

**MİTOKONDRIAL GLUTAMAT DEHİDROGENAZ
ENZİMİNİN KOYUN KARACİĞERİNDEN
SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE ENZİM
AKTİVİTESİ ÜZERİNE BAZI METAL İYONLARININ
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Uğur GÜLLER

Doktora Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Bilim Dalı

Prof. Dr. Ömer İrfan KÜFREVİOĞLU

2014

Her hakkı saklıdır

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**MİTOKONDRIAL GLUTAMAT DEHİDROGENAZ ENZİMİNİN
KOYUN KARACİĞERİNDEN SAFLAŞTIRILMASI,
KARAKTERİZASYONU VE ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE BAZI
METAL İYONLARININ ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Uğur GÜLLER

**KİMYA ANABİLİM DALI
Biyokimya Bilim Dalı**

**ERZURUM
2014**

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

Mitokondrial Glutamat Dehidrogenaz Enziminin Koyun Karaciğerinden Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkilerinin İncelenmesi

Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU danışmanlığında, Uğur GÜLLER tarafından hazırlanan bu çalışma 29/08/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak **oybirliği/oy çokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU

İmza

:

Üye : Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ

İmza

:

Üye : Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR

İmza

:

Üye : Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

İmza

:

Üye : Doç. Dr. Murat ÇANKAYA

İmza

:

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 02 / 10 / 2014 tarih ve 39 / 1349 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. İhsan EFEOĞLU
Enstitü Müdürü

Bu çalışma BAP projeleri kapsamında desteklenmiştir.

Proje No: 2013/302

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Doktora Tezi

MITOKONDRIAL GLUTAMAT DEHİDROGENAZ ENZİMİNİN KOYUN KARACİĞERİNDEN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE BAZI METAL İYONLARININ ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Uğur GÜLLER

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ömer İrfan KÜFREYİOĞLU

Bu çalışmada koyun karaciğer mitokondrisinden glutamat dehidrogenaz (NAD(P)⁺-spesifik EC 1.4.1.3, GDH) enzimi 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi kullanılarak ilk kez tek basamakta saflaştırılmıştır. Enzim yaklaşık olarak 1320 EÜ/mg protein spesifik aktiviteyle, %9 verimle, 272 kat elde edilmiştir. Saflaştırılan enzimin stabil pH'sı 7,0; optimum pH'sı 7,5; optimum iyonik şiddeti 500 mM K-fosfat, optimum sıcaklığı 40°C, tabii molekül kütlesi jel filtrasyon kromatografisi ile 363 kDa ve alt birimlerinin molekül kütlesi 62 kDa olarak bulunmuş ve özdeş altı alt birimden oluştuğu tespit edilmiştir. Saflaştırılan enzimin substratlarının ve koenzimlerinin K_M sabiti ve V_{max} değerleri de belirlenmiştir. NADH, NADPH, α-ketoglutarat, NH₄⁺, NAD⁺, NADP⁺ ve L-glutamat için K_M sabitleri sırası ile 0,14; 1,67; 0,40; 12,92; 1,21; 0,24 ve 5,57 mM olarak, V_{max} değerleri 3,86; 3,08; 1,68; 1,32; 0,81; 0,27 ve 0,46 EÜ/ml olarak bulunmuştur. Saflaştırılan enzim üzerine bazı metal iyonlarının inhibisyon etkisi araştırılmış, Ag⁺; Zn²⁺; Cu²⁺; Co²⁺; Ni²⁺ ve Fe³⁺ iyonlarının enzimi inhibe ettiği görülmüştür. İnhibisyon etkisi gösteren metallerin IC₅₀ değerlerini belirlemek için %aktivite-[metal iyonu] grafiği ve inhibisyon türünü belirlemek ve K_i sabitini hesaplamak amacı ile Lineweaver-Burk grafikleri çizilmiş ve inhibisyon türü belirlenmiştir.

2014, 80 sayfa

Anahtar Kelimeler: Glutamat dehidrogenaz, koyun karaciğeri, mitokondri, metal iyonları, inhibisyon

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF MITOCHONDRIAL GLUTAMATE DEHYDROGENASE ENZYME FROM SHEEP LIVER, AND INVESTIGATION OF SOME METAL IONS' EFFECTS ON THE ENZYME ACTIVITY

Uğur GÜLLER

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry
Branch of Biochemistry

Supervisor: Prof. Dr. Ömer İrfan KÜFREYİOĞLU

In this study, glutamate dehydrogenase (NAD(P)⁺-specific EC 1.4.1.3, GDH) enzyme was purified from sheep liver for the first time by using 2',5'-ADP Sepharose 4B affinity chromatography in a single step. Enzyme was obtained with a specific activity of 1320 EU/mg protein, 272 fold and 9% yield. Optimal conditions for the enzyme were determined as optimal pH 7.5, optimal ionic strength 500 mM, optimal temperature 40°C, stable pH 7.0. Natural molecular weight and subunits' molecular weight for the enzyme were determined as 363 kDa from the gel filtration chromatography and 62 kDa from the SDS-PAGE. It was concluded that mitochondrial GDH was composed of six identical subunits. K_M constants and V_{max} values for NADH, NADPH, α -ketoglutarate, NH_4^+ , NAD^+ , $NADP^+$ and L-glutamate which were substrates and coenzymes of the enzyme were examined and K_M constants were calculated as 0.14; 1.67; 0.40; 12.92; 1.21; 0.24 and 5.57 mM, V_{max} values were calculated as 3.86; 3.08; 1.68; 1.32; 0.81; 0.27 and 0.46 EU/ml respectively. Also, the inhibition effects of some metal ions on the enzyme activity were investigated. Ag^+ ; Zn^{2+} ; Cu^{2+} ; Co^{2+} ; Ni^{2+} ve Fe^{3+} inhibited the enzyme and K_i constants and inhibition types of these ions were determined from the Lineweaver-Burk graphs.

2014, 80 pages

Keywords: Glutamate dehydrogenase, sheep liver, mitochondria, metal ions, inhibition

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışmanın deneysel kısmı Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Lisansüstü öğrenimim boyunca her türlü yardım ve desteği sağlayan, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım danışman hocam Atatürk Üniversitesi Rektör Yardımcısı ve Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı başkanı Sayın Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca lisansüstü öğrenimim boyunca kendilerinden çok destek gördüğüm Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden değerli hocalarım başta Sayın Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR olmak üzere, Sayın Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ'ye, Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR'e ve Sayın Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN'e ayrı ayrı teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Araştırma Laboratuvarı çalışma arkadaşım M. Serhat ÖZASLAN başta olarak tüm çalışma arkadaşlarıma ve Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünde çalışan tüm hocalarım ve arkadaşlarıma teşekkür ederim. Ayrıca eğitim hayatım boyunca katkılarını gördüğüm adını şimdi tek tek sayamadığım tüm hocalarıma üzerimdeki emeklerinden dolayı teşekkür ederim.

Çalışmalarımın her aşamasında maddi-manevi yardım ve desteklerinin yanı sıra göstermiş oldukları sabır ve anlayıştan dolayı aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca çalışmalarına katkılarının yanı sıra bana her konuda destek olması, verdiği çalışma azmi, göstermiş olduğu fedakarlık ve hayatımı kolaylaştırmasından dolayı nişanlım Kimya Bölümü öğretim elemanı Sayın Arş. Gör. Pınar TAŞER'e teşekkürü bir borç bilirim.

Uğur GÜLLER

Ağustos, 2014

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Enzimler	1
1.2. Amino Asit Yıkımı	8
1.3. Ağır Metaller ve Çevresel Etkileri	16
2. KAYNAK ÖZETLERİ	18
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	23
3.1. Materyal.....	23
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	23
3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar.....	25
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması	26
3.1.3.a Koyun karaciğer mitokondrial GDH enziminin aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler	26
3.1.3.b Koyun karaciğer mitokondrial GDH enziminin homojenatının hazırlanmasında kullanılan çözelti	27
3.1.3.c Koyun karaciğer mitokondrial GDH enziminin 2', 5' ADP-Sepharose 4B afinite kolonu ile saflaştırılırken kullanılan çözeltiler.....	27
3.1.3.d. Bradford yöntemiyle protein tayini için kullanılan çözelti	28
3.1.3.e. SDS-PAGE için kullanılan çözeltiler	28
3.1.3.f. Coomassie Brilliant Blue boyamada kullanılan çözeltiler	29
3.1.3.g. Gümüş boyamada kullanılan çözeltiler	29
3.1.3.h. Koyun karaciğer mitokondrial GDH enziminin tabii molekül kütlesi tayini için jel filtrasyon kromatografisinde kullanılan çözelti	30

3.1.3.i. Koyun karaciğer mitokondrial GDH enziminin inhibisyon çalışmalarında kullanılan metal çözeltilerinin hazırlanması	30
3.2. Yöntem	31
3.2.1. Koyun karaciğer mitokondrial glutamat dehidrogenaz enziminin aktivite ölçümü	31
3.2.2. Protein tayini	32
3.2.2.a. Kalitatif protein tayini	32
3.2.2.b. Kantitatif protein tayini	32
3.2.3. Koyun karaciğer mitokondrial GDH enziminin saflaştırılması	33
3.2.3.a. Homojenatın hazırlanması	33
3.2.3.b. 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonunun hazırlanması ve koyun karaciğer mitokondrial GDH enziminin saflaştırılması	34
3.2.4. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzim saflığının kontrolü.....	35
3.2.4.a. Coomessie Brilliant Blue ile boyama	36
3.2.4.b. Gümüş boyama.....	36
3.2.5. Koyun karaciğer mitokondrial GDH enziminin karakterizasyon çalışmaları ..	37
3.2.5.a. Koyun karaciğer mitokondrial GDH enziminin stabil pH'sının bulunmasına yönelik çalışmalar	37
3.2.5.b. Koyun karaciğer mitokondrial GDH enziminin optimum pH'sının bulunmasına yönelik çalışmalar	37
3.2.5.c. Koyun karaciğer mitokondrial GDH enzimi için optimum iyonik şiddetin belirlenmesine yönelik çalışmalar	38
3.2.5.d. Koyun karaciğer mitokondrial GDH enzimi için optimum sıcaklığın belirlenmesine yönelik çalışmalar	38
3.2.5.e. Koyun karaciğer mitokondrial GDH enziminin alt birimlerinin molekül kütlelerinin tayinine yönelik çalışmalar	38
3.2.5.f. Sephadex G-150 jel filtrasyon kromatografisi kolonunun hazırlanması ve koyun karaciğer mitokondrial GDH enziminin tabii molekül kütlelerinin tayini.....	39
3.2.5.g. Koyun karaciğer mitokondrial GDH enziminin substratları için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar	40

3.2.6. Koyun karaciğer mitokondrial GDH enzimi için bazı metal iyonlarının inhibisyon etkilerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar.....	41
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	42
4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik.....	42
4.2. Koyun Karaciğer Mitokondrial GDH Enziminin Saflaştırılması Sonuçları	43
4.2.1. Homojenatin hazırlanması.....	43
4.2.2. Afinite kromatografisi sonuçları	43
4.2.3. Koyun karaciğer glutamat dehidrogenaz (GDH) enziminin SDS-PAGE sonuçları	45
4.3. Koyun Karaciğer Mitokondrial GDH Enziminin Karakterizasyon Sonuçları ...	45
4.3.1. Koyun karaciğer mitokondrial GDH enziminin SDS-PAGE ile alt birimlerinin molekül kütlelerinin belirlenmesine yönelik sonuçlar	45
4.3.2. Koyun karaciğer mitokondrial GDH enziminin jel filtrasyon kromatografisi ile tabii molekül kütleleri tayinine yönelik sonuçlar	46
4.3.3. Koyun karaciğer mitokondrial GDH enzimi için optimum pH bulunmasına yönelik sonuçlar	48
4.3.4. Koyun karaciğer mitokondrial GDH enziminin optimum iyonik şiddetinin belirlenmesine yönelik sonuçlar	49
4.3.5. Koyun karaciğer mitokondrial GDH enzimi için optimum sıcaklık belirlenmesine yönelik sonuçlar	50
4.3.6. Koyun karaciğer mitokondrial GDH enzimi için stabil pH bulunmasına yönelik sonuçlar.....	51
4.3.7. Koyun karaciğer mitokondrial GDH enziminin substratları için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışmaların sonuçları.....	53
4.4. Koyun Karaciğer Mitokondrial GDH Enzimi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkilerinin Belirlenmesine Yönelik Çalışmaların Sonuçları	57
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	65
KAYNAKLAR	76
ÖZGEÇMİŞ	81

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ADP	Adenozin difosfat
ATP	Adenozin trifosfat
BSA	Sığır serum albümin
DNA	Deoksiribonükleik asit
E	Enzim
EC	Enzim komisyon numarası
EI	Enzim-İnhibitör kompleksi
ES	Enzim-Substrat kompleksi
ESI	Enzim-Substrat-İnhibitör kompleksi
EÜ	Enzim ünitesi
GDH	Glutamat dehidrogenaz
GDP	Guanozin difosfat
GTP	Guanozin trifosfat
I	İnhibitör
IC ₅₀	Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
K _i	Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti
K _M	Michealis-Menten sabiti
NAD ⁺	Nikotinamid adenin dinükleotit (yükseltgenmiş form)
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotit (indirgenmiş form)
NADP ⁺	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (yükseltgenmiş form)
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (indirgenmiş form)
nkat	Nanokatal
P	Ürün
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PER	Amonyum peroksidisülfat
RER	Granüllü endoplazmik retikulum
RNA	Ribonükleik asit
rpm	Devir/dakika
S	Substrat

SDS	Sodyum dodesil sülfat
TCA	Triklor asetik asit
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametilendiamin
Tris	Trihidroksimetil amino metan
V _{max}	Maksimum hız

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Lineweaver-Burk Grafiği.....	7
Şekil 1.2.	Memelilerde amino asitlerin yıkımına genel bakış	9
Şekil 1.3.	Üre döngüsü için NH_4^+ kaynaklarının özeti	13
Şekil 1.4.	Glutamat dehidrogenaz ile oksidatif deaminasyon	15
Şekil 4.1.	Bradford yöntemiyle proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan standart Grafik.....	42
Şekil 4.2.	GDH enziminin 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonu ile saflaştırılması sonucu elde edilen elüsyon grafiği	44
Şekil 4.3.	Koyun karaciğer GDH enziminin saflaştırma işlemleri sonucu elde edilen gümüş boyamalı SDS-poliakrilamid jel elektroforezi fotoğrafı	45
Şekil 4.4.	SDS-PAGE sonucu çizilen R_F - log M_K grafiği	46
Şekil 4.5.	Jel filtrasyon kolonundan alınan blue dekstran ve standart proteinlerin tüp sayısına karşılık 280 nm'deki absorbans değerleri....	47
Şekil 4.6.	Jel filtrasyon kolonundan alınan GDH enziminin aktivite-tüp sayısı grafiği	47
Şekil 4.7.	Jel filtrasyon kromatografisi sonucu çizilen K_{av} - log M_K grafiği	48
Şekil 4.8.	Koyun karaciğer GDH enzimi için yapılan optimum pH çalışmasının sonucunda çizilen pH-Aktivite grafiği	49
Şekil 4.9.	Değişik konsantrasyonlardaki KH_2PO_4 ve Tris/HCl tampon çözeltileri kullanılarak koyun karaciğer GDH enzimi için hazırlanan iyonik şiddet-aktivite grafiği	50
Şekil 4.10.	Koyun karaciğer GDH enziminin optimum sıcaklığı için sıcaklık-aktivite grafiği	51
Şekil 4.11.	Değişik pH'lardaki KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak koyun karaciğer GDH enzimi için elde edilen stabil pH grafiği.....	52
Şekil 4.12.	Değişik pH'lardaki Tris/HCl tampon çözeltisi kullanılarak koyun karaciğer GDH enzimi için elde edilen stabil pH grafiği	52

Şekil 4.13.	Koyun karaciğer GDH enziminin NAD^+ substratının 5 farklı konsantrasyonunda aktivite ölçülerek çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	53
Şekil 4.14.	Koyun karaciğer GDH enziminin NADP^+ substratının 5 farklı konsantrasyonunda aktivite ölçülerek çizilen Lineweaver-Burk grafiği	54
Şekil 4.15.	Koyun karaciğer GDH enziminin L-glutamat substratının 5 farklı konsantrasyonunda aktivite ölçülerek çizilen Lineweaver-Burk grafiği	54
Şekil 4.16.	Koyun karaciğer GDH enziminin NADH substratının 5 farklı konsantrasyonunda aktivite ölçülerek çizilen Lineweaver-Burk grafiği	55
Şekil 4.17.	Koyun karaciğer GDH enziminin NADPH substratının 5 farklı konsantrasyonunda aktivite ölçülerek çizilen Lineweaver-Burk grafiği	55
Şekil 4.18.	Koyun karaciğer GDH enziminin α -ketoglutarat substratının 5 farklı konsantrasyonunda aktivite ölçülerek çizilen Lineweaver-Burk grafiği	56
Şekil 4.19.	Koyun karaciğer GDH enziminin NH_4^+ substratının 5 farklı konsantrasyonunda aktivite ölçülerek çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	56
Şekil 4.20.	Ag^+ metal iyonunun koyun karaciğer mitokondrial GDH enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	58
Şekil 4.21.	Zn^{+2} metal iyonunun koyun karaciğer mitokondrial GDH enzim aktivitesi üzerine etkisi	58
Şekil 4.22.	Cu^{+2} metal iyonunun koyun karaciğer mitokondrial GDH enzim aktivitesi üzerine etkisi	59
Şekil 4.23.	Co^{+2} metal iyonunun koyun karaciğer mitokondrial GDH enzim aktivitesi üzerine etkisi	59
Şekil 4.24.	Ni^{+2} metal iyonunun koyun karaciğer mitokondrial GDH enzim aktivitesi üzerine etkisi	60

Şekil 4.25.	Fe^{+3} metal iyonunun koyun karaciğer mitokondrial GDH enzim aktivitesi üzerine etkisi	60
Şekil 4.26.	Koyun karaciğer mitokondrial GDH enzimi için Ag^{+} iyonunun inhibisyon türünü gösteren grafik	61
Şekil 4.27.	Koyun karaciğer mitokondrial GDH enzimi için Zn^{+2} iyonunun inhibisyon türünü gösteren grafik	61
Şekil 4.28.	Koyun karaciğer mitokondrial GDH enzimi için Cu^{+2} iyonunun inhibisyon türünü gösteren grafik	62
Şekil 4.29.	Koyun karaciğer mitokondrial GDH enzimi için Co^{+2} iyonunun inhibisyon türünü gösteren grafik	62
Şekil 4.30.	Koyun karaciğer mitokondrial GDH enzimi için Ni^{+2} iyonunun inhibisyon türünü gösteren grafik	63
Şekil 4.31.	Koyun karaciğer mitokondrial GDH enzimi için Fe^{+3} iyonunun inhibisyon türünü gösteren grafik	63

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1.	Çalışmada kullanılan kimyasallar	23
Çizelge 3.2.	Çalışmalar esnasında kullanılan alet ve cihazlar.....	25
Çizelge 3.3.	GDH'ın aminasyon ve deaminasyon aktivitesinin ölçümü	31
Çizelge 3.4.	Elüsyon işlemlerinde kullanılan çözelti miktarları.....	35
Çizelge 4.1.	GDH enziminin saflaştırma basamakları.....	44
Çizelge 4.2.	Karakterizasyon sonuçları	57
Çizelge 4.3.	Koyun karaciğer mitokondrial GDH enzimi için bulunan IC_{50} değerleri, K_i sabitleri ve inhibisyon türleri.....	64
Çizelge 5.1.	Koyun karaciğer mitokondrial GDH enzimi için bulunan karakterizasyon sonuçları, IC_{50} değerleri, K_i sabitleri ve inhibisyon türleri	74

1. GİRİŞ

1.1. Enzimler

Enzimler en dikkate değer ve oldukça özellikli proteinlerdir. Enzimler çoğu kez sentetik ve inorganik katalizörlerden çok daha önemli olağanüstü katalitik güce sahiptir. Substratları için yüksek özgülüğe sahiptirler, kimyasal tepkimeleri yüksek derecede hızlandırırlar ve pH ve sıcaklığın optimum olduğu koşullarda sıvı çözeltilerde işlev görürler. Biyolojik olmayan katalizörlerin çok azı bu özelliklerin hepsine sahiptir. Enzimler düzenli tepkime dizilerindeki aktiviteleriyle besin moleküllerinin parçalandığı tepkime basamaklarının yüzlercesini katalizlerler, böylece kimyasal enerjiyi korur, dönüştürür ve basit moleküllerden biyolojik makromoleküller üretirler (Nelson and Cox 2005).

Bazı enzimler, enzimatik reaksiyon için gerekli olan, protein olmayan kofaktörlerle birleşirler. Sıklıkla karşılaşılan kofaktörler arasında Zn^{+2} ve Fe^{+2} gibi metal iyonları ve koenzim olarak B12 vitamini gibi vitaminler ya da genellikle vitamin türevi olan organik moleküller yer alır. Örneğin NAD^{+} koenzimi niyasin, FAD^{+} koenzimi riboflavin içerir. Holoenzim, enzimle birlikte koenzimi, apoenzim ise holoenzimin protein kısmını ifade eder. Uygun kofaktör yoksa apoenzim biyolojik aktivite göstermez. Prostetik grup ise enzimden ayrılmayan enzimin yapısına sıkı bağlı bir koenzimdir. Örneğin; karboksilaz enziminin üç boyutlu yapısına bağlı biyotin gibi. Enzimlerin üzerine etki ettikleri ve ürüne dönüştürdükleri bileşiklere substrat denir. Enzimler genelde belirli bir substratla etkileşirler, sadece tek tip kimyasal reaksiyonu katalizlerler ve bu yönleriyle oldukça spesifiktirler. Birçok enzim hücre içinde farklı kısımlarda eksprese olmaktadır. Böylece bir reaksiyonun substratı ve ürünü diğer reaksiyonlardan izole olur, reaksiyon için uygun ortam sağlanmış olur ve hücredeki binlerce enzim amaca uygun olarak organize edilmiş olur (Harvey *et al.* 2007).

Enzim moleküllerinde aktif bölge denilen özel bir cep ya da yuva bulunur. Aktif bölge substrata komplementer olan üç boyutlu bir yüzey oluşturan aminoasit yan zincirleri içerir. Aktif bölge substratı bağlayarak bir enzim-substrat (ES) kompleksi meydana getirir. ES, sonradan enzim ve ürüne parçalanan enzim-ürüne (EP) dönüşür (Harvey *et al.* 2007).

Enzimle katalizlenen reaksiyonların çoğu katalizlenmeyen reaksiyonlara göre 10^8 ila 10^{20} kere daha hızlı olarak oldukça etkindir. Tipik olarak, her enzim molekülü saniyede 100 ila 1000 substrat molekülünü ürüne çevirme yeteneğine sahiptir. Enzim başına düşen ürüne çevrilmiş substrat sayısına '**turnover sayısı**' denir (Harvey *et al.* 2007).

Bir kısım enzimler substrat adının sonuna '-az' son eki getirilerek adlandırılırken (örneğin üreaz) bazıları da ilk keşiflerinin ortaya attıkları isimlerle tanınır (örneğin tripsin). 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 (Nelson and Cox 2005; Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Enzimler katalizledikleri reaksiyon tiplerine ve mekanizmalarına göre şu şekilde sınıflandırılmıştır;

- 1. Oksidoredüktazlar:** İki substrat arasında redoks reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.
- 2. Transferazlar:** İki substrat arasında hidrojen dışındaki grupların transferini katalizleyen enzimlerdir.
- 3. Hidrolazlar:** Ester, eter, peptid, glikozid, anhidrid, C-halojenür veya P-N bağlarının bir su katılmasıyla hidrolizini katalizleyen enzimlerdir.
- 4. Liyazlar:** Hidrolizden farklı bir mekanizmayla substratlardan grupların uzaklaştırılıp çift bağların oluşturulduğu reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir.
- 5. İzomerazlar:** Geometrik, optik veya yapısal izomerlerin birbirine dönüşümünü katalizleyen enzimlerdir.

6. Ligazlar: ATP ve GTP gibi yüksek enerjili fosfat bileşiklerinden fosfat bağının kopması sonucu ortaya çıkan enerji yardımıyla iki molekülün bağlanması reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Enzim aktivitesi düzenlenebilir, yani enzimler ürün oluşum hızı ve hücrenin ihtiyacını karşılayacak şekilde aktive veya inhibe edilebilirler (Harvey *et al.* 2007). 1913 yılında Leonor Michaelis ve Maud Menten, enzimli reaksiyonların ilk basamağında bir ES oluşmasından ve enzimlerin doygunluk özelliğinden yola çıkarak, bir model geliştirdiler (Keha ve Küfrevioğlu 2009). Bu modelde, enzim substratıyla geri dönüşümlü olarak bağlanarak sonradan enzimi serbest olarak bırakarak ürüne yıkılan bir ES kompleksi meydana getirir. Bir substrat molekülünü kapsayan model aşağıda gösterilmiştir.



E: Enzim

S: Substrat

ES: Enzim-Substrat kompleksi

P: Ürün

k_1, k_2, k_3 : hız sabitleri

Michaelis-Menten denklemi reaksiyon hızının substrat konsantrasyonu ile nasıl değiştiğini göstermektedir.

$$V_0 = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

V_0 = ilk hız

$V_{\max}$ = maksimum hız

K_M = Michaelis-Menten sabiti= $(k_2+k_3)/k_1$

$[S]$ = substrat konsantrasyonu

Michaelis-Menten hız denklemi kurulurken aşağıdaki varsayımlar kabul edilmiştir:

i. E ve S'in göreceli konsantrasyonları: Sustrat konsantrasyonu [S], enzim konsantrasyonundan [E], çok daha fazladır, böylece herhangi bir zamanda enzim tarafından bağlanan substrat miktarı küçüktür.

ii. Denge durumu varsayımı: [ES] zamanla değişmez (denge-denge varsayımı), yani ES oluşum hızı, ES yıkım hızına (E+S ve E+P) eşittir. Genel bir kural olarak, bir reaksiyon serisindeki bir ara ürünün sentez hızı, yıkım hızına eşitse bu ara ürünün denge durumunda olduğu söylenir.

iii. İlk hız: Enzim reaksiyonu analizlerinde sadece ilk hızlar kullanılır, yani reaksiyonun hızı enzim ve substrat karıştırılır karıştırılmaz ölçülür. Bu esnada ürün konsantrasyonu küçüktür ve bu yüzden P'den S'ye geri dönen reaksiyon hızı ihmal edilebilir (Nelson and Cox 2005).

Enzimlerin K_M değerleri çok farklılık gösterir. Birçok enzim için bu değer 10^{-1} ile 10^{-6} M arasındadır. K_M değeri enzim konsantrasyonuna bağlı değildir. Substratın yapısı, pH, sıcaklık ve iyonik şiddetle değişebilir. Birden fazla substrata sahip enzimlerde, her substrat için ayrı bir K_M değeri vardır.

K_M değerinin iki anlamı vardır. Birincisi; K_M enzimin aktif bölgelerinin yarısının dolduğu substrat konsantrasyonudur. İkincisi; K_M değerinin



denklemleriyle gösterilen katalizleme mekanizması basamaklarının hız sabitleriyle ilişkisi vardır. $K_M = (k_2 + k_3)/k_1$ 'e eşittir.

$k_2 \gg k_3$ olduğu zaman K_M , ES'nin ayrışma sabitine eşittir. Bu durumda K_M , ES kompleksinin bir sağlamlık ölçüsüdür. Yüksek K_M zayıf bağlanmayı, düşük bir K_M kuvvetli bağlanmayı ifade eder.

V_{max} enzimin katalitik aktivitesinin bir ifadesidir. V_{max} teriminin birimi, ürüne çevrilen substratın mol sayısı/birim zaman'dır. Enzimlerin V_{max} değerleri de birbirlerinden çok farklıdır. Aynı zamanda substratların yapısı, pH, sıcaklık ve iyonik şiddetle de değişirler.

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**” denir. İnhibitörler genellikle küçük molekül kütlesine sahip bileşik veya iyonlardır. Enzimatik aktiviteyi kontrol eden en küçük moleküller biyolojik sistemler üzerinde büyük ölçüde kontrol sağladıkları için önemlidirler. 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, bunlar;

- Yarışmalı (kompetitif) inhibisyon
- Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyon
- 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. 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. Bu durum bağlanmanın enzimin aynı bölgesine olmadığını gösterir. Enzimin $V_{\max}$ değeri azalırken, K_M sabit kalır. Substrat ve inhibitör, farklı bölgelere bağlanabildiğinden enzimin iki çeşit inaktif kompleksi meydana gelir.

