

Article Arrival Date

09.11.2021

Article Type

Research Article

Article Published Date

20.12.2021

Doi Number: <http://dx.doi.org/10.38063/ejons.546>

**KALORİ KISITLI DİYETLE BESLENEN MMTV-TGF-A TRANSGENİK
FARELERİN TİMUS DOKULARINDA OKSİDATİF STRES VE OTOFAJİ İLİŞKİLİ
SQSTM1 GENİNİN REAL TIME PCR TEKNİĞİ İLE EKSPRESYONUNUN
ARAŞTIRILMASI**

INVESTIGATION BY REAL TIME PCR TECHNIQUE OF THE EXPRESSION OF
AUTOPHAGY AND OXIDATIVE STRESS RELATED SQSTM1 GENE IN THYMUS
TISSUE OF MMTV-TGF- A TRANSGENIC MICE WITH A CALORIE RESTRICTED
DIET

Hanifenu MANCILAR¹**Zehra ÖMEROĞLU ULU²****Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK³**

*^{1,2,3}Yıldız Technical University, Department of Molecular Biology and Genetics, Istanbul
Turkey

*²Yeditepe University, Department of Genetics and Bioengineering, Istanbul Turkey

¹ORCID: 0000-0003-2338-5436

²ORCID: 0000-0002-8884-4683

³ORCID: 0000-0003-3809-6303

919

ÖZET

Otofaji, hücre içi makro moleküllerin ve organellerin bir kesecik içine alınarak ve lizozomla bir araya gelerek parçalanmasına sebep olan bir mekanizmadır. Uzun ömürlü proteinler ve hücre içi organeller otofaji vasıtasıyla parçalara ayrılır ve meydana gelen yapı taşları (örn. aminoasitler) hücrede tekrar kullanılır. Reaktif oksijen türlerinin (ROS), otofajik kesecik oluşumunda ve otofajinin hücre ölümü ya da hayatta kalımı üzerindeki rolünün düzenlenmesinde etkili olduğu gösterilmiştir. Düşük konsantrasyondaki reaktif oksijen türleri; hücre adezyonu, apoptoz, hücre sel sinyalleşme, transkripsiyon faktörü aktivitesi, hasarların azaltılması, tümör olasılığının azaltılması, patojen olguların azalması, immün işlevlerin değişimi gibi çeşitli fizyolojik süreçler için gereklidir. Açlık ve hipoksi gibi otofajiyi indükleyen farklı stresörler ROS üretimini artırabilir. Kalori kısıtlaması, yetersiz beslenme olmaksızın kalori alımının azaltılması ile uygulanmakta olup omurgalı ve omurgasız canlılarda hayat uzunluğunu arttırdığına dair birçok delil bulunmaktadır. Timus, diğer lenfoid organlar gibi, besin eksikliğine hızla yanıt verir. Kemirgenlerde yapılan kalori kısıtlaması çalışmalarında Aralıklı Kalori Kısıtlamasının (AKK) Kronik Kalori Kısıtlamasına (KKK) ve Ad Libitum (AL) beslenmeye kıyasla supresif tümör gelişmesinde, oto-immünite supresyonunda ve hayat süresinin uzamasında daha etkin bir deneysel manipülasyon olduğu bildirilmiştir. Grubumuz daha önce 2 farklı kalori kısıtlaması ve normal beslenen 18 haftalık MMTV-TGF α (Mouse Tumor Virus Transforming Growth Factor α) farelerinin timus

