



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**MİTOKONDRIYAL MEMBRAN
MODELİNDEKİ SÜPERKOMPLEKS YAPI VE
FONSIYONUNA KARDİYOLİPİN'İN
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Müge KOPUZ

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU

TRABZON-2014



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**MİTOKONDRIYAL MEMBRAN
MODELİNDEKİ SÜPERKOMPLEKS YAPI VE
FONSIYONUNA KARDİYOLİPİN'İN
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Müge KOPUZ

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU

TRABZON-2014

ONAY

Bu Tez Doktora Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur.

Prof. Dr. Asım ÖREM

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı



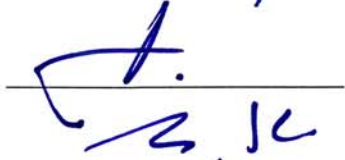
Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Müge KOPUZ'un hazırladığı "Mitokondriyal Membran Modelindeki Süperkompleks Yapı Ve Fonsiyonuna Kardiyolipin'in Etkisinin İncelenmesi" başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU



Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Orhan DEĞER



Prof. Dr. S. Caner KARAHAN



Prof. Dr. Abdulkerim BEDİR



Prof. Dr. Mehmet YILDIRIM



Tarih: 11/06/2014

Bu tez KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun .../.../.... tarih ve ... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ahmet KALKAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun olarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eseri olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

11.06.2014

Müge KOPUZ

İTHAF

Bu doktora tezimi, benim bu günlere gelmem için maddi, manevi hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan ve her zaman yanımda olan sevgili aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca tez çalışmamın gerçekleşmesinde değerli bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, danışman hocam sayın Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU'na, bilimsel olarak tarifsiz faydalar edindiğim çok değerli bir bilim adamı ve süperkompleks konusunda otör olan Prof. Dr. Giorgio LENAZ'a, tez çalışmamda engin bilgi ve tecrübesi ile daima yanımda olan Doç. Dr. Maria Luisa GENOVA' ya, bilimsel ve akademik kimliğimin oluşmasında büyük katkıları olan bilgi ve deneyimlerinden fazlasıyla istifade ettiğim yüksek lisans tez danışman hocam Prof. Dr. S. Caner KARAHAN' a, birçok bilimsel çalışmada birlikte çalıştığım, akademik geçmişimin oluşmasında yol göstericilerimden biri olan ve birlikte çalışmaktan büyük zevk duyduğum Doç. Dr. Ahmet MENTEŞE' ye, bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen ve bana daima doğru tavsiyelerde bulunan Doç. Dr. Ahmet ALVER' e, yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca bilimsel ve manevi yönden yetişmemde emekleri geçen değerli hocalarım, Prof. Dr. Orhan DEĞER, Prof. Dr. Asım ÖREM, Prof. Dr. Edip KEHA, Prof. Dr. Birgül VANİZÖR KURAL, Yrd. Doç. Dr. Fulya BALABAN YÜCESAN' a, aramızdan ayrılan, saygıyla andığımız değerli hocamız Prof. Dr. Ekin ÖNDER'e,, tez çalışmamın gerçekleşmesinde gerekli imkânları sağlayan Karadeniz Teknik Üniversitesi'ne, yurtdışı deneyimim için beni yüreklendiren Yrd. Doç. Dr. Gülçin BİLGİN TURNA' ya, varlığıyla bana destek olan Carlos ALVAREZ NOVAL' a, bana her aşamada destek ve yardımcı olan Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalındaki tüm değerli arkadaşlarıma, çalışma arkadaşım ve can yoldaşım Yelda BİRİNCİ' ye, tüm eğitim aşamalarımda yanımda olan dostluğuyla içimi ısıtan Ayşegül UZUN' a, bugünlere gelmemde büyük katkıları olan, sonsuz özveri, sevgi, sabır gösteren sevgili ebeveynlerim Sabiha ve Arif KOPUZ'a, hayatımı güzelleştiren her başım sıkıştığında soluğu yanlarında aldığım canım kardeşlerim Açelya ve Hale KOPUZ' a çok teşekkür ederim.

Arş. Gör. Müge KOPUZ

Bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi 9714 nolu BAP-01 projesi ile desteklenmiştir.

ÖZET

Mitokondriyal Membran Modelindeki Süperkompleks Yapı Ve Fonsiyonuna Kardiyolipin'in Etkisinin İncelenmesi

Son yıllarda yapılan çalışmalar ile mitokondri solunum zinciri komplekslerinin süperkompleks adı verilen supramoleküler organizasyonlar içerisinde bulunduğu gösterilmektedir. Süperkompleks yapısı içerisinde bulunan komplekslerin bir araya gelerek adeta bir substrat kanalı oluşturduğu ve daha hızlı ve etkin bir elektron akışına sebep olduğu önerilmektedir. Kardiyolipin, mitokondri iç membranına spesifik bir fosfolipid olup süperkompleks oluşumuna yardımcı olduğu ve bu supramoleküler yapının stabilizasyonunu sağladığı düşünülmektedir. Mitokondriyal solunum zinciri komplekslerinin membran ile etkileşen domainlerinde kardiyolipin bağlanma bölgelerinin bulunması, bu molekülün adeta bir yapıştırıcı gibi davranarak komplekslerin bir araya gelmesine yardımcı olabileceği ve komplekslerinin elektron alan bölgelerine yakın bağlanma bölgelerinin olması ise elektron akışını kolaylaştırabileceği şeklinde yorumlanmaktadır.

Yapılan çalışmalarda protein:fosfolipid oranı 1:1 olan proteolipozomlarda süperkompleks I_1III_2 yapısının gözleendiği, lipid dilüsyonu ile bu oranı 1:30 olduğunda süperkompleks yapısının destabilize olduğu gösterilmiştir. Bu bağlamda, kardiyolipin içeren ve içermeyen lipozomlara, sıgır kalp mitokondrilerinden izole edilen kompleks I ve III'ce zengin mitokondri fraksiyonları (R4B), 1:1 ve 1:30 oranlarında yerleştirilerek oluşan proteolipozomlardakardiyolipinin SK I_1III_2 üzerindeki etkileri incelenmiştir.

Süperkompleks varlığında kardiyolipin içeren 1:30 proteolipozomların NADH-sitokrom c oksidoredüktaz aktivitesi, komplekslerin bireysel olarak yer aldığı kardiyolipin içermeyen 1:30 proteolipozomlarına oranla anlamlı derecede artmış ve 1:1 proteolipozomların seviyesine ulaşmıştır. BN-PAGE yöntemi ile gerçekleştirilen yapısal analizlerde kardiyolipin içermeyen 1:30 proteolipozomlarda süperkompleks yapısı gözlenmez iken kardiyolipin içeren 1:30 proteolipozomlarda süperkompleks yapısının tekrar oluştuğu gözlenmiştir. Kardiyolipinin kompleks I kaynaklı ROS üretimini azalttığı bu etkisinin süperkompleks yapılarının tekrar oluşmasını sağlayarak elektron kaçışını azaltması ile gösterdiği şeklinde yorumlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Süperkompleks, kardiyolipin, proteolipozom, BN-PAGE, ROS

SUMMARY

Investigation of Effect of Cardiolipin on Structure and Function of Supercomplexes in Mitochondrial Membrane Model System

In recent years, it has been shown that the mitochondrial respiratory chain complexes, called supercomplexes have been present in supramolecular organizations. It is recommended that substrate channelling has occurred in the structure of supercomplexes and caused faster and more effective electron flow. It is thought that cardiolipin, a phospholipid specific to mitochondrial inner membrane, aids in the formation of supercomplexes as well as providing stabilization of these supramolecular structures. It has been suggested that, cardiolipin can act as a glue in establishment of cardiolipin binding sites in membrane-interacting domains of some mitochondrial respiratory complexes. Cardiolipin can also make the flow of electrons more effective and faster. This is achieved in the binding regions, where the complexes accept electrons better.

Supercomplex I₁III₂ structure has been shown in proteoliposomes that have protein:phospholipid ratio of 1:1, whereas it has disappeared in proteoliposomes that have a lipid dilution with the ratio of 1:30. In this study, the effect of cardiolipin on function and structure of supercomplex I₁III₂ was investigated by scrutinizing the proteoliposomes that are formed by incorporation of mitochondrial fractions (R4B) enriched with complex I and III into liposomes with and without cardiolipin and with the ratios of 1:1 and 1:30.

NADH-cytochrome c oxidoreductase activity of proteoliposomes that contain cardiolipin with the ratio of 1:30 are significantly higher than the activity of proteoliposomes without cardiolipin and with the ratio of 1:30, which reach to the activity level of 1:1 proteoliposomes. In the structural analysis made by BN-PAGE, the disassembling of supercomplex was monitored in the proteoliposomes with the ratio 1:30 and without cardiolipin whereas, the formation of supercomplex structure was shown in proteoliposomes that contain cardiolipin and with the ratio of 1:30. It was suggested that the cardiolipin reduced complex I induced ROS production, and by means of this effect a reduced leakage of electrons within the structure of the supercomplexes occurred.

Keywords: Supercomplex, cardiolipin, proteoliposome, ROS, BN-PAGE

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Mitokondriyal solunum zinciri ilk olarak, elektron iletimini sağlayan mitokondri iç membranına gömülü prostetik gruplar (*flavinler ve sitokromlar*) dizisi olarak tanımlanmıştır (1). Mitokondriyal solunum zincirinde yer alan kompleksler : NADH-Koenzim Q redüktaz, süksinat-CoQ redüktaz, ubikinol-sitokrom c redüktaz ve sitokrom c oksidaz olarak adlandırılmıştır (2). Süperkompleks modeli; mitokondriyal iç membranda yer alan solunum zinciri komplekslerinin bir araya gelmesiyle oluşan supramoleküler organizasyonlardır (3). Süperkompleks oluşumunun gücü ve stabilitesi membrandaki lipid içeriğine ve kompozisyonuna bağlıdır. Mitokondri membranı için karakteristik olan ve membran proteinleri ile spesifik etkileşimde bulunarak membran yapı ve fonksiyonu için gerekli olan kardiyolipinin süperkompleks oluşumunda etkili olabileceği düşünülmektedir ve kardiyolipin eksikliği olduğu bilinen Barth Sendromu hastalarında süperkompleks disorganizasyonu olduğu gösterilmiştir. Bu disorganizasyona kardiyolipin eksikliğin yol açmış olabileceği ileri sürülmüştür (4).

Mitokondriyal solunum zinciri, hücrede reaktif oksijen türlerinin (ROS) ana kaynağıdır. Moleküler oksijeni süperoksit radikale indirgeyen başlıca redoks kaynakları, kompleks I ve kompleks III'te yer alırlar. Özellikle kompleks I'de elektron akışını sınırlandıran şartlar büyük oranda süperoksit oluşumunu indüklerler. Mitokondriyal lipid kompozisyonundaki değişiklik süperkompleks disorganizasyonuna yol açarak kompleks I'e etki edebilir ve ROS üretimi artabilir (5).

Bu çalışmanın amacı, lipid kompozisyonundaki kardiyolipin içeriği farklı olan mitokondriyal membran modelleri kullanılarak süperkompleks I-III supramoleküler organizasyonunda herhangi bir değişikliğe yol açıp açmadığının belirlenerek bu yapısal değişikliklerin kompleks I aktivitesine ve ROS üretimine etkisini araştırmaktır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Mitokondri

Mitokondri, ökaryot hücrelerde bulunan 0.5-1 µm çapında en önemli organellerden biridir. İlk defa 19.yy'ın sonunda keşfedildiklerinde, ışık mikroskopunda tanecikler (*condria*) ve filamentler (*mitos*) gibi göründüklerinden latince *mitochondria* ismini almışlardır. Mitokondri izolasyon teknikleri 1940'ların sonlarına doğru geliştirilmiş olup mitokondri organelinin 3 boyutlu yapısı, ilk kez 1950 yıllarında Palade ve Sjostrand tarafından elektron mikroskopisi ile gösterilmiştir(6,7). Oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) aracılığıyla ATP formatında enerji üreterek hücre enerji gereksinimini büyük oranda karşılaması bu organelin en bilinen fonksiyonel özelliğidir. Bunun yanı sıra hücrel redox durumunun kontrolü, reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumunun indüklenmesi, sitoplazmik kalsiyumun tamponlanması, kritik yolları düzenleyen süksinat ve α-ketoglutarat gibi metabolitlerin sentezi, apoptozun düzenlenmesi ve çeşitli sinyal yolları kullanarak substrat çeşitliliğine karşı hücrenin adaptasyonun sağlamak gibi fizyolojik özellikleri de bulunmaktadır. Mitokondri, yaşam ve ölüm arasındaki dengeyi koruyan bir merkez gibidir ve bu nedenle regülasyon mekanizmaları oldukça fazladır. Bu regülasyon, hem ekspresyon, transkripsiyon ve translasyon aşamalarındaki uzun dönemli cevaplarda hem de uzun dönemli post-transkripsiyonel cevaplarda oluşur (8-10).

Mitokondri yapısında iki farklı membran bulunmaktadır ve bu membranlar mitokondri iç membranı (MIM) ve mitokondri dış membranı (MOM) olarak adlandırılmaktadır. İç mitokondri membranının protein ve lipid kompozisyonu diğer membranlara göre farklılıklar göstermektedir. Memeli hücrelerindeki iç mitokondri membranının fosfolipid içeriği yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Fosfatidilkolin (PC) ve fosfatidiletanolamin (PE) iç membran yapısında en çok bulunan fosfolipidler olup sırası ile iç membran fosfolipidlerinin ~%40 ve ~%34' ünü oluşturmaktadırlar. Mitokondri iç membranına spesifik bir fosfolipid olan kardiyolipin (CL) oranı ~%18 iken fosfatidilinositol (PI) ve fosfatidilserin (PS) oranları ise %5 civarındadır (11) (Tablo 1).

Mitokondri iç membranı, biyolojik sistemlerdeki membranlar arasında en yüksek protein oranına sahip olup çift tabakalı lipid yapısındadır. Mitokondri işlevlerinin bir

çoğu iç membrana gömülü çok alt birimli protein kompleksleri tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu komplekslerin büyük bir kısmını oksidatif fosforilasyonda görev alan mitokondri solunum zinciri kompleksleri oluşturmaktadır (12).

Tablo 1. Mitokondri iç membranına (MIM) ait fosfolipid kompozisyonu (11).

Fosfolipid	Memeli Hücresi (Rat Karaciğer)
Çeşitleri	MIM
	Fosfolipid oranı (%)
Fosfatidilkolin	40
Fosfatidiletanolamin	34
Kardiyolipin	18
Fosfatidilinositol	5
Fosfatidilserin	3

4.2. Mitokondri Solunum Zinciri

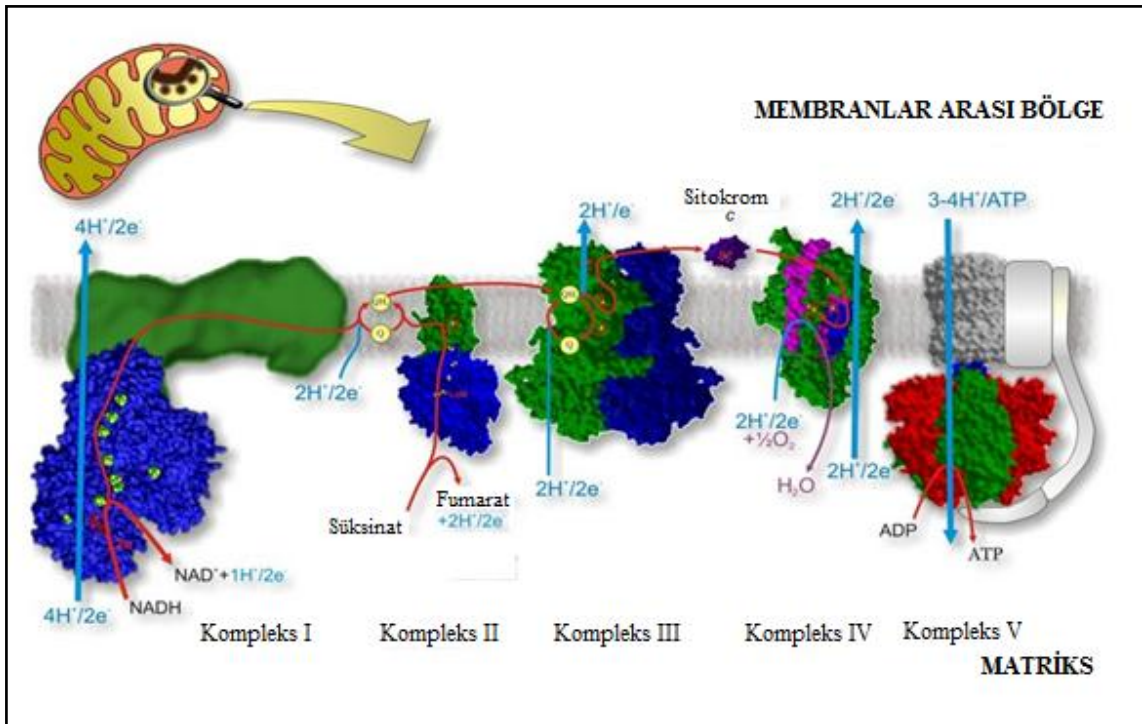
4.2.1. Mitokondri Solunum Komplekslerinin Yapı ve Organizasyonu

Klasik elektron transfer zinciri, ilk olarak elektronları sırasıyla ileterek redoks potansiyelini arttıran ve iç mitokondri zarında sıralanan prostetik (flavinler ve sitokromlar) dizisi olarak tanımlanmıştır (1). Sonrasında, fonksiyonel dizinin iç mitokondri membranında rastgele dağılmış dört büyük çok alt birimli kompleksden oluştuğu yaygın bir kanı haline dönüşmüştür. Bu kompleksler; NADH - koenzimQ (KoQ) redüktaz (Kompleks I, K I), süksinat-KoQ redüktaz (Kompleks II, K II), ubikinonsitokrom c redüktaz (Kompleks III, K III) ve sitokrom c oksidaz (Kompleks IV, K IV) olarak isimlendirilmektedir. Enzim kompleksleri iki hareketli redoks-aktif protein ile etkileşim halindedir. Bu proteinlerden biri zara gömülü KoQ veya ubikinon ve iç zarın dış yüzünde bulunan hidrofilik hem proteini sitokrom c' dir (2). Mitokondri solunum zinciri komplekslerinin özellikleri Tablo 2' de verilmiştir.

Tablo 2. Mitokondri Solunum Zinciri Kompleksleri (13)

Enzim Kompleksi	Mass (kDa)	Number of subunits	Prosthetic group (s)
Kompleks I	850	43 (14)	FMN, Fe-S
Kompleks II	140	4	FAD, Fe-S
Kompleks III	250	11	Hemes, Fe-S
Kompleks IV	160	13 (3-4)	Hemes; Cu

Sığır kalbinde kompleksler arasındaki sitokiyometri 1 kompleks I – 1.3 kompleks II – 3 kompleks III – 6.7 kompleks IV şeklindedir (14). Ek olarak, 0.5 ATP sentaz (kompleks V), ADP-ATP translokaz ve NADH-ADP⁺ transhidrogenaz elektron transport zinciri kompleksleri ile birlikte çalışmaktadır (15, 16).



Şekil.1. Mitokondriyal Solunum Zinciri Kompleksleri

Oksidatif fosforilasyon yukarıda bahsedilen mitokondriyal solunum zinciri kompleksleri tarafından MİM’ de gerçekleştirilmektedir. Sitrik asit döngüsü, yağ asidi oksidasyonu veya glikoliz gibi metabolik yollardan açığa çıkan NADH ve FADH₂’

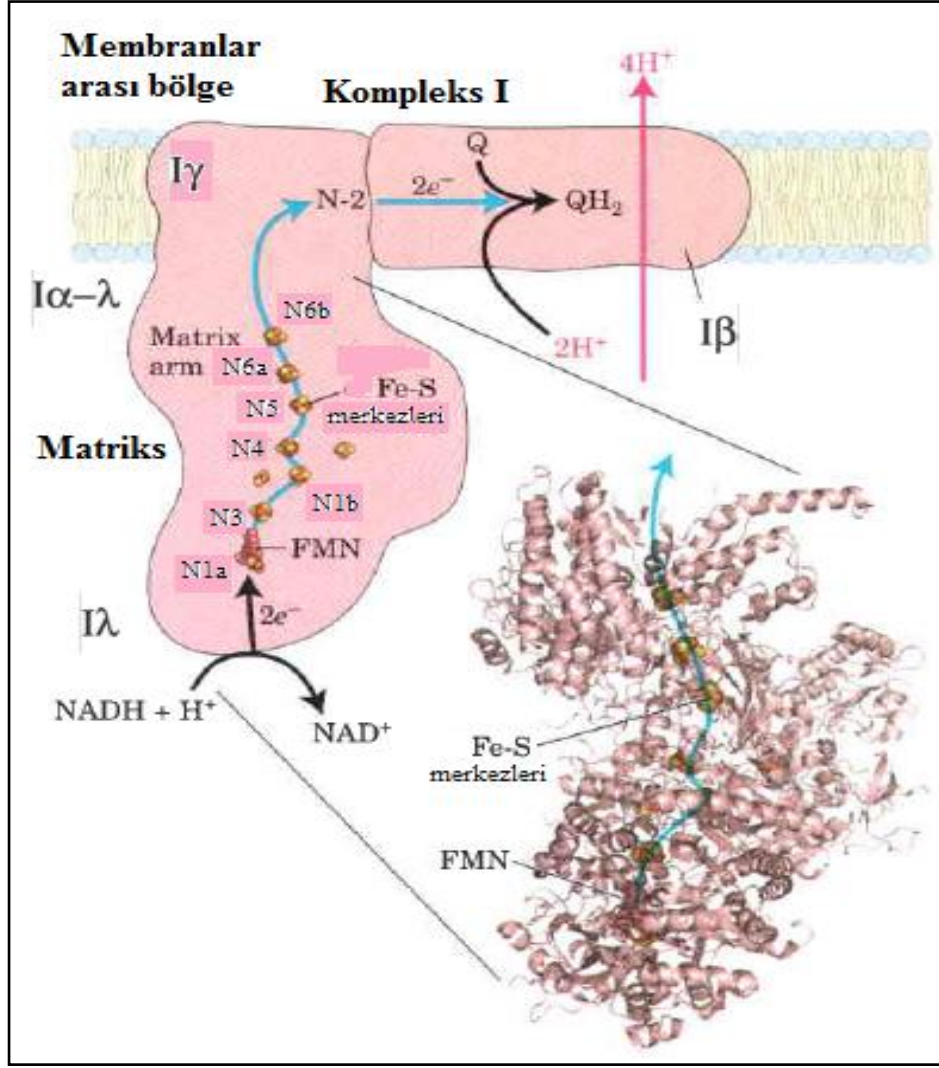
den alınan elektronlar solunum zinciri kompleksleri tarafından oksijene aktarılır ve su molekülü oluşumuna sebebiyet verirler. Elektron akışı sırasında her bir kompleks mitokondriyal matriksden iç ve dış membranlar arasındaki boşluğa proton (H^+) pompalayarak elektrokimyasal gradiyent ($\Delta\psi$) oluştururlar. Bu gradiyent oluşumu kompleks V’i aktive eder ve kompleks V ADP’ yi fosforilleyerek hücrenin enerji kaynağı olan ATP molekülünü sentezler (17) (Şekil 1).

4.2.1.1. Kompleks I (NADH-koenzim Q Oksidoredüktaz)

Kompleks I (E.C. 1.6.5.3) elektron transport zincirinin ilk adımı olan iki eş zamanlı ve birbirini ile bağlantılı reaksiyonu katalizlemektedir. Bunlarda biri hidrojen iyonun NADH’den koenzim Q’ ya egzergonik transferi iken diğeri ise 4 protonun matriksden membranlar arası boşluğa endergonik transferidir ($NADH + Q + H^+ + 4H^+_{iç} \Rightarrow NAD^+ + QH_2 + 4H^+_{dış}$)(18).

Memeli mitokondrilerinde bulunan kompleks I enzimi 45 alt birimden oluşan, molekül kütlesi yaklaşık 1,000 kDa olan solunum zincirinin en büyük enzimidir. Alt birimlerden 7 tanesi mitokondriyal genom ürünüdür. Yapısal ve genetik açıdan bakıldığında kompleks 3 farklı bölgeden oluşmaktadır: dehidrogenaz ünitesi, hidrogenaz benzeri ünite ve proton translokasyon ünitesi. Dehidrogenaz ünitesi NADH oksitleyici bölgeyi içerirken hidrogenaz ünitesi koenzim Q’ yu bağlar ve indirger. Her iki unitede prostetik gruplar bulunmaktadır, fakat translokasyon ünitesi herhangi bir kofaktör içermez (19).

İnsan kompleks I için tarif edilen 45 altbirimden oluşan L-şeklindeki enzim kompleksi $I\alpha$, $I\beta$, $I\lambda$ ve $I\gamma$ isimli fragmentlere ayrılmıştır. NADH’ den FMN’e, FMN’den demir-sülfür gruplarına ($N1'$ den $N6'$ ya) ve nihayetinde koenzim Q’ ya uzanan elektron transfer yolu Hinchliffe and Sazanov tarafından şematize edilmiştir (20)(Şekil 2).

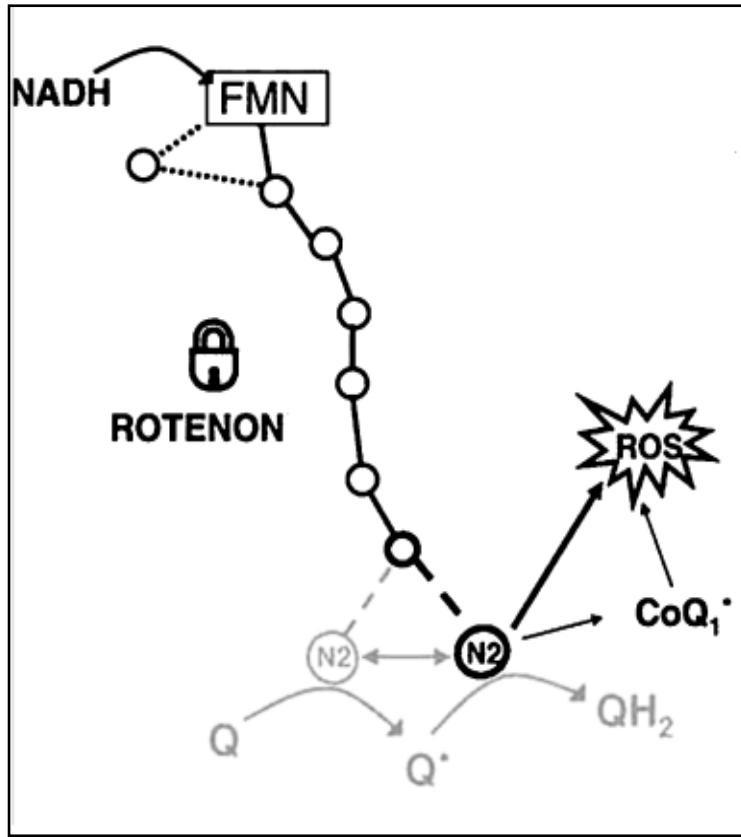


Şekil 2. Kompleks I Yapısı (13).

Kompleks I yapısındaki elektron yolağı iyi bilinmektedir. NADH' den gelen elektronların ilk alıcısı 51-kDa molekül kütleli altbirime bağlı olan FMN'dir. Çünkü, demir-sülfür grubu N1a negatif potansiyele sahiptir ve diğer demir-kükürt gruplarından da daha uzak bir mesafededir. Dolayısıyla, elektronlar FMN' den N3' e geçerler ve ardından sırasıyla 75-kDa molekül kütleli alt birimde yer alan N4 ve N5 yolunda devam ederler. Ardından N6a ve N6b' den geçerek 49-kDa molekül kütleli alt birimde bulunan N2' ye ulaşırlar (21). N2 direk koenzim Q'ya bağlanan elektron vericidir. Bu adımın proton transferi ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir. Kompleks I' deki bütün redoks grupları hidrofilik kolda veya hidrofilik kolun hidrofobik kol ile etkileştiği bölgede olduğundan elektron akışının yarattığı konformasyonel değişikliğin proton taşınımı için gerekli ortamı oluşturduğu önerilmektedir (18).

Kompleks I yapısındaki N2 çukurunun pH bağımlılığı bir mutasyon ile tamamen ortadan kaldırıldığında redoks potansiyelinin proton translokasyonu üzerinde hiç etkisi olmadığı gözlenmiştir. Dolayısıyla, konformasyonel değişikliğin proton translokasyonunu sürdürdüğü ve bu olayın özellikle koenzim Q' nun indirgenmesi ile bağlantılı olduğu kanısına varılmaktadır(22).

