

**T.C.
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİMİNİN KOYUN DALAK
DOKUSUNDAN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FATİH YÜKSEL

KİMYA

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Yusuf TEMEL**

BİNGÖL-2022



T.C.
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİMİNİN KOYUN DALAK DOKUSUNDAN
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

Doç. Dr. Yusuf TEMEL danışmanlığında, Fatih YÜKSEL tarafından hazırlanan bu çalışma 08/09/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan	: Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ	İmza	:
Üye	: Doç. Dr. Ümit Muhammet KOÇYİĞİT	İmza	:
Üye	: Doç. Dr. Yusuf TEMEL	İmza	:

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulunun// tarih ve/
nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Zafer ŞİAR
Enstitü Müdürü

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.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezi olarak sunulan bu çalışmanın yürütülmesi için gerekli ortamı sağlayan Bingöl Üniversitesi Kimya Bölüm Başkanı Prof. Dr. Zafer ŞERBETÇİ'ye ve kimya bölümü öğretim elemanlarına teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana yol gösteren her türlü desteğini gördüğüm, insani değerlerini örnek edindiğim, tez eğitimimi onunla yapmaktan gurur duyduğum özellikle çalışmalarında tecrübelerini sabırla paylaştığından dolayı saygıdeğer danışmanım, sayın hocam Doç. Dr. Yusuf TEMEL'e sonsuz teşekkür ve minnetlerimi sunarım. Tez çalışmalarım boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım değerli hocam Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ'ye minnetlerimi sunarım.

Her konuda desteklerini gördüğüm çok kıymetli aileme ve laboratuvar arkadaşlarıma katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Fatih YÜKSEL

Bingöl 2022

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ	v
TABLolar LİSTESİ	vi
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. Okside Moleküller	1
1.2. Okside Moleküllerin Zararları	2
1.3. Antioksidanlar	3
1.4. Glutasyon	8
1.5. Enzimler	10
1.6. Glutasyon S-Transferaz	14
2. KAYNAK ÖZETLERİ	16
2.1. Çalışmanın Amacı	23
3. MATERYAL VE YÖNTEM	24
3.1. Kimyasallar.....	24
3.2. GST Enziminin Aktivite Ölçümü	24
3.3. Protein Tayini	24
3.3.1. Kalitatif Protein Tayini	24
3.3.2. Bradford Yöntemiyle Protein Tayini	24
3.3. Koyun Dalak Dokusunun Temini ve Homojenat hazırlanması.....	25
3.4. Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Diyaliz	26
3.5. GST Enziminin Afinite Kromatografisi Kullanılarak Saflaştırılması.....	26
3.6. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) ile Enzim Saflığının Kontrolü.....	27
3.7. GST Enzimi için Yürütülen Karakterizasyon Çalışmaları	27
3.7.1. GST Enzimi için Optimum pH Belirlenmesi.....	27

3.7.2. GST Enzimi için Optimum İyonik Şiddetin Tespit Edilmesi	28
3. 7.3. GST Enzimi için Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi	28
3.7.4. GST Enzimi için Stabil pH Belirlenmesi.....	28
3.7.5. K_M ve V_{max} Değerlerinin Bulunmasına Yönelik Çalışmalar	28
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	30
4.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesine Ait Sonuçlar.....	30
4.2. Kantitatif Protein Tayini Sonuçları	31
4.3. Glutasyon-Agaroz Afinite Kromatografisi Sonuçları.....	31
4.4. Koyun Dalak Dokusu GST Enzimine Ait Saflaştırma Sonuçları.....	32
4.5. SDS-PAGE Yöntemi ile GST Enziminin Saflık Kontrolü.....	32
4.6. Koyun Dalak Dokusundan Saf Olarak Elde Edilen GST Enzimine Ait Alt Birimlerinin Molekül Kütlesinin Belirlenmesi Sonuçları	33
4.7. GST Enzimiyle İlgili Yapılan Karakterizasyon Çalışmalarına Ait Sonuçlar	34
4.7.1. Koyun Dalak GST Enzimi için Yapılan Optimum pH Çalışması Sonuçları.	34
4.7.2. Koyun Dalak Dokusu GST Enziminin Optimum İyonik Şiddet Çalışması Sonuçları.....	35
4.7.3. Koyun Dalak Dokusu GST Enzimi İçin Optimum Sıcak Çalışması Sonuçları.....	37
4.7.4. Koyun Dalak Dokusu GST Enzimi Stabil pH Çalışması Sonuçları	38
4.7.5. Koyun Dalak Dokusu GST Enziminin GSH ve CDNB Substratları için K_M ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesine Ait Çalışmaların Sonuçları.....	40
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	42
KAYNAKLAR	47
ÖZGEÇMİŞ	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

BSA	: Bovin serum albümin
Da	: Dalton
DTT	: Ditiyotreitöl
E	: Enzim
EDTA	: Etilendiamin tetra asetik asit
EC	: Enzim kodu
ES	: Enzim substrat kompleksi
GSH	: İndirgenmiş glutatyon
GSSG	: Yükseltgenmiş glutatyon
GST	: Glutatyon S- transferaz enzimi
M _A	: Molekül kütlesi
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforez
RNA	: Ribonükleik asit
S	: Substrat
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
V _{max}	: Maksimum hız
Tris	: Trihidroksimetil amino metan
TCA	: Triklor asetik asit
TEMED	: N,N,N',N'-tetrametilendiamin

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.1.	Koyun dalak GST enziminin amonyum sülfat çöktürmesi sonuçları ..	30
Şekil 4.2.	GST enziminin saflaştırma aşamalarında kantitatif protein tayini için hazırlanan standart grafik	31
Şekil 4.3.	Koyun dalak dokusu GST enziminin afinite kolonundan elüsyonu.....	32
Şekil 4.4.	1. kuyu: standart proteinler (14kDa - 130 kDa), 2. ve 3. kuyu: afinite kolonu kullanılarak elde edilen koyun dalak dokusu GST enzimi.....	33
Şekil 4.5.	Koyun dalak dokusu GST enzimi için oluşturulan Log MK - R _f grafiği	34
Şekil 4.6.	Koyun dalak dokusu GST enzimi için K-fosfat ve Tris-HCl tampon çözeltileri kullanılarak elde edilen optimum pH grafiği.....	35
Şekil 4.7.	Koyun dalak dokusu GST enzimi için hazırlanan optimum iyonik şiddet grafiği.....	37
Şekil 4.8.	Koyun dalak dokusu GST enzimi için hazırlanan optimum sıcaklık grafiği	38
Şekil 4.9.	Koyun dalak dokusu GST enzimi KH ₂ PO ₄ tamponu kullanılarak elde edilen stabil pH grafiği	39
Şekil 4.10.	GST enziminin CDNB substratı için K _M ve V _{max} değerlerinin belirlenmesi grafiği.....	40
Şekil 4.11.	GST enziminin GSH substratı için K _M ve V _{max} değerlerinin belirlenmesi grafiği.....	41

TABLolar LİSTESİ

Tablo 4.1. Koyun dalak GST enziminin amonyum sülfat çöktürme sonuçları....	30
Tablo 4.2. Koyun dalak dokusu GST enzimine ait saflaştırma sonuçları	32
Tablo 4.3. Koyun dalak dokusu GST enzimi için 1 M K-fosfat ve Tris/HCl tampon çözeltileri için elde edilen aktivite ölçümü sonuçları.....	35
Tablo 4.4. Koyun dalak dokusundan saflaştırılan GST enzimine ait optimum iyonik şiddetinin belirlenmesinde kullanılan KH_2PO_4 tampon çözeltisi aktivite ölçüm sonuçları.....	36
Tablo 4.5. Koyun dalak dokusundan saflaştırılan GST enzimi için Tris/HCl tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	36
Tablo 4.6. Koyun dalak dokusu GST enziminin optimum sıcaklığın belirlenmesi amacıyla yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	38
Tablo 4.7. Koyun dalak dokusu GST enzimi için K-fosfat tamponu kullanılarak ölçülen aktivite sonuçları	39
Tablo 4.8. Koyun dalak dokusu GST enzimi için Tris-HCl tamponu kullanılarak elde edilen aktivite ölçüm sonuçları.....	40
Tablo 4.9. Koyun dalak dokusu GST enzimine ait GSH ve CDNB substratları kullanılarak hesaplanan K_M ve V_{max} değerleri.....	41

GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİMİNİN KOYUN DALAK DOKUSUNDAN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

ÖZET

Yüksek lisans tezi olarak sunulan bu çalışmada, mikroorganizmalardan memelilere kadar pekçok organizmada yaygın olarak bulunan ve hücre içi majör antioksidan sistem olan glutatyon (GSH) antioksidan sisteminin önemli enzimlerinden glutatyon S-transferaz (GST; EC 2.5.1.18) sitozolik enzimi koyun dalak dokusundan homojenat hazırlanması, salting out (amonyum sülfat tuzu ile çöktürme yöntemi) ve afinite kromatografisi (glutatyon-agaroz) olmak üzere üç adımda 3.67 EÜ/ mg protein değeri (spesifik aktivite) ile %3.73 verim ile 122.3 kat saflaştırıldı. Koyun dalak dokusundan saflaştırılan GST enziminin saflık derecesini belirlemek ve doğal alt birim molekül kütlelerini tespit etmek amacıyla SDS-PAGE metodu kullanıldı. Koyun dalak dokusu GST enziminin alt birimlerine ait molekül kütlesi SDS-PAGE metodu ile yaklaşık 26.36 kDa olarak hesaplandı. Koyun dalak dokusundan saflaştırılan GST enziminin karakterizasyonu için gerçekleştirilen çalışmalarda; optimum pH, K-fosfat tamponu pH=8.0, optimum aktivite gösterdiği iyonik şiddet, K-fosfat tampon çözeltisi 1.0 M, stabil pH, K-fosfat tampon çözeltisi pH = 7.0 ve optimum sıcaklığı 60 °C olarak bulundu. Koyun dalak dokusundan saflaştırılan GST enzimi için gerçekleştirilen kinetik çalışmalarda enzime ait K_M ve V_{max} değerleri Lineweaver-Burk grafikleri vasıtasıyla hesaplandı. Enzimin substratları olan GSH için K_M değeri 0.629 mM, V_{max} değeri 0.056 EÜ/mL; 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) için K_M değeri 0.321 mM, V_{max} değeri 0.129 EÜ/mL olarak belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Glutatyon S-Transferaz, saflaştırma, karakterizasyon, koyun, dalak.

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASE ENZYME FROM SHEEP SPLEEN TISSUE

ABSTRACT

In this study, common in many organisms from microorganisms to mammals the cytosolic enzyme glutathione S-transferase (GST; EC 2.5.1.18), which is one of the important enzymes of the the major intracellular antioxidant system of glutathione (GSH), purified from sheep spleen tissue was used prepare homogenate, *salting out* method (ammonium sulfate salt precipitation) and affinity chromatography (glutathione-agarose). SDS-PAGE method was used to determine the purity level of the GST enzyme purified from sheep spleen tissue and to determine the natural subunit molecular masses. The molecular mass of the subunits of the sheep spleen tissue GST enzyme was calculated as approximately 26,36 kDa by SDS-PAGE method. In the studies carried out for the characterization of the GST enzyme purified from sheep spleen tissue; optimum pH, K-phosphate buffer pH=8.0, optimum ionic strength, K-phosphate buffer solution 1.0 M, stable pH, K-phosphate buffer solution pH = 7.0 and optimum temperature 60 °C. In the kinetic studies performed for the GST enzyme purified from sheep spleen tissue, the K_M and V_{max} values of the enzyme were calculated using Lineweaver-Burk graphs. For GSH, which is the substrate of the enzyme, the K_M value was 0,629 mM, the V_{max} value was 0,056 EU/ mL; The K_M value for 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) was determined as 0,321 mM, and the V_{max} value was determined as 0,129 EU / mL.

Keywords: Glutathione S-transferase, purification, characterization, sheep, spleen.

1. GİRİŞ

1.1. Okside Moleküller

Serbest radikaller, yapısında bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip olan kimyasal tür olarak tanımlanmaktadır (Halliwell and Foyer, 1978). Reaktif oksijen türleri (ROS), süperoksit (O_2^-), hidroksil (OH^*), peroksil (RO_2^*) hidroperoksil (HO_2) radikallerinden oluşan oksijen radikallerini ve bazı radikal olmayıp ama kolayca radikallere dönüşebilen bazı türler olan, hidrojen peroksit (H_2O_2), hipokloröz asit ($HOCl$) ve ozon (O_3) gibi oksitleyici türleri içerir. (Halliwell and Foyer, 1978). Bununla birlikte, ROS ayrıca normal metabolizma sırasında üretilir ve enzimatik reaksiyonlarda, mitokondriyal elektron taşınmasında, sinyal iletiminde, nükleer transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunda, gen ekspresyonunda ve nötrofillerin ve makrofajların antimikrobiyal etkisinde yer alır.

Reaktif oksijen türleri (ROS), insan fizyolojik ve patofizyolojik süreçlerinde çok önemli bir role sahiptir (D'Autréaux, 2007). Süperoksit anyonları ve hidrojen peroksit dahil olmak üzere tüm ROS türleri, eşleşmemiş değerlik elektronlarına veya kararsız bağlara sahiptir. (Krause, 2007)

O_2^- 'nin büyük kısmı nispeten reaktif olmayan bir serbest radikaldir, mitokondriyal elektron taşıma zinciri içinde veya daha az ölçüde fagositik hücrelerin belirli enzimleri yoluyla üretilir (Cooke et al., 2003). Lipid zarlarına nüfuz edemez ve bu nedenle çoğunlukla solunum zincirinin yanındaki mitokondride bulunur. Bununla birlikte, mitokondride uygun şekilde yok edilmezse, elektron taşıma zincirindeki Fe-S merkezlerini inaktive ederek, zamanla biriken hasara neden olarak, mitokondriyi kapatarak ve nihayetinde apoptozu başlatarak mitokondriyal fonksiyonu inhibe edebilir (Valko et al., 2004).

H_2O_2 peroksizomlardaki moleküler oksijenden kendiliğinden ya da daha genel olarak O_2 'den süperoksit dismutazların (SOD) katalitik aktivitesi ile oluşturulabilir (Ray and Husain, 2002). Diğer ROS'lara kıyasla daha az reaktivitesine rağmen, H_2O_2 , mitokondri ve çapraz hücre zarları boyunca yayılma ve ayrıca örneğin çekirdekte birçok hücre hasarı tipi

üretme yeteneğine sahip olduğundan karsinogenezde önemli bir rol oynar (Ray and Husain, 2002). H₂O₂ ayrıca katalaz, glutatyon peroksidazlar veya peroksiredoksinler tarafından moleküler oksijene ve suya dönüştürülür. (Szatrowski and Nathan 1991).

1.2. Okside Moleküllerin Zararları

Yüksek konsantrasyonlarda ROS, proteinler, lipidler, karbonhidratlar ve nükleik asitlerle kolayca reaksiyona girerek, genellikle geri dönüşü olmayan fonksiyonel değişikliklere ve hatta tam yıkıma neden olur.(Krause, 2007) ROS, DNA, lipidler ve proteinler gibi çok sayıda hücrenel komponentle etkileşime girebilir. Oksidatif DNA hasarı, DNA baz hasarı, DNA tek zincir kırılması, DNA-protein çapraz bağları ve bazsız DNA (apirimidinik/apürinik bölgeler) yapılarında geri dönüşümsüz hasara sebep olur. Bununla birlikte, ROS'un DNA'daki baskın modifikasyonu, guaninin (8-hidroksil-2'-deoksiguanozin) 8-hidroksilasyonu olduğu belirlenmiştir (Cadet et al., 1994).

ROS'un memeli hücrelerindeki başlıca zararlı etkilerine OH^{*} radikali aracılık eder. Çok kararsız bir elektron yapısına sahiptir ve bu nedenle pratikte herhangi bir hücrenel bileşenle reaksiyona girmeden önce bir veya iki moleküler çaptan fazlasını yayamaz (Valko et al., 2004). OH'nin in vivo çoğunluğu, indirgenmiş geçiş metallerinin (Fe, Cu, Co veya Ni iyonları) varlığında, özellikle Fe⁺² H₂O₂ ile temas ettiğinde Fenton reaksiyonu yoluyla üretilir.



Süperoksit anyonu, oksitlenmiş metal iyonları:



Hücre zarı akışkanlığı, büyük ölçüde, zar fosfolipidlerinde çoklu doymamış yağ asidi yan zincirlerinin varlığı ile belirlenir. Çoklu doymamış yağ asitleri, serbest radikal saldırılarına karşı çok hassastır ve lipid peroksidasyonunu tetikleyebilir. OH^{*} veya oksoferril türleri gibi farklı ROS, lipid peroksidasyonunu başlatabilir. Lipid radikalleri üretildiğinde, zarlarda çözülmüş oksijen ile birleşirler ve zar proteinlerine ve bitişik çoklu doymamış yağ asidine

saldırabilen, zar lipid peroksidasyonunu yayan peroksil radikalini oluştururlar. Lipid peroksidasyonuna karşı koruma, lipide çözünen antioksidanlar (E vitamini ve ubikinol gibi) tarafından peroksil radikal süpürme yoluyla veya lipid hidroperoksitlerin glutatyon peroksidaz tarafından indirgenmesi yoluyla sağlanabilir.

H₂O₂, HOCl, geçiş metalleri, aktive nötrofiller, oksidoredüktaz enzimleri ve lipid oksidasyonunun yan ürünleri gibi çeşitli ajanlar protein oksidasyonuna yol açabilir. Çok sayıda oksidatif protein modifikasyonu türü vardır. En yaygın olanları protein tiyol oksidasyonu ve protein karbonillerinin oluşumudur. Proteinlere serbest radikal saldırısı, tiyol gruplarının oksidasyonu ile sonuçlanır. Kükürt içeren amino asitler, yani sistein ve metionin, muhtemelen oksidatif saldırıya en yatkın olanlardır. Tüm oksitleyici maddeler, sistein ve metioninin modifikasyonunu indükleyebilir. sistein oksidasyonu radikalleri ve disülfidler oluşturur. Metioninin oksidasyonu, metionin sülfoksit oluşumuna yol açar. Proteinlerdeki oksidatif değişiklikler, enzim aktivitelerinin inhibisyonuna ve bağlanmaya yol açabilir. Mitokondriyal akonitaz (Yan et al., 1997) ve glutamin sentetaz (Carney et al., 1991) aşamalı olarak Yaşlanma sırasında oksitlenir. Proteinlerin oksidatif modifikasyonu, fibrinojen oksidasyonunun pıhtı oluşumunu engellediği şekilde fonksiyon kaybına da neden olabilir.(Shacter et al., 1995) okside moleküllerin neden olduğu oksidatif stres, hücresel nekroz, kardiyovasküler hastalıklar, kanser, nörolojik bozukluklar, Parkinson, Demans, Alzheimer, enflamatuvar hastalıklar, karaciğer bozukluğu ve kas distrofisi gibi çeşitli hastalıklara neden olurlar (Kunwar and Priyadarsini, 2011).

