



Protein Oksidasyonun Biyokimyasal ve Moleküler Mekanizması

Biochemical and Molecular Mechanism of Protein Oxidation

Ender Büyükgüzel

Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 67100, İncivez, Zonguldak

Özet

Serbest amino asitler ve proteinlerdeki amino asit kökleri çeşitli reaktif oksijen ve azot türleri (ROT, RAT) ve metal iyonlarının okside edici etkilerine karşı oldukça hassastırlar. ROT üretimi çevresel faktörlerin etkisi ile olduğu kadar hücrel metabolik aktiviteler sonucunda da gerçekleşir. ROT'lar karbohidrat, nükleik asit, lipid ve proteinler gibi hücrenin temel makromolekülleri ile etkileşebilir. Proteinler canlı organizmalarda yapısal ve işlevsel olarak önemli rolleri üstlenmiş biyomoleküller olduğundan bu makalede protein ve serbest amino asitlerin ROT aracılığı ile oksidasyonu üzerinde durulmuştur. Proteinlerin oksidasyonu sonucu aromatik grupların ve alifatik amino asit yan zincirlerinin hidroksilasyonu, aromatik amino asit köklerinin ve sülfidril gruplarının nitrolanması, metiyoninin sülfoksitlenmesi, aromatik ve primer amin gruplarının klorlanması ve bazı amino asit köklerinin karbonil türevlerine dönüşümü gerçekleşir. Oksidasyon aynı zamanda çapraz bağlı proteinlerin oluşumu ve polipeptit zincirinin kırılmasına da neden olarak sonuçta bazı radikallerin en önemlisi alkoksil radikallerinin oluşumunu sağlar. Ayrıca proteinlerin fonksiyonel grupları 2-alkenal, 4-hidroksi-2-alkenal, and ketoaldehid gibi çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyon ürünleri ve bazı karbohidrat türevleri (karbohidrat eklenmesi veya karbohidratların oksidasyon ürünleri) ile reaksiyona girerek inaktif türev bileşikleri oluştururlar. Diğer taraftan yaşlanma ve oksidatif hasara uğramış protein lipid ve nükleik asitlerin birikmesi arasında bir ilişki bulunmaktadır. Oksidatif olarak modifiye olmuş proteinlerin miktarında yaşın ilerlemesi ile birlikte artış olduğu ve protein oksidasyonunu azaltan faktörlerin aynı zamanda canlıların yaşam süresini uzattığı bilinmektedir. Ayrıca omurgalılarda diyabet, aterosklerosis, nörodejeneratif hastalıklar, kalp ve damar sistemi rahatsızlıkları gibi yaşlanmaya ve diğer çok sayıda hastalıklara bağlı protein oksidasyonu ürünlerinin fazla oluşumu sonucu hücre ve dokularda aşırı birikimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Protein oksidasyonu seviyesi çeşitli oksidatif stres faktörlerinden kaynaklanan bazı hastalıklar ve önemli yaşlanma sırasında miktarı yükselen protein oksidasyonun en önemli belirteci olan protein karbonil bileşiklerinin ve diğer son ürünlerin miktarının ölçülmesi ile belirlenebilmektedir.

Anahtar Sözcükler: Protein oksidasyonu, ROT, Karbonil bileşikler, Nörodejeneratif hastalıklar, Yaşlanma

Abstract

Free amino acids and amino acid residues in proteins are highly susceptible to oxidation by various oxygen and nitrogen species (ROS, RNS) or metal ions. The production of ROS is influenced by cellular metabolic activities as well as environmental factors. ROS can react with all major biological macromolecules such as carbohydrates, nucleic acids, lipids, and proteins. Proteins are the key molecules that play the ultimate role in various structural and functional aspects of living organisms. We report on biochemical and molecular mechanisms of ROS-mediated oxidation of proteins and free amino acids. Oxidation of proteins can lead to hydroxylation of aromatic groups and aliphatic amino acid side chains, nitration of aromatic amino acid residues, nitrosylation of sulfhydryl groups, sulfoxidation of methionine residues, chlorination of aromatic groups and primary amino groups, and to conversion of some amino acid residues to carbonyl derivatives. Oxidation can lead also to cleavage of the polypeptide chain and to formation of cross-linked protein aggregates. The consequent protein oxidation involves several propagating radicals, notably alkoxy radicals. Furthermore, functional groups of proteins can react with oxidation products of polyunsaturated fatty acids such as 2-alkenals, 4-hydroxy-2-alkenals, and ketoaldehydes and with carbohydrate derivatives (glycation/glycoxidation) to produce inactive derivatives. There is also a correlation between aging and the accumulation of oxidatively damaged proteins, lipids, and nucleic acids. Oxidatively modified proteins have been shown to increase as a function of age. Factors that decelerate protein oxidation also increase the life span of living organisms. Furthermore, a number of age-related or other diseases such as cancer, diabetes mellitus, atherosclerosis, neurodegenerative, and cardiovascular diseases in vertebrates have been shown to be associated with elevated levels of oxidatively modified proteins. The level of these modified molecules can be quantitated by measurement of the protein carbonyls compounds and other oxidized end products content, which have been shown to increase in a variety of diseases and processes, notably during aging as a result of oxidative stress.

Keywords: Protein oxidation, ROS, Carbonyl compounds, Neurodegenerative diseases, Aging

1. Giriş

Biyolojik sistemlerde serbest radikallerin varlığı Denham Harman (1956) tarafından *in vivo* enzimatik reaksiyonların yan ürünleri olarak oksijen radikallerinin oluşabileceğinin gösterilmesiyle anlaşılmıştır. Serbest radikallerin büyük hücre hasar, mutasyon, kanser ve biyolojik yaşlanmadan sorumlu olabileceği ifade edilmiştir (Harman 1981, Aikawa vd. 1997). Canlılardaki serbest radikaller McCord ve Fridovich (1969) tarafından süperoksit dismutaz enziminin (SOD) keşfinden sonra önem kazanmış ve sonuç olarak serbest radikallerin biyolojide önemli olduğu anlaşılmıştır. Birçok araştırmacı radikallerin hücredeki DNA, protein, lipid ve diğer biyomoleküller ile etkileşimleri sonucu ortaya çıkabilen oksidatif hasarlar üzerinde çalışmıştır (Beckman ve Ames 1998). Daha sonraları serbest radikallerin yararlı biyolojik etkilerinin de tespit edildiği yeni bir dönem başlamıştır. Yirmi birinci yüzyılın başlarında, canlıların serbest radikallerin zararlı etkilerine yalnızca adapte olmadıkları aynı zamanda bunların yararlı olarak kullanılmaları için mekanizmalar geliştirdiklerine dair önemli ipuçları bulunmuştur. Serbest radikaller veya bunların türevlerinin sorumlu olduğu önemli fizyolojik işlevler damar tonusunun düzenlenmesi, oksijen basıncının algılanması ve oksijen konsantrasyonu tarafından kontrol edilen fizyolojik işlevlerin düzenlenmesi, lenfositlerin antijen reseptörlerinin de dâhil olduğu çeşitli zar reseptörlerinden sinyal iletiminin sağlanması ve redoks homeostazisinin sağlanması ve devam ettirilmesine yönelik oksidatif stres tepkileridir (Dröge 2002).

Oksidatif stresin birçok hastalık durumunda önemli rol oynadığının tespit edilmesiyle redoks düzenlemesiyle ilgili çalışmalara aynı zamanda klinisyenler tarafından da ilgi duyulmuştur. Serbest radikallerin zararlı ve yararlı etkileri arasındaki hassas denge, yaşamın önemli bir sürecidir. Biyolojik olarak redoks düzenlenmesi fizyoloji, hücre biyolojisi ve klinik tıbbi içine alan çeşitli bilimsel alanlarda gittikçe önem kazanmaktadır. Omurgalılar ve omurgasızlar üzerinde yapılan çalışmalar belirli reaktif oksijen (ROT) ve reaktif azot türleri (RAT) özellikle tekli oksijen (1O_2), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve nitrik oksit (NO) yalnızca sitotoksik moleküller olmayıp aynı zamanda fizyolojik işlevlerde önemli sinyal molekülleri olduğu ortaya çıkarılmıştır (Adler vd. 1999, Stefano ve Ottaviani 2002). *Drosophila melanogaster*'deki immun reaksiyonlarda (Foley ve O'farrell 2003, Nappi ve Vass 2001), *Anopheles* cinsi sivrisinekte *Plasmodium* enfeksiyonuna karşı (Dimopoulos vd. 2001, Luckhart vd. 1998), *Trypanosoma* ile enfekte olmuş *Rodnius prolixus* (Whitten vd. 2007), ve immun olarak uyarılmış lepidopter hemositlerinde (Weiske ve Wiesner 1999) bu sinyal moleküllerin

bir ya da bir kaçının miktarının arttığı tespit edilmiştir. Nitrik oksit'in omurgalı bağışıklık sisteminde uzun süreden bu yana hem koruyucu hemde oksidan etkiye sahip olduğu bilinmektedir (Bogdan 2001, Bogdan vd. 2000).

