



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**KOENZİM Q'NUN MİTOKONDRIYAL  
SOLUNUM ZİNCİRİ SÜPERKOMPLEKS  
I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>'ÜN YAPISI VE FONKSİYONU ÜZERİNE  
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**Yelda BİRİNCİ**

**DOKTORA TEZİ**

**Prof. Dr. Orhan DEĞER**

**TRABZON - 2014**





**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**KOENZİM Q'NUN MİTOKONDRIYAL  
SOLUNUM ZİNCİRİ SÜPERKOMPLEKS  
I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>'ÜN YAPISI VE FONKSİYONU ÜZERİNE  
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**Yelda BİRİNCİ**

**DOKTORA TEZİ**

**Prof. Dr. Orhan DEĞER**

**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 Yelda BİRİNCİ'nin hazırladığı "Koenzim Q'nun mitokondriyal solunum zinciri süperkompleks I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>'ün yapısı ve fonksiyonu üzerine etkilerinin incelenmesi" 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. Orhan DEĞER

\_\_\_\_\_

Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Orhan DEĞER

\_\_\_\_\_

Prof. Dr. Hüveyda BAŞAĞA

\_\_\_\_\_

Prof. Dr. Edip KEHA

\_\_\_\_\_

Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU

\_\_\_\_\_

Prof. Dr. Mehmet YILDIRIM

\_\_\_\_\_

Tarih:26/03/2014

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 bağılı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim 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.

10.03.2014

Yelda BİRİNCİ

## İTHAF

*Doktora tezimi, bana çocukluğumdan itibaren okumanın önemini aşılayan ve içimdeki öğrenme aşkının mimarı olan anneme ithaf ediyorum.*

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince karmaşık sorunlara basit çözümler bularak beni hep şaşırtan ve bana en doğru yolda ilerlemem için kılavuzluk eden sevgili danışman hocam Prof. Dr. Orhan DEĞER'e, bilimsel olarak tarifsiz faydalar edindiğim süperkomplekslerin babalarından biri olan Prof. Dr. Giorgio Lenaz'a, tez çalışmamda engin bilgi ve tecrübesiyle her zaman yanımda olan Maria Luisa Genova'ya, çalışma arkadaşım ve can yoldaşım Müge KOPUZ'a, doktora eğitimimde emeği geçen Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki bütün değerli hocalarıma, dönem arkadaşlarım Buket AKCAN, Ayşegül UZUN başta olmak üzere tüm bölüm arkadaşlarıma, varlığı ile bana destek olan şenol BAHADIR'a, tez çalışmamın gerçekteşmesinde gerekli imkânları sağlayan Karadeniz Teknik Üniversitesi'ne ve her zaman her koşulda yanımda olan, sonsuz sevgi ve sabır gösteren aileme teşekkür ederim.

Araş. Gör. Yelda BİRİNCİ

Bu çalışma KTÜ. Araştırma Fonu 9702 nolu BAP 01 projesiyle desteklenmiştir.

## İÇİNDEKİLER

<b>BEYAN</b>	
<b>İTHAF</b>	
<b>TEŞEKKÜR</b>	
<b>TABLolar DİZİNİ</b>	<b>viii</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	<b>ix</b>
<b>SİMGELER KISALTMALAR ve FORMÜLLER DİZİNİ</b>	<b>x</b>
<b>1. ÖZET</b>	<b>1</b>
<b>2. SUMMARY</b>	<b>2</b>
<b>3. GİRİŞ ve AMAÇ</b>	<b>3</b>
<b>4. GENEL BİLGİLER</b>	<b>5</b>
4.1. Mitokondri ve Oksidatif Fosforilasyon	5
4.1.1. Mitokondri	5
4.1.2. Oksidatif Fosforilasyon	6
4.1.2.1. Kompleks I	8
4.1.2.2. Kompleks II	12
4.1.2.3. Kompleks III	13
4.1.2.4. Kompleks IV	15
4.1.2.5. Kompleks V	16
4.2. Mitokondriyal Solunum Zincir Organizasyonu	18
4.3. Süperkompleks Organizasyonuna Dair Kanıtlar	20
4.3.1. Yapısal Kanıtlar	22
4.3.2. Kinetik Kanıtlar	23
4.4. Solunum Zinciri Mobil Taşıyıcıları	26
4.4.1. Sitokrom c	26
4.5. Koenzim Q	27
4.5.1. Koenzim Q Havuz Davranışı	28
4.5.2. Koenzim Q Havuz Davranışı'ndan Sapmalar	30
4.5.2.1. Elektron Transferi Açısından Değerlendirmeler	30
4.5.2.2. Satürasyon Kinetiği Açısından Değerlendirmeler	31
4.5.2.3. Mitokondriyal membranın Protein-lipid Kompozisyonu Açısından Değerlendirmeler	32



	vii
<b>5. GEREÇ ve YÖNTEMLER</b>	<b>33</b>
5.1. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler	33
5.2. Kullanılan Kimyasallar	34
5.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları	35
5.3.1. Mitokondri İzolasyonu İçin Kullanılan Çözeltiler	35
5.3.2. Kompleks I ve III'ce Zengin Mitokondri Fraksiyonları(R4B) Fraksiyonlarının Hazırlanması İçin Kullanılan Çözeltiler	35
5.3.3. Kinetik Analizler ve ROS Ölçümü İçin Kullanılan Çözeltiler	36
5.4. Sığır ( <i>B. taurus</i> ) Kalbinden Mitokondri İzolasyonu	38
5.5. Mitokondri İzolatlarından R4B Fraksiyonlarının Hazırlanması	39
5.6. Lipozom (Fosfolipid Veziküllerinin) Hazırlanması	40
5.7. Lipozomlara R4B Fraksiyonlarının yerleştirilmesi	41
5.8. Kinetik analizler	41
5.9. Kompleks I Tarafından Oluşturulan Hidrojen Peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) Tayini	42
<b>6. BULGULAR</b>	<b>44</b>
6.1. Sığır Kalbinden İzole Edilen Mitokondrilerin ve R4B'lerin Aktivite Tayini	44
6.2. R4B:FL 1:1 ve R4B:FL 1:30 Proteolipozomlarının NADH-Sit c Oksidoredüktaz Aktivite Ölçümleri	44
6.3. R4B:FL 1:1 ve R4B:FL 1:30 Proteolipozomlarının NADH-Sit c Oksidoredüktaz Aktivitelerinin Birleştirilmiş Grafik ile Gösterimi	46
6.4. R4B:FL 1:1 ve R4B:FL 1:30 Proteolipozomlarının NADH Oksidasyonu için [KoQ <sub>10</sub> ] Konsantrasyonlarına Göre K <sub>m</sub> ve V <sub>max</sub> Değerlerini Gösteren Michaelis-Menten ve Lineweaver- Burk Grafiklerini	47
6.5. R4B:FL 1:1 ve R4B:FL 1:30 Proteolipozomlarının NADH-DB Aktivite Ölçümleri	48
6.6. ROS Ölçüm Sonuçları	49
6.6.1. ROS-I Ölçüm Sonuçları	49
6.6.2. ROS-II Ölçüm Sonuçları	50
<b>7. TARTIŞMA ve SONUÇ</b>	<b>53</b>
<b>8. KAYNAKLAR</b>	<b>60</b>
<b>9. ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>72</b>

## TABLOLAR DİZİNİ

<b>Tablo</b>	<b>Sayfa</b>
<b>Tablo 1.</b> Kompleks I Fe-S Merkezlerinin, $E_m$ Potansiyellerini İçeren Tablo	10
<b>Tablo 2.</b> Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar Ve Malzemeler	33
<b>Tablo 3.</b> Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasallar	34
<b>Tablo 4.</b> <i>B. taurus</i> Kalbinden İzole Edilen Mitokondrilerin Solunumsal Aktiviteleri	44
<b>Tablo 5.</b> R4B'lerin Enzimatik Aktivite Ölçümü	44
<b>Tablo 6.</b> R4B: FL 1:1 Proteolipozomlarının NADH-Sit c Oksidoredüktaz Aktivite Sonuçları	45
<b>Tablo 7.</b> R4B: FL 1:30 Proteolipozomlarının NADH-Sit c Oksidoredüktaz Aktivite Sonuçları	45
<b>Tablo 8.</b> Proteolipozom R4B:FL 1:1 Musidin İnhibitörü Varlığında Kompleks I Aktivitesi Başına ROS-I Ölçüm Sonuçları	49
<b>Tablo 9.</b> Proteolipozom R4B:FL 1:1 Musidin + Rotenon İnhibitörü Varlığında Kompleks I Aktivitesi Başına ROS-I Ölçüm Sonuçları	49
<b>Tablo 10.</b> Proteolipozom R4B:FL 1:30 Musidin İnhibitörü Varlığında Kompleks I Aktivitesi Başına ROS-I Ölçüm Sonuçları	50
<b>Tablo 11.</b> Proteolipozom R4B:FL 1:30 Musidin+Rotenon İnhibitörü Varlığında Kompleks I Aktivitesi Başına ROS-I Ölçüm Sonuçları	50
<b>Tablo 12.</b> Proteolipozom R4B:FL 1:1 Musidin İnhibitörü Varlığında Kompleks I Aktivitesi Başına ROS-II Ölçüm Sonuçları	51
<b>Tablo 13.</b> Proteolipozom R4B:FL 1:1 Musidin + Rotenon İnhibitörü Varlığında Kompleks I Aktivitesi Başına ROS-II Ölçüm Sonuçları	51
<b>Tablo 14.</b> Proteolipozom R4B:FL 1:30 Musidin İnhibitörü Varlığında Kompleks I Aktivitesi Başına ROS-II Ölçüm Sonuçları	52
<b>Tablo 15.</b> Proteolipozom R4B:FL 1:1 Musidin + Rotenon İnhibitörü Varlığında Kompleks I Aktivitesi Başına ROS-II Ölçüm Sonuçları	52

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil</b>	<b>Sayfa</b>
<b>Şekil 1.</b> Mitokondrinin Elektron Mikroskop Görüntüsü	5
<b>Şekil 2.</b> Solunum Zincirinin Şematik Görünümü	7
<b>Şekil 3.</b> Sığır Kalp Kası Mitokondrisinden Menşeli Kompleks I'ın 3 Boyutlu Yapısı	9
<b>Şekil 4.</b> Kompleks I ve Alt Birimleri	10
<b>Şekil 5.</b> Brandt'ın "Redoks Kapılı Ligand İletim Mekanizması Modeli"	12
<b>Şekil 6.</b> Kompleks II	13
<b>Şekil 7.</b> Kompleks III	14
<b>Şekil 8.</b> Q-siklusu ve Kompleks III'ten Elektron Akışının Şematik Gösterimi	15
<b>Şekil 9.</b> Kompleks IV'ün Yapısı ve O <sub>2</sub> 'nin Suya İndirgenmesi	16
<b>Şekil 10.</b> Kompleks V	17
<b>Şekil 11.</b> Solunum Zinciri Membran Organizasyonu İçin Önerilen İki Modelin Şematik Olarak Gösterimi	20
<b>Şekil 12.</b> Sığır Kalp Mitokondrisinde ve Sıçan Karaciğer Mitokondrisinde Süperkompleks I <sub>1</sub> III <sub>2</sub> IV <sub>1</sub> 'ün 2D BN/SDS-PAGE İle Gösterimi	21
<b>Şekil 13.</b> Solunum Zinciri Süperkompleks Modelleri	22
<b>Şekil 14.</b> Sığır Kalp Mitokondrisi, SK I <sub>1</sub> III <sub>2</sub> IV <sub>1</sub> 'ün 3D Yapısal Gösterimi	23
<b>Şekil 15.</b> Rastgele Difüzyon Modeli ve Süperkompleks Modellerinde, NADH Bağımlı MAK Analiz Gösterimi	24
<b>Şekil 16.</b> Proteolipozom Modellerinde, SK I <sub>1</sub> III <sub>2</sub> 'ün 2D BN/SDS-PAGE ile Gösterimi	26
<b>Şekil 17.</b> Koenzim Q Molekülünün Kimyasal Yapısı	27
<b>Şekil 18.</b> R4B:FL 1:1 ve R4B:FL 1:30 Proteolipozomlarının NADH-Sit c Oksidoredüktaz Aktiviteler Grafiği	46
<b>Şekil 19.</b> R4B:FL 1:1 ve R4B:FL 1:30 Proteolipozomlarının Michaelis-Menten Grafiği ve V <sub>max</sub> , K <sub>m</sub> Değerleri	47
<b>Şekil 20.</b> R4B:FL 1:1 ve R4B:FL 1:30 Proteolipozomlarının Lineweaver-Burk Grafiği	47
<b>Şekil 21.</b> R4B: FL 1:30 Proteolipozomlarının Kompleks I Aktivite Sonuçları	48
<b>Şekil 22.</b> R4B: FL 1:1 proteolipozomlarının Kompleks I Aktivite Sonuçları	48

## KISALTMA, SİMGE ve FORMÜLLER DİZİNİ

### Kısaltmalar

<b>AA</b>	AntimisinA
<b>ATP</b>	Adenozin trifosfat
<b>BHM</b>	Bovine Heart Mitochondria
<b>BN-PAGE</b>	Blue native jel elektroforezi
<b>DB</b>	Desil-ubikinon
<b>Dk</b>	Dakika
<b>EDTA</b>	Etilendiamintetraasetik asit
<b>EM</b>	Elektron mikroskopu
<b>FADH</b>	Flavin adenin dinükleotit
<b>FL</b>	Fosfolipid
<b>FMN</b>	Flavinmononükleotit
<b>g</b>	Gram
<b>GPx</b>	Glutasyon peroksidaz
<b>GSSG</b>	Okside glutasyon
<b>GSH</b>	Redükte glutasyon
<b>HPLC</b>	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
<b>İmm</b>	İç mitokondriyal membran
<b>kDa</b>	Kilo dalton
<b>KoQ</b>	Koenzim Q
<b>KTÜ</b>	Karadeniz Teknik Üniversitesi
<b>mtDNA</b>	Mitokondriyal DNA
<b>mL</b>	Mililitre
<b>mM</b>	Milimolar
<b>µL</b>	Mikrolitre
<b>UQ</b>	Ubikinon
<b>UQH<sub>2</sub></b>	Ubikinol
<b>SK</b>	Süperkompleks
<b>MAK</b>	Metabolik akış kontrol
<b>mL</b>	Mililitre
<b>NADH</b>	Nikotinamid adenin dinükleotid

<b>nm</b>	Nanometre
<b>nmol</b>	Nanomol
<b>R4B</b>	Mitokondriyal fraksiyon
<b>ROS</b>	Reaktif oksijen türleri
<b>Sn</b>	Saniye
<b>SDS</b>	Sodyum dodesilsülfat
<b>SOD</b>	Süperoksit dismutaz
<b>TCA</b>	Trikloroasetik asit
<b>UCP</b>	Uncoupling protein

### Simgeler

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\gamma$	Gama
$\epsilon$	Epsilon

### Formüller

<b>CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O</b>	Bakır sülfat pentahidrat
<b>C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>KNaO<sub>6</sub>.4H<sub>2</sub>O</b>	Sodyum potasyum tartarat tetrahidrat
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Hidrojen peroksit
<b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub></b>	Fosforik asit
<b>HO<sub>2</sub><sup>•</sup></b>	Hidroperoksil
<b>KCl</b>	Potasyum klorür
<b>NaOH</b>	Sodyum hidroksit
<b>Na<sub>2</sub>EDTA</b>	Sodyum EDTA
<b>NaCl</b>	Sodyum klorür
<b>Na-DOC</b>	Sodyum-Deoksikolat
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	Sodyum karbonat
<b>O<sub>2</sub></b>	Oksijen
<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b>	Süperoksit
<b>OH<sup>•</sup></b>	Hidroksil radikali

## ÖZET

### **Koenzim Q'nun mitokondriyal solunum zinciri süperkompleks I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>'ün yapısı ve fonksiyonu üzerine etkilerinin incelenmesi**

Mitokondriyal solunum zinciri ilk olarak elektron iletimini sağlayan mitokondri iç membranına gömülü prostetik gruplar (flavinler ve sitokromlar) dizisi olarak tanımlanmıştır. Daha sonra artan redoks potansiyellerine göre çok alt birimli dört büyük protein kompleksinin membranda dizili olduğu gösterilmiştir. Mitokondriyal solunum zincirinde yer alan protein komplekslerin organizasyonunda halen geçerli olan model rastgele difüzyon modelidir. Bu modele göre Koenzim Q (KoQ) molekülleri membranda bir arada bulunarak havuz davranışı gösterirler. Son on yıldır artan veriler, pek çok organizmanın mitokondriyal solunum zincirinde yer alan komplekslerin, süperkompleks (SK) adı verilen supramoleküler organizasyonlar şeklinde membranda sabit olarak bulunduğunu göstermektedir. Rastgele difüzyon modelinin aksine koenzim Q molekülleri, süperkompleks yapılarına bağlı bir şekilde bulunurlar böylece adeta bir elektron kanalı görevi gören süperkompleks yapılarında daha hızlı ve etkin bir şekilde elektron akışı gerçekleştirerek kinetik avantaj sağlanmaktadır. Bu çalışmada, membran proteinlerinin doğal yapıları ile analiz edilebilmelerine olanak sağlayan proteolipozom modellerinden yararlanılmıştır. Bu bağlamda, dört farklı konsantrasyonda KoQ içeren lipozomlara, sığır kalp mitokondrilerinden izole edilen kompleks I ve III'ce zengin mitokondri fraksiyonları (R4B), 1:1 ve 1:30 oranlarında yerleştirilerek koenzim Q miktarının SK I<sub>1</sub>III<sub>2</sub> üzerindeki etkileri incelenmiştir.

Süperkompleks varlığında NADH-sitokrom c oksidoredüktaz aktivitesi, komplekslerin bireysel olarak yer aldığı R4B 1:30 proteolipozomlarına oranla anlamlı derecede artmıştır. Artan enzimatik aktivitenin, KoQ moleküllerinin havuz davranışına uymayıp süperkompleks yapısında sabit olarak yer almasından kaynaklandığı şeklinde yorumlanmıştır. Bunun yanı sıra, her iki proteolipozom modelinde de KoQ konsantrasyonu arttıkça kompleks I kaynaklı ROS oluşumunun azaldığı gösterilmiştir. Buna dayanarak ekzojen KoQ alınımının mitokondriyal ROS oluşumunu azaltabileceği önerilmiştir.

**Anahtar Sözcükler:** Süperkompleks I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>, R4B, Proteolipozom Mitokondri, KoQ.

## SUMMARY

### **Investigation of the effects of CoQ on structure and function of supercomplex I<sub>1</sub>III<sub>2</sub> in mitochondrial respiratory chain**

The mitochondrial respiratory chain was first described as a sequence of prosthetic groups (flavins and cytochromes) embedded in a protein matrix in the inner mitochondrial membrane and was shown the four big multi-protein complex arranged according to increasing redox potential in membrane. The random diffusion model that is still in use concerning organisation of protein complexes in mitochondrial respiratory chain. According to this model, Coenzyme Q (CoQ) molecules are located together in membrane and they show pool behavior. Evidence accumulated in last decade has demonstrated that a large proportion of the mitochondria respiratory chain complexes in a variety of organisms is arranged in supramolecular assemblies called supercomplexes (SC) and they exist as stable in membrane. In contrast to random diffusion model, CoQ does not exist as free in mitochondrial inner membrane, it is supercomplex bound and this binary behaves like an electron channel so provides kinetic advantage for electron transport. It has been benefited from proteoliposomes that provide analysis of membrane proteins as native form in this study. Within this context, the effects of CoQ molecules examined on SC I<sub>1</sub>III<sub>2</sub> by means of proteoliposome models included mitochondrial fractions (R4B) which are enriched by complex I and III isolated from bovine heart mitochondria. R4B incorporated with liposomes included four different CoQ concentrations in a ratio R4B:PL 1:1 and 1:30 in this study.

NADH-cyt c oxidoreductase integrated activity enhanced significantly in the presence of Supercomplex I<sub>1</sub>III<sub>2</sub> compared with complexes placed as a individual in proteoliposomes R4B 1:30. It has been concluded that CoQ molecules do not obey pool behavior, since they are fixed in supercomplexes association. In addition, ROS caused from complex I reduced with increased CoQ concentrations in both proteoliposome models. On this basis, it has been thought that CoQ reinforcement can reduce production of ROS by mitochondria.

**Key Words:** Supercomplex I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>, R4B, Proteoliposome, Mitochondria, CoQ.

### 3. GİRİŞ ve AMAÇ

Günümüzde halen geçerli olan mitokondriyal solunum zinciri membran organizasyon modeli 1984 yılında Hackenbrock tarafından ortaya atılan ‘rastgele difüzyon modeli’dir (1). Rastgele difüzyon modeline göre koenzim Q molekülleri membranda bir arada bulunarak ‘havuz davranışı’ gösterirler. Mitokondriyal solunum sırasında lateral difüzyonla hareket ederek kompleksler arasında elektron iletimini sağlarlar. Artan veriler, bu modelin mitokondriyal membran solunum zinciri organizasyonunu yanlış ifade ettiği yönündedir. Bu bağlamda mitokondriyal solunum zinciri süperkompleks oluşumları ile ilgili çalışmalar oldukça önemlidir.

Süperkompleks modeli; mitokondriyal iç membranda yer alan solunum zinciri komplekslerinin bir araya gelmesiyle oluşan supramoleküler organizasyonlardır (2). Rastgele difüzyon modelinin aksine koenzim Q moleküllerinin serbest halde değil komplekslere bağlı şekilde bulunduğu ve havuz davranışı göstermedikleri varsayılmaktadır (3). Literatürde, yeniden yapılandırılan mitokondriyal membranlarda yapılan çalışmalar genellikle süksinat oksidasyonu üzerinedir. NADH substrat olarak kullanıldığında, KoQ moleküllerinin mitokondriyal solunum sırasında havuz davranışı gösterip göstermediklerine dair kesin bir kanıt henüz bulunmamaktadır. Bu çalışma ile koenzim Q moleküllerinin, NADH oksidasyonu sırasında havuz davranışı gösterip göstermedikleri enzim kinetiği açısından araştırılması planlanmıştır. Bu kapsamda, KoQ’nun, elektron iletiminde adeta bir substrat kanalı gibi çalışan süperkomplexlere bağlı biçimde bulunduğu ve bu sayede daha hızlı ve etkin elektron akışı sağlanmasına hizmet ettiği yönündeki hipoteze destek oluşturacak veriler elde edilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada, süperkompleks I<sub>1</sub>III<sub>2</sub> içeren ve komplekslerin ayrı ayrı yer aldığı süperkompleks içermeyen proteolipozom modelleri kullanılmıştır. Membranlardaki protein konsantrasyonunun artması protein komplekslerinin bir araya gelme eğilimini arttırmaktadır. Proteolipozom modelleri bu açıdan süperkompleks çalışmaları için idealdir (4). Bu çalışmada, sığır (*Bovine taurus*) kalp dokusundan izole edilecek kompleks I ve III’ce zengin mitokondri fraksiyonları (R4B) içeren proteolipozomlar kullanılmıştır. Bunun yanı sıra hücre zarına gömülü proteinlerin yüksek hidrofobik özellikleri dolayısıyla in vitro olarak analiz edilmeleri oldukça zordur. Zarın yapısını oluşturan lipid tabakasından uzaklaştıklarında bu proteinler genellikle



konformasyonlarını ve fonksiyonları kaybederler. Proteolipozomlar, proteinlerin membranda buldukları doğal yapıları ile analiz edilebilmelerine olanak sağlamaları açısından da oldukça önemlidirler. Böylece mitokondriyal membran solunum kompleksleri organizasyonunun istenilen şekilde modifiye edilebileceği ideal bir deneysel ortam sağlanmış olacaktır. Çalışmada kullanılan proteolipozomlar temel olarak dört farklı konsantrasyonda KoQ<sub>10</sub> içermektedirler. Böylece, KoQ<sub>10</sub> konsantrasyonunun süperkompleks I<sub>1</sub>III<sub>2</sub> aktivitesi üzerine etkileri detaylı bir şekilde incelenebilecektir .

Çalışmamız proteolipozom modellerinden avantaj sağlanarak KoQ<sub>10</sub> miktarının, süperkompleks varlığında ve ayrıştığı durumlarda NADH oksidasyonu üzerindeki etkilerinin incelemesi yönünden oldukça orjinaldir ve bu konudaki literatüre önemli katkılar sağlayacak niteliktedir.