1.3. Antioksidanlar

Okside moleküllerin oksidasyondan kaynaklanan hücresel hasarı önleyebilen moleküllere antioksidanlar denir. Elektronları bir molekülden oksitleyici olan maddeye aktaran kimyasal reaksiyon oksidasyon olarak tanımlanır. Oksidasyon reaksiyonları sonucunda serbest radikaller üretildiği bilinmektedir. Oksidasyon reaksiyonları sonucu üretilen serbest radikaller, dış enerji seviyelerinde bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron bulunan ve oldukça reaktif olan kimyasal türlerdir. Serbest radikaller oluşturulduktan sonra, zincir reaksiyonlar başlar. Antioksidan olarak tanımlanan moleküller oluşan bu serbest radikaller ile reaksiyona girer ve serbest radikalleri ve oluşturdukları ara ürünleri uzaklaştırır ve bu sayede zincirleme reaksiyonları durdurular. Antioksidanlar kendileri oksitlenerek

oksidasyon reaksiyonlarının inhibisyonuna neden olurlar. Oksidasyon reaksiyonları hücreler açısından çok önemli olsa da, bazı durumlarda zarar verici olabilirler (Hamid et al., 2010).

Bitki ve hayvan hücreleri, okside moleküllerin zararlarından korunmak için enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan sistemlere sahiptir. C vitamini ve E vitamini gibi vitaminler enzimatik olmayan antioksidan türlerini temsil ederken, katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD) ve çeşitli peroksidazlar gibi enzimler ise enzimatik antioksidanları temsil etmektedir (Hamid et al., 2010). Enzimatik antioksidanlar canlı vücudunda hücreler tarafından üretilir ve birincil ve ikincil antioksidanlara dönüşebilir.

Birincil antioksidan türler: Birincil antioksidanlar süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz (GPx) enzimlerinden oluşur. SOD enzimi, süperoksit radikalının ($O_2^{\cdot -}$) hücreden uzaklaştırılmasında ve serbest radikallerin verdiği zararı onarmakla görevlidir. SOD enzimi süperoksit kararsız anyonların hidrojen peroksite dönüştürüldüğü indirgenme reaksiyonunu katalizler. SOD enziminin katalizlediği reaksiyon;

SOD



Katalaz enzimi (CAT); kan serumunda ve canlı hücrelerin birçoğunda bulunmaktadır. Hücredeki görevi H_2O_2 'yi suya ve oksijene dönüştürmektir. Ayrıca meyve sularında, yumurta sarısından yapılan krema da ve salatanın korunmasında ortamdaki oksijeni uzaklaştırmak için ticari olarak kullanılır (Chakraborty et al., 2009). Katalaz enziminin katalizlediği reaksiyon

CAT



Glutatyon Peroksidaz (GPx) enzimi; selenyum içeren enzimlerin grubundandır. Sitozolik form, plazmik form, fosfolipid hidroperoksit ve gastrointestinal glutatyon peroksidaz ailesinden oluşmaktadır (Chakraborty et al., 2009). Glutatyon Peroksidaz enziminin hücredeki ve plazmadaki görevi indirgenmiş glutatyon (GSH) varlığında H_2O_2 'nin H_2O

'ya dönüşüm reaksiyonunu kataliz etmektedir. Bu reaksiyon sonucu oksitlenmiş glutatyon (GSSG) oluşur. Oluşan okside glutatyon glutatyon redüktaz (GR) enziminin katalizlediği reaksiyonla indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) tarafından sağlanan sağlanan elektronlarla indirgenmiş formunu geri kazanır. GPx enziminin katalizlediği reaksiyon

GP_x



İkincil antioksidan türler: Sekonder antioksidanlar olarak adlandırılan, glutatyon redüktaz (GR) enzimi, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) enzimi ve 6-fosfoglukonat dehidrogenaz (6PGD) enziminden oluşmaktadır. G6PD ve 6PGD enzimleri pentoz fosfat yolu oksidatif reaksiyonlarında NADPH üretirler. GR enzimi GSSG ve NADPH kullanılarak indirgenmiş glutatyon (GSH) molekülünü geri dönüştürmek için gereklidir. Glutatyon redüktaz enziminin katalizlediği reaksiyon

GR



Enzimatik olmayan antioksidanlar olarak adlandırılan moleküller genellikle vücutta doğal olarak bulunmaz besinsel takviye ile alınması gereken antioksidan sınıfıdır (Raygani et al., 2007). Bu sınıfta mineraller, vitaminler, karotenoidler, polifenoller ve aşağıda listelenen diğer antioksidanlar sayılabilmektedir.

Mineraller: Enzimlerin görevlerini yapabilmesi için vücut hücrelerinde kofaktör olarak mineraller gereklidir. Hücredeki mineral eksikliğinin pekçok hücrel makromolekülün anabolizma ve katabolizma reaksiyonunu etkilediği bilinmektedir. Bunlar mineraller arasında selenyum, bakır, demir, çinko ve manganez sayılabilir.

Demir (Fe) ; hücrelerde hemoglobin, miyoglobin gibi proteinler ile bağlanmış olarak en bol bulunan metaldir. Normalde metabolizmada serbest olarak bulunan demir konsantrasyonu oldukça düşüktür. Fakat yapılan araştırmalar demir bağlayıcı proteinlerin metabolizmadaki düşük konsantrasyonlarının ROS üretimini, hücrel lipitlerin peroksidasyonunu ve oksidatif stress'e neden olduğunu ortaya koymaktadır (Dabbagh et al., 1994). Bu sebeple yeterli demir takviyesinin hücrede oksidatif stresin azaltılmasına yardımcı olduğu ileri sürülmektedir.

Magnezyum (Mg); glukoz metabolizmasında pentoz fosfat yolu reaksiyonlarında NADP⁺ nin NADPH'a indirgenmesi reaksiyonlarını katalize eden ve dolayısıyla GSH'nin GSSG'ye dönüşümü için gerekli NADPH'ı üreterek hücrelerde normal bir redoks durumunu koruyan glikoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) ve 6-fosfoglukonat dehidrogenaz (6PGD) enzimleri için kofaktör olarak görev alır. Magnezyum eksikliği G6PD, 6PGD ve GR enzimlerinin aktivitelerini azaltır ve GSSG'nin GSH'ye dönüşümü kısıtlanır bu nedenle hücrelerde oksidatif hasar oluşumuna sebep olur. (Fang et al., 2002).

Selenyum (Se); enzimatik antioksidanlar çok önemli bir kofaktördür. Selenyum antioksidan metabolizmasında görev yapan özellikle glutatyon peroksidaz ve tiyoredoksin redüktaz gibi enzimlerin aktivite gösterebilmesi için gereklidir. Selenyum yeterli seviyede bulunduğu anda, enzimatik antioksidanlar lipit peroksidasyonu ve okside moleküllerin oluşturacağı hasara karşı koruyucu rol oynar ve özellikle hücre zarını korurlar. Se, H₂O₂ ve lipitlerin hidroksiperoksit metabolizmasında yer almaktadır. Bu reaksiyonlarda görev aldığından dolayı E vitamini yerine ikame edilebilir. Dolaylı olarak kanser ve kardiyovasküler hastalık riskini azaltmak için kullanılabilir (Sikora et al., 2008).

Bakır (Cu) ve Çinko (Zn) SOD1 ve SOD3 enzim izoformlarına, Manganez (Mn) ise SOD2 enzim izoformuna kofaktör olarak bağlı olan metallerdir. Cu-Zn SOD (SOD1 ve SOD3) izoenzimleri proton iletimine yardımcı olan aktif bölgelerinde Cu ve Zn'ye sahip sitozolik

enzimlerdir. Mn-SOD (SOD2) ise mitokondride bulunur ve aktif bölgesinde Mn'ye sahiptir. Bu metaller SOD izoenzimlerinin antioksidan aktivite göstermelerini sağlarlar.

Vitaminler: Vitamin sınıflarından olan A, C, E ve B vitaminleri vücudun enzimatik antioksidan sistemlerinin çalışması için gereklidir. Bu vitaminler vücudumuzda sentezlenemediğinden dolayı diyetle alınmaları gerekir.

A vitamini; retinol, 3,4-didehidroretinol ve 3-hidroksiretinol gibi üç ana izoformda bulunan A vitamini, organizmanın bakarkörlük, gece körlüğüne karşı korunmasında cilt epitell hücrelerinin korunmasında ve mukus zarlarının oluşumunda görevlidir. Bu görevleri yanında antioksidan özelliklere sahiptir ve bağışıklık sisteminin çalışmasına da yardımcı olur. A vitamininin besinsel kaynakları arasında başta havuç olmak üzere patates, süt, yumurta sarısı ve mozzarella peyniri sayılabilir.

C vitamini; suda çözünen vitaminler sınıfındadır ve kimyasal adı askorbik asittir. C vitamini organizmanın yaşlanma sürecine ve kanser, kalp hastalığı ve artrit gibi hastalıkların oluşumuna katkıda bulunabilecek serbest radikallerin ve okside moleküllerin neden olduğu DNA hasarını önler. C vitamini kaynakları arasında, meyveler (çoğunlukla narenciye), sebzeler, tahıllar, sığır eti, kümes hayvanları ve balıklar sayılabilir.

E vitamini; suda çözünmeyen lipitte çözünen bir vitamindir. α , β , γ ve δ tokoferol ve α , β , γ ve δ -tokotrienol gibi sekiz farklı formu vardır. Bu formlar içerisinde α -tokoferol en yüksek biyoyararlanıma sahiptir. E vitamini, lipit radikali ile reaksiyona girerek hücrenin en önemli komponentlerinden olan zırları koruyan lipitte çözüner bir antioksidandır. E vitamini kaynakları arasında, badem, aspir yağı, soya fasulyesi yağları, buğday tohumu yağı, fındık, brokoli, balık yağı vb. sayılabilir.(Hamid et al., 2010)

Karotenoidler: Karotenoid sınıfını β -karoten, likopen, lutein ve zeaksantin oluşturur. β -karoten A vitaminin öncül maddesi olarak bilinir. Antioksidan aktiviteye sahip olan β -Karoten, kayısı, havuç, balkabağı, tatlı patates, mango, kavun, turp, ıspanak ve lahana gibi turuncu-yeşil renkli gıda maddelerinde bulunur. Güçlü bir antioksidan olan Likopen domates, karpuz, kayısı, guava, papaya, pembe greyfurt ve diğer gıdalarda bulunur. Yapılan araştırmalar Likopenin singlet oksijenin giderilmesinde etkili bir bileşik olduğunu

göstermektedir. Retinanın serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı korunmasında ve aterosklerozun önlenmesinde etkili olan Lutein, ıspanak ve lahana gibi yeşil yapraklı sebzelerde bol miktarda bulunur (Sikora et al., 2008)

Polifenoller: Fenolik asitler, flavonoidler, gingerol, kurkumin vb. sınıfları içeren polifenoller, güçlü antioksidan aktivitelere sahip fitokimyasalların bir sınıfıdır. Polifenollerin antioksidan aktiviteleri bu bileşiklerin kimyasal ve fiziksel özelliklerine bağlıdır (Ajila et al., 2011). Flavonoidler, polifenolik bileşiklerin önemli bir sınıfıdır ve sebzelerde, meyvelerde, tahıllarda, tohumlarda, yapraklarda, çiçeklerde, kabuklarda bol bulunmaktadır. Zencefil ve zerdeçal gibi baharatlarda bazı polifenolik bileşiklerin kaynaklarındandır. Örneğin, gin-gerol zencefilden elde edilirken, kurkumin zerdeçalın ana biyoaktif bileşenidir ve çok güçlü bir antioksidan aktivitesine sahip olduğu bilinmektedir. Daha önce yapılan araştırmalarda kurkumin bileşiğinin lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği ve daha düşük ROS üretimine yol açtığı belirlenmiştir. Aynı zamanda epitel hücrelerinde GSH seviyelerini arttırdığı rapor edilmiştir (Biswas et al., 2005).

1.4. Glutasyon

Bir tiyol tipeptid olan glutasyon (GSH; γ -L-glutamil-L-sisteinil-glisin), çoğu organizmada bulunur. α -karboksil glutamat grubunun sistein amino grubuna bağlanması, bu bağı proteinlerdeki peptit bağlarından ayırır. Bunun moleküle stabilite kazandırdığı düşünülmektedir, çünkü spesifik amino asit transferazları yoluyla bozunmaya izin verir. Halobakteriler gibi bazı organizmalarda, glutasyon tiyosülfat gibi diğer kükürt bileşikleriyle değiştirilebilir (Newton et al., 1985). Başka bir örnek, bazı parazitik protozoalarda glutatyona benzer redoks fonksiyonlarını yerine getiren bir bileşik olan tripanotyon (N 1, N 8-bis (glutatyonyl) spermidin) 'dir (Fairlamb et al., 1985). Bitkilerde, glutasyon tipik olarak hücrelerde milimolar konsantrasyonlara birikir, doku içeriği serbest sistein 10 ila 50 kat artar. Bazı bitki taksonlarında, GSH'nin yanı sıra homolog glutasyon formları da bulunur. Glisin yerine, bu bileşikler serin, a-alanin veya gluta-mate gibi diğer C-terminal amino asitleri içerir (Rennenberg, 1980). GSH'nin yanında homoglutasyonun (α -Glu-Cys- α -Ala) bulunabildiği baklagillerde, iki homolog farklı genler tarafından kodlanan farklı enzimler tarafından sentezlenir (Macnicol, 1987). Buğday gibi tahıllarda bulunan hidroksimetil-GSH (a-Glu-Cys-Ser) yolu daha az açıktır (Klapheck, 1988). Safılaştırılmış bir buğday

glutasyon sentetazı (GSH-S), L-serin veya D-ser-ine karşı hiçbir aktivite göstermedi, ancak diğer bazı L- ve D-amino asitlerine ve glisine karşı düşük aktivite bildirildi (Skipsey, et al., 2005). Hidroksi-metilGSH, karboksipeptidaz Y gibi transpeptidaz aktivitesine sahip enzimler tarafından katalize edilen GSH'nin modifikasyonlarından kaynaklanabilir (Okumura et al., 2003). Homoglutasyon ve α -Glu-Cys-Ser'in disülfür formları glutasyon redüktaz (Klapheck, 1988). Bildiğimiz kadarıyla, Arabidopsis'te önemli miktarda GSH homologu bildirilmemiştir, ancak saflaştırılmış GSH-S sug- analizi, bazı türlerde yeni homologların keşfedilmeyi bekleyebileceğini göstermektedir (Skipsey et al., 2005). Bakteriyel GSH-S'yi aşırı eksprese eden kavaklarda, HPLC izlerinde iki yeni tepe noktası ortaya çıktı ve bunlar, glisin içeriği düşük olduğunda, karanlıkta tutulan bitkilerde en güçlü şekilde birikti. Bu zirvelerin kimyasal kimliği bilinmemektedir.

Birçok GSH fonksiyonu, sistein kükürt grubunun geri dönüşümlü redoks reaksiyonları ile bağlantılıdır. Diğer tiyoller gibi, glutasyon de çok sayıda redoks reaksiyonuna maruz kalabilir. Oksitlenmiş formlar, glutasyon disülfür (GSSG) üretmek için başka bir glutasyon sistein resi ile veya 'karışık disülfidler' oluşturmak için farklı bir tiol ile disülfidler yanı sıra, tiol grubunun sülfenik, sülfirik veya sülfonik asitlere dönüştürüldüğü daha fazla öküridize formları ile özellikle include disülfidler (Fuaye ve Noktor, 2005). Bununla birlikte, glutasyon biyokimya bu bileşiklerle sınırlı değildir. Endojen ve ksenobiyotik elektrofilik türlerle bir dizi glutasyon konjugatının oluşma potansiyeli çok büyüktür (Wang et al., 1998). Özellikle, GSNO, potansiyel bir sinyal molekülü veya NO'nun yedek bir öbeği olarak fizyolojik önemi için artan bir dikkat çekmektedir (Astier and Lindermayr, 2012).

GSH'yi yüksek oranlarda oksitleyebilen bileşikler arasında süperoksit veya hidroksil radikali gibi ROS'lar bulunur. Bu nedenle, nispeten yüksek hücresel konsantrasyonu nedeniyle, glutasyon bir çöpçü nükleofil görevi görür. Bu nedenle, glutasyon, hassas hücresel bileşenlerin aşırı oksidasyonu önleyen oldukça indirgeyici bir kimyasal bariyerdir. Birçok birincil ve ikincil metabolit, kurban antioksidanları olarak benzer şekilde hareket edebilir. Bununla birlikte, glutasyonun aksine, bu bileşiklerin oksitlenmiş formları ya stabil değildir ve / veya yüksek oranlarda indirgenmiş forma geri dönüştürülmez. Buna karşılık, glutasyon, GSSG ve özellikle NADPH için yüksek afiniteye sahip sitozol, plastidler, mitokondri ve peroksizomlarda bulunan spesifik GR'ler tarafından ağırlıklı olarak indirgenmiş bir durumda tutulur (Halliwell and Foyer, 1978). Ayrıca, glu-tathione

oksidasyonu sadece kimyasal olarak değil, aynı zamanda H₂O₂ veya diğer peroksitleri suya veya ilgili alkole indirgemek için GSH'yi kullanabilen enzimler tarafından katalize edilir. Son olarak, dehidroaskorbat redüktaz enzimi (DHAR), glutatyon oksidasyonunu askorbat rejenerasyonuna bağlar, ancak bu reaksiyon kimyasal olarak önemli ancak daha düşük oranlarda da ortaya çıkabilir. DHA'nın GSH bağımlı indirgenmesi, NADPH oksidasyonunun askorbat ve glutatyon havuzları yoluyla ROS giderimine bağlanmasına izin verir (Halliwell and Foyer, 1978). Bitki antioksidatif sistemlerinin kompleks olduğu gösterilmiş olsa da (Mittler et al., 2004) ve birçok bileşenin fonksiyonları tanımlanmaya devam ederken, mevcut bilgiler askorbat ve glutatyonun katalazların yanı sıra, yüksek kapasiteli redoks-homeostatik H₂O₂ işleme yollarında birlikte hareket ettiğini doğrulamaktadır. (Mittler et al., 2004)

1.5. Enzimler

Biyokimya tarihinin çoğu, enzim araştırmalarının tarihidir. Biyokimyasal kataliz ilk olarak 1700'lü yılların sonlarında mide salgılarının etin sindirimi üzerine etkisi çalışmalarında keşfedilmiş ve tanımlanmıştır. 1800'lerde nişastanın tükürük ve çeşitli bitki ekstraktları ile şekere dönüştürülmesinin incelenmesiyle araştırmalar devam etmiştir. 1850'li yıllarda Louis Pasteur, şekerin maya tarafından alkole fermentasyonunun "fermentler" tarafından katalize edildiği çıkarımına vardı. Fakat bu ferment olarak tanımladığı moleküllerin canlı maya hücrelerinin yapısından ayrılamayacağını öne sürdü;

Bu vitalizm olarak adlandırılan görüş, onlarca yıl hüküm sürdü. 1897 yılında Eduard Buchner ise maya ekstraktlarının şekeri alkole fermente edebileceğini keşfetti ve bu, fermentasyonun hücrelerden çıkarıldığında çalışmaya devam eden moleküller tarafından teşvik edildiğini kanıtladı. Frederick W. Kühne bu moleküllere enzimler adını verdi. Hayata dair dirimsel kavramlar çürütülürken, yeni enzimlerin farklı kaynaklardan izolasyonu ve karakterizasyon özelliklerinin araştırılması biyokimya biliminde bir çığır açtı. (Fisher, 2001)

1926 yılında James Sumner tarafından üreazın izolasyonu ve kristalizasyonu, erken enzim araştırmalarında bir atılım sağladı. Sumner, elde ettiği üreaz kristallerinin tamamının proteinden oluştuğunu buldu ve tüm enzimlerin protein yapısında olacağını öne sürdü. Bu

fikir yeni örnekler keşfedilene kadar bir süre tartışmalı olarak kaldı. John Northrop ve Moses Kunitz yaptıkları çalışmalarda pepsin ve tripsininde aralarında bulunduğu diğer sindirim enzimlerini kristalize ettiler ve onların da protein yapısında olduklarını buldular. Sumner'ın enzimler konusunda vardığı çıkarım ancak 1930'larda geniş çapta kabul gördü.