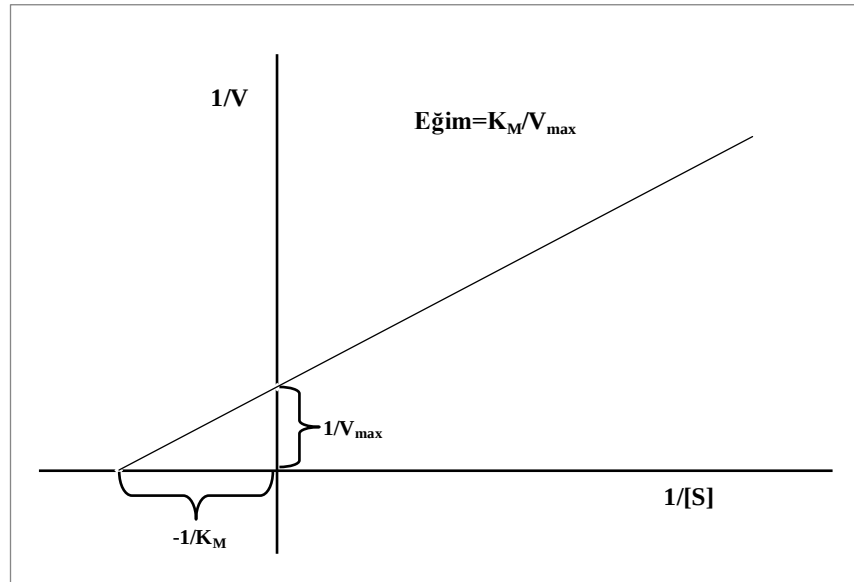
Bir başka dönüşümlü inhibisyon tipi de yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyondur. Bu inhibisyon çeşidinde inhibitör serbest enzime bağlanamaz. Sadece enzim-substrat (ES) kompleksine bağlanır. Tek substratlı sistemlerde yarı yarışmalı inhibisyona nadir rastlanır. Daha çok birden fazla substratlı enzimler 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. Allosterik enzimlerin kinetiği Michaelis–Menten kinetiğinden farklılık gösterir.

İnhibisyon çeşidinin ve K_i sabitinin belirlenmesi için en çok kullanılan yöntem, Lineweaver–Burk grafikleridir (Şekil 1.1). Bu yöntemde $1/V-1/[S]$ grafikleri sabit inhibitör ve en az beş farklı substrat konsantrasyonunda çizilir. Kesim noktalarında değerlendirmeler yapılır (Keha ve Küfrevioğlu 2009).



Şekil 1.1. Lineweaver-Burk Grafiği (Keha ve Küfrevioğlu 2009)

Yarışmalı inhibisyonunda yapı itibariyle inhibitör substrata benzemekte ve enzimin aktif bölgesine bağlanarak substratın enzime bağlanmasını önlemektedir. Fakat enzime dönüşümlü bağlanan inhibitörün substrat konsantrasyonu artırıldığı durumlarda inhibitörlerin inhibisyon etkisi ortadan kaldırılabilir. Başka bir söylemle enzimin V_{max} değeri değişmezken K_M değerinde artış gözlenir (Segel 1975; Telefoncu 1986; Keha ve Küfrevioğlu 2009). Yarışmasız inhibisyonunda ise inhibitör ile substrat arasında enzimin aktif bölgesine bağlanma hususunda bir yarış söz konusu değildir. Çünkü inhibitör enzimin farklı bir bölgesine bağlanmaktadır. Enzimin V_{max} değeri azalırken K_M değeri

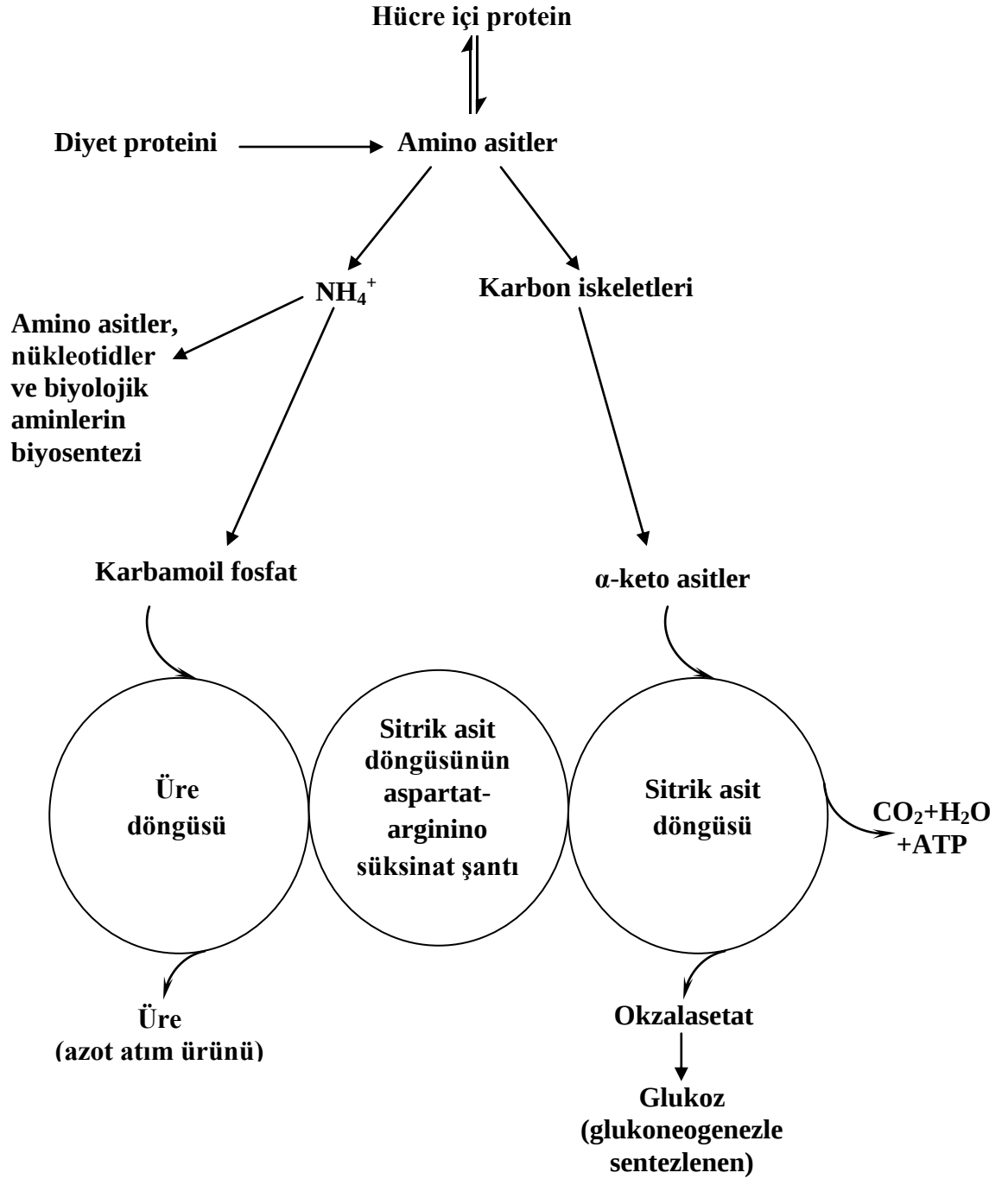
sabit kalır. Substrat ve inhibitör enzimin farklı bölgelerine bağlanabilmesi ile enzimin EI ve ESI olarak iki farklı inaktif kompleksi meydana gelir (Telefoncu 1986; Keha ve Küfrelioğlu 2009). Grafik denkleminde yarışmalı inhibisyon için $K_M^I = K_M / (1 + [I]/K_i)$ ifadesinden, yarışmasız ve yarı yarışmalı inhibisyon için $V_{max}^I = V_{max} / (1 + [I]/K_i)$ formülünden yararlanılarak K_i değerleri belirlenebilir.

1.2. Amino Asit Yıkımı

Diyet proteininden türeyen amino asitler amino gruplarının çoğunun kaynağıdır. Amino asitlerin çoğu karaciğerde metabolize edilir. Bu işlemle oluşan amonyağın bir kısmı geri dönüştürülür ve çeşitli biyosentetik yollarda kullanılır; fazlası organizmaya bağlı olarak ya doğrudan atılır ya da atım için üre veya ürik aside çevrilir. Diğer dokularda (ekstrahepatik) oluşan fazla amonyak atılacağı forma çevrilmek için karaciğere gelir (Nelson and Cox 2005).

α -Amino grubunun varlığı amino asitleri oksidatif yıkımdan korur. α -Amino grubunun uzaklaştırılması amino asitten enerji sağlanması için gereklidir ve tüm amino asitlerin katabolizmasında zorunlu bir basamaktır. Bir kez uzaklaştırıldığında, bu amino grupları başka bileşiklerin yapısına girer veya atılır (Harvey *et al.* 2007).

Karbohidrat ve yağ asidi yıkımında olduğu gibi, amino asit yıkım işlevleri, çoğu amino asidin karbon iskeletlerinin sitrik asit döngüsüne katılmasıyla merkezi yıkım yollarında birbirine benzerdir. Amino asit yıkım yolu tepkimelerinin bazıları yağ asitlerinin yıkım basamaklarıyla yakın benzerlik gösterir. Ancak, her amino asit bir amino grubu içerir ve bu nedenle amino asit yıkımı için metabolik yollar α -amino grubunun karbon iskeletten ayrıldığı ve amino grubu metabolizmasının yollarına bağlandığı bir anahtar basamak kapsar (Şekil 1.2). Bu basamak ile amino asit yıkımının diğer metabolik yıkım işlemlerinden ayrıldığı önemli bir özellik bu noktada tanımlanabilir (Nelson and Cox 2005).



Şekil 1.2. Memelilerde amino asitlerin yıkımına genel bakış (Nelson and Cox 2005)

Transaminasyon amino asitlerden azotun uzaklaştırılması için kullanılan başlıca yoldur. Çoğu kez azot bir amino asitten amino grubu olarak α -ketoglutarata aktarılabilir ve böylece glutamat oluşurken diğer yandan orijinal amino asit kendi α -keto asidine dönüşür. Örneğin aspartat amino asidi transamine olduğunda kendi α -keto asidi olan

okzalasetat oluşur. Bu tepkimede amino grubu α -ketoglutarata aktarılarak kendi eşlenik amino asidi olan glutamat amino asidine dönüştürülür. Bu tepkimeleri katalizleyen enzimler transaminaz ya da aminotransferazlardır. Bu tepkimelerin çoğu için α -ketoglutarat ve glutamat, α -keto asit-amino asit çiftlerinden biri olarak görev yapar. Transaminasyon tepkimelerinin kofaktörü piridoksal fosfattır. Genel olarak transaminasyon tepkimelerinde bir amino asitten bir amino grubu ikinci bir amino asidin amino grubu haline gelir. Bu tepkimeler, kolayca geri dönüşümlü olduğu için amino asitlerden azotun uzaklaştırılması ya da α -keto asitlere azot aktarımı ile amino asit oluşturulmasında kullanılabilir. Bu yüzden transaminasyon reaksiyonları hem amino asit yıkımı hem de amino asit sentezinde yer alabilir (Marks *et al.* 2007).

Karaciğere ulaştıktan sonra çoğu L-amino asitlerin katabolizmasının ilk basamağı aminotransferazlar veya transaminazlarla α -amino gruplarının uzaklaştırılmasıdır. α -amino asit deamine olurken α -ketoglutarat aminlendiğinden bu net bir deaminasyon değildir. Transaminasyon tepkimelerinin etkinliği birçok farklı amino asidin amino gruplarının L-glutamat yapısında toplamaktır. Glutamat sonra biyosentetik yollara veya azot atım ürünlerinin eliminasyonunu sağlayan atım yollarına, bir amino grubu vericisi olarak işlev görür (Nelson and Cox 2005).

Glutamat, amino asit metabolizmasında temel rol oynamasının yanında amino asitlerin hem yıkımına hem de sentezine katılır ve amino asit sentezi için azot sağlar. Bu işlem glutamat azotunu ya diğer amino asitlerin transaminasyonu ile ya da GDH tepkimesiyle oluşan NH_4^+ 'dan sağlar. Transaminasyon tepkimeleri daha sonra amino gruplarını glutamattan α -ketoasitlere aktararak kendi eşlenik amino asitlerin üretilmesini sağlar. Amino asitler yıkıldığı ve üre olduğu zaman, glutamat transaminasyon tepkimeleri ile diğer amino asitlerden azotu toplar. Bu azotun bir kısmı glutamat dehidrogenaz (GDH) tepkimesi ile amonyak olarak salınır, amonyanın diğer kısmı Şekil. 1.2'de gösterilen diğer kaynaklar tarafından üretilir. NH_4^+ üre döngüsüne giren iki tip azot kaynağından biridir. Üre sentezi için azotun ikinci formu aspartat tarafından sağlanır. Glutamat azot kaynağı olabilir. Glutamatın amino gruplarını okzalasetata aktarılmasıyla aspartat ve α -ketoglutarat oluşur (Marks *et al.* 2007).

Biyomoleküllerin son grubu olan amino asitler oksidatif yıkımlarıyla metabolik enerjinin oluşumuna önemli katkıda bulunurlar. Doku proteini veya diyet proteininden gelen amino asitlerden alınan metabolik enerji fraksiyonu, organizmanın tipine ve metabolik durumlara göre büyük değişim gösterir. Etoburlar (bir yemeği takiben hemen) enerji gereksinimlerinin %90'ını amino asit oksidasyonundan sağlayabilirken, otoburlar enerji gereksinimlerinin sadece az bir kısmını bu yolla giderebilir. Çoğu mikroorganizmalar çevrelerindeki amino asitleri yakalayabilir ve bunları metabolik durumlarının gereksinimlerine göre yakıt olarak kullanabilirler. Bununla birlikte, bitkiler amino asitleri enerji sağlamak için nadiren oksitlerler; fotosentezle CO₂ ve H₂O'dan üretilen karbohidrat, enerji kaynağı olarak özellikle kullanılır. Bitki dokularındaki amino asit derişimi büyüme destekleme gereksinimine göre, proteinlerin, nükleik asitlerin ve diğer moleküllerin biyosentezi için gereksinimleri tam karşılayacak şekilde dikkatlice düzenlenir. Bitkilerde amino asit katabolizması olur, fakat amacı diğer biyosentez yollarına metabolit sağlamaktır (Nelson and Cox 2005).

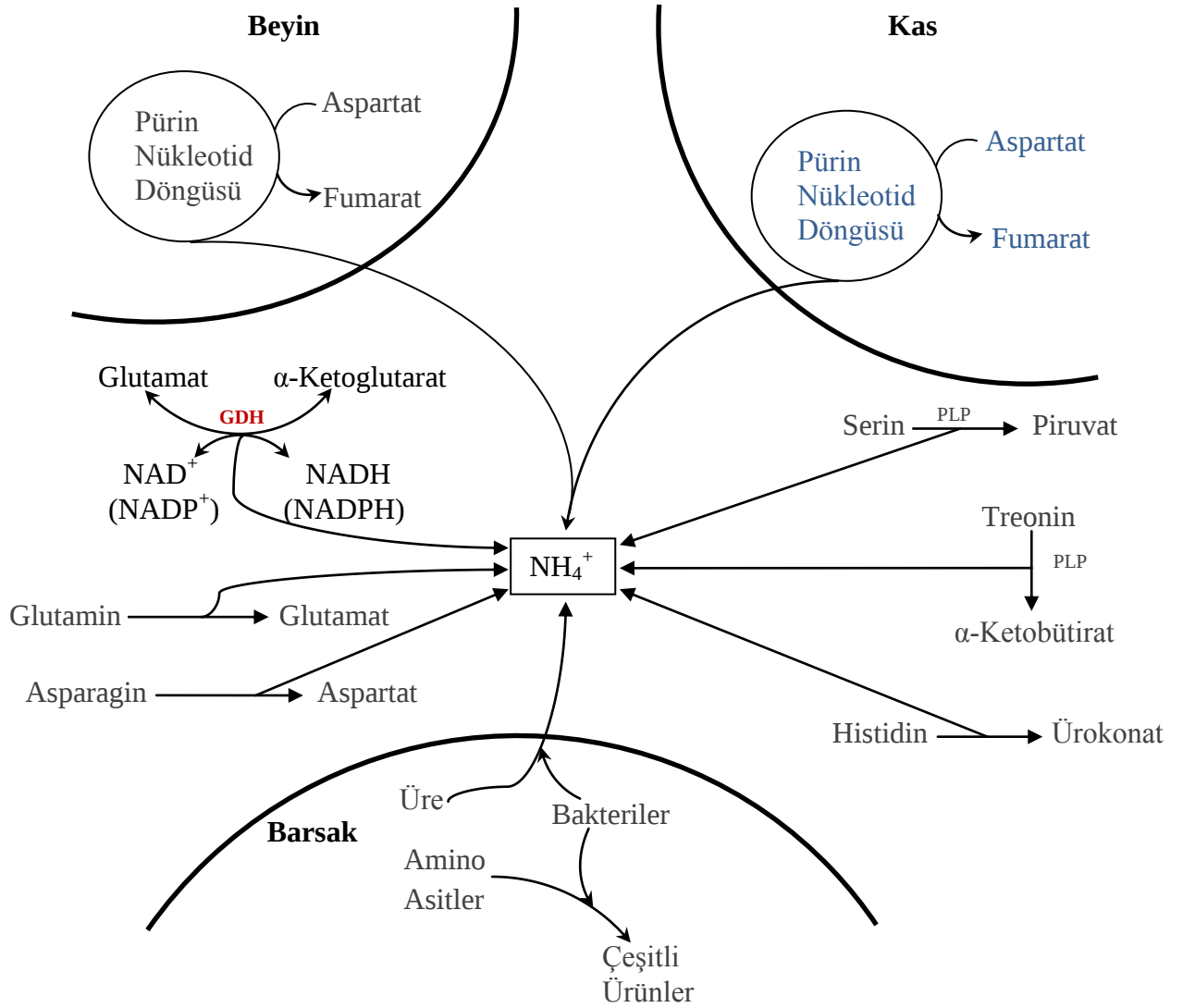
Hayvanlarda, amino asitler üç farklı metabolik durumla oksidatif yıkıma uğrar.

1. Hücre proteinlerinin normal yıkımı sırasında açığa çıkan bazı amino asitler eğer yeni protein sentezi için gereksinim yoksa, oksidatif parçalanmaya uğrar.
2. Bir diyet, proteince zenginse ve yenen amino asitler vücudun protein sentezi gereksinimini aşıyorsa, fazlası yıkılır; amino asitler depolanamaz.
3. Karbohidratların ya hiç olmadığı veya uygun yararlanılmadığı, açlıkta veya şeker hastalığında yakıt olarak hücresel proteinler kullanılır.

Tüm bu metabolik durumlarda amino asitler amino gruplarını kaybederek, amino asitlerin “karbon iskeletleri” α -keto asitleri oluşturur. α -Keto asitler oksidasyona uğrayarak CO₂ ve H₂O'ya dönüşür veya sıklıkla daha önemli olan, glukoneogenezle beyin, iskelet kası ve diğer dokuların yakıtı olan glukozaya çevrilebilen üç ve dört karbonlu birimleri sağlar (Nelson and Cox 2005).

Glutamat, glutamat dehidrogenaz (GDH) tarafından katalizlenen tepkime ile oksidatif olarak deamine edilerek α -ketoglutarat ve amonyak oluşur. GDH, NAD^+ veya NADP^+ 'yi kofaktör olarak kullanabilir. Birçok hücrenin mitokondrisinde olan bu tepkime geri dönüşümlüdür; bu tepkimede ya amonyak α -ketoglutarat ile birleşir, ya da glutamattan amonyak salınır. Glutamat diğer amino asitlerin azotunu transaminasyon tepkimelerinin sonucunda toplar ve daha sonra GDH tepkimesi ile amonyağı salar. Bu işlem üre döngüsüne giren amonyak kaynaklarından birini sağlar (Şekil 1.3) (Marks *et al.* 2007).

Amino gruplarının transfer edildiği transaminasyon reaksiyonlarına zıt olarak GDH ile oksidatif deaminasyon amino gruplarının serbest amonyak olarak salınmasıyla sonuçlanır. GDH reaksiyonları özellikle karaciğer ve böbrekte meydana gelir. Ayrıca GDH enerji metabolizmasının ana yollarına katılan α -keto asiti ve üre sentezinde azot kaynağı olan amonyağı sağlar (Marks *et al.* 2007).



Şekil 1.3. Üre döngüsü için NH_4^+ kaynaklarının özeti (Marks *et al.* 2007)

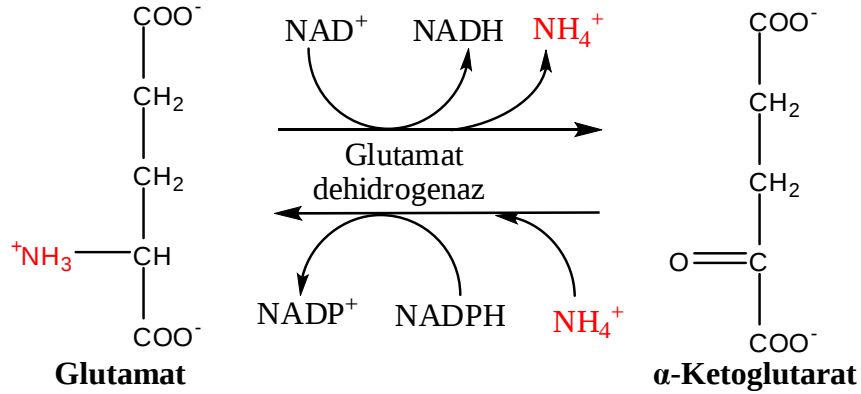
Glutamat ve glutamin özellikle azot metabolizmasında kritik rol oynar. Hepatositlerin sitozolünde, çoğu amino asitlerin amino grupları glutamat oluşturmak için α -ketoglutarata transfer edilir. Glutamat sonra amino grubunun NH_4^+ oluşturmak için uzaklaştırıldığı mitokondri içine taşınır. Diğer çoğu dokuda oluşan fazla amonyak glutaminin amid azotuna çevrilir, karaciğere geçerek karaciğer mitokondrisine girer. Dokuların çoğunda glutamin veya glutamat ya da her ikisi diğer amino asitlerden daha yüksek derişimde bulunur (Nelson and Cox 2005).

Birçok α -amino asidin amino grupları, L-glutamatın amino grubu şeklinde karaciğerde biriktirilir. Amino gruplarını, atıma hazırlamak için, glutamattan uzaklaştırmak gereklidir. Bunun için glutamat hepatositlerde, sitozolden mitokondri içine taşınır, orada L-glutamat dehidrogenaz tarafından katalizlenen oksidatif deaminasyon geçirir. Memelilerde bu enzim mitokondri matriksinde bulunur ve indirgen ekivalanların alıcısı olarak NAD^+ veya NADP^+ kullanabilir. Aminotransferaz ve glutamat dehidrogenazın kombine işlevi transdeaminasyon olarak tanımlanır. Birkaç amino asit transdeaminasyon yolunu atlar ve doğrudan oksidatif deaminasyona uğrar. Glutamat deaminasyonundan oluşan α -ketoglutarat sitrik asit döngüsünde ve glukoz sentezinde kullanılabilir (Nelson and Cox 2005).

GDH karbon ve azot metabolizmasının önemli bir kesişme noktasında görev yapar. Memelilerde altı özdeş alt birim içeren bu allosterik enzimin aktivitesi allosterik modölatörlerin karmaşık düzeniyle etkilenir. Bunlardan en iyi çalışanlar pozitif modölatör ADP ve negatif modölatör GTP'dir. Böylece hücrede enerji düzeyleri düşük olduğunda glutamat dehidrogenaz ile amino asit yıkımı artar, bu da amino asitlerden elde edilen karbon iskeletlerinden enerji elde edilmesine yardımcı olur. Bu regölatör modelin metabolik mantığı ayrıntılarıyla açıkça anlaşılamamıştır. Mutasyonlar GTP için allosterik bağlanma yerini değiştirir veya başka bir deyişle glutamat dehidrogenazın sürekli aktivasyonuna neden olarak, hiperinsülinizm-hiperamonemi sendromu olarak adlandırılan bir insan genetik hastalığına neden olur. Bu durum kan akımı içinde yüksek düzeyde amonyak ve buna eşlik eden hipoglisemi ile tanımlanır (Nelson and Cox 2005; Harvey *et al.* 2007).

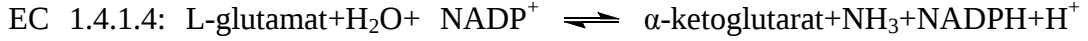
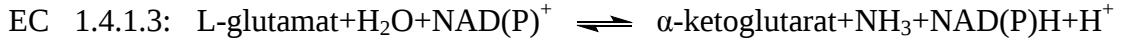
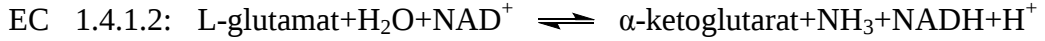
GDH koenzim olarak hem NAD^+ hem de NADP^+ kullanabilir. NAD^+ temel olarak oksidatif deaminasyonda (amonyak kaybının karbon iskeletin oksidasyonu ile kenetlenmesi) kullanılırken NADP^+ indirgeyici aminasyonda (amonyak kazancının karbon iskeletin indirgenmesi ile kenetlenmesi) kullanılır (Şekil 1.4). Reaksiyonların yönü, glutamat, α -ketoglutarat ve amonyağın göreceli konsantrasyonlarına ve okside/indirgenmiş koenzim oranına bağlıdır. Örneğin, protein içeren bir yemekten sonra karaciğer glutamat düzeyi yükselir ve reaksiyon amino asit yıkımı, amonyak

oluşumu yönünde ilerler. Reaksiyon aynı zamanda ilişkili α -keto asitlerden amino asit sentezi için de kullanılır.



Şekil 1.4. Glutamat dehidrogenaz ile oksidatif deaminasyon

GDH pek çok omurgalı hayvanların organlarında (karaciğer, beyin, lökosit vs.) bulunur. Omurgalı hücrelerinde enzim temelde mitokondri matriksinde bulunur ve amonyak ve glutamat seviyelerinin kontrolünde önemli bir rolü vardır. GDH ürotelik organizmaların karaciğerinde meydana gelen üre döngüsünde amino gruplarının beslenmesinde ve ammonotelik organizmalar tarafından atılan amonyağın üretiminde önemli rolü vardır. GDH beyinde de hayati bir rol oynar; çünkü glutamat önemli bir nörotransmitterdir ve glutamat üretiminin ve bozulmasının iyi bir biçimde düzenlenmesi zaruridir (Fonnum 1984; Plaitakis *et al.* 1984). GDH üç gruba ayrılır; NAD^+ 'ya spesifik olanlar, NADP^+ 'ya spesifik olanlar ve kofaktör olarak her ikisini de kullanabilenler (çift koenzim spesifik GDH'lar). Genellikle amonyağın asimilasyonunda görevli olan GDH NADP^+ bağımlıdır (Britton *et al.* 1992; Hudson and Daniel 1993). Glutamat katabolizmasında görev alan ise NAD^+ bağımlıdır. Omurgalılarda çift koenzim spesifik GDH'lar NAD^+ ve NADP^+ için benzer afinite sergilerler. Tuna balığı ve bir çeşit köpekbalığı türünden saflaştırılan GDH'ların NAD^+ 'yı tercih ettiği görülmüştür (Corman *et al.* 1966; Veronese *et al.* 1976; Ciardiello *et al.* 1997).



Yapılan çalışmalar GDH'nin nörolojik dejeneratif bozukluğu olan hastalarda fibroblast ve lökositlerde azaldığını gösterir (Duvoisin *et al.* 1983). Hiperinsülinizm/hiperamoni sendromu olan hastalarda GDH geninin 11. ve 12. ekzonunda mutasyonlar tespit edilmiştir. Bu mutasyon GTP bağlanma bölgesi olan amino asit sekansına denk gelir (Stanley *et al.* 1998; Allen *et al.* 2004; Choi *et al.* 2008).

1.3. Ağır Metaller ve Çevresel Etkileri

İnsanlar çok eski zamanlardan bu yana metalleri işleyip kullanmaktadırlar. Bu faaliyetler sonucunda metaller doğal çevirimleri dışında değişik formlarda doğaya yayılmaya başlamışlardır. Sanayi devrimi ile birlikte ağır metal içeren kömürlerin yakılmaya başlanması, endüstri bölgelerindeki ağır metal kirliliğini aşırı boyutlara ulaştırmıştır. Ağır metal kirliliğinden kaynaklanan ilk tanımlanan zehirlenmeler Japonya'da ortaya çıkmıştır (Kahvecioğlu vd 2003). Ağır metal tanımı fiziksel özellik açısından yoğunluğu 5 g/cm³'ten daha yüksek olan metaller için kullanılır. Bu ağır metaller kurşun, kadmiyum, krom, demir, kobalt, bakır, civa ve çinko da dahil olmak üzere 60 tan fazladır (Kahvecioğlu vd 2003).