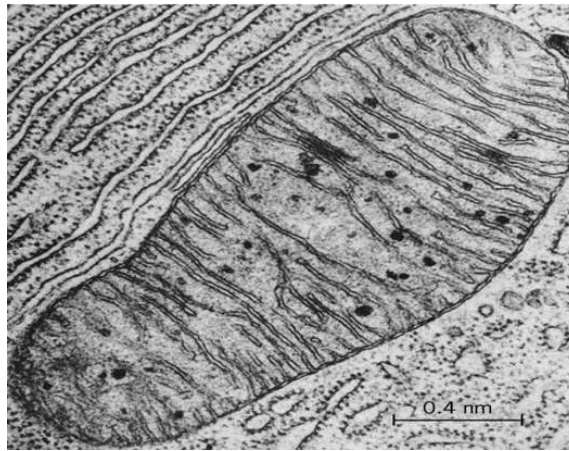
Mitokondri organeli hücrede ROS oluşumunun ana kaynağıdır. Mitokondriyal ROS'un büyük bölümü kompleks I'den kaçan elektronlar tarafından oluşturulmaktadır (5). Bu çalışmada ek olarak kompleksler arası elektron iletimini sağladığı bilinen koenzimQ<sub>10</sub> molekülünün konsantrasyon farkının, kompleks I kaynaklı ROS oluşumu üzerine etkileri de incelenecektir.

## 4. GENEL BİLGİLER

### 4.1. Mitokondri ve Oksidatif Fosforilasyon

#### 4.1.1. Mitokondri

Mitokondri, tüm ökaryot hücrelerin sitoplazmasında 0.5-1µm çapında çubuk şekilli veya yuvarlak şekilli organellerdir. 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). Mitokondri, dış membran ve iç membran olmak üzere iki ayrı membransistemine sahiptir. İç membran; sıkı bir şekilde katlanmış, geniş bir yapıya sahip olup üzerinde çıkıntı şeklinde "krista" denilen yapılar yer almaktadır (Şekil 1). Bu yapılar ilk kez elektron mikroskopisi ve elektron tomografisi ile görüntülenmiş olup membrana paralel düzenlenmiş kıvrımlar şeklindedirler. İki membran arasında kalan alana membranlar arası boşluk ve iç membranın çevrelediği yoğun sıvıya matriks denir. Dış membran oldukça geçirgen olup 10 kDa'dan küçük molekülleri ve iyonları porin denilen transmembran protein kanallar sayesinde geçirebilmektedir. Bunun tam tersi olarak iç membran sadece spesifik protein taşıyıcıları vasıtasıyla ADP ve uzun zincirli yağ asitleri gibi moleküllere karşı geçirgendir. Bunun yanısıra iç membran, kardiyolipin ve fosfoglisericit içererek membranın geçirgenliğini iyice azaltmaktadır.



Şekil 1. Mitokondrinin Elektron Mikroskop Görüntüsü (8)

Mitokondri iç membranı, oksidatif fosforilasyon ile ilgili enzimleri barındırdığından, mitokondriler “hücrelerin enerji ocakları” olarak tasvir edilmektedirler. Kristalların sayısı ve morfolojisi hücrenin enerji ihtiyacına göre düzenlenmektedir. Sıkı bir şekilde katlanmış olan kristal lamelleri kas ve nöronlarda olduğu gibi geniş bir yüzeyi de kaplayabilmektedirler (9). Elektron mikroskop analizlerinde, mitokondri iç membranı ve dış membranın temas ettiği “benekli bölgeler” olduğu belirlenmiştir. Son verilere göre bu bölgeler, proteinlerin transportunda önemli rol oynayabileceği düşünülmektedir (10).

Sitrik asit döngüsü ve yağ asidi oksidasyonu ile ilgili reaksiyonların çoğu matriks içerisinde gerçekleşirken bunun yanısıra, mitokondriyal genom (mtDNA), mitokondriyal ribozomlar ve mitokondriyal gen ekspresyonu için gerekli enzimler burada yer almaktadır.

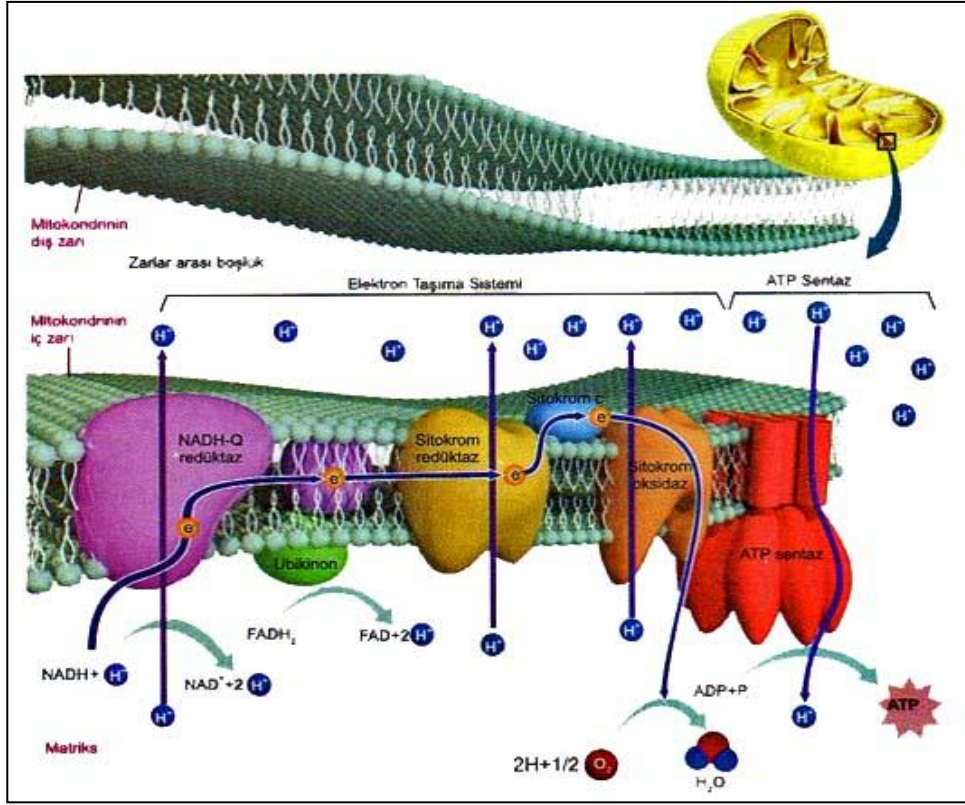
Mitokondrilerin hücrelerde dağılımlarının rastgele olmayıp enerji gereksinimlerini en kısa zamanda karşılayabilecek şekilde pozisyon aldıkları kabul edilmektedir. Bunun yanısıra mitokondriler dinamik organellerdir ve sadece hücredeki pozisyonları değil aynı zamanda füzyon ve fizyon reaksiyonları ile sayıları, şekilleri ve büyüklükleri değişebilmektedir (9).

#### **4.1.2. Oksidatif Fosforilasyon**

Oksidatif fosforilasyon, aerobik organizmalar için mitokondri iç membranında cereyan eden bir dizi enzimatik reaksiyon sonucunda ATP üretilen, hücrenin temel enerji kaynağıdır. Elektronların NADH veya  $FADH_2$  den koparılarak oksijene iletilmesi sırasında gerçekleşen bir dizi reaksiyon sonucunda ATP üretilir.

Glikoliz, yağ asidi oksidasyonu ve sitrik asit döngüsü sonucunda üretilen NADH ve  $FADH_2$  yüksek transfer enerjisi içeren bir çift elektron taşıdıklarından dolayı yüksek enerjili moleküllerdir. Bu moleküller, elektronlarını moleküler oksijene verdiklerinde ATP üretiminde kullanılacak olan serbest enerji salınır. NADH'nin oksidasyonundan 2.5ATP,  $FADH_2$ 'nin oksidasyonundan ise 1.5 ATP enerji üretimi gerçekleşir (11).

Elektronlar, NADH veya FAD-bağlı dehidrogenazlardan oksijene KoQ ve sitokrom c denilen iki mobil taşıyıcılar vasıtasıyla iletilir (Şekil2).



Şekil 2. Solunum Zincirinin Şematik Görünümü (12)

NADH'nin iki elektronu solunum zincirine kompleks I, NADH-koenzim Q redüktaz (NADH dehidrogenaz) aracılığı ile girer. Flavin mononükleotit (FMN) denilen prostetik grubu, elektronların kompleks I'deki ilk alıcılarıdır. Elektronları alarak FMNH<sub>2</sub>'ye indirgenirler. Elektronlar burdan bir seri demir-kükürt (Fe-S) merkezine iletilerek koenzim Q'ya aktarılırlar. Koenzim Q diğer adıyla, Ubikinon molekülü (UQ), ilk elektronu aldıktan sonra semikinon ara ürününe indirgenir. Semikinonun bir elektron alıp indirgenmesiyle ise ubikinonun indirgenmiş formu olan ubikinol oluşur.

Ubikinon, aynı zamanda FADH<sub>2</sub>'den gelen elektronlarında ilk alıcısıdır. Sitrik asit çemberinde oluşan FADH<sub>2</sub>, süksinatın fumarata dönüşmesi sırasında kompleks II'den, ayrılmaz. Elektronlarını Fe-S merkezlerine iletir ve sonrasında elektronlar koenzim Q'ya verilerek solunum zincirine girmiş olur.

Ubikinol (QH<sub>2</sub>), elektronlarını bir hem grubu içeren suda çözünür bir protein olan kompleks III'e, aktarır. Hem grubu, demir atomu indirgenmiş Fe<sup>2+</sup> ile okside olmuş Fe<sup>3+</sup> formu arasında elektron transportu boyunca değişir. Dördüncü olarak elektronlar

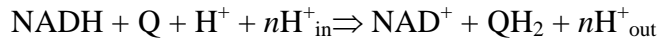
kompleks IV'e iletilir ve son elektron alıcısı olan bu kompleks moleküler oksijenin suya indirgenmesini katalizler.

Elektron transportu sırasında kullanılabilir enerji formu ATP sentezlenmesi için kemiosmotik hipotez olarak bilinen bir çiftleşme gerçekleşir (13). Elektronlar indirgenme potansiyeline göre sıralanmış kompleksler arasında ileri doğru iletilirken kompleks I, kompleks III ve kompleks IV tarafından protonlar membranlar arası alana salınırlar. Membranlar arası alanda proton konsantrasyonunun artması sebebiyle elektrokimyasal gradient oluşur (Şekil 2). Protonların geri akışı solunum zincirinin son elemanı kompleks V tarafından gerçekleştirilirken gradient enerjisi ATP enerjisine dönüştürülür.

Elektron transportunun en önemli noktası elektron transportu boyunca elektronların eşleşerek iç mitokondriyal membran boyunca bir proton gradienti oluşmasına neden olmasıdır. Membranlar arası gradient ayrıca seçilmiş metabolitlerin iç membran boyunca geçişi içinde kullanılır.

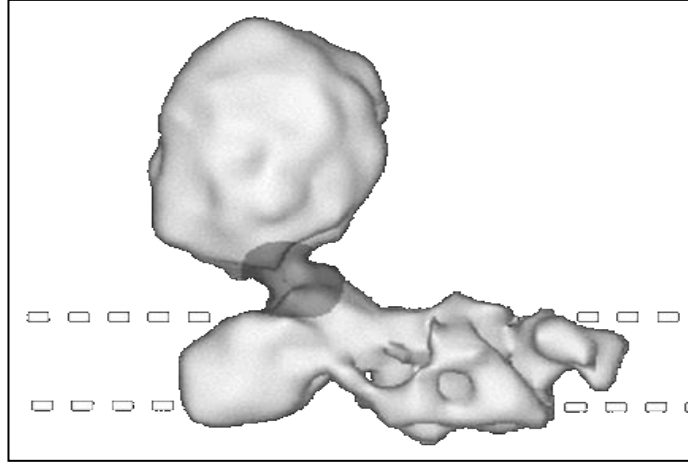
#### 4.1.2.1. Kompleks I

Kompleks I (NADH-koenzim Q redüktaz veya NADH dehidrogenaz); solunum zincirinin en karmaşık ve en az anlaşılan çoklu-altbirimli enzim kompleksidir. Kompleks I'in katalizlediği reaksiyon aşağıdadır:



$n$  sayısı matriksten membranlar arası boşluğa salınan proton sayısını gösterir. Her iki elektron transfer edildiğinde 4 proton membranlar arası boşluğa pompalanır (14, 15).

Memeli kompleks I enzimi en az 43 farklı alt birimden oluşur (16). Kompleks I, EPR spektroskopisine göre bir FMN prostetik grubu ve 6-8 arası Fe-S merkezi içerir (17,18). Bunlardan iki tanesi N-1a ve N-1b olarak adlandırılır, bunun yanı sıra, 4 tane N-2, N-3, N-4 ve N-5 olarak adlandırılan Fe-S merkezleri içerir. Kompleks I, mtDNA tarafından kodlanan 7 hidrofobik alt birim ve 34 nükleer DNA kökenli alt birim içerir (19,20). Kompleks I'in ölçülmüş moleküler kütlesi 900 kDa'dan daha büyüktür. Sığır kalp kasında, kompleks I'in yapısı, düşük çözünürlüklü elektron mikroskopisi çalışmalarıyla ortaya konulmuştur (Şekil 3).



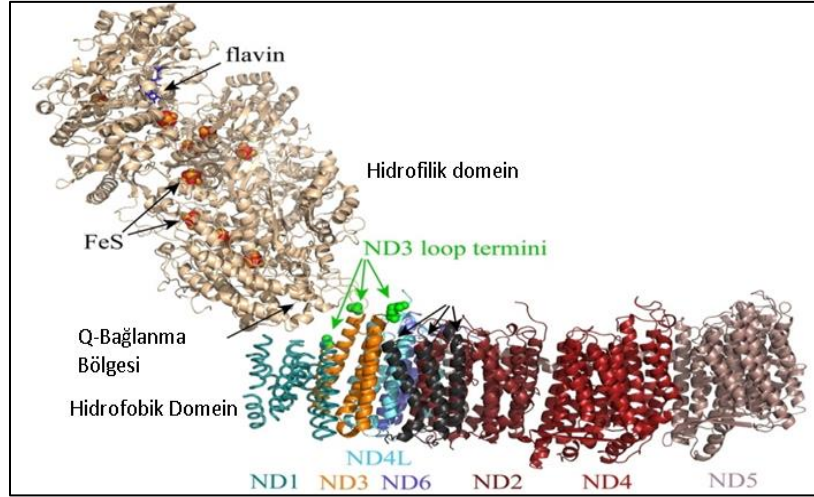
**Şekil 3.** Sığır Kalp Kası Mitokondrisinden Menşeli Kompleks I'in 3 Boyutlu Yapısı (21)

Kompleks I, uzun kolu iç mitokondriyal membrana gömülü, kısa kolu matrikse doğru uzanan “L” harfi şeklinde bir yapıya sahiptir. Membran domeininin moleküler kütlesi 370 kDa, matriks domeininin ise 520 kDa'dır. Membran domeini ile matriks domeini arasında daralan boğaz şeklindeki yapıya “stalk” denir.

Kısa kol, FMN kofaktörü ve en az 4 Fe-S merkezi içerirken fonksiyonel olarak NADH dehidrogenaz enzimi gibi çalışır. NADH substratının enzime bağlanma bölgesi enzimin matrikse bakan alt bölgesinde yer alır.

Stalk, matriks tarafında NADH bağlanma bölgesi ile membran domeinindeki ubikinon bağlanma bölgesi olarak düşünülen bölge arasında adeta bağlantı bölgesi oluşturarak elektron transportunun bir parçası olmaktadır. 30 Å çapındaki stalk, mitokondrial matriks içerisinde bulunan diğer elektron alıcılarının elektronları yakalamasını önleyerek elektron transportunun izole olması için yeterli alan sağlamaktadır.

Uzun kol, mitokondriyal iç membrana gömülüdür ve ubikinon hidrogenaz şeklinde görev yapar. Kompleks I'in uzun kolu, mtDNA tarafından kodlanan ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 ve ND6 olarak adlandırılan yedi hidrofobik alt birim içerir (22). Kompleks I'in adeta hidrofobik domeinini oluşturan bu alt birimler Şekil 4'te gösterilmiştir.



**Şekil 4.** Kompleks I ve Alt Birimleri (Robert 2012, 23)

Kompleks I'in pekçok Q-bağlanma bölgesi içerdiği ve NADH oksidasyonu süresince en az 3 farklı ubisemikinin türü ile ilişki içerisinde olduğu bilinmektedir (24,25). Ubikinon indirgenmesinin kompleks I'in hidrofobik kolunda ve hidrofobik – hidrofilik domeinlerin arayüzünde gerçekleştiği düşünülmektedir (26). Kompleks I, çift taraflı bir yapıya sahiptir. Periferal kısmı; suda çözünür ve prostetik grup içerir. Membran tarafı; elektron transportu ve proton pompalanması üzerinde bir kontrol çerçevesi oluşturur aynı zamanda kinon için bağlanma bölgesi içerir. Fe-S merkezlerinin *Em* potansiyelleri dikkate alındığında (Tablo 1), N-1a, FMN prostetik grubundan gelen elektronun ilk alıcısıdır ve elektronu N-1b, N-3, N-4, N-5 yönünde iletmektedir.

**Tablo 1.** Kompleks I Fe-S Merkezlerinin *Em* Potansiyelleri (14).

Demir-kükürt merkezleri	Tip	<i>Em</i> (mV)
N-1a	[2Fe-2S]	- 370
N-1b	[2Fe-2S]	- 250
N-2	[4Fe-4S]	- 150
N-3	[4Fe-4S]	- 250
N-4	[4Fe-4S]	- 250
N-5	[4Fe-4S]	- 260

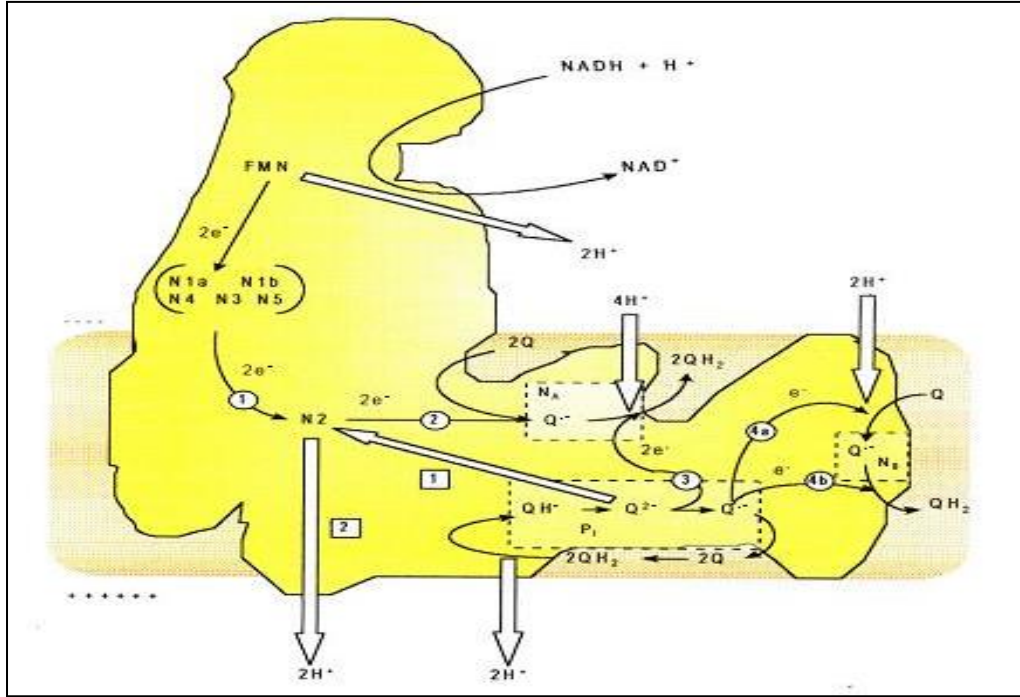
N-2, diğer Fe-S merkezleri arasında en yüksek *Em* potansiyeline sahiptir. Bundan dolayı son elektron alıcısı olarak kabul edilmektedir. Bütün bunlar göz önüne

alındığında N-2, büyük ihtimalle ubikinon ile temas edebilen tek Fe-S merkezidir. Maalesef bu çok adımlı indirgenme olayının mekanizması halen daha tam olarak bilinmemektedir. Bu konuyla ilgili çeşitli teoriler mevcut olmasına rağmen Brandt'ın "redoks kapılı ligand iletim mekanizması modeli" diğerleri arasında öne çıkmaktadır (14).

Brandt'ın modeli: N-2'nin redoks bağımlı protonasyon/deprotonasyon özelliklerini merkez alır. N-2'nin  $E_m$  potansiyelinin, pH bağımlı olduğu ile ilgili kanıtlar vardır. pH'nın 6-8.5 olduğu aralıkta  $E_m$  eğrisi  $-60$  mV/pH olarak seyretmektedir (27). Bunun anlamı okside olan türlerde deprotonasyon/protonasyon arasında minimum 150 mV birim  $E_m$  potansiyeli değişiminin  $pK_a$ 'ya 2.5 dan fazla değişim olarak yansımalarıdır. Deprotone N-2'nin  $E_m$  değeri aynı aralıktadır hatta biraz daha düşüktür. Dahası N-2 kümesi indirgenmiş durumda bir proton alma eğiliminde olmalıdır, çünkü okside olmuş türlerde deprotonasyon süresince  $pK_a$  yüksek olmalıdır. Bu N-2 kümesinin proton translokasyon makinesinin uygun bir parçası redox-Bohr grubu ile ilişkisi olduğunu düşündürmektedir.

Brandt modeline göre kompleks I, üç tane ubikinon bağlanma bölgesi içerir: P1 denilen ubikinon oksidasyon bölgesi ve  $N_A$  ve  $N_B$  denilen iki tane ubikinon indirgenme bölgesi (Şekil 5). N-2'nin indirgenmesi sırasında  $pK_a$  değeri artar ve P1 bölgesinde bir proton kanalı vasıtasıyla bir proton çıkarır. N-2 elektronlarını ubikinona verdiğinde reokside olur ve  $pK_a$  değeri protonun membranın pozitif tarafına doğru çıkmasını sağlar. P1 merkezinde ubikinolün  $pK_a$ 'sı düşer ve bu spontan deprotonasyona neden olur ve 2. protonun indirgenmiş N-2'den çıkarılmasını sağlar. Bu  $Q^{2-}$  nin oluşmasını sağlar ve bu negatif yüklü aracı molekül  $N_A$  merkezinde semikinonun ( $Q^-$ ) indirgenerek ubikinol oluşması için yeterli potansiyele sahiptir. Bunun sonucunda membranın negatif tarafından 2 proton alınır. P1 bölgesinde semikinon oluşur ve  $N_B$  bölgesinde yeni bir semikinon oluşturmak için ubikinonu indirger. Akabinde,  $N_B$  merkezinde tamamiyle ubikinole indirgenmiş olan semikinon hariç, diğer bütün seri reaksiyonlar tekrar edilir, membranın negatif tarafından diğer 2 protonun alınması sağlanır.





**Şekil 5.** Brandt'ın "Redoks Kapılı Ligand İletim Mekanizması Modeli" (14)

Bu model ayrıca FMN prostetik grubunun bir proton translokator olarak rol aldığını önerir. Bütün bu reaksiyonlar bir molekül NADH'nin oksidasyonuna neden olurken 1 molekül ubiquinon indirgenir ve sitokiyometrik olarak her 2 elektron ilerlerken membranın pozitif tarafına 4 proton salınır.

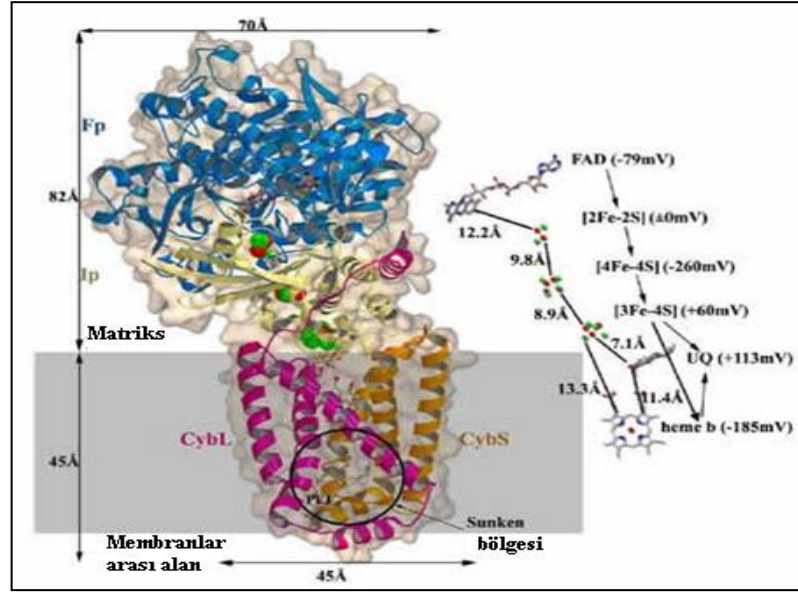
Kompleks I'in en yaygın kullanılan inhibitörü rotenondur. Rotenon demir kükürt merkezlerinden ubiquinona elektron iletilmesini engellemektedir (28).