dokularından yeni nesil dizileme teknolojisi kullanılarak 3 RNA-Seq verisi elde etmiştir. Biyoinformatik analiz sonucunda toplam 916091 farklı eksprese edilmiş gen (DEG) tespit edilmişti ($p < 0.05$). Bu çalışmada kalori kısıtlamalarına bağlı olarak RNA-Seq DEG verisinde ekspresyonu değişen SQSTM1 geni belirlendi. Bu genlerin ekspresyonlarının validasyonu Gerçek Zamanlı PCR (RT-PCR) ile yapıldı. Yaşamlarının 18. haftasındaki farelerin timus organının dokularından elde edilen total RNA'dan cDNA sentezi yapıldı ve gene spesifik primerler kullanılarak RT-PCR yapıldı. RT-PCR verilerinin analizinde söz konusu 15 genin yaşamın erken, orta ve geç dönemlerindeki ekspresyon düzeylerindeki farklılıkların araştırılması amaçlanmıştır. Analizimizin sonuçlarına göre, söz konusu genlerdeki DEG'lerin AL-KKK ve KKK-AKK diyet grupları arasında, AL grupları arasında olduğundan daha yüksek olduğu gözlemlendi. Bu sonuçlar, otofaji ve oksidatif stres genlerinin ekspresyonlarının kronik kalori kısıtlamasıyla regülasyonlarının değiştiğini göstermiştir. Bulgularımıza göre AL, KKK ve AKK diyet tiplerinde ekspresyon farkı ortaya çıkmıştır. DEG sonuçlarına paralel sonuç almış olup RNA-seq transkripsiyon sonucu desteklenmiştir. Bu sonuç kalori kısıtlaması, otofaji, oksidatif stres, bağışıklık sistemi ve kanser gelişimi çalışmaları için yeni ipuçları sağlayacaktır.

Anahtar Sözcükler: Kalori kısıtlaması, meme kanseri, otofaji, oksidatif stres, RNA-seq, Real Time PCR

ABSTRACT

Autophagy is a mechanism that causes intracellular macromolecules and organelles to be taken into a vesicle and combined with the lysosome to degrade. Long-lived proteins and intracellular organelles are degraded by autophagy and the resulting building blocks (eg amino acids) are re-used in the cell. Reactive oxygen species (ROS) have been shown to be involved in autophagic vesicle formation and in regulating the role of autophagy in cell death or survival. Reactive oxygen species in low concentration; It is necessary for various physiological processes such as cell adhesion, apoptosis, cellular signaling, transcription factor activity, reduction of damage, reduction of tumor probability, reduction of pathogenic phenomena, alteration of immune functions. Different stressors that induce autophagy, such as starvation and hypoxia, can increase ROS production. Calorie restriction is practiced by reducing calorie intake without malnutrition, and there is ample evidence that it increases lifespan in vertebrates and invertebrates. The thymus, like other lymphoid organs, responds rapidly to nutrient deficiency. In studies of calorie restriction in rodents, Intermittent Calorie Restriction (ICR) has been reported to be a more effective experimental manipulation in suppressive tumor development, auto-immunity suppression and prolongation of lifespan compared to Chronic Calorie Restriction (CCR) and Ad Libitum (AL) feeding. Our group previously obtained 3 RNA-Seq data using next-generation sequencing technology from thymus tissues of 18-week-old MMTV-TGF α (Mouse Tumor Virus Transforming Growth Factor α) mice that were fed 2 different calorie restrictions and normally. As a result of bioinformatic analysis, a total of 916091 differentially expressed genes (DEG) were detected ($p < 0.05$). In this study, autophagy and oxidative stress-related SQSTM1 gene whose expression changed in RNA-Seq DEG data due to calorie restrictions were determined. The expressions of these genes were validated by Real Time PCR (RT-PCR). cDNA was

synthesized from total RNA obtained from thymus tissues of mice at 18-weeks of life, and RT-PCR was performed using gene-specific primers. In the analysis of RT-PCR data, it was aimed to investigate the differences in expression levels of this gene in the early, mid and late stages of life. According to the results of our analysis, it was observed that DEGs in these genes were higher among AL-CCR and CCR-ICR diet groups than among AL groups. These results indicated that the expression of autophagy and oxidative stress genes was altered by chronic calorie restriction. According to our findings, there was a difference in expression in AL, CCR and ICR diet types. The results were parallel to the DEG results and the RNA-seq transcription result was supported. This result will provide new clues for studies of calorie restriction, autophagy, oxidative stress, immune system and cancer development.

Keywords: Calorie restriction, breast cancer, autophagy, oxidative stress, RNA-seq, Real Time PCR

1. GİRİŞ

Dünya genelinde kadınlar arasında ölüme sebep olan en önemli ikinci ölüm nedeninin meme kanseri olduğu belirtilmektedir . Meme kanseri 2018'de Amerika Birleşik Devletleri'ndeki vakaların %30'nu oluşturduğu belirtilmektedir. Ayrıca, meme kanseri görülme oranı gün geçtikçe arttığı vurgulanmaktadır. ABD'de 2008'de de meme kanseri vakaları, toplam kanserin %23'ünü oluştururken, Türkiye'de ise kanser ölümlerinin % 14'ünü oluşturduğunu bildirilmektedir. Meme kanseri, genetik materyalde meydana gelen mutasyonlar sonucu oluşan genetik anormalliklerden kaynaklanmaktadır. Meme kanseri vakalarının %5 ila %10'una kalıtsal genetik sebep olurken, meme kanseri vakalarının % 85-90'ına çevresel faktörlerden ve yaşlanmadan kaynaklanan genetik anormalliklerin sebep olduğu belirtilmektedir (1).