Kompleks I, rotenon gibi 60 farklı bileşik ailesi tarafından inhibe edilmektedir. Bu bileşiklerin enzimdekine benzer geniş hidrofobik cep sayesinde inhibitör olarak etki ettikleri kabul edilmektedir. Demir-sülfür yapılarının bulunduğu N2 merkezinin elektronun koenzim Q' ya ulaşmasında rol oynadığı düşünülmektedir (Şekil 3)(23).

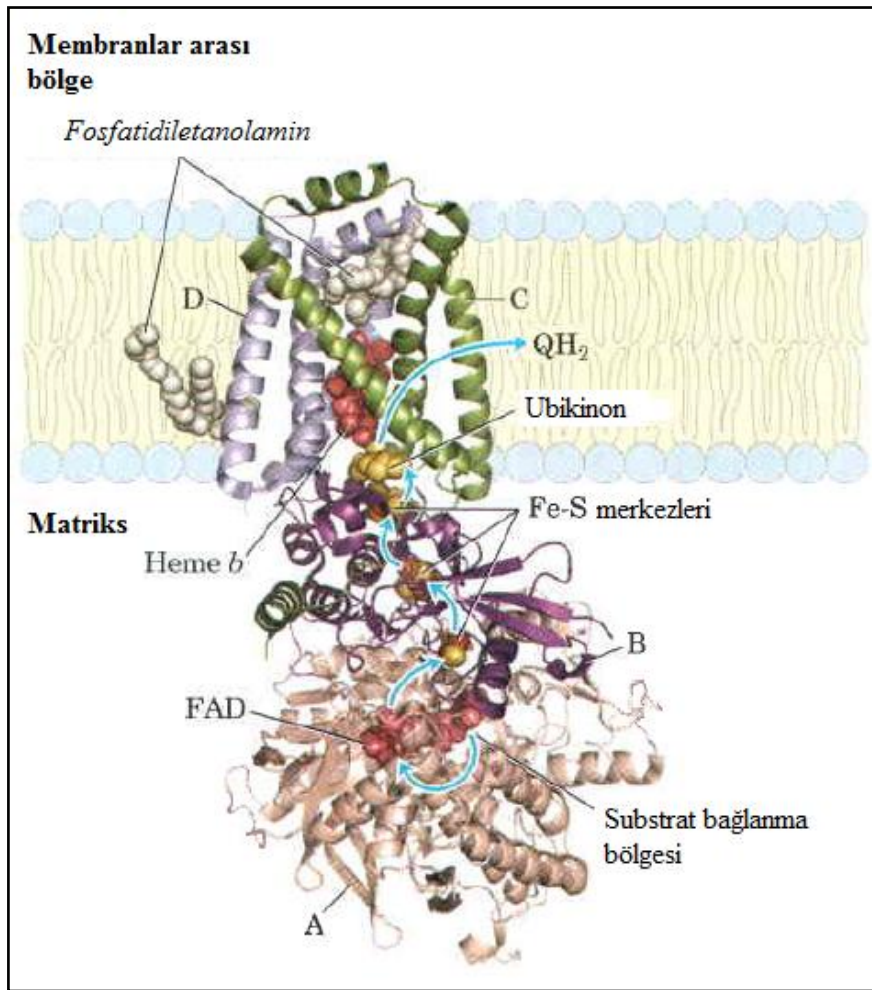


Şekil 3. Kompleks I' in Rotenon tarafından inhibisyonu (23).

4.2.1.2. Kompleks II (Süksinat-Koenzim Q Oksidoredüktaz)

Süksinat dehidrogenaz (E.C. 1.3.5.1) olarak da adlandırılan bu enzim kompleksi aynı zamanda sitrik asit döngüsünde yer alan ve membrana bağlı olan tek enzimdir. Kompleks I' e göre oldukça küçük olan bu protein iki farklı tipte 5 adet prostetik gruba

ve 4 altbirime (A-D) sahiptir. İntegral membran proteini olan C ve D altbirimleri yapılarında 3 adet transmembran heliks içermektedir. Hem a ve hem b grupları ile son elektron alıcısı ubiquinon için bağlanma bölgesini yapısında bulundurmaktadır. A ve B altbirimleri matrikse doğru bakan kısımda bulunup 3 adet demir-sülfür merkezi, FAD ve süksinat bağlanma bölgesi içerirler. Elektron akış yolu, süksinatın bağlanma bölgesine bağlanarak elektronu FAD' ye vermesi ile başlar, akabinde FAD' den demir-sülfür merkezlerine ve nihayetinde kinon bağlanma bölgesine doğru devam eder (Şekil 4).



Şekil 4. Kompleks II Yapısı (13).

Kompleks II, tenoil trifloroaseton ve karboksın (5,6-dihidro-2-metil-1,4-oksatin-3-karboksilat) tarafından B altbirimdeki demir-sülfür merkezlerine bağlanarak inhibe edilir (24).

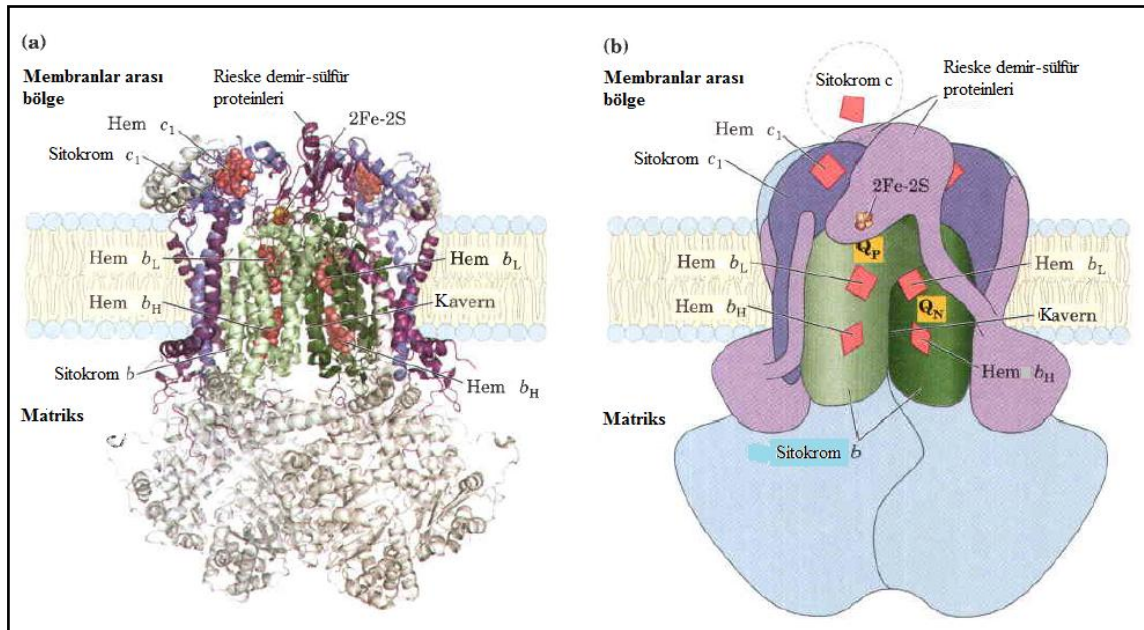
4.2.1.3. Kompleks III (Ubikinol-sitokrom c Oksidoredüktaz)

Sitokrom bc₁ kompleksi (E.C. 1.10.2.2) olarak adlandırılan kompleks III ubikinolden sitokrom c' ye elektron transferini ve matriksden membranlar arası boşluğa proton pompalanması reaksiyonlarını katalizler (25).

Sitokrom bc₁ kompleksleri 11 altbirimli yapılarında sitokrom b, sitokrom c₁ ve demir-sülfür proteini (Rieske protein) bulunmaktadır (26).

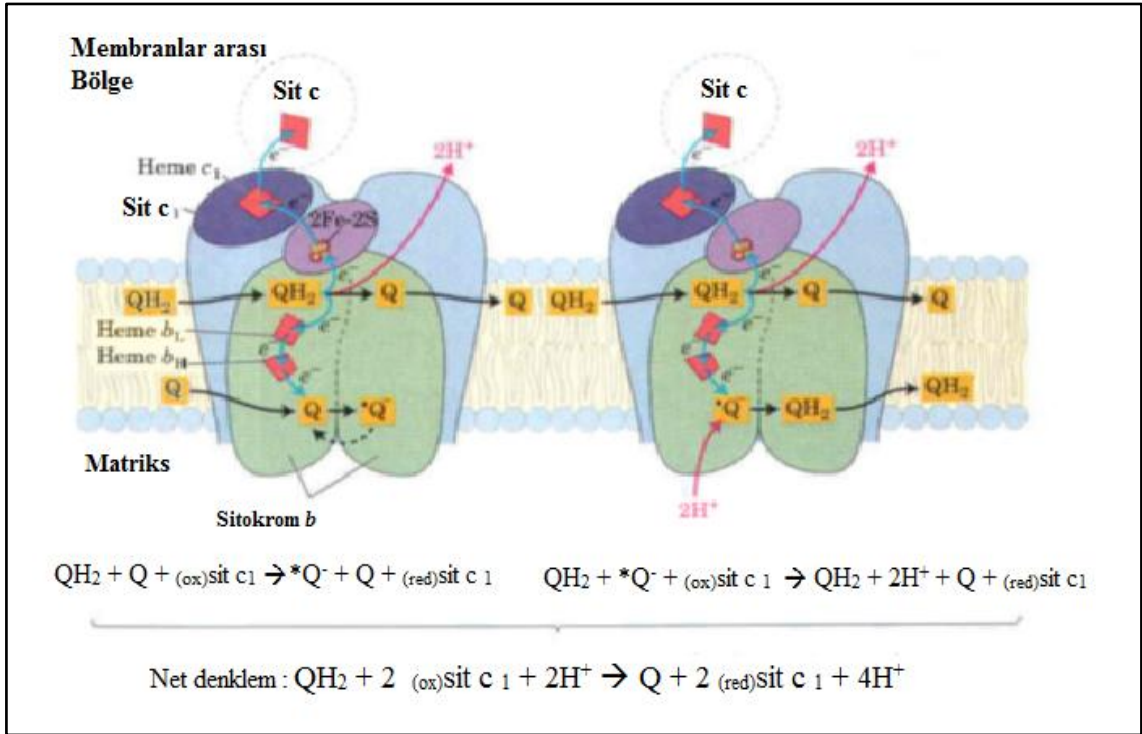
Solunum zinciri komplekslerinde bulunan fakat elektron transferinde ve proton translokasyonunda görev almayan altbirimler enzimin yapısal stabilitesini sağlayarak regülasyonunda görev alırlar (27).

Mitokondriyal kompleks III, oligomerik ve simetrik dimer yapıdadır. Demir-kükürt proteininin bir kısmı bir monomere saplanmış durumda iken periferal kısmı diğer monomerin ubikinol oksidasyonu bölgesine yerleşmiş durumdadır. Böylece Rieske proteini dimerik yapının stabilitesine destek vermektedir. Dimerik yapı, fonksiyonel bir monomerik yapı gibi tavır sergilemektedir (28). Rieske proteininin periferal domaini sitokrom b ve sitokrom c₁ arasında ileri giderek elektron transferini kolaylaştırdığına dair çarpıcı kanıtlar elde edilmiştir (29, Şekil 5).



Şekil 5. Kompleks III Yapısı (13).

Ubikinol oksidasyonu için “Q-döngüsü” mekanizması ilk olarak Mitchell tarafından önerilmiş, Trumpower tarafından özetlenmiş ve kabul edilmiştir. İlk etapta, ubikinoldaki iki elektrondan biri Fe-S yapılarına geçer. Bu elektron sırasıyla sitokrom c1 ve sitokrom c’ ye geçer. Tek elektronunu kaybeden ubikinol, semikinon forma dönüşmüş olur. Semikinondaki tek kalan elektron sitokrom b’ ye transfer edilir. Dolayısıyla, ubikinoldaki iki elektronun da akış yolağı farklıdır. Elektronlar kompleks III’ den sitokrom c’ ye aktarılır (30, 31)(Şekil 6).



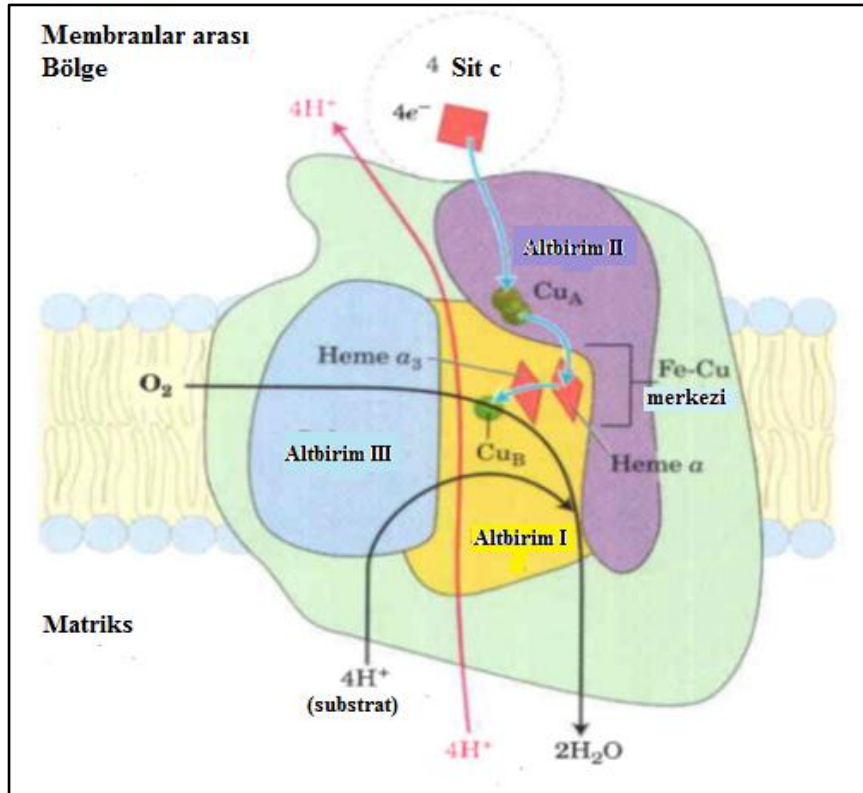
Şekil 6. Kompleks III’ elektron akışı şeması (13).

Kompleks III, 4 farklı bölgeden etki eden inhibitörler tarafından inhibe olmaktadır. Bunlardan en popülerleri Antimisin a’ dır (32).

4.2.1.4. Kompleks IV (Sitokrom c Oksidaz)

Kompleks IV (EC. 1.9.3.1), hem-bakır oksijen redüktaz ailesine mensup oksijenin suya indirgenmesini katalizleyen ve proton translokasyonunu sağlayan bir enzimdir. Memelilerde bulunan kompleks IV yapısında 13 altbirim, iki adet hem grubu (a ve a₃) ve iki adet bakır merkezine (CuA ve CuB) bulunmaktadır. Molekül kütlesi 204 kDalton'dur.

Enzimatik fonksiyon altbirim I, altbirim II ve altbirim 3 tarafından gerçekleştirilmektedir. Diğer altbirimler kompleksin stabilasyonunu sağlamaktadır. Kompleks IV yapısı Şekil 7' de verilmiştir.



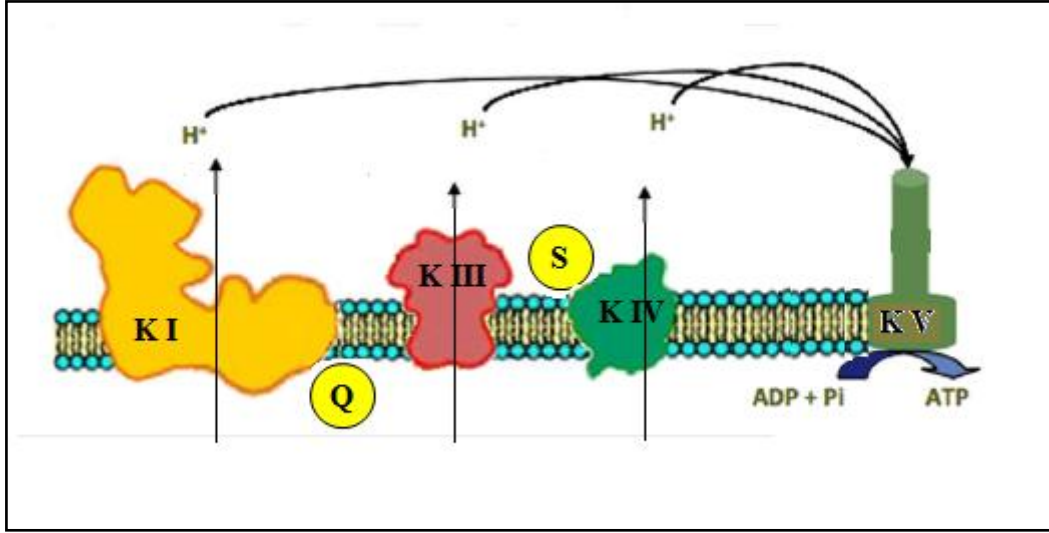
Şekil 7. Kompleks IV yapısı (13).

Sitokrom c oksidaz, siyanür tarafından enzimin oksijen bağlanma bölgesine bağlanarak inhibe edilir (23, 33).

Son bulgular, iç mitokondri membranındaki solunum zinciri komplekslerinin supramoleküler organizasyonlarda bulunduklarını göstermektedir (34, 35).

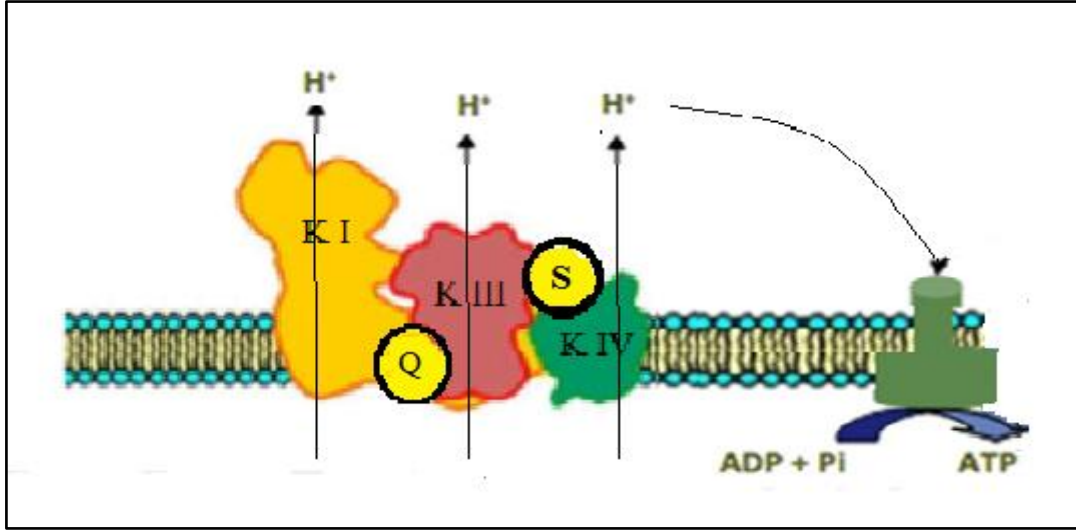
4.2.2. Superkompleks Teorisi

1985 yılında, Hackenbrock ve ark. solunum zinciri komplekslerinin iç mitokondri zarında birbirinden bağımsız kompleksler halinde bulunduğunu, elektron iletiminin lateral difüzyon ile rastgele biraraya gelerek gerçekleştirdiklerini ifade etmişler ve bu membran modelini “random collision model” olarak adlandırmışlardır (36-38)(Şekil 8).



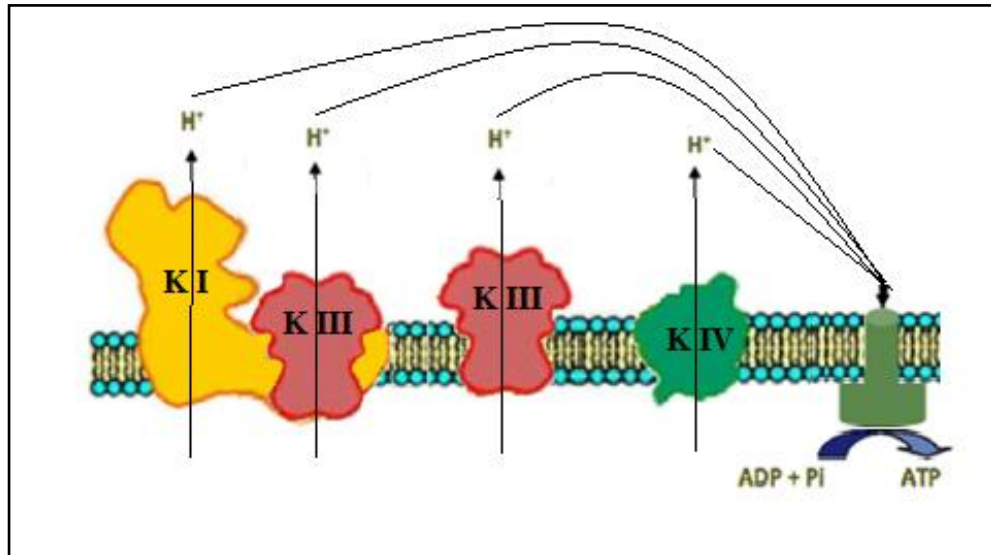
Şekil 8. Random Collision Modeli (K I: Kompleks I, K III : Kompleks III, K IV: Kompleks IV, K V: Kompleks V, Q: Koekzim Q, S: Sitokrom c)

Alternatif olarak, solunum zinciri komplekslerinin membranda bir arada bulunarak çalıştığı düşünülen “**solid-state model**” önerilmiştir (1) (Şekil 9). Bu model, 2000 yılında Schagger ve Pfeiffer’ ın Blue-Native-poliakrilamid jel elektroforezi (BN-PAGE) yöntemi ile solunum zinciri komplekslerinin supramoleküler yapılarda bulunduklarını göstermesiyle destek kazanmıştır. Bu supramoleküler yapılar “süperkompleks” veya “respirazom” olarak adlandırılmaktadır (3, 23). Ek olarak, Althoff ve Kühlbrant supramoleküler organizasyonun 3-boyutlu yapısını göstermeyi başarmıştır (39).



Şekil 9.Solid-state Modeli. (K I: Kompleks I, K III : Kompleks III, K IV: Kompleks IV, K V: Kompleks V, Q: Koekzim Q, S: Sitokrom c)

Bu iki modelin yanısıra, “**plasticity model**” olarak isimlendirilen diğer bir model de ise, random collision model gibi kompleks II ve kompleks IV proteinlerinin bir çoğunun mitokondri iç membranında serbest olarak dolaştıklarını önermektedir. Aynı zamanda, çok sayıda kompleks I proteininin diğer solunum zinciri kompleksleri ile farklı kombinasyonlarda etkileşim içinde bulunduğu supramoleküler formda olduğunu da önermektedir (35,40)(Şekil 10).



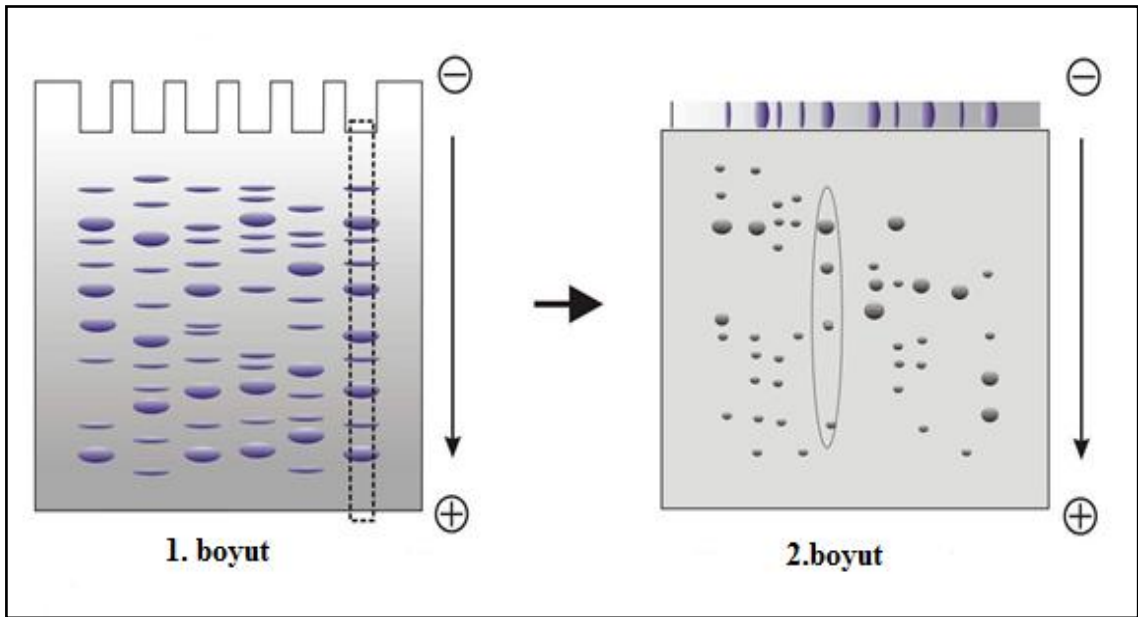
Şekil 10.Plasticity Model.(K I: Kompleks I, K III : Kompleks III, K IV: Kompleks IV, K V: Kompleks V, Q: Koekzim Q, S: Sitokrom c)

Membran modellerinin konu alındığı çalışmalarda süperkompleks varlığına dair kanıtlar gün geçtikçe artmaktadır.

4.2.3. Süperkompleks Organizasyonun Varlığına Dair Kanıtlar

4.2.3.1. Yapısal Kanıtlar

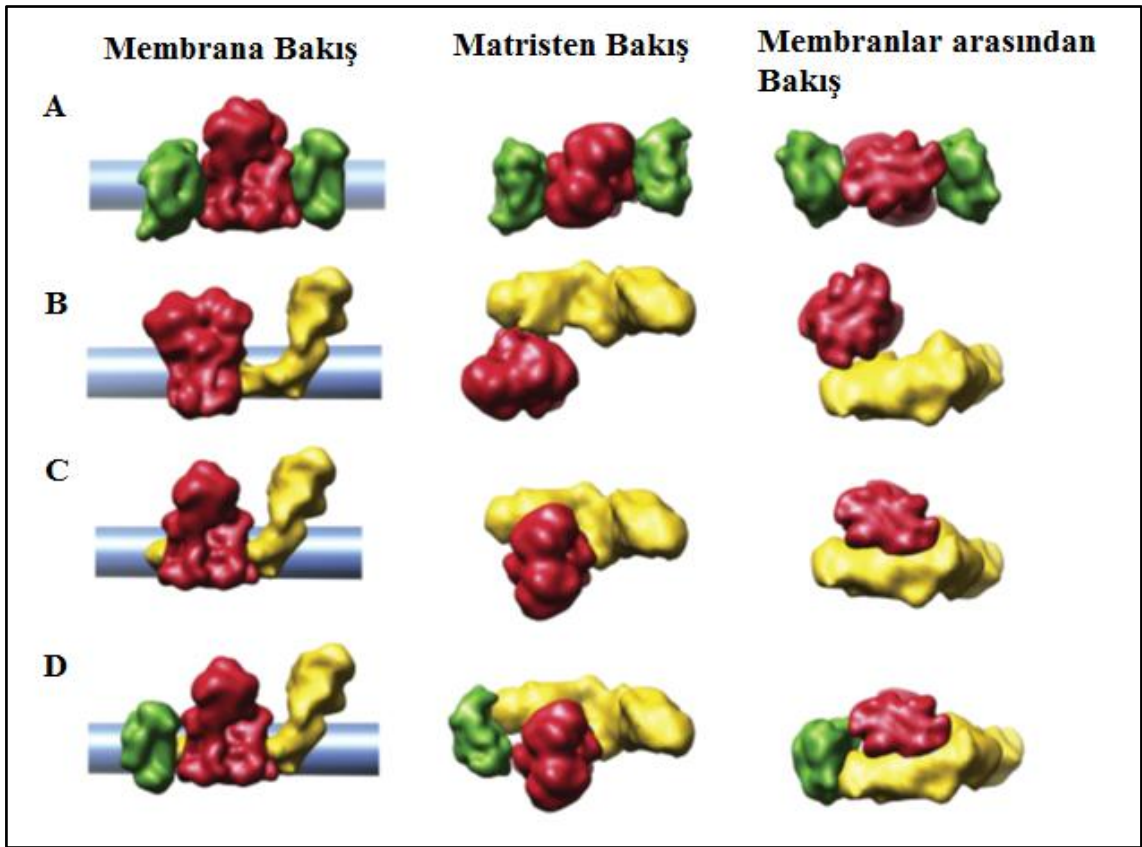
Blue Native- Poliakrilamid Jel Elektroforezi (BN-PAGE) ve Clear Native- Poliakrilamid Jel Elektroforezi (CN-PAGE), çeşitli canlılardaki solunum zinciri süperkompleks kompozisyonunun yapısal analizinde en popüler yöntemler haline gelmişlerdir (41).BN-PAGE,Coomassie Brilliant Blue boyası kullanılarak protein komplekslerinin işaretlendiği ve membranda bulunduları formları ile arılabildiği 2 boyutlu elektroforetik bir tekniktir. 1. boyutta Coomassie Brilliant Blue boyası ile işaretlenen protein kompleksleri denatüre edilmeden jelde boyut büyüklüğüne göre farklı bantlar oluştururlar. 2. boyutta ise numune yüklenen şerit kesilerek 2. bir SDS (sodyum dodesil sülfat) – PAGE jeline yüklenerek protein komplekslerinin hangi komplekslerden oluştuğu belirlenir (Şekil 11) (42, 43).



