

T.C.

BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GLUTATYON S-TRANSFERAZ (GST) ENZİMİNİN JAPON
BILDIRCIN (*Coturnix coturnix japonica*) KARACİĞERİNDEN
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Mehmet Şerif TAYSI

TEZ DANIŞMANI

Dr. Öğr. Üyesi YUSUF TEMEL

BİNGÖL-2018

T.C.
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GLUTATYON S-TRANSFERAZ (GST) ENZİMİNİN JAPON
BILDIRCIN (*Coturnix coturnix japonica*) KARACİĞERİNDEN
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Mehmet Şerif TAYSI

Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA

Bu tez Tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı

Üye

Üye

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Enstitü Müdürü

Doç.Dr. Zafer ŞİAR

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın yapılması için gerekli ortamı sağlayan Bingöl Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi dekanı Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ'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 Dr. Öğr. Üyesi Yusuf TEMEL'e sonsuz teşekkür ve minnetlerimi sunarım.

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

Mehmet Şerif TAYSI

Bingöl 2018

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SEMBOLLER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
TABLolar LİSTESİ	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Enzimler	1
1.2. Glutasyon	5
1.3. Glutasyon S- Transferaz	6
2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	13
3. MATERYAL VE METOD	21
3.1. Materyal.....	21
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	21
3.1.2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar	21
3.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanmaları	22
3.1.3.1. Aktivite Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler.....	22
3.1.3.2. Karaciğer Dokusundan Homojenat Hazırlamak İçin Kullanılan Çözeltiler	22
3.1.3.3. Afinite Kolonunda Kullanılan Çözeltiler	22

3.1.3.4. Bradford Yöntemiyle Protein Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler	23
3.1.3.5. Elektroforez İçin Kullanılan Çözeltiler	24
3.2. Metod.....	25
3.2.1. Protein Tayini	25
3.2.1.1. Kalitatif Protein Tayini.....	25
3.2.1.2. Bradford Yöntemi ile Protein Tayini.....	25
3.2.2. Glutasyon S-Transferaz Aktivite Tayini	26
3.2.3. GST Enzimi İçin Afinite Jelinin Hazırlanması.....	27
3.2.4. Bıldırcın Karaciğerinden GST' nin Saflaştırılması.....	
3.2.4.1. Bıldırcın Karaciğeri Temini ve Homojenat Hazırlanması.....	
3.2.4.2. Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Diyaliz	28
3.2.4.3. Homojenattaki Enzimin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması.....	29
3.2.5. SDS-PAGE ile Enzim Saflığının Kontrolü.....	29
3.2.6. GST Enziminin Molekül Kütlesinin SDS-PAGE ile Tayini	30
3.3. GST Enzimiyle İlgili Olarak Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları	31
3.3.1. Optimum pH'nın Belirlenmesi	31
3.3.2. Optimum İyonik Şiddetin Belirlenmesi.....	31
3.3.3. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi	31
3.3.4. Stabil pH'nın Belirlenmesi	32
3.3.5. GST Substratları İçin K_M ve V_{max} Değerlerinin Bulunmasına Yönelik Çalışmalar.....	32
4. SONUÇLAR	33
4.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi.....	33
4.2. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik.....	34
4.3. Afinite Kromatografisi Sonuçları	34
4.4. GST Enziminin Saflaştırılması ile İlgili Sonuçlar.....	35

4.5. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrophorezi ile GST Enzim Saflıgının Kontrolü.....	35
4.6. Bildircin Karaciğerinden Saflastırılan GST Enziminin SDS-PAGE ile Alt Birimlerinin Mol Kütlesinin Belirlenmesine Ait Sonuçlar	36
4.7. GST Enzimiyle İlgili Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları.....	37
4.7.1. Optimum pH'nın Belirlenmesi İçin Yapılan Çalışmaların Sonuçları.....	37
4.7.2. Optimum İyonik Şiddetin Belirlenmesine Ait Çalışma Sonuçları	38
4.7.3. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi İçin Yapılan Çalışma Sonuçları	39
4.7.4. Stabil pH'nın Belirlenmesi İçin Yapılan Çalışma Sonuçları.....	40
4.7.5. Bildircin Karaciğerinden Saflastırılan GST Enziminin GSH ve CDNB Substratları İçin K_M ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesine Ait Çalışmaların Sonuçları	41
5. TARTIŞMA.....	44
6. SONUÇ	50
KAYNAKLAR.....	52
ÖZGEÇMİŞ.....	58