Yaklaşık 50 yıl kadar önce yaşlanmanın en yaygın itibar gören teorilerinden biri olan "serbest radikal" teorisinin ortaya atılmasıyla ROT'ların hücre makromolekülleri hasara uğratması sonucu hücre yaşlanmaya sebep oldukları anlaşılmıştır. Günümüzde aerobik solunum yapan organizmalarda ROT'ların en çok üretildiği yer mitokondriler olup en çok etkilenen hedefler de mitokondrilerin yapısal ve işlevsel bileşenleridir. Canlılarda aerobik solunum sonucu oluşan serbest radikaller DNA, protein ve lipidler gibi hücre ve organel bileşenlerinde oksidatif olarak hasara sebep olur. Böyle hasarlar yapı değişimi ile birlikte yaşlanma ve hücre ölümüne sebep olacak şekilde biyolojik işlev kaybına yol açar (Berlett ve Stadtman 1997). Mitokondri iç zarındaki solunum zinciri ökaryotlarda reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumu için önemli hücre içi kaynaktır. ROT'lar oldukça reaktif ve kısa ömürlü olduğundan mitokondri sürekli olarak bu ROT'lara maruz kalır ve hücrenin diğer organellerine ve bölümlerine göre daha hızlı bir şekilde oksidatif hasara uğrar (Kowaltowski ve Vercesi 1999). Mitokondrideki oksidatif stresin zararlı etkisini en aza indirmek, mitokondri ve hücrenin diğer bölümlerindeki işlevlerinin normal yürümesi için bazı koruyucu enzimler ve proteinler iş görür (Andreoli vd. 2004). Bunların arasında Mn-süperoksit dismutaz (Sod2, Mn-SOD), glutaredoksin (Grx5), peroksiredoksin (Prx1), tiyoredoksin (Trx3), sitokrom c peroksidaz (CcP), Cu, Zn süperoksit dismutaz (Sod1, Cu, Zn-SOD), glioksilaz-II (Glo4), tiyoredoksin redüktaz (Trr2), Glutaredoksin (Grx2), bakırlı şaperon (Ccs1) (Ünlü ve Koç 2007) gibi enzim ve proteinler bulunmaktadır. Bunların bazıları serbest radikallerin süpürülmesinde doğrudan bir role sahiptir, örneğin SOD süperoksit anyonunu H_2O_2 'ye dönüştürür. Daha sonra H_2O_2 CAT ve peroksidaz (POX) ile detoksifiye edilerek moleküler oksijen ve suya dönüştürülür (Jensen vd. 2000). Oksidatif hasara uğrayan bileşenlerin ürünlerini tamir eden enzimler antioksidan savunmanın ikinci hatını oluşturmaktadır (Moradas-Ferreira vd. 1996). Eğer oksidatif strese karşı savunma mekanizması zayıflatılırsa patofizyolojik durumlar ortaya çıkabilir. Mitokondri kaynaklı oksidatif hasar insanlarda nörodejeneratif hastalıklar, kanser ve yaşlanmaya neden olur (Singh 1998). Maya, *Saccharomyces cerevisiae*, hücreleri sınırlı bir hayat süresine sahip olup hücre yaşlanmasında mitokondrilerdeki antioksidan genlerin rolünü çalışmada iyi bir model organizmadır. Hayat süresinin kısa olması ve genetiğinin iyi bilinmesi sebebiyle *Drosophila melanogaster*'de bu tür

çalışmalar için iyi bir modeldir. Maya hücrelerinden bazı antioksidant enzim genleri *SOD1* (Cu, Zn süperoksit dismutaz), *SOD2* (manganez içeren süperoksit dismutaz) ve *CCS1* (bakır içeren şaperonları) çıkarıldığında hücrelerin yaşam süresi önemli derecede kısalmıştır. Yaşam süresi *SOD1* geni mutantlarında %40, *SOD2* mutantlarında %72 oranında, *CCS1* mutantlarında ise %50 oranında kısalmıştır (Ünlü ve Koç 2007, Bonawitz vd. 2006, Barker vd. 1999). Ömür uzunluğundaki kısalmanın mitokondrilerde oksidan üretiminin artışına bağlı olarak hücrel biyomoleküllerdeki hasar ile ilişkili olduğu meyve sineği *D. melanogaster* ile yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Sohal vd. 1994). Oksidanlara bağlı olarak serbest radikaller aerobik metabolizma tarafından yüksek oranlarda ve sürekli olarak üretilir. Serbest radikaller antioksidan sistemlerin yetersiz kalması durumunda DNA, protein ve lipid makromoleküllerinin oksidasyonuna neden olurlar (Fraga vd. 1990, Stadtman 1992). Oksidatif strese bağlı olarak oluşan *in vivo* DNA ve protein hasarının lipidlerdeki hasardan daha önemli olduğu ileri sürülmektedir (Reznick ve Packer 1994). Reaktif oksijen türlerinin üretimine neden olan tüm reaksiyonlar ve ajanlar protein oksidasyonuna yol açabilmektedir (Berlett ve Stadtman 1997, Gülbahar 2007).

1.1 Protein Oksidasyonu ve Karbonil Bileşikleri

Protein oksidasyonu, ROT (OH^\cdot , H_2O_2 gibi) ile doğrudan veya oksidatif stresin sekonder ürünleri ile reaksiyonu sonucu dolaylı olarak indüklenen, proteinlerin kovalent modifikasyonu olarak tanımlanmaktadır (Gülbahar 2007). Serbest radikallerin oksidan etkisi sonucu meydana gelen oksidatif protein modifikasyonu ve bunun sonucu oksitlenmiş proteinlerin fazla miktarda birikmesi hücre ve doku hasarına bağlı olarak çeşitli patolojik durumlara ve gittikçe yaşlanmaya neden olur (Stadtman 1992, Dean vd. 1997). Oksidatif olarak mofiyeye olmuş proteinlerin yaşlanma ile birlikte arttığı görülmüştür. Bu konuda yapılan çalışmalar protein oksidasyonu indikatörü olarak ısı ve proteolitik parçalanmaya daha hassas olan düşük aktifliğe sahip enzimler kadar, protein karbonil miktarının, okside metiyoninin, protein hidrofobitesinin, çapraz bağlı protein ve glikozillenmiş protein miktarının yaşa bağlı olarak arttığını ortaya koymuşlardır. Buna karşılık, protein oksidasyonunu yavaşlatan faktörlerin canlıların yaşam sürelerini (ömür uzunluğunu) uzattıkları bilinmektedir (Stadtman 2001). Meyve sineği *Drosophila melanogaster* yaşlanma çalışmalarında uzun süreden beri yaygın bir şekilde model organizma olarak kullanılmakta olup bu böcekte yaşlanmaya bağlı olarak fazla miktarda lipofuskin birikimi görülmektedir. Sohal ve çalışma arkadaşları tarafından yürütülen önemli araştırmalarda böceğin uçma kası mitokondrilerinde

yaşa bağımlı olarak oksidan üretiminin arttığı bununla birlikte protein karbonil ve DNA hasarı ürünlerinin yükseldiği gösterilmiştir (Sohal 1991, Sohal vd. 1994, Sohal vd. 1990, Sohal ve Dubey 1994). Transgenik meyve sineği ile yapılan çalışmalarda katalaz ve süperoksit dismutaz enzimlerinin tek başlarına aktivitelerinin yüksek olması yaşam süresi üzerinde önemli bir etki yapmamış ancak her iki enzimin birlikte aktivitelerinin artmasının yaşam süresini uzattığı gösterilmiştir (Orr ve Sohal 1994, Sohal vd. 1995). Proteinlerde *in vivo* olarak meydana gelen oksidatif değişiklikler, proteinlerin rol oynadığı çeşitli hücrel fonksiyonları etkiler. Reseptörlerin, sinyal ileti mekanizmalarının, yapısal proteinlerin, taşıma sistemlerinin ve enzimlerin rol oynadığı hücrel olaylar oksidatif protein hasarından etkilenir (Reznick ve Packer 1994).

Protein oksidasyonu birçok mekanizmayla gerçekleşebildiği ve amino açıl yan zincirlerinin hepsi oksidatif olarak modifiye olabildiği için çok farklı tipte oksidatif protein modifikasyonları vardır. Serbest radikal ya da radikal olmayan bir oksidan ile gerçekleşen oksidatif protein modifikasyonlarının biyokimyasal sonuçları; yan zincir gruplarının oksidasyonu, omurganın fragmentasyonu, yeni reaktif türlerin oluşumu (DOPA, peroksit), fazla miktarda radikal oluşumu ve zincir reaksiyonu şeklinde devam ettirilmesi, protein yada amino asitlerde dimerleşme, çökme, proteinin normal katlanmasının bozulması veya konformasyon değişimi, yapısal bozulmaya bağlı işlevsel kayıp, enzim gibi işlevsel proteinlerin çevirim sayısının değişmesi, gen düzenlenmesinin ve ifadesinin değişimi, hücre sinyal yollarında modifikasyon, apoptoz ve nekrozun uyarılması, çapraz bağlanmalar, yanlış katlanmalar, konformasyon ve hidrofobik yapıda değişiklikler ve proteolitik enzimlerde aktivite kaybı olarak sıralanabilir (Hawkins ve Davies 2001).