#### 4.1.2.2. Kompleks II

Kompleks II (süksinat-koenzimQ redüktaz) de, Süksinatın fumarata oksidasyonu sırasında elektronlar bu kompleks tarafından ubiquinona iletilir. Kompleks II, Krebs devri ile solunum zincirini direkt birbirine bağlamaktadır.

Kompleks II, sadece 4 peptitten oluşur bundan dolayı solunum zincirinin en basit kompleksidir. İki geniş peptit kompleksin periferal kısmını oluştururken Krebs devrinde süksinat dehidrogenaz aktivitesi gösterir. Bu peptitler, "çapa protein" denilen iki integral protein vasıtasıyla membrane tutunurlar. Kofaktörler ve metal iyonları kompleks II'nin diğer aksesuar elemanlarıdır. Bir FAD, Fp altbiriminde 70 kDa'luk en büyük peptide kovalent bağlanır. Fp alt birimi, 27 kDa'luk üç adet non-hem Fe-S

merkezi([2Fe-2S], [3Fe-4S], ve [4Fe-4S]) içeren demir-protein alt birimi (Ip) ile çok yakından ilgilidir (29). Fe-S merkezinden çıkan elektronlar, b-tip sitokrom ve ubikinon bağlanma bölgesi içeren 2 çapa proteininden oluşan membran alt birimine verilir. Bu konuyla ilgili mevcut verilerle b-tipi sitokromun ubikinona elektron verilmesi ile nasıl bir ilişkisi olduğu henüz açıklanmış değildir. Hem b-tipi sitokrom hem de ubikinon çapa proteinlerine tutunmuşlardır (30).



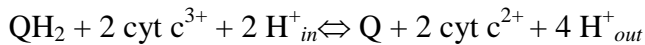
**Şekil 6.** Kompleks II (31)

FADH<sub>2</sub>'den koenzim Q'ya elektron transfer eden kompleks II ve diğer enzimler proton pompası değildirler. Çünkü serbest enerji değişimleri çok azdır. Sonuç olarak; FADH<sub>2</sub>'nin oksidasyonunda NADH oksidasyonuna oranla daha az ATP elde edilir.

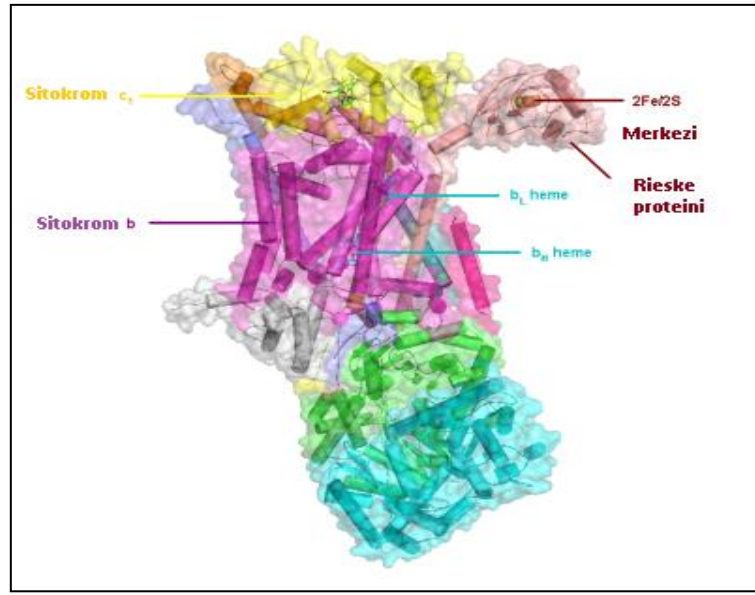
#### 4.1.2.3. Kompleks III

Kompleks III'ün (ubikinol-sitokrom c redüktaz veya bc<sub>1</sub> kompleks), fonksiyonu ubikinolden sitokrom c'ye elektron transferini katalizlemek ve aynı zamanda membranlar arası boşluğa proton pompalamaktır. Bu kompleks sitokrom b ve c<sub>1</sub> olmak üzere iki çeşit sitokrom ve "Rieske protein" denilen Fe-S proteini içerir.

Kompleks III tarafından katalizlenen reaksiyon aşağıdadır:



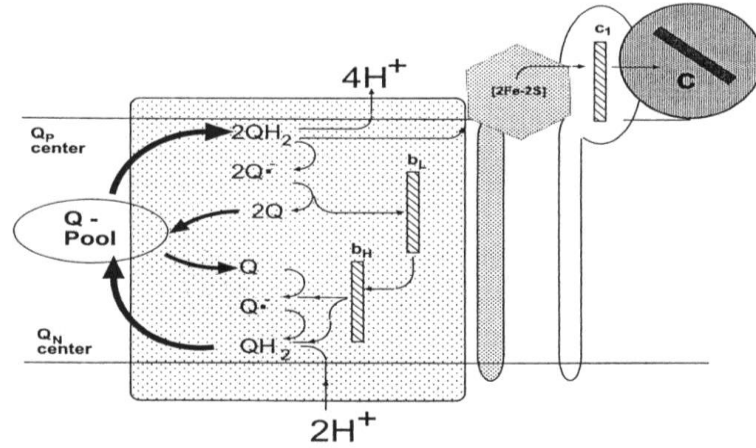
Sığır kalbinden izole edilen kompleks III, kristalizasyon çalışmalarında; mitokondriyal membrana dikey olarak bulunan ve her 13 tanesinin 8 tanesi sitokrom b'ye ait olan transmembran monomerlerinden oluşmaktadır. Yarısından fazlasının moleküler kütlesi, matriks içersinde 75 Å'a kadar olabilmektedir. Kompleks III, çekirdek proteinlerinden oluşmaktadır ve daha çok bu isim proteinlerin fonksiyonlarından ziyade yapısal durumları için söylenmiştir. Membranın dış tarafında Rieske protein, Fe-S merkezi ve sitokrom c<sub>1</sub> bulunmaktadır (Şekil 7). Kompleks III'ün boşluklu ve cepli yapısı ubikinon ve antimycin A (AA), myxothiazol gibi inhibitörler için bağlanma bölgesi içerir.



**Şekil 7.** Kompleks III'ün Yapısı (32)

Ubikinolün oksidasyonu için “Q-siklus” mekanizması ilk olarak Mitchell tarafından önerilmiş daha sonra Trumpower tarafından genişletilmiştir (33,34). İlk adımda ubikinol iki elektronundan birini Fe-S kümesine transfer eder. Sonra bu elektron sırasıyla sitokrom c<sub>1</sub> ve elektronu kompleksten dışarı çıkaracak olan sitokrom c'ye iletilir. Bu bir elektronun transferi, ubikinol'ü semikinon formuna dönüştürür. İki spesifik sitokrom b'nin hem formları sitokrom b<sub>L</sub> ve b<sub>H</sub> semikinon ile reaksiyona girer. Semikinon elektronunu sitokrom b<sub>L</sub>'ye transfer ederken sitokrom b<sub>H</sub> indirgenir. İkinci semikinon molekülü ubikinole indirgenir (Şekil 8). Bu olay, iki elektron taşıyıcısı ubikinol'ün bir elektron taşıyıcısı Fe-S kümesi ile reaksiyona girmesini sağlar.

Bu döngüde kompleks III, ubikinon için  $Q_N$  and  $Q_P$  olmak üzere 2 reaksiyon merkezine sahiptir.  $Q_N$  diğer bir adıyla kinon indirgenme merkezi, iç mitokondriyal membranın (imm) matriks tarafında yer alırken elektronların kinon havuzundan döngüsel olarak yarılanmasından ve matriksten protonların alınmasından sorumludur. Bu reaksiyon AA, funiculosin ve hydroquinoline-N-oxides inhibitörleri ile inhibe edilir.  $Q_P$  merkezi elektronları iki yolak ile kabul edilir. Bunlardan ilki geridönüşüm için yarım döngü şeklinde olup ikincisi demir-kükürt merkezi ve sitokrom  $c_1$ -sitokrom c dönüşümü için yarı transfer yoludur.  $Q_P$  merkezi, imm'nin dış yüzünde ve protonların membranlar arası boşluğa salındığı yerdedir.  $Q_P$ , 2-hydroxy-1,4-benzoquinone türevleri, musidin, stigmatellins, MOA-stilbene, myxothiazol gibi farklı maddeler tarafından inhibe edilebilir.

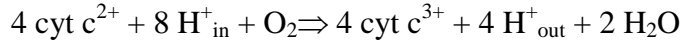


Şekil 8. Q-siklusunu ve Kompleks III'ten Elektron Akışının Şematik Gösterimi (30)

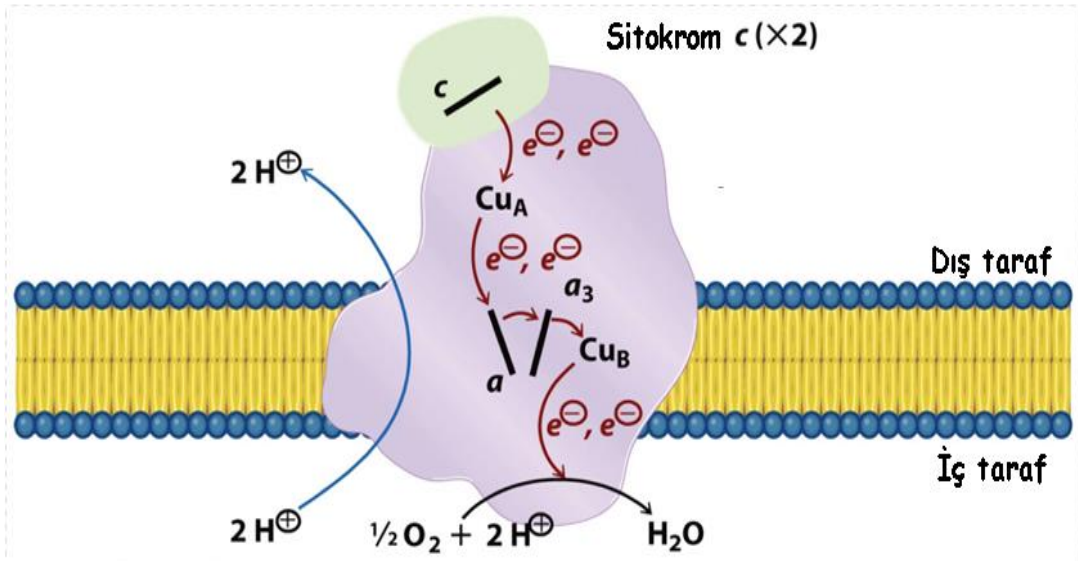
#### 4.1.2.4. Kompleks IV

Kompleks IV (sitokrom oksidaz), solunum zincirinin 2.8 Å çözünürlükle kristalize edilerek yapısı ilk belirlenen kompleksidir (35). 13 alt birimden birimden oluşan memeli kompleks IV'ü hem grubu ( $a$  ve  $a_3$ ) ve iki bakır merkezi ( $Cu_A$  ve  $Cu_B$ ) içerir (36). Alt birim I; hem  $a$  ve hem  $a_3$  prostetik gruplarını bağlar ve ayrıca  $Cu_B$  redoks merkezini oluşturur. Alt birim II,  $Cu_A$  merkezini bağlar. Alt birim III'ün proton pompalanması ve metal merkezleri vasıtasıyla elektron transportunun modülasyonu olayları ile yakından ilgili olduğu düşünülmektedir ve bundan dolayı alt birim I-III'ün, enzimin fonksiyonel çekirdeğini oluşturduğu varsayılmaktadır. Diğer alt birimlerin ise enzim kompleksinin düzenleyici fonksiyonları veya montajı ile ilgili olabileceği

düşünülmektedir. Kompleks IV, dört elektronun indirgenmiş sitokrom c ye transferini katalizleyerek moleküler oksijenin suya indirgenmesini sağlar:



Sitokrom c elektronlarını hem a'ya verir. Daha sonra elektronlar sırasıyla heme  $a_3$ - $\text{Cu}_B$  merkezine iletilir ve bu arada bir reaksiyon sonucunda  $\text{O}_2$ , iki molekül suya indirgenir.  $\text{O}_2$ , termodinamik olarak reaktiftir, fakat kinetik olarak stabildir. Bu nedenle suyun indirgenmesi reaksiyonunda bir katalizöre gerek duyar.  $\text{O}_2$ , aktive olduğunda tehlikeli hale gelir. Bunun nedeni oksijenin kısmen indirgenmesi sonucu süperoksit radikali ( $\text{O}_2^-$ ) oluşabilmesidir. Güvenli bir  $\text{O}_2$  indirgenmesi için katalizörün kısmi indirgeyiciler salgılamaması gerekmektedir. Kompleks IV gerçekte hem  $a_3$ - $\text{Cu}_B$  merkezi arasında demir ve bakır iyonlarını bağlar. Bu yolla, elektron ve proton hızlı bir şekilde kısmi olarak indirgenmiş oksijen türlerine, daha onlar salınmadan, aktarılır. Bu yolakla ilgili olası mekanizma Şekil 9' da özetlenmiştir.

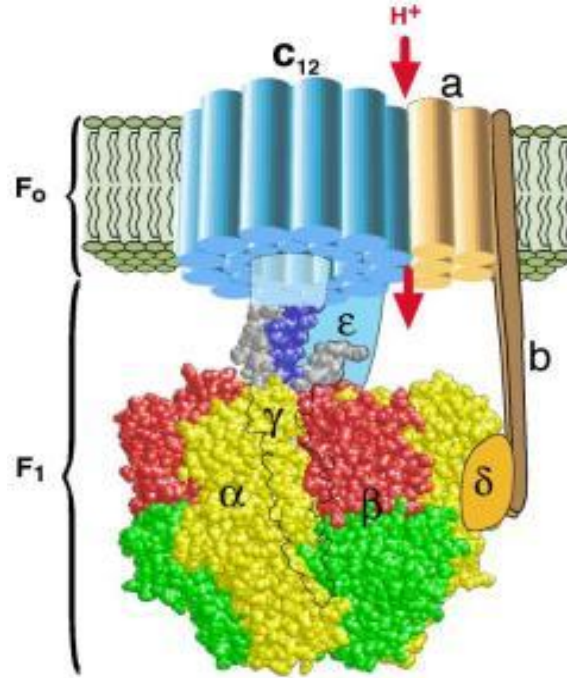


Şekil 9. Kompleks IV'ün Yapısı ve  $\text{O}_2$ 'nin Suya İndirgenmesi (37)

#### 4.1.2.5. Kompleks V

Kompleks V (ATP sentaz, ATPaz), solunum zincirinde fiziksel olarak diğer komplekslerden ayrılabilen ve proton gradient sayesinde ATP nin sentezlenmesini sağlayan enzim kompleksidir. Sığır kalp ATP sentazı, moleküler ağırlığı yaklaşık 550 kDa olan 16 proteinden oluşan çoklu altbirimli bir enzim kompleksidir (38).  $F_0$  ve  $F_1$

diye adlandırılan iki ana domeinden oluşur. F<sub>1</sub> domeini; ADP ve inorganik fosfattan ATP sentezlerken F<sub>0</sub> domeini; imm'ye gömülü bir şekilde bulunur ve bir proton kanalı içerir (Şekil 10).



**Şekil 10.** Kompleks V (39)

Sığır F<sub>0</sub> domeini, 9 farklı protein içerir. Bunlardan 3 tanesi a, b ve c diye adlandırılırken proton-translokasyonu sağlayan hidrofobik çekirdeği oluşturmaktadırlar. Altbirim a, çoklu transmembran bölgeleri içerir ve bu F<sub>1</sub> kısmının bağlanmasıyla alakalı değildir. Altbirim b, bir dimer olarak kabul edilebilir ve F<sub>0</sub>'ın dış kısmında yer almaktadır. c altbirimi ise çoklu kopyalar şeklindedir; tek bir a alt birimi ve membrana proton akışı için bir kanal oluşturan 9-12 c alt birimi içerir.

F<sub>1</sub> domeininin yapısı, ilk kez 1994 yılında 2.8 Å çözünürlükle ortaya konulmuştur (40).  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  ve  $\epsilon$ , denilen ve 3:3:1:1:1 oranında dağılım gösteren 5 farklı peptitten oluşur.  $\alpha$  ve  $\beta$  alt birimleri  $\alpha_3\beta_3$  hegzamerini oluştururlar.  $\beta$  altbirimi hariç diğerleri homologdurlar.  $\beta$  alt birimi katalitik bölge içermesiyle diğer alt birimlerden farklıdır.  $\alpha_3\beta_3$  hegzameri,  $\gamma$  ve  $\epsilon$  alt birimleri içeren bir sap kısmıyla hidrofobik F<sub>0</sub> kısmına bağlıdır. Özellikle, “stator-rotor modeline” göre c,  $\gamma$  ve  $\epsilon$  alt birimleri, merkezi bir “rotor” oluştururlar. Daha sonra bu rotor,  $\alpha_3\beta_3$  hegzameri ve  $\gamma$  ve  $\epsilon$  alt birimlerinden oluşan “stator” denilen çark yapısı içerisinde döner (41). ATPaz'ın F<sub>1</sub> domeininin dönme

hareketi,  $\gamma$  alt birimine bağılı floresans aktin filamenti ile çalışan spektaküler deneyler ile direkt olarak incelenmiştir. ATP varlığında filament saat yönünün tersi yönde dönmektedir (42). Bu moleküler motor içerisinde proton akışı, a ve c altbirimleri arasında bir tork (dönme momenti) oluşturur. Bu tork,  $\gamma$ - $\epsilon$  sapları sayesinde  $F_1$ 'e transfer edilir, ve buda ATP nin salınması için kullanılır.

Bu modelde; 3 katalitik  $\beta$  alt birimleri doğal olarak tipiktir aynı zamanda fonksiyonel olarak eşdeğer değildirler. Herhangi bir enerji girişi olmadığında  $\beta$  alt birimlerinin bir katalitik tarafı, 3. tarafı boş iken, ADP ve  $P_i$  tarafından işgal edilirler ve ikinci tarafı bir ATP tarafından tutulur.

Proton akışı aracılığıyla enerji girişi, rotasyona neden olur ve bunun sonucunda konformasyonel değişiklikler gerçekleşir. Böylece ATP bir taraftan salınırken ADP +  $P_i$  diğer tarafta tutulur, bu sayede yeni substratlar enzime giriş yapabilir.  $\beta$  alt biriminin bu 3 konformasyonel durumu: “open” (O), “loose” (L) and “tight” (T) olarak ifade edilir. Mekanizmanın özü aslında; proton gradientinin direkt olarak ATP sentezlenmesi şeklinde değilde onun enzimden salınması şeklindedir. Oligomycin, ATPaz için en yaygın kullanılan inhibitördür. Sap proteinlerinden birini bağlayarak proton gradientinin kullanılmasını engeller.

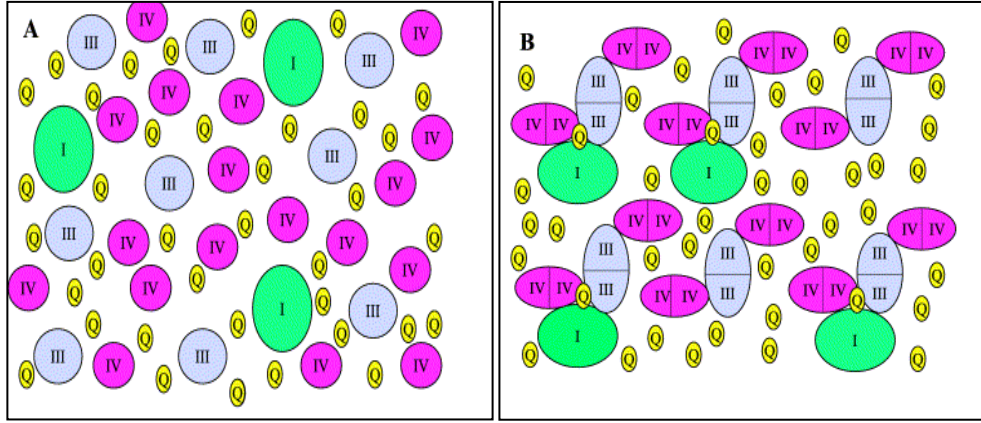
#### **4.2. Mitokondriyal Solunum Zinciri Organizasyonu**

Mitokondriyal solunum zinciri organizasyonu ile ilgili günümüze kadar iki temel model önerilmiştir. Bunlardan ilki, 1955 yılında Chance tarafından ortaya konulmuş olan “katı zar modeli”dir (Solid-State model) (43). Bu modele göre; solunum zinciri kompleksleri, daha hızlı ve etkin bir elektron transportu için mitokondriyal iç membranda sabit bir şekilde yer alan büyük protein molekülleridir. İkinci model ise Hackenbrock tarafından geliştirilen ve halen geçerli olan membran organizasyon modeli olan “sıvı zar modeli” (fluid model) diğer bir adıyla “rastgele difüzyon modeli” dir (1). Bu model çerçevesinde solunum zinciri komplekslerinin, mitokondriyal iç membranda rastgele yer aldıkları, lateral difüzyon vasıtasıyla hareket ettikleri ve kompleksler arası elektron transferinin mobil taşıyıcılar (sitokrom c ve koenzim Q) tarafından gerçekleştirildiği düşünülmektedir. Bu modele göre koenzim Q molekülleri membranda bir arada bulunarak havuz davranışı gösterirler.

Solunum zincirinin organizasyonu 1970'lerden 1980'lere kadar popüler bir araştırma konusu olmuş, bunun yanı sıra, araştırmalar rastgele difüzyon modeli üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu modelin çok taraftarları olsa da katı zar modeli hiçbir zaman terk edilmemiş ve yapılan çalışmalarla geliştirilmiştir. Mitokondriyal solunum zincirinde yer alan protein kompleksleri arasında ilişki bulunduğu "supramoleküler yapılar" ilk kez Hatefi tarafından membran yeniden yapılandırma çalışmaları ile dile getirilmiştir (44). 1987 yılında Ozawatarafından bu kavram geliştirilerek, komplekslerin supramoleküler yapılar içerisinde birleştiği söylenmiştir (45).

2000 yılına gelindiğinde çoklu protein komplekslerinin ayrılmadan birlikte göç etmesine imkan sağlayan Blue Native Jel Elektroforezi (BN-PAGE) yönteminden avantaj sağlayan Schägger, solunum zinciri komplekslerinin, imm'de supramoleküler yapılar şeklinde bulunduğunu, memeli ve mayalarda göstermiştir. Bu supramoleküler yapılar "süperkompleks" (SK) olarak adlandırılmıştır (2). Süperkompleksler; birden fazla kompleksin aktif bölgelerinin etkileşerek bir araya geldiği büyük stabil protein kompleksleridir. Süperkompleksler adeta bir kanal oluşturarak solunum için gerekli olan subsratların ve ara elemanların protein çevreden ayrılmadan, hızlı ve etkin bir şekilde bir taraftan diğer tarafa iletilmesini sağlarlar. BN-PAGE ile solunum zinciri komplekslerinden kompleks I monomeri, kompleks III dimerive dört kompleks IV monomerinin birlikte göç ettiği süperkompleks  $I_1III_2IV_4$  çoklu protein kompleksleri tespit edilmiştir (Şekil 11). Solunum zinciri komplekslerinin birbirine adeta montaj olarak oluşturdukları bu yapıya, "respirazom" da denilmektedir. Süperkompleks yapılarında kompleksler arasındaki etkileşimler rastgele olmaz ve adeta bir subsrat kanalı olarak çalışır. Bundan dolayı koenzim Q molekülü komplekslere bağlı şekilde bulunduğu varsayılır.





