

**GÖKKUŞAĞI ALABALIK (*Oncorhynchus mykiss*)
KARACİĞER DOKUSUNDAN GLUTATYON REDÜKTAZ
ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI,
KARAKTERİZASYONU VE BAZI METALLERİN ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE
İNHİBİSYON ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Bilge TEKMAN

**Yüksek Lisans Tezi
Kimya Anabilim Dalı**

**Doç.Dr.Hasan ÖZDEMİR
2007**

Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**GÖKKUŞAĞI ALABALIK (*Oncorhynchus mykiss*) KARACİĞER
DOKUSUNDAN GLUTATYON REDÜKTAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE BAZI
METALLERİN ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE İNHİBİSYON
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Bilge TEKMAN

KİMYA ANABİLİM DALI

ERZURUM

2007

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

GÖKKUŞAĞI ALABALIK (*Oncorhynchus mykiss*) KARACİĞER DOKUSUNDAN GLUTATYON REDÜKTAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE BAZI METALLERİN ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE İNHİBİSYON ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Bilge TEKMAN

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç.Dr.Hasan ÖZDEMİR

Glutasyon redüktaz (Glutasyon: NADP^+ , oksidoredüktaz, E.C 1.8.1.7.; GR) enzimi Gökkuşığı Alabalık karaciğerinden saflaştırıldı. Saflaştırma işlemi homojenatın hazırlanması, amonyum sülfat çöktürmesi ve 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi olmak üzere 3 basamakta gerçekleştirildi. 13,957 EÜ/mg protein spesifik aktivitesine sahip olan GR enzimi %47,28 verimle elde edildi. Enzim için optimum pH, stabil pH, optimum sıcaklık sırasıyla 7,5, 8,0, 10°C olarak bulundu. Ayrıca NADPH ve GSSG substratları için K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 0,055, 0,025 mM ve 0,143, 0,098 EÜ/ml olarak belirlendi. Tüm saflaştırma basamakları sonucu enzim 840,78 kat saflaştırıldı ve enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak 340 nm 'de Beutlar metoduna göre ölçüldü. Buna ilaveten NADP^+ ve GSH için Lineweaver-Burk grafikleri yardımıyla K_i sabitleri sırasıyla 0,295 ve 10,17 mM olarak bulundu. Bunun yanısıra Gökkuşığı Alabalık karaciğeri GR aktiviteleri üzerine bazı metallerin (bakır, civa, demir, kadmiyum, alüminyum, kurşun) inhibitör etkileri incelendi. Karaciğer dokusu GR enzimi aktivitesinin %50'sinin inhibe edildiği bazı metal konsantrasyonları GR enzimi için elde edildi. Daha sonra, bu maddeler için K_i değerleri Lineweaver-Burk grafiklerinden hesaplandı.

2007, 65sayfa

Anahtar Kelimeler: Glutasyon redüktaz, karakterizasyon, saflaştırma, gökkuşığı alabalığı, metal iyonları

ABSTRACT

Master Thesis

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF GLUTATHIONE REDUCTASE ENZYME FROM RAINBOW TROUT (*Oncorhynchus mykiss*) LIVER TISSUE AND INVESTIGATION OF THE INHIBITION EFFECTS OF SOME METALS ON ENZYME ACTIVITY

Bilge TEKMAN

Atatürk University

Graduate School of Natural and Applied sciences

Department of Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof.Dr.Hasan ÖZDEMİR

Glutathione reductase (Glutathione: NADP⁺ oxidoreductase, E.C 1.8.1.7; GR) was purified from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver. The purification consisted of three steps, preparation of homogenate, ammonium sulphate fractionation and 2',5'-ADP Sepharose 4B affinity chromatography. GR enzyme was obtained with a yield 47,28% having a specific activity of 13,957 EU/ml proteins. Optimal pH, stable pH, optimal temperature were determined as 7,5, 8,0, 10°C respectively, Also K_M and V_{max} values were determined for NADPH and GSSG substrates 0,055, 0,025 mM and 0,143,0,098 EU/ml respectively. The overall purification was about 840,78 fold for liver GR. Enzymatic activity was spectrophotometrically measured according to Beutler method at 340 nm. In addition, K_i values were determined by means of Lineweaver-Burk graphs obtained as 0,295 and 10,17 mM, NADP⁺ and GSH respectively. Besides, the inhibitory effects of different some metals (copper, cadmium, iron, mercury, aluminium, lead) on rainbow trout liver GR activities were investigated. Some metals concentrations, inhibited 50% of tissue GR enzymes activity, were obtained for GR enzymes. Then, K_i values for these substances were also calculated from Lineweaver-Burk graphs.

2007, 65 pages

Keywords: Glutathione reductase, purification , characterization, rainbow trout, metal ions

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmanın deneysel kısmı Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmamda bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Biyokimya Anabilim dalı Başkanı değerli hocam Sayın Prof.Dr.Ö.İrfan KÜFREVİOĞLU'na, tezimin her aşamasında yardım ve desteğini esirgemeyen tez danışmanım değerli hocam Sayın Doç.Dr.Hasan ÖZDEMİR'e ve çalışmalarım süresince yardımlarını esirgemeyen Doç.Dr.Mehmet ÇİFTÇİ'ye derin minnet ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmam boyunca değerli katkılarından dolayı değerli hocalarım Sayın Doç.Dr. İhami GÜLÇİN ve Sayın Doç.Dr. Şükrü BEYDEMİR'e teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmam boyunca her türlü yardımını esirgemeyen arkadaşım Sayın Murat ŞENTÜRK'e teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca çalışmalarım boyunca her türlü yardımını esirgemeyen Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Başkanı Sayın Prof.Dr. Hasan SEÇEN'e, Biyokimya Anabilim dalı araştırma laboratuvarında çalışma arkadaşlarım Sayın Arş.Gör.Melda ŞİŞECİOĞLU'na, Sayın Arş.Gör.Deniz EKİNCİ'ye, Sayın Arş.Gör.Esra BAYRAM'a ve kimya bölümünün tüm elemanlarına teşekkür ediyorum.

Çalışmalarımın her aşamasında maddi-manevi yardım ve desteklerinin yanı sıra göstermiş oldukları sabır ve anlayıştan dolayı anneme, babama ve eşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bilge TEKMAN

Temmuz, 2007

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	13
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	18
3.1. Materyal.....	18
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	18
3.1.2. Kullanılan alet ve cihazlar.....	19
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması.....	20
3.2. Yöntemler.....	24
3.2.1. Gökkuşığı Alabalık karaciğer dokusundan saflaştırılan GR enziminin aktivitesinin ölçümü.....	24
3.2.2. Protein Tayini.....	25
3.2.2.a. Kalitatif protein tayini.....	25
3.2.2.b. Bradford yöntemiyle protein tayini.....	25
3.2.3. Gökkuşığı Alabalık karaciğer dokusundan GR enziminin saflaştırılması ile ilgili yöntemler.....	26
3.2.3.a. Gökkuşığı Alabalık karaciğer dokusu temini ve homojenat hazırlanması.....	26
3.2.3.b. Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz.....	27
3.2.3.c. Afinite kolonunun hazırlanması ve Gökkuşığı Alabalık karaciğer dokusu GR enziminin saflaştırılması	28
3.2.4. Sodyum Dodesilsülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzim saflığının kontrolü.....	29
3.3. Gökkuşığı Alabalık Karaciğer Dokusundan saflaştırılan GR Enzimiyle ilgili yapılan kinetik çalışmalar.....	30
3.3.1. Gökkuşığı Alabalık karaciğer dokusundan saflaştırılan GR enzimi için optimum iyonik şiddetin belirlenmesine yönelik çalışmalar	30
3.3.2. Gökkuşığı Alabalık karaciğer dokusundan saflaştırılan GR wnzimi için optimum pH bulunmasına yönelik çalışmalar.....	30
3.3.3. Gökkuşığı Alabalık karaciğer dokusundan saflaştırılan GR enzimi için stabil pH bulunmasına yönelik çalışmalar.....	31
3.3.4. Gökkuşığı Alabalık karaciğer dokusundan saflaştırılan GR enzimi için optimum sıcaklık belirlenmesine yönelik çalışmalar.....	31
3.3.5. NADPH ve GSSG substratları İçin K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik çalışmalar.....	31
3.3.6. GSH ve $NADP^{+}$ nin enzim üzerinde etkilerinin incelenmesi.....	32

3.4. Gökkuşığı Alabalık Karaciğer Dokusundan Saflaştırılan GR Enzimi Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının İnhibitör Etkilerinin Belirlenmesi.....	32
3.5. İnhibitör Etkisi Gösteren Metal İyonları İçin K_i Değerlerinin belirlenmesine ait çalışmalar.....	32
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	34
4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik.....	34
4.2. Gökkuşığı Alabalık Karaciğer Doku GR Enziminin Saflaştırılması Sonuçları.....	35
4.2.1. Amonyum sülfat çöktürmesi sonuçları	35
4.2.2. Afinite kromatografisi sonuçları.....	36
4.3. Gökkuşığı Alabalık Karaciğer Dokusundan Saflaştırılan GR Enziminin SDS-PAGE ile Saflık Kontrolü.....	37
4.4. Gökkuşığı Alabalık Karaciğer Dokusundan Saflaştırılan GR Enziminin Optimum şartlarının belirlenmesine yönelik sonuçlar.....	38
4.4.1. Gökkuşığı Alabalık karaciğer dokusundan saflaştırılan GR enziminin optimum iyonik şiddetinin belirlenmesine yönelik sonuçlar.....	38
4.4.2. Gökkuşığı Alabalık karaciğer dokusundan Saflaştırılan GR enzimi için optimum pH bulunmasına yönelik sonuçlar.....	39
4.4.3. Gökkuşığı Alabalık karaciğer dokusundan saflaştırılan GR enzimi için stabil pH bulunmasına yönelik sonuçlar.....	41
4.4.5. Gökkuşığı Alabalık karaciğer dokusundan saflaştırılan GR enzimi için optimum sıcaklık belirlenmesine yönelik sonuçlar.....	43
4.4.6. NADPH ve GSSG substratları İçin K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesine yönelik sonuçlar.....	44
4.4.7. Gökkuşığı Alabalık karaciğer dokusundan saflaştırılan GR enziminin GSH ve $NADP^+$ inhibitörleri için K_i sabitlerinin belirlenmesine yönelik sonuçlar	46
4.5. Gökkuşığı Alabalık Karaciğer Dokusundan Saflaştırılan GR Enzimi Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının İnhibitör Etkilerinin sonuçları.....	49
4.6. Gökkuşığı Alabalık Karaciğer Dokusundan Saflaştırılan GR Enziminin İnhibe eden bazı metal İyonları İçin K_i Değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışmaların sonuçları.....	53
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	55
KAYNAKLAR.....	62
ÖZGEÇMİŞ.....	66

SİMGELER DİZİNİ

ADP	Adenozin difosfat
ATP	Adenozin trifosfat
DNA	Deoksiribonükleik asit
DTT	Dityotretiol
EC	Enzim kodu
EDTA	Etilen daimin tetra asetik asit
ES	Enzim substrat kompleksi
FAD	Flavin adenin dinükleotid
GR	Glutasyon redüktoz
GSH	İndirgenmiş glutasyon
GSSG	Oksite glutasyon
NADP ⁺	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (okside form)
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (redukte form)
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilendiamin
Tris	Trihidroksimetil amino metan
TCA	Triklor asetik asit
RNA	Ribonükleik asit
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
SDS	Sodyum dodesil sülfat
K _i	Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti
V _{max}	Maksimum hız
I ₅₀	Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.a. İndirgenmiş glutatyon yapısı, GSH.....	6
Şekil 1.1.b. Okside glutatyonun yapısı, GSSG.....	6
Şekil 4.1. Bradford yöntemiyle proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan standart grafik.....	34
Şekil 4.2 Gökkuşığı Alabalık karaciğeri GR enzimi için amonyum sülfat doyunluk aralığı tespitine yönelik aktivite-çöktürme aralığı grafiği.....	36
Şekil 4.3. Gökkuşığı Alabalık karaciğeri dokusundan saflaştırılan GR enziminin 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonundan elüsyon grafiği.....	37
Şekil 4.4. Gökkuşığı Alabalık karaciğeri GR enziminin SDS-poliakrilamid jel alektroforezi fotoğrafı.....	38
Şekil 4.5. Değişik konsantrasyonlardaki Tris-HCl Tampon çözeltileri kullanılarak Gökkuşığı Alabalık karaciğeri GR enzimi için yapılan iyonik şiddet-aktivite grafiği.....	39
Şekil 4.6. 50 mM Tris HCl tampon çözeltisi kullanılarak Gökkuşığı Alabalık karaciğeri GR enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm grafiği.....	40
Şekil 4.7. 50 mM fosfat tamponu çözeltisi kullanılarak Gökkuşığı Alabalık karaciğeri GR enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm grafiği.....	41
Şekil 4.8. Değişik pH'lardaki 50 mM Tris HCl tampon çözeltisi kullanılarak Gökkuşığı Alabalık karaciğeri GR enzimi için elde edilen stabil pH grafiği.....	42
Şekil 4.9. Değişik pH'lardaki 50 mM fosfat tampon çözeltisi kullanılarak Gökkuşığı Alabalık karaciğeri GR enzimi için elde edilen stabil pH grafiği.....	43
Şekil 4.10. Gökkuşığı Alabalık karaciğeri GR enzimi için optimum sıcaklık	

ölçülmesi için çizilen sıcaklık-aktivite grafiği.....	44
Şekil 4.11. 5 farklı NADPH derişimi kullanılarak Gökkuşığı Alabalık karaciğeri GR enzimi için çizilen grafik.....	45
Şekil 4.12. 5 farklı GSSG derişimi kullanılarak Gökkuşığı Alabalık karaciğeri GR enzimi için çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	46
Şekil 4.13. GSH için K_i sabitinin bulunmasına yönelik çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	48
Şekil 4.14. NADP^+ için K_i sabitinin bulunmasına yönelik çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	49
Şekil 4.15. Gökkuşığı Alabalık karaciğer dokusu GR enzimi için 5 farklı Cu^{+2} konsantrasyonunda elde edilen %aktivite- $[\text{Cu}^{+2}]$ grafiği.....	50
Şekil 4.16. Gökkuşığı Alabalık karaciğer dokusu GR enzimi için 5 farklı Cd^{+2} konsantrasyonunda elde edilen %aktivite- $[\text{Cd}^{+2}]$ grafiği.....	50
Şekil 4.17. Gökkuşığı Alabalık karaciğer dokusu GR enzimi için 5 farklı Fe^{+2} konsantrasyonunda elde edilen %aktivite- $[\text{Fe}^{+2}]$ grafiği.....	51
Şekil 4.18. Gökkuşığı Alabalık karaciğer dokusu GR enzimi için 5 farklı Pb^{+2} konsantrasyonunda elde edilen %aktivite- $[\text{Pb}^{+2}]$ grafiği.....	51
Şekil 4.19. Gökkuşığı Alabalık karaciğer dokusu GR enzimi için 5 farklı Hg^{+2} konsantrasyonunda elde edilen %aktivite- $[\text{Hg}^{+2}]$ grafiği.....	52
Şekil 4.20. Gökkuşığı Alabalık karaciğer dokusu GR enzimi için 5 farklı Al^{+3} konsantrasyonunda elde edilen %aktivite- $[\text{Al}^{+3}]$ grafiği.....	52
Şekil 4.21. Gökkuşığı Alabalık karaciğeri dokusundan saflaştırılan GR enzimi üzerine $[\text{Cu}^{+2}]$ iyonunun etkisi $[\text{I}_1] = 0,070\text{mM}$, $[\text{I}_2] = 0,080 \text{ mM}$, $[\text{I}_3] = 0,090\text{mM}$	53
Şekil 4.22. Gökkuşığı Alabalık karaciğeri dokusundan saflaştırılan GR enzimi üzerine $[\text{Cd}^{+2}]$ iyonunun etkisi $[\text{I}_1] = 0,050\text{mM}$, $[\text{I}_2] = 0,070 \text{ mM}$, $[\text{I}_3] = 0,080\text{mM}$	54

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Gökkuşığı Alabalık karaciğeri GR enzimi için amonyum sülfat doygunluk aralığı tespitine yönelik aktivite- çöktürme aralığı çizelgesi.....	35
Çizelge 4.2. Glutatyon redüktaz enziminin saflaştırılması basamakları.....	36
Çizelge 4.3. Gökkuşığı Alabalık karaciğeri GR enzimi optimum iyonik siddet için Tris-HCl Tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	39
Çizelge 4.4. 50 mM Tris-HCl tampon çözeltisi kullanılarak Gökkuşığı Alabalık karaciğeri GR enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	40
Çizelge 4.5. 50 mM Fosfat tampon çözeltisi kullanılarak Gökkuşığı Alabalık karaciğeri GR enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	40
Çizelge 4.6. Gökkuşığı Alabalık karaciğeri GR enziminin stabil pH'sı için 50mM Tris-HCl tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	42
Çizelge 4.7. Gökkuşığı Alabalık karaciğeri GR enziminin stabil pH'sı için 50mM potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	43
Çizelge 4.8. Gökkuşığı Alabalık karaciğeri GR enziminin optimum sıcaklığı için sıcaklık-aktivite ölçüm sonuçları çizelgesi.....	44
Çizelge 4.9. Gökkuşığı Alabalık karaciğer dokusu GR enzimi için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik NADPH derişimi aktivite çizelgesi.....	45
Çizelge 4.10. Gökkuşığı Alabalık karaciğer dokusu GR enzimi için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik GSSG derişimi-aktivite çizelgesi.....	46
Çizelge 4.11. GSH için K_i sabitinin bulunmasına yönelik çizelge.....	47

Çizelge 4.12. NADP ⁺ için K _i sabitinin bulunmasına yönelik çizelge.....	48
Çizelge 4.13. Gökkuşığı Alabalık karaciğeri dokusundan saflaştırılan GR enzimi üzerine metal etkilerinin toplu sonuçları.....	54

1.GİRİŞ

Enzimler canlı hücreler tarafından sentezlenen ve canlı metabolizmasındaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hiçbir yan ürün oluşturmada %100 ürün verimi sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Enzimlerin en önemli özellikleri katalizleme güçleri ve spesifiklikleridir. Katalitik RNA moleküllerin küçük bir grubu hariç tutulduğunda bütün enzimler protein yapısındadır (Keha ve Küfrevioğlu 2000).

Biyokimya alanında günümüze kadar en çok araştırma yapılan konu enzimlerdir. Enzimler sağlıktan endüstriyel konulara kadar uygulama alanı bulmuştur. Kataliz olayı ile ilgili ilk denemeler 1760–1825 yılları arasında midedeki enzimatik sindirim üzerine yapılmıştır.

Belirli bir enzim üzerindeki ilk çalışma 1860 yılında Pasteur tarafından yapılmış ve fermantasyon olayının enzimlerce yürütüldüğünü ispat etmiştir. Bu yüzden enzimler için “Ferment” terimi kullanılmıştır.

Buchner kardeşler 1897’li yıllarda maya hücrelerinde alkolik fermantasyonu katalize eden enzimleri elde etmeyi başardılar. Bu bulgu enzimlerin aktivite göstermeleri için hücre içinde bulunmalarının şart olmadığı ortaya koymuştur.

Enzimoloji alanında en önemli gelişme 1926 yılında Summer’ın üreaz enzimini “Jack Bean” bitkisinden elde edip kristallendirdikten sonra protein yapısında bir bileşik olduğunu ortaya koymasıdır (Keha ve Küfrevioğlu 2000, Lehninger *et al.* 2000)

Northrop 1930 yılında pepsin’i saf ve karakterize halde elde etmeyi başarmıştır. Bu araştırma sonucunda enzimlerin protein yapısında olduğu herkes tarafından kabul edilmeye başlandı (Gözükara 1989)

Günümüzde 2000 kadar enzim tanımlanmış, birçoğu saflaştırılmış, karakterize edilmiş ve 200'den fazla enzim de kristalleştirilmiştir. Yapılan genetik çalışmalar ve hücre içindeki kimyasal reaksiyonların çeşitliliği daha bir çok enzimin keşfedilmediğini göstermektedir. Bütün canlı hücrelerde meydana gelen reaksiyonlar enzimlerle ilgilidir. Enzimler canlı hücrelerde sentezlenir ve hücre, canlılığını yitirdikten sonra uzun süre etkili kalırlar. Katalitik etkileri hücreye bağlı değildir. Enzimler, protein yapısında olduklarından protein özelliklerine sahiptirler.

Enzimlerin, üzerinde etkili oldukları ve ürüne dönüştürdükleri bileşiklere “Substrat” denir. Bazı enzimler substrat adının sonuna “-az” son eki getirilerek adlandırılırken, bazıları da ilk bulucularının ortaya attıkları isimlerle tanınır. Örneğin; fosfataz, üreaz, tripsin ve pepsin gibi. Ancak bu isimlerin çoğu enzimlerin fonksiyonları hakkında eksik bilgi verdiğinden Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB) tarafından sistematik bir sınıflandırma yapılmıştır. Ayrıca her enzim için 4 rakamlı enzim kod numarası öngörülmüştür (Keha ve Küfrevioğlu 2000; Lehninger *et al.* 2000)

Enzimlerin katalizleme güçleri “Turnover Sayısı” adı verilen bir değerle ifade edilir ve birim zamanda bir mol enzimin ürüne dönüştürdüğü substratın mol sayısı demektir. Bazı enzimler, katalizleme işini kendi başlarına yapabilirler. Bazıları ise “Kofaktör” denilen gruplara ihtiyaç duyarlar. Kofaktör, bir metal iyonu olabildiği gibi “koenzim” denilen kompleks bir organik bileşikte olabilir. Bazen aktivite için her ikisi de gerekebilir. Kofaktöre sahip enzimlere “Holoenzim”; enzimin protein kısmına ise “Apoenzim” denir.

Enzim aktivitesini yani enzimli reaksiyon hızlarına etki eden faktörleri şöyle sıralayabiliriz:

- a.Substrat konsantrasyonu
- b.Enzim konsantrasyonu
- c.pH
- d.İyonik şiddet
- e.İnhibitor ve aktivatörlerin varlığı

f.Sıcaklık

Enzimlerin hem “in vivo” hem de “in vitro” aktivitelerinin bazı bileşikler tarafından azaltılması hatta yok edilmesi olayına “inhibisyon” adı verilir. Buna sebep olan bileşiklere “inhibitor” denilir.