ROT'un proteinlerle etkileşimi sonucunda histidin, prolin, arjinin, ve lizin gibi çok sayıda aminoasit kalıntısında ve/veya peptid omurgasında meydana gelen hasar sonucunda protein karbonil (PCO) ürünleri meydana gelir. Protein oksidasyonunun en yaygın olarak ölçülen ürünü protein karbonilleridir. PCO düzeylerinin saptanması, oksidatif protein hasarını belirlemede duyarlı bir yöntem olmasına rağmen belirli bir aminoasit için spesifik değildir (Evans vd. 1999).

Son yıllarda, yeni bir protein oksidasyon belirteci olan AOPP (ileri düzey okside protein ürünleri) tespit edilmiştir. AOPP, ditrozin içeren çapraz bağlı protein ürünleri olarak tanımlanır ve protein hasarının saptanmasında güvenilir bir belirteç olduğu düşünülmektedir (Çakatay vd. 2003). AOPP ilk defa 1996'da Witko-Sarsat vd. (1996) tarafından üremik hastalarda tanımlanmıştır. Oksidatif stres sırasında, aktive fagositik hücrelerde

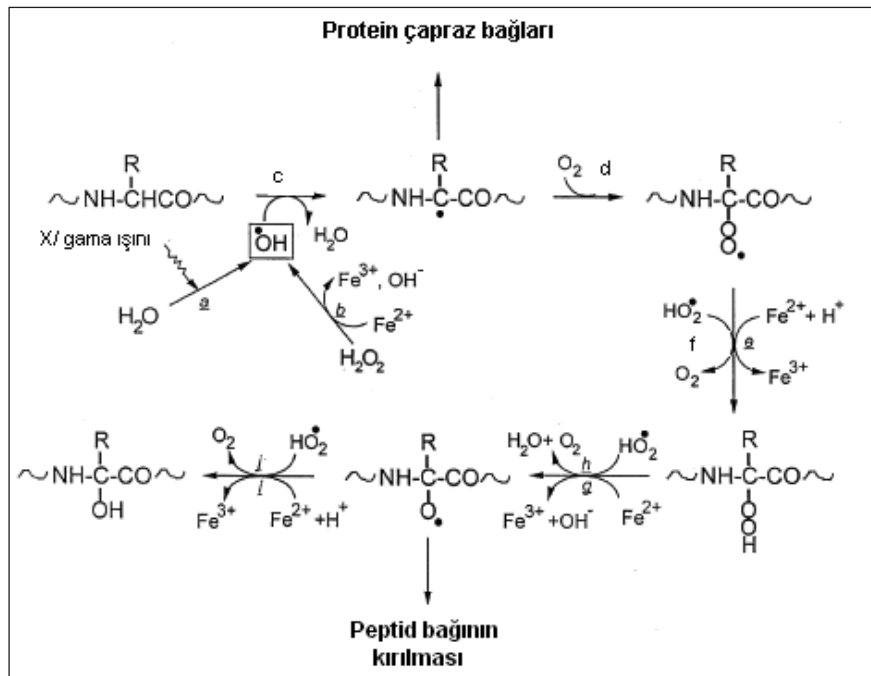
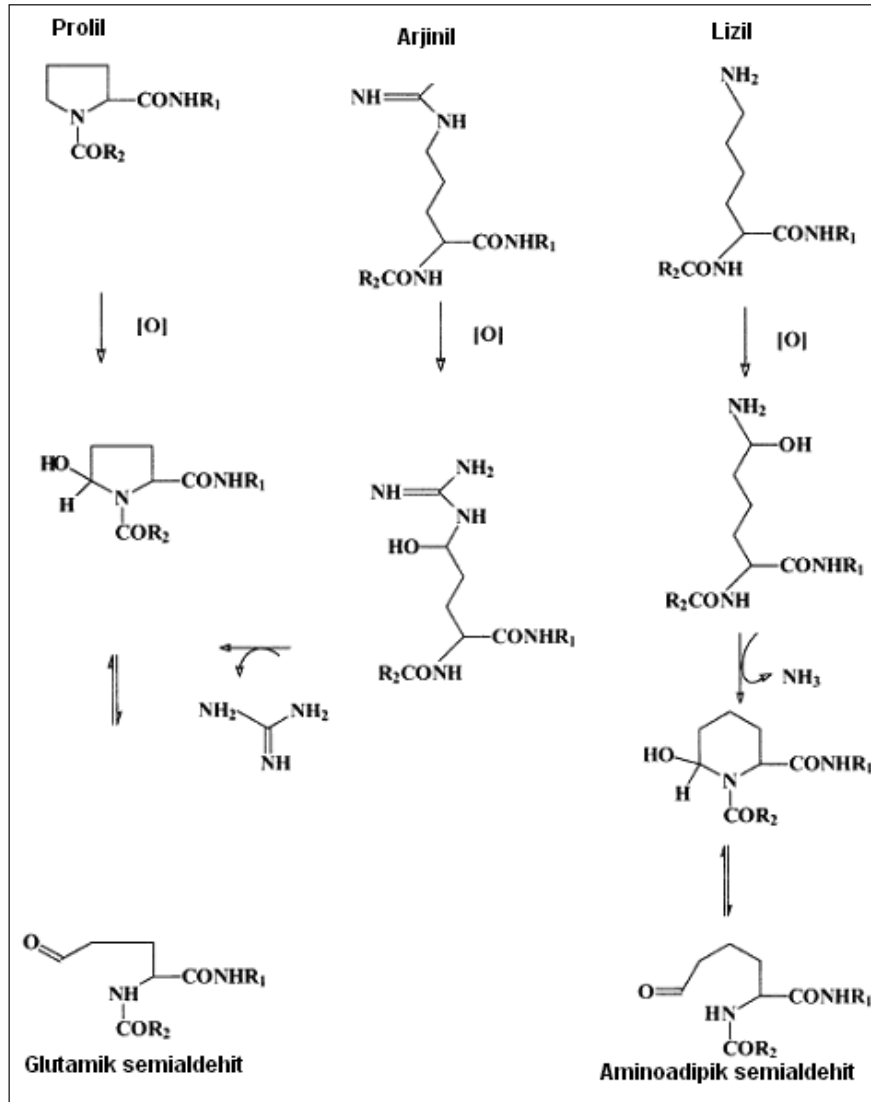
miyeloperoksidaz (MPO) tarafından oluşturulan hipoklorik asit (HOCl) ve kloramin gibi kloronize oksidanlar ile konakçı savunması sağlanır. Oluşan bu potent radikal (HOCl) bakteri, virüs ve tümör hücrelerine karşı konakçı savunmasında önemli rol oynarken normal dokularda hasara ve proteinlerin oksidasyonuna neden olur. AOPP vücutta oluşan kloronize oksidanların proteinlerle aktivasyonu ile oluşmaktadır. HOCl en sık amin gruplarıyla reaksiyona girer ve oluşan kloronize ürün de reaktif bir oksidandır. Proteinlerin tirozin kökü ile reaksiyona girerek stabil yapıdaki 3- klorotirozin ve 3-5 diklorotirozin oluşumuna, proteinler arası çapraz bağlara ve parçalanmaya neden olur. Yüksek HOCl düzeyleri 3-klorotirozinin 3-5 diklorotirozine dönüşümünü artırır. Kloronize amino asitler kendiliğinden aldehitlere yıkılarak, amonyak ve CO₂ olarak atılır (Winterbourn ve Kettle 2000). AOPP oluşumunda kloronize oksidanların kritik önemi vardır. MPO enzimine sahip fagositik hücreler kloronize oksidan oluşturabilme kapasitesine sahiptir. Aktive fagositler, konakçı savunmasında temel rol oynar ve reaktif oksidanların esas kaynağını oluştururlar. Aktive polimorfonükleer nötrofiller (PMN) reaktif oksijen türlerini NADPH oksidaz kompleksi ile oluştururlar. Bununla birlikte aktive monositlerin, PMN'lere göre daha az oranda olmakla birlikte bu radikalleri serbestleştirilmesi potent pro-inflamatuar sitokinlerin (IL-1, TNF-1, IL-6) üretimine neden olur (Witko-Sarsat vd. 1996). Proteinler serbest radikal saldırılarına doymamış yağ asitlerinden daha az duyarlıdır. Çok yoğun bir saldırı olmadıkça fazla hasar görmezler (Chesemann ve Slater 1993). Protein, geçiş metal iyonunu özel bir bölgeden bağlarsa, geçiş metal iyonu H₂O₂ ile reaksiyona girerek OH[•] radikalini oluşturur. OH[•] radikali de hasar verici etkisini metal bağlanma bölgesinde veya ona yakın bölgelerde meydana getirir. Proteinlere olan serbest radikal atakları peroksitlerin ve karbonillerin oluşumu ile sonuçlanır. Karbonillerin tespiti proteinlerde oluşan oksidatif hasarın ölçülmesi için kullanılabilir. Katarakta lens kristallerinin oksidatif hasarının, proteinlerin radikallerce hasara uğratılması sonucu geliştiği son yıllarda iddia edilmektedir (Chesemann ve Slater 1993). Fazla miktarda ROT üretimi ve/veya ROT üretiminin sürekli yüksek olması sonucu oluşan protein oksidasyonu, nörodejeneratif hastalıklar olan Alzheimer ve Parkinson hastalığı, amilodosis, kas distrofisi, solunumsal distress sendromu, iske-mi-reperfüzyon hasarı, kalp-damar sistemi hastalıkları, kanser, protein glikozilasyon veya glikoksidasyon son ürünlerinin artmasına bağlı olarak diyabet, protein nitrotirozin hasarının artmasına bağlı olarak aterosklerosis, iltihaplı eklem romatizması, iske-mi-reperfüzyon hasarı ve diğer hastalıklar ile ilişkilidir (Stadtman 2001).

