde 20 dakikalık inkübasyonlar gerçekleştirilmiştir. Hava ile kurutulan hücreler altın-paladyum parçacıkları ile kaplanmış ve Pamukkale Üniversitesi İleri Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'nin (İLTAM) FE-SEM biriminde 15,00 KX büyütme ile görüntülenmişlerdir.

3.2.3 Koloni Oluşturan Birim (CFU) Yöntemi ile Canlılık Tayini

Transforme maya hücrelerinin canlılığı CFU yöntemi ile belirlenmiş ve yayma ekim tekniğine göre SD agarlı katı besiyerinde canlı hücrelerin oluşturduğu kolonilerin sayısı hesaplanmıştır. Bu amaçla yaşlanma periyodunun 2., 6. ve 10. günlerine ulaşan transforme maya hücrelerinin başlangıç yoğunlukları steril PBS ile ardışık dilüe edilmiş (10^1 ve 10^5 kat arası) ve bu dilüsyonların 0.1 ml'si SD agarlı besiyerine yayılarak 30 °C'de 48 saat süreyle inkübasyonu gerçekleştirilmiştir. 10^3 ve 10^4 kat seyrelme ile elde edilen koloni yoğunlukları sayılarak görselleri alınmış ve 10^4 kat seyrelme ile sayım standardı aralığına (30-300 arası koloni içeren seyrelti) sokulmuş transforme suşların boş vektör kontrol grubuna kıyasla canlılığı ne oranda artırdığı ifade edilmiştir.



Şekil 3.4: YPD plakalarında canlı maya hücre kolonilerinin sayımına yönelik CFU prosedürüne genel bakış (Arslan ve diğ. 2018 tarafından yapılan çalışmadan alınmış ve düzenlenmiştir).

3.2.4 Annexin V-FITC ve Propidyum İyodür (PI) Çift Boyama

Yaşlanma periyodunun 6. gününde transforme maya suşlarının proliferasyonlarındaki değişimin belirlenebilmesi amacıyla BioLegend firmasından temin edilen FITC Annexin V-PI apoptoz kitinden faydalanılmıştır. Boyama prosedürü için toplanan hücreler iki kez soğuk BioLegend's Cell Staining Buffer ile yıkanmış ve ardından hücreler Annexin V Binding Buffer içinde $0.25-1.0 \times 10^7$ hücre/mL konsantrasyonda yeniden süspanse edilmiştir. 100 µL hücre süspanسیونunun üzerine 5 µL FITC Annexin V ve 10 µL Propidyum İyodür solüsyonu eklenerek karıştırıldıktan sonra karanlıkta oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilmiştir. Ardından 400 µL Annexin V Binding Buffer eklenmiş ve flow sitometrik analizi gerçekleştirilmiştir.

3.2.5 Biyokimyasal Analizler İçin Hücre Lizis Prosedürü

Transforme maya hücrelerinin lize edilebilmesi için ticari CelLytic Y Cell Lysis Reagent (Sigma, ABD) kullanılmıştır. Prosedüre göre, kontrol ve test gruplarından hücreler toplanmış ve hücre pelletleri tartılarak 1 g ıslak ağırlıktaki hücre başına 5 ml tampon (1:5) olacak şekilde lizis tamponunda resüspanse edilmiş ve oda sıcaklığında hafif çalkalama ile 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon periyodunun ardından hücre lizatları 3000 rpm'de 5 dk boyunca santrifüjlenmiş ve süpernatantlar biyokimyasal analizler için toplanmıştır.

Lipid peroksidasyonu ve protein karbonilasyonu analizleri için ise, hücre pelletlerinin net ağırlığı ile 1:1 oranda cam boncuk (glass bead) ve 1:3 oranda 20 mM pH:7 NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ fosfat tamponu eklenmiştir. Hücreler 3 dakikalık periyotlar halinde toplamda 5 kez vortekslenip santifüj edilerek hücre lizisi gerçekleştirilmiş ve elde edilen süpernatantlar hasar parametrelerinin çalışılması için toplanmıştır.

3.2.6 Biyokimyasal Analizler

3.2.6.1 Toplam Antioksidan ve Oksidan Durum

Yaşlanma periyodunun 2., 3., 6., 8. ve 10. günleri boyunca toplanan transforme maya hücrelerinin toplam antioksidan ve oksidan durumu (TAS ve TOS), sırasıyla TAS ve TOS kolorimetrik analiz kitleri (Elabscience Biotechnology) kullanılarak belirlenmiş ve kitle yer alan prosedürler takip edilmiştir.

Bir numunenin toplam antioksidan durumu; çeşitli antioksidan makromoleküller, antioksidan küçük moleküller ve enzimlerin toplam seviyesi ile yansıtılmaktadır. Farklı antioksidan moleküllerin ayrı ayrı ölçülmesi pratik olmamakla birlikte klinik açıdan da bir anlam ifade etmemektedir. Antioksidanların etkileri aditif olduğundan ve her bir antioksidanı ayrı ayrı ölçmek zaman alıcı ve yoğun emek gerektirdiğinden dolayı, tüm antioksidanların birleşik aktivitelerinin veya toplam antioksidan durumunun ölçümü, genel antioksidatif durumu tahmin etmek için kullanılmaktadır (Erel 2004). TAS kitinin analiz ilkesi; numunedeki

antioksidanların konsantrasyonlarına bağı olarak koyu mavi-yeşil renkli ABTS^{•+} radikalini renksiz ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzoitazolin-6-sülfonik asit) formuna indirgemesidir. Bu nedenle numunenin TAS değeri, 660 nm'de azot bazlı ABTS^{•+} radikalinin absorbansı ölçülerek hesaplanabilmektedir. Test; E vitamini analogu olan Trolox eşdeğeri adı verilen kararlı bir antioksidan standart solusyon ile kalibre edilmektedir (Lavová ve Urminská 2013).

TAS kit prosedürüne göre, farklı konsantrasyonlarda hazırlanan standartlar ve analiz edilecek örneklerden 10 µL sırasıyla standart ve örnek kuyucuklarına yüklendikten sonra her bir kuyucuğa Reagent 1'den 200 µL eklenerek plate reader ile 660 nm'deki absorbansı (A1) ölçülmüştür. Daha sonra her bir kuyucuğa Reagent 2'den 20 µL eklenerek 37°C'de 5 dakika inkübasyonu sağlanmış ve 660 nm'deki absorbansı (A2) tekrar ölçülmüştür. Sonuçlar, standart konsantrasyona karşı ΔA'nın (ΔAblank - ΔAstandart (A2-A1)) doğrusal regresyonundan hesaplanmış ve mmol Trolox Eşdeğeri/L olarak ifade edilmiştir.

Fizyolojik koşullarda, oksidan/antioksidan denge oksidatif duruma doğru kayabilmektedir. Bir numunedeki oksidasyon durumunun değerlendirilmesinde reaktif türlerin derişimlerinin belirlenmesi söz konusu moleküllerin kararsızlıkları nedeniyle oldukça zor olup hata payı yüksektir. Öte yandan, toplam oksidan durumun tayini hücredeki dinamik süreçlerin bütüncül olarak değerlendirilebildiği kararlı bir türev oluşturmaya dayalı olarak gerçekleştirilebilmektedir (Erel 2005). TOS kitinin analiz ilkesi; asidik koşullar altında numunedeki oksidanların Fe⁺²'yi Fe⁺³'e yükseltgemesi ve Fe⁺³ iyonlarının ise metal titrasyonlarında indikatör olarak kullanılan ksilenol turuncusu (xylenol orange) ile mavi-mor renkli kompleks oluşturarak 590 nm'de maksimum absorbans vermesi prensibine dayanmaktadır. Ölçülen rengin yoğunluğu numunedeki toplam oksidan moleküllerinin miktarı ile orantılıdır (Dikilitas ve diğ. 2011). Test; H₂O₂ standart solusyon ile kalibre edilmektedir.

TOS kit prosedürüne göre, farklı konsantrasyonlarda hazırlanan standartlar ve analiz edilecek örneklerden 20 µL sırasıyla standart ve örnek kuyucuklarına yüklendikten sonra her bir kuyucuğa Reagent 1'den 200 µL eklenerek plate reader ile 590 nm'deki absorbansı (A1) ölçülmüştür. Daha sonra her bir kuyucuğa Reagent 2'den 50 µL eklenerek 37°C'de 5 dakika inkübasyonu sağlanmış ve 590 nm'deki

absorbansı (A2) tekrar ölçülmüştür. Sonuçlar, standart konsantrasyona karşı ΔA 'nın (A2-A1) doğrusal regresyonundan hesaplanmış ve $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eşdeğeri/g protein olarak ifade edilmiştir.

3.2.6.2 Antioksidan Enzim Aktivite Tayinleri

Transforme maya hücrelerinde glutatyon redüktaz (GR), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon-S-transferaz (GST), süperoksit dismutaz (SOD) ve tiyoredoksin redüktaz (TrxR) antioksidan enzim aktiviteleri, Cayman Chemicals tarafından temin edilen kolorimetrik kitler kullanılarak ölçülmüş ve protokoller üreticinin önerileri doğrultusunda uygulanmıştır.

3.2.6.2.1 GR Aktivite Tayini

Yaşlanma periyodunun 2., 3., 6., 8. ve 10. günleri boyunca toplanan transforme maya örneklerinde GR aktivitesi tayini, okside glutatyonun (GSSG) indirgenmiş formuna (GSH) rejenerasyonunu katalize eden GR enzimi aracılığıyla NADPH'ın NADP^+ 'ya oksidasyonunun 340 nm'de absorbanstaki azalma şeklinde izlenmesi prensibine dayanmaktadır. Deney kapsamında numune kuyucuklarına 100 μL analiz tamponu, 20 μL GSSG solusyonu ve 20 μL örnek eklendikten sonra 50 μL NADPH ile enzimatik reaksiyonlar başlatılmıştır. En az 5 zaman noktası belirlenerek 340 nm'deki absorbanlar dakikada 1 kez okunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre lineer bölge tayin edilerek GR aktiviteleri, 340 nm'deki NADPH ekstinksiyon katsayısından ($0.00373 \mu\text{M}^{-1}$) zamanın bir fonksiyonu olarak hesaplanmış ve sonuçlar U/mg protein cinsinden ifade edilmiştir. Bir ünite GR aktivitesi, 25°C 'de dakikada 1.0 nmol NADPH'ın NADP^+ 'ya oksidasyonu için gereken enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

3.2.6.2.2 GPx Aktivite Tayini

Yaşlanma periyodunun 2., 3., 6., 8. ve 10. günleri boyunca toplanan transforme maya örneklerinde GPx aktivitesi tayini, GPx aktivitesi tarafından

Üretilen GSSG'den GSH rejenerasyonunu katalize eden GR ile eşleştirilmiş bir reaksiyonla dolaylı olarak ölçülmekte ve NADPH'ın NADP⁺'ya oksidasyonu sırasında 340 nm'de absorbanstaki azalmanın izlenmesi prensibine dayanmaktadır. Deney kapsamında kuyucuklara 50 µL analiz tamponu, 50 µL co-substrat solusyonu, 50 µL NADPH ve 20 µL rnek eklendikten sonra 20 µL kmen hidroperoksit ile enzimatik reaksiyonlar başlatılmıştır. En az 5 zaman noktası belirlenerek 340 nm'deki absorbanlar dakikada 1 kez okunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre lineer bölge tayin edilerek GPx aktiviteleri, 340 nm'deki NADPH ekstinksiyon katsayısından (0.00373 µM⁻¹) zamanın bir fonksiyonu olarak hesaplanmış ve sonuçlar U/mg protein cinsinden ifade edilmiştir. Bir nite GPx aktivitesi, 25°C'de dakikada 1.0 nmol NADPH'ın NADP⁺'ya oksidasyonu için gereken enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

3.2.6.2.3 GST Aktivite Tayini

Yaşlanma periyodunun 2., 3., 6., 8. ve 10. günleri boyunca toplanan transforme maya örneklerinde GST aktivitesi tayini, 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) ile GSH konjugasyonunun 340 nm'de absorbanstaki artma şeklinde izlenmesi prensibine dayanmaktadır. Deney kapsamında numune kuyucuklarına 150 µL analiz tamponu, 20 µL glutatyon solusyonu ve 20 µL rnek eklendikten sonra 10 µL CDNB ile enzimatik reaksiyonlar başlatılmıştır. En az 5 zaman noktası belirlenerek 340 nm'deki absorbanlar dakikada 1 kez okunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre lineer bölge tayin edilerek GST aktiviteleri, 340 nm'deki CDNB ekstinksiyon katsayısından (0.00503 µM⁻¹) zamanın bir fonksiyonu olarak hesaplanmış ve sonuçlar U/mg protein cinsinden ifade edilmiştir. Bir nite GST aktivitesi, 25°C'de dakikada 1.0 nmol CDNB'nin GSH ile konjugasyonu için gereken enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

3.2.6.2.4 SOD Aktivite Tayini

Yaşlanma periyodunun 2., 3., 6., 8. ve 10. günleri boyunca toplanan transforme maya örneklerinde SOD aktivitesi tayini, moleküler O₂ varlığında ksantin

oksidaz tarafından ksantinin ürik aside okside edilmesiyle üretilen $O_2^{\bullet-}$ tespiti için tetrazolyum tuzunun kullanılması prensibine dayanmaktadır. Yönteme göre, $O_2^{\bullet-}$, O_2 'e yükseltgenirken tetrazolyum tuzunu 450 nm'de maksimum absorbands veren formazana indirgemekte ve oluşan rengin şiddeti ile SOD aktivitesi belirlenmektedir. Deney kapsamında SOD standart kuyucuklarına 200 μ L radikal dedektör ve 10 μ L standart, numune kuyucuklarına ise 200 μ L radikal dedektör ve 10 μ L örnek eklenmiştir. Tüm kuyucuklara 20 μ L ksantin oksidaz eklenerek reaksiyonlar başlatılmış ve hafif çalkalama ile 30 dk oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 450 nm'de standart ve numunelerin absorbandsları tayin edilmiştir. SOD standart eğrisinin doğrusal regresyonundan (LR) elde edilen denklemden faydalanılarak numunelere ait SOD aktiviteleri U/mg protein cinsinden ifade edilmiştir. Bir ünite SOD aktivitesi, ksantin oksidaz ve hipoksantin tarafından üretilen süperoksit radikalının 25°C'de dakikada %50'lik dismutasyonu için gereken enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

$$LR = \text{Blank absorbandsı} / \text{Standart veya numunenin absorbandsı}.$$

3.2.6.2.5 TrxR Aktivite Tayini

Yaşlanma periyodunun 2., 3., 6., 8. ve 10. günleri boyunca toplanan transforme maya örneklerinde TrxR aktivitesi tayini, NADPH varlığında 5,5'-ditiyo-bis-(2-dinitrobenzoik asit)'in (DTNB) 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit'e (TNB) indirgenmesinin 405-414 nm'de sarı renkli bir ürün oluşturarak maksimum absorbands verme prensibine dayanmaktadır. Deney kapsamında numune kuyucuklarına 140 μ L analiz tamponu ile 20 μ L örnek konulduktan sonra 20 μ L NADPH ve 20 μ L DTNB eklenerek enzimatik reaksiyonlar başlatılmıştır. En az 5 zaman noktası belirlenerek 405 nm'deki absorbandslar dakikada 1 kez okunmuştur. TrxR aktivitesi ayrıca bu enzimin spesifik inhibitörü olan aurotiyomalat varlığında ölçülmüş böylece DTNB'yi indirgeme kapasitesine sahip diğer enzim aktivitelerinin hesaplanabilmesi sağlanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre lineer bölge tayin edilerek TrxR aktiviteleri, DTNB ekstinksiyon katsayısından ($0.00792 \mu\text{M}^{-1}$) zamanın bir fonksiyonu olarak hesaplanmış ve sonuçlar U/mg protein cinsinden ifade edilmiştir. Bir ünite TrxR aktivitesi, 22°C'de dakikada 2.0 μ mol ürünün (2-nitro-5-

tiyobenzoatın) NADPH-bağımlı üretilmesi için gereken enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

3.2.6.3 Lipid Peroksidasyon (LPO) Seviyesi Tayini

Yaşlanma periyodunun 2., 3., 6., 8. ve 10. günleri boyunca toplanan transforme maya örneklerine ait membran lipid peroksidasyonu belirleme işlemi, yaşlanma oksidatif stresine bağlı oluşan reaktif oksijen türlerinin lipidlerle özel reaksiyonuna dayanmaktadır. Transforme maya hücrelerinde LPO kararlı ürünü olan malondialdehit (MDA) seviyeleri tiyobarbitürik asit reaktif maddeler (TBARS) testine göre belirlenmiştir (Ledwozyw ve diğ. 1986). Bu kapsamda, 250 µl süpernatant, 0.6 M HCl içerisinde hazırlanan 1.22 M TCA çözeltisi ile eşit hacimde karıştırılmış ve 90°C'de 20 dakika inkübe edilmiştir. Soğutulan örnekler, 12.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiş ve ardından 450 µl süpernatant, 6 ml 1 M NaOH ve 69 ml saf su içindeki 0.047 M TBA çözeltisine eklenmiştir. Karışımlar 90°C'de 20 dakika inkübe edildikten sonra soğutulan numunelerin absorbansı 532 nm dalga boyunda belirlenmiştir. LPO seviyeleri, MDA ekstinksiyon katsayısı ($155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) kullanılarak ıslak ağırlıktaki hücrelerin gramı başına µmol MDA olarak ifade edilmiştir.

3.2.6.4 Protein Karbonil Tayini

Yaşlanma periyodunun 2., 3., 6., 8. ve 10. günleri boyunca toplanan transforme maya örneklerine ait protein karbonil seviyeleri, Cayman Chemicals tarafından sağlanan kolorimetrik kit kullanılarak nicel olarak belirlenmiştir. Deneysel prosedür, üreticinin yönergelerine uygun şekilde gerçekleştirilmiştir. Kitin çalışma prensibi, 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) ile Schiff bazı oluşturan protein karboniller arasındaki reaksiyona dayanmaktadır. Reaksiyon sonucu üretilen protein-hidrazon miktarı 360-385 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmektedir. Yönteme göre analiz edilecek örneklerin 200 µL'si numune ve kontrol şeklinde iki tüpe bölünmüştür. Numune tüpe 800 µL DNPH, kontrol tüpe ise 800 µL HCl eklenmiştir. Ardından her iki tüp karanlıkta oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiş ve her 15

dakikada bir vorteks işlemi uygulanmıştır. Karışımlara 1 ml %20 TCA eklenmiş ve 5 dakika boyunca buz üzerinde inkübe edilip santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen pelletler %10 TCA ile resüspanse edilmiştir. Örnekler yukarıda tarif edildiği gibi tekrar inkübe edilmiş ve santrifüjlenmiştir. Elde edilen pelletler 1 mL etanol:etil asetat karışımı (1:1, v/v) içerisinde resüspanse edilmiştir. Süspansiyonlar vortekslenmiş ve ardından santrifüjlenmiştir. Bu adım iki kere tekrarlandıktan sonra protein pelletleri 500 µL guanidin hidroklorür içerisinde vortekslenerek resüspanse edilmiştir. Son santrifüjleme işleminden sonra numune ve kontrol tüplerindeki süpernatantlardan 220 µL alınmış ve 370 nm dalga boyundaki absorbansları ölçülmüştür. Örneklerin protein karbonil konsantrasyonu, kontrol grubunun absorbansının numunelerin absorbansından çıkarılması ve ardından bu farkın DNPH ekstinksiyon katsayısı ($0.022 \mu\text{M}^{-1}$) ile çarpılmasıyla belirlenmiştir. Sonuçlar nmol/mg protein cinsinden ifade edilmiştir.

3.2.6.5 Total Protein Tayini

Transforme maya hücrelerinin toplam protein konsantrasyonlarını ölçmek için Bradford yöntemi kullanılmıştır (Bradford 1976).

3.2.6.6 Transforme Maya Suşlarında İnsan Bcl-2 ve Bcl-xL Konsantrasyonlarının Kantitatif Tayini

Transforme maya suşlarında insan Bcl-2 ve Bcl-xL konsantrasyonlarının (transgen ekspresyonu) belirlenebilmesi için Elabscience Biotechnology (Wuhan, Çin) tarafından sağlanan Human Bcl-2(B-cell Leukemia/Lymphoma 2) ELISA Kit ve Human BCL2L1/BCL-X(Bcl-2 Like Protein 1) ELISA Kit kullanılmıştır. Bu amaçla, her maya grubundan (boş vektör kontrolü, Bcl-2 transforme ve Bcl-xL transforme) rastgele seçilen üç koloni SD besi yerinde yaşlanma fazının 48. saatine kadar büyütülmüş ve toplanan hücrelerde ELISA analizleri kullanılarak Bcl-2 ve Bcl-xL protein seviyeleri açısından analiz edilmiştir.

Bu ELISA kitlerinde, Sandwich-ELISA prensibi kullanılmaktadır. Kitlerde sağlanan mikro ELISA plakası, insan Bcl-2 ve Bcl-xL'e özgü bir antikor ile önceden

kaplanmıştır. Kitteki yönergelere göre, örnekler ve standartlardan 100 µL mikro ELISA plaka kuyularına eklenmiş ve spesifik antikor ile birleştirilmiştir. Plakalar 37°C’de 90 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında kuyucuklar boşaltılmış ve ardından her bir kuyucuğa insan Bcl-2 veya Bcl-xL’ye spesifik biyotinlenmiş tespit antikorundan 100 µL eklenmiştir. Plakalar 37°C’de 60 dakika inkübe edilmiştir. Üç yıkama adımının ardından, her bir kuyucuğa 100 µL Avidin-Horseradish Peroksidaz (HRP) konjugat çalışma çözeltisi eklenmiş ve 37°C’de 30 dakika inkübe edilmiştir. Plakalar beş kez yıkanarak serbest bileşenler uzaklaştırılmıştır. Takiben her bir kuyucuğa 90 µL substrat çözeltisi eklenmiş ve plakalar karanlıkta 37°C’de 15 dakika inkübe edilmiştir. Sadece insan Bcl-2 veya Bcl-xL, biyotinlenmiş tespit antikor ve Avidin-HRP konjugatı içeren kuyucuklar mavi renkte görünmüştür. Son olarak, her bir kuyucuğa 50 µL enzim-substrat reaksiyonu durdurma çözeltisi eklenmiş ve renk sarıya dönmüştür. Optik yoğunluk hemen 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Numunelerin OD değeri standart eğri ile karşılaştırarak numunelerdeki insan Bcl-2 veya Bcl-xL konsantrasyonu hesaplanmıştır.

3.2.7 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi ve Denetimsiz Kemometrik Analiz

Transforme maya hücrelerinin kızılötesi (IR) spektrumlarını elde etmek amacıyla attenuated total reflectance (PerkinElmer Spectrum Two with the Universal Attenuated Total Reflectance (UATR) modunda Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi kullanılmıştır. Spektral veriler, 4 cm⁻¹ çözünürlük, 50 tarama ve 4000 ile 450 cm⁻¹ arası spektral aralık ile elde edilmiştir. Spektral veriler toplanmadan önce, distile su ile hazırlanmış 1 × 10⁷ hücre/mL konsantrasyonunda bir süspansiyon hazırlanmış ve 20 µL’si kristal üzerine uygulanarak örnekler kurutulmadan spektrumları toplanmıştır. Suyun spektral katkısını elimine etmek için aynı hacimde distile suyun IR spektrumları da alınmıştır. Boş bir ATR kristalinden baseline taraması alınmış ve ardından örnek spektrumlarından çıkarılmıştır. Örnek spektrumlarının tekrarlanabilirliğini doğrulamak için, her örnek üç ayrı durumda bağımsız olarak kültive edilmiş ve toplanmıştır. Spektrometrenin elmas kristali her ölçüm sonrası %70 etanol ve distile su kullanılarak temizlenmiştir.

3.2.8 Spektral Veri Analizi

3.2.8.1 Kemometrik Veri Analizi

Kemometrik analizden önce, boş vektör ve Bcl-2 ile Bcl-xL transforme maya hücrelerinin IR spektrumlarında spektral önileme gerçekleştirilmiştir. İlk olarak, Opus 5.5 yazılımı (Bruker, Almanya) kullanılarak 4000-400 cm^{-1} (tüm) spektral bölgesindeki IR spektrumlarında yumuşatma (13 yumuşatma noktası ile Savitzky-Golay algoritması) ve baseline düzeltilmesi (konkav rubber band yöntemi, 10 iterasyon ve 64 baseline noktası) işlemleri uygulanmıştır. Ardından, boş vektör ve plazmid DNA transforme maya hücreleri arasındaki ilişkiyi belirlemek için tüm spektral bölgede önceden işlenmiş spektrumlar üzerinde temel bileşen analizi (PCA) ve hiyerarşik küme analizi (HCA) gerçekleştirilmiştir. PCA ve HCA dahil olmak üzere denetimsiz kemometrik yaklaşımlar için Unscrambler® X 10.3 (CAMO Software AS, Norveç) yazılımı kullanılmıştır. PCA ortalama-merkezli veriler üzerinde gerçekleştirilmiştir. Modele, tam çapraz doğrulama yöntemi (full crossvalidation method) ve tekil değer ayrıştırma (singular value decomposition-SVD) algoritması uygulanmıştır. PCA bulguları, skorlar (scores) ve yükleme grafikleri (loading plots) olarak gösterilmiştir. Bunun aksine HCA, Ward algoritması ve karelenmiş Öklid mesafesi (Squared Euclidean distance) ölçümleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. HCA sonuçları dendrogram olarak sunulmuştur. Bcl-2 ve Bcl-xL transformasyonu ile ilişkili biyomoleküler kompozisyon değişikliklerini belirlemek için, spektral bantların ayırımına yönelik katkı varyans değerini belirlemek üzere PCA yükleme spektrumları (PCA loading spectra) analiz edilmiştir.

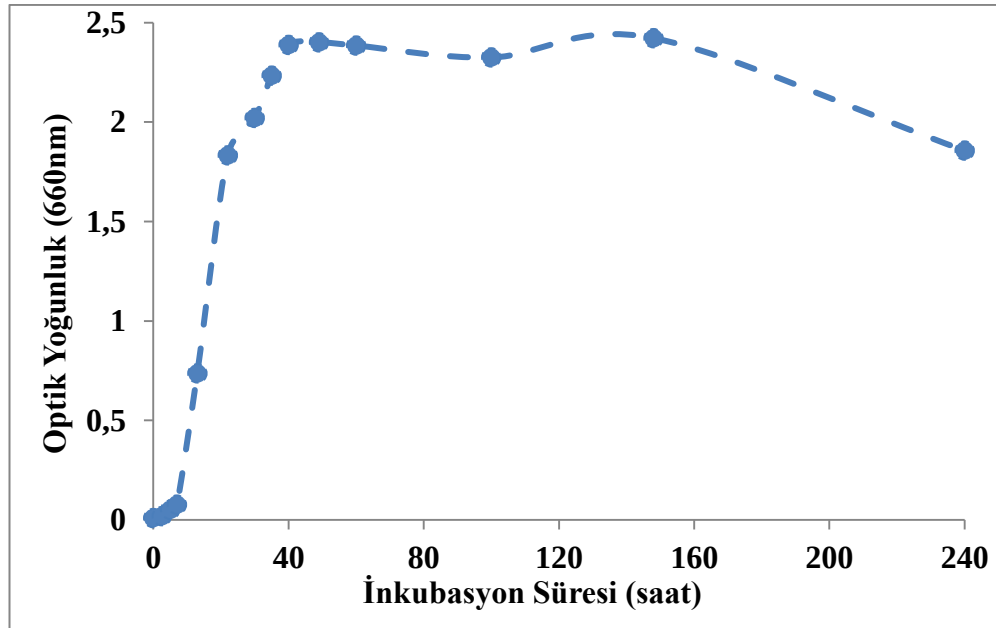
3.2.9 İstatistiksel Analiz

Veriler ortalama $\pm$ S.E.M. olarak sunulmuştur. Varyans farklılıkları, iki yönlü varyans analizi (ANOVA) testi kullanılarak istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Post hoc olarak Tukey's testi kullanılmıştır. GraphPad prism 5.0 istatistik yazılımı (GraphPad, La Jolla, CA) kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1 Maya Suşlarının Büyüme Eğrileri

10 günlük inkübasyon periyodu boyunca büyütülen transforme *S. cerevisiae* hücreleri toplanmış ve OD_{660nm} optik yoğunluk değerleri spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değerlerine göre suşlara ait büyüme grafikleri çizilerek eksponansiyel ve stasyoner fazları belirlenmiştir. Gerekli literatür verileri tarandığında diğer çalışmaların *S. cerevisiae* suşlarına ait logaritmik faz, inkübasyonun ilk gününün sonuna kadar sürmüş ve hücre büyüme oranında azalma sonraki günlerde gözlenmiştir. Ayrıca, kültürlerin optik yoğunlukları inkübasyonun 3. gününden sonra sabit kalmıştır ve bu durum tüm suşların stasyoner faza ulaştığını göstermektedir (Arslan ve diğ. 2018; Ocampo ve Barrientos 2011). Bu veriler kendi suşlarımıza ait eksponansiyel ve stasyoner fazı belirlemede yardımcı olmuştur. Bu amaçla kontrol grubu hücreleri ve transforme hücreler 180 rpm’de ajite edilmiş ve 30°C’de inkübe edilmiştir. Suşların 240 saat (10 gün) süreyle izlenen büyüme eğrilerinde kayda değer bir fark görülmemiş olup tüm suşları temsilen boş vektör kontrol grubu için ortak büyüme eğrisi Şekil 4.1’de verilmiştir.

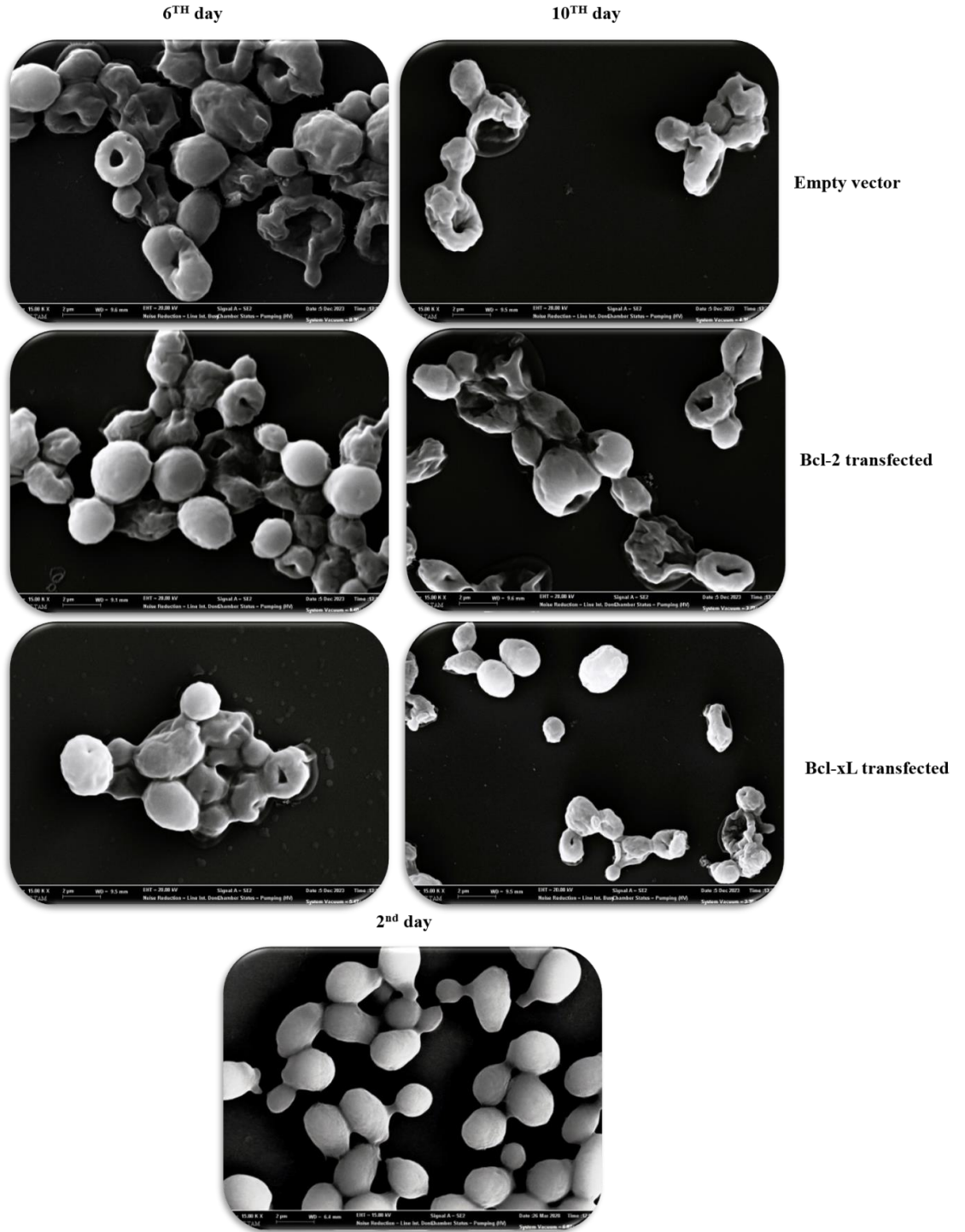


Şekil 4.1: Boş vektör (kontrol grubu) maya suşının büyüme eğrisi.

Her üç suş için de optik yoğunluklara karşılık inkübasyon süreleri incelendiğinde yaklaşık 5-6 saatlik bir gecikme fazının ardından büyüme fazının 7-8. saatinde eksponansiyal faza, 20-25. saatine ulaşıldığında hücrelerin eksponansiyel fazdan stasyoner faza girmeye başladığı, 3. günden itibaren optik yoğunluklarda kayda değer bir değişiklik olmadığı ve ortalama 10. günde ise geç stasyoner faza girerek hücrelerin bölünmeyi durdurduğu ölüm fazından önceki evreye ulaşılmıştır. Elde edilen bu sonuçlar literatür verileri ile bağdaşmaktadır (Arslan ve diğ. 2018; Ocampo ve Barrientos 2011).

4.2 Yaşlanmaya Bağlı Oksidatif Stresin Maya Hücre Morfolojisi Üzerindeki Etkileri ve Bcl-2 ile Bcl-xL Proteinlerinin Koruyucu Rolü

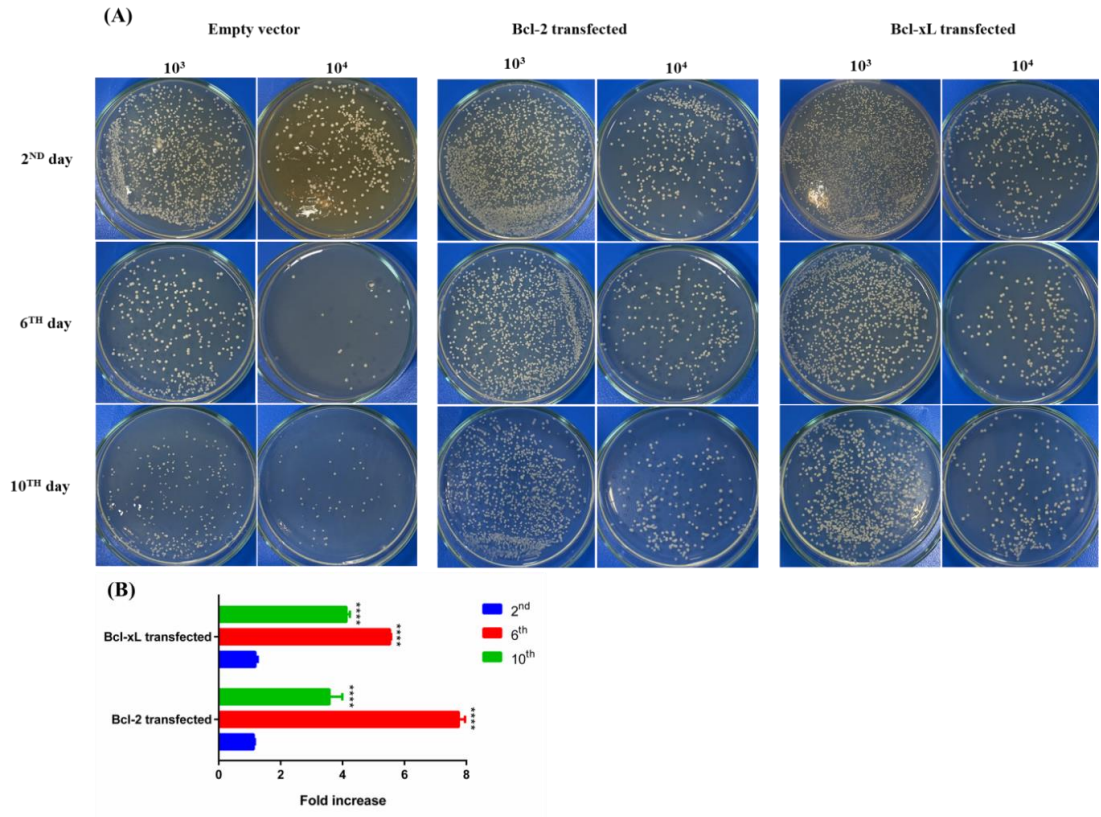
Yaşlanma periyodunun 2., 6. ve 10. günlerinde maya hücrelerinin yüzey morfolojisindeki değişiklikler SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) ile incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.2’de sunulmuştur. SEM görüntüleri incelendiğinde, genç hücreler ile ölüm aşamasına yaklaşan yaşlı anne maya hücreleri görünüm ve fizyolojide çarpıcı değişiklikler göstermişlerdir. Periyodun 2. gününde, hem Bcl-2 ve Bcl-xL transforme gruplar hem de boş vektör kontrol grubu, morfolojik bütünlüğü gösteren pürüzsüz ve sağlam bir yüzeye sahip karakteristik küresel bir form sergilemişlerdir. Bu hücrelerin tomurcuklanma mekanizmalarıyla çoğalması nedeniyle, yeni oluşan tomurcuklar, yavru hücreler ve tomurcukların tümü kolaylıkla görülebilmektedir (Kavakcıoğlu Yardımcı ve Mollaoğlu 2021). Yaşam ömrünün ilerleyen aşamalarında, Bcl-2 ve Bcl-xL transforme olanlarda daha az belirgin olmakla birlikte, tüm gruplarda önemli ölçüde deforme olmuş hücrelerin varlığı ve morfolojik bütünlükte kayıplar tespit edilmiştir. Çalışmamızda yaşlanma indüklü oksidatif stresin başlıca göstergeleri, kırışık şekil, oyuk oluşumu ve hücre kırılmaları olmuştur. Öte yandan, Bcl-xL transforme grupta 10 gün sonra bile tarif edilen deformasyonları sergilemeyen ve morfolojiyi koruma eğilimi gösteren önemli bir hücre grubu bulunduğunu belirtmek önemli ve dikkat çekicidir.



Şekil 4.2: Transforme maya hücrelerinin yaşam ömürlerinin farklı zamanlarında çekilen taramalı elektron mikrografları (15 K X büyütme). Tüm gruplar, yaşam ömürlerinin 2. gününde maya hücrelerinin karakteristik sağlıklı formunu sergilemiştir.

4.3 Bcl-2 ve Bcl-xL Gen Ekspresyonlarının Yaşlı Maya Hücrelerinin Hayatta Kalımı Üzerine Etkisi

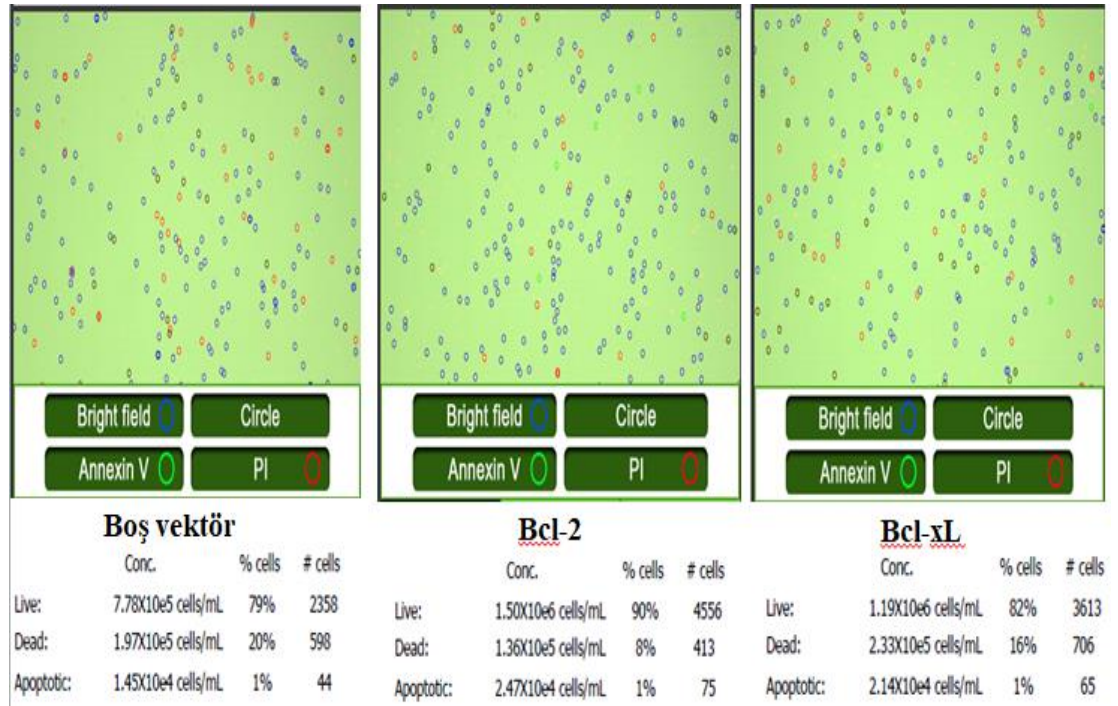
Transforme maya hücrelerinin yaşlanma sürecine bağlı canlılığı 10 günlük bir periyod boyunca değerlendirilmiştir. Bu amaçla, yaşam ömrünün 2., 6. ve 10. günlerinde transforme hücreler toplanmış ve hücrelerin bölünme ve koloni oluşturma yeteneğinin belirlenmesine dayanan CFU yöntemi kullanılarak canlı hücre sayımı yapılmıştır (Ocampo ve Barrientos 2011). Bulgular Şekil 4.3'de gösterilmiştir. Görüldüğü üzere, yaşam ömrünün 2. gününde, Bcl-2 ve Bcl-xL genlerini ektopik olarak eksprese eden maya suşlarının üreme yoluyla hayatta kalma oranlarında boş vektör kontrol grubuna kıyasla belirgin bir fark bulunmamaktadır. Ancak, geç stasyonier faz olarak bilinen 6. günde, Bcl-2 ve Bcl-xL transforme gruplardaki hücrelerin canlılık oranlarının kontrole kıyasla sırasıyla yaklaşık 7.8 ve 5.5 kat arttığı gözlemlenmiştir. Dolayısıyla bu noktada, Bcl-2 proteininin Bcl-xL'ye göre daha etkin bir koruma sağladığı söylenebilir. Benzer şekilde, yaşlanma periyodunun 10. gününde kontrol grubuna kıyasla Bcl-2 ve Bcl-xL transforme gruplarda hücre canlılığında önemli bir artış gözlenmiştir. Yaşlanma periyodunun 10. gününde, Bcl-xL transforme grupta hücre canlılığı yaklaşık 4.1 kat daha yüksek iken, Bcl-2 transforme grupta bu oran vektör kontrol grubuna kıyasla yaklaşık 3.6 kat daha yüksektir. Bu değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p < 0,05$) ve bu durum, son periyotta artan yaşlanmayla birlikte, Bcl-xL geni eksprese eden hücrelerin Bcl-2 grubuna kıyasla oksidatif strese karşı daha yüksek direnç geliştirdiğini açıkça ortaya koymuştur.



Şekil 4.3: Transforme maya hücrelerinin yaşam ömürlerinin farklı zamanlarında CFU yöntemi ile canlılık tayini sonuçları. (A) SD agar plakalarında meydana gelen maya kolonileri. 10³ ve 10⁴ örneklerin seyreltme faktörleridir. (B) Boş vektör grubuna kıyasla canlılıktaki artış katı gösterilmiştir. Hata çubuklu veriler, üç bağımsız deneyin ortalama $\pm$ S.E.M değerlerini göstermektedir. **** $p < 0.0001$, iki yönlü ANOVA ve Tukey post-test ile kontrol ve diğer çalışılan gruplar arasındaki anlamlı farklılıkları ifade etmektedir.

4.4 Yaşlanma İndüklü Oksidatif Strese Karşı Bcl-2 ve Bcl-xL'nin Koruyucu Rolünün Annexin V-PI Flow Sitometri ile Değerlendirilmesi

Ökaryotik maya hücrelerinin yaşlanma bağımlı maruz kaldıkları şiddetli oksidatif stresin organizmalarda eksojen ve endojen yollarla reaktif oksijen ürünleri ürettiği ve bu ürünlerin patolojik düzeyde hücelere zarar vererek apoptotik ve nekrotik ölüm sürecini hızlandığı bilinmektedir (Eisenberg ve diğ. 2010; Laun ve diğ. 2001). Bu amaçla yaşlanma periyodunun 6.gününde transforme suşların proliferasyonlarındaki değişimin belirlenebilmesi için Annexin V-PI flow sitometri testinden faydalanılmıştır. Bulgular Şekil 4.4'de gösterilmiştir. Veriler incelendiğinde yaşlanma periyodunun 6.gününde boş vektöre kıyasla Bcl-2 ve Bcl-xL transforme maya suşlarının yaşlanma bağımlı canlılık yüzdelерini artırarak koruma sağladıkları açıkça görülmektedir. CFU verileri ile uyumlu olarak 6. günde Bcl-2'nin Bcl-xL transforme gruba kıyasla canlılığı daha fazla arttırdığı görülmüştür.