İnhibitörler genellikle küçük molekül kütlesine sahip bileşikler veya iyonlardır. Enzimatik aktiviteyi kontrol eden en küçük moleküller biyolojik sistemler üzerinde büyük ölçüde kontrol sağladıkları için önemlidirler. Enzim inhibisyonu biyolojik sistemlerde başlı başına bir kontrol mekanizması oluşturduğu için önemlidir. Birçok kimyasal madde ilaç ve zehirli bileşikler de fonksiyonlarını bu yolla gerçekleştirirler.

Enzimatik inhibisyon, dönüşümlü ve dönüşümsüz olmak üzere başlıca iki şekilde sınıflandırılır.

Dönüşümsüz inhibisyonda enzimin bir veya daha fazla fonksiyonel grubu etkilenir. İnhibitör, enzime ya kovalent olarak bağlanır veya kompleks oluşturur. V_{max} (enzimatik reaksiyonda ulaşılacak maksimum hız) azalır, K_M (enzimin substrata ilgisini gösteren sabit) değişmeden kalır.

Dönüşümsüz inhibisyonun aksine dönüşümlü inhibisyonda enzim ile inhibitör etkileşmesi, bir denge reaksiyonu şeklindedir.

Dönüşümlü inhibisyon üç grupta incelenir:

- i)yarışmalı (kompetitif) inhibisyon
- ii)yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyon
- iii)yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyon

Dönüşümlü inhibisyonun en basit tipi yarışmalı (kompetitif) inhibisyondur. Yarışmalı inhibitör yapı itibariyle substrata benzer ve enzimin aktif bölgesine bağlanır. Böylece substratın enzime bağlanması önlenmiş olur. Fakat substrat konsantrasyonu artırılmakla

inhibisyon etkisi ortadan kaldırılabilir. Yani enzimin $V_{\max}$ değeri değişmezken, K_M değeri artar.

Yine dönüşümlü tip olan yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyonda inhibitör ve substrat enzim molekülüne aynı anda bağlanabilir. Bu durum bağlanmanın enzimin aynı bölgesine olmadığını gösterir. Yarışmasız bir inhibitör, etkisini; bir enzimin turnover sayısını, yani katalitik aktivitesini düşürerek gösterir. Burada substrat ve inhibitör arasında yarışma söz konusu değildir. Substrat konsantrasyonu artırılmakla inhibisyon ortadan kaldırılamaz. Enzimin $V_{\max}$ değeri azalırken, K_M sabit kalır. Substrat ve inhibitör, farklı bölgelere bağlanabildiğinden enzimin iki çeşit inaktif kompleksi meydana gelir.

Bir başka dönüşümlü inhibisyon tipi de yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyondur. Bu inhibisyon çeşidinde inhibitör serbest enzime bağlanamaz. Sadece enzim – substrat (ES) kompleksine bağlanır. Tek substratlı sistemlerde yarı yarışmalı inhibisyona nadir rastlanır. Daha çok birden fazla substratlı enzimler için geçerlidir.

Enzim–substrat–inhibitör (ESI) kompleksi ortamda bulunacağından yarı yarışmalı inhibitörün varlığında $V_{\max}$ azalır. ESI kompleksinin oluşumu vasıtasıyla S kompleksi ortamdan sürekli çekileceğinden enzim ve substrattan ES kompleksinin oluşumu dengesini daha fazla sağa kaydırır ve K_M değeri küçülür.

Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyonunun özel bir çeşidi olan lineer karışık tip inhibisyon dönüşümlü inhibisyon çeşitleri arasındadır. Bu tür inhibisyonda enzim, substrat ve inhibitörün bağlanma denge sabitleri farklılaşmaktadır.

Birçok multienzim sistemi net reaksiyon hızlarını kendileri düzenleme kapasitesine sahiptir. Bu sistemlerin çoğunda seri reaksiyonların son ürünü belirli bir konsantrasyona eriştiğinde sistemin ilk enzimini veya dallanma noktasındaki enzimi inhibe eder. Bu enzimlere “allosterik enzimler” denir ve bu olaya da “feed-back” inhibisyonu adı

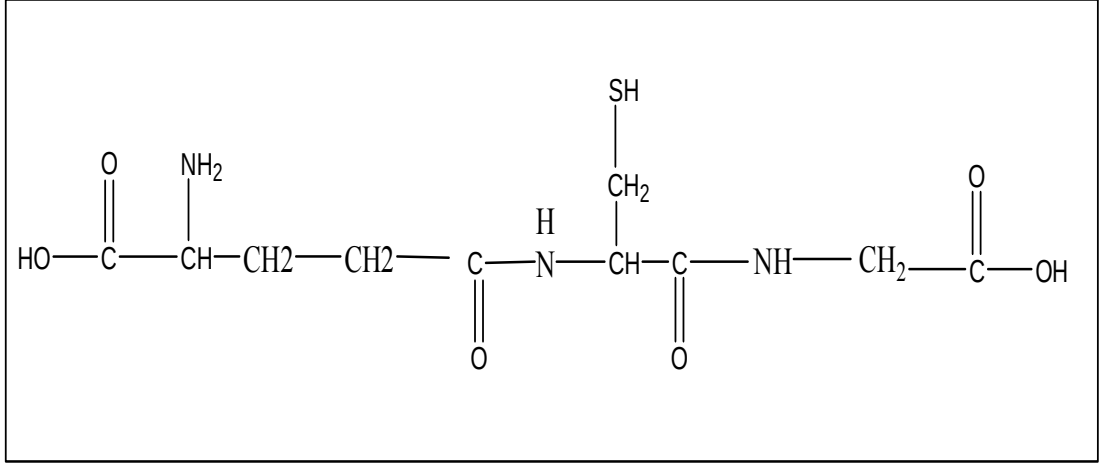
verilir. Birden fazla polipeptid zinciri ihtiva eden allosterik enzimlerde inhibitörlerin enzime bağlanmasıyla değişik alt birimlerin bağlanma merkezleri arasındaki etkileşimlerle allosterik inhibisyon olayı meydana gelir. Allosterik enzimleri etkileyen bileşiklere “modülatör” denir.

Homotropik allosterik enzimlerde enzimin substratı bizzat pozitif modülatör olarak etki yapar. Heterotropik allosterik enzimlerde enzim substrattan başka bileşikler tarafından etkilenmektedir. Bazı allosterik enzimler, homotropik–heterotropik karakterde olup modülatörlerden birisi bu enzimin substratı, diğeri başka bileşiklerdir. Allosterik enzimlerin kinetiği Michaelis–Menten kinetiğinden farklılık gösterir.

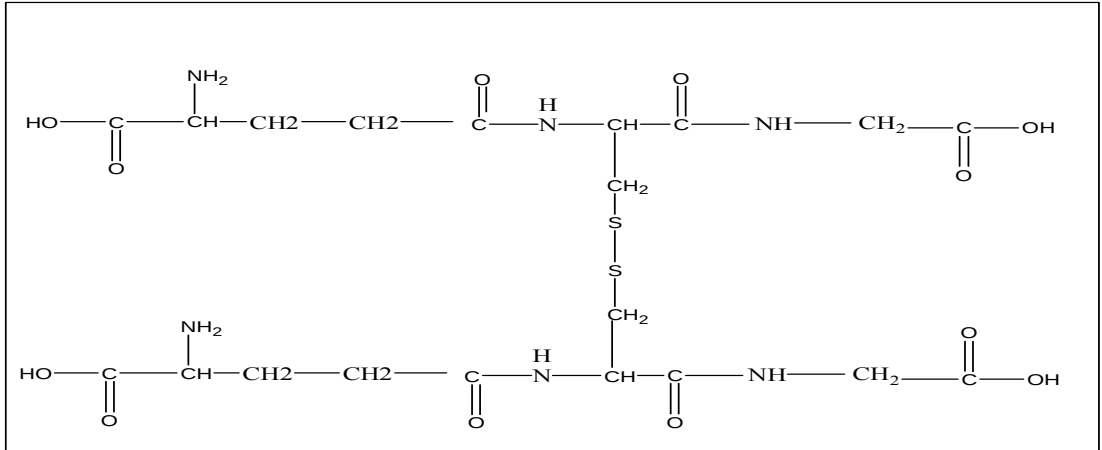
İnhibisyon çeşidinin ve K_i sabitinin belirlenmesi için en çok kullanılan yöntem, Lineweaver–Burk grafikleridir. Bu yöntemde $1/V-1/[S]$ grafikleri sabit inhibitör ve beş farklı substrat konsantrasyonunda çizilir. Kesim noktalarında değerlendirmeler yapılır. K_i sabitlerinin bulunmasında ikinci yol Dixon grafikleri yoludur. Bu yöntemde en az iki basit substrat konsantrasyonunda $1/V-[I]$ grafiği çizilerek kesim noktalarından K_i sabitleri hesaplanır (Keha ve Küfrevioğlu 2000; Lehninger *et al.* 2000).

Genellikle enzim aktivatörleri küçük iyonlar veya fazla büyük olmayan moleküllerdir. Bunlar kofaktörlerin aksine kataliz olayına her zaman katılmazlar. Aktivatörleri iki grupta toplamak mümkündür. Birincisi sadece substratla birleşerek aktivatör rolü oynayan bileşiklerdir. İkincisi ise serbest enzimle birleşerek aktivatör rolü oynayan bileşiklerdir.

Bir tripeptid olan glutatyon, gerek prokaryot gerekse ökaryot hücrelerde, hücre içi serbest sülfhidril gruplarının büyük bir bölümünü oluşturan ve en önemli (protein yapısında olmayan) tiyoldür. Okside ve redükte olmak üzere iki formda bulunur.



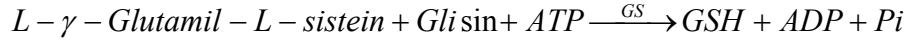
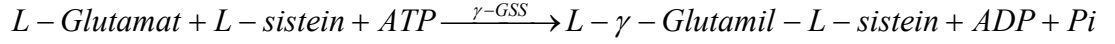
Şekil 1.1.a. İndirgenmiş glutatyon yapısı ,GSH, (L-γ-glutamil-L-sisteinil-glisin)



Şekil 1.1.b. Okside glutatyonun yapısı ,GSSG, 2 (L-γ-glutamil-L-sisteinil-glisin)

İlk olarak 1888 yılında Roy – Pailhade tarafından maya hücresinde bulunarak “filothian” olarak adlandırılmıştır. 1921’de Hopkins tarafından saflaştırılarak kristallendirilmiştir ve bugünkü ismi verilmiştir (Zubay 1988; Açan 1990).

Glutatyan, hücrede ATP gerektiren iki ardışık reaksiyon ile sentezlenir. Bu reaksiyonları (γ-glutamil sistein senentetaz . (γ-GSS) ve glutatyon sentetaz (GS)) enzimleri katalizler (Richman and Meister 1975; Toribio *et al.* 1996; Mistra and Griffith 1998).



Normal kořullarda indirgenmiş glutatyan hücreslere göre deęiřmekle beraber 0,5 ile 10 mM düzeyinde bulunur (Kondo *et al.* 1980; Arrick and Nathon 1984; Shahet And Beutler 1986; Ceoper 1997).

İndirgenmiş glutatyon enzimatik ya da enzimatik olmayan yollarla okside glutatyon (GSSG) dönüşür. Bu dönüşüm özellikle peroksitlerin parçalanmasında ve enzimatik transhidrojenasyon sonucu gerçekleşmektedir.

Glutatyon yapısında bulunan–SH grupları ile oksitleyici ajanların bozucu etkilerine karşı hücreyi korumaktadır. Dolayısıyla glutatyonun düşük konsantrasyonunda bazı metabolik olumsuzluklar meydana gelebilir. Glutatyonun belirlenen görevlerinden bazıları şunlardır:

- Serbest radikallerin ve reaktif oksijen ürünlerinin inaktivasyonu
- Hemoglobin ve spektrin gibi membran proteinleri ve çeşitli enzim proteinlerinin tiyol gruplarının korunması
- Ksenobiyotiklerin , bazı antineoplastik ilaçların ve bazı metabolik son ürünlerin konjugasyonla detoksifikasyonu
- DNA ve protein sentezi
- Aminoasit transportu
- İnsülin gibi bazı proteinlerin disülfür bağlarının koparılması ve böylece proteinlerin konformasyonlarının değişmesi
- Hücre içerisinde sistein deposu olarak bulunması
- Bazı enzimlerin reaksiyonlarında rol oynamasıdır (Demir 1994; Knapen *et al.* 1999).

İndirgenmiş glutatyon antioksidatif reaksiyonlarda önemli görevler yaptığı için oksidasyona sebep olan serbest radikaller ile reaktif oksijen ürünlerinin ve de metabolizmadaki rollerinin bilinmesi gerekir. Enzimatik savunma sistemlerinde süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz gibi enzimler rol oynamaktadır.

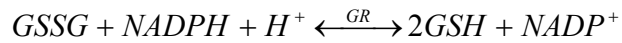
İlk olarak 1818 yılında hayvan dokularında H_2O_2 'nin parçalanarak oksijen açığa çıktığı Thenard tarafından bulunmuştur. 1901'de Loew bunun spesifik bir enzim olan katalaz tarafından katalizlendiğini göstermiştir.

Glutatyon peroksidaz (GPX), hidrojen peroksiti ve organik hidroperoksitlerin (lipit hidroperoksit ve DNA hidroperoksit) GSH ile indirgenmesini katalizler (Rotruck *et al.* 1973). Glutatyon peroksidazın H_2O_2 'ye karşı K_M değeri daha yüksektir.

Glutatyon S transferazlar (GST) elektrofilik ksenobiyotiklerin nükleofilik GSH ile konjugasyonunu katalizleyen enzimlerdir. Reaksiyon;



Glutatyon redüktaz (GR) enzimi (E.C.1.8.1.7) ilk defa 1951'de tanımlanmıştır. Bu enzim düşük veya yüksek molekül ağırlıklı disülfür substratları ile indirgenmiş piridin nükleotidleri arasında elektron transferini katalizler.



Glutatyon redüktaz enziminin katalizlediği reaksiyonun bilinen en önemli hedeflerinden biri hücre ortamındaki GSH/GSSG oranını korumaktır. Bu oran eritrosit hücrelerinde yaklaşık 500/1'dir. Bu oranın daha düşük olduğu zaman eritrosit hücreleri hemoliz olmaktadır (Keha ve Küfrevioğlu 2000). Glutatyon peroksidaz enziminin katalizlediği,

özellikle hidroperoksitlerin detoksifikasyonu diğer bazı bileşiklerin indirgenmesi sonucu GSSG olduğu için glutatyon redüktaz hücre içi glutatyon indirgeme – yükseltgeme olayında merkezi bir role sahiptir. Glutatyon redüktaz, GSH/GSSG oranını yükselterek hücre içi –SH/–SS oranını korur (Torinibo 1996).

Glutatyon redüktaz klinik kimyada karaciğer ve kanser hastalıklarının belirlenmesinde, beslenmede, riboflavin yetersizliğinin ölçümünde ve bazı genetik eksikliklerin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Beutler 1984).

Çeşitli balıkların organ fizyolojileri hakkında birçok bilgi bulunmaktadır. Organların yapısal ve metabolik fonksiyonları arasında küçük farklılıklar bulunmasına rağmen genelde benzer özellikler taşımaktadırlar. Karaciğer tüm balıklarda büyük bir yapıya sahiptir; fakat kimi balıklarda vücut ağırlığının %20'si kadar aşırı büyüklükte olabilmektedir. Balıklarda karaciğer genelde midenin üzerinde uzanır veya midneyi kısmen sarar bir şekildedir. Temel olarak iki lop'lu şekilde bulunmakla birlikte bazı balıklarda üç; alabalıkta ise tek lop'ludur. Bu loplardan safra kesesine giden iki ayrı kanal mevcuttur. Karaciğer aynı zamanda balıklarda yağ, glikojen A ve D vitaminlerinin depolandığı yerdir. Karaciğerin üre ve diğer azotlu boşaltım maddelerinin oluşumuyla ilgili önemli metabolik rolü de vardır (Demir 2006).

Günümüzde canlılar ister istemez değişik kimyasal maddelerin etkisine maruz kalabilmektedirler. Bu durum, özellikle insanların çalışma ortamları gibi bulundukları ortamların özelliğinden kaynaklandığı gibi, hiç böyle bir çalışma atmosferi ile bağlantısı olmadığı halde yine insanların meydana getirdikleri atıklar yüzünden başta insanların kendisi ve diğer organizmalar da önemli ölçüde etkilenmektedirler. Bilhassa gelişmekte olan ülkelerde çeşitli fabrikalardan meydana çıkan atık maddelerin eliminasyonu toprağa gömülerek veya havaya verilerek yapılmaya çalışılmaktadır. Bunun sonucunda ağır metaller gibi birçok toksik madde toprağa, suya, oradan bitkilere ve daha sonra da hayvan ve insanlara geçmektedir. Bu yüzden günümüzde özellikle insan aktivitelerini etkileyen bu maddeler kullanılarak yapılan çalışmalar popülaritesini korumaktadır (Çelik *et al.* 1996; Norris *et al.* 2000; Blasko and Puppo 1999; Ekinci *et al.* 2006).

Ağır metaller yer kabuğunda doğal olarak bulunurlar. Bozulmaz ve yok edilemezler. Küçük bir miktara kadar vücudumuza gıdalar, içme suyu ve hava yolu ile girerler, İz elementler gibi bazı ağır metaller (örneğin; bakır, selenyum, çinko) insan vücudunun metabolizmasını sürdürmek için gereklidirler. Bununla birlikte yüksek konsantrasyonlarda toksik olabilirler (<http://www.lenntech.com/heavy-metals.html>).

Ağır metaller tehlikelidir çünkü biyobirikme eğilimlidirler. Biyobirikim zamanla biyolojik bir organizmada bir kimyasal konsantrasyonunun, kimyasalın doğadaki konsantrasyonu ile karşılaştırıldığında artması demektir. Bileşikler herhangi bir zamanda canlı bünyesinde birikebilirler ve onların vücudu alınmaları ve depolanması, metabolize edilmelerinden veya atılmalarından daha hızlıdır.

Ağır metallere kaynaklanan gıda zehirlenmeleri çok nadir görülmekle birlikte, bu durum genelde çevresel kirlenmeden sonra meydana gelmektedir. Böyle bir çevresel kirlenmenin en iyi bilinen örneği 1932 – 1955 yılları arasında Japonya’da meydana gelmiştir. 1932’den itibaren, Japonya’da Chisso’s kimyasalları tarafından civa içeren lağım Minamata sahiline serbest bırakılmıştı ve bu da civanın deniz ürünlerinin vücudunda birikmesine sebep olmuştu. Daha sonra burada yaşayan halkta civa zehirlenmesi gözlenmiş ve bunun nedeni olarak civa ile kirlenmiş balıkların tüketimi gösterilmişti. 1950’lerde bu bölgede toplam 500 ölüm vakası kaydedildi. Bu olaydan sonra; Japonya, endüstri dünyasının en katı çevresel kanunlarını çıkardı ve hastalık da Minamata sendromu olarak literatüre geçmiş oldu (<http://www.lenntech.com/heavy-metals.html>).

Pb^{+2} , Hg^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} gibi ağır metaller suda çok az miktarlarda bulunmalarına rağmen bu maddelerin hepsi suda yaşayan hayvanlar için toksiktir. Çoğu 1 ppm sınırında öldürücüdür. Çinko normal miktarlarda bazı enzimatik fonksiyonlar için gereklidir ve birçok proteinlerde yapı elementi olarak bulunur. Bakır bazı enzimlerde bulunur ve pek çok omurgasızın kan proteininde solunum pigmenti halinde mevcuttur. Çinko ve bakır özellikle deniz balıklarındaki protozonlardan meydana gelen hastalıkların tedavisinde

kullanılır. Burada metalin toksik etkileri bir süre sonra CaCO_3 ile çökelmeyle giderilir. Çinko ve bakır balıklarda aşırı salgılanmaya neden olur ve balıklara zararlı olan bazı organizmaları öldürürler. Şelatlaşma bakırın balıklara karşı zehirliliğini azaltır. Örneğin sitrik asitle şelatlaşan CuSO_4 daha az toksiktir. $\text{pH} = 6-8.5$ arasında şelatlaşma bakırın %90'ının suda çözülmüş kalmasını sağlar. Şelatlaşmış bakır, bakırın uzun süre çözülmüş miktarlarda kalması istendiğinde denizde uygulanır. Fakat birçok bakteriler, hastalıktan koruyucu düzeylerde bakıra direnç gösterdiklerinden organik şelatları kademeli bozundurlar. Böylece Cu^{+2} iyonları karbonat iyonlarıyla birleşerek çöker. Balıklarda görülen ağır metal zehirlenmelerinde bakır, solungaç yüzeylerinde çözünmeyen organometalik bileşikler oluşturur. Diğer bir görüşe göre solungaçlar içindeki proteinler kimyasal bozunmaya uğrar. Ayrıca bakırın, deniz balıklarının kan ve dokularında toplandığı gözlenmiştir. $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, ZnSO_4 ve HgCl_2 çözeltilerine konmuş bazı tatlı su balıklarında solunum hızının arttığı görülmüştür. Bu esnada oksijen harcama hızında düşme olur. Artan solunum hızı bakırla muamele edilmiş sulardaki balıklarda gözlenir. Ağır metaller solungaç üzerine çökerler ve salgıyı pıhtılaştırırlar. Böylece oksijen alınması zorlaşır (Mutluay ve Demirak 1996).

Ağır metallerin toksisitesi; pH , çözülmüş oksijen, sıcaklık, balığın büyüklüğüne oranla çözeltilerin hacmi, çözeltilerin yenilenme frekansı, çözeltideki diğer maddeler ve sinerjik etki gibi faktörlere bağlıdır. Suyun pH 'sı en önemli faktör olabilir. Tatlı sular deniz suyundan biraz daha zayıfça tamponlanmıştır ve bu işlem görmüş tatlı su sistemlerinde ağır metal toksisitesinin etkileri görülür. Ağır metallerin destile ve yumuşak sularda sert ve bazik sulara göre daha toksik olduğu sanılmaktadır. Yüksek miktarda çözülmüş oksijen, bakırın toksik etkilerini bir dereceye kadar azaltarak solunumu kolaylaştırır. Su yüzeyinin kuvvetli bir şekilde karıştırılması, suyun pH 'sını düşürecek ve bakırın çözünür halde tutacak olan serbest CO_2 birikimini önler. Sıcaklık artışı ağır metallerin balıklara karşı olan toksikliğini çoğaltır. Kurşun tuzlarının toksisitesi, su miktarı ve balığın büyüklüğü arttıkça azalır. Ayrıca kurşun salgıyla balık üzerinde çöktürülerek zehirliliği giderilir. İşleme sokulan suyun sık sık değiştirilmesi de toksisiteye etki eden bir faktördür. Eğer su değiştirilmezse balıklar salgı salarak metal iyonlarını çöktürerek kısmen toksisiteyi azaltırlar. İki ağır metal ya da bir ağır metalle başka bir madde

arasındaki sinerjik etkiye gelince örneğin bakır-çinko kombinasyonları bazen tek başına çinko veya bakırdan daha zehirlidir. Başka bir örnek ise bakır ile amonyaktır. Bakır (II) iyonlarının amonyağa karşı afinitesi büyüktür. Bu iyonlar NH_3 ile birleşerek $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{+2}$ bakır tetramin kompleksi verir. Bu kompleks toksisite olarak bakıra eşdeğerdir (Mutluay ve Demirak 1996).