Meme kanseri gelişiminde yaş, cinsiyet, ırk ve aile öyküsü gibi içsel faktörler ve ayrıca sigara içme, aşırı alkol alımı, egzersiz eksikliği, diyet ve obezite gibi dışsal faktörler gibi çeşitli risk faktörlerin rol oynadığı belirtilmektedirⁱ. Bu bağlamda, yaşam tarzı ile ilişkili faktörlerin meme kanseri gelişimi üzerinde genetik faktörlerden daha fazla etkiye sahip olduğu bildirilmektedir (5). Bu dışsal risk faktörleri ayrıntılı olarak incelenerek karakterize edilebilirse, meme kanseri gelişimi için daha etkili müdahale stratejileri geliştirilebilir (2).

KK, canlı organizmada yaşam kalitesini ve süresini etkileyebilecek ana sağlık düzenleyicilerinden bir tanesidir. Ek olarak, KK kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, kanser, inflamasyon ve nörogenez gibi çeşitli patolojik hastalıklarla ilişkisinin olduğu belirtilmiştirⁱⁱ. Genel olarak kalori alımının genellikle yüzde 20 ila 40 oranında azaltıldığı bir diyet rejimi olan kalori kısıtlaması kemirgen modellerinde vücut ağırlığını azaltmak ve kanser gelişimini önlemek için en çok uygulanan müdahalelerden bir tanesidir (2). KK'nın tümörün

oluşumu üzerindeki etkisini ele alan ilk araştırma 1909 yılında Moreschi tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada KK ile beslenen sıçanlara verilen tümörlerin, tümörün gelişiminin durduğu gözlemlenmiştir (3). KK ile ilgili daha sonra ki bir çalışma 1935'te McCay tarafından gerçekleştirildi ve bu çalışmaya göre, KK'nın sıçanların ömrünü uzattığını bildirilmiştir. Aynı çalışmada KK'nın yaşam süresini uzattığı ve tip 2 diyabet, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar gibi çeşitli hastalıkların gelişimini geciktirdiği bildirilmiştir. KK'nın koruyucu etkisi 1940'larda Tannenbaum tarafından gerçekleştirilen araştırmalarda doğrulanmıştır. Küçük kemirgenler üzerinde gerçekleştirilen araştırmalarda KK'nın kansere eğilimi azalttığı ispatlanmıştır. Bu koruyucu etki, farklı dokulardaki spontan tümörlerin başlamasında ve gelişmesinde geciktirmeyi kapsamaktadır (6).

KK ve kanser ilişkisini ele alan çalışmaların büyük çoğunluğu, KK'nın meme kanseri üzerindeki koruyucu rolleriyle ilişkilidir. Dirx ve ark (2003) yaptıkları bir meta analiz çalışmasında, KK' tabi tutulmuş hayvanlarda, kontrol grubuna kıyasla %41 ila %69 arasında daha az oranda meme tümörü olduğu gözlemlenmiştir. KK uygulaması başlatılan farelerin yaşı, KK uygulamasının süresi, farelerin doğurganlık oranları ve enerji veren besleyici gıdaların çeşidi ele alındığında araştırmanın sonuçları üzerinde herhangi bir farklılık gözlemlenmemiştir. Bu çalışmada, KK'nın farelerin meme tümörüne yalanmasını ve ilerlemesinin geciktirdiği ve meme tümörüne karşı koruma sağladığı ispatlanmıştır. Doğan ve ark (2010) tarafından MMTV-TGF- α transgenik farelerle yapılan bir çalışmada %25 KK uygulanan kronik kalori kısıtlımsı grubu, üç hafta AL bir hafta %50 kısıtlama ile beslenen aralıklı kalori kısıtlaması uygulanan farelerde meme kanseri gelişiminin geciktiği gözlemlenmiştir (5).