Şekil 11. Blue Native- Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Protein komplekslerinin jelde yürüme mesafesi buyutlarına, yüklerine ve jelindeki gözeneklerin büyüklüğü ile bağlantılıdır. CN-PAGE tekniğinde BN-PAGE'den farklı olarak yüksüz boya kullanılmaktadır (44). Native-PAGE yöntemi, membran proteinlerinin membranda bulundukları formları ile analiz edilebilmelerine olanak sağladığı için süperkompleks yapılarının analizleri için oldukça uygun bir yöntemdir (41).

Bu yöntem ile bakteri, mantar, bitki ve insan mitokondrilerinde süperkompleks yapılarının bulunduğu gösterilmiştir (45-49, Şekil 12).

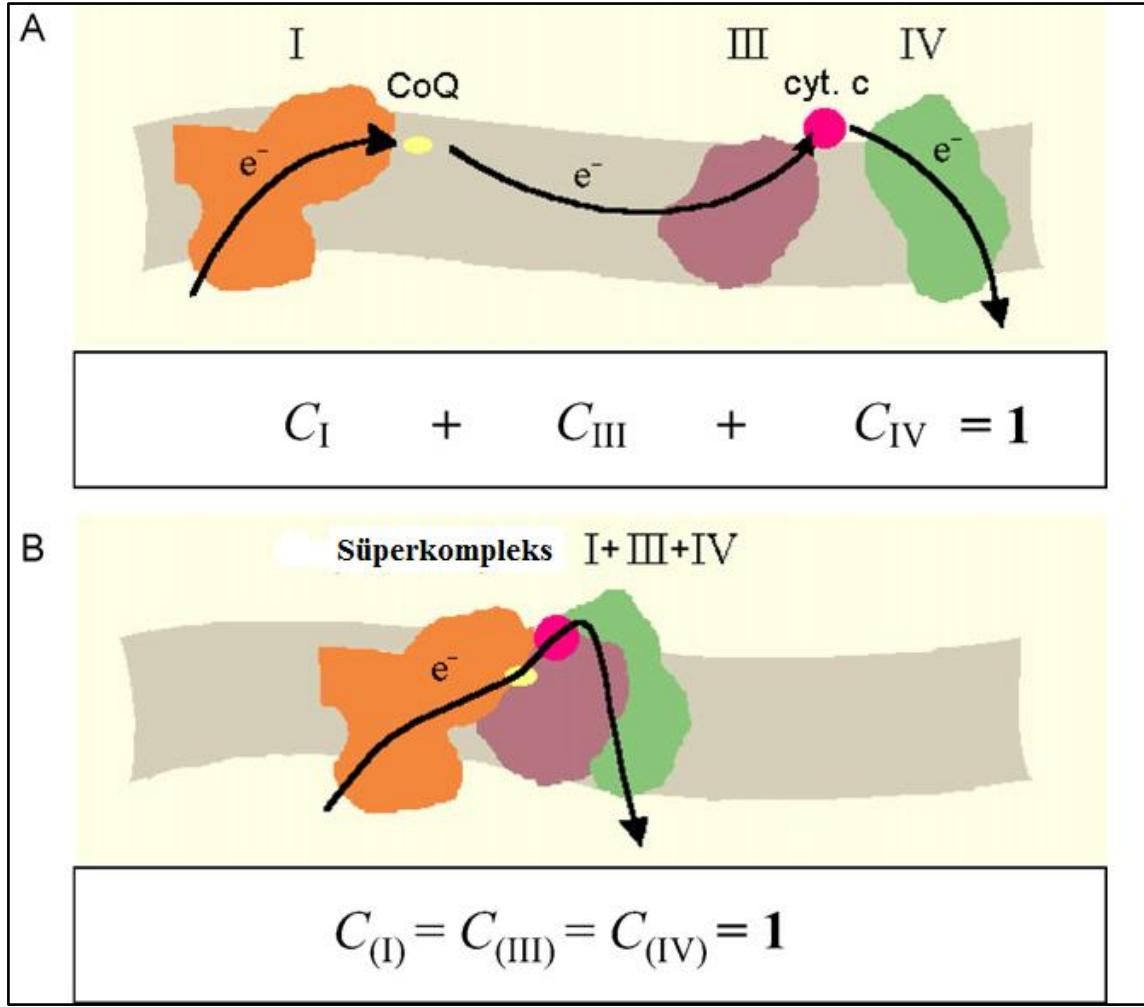


Şekil 12. Mitokondriyal Solunum Zinciri Süperkomplekslerinin 3-Boyutlu Modelleri. **A;** *Saccharomyces cerevisiae*' da bulunan Süperkompleks III₂IV₂(52), **B;** *Arabidopsis thaliana*' da bulunan Süperkompleks I₁III₂(53), **C;** *Bos taurus*' da bulunan Süperkompleks I₁III₂, **D;** *B. Taurus*'da bulunan Süperkompleks I₁III₂IV₁(27). (Mitokondri iç membranı mavi bant, Kompleks I sarı, dimerik Kompleks III kırmızı ve Kompleks IV yeşil renkte gösterilmiştir).

Süperkomplekslerin varlığı ile ilgili kanıtlar yapılan çalışmalarla her geçen gün daha da artmaktadır. Son olarak, Cruciat (50) ve Schägger (14, 51) membrandaki proteinleri membranda bulundukları formları ile izole ederek molekül yapısını belirleyebilen BN-PAGE yöntemi ile maya ve memeli mitokondrilerinde multikompleks yapıların olduğuna dair kanıtlar elde etmişlerdir. İzole *Saccharomyces cerevisiae* mitokondrisi üzerinde yapılan BN-PAGE çalışmalarında iki adet süperkompleks yapısı ortaya konmuştur. Bunlardan biri, dimerik kompleks III ve monomerik kompleks IV' den oluşan süperkompleks III_2IV_1 diğeri ise, dimerik kompleks III ve dimerik kompleks IV' den oluşan süperkompleks III_2IV_2 ' dir (3). Sığır kalbi mitokondrileri ile yapılan benzer bir çalışmada benzer etkileşimlerin olduğu gözlenmiştir. Süperkompleks I_1III_2 'nin kompleks IV ile etkileşerek süperkompleks $I_1III_2IV_2$ ve süperkompleks $I_1III_2IV_4$ gibi iki büyük süperkompleksin varlığı gösterilmiştir. BN-PAGE yönteminde kullanılan deterjan digitoninin varlığında kompleks I' in sadece %14-16' sı serbest olarak bulunmaktadır. Bu veri, fizyolojik koşullarda kompleks I' in tamamının kompleks III ile etkileşim içinde olduğuna işaret etmektedir (14, 23).

4.2.3.2. Kinetik Kanıtlar

Bu konuyla ilgili yapılan çalışmalar süperkomplekslerin substrat kanalına sahip olabileceği fikrinden yola çıkarak daha çok metabolik akış-kontrol (MAK) çalışmaları yönünde yoğunlaşmıştır. Bu ölçümün temel prensibi; farklı enzimlerin katıldığı ortak aracı moleküllerin difüze olduğu her bir enzimatik adımın analiz edilmesidir. Herhangi bir sistem birden fazla enzimatik aşamadan oluşsa bile kontrol MAK katsayılarının toplamı bir olmalıdır. Süperkompleksler, birden fazla enzimin bir araya gelmesiyle oluşan fakat tek bir enzim gibi hareket eden yapılardır. Bu nedenle MAK analizi söz konusu olduğunda her bir enzimatik adımının aynı kontrol katsayısına eşit olması ve her birinin MAK katsayısının 1'den küçük olmaması gerekmektedir. İki alternatif membran modeli; rastgele difüzyon modeli ve süperkompleks modellerinin MAK analizi açısından beklenen sonuçları Şekil 13'te tasvir edilmiştir.



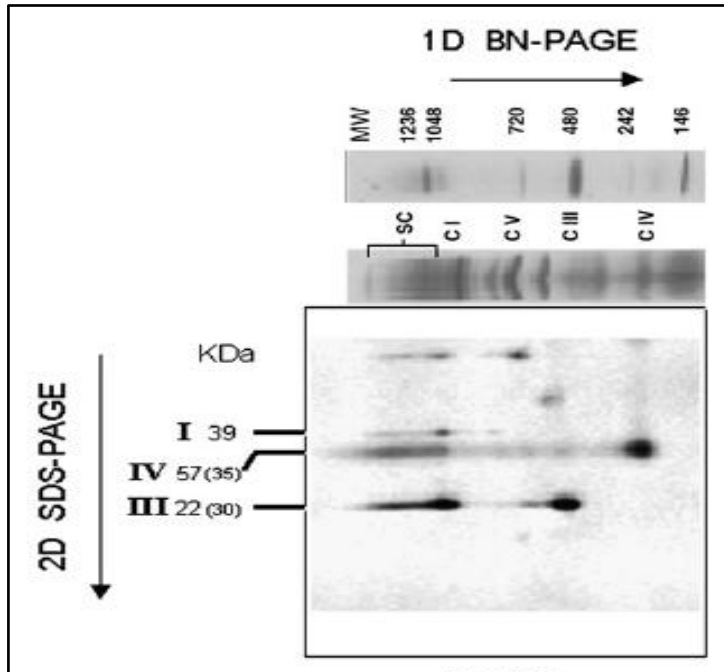
Şekil 13. Rastgele difüzyon modeli ve Süperkompleks Modellerinde, NADH bağımlı MAK Analiz Gösterimi (23).

Her iki modelin MAK açısından karşılaştırılması amacıyla, oksidatif fosforilasyonun diğer elemanlarından (ATP sentaz, membran potansiyeli, taşıyıcılar) arındırılmış açık ve fosforile olamayan submitokondriyal partiküllerde ve sığır kalp mitokondrilerinde her komplekse özgü inhibitör kullanılarak akış-kontrol analizi yapılmıştır (54). Elde edilen MAK değerleri, kompleks I ve III'ün her ikisinde, NADH oksidasyonu üzerinde yüksek oranda kontrol gücü olduğunu ($C_I=1.1; C_{III}=1.0$) ve her iki kompleks arasında güçlü bir ilişki olduğunu doğrulamaktadır. Bunun aksine kompleks IV'ün rastgele dağıldığı ($C_{IV}=0.3$) tespit edilmiştir. Bunun nedeni olarak; kompleks IV'ün birleşmemiş formlarda çok fazla oranda bulunmasından dolayı yalancı negatiflik oluşturabileceği veya sitokrom c'nin süperkompleksin stabil bir parçası olmadığı için havuz davranışı gösteriyor olabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Farklı

olarak patates yumrularında (potato tubers mitochondria, POM) yapılan titrasyon çalışmalarında MAK katsayıları değerlendirildiğinde (CII=0.9;CIII=1.1;CIV=1.2) kompleks I, III ve IV'ün süperkompleks yapısı içerisinde birleştiği gözlenmiştir. Yaşlı sıçan karaciğer mitokondrilerinde yapılan MAK analizinde yine sığır kalp mitokondrilerinde olduğu gibi kompleks I ve kompleks III arasında bağlantı olduğu her ikisinde NADH oksidasyonunu yüksek oranda kontrol ettikleri gösterilmiştir (55). Bu çalışmalarda, inhibitörlerin etki ettikleri spesifik kompleksten ziyade metabolik akışı durdurmuş olması süperkomplekslerin metabolik bir yolak gibi değil de tek bir enzim gibi çalıştığını destekler niteliktedir (23).

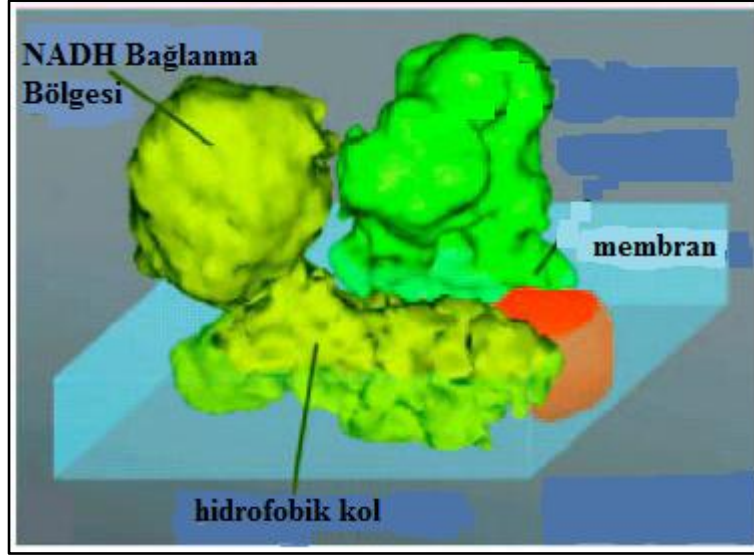
4.2.4. Süperkompleks I-III

Sığır kalbi mitokondrileri ile yapılan çalışmalarda kompleks I proteinlerinin % 76'sı süperkompleks I₁III₂IV yapısında bulunurken % 17'sinin süperkompleks I₁III₂ oluşumu içerisinde yer aldığı belirlenmiştir. Kompleks I' in sadece % 14-16'sının digitonin varlığında serbest halde bulunması fizyolojik koşullarda kompleks I'in hemen hemen hepsinin kompleks III ve/veya diğer kompleksler ile etkileşim halinde olduğunu işaret etmektedir (14).Bu durum, sığır kalbi mitokondrileri ile yürütülen iki-boyutlu jel elektroforezlerinde solunum zinciri süperkomplekslerinin yapısı gösterilmiştir (56) (Şekil 14).



Şekil 14. Sığır kalbi mitokondrilerinin iki boyutlu jel elektroforezi (56)

Memeli hayvanlar ve bitkilerden izole edilen Süperkompleks I_1III_2 ün 3 boyutlu modeli, kompleks I ve kompleks III ün elektron mikroskopu ve X-ray görüntüleme teknikleri ile ortaya koyulan yapıları ve süperkomplekslerin 2 boyutlu haritası dikkate alınarak oluşturulmuştur (53, 57, 58)(Şekil 15).



Şekil 15. Süperkompleks I_1III_2 ün üç boyutlu modeli (53).

Her iki kompleksin membran düzlemi içerisinde etkileşim halinde olduğu gözlenirken komplekslerin matriks yüzeyine bakan domainleri birbirlerine çok yakın olsalarda güçlü bir etkileşim içerisinde değildirler. Fakat, bu iki kompleksin *Arabidopsis*' deki etkileşimi farklı olabilir (53). Sığır kalbi mitokondrilerinde gözlenen süperkompleks $I_1III_2IV_1$ oluşumundaki bireysel komplekslerin yönelimleri ve pozisyonları ayrıntılı olarak incelenmiştir (58). Schäfer ve ark. bitkilerde kompleks III' ün kompleks I'in membran kolu ile etkileşim halinde iken sığır kalbindeki etkileşim daha kapsamlı olduğunu belirtmişlerdir. Kompleks III ve kompleks IV sırasıyla kompleks I 'in membran kolunun orta kısmı ve terminal ucuyla ve ayrıca birbirleri ile etkileşim halindedirler (27, 58). Üç-boyutlu haritalardan elde edilen yapısal bilgiler ışığında, hareketli elektron taşıyıcıların (koenzim Q ve sitokrom c) bağlanma bölgelerinin kompleksler üzerinde karşılıklı bulunduğu bilinmektedir. Bu durum, substratlara kısa mesafe difüzyonu sağlayan süperkompleks yapılarının elektron transferini kolaylaştırdığı (daha etkili kıldığı) görüşünü desteklemektedir (58).

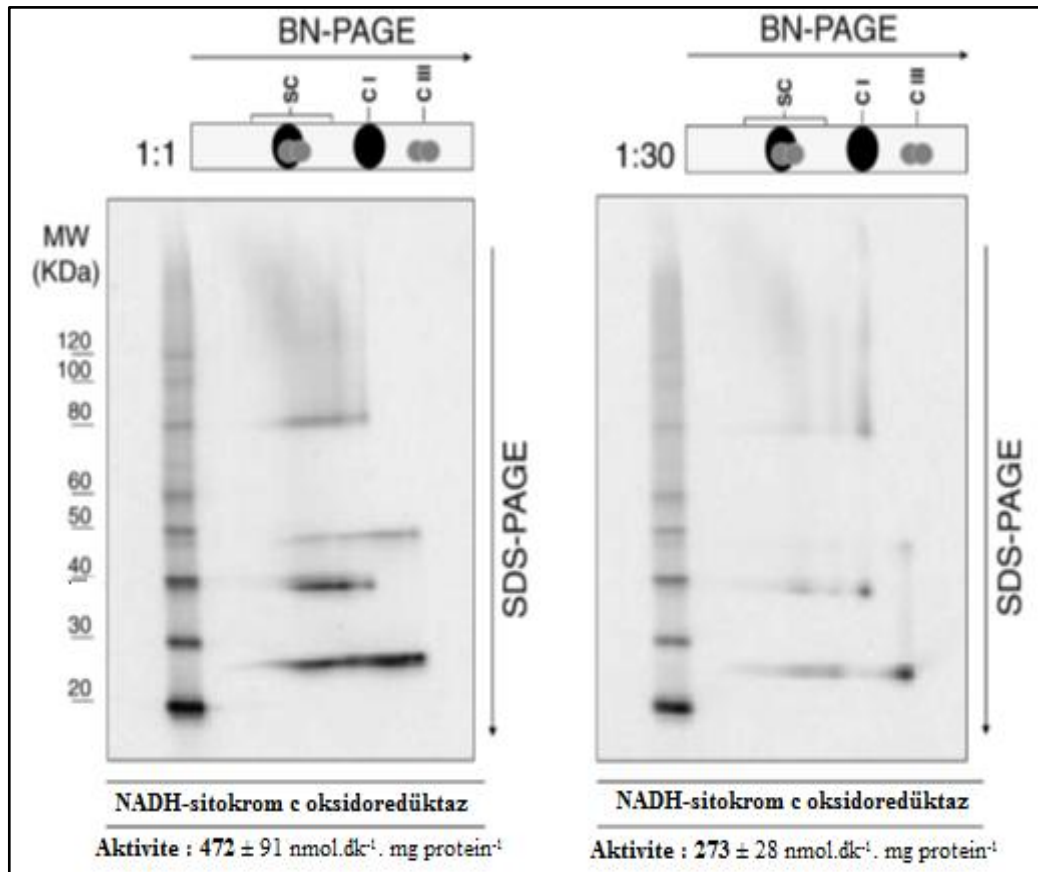
Komplek I ve kompleks III ce zenginleştirilmiş mitokondri fraksiyonları (R4B), fosfolipid ve CoQ10 içeriği farklı lipozomların membranlarına tekrar yerleştirilerek, solunum komplekslerinin bireysel olarak mı veya süperkompleks yapısında birlikte mi hareket ettikleri sorusuna cevap aranmıştır (59,60). Fosfolipid dilüsyonu 1:10 (w:w) olduğu durumda, Kröger andKlingenberg tarafından havuz metodu ile teorik olarak hesaplanan NADH-sitokrom c oksidoredüktaz aktivitesinin, deneysel veriler ile örtüştüğü gösterilmiştir (61). Ayrıca, komplekslerin rastgele dağıldıkları varsayımıyla yapılan hesaplama da kompleks I ve kompleks III arasında öngörülen mesafenin >50 nm olduğu ve mitokondri solunum zinciri kompleksleri arasındaki mesafe ile benzerlik gösterdiği belirtilmiştir (62, 63).

4.3. Lipidlerin Süperkompleks Oluşumundaki Rolü

Lipidlerin süperkompleks etkileşimlerinde belirleyici rol oynadığı söylenmektedir. Fakat bu etkileşimin niteliği ve kapsamı üzerindeki etkileri zamana bağımlı olarak ortaya çıkmakla beraber bu etkiler organizmaya, dokuya, diyet ve yaşam tarzına göre değişmekte olduğu düşünülmektedir. İç mitokondri membranındaki lipid içeriği ve kompozisyonunun süperkompleks oluşumuna etki ettiğine düşüncesi gün geçtikçe güçlenmektedir (64-67).

Ragan ve Heron tarafından yapılan deneylerde sırasıyla izole kompleks I ve kompleks III fraksiyonları, FMN, sitokrom c ve koenzim Q10 varlığında ve 1:1 (protein:lipid) oranında kompleks I-III unitesi (NADH-siyokrom c oksidoredüktaz) oluşturabilmek amacıyla deterjan varlığında karıştırılarak yapılan BN-PAGE analizinde süperkompleks I-III₂ yapısını net olarak görüntüleyebilmişlerdir. Bu çalışma, komplek I ve kompleks III tarafından oluşturulan süperkompleksin varlığının ilk kez gösterilmesi açısından önemlidir. Ayrıca iç mitokondri membranında bulunan doğal fosfolipidlerin varlığında in vitro süperkompleks oluşumunun düşük lipid konsantrasyonunda gerçekleştiği belirtilmiştir (65). Bununla birlikte, iç ve dış membran bağlantılarının ve matriksin yarı katı organizasyonunun integral proteinleri membranda kümeleşerek hareketsiz düzenlenmeler içerisinde bulunabileceği ifade edilmiştir. Bu kümeleşme etrafındaki fosfolipid kompozisyonun da belirliğı olduğu düşünülmektedir (66, 67).

Protein:fosfolipid oranının 1:30 ve 1:1 olduğu iki ayrı proteolipozom modeli üzerinde metabolik flux kontrol analiziyle yapılan kinetik testler, kompleks I ve Kompleks III arasındaki işlevsel bir birleşme olduğu yönündeki hipotezi destekler niteliktedir (55). BN-PAGE metodu ile yapılan deneylerle, yüksek protein oranına sahip örneklerin superkompleks I-III ce zengin iken fosfolipid oranı yüksek örneklerde ise superkompleks I-III miktarının serbest kompleks sayısına kıyasla dramatik olarak azaldığı gözlenmiştir (56)(Şekil 16). Jel bantlarının dansitometrik sonuçlarına göre, 1:1 örneklerinde bağlı kompleks I oranı 20 ve bağlı kompleks III oranı 1 iken, 1:30 örneklerinde ise bağlı kompleks I oranı 0.4 ve bağlı kompleks III oranının 0.3' e düştüğü gözlenmiştir. Başka bir deyişle, fosfolipid miktarını arttırarak proteinlerin seyreltilmesi ile birlikte solunum zinciri komplekslerini bir arada tutan bağların zayıfladığı gözlenmiştir (56).

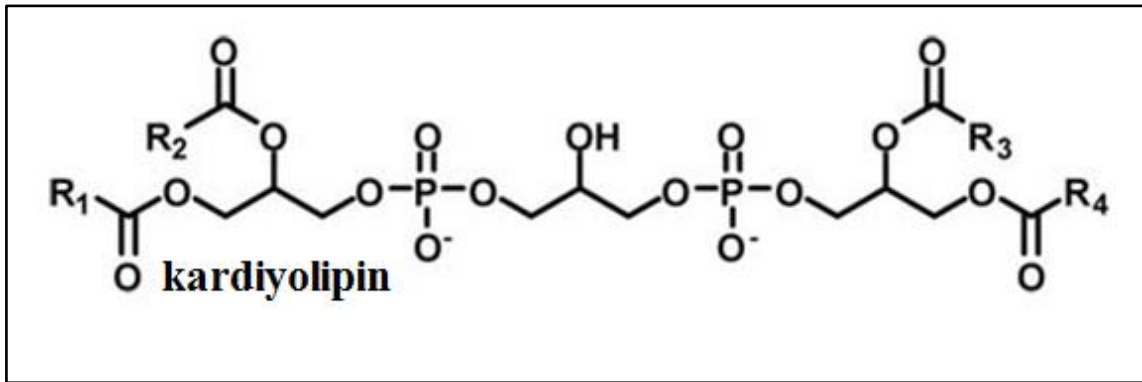


Şekil 16. Proteolipozom sistemleri (Protein:FL oranı 1:1 ve 1:30) içerisinde Süperkompleks I₁III₂ yapı analizinin BN-PAGE yöntemi ile gösterimi.

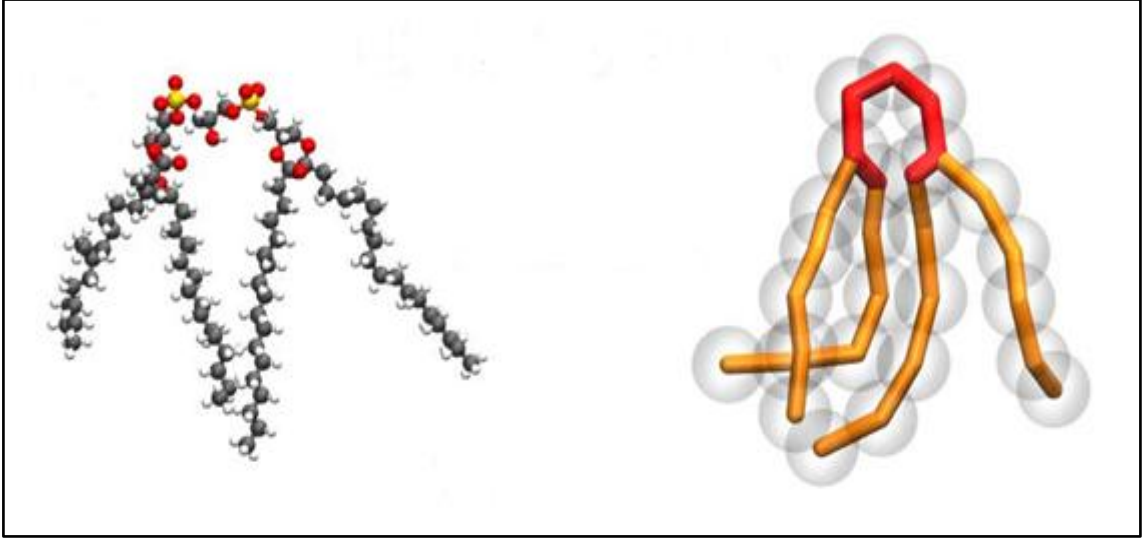
İç mitokondri membranı fosfolipidleri arasında kardiyolipin ve fosfatidiletanolamin mitokondri fonksiyonunda kritik role sahiptir. Her ikisinde iri gövdeli apolar kurukları ile karşılaştırıldığında küçük polar başlara sahiptirler (68, 69). Fosfolipidler protein yüzeylerine oldukça yakın mesafede bulunurlar ve oldukça hareketli olup değişim için serbestirler. Fakat, kardiyolipin daha çok protein komplekslerinin içine gömülü şekilde onlara bağlı halde bulunmaktadır (70-72). Sitokrom c aktivitesi için kardiyolipinin mutlak gerekliliği bu fosfolipidin elektron transfer işleminde kritik bir rol oynadığını düşündürmektedir (73-75).

4.3.1. Kardiyolipin

Kardiyolipin (CL), ilk olarak 1947 yılında kimyager Mary Pangborn tarafından keşfedilen mitokondri lipid belirteçidir (76). Kardiyolipin, difosfatidilgliserol (1,3-bis(sn-3_-fosfatidil)-sn-gliserol) olarak da adlandırılmaktadır. Kardiyolipin, diğer anyonik fosfolipidlere göre yapısal olarak farklıdır. Dimerik olan bu fosfolipidin yapısında iki fosfat grubu ve dört yağ asidi bulunmaktadır (Şekil 17, 18) (77). Hayvanlarda ve yüksek bitkilerde kardiyolipin yapısındaki yağ asitleri genellikle 18 karbonlu çoklu doymamış yağ asitleri iken *Saccharomyces cerevisiae*'de bulunan kardiyolipindeki yağ asitleri genellikle 16 ve 18 karbonlu tekli doymamış yağ asitleridir (78).