Balıkların maruz kaldıkları stres unsurlarına (stok yoğunluğu, sıcaklık, oksijen v.s.) hastalık durumuna, çeşitli ilaçlar, ağır metaller ve pestisitler gibi kimyasal kirleticilere karşı göstermiş oldukları fizyolojik cevapların anlaşılması için yapılan çalışmalar daha çok hemotolojik, biyokimyasal ve histopatolojik metodlara dayanmaktadır (Heath 1987; Pickering and Pottinger 1987; Mazur and Iwama 1993; Sohlberg *et al.* 1990; Asztalos *et al.* 1990; Mughal *et al.* 1993; Shakoori *et al.* 1994). Fakat kullanılan metodların hiçbiri tek başlarına balıkların göstermiş oldukları fizyolojik cevapların anlaşılmasında yeterli değildir. Bu nedenle bu çalışmanın amacı balıklarda hemen hemen her organ ve dokuda bulunan glutatyon redüktaz (GR) enzimini karaciğer dokusundan saflaştırıp karakterize ederek yukarıda belirtilen unsurlara karşı, *in vitro* ortamda gökkuşağı alabalığının fizyolojik cevaplarının tam olarak belirlenebilmesi için gerekli olan temeli oluşturmak ve bazı metallerin saflaştırılan GR enzimi üzerindeki etkilerini *in vitro* olarak araştırmaktır.

2.KAYNAK ÖZETLERİ

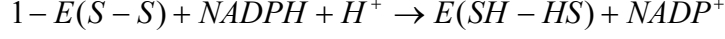
Glutasyon redüktaz (Glutasyon; NADP^+ oksidoredüktaz, E.C: 1.8.1.7: GR) flavoenzimlerin piridin-nükleotid disülfid oksidoredüktaz ailesinin bir üyesidir. Bu enzim glutasyon disülfiti (GSSG) indirgenmiş glutatyona (γ -L-glutamil-L-sisteinil glisin;GSH)'a NADPH yada NADH 'ı bir indirgeyici ajan gibi kullanarak indirgenmesini katalizler (Müller 1992; Gül. *et al.* 2000).

GR'nin farklı kaynaklardaki mol kütlesi 70.000-140.000 dalton arasında değişir. Enzimin genellikle birbirinin aynı olan iki alt birimden oluştuğu ve her bir alt birimine bir FAD'nin bağlandığı tesbit edilmiştir. İnsan eritrosit glutasyon redüktaz enziminin yaklaşık 132.000 dalton olduğu belirlenmiştir (Douglas 1987).

İnsan glutasyon redüktaz enzimi 478 amino asitten oluşmuştur. İnsan GR enziminin, birbirinden ayrılması çok zor olan, mitokondrial ve stoplazmik iki formu vardır. Bu iki izoenzim çekirdekte tek genden kontrol edilmektedir. Yapılan çalışmalarda insan ve fare genlerinin yüksek oranda benzerlik gösterdiği tesbit edilmiştir. Hem insan hem de fare glutasyon redüktaz geninde 13 tane exon bölgesi olduğu belirlenmiş 3' ve 5' uçlarında ufak birkaç bölge hariç genin tamamının yapısı belirlenmiştir (George and Franke 1976; Tutic *et al.* 1990; Tamura *et al.* 1996; Becker *et al.* 1998; Kelner and Montoya 2000).

Glutasyon redüktaz, okside glutasyonu indirgenmiş hale dönüştürürken, NADPH 'dan gelen elektronlar okside glutasyonun disülfür bağına direkt olarak aktarılmaz. Önce FAD'ye aktarılır daha sonra alt birimdeki 2 sistein arasında bulunan disülfür köprüsüne transfer etmek suretiyle okside glutatyona aktarılmış olur. Her bir alt birim 3 tane yapısal alan içerir. Bunlar FAD bağlayıcı alan, NADPH bağlayıcı alan ve ara yüz alanıdır. FAD alanı ve NADP^+ alanı birbirine benzer ve diğer dehidrogenazlardaki nükleotid bağlayıcı alanlara da benzer. FAD ve NADP^+ izoalloksazin ve nikotinamid halkaları birbirine geçecek şekilde aralarında bağlanırlar. Okside glutasyon için bağlayıcı alan, bir alt birimin FAD alanı ile diğer alt birimin ara yüz alanından meydana

geldiği bilinmektedir. Reaksiyonun iki basamakta gerçekleştiği önerilmektedir (Siegel *et al.* 1998; Patel *et al.* 1998; Iribarne *et al.* 2000).



İlk yarı reaksiyonda, NADPH tarafından enzimin indirgenmesi sağlanır ve kararlı bir hal olan E(SH)₂ formu oluşur. İkinci yarı reaksiyonda ise GSSG, E(SH)₂ tarafından indirgenerek iki mol GSH oluşur (Siegel *et al.* 1998).

Enzimin katalitik mekanizmasında amino asit kalıntıları da görev yapar. GSSG'nin bağlandığı bölgede Tyr114 ve NADPH bağlama bölgelerinde ise Tyr197 amino asitleri bulunmaktadır. İnsan glutatyon redüktazındaki bu bölgeler, diğer türlerden elde edilen enzimlerle karşılaştırıldığında oldukça spesifik bölgelerdir. Tyr197 yüksek ökaryotlardan elde edilen bütün glutatyon redüktaz ve tiyoredoksin redüktazlarda bulunur.

Tyr114 ve Tyr197 enzim-substrat kompleksinin x-ray difraksiyon analizlerinde sustrat aktif bölgeye bağlandığı zaman değişikliğe uğradığı belirlenmiştir. Enzim üzerinde Tyr197 yan zinciri flavin halkasının üzerine dikey konumda bulunur. Bu düzenlenmenin çözücülerin girişini engelleyerek enzimi koruduğu düşünülmektedir. NADPH ile bağlanma Tyr197'nin ana zincire doğru hareket etmesine ve OH grubunun 6,4 Å hareketinden dolayı C_α-C_β bağlarının çevresinde dönmeye sebep olur. Enzim- NADPH kompleksinde flavin, nikotinamid ve Tyr197 halkalarının hemen hemen paralel olduğu belirlenmiştir.

İnsan GR'sinin spektroskopik, kinetik ve katalitik nitelikleriyle ilgili yapılan bir çalışmada aktif bölgelerdeki Try114 ve Try197 amino asitleri Leu ve Ser amino

asitleriyle yerleri değiştirildiğinde enzimin kinetik özelliklerinin büyük ölçüde değiştiği belirlenmiştir. Sonuç olarak aktif bölgedeki amino asitlerin aromatikliğinin enzimin kinetik özelliklerini etkilediği belirlenmiştir (Siegel *et al.* 1998).

Enzimin kendi substratı olan NADPH'a ilgisinin yüksek olduğu belirlenmiştir. GR'nin katalizlediği reaksiyon dönüşümlüdür. Fakat reaksiyonun ters yönde ilerlemesi için ortamda yüksek konsantrasyonda GSH ve NADP^+ olmalıdır. İn vitro şartlarda NADH az bir afinite ile elektron ve proton sağlayıcı olarak kullanılabilirse de NADPH fizyolojik şartlarda aktiviteyi sağlayan tek koenzimdir. Fizyolojik şartlarda reaksiyon esas olarak tek yönlüdür ve GR bu yolla hücre içerisinde GSH/GSSG oranının yüksek tutulmasını sağlar (Douglas 1987; Açan 1990).

Glutatyon redüktaz enzimi domuz eritrositi, sığır eritrositi, sıçan karaciğeri, sığır karaciğeri, koyun beyni, koyun karaciğeri gibi memeli kaynaklardan, mantar, siyanobakteri gibi mikroorganizmalardan ve buğday, mısır, bezelye ve ıspanak gibi bitkisel kaynaklardan saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir (Carlberg and Mannervik 1975; Worthington 1975; Boggaram *et al.* 1979; Carlberg and Mannervik 1981; Acan and Tezcan 1989; McCallum and Barrett 1995; Jiang *et al.* 1995; Mullineaux *et al.* 1996; Patel *et al.* 1998; Lamotte *et al.* 2000; Erat *et al.* 2003; Ulu 2005).

GR enziminin saflaştırılması çalışmalarında çoğunlukla kromatografi tekniklerden yararlanılmış ve bir çok kromatografi tekniği kullanılmıştır. Saflaştırmada kullanılan kromatografik teknikler başta afinite olmak üzere; iyon değişim kromatografisi, hidrofobik etkileşim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisidir (Brodelius *et al.* 1974; Mannervik *et al.* 1976).

GR enziminin aktivite ölçümü ya karışımdaki NADPH'ın azalması ya da GSH'ın oluşması esasına dayanarak yapılmaktadır. NADPH'ın oranının azalmasına dayanan ölçüm 340 nm'de spektrofotometrik olarak takip edilerek aktivite belirlenir. GSH oluşumuna dayanan yöntemlerde ise 5,5'-ditiyo-bis-[2-nitrobenzoik asit] (DTNB)

kullanılır ve 412nm’de spektrofotometrik olarak takip edilir (Carlberg and Mannervik 1985; Toribio *et al.* 1996).

Enzimin aktivitesi ölçülürken GSSG, NADPH, uygun pH’daki uygun tampon ve genelde 1/20 oranında hemolizat veya homojenat kullanılmaktadır. NADH’ın K_M ’si NADPH’ın K_M ’sinden 17 kat daha büyük olduğundan NADPH’ı kullanmak tercih edilmektedir. Substrat olarak GSSG dışında CoASSG, CySSCy ve GSSO₃H molekülleride kullanılabilir. Bazı yayınlarda ölçüm ortamına EDTA ve FAD’de katılmaktadır. Aktivite ölçüm ortamına son eklenen madde bazı yayınlarda NADPH, bazılarında ise enzim örneğidir. Enzim için aktivite birimi 1µ mol NADPH’ın yükseltgenmesine sebep olan enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır (Le Trang *et al.* 1983; McCallum and Barrett 1995; Lamotte *et al.* 2000).

Farklı kaynaklardan elde edilen GR enziminin aktif formunun bir dimer olduğu belirlenmiştir. Tetramer yapıda enzim olduğu da bilinmektedir, fakat bu yapı aktif olmayan ya da daha az aktif formdur. İnsan eritrosit GR enziminin yüksek NADPH konsantrasyonunda inhibe olduğu belirlenmiştir. Bu durum dimer yapıdaki enzimin tetramer yapıya dönüşmesiyle açıklanmaktadır (Rendon *et al.* 1986). Buzağı karaciğerinden saflaştırılan enzimin PAGE’de yürütülmesi sonucu büyük bir band ve onu takip eden küçük bir band olduğu belirlenmiştir. Küçük bandın disülfür bağlarının oluşturduğu agregasyondan (kümelenme) kaynaklandığı düşünülmüştür. 0,2 M GSH ile ön inkübasyona tabi tutulduğunda küçük band gözlenmemiştir. Bu çalışmada, ultrasantrifüj ile enzimin mol kütlesinin 100.000 dalton, iki alt birimli, prostetik grup 1 FAD/alt birim, izoelektrik pH’sı 6,1, K_M değeri GSSG için $101 \pm 7 \mu M$, NADPH için $21 \pm 1 \mu M$, optimum pH=7,0 olarak belirlenmiştir ve bu enzimin amino asit dizilimi de belirlenmiştir. Buzağı karaciğerinden elde edilen GR, domuz ve insan eritrositinden elde edilen enzim ile kinetik ve elektroforetik özellikleri açısından benzerlik göstermektedir (Carlberg and Mannervik 1981).

İnsan eritrosit glutatyon redüktaz enzimini 2-(5'-nitrofurilvinil)-kuinolin bileşiğinin 4 nolu karbonuna COOH, CONH₂, CONHCH₃, CONHCH₂CH₃ gibi moleküller takılarak türetilen moleküllerin inhibe ettiği belirlenmiştir. Ayrıca yapılan başka bir çalışmada da nitrofurantion, 5-nitro-2-froik asit, 5-nitroindol ve 2,4,6-trinitrobenzen sülfonat gibi nitro grubu ihtiva eden bileşiklerin de inhibe ettiği belirlenmiştir (McCallum and Baret 1995; Grellier *et al.* 2001).

3.MATERYAL ve YÖNTEM

3.1.Materyal

3.1.1.Kullanılan kimyasal maddeler

Çalışmalarımızda kullanılan standart serum albümin, N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin (TEMED), diyaliz torbaları, β -nikotinamidadenindinükleotidfosfat (indirgenmiş form) (NADPH), β -nikotinamidadenindinükleotidfosfat (okside form) (NADP^+), okside glutatyon (GSSG), indirgenmiş glutatyon (GSH), flavinadenindinükleotid (FAD), potasyum siyanür, potasyum ferrisiyanür, sodyum bikarbonat ve etilendiamintetraasetikasit (EDTA) Sigma Chemical Comp.'den Fluka'dan; triklor asetik asit, sodyum hidroksit, trihidroksimetilaminometan (Tris), amonyum sülfat, sodyum klorür, sodyum asetat, hidroklorik asit, glisin, fosforik asit, sodyum azotür, gliserin, potasyum fosfat, potasyum bisfosfat, potasyum asetat, potasyum klorür, etanol, metanol, asetik asit, sodyum asetat, izopropanol E.Merc AG'den;akriamid, N,N'-metilen bisakrilamid, coomessie brilliant blue G-250, brom timol mavisi,sodyum dodesil sülfat (SDS), Sephadex G-200, agar, amonyum persülfat, β -merkapt etanol ve 2',5' ADP-Sepharose 4B Pharmacia'dan temin edildi.

3.1.2.Yararlanılan alet ve cihazlar

Çalışmalar esnasında aşağıdaki alet ve cihazlardan faydalanılmıştır.

Satirifüj	:MSE Mıstral 2000
Soğutmalı satirifüj	:Heraeus Sepatech
Soğutmalı satirifüj	:Hermle Z 323 K(Germany)
Spektrofotometre	: CHEBİOS s.r.l.
pH metre	: Sehott pH-Meter CG840
Elektroforez tankı	: BIO RAD (dikey)
Peristaltik pompa	: İsmatec
Karıştırıcı(Shaker)	: GFL 3025
Karıştırıcı(Vorteks)	: Fisons whırlımıxer
Hassas terazi	: Gec avery
Afinite kolonu	: Kapalı sistem oluştırucu ve soğutmalı (1x10), sigma (ABD)
Otomatik pipet	: Eppendorf
Çalkalayıcı	: Mıdı Dual 14
Magnetik karıştırıcı	: Chiltın Hotplate Magmetıc Stirrer HSBI
Saf su cihazı	: Barnstead Easy Pure UV/UF
Su banyosu	: Clifton
Kar makinesi	: Scotsman AF-20
Liyofilizatör	: Snijders
Güç kaynağı	: 1-Bio Rad Power Pac 3000 2-Apparatus Corporation EC 135
Buzdolapları	: Arçelik
Derindondurucu(-20°C'ye kadar):	Sanyo Madical Freezer
Derin dndurucu(-85°C'ye kadar):	Sanyo Ultra Low

3.1.3.Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

Çözelti hazırlamak amacıyla kullanılan su, saf ve deiyonize sudur. Ayrıca bazı çözeltilerde kullanılan su sterilize edilmiştir.

Aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler:

1. 50 mM Tris-HCl/1mM EDTA(pH=8.0): 0,61 g (5mmol) Tris ve 0,029g (0,1mmol) EDTA alınarak 90 ml destile suda çözöldü. HCl çözeltisi ile pH= 8,0'a ayarlandı.Daha sonra toplam hacim su ile 100 ml'ye tamamlandı.
2. 1 M KH₂PO₄ (pH=7,3): 6,8 g KH₂PO₄ (0,05mol) tartılarak 80 ml suda çözöldü , pH=7,3'e ayarlandı ve toplam hacim 100 ml'ye tamamlandı.
3. 20 mM GSSG Çözeltisi: 61,88 mg okside glutatyon (0,1mmol) alınarak bir miktar suda çözöldü, toplam hacim suyla 5 ml'ye tamamlandı.
4. 2 mM NADPH Çözeltisi: 8,3 mg NADPH($9,9 \times 10^{-3}$ mmol) alınarak bir miktar suda çözöldü. Suyla 5 ml'ye tamamlandı.
5. 10 µM FAD çözeltisi: 0,8294 mg FAD (1×10^{-3} mmol) alınarak bir miktar suda çözöldü, toplam hacim suyla 100 ml ye tamamlandı.

Amonyum sülfat çökeltisinin çözünmesi için kullanılan tampon:

1. 50 mM KH₂PO₄ (pH=7,5): 0,68 g KH₂PO₄(5×10^{-3} mol) alınıp 80 ml destile suda çözöldü. pH'sı KOH ile 7,5'e ayarlandı.Daha sonra toplam hacim destile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

Diyaliz çözeltisi:

1. 10 mM Tris-HCl/1 mM EDTA (pH=7,5): 1,21 g Tris, 0,29 g EDTA alınarak 975 ml suda çözüldü, pH=7,5'e ayarlandı ve toplam hacim 1 L'ye tamamlandı.

Afinite kolonunda kullanılan çözeltiler:

1. 50 mM KH_2PO_4 /1 mM EDTA, 1mM DTT, pH=7,3 (Kolonun paketlenmesi ve dengelenmesi için kullanılan tampon): 6,8 g KH_2PO_4 (50 mmol), 0,292 g EDTA (1mmol) ve 0,152 g DTT (1 mmol) alınarak 950 ml suda çözüldü. pH=7,3'e ayarlandıktan sonra 1L'ye tamamlandı.

2. 0,1 M K-asetat/0,1 M K-fosfat, pH=7,85 (Numune tatbik ettikten sonra afinite kolonunun yıkanması için kullanılan tampon): 9,8 g K-asetat (0,1 mol) ve 13,6 g K-fosfat (0,1 mol) karışımı 800 ml destile suda çözüldü. pH'sı 7,85'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 1L'ye tamamlandı.

3. 0,1 M K-fosfat/0,1 M KCl, pH=7,85 (Numune tatbik ettikten sonra afinite kolonunun yıkanması için kullanılan tampon): 13,6 g K-fosfat (0,1 mol) ve 7,45 g (0,1 mol) KCl karışımının hacmi destile su ile 800 ml'ye tamamlandı. pH'sı 7,85'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 1 L'ye tamamlandı.

4. 2 mM GSH çözeltisi: 0,012 g GSH'ın 20 ml suda çözülmesiyle elde edildi.

5. 0,1 M Na-asetat/0,5 M NaCl (pH=4,5) (afinite kolonunun rejenerasyonu için kullanılan tampon): 4,1 g Na-asetat (50 mmol) ve 14,61 g NaCl (0,25 mol) alınıp suda çözüldü, pH=4,5'e ayarlandı ve toplam hacim suyla 500 ml'ye tamamlandı.

6. 50 mM K-fosfat/1 mM EDTA, 1 mM GSH ve 0,5 mM NADPH, pH=7,3 (Afinite jeline tutunmuş olan glutatyon redüktaz enziminin elüsyonu için kullanılan tampon); 0,34 g K.fosfat, 0,015 gr EDTA 0,0307 gr GSH, 0,021 gr NADPH karışımı 45 ml suda çözüldü. pH=7,3'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 50 ml'ye tamamlandı.

Elektroforez için kullanılan çözeltiler:

1. 1 M Tris-HCl (pH=8,8): 12,11 g Tris (0,1mol) tartılarak 80 ml suda çözüldü, pH ayarı yapıldıktan sonra 100 ml'ye tamamlandı.

2. 1 M Tris-HCl (pH=6,8): 12,11 g Tris (0,1 mol) tartılarak 80 ml suda çözüldü, pH ayarı yapıldıktan sonra 100 ml'ye tamamlandı.

3. %30 Akrilamid-%0,8 Bisakrilamid çözeltisi: 15 g akrilamid, 0,4 g bisakrilamid ve 34,6 g su karıştırılarak çözüldü.

4. %10'luk amonyum persülfat çözeltisi: 1 g amonyum persülfat tartılarak su ile 10 ml'ye tamamlandı.

5. %10'luk SDS: 1 g SDS 9 g suda çözülerek elde edilir.

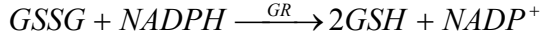
6. Yürütme tamponu: 1,51 g Tris (12,5 mmol) ve 7,51 g glisin (0,1 mol) tartılarak 450 ml suda çözüldü. %10'luk SDS'den 5 ml ilave edildi, pH=8,3'e ayarlandı ve toplam hacim 500 ml'ye tamamlandı.

7. Numune tamponu: 1 M Tris-HCl (pH=8)'den 0,5 ml, %10'luk SDS'den 1 ml, %100'lük gliserinden 1 ml ve %0,1'lik bromtimol mavisinden 1 ml alınarak suyla 10 ml'ye tamamlandı. Bu tampona kullanılmadan önce 950 µl numune tamponundan 50 µl olacak şekilde β-merkaptetanol ilave edildi.