Bu süreçte, J. B. S. Haldane, “Enzimler” başlıklı bir inceleme yazdı. Enzimlerin moleküler doğası henüz tam olarak anlaşılammış olsa da Haldane, bir enzim ile onun substratı arasındaki zayıf bağ etkileşimlerinin bir reaksiyonu katalize etmek için kullanılabileceğine dair dikkate değer bir öneride bulundu. Bu kavrayış, mevcut enzimatik kataliz anlayışımızın temelinde yer almaktadır. (Fisher, 2001)

Bugüne kadar yapılan çalışmalar küçük bir katalitik RNA molekülü grubu dışında, tüm enzimlerin protein yapısında olduğunu göstermektedir. Enzimlerin katalitik aktivite gösterebilmeleri doğal protein konformasyonlarının bütünlüğüne bağlıdır. Bir enzim denatüre edilirse ya da alt birimlerine ayrıştırılırsa, katalitik aktiviteleri genellikle yok olur. Bir enzim, yapısını oluşturan amino asitlerine parçalanırsa, katalitik aktivitesi her zaman kaybolur. Bu nedenle protein yapısında olan enzimlerinin primer, sekonder, tersiyer ve quaterner yapıları, katalitik aktivite gösterebilmeleri için esastır.

Enzimler, proteinlere benzer şekilde, yaklaşık 12.000 ila 1 milyon arasında değişen moleküler ağırlıklara sahiptir. Bazı enzimler, aktivite için amino asitlerden oluşan alt birimleri dışında hiçbir kimyasal gruba ihtiyaç duymazlar. Diğerleri, Fe^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} veya Zn^{+2} gibi kofaktör olarak adlandırılan inorganik iyon veya koenzim adı verilen karmaşık bir organik veya metalloorganik molekül gibi ek bir kimyasal bileşen gerektirir. Bazı enzimler, aktivite için hem bir koenzim hem de bir veya daha fazla metal iyonu gerektirir. Apoenzime çok sıkı veya hatta kovalent olarak bağlı olan bir koenzim veya metal iyonuna prostetik grup denir. Bağlı koenzim ve/veya metal iyonlarıyla birlikte katalitik olarak aktif tam bir enzime holoenzim adı verilir. Holoenzimlerin protein içeren kısmına apoenzim veya apoprotein yapısı denir. Koenzimler, belirli fonksiyonel grupların geçici taşıyıcıları olarak hareket eder. Çoğu, diyetle küçük miktarlarda gerekli olan organik besinler olan vitaminlerden elde edilir. Son olarak, bazı enzim proteinleri fosforilasyon, glikosilasyon ve diğer işlemlerle kovalent modifikasyona uğrar. Bu değişikliklerin çoğu enzimatik aktivitenin düzenlenmesinde rol oynar.

Pek çok enzim, fizyolojik substratlarının ismine ya da aktivite gösterdikleri reaksiyonları tanımlayan bir kelime veya deyim " -az" eki getirilerek isimlendirilmiştir. Böylece üreaz, ürenin hidrolizini katalize eder ve DNA polimeraz, DNA oluşturmak için nükleotitlerin polimerizasyonunu katalize eder. Diğer enzimler, katalize edilen spesifik reaksiyon bilinmeden önce, geniş bir işlev için keşifleriyle adlandırıldı. Örneğin, gıdaların sindiriminde etkili olduğu bilinen bir enzim, Yunanca pepsis'ten gelen "sindirim" pepsin olarak adlandırıldı ve lizozim, bakteri hücre duvarlarını parçalama yeteneğinden dolayı adlandırıldı. Yine de diğerleri kaynakları için adlandırıldı: kısmen Yunanca tryein'den "yıpranmak" olarak adlandırılan tripsin, pankreas dokusunun gliserin ile ovulmasıyla elde edildi. Bazen aynı enzimin iki veya daha fazla adı olabilir veya iki farklı enzimin adı aynı olabilir. Bu tür belirsizlikler ve yeni keşfedilen enzimlerin sayısının sürekli artması nedeniyle, biyokimyacılar uluslararası anlaşma ile enzimleri adlandırmak ve sınıflandırmak için bir sistem benimsemişlerdir. Bu sistem enzimleri, katalize edilen reaksiyon tipine göre her biri alt sınıfları olan altı sınıfa ayırır. Her enzime dört parçalı bir sınıflandırma numarası ve katalize ettiği reaksiyonu tanımlayan sistematik bir isim verilir. Örnek olarak, aşağıdaki reaksiyonu katalize eden enzimin resmi sistematik adı



ATP:glukoz fosfotransferazdır, bu da enzimin bir fosforil grubunun ATP'den glukoz transfer reaksiyonunu katalize ettiğini gösterir. Bu enzime ait Enzim Komisyon numarası (E.C.) 2.7.1.1'dir. enzim komisyon numarasındaki birinci sayı (2), sınıf adını (transferaz) belirtir; ikinci sayı (7), alt sınıf (fosfotransferaz); üçüncü sayı (1), ise bir hidroksil grubuna alıcı olarak sahip olan bir fosfotransferaz; ve dördüncü sayı (1), fosforil grubunun alıcısının D-glukoz olduğunu gösterir. Birçok enzim için daha yaygın olarak geleneksel bir isim kullanılır. Örneğin heksokinaz enzimi. Bilinen binlerce enzimin tam listesi ve açıklaması "Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği'nin Adlandırma Komitesi" tarafından sağlanmaktadır.

Reaksiyonların enzimler tarafından katalizi, canlı sistemler için hayati önem arz etmektedir. Biyolojik olarak ilgili koşullar altında, katalize edilmemiş reaksiyonlar yavaş olma eğilimindedir - çoğu biyolojik molekül, hücrelerin içindeki nötr pH, hafif sıcaklık, sulu ortamda oldukça kararlıdır. Ayrıca, biyokimyadaki birçok yaygın reaksiyon, kararsız

yüklü ara maddelerin geçici oluşumu veya reaksiyon için gereken kesin oryantasyonda iki veya daha fazla molekülün çarpışması gibi hücrel ortamda elverişsiz veya olası olmayan kimyasal olayları gerektirir. Yiyecekleri sindirmek, sinir sinyalleri göndermek veya bir kasın kasılması için gereken reaksiyonlar, enzimatik kataliz reaksiyonları olmadan yararlı bir hızda gerçekleşmez. Enzimler olağanüstü katalizörlerdir. Enzimler de oldukça spesifik ve oldukça benzer yapılara sahip substratlar arasında kolaylıkla ayırım yapabilirler . (Fisher, 2001)

Bu etkileşim iki şekilde açıklanabilir; Birincisi, enzim katalizli bir reaksiyon sırasında kovalent bağların yeniden düzenlenmesinde yatmaktadır. Substratlar ve enzimlerin fonksiyonel grupları arasında birçok türden kimyasal reaksiyonlar meydana gelir. Bir enzim üzerindeki katalitik fonksiyonel gruplar, bir substrat ile geçici bir kovalent bağ oluşturabilir ve onu reaksiyon için aktive edebilir veya bir grup, substrattan enzime geçici olarak transfer edilebilir. Çoğu durumda, bu reaksiyonlar sadece enzimin aktif bölgesinde meydana gelir. Enzimler ve substratlar arasındaki kovalent etkileşimler, alternatif, aktivasyon enerjisinin daha düşük olduğu bir reaksiyon mekanizması sağlar ve reaksiyonun aktivasyon enerjisini düşürür (ve dolayısıyla reaksiyonu hızlandırır).

İkinci kısmı, enzim ile substrat arasında meydana gelen kovalent olmayan etkileşimlerde yatmaktadır. Aktifleşme enerjilerini düşürmek için gerekli olan enerjinin çoğu, substrat ile enzim arasında meydana gelen zayıf, non-kovalent etkileşimlerden elde edilir. Enzimleri diğer katalizörlerin çoğundan gerçekten ayıran şey, spesifik bir ES kompleksinin oluşumudur. Bu kompleks içerisinde substrat ve enzim arasındaki etkileşimlere, hidrojen bağları ve hidrofobik ve iyonik etkileşimler dahil olmak üzere protein yapısını stabilize eden aynı kuvvetler aracılık eder. ES kompleksindeki her zayıf etkileşimin oluşumuna, etkileşime bir dereceye kadar kararlılık sağlayan az miktarda serbest enerjinin salınması eşlik eder. Önemli, enzim-substrat etkileşiminin basit bir stabilizasyonunun ötesine uzanır. Bağlanma enerjisi, enzimler tarafından reaksiyonların aktivasyon enerjilerini düşürmek için kullanılan ana serbest enerji kaynağıdır. (Fisher, 2001)

Enzimlerin kristalleştirilebileceğinin keşfidimesi sonrasında enzimatik yapıların x-ışını kristalografisi yöntemi ile çözümlenmesi gerçekleşti. Bu yöntem ilk olarak gözyaşında, tükürükte ve yumurta akında bulunan ve bazı bakterileri sindiren bir enzim olan lizozim

enzimi için uygulandı. Enzim yapılarının aydınlatılması David Chilton Phillips ve arkadaşları tarafından gerçekleştirildi ve 1965'te yayına geçirildi (Hayes, 2005). Lizozimin aydınlatılan yapısı, yapısal biyoloji alanında yeni bir devrin başladığını ve enzimlerin nasıl çalıştığının açıklamasının atomik ayrıntı düzeyinde gerçekleşeceğini ilan ediyordu (Leaver and George, 1998).

1.6. Glutasyon S-Transferaz

Daha önceden ligandinler olarak adlandırılan glutasyon S-transferazlar (GST'ler), indirgenmiş glutasyon formunun (GSH) detoksifikasyon metabolizmasında ksenobiyotik olarak adlandırılan substratlara konjugasyonu reaksiyonlarını katalize eden ökaryotik ve prokaryotik faz II detoksifikasyon metabolik izozimler ailesidir. GST izoenzimleri ailesini üç süper aile oluşturur. Bu aileler, sitozolik, mitokondriyal ve mikrozomal GST'lerdir (Adler et al., 1999). GST süper izoenzim ailesinin üyelerinin sahip olduğu amino asit dizisinde oldukça çeşitlidir ve halka açık veritabanlarında depolanan dizilerin çoğunun bilinmeyen işlevleri vardır.

GST izoenzimleri bazı memeli organizmalarda sitozolik proteinlerin %10'unu oluşturabilirler. GST izoenzimleri, ksenobiyotikleri suda daha çözünür hale getirmek için çok çeşitli substratlar üzerindeki elektrofilik merkezlere bir sülfhidril grubu vasıtasıyla GSH'nin konjugasyon reaksiyonunu katalizler (Sheehan et al., 2001). Bu reaksiyon aktivitesi sonucu peroksidize lipidler benzeri endojen bileşikler detoksifiye olur ve ksenobiyotikler parçalanır. GST'ler ayrıca toksinleri bağlayabilir. GST izoenzimlerinin aktif bölgelerinde glutasyonun bağlandığı bölge "G bölgesi", olarak adlandırılır (Atkinson and Babbitt, 2009).

GST'nin aktivite gösterebilmesi için, sentetik enzimler gama-glutamilsistein sentetaz enzimi ve glutasyon sentaz enziminden sürekli bir GSH tedarikine ve ayrıca GSH konjugatlarını hücreden çıkarmak için spesifik taşıyıcılara ihtiyaç duyar. GST dimerinin her iki alt birimi, doğada hetero veya homodimer olarak bulunanlar, tek bir substrat olmayan bağlanma bölgesi ve bir GSH bağlanma bölgesi içerir. Glutasyon molekülü, N- ve C-terminal alanları arasında bir yarıktan bağlanır.

GST ler tarafından hedeflenen bileşikler, kemoterapötikler ve diğer ilaçlar, böcek ilaçları, herbisitler, kanserojenler, epoksitler dahil olmak üzere çok çeşitli çevresel veya başka şekilde eksojen olan toksinlerdir

Memeli GST izoenzimlerinin birçoğu substrat olarak 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) molekülü için afiniteye sahiptir. CDNB substratı spektrofotometrik testlerde genellikle GST aktivitesini belirlemek için kullanılır. Bunun yanısıra, bilirubin gibi bazı endojen bileşikler GST'lerin aktivitesini inhibe edebilir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

GST izoenzimleri ilk defa 1961 yılında sıçan karaciğerinde tanımlanarak farklı substrat özelliklerine göre beş grupta epoksit transferaz, asiltransferaz, alkiltransferaz, alken transferaz ve aralkil transferaz olarak sınıflandırıldı.

Sonraki çalışmalar memelilerde, böceklerde, balıklarda, kuşlarda, yumuşakçalarda ve birçok mikroorganizmada GST enziminin varlığını göstermiştir. Aynı zamanda karaciğer, ince bağırsaklar, kalın bağırsaklar, böbrekler, akciğerler, meme, kas, dalak, testis ve plasenta başta olmak üzere birçok organın sitozol ve zarında bulunduğu tespit edilmiştir.

Pabst ve arkadaşları (1974), GST enzimini, DEAE-selüloz üzerinde anyon değişim kromatografisi yöntemi, amonyum sülfat çöktürmesi yöntemi, CM-selüloz katyon değişim kromatografisi yöntemi ve hidrosilepatitli kolon kromatografisi kullanarak 4.1 EU / mg spesifik aktivite ile sıçan karaciğerinden saflaştırmıştır. Enzimin fosfat tamponunda pH 7.0'de stabil olduğu belirlenmiştir. Saf enzimin bir homodimer olduğu molekül ağırlığının 45 kDa ve alt birim molekül kütesininin 25 kDa olduğu bulunmuştur.

Awasthi ve arkadaşları (1980) tarafından yürütülen çalışmada GST enziminin katyonik ve anyonik izoformlarını insan karaciğerinden saflaştırmışlardır. Bu saflaştırma işlemlerinde %65 amonyum sülfat doygunluğunda çöktürme yapılmış, DEAE-selüloz anyon değişim kromatografisi yöntemi, sephadex G-200 jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırma işlemleri gerçekleştirmişlerdir. Daha sonra anyonik ve katyonik GST'ler izoelektrik odaklama ile birbirinden ayrılmıştır. Bu işlemler sonucunda elde edilen anyonik GST enzimine ait alt birimi molekül ağırlığını 22.5 kDa, katyonik GST enzimine ait alt birimin molekül ağırlığını 24.5 kDa olarak hesaplamışlardır.

Asaoka ve arkadaşları (1983) tarafından yapılan çalışmada sığır karaciğeri sitozolünden GST enzimi orange-A agaroz afinite kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Bu saflaştırma işleminde enzimin iki temel izoformu DEAE iyon değişim kromatografisi ile ayrılmış ve bu iki formun izoelektrik pH değeri sırasıyla 6.7 ve 6.1 olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada

GST nin iki izoenziminin aktivitesinin Cu^{+2} , Hg^{+2} , Cd^{+2} , Zn^{+2} iyonları tarafından inhibe edildiği belirlenmiştir. İzoenzimlerin alt birimlerinin molekül kütleleri SDS-PAGE ile 27 kDa, jel filtrasyon kromatografisi ile 49 kDa olarak saptanmıştır. Bu sonuçlar, her iki formun da birbirine yapışık olmayan iki alt birimden oluştuğunu göstermektedir. Bu çalışmada izoenzim 1'in GSH substratı için spesifik aktivite ve K_M , V_{max} değerleri sırasıyla 320 EU/mg, 0.55 mM, 0.10 mM ve izoenzim 2'nin spesifik aktivitesi ve K_M , V_{max} değerleri sırasıyla 380 EU/mg, 0.83 mM 0.165 mM olarak bulunmuştur.

Catherine ve arkadaşları (1984) insan akciğerinden iki farklı GST formunu incelediler ve bu izoformların izoelektrik pH'larını sırasıyla 4.9 ve 9.2 olduğunu buldular. Elde ettikleri anyonik ve katyonik izoformlar saflaştırılan GST aktivitesinin %98'ini ve %2'sini oluşturmaktaydı. Elde edilen katyonik form, toplam GST aktivitesinin sadece %2'sini oluşturmasına karşın akciğerdeki proteinlerin %28'ini içerir. Bu iki formun alt birimlerinin moleküler kütleleri sırasıyla 22 kDa ve 24 kDa idi ve her ikisinin de homodimerler olduğu bulundu.

Jagt ve diğ. (1985), çalışmasında glutatyon-afinite kromatografisi ve kromatofokuslama yöntemini kullanarak insan karaciğerinden 13 farklı GST formunu yüksek verimlilikle izole etmiştir. Saflaştırılmış enzimin izoelektrik Ph'sının 4.9 ile 8.9 arasında değiştiği bulundu. Bu 13 farklı form, substrat olarak CDNB'YE benzer aktivite gösterdi ve spesifik aktivite 33 ila 94 AB / mg arasında değişiyordu. Benzer şekilde, bu formlar 1.5-8.3 EU / mg spesifik aktiviteye sahip kümen hidroperoksit ile peroksidaz aktivitesi göstermiştir.

Boyer ve Morgenstern (1985-1988) yaptıkları araştırmalarda, enzim sınıflandırmalarını proteinin fiziksel ve yapısal özelliklerine dayandığını. Glutatyon S-transferaz enziminin çoğunlukla hücrelerin sitozolünde bulunduğunu, bununla birlikte, karaciğer mikrozomal hücrelerinde glutatyon S-transferaz aktivitesinin bulunduğunu, bu kısımda bulunan enzimin mikrozomal membrana sıkıca bağlı olduğunu ve mikrozomal formun sitozolik formdan farklı özellikleri olduğunu bildirmişlerdir.

Loscalzo ve Freedman (1986) tarafından gerçekleştirilen çalışmada GST enzimi insan trombositlerinden saflaştırıldı. Bu çalışmada GST enzimini saflaştırmak amacıyla CM-selüloz iyon değişim, Sephadex G-75 jel filtrasyon, afinite kromatografisi, amonyum sülfat çöktürmesi gibi yöntemlerden yararlanılmıştır. 7.5 EU/mg spesifik aktivite ile 1071.4 kez

saflaştırılan enzime ait izoelektrik pH değeri 4.6 ve molekül ağırlığı ise 48 kDa olarak bulundu. Ayrıca SDS-PAGE yöntemi ile alt birimlerin molekül ağırlığının 25 kDa olduğu tespit edilmiştir.