Oksidatif stres, serbest radikaller olarak adlandırılan reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimiyle antioksidan savunma arasındaki dengede meydana gelen bozukluk olarak tanımlanır. ROT, normal hücrel metabolizmanın bir sonucu olup canlı organizmalar tarafından üretilmektedirⁱⁱⁱ. Düşük ve orta konsantrasyonlarda, fizyolojik hücre süreçlerinde çalışmaktadırlar. Fakat yüksek konsantrasyonlarda; lipidler, proteinler ve DNA gibi hücre bileşenlerinde negatif yönlü modifikasyonlar oluşturmaktadırlar. Oksidan/antioksidanlar arasındaki dengede oksidanlar lehine kaymalar “oksidatif stres” olarak adlandırılmaktadır. Oksidatif stres; kanser, nörolojik bozukluklar, ateroskleroz, yüksek tansiyon, iskemi/perfüzyon şeker hastalığı, akut solunum sıkıntısı sendromu, idiyomatik pulmoner fibrozis, kronik obstruktif akciğer rahatsızlığı gibi pek çok patolojik durumun oluşma esnasında katkıda bulunmaktadır (7).

Azaltılmış oksidatif stres birden fazla farklı mekanizmayla sağlanabilmektedir. Bunlardan bir tanesi, oksijen serbest radyallerin üretilmesinde bir azalma ve ROT' nin detoksifiye edildiği

oranda bir artış ve bu nedenle oluşan hasarın oranında bir azalma şeklinde olabilmektedir. Bozulma ve onarma işlemlerinde, hasarın etkisini ortadan kaldırmak için bir regülasyona sebep olmaktadır. KK'nın oksidatif strese genel bir azalma meydana getirmek için çeşitli bileşenlerin ucunu modüle ettiğini ortaya koyan çalışmalar mevcuttur(8).

Otofaji, hücre içi makro moleküllerin ve organellerin bir kesecik içine alınarak lizozomlara gönderilmesi ve lizozomla bir araya gelerek parçalanmasına sebep olan bir mekanizma olarak tanımlanmaktadır^{iv}. Kısa ömürlü proteinler ubiquitin-proteozom sisteminde parçalara ayrılmasına rağmen, uzun ömürlü proteinler ve hücre içi organeller otofaji sistemi vasıtasıyla parçalara ayrılır ve meydana gelen yapı taşları (örn. aminoasitler) hücrenin kullanımı için tekrardan kazanımını sağlarlar. Otofajinin, kelime manası kendi kendini (auto) yeme (phagy) olarak tanımlanır ve hücrenin açlıkla karşılaşı karşıya kaldığı fizyolojik şartlarda, besin temin edebilmek için hücre içerisindeki yapıların ne şekilde parçalandığını ifade etmek hedefiyle kullanıldığı belirtilmiştir. Yapılan ilk araştırmalarda otofajinin, besin eksikliğinde hücre içi moleküllerin tekrardan kazanımını sağlayarak hücrenin stres şartlarına uyumunu kolaylaştırdığı böylece hücre homeostazisinin korunmasında etkin şekilde yol oynayan bir yol olduğu saptanmıştır^v. Son yıllarda gerçekleştirilen araştırmalar ise otofajinin; metabolizmanın regülasyonu, morfogenezis, hücrenin farklılaşması, yaşlanma, hücrenin ölümü ve bağışıklık sisteminin bir elemanı olarak hücre içi patojenlerin parçalanmasında da etkin bir rol aldığı belirtilmiştir. Bununla birlikte araştırmalar, otofaji değişimlerinin, kanser, enfeksiyon hastalıkları ve nörodejeneratif hastalıklar gibi hayati sağlık problemlerinin de sebepleri içerisinde yer aldığını belirtmektedir (8).