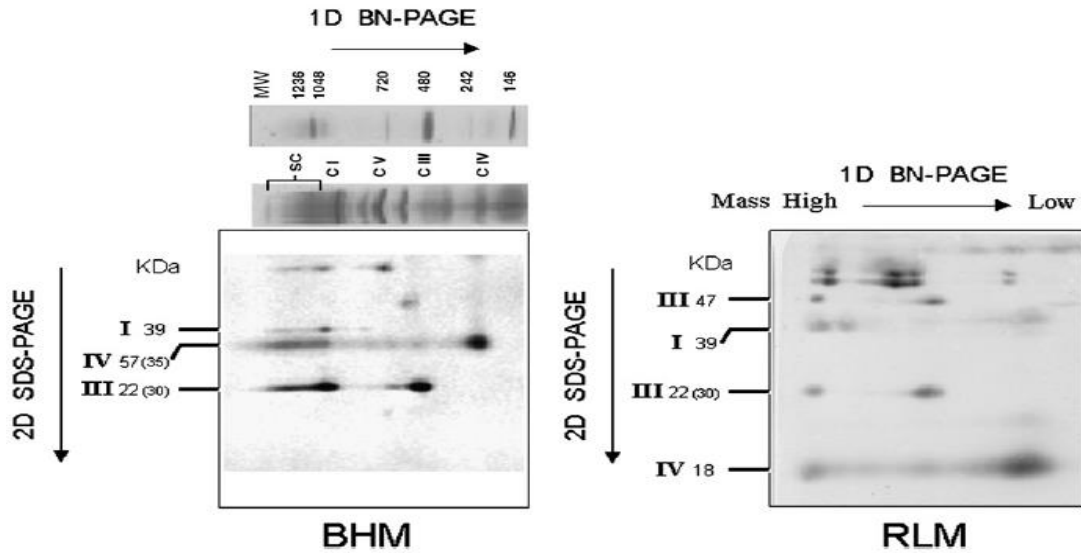
**Şekil 11.** Solunum Zinciri Membran Organizasyonu İçin Önerilen İki Modelin Şematik Olarak Gösterimi (46) **A)** Rastgele Difüzyon Modeli **B)** Respirazom Modeli

### 4.3. Süperkompleks Organizasyonuna Dair Kanıtlar

Süperkomplekslere ait ilk veriler Chance ve Williams'ın yaptıkları çalışmalarla solunum zincirini protein matriks içerisinde flavinler ve sitokromların bir arada bulunduğu sabit yapılar şeklinde tespit etmelerine kadar dayanmaktadır. Süperkomplekslere dair dolaylı kanıtlar; kompleks I-III ve kompleks II-III birimlerinin belirlendiği öncül çalışmalardan gelmiş ve protein komplekslerinin, doğal membranda rastgele olmayan tercihi birleşmelerle bir arada buldukları düşünülmüştür (47,48). Bununla birlikte o yıllarda bu konu araştırmacıların fazla ilgisini çekmemiştir. 1980'li yıllarda süperkompleks III-IV, Ozawa ve Hotchman tarafından bazı bakteri türlerinde izole edilmiş böylece süperkompleks varlığı dolaylı olarak desteklenmiştir (45,47).

Son yıllarda memeli ve mayalarda yumuşak deterjanlar varlığında membran protein komplekslerinin ayrılmadan izole edilmesine olanak sağlayan BN-PAGE yöntemi sayesinde, çoklu protein kompleksleri kantitatif olarak gösterilebilmiştir (49,50,51). BN-PAGE yöntemiyle *Saccharomyces cerevisiae* türünde izole edilen süperkompleks III-IV'te 750kDa ve 1,000kDa büyüklüğünde kompleks III ve kompleks IV altbirimleri belirlenmiştir (2). En küçük süperkompleks ( $III_2IV_1$ ), dimer halinde kompleks III ve monomer halinde kompleks IV içerirken en büyük süperkompleks ( $III_2IV_2$ ), kompleks III dimeri ve iki adet kompleks IV monomeri içerir. Kompleksler arası benzer etkileşimler sığır kalp mitokondrilerinde incelenmiş; toplam kompleks I'in %17 oranında süperkompleks  $I_1III_2$  yapısı içerisinde yer aldığı, bunun yanı sıra, süperkompleks  $I_1III_2IV_1$  ve  $I_1III_2IV_2$  yapısında sırasıyla %54 ve %9 oranında bulunduğu

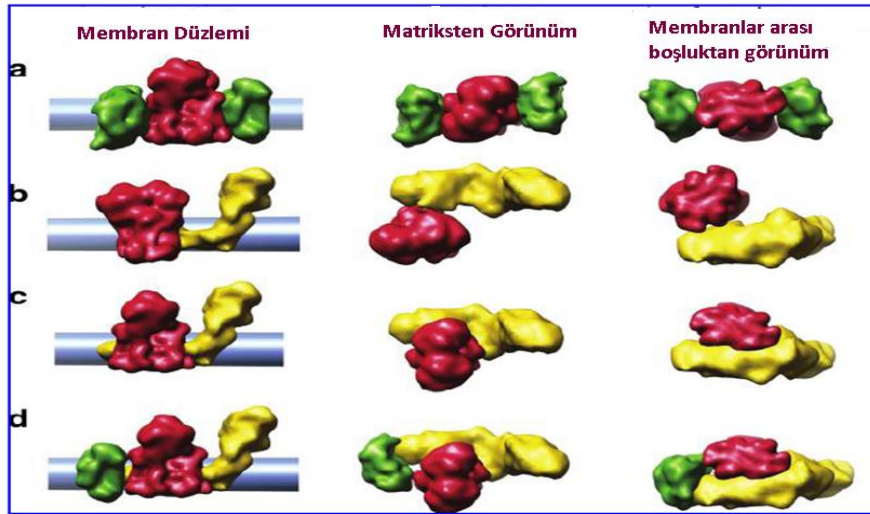
tespit edilmiştir. Sadece %14-16 oranında kompleks I'in hiçbir süperkompleks yapısına katılmadan serbest halde bulunduğu belirlenmiştir (51). Böylece, fizyolojik koşullarda nerdeyse tüm kompleks I'lerin kompleks III'e bağlı bir şekilde bulunduğu belirlenmiştir. Kompleks III'ün kompleks I'e oranla fazla miktarda bulunmasından dolayı total kompleks III'ün üçte birinin serbest halde bulunduğu söylenebilmektedir. Kompleks IV'ün ise %85 oranında hiçbir komplekse bağlı olmadan serbest halde bulunduğu gösterilmiştir. BN-PAGE ile yapılan çalışmalarda sadece fare karaciğer mitokondrilerinde kompleks II'nin diğer komplekslerle bazı varsayımsal ilişkilerinin olduğu gösterilmiştir (52). *Podospora anserina* mantarının wild-tiplerinde süperkompleks  $I_1III_2IV_1$  varlığı, aşırı derecede alternatif oksidaz (AOX) eksprese eden tiplerinde ise süperkompleks  $I_2III_2$  varlığı keşfedilmiştir (53). İlginç olarak bu mutant tiplerde süperkompleks  $I_2III_2$ 'te kompleks I'den çıkan elektronlar direkt olarak KoQ havuzuna salınır ve oradanda AOX'e iletilir. Bundan dolayı kompleks III'ün kinetik olarak inaktif olduğu ve sadece kompleks I'in stabil olmasını sağladığı şeklinde yorumlanmıştır (53). İki farklı menşeyli mitokondrilerle yapılan 2 boyutlu-BN-PAGE yöntemiyle süperkompleksler Şekil 12'de gösterilmiştir.



**Şekil 12.** Sığır Kalp (**BovineHeartMit.**) Mitokondrisinde ve Sıçan Karaciğer (**RatLiverMit.**) Mitokondrisinde Süperkompleks  $I_1III_2IV_1$ 'ün 2D BN/SDS-PAGE ile Gösterimi (54)

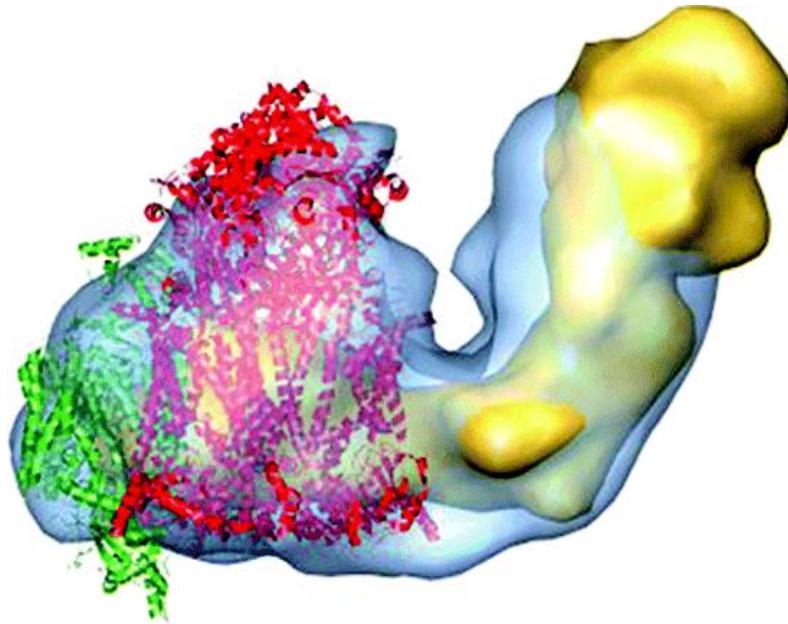
### 4.3.1. Yapısal Kanıtlar

Bitki ve memeli mitokondrilerinden izole edilen süperkomplekslerin üç-boyutlu yapıları; bilinen kompleks I ve kompleks III elektron mikroskopik (EM) ve x-ışını yapıları ile süperkomplekslerin 2D projeksiyon karşılaştırmaları ve bunların EM ve tek partikül imaj çalışmaları ile değerlendirilmeleri sonucu ortaya konulmuştur (55,56). Arabidopsis bitkisinde iki solunum kompleksi arasında membran düzleminde spesifik oryantasyon gözlenmiştir. Bunun aksine, bu bitkinin matriks içersinde bulunan protein domeinleri yakınındaki diğer proteinlerle muhtemelen güçlü olmayan etkileşimler kurduğu gözlenmiştir (55). Komplekslerin pozisyonları ve oryantasyonları daha detaylı olarak süperkompleks ( $I_1III_2IV_1$ ) içeren sığır mitokondrilerinde incelenmiştir. Schäfer ve arkadaşları, kompleks III ve kompleks IV'ün her ikisinde kompleks I'in membran koluyla temas kurduklarını ve kompleks IV'ün konkav yüzünün (x-ışınına göre dimer ara yüzü) süperkompleksin geri kalan kısmı ile bağlantılı olduğunu göstermişlerdir (57). Bunun aksine maya ve patatesteki kompleks IV monomeri kompleks  $III_2$ 'ün konveks tarafı ile bağlantılıdır (58,59). Farklı kaynaklardan esinlenerek yapılmış solunum zinciri süperkompleks modelleri Şekil 13'te gösterilmiştir.



**Şekil 13.** Solunum Zinciri Süperkompleks Modelleri (kompleks III-kırmızı, Kompleks I-Sarı ve Kompleks IV-yeşil Renkleriyle Gösterilmiştir) (a) *Saccharomyces cerevisiae* SK  $III_2IV_2$  (58) (b) *Arabidopsis thaliana* SK  $I_1III_2$  (55) (c) *Bos taurus* SK  $I_1III_2$  (57) (d) *B. taurus* SK  $I_1III_2IV_1$  (57)

3D haritalama yöntemiyle yapılan yapısal analizlerde, komplekslerin her biri için olası mobil taşıyıcı bağlanma bölgelerinin, daha etkili elektron transportu için substratlara en kısa difüzyon mesafesi olacak şekilde yer aldığı gösterilmiştir (Şekil 14) (57). İlginç olarak *S. cerevisiae* türünün SK III<sub>2</sub>IV<sub>2</sub>'nin karakteristik özelliklerinin analizinde kompleks III'ün membranlar arası alana bakan yüzünde sitokrom c ile bağlantılı olduğu EM değerlendirmelerinde keşfedilmiştir (58). Sistematik kimyasal çalışmalar süperkomplekslerin alt birimlerinin kontakt bölgelerini ve süperkompleksin 3 boyutlu yapısı için gerekli olan protein-protein etkileşimlerini incelemeyi amaçlamaktadır. Sığır kalp mitokondrisi ile yapılan öncül çalışmalarda kompleks IV'ü kompleks III'ten bağımsız olarak izole etmenin ve sitokrom c'yi kompleks IV'ten ayırmanın mümkün olmadığını göstermişlerdir (60). Kompleks I ve onun olası partnerleri ile ilgili bu çeşit bir çalışma henüz yapılmamıştır. Bununla birlikte, maya ve bitki süperkomplekslerinin TIM23 protein translokaz ve ATP taşıyıcısı, motor ( PAM makinesi gibi), bazı COX aksesuar proteinleri ile bağlantılı olan karbonik anhidraz alt birimleri gibi bazı moleküllerle ilişkili olduğu belirlenmiştir.

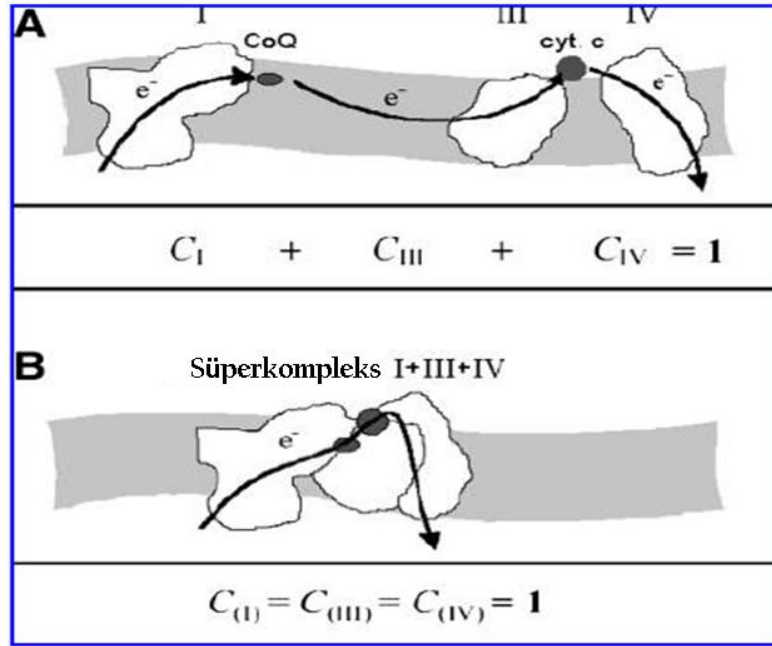


**Şekil 14.** Sığır Kalp Mitokondrisi, SKI<sub>1</sub>III<sub>2</sub>IV<sub>1</sub>'ün , 3D Yapısal Gösterimi (57)

#### **4.3.2. Kinetik Kanıtlar**

Bu konuyla ilgili yapılan çalışmalar daha çok metabolik akış-kontrol (MAK) (Metabolic Flux-control, MAC) çalışmaları yönünde yoğunlaşarak süperkomplekslerin

substrat kanalı olması ile ilgili kanıtlar aranmıştır. Metabolik akış-kontrol çalışmaları; birden fazla enzimin görev aldığı sistemlerin veya metabolik yolların kontrolünün kantitatif olarak ölçülebilmesini sağlayan bir analizdir. 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. Bunun yanı sıra sistem bir aşamada inhibe edildiğinde metabolik akışın tamamiyle durması gerekmektedir. İki alternatif membran modeli; rastgele difüzyon modeli ve Süperkompleks modellerinin MAK analizi açısından beklenen sonuçları Şekil 15'te tasvir edilmiştir.

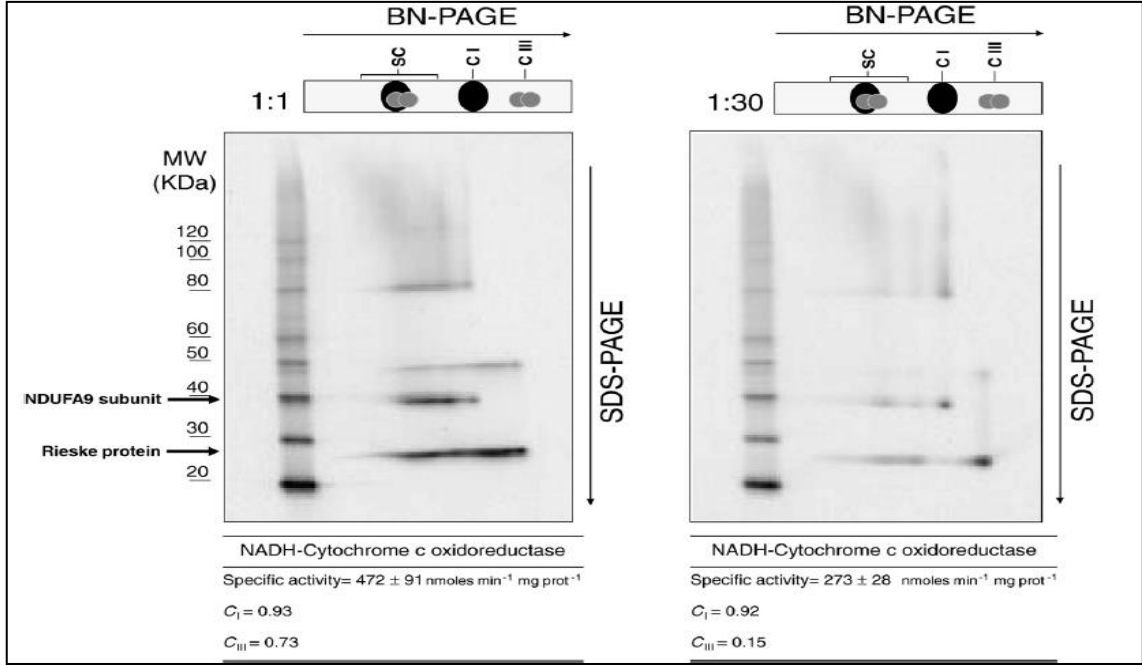


**Şekil 15.** Rastgele difüzyon modeli ve Süperkompleks Modellerinde, NADH bağımlı MAK Analiz Gösterimi (61).

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 (62). Elde edilen MAK değerleri, kompleks I ve III'ün her ikisinde, NADH oksidasyonu üzerinde yüksek oranda kontrol gücü olduğunu (CI=1.1;CIII=1.0) ve her iki kompleks arasında güçlü bir ilişki olduğunu doğrulamaktadır. Bunun aksine kompleks IV'ün rastgele dağıldığı (CIV=0.3) tespit edilmiştir. Bunun nedeni olarak; kompleks IV'ün birleşmemiş formlarda çok fazla oranda bulunmasından dolayı deteksiyondan kaçmış olabileceği 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 içersinde birleştiği gözlenmiştir (63). 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 (63). 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.

Süperkompleksler adeta substrat kanalı gibi çalışarak daha hızlı ve etkin bir elektron iletimi sağlarlar. Bu hipotezin doğruluğunu araştırmak için proteolipozom modellerinden faydalanılarak süperkomplekslerin, elektron transfer hızı araştırılmıştır. Yapılan in-vitro denemelerde membranda protein oranı arttığında proteinlerin bir araya gelme eğiliminde olduğu belirlenmiştir. Proteolipozom modelleriyle, bu özellikten avantaj elde edilerek lipozomların protein: lipid oranlarını değiştirmek koşuluyla süperkompleksler oluşturulmasına imkan sağlamaktadır. Proteolipozomlarda kompleks I ve III'ce zengin mitokondri sığır kalp mitokondri R4B'leri kullanılmıştır. Yapılan çalışmada protein:lipid oranı 1:1 olduğunda süperkompleks olduğu lipid oranı arttığında ise komplekslerin ayrıştığı gösterilmiştir (Şekil 16). Proteolipozom modellerinde yapılan çalışmada süperkompleks varlığında NADH-sitokrom c oksidoredüktaz aktivitesinin süperkompleks ayrıştırdığına oranla yaklaşık 2 kat daha hızlı olduğu gösterilmiştir (61).



**Şekil 16.** Proteolipozom Modellerinde, SK I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>'ün 2D BN/SDS-PAGE İle Gösterimi. Sağ Tarafda Protein:Lipid Oranı 1:1 (SK I<sub>1</sub>III<sub>2</sub> Varlığında), Sol Tarafda Protein:Lipid Oranı 1:30 (SK Ayrıştığında) Olan Proteolipozomların NADH-Sitokrom c Oksido Redüktaz Aktiviteleri Gösterilmektedir (61)

#### 4.4. Solunum Zinciri Mobil Taşıyıcıları

##### 4.4.1. Sitokrom c

Sitokrom c solunum zincirinde görev alan mobil taşıyıcılardan biridir. İmm'nin dış tarafında lokalize olup görevi, kompleks III'ten elektron almaktır. Sitokrom c küresel şekilli bir protein olup çapı 34 Å'dur. Hem grubuna kovalent olarak bağlı olan tek bir polipeptit zincirinden oluşur. Demir atomu, metiyonin rezidüsünün kükürt atomuna ve histidin rezidüsünün azot atomuna bağlıdır. Hem grubunun çevresi çok sıkışık hidrofobik yan zincirlerle çevrelenmiştir ve bu çevrenin hidrofobik karakteri, sulu ortam içerisinde bulunan hem-kompleksine oranla sitokrom c'nin indirgenme potansiyelini daha pozitif yapmaktadır.

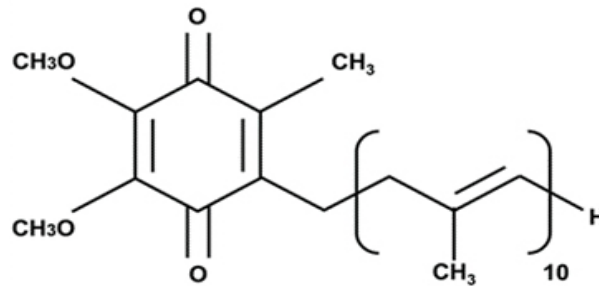
Proteinin yüzeyindeki pozitif yüklü rezidülerin dağılımı, negatif yüklü olan sitokrom c redüktazın ve oksidazın (kompleks III ve IV) tanınması ve bağlanması için çok önemlidir. Pek çok lizin ve arjinin rezidüleri sabit olarak molekülün yüzeyinde pozitif yüklü demetler şeklinde kümelenmişlerdir. Bu demetlerden birisi kompleks III

ile diğeri, kompleks IV ile ilişkilidir. Her rastgele çarpışma üretken bir karşılaşma olmalıdır; çünkü elektrostatik kuvvetler pozitif ve negatif yüklü grupları doğru pozisyonda bir araya getirmeye çalışırlar. Maalesef bazı çalışmalarda sitokrom c nin kompleks III ve IV ile etkin bir şekilde karşılaşma oranının oldukça düşük olduğunu göstermektedir.

Sitokrom c'nin hem grubunun kenarlarından birisi direkt elektron transferi için kullanılır. Bu nedenle kompleks III den IV'e sitokrom c aracılığı ile elektron iletilen yolak büyük ihtimal ile 2 farklı proteinde 2 hem grubu arasında bir elektron transferi ile alakalıdır (kompleks III ten sitokrom<sub>c1</sub>- sitokrom c ve sitokrom c- hem a).

#### 4.5. Koenzim Q

Doğal Koenzim Q, 2,3-dimetoksi-5-metil-6-poliprenil-1,4-benzokinon molekülü olup poliprenillenmiş yan zinciri türlere göre 6-10 arasında değişmektedir (Şekil 17). Memelilerde KoQ<sub>9</sub> ve KoQ<sub>10</sub> molekülleri bulunmakla birlikte KoQ<sub>9</sub>, sadece kemirgen memelilerde bulunmaktadır. Çok az sayıda ökaryotlar (Tetrahymena, Euglena) KoQ<sub>8</sub> içermekte; bu molekülün homologları ise E.coli gibi bakterilerde bulunmaktadır (64). Bitki mitokondrilerinde, memelilere benzer olarak sadece KoQ<sub>9</sub> ve KoQ<sub>10</sub> bulunmaktadır. *Saccharomyces cerevisiae* türünde sadece bu türe özgü olarak KoQ<sub>6</sub> bulunur. Parazit mitokondrisinde diğer hayvanlarda olmayan redoks-aktif kinonlar bulunur. Kompleks II tarafından katalizlenen süksinatın oksidasyonuna ters olarak fumaratın süksinata indirgenmesi bir çeşit oksijensiz ortama adaptasyon şeklinde yorumlanır. Ökaryotlarda iki farklı enzim içeren menakinon ve ubikinon olmak üzere iki farklı kinon bulunur. Bu moleküller, fumarat redüktaz ve süksinat KoQ redüktaz olarak çalışırlar (65).