Başka bir çalışmada Singh et al. (1987), 3 önemli GST enzim sınıfı (α , μ , π) insan böbreklerinden saflaştırıldı ve incelendi. Bu çalışmada, 3 sınıfa ait izoenzim yapılarının, immünolojik ve fonksiyonel özelliklerinin birbirinden anlamlı derecede farklı, aynı sınıfa ait izoenzimlerin ise benzer özellikler gösterdikleri belirlenmiştir. İnsan böbreklerine ait tüm katyonik GST izoenzimleri, izoelektrik pH değeri 9,1 olanlar hariç, diğerlerinin heterodimerler olduğu bulundu. Saflaştırılan enzimlerin alt birimlerine ait molekül ağırlığı 26.5 kDa-24.5 kDa aralığında bulundu. GST 9.1'in alt birimi 24.5 kDa'dır ve bir homodimerdir. Saflaştırma işlemlerinde epoksi ile aktive edilmiş Sepheroz-6B'ye bağlanmış GSH afinite kromatografisi kolon kromatografisi kullanıldı. CDNB substratı için afinite sırasıyla GST 6.6 > GST 5.45 > GST 4.9 veya GST 4.7 > katyonik izoenzimler için bulundu.

Yoshino ve arkadaşları (1989) çalışmalarında dört farklı tip GST enzimini saflaştırdılar. Saflaştırma çalışmalarında art arda DEAE selüloz iyon değişimi, Sephadex G-75 jel filtrasyonu, CM-selüloz katyon değişimi ve afinite kromatografisi olmak üzere 4 tip kromatografi tekniği kullanılmıştır. Bu dört farklı tip GST enzimi homodimerler olarak tanımlandı ve sırayla a, b, c, d olarak adlandırıldı. Bu çalışmada, b, c, d izoenzimlerinin benzer molekül ağırlığı 50 kDa, a izomerinin (alt birim 23.5 kDa) ağırlığı 45 kDa ve a enziminin peroksidaz aktivitesinin diğerlerinden 100 kat daha fazla olduğu bulunmuştur. Ayrıca GSTa ve GStb'nin amino asit kombinasyonu araştırılmış ve Gita'nın 408 amino asitten, gStb'nin ise 424 amino asitten oluştuğu gözlenmiştir. Çalışmada GSTA ve gStb'nin substratlarına afinitesi incelenmiştir. GSt'lerin CDNB ve GSH substratlarına ait K_M sabitleri sırasıyla 0.35 mM ve 0.10 mM, GSTb için 0.35 mM ve 0.14 mM idi.

Young ve Briedis (1989), GST enzimini sıgır beyin dokusundan kalsiyum fosfat jeli, amonyum sülfat çökeltisi, DEAE selüloz iyon değişim kromatografisi ve GSH-sefaroza afinite yöntemleri kullanılarak 500 kat saflaştırıldı. Enzimin izoelektrik pH değeri 7.39 ± 0.02 , alt birimlerinin molekül ağırlıkları 22 kDa ve 24 kDa olarak bulundu. İnhibisyon

çalışmalarında, uzun zincirli yağ asitlerinin enzimin iyi inhibitörleri olduğu bulunmuştur". Ek olarak, inhibitörlerin inhibisyon tipleri CDNB ve gsh'ye göre belirlendi.

Iizuka ve diğ. (1989) GST enzimini E.coli ekstraktından %7.5 verimde yaklaşık 2300 kez saflaştırmıştır. Molekül ağırlığı 45 kDa olan enzimin iki özdeş alt birimden oluştuğunu gösterdiler. Yapılan çalışmada kapsamında enzime ait substratlar CDNB ve GSH için K_M sabiti değerleri sırasıyla 1.43 mM ve 0.33 mM olarak hesaplanmıştır. Enzim aktivitesini optimum olduğu pH değeri 7.0, optimum sıcaklığı 50°C ve stabil pH değerini 5 ile 11 arasında geniş bir pH aralığı olarak tespit etmişlerdir.

Arca ve arkadaşları (1990), E.coli üzerinde yürüttükleri bir çalışmada GST enzimini, %11 verim ile 800 kat DEAE-sefadeks iyon değişim ve glutatyon agaroz afinite kolonunu kullanarak saflaştırdılar. Enzime ait molekül ağırlığını 24 kDa olan bir alt birime sahip bir homodimer olarak belirlediler. GSH ve CDNB substratları için K_M değerlerini ayrı ayrı 0.25 ve 1.5 mM olarak hesapladılar. Optimum pH değerini 7.5, optimum sıcaklık değerini 35°C olarak belirlediler. N-terminal bölge amino asit dizisini, Met-Leu-Leu-Phe-Ile-Leu-Pro-Gly-Ala olarak aydınlattılar. Ayrıca EDTA kimyasalının enzim aktivitesini %30 artırdığını bildirdiler.

Kashiwada ve diğ. (1991), insan fetal karaciğer dokusundan yapılan bir çalışmada, asidik bir GST formu, afinite kromatografisi ve kromatofoklama ile saflaştırma yaptılar. Asidik bir GST homodimeridir ve alt birimi 23 kDa moleküler ağırlığa sahiptir. mRNA ve protein düzeyinde incelendiğinde erişkin insan ve fetal karaciğerde asidik GST formunun ekspresyon düzeyinin farklı olduğu gözlenmiştir.

Çetinkaya ve arkadaşları(1993) tarafından bazı elektrofilik bileşikler metabolitlerin GST aktivitesini artırabilir veya azaltabilir olduğu bulunmuştur. Bu çalışmada, sıçanlara bromobenzen ve karbon tetraklorür uygulaması yapılarak GST enziminin aktivitesinde gerçekleşen değişiklikler araştırılmıştır. Uygulamadan sonra karaciğer dokusu GST enziminin aktivite değerinin azaldığı ve serum GST enzimine ait aktivitenin ise arttığı gözlemlendi.

Orhan ve diğ. (1994) yaptıkları çalışmada, anti-enflamatuar ilaç grubunun bir üyesi olan indometasinin sıçan karaciğeri GST ve insan eritrosit dokusu GST izozimleri üzerindeki in vitro etkilerini incelediler. Çalışma sonucu bu ilacın sıçan karaciğeri GST üzerinde inhibe edici bir etkiye sahip olduğu, ancak insan eritrosit izoenziminin aktivitede bir artışa neden olduğunu göstermiştir.

Luty ve arkadaşları (1998) tarafından yürütülen başka bir çalışmada, sıçanlara intraperitoneal olarak 0-72 saatlik periyotlar için 4 mg / kg diltiazem dozunda DDVP uygulanmıştır. Karaciğerde GST enzimine ait aktivite değerinin diğer dokulardan daha fazla arttığı gözlenmiştir. GST aktivitesindeki değişimin nedeninin hücre zarının geçirgenliğindeki değişiklik veya hücre bozulması olabileceği düşünülmüştür.

Öte yandan Eaton and Bammler (1999), sitozolik, mitokondriyal ve MAPEG GST izoenzimlerinin sınıflandırılmasında protein sekansının ve yapısının önemli kriterler olduğunu bildirmişlerdir. Sitozolik GST ailesinin sekansının %40'tan fazla homolojik modelleme gösterdiğini, diğerlerinin ise %20 homolojik modelleme gösterdiklerini bildirmişlerdir. Buna ek olarak, sitozolik GSTs ve omega, mitokondriyal GSTs kappa sınıftayız, karaciğer MHV İnsan sitozolik GSTs insan sitozolik GSTs süper alpha, zeta, theta, mu, pi oluşan MAPEG 6 izoenzim iken MAPEG süper den daha az %20 amino asit dizisi benzerliği ile 1-IV, alt gruplar oluşur, 13 sınıflara alfa, beta, delta, epsilon, zeta, theta, mu, nu, pi, sigma, tau, phi gibi yapılarına göre ayrılır sigma ve omega sınıfların II ve IV. sınıflarına ait olduklarını bildirmişlerdir.

Cnubben ve diğ. (2001), yaptıkları çalışmada glutatyon S-transferaz izoenzimlerinin, yapıları birbirinden farklı olan çok sayıda elektrofilik bileşiğin GSH substratı ile konjugasyon reaksiyonunu katalizlediğini bildirmiştir. Bunun, GST yapısındaki hidrofobik substrat bağlanma bölgesinin spesifik olmamasından kaynaklandığını bildirmişlerdir. Bu nedenle, GST izoenzimlerinin substrat olarak çevresel kirleticileri, kanserojen bileşikler, ilaç kalıntılarını ve diğer birçok bileşiği kullandığını bildirmişlerdir. Ayrıca, GST izoenzimlerinin yapısının iki protein alt biriminden meydana geldiğini ve bu proteinlerin bir bağlanma bölgesine, GSH bağlanma bölgesi olan G bölgesine ve elektrofilik substratların bağlandığı H bölgesine sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Novoa ve Valinas (2001), HPLC ve glutatyon agaroz afinite kromatografisi kullanılarak Atlantik fıstığı ve kahverengi alabalığın karaciğer ve böbreklerinden sitozolik gst'yi saflaştırdı. Enzimi Atlantik cevizi karaciğerinden 57.2 kez 0.26 ± 0.081 EU / mg spesifik aktivite ve %70,58 verim ile, 187 kez böbrekten 37.50 ± 5.39 EU / mg spesifik aktivite ile %86,9 verim ile saflaştırdılar. Kahverengi alabalık karaciğerinden %74,54 verimle 27.69 ± 3.34 EU / mg spesifik aktivite ile 42.66 kez ve %67,48 spesifik aktivite ile 21.96 ± 4.531 EU / mL spesifik aktivite ile 56.30 kez böbrekten saflaştırıldılar.

Çelik ve arkadaşları (2003) tarafından, normal doğum yapan bir hastanın plasentasından glutatyon S-transferaz (GST- π) enzimi glutatyon-agaroz afinitesi kullanan kullanarak 2,63 EÜ / mg spesifik aktivite ile %0,5 verim ile 16 kat saflaştırıldı. Saf enzimin GSH substratı için K_M değeri 2 mM, V_{max} değeri ise 11.1 EÜ / mg; CDNB substratı K_M değeri 0,55 mM ve V_{max} değeri 35 EÜ /mg bulunmuştur. İlaçların saflaştırılmış enzimin aktivitesi üzerindeki etkilerinin incelendiği in vitro çalışmalarda, ampisilin antibiyotiğinin GST enzim aktivitesini in vitro olarak %50-55 oranında inhibe ettiği belirlemiştir.

Gyamfi ve arkadaşları (2004) tarafından yapılan başka bir çalışma kapsamında, tıbbi bitkiler sınıfında olan Thonningia sanguinea'dan izolasyonu yapılan bir antioksidan yapısında olan thonningianin A'nın (ThA), karaciğer dokusu sitozolik GSTenzimi ile etkileşime girdiğinde güçlü bir in vitro inhibitör etkiye sahip olduğunu bulmuşlardır.

Casalino ve arkadaşları (2004) tarafından yürütülen başka bir çalışmada, doğada ve canlı yapılarında biriken ve canlılarda ağır metal zehirlenmesine sebep olan Cd^{+2} ve Mn^{+2} ağır metal iyonlarının sıçan karaciğerinden saflaştırılan GST enzim aktivitesi üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Tek doz olarak $CdCl_2$ (2.5 mg.kg^{-1}) veya $MnCl_2$ (2.0 mg.kg^{-1}) konsantrasyonlarında verildiğinde, GST enzim aktivitesinin bir gün sonra %36 arttığı tespit edildi.

Hamed ve arkadaşlarının (2004) yaptığı çalışmada, sitozolik GST enzimi glutatyon-sefaroze afinite kolonu ile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) balıklarının karaciğerinden saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzime ait alt birim molekül ağırlığı SDS-PAGE yardımıyla yaklaşık olarak 25,46 kDa, optimum pH değeri 8 olarak bulunmuştur. Michaelis-Menten

grafiği kullanılarak, enzimin GSH ve CDNB için substratları olan K_M sabitlerinin değeri sırasıyla 0,35 mM ve 0,42 mM olarak belirlenmiştir.

Martinez-Lara et al. (1997) tarafından yürütülen bir çalışmada, kefal balığı karaciğerinden doku kaynağı olarak kullanıldı. Bu çalışmada anyon değişim kromatografisi yöntemiyle 14 farklı GST izoformunu saflaştırdılar. Saf GST izoformunun dimerik yapıda ve her bir alt biriminin moleküler kütlelerinin 23 ila 28 kDa arasında olduğunu rapor ettiler.

Türkanoglu (2007), çalışmalarında GST enzimini insan kan serumundan saflaştırdı ve karakterize etti. Saf enzim üzerine yürütülen karakterizasyon çalışmalarında GST enzimi için optimum iyonik şiddeti 2 mM potasyum fosfat tamponu, optimum pH değerini potasyum fosfat tamponu pH=5,5, optimum sıcaklık değerini 65 °C olarak belirlemişlerdir. Kinetik çalışmalarda CDNB substratı için K_M ve V_{max} değerlerini sırasıyla 2,8 mM ve 0,43 nmol/dk.mg GSH substratı için K_M ve V_{max} değerlerini sırasıyla; 4,11 mM ve 0,23 nmol/dk.mg protein olarak belirlemişlerdir.

Hee ve Jung (2005) tarafından yapılan çalışmada, GST enzimi maruldan %9.6 verimle DEAE-sephadex ve glutatyon-sefaroze kolon kromatografisi kullanılarak yaklaşık 403 kat (*Lactuca sativa*) saflaştırılmıştır. Gerçekleştirilen bu çalışmada enzime ait molekül ağırlığı SDS-PAGE metodu ile yaklaşık 23 kDa, jel filtrasyon kolon kromatografisi kullanılarak yaklaşık 48 kDa olarak hesaplanmıştır.

Al ve Mustafa (2006) tarafından yapılan çalışmada, metal iyonlarının insan eritrositleri üzerindeki in vitro etkileri incelenmiştir. Bu çalışmada, Cr^{+6} metal iyonlarının glutatyon peroksidaz enziminin aktivitesini artırırken, glutatyon redüktaz enzimine ait aktivite değerini azalttığını, GST ve katalaz enzimlerine ait aktivite değerlerinde fark olmadığı belirlenmiştir.

Huang et al. (2008) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, *Monopterus albus* balık türünün karaciğerinden afinite kromatografisi ile GST enzimi saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Bu çalışmada GST enzimi 13.07 μ mol / mg spesifik aktiviteyle, %14 verimle 300 kat, bir glutatyon sepharose-6B afinite kolonu ile saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış enzimin, SDS-PAGE ile moleküler ağırlığı 26 kDa olan iki alt birimden (homodimer)

oluşturduğunu belirlediler. Enzimin optimum pH'sının 7.0-7.5 arasında ve optimum sıcaklığın 45°C olduğunu bulmuşlardır. Kinetik çalışmalarında enzimin GSH ve CDNB substratları için K_M değerlerini sırasıyla 0,20 mM ve 0,28 mM olarak, V_{max} değerlerini ise sırasıyla 7,57 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ ve 15,68 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ olarak belirlediler.

Erat ve Şakiroğlu (2012) tarafından yapılan bir çalışmada, insan kırmızı kan hücrelerinden GST enzimini glutatyon agaroz afinite kromatografisi metodunu kullanılarak, 16,00 EÜ/mg protein spesifik aktivite ile, %80 verim ile 1143 kat saflaştırmışlardır. Çalışmanın ikinci aşamasında bazı kimyasalların enzim aktivitesi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Paklitaksel için IC_{50} değeri 0,23 mM olarak, siklofosfamid için IC_{50} değeri 5,75 mM ve gemitabin için IC_{50} değeri 6,35 mM olarak hesaplanmıştır. Buna ilaveten GSH substratı kullanılarak gerçekleştirilen inhibisyon çalışmalarında K_i sabitleri paklitaksel için $0,182 \pm 0,028$ mM, siklofosfamid için $6,97 \pm 0,49$ mM ve gemitabin için 6,71 mM olarak hesaplanmıştır.

Ağır metal Cd^{+2} 'nin pirinçten elde edilen GST enzimi üzerindeki etkileri incelenmiş ve inhibisyon belirlenmiştir. Kadmiyumlu ve kadmiyumsuz jel filtrasyon ve afinite kromatografi teknikleri kullanılarak GST enziminin pirinç kökünden saflaştırılması için çalışmalar yapılmıştır (Chun-hua Zhang ve ark. 2013)

2.1. Çalışmanın Amacı

Yapılan literatür taramalarında GST enziminin birçok dokudan saflaştırılarak karakterizasyonunun yapıldığı ve bazı ilaç ve kimyasalların GST enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon çalışmalarının gerçekleştirildiği (Akkemik et al., 2012; Aksoy et al., 2016; Özaslan et al., 2018a, 2018b; Taysi and Temel, 2021; Temel et al., 2018; Türkan et al., 2020, 2019), fakat bu enzimin koyun dalak dokusundan saflaştırılmadığı tespit edildi. Bu çalışmada metabolizmadaki önemi vurgulanan GST enziminin koyun dalak dokusundan saflaştırılması ve karakterizasyon özelliklerinin araştırılması amaçlanmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kimyasallar

Bu çalışmada kullanılan SDS-PAGE protein standartları, Applied Biological Materials Inc (Richmond, BC, Canada) glutasyon-agaroz afinite jeli, CDNB, GSSG, GSH, TEMED, EDTA, elektroforez kimyasalları, ve diğer kimyasal ve numuneler Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO) veya Merck'den (Darmstadt, Germany) temin edildi.

3.2. GST Enziminin Aktivite Ölçümü

Glutasyon S-transferaz enzimi, bir glutasyon molekülünün genellikle aromatik bir elektrofil ile konjugasyon reaksiyonunu katalize eder. En sık kullanılan aromatik bileşik 1-kloro-2,4 dinitrobenzendir (CDNB). CDNB substratın kullanımı nedeniyle oluşan dinitrobenzen-glutasyon (DNP-SG) ürünü 340 nm dalga boyunda maksimum absorbans vermektedir. Bu çalışmada CDNB substratı kullanılarak maksimum dalga boyundaki absorbans ölçümü gerçekleştirilerek GST enzim aktivite hesaplaması yapılmıştır.

3.3. Protein Tayini

3.3.1. Kalitatif Protein Tayini

Bu çalışmada saflaştırmanın her aşamasında enzimlere ait kalitatif protein tayini, ultraviyole ışığın 280 nm'de triptofan ve tirozin tarafından absorbe edilmesi esasına dayanılarak gerçekleştirildi. Saflaştırma aşamalarında elde edilen fraksiyonlar kuvars küvetlere alındı ve absorbansları spektrofotometrik olarak ölçüldü.