Otofaji; makrotofaji, mikrotofaji ve şaperon aracılıklı otofaji olarak üç ayrı mekanizma ile meydana gelmektedir^{vi}. Her üç otofaji tipinde de sitosolik bileşenlerin lizozomlarda proteolitik parçalanması gerçekleşmektedir. Makrotofaji hücrede bazal seviyede meydana gelmektedir. Protein parçalarının ve hasara uğramış organellerin parçalara ayrılmasında hayati roller oynamaktadır. Sitoplazmik kargonun lizozomlara çift zar yapıdaki otofagozomlar ile taşınması ve otofagozomun, lizozomlar ile otolizozom oluşturmak üzere füzyonu gerçekleşir(9). Mikrotofajide, sitosolik bileşenlerin lizozomların iç kısmına direkt olarak lizozomun invajinasyonuyla alınmasıyla gerçekleşmektedir. Hem makrotofaji hem de mikrotofajide, büyük yapıların seçici ya da seçici olmayan mekanizmalar ile alınması olabilmektedir. Şaperon-aracılı otofajide, KFERQ motifli hedef proteinler, lizozomal zara şaperon protein kompleksi (Hsc-70) ile transloke olmaktadır. Bunlar lizozomal zar reseptörü olan lizozom ile ilgili zar proteini 2A (LAMP-2A) tarafından tanınarak ve yıkımları

gerçekleşmektedir. Yapılan çalışmalarda SQSTM1'in otofaji ve meme kanserindeki rolünü araştırmışlar ve p62 ile etkileşime giren yeni bir protein olan Flightless-I'in seçici otofajiyi engelleyerek meme kanseri ilerlemesini desteklediğini bildirmişlerdir. Flightless-I'in LC3'ün tanınmasını engellemek için p62 ile etkileşime girerek seçici otofajiyi engelleyerek, meme kanseri oluşumuna yol açtığını saptamışlardır (11).

2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE

Araştırmada, farklı kalori kısıtlamalarına maruz bırakılan MMTV-TGF- α farelerinin RNA-Seq sonucunda DEG verisinde ifadesi değişen oksidatif stres ve otofaji ile ilişkili SQSTM1 geninin Gerçek Zamanlı PCR (RT-PCR) yöntemi ile validasyonu yapıldı ve RNA-seq datasının güvenilirliği, meme kanseri, kalori kısıtlaması, otofaji ve oksidatif stres arasındaki bağlantı için önem arz etmektedir.

2.1 Deney hayvanları

Çalışmada, MMTV-TGF- α transgenik farelerinden temin edilen timüs dokuları kullanılmıştır. Bu farelerin orijinalini, Minnesota Üniversitesi Hormel Enstitüsü Tıbbi Araştırma Merkezi'nden Dr. Margot Cleary, Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde bir koloni meydana getirmek amacıyla Dr. Soner Doğan'a bağışlamıştır. Buna göre, hayatlarının 10. haftasından itibaren üç beslenme grubu oluşturulan [AL(Ad Libitum), CCR (Kronik Kalori Kısıtlaması), ICR (Aralıklı Kalori Kısıtlaması)] fareler ve 18. haftada sakrifiye edilmiştir. CCR, AL beslenmeden %15 kısıtlama ile olmuştur. AKK, açık periyotta AL beslenmeden %60 kısıtlama ile olmuştur. Yetiştirilen farelerin timüs dokuları RNA izolasyonu yapıldığına dek -80°C'de saklanmıştır.

2.2 RNA İzolasyonu ve Konstanrasyon Analizi

17 ve 18. haftalarda, sakrifikasyon yapılan MMTV-TGF- α farelerden temin edilen timüs dokusundan kesilen 25-30 mg numuneler alınmıştır. Bu numunelerden RNA izolasyonu yapılmasında Qiagen RNeasy Mini Kit kullanılmıştır. Meydana gelen çözeltilerden RNA konsantrasyonu ve miktar saptanması amacıyla Nano-Drop spektrofotometreyle ölçüm metodu kullanılmıştır. Sonrasında örnekler RNA Jel elektroforezinde 2 μ L yükleme tamponu eklenip, jele yüklenmiştir. Jelde 60 Volttta 90 dk yürütülmüştür.

3.2.4. cDNA Sentezi ve RT-PCR

Komplementer DNA sentezlenmesi için GeneMark First Strabded Synthesis Kit (SAMscript) kullanılmıştır. cDNA sentezinden önce bütün RNA konsantrasyonları

sabitlenmiştir. Kitteki protokole göre cDNA elde edildikten sonra Gerçek Zamanlı PCR (RT-PCR) metodu için ticari kitlerden olan GM SYBR Q-PCR Kiti ve SQSTM1 genine spesifik primerler esas olarak kullanılmıştır. Q-PCR reaksiyonu için gereken bileşenler kitin protokolünde belirtildiği şekilde kullanılmıştır. Hazırlanan karışım BIORAD Q-PCR cihazına konulup aşağıdaki şartlarda reaksiyon gerçekleştirilmiştir.