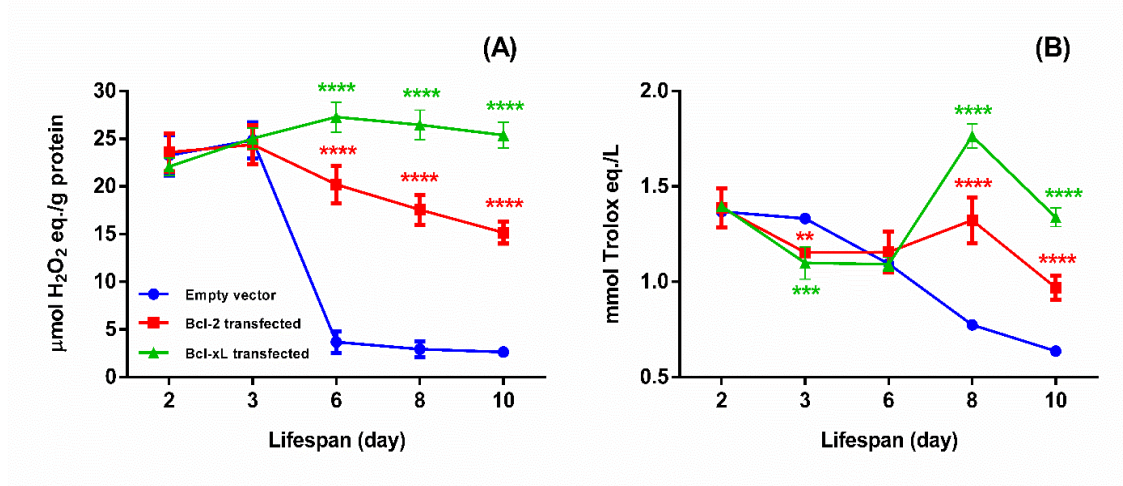


Şekil 4.4: Transforme maya hücrelerinin yaşlanma periyodunun 6.gününde Annexin V-PI flow sitometrik test ile canlı, ölü ve apoptotik populasyon yüzdeleri.

4.5 Erken Evre Pro-Oksidan, Geç Evre Antioksidan: Bcl-2 ve Bcl-xL Proteinlerinin Etkisi

Transforme maya hücrelerindeki TAS ve TOS durumu, 10 günlük yaşam ömürleri boyunca çeşitli zaman noktalarında değerlendirilmiştir. Temel olarak, TOS ve TAS seviyeleri sırasıyla Fe^{+2} 'yi Fe^{+3} 'e oksitleyebilen ve ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) radikal katyonunu indirgeyebilen maddelerin içeriği ile orantılıdır. Yaşam ömrünün 2. ve 3. gününde, Şekil 4.5A'da gösterildiği gibi, gruplar arasında TOS seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur. Öte yandan, Bcl-2 ve Bcl-xL genlerini ektopik olarak ifade eden gruplarda bu seviyelerin 6. günden itibaren boş vektör kontrol grubuna kıyasla kayda değer yüksek olduğu gözlemlenmiştir ($p < 0.0001$). Ayrıca, 6. günden itibaren Bcl-2 ve Bcl-xL grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar bulunmuştur. Okside molekül konsantrasyonunun kontrol grubuna kıyasla Bcl-2 ve özellikle Bcl-xL transforme gruplarda daha yüksek olması, büyük olasılıkla bu proteinlerin dolaylı antioksidan işlevleri aracılığıyla hücre zar bütünlüğünü daha iyi korumalarından kaynaklanmaktadır; bu durum SEM analizi ile de desteklenmiştir. Öte yandan, Bcl-2 ve Bcl-xL gruplarındaki TAS seviyelerinin 3. günde kontrol grubunun altında olduğu, ancak periyodun 8. ve 10. günlerinde kontrol değerlerinin üzerine çıkarak önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.5B).

Tüm bu sonuçlar, bu proteinlerin erken evrede dolaylı olarak pro-oksidan gibi hareket ederken, yaşam ömrünün ilerleyen aşamalarında hücreleri yaşlanma indüklü oksidatif strese korumak için antioksidan bileşenlerin seviyelerini artırdıklarını ortaya koymaktadır.



Şekil 4.5: Transforme maya hücrelerinin yaşam ömürlerinin farklı zamanlarındaki TOS (A) ve TAS (B) seviyeleri. Sonuçlar sırasıyla $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ eşdeğeri/L ve mmol Trolox eşdeğeri/L olarak ifade edilmiştir. Hata çubuklu veriler, üç bağımsız deneyin ortalama $\pm$ S.E.M. değerlerini göstermektedir. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ ve **** $p < 0.0001$, iki yönlü ANOVA ve Tukey post-test ile kontrol ve diğer çalışılan gruplar arasındaki anlamlı farklılıkları ifade etmektedir.

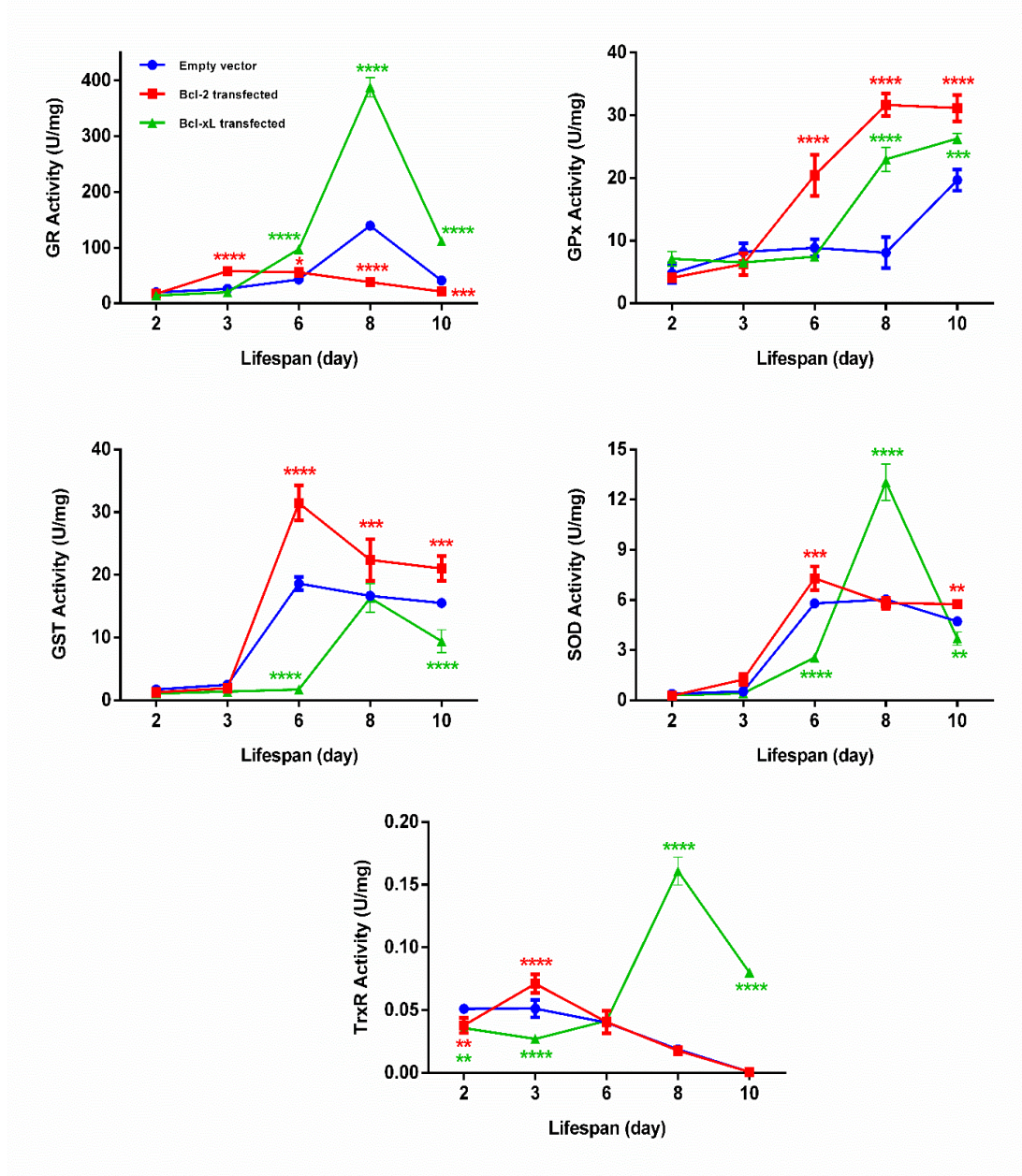
4.6 Bcl-2 ve Bcl-xL Genlerinin Ekspresyonlarına Bağlı Olarak Yaşlı Maya Hücrelerinde Antioksidan Enzim Aktivitelerindeki Değişiklikler

Bcl-2 ve Bcl-xL ekspresyonu yoluyla yaşlanma indüklü oksidatif strese karşı hücrel korumada antioksidan enzimlerin işlevleri incelenmiş ve bulgular Şekil 4.6'da verilmiştir. Elde edilen bulgular, GPx ve GST enzim aktivitelerinin yaşam ömrünün 6. gününden itibaren Bcl-2 transforme grupta kontrole kıyasla belirgin şekilde daha yüksek olduğunu göstermiştir. 6. ve 8. günler arasında Bcl-2 transforme grupta gözlemlenen GPx aktivitesindeki önemli artışın aksine, GST enzim aktivitesi tamamen zıt bir eğilim sergilemiştir ($p < 0.0001$). Ancak, 8. ve 10. günler arasında her iki enzimin aktivitesinde anlamlı bir değişiklik olmamış ve mevcut aktiviteler korunmuştur.

Bcl-2 transforme gruptaki SOD enzim aktivitesi, yaşam ömrünün 6. ve 10. günlerinde kontrol seviyelerinin üzerinde kayda değer bir artış gösterirken, genel olarak büyük bir değişiklik sergilememiştir. GR aktivitesi, Bcl-2 ekspresyonunun bir sonucu olarak yaşam ömrünün ilk evrelerinde kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde artmış ($p < 0.0001$), ancak sonraki evrelerde azalmış ve periyodun sonunda kontrol

grubundan önemli ölçüde düşük kalmıştır. Benzer şekilde, TrxR aktivitesi, Bcl-2 ekspresyonuna bağlı olarak yaşam ömrünün 3. gününde kontrol grubuna kıyasla belirgin bir artış göstermiştir. Ancak, GR aktivitelerinin aksine, bu enzim, periyodun ilerleyen aşamalarında kontrol grubu ile oldukça karşılaştırılabilir aktivite değerlerine sahip olmuştur. GPx ve GST enzimleri, Bcl-2 ekspresyonu aracılı hücrel korumada önemli rol oynarken, GR ve TrxR enzim aktivitelerindeki bu erken induksiyonlar, Bcl-2 transforne grubun yaşam ömrünün 6. günündeki en yüksek canlılığı ile ilişkili olabilir.

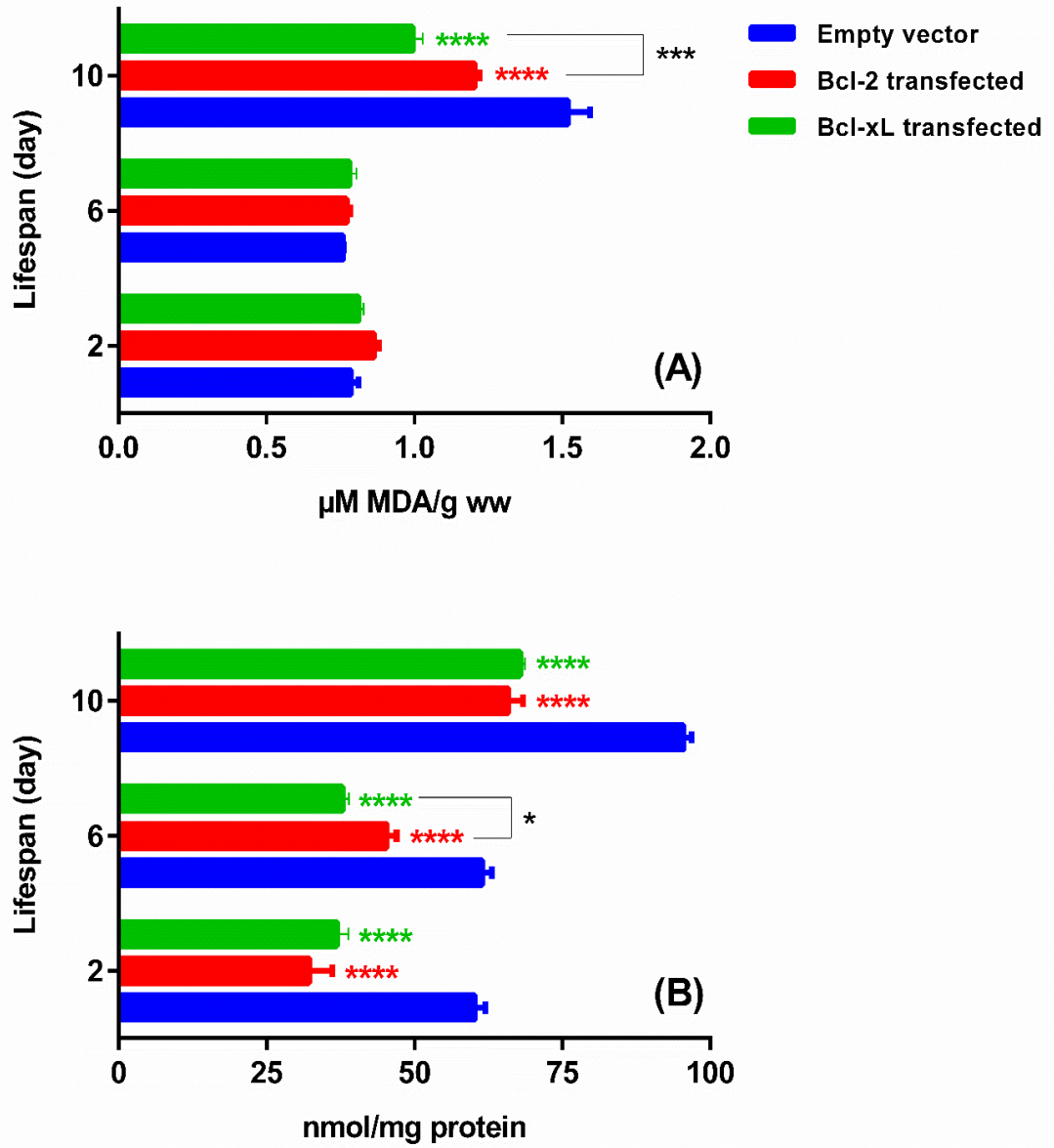
Bcl-xL transforne grupta ise, GR, SOD ve TrxR enzimleri hemen hemen aynı değışim paternlerini sergilemiş ve hepsi yaşam ömrünün 8. gününde sırasıyla 388.01 ± 17.23 , 13.04 ± 1.08 ve 0.16 ± 0.01 değeriyle en yüksek aktivite değeriine ulaşmışlardır. Yaşam ömrünün 10. gününde Bcl-xL genini ektopik olarak ifade eden grupta hücre deformasyonunun diğeri gruplara göre daha düşük olması bu ciddi değışikliklere bağlanabilir. GST enzim aktivitesinin periyodun 8. gününde zirve yapan keskin artışına rağmen, neredeyse tüm yaşam süresi boyunca kontrol değeriinin altında olması nedeniyle Bcl-xL ekspresyonu aracılı hücrel korumada hiçbir rolü olmadığı sonucuna varılmıştır. Son olarak, GPx aktivite değeri 6. güne kadar kontrol değeriine yaklaşık olarak eşit seyretmiştir. Bununla birlikte, periyodun geri kalanında kademeli olarak artış gözlenmiş ve kontrol değeriinin önemli ölçüde üstünde yer almışlardır. Sonuç olarak, GST hariç, incelenen tüm antioksidan enzimler, yaşlanma indüklü oksidatif strese karşı Bcl-xL ekspresyonu aracılı hücrel korumaya katkıda bulunmuşlardır.



Şekil 4.6: Transforme maya hücrelerinin yaşam ömürlerinin farklı zamanlarındaki GR, GPx, GST, SOD ve TrxR enzim aktiviteleri. Sonuçlar U/mg olarak ifade edilmiştir. Hata çubuklu veriler üç bağımsız deneyin ortalama $\pm$ S.E.M. değerlerini göstermektedir. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ ve **** $p < 0.0001$, iki yönlü ANOVA ve Tukey post-test ile kontrol ve diğer çalışılan gruplar arasındaki anlamlı farklılıkları ifade etmektedir.

4.7 Bcl-2 ve Bcl-xL Proteinlerinin Yaşlanma İndüklü Lipid Peroksidasyonu ve Protein Karbonilasyonuna Etkisi

Transforme maya hücrelerinin lipid peroksidasyonu ve protein karbonil seviyeleri yaşam ömürlerinin 2., 6. ve 10. günlerinde kantifiye edilmiştir. Şekil 4.7, tüm gruplarda zaman içinde hem lipidlerde hem de proteinlerde oksidasyon seviyelerinde genel bir artış olduğunu açıkça göstermiştir. Yaşam ömürlerinin 2. ve 6. günlerinde lipid peroksidasyon seviyelerinde gruplar arasında önemli bir fark bulunmamıştır. Öte yandan, 10. günde her iki test grubunda da lipid peroksidasyon seviyelerinin önemli ölçüde kontrol değerinin altında olduğu tespit edilmiştir ($p<0.0001$). Ayrıca, Bcl-2 ve Bcl-xL transforme gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir ($p<0.001$). Periyodun başından itibaren, Bcl-2 ve Bcl-xL transforme gruplardaki protein karbonil seviyeleri kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde azalmıştır ($p<0.0001$). Bcl-2 ve Bcl-xL transforme gruplar arasındaki tek anlamlı fark yaşam ömrünün 6. gününde belirlenmiştir. Dolayısıyla, her iki antiapoptotik proteinin de maya hücrelerini yaşlanmadan kaynaklanan oksidatif hasara karşı koruduğu açıktır.



Şekil 4.7: Transforme maya hücrelerinin yaşam ömürlerinin farklı zamanlarındaki lipid peroksidasyonu (A) ve protein karbonil (B) seviyeleri. Hata çubuklu veriler üç bağımsız deneyin ortalama $\pm$ S.E.M. değerlerini göstermektedir. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ ve **** $p < 0.0001$ değerleri, iki yönlü ANOVA ve Tukey post-test ile kontrol ve diğer incelenen gruplar veya belirtilen gruplar arasındaki anlamlı farklılıkları göstermektedir.

4.8 Bcl-2 ve Bcl-xL Proteinlerinin İfade Düzeylerinin Belirlenmesi

Transforme maya suşlarında insan Bcl-2 ve Bcl-xL konsantrasyonlarının (transgen ekspresyonu) belirlenebilmesi için Human Bcl-2(B-cell Leukemia/Lymphoma 2) ELISA Kit ve Human BCL2L1/BCL-X(Bcl-2 Like Protein 1) ELISA Kit kullanılmıştır. Bu kapsamda, Bcl-2 ve Bcl-xL standartları kullanılarak oluşturulan kalibrasyon eğrilerinin R^2 değerleri sırasıyla 0.988 ve 0.9968 olarak belirlenmiştir. İlgili denklemler Bcl-2 için $y = 0.3587x + 0.0989$, Bcl-xL için ise $y = 0.1952x + 0.0681$ şeklindedir.

Yaşlanma fazının 48. saatine kadar büyütülmüş üç deney grubunun her biri için Bcl-2 ve Bcl-xL proteinlerinin niceliksel seviyeleri Tablo 4.1'de sunulmaktadır. Sonuçlar, *S. cerevisiae* hücrelerinin transfer edilen genleri, bu ekspresyon ile ilişkili herhangi bir fizyolojik maliyet/yük olmaksızın karşılaştırılabilir seviyelerde ifade ettiğini göstermektedir.

Tablo 4.1: Üç deney grubundaki Bcl-2 ve Bcl-xL protein seviyeleri (tsa: tespit sınırının altında).

Grup	Tayin edilen protein seviyeleri (ng/mL)	
	Bcl-2	Bcl-xL
Boş vektör	tsa	tsa
Bcl-2 transforme	14.78±0.75	tsa
Bcl-xL transforme	tsa	16.38±0.42

4.9 Bcl-2 ve Bcl-xL Gen İfadesine Sahip Yaşlı Maya Hücrelerinin Biyokimyasal Bileşim Varyasyonları Açısından Boş Vektör Hücrelerinden ve Birbirlerinden Ayrılması

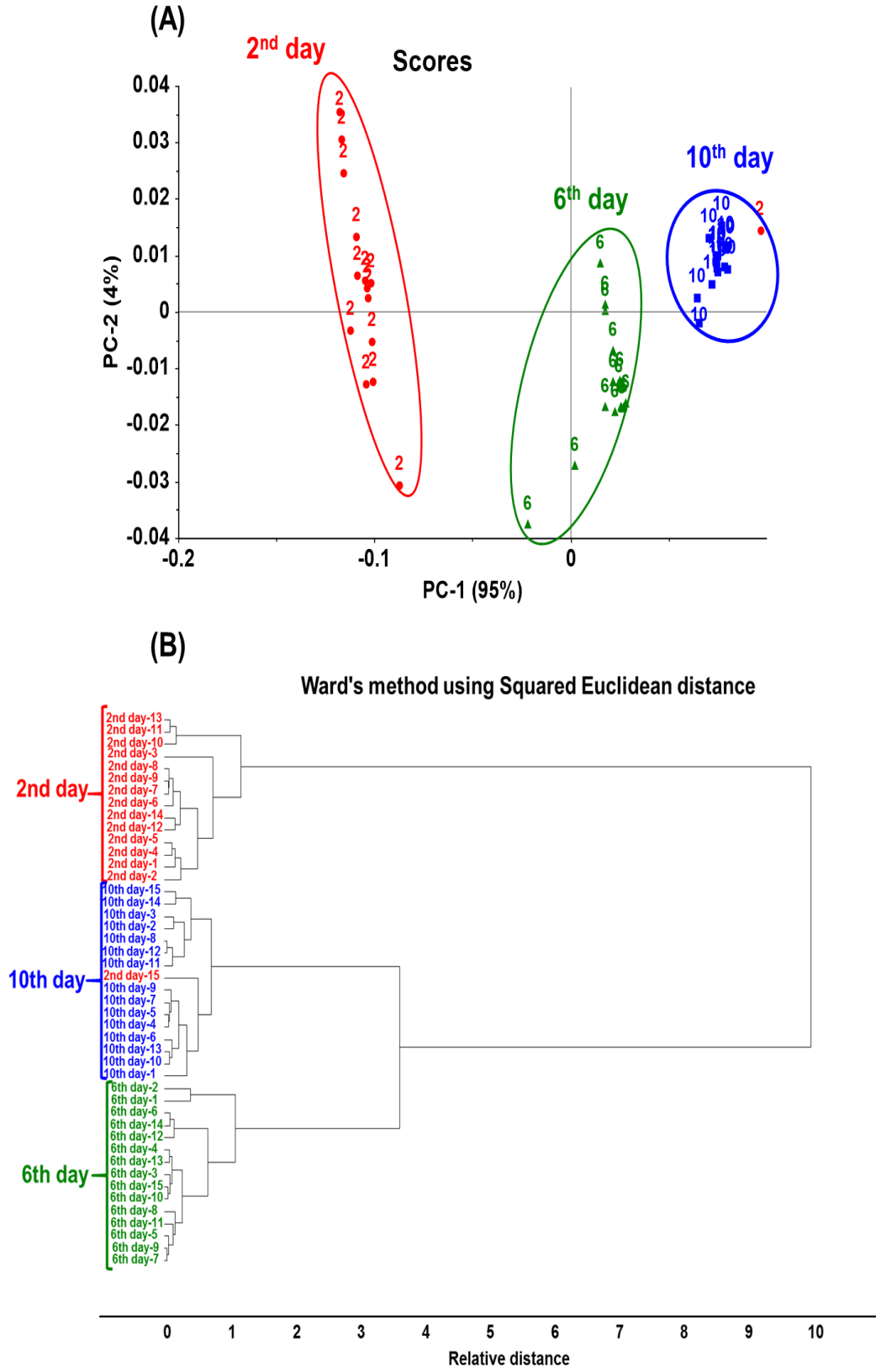
Hücrelerdeki yaşlanma süreçlerinin oksidatif stres ve hücrelerin biyokimyasal bileşimindeki değişikliklerle ilişkili olduğu kanıtlanmıştır (Mouton ve diğ. 2023; Eleutherio ve diğ. 2018). Çalışmalar, Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektroskopisinin, maya dahil tüm hücrelerdeki makromoleküler değişiklikleri aydınlatmada etkili bir yöntem olduğunu ortaya koymuştur (Bermúdez-Moretti ve

diğ. 2019; Mihoubi ve diğ. 2017; Correa-García ve diğ. 2014; Burattini ve diğ. 2008). Bu nedenle çalışmada, maya hücre yaşlanması ile indüklenen hücre biyomoleküllerindeki değişiklikler ve bu süreçte Bcl-2 ve Bcl-xL proteinlerinin koruyucu rolünü belirlemek için FTIR spektroskopisi kullanılmıştır.

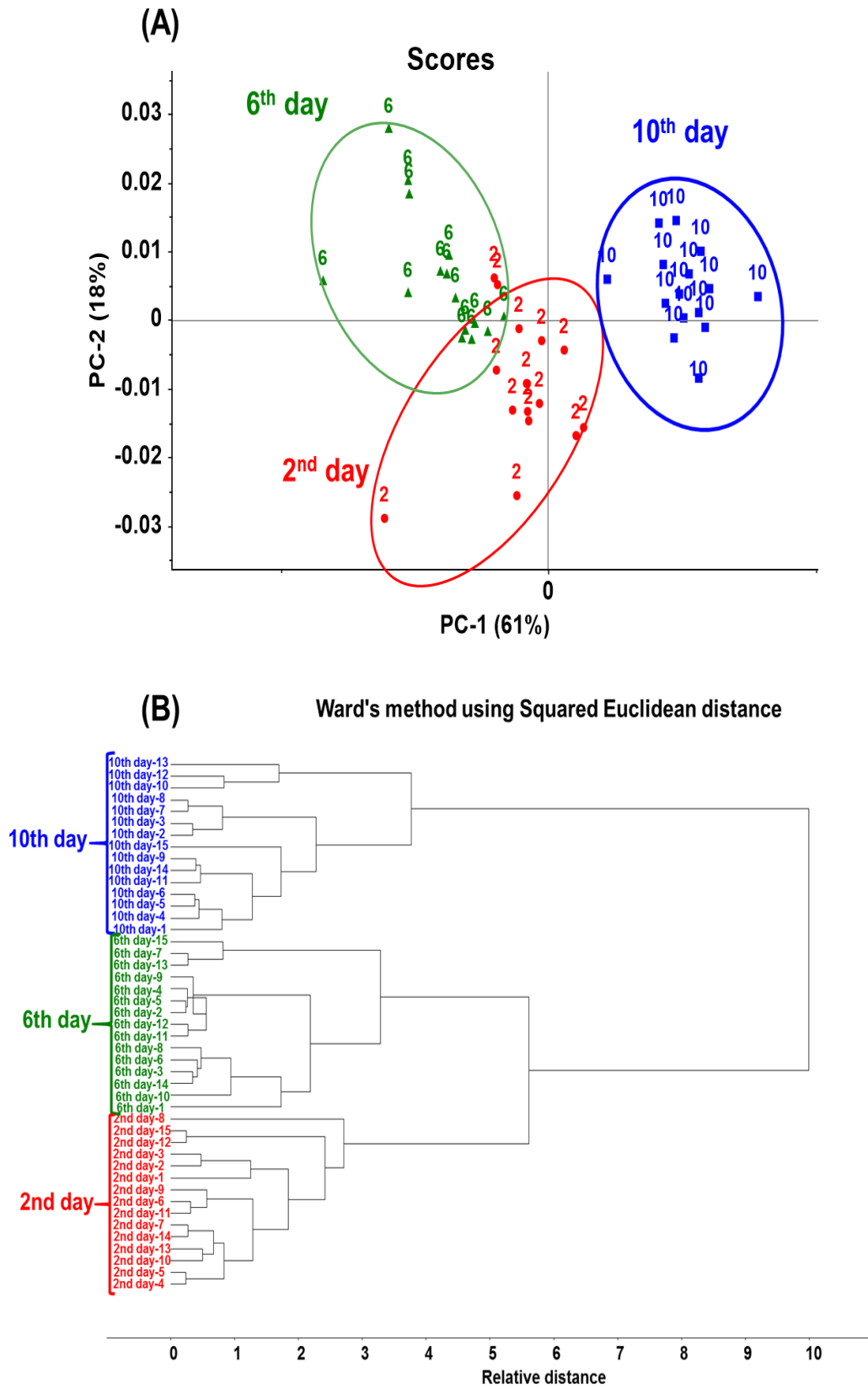
Bir numunenin tek bir IR spektrumu yaklaşık binlerce veri noktası içermektedir. On örnek spektrumunu analiz etmek çok fazla zaman ve çaba gerektirmektedir. Bu nedenle, bu verileri kısa sürede verimli bir şekilde analiz etmek ve yorumlamak için çok değişkenli kemometrik analizler yaygın olarak kullanılmaktadır (Morais ve diğ. 2020; Cozzolino ve diğ. 2011). Genel olarak, PCA (Temel Bileşen Analizi) gibi kemometrik yaklaşımlar veya keşifsel analiz (exploratory analysis), gruplar arasındaki ilişkiyi veya grupların ayrımını tanımlamaktadır (Morais ve diğ. 2020; Cozzolino ve diğ. 2011). Ayrıca, PCA bulgularını desteklemek amacıyla HCA (Hiyerarşik Kümeleme Analizi) gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda, aynı grup içindeki (boş vektör, Bcl-2 ve Bcl-xL transforme) yaşlanma periyodu ile ilişkili hücresel moleküler farklılıkları belirlemek için, bu grupların 2. , 6. ve 10. günlerine ait IR spektrumlarına ayrı ayrı PCA uygulanmıştır. Ek olarak, bu analizi kontrol etmek amacıyla aynı gruplar üzerinde HCA gerçekleştirilmiştir. PCA'da, gruplar arasındaki ilişki bir skor grafiği ile gösterilmektedir. Bu grafik, temel bileşenlerden (PC) oluşturulmakta ve gruplar arasındaki spektral varyasyonların ortaya konmasına yardımcı olmaktadır. En büyük varyasyon, PC1 ile açıklanmaktadır. HCA'da örnekler arasındaki ilişki dendrogram ile gösterilmektedir ve spektral farklılıklar bağlı uzaklık değeri (relative distance value) ile açıklanmaktadır. Şekil 4.8A ve B, yaşlanma periyodunun 2., 6. ve 10. günleri için boş vektör grubunun PCA skor grafiğini ve HCA dendrogramını göstermektedir. 6. ve 10. gün gruplarının, %99 varyans ile (PC1: %95, PC2: %4) 2. gün grubundan belirgin şekilde ayrıldığı açıkça görülmektedir. Destekleyici olarak, HCA dendrogramı da 2. gün grubunun diğer iki gruptan görece yüksek bir mesafe ile ayrı kümelendiğini göstermiştir.

Bcl-2 transforme grubun PCA skoru ve HCA dendrogram grafikleri sırasıyla Şekil 4.9A ve B 'de verilmiştir. PCA skor grafiğine göre, 2. ve 6. gün grupları birbirine yakın konumlanmış ancak %90 varyans değeri ile (PC1: %61, PC2: %18, PC3: %11) 10. gün grubundan ayrılmıştır. HCA dendrogramı bu bulguyu

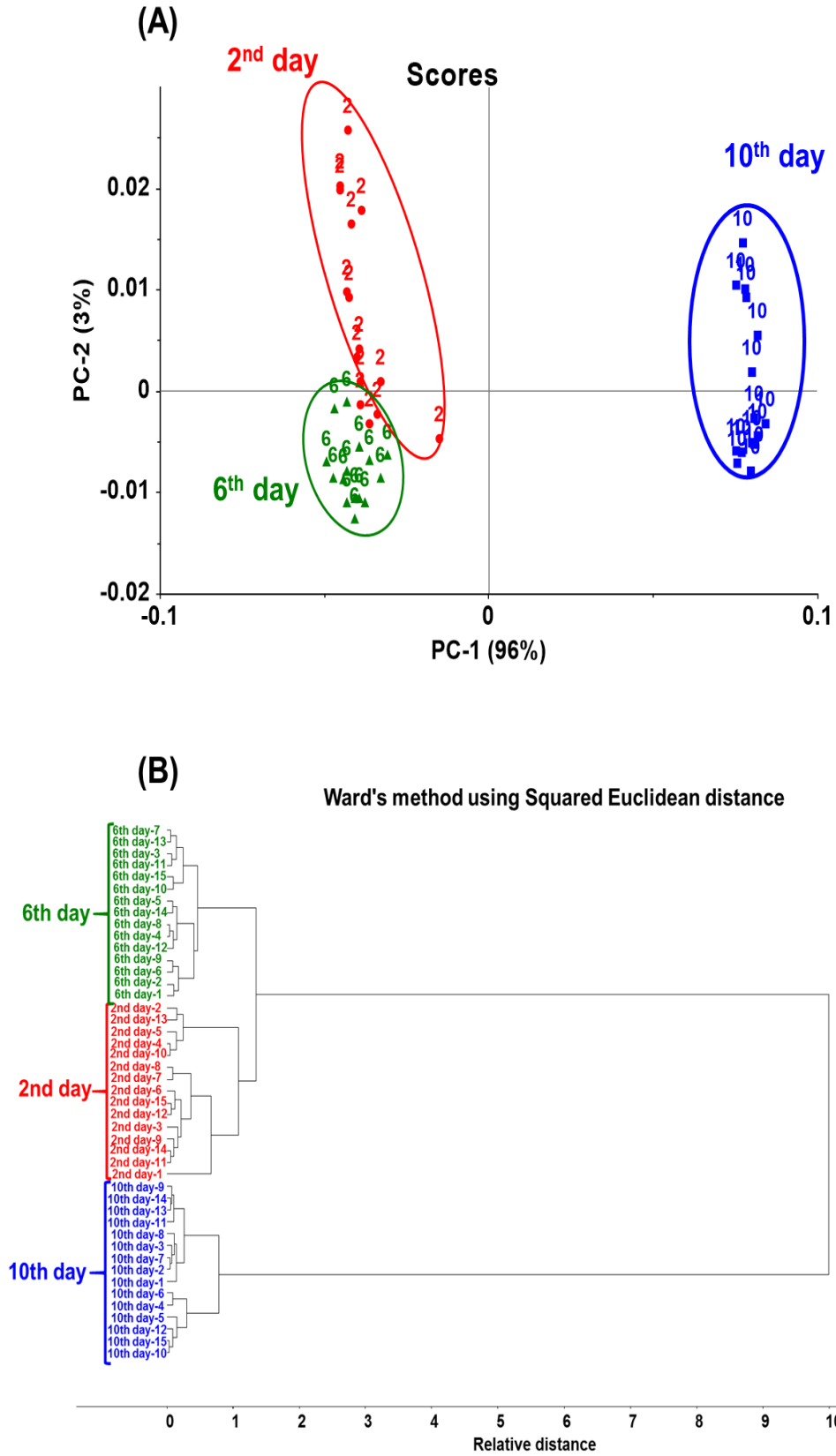
doğrulamıştır. Bcl-2 transforme maya hücreleri için elde edilen bulgulara benzer bir sonuç Bcl-xL transforme maya hücreleri için de elde edilmiştir. Öte yandan, Bcl-2 transforme grup için varyans değeri %79 iken, Bcl-xL transforme grupta PC1 ve PC2 için %99 gibi daha yüksek bir değer elde edilmiştir (Şekil 4.10A ve B). Her halükarda, 10. gün grubunun diğer iki günden belirgin bir şekilde ayrıldığı kesin olarak söylenebilmektedir. Tüm bu sonuçlar, boş vektör yerleştirilmiş maya hücrelerinde 6. ve 10. gün gruplarının biyomoleküler bileşimlerinin 2. gün grubundan son derece farklı olduğunu göstermektedir. Ancak, bu farklılıkların Bcl-2 ve Bcl-xL transforme maya hücrelerinde 10. gün ile diğer iki grup arasında olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.8: Yaşlanma periyodunun 2., 6. ve 10. günleri için boş vektör grubunun PCA skor (A) ve HCA dendrogram grafikleri (B).

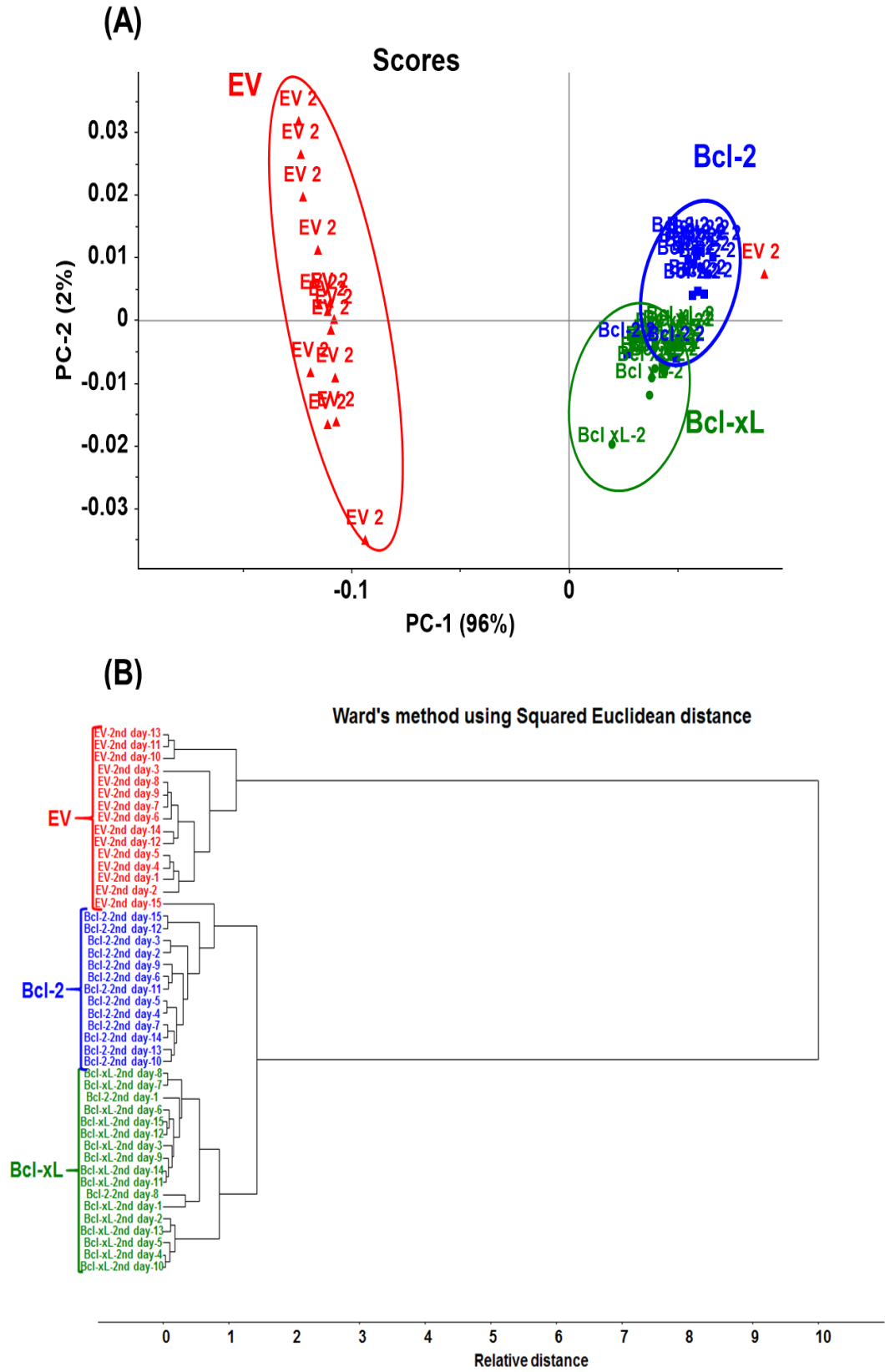


Şekil 4.9: Yaşlanma periyodunun 2., 6. ve 10. günleri için Bcl-2 transforme grubun PCA skor (A) ve HCA dendrogram grafikleri (B).

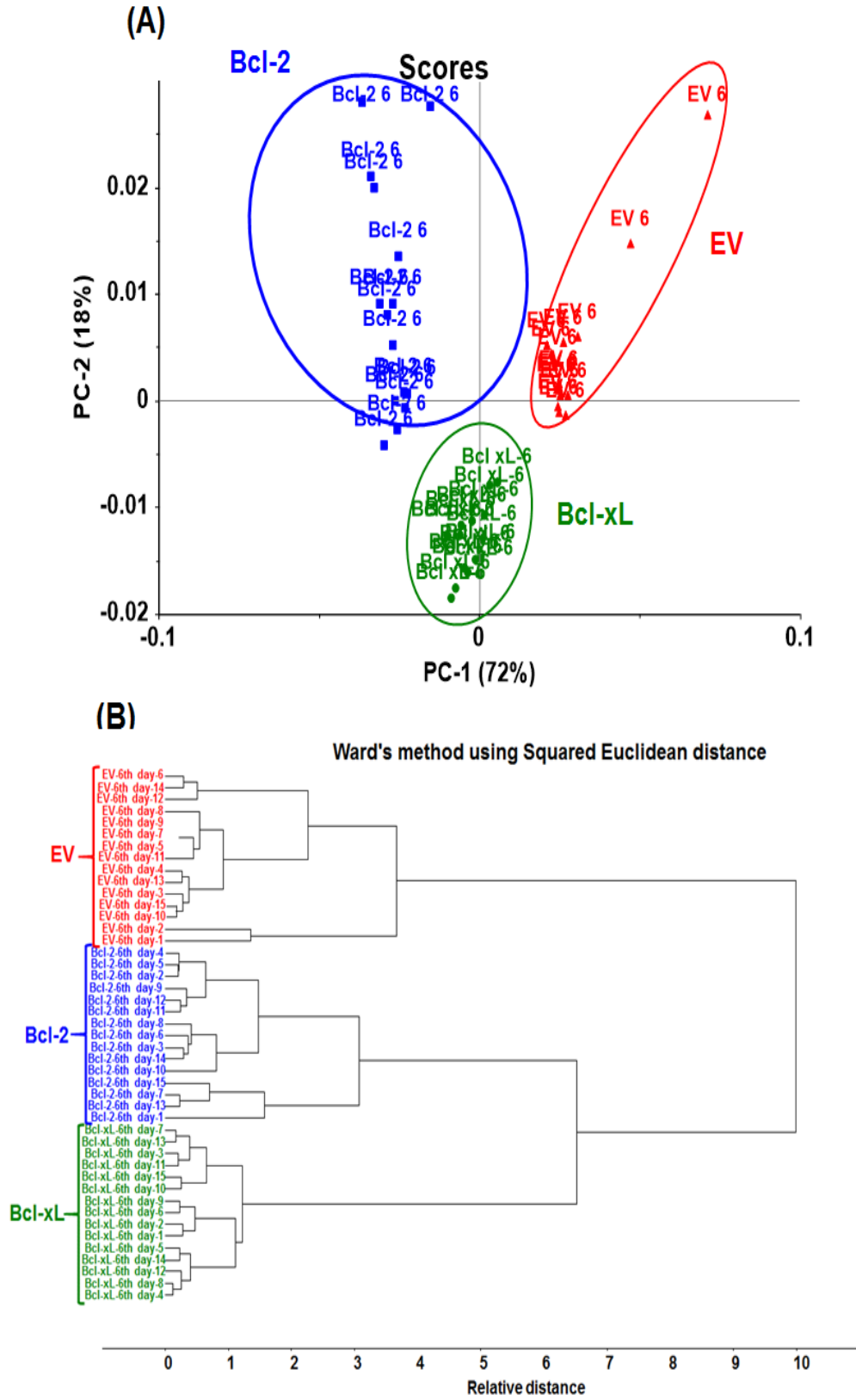


Şekil 4.10: Yaşlanma periyodunun 2., 6. ve 10. günleri için Bcl-xL transforme grubun PCA skor (A) ve HCA dendrogram grafikleri (B).

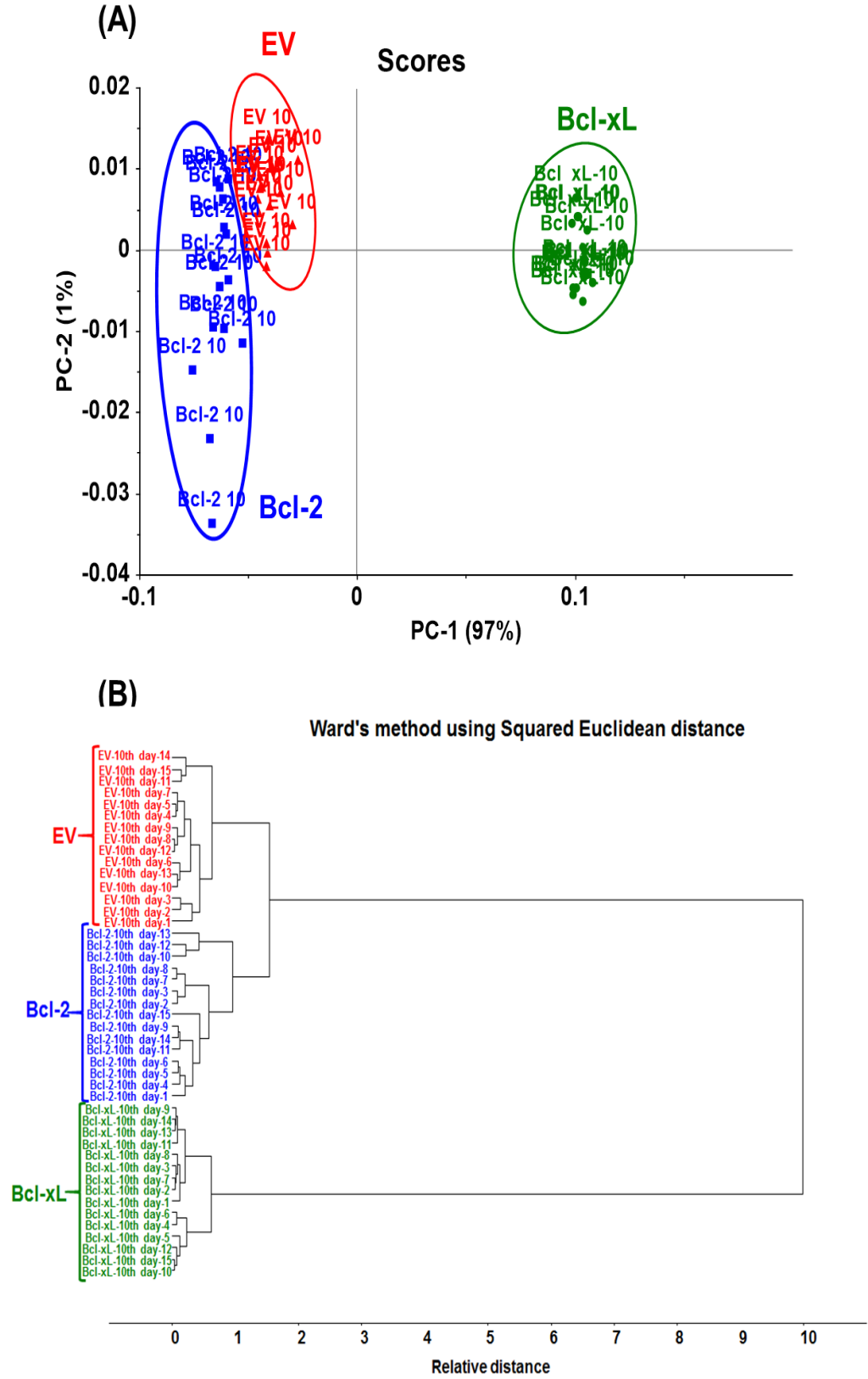
Bu analizlere ek olarak, aynı yaşlanma periyodu içinde bu gruplar arasındaki biyomoleküler farklılıkları belirlemek amacıyla 2., 6. ve 10. günler için boş vektör, Bcl-2 ve Bcl-xL transforme maya hücrelerine bağımsız olarak PCA ve HCA uygulanmıştır. Şekil 4.11A ve B, 2. güne ait PCA skor ve HCA dendrogram grafiklerini göstermektedir. Bcl-2 ve Bcl-xL transforme hücreler, HCA dendrogramında doğrulandığı üzere, %98 varyans ile (PC1: %96, PC2: %2) boş vektör kontrol grubundan net bir şekilde ayrılmıştır. 6. gün için yapılan analizlerde, 2. günde olduğu gibi benzer bir kümelenme eğilimi gözlenmiştir (Şekil 4.12A ve B). Bununla birlikte, varyans değeri %90 (PC1: %72, PC2: %18) olarak elde edilmiştir ki bu değer 2. günde elde edilen varyans değerinden daha düşüktür. Yaşlanma periyodunun 10. gününde diğer iki yaşlanma periyoduna kıyasla farklı bir kümelenme şeması gözlenmiştir. Boş vektör kontrol grubu ve Bcl-2 transforme maya hücreleri yakın kümelenmiş ancak Bcl-xL transforme olanlardan ayrılmıştır. Bu ayrımın varyans değeri % 98 olarak bulunmuştur (PC1: %97, PC2: %1) (Şekil 4.13A ve B). Bu sonuçlar, yaşlanma periyodunun 2. ve 6. günlerinde boş vektör grubunun spektral biyokompozisyonunun Bcl-2 ve Bcl-xL transforme maya hücrelerinden belirgin şekilde farklı olduğunu ortaya koymuştur. Buna karşılık, yaşlanmanın 10. gününde bu farklılıkların Bcl-xL grubu ile diğer iki grup arasında olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.11: Boş vektör (EV), Bcl-2 ve Bcl-xL transforme gruplar için yaşlanma periyodunun 2. gününe ait PCA skor (A) ve HCA dendrogram grafikleri (B).