3.3.2. Bradford Yöntemiyle Protein Tayini

Bu çalışmada hazırlanan homojenatta ve saflaştırmanın her aşamasında elde edilen GST enzimleri için kantitatif protein miktarları, Bradford (1976) yöntemi kullanılarak

belirlenmiştir [17]. Bu yöntemde boya olarak Coomassie Brilliant Blue G-250 kullanılmaktadır. Bu boya negatif bir yük ile yüklüdür ve protein üzerindeki pozitif yük ile etkileşmektedir. Boyaya ait kırmızı ($\lambda_{max} = 465 \text{ nm}$) ve mavi ($\lambda_{max} = 595 \text{ nm}$) formlar mevcuttur. Proteinin boya ile bağlanması boyanın kırmızı formunun mavi forma dönüşmesine neden olur. Bu yöntem ile oldukça düşük miktarda (1-100 μg arasında) proteinin kantitatif tayini gerçekleştirilebilir. Reaksiyon oldukça tekrarlanabilir ve hızlı bir şekilde gerçekleşir ve iki dakika gibi kısa bir zaman içinde tamamlanır. Bu çalışmada 1 ml'de 1 mg protein içeren sığır serum albümin stok çözeltisi hazırlanarak bu çözeltiden 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 μl hacimleri tüplere yerleştirildi. Tüm tüplerin hacmi, damıtılmış su ile 0,1 mL'ye tamamlandı ve üzerine 4900 mL Coomessie brilliant blue G-250 çözeltisi ilave edildi. Vorteks ile karıştırılarak 10 dakika inkübasyon gerçekleştirildi. İnkübasyon sonrası 3 mL'lik küvetler kullanılarak köre karşı (Coomessie brilliant blue G-250 çözeltisi) albümin çözeltilerine ait absorbens değerleri 595 nm'de ölçüldü. Ölçüm sonuçlardan elde edilen absorbens değerlerine karşılık gelen μg protein değerleri ile standart grafik oluşturuldu. Saflaştırmanın her aşamasında elde edilen numunelerdeki protein miktarını bulmak için, seyreltilmiş homojenat yada afinite işlemleri sonucu elde edilen enzim numunelerinin 100 μL 'si sırasıyla 3 ayrı tüpe alınmış ve üzerine 4900 mL renklendirici reaktif eklenmiştir. Elde edilen karışım vortex ile karıştırıldıktan sonra, 10 dakika inkübe edilmeye bırakılmıştır. Daha sonra numunelere ait absorbens değerleri 595 nm'de okunmuştur. Bu işlem 3 kez tekrarlanmış ve 3 ayrı ölçümün aritmetik ortalaması alınmış ve protein miktarları standart grafikten belirlenmiştir.

3.3. Koyun Dalak Dokusunun Temini ve Homojenat hazırlanması.

Deneyde kullanılan koyun derisi dokusu Bingöl Et Balık Kurumundan taze olarak elde edilmiştir. Alınan koyun dalak dokuları soğuk zincir kuralına göre laboratuvara getirildi, -20°C'de derin dondurucuda hızlı bir şekilde çıkarılıp donduruldu. Deneylerde donmuş dalak dokuları küçük parçalar halinde kesilerek ultraturraks ile 50mm KH₂PO₄ (pH=7.5) tamponda askıya alındı. Süspansiyon 30 dakika boyunca 13.000xg'de santrifüjlendi ve çökelti atıldı. Böylece homojenat elde edildi.

3.4. Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Diyaliz

Koyun dalak dokusu kullanılarak elde edilen homojenat için %10, %20, doygunlukta katı amonyum sülfat çöktürmesi gerçekleştirilmiş ve GST enzimine ait çökeltme aralığı belirlenmiştir. Çöktürme işlemlerinde kullanılan katı $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ tuzu homojenata yavaşça ilave edilerek manyetik karıştırıcı ile iyice çözünmesi sağlanmıştır. Enzime ait amonyum sülfat çöktürme aralığı belirlenirken ilk olarak, %0-20 doygunlukta amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. İşlem sonrası hemolizat santrifüj tüplerine yerleştirildi ve 5000 xg'de 15 dakika santrifüjlendi (böylece yabancı proteinler çöktürüldü). Daha sonra %30, %40, %50, %60, %70, %80, %90 doygunlukta amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Her defasında çözünmüş tuzlu hemolizat Eppendorf tüplerine yerleştirildi ve 15 dakika boyunca 5000xg'de santrifüjlendi. Santrifüj işlemi sonrası hem çökeltide hemde süpernatantta aktivite ölçümleri gerçekleştirildi. Amonyum sülfat çöktürme işlemleri buz dolu bir kaptaki gerçekleştirildi. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen karışım diyaliz torbasına yerleştirildi ve 10 mM K-fosfat, 1 mM EDTA pH=7,5 olan diyaliz tamponuna karşı iki saat süre ile diyaliz edildi.

3.5. GST Enziminin Afinite Kromatografisi Kullanılarak Saflaştırılması

Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen ve hacmi belirlenen GST enzim numunesi glutatyon-agaroz afinite kromatografisi kolonuna tatbik edildi. Numune tatbiki sonrası kolon, 10 mM KH_2PO_4 ve 0.1M KCl içeren tampon çözeltisi pH=8 ile yıkandı. Yıkama işlemi spektrofotometrik yöntemle takip edildi ve absorbans değerlerinin 280 nm'de köre karşı 0,05 olmasıyla yıkama işlemi sonlandırıldı. Yıkama işlemi sonrası GST enzimi gradientli elüsyon yapılarak saflaştırıldı. Elüsyon için kullanılan çözelti, 50 mM Tris-HCl ve (1,25-10 mM GSH, pH: 9,5) içeren çözeltilerden oluşturuldu. Fraksiyon toplayıcı kullanılarak elüatlar toplandı ve 1,5 ml'lik tüplere alındı ve 340 nm'de spektrofotometrik yöntemle absorbansları ölçüldü. Bu işlemler sırasında afinite kolonun akış hızı bir peristaltik pompa ile 20 mL/ saate ayarlandı [18].

3.6. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) ile Enzim Saflığının Kontrolü

Koyun dalak dokusundan saflaştırılan GST enziminin saflığını kontrol etmek için Laemmli yönteminden yararlanıldı. Bu yöntemde göre %3-8 kesikli sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektrofrez (SDS-PAGE) kullanıldı. Jel çözeltisi hazırlanırken %10 SDS ilave edildi. Elde edilen jeldeki protein miktarı göz önünde bulundurularak jel için Coomassie Brilliant Blue R-250 boyaması gerçekleştirildi [19]. Ayrıca, koyun dalak dokusundan saflaştırılan enzimin moleküler kütlesi sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektrofrez (SDS-PAGE) yöntemi kullanılarak aşağıdaki şekilde belirlendi. Elektrofrezde moleküler ağırlığı bilinen (14-130 kDa aralığında) standart proteinleri kullanıldı. Elektrofrez işlemi sonucu elde edilen PAGE jeli görüntüleme cihazı yardımıyla fotoğraflandı. Elde edilen PAGE fotoğrafı kullanılarak standart proteinlerin jelde yürüme mesafelerinden R_f değerleri hesaplandı ve log MK- R_f standart grafiği hazırlandı. Daha koyun dalak dokusundan saflaştırılan GST enzimi için R_f değeri hesaplandı ve GST enziminin log MK değeri standart grafiğin eğimi kullanılarak belirlendi. Numunenin moleküler kütlesi, bu değerın antilogaritması alınarak belirlendi. Proteinlerin R_f değerleri;

$$R_f = \frac{X_e}{X_{boya}} \quad (3.1)$$

formülü kullanılarak belirlendi. Bu formülde

X_e = Proteinin jel üzerinde yürüme mesafesini,

X_{boya} = Jel üzerindeki toplam yürüme mesafesini göstermektedir.

3.7. GST Enzimi için Yürütülen Karakterizasyon Çalışmaları

3.7.1. GST Enzimi için Optimum pH Belirlenmesi

Koyun dalak dokusundan saflaştırılan GST enzime ait optimum pH'yı belirlemek için, pH değerleri 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0 olan potasyum fosfat ve pH değerleri 7,5, 8,0, 8,5, 9,0 arasında olan 1 M Tris/HCl tamponları hazırlandı. GST enzim enzim aktivitesi, uygun substrat çözeltileri kullanılarak ile her tamponda ayrı ayrı belirlendi.

3.7.2. GST Enzimi için Optimum İyonik Şiddetin Tespit Edilmesi

Koyun dalak dokusundan saflaştırılan GST enzimine ait iyonik şiddeti belirlemek için optimum pH'da, uygun substrat çözeltileri kullanılarak konsantrasyonları 500, 600, 700, 800, 900, 1000,1200,1400,1600 mM olan K-fosfat tamponları ve konsantrasyonları 500, 600, 700, 800, 900, 1000 mM olan Tris/HCl tampon çözeltileri kullanılarak 340 nM de GST enzimine ait aktivite ölçümleri gerçekleştirildi. Bu işlem sonucu GST enziminin optimum aktivite gösterdiği iyonik şiddet değeri tespit edildi

3.7.3. GST Enzimi için Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi

Koyun dalak dokusundan saflaştırılan GST enzimine ait optimum sıcaklığını belirleme maksadıyla ısıtmalı soğutmalı su banyosundan yararlanıldı. Aktivite ölçümleri gerçekleştirilirken uygun tampon ve substratları içeren karışım, kuvarz küvet ile ilgili sıcaklık ayarı yapılan ısıtmalı su banyosunda tutuldu. GST enzim aktivitesi hazırlanan karışımlar kullanılarak 0°C ile 80°C sıcaklık değerleri arasında her 10°C aralıkta bir gerçekleştirildi.

3.7.4. GST Enzimi için Stabil pH Belirlenmesi

Koyun dalak dokusundan saflaştırılan GST enzimine ait stabil pH'yı belirlemek için pH değerleri 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0 aralığında değişen potasyum fosfat tampon çözeltileri ve pH değerleri 7,5, 8,0, 8,5 ve 9,0 olan Tris/HCl tampon çözeltileri kullanıldı. Belirtilen pH'larda 2 mL tampon solüsyonu 1 mL enzim solüsyonu karıştırılarak +4°C'de bekletildi. Bu çözeltiler bir enzim kaynağı olarak kullanıldı. Optimum koşullar altında 3 gün boyunca 12 saatlik aralıklarla numunelerdeki GST enzim aktivite ölçümleri yapıldı ve sonuçlar zamana karşı aktivite yüzdesi (Aralık) olarak grafiğe işlendi.

3.7.5. K_M ve V_{max} Değerlerinin Bulunmasına Yönelik Çalışmalar

Koyun dalak dokusundan saf olarak elde edilen GST enzimine ait kinetik çalışmalarda GSH ve CDNB substratlarına ait K_M ve V_{max} kinetik değerlerini belirlemek için, sabit GSH konsantrasyonu kullanılarak 5 farklı CDNB konsantrasyonu ile aktivite ölçümleri

gerçekleştirildi. Elde edilen ölçüm sonuçları ile Lineweaver-Burk grafiği oluşturuldu. CDNB için K_M ve V_{max} değerleri bu grafiğin eğiminden yararlanarak belirlendi. Benzer şekilde, sabit CDNB konsantrasyonu kullanarak 5 farklı GSH konsantrasyonu ile aktivite ölçümleri gerçekleştirildi. Elde edilen ölçüm sonuçlarıyla Lineweaver-Burk grafiği oluşturuldu. Bu grafiğin eğimi kullanılarak GSH için K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı. Bu çalışma sırasında tüm aktivite ölçümleri optimum koşullar altında gerçekleştirildi [20].

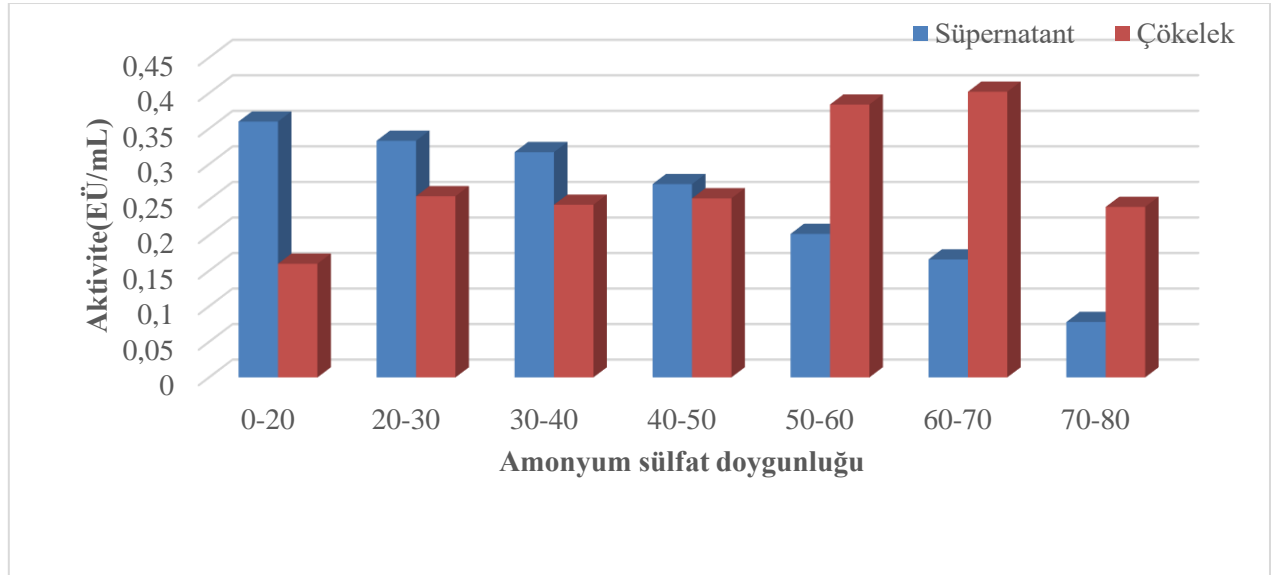
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesine Ait Sonuçlar

Koyun dalak dokusundan saflaştırılan GST enzimine ait amonyum sülfat çöktürmesi işlemi, bölüm 3.4'de tarif edildiği şekliyle gerçekleştirildi. Koyun dalak dokusundan saflaştırılan GST enzime ait amonyum sülfat çöktürme aralığı Tablo 4.1 ve Şekil 4.1'de verildiği gibi %20-80 olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.1. Koyun dalak GST enziminin amonyum sülfat çöktürme sonuçları

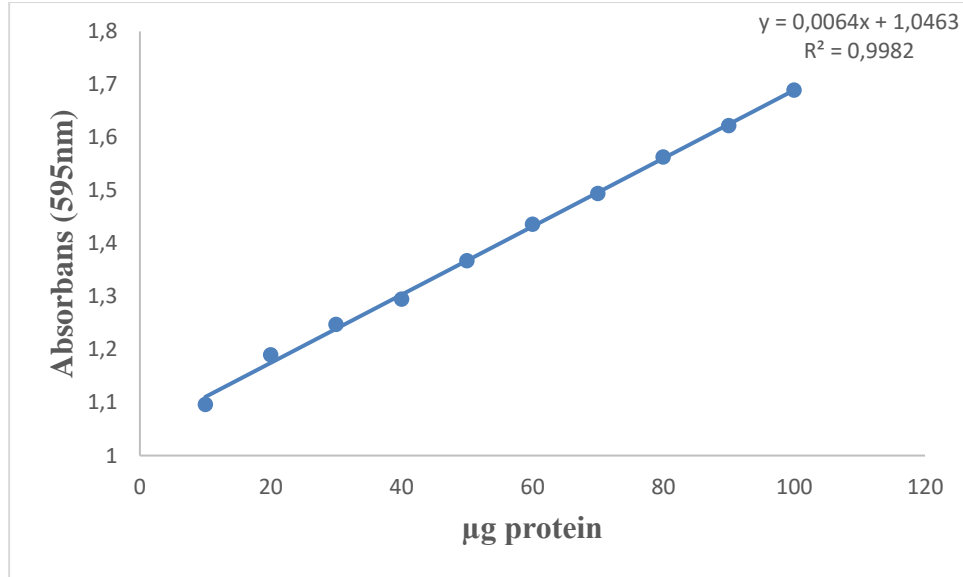
Amonyum Sülfat (%)	Süpernatant (EÜ/mL)	Çökelek (EÜ/mL)
0-20	0,360	0,160
20-30	0,333	0,255
30-40	0,317	0,243
40-50	0,272	0,252
50-60	0,202	0,384
60-70	0,166	0,402
70-80	0,078	0,240



Şekil 4.1. Koyun dalak GST enziminin amonyum sülfat çöktürmesi sonuçları

4.2. Kantitatif Protein Tayini Sonuçları

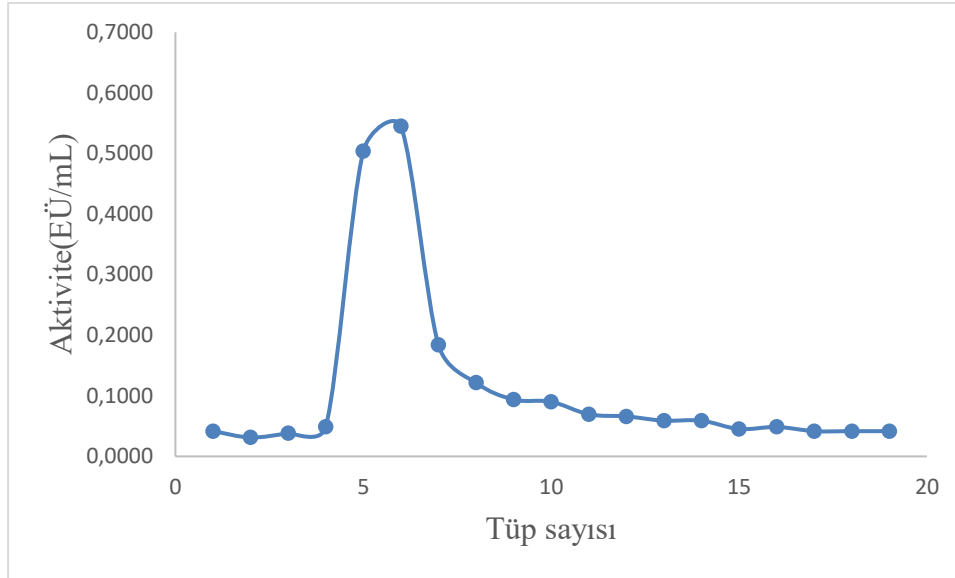
Saflaştırmanı her aşamasındaki numunelerin içerdiği kantitatif protein miktarı Bradford yöntemi ile belirlenmiştir. Standart grafik bölüm 3.2.b'de açıklandığı şekilde hazırlanmıştır. Homojenat, amonyum sülfat çöktürmesi ve glutatyon agaroz afinite kromatografisi sonucu elde edilen enzim numunelerindeki kantitatif protein tayini bu standart çizelge yardımıyla hesaplanmıştır. Standart grafik için hazırlanan sığır serum albümin solüsyonlarında μg proteinine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. GST enziminin saflaştırma aşamalarında kantitatif protein tayini için hazırlanan standart grafik

4.3. Glutatyon-Agaroz Afinite Kromatografisi Sonuçları

Homojenat hazırlanması ve amonyum sülfat çöktürmesi prosesleri sonrası elde edilen numuneden GST enziminin tam olarak saflaştırılması amacıyla numune glutatyon-agaroz afinite kolonuna tatbik edildi. Afinite kolonuna tatbik edilen karışımdan GST enziminin gradientli elüsyonu Bölüm 3.5'te açıklandığı şekliyle yapıldı. Elüatlarda bulunan GST enzimlerinin aktivite ölçüm sonuçları Şekil 4.3'te gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Koyun dalak dokusu GST enziminin afinite kolonundan elüsyonu

4.4. Koyun Dalak Dokusu GST Enzimine Ait Saflaştırma Sonuçları

Bu çalışmada koyun dalak dokusundan glutatyon S-transferaz enzimi, homogenat hazırlanması amonyum sülfat çöktürme yöntemi ve glutatyon agaroz afinite kromatografisi sonrası 3,67 EÜ/mg spesifik aktivite, %3,73 verimle 122,3 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırma kademelerine ait elde edilen sonuçlar Tablo 4.2'de gösterildi.