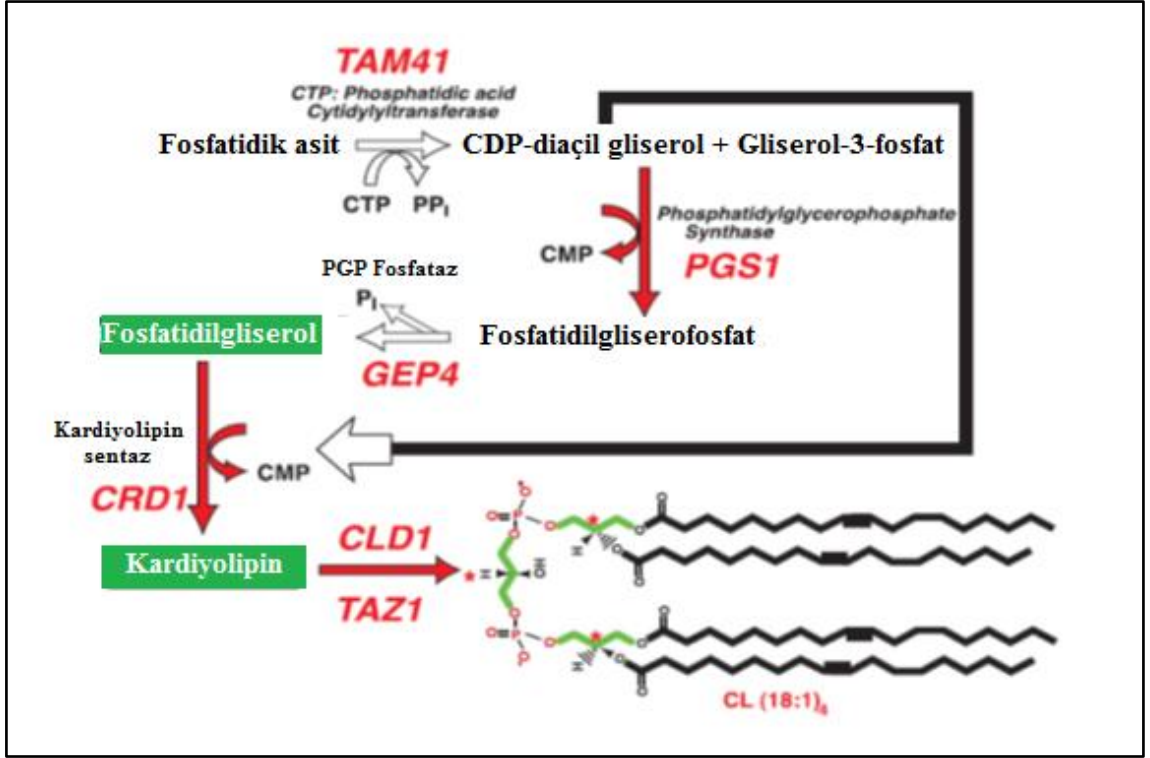
Şekil 17.Kardiyolipin (difosfatidil gliserol) yapısı.



Şekil 18.Kardiyolipin molekülünün atomik ve 3-boyulu görünümü.

Kardiyolipin gibi mitokondriyal fosfolipidlerin fonksiyonu ve sentez mekanizması mayalarda ve memelilerde oldukça benzerdir. Maya hücreleri kullanılarak yapılan çalışmalar, yüksek ökaryotlar ile yapılanlarla karşılaştırıldığında mitokondriyal fosfolipid kompozisyonundaki dramatik farklılıklarda büyüme ve genetik manipülasyon kolaylığına bağlı olarak büyük bir avantaja sahiptir. Mayalarda, CL ve öncülü fosfatidilgliserol (PG) ortak öncülleri fosfatidik asit üzerinden mitokondriyal enzimlerin katalizörlüğünde sentezlenirler. Bu enzimler sitoplazmik ribozomlarda sentezlenip iç mitokondri membranına yerleşirler. Sentezlenen kardiyolipinin kendisine özel yağ asidi kompozisyonu CLD1 ve TAZ1 genlerinden sentezlenen ürünlerin yer aldığı translasyon reaksiyonu ile oluşturulur. Mayalarda kardiyolipin biyosentezinde her bir basamakta görev alan proteinleri kodlayan genler Şekil 19’ de gösterilmiştir (79).

Kardiyolipin özellikle ATP sentezi için gerekli elektrokimyasal potansiyelin olduğu membranlarda bulunur. Kardiyolipin, mitokondri iç membranına spesifiktir ve membranda bulunan fosfolipidlerin % 18’ ini oluşturur (11). Kardiyolipin, mitokondriyal membrandaki osmotik basıncı koruyarak mitokondri yapı ve fonksiyonunda hayati bir role sahiptir (80). Aynı zamanda, kompleks I, kompleks III ve kompleks IV gibi birçok mitokondri iç membran proteini ile etkileşim halinde olup kompleks III ve kompleks IV gibi proteinlerin stabilitesini sağladığı önerilmektedir.



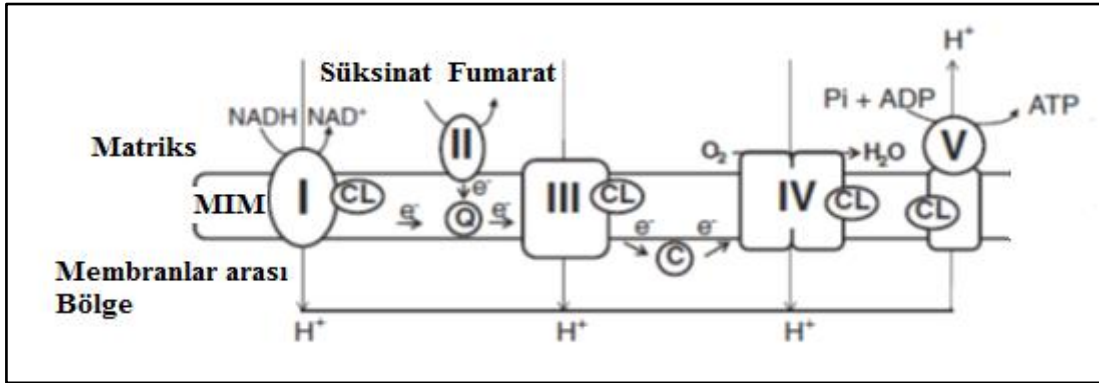
Şekil 19. Kardiyolipin sentezi

Mitokondriyal biyoenerjetik fonksiyonun gerçeklermesi için kardiyolipin seviyesinin normal olması gereklidir. Apoptositze giden hücrelerde, yaşlanmada ve X-bağımlı genetik bir bozukluk olan Barth Sendromu hastalarında düşük kardiyolipin seviyeleri tespit edilmiştir (81, 82).

Kardiyolipinin süperkompleks oluşumu ve stabilitesinin devamı için gerekli olduğu düşünülmektedir (4, 83 - 87). Bu rolü, ilk olarak mayadaki tetramerik SK III₂IV₂ oluşumu üzerinde yapılan BN-PAGE, CN-PAGE ve kinetik analizlerde ortaya konmuştur. Kardiyolipin sentezi için gerekli olan crd1 geni null mutant olan mayalarda SK III₂IV₂ oluşumu gözlenmemiştir (4, 88, 89). CL içeriğinin yeniden düzenlendiği in vivo çalışmalarda, CL düzeyleri ve SK oluşum miktarı arasında bağlantı olduğu öne sürülmektedir. Ek olarak, CL sentezinde görev alan Taz 1 geni susturulmuş mayalarda kompleks IV stabilitesinin ve diğer komplekslerle etkileşiminin azaldığı bulunmuştur (90). TAZ geni, cardiolipin sentezinde görev alan tafazzin proteinin sentezinden sorumludur. Barth sendromu hastalarında oluşan tafazzin mutasyonu, nötropen, kardiy-iskelet miyopati ve solunum zinciri disfonksiyonu ile karakterizedir (91). CL sentezinde görev alan TAZ geni mutasyonu olan Barth Sendromu hastalarında SK

oluşumunun CL miktarı ile değiştiği görülmüştür. CL seviyesinin düşük olduğu belirlenen bu hastaların (92) lenfosit hücreleri ile yapılan BN-PAGE çalışmalarında serbest K IV oranının arttığı ve SK I₁III₂IV₁ miktarının azaldığı gözlenmiştir (93). Kardiyolipin içeriği azaltılmış mitokondrilerde süperkompleks yapılarının görülmemesi kardiyolipinin solunum zinciri süperkomplekslerini bir araya getirmede etkili olabileceği ve/veya süperkompleks stabilitesini koruyabileceği yorumunu desteklemektedir. Muhtemelen, CL, komplekslerin membranla etkileştikleri bölgede görev alarak kompleksleri birleştirici bir yapıştırıcı gibi davranmaktadır (94).

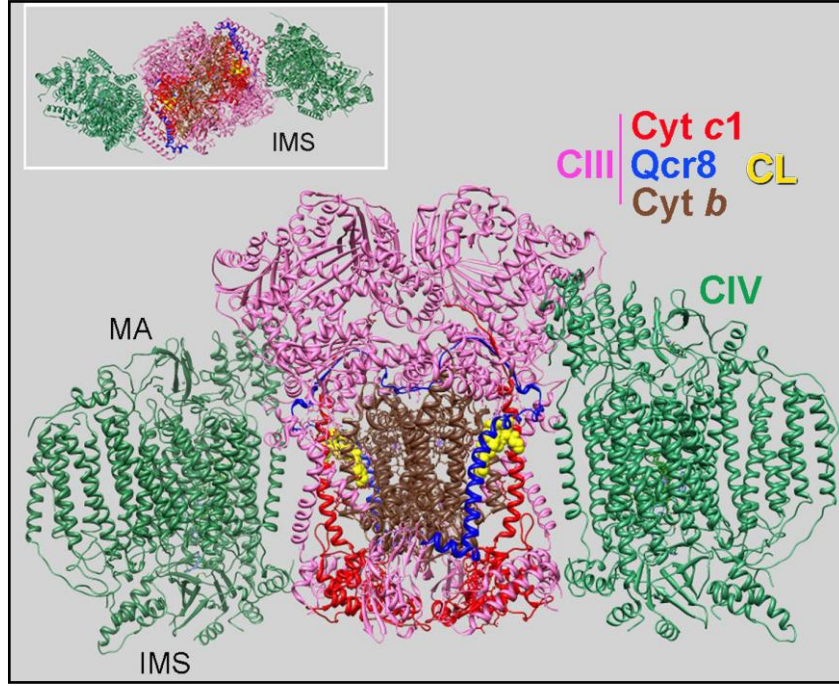
Süperkompleks organizasyonunun yapısal analizlerinde süperkompleks yapısında bulunan komplekslerin birbirleri ile etkileşen domainleri, bu domainler arasındaki uzaklık ve CL' inin sıkı veya gevşek bağlı olduğu pozisyonlar açığa kavuşturulmaya çalışılmıştır. Kardiyolipinin kendisine yüksek affinite gösteren solunum zinciri kompleksleri gibi mitokondri iç membranı (MIM) proteinleri ile etkileşim halide olduğu gösterilmiştir (95-97)(Şekil 20).



Şekil 20. Mitokondriyal solunum zinciri komplekslerinin CL ile etkileşim şematik gösterimi (98).

Sığır kalbi süperkompleks I₁III₂IV₁' in üç-boyutlu yapısı elektron kromatografisi, elektron mikroskopu (EM) ve tek parçacık analizi yöntemleri kullanılarak ortaya konulmuştur (39). Bu üç-boyutlu haritalar Pettersen ve ark. tarafından geliştirilen UCSF Chimera programı kullanılarak gerçeğine çok benzer atomik modelleme ile elde edilmiştir (99,39).

Mayalarda, K IV' ün dimerik K III ile yüzleştigi bölge transmembran dominlerin bulunduğu oyuk olmakla beraber bu oyuk aynı zamanda kendisine bağılı bir kardiyolipin fosfolipidi içermektedir (79, 100) (Şekil 21).



Şekil 21. Süperkompleks III₂IV₂ üzerindeki CL-bağılanma bölgelerinin 3-Boyutlu Gösterimi (79).

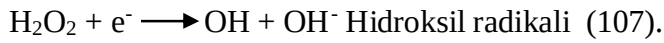
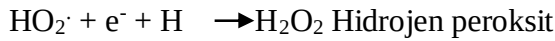
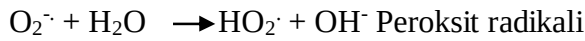
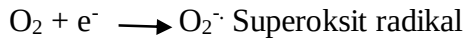
Kompleklerin birbirleri ile etkileştiğı bölgelerde kardiyolipin bağlanma bölgelerinin varlığı, bu fosfolipidin süperkompleks oluşumuna yardım edebileceğı hipotezini desteklemektedir (79).

4.4. Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS)

Serbest radikaller, dış yörüngelerinde eşleşmemiş elektrona sahip bileşikler olarak adlandırılmaktadır (101, 102). Eşleşmemiş elektronlarından dolayı serbest radikaller hücre bileşenleri ile kolayca kimyasal etkileşimde bulunabilirler. Bu kimyasal etkileşimler hücre ve doku hasarına neden olmaktadır (101). Biyolojik sistemlerin bir çoğunda oksijen-merkezli serbest radikaller reaktif oksijen türleri (ROS) olarak adlandırılmaktadır. ROS, hücrede süperoksit iyonu ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikali($OH^{\cdot}$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) üretiminden sorumludur. Hidrojen peroksit yapısında eşleşmemiş elektron bulunmamasına karşın demir ve bakır iyonlarıyla etkileşime

girerek yüksek reaktiviteye sahip hidroksil serbest radikalleri oluşturabilmesi nedeniyle bu grup içerisinde yer alır (103-105).

İnsanlarda, ROS üretimi daha çok oksidatif fosforilasyon sırasında gerçekleşmektedir (106). Moleküler oksijen molekülü yapısında iki adet eşleşmemiş elektron bulunmaktadır. Moleküler oksijenin suya indirgenmesi sırasında O_2^- , H_2O_2 ve $\cdot OH$ gibi radikaller oluşur (105, 106). Oksijenin indirgenmesi reaksiyonu aşağıdaki gibidir :



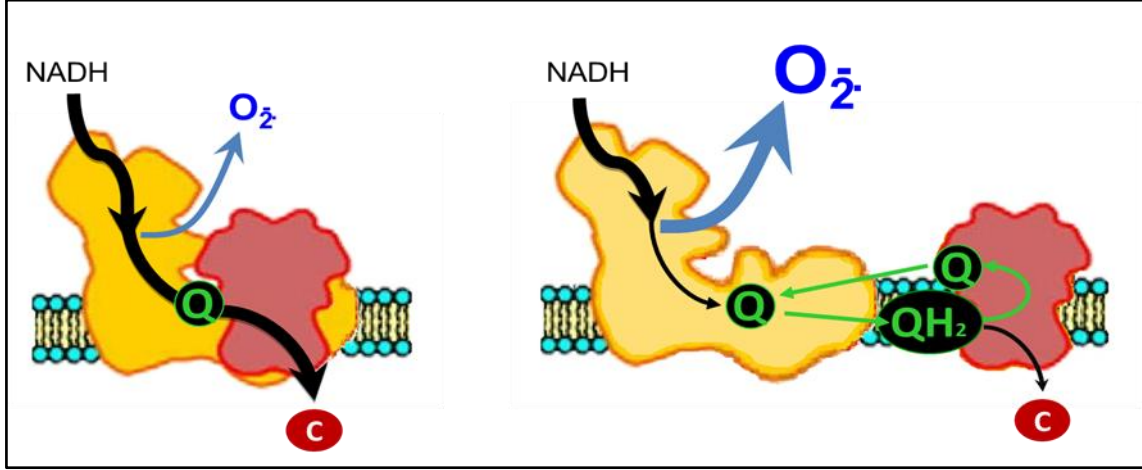
4.4.1. ROS Üretiminin Süperkompleks Oluşumu Üzerindeki Etkisi

Hücredeki reaktif oksijen türlerinin (ROS) çeşitli kaynakları, sinyal iletimi ve patolojik koşullarda önemli bir etkiye sahip olabilir. Birçok çalışmada mitokondri solunum zinciri komplekslerinin ROS üretimi kaynağı olduğuna dair kanıtlar elde edilmiştir (108-110). Süperoksit oluşumundan sorumlu başlıca redoks bileşenlerinin kompleks I ve kompleks III oluşu söylenmektedir. Özellikle, elektron akışının limitli olduğu koşullarda kompleks I'in süperoksit oluşumunu indüklemektedir. Bu olay, fizyolojik ve kompleks I' in etkilendiği patolojik durumlarda veya rotenon gibi kompleks I inhibitörlerinin varlığında gerçekleşmektedir (111). Kompleks I' de elektronun hangi bölgeden kaçtığı konusundaki tartışmalar sürmektedir. Olası noktaların FMNH₂ veya ubisemikinon veya demir-sülfür oyuğu (N₂) olabileceği önerilmektedir. (111-114).

Süperkompleks I₁III₂' nin ayrışması, kompleks I ve kompleks III arasındaki elektron akışını sınırlandırmaktadır. Bu durumun kompleks I kaynaklı ROS üretiminin artışına ve/veya modifiye olmasına sebep olup olmadığı sorusu akla gelmektedir.

Süperkompleks oluşumunun solunum zinciri tarafından üretilen süperoksit miktarını azalttığı düşünülmektedir. Panov ve ark. süperkompleks yapısındaki komplekslerin redoks bileşenlerinin korunduğunu, bu durumun elektron akışını kolaylaştırdığını ve ROS üretimini azalttığını ileri sürmektedirler (115). Benzer olarak,

Seelert ve ark. elektron akışı kolay olduğunda ROS üretiminin azalabileceğini belirtmektedirler (116) (Şekil 22).



Şekil 22. Süperkompleks I₁III₂ yapısı organize iken ve ayrıştığında ROS oluşum mekanizması.

Süperoksit oluşumuna neden olan elektron kaçışının lokasyonunu belirlemeye yönelik, izole kompleks I veya mitokondri ile yapılan çalışmaların bir çoğunda kompleks I yapısında bulunan N2 bölgesinin ROS kaynağı olabileceği kanısına varılırken (111, 113). FMN'in ise sadece izole kompleks I ile çalışıldığında e⁻ kaçışına mücade ettiği belirlenmiştir (112, 114). Dolayısıyla, kompleks I ve kompleks III arasındaki etkileşim ortadan kalktığında FMN bölgesinden elektron kaçtığı hipotezi ortaya çıkmaktadır (23, 40, 117).

Bu bilgiler ışığında, Maranzana ve ark. tarafından kompleks I ve kompleks III' ün birleşerek süperkompleks I₁III₂ oluşturduğu durumda ve bu iki kompleksin ayrıştığı durumdaki kompleks I tarafından üretilen ROS miktarının ölçüldüğü çalışmada süperkompleks oluşumunun ROS üretimini azalttığı yolundaki hipotezi destekler veriler elde edilmiştir (118).

Ayrıca, reaktif oksijen türlerine maruz kalan mitokondrilerde süperkompleks oluşumuna etki ettiği düşünülen kardiyolipin gibi fosfolipidlerin oksidatif hasara uğraması sonucu solunum zinciri aktivitesinin azalabileceği düşünülmektedir (119-121). Paradies ve ark. ve Genova ve ark. tarafından yapılan çalışmalarda, lipid

peroksidasyonunun 2,2'-azobis-(2-amidinopropan) dihidroklorür ile indüklenmesiyle süperkompleks ayrışmasının meydana geldiği gözlenmiştir (55, 122).

Süperkompleks oluşumundaki azalma düşük CL seviyesi ile bağlantılıdır ve olduğu bu durumun yaşlılıkta, nörodejeneratif hastalıklarda ve kanserde CL peroksidasyonuna ve oksidatif strese yol açmaktadır (120-125).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

Bu çalışmada kullanılan cihaz ve malzemeler Tablo 3’ de verilmiştir.

Tablo 3. Tez Çalışmasında Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

Cihaz	Marka/Model
Ultrasantrifüj	Beckman Coulter, Optima LE-80K, Rotor type 50.2 Ti, JA20
Santrifüj	Beckman Coulter, Avanti JA10, Rotor SA 10
Santrifüj	Kontron Centrifuge Centrikon T-1080, Rotor TFT 55.38
Santrifüj	Sorvall RC-5B, Rotor GS3
pH metre	Hanna, bench pH/ISE meter HI 4222
Spektrophotometre	Jasco Europe, Cremella-LC, V550
Kuartz küvet	Hellma, QS 10.00 mm
Homojenizatör	Wheaton, Potter-Elvehjem
Sonikatör	Labsonic, Braun model U 2000
Vorteks	Nüve, NM 110
Hassas Terazî	Kern ACS, Z757217 ALDRICH
Semi-otomatik pipet	Gilson, PIPETMAN Classic P1000, P500, P100, P10, P5
Şırınga	Hamilton
Florasana okuyucu	Perkin Elmer, Victor 2
Elektroforez Tank Sist.	İnvitrogen
Güç kaynağı	Bio-Rad
Görüntüleme sistemi	Bio – Rad, Fluor-S Max MultiImager
Ekstrüzyon cihazı	Avanti, Mini Ekstruder AVA610023-1EA

5.2. Kullanılan Kimyasallar

Bu çalışmada kullanılan kimyasallar Tablo 4’ de verilmiştir.

Tablo 4. Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasallar

Kimyasal Adı	Markası
KCl	Carlo Erba 471177
Tris	Sigma T1303-1KG
Sükroz	Sigma 84097
Histidin	Sigma-Aldrich H3751
Na-DOC (Sodyum-deoksikolat)	Sigma D6750-500G
EDTA	Sigma-Aldrich E9884
NADH	Sigma N8129
Rotenon	Sigma R-8875
Musidin	Pharma
Amonyum asetat	Sigma A7330-100G
Kardiyolipin	Sigma C1649
Koenzim Q10	Sigma C9538-1G
ODG (n-oktil –D-glukopiranosid)	Fluka-BroChemika 75083
Asolektin	Sigma 11145
Mannitol	Sigma M4125-1KG
Sitokrom c	GERBY #1338
DB (deçil-ubikinon)	Sigma D7911-10MG
Antimisin A	Sigma A8674
KCN	Baker Chemicals-0213
Na ₂ S ₂ O ₄ (Sodyum Hidrosülfür)	Sigma 71699
Asolektin	A11145
DCFDA (diklorofloresandiasetat)	Sigma 35845-5G
H ₂ O ₂	
Total OXPHOS Blue Native WB	MitoScience MS603
Antibadi Kokteyli	
Kompleks I altbirim NDUFA9 monoklonal antikor	MitoScience MS111

Tablo 4'ün devamı.

Kimyasal Adı	Markası
Kompleks III altbirim Core 2 monoklonal antikor	MitoScience MS304
Coomassie blue G Boyası	Sigma-Aldrich B5133
6-aminohegzanoik asit	Sigma A2504
Anot Tamponu	Invitrogen, BN2001
Katot Tamponu	Invitrogen, BN2002
1.Boyut Jeli	Invitrogen, Native-PAGE Bis-Tris gel system (%3-%12)
2.Boyut Jeli	%4-%12 T, Nu-PAGE Bis-Tris gel system; NP0326
Molekül Ağırlığı Belirteci	Invitrogen, NativeMark
BSA	Bio-Rad
TWEEN 20	BioRad 170-6531
DMSO	Sigma D8418-100ML

5.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları

5.3.1. Mitokondri İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler

0.15 M KCL Tamponu: 55,92 g KCl (MA: 74,55 g/mol) tartılarak 5 L saf su içerisinde çözöldü.

1 M Tris Tamponu : 30,29 g Tris (MA: 121,14 g/mol) tartılarak 250 mL saf su ile çözöldü.

0,25 M Sükroz/ 10 mM Tris Tamponu (pH;7,4) : 171,15 g sükroz (MA: 342,3 g/mol) ve 2,42 g (MA: 121,14 g/mol) tarılarak 1,5 L saf su içerisinde çözölerək pH'sı 1 M Tris tamponu ile 7,4' e ayarlandı. Ardından, hacim saf su ile 2 L' ye tamamlandı.

0,25 M Sükroz Tamponu (pH;7,6) : 427,88 g sükroz (MA: 342,3 g/mol) tartılarak bir miktar saf suda çözöldü. Akabinde, pH'sı 1 M Tris tamponu ile 7,6' ya ayarlanarak hacim saf su ile 5 L' ye tamamlandı.

5.3.2. R4B Fraksiyonlarının Hazırlanmasında Kullanılan Çözeltiler

TSH Tamponu (pH;8) : Bu tampon 660 mM sükroz, 50 mM Tris ve 1 mM histidin içerecek şekilde hazırlandı. 22,6 g sükroz, 0,61 g Tris ve 0,016 g histidin (MA: 155,16 g/mol) tartılarak 70 mL saf su içerisinde çözöldü ve pH' sı 8' e ayarlandıktan sonra hacmi saf su ile 100 mL' ye tamamlandı.

%10' luk Sodyum-Deoksikolat (Na-DOC) Çözeltisi:10 g Na-DOC, 100 mL saf su içerisinde çözöldü.

10 mM Tris-HCl Tamponu (pH; 8) : 1,21 g Tris 750 mL saf su ile çözöldü. pH' sı 8' e ayarlandıktan sonra hacmi 1 L' ye tamamlandı.

% 50 Doygun Amonyum Asetat Çözeltisi : 100 g amonyum asetat kutusuna 135 mL saf su eklenerek %50 doygün hale getirildi.

5.3.3. Lipozom Hazırlığında Kullanılan Çözeltiler

NaCl tamponu (140mM, pH: 8): Bu tampon 140 mM NaCl ve 10 mM Tris içerecek şekilde hazırlandı. 81,82 mg NaCl (MA: 58,44 g/mol) ve 12,11mg Tris tartılarak 6 mL saf su içerisinde çözüldü ve pH' sı 8' e ayarlandıktan sonra hacmi saf su ile 10 mL' ye tamamlandı.

Kloroform-Metanol (3:1 v/v) Çözeltisi: 1500 µL kloroform üzerine 500 µL Metanol eklenerek hazırlandı.

5.3.4. R4B fraksiyonlarının Lipozomlara Yerleştirilmesi İşleminde Kullanılan Çözeltiler

KCl-Tris-EDTA Tamponu (pH; 7.4) :Bu tampon 50 mM KCl, 10 mM Tris ve 1 mM EDTA içerecek şekilde hazırlandı. 0,373 g KCl, 0,121g Tris ve 0,037g EDTA (MA: 372,24 g/mol) tartılarak 80 mL saf su içerisinde çözüldü ve pH' sı 7.4' e ayarlandıktan sonra hacmi saf su ile 100 mL' ye tamamlandı.

% 50' lik ODG (n-oktil –D-glukopiranosid) Çözeltisi: 0,025 g ODG tartıldı ve 50 µL saf su içerisinde çözüldü.

5.3.5. BN-PAGE Analizinde Kullanılan Çözeltiler

5.3.5.1. 1.Boyut Elektforezde Kullanılan Çözeltiler

Tampone B (pH:7,2): 1,002g mannitol, 0,599g sükröz, 0,03 gTris ve 0,00931g EDTA tartılarak 20 mL saf suda çözüldükten sonra pH' sı 7,2' ye ayarlandı ve çözeltinin hacmi 25 mL' ye tamamlandı.

Resüspansiyon Tamponu (pH:7):0,073050 g NaCl, 0,08505 g imidazol ve 0,01640 g 6-aminoheksanoik asit tartılarak 20 mL saf suda çözüldükten sonra pH' sı 7' ye ayarlandı ve çözeltinin hacmi 25 mL' ye tamamlandı.

Aminohegzanoik Asit Çözeltisi: 0,656 g6-aminohegzanoik asit 10 mL saf su ile çözüldü.

Digitonin Çözeltisi (%5): 5 mg digitonin tartılarak 100 µL saf su ile çözüldü.

Coomassie Boyası :1 mgCoomassieBlue G tartılarak 20 µl aminohegzanoik asit çözeltisi içerisinde çözüldü.

Anot Tamponu: 30 mL BN2001 570 mL saf su ile seyreltili.

Koyu Katot Tamponu:10 mL BN2001 ve 10ml BN2002, 180 mL saf su ile seyreltili.

Açık Katot Tamponu:10 ml BN2001 ve 1 ml BN2002, 189 mL saf su ile seyreltili.

5.3.5.2.2.BoyutElektroforezde Kullanılan Çözeltiler

Quenching Çözeltisi: 1 mL NuPAGE LDS numune tamponu 3 mL saf su ile seyreltili.