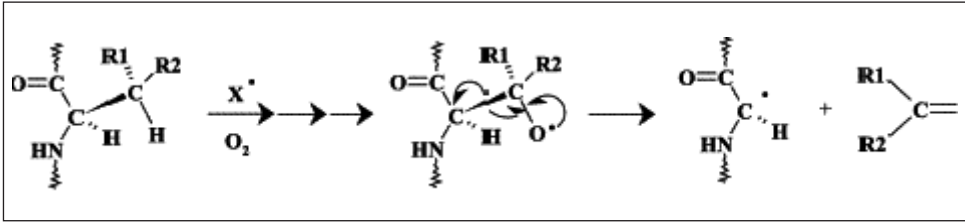
Protein oksidasyonu çok sayıda dejeneratif hastalığın ve yaşlanma sürecinin patogenezinde temel bir rol oynar. Protein oksidasyonu sonucunda protein karbonil bileşik-leri oluşmaktadır. Protein zincirlerinde karbonil grupları çok değişik oksidatif yollar ile özellikle proteinlerin spesifik amino asit yan zincirlerinin metaller aracılığıyla katalizlenen oksidasyonu ve aynı zamanda karbonil içeren oksitlenmiş lipid ya da şekerlerin etkisi ile oluşmaktadır. Glutamik semialdehit arjinin ve prolinin birer oksidasyon ürünüdür. Aminoadipik semialdehit lizinin oksidasyon ürünüdür. Karbonil içeren bu iki bileşik metal aracılığı ile katalizlenen protein oksidasyonunun başlıca karbonil ürünleridir (Şekil 1).

1.2 Proteinin Ana Yapısının Oksidasyonu ve Peptid Bağlarının Kırılması

Serbest radikal aracılığıyla protein modifikasyonunun mekanizması hakkındaki bilgilerimizin çoğu Swallow (1960), Garrison vd. (1962) ve Shuessler ve Schilling (1984) tarafından HO[•] ya da O₂^{•-} radikallerinin oluşumunu sağlayacak oksijen varlığında, proteinin sulu çözeltisinin iyonize radyasyona (X ışınları, gama ışınları) maruz bırakılması ile elde edilen sonuçlara dayanır (reaksiyon b). Şekil 2 de görüldüğü gibi polipeptit omurgasındaki herhangi bir amino asit kökünün birinden α-karbon atomundan OH[•] radikali ile α-hidrojen atomunun çıkarılması sonucunda amino asit kökü karbon merkezli radikal haline dönüşür (reaksiyon c). Daha sonra alkil-peroksil radikalini (reaksiyon d) oluşturmak üzere O₂ ilave edilir. Bunu süperoksit anyonunun protonlanmış formu olan HO₂[•] ile alkil peroksit radikalinin oluşumu takip eder (reaksiyon f). Bu peroksitin HO₂[•] ile etkileşimi protein alkoksil radikalini oluşturur (reaksiyon h). Bu alkoksil radikali daha sonra peptid bağının kopmasına sebep olur veya bir hidroksil türevi oluşturmak üzere daha fazla HO₂[•] ile reaksiyona girer (reaksiyon j). Aynı reaksiyonlar H₂O₂'in Fe²⁺'e bağımlı olarak yıkıldığı bir reaksiyon ile üretilen HO[•]radikali tarafından da başlatılabilir (reaksiyon b). Fe²⁺, f, h ve j reaksiyonlarında HO₂[•] ile de yer değiştirebilir. Bu durum daha sonra üzerinde durulacağı gibi metal aracılığıyla protein oksidasyonunun önemini vurgulamaktadır.

Oksijen (O₂) varlığında proteinlerin serbest radikallere maruz kalması amino asitlerin yan gruplarında oksidasyona ve proteinin ana omurgasında parçalanmaya neden olur (Şekil 3). Son zamanlarda Alanin (Ala) amino asitinin yan zincirine yapılan bir saldırının C-3 konumunda alkoksil radikalinin oluşumu ve takiben β karbondan kopma ile α-karbon radikalleri (peptit omurgasının kırılması) ve formaldehit oluşturduğu gösterilmiştir.

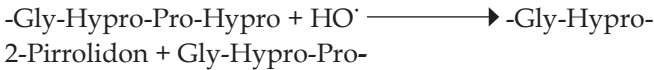




Şekil 3. Peptit ve proteinlerde C-3 konumunda alkoksil radikallerinin oluşma mekanizması ve bu radikallerin α -karbon merkezli radikaller vermek ve karbonil oluşturmak üzere β - kırılmaları (Headlam vd. 2000).

Valin (Val), Lösin (Leu) ve Aspartik asit (Asp) köklerinin $\text{HO}^\bullet/\text{O}_2$ ile oksidasyonu C-3 konumunda alkoksil radikalinin oluşumu ve takiben β karbondan kopma ile bu radikalden formaldehit, aseton, izobutiraldehit ve glioksilik asit gibi bir grup karbonil bileşiği oluşturur (Çizelge 1). Bu ürünlerin konsantrasyonları HO^\bullet radikalinin miktarının artması ile artar. Çok sayıda karbonil bileşiğinin oluşumunda oksidasyonun Val için C-3 ve C-4, Leu için bu iki konuma ilave olarak C-5 konumunda da meydana geldiğini açıkça göstermektedir (Headlam vd. 2000, Headlam ve Davies 2002).

Shuessler ve Schilling (1984) prolin köklerinin oksidasyonunun peptid bağı kırılmasına yol açtığını ileri sürmüşlerdir. Kollegen proteinindeki prolin köklerinin 2-pirrolidon türevine dönüştüğü ve bunu takiben bu amino asit türevinin olduğu bölgeden peptid bağının koptuğu gözlenmiştir (Reaksiyon)



1.3 Amino Asit Yan Zincirlerinin Oksidasyonu

Protein karbonil oluşumuna yol açan amino asitlerin dışında bazı amino asitler ile ilgili bir çok oksidatif modifikasyon yalnızca karbonil bileşiklerini oluşturmaz. Amino asitlerin oksidatif parçalanması sonucu karbonil gruplarının oluşmadığı ve farklı ürünlerin olduğu bir çok protein oksidasyonu da mevcuttur. HO^\bullet radikali ile valin ve lösin gibi alifatik amino asitlerin oksidasyonu sırasında özellikle yan zincirlerin oksitlenmesi ile hidroksillenmiş türevler oluşur. Aromatik amino asitlerin oksitlenmesi sırasında ise tirozil radikallerinin tamiri için gerekli bir redükleyicinin (tiyol, vitamin E) bulun-

madığı durumda tirozinden fenoksil radikalinin oluşumu ve tirozinin ditirozine dönüşümü gerçekleşir. Fenil alanin, tirozin ve triptofanın hidroksilasyonu hidroksil radikallerinin karakteristik reaksiyonudur. Histidin benzer reaksiyonu da (2-oksohistidin veren reaksiyon) oldukça önemlidir. Fenton reaksiyonu bu alifatik ve aromatik reaksiyonların ikisini de oluşturabilir (Çizelge 2). Protein oksidasyonunda radikal olmayan iki grup reaktif belirlenmiştir. Özellikle tirozinden DOPA'nın olduğu reaksiyonda olduğu gibi indirgeyici kökler geçiş metal iyonlarını indirgeyerek hidroperoksit ile reaksiyonu artırabilir ve O_2 ile reaksiyona girerek radikal oluşumunu uyarabilir. Diğer grup ise alifatik yan zincirlerde, özellikle α -C nun bulunduğu ana zincirde, hidroperoksitlerin oluşumudur. Oluşan bu ürünler daha fazla radikal vermek üzere geçiş metal iyonları tarafından parçalanır (Dean vd. 1997).