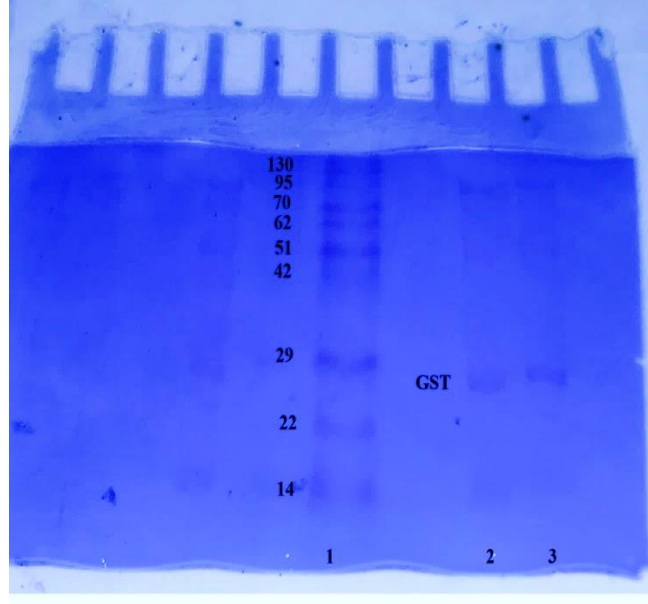
Tablo 4.2. Koyun dalak dokusu GST enzimine ait saflaştırma sonuçları

Numune Türü	Toplam Hacim (mL)	Aktivite (EÜ/mL)	Protein (mg/mL)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (EÜ)	Spesifik Aktivite (EÜ/mg)	% Verim	Saflaştırma Katsayısı
Homojenat	17,50	1,27	39,64	693,70	22,23	0,03	100,00	1,00
Amonyum sülfat	2,00	0,62	0,54	1,08	1,24	1,15	5,58	35,83
Afinite	1,50	0,55	0,15	0,23	0,83	3,67	3,73	122,30

4.5. SDS-PAGE Yöntemi ile GST Enziminin Saflık Kontrolü

Homojenat hazırlanması, amonyum sülfat çöktürmesi yöntemi ve afinite kromatografisi gibi üç farklı saflaştırma prosesi sonrası koyun dalak dokusundan elde edilen elüatlardaki GST enziminin saflığını kontrol etmek için bölüm 3.6'da anlatıldığı şekilde SDS-PAGE

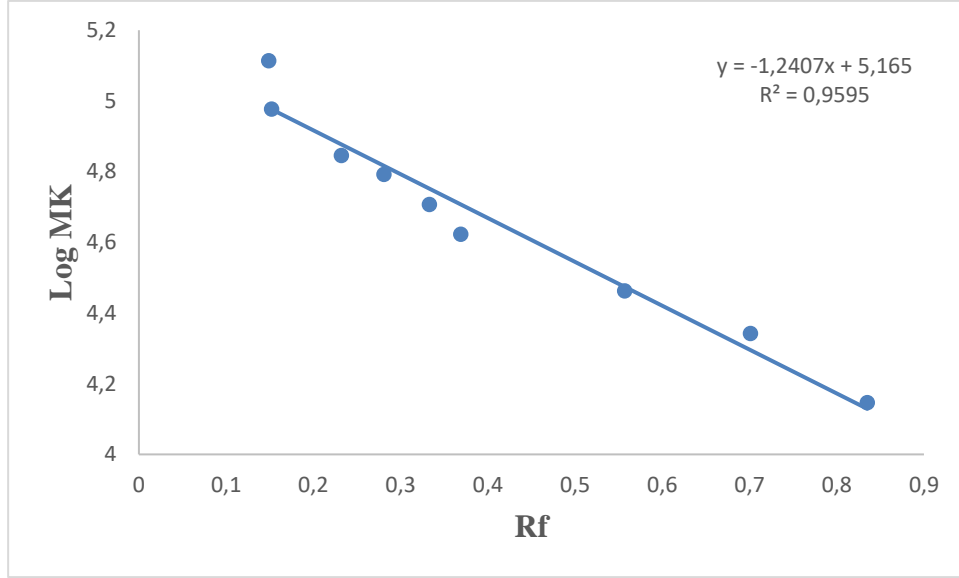
yöntemi kullanılmıştır. Elektroforez sisteminde enzim örnekleri ve standart proteinler kuyulara sırayla uygulanarak çalıştırıldı. Saf enzim ve standart proteinlerin bantlarını gösteren fotoğraf Şekil 4.4'te verilmiştir.



Şekil 4.4. 1. kuyu: standart proteinler (14kDa - 130 kDa), 2. ve 3. kuyu: afinite kolonu kullanılarak elde edilen koyun dalak dokusu GST enzimi.

4.6. Koyun Dalak Dokusundan Saf Olarak Elde Edilen GST Enzimine Ait Alt Birimlerinin Molekül Kütlesinin Belirlenmesi Sonuçları

Koyun dalak dokusunda saflaştırılmış GST enziminin doğal halinin alt birimlerine ait molekül kütlesini belirlemek için, Bölüm 3.6'da açıklandığı gibi kesikli SDS-PAGE jeli hazırlandı. SDS-PAGE sonucu elde edilen bantların fotoğrafı Şekil 4.4'te verildi. Jel boyunca yürütülen standart proteinlerin ve GST enziminin ayrı ayrı Rf değerleri ölçüldü ve log MK-Rf değerleri hesaplanarak standart grafik oluşturuldu (Şekil 4.5). Bu grafiğin eğiminden koyun dalak dokusu glutatyon S-transferaz enzimine ait alt birimlerin molar kütlesi yaklaşık olarak 26.36 kDa olarak belirlendi.



Şekil 4.5.Koyun dalak dokusu GST enzimi için oluşturulan Log MK - Rf grafiği

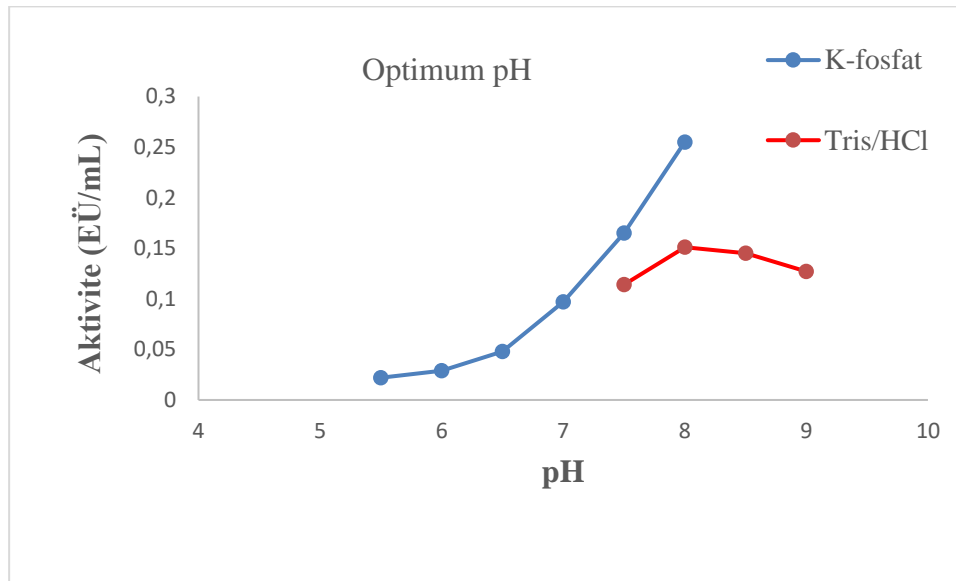
4.7. GST Enzimiyle İlgili Yapılan Karakterizasyon Çalışmalarına Ait Sonuçlar

4.7.1. Koyun Dalak GST Enzimi için Yapılan Optimum pH Çalışması Sonuçları

Koyun dalak dokusundan saflaştırılan GST enziminin aktivitesinin optimum olduğu pH değeri Bölüm 3.7.1'de açıklandığı şekilde belirlendi. Optimum pH değerini belirlemek için pH değerleri 5,5 ile 8,0 arasında değişen K- fosfat ve pH değerleri 7,5 ile 9,0 arasında değişen Tris-HCl tampon çözeltileri kullanıldı. Enzim aktiviteleri, her tampondaki enzimin absorbans değerleri spektrofotometrik yöntemle ölçülerek hesaplandı. Koyun dalak dokusu GST enzimine ait optimum pH değeri Tablo 4.3 ve Şekil 4.6'da gösterildiği gibi K-fosfat tamponu pH = 8,0 olarak belirlendi.

Tablo 4.3. Koyun dalak dokusu GST enzimi için 1 M K-fosfat ve Tris/HCl tampon çözeltileri için elde edilen aktivite ölçümü sonuçları

K-fosfat		Tris- HCl	
pH	Aktivite (EÜ/mL)	pH	Aktivite (EÜ/mL)
5,5	0,0222	7,5	0,1139
6	0,0292	8	0,1514
6,5	0,0486	8,5	0,1458
7	0,0972	9	0,1278
7,5	0,1653		
8	0,2556		



Şekil 4.6. Koyun dalak dokusu GST enzimi için K-fosfat ve Tris-HCl tampon çözeltileri kullanılarak elde edilen optimum pH grafiği

4.7.2. Koyun Dalak Dokusu GST Enziminin Optimum İyonik Şiddet Çalışması Sonuçları

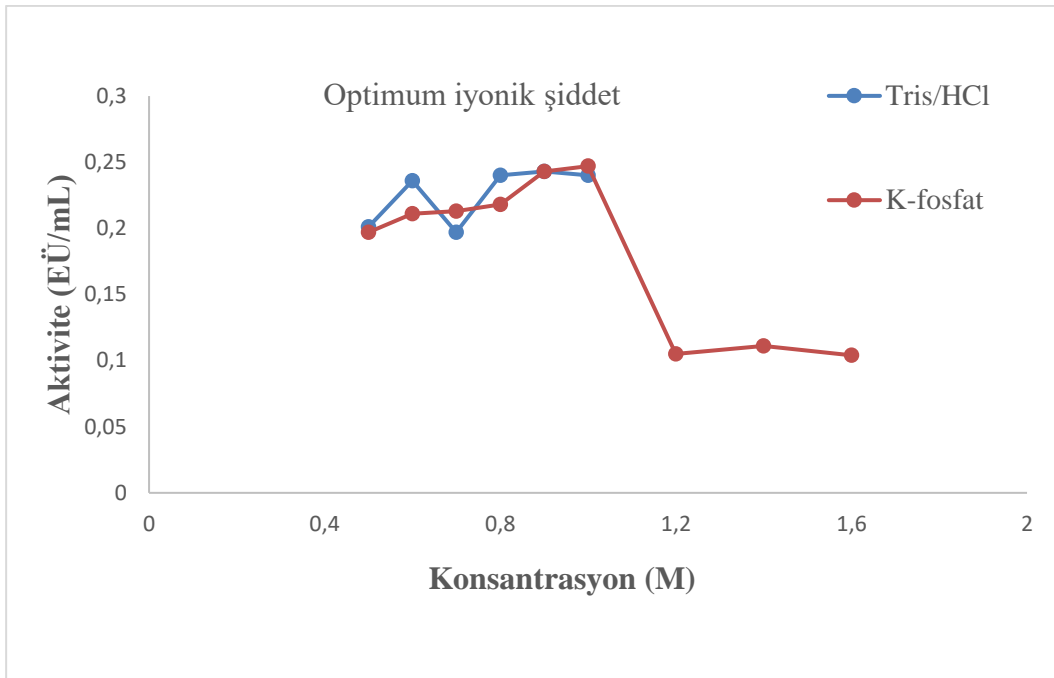
Koyun dalak dokusu GST enziminin aktivitesinin maksimum olduğu iyonik şiddet değeri Bölüm 3.7.2'de açıklandığı şekilde belirlendi. Bu amaçla önceki çalışmalar sonucunda belirlenen optimum pH değerine sahip K-fosfat ve Tris-HCl tamponları ile farklı konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlandı. Enzim aktiviteleri, hazırlanan farklı konsantrasyonlarda KH_2PO_4 ve Tris/HCl tampon çözeltileri kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçüldü. Bu ölçümler sonucu koyun dalak dokusundan saflaştırılan GST enzime ait iyonik şiddet değeri Tablo 4.4, Tablo 4.5 ve Şekil 4.7'de gösterildiği şekilde K-fosfat tamponunda 1,0 M olarak belirlendi.

Tablo 4.4. Koyun dalak dokusundan saflaştırılan GST enzimine ait optimum iyonik şiddetinin belirlenmesinde kullanılan KH₂PO₄ tampon çözeltisi aktivite ölçüm sonuçları

K-Fosfat	
İyonik şiddet (M)	Aktivite (EÜ/mL)
0,5	0,1972
0,6	0,2111
0,7	0,2139
0,8	0,2181
0,9	0,2431
1	0,2472
1,2	0,1056
1,4	0,1111
1,6	0,1042

Tablo 4.5. Koyun dalak dokusundan saflaştırılan GST enzimi için Tris/HCl tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

Tris-HCl	
İyonik şiddet (M)	Aktivite (EÜ/mL)
0,5	0,2014
0,6	0,2361
0,7	0,1972
0,8	0,2431
0,9	0,2431
1,0	0,2403



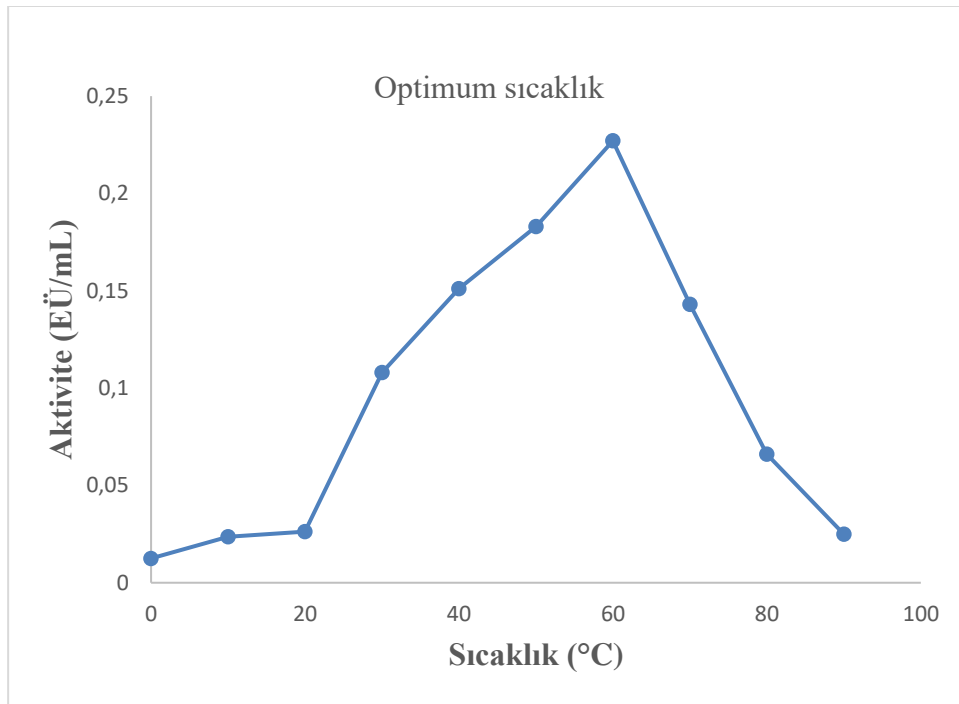
Şekil 4.7. Koyun dalak dokusu GST enzimi için hazırlanan optimum iyonik şiddet grafiği

4.7.3. Koyun Dalak Dokusu GST Enzimi İçin Optimum Sıcak Çalışması Sonuçları

Koyun dalak dokusundan saflaştırılan GST enzimi aktivitesinin optimum olduğu sıcaklığı belirlemek için Bölüm 3.7.3'te açıklanan şekilde GST enziminin aktivite değerleri 0 °C ile 90 °C arasında her 10 °C'de bir spektrofotometre ile ölçüldü. Koyun dalak dokusu GST enzimi için optimum sıcaklık değeri Tablo 4.6 ve Şekil 4.8'de gösterildiği gibi 60 °C olarak tespit edildi.

Tablo 4.6. Koyun dalak dokusu GST enziminin optimum sıcaklığın belirlenmesi amacıyla yapılan aktivite ölçüm sonuçları

Sıcaklık (°C)	Aktivite (EÜ/mL)
0	0,012
10	0,023
20	0,026
30	0,108
40	0,151
50	0,183
60	0,227
70	0,143
80	0,066
90	0,025



Şekil 4.8. Koyun dalak dokusu GST enzimi için hazırlanan optimum sıcaklık grafiği

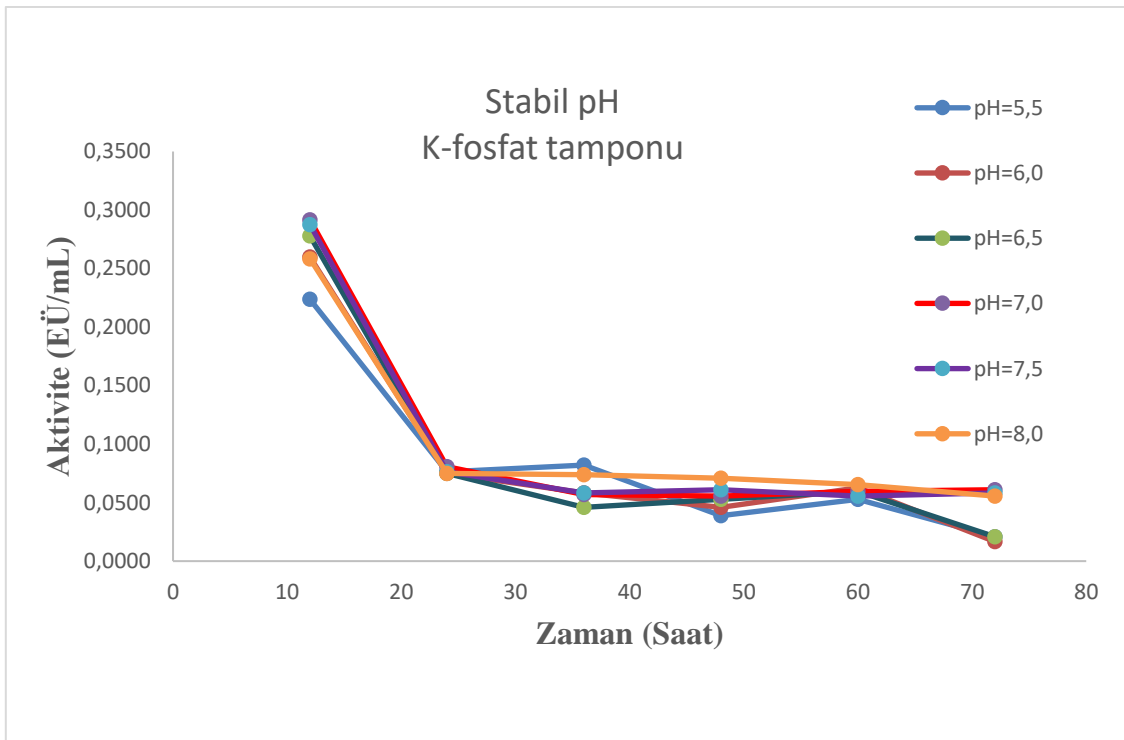
4.7.4. Koyun Dalak Dokusu GST Enzimi Stabil pH Çalışması Sonuçları

Koyun dalak dokusundan saflaştırılan GST enziminin stabil olduğu pH'ı belirlemek için, bölüm 3.7.4'te anlatıldığı gibi farklı pH değerlerinde uygun iyonik şiddete sahip tampon

çözeltiler hazırlandı. Farklı tampon çözeltilerdeki enzim aktiviteleri 3 gün süresince her 12 saatte bir ölçüldü. Koyun dalak dokusu GST enziminin stabil pH değeri Tablo 4.7, Tablo 4.8 ve Şekil 4.9'da gösterildiği gibi K-fosfat tamponu pH=8 olarak belirlendi.