İndirgeme Çözeltisi: 15 mL' lik steril falkon tüpüne 1,124 mL NuPAGE LDS(4X) numune tamponu, 500 µL numune indirgeyici ajan (10X) ve 3,375 mL saf su eklenerek vortekslendi.

Alkilleyici Çözelti: 1,25 mL NuPAGE LDS(4X) numune tamponu, 28 µL antioksidan ve 3,75 mL saf su karıştırılarak hazırlandı.

Yürütme Tamponu:40 mL MOPS-SDS (20X) yürütme tamponuna 760 mL eklenerek 800 mL çözelti elde edildi. Bu çözeltinin 600 mL' si anot tamponu olarak kullanıldı. Kalan 200 mL'sine 500 µL antioksidan eklenerek katot tamponu olarak kullanıldı.

5.3.5.3.Western Blotting İşleminde Kullanılan Çözeltiler

PBS Tamponu (10X):0,72 g KH_2PO_4 , 45 g NaCl ve 2,67 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$ tartılarak 500 mL saf su içerisinde çözüldü.

PBS Tamponu (1X):50 mL PBS (10X), 450 mL saf su ile seyreltili.

PBS Tween Çözeltisi: 250 μ L Tween-20 ile 500 mL PBS (1X) tamponu karıştırılarak hazırlandı.

Transfer Tamponu : 50 mL transfer tamponu, 1 mL antioksidan ve 100 mL metanol karıştırılarak hazırlandı.

Bloklama Çözeltisi (%2): 2 g BSA (Bovine Serum Albumin), 100 mL PBS Tween çözeltisi içerisinde çözülür.

5.3.6. Enzimatik Aktivite Tayinlerinde Kullanılan Çözeltiler

KCl-Tris-EDTA Tamponu (pH; 7.4) :Bu tampon 50 mM KCl, 10 mM Tris ve 1 mM EDTA içerecek şekilde hazırlandı. 0,373 g KCl, 0,121g Tris ve 0,037g EDTA (MA: 372,24 g/mol) tartılarak 80 mL saf su içerisinde çözöldü ve pH' sı 7.4' e ayarlandıktan sonra hacmi saf su ile 100 mL' ye tamamlandı.

Tampon B (pH 7.4):Bu tampon 0.22 mM Mannitol, 0.07mM Sükroz 10 mM Tris ve 1 mM EDTA içerecek şekilde hazırlandı. 4g Mannitol, 2.396 g sükroz, 0.12 g Tris ve 0.037 g EDTA tartılarak 70 mL saf su içerisinde çözöldü ve pH' sı 7.4' e ayarlandıktan sonra hacmi saf su ile 100 ml' ye tamamlandı.

KCN Çözeltisi : Çözelti konsantrasyonu 200 mM olacak şekilde hazırlandı. 0,013 g KCN (65,12 g/mol) tartılarak 600 μ L saf su içerisinde çözöldükten sonra pH'sı HCl ile 7,4' e ayarlanarak hacmi 1000 μ L' ye tamamlandı.

5.3.7. ROS Tayininde Kullanılan Çözeltiler

KCl-Tris-EDTA Tamponu (pH; 7.4) :Bu tampon 50 mM KCl, 25 mM Tris ve 1 mM EDTA içerecek şekilde hazırlandı. 0,093 g KCl, 0,076 g Tris ve 0,009 g EDTA (MA: 372,24 g/mol) tartılarak 20 mL saf su içerisinde çözöldü ve pH' sı 7.4' e ayarlandıktan sonra hacmi saf su ile 25 mL' ye tamamlandı.

DFCDA Çözeltisi (5mM): 2,4 mg prob tartılarak 1 mL DMSO (dimetil sülfoksit) ile çözülerek spektrofotometre ile konsantrasyonu teyit edildi. Spektrofotometrede dalga boyu 258 nm' ye ayarlandıktan sonra kuartz küvete 1 mL metanol koyularak absorbans sıfırlanır ve 5 µL DFCDA çözeltisi de küvete eklenerek karıştırıldıktan sonra absorbans okunur. Ölçüm iki veya üç kez tekrarlanır. Formül 1'e göre konsantrasyonu hesaplanır. Çözelti küçük eperdorflara bölünerek -20 °C' ye kaldırıldı.

0,01 N NaOH Çözeltisi: 0,020 g NaOH (39,997 g/mol) tartılarak 50 mL saf su içerisinde çözüldü.

5.3.8. Lipozom Hazırlığı, Enzimatik Aktivite Tayinleri ve ROS Tayininde Kullanılan Ortak Çözeltiler

Aşağıda belirtilen çözeltilerin konsantarsyonları Formül 1 kullanılarak hesaplandı.

Formül 1.

$$\text{Konsantrasyon (mM)} = \frac{\text{ortalama absorbans değeri} \times \text{küvetteki toplam hacim (}\mu\text{L)}}{\epsilon \text{ değeri} \times \text{küvetteki numune hacmi}}$$

Koenzim Q₁₀ Çözeltisi: Çözelti konsantrasyonu 20 mM olacak şekilde hazırlandı. 0.017 g KoQ10 tartılarak 1 ml etanol ile cam tüp içersinde çözüldü. Aşırı hidrofobik yapısından dolayı çözülme işleminin tam olarak gerçekleşmesi için sıcak musluk suyu altında bir süre bekletildi.

Spektrofotometrede dalga boyu 275 nm'ye ayarlandıktan sonra kuartz küvete 1 ml etanol koyularak absorbans sıfırlandı ve 2µl KoQ₁₀ çözeltisi de küvete eklenerek karıştırıldıktan sonra absorbans okundu. Ölçüm üç kez tekrarlandı. Formül 1'e göre konsantrasyonu hesaplandı.

30 mM NADH Çözeltisi : 0,00638 g NADH (MA:709,4 g/mol) 300 µL saf su içerisinde çözülerek spektrofotometre ile konsantrasyonu tespit edildi.

Spektrofotometrede dalga boyu 340 ve 380 nm' ye ayarlandıktan sonra kuartz küvete 1 mL saf su koyularak absorbans sıfırlandı ve 5 µL NADH çözeltisi de küvete eklenerek karıştırıldıktan sonra her iki dalga boyunda da okuma yapıldı. Ölçüm iki veya üç kez tekrarlandı.

340 nm absorbans değerlerinden 380 nm absorbans değerleri birbirinden çıkartılarak ortalamaları alındı. Konsantrasyonlar Formül 1 uygulanarak hesaplandı.

Sitokrom c³⁺ Çözeltisi: Çözelti konsantrasyonu 5mM olacak şekilde hazırlandı. 61,635 mg sitokrom c³⁺ (12384g/mol) 1 mL saf su içerisinde çözülerek spektrofotometre ile konsantrasyonu tespit edildi.

Spektrofotometrede dalga boyu 550 nm' ye ayarlandıktan sonra kuartz küvete 1 mL saf su koyularak absorbans sıfırlandı ve 10 µL sitokrom c çözeltisi de küvete eklenerek karıştırıldıktan okuma yapıldı. Daha sonra Na₂S₂O₄ ile okside edilmek koşuluyla en az iki kez ölçüldü. Okside olmuş absorbans değeri ile ilk değerin farkı alındı ve Formül 1'e göre konsantrasyonu hesaplandı.

DB: Çözelti konsantrasyonu 40 mM olacak şekilde hazırlandı. 0,012896 g DB 1 mL etanol içerisinde çözülerek spektrofotometre ile konsantrasyonu belirlendi.

Spektrofotometrede dalga boyu 280 nm' ye ayarlandıktan sonra kuartz küvete 1 mL etanol koyularak absorbans sıfırlandı ve 0.3 µL DB çözeltisi de küvete eklenerek karıştırıldıktan sonra absorbans okundu. Ölçüm iki veya üç kez tekrarlandı ve Formül 1'e göre konsantrasyonu hesaplandı.

Rotenon Çözeltisi : Çözelti konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde hazırlandı. 0,4 mg Rotenon (MA: 394,4 g/mol) 1 mL etanol içerisinde çözülerek spektrofotometre ile konsantrasyonu belirlendi.

Spektrofotometrede dalga boyu 292 nm' ye ayarlandıktan sonra kuartz küvete 1 mL etanol koyularak absorbans sıfırlandı ve 4 µL Rotenon çözeltisi de küvete eklenerek

karıştırıldıktan sonra absorbans okundu. Ölçüm iki veya üç kez tekrarlandı. Formül 1'e göre konsantrasyonu hesaplandı.

Mucidin: Çözelti konsantrasyonu 1 mg/mL olacak şekilde hazırlandı. 1 mg mucidin tartılarak (M.A: 258 g/mol) 1 mL etanol içerisinde çözülerek spektrofotometre ile konsantrasyonu tespit belirlendi.

Spektrofotometrede dalga boyu 292 nm' ye ayarlandıktan sonra kuartz küvete 1 mL etanol koyularak absorbans sıfırlandı ve 4 µL Rotenon çözeltisi de küvete eklenerek karıştırıldıktan sonra absorbans okundu. Ölçüm iki veya üç kez tekrarlandı. Formül 1'e göre konsantrasyonu hesaplandı.

Antimisin A (AA) Çözeltisi :Çözelti konsantrasyonu 1.8 mM olacak şekilde hazırlandı. 1 mg AA tartılarak 1 mL etanol içerisinde çözülerek spektrofotometre ile konsantrasyonu tespit belirlendi.

Spektrofotometrede dalga boyu 320 nm'ye ayarlandıktan sonra kuartz küvete 1 mL etanol koyularak absorbans sıfırlandı ve 20 µL AA çözeltisi de küvete eklenerek karıştırıldıktan sonra absorbans okundu. Ölçüm üç kez tekrarlandı ve Formül 1'e göre konsantrasyonu hesaplandı.

Çözeltisi hazırlanan kimyasalların molar absorpsiyon katsayısı katsayıları (ϵ) aşağıdaki gibidir.

NADH: $5.5 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, DB: $14.5 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ Rotenon: $25 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, Musidin $21.9 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, AA: $4.8 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, Sitokrom c: $19.1 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, KoQ10: $14.2 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$

5.4. Deneysel Yöntemler

5.4.1. Sığır Kalbi Mitokondri İzolasyonu

Sığır kalbi mitokondri izolasyonu için Smith tarafından geliştirilen metod modifiye edilerek kullanıldı(126).

- Öncelikle taze kesilmiş genç erkek sığır kalp dokusu yağ ve bağlantı dokularından arındırıldı.
- Ardından, doku kan ve kas olamayan dokulardan temizlenmek üzere 0.15 M KCl tamponu ile yıkandı.
- Kalp dokusu 0.25 M süktroz tamponu ile homojenize edildi. Homojenizasyon sırasında 1 M tris tamponu kullanılarak çözeltinin pH'sının 7.6 civarında olması sağlandı.
- Homojenatlar 706 x g 'de 20 dakika boyunca santrifüj edildi.
- Süpernatant 14295x g'de 30 dakika süresince tekrar santrifüj edildi.
- Süpernatant uzaklaştırıldı. Mitokondri içeren sediment süktroz Tris-HCl tamponu ile resüspanse edildi ve 14295 x g 'de 30 dakika santrifüj edildi.
- Sediment konsantrasyonu 50 mg/mL olacak şekilde süktroz Tris-HCl tamponu ile resüspanse edildi ve kullanılmak üzere -80 °C' de muhafaza edildi.

5.4.2. Sığır Kalbi Mitokondrisinden Kompleks I ve Kompleks III' ce zengin R4B Fraksiyonlarının Hazırlanması

Mitokondriyal protein fraksiyonu olan Kompleks I ve III' ce zengin R4B, izole sığır kalbi mitokondrileri kullanılarak elde edildi. Bu işlem Hatefi tarafından geliştirilen protokol ile gerçekleştirildi (127).

- Mitokondriler, çözelti konsantrasyonu 20 mg/mL olacak şekilde TSH tamponu içerisinde homojenize edildi.
- Ardından 0.35 mg potasyum deoksikolat ve 72 mg katı KCl eklenerek 30 000 rpm'de 30 dakika boyunca +4 °C' de santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası açık kırmızı renkli süpernatant alınarak ¼ oranında soğuk distile su ile seyreltildi ve tekrar 108472 x g'de 30 dakika santrifüj edildi.

- Süpernatant diyaliz membranına alınarak 10 mM Tris tamponu içerisinde 3 saat boyunca diyaliz edildi.
- Diyalizat, tekrar santrifüj tüplerine konularak 108472 x g rpm' de 75 dakika boyunca santrifüj edildi.
- Sediment TSH tamponu ile çözülerek Potter-Elvehjem homojenizatör ile homojenize edildi.
- Homojenizatın konsantrasyonu Biüret metodu ile tayin edildi. Bir gece boyunca -80°C' de saklandı.
- Ertesi gün çözelti çözülerek konsantrasyonu 10-12 mg/mL olacak şekilde TSH tamponu ile seyreltilti.
- Üzerine mg protein başına 0.5 mg olacak şekilde %10'luk sodyum deoksikolat ve 100 mL çözelti için 17 mL olacak şekilde %50'lik amonyum asetat çözeltisi eklendi.
- Buz içerisinde 15 dakika inkübe edildikten sonra 108472 x g 'de 30 dakika boyunca santrifüj edildi.
- Açık kırmızı renkli süpernatana 100 mL çözelti için 6 mL olacak şekilde %50'lik amonyum asetat çözeltisi eklenerek 15 dakika boyunca buz üzerinde inkübe edildi.
- Akabinde, 108472 x g'de 30 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatana 100 mL özetti için 3,2 mL olacak şekilde %50'lik amonyum asetat çözeltisi eklenerek 15 dakika boyunca buz üzerinde inkübe edilerek 30 000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi.
- Kompleks I ve kompleks III ce zengin sediment TSH tamponu ile resüspense edilerek konsantrasyonu Biüret metodu ile belirlendi ve daha sonra kullanılmak üzere aligotlara bölünerek -80 °C de saklandı.

5.4.3. Lipozom (Fosfolipid Veziküllerinin) Hazırlığı

Fosfolipid vezikülleri Degli Esposti tarafından geliştirilen metod modifiye edilerek hazırlandı (128).

- **Kontrol numunesi** hazırlamak üzere son lipid konsantrasyonu 30 mg/mL olacak şekilde asolektin (soya fasülyesi yapısında bulunan fosfolipid karışımı) cam tüp içerisinde tartılarak 2 mL kloroform metanol (3:1 v/v) çözeltisi ile çözüldü ve konsantrasyonu mg fosfolipid başına 30 nmol olup etanolde çözülen KoenzimQ10 çözeltisi cam tüpe eklendi.
- **Kardiolipin numunesi** hazırlamak üzere toplam fosfolipid miktarının % 82' sine tekabül eden miktarda asolektin cam tüp içerisinde tartılarak 2 mL kloroform metanol (3:1 v/v) çözeltisi ile çözüldükten sonrakalan % 18' lik kısmı tamamlayacak şekilde kardiyolipin çözeltisi eklendi ve konsantrasyonu mg fosfolipid başına 30 nmol olup etanolde çözülen KoenzimQ10 çözeltisi cam tüpe eklendi.
- Sarı renkte olan çözelti iyice vorteklendikten sonra cam kapağı açıldı ve lipid peroksidasyonunu engellemek amacıyla nitrojen gaz akışı altında cam tüp eğik tutularak ve kendi eksenine etrafında çevrilerek çözelti buharlaştırıldı.
- Cam tüpün çeperine ince bir tabaka halinde yapışmış olan fosfolipid-ubikinson karışımının iyice çözüldüğünden emin olunduktan sonra 140mM NaCl tamponu (pH: 8) ile lipid konsantrasyonu 30 mg/mL olacak şekilde 5-7 dakika boyunca çözüldü.
- Elde edilen çözelti mini-extruder (Avanti) ekstrüzyon aletinde bulunan şırıngalardan birine çekildi ve 200 nm'lik porlara sahip çift membrandan ortalama 21 kez geçirilerek lipozomlar hazırlandı (Resim 1).

Resim 1. Ekstrüzyon Cihazı



- Hazırlanan berrak sarı lipozom çözeltisi kullanılmadan önce cam tüpte cam kapakla kapatılmış bir şekilde bir gece +4 °C’de bekleyebilir.

5.4.4. Hazırlanan Lipozomlara R4B Fraksiyonlarının Yerleştirilmesi

R4B fraksiyonlarının fosfolipid veziküllerine yerleştirilmesi, Racker ve ark. tarafından kullanılan metod modifiye edilerek gerçekleştirildi (129).

Hazırlanan fosfolipid vezikülleri (30 mg/mL) ile R4B fraksiyonları 1:1 ve 1:30 (protein:fosfolipid) oranlarında ve 1.7 M n-oktil–D-glukopiranosid isimli deterjan varlığında deterjanın konsantrasyonu %1.4 hacim/hacim olacak şekilde karıştırıldı.

Karışım, 10 dakika buz içinde bekletildikten sonra 40 kat KCl tamponu ile dilue edildi. Böylece deterjan uzaklaştırılmış oldu (130).

Hazırlanan çözeltinin konsantrasyonu Lowry yöntemi ile tespit edildi (131).

5.4.5. Aktivite Tayinleri

Bütün kinetik analizler proteinlerin uygun tamponlarda istenilen konsantrasyonda olacak şekilde çözülmesi ile gerçekleştirildi. Sığır kalp mitokondrileri ve R4B proteolipozomları tampon B ile konsantrasyonları 2 mg/mL olacak şekilde seyreltilerek ölçüldü. Enzimatik analizler çift dalga boyulu spektrofotometrede (V550 extended model, Jasco Europe, Cremella-LC, Italy) 30 °C sıcaklıkta ve kuartz küvet kullanılarak gerçekleştirildi (132).

5.4.5.1. NADH-O₂ Aktivite Tayini

NADH-O₂ aktivite tayini; fizyolojik koşullar sağlanarak NADH substratının birim zamanda azalma hızı hesaplanarak ölçüldü.

- Sığır kalbinden izole edilen mitokondri izolatının konsantrasyonu 2 mg/mL olacak şekilde Tampon B ile seyreltili.
- Ölçüm yapılacak olan küvete KCl -Tris -EDTA tamponu eklendi.
- Spektrofotometre dalga boyu 340, referans dalga boyu 380 nm, bant genişliği 5 nm ve kabin sıcaklığı 30 °C olacak şekilde ayarlandı.
- Okuma haznesine yerleştirilen küvete son konsantrasyonu 75 µM olacak şekilde aynı gün içerisinde hazırlanmış NADH çözeltisi eklendi.

- Bu koşullar altında reaksiyon minimum 250 saniye monitörize edildi.
- Elde edilen NADH miktarındaki azalma hızının mitokondri solunum zinciri aktivitesinden kaynaklandığından emin olmak amacıyla konsantrasyonu 4 µM olacak şekilde Rotenon eklenerek reaksiyonun durduğu teyit edildi.

Hesaplama :

- Hesaplama spektrofotometrenin yazılım programı kullanılarak yapıldı.
- Aşağıdaki formül kullanılarak faktör (f) değeri hesaplandı ve yazılımdaki formülde yerine koyularak aktivite hesabı yapıldı.

$$Faktör(f) = \frac{1}{\epsilon \cdot x \cdot [protein_{(mg/mL)}]}$$

- Kullanılan spektrofotometrede NADH için molar absorpsiyon katsayısı (ε) 3,5 mM⁻¹.cm⁻¹, yol (x) 1 cm'dir.
- Hesaplanan aktivite birimi µmol NADH-O₂ oksidoredüktaz / dakika/ mg protein olarak verildi.

5.4.5.2.NADH-Ubikinon Oksidoredüktaz (Kompleks I) Aktivite Tayini

NADH-ubikinon oksidoredüktaz aktivitesi; substrat, Rotenon ve AA inhibitörleri varlığında ölçüldü. Bu tayin için substrat olarak NADH kullanılır ve protein örneğindeki diğer kompleksler inhibe edilerek ortama elektron alıcısı olarak Decyl-ubikinon, DB eklenir ve birim zamanda NADH miktarındaki azalmanın hızı ölçülerek aktivite tayini yapılır.

- Ölçüm yapılacak olan küvete KCl -Tris -EDTA tamponu eklendi.
- Spektrofotometre dalga boyu 340, referans dalga boyu 380 nm, bant genişliği 5 nm ve kabin sıcaklığı 30 °C olacak şekilde ayarlandı.
- Okuma haznesine yerleştirilen küvete son konsantrasyonu 75 µM olacak şekilde aynı gün içerisinde hazırlanmış NADH çözeltisi eklendi.
- Ardından, son protein konsantrasyonu 1,4 mg/mL olacak şekilde protein numunesi ve son konsantrasyonu 1mM olacak şekilde Antimisin A eklenerek yaklaşık 30 sn beklendi.

- Son elektron alıcısı olarak konsantrasyonu 120µM olacak şekilde Decyl-ubikinon, DB eklendikten sonra yaklaşık 50 sn boyunca ölçüm yapıldı.
- Elde edilen NADH miktarındaki azalma hızının kompleks I aktivitesinden kaynaklandığından emin olmak amacıyla konsantrasyonu 4 µM olacak şekilde Rotenon eklenerek reaksiyonun durduğu teyit edildi.
- Bu koşullar altında reaksiyon minimum 250 saniye monitörize edildi.

Hesaplama :

- Hesaplama spektrofotometrenin yazılım programı kullanılarak yapıldı.
- Aşağıdaki formül kullanılarak faktör (f) değeri hesaplandı ve yazılımdaki formülde yerine koyularak aktivite hesabı yapıldı.

$$Faktör(f) = \frac{1}{\epsilon \cdot x \cdot [protein_{(mg/mL)}]}$$

- Kullanılan spektrofotometrede NADH için molar absorpsiyon katsayısı (ϵ) 3,5 mM⁻¹.cm⁻¹, yol (x) 1 cm'dir.
- Hesaplanan aktivite birimi µmol NADH-ubikinon oksidoredüktaz / dakika/ mg protein olarak verildi.

5.4.5.3. NADH-Sitokrom c Oksidoredüktaz (Kompleks I-III) Aktivite Tayini

NADH-sitokrom c oksidoredüktaz aktivite ölçümleri, substrat NADH varlığında son elektron alıcısı olarak sitokrom c³⁺ kullanıldı ve birim zamanda sitokrom c³⁺'nin elektron alarak sitokrom c²⁺'ya dönüşüm hızı hesaplanarak aktivite tayini yapıldı.

- Ölçüm yapılacak olan küvete KCl -Tris -EDTA tamponu eklendi.
- Spektrofotometre dalga boyu 550, referans dalga boyu 540 nm, bant genişliği 2 nm ve kabin sıcaklığı 30 °C olacak şekilde ayarlandı.
- Okuma haznesine yerleştirilen küvete son konsantrasyonu 75 µM olacak şekilde aynı gün içerisinde hazırlanmış NADH çözeltisi eklendi.

- Ardından, son protein konsantrasyonu 1,4 mg/mL olacak şekilde protein numunesi eklendi.

- Son elektron alıcısı olarak konsantrasyonu 50µM olacak şekilde sitokrom c³⁺ çözeltisi eklendikten sonra ölçüm başlatıldı.

- Elde edilen sitokrom c³⁺ miktarındaki azalma hızının kompleks I-III aktivitesinden kaynaklandığından emin olmak amacıyla konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde Antimisin A eklenerek reaksiyonun durduğu teyit edildi.

- Bu koşullar altında reaksiyon minimum 150 saniye monitörize edildi.

Hesaplama :

- Hesaplama spektrofotometrenin yazılım programı kullanılarak yapıldı.

- Aşağıdaki formül kullanılarak faktör (f) değeri hesaplandı ve yazılımdaki formülde yerine koyularak aktivite hesabı yapıldı.

$$Faktör(f) = \frac{1}{\epsilon \cdot x \cdot [protein_{(mg / mL)}]}$$

- Kullanılan spektrofotometrede Sitokrom c için molar absorpsiyon katsayısı (ε) 19,1 mM⁻¹.cm⁻¹, yol (x) 1 cm'dir.

- Hesaplanan aktivite birimi µmol NADH-sitokrom c oksidoredüktaz / dakika/ mg protein olarak verildi.

5.4.6. Blue Native – Poliakrilamid Jel Elektroforezi (BN-PAGE)

Hazırlanan proteolipozomların içerisindeki superkompleks yapısı ve ayırık solunum zinciri kompleksleri 2-boyutlu BN-PAGE yöntemi kullanılarak görüntülendi (42, 133).

5.4.6.1. Numune Hazırlığı

R4B fraksiyonları ile 1:1 ve 1:30 oranlarında hazırlanan proteolipozomlar her bir kuyucukta 0.4 µg protein olacak şekilde ayarlandı.

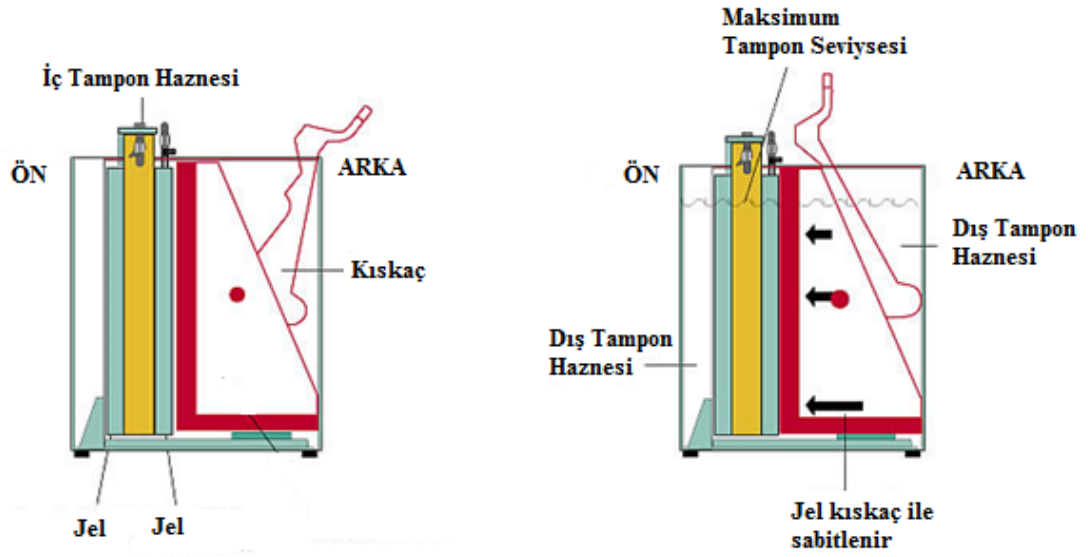
- 75 µg protein içeren proteolipozom 33051 x g 'de, 4 °C' de, 1 saat süreyle KCl-Tris-EDTA tamponunu uzaklaştırmak amacıyla santrifüj edildi.
- Proteolipozom örneklerindeki proteinlerin membran yapısından ayrılması, örneklerin 50 mM NaCl, 50 mM imidazole, 5 mM 6-aminohekzanoik asit ve % 5 digitonin varlığında pH 7.0'de resüspense edilmesi ile gerçekleştirildi.
- Protein konsantrasyonu 4 µg/µl olacak şekilde ayarlandı.
- Protein konsantrasyonu Lowry metodu ile teyit edildikten sonra 5% oranında Coomassie G boyası eklendi. "Coomassie mg/mg digitonin" oranının tam olarak 1/10 olarak ayarlandı.
- %87' lik gliserol çözeltisinden son konsantrasyon%11 olacak şekilde eklenir ve ardından hazırlanan numune jel kuyucuğuna eklenir.

5.4.6.2. 1. Boyut Jel Elektroforezi

1.boyut elektroforez, hazır %3 -%12 T gradyan jelleri (Native-PAGE Bis-Tris gel system; Invitrogen) kullanılarak yapıldı.

- Elektroforez tankı buz dolu bir kap içerisine yerleştirildi.
- Hazır jel kaseti açıldı ve örneklerin yükleneceği kuyucuk kısmındaki tarak çıkarıldı ve jel saf su ile yıkandı.
- Jel Resim 2' de gösterilen şekilde tanka yerleştirilerek sabitlendi.

Resim 2. Elektroforez jelinin tanka yerleştiriliş basamakları



- İç tampon haznesine saf su doldurularak herhangi bir sızıntı olup olmadığı kontrol edildi ve saf su boşaltıldı.
- Dış tampon haznesine 600 mL anot tamponu eklendikten sonra her bir kuyucuğa 30 μ L numune, başlangıç kuyucuğuna 5 μ L molekül ağırlığı markırı [NativeMark unstained Protein Standard (Invitrogen)] eklendi.
- 200 mL koyu renkli katot tamponu ise iç tampon haznesine eklendikten sonra elektrot kapatıldı ve buz içerisindeki tank soğuk odaya veya buzdolabına (+4 $^{\circ}$ C) yerleştirildi.
- Güç kaynağı 70 Volt (V) ($\sim$ 4 mA)' a ayarlanarak jel 20 dakika boyunca yürütüldü. Bu süre sonunda protein bantlarının en çok 2 cm yürüdüğü gözlemlendi.