8. Antikoagulant çözelti: 26,3 g Na-sitrat (dihidrat) (115,35 mmol), 3 g sitrik asit (15,62 mmol), 31,9 g glukoz (monohidrat) (177 mmol), 2,2 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (15,94 mmol) ve 0,35 g adenin (2,6 mmol) tartılarak suda çözüldü ve 1 L'ye tamamlandı.
9. Sabitleştirme çözeltisi(jelde yürütülen proteinlerin sabitleştirilmesi için kullanılan çözelti): %50 izopropanol, %10 TCA ve %40 su olacak şekilde karıştırılarak hazırlandı.
10. Jel boyama çözeltisi: 50 ml metanol, 10 ml asetik asit ve 40 ml su içerisinde 0,1 g coomassie brilliant blue R-250 reaktifinin çözülmesiyle hazırlandı.
11. Jel yıkama çözeltisi: 50 ml metanol, 10 ml asetik asit ve 40 ml su karıştırılarak elde edildi.
12. Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi (proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti): 100 mg coomassie brilliant blue G-250, 50 ml %95'lik etanolde çözüldü. Bu çözeltiye %95'lik 100 ml fosforik asit ilave edildi.Çözeltinin hacmi suyla 1L'ye tamamlandı.
13. %0,04'lük brom timol mavisi çözeltisi: 0,1 g indikatör 0,01 M 16 ml NaOH içerisinde çözüldü ve toplam hacim suyla 250 ml'ye tamamlandı.

3.2.Yöntemler

3.2.1. Gökkuşığı Alabalık karaciğer dokusundan saflaştırılan GR enziminin aktivitesinin ölçümü



Glutasyon redüktaz enzim aktivitesinin belirlenmesi iki temel esasa dayanmaktadır. Birincisi; yukarıdaki reaksiyonda reaksiyona giren NADPH 340 nm’de maksimum absorbans vermektedir. Reaksiyon ortamına katılan GR enzimi NADPH’ın azalmasına sebep olmaktadır. Bu azalma spektrofotometrik olarak 340 nm’de takip edilmektedir (Carlberg and Mannervik 1985).

İkincisi ise aynı reaksiyonda ürün olarak ortaya çıkan GSH’ın 5,5’-ditiyobis(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) ile reaksiyonu sonucu oluşturduğu bileşiğin 412 nm’de verdiği absorbansın spektrofotometrik olarak takip edilmesi esasına dayanır. GR enzimi GSH’ın zamanla artmasını sağlamakta, oluşan GSH da DTNB ile reaksiyona girerek absorbans artışına sebep olmaktadır (Smit *et al.* 1988).

Bu iki yöntemden birincisi daha spesifik olduğu için tercih edilmektedir. Bu sebeple biz de bu çalışmada birinci yöntemi kullandık. Glutasyon redüktaz enzim aktivitesi FAD’li ve FAD’sız olmak üzere iki değişik ölçüm yapılmaktadır. Bazen biri bazen de her iki türlü ölçüm yapılarak karşılaştırma yapılmaktadır. Çalışmamızda FAD’sız ölçüm yapıldı.

Enzim ünitesi hesaplanırken aşağıdaki formül kullanıldı:

$$EÜ / ml \frac{\Delta OD}{6,22} \times \frac{V_T}{V_E} \times S_F$$

Bu formülde yer alan simgeler aşağıda açıklandı;

EU/ml : 1 ml'deki enzim ünitesi

ΔOD : Bir dakikadaki absorbans değişimi

6,22 : 1 mM NADPH'ın oluşturduğu absorbans değeri (ekstinsiyon katsayısı)

V_T : Ölçümün yapıldığı toplam küvet hacmi

V_E : Ölçümün yapıldığı küvete ilave edilen enzim numunesinin hacmi

S_F : Seyreltme faktörü (seyreltilen örnek için kullanılır)

3.2.2. Protein tayini

3.2.2.a. Kalitatif protein tayini

Kalitatif protein tayini, 280 nm'de proteinlerin yapısında bulunan triptofan, trozin ve fenilalanin amino asitlerinin maksimum absorbans göstermesi esasına dayanır (Segel 1968). Kromatografi işlemlerinden sonra eşit hacimlerde alınan bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı. Fraksiyonlar kuvarz küvetlere alınarak, absorbansları spektrofotometrede köre karşı okundu.

3.2.2.b. Bradford yöntemiyle protein tayini

Hazırlanan homojenat amonyum sülfat çöktürmesi ile elde edilen enzim çözeltisi ve 2', 5' ADP-Sepharose 4B anfinite kromatografisi yöntemiyle kısmi saflaştırılmış enzim için kanitatif protein miktarı Bradford 1976 metoduna göre belirlendi. Bu yöntemde boya olarak kullanılan Coomassie brilliant blue G-250, negatif bir yüke sahiptir ve protein üzerindeki pozitif yüke bağlanır. Boyanın kırmızı ($\lambda_{max}=465$ nm) ve mavi ($\lambda_{max}=595$ nm) formu mevcuttur. Proteinin bağlanması, kırmızı formun mavi forma dönüşümünü sağlar. Bu yöntemin bozucu faktörlere karşı hassasiyeti oldukça azdır

(1-100 μg arası). Reaksiyon yüksek oranda tekrarlanabilir ve hızlı cereyan eder, iki dakikada tamamlanır.

Tayin işlemleri şu prosedüre göre gerçekleştirildi: 1 ml'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albumin çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 μl konuldu. Saf su ile bütün tüplerin hacmi 0,1 ml'ye tamamlandı ve 5 ml Coomessie brilliant blue G-250 çözeltisi ilave edilip vorteks ile karıştırıldı. 10 dakika inkübe edildikten sonra 595 nm'de 3 ml'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak, 0,1 ml enzim numunesinin içinde bulunduğu tampondan ve 5 ml Coomessie brilliant blue G-250 çözeltisinden oluşan karışım kullanıldı. Elde edilen sonuçlardan absorbans değrlerine karşılık gelen μg protein değerleri standart grafik haline getirildi (Şekil.4.1).

Numune çalışmaları için, 20 kat seyreltilmiş karaciğer homojenatı, amonyum sülfat çökeltisi numunesi ve afinite kromatografisinden elde edilen kısmen saflaştırılmış enzim çözeltilerinden 3 ayrı tüpe sırasıyla 50,50 ve 200 μl alınarak üzerlerine 5'er ml renklendirme reaktifi eklendi. Vorteks ile karıştırıldıktan sonra 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Sonra 595 nm'de absorbans değerleri okundu. Bu işlem 3 defa tekrarlanarak 3 ayrı ölçümün aritmetik ortalaması alınıp standart grafikten protein miktarları belirlendi.

3.2.3.Gökkuşağı Alabalık karaciğer dokusundan GR enziminin saflaştırılması ile ilgili yöntemler

3.2.3.a.Gökkuşağı Alabalık karaciğer dokusu temini ve homojenat hazırlanması

Deneylerde kullanılan Alabalıklar Atatürk Üniversitesi Alabalık çiftliğinden taze olarak temin edildi. Alınana Alabalıklar soğuk zincir kuralına göre laboratuara getirilerek karaciğer dokusu hızlıca çıkarıldı. -20°C 'de derin dondurucuda donduruldu ve sıvı azot ile hücre zarları parçalandı. Daha sonra 50 mM KH_2PO_4 (pH=7,5) tamponunda

süspanse edildi. Süspansiyon 13.000xg de 20 dakika santrifüj edildi ve çökelti atıldı. Böylece homojenat elde edildi.

3.2.3.b.Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz

Proteinler çok değerli elektrolitler oldukları için iyonlara benzer şekilde hareket ederler. Yüksek tuz konsantrasyonlarında, protein moleküllerini çevreleyen ve çözünür halde tutan su molekülleri, amonyum sülfat tuzundaki iyonlar tarafından çekilir ve proteinler çöker (salting-out). Yapılacak amonyum sülfat çöktürmesi deneyleri proteinlerin bu özellikleri esasına dayanmaktadır.

Katı amonyum sülfat miktarı aşağıdaki formülden hesaplandı:

$$g(NH_4)_2SO_4 = \frac{1,77 \times V \times (S_2 - S_1)}{3,54 - S_2}$$

V : Enzim çözeltisinin hacmi

S_1 : 1'in kesri olarak çözeltideki amonyum sülfat doygunluğu

S_2 : 1'in kesri olarak istenen amonyum sülfat doygunluğu

Hazırlanan homojenat için ayrı ayrı %0-20, %20-30,%30-40,%40-50,%50-60,%60-70,%70-80 aralıklarında amonyum sülfat çöktürmeleri yapıldı. Yapılan amonyum sülfat çöktürmesinin her aralığında çökeltide ve süpernatantta aktivite ölçümü yapılarak enzimim aktif olduğu aralık belirlendi. Bundan sonraki çalışmalarda çöktürme, belirlenen aralıkta yapıldı. Bütün bu işlemler +4°C'de gerçekleştirildi. Her defasında homojenatlar 5.000xg'de 15 dakika santrifüj edildi. Daha sonra süpernatantta ayrı behere alındı ve çökelekler ise yeteri kadar 50 mM KH_2PO_4 (pH=7,5) ile çözülerek hem süpernatantta hem de çökelekte ayrı ayrı enzim enzim aktivitesine bakıldı.

Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen karışım diyaliz torbasına yerleştirildi ve 10 mM Tris-HCl / 1 mM EDTA (pH=7,5) tamponuna karşı 2 defa değiştirilerek, 2 saat süreyle diyaliz edildi (Smith 1987). Diyaliz işlemi magnetik karıştırıcı üzerinde +4°C’de gerçekleştirildi ve daha sonra protein ve aktivite tayini Bölüm 3.2.1 ve Bölüm 3.2.2 de izah edildiği şekilde yapıldı.

3.2.3.c.Afinite kolonunun hazırlanması ve Gökkuşığı Alabalık karaciğer dokusu GR enziminin saflaştırılması

10 ml’lik yatak hacmi için 2 g kuru 2',5'-ADP sepharose 4B jeli tartılarak, 400 ml destile su ile katı maddelerin uzaklaştırılması için birkaç defa yıkandı. Yıkama esnasında jel şişirilmiş oldu. Şişirilmiş jelin havası su trombu kullanılarak vakum ile alındıktan sonra dengeleme tamponu (50 mM KH_2PO_4 /1 mM EDTA, 1mM DTT, pH=7,3) ilave edilerek jel süspanse edildi. Süspanse edilmiş jel, 1x10 cm’lik kapalı sistemden oluşan soğutmalı kolona paketlenildi. Jel çöktükten sonra peristaltik pompa yardımıyla yıkama ve dengeleme tamponu ile yıkandı. Kolonun dengelenmiş olduğu eluat ile tamponun 280 nm’de absorbanslarının ve pH’larının eşitlenmesinden anlaşıldı. Böylece afinite kolonu hazırlanmış oldu. Belirlenen amonyum sülfat doygunluk aralığında çöktürülen numune, uygun tamponda çözülüp diyaliz edildikten sonra 2',5'-ADP sepharose 4B afinite kolonuna uygulandı. Enzim çözeltisinin tamamı kolondan geçtikten sonra kırmızı renk tamamen yok oluncaya kadar dengeleme tamponu geçirmeye devam edilerek kolonun yıkanması sağlandı. Bunu takiben kolondan 0,4 M KH_2PO_4 tamponu (pH=7,3) geçirilerek yıkandı. Bu yıkama, spektrofotometrede takip edilerek absorbans değerlerinin köre eşit olmasıyla belirlendi. Kolon yıkandıktan sonra elüsyon tamponu ile elüe edildi (Danner *et al.* 1977; Boggaram *et al.* 1979; Carlbeg and mannervik 1981).

Gökkuşığı Alabalık Karaciğer Dokusundan Saflaştırılan GR ile çalışılırken literatürde kullanılan optimal şartlar uygulandı. Elüsyonlar 1,7 ml olacak şekilde eppendorf tüplerine alındı, her birinde aktivite değerleri okunarak Gökkuşığı Alabalık Karaciğer Dokusundan Saflaştırılan GR enzimi için grafik oluşturuldu (Şekil 4.3).Bu çalışmayla

elde edilen enzim örneklerinin saf olup olmadıklarını kontrol etmek amacıyla SDS-PAGE yapılarak elektroforez bantları elde edildi (Şekil4.4).

3.2.4. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzim saflığının kontrolü

Enzim saflaştırıldıktan sonra %3-8 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) Laemmli metoduna göre yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi (Laemmli 1970).

Bunun için elektroforez plakaları önce su ile sonra alkol ile iyice yıkandı. Her iki kenarında aralık oluşturunca bir plaka ile düz bir plaka üst üste getirilerek kısıkaçlarla tutturuldu. Sabitleştirilen plakalar, içerisinde sızdırmayı önleyen sünger ihtiva eden jel hazırlama kabinine konuldu. Önce ayırma jeli hazırlandı ve enjektörle plakaların arasına üst kesimde 0,5 cm kalıncaya kadar dolduruldu. İki saat jelin donması beklendi ,ayırma jelinin katılaştığından emin olunduktan sonra yığılma jeli hazırlandı. Jelin üst kısmındaki boşluğa dolduruldu ve numune kuyucuklarının oluşması için tarak dikkatlice yerleştirildi. Yığılma jelinin katılaşması beklenirken ıslatılmış süzgeç kağıdı sistemin üzerine kapatıldı ve kuruması önlendi. Yığılma jeli katılaştıktan sonra tarak dikkatlice çıkartılarak numune kuyuları belirlendi. Önce saf su, sonra da yürütme tamponuyla yıkandı ve jel plakalarla birlikte elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu dolduruldu. Enzim örnekleri yaklaşık 10 µg protein olacak şekilde hazırlandı. Toplam hacim 50 µl olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu katıldı. Üç dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi. Elektroforez tankı kapatılarak alt tarafından (+) anot, üst taraftan ise (-) katot yerleştirildi. Önce 80 voltta 20 dakika yürütüldü ve örnek ayırma jeline kadar gelip yığıldı. Sonra akım 100 volt'a çıkartılarak numunelerin jelin alt sınırına gelmesine kadar yürütüldü. Numunelerin takip edilmesi, numune tamponuna katılan brom timol mavisi yardımıyla anlaşıldı. Yürütme işlemi bittikten sonra akım kesilerek plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı ve sabitleştirme çözeltisine konuldu. Sabitleştirme çözeltisinde 20 dakika bekletilen jel , çıkarılarak boyama çözeltisine konuldu ve çalkalayıcı üzerinde 2 saat bekletildi. Jel

boyandıktan sonra çıkarılarak yıkama çözeltisine konuldu. Rengi açılıp, protein bantları belirginleşene kadar çalkalayıcı üzerinde yıkanan jel çıkarılarak fotoğrafı çekildi (Şekil 4.4).

Ayırma jeli şöyle hazırlandı: 3,75 ml 1M Tris-HCl (pH=8,8), 3,3 ml %30 Akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 0,15 ml %10'luk SDS, 0,1 ml %5'lik TEMED, 0,2 ml %1,5'lik PER ve 2,35 ml saf su karıştırıldı.

Yığıma jeli şöyle hazırlandı: 0,31 ml 1 M Tris-HCl (pH=6,8), 0,3325 ml %30 Akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 0,025 ml %10'luk SDS, 0,025 ml %5'lik TEMED, 0,05 ml %1,5'lik PER ve 1,84 ml saf su karıştırıldı. PER çözeltisi taze hazırlandı ve karıştırıldığında hemen PER döküldü.

3.3.Gökkuşığı Alabalık Karaciğer Dokusundan saflaştırılan GR Enzimiyle ilgili Yapılan Kinetik Çalışmalar:

3.3.1. Gökkuşığı Alabalık karaciğer dokusundan saflaştırılan GR enzimi için optimum iyonik şiddetin belirlenmesine yönelik çalışmalar

Gökkuşığı Alabalık Karaciğeri glutatyon redüktaz enziminin optimum aktivite sağlayan iyonik şiddetinin belirlenmesi amacıyla 1 mM EDTA içeren 10, 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1000 mM Tris-HCl (pH=8,0) tamponları kullanılarak belirlendi.

3.3.2. Gökkuşığı Alabalık karaciğer dokusundan saflaştırılan GR enzimi için optimum pH bulunmasına yönelik çalışmalar

Gökkuşığı Alabalık Karaciğeri glutatyon redüktaz enziminin optimum pH'sını belirlemek amacıyla pH'sı 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 ve 8,0 olan potasyum fosfat ve 7,5, 8,0,

8,5 ve 9,0 olan Tris-HCl tamponları hazırlandı. Uygun substrat çözeltisi ile her bir tamponda ayrı ayrı enzim aktivitesi belirlendi.

3.3.3. Gökkuşığı Alabalık karaciğer dokusundan saflaştırılan GR enzimi için stabil pH bulunmasına yönelik çalışmalar

Enzimin stabil olduğu pH'yı tesbit etmek için pH'ları 7,5, 8,0, 8,5 ve 9,0 olan Tris-HCl ve pH'ları 6,5, 7,0, 7,5 ve 8,0 olan fosfat tamponları kullanıldı. Belirtilen pH'lardaki tampon çözeltilerinin 2 ml si 1 ml enzim çözeltisi karıştırılarak +4°C'de muhafaza edildi. 6 gün boyunca 48 saat arayla yapılan aktivite ölçümünde enzimin stabil olduğu pH belirlendi.

3.3.4. Gökkuşığı Alabalık karaciğeri dokusundan saflaştırılan GR enzimi için optimum sıcaklığın belirlenmesine yönelik çalışmalar

Gökkuşığı Alabalık Karaciğeri glutatyon redüktaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla 0°C ile 90°C arasında 10 ar °C aralıklarla aktivite ölçümü yapıldı.

3.3.5. NADPH ve GSSG substratları için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik çalışmalar:

Gökkuşığı Alabalık Karaciğeri glutatyon redüktaz enziminin GSSG ve NADPH substratları için K_M ve V_{max} Değerlerini belirlemek için sabit GSSG konsantrasyonunda NADPH'ın 5 farklı konsantrasyonlarıyla aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen değerlerle Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Bu grafikten yararlanarak NADPH için K_M ve V_{max} değerleri belirlendi. Aynı şekilde NADPH'ın sabit konsantrasyonunda GSSG'nin 5 farklı konsantrasyonlarıyla aktivite ölçümleri yapılarak Lineweaver-Burk grafiği oluşturuldu ve GSSG için K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı. Aktivite ölçümleri optimal şartlarda gerçekleştirildi (Lineweaver and Burk 1934).

3.3.6. GSH ve NADP^+ 'nin enzim üzerinde etkilerinin incelenmesi

İnhibisyon etkisi gösteren NADP^+ ve GSH'ın inhibisyon türünü K_i sabitlerini belirlemek amacıyla NADP^+ 'nin uygun 2 sabit konsantrasyonunda artan NADPH konsantrasyonlarıyla aktivite ölçümleri yapılarak Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Bu grafik ve denkleminde yararlanılarak inhibisyon türü ve K_i sabiti hesaplandı. GSH ile yapılan çalışmada da sabit 2 uygun GSH konsantrasyonu belirlendi. Belirlenen her bir konsantrasyonda GSSG'nin artan konsantrasyonlarında aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen değerlerle oluşturulan Lineweaver-Burk grafiğinden ve denkleminde inhibisyon türü ve K_i sabiti hesaplandı (Lineweaver and Burk 1934).

3.4. Gökkuşaağı Alabalık Karaciğeri Dokusundan Saflaştırılan GR Enzimi Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının İnhibitör Etkilerinin Belirlenmesi

Günümüzde pek çok canlı çeşitli şekillerde metallerin etkilerine maruz kalabilmektedir. Bu çalışma kapsamında da gökkuşaağı alabalık karaciğer dokusunda afinite kromatografisiyle saflaştırılan GR enzimi aktivitesi üzerine etkileri araştırıldı. Enzimi inhibe eden $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ve $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ kimyasal maddeler için sabit substrat konsantrasyonunda beş farklı inhibitör konsantrasyonu kullanılarak IC_{50} değerleri (Enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu) %aktivite-[I] grafikleri çizilerek belirlendi.

3.5. İnhibitör Etkisi Gösteren Metal İyonları İçin K_i Değerlerinin Belirlenmesine Ait Çalışmalar

İnhibitör çalışmaları için bölüm 3.4'de anlatıldığı gibi ön deneyle alabalık karaciğer dokusundan elde edilen GR enzimini inhibe eden $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ve $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ maddeleri kullanıldı.

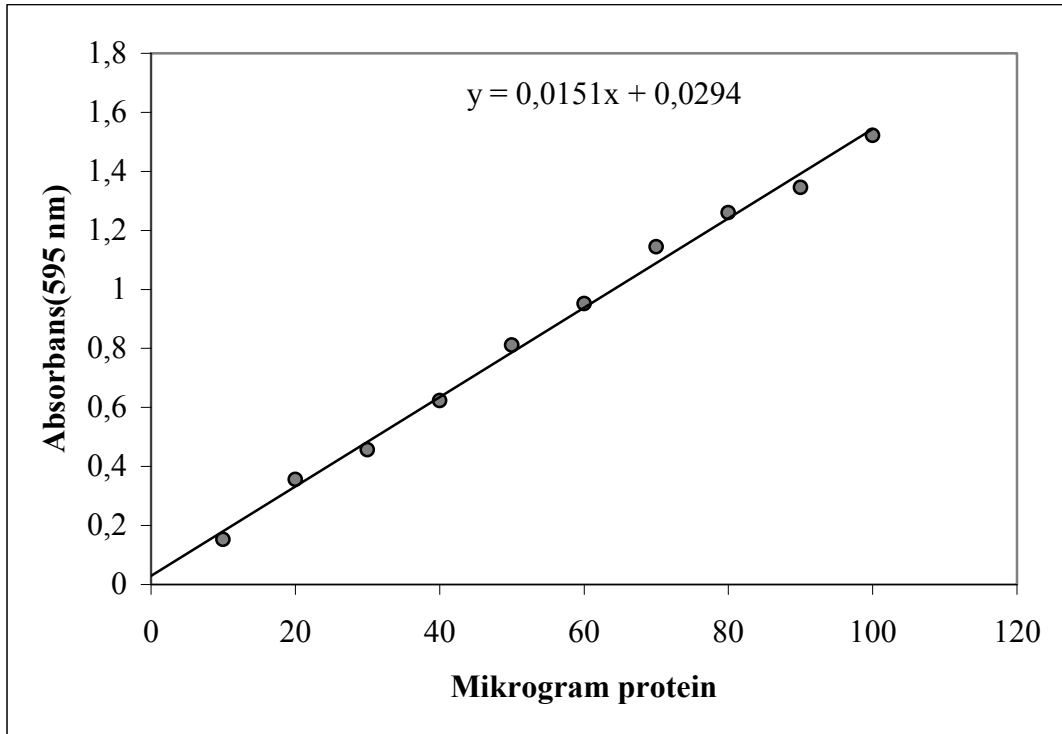
Çalışmalarda en uygun beş farklı substrat konsantrasyonu substrat stok çözeltileri kullanılarak ön çalışmayla belirlendi. Yine aynı şekilde her bir substrat konsantrasyonu için en uygun 3 farklı inhibitör stok çözeltileri kullanılarak ön çalışmayla tesbit edildi.