Ağır metaller biyolojik proseslere katılma derecelerine göre yaşamsal ve yaşamsal olmayan olarak ikiye ayrılır. Yaşamsal olarak tanımlananların organizma yapısında belirli bir konsantrasyonda bulunmaları gereklidir ve bu metaller biyolojik reaksiyonlara katıldıklarından dolayı düzenli olarak besinler yoluyla alınmaları elzemdir. Örneğin bakır hayvanlarda ve insanlarda kırmızı kan hücrelerinin ve birçok oksidasyon ve redüksiyon prosesinin vazgeçilmez parçasıdır. Fakat yaşamsal olmayan ağır metaller ise çok düşük konsantrasyonda bile fizyolojik yapıyı etkileyerek çok ciddi sağlık

problemlerine yol açabilmektedirler. Bu gruba en iyi örnek kükürtlü enzimlere bağlanan civadır (Bigersson *et al.* 1988).

Böyle bir genelleme yapılsa da ağır metaller canlı bünyelerde yalnızca konsantrasyonlarına bağlı olarak etki göstermezler. Çünkü etki canlı türüne ve metal iyonunun yapısına da bağlıdır (çözünürlük değeri, kimyasal yapısı, redoks ve kompleks oluşturma yeteneği, vücuda alınış şekline, çevrede bulunma sıklığına, lokal pH değeri v.b.) (Özaslan 2014).

Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde ağır metallerin üretiminin ve gereksinimin sürekli artış göstermesi, bunların çevreye yayılma ve bulaşma olasılığını arttırmaktadır. Bir element gerek maden cevheri halindeyken gerekse işlenirken doğaya karışabilmektedir. Ayrıca, tarımda yüksek üretim için gübre kullanımının artması yukarıdaki olasılığı daha da artırmaktadır. Son hesaplamalara göre günümüze kadar yaklaşık 20, 240, 250, ve 310 milyon ton Cd, Pb, Zn ve Cu çıkarılmış ve biyosfere bırakılmıştır. Cd, Pb, Cu ve Zn antropojenik kaynaklarının ise sırası ile 73000, 400000, 56000 ve 214000 ton civarında olduğu hesaplanmıştır (Öztürk vd 1992). Genel olarak antropojenik kaynaklardan ağır metal girişi, doğal kaynaklardan olan girişin birkaç kat üzerindedir. Bu durum, insan etkenliklerinin tüm dünyadaki ağır metallerin döngülerini arttırdığını göstermektedir. Japonya’da İtai-itai ve Minamata hastalıklarının ortaya çıkmasıyla ağır metaller ilgi odağı haline gelmiş bu konuda yapılan çalışmalar son yıllarda artış göstermiştir. Günümüzde çevreye verilen toksik maddeler doğanın dengesini bozacak düzeye ulaşmıştır. Antropojenik işlevlerin yoğun olduğu kentsel alanlardan ve çeşitli endüstri kuruluşlarından çevreye yayılan toksik maddeler su, hava ve toprak kirliliğinin başlıca nedenlerindendir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

GDH'lar birçok kaynaktan izole edilmiş, sekans analizi yapılmış ve iki oligomerik sınıfa ayrılmıştır. Bunlar bakteriyel ve fungal NADP^+ bağlı ve omurgalı çift koenzim spesifik GDH'lardır. Her biri 48 kDa (bakteriyel) (McPherson *et al.* 1983) ve 55 kDa (omurgalı) (Smith *et al.* 1975) molekül ağırlıklı altı alt birime sahiptir. Halbuki NAD^+ bağlı enzimler ya 48 kDa (Rice *et al.* 1985) civarında altı alt birim ya da 115 kDa (Veronese *et al.* 1974) civarında dört alt birime sahiptir. Pek çok kaynaktan saflaştırılan GDH'ların sekansları karşılaştırıldığı zaman koenzim spesifiklikleri ne olursa olsun heksamerik enzimler yapısal olarak benzer özellik göstermiştir (Lilley *et al.* 1991; Beker *et al.* 1992; Britton *et al.* 1992).

Kim *et al.* (2002) kolza tohumundan yaptıkları çalışmada GDH'ı amonyum sülfat çöktürmesi, DE-52 selüloz kolon kromatografisi, DEAE-Toyopearl kolon kromatografisi ve Fenil-Toyopearl kolon kromatografisi kullanarak %35 verimle 190 EÜ/mg protein spesifik aktiviteyle saflaştırmışlardır. GDH'ın özde 52 kDa molekül kütlelerinde altı alt birimden oluştuğu ve doğal halinin yaklaşık 300 kDa molekül kütlelerine sahip olduğu, optimum pH'nın 8,0 ve stabil pH'nın 5,5 olduğunu da tespit etmişlerdir. Ayrıca GDH'ın NADP^+ 'ya spesifik olduğu ve Ag^+ 'nın bu enzimin kuvvetli bir inhibitörü olduğu tespit edilmiştir.

El-Shora and Abo-Kassem (2001) yaptıkları çalışmada kabak bitkisinin ilk çıkan yaprağından GDH enzimini %31,2 verim, 136 kat ve 31,4 EÜ/mg protein spesifik aktiviteyle saflaştırmışlardır. K_M sabiti ise α -ketoglutarat için 3,3 mM, NH_4^+ için ise 33,3 mM olarak bulunmuştur.

McCarthy *et al.* (1980) GDH enzimini öküz beyninden homojenatın hazırlanması, amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-selüloz iyon değişim kromatografisi ve GTP-Sepharose afinite kromatografisi olmak üzere dört basamakta saflaştırmıştır. Enzimi 40 EÜ/mg protein spesifik aktiviteyle 1300 kat ve %22 saflıkta elde etmişlerdir. Enzimin

saflığı SDS-PAGE ile kontrol edilmiş ve alt birimlerinin molekül kütlesi 55 ± 5 kDa olarak bulunmuştur (McCarthy *et al.* 1980)

Yapılan bir çalışmada GDH enzimi bir siyanobakteri olan *Synechocystis* PCC 6803'den homojenatın hazırlanması, DE-52 iyon değişim kromatografisi ve 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi teknikleri olmak üzere üç basamak kullanılarak 28,5 EÜ/mg protein spesifik aktiviteyle 3353 kat %101 verimle saflaştırılmıştır. Tetramer olan enzimin tabii molekül kütlesi Sephacryl S-300 jel filtrasyon kromatografisi ile 208 ± 5 kDa, alt birimlerinin molekül kütlesi ise SDS-PAGE ile 46 kDa olarak bulunmuştur. Yapılan literatür taramasında Ca^{+2} iyonlarının enzimin aktivitesini artırdığı görülmüş bu nedenle farklı konsantrasyonlarda CaCl_2 varlığında enzimin hem aminasyon hem de deaminasyon aktiviteleri ölçülmüştür. Glutamat oluşumunun 20 mM CaCl_2 varlığında %25 arttığı, deaminasyon aktivitesinin ise %108 arttığı gözlenmiştir. Aminasyon aktivitesi için optimum pH 7,5-8,0 arasında bulunmuştur. Bu pH'da NADP^+ , α -ketoglutarat ve amonyum için K_M sabitleri sırasıyla 20 μM , 1,5 mM ve 3,7 mM olarak bulunmuştur (Florencio *et al.* 1987).

Synechocystis PCC 6803 üzerinde yapılan başka bir çalışmada NAD^+ -spesifik GDH saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Bu enzim aynı soyda bulunan ve farklı genle kodlanan NADP^+ -spesifik GDH'dan farklıdır. NAD^+ -spesifik GDH enzimi homojenatın hazırlanması, amonyum sülfat çöktürmesi, DE-52 selüloz anyon değişim kromatografisi, iki kez ard arda yapılan kırmızı agaroz kolon kromatografisi ve Sephacryl S-300 jel filtrasyon kromatografisinden oluşan altı basamakta saflaştırılmıştır. Enzim 5,9 EÜ/mg protein spesifik aktiviteyle 424 kat ve %10 verimle elde edilmiştir. Enzimin SDS-PAGE ile saflığı kontrol edilmiş, tek bant bulunmuş ayrıca alt biriminin molekül kütlesi 48,5 kDa olarak bulunmuştur. Jel filtrasyon kromatografisi ile tabii molekül kütlesi 295 ± 5 kDa olarak bulunduğundan enzimin altı eş alt birimden oluştuğu kanaatine varılmıştır. NADH yerine NADPH kullanıldığında reaksiyonun 42 kat daha yavaş gerçekleştiği görülmüştür. Tersine olan reaksiyonda ise NAD^+ yerine NADP^+ kullanıldığında reaksiyonun 45 kat daha yavaş gerçekleştiği görülmüştür. Optimum pH 8,5-9,0 olarak bulunmuş ve bu pH'da α -ketoglutarat, amonyum, glutamat,

NAD⁺ ve NADH için K_M sabitleri sırasıyla 1,8 mM; 4,5 mM; 16,1 mM; 190 µM ve 50 µM olarak bulunmuştur (Chavez and Candau 1991).

Ciardiello *et al.* (1997) yaptıkları çalışmada GDH enzimini güney kutup balığı eritrositlerinden saflaştırmış ve karakterize etmişlerdir. Hekzamer olan enzimin alt birimlerinin molekül kütesini 57,9 kDa olarak bulmuşlardır (Ciardiello *et al.* 1997).

Yapılan başka bir çalışmada GDH enzimi bataklık yosunundan homojenatın hazırlanması, amonyum sülfat çöktürmesi, fenil Sepharose, Süperdeks 200, Q Sepharose ve Süperdeks 200 kolon kromatografileri olmak üzere altı basamakta saflaştırılmıştır. Enzim 681 nkat/mg protein spesifik aktiviteyle 2003 kat, %7,5 verimle elde edilmiştir. Aminasyon aktivitesi için optimum pH 7,7; deaminasyon reaksiyonu için optimum pH 8,6 olarak bulunmuştur. NADPH-bağımlı GDH enziminin substratlarına olan ilgisini gösteren K_M sabitleri NADPH, α-ketoglutarat ve NH₄Cl için sırasıyla $1,1 \times 10^{-4}$ M; $6,3 \times 10^{-3}$ M ve $4,1 \times 10^{-2}$ M olarak bulunmuştur. NADH-bağımlı GDH'nin K_M sabitleri NADH, α-ketoglutarat ve NH₄Cl için sırasıyla $8,3 \times 10^{-6}$ M; $0,7 \times 10^{-3}$ M ve $2,8 \times 10^{-2}$ M olarak tespit edilmiştir. NAD⁺ bağımlı GDH enziminin glutamat için K_M sabiti $2,1 \times 10^{-3}$ M, NAD⁺ için $1,4 \times 10^{-4}$ M olarak bulunmuştur. NADP⁺ bağımlı GDH enziminin glutamat ve NADP⁺ için K_M sabitleri tespit edilememiştir. NADH'nin K_M sabitinin NADPH'nin K_M sabitinden 13 kat daha düşük olduğu görülmüştür. Glutamat konsantrasyonu 25 mM'ın üzerine çıktığında enzimin inhibe olduğu belirtilmiştir. Birbirine eş dört alt birimden oluşan enzimin tabii molekül kütlesi 210 kDa, alt birimlerinin molekül kütlesi ise 52 kDa olarak bulunmuştur (Heeschen *et al.* 1996).

Küçük, renkli bir mantar türü olan *Laccoria bicolor*'dan NADH bağımlı GDH enzimi homojenatın hazırlanması, amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-Trisacryl ve Sephacryl S-300 kolon kromatografilerinden oluşan dört basamakta saflaştırılmıştır. NADH-bağımlı enzim 2420 nkat/mg protein spesifik aktiviteyle 410 kat, %40 verimle elde edilmiştir. Saflaştırılan enzimin substratları olan amonyum, α-ketoglutarat, glutamat, NADH ve NAD⁺ K_M sabitleri sırasıyla 37 mM; 1,35 mM; 0,24 mM; 0,089 mM ve 0,282 mM olarak bulunmuştur. Enzimin aminasyon reaksiyonu için k_{cat} değeri 68244;

deaminasyon reaksiyonu için ise 13372 mol/dk olarak hesaplanmıştır. Enzimin optimum pH değeri aminasyon reaksiyonu için 7,4 deaminasyon reaksiyonu için ise 8,8 olarak belirlenmiştir. *L.bicolor* GDH enziminin tabii molekül kütlesi 470 kDa, alt birimlerinin molekül kütlesi ise 116 kDa olarak bulunmuştur (Garnier *et al.* 1997).

Lee *et al.* (1999) yaptığı çalışmada GDH enzimini sıçan karaciğeri granüllü endoplazmik retikulumdan (RER) ve mitokondriden saflaştırmıştır. RER’de GDH enzimini subselüler fraksiyonlama, 0,6 M NaCl ile yıkama ve DEAE-Sephrose, ATP-agaroz ve Resource Q kromatografilerinden oluşan beş basamakta 29,7 EÜ/mg protein spesifik aktiviteyle 606 kat saflaştırılmıştır. RER-GDH enziminin substratlarının K_M değerleri hesaplanmış, glutamat için NAD^+ kullanıldığında $5,93 \pm 0,24$ mM; $NADP^+$ kullanıldığında ise $23,8 \pm 1,7$ mM olarak bulunmuştur. NAD^+ ve $NADP^+$ için K_M sabitleri sırasıyla $0,924 \pm 0,035$ mM ve $0,441 \pm 0,012$ mM olarak tespit edilmiştir. Aynı çalışmayı mitokondriyal GDH için yaptıklarında glutamat için NAD^+ kullanıldığında $4,61 \pm 0,32$ mM; $NADP^+$ kullanıldığında ise $20,7 \pm 2,6$ mM olarak bulunmuştur. NAD^+ ve $NADP^+$ için K_M sabitleri sırasıyla $0,364 \pm 0,026$ mM ve $0,637 \pm 0,025$ mM olarak tespit edilmiştir (Lee *et al.* 1999).

Yapılan bir başka çalışmada iki GDH izoenzimi GDH1 ve GDH7 *Brassica nopus* yapraklarında saflaştırılmıştır. İzoenzimleri homojenatın hazırlanması, amonyum sülfat çöktürmesi ve birbirini izleyen dört kromatografik basamaklardan saflaştırmışlardır. Daha sonra ise iki izoenzimi birbirinden doğal PAGE ile ayırmışlardır. GDH1 ve GDH7’nin tabii molekül ağırlıkları 239 kDa olarak; GDH1’in alt birimlerinin molekül kütlesi 41,4 kDa, GDH7’nin alt birimlerinin molekül kütlesi ise 42,4 kDa olarak hesaplanmıştır. Her iki izoenzimde altı özdeş alt birimden oluşmaktadır. Her iki enzim için de aminasyon ve deaminasyon aktivitelerinin optimum pH’ları sırasıyla 9,0 ve 9,5 olarak bulunmuştur. GDH1 izoenziminin amonyum, α -ketoglutarat, glutamat, NADH ve NAD^+ için K_M sabitleri sırasıyla 6,62 mM; 0,87 mM; 3,23 mM; 0,024 mM ve 0,116 mM’dır. GDH7 izoenziminin ise amonyum, α -ketoglutarat, glutamat, NADH ve NAD^+ için K_M sabitleri sırasıyla 9,3 mM; 0,64 mM; 3,32 mM; 0,021 mM ve 0,15 mM olarak bulunmuştur (Watanabe *et al.* 1999).

Burbaeva *et al.* (2002) yaptıkları çalışmada insan beyninden GDH'ı amonyum sülfat çöktürmesi, Fenil-sepharose kolon kromatografisi, DEAE-Sephasel iyon değişim kromatografisi ve GTP-Agaroz afinite kromatografisi kullanılarak 4 basamakta 4275 EÜ/mg protein spesifik aktivite ile 193 kat saflaştırmışlardır. Bu çalışmada 58 ± 1 kDa'luk özdeş alt birimlerden oluşan GDH I, 56 ± 1 kDa'luk özdeş alt birimler oluşan GDH II ve 56 ± 1 kDa'luk özdeş alt birimler oluşan GDH III izoenzimleri insan beyninden saflaştırılmış ve GDH III için kinetik parametreler belirlenmiştir. GDH III izoenziminin K_M değerleri α -ketoglutarat için $1,51 \pm 0,12$ mM; NADH için $0,11 \pm 0,02$ mM; amonyum için $24,47 \pm 2,2$ mM; L-glutamat için $3,03 \pm 0,2$ mM; NAD^+ için $0,63 \pm 0,03$ mM ve $NADP^+$ için $0,72 \pm 0,05$ mM olarak belirlenmiştir (Burbaeva *et al.* 2002).

Choudhry and Punekar (2007) yaptığı bir çalışmada bir mantar türü olan *Aspergilli* GDH ve sığır karaciğer GDH enzimleri üzerine 2-metilenglutarat, izofoalat ve 2,4-piridindikarboksilat moleküllerinin inhibisyon etkisini incelemiştir. Sığır karaciğeri NAD^+ bağımlı GDH'ın izofoalat için K_i sabiti 475 μ M, $NADP^+$ bağımlı GDH'ın izofoalat için K_i sabiti 3100 μ M olarak bulunmuştur. Benzer şekilde 2-metilenglutarat ve 2,4-piridindikarboksilat molekülleri için K_i sabitleri sırasıyla 5,8 μ M; 67 μ M; 866 μ M ve 6000 μ M olarak tespit edilmiştir. Moleküllerin tamamının sığır GDH enzimini yarışmalı olarak inhibe ettiği bulunmuştur (Choudhry and Punekar 2007).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasallar

2', 5' ADP-Sepharose 4B	Pharmacia
Akrilamid	Sigma
Amonyum persülfat	Sigma
Amonyum sülfat	E.Merc AG
Asetik asit	E.Merc AG
Brom timol mavisi	Sigma
Coomassie Brilliant Blue G-250	Sigma
Coomassie Brilliant Blue R-250	Sigma
Etanol	Sigma
Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA)	Fluka
Gliserol	Sigma
Glisin	E.Merc AG
Glutaraldehit	Sigma
Hidroklorik Asit	E.Merc AG
İzopropanol	E.Merc AG
L-Glutamat	Sigma
Metanol	E.Merc AG
Molekül kütlesi tayini standartları (jel filtrasyon için)	Sigma
N,N'- metilen bisakrilamid	Sigma
N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin (TEMED)	Sigma
Potasyum fosfat	Riedel de Haen

Çizelge 3.1 (devam)

Potasyum fosfat	E.Merc AG
Protein marker	BioRad 0375
Protein marker V	peqGOLD/peqlab
Sephadex G-150	Sigma
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	E.Merc AG
Sodyum fosfat	E.Merc AG
Sodyum hidroksit	Riedel de Haen
Sodyum klorür	E.Merc AG
Trihidroksimetil amino metan (Tris)	Sigma
Triklor asetik asit (TCA)	Riedel de Haen
α -ketoglutarat	Sigma
β -merkapto etanol	Fluka
β -merkapto etanol	E.Merc AG
β -NAD ⁺	Sigma
β -NADH	Sigma
NADPH	Sigma
NADP ⁺	Sigma

Çalışmamızda kullanılan diğer kimyasallar Sigma Chemical Comp.’den veya E. Merc AG’den temin edilmiştir.

3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar

Çizelge 3.2. Çalışmalar esnasında kullanılan alet ve cihazlar

Soğutmalı satrifüj	: Hermle Z 323 K (Germany)
Spektrofotometre	: Beckman Coulter
pH metre	: Thermo Scientific Orion Star A211
Elektroforez	: BIO RAD (dikey)
Peristaltik pompa	: Ismatec
Karıştırıcı (Shaker)	: GFL 3025
Karıştırıcı (Vorteks)	: Fisons whirlimixer
Hassas terazi	: Gec avery
Afinite kolonu	: Kapalı sistem oluşturucu ve soğutmalı (1x10), sigma (ABD)
Otomatik pipet	: Eppendorf
Çalkalayıcı	: Midi Dual 14
Magnetik karıştırıcı	: Chiltern Hotplate Magnetic Stirrer HSBI
Saf su cihazı	: Barnstead Easy Pure UV/UF
Su banyosu	: Nüve
Kar makinesi	: Scotsman AF-20
Güç kaynağı	: 1-Bio Rad Power Pac 3000 2-Apparatus Corporation EC 135
Buzdolapları	: Siemens Derindondurucu
(-20°C'ye kadar)	: Sanyo Madical Freezer
(-85°C'ye kadar)	: Sanyo Ultra Low

3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

3.1.3.a Koyun karaciğer mitokondrial GDH enziminin aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler

1. 500 mM K-fosfat, 20 mM EDTA çözeltisi (pH=7,4): 6,8 g KH_2PO_4 ve 0,744 g EDTA tartılarak 80 ml saf suda çözüldü, pH=7,4'e ayarlandı ve toplam hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.
2. 500 mM amonyum sülfat çözeltisi: 6,6 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ tartılarak 80 g saf suda çözüldü ve son hacmi 100 ml olacak şekilde saf su ile ayarlandı.
3. 1,5 mM NADPH çözeltisi: 0,0125 g NADPH tartılarak 10 ml saf suda çözüldü.
4. 1,5 mM NADH çözeltisi: 0,0111 g NADH tartılarak 10 ml saf suda çözüldü.
5. 10 mM α -Ketoglutarat çözeltisi: 0,0365 g α -Ketoglutarat tartılarak 25 ml saf suda çözüldü.
6. 1,5 mM NADP^+ çözeltisi: 0,0115 g NADP^+ tartılarak 10 ml saf suda çözüldü.
7. 1,5 mM NAD^+ çözeltisi: 0,0103 g NAD^+ tartılarak 10 ml saf suda çözüldü.
8. 400 mM L-glutamat çözeltisi: 0,6764 g L-glutamat tartılarak 10 ml saf suda çözüldü.

3.1.3.b Koyun karaciğerinden mitokondrial homojenatının hazırlanmasında kullanılan çözelti

50 mM K-fosfat, 1 mM EDTA ve 1 mM DTT çözeltisi (pH=7,0): 6,8045 g KH_2PO_4 , 0,372 g EDTA ve 0,154 g DTT tartılarak yaklaşık 900 ml saf suda çözöldü. pH metre kullanılarak 1 M NaOH ile pH=7,0'ye ayarlandıktan sonra toplam hacim saf su ile 1 L'ye tamamlandı.

3.1.3.c Koyun karaciğer mitokondrial GDH enziminin 2', 5' ADP-Sepharose 4B afinite kolonu ile saflaştırılmasında kullanılan çözeltiler

1. 50 mM KH_2PO_4 /1 mM EDTA, 1mM DTT, pH:7,0 (Kolonun paketlenmesi, dengelenmesi, yıkanması ve elüsyonda kullanılan maddelerin çözümlmesi için kullanılan çözelti): 3,4 g KH_2PO_4 , 0,146 g EDTA ve 0,077 g DTT alınarak 450 ml saf suda çözüldü. pH: 7,0'a ayarlandıktan sonra toplam hacim saf su ile 500 ml'ye tamamlandı.

2. 10 mM NADH çözeltisi (Afinite jeline tutunmuş olan GDH enziminin elüsyonu için kullanılan çözelti): 0,0742 g NADH tartılarak 10 ml saf suda çözüldü.

3. 2 mM KCl (Afinite jeline tutunmuş olan GDH enziminin elüsyonu için kullanılan çözelti): 0,00745 g KCl tartılarak 50 ml saf suda çözüldü.

4. Rejenere 1 çözeltisi (0,1 M Na-asetat/0,5 M NaCl (pH:4,5) afinite kolonunun rejenerasyonu için kullanılan 1. tampon çözelti): 4,1 g Na-asetat ve 14,61 g NaCl alınıp 400 ml saf suda çözüldü. pH metre kullanılarak pH 4,5'e ayarlandı ve toplam hacim saf su ile 500 ml'ye tamamlandı.

5. Rejenere 2 çözeltisi (0,1 M Tris/HCl /0,5 M NaCl (pH:8,5) afinite kolonunun rejenerasyonu için kullanılan 2. tampon çözelti): 6,05 g Tris ve 14,61 g NaCl alınıp 400

ml saf suda çözüldü. pH metre kullanılarak pH 8,5'e ayarlandı ve toplam hacim saf su ile 500 ml'ye tamamlandı.

3.1.3.d. Bradford yöntemiyle protein tayini için kullanılan çözelti

Coommassie Brilliant Blue çözeltisi: 100 mg Coommassie Brilliant Blue G-250 reaktifi 50 ml %95'lik etanolde çözüldü. Çözeltiye %95'lik 100 ml fosforik asit ilave edildi. Çözeltinin hacmi saf su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti karanlık ortamda muhafaza edildi.

3.1.3.e. SDS-PAGE için kullanılan çözeltiler

1. 1 M Tris-HCl (pH:8,8): 12,11 g Tris alınarak 80 ml suda çözülüp pH 8,8'e ayarlandıktan sonra toplam hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.
2. 1 M Tris-HCl (pH:6,8): 12,11 g Tris alınarak 80 ml suda çözüldü pH 6,8'e ayarlandıktan sonra toplam hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.
3. %30 Akrilamid-%0,8 Bisakrilamid çözeltisi: 15 g akrilamid ve 0,4 g bisakrilamid, 34,6 ml saf su içerisinde çözüldü.
4. %10'luk SDS çözeltisi: 1 g sodyum dodesil sülfat 9 ml saf su içerisinde çözüldü.
5. %10'luk amonyum persülfat çözeltisi: 1 g PER alınarak, 9 ml saf suda çözüldü.
6. Yürütme tamponu: 1,51 g Tris ve 7,51 g glisin tartılarak 450 ml suda çözüldü. %10'luk SDS'den 5 ml ilave edilerek pH 8,3'e ayarlanıp son hacim saf su ile 500 ml'ye tamamlandı.

7. Numune tamponu: 1 M Tris-HCl (pH 6,8)'den 0,65 ml, %10'luk SDS'den 1 ml %100'lük gliserinden 1 ml ve %0,1'lik bromtimol mavisinden 1 ml alınarak saf su ile hacim 10 ml'ye tamamlandı. Bu tampona kullanılmadan önce 950 µl numuneye karşılık 50 µl β-merkaptoetanol ilave edildi.

3.1.3.f. Coomassie Brilliant Blue boyamada kullanılan çözeltiler

1. Sabitleştirme çözeltisi: %50 izopropanol, %40 su ve %10 TCA içeren bir karışım hazırlamak amacıyla 50 ml izopropanol, 40 ml saf su ve 10 g TCA birbiriyle karıştırıldı.

2. Jel boyama çözeltisi: 50 ml metanol, 40 ml su ve 10 ml asetik asit içerisinde 0,1 g Coomassie Brilliant Blue R-250 reaktifi çözülerek hazırlandı.

3. Jel yıkama çözeltisi: 50 ml metanol, 40 ml su ve 10 ml asetik asit karıştırılarak hazırlandı.

4. % 0,1'lik bromtimol mavisi çözeltisi: 0,1 gram indikatör 0,01 M 16 ml NaOH içerisinde çözülerek toplam hacmi saf suyla 100 ml ye tamamlandı.

3.1.3.g. Gümüş boyamada kullanılan çözeltiler

1. Tespit çözeltisi: 60 ml saf su, 30 ml %96'lık etanol, 10 ml asetik asit karıştırılarak hazırlandı.

2. Redüksiyon çözeltisi: 4,8 g sodyum asetat 80 ml saf su da çözüldü, üzerine 45 ml etanol eklendi ve pH=6'ya asetik asit ile ayarlandıktan sonra 150 mg sodyum tiyosülfat, 3 ml glutaraldehit eklenerek toplam hacim saf su ile 150 ml'ye tamamlandı.

3. Boyama çözeltisi: 150 mg gümüş nitrat 150 ml saf suda çözöldü ve üzerine 30 µl formaldehit eklendi.
4. Yıkama 1 çözeltisi: 3,75 g sodyum karbonat 270 ml saf suda çözöldü ve üzerine 120 µl formaldehit eklendi.
5. Yıkama 2 çözeltisi: 1 ml gliserin ve %5'i asetik asit olan 250 ml saf suda çözöldü.

3.1.3.h. Koyun karaciğer mitokondrial GDH enziminin tabii molekül kütlesi tayini için jel filtrasyon kromatografisinde kullanılan çözelti

50 mM Tris-HCl, 100 mM KCl (pH 7,5) (kolonun paketlenmesi, dengelenmesi ve standartların çözölməsi için kullanılan tampon): 6,055 g Tris, 7,45 g KCl alınarak 950 ml saf suda çözöldü. pH 7,5'e ayarlandıktan sonra toplam hacim saf su ile 1 L'ye tamamlandı.

3.1.3.i. Koyun karaciğer mitokondrial GDH enziminin inhibisyon çalışmalarında kullanılan metal çözeltilerinin hazırlanması

İnhibisyon çalışmalarında kullanılan metal çözeltileri kullanılacak metalin klorür tuzu 0,1 M konsantrasyonda saf su kullanılarak hazırlandı ve kullanım durumuna göre seyreltildi.

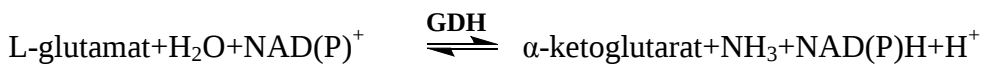
3.2. Yöntem

3.2.1. Koyun karaciğer mitokondrial glutamat dehidrogenaz enziminin aktivite ölçümü

GDH aktivitesi McCarthy ve arkadaşlarının uyguladığı prosedür modifiye edilerek spektrofotometrik olarak ölçüldü (McCarthy *et al.* 1980). 1 ml'lik reaksiyon ortamında kullanılacak olan aktivite ölçüm çözeltileri son konsantrasyonları Çizelge 3.3'de verildiği gibi hazırlandı. Kör olarak enzim numunesi yerine ortama %0,004'lük sığır serum albümin ilave edilmiştir.