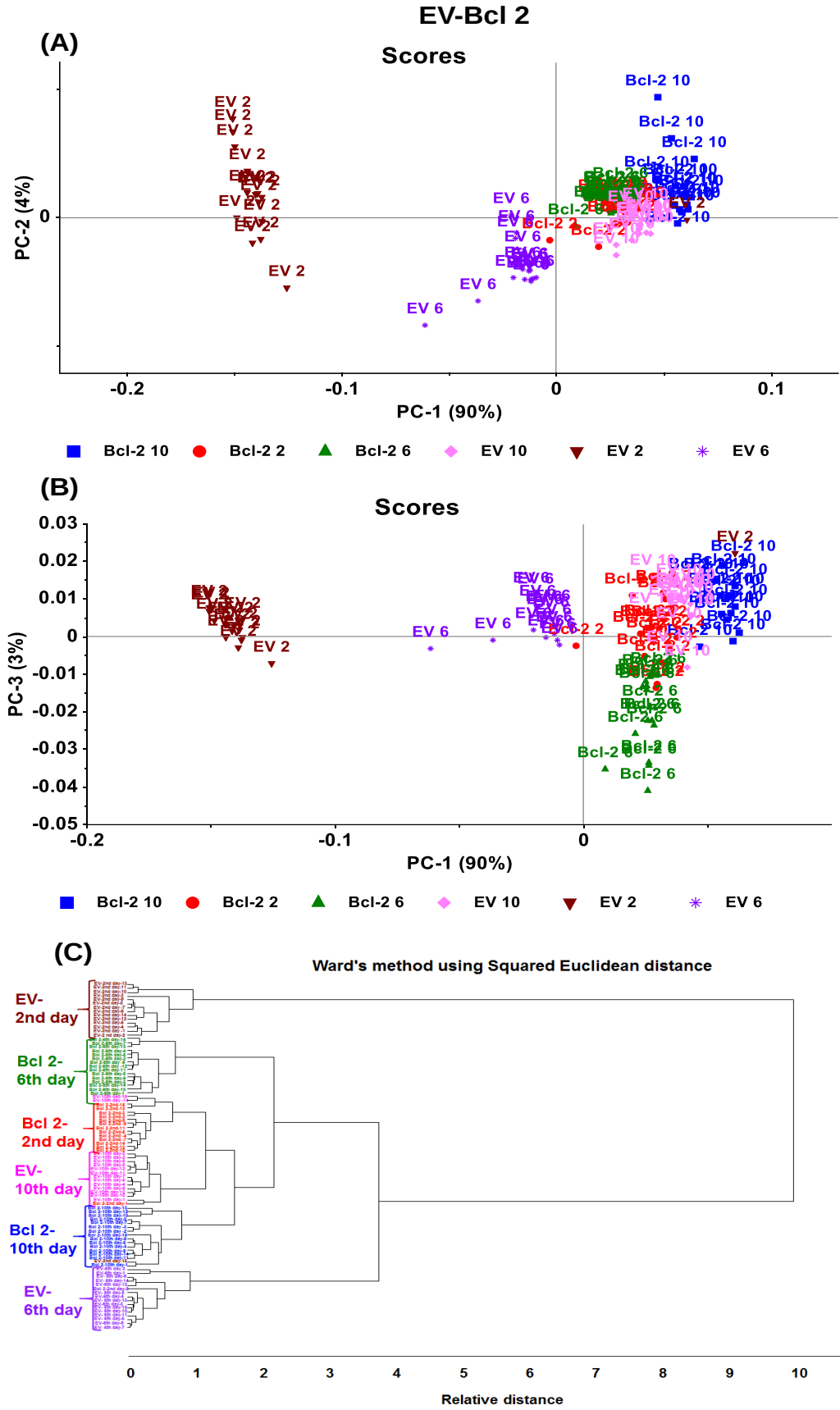
Şekil 4.12: Boş vektör (EV), Bcl-2 ve Bcl-xL transforme gruplar için yaşlanma periyodunun 6. gününe ait PCA skor (A) ve HCA dendrogram grafikleri (B).



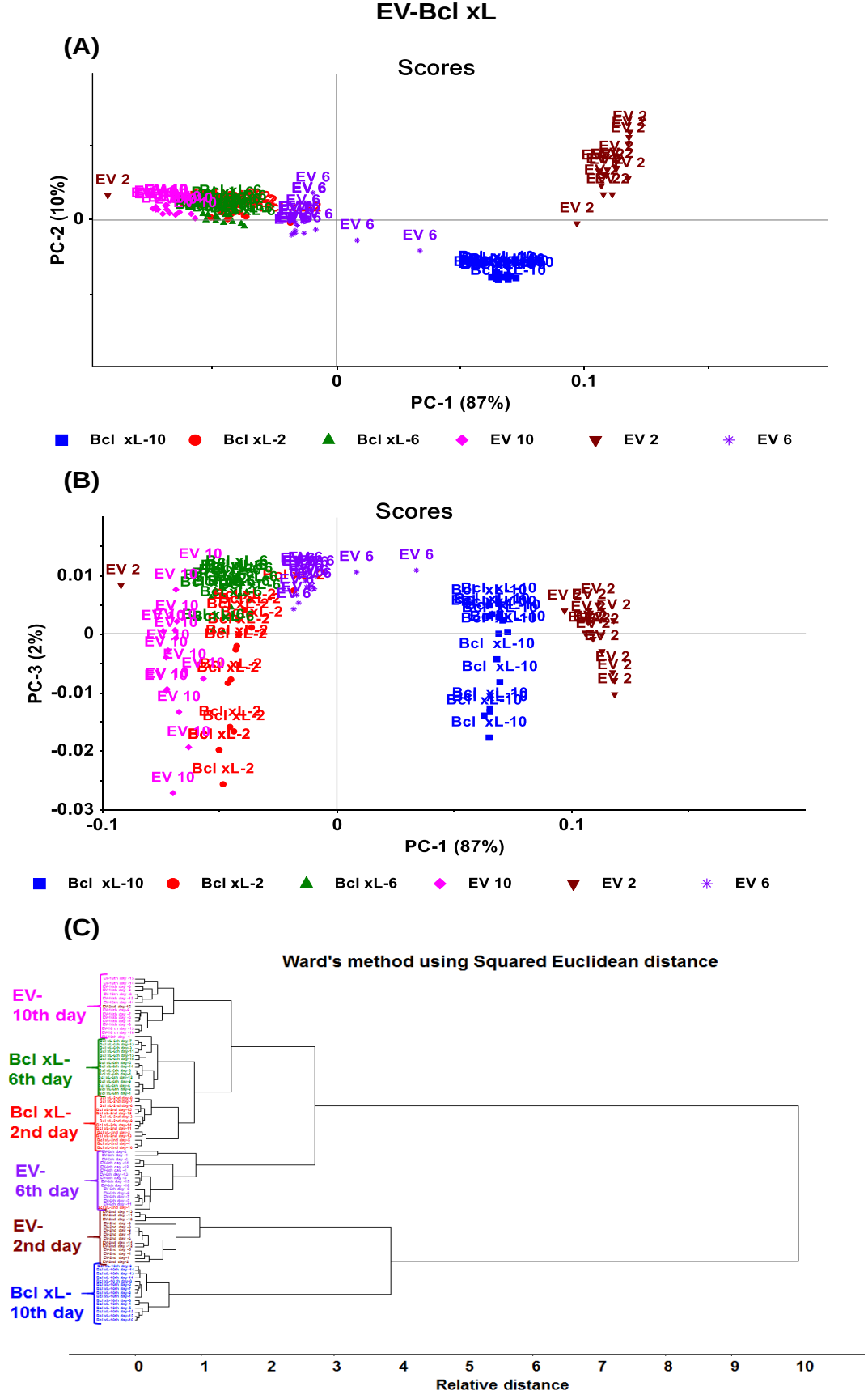
Şekil 4.13: Boş vektör (EV), Bcl-2 ve Bcl-xL transforme gruplar için yaşlanma periyodunun 10. gününe ait PCA skor (A) ve HCA dendrogram grafikleri (B).

Anti-apoptotik Bcl-2 proteininin koruma sağlamadaki etkinliğini değerlendirmek amacıyla, yaşlanma periyodu boyunca farklı zaman noktalarında hem boş vektör hem de Bcl-2 transforme grupların IR spektrumları üzerinde PCA ve HCA analizleri yapılmıştır. şekil 4.14A ve B'de, PC1-PC2 ve PC1-PC3 çiftlerinden elde edilen PCA skor grafikleri gösterilmektedir. Bu bileşenler için sırasıyla % 94 ve % 93 varyans değerleri elde edilmiştir. Skor grafikleri, boş vektör grubunun yaşlanma periyodunun 2. gününün diğer tüm gruplardan son derece farklı olduğunu ortaya koymuştur. Bu ayırım paterni HCA dendogramında da gözlenmiştir (şekil 4.14C). Bu kümenin ayrıntılı görsel analizi, Bcl-2 grubunun 2. gününün boş vektör kontrol grubunun 10. günü ile yakın bir şekilde kümelandiğini göstermiştir. Bu sonuç, Bcl-2 proteininin hücre ölümü ile ilişkili olmayan bazı diğer hücresel süreçlerde de rol oynayabileceğini göstermektedir; zira u grupların canlılık yüzdeleri arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır (Gross ve Katz 2017). Ek olarak, Bcl-2 proteininin fizyolojik koşullar altında pro-oksidan bir ortam yaratmak için mitokondriyal redoks metabolizmasını regüle ederken, şiddetli oksidatif stres durumunda aşırı ROS birikimini önlemek üzere dolaylı antioksidan aktivite sergileyerek bir redoks havuzu olarak işlev gördüğü iyi bilinmektedir (Pohl ve diğer. 2018; Pervaiz ve Clement 2007). Bu nedenle, Bcl-2'nin, hücreyi daha şiddetli oksidatif stresten korumak amacıyla yaşlanma sürecinin ilk aşamasında pro-oksidan bir ortamı indükleyerek biyokimyasal bileşimi değerıştirmiş olması muhtemeldir. Bcl-2 grubunun 6. ve 10. günlerinin sırasıyla boş vektör grubunun 2. ve 6. günleriyle yakın konumda olduğu, ancak farklı kümelerde yer aldığı tespit edilmiştir. Bu bulgular, Bcl-2'nin yaşlanma indüklü maya hücre ölümü karşısında ılımlı bir koruyucu etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Boş vektör ve Bcl-xL transforme grupların yaşlanma periyoduna bağlı PCA skor ve HCA dendrogram grafikleri şekil 4.15'de gösterilmiştir. Bu grafiklerden, boş vektör kontrol grubu ile Bcl-xL plazmid DNA gruplarının birbirinden farklı ve belirgin şekilde ayrılmış olduğu açıkça görölmektedir. Özellikle Bcl-xL transforme grubun 10. günü ile boş vektör kontrol grubunun 2. gününün birbirine yakın kümelandiği, dolayısıyla benzer biyokimyasal bileşimlere sahip olabileceklerine işaret etmektedir. Bu veriler, morfolojik ve biyokimyasal analizlerin bulgularını doğerulamakta ve Bcl-xL proteininin, özellikle yaşlanmanın ileri evrelerinde maya hücrelerini defektlerden büyük ölçüde koruduğunu göstermektedir.

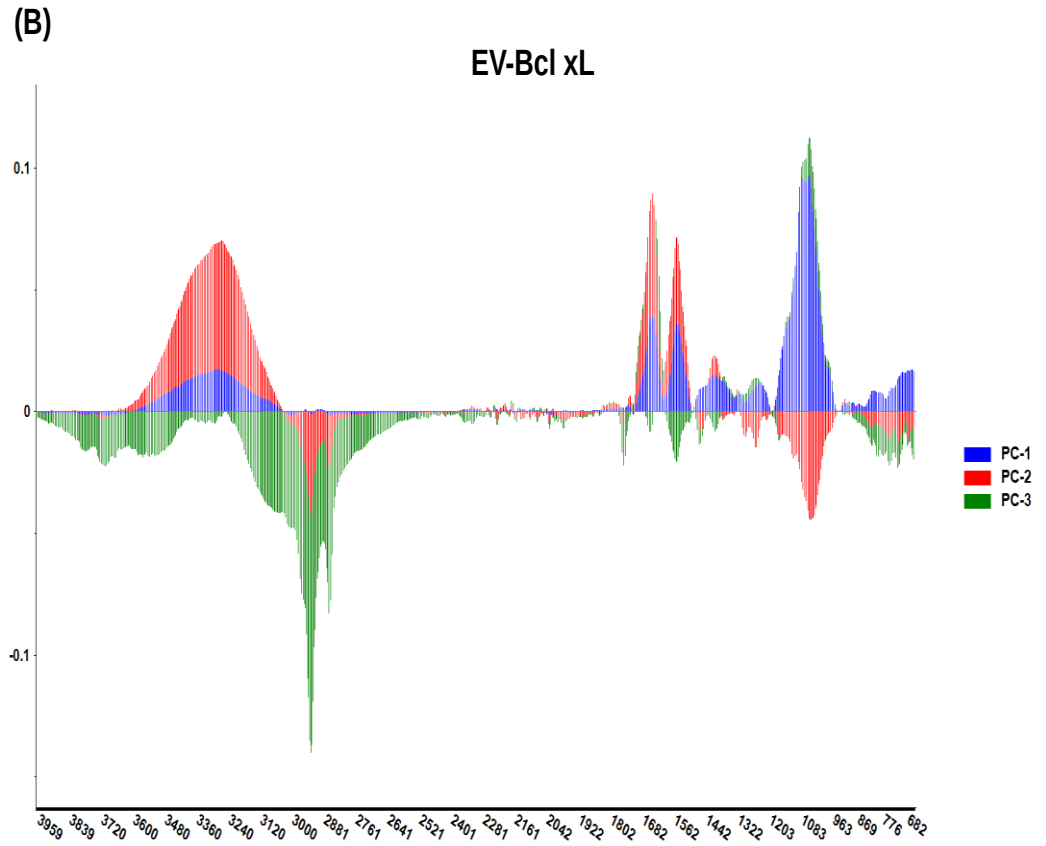
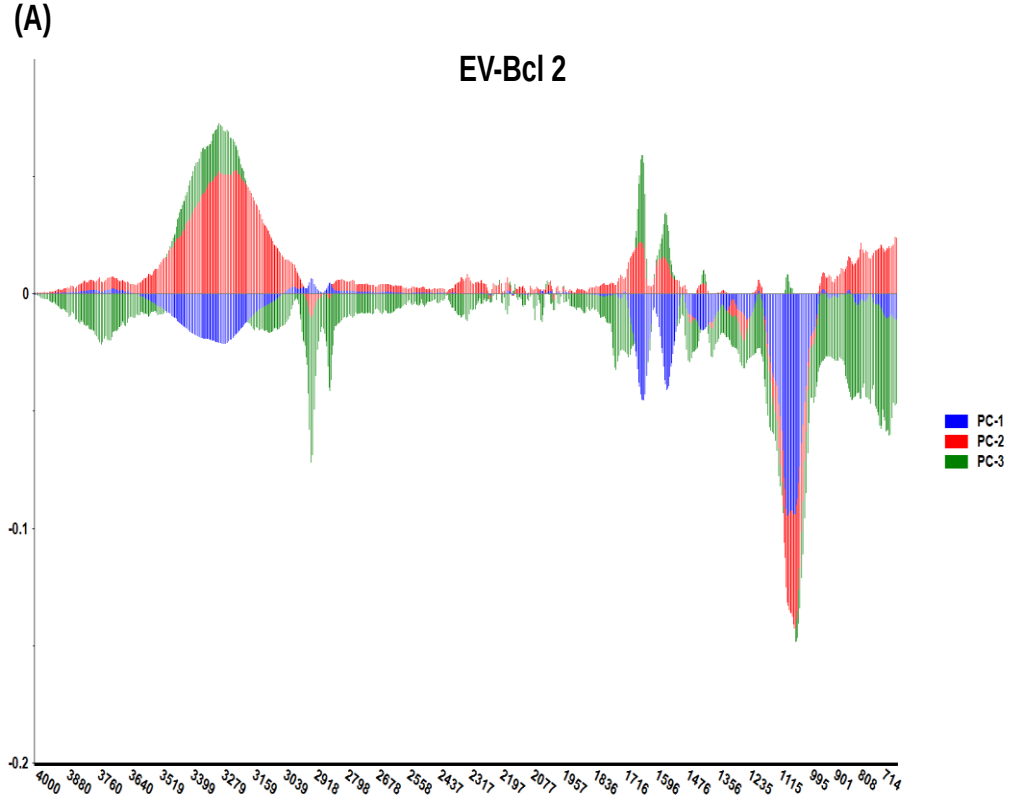


Şekil 4.14: Boş vektör (EV) ve Bcl-2 grupları için yaşlanma periyodunun 2., 6. ve 10. günlerine ait PCA skorları (A ve B) ve HCA dendrogram grafikleri (B).



Şekil 4.15: Boş vektör (EV) ve Bcl-xL grupları için yaşlanma periyodunun 2., 6. ve 10. günlerine ait PCA skorları (A ve B) ve HCA dendogram grafikleri (B).

PCA'da yükleme grafiği, grupların ayırımına katkıda bulunan ana spektral bantları ortaya çıkarmaktadır. Bu grafiğin y eksenini özdeğer ile gösterilmektedir. Yüksek özdeğer, spektral bantın ve ilişkili moleküllerin belirgin varyansını göstermektedir (Cordella 2012). Bu nedenle, boş vektör, Bcl-2 ve Bcl-xL transforme gruplar arasında biyokimyasal kompozisyonundaki farklılıklarını açıklığa kavuşturmak için, boş vektör-Bcl-2 ve boş vektör-Bcl-xL gruplarının PCA'sından elde edilen yükleme grafikleri incelenmiştir. Sonuçlar sırasıyla Şekil 4.16A ve B'de sunulmuştur. Bu grafikler, biyomoleküler içerik varyasyonlarının esas olarak iki bölgede gözlemlendiğini ortaya koymuştur. İlk bölge, protein ve lipidlerle ilişkili spektral bantları içeren 3500 ile 2800 cm^{-1} spektral aralığında yer almaktadır. Buna karşılık, parmak izi bölgesi olarak adlandırılan ikinci bölge, 1800 ile 600 cm^{-1} spektral aralığında yer almakta ve trigliseritler, protein, mannan, glukoz ve nükleik asitler ile ilişkili çoğu maya hücrelerine spesifik spektral bantları içermektedir. Grafiğin Y eksenini özdeğerleri, X eksenini ise yükleme grafiklerindeki dalga sayısını temsil etmektedir. Her iki bölgede yer alan spektral bantlar için yüksek özdeğerler elde edilmiş olsa da, grafiklerin büyüklüğü ve yönü bu analizlerde farklılık göstermiştir. Tablo 4.2, bu farklılıkları açıkça göstermekte olup, PC1, PC2 ve PC3 yükleme spektrumlarında spektral bantların açıklanan varyansını belirtmektedir. Örneğin, boş vektör-Bcl-2 gruplarında protein ile ilişkili pik (3264 cm^{-1}) için %80'in üzerinde daha yüksek varyans değerleri elde edilmiştir. Öte yandan, bu değerler boş vektör-Bcl-xL gruplarında sadece protein değil, aynı zamanda lipidlere atfedilen spektral bantlar (3010, 2952, 2924, 2875, 2859 cm^{-1}) için de bulunmuştur. Lipid bantlarının varyans değerlerinin %100 olarak bulunduğu belirtilmelidir. İkinci spektral bölgede, proteinler, amino asitler (1632, 1543, 1401, 1307 cm^{-1}), lipidler (1401, 1377, 1265, 1241, 1080 cm^{-1}), nükleik asitler (1265, 1241, 1080, 775 cm^{-1}), polisakkaritler (1153, 1044, 1080 cm^{-1}), mannan (1130, 883, 843, 805 cm^{-1}), β -glukan (1377, 1130, 1106, 1044 cm^{-1}) ve piranoz (916, 775 cm^{-1}) için yüksek varyans değerleri ölçülmüştür. Bu varyasyonlar, yaşlanma sürecinin maya hücrelerinin tüm biyomoleküler bileşimini bozduğunu ve Bcl-2 ile Bcl-xL proteinlerinin bu değişiklikleri iyileştirebileceğini açıkça göstermektedir.



Şekil 4.16: Yaşlanma periyodunun 2., 6. ve 10. günlerine ait PCA yükleme grafikleri. PC1, PC2 ve PC3 için; A) boş vektör (EV)-Bcl-2 transforme gruplar B) boş vektör (EV)-Bcl-xL transforme gruplar.

Tablo 4.2: PCA yükleme grafiklerinden bantların IR bandı tanımlamaları ve PC1, PC2 ve PC3 için açıklanan varyansları.

Bant Lokasyon	Boş vektör ve Bcl-2			Boş vektör ve Bcl-xL			Bant Tanımlama	Referanslar
	PC1	PC2	PC3	PC1	PC2	PC3		
3264	76	97	99	46	99	99	Amid A: proteinler	Santos ve diğ. 2015
3006-3010	22	39	45	2	5	97	Olefinik grup =CH: doymamış lipidler	Ami ve diğ. 2014
2952	13	13		0	39	99	ν_{asym} CH ₃ lipidler	Socrates 2004
2924	16	18	68	0	51	99	ν_{as} CH ₂ (lipidler)	Socrates 2004
2875	3	3	34	1	35	98	ν_s CH ₃ simetrik (lipidler)	Nguyen ve diğ. 2020
2859	19	20	65	1	44	99	ν_s CH ₂ (lipidler)	Socrates 2004
1748	0	1	87	17	35	71	$\nu C = O$ lipid esterleri	Legal ve diğ. 1991
1632	0	95	96	83	97	97	Amid I: proteinler, C = O gerilmesi: β tabaka yapısı	Oberg ve diğ. 2004
1543	95	96	97	87	95	96	Amid II: proteinler, $\delta N-H$ (bükülme) ve $\nu C-N$ (gerilme)	Socrates 2004
1454	87	88	99	92	99	99	Lipidler ve proteinlerde CH ₂ /CH ₃ bükülme titreşimleri	Socrates 2004
1401	96	97	97	94	97	97	Aminoasitlerin karboksilatları ve lipidlerin δSCH_2 grubu	Mihoubi ve diğ. 2017
1377	97	99	99	99	100	100	Lipidlerdeki CH ₂ salınım titreşimleri ve $\beta 1,3$ glukanlar	Wolfangel ve diğ. 1999
1307	88	88	97	98	98	98	Amid III: C–N ve C–O uzama, N–H ve O C–N bükülme: protein	Socrates 2004
1265	80	82	93	89	98	99	DNA, RNA ve	Socrates

							fosfolipidlerde $v_{\text{asym}} \text{PO}_2^-$	2004
1241	88	92	97	87	99	99	DNA, RNA ve fosfolipidlerde $v_{\text{asym}} \text{PO}_2^-$	Socrates 2004
1153	95	95	100	98	99	99	C-O, C-OH karbonhidratla r, çeşitli katkıları	Yu ve Irudayaraj 2005
1130	99	99	100	99	100	100	Mannanlar ve β 1,3 glukanlar	Galichet ve diğ. 2001
1106	99	100	100	98	100	100	β 1,3 glukanlar	Adt ve diğ. 2006
1080	99	100	100	99	100	100	Nükleik asitler ve fosfolipidlerde ki $N_{\text{sym}} \text{C-O-C}$	Gasparri ve Muzio 2003
1044	99	100	100	97	100	100	Polisakkaritler, nükleik asitler, β -glukan vC-O	Gautam ve diğ. 2012; Galichet ve diğ. 2001
975	90	91	99	97	100	100	Mannanlar	Galichet ve diğ. 2001
916	13	22	83	93	95	95	Piranoz halkasının asimetrik titreşimleri	Lu ve Guo 2006
883	6	14	85	92	93	93	Mannanlar	Galichet ve diğ. 2001
848	0	11	90	66	68	72	Mannan	Burattini ve diğ. 2008
805	25	36	91	89	92	93	Mannanlar	Galichet ve diğ. 2001
775	12	29	90	78	85	87	Piranoz halkasının simetrik titreşimleri, GMP halkası gerilmesi: nükleik asit	Lu ve Guo 2006

5. TARTIŞMA

Yaşlanma, tüm organizmalar için biyolojik, zamana bağlı ve dejeneratif bir süreçtir. Yaşlanmanın moleküler mekanizması hala tam olarak anlaşılamamış olsa da, ilk olarak 1950'lerde Denham Harman tarafından tanımlanan ve yaşlanmanın serbest radikal teorisinden uyarlanmış olan oksidatif stres teorisi (Harman 2002), her yıl üretilen çok sayıda yayın ile en önde gelen teorilerden biri olarak kabul edilmektedir. Bu teori, hücreler ve dokularda reaktif türler (RT) tarafından indüklenen hücresel hasarın birikimi ve biyolojik organizasyonun her seviyesinde hasar birikimi gerçekleşmesinin yaşlanmanın temel nedeni ve biyobelirteci olduğunu iddia etmektedir (Hajam ve diğ. 2022; Hussain ve Kayani 2020). Esasen hücreler, düzenli işleyişleri için gerekli olan ve çeşitli endojen, özellikle mitokondriyal ve dış faktörler tarafından üretilen optimum RT seviyesini korumak için sürekli olarak çalışmaktadırlar. Oksidatif stres, hücrelerdeki RT seviyeleri kritik eşikleri ve endojen olarak indüklenen anti-oksidatif savunma kapasitesini aştığında ortaya çıkmaktadır. Bu stres çeşitli hastalıkların, bozuklukların, yaşlanmanın ve nihayetinde ölüm süreçlerinin başlamasına katkıda bulunmaktadır. Bu doğrultuda, hücresel oksidatif stresin yaşlanma sürecindeki merkezi rolü göz önünde bulundurulduğunda, bu strese karşı savunma mekanizmalarının başında gelen antiapoptotik Bcl-2 ailesi proteinlerinin işlevleri, yaşlanma biyolojisinin anlaşılması açısından büyük önem taşımaktadır. Antiapoptotik Bcl-2 ailesi proteinlerinden özellikle Bcl-2 ve Bcl-xL'nin, hücre içi oksidatif stresin zararlı etkilerine karşı belirli moleküler mekanizmalar aracılığıyla koruyucu işlevler üstlendiği birçok çalışmada ortaya konmuştur. Bu proteinlerin, serbest radikal üretiminin yoğun olduğu mitokondri, endoplazmik retikulum ve nükleer membran gibi hücresel bölgelere lokalize olarak reaktif türlerin neden olduğu yapısal hasarı sınırladığı gösterilmiştir (Hockenbery ve diğ. 1993). Aynı çalışmada, Bcl-2'nin doğrudan radikal temizleyici bir etki göstermediği, bunun yerine DNA hasarını ve lipid peroksidasyonunu baskılayarak zar bütünlüğünü koruduğu ve böylece hücre ölümünü engellediği bildirilmiştir. Bu koruyucu etkinin glutatyon düzeyleriyle yakından ilişkili olduğu; glutatyon eksikliği durumunda oksidatif hasarın arttığı, buna karşın Bcl-2 overekspresyonunun bu hasarı belirgin ölçüde engellediği ve hücre sağkalımını desteklediği gösterilmiştir (Kane ve

diğ. 1993). Ayrıca Bcl-2'nin NAD^+/NADH ve GSSG/GSH oranlarını düşürerek hücrel redoks potansiyelini daha indirgenmiş bir seviyede tuttuğu ve bu yolla mitokondriyal metabolizmanın stabilitesine katkı sağladığı bildirilmiştir (Ellerby ve diğ. 1996). Aynı çalışmada Bcl-2'nin, bazı hücre hatlarında süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) gibi antioksidan enzimlerin aktivitesini artırarak seçici bir savunma mekanizması oluşturduğu ve serum çekilmesiyle indüklenen apoptoz koşullarında hücrelerin %80–90 oranında hayatta kalmasını sağlayarak yalnızca apoptoza değil, aynı zamanda nekroza karşı da geniş spektrumlu bir koruma sağladığı rapor edilmiştir. Bununla birlikte, Bcl-2'nin temel oksidatif hasar göstergeleri olan DNA hasarı ve lipid peroksidasyonunda anlamlı bir azalma sağlamamasına rağmen, 3-nitrotirozin ve protein karbonil düzeylerini azaltarak proteazom aktivitesini artırdığı bildirilmiştir (Lee ve diğ. 2001). Benzer şekilde Gupta ve diğ. (2003), oksidatif stresin apoptozu tetiklediğini; ancak Bcl-2 ekspresyonunun mitokondriyal zar potansiyelini koruduğunu, ROS üretimini ve sitokrom c ile AIF salınımını baskılayarak bu süreci engellediğini ve bu yolla hücreyi dolaylı olarak oksidatif hasara karşı koruduğunu göstermiştir. Ayrıca, Bcl-2'nin hücre içi askorbat alımını artırarak hücrel antioksidan kapasiteyi güçlendirdiği de bildirilmiştir (Saitoh ve diğ. 2003). Buna ek olarak Chen ve Pervaiz (2007), Bcl-2'nin mitokondriyal solunumu ve oksijen tüketimini artırarak kontrollü bir pro-oksidan ortam oluşturduğunu ve bu mekanizma aracılığıyla hücre sağkalımını destekleyen ikili bir rol üstlendiğini ileri sürmüştür. Zimmermann ve diğ. (2007) ise, Bcl-2'nin BH3 bölgesi aracılığıyla glutatyonla etkileşerek mitokondriyal membranda lokalize bir antioksidan savunma hattı oluşturduğunu ve böylece oksidatif stresi azaltarak hem hücrel antioksidan yanıtı güçlendirdiğini hem de apoptozu geciktirdiğini ortaya koymuştur. Bir diğer çalışmada Porcelli ve diğ. (2008), solunum kompleksi I defekti taşıyan hücrelerde artan oksidatif stresin glutatyon dengesizliği ve sitoskeletal bozulmaya (aktin ve mikrotübül yapılar) neden olduğunu, Bcl-2'nin ise bu yapısal hasarı kısmen engelleyerek hücrel bütünlüğü koruduğunu göstermiştir. Öte yandan, antiapoptotik Bcl-2 ailesinin bir diğer üyesi olan Bcl-xL'nin de Bcl-2 gibi hem endojen hem de ekzojen oksidatif stres etmenlerine karşı doğrudan ya da dolaylı yoldan antioksidan etki göstererek hücreyi koruduğu ve hücrel direnci artırdığı sınırlı sayıda çalışmada ifade edilmiştir. Örneğin, Gottlieb ve diğ. (2000), Bcl-xL'nin mitokondriyal zar potansiyelini ve ROS düzeylerini düzenleyerek doğrudan bir antioksidan gibi değil, mitokondriyal fonksiyonların sürdürülmesi yoluyla apoptoza

karşı koruyucu etki sağladığını bildirmiştir. Benzer şekilde, Saez-Atienzar ve diğ. (2016), hücrel toksisiteye yol açan koşullar altında Bcl-xL overekspresyonunun ROS üretimini azalttığını, tübülün hiperasetilasyonunu ortadan kaldırdığını, mitokondriyal zar potansiyelini koruyarak hücre sağkalımını artırdığını ve BAX'ın mitokondriye translokasyonunu engelleyerek mitokondriyal füzyonu baskıladığını ortaya koymuştur. Tüm bu bulgular bir arada değerlendirildiğinde, Bcl-2 ailesi proteinlerinin oksidatif stresle ilişkili hücrel hasarı sınırlamak ve sağkalımı desteklemek üzere çok yönlü ve birbirini tamamlayan mekanizmalarla işlev gördüğü anlaşılmaktadır. Bu noktada, memeli Bcl-2 ailesi üyelerinin koruyucu etkilerinin yalnızca memeli hücreleriyle sınırlı kalmayıp, maya gibi model organizmalarda da benzer şekilde işlevsel olduğu ve oksidatif stres koşullarında hücrel sağkalımı desteklediği çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur. Chen ve diğ. (2003) tarafından bu genleri ifade eden maya suşlarının, H₂O₂ ve menadion ile indüklenen bir dizi oksidatif stresi tolere ettiği, apoptoz ile ilişkili özellikler sergilemediği ve yabancı tip maya için ölümcül olan koşullar altında canlı kalabildiği gösterilmiştir. Memeli Bcl-xL'nin ektopik ekspresyonu, maya hücrelerinin stasyonere fazda daha uzun süre hayatta kalmasını sağlamış ve Bcl-xL'nin koruyucu etkisi, mitokondriyal ADP/ATP translokasyonunda kusurlar içeren solunum yeteneğine sahip hücrelerde daha belirgin bulunmuştur (Trancíková ve diğ. 2004). Aynı çalışmada, ROS üretiminin canlılık kaybına eşlik eden bir olay olabileceği ve Bcl-xL'nin bu hücrelerin ölümüne karşı koruyucu etkisinin mitokondriyal bir mekanizmaya işaret ettiği de rapor edilmiştir. Benzer şekilde, bu proteinlerin oksidatif stres ile ilişkili süreçlerde farklı hücre tiplerini ölüme karşı koruduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin, Kumazaki ve diğ. (2002), normal fibroblastların Bcl-2 seviyesinin antisens bcl-2 oligodeoksinükleotid veya antisens bcl-2 RNA ekspresyonu ile baskılanması durumunda kültürün yaşam süresinin kısalacağını bildirmiştir. Anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinin senolitik hedeflenmesinin, ışınlanmış sarkoma hücrelerinde hücre ölümünü artırdığı gösterilmiştir (Lafontaine ve diğ. 2021). Ayrıca, Bcl-xL proteininin yaşlanmayı düzenleyici etkisi, yakın tarihli bir derleme çalışmasında ele alınmış olup, proteinin yaşlanma sürecini intrinsik apoptoz, mitokondriyal biyoenerjetik, oksidatif stres ve otofajiyi modüle ederek düzenlemedeki olası rolü tartışılmıştır (Mas-Bargues ve diğ. 2021). Gerçekten de Bcl-2 proteinleri, oksidatif strese karşı koruyucu işlevlerinin yanı sıra otofajinin düzenlenmesiyle de ilişkilendirilmiştir. Araştırmalar, Bcl-2'nin Beclin-1 ile etkileşime girerek otofajiyi

baskılayabildiğini ve böylece otofagozomların gelişimini engellediğini göstermektedir (Zhang ve diğ. 2020; Pattingre ve diğ. 2005). Bu durum, bu anti-apoptotik proteinlerin apoptoza karşı koruma sağlarken, aynı zamanda hücrel homeostazın sürdürülmesinde otofajik süreçleri düzenleyerek ikili bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Anti-apoptotik Bcl-2 proteinleri ile otofaji arasındaki etkileşimin anlaşılması, bu proteinlerin yaşlanma süreci boyunca hücrel sağlığı nasıl koruduğuna dair değerli bilgiler sunabilir. Ayrıca, mayalarda Bcl-2 ailesi proteinlerinin doğrudan homologları bulunmamasına rağmen, bu proteinlerin memeli hücrelerinden gelen üyeleri maya sisteminde eksprese edildiklerinde biyolojik işlevlerini koruyabilmektedir (Polčic ve diğ. 2015). Bu özellik, mayayı Bcl-2 ailesi üyelerinin fonksiyonel özelliklerini analiz etmek için değerli ve uygun bir model organizma haline getirmektedir. Bcl-2 proteini ilk kez foliküler lenfomada aşırı ekspresyonla tanımlanmış; takip eden araştırmalar ise Bcl-2 ile birlikte Bcl-xL, Bcl-w, A1, Mcl-1 ve Bcl-B gibi pro-survival proteinlerin çeşitli kanser türlerinde upregüle edildiğini ortaya koymuştur (Kelly ve Strasser 2011). Bu doğrultuda, Bcl-2 benzeri anti-apoptotik proteinleri hedef alan veya onların düzeylerini azaltan çeşitli anti-kanser ajanlar da geliştirilmiştir. Örneğin, BH3-mimetik ajanlardan ABT-263 (Navitoclax) (Park ve diğ. 2008) ve onun preklinik öncülü ABT-737 (Oltersdorf ve diğ. 2005), Bax/Bak bağımlı apoptozu indükleyerek pro-survival Bcl-2 ailesi proteinlerine karşı etkili antagonistik aktivite göstermektedir (Vogler ve diğ. 2009; Vogler ve diğ. 2010; Van Delft ve diğ. 2006). Bu çerçevede, Beaumont ve arkadaşları (2013) tarafından geliştirilen çalışmada, Bcl-2 ailesi üyeleri ile kaspazları hedefleyen ilaçların aktivite ve özgüllüklerini değerlendirmeye yönelik maya temelli bir model sistem oluşturulmuştur. İnsan apoptotik düzenleyicilerinin (Bax, Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, A1, Bcl-w) ifade edildiği maya hücreleri kullanılarak, BH3-mimetik ilaçlar (ABT-737, ABT-263, Obatoclax, TW-37, HA14-1) ve pan-kaspaz inhibitörü Q-VD-OPh'nin etkileri analiz edilmiştir. ABT-737 ve ABT-263'ün, özellikle Bcl-2 ve Bcl-xL'nin Bax kaynaklı hücre ölümünü baskılayıcı etkisini ortadan kaldırarak, hücre büyümesini belirgin biçimde engellediği ve ATP düzeylerini azalttığı saptanmıştır. Buna karşın, Bcl-w, Mcl-1, A1 ve bazı viral homologların (DPV022, SPPV14, E1B19K) bu ajanlara karşı daha dirençli olduğu gösterilmiştir. Obatoclax ve TW-37 yüksek dozlarda tüm transformantlarda toksik etki gösterirken, HA14-1 anlamlı bir etki oluşturmamıştır. Ayrıca, Q-VD-OPh kaspaz-1 ve kaspaz-3 aracılı maya hücre ölümünü baskılamış; ancak Bax aracılı hücre ölümüne karşı etkisiz

bulunmuştur. Bu veriler, ilaçların hedef seçiciliği ve etkinliğini maya temelli sistemler aracılığıyla hızlı ve ekonomik şekilde değerlendirmenin mümkün olduğunu göstermiştir. Benzer şekilde, Tao ve arkadaşlarının (1997) gerçekleştirdiği çalışmada da, memelilerde apoptozu düzenleyen Bcl-2 ailesi proteinlerinin maya hücrelerindeki işlevleri incelenmiştir. LexA ve VP16 füzyon proteinleri aracılığıyla çeşitli Bcl-2 ailesi üyeleri (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, A1, Bak, Bax, Bcl-xS, Bad, Ced-9) mayaya eksprese edilmiş ve ikili-hibrit sistemi kullanılarak bu proteinlerin Bax ve Bak ile fiziksel etkileşim kurma yetenekleri araştırılmıştır. Bax ve Bak'ın maya hücrelerinde doğrudan hücre ölümünü indükleyebildiği, Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 ve A1'in bu toksisiteyi baskılayabildiği, buna karşın Ced-9, Bcl-xS ve Bad'ın bu yönde etkisiz olduğu gösterilmiştir. Hücre ölümünü baskılayan proteinlerin aynı zamanda Bax ve Bak ile fiziksel etkileşim kurduğu; baskılamayanların ise bu etkileşimi göstermediği tespit edilmiştir. Öte yandan, Bcl-xL mutantları (XF14 ve XF15), Bax'a bağlanmamasına rağmen Bax kaynaklı hücre ölümünü baskılamış; bu da Bcl-xL'nin Bax'tan bağımsız alternatif yollarla koruyucu etki gösterebildiğine işaret etmiştir. Ayrıca, Bcl-xL ve Bcl-2'nin Bax toksisitesini mayada farklı mekanizmalarla baskıladığı bulunmuştur. Bcl-2'nin transmembran (TM) bölgesi olmadan da Bax'ı baskılayabildiği görülürken, Bcl-xL'nin TM bölgesinin silinmesi, hem Bax'a bağlanmayı hem de ölüm baskılama etkisini ortadan kaldırmıştır. Sonuç olarak her iki çalışma, memeli Bcl-2 ailesi üyelerinin maya modelinde işlevsel kaldığını ve bu sistemin apoptotik sinyal yollarını, protein-protein etkileşimlerini ve anti-kanser ajanların etkilerini analiz etmek için güçlü bir model sunduğunu ortaya koymaktadır. Bu bulgular, Bcl-2 ailesi proteinlerinin etkilerinin maya ve memeliler arasında evrimsel olarak korunduğuna işaret etmekte ve maya temelli sistemlerin, hem temel hücresel ölüm mekanizmalarını hem de hedefe yönelik tedavi stratejilerini araştırmada değerli bir araç olduğunu göstermektedir. Bu çalışmalara ek olarak, reaktif türlerin hücresel biyomoleküllerin bozulmasına yol açtığı, yaşlanmayı hızlandırdığı ve bu nedenle hücrelerin yaşam ömürlerini kısalttığı da ifade edilmektedir (Farrugia ve Balzan 2012; Stadtman 1992). Özellikle nükleik asitler (Yakes ve Van Houten 1997), proteinler (Cabisco ve diğ. 2000) ve lipitler (Biliński ve diğ. 1989) gibi temel biyomoleküllerin zarar görmesi, oksidatif hasarla ilişkili reaktif türlerden kaynaklanmaktadır. Bu noktada, maya hücre moleküllerinin belirlenmesinde FTIR spektroskopisinin etkinliği çeşitli çalışmalar ile kanıtlandığından (Yardimci ve diğ. 2022; Shapaval ve diğ. 2019; Correa-García ve

diğ. 2014; Corte ve diğ. 2010; Burattini ve diğ. 2008) memeli hücrelerinde olduğu gibi, oksidatif stresin maya hücrelerinde de temel biyomoleküller üzerinde yol açtığı hasarın değerlendirilmesi, bu organizmada yürütülen moleküler düzeydeki analizlerin önemini ortaya koymaktadır.