Proteinlerin amino asit yan zincirleri, metal iyonları katalizörliğünde serbest radikaller tarafından oksidasyona oldukça hassastır. Proteinlerin lizin bakiyeleri Fe^{2+} katalizli oksidasyonun doğrudan hedefleridir. Bu mekanizmaya göre Fe^{2+} , proteinlerin lizin bakiyelerine bağlanarak ortamdaki hidrojen peroksitten hidroksil radikali oluşumunu katalizler. Daha önce bahsedildiği gibi, hidroksil radikali ise hızla proteinin lizin motifine atak yaparak 2-aminoadipik semialdehitleri oluşturur. Fe^{2+} diğer amino asitleri de etkileyerek karbonil gruplarının oluşumunu katalizler (Uchida 2003). Sistein, metiyonin gibi sülfür içeren amino asitler de oksidanlara karşı hassastır. Serbest radikallerin bu amino asitlere atağı sonucu sülfenik (Cys-SOH), sülfenik (Cys-SO₂-H), sülfonik (Cys-SO₃-H) türevleri, disülfidler ve metiyonin sülfoksit gibi

Çizelge 1. Alifatik amino asitlerin yan gruplarının oksijen varlığında serbest radikaller ile oksidasyonu sonucu oluşan karbonil bileşikleri

Amino asit kökü	Yan grup		Oluşan karbonil bileşiği
	R1	R2	
Alanin	H	H	Formaldehit ^a
Valin	CH ₃	CH ₃	Aseton ^a + formaldehit ^b
Lösin	H	CH(CH ₃) ₂	İzobutiriraldehit ^a + Aseton ^c + Formaldehit ^b
Aspartik asit	H	CO ₂ ⁻	Glioksilik asit ^a

^aC-3 konumunda oluşan bir alkoksil radikalin b-kırılmasından oluşur. ^bUç metil grubun oksidasyonundan. ^cC-4 konumunda oluşan bir alkoksil radikalden b-kırılmaya ilave olarak oluşur.

Çizelge 2. Oksidasyona yatkın olan amino asitler ve bu amino asitlerin yan zincir oksidasyon ürünleri (Dean vd. 1997, Kayalı ve Çakatay 2004, Çakatay ve Telci 2000)

Amino asit	Oksidatif saldırı	Oksidasyon ürünleri
Sistein	HO [·] , diğer hidrojen atomu çıkaran türler	Sistein disülfidler, sülfenik asit,
Metionin	HO [·] , bir elektron oksidasyonu	Metionin sülfoksit, metionin sülfon
Triptofan	HO [·] , bir elektron oksidasyonu	2-,4-,5-,6- ve 7-Hidroksitriptofan, nitrotriptofan, kinürenin, formil ve hidroksi kinürenin
Fenilalanin	HO [·] ; bir elektron oksidasyonu	2,3-Dihidroksifenilalanin, 2-,3-, ve 4-hidroksifenilalanin
Tirozin	HO [·] , RNT, HOCl	3,4-Dihidroksifenilalanin, tirozin-tirozin çapraz bağları, Tyr-O-Tyr, çapraz bağlı nitrotirozin, 3-klorotirozin, DOPA
Histidin*	HO [·] ; bir elektron oksidasyonu	2-Okso-histidin, aspartat, aspartilüre
Arginin*	O ₂ varlığında HO [·]	Glutamik semialdehit, 5-hidroksi-2-amino valerik asit
Lizin*	O ₂ varlığında HO [·]	Lizin hidroperoksitleri ve hidroksitleri, 2-aminoadipik semialdehit karbonil bileşiği
Glisin	a-C dan hidrojen atomu çıkarılması	Amino malonik asit
Prolin*	O ₂ varlığında HO [·]	2-Pirrolidon, 4- ve 5-hidroksiprolin, piroglutamik asit, glutamik semialdehit
Valin*	O ₂ varlığında HO [·]	Valin hidroperoksitleri ve hidroksitleri
Lösin*	O ₂ varlığında HO [·]	Lösin hidroperoksitleri (3-,4-,5-hidroksilösin) ve hidroksitleri, α-ketoizokaproik asit, izovalerik asit ve aldehit
İzolösin	O ₂ varlığında HO [·]	İzolösin hidroperoksitleri
Treonin	O ₂ varlığında HO [·]	2-Amino-3-ketobütirik asit
Glutamik asit	O ₂ varlığında HO [·]	Glutamik asit hidroperoksit

*Protein karbonil oluşumuna yol açan amino asitler

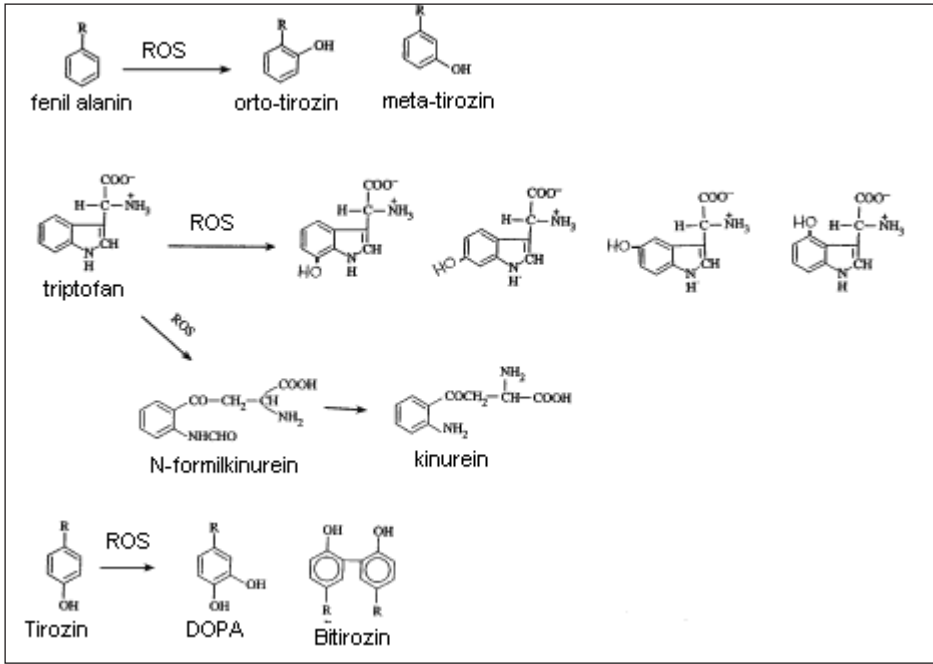
okside ürünler oluşur. Reaksiyon genellikle dönüşümlü kovalent modifikasyona örnek olup, bu okside ürünler çoğu zaman disülfid redüktaz ve metiyonin sülfoksit redüktazlar tarafından okside olmamış formlarına yeniden dönüştürülebilirler. Yan zincirlerinde okside metiyonine sahip proteinler, katalitik aktivitelerinde ve yüzey hidrofobitelerinde değişime uğrarlar (Levine vd. 1999). Fenil alanin, tirozin, triptofan, histidin gibi aromatik yapıya sahip amino asitler de reaktif oksijen türlerinin etkisiyle değişime uğrayabilir. Proteinlerin fenil alanin köklerinin sonucu orto- ve meta-tirozin türevleri tirozin bakiyelerinin oksidasyonu sonucu ise 3,4-hidroksifenilalanin (DOPA) ve ditrozin gibi (karbon-karbon dimer) okside ürünler oluşur. Bununla beraber triptofan kökleri, radikal aracılı oksidasyonla 2-, 4-, 5-, 6-, 7-hidroksi türevlerine veya N-formilkinurein yada kinurein türevlerine dönüşür (Stadtman ve Levine 2000) (Şekil 4).

Histidin, 2-okso-histidin ve halka yapısının bozulması ile oluşan ürünleri meydana getiren metal iyonları aracılığıyla oksidasyona oldukça hassastır (Requena vd. 2003) (Şekil 5). Histidin metal ile katalizlenen oksidasyon sistemi (O₂/Cu²⁺/askorbat) ile inkübe edildiğinde

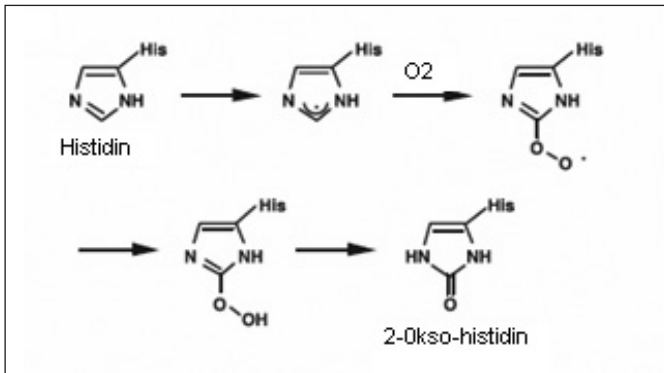
2-okso-histidin ana oksidasyon ürünü olduğu belirlenmiştir. 2-okso-histidin daha sonra aspartat, aspartilüre ve formil asparajin gibi açık zincir ürünlerini meydana getirmek üzere daha fazla okside olmaktadır (Uchida ve Kawakishi 1986). Şimdiye kadar Cu, Zn-süperoksit dismutaz (Uchida ve Kawakishi 1994), insan relaksin (Li vd. 1995), vanadyum boromoperoksidad (Meister Winter ve Butler 1996), insan büyüme hormonu (Zhao vd. 1997) ve prion proteini (Requena vd. 2001) gibi proteinlerin in vitro oksidasyonunda 2-okso-histidin oluştuğu belirlenmiştir.