Sıcaklık (°C)	Süre	Siklus
95	120 sn	1 siklus
95	15sn	40 siklus
59-62	30 sn	
72	30 sn	

Tablo 1: RT-PCR için kullanılan cihaz protokolü

TABLO 2: RT-PCR reaksiyonun kullanılan ileri ve geri primerler

SQSTM1-F	GCACAGGCACAGAAGACAAG	59,4
SQSTM1-R	CACCGACTCCAAGGCTATCT	58,8

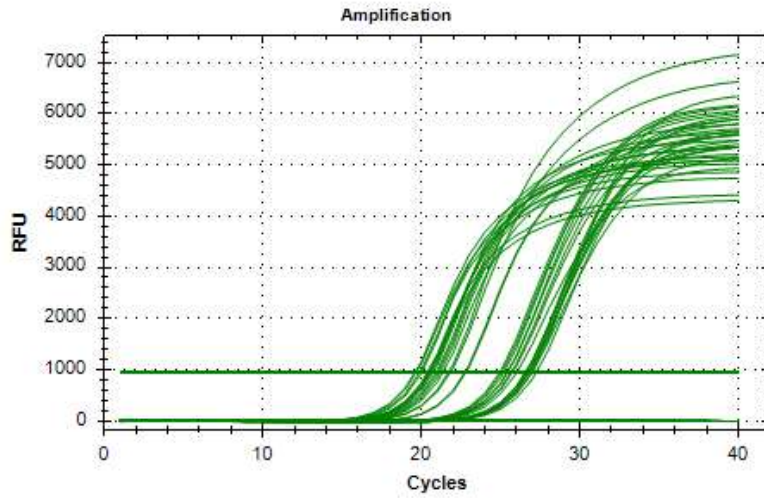
Q-PCR tepkimesi gerçekleştirildikten sonra, Ct değerleri incelenen SQSTM1 geninin ve GAPDH geninde kat değişimi (fold change) hesaplanması amacıyla kullanılmıştır. ΔC_t ve $2^{-\Delta \Delta C_t}$ değerlerinin hesaplanması için karşılaştırmalı Ct metodu kullanılmıştır.

3. BULGU VE TARTIŞMALAR

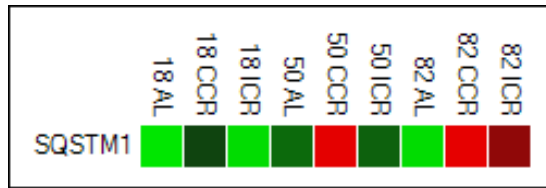
3.1 Sonuçlar

Gerçek Zamanlı PCR sonucunda farklı beslenme grubundaki farelerden elde edilen timüs dokularında çalışılan SQSTM1 geni için ekspresyon miktarlarındaki kat değişimi değerleri $2^{\Delta \Delta C_t}$

- Δ Δ C_t metodu kullanılarak hesaplanmıştır. Amplifikasyon eğrisi, kümeleme analizi ve kıyaslaması Şekil 1 ve 2’de gösterilmiştir.



Şekil 1: SQSTM1 genine ait erime eğrisi grafiği



Şekil:2 SQSTM1 genine ait kümeleme analizi

Tablo: 3 GAPDH ve SQSTM1 ortalama C_t değerleri

	18. AL	18. CCR	18. ICR
GAPDH	19,99	20,45	20,50
SQSTM1	26,58	25,72	26,91
LC3	32,11	29,43	32,37

$$\Delta C_t (\text{Kontrol}) = C_t(\text{Kontrol grubu Hedef geni}) - C_t(\text{Kontrol grubu Referans geni})$$

$$\Delta C_t (\text{Deneyssel}) = C_t(\text{Deney grubu Hedef geni}) - C_t(\text{Deney grubu Referans geni})$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{Denseysel}) - \Delta C_t(\text{Kontrol})$$

$$2^{-\Delta\Delta C_t} = \text{Kat deęişim deęeri}$$

Tablo: **Hata! Belgede belirtilen stilde metne rastlanmadı.** SQSTM1 geninin AL'ye göre $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri

$2^{-\Delta\Delta C_t}$			
Genler	18. AL	18. CCR	18. ICR
SQSTM1	1	2,60	1,09

18. Hafta sonuçlarına göre;

- SQSTM1 geninin CCR beslenme tipinde ekspresyon seviyesinin arttığı gözlemlenmiştir.