Tüm bu veriler ışığında bu çalışmada, insan Bcl-2 ve Bcl-xL proteinlerinin, 10 günlük yaşam ömrü boyunca transforme *S. cerevisiae* BY4741 hücrelerinde oksidatif stres indüklü yaşlanma ve ölüme karşı koruyucu etkileri belirlenmeye çalışılmıştır. Bu suş S288C'nin bir türevidir ve diğer suş backgroundlarına kıyasla nispeten uzun bir CLS'ye sahip olduğu gösterilmiştir (Piper ve diğ. 2006). Öte yandan, literatürde bizim bulgularımızla benzer şekilde, canlılık ve yaşam ömrü arasındaki korelasyonu ortaya koyan veriler de bulunmaktadır (Ocampo ve Barrientos 2011; Fabrizio ve diğ. 2004). Bu çalışmada, ilk kez Bcl-2 protein ailesinin anti-apoptotik üyelerinin her ikisinin de yaşlı maya hücrelerinin üreme hayatta kalma oranını artırdığı ve genlerin ekspresyonuna bağlı olarak deforme olmuş hücre morfolojisini iyileştirdiği bulunmuştur. Ayrıca, her iki proteinin, özellikle de Bcl-xL'nin, maya yaşlanmasında intraselüler oksidatif stres durumunu modüle ettiği gösterilmiştir. Bcl-xL eksprese maya hücrelerinde, başlıca antioksidan enzimlerin neredeyse tümünün maksimum aktivite seviyelerine ve TAS seviyelerine 8. günde ulaşılmıştır. Bu genel bulgu, Bcl-xL proteininin incelenen yaşlanma periyodunun ilerleyen safhalarında hücreleri aşırı RT'den korumak için hem enzimatik hem de enzimatik olmayan antioksidan mekanizmaları uyardığını ve bu yanıtın, Bcl-xL genini eksprese eden hücrelerde yaşlanma periyodunun 10. gününde lipid peroksidasyon (LPO) seviyelerini diğer iki gruba kıyaslandığında önemli ölçüde azalttığını göstermektedir. LPO ürünlerinin otofaji aktivasyonu için farklı sinyal yollarını aktive ettiği bilindiğinden (Su ve diğ. 2019), bu proteinlerin bu tür bir ölümü engelleyebileceği varsayılabilir. Öte yandan, incelenen parametreler açısından böyle bir genelleme Bcl-2 geni eksprese eden hücrelerde mümkün olmamıştır. Bcl-2 genini eksprese eden hücrelerin antioksidan enzim aktiviteleri, boş vektör grubuna kıyasla 10 günlük yaşlanma periyodu boyunca en az bir kez önemli ölçüde artmış olsa da, belirgin bir trend gözlenmemiştir. Maksimum aktivite değerlerinin ağırlıklı olarak yaşlanma periyodunun 6. gününde veya daha erken bir günde kaydedildiğini ve Bcl-xL transforme gruba kıyasla genellikle daha yüksek olduğunu belirtmek önemlidir. Ek olarak, TAS seviyelerinin 8. günde artış gösterdiği, ancak yaşlanma periyodunun

erken safhalarından itibaren kayda değer bir değişiklik göstermediği saptanmıştır. Yaşlanma periyodunun 6. gününde Bcl-xL transforme gruptaki protein karbonil seviyeleri Bcl-2 grubuna kıyasla önemli ölçüde düşük bulunmuş olsa da, antioksidan sistemdeki bu değişiklikler canlılık sonuçlarıyla birleştirildiğinde, Bcl-2 proteininin erken evrelerde daha fazla etkinlik gösterirken, Bcl-xL proteininin yaşlanma sürecinin ilerleyen safhalarında daha belirgin hale geldiği öne sürülebilir. Ek olarak, makromoleküllerde oksidatif stres indüklü hasarı ve anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerinin koruyucu işlevini belirlemek üzere kemometrik analiz ile birlikte FTIR spektroskopisi uygulanmıştır. Bu değişiklikleri hızlı ve doğru bir şekilde değerlendirmek için transforme maya hücrelerinin IR spektrumlarına PCA ve HCA uygulanmıştır. Boş vektör grubunda, yaşlanma periyodunun 6. ve 10. günlerinin 2. günden ayrılması göz önünde bulundurularak, protein, lipid, nükleik asitler ve karbonhidratlar gibi hücresel makromoleküler bileşenlerin yaşlanmanın ilerleyen safhalarında zarar gördüğü tespit edilmiştir. Yaşlanma sürecinde maya hücrelerinde lipid damlacıklarının biriktiği (Beas ve diğ. 2020), proteinlerin oksidatif hasara uğradığı (Reverter-Branchat ve diğ. 2004) ve DNA hasarının biriktiği (Burhans ve Weinberger 2012) yönündeki bulgular, yaşlanma boyunca maya hücrelerine ait makromoleküllerin zarar gördüğünü ortaya koymakta ve elde ettiğimiz sonuçları desteklemektedir. Bcl-2 ve Bcl-xL genlerini eksprese eden yaşlı maya hücrelerinde ise, herhangi bir biyomoleküler hasar tespit edilmemiştir. Bu bulgu, yaşlanma periyodunun 2. ve 6. günleri için Bcl-2 ve Bcl-xL eksprese maya hücrelerinin boş vektör grubundan uzak bir konumda yer almasıyla doğrulanabilir. Yaşlanmanın 10. gününde Bcl-xL grubu, boş vektör ve Bcl-2 gruplarına göre farklı bir kümede yer almıştır. Ek olarak, yaşlanma periyodunun 10. gününde Bcl-xL grubu 2. gün boş vektör grubu ile yakın kümelenmiştir. Bu sonuçlar, yaşlanmanın 6. gününde Bcl-2'nin hücreleri reaktif türler indüklü oksidasyondan koruyabileceğini ortaya koymaktadır. Öte yandan, bu koruma en belirgin şekilde Bcl-xL'nin yaşlanmanın 10. günündeki hücrelerinde gözlenmiştir. Bahsi geçen bulgular, Bcl-2'nin yaşlanmanın başlangıç safhalarında koruyucu bir etki gösterdiğini, Bcl-xL proteininin ise bu fonksiyonu periyodun ilerleyen evrelerinde yerine getirdiğini doğrulamaktadır.

Sonuç olarak, bu çalışma, Bcl-2 ve Bcl-xL proteinlerinin varlığının, yaşlanma nedeniyle oluşan oksidatif stresin zararlı etkilerine ve hücre ölümüne karşı maya hücrelerini koruduğunu ilk kez ortaya koymaktadır. Bcl-xL proteini, özellikle

incelenen yaşlanma periyodunun son safhalarında oldukça etkin bir koruma sağlayabilir. Bu bağlamda, Bcl-xL'nin maya hücrelerinde hücresel redoks durumu üzerindeki etki mekanizmasının anlaşılması, bu proteinin daha yüksek ökaryotlarda sahip olduğu dolaylı antioksidan işlevin anlaşılmasına olanak sağlayabilir.

6. KAYNAKLAR

Abd El, H. A. H. M., “Lipid peroxidation end-products as a key of oxidative stress: effect of antioxidant on their production and transfer of free radicals”, *In Lipid peroxidation*, IntechOpen, (2012).

Abd El, H. A. H. M., “Lipid peroxidation end-products as a key of oxidative stress: effect of antioxidant on their production and transfer of free radicals”, *In Lipid peroxidation*, IntechOpen, (2012).

Abdulnur, S. F. and Flurry Jr, R. L., “Effect of guanine alkylation on mispairing”, *Nature*, 264 (5584), 369-370, (1976).

Abe, C., Miyazawa, T. and Miyazawa, T., “Current use of Fenton reaction in drugs and food”, *Molecules*, 27 (17), 5451, (2022).

Abreu, I. A. and Cabelli, D. E., “Superoxide dismutases—a review of the metal-associated mechanistic variations”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1804 (2), 263-274, (2010).

Ackermann, M., Stearns, S. C. and Jenal, U., “Senescence in a bacterium with asymmetric division”, *Science*, 300 (5627), 1920-1920, (2003).

Adams, J. M. and Cory, S., “The BCL-2 arbiters of apoptosis and their growing role as cancer targets”, *Cell Death & Differentiation*, 25 (1), 27-36, (2018).

Adt, I., Toubas, D., Pinon, J. M., Manfait, M. and Sockalingum, G. D., “FTIR spectroscopy as a potential tool to analyse structural modifications during morphogenesis of *Candida albicans*”, *Archives of microbiology*, 185, 277-285, (2006).

Aebi, H., “Catalase in vitro”, *Methods in enzymology*, Academic press, 105, 121-126, (1984).

Aerts A. M., Zabrocki, P., Govaert, G., Mathys, J., Carmona-Gutierrez, D., Madeo, F., Winderickx, J., Cammue, B. P. and Thevissen, K., “Mitochondrial dysfunction leads to reduced chronological lifespan and increased apoptosis in yeast”, *FEBS Lett.*, 583 (1), 113–117, (2009).

Aguilaniu, H., Gustafsson, L., Rigoulet, M. and Nystrom, T., “Asymmetric inheritance of oxidatively damaged proteins during cytokinesis”, *Science*, 299 (5613), 1751–1753, (2003).

Ağagündüz, D., Yeşildemir, Ö., Koçyiğit, E., Koçak, T., Özen Ünaldı, B., Ayakdaş, G. and Budán, F., “Oxylipins Derived from PUFAs in Cardiometabolic Diseases: Mechanism of Actions and Possible Nutritional Interactions”, *Nutrients*, 16 (22), 3812, (2024).

Aitken, R. J., “Free radicals, lipid peroxidation and sperm function”, *Reproduction, Fertility and Development*, 7 (4), 659-668, (1995).

Akki, R., Fath, N. and Mohti, H., “COVID-19: Oxidative Preconditioning as a Potential Therapeutic Approach”, *ACS Chemical Neuroscience*, 11 (22), 3732-3740, (2020).

Akşit, H. and Bildik, A., “Apoptozis”, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19 (1), 55-63, (2008).

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. M. and Walter, P., Sexual reproduction: meiosis, germ cells and fertilization, *Molecular Biology of the Cell*, 5th ed., New York: GS Garland Science, Taylor and Francis Group, 1269-1304, (2008).

Alers, S., Löffler, A. S., Wesselborg, S. and Stork, B., “Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks”, *Molecular and cellular biology*, 32 (1), 2-11, (2012).

Ali, S. S., Ahsan, H., Zia, M. K., Siddiqui, T. and Khan, F. H., “Understanding oxidants and antioxidants: Classical team with new players”, *Journal of food biochemistry*, 44 (3), e13145, (2020).

Alic, N., Higgins, V. J. and Dawes, I. W., “Identification of a *Saccharomyces cerevisiae* gene that is required for G1 arrest in response to the lipid oxidation product linoleic acid hydroperoxide”, *Molecular Biology of the Cell*, 12 (6), 1801-1810, (2001).

Aljuhani, N., Michail, K., Karapetyan, Z. and Siraki, A. G., “The effect of bicarbonate on menadione-induced redox cycling and cytotoxicity: potential involvement of the carbonate radical”, *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 91 (10), 783-790, (2013).

Allen, C., Büttner, S., Aragon, A. D., Thomas, J. A., Meirelles, O., Jaetao, J. E., ... and Werner-Washburne, M., “Isolation of quiescent and nonquiescent cells from yeast stationary-phase cultures”, *The Journal of cell biology*, 174 (1), 89-100, (2006).

Alli, J. A., Kehinde, A. O., Kosoko, A. M. and Ademowo, O. G., “Oxidative stress and reduced vitamins C and E levels are associated with multi-drug resistant tuberculosis”, *Journal of tuberculosis research*, 2014, (2014).

Allocati, N., Masulli, M., Di Ilio, C. and Federici, L., “Glutathione transferases: substrates, inhibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases”, *Oncogenesis*, 7 (1), 8, (2018).

Almeida, B., Silva, A., Mesquita, A., Sampaio-Marques, B., Rodrigues, F. and Ludovico, P., “Drug-induced apoptosis in yeast”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1783 (7), 1436-1448, (2008).

Almeida, T., Marques, M., Mojzita, D., Amorim, M. A., Silva, R. D., Almeida, B., ... and Costa, V., “Isc1p plays a key role in hydrogen peroxide resistance and chronological lifespan through modulation of iron levels and apoptosis”, *Molecular biology of the cell*, 19 (3), 865-876, (2008).

Alsop, A. E., Fennell, S. C., Bartolo, R. C., Tan, I. K., Dewson, G. and Kluck, R. M., “Dissociation of Bak α 1 helix from the core and latch domains is required for apoptosis”, *Nature communications*, 6 (1), 6841, (2015).

Altindag, O., Karakoc, M., Kocyigit, A., Celik, H. and Soran, N., “Increased DNA damage and oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis”, *Clinical Biochemistry*, 40 (3-4), 167-171, (2007).

Altintas, O., Park, S. and Lee, S. J. V., “The role of insulin/IGF-1 signaling in the longevity of model invertebrates, *C. elegans* and *D. melanogaster*”, *BMB reports*, 49 (2), 81, (2016).

Altunkaynak, B. Z. and Özbek, E., “Programlanmış hücre ölümü: Apoptoz nedir”, *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 6 (2), 93-104, (2008).

Alugoju, P., Janardhanshetty, S. S., Subaramanian, S., Periyasamy, L. and Dyavaiah, M., “Quercetin protects yeast *Saccharomyces cerevisiae* pep4 mutant from oxidative and apoptotic stress and extends chronological lifespan”, *Current microbiology*, 75, 519-530, (2018).

Alugoju, P., Palanisamy, C. P., Anthikapalli, N. V. A., Jayaraman, S., Prasanskulab, A., Chuchawankul, S., ... and Tencomnao, T., “Exploring the anti-aging potential of natural products and plant extracts in budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*: A review”, *F1000Research*, 12, 1265, (2023).

Ambekar, S. S., Hattur, S. S. and Bule, P. B., “DNA: Damage and repair mechanisms in humans”, *Group*, 1, 7, (2017).

Ames, B. N., Cathcart, R., Schwiers, E. and Hochstein, P., “Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant-and radical-caused aging and cancer: a hypothesis”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78 (11), 6858-6862, (1981).

Ami, D., Di Segni, M., Forcella, M., Meraviglia, V., Baccarin, M., Doglia, S. M. and Terzoli, G., “Role of water in chromosome spreading and swelling induced by acetic acid treatment: a FTIR spectroscopy study”, *European journal of histochemistry*, 58 (1), (2014).

Anderson, R. M. and Weindruch, R., “The caloric restriction paradigm: implications for healthy human aging”, *American Journal of Human Biology*, 24 (2), 101-106, (2012).

Anjum, N. A., Umar, S. and Chan, M. T. (Eds.), Ascorbate-glutathione pathway and stress tolerance in plants, *Springer Science & Business Media*, (2010).

Aranda-Rivera, A. K., Cruz-Gregorio, A., Arancibia-Hernández, Y. L., Hernández-Cruz, E. Y. and Pedraza-Chaverri, J., “RONS and oxidative stress: An overview of basic concepts”, *Oxygen*, 2 (4), 437-478, (2022).

Arena, S., Salzano, A. M., Renzone, G., D'Ambrosio, C. and Scaloni, A., “Non-enzymatic glycation and glycoxidation protein products in foods and diseases: An interconnected, complex scenario fully open to innovative proteomic studies”, *Mass Spectrometry Reviews*, 33 (1), 49-77, (2014).

Arlia-Ciommo, A., Leonov, A., Mohammad, K., Beach, A., Richard, V. R., Bourque, S. D., ... and Titorenko, V. I., “Mechanisms through which lithocholic acid delays yeast chronological aging under caloric restriction conditions”, *Oncotarget*, 9 (79), 34945, (2018).

Arnao, M. B., Giraldo-Acosta, M., Castejón-Castillejo, A., Losada-Lorán, M., Sánchez-Herrerías, P., El Mihyaoui, A., ... and Hernández-Ruiz, J., “Melatonin from microorganisms, algae, and plants as possible alternatives to synthetic melatonin”, *Metabolites*, 13 (1), 72, (2023).

Arnér, E. S. and Holmgren, A., “Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase”, *European journal of biochemistry*, 267 (20), 6102-6109, (2000).

Arnér, E. S., “Focus on mammalian thioredoxin reductases—important selenoproteins with versatile functions”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1790 (6), 495-526, (2009).

Arora, R., Vig, A. P. and Arora, S., “Lipid peroxidation: a possible marker for diabetes”, *J. Diabetes Metab. S.*, 11, 2, (2013).

Arsilan, M., Turanli-Yildiz, B., Yilmaz, B., Kocaefe, N. and Cakar, Z. P., “An improved semi-quantitative spot assay to analyse chronological lifespan in yeast”, *Romanian Biotechnol. Lett.*, 23 (3), 13551-13560, (2018).

Ashrafi, K., Sinclair, D., Gordon, J. I. and Guarente, L., "Passage through stationary phase advances replicative aging in *Saccharomyces cerevisiae*", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96 (16), 9100-9105, (1999).

Atale, N., Chakraborty, M., Mohanty, S., Bhattacharya, S., Nigam, D., Sharma, M. and Rani, V., "Cardioprotective role of *Syzygium cumini* against glucose-induced oxidative stress in H9C2 cardiac myocytes", *Cardiovascular toxicology*, 13, 278-289, (2013).

Atale, N., Gupta, S., Yadav, U. C. S. and Rani, V., "Cell-death assessment by fluorescent and nonfluorescent cytosolic and nuclear staining techniques", *Journal of microscopy*, 255 (1), 7-19, (2014).

Auboeuf, D., "Physicochemical foundations of life that direct evolution: chance and natural selection are not evolutionary driving forces", *Life*, 10 (2), 7, (2020).

Aung-Htut, M. T., Ayer, A., Breitenbach, M. and Dawes, I. W., "Oxidative stresses and ageing", *Aging research in yeast*, 13-54, (2012).

Avery, A. M. and Avery, S. V., "Saccharomyces cerevisiae expresses three phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases", *Journal of Biological Chemistry*, 276 (36), 33730-33735, (2001).

Avery, A. M., Willetts, S. A. and Avery, S. V., "Genetic dissection of the phospholipid hydroperoxidase activity of yeast gpx3 reveals its functional importance", *Journal of Biological Chemistry*, 279 (45), 46652-46658, (2004).

Ayala, A. and Cutler, R. G., "The utilization of 5-hydroxyl-2-amino valeric acid as a specific marker of oxidized arginine and proline residues in proteins", *Free Radical Biology and Medicine*, 21 (1), 65-80, (1996).

Ayala, A., Muñoz, M. F. and Argüelles, S., "Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal", *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2014 (1), 360438, (2014).

Ayer, A., Tan, S. X., Grant, C. M., Meyer, A. J., Dawes, I. W. and Perrone, G. G., "The critical role of glutathione in maintenance of the mitochondrial genome", *Free Radical Biology and Medicine*, 49 (12), 1956-1968, (2010).

Aziz, M. A., Diab, A. S. and Mohammed, A. A., "Antioxidant categories and mode of action", *Antioxidants*, 2019, 3-22, (2019).

Ba, X. and Boldogh, I., "8-Oxoguanine DNA glycosylase 1: Beyond repair of the oxidatively modified base lesions", *Redox biology*, 14, 669-678, (2018).

Babizhayev, M. A., “Generation of reactive oxygen species in the anterior eye segment. Synergistic codrugs of N-acetylcarnosine lubricant eye drops and mitochondria-targeted antioxidant act as a powerful therapeutic platform for the treatment of cataracts and primary open-angle glaucoma”, *BBA Clinical*, 6, 49-68, (2016).

Babizhayev, M. A., Deyev, A. I. and Linberg, L. F., “Lipid peroxidation as a possible cause of cataract”, *Mechanisms of ageing and development*, 44 (1), 69-89, (1988).

Baetu, T. M. and Hiscott, J., “On the TRAIL to apoptosis”, *Cytokine & growth factor reviews*, 13 (3), 199-207, (2002).

Baima, B. and Sticherling, M., “How specific is the TUNEL reaction?: An account of a histochemical study on human skin”, *The American journal of dermatopathology*, 24 (2), 130-134, (2002).

Balaban, R. S., Nemoto, S. and Finkel, T., “Mitochondria, oxidants, and aging”, *Cell*, 120 (4), 483-495, (2005).

Ballatori, N., Krance, S. M., Notenboom, S., Shi, S., Tieu, K. and Hammond, C. L., “Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases”, *Biological Chemistry*, 390, 191-214, (2009).

Banfalvi, G., “Methods to detect apoptotic cell death”, *Apoptosis*, 22 (2), 306-323, (2017).

Barker, M. G. and Smart, K. A., “Morphological changes associated with the cellular aging of a brewing yeast strain”, *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 54 (2), 121-126, (1996).

Barker, M. G. and Walmsley, R. M., “Replicative ageing in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*”, *Yeast*, 15 (14), 1511-1518, (1999).

Barker, M. G., Brimage, L. J. and Smart, K. A., “Effect of Cu, Zn superoxide dismutase disruption mutation on replicative senescence in *Saccharomyces cerevisiae*”, *FEMS microbiology letters*, 177 (2), 199-204, (1999).

Barker, S., Weinfeld, M. and Murray, D., “DNA–protein crosslinks: their induction, repair, and biological consequences”, *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 589 (2), 111-135, (2005).

Barnham, K. J., Masters, C. L. and Bush, A. I., “Neurodegenerative diseases and oxidative stress”, *Nature reviews Drug discovery*, 3 (3), 205-214, (2004).

Barreto, L., Garcerá, A., Jansson, K., Sunnerhagen, P. and Herrero, E., “A peroxisomal glutathione transferase of *Saccharomyces cerevisiae* is

functionally related to sulfur amino acid metabolism”, *Eukaryotic Cell*, 5 (10), 1748-1759, (2006).

Barros, M. H., Bandy, B., Tahara, E. B. and Kowaltowski, A. J., “Higher respiratory activity decreases mitochondrial reactive oxygen release and increases life span in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Journal of Biological Chemistry*, 279 (48), 49883-49888, (2004).

Bartsch, H. and Nair, J., “Chronic inflammation and oxidative stress in the genesis and perpetuation of cancer: role of lipid peroxidation, DNA damage, and repair”, *Langenbeck's Archives of Surgery*, 391, 499-510, (2006).

Bartz, R. R. and Piantadosi, C. A., “Clinical review: oxygen as a signaling molecule”, *Critical Care*, 14, 1-9, (2010).

Basri, D. F., Alamin, Z. A. Z., Ishak, S. F., Shamsuddin, N. A. M., Ramle, N. A., Rajab, N. F. and Raus, R. A., “Mitochondrial stressors and their role in programmed cell death”, *Int. J. Recent Sci. Res.*, 9 (2), 24657-24665, (2018).

Bastow, E. L., Peswani, A. R., Tarrant, D. S., Pentland, D. R., Chen, X., Morgan, A., ... and Gourlay, C. W., “New links between SOD1 and metabolic dysfunction from a yeast model of amyotrophic lateral sclerosis”, *Journal of cell science*, 129 (21), 4118-4129, (2016).

Baudouin-Cornu, P., Lagniel, G., Kumar, C., Huang, M. E. and Labarre, J., “Glutathione degradation is a key determinant of glutathione homeostasis”, *Journal of Biological Chemistry*, 287 (7), 4552-4561, (2012).

Bauer, H., Massey, V., Arscott, L. D., Schirmer, R. H., Ballou, D. P. and Williams, C. H., “The mechanism of high M_r thioredoxin reductase from *Drosophila melanogaster*”, *Journal of Biological Chemistry*, 278 (35), 33020-33028, (2003).

Beas, A. O., Gordon, P. B., Prentiss, C. L., Olsen, C. P., Kukurugya, M. A., Bennett, B. D., ... and Gottschling, D. E., “Independent regulation of age associated fat accumulation and longevity”, *Nature communications*, 11 (1), 2790, (2020).

Beaumont, T. E., Shekhar, T. M., Kaur, L., Pantaki-Eimany, D., Kvensakul, M. and Hawkins, C. J., “Yeast techniques for modeling drugs targeting Bcl-2 and caspase family members”, *Cell death & disease*, 4 (5), e619-e619, (2013).

Beckman, J. S., Chen, J., Ischiropoulos, H. and Crow, J. P., “[23] Oxidative chemistry of peroxynitrite”, *Methods in enzymology*, Academic Press, 233, 229-240, (1994).

Bekatorou, A., Psarianos, C. and Koutinas, A. A., “Production of food grade yeasts”, *Food Technology & Biotechnology*, 44 (3), (2006).

Benjamin, J. J., Poon, P. P., Drysdale, J. D., Wang, X., Singer, R. A. and Johnston, G. C., “Dysregulated Arl1, a regulator of post-Golgi vesicle tethering, can inhibit endosomal transport and cell proliferation in yeast”, *Molecular biology of the cell*, 22 (13), 2337-2347, (2011).

Berger, K. H. and Yaffe, M. P., “Prohibitin family members interact genetically with mitochondrial inheritance components in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Molecular and Cellular Biology*, 18, 4043–4052, (1998).

Bermúdez-Moretti, M., Gulías, J. F., Valencia-Guillén, J., Muñoz, S. A., Forfar, I. and Correa-García, S., “Monitoring changes in the cellular content of biomolecules during ageing with FTIR spectroscopy”, *Vibrational Spectroscopy*, 105, 102972, (2019).

Bertram, C. and Hass, R., “Cellular responses to reactive oxygen species-induced DNA damage and aging”, *Biological Chemistry*, 389 (3), (2008).

Bevan, R. J., Durand, M. F., Hickenbotham, P. T., Kitas, G. D., Patel, P. R., Podmore, I. D., ... and Lunec, J., “Validation of a novel ELISA for measurement of MDA-LDL in human plasma”, *Free Radical Biology and Medicine*, 35 (5), 517-527, (2003).

Bhakat, K. K., Mantha, A. K. and Mitra, S., “Transcriptional regulatory functions of mammalian AP-endonuclease (APE1/Ref-1), an essential multifunctional protein”, *Antioxidants & redox signaling*, 11 (3), 621-637, (2009).

Bhutani, V. K., Wong, R. J. and Stevenson, D. K., “Hyperbilirubinemia in preterm neonates”, *Clinics in perinatology*, 43 (2), 215-232, (2016).

Bielski, B. H., Arudi, R. L. and Sutherland, M. W., “A study of the reactivity of HO₂/O₂-with unsaturated fatty acids”, *Journal of biological chemistry*, 258 (8), 4759-4761, (1983).

Biliński, T., Litwińska, J., Błszyński, M. and Bajus, A., “Superoxide dismutase deficiency and the toxicity of the products of autooxidation of polyunsaturated fatty acids in yeast”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1001 (1), 102-106, (1989).

Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S. and Kalayci, O., “Oxidative stress and antioxidant defense”, *World allergy organization journal*, 5, 9-19, (2012).

Bisht, R., “Antioxidants: a brief review”, *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 8 (6-s), 373-376, (2018).

- Bitterman, K. J., Medvedik, O. and Sinclair, D. A., "Longevity regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: linking metabolism, genome stability, and heterochromatin", *Microbiology and molecular biology reviews*, 67 (3), 376-399, (2003).
- Boiteux, S. and Guillet, M., "Abasic sites in DNA: repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*", *DNA repair*, 3 (1), 1-12, (2004).
- Bollineni, R. C., Fedorova, M. and Hoffmann, R., "Qualitative and quantitative evaluation of derivatization reagents for different types of protein-bound carbonyl groups", *Analyst*, 138 (17), 5081-5088, (2013).
- Bonawitz, N. D., Chatenay-Lapointe, M., Pan, Y. and Shadel, G. S., "Reduced TOR signaling extends chronological life span via increased respiration and upregulation of mitochondrial gene expression", *Cell metabolism*, 5 (4), 265-277, (2007).
- Bonnefont-Rousselot, D. and Collin, F., "Melatonin: action as antioxidant and potential applications in human disease and aging", *Toxicology*, 278 (1), 55-67, (2010).
- Booth, L. N. and Brunet, A., "The aging epigenome", *Molecular cell*, 62 (5), 728-744, (2016).
- Borghouts, C., Benguria, A., Wawryn, J. and Jazwinski, S. M., "Rtg2 protein links metabolism and genome stability in yeast longevity", *Genetics*, 166 (2), 765-777, (2004).
- Bortner, C. D. and Cidlowski, J. A., "Uncoupling cell shrinkage from apoptosis reveals that Na⁺ influx is required for volume loss during programmed cell death", *Journal of Biological Chemistry*, 278 (40), 39176-39184, (2003).
- Botstein, D., Chervitz, S. A. and Cherry, M., "Yeast as a model organism", *Science*, 277 (5330), 1259-1260, (1997).
- Bouklas, T. and Fries, B. C., "Aging as an emergent factor that contributes to phenotypic variation in *Cryptococcus neoformans*", *Fungal Genetics and Biology*, 78, 59-64, (2015).
- Bowman, G. L., Shannon, J., Frei, B., Kaye, J. A. and Quinn, J. F., "Uric acid as a CNS antioxidant", *Journal of Alzheimer's disease*, 19 (4), 1331-1336, (2010).
- Bowry, V. W., Ingold, K. U. and Stocker, R., "Vitamin E in human low-density lipoprotein. When and how this antioxidant becomes a pro-oxidant", *Biochemical Journal*, 288 (2), 341-344, (1992).

- Bowry, V. W., Mohr, D., Cleary, J. and Stocker, R., "Prevention of tocopherol-mediated peroxidation in ubiquinol-10-free human low density lipoprotein", *Journal of Biological Chemistry*, 270 (11), 5756-5763, (1995).
- Böcking, T., Barrow, K. D., Netting, A. G., Chilcott, T. C., Coster, H. G. and Höfer, M., "Effects of singlet oxygen on membrane sterols in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*", *European journal of biochemistry*, 267 (6), 1607-1618, (2000).
- Brachmann, C. B., Sherman, J. M., Devine, S. E., Cameron, E. E., Pillus, L. and Boeke, J. D., "The SIR2 gene family, conserved from bacteria to humans, functions in silencing, cell cycle progression, and chromosome stability", *Genes & development*, 9 (23), 2888-2902, (1995).
- Bradford, M. M., "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Analytical biochemistry*, 72 (1-2), 248-254, (1976).
- Brand, M. D., "Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling", *Free Radical Biology and Medicine*, 100, 14-31, (2016).
- Bravo, L., "Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance", *Nutrition reviews*, 56 (11), 317-333, (1998).
- Breitenbach, M., Jazwinski, S. M. and Laun, P. (Eds.), "Aging research in yeast", *Springer Science & Business Media*, 57, (2011).
- Breitzig, M., Bhimineni, C., Lockey, R. and Kolliputi, N., "4-Hydroxy-2-nonenal: a critical target in oxidative stress?", *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 311 (4), C537-C543, (2016).
- Brennan, R. J., Swoboda, B. E. and Schiestl, R. H., "Oxidative mutagens induce intrachromosomal recombination in yeast", *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 308 (2), 159-167, (1994).
- Briviba, K., Klotz, L. O. and Sies, H., "Toxic and signaling effects of photochemically or chemically generated singlet oxygen in biological systems", *Biological chemistry*, 378 (11), 1259-1265, (1997).
- Broer, L. and van Duijn, C. M., "GWAS and meta-analysis in aging/longevity", *Longevity Genes: A Blueprint for Aging*, 107-125, (2015).
- Bronzetti, G., Cini, M., Andreoli, E., Caltavuturo, L., Panunzio, M. and Della Croce, C., "Protective effects of vitamins and selenium compounds in yeast", *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 496 (1-2), 105-115, (2001).

- Brouwer, J. M., Westphal, D., Dewson, G., Robin, A. Y., Uren, R. T., Bartolo, R., ... and Czabotar, P. E., “Bak core and latch domains separate during activation, and freed core domains form symmetric homodimers”, *Molecular cell*, 55 (6), 938-946, (2014).
- Buchczyk, D. P., Briviba, K., Hartl, F. U. and Sies, H., “Responses to peroxynitrite in yeast: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as a sensitive intracellular target for nitration and enhancement of chaperone expression and ubiquitination”, *Biological Chemistry*, 381, 121–126, (2000).
- Burattini, E., Cavagna, M., Dell’Anna, R., Campeggi, F. M., Monti, F., Rossi, F. and Torriani, S., “A FTIR microspectroscopy study of autolysis in cells of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*”, *Vibrational Spectroscopy*, 47 (2), 139-147, (2008).
- Burhans, W. C. and Weinberger, M., “DNA damage and DNA replication stress in yeast models of aging”, *Aging research in yeast*, 187-206, (2012).
- Burtner, C. R., Murakami, C. J., Kennedy, B. K. and Kaerberlein, M., “A molecular mechanism of chronological aging in yeast”, *Cell cycle*, 8 (8), 1256-1270, (2009).
- Burtner, C. R., Murakami, C. J., Olsen, B., Kennedy, B. K. and Kaerberlein, M., “A genomic analysis of chronological longevity factors in budding yeast”, *Cell cycle*, 10 (9), 1385-1396, (2011).
- Burton, G. W. and Ingold, K., “ β -Carotene: an unusual type of lipid antioxidant”, *Science*, 224 (4649), 569-573, (1984).
- Buss, H., Chan, T. P., Sluis, K. B., Domigan, N. M. and Winterbourn, C. C., “Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method”, *Free Radical Biology and Medicine*, 23 (3), 361-366, (1997).
- Busti, S., Coccetti, P., Alberghina, L. and Vanoni, M., “Glucose signaling-mediated coordination of cell growth and cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Sensors*, 10 (6), 6195-6240, (2010).
- Butow, R. A. and Avadhani, N. G., “Mitochondrial signaling: the retrograde response”, *Molecular cell*, 14 (1), 1-15, (2004).
- Büttner, S., Eisenberg, T., Carmona-Gutierrez, D., Ruli, D., Knauer, H., Ruckenstuhl, C., ... and Madeo, F., “Endonuclease G regulates budding yeast life and death”, *Molecular cell*, 25 (2), 233-246, (2007).
- Caballero, A., Ugidos, A., Liu, B., Öling, D., Kvint, K., Hao, X., ... and Nyström, T., “Absence of mitochondrial translation control proteins extends life span by activating sirtuin-dependent silencing”, *Molecular cell*, 42 (3), 390-400, (2011).

Cabiscol, E., Piulats, E., Echave, P., Herrero, E. and Ros, J., “Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Journal of Biological Chemistry*, 275 (35), 27393-27398, (2000).

Cabiscol, E., Tamarit, J. and Ros, J., “Protein carbonylation: proteomics, specificity and relevance to aging”, *Mass spectrometry reviews*, 33 (1), 21-48, (2014).

Cabral, W. A., Tavaréz, U. L., Beeram, I., Yeritsyan, D., Boku, Y. D., Eckhaus, M. A., ... and Collins, F. S., “Genetic reduction of mTOR extends lifespan in a mouse model of Hutchinson-Gilford Progeria syndrome”, *Aging Cell*, 20 (9), e13457, (2021).

Cai, H. and Harrison, D. G., “Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress”, *Circulation research*, 87 (10), 840-844, (2000).

Caine, J., Sankovich, S., Antony, H., Waddington, L., Macreadie, P., Varghese, J. and Macreadie, I., “Alzheimer's A β fused to green fluorescent protein induces growth stress and a heat shock response”, *FEMS yeast research*, 7 (8), 1230-1236, (2007).

Calder, P. C., “Polyunsaturated fatty acids and inflammation”, *Biochemical Society Transactions*, 33 (2), 423-427, (2005).

Caliskan-Can, E., Miser-Salihoglu, E., Atalay, C., Yalcintas-Arslan, U., Simsek, B. and Yardim-Akaydin, S., “DNA damage and lipid peroxidation in several types of cancer”, *Fabad J. Pharm. Sci.*, 35 (3), 125-132, (2010).

Campdelacreu, J., “Parkinson's disease and Alzheimer disease: environmental risk factors”, *Neurología*, 29 (9), 541-549, (2014).

Campisi, J. and d'Adda di Fagagna, F., “Cellular senescence: when bad things happen to good cells”, *Nature reviews Molecular cell biology*, 8 (9), 729-740, (2007).

Campos, S. E. and DeLuna, A., “Functional genomics of dietary restriction and longevity in yeast”, *Mechanisms of Ageing and Development*, 179, 36-43, (2019).

Cannan, W. J. and Pederson, D. S., “Mechanisms and consequences of double-strand DNA break formation in chromatin”, *Journal of cellular physiology*, 231 (1), 3-14, (2016).

Carlson, M., “Regulation of sugar utilization in *Saccharomyces* species”, *Journal of Bacteriology*, 169 (11), 4873-4877, (1987).

Carmona-Gutiérrez, D., Bauer, M. A., Ring, J., Knauer, H., Eisenberg, T., Büttner, S., ... and Madeo, F., “The propeptide of yeast cathepsin D inhibits programmed necrosis”, *Cell death & disease*, 2 (5), e161-e161, (2011).

Carmona-Gutierrez, D., Eisenberg, T., Büttner, S., Meisinger, C., Kroemer, G. and Madeo, F., “Apoptosis in yeast: triggers, pathways, subroutines”, *Cell Death & Differentiation*, 17 (5), 763-773, (2010).

Carolina de Souza-Guerreiro, T., Meng, X., Dacheux, E., Firczuk, H. and McCarthy, J., “Translational control of gene expression noise and its relationship to ageing in yeast”, *The FEBS journal*, 288 (7), 2278-2293, (2021).

Carr, A. C. and Vissers, M. C., “Synthetic or food-derived vitamin C—are they equally bioavailable?”, *Nutrients*, 5 (11), 4284-4304, (2013).

Castro, J. P., Jung, T., Grune, T. and Siems, W., “4-Hydroxynonenal (HNE) modified proteins in metabolic diseases”, *Free Radical Biology and Medicine*, 111, 309-315, (2017).

Catalá, A., “Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions”, *Chemistry and physics of lipids*, 157 (1), 1-11, (2009).

Cavalier, A. N., Clayton, Z. S., Wahl, D., Hutton, D. A., McEntee, C. M., Seals, D. R. and LaRocca, T. J., “Protective effects of apigenin on the brain transcriptome with aging”, *Mechanisms of Ageing and Development*, 217, 111889, (2024).

Cedrowski, J., Litwinienko, G., Baschieri, A. and Amorati, R., “Hydroperoxyl Radicals (HOO.): Vitamin E Regeneration and H-Bond Effects on the Hydrogen Atom Transfer”, *Chemistry—A European Journal*, 22 (46), 16441-16445, (2016).

Chae, H. Z., Kim, H. J., Kang, S. W. and Rhee, S. G., “Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin”, *Diabetes research and clinical practice*, 45(2-3), 101-112, (1999).

Chakraborty, A., Ramani, P., Sherlin, H. J., Premkumar, P. and Natesan, A., “Antioxidant and pro-oxidant activity of Vitamin C in oral environment”, *Indian Journal of Dental Research*, 25 (4), 499-504, (2014).

Chakravarthi, S., Jessop, C. E. and Bulleid, N. J., “The role of glutathione in disulphide bond formation and endoplasmic-reticulum-generated oxidative stress”, *EMBO reports*, 7 (3), 271-275, (2006).

Chakravarti, B. and Chakravarti, D. N., “Oxidative modification of proteins: age-related changes”, *Gerontology*, 53 (3), 128-139, (2007).

Chandra, D. and Singh, K. K., “Genetic insights into OXPHOS defect and its role in cancer”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1807 (6), 620-625, (2011).

Chao, M. R., Rossner Jr, P., Haghdoust, S., Jeng, H. A. and Hu, C. W., “Nucleic acid oxidation in human health and disease”, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, (2013).

Chatterjee, A., “Reduced glutathione: a radioprotector or a modulator of DNA-repair activity?”, *Nutrients*, 5 (2), 525-542, (2013).

Chavez, J. D., Bisson, W. H. and Maier, C. S., “A targeted mass spectrometry-based approach for the identification and characterization of proteins containing α -amino adipic and γ -glutamic semialdehyde residues”, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 398, 2905-2914, (2010).

Chen, Q., Ding, Q. and Keller, J. N., “The stationary phase model of aging in yeast for the study of oxidative stress and age-related neurodegeneration”, *Biogerontology*, 6, 1-13, (2005).

Chen, Q., Kang, J. and Fu, C., “The independence of and associations among apoptosis, autophagy, and necrosis”, *Signal transduction and targeted therapy*, 3 (1), 18, (2018).

Chen, S. R., Dunigan, D. D. and Dickman, M. B., “Bcl-2 family members inhibit oxidative stress-induced programmed cell death in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Free Radical Biology and Medicine*, 34 (10), 1315-1325, (2003).

Chen, Z. X. and Pervaiz, S., “Bcl-2 induces pro-oxidant state by engaging mitochondrial respiration in tumor cells”, *Cell Death & Differentiation*, 14 (9), 1617-1627, (2007).

Cheng, E. H. Y., Sheiko, T. V., Fisher, J. K., Craigen, W. J. and Korsmeyer, S. J., “VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis”, *Science*, 301 (5632), 513-517, (2003).

Cheng, L., Liu, J., Wang, Q., Hu, H. and Zhou, L., “The Protective Effect of a Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Supernatant on UVB-Induced Skin Photodamage”, *Cells*, 13 (2), 156, (2024).

Cherry, J. M., Hong, E. L., Amundsen, C., Balakrishnan, R., Binkley, G., Chan, E. T., ... and Wong, E. D., “*Saccharomyces* Genome Database: the genomics resource of budding yeast”, *Nucleic acids research*, 40 (D1), D700-D705, (2012).

- Chiang, H. S. and Maric, M., “Lysosomal thiol reductase negatively regulates autophagy by altering glutathione synthesis and oxidation”, *Free Radical Biology and Medicine*, 51 (3), 688-699, (2011).
- Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Tewari, M. and Dixit, V. M., “FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis”, *Cell*, 81 (4), 505-512, (1995).
- Chiocchetti, A., Zhou, J., Zhu, H., Karl, T., Haubenreisser, O., Rinnerthaler, M., ... and Breitenbach-Koller, L., “Ribosomal proteins Rpl10 and Rps6 are potent regulators of yeast replicative life span”, *Experimental gerontology*, 42 (4), 275-286, (2007).
- Chipuk, J. E. and Green, D. R., “How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization?”, *Trends in cell biology*, 18 (4), 157-164, (2008).
- Choi, J. H., Lou, W. and Vancura, A., “A novel membrane-bound glutathione S-transferase functions in the stationary phase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*”, *Journal of Biological Chemistry*, 273 (45), 29915-29922, (1998).
- Choi, J., Rees, H. D., Weintraub, S. T., Levey, A. I., Chin, L. S. and Li, L., “Oxidative modifications and aggregation of Cu, Zn-superoxide dismutase associated with Alzheimer and Parkinson diseases”, *Journal of Biological Chemistry*, 280 (12), 11648-11655, (2005).
- Christ-Hazelhof, E. and Nugteren, D. H., “Purification and characterisation of prostaglandin endoperoxide D-isomerase, a cytoplasmic, glutathione-requiring enzyme”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 572 (1), 43-51, (1979).
- Churg, A., “Interactions of exogenous or evoked agents and particles: the role of reactive oxygen species”, *Free Radical Biology and Medicine*, 34 (10), 1230-1235, (2003).
- Ciacka, K., Tyimiński, M., Gniazdowska, A. and Krasuska, U., “Carbonylation of proteins—an element of plant ageing”, *Planta*, 252 (1), 12, (2020).
- Clemente, S. M., Martínez-Costa, O. H., Monsalve, M. and Samhan-Arias, A. K., “Targeting lipid peroxidation for cancer treatment”, *Molecules*, 25 (21), 5144, (2020).
- Cohen, A. A., Ferrucci, L., Fülöp, T., Gravel, D., Hao, N., Kriete, A., ... and Varadhan, R., “A complex systems approach to aging biology”, *Nature Aging*, 2 (7), 580-591, (2022).

Cohen, G. M., “Caspases: the executioners of apoptosis”, *Biochemical Journal*, 326 (1), 1-16, (1997).

Collinson, E. J. and Grant, C. M., “Role of yeast glutaredoxins as glutathione S-transferases”, *Journal of Biological Chemistry*, 278 (25), 22492-22497, (2003).

Collinson, E. J., Wheeler, G. L., Garrido, E. O., Avery, A. M., Avery, S. V. and Grant, C. M., “The yeast glutaredoxins are active as glutathione peroxidases”, *Journal of Biological Chemistry*, 277 (19), 16712-16717, (2002).

Collinson, L. P. and Dawes, I. W., “Inducibility of the response of yeast cells to peroxide stress”, *Microbiology*, 138 (2), 329-335, (1992).

Collinson, L. P. and Dawes, I. W., “Isolation, characterization and overexpression of the yeast gene, GLR1, encoding glutathione reductase”, *Gene*, 156 (1), 123-127, (1995).

Contour-Ansel, D., Torres-Franklin, M. L., Cruz De Carvalho, M. H., D'Arcy-Lameta, A. and Zuily-Fodil, Y., “Glutathione reductase in leaves of cowpea: cloning of two cDNAs, expression and enzymatic activity under progressive drought stress, desiccation and abscisic acid treatment”, *Annals of Botany*, 98 (6), 1279-1287, (2006).

Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M. and Lunec, J., “Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease”, *The FASEB Journal*, 17 (10), 1195-1214, (2003).

Coppedè, F. and Migliore, L., “DNA damage in neurodegenerative diseases”, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 776, 84-97, (2015).

Cordella, C. B., “PCA: the basic building block of chemometrics”, *Analytical chemistry*, 47, 567, (2012).

Correa-García, S., Bermúdez-Moretti, M., Travo, A., Déléris, G. and Forfar, I., “FTIR spectroscopic metabolome analysis of lyophilized and fresh *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells”, *Analytical Methods*, 6 (6), 1855-1861, (2014).

Corte, L., Rellini, P., Roscini, L., Fatichenti, F. and Cardinali, G., “Development of a novel, FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy) based, yeast bioassay for toxicity testing and stress response study”, *Analytica chimica acta*, 659 (1-2), 258-265, (2010).

Cory, S., Huang, D. and Adams, J. M., “The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis”, *Oncogene*, 22 (53), 8590-8607, (2003).

Couto, N., Malys, N., Gaskell, S. J. and Barber, J., “Partition and turnover of glutathione reductase from *Saccharomyces cerevisiae*: a proteomic approach”, *Journal of proteome research*, 12 (6), 2885-2894, (2013).

Couto, N., Schooling, S. R., Dutcher, J. R. and Barber, J., “Proteome profiles of outer membrane vesicles and extracellular matrix of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms”, *Journal of proteome research*, 14 (10), 4207-4222, (2015).

Couto, N., Wood, J. and Barber, J., “The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network”, *Free radical biology and medicine*, 95, 27-42, (2016).

Cozzolino, D., Cynkar, W. U., Shah, N. and Smith, P., “Multivariate data analysis applied to spectroscopy: Potential application to juice and fruit quality”, *Food Research International*, 44 (7), 1888-1896, (2011).

Cramer-Morales, K., Heer, C. D., Mapuskar, K. A. and Domann, F. E., “SOD2 targeted gene editing by CRISPR/Cas9 yields Human cells devoid of MnSOD”, *Free Radical Biology and Medicine*, 89, 379-386, (2015).

Crowley, L. C., Marfell, B. J., Scott, A. P. and Waterhouse, N. J., “Quantitation of apoptosis and necrosis by annexin V binding, propidium iodide uptake, and flow cytometry”, *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016 (11), pdb-prot087288, (2016).

Csiszar, K., “Lysyl oxidases: a novel multifunctional amine oxidase family”, *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 70, 1-32, (2001).

Cudkowicz, M. E., McKenna-Yasek, D., Sapp, P. E., Chin, W., Geller, B., Hayden, D. L., ... and Brown, R. H., “Epidemiology of mutations in superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis”, *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 41 (2), 210-221, (1997).

Culotta, V. C., “Superoxide dismutase, oxidative stress, and cell metabolism”, *Current topics in cellular regulation*, 36, 117-132, (2001).

Culotta, V. C., Yang, M. and O'Halloran, T. V., “Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1763 (7), 747-758, (2006).

Curran, S. P. and Ruvkun, G., “Lifespan regulation by evolutionarily conserved genes essential for viability”, *PLoS genetics*, 3 (4), e56, (2007).

Czabotar, P. E., Westphal, D., Dewson, G., Ma, S., Hockings, C., Fairlie, W. D., ... and Colman, P. M., “Bax crystal structures reveal how BH3 domains

activate Bax and nucleate its oligomerization to induce apoptosis”, *Cell*, 152 (3), 519-531, (2013).

Czachor, J., Miłek, M., Galiniak, S., Stępień, K., Dżugan, M. and Mołoń, M., “Coffee extends yeast chronological lifespan through antioxidant properties”, *International Journal of Molecular Sciences*, 21 (24), 9510, (2020).

D Silva, R., Manon, S., Goncalves, J., Saraiva, L. and Côte-Real, M., “The importance of humanized yeast to better understand the role of bcl-2 family in apoptosis: finding of novel therapeutic opportunities”, *Current Pharmaceutical Design*, 17 (3), 246-255, (2011).

D’arcy, M. S., “Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy”, *Cell biology international*, 43 (6), 582-592, (2019).

Da Cunha, F. M., Torelli, N. Q. and Kowaltowski, A. J., “Mitochondrial retrograde signaling: triggers, pathways, and outcomes”, *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2015 (1), 482582, (2015).