1.4 Peroksinitrit Radikali Aracılığıyla Protein Oksidasyonu

Arjinin metabolizması ile ilgili olarak sentezlenen nitrik oksit çeşitli hücresel işlevlerde bir ikincil mesajcı olarak önemli rol oynamasına rağmen, süperoksit anyonu ile reaksiyona girdiğinde oldukça toksik peroksinitrit radikale dönüşür. Peroksinitrik radikali sisteinin sülfidril gruplarının nitrolanmasına, tirozin ve triptofana nitrat grubunun eklenmesine ve metiyoninin oksitlenmesine sebep olur. Nitrotrozin oluşumu protein oksidasyonuna yol açan bir başka moleküler mekanizmadır. Peroksinit-



Şekil 4. Aromatik amino asitlerin ROS tarafından oksidasyonu (Stadtman ve Levine 2000).

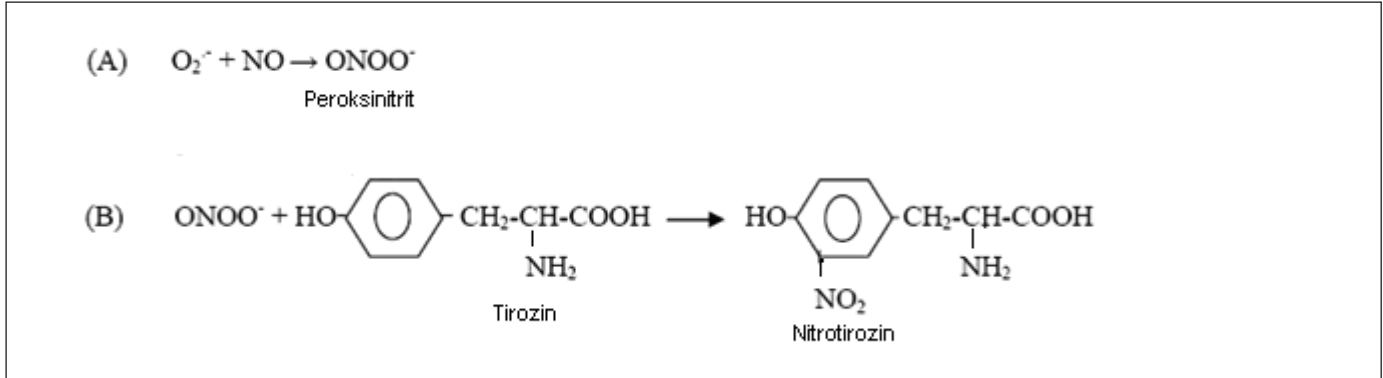


Şekil 5. Histidin metal iyonları aracılığıyla oksidasyonu (Uchida 2003).

rit (ONOO⁻), nitrik oksidin (NO), süperoksit ile in vivo reaksiyonu sonucunda oluşan reaktif bir türedir (Kayalı ve Çakatay 2004, Stadtman ve Levine 2000). Süperoksit ve nitrik oksit radikallerinin peroksinitrite göre nispeten daha dayanıklı olmalarına karşılık, peroksinitrit daha reaktif bir türedir. Normal koşullarda süperoksit dismutaz, oluşan tüm süperoksit radikallerini dismutasyona uğratmaya yetecek düzeydedir fakat, süperoksit düzeyleri çok artmışsa ya da fazla miktarda nitrik oksit radikali meydana gelmişse, nitrik oksidin süperoksit radikali ile tepkimesi sonucu daha reaktif peroksinitrit oluşur. Peroksinitrit'in proteinler üzerine atığının ana ürünü trozinin orto pozisyonunda nitrolanmasıdır (Şekil 6). Peroksinitrit, DNA'yı, enzimleri, proteinleri, lipidleri ve tiyol gruplarını okside edebilmesinden dolayı yüksek toksisiteye sahiptir (Kayalı ve Çakatay 2004).

1.5 Protein Karbonil Türevlerinin Oluşumu

Protein karbonil türevleri oksidatif protein hasarının belirlenmesinde en çok kullanılan belirteçlerden biridir. Glutatyon disülfid, malondialdehit gibi diğer oksidatif stres belirteçleri ile karşılaştırıldıklarında protein karbonil türevleri daha uzun süre dolaşımda stabil halde bulunur. Glutamil bakiyelerinin oksidasyonu, proteinlerin α-amidasyon metabolik yoluyla bölünmesi veya lizin, arjinin, prolin ve treonin amino asitlerinin direkt oksidasyonu sonucu protein karbonil türevleri oluşur. Aynı zamanda proteinlerin lizin bakiyelerinin lipid peroksidasyon metabolitleri (4-hidroksi-2-onenal, malondialdehit), indirgen karbohidratlar yada bunların oksidasyon ürünleri (glikasyon/glikoksidasyon reaksiyonları) (Şekil 7) veya diğer reaktif karbonil türevleri (ketoaminler, ketoaldehitler, deoksiozon türevleri) ile enzimatik olmayan reaksiyonu sonucu da protein karbonil türevleri oluşur. Diğer taraftan karbohidratların oksidasyon ürünleri örneğin monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu meydana gelen peroksitler ve okzoaldehitler proteinlere bağlanabilme özelliklerinden dolayı antimetotik etki gösterir. Bu olaylar kanser ve yaşlanmaya neden olabilir (Ceballos vd. 1992). Lipitlerden türetilen aldehitler veya otooksidasyona uğramış şekerler Schiff bazı oluşumu yolu ile proteinlerdeki amino gruplarına bağlanır. Schiff bazı oluşumu geri dönüşümlü bir reaksiyon olmakla birlikte, sıklıkla geri dönüşümsüz bir reaksiyon olan Amodori düzenlemesine uğrar ve Amodori ürünleri adını verdiğimiz proteinler oluşur (Kayalı ve Çakatay 2004).



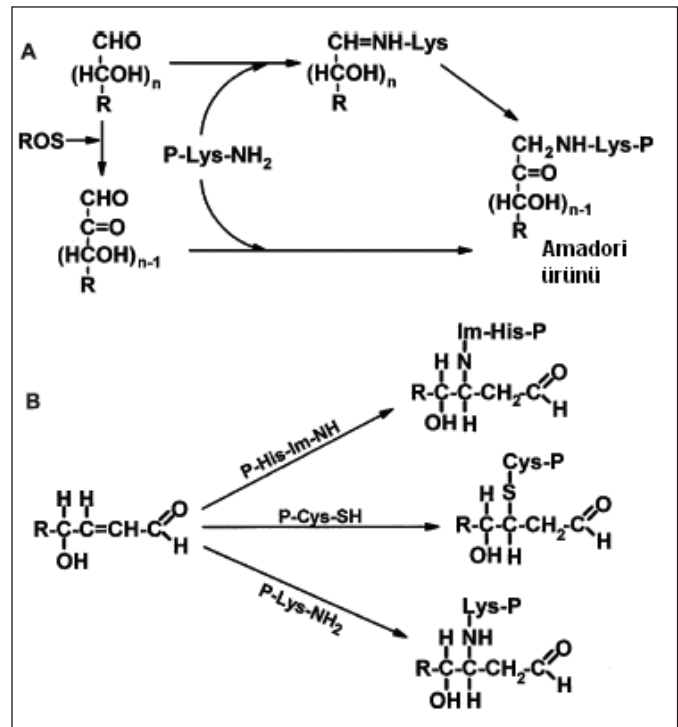
Şekil 6. Nitrik oksit ile süperoksitin reaksiyonu sonucu daha reaktif peroksinitritin oluşumu (A). Peroksinitrit'in proteinlerin tirozin köküne saldırısı ile orto-nitrotirozinin oluşumu (B) (Kayalı ve Çakatay 2004).