3.2 TARTIŞMA

927

SQSTM1 geni hücrede otofajik bir substrat olarak görev yapmaktadır ve otofajik degradasyon için bir işaretleyici görevi görmektedir (16). Meme kanserinde de önemli bir rol oynayan SQSTM1 geninin bulgularımıza göre meme kanserinde kronik kalori kısıtlamasında ekspresyonunun artması hücre içerisinde oksidatif stresin azalmasına ve otofajik yolağın aktifleşmesine neden olduğu göstermiştir. Bulgularımız RNA-seq datası ile de uyumlu olup, RNA-seq transkripsiyon sonucunu desteklemiştir.

KAYNAKLAR:

1. Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S. ve Kalayci, O., (2012). "Oxidative Stress and Antioxidant Defense", WAO Journal, 5:9–19.

2. Arslan, D.Ö., Korkmaz, G., Gözüaçık, D. (2011). Otofaji: Bir Hücrel Stres Yanıtı ve Ölüm Mekanizması. Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 2 (4), 184-194.

- 3.Xie, Z.,Klionsky, D.J. (2007). Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nature Cell Biology*, 9 (10), 1102-1109.
- 4.Huang, T., Kim, C. K., Alvarez, A. A., Pangeni, R. P., Wan, X., Song, X., ... Cheng, S.-Y. (2017). MST4 Phosphorylation of ATG4B Regulates Autophagic Activity, Tumorigenicity, and Radioresistance in Glioblastoma. *Cancer Cell*, 32(6), 840–855.e8.
- 5.Fleming, A. M., Zhu, J., Howpay Manage, S. A., & Burrows, C. J. (2019). Human NEIL3 gene expression is regulated by epigenetic-like oxidative DNA modification. *Journal of the American Chemical Society*.
- 6.Kuo, M.-L., Lee, M. B.-E., Tang, M., den Besten, W., Hu, S., Sweredoski, M. J., ... Yen, Y. (2016). PYCR1 and PYCR2 Interact and Collaborate with RRM2B to Protect Cells from Overt Oxidative Stress. *Scientific Reports*, 6(1).
- 7.Chang C, Worley BL, Phaëton R, Hempel N. Extracellular Glutathione Peroxidase GPx3 and Its Role in Cancer. *Cancers (Basel)*. 2020;12(8):E2197. Published 2020 Aug 6. doi:10.3390/cancers12082197
- 8.Fu F, Nie J, Tong TK. Serum cardiac troponin T in adolescent runners: effects of exercise intensity and duration. *Int J Sports Med* 2009; 30: 168–172.
- 9.Lippi G, Schena F, Montagnana M, Salvagno GL, Guidi GC. Influence of acute physical exercise on emerging muscular biomarkers. *Clin Chem Lab Med* 2008; 46(9): 1313- 1318.
- 10.Fontana S, Schillaci O, Frinchi M, Giallombardo M, Morici G, Di Liberto V, Alessandro R, De Leo G, Perciavalle V, Belluardo N, Mudò G. Reduction in mdx mouse muscle degeneration by low-intensity endurance exercise: a proteomic analysis in quadriceps muscle of exercised compared with sedentary mdx mice. *Biosci Rep* 2015; 12: 35(3).
- 11.Cox, A. G., Winterbourn, C. C., & Hampton, M. B. (2010). Mitochondrial peroxiredoxin involvement in antioxidant defence and redox signalling. *Biochemical Journal*, 425(2), 313–325. doi:10.1042/bj20091541
- 12.Peskin, A. V., Low, F. M., Paton, L. N., Maghzal, G. J., Hampton, M. B., & Winterbourn, C. C. (2007). The High Reactivity of Peroxiredoxin 2 with H₂O₂ Is Not Reflected in Its Reaction with Other Oxidants and Thiol Reagents. *Journal of Biological Chemistry*, 282(16), 11885–11892. doi:10.1074/jbc.m700339200
- 13.Hu, W., Dang, X.-B., Wang, G., Li, S., & Zhang, Y.-L. (2018). Peroxiredoxin-3 attenuates traumatic neuronal injury through preservation of mitochondrial function. *Neurochemistry International*, 114, 120–126. doi:10.1016/j.neuint.2018.02.004