Dahiya, R., Mohammad, T., Alajmi, M. F., Rehman, M. T., Hasan, G. M., Hussain, A. and Hassan, M. I., “Insights into the conserved regulatory mechanisms of human and yeast aging”, *Biomolecules*, 10 (6), 882, (2020).

Dai, D. F., Santana, L. F., Vermulst, M., Tomazela, D. M., Emond, M. J., MacCoss, M. J., ... and Rabinovitch, P. S., “Overexpression of catalase targeted to mitochondria attenuates murine cardiac aging”, *Circulation*, 119 (21), 2789-2797, (2009).

Dakik, P., Rodriguez, M. E. L., Junio, J. A. B., Mitrofanova, D., Medkour, Y., Tafakori, T., ... and Titorenko, V. I., “Discovery of fifteen new geroprotective plant extracts and identification of cellular processes they affect to prolong the chronological lifespan of budding yeast”, *Oncotarget*, 11 (23), 2182, (2020).

Dalle-Donne, I., Aldini, G., Carini, M., Colombo, R., Rossi, R. and Milzani, A., “Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression”, *Journal of cellular and molecular medicine*, 10 (2), 389-406, (2006).

Dalle-Donne, I., Giustarini, D., Colombo, R., Rossi, R. and Milzani, A., “Protein carbonylation in human diseases”, *Trends in molecular medicine*, 9 (4), 169-176, (2003).

Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A. and Colombo, R., “Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress”, *Clinica chimica acta*, 329 (1-2), 23-38, (2003).

Dang, W., Steffen, K. K., Perry, R., Dorsey, J. A., Johnson, F. B., Shilatifard, A., ... and Berger, S. L., "Histone H4 lysine 16 acetylation regulates cellular lifespan", *Nature*, 459 (7248), 802-807, (2009).

Danial, N. N. and Korsmeyer, S. J., "Cell death: critical control points", *Cell*, 116 (2), 205-219, (2004).

Darzynkiewicz, Z., Galkowski, D. and Zhao, H., "Analysis of apoptosis by cytometry using TUNEL assay", *Methods*, 44 (3), 250-254, (2008).

Davalli, P., Mitic, T., Caporali, A., Lauriola, A. and D'Arca, D., "ROS, cell senescence, and novel molecular mechanisms in aging and age-related diseases", *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016 (1), 3565127, (2016).

David, S. S., O'Shea, V. L. and Kundu, S., "Base-excision repair of oxidative DNA damage", *Nature*, 447 (7147), 941-950, (2007).

Davies, M. J., "The oxidative environment and protein damage", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1703 (2), 93-109, (2005).

Dawes, I. W. and Perrone, G. G., "Stress and ageing in yeast", *FEMS yeast research*, 20 (1), foz085, (2020).

Dawes, I. W., "Stress responses", *The metabolism and molecular physiology of Saccharomyces cerevisiae*, CRC Press LLC, Boca Raton, FL, 376-438, (2004).

De Carvalho, M., De Mesquita, J. F. and Eleutherio, E., "In vivo characterization of I91T Sod2 polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae*", *Journal of Cellular Biochemistry*, 118 (5), 1078-1086, (2017).

De Lamirande, E. and Gagnon, C., "Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects", *Human reproduction*, 10(suppl_1), 15-21, (1995).

De Lamirande, E. and Gagnon, C., "Reactive oxygen species and human spermatozoa: I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes", *Journal of Andrology*, 13 (5), 368-378, (1992).

De Magalhaes, J. P., "Paternal genome effects on aging: Evidence for a role of Rasgrf1 in longevity determination?", *Mechanisms of Ageing and Development*, 132 (1-2), 72-73, (2011).

De Montellano, P. O. and Kerr, D. E., "Inactivation of catalase by phenylhydrazine. Formation of a stable aryl-iron heme complex", *Journal of Biological Chemistry*, 258 (17), 10558-10563, (1983).

Declercq, W., Berghe, T. V. and Vandenabeele, P., “RIP kinases at the crossroads of cell death and survival”, *Cell*, 138 (2), 229-232, (2009).

Deffieu, M., Bhatia-Kissova, I., Salin, B., Galinier, A., Manon, S. and Camougrand, N., “Glutathione participates in the regulation of mitophagy in yeast”, *Journal of Biological Chemistry*, 284 (22), 14828-14837, (2009).

Defossez, P. A., Prusty, R., Kaeberlein, M., Lin, S. J., Ferrigno, P., Silver, P. A., ... and Guarente, L., “Elimination of replication block protein Fob1 extends the life span of yeast mother cells”, *Molecular cell*, 3 (4), 447-455, (1999).

Del Valle, L. G., “Oxidative stress in aging: theoretical outcomes and clinical evidences in humans”, *Biomedicine & Aging Pathology*, 1 (1), 1-7, (2011).

Delaney, J. R., Murakami, C., Chou, A., Carr, D., Schleit, J., Sutphin, G. L., ... and Kaeberlein, M., “Dietary restriction and mitochondrial function link replicative and chronological aging in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Experimental gerontology*, 48 (10), 1006-1013, (2013).

Delaunay, A., Pflieger, D., Barrault, M. B., Vinh, J. and Toledano, M. B., “A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation”, *Cell*, 111 (4), 471-481, (2002).

Denecker, G., Vercammen, D., Declercq, W. and Vandenabeele, P., “Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors”, *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 58, 356-370, (2001).

Deneke, S. M. and Fanburg, B. L., “Regulation of cellular glutathione”, *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 257 (4), L163-L173, (1989).

Deprez, M. A., Eskes, E., Winderickx, J. and Wilms, T., “The TORC1-Sch9 pathway as a crucial mediator of chronological lifespan in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*”, *FEMS yeast research*, 18 (5), foy048, (2018).

Desa, D. E., Nichols, M. G. and Smith, H. J., “Aminoglycosides rapidly inhibit NAD (P) H metabolism increasing reactive oxygen species and cochlear cell demise”, *Journal of biomedical optics*, 24 (5), 051403-051403, (2019).

Devasagayam, T. P. A., Tilak, J. C., Boloor, K. K., Sane, K. S., Ghaskadbi, S. S. and Lele, R. D., “Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects”, *Japi*, 52 (794804), 4, (2004).

Devore, E. E., Harrison, S. L., Stone, K. L., Holton, K. F., Barrett-Connor, E., Ancoli-Israel, S., ... and Osteoporotic Fractures in Men (MrOS) Study

Research Group., “Association of urinary melatonin levels and aging-related outcomes in older men”, *Sleep medicine*, 23, 73-80, (2016).

Dewson, G., Kratina, T., Sim, H. W., Puthalakath, H., Adams, J. M., Colman, P. M. and Kluck, R. M., “To trigger apoptosis, Bak exposes its BH3 domain and homodimerizes via BH3: groove interactions”, *Molecular cell*, 30 (3), 369-380, (2008).

Dewson, G., Ma, S., Frederick, P., Hockings, C., Tan, I., Kratina, T. and Kluck, R. M., “Bax dimerizes via a symmetric BH3: groove interface during apoptosis”, *Cell Death & Differentiation*, 19 (4), 661-670, (2012).

Di Gregorio, S. E. and Duennwald, M. L., “Yeast as a model to study protein misfolding in aged cells”, *FEMS yeast research*, 18 (6), foy054, (2018).

Di Simplicio, P., Cheeseman, K. H. and Slater, T. F., “The reactivity of the SH group of bovine serum albumin with free radicals”, *Free radical research communications*, 14 (4), 253-262, (1991).

Dickinson, J. R. and Schweizer, M. (Eds.), *Metabolism and molecular physiology of Saccharomyces cerevisiae*, CRC press, (2004).

DiDonato, M., Craig, L., Huff, M. E., Thayer, M. M., Cardoso, R. M., Kassmann, C. J., ... and Tainer, J. A., “ALS mutants of human superoxide dismutase form fibrous aggregates via framework destabilization”, *Journal of molecular biology*, 332 (3), 601-615, (2003).

Dikilitas, M., Guldur, M. E., Deryaoglu, A. and Erel, O., “Antioxidant and oxidant levels of pepper (*Capsicum annuum* cv.'Charlee') infected with pepper mild mottle virus”, *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 39 (2), 58-63, (2011).

Dionisi, O., Galeotti, T., Terranova, T. and Azzi, A., “Superoxide radicals and hydrogen peroxide formation in mitochondria from normal and neoplastic tissues”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 403 (2), 292-300, (1975).

Dix, T. A. and Aikens, J., “Mechanisms and biological relevance of lipid peroxidation initiation”, *Chemical research in toxicology*, 6 (1), 2-18, (1993).

Dizdaroglu, M. and Jaruga, P., “Mechanisms of free radical-induced damage to DNA”, *Free radical research*, 46 (4), 382-419, (2012).

D'mello, N. P., Childress, A. M., Franklin, D. S., Kale, S. P., Pinswasdi, C. and Jazwinski, S. M., “Cloning and characterization of LAG1, a longevity-assurance gene in yeast”, *Journal of Biological Chemistry*, 269 (22), 15451-15459, (1994).

- Do, D. T., Fickers, P. and Ben Tahar, I., "Improvement of glutathione production by a metabolically engineered *Yarrowia lipolytica* strain using a small-scale optimization approach", *Biotechnology Letters*, 43, 407-414, (2021).
- Dong, X. X., Wang, Y. and Qin, Z. H., "Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases", *Acta Pharmacologica Sinica*, 30 (4), 379-387, (2009).
- Doudican, N. A., Song, B., Shadel, G. S. and Doetsch, P. W., "Oxidative DNA damage causes mitochondrial genomic instability in *Saccharomyces cerevisiae*", *Molecular and cellular biology*, 25 (12), 5196-5204, (2005).
- Douzery, E. J., Snell, E. A., Baptiste, E., Delsuc, F. and Philippe, H., "The timing of eukaryotic evolution: does a relaxed molecular clock reconcile proteins and fossils?", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101 (43), 15386-15391, (2004).
- Drakulic, T., Temple, M. D., Guido, R., Jarolim, S., Breitenbach, M., Attfield, P. V. and Dawes, I. W., "Involvement of oxidative stress response genes in redox homeostasis, the level of reactive oxygen species, and ageing in *Saccharomyces cerevisiae*", *FEMS yeast research*, 5 (12), 1215-1228, (2005).
- Dubocovich, M. L., Delagrange, P., Krause, D. N., Sugden, D., Cardinali, D. P. and Olcese, J., "International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, classification, and pharmacology of G protein-coupled melatonin receptors", *Pharmacological reviews*, 62 (3), 343-380, (2010).
- Dubois-Deruy, E., Peugnet, V., Turkieh, A. and Pinet, F., "Oxidative stress in cardiovascular diseases", *Antioxidants*, 9 (9), 864, (2020).
- Duina, A. A., Miller, M. E. and Keeney, J. B., "Budding yeast for budding geneticists: a primer on the *Saccharomyces cerevisiae* model system", *Genetics*, 197 (1), 33-48, (2014).
- Dujon, B., "The yeast genome project: what did we learn?", *Trends in Genetics*, 12 (7), 263-270, (1996).
- Duke, R. C., Ojcius, D. M. and Young, J. D. E., "Cell suicide in health and disease", *Scientific American*, 275 (6), 80-87, (1996).
- Dyall, S. C., Balas, L., Bazan, N. G., Brenna, J. T., Chiang, N., da Costa Souza, F., ... and Taha, A. Y., "Polyunsaturated fatty acids and fatty acid-derived lipid mediators: Recent advances in the understanding of their biosynthesis, structures, and functions", *Progress in lipid research*, 86, 101165, (2022).

Edlich, F., Banerjee, S., Suzuki, M., Cleland, M. M., Arnoult, D., Wang, C., ... and Youle, R. J., “Bcl-xL retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol”, *Cell*, 145 (1), 104-116, (2011).

Egilmez, N. K. and Jazwinski, S. M., “Evidence for the involvement of a cytoplasmic factor in the aging of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*”, *Journal of bacteriology*, 171 (1), 37-42, (1989).

Eigenfeld, M., Kerpes, R. and Becker, T., “Understanding the impact of industrial stress conditions on replicative aging in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Frontiers in Fungal Biology*, 2, 665490, (2021).

Eisenberg, T., Carmona-Gutierrez, D., Büttner, S., Tavernarakis, N. and Madeo, F., “Necrosis in yeast”, *Apoptosis*, 15, 257-268, (2010).

Eisenberg, T., Knauer, H., Schauer, A., Büttner, S., Ruckenstuhl, C., Carmona-Gutierrez, D., ... and Madeo, F., “Induction of autophagy by spermidine promotes longevity”, *Nature cell biology*, 11 (11), 1305-1314, (2009).

Eleutherio, E., de Araujo Brasil, A., França, M. B., de Almeida, D., Rona, G. B. and Magalhães, R., “Oxidative stress and aging: Learning from yeast lessons”, *Fungal biology*, 122 (6), 514-525, (2018).

Ellerby, L. M., Ellerby, H. M., Park, S. M., Holleran, A. L., Murphy, A. N., Fiskum, G., ... and Bredeisen, D. E., “Shift of the cellular oxidation-reduction potential in neural cells expressing Bcl-2”, *Journal of neurochemistry*, 67 (3), 1259-1267, (1996).

Elmacı, S. B., Özçelik, F., Tokatlı, M. and Çakır, İ., “Technological properties of indigenous wine yeast strains isolated from wine production regions of Turkey”, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 105 (5), 835-847, (2014).

Elmore, S. P., Qian, T., Grissom, S. F. and Lemasters, J. J., “The mitochondrial permeability transition initiates autophagy in rat hepatocytes”, *The FASEB Journal*, 15 (12), 1-17, (2001).

Elmore, S., “Apoptosis: a review of programmed cell death”, *Toxicologic pathology*, 35 (4), 495-516, (2007).

Engel, S. R., Dietrich, F. S., Fisk, D. G., Binkley, G., Balakrishnan, R., Costanzo, M. C., ... and Cherry, J. M., “The reference genome sequence of *Saccharomyces cerevisiae*: then and now”, *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 4 (3), 389-398, (2014).

Engel, S. R., Wong, E. D., Nash, R. S., Aleksander, S., Alexander, M., Douglass, E., ... and Cherry, J. M., “New data and collaborations at the

Saccharomyces Genome Database: updated reference genome, alleles, and the Alliance of Genome Resources”, *Genetics*, 220 (4), iyab224, (2022).

Enjalbert, B., MacCallum, D. M., Odds, F. C. and Brown, A. J., “Niche-specific activation of the oxidative stress response by the pathogenic fungus *Candida albicans*”, *Infection and immunity*, 75 (5), 2143-2151, (2007).

Enjalbert, B., Nantel, A. and Whiteway, M., “Stress-induced gene expression in *Candida albicans*: absence of a general stress response”, *Molecular biology of the cell*, 14 (4), 1460-1467, (2003).

Erel, O., “A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status”, *Clinical biochemistry*, 38 (12), 1103-1111, (2005).

Erel, O., “A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation”, *Clinical biochemistry*, 37 (4), 277-285, (2004).

Erjavec, N. and Nyström, T., “Sir2p-dependent protein segregation gives rise to a superior reactive oxygen species management in the progeny of *Saccharomyces cerevisiae*”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104 (26), 10877-10881, (2007).

Erjavec, N., Larsson, L., Grantham, J. and Nyström, T., “Accelerated aging and failure to segregate damaged proteins in Sir2 mutants can be suppressed by overproducing the protein aggregation-remodeling factor Hsp104p”, *Genes & development*, 21 (19), 2410-2421, (2007).

Ermini, M., “Ageing changes in mammalian skeletal muscle: biochemical studies”, *Gerontology*, 22 (4), 301-316, (1976).

Escobar, K. A., Cole, N. H., Mermier, C. M. and VanDusseldorp, T. A., “Autophagy and aging: Maintaining the proteome through exercise and caloric restriction”, *Aging cell*, 18 (1), e12876, (2019).

Esterbauer, H., Schaur, R. J. and Zollner, H., “Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes”, *Free radical Biology and medicine*, 11 (1), 81-128, (1991).

Esteves, F., Rueff, J. and Kranendonk, M., “The central role of cytochrome P450 in xenobiotic metabolism—a brief review on a fascinating enzyme family”, *Journal of xenobiotics*, 11 (3), 94-114, (2021).

Evans, M. V., Turton, H. E., Grant, C. M. and Dawes, I. W., “Toxicity of linoleic acid hydroperoxide to *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of a respiration-related process for maximal sensitivity and adaptive response”, *Journal of bacteriology*, 180 (3), 483-490, (1998).

Evans, M., Cooke, M. and Singh, K. K., “Lipid-and protein-mediated oxidative damage to DNA”, *Oxidative Stress, Disease and Cancer*, London: Imperial College Press, 2006, 201-20, (2006).

Fabbrini, E., Serafini, M., Colic Baric, I., Hazen, S. L. and Klein, S., “Effect of plasma uric acid on antioxidant capacity, oxidative stress, and insulin sensitivity in obese subjects”, *Diabetes*, 63 (3), 976-981, (2014).

Fabrizio, P. and Longo, V. D., “The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*”, *Biological Aging: Methods and Protocols*, 371, 89-95, (2007).

Fabrizio, P., Battistella, L., Vardavas, R., Gattazzo, C., Liou, L. L., Diaspro, A., ... and Longo, V. D., “Superoxide is a mediator of an altruistic aging program in *Saccharomyces cerevisiae*”, *The Journal of cell biology*, 166 (7), 1055-1067, (2004).

Fabrizio, P., Hoon, S., Shamalnasab, M., Galbani, A., Wei, M., Giaever, G., ... and Longo, V. D., “Genome-wide screen in *Saccharomyces cerevisiae* identifies vacuolar protein sorting, autophagy, biosynthetic, and tRNA methylation genes involved in life span regulation”, *PLoS genetics*, 6 (7), e1001024, (2010).

Fabrizio, P., Li, L. and Longo, V. D., “Analysis of gene expression profile in yeast aging chronologically”, *Mechanisms of ageing and development*, 126 (1), 11-16, (2005).

Fabrizio, P., Liou, L. L., Moy, V. N., Diaspro, A., Valentine, J. S., Gralla, E. B. and Longo, V. D., “SOD2 functions downstream of Sch9 to extend longevity in yeast”, *Genetics*, 163 (1), 35-46, (2003).

Fabrizio, P., Pletcher, S. D., Minois, N., Vaupel, J. W. and Longo, V. D., “Chronological aging-independent replicative life span regulation by Msn2/Msn4 and Sod2 in *Saccharomyces cerevisiae*”, *FEBS letters*, 557 (1-3), 136-142, (2004).

Fabrizio, P., Pozza, F., Pletcher, S. D., Gendron, C. M. and Longo, V. D., “Regulation of longevity and stress resistance by Sch9 in yeast”, *Science*, 292 (5515), 288-290, (2001).

Fadok, V. A., Bratton, D. L., Rose, D. M., Pearson, A., Ezekewitz, R. A. B. and Henson, P. M., “A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells”, *Nature*, 405 (6782), 85-90, (2000).

Fadok, V. A., De Cathelineau, A., Daleke, D. L., Henson, P. M. and Bratton, D. L., “Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by

macrophages and fibroblasts”, *Journal of Biological Chemistry*, 276 (2), 1071-1077, (2001).

Fadok, V. A., Voelker, D. R., Campbell, P. A., Cohen, J. J., Bratton, D. L. and Henson, P. M., “Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages”, *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 148 (7), 2207-2216, (1992).

Fahrenkrog, B., Sauder, U. and Aebi, U., “The *S. cerevisiae* HtrA-like protein Nma111p is a nuclear serine protease that mediates yeast apoptosis”, *Journal of cell science*, 117 (1), 115-126, (2004).

Fan, T. J., Han, L. H., Cong, R. S. and Liang, J., “Caspase family proteases and apoptosis”, *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 37 (11), 719-727, (2005).

Fang, J. and Beattie, D. S., “External alternative NADH dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*: a potential source of superoxide”, *Free Radical Biology and Medicine*, 34 (4), 478-488, (2003).

Farhat, Z., Browne, R. W., Bonner, M. R., Tian, L., Deng, F., Swanson, M. and Mu, L., “How do glutathione antioxidant enzymes and total antioxidant status respond to air pollution exposure?”, *Environment international*, 112, 287-293, (2018).

Farrugia, G. and Balzan, R., “Oxidative stress and programmed cell death in yeast”, *Frontiers in oncology*, 2, 64, (2012).

Favaloro, B., Allocati, N., Graziano, V., Di Ilio, C. and De Laurenzi, V., “Role of apoptosis in disease”, *Aging (Albany NY)*, 4 (5), 330, (2012).

Favre, C. N., Aguilar, P. S. and Carrillo, M. A. C., “Oxidative stress and chronological aging in glycogen-phosphorylase-deleted yeast”, *Free Radical Biology and Medicine*, 45 (10), 1446-1456, (2008).

Fedorova, M., Bollineni, R. C. and Hoffmann, R., “Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: update of analytical strategies”, *Mass spectrometry reviews*, 33 (2), 79-97, (2014).

Feldmann, H., “Yeast: molecular and cell biology”, *John Wiley & Sons*, (2011).

Feng, K., Song, X., Tan, F., Li, Y. H., Zhou, Y. C. and Li, J. H., “Topological analysis and prediction of aging genes in *Mus musculus*”, *2012 International Conference on Systems and Informatics*, 2268-2271, (2012, May).

Feng, Z., Hu, W., Marnett, L. J. and Tang, M. S., “Malondialdehyde, a major endogenous lipid peroxidation product, sensitizes human cells to UV-and BPDE-induced killing and mutagenesis through inhibition of nucleotide excision repair”, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 601 (1-2), 125-136, (2006).

Fernandes, P. N., Mannarino, S. C., Silva, C. G., Pereira, M. D., Panek, A. D. and Eleutherio, E. C., “Oxidative stress response in eukaryotes: effect of glutathione, superoxide dismutase and catalase on adaptation to peroxide and menadione stresses in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Redox Report*, 12 (5), 236-244, (2007).

Feser, J., Truong, D., Das, C., Carson, J. J., Kieft, J., Harkness, T. and Tyler, J. K., “Elevated histone expression promotes life span extension”, *Molecular cell*, 39 (5), 724-735, (2010).

Fiers, W., Beyaert, R., Declercq, W. and Vandenabeele, P., “More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage”, *Oncogene*, 18 (54), 7719-7730, (1999).

Fink, S. L. and Cookson, B. T., “Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells”, *Infection and immunity*, 73 (4), 1907-1916, (2005).

Flatt, T. and Partridge, L., “Horizons in the evolution of aging”, *BMC biology*, 16, 1-13, (2018).

Flattery-O'Brien, J., Collinson, L. P. and Dawes, I. W., “*Saccharomyces cerevisiae* has an inducible response to menadione which differs from that to hydrogen peroxide”, *Microbiology*, 139 (3), 501-507, (1993).

Flattery-O'Brien, J. A. and Dawes, I. W., “Hydrogen peroxide causes RAD9-dependent cell cycle arrest in G2 in *Saccharomyces cerevisiae* whereas menadione causes G1 arrest independent of RAD9 function”, *Journal of Biological Chemistry*, 273 (15), 8564-8571, (1998).

Flohé, L. and Brigelius-Flohé, R., “Selenoproteins of the glutathione peroxidase family”, *Selenium: Its Molecular Biology and Role in Human Health*, New York: Springer New York, 167-180, (2011).

Floor, E. and Wetzel, M. G., “Increased protein oxidation in human substantia nigra pars compacta in comparison with basal ganglia and prefrontal cortex measured with an improved dinitrophenylhydrazine assay”, *Journal of neurochemistry*, 70 (1), 268-275, (1998).

Floyd, R. A., “Oxidative damage to behavior during aging”, *Science*, 254 (5038), 1597, (1991).

Flynn, J. M. and Melov, S., “SOD2 in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration”, *Free Radical Biology and Medicine*, 62, 4-12, (2013).

Fontana, L., Partridge, L. and Longo, V. D., “Extending healthy life span—from yeast to humans”, *Science*, 328 (5976), 321-326, (2010).

Forman, H. J. and Zhang, H., “Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy”, *Nature Reviews Drug Discovery*, 20 (9), 689-709, (2021).

Forman, H. J., Zhang, H. and Rinna, A., “Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis”, *Molecular aspects of medicine*, 30 (1-2), 1-12, (2009).

Foster, M. W., Forrester, M. T. and Stamler, J. S., “A protein microarray-based analysis of S-nitrosylation”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106 (45), 18948-18953, (2009).

Freeman, B. A., Young, S. L. and Crapo, J. D., “Liposome-mediated augmentation of superoxide dismutase in endothelial cells prevents oxygen injury”, *Journal of Biological Chemistry*, 258 (20), 12534-12542, (1983).

Fridovich, I., “Superoxide radical and superoxide dismutases”, *Oxygen and Living Processes: An Interdisciplinary Approach*, 250-272, (1981).

Fröhlich, K. U. and Madeo, F., “Apoptosis in yeast: a new model for aging research”, *Experimental gerontology*, 37 (1), 27-31, (2001).

Fröhlich, K. U., Fussi, H. and Ruckstuhl, C., “Yeast apoptosis—from genes to pathways”, *Seminars in cancer biology*, Academic Press, 17 (2), 112-121, (2007).

Fu, S., Gebicki, S., Jessup, W., Gebicki, J. M. and Dean, R. T., “Biological fate of amino acid, peptide and protein hydroperoxides”, *Biochemical Journal*, 311 (3), 821-827, (1995).

Fulda, S., Gorman, A. M., Hori, O. and Samali, A., “Cellular stress responses: cell survival and cell death”, *International journal of cell biology*, 2010 (1), 214074, (2010).

Gaillard, H., García-Muse, T. and Aguilera, A., “Replication stress and cancer”, *Nature Reviews Cancer*, 15 (5), 276-289, (2015).

Galagan, J. E., Henn, M. R., Ma, L. J., Cuomo, C. A. and Birren, B., “Genomics of the fungal kingdom: insights into eukaryotic biology”, *Genome research*, 15 (12), 1620-1631, (2005).

Galano, A., Tan, D. X. and Reiter, R. J., “Melatonin: a versatile protector against oxidative DNA damage”, *Molecules*, 23 (3), 530, (2018).

Galiazzo, F., Schiesser, A. and Rotilio, G., "Glutathione peroxidase in yeast. Presence of the enzyme and induction by oxidative conditions", *Biochemical and biophysical research communications*, 147 (3), 1200-1205, (1987).

Galichet, A., Sockalingum, G. D., Belarbi, A. and Manfait, M., "FTIR spectroscopic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls: study of an anomalous strain exhibiting a pink-colored cell phenotype", *FEMS microbiology letters*, 197 (2), 179-186, (2001).

Galluzzi, L., Maiuri, M. C., Vitale, I., Zischka, H., Castedo, M., Zitvogel, L. and Kroemer, G., "Cell death modalities: classification and pathophysiological implications", *Cell Death & Differentiation*, 14 (7), (2007).

Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J. M., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., ... and Kroemer, G., "Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012", *Cell Death & Differentiation*, 19 (1), 107-120, (2012).

Gamliel, A., Afri, M. and Frimer, A. A., "Determining radical penetration of lipid bilayers with new lipophilic spin traps", *Free Radical Biology and Medicine*, 44 (7), 1394-1405, (2008).

Gan, Z. R., "Yeast thioredoxin genes", *Journal of Biological Chemistry*, 266 (3), 1692-1696, (1991).

Garcerá, A., Barreto, L., Piedrafita, L., Tamarit, J. and Herrero, E., "Saccharomyces cerevisiae cells have three Omega class glutathione S-transferases acting as 1-Cys thiol transferases", *Biochemical Journal*, 398 (2), 187-196, (2006).

García-Trejo, S. S., Gómez-Sierra, T., Eugenio-Pérez, D., Medina-Campos, O. N. and Pedraza-Chaverri, J., "Protective Effect of Curcumin on D-Galactose-Induced Senescence and Oxidative Stress in LLC-PK1 and HK-2 Cells", *Antioxidants*, 13 (4), 415, (2024).

Gardner, A., Xu, F. H., Fady, C., Sarafian, T., Tu, Y. and Lichtenstein, A., "Evidence against the hypothesis that BCL-2 inhibits apoptosis through an anti-oxidant effect", *Cell Death & Differentiation*, 4 (6), 487-496, (1997).

Garrido, E. O. and Grant, C. M., "Role of thioredoxins in the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress induced by hydroperoxides", *Molecular Microbiology*, 43 (4), 993-1003, (2002).

Gasch, A. P., Spellman, P. T., Kao, C. M., Carmel-Harel, O., Eisen, M. B., Storz, G., ... and Brown, P. O., "Genomic expression programs in the

response of yeast cells to environmental changes”, *Molecular biology of the cell*, 11 (12), 4241-4257, (2000).

Gasparri, F. and Muzio, M., “Monitoring of apoptosis of HL60 cells by Fourier-transform infrared spectroscopy”, *Biochemical Journal*, 369 (2), 239-248, (2003).

Gaucher, C., Boudier, A., Bonetti, J., Clarot, I., Leroy, P. and Parent, M., “Glutathione: antioxidant properties dedicated to nanotechnologies”, *Antioxidants*, 7 (5), 62, (2018).

Gautam, R., Chandrasekar, B., Deobagkar-Lele, M., Rakshit, S., Kumar, V., Umapathy, S. and Nandi, D., “Identification of early biomarkers during acetaminophen-induced hepatotoxicity by Fourier transform infrared microspectroscopy”, *PLoS ONE*, 7 (9), e45521, (2012).

Gavathiotis, E., Reyna, D. E., Davis, M. L., Bird, G. H. and Walensky, L. D., “BH3-triggered structural reorganization drives the activation of proapoptotic BAX”, *Molecular cell*, 40 (3), 481-492, (2010).

Gavathiotis, E., Suzuki, M., Davis, M. L., Pitter, K., Bird, G. H., Katz, S. G., ... and Walensky, L. D., “BAX activation is initiated at a novel interaction site”, *Nature*, 455 (7216), 1076-1081, (2008).

Gavrieli, Y., Sherman, Y. and Ben-Sasson, S. A., “Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation”, *The Journal of cell biology*, 119 (3), 493-501, (1992).

Ge, C., Spånning, E., Glaser, E. and Wieslander, Å., “Import determinants of organelle-specific and dual targeting peptides of mitochondria and chloroplasts in *Arabidopsis thaliana*”, *Molecular plant*, 7 (1), 121-136, (2014).

Gebicki, S., Gill, K. H., Dean, R. T. and Gebicki, J. M., “Action of peroxidases on protein hydroperoxides”, *Redox Report*, 7 (4), 235-242, (2002).

Gentile, F., Arcaro, A., Pizzimenti, S., Daga, M., Cetrangolo, G. P., Dianzani, C., ... and Barrera, G., “DNA damage by lipid peroxidation products: implications in cancer, inflammation and autoimmunity”, *AIMS genetics*, 4 (02), 103-137, (2017).

Gershon, H. and Gershon, D., “The budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, as a model for aging research: a critical review”, *Mechanisms of ageing and development*, 120 (1-3), 1-22, (2000).

Ghosh, R. and Mitchell, D. L., “Effect of oxidative DNA damage in promoter elements on transcription factor binding”, *Nucleic acids research*, 27 (15), 3213-3218, (1999).

Gianazza, E., Brioschi, M., Martinez Fernandez, A., Casalnuovo, F., Altomare, A., Aldini, G., and Banfi, C., “Lipid peroxidation in atherosclerotic cardiovascular diseases”, *Antioxidants & redox signaling*, 34 (1), 49-98, (2021).

Gilberger, T. W., Bergmann, B., Walter, R. D. and Müller, S., “The role of the C-terminus for catalysis of the large thioredoxin reductase from *Plasmodium falciparum*”, *FEBS letters*, 425 (3), 407-410, (1998).

Giles, G. I., Nasim, M. J., Ali, W. and Jacob, C., “The reactive sulfur species concept: 15 years on”, *Antioxidants*, 6 (2), 38, (2017).

Giles, S. S., Stajich, J. E., Nichols, C., Gerrald, Q. D., Alspaugh, J. A., Dietrich, F. and Perfect, J. R., “The *Cryptococcus neoformans* catalase gene family and its role in antioxidant defense”, *Eukaryotic Cell*, 5 (9), 1447-1459, (2006).

Girotti, A. W., “Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems”, *Journal of lipid research*, 39 (8), 1529-1542, (1998).

Giustarini, D., Colombo, G., Garavaglia, M. L., Astori, E., Portinaro, N. M., Reggiani, F., ... and Dalle-Donne, I., “Assessment of glutathione/glutathione disulphide ratio and S-glutathionylated proteins in human blood, solid tissues, and cultured cells”, *Free Radical Biology and Medicine*, 112, 360-375, (2017).

Gladyshev, V. N., Stadtman, T. C., Hatfield, D. L. and Jeang, K. T., “Levels of major selenoproteins in T cells decrease during HIV infection and low molecular mass selenium compounds increase”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96 (3), 835-839, (1999).

Glorieux, C. and Calderon, P. B., “Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach”, *Biological chemistry*, 398 (10), 1095-1108, (2017).

Godic, A., Poljšak, B., Adamic, M. and Dahmane, R., “The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment”, *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2014 (1), 860479, (2014).

Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., ... and Oliver, S. G., “Life with 6000 genes”, *Science*, 274 (5287), 546-567, (1996).

Gomes, F. M., Ramos, I. B., Wendt, C., Girard-Dias, W., De Souza, W., Machado, E. A. and Miranda, E. K., “New insights into the in situ microscopic visualization and quantification of inorganic polyphosphate stores by 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)-staining”, *European Journal of Histochemistry*, 57 (4), e34, (2013).

Gomi, I., Fukushima, H., Shiraki, M., Miwa, Y., Ando, T., Takai, K. and Moriwaki, H., “Relationship between serum albumin level and aging in community-dwelling self-supported elderly population”, *Journal of nutritional science and vitaminology*, 53 (1), 37-42, (2007).

Gonos, E. S., Kapetanou, M., Sereikaite, J., Bartosz, G., Naparło, K., Grzesik, M. and Sadowska-Bartos, I., “Origin and pathophysiology of protein carbonylation, nitration and chlorination in age-related brain diseases and aging”, *Aging (Albany NY)*, 10 (5), 868, (2018).

Gorczyca, W., Bruno, S., Darzynkiewicz, R. J., Gong, J. P. and Darzynkiewicz, Z., “DNA strand breaks occurring during apoptosis-their early insitu detection by the terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays and prevention by serine protease inhibitors”, *International journal of oncology*, 1 (6), 639-648, (1992).

Goschorska, M., Gutowska, I., Baranowska-Bosiacka, I., Piotrowska, K., Metryka, E., Safranow, K. and Chlubek, D., “Influence of acetylcholinesterase inhibitors used in Alzheimer’s Disease treatment on the activity of antioxidant enzymes and the concentration of glutathione in THP-1 macrophages under fluoride-induced oxidative stress”, *International journal of environmental research and public health*, 16 (1), 10, (2019).

Goth, L. and Eaton, J. W., “Hereditary catalase deficiencies and increased risk of diabetes”, *The Lancet*, 356 (9244), 1820-1821, (2000).

Góth, L., Rass, P. and Páy, A., “Catalase enzyme mutations and their association with diseases”, *Molecular Diagnosis*, 8, 141-149, (2004).

Gottlieb, E., Vander Heiden, M. G. and Thompson, C. B., “Bcl-xL prevents the initial decrease in mitochondrial membrane potential and subsequent reactive oxygen species production during tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis”, *Molecular and cellular biology*, 20 (15), 5680-5689, (2000).

Gourlay, C. W., Carpp, L. N., Timpson, P., Winder, S. J. and Ayscough, K. R., “A role for the actin cytoskeleton in cell death and aging in yeast”, *The Journal of cell biology*, 164 (6), 803-809, (2004).

Gralla, E. B. and Kosman, D. J., “Molecular genetics of superoxide dismutases in yeasts and related fungi”, *Advances in Genetics*, 30, 251-319, (1992).

Gralla, E. B. and Valentine, J. S., “Null mutants of *Saccharomyces cerevisiae* Cu, Zn superoxide dismutase: characterization and spontaneous mutation rates”, *Journal of Bacteriology*, 173 (18), 5918-5920, (1991).

Grant, C. M., Collinson, L. P., Roe, J. H. and Dawes, I. W., “Yeast glutathione reductase is required for protection against oxidative stress and is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation”, *Molecular microbiology*, 21 (1), 171-179, (1996a).

Grant, C. M., MacIver, F. H. and Dawes, I. W., “Glutathione is an essential metabolite required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*”, *Current genetics*, 29, 511-515, (1996c).

Grant, C. M., MacIver, F. H. and Dawes, I. W., “Stationary-phase induction of GLR1 expression is mediated by the yAP-1 transcriptional regulatory protein in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*”, *Molecular microbiology*, 22 (4), 739-746, (1996b).

Grant, C. M., Perrone, G. and Dawes, I. W., “Glutathione and catalase provide overlapping defenses for protection against hydrogen peroxide in the yeast *saccharomyces cerevisiae*”, *Biochemical and biophysical research communications*, 253 (3), 893-898, (1998).

Gray, D. A. and Woulfe, J., “Lipofuscin and aging: a matter of toxic waste”, *Science of Aging Knowledge Environment*, 2005 (5), re1-re1, (2005).

Gray, J. V., Petsko, G. A., Johnston, G. C., Ringe, D., Singer, R. A. and Werner-Washburne, M., “Sleeping beauty: quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Microbiology and molecular biology reviews*, 68 (2), 187-206, (2004).

Griveau, J. F., Dumont, E., Renard, P., Callegari, J. P. and Le Lannou, D., “Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa”, *Reproduction*, 103 (1), 17-26, (1995).

Grogan, S. P., Lotz, M. K. and D’Lima, D. D., “Potential Mechanisms of PTA: Cell Death”, *Post-Traumatic Arthritis: Pathogenesis, Diagnosis and Management*, 185-199, (2015).

Gross, A. and Katz, S. G., “Non-apoptotic functions of BCL-2 family proteins”, *Cell Death & Differentiation*, 24 (8), 1348-1358, (2017).

- Gross, A., McDonnell, J. M. and Korsmeyer, S. J., “BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis”, *Genes & development*, 13 (15), 1899-1911, (1999).
- Grunstein, M. and Gasser, S. M., “Epigenetics in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5 (7), a017491, (2013).
- Gu, F., Chauhan, V. and Chauhan, A., “Glutathione redox imbalance in brain disorders”, *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 18 (1), 89-95, (2015).
- Guicciardi, M. E. and Gores, G. J., “Life and death by death receptors”, *The FASEB Journal*, 23 (6), 1625, (2009).
- Guidot, D. M., McCord, J. M., Wright, R. M. and Repine, J. E., “Absence of electron transport (Rho 0 state) restores growth of a manganese-superoxide dismutase-deficient *Saccharomyces cerevisiae* in hyperoxia. Evidence for electron transport as a major source of superoxide generation in vivo”, *Journal of Biological Chemistry*, 268 (35), 26699-26703, (1993).
- Gump, J. M. and Thorburn, A., “Autophagy and apoptosis: what is the connection?”, *Trends in cell biology*, 21 (7), 387-392, (2011).
- Gunstone, F. D., *Fatty acid and lipid chemistry*, Springer, (2012).
- Guo, C., Zhang, H., Guan, X. and Zhou, Z., “The anti-aging potential of neohesperidin and its synergistic effects with other citrus flavonoids in extending chronological lifespan of *saccharomyces cerevisiae* BY4742”, *Molecules*, 24 (22), 4093, (2019).
- Gupta, S., Yel, L., Kim, D., Kim, C., Chiplunkar, S. and Gollapudi, S., “Arsenic trioxide induces apoptosis in peripheral blood T lymphocyte subsets by inducing oxidative stress: a role of Bcl-2”, *Molecular cancer therapeutics*, 2 (8), 711-719, (2003).
- Güner, G., İşlekel, H., Oto, Ö., Hazan, E. and Açikel, Ü., “Evaluation of some antioxidant enzymes in lung carcinoma tissue”, *Cancer Letters*, 103 (2), 233-239, (1996).
- Haber, J. E., “Mating-type genes and MAT switching in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Genetics*, 191 (1), 33-64, (2012).
- Häcker, G., “The morphology of apoptosis”, *Cell and tissue research*, 301, 5-17, (2000).

- Hajam, Y. A., Rani, R., Ganie, S. Y., Sheikh, T. A., Javaid, D., Qadri, S. S., ... and Reshi, M. S., "Oxidative stress in human pathology and aging: molecular mechanisms and perspectives", *Cells*, 11 (3), 552, (2022).
- Hajeyah, A. A., Griffiths, W. J., Wang, Y., Finch, A. J. and O'Donnell, V. B., "The biosynthesis of enzymatically oxidized lipids", *Frontiers in endocrinology*, 11, 591819, (2020).
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M., Free radicals in biology and medicine, Oxford university press, USA, (2015).
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M., Oxidative stress and antioxidant protection: some special cases, Free radicals in biology and medicine, Oxford: Oxford University Press, 485-489, (1999).
- Halliwell, B., "Oxidative stress and cancer: have we moved forward?", *Biochemical Journal*, 401 (1), 1-11, (2007).
- Hano, C. and Tungmunthum, D., "Plant polyphenols, more than just simple natural antioxidants: Oxidative stress, aging and age-related diseases", *Medicines*, 7 (5), 26, (2020).
- Harman, D., "Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry", *Journal of Gerontology*, 11 (3), 298-300, (1956).
- Harman, D., "Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry", *Science of Aging Knowledge Environment*, 2002 (37), cp14-cp14, (2002).
- Harman, D., "The free radical theory of aging", *Antioxidants and Redox Signaling*, 5 (5), 557-561, (2003).
- Harris, N., Costa, V., MacLean, M., Mollapour, M., Moradas-Ferreira, P. and Piper, P. W., "MnSOD overexpression extends the yeast chronological (G0) life span but acts independently of Sir2p histone deacetylase to shorten the replicative life span of dividing cells", *Free Radical Biology and Medicine*, 34 (12), 1599-1606, (2003).
- Harrison, D. E., Strong, R., Sharp, Z. D., Nelson, J. F., Astle, C. M., Flurkey, K., ... and Miller, R. A., "Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice", *Nature*, 460 (7253), 392-395, (2009).
- Hartl, F. U., Bracher, A. and Hayer-Hartl, M., "Molecular chaperones in protein folding and proteostasis", *Nature*, 475 (7356), 324-332, (2011).
- Hartwell, L. H., "Yeast and cancer", *Bioscience Reports*, 22 (3-4), 373-394, (2002).

Hashim, Z., Mukai, Y., Bamba, T. and Fukusaki, E., “Metabolic profiling of retrograde pathway transcription factors *rtg1* and *rtg3* knockout yeast”, *Metabolites*, 4 (3), 580-598, (2014).

Hassan, M., Watari, H., AbuAlmaaty, A., Ohba, Y. and Sakuragi, N., “[Retracted] Apoptosis and Molecular Targeting Therapy in Cancer”, *BioMed research international*, 2014 (1), 150845, (2014).

Hayflick, L., “The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains”, *Experimental cell research*, 37 (3), 614-636, (1965).

He, C. and Klionsky, D. J., “Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy”, *Annual review of genetics*, 43 (1), 67-93, (2009).

He, C., Zhou, C. and Kennedy, B. K., “The yeast replicative aging model”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1864 (9), 2690-2696, (2018).

He, Y. and Jasper, H., “Studying aging in *Drosophila*”, *Methods*, 68 (1), 129-133, (2014).

Heck, D. E., Vetrano, A. M., Mariano, T. M. and Laskin, J. D., “UVB light stimulates production of reactive oxygen species: unexpected role for catalase”, *Journal of Biological Chemistry*, 278 (25), 22432-22436, (2003).

Hecker, M. and Wagner, A. H., “Role of protein carbonylation in diabetes”, *Journal of inherited metabolic disease*, 41 (1), 29-38, (2018).

Heeren, G., Rinnerthaler, M., Laun, P., von Seyerl, P., Kössler, S., Klinger, H., ... and Breitenbach, M., “The mitochondrial ribosomal protein of the large subunit, Afo1p, determines cellular longevity through mitochondrial back-signaling via TOR1”, *Aging*, 1 (7), 622, (2009).

Hellfritsch, J., Kirsch, J., Schneider, M., Fluege, T., Wortmann, M., Frijhoff, J., ... and Beck, H., “Knockout of mitochondrial thioredoxin reductase stabilizes prolyl hydroxylase 2 and inhibits tumor growth and tumor-derived angiogenesis”, *Antioxidants & redox signaling*, 22 (11), 938-950, (2015).

Hemagirri, M. and Sasidharan, S., “In vitro antiaging activity of polyphenol rich *Polyalthia longifolia* (Annonaceae) leaf extract in *Saccharomyces cerevisiae* BY611 yeast cells”, *Journal of ethnopharmacology*, 290, 115110, (2022).

Hengartner, M. O., “The biochemistry of apoptosis”, *Nature*, 407 (6805), 770-776, (2000).

Henning, C. and Glomb, M. A., “Pathways of the Maillard reaction under physiological conditions”, *Glycoconjugate journal*, 33, 499-512, (2016).

- Hensley, K., Benaksas, E. J., Bolli, R., Comp, P., Grammas, P., Hamdheydari, L., ... and Floyd, R. A., "New perspectives on vitamin E: γ -tocopherol and carboxyethylhydroxychroman metabolites in biology and medicine", *Free radical biology and medicine*, 36 (1), 1-15, (2004).
- Herker, E., Jungwirth, H., Lehmann, K. A., Maldener, C., Fröhlich, K. U., Wissing, S., ... and Madeo, F., "Chronological aging leads to apoptosis in yeast", *The Journal of cell biology*, 164 (4), 501-507, (2004).
- Herrero, E., Ros, J., Bellí, G. and Cabiscol, E., "Redox control and oxidative stress in yeast cells", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1780 (11), 1217-1235, (2008).
- Herskowitz, I., "Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*", *Microbiological reviews*, 52 (4), 536-553, (1988).
- Hertveldt, K., Philippe, J., Thierens, H., Cornelissen, M., Vral, A. and De Ridder, L., "Flow cytometry as a quantitative and sensitive method to evaluate low dose radiation induced apoptosis in vitro in human peripheral blood lymphocytes", *International Journal of Radiation Biology*, 71 (4), 429-433, (1997).
- Hink, H. U., Santanam, N., Dikalov, S., McCann, L., Nguyen, A. D., Parthasarathy, S., ... and Fukai, T., "Peroxidase properties of extracellular superoxide dismutase: role of uric acid in modulating in vivo activity", *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 22 (9), 1402-1408, (2002).
- Hinnen, A., Hicks, J. B. and Fink, G. R., "Transformation of yeast", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75 (4), 1929-1933, (1978).
- Hockenbery, D. M., Oltvai, Z. N., Yin, X. M., Millman, C. L. and Korsmeyer, S. J., "Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis", *Cell*, 75 (2), 241-251, (1993).
- Hoeijmakers, J. H., "Genome maintenance mechanisms for preventing cancer", *Nature*, 411 (6835), 366-374, (2001).
- Hoff, K. A., "Rapid and simple method for double staining of bacteria with 4', 6-diamidino-2-phenylindole and fluorescein isothiocyanate-labeled antibodies", *Applied and environmental microbiology*, 54 (12), 2949-2952, (1988).
- Holman, R. T., "Autoxidation of fats and related substances", *Progress in the chemistry of fats and other lipids*, 2, 51-98, (1954).