Spektrofotometrenin hassasiyet sınırları içinde absorbans değerinin ölçüldüğü konsantrasyonlar diğer deneylerde kullanıldı. Daha sonra karaciğer dokusundan saflaştırılan GR enzimi için 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonda $V-[S]$ değerleri belirlenerek iki inhibitör için ayrı ayrı Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek K_i değerleri ve inhibisyon tipleri tayin edildi (Lineweaver and Burk 1934).

4.ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik

Elde ettiğimiz enzim çözeltilerindeki kantitatif protein tayini Bradford yöntemiyle belirlendi. Standart grafik bölüm 3.2.2.b’de anlatıldığı gibi hazırlandı. Ham homojenat, amonyum sülfat çöktürmesi ve afinite kromatografisi sonucu elde edilen enzim çözeltilerindeki kantitatif protein tayini bu standart grafikten faydalanılarak bulundu. Standart çözeltilerin μg proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 4.1’de gösterildi.



Şekil 4.1. Bradford yöntemiyle proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan standart grafik.

4.2. Gökkuşığı Alabalık Karaciğer Dokusu GR Enziminin Saflaştırılması

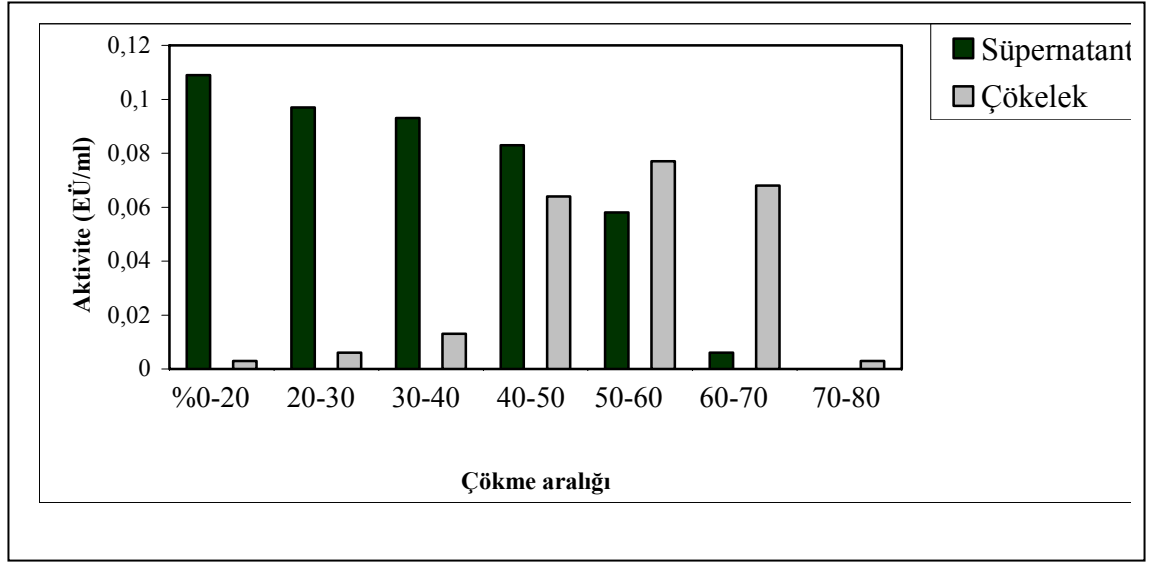
Sonuçları

4.2.1. Amonyum sülfat çöktürmesi sonuçları

Gökkuşığı Alabalık Karaciğer Dokusundan Saflaştırmak için bölüm 3.2.3.a'da anlatıldığı gibi hazırlanan homojenat bölüm 3.2.3.b.'de anlatıldığı gibi %30-80 aralığında amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Elde edilen çökelek 50 mM KH_2PO_4 (pH=7,5) tampon çözeltisinde çözülerek bir sonraki işleme hazır hale getirildi (Erat 2003).

Çizelge 4.1.Gökkuşığı Alabalık karaciğeri GR enzimi için amonyum sülfat doygunluk aralığı tespitine yönelik aktivite- çöktürme aralığı çizelgesi

Amonyum sülfat aralığı (%)	0-20	20-30	30-40	40-50	50-60	60-70	70-80
Süpernatant	0,109	0,097	0,093	0,083	0,058	0,006	0
Çökelti	0,003	0,006	0,013	0,064	0,077	0,068	0,003



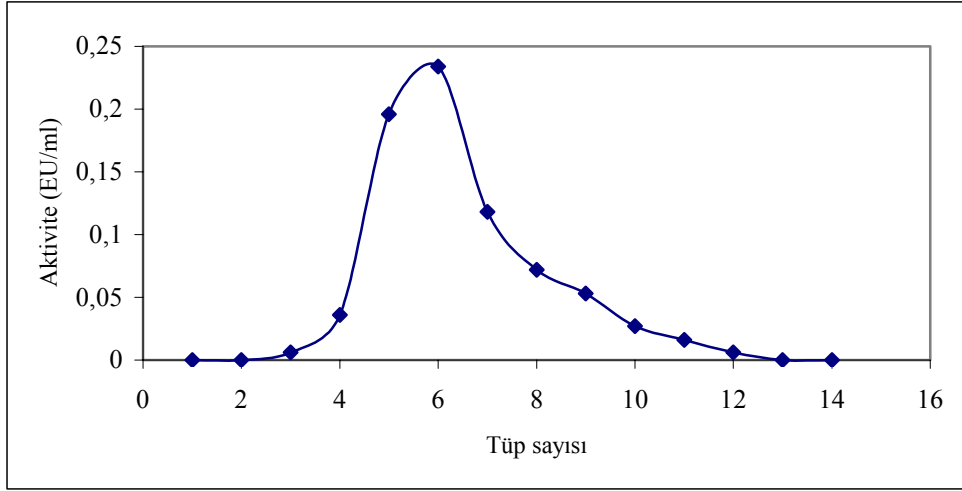
Şekil 4.2 Gökkuşuğu Alabalık karaciğeri GR enzimi için amonyum sülfat doygunluk aralığı tespitine yönelik aktivite-çöktürme aralığı grafiği

Çizelge 4.2. Glutatyon redüktaz enziminin saflaştırılması basamakları

Numune türü	Total hacim (ml)	Aktivite (EU/ml)	Protein (mg/ml)	Total protein (mg)	Total aktivite	Spesifik aktivite (EU/mg)	% verim	Saflaştırma katsayısı
Homojenat	35	0,252	15,21	535,35	8,82	0,0166	100	1
AS çöktürmesi ve diyaliz	18	0,276	2,64	47,52	4,97	0,104	56,35	6,26
Afinite kromatografisi	13	0,321	0,023	0,416	4,17	13,957	47,28	840,78

4.2.2. Afinite kromatografisi sonuçları

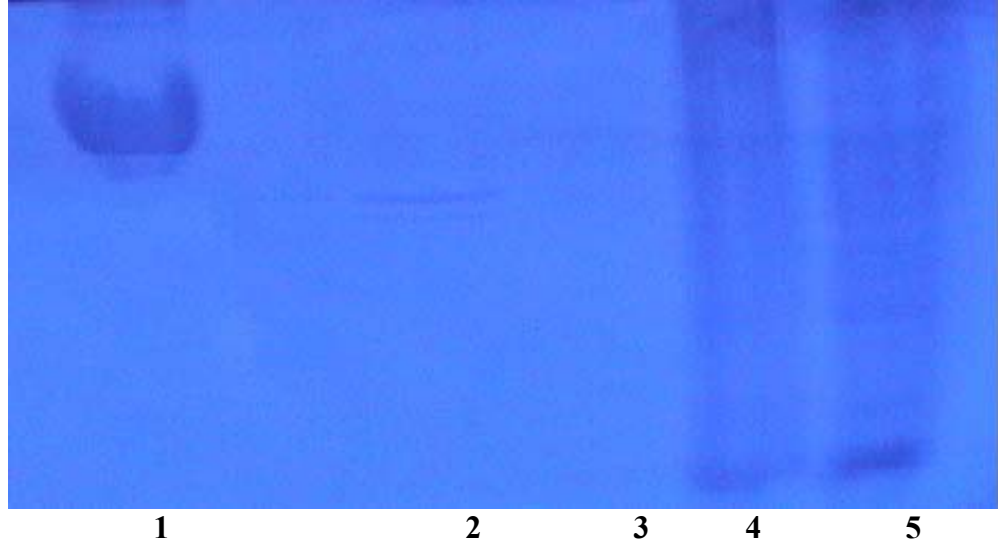
Balık karaciğeri homojenatı hazırlandıktan sonra amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Çökelek 50 mM KH_2PO_4 (pH=7,5) tampon çözeltisinde çözüldükten sonra diyaliz edildi. Diyaliz edilen numune afinite kolonuna tatbik edildi. Uygun tamponla elüsyon sonucu elde edilen elüatlardaki aktivite değerleri şekil 4.3'te gösterildi.



Şekil 4.3. Gökkuşığı Alabalık karaciğeri dokusundan saflaştırılan GR enziminin 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonundan elüsyon grafiği

4.3. Gökkuşığı Alabalık karaciğeri dokusundan saflaştırılan GR enziminin SDS-PAGE ile saflık kontrolü

Gökkuşığı Alabalık Karaciğeri dokusundan elde edilen GR enzimi numunelerinin, homojenat, amonyum sülfat çökeleği ve afinite sonucu elde edilen elüatlardaki enzimlerin saflığını kontrol etmek için SDS-PAGE yöntemi kullanıldı. Bu amaçla bölüm 3.2.4.a'da izah edilen elektroforez sistemi kurularak enzim numuneleri sırayla kuyulara uygulandı ve yürütüldü. Elde edilen bantları gösteren fotoğraf Şekil 4.4'te gösterildi.



Şekil 4.4. 1: Sığır serum albümini, 2: 2',5'-ADP-Sepharose 4-B afinite kromatografisi sonrası, 3:İnsan G-6PD enzimi, 4: Amonyum sülfat çöktürmesi sonrası, 5: Alabalık karaciğer homojenatı.

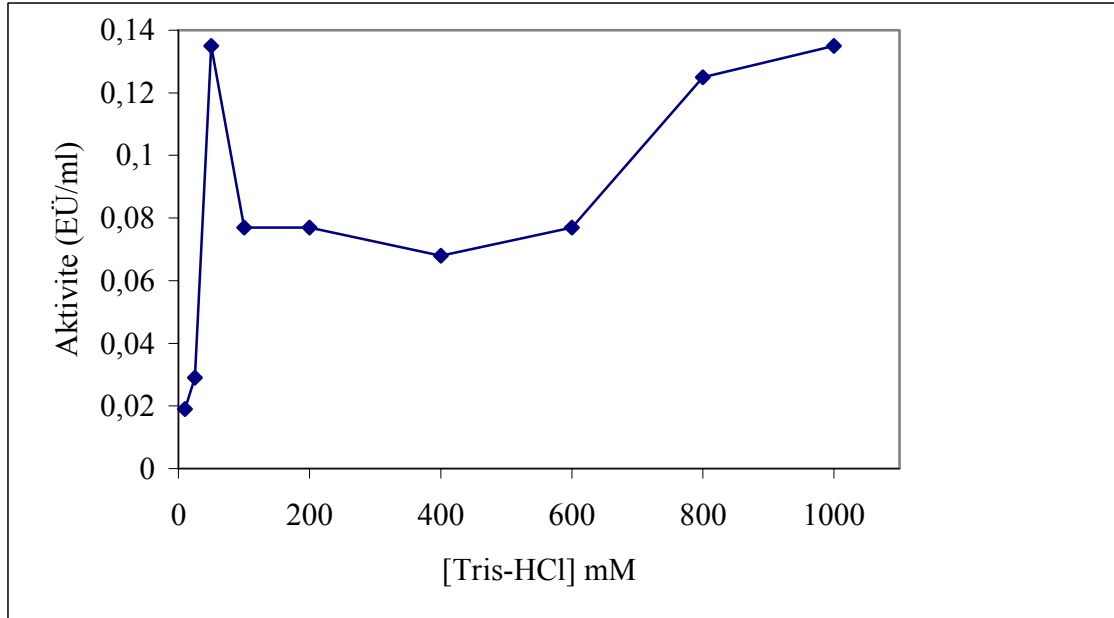
4.4. Gökkuşığı Alabalık Karaciğer Dokusundan Saflaştırılan GR Enziminin Optimum şartlarının belirlenmesine yönelik sonuçlar

4.4.1. Gökkuşığı Alabalık karaciğer dokusundan saflaştırılan GR enziminin optimum iyonik şiddetinin belirlenmesine yönelik sonuçlar

Gökkuşığı Alabalık Karaciğeri GR enzim aktivitesi için en uygun iyonik şiddetin belirlenmesi amacıyla önceki çalışmalarla uygunluğu belirlenen Tris-HCl tamponunun optimal pH'daki değişik konsantrasyonlardaki çözeltileri Bölüm 3.3.1'de anlatıldığı gibi hazırlandı. Farklı Tris-HCl konsantrasyonlarında aktivite ölçümleri yapılarak Tris-HCl konsantrasyonu ile aktivite değerlerinden oluşan grafik çizildi. Yapılan çalışmalar sonucu Gökkuşığı Alabalık Karaciğeri GR enzimi için en uygun iyonik şiddetin 50 mM Tris-HCl pH=8,0 tamponu olarak tespit edildi (Şekil 4.5 ve Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Gökkuşığı Alabalık karaciğeri GR enzimi optimum iyonik siddet için Tris-HCl Tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

Tris-HCl Derişimi (mM)	10	25	50	100	200	400	600	800	1000
Aktivite (EÜ/ml)	0,019	0,029	0,135	0,077	0,077	0,068	0,077	0,125	0,135



Şekil 4.5. Değişik konsantrasyonlardaki Tris-HCl Tampon çözeltileri kullanılarak Gökkuşığı Alabalık karaciğeri GR enzimi için yapılan iyonik şiddet-aktivite grafiği

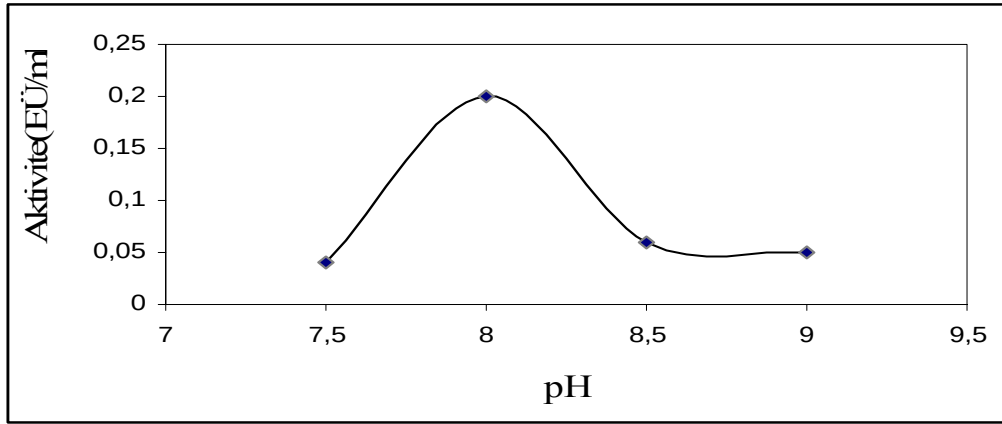
4.4.2. Gökkuşığı Alabalık karaciğer dokusundan saflaştırılan GR enzimi için optimum pH bulunmasına yönelik sonuçlar

Gökkuşığı Alabalık Karaciğeri GR enzimi optimum pH'sı Bölüm 3.3.2'de anlatıldığı şekilde; pH'sı 7,5-9,0 aralığında 50 mM Tris-HCl ve pH'sı 5,5-8,0 aralığında 50 mM potasyum fosfat tampon çözeltileri kullanılarak enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak belirlendi (Şekil 4.6-4.7 ve Çizelge 4.4-4.5). Gökkuşığı

Alabalık Karaciğeri GR enzimi için optimum pH, 50 mM Tris-HCl pH=8,0 tamponu olarak belirlendi.

Çizelge 4.4. 50mM Tris-HCl tampon çözeltisi kullanılarak Gökkuşığı Alabalık karaciğeri GR enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları

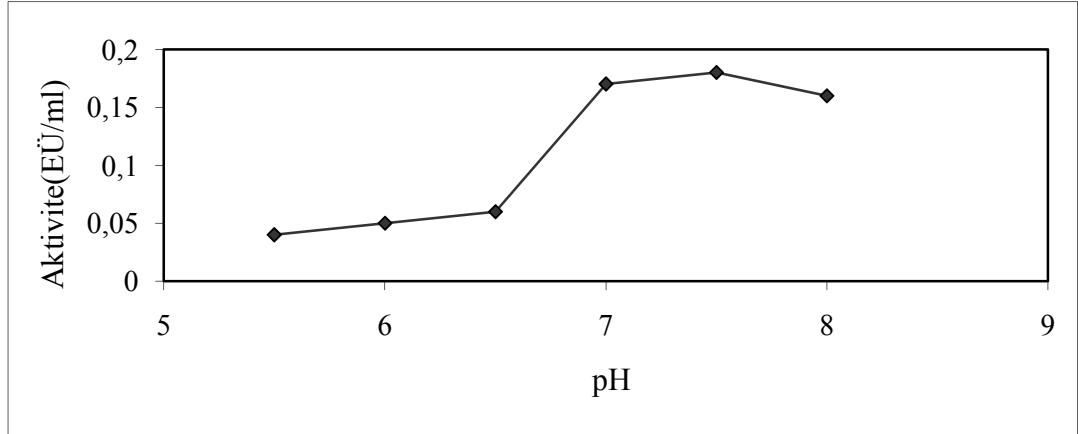
pH	Aktivite(EÜ/ml)
7,5	0,04
8,0	0,20
8,5	0,06
9,0	0,05



Şekil 4.6. 50mM Tris HCl tampon çözeltisi kullanılarak Gökkuşığı Alabalık karaciğeri GR enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm grafiği

Çizelge 4.5. 50mM Fosfat tampon çözeltisi kullanılarak Gökkuşığı Alabalık karaciğeri GR enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları

pH	Aktivite(EÜ/ml)
5,5	0,04
6,0	0,05
6,5	0,06
7,0	0,17
7,5	0,18
8,0	0,16



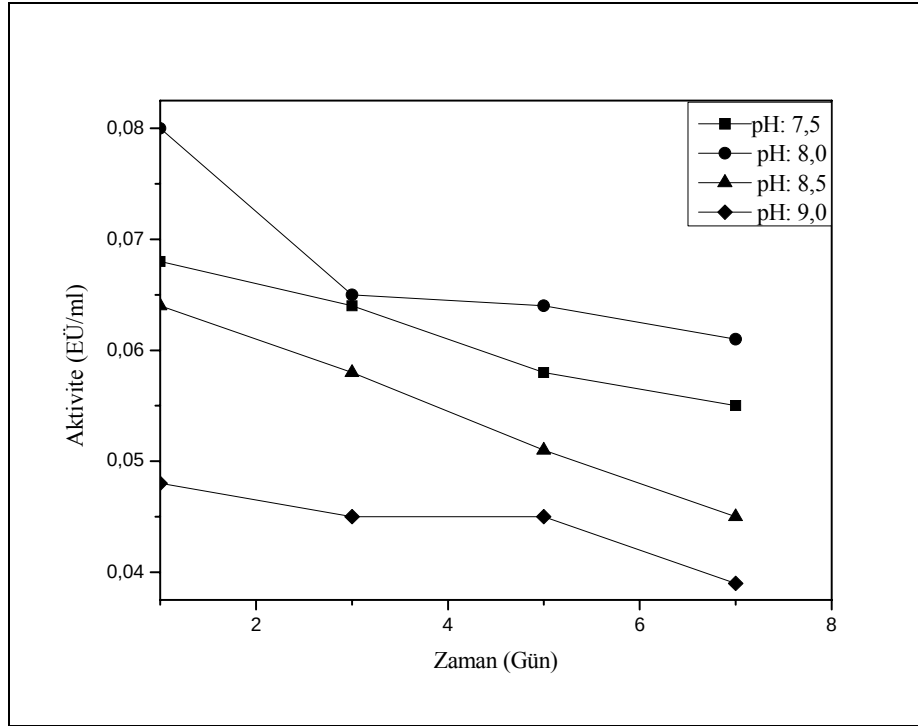
Şekil 4.7. 50mM fosfat tamponu çözeltisi kullanılarak Gökkuşığı Alabalık karaciğeri GR enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm grafiği.

4.4.3. Gökkuşığı Alabalık karaciğer dokusundan saflaştırılan GR enzimi için stabil pH bulunmasına yönelik sonuçlar

Gökkuşığı Alabalık Karaciğeri GR enzimi optimum pH'sı Bölüm 3.3.3'de anlatıldığı şekilde; pH 'ları 7,5, 8,0, 8,5, ve 9,0 aralığında 50 mM Tris-HCl ve pH 'ları 5,5, 6,0, 7,0, 7,5, 8,0 aralığında 50 mM potasyum fosfat tampon çözeltileri kullanılarak enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak belirlendi (Şekil 4.8-4.9 ve Çizelge 4.6-4.7). Gökkuşığı Alabalık Karaciğeri GR enzimi için stabil pH, 50 mM Tris-HCl tamponu pH=8,0 olarak belirlendi.