Çizelge 3.3. GDH'nin aminasyon ve deaminasyon aktivitesinin ölçümü

Aminasyon reaksiyonunda	Deaminasyon reaksiyonunda
50 mM K-fosfat pH:7,4	50 mM K-fosfat pH:7,4
2 mM EDTA	2 mM EDTA
50 mM (NH ₄) ₂ SO ₄	40 mM L-Glutamat
1 mM α-ketoglutarat	0,15 mM NAD(P) ⁺
0,15 mM NAD(P)H	-



Reaksiyon NAD(P)H veya NAD(P)⁺ çözeltilerinin ilavesiyle başlar ve 60-180 sn oda sıcaklığında 340 nm'de deaminasyon reaksiyonunda absorbens artışı veya aminasyon reaksiyonunda absorbens azalışı spektrofotometre ile 1 cm ışık yoluna sahip küvet kullanılarak takip edilmiştir.

Bir enzim ünitesi standart deney koşulları altında 1 µmol substratı 1 dakikada ürüne dönüştüren enzim miktarı olarak aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$E\ddot{U}/ml = \frac{\Delta OD}{6,22} \times \frac{V_T}{V_E} \times S_F$$

Bu formülde yer alan simgeler aşağıda açıklandı:

$E\ddot{U}/ml$: 1 ml'deki enzim ünitesi

ΔOD : Bir dakikadaki absorbens değişimi

6,22: 1 mM NADPH'ın oluşturduğu absorbens değeri

V_T : Ölçümün yapıldığı toplam hacim

V_E : Ölçümün yapıldığı küvete ilave edilen enzim numunesinin hacmi

S_F : Seyreltme faktörü (seyreltilen örnek için kullanıldı)

3.2.2. Protein tayini

3.2.2.a. Kalitatif protein tayini

Kalitatif protein tayini, 280 nm'de proteinlerin yapısında bulunan triptofan, tirozin ve fenilalanin amino asitlerinin maksimum absorbens göstermesi esasına dayanır (Segel 1968). Jel filtrasyon kromatografisinde standartların kolondan geçirilmesi işlemlerinden sonra eşit hacimlerde alınan Blue Dekstran ve proteinlerin bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı. Fraksiyonlar kuvarz küvetlere alınarak, absorbensları spektrofotometrede köre karşı okundu.

3.2.2.b. Kantitatif protein tayini

Hazırlanan homojenat ve kromatografik yöntemlerle saflaştırılmış enzim için kantitatif 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 gerçekleştirilmiştir: 1 ml'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır serum 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 4,9 ml Coomassie brilliant blue G-250 çözeltisi ilave edilerek vorteks ile karıştırıldı. 10 dakika inkübe edildikten sonra 595 nm'de 3 ml'lik cam küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak, 0,1 ml enzim numunesinin içinde bulunduğu tampondan ve 4,9 ml Coomassie brilliant blue G-250 çözeltisinden oluşan karışım kullanıldı. Elde edilen sonuçlardan absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri standart grafik haline getirildi (Şekil 4.1). Saflaştırmanın her aşamasında ortamdaki protein miktarını belirlemek için enzim numuneleri seyreltme yapılarak 100 µl alınarak üzerlerine 4,9'ar 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 hesaplandı.

3.2.3. Koyun karaciğer mitokondrial GDH enziminin saflaştırılması

3.2.3.a. Homojenatın hazırlanması

Dokular Erzurum Özbeyli Et Kombinasından taze olarak elde edildi, küçük parçalara ayrılarak kullanılabilecek kadar -80°C'de saklandı. Homojenat yaklaşık 20 g dokudan hazırlandı. Doku önce 1 mM EDTA içeren %1,5'lik soğuk KCl çözeltisi ile yıkandı. Bundan sonraki bütün çalışmalar 0-4°C arasında gerçekleştirildi. Bir süzgeç kağıdı üzerinde bekletilerek süzülmesi ve kuruması sağlandı. Bir neşter yardımıyla doku küçük parçalara ayrıldı. Yeteri miktarda küçültülmüş doku parçaları buz ile soğutularak 1 mM DTT ve 1 mM EDTA içeren 50 mM K-fosfat (pH:7,0) çözeltisi içerisinde ultra turraks vasıtasıyla 2400 rpm'de işlem birkaç kez tekrarlanarak homojenize edildi. Bu işlemde kullanılan çözelti hacmi doku miktarının 2,5 katı kadar olmalıdır. Elde edilen homojenat 480xg'de 10 dk santrifüj edildi. Mitokondri ve diğer çözünebilen hücre fraksiyonlarını içeren süpernatant 22000xg'de 60 dk 4°C'de tekrar santrifüj edilerek çöktürüldü.

Süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı. Çöken mitokondri içeren pellet dikkatli bir şekilde bir havana alınarak -80°C 'de bir gece bekletildi. Bir gece dondurucuda bekletilen pellet içerisinde yer alan mitokondri zarı mekanik hareket de kullanılarak dondurma çözme yöntemiyle parçalandı. Daha sonra 1 mM DTT ve 1 mM EDTA içeren 50 mM K-fosfat (pH:7,0) çözeltisi içerisinde çözöldü. Çözme işleminde pelletin her bir gramı için 0,5 ml homojenat çözeltisi kullanıldı. Elde edilen mitokondriyal homojenat 24000xg'de santrifüj edildi ve süpernatant alınarak sonraki işlemlere devam edildi.

3.2.3.b. 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonunun hazırlanması ve koyun karaciğer mitokondrial GDH 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 trompu kullanılarak vakum ile alındı. Daha sonra dengeleme tamponu (50 mM KH_2PO_4 /1 mM EDTA, 1mM DTT, pH:6,0) ilave edilerek jel süspanse edildi. Süspanse edilmiş jel, 0,7x9 cm'lik kapalı sistemden oluşan soğutmalı kolona pakettendi. Jel çöktükten sonra peristaltik pompa yardımıyla dengeleme tamponu ile yıkanarak kolon dengelendi. Kolonun dengelenmiş olduğu elüat ile tamponun 280 nm'de absorpsanlarının ve pH'larının eşitlenmesinden anlaşıldı. Böylece afinite kolonu hazırlanmış oldu. Hazırlanan mitokondrial homojenat dengelenmiş olan kolona yüklendi. GDH'ın kolona bağlanabilmesi için akış hızı 20 ml/h olarak ayarlandı. Daha sonra kolon 1 mM DTT ve 1 mM EDTA içeren 50 mM K-fosfat (pH:7,0) ilave edilerek yıkandı. Yıkama işlemine elüat ile tamponun pH'ları eşitleninceye kadar devam edildi. Daha sonra yıkama tamponunda 10 mM NADH ve 2 mM KCl hazırlanarak Çizelge 3.4'e göre tüplere koyuldu ve tüpler sıra ile kolona eklenerek basamaklı elüsyon işlemi gerçekleştirildi. Böylece koyun karaciğer GDH enzimi yoğun bir şekilde elde edilmiş oldu.

Çizelge 3.4. Elüsyon işlemlerinde kullanılan çözelti miktarları

Çözelti	1.tüp	2.tüp	3.tüp	4.tüp	5.tüp
NADH	0,5 ml	1 ml	1,5 ml	2 ml	2,5 ml
KCl	0,25 ml	0,5 ml	0,75 ml	1 ml	1,25 ml
Tampon	4,25 ml	3, 5 ml	2,75 ml	2 ml	1,25 ml

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 oluşturucu plaka ile düz plaka üst üste getirilerek kışkaçlarla tutturuldu. Sabitleştirilen plakalar, içerisinde sızdırmayı önleyen sünger ihtiva eden jel hazırlama kabinine yerleştirildi. Önce ayırma jeli hazırlandı ve otomatik pipetle plakaların arasının 2/3'si dolduruldu. Belli bir süre jelin donması bekledi, ayırma jelinin katılaştığından emin olunduktan sonra yığma jeli hazırlandı. Jelin üst kısmındaki boşluğa dolduruldu ve numune kuyucuklarının oluşması için tarak dikkatlice yerleştirildi. Yığma jelinin katılaşması beklenirken ıslatılmış süzgeç kağıdı sistemin üzerine kapatıldı ve kuruması önlendi. Yığma jeli katılaştıktan sonra tarak dikkatlice çıkartılarak numune kuyuları oluşturulmuş oldu. Önce saf su, sonra da yürütme tamponuyla yıkandı ve jel plakalarla birlikte elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankına yürütme tamponu dolduruldu. Protein tayini yapılan enzim örnekleri yaklaşık 10 µg protein ihtiva edecek şekilde hazırlandı. Örneklerle toplam hacim 50 µl olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu katıldı. Üç dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi. Daha sonra numuneler tanka yerleştirilen jelin kuyularına dikkatli bir şekilde tatbik edildi. Elektroforez tankı kapatılarak alt tarafından (+) anot, üst taraftan ise (-) katot olması sağlandı. Önce 80 voltta 20 dakika yürütüldü ve örnek ayırma jeline kadar gelip yığıldı. Sonra akım 100 volt'a çıkartılarak numuneler jelin alt sınırına gelene kadar yürütüldü. Bu işlem yaklaşık 75 dakika sürdü. Numunelerin takip

edilmesi, numune tamponuna katılan brom timol mavisi yardımıyla anlaşıldı. Yürütme işlemi bittikten sonra akım kesilerek plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı. Boyama işlemi iki farklı yöntem ile gerçekleştirildi.

Ayırma jeli şöyle hazırlandı: 5 ml 1M Tris-HCl (pH:8,8), 4,4 ml %30 akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 0,2 ml %10'luk SDS, 0,130 ml %5'lik TEMED, 0,1 ml %10''luk PER ve 3,130 ml saf su karıştırılarak hazırlandı.

Yığılma jeli şöyle hazırlandı: 0,410 ml 1 M Tris-HCl (pH:6,8), 0,400 ml %30 akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 0,030 ml %30'luk SDS, 0,030 ml %5'lik TEMED, 2,450 ml saf su ve en son taze olarak hazırlana 0,05 ml %10'luk PER çözeltisi karıştırıldı ve karışım hemen plakalar arasına döküldü.

3.2.4.a. Coomassie Brilliant Blue ile boyama

Coomassie Brilliant Blue R-250 ile yapılan boyama işleminde sırası ile şu işlemler uygulandı; Jel önce sabitleştirme çözeltisine konuldu. Sabitleştirme çözeltisinde çalkalayıcı üzerinde 20 dakika bekletilen jel, çıkarılarak boyama çözeltisine konuldu ve çalkalayıcı üzerinde 2 saat bekletildi. Jel boyandıktan sonra çıkarılarak yıkama çözeltisine konuldu ve karıştırıcı üzerinde 30 dakika bekletildi. Rengi açılıp, protein bantları belirginleşen jel çıkarılarak fotoğrafı çekildi.

3.2.4.b. Gümüş boyama

Yapılan saflaştırma işleminin hassaslığını göstermek için gümüş boyama yapıldı. Gümüş boyamada ise sıra ile şu işlemler yapıldı: Yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanıp yürütülen jel tankın içinden çıkarıldı. Önce tespit çözeltisinde karıştırıcı üzerinde 30 dakika bekletildi. Daha sonra tespit çözeltisinden çıkarılan jel saf su ile yıkandı ve redüksiyon çözeltisine alındı. Redüksiyon çözeltisinde 30 dakika çalkalayıcı üzerinde bekletildi. Daha sonra jel redüksiyon çözeltisinden çıkarıldı ve 3 defa saf su içerisinde

5 dakika çalkalanarak yıkandı. Gümüş nitrat çözeltisi bu esnada taze olarak hazırlandı. Hazırlanan gümüş nitrat çözeltisi içerisine alınan jel 20 dakika çalkalayıcıda bekletildi. Daha sonra jel 2-3 defa saf su ile yıkandı ve yıkama 1 çözeltisi içerisine alınarak 10 dakika çalkalayıcı üzerinde bekletildi. Bantlar görüldükten sonra iyice belirginleşmesi için yıkama 2 çözeltisine alındı ve 10 dakika çalkalayıcıda karıştırıldı ve fotoğrafı çekildi.

3.2.5. Koyun karaciğer mitokondrial GDH enziminin karakterizasyon çalışmaları

3.2.5.a. Koyun karaciğer mitokondrial GDH enziminin stabil pH'sının bulunmasına yönelik çalışmalar

Enzimin stabil olduğu pH'yı tespit etmek için pH'sı 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 ve 8,0 olan 0,5 M K-fosfat, tampon çözeltileri ve pH'sı 7,5; 8,0; 8,5 ve 9,0 olan 0,5 M Tris/HCl tampon çözeltileri kullanıldı. Belirtilen pH'lardaki tampon çözeltilerinin 2 ml si 2 ml enzim çözeltisi karıştırıldı ve 4°C'de muhafaza edildi. 5 gün boyunca 24 saat arayla yapılan aktivite ölçümünde enzimin stabil olduğu pH belirlendi.

3.2.5.b. Koyun karaciğer mitokondrial GDH enziminin optimum pH'sının bulunmasına yönelik çalışmalar

GDH enziminin optimum pH'sını belirlemek amacıyla pH'sı 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 ve 8,0 olan 0,5 M K-fosfat, tampon çözeltileri ve pH'sı 7,5; 8,0; 8,5 ve 9,0 olan 0,5 M Tris/HCl tampon çözeltileri hazırlandı. Uygun substrat çözeltileri ile her bir tamponda enzim aktivitesi ölçüldü.

3.2.5.c. Koyun karaciğer mitokondrial GDH enzimi için optimum iyonik şiddetin belirlenmesine yönelik çalışmalar

GDH enziminin optimum iyonik şiddetinin belirlenmesi amacıyla optimum pH'da 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 ve 1000 mM K-Fosfat ve Tris/HCl tamponları kullanılarak aktivite ölçümleri yapıldı.

3.2.5.d. Koyun karaciğer mitokondrial GDH enzimi için optimum sıcaklığın belirlenmesine yönelik çalışmalar

GDH enziminin optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla ısıtmalı soğutmalı su banyosu kullanıldı. Aktivite ölçümü için gerekli olan tampon ve substratları ihtiva eden karışım kuvvet içerisinde ilgili sıcaklığa ayarlı su banyosunda bekletildi. 0°C ile 80°C arasında 10 ar °C aralıklarla aktivite ölçümü yapılarak belirlenmiştir.

3.2.5.e. Koyun karaciğer mitokondrial GDH enziminin alt birimlerinin molekül kütlesinin tayinine yönelik çalışmalar

Laemmli (1970), metoduna göre molekül kütlesi tayini şu şekilde yapıldı; standart protein olarak, 250, 150, 100, 70, 50, 40, 30, 20, 15, 10 ve 5 kDa'luk proteinler kullanıldı. GDH enzimi için gerçekleştirilen elektroforez işlemlerinden sonra standart proteinlerin R_f değerleri hesaplanarak $\log M_K$ - R_f grafiği çizildi. Daha sonra koyun karaciğerinden elde edilen GDH enziminin alt birimlerinin R_f değeri hesaplandı ve standart grafikte yerine konularak $\log M_K$ 'sı belirlendi. Bu değerlerin antilogaritması alınarak numunenin molekül kütlesi tespit edildi. Proteinlerin R_f değerleri;

$$R_f = \frac{X_e}{X_{boya}}$$

formülü kullanılarak belirlendi.

X_e = Proteinin yürüme mesafesi

X_{boya} = Boyanın yürüme mesafesi

3.2.5.f. Sephadex G-150 jel filtrasyon kromatografisi kolonunun hazırlanması ve koyun karaciğer mitokondrial GDH enziminin tabii molekül kütlesinin tayini

Jel filtrasyon kromatografisi ile molekül kütlesinin tayini için önceden 40 ml yatak hacmi elde etmek için 3 g Sephadex G-150 500 ml saf su içine alındı. 90°C’de su banyosunda bekletilerek polimer materyal (Sephadex G-150) şişirildi. Şişirilmiş materyalin içindeki hava, su trompu kullanılarak vakumla uzaklaştırıldı. Şişirilmiş ve havası uzaklaştırılmış polimer materyali 50 mM Tris-HCl, 100 mM KCl pH:7,5 tamponuyla dolu kolona, içinde hava kabarcığı kalmayacak şekilde paketlenerek aynı tamponla dengeleme işlemi yapıldı. Kolonun dengelendiğini tespit etmek için, üstten ilave edilen tamponla alttan alınan tamponun pH ve 280 nm’de absorbans değerleri aralıklarla ölçüldü ve bu değer aynı oluncaya kadar dengeleme işlemine devam edildi. Kolonun akış hızı 10 ml/saat olarak ayarlandı. GDH enziminin molekül kütlesi tayininde kullanılacak olan standart grafiği elde edebilmek için kolondan önce standart proteinler geçirildi. Standart olarak, blue dekstran (2 000 kDa), at dalak apoferritin (443 kDa), β -amilaz (200 kDa), maya alkol dehidrogenaz (150 kDa), sığır serum albumin (66 kDa), sığır eritrosit karbonik anhidraz (29 kDa) kullanıldı.

Dengelenen kolon içindeki tampon çözelti jel seviyesine indirildi. Kolona 2’şer 2’şer birleştirilen standart protein çözeltilerinden (β -amilaz ile sığır serum albumin, maya alkol dehidrogenaz ile sığır eritrosit karbonik anhidraz birleştirildi ve at dalak apoferritin, blue dekstran ve GDH enzim çözeltisi ayrı ayrı yüklendi) 2’şer ml tatbik edildi. Kolona tatbik edilen protein çözeltisi jel tarafından tamamen emildikten sonra

üzerine birkaç ml elüsyon tamponu 50 mM Tris-HCl, 100 mM KCl pH:7,5 ilave edildi. Jele proteinler yüklenir yüklenmez tüplere 1'er ml'lik elüsyonlar alınmaya başlandı.

Elüsyon tamponu kör olarak kullanıldı ve toplanan elüatların 280 nm'de absorbansları ölçülerek kaydedildi. Elüsyon işlemine 280 nm'deki absorbans değerleri 0 oluncaya kadar devam edildi. Standart proteinlerden sonra numune aynı şekilde kolona yüklendi. Enzim elüe edilirken tüplerde 340 nm'de aktivite ölçümleri yapıldı. 280 nm'de kalitatif ölçüm için alınan absorbans değerleri tüp sayısına karşı grafiğe geçirildi. Daha sonra enzimin molekül kütlesini belirlemek için her bir standart protein için ayrı ayrı K_{av} değerleri ve $\log M_K$ değerleri hesaplandı. $\log M_K$ - K_{av} grafiği bilgisayarda Excel programı yardımıyla çizildi (Şekil 4.7). Son olarak GDH enziminin K_{av} değeri belirlendi ve $\log M_K$ - K_{av} grafiğinin doğru denklemi kullanılarak tabii molekül kütlesi hesaplandı.

K_{av} değerlerinin hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanıldı.

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_T - V_0}$$

V_0 = Void hacim

V_e = Elüsyon hacmi

V_t = Kolon yatak hacmi

3.2.5.g. Koyun karaciğer mitokondrial GDH enziminin substratları için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar

GDH enziminin L-glutamat, NAD^+ , $NADP^+$, NADH, NADPH, NH_4^+ ve α -ketoglutarat substratları için K_M ve V_{max} değerlerini belirlemek amacıyla çalışılan substrat hariç diğer substratların doygun konsantrasyonlarında (doygun konsantrasyon $100K_M$ 'ye eşittir) çalışılan substratın 5 farklı konsantrasyonunda aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen değerlerle Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Bu grafiklerden yararlanarak

substratlar için ayrı ayrı K_M ve V_{max} değerleri belirlendi. Aktivite ölçümleri optimal şartlarda gerçekleştirildi (Lineweaver and Burk 1934).

3.2.6. Koyun karaciğer mitokondrial GDH enzimi için bazı metal iyonlarının inhibisyon etkilerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar

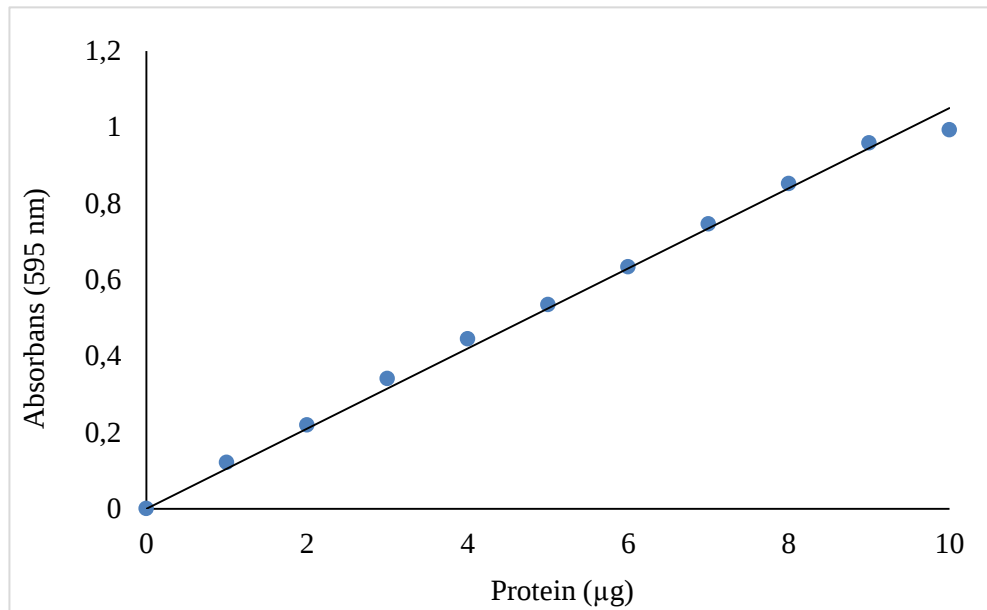
Bazı metal iyonlarının inhibisyon etkisini incelemek amacıyla önce sırasıyla metallerin 5'er farklı konsantrasyonlarında aktivite ölçümü yapıldı. İnhibitörsüz ölçüm sonucu bulunan aktivite %100 kabul edilerek inhibitörlü ortamdaki aktiviteler %aktivite olarak hesaplandı. İnhibitör konsantrasyonuna karşı %aktivite grafikleri çizilerek enzimin aktivitesini yarıya indiren inhibitör konsantrasyonları (IC_{50} değerleri) hesaplandı.

İnhibisyon etkisi gösteren metal iyonların inhibisyon türünü ve K_i sabitlerini belirlemek amacıyla en az 5 farklı substrat konsantrasyonuna karşı metal iyonların 3 farklı konsantrasyonunda aktivite ölçümleri yapılarak Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Bu grafik ve denkleminde yararlanılarak inhibisyon türü ve K_i sabitleri hesaplandı. (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, 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. Koyun Karaciğer Mitokondrial GDH Enziminin Saflaştırılması Sonuçları

4.2.1. Homojenatın hazırlanması

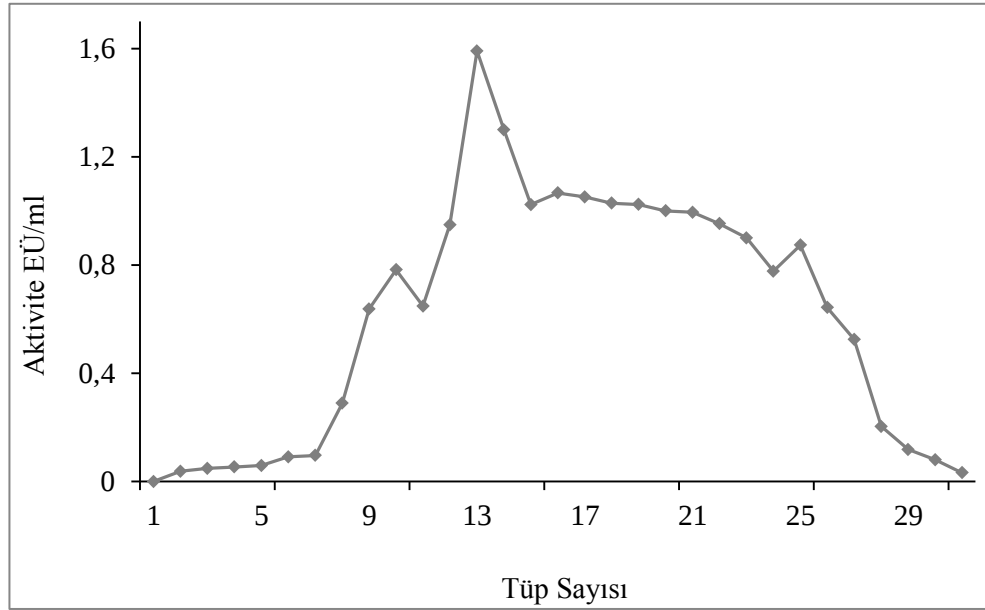
Homojenat;

- i. Karaciğerin 1 mM EDTA içeren %1,5'lik soğuk KCl çözeltisi ile yıkanması
- ii. Karaciğerin küçük parçalara ayrılması
- iii. Küçük parçalar halindeki karaciğerin homojenizatör vasıtasıyla hücre zarının parçalanması
- iv. Elde edilen homojenatın 4°C de 480xg'de 10 dk santrifüj işlemi
- v. Çökeleğin atılması ve mitokondri ve diğer çözünebilen hücre fraksiyonlarını içeren süpernatantın 4°C'de 22000xg'de 30 dk santrifüj işlemi
- vi. Süpernatantın atılması ve mitokondri içeren pelletin dondurma çözme yöntemi ile parçalanması
- vii. Elde edilen mitokondri homojenatının homojenat tamponunda çözülmesi ve 4°C'de 24000xg'de 30 dk santrifüj edilmesi
- viii. Çökeleğin atılması ve süpernatantın alınması

aşamaları ile hazırlanabildiği belirlendi.

4.2.2. Afinite kromatografisi sonuçları

Hazırlanan mitokondrial homojenat 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonuna yüklendi. Uygun çözeltiler ile basamaklı elüsyon yapılarak elde edilen elüatlardaki GDH enzimine ait aktivite değerleri Şekil 4.2'de gösterildi. Elüsyon çözeltisinde NADH bulunduğu için elüatlarda 280 nm de absorbands bakılamadı.