- Holmgren, A. and Lu, J., “Thioredoxin and thioredoxin reductase: current research with special reference to human disease”, *Biochemical and biophysical research communications*, 396 (1), 120-124, (2010).
- Holmström, K. M. and Finkel, T., “Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling”, *Nature reviews Molecular Cell Biology*, 15 (6), 411-421, (2014).
- Hopkins, F. G., “Glutathione: its influence in the oxidation of fats and proteins”, *Biochemical Journal*, 19 (5), 787, (1925).
- Huang, S. X., Jaurand, M. C., Kamp, D. W., Whysner, J. and Hei, T. K., “Role of mutagenicity in asbestos fiber-induced carcinogenicity and other diseases”, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 14 (1-4), 179-245, (2011).
- Huang, S. X., Partridge, M. A., Ghandhi, S. A., Davidson, M. M., Amundson, S. A. and Hei, T. K., “Mitochondria-derived reactive intermediate species mediate asbestos-induced genotoxicity and oxidative stress-responsive signaling pathways”, *Environmental health perspectives*, 120 (6), 840-847, (2012).
- Huang, W. P. and Klionsky, D. J., “Autophagy in yeast: a review of the molecular machinery”, *Cell structure and function*, 27 (6), 409-420, (2002).
- Huang, X., Liu, J. and Dickson, R. C., “Down-regulating sphingolipid synthesis increases yeast lifespan”, *PLoS genetics*, 8 (2), e1002493, (2012).
- Hughes, A. L. and Gottschling, D. E., “An early age increase in vacuolar pH limits mitochondrial function and lifespan in yeast”, *Nature*, 492 (7428), 261-265, (2012).
- Huh, W. K., Lee, B. H., Kim, S. T., Kim, Y. R., Rhie, G. E., Baek, Y. W., ... and Kang, S. O., “D-Erythroascorbic acid is an important antioxidant molecule in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Molecular microbiology*, 30 (4), 895-903, (1998).
- Hulbert, A. J., Pamplona, R., Buffenstein, R. and Buttemer, W. A., “Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals”, *Physiological reviews*, 87 (4), 1175-1213, (2007).
- Hussain, F. and Kayani, H. U. R., “Aging-Oxidative stress, antioxidants and computational modeling”, *Heliyon*, 6 (5), (2020).
- Igney, F. H. and Krammer, P. H., “Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis”, *Nature Reviews Cancer*, 2 (4), 277-288, (2002).

Ilyasov, I., Beloborodov, V., Antonov, D., Dubrovskaya, A., Terekhov, R., Zhevlakova, A., ... and Selivanova, I., "Flavonoids with glutathione antioxidant synergy: Influence of free radicals inflow", *Antioxidants*, 9 (8), 695, (2020).

Imlay, K. R. and Imlay, J. A., "Cloning and analysis of *sodC*, encoding the copper-zinc superoxide dismutase of *Escherichia coli*", *Journal of bacteriology*, 178 (9), 2564-2571, (1996).

Ingram, P. R., Homer, N. Z., Smith, R. A., Pitt, A. R., Wilson, C. G., Olejnik, O. and Spickett, C. M., "The interaction of sodium chlorite with phospholipids and glutathione: a comparison of effects in vitro, in mammalian and in microbial cells", *Archives of biochemistry and biophysics*, 410 (1), 121-133, (2003).

Inoue, Y., Kobayashi, S. and Kimura, A., "Cloning and phenotypic characterization of a gene enhancing resistance against oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*", *Journal of fermentation and bioengineering*, 75 (5), 327-331, (1993).

Inoue, Y., Matsuda, T., Sugiyama, K. I., Izawa, S. and Kimura, A., "Genetic analysis of glutathione peroxidase in oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*", *Journal of Biological Chemistry*, 274 (38), 27002-27009, (1999).

Ishibashi, T., "Molecular hydrogen: new antioxidant and anti-inflammatory therapy for rheumatoid arthritis and related diseases", *Current Pharmaceutical Design*, 19 (35), 6375-6381, (2013).

Ishii, T., Mori, T., Ichikawa, T., Kaku, M., Kusaka, K., Uekusa, Y., ... and Nakayama, T., "Structural characteristics of green tea catechins for formation of protein carbonyl in human serum albumin", *Bioorganic & medicinal chemistry*, 18 (14), 4892-4896, (2010).

Ishtar Snoek, I. S. and Yde Steensma, H., "Factors involved in anaerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*", *Yeast*, 24 (1), 1-10, (2007).

Iskusnykh, I. Y., Zakharova, A. A. and Pathak, D., "Glutathione in brain disorders and aging", *Molecules*, 27 (1), 324, (2022).

Islam, M. T., "Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders", *Neurological research*, 39 (1), 73-82, (2017).

Ito, F., Sono, Y. and Ito, T., "Measurement and clinical significance of lipid peroxidation as a biomarker of oxidative stress: oxidative stress in diabetes, atherosclerosis, and chronic inflammation", *Antioxidants*, 8 (3), 72, (2019).

Izawa, S., Inoue, Y. and Kimura, A., “Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae*”, *Biochemical Journal*, 320 (1), 61-67, (1996).

Izawa, S., Inoue, Y. and Kimura, A., “Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in *Saccharomyces cerevisiae*”, *FEBS letters*, 368 (1), 73-76, (1995).

Izawa, S., Maeda, K., Sugiyama, K. I., Mano, J. I., Inoue, Y. and Kimura, A., “Thioredoxin deficiency causes the constitutive activation of Yap1, an AP-1-like transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Journal of Biological Chemistry*, 274 (40), 28459-28465, (1999).

Jach, M. E., Sajnaga, E., Janeczko, M., Juda, M., Kochanowicz, E., Baj, T. and Malm, A., “Production of enriched in B vitamins biomass of *Yarrowia lipolytica* grown in biofuel waste”, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28 (5), 2925-2932, (2021).

Jakovljevic, B., Novakov-Mikic, A., Brkic, S., Bogavac, M. A., Tomic, S. and Miler, V., “Lipid peroxidation in the first trimester of pregnancy”, *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 25 (8), 1316-1318, (2012).

Jakubowski, W., Biliński, T. and Bartosz, G., “Oxidative stress during aging of stationary cultures of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*”, *Free Radical Biology and Medicine*, 28 (5), 659-664, (2000).

Jamieson, D. J., “*Saccharomyces cerevisiae* has distinct adaptive responses to both hydrogen peroxide and menadione”, *Journal of bacteriology*, 174 (20), 6678-6681, (1992).

Janciauskiene, S., “The beneficial effects of antioxidants in health and diseases”, *Chronic Obstructive Pulmonary Diseases: Journal of the COPD Foundation*, 7 (3), 182, (2020).

Janssens, G. E., Meinema, A. C., Gonzalez, J., Wolters, J. C., Schmidt, A., Guryev, V., ... and Heinemann, M., “Protein biogenesis machinery is a driver of replicative aging in yeast”, *eLife*, 4, e08527, (2015).

Jaruga, P. and Dizdaroglu, M., “Repair of products of oxidative DNA base damage in human cells”, *Nucleic acids research*, 24 (8), 1389-1394, (1996).

Jazwinski, S. M., “Growing old: metabolic control and yeast aging”, *Annual Reviews in Microbiology*, 56 (1), 769-792, (2002).

Jazwinski, S. M., “Mitochondria to nucleus signaling and the role of ceramide in its integration into the suite of cell quality control processes during aging”, *Ageing Research Reviews*, 23, 67-74, (2015).

Jazwinski, S. M., “The retrograde response and other pathways of interorganelle communication in yeast replicative aging”, *Aging Research in Yeast*, 79-100, (2012).

Jeeva, J. S., Sunitha, J., Ananthalakshmi, R., Rajkumari, S., Ramesh, M. and Krishnan, R., “Enzymatic antioxidants and its role in oral diseases”, *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 7(Suppl 2), S331-S333, (2015).

Jena, N. R. and Mishra, P. C., “Formation of ring-opened and rearranged products of guanine: mechanisms and biological significance”, *Free Radical Biology and Medicine*, 53 (1), 81-94, (2012).

Jena, N. R. and Mishra, P. C., “Mechanisms of formation of 8-oxoguanine due to reactions of one and two OH• radicals and the H₂O₂ molecule with guanine: a quantum computational study”, *The journal of physical chemistry B*, 109 (29), 14205-14218, (2005).

Jena, N. R., “DNA damage by reactive species: Mechanisms, mutation and repair”, *Journal of biosciences*, 37 (3), 503-517, (2012).

Jeon, B. W., Kim, K. T., Chang, S. I. and Kim, H. Y., “Phosphoinositide 3-OH kinase/protein kinase B inhibits apoptotic cell death induced by reactive oxygen species in *Saccharomyces cerevisiae*”, *The Journal of Biochemistry*, 131 (5), 693-699, (2002).

Jiang, J. C., Stumpferl, S. W., Tiwari, A., Qin, Q., Rodriguez-Quiñones, J. F. and Jazwinski, S. M., “Identification of the target of the retrograde response that mediates replicative lifespan extension in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Genetics*, 204 (2), 659-673, (2016).

Jiang, J. C., Wawryn, J., Kumara, H. S. and Jazwinski, S. M., “Distinct roles of processes modulated by histone deacetylases Rpd3p, Hda1p, and Sir2p in life extension by caloric restriction in yeast”, *Experimental gerontology*, 37 (8-9), 1023-1030, (2002).

Jiang, X., Stockwell, B. R. and Conrad, M., “Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease”, *Nature reviews Molecular cell biology*, 22 (4), 266-282, (2021).

Jin, Z. and El-Deiry, W. S., “Overview of cell death signaling pathways”, *Cancer biology & therapy*, 4 (2), 147-171, (2005).

Johnson, B. S., Snead, D., Lee, J. J., McCaffery, J. M., Shorter, J. and Gitler, A. D., “TDP-43 is intrinsically aggregation-prone, and amyotrophic lateral sclerosis-linked mutations accelerate aggregation and increase toxicity”, *Journal of Biological Chemistry*, 284 (30), 20329-20339, (2009).

Johnson, F. and Giulivi, C., “Superoxide dismutases and their impact upon human health”, *Molecular aspects of medicine*, 26 (4-5), 340-352, (2005).

Jomova, K. and Valko, M., “Advances in metal-induced oxidative stress and human disease”, *Toxicology*, 283 (2-3), 65-87, (2011).

Jones, M. N., Finn, A., Mosavi-Movahedi, A. and Waller, B. J., “The activation of *Aspergillus niger* catalase by sodium n-dodecylsulphate”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 913 (3), 395-398, (1987).

Joza, N., Susin, S. A., Daugas, E., Stanford, W. L., Cho, S. K., Li, C. Y., ... and Penninger, J. M., “Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death”, *Nature*, 410 (6828), 549-554, (2001).

Julien, J. P., “Amyotrophic lateral sclerosis: unfolding the toxicity of the misfolded”, *Cell*, 104 (4), 581-591, (2001).

Kachroo, A. H., Laurent, J. M., Yellman, C. M., Meyer, A. G., Wilke, C. O. and Marcotte, E. M., “Systematic humanization of yeast genes reveals conserved functions and genetic modularity”, *Science*, 348 (6237), 921-925, (2015).

Kachroo, A. H., Vandeloo, M., Greco, B. M. and Abdullah, M., “Humanized yeast to model human biology, disease and evolution”, *Disease models & mechanisms*, 15 (6), dmm049309, (2022).

Kaeberlein, M., “Lessons on longevity from budding yeast”, *Nature*, 464 (7288), 513-519, (2010).

Kaeberlein, M., Burtner, C. R. and Kennedy, B. K., “Recent developments in yeast aging”, *PLoS genetics*, 3 (5), e84, (2007).

Kaeberlein, M., Kirkland, K. T., Fields, S. and Kennedy, B. K., “Genes determining yeast replicative life span in a long-lived genetic background”, *Mechanisms of ageing and development*, 126 (4), 491-504, (2005a).

Kaeberlein, M., McVey, M. and Guarente, L., “The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms”, *Genes & development*, 13 (19), 2570-2580, (1999).

Kaeberlein, M., Powers III, R. W., Steffen, K. K., Westman, E. A., Hu, D., Dang, N., ... and Kennedy, B. K., “Regulation of yeast replicative life span by TOR and Sch9 in response to nutrients”, *Science*, 310 (5751), 1193-1196, (2005).

- Kagan, V. E., Mao, G., Qu, F., Angeli, J. P. F., Doll, S., Croix, C. S., ... and Bayır, H., "Oxidized arachidonic and adrenic PEs navigate cells to ferroptosis", *Nature chemical biology*, 13 (1), 81-90, (2017).
- Kalkavan, H. and Green, D. R., "MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business", *Cell Death & Differentiation*, 25 (1), 46-55, (2018).
- Kalogeris, T., Baines, C. P., Krenz, M. and Korthuis, R. J., "Cell biology of ischemia/reperfusion injury", *International review of cell and molecular biology*, 298, 229-317, (2012).
- Kam, P. C. A. and Ferch, N. I., "Apoptosis: mechanisms and clinical implications", *Anaesthesia*, 55 (11), 1081-1093, (2000).
- Kamp, D. W. and Weitzman, S. A., "The molecular basis of asbestos induced lung injury", *Thorax*, 54 (7), 638-652, (1999).
- Kamp, D. W., Graceffa, P., Pryor, W. A. and Weitzman, S. A., "The role of free radicals in asbestos-induced diseases", *Free Radical Biology and Medicine*, 12 (4), 293-315, (1992).
- Kane, D. J., Sarafian, T. A., Anton, R., Hahn, H., Gralla, E. B., Valentine, J. S., ... and Bredesen, D. E., "Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species", *Science*, 262 (5137), 1274-1277, (1993).
- Kang, S. J., Wang, S., Kuida, K. and Yuan, J., "Distinct downstream pathways of caspase-11 in regulating apoptosis and cytokine maturation during septic shock response", *Cell Death & Differentiation*, 9 (10), 1115-1125, (2002).
- Kanner, J., German, J. B., Kinsella, J. E. and Hultin, H. O., "Initiation of lipid peroxidation in biological systems", *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 25 (4), 317-364, (1987).
- Kanoh, M., Takemura, G., Misao, J., Hayakawa, Y., Aoyama, T., Nishigaki, K. ... and Fujiwara, H., "Significance of myocytes with positive DNA in situ nick end-labeling (TUNEL) in hearts with dilated cardiomyopathy: not apoptosis but DNA repair", *Circulation*, 99 (21), 2757-2764, (1999).
- Kapahi, P., Chen, D., Rogers, A. N., Katewa, S. D., Li, P. W. L., Thomas, E. L. and Kockel, L., "With TOR, less is more: a key role for the conserved nutrient-sensing TOR pathway in aging", *Cell metabolism*, 11 (6), 453-465, (2010).
- Kapahi, P., Zid, B. M., Harper, T., Koslover, D., Sapin, V. and Benzer, S., "Regulation of lifespan in *Drosophila* by modulation of genes in the TOR signaling pathway", *Current biology*, 14 (10), 885-890, (2004).

Käppeli, O., “Cytochromes P-450 of yeasts”, *Microbiological reviews*, 50 (3), 244-258, (1986).

Kar, B. and Sivamani, S., “Apoptosis: basic concepts, mechanisms and clinical implications”, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6 (3), 940, (2015).

Karathia, H., Vilaprinyo, E., Sorribas, A. and Alves, R., “*Saccharomyces cerevisiae* as a model organism: a comparative study”, *PloS one*, 6 (2), e16015, (2011).

Karplus, P. A. and Schulz, G. E., “Refined structure of glutathione reductase at 1.54 Å resolution”, *Journal of molecular biology*, 195 (3), 701-729, (1987).

Kashyap, D., Garg, V. K. and Goel, N., “Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis: Role in cancer development and prognosis”, *Advances in protein chemistry and structural biology*, 125, 73-120, (2021).

Kaushal, J., Mehandia, S., Singh, G., Raina, A. and Arya, S. K., “Catalase enzyme: Application in bioremediation and food industry”, *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 16, 192-199, (2018).

Kavakcıoğlu Yardımcı, B. and Mollaoğlu, Z., “Antioxidant or pro-oxidant? The effects of boron compounds on *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 strain”, *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 51 (1), 96-103, (2021).

Kavakcıoğlu Yardımcı, B., “The investigation of the clotrimazole induced apoptosis mechanism in *Saccharomyces cerevisiae*”, Ph.D. Thesis, University of Dokuz Eylül, İzmir, (2017).

Kavitate, D., Veerabhadrappe, B., Sudharshan, S. J., Kandasamy, S., Devi, P. B., Dyavaiah, M. and Shetty, P. H., “Oxidative stress alleviating potential of galactan exopolysaccharide from *Weissella confusa* KR780676 in yeast model system”, *Scientific Reports*, 12 (1), 1089, (2022).

Kawai, S., Hashimoto, W. and Murata, K., “Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi: methods and possible underlying mechanism”, *Bioengineered bugs*, 1 (6), 395-403, (2010).

Kayikci, Ö. and Nielsen, J., “Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*”, *FEMS yeast research*, 15 (6), fov068, (2015).

Kaźmierczak-Barańska, J., Boguszevska, K., Adamus-Grabicka, A. and Karwowski, B. T., “Two faces of vitamin C—antioxidative and pro-oxidative agent”, *Nutrients*, 12 (5), 1501, (2020).

Kelly, K. A., Havrilla, C. M., Brady, T. C., Abramo, K. H. and Levin, E. D., “Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine

model systems”, *Environmental health perspectives*, 106 (7), 375-384, (1998).

Kelly, P. N. and Strasser, A., “The role of Bcl-2 and its pro-survival relatives in tumorigenesis and cancer therapy”, *Cell Death & Differentiation*, 18 (9), 1414-1424, (2011).

Kendall, E. C. and Loewen, D. F., “The mechanism of oxidation-reduction potential: The oxidation-reduction potential of cysteine and cystine”, *Biochemical Journal*, 22 (3), 669, (1928).

Kennedy, B. K., Austriaco Jr, N. R. and Guarente, L., “Daughter cells of *Saccharomyces cerevisiae* from old mothers display a reduced life span”, *The Journal of cell biology*, 127 (6), 1985-1993, (1994).

Kennedy, B. K., Steffen, K. K. and Kaeberlein, M., “Ruminations on dietary restriction and aging”, *Cellular and molecular life sciences*, 64, 1323-1328, (2007).

Kerr, J. F., Wyllie, A. H. and Currie, A. R., “Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics”, *British journal of cancer*, 26 (4), 239-257, (1972).

Khalid, N. and Azimpouran, M., “Necrosis”, In: StatPearls, StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), (2020).

Khan, I. A. and Luduen, R. F., “Possible regulation of the in vitro assembly of bovine brain tubulin by the bovine thioredoxin system”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1076 (2), 289-297, (1991).

Kharade, S. V., Mittal, N., Das, S. P., Sinha, P. and Roy, N., “Mrg19 depletion increases *S. cerevisiae* lifespan by augmenting ROS defence”, *FEBS letters*, 579 (30), 6809-6813, (2005).

Kim, E. J., Kim, H. P., Hah, Y. C. and Roe, J. H., “Differential expression of superoxide dismutases containing Ni and Fe/Zn in *Streptomyces coelicolor*”, *European Journal of Biochemistry*, 241 (1), 178-185, (1996).

Kim, S., Ohkuni, K., Couplan, E. and Jazwinski, S. M., “The histone acetyltransferase GCN5 modulates the retrograde response and genome stability determining yeast longevity”, *Biogerontology*, 5, 305-316, (2004).

King, L. E., Hohorst, L. and García-Sáez, A. J., “Expanding roles of BCL-2 proteins in apoptosis execution and beyond”, *Journal of Cell Science*, 136 (22), jcs260790, (2023).

Kirkwood, T. B. and Austad, S. N., “Why do we age?”, *Nature*, 408 (6809), 233-238, (2000).

Klaunig, J. E., “Oxidative stress and cancer”, *Current pharmaceutical design*, 24 (40), 4771-4778, (2018).

Klebanoff, S. J., “Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes”, *Annals of Internal Medicine*, 93 (3), 480-489, (1980).

Klein, B. E., Klein, R. and Lee, K. E., “Components of the metabolic syndrome and risk of cardiovascular disease and diabetes in Beaver Dam”, *Diabetes care*, 25 (10), 1790-1794, (2002).

Klener Jr, P., Andera, L., Klener, P., Necas, E. and Zivný, J., “Cell death signalling pathways in the pathogenesis and therapy of haematologic malignancies: overview of apoptotic pathways”, *Folia biologica*, 52 (1/2), 34, (2006).

Klinger, H., Rinnerthaler, M., Lam, Y. T., Laun, P., Heeren, G., Klocker, A., ... and Breitenbach, M., “Quantitation of (a) symmetric inheritance of functional and of oxidatively damaged mitochondrial aconitase in the cell division of old yeast mother cells”, *Experimental gerontology*, 45 (7-8), 533-542, (2010).

Klis, F. M., Boorsma, A. and De Groot, P. W., “Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Yeast*, 23 (3), 185-202, (2006).

Kluck, R. M., Bossy-Wetzel, E., Green, D. R. and Newmeyer, D. D., “The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis”, *Science*, 275 (5303), 1132-1136, (1997).

Knorre, D. A., Azbarova, A. V., Galkina, K. V., Feniouk, B. A. and Severin, F. F., “Replicative aging as a source of cell heterogeneity in budding yeast”, *Mechanisms of Ageing and Development*, 176, 24-31, (2018).

Kobayashi, S., Miyabe, S., Izawa, S., Inoue, Y. and Kimura, A., “Correlation of the OSR/ZRCI gene product and the intracellular glutathione levels in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Biotechnology and applied biochemistry*, 23 (1), 3-6, (1996).

Koenig, U., Eckhart, L. and Tschachler, E., “Evidence that caspase-13 is not a human but a bovine gene”, *Biochemical and biophysical research communications*, 285 (5), 1150-1154, (2001).

Kojo, S., “Vitamin C: basic metabolism and its function as an index of oxidative stress”, *Current medicinal chemistry*, 11 (8), 1041-1064, (2004).

- Kondo, N., Nakamura, H., Masutani, H. and Yodoi, J., “Redox regulation of human thioredoxin network”, *Antioxidants & redox signaling*, 8 (9-10), 1881-1890, (2006).
- Koopman, G., Reutelingsperger, C. P., Kuijten, G. A., Keehnen, R. M., Pals, S. T. and Van Oers, M. H., “Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis”, *Blood*, 84 (5), 1415-1420, (1994).
- Korge, P., Calmettes, G. and Weiss, J. N., “Increased reactive oxygen species production during reductive stress: the roles of mitochondrial glutathione and thioredoxin reductases”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1847 (6-7), 514-525, (2015).
- Krisko, A. and Radman, M., “Protein damage, ageing and age-related diseases”, *Open biology*, 9 (3), 180249, (2019).
- Krobitsch, S. and Lindquist, S., “Aggregation of huntingtin in yeast varies with the length of the polyglutamine expansion and the expression of chaperone proteins”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97 (4), 1589-1594, (2000).
- Kroemer, G., El-Deiry, W., Golstein, P., Peter, M. E., Vaux, D., Vandenabeele, P., ... and Melino, G., “Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death”, *Cell death and differentiation*, 12, 1463-1467, (2005).
- Kroemer, G., Galluzzi, L. and Brenner, C., “Mitochondrial membrane permeabilization in cell death”, *Physiological reviews*, 87 (1), 99-163, (2007).
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., ... and Melino, G., “Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009”, *Cell death & differentiation*, 16 (1), 3-11, (2009).
- Krych, J. and Gebicka, L., “Catalase is inhibited by flavonoids”, *International journal of biological macromolecules*, 58, 148-153, (2013).
- Krych, J., Gebicki, J. L. and Gebicka, L., “Flavonoid-induced conversion of catalase to its inactive form—Compound II”, *Free Radical Research*, 48 (11), 1334-1341, (2014).
- Krych-Madej, J. and Gebicka, L., “Interactions of nitrite with catalase: Enzyme activity and reaction kinetics studies”, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 171, 10-17, (2017).

- Kuge, S. and Jones, N., “YAP1 dependent activation of TRX2 is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides”, *The EMBO journal*, 13 (3), 655-664, (1994).
- Kulawiec, M., Ayyasamy, V. and Singh, K. K., “p53 regulates mtDNA copy number and mitochekpoint pathway”, *Journal of carcinogenesis*, 8, (2009).
- Kumazaki, T., Sasaki, M., Nishiyama, M., Teranishi, Y., Sumida, H. and Mitsui, Y., “Effect of BCL-2 down-regulation on cellular life span”, *Biogerontology*, 3, 291-300, (2002).
- Kuranda, M. J. and Robbins, P. W., “Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*”, *Journal of Biological Chemistry*, 266 (29), 19758-19767, (1991).
- Kurien, B. T. and Scofield, R. H., “Free radical mediated peroxidative damage in systemic lupus erythematosus”, *Life sciences*, 73 (13), 1655-1666, (2003).
- Kurosaka, K., Takahashi, M., Watanabe, N. and Kobayashi, Y., “Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages”, *The Journal of Immunology*, 171 (9), 4672-4679, (2003).
- Kurylenko, O. O., Dmytruk, K. V. and Sibirny, A., Glutathione metabolism in yeasts and construction of the advanced producers of this tripeptide, *Non-conventional Yeasts: from Basic Research to Application*, Springer Cham., 153-196, (2019).
- Kwolek-Mirek, M., Bartosz, G. and Spickett, C. M., “Sensitivity of antioxidant-deficient yeast to hypochlorite and chlorite”, *Yeast*, 28 (8), 595-609, (2011).
- Lafontaine, J., Cardin, G. B., Malaquin, N., Boisvert, J. S., Rodier, F. and Wong, P., “Senolytic targeting of Bcl-2 anti-apoptotic family increases cell death in irradiated sarcoma cells”, *Cancers*, 13 (3), 386, (2021).
- Lam, Y. T., Aung-Htut, M. T., Lim, Y. L., Yang, H. and Dawes, I. W., “Changes in reactive oxygen species begin early during replicative aging of *Saccharomyces cerevisiae* cells”, *Free Radical Biology and Medicine*, 50 (8), 963-970, (2011).
- Lam, Y. T., Stocker, R. and Dawes, I. W., “The lipophilic antioxidants α -tocopherol and coenzyme Q10 reduce the replicative lifespan of *Saccharomyces cerevisiae*”, *Free Radical Biology and Medicine*, 49 (2), 237-244, (2010).

- Landry, C. R., Townsend, J. P., Hartl, D. L. and Cavalieri, D., “Ecological and evolutionary genomics of *Saccharomyces cerevisiae*”, *Molecular ecology*, 15 (3), 575-591, (2006).
- Langseth, L., Oxidants, antioxidants, and disease prevention, Brussels’s, Belgium: ILSI Europe, (1-26), (1995).
- Laun, P., Heeren, G., Rinnerthaler, M., Rid, R., Kössler, S., Koller, L. and Breitenbach, M., “Senescence and apoptosis in yeast mother cell-specific aging and in higher cells: a short review”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1783 (7), 1328-1334, (2008).
- Laun, P., Pichova, A., Madeo, F., Fuchs, J., Ellinger, A., Kohlwein, S., ... and Breitenbach, M., “Aged mother cells of *Saccharomyces cerevisiae* show markers of oxidative stress and apoptosis”, *Molecular microbiology*, 39 (5), 1166-1173, (2001).
- Laun, P., Rinnerthaler, M., Bogengruber, E., Heeren, G. and Breitenbach, M., “Yeast as a model for chronological and reproductive aging—a comparison”, *Experimental gerontology*, 41 (12), 1208-1212, (2006).
- Laurent, J. M., Young, J. H., Kachroo, A. H. and Marcotte, E. M., “Efforts to make and apply humanized yeast”, *Briefings in functional genomics*, 15 (2), 155-163, (2016).
- Lavoie, H. and Whiteway, M., “Increased respiration in the *sch9Δ* mutant is required for increasing chronological life span but not replicative life span”, *Eukaryotic cell*, 7 (7), 1127-1135, (2008).
- Lavová, B. and Urminská, D., “Total antioxidant activity of yeast *Saccharomyces cerevisiae*”, *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 1927, (2013).
- Lawrence, M. D., Blyth, B. J., Ormsby, R. J., Tilley, W. D. and Sykes, P. J., “False-positive TUNEL staining observed in SV40 based transgenic murine prostate cancer models”, *Transgenic research*, 22, 1037-1047, (2013).
- Layrisse, M., Martínez-Torres, C., Leets, I., Taylor, P. and Ramírez, J., “Effect of histidine, cysteine, glutathione or beef on iron absorption in humans”, *The Journal of nutrition*, 114 (1), 217-223, (1984).
- Leadsham, J. E., Kotiadis, V. N., Tarrant, D. J. and Gourlay, C. W., “Apoptosis and the yeast actin cytoskeleton”, *Cell death & differentiation*, 17 (5), 754-762, (2010).
- Ledwozyw, A., Michalak, J., Stepień, A. and Kadziołka, A., “The relationship between plasma triglycerides, cholesterol, total lipids and lipid

peroxidation products during human atherosclerosis”, *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 155 (3), 275-283, (1986).

Lee, J. C. Y., Tsoi, A., Kornfeld, G. D. and Dawes, I. W., “Cellular responses to L-serine in *Saccharomyces cerevisiae*: roles of general amino acid control, compartmentalization, and aspartate synthesis”, *FEMS yeast research*, 13 (7), 618-634, (2013).

Lee, J. C., Straffon, M. J., Jang, T. Y., Higgins, V. J., Grant, C. M. and Dawes, I. W., “The essential and ancillary role of glutathione in *Saccharomyces cerevisiae* analysed using a grande *gsh1* disruptant strain”, *FEMS yeast research*, 1 (1), 57-65, (2001).

Lee, J., Romeo, A. and Kosman, D. J., “Transcriptional remodeling and G1 arrest in dioxygen stress in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Journal of Biological Chemistry*, 271 (40), 24885-24893, (1996).

Lee, M. G. and Nurse, P., “Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*”, *Nature*, 327 (6117), 31-35, (1987).

Lee, M., Hyun, D. H., Marshall, K. A., Ellerby, L. M., Bredesen, D. E., Jenner, P. and Halliwell, B., “Effect of overexpression of BCL-2 on cellular oxidative damage, nitric oxide production, antioxidant defenses, and the proteasome”, *Free Radical Biology and Medicine*, 31 (12), 1550-1559, (2001).

Lee, S. F. and Pervaiz, S., “Assessment of oxidative stress-induced DNA damage by immunofluorescent analysis of 8-oxodG”, *Methods in cell biology*, 103, 99-113, (2011).

Lee, Y. J., Hoe, K. L. and Maeng, P. J., “Yeast cells lacking the CIT1-encoded mitochondrial citrate synthase are hypersusceptible to heat-or aging-induced apoptosis”, *Molecular biology of the cell*, 18 (9), 3556-3567, (2007).

Legal, J. M., Manfait, M. and Theophanides, T., “Applications of FTIR spectroscopy in structural studies of cells and bacteria”, *Journal of Molecular structure*, 242, 397-407, (1991).

Lei, X. G., Zhu, J. H., Cheng, W. H., Bao, Y., Ho, Y. S., Reddi, A. R., ... and Arnér, E. S., “Paradoxical roles of antioxidant enzymes: basic mechanisms and health implications”, *Physiological reviews*, 96 (1), 307-364, (2016).

Leist, M., Single, B., Castoldi, A. F., Kühnle, S. and Nicotera, P., “Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis”, *The Journal of experimental medicine*, 185 (8), 1481-1486, (1997).

- Lesur, I. and Campbell, J. L., “The transcriptome of prematurely aging yeast cells is similar to that of telomerase-deficient cells”, *Molecular biology of the cell*, 15 (3), 1297-1312, (2004).
- Leung, C. T. and Loewus, F. A., “Concerning the presence and formation of ascorbic acid in yeasts”, *Plant science*, 38 (1), 65-69, (1985).
- Levine, R. L., Williams, J. A., Stadtman, E. P. and Shacter, E., “Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins”, *Methods. Enzymol.*, 233, 246-257, (1994).
- Li, L. Y., Luo, X. and Wang, X., “Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria”, *Nature*, 412 (6842), 95-99, (2001).
- Li, L., He, J., Zhang, G., Chen, H., Luo, Z., Deng, B., ... and Kang, X., “Role of caspase family in intervertebral disc degeneration and its therapeutic prospects”, *Biomolecules*, 12 (8), 1074, (2022).
- Li, M. and Wilson III, D. M., “Human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1”, *Antioxidants & redox signaling*, 20 (4), 678-707, (2014).
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S. and Wang, X., “Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade”, *Cell*, 91 (4), 479-489, (1997).
- Li, Q., Sun, J., Ran, Q., Liu, Z. and Chen, J., “The protective effects of Chromofungin in oligomeric amyloid β 42 (A β 42)-induced toxicity in neurons in Alzheimer’s disease”, *Aging (Albany NY)*, 16 (10), 9216, (2024).
- Li, Y., Zhao, T., Li, J., Xia, M., Li, Y., Wang, X., ... and Sun, P., “Oxidative stress and 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE): Implications in the pathogenesis and treatment of aging-related diseases”, *Journal of immunology research*, 2022 (1), 2233906, (2022).
- Liang, G., Liao, X., Du, G. and Chen, J., “Elevated glutathione production by adding precursor amino acids coupled with ATP in high cell density cultivation of *Candida utilis*”, *Journal of applied microbiology*, 105 (5), 1432-1440, (2008).
- Lin, S. J., Defossez, P. A. and Guarente, L., “Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Science*, 289 (5487), 2126-2128, (2000).
- Lin, S. S., Manchester, J. K. and Gordon, J. I., “Enhanced Gluconeogenesis and Increased Energy Storage as Hallmarks of Aging in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Journal of Biological Chemistry*, 276 (38), 36000-36007, (2001).

- Lin, S., Wei, X., Bales, K. R., Paul, A. B., Ma, Z., Yan, G., ... and Du, Y., "Minocycline blocks bilirubin neurotoxicity and prevents hyperbilirubinemia-induced cerebellar hypoplasia in the Gunn rat", *European Journal of Neuroscience*, 22 (1), 21-27, (2005).
- Lin, Y. J., Seroude, L. and Benzer, S., "Extended life-span and stress resistance in the *Drosophila* mutant methuselah", *Science*, 282 (5390), 943-946, (1998).
- Lindahl, T. and Andersson, A., "Rate of chain breakage at apurinic sites in double-stranded deoxyribonucleic acid", *Biochemistry*, 11 (19), 3618-3623, (1972).
- Lindahl, T., "Instability and decay of the primary structure of DNA", *Nature*, 362 (6422), 709-715, (1993).
- Lindquist, S. L., Alberti, S., Halfmann, R. and Jackson, W., "Prion proteins: one surprise after another", *The FASEB Journal*, 23, 324-1, (2009).
- Lippi, G., Montagnana, M., Franchini, M., Favaloro, E. J. and Targher, G., "The paradoxical relationship between serum uric acid and cardiovascular disease", *Clinica Chimica Acta*, 392 (1-2), 1-7, (2008).
- Liu, B., Larsson, L., Caballero, A., Hao, X., Öling, D., Grantham, J. and Nyström, T., "The polarisome is required for segregation and retrograde transport of protein aggregates", *Cell*, 140 (2), 257-267, (2010).
- Liu, F., Tran, S., Sachetelli, S., Filep, J. G., Ingelfinger, J. R. and Chan, J. S. D., "Catalase overexpression attenuates angiotensinogen expression and apoptosis in diabetic mice", *Kidney international*, 71 (9), 912-923, (2007).
- Liu, J., Huang, X., Withers, B. R., Blalock, E., Liu, K. and Dickson, R. C., "Reducing sphingolipid synthesis orchestrates global changes to extend yeast lifespan", *Aging cell*, 12 (5), 833-841, (2013).
- Liu, K., Zhang, X., Lester, R. L. and Dickson, R. C., "The sphingoid long chain base phytosphingosine activates AGC-type protein kinases in *Saccharomyces cerevisiae* including Ypk1, Ypk2, and Sch9", *Journal of Biological Chemistry*, 280 (24), 22679-22687, (2005).
- Liu, M., Dong, F., Yan, X., Zeng, W., Hou, L. and Pang, X., "Biosorption of uranium by *Saccharomyces cerevisiae* and surface interactions under culture conditions", *Bioresource technology*, 101 (22), 8573-8580, (2010).
- Liu, X. F., Elashvili, I., Gralla, E. B., Valentine, J. S., Lapinskas, P. and Culotta, V. C., "Yeast lacking superoxide dismutase. Isolation of genetic suppressors", *Journal of Biological Chemistry*, 267 (26), 18298-18302, (1992).

- Liu, X. T. and Hu, J., "Relationship between bilirubin free radical and formation of pigment gallstone", *World Journal of Gastroenterology*, 8 (3), 413, (2002).
- Lloyd, D. R. and Phillips, D. H., "Oxidative DNA damage mediated by copper (II), iron (II) and nickel (II) Fenton reactions: evidence for site-specific mechanisms in the formation of double-strand breaks, 8-hydroxydeoxyguanosine and putative intrastrand cross-links", *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 424 (1-2), 23-36, (1999).
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A. and Chandra, N., "Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health", *Pharmacognosy reviews*, 4 (8), 118, (2010).
- Loeb, L. A. and Preston, B. D., "Mutagenesis by apurinic/apyrimidinic sites", *Annual review of genetics*, 20 (1), 201-230, (1986).
- Lohr, J. B., "Oxygen radicals and neuropsychiatric illness: some speculations", *Archives of general psychiatry*, 48 (12), 1097-1106, (1991).
- Lomonosova, E. and Chinnadurai, G., "BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview", *Oncogene*, 27 (1), S2-S19, (2008).
- Longo, V. D. and Fabrizio, P., "Chronological aging in *Saccharomyces cerevisiae*", In: Breitenbach, M., Jazwinski, S., Laun, P. (eds.), *Aging Research in Yeast, Subcellular Biochemistry*, Springer, Dordrecht, vol 57, 101-121, (2012).
- Longo, V. D. and Kennedy, B. K., "Sirtuins in aging and age-related disease", *Cell*, 126 (2), 257-268, (2006).
- Longo, V. D., "Linking sirtuins, IGF-I signaling, and starvation", *Experimental gerontology*, 44 (1-2), 70-74, (2009).
- Longo, V. D., "The Ras and Sch9 pathways regulate stress resistance and longevity", *Experimental gerontology*, 38 (7), 807-811, (2003).
- Longo, V. D., Gralla, E. B. and Valentine, J. S., "Superoxide Dismutase Activity Is Essential for Stationary Phase Survival in *Saccharomyces cerevisiae*: Mitochondrial Production of Toxic Oxygen Species In Vivo (*)", *Journal of Biological Chemistry*, 271 (21), 12275-12280, (1996).
- Longo, V. D., Shadel, G. S., Kaeberlein, M. and Kennedy, B., "Replicative and chronological aging in *Saccharomyces cerevisiae*", *Cell metabolism*, 16 (1), 18-31, (2012).

- Loo, D. T., “In situ detection of apoptosis by the TUNEL assay: an overview of techniques”, In: Didenko, V. (eds.), *DNA Damage Detection In Situ, Ex Vivo, and In Vivo: Methods and Protocols*, vol 682, 3-13, (2011).
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M. and Kroemer, G., “Hallmarks of aging: An expanding universe”, *Cell*, 186 (2), 243-278, (2023).
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M. and Kroemer, G., “The hallmarks of aging”, *Cell*, 153 (6), 1194-1217, (2013).
- Louis, W. Y., Latriano, L., Duncan, S., Hartwick, R. A. and Witz, G., “High-performance liquid chromatography analysis of the thiobarbituric acid adducts of malonaldehyde and trans, trans-muconaldehyde”, *Analytical biochemistry*, 156 (2), 326-333, (1986).
- Lu, J. Y., Lin, Y. Y., Sheu, J. C., Wu, J. T., Lee, F. J., Chen, Y., ... and Boeke, J. D., “Acetylation of yeast AMPK controls intrinsic aging independently of caloric restriction”, *Cell*, 146 (6), 969-979, (2011).
- Lu, S. C., “Glutathione synthesis”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830 (5), 3143-3153, (2013).
- Lu, Y. and Guo, J., “Metal-ion interactions with sugars. Crystal structure and FT-IR study of PrCl₃-D-ribose complex”, *Carbohydrate research*, 341 (5), 683-687, (2006).
- Lubos, E., Loscalzo, J. and Handy, D. E., “Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities”, *Antioxidants & Redox Signaling*, 15 (7), 1957-1997, (2011).
- Lubrano, V. and Balzan, S., “Enzymatic antioxidant system in vascular inflammation and coronary artery disease”, *World journal of experimental medicine*, 5 (4), 218, (2015).
- Ludovico, P. and Burhans, W. C., “Reactive oxygen species, ageing and the hormesis police”, *FEMS yeast research*, 14 (1), 33-39, (2014).
- Luo, S. and Rubinsztein, D. C., “Apoptosis blocks Beclin 1-dependent autophagosome synthesis: an effect rescued by Bcl-xL”, *Cell Death & Differentiation*, 17 (2), 268-277, (2010).
- Lushchak, V. I., “Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions”, *Journal of amino acids*, 2012 (1), 736837, (2012).
- Lutchman, V., Dakik, P., McAuley, M., Cortes, B., Ferraye, G., Gontmacher, L., ... and Titorenko, V. I., “Six plant extracts delay yeast chronological aging through different signaling pathways”, *Oncotarget*, 7 (32), 50845, (2016).

- Ma, P., Wera, S., Van Dijck, P. and Thevelein, J. M., “The PDE1-encoded low-affinity phosphodiesterase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* has a specific function in controlling agonist-induced cAMP signaling”, *Molecular biology of the cell*, 10 (1), 91-104, (1999).
- Ma, S. B., Nguyen, T. N., Tan, I., Ninnis, R., Iyer, S., Stroud, D. A., ... and Dewson, G., “Bax targets mitochondria by distinct mechanisms before or during apoptotic cell death: a requirement for VDAC2 or Bak for efficient Bax apoptotic function”, *Cell Death & Differentiation*, 21 (12), 1925-1935, (2014).
- Machlin, L. J. and Bendich, A., “Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients”, *The FASEB Journal*, 1 (6), 441-445, (1987).
- Madeo, F., Carmona-Gutierrez, D., Ring, J., Büttner, S., Eisenberg, T. and Kroemer, G., “Caspase-dependent and caspase-independent cell death pathways in yeast”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 382 (2), 227-231, (2009).
- Madeo, F., Fröhlich, E. and Fröhlich, K. U., “A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis”, *The Journal of cell biology*, 139 (3), 729-734, (1997).
- Madeo, F., Fröhlich, E., Ligr, M., Grey, M., Sigrist, S. J., Wolf, D. H. and Fröhlich, K. U., “Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast”, *The Journal of cell biology*, 145 (4), 757-767, (1999).
- Madeo, F., Herker, E., Maldener, C., Wissing, S., Lächelt, S., Herlan, M., ... and Fröhlich, K. U., “A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast”, *Molecular cell*, 9 (4), 911-917, (2002).
- Madeo, F., Herker, E., Wissing, S., Jungwirth, H., Eisenberg, T. and Fröhlich, K. U., “Apoptosis in yeast”, *Current opinion in microbiology*, 7 (6), 655-660, (2004).
- Mahajan, M., Kaur, S., Mahajan, S. and Kant, R., “Uric acid a better scavenger of free radicals than vitamin C in rheumatoid arthritis”, *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 24, 205-207, (2009).
- Maiorino, M., Conrad, M. and Ursini, F., “GPx4, lipid peroxidation, and cell death: discoveries, rediscoveries, and open issues”, *Antioxidants & redox signaling*, 29 (1), 61-74, (2018).
- Majno, G. and Joris, I., “Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death”, *The American journal of pathology*, 146 (1), 3, (1995).

Majzunova, M., Dovinova, I., Barancik, M. and Chan, J. Y., “Redox signaling in pathophysiology of hypertension”, *Journal of biomedical science*, 20, 1-10, (2013).

Makker, K., Agarwal, A. and Sharma, R., “Oxidative stress & male infertility”, *Indian Journal of Medical Research*, 129 (4), 357-367, (2009).

Maksimenko, A. V. and Vavaev, A. V., “Antioxidant enzymes as potential targets in cardioprotection and treatment of cardiovascular diseases. Enzyme antioxidants: the next stage of pharmacological counterwork to the oxidative stress”, *Heart international*, 7 (1), (2012).

Malik, P. and Mukherjee, T. K., “Immunological methods for the determination of AGE-RAGE axis generated glutathionylated and carbonylated proteins as oxidative stress markers”, *Methods*, 203, 354-363, (2022).

Mannarino, S. C., Amorim, M. A., Pereira, M. D., Moradas-Ferreira, P., Panek, A. D., Costa, V. and Eleutherio, E. C., “Glutathione is necessary to ensure benefits of calorie restriction during ageing in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Mechanisms of ageing and development*, 129 (12), 700-705, (2008).

Mantle, D., Falkous, G. and Walker, D., “Quantification of protease activities in synovial fluid from rheumatoid and osteoarthritis cases: comparison with antioxidant and free radical damage markers”, *Clinica chimica acta*, 284 (1), 45-58, (1999).

Margis, R., Dunand, C., Teixeira, F. K. and Margis-Pinheiro, M., “Glutathione peroxidase family—an evolutionary overview”, *The FEBS journal*, 275 (15), 3959-3970, (2008).

Marietta, C., Gulam, H. and Brooks, P. J., “A single 8, 5'-cyclo-2'-deoxyadenosine lesion in a TATA box prevents binding of the TATA binding protein and strongly reduces transcription in vivo”, *DNA repair*, 1 (11), 967-975, (2002).

Marino, G., Niso-Santano, M., Baehrecke, E. H. and Kroemer, G., “Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis”, *Nature reviews Molecular cell biology*, 15 (2), 81-94, (2014).

Marklund, S. L., “Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species”, *Biochemical Journal*, 222 (3), 649-655, (1984).

Martin, S., Reutelingsperger, C. P., McGahon, A. J., Rader, J. A., Van Schie, R. C., LaFace, D. M. and Green, D. R., “Early redistribution of plasma

membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl”, *The Journal of experimental medicine*, 182 (5), 1545-1556, (1995).