Şekil 17. Koenzim Q Molekülünün Kimyasal Yapısı



KoQ'nun organik yapısı pentan ekstraksiyon ve yeniden yapılandırma aşamalarından sonra sığır kalbinde araştırılmıştır. KoQ'nun homolog spesifikliğı, 6. pozisyondaki izopren birim sayısına bağılıdır ve bu kompleks I'in aktif cebindeki kinon halkasının indirgenmesi için kritik öneme sahiptir (66). KoQ, aşırı hidrofobikliğı nedeniyle doğal olarak 3 fiziksel formda bulunabilir: miçel agregatları şeklinde, çift katlı lipid membranda çözülmüş halde ve proteinlere bağlanmış halde. KoQ'nun son fiziksel hali, hücresele olmayan sistemlerde çalışmak için önemlidir bununla birlikte canlı organizmalarda diğere iki formda bulunur (67).

Uzun zamandır KoQ molekülünün şeklinin lineer olduğı ve sınırlı dönme kabiliyetiyle uzun izoprenid kuyruğunu döndürebildiğı kabul edilmektedir. KoQ'nun çift tabakalı lipid membranın orta düzleminde yer alması, polar baş kısmının tamamen lineer pozisyundayken 3. İzopren birimi ve maksimum 90 derece dönebilen fosfolipidlerin polar baş kısımları arasında ileri geri şekilde hareket halinde olduğı lineer dikroizm çalışmalarıyla gösterilmiştir (68). Bunun aksine, bilgisayar simülasyon çalışmaları ile katlanmış olan en düşük enerjili formunda polar baş grubun hidrofobik kuyruğun son izoprenid birimi ile sıkı bir şekilde bağlantılı olduğı gösterilmiştir (67). Katlanma 4. izoprenid birimin ayrılması ile gerçekleşir. KoQ'nun katlanmış formunun önemli etkileri vardır. Öncelikle uzun kinon molekülleri bu sayede kısa moleküller ile aynı oranda yüksek lateral difüzyon hızına sahip olacaktır. Bunu yanı sıra elektron transferi sırasında protein bağlanması için katlanmamış, yüksek enerjili ve yavaş hareket yeteneğine sahip olması gerektiğinden avantaj elde edilecektir (67,69). Yüksek hidrofobiklik, kinon moleküllerinin partitasyon katsayıları ile ilişkilidir ve sadece KoQ<sub>1</sub>,pentil-ubikinon(PB), desil-ubikinon(DB) gibi çok kısa kinonlar kompleks I çalışmalarında kullanılabilirler.

#### **4.5.1. Koenzim Q Havuz Davranışı**

KoQ'nun elektron taşıyıcısı olarak görev yaptığı ilk kez Green tarafından keşfedilmiştir (70). Green solunum zincirinde yer alan komplekslerin izolasyonu sırasında, kinon moleküllerini komplekslerin prostetik grupları için yüksek konsantrasyonlarda bulunan substrat olarak tanımlanmıştır. Bu keşif, Kröger ve Klingenberg'in kinetik analizleriyle desteklenmiştir (71). Kröger ve Klingenberg, sığır kalbinden izole ettikleri submitokondriyal partiküllerde iki enzim sistemli basit bir

model önermişlerdir. Birinci enzim ubikinonun indirgenmesini sağlarken diğer enzim ubikinolün oksidasyonuna neden olmaktadır. Eğer kinonun ve kinol türlerinin difüzyonu KoQ'nun kimyasal olarak indirgenmesi ve okside olmasından çok daha hızlıysa kinon molekülleri kinetik olarak homojen havuz davranışı gösterirler. Bu varsayım doğrultusunda solunum zinciri kararlı halde iken elektron transferi boyunca, gözlenen genel akış ( $V_{obs}$ ) ile kinon'un redoks durumu ve kısmen indirgenmiş ( $Q_{red}$ ) veya yükseltgenmiş ( $Q_{ox}$ ) olup olmadığı tespit edilmiştir. Bu amaçla geliştirilen denklem aşağıda gösterilmiştir:

$$V_{obs} = V_{ox} ( Q_{red} / Q_t ) = V_{red} ( Q_{ox} / Q_t )$$

$V_{ox}$  ubikinolün ( $CoQH_2$ ) oksidasyon oranını gösterirken;  $V_{red}$ , KoQ'nun indirgenme oranını gösterir ve  $Q_t$  total KoQ (indirgenmiş + yükseltgenmiş) miktarını gösterir. Bu denklemin manipüle edilmesiyle havuz eşitliği (pool equation) oluşur:

$$V_{obs} = ( V_{red} \cdot V_{ox} ) / ( V_{red} + V_{ox} )$$

Elektron akışı ve KoQ'nun indirgenme ( $V_{red}$ ) veya  $CoQH_2$  yükseltgenme ( $V_{ox}$ ) oranları üzerindeki hiperbolik ilişkisi, pek çok farklı sistem üzerinde denenmiştir. KoQ moleküllerinin mobil olma, lateral difüze olarak havuz oluşturma şeklindeki havuz davranışı kavramı, kinetik gözlemlerin doğal bir sonucu olarak ortaya çıkmıştır. Bu kavram, daha sonra yapılan inhibitör titrasyon çalışmaları ile geliştirilmiştir (72). Havuz davranışı modeli, entegre oksidasyon oranı ve inhibitör konsantrasyonu arasındaki konveks hiperbolik ilişki ile yeniden karakterize edilmiştir.

Çalışmaların büyük bir kısmı, süksinat oksidasyonu üzerinde yapılmış ve KoQ moleküllerinin havuz davranışı gösterdiği pek çok farklı mitokondriyal sistemde ispat edilmiştir. Bunun yanı sıra Bouman adlı araştırmacının mayalarda yaptığı çalışmada; süksinatın AA ile inhibisyonunda doğrusal bir ilişki göstermiş ve böylece süksinatın havuz davranışı göstermediğini ispat etmiştir (73). Bunun yanı sıra NADH oksidasyonu ile ilgili çok az veri olduğu için kesin bir şey söylemek zordur (71,74,75).

KoQ- havuz davranışı sadece yeniden yapılandırılmış sistemlerde veya şişirilerek membran bütünlüğü bozulmuş mitokondrilerde veya dondurma-çözme işlemine maruz kalmış veya sonike edilmiş mitokondrilerde çalışılmıştır (76-79). Bu nedenle, membran

bütünlüğünün bozulmasının, iç-dış membran temaslarını ve integral proteinlerin sabit kümeler oluşturmasını engellediği düşünülmektedir (80,81).

#### **4.5.2. Koenzim Q Havuz Davranışından Sapmalar**

Koenzim Q havuz davranışı ilk ortaya atıldığı andan itibaren havuz davranışından çeşitli sapmalar fark edilmiş ve araştırılmıştır. Tezin konusuyla direkt olarak ilişki kurulması açısından havuz davranışından sapmalar, süperkompleksler açısından irdelenecektir (3).

Aslında havuz eşitliği, süperkompleksleri oluşturan komplekslerin birleşme/ayrışma hızlarının, komplekslerden KoQ'ya elektron iletiminden daha hızlı olsaydı geçerli olabileceği varsayılmaktadır. Alternatif bir olasılık olarak; KoQ molekülleri havuzdan süperkompleks içerisinde yeralan bir enzim tarafından indirgendiğinde veya yükseltgendiğinde ayrılıp diğer komplekslere yönelecektir. Bu olasılıkların doğru olma ihtimalleri oldukça zayıftır. Çünkü BN-PAGE yönteminde süperkomplekslerin stabil doğalarından ötürü ayrışmasının kolay olmadığı deneysel olarak gösterilmiştir. Dijitonin gibi yumuşak deterjanlar ile BN-PAGE jelinde kompleksleri ayırmak oldukça güç olmaktadır.

##### **4.5.2.1. Elektron İletimi Açısından Değerlendirme**

Geçmişte yapılan çalışmalarda kompleksler arasındaki elektron transferinin Kröger ve Klingenberg'in eşitliğine uygun bulunmasının başlıca iki nedeni vardır. Birincisi daha öncede bahsedildiği üzere yapılan çalışmaların büyük çoğunluğunun süksinat oksidasyonu üzerine olması ve NADH oksidasyonu ile ilgili yeterli veri olmamasıdır. Süksinat oksidasyonunda görev alan KoQ moleküllerinin havuz davranışı gösterdiği bugünkü bilgiler ile doğrulanmıştır. Fakat kompleks II, genel olarak süperkompleks yapısında yer alan bir kompleks değildir. NADH oksidasyonu ile ilgili çalışmalarında direkt olarak  $V_{red}$  (NADH-KoQ redüktaz ) ölçülmemiş bilinen NADH oksidaz değerinden dolayı olarak hesaplanmıştır (74,82,83).

İkinci önemli neden ise yapılan çalışmalarda kompleks I/kompleks III oranının göz ardı edilmiş olmasıdır. Kompleks I'in maksimum aktivitesi kompleks III'e oranla oldukça düşüktür. Çünkü mitokondrideki kompleks I miktarı kompleks III'e göre daha azdır (84).

NADH-KoQ redüktaz aktivitesi,  $V_{red}$ :  $0.5 \mu\text{mol dk}^{-1}\text{mg protein}^{-1}$ , ubikinol-sitokrom c redüktaz aktivitesi,  $V_{ox}$ :  $2.5 \mu\text{mol dk}^{-1}\text{mg protein}^{-1}$  formüle yerleştirildiğinde NADH-sitokrom c redüktaz aktivitesi  $V_{obs}$ :  $0.42 \mu\text{mol dk}^{-1}\text{mg protein}^{-1}$  olmalıdır.

Süperkomplekslerde kompleks I monomeri ve kompleks III dimeri içerdiğinden bu kompleksler arasındaki sitokiyometrik oran 1:2'dir. Fakat süperkompleksler tek bir enzim ünitesi gibi davrandıklarından entegre enzim aktivitesinin, spesifik kompleks I aktivitesi ile aynı olması ( $V_{obs}=V_{red}$ ) beklenir. Çünkü süperkompleksler için hız belirleyici enzim kompleks I'dir.

Kısaca özetlemek gerekirse: süperkompleks varlığında beklenen  $V_{obs}=V_{red}=0.5 \mu\text{mol dk}^{-1}\text{mg protein}^{-1}$ , Havuz eşitliğine göre  $V_{obs}=(0.5 \times 1)/1.5=0.33 \mu\text{mol dk}^{-1}\text{mg protein}^{-1}$ , tüm bilinen değerler formüle konulduğunda ise  $V_{obs}=(0.5 \times 2.5)/3=0.42 \mu\text{mol dk}^{-1}\text{mg protein}^{-1}$  değerleri elde edilmektedir. Görüldüğü üzere; gerçek değerlerle elde edilen sonuç ile süperkompleks varlığında beklenen sonuç birbirine oldukça yakındır (3).

#### 4.5.2.2. Saturasyon Kinetiği Açısından Değerlendirmeler

$V_{obs}$  oranının membrandaki total KoQ konsantrasyonu üzerindeki hiperbolik ilişkisi saturasyon kinetiği gösterir (78). Bu çalışmalar yeniden yapılandırılmış membranlarda olduğu için, deneye başlamadan önce KoQ'nun membrana yerleştirilmesi için önemsenecek bir süre geçmektedir. Eğer kompleksler arasında bağlı KoQ molekülleri varsa bu moleküller KoQ havuzunun ayrışma dengesini bozacağından saturasyon kinetik eğrisini değiştirecektir. Fakat bu çalışmalarda bütün KoQ moleküllerinin serbest olup havuz içersinde yer aldığı varsayılarak hesaplamalar yapılmıştır. Membrandaki total KoQ molekül miktarı  $4 \text{ nmol/mg protein}$ 'dir (75,84). Yapılan çalışmalarda sadece %10-32 oranında KoQ molekülünün bağlı olduğu, %75'den fazlasının ise serbest halde bulunduğu 5 farklı memeli türünde gösterilmiştir (85).

Metabolik akış analizlerini bu doğrultuda açıklayabilmek için, bağlı KoQ moleküllerin ayrışmasının kompleksler arasındaki elektron transferinden oldukça yavaş olması gerekmektedir. Dahası KoQ'nun NADH oksidaz aktivitesi için yüksek  $K_m$

göstermesinin açıklanması için de KoQ nun kompleks I'e bağlanmasının yavaş olması gerekmektedir (86).

#### **4.5.2.3. Mitokondriyal Membranın Protein-lipid Kompozisyonu Açısından Değerlendirmeler**

Megamitokondrilerde yapılan “freeze-fracture elektron mikroskopisi” çalışmalarında membranlar arası partiküllerin mitokondri iç membranında rastgele bir şekilde dağıldıkları gösterilmiştir (87). Bu çalışmalarda dondurup-çözme esnasında, süperkompleks organizasyonlarını bir arada tutan hidrofobik etkileşimlerin kırılmış olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca bu teknikle membranda yer alan partiküller arasındaki yakın mesafeli ilişkiler göz ardı edilmiştir.

Daha sonra gelişen “rapid-freeze deep-etch technique” yöntemiyle mitokondri kristalleri ile yapılan çalışmada, kristalarda kompleks V'in rastgele değilde çok düzenli bir şekilde dizildiği gösterilmiştir (88). Yine Thomas ve ark. maya mitokondri membranlarında yaptıkları çalışmalarda ATPaz enzim kompleksi dimerlerinin düzenli bir şekilde yerleştikleri gösterilmiştir.(89).

Mitokondrilere lipid takviyesi yapıldıktan sonra düşen solunum zinciri aktivitesinin KoQ desteği ile restore yeniden eski haline getirilmesi membranlardaki protein:lipid oranının değişmesiyle açıklanabilir (87). Daha öncede proteolipozom modelleri bahsinde açıklandığı üzere; membranların protein:lipid oranı değiştirildiğinde komplekslerin birleşip/ayrışması gerçekleşir. Protein konsantrasyonu arttırılıp kompleksler arasındaki fiziksel uzaklık kısaldığında kompleksler bir araya gelme eğilimi gösterirler ve havuz davranışı artık etki gösteremez. Bunun yanı sıra, membranın lipidlerle seyreltilmesi edilmesi komplekslere bağlı olan KoQ moleküllerinin ayrılmasına neden olacağından solunum aktivitesi azalacak ve ekzojen KoQ takviyesi ile tekrar düzelecektir.

## 5. GEREÇ ve YÖNTEM

### 5.1. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

**Tablo 2.** Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar Ve Malzemeler

<b>Cihaz</b>	<b>Marka/ Model</b>
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
Spektrofotometre	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
Floresans okuyucu	Perkin Elmer, Victor 2

## 5.2. Kullanılan Kimyasallar

**Tablo 3.** Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasallar

<b>Kimyasal</b>	<b>Marka/Kod</b>
Sükroz	Sigma 84097
Histidin	Sigma-Aldrich H3751
Sodyum-Deoksikolat (Na-DOC)	Sigma D6750
KCl	Carlo Erba 471177
Amonyum Asetat	Sigma A1542
Mannitol	Sigma 63560
EDTA	Sigma-Aldrich E9884
NADH	Sigma-Aldrich N8129
Desil-ubikinon (DB)	Sigma D7911
Rotenon	Sigma R8875
Sitokrom c	Sigma-Aldrich C7752
Musidin	Pharma
Antimisin A (AA)	Sigma A8674
Koenzim Q <sub>10</sub>	Sigma C9538
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	BioReagent C8027
C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> KNaO <sub>6</sub> .4H <sub>2</sub> O	Sigma S2377
NaOH	BioXtra S8045
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	BioXtra S7795
Albumin (BSA)	Sigma A-7030
Folin-Ciocalteu	Sigma F9252
Asolektin	Sigma 11145
DCFDA	Sigma 35845
n-oktil –D-glukopiranosid	Sigma-Aldrich D8035
KCN	Baker Chemicals 0213
Trizma base	Sigma-Aldrich T1503

### **5.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışlar**

#### **5.3.1. Mitokondri İzolasyonu İçin Kullanılan Çözeltiler**

##### **0.15 M KCL Tamponu**

55.92 g KCl tartılarak 5 litre saf su içerisinde çözüldü.

##### **1 M Tris Tamponu**

30.29 g Tris tartılarak 250 ml saf su ile çözüldü.

##### **0.25 M Sükroz/ 10 mM Tris Tamponu (pH;7,4)**

171.15 g Sükroz ve 2.42 g Tris tartılarak 1,5 litre saf su içerisinde çözülerek pH'sı 1M Tris tamponu ile 7.4' e ayarlandı. Ardından, hacim saf su ile 2 litreye tamamlandı.

##### **0,25 M Sükroz Tamponu (pH;7,6)**

427.88 g tartılarak bir miktar saf suda çözüldü. Akabinde, pH'sı 1 M Tris tamponu ile 7.6' ya ayarlanarak hacim saf su ile 5 litreye tamamlandı.

#### **5.3.2. Kompleks I ve III'ce Zengin Mitokondri Fraksiyonu (R4B) Hazırlanması İçin Kullanılan Çözeltiler**

##### **TSH Tamponu (pH;8)**

Bu tampon 660 mM sükroz, 50 mM Tris ve 1 mM histidin içerecek şekilde hazırlandı. 2.6 g sükroz, 0.61 g Tris ve 0.016 g histidin tartılarak 70 ml saf su içerisinde çözüldü 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 çözüldü.

##### **10 mM Tris-HCl Tamponu (pH; 8)**

1.21 g Tris 750 mL saf su ile çözüldü. pH' sı 8' e ayarlandıktan sonra hacmi 1 litreye tamamlandı.



### **% 50 doygun Amonyum Asetat Çözeltisi**

100 g kutu içersine 135 ml saf su eklenerek %50 doygun hale getirildi.

### **5.3.3. Kinetik Analizler ve ROS Ölçümü İçin Kullanılan Çözeltiler**

#### **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 çözüldü ve pH' sı 7.4' e ayarlandıktan sonra hacmi saf su ile 100 ml' ye tamamlandı.

#### **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 sükroz, 0.076 g Tris ve 0.009 g EDTA tartılarak 20 mL saf su içerisinde çözüldü ve pH' sı 7.4' e ayarlandıktan sonra hacmi saf su ile 25 ml' ye tamamlandı.

#### **0,01 N NaOH Çözeltisi**

0.020 g NaOH tartılarak 50 mL saf su içerisinde çözüldü.

Çözelti konsantrasyonları aşağıdaki Formüle1'e göre hesaplandı.

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

#### **NADH Çözeltisi**

Çözelti konsantrasyonu 30mM olacak şekilde hazırlandı. 0.00638 g NADH 300 µl saf su içerisinde çözümlenerek spektrofotometre ile konsantrasyonu tespit edildi.

Spektrofotometrede dalga boyu 340 ve 380 nm' ye ayarlandıktan sonra kuartz küvete 1 mL saf su koyularak absorbans sıfırlanır ve 5 µl NADH çözeltisi de küvete eklenerek karıştırıldıktan sonra her iki dalga boyunda da okuma yapılır. Ölçüm iki veya üç kez tekrarlanır. 340 nm absorbans değerlerinden 380 nm absorbans değerleri birbirinden çıkartılarak ortalamaları alındı. Formül 1 uygulanarak konsantrasyon hesaplandı.

## **DB**

Çözelti konsantrasyonu 20mM olacak şekilde hazırlandı. 0.007094g mg DB 500µl etanol içerisinde çözülerek spektrofotometre ile konsantrasyonu belirlendi.

Spektrofotometrede dalga boyu 280 nm' ye ayarlandıktan sonra kuartz küvete 1 ml etanol koyularak absorbans sıfırlanır ve 0.3µl DB çözeltisi de küvete eklenerek karıştırıldıktan sonra absorbans okunur. Ölçüm iki veya üç kez tekrarlanır. Formül 1'e göre konsantrasyonu hesaplanır.

## **Rotenon Çözeltisi**

Çözelti konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde hazırlandı. 0.4 mg Rotenon 1 mL etanol içerisinde çözülerek spektrofotometre ile konsantrasyonu belirlendi.

Spektrofotometrede dalga boyu 292 nm'ye ayarlandıktan sonra kuartz küvete 1 ml etanol koyularak absorbans sıfırlanır ve 4 µl Rotenon çözeltisi de küvete eklenerek karıştırıldıktan sonra absorbans okunur. Ölçüm iki veya üç kez tekrarlanır. Formül 1'e göre konsantrasyonu hesaplanır.

## **Sitokrom c<sup>+3</sup>**

Çözelti konsantrasyonu 5mM olacak şekilde hazırlandı. 61.635mg sitokrom c lml 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 sıfırlanır ve 10 µl sitokrom c çözeltisi de küvete eklenerek karıştırıldıktan okuma yapılır. Daha sonra Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> ile okside edilmek koşuluyla en az iki kez ölçülür. Okside olmuş absorbans değeri ile ilk değer farkı alınır ve Formül 1'e göre konsantrasyonu hesaplanır.

## **Mucidin**

Çözelti konsantrasyonu 1 mg/mL olacak şekilde hazırlandı. 1 mg mucidin tartılıp 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 sıfırlanır ve 4 µL mucidin çözeltisi de küvete eklenerek

karıştırıldıktan sonra absorbans okunur. Ölçüm iki veya üç kez tekrarlanır. Formül 1'e göre konsantrasyonu hesaplanır.

## **AA**

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 sıfırlanır ve 20µl AA çözeltisi de küvete eklenerek karıştırıldıktan sonra absorbans okunur. Ölçüm üç kez tekrarlanır. Formül 1'e göre konsantrasyonu hesaplanır.

## **KoQ<sub>10</sub> Çözeltisi**

Çözelti konsantrasyonu 20 mM olacak şekilde hazırlandı. 0.017 g KoQ<sub>10</sub> tartılarak 1 ml etanol ile cam tüp içerisinde çözüldü. Aşırı hidrofobik yapısından dolayı çözülme işleminin tam olarak gerçekleşmesi için musluk suyu altında bir süre bekletildi.

Spektrofotometrede dalga boyu 275 nm'ye ayarlandıktan sonra kuartz küvete 1 ml etanol koyularak absorbans sıfırlanır ve 2µl KoQ<sub>10</sub> çözeltisi de küvete eklenerek karıştırıldıktan sonra absorbans okunur. Ölçüm üç kez tekrarlanır. Formül 1'e göre konsantrasyonu hesaplanır.

Çözeltisi hazırlanan kimyasalların ekstinsiyon katsayıları (ε) aşağıdaki gibidir:

NADH: 5.5 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>, DB: 14.5 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> Rotenon: 25 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>, Musidin 21.9 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>, AA: 4.8 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>, Sitokrom c: 19.1 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>, KoQ<sub>10</sub>: 14.2 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>

## **5.4. Sığır (*B. taurus*) Kalbinden Mitokondri İzolasyonu**

Sığır kalbinden mitokondri izolasyonu Smith tarafından geliştirilen metod protokolü takip edilerek gerçekleştirildi (91). İlgili protokol adımları aşağıda özetlenmiştir:

- Öncelikle taze kesilmiş 3 adet, 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 iyice yıkandı.
- Kalp dokusu 0.25 M sükröz tamponu ile homojenize edildi. Homojenizasyon sırasında 1 M tris tamponu kullanılarak çözeltinin pH'sının 7.6 civarında olması sağlandı.
- Homojenatlar 2000 rpm'de 20 dakika boyunca santrifüj edildi.
- Süpernatant 9000 rpm'de 30 dakika süresince tekrar santrifüj edildi.
- Süpernatant uzaklaştırıldı. Mitokondri içeren çökelek, sükröz Tris-HCl tamponu ile resüspanse edildi ve 9000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi.
- Çökelek konsantrasyonu 50 mg/ml olacak şekilde sükröz Tris-HCl tamponu ile resüspande edildi ve kullanılmak üzere -80 °C' de muhafaza edildi.

### **5.5. Mitokondri İzolatlarından R4B Fraksiyonlarının Hazırlanması**

Sığır kalbi mitokondrileri kullanılarak kompleks I ve III' ce zengin mitokondriyal protein fraksiyonu olan R4B'ler elde edildi. Bu işlem Hatefi tarafından geliştirilen protokole uygun olarak gerçekleştirildi (92). R4B hazırlama protokol aşamaları aşağıda belirtilmiştir.

- 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 30.000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant diyaliz membranına alınarak 10 mM Tris tamponu içerisinde 3 saat boyunca diyaliz edildi.
- Diyalizat, tekrar santrifüj tüplerine konularak 30.000 rpm' de 75 dakika boyunca santrifüj edildi.
- Çökelek, TSH tamponu ile çözülerek Potter-Elvehjem homojenizatör ile homojenize edildi.
- Homejenatın konsantrasyonu Biüret metodu (93) ile tayin edildi. Bir gece boyunca -80°C' de saklandı.