- Güç 150 V' a yükseltildi ve protein bantları jelin yarısına geldiğinde koyu katot tamponu açık renkli katot tamponu ile değiştirildi (yaklaşık 1 saat).
- Elektrik gücü 250 V' a yükseltilerek elektroforez tamamlandı (yaklaşık 1 saat).
- Jelin içinde bulunduğu plastik kap kenardan açılarak ince ve kaygan yapıdaki jel çok dikkatli bir şekilde çıkarıldı.
- Jelin ön yüzü üst kısma bakacak şekilde plastik bir kaba yerleştirildi ve saf su eklenerek + 4 ° C' de 2. Boyut elektroforezde kullanılabilecek kadar saklandı.

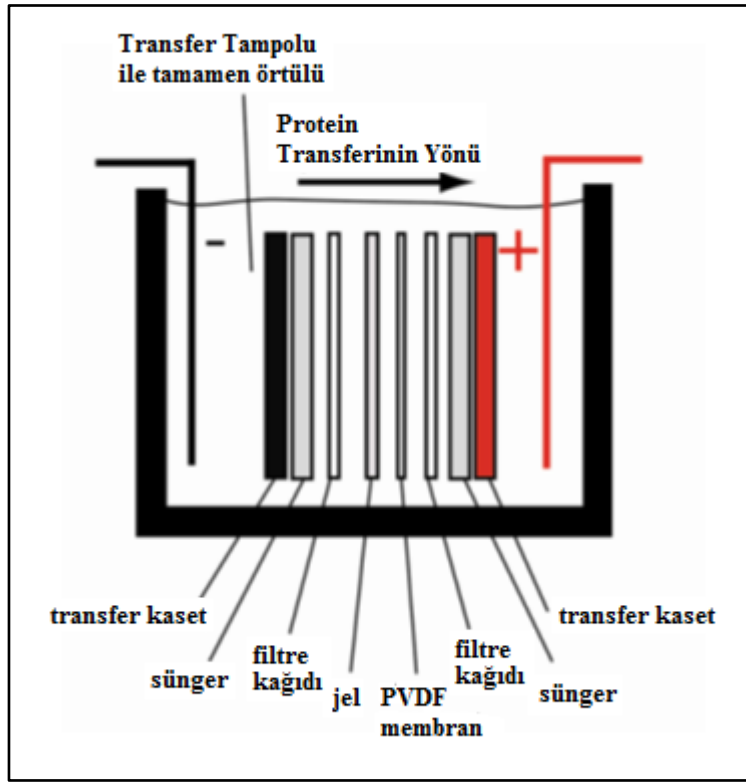
5.4.6.3. 2. Boyut Jel Elektroforezi

- 1. Boyutta kullanılan jeldeki protein bantları 2. Boyutta kullanılmak üzere dikey olarak kesilir (Bakınız Şekil 11).
- Kesilen bant 15 mL' lik falkona yerleştirilerek 5 mL indirgeme çözeltisi eklendi ve 20 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
- İndirgeme çözeltisi uzaklaştırıldı ve ardından 5 mL alkilleyici çözelti eklenerek 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Alkilleyici çözelti uzaklaştırıldıktan sonra jel bandı 5 mL quenching çözeltisi içerisinde 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi ve quenching çözeltisi uzaklaştırıldı.
- Bant hiç beklemeden 2. Boyut jeline (4%–12% T, Nu-PAGE Bis-Tris gel system; Invitrogen) yerleştirildi ve bantın üst kısmı bisakrilamid jelle kapatıldı.
- Başta kalan boş kuyucuğa 5 µL molekül ağırlığı markırı uygulandı ve jel 1. Boyut jel elektroforezinde olduğu gibi buzla sarılı tanka yerleştirildi.
- 600 mL anot tamponu dış, 200 mL katot tamponu ise iç tampon haznesine konuldu ve buz içerisindeki tank soğuk odaya veya buzdolabına (+4 0C) yerleştirildi.
- 110 V' da 60 dakika boyunca yürütüldü.

5.4.6.4. Western Blotting

Elektro blotting yöntemiyle proteinler bir membrana geçirildi. Daha sonra çeşitli solüsyonlarla işleme tabi tutulan membrandaki proteinlere spesifik antikorlar (MitoSciences, Inc., Eugene, OR) bağlandı. Bu antikorların tespit edilmesiyle proteinin olup olmadığı, çıkan bantların kalınlığının kontrol bantlarıyla karşılaştırılmasıyla da ne kadar olduğu tespit edildi.

- Jel çıkarılıp saf su ile yılandı ve Şekil 23’ de gösterilen sıra ile sandviç hazırlandı.



Şekil 23. Western Blotting Sandviç Hazırlığı

- Hazırlanan sandviçde jelin proteinlerin bulunduğu yüzü ile nitroselüloz membranının (GE- Healthcare) karşılıklı olmasına ve aralarında hava boşluğu olmamasına dikkat edildi.
- Hazırlanan sandviç yürütme tankına yerleştirildikten sonra iç tampon haznesine sandviçi kaplayacak kadar transfer tamponu, dış tampon haznesine ise 650 mL saf su yerleştirildi.

- 110 V’ da yaklaşık 120 dakika boyunca yürütülerek jeldeki protein bantlarının membrana geçişi sağlandı.
- Bu işlemin ardından nitroselüloz membran PBS (1X) - % 0,05 Tween ile 3 kez 5 dakika süreyle yıkandı.
- Ardından 5 mL kompleks I altbirimi NDUFA9 (39 kDa)’a spesifik birincil antikor (MS-111) içeren bloklama tamponu ile 1 gece boyunca +4 °C’ de inkübe edildi.
- Ertesi gün nitroselüloz membran PBS (1X) - % 0,05 Tween ile 3 kez 5 dakika süreyle yıkandı.
- Sonrasında 5 mL kompleks III Rieske proteinine (22 kDa) spesifik ikincil antikor (MS-305) içeren bloklama tamponu ile 1 saat boyunca +4 °C’ de inkübe edildi.
- Birincil antikor tespiti için “goat anti-mouse IgG_{H+L}”, ikincil antikor tespiti için ise “horseradish peroxidase” kullanılarak kemilüminesans teknik (Amersham ECL Western Blotting Reagent Pack; GE Healthcare) ile gerçekleştirildi.
- 60 saniyelik uygulamanın ardından dijital resimler Fluor-S Max MultiImager (Bio - Rad Laboratories) cihazı kullanılarak çekildi.

5.4.7. Kompleks I tarafından oluşturulan Hidrojen Peroksit (H₂O₂) Tayini

Hidrojen peroksit miktarı, oluşan hidrojen peroksit ile diklorofloresandiasetat (DCFDA) probun tepkimesi sonucu oluşan florasen emisyonun ölçülmesiyle belirlendi. Tepkimenin kompleks I ve kompleks III inhibitörleri Rotenon ve Mucidin varlığında gerçekleştirilerek kaçan elektronların kompleksler tarafından tekrar yakalanması engellenmiştir (111, 134, 135).

- 10 µL 6 mM DCFDA üzerine 40 µL 0.01N NaOH çözeltisi eklenerek karanlıkta 30 dakika inkübe edildi.
- Ardından üzerine 200 µL 25 mM Tris-KCl-EDTA tamponu eklenerek konsantrasyonu 240 µM olan prob çözeltisi elde edildi.
- Konsantrasyonu 0.5 mg/mL olacak şekilde hazırlanan örneklerden, kör olarak tampondan ve positive kontrol olarak H₂O₂ çözeltisinden 800 µL alınarak her biri ayrı tüpe koyularak tüpler örnek içeriğine göre işaretlendi.

- Her bir tüpe son konsantrasyonu 5 μ M olacak şekilde 240 μ M DCFDA ve son konsantrasyonu 1,8 μ M olacak şekilde mucidin eklendi.
- Her bir örneğin yarısı yeni bir tüpe alınarak üzerlerine son konsantrasyonu 4 μ M olacak şekilde rotenon eklendi. Böylece her bir örneğin sadece mucidin varlığında ve mucidin+rotenon varlığında tepkimeye girmesi sağlandı.
- Oda ısısında 5 dakika inkübasyonun ardından her bir tüpe son konsantrasyonu 150 μ M olacak şekilde NADH eklendi.
- Her bir kuyucukta 200 μ L olacak şekilde örnekler çift çalışılacak şekilde 96'lık pleyte yüklendi.
- Florasan okuyucuda 5 dakikada bir olmak üzere 45 dakika boyunca 30°C'de 10 adet okuma yapıldı.

Hesaplama : Pleyt üzerinde çift çalışılan örneklerin ortalaması alınarak aynı zamana ait kör değerleri çıkarıldı. Ardından 10. okuma değerlerinden 1. okuma değerleri çıkarıldı ve her bir örneğin kompleks I aktivitesi dikkate alınarak sonuçlar hesaplandı.

5.5.İstatistiksel Analizler

Tüm veriler ortalama $\pm$ SD şeklinde verildi. Proteolipozom modellerindeki parametrelerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Simironov testi ile değerlendirildi. Ortalamalar arasındaki farkın önemliliğini analiz etmek için normal dağılıma uyanlara Student-T testi uygulandı. $P<0,05$ değerleri anlamlı kabul edildi.

6. BULGULAR

6.1. Sığır Kalbinden İzole Edilen Mitokondrilerin ve R4B'lerin Aktivite Değerleri

İki genç erkek *B. taurus* kalbinden izole edilen mitokondrilerin, Biüret metoduyla ölçülen protein konsantrasyonu, 18.36 mg/mL olarak tespit edilmiştir. Mitokondrilerin NADH substrat olarak kullanıldığı solunumsal aktivitelerinin kinetik olarak ölçüm sonuçları aşağıdaki Tablo 5' de gösterilmiştir.

Tablo 5. *B. taurus* Kalbinden İzole Edilen Mitokondrilerin Aktivite Değerleri (n=3)

Enzim aktivitesi	$\mu\text{mol NADH-O}_2/\text{dk/mg protein}$ Ortalama $\pm$ SD	% İnhibisyon (Rotenon)
NADH-O ₂	0,209 $\pm$ 0,007	≥ 90
Sonikasyon (3x10sn)	0,464 $\pm$ 0,015	≥ 90

Mitokondri izolatlarından hazırlanan kompleks I ve III'ce zengin R4B fraksiyonlarının konsantrasyonu Lowry metoduyla, 7.34 mg/ml olarak ölçülmüştür. R4B fraksiyonlarının enzimatik aktiviteleri NADH'in substrat olarak kullanıldığı kinetik analizlere ait sonuçlar aşağıdaki Tablo 6' da gösterilmiştir.

Tablo 6. R4B fraksiyonlarının Aktivite Değerleri (n=3)

Enzim aktivitesi	$\mu\text{mol NADH-Sit c/dk/mg protein}$ Ortalama $\pm$ SD	% inhibisyon (AA)
NADH- Sit c	0,692 $\pm$ 0,002	≥ 90

Elde edilen R4B fraksiyonlarının NADH-sitokrom c aktiviteleri çalışma için yeterli bulunmuştur.

6.2. R4B:FL Oranları 1:1 ve 1:30 Olan Proteolipozomların NADH-Sitokrom c Oksidoredüktaz Aktivite Değerleri

Kompleks I ve III’ce zengin R4B’lerin, kardiyolipin içeren ve içermeyen lipozomlara 1:1 ve 1:30 oranlarında yerleştirilmesiyle oluşan proteolipozomların entegre enzim aktivitelerinin ölçüm sonuçlarının ortalama değerleri tablo 7 ve tablo 8’de gösterilmiştir.

Tablo 7.R4B:FL 1:1 Proteolipozomlarının NADH-Sitokrom c Oksidoredüktaz Aktivite Sonuçları (n=6)

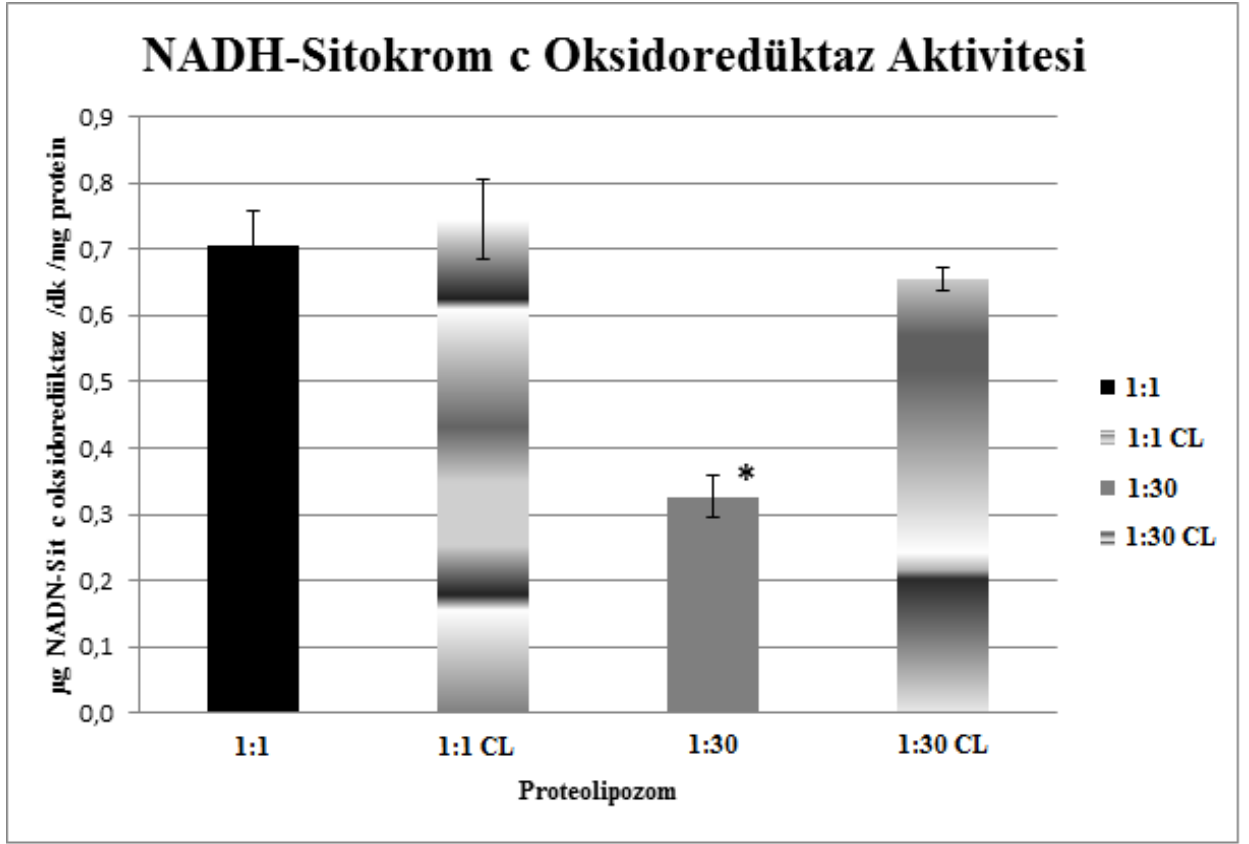
Enzim aktivitesi	$\mu\text{mol NADH-Sit c/dk/mg protein}$ Ortalama $\pm$ SD	% İnhibisyon (AA)
R4B:FL 1:1	0,706 $\pm$ 0,050	≥ 90
R4B:FL 1:1 + CL	0,545 $\pm$ 0,059	≥ 90

Tablo 8. R4B:FL 1:30 Proteolipozomlarının NADH-Sitokrom c Oksidoredüktaz Aktivite Sonuçları (n=8)

Enzim aktivitesi	$\mu\text{mol NADH-Sit c/dk/mg protein}$ Ortalama $\pm$ SD	% İnhibisyon (AA)
R4B:FL 1:30	0,327 $\pm$ 0,031*	≥ 90
R4B:FL 1:30 + CL	0,655 $\pm$ 0,018	≥ 90

*: $p < 0.01$, kardiyolipin içeren proteolipozomlar kontrole göre anlamlı olarak farklı, Student-T test

R4B:FL oranı 1:1 olan proteolipozomların NADH-Sitokrom c oksidoredüktaz aktivite sonuçlarında kardiyolipin içeren ile kontrol arasında anlamlı farklılık gözükmezken, R4B:FL oranı 1:30 olan proteolipozomlarda kardiyolipin içeren numunenin NADH-Sitokrom c oksidoredüktaz aktivitesi kontrole göre 2 kat artmış ve anlamlı olarak farklıdır (Şekil 24).



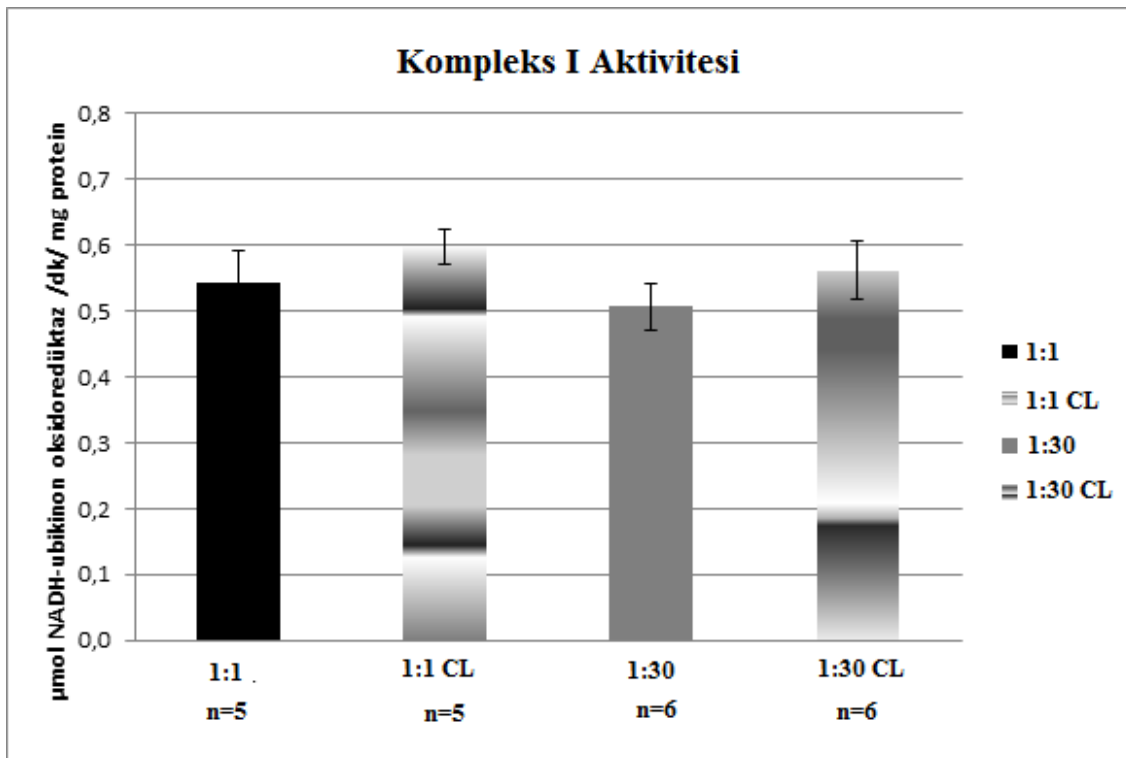
Şekil 24. R4B:FL 1:1 ve R4B:FL 1:30 Proteolipozomlarının NADH-Sitokrom c Oksido Redüktaz Aktiviteler Grafiği

6.3. R4B:FL Oranları 1:1 ve 1:30 Olan Proteolipozomların NADH-ubikinin Oksidoredüktaz Aktivite Değerleri

Kompleks I ve III'ce zengin R4B'lerin, kardiyolipin içeren ve içermeyen lipozomlara 1:1 ve 1:30 oranlarında yerleştirilmesiyle oluşan proteolipozomların spesifik kompleks I enzim aktivitelerinin ölçüm sonuçları Tablo 9 ve Şekil 25'de gösterilmiştir.

Tablo 9. R4B:FL 1:1 (n=5) ve R4B:FL 1:30 (n=6) Proteolipozomlarının NADH-ubikinin Oksidoredüktaz Aktivite Sonuçları

Proteolipozom	$\mu\text{mol NADH-DB/dk/mg protein}$	% İnhibisyon
	Ortalama $\pm$ SD	(Rotenon)
R4B:FL 1:1	0,543 $\pm$ 0,047	≥ 90
R4B:FL 1:1 + CL	0,597 $\pm$ 0,027	≥ 90
R4B:FL 1:30	0,506 $\pm$ 0,036	≥ 90
R4B:FL 1:30 + CL	0,561 $\pm$ 0,043	≥ 90



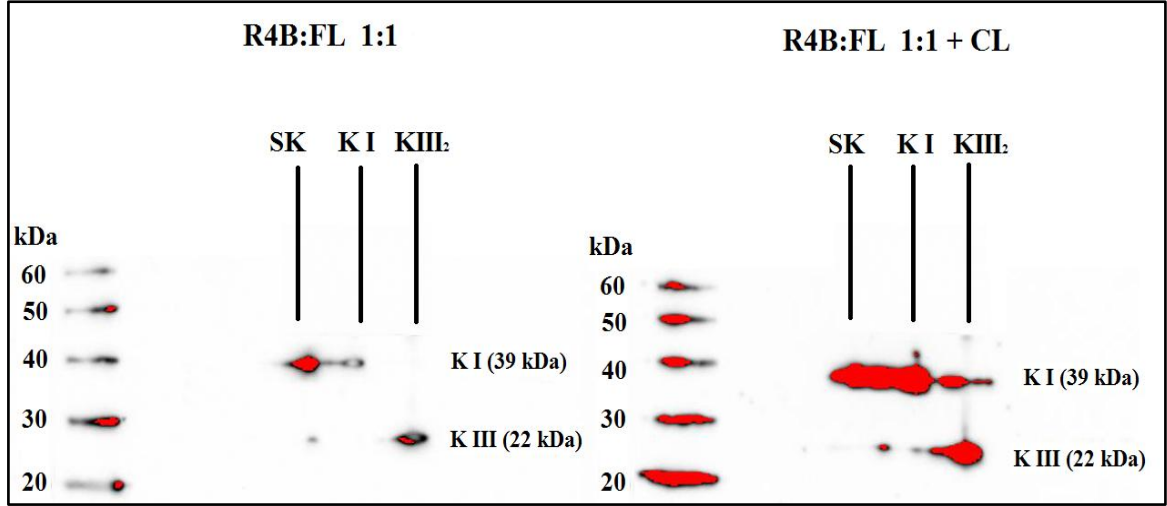
Şekil 25. R4B:FL 1:1 ve R4B:FL 1:30 Proteolipozomlarının NADH-Ubikinon Oksido Redüktaz Aktiviteler Grafiği

Hazırlanan proteolipozom numunelerinin ölçülen spesifik kompleks I aktivite değerleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p > 0.05$, Student-T test).

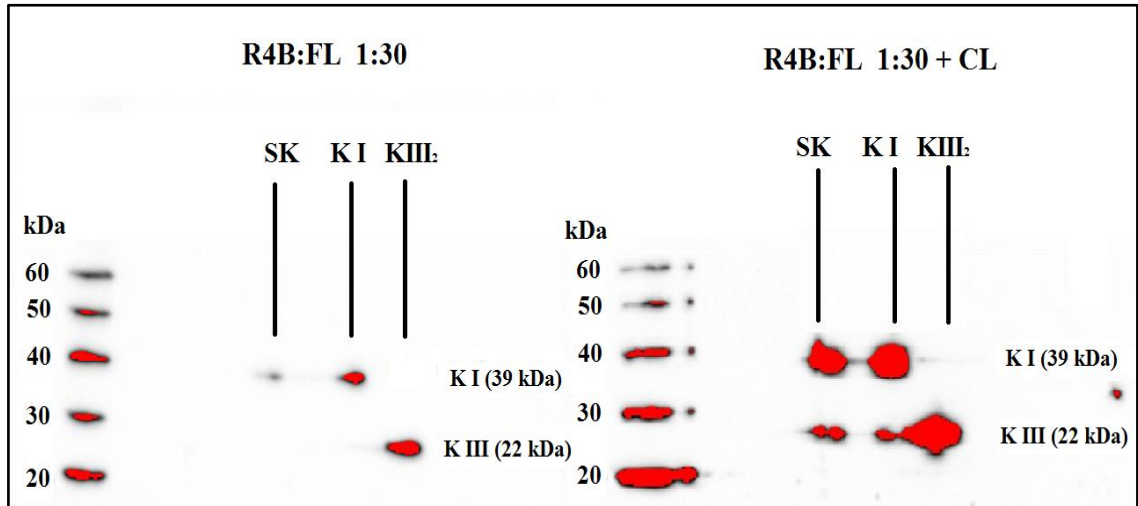
6.4. Proteolipozomların Yapısal Analiz Bulguları (BN-PAGE)

R4B'lerin, kardiyolipin içeren ve içermeyen lipozomlara 1:1 ve 1:30 oranlarında yerleştirilmesiyle oluşan proteolipozomların BN-PAGE metodu kullanılarak elde edilen resimler Resim 3 ve 4' de verilmiştir.

Resim 3.R4B :FL 1:1 protelipozom serisinin CL içeren ve içermeyen numunelerin BN-PAGE 2. Boyut yapısal analizlerinin görüntüsü.



Resim 4.R4B :FL 1:30 protelipozom serisinin CL içeren ve içermeyen numunelerin BN-PAGE 2. Boyut yapısal analizlerinin görüntüsü



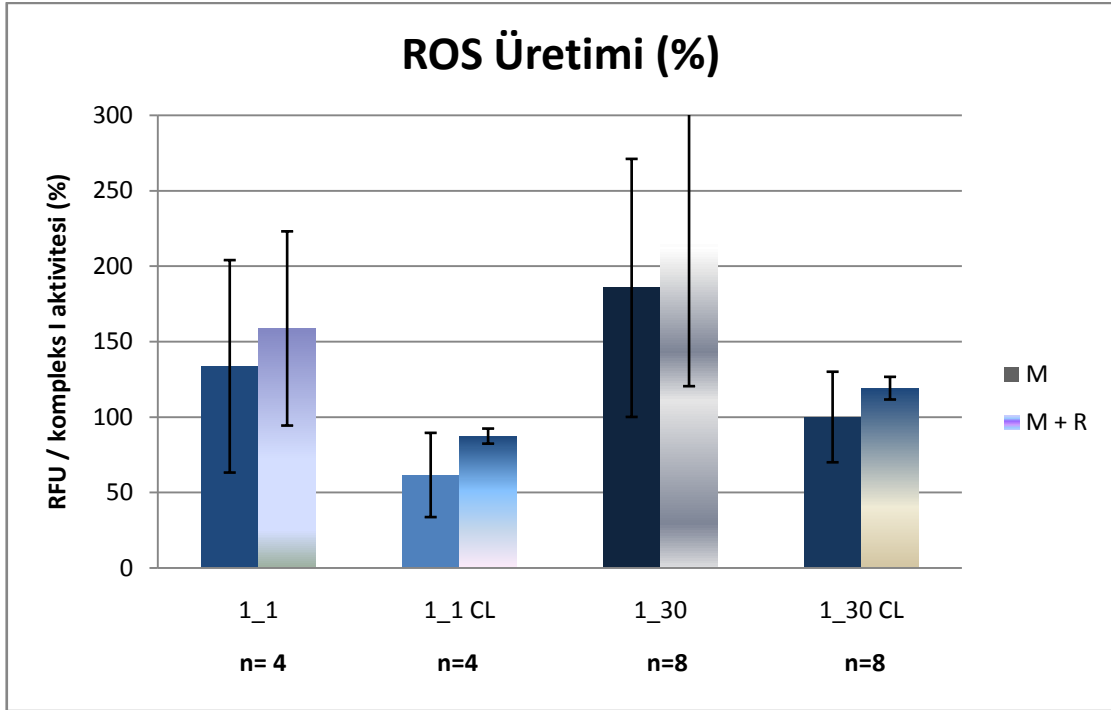
6.5. ROS Ölçüm Sonuçları

Kardiyolipin içeren ve içermeyen proteolipozomların (R4B:FL 1:1 ve R4B:FL 1:30) kompleks I kaynaklı ROS üretimleri, musidin ve rotenon inhibitörleri varlığında, DCFDA (diklorofloresandiasetat) probuyla kolorimetrik olarak ölçülmüştür. Elde edilen değerler relatif floresan yoğunluğu (RFU) olarak ifade edilmiştir. Ölçüm protokolü 0,5 mg/ml protein konsantrasyonlarına göre düzenlendiği için, ROS ölçümleri proteolipozomların gerçek protein konsantrasyonlarına göre yeniden doğrulanmıştır. Daha hassas bir analiz için ROS ölçümleri proteolipozomların kompleks I aktivitesi göre teker teker hesaplanmıştır. ROS tayininde kullanılan proteolipozomlarda birden çok R4B fraksiyonu kullanıldığından sonuçlar % değeriyle tablo 10' da verilmiştir.