1.6 Sülfür İçeren Amino Asitlerin Tiyol Gruplarının Oksidasyonu

Serbest radikallerin proteinlerdeki sülfür içeren amino asitlerin tiyol (-SH) gruplarının oksidasyonuna yol açtığı ve bunun da protein oksidasyonunun en erken gözlenebilen belirtisi olduğu bilinmektedir. Sistein amino asidinin -SH grubu oksidatif atığa oldukça yatkındır ve -SH gruplarından değişik mekanizmalarla oluşan tiil radikali (-S) proteinlerdeki disülfid bağlarının oluşumuna öncülük eder (Kayalı ve Çakatay 2004). Aynı zamanda -SH grupları oksidasyonu sonucu oksiasit türevleride oluşur. Birçok araştırmacı elektron paramanyetik rezonans tekniğini kullanarak peroksinitritin tiyol grupları ile reaksiyonu sonucu tiil radikallerinin oluştuğunu göstermiştir (Shacter 2000). Tiyol gruplarının diğer bir oksidasyon şekli ise 4-hidroksinonenal'in, proteinlerdeki -SH gruplarına Michael reaksiyonu sonucunda tiyoeter bağıyla bağlanması sonucu gerçekleşir. Tiyol grubundan kaynaklanan Michael yapılarının oluşumu 2-alkenal, 4-hidroksi-2-alkenal gibi aldehitlerin ana reaksiyonunu oluşturmaktadır. Diğer taraftan lizin ve histidin nükleofilik amino asitler olduğundan bu sebeple, 2-alkenal, 4-hidroksi-2-alkenal ve ketoaldehid gibi lipid peroksidasyonu ürünlerinin saldırısına karşı oldukça hassastırlar (Uchida 2003). 2-alkenal ve 4-hidroksi-2-alkenal ile histidinin modifikasyonu, α , β -doymamış bağa histidinin imidazol azot atomunun bir Michael tipi ilavesi ile katılmasından ibarettir (Şekil 8). 4-hidroksi-2-alkenal-histidin Michael yapısı halkasal hemiasetal türevleri oluşturmak üzere daha fazla halkalaşmaya uğrar (Uchida ve Stadtman 1993)

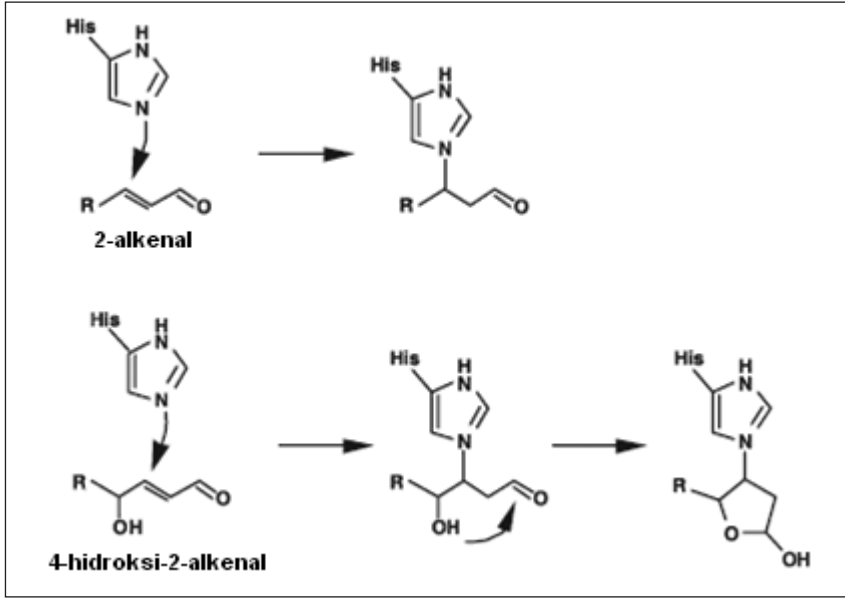
2. Sonuç

Sonuç olarak hücrede tüm biyolojik makromoleküller oksidatif stres ile yüz yüzedir. Bir protein molekülünün oksidasyonu o moleküle inaktif bir yapı ve özellik kazandırırken hücre içinde o molekülün akibeti belirlenmek-



Şekil 7. Protein karbonil türevlerinin oluşumu, A. Glikasyon (glukoz) ile proteinlerdeki lizin aminoasitinin amino gruplarının reaksiyonu sonucu protein karbonil gruplarının oluşumu, B. Proteinlerin lizin, sistein veya histidin kalıntılarıyla lipid peroksidasyonu ürünleri α - β doymamış aldehitlerin reaksiyonu (Stadtman ve Levine 2000).

tedir. Ilımlı bir oksidatif ortamda protein oksidasyonu sonucu oluşan protein radikalleri, proteine bağlı reaktif türler, aldehitler ve sekonder radikallerin antioksidan sistemler tarafından sürekli uzaklaştırılması mümkün iken, protein oksidasyonun kararlı son ürünleri lizozomal ve lizozomal olmayan bir protein yıkım yolu olan proteozom sistemi gibi çeşitli güçlü proteolitik araçlar tarafından in vivo parçalanmaktadır (Dean vd. 1997). Protein modifikasyonu ve kimyasal olarak modifiye olmuş proteinlerin yıkımının birlikte yürütmesi in vivo normal



Şekil 8. Michael tipi katılma reaksiyonu ile histidin köklerinin 2-alkenal ve 4-hidroksi-2-alkenal ile reaksiyonu (Uchida 2003).

bir protein çevrimi yollarından biridir. Programlı hücre ölümünün erken belirtilerinden biri olan bu işlem “kimyasal apoptosis” olarak isimlendirilmektedir (Chang vd. 2000). Proteolitik aktivitenin azalması ya da okside olan proteinlerin yıkımının arasındaki hassas dengenin ortadan kalkması yukarıda da bahsedildiği gibi çeşitli klinik anormalliklere neden olan oksitlenmiş işlevsel olmayan proteinlerin ya da “yaşlanmış proteinlerin” birikimine sebep olacaktır. Diğer taraftan omurgasızlarda oksidatif homeostatik sinyal yollarının inhibe edilmesi ile zayıflayan antioksidan savunma mekanizması sonucunda protein oksidasyonunun hızlandığına yönelik kanıtlar elde edilmeye başlanmıştır (Büyükgüzel vd. 2010).

3. Kaynaklar

- Adler, V., Yin, ZM., Tew, KD., Ronai, Z. 1999. Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling. *Oncogene*, 18 (45): 6104-6111.
- Aikawa, R., Komuro, I., Yamazaki, T., Zou, Y., Kudoh, S., Tanaka, M., Shiojima, I., Hiroi, Y., Yazaki, Y. 1997. Oxidative stress activates extracellular signal regulated kinases through Src and Ras in cultured cardiac myocytes of neonatal rats. *J. Clin. Invest.*, 100 (7): 1813-1821.
- Andreoli, C., Prokisch, H., Hortnagel, K., Mueller, JC., Münter-kötter, M., Scharfe, C., Meitinger, T. 2004. MitoP2, an integrated database on mitochondrial proteins in yeast and man. *Nucleic Acids Res.*, 32: 459-462.
- Barker, MG., Brimage, LJ., Smart, KA. 1999. Effect of Cu,Zn superoxide dismutase disruption mutation on replicative senescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 177 (2): 199-204.
- Beckman, KB., Ames, BN. 1998. The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.*, 78 (2): 547-581.
- Berlett, BS., Stadtman, ER. 1997. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.*, 272 (33): 20313-20316.
- Bogdan, C., Rollinghoff, M., Diefenbach, A. 2000. The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol. Rev.*, 173 (1): 17-26.
- Bogdan, C. 2001. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol.*, 2 (10): 907-916.
- Bonawitz, ND., Rodeheffer, MS., Shadel, GS. 2006. Defective mitochondrial gene expression results in reactive oxygen species-mediated inhibition of respiration and reduction of yeast life span. *Mol. Cell Biol.*, 26 (13): 4818-4829.
- Büyükgüzel, E., Hyršl, P., Büyükgüzel, K. 2010. Eicosanoids mediate hemolymph oxidative and antioxidative response in larvae of *Galleria mellonella* L. *Comp. Biochem. Physiol. Part A: Mol. & Integrative Physiol.*, 156: 176-183.
- Ceballos, PI., Trivier, JM., Nicole, A. 1992. Age-correlated modification of copper-zinc superoxide dismutase and glutathione related enzyme activities in human erythrocytes. *Clinical Chem.*, 38: 66-70.
- Chang, TC., Chou, WY., Chang, GG. 2000. Protein oxidation and turnover. *J. Biomed. Sci.*, 7: 357-363.
- Chesemann, KH., Slater, TF. 1993. An introduction to free radical biochemistry. *Br. Med. Bulletin.*, 49 (5): 481-493.
- Çakatay, U., Telci, A., Kayalı, R., Tekeli, F., Akcay, T., Sivas, A. 2003. Relation of aging with oxidative protein damage parameters in the rat skeletal muscle. *Clin. Biochem.*, 36 (1): 51-55.
- Çakatay, U., Telci, A. 2000. Oksidatif protein hasarı ve saptanmasında kullanılan marker'lar. *İst. Tıp Fak. Mecmuası.*, 63: 314-317.
- Dean, RT., Fu, S., Stocker, R., Davies, MJ. 1997. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem. J.*, 324 (1): 1-18.