- Ertesi gün çözelti çözülerek konsantrasyonu 10-12 mg/ml olacak şekilde TSH tamponu ile seyreltildi.
- 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 30 000 rpm' 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, 30 000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatana 100 ml özetli 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 çökelek TSH tamponu ile resüspanse edilerek konsantrasyonu Biüret metodu ile belirlendi ve daha sonra kullanılmak üzere alikotlara bölünerek  $-80^{\circ}\text{C}$  de saklandı.

## 5.6. Lipozom (Fosfolipid Veziküllerinin) Hazırlanması

Fosfolipid vezikülleri Degli Esposti ve ark. tarafından modifiye edilen yöntem ile hazırlandı (94,95). Deney protokolü aşağıda özetlenmiştir.

0.3 g Asolektin tartılır ve üzerine kabinet içersinde cam pipetle çekilen 1ml eter eklenir. İyice vortekslenir. Daha önce hazırlanan KoQ<sub>10</sub> solüsyonu iyice çözünmüş olduğundan emin olmak kaydıyla lipozomlara sırasıyla istenilen konsantrasyon sağlanmak üzere daha önceden belirlenen miktarlarda eklenir. KoQ<sub>10</sub> aşırı hidrofobik yapısından dolayı ilgili konsantrasyonun elde edilmesi için bu işlemin olabildiğince hızlı olması gerekmektedir. KoQ<sub>10</sub> eklendikten sonra iyice vortekslenir. Nitrojen tüpü açılır ve gaz akışı ne çok fazla nede çok az olacak şekilde ayarlanır. Tüpler 45 derecelik bir açıyla tutularak yavaşça çevrilmek suretiyle kurutulur. KoQ<sub>10</sub> konsantrasyonu arttıkça lipozomların fiziksel görünüşleri ve kuruma süreleri değişmektedir. Tüpler iyice kuruduktan sonra üzerlerine 5ml KCI tamponu eklenir ve iyice çözünene kadar vortekslenir. Sonra 5 dakika buz üzerinde inkübe edilir ve tekrar 5ml tampon eklenerek

vortekslenir. Bu aşamada çözeltilerin iyice çözüldüğünden emin olunur aksi taktirde tekrar buz üzerinde inkübe edilerek çözünmesi sağlanır.

Farklı KoQ<sub>10</sub> konsantrasyonu içeren lipozom solüsyonlarının her biri 10 kez sonike edilir. Sonikasyon işlemi buz içersinde ve nitrojen akışı eşliğinde yapılır. Her bir siklus 30 saniye sonikasyon ve 30 saniye bekleme şeklinde yaklaşık 350-700 watt arasında yapılır. Bu aşamanın ardından tek katlı membran lipid vezikülleri elde edilmiş olur. Lipid peroksidasyonunu engellemek açısından lipozomlar elde edildikleri gün inkorpore edilmişlerdir.

### **5.7. Lipozomlara R4B Fraksiyonlarının Yerleştirilmesi**

R4B fraksiyonlarının fosfolipid veziküllerine yerleştirilmesi, Racker ve ark. tarafından kullanılan metod modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir (96).

Farklı konsantrasyonlarda KoQ<sub>10</sub> içeren fosfolipid vezikülleri ile R4B fraksiyonları 1:1 ve 1:30 (R4B: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 (97).

Hazırlanan çözeltinin konsantrasyonu Lowry yöntemi ile tespit edildi (98).

### **5.8. Kinetik Analizler**

Bütün kinetik analizler proteinlerin uygun tamponlarda istenilen konsantrasyonda olacak şekilde çözülmesi ile yapılır. Sığır kalp mitokondrileri tampon B ile R4B proteolipozomları KCL tamponu ile çözülür. Ölçüm sırasında konsantrasyonları sırasıyla 40 µg/ml ve 15 µg/ml olacak şekilde ayarlanır. Enzimatik analizler 2 dalga boylu spektrofotometrede 30°C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir (84).

NADH-ubikinon oksido redüktaz aktivitesi; subsrat saturasyonu koşullarında ve Rotenon ve AA inhibitörleri varlığında ölçülmüştür. NADH her analiz öncesi taze hazırlanıp konsantrasyonu spektrofotometrede 380/340nm dalga boyunda ölçülmüş ve son konsantrasyonu 75 µM olacak şekilde ayarlanmıştır. Elektron alıcısı olarak

kullanılan Decyl-ubikinin, DB aynı şekilde her analiz öncesi taze olarak hazırlanıp 280nm dalga boyunda konsantrasyonu ölçülüp son konsantrasyonu 120µM olacak şekilde ayarlanmıştır. Rotenon inhibitörü her seferinde taze olarak hazırlanmalı ve konsantrasyonu 290nm dalga boyunda etanol varlığında ölçülmelidir. Kompleks I'ı inhiye edecek rotenon konsantrasyonu 4µM'dır. Kompleks III'ün bloke edilmesi için kullanılan AA inhibitörü taze hazırlanmak zorunda değildir fakat analiz öncesi konsantrasyonu 320nm'de etanol ile ölçülmelidir. Kompleks III inhibisyonu için uygun görülen AA konsantrasyonu 1mM'dır. Bu koşullar altında NADH oksidasyonu λ= 340-380 nm olacak şekilde minimum 250saniye monitörize edilmiştir.

NADH-sitokrom c oksidoredüktaz aktivite ölçümleri her seferinde taze olarak hazırlanan, 50 µM sitokrom c kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 75 µM konsantrasyonda NADH, AA ve rotenon inhibitörleri varlığında elektron vericisi olarak kullanılır. Aktivite ölçümü 2 dalga boylu spektrofotometrede λ= 550-540 nm olacak şekilde minimum 150 saniye monitörize edilmiştir.

Aktivite hesaplamaları cihazın kendi orijinal yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. NADH oksidasyonu için bandwidth:5nm ve sitokrom c redüksiyonu için bandwidth:2nm olarak alınmıştır.

### **5.9. Kompleks I Tarafından Oluşturulan Hidrojen Peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) Tayini**

Hidrojen peroksit miktarı, oluşan hidrojen peroksit ile diklorofloresandiasetat, DCFDA, probun tepkimesi sonucu oluşan floresan emisyonun ölçülmesiyle belirlendi. Tepkimenin kompleks I ve kompleks III inhibitörleri olan rotenon ve musidin varlığında gerçekleştirilerek kaçan elektronların kompleksler tarafından tekrar yakalanması engellenmiştir (99,100,101).

- 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.
- Hazırlanan örneklerden, kör olarak tampondan ve positive kontrol olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisinden 800 µL alınarak her biri ayrı tüpe koyularak tüpler örnek içeriğine göre işaretlendi.

- Her bir tüpe son konsantrasyonu 5  $\mu\text{M}$  olacak şekilde 240  $\mu\text{M}$  DCFDA ve son konsantrasyonu 1,8  $\mu\text{M}$  olacak şekilde mucidin eklendi.
- Her bir örneğin yarısı yeni bir tüpe alınarak üzerlerine son konsantrasyonu 4  $\mu\text{M}$  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  $\mu\text{M}$  olacak şekilde NADH eklendi.
- Her bir kuyucukta 200  $\mu\text{L}$  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.



## 6. BULGULAR

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

Üç genç erkek *B. taurus* kalbinden izole edilen mitokondrilerin, lowry metoduyla ölçülen protein konsantrasyonu, 17.59 mg/ml olarak tespit edilmiştir. Mitokondrilerin NADH substrat olarak kullanıldığı solunumsal aktivitelerinin kinetik olarak ölçüm sonuçları aşağıdaki tabloda gösterilmiştir:

**Tablo 4.** *B. taurus* Kalbinden İzole Edilen Mitokondrilerin Solunumsal Aktiviteleri

Enzim aktivitesi	$\mu\text{Mol}_{\text{NADH}}/\text{dk mg protein}$			Ortalama
<b>NADH-O2</b>		0.1204	0.1215	0.12
Sonikasyon sonrası (3x10sn)	0.2628	0.2767	0.2971	0.28
<b>NADH-DB/AA/Rot</b>		0.1555	0.1765	0.17
Sonikasyon sonrası (3X10sn)	0.3018	0.2807	0.3199	0.30

Elde edilen mitokondri izolatlarından hazırlanan kompleks I ve III'ce zengin R4B'lerin konsantrasyonu lowry metoduyla, 9mg/ml olarak ölçülmüştür. R4B'lerin enzimatik aktiviteleri NADH'in substrat olarak kullanıldığı kinetik analizlere ait sonuçlar aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

**Tablo 5.** R4B'lerin Enzimatik Aktivite Ölçümü

Enzim aktivitesi	$\mu\text{Mol}_{\text{NADH}}/\text{dk mg protein}$		Ortalama
NADH-O2	0.2392	0.1844	0.22
NADH-DB/AA/Rot	0.7873	0.5916	0.69
NADH-Sitokrom c	1.3	1.295	1.30

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

### 6.2. R4B:FL 1:1 ve R4B:FL 1:30 Proteolipozomlarının NADH-Sitokrom c Oksidoredüktaz Aktivite Ölçümleri

Kompleks I ve III'ce zengin R4B'lerin, dört farklı KoQ<sub>10</sub> içeren lipozomlara 1:1 ve 1:30 oranlarında yerleştirilmesiyle oluşan proteolipozomların entegre enzim aktivitelerinin ölçüm sonuçları tablo 6 ve 7'de gösterilmiştir.

**Tablo 6.** R4B: FL 1:1 Proteolipozomlarının NADH-Sitokrom c Oksidoredüktaz Aktivite Sonuçları (n=2)

Enzim aktivitesi (NADH-sitokrom c/AA/Rot)	$\mu\text{Mol}_{\text{NADH}}/\text{dk mg protein}$					Ort.*	İnhb. %
	D1	D2	D3	D4	D5		
<b>0nmol<sub>KoQ</sub>/mgFL</b>	0.559±0.07	0.611±0.06	0.543±0.03	0.776±0.01	0.615±0.01	0.622±0.1	≥ 90
<b>10nmol<sub>KoQ</sub>/mgFL</b>	1.020±0.04	1.000±0.00	0.769±0.03	1.040±0.01	0.652±0.00	0.957±0.1	≥ 90
<b>20nmol<sub>KoQ</sub>/mgFL</b>	1.023±0.03	1.117±0.05	0.808±0.00	1.141±0.04	0.988±0.03	1.022±0.2	≥ 90
<b>30nmol<sub>KoQ</sub>/mgFL</b>	1.033±0.07	1.079±0.06	1.140±0.06	1.471±0.04	1.286±0.02	1.181±0.1	≥ 90

\*İstatistiksel açıdan D5'e ait sonuçlar hesaplamalardan çıkarılmıştır

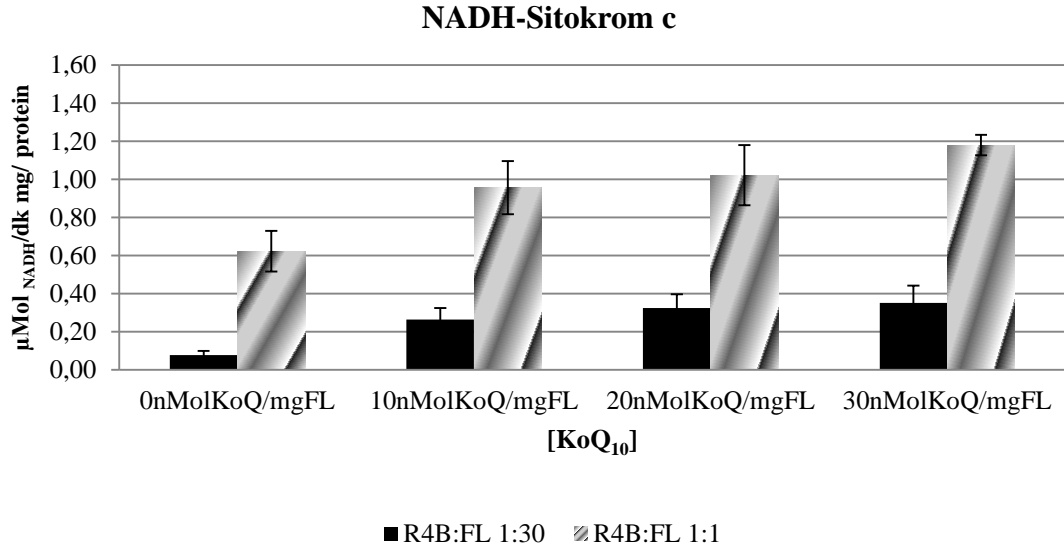
**Tablo 7.** R4B: FL 1:30 Proteolipozomlarının NADH-Sitokrom c Oksidoredüktaz Aktivite Sonuçları (n=2)

Enzim aktivitesi (NADH-sitokrom c/AA/Rot)	$\mu\text{Mol}_{\text{NADH}}/\text{dk mg protein}$					Ort.*	İnhb. %
	D1	D2	D3	D4	D5		
<b>0nmol<sub>KoQ</sub>/mgFL</b>	0.360±0.01	0.060±0.00	0.061±0.00	0.078±0.00	0.111±0.00	0.078±0.02	≥ 90
<b>10nmol<sub>KoQ</sub>/mgFL</b>	0.546±0.02	0.212±0.04	0.216±0.01	0.273±0.00	0.351±0.00	0.263±0.06	≥ 90
<b>20nmol<sub>KoQ</sub>/mgFL</b>	0.628±0.01	0.270±0.01	0.267±0.01	0.325±0.01	0.434±0.01	0.324±0.07	≥ 90
<b>30nmol<sub>KoQ</sub>/mgFL</b>	0.818±0.04	0.279±0.03	0.284±0.03	0.350±0.01	0.492±0.02	0.351±0.09	≥ 90

\* İstatistiksel açıdan D1'e ait sonuçlar hesaplamalardan çıkarılmıştır.

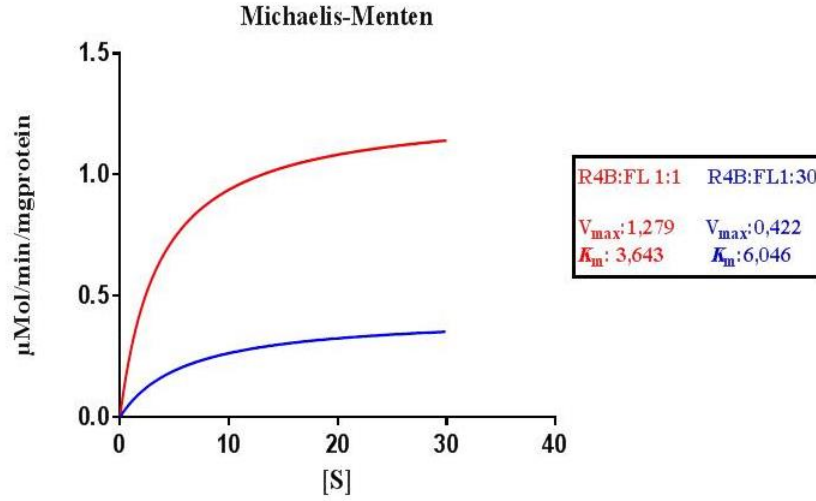
Her iki proteolipozom modelinde de NADH-Sitokrom c aktiviteleri 30nmol<sub>KoQ</sub>/mgFL konsantrasyonunda maksimum seviyededir. R4B:FL 1:1 proteolipozomlarının bu konsantrasyonda enzimatik aktiviteleri R4B:FL 1:30 proteolipozomlarında oranla 3.4 kat yüksek bulunmuştur.

### 6.3. R4B:FL 1:1 ve R4B:FL 1:30 Proteolipozomlarının NADH-Sitokrom c Oksidoredüktaz Aktivitelerinin Birleştirilmiş Grafik İle Gösterimi

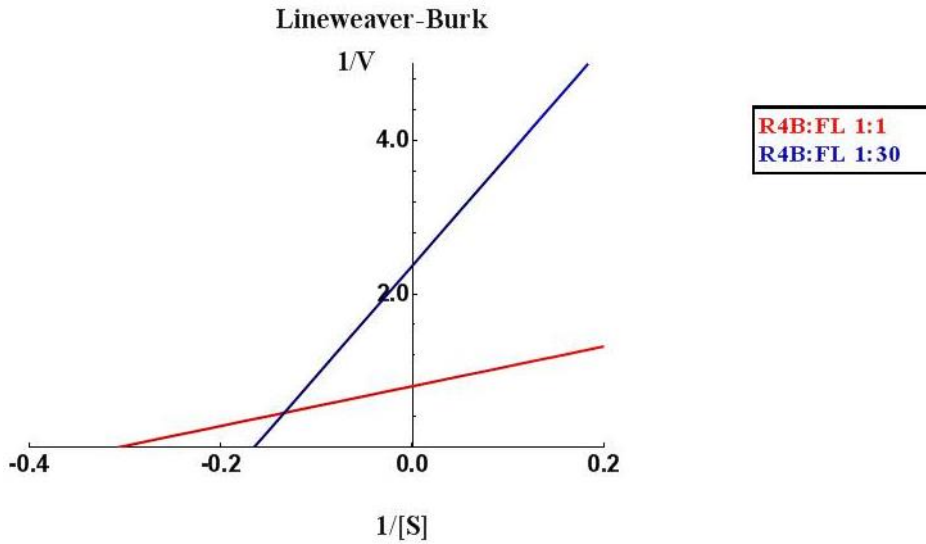


**Şekil 18.** R4B:FL 1:1 ve R4B:FL 1:30 Proteolipozomlarının NADH-Sitokrom c Oksido Redüktaz Aktiviteler Grafiği

6.4. R4B:FL 1:1 ve R4B:FL 1:30 Proteolipozomlarının NADH Oksidasyonu İçin [KoQ<sub>10</sub>] Konsantrasyonlarına Göre  $K_m$  ve  $V_{max}$  Değerlerini Gösteren Michaelis-Menten ve Lineweaver- Burk Grafiklerini



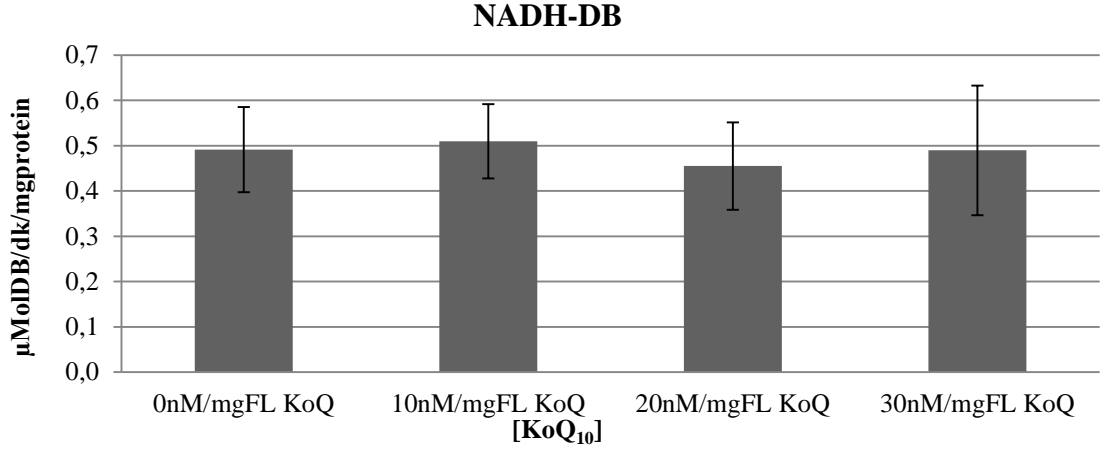
Şekil 19. R4B:FL 1:1 ve R4B:FL 1:30 Proteolipozomlarının Michaelis-Menten Grafiği ve  $V_{max}$ ,  $K_m$  Değerleri.



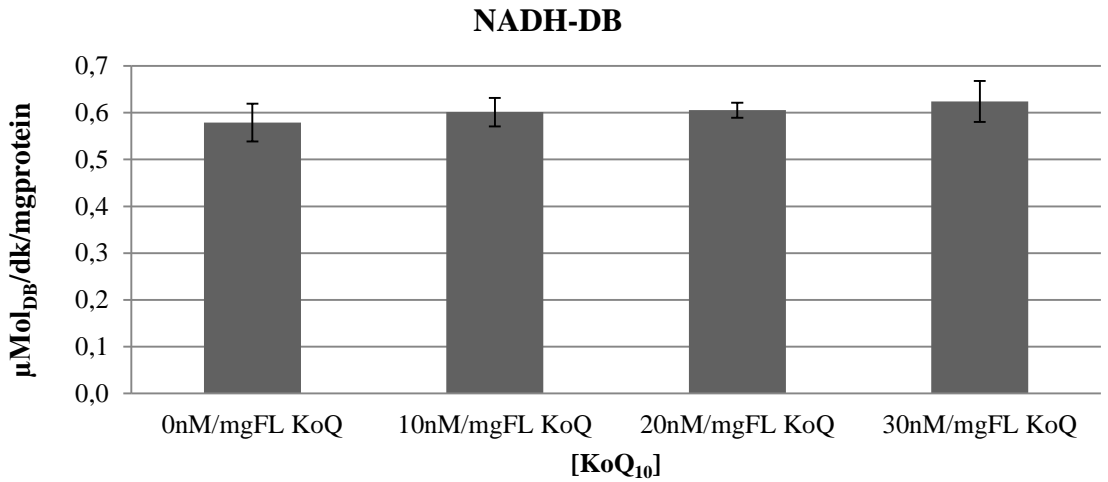
Şekil 20. R4B:FL 1:1 ve R4B:FL 1:30 Proteolipozomlarının Lineweaver –Burk Grafiği.

### 6.5. R4B:FL 1:1 ve R4B:FL 1:30 Proteolipozomlarının NADH-DB Aktivite Ölçümleri

Kompleks I ve III'ce zengin R4B'lerin, dört farklı KoQ<sub>10</sub> içeren lipozomlara 1:1 ve 1:30 oranlarında yerleştirilmesiyle oluşan proteolipozomların spesifik kompleks I enzim aktivitelerinin ölçüm sonuçları Şekil 21 ve 22'de gösterilmiştir.



Şekil 21. R4B: FL 1:30 Proteolipozomlarının Kompleks I Aktivite Sonuçları (n=4)



Şekil 22. R4B: FL 1:1 Proteolipozomlarının Kompleks I Aktivite Sonuçları (n=4)

Her iki proteolipozom serisinin dört farklı KoQ<sub>10</sub> konsantrasyonu için spesifik kompleks I aktiviteleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

## 6.6. ROS Ölçüm Sonuçları

### 6.6.1. ROS-I Ölçüm Sonuçları

Artan KoQ<sub>10</sub> konsantrasyonlarına göre hazırlanmış proteolipozomların (R4B:FL 1:1 ve R4B:FL 1:30) kompleks I kaynaklı ROS üretimleri, musidin ve rotenon inhibitörleri varlığında, DCFDA probuyla kolorimetrik olarak ölçülmüştür. 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. Proteolipozomların konsantrasyonlarını ve kompleks I aktiviteleri aşağıdaki tablolarda gösterilmiştir.