Tablo 10.R4B:FL 1:1(n=4) ve R4B:FL 1:30 (n=8) Proteolipozomlarının NADH-ubikinon Oksidoredüktaz Aktivite Sonuçları

Proteolipozom	RFU/ Kompleks I Aktivitesi	RFU/ Kompleks I Aktivitesi
	(%) Musidin	(%) Musidin + Rotenon
R4B:FL 1:1	134 ± 70	159 ± 64
R4B:FL 1:1 + CL	62 ± 28	87 ± 5
R4B:FL 1:30	186 ± 85	214 ± 94
R4B:FL 1:30 + CL	100 ± 30	119 ± 8

Elde edilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p > 0.05$) Sayısal olarak R4B:FL oranı 1:30 olan proteolipozomların ROS üretim miktarı diğer proteolipozomlara göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir.



Şekil 26. ROS Üretimi Ölçüm Sonuçlarının Grafik ile Gösterimi (M: Mucidin R: Rotenon).

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Mitokondrilerin solunum aktiviteleri; elde edildikleri hayvanların cinsiyetlerine, yaşlarına ve ihtiva ettikleri mitokondri miktarına bağlıdır. Bu çalışmada ilk olarak daha kaliteli ve çok miktarda mitokondri elde edebilmek amacıyla genç, erkek B. taurus kalp dokusundan mitokondri izole edilmiştir. Elde edilen mitokondrilerden kompleks I ve III'ce zengin R4B fraksiyonları Hatefi ve Rieske tarafından modifiye edilen yöntemle izole edilmiştir (127). İzole mitokondrilerin ve onlardan elde edilen R4B fraksiyonlarının NADH-O₂ ve NADH-DB aktiviteleri ölçülüp enzimatik aktivitelerinin çalışmaya uygun olup olmadığı belirlenmiştir. Bu çalışmada kullanılan mitokondrilerin ve R4B fraksiyonlarının enzimatik aktiviteleri yeterli ve literatürle uyumlu bulunmuştur (56, 118).

Kardiyolipin fosfolipidinin etkisini tespit edebilmek amacıyla lipozom adı verilen membran modelleri hazırlandı. Lipozomlar, yapı ve içerik bakımından hücre zarı ile benzerlik gösteren, fosfolipit yapıda, amfipatik veziküllerdir (136, 137). Lipozomlar, katman sayılarına ve büyüklüklerine göre sınıflandırılırlar. Farklı hazırlama yöntemlerine bağlı olarak çok katmanlı (Multi Lamellar Vesicle=MLV) ve tek katmanlı (Small Unilamellar Vesicle=SUV, Large Unilamellar Vesicle=LUV) lipozomlar oluşturulabilmektedir (138). MLV hazırlığında, lipozomun yapısına katılacak lipidlerin kloroform gibi organik çözücülerde çözündürülmesi ve daha sonra bu çözücünün azot gazı kullanılarak uçurulması ile lipid film elde edilmektedir. Oluşturulan lipid film, oda sıcaklığında bir tampon çözelti ile hidrate edilir. Hidrate edilen lipid film voretexlenerek çok tabakalı lipozomlar elde edilir. MLV'ler büyük ve heterojen bir yapıya sahip olduğundan büyüklüğünü veya katmanlarının özelliklerini değiştirebilmek amacıyla sonikasyon, ekstrüzyon, vorteksleme gibi yöntemler kullanılarak MLV'ler SUV veya LUV haline dönüştürülmektedir. Sonikasyon cihazı ile, MLV'lere yüksek düzeyde enerji uygulanarak SUV elde edilir. Ekstrüzyon işlemini gerçekleştiren lipozom ekstrüzyon cihazı, kullanılan membranın por çapına göre lipozomları ayırmada kullanılır. Por çapından daha küçük çapa sahip lipozomlar porlardan geçerek ayrışır ve homojen por çaplarına sahip lipozomlar elde edilmiş olur (139). Sonikasyon yöntemi, elde edilen lipozomların çaplarının homojen olmaması ve büyük hacimlerle çalışılması gibi dezavantajlara sahiptir. Ekstrüzyon yöntemi, küçük hacimlerde çalışmaya olanak vermesi ve oluşan lipozomların çaplarının homojen olması gibi avantajlara sahip olması

sebebiyle bu çalışmada kullanılmaya uygun bulunmuştur. Lipozom hazırlığında kontrol numuneleri için fosfolipid kaynağı olarak % 20-24 fosfatidil kolin, % 18-22 fosfatidil etanolamin, % 12-15 fosfatidil inozitol ve % 4-7 diğerfosfolipidleri içeren asolektin kullanılmıştır. Kardiyolipin etkisinin anlaşılması amacıyla ise ek olarak literatürle uyumlu olarak toplam fosfolipidlerin % 18' ine tekabül edecek şekilde kardiyolipin içeren lipozomlar hazırlanmıştır (11). Her iki lipozom modelinde de elektron akışı reaksiyonun gerçekleşmesi için eser olan 30 nmol_{KoQ}/mgFL oranında Koenzim Q₁₀ bulunmaktadır.

Süperkompleks oluşumlarının gücü, büyük oranda iç mitokondriyal membranın lipid miktarına, kompozisyonuna ve yapısına bağlıdır (64-67). Yapılan araştırmalarda lipid oranı protein oranına göre yüksek olduğunda (>3:1) süperkompleks I-III oluşumunun engellendiği BN-PAGE ve kinetik çalışmalarda gösterilmiştir (55,56, 65,140). Lenaz ve ark. tarafından yapılan çalışmalarda protein:fosfolipid (R4B:FL) oranı 1:1 olan proteolipozomlarda süperkompleks oluşumuna dair kinetik ve yapısal analiz sonuçları elde edilirken bu oran 1:30'a düşürüldüğünde süperkompleksi oluşturan komplekslerin ayrışarak serbest kompleksler halinde bulunduklarını göstermişlerdir (56). Kardiyolipin fosfolipidinin süperkompleks oluşumu ve stabilitesinin devamı için gerekli olduğu düşünülmektedir. Süperkomplekslerin ayrıştıkları koşulda kardiyolipinin kompleksleri tekrar bir araya getirip getiremeyeceği sorusuna cevap aramak amacıyla bu çalışmada, kardiyolipin etkisini araştırabilmek amacıyla kardiyolipin içeren ve içermeyen lipozomlara mitokondrilerden izole edilen kompleks I ve kompleks III' ce zengin R4B fraksiyonları protein:fosfolipid oranları 1:1 ve 1:30 olacak şekilde yerleştirilerek proteolipozom modelleri oluşturulmuş ve bu proteolipozomlarla kinetik, yapısal ve oksidatif stres analizleri gerçekleştirilmiştir.

Gerçekleştirilen aktivite tayinleri Bologna Üniversitesi, Biyokimya Bölümünde bu konuda oldukça tecrübe sahibi olan Prof. Giorgio Lenaz önderliğindeki biyoenerjetik grubu tarafından yapılan seri deneyler ile belirlenen optimal şartlara uygun protokoller kullanılarak gerçekleştirilmiştir (55). Her bir proteolipozom serisi için spesifik NADH-ubikinon oksidoredüktaz ve NADH-sitokrom c oksidoredüktaz entegre aktiviteleri, ortamın sıcaklığı, nemi sabit tutulmak kaydı ile oldukça hassas bir şekilde ölçülmüştür.

Yapılan aktivite tayinlerinde, her iki proteolipozom modelinin kardiyolipin içeren ve içermeyen örneklerinde spesifik kompleks I (NADH-DB) aktivite değerleri, beklenildiği üzere birbirine yakın ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. Fakat, kardiyolipin içeren serilerin aktiviteleri kontrollerine göre sayısal olarak yüksektir (Şekil 25). Çalışmamızda süperkompleks varlığında (R4B:FL oranı 1:1 olan proteolipozomlarda) ve ayrıştığında (R4B:FL oranı 1:30 olduğu proteolipozomlarda) solunum aktiviteleri arasındaki farklar incelendiğinde; çalışılan proteolipozom numunelerinde kompleks I'in aktif olarak çalıştığı, değerlerin istatistiksel açıdan anlamlı olarak birbirinden farklı olmadığı ve literatür ile uyumlu olduğu gösterilmiştir (55,56). Bu sonuç, çalışmada hazırlanan proteolipozomların başarıyla oluşturulduğunun bir kanıtı niteliğindedir. Süperkompleks modelinde elektron iletimi için hız sınırlandırıcı kompleks olarak kabul edilen kompleks I aktivitesinin supramoleküler organizasyon yapısının varlığından ve membran lipid içeriğinden bağımsız olduğu ileri sürülmektedir (141). SK I₁III₂ içeren (1:1) proteolipozomların süperkompleksin ayrıştığı (1:30) proteolipozomlara göre nispeten biraz daha yüksek kompleks I aktivitesine sahip olmasının nedeni; komplekslerin ayrıştığı durumlarda kompleks I'in destabilize olması olabilir. Literatürde benzer olarak süperkompleks yapısında bulunan kompleks I aktivitesi ile serbest kompleks I aktivitesinin arasında anlamlı bir fark gösterilmemiştir (118). Bunun yanı sıra, kardiyolipin içeren proteolipozomların içermeyenlere göre daha yüksek olmasının nedeni ise; kompleks I üzerindeki kardiyolipin bağlanma bölgesinin elektron (e⁻) alınan bölgeye çok yakın olması ve buna bağlı olarak e⁻ alımını kolaylaştırması olabilir (97, 98).

Süperkomplekslerin yapısında bulunan substrat kanalları kompleksler arasındaki katalizi arttırarak daha etkili bir elektron iletimi gerçekleştirmelerine olanak sağlamaktadır. Süperkompleks organizasyonları, solunum sırasında cereyan eden redoks reaksiyonlarında iki enzimin aktif bölgeleri arasında adeta bir substrat kanalı oluşturarak, aracı moleküllerin direkt ve hızlı bir şekilde iletimini sağlamaktadırlar (142). Bu hipotezden yola çıkarak süperkompleks organizasyonu içerisinde bulunan yapılarda enzim aktivitesinin daha yüksek olması beklenmektedir. Çalışmamızda, NADH-sitokrom c oksidoredüktaz entegre aktivitesi ile ilgili SK I₁III₂ içeren proteolipozomlar ve SK içermeyen proteolipozomlar elektron iletim hızları açısından karşılaştırılmıştır. R4B:FL oranı 1:1 olan ve SK içeren proteolipozomlar, R4B:FL oranı

1:30 olan ve SK içermeyen proteolipozomlara göre yaklaşık iki kat daha fazla entegre aktivite gösterdiler ve bu değerler istatistiksel açıdan birbirinden anlamlı olarak farklıdır (Şekil 24). Bu sonuç lipid dilüsyonu ile birlikte süperkompleks organizasyonunun ayrıştığı ve aktivite hızının azaldığı literatür çalışmalarını teyit eder niteliktedir (56, 118). Çalışmanın omurgasını oluşturan kardiyolipin etkisi değerlendirildiğinde; R4B:FL oranı 1:1 olan ve kardiyolipin içermeyen proteolipozomların entegre aktivite değerleri ile R4B:FL oranının 1:1 olan ve kardiyolipin içeren proteolipozomların aktivite değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmazken R4B:FL oranı 1:30 olan ve kardiyolipin içeren proteolipozomların, R4B:FL oranı 1:30 olan ve süperkompleks yapılarının ayrıştığı proteolipozomlara göre yaklaşık iki kat daha fazla entegre aktivite göstermiş ve bu değerlerin istatistiksel analizle birbirlerinden anlamlı olarak farklı olduğu belirlenmiştir (Şekil 23). Elde edilen bu sonuçlar literatürde bir ilk olmasından dolayı değerlidir. Kardiyolipin fosfolipidinin kompleksler üzerinde bağlanma bölgelerinin bulunması kompleksleri bir araya getirmede adeta bir yapıştırıcı gibi davranarak süperkompleks yapılarının oluşumuna yardımcı olabileceği düşünülmektedir (100). Elde edilen aktivite sonuçları bu hipotezi desteklerken, aynı zamanda lipid dilüsyonu ile ayrılan süperkompleks yapılarının kardiyolipin varlığının etkisi ile bir araya gelmiş olabileceği düşüncesini destekler niteliktedir. R4B 1:1 proteolipozomları ile R4B 1:1 + CL içeren proteolipozomlarının aktivite değerlerinde farklılık görülmemesinin nedeni olarak, protein konsantrasyonunun artışı ile hali hazırda bir araya gelmiş süperkomplekslere kardiyolipin fosfolipidinin ekstra bir fayda sağlamamış olabileceği düşünülmektedir. Lenaz ve ark. yaptıkları çalışmalarda R4B:FL oranı 1:1 olan örneklerde serbest kompleks I oranının çok az olduğunu göstermesi de bu düşünce ile uyumludur (56).

Bu çalışmada ayrıca, elde edilen aktivite değerleri neticesinde oluşan hipotezlerin desteklenmesi amacıyla yapısal analizler gerçekleştirildi. Membranlarda bulunan protein-protein etkileşimlerini tespit ve analiz etmek amacıyla en çok kullanılan iki önemli yöntem 2-boyutlu BN-PAGE ve CN-PAGE adlı elektroforezlerdir. Çözünebilir membran protein komplekslerinin tespit ve analizi için kullanılan BN-PAGE yöntemi son 10 yıldır oldukça başarılı sonuçlar vermektedir. BN-PAGE yönteminin pahalı ve büyük ekipmanlara gerek kalmadan her türlü laboratuarda kolayca yapılabilmesi nedeniyle büyük avantaj sağlamaktadır. Kullanılan yöntemin çok yönlü olmasının yanı sıra doğruluğu ve güvenilirliği protein-protein etkileşimleri tanımlamada çok önemlidir.

Bu yöntem kullanımında yanlış-pozitif (artifisiyel, fizyolojik olmayan proteinler) sonuçların görülme sıklığı oldukça düşüktür. Fakat, zayıf etkileşimlerin kaybolmasına neden olan anyonik Coomassie boyasının varlığı ve deterjan ile çözme işleminden kaynaklanan bazı ayrışmaların olabileceği ve gerçekte var olan protein-protein etkileşimlerinin gözden kaçırılabilmesi düşüncesi ile CN-PAGE yöntemi geliştirilmiştir. Fakat yapılan birçok çalışmada geçici protein kompleksleri gibi oldukça zayıf bağlı etkileşimler CN-PAGE yöntemi kullanılsa da tespit edilememektedir. BN-PAGE uygulaması, protein-protein etkileşimlerinin tespitinde kullanılan diğer yöntemler ile paralel olarak kullanıldığında üstün sonuçlar sağlayabilmektedir (41). Bu yorumlar doğrultusunda ve literatürde sıklıkla rastlanması nedeniyle BN-PAGE yönteminin kullanılması uygun bulunmuştur. BN-PAGE uygulamasının gerçekleştirildiği ön çalışmalar, Bologna Üniversitesi, Biyokimya Bölümünde Prof. Giorgio Lenaz önderliğindeki biyoenerjetik grubu mensupları Doç. Dr. Maria Luisa Genova ve çalışma arkadaşlarının yardımları ve tecrübelerinden faydalanılarak gerçekleştirilmiştir.

R4B:FL oranı 1:1 olan ve R4B:FL oranı 1:1 olan ve CL içeren örneklerde süperkompleks I₁III₂ yapısının varlığı gözlenmektedir (Resim 3). R4B:FL oranı 1:30 olan proteolipozom numunesinde süperkompleks yapısı neredeyse yok denecek kadar az iken R4B: FL oranı 1:30 olup CL içeren numunede süperkompleks I₁III₂ var olduğu gözlenmiştir (Resim 4). Yapılan yapısal analiz sonuçları kinetik aktivite sonuçları ile örtüşmektedir. R4B:FL1:1 ve R4B:FL 1:30 yapısal analiz sonuçları literatürle uyumludur (118). R4B 1:1 + CL ve R4B 1:30 +CL numunelerinin yapısal analizleri literatürde bir ilk olması açısından değerlidir. R4B:FL oranı 1:30 olan ve kardiyolipin içeren numunelerin BN-PAGE yöntemi ile gerçekleştirilen yapısal analizinde süperkompleks I₁III₂varlığının gözlenmesi kardiyolipin fosfolipidinin etkisi ile bir araya gelmiş olabileceği düşüncesini desteklemektedir. Çalışmamıza benzer olarak, Bazán ve ark. *Saccharomyces cerevisiae*' den izole ettikleri kompleks III ve kompleks IV' ü kardiyolipin içeren ve içermeyen lipozomlara yerleştirdikten sonra yaptıkları yapı analizlerinde benzer olarak kardiyolipin içeren lipozomlarda süperkompleks III₂IV₂varlığını göstermişlerdir (143).

Son yıllarda artan veriler mitokondriyal solunum sisteminde görev alan protein komplekslerinin fizyolojik koşullarda, daha etkin bir elektron iletimi için bir araya

gelerek süperkompleks oluşturdıkları yönündedir. Bununla birlikte süperkomplekslerin ayrışması solunum kapasitesinin düşmesine ve ROS üretiminde artışa neden olduğundan pek çok patolojik durum ile alakalı olarak gösterilmiştir (56).İndirekt çalışmalar komplekslerin süperkompleksler şeklinde supramoleküler organize olmasının elektronların kanal içersinde akışı sırasında komplekslerin redoks bileşenlerinin okside durumda kalmasını sağladığından süperoksit oluşumunu sınırlandırabileceği yönündedir (115). Bunun yanı sıra değişik oranlarda R4B içeren proteolipozomlarla yapılan çalışmada süperkompleks yapılarının ayrışmasının kompleks I'in destabilize olmasına neden olduğundan süperoksit üretiminin 3-4 kat arttırdığı gösterilmiştir (118).Çalışmamızda kullanılan kompleks I tarafından üretilen hidrojen peroksit miktarının ölçüldüğü metodun duyarlılığı ve hassaslığı düşük olmasına karşın günümüzde oldukça sık kullanılan bir metoddur.Maranzana ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya benzer olarak çalışmamızda; rotenon ve mucidin inhibitörleri varlığında kompleks I'in tüm elektron alıcıları bloke edilmek suretiyle, süperkompleks varlığında ve ayrıştığı durumlarda kompleks I kaynaklı süperoksit oluşumu araştırılmıştır. Öncül çalışmadan farklı olarak kardiyolipin içeren proteolipozomlar ile çalışılmıştır. Solunum zinciri kompleksleri supramoleküler organizasyonların içerisinde bulunduklarında aralarındaki mesafe kısalmış olduğundan ve elektron akış hızı arttığından dolayı kompleks I' den kaçan elektronların sayısının ve buna bağlı olarak ROS üretiminin azalacağı düşünülmektedir.

Çalışmamızda, beklenildiği üzere süperkomplekslerin ayrıştığı R4B:FL oranı 1:30 olan proteolipozumun kompleks I kaynaklı ROS üretim değerleri, süperkompleks yapısının bulunduğu R4B:FL oranı 1:1 olan proteolipozumun kompleks I kaynaklı ROS üretimi değerlerine göre sayısal olarak daha yüksektir. Bu değerler literatür ile uyumludur (118). Yine beklenildiği üzere 1:1 ve 1:30 serilerinin kardiyolipin içeren örneklerinin kompleks I kaynaklı ROS üretimleri kendi kontrollerine göre sayısal olarak azalırken anlamlı olarak farklı değildir (Şekil 26).Elde edilen sonuçlarda ve literatürde de gözlendiği üzere $\pm$ SD değerlerinin çok yüksek olmasının nedeni metodun duyarlılığının ve hassaslığının düşük olmasına bağlanabilir.

Kardiyolipin molekülleri, yağ açıl kompozisyonundan veya ROS üreten merkezlerine yakın olmasından dolayı ROS indüklü oksidasyona karşı oldukça duyarlıdır. CL molekülleri özellikle kompleks I ve kompleks III' den kaynaklanan ROS

üretiminin olduğu bölgelerin yakınında bulunmaktadır. CL yapısında bulunan yağ asitlerinin arasındaki metilen köprüsü ROS-indüklü oksidasyona karşı oldukça duyarlıdır. Bu nedenle, CL molekülüne etki eden oksidatif hasar, solunum zinciri kompleksi aktivitesi ve mitokondriyal fonksiyonu üzerinde zararlı bir etkiye sahip olabilir. Gerçekten de, sığır kalbi submitochondrial parçacıklarının enzimatik sistemler tarafından üretilen ROS' a maruz bırakılması sonucunda mitokondriyal CL ' nin oksitlenmesine ve tükenmesine paralel olarak kompleks I, III ve IV inaktivasyonu gözlenmiştir (144). Bu nedenle süperkompleks varlığının vuku bulduğu kardiyolipin içeren peoteolipozomlarda ölçüm sırasında oluşan ROS bileşenlerinin CL peroksidasyonuna yol açarak tekrar destabilizasyona yol açabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak bu çalışma ile,kardiyolipin varlığının süperkompleks oluşumuna yardımcı olduğu ve kardiyolipin yokluğunun çok daha yavaş bir elektron iletimine yol açtığı görülmüştür. Ayrıca, yapılan yapı analizlerinde süperkomplekslerin destabilizasyonuna yol açan lipid ile seyreltilmiş proteolipozomlarda kardiyolipinin adeta bir yapıştırıcı gibi davranarak tekrar süperkompleks yapısının oluşumuna yardımcı olduğu gözlenmiştir. Kardiyolipinin süperkompleks yapı ve stabilizesine yardımcı olduğuna ve kompleksler üzerinde bağlanma bölgelerine sahip olarak kompleksleri biraraya getirdiğine ve kompleksler tarafından elektron alımına yardımcı olduğuna dair hipotez desteklenerek kardiyolipinin ayrışan kompleksleri biraraya getirebilme yetisi ilk defa ortaya konulmuştur.

8. KAYNAKLAR

1. Chance B and Williams GR (1955). A method for the localization of sites for oxidative phosphorylation. *Nature* 176: 250–254.
2. Green DE and Tzagoloff A (1966). The mitochondrial electron transfer chain. *Arch Biochem Biophys* 116: 293–304, 1966.
3. Schagger H, Pfeiffer K (2000). Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J* 19(8): 1777-1783.
4. Pfeiffer K, Gohil V, Stuart RA, Hunte C, Brandt U, Greenberg ML, Schagger H (2003). Cardiolipin stabilizes respiratory chain supercomplexes. *J. Biol. Chem.* 278: 52873–52880.
5. Cadenas E, Davies KJ (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med* 29(3-4): 222-30.
6. Palade G (1952). The Fine Structure of Mitochondria. *Anat Rec* 114: 427-451.
7. Sjostrand FS (1953). Electron Microscopy of Mitochondria and Cytoplasmic Double Membranes. *Nature* 171:30-31.
8. McBride H, Scorrano L (2013). Mitochondrial dynamics and physiology, *Biochim. Biophys. Acta* 1833 148–149.
9. Galluzzi L, Kepp O, Trojel-Hansen C, Kroemer G (2012). Mitochondrial control of cellular life, stress, and death, *Circ. Res.* 111 1198–1207.
10. Liesa M, O.Shirihai OS (2013). Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure, *Cell Metab.* 17 491–506.
11. Horvath SE, Daum G (2013). Lipids of mitochondria. *Prog Lipid Res.* 52(4): 590-614. doi: 10.1016/j.plipres.2013.07.002.
12. Vogel F, Bornhovd C, Neupert W, Reichert AS (2006). Dynamic subcompartmentalization of the mitochondrial inner membrane. *J Cell Biol.* Oct 23;175(2):237-47. doi: 10.1083/jcb.200605138.
13. Nelson DL, Cox MM (2008). *Principles Of Biochemistry*. 5th ed. Lehninger, 707-723.

14. Schagger H and Pfeiffer K (2001). The ratio of oxidative phosphorylation complexes I-V in bovine heart mitochondria and the composition of respiratory chain supercomplexes. *J Biol Chem* 276: 37861–37867.
15. Capaldi RA (1982). Arrangement of proteins in the mitochondrial inner membrane. *Biochim Biophys Acta* 694: 292–306.
16. Jackson JB (2003). Proton translocation by transhydrogenase. *FEBS Lett* 545: 18–24 [Review].
17. Saada A (2014). Mitochondria: mitochondrial OXPHOS (dys) function ex vivo--the use of primary fibroblasts. *Int J Biochem Cell Biol.* 2014 Mar;48:60-5. doi: 10.1016/j.biocel.2013.12.010.
18. Brandt U (2006). Energy converting NADH:quinone oxidoreductase (complex I). *Annu Rev Biochem.* 75: 69–92
19. Friedrich T and Bottcher B (2004). The gross structure of the respiratory complex I: a Lego system. *Biochim Biophys Acta.* 1608: 1–9.
20. Hinchliffe P and Sazanov LA (2005). Organization of iron-sulfur clusters in respiratory complex I. *Science* 309: 771–774.
21. Lenaz G, Bergamini C, Leoni S, and Fato R (2007). Oxygen radical generation by mitochondrial complex I: from the molecular mechanism of electron transfer to pathophysiological implications. In: *Complex I and alternative dehydrogenases*, edited by Gonzalez Siso MI. Kerala, India: Transworld Research Network, , pp. 119–156.
22. Lenn T, Leake MC, and Mullineaux CW (2008). Are Escherichia coli OXPHOS complexes concentrated in specialized zones within the plasma membrane? *Biochem Soc Trans* 36: 1032–1036.
23. Lenaz G, Genova ML (2010). Structure and organization of mitochondrial respiratory complexes: a new understanding of an old subject. *Antioxid Redox Signal.* 12(8):961-1008. doi: 10.1089/ars.2009.2704.
24. Matsson M and Hederstedt L (2001). The carboxin-binding site on *Paracoccus denitrificans* succinate:quinone reductase identified by mutations. *J Bioenerg Biomembr* 33: 99–105.

25. Crofts AR, Lhee S, Crofts SB, Cheng J, and Rose S (2006). Proton pumping in the bc₁ complex: a new gating mechanism that prevents short circuits. *Biochim Biophys Acta* 1757: 1019–1034.
26. Berry EA, Guergova-Kuras M, Huang LS, and Crofts AR (2000). Structure and function of cytochrome bc complexes. *Annu Rev Biochem* 69: 1005–1075.
27. Schäfer E, Dencher NA, Vonck J, and Parcej DN (2007). Three dimensional structure of the respiratory chain supercomplex I₁III₂IV₁ from bovine heart mitochondria. *Biochemistry* 46: 12579–12585.
28. Covian R and Trumpower BL (2006). Regulatory interactions between ubiquinol oxidation and ubiquinone reduction sites in the dimeric cytochrome bc₁ complex. *J Biol Chem* 281:30925–30932.
29. Nett JH, Hunte C, and Trumpower BL (2000). Changes to the length of the flexible linker region of the Rieske protein impair the interaction of ubiquinol with the cytochrome bc₁ complex. *Eur J Biochem* 267: 5777–5782.
30. Mitchell P (1975). The protonmotive Q cycle: a general formulation. *FEBS Lett* 59: 137–139
31. Osyczka A, Moser CC, and Dutton PL (2005). Fixing the Q cycle. *Trends Biochem Sci* 30: 176–182.
32. Xiao YM, Esser L, Zhou F, Li C, Zhou YH, Yu CA, Qin ZH, Xia D (2014). Studies on inhibition of respiratory cytochrome bc₁ complex by the fungicide pyrimorph suggest a novel inhibitory mechanism. *PLoS One*. 9(4):e93765. doi: 10.1371/journal.pone.0093765.
33. Cooper CE and Brown GC (2008). The inhibition of mitochondrial cytochrome oxidase by the gases carbon monoxide, nitric oxide, hydrogen cyanide and hydrogen sulfide: chemical mechanism and physiological significance. *J Bioenerg Biomembr*. 40: 533–539.
34. Lapuente-Brun E, Moreno-Loshuertos R, Acín-Pérez R, Latorre-Pellicer A, Colás C, Balsa E, Perales-Clemente E, Quirós PM, Calvo E, Rodríguez-Hernández MA, Navas P, Cruz R, Carracedo Á, López-Otín C, Pérez-Martos A, Fernández-Silva P, Fernández-Vizarra E, Enríquez JA (2013). Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain. *Science*. 2013 Jun 28;340(6140):1567-70. doi: 10.1126/science.1230381.