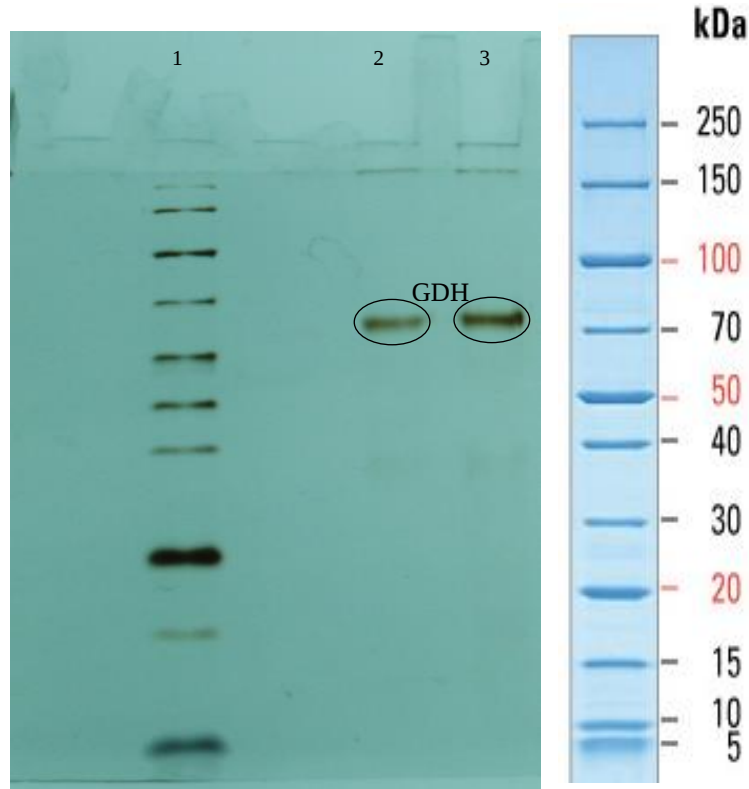


Şekil 4.2. GDH enziminin 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonu ile saflaştırılması sonucu elde edilen elüsyon grafiği

Çizelge 4.1. GDH enziminin saflaştırma basamakları

Saflaştırma basamağı	Toplam hacim (ml)	Aktivite (EÜ/ml)	Protein (mg/ml)	Toplam protein (mg)	Toplam aktivite (EÜ)	Spesifik aktivite (EÜ/mg protein)	Saflaştırma katsayısı	Verim (%)
Homojenat	11	4,070	0,838	9,219	44,770	4,857	1	100
Afinite kromatografisi	3	1,320	0,001	0,003	3,960	1320	271,8	8,845

4.2.3. Koyun karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrogenaz (GDH) enziminin SDS-PAGE sonuçları



Şekil 4.3. Koyun karaciğer GDH enziminin saflaştırma işlemleri sonucu elde edilen gümüş boyamalı SDS-poliakrilamid jel elektroforezi fotoğrafı

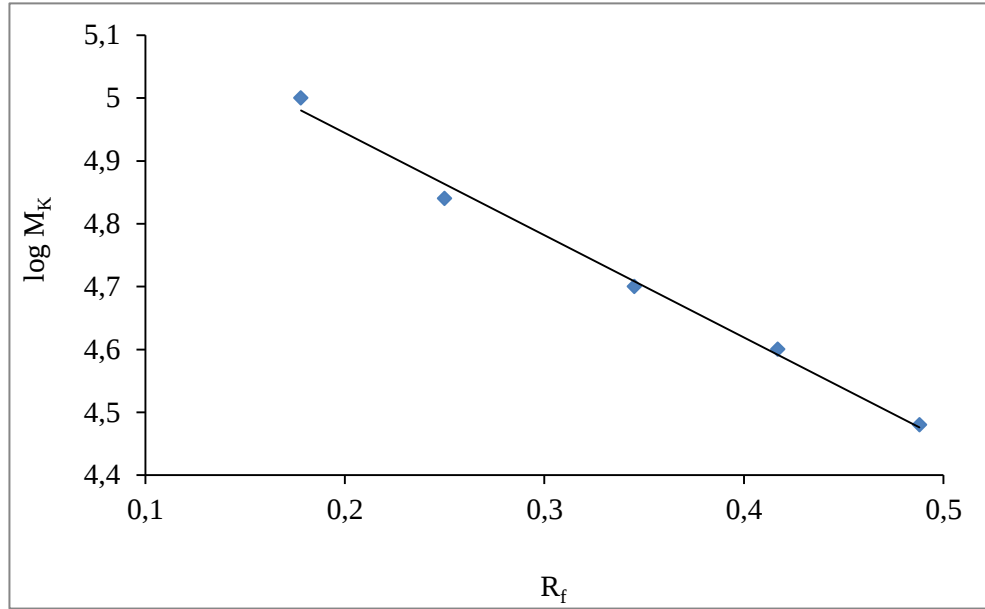
*1. kuyu standart proteinler (Thermo scientific PageRuler Broad Range Unstained Protein Ladder 26630), 2. ve 3. kuyu koyun karaciğerinden saflaştırılan GDH enzimi

4.3. Koyun Karaciğer Mitokondrial GDH Enziminin Karakterizasyon Sonuçları

4.3.1. Koyun karaciğer mitokondrial GDH enziminin SDS-PAGE ile alt birimlerinin molekül kütlelerinin belirlenmesine yönelik sonuçlar

Afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim SDS-PAGE’de yürütüldükten sonra fotoğrafı çekildi (Şekil 4.3). Standart proteinlerin ve enzimin jelde yürüdükleri mesafeler ölçülerek R_f değerleri 0,292 olarak hesaplandı. $\log M_K-R_f$ grafiği çizildi (Şekil 4.4). Grafikten faydalanarak koyun karaciğer mitokondrial GDH enziminin

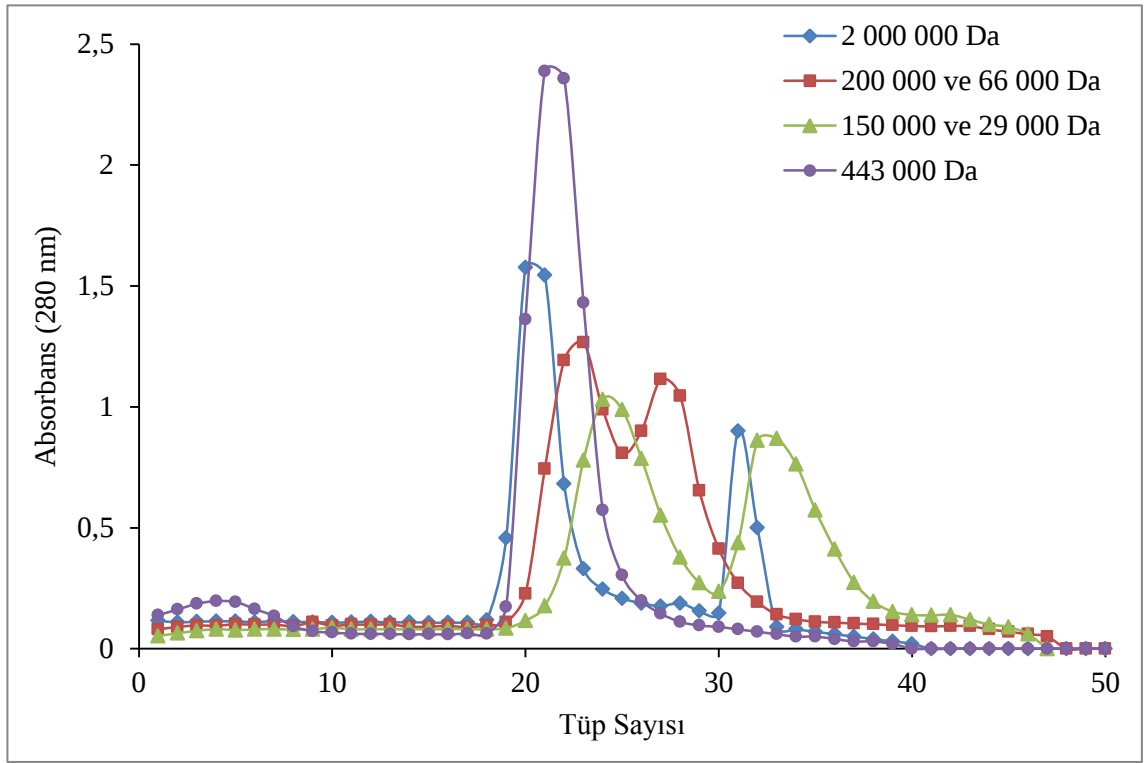
homohekzamer olduğu bulundu. Her bir alt biriminin molekül kütlesi ise yaklaşık 62 kDa olarak hesaplandı.



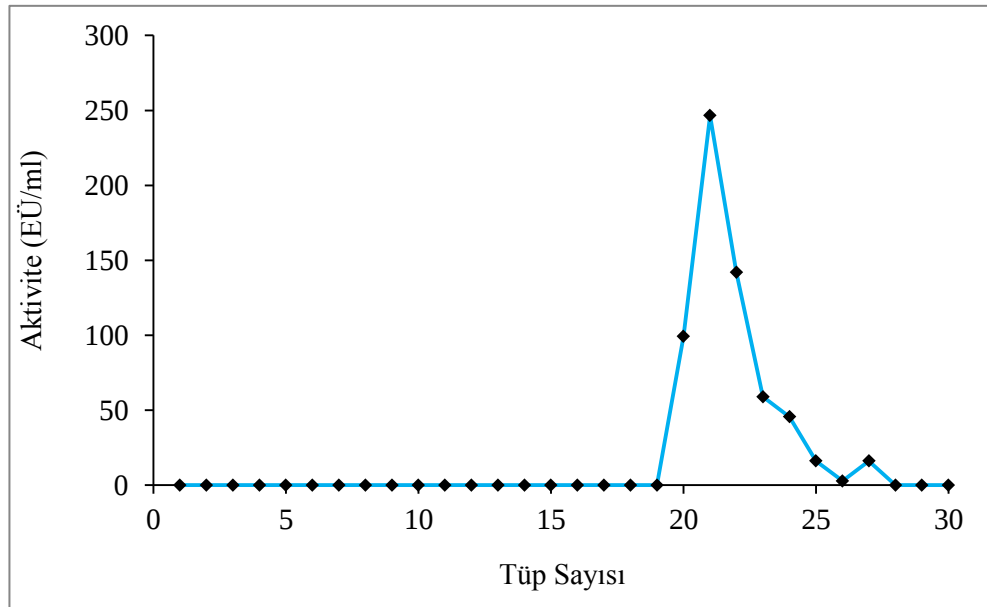
Şekil 4.4. SDS-PAGE sonucu çizilen $\log M_K$ - R_f grafiği

4.3.2. Koyun karaciğer mitokondrial GDH enziminin jel filtrasyon kromatografisi ile tabii molekül kütlesi tayinine yönelik sonuçlar

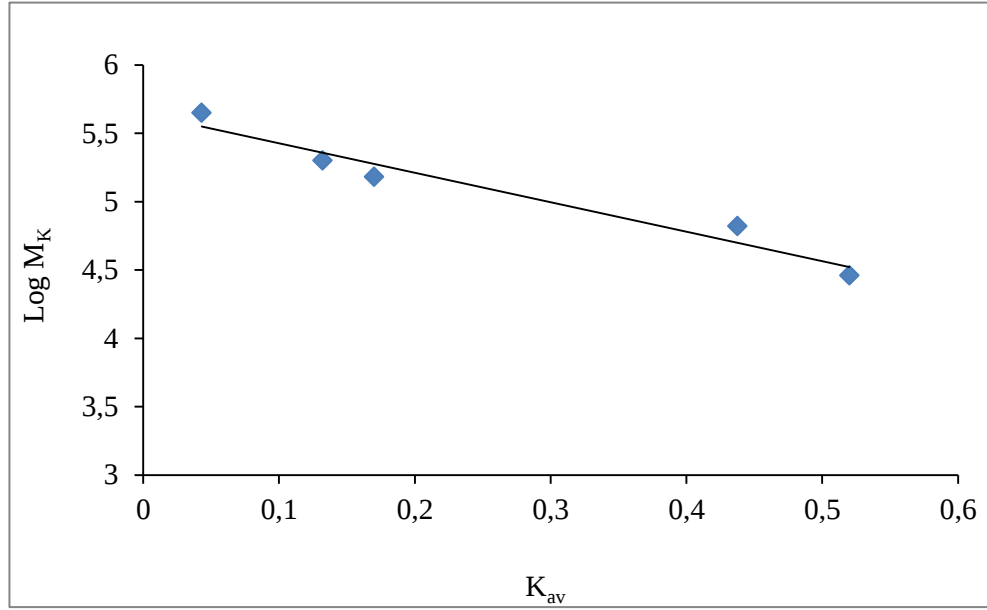
Jel filtrasyon kolonundan önce blue dekstran sonra standart proteinler daha sonra ise içinde enzim numunesi bulunan çözelti Bölüm 3.2.5.f’de anlatıldığı şekilde geçirildi. Elüe edilen blue dekstran ve standart proteinler 280 nm’de absorbans ölçümü yapılarak Şekil 4.5’de gösterilen grafik çizildi. Elüe edilen enzimin 340 nm’de aktivite değerlerine karşılık tüp sayısı grafiği çizilerek Şekil 4.6’de gösterildi. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda Şekil 4.7’de gösterilen $\log M_K$ - K_{av} grafiği çizildi, GDH enziminin K_{av} değeri hesaplanarak 0,042 bulundu. Grafikte yerine konulduğunda enzimin tabii molekül kütlesi yaklaşık olarak 363 kDa olarak hesaplandı.



Şekil 4.5. Jel filtrasyon kolonundan alınan blue dekstran ve standart proteinlerin tüp sayısına karşılık 280 nm'deki absorbans değerleri



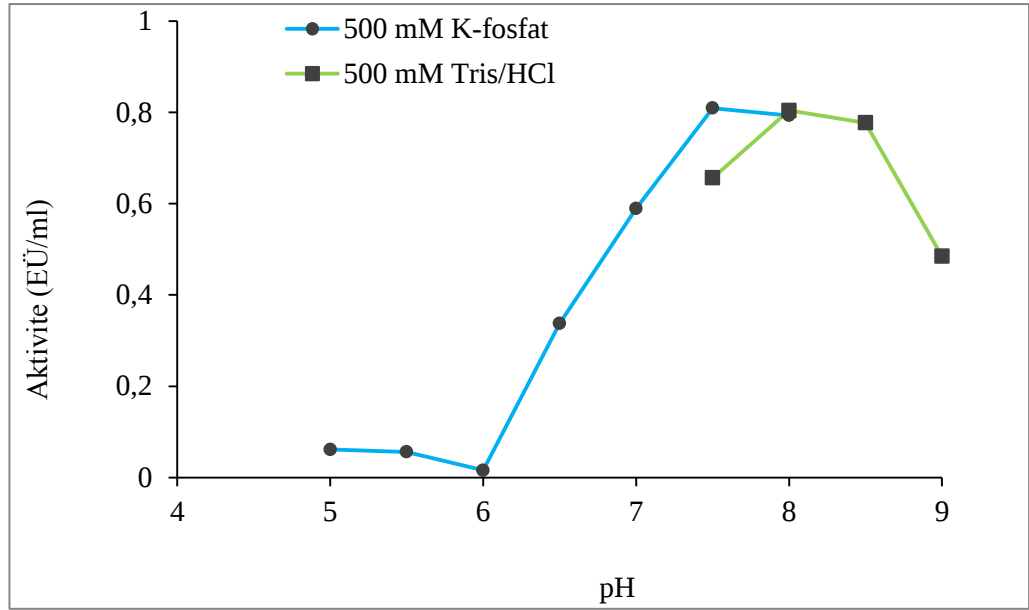
Şekil 4.6. Jel filtrasyon kolonundan alınan GDH enziminin aktivite-tüp sayısı grafiği



Şekil 4.7. Jel filtrasyon kromatografisi sonucu çizilen $\log M_K$ - K_{av} grafiği

4.3.3. Koyun karaciğer mitokondrial GDH enzimi için optimum pH bulunmasına yönelik sonuçlar

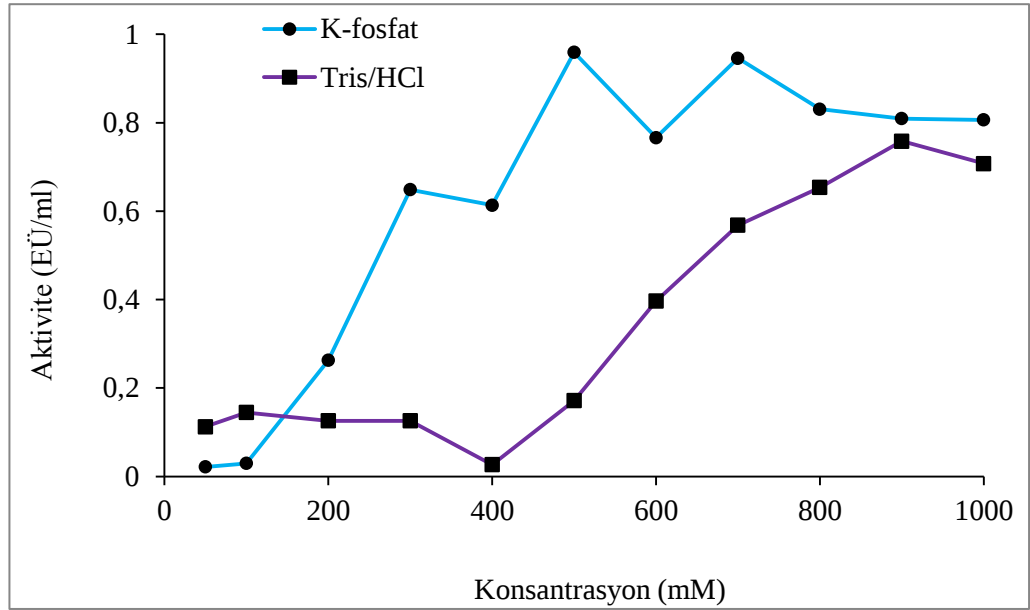
Koyun karaciğer GDH enziminin optimum pH'sı Bölüm 3.2.5.b'de anlatıldığı şekilde; pH'sı 7,5-9,0 aralığında 500 mM Tris-HCl ve pH'sı 5,0-8,0 aralığında 500 mM potasyum fosfat tampon çözeltileri kullanılarak enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak belirlendi (Şekil 4.8). Koyun karaciğer GDH enzimi için optimum pH, 0,5 M potasyum fosfat pH=7,5 tamponu olarak bulundu.



Şekil 4.8. Koyun karaciğer GDH enzimi için yapılan optimum pH çalışmasının sonucunda çizilen aktivite-pH grafiği

4.3.4. Koyun karaciğer mitokondrial GDH enziminin optimum iyonik şiddetinin belirlenmesine yönelik sonuçlar

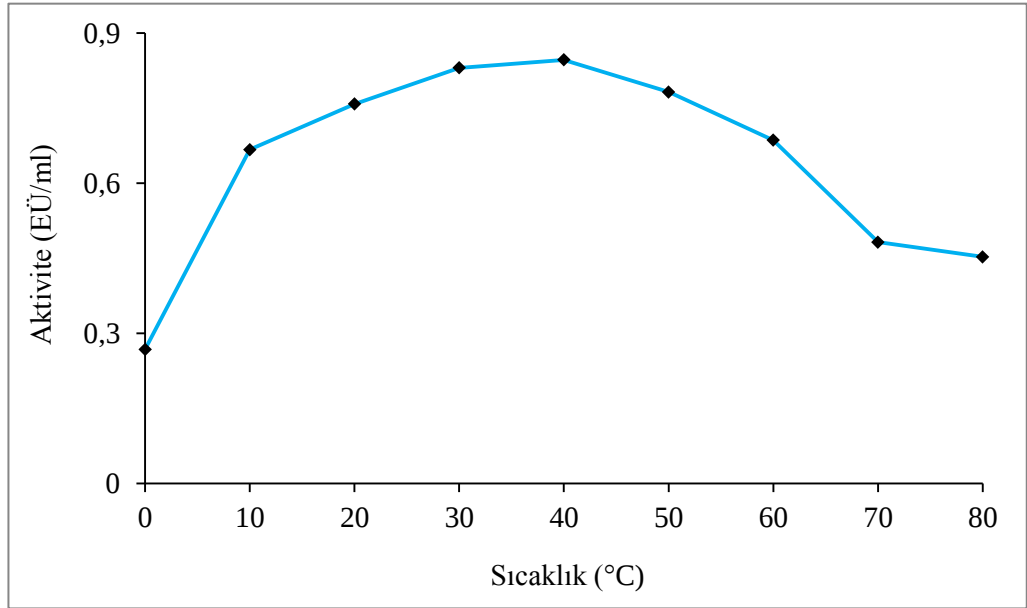
Koyun karaciğer GDH enzim aktivitesi için en uygun iyonik şiddetin belirlenmesi amacıyla optimum pH'da farklı konsantrasyonlarda KH_2PO_4 ve Tris/HCl tamponları Bölüm 3.2.5.c'de anlatıldığı gibi hazırlandı. Farklı KH_2PO_4 konsantrasyonlarında aktivite ölçümleri yapılarak KH_2PO_4 konsantrasyonu ile aktivite değerlerinden oluşan ve farklı Tris/HCl konsantrasyonlarında aktivite ölçümleri yapılarak Tris/HCl konsantrasyonu ile aktivite değerlerinden oluşan grafik çizildi (Şekil 4.9). Yapılan çalışmalar sonucu koyun karaciğer GDH enzimi için en uygun iyonik şiddetin 500 mM KH_2PO_4 pH=7,5 tamponu olduğu tespit edildi.



Şekil 4.9. Değişik konsantrasyonlardaki KH_2PO_4 ve Tris/HCl tampon çözeltileri kullanılarak koyun karaciğer GDH enzimi için hazırlanan aktivite-iyonik şiddet grafiği

4.3.5. Koyun karaciğer mitokondrial GDH enzimi için optimum sıcaklık belirlenmesine yönelik sonuçlar

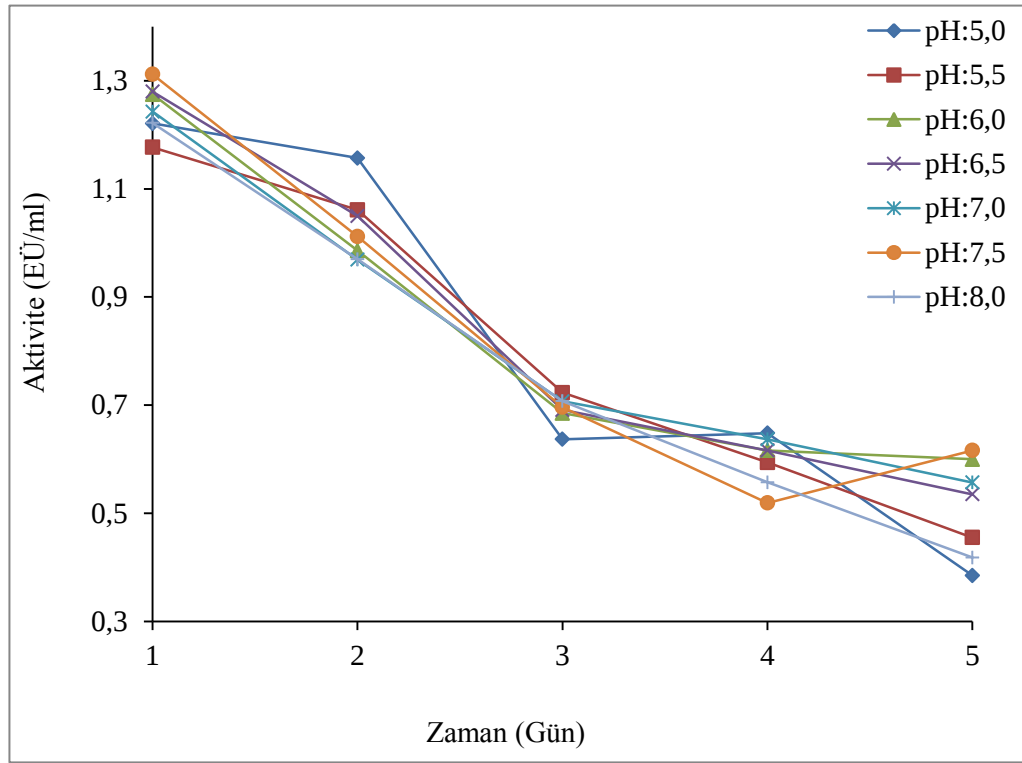
Koyun karaciğer GDH enziminin optimum sıcaklığını belirlemek üzere optimum pH ve iyonik şiddete sahip pH'sı 7,5 olan 500 mM KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanıldı. 0°C ile 80°C arasında her 10°C'de bir olmak üzere bölüm 3.2.5.d'de anlatıldığı şekilde aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen değerler ile Şekil 4.10'da gösterilen grafik çizildi. Bu çalışmalar sonucu optimum sıcaklık 40°C olarak tespit edildi.



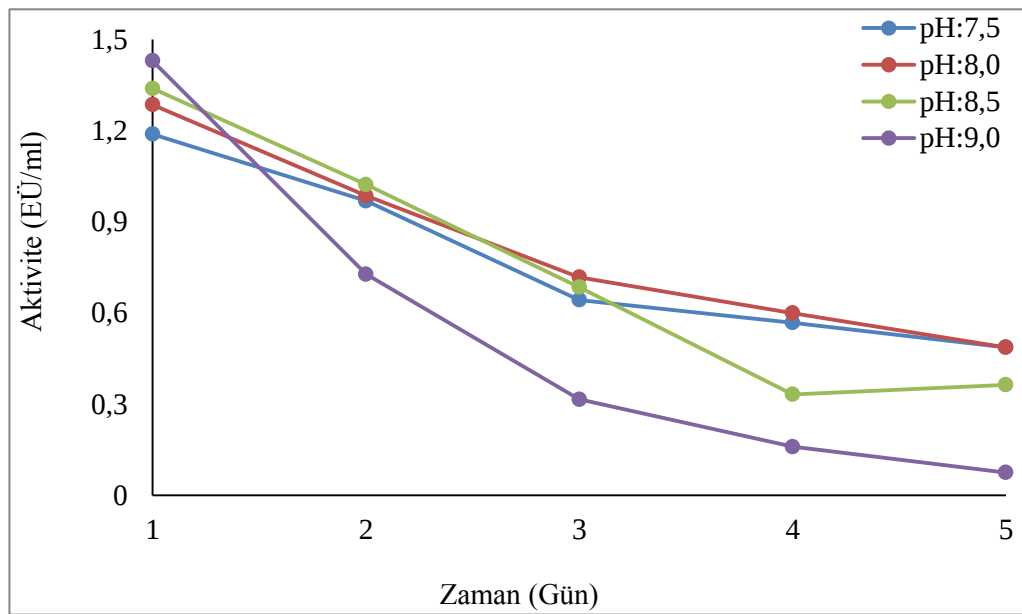
Şekil 4.10. Koyun karaciğer GDH enziminin optimum sıcaklığı için aktivite-sıcaklık grafiği

4.3.6. Koyun karaciğer mitokondrial GDH enzimi için stabil pH bulunmasına yönelik sonuçlar

Koyun karaciğer GDH enziminin stabil pH'sı Bölüm 3.2.5.a'da anlatıldığı şekilde; pH'ları 7,5; 8,0; 8,5, ve 9,0 olan 500 mM Tris-HCl ve pH'ları 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 ve 8,0 olan 500 mM potasyum fosfat tampon çözeltileri kullanılarak enzimin aktivitesi spektrofotometrik olarak belirlendi ve aktivite-zaman grafiği çizildi (Şekil 4.11 ve 4.12). Koyun karaciğer GDH enzimi için stabil pH, 500 mM K-fosfat tamponunda pH:7,0 olarak belirlendi.



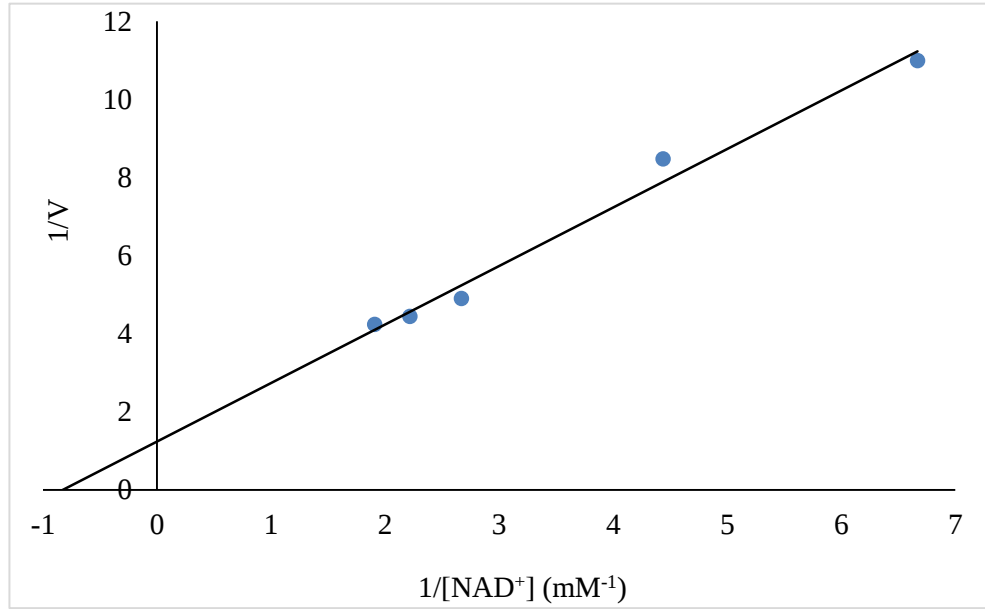
Şekil 4.11. Koyun karaciğer mitokondrial GDH enziminin değişik pH'lardaki KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılıp aktivitesi ölçülerek elde edilen stabil pH grafiği



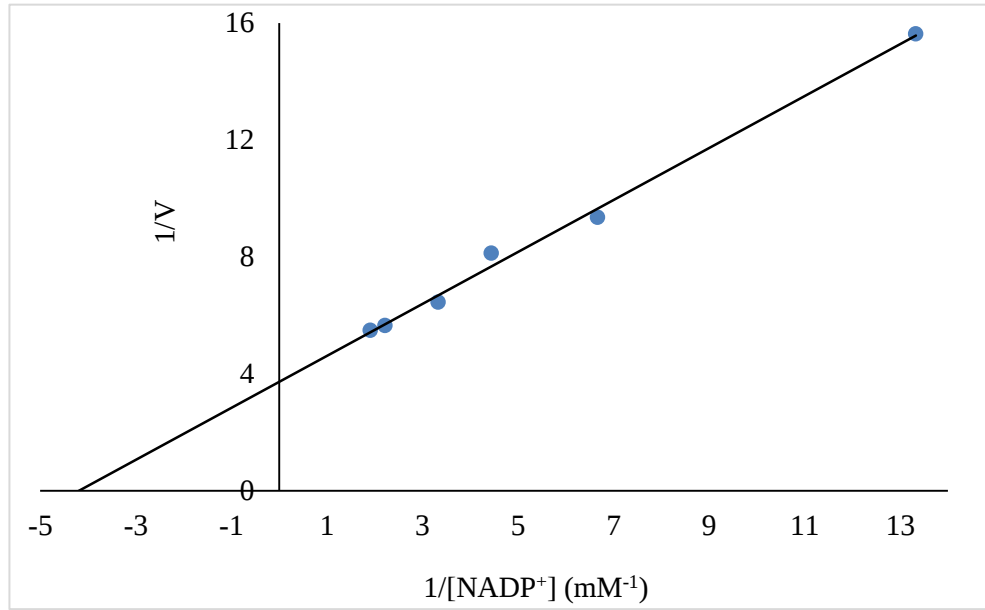
Şekil 4.12. Koyun karaciğer mitokondrial GDH enziminin değişik pH'lardaki Tris/HCl tampon çözeltisi kullanılıp aktivitesi ölçülerek elde edilen stabil pH grafiği

4.3.7. Koyun karaciğer mitokondrial GDH enziminin substratları için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışmaların sonuçları

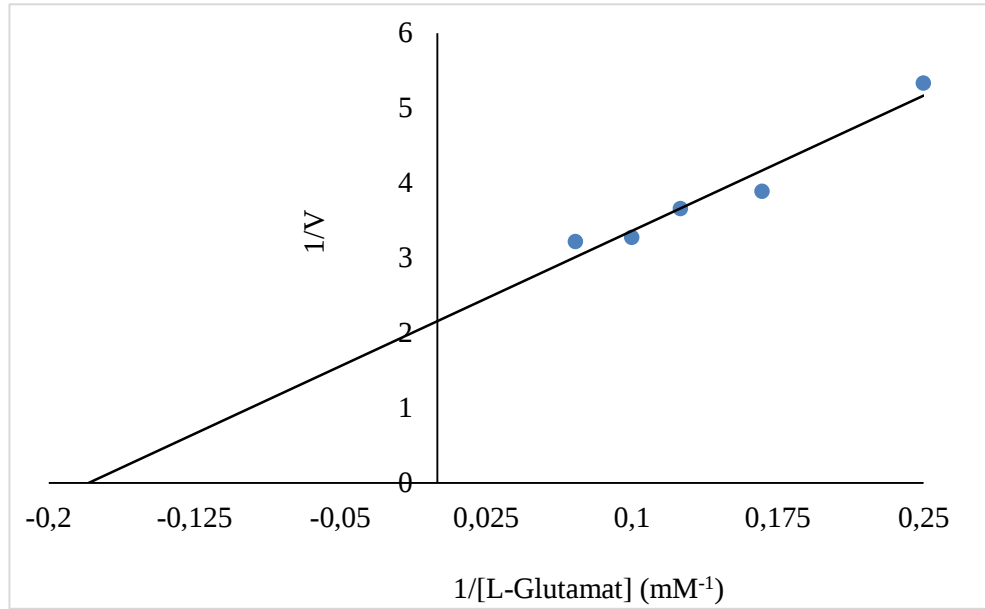
GDH enziminin L-glutamat, NAD^+ , $NADP^+$, NADH, NADPH, NH_4^+ ve α -ketoglutarat substratları için K_M ve V_{max} değerlerini belirlemek amacıyla Lineweaver-Burk grafiği çizildi (Şekil 4.13, 4.14, 4.15, 4.16, 4.17, 4.18, 4.19). Bu grafiklerden yararlanarak substratlar için ayrı ayrı K_M ve V_{max} değerleri belirlendi.