**Tablo 8.** Proteolipozom R4B:FL 1:1 Musidin İnhibitörü Varlığında Kompleks I Aktivitesi Başına ROS-I Ölçüm Sonuçları

Proteolipozomlar	0nmol <sub>KoQ</sub> /mgFL	10nmol <sub>KoQ</sub> /mgFL	20nmol <sub>KoQ</sub> /mgFL	30nmol <sub>KoQ</sub> /mgFL
DCFDA +Musidin	63749	56616,5	63215,5	79246
Protein mg/ml	0.31	0.33	0.38	0.39
Pro 0.5 mg/ml (doğrulama)	102821	85783	83178	101597
Kompleks I ( $\mu$ Mol/dk mg protein)	0.64	0.60	0.56	0.58
ROS/kompleks I	161288	142971	148533	176660

**Tablo 9.** Proteolipozom R4B:FL 1:1 Musidin + Rotenon İnhibitörleri Varlığında Kompleks I Aktivitesi Başına ROS-I Ölçüm Sonuçları

Proteolipozomlar	0nmol <sub>KoQ</sub> /mgFL	10nmol <sub>KoQ</sub> /mgFL	20nmol <sub>KoQ</sub> /mgFL	30nmol <sub>KoQ</sub> /mgFL
DCFDA +Musidin+Rot	231860	176997	256999	290176
Protein mg/ml	0.31	0.33	0.38	0.39
Pro 0.5 mg/ml (doğrulama)	373968	268178	338157	372020
Kompleks I ( $\mu$ Mol /dk mg protein)	0.64	0.60	0.56	0.58
ROS/kompleks I	586617	446963	603851	646879

**Tablo 10.** Proteolipozom R4B:FL 1:30 Musidin İnhibitörü Varlığında Kompleks I Aktivitesi Başına ROS-I Ölçüm Sonuçları

Proteolipozomlar	0nmol <sub>KoQ</sub> /mgFL	10nmol <sub>KoQ</sub> /mgFL	20nmol <sub>KoQ</sub> /mgFL	30nmol <sub>KoQ</sub> /mgFL
DCFDA +Musidin	266721	162736	113668	79364
Protein mg/ml	0.33	0.46	0.44	0.49
Pro 0.5 mg/ml (doğrulama)	404123	176887	129169	80984
Kompleks I ( $\mu$ Mol/dk mg protein)	0.28	0.27	0.29	0.3
ROS/kompleks I	1443295	655139	445409	269946

**Tablo 11.** Proteolipozom R4B:FL 1:30 Musidin+ Rotenon İnhibitörü Varlığında Kompleks I Aktivitesi Başına ROS-I Ölçüm Sonuçları

Proteolipozomlar	0nmol <sub>KoQ</sub> /mgFL	10nmol <sub>KoQ</sub> /mgFL	20nmol <sub>KoQ</sub> /mgFL	30nmol <sub>KoQ</sub> /mgFL
DCFDA +Musidin+Rot	306210	212223	154409	121487
Protein mg/ml	0.33	0.46	0.44	0.49
Pro 0.5 mg/ml (doğrulama)	463955	230678	175465	123966
Kompleks I ( $\mu$ Mol/dk mg protein)	0.28	0.27	0.29	0.3
ROS/kompleks I	1656983	854362	605053	413221

R4B:FL 1:1 proteolipozom serilerinde KoQ<sub>10</sub> konsantrasyonu ile ROS miktarı arasında anlamlı bir artış veya azalış gözlenmemiştir. R4B:FL 1:30 proteolipozomlarında KoQ<sub>10</sub> konsantrasyonunun artmasıyla ROS oluşumunda düzenli bir artış olduğu tespit edilmiştir.

#### 6.6.2. ROS-II Ölçüm Sonuçları

Her iki proteolipozom modelinde müsadin ve rotenon varlığında kompleks I kaynaklı ROS üretimi ölçüm sonuçlarını doğrulamak amacıyla aynı R4B fraksiyonları başka bir lipozoma inkorpore edilerek çalışma tekrarlandı. Bu deney sırasında spesifik kompleks I aktivitesi ölçülmedi. Kompleks I aktiviteleri için yapılan tüm deneyler sonucu elde edilmiş kompleks I aktivite verilerinin ortalaması alınarak kullanıldı.

Proteolipozomların gerçek protein değerleri lowry yöntemiyle tayin edildi ve deney protokolünde önerilen 0,5 mg/ml'ye göre düzenlendi. Sonuçlara ait tablolar aşağıda gösterilmiştir.

**Tablo 12.** Proteolipozom R4B:FL 1:1 Musidin İnhibitörü Varlığında Kompleks I Aktivitesi Başına ROS-II Ölçüm Sonuçları

Proteolipozomlar	0nmol <sub>KoQ</sub> /mgFL	10nmol <sub>KoQ</sub> /mgFL	20nmol <sub>KoQ</sub> /mgFL	30nmol <sub>KoQ</sub> /mgFL
<b>DCFDA +Musidin</b>	1112272	249791	150311	100890
<b>Protein mg/ml</b>	0.68	0.60	0.60	0.59
<b>Pro 0.5 mg/ml (doğrulama)</b>	404122.7	176887.5	129168.8	80983.67
<b>Kompleks I (<math>\mu</math>Mol /dk mg protein)</b>	0.58	0.60	0.61	0.62
<b>ROS/komplex I</b>	1409034	344651	204726	137339

**Tablo 13.** Proteolipozom R4B:FL 1:1 Musidin+Rotenon İnhibitörleri Varlığında Kompleks I Aktivitesi Başına ROS-II Ölçüm Sonuçları

Proteolipozomlar	0nmol <sub>KoQ</sub> /mgFL	10nmol <sub>KoQ</sub> /mgFL	20nmol <sub>KoQ</sub> /mgFL	30nmol <sub>KoQ</sub> /mgFL
<b>DCFDA +Musidin+Rot</b>	1116311	681600	685849	422517
<b>Protein mg/ml</b>	0.68	0.60	0.60	0.59
<b>Pro 0.5 mg/ml (doğrulama)</b>	820207	564265	569826	356603
<b>Kompleks I (<math>\mu</math>Mol /dk mg protein)</b>	0.58	0.60	0.61	0.62
<b>ROS/komplex I</b>	1414150	940442	934141	575166



**Tablo 14.** Proteolipozom R4B:FL 1:30 Musidin İnhibitörü Varlığında Kompleks I Aktivitesi Başına ROS-II Ölçüm Sonuçları

Proteolipozomlar	0nmol <sub>KoQ</sub> /mgFL	10nmol <sub>KoQ</sub> /mgFL	20nmol <sub>KoQ</sub> /mgFL	30nmol <sub>KoQ</sub> /mgFL
<b>DCFDA +Musidin</b>	524184	298965	175661	136302
<b>Protein mg/ml</b>	0.40	0.46	0.45	0.45
<b>Pro 0.5 mg/ml (doğrulama)</b>	655861	327978	197031	150036
<b>Kompleks I (<math>\mu</math>Mol /dk mg protein)</b>	0.49	0.51	0.46	0.49
<b>ROS/komplex I</b>	1338491	643095	428328	306196

**Tablo 15.** Proteolipozom R4B:FL 1:30 Musidin+Rotenon İnhibitörleri Varlığında Kompleks I Aktivitesi Başına ROS-II Ölçüm Sonuçları

Proteolipozomlar	0nmol <sub>KoQ</sub> /mgFL	10nmol <sub>KoQ</sub> /mgFL	20nmol <sub>KoQ</sub> /mgFL	30nmol <sub>KoQ</sub> /mgFL
<b>DCFDA +Musidin+Rot</b>	678496	531444	407080	279213
<b>Protein mg/ml</b>	0.40	0.46	0.45	0.45
<b>Pro 0.5 mg/ml (doğrulama)</b>	848936	583018	456604	307346
<b>Kompleks I (<math>\mu</math>Mol /dk mg protein)</b>	0.49	0.51	0.46	0.49
<b>ROS/komplex I</b>	1732522	1143173	992617	627238

ROS-II ölçüm sonuçlarına göre her iki proteolipozom serisinde de artan KoQ<sub>10</sub> konsantrasyonuna karşı ROS oluşumun azaldığı gözlenmiştir. Bu azalma R4B:FL 1:30 modelinde daha düzenlidir.

## 7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Mitokondrilerin solunum aktiviteleri; elde edildikleri hayvanların cinsiyetlerine, yaşlarına ve ihtiva ettikleri mitokondri miktarına bağlıdır. Çalışmada genç, erkek *B. taurus* kalp dokusundan, elde edilen mitokondrilerden kompleks I ve III'ce zengin R4B fraksiyonları Hatefi ve Rieske tarafından modifiye edilen yöntemle izole edilmiştir (92). Elde edilen mitokondri izolatlarının ve onlardan elde edilen R4B fraksiyonlarının NADH-0<sub>2</sub> ve NADH-DB aktiviteleri ölçülmüştür. Çalışma öncesinde 3 kez mitokondri izolasyonu ve iki kez R4B izolasyonu yapılmış fakat aktiviteleri yetersiz görüldüğünden çalışma ileriki aşamalara götürülmemiştir. Bu çalışmada kullanılan mitokondrilerin (Tablo 4) ve R4B fraksiyonlarının (Tablo 5) enzimatik aktiviteleri yeterli bulunmuş ve çalışmaya devam edilmiştir. Her iki modelde de 30nMol<sub>KoQ</sub>/mgFL konsantrasyon içeren proteolipozomlar maksimum solunum aktivitesi göstermişlerdir ve bu aktiviteler literatürle örtüşmektedir.

Süperkompleks oluşumlarının gücü, büyük oranda iç mitokondriyal membranın lipid içeriğine, kompozisyonuna ve şekline bağlıdır (87). Yapılan araştırmalarda lipid oranı protein oranına karşı yüksek olduğunda (>10:1) süperkompleks I-III oluşumunun engellendiği BN-PAGE ve kinetik çalışmalarda gösterilmiştir (63,102,103). Çalışmada R4B fraksiyonları, SK I<sub>1</sub>III<sub>2</sub> oluşumu için gerekli oranlarda fosfolipid içeren, R4B:FL 1:1 oranında ve süperkomplekslerin ayrıştığı oran olarak belirlenen R4B:FL 1:30 oranında olmak üzere iki farklı proteolipozom modeli kullanılmıştır. Çalışmanın amacı doğrultusunda, İki ayrı modelde de R4B fraksiyonları, farklı miktarda KoQ<sub>10</sub> içeren lipozomlara yerleştirilerek KoQ<sub>10</sub> miktarının, süperkompleks varlığında ve de yokluğunda solunum zinciri aktivitesi üzerine etkileri incelenmiştir. Daha önce İtalya'nın Bologna Üniversitesi, Biyokimya Bölümünde Prof. Giorgio Lenaz önderliğindeki biyoenerjetik grubu tarafından yapılan KoQ<sub>10</sub> titrasyon çalışmalarında solunum zinciri süperkompleks varlığında ve ayrıştığında enzim doygunluk konsantrasyonu 30nMol<sub>KoQ</sub>/mgFL olarak tespit edilmiştir. Bundan dolayı çalışmamızda 30nMol<sub>KoQ</sub>/mgFL konsantrasyonu üst sınır olarak kabul edilip bu değerden düşük KoQ<sub>10</sub> konsantrasyonlarının süperkompleks üzerine etkisi incelenmiştir.

Çalışmamızda, NADH oksidasyonu üzerine KoQ<sub>10</sub> konsantrasyonunun etkilerinin incelendiği toplam 5 enzimatik analiz yapılmıştır. Beş deney için dört kez lipozom

hazırlanmıştır. Lipozom serileri her bir proteolipozom modeli için 4 farklı KoQ<sub>10</sub> konsantrasyonunda hazırlanmıştır. Hazırlanan R4B fraksiyonları, R4B:FL 1:1 ve 1:30 oranlarında olacak şekilde aynı gün lipozomlara yerleştirilmiştir. Deneylede oluşacak hata paylarını asgari seviyeye indirmek ve deneyleri standardize etmek amacıyla proteolipozomlar hazırlandığı gün içersinde kinetik analizleri yapılmıştır. Her bir proteolipozom serisi için spesifik kompleks I aktivitesi ve NADH-sitokrom c oksido redüktaz entegre aktiviteleri, ortamın sıcaklığı, nemi sabit tutulmak kaydı ile oldukça hassas bir şekilde ölçülmüştür. Her iki modelde de farklı KoQ<sub>10</sub> konsantrasyonu içeren proteolipozomların en az iki kez NADH-DB ve NADH-sitokrom c oksidoredüktaz kinetik aktiviteleri ölçülmüştür.

Yapılan kinetik analizlerde, her iki proteolipozom modelinin kendi içersindeki spesifik kompleks I aktiviteleri, beklenildiği üzere birbirine çok yakın değerlerde çıkmıştır (Şekil 21,22). Çalışmamızda süperkompleks varlığında ve ayrıştığında solunum aktiviteleri arasındaki farklar incelenmesi amaçlandığından; her iki durumda da kompleks I'in aktif olarak çalıştığının gösterilmesi oldukça başarılı bir sonuçtur. Beklenen; kompleks I'in süperkompleks oluşup oluşmamasından bağımsız olarak görevini yerine getirmesidir. Bunun yanı sıra her iki modelde de KoQ<sub>10</sub> miktarının kompleks I aktivitesini etkilememesi bu nedenle seriler içersinde aktivitelerin birbirine yakın çıkması oldukça önemli bir sonuçtur. Bu sonuç, çalışmada hazırlanan proteolipozomların başarıyla oluşturulduğunun bir kanıtı niteliğindedir.

R4B:FL 1:1 proteolipozom serileri ile R4B:FL 1:30 serileri kompleks I aktiviteleri açısından karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir fark olmadığı görülmektedir. Süperkompleks modelinde elektron iletimi için hız sınırlandırıcı kompleks olarak kabul edilen kompleks I'in aktivitesinin lipid içeriğinden bağımsız olduğu düşünülmektedir (104). SK I<sub>1</sub>III<sub>2</sub> içeren proteolipozomların diğerlerine nispeten biraz daha yüksek kompleks I aktivitesine sahip olmasının nedeni; komplekslerin ayrıştığı durumlarda kompleks I'in destabilize olması ve bu yüzden etkin bir şekilde çalışmaması olabileceği gibi proteolipozomların endojen KoQ<sub>10</sub> miktarları arasındaki farkların da aktivitelerin farklı olmasına neden olmuş olabileceği ihtimaller arasındadır. Maalesef, çalışmamızda henüz proteolipozomların içerdikleri endojen KoQ<sub>10</sub> miktarları tespit edilememiştir. Bundan dolayı kesin bir yorumda bulunmak mümkün değildir.

Literatürde benzer olarak süperkompleks yapısında bulunan kompleks I aktivitesi ile serbest kompleks I aktivitesi arasında anlamlı bir fark gösterilmemiştir (4). Bunun yanı sıra süperkompleks I<sub>1</sub>III<sub>2</sub> ayrışımının sağlandığı hücrelerde, NADH-ubikinon oksidoredüktaz aktivitesinde, kompleks I destabilizasyonuna bağlı önemli ölçüde düşme gösterilmiştir (105-107).

Süperkomplekslerin substrat kanalı oluşturmaları ve kompleksler arasındaki katalizi arttırmaları vasıtasıyla daha etkili bir elektron iletimi gerçekleştirmeleri, bu supramoleküler organizasyonun beklenen bir sonucudur. Süperkompleks organizasyonları, solunum sırasında cereyan eden redoks reaksiyonlarında iki enzimin aktif bölgeleri arasında adeta bir substrat kanalı gibi çalışarak, aracı moleküllerin direkt ve hızlı bir şekilde iletimini sağlamaktadırlar (108). Bu hipotezden yola çıkarak çalışmamızda; NADH-sitokrom c oksidoredüktaz entegre aktivitesi ile ilgili SK I<sub>1</sub>III<sub>2</sub> içeren proteolipozomlar ve SK içermeyen proteolipozomlar elektron iletim hızları açısından karşılaştırılmıştır. Her iki modelde de proteolipozomlar 30nMol<sub>KoQ</sub>/mgFL konsantrasyonunda maksimum aktivite göstermişlerdir (Tablo 6,7). Bu sonuçlar literatürle uyumludur (78). Bunun yanı sıra SK I<sub>1</sub>III<sub>2</sub> olduğu proteolipozom modellerinin en yüksek KoQ<sub>10</sub> konsantrasyonunda, NADH-sitokrom c oksidoredüktaz aktiviteleri SK ayrıştığı durumdaki aktiviteye oranla yaklaşık 3,4 kat yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç tez çalışmasının, süperkomplekslerin substrat kanalı gibi çalışarak daha hızlı ve etkin elektron akışı sağlamaları şeklindeki hipotezini doğrulamaktadır ve aynı zamanda literatürle uyumludur (104). 20nMol<sub>KoQ</sub>/mgFL ve 10nMol<sub>KoQ</sub>/mgFL içeren proteolipozomların da benzer olarak R4B:FL 1:1 serilerinde entegre aktiviteleri anlamlı derecede fazla bulunmuştur. En düşük aktivite değerleri her iki modelde 0nMol<sub>KoQ</sub>/mgFL içeren proteolipozomlarda tespit edilmiştir. R4B:FL 1:1 proteolipozomlarının 0nMol<sub>KoQ</sub>/mgFL konsantrasyonunda yaklaşık 8 kat fazla aktivite göstermişlerdir. Bu dramatik farkın kaynağının temel olarak iki nedenden dolayı olabileceği düşünülmektedir. Birincisi; lipozom modellerininin içerdikleri endojen KoQ miktarlarının farklı olmasıdır. Her iki modelde KoQ<sub>10</sub> içermeyen lipozomlara R4B fraksiyonları yerleştirilmiştir. Bu yüzden gösterilen aktivite R4B fraksiyonlarının içerdikleri endojen KoQ<sub>10</sub> molekülleri tarafından gerçekleştirilmektedir. Teorik olarak, her iki modelde de kullanılan R4B fraksiyonları aynı menşeli olduğu için içerdikleri endojen KoQ<sub>10</sub> moleküllerinin aynı miktarda olması beklenilir. Fakat yine de farazi

farkların olması olasıdır. Maalesef daha öncede değinildiği üzere çalışmada kullanılan proteolipozomların KoQ<sub>10</sub> içerikleri ile ilgili bir veri elimizde bulunmamakla birlikte bu farazi farkın enzimatik aktiviteyi dramatik olarak değiştirmesi mümkün değildir.

Bunun yanı sıra KoQ<sub>10</sub> içermeyen proteolipozomların aktivitelerinin süperkompleks varlığında artması beklenen bir sonuçtur. Sonuçlardan da görüldüğü üzere süperkompleks içeren proteolipozomlar dört farklı KoQ<sub>10</sub> konsantrasyonunda da daha hızlı bir elektron transportu sağlamaktadırlar. Rastgele difüzyon modelinde, KoQ gibi mobil taşıyıcılar substrat benzeri davranış göstererek, difüzyon ile hareket ederler rastgele etkileşimler sonucunda elektron iletimini sağlarlar (1). Süperkompleks modelinde ise KoQ molekülleri süperkompleks yapısı içerisinde yer alan ardışık enzimlerin ara yüzlerine bağlı olarak yer alırlar ve tüm aracı molekül iletimleri kanal içerisinde, protein çevreden uzaklaşmadan gerçekleştirilir (87). Bu nedenle daha hızlı bir iletim sağlanabilmektedir. Bunun aksine R4B:FL 1:30 proteolipozomlarında olduğu gibi süperkompleksler ayrıştığında rastgele difüzyon kuralları geçerli olup KoQ molekülleri havuz davranışı gösterdikleri için enzimatik aktiviteler büyük ölçüde düşmektedir. Çalışmamızda elde edilen bu sonuç; süperkompleks varlığında KoQ havuz davranışının artık geçerli olmadığını bir kanıtı niteliğindedir.

Çalışmada elde edilen sonuçlar, enzim kinetiği açısından değerlendirildiğinde, süperkompleks oluşumunun gözlendiği proteolipozomların diğerlerine oranla; düşük  $K_m$  ve yüksek  $V_{max}$  değerlerine sahip olduğu gösterilmiştir (Şekil 19). Bu da süperkomplekslerin substrat afinitelerinin çok daha yüksek olduğunu, daha az KoQ<sub>10</sub> konsantrasyonunda substrat doygunluğuna ulaşarak  $V_{max}/2$  ye eriştiğini göstermektedir. Süperkompleks I<sub>1</sub>III<sub>2</sub> içeren proteolipozom modellerinde  $K_m$  değeri 3,6nmol<sub>KoQ</sub>/mg protein, komplekslerin ayrıştığı durumda ise  $K_m$  değeri 6nmol<sub>KoQ</sub>/mg protein'dir. Süperkomplekslerin  $V_{max}$  değerleri komplekslerin bireysel olarak yerleştiği proteolipozomlara oranla 3 kat daha fazladır (Şekil 19). Bu da süperkomplekslerin daha hızlı elektron iletimi sağladığının bir başka göstergesidir.

Literatürde yeniden yapılandırılmış mitokondriyal membran sistemlerinde koenzim Q molekülünün NADH oksidasyonu için  $K_m$  değeri 2-5nmol/mg protein'dir (78). Çalışmamızda her iki proteolipozom modeli için elde edilen  $K_m$  değerleri literatürle uyumludur. Sığır kalbi mitokondileriyle yapılan çalışmalarda total KoQ

miktarı 1-4nmol/mg protein olarak tespit edilmiştir (78). Pekçok farklı kaynaktan izole edilen mitokondri membranlarıyla yapılan daha detaylı ve kapsamlı bir çalışmada fizyolojik koşullarda mitokondrilerin KoQ içeriğinin 4nmol/mg protein civarında olduğu gösterilmiştir (109). Bu miktar göz önüne alındığında süperkompleks ayrışması durumunda [KoQ] Km değerlerinin [KoQ]<sub>t</sub> değerinden daha düşük olacağından NADH oksidasyonunun saturasyonu için yeterli olamayacağı sonucu ortaya çıkmaktadır. çalışmamızda elde edilen bu bulgu, fizyolojik açıdan oldukça önem arz etmektedir. Daha önce Acin-perez ve ark tarafından ortaya atılan “plastisite modeli” ile fizyolojik koşullarda süperkompleks oluşumlarının önem kazandığı vurgulanmıştır (52).

Hücrede ROS; sinyal iletiminden patolojik durumlara kadar pek çok olayda önemli rol oynamaktadır. Bilindiği üzere hücredeki majör ROS kaynağı mitokondriyal solunum sistemi, özellikle tek değerli oksijenin süperoksite indirgenmesini sağlayan redoks bileşenlerini içeren kompleks I ve III'tür. Kompleks I'de elektron akışının engellenmesi büyük oranda süperoksit oluşumuna neden olmaktadır. Örneğin kompleks I'in defosforile olduğu fizyolojik koşullarda veya kompleks I'in etkilendiği optik nöropati, Parkinson hastalığı gibi patolojik durumlarda veya kompleks I'in inhibe edildiği in vitro durumlarda aşırı miktarda süperoksit oluşumu gösterilmiştir. (4). Kompleks I'de elektronların oksijene kaçtığı aday bölgeler arasında başlıca N2 gelmektedir. Bunun yanı sıra FMNH<sub>2</sub> veya ubikinonun da elektron kaçağına neden olabileceği tartışılmaktadır.

İndirekt çalışmalar komplekslerin süperkompleksler şeklinde supramoleküler organize olmasının elektronların kanal içerisinde akışı sırasında komplekslerin redoks bileşenlerinin okside durumda kalmasını sağladığından süperoksit oluşumunu sınırlandırabileceği yönündedir (110). 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 (4).

Çalışmamızda Maranzana ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya benzer olarak; rotenon ve musidin inhibitörleri varlığında kompleks I'in tüm elektron alıcıları bloke edilmek suretiyle, süperkompleks varlığında-ayrıştığı durumda kompleks I kaynaklı süperoksit oluşumu araştırılmıştır. Öncül çalışmadan farklı olarak proteolipozomlarımız

4 farklı oranda KoQ<sub>10</sub> içermektedirler. Böylece KoQ moleküllerinin ROS oluşumu için koruyucu olup olmadıkları araştırılmıştır. R4B:FL 1:1 proteolipozom modellerinde, ROS ölçümü için fazla miktarda R4B kullanılmasından dolayı ROS ölçümü sadece bir kez tekrarlanabilmiştir.

Yapılan çalışmada, süperkompleks varlığında kompleks I kaynaklı ROS oluşumu ile süperkompleks oluşumu engellendiğindeki ROS oluşumu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. KoQ<sub>10</sub> içermeyen proteolipozomlarda, SK I<sub>1</sub>III<sub>2</sub> ayrıştığına %20 oranında bir artış gözlenmiştir. Maranzana ve ark. tarafından yapılmış çalışmada ise süperkompleks ayrışması gerçekleştiği 30nMol<sub>KoQ</sub>/mgFL içeren proteolipozomlarda kompleks I kaynaklı ROS üretimi 3-4 kat artarken, çalışmamızda benzer bir artış bulunamamıştır (4). KoQ'nun düşük konsantrasyonlarında elde ettiğimiz sonuçları karşılaştıracak herhangi bir literatür çalışması bulunmamaktadır.

Bunun yanı sıra, her iki proteolipozom modelinde KoQ<sub>10</sub> konsantrasyonuna bağlı olarak ROS oluşumunun düzenli bir şekilde azaldığı gösterilmiştir. Özellikle SK I<sub>1</sub>III<sub>2</sub> yapısının bulunmadığı proteolipozom serilerinde her iki denemede de birebir aynı grafikler elde edilmiştir. Bu bulgu kompleks I'in serbest olduğu bu proteolipozomlarda KoQ<sub>10</sub> molekülünün antioksidan gibi davranarak ROS oluşumunu bertaraf ettiği şeklinde yorumlanmıştır. Çalışmamızda maalesef, birinci ROS denemesinde R4B:FL 1:1 proteolipozom serilerinde KoQ<sub>10</sub> konsantrasyonuna bağlı ROS ölçüm sonuçları anlamsız bir trend göstermiş ve inhibitörlerin çalışmaması veya ortamda herhangi bir interferans kaynaklı olabileceği düşünülmüş ve sonuçlar çalışmaya dahil edilmemiştir. R4B:FL 1:1/1:30 proteolipozom modellerinin her ikisinde de 30nMol<sub>KoQ</sub>/mgFL konsantrasyonda en düşük ROS değerinin elde edilmesi; KoQ<sub>10</sub> miktarının süperkompleks oluşumunun ROS üretimine karşı koruyucu etki gösterdiği sonucunu ortaya çıkarmıştır.