Martini, A., “Origin and domestication of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*”, *Journal of Wine research*, 4 (3), 165-176, (1993).

Mas-Bargues, C., Borrás, C. and Viña, J., “Bcl-xL as a Modulator of Senescence and Aging”, *International journal of molecular sciences*, 22 (4), 1527, (2021).

Matmati, N. and Hannun, Y. A., “Thematic review series: sphingolipids. ISC1 (inositol phosphosphingolipid-phospholipase C), the yeast homologue of neutral sphingomyelinases”, *Journal of lipid research*, 49 (5), 922-928, (2008).

Mayne, S. T., “Beta-carotene, carotenoids, and disease prevention in humans”, *The FASEB Journal*, 10 (7), 690-701, (1996).

McCarthy, J. V. and Cotter, T. G., “Cell shrinkage and apoptosis: a role for potassium and sodium ion efflux”, *Cell Death & Differentiation*, 4 (8), 756-770, (1997).

McCord, J. M. and Edeas, M. A., “SOD, oxidative stress and human pathologies: a brief history and a future vision”, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 59 (4), 139-142, (2005).

McCord, J. M., “Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury”, *New England Journal of Medicine*, 312 (3), 159-163, (1985).

McCormick, M. A., Mason, A. G., Guyenet, S. J., Dang, W., Garza, R. M., Ting, M. K., ... and Kennedy, B. K., “The SAGA histone deubiquitinase module controls yeast replicative lifespan via Sir2 interaction”, *Cell reports*, 8 (2), 477-486, (2014).

McIlwain, D. R., Berger, T. and Mak, T. W., “Caspase functions in cell death and disease”, *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5 (4), a008656, (2013).

McMurray, M. A. and Gottschling, D. E., “Aging and genetic instability in yeast”, *Current opinion in microbiology*, 7 (6), 673-679, (2004).

McVey, M., Kaeberlein, M., Tissenbaum, H. A. and Guarente, L., “The short life span of *Saccharomyces cerevisiae* sgs1 and srs2 mutants is a composite of normal aging processes and mitotic arrest due to defective recombination”, *Genetics*, 157 (4), 1531-1542, (2001).

Medvedik, O., Lamming, D. W., Kim, K. D. and Sinclair, D. A., “MSN2 and MSN4 link calorie restriction and TOR to sirtuin-mediated lifespan extension in *Saccharomyces cerevisiae*”, *PLoS biology*, 5 (10), e261, (2007).

Mendes, V., Vilaça, R., de Freitas, V., Ferreira, P. M., Mateus, N. and Costa, V., “Effect of myricetin, pyrogallol, and phloroglucinol on yeast resistance to oxidative stress”, *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2015 (1), 782504, (2015).

Mercola, J. and D’Adamo, C. R., “Linoleic acid: A narrative review of the effects of increased intake in the standard american diet and associations with chronic disease”, *Nutrients*, 15 (14), 3129, (2023).

Mesquita, A., Weinberger, M., Silva, A., Sampaio-Marques, B., Almeida, B., Leão, C., ... and Ludovico, P., “Caloric restriction or catalase inactivation extends yeast chronological lifespan by inducing H₂O₂ and superoxide dismutase activity”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107 (34), 15123-15128, (2010).

Métrailler-Ruchonnet, I., Pagano, A., Carnesecchi, S., Ody, C., Donati, Y. and Argiroffo, C. B., “Bcl-2 protects against hyperoxia-induced apoptosis through inhibition of the mitochondria-dependent pathway”, *Free Radical Biology and Medicine*, 42 (7), 1062-1074, (2007).

Miao, X., Rong, L., Fu, B., Cui, S., Gu, Z., Hu, F., ... and Li, C., “Astragalus polysaccharides attenuate rat aortic endothelial senescence via regulation of the SIRT-1/p53 signaling pathway”, *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 24 (1), 80, (2024).

Miceli, M. V., Jiang, J. C., Tiwari, A., Rodriguez-Quiñones, J. F. and Jazwinski, S. M., “Loss of mitochondrial membrane potential triggers the retrograde response extending yeast replicative lifespan”, *Frontiers in genetics*, 2, 102, (2012).

Mihoubi, W., Sahli, E., Gargouri, A. and Amiel, C., “FTIR spectroscopy of whole cells for the monitoring of yeast apoptosis mediated by p53 over-expression and its suppression by *Nigella sativa* extracts”, *PLoS One*, 12 (7), e0180680, (2017).

Miller, E., Mrowicka, M., Malinowska, K., Mrowicki, J., Saluk-Juszczak, J. and Kędziora, J., “The effects of whole-body cryotherapy on oxidative stress in multiple sclerosis patients”, *Journal of Thermal Biology*, 35 (8), 406-410, (2010).

Mirisola, M. G. and Longo, V. D., “Acetic acid and acidification accelerate chronological and replicative aging in yeast”, *Cell Cycle*, 11 (19), 3532-3533, (2012).

- Mirisola, M. G. and Longo, V. D., “Conserved role of Ras-GEFs in promoting aging: from yeast to mice”, *Aging (Albany NY)*, 3 (4), 340, (2011).
- Mirisola, M. G. and Longo, V. D., “Yeast chronological lifespan: longevity regulatory genes and mechanisms”, *Cells*, 11 (10), 1714, (2022).
- Mirończuk-Chodakowska, I., Witkowska, A. M. and Zujko, M. E., “Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body”, *Advances in medical sciences*, 63 (1), 68-78, (2018).
- Mirzayans, R. and Murray, D., “Do TUNEL and other apoptosis assays detect cell death in preclinical studies?”, *International Journal of Molecular Sciences*, 21 (23), 9090, (2020).
- Mittal, N., Guimaraes, J. C., Gross, T., Schmidt, A., Vina-Vilaseca, A., Nedialkova, D. D., ... and Zavolan, M., “The Gcn4 transcription factor reduces protein synthesis capacity and extends yeast lifespan”, *Nature communications*, 8 (1), 457, (2017).
- Mittl, P. R. and Schulz, G. E., “Structure of glutathione reductase from *Escherichia coli* at 1.86 Å resolution: comparison with the enzyme from human erythrocytes”, *Protein Science*, 3 (5), 799-809, (1994).
- Mittler, R., “ROS are good”, *Trends in plant science*, 22 (1), 11-19, (2017).
- Miwa, S., Riyahi, K., Partridge, L. and Brand, M. D., “Lack of correlation between mitochondrial reactive oxygen species production and life span in *Drosophila*”, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1019 (1), 388-391, (2004).
- Modica-Napolitano, J. S. and Singh, K. K., “Mitochondrial dysfunction in cancer”, *Mitochondrion*, 4 (5-6), 755-762, (2004).
- Moldogazieva, N. T., Mokhosoev, I. M., Mel'nikova, T. I., Porozov, Y. B. and Terentiev, A. A., “Oxidative stress and advanced lipoxidation and glycation end products (ALEs and AGEs) in aging and age-related diseases”, *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019 (1), 3085756, (2019).
- Moldoveanu, T., Grace, C. R., Llambi, F., Nourse, A., Fitzgerald, P., Gehring, K., ... and Green, D. R., “BID-induced structural changes in BAK promote apoptosis”, *Nature structural & molecular biology*, 20 (5), 589-597, (2013).
- Møller, I. M., Rogowska-Wrzesinska, A. and Rao, R. S. P., “Protein carbonylation and metal-catalyzed protein oxidation in a cellular perspective”, *Journal of proteomics*, 74 (11), 2228-2242, (2011).

- Moller, M., Botti, H., Batthyany, C., Rubbo, H., Radi, R. and Denicola, A., “Direct measurement of nitric oxide and oxygen partitioning into liposomes and low density lipoprotein”, *Journal of Biological Chemistry*, 280 (10), 8850-8854, (2005).
- Molon, M. and Zadrag-Tecza, R., “Effect of temperature on replicative aging of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*”, *Biogerontology*, 17, 347-357, (2016).
- Mondola, P., Serù, R., Santillo, M., Damiano, S., Bifulco, M., Laezza, C., ... and Ciriolo, M. R., “Effect of Cu, Zn superoxide dismutase on cholesterol metabolism in human hepatocarcinoma (HepG2) cells”, *Biochemical and biophysical research communications*, 295 (3), 603-609, (2002).
- Montagnier, L., Olivier, R. and Pasquier, C. (eds.), *Oxidative stress in cancer, AIDS and neurodegenerative diseases*, New York: Marcel Dekker, (1997).
- Moon, J., Kitty, I., Renata, K., Qin, S., Zhao, F. and Kim, W., “DNA damage and its role in cancer therapeutics”, *International Journal of Molecular Sciences*, 24 (5), 4741, (2023).
- Morais, C. L., Lima, K. M., Singh, M. and Martin, F. L., “Tutorial: multivariate classification for vibrational spectroscopy in biological samples”, *Nature Protocols*, 15 (7), 2143-2162, (2020).
- Morano, K. A., Grant, C. M. and Moye-Rowley, W. S., “The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Genetics*, 190 (4), 1157-1195, (2012).
- Morgunova, G. V., Klebanov, A. A., Marotta, F. and Khokhlov, A. N., “Culture medium pH and stationary phase/chronological aging of different cells”, *Moscow University Biological Sciences Bulletin*, 72, 47-51, (2017).
- Mortensen, A., Skibsted, L. H. and Truscott, T. G., “The interaction of dietary carotenoids with radical species”, *Archives of biochemistry and Biophysics*, 385 (1), 13-19, (2001).
- Mortimer, R. K. and Johnston, J. R., “Life span of individual yeast cells”, *Nature*, 183 (4677), 1751-1752, (1959).
- Moussa, Z., Judeh, Z. M. and Ahmed, S. A., “Nonenzymatic exogenous and endogenous antioxidants”, *Free radical medicine and biology*, 1, 11-22, (2019).
- Mouton, S. N., Boersma, A. J. and Veenhoff, L. M., “A physicochemical perspective on cellular ageing”, *Trends in Biochemical Sciences*, 48 (11), 949-962, (2023).

Mouton, S. N., Thaller, D. J., Crane, M. M., Rempel, I. L., Terpstra, O. T., Steen, A., ... and Veenhoff, L. M., "A physicochemical perspective of aging from single-cell analysis of pH, macromolecular and organellar crowding in yeast", *Elife*, 9, e54707, (2020).

Mukherjee, P., Desai, P., Zhou, Y. D. and Avery, M., "Targeting the BH3 domain mediated protein– protein interaction of Bcl-xL through virtual screening", *Journal of chemical information and modeling*, 50 (5), 906-923, (2010).

Mukherjee, S., Mahadik, S. P., Scheffer, R., Correnti, E. E. and Kelkar, H., "Impaired antioxidant defense at the onset of psychosis", *Schizophrenia Research*, 19 (1), 19-26, (1996).

Muller, E. G., "A glutathione reductase mutant of yeast accumulates high levels of oxidized glutathione and requires thioredoxin for growth", *Molecular biology of the cell*, 7 (11), 1805-1813, (1996).

Muller, E. G., "A redox-dependent function of thioredoxin is necessary to sustain a rapid rate of DNA synthesis in yeast", *Archives of biochemistry and biophysics*, 318 (2), 356-361, (1995).

Muller, E. G., "Deoxyribonucleotides are maintained at normal levels in a yeast thioredoxin mutant defective in DNA synthesis", *Journal of Biological Chemistry*, 269 (39), 24466-24471, (1994).

Muller, E. G., "Thioredoxin deficiency in yeast prolongs S phase and shortens the G1 interval of the cell cycle", *Journal of Biological Chemistry*, 266 (14), 9194-9202, (1991).

Muller, F. L., Lustgarten, M. S., Jang, Y., Richardson, A. and Van Remmen, H., "Trends in oxidative aging theories", *Free Radical Biology and Medicine*, 43 (4), 477-503, (2007).

Murakami, C., Delaney, J. R., Chou, A., Carr, D., Schleit, J., Sutphin, G. L., ... and Kaeberlein, M., "pH neutralization protects against reduction in replicative lifespan following chronological aging in yeast", *Cell cycle*, 11 (16), 3087-3096, (2012).

Murphy, M. P., "How mitochondria produce reactive oxygen species", *Biochemical journal*, 417 (1), 1-13, (2009).

Naini, A., Musumeci, O., Hayes, L., Pallotti, F., Del Bene, M. and Mitumoto, H., "Identification of a novel mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene associated with familial amyotrophic lateral sclerosis", *Journal of the neurological sciences*, 198 (1-2), 17-19, (2002).

Najjar, F. M., Ghadari, R., Yousefi, R., Safari, N., Sheikhhasani, V., Sheibani, N. and Moosavi-Movahedi, A. A., “Studies to reveal the nature of interactions between catalase and curcumin using computational methods and optical techniques”, *International journal of biological macromolecules*, 95, 550-556, (2017a).

Najjar, F. M., Taghavi, F., Ghadari, R., Sheibani, N. and Moosavi-Movahedi, A. A., “Destructive effect of non-enzymatic glycation on catalase and remediation via curcumin”, *Archives of biochemistry and biophysics*, 630, 81-90, (2017b).

Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B. A. and Yuan, J., “Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- β ”, *Nature*, 403 (6765), 98-103, (2000).

Nakagawa, Y., Kanbe, T. and Mizuguchi, I., “Disruption of the human pathogenic yeast *Candida albicans* catalase gene decreases survival in mouse-model infection and elevates susceptibility to higher temperature and to detergents”, *Microbiology and immunology*, 47 (6), 395-403, (2003).

Nakano, A., “Yeast Golgi apparatus–dynamics and sorting”, *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 61, 186-191, (2004).

Nakano, T., Miyamoto-Matsubara, M., Shoukamy, M. I., Salem, A. M., Pack, S. P., Ishimi, Y. and Ide, H., “Translocation and stability of replicative DNA helicases upon encountering DNA-protein cross-links”, *Journal of Biological Chemistry*, 288 (7), 4649-4658, (2013).

Nakano, T., Morishita, S., Katafuchi, A., Matsubara, M., Horikawa, Y., Terato, H., ... and Ide, H., “Nucleotide excision repair and homologous recombination systems commit differentially to the repair of DNA-protein crosslinks”, *Molecular cell*, 28 (1), 147-158, (2007).

Nandi, A., Yan, L. J., Jana, C. K. and Das, N., “Role of catalase in oxidative stress-and age-associated degenerative diseases”, *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019 (1), 9613090, (2019).

Navarro-Alarcon, M., Ruiz-Ojeda, F. J., Blanca-Herrera, R. M. and Agil, A., “Antioxidant activity of melatonin in diabetes in relation to the regulation and levels of plasma Cu, Zn, Fe, Mn, and Se in Zucker diabetic fatty rats”, *Nutrition*, 29 (5), 785-789, (2013).

Naziroğlu, M. and Butterworth, P. J., “Protective effects of moderate exercise with dietary vitamin C and E on blood antioxidative defense mechanism in rats with streptozotocin-induced diabetes”, *Canadian journal of applied physiology*, 30 (2), 172-185, (2005).

Negre-Salvayre, A., Coatrieux, C., Ingueneau, C. and Salvayre, R., “Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors”, *British journal of pharmacology*, 153 (1), 6-20, (2008).

Nestelbacher, R., Laun, P., Vondráková, D., Pichová, A., Schüller, C. and Breitenbach, M., “The influence of oxygen toxicity on yeast mother cell-specific aging”, *Experimental gerontology*, 35 (1), 63-70, (2000).

Ng, C. Y., Kamisah, Y., Faizah, O. and Jaarin, K., “The role of repeatedly heated soybean oil in the development of hypertension in rats: association with vascular inflammation”, *International Journal of Experimental Pathology*, 93 (5), 377-387, (2012).

Nguyen, T. D., Guyot, S., Pénicaud, C., Passot, S., Sandt, C., Fonseca, F., ... and Husson, F., “Highlighting protective effect of encapsulation on yeast cell response to dehydration using synchrotron infrared microspectroscopy at the single-cell level”, *Frontiers in Microbiology*, 11, 1887, (2020).

Niedernhofer, L. J., Daniels, J. S., Rouzer, C. A., Greene, R. E. and Marnett, L. J., “Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells”, *Journal of Biological Chemistry*, 278 (33), 31426-31433, (2003).

Nijveldt, R. J., Van Nood, E. L. S., Van Hoorn, D. E., Boelens, P. G., Van Norren, K. and Van Leeuwen, P. A., “Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications”, *The American journal of clinical nutrition*, 74 (4), 418-425, (2001).

Niki, E. and Noguchi, N., “Dynamics of antioxidant action of vitamin E”, *Accounts of chemical research*, 37 (1), 45-51, (2004).

Niles, J. C., Wishnok, J. S. and Tannenbaum, S. R., “Peroxynitrite-induced oxidation and nitration products of guanine and 8-oxoguanine: structures and mechanisms of product formation”, *Nitric oxide*, 14 (2), 109-121, (2006).

Njus, D., Kelley, P. M., Tu, Y. J. and Schlegel, H. B., “Ascorbic acid: The chemistry underlying its antioxidant properties”, *Free Radical Biology and Medicine*, 159, 37-43, (2020).

Nocentini, A., Bonardi, A., Pratesi, S., Gratteri, P., Dani, C. and Supuran, C. T., “Pharmaceutical strategies for preventing toxicity and promoting antioxidant and anti-inflammatory actions of bilirubin”, *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 37 (1), 487-501, (2022).

- Noctor, G., Queval, G., Mhamdi, A., Chaouch, S. and Foyer, C. H., “Glutathione”, *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, 9, 1-32, (2011).
- Noguchi, C., Wang, L., Shetty, M., Mell, J. C., Sell, C. and Noguchi, E., “Maf1 limits RNA polymerase III-directed transcription to preserve genomic integrity and extend lifespan”, *Cell Cycle*, 20 (3), 247-255, (2021).
- Noh, S., Go, A., Kim, D. B., Park, M., Jeon, H. W. and Kim, B., “Role of antioxidant natural products in management of infertility: a review of their medicinal potential”, *Antioxidants*, 9 (10), 957, (2020).
- Nordberg, J. and Arnér, E. S., “Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system”, *Free radical biology and medicine*, 31 (11), 1287-1312, (2001).
- Novarina, D., Janssens, G. E., Bokern, K., Schut, T., van Oerle, N. C., Kazemier, H. G., ... and Chang, M., “A genome-wide screen identifies genes that suppress the accumulation of spontaneous mutations in young and aged yeast cells”, *Aging Cell*, 19 (2), e13084, (2020).
- Nunes, E. and Siede, W., “Hyperthermia and paraquat-induced G1 arrest in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is independent of the RAD9 gene”, *Radiation and environmental biophysics*, 35 (1), 55-57, (1996).
- Obeng, E., “Apoptosis (programmed cell death) and its signals-A review”, *Brazilian Journal of Biology*, 81 (4), 1133-1143, (2020).
- Oberg, K. A., Ruysschaert, J. M. and Goormaghtigh, E., “The optimization of protein secondary structure determination with infrared and circular dichroism spectra”, *European journal of biochemistry*, 271 (14), 2937-2948, (2004).
- Ocampo, A. and Barrientos, A., “Quick and reliable assessment of chronological life span in yeast cell populations by flow cytometry”, *Mechanisms of ageing and development*, 132 (6-7), 315-323, (2011).
- Ocampo, A., Liu, J., Schroeder, E. A., Shadel, G. S. and Barrientos, A., “Mitochondrial respiratory thresholds regulate yeast chronological life span and its extension by caloric restriction”, *Cell metabolism*, 16 (1), 55-67, (2012).
- Ohdate, T., Kita, K. and Inoue, Y., “Kinetics and redox regulation of Gpx1, an atypical 2-Cys peroxiredoxin, in *Saccharomyces cerevisiae*”, *FEMS yeast research*, 10 (6), 787-790, (2010).

Ohtsuka, H., Shimasaki, T. and Aiba, H., “Genes affecting the extension of chronological lifespan in *Schizosaccharomyces pombe* (fission yeast)”, *Molecular Microbiology*, 115 (4), 623-642, (2021).

Okado-Matsumoto, A. and Fridovich, I., “Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu, Zn-SOD in mitochondria”, *Journal of Biological Chemistry*, 276 (42), 38388-38393, (2001).

Okamoto, K., Kondo-Okamoto, N. and Ohsumi, Y., “Mitochondria-anchored receptor Atg32 mediates degradation of mitochondria via selective autophagy”, *Developmental cell*, 17 (1), 87-97, (2009).

O’Kennedy, K. and Reid, G., “Yeast nutrient management in winemaking”, *Australian and New Zealand grapegrower and winemaker*, 537, 92-100, (2008).

Oliveira, P., Martins, N. M., Santos, M., Couto, N. A., Wright, P. C. and Tamagnini, P., “The *Anabaena* sp. PCC 7120 exoproteome: taking a peek outside the box”, *Life*, 5 (1), 130-163, (2015).

Oltsersdorf, T., Elmore, S. W., Shoemaker, A. R., Armstrong, R. C., Augeri, D. J., Belli, B. A., ... and Rosenberg, S. H., “An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours”, *Nature*, 435 (7042), 677-681, (2005).

O’Neill, K. L., Huang, K., Zhang, J., Chen, Y. and Luo, X., “Inactivation of prosurvival Bcl-2 proteins activates Bax/Bak through the outer mitochondrial membrane”, *Genes & development*, 30 (8), 973-988, (2016).

Opferman, J. T. and Kothari, A., “Anti-apoptotic BCL-2 family members in development”, *Cell Death & Differentiation*, 25 (1), 37-45, (2018).

Orallo, F., Álvarez, E., Camiña, M., Leiro, J. M., Gómez, E. and Fernández, P., “The possible implication of trans-resveratrol in the cardioprotective effects of long-term moderate wine consumption”, *Molecular pharmacology*, 61 (2), 294-302, (2002).

Orlandi, I., Ronzulli, R., Casatta, N. and Vai, M., “Ethanol and acetate acting as carbon/energy sources negatively affect yeast chronological aging”, *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2013 (1), 802870, (2013).

Orozco, H., Matallana, E. and Aranda, A., “Genetic manipulation of longevity-related genes as a tool to regulate yeast life span and metabolite production during winemaking”, *Microbial Cell Factories*, 12 (1), 1-14, (2013).

- Orumets, K., Kevvai, K., Nisamedtinov, I., Tamm, T. and Paalme, T., “YAP1 over-expression in *Saccharomyces cerevisiae* enhances glutathione accumulation at its biosynthesis and substrate availability levels”, *Biotechnology journal*, 7 (4), 566-568, (2012).
- Østergaard, H., Tachibana, C. and Winther, J. R., “Monitoring disulfide bond formation in the eukaryotic cytosol”, *The Journal of cell biology*, 166 (3), 337-345, (2004).
- Otagiri, M. and Chuang, V. T. G., “Pharmaceutically important pre-and posttranslational modifications on human serum albumin”, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 32 (4), 527-534, (2009).
- Othman, A. I., El-Missiry, M. A., Amer, M. A. and Arafa, M., “Melatonin controls oxidative stress and modulates iron, ferritin, and transferrin levels in adriamycin treated rats”, *Life sciences*, 83 (15-16), 563-568, (2008).
- Outeiro, T. F. and Lindquist, S., “Yeast cells provide insight into alpha-synuclein biology and pathobiology”, *Science*, 302 (5651), 1772-1775, (2003).
- Outten, C. E. and Culotta, V. C., “Alternative start sites in the *Saccharomyces cerevisiae* GLR1 gene are responsible for mitochondrial and cytosolic isoforms of glutathione reductase”, *Journal of Biological Chemistry*, 279 (9), 7785-7791, (2004).
- Owsiak, A., Bartosz, G. and Bilinski, T., “Oxidative stress during aging of the yeast in a stationary culture and its attenuation by antioxidants”, *Cell biology international*, 34 (7), 731-736, (2010).
- Özmen, B., Özmen, D., Erkin, E., Güner, İ., Habif, S. and Bayındır, O., “Lens superoxide dismutase and catalase activities in diabetic cataract”, *Clinical Biochemistry*, 35 (1), 69-72, (2002).
- Packer, J. E., Slater, T. and Willson, R. L., “Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C”, *Nature*, 278 (5706), 737-738, (1979).
- Palermo, V., Falcone, C., Calvani, M. and Mazzoni, C., “Acetyl-L-carnitine protects yeast cells from apoptosis and aging and inhibits mitochondrial fission”, *Aging cell*, 9 (4), 570-579, (2010).
- Palozza, P., “Prooxidant actions of carotenoids in biologic systems”, *Nutrition reviews*, 56 (9), 257-265, (1998).
- Pamplona, R., “Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular integrity: a causal role in aging and longevity”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1777 (10), 1249-1262, (2008).

Pan, Y. and Shadel, G. S., “Extension of chronological life span by reduced TOR signaling requires down-regulation of Sch9p and involves increased mitochondrial OXPHOS complex density”, *Aging (Albany NY)*, 1 (1), 131, (2009).

Pan, Y., Schroeder, E. A., Ocampo, A., Barrientos, A. and Shadel, G. S., “Regulation of yeast chronological life span by TORC1 via adaptive mitochondrial ROS signaling”, *Cell metabolism*, 13 (6), 668-678, (2011).

Pandi-Perumal, S. R., Trakht, I., Srinivasan, V., Spence, D. W., Maestroni, G. J., Zisapel, N. and Cardinali, D. P., “Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways”, *Progress in neurobiology*, 85 (3), 335-353, (2008).

Papastergiadis, A., Mubiru, E., Van Langenhove, H. and De Meulenaer, B., “Malondialdehyde measurement in oxidized foods: evaluation of the spectrophotometric thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) test in various foods”, *Journal of agricultural and food chemistry*, 60 (38), 9589-9594, (2012).

Park, C. M., Bruncko, M., Adickes, J., Bauch, J., Ding, H., Kunzer, A., ... and Elmore, S. W., “Discovery of an orally bioavailable small molecule inhibitor of prosurvival B-cell lymphoma 2 proteins”, *Journal of medicinal chemistry*, 51 (21), 6902-6915, (2008).

Park, J. I., Collinson, E. J., Grant, C. M. and Dawes, I. W., “Rom2p, the Rho1 GTP/GDP exchange factor of *Saccharomyces cerevisiae*, can mediate stress responses via the Ras-cAMP pathway”, *Journal of Biological Chemistry*, 280 (4), 2529-2535, (2005).

Park, J. I., Grant, C. M., Davies, M. J. and Dawes, I. W., “The cytoplasmic Cu, Zn superoxide dismutase of *Saccharomyces cerevisiae* is required for resistance to freeze-thaw stress: generation of free radicals during freezing and thawing”, *Journal of Biological Chemistry*, 273 (36), 22921-22928, (1998).

Parrella, E. and Longo, V. D., “The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae* to study mitochondrial dysfunction and disease”, *Methods*, 46 (4), 256-262, (2008).

Pascual-Ahuir, A. and Proft, M., “The Sch9 kinase is a chromatin-associated transcriptional activator of osmostress-responsive genes”, *The EMBO Journal*, 26 (13), 3098-3108, (2007).

Pascual-Ahuir, A., González-Cantó, E., Juyoux, P., Pable, J., Poveda-Huertes, D., Saiz-Balbastre, S., ... and Proft, M., “Dose dependent gene expression is dynamically modulated by the history, physiology and age of yeast

cells”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1862 (4), 457-471, (2019).

Pastore, A., Federici, G., Bertini, E. and Piemonte, F., “Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification”, *Clinica chimica acta*, 333 (1), 19-39, (2003).

Patil, C. S., Singh, V. P., Satyanarayan, P. S. V., Jain, N. K., Singh, A. and Kulkarni, S. K., “Protective effect of flavonoids against aging-and lipopolysaccharide-induced cognitive impairment in mice”, *Pharmacology*, 69 (2), 59-67, (2003).

Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X. H., Mizushima, N., ... and Levine, B., “Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy”, *Cell*, 122 (6), 927-939, (2005).

Patwardhan, R. S., Sharma, D. and Sandur, S. K., “Thioredoxin reductase: An emerging pharmacologic target for radiosensitization of cancer”, *Translational oncology*, 17, 101341, (2022).

Pawelczak, P., Fedoruk-Wyszomirska, A. and Wyszko, E., “Antiaging effect of 4-n-furfurylcytosine in yeast model manifests through enhancement of mitochondrial activity and ROS reduction”, *Antioxidants*, 11 (5), 850, (2022).

Pedrajas, J. R., Kosmidou, E., Miranda-Vizuete, A., Gustafsson, J. Å., Wright, A. P. and Spyrou, G., “Identification and functional characterization of a novel mitochondrial thioredoxin system in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Journal of Biological Chemistry*, 274 (10), 6366-6373, (1999).

Pedrajas, J. R., Miranda-Vizuete, A., Javanmardy, N., Gustafsson, J. Å. and Spyrou, G., “Mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* contain one-conserved cysteine type peroxiredoxin with thioredoxin peroxidase activity”, *Journal of Biological Chemistry*, 275 (21), 16296-16301, (2000).

Pellegrini, N., Vitaglione, P., Granato, D. and Fogliano, V., “Twenty-five years of total antioxidant capacity measurement of foods and biological fluids: merits and limitations”, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100 (14), 5064-5078, (2020).

Percival M., Clinical nutrition insights, Advanced nutrition publications, Inc., Revised, 1-4, (1998).

Pereira, M. D., Herdeiro, R. S., Fernandes, P. N., Eleutherio, E. C. A. and Panek, A. D., “Targets of oxidative stress in yeast sod mutants”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1620 (1-3), 245-251, (2003).

- Perrone, G. G., Tan, S. X. and Dawes, I. W., "Reactive oxygen species and yeast apoptosis", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1783 (7), 1354-1368, (2008).
- Pervaiz, S. and Clement, M. V., "Superoxide anion: oncogenic reactive oxygen species?", *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39 (7-8), 1297-1304, (2007).
- Peskin, A. V., Koen, Y. M. and Zbarsky, I. B., "Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in tumors", *FEBS letters*, 78 (1), 41-45, (1977).
- Petrie, J. R., Guzik, T. J. and Touyz, R. M., "Diabetes, hypertension, and cardiovascular disease: clinical insights and vascular mechanisms", *Canadian Journal of Cardiology*, 34 (5), 575-584, (2018).
- Pézerat, H., Zalma, R., Guignard, J. and Jaurand, M. C., "Production of oxygen radicals by the reduction of oxygen arising from the surface activity of mineral fibres", *IARC Scientific Publications*, 90, 100-111, (1989).
- Pichová, A., Vondráková, D. and Breitenbach, M., "Mutants in the *Saccharomyces cerevisiae* RAS2 gene influence life span, cytoskeleton, and regulation of mitosis", *Canadian journal of microbiology*, 43 (8), 774-781, (1997).
- Piper, P. W., "Maximising the yeast chronological lifespan", *Aging research in yeast*, 145-159, (2012).
- Piper, P. W., Harris, N. L. and MacLean, M., "Preadaptation to efficient respiratory maintenance is essential both for maximal longevity and the retention of replicative potential in chronologically ageing yeast", *Mechanisms of ageing and development*, 127 (9), 733-740, (2006).
- Pisoschi, A. M. and Pop, A., "The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review", *European journal of medicinal chemistry*, 97, 55-74, (2015).
- Pisoschi, A. M., Pop, A., Iordache, F., Stanca, L., Predoi, G. and Serban, A. I., "Oxidative stress mitigation by antioxidants-an overview on their chemistry and influences on health status", *European Journal of Medicinal Chemistry*, 209, 112891, (2021).
- Plymate, S. R., Haugk, K. H., Sprenger, C. C., Nelson, P. S., Tennant, M. K., Zhang, Y., ... and Oberley, T. D., "Increased manganese superoxide dismutase (SOD-2) is part of the mechanism for prostate tumor suppression by Mac25/insulin-like growth factor binding-protein-related protein-1", *Oncogene*, 22 (7), 1024-1034, (2003).

- Pohl, S. Ö. G., Agostino, M., Dharmarajan, A. and Pervaiz, S., “Cross talk between cellular redox state and the antiapoptotic protein Bcl-2”, *Antioxidants & Redox Signaling*, 29 (13), 1215-1236, (2018).
- Polak, P. and Hall, M. N., “mTOR and the control of whole body metabolism”, *Current opinion in cell biology*, 21 (2), 209-218, (2009).
- Polčič, P., Jaká, P. and Mentel, M., “Yeast as a tool for studying proteins of the Bcl-2 family”, *Microbial Cell*, 2 (3), 74, (2015).
- Pomatto, L. C. and Davies, K. J., “Adaptive homeostasis and the free radical theory of ageing”, *Free Radical Biology and Medicine*, 124, 420-430, (2018).
- Pompella, A., Corti, A., Paolicchi, A., Giommarelli, C. and Zunino, F., “ γ -Glutamyltransferase, redox regulation and cancer drug resistance”, *Current opinion in pharmacology*, 7 (4), 360-366, (2007).
- Popa-Wagner, A., Mitran, S., Sivanesan, S., Chang, E. and Buga, A. M., “ROS and brain diseases: the good, the bad, and the ugly”, *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2013 (1), 963520, (2013).
- Porcelli, A. M., Ghelli, A. N. N. A., Iommarini, L., Mariani, E., Hoque, M., Zanna, C., ... and Rugolo, M., “The antioxidant function of Bcl-2 preserves cytoskeletal stability of cells with defective respiratory complex I”, *Cellular and molecular life sciences*, 65, 2943-2951, (2008).
- Porter, N. A., Caldwell, S. E. and Mills, K. A., “Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids”, *Lipids*, 30 (4), 277-290, (1995).
- Postnikoff, S. D., Johnson, J. E. and Tyler, J. K., “The integrated stress response in budding yeast lifespan extension”, *Microbial Cell*, 4 (11), 368, (2017).
- Powell, C. D., Quain, D. E. and Smart, K. A., “Chitin scar breaks in aged *Saccharomyces cerevisiae*”, *Microbiology*, 149 (11), 3129-3137, (2003).
- Powell, C. D., Quain, D. E. and Smart, K. A., “The impact of media composition and petite mutation on the longevity of a polyploid brewing yeast strain”, *Letters in applied microbiology*, 31 (1), 46-51, (2000).
- Powers, R. W., Kaeberlein, M., Caldwell, S. D., Kennedy, B. K. and Fields, S., “Extension of chronological life span in yeast by decreased TOR pathway signaling”, *Genes & development*, 20 (2), 174-184, (2006).
- Price, D. J. and Joshi, J. G., “Ferritin. Binding of beryllium and other divalent metal ions”, *Journal of Biological Chemistry*, 258 (18), 10873-10880, (1983).

Pryor, W. A., “Vitamin E and heart disease:: Basic science to clinical intervention trials”, *Free Radical Biology and Medicine*, 28 (1), 141-164, (2000).

Psciuk, B. T., Lord, R. L., Munk, B. H. and Schlegel, H. B., “Theoretical determination of one-electron oxidation potentials for nucleic acid bases”, *Journal of Chemical Theory and Computation*, 8 (12), 5107-5123, (2012).

Puentes-Pardo, J. D., Moreno-SanJuan, S., Carazo, Á. and León, J., “Heme oxygenase-1 in gastrointestinal tract health and disease”, *Antioxidants*, 9 (12), 1214, (2020).

Quera Salva, A. M., Hartley, S., Barbot, F., Alvarez, C. J., Lofaso, F. and Guilleminault, C., “Circadian rhythms, melatonin and depression”, *Current pharmaceutical design*, 17 (15), 1459-1470, (2011).

Quinlan, G. J., Martin, G. S. and Evans, T. W., “Albumin: biochemical properties and therapeutic potential”, *Hepatology*, 41 (6), 1211-1219, (2005).

R Kelley, M., M Georgiadis, M. and L Fishel, M., “APE1/Ref-1 role in redox signaling: translational applications of targeting the redox function of the DNA repair/redox protein APE1/Ref-1”, *Current molecular pharmacology*, 5 (1), 36-53, (2012).

Raghavendran, V., Marx, C., Olsson, L. and Bettiga, M., “The protective role of intracellular glutathione in *Saccharomyces cerevisiae* during lignocellulosic ethanol production”, *AMB Express*, 10, 1-8, (2020).

Rai, N. K., Tripathi, K., Sharma, D. and Shukla, V. K., “Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing”, *The international journal of lower extremity wounds*, 4 (3), 138-144, (2005).

Rai, R. and Cooper, T. G., “In vivo specificity of Ure2 protection from heavy metal ion and oxidative cellular damage in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Yeast*, 22 (5), 343-358, (2005).

Ralser, M., Michel, S. and Breitenbach, M., “Sirtuins as regulators of the yeast metabolic network”, *Frontiers in Pharmacology*, 3, 32, (2012).

Rambold, A. S. and Lippincott-Schwartz, J., “Mechanisms of mitochondria and autophagy crosstalk”, *Cell cycle*, 10 (23), 4032-4038, (2011).

Ramsden, C. E., Ringel, A., Feldstein, A. E., Taha, A. Y., MacIntosh, B. A., Hibbeln, J. R., ... and Mann, J. D., “Lowering dietary linoleic acid reduces bioactive oxidized linoleic acid metabolites in humans”, *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 87 (4-5), 135-141, (2012).

Rasmussen, A. K., Chatterjee, A., Rasmussen, L. J. and Singh, K. K., "Mitochondria-mediated nuclear mutator phenotype in *Saccharomyces cerevisiae*", *Nucleic acids research*, 31 (14), 3909-3917, (2003).

Raspor, P., Plesničar, S., Gazdag, Z., Pesti, M., Miklavčič, M., Lah, B., ... and Poljšak, B., "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, (2005).

Ratliff, B. B., Abdulmahdi, W., Pawar, R. and Wolin, M. S., "Oxidant mechanisms in renal injury and disease", *Antioxidants & redox signaling*, 25 (3), 119-146, (2016).

Ray, P. D., Huang, B. W. and Tsuji, Y., "Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling", *Cellular signalling*, 24 (5), 981-990, (2012).

Reczek, C. R. and Chandel, N. S., "ROS-dependent signal transduction", *Current opinion in cell biology*, 33, 8-13, (2015).

Reddy, R. D. and Yao, J. K., "Free radical pathology in schizophrenia: a review", *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 55 (1-2), 33-43, (1996).

Reddy, R., Mahadik, S., Mukherjee, S. and Makar, T., "Neuroleptic Effects On The Enzymes Of The Anti-Oxidant Defense System In Manic And Schizophrenic Patients", *Biol. Psychiatry*, 31, 61A-252A, (1992).

Reed, T. T., "Lipid peroxidation and neurodegenerative disease", *Free Radical Biology and Medicine*, 51 (7), 1302-1319, (2011).

Reingruber, H. and Pontel, L. B., "Formaldehyde metabolism and its impact on human health", *Current opinion in toxicology*, 9, 28-34, (2018).

Reiter, R. J., Tan, D. X., Rosales-Corral, S., Galano, A., Zhou, X. J. and Xu, B., "Mitochondria: central organelles for melatonin's antioxidant and anti-aging actions", *Molecules*, 23 (2), 509, (2018).

Reiter, R., Tan, D. X., Mayo, J., Sainz, R., Leon, J. and Czarnocki, Z., "Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans", *Acta Biochimica Polonica*, 50 (4), 1129-1146, (2003).

Remm, M., Storm, C. E. and Sonnhammer, E. L., "Automatic clustering of orthologs and in-paralogs from pairwise species comparisons", *Journal of molecular biology*, 314 (5), 1041-1052, (2001).

- Requena, J. R., Chao, C. C., Levine, R. L. and Stadtman, E. R., “Glutamic and aminoadipic semialdehydes are the main carbonyl products of metal-catalyzed oxidation of proteins”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98 (1), 69-74, (2001).
- Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M. and Aggarwal, B. B., “Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?”, *Free radical biology and medicine*, 49 (11), 1603-1616, (2010).
- Reverter-Branchat, G., Cabiscol, E., Tamarit, J. and Ros, J., “Oxidative damage to specific proteins in replicative and chronological-aged *Saccharomyces cerevisiae*: common targets and prevention by calorie restriction”, *Journal of Biological Chemistry*, 279 (30), 31983-31989, (2004).
- Ribas, V., García-Ruiz, C. and Fernández-Checa, J. C., “Glutathione and mitochondria”, *Frontiers in pharmacology*, 5, 151, (2014).
- Richier, S., Merle, P. L., Furla, P., Pigozzi, D., Sola, F. and Allemand, D., “Characterization of superoxide dismutases in anoxia-and hyperoxia-tolerant symbiotic cnidarians”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1621 (1), 84-91, (2003).
- Robin, A. Y., Krishna Kumar, K., Westphal, D., Wardak, A. Z., Thompson, G. V., Dewson, G., ... and Czabotar, P. E., “Crystal structure of Bax bound to the BH3 peptide of Bim identifies important contacts for interaction”, *Cell death & disease*, 6 (7), e1809-e1809, (2015).
- Roche, M., Rondeau, P., Singh, N. R., Tarnus, E. and Bourdon, E., “The antioxidant properties of serum albumin”, *FEBS letters*, 582 (13), 1783-1787, (2008).
- Rohr-Udilova, N., Bauer, E., Timelthaler, G., Eferl, R., Stolze, K., Pinter, M., ... and Trauner, M., “Impact of glutathione peroxidase 4 on cell proliferation, angiogenesis and cytokine production in hepatocellular carcinoma”, *Oncotarget*, 9 (11), 10054, (2018).
- Roos, W. P. and Kaina, B., “DNA damage-induced cell death by apoptosis”, *Trends in molecular medicine*, 12 (9), 440-450, (2006).
- Rosenfeld, E. and Beauvoit, B., “Role of the non-respiratory pathways in the utilization of molecular oxygen by *Saccharomyces cerevisiae*”, *Yeast*, 20 (13), 1115-1144, (2003).
- Rosenfeld, E., Beauvoit, B., Rigoulet, M. and Salmon, J. M., “Non-respiratory oxygen consumption pathways in anaerobically-grown *Saccharomyces cerevisiae*: evidence and partial characterization”, *Yeast*, 19 (15), 1299-1321, (2002).

Rouchidane Eyitayo, A., Gonin, M., Arokium, H. and Manon, S., “Contribution of yeast studies to the understanding of BCL-2 family intracellular trafficking”, *International Journal of Molecular Sciences*, 22 (8), 4086, (2021).

Roux, A. E., Leroux, A., Alaamery, M. A., Hoffman, C. S., Chartrand, P., Ferbeyre, G. and Rokeach, L. A., “Pro-aging effects of glucose signaling through a G protein-coupled glucose receptor in fission yeast”, *PLoS genetics*, 5 (3), e1000408, (2009).

Roux, A. E., Quissac, A., Chartrand, P., Ferbeyre, G. and Rokeach, L. A., “Regulation of chronological aging in *Schizosaccharomyces pombe* by the protein kinases Pka1 and Sck2”, *Aging cell*, 5 (4), 345-357, (2006).

Roveri, A., Maiorino, M. and Ursini, F., “Enzymatic and immunological measurements of soluble and membrane-bound phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase”, *Methods in enzymology*, 233, 202-212, (1994).

Rowland, L. P. and Shneider, N. A., “Amyotrophic lateral sclerosis”, *New England Journal of Medicine*, 344 (22), 1688-1700, (2001).

Roy, S. S., Ehrlich, A. M., Craigen, W. J. and Hajnóczky, G., “VDAC2 is required for truncated BID-induced mitochondrial apoptosis by recruiting BAK to the mitochondria”, *EMBO reports*, 10 (12), 1341-1347, (2009).

Rozell, B., Holmgren, A. and Hansson, H. A., “Ultrastructural demonstration of thioredoxin and thioredoxin reductase in rat hepatocytes”, *European journal of cell biology*, 46 (3), 470-477, (1988).

Ruetenik, A. and Barrientos, A., “Dietary restriction, mitochondrial function and aging: from yeast to humans”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1847 (11), 1434-1447, (2015).

Ruis, H., “Regulation of yeast catalase genes”, *Molecular Biology of Free Radical Scavenging Systems*, 155-172, (1992).

Saez, I. and Vilchez, D., “The mechanistic links between proteasome activity, aging and age-related diseases”, *Current genomics*, 15 (1), 38-51, (2014).

Saez-Atienzar, S., Bonet-Ponce, L., da Casa, C., Perez-Dolz, L., Blesa, J. R., Nava, E., ... and Jordan, J., “Bcl-xL-mediated antioxidant function abrogates the disruption of mitochondrial dynamics induced by LRRK2 inhibition”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1862 (1), 20-31, (2016).

Saikumar, P., Dong, Z., Mikhailov, V., Denton, M., Weinberg, J. M. and Venkatachalam, M. A., “Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease”, *The American journal of medicine*, 107 (5), 489-506, (1999).

- Saikumar, P., Dong, Z., Weinberg, J. M. and Venkatachalam, M. A., “Mechanisms of cell death in hypoxia/reoxygenation injury”, *Oncogene*, 17 (25), 3341-3349, (1998).
- Saitoh, Y., Ouchida, R., Kayasuga, A. and Miwa, N., “Anti-apoptotic defense of bcl-2 gene against hydroperoxide-induced cytotoxicity together with suppressed lipid peroxidation, enhanced ascorbate uptake, and upregulated Bcl-2 protein”, *Journal of cellular biochemistry*, 89 (2), 321-334, (2003).
- Sakamoto, H. and Touati, D., “Cloning of the iron superoxide dismutase gene (sodB) in Escherichia coli K-12”, *Journal of bacteriology*, 159 (1), 418-420, (1984).
- Samokhvalov, V., Ignatov, V. and Kondrashova, M., “Reserve carbohydrates maintain the viability of Saccharomyces cerevisiae cells during chronological aging”, *Mechanisms of ageing and development*, 125 (3), 229-235, (2004).
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Ünsal-Kaçmaz, K. and Linn, S., “Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints”, *Annual review of biochemistry*, 73 (1), 39-85, (2004).
- Santos, L. O., Silva, P. G. P., Lemos Junior, W. J. F., de Oliveira, V. S. and Anschau, A., “Glutathione production by Saccharomyces cerevisiae: current state and perspectives”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106 (5), 1879-1894, (2022).
- Santos, M. I., Gerbino, E., Tymczyszyn, E. and Gomez-Zavaglia, A., “Applications of infrared and Raman spectroscopies to probiotic investigation”, *Foods*, 4 (3), 283-305, (2015).
- Santos-Buelga, C., González-Paramás, A. M., Oludemi, T., Ayuda-Durán, B. and González-Manzano, S., “Plant phenolics as functional food ingredients”, *Advances in food and nutrition research*, 90, 183-257, (2019).
- Saunders, N., Walshe, J., Serewko-Auret, M., Chu, F. F., Esworthy, S., Burcham, P. and Reeve, V., “Glutathione peroxidase deficiency is a predisposing factor for UV-induced SCC in humans”, *Cancer Research*, 67 (9_Supplement), 2632-2632, (2007).
- Savill, J. and Fadok, V., “Corpse clearance defines the meaning of cell death”, *Nature*, 407 (6805), 784-788, (2000).
- Scandalios, J. G., “Molecular genetics of superoxide dismutases in plants”, *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*, Scandalios, J. G. (Ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, USA, 527–568, (1997).