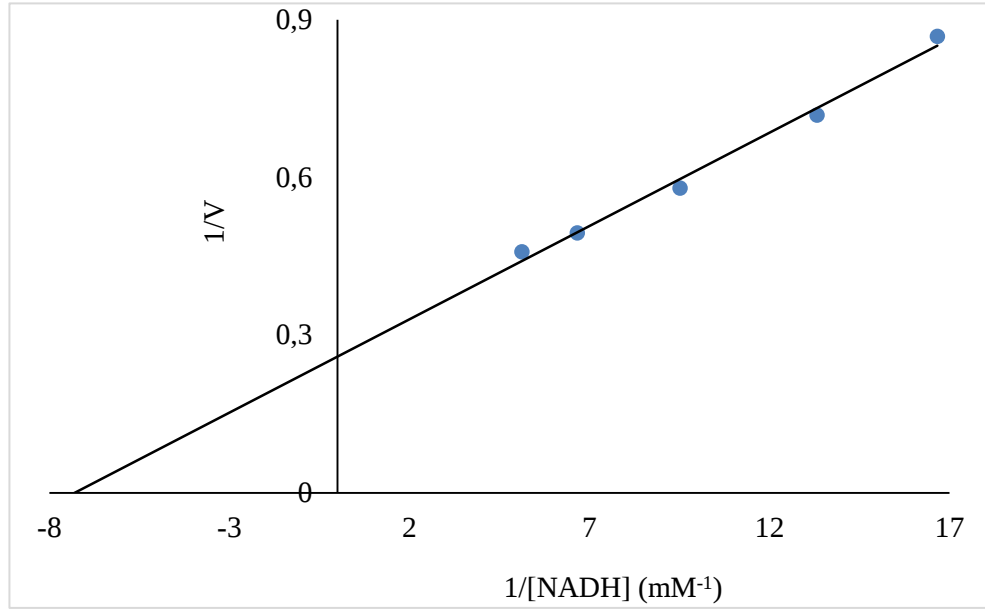
Şekil 4.13. Koyun karaciğer mitokondrial GDH enziminin NAD^+ substratının 5 farklı konsantrasyonunda aktivite ölçülerek çizilen Lineweaver-Burk grafiği



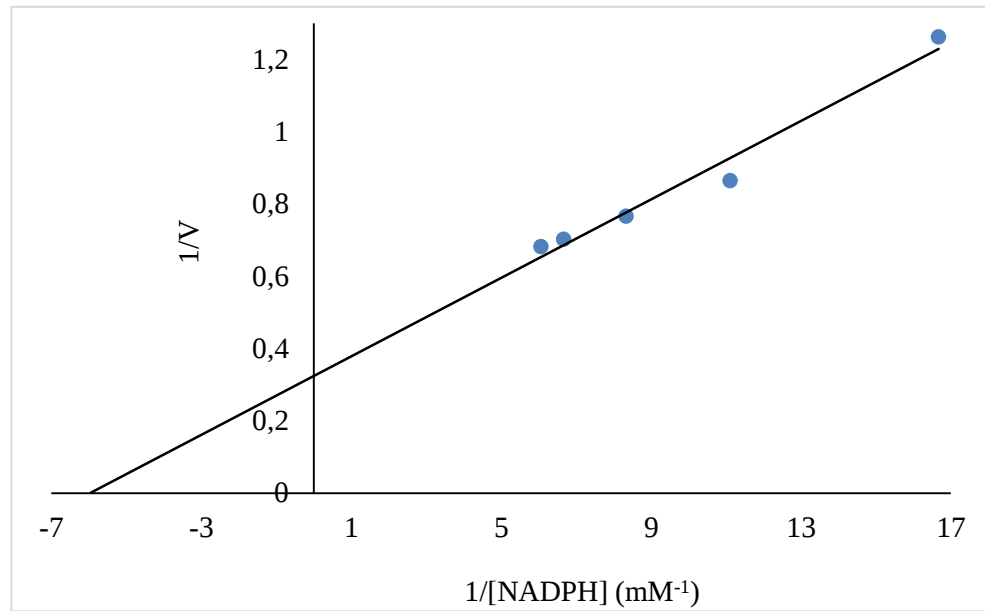
Şekil 4.14. Koyun karaciğer mitokondrial GDH enziminin $NADP^+$ substratının 5 farklı konsantrasyonunda aktivite ölçülerek çizilen Lineweaver-Burk grafiği



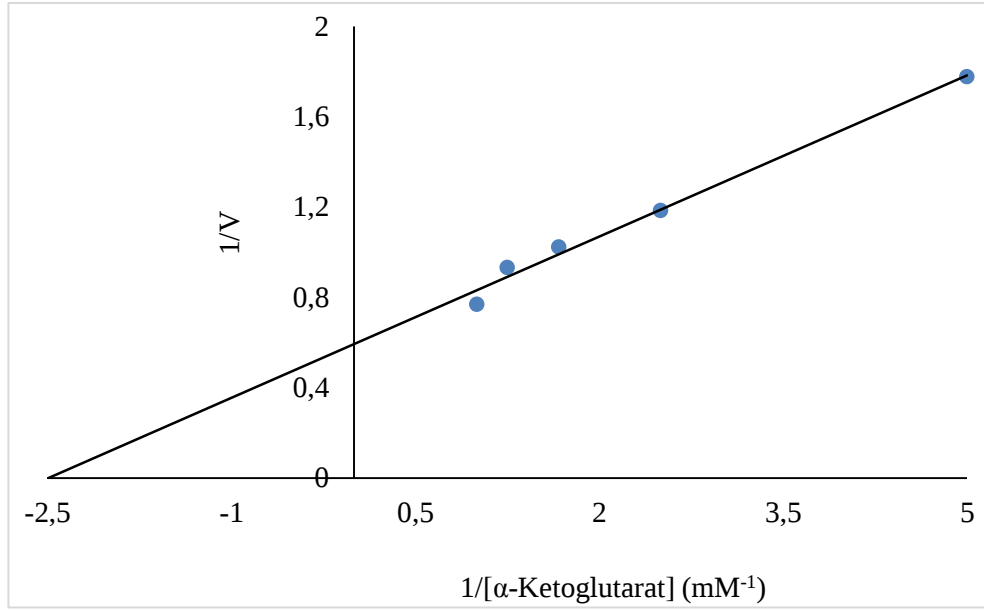
Şekil 4.15. Koyun karaciğer mitokondrial GDH enziminin L-glutamat substratının 5 farklı konsantrasyonunda aktivite ölçülerek çizilen Lineweaver-Burk grafiği



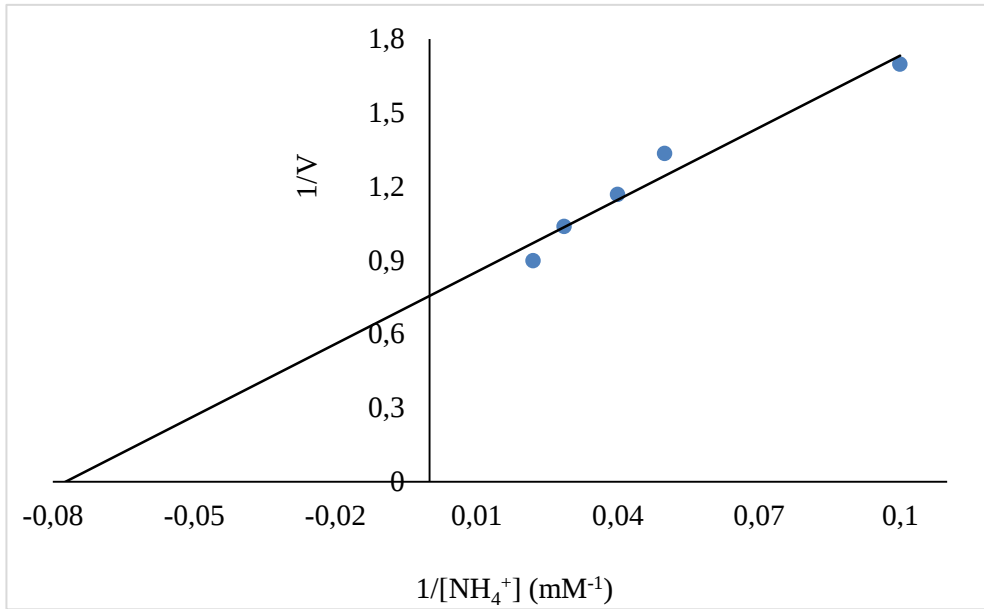
Şekil 4.16. Koyun karaciğer mitokondrial GDH enziminin NADH substratının 5 farklı konsantrasyonunda aktivite ölçülerek çizilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.17. Koyun karaciğer mitokondrial GDH enziminin NADPH substratının 5 farklı konsantrasyonunda aktivite ölçülerek çizilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.18. Koyun karaciğer mitokondrial GDH enziminin α -ketoglutarat substratının 5 farklı konsantrasyonunda aktivite ölçülerek çizilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.19. Koyun karaciğer mitokondrial GDH enziminin NH_4^+ substratının 5 farklı konsantrasyonunda aktivite ölçülerek çizilen Lineweaver-Burk grafiği

Koyun Karaciğer Mitokondrial GDH Enziminin Karakterizasyon Sonuçları Çizelge 4.2’de özetlendi.

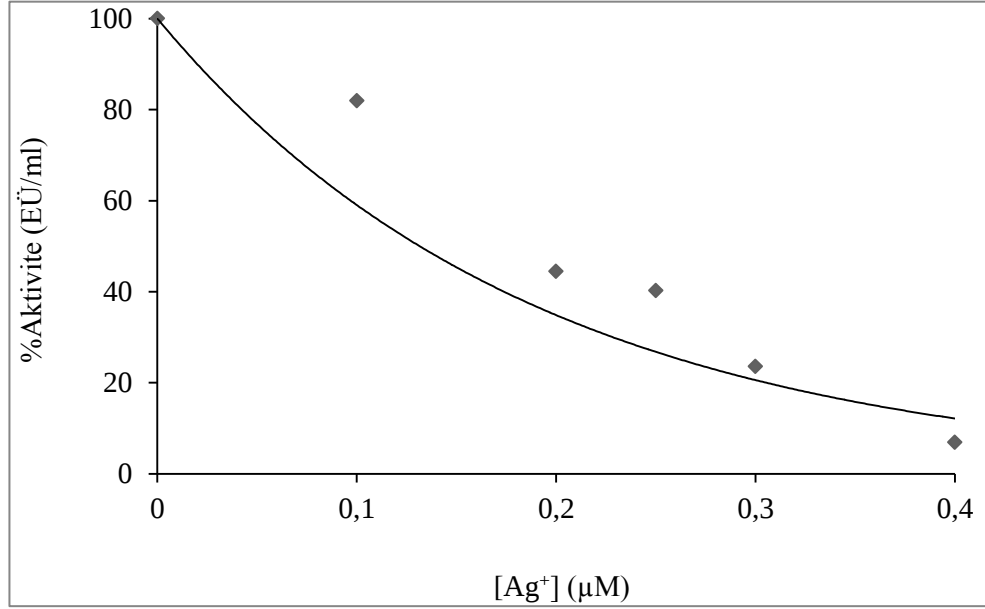
Çizelge 4.2. Karakterizasyon sonuçları

Çalışmanın adı		Değeri	
Karakterizasyon	Alt birim molekül kütlesi	62 kDa	
	Tabii molekül kütlesi	363 kDa	
	Optimum pH	7,5	
	Optimum iyonik şiddet	500 mM	
	Optimum sıcaklık	40°C	
	Stabil pH	7,0	
K _M -V _{max} Çalışması		K _M (mM)	V _{max} (EÜ/ml)
	NADH	0,14	3,86
	NADPH	1,67	3,08
	α -ketoglutarat	0,40	1,68
	NH ₄ ⁺	12,92	1,32
	NAD ⁺	1,21	0,81
	NADP ⁺	0,24	0,27
	L-glutamat	5,57	0,46

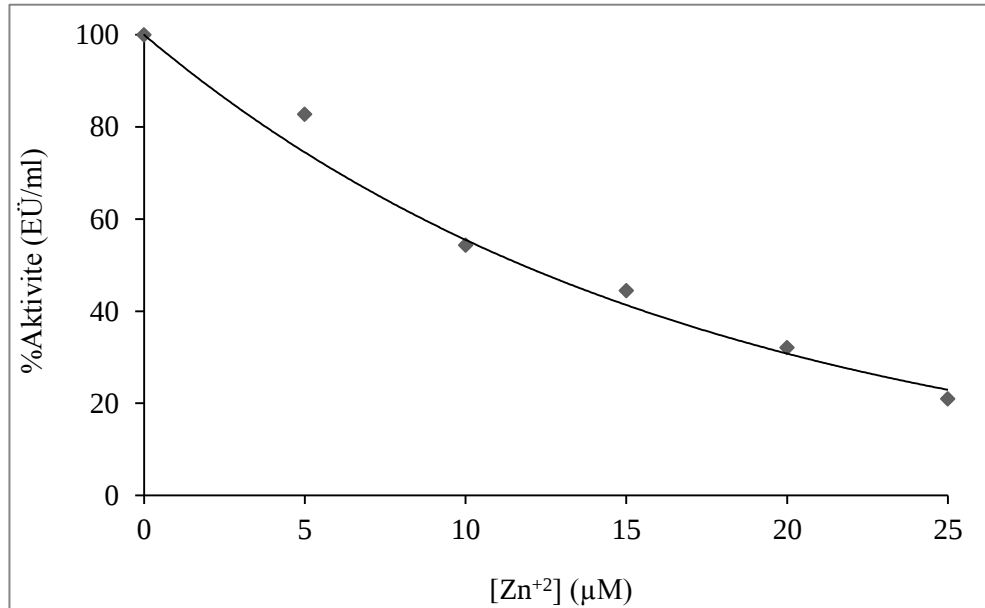
4.4. Koyun Karaciğer Mitokondrial GDH Enzimi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkilerinin Belirlenmesine Yönelik Çalışmaların Sonuçları

Çalışmamız kapsamında koyun karaciğer mitokondrial GDH enzim aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkileri *in vitro* şartlarda araştırılmıştır. İnhibisyon etkisi gösteren metal iyonları için %aktivite-[metal iyon] grafikleri çizildi (Şekil 4.20-25). IC₅₀ değeri bu grafikten yararlanılarak hesaplandı. K_i sabiti ve inhibisyon türü belirlemek amacıyla Lineweaver-Burk grafikleri çizildi (Şekil 4.26-4.31). Bu grafikler ve denklemlerinden

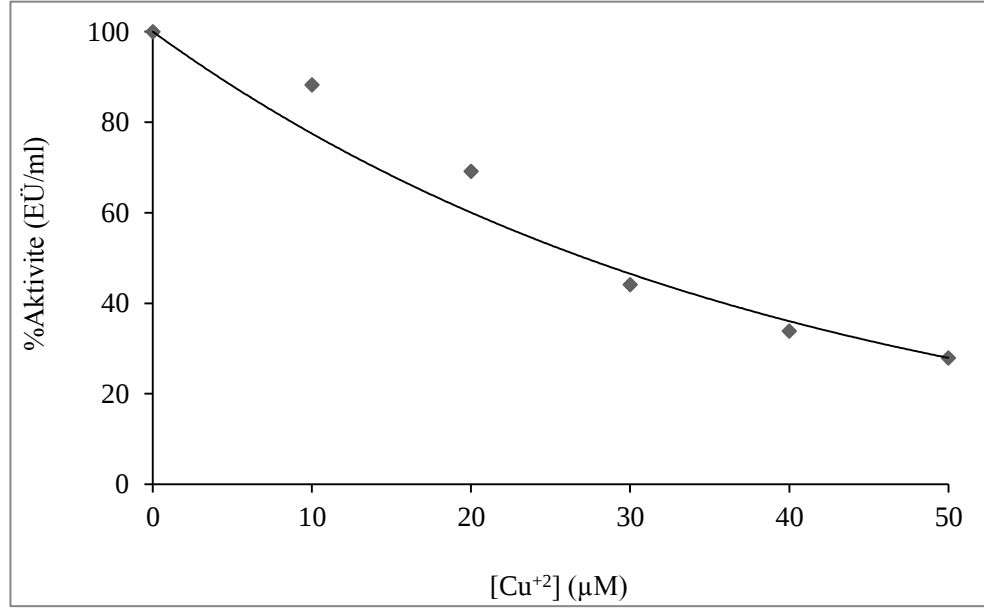
yararlanılarak inhibisyon türü ve K_i sabitleri belirlendi (Lineweaver and Burk 1934). Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3’de gösterildi.



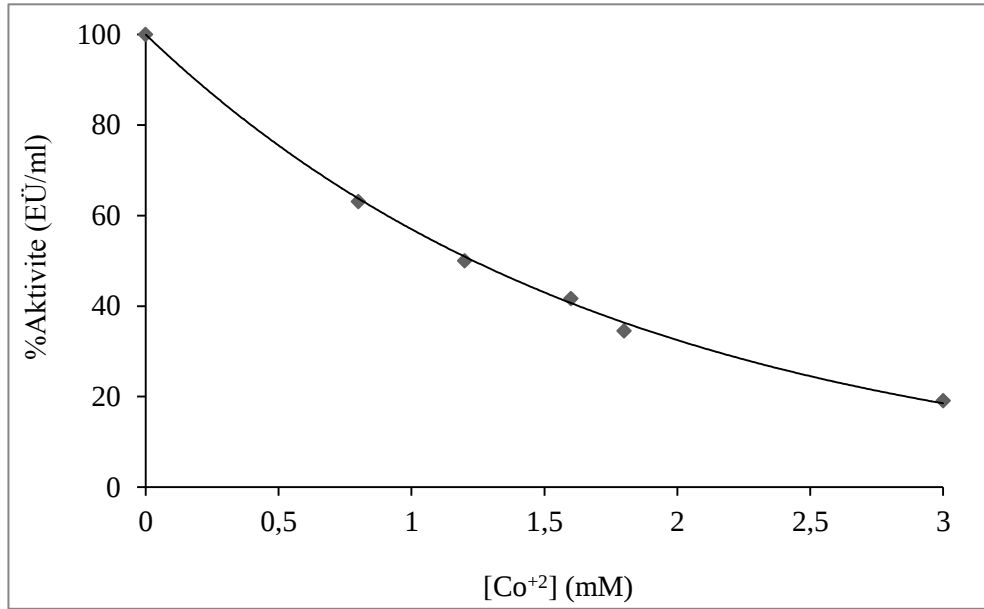
Şekil 4.20. Ag⁺ metal iyonunun koyun karaciğer mitokondrial GDH enzim aktivitesi üzerine etkisi



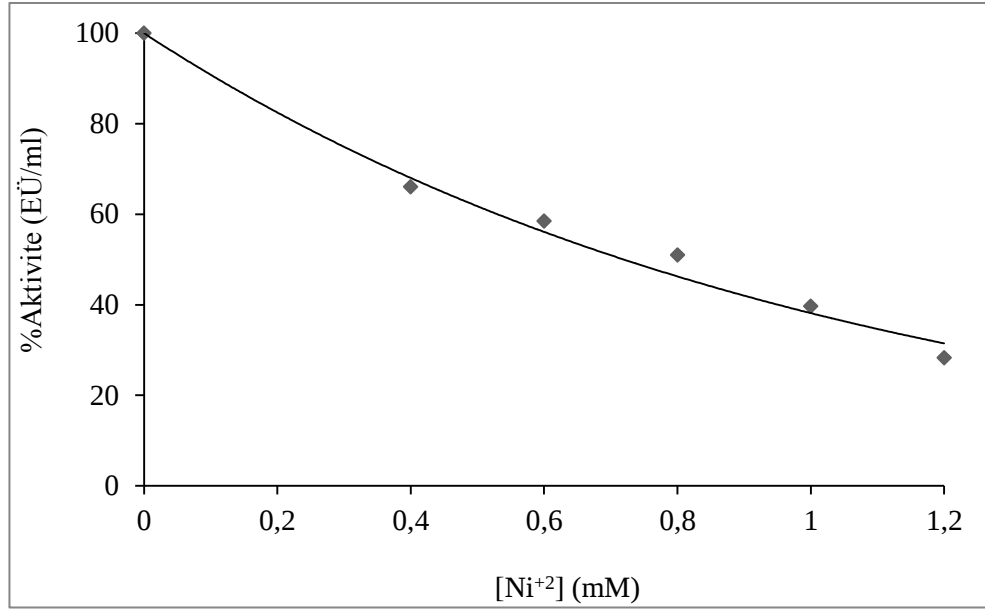
Şekil 4.21. Zn²⁺ metal iyonunun koyun karaciğer mitokondrial GDH enzim aktivitesi üzerine etkisi



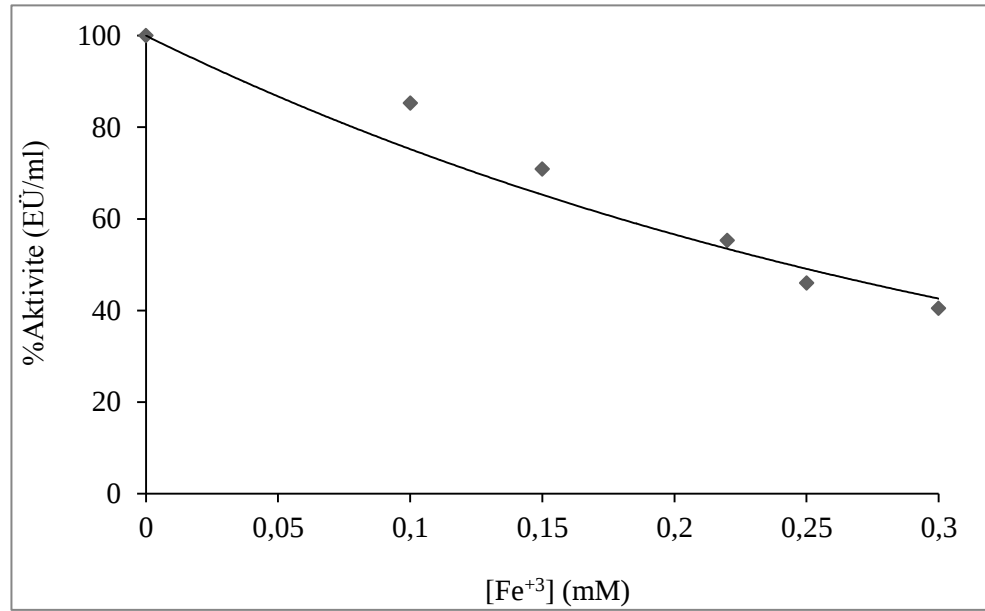
Şekil 4.22. Cu²⁺ metal iyonunun koyun karaciğer mitokondrial GDH enzim aktivitesi üzerine etkisi



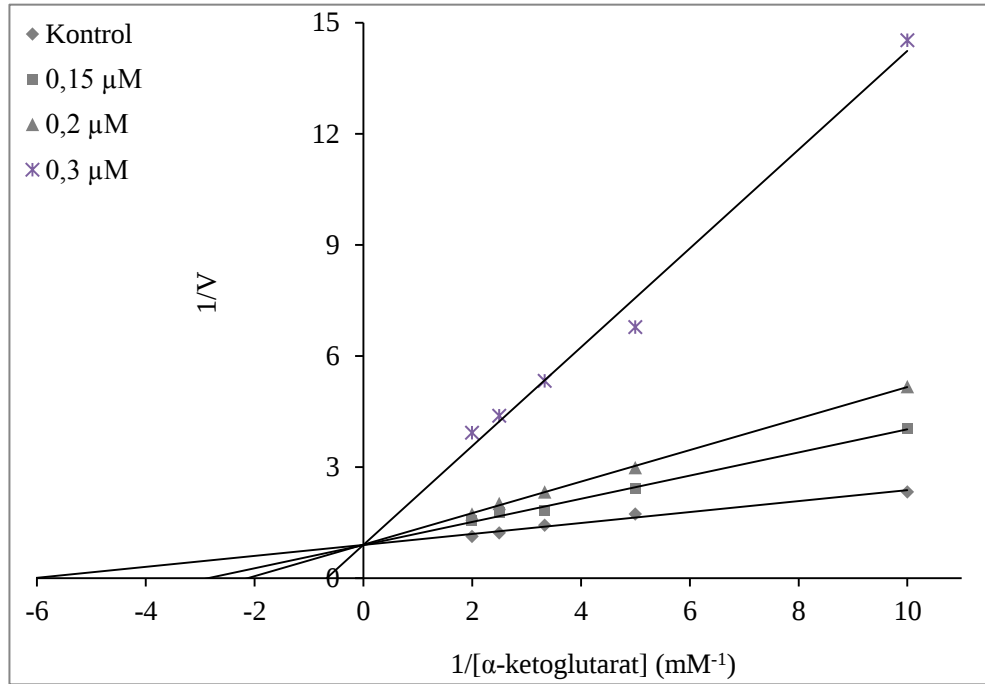
Şekil 4.23. Co²⁺ metal iyonunun koyun karaciğer mitokondrial GDH enzim aktivitesi üzerine etkisi



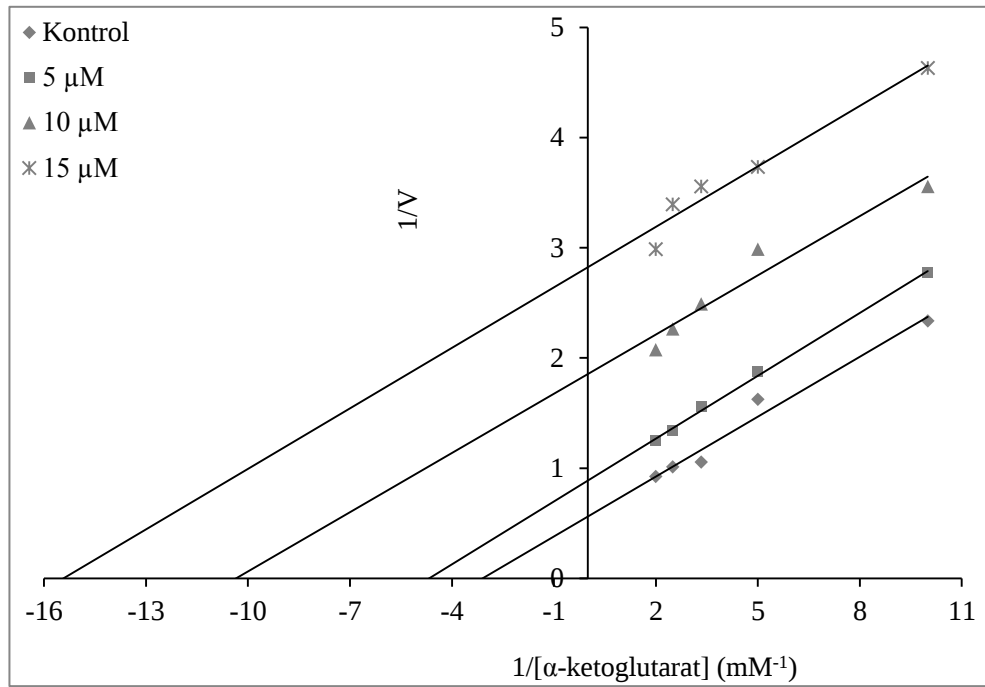
Şekil 4.24. Ni²⁺ metal iyonunun koyun karaciğer mitokondrial GDH enzim aktivitesi üzerine etkisi