Tablo 4.7. Koyun dalak dokusu GST enzimi için K-fosfat tamponu kullanılarak ölçülen aktivite sonuçları

K-fosfat						
pH	5,5	6	6,5	7	7,5	8
Zaman (Saat)	Aktivite (EÜ/ mL)					
12	0,22361	0,25972	0,27778	0,29167	0,2875	0,25833
24	0,07639	0,075	0,075	0,08056	0,07639	0,075
36	0,08194	0,05833	0,04583	0,05694	0,05833	0,07383
48	0,03889	0,04583	0,05278	0,05556	0,06111	0,07083
60	0,05278	0,0625	0,05972	0,05972	0,05556	0,06528
72	0,02083	0,01667	0,02083	0,06111	0,05833	0,05556



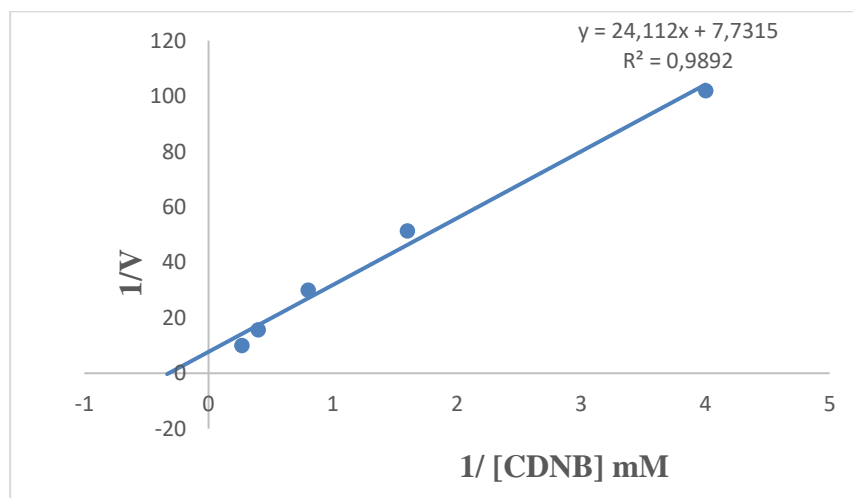
Şekil 4.9. Koyun dalak dokusu GST enzimi KH₂PO₄ tamponu kullanılarak elde edilen stabil pH grafiği

Tablo 4.8. Koyun dalak dokusu GST enzimi için Tris-HCl tamponu kullanılarak elde edilen aktivite ölçüm sonuçları

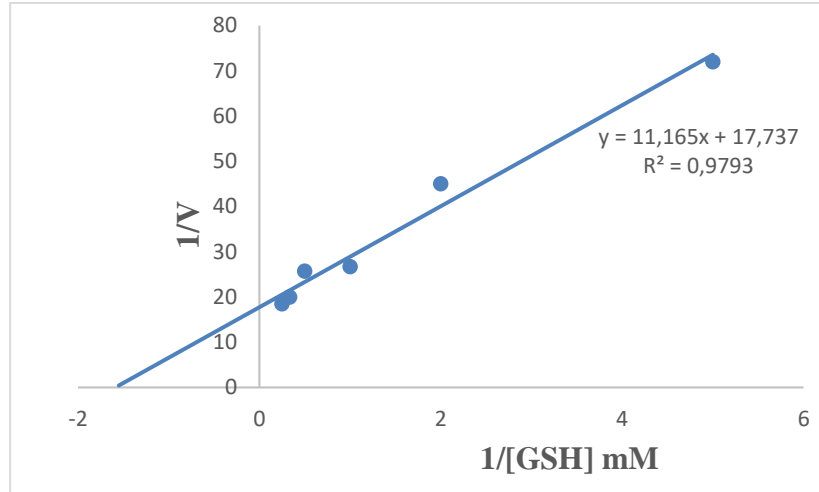
Tris-HCl				
pH	7,5	8	8,5	9
Zaman (Saat)	Aktivite (EÜ/ mL)			
12	0,2764	0,25417	0,29028	0,37083
24	0,09444	0,09306	0,08194	0,08889
36	0,06667	0,06944	0,06944	0,07917
48	0,06389	0,07778	0,07778	0,08056
60	0,13889	0,13542	0,16667	0,15278
72	0,13889	0,15625	0,01736	0,03472

4.7.5. Koyun Dalak Dokusu GST Enziminin GSH ve CDNB Substratları için K_M ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesine Ait Çalışmaların Sonuçları

Koyun dalak dokusundan saflaştırılan GST enziminin substratları olan GSH ve CDNB için K_M ve V_{max} değerlerini belirlemek amacıyla, Bölüm 3.7.5'te anlatıldığı şekilde 25 mM sabit konsantrasyonda 5 farklı GSH konsantrasyonu ile enzim aktivitesi ölçümleri yapıldı. Elde edilen değerlerle $1/[GSH]-1/V$ grafiği hazırlandı. Bu grafiğin eğiminden yararlanarak GSH substratı için K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı. GST enziminin diğer substratı olan CDNB için K_M ve V_{max} değerlerini hesaplamak amacıyla, Bölüm 3.7.5'te açıklanan şekilde 20 mM GSH sabit konsantrasyonda 5 farklı CDNB konsantrasyonu kullanılarak aktivite ölçümleri yapılmıştır. Elde edilen değerlerle $1/[CDNB] - 1/V$ grafiği hazırlanmış ve bu grafiğin eğiminden K_M ve V_{max} değerleri hesaplanmıştır. Hesaplanan değerler Şekil 4.11, Şekil 4.12 ve Tablo 4.9'da gösterilmiştir (Lineweaver ve Burk 1934).



Şekil 4.10. GST enziminin CDNB substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi grafiği



Şekil 4.11. GST enziminin GSH substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi grafiği

Tablo 4.9. Koyun dalak dokusu GST enzimine ait GSH ve CDNB substratları kullanılarak hesaplanan K_M ve V_{max} değerleri

Substrat	K_M (mM)	V_{max} (E \dot{U} /mL)
CDNB	0,321	0,129
GSH	0,629	0,056

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Glutasyon (GSH), hücre farklılaşması, proliferasyon ve apoptoz gibi çok sayıda hücrenel süreçte önemli bir roller oynamaktadır. GSH homeostazındaki meydana gelen bozukluklar birçok hastalığın etiolojisinde ya da ilerlemesinde rol oynamaktadır. Bu hastalıklar arasında, kanser, metabolik ve nörodejeneratif hastalıklar, yaşlanma ile bağlantılı hastalıklar, kistik fibrozis, inflamatuvar hastalıklar, immün hastalıklar ve kardiyovasküler sayılabilmektedir. GSH'nin hücre fonksiyonları üzerindeki etkileri konusunda önemli ilerlemeler kaydedilmesine rağmen, GSH'nin insan hastalıklarının başlangıcında ya da gelişmesindeki rolünü tanımlamak oldukça zordur. Hücre içi GSH seviyeleri, hücrenin oksidasyon durumu, metabolik enzimlerdeki, hücre içi taşıyıcılardaki, sinyal moleküllerindeki, hücre homeostazında yer alan transkripsiyon faktörlerindeki kalıtsal veya edinilmiş kusurlar ya da reaktif kimyasallara veya metabolik etkileşimlere maruz kalma nedeniyle sürekli değişim göstermektedir. GSH eksikliği veya GSH/glutasyon disülfid oranındaki azalma, hücreyi büyük ölçüde oksidatif strese karşı artan duyarlılıklara maruz bırakır. Oksidatif stres sonucu ortaya çıkan hasarın kanser, Parkinson hastalığı ve Alzheimer hastalığı gibi hastalıklarla ilgili olduğu düşünülmektedir. Ayrıca GSH düzeylerindeki dengesizliklerin bağışıklık sistemi fonksiyonunu etkilediği ve yaşlanma sürecinde rol oynadığı düşünülmektedir. Düşük hücre içi GSH seviyeleri hücrenel antioksidan kapasiteyi azalttığı gibi, yüksek GSH seviyeleri de genellikle antioksidan kapasiteyi ve oksidatif strese karşı direnci artırır ve bu birçok kanser hücresinde gözlenir. Bazı tümör hücrelerindeki daha yüksek GSH seviyeleri ayrıca tipik olarak daha yüksek GSH ile ilgili enzimler ve taşıyıcıların seviyeleri ile ilişkilidir. Bu değişikliklerin ne mekanizması ne de etkileri iyi tanımlanmamış olsa da, yüksek GSH içeriği kanser hücrelerini kemoterapiye karşı dayanıklı hale getirir ve bu da ilaç tedavisini sınırlayan önemli bir faktördür (Ballatori et al. 2009). GSSG (GSH'nin oksitlenmiş formu), glutasyon redüktaz enzimi tarafından rejenere edilir. GSSG pentoz fosfat yolunda üretilen NADPH tarafından indirgenir (Adem and Ciftci, 2012; Akkemik et al., 2011; Karaman et al., 2020; Temel et al., 2017a; Temel et al., 2017b; Temel and Kocuyigit, 2017; Temel et al., 2020). GSH ve GSH'ye bağlı enzim sistemleri hücreleri iç ve dış toksik maddelere, ilaçlara, reaktif oksijen türlerine ve ksenobiyotiklere karşı korur (Akkemik et al., 2012; Aybek et al., 2020;

Orhan and Şahin, 1995; Liao and Williams-Ashman, 1964; Özaslan et al., 2018a; Temel and Taysi, 2019; Türkan et al., 2020). Glutasyon transferazlar (glutasyon S-transferazlar veya GST'ler), geleneksel olarak faz II hücresel detoksifikasyon sistemi enzimleri olarak bilinen, bir dizi katalitik ve katalitik olmayan reaksiyonlarda yer alan çok işlevli enzimlerdir. Çok çeşitli polar olmayan eksojen (kimyasal kanserojenler, çevresel kirlenmeler ve hatta antitümör ajanlar) ve endojen bileşiklere glutasyonun (GSH) nükleofilik bağlanmasını katalize edebilirler, böylece daha fazla suda çözünür ürünler verirler, dolayısıyla bunların ortadan kaldırılmasını kolaylaştırırlar. GST tarafından katalize edilen reaksiyonlarda, GSH endojen ve eksojen hidrofobik elektrofilleri bağlar. (Balcı et al., 2019; Gulçin et al., 2018).

Metabolizmadaki öneminden dolayı GST enzimi 1961 yılında keşfedilmesinden itibaren çeşitli bitkisel, hayvansal ve insan dokularından saflaştırılarak karakterize edilmiştir. İlk olarak sıçan karaciğerinden saflaştırılan GST enzimi sonraki yıllarda insan karaciğeri (Simons and Wander, 1977), insan trombositleri (Loscalzo and Freedman, 1986), sığır karaciğeri (Asaoka, 1984), insan karaciğeri (Jagt, 1985), *E Coli* ekstraktı (Iizuka ve ark.,1989), kefal balığı karaciğerinden (Martinez-Lara et al., 1997), Atlantik somunu ve kahverengi alabalık karaciğer ve böbrek dokuları (Novoa ve Valinas, 2001), maruldan (*Lactuca sativa*'dan) (Hee ve Joong, 2005), insan eritrositlerinden (Erat ve Şakiroğlu, 2012), Van gölü balığının karaciğerinden (Özaslan 2014), Koyun dalak dokusu karaciğerinden (Taysi and Temel, 2021) saflaştırılmıştır.

Bu çalışmada metabolizma açısından önemi yukarıda vurgulanan glutasyon S- transferaz enzimi koyun dalak dokularının sitozolünden afinite kromatografisi tekniği ile saflaştırılması ve karakterizasyonu amaçlanmıştır. Bu amaçla Bingöl İli Et ve Süt Kurumundan temin edilen koyun dalak dokusu soğuk zincir uygulaması yapılarak Bingöl Üniversitesi Biyokimya Araştırma Laboratuvarına getirilmiş ve küçük parçalara ayrılarak ultratüraks yöntemiyle hücre zarlarının parçalanması sağlanmıştır. Hazırlanan homojenat tampon çözelti içerisine alınarak 13 000 g'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj yöntemiyle çöktürülen hücre zarları ve çözünmeyen hücresel moleküller atılarak alınan süpernatant için salting out metodu (amonyum sülfat çöktürmesi) uygulanarak en uygun çökme aralığı tespit edilmiş ve uygun tamponla yıkanarak dengeleme işlemi yapılan glutasyon agaroz

afinite kromatografisi kolonu kullanılarak enzimin saflaştırılması işlemi gerçekleştirilmiştir.

GST enzimi için daha önceki saflaştırma işlemlerinde, amonyum sülfat çöktürmesi, anyon değişim kromatografisi (DEAE-selüloz), katyon değişim (CM-selüloz kromatografisi), hidrosilepatit kolon kromatografisi, jel filtrasyon kromatografisi, orange-A agaroz afinite kromatografisi, epoksi kullanılarak aktive edilen Sepheroz-6B'ye bağlanmış GSH afinite kolon kromatografisi, GSH-sepharose afinite kromatografisi gibi metodlar kullanılmıştır (Lebda et al., 2012; Özaslan, 2014; Türkan, 2015; Özaslan et al., 2017; Temel et al., 2018; Balcı et al., 2019). Bu çalışmada kullanılan glutatyon-agaroz afinite kromatografisi önceki yöntemlere göre hem ekonomik olması hem de kısa sürede ve yüksek saflıkta enzim elde edilmesi dolayısıyla daha etkili ve avantajlıdır.

GST enzimi üzerine yürütülen önceki çalışmalarda enzimin at birimlerinin molekül kütlelerinin, insan kanında yaklaşık 25 (Loscalzo and Freedman, 1986), E.coli'de yaklaşık olarak 22,5 kDa (Iizuka et al., 1989), rat karaciğerinde yaklaşık 26 kDa (Hiratsuka et al. 1990), Kefal balığı karaciğerinde yaklaşık 23 kDa (homodimer) (Martinez-Lara et al., 1997), gökkuşuğu alabalığı karaciğerinde yaklaşık 23 kDa (homodimer) (Riol et al., 2001), yılan balığı karaciğerinden saflaştırılan GST enzimi için yaklaşık 22,3 kDa (homodimer) (Novoa et al. 2004), sığır eritrositleri ve sığır beyninden elde edilen GST lerin molekül kütleleri sırasıyla 27 kDa (homodimer alt birimler) ve 24 kDa (homodimer alt birimler) (Young et al., 1989; Erat et al., 2008), insan böbreğinden saflaştırılan GST enziminin molekül kütlesi yaklaşık olarak 26,5 ile 24,5 kDa civarında (farklı iki alt birim) (Singh et al., 1987), bildircin karaciğer dokusundan saf olarak elde edilen GST enziminin molekül ağırlığının yaklaşık 25,1 kDa (Taysi and Temel, 2021) olduğu rapor edilmiştir. Yapılan bu çalışmada koyun dalağında saflaştırılan GST enzime ait alt birimlerin molekül kütlesi SDS-PAGE metodu ile yaklaşık olarak 26.36 kDa olarak bulunmuştur. Bu değer daha önceki çalışmalarda belirlenen değer aralığında ve insan kanı ve insan böbreğinden saflaştırılan GST enzimlerinin molekül kütlelerine yakın olduğu tespit edilmiştir.

Koyun dalak dokusu siztozolundan saflaştırılan GST enzimi için yürütülen karakterizasyon çalışmalarında enzime ait optimum pH'nı belirlenmesi amacıyla pH'ları 5,5-8,0 arasında değişen K-fosfat ve pH'ları 7,0-9,0 arasında değişen Tris/HCl tamponları kullanıldı ve

enzim için optimum pH KH_2PO_4 tamponu pH=8.0 olarak belirlendi. Önceki çalışmalarda E coli ekstraktından saflaştırılan GST enzime ait optimum pH =7,0 (Iizuka et al., 1989), İnsan kanı GST enzimi için optimum pH=5,5 (Türkanoglu, 2007), Van gölü balığı karaciğeri GST enzimi için Tris/HCl tamponu pH = 7,8 (Özaslan, 2014), Koyun dalak dokusu karaciğeri GST enzimi için optimum pH Tris-HCl pH= 8,5 (Taysi and Temel, 2021) olarak belirlenmiştir. Daha önceki çalışmalar analiz edildiğinde GST enzimi için optimum pH'nın 5.5-8.5 aralığında olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada koyun dalak dokusu GST enzime ait belirlenen bu değer literatürde belirlenen değer aralığındadır.

Bu çalışmada koyun dalak dokusu GST enziminin için en uygun iyonik şiddetin belirlenmesi amacıyla konsantrasyonları 0,5 M - 1 M aralığında olan K-fosfat ve 0,5 M-1,0 M konsantrasyon aralığında Tris/HCl tamponları kullanıldı. Koyun dalak dokusu GST enzimi için optimum iyonik şiddet 1 M K-fosfat tamponu olarak belirlendi. Önceki çalışmalarda, insan kan serumu GST enzimi için optimum iyonik şiddet 2 mM K- fosfat tamponu (Türkanoglu, 2007), Van Gölü Balığının karaciğer dokusu GST enzimi için 100 mM Tris/HCl tamponu (Özaslan, 2014), Karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enzimi için K-fosfat 0,125 M (Türkan, 2015), bıdırcın karaciğeri GST enzimi için Tris-HCl tamponu 140 mM (Taysi and Temel, 2021) olduğu rapor edilmiştir. Koyun dalak dokusu GST enzimi için belirlenen 1M K-fosfat optimum iyonik şiddet değeri önceki çalışmalara göre farklılık arz etmektedir.