Scandalios, J. G., “The antioxidant enzyme genes Cat and Sod of maize: regulation, functional significance, and molecular biology”, *Isozymes: current topics in biological and medical research*, 14, 19-44, (1987).

Schaedle, M. and Bassham, J. A., “Chloroplast glutathione reductase”, *Plant physiology*, 59 (5), 1011-1012, (1977).

Schafer, F. Q. and Buettner, G. R., “Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple”, *Free radical biology and medicine*, 30 (11), 1191-1212, (2001).

Schaur, R. J., “Basic aspects of the biochemical reactivity of 4-hydroxynonenal”, *Molecular aspects of medicine*, 24 (4-5), 149-159, (2003).

Schieber, M. and Chandel, N. S., “ROS function in redox signaling and oxidative stress”, *Current biology*, 24 (10), R453-R462, (2014).

Schleit, J., Wasko, B. M. and Kaeberlein, M., “Yeast as a model to understand the interaction between genotype and the response to calorie restriction”, *FEBS letters*, 586 (18), 2868-2873, (2012).

Schmacht, M., Lorenz, E. and Senz, M., “Microbial production of glutathione”, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33, 1-13, (2017).

Schmedes, A. and Hølmer, G., “A new thiobarbituric acid (TBA) method for determining free malondialdehyde (MDA) and hydroperoxides selectively as a measure of lipid peroxidation”, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 66 (6), 813-817, (1989).

Schneider, P. and Tschopp, J., “Apoptosis induced by death receptors”, *Pharmacochimistry library*, 31, 281-286, (2000).

Schriner, S. E. and Linford, N. J., “Extension of mouse lifespan by overexpression of catalase”, *Age*, 28, 209-218, (2006).

Schriner, S. E., Linford, N. J., Martin, G. M., Treuting, P., Ogburn, C. E., Emond, M., ... and Rabinovitch, P. S., “Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria”, *Science*, 308 (5730), 1909-1911, (2005).

Schroeder, E. A., Raimundo, N. and Shadel, G. S., “Epigenetic silencing mediates mitochondria stress-induced longevity”, *Cell metabolism*, 17 (6), 954-964, (2013).

Schuster, S., Johnson, C. D., Hennebelle, M., Holtmann, T., Taha, A. Y., Kirpich, I. A., ... and Feldstein, A. E., “Oxidized linoleic acid metabolites

induce liver mitochondrial dysfunction, apoptosis, and NLRP3 activation in mice”, *Journal of lipid research*, 59 (9), 1597-1609, (2018).

Seppanen, C. M., Cho, H. and Csallany, A. S., “Comparison between high-PUFA and low-PUFA fats on lipid peroxidation and LDL oxidation”, *Food and Nutrition Sciences*, 4 (5), 572-579, (2013).

Shang, G., Niu, X., Tong, Q., Zhao, Y., Yin, J., Zhou, X., ... and Yao, W., “Integrated metabolomic and lipidomic analysis revealed the protective mechanisms of Erzhi Wan on senescent NRK cells through BRL cells”, *Journal of Ethnopharmacology*, 320, 117482, (2024).

Shapaval, V., Brandenburg, J., Blomqvist, J., Tafintseva, V., Passoth, V., Sandgren, M. and Kohler, A., “Biochemical profiling, prediction of total lipid content and fatty acid profile in oleaginous yeasts by FTIR spectroscopy”, *Biotechnology for biofuels*, 12, 1-12, (2019).

Shcheprova, Z., Baldi, S., Frei, S. B., Gonnet, G. and Barral, Y., “A mechanism for asymmetric segregation of age during yeast budding”, *Nature*, 454 (7205), 728-734, (2008).

Shen, N., Wang, T., Gan, Q., Liu, S., Wang, L. and Jin, B., “Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity”, *Food chemistry*, 383, 132531, (2022).

Sherman, F., “Getting started with yeast”, *Methods in enzymology*, 350, 3-41, (2002).

Sheu, S. S., Nauduri, D. and Anders, M. W., “Targeting antioxidants to mitochondria: a new therapeutic direction”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1762 (2), 256-265, (2006).

Sheweita, S. A., “Drug-metabolizing enzymes mechanisms and functions”, *Current drug metabolism*, 1 (2), 107-132, (2000).

Shi, Y., Lo, C. S., Chenier, I., Maachi, H., Filep, J. G., Ingelfinger, J. R., ... and Chan, J. S., “Overexpression of catalase prevents hypertension and tubulointerstitial fibrosis and normalization of renal angiotensin-converting enzyme-2 expression in Akita mice”, *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 304 (11), F1335-F1346, (2013).

Shi, Y., Ye, D., Cui, K., Bai, X., Fan, M., Feng, Y., ... and Huang, J., “Melatonin ameliorates retinal ganglion cell senescence and apoptosis in a SIRT1-dependent manner in an optic nerve injury model”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1870 (4), 167053, (2024).

Shields, H. J., Traa, A. and Van Raamsdonk, J. M., “Beneficial and detrimental effects of reactive oxygen species on lifespan: a comprehensive review of comparative and experimental studies”, *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 628157, (2021).

Shinozaki, Y., Koizumi, S., Ohno, Y., Nagao, T. and Inoue, K., “Extracellular ATP counteracts the ERK1/2-mediated death-promoting signaling cascades in astrocytes”, *Glia*, 54 (6), 606-618, (2006).

Shipelin, V. A. and Sidorova, Y. S., “Oxylipins-biologically active substances of food”, *Voprosy Pitaniia*, 89 (6), 6-13, (2020).

Shoeb, M., H Ansari, N., K Srivastava, S. and V Ramana, K., “4-Hydroxynonenal in the pathogenesis and progression of human diseases”, *Current medicinal chemistry*, 21 (2), 230-237, (2014).

Shoskes, D. A., “Effect of bioflavonoids quercetin and curcumin on ischemic renal injury: A New Class of Renoprotective Agents: 1”, *Transplantation*, 66 (2), 147-152, (1998).

Shrestha, A. and Megeney, L. A., “Yeast proteinopathy models: a robust tool for deciphering the basis of neurodegeneration”, *Microbial Cell*, 2 (12), 458, (2015).

Shukla, A., Gulumian, M., Hei, T. K., Kamp, D., Rahman, Q. and Mossman, B. T., “Multiple roles of oxidants in the pathogenesis of asbestos-induced diseases”, *Free Radical Biology and Medicine*, 34 (9), 1117-1129, (2003).

Shulaev, V. and Oliver, D. J., “Metabolic and proteomic markers for oxidative stress. New tools for reactive oxygen species research”, *Plant physiology*, 141 (2), 367-372, (2006).

Siegel, G., Ermilov, E., Pries, A. R., Winkler, K., Schmidt, A., Ringstad, L., ... and Lindman, B., “The significance of lipid peroxidation in cardiovascular disease”, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 442, 173-180, (2014).

Sies, H. and Stahl, W., “Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants”, *The American journal of clinical nutrition*, 62 (6), 1315S-1321S, (1995).

Sies, H., “Strategies of antioxidant defense”, *European journal of biochemistry*, 215 (2), 213-219, (1993).

Sies, H., Berndt, C. and Jones, D. P., “Oxidative stress”, *Annual review of biochemistry*, 86 (1), 715-748, (2017).

- Sies, H., Stahl, W. and Sundquist, A. R., “Antioxidant functions of vitamins. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids”, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 669, 7-20, (1992).
- Sinclair, D. A. and Guarente, L., “Extrachromosomal rDNA circles—a cause of aging in yeast”, *Cell*, 91 (7), 1033-1042, (1997).
- Sindhu, R. K., Kaur, P., Kaur, P., Singh, H., Batiha, G. E. S. and Verma, I., “Exploring multifunctional antioxidants as potential agents for management of neurological disorders”, *Environmental Science and Pollution Research*, 29 (17), 24458-24477, (2022).
- Singh, A., Kukreti, R., Saso, L. and Kukreti, S., “Oxidative stress: a key modulator in neurodegenerative diseases”, *Molecules*, 24 (8), 1583, (2019).
- Singh, R. R. and Reindl, K. M., “Glutathione S-transferases in cancer”, *Antioxidants*, 10 (5), 701, (2021).
- Singh, R., Letai, A. and Sarosiek, K., “Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins”, *Nature reviews Molecular cell biology*, 20 (3), 175-193, (2019).
- Sitte, N., Merker, K., von Zglinicki, T. and Grune, T., “Protein oxidation and degradation during proliferative senescence of human MRC-5 fibroblasts”, *Free Radical Biology and Medicine*, 28 (5), 701-708, (2000).
- Sj, S., Veerabhadrapa, B., Subramaniyan, S. and Dyavaiah, M., “Astaxanthin enhances the longevity of *Saccharomyces cerevisiae* by decreasing oxidative stress and apoptosis”, *FEMS yeast research*, 19 (1), foy113, (2019).
- Slaughter, B. D., Smith, S. E. and Li, R., “Symmetry breaking in the life cycle of the budding yeast”, *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1 (3), a003384, (2009).
- Slekar, K. H., Kosman, D. J. and Culotta, V. C., “The yeast copper/zinc superoxide dismutase and the pentose phosphate pathway play overlapping roles in oxidative stress protection”, *Journal of Biological Chemistry*, 271 (46), 28831-28836, (1996).
- Smith, D. L., McClure, J. M., Matecic, M. and Smith, J. S., “Calorie restriction extends the chronological lifespan of *Saccharomyces cerevisiae* independently of the Sirtuins”, *Aging cell*, 6 (5), 649-662, (2007).
- Smith, E. D., Tsuchiya, M., Fox, L. A., Dang, N., Hu, D., Kerr, E. O., ... and Kennedy, B. K., “Quantitative evidence for conserved longevity pathways between divergent eukaryotic species”, *Genome research*, 18 (4), 564-570, (2008).

Socrates, G., "Infrared and Raman characteristic group frequencies: tables and charts", John Wiley & Sons: Chichester, UK, (2004).

Song, J. and Pfeifer, G. P., "Are there specific readers of oxidized 5-methylcytosine bases?", *Bioessays*, 38 (10), 1038-1047, (2016).

Spector, D., Labarre, J. and Toledano, M. B., "A genetic investigation of the essential role of glutathione: mutations in the proline biosynthesis pathway are the only suppressors of glutathione auxotrophy in yeast", *Journal of biological chemistry*, 276 (10), 7011-7016, (2001).

Speranza, M. L., Ronchi, S. and Minchiotti, L., "Purification and characterization of yeast thioredoxin reductase", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 327 (2), 274-281, (1973).

Spickett, C. M., "The lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal: advances in chemistry and analysis", *Redox biology*, 1 (1), 145-152, (2013).

Spickett, C. M., Smirnoff, N. and Pitt, A. R., "The biosynthesis of erythroascorbate in *Saccharomyces cerevisiae* and its role as an antioxidant", *Free Radical Biology and Medicine*, 28 (2), 183-192, (2000).

Srikanth, C. V., Vats, P., Bourbouloux, A., Delrot, S. and Bachhawat, A. K., "Multiple cis-regulatory elements and the yeast sulphur regulatory network are required for the regulation of the yeast glutathione transporter, Hgt1p", *Current genetics*, 47, 345-358, (2005).

Stadtman, E. R. and Berlett, B. S., "Fenton chemistry. Amino acid oxidation", *Journal of Biological Chemistry*, 266 (26), 17201-17211, (1991).

Stadtman, E. R. and Levine, R. L., "Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins", *Amino acids*, 25, 207-218, (2003).

Stadtman, E. R., "Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences", *Free Radical Biology and Medicine*, 9 (4), 315-325, (1990).

Stadtman, E. R., "Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions", *Annual review of biochemistry*, 62, 797-821, (1993).

Stadtman, E. R., "Protein oxidation and aging", *Science*, 257 (5074), 1220-1224, (1992).

Stahl, W. and Sies, H., "Antioxidant activity of carotenoids", *Molecular aspects of medicine*, 24 (6), 345-351, (2003).

Stahl, W., Ale-Agha, N. and Polidori, M. C., “Non-antioxidant properties of carotenoids”, *Biological Chemistry*, 383, 553-558, (2002).

Steinkraus, K. A., Kaeberlein, M. and Kennedy, B. K., “Replicative aging in yeast: the means to the end”, *Annual review of cell and developmental biology*, 24 (1), 29-54, (2008).

Stępień, K., Wojdyła, D., Nowak, K. and Mołoń, M., “Impact of curcumin on replicative and chronological aging in the *Saccharomyces cerevisiae* yeast”, *Biogerontology*, 21 (1), 109-123, (2020).

Stewart, A. N., Glaser, E. P., Mott, C. A., Bailey, W. M., Sullivan, P. G., Patel, S. P. and Gensel, J. C., “Advanced age and neurotrauma diminish glutathione and impair antioxidant defense after spinal cord injury”, *Journal of Neurotrauma*, 39 (15-16), 1075-1089, (2022).

Sticova, E. and Jirsa, M., “New insights in bilirubin metabolism and their clinical implications”, *World Journal of Gastroenterology*, 19 (38), 6398, (2013).

Stinefelt, B., Leonard, S. S., Blemings, K. P., Shi, X. and Klandorf, H., “Free radical scavenging, DNA protection, and inhibition of lipid peroxidation mediated by uric acid”, *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 35 (1), 37-45, (2005).

Stumpferl, S. W., Brand, S. E., Jiang, J. C., Korona, B., Tiwari, A., Dai, J., ... and Jazwinski, S. M., “Natural genetic variation in yeast longevity”, *Genome research*, 22 (10), 1963-1973, (2012).

Sturtz, L. A., Diekert, K., Jensen, L. T., Lill, R. and Culotta, V. C., “A fraction of yeast Cu, Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria: a physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage”, *Journal of Biological Chemistry*, 276 (41), 38084-38089, (2001).

Su, L. J., Zhang, J. H., Gomez, H., Murugan, R., Hong, X., Xu, D., ... and Peng, Z. Y., “Reactive oxygen species-induced lipid peroxidation in apoptosis, autophagy, and ferroptosis”, *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019 (1), 5080843, (2019).

Sun, J., Kale, S. P., Childress, A. M., Pinswasdi, C. and Jazwinski, S. M., “Divergent roles of RAS1 and RAS2 in yeast longevity”, *Journal of Biological Chemistry*, 269 (28), 18638-18645, (1994).

Sun, Q. A., Kirnarsky, L., Sherman, S. and Gladyshev, V. N., “Selenoprotein oxidoreductase with specificity for thioredoxin and glutathione

systems”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98 (7), 3673-3678, (2001).

Sunthonkun, P., Palajai, R., Somboon, P., Suan, C. L., Ungsurangsri, M. and Soontorngun, N., “Life-span extension by pigmented rice bran in the model yeast *Saccharomyces cerevisiae*”, *Scientific Reports*, 9 (1), 18061, (2019).

Suzuki, M., Youle, R. J. and Tjandra, N., “Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization”, *Cell*, 103 (4), 645-654, (2000).

Suzuki, T., Yokoyama, A., Tsuji, T., Ikeshima, E., Nakashima, K., Ikushima, S., ... and Yoshida, S., “Identification and characterization of genes involved in glutathione production in yeast”, *Journal of bioscience and bioengineering*, 112 (2), 107-113, (2011).

Swinnen, E., Wilms, T., Idkowiak-Baldys, J., Smets, B., De Snijder, P., Accardo, S., ... and Winderickx, J., “The protein kinase Sch9 is a key regulator of sphingolipid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Molecular biology of the cell*, 25 (1), 196-211, (2014).

Szymanek, M., Chodorowska, G., Pietrzak, A. and Krasowska, D., “Apoptosis of T Lymphocytes in Systemic Sclerosis”, *Systemic Sclerosis-An Update on the Aberrant Immune System and Clinical Features*, 69-92, (2012).

Tahara, E. B., Barros, M. H., Oliveira, G. A., Netto, L. E. and Kowaltowski, A. J., “Dihydrolipoyl dehydrogenase as a source of reactive oxygen species inhibited by caloric restriction and involved in *Saccharomyces cerevisiae* aging”, *The FASEB Journal*, 21 (1), 274-283, (2007).

Tamaki, H., “Glucose-stimulated cAMP-protein kinase A pathway in yeast *Saccharomyces cerevisiae*”, *Journal of bioscience and bioengineering*, 104 (4), 245-250, (2007).

Tanaka, T., Izawa, S. and Inoue, Y., “GPX2, encoding a phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase homologue, codes for an atypical 2-Cys peroxiredoxin in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Journal of Biological Chemistry*, 280 (51), 42078-42087, (2005).

Tao, W., Kurschner, C. and Morgan, J. I., “Modulation of cell death in yeast by the Bcl-2 family of proteins”, *Journal of Biological Chemistry*, 272 (24), 15547-15552, (1997).

Tao, W., Kurschner, C. and Morgan, J. I., “Modulation of cell death in yeast by the Bcl-2 family of proteins”, *Journal of Biological Chemistry*, 272 (24), 15547-15552, (1997).

Tehrani, H. S. and Moosavi-Movahedi, A. A., “Catalase and its mysteries”, *Progress in biophysics and molecular biology*, 140, 5-12, (2018).

Teixeira, H. D., Schumacher, R. I. and Meneghini, R., “Lower intracellular hydrogen peroxide levels in cells overexpressing CuZn-superoxide dismutase”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95 (14), 7872-7875, (1998).

Telci, A., Çakatay, U., Salman, S., Satman, İ. and Sivas, A., “Oxidative protein damage in early stage Type 1 diabetic patients”, *Diabetes research and clinical practice*, 50 (3), 213-223, (2000).

Tell, G., Quadrifoglio, F., Tiribelli, C. and Kelley, M. R., “The many functions of APE1/Ref-1: not only a DNA repair enzyme”, *Antioxidants & redox signaling*, 11 (3), 601-619, (2009).

Terman, A. and Brunk, U. T., “Lipofuscin”, *The international journal of biochemistry & cell biology*, 36 (8), 1400-1404, (2004).

Terman, A., Dalen, H., Eaton, J. W., Neuzil, J. and Brunk, U. T., “Mitochondrial recycling and aging of cardiac myocytes: the role of autophagocytosis”, *Experimental gerontology*, 38 (8), 863-876, (2003).

Tesauro, M., Nisticò, S., Noce, A., Tarantino, A., Marrone, G., Costa, A., ... and Di Daniele, N., “The possible role of glutathione-S-transferase activity in diabetic nephropathy”, *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 28 (1), 129-133, (2015).

Tettamanti, G. and Casartelli, M., “Cell death during complete metamorphosis”, *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 374 (1783), 20190065, (2019).

Thorsen, M., Perrone, G. G., Kristiansson, E., Traini, M., Ye, T., Dawes, I. W., ... and Tamás, M. J., “Genetic basis of arsenite and cadmium tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*”, *BMC genomics*, 10, 1-15, (2009).

Tibell, L. A., Skärfstad, E. and Jonsson, B. H., “Determination of the structural role of the N-terminal domain of human extracellular superoxide dismutase by use of protein fusions”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1292 (1), 47-52, (1996).

Tissenbaum, H. A., “Using *C. elegans* for aging research”, *Invertebrate reproduction & development*, 59 (sup1), 59-63, (2015).

Todt, F., Cakir, Z., Reichenbach, F., Emschermann, F., Lauterwasser, J., Kaiser, A., ... and Edlich, F., “Differential retrotranslocation of mitochondrial Bax and Bak”, *The EMBO journal*, 34 (1), 67-80, (2015).

Tornaletti, S., Maeda, L. S. and Hanawalt, P. C., “Transcription arrest at an abasic site in the transcribed strand of template DNA”, *Chemical research in toxicology*, 19 (9), 1215-1220, (2006).

Touati, D., “Cloning and mapping of the manganese superoxide dismutase gene (sodA) of Escherichia coli K-12”, *Journal of bacteriology*, 155 (3), 1078-1087, (1983).

Toyokuni, S., “Mechanisms of asbestos-induced carcinogenesis”, *Nagoya journal of medical science*, 71 (1-2), 1, (2009).

Tram, N. K., McLean, R. M. and Swindle-Reilly, K. E., “Glutathione improves the antioxidant activity of vitamin C in human lens and retinal epithelial cells: implications for vitreous substitutes”, *Current Eye Research*, 46 (4), 470-481, (2021).

Trancíková, A., Weisová, P., Kiššová, I., Zeman, I. and Kolarov, J., “Production of reactive oxygen species and loss of viability in yeast mitochondrial mutants: protective effect of Bcl-xL”, *FEMS yeast research*, 5 (2), 149-156, (2004).

Tretyakova, N. Y., Groehler IV, A. and Ji, S., “DNA–protein cross-links: formation, structural identities, and biological outcomes”, *Accounts of chemical research*, 48 (6), 1631-1644, (2015).

Trotter, E. W. and Grant, C. M., “Non-reciprocal regulation of the redox state of the glutathione–glutaredoxin and thioredoxin systems”, *EMBO reports*, 4 (2), 184-188, (2003).

Trotter, E. W. and Grant, C. M., “Overlapping roles of the cytoplasmic and mitochondrial redox regulatory systems in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*”, *Eukaryotic cell*, 4 (2), 392-400, (2005).

Tsikas, D., “Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges”, *Analytical biochemistry*, 524, 13-30, (2017).

Tungmunnithum, D., Abid, M., Elamrani, A., Drouet, S., Addi, M. and Hano, C., “Almond skin extracts and chlorogenic acid delay chronological aging and enhanced oxidative stress response in yeast”, *Life*, 10 (6), 80, (2020).

Tungmunnithum, D., Drouet, S. and Hano, C., “Flavonoids from sacred lotus stamen extract slows chronological aging in yeast model by reducing oxidative stress and maintaining cellular metabolism”, *Cells*, 11 (4), 599, (2022).

Turton, H. E., Dawes, I. W. and Grant, C. M., “Saccharomyces cerevisiae exhibits a yAP-1-mediated adaptive response to malondialdehyde”, *Journal of bacteriology*, 179 (4), 1096-1101, (1997).

Tyczewska, A., Rzepczak, A., Sobańska, D. and Grzywacz, K., “The emerging roles of tRNAs and tRNA-derived fragments during aging: Lessons from studies on model organisms”, *Ageing Research Reviews*, 101863, (2023).

Uchida, K., “Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases”, *Free radical biology and medicine*, 28 (12), 1685-1696, (2000).

Unlu, E. S. and Koc, A., “Effects of deleting mitochondrial antioxidant genes on life span”, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1100 (1), 505-509, (2007).

Urban, J., Soulard, A., Huber, A., Lippman, S., Mukhopadhyay, D., Deloche, O., ... and Loewith, R., “Sch9 is a major target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Molecular cell*, 26 (5), 663-674, (2007).

Urig, S. and Becker, K., “On the potential of thioredoxin reductase inhibitors for cancer therapy”, *Seminars in cancer biology*, 16 (6), 452-465, (2006).

Valavanidis, A., Vlachogianni, T. and Fiotakis, C., “8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): a critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis”, *Journal of environmental science and health Part C*, 27 (2), 120-139, (2009).

Valdés, F., “Vitamina C”, *Actas dermo-sifiliográficas*, 97 (9), 557-568, (2006).

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M. and Telser, J., “Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease”, *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39 (1), 44-84, (2007).

Van Delft, M. F., Wei, A. H., Mason, K. D., Vandenberg, C. J., Chen, L., Czabotar, P. E., ... and Huang, D. C., “The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized”, *Cancer cell*, 10 (5), 389-399, (2006).

Van der Rest, M. E., Kamminga, A. H., Nakano, A., Anraku, Y., Poolman, B. and Konings, W. N., “The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function, and biogenesis”, *Microbiological reviews*, 59 (2), 304-322, (1995).

Van Loon, A. P., Pesold-Hurt, B. and Schatz, G., “A yeast mutant lacking mitochondrial manganese-superoxide dismutase is hypersensitive to

oxygen”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83 (11), 3820-3824, (1986).

Van Remmen, H., Hamilton, M. L. and Richardson, A., “Oxidative damage to DNA and aging”, *Exercise and Sport Sciences Reviews*, 31 (3), 149-153, (2003).

Vandebroek, T., Vanhelmont, T., Terwel, D., Borghgraef, P., Lemaire, K., Snauwaert, J., ... and Winderickx, J., “Identification and isolation of a hyperphosphorylated, conformationally changed intermediate of human protein tau expressed in yeast”, *Biochemistry*, 44 (34), 11466-11475, (2005).

Vanderwaeren, L., Dok, R., Voordeckers, K., Nuyts, S. and Verstrepen, K. J., “*Saccharomyces cerevisiae* as a model system for eukaryotic cell biology, from cell cycle control to DNA damage response”, *International Journal of Molecular Sciences*, 23 (19), 11665, (2022).

Vázquez, J., Grillitsch, K., Daum, G., Mas, A., Torija, M. J. and Beltran, G., “Melatonin minimizes the impact of oxidative stress induced by hydrogen peroxide in *Saccharomyces* and non-conventional yeast”, *Frontiers in Microbiology*, 9, 1933, (2018).

Verma, V. V., Gupta, R. and Goel, M., “Phylogenetic and evolutionary analysis of functional divergence among Gamma glutamyl transpeptidase (GGT) subfamilies”, *Biology Direct*, 10, 1-21, (2015).

Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. and Reutellingsperger, C., “A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V”, *Journal of immunological methods*, 184 (1), 39-51, (1995).

Vido, K., Spector, D., Lagniel, G., Lopez, S., Toledano, M. B. and Labarre, J., “A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Journal of Biological Chemistry*, 276 (11), 8469-8474, (2001).

Vina, J., Borras, C., Abdelaziz, K. M., Garcia-Valles, R. and Gomez-Cabrera, M. C., “The free radical theory of aging revisited: the cell signaling disruption theory of aging”, *Antioxidants & redox signaling*, 19 (8), 779-787, (2013).

Violi, F., Loffredo, L., Carnevale, R., Pignatelli, P. and Pastori, D., “Atherothrombosis and oxidative stress: mechanisms and management in elderly”, *Antioxidants & redox signaling*, 27 (14), 1083-1124, (2017).

Visser, M., Kritchevsky, S. B., Newman, A. B., Goodpaster, B. H., Tylavsky, F. A., Nevitt, M. C., ... and Study, B. C., “Lower serum albumin concentration and change in muscle mass: the Health, Aging and Body

Composition Study”, *The American journal of clinical nutrition*, 82 (3), 531-537, (2005).

Vitolo, M., “Overview on the biological role of free radicals”, *World Journal of Pharmaceutical Research*, 8 (13), 23-46, (2019).

Vogler, M., Furdas, S. D., Jung, M., Kuwana, T., Dyer, M. J. and Cohen, G. M., “Diminished sensitivity of chronic lymphocytic leukemia cells to ABT-737 and ABT-263 due to albumin binding in blood”, *Clinical Cancer Research*, 16 (16), 4217-4225, (2010).

Vona, R., Gambardella, L., Cittadini, C., Straface, E. and Pietraforte, D., “Biomarkers of oxidative stress in metabolic syndrome and associated diseases”, *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019 (1), 8267234, (2019).

Vucic, V., Isenovic, E. R., Adzic, M., Ruzdijic, S. and Radojcic, M. B., “Effects of gamma-radiation on cell growth, cycle arrest, death, and superoxide dismutase expression by DU 145 human prostate cancer cells”, *Brazilian journal of medical and biological research*, 39, 227-236, (2006).

Wall, S. B., Oh, J. Y., Diers, A. R. and Landar, A., “Oxidative modification of proteins: an emerging mechanism of cell signaling”, *Frontiers in physiology*, 3, 369, (2012).

Wallace, M. A., Liou, L. L., Martins, J., Clement, M. H., Bailey, S., Longo, V. D., ... and Gralla, E. B., “Superoxide inhibits 4Fe-4S cluster enzymes involved in amino acid biosynthesis: cross-compartment protection by CuZn-superoxide dismutase”, *Journal of Biological Chemistry*, 279 (31), 32055-32062, (2004).

Wande, Y., “Berberine alleviates pulmonary hypertension through Trx1 and β -catenin signaling pathways in pulmonary artery smooth muscle cells”, *Experimental cell research*, 390 (1), 111910, (2020).

Wang, D., Wu, M., Li, S., Gao, Q. and Zeng, Q., “Artemisinin mimics calorie restriction to extend yeast lifespan via a dual-phase mode: a conclusion drawn from global transcriptome profiling”, *Science China Life Sciences*, 58, 451-465, (2015).

Wang, J. and Wang, H., “Oxidative stress in pancreatic beta cell regeneration”, *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017 (1), 1930261, (2017).

- Wang, J., Jiang, J. C. and Jazwinski, S. M., “Gene regulatory changes in yeast during life extension by nutrient limitation”, *Experimental gerontology*, 45 (7-8), 621-631, (2010).
- Wang, L., Du, F. and Wang, X., “TNF- α induces two distinct caspase-8 activation pathways”, *Cell*, 133 (4), 693-703, (2008).
- Wang, R., Zhang, L., Wang, R., Dou, H., Li, H., Wang, Y., ... and Wang, R., “Spectroscopic study on the interaction of catalase with bifendate and analogs”, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 102, 88-98, (2013).
- Wang, S., Qiao, J., Jiang, C., Pan, D., Yu, S., Chen, J., ... and Liu, M., “Ginsenoside Rg1 Delays Chronological Aging in a Yeast Model via CDC19- and SDH2-Mediated Cellular Metabolism”, *Antioxidants*, 12 (2), 296, (2023).
- Wang, X., Sirianni, A., Pei, Z., Cormier, K., Smith, K., Jiang, J., ... and Friedlander, R. M., “The melatonin MT1 receptor axis modulates mutant Huntingtin-mediated toxicity”, *Journal of Neuroscience*, 31 (41), 14496-14507, (2011).
- Wang, Y. and Tjandra, N., “Structural insights of tBid, the caspase-8-activated Bid, and its BH3 domain”, *Journal of Biological Chemistry*, 288 (50), 35840-35851, (2013).
- Wang, Y., Lin, Y., Xiang, L., Osada, H. and Qi, J., “Sesquiterpene glucosides from Shenzhou honey peach fruit showed the anti-aging activity in the evaluation system using yeasts”, *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 81 (8), 1586-1590, (2017).
- Wang, Z., Tan, T. and Song, J., “Effect of amino acids addition and feedback control strategies on the high-cell-density cultivation of *Saccharomyces cerevisiae* for glutathione production”, *Process Biochemistry*, 42 (1), 108-111, (2007).
- Wasko, B. M., Carr, D. T., Tung, H., Doan, H., Schurman, N., Neault, J. R., ... and Kaeberlein, M., “Buffering the pH of the culture medium does not extend yeast replicative lifespan”, *F1000Research*, 2, (2013).
- Wauters, R., Britton, S. J. and Verstrepen, K. J., “Old yeasts, young beer—The industrial relevance of yeast chronological life span”, *Yeast*, 38 (6), 339-351, (2021).
- Wawryn, J., Krzepiłko, A., Myszka, A. and Biliński, T., “Deficiency in superoxide dismutases shortens life span of yeast cells”, *Acta Biochimica Polonica*, 46 (2), 249-253, (1999).

Weber, D., Davies, M. J. and Grune, T., “Determination of protein carbonyls in plasma, cell extracts, tissue homogenates, isolated proteins: Focus on sample preparation and derivatization conditions”, *Redox biology*, 5, 367-380, (2015).

Wei, M., Fabrizio, P., Hu, J., Ge, H., Cheng, C., Li, L. and Longo, V. D., “Life span extension by calorie restriction depends on Rim15 and transcription factors downstream of Ras/PKA, Tor, and Sch9”, *PLoS genetics*, 4 (1), e13, (2008).

Wei, M., Fabrizio, P., Madia, F., Hu, J., Ge, H., Li, L. M. and Longo, V. D., “Tor1/Sch9-regulated carbon source substitution is as effective as calorie restriction in life span extension”, *PLoS genetics*, 5 (5), e1000467, (2009).

Weinberger, M., Feng, L., Paul, A., Smith Jr, D. L., Hontz, R. D., Smith, J. S., ... and Burhans, W. C., “DNA replication stress is a determinant of chronological lifespan in budding yeast”, *PLoS one*, 2 (8), e748, (2007).

Weinberger, M., Mesquita, A., Carroll, T., Marks, L., Yang, H., Zhang, Z., ... and Burhans, W. C., “Growth signaling promotes chronological aging in budding yeast by inducing superoxide anions that inhibit quiescence”, *Aging (Albany NY)*, 2 (10), 709, (2010).

Weitzman, S. A. and Graceffa, P., “Asbestos catalyzes hydroxyl and superoxide radical generation from hydrogen peroxide”, *Archives of biochemistry and biophysics*, 228 (1), 373-376, (1984).

Wen, S., Zhang, T. and Tan, T., “Maximizing production of glutathione by amino acid modulation and high-cell-density fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae*”, *Process Biochemistry*, 41 (12), 2424-2428, (2006).

Wensink, M. J. and Cohen, A. A., “The Danaid theory of aging”, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 671208, (2022).

Wheeler, G. L., Trotter, E. W., Dawes, I. W. and Grant, C. M., “Coupling of the transcriptional regulation of glutathione biosynthesis to the availability of glutathione and methionine via the Met4 and Yap1 transcription factors”, *Journal of Biological Chemistry*, 278 (50), 49920-49928, (2003).

Wierman, M. B. and Smith, J. S., “Yeast sirtuins and the regulation of aging”, *FEMS yeast research*, 14 (1), 73-88, (2014).

Williams Jr, C. H., Arscott, L. D., Müller, S., Lennon, B. W., Ludwig, M. L., Wang, P. F., ... and Schirmer, R. H., “Thioredoxin reductase: two modes of catalysis have evolved”, *European journal of biochemistry*, 267 (20), 6110-6117, (2000).

Willingham, S., Outeiro, T. F., DeVit, M. J., Lindquist, S. L. and Muchowski, P. J., “Yeast genes that enhance the toxicity of a mutant huntingtin fragment or α -synuclein”, *Science*, 302 (5651), 1769-1772, (2003).

Winterbourn, C. C. and Hampton, M. B., “Thiol chemistry and specificity in redox signaling”, *Free Radical Biology and Medicine*, 45 (5), 549-561, (2008).

Winterbourn, C. C., Hampton M. B., Livesey J. H. and Kettle A. J., “Modeling the reactions of superoxide and myeloperoxidase in the neutrophil phagosome: implications for microbial killing”, *The Journal of Biological Chemistry*, 281 (52), 39860-39869, (2006).

Wiseman, H. and Halliwell, B., “Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer”, *Biochemical Journal*, 313, 17-29, (1996).

Wissing, S., Ludovico, P., Herker, E., Büttner, S., Engelhardt, S. M., Decker, T., ... and Madeo, F., “An AIF orthologue regulates apoptosis in yeast”, *The Journal of cell biology*, 166 (7), 969-974, (2004).

Wolfangel, P., Meyer, H. H. and Müller, K., “FTIR studies of phospholipid membranes containing monoacetylenic acyl chains”, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 1 (20), 4833-4841, (1999).

Wu, G., Lupton, J. R., Turner, N. D., Fang, Y. Z. and Yang, S., “Glutathione metabolism and its implications for health”, *The Journal of nutrition*, 134 (3), 489-492, (2004).

Wu, S., Li, Q., Du, M., Li, S. Y. and Ren, J., “Cardiac-specific overexpression of catalase prolongs lifespan and attenuates ageing-induced cardiomyocyte contractile dysfunction and protein damage”, *Clinical and experimental pharmacology and physiology*, 34 (1-2), 81-87, (2007).

Wu, Z., Song, L., Liu, S. Q. and Huang, D., “Independent and additive effects of glutamic acid and methionine on yeast longevity”, *PloS one*, 8 (11), e79319, (2013).

Wu, Z., Song, L., Liu, S. Q. and Huang, D., “Tanshinones extend chronological lifespan in budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*”, *Applied microbiology and biotechnology*, 98, 8617-8628, (2014).

Xiao, L., Xian, M., Zhang, C., Guo, Q. and Yi, Q., “Lipid peroxidation of immune cells in cancer”, *Frontiers in Immunology*, 14, 1322746, (2024).

Xu, A., Wu, L. J., Santella, R. M. and Hei, T. K., “Role of oxyradicals in mutagenicity and DNA damage induced by crocidolite asbestos in mammalian cells”, *Cancer research*, 59 (23), 5922-5926, (1999).

Xu, A., Zhou, H., Yu, D. Z. and Hei, T. K., “Mechanisms of the genotoxicity of crocidolite asbestos in mammalian cells: implication from mutation patterns induced by reactive oxygen species”, *Environmental Health Perspectives*, 110 (10), 1003-1008, (2002).

Xu, C., Li, C. Y. T. and Kong, A. N. T., “Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics”, *Archives of pharmacal research*, 28, 249-268, (2005).

Xu, P., Chen, Q., Chen, X., Qi, H., Yang, Y., Li, W., ... and Wu, Z., “Morusin and mulberrin extend the lifespans of yeast and *C. elegans* via suppressing nutrient-sensing pathways”, *GeroScience*, 45 (2), 949-964, (2023).

Xu, Z. and Wickner, W., “Thioredoxin is required for vacuole inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*”, *The Journal of cell biology*, 132 (5), 787-794, (1996).

Yakes, F. M. and Van Houten, B., “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*, 94 (2), 514-519, (1997).

Yamamoto, H., Koizumi, T., Kaneki, T., Hanaoka, M. and Kubo, K., “Effects of lecithinized superoxide dismutase and a neutrophil elastase inhibitor (ONO-5046) on hyperoxic lung injury in rat”, *European journal of pharmacology*, 409 (2), 179-183, (2000).

Yan, C., Duan, L., Fu, C., Tian, C., Zhang, B., Shao, X. and Zhu, G., “Association between glutathione S-transferase (GST) polymorphisms and schizophrenia in a Chinese Han population”, *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 479-487, (2020).

Yan, L. J. and Forster, M. J., “Chemical probes for analysis of carbonylated proteins: a review”, *Journal of Chromatography B*, 879 (17-18), 1308-1315, (2011).

Yang, B., Hao, F., Li, J., Chen, D. and Liu, R., “Binding of chrysoidine to catalase: spectroscopy, isothermal titration calorimetry and molecular docking studies”, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 128, 35-42, (2013).

Yang, H., Roberts, L. J., Shi, M. J., Zhou, L. C., Ballard, B. R., Richardson, A. and Guo, Z. M., “Retardation of atherosclerosis by overexpression of catalase or both Cu/Zn-superoxide dismutase and catalase in mice lacking apolipoprotein E”, *Circulation research*, 95 (11), 1075-1081, (2004).

Yang, Q. H., Church-Hajduk, R., Ren, J., Newton, M. L. and Du, C., “Omi/HtrA2 catalytic cleavage of inhibitor of apoptosis (IAP) irreversibly inactivates IAPs and facilitates caspase activity in apoptosis”, *Genes & development*, 17 (12), 1487-1496, (2003).

Yang, T. P. B. W. and Poovaiah, B. W., “Hydrogen peroxide homeostasis: activation of plant catalase by calcium/calmodulin”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99 (6), 4097-4102, (2002).

Yang, T., Zhong, P., Qu, L., Wang, C. and Yuan, Y., “Preparation and identification of anti-2, 4-dinitrophenyl monoclonal antibodies”, *Journal of immunological methods*, 313 (1-2), 20-28, (2006).

Yardimci, B. K., Sahin, S. C., Sever, N. I. and Ozek, N. S., “Biochemical effects of sodium benzoate, potassium sorbate and sodium nitrite on food spoilage yeast *Saccharomyces cerevisiae*”, *Biologia*, 77 (2), 547-557, (2022).

Yekta, R., Dehghan, G., Rashtbari, S., Sheibani, N. and Moosavi-Movahedi, A. A., “Activation of catalase by pioglitazone: Multiple spectroscopic methods combined with molecular docking studies”, *Journal of Molecular Recognition*, 30 (12), e2648, (2017).

Yi, D. G., Hong, S. and Huh, W. K., “Mitochondrial dysfunction reduces yeast replicative lifespan by elevating RAS-dependent ROS production by the ER-localized NADPH oxidase Yno1”, *PLoS One*, 13 (6), e0198619, (2018).

Yim, M. B., Yim, H. S., Boon Chock, P. and Stadtman, E. R., “Pro-oxidant activity of Cu, Zn-superoxide dismutase”, *Age*, 21, 91-93, (1998).

Yin, H., Xu, L. and Porter, N. A., “Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis”, *Chemical reviews*, 111 (10), 5944-5972, (2011).

Young, I. S. and Trimble, E. R., “Measurement of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography with fluorimetric detection”, *Annals of clinical biochemistry*, 28 (5), 504-508, (1991).

Yu, C. and Irudayaraj, J., “Spectroscopic characterization of microorganisms by Fourier transform infrared microspectroscopy”, *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 77 (6), 368-377, (2005).

Yu, J. and Zhou, C. Z., “Crystal structure of glutathione reductase Glr1 from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*”, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 68 (4), 972-979, (2007).

Yu, L., Chen, M., Zhang, R. and Xu, T., “Antitumor effects of glychionide-a flavonoid in human pancreatic carcinoma cells are mediated by activation of apoptotic and autophagic pathways, cell cycle arrest, and disruption of

mitochondrial membrane potential”, *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 25, 962, (2019).

Zagrodzki, P., “Thioredoxin reductase--a new target for molecular medical investigations”, *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej*, 56 (2), 155-167, (2002).

Zambrano, M. M. and Kolter, R., “GASping for life in stationary phase”, *Cell*, 86 (2), 181-184, (1996).

Zambrano, M. M., Siegele, D. A., Almirón, M., Tormo, A. and Kolter, R., “Microbial competition: Escherichia coli mutants that take over stationary phase cultures”, *Science*, 259 (5102), 1757-1760, (1993).

Zámocký, M. and Koller, F., “Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis”, *Progress in biophysics and molecular biology*, 72 (1), 19-66, (1999).

Zeb, A., “Concept, mechanism, and applications of phenolic antioxidants in foods”, *Journal of Food Biochemistry*, 44 (9), e13394, (2020).

Zeiss, C. J., “The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice”, *Veterinary pathology*, 40 (5), 481-495, (2003).

Zelko, I. N., Mariani, T. J. and Folz, R. J., “Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression”, *Free radical biology and medicine*, 33 (3), 337-349, (2002).

Zhang, J., Li, X., Han, X., Liu, R. and Fang, J., “Targeting the thioredoxin system for cancer therapy”, *Trends in pharmacological sciences*, 38 (9), 794-808, (2017).

Zhang, J., Zhang, S., Shi, Q., Allen, T. D., You, F. and Yang, D., “The anti-apoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-xL suppress Beclin 1/Atg6-mediated lethal autophagy in polyploid cells”, *Experimental Cell Research*, 394 (1), 112112, (2020).

Zhang, R., Piao, M. J., Oh, M. C., Park, J. E., Shilnikova, K., Moon, Y. J., ... and Hyun, J. W., “Protective effect of an isoflavone, tectorigenin, against oxidative stress-induced cell death via catalase activation”, *Journal of Cancer Prevention*, 21 (4), 257, (2016).

Zhang, X. Y., Zhou, D. F., Su, J. M. and Zhang, P. Y., “The effect of extract of ginkgo biloba added to haloperidol on superoxide dismutase in inpatients with chronic schizophrenia”, *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 21 (1), 85-88, (2001).

Zhang, Y., Roh, Y. J., Han, S. J., Park, I., Lee, H. M., Ok, Y. S., ... and Lee, S. R., "Role of selenoproteins in redox regulation of signaling and the antioxidant system: a review", *Antioxidants*, 9 (5), 383, (2020).

Zhao, H., Ruan, H. and Li, H., "Progress in the research of GSH in cells", *Chinese science bulletin*, 56, 3057-3063, (2011).

Zhao, Y., Chaiswing, L., Oberley, T. D., Batinic-Haberle, I., St. Clair, W., Epstein, C. J. and St. Clair, D., "A mechanism-based antioxidant approach for the reduction of skin carcinogenesis", *Cancer research*, 65 (4), 1401-1405, (2005).

Zhao, Y., Ye, X., Xiong, Z., Ihsan, A., Ares, I., Martínez, M., ... and Martínez, M. A., "Cancer metabolism: the role of ROS in DNA damage and induction of apoptosis in cancer cells", *Metabolites*, 13 (7), 796, (2023).

Zhen, A. X., Kang, K. A., Piao, M. J., Madushan Fernando, P. D. S., Lakmini Herath, H. M. U. and Hyun, J. W., "Protective effects of astaxanthin on particulate matter 2.5-induced senescence in HaCaT keratinocytes via maintenance of redox homeostasis", *Experimental and Therapeutic Medicine*, 28 (1), 1-10, (2024).

Zhou, Y., Lin, W., Rao, T., Zheng, J., Zhang, T., Zhang, M. and Lin, Z., "Ferroptosis and its potential role in the nervous system diseases", *Journal of Inflammation Research*, 1555-1574, (2022).

Zhou, Z. X., Chen, J. K., Hong, Y. Y., Zhou, R., Zhou, D. M., Sun, L. Y., ... and Wang, T. C., "Relationship between the serum total bilirubin and inflammation in patients with psoriasis vulgaris", *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 30 (5), 768-775, (2016).

Zhu, S., Jia, L., Wang, X., Liu, T., Qin, W., Ma, H., ... and Li, N., "Anti-aging formula protects skin from oxidative stress-induced senescence through the inhibition of CXCR2 expression", *Journal of Ethnopharmacology*, 318, 116996, (2024).

Zibera, L., Martelanc, M., Franko, M. and Passamonti, S., "Bilirubin is an endogenous antioxidant in human vascular endothelial cells", *Scientific reports*, 6 (1), 29240, (2016).

Zimmermann, A. K., Loucks, F. A., Schroeder, E. K., Bouchard, R. J., Tyler, K. L. and Linseman, D. A., "Glutathione binding to the Bcl-2 homology-3 domain groove: a molecular basis for Bcl-2 antioxidant function at mitochondria", *Journal of Biological Chemistry*, 282 (40), 29296-29304, (2007).

Zinser, E. R. and Kolter, R., “Escherichia coli evolution during stationary phase”, *Research in microbiology*, 155 (5), 328-336, (2004).

Zuin, A., Gabrielli, N., Calvo, I. A., García-Santamarina, S., Hoe, K. L., Kim, D. U., ... and Hidalgo, E., “Mitochondrial dysfunction increases oxidative stress and decreases chronological life span in fission yeast”, *PloS one*, 3 (7), e2842, (2008).

Zwaal, R. F. A., Comfurius, P. and Bevers, E. M., “Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells”, *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 62, 971-988, (2005).