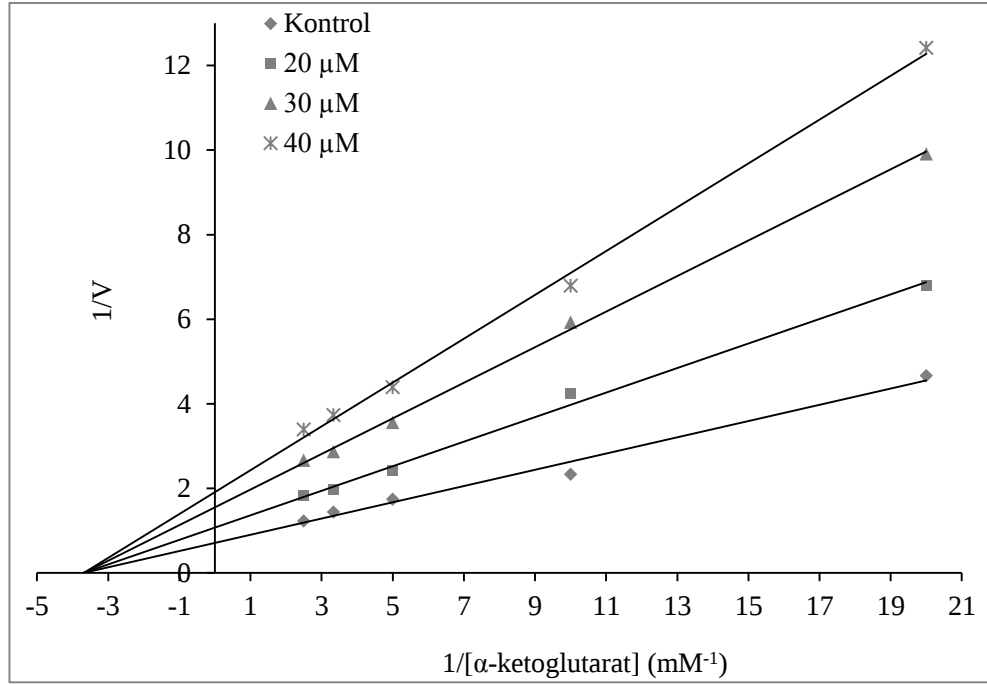
Şekil 4.25. Fe³⁺ metal iyonunun koyun karaciğer mitokondrial GDH enzim aktivitesi üzerine etkisi



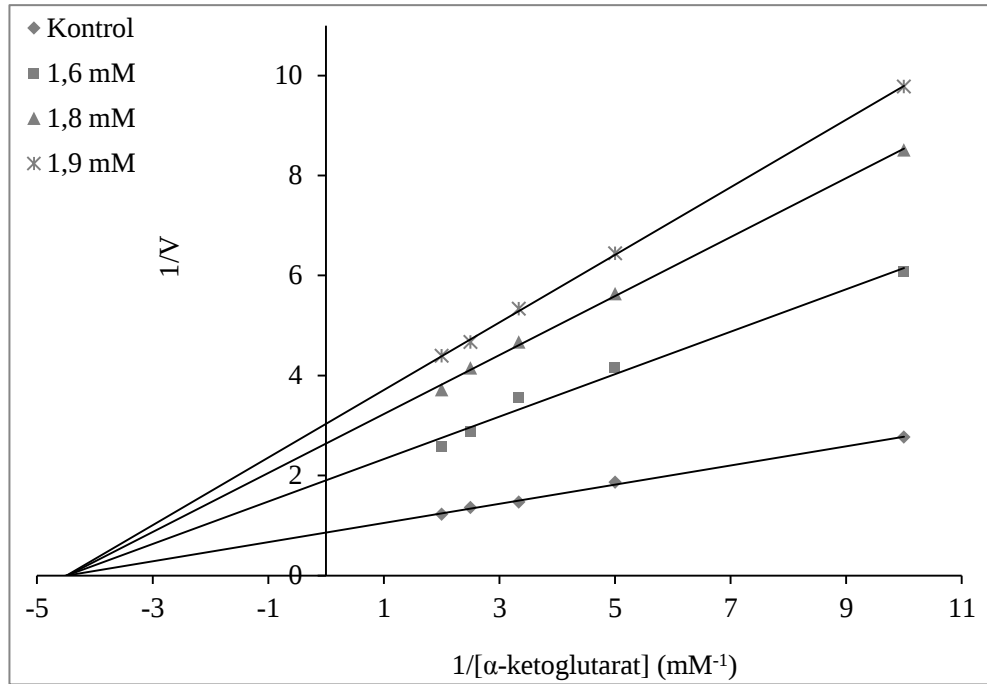
Şekil 4.26. Koyun karaciğer mitokondrial GDH enzimi için Ag^+ iyonunun inhibisyon türünü gösteren grafik



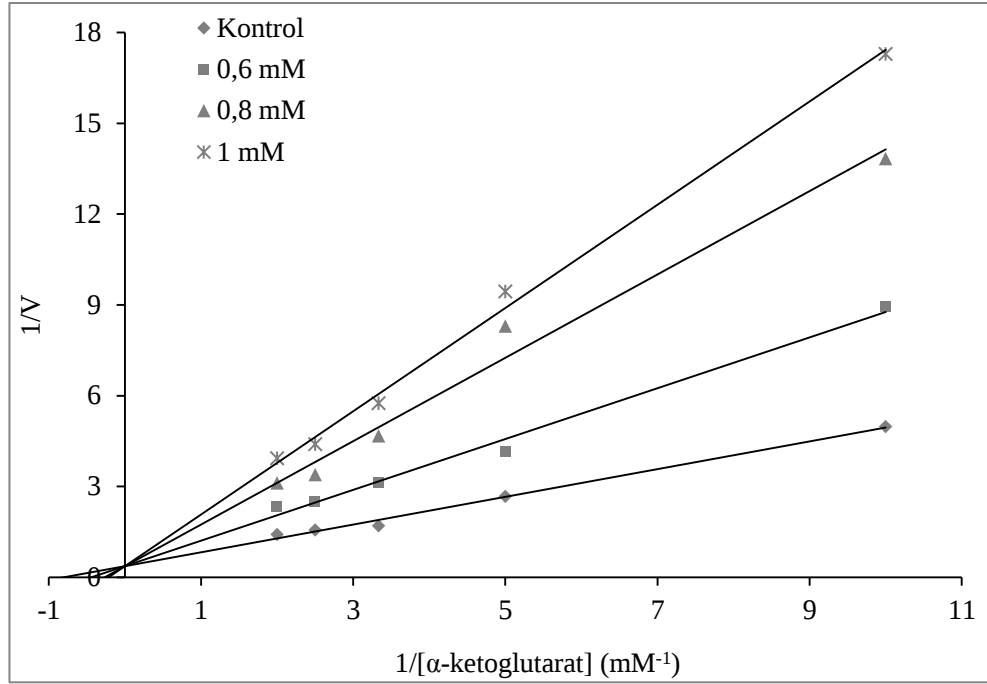
Şekil 4.27. Koyun karaciğer mitokondrial GDH enzimi için Zn^{+2} iyonunun inhibisyon türünü gösteren grafik



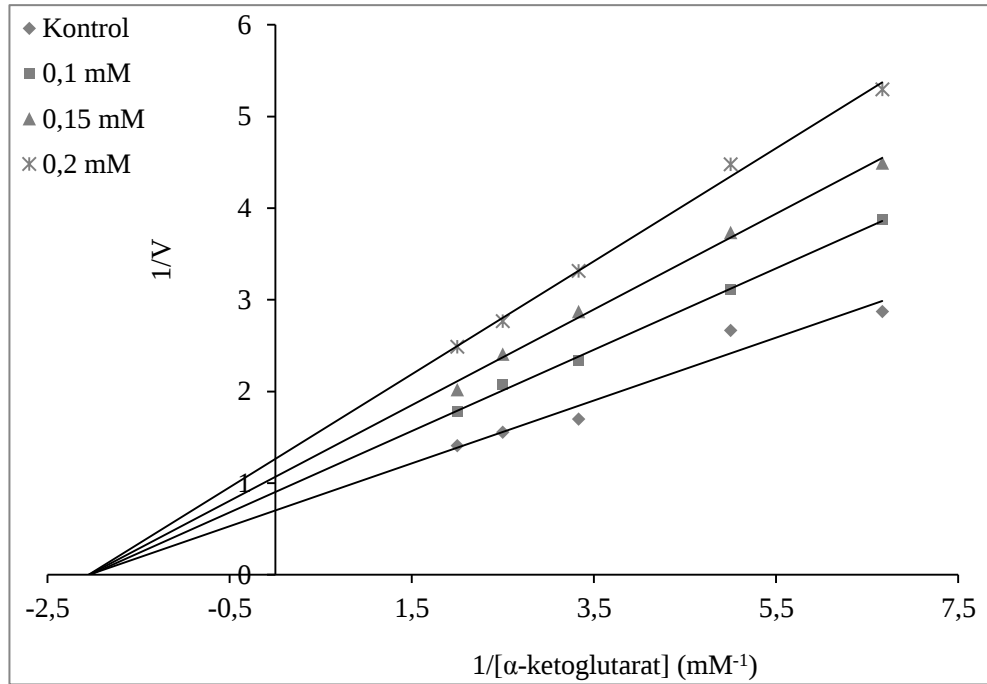
Şekil 4.28. Koyun karaciğer mitokondrial GDH enzimi için Cu^{+2} iyonunun inhibisyon türünü gösteren grafik



Şekil 4.29. Koyun karaciğer mitokondrial GDH enzimi için Co^{+2} iyonunun inhibisyon türünü gösteren grafik



Şekil 4.30. Koyun karaciğer mitokondrial GDH enzimi için Ni^{+2} iyonunun inhibisyon türünü gösteren grafik



Şekil 4.31. Koyun karaciğer mitokondrial GDH enzimi için Fe^{+3} iyonunun inhibisyon türünü gösteren grafik

Çizelge 4.3. Koyun karaciğer mitokondrial GDH enzimi için bulunan IC₅₀ değerleri, K_i sabitleri ve inhibisyon türleri

Metal iyon	IC ₅₀	Ortalama K _i	İnhibisyon türü
Ag⁺	0,13 µM	0,09±0,04 µM	Yarışmalı
Zn⁺²	11,75 µM	5,61±2,27 µM	Yarı yarışmalı
Cu⁺²	26,65 µM	29,16±8,1 µM	Yarışmasız
Co⁺²	1,23 mM	0,98±0,29 mM	Yarışmasız
Ni⁺²	0,72 mM	0,49±0,17 mM	Yarışmalı
Fe⁺³	0,25 mM	0,29±0,04 mM	Yarışmasız
Ca⁺²	Aktivasyon	-	-
Pb⁺²	Etkisiz	-	-
Mg⁺²	Etkisiz	-	-

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Glutamat dehidrogenaz (GDH) (E.C.1.4.1.3) kofaktör olarak ya NAD(H) ya da NADP(H)'ı kullanarak glutamatın α -ketoglutarata oksidatif deaminasyonunu dönüşümlü olarak katalizler (Smith *et al.* 1975). İnsan olgun GDH proteini her biri aminoasitten oluşan altı eş alt birimden oluşur. Enzimin hücresel metabolizmada ve enerji homostasizinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir (Zaganas and Plaitakis 2002). Pankreatik β hücrelerinde GDH'nin insülin salgı mekanizmasıyla ilgili olduğu sinir sisteminde ise enzimin nörotransmitter glutamat metabolizmasında ve nörodejeneratif süreçte rol oynadığı düşünülmektedir (Plaitakis *et al.* 1984; Plaitakis and Zaganas 2001).

İnsanda GDH sırasıyla GLUD1 ve GLUD2 genleri ile kodlanan bir house-keeping ve bir de sinir dokusuna spesifik iki izoenzimden oluşur (Mavrothalassitis *et al.* 1988; Michaelides *et al.* 1993; Shashidharan *et al.* 1994; Shashidharan *et al.* 1997). GLUD1 13 ekzondan oluşur ve 10. kromozomda bulunur, GLUD2 geninde intronlar bulunmaz ve X-bağılıdır. İnsan GDH'ı pürin nükleotidleri, steroid hormonları gibi farklı bileşiklerle allosterik olarak düzenlenir (Smith *et al.* 1975). İki GDH izoenzimi yüksek oranda homolog olmasına rağmen (%97 aminoasit benzerliği), düzenleyici özellikleriyle birbirlerinden ayrılır (Shashidharan *et al.* 1997; Plaitakis *et al.* 2000). GLUD1 tarafından kodlanan GDH GTP inhibisyonuna karşı hassasken, GLUD2 tarafından kodlanan GDH bu bileşiğe direnç gösterir. GLUD2-GDH ADP ya da L-lösin tarafından allosterik aktivasyona daha hassastır (Plaitakis *et al.* 2000). Ayrıca iki izoenzimin de substratlara karşı K_M 'leri önemli ölçüde farklıdır (Zaganas and Plaitakis 2002).

Literatürler incelendiğinde GDH enziminin omurgalılar, bakteriler, mantarlar ve bitkilere kadar birçok türden saflaştırıldığı ve kısmen karakterize edildiği görülmüştür. GDH'ı Kim *et al.* (2002) kolza tohumundan amonyum sülfat çöktürmesini takip eden üç farklı kolon kromatografisi ile dört basamakta saflaştırırken, McCarthy *et al.* (1980) öküz beyninden amonyum sülfat çöktürmesinin ardından iyon değişim ve afinite

kromatografisi teknikleriyle üç basamakta saflaştırmıştır. Benzer şekilde bakteriden ve mantardan yapılan çalışmalarda ise yine ardışık birkaç basamak kromatografi tekniği kullanarak saflaştırılmıştır (Florencio *et al.* 1987; Chavez and Candau 1991; Garnier *et al.* 1997). Çalışmamızda GDH enzimi koyun karaciğer mitokondrisinden homojenatın hazırlanması ve afinite kromatografisiyle tek kromatografik yöntem kullanılarak saflaştırıldı. Afinite kromatografisi, proteinlerin spesifik ligantları esasına dayanarak ayrılmasında kullanılan bir saflaştırma yöntemidir. Saflaştırılması istenen molekül, matriks adı verilen bir kolon dolgu maddesine kovalent olarak bağlanırken liganda spesifik ve tersinir bağlanır. Günümüzde diğer tekniklerle saflaştırılması birçok basamak isteyen, daha fazla zaman gerektiren biyolojik materyaller, afinite kromatografisi tekniği ile tek bir basamakta kompleks karışımlardan saflaştırılmaktadır. Saflaştırılacak madde için matrikse bağlanan ligandın spesifik ve tersinir bağlanma afinitesine sahip olması gerekmektedir (Keha ve Küfrevioğlu 2009). Afinite kromatografisi tekniği sayesinde enzim literatürdeki çalışmalardan daha kısa sürede ve daha az kimyasal kullanılarak yüksek spesifik aktiviteyle, yüksek saflıkta ve verimde saflaştırılmıştır. Ayrıca bu yöntemde kullanılan materyalin tekrar kullanılması ve diğer yöntemlerde çok az hacimlerde numune ile çalışılırken afinite kromatografisinde yüksek hacimlerde çalışması da bir avantajdır.

Çalışmamız sırasında kantitatif protein tayinleri ise Bradford yöntemi ile belirlendi. Bu yöntemin diğer protein tayin metotlarından üstün tarafı, bozucu etkilere karşı daha az hassas olması, reaksiyon yüksek oranda tekrarlanabilir olması, hızlı gerçekleşmesi ve renk stabilitesi bir saatin üstünde olmasıdır (Bradford 1976).

Elde edilen koyun karaciğer mitokondrial GDH'nin saflığını kontrol etmek amacıyla SDS-PAGE yapıldı. Yapılan elektroforez jelindeki protein bantları gümüş boyama metoduyla belirginleştirildi. Gümüş boyama yöntemi Coomassie Brilliant Blue boyamadan daha hassastır. ng miktardaki proteinin dahi görünmesini sağlar. Böylece elektroforez jelindeki tek bant saflaştırma işlemimizin yüksek saflıkta başarı ile gerçekleştiğini kanıtlamış oldu. Ayrıca enzimin alt birimlerinin molekül kütlesi aynı jel sayesinde $\log M_K - R_f$ grafiği çizilerek hesaplandı. Literatürler gözden geçirildiğinde

kolza tohumundan saflaştırılan GDH'nin özdeş 52 kDa molekül kütleinde altı alt birimden oluştuğu ve doğal halinin yaklaşık 300 kDa molekül kütleine sahip olduğu, öküz beyninden saflaştırılan GDH'nin alt birimlerinin molekül kütlei 55 ± 5 kDa, hekzamer olan güney kutup balığı eritrositi GDH enzimi 57,9 kDa, olarak bulunmuştur (McCarthy *et al.* 1980; Ciardiello *et al.* 1997; Kim *et al.* 2002). Bir siyanobakteri olan *Synechocystis* PCC 6803 den saflaştırılan tetramer olan GDH enziminin tabii molekül kütlei 208 ± 5 kDa, alt birimlerinin molekül kütlei ise 46 kDa olarak, birbirine eş dört alt birimden oluşan bataklık yosunu GDH enziminin tabii molekül kütlei 210 kDa, alt birimlerinin molekül kütlei ise 52 kDa olarak bulunmuştur (Florencio *et al.* 1987; Heeschen *et al.* 1996). Koyun karaciğeri mitokondrial GDH enzimi ise literatürlerle uyumlu olarak altı özdeş alt birimden oluştuğu bulundu. Enzimin tabii molekül kütlei ise 363 kDa olarak tespit edildi.

Bu güne kadar yapılan çalışmalarda GDH enziminin substratlarının K_M sabitleri araştırılmış ve çok farklı çeşitlilikte sonuçlar elde edilmiştir. El-Shora and Abo-Kassem (2001) yaptıkları çalışmada kabak bitkisi GDH enzimi için α -ketoglutarat ve NH_4^+ substratlarının K_M değerini araştırmışlar ve sırası ile 3,3 mM ve 33,3 mM olarak bulmuşlardır. Bu sonuca göre kabak bitkisi GDH enziminin α -ketoglutarata ilgisi NH_4^+ 'a göre 10 kat daha fazladır. *Synechocystis* PCC 6803 isimli bir bakteriden izole edilen GDH enziminin NADH yerine NADPH kullanıldığında reaksiyonun 42 kat daha yavaş gerçekleştiği görülmüştür. Tersisi olan reaksiyonda ise NAD^+ yerine $NADP^+$ kullanıldığında reaksiyonun 45 kat daha yavaş gerçekleştiği görülmüştür. Enzimin substratları olan α -ketoglutarat, amonyum, glutamat, NAD^+ ve NADH için K_M sabitleri sırasıyla 1,8 mM; 4,5 mM; 16,1 mM; 190 μ M ve 50 μ M olarak bulunmuştur (Chavez and Candau 1991). Bataklık yosunundan yapılan bir çalışmada ise GDH enzimi NADPH-bağımlı ve NADH-bağımlı olarak ikiye ayrıldıktan sonra; NADPH-bağımlı enzimin substratlarına olan ilgisini gösteren K_M sabitleri NADPH, α -ketoglutarat, NH_4Cl için sırasıyla $1,1\times10^{-4}$ M; $6,3\times10^{-3}$ M ve $4,1\times10^{-2}$ M olarak bulunmuştur. NADH-bağımlı GDH'nin K_M sabitleri NADH, α -ketoglutarat, NH_4Cl için sırasıyla $8,3\times10^{-6}$ M; $0,7\times10^{-3}$ M; $2,8\times10^{-2}$ M olarak tespit edilmiştir. NAD^+ bağımlı GDH enziminin glutamat için K_M sabiti $2,1\times10^{-3}$ M olarak bulunurken NAD^+ için $1,4\times10^{-4}$ M

olarak bulunmuştur. NADP^+ bağımlı GDH enziminin glutamat ve NADP^+ için K_M sabitleri tespit edilememiştir. NADH'ın K_M sabitinin NADPH'nin K_M sabitinden 13 kat daha düşük olduğu ve glutamat konsantrasyonu 25 mM'ın üzerine çıktığında enzimin inhibe olduğu görülmüştür (Heeschen *et al.* 1996). Yapılan bir başka çalışmada *Brassica nopus* yapraklarında saflaştırılan iki GDH izoenzimi GDH1 ve GDH7'nin K_M sabitleri araştırılmıştır. GDH1 izoenziminin amonyum, α -ketoglutarat, glutamat, NADH ve NAD^+ için K_M sabitleri sırasıyla 6,62 mM; 0,87 mM; 3,23 mM; 0,024 mM ve 0,116 mM olarak tespit edilmiştir. GDH7 izoenziminin ise amonyum, α -ketoglutarat, glutamat, NADH ve NAD^+ için K_M sabitleri sırasıyla 9,3; 0,64; 3,32; 0,021 ve 0,150 mM olarak bulunmuştur (Watanabe *et al.* 1999). Her iki izoenzim için de yakın değerlerle en yüksek ilginin NADH'a olduğu belirlenmiştir. Burbaeva *et al.* (2002) yaptıkları çalışmada insan beyni GDH III izoenziminin K_M sabitlerini araştırmışlar ve α -ketoglutarat için $1,51 \pm 0,12$ mM; NADH için $0,11 \pm 0,02$ mM; amonyum için $24,47 \pm 2,2$ mM; L-glutamat için $3,03 \pm 0,2$ mM; NAD^+ için $0,63 \pm 0,03$ mM ve NADP^+ için $0,72 \pm 0,05$ mM olarak tespit edilmiştir (Burbaeva *et al.* 2002). Yapılan başka bir çalışmada granüllü endoplazmik retikulum (RER) GDH enziminin substratlarının K_M değerleri hesaplanmış, glutamat için NAD^+ kullanıldığında $5,93 \pm 0,24$ mM; NADP^+ kullanıldığında ise $23,8 \pm 1,7$ mM olarak bulunmuştur. NAD^+ ve NADP^+ için K_M sabitleri sırasıyla $0,924 \pm 0,035$ mM ve $0,441 \pm 0,012$ mM olarak tespit edilmiştir. Aynı çalışmayı mitokondriyal GDH için yaptıklarında glutamat için NAD^+ kullanıldığında $4,61 \pm 0,32$ mM; NADP^+ kullanıldığında ise $20,7 \pm 2,6$ mM olarak bulunmuştur. NAD^+ ve NADP^+ için K_M sabitleri sırasıyla $0,364 \pm 0,026$ mM ve $0,637 \pm 0,025$ mM olarak tespit edilmiştir (Lee *et al.* 1999). Bu sonuca göre RER ve mitokondriyal GDH enzimlerinin adı geçen substratlara ilgisinin çok benzer olduğu görülmüştür. Yapılan bir başka çalışmada ise GDH enzimi bir siyanobakteri olan *Synechocystis* PCC 6803'den saflaştırılmış ve enzimin substratları için K_M sabitleri belirlenmiştir. Substratlardan NADP^+ , α -ketoglutarat ve amonyum için K_M sabitleri sırasıyla 20 μM , 1,5 mM ve 3,7 mM olarak belirlenmiştir (Florencio *et al.* 1987). *L.bicolor*'dan saflaştırılan GDH enziminin substratlarından amonyum, α -ketoglutarat, glutamat, NADH ve NAD^+ 'nın K_M sabitleri sırasıyla 37 mM; 1,35 mM; 0,24 mM; 0,089 mM ve 0,282 mM olarak bulunmuştur (Garnier *et al.* 1997). Bizim çalışmamızda ise koyun karaciğer mitokondrisinden saflaştırılan GDH enziminin K_M sabitleri belirlenmiştir. Enzimin

substratlarının ve koenzimlerinin K_M sabitlerinin; NADH, NADPH, α -ketoglutarat, NH_4^+ , NAD^+ , $NADP^+$ ve L-glutamat için sırası ile 0,14; 1,67; 0,40; 12,92; 1,21; 0,24 ve 5,57 mM olarak bulunmuştur. Bu sonuca göre enzimin ilgisinin 0,14 mM ile K_M sabiti en küçük olan NADH'a ait olduğu belirlenmiştir. Ayrıca enzimin aminasyon reaksiyonunda NADH'ı deaminasyon reaksiyonunda ise $NADP^{+}$ 'ı tercih ettiği de bu sonuçlardan elde edilmiştir.

Yapılan çalışmalara bakıldığında GDH enziminin optimal şartlarının pek araştırılmadığı belirlenmiştir. Bataklik yosunundan yapılan bir çalışmada aminasyon reaksiyonu için optimum pH 7,7; deaminasyon reaksiyonu için optimum pH 8,6 olarak bulunmuştur (Heeschen *et al.* 1996). *Synechocystis* PCC 6803 isimli bir bakteri GDH enzimi için yapılan çalışmada optimum pH 8,5-9,0 aralığı olarak bulunmuştur (Chavez and Candau 1991). Bir başka çalışmada ise *Synechocystis* PCC 6803'den elde edilen GDH enziminin ise aminasyon aktivitesi için optimum pH 7,5-8,0 arasında bulunmuştur (Florencio *et al.* 1987). Yapılan diğer bir çalışmada *Brassica nopus* yapraklarından elde edilen GDH1 ve GDH7 enzimlerinin her ikisi içinde birbirinin aynı olarak aminasyon ve deaminasyon aktivitelerinin optimum pH'ları sırasıyla 9,0 ve 9,5 olarak bulunmuştur (Watanabe *et al.* 1999). Diğer bir çalışmada ise kolza tohumu GDH enziminin optimum pH'sının 8,0 ve stabil pH'sının 5,5 olduğunu tespit edilmiştir (Kim *et al.* 2002). *L.bicolor*'dan saflaştırılan GDH enziminin optimum pH değeri aminasyon reaksiyonu için 7,4 deaminasyon reaksiyonu için ise 8,8 olarak belirlenmiştir (Garnier *et al.* 1997). Bizim çalışmamızda ise koyun karaciğer mitokondrisinden saflaştırılan GDH enzimi karakterize edilmiş ve literatüre benzer sonuçlar elde edilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda enzimin stabil pH'sı 7,0; optimum pH'sı 7,5; optimum iyonik şiddeti 500 mM K-fosfat tampon çözeltisi ve optimum sıcaklığı 40°C olarak bulunmuştur.

GDH, karbohidrat ve amino asit metabolizması arasında önemli bir bağ olarak görev yapar ve GDH'nin birçok görevi rapor edilmiştir. Örneğin; serebellar dejenerasyon olan hastalarda GDH'nin kısmi eksikliği görülmüş ve enzimin beyin fonksiyonlarında önemli olduğu kanısına varılmıştır (Hussain *et al.* 1989). Ayrıca, glutamat alımının inhibe olduğu model sistemlerde GDH sinir koruyucu değer gösterir (Gorovitis *et al.* 1997).

GDH'nin ekspresyonunun antisens oligonükleotidlerle inhibisyonunun, bu inhibisyonun ilk safhasında etkilenen dopaminerjik nöronlarla üretilmiş mezonsefalik nöronlarla toksik olduğu rapor edilmiştir (Platakis and Shashidharan 2000). Genetik olarak epilepsi olan sıçanlarda GDH ekspresyonunda spesifik değişiklikler gözlenmiştir (Dutuit 2000). Bunun yanısıra, membran bağlı GDH formu mikrotübül bağlı aktivite gösterir (Rajas *et al.* 1996). GDH RNA-bağlı protein olarak davranır ve transkripsiyonun düzenlenmesinde muhtemel rol oynar (McDaniel 1995; Bringaud *et al.* 1997). Cavallaro *et al.* (1997) GDH'nin hipokampüste geç hafıza ile ilgili genlerden biri ile ilişkili olduğunu ve Frattini *et al.* (1997) GDH'nin Xq24-25'de yüzük parmağı gen ailesinin yeni bir üyesi olduğunu aydınlatmıştır. Hiperinsülinizm-hiperamonnemi sendromlarının varlığı insülin salınımının düzenlenmesinde ve hepatik üre oluşmasının düzenlenmesinde GDH'nin önemini vurgulamıştır (Stanley *et al.* 1998; Tanizawa *et al.* 2002; Li *et al.* 2003; Yang *et al.* 2003). Bu sonuçlar gösteriyor ki GDH enziminin inhibisyon çalışmaları son derece önemlidir.