35. Acin-Perez R, Enriquez JA (2014). The function of the respiratory supercomplexes: the plasticity model. *Biochim Biophys Acta*. 1837(4):444-50. doi: 10.1016/j.bbabi.2013.12.009.
36. Hackenbrock, C. R (1981). *Trends Biol. Sci.* 6, 151-154.
37. Gupte S, Wu ES, Hoechli L, Hoechli M, Jacobson K, Sowers AE, Hackenbrock CR (1984). Relationship between lateral diffusion, collision frequency, and electron transfer of mitochondrial inner membrane oxidation-reduction components. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 81(9):2606-10.
38. Hackenbrock CR, Chazotte B and Gupte S (1986). The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport. *J. Bioenerg. Biomembr.* 18, 331–368.
39. Althoff T, Mills, D.J., Popot JL and Kühlbrant W (2011). Arrangement of electron transport chain components in bovine mitochondrial supercomplex I₁III₂IV₁. *EMBO J.* 30:4652-64, 2011.
40. Acin-Perez R, Fernandez-Silva P, Peleato ML, Perez-Martos A, Enriquez JA (2008). Respiratory Active Mitochondrial Supercomplexes. *Mol. Cell*. 32:529-539.
41. Krause F (2006). Detection and analysis of protein–protein interactions in organellar and prokaryotic proteomes by native gel electrophoresis: (Membrane) protein complexes and supercomplexes. *Electrophoresis* 27: 2759–81.
42. Schägger H, Jagow G (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* 199 (2): 223–231. doi:10.1016/0003-2697(91)90094-A.
43. Wittig I, Braun HP, Schägger H (2006). Blue native PAGE. *Nat. Protoc.* 1 (1): 418–428. doi:10.1038/nprot.2006.62.
44. Wittig I, Schägger H (2005). Advantages and limitations of clear-native PAGE. *Proteomics* 5 (17): 4338–46. doi:10.1002/pmic.200500081.
45. Stroh A, Anderka O, Pfeiffer K, Yagi T, Finel M, Ludwig B and H. Schägger H (2004). Assembly of respiratory complexes I, III, and IV into NADH oxidase supercomplex stabilizes complex I in *Paracoccus denitrificans*, *J. Biol. Chem.* 279,5000–5007.

46. Krause F, Scheckhuber CQ, Werner A, Rexroth S, Reifschneider NH, Dencher NA and Osiewacz HD (2004). Supramolecular organization of cytochrome c oxidase- and alternative oxidase-dependent respiratory chains in the filamentous fungus *Podospora anserina*, *J. Biol. Chem.* 279, 26453–26461.
47. Eubel H, Heinemeyer J, Sunderhaus S and Braun HP (2004). Respiratory chain supercomplexes in plant mitochondria, *Plant Physiol. Biochem.* 42, 937–942.
48. Krause F, Reifschneider NH, Vocke D, Seelert H, Rexroth S and Dencher NA (2004). “Respirasome”-like supercomplexes in green leaf mitochondria of spinach, *J. Biol. Chem.* 279, 48369–48375.
49. Schagger H, de Coo R, Bauer MF, Hofmann S, Godinot C and Brandt U (2004). Significance of respirasomes for the assembly/stability of human respiratory chain complex I, *J. Biol. Chem.* 279, 36349–36353.
50. Cruciat CM, Brunner S, Baumann F, Neupert W and Stuart RA (2000). The cytochrome bc₁ and cytochrome c oxidase complexes associate to form a single supracomplex in yeast mitochondria, *J. Biol. Chem.* 275, 18093–18098.
51. Schagger H (2001). Respiratory chain supercomplexes. *IUBMB Life* 52, 119–128.
52. Heinemeyer J, Braun HP, Boekema EJ, and Kouril R (2007). A structural model of the cytochrome c reductase=oxidase supercomplex from yeast mitochondria. *J Biol Chem* 282:12240–12248.
53. Dudkina NV, Eubel H, Keegstra W, Boekema EJ, and Braun HP (2005). Structure of a mitochondrial supercomplex formed by respiratory-chain complexes I and III. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 3225–3329.
54. Bianchi C, Genova ML, Parenti CG, Lenaz G (2004). The mitochondrial respiratory chain is partially organized in a supercomplex assembly: kinetic evidence using flux control analysis. *J Biol Chem* 279: 36562–36569.
55. Genova ML, Baracca A, Biondi A, Casalena G, Faccioli M, Falasca AI, Formiggini G, Sgarbi G, Solaini G, Lenaz G (2008). Is supercomplex organization of the respiratory chain required for optimal electron transfer activity? *Biochim Biophys Acta* 1777: 740–1776.
56. Lenaz G, Baracca A, Barbero G, Bergamini C, Dalmonte ME, Del Sole M, Faccioli M, Falasca A, Fato R, Genova ML, Sgarbi G, Solaini G (2010). Mitochondrial respiratory chain super-complex I-III in physiology and pathology.

- Biochim Biophys Acta. 1797(6-7): 633-40. doi: 10.1016/j.bbabbio.2010.01.025.
57. Peters K, Dudkina NV, Jansch L, Braun HP, Boekema EJ (2008). A structural investigation of complex I and I+III₂ supercomplex from *Zea mays* at 11–13 Å resolution: assignment of the carbonic anhydrase domain and evidence for structural heterogeneity within complex I, *Biochim. Biophys. Acta* 1777: 84–93.
 58. Schäfer E, H. Seelert, N.H. Reifschneider, F. Krause, N.A. Dencher, J. Vonck (2006). Architecture of active mammalian respiratory chain supercomplexes, *J. Biol. Chem.* 281: 15370–15375.
 59. Rieske JS (1967). Preparation and properties of reduced Coenzyme Q–cytochrome c reductase (complex III of the respiratory chain), *Methods Enzymol.* 10: 239–245.
 60. Lenaz G, Fato R, Di Bernardo S, Jarreta D, Costa A, Genova ML, G. Parenti Castelli G (1999). Localization and mobility of coenzyme Q in lipid bilayers and membranes, *Biofactors* 9: 87–93.
 61. Kröger A, Klingenberg M (1973). The kinetics of the redox reactions of ubiquinone related to the electron-transport activity in the respiratory chain, *Eur. J. Biochem.* 34 358–368.
 62. Vanderkooi G (1978). Organization of protein and lipid components in membranes, in: S. Fleischer, Y. Hatefi, D. MacLennan, A. Tzagoloff (Eds.), *Molecular Biology of Membranes*, Plenum Publishing Corp, New York, , pp. 25–55.
 63. Schwerzmann K, Cruz-Orive LM, Eggman R, Sängler A, Weibel ER (1986). Molecular architecture of the inner membrane of mitochondria from rat liver: a combined biochemical and stereological study, *J. Cell Biol.* 102 97–103.
 64. Lenaz G, Genova ML (2007). Kinetics of integrated electron transfer in the mitochondrial respiratory chain: random collisions vs. solid state electron channeling, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 292: C1221–C1239.
 65. Ragan CI, Heron C (1978). The interaction between mitochondrial NADH-ubiquinone oxido-reductase and ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase evidence for stoichiometric association, *Biochem. J.* 174: 783–790.

66. Srere PA (1982). The structure of the mitochondrial inner membrane-matrix compartment, *TIBS* 7: 375–378.
67. Srere PA (1987). Complexes of sequential metabolic enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 56: 89–124.
68. Van den Brink-van der Laan E, Killian JA, de Kruijff B (2004). Nonbilayer lipids affect peripheral and integral membrane proteins via changes in the lateral pressure profile. *Biochim. Biophys. Acta.* 1666: 275–288.
69. Osman C, Voelker DR, T. Langer T (2011). Making heads or tails of phospholipids in mitochondria, *J. Cell Biol.* 192: 7–16.
70. Kang SY, Gutowsky HS, Hsung JC, Jacobs R, King TE, Rice D, Oldfield E (1979). Nuclear magnetic resonance investigation of the cytochrome oxidase–phospholipid inter-action: a new model for boundary lipid, *Biochemistry* 18: 3257–3267.
71. Lange C, Nett JH, Trumpower BL, Hunte C (2001). Specific roles of protein–phospholipid interactions in the yeast cytochrome bc1 complex structure, *EMBO J.* 20: 6591–6600.
72. Sedláč E, Robinson NC (1999). Phospholipase A(2) digestion of cardiolipin bound to bovine cytochrome c oxidase alters both activity and quaternary structure. *Biochemistry* 38: 14966–14972.
73. Fry M, Green DE (1980). Energized cation transport by complex III (ubiquinone-cytochrome c reductase), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 97: 852–859.
74. Fry M, Green DE (1981), Cardiolipin requirement for electron transfer in complex I and III of the mitochondrial respiratory chain, *J. Biol. Chem.* 256: 1874–1880.
75. Genova ML, Lenaz G (2014). Functional role of mitochondrial respiratory supercomplexes. *Biochim Biophys Acta.* 1837(4):427-43. doi: 10.1016/j.bbabo.2013.11.002.
76. Pangborn MC (1947). The composition of cardiolipin. *J Biol Chem.* 168(1): 351-61.
77. Aranez C, Marrink SJ, Periole X (2013). Identification of Cardiolipin binding sites on Cytochrome c Oxidase at the Entrance of Protein Channels. *Scientific Reports.* 3:1263.

78. Schlame M, Ren M (2009). The role of cardiolipin in the structural organization of mitochondrial membranes. *Biochim Biophys Acta*. 1788(10):2080-3.
79. Mileykovskaya E, Dowhan W (2014). Cardiolipin-dependent formation of mitochondrial respiratory supercomplexes. *Chem Phys Lipids*. 179:42-8. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2013.10.012.
80. Koshkin V, Greenberg ML (2002). Cardiolipin prevents rate-dependent uncoupling and provides osmotic stability in yeast mitochondria. *Biochem J*. 364: 317-22.
81. Gohil VM, Hayes P, Matsuyama S, Schägger H, Schlame M and Greenberg ML (2004). Cardiolipin Biosynthesis and Mitochondrial Respiratory Chain Function Are Interdependent *The Journal of Biological Chemistry*. 279 (41) : 42612-18.
82. Vernon HJ, Sandlers Y, McClellan R, Kelley RI (2014). Clinical laboratory studies in Barth Syndrome. *Mol Genet Metab*. pii: S1096-7192(14)00095-X. doi: 10.1016/j.ymgme.2014.03.007.
83. Schägger H (2002). Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria, *Biochim. Biophys. Acta* 1555: 154–159.
84. Claypool SM, Oktay Y, Boontheung P, Loo JA, Koehler CM (2008), Cardiolipin defines the interactome of the major ADP/ATP carrier protein of the mitochondrial inner membrane, *J. Cell Biol*. 182 937–950.
85. Zhang M, Mileykovskaya E, Dowhan W (2002). Gluing the respiratory chain together. Cardiolipin is required for supercomplex formation in the inner mitochondrial membrane, *J. Biol. Chem*. 277: 43553–43556.
86. Claypool SM (2009). Cardiolipin, a critical determinant of mitochondrial carrier protein assembly and function, *Biochim. Biophys. Acta* 1788: 2059–2068.
87. Wenz T, Hielscher R, Hellwig P, Schägger H, Richers H, Hunte C (2009). Role of phospholipids in respiratory cytochrome bc(1) complex catalysis and supercomplex formation, *Biochim. Biophys. Acta* 1787 609–616.
88. Mileykovskaya E, Zhang M, Dowhan W (2005). Cardiolipin in energy transducing membranes. *Biochemistry (Mosc)*. 70(2):154-8.
89. Zhang M, Mileykovskaya E, Dowhan W (2005). Cardiolipin is essential for organization of complexes III and IV into a supercomplex in intact yeast mitochondria. *J Biol Chem*. 280(33):29403-8.

90. Brandner K, Mick DU, Frazier AE, Taylor RD, Meisinger C, Rehling P (2005). Taz1, an outer mitochondrial membrane protein, affects stability and assembly of inner membrane protein complexes: implications for Barth Syndrome. *Mol. Biol. Cell.* 16: 5202–5214.
91. Neuwald AF (1997). Barth syndrome may be due to an acyltransferase deficiency, *Curr. Biol.* 7: R465–R466.
92. Schlame M, Ren M (2006). Barth syndrome, a human disorder of cardiolipin metabolism. *FEBS Lett.* 580(23):5450-5.
93. McKenzie M, Lazarou M, Thorburn DR, Ryan MT (2006). Mitochondrial respiratory chain supercomplexes are destabilized in Barth Syndrome patients. *J Mol Biol.* 361(3):462-9.
94. Haines TH, Dencher NA (2002). Cardiolipin: a proton trap for oxidative phosphorylation, *FEBS Lett.* 528: 35–39.
95. Houtkooper RH, Vaz FM (2008). Cardiolipin, the heart of mitochondrial metabolism, *Cell. Mol. Life Sci.* 65 2493–2506.
96. Paradies G, Petrosillo G, Paradies V, Ruggiero FM (2009), Role of cardiolipin peroxidation and Ca^{2+} in mitochondrial dysfunction and disease, *Cell Calcium.* 45: 643–650.
97. Schlame M, Rua D, Greenberg ML (2000). The biosynthesis and functional role of cardiolipin, *Prog. Lipid Res.* 39: 257–288.
98. Paradies G, Paradies V, De Benedictis V, Ruggiero FM, Petrosillo G (2014). Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics. *Biochim Biophys Acta.* 1837(4):408-17. doi: 10.1016/j.bbabbio.2013.10.006. Epub 2013 Oct 29.
99. Dudkina, NV, Kouril R, Peters K, Braun HP, Boekema EJ (2010). Structure and function of mitochondrial supercomplexes. *Biochim. Biophys. Acta* 1797: 664–670.
100. Hunte C, Palsdottir H, Trumpower BL (2003). Protonmotive pathways and mechanisms in the cytochrome bc₁ complex. *FEBS Lett.* 545: 39–46.
101. Kohen R, Nyska A (2002). Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol.* 30(6):620-50.

102. Pryor WA, Houk KN, Foote CS, Fukuto JM, Ignarro LJ, Squadrito GL (2006). Free radical biology and medicine: it's a gas, man! *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 291(3):R491-511.
103. Slater TF (1984). Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J*. 222(1):1-15.
104. Valko M, Morris H, Cronin MT (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem*. 12(10):1161-208.
105. Aruoma OI, Halliwell B, Gajewski E, Dizdaroglu M (1991). Copper-ion-dependent damage to the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide. *Biochem J*. 273 (Pt 3):601-4.
106. Lenaz G (2001). The mitochondrial production of reactive oxygen species: mechanisms and implications in human pathology. *IUBMB Life*. 52(3-5): 159-64.
107. Aprioku JS (2013). Pharmacology of Free Radicals and the Impact of Reactive Oxygen Species on the Testis. *J Reprod Infertil*. 14(4):158-172.
108. Jezek P and Hlavata' L (2005). Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int J Biochem Cell Biol* 37: 2478–2503.
109. Lenaz G (2012). Mitochondrial and reactive oxygen species. Which role in physiology and pathology? *Adv Exp Med Biol* 942: 93–136.
110. Raha S and Robinson BH (2000). Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem Sci* 25: 502–508.
111. Fato R, Bergamini C, Bortolus M, Maniero AL, Leoni S, Ohnishi T, and Lenaz G (2009). Differential effects of mitochondrial Complex I inhibitors on production of reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta* 1787: 384–392.
112. Galkin A and Brandt U (2005). Superoxide radical formation by pure complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) from *Yarrowia lipolytica*. *J Biol Chem* 280: 30129–30135.
113. Genova ML, Ventura B, Giuliano G, Bovina C, Formiggini G, Parenti Castelli G, and Lenaz G (2001). The site of production of superoxide radical in mitochondrial Complex I is not a bound ubisemiquinone but presumably iron-sulfur cluster N2. *FEBS Lett* 505: 364–368.

114. Pryde KR and Hirst J (2011). Superoxide is produced by the reduced flavin in mitochondrial complex I: a single, unified mechanism that applies during both forward and reverse electron transfer. *J Biol Chem* 286: 18056–18065.
115. Panov A, Dikalov S, Shalbuyeva N, Hemendinger R, Greenamyre JT, and Rosenfeld J (2007). Species- and tissue-specific relationships between mitochondrial permeability transition and generation of ROS in brain and liver mitochondria of rats and mice. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: C708–C718.
116. Seelert H, Dani DN, Dante S, Hauss T, Krause F, Schäfer E, Frenzel M, Poetsch A, Rexroth S, Schwassmann HJ, Suhai T, Vonck J, and Dencher NA (2009). From protons to OXPHOS supercomplexes and Alzheimer's disease: structure-dynamics-function relationships of energy-transducing membranes. *Biochim Biophys Acta* 1787: 657–671.
117. Lenaz G and Genova ML (2009). Structural and functional organization of the mitochondrial respiratory chain: a dynamic super-assembly. *Int J Biochem Cell Biol* 41: 1750–1772.
118. Maranzana E, Barbero G, Falasca AI, Lenaz G, Genova ML, (2013). Mitochondrial respiratory supercomplex association limits production of reactive oxygen species from complex I. *Antioxid Redox Signal* 1:19(13):1469-80.
119. Paradies G, Petrosillo G, Pistolese M, Ruggiero FM (2000). The effect of reactive oxygen species generated from the mitochondrial electron transport chain on the cytochrome c oxidase activity and on the cardiolipin content in bovine heart submitochondrial particles, *FEBS Lett.* 466: 323–326.
120. Paradies G, Petrosillo G, Pistolese M, Ruggiero FM (2002). Reactive oxygen species affect mitochondrial electron transport complex I activity through oxidative cardiolipin damage, *Gene* 286: 135–141.
121. Petrosillo G, Ruggiero FM, Di Venosa N, Paradies G (2003). Decreased complex III activity in mitochondria isolated from rat heart subjected to ischemia and reperfusion: role of reactive oxygen species and cardiolipin, *FASEB J.* 17: 714–716.
122. Paradies G, Petrosillo G, Paradies V, Ruggiero FM (2010). Oxidative stress, mitochondrial bioenergetics, and cardiolipin in aging, *Free Radic. Biol. Med.* 48: 1286–1295.

123. Gómez LA, Hagen TM (2012). Age-related decline in mitochondrial bioenergetics: does supercomplex destabilization determine lower oxidative capacity and higher superoxide production? *Semin Cell Dev Biol.* 23(7):758-67. doi: 10.1016/j.semcdb.2012.04.002.
124. Paradies G, Petrosillo G, Paradies V, Ruggiero FM (2011). Mitochondrial dysfunction in brain aging: role of oxidative stress and cardiolipin. *Neurochem Int.* 58(4):447-57. doi: 10.1016/j.neuint.2010.12.016.
125. Gasparre G, Porcelli AM, Lenaz G (2013). Romeo G Relevance of mitochondrial genetics and metabolism in cancer development. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 5(2). pii: a011411. doi: 10.1101/cshperspect.a011411.
126. Smith AL (1967). Preparation, properties, and conditions for assay of mitochondria: Slaughterhouse material small-scale. *Methods Enzymol* 10: 81- 86.
127. Hatefi Y, and Rieske JS (1967). The preparation and properties of DPNH-cytochrome c reductase (Complex I-III of the respiratory chain). *Methods Enzymol* 10: 225 – 231.
128. Degli Esposti, M; Bertoli, E; Parenti-Castelli, G; Fato, R; Mascarello, S and Lenaz, G (1981). Incorporation of ubiquinone analogs into lipid vesicles and mitochondrial membranes. *Arch. Biochem. Biophys.* 210: 21- 32.
129. Racker, E; Violand, B; O’Neal, S; Alfonzo, M and Telford, J (1979). Reconstitution, a way of biochemical research; some new approaches to membrane-bound enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* 198: 470 – 477.
130. Rigaud, J E; Pitard, B and Levy, D (1995). Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application to energy-transducing membrane proteins. *Biochem. Biophys. Acta* 1231: 223 – 246.
131. Lowry, O; Rosebrough N. J.; Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265 – 275.
132. Genova ML, Castelluccio C, Fato R, Parenti Castelli G, Merlo Pich M, Formiggini G, Bovina C, Marchetti M, and Lenaz G (1995). Major changes in complex I activity in mitochondria from aged rats may not be detected by direct assay of NADH: coenzyme Q reductase. *Biochem J* 311: 105–109.
133. Schagger H, Cramer WA, and von Jagow G (1994). Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and

- isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal Biochem* 217: 220–230.
134. Degli Esposti M (2002). Measuring mitochondrial reactive oxygen species. *Methods* 26: 335–340.
 135. Black MJ and Brandt RB (1974). Spectrofluorometric analysis of hydrogen peroxide. *Anal Biochem* 58: 246–254.
 136. Duve, C., Trouet A., Campeneere, D.D., et al.: Liposomes as Lysosomotropic Carriers, N.Y. Acad.Sci, 1998; 53: 266-234.
 137. Huang, C.: Studies on Phosphatidylcholine Vesicles. Formation and Physical Characteristics , *Biochem .*, 1978; 8: 344-351.
 138. Wang, G.: Liposomes as Drug Delivery Vehicles, John Wiley & Sons, Inc., 2005: 411-434.
 139. Su C, Xia Y, Wang N, Zhu L, Chen T, Huang Y, Liang D (2014). Liposomes Physically Coated with Peptides: Preparation and Characterization. (Equb ahead of print).
 140. Heron C, Ragan CI, Trumpower BL (1978). The interaction between mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase and ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase. Restoration of ubiquinone-pool behaviour. *Biochem J* 15:174(3):791-800.
 141. Bianchi C, Fato R, Genova ML, Parenti Castelli G, Lenaz G (2003). Structural and functional organization of Complex I in the mitochondrial respiratory chain. *Biofactors* 18(1-4):3-9.
 142. Ovádi J (1991). Physiological significance of metabolic channelling. *J Theor Biol* 152(1):1-22.
 143. Bazán S, Mileykovskaya E, Mallampalli VK, Heacock P, Sparagna GC, Dowhan W (2013). Cardiolipin-dependent Reconstitution of Respiratory Supercomplexes from Purified *Saccharomyces cerevisiae* Complexes III and IV. *J Biol Chem.* 4;288(1):401-11.
 144. Paradies G, Paradies V, De Benedictis V, Ruggiero FM, Petrosillo G (2014). Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics. *Biochim Biophys Acta.* 1837(4):408-17.

9. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Soyadı, Adı :KOPUZ, Müge
Uyruğu :T.C.
Doğum tarihi ve yeri :10/10/1980 RİZE
Medeni hali :Bekar
Telefon :00 90 462 377 7878
E-Posta :mugekopuz@gmail.com
Yazışma adresi :Tıbbi Biyokimya AbD, Sağlık Bilimleri
Enstitüsü, Karadeniz Teknik Üniversitesi,
61020, TRABZON, TÜRKİYE

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora	K.T.Ü Tıbbi Biyokimya	2014
Yüksek Lisans	K.T.Ü Tıbbi Biyokimya	2008
Lisans	Ege Üniversitesi Biyokimya Bölümü	2004
Lisans	Anadolu Üniversitesi Açıköğretim Fakültesi İşletme Bölümü	2010
Lise	Rize Anadolu Lisesi	1998

AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre (Yıl -Yıl)
1. Araştırma Görevlisi	K.T.Ü Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya AbD	2006-2014
2. Misafir Araştırmacı	Bologna Üniversitesi İtalya Biyokimya Bölümü Biyoenerjetik Laboratuvarı	2012-2013
3. Misafir Öğrenci	Bologna Üniversitesi İtalya Biyokimya Bölümü Biyoenerjetik Laboratuvarı	2010-2011

YABANCI DİL

İngilizce (İleri Düzeyde), İtalyanca (Başlangıç)

UZMANLIK ALANI

Mitokondri Solunum Zinciri Kompleksleri, Antioksidan/Oksidan Denge, Kardiyolipin, IMA (İskemik Modifiye Albumin), Proteomiks, Metabolomiks, Elektroforetik Teknikler, AAS (Atomik Absorbsiyon Spektrofotometrisi)

YAYINLAR/BİLDİRİLER

1. Osmanağaoğlu MA, Karahan SC, Aran T, Güven S, Cora A, **Kopuz M**, Bozkaya H. The effects of hormone therapy on ischemia modified albumin and soluble CD40 ligand levels in obese surgical menopausal women. Clin Exp Obstet Gynecol. 2013;40(3):389-92.
2. Karahan SC, Sonmez M, Saglam F, Mentese A, Erkut N, Topbas M, **Kopuz M**, Cobanoglu U. "Can ischemia-modified albumin be a valuable indicator of tissue ischemia in polycythemia vera?" Hematology. 2010 Jun;15(3):151-6.
3. Karahan SC, Koramaz I, Altun G, Uçar U, Topbaş M, Mentese A, **Kopuz M**. "Ischemia-modified albumin reduction after coronary bypass surgery is associated with the cardioprotective efficacy of cold-blood cardioplegia enriched with N-acetylcysteine: a preliminary study." Eur Surg Res. 2010;44(1):30-6. (Epub 2009 Dec).
4. Karahan SC, Guven S, Mentese A, Bacak A, **Kopuz M**, Ozeren M. "Serum anti-carbonic anhydrase I and II antibodies and idiopathic recurrent pregnancy loss." Reprod Biomed Online. 2009 Dec;19(6):859-63.
5. Turedi S, Gunduz A, Mentese A, Dasdibi B, Karahan SC, Sahin A, Tuten G, **Kopuz M**, Alver A. "Investigation of the possibility of using ischemia-modified albumin as a novel and early prognostic marker in cardiac arrest patients after cardiopulmonary resuscitation" Resuscitation; (2009) 80(9):994-999.
6. Çolak M, Kural BV, Bulut V, Aliyazıcıoğlu R, **Kopuz M**, Değer O, Mentese A. "Mineral Composition of Different Type Polens". P-89, pp. 133. Laboratory Medicine Symposium and Second Quality Accreditation Symposium, 1-4 Nov 2006, Girne, KKTC.
7. Çolak M, Kural BV, Bulut V, Aliyazıcıoğlu R, **Kopuz M**, Değer O, Cengiz S (2006). "Mineral Composition of Two Types Bee Milks", P-90, pp. 133. Laboratory Medicine Symposium and Second Quality Accreditation Symposium, 1-4 Nov 2006, Girne, KKTC.
8. Çolak M, Kural BV, Aliyazıcıoğlu R, Gündoğdu A, **Kopuz M**, Değer O, Barlak Y. "Mineral Composition of Different Type Propolis" P-91, pp. 134. Laboratory Medicine Symposium and Second Quality Accreditation Symposium, 1-4 Nov 2006, Girne, KKTC.

9. **Kopuz M**, Karahan SC, Özeren M, Menteşe A, Uçar U, Uzun A, Turan İ. “L-Carnitine Levels in Recurrent Pregnancy Lost” P-031, pp. 125. XX. National Congress of Biochemistry”, 29 October-1 November 2008, Kapadokya, Nevşehir
10. Menteşe A, Karahan SC, Aliyazıcıoğlu R, Alver A, Uzun A, Keha EE, **Kopuz M**, Uçar U. “İki Uçlu Duygu durum Bozukluğu Olan Hastalarda Serum Karbonik Anhidraz Otoantikör Düzeyleri” P-076, pp. 160. XX. National Congress of Biochemistry”, 29 October-1 November 2008, Kapadokya, Nevşehir.
11. Birinci Y, **Kopuz M**, Maranzana E, Falasca AI, Lenaz G and Maria Genova ML. “Mitochondrial Respiratory Supercomplexes Limit ROS Production”. 8th Forum on Oxidative Stress and Aging, 12-14 June 2013, Bologna, Italy.
12. **Kopuz M**, Birinci Y, Maranzana E, Falasca AI, Lenaz G and Maria Genova ML. “Mitochondrial Respiratory Supercomplexes: Kinetic Advantage and ROS Production”. pp 9. GIBB, 20-22 June 2013, Padova, Italy
13. Osmanağaoğlu MA, Karahan SC, Aran T, Güven S, Cora A, **Kopuz M**, Bozkaya H. “Ağır Preeklampside Antihipertansif Tedavi Öncesi ve Sonrasında İskemik Modifiye Albumin Düzeyleri” PS-054, pp 97. Congress of Gynecology, 5-8 March 2014, Palandöken, Erzurum.

ÖDÜLLER/ TEŞVİKLER/ BURSLAR

- | | |
|-------------------------------------|-----------|
| 1. Erasmus Staj Programı Erasmus | 2012-2013 |
| 2. Erasmus Öğrenci Değişim Programı | 2010-2011 |

HOBİLER

Snowboarding yapmak, halk dansları oynamak, dalış yapmak, piyano çalmak