Bu çalışmada koyun dalak dokusu GST enziminin stabil olduğu pH değerini belirlemek pH'ları 5,5-8,0 arasında değişen K-fosfat ve pH'ları 7,0-9,0 arasında değişen Tris/HCl tamponları kullanılarak 3 gün boyunca her 12 saattebir aktivite ölçümleri gerçekleştirildi. Bu süre sonunda koyun dalak dokusu GST enzimi için stabil pH, 1 M KH_2PO_4 tamponu pH=7.0 olarak belirlendi. Önceki çalışmalarda, Van Gölü Balığı karaciğeri GST enzimi için stabil pH fosfat tamponu pH 5,5 (Özaslan, 2014), karayemiş meyvesi için K-fosfat tamponu pH= 6,5 (Türkan 2015), Koyun dalak dokusu karaciğeri GST enzimi için Tris-HCl tamponu pH=8,5 olmak üzere farklı kaynaklardan saflaştırılan GST enzimi için stabil pH'nın 5-11 olmak üzere geniş bir aralıkta olduğu rapor edilmiştir. Bu çalışmada tespit edilen stabil pH değeri literatürde belirlenen değerlerle uyum arz etmektedir.

Bu çalışmada koyun dalak GST enzimine ait optimum sıcaklığın belirlenmesi amacıyla ısıtılmalı su banyosu kullanılarak her 10 °C sıcaklık aralığında enzim aktiviteleri ölçülerek, enzim aktivitesinin optimum olduğu sıcaklık değeri 60 °C olarak belirlenmiştir. Önceki çalışmalarda Önceki çalışmalarda hindi karaciğeri GST enzimi için 50 °C (Akkemik et al., 2012), gökkuşacağı alabalık eritrositi GST enzimi optimum sıcaklığını 30 °C Çomaklı (2011), insan kan serum GST enzimin optimum sıcaklığı 65°C Türkanoglu (2007), karayemiş meyvesinden saflaştırılan GST enziminin optimum olduğu sıcaklık 30°C (Türkan, 2015), Van Gölü Balığı karaciğeri GST enzimi için optimum sıcaklık 30 °C (Özaslan, 2014), Koyun dalak dokusu karaciğeri GST enzimi için optimum sıcaklık 55 °C (Taysi and Temel, 2021) olarak rapor etmişlerdir. Bu çalışmada belirlenen optimum sıcaklık değeri insan kanı ve Koyun dalak dokusu karaciğeri GST enzimi optimum sıcaklık değerlerine yakındır.

K_M değeri bir enzime ait aktif bölgesinin yarısının dolduğu andaki substrat konsantrasyonunu ve aynı zamanda enzim substrat kompleksi olan ES kompleksinin ayrışma sabitidir yani enzimin substratı ile bağlanma dercesini ve substrata olan ilgisini gösterir. K_M değerinin yüksek olması enzimin substrata olan afinitesinin düşük olduğunu, K_M değerinin düşük olması ise enzimin substrata olan afinitesinin yüksek olduğu anlamına gelmektedir. V_{max} ise enzimin katalitik aktivitesinin bir ölçüsüdür. V_{max} birim zamanda ürüne çevrilen substratın mol sayısını göstermektedir. Bu çalışmada koyun dalak dokusu GST enzimi için yürütülen kinetik çalışmalarda GST enziminin substratları için K_M ve V_{max} kinetik değerleri Lineweaver-Burk grafikleri kullanılarak hesaplanmıştır. GSH substratına ait K_M ve V_{max} değerleri hesaplanırken sabit CDNB konsantrasyonunda 5 farklı GSH konsantrasyonuyla aktivite ölçümleri gerçekleştirilerek Lineweaver-Burk grafiği oluşturulmuş ve bu grafik vasıtasıyla GSH için K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 0.629 mM, 0.056 EÜ/mL olarak; aynı zamanda CDNB substratına ait K_M ve V_{max} değerleri hesaplanırken sabit GSH konsantrasyonunda 5 farklı CDNB konsantrasyonu ile aktivite ölçümleri gerçekleştirilerek Lineweaver-Burk grafiği oluşturulmuş ve bu grafik vasıtasıyla CDNB substratına ait K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 0.321 mM, 0.129 EÜ/mL olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar değerlendirildiğinde koyun dalak dokusu GST enziminin GSH substratına olan afinitesinin CDNB substratına olan afinitesinden daha az olduğu belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

Adem, S. and Ciftci, M. (2012) Purification of rat kidney glucose 6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase, and glutathione reductase enzymes using 2',5'-ADP Sepharose 4B affinity in a single chromatography step. *Protein Expr Purif* 81, 1-4. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2011.08.031>

Adler, V., Yin, Z., Fuchs, S. Y., Benezra, M., Rosario, L., Tew, K. D., ... and Ronai, Z. E. (1999). Regulation of JNK signaling by GSTp. *The EMBO journal*, 18(5), 1321-1334.

Ajila, C. M., Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., Godbout, S., and Valéro, J. R. (2011). Extraction and analysis of polyphenols: recent trends. *Critical reviews in biotechnology*, 31(3), 227-249.

Akkemik, E., Şentürk, M., Özgeriş, F. B., Taşer, P., and Ciftci, M. (2011). In vitro effects of some drugs on human erythrocyte glutathione reductase. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 41(2), 235-241. <https://doi.org/10.3906/sag-1002-4>

Akkemik, E., Taser, P., Bayindir, A., Budak, H., and Ciftci, M. (2012). Purification and characterization of glutathione S-transferase from turkey liver and inhibition effects of some metal ions on enzyme activity. *Environmental Toxicology and pharmacology*, 34(3), 888-894. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2012.08.010>

Aksoy M, Ozaslan M. S, Kufrevioglu O. I (2016). Purification of glutathione S-transferase from Van Lake fish (*Chalcalburnus tarichii* Pallas) muscle and investigation of some metal ions effect on enzyme activity. *J Enzyme Inhib Med Chem* 31:546-550. <https://doi.org/10.3109/14756366.2015.1046063>

Astier, J., and Lindermayr, C. (2012). Nitric oxide-dependent posttranslational modification in plants: an update. *International journal of molecular sciences*, 13(11), 15193-15208.

Atkinson, H. J., and Babbitt, P. C. (2009). Glutathione transferases are structural and functional outliers in the thioredoxin fold. *Biochemistry*, 48(46), 11108-11116.

Aybek, H., Temel, Y., Ahmed, B. M., Ağca, C. A., and Çiftci, M. (2020). Deciphering of the effect of chemotherapeutic agents on human glutathione S-transferase enzyme and MCF-7 cell line. *Protein and Peptide Letters*, 27(9), 888-894. <https://doi.org/10.2174/0929866527666200413101017>

Balcı, N., Türkan, F., Şakiroğlu, H., Aygün, A., and Şen, F. (2019). Purification and characterization of glutathione S-transferase from blueberry fruits (*Vaccinium arctostaphylos* L.) and investigated of some pesticide inhibition effects on enzyme activity. *Heliyon*, 5(4), e01422. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01422>

Ballatori, N., Krance, S. M., Notenboom, S., Shi, S., Tieu, K., and Hammond, C. L. (2009). Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol Chem* 390:191-214 . <https://doi.org/10.1515/BC.2009.033>

Biswas, S. K., McClure, D., Jimenez, L. A., Megson, I. L., and Rahman, I. (2005). Curcumin induces glutathione biosynthesis and inhibits NF- κ B activation and interleukin-8 release in alveolar epithelial cells: mechanism of free radical scavenging activity. *Antioxidants and redox signaling*, 7(1-2), 32-41.

Cadet, J., Ravanat, J. L., Helen, G. W., Yeo, H. C., and Ames, B. N. (1994). [8] Singlet oxygen DNA damage: Chromatographic and mass spectrometric analysis of damage products. In *Methods in enzymology* 234, 79-88.

Carney, J. M., Starke-Reed, P. E., Oliver, C. N., Landum, R. W., Cheng, M. S., Wu, J. F., and Floyd, R. A. (1991). Reversal of age-related increase in brain protein oxidation, decrease in enzyme activity, and loss in temporal and spatial memory by chronic administration of the spin-trapping compound N-tert-butyl-alpha-phenylnitron. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(9), 3633-3636.

Chakraborty, P., Kumar, S., Dutta, D., and Gupta, V. (2009). Role of antioxidants in common health diseases. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 2(2), 238-244.

Comakli, V., Ciftci, M., and Küfrevioğlu, Ö. İ. (2011). Purification of glutathione S-transferase enzyme from rainbow trout erythrocytes and examination of the effects of certain antibiotics on enzyme activity. *Haceteppe Journal of Biology and Chemistry*, 39(4), 413-419.

Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M., and Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal*, 17(10), 1195-1214.

Dabbagh, A. J., Mannion, T., Lynch, S., and Frei, B. (1994). The effect of iron overload on rat plasma and liver oxidant status in vivo. *Biochemical Journal*, 300(3), 799-803.

D'Autréaux, B., and Toledano, M. B. (2007). ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(10), 813-824.

Eaton, D. L., and Bammler, T. K. (1999). Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*, 49(2), 156-164. <https://doi.org/10.1093/toxsci/49.2.156>

Erat, M., Guvercin, S., and Sakiroglu, H. (2008). Determination of some kinetic and characteristic properties of glutathione S-transferase from bovine erythrocytes. *Protein and peptide letters*, 15(1), 6-12.

Fairlamb, A. H., Blackburn, P., Ulrich, P., Chait, B. T., and Cerami, A. (1985). Trypanothione: a novel bis (glutathionyl) spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. *Science*, 227(4693), 1485-1487.

Fang, Y. Z., Yang, S., and Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18(10), 872-879.

Fisher, M. (2001). Lehninger principles of biochemistry, ; by David L. Nelson and Michael M. Cox. *The Chemical Educator*, 6(1), 69-70.

Gulçin, İ., Taslimi, P., Aygün, A., Sadeghian, N., Bastem, E., Kufrevioglu, O. I., ... and Şen, F. (2018). Antidiabetic and antiparasitic potentials: Inhibition effects of some natural antioxidant compounds on α -glycosidase, α -amylase and human glutathione S-transferase enzymes. *International journal of biological macromolecules*, 119, 741-746. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.001>

Halliwell, B., and Foyer, C. H. (1978). Properties and physiological function of a glutathione reductase purified from spinach leaves by affinity chromatography. *Planta*, 139(1), 9-17.

Hamid, A. A., Aiyelaagbe, O. O., Usman, L. A., Ameen, O. M., and Lawal, A. (2010). Antioxidants: Its medicinal and pharmacological applications. *African Journal of pure and applied chemistry*, 4(8), 142-151.

Hayes, J. D., Flanagan, J. U., and Jowsey, I. R. (2005). Glutathione transferases. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 45(1), 51-88.

Huang, Q., Liang, L., Wei, T., Zhang, D., Zeng, Q. Y. (2008). Purification and partial characterization of glutathione transferase from the teleost *Monopterus albus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 147, 96-100.

Karaman, M., Temel, Y., and Bayindir, S. (2020). Inhibition effect of rhodanines containing benzene moieties on pentose phosphate pathway enzymes and molecular docking. *Journal of Molecular Structure*, 1220, 128700. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.128700>

Klapheck, S. (1988). Homogluthathione: isolation, quantification and occurrence in legumes. *Physiologia Plantarum*, 74(4), 727-732.

Krause, K. H. (2007). Aging: a revisited theory based on free radicals generated by NOX family NADPH oxidases. *Experimental gerontology*, 42(4), 256-262.

Kunwar, A., and Priyadarsini, K. I. (2011). Free radicals, oxidative stress and importance of antioxidants in human health. *Journal of Medical and Allied Sciences*, 1(2), 53-60

Leaver, M. J., and George, S. G. (1998). A piscine glutathione S-transferase which efficiently conjugates the end-products of lipid peroxidation. *Marine Environmental Research*, 46(1-5), 71-74. [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(97\)00071-8](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(97)00071-8)

Lebda, M., Taha, N., Noeman, S., Korshom, M., and El-Wahab Mandour, A. (2012). Purification and Characterization of Glutathione-S-Transferase from Rat' s Liver: Effect of Carbon Tetrachloride and Camel' s Milk. *J. Chromat. Separation Techniq*, 3(4), 2-8. <https://doi.org/10.4172/2157-7064.1000133>

Liao, S., and Williams-Ashman, H. G. (1964). Glutathione reductase. In *Enzyme* (pp. 888-894). Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-11689-0_30

Loscalzo, J., and Freedman, J. (1986). Purification and characterization of human platelet glutathione-S-transferase. *Blood*, 67(6), 1595-1599. <https://doi.org/10.1182/blood.v67.6.1595.1595>

Macnicol, P. K. (1987). Homogluthathione and glutathione synthetases of legume seedlings: partial purification and substrate specificity. *Plant Science*, 53(3), 229-235.

Martinez-Lara, E., George, S. G., Lopez-Barea, J., and Barcena, J. A. (1997). Purification and characterization of multiple glutathione transferase isoenzymes from grey mullet liver. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 53(9), 759-768.

Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., and Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in plant science*, 9(10), 490-498.

Newton, G. L., and Javor, B. (1985). gamma-Glutamylcysteine and thiosulfate are the major low-molecular-weight thiols in halobacteria. *Journal of bacteriology*, 161(1), 438-441.

Özaslan, M. S. (2014). *Glutasyon S-Transferaz Enziminin Van Gölü Balığı (chalcalburnustarichipallas) Karaciğerinden Saflaştırılması, Karakterizasyonu Ve Bazı Metal İyonlarının Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi* (Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum).

Özaslan, M. S., Demir, Y., Aksoy, M., Küfrevioğlu, Ö. I., and Beydemir, Ş. (2018a). Inhibition effects of pesticides on glutathione-S-transferase enzyme activity of Van Lake fish liver. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 32(9), e22196. <https://doi.org/10.1002/jbt.22196>

Özaslan, M. S., Demir, Y., Aslan, H. E., Beydemir, Ş., and Küfrevioğlu, Ö. İ. (2018b). Evaluation of chalcones as inhibitors of glutathione S-transferase. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 32(5), e22047. <https://doi.org/10.1002/jbt.22047>

Özaslan, M. S., Demir, Y., Küfrevioğlu, O. I., and Çiftci, M. (2017). Some metals inhibit the glutathione S-transferase from Van Lake fish gills. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 31(11), e21967. <https://doi.org/10.1002/jbt.21967>

Ray, G., and Husain, S. A. (2002). Oxidants, antioxidants and carcinogenesis. *Indian journal of experimental biology*, 40(11), 1213-1232.

Raygani, A. V., Rahimi, Z., Zahraie, M., and Pourmotabbed, M. N. A. (2007). Enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense with alzheimer disease1. *Acta Medica Iranica*, 271-276.

Rennenberg, H. (1980). Glutathione metabolism and possible biological roles in higher plants. *Phytochemistry*, 21(12), 2771-2781.

Shacter, E., Williams, J. A., and Levine, R. L. (1995). Oxidative modification of fibrinogen inhibits thrombin-catalyzed clot formation. *Free Radical Biology and Medicine*, 18(4), 815-821.

Sikora, E., Cieřlik, E., and Topolska, K. (2008). The sources of natural antioxidants. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 7(1), 5-17.

Singh, S. V., Leal, T., Ansari, G. A., and Awasthi, Y. C. (1987). Purification and characterization of glutathione S-transferases of human kidney. *Biochemical journal*, 246(1), 179-186.

Skipsey, M., Davis, B. G., and Edwards, R. (2005). Diversification in substrate usage by glutathione synthetases from soya bean (*Glycine max*), wheat (*Triticum aestivum*) and maize (*Zea mays*). *Biochemical Journal*, 391(3), 567-574.

Szatrowski, T. P., and Nathan, C. F. (1991). Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer research*, 51(3), 794-798.

Taysi, M. Ş., and Temel, Y. (2021). Glutathione S-transferase: Purification and Characterization from Quail (*Coturnix coturnix japonica*) Liver and the Impact of Some Metal Ions on Enzyme Activity. *Bionanoscience*, 11(1), 91-98. <https://doi.org/10.1007/s12668-020-00811-4>

Temel, Y., Ayna, A., Hamdi Shafeeq, I., and Ciftci, M. (2020). In vitro effects of some antibiotics on glucose-6-phosphate dehydrogenase from rat (*Rattus norvegicus*) erythrocyte. *Drug and chemical toxicology*, 43(2), 219-223.

Temel, Y., Bozkuş, T., Karagözoğlu, Y., and Çiftçi, M. (2017). Glutatyon redüktaz (GR) enziminin japon bildircin (*Coturnix coturnix japonica*) eritrositlerinden saflaştırılması ve karakterizasyonu. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 7(3), 143-150.

Temel, Y., Bengü, A. Ş., Akkoyun, H. T., Akkoyun, M., and Ciftci, M. (2017). Effect of astaxanthin and aluminum chloride on erythrocyte G6PD and 6PGD enzyme activities in vivo and on erythrocyte G6PD in vitro in rats. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 31(10), e21954. <https://doi.org/10.1002/jbt.21954>

Temel, Y., and Kocyigit, U. M. (2017). Purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase from rat (*Rattus norvegicus*) erythrocytes and inhibition effects of some metal ions on enzyme activity. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 31(9), e21927.

Temel, Y., Koçyigit, U. M., Taysı, M. Ş., Gökalp, F., Gürdere, M. B., Budak, Y., ... and Çiftci, M. (2018). Purification of glutathione S-transferase enzyme from quail liver tissue and inhibition effects of (3aR, 4S, 7R, 7aS)-2-(4-((E)-3-(aryl) acryloyl) phenyl)-3a, 4, 7, 7a-tetrahydro-1H-4, 7-methanoisoindole-1, 3 (2H)-dione derivatives on the enzyme activity. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 32(3), e22034. <https://doi.org/10.1002/jbt.22034>

Temel, Y., and Taysi, M. Ş. (2019). The effect of mercury chloride and boric acid on rat erythrocyte enzymes. *Biological trace element research*, 191(1), 177-182.

Türkan, F. (2015). *Karayemiş meyvesinden (prunus laurocerasus l.) glutatyon s-transferaz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu ve kinetik özelliklerinin incelenmesi.* (Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum)

Türkan, F., Huyut, Z., Demir, Y., Ertaş, F., and Beydemir, Ş. (2019). The effects of some cephalosporins on acetylcholinesterase and glutathione S-transferase: an in vivo and in vitro study. *Archives of physiology and biochemistry*, 125(3), 235-243. <https://doi.org/10.1080/13813455.2018.1452037>

Türkan, F., Huyut, Z., Taslimi, P., Huyut, M. T., and Gülçin, İ. (2020). Investigation of the effects of cephalosporin antibiotics on glutathione S-transferase activity in different tissues of rats in vivo conditions in order to drug development research. *Drug and chemical toxicology*, 43(4), 423-428. <https://doi.org/10.1080/01480545.2018.1497644>

Türkanoğlu, A. (2007). *Human serum arylesterase and glutathione S-transferase activities in patients with ischemic stroke compared to healthy controls* (Master's thesis, Middle East Technical University).

Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C. J., and Telser, J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and cellular biochemistry*, 266(1), 37-56.

Wang, W., and Ballatori, N. (1998). Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions. *Pharmacological reviews*, 50(3), 335-356.

Yan, L. J., Levine, R. L., and Sohal, R. S. (1997). Oxidative damage during aging targets mitochondrial aconitase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(21), 11168-11172.