Çizelge 4.6. Gökkuşığı Alabalık karaciğeri GR enziminin stabil pH'sı için 50mM Tris-HCl tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

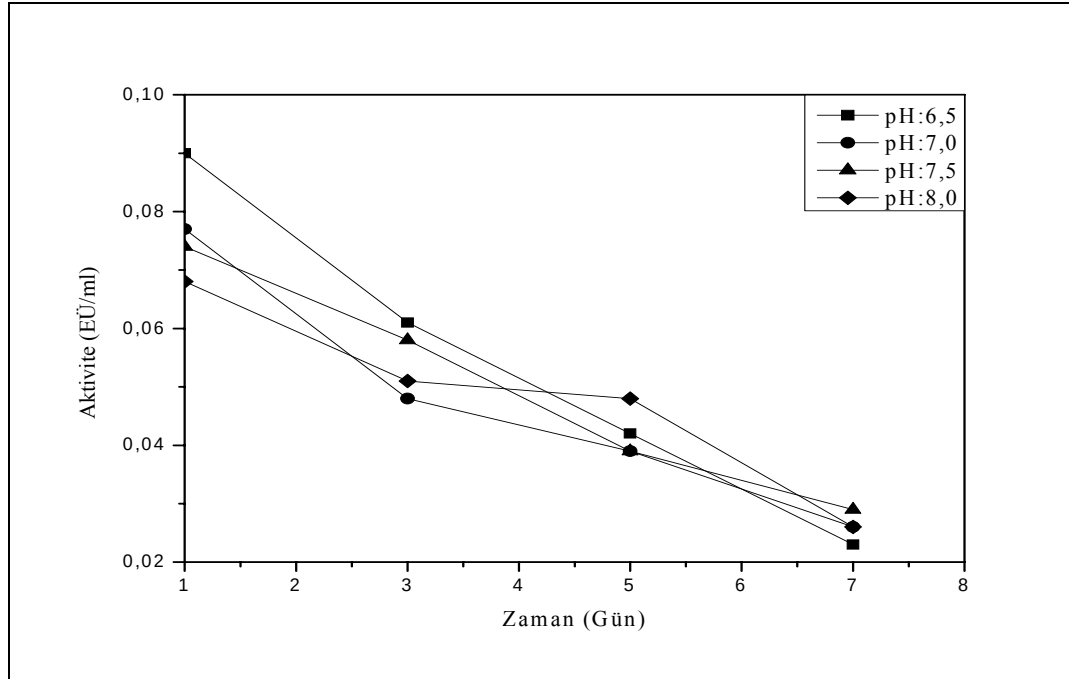
Zaman (Gün)	(pH=7,5) Aktivite (EÜ/ml)	(pH=8,0) Aktivite (EÜ/ml)	(pH=8,5) Aktivite (EÜ/ml)	(pH=9,0) Aktivite (EÜ/ml)
1	0,068	0,061	0,058	0,055
3	0,08	0,061	0,064	0,061
5	0,064	0,058	0,051	0,045
7	0,048	0,045	0,045	0,039



Şekil 4.8. Değişik pH'lardaki 50mM Tris HCl tampon çözeltisi kullanılarak Gökkuşığı Alabalık karaciğeri GR enzimi için elde edilen stabil pH grafiği

Çizelge 4.7. Gökkuşığı Alabalık karaciğeri GR enziminin stabil pH'sı için 50mM potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

Zaman (Gün)	(pH=6,5) Aktivite (EÜ/ml)	(pH=7,0) Aktivite (EÜ/ml)	(pH=7,5) Aktivite (EÜ/ml)	(pH=8,0) Aktivite (EÜ/ml)
1	0,090	0,061	0,042	0,023
3	0,077	0,048	0,039	0,026
5	0,074	0,039	0,058	0,029
7	0,068	0,051	0,048	0,026



Şekil 4.9. Değişik pH'lardaki 50mM fosfat tampon çözeltisi kullanılarak Gökkuşığı Alabalık karaciğeri GR enzimi için elde edilen stabil pH grafiği

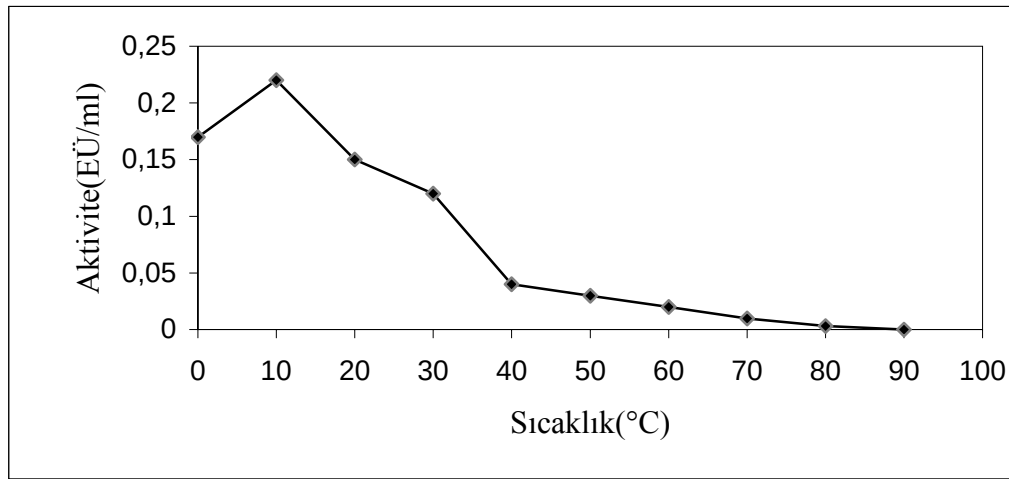
4.4.5. Gökkuşığı Alabalık karaciğer dokusundan saflaştırılan GR enzimi için optimum sıcaklık belirlenmesine yönelik sonuçlar

Gökkuşığı Alabalık Karaciğeri GR enziminin optimum sıcaklığını belirlemek üzere optimum pH ve uygun iyonik şiddete sahip 50mM Tris HCl pH=8,0 tampon çözeltisi kullanıldı. 0°C ile 90°C arasında her 10°C'de bir olmak üzere bölüm 3.3.4'de anlatıldığı

şekilde aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen eğriler Şekil 4.10'da ve Çizelge 4.8'de gösterildi. Bu çalışmalar sonucu optimum sıcaklık 10°C olarak tespit edildi.

Çizelge 4.8. Gökkuşığı Alabalık karaciğeri GR enziminin optimum sıcaklığı için sıcaklık- aktivite ölçüm sonuçları çizelgesi

Sıcaklık (°C)	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90
Aktivite (EÜ/ml)	0,17	0,22	0,15	0,12	0,04	0,03	0,02	0,01	0,003	0



Şekil 4.10. Gökkuşığı Alabalık karaciğeri GR enzimi için optimum sıcaklık ölçülmesi için çizilen sıcaklık-aktivite grafiği

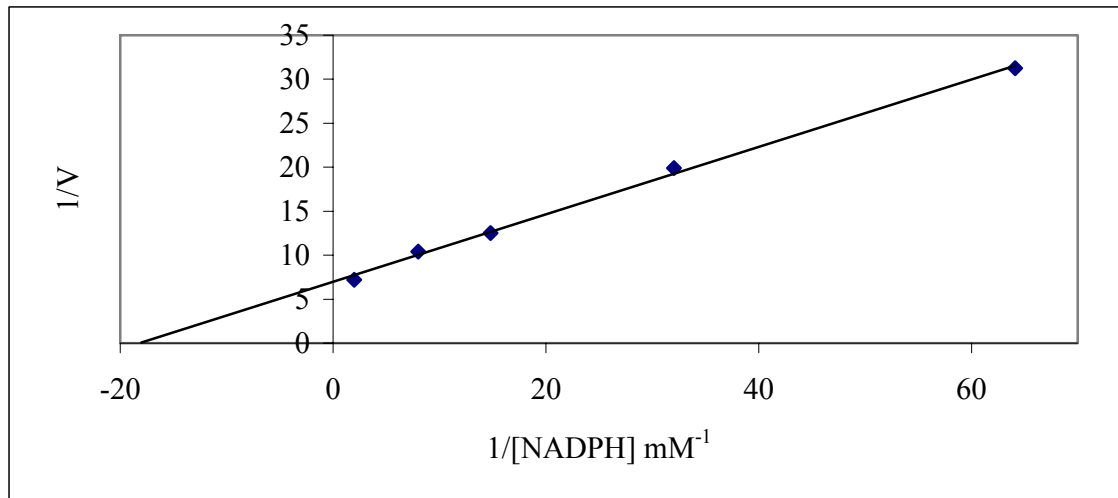
4.4.6. NADPH ve GSSG substratları için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesine yönelik sonuçlar

Gökkuşığı Alabalık Karaciğeri glutatyon redüktaz enziminin GSSG ve NADPH substratları için K_M ve V_{max} değerlerini belirlemek için bölüm 3.3.5'de anlatıldığı gibi sabit GSSG konsantrasyonunda NADPH'nin 5 farklı konsantrasyonlarıyla aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen değerlerle $1/[NADPH]-1/V$ Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Bu grafikten yararlanarak NADPH için K_M ve V_{max} değerleri belirlendi. Aynı şekilde NADPH'nin sabit konsantrasyonunda GSSG'nin 5 farklı konsantrasyonlarıyla

aktivite ölçümleri yapılarak $1/[GSSG]$ - $1/V$ Lineweaver-Burk grafiği oluşturuldu ve GSSG için K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı. Bu çalışmalar sonucunda NADPH için K_M değeri 0,055 mM ve V_{max} değeri 0,143 EÜ/ml olarak; GSSG için ise, K_M değeri 0,025 mM ve V_{max} değeri 0,098 EÜ/ml olarak tespit edildi. Aktivite ölçümleri optimal şartlarda gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.9-4.10 ve Şekil 4.11-4.12’de görülmektedir.

Çizelge 4.9. Gökkuşığı Alabalık karaciğer dokusu GR enzimi için K_M ve V_{MAX} değerlerinin bulunmasına yönelik NADPH derişimi-aktivite çizelgesi

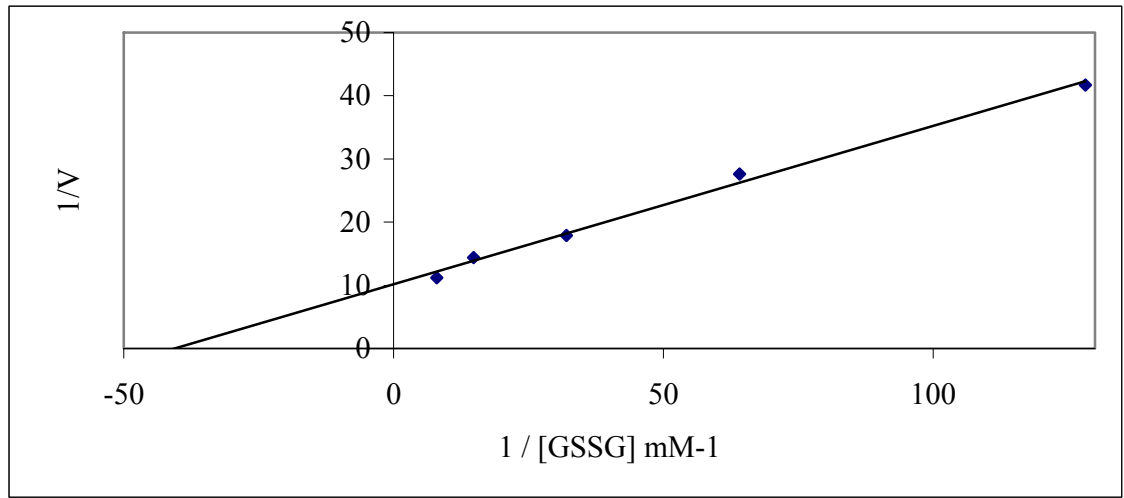
NADPH derişimi (mM)	0,5	0,125	0,0675	0,0312	0,0156
Aktivite (EÜ/ml)	0,177	0,096	0,080	0,048	0,032



Şekil 4.11. 5 farklı NADPH derişimi kullanılarak Gökkuşığı Alabalık karaciğeri GR enzimi için çizilen grafik.

Çizelge 4.10.Gökkuşığı Alabalık karaciğer dokusu GR enzimi için K_M ve V_{MAX} değerlerinin bulunmasına yönelik GSSG derişimi-aktivite çizelgesi

GSSG derişimi (mM)	0,125	0,0675	0,0312	0,0156	0,0078
Aktivite (EÜ/ml)	0,121	0,064	0,056	0,032	0,024



Şekil 4.12. 5 farklı GSSG derişimi kullanılarak Gökkuşığı Alabalık karaciğeri GR enzimi için çizilen Lineweaver-Burk grafiğı.

4.4.7. Gökkuşığı Alabalık karaciğer dokusundan saflaştırılan GR enziminin GSH ve $NADP^+$ inhibitörleri için K_i sabitlerinin belirlenmesine yönelik sonuçlar

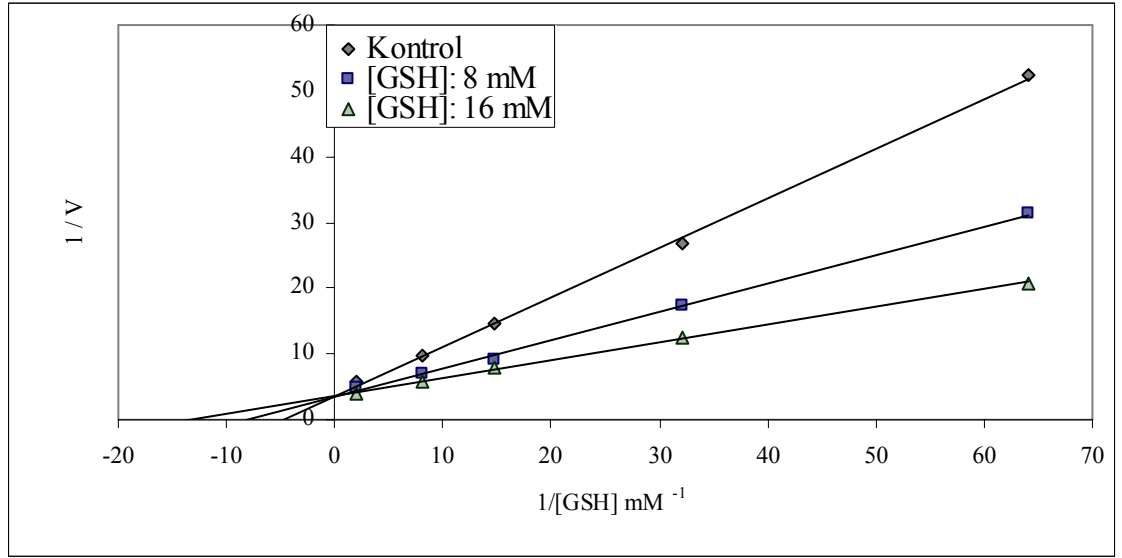
Gökkuşığı Alabalık Karaciğeri glutatyon redüktaz enziminin katalizlediğı reaksiyon ürünleri olan GSH ve $NADP^+$ 'nın etkilerini belirlemek amacıyla bölüm 3.3.6'da optimal aktivite ölçüm şartlarında reaksiyon ortamına GSH'ın farklı konsantrasyonları katılarak enzim aktivitesi üzerine etkisi belirlendi. Aynı şekilde ürünlerden diğeri olan $NADP^+$ 'nın da farklı konsantrasyonlarında aktivite ortamına katılarak enzim üzerindeki etkisi belirlendi.

İnhibisyon etkisi gösteren $NADP^+$ ve GSH'ın inhibisyon türleri ve K_i sabitlerinin belirlenmesi amacıyla $NADP^+$ 'nın uygun iki sabit konsantrasyonunda artan NADPH

konsantrasyonlarıyla aktivite ölçümleri yapılarak Lineweaver- Burk grafikleri çizildi. Bu grafik ve denklemden yararlanarak inhibisyon türü ve K_i sabiti hesaplandı. GSH ile yapılan çalışmada da iki sabit GSH konsantrasyonunda aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen değerlerle oluşturulan Lineweaver-Burk grafiğinden ve denklemden yararlanarak inhibisyon türü ve K_i sabiti hesaplandı. Bu çalışmalar sonucu GSH için K_i sabiti 10,17 mM, inhibisyon türü ise yarışmalı, NADP^+ için K_i sabiti 0,295, inhibisyon türü ise yarışmalı olarak bulundu. Sonuçlar Çizelge 4.11- 4.12 ve Şekil 4.13- 4.14 'te verilmiştir.

Çizelge 4.11. GSH için K_i sabitinin bulunmasına yönelik çizelge

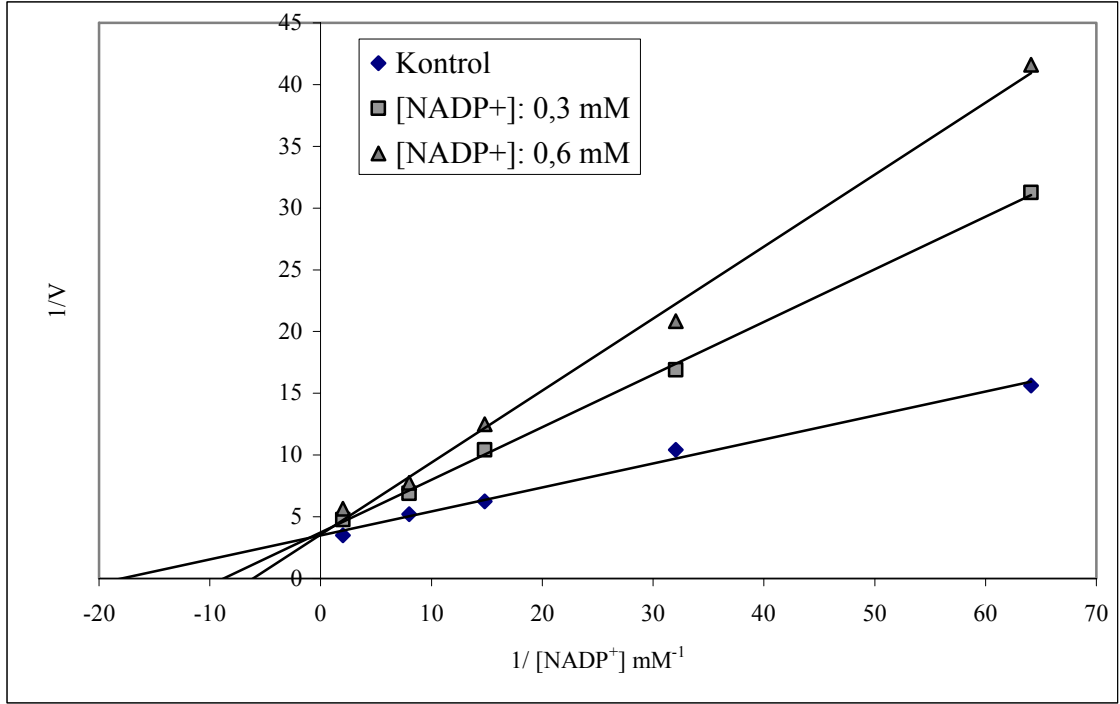
[GSH] (mM)	[NADPH] mM	Aktivite (EÜ/ml)
Kontrol (2mM)	0,5000	0,531
	0,1250	0,288
	0,0625	0,240
	0,0312	0,144
	0,0156	0,096
8	0,5000	0,257
	0,1250	0,177
	0,0625	0,113
	0,0312	0,080
	0,0156	0,048
16	0,5000	0,193
	0,1250	0,161
	0,0625	0,113
	0,0312	0,064
	0,0156	0,032



Şekil 4.13. GSH için K_i sabitinin bulunmasına yönelik çizilen Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.12. NADP^+ için K_i sabitinin bulunmasına yönelik çizelge

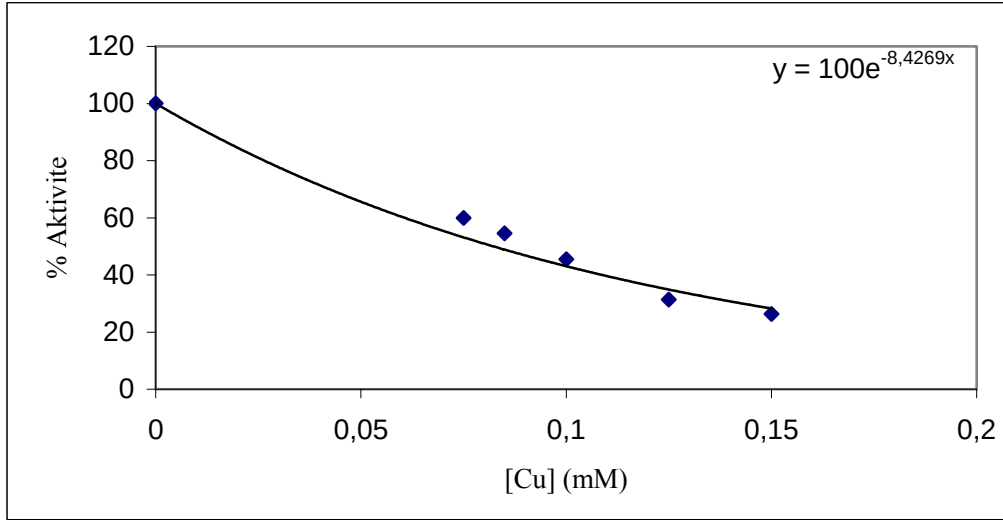
[NADP ⁺] (mM)	[NADPH] mM	Aktivite (EÜ/ml)
Kontrol (2mM)	0,5000	0,354
	0,1250	0,192
	0,0675	0,160
	0,0312	0,096
	0,0156	0,064
0,3	0,5000	0,209
	0,1250	0,145
	0,0675	0,096
	0,0312	0,064
	0,0156	0,032
0,6	0,5000	0,177
	0,1250	0,129
	0,0675	0,080
	0,0312	0,048
	0,0156	0,016



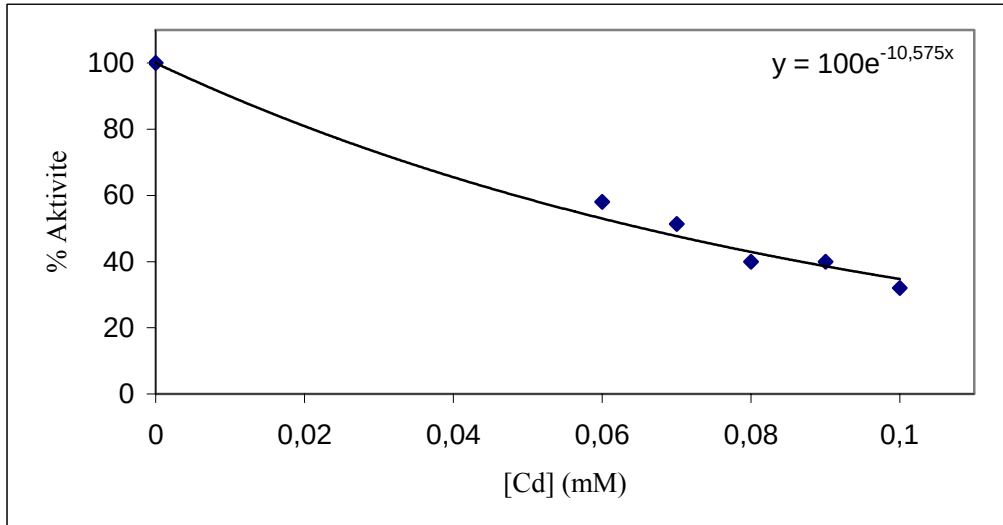
Şekil 4.14. NADP⁺ için K_i sabitinin bulunmasına yönelik çizilen Lineweaver-Burk grafiği

4.5. Gökkuşuğu Alabalık Karaciğer Dokusundan Saflaştırılan GR Enzimi Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının İnhibitör Etkilerinin sonuçları

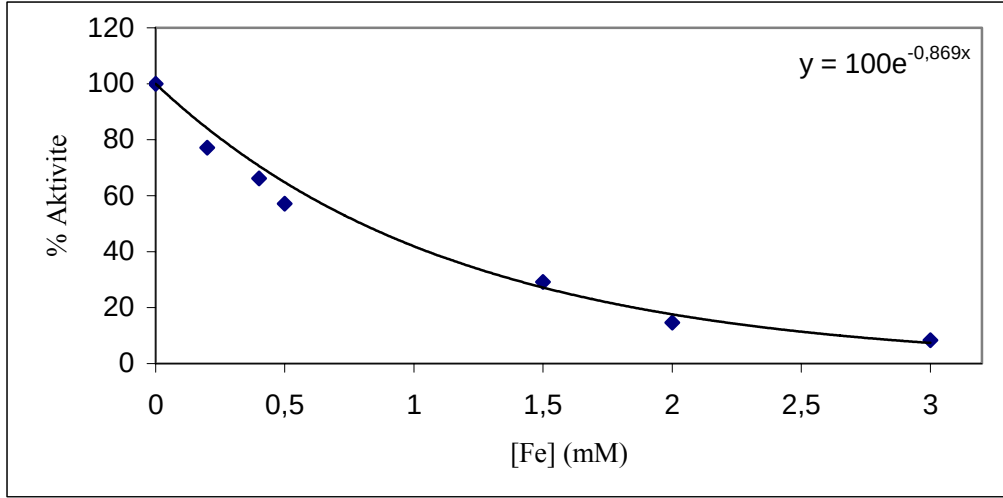
Gökkuşuğu Alabalık Karaciğer dokusundan 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi ile saflaştırılan glutatyon redüktaz enzimi için bölüm 3.4'de anlatıldığı şekilde Hg(NO₃)₂, Cu(NO₃)₂·3H₂O, Fe(NO₃)₃·9H₂O, AlCl₃·6H₂O, Pb(NO₃)₂ ve CdCl₂·H₂O kimyasal maddelerinin stok çözeltileri hazırlandı. Gökkuşuğu Alabalık Karaciğeri glutatyon redüktaz enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren yukarıda adı geçen kimyasal maddeler ile ilgili konsantrasyonlar ve %aktivite değerleri için GR enzimi üzerinde inhibisyon etkileri araştırıldı. Sonuçlar Şekil 4.15- 4.16- 4.17- 4.18- 4.19- 4.20'de verildi.