- Dimopoulos, G., Muller, HM., Levashina, EA., Kafatos, FC. 2001.** Innate immune defense against malaria infection in the mosquito. *Curr. Opin. Immunol.*, 13 (1): 79-88.
- Dröge, W. 2002.** Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.*, 82 (1): 47-95.
- Evans P, Lyras L, Halliwell B. 1999.** Measurement of protein carbonyls in human brain tissue. *Methods Enzymol.*, 300: 145-156.
- Foley, E., O'farrell, PH. 2003.** Nitric oxide contributes to induction of innate immune responses to Gram-negative bacteria in *Drosophila*. *Genes Dev.*, 17 (1): 115-125.
- Fraga, CG., Shigenaga, MK., Park, JW., Degan, P., Ames, BN. 1990.** Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87 (12): 4533-4537.
- Garrison, WM., Jayko, ME., Bennet, W. 1962.** Radiation-induced oxidation of proteins in aqueous solution. *Radiat. Res.*, 16: 487-502.
- Gülbahar, Ö. 2007.** Protein oksidasyonun mekanizması, önemi ve yaşlılıkla ilgisi. *Turk. J. Geriatrics.*, 10 (1): 43-48.
- Harman D. 1956.** Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.*, 11 (3): 298-300.
- Harman, D. 1981.** The aging process. *Proc Natl Acad Sci USA*. 78 (11): 7124-7128.
- Hawkins, CL., Davies, MJ. 2001.** Generation and propagation of radical reactions on proteins. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1504 (2-3): 196-219.
- Headlam, HA., Davies, MJ. 2002.** Beta-scission of side-chain alkoxy radicals on peptides and proteins results in the loss of side-chains as aldehydes and ketones. *Free Rad. Biol. Med.* 32 (11): 1171-1184.
- Headlam, HA., Mortimer, A., Easton, CJ., Davies, MJ. 2000.** β -Scission of C-3 (β -Carbon) alkoxy radicals on peptides and proteins: a novel pathway which results in the formation of α -carbon radicals and the loss of amino acid side chains. *Chem. Res. Toxicol.*, 13 (11): 1087-1095.
- Jensen, RE., Hobbs, AE., Cervený, KL., Sesaki, H. 2000.** Yeast mitochondrial dynamics: fusion, division, segregation, and shape. *Microsc. Res. Tech.*, 51 (6): 573-583.
- Kayalı, R., Çakatay, U. 2004.** Protein oksidasyonunun ana mekanizmaları. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi.*, 35 (2): 83-89.
- Kowaltowski, AJ., Vercesi, AE. 1999.** Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.*, 26 (3-4): 463-471.
- Levine, RL., Berlett, BS., Moskovitz, J., Mosoni, L, Stadtman, ER. 1999.** Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage. *Mech Ageing Dev.*, 107 (3): 323-332.
- Li, S., Nguyen, TH., Schoneich, C., Borchardt, RT. 1995.** Aggregation and precipitation of human relaxin induced by metal-catalyzed oxidation. *Biochemistry*. 34 (17): 5762-5772.
- Luckhart, S., Vodovotz, Y., Cui, LW., Rosenberg, R. 1998.** The mosquito *Anopheles stephensi* limits malaria parasite development with inducible synthesis of nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 95 (10): 5700-5705.
- Mccord, JM., Fridovich, I. 1969.** Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.*, 244 (22): 6049-6055.
- Meister Winter, GE., Butler, A. 1996.** Inactivation of vanadium bromoperoxidase: formation of 2-oxohistidine. *Biochemistry.*, 35 (36): 11805-11811.
- Moradas-Ferreira, P., Costa, V., Piper, P., Mager, W. 1996.** The molecular defences against reactive oxygen species in yeast. *Mol. Microbiol.*, 19 (4): 651-658.
- Nappi, AJ., Vass, E. 2001.** Cytotoxic reactions associated with insect immunity. In: phylogenetic perspectives on the vertebrate immune system, edited by Beck G, Sugumaran M, Cooper EL. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, p.329- 348.
- Orr, WC., Sohal, RS. 1994.** Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science*. 263 (5150): 1128-1130.
- Requena, JR., Groth, D., Legname, G., Stadtman, ER., Prusiner, SB., Levine, RL. 2001.** Copper-catalyzed oxidation of the recombinant SHa (29-231) prion protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98 (13): 7170-7175.
- Requena, JR., Levine, RL., Stadtman, ER. 2003.** Recent advances in the analysis of oxidized proteins. *Review Article Amino Acids.*, 25 (3): 221-226.
- Reznick, AZ., Packer, L. 1994.** Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.*, 233:357-363.
- Shacter, E. 2000.** Protein oxidative damage. *Methods Enzymol.*, 319: 428-436.
- Shuessler H, Schilling K. 1984.** Oxygen effect in radiolysis of proteins. Part 2. Bovine serum albumin. *Int J Radiat Biol.*, 45 (3): 267-281.
- Singh, KK. 1998.** Mitochondrial DNA mutations in aging, disease and cancer. Springer. New York, NY.
- Sohal, RS., Agarwal, A., Agarwal, S., Orr, WC. 1995.** Simultaneous overexpression of copper- and zinc-containing superoxide dismutase and catalase retards age-related oxidative damage and increases metabolic potential in *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.*, 270 (26): 15671-15674.
- Sohal, RS., Agarwal, S., Candas, M., Forster, MJ., Lal, H. 1994.** Effect of age and caloric restriction of DNA oxidative damage in different tissues of C57BL/6 mice. *Mech. Ageing Dev.*, 76 (2-3): 215-224.
- Sohal, RS., Arnold, LA., Sohal, BH. 1990.** Age-related changes in antioxidant enzymes and prooxidant generation in tissues of the rat with special reference to parameters in two insect species. *Free Rad. Biol. Med.*, 9 (6): 495-500.

- Sohal, RS., Dubey, A. 1994.** Mitochondrial oxidative damage, hydrogen peroxide release, and aging. *Free Rad. Biol. Med.*, 16 (5): 621-626.
- Sohal, RS. 1991.** Hydrogen peroxide production by mitochondria may be a biomarker of aging. *Mech. Ageing Dev.*, 60 (2): 189-198.
- Stadtman, ER., Levine, RL. 2000.** Protein oxidation. *Ann N Y Acad Sci.* 899: 191-208.
- Stadtman, ER. 1992.** Protein oxidation and aging. *Science.*, 257 (5074): 1220-1224.
- Stadtman, ER. 2001.** Protein oxidation in aging and age-related diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 928 (1): 22-38.
- Stefano, GB., Ottaviani, E. 2002.** The biochemical substrate of nitric oxide signaling is present in primitive non-cognitive organisms. *Brain Res.*, 924 (1): 82-89.
- Swallow, AJ. 1960.** Radiation chemistry of organic compounds. New York, John Wiley & Sons, 211-224.
- Uchida, K., Kawakishi, S. 1986.** Selective oxidation of imidazole ring in histidine residues by the ascorbic acid-copper ion system. *Biochem Biophys Res Commun.*, 138 (2): 659-665.
- Uchida, K., Kawakishi, S. 1994.** Identification of oxidized histidine generated at the active site of Cu, Zn-superoxide dismutase exposed to H₂O₂. Selective generation of 2-oxo-histidine at the histidine 118. *J. Biol. Chem.*, 269: 2405-2410.
- Uchida, K., Stadtman, ER. 1993.** Covalent attachment of 4-hydroxynonenal to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: a possible involvement of intramolecular and intermolecular cross-linking reactions. *J. Biol. Chem.*, 268 (9): 6388-6393.
- Uchida, K. 2003.** Histidine and lysine as targets of oxidative modification. *Review Article Amino Acids.*, 25 (3-4): 249-257.
- Ünlü, ES., Koç, A. 2007.** Effects of deleting mitochondrial antioxidant genes on life span. *Ann NY Acad Sci.* 1100: 505-509.
- Weiske, J., Wiesner, A. 1999.** Stimulation of NO synthase activity in the immune competent lepidopteran *Estigmene acraea* hemocyte line. *Nitric Oxid Biol. Chem.*, 3 (2): 123-131.
- Whitten, M., Sun, F., Tew, I., Schaub, G., Soukou, C., Nappi, A., Ratcliffe, NA. 2007.** Differential modulation of *Rhodnius prolixus* nitric oxide activities following challenge with *Trypanosoma rangeli*, *T. cruzi* and bacterial cell wall components. *Insect Biochem Mol. Biol.*, 37 (5): 440-452.
- Winterbourn, CC., Kettle, AJ. 2000.** Biomarkers of myeloperoxidase derived hypochlorous acid. *Free Rad. Biol. Med.*, 29: 403-409.
- Witko-Sarsat, V., Friedlander, M., Capeillere-Blandin, C., Nguyen-Khoa, T., Nguyen, AT., Zingraff, J., Jungers, P., Descamps-Latscha, B. 1996.** Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int.*, 49 (5): 1304-1313.
- Zhao, F., Ghezzi-Schoneich, E., Aced, GI., Hong, J., Milby, T., Schoneich, C. 1997.** Metal-catalyzed oxidation of histidine in human growth hormone: mechanism, isotope effects, and inhibition by a mild denaturing alcohol. *J. Biol. Chem.*, 272 (14): 9019-9029.