Bu güne kadar GDH enzimi üzerine yapılan inhibisyon çalışmalarında aşağıdaki sonuçlar tespit edilmiştir. Choudhry and Punekar (2007) yaptığı çalışmada sığır karaciğer GDH enzimleri üzerine 2-metilen glutarat, izofoalat ve 2,4-piridindikarboksilat moleküllerinin inhibisyon etkisini incelemiştir. Sığır karaciğeri NAD^+ bağımlı GDH'nin izofoalat için K_i sabiti 475 μM , NADP^+ bağımlı GDH'nin izofoalat için K_i sabiti 3100 μM olarak bulunmuştur. Benzer şekilde 2-metilenglutarat ve 2,4-piridin dikarboksilat molekülleri için K_i sabitleri sırasıyla 5,8 μM ; 67 μM ; 866 μM ve 6000 μM olarak tespit edilmiştir. Moleküllerin tamamının sığır GDH enzimini yarışmalı olarak inhibe ettiği bulunmuştur (Choudhry and Punekar 2007). Kolza tohumundan yapılan bir çalışmada NADP^+ 'ya spesifik GDH için Ag^+ 'nın kuvvetli bir inhibitör olduğu tespit edilmiştir (Kim *et al.* 2002). Bir diğer çalışmada *L.bicolor*'dan saflaştırılan NADH bağımlı enzimin hem aminasyon hemde deaminasyon aktiviteleri üzerine metal iyonların etkileri araştırıldığında ise Ca^{+2} iyonlarının %150-%175 aktivasyona sebep olduğu görülmüştür. Her iki yönde reaksiyonda da Mn^{+2} ve Cu^{+2} iyonlarının enzimi inhibe ettiği ancak Mg^{+2} iyonunun MgCl_2 tuzunun aktivasyona sebep olurken MgSO_4 tuzunun inhibisyona neden olduğu tespit edilmiştir (Garnier *et al.* 1997). Yapılan literatür taramasında Ca^{+2}

iyonlarının enzimin aktivitesini artırdığı görülmüş, bu nedenle farklı konsantrasyonlarda CaCl_2 varlığında enzimin hem aminasyon hem de deaminasyon aktiviteleri ölçülmüştür. Glutamat oluşumunun 20 mM CaCl_2 varlığında %25 arttığı, deaminasyon aktivitesinin ise %108 arttığı gözlenmiştir (Florencio *et al.* 1987). Bizim çalışmamızda ise koyun karaciğer mitokondrial GDH enzimi üzerine Ag^+ , Zn^{+2} , Cu^{+2} , Co^{+2} , Ni^{+2} , Fe^{+3} , Mg^{+2} , Pb^{+2} ve Ca^{+2} metal iyonlarının inhibisyon etkileri araştırılmıştır. Ag^+ , Zn^{+2} , Cu^{+2} , Co^{+2} , Ni^{+2} ve Fe^{+3} 'ün sırası ile 0,13 μM ; 11,75 μM ; 26,65 μM ; 1,23 mM; 0,72 mM ve 0,25 mM IC_{50} değerleri ile enzimi inhibe ettiği belirlenmiştir. Ca^{+2} 'nin ise enzimi aktive ettiği tespit edilmiştir. Enzim üzerine inhibisyon etkisi gösteren, Ag^+ , Zn^{+2} , Cu^{+2} , Co^{+2} , Ni^{+2} ve Fe^{+3} metal iyonlarının K_i sabitleri sırası ile $0,09 \pm 0,04$ μM , $5,61 \pm 2,27$ μM , $29,16 \pm 8,1$ μM , $0,98 \pm 0,29$ mM, $0,49 \pm 0,17$ mM ve $0,29 \pm 0,04$ mM olarak tespit edilmiştir. Ayrıca söz konusu enzimi Ag^+ ve Ni^{+2} 'nin yarışmalı olarak, Cu^{+2} , Co^{+2} ve Fe^{+3} 'ün yarışmasız olarak ve Zn^{+2} 'nin yarı yarışmalı olarak inhibe ettiği belirlenmiştir.

Günümüzde insanoğlunun karşılaştığı en büyük sorun çevre kirliliğidir. Çevre kirliliğinin başında ise sanayi atıklarından kaynaklanan kirlilikler gelmektedir. Çevre şartlarını umursamayan kuruluşların çevreye bıraktığı kirleticilerden biri de ağır metal atıklarıdır. Ağır metaller özellikle suya karışarak kontrolsüz bir şekilde çevreye yayılmaktadır. Sanayi atıklarına insanoğlu ya doğrudan ya da dolaylı olarak maruz kalabilir. Bu durum dikkatleri toksikoloji alanında çalışmalara çekmiştir.

Toksikoloji, kimyasallar ile biyolojik sistem arasındaki etkileşimleri zararlı sonuçları yönünden inceleyen ve toksik kimyasalların zararsızlık limitlerini belirleyen bilim dalıdır. Her kimyasalın doza bağımlı olarak toksik etki gösterebilmesi gerçeği toksikolojinin uğraş konusunu ilaç, kozmetik, tarım ilacı, gıda katkı maddeleri, ev temizlik malzemesi ve endüstriyel kimyasallar olarak çok geniş bir alana yaymaktadır. Bütün bu kimyasallara, organizmaya yabancı anlamına gelen “ksenobiyotik” adı da verilmektedir (Güner 2008).

Birçok metal, insan ve hayvanlar için esansiyeldir. Esansiyel olanlar, eksikliklerinde olduğu gibi fazla miktarlarda alındıklarında da vücut homeostazını bozarak toksik etki

oluşturabilirler. Bugün “endüstriyel metaller” olarak nitelendirilen yaklaşık 50 metal ve alaşımı çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır. Ayrıca metaller ve tuzları tıpta ve veteriner hekimlikte ilaç, pestisit (fungisit, insektisit, herbisit, rodendisit gibi) olarak da kullanılmaktadır. Başta besinler olmak üzere diğer bazı yollarla (su, hava gibi) alınan metaller “vücut metal yükü” oluşturmakta; bazıları ise (alüminyum, kurşun ve kadmiyum gibi) yaş ilerledikçe birikerek vücuttaki konsantrasyonları artmaktadır (Güner 2008).

Sonuç olarak; bu çalışma kapsamında bu tarz durumlarda metabolizma için yüksek önem taşıyan glutamat dehidrogenaz enziminin ne oranda etkilendiğini incelemek amacı ile koyun karaciğeri mitokondrisinden GDH enzimi izole edilmiş, çevresel etkilere karşı duyarlılığını incelemek için karakterize edilmiş ve metal atıkların ne gibi etkiler gösterdiğini belirlemek için bazı metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi *in vitro* şartlarda incelenmiştir. Koyun karaciğer mitokondrisinden glutamat dehidrogenaz enzimi 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi kullanılarak literatürde ilk kez tek basamakta saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimin yaklaşık olarak 1320 EÜ/mg protein spesifik aktiviteyle, 272 kat ve %9 verimle saflaştırıldığı tespit edilmiştir. Saflaştırılan enzim karakterize edilmiş; Stabil pH'sı 500 mM K-fosfat tamponunda pH: 7,0; Optimum pH'sı 500 mM K-fosfat tamponunda pH: 7,5; Optimum iyonik şiddeti 500 mM K-fosfat tamponu pH: 7,5 ve Optimum sıcaklığı 40°C olarak bulunmuştur. Saflaştırılan enzimin tabii molekül kütlesi jel filtrasyon kromatografisi ile 363 kDa ve alt birim molekül kütlesi 62 kDa olarak bulunmuştur. Bu sonuca göre enzimin özdeş altı alt birimden oluştuğu belirlenmiştir. Saflaştırılan enzimin substratlarının ve koenzimlerinin K_M - V_{max} değerleri araştırılmıştır. NADH, NADPH, α -ketoglutarat, NH_4^+ , NAD^+ , $NADP^+$ ve L-glutamat için sırası ile K_M değerleri 0,14; 1,67; 0,40; 12,92; 1,21; 0,24 ve 5,57 mM olarak bulunmuştur. V_{max} değerleri NADH, NADPH, α -ketoglutarat, NH_4^+ , NAD^+ , $NADP^+$ ve L-glutamat için sırası ile 3,86; 3,08; 1,68; 1,32; 0,81; 0,27 ve 0,46 EÜ/ml olarak bulunmuştur. İnhibisyon çalışmasında ise Ag^+ , Zn^{+2} , Cu^{+2} , Co^{+2} , Ni^{+2} , Fe^{+3} , Mg^{+2} , Pb^{+2} ve Ca^{+2} metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkileri araştırılmış ve Ag^+ , Zn^{+2} , Cu^{+2} , Co^{+2} , Ni^{+2} ve Fe^{+3} 'ün enzimi inhibe ettiği bulunmuştur. Ca^{+2} ise enzimi aktive etmiştir. İnhibisyon etkisi gösteren Ag^+ , Zn^{+2} ,

Cu^{+2} , Co^{+2} , Ni^{+2} ve Fe^{+3} 'ün IC_{50} değerlerinin sırası ile 0,13 μM ; 11,75 μM ; 26,65 μM ; 1,23 mM; 0,72 mM ve 0,25 mM olduğu belirlenmiştir. İnhibisyon etkisi gösteren metal iyonlarının inhibisyon türünü ve K_i sabitini belirlemek amacı ile Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Enzim üzerine inhibisyon etkisi gösteren Ag^+ , Zn^{+2} , Cu^{+2} , Co^{+2} , Ni^{+2} ve Fe^{+3} metal iyonlarının K_i sabitleri sırası ile $0,09 \pm 0,04 \mu\text{M}$, $5,61 \pm 2,27 \mu\text{M}$, $29,16 \pm 8,1 \mu\text{M}$, $0,98 \pm 0,29 \text{ mM}$, $0,49 \pm 0,17 \text{ mM}$ ve $0,29 \pm 0,04 \text{ mM}$ olarak tespit edilmiştir. Söz konusu enzimi Ag^+ ve Ni^{+2} 'nin yarışmalı olarak, Cu^{+2} , Co^{+2} ve Fe^{+3} 'ün yarışmasız olarak ve Zn^{+2} 'nin yarı yarışmalı olarak inhibe ettiği de belirlenmiştir. Sonuçlar toplu olarak Çizelge 5.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 5.1. Koyun karaciğer mitokondrial GDH enzimi için bulunan karakterizasyon sonuçları, IC₅₀ değerleri, K_i sabitleri ve inhibisyon türleri

Karakterizasyon Sonuçları	Alt birim molekül kütlesi		62 kDa	
	Tabii molekül kütlesi		363 kDa	
	Optimum pH		7,5	
	Optimum iyonik şiddet		500 mM	
	Stabil pH		7,0	
	Optimum sıcaklık		40°C	
K _M -V _{max} Sonuçları			K _M (mM)	V _{max} (EÜ/ml)
	NADH		0,14	3,86
	NADPH		1,67	3,08
	α-ketoglutarat		0,40	1,68
	NH ₄ ⁺		12,92	1,32
	NAD ⁺		1,21	0,81
	NADP ⁺		0,24	0,27
	L-glutamat		5,57	0,46
İnhibisyon Sonuçları				
	Metal iyon	IC ₅₀	Ortalama K _i	İnhibisyon türü
	Ag ⁺	0,13 µM	0,09±0,04 µM	Yarışmalı
	Zn ⁺²	11,75 µM	5,61±2,27 µM	Yarı yarışmalı
	Cu ⁺²	26,65 µM	29,16±8,1 µM	Yarışmasız
	Co ⁺²	1,23 mM	0,98±0,29 mM	Yarışmasız
	Ni ⁺²	0,72 mM	0,49±0,17 mM	Yarışmalı
	Fe ⁺³	0,25 mM	0,29±0,04 mM	Yarışmasız
	Ca ⁺²	Aktivasyon	-	-
	Pb ⁺²	Etkisiz	-	-
	Mg ⁺²	Etkisiz	-	-

Koyun karaciğer mitokondrial GDH enzimi üzerine inhibisyon etkisini incelediğimiz Ag, Zn, Cu, Co, Ni, Fe, Mg, Pb ve Ca gibi elementlerden Cu, Zn ve Fe elementleri canlılarda normal gelişim ve biyolojik işlevlerin sürdürülebilmesi için enzimlerin koenzimi olarak iş görmeleri açısından gereklidirler. Ancak bu metallerin ve diğer toksik metallerin ortamdaki derişimlerinin artması;

- Karaciğer gibi metabolik aktivitesi yüksek olan organlarda metal birikmesine
- Enzimlerin aktif bölgelerini bloke ederek organizmada toksik etkilerin ortaya çıkmasına
- Metabolizma içinde fonksiyonu olan eser elementlerin yerine geçerek hücrede eser elementlerce yapılan işlemlerin durmasına (Örneğin Cd benzer elektron dizilimine sahip Zn yerine geçerek hücre içinde koenzim, kofaktör görevlerini sekteye ugratabilir.)
- Hücre içi dengenin kurulmasında hayati önemi olan Na, K, Ca gibi elementlerin hücre zarından geçişinde fizyolojik rekabet sonunda bu iyonlara bağlı olan fizyolojik olayın bloke olmasına
- Serbest radikal ile hücre zarı geçirgenliği bozulmasına (Özellikle Hg, Pb gibi toksitesi yüksek olan ağır metaller bu yolla etkilerini gösterirler.)
- Bazı ağır metaller mitokondri ve hücre enerji üretim sisteminin olumsuz etkilenmesine neden olur (Güner 2008).

Sanayi atıklarına maruz kalan canlılardan oluşan diyet insan için büyük tehlike oluşturur. Her ne kadar toksik maddeler için savunma sistemi canlılarda mevcut olsa da atılamayan kısım omurgalıların karaciğerinde birikir. Böyle bir birikime sahip diyet ile beslenen canlılar yoğun bir şekilde toksik maddelere istemeden de olsa maruz kalmış olur. Bu nedenle kaynakların gittikçe daraldığı günümüzde özellikle ekonomik önemi olan canlıların bu kirlilikten nasıl etkilendiğinin incelenmesi zorunluluk haline gelmiştir.

KAYNAKLAR

- Allen, A., Kwagh, J., Fang, J., Stanley, C.A., Smith, T.J., 2004. Evolution of glutamate dehydrogenase regulation of insulin homeostasis is an example of molecular exaptation. *Biochem.*, 43, 14431-14443.
- Baker, P.J., Britton, K.L., Engel, P.C., Parrants, G.W., Lilley, K.S., Rice, D.W. and Stillman, T. J., 1992. Subunit assembly and active site location in the structure of glutamate dehydrogenase. *Proteins Struct. Funct. Genet.*, 12, 75-86.
- Bigersson, B., Sterner, O., Zimerson, E., 1988. Eineverständliche Einführung in die Toxikologie. *Cheime und Gesundheit*, ISBN. 3-527-26-455-8.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.*, 72, 248.
- Bringaud, F., Stripecke, R., French, G.C., Freedland, S., Turck, C., Byrne, E.M. and Simpson, L., 1997. Mitochondrial glutamate dehydrogenase from *Leishmania tarentolae* is a guide RNA-binding protein. *Mol. and Cell. Bio.*, 17, 3915-3923.
- Britton, K.L., Baker, P.J., Rice, D.W. and Stillman, T.J., 1992. Structural relationship between the hexameric and tetrameric family of glutamate dehydrogenases. *Eur. J. Biochem.*, 209, 851-859.
- Burbaeva, G.S., Turishcheva, M.S., Vorobyeva, E.A., Savushkina, O.K., Tereshkina, E.B., Boksha, I.S., 2002. Diversity of glutamate dehydrogenase in human brain. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 26, 427-435.
- Cavallaro, S., Meiri, N., Yi, C.L., Musco, S., Ma, W., Goldberg, J. and Alkon, D.L., 1997. Late memory-related genes in the hippocampus revealed by RNA fingerprinting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 94, 9669-9673.
- Chavez, S. and Candau, P., 1991. An NAD-specific glutamate dehydrogenase from cyanobacteria identification and properties. *FEBS*, 285, 35-38.
- Choi, M.M., Hwang, E.Y., Kim, E.A., Huh, J.W., Cho, S.W., 2008. Identification of amino acid residues responsible for different GTP preferences of human glutamate dehydrogenase isozymes, *BBRC*, 368, 742-747.
- Choudhury, R. and Punekar, N.S., 2007. Competitive inhibition of glutamate dehydrogenase reaction. *FEBS Letters*, 581, 2733-2736.
- Ciardiello, M.A., Cumurdella, L., Carrutore, V. and Di Prisco, G., 1997. Enzymes in antarctic fish: Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase and Glutamate Dehydrogenase, *Comp. Biochem. Physiol.*, 118A, 4, pp. 1031-1036.
- Ciardiello, M.A., Cumurdella, L., Carrutore, V. and Prisco, G.D., 1997. Enzymes in Antarctic Fish: Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase and Glutamate Dehydrogenase. *Comp. Biochem. Physiol.*, Vol. 118A, (4), 1031-1036.
- Corman, L., Prescott, L.M., Kaplan, N.O., 1966. Purification and kinetic characteristics of dogfish liver glutamate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, 242, 1383-1390.
- Dutuit, M., Didier-Bazes, M., Vergnes, M., Mutin, M., Conjard, A., Akaoka, H., Belin, M.F. and Touret, M., 2000. Specific alteration in the expression of glial fibrillary acidic protein, glutamate dehydrogenase, and glutamine synthetase in rats with genetic absence epilepsy. *Glia.*, 32, 15-24.

- Duvoisin, R.C., Chokroverty, S., Lepore, F., Nicklas, W.J., 1983. Glutamate dehydrogenase deficiency in patients with olivopontocerebellar atrophy, *Neurology.*, 33, 1322-1326.
- El-Shora, H.M. and Abo-Kassem, E.M., 2001. Kinetic characterization of glutamate dehydrogenase of marrow cotyledons. *Plant Science.*, 161, 1047-1053.
- Florencio, F.J., Marques, S. and Candau, P., 1987. Identification and characterization of a glutamate dehydrogenase in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *FEBS*, 223, 1, 37-41.
- Fonnum, F., 1984. Glutamate: A neurotransmitter in mammalian brain. *J. Neurochem.*, 42, 1-10.
- Frattoni, A., Faranda, S., Bagnasco, L., Patrosso, C., Nulli, P., Zucchi, I. and Vezzoni, P., 1997. Identification of a new member (ZNF183) of the Ring finger gene family in Xq24-25. *Gene.*, 192, (2) 291-298.
- Garnier, A., Berredjem, A. and Botton, B., 1997. Purification and characterization of the NAD-Dependent Glutamate Dehydrogenase in the ectomycorrhizal fungus *laccaria bicolor* (maire) orton. *Fungal Genet Bio.*, 22, 168-176.
- Gorovitis, R., Avidan, N., Avisar, N., Shaked, I. and Vardimon, L., 1997. Glutamine synthetase protects against neuronal degeneration in injured retinal tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94, 7024-7029.
- Güner, U., 2008. Toksikoloji. Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Edirne.
- Harvey, R.A., Champe, P.C. and Ferrier, D.R., 2007. *Biochemistry*. Lippincott Williams & Wilkins, 440 p, New York, USA.
- Heeschen, V., Gerendas, J., Richter C.P. and Rudolph, H., 1996. Glutamate Dehydrogenase of *Sphagnum*. *Phytochemistry.*, 45, 5. pp. 881-887.
- Hudson, R.C. and Daniel, R.M., 1993. L-Glutamate dehydrogenases: Distribution, properties and mechanism. *Camp. Biochem. Physiol.*, 106B, 767-792.
- Hussain, M.H., Zannis, V.I. and Plaitakis, A., 1989. Characterization of glutamate dehydrogenase isoproteins purified from cerebellum of normal subjects and patients with degenerative neurological disorders and human neoplastic lines. *J. Biol. Chem.*, 264, 20730-20735.
- Kahvecioğlu, Ö., Kartal, G., Güven, A., Timur, S., 2003. Metallerin Çevresel Etkileri -I, İTÜ Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü, İstanbul.
- Keha, E.E. ve Küfrevioğlu, Ö.İ., 2009. *Biyokimya. Aktif Yayınevi*, Erzurum. 637.
- Kim, Y.J., Yoshizawa, M., Takenala, S., Murakami, S. and Aoi, K., 2002. Ammonia assimilation in *klebsiella pneumoniae* F-5-2 that can utilize ammonium and nitrate ions simultaneously: Purification and characterization of glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase. *J. Biosci. Bioeng.*, 93, 6, 584-588.
- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lee, W.-K., Shin, S., Cho, S.S. and Park, J.-S., 1999. Purification and characterization of glutamate dehydrogenase as another isoprotein binding to the membrane of rough endoplasmic reticulum. *J. Cell. Biochem.*, 76: 244-253.
- Li, C., Najafi, H., Daikhin, Y., Nissim, I.B., Collins, H.W., Yudkoff, M., Matschinsky, F.M. and Stanley, C.A., 2003. Regulation of leucine-stimulated insulin secretion and glutamine metabolism in isolated rat islets. *J. Biol. Chem.*, 278, 2853-2858.

- Lilley, K.S., Baker, P.J., Britton, K.L., Stillman, T.J., Brown, P.E., Moir, A.G., Engel, P.C. and Rice, D.W., 1991. The partial amino acid sequence of the NAD⁺-dependent glutamate dehydrogenase of *Clostridium symbiosum*: implications for the evolution and structural basis of coenzyme specificity. *Biochim. Biophys. Acta*, 1080, 191-197.
- Lineweaver, H. and Burk, D., 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.*, 57, 685.
- Mavrothalassitis, G., Tzimagiorgis, G., Mitsialis, A., Zannis, V.I., Plaitakis, A., Papamatheakis, J. and Moschonas, N.K., 1988. Isolation and characterization of cDNA clones encoding for human liver glutamate dehydrogenase: Evidence for a small gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 85, 3494-3498.
- McCarthy, A.D., Walker, J.M. and Tipton, K.F., 1980. Purification of glutamate dehydrogenase from ox brain and liver. *Biochem J.*, 191, 605-611.
- McDaniel, H.G., 1995. Comparison of the primary structure of nuclear and mitochondrial glutamate dehydrogenase from bovine liver. *Arch. Biochem. Biophys.*, 319, 316-321.
- McPherson, M.J. and Wootton, J.C., 1983. Complete nucleotide sequence of the escherichia coli GDHA gene. *Nucleic Acids Res.*, 11, 5257-5266.
- Michaelides, T.M., Tzimagiorgis, G., Moschonas, N.K. and Papamatheakis, J., 1993. The human glutamate dehydrogenase gene family: gene organization and structural characterization. *Genomics*, 16, 150-160.
- Nelson, D.L. and Cox, M.M., 2005. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Worth Publishers, 1152 p, New York, USA.
- Özaslan, M.S., 2014. Glutatyon s-transferaz enziminin van gölü balığı (*chalcalburnus tarichi pallas*) karaciğerinden saflaştırılması, karakterizasyonu ve bazı metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Plaitakis, A. and Shashidharan, P., 2000. Glutamate transport and metabolism in dopaminergic neurons of substantia nigra: implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. *J. Neurol.*, 247, 1125-1135.
- Plaitakis, A. and Zaganas, I., 2001. Regulation of human glutamate dehydrogenases: implications for glutamate, ammonia and energy metabolism in brain. *J. Neurosci. Res.*, 66, 899-908.
- Plaitakis, A., Berl, S. and Yahr, M.D., 1984. Neurological disorders associated with deficiency of glutamate dehydrogenase. *Ann. Neurol.*, 15, 144-153.
- Plaitakis, A., Metaxari, M. and Shashidharan, P., 2000. Nerve tissue-specific (GLUD2) and housekeeping (GLUD1) glutamate dehydrogenases are regulated by distinct allosteric mechanisms: implications for biologic functions. *J. Neurochem.*, 75, 1862-1869.
- Rajas, F., Gire, V. and Rousset, B., 1996. Involvement of a membrane-bound form of glutamate dehydrogenase in the association of lysosomes to microtubules. *J. Biol. Chem.*, 271, 29882-29890.
- Rice, D.W., Hornby, D.P. and Engel, P.C., 1985. Crystallization of an NAD⁺-dependent glutamate dehydrogenase from *Clostridium symbiosum*. *J. Mol. Biol.*, 181, 147-149.
- Segel, I.H., 1968. *Biochemical Calculations*, Inc, New York, P:403.
- Segel, I.H., 1975. *Enzyme Kinetics*. Wiley-Interscience, New York, 564-567.

- Shashidharan, P., Clarke, D.D., Ahmed, N., Moschonas, N. and Plaitakis, A., 1997. A nerve tissue-specific human glutamate dehydrogenase that is thermolabile and highly regulated by ADP. *J. Neurochem.*, 68, 1804-1811.
- Shashidharan, P., Michaelides, T.M., Robakis, N.K., Kretsovali, A., Papamatheakis, J. and Plaitakis, A., 1994. Novel human glutamate dehydrogenase expressed in neural and testicular tissues and encoded by an X-linked intronless gene. *J. Biol. Chem.*, 269, 16971-16976.
- Smith, C., Marks, A.D., Lieberman, M., 2007. *Marks' Basic Medical Biochemistry A Clinical Approach*. Lippincott Williams & Wilkins, 976 p, New York, USA.
- Smith, E.L., Austen, B.M., Blumenthal, K.M. and Nyc, J.F., 1975. The enzymes, 3rd Edn. Academic Press, New York vol. 11, 293-367.
- Smith, E.L., Austin, B.M., Blumenthal, K.M. and Nyc, J.F., 1975. Glutamate dehydrogenase; in *The enzymes*. Academic Press, New York, USA. 11, 293-367.
- Stanley, C.A., Lieu, Y.K., Hsu, B.Y., Burlina, A.B., Greenberg, C.R., Hopwood, N.J., Perlman, K., Rich, B.H., Zammarchi, E., Poncz, M., 1998. Hyperinsulinism and hyperammonemia in infants with regulatory mutations of the glutamate dehydrogenase gene. *N. Engl. J. Med.*, 338, 1352-1357.
- Stanley, C.A., Lieu, Y.K., Hsu, B.Y.L., Burlina, A.B., Greenberg, C.R., Hopwood, N.J., Perlman, K., Rich, B.H., Zammarchi, E. and Poncz, M., 1998. Hyperinsulinism and hyperammonemia in infants with regulatory mutations of the glutamate dehydrogenase gene. *New Engl. J. Med.*, 338, 1353-1357.
- Tanizawa, Y., Nakai, K., Sasaki, T., Anno, T., Ohta, Y., Inoue, H., Matsuo, K., Koga, M., Furukawa, S. and Oka, Y., 2002. Unregulated elevation of glutamate dehydrogenase activity induces glutamine-stimulated insulin secretion: identification and characterization of a GLUD1 gene mutation and insulin secretion studies with MIN6 cells overexpressing the mutant glutamate dehydrogenase. *Diabetes*, 51, 712-717.
- Telefoncu, A., 1986. *Temel ve Uygulamalı Enzimoloji*, Ege Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Yayını (Der) 59, İzmir.
- Veronese, F.M., Bevilacqua, R., Boccu', E., Brown, D.M., 1976. Glutamate dehydrogenase from tuna liver. Purification, characteristics and sequence of a peptide containing an essential lysine residue. *Biochim. Biophys. Acta*, 445, 1-13.
- Veronese, F.M., Nyc, J.F., Degani, Y., Brown, D.M. and Smith, E. L., 1974. Nicotinamide adenine dinucleotide-specific glutamate dehydrogenase of *Neurospora*. I. Purification and molecular properties. *J. Biol. Chem.*, 249, 7922-7928.
- Watanabe, M., Hoshino, T., Kikuchi, A., Watanabe, Y., 1999. Purification and characterization of two glutamate dehydrogenase isoenzymes from *Brassica napus*. *Plant. Physiol. Biochem.*, 37, 731-739.
- Yang, S.-J., Huh, J.-W., Kim, M.J., Lee, W.-J., Kim, T.U., Choi, S.Y. and Cho, S.-W., 2003. Regulatory effects of 5'-deoxypyridoxal on glutamate dehydrogenase activity and insulin secretion in pancreatic islets. *Biochimie.*, 85, 581-586.

Zaganas, I. and Plaitakis, A., 2002. Single amino acid substitution (G456A) in the vicinity of the GTP binding domain of human housekeeping glutamate dehydrogenase markedly attenuates GTP inhibition and abolishes the cooperative behavior of the enzyme. *J. Biol. Chem.*, 277, 26422–26428.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Samsun'un Bafra ilçesinde doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Samsun'da tamamladı. 2003 yılında lisans öğrenimine başladığı Atatürk Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü'nden 2007 yılında mezun oldu. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilimdalı, Biyokimya Bilimdalı'nda başladığı yüksek lisans öğrenimini 2011 yılında tamamladı. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilimdalı, Biyokimya Bilimdalı'nda doktora eğitimine başladı.