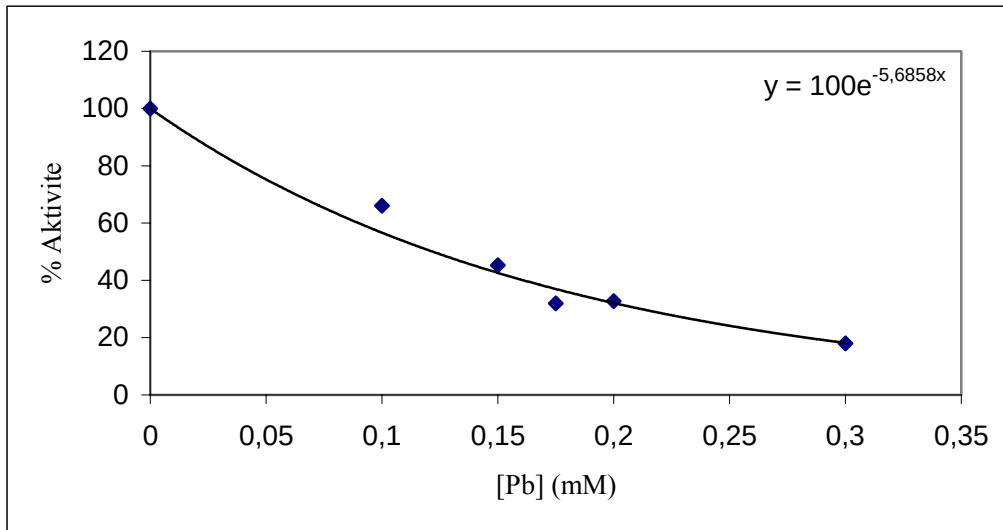
Şekil 4.15. Gökkuşığı Alabalık karaciğer dokusu GR enzimi için 5 farklı Cu⁺² konsantrasyonunda elde edilen %aktivite-[Cu⁺²] grafiği



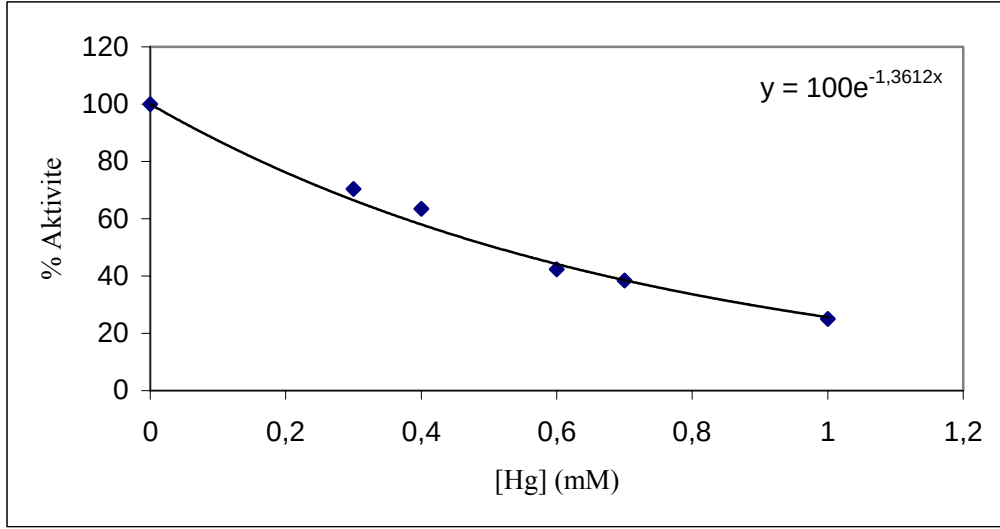
Şekil 4.16. Gökkuşığı Alabalık karaciğer dokusu GR enzimi için 5 farklı Cd⁺² konsantrasyonunda elde edilen %aktivite-[Cd⁺²] grafiği



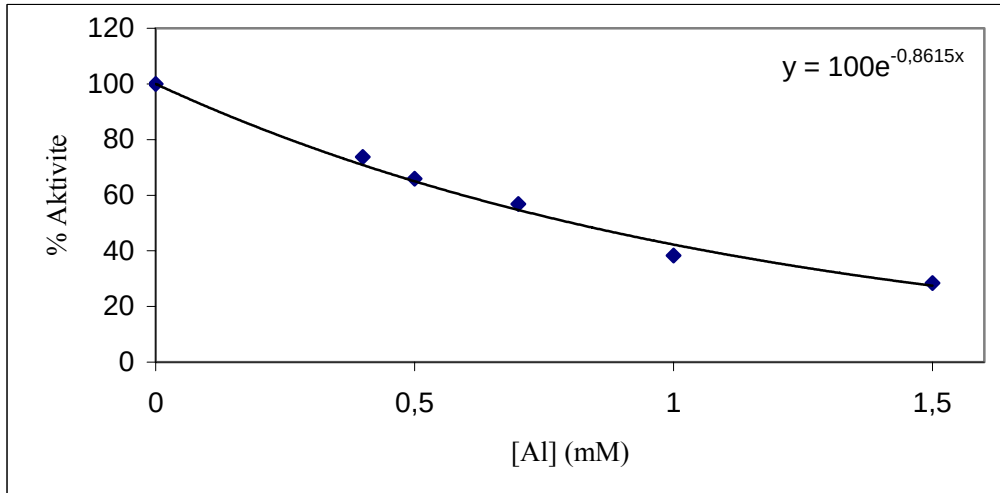
Şekil 4.17 Gökkuşığı Alabalık karaciğer dokusu GR enzimi için 5 farklı Fe⁺² konsantrasyonunda elde edilen %aktivite-[Fe⁺²] grafiği



Şekil 4.18. Gökkuşığı Alabalık karaciğer dokusu GR enzimi için 5 farklı Pb⁺² konsantrasyonunda elde edilen %aktivite-[Pb⁺²] grafiği.



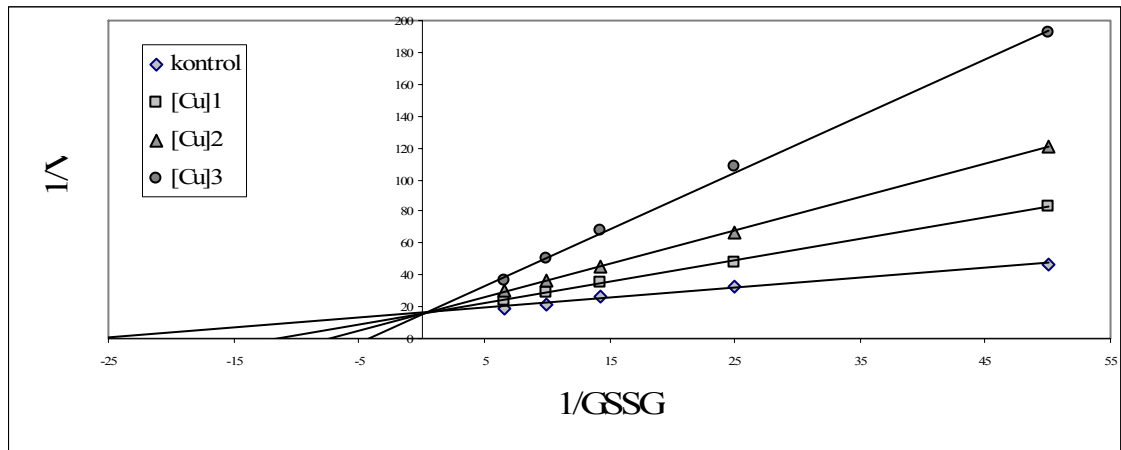
Şekil 4.19. Gökkuşığı Alabalık karaciğer dokusu GR enzimi için 5 farklı Hg^{+2} konsantrasyonunda elde edilen %aktivite- $[\text{Hg}^{+2}]$ grafiği



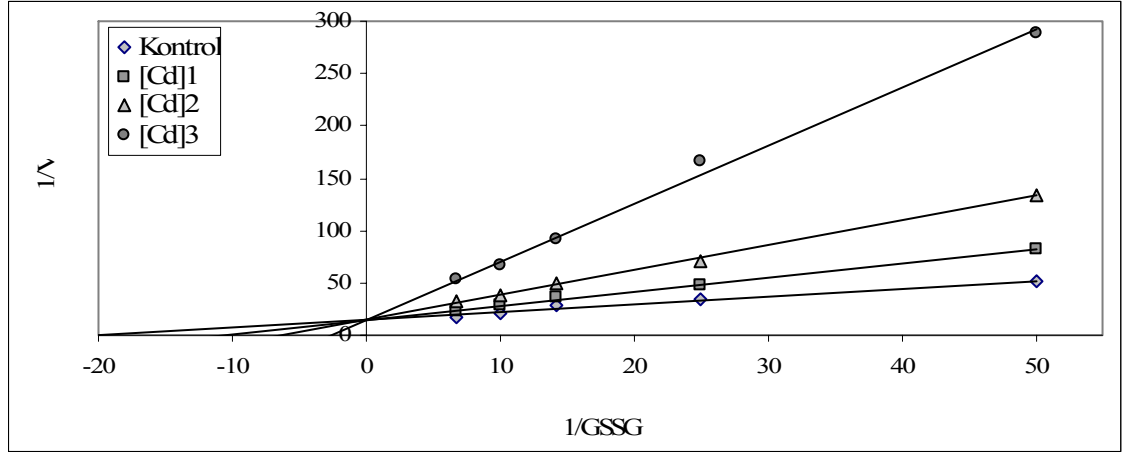
Şekil 4.20. Gökkuşığı Alabalık karaciğer dokusu GR enzimi için 5 farklı Al^{+3} konsantrasyonunda elde edilen %aktivite- $[\text{Al}^{+3}]$ grafiği

4.6. Gökkuşığı Alabalık Karaciğer Dokusundan Saflaştırılan GR Enzimini İnhibe eden bazı metal İyonları İçin K_i Değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışmaların sonuçları

Gökkuşığı Alabalık Karaciğer Dokusundan Saflaştırılan GR Enziminin inhibitörsüz ve inhibitörlü ortamda beş farklı substrat konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapılmıştır. Daha sonra kullanılan metaller için üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonu ve beş farklı substrat konsantrasyonunda elde edilen aktivite değerleri kullanılarak; $1/V$ - $1/S$ değerleri bulunmuştur. Lineweaver- Burk grafikleri çizilerek K_i değerleri hesaplanmıştır. Gökkuşığı Alabalık Karaciğer GR enzimi için elde edilen sonuçlar Şekil 4.21- 4.22’ de verildi.



Şekil 4.21. Gökkuşığı Alabalık karaciğeri dokusundan saflaştırılan GR enzimi üzerine $[Cu^{+2}]$ iyonunun etkisi
 $[I_1] = 0,070mM$, $[I_2] = 0,080M$, $[I_3] = 0,090mM$



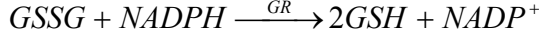
Şekil 4.22. Gökkuşığı Alabalık karaciğeri dokusundan saflaştırılan GR enzimi üzerine $[Cd^{+2}]$ iyonunun etkisi
 $[I_1] = 0,050mM$, $[I_2] = 0,070 mM$, $[I_3] = 0,080mM$.

Çizelge 4.13. Gökkuşığı Alabalık karaciğeri dokusundan saflaştırılan GR enzimi üzerine bazı metal etkilerinin toplu sonuçları

Bazı Metal iyonları	IC ₅₀ (mM)	Ortalama K _i (mM)	İnhibisyon Tipi
Hg(NO ₃) ₂	0,509	-	-
Cu(NO ₃) ₂ .3H ₂ O	0,082	0,117	Yarışmalı
Fe(NO ₃) ₃ . 9H ₂ O	0,797	-	-
AlCl ₃ . 6H ₂ O	0,804	-	-
Pb(NO ₃) ₂	0,122	-	-
CdCl ₂ . H ₂ O	0,0655	0,104	Yarışmalı

5.TARTIŞMA ve SONUÇ

Glutatyon redüktaz enzimi ;



reaksiyonunu katalizler. İndirgenmiş glutatyon üreten bu enzim canlı hücreler için hayati bir öneme sahiptir. Dolayısıyla bu enzimin çalışılması oldukça önemlidir.

Reaksiyon sonucu elde edilen GSH'ın metabolizmadaki görevi çok önemlidir. Antioksidan ajan olan GSH aynı zamanda bazı enzimlerin substratı olarakta görev alır. Bu reaksiyonlar reaktif oksijen ürünlerinin hidrojen perokside dönüşmesi,peroksitlerin giderilmesi, proteinlerin sülfhidril gruplarının korunması ve hücre içine alınan ilaç ve ajanların zehirsizleştirilmesi reaksiyonları olarak sayılabilir. Ayrıca GSH redoks homeostasisinde, deoksiribonükleotidlerin şekillendirilmesinde, peroksitlerin, 2-oksoaldehitlerin ve ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda görev alır. Oksidatif strese karşı dayanıksız hücreler ve ek olarak hızlı poliferasyon hücreleri kısmen GSH'ın rejenerasyonuna bağlıdır. Bu sebepten, potansiyel GR inhibitörleri antitümör ve antiparaziter ilaçların geliştirilmesinde önemli rol oynar (Knapen *et al.*1999; Karplus *et al* 1988; Nordhoff *et al.* 1999; Boehme *et al.* 2000; Irmiler *et al.* 2002; Savvides *et al.* 2002; Becker *et al.* 2001).

Bu öneminden dolayı enzimin üzerine çok sayıda çalışma yapılmış, bir çok kaynaktan saflaştırılmış ve biyokimyasal özellikleri incelenmiştir. Bazı kaynaklardan elde edilen enzimin amino asit dizilimi ve aktif bölgeleri belirlenmiştir (Douglas 1987, Krauth-Siegel *et al* 1998, Becker *et al* 2001). İnsan, fare,bazı bitki ve bakteri hücrelerinden GR cDNA'ları elde edilmiş ve bazı biyokimyasal çalışmalar yapılmıştır (Jiang *et al.* 1995; Tamura *et al.*1996; Kelner *et al.* 2000).

İnsan eritrosit GR enziminin amino asit analizi ve x-ray kristalografisi çalışmaları yapılarak enzimin yapısı belirlenmiştir. Her alt biriminin 478 amino asitten oluştuğu ve Cys-90 amino asitinin oluşturuğu disülfid bağıyla birleştiği belirlenmiştir. Enzimin aktif bölgesini arginin, tirozin ve histidin amino asitlerinin oluşturuğu belirlenmiştir (Douglas 1987).

Bu çalışmada GR enzimi Gökkuşuğı Alabalık Karaciğer Dokusundan saflaştırılarak, karakterize edilip çeşitli kinetik özellikleri incelendi.

Gökkuşuğı Alabalık Karaciğer dokusundan GR enzimini saflaştırmak için önce homojenat hazırlandı, literatür bilgilerine dayanılarak %0-80 aralığında amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz yapıldıktan sonra numune 2',5'-ADP sepharose 4B afinite kolonuna tatbik edildi. Bütün bu saflaştırma işlemleri yapılırken sıcaklığın kontrol altında tutulması gerekiyordu. Bu nedenle saflaştırma işlemleri +4°C'de gerçekleştirildi. Böylece mümkün olduğu kadar aktivite kaybı önendi. Saflaştırma basamaklarından elde edilen sonuçların literatürle uyumlu olduğu belirlendi.

Elde edilen homojenatlar %0-20, %20-30, %30-40, %40-50, %50-60, %60-70, %70-80 aralıklarında amonyum sülfat çöktürmeleri yapılarak GR enziminin %30-70 aralığında çöktüğü belirlendi. Amonyum sülfat çöktürmesi uzun zamandan beri çeşitli bilim adamları tarafından kullanılan kısmi saflaştırma metodudur. Bu metot vasıtası ile numune içerisindeki bir çok safsızlıklar elimine edilir ve proteinler daha derişik halde elde edilir. Afinite kromatografisinden önce amonyum sülfat çöktürmesi yapılması kolonuna tatbik edilecek çözeltideki GR konsantrasyonunun yüksek olması bakımından önemlidir. Sığır ve insan eritrositlerinden elde edilen GR enzimi için amonyum sülfat çöktürme aralığı %30-70, koyun beyini için %35-55 ve koyun karaciğeri için %0-60 olarak bulunmuştur. Bizim bulduğumuz çökme aralığı da bu çalışmalarda bulunan aralıklarla benzerdir. Diyalizin yapılması ise afinite kromatografisinden önce ortamdaki iyonların uzaklaştırılması açısından önemlidir (Erat 2002; Açan ve Tezcan 1989; Uluşu 2003)

Saflaştırma basamakları esnasında elüatların protein muhtevaları 280 nm’de absorbansları ölçülerek belirlendi. Bu şekilde yapılan kalitatif tayin protein yapısında bulunan fenil alanin, tirozin ve triptofan amino asitlerinin bu dalga boyunda absorbans vermesi esasına dayanmaktadır. Kantitatif protein tayinleri ise Bradford yöntemiyle belirlendi. Bu yöntem fosforik asitli ortamda proteinlerin Coomassie brilliant blue G-250 reaktifiyle kompleks oluşturması esasına dayanır. Coomassie brilliant blue G-250 negatif yüklü bir gruba sahiptir ve protein üzerindeki pozitif yüklü gruba bağlanır. Proteinin bağlanması kırmızı formun ($\lambda_{\max}=465$ nm) mavi forma ($\lambda_{\max}=595$ nm) dönüşümünü sağlar. Bu yöntemin diğer protein tayin yöntemlerinden üstün tarafı, çok kısa sürede uygulanması, bozucu faktörlerin pek olmaması, protein boya kompleksinin çözeltisinde uzun süre kalmasıdır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır.

Çalışma sonucunda Gökkuşığı Alabalık Karaciğer Dokusundan Saflaştırılan GR enzimi %47,28 verimle 840,78 kat saflaştırma yapıldı. Enzimin saflığı elektroforezle kontrol edildi.

Bu enzim domuz eritrositlerinden 3.047 kat, koyun beyninden 75 kat, buzağı karaciğerinden 633 kat, dana karaciğerinden 218 kat saflaştırılmıştır (Boggaram *et al.* 1979; Açıkan ve Tezcan, Le Trang *et al.* 1983; Carlberg ve Mannervik 1981).

Gökkuşığı Alabalık Karaciğer Dokusundan Saflaştırılan GR enziminin optimum pH değeri Tris-HCl tamponunda 8,0 olarak belirlendi. Literatürde domuz eritrositleri için 7,0, insan eritrositi için 8,0, buzağı karaciğeri için 7,0, sığır eritrositleri için 7,3 olduğu literatürde geçmektedir. Elde ettiğimiz sonuç diğer değerlerle benzerlik göstermektedir (Boggaram *et al.* 1979; Beutlar 1984; Le Trang *et al.* 1983; Erat 2002).

Gökkuşığı Alabalık Karaciğer Dokusundan Saflaştırılan GR enziminin stabil pH değeri Tris-HCl tamponunda pH=8,0 olarak tespit edildi. Literatürde stabil pH çalışması ile ilgili sığır eritrosit GR enzimi için pH=7,3 olarak bulunmuştur (Erat 2002).

Yapılan denemelerde enzimin optimum sıcaklığı 10°C olarak tespit edildi. Literatürde sığır eritrosit GR enzimi için optimum sıcaklık 55°C ,koyun karaciğeri için 60°C olarak bulunmuştur (Erat 2002; Uluşu 2003). Bulduğumuz optimum sıcaklık değeri bu değerden oldukça farklıdır.