Son yıllarda artan veriler mitokondriyal solunum sisteminde görev alan protein komplekslerinin fizyolojik koşullarda, daha etkin bir elektron iletimi için bir araya gelerek süperkompleks oluşturdukları yönündedir (47) Bununla birlikte süperkomplekslerin ayrışması solunum kapasitesinin düşmesine ve ROS üretiminde artışa neden olduğundan pek çok patolojik durum ile alakalı olarak gösterilmiştir (54).

Sonuç olarak çalışmamızda, literatüre paralel olarak; süperkompleks I<sub>1</sub>III<sub>2</sub> oluşumunun, komplekslerin bireysel olarak yer aldığı durumlara göre daha hızlı ve etkin bir elektron iletimi gerçekleştirdiği enzimatik açıdan gösterilmiştir. Bunun nedeni olarak; KoQ<sub>10</sub> moleküllerinin komplekslere bağlı halde bulunması ve bu sayede daha etkin bir elektron iletimi sağladığı bunun aksine SK içermeyen modellerde ise havuz davranışına uygun olarak difüzyonel hareket ettiği düşünülmüştür.

Süperkompleks oluşumu gözlenmeyen proteolipozomların *K<sub>m</sub>* değerlerinin fizyolojik [KoQ<sub>10</sub>]<sub>t</sub> oranla düşük olması, özellikle fizyolojik koşullarda NADH oksidasyonunun sature olabilmesi için süperkompleks yapılarının gerekli olduğu gerçeğini ortaya koymuştur. Bunun yanı sıra, KoQ<sub>10</sub> konsantrasyonuna bağlı olarak solunum zinciri kaynaklı ROS üretiminin azaldığı gösterilmiştir. Koenzim Q eksikliğinin pek çok hastalıkla ilişkisi olduğu ve ekzojen KoQ desteğinin bu gibi durumlarda iyileştirici etkileri olduğu bilinmektedir (111). Bütün bunlar göz önüne alındığında; ekzojen KoQ desteğinin mitokondriyal solunum için restore edici özelliğinden dolayı yararlı olabileceği tavsiye edilmektedir.



## 8. KAYNAKLAR

1. Gupte S, Wu ES, Hoehli L, Hoehli 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* 81: 2606-2610.
2. Schägger H, Pfeiffer K, (2000). Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J* 19(8): 1777-1783.
3. Lenaz G, Genova ML, (2009). Mobility and function of coenzyme (ubiquinone) in the mitochondrial respiratory chain. *Biochim Biophys Acta* 1787: 563–573.
4. 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.
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. Electronic resources [online]. Available from: <http://encyclopedia2.thefreedictionary.com/Mitochondria>. [Accessed February 2013].
9. Scheffler IE (1999). Mitochondria. John Wiley and Sons Inc Publication Chapter 3:15-46.
10. Perkins G, Renken C, Martone ME, Young SJ, Ellisman M, Frey T (1997). Electron Tomography of Neuronal Mitochondria: Three-Dimensional Structure and Organization of Cristae and Membrane Contacts. *J Struct Biol* 119: 260-272.
11. Nelson DL, Cox MM (2008). *Lehninger Principles of Biochemistry*. Fifth ed. W H Freeman and Company Newyork. Bioenergetic and Metabolism II, 707.

12. Electronic resources [online]. Available from: <http://www.biyolojisitesi.net>[Accessed February 2013].
13. Mitchell P (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism *Nature* 191:144-148
14. Brandt U (1997). Proton-translocation by membrane-bound NADH:ubiquinone-oxidoreductase (complex I) through redox-gated ligand conduction *Biochim Biophys Acta* 1318:79-91.
15. Galkin AS, Grivennikova VG, Vinogradov AD (1999).  $H^+/2e^-$  stoichiometry in NADH-quinone reductase reactions catalyzed by bovine heart submitochondrial particles. *FEBS Lett* 451:157-161
16. Walker JE, Skehel JM, Buchanan SK (1995). Structural Analysis of NADH:Ubiquinone Oxidoreductase from Bovine Heart Mitochondria *Methods Enzymol* 260:14-34.
17. Friedrich T, Brors B, Hellwig P, Kintscher L, Rasmussen T, Scheide D, Schulte U, Mäntele W, Weiss H (2000). Characterization of two novel redox groups in the respiratory NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I) *Biochim Biophys Acta* 1459:305-309.
18. Ohnishi T (1998). Iron-sulfur clusters/semiquinones in Complex I' *Biochim. Biophys Acta* 1364:186-206.
19. Walker JE (1992). The NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I) of respiratory chain Q. *Rev Biophys* 25:253-324.
20. Arizmendi JM, Runswick MJ, Skehel JM, Walker JE (1992). NADH:ubiquinone oxidoreductase from bovine heart mitochondria. A fourth nuclear encoded subunit with a homologue encoded in chloroplast genomes. *FEBS Lett* 301(3):237-242.
21. Grigorieff N (1998). Three-dimensional structure of bovine NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) at 22 Å in ice *J Mol Biol* 277:1033-1046.

22. Sazanov LA, Peak-Chew SY, Fearnley IM, Walker JE (2000). Resolution of the Membrane Domain of Bovine Complex I into Subcomplexes: Implications for the Structural Organization of the Enzyme. *Biochemistry* 39:7229-7235.
23. Electronic resources [online]. Available from: <http://www.ianlogan.co.uk/lhon/complex.htm> [Accessed February 2013].
24. Vinogradov AD, Sled VD, Burbaev DS, Grivennikova VG, Moroz IA, Ohnishi T (1995). Energy-dependent Complex I-associated ubisemiquinones in submitochondrial particels. *FEBS Lett* 370:83-87.
25. Ohnishi T, Sled VD, Yano T, Yagi T, Burbaev DS, Vinogradov AD (1998). Structure-function studies of iron-sulfur clusters and semiquinones in the NADH-Q oxidoreductase segment of the respiratory chain. *Biochim Biophys Acta* 1365:301-308.
26. Yano T, Magnitsky S, Ohnishi T (2000). Characterization of the complex I-associated ubisemiquinone species: toward the understanding of their functional roles in the electron/proton transfer reaction. *Biochim Biophys Acta* 1459:299-304.
27. Ingledew WJ, Ohnishi T (1980). An Analysis of some Thermodynamic Properties of Iron-Sulphur Centers in Site I of Mitochondria. *Biochem J* 186:111-117.
28. Doull J, Hodgeson E, Maibach H, Reitter L, Ross J, Slikker W JR, Hemmen J (2010). *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology*. 3rd Ed. Volume 1. Academic press.
29. Johnson MK, Morningstar JE, Bennett DE, Ackrell BA, Kearney EB (1985). Magnetic Circular Dichroism Studies of Succinate Dehydrogenase. *J Biol Chem* 160:7368-7378.
30. Scheffler IE (1999). *Mitochondria*. John Wiley and Sons Inc Publication Chapter 5:141-238.

31. Sun F, Huo X, Zhai Y, Wang A, Xu J, Su D, Bartlam M, and Rao Z (2005). Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell* 121(7):1043-57.
32. Electronic resources [online]. Available from: [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Cytochrome\\_bc1\\_complex.png](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Cytochrome_bc1_complex.png) [Accessed February 2013].
33. Mitchell P (1975). The protonmotive Q cycle: a general formulation. *FEBS Lett* 59:137-139.
34. Trumpower BL (1990). The protonmotive Q cycle. Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome bc1 complex. *J Biol Chem* 265:11409-11412.
35. Iwata S, Ostermeier C, Ludwig B, Michel H (1995). Structure at 2.8 Å Resolution of Cytochrome c Oxidase from *Paracoccus Denitrificans*. *Nature* 376:660-669.
36. Yoshikawa S, Shinzawa-Itoh K, Nakashima R, Yaono R, Yamashita E, Inoue N, Yao M, Fei MJ, Libeu CP, Mizushima T, Yamaguchi H, Tomizaki T, Tsukihara T (1998). Redox-Coupled Crystal Structural Changes in Bovine Heart Cytochrome c Oxidase. *Science* 280:1723-1729.
37. Horton HR, Moran LA, Ochs RS, Rawn DJ, Scrimgeour GK (2006). Principles of biochemistry. 3rd edition.
38. Buchanan SK, Walker JE (1996). Large-scale chromatographic purification of F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase and complex I from bovine heart mitochondria. *Biochem J* 318:343-349.
39. Wang H, Oster G (1998). Energy transduction in the F1 motor of ATP synthase. *Nature* 396(6708):279-82.
40. Abrahams JP, Leslie AGW, Lutter R, Walker JE (1994). Structure at 2.8 Å resolution of F<sub>1</sub>-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* 370: 621-628.
41. Elston T, Wang H, Oster G (1998). Energy transduction in ATP synthase. *Nature* 391:510-513.

42. Noji H, Yasuda R, Yoshida M, Kinosita K Jr (1997). Direct observation of the rotation of F<sub>1</sub>-ATPase. *Nature* 386: 299-302.
43. Chance B, Williams GR (1955). A method for the localization of sites for oxidative phosphorylation. *Nature* 176: 250-254.
44. Hatefi Y, Haavik AG, Rieske JS (1962). Studies on the electron transfer system. XL. Preparation and properties of mitochondrial DPNH-coenzyme Q reductase. *J Biol Chem* 237:1676-1680.
45. Ozawa T, Nishikimi M, Suzuki H, Tanaka M, Shimomura Y (1987). *Bioenergetics: Structure and Function of Energy-Transducing Systems*. Japan Sci. Soc. Press Tokyo 101-119.
46. Lenaz G (2001). A critical appraisal of the mitochondrial coenzyme Q pool. *FEBS Lett* 509(2):151-155.
47. Hochman J, Ferguson-Miller S, Schindler M (1985). Mobility in the mitochondrial electron transport chain. *Biochemistry* 24: 2509–2516.
48. Yu A, Yu L (1987). Resolution and reconstitution of succinate cytochrome c reductase: preparations and properties of high purity succinate dehydrogenase and ubiquinol-cytochrome c reductase. *Biochim Biophys Acta* 591:409–420.
49. Cruciat CM, Brunner S, Baumann F, Neupert W, Stuart RA (2000). The cytochrome bc<sub>1</sub> and cytochrome c oxidase complexes associate to form a single supracomplex in yeast mitochondria. *J Biol Chem* 275:18093–18098.
50. Schägger H (2000). Respiratory chain supercomplexes. *IUBMB Life* 52:119–128.
51. Schägger H, 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.
52. Acín-Pérez R, Fernandez-Silva P, Peleato ML, Perez-Martos A, Enriquez JA (2008). Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Mol Cell* 32:529–39.

53. Krause F, Scheckhuber CQ, Werner A, Rexroth S, Reifschneider NH, Dencher NA, Osiewacz HD (2006). OXPHOS supercomplexes: respiration and life-span control in the aging model *Podospora anserina*. *Ann N Y Acad Sci* 1067:106–115.
54. Lenaz G, Baracca A, Barbero G, Bergamini G, Dalmonte ME, Del Sole M, Faccoli M, Falasca A, Fato R, Genova ML, Sgarbi G, Solaini G (2010). Mitochondrial respiratory chain super-complex I-III in physiology and pathology. *Biochimica et Biophysica Acta* 1797(6-7):633-640.
55. Dudkina NV, Eubel H, Keegstra W, Boekema EJ, Braun HP (2005). Structure of a mitochondrial supercomplex formed by respiratory-chain complexes I and III. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:3225–3329.
56. Peters K, Dudkina NV, Jansch L, Braun HP, Boekema EJ (2008). A structural investigation of complex I and I+III<sub>2</sub> 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.
57. Schäfer E, Dencher NA, Vonck J, Parcej DN (2007). Threedimensional structure of the respiratory chain supercomplex I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>IV<sub>1</sub> from bovine heart mitochondria. *Biochemistry* 46:12579–12585.
58. Heinemeyer J, Braun HP, Boekema EJ, Kouril R (2007). A structural model of the cytochrome c reductase/oxidase supercomplex from yeast mitochondria. *J Biol Chem* 282:12240–12248.
59. Bultema JB, Braun HP, Boekema EJ, Kouril R (2009). Megacomplex organization of the oxidative phosphorylation system by structural analysis of respiratory supercomplexes from potato. *Biochim Biophys Acta* 1787: 60–67.
60. Swanson M, Packer L (1980). Effect of crosslinking cytochrome c oxidase. *Arch Biochem Biophys* 204: 30–40.
61. Lenaz G, Genova ML (2010). Structure and Organization of Mitochondrial Respiratory Complexes: A New Understanding of an Old Subject, *Antioxidants & Redox Signaling* 12: 961-1008.

62. 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.
63. 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.
64. Ramasarma T (1985). Natural occurrence and distribution of coenzyme Q. In: *Coenzyme Q*, edited by Lenaz G. Chichester, UK: Wiley 67–82.
65. Van Hellemond JJ, Klockiewicz M, Gaasenbeek CP, Roos MH, Tielens AG (1995). Rhoquinone and complex II of the electron transport chain in anaerobically functioning eukaryotes. *J Biol Chem* 270: 31065–31070.
66. Lenaz G (1998). Quinone specificity of complex I. *Biochim Biophys Acta* 1364: 207–221.
67. Fato R, Battino M, Degli Esposti M, Parenti Castelli G, Lenaz G (1986). Determination of partition and lateral diffusion coefficients of ubiquinones by fluorescence quenching of n-(9-anthroyloxy)stearic acids in phospholipid vesicles and mitochondrial membranes. *Biochemistry* 25: 3378–3390.
68. Samori` B, Lenaz G, Battino M, Marconi G, and Domini I (1992). On coenzyme Q orientation in membranes: a linear dichroism study of ubiquinones in a model bilayer. *J Membr Biol* 128: 193–203.
69. Di Bernardo S, Fato R, Casadio R, Fariselli P, Lenaz G (1998). A high diffusion coefficient for coenzyme Q<sub>10</sub> might be related to a folded structure. *FEBS Lett* 426: 77–80.
70. Green DE, Tzagoloff A (1966). The mitochondrial electron transfer chain. *Arch Biochem Biophys.* 116: 293–304.

71. 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.
72. Kröger A, Klingenberg M (1973). Further evidence of the pool function of ubiquinone as derived from the inhibition of the electron transport by antimycin, *Eur J Biochem.* 39: 313–323.
73. Boumans H, Grivell LA, Berden JA (1998). The respiratory chain in yeast behaves as a single functional unit. *J Biol Chem* 273: 4872–4877.
74. Gutman M (1985). Kinetic analysis of electron flux through the quinones in the mitochondrial system. G. Lenaz (Ed.) *Coenzyme Q* Wiley Chichester UK 215–234.
75. Fato R, Estornell E, Di Bernardo S, Pallotti F, Parenti Castelli G, Lenaz G (1996). Steadystate kinetics of the reduction of Coenzyme Q analogs by Complex I (NADH: ubiquinone oxidoreductase) in bovine heart mitochondria and submitochondrial particles. *Biochemistry* 35: 2705–2716.
76. Norling B, Glazek E, Nelson BD, Ernster L (1974). Studies with ubiquinone-depleted submitochondrial particles: Quantitative incorporation of small amounts of ubiquinone and its effects on the NADH and succinate oxidase activities. *Eur J Biochem* 47: 475–482.
77. Lenaz G, Battino M, Castelluccio C, Fato R, Cavazzoni M, Rauchova H, Bovina C, Formiggini G, Parenti Castelli G (1989). Studies on the role of ubiquinone in the control of the mitochondrial respiratory chain. *Free Rad Res Commun* 8: 317–327.
78. Estornell E, Fato R, Castelluccio C, Cavazzoni M, Parenti Castelli G, Lenaz G (1992). Saturation kinetics of Coenzyme Q in NADH and succinate oxidation in beef heart mitochondria. *FEBS Lett* 311:107–109.
79. Schneider H, Lemasters JJ, Hackenbrock CR (1982). Lateral diffusion of ubiquinone during electron transfer in phospholipid- and ubiquinone-enriched mitochondrial membranes. *J Biol Chem* 257: 10789–10793.



80. Parenti Castelli G, Fato R, Castelluccio C, Lenaz G (1987). Kinetic studies on the pool function of ubiquinone in mitochondrial systems. *Chem Scr* 27: 161–166.
81. Srere PA (1982). The structure of the mitochondrial inner membrane-matrix compartment. *TIBS* 7: 375–378.
82. Srere PA (1987). Complexes of sequential metabolic enzymes. *Annu Rev Biochem* 56: 89–124.
83. Zhu QS, Berden JA, de Vries S, Slater EC (1982). On the role of ubiquinone in the respiratory chain *Biochim Biophys Acta* 680: 69–79.
84. Genova ML, Castelluccio C, Fato R, Parenti Castelli G, Merlo Pich M, Formiggini G, Bovina C, Marchetti M, 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.
85. Capaldi RA (1982). Arrangement of proteins in the mitochondrial inner membrane. *Biochim Biophys Acta* 694: 292–306.
86. Lass A, Sohal RS (1999). Comparisons of coenzyme Q bound to mitochondrial membrane proteins among different mammalian species. *Free Radic Biol Med* 27: 220–226.
87. Lenaz G, Genova ML (2007). Kinetics of integrated electron transfer in the mitochondrial respiratory chain: random collisions vs. solid state electron channelling. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: C1221–1239.
88. Sowers E, Hackenbrock CR (1981). Rate of lateral diffusion of intramembrane particles: measurement by electrophoretic displacement and rerandomization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 78: 6246–6250.
89. Allen RD, Schroeder CC, Fok AK (1989). An investigation of mitochondrial inner membranes by rapid-freeze deep-etch techniques. *J Cell Biol* 108: 2233–2240.
90. Thomas D, Weimann T, Dautant A, Giraud MF, Paumard P, Salin B, Cavalier A, Velours J, Brèthes D (2008). Supramolecular organization of the yeast F1Fo-ATP synthase. *Biol Cell* 100: 591–721.

91. Smith AL (1967). Preparation, properties, and conditions for assay of mitochondria: Slaughterhouse material small-scale. *Methods Enzymol* 10: 81- 86.
92. Hatefi Y, Rieske JS (1967). The preparation and properties of DPNH-cytochrome c reductase (Complex I-III of the respiratory chain). *Methods Enzymol* 10: 225–231.
93. Gornall AG, Bardawill CJ, David MM (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem* 177: 751-766.
94. Degli Esposti M, Lenaz G (1979). Partition of CoQ-homologs in lipid membranes. *Boll Soc Ital Biol Sper* 55: 1607-1611.
95. Lenaz G, Fato R, Di Bernardo S, Jarreta D, Costa A, Genova ML, Parenti Castelli G (1999). Localization and mobility of coenzyme Q in lipid bilayers and membranes. *Biofactors* 9: 87-93.
96. Racker E; Violand B; O'Neal S; Alfonzo M, Telford J (1979). Reconstitution, a way of biochemical research; some new approaches to membrane-bound enzymes. *Arch Biochem Biophys* 198: 470 – 477.
97. Rigaud JE; Pitard B, Levy D (1995). Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application to energy-transducing membrane proteins. *Biochem Biophys Acta* 1231: 223 – 246.
98. Lowry O, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265 – 275.
99. Degli Esposti M (2002). Measuring mitochondrial reactive oxygen species. *Methods* 26: 335–340.
100. Fato R, Bergamini C, Bortolus M, Maniero AL, Leoni S, Ohnishi T, Lenaz G (2009). Differential effects of mitochondrial Complex I inhibitors on production of reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta* 1787: 384–392.
101. Black MJ, Brandt RB (1974). Spectrofluorometric analysis of hydrogen peroxide. *Anal Biochem* 58: 246–254.

102. 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.
103. Ragan CI, Heron C (1978). The interaction between mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase and ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase. Evidence for stoichiometric association. *Biochem J* 15:174(3):783-90.
104. 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.
105. Diaz F, Fukui H, Garcia S, Moraes CT (2006). Cytochrome c oxidase is required for the assembly/stability of respiratory complex I in mouse fibroblasts. *Mol Cell Biol* 26: 4872–4881.
106. Schägger H, de Coo R, Bauer MF, Hofmann S, Godinot C, Brandt U (2004). Significance of respirasomes for the assembly/stability of human respiratory chain complex I. *J Biol Chem* 279: 36349–36353.
107. Seelert H, Dani DN, Dante S, Hauss T, Krause F, Schäfer E, Frenzel M, Poetsch A, Rexroth S, Schwassmann HJ, Suhai T, Vonck J, Dencher NA (2009). From protons to OXPHOS supercomplexes and Alzheimer's disease: structure-dynamics-function. *Biochim Biophys Acta* 1787(6):657-71.
108. Ovádi J (1991). Physiological significance of metabolic channelling. *J Theor Biol* 152(1):1-22.
109. Battino M, Ferri E, Villa RF, Gorini A, Huertas JFR, Fiorella PC, Genova ML, Lenaz G, Marchetti M (1990). Natural distribution and occurrence of Coenzyme Q homologues. *Membrane Biochem* 9: 179–190.
110. Panov A, Dikalov S, Shalbuyeva N, Hemendinger R, Greenamyre JT, 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: 708–718.

111. Genova ML, Lenaz G (2011). New developments on the functions of coenzyme Q in mitochondria. *Biofactors* 37: 330-54.

## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

<b>Soyadı, Adı:</b>	Yelda BİRİNCİ
<b>Uyruğu:</b>	TC
<b>Doğum tarihi ve yeri:</b>	18.01.1980, Zonguldak
<b>Medeni hali:</b>	Bekar
<b>Telefon:</b>	0 462 2294711
<b>E-Posta:</b>	daisyelda@gmail.com
<b>Yazışma adresi:</b>	KTÜ, SABE, Tıbbi Biyokimya A.D

### EĞİTİM BİLGİLERİ:

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora	KTÜ, Tıbbi Biyokimya	2007-2014
Yüksek Lisans	KTÜ, Tıbbi Biyoloji	2005-2007
Lisan	DEÜ, Biyoloji Öğretmenliği	1999-2004
Lise	Fatih Süper Lisesi	1994-1998

### AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİM

Görevi	Kurum	Süre (Yıl -Yıl)
1. Araştırmacı	Bologna Üniversitesi	2012-2013
2.Erasmus Öğrencisi	Bologna Üniversitesi	2010-2011
3.Araştırma Görevlisi	KTÜ	2007-2013

**YABANCI DİL:** Ielts, 5.5

### UZMANLIK ALANI

Mitokondriyal Solunum Zinciri,Süperkompleksler.

## YAYINLAR/BİLDİRİLER

1. Bahadır A, Erduran E, Değer O, Birinci Y (2013). Demir Eksikliği ve Demir Eksikliği Anemisi Olan Çocuklarda Sitokrom C Oksidaz, Katalaz Enzim Aktivitelerinin Ve Bakır Seviyelerinin Değerlendirilmesi. 8<sup>th</sup> Balkan Day of Hematology/ 39.
2. Genova ML, Kopuz M, Birinci Y, Maranzana E, Dalmonte ME, Falasca AI, Lenaz G (2013). Modulation of ROS production plasticity of respiratory supercomplexes: a possible mechanism of intracellular signaling. 57<sup>th</sup> National Meeting of the Italian Society of Biochemistry and Molecular Biology.
3. Kopuz M, Birinci Y, Maranzana E, Falasca A.I, Lenaz G, Genova ML (2013). Mitochondrial respiratory supercomplexes: kinetic advantage and ROS production GIBB, Annual Meeting of the Italian Group of Biomembranes and Bioenergetics.
4. Birinci Y, Kopuz M, Maranzana E, Falasca AI, Lenaz G, Genova ML (2013). Mitochondrial Respiratory Chain Supercomplexes limit ROS production. 8<sup>th</sup> Forum on Oxidative Stress and Aging.
5. Birinci Y, Kalay E, Toraman B, Kayıpmaz S, Çaylan R, Koşucu P, Karagüzel A (2011). Mutation analysis of the *SOST* gene in a family with sclerosteosis. XII Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik kongresi.
6. Collin RW, Kalay E, Oostrik J, Çaylan R, Wollnik Bernd, Arslan S, Den Hollander AI, Birinci Y, Strom TM, Lichtner P, Toraman B, Hoefsloot LH, Cremers CW, Brunner HC, Cremers FP, Karagüzel A, Kremer H (2007). The involvement of the DFNB59 mutations in autosomal recessive non-syndromic hearing impairment. Human mutation 28: 718-723.