Yapılan işlemlerle enzimin optimum iyonik şiddeti 50 mM Tris-HCl tamponu olarak tespit edildi. Literatürde sığır eritrosit GR enzimi için optimum iyonik şiddet 435 mM fosfat tamponu, koyun karaciğeri için 50 mM Tris olarak bulunmuştur (Erat 2002; Uluşu 2003). Görüldüğü gibi bulduğumuz optimum iyonik şiddet değeri koyun karaciğeri GR enzimiyle aynı iken, sığır eritrosit GR enzimi optimum iyonik şiddet değerinden oldukça farklıdır.

GR enziminin doğal substratı GSSG'dir. GSSG için bulunan K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 0,025 mM ve 0,098 EÜ/ml şeklindedir. GR enziminin diğer bir substratı olan NADPH için ise bu değerler sırasıyla 0,055 mM ve 0,143 EÜ/ml olarak bulunmuştur. Literatürde sığır eritrosit GR enziminde GSSG için K_M ve V_{max} değerleri sırası ile 0,149 mM ve 0,676 EÜ/ml, NADPH için ise 0,0714 mM ve 0,0931 EÜ/ml, koyun karaciğeri GR enziminde GSSG için 0,0239 mM ve 0,255 EÜ/ml, NADPH için ise 0,0258 mM ve 0,266 EÜ/ml olarak bulunmuştur (Erat 2002; Uluşu 2003).

Proteinler amino asitlerin peptid bağları ile bağlanması ile meydana gelirler. Proteinin yapısındaki amino asitler,R gruplarında ihtiva ettikleri fonksiyonel grupların üzerinden reaksiyon verirler. Örneğin,sistein –SH, tirozin –OH ve arginin guanidyum grupları üzerinden reaksiyon verirler. Sisteinde bulunan –SH grubu zayıf asit özelliği taşır ve reaksiyona girmeye oldukça yatkındır. Sistein eser miktarda da olsa metal iyonlarına maruz bırakıldığında merkaptanlar oluşur. Sistein birçok enzimin aktif ve katalitik bölgelerinin çok önemli bir bileşenidir. Bu tip enzimler Ag^+ ve Hg^{+2} gibi metal iyonlarıyla muamele edilirse -SH üzerinden merkaptanlar oluşur ve enzim aktivitesini kaybeder (Keha ve Küfrevioğlu 2004).

Metaller yer kabuğunda doğal olarak bulunurlar. Bozulmazlar ve yok edilemezler. Küçük bir miktara kadar vücudumuza gıdalar, içme suyu ve hava yolu ile girerler. İz elementler gibi bazı metaller (örneğin bakır, selenyum, çinko) insan vücudunun metabolizmasını sürdürmek için gereklidir. Bununla birlikte yüksek konsantrasyonda toksik olabilirler.

Çevremizde çeşitli şekillere bulunan metallerin kolay kolay bozulmaması ve yok edilememesi bu çalışmanın önemini bir kez daha ortaya koymaktadır. Çünkü havaya, nehirlerle ve denizlere karışan atıklar içerisinde bulunan veya bulunabilecek metaller insanların en fazla tükettikleri balıklar gibi birçok besin maddesi vasıtası ile vücudumuza girmekte ve atılamayarak biyobirikime sebep olmaktadır. Bunun sonuçları ise günümüzde tartışılmaz boyuttur.

Gökkuşaağı Alabalık Karaciğer Dokusundan Saflaştırılan GR enzimi üzerine bazı metal iyonlarının inhibisyon etkisi incelendi. Bu amaçla $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ve $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ maddeleri çalışıldı.

Gökkuşaağı Alabalık Karaciğer Dokusundan Saflaştırılan GR enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Hg^{+2} , Cu^{+2} , Fe^{+3} , Al^{+3} , Pb^{+2} ve Cd^{+2} metal iyonlarından Cu^{+2} ve Cd^{+2} için K_i sabitlerinin belirlenmesi işleminde Lineweaver-Burk grafikleri kullanıldı (Segel 1975; Telefoncu 1986). Sonuçların hasas bulunabilmesi için her inhibitörlü çalışma için 3 farklı inhibitör konsantrasyonunda $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri elde edilmiştir. Grafik çiziminde Microsoft Excel programından faydalanılmıştır.

K_i sabitleri küçük olan inhibitörün enzime ilgisi büyük olduğundan enzimin katalitik aktivitesi üzerine inhibisyon etkisinin büyük olacağı bilinmektedir. Gökkuşaağı Alabalık Karaciğer Dokusundan Saflaştırılan GR enzimi için IC_{50} değerleri küçükten büyüğe doğru $\text{Cd} < \text{Cu} < \text{Hg} < \text{Pb} < \text{Fe} < \text{Al}$ şeklindedir. Cu^{+2} ve Cd^{+2} için $(K_i)_{\text{ort}}$ değerleri 0,117 ve 0,104 olarak bulunmuştur. Inhibisyon tipleri ise yarışmalı inhibisyonudur.

Bu çalışmada enzimin doğal inhibitörleri olan NADP^+ ve GSH'ın enzim üzerindeki inhibisyon etkileri araştırılarak, inhibitörler için K_i sabitleri bulundu. NADP^+ ve GSH için K_i sabitleri sırasıyla 0,295(yarışmalı) ve 10,17(yarışmalı) mM'dır. Erat sığır eritrosit GR enzimi için NADP^+ (yarışmalı) ve GSH (yarışmasız) için K_i sabitlerini sırasıyla 0,248 ve 7,841 mM, Ulusu ise NADP^+ (yarışmalı) ve GSH (yarışmalı) için 4,367 ve 0,4055 mM olarak bulmuştur.

Farklı kaynaklardan elde edilen GR enzimini 2-(5'-nitrofurilvinil)-kuinolin bileşiği türevlerinin, arilzoaloksazin bileşiklerinin, arsenik grubu ve nitro grubu ihtiva eden bileşiklerin de inhibe ettiği belirlenmiştir (McCallum and Barrett 1995; Styblo and Thomas 1995; Janet *et al.* 1996; Grellier *et al.* 2001).

Sonuç olarak şu değerlendirme yapılabilir; Gökkuşığı Alabalık Karaciğer Dokusundan Saflaştırılan GR enzimi hayati öneme sahip olan GSH/GSSG oranını kontrol altında tuttuğu için GR enzimini inhibe ederek bu dengeyi bozabilecek olan bu maddelerin kullanımında son derece dikkatli olunmalı ve kullanımı kontrollü olmalıdır.

Yukarıda verilen sonuçlara göre bu tez kapsamında, hemen hemen tüm canlı organizmalarda yaygın bir şekilde bulunan ve birçok metabolik olayda hayati önem taşıyan glutatyon redüktaz enzimi Gökkuşığı Alabalık Karaciğer Dokusundan 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi kullanılarak tek bir basamakta ve çok kısa sürede yüksek bir saflıkta elde edildi ve enzimin karakteristik ve kinetik özellikleri belirlendi. Ayrıca bu dokudan elde edilen GR enzimi aktivitesi üzerine 6 farklı metal iyonunun inhibisyon etkisi araştırıldı ve düşük konsantrasyonlarda bile bu iyonların enzimi inhibisyona uğrattıkları tespit edildi. Daha sonra, Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek inhibisyon tipleri belirlendi. Bu inhibisyon alabalıklarda asit-baz dengesi, osmoregülasyon ve iyon regülasyon gibi fizyolojik fonksiyonlara zarar verebilir. Ayrıca tatlı su balıklarında GR üzerine toksikolojik bilgilerin az olmasından dolayı bu enzimin Hg^{+2} , Cu^{+2} , Fe^{+3} , Al^{+3} , Pb^{+2} ve Cd^{+2} metal iyonlarına karşı duyarlılığı toksikolojik alanda bu enzim üzerine yapılacak çalışmalara temel teşkil edecektir. Diğer bir husus ise enzim inhibisyonu gibi biyokimyasal değişiklikler çevresel sağlığın indikatörleri

olarak kullanılmaktadır. Çünkü bu biyokimyasal değişiklikler suda yaşayan organizmalar üzerine kimyasalların zararlı etkilerinin gözlemlenmesinde hızlı ve hasas araçlardır. Bu nedenle GR enzimi çevresel kirliliğin kalitatif tayininde biyomarker olarak kullanılabileceği kanaatindeyiz.

Sonuç olarak bu tez kapsamında aşağıdaki bulgular elde edilmiştir;

1. Gökkuşığı Alabalık Karaciğeri GR enzimi homojenatın hazırlanması, amonyum sülfat çöktürmesi ve 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi yöntemleri kullanılarak spesifik aktivitesi 13,957 EÜ/mg protein olan enzim %47,28 verimle 840,78 kat saflaştırılmıştır.
2. Enzimin stabil olduğu pH = 8,0, optimum iyonik şiddet 50 mM Tris-HCl, optimum pH =8,0, aktivitesinin en yüksek olduğu sıcaklık 10°C olarak belirlenmiştir.
3. pH=8,0'de K_M değerleri NADPH için 0,055 mM, GSSG için 0,025 mM, V_{max} değerleri sırasıyla 0,143, 0,098 EÜ/ml olarak bulunmuştur. Ayrıca $NADP^+$ (yarışmalı) ve GSH(yarışmalı) için elde edilen K_i sabitleri sırasıyla 0,295 ve 10,17 mM olarak bulunmuştur.
4. Hg^{+2} , Cu^{+2} , Fe^{+3} , Al^{+3} , Pb^{+2} ve Cd^{+2} metal iyonları için IC_{50} değerleri sırası ile 0,509, 0,082, 0,797, 0,804, 0,122 ve 0,0655 mM olarak belirlenmiştir. Ayrıca Cu^{+2} ve Cd^{+2} iyonları için K_i sabitleri sırası ile 0,117, 0,104 mM ve inhibisyon tipleri her ikisi içinde yarışmalı olarak tespit edildi.

KAYNAKLAR

- Acan, N.L. and Tezcan, E.F., 1989. Sheep brain glutathione reductase: purification and general properties. *FEBS Letter*, 250, 1, 72-74.
- Açan, L., 1990. Koyun beyini glutatyon redüktazının saflaştırılması ve bazı özelliklerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Ankara.
- Arrick, B.A. and Nathan, C.F., 1984. Glutathione metabolism as a determinant of therapeutic efficiency. A review, *Cancer Research*, vol.44,4224-4232.
- Asztalos, B., Nemcsok, J., Benedeczky, I., Gabriel, R., Szabo, A. And Refaie, O.J., 1990. The effect of pesticides on some biochemical parameters of carp (*Cyprinus carpio*). *Arch. environ. Toxicol.* 19, 275-282.
- Becker, K., Herold-Mende, C., Park, J. J., Lowe, G. and Schirmer, R. H., 2001. Human Thioredoxin Reductase is efficiently inhibited by (2,2':6',2"-Terpyridine)platinum(II) complexes. Possible implications for a novel antitumor strategy *J. Med. Chem.* 44, 2784-2792.
- Becker K., Rahlfs S., Nickel C. and Schirmer R. H., 2003. Glutathione-function and metabolism in the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Biol. Chem.* 384, 551-566.
- Beütler E., 1969. Effect of flavin compound on Glutathione Reductase Activity; In vivo and in vitro studies.
- Blasco, J. and Puppo, J., 1999. Effect of heavy metals (Cu, Cd and Pb) on aspartate and alanine aminotransferase in *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: Bivalvia). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 122, 253-263.
- Boehme C.C., Arscott L.D., Becker K., Schirmer R.H. and Williams C.H., 200. Kinetic characterization of glutathione reductase from the malarial parasite *Plasmodium falciparum* Comparison with the human enzyme. *J. Biol. Chem.* 275, 37317-37323.
- Boggaram, V., Brobjer, K.L. and Mannervik, B., 1979. Purification of glutathione reductase from porcine erythrocytes by the use of affinity chromatography on 2',5'-ADP-Sepharose 4B and crystallization of the enzyme. *Analytical Biochemistry*, 98, 335-340.
- Carlberg, I. and Mannervik, B., 1975. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 250, 5475-5480.
- Carlberg, I. and Mannervik, B., 1981. Purification and characterization of glutathione reductase from calf liver. An improved procedure for affinity chromatography on 2',5'-ADP. Carlberg, C. And Mannervik B., 1985. Glutathione reductase assays. *Methods in Enzymology*, 113, 484-495. Academic Press, Orlando, FL.
- Cooper, A.J.L., 1997. Glutathione in the brain: disorders of glutathione metabolism. In: Rosenberg, R.N., Prusiner, S.B., Dimauro, S., Barchi, R.L., Kunk, L.M. (Eds), *The Molecular and Genetic Basis of Neurological Disease*. Butterworth-Heinemann, Boston, pp.1195-1230.
- Çelik, İ., Çamaş, H., Arslan, O. and Küfrevioğlu, Ö.İ., 1996. The effects of some pesticides on human and bovine erythrocyte carbonic anhydrase enzyme activities in vitro. *J. Environ. Sci. Health*, 31, 2651-2652.

- Danner, J., Lenhoff, H.M. and Heagy, W., 1977. Affinity chromatography of glutathione reductase: Bound by immobilized GSSG, eluted by NADPH., *Analytical Biochemistry*, 82, 586-590.
- Douglas, K.T., 1987. Mechanizm of glutathione-dependent enzymes., Meister, A., (ed). Avdan. *Enzymol.*, John Wiley and Sons inc., New York. 59, 103-167.
- Ekinci, D., Beydemir, Ş. ve Küfrevioğlu, Ö.İ., 2006. İnsan eritrositlerinden karbonik anhidraz izoenzimlerinin saflaştırılması ve bazı ağır metallerin in vitro inhibisyon etkilerinin etkilenmesi. II. Afinité Teknikleri Kongresi, Zonguldak.
- Erat, M., 2002. İnsan ve sığır eritrosit glutatyon redüktaz enziminin saflaştırılması, bazı ilaç ve kimyasal maddelerin inhibisyon veya aktivasyon etkilerinin araştırılması. Doktora tezi, Erzurum.
- Erat, M., 2003. Purification of human erythrocyte glucose 6-phosphate dehydrogenase and glutathione reductase enzymes using 2',5'-ADP Sepharose 4B affinity column material in single chromatographic step. *Protein Expression and Purification*. 34. 257-260.
- George, D. L. and Franke U. 1976. *Cytogenet. Cell Genet.* 17, 282-286
- Grellier, P., Sarlauskas, J., Anusevicius, Z., Marozienė, A., Houee-Levin, C., Schrevel, J. and Cenas N., 2001. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 393, 199-206
- Gözükara E.M. 1990. *Biyokimya*, Ofset Repromat Ltd Şti., Ankara 792-795
- Gül M., Kutay F.Z., Temocin S. and Hanninen O., 2000. Cellular and clinical implications of glutathione. *Indian J. Exp. Biol.* 38, 625-634.
- Hunaiti, A.A. and Soud, M., 2000. Effect of lead concentration on the level of glutathione, glutathione S-transferase, reductase and peroksidase in human blood. *The Science of The Total Environment*, 248, 45-50.
- Irmiler, A., Bechthold, E., Davioud-Charvet, E., Hofman, V., Reau, R., Gromer, S., Schirmer, R. H., and Becker, K. (2002) in *Flavins and Flavoproteins* (Chapman, S., Perham, R., and Scrutton, N., eds) pp. 803-815, Agency for Scientific Publications, Berlin.
- Jiang, F., Hellmans, U., Stroga, E., Bergman, B. and Mannervik, B., 1995. Cloning, sequencing and regulation of the glutathione reductase gene from the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120. *The Journal of Biological chemistry*, 270(39), 22882-22889.
- Keha, E. ve Küfrevioğlu, Ö.İ., 2004. *Biyokimya*, Aktif Yayınevi, Erzurum
- Kelner J. M. and Montoya M. A. 2000. Structural Organization of the Human Glutathione Reductase Gene: Determination of Correct cDNA Sequence and Identification of a Mitochondrial Leader Sequence *Biochemical and Biophysical Research Communications* 269, 366–368.
- Knapen, M. F.C.M., Zusterzeel, P.L.M., Peters, W.H.M. and Steegers, E.A.P., 1999. Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 82, 171-184.
- Krauth-Siegel, R.L., Arscott, L.D., Schönleben-Janás, A., Schirmer, R.H. and Williams, C.H., 1998. Role of active site tyrosine residues by human glutathione reductase. *Biochemistry*, 37, 13968-13977.
- Lamotte, F., Vianey-Liuaud, N., Duviau, M. P. and Kobrehel, K., 2000. Glutathione reductase in wheat grain. 1. Isolation and characterization. *J. Agric. Food Chem.* 48, 4978-4983.
- Lehninger AL. *Principles of biochemistry*. New York: Worth Publishers Inc, 2000

- Le Trang, N., Bhargava, K. K. and Cerami, A., 1983. Purification of glutathione reductase from gerbil liver in two steps. *Analytical Biochemistry*. 133, 94-99.
- Lineweaver, H., and Burk, D., 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.* 57, 685
- Mannervik, B., Jacobsson, K. and Boggaram, V., 1976. Purification of glutathione reductase from erythrocytes by the use of affinity chromatography on 2',5'-ADP-Sepharose 4-B. *FEBS Letters*. 66, 221-224.
- Mazur, C.F. and Iwama, O.K., 1993. Effect of handling and stocking density on haematocrit, plasma cortisol and survival in wild and hatchery-reared Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquaculture*, 112, 291-299.
- McCallum, M. J. and Barrett, J., 1995. Purification and properties of glutathione reductase from the cestode *Moniezia expansa*. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 27, 393-401.
- Misra, I. and Griffith, O.W., 1998. Expression and purification of human γ -glutamylcysteine synthetase. *Prot. Expr. Purific.* 13, 268-276.
- Mughal, A.L., Iqbal, M.J. and Shakoori, A.R., 1993. Toxicity of short term exposure of sublethal doses of a synthetic pyrethroid, fenvalerate, on the Chinese grass carp, *Ctenopharyngodon idella*. *Proc. Sem. Aqua. Dev. Pak.*, 49-74.
- Mullineaux, P., Enard, C., Hellens, R. and Creissen, G., 1996. Characterization of glutathione reductase gene and its genetic locus from pea (*Pisum sativum L.*). *Planta*, 200, 186-194.
- Mutluay, H. ve Demirak, A., 1996. Su kimyası, Beta basım yayım dağıtım A.Ş., s:83-84, İstanbul.
- Müller F. *Chemistry & Biochemistry of Flavoenzymes*; Williams C.H., Ed.; CRC Press: Boca Raton, Florida, 1992; 121-211.
- Nordhoff A., Bücherler U.S., Werner D. And Schirmer R.H., 1993. Folding of the four domains and dimerization are impaired by the Gly446--Glu exchange in human glutathione reductase. Implications for the design of antiparasitic drugs. *Biochemistry* 32, 4060-4066.
- Noris, D.O., Camp, J.M., Maldonado, T.A. and Woodling, J.D., 2000. Some aspects of hepatic function in feral Brown trout, *Salmo trutta*, living in metal contaminated water. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 127, 71-78.
- Patel, M. P., Marcinkeviciene, J. and Blanchard, J. S., 1998. *Enterococcus faecalis* glutathione reductase: Purification, characterization and expression under normal and hyperbaric O₂ conditions. *FEMS Microbiology Letters*, 166, 155-163.
- Pickering, A.D. and Pottinger, T.G., 1987. Crowding causes prolonged leucopenia in salmonid fish, despite acclimation. *J. Fish Biol.*, 20, 229-244.
- Rendon, J. L., Calcagno, M., Mendoza-Hernandez, G. and Ondarza, R. N., 1986. Purification, properties and oligomeric structure of glutathione reductase from the cyanobacterium *spirulina maxima*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 248(1), 215-223.
- Richman, P.G. and Meister, A., 1975. Regulation of γ - glutamylcysteine synthetase by nonallosteric feed back inhibition by glutathione. *J. Biol. Chem.* 250, 1422-1426.

- Savvides S.N., Scheiwein M., Böhme C.C., Arteel G.E., Karplus P.A., Becker K. and Schirmer, R. H. (2002) Crystal structure of the antioxidant enzyme glutathione reductase inactivated by peroxynitrite. *J. Biol. Chem.* 277, 2779-2784.
- Segel I.H., 1968. Biochemmical calculations. Inc., New York, 403.
- Shakoori, A.R., Iqbal, M.J., Mughal, A.L. and Ali, S.S., 1994. Biochemical changes induced by inorganic mercury on the blood, liver and muscles of freshwater Chinese grass carp, *Ctenopharyngodon idella*. *J. Ecotoxicol. Environ. Monit.*, 4, 81-92.
- Shohet, S.B. and Beütler, E., 1986. Glutathione metabolism of the erythrocyte. *Williams Hematologie. The Erythrocyte, Part Four.*
- Siegel, R.L.K., Arscott, L.D., Janas, A.S., Schirmer, R.H. and Williams, C.H., 1998. Role of active site tyrsine residues in catalysis by human glutathione reductase. *Biochemistry.* 37, 13968-13977.
- Smith, I.K., Vierheller, T.L. and Thorne, A.C., 1988. Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoic acid). *Analitical Biochemisty*, 175, 408-413.
- Sohlberg, S., Czerwinska, K., Rasmusen, K. and Soli. N.e., 1990. Plasma concentration flumequine after intra-arterial and oral administration to rainbow trout (*Salmo gairdneri*) exposed to low water temperatures. *Aquaculture*, 84, 355-361.
- Tamura T., McMicken H.W. Smith C.V. and Hansen T.N. 1997. Gene structure for mouse glutathione reductase, including a functional mitochondrial targeting signal. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 237, 419-422
- Telefoncu, A., 1986. Temel ve Uygulamalı Enzimoloji, Ege Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi yayını (Der) 59, İzmir.
- Tutic M., Lu X. A., Schimer R. H. and Werner D. 1990. Cloning and sequencing of mamalian glutathione reductase cDNA. 188, 523-528.
- Ulus, G. 2003. Koyun Karaciğerinden Glutatyon Redüktaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Erzurum.
- Ulus G., Erat M., Çiftçi M., Şakiroğlu H., Bakan E., 2005. Purification and characterization of glutathione reductase from sheep liver. *Turk J. Vet. Anim. Sci.* 29, 1109-1117.
- Worhingyon, D. J. and Rosemeyer, M. A., 1976. Glutathione reductase from human erythrocytes. Molecular weight, subunit composition and aggregation properties. *EÜr. J. Biochem.*, 15, 60(2), 459-66.
- Zubay, G., 1988. *Biochemistry*, Second Edition, Macmillan Publishing Company.

ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Erzurum'un Hasankale ilçesinde doğdu. İlk öğrenimini Hasankale'de, orta ve lise öğrenimini Erzurum'da tamamladı. 2000 yılında Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümüne girdi ve 2004 yılında buradan mezun oldu. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimine başladı.