SEMBOLLER VE KISALTMALAR LİSTESİ

BSA	: Bovin serum albumin
CDNB	: 1-kloro- 2,4- dinitrobenzen
Tris	: Trihidroksimetil amino metan
TCA	: Triklor asetik asit
DTT	: Ditiyotreitol
EDTA	: Etilendiamin tetra asetik asit
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
TEMED	: N,N,N',N'-tetrametilendiamin
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
GST	: Glutasyon S- transferaz
GSH	: indirgenmiş glutasyon
RNA	: Ribonükleik asit
Da	: Dalton
E	: Enzim
EC	: Enzim kodu
ES	: Enzim Substrat kompleksi
I	: İnhibitör
IC ₅₀	: Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
K _i	: Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti
kDa	: Kilodalton
M _K	: Molekül kütlesi
S	: Substrat
V _{max}	: Maksimum hız
mL	: Mili Litre
mg	: Mili gram
mM	: Mili molar

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.2.	Detoksifikasyon reaksiyonları (Faz I, Faz II, Faz III)	7
Şekil 1.3.	GST enziminin katalizlediği reaksiyon	8
Şekil 1.4.	Anopheles cracens'den saflaştırılan GST enziminin kristallografik yapısı (a) GSH bağlanma bölgesi ve (b) substrat bağlanma bölgesi	9
Şekil 1.5.	Dimerik bir GST molekülünün iki aktif bölgesinin gösterimi	15
Şekil 3.1.	Spektrofotometrik olarak GST enziminin aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan ürünün oluşum mekanizması	26
Tablo 3.1.	GST enzimini aktivite ölçümünde kullanılan prosedür	24
Şekil 4.1.	Amonyum sülfat çöktürmesi	33
Şekil 4.2.	Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayini için kullanılan standart grafik	34
Şekil 4.3.	Bırdırcın karaciğeri GST enziminin glutatyon agaroz afinite kolonundan elüsyon grafiği	35
Şekil 4.4.	Afinite kromatografisi ile saflaştırılan GST enziminin SDS-PAGE ile saflık kontrolü	36
Şekil 4.5.	Saflaştırılan GST enzimi için $\text{Log}M_K/R_f$ grafiği	36
Şekil 4.6.	GST enziminin K-fosfat ve Tris-HCl tamponu ile elde edilen Aktivite-pH grafiği	37
Şekil 4.7.	GST enziminin farklı sıcaklıklarda ölçülen aktivite-sıcaklık grafiği	38
Şekil 4.8.	GST enziminin farklı sıcaklıklarda ölçülen aktivite-sıcaklık grafiği	39
Şekil 4.9.a.	GST enziminin stabil pH'sını belirlemek için KH_2PO_4 tamponu ile yapılan çalışma sonucu elde edilen K-fosfat grafiği	41
Şekil 4.9.b.	GST enziminin stabil pH'sını belirlemek için Tris-HCl tamponu ile yapılan çalışma sonucu elde edilen Tris-HCl grafiği	41
Şekil 4.10.a.	GST enzimi ile sabit GSH konsantrasyonunda CDNB için K_M ve $V_{\max}$ değerlerinin belirlenmesi grafiği	42
Şekil 4.10.b.	GST enzimi ile sabit CDNB konsantrasyonunda GSH için K_M ve $V_{\max}$ değerlerinin belirlenmesi grafiği	42

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1.1.	GST enziminin aminoasit analizi (mol başına).....	10
Tablo 3.1.	GST enzimini aktivite ölçümünde kullanılan prosedür	27
Tablo 3.2.	Elektroforez jellerinin hazırlanması.....	30
Tablo 4.1.	GST enziminin amonyum sülfat çöktürme sonuçları	33
Tablo 4.2.	GST enziminin saflaştırma sonuçları.....	35
Tablo 4.3.	GST enziminin optimum pH'sı için 0,1 M KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları	37
Tablo 4.4.	GST enziminin optimum iyonik şiddetini KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları	38
Tablo 4.5.	GST enziminin optimum sıcaklığın belirlenmesi için yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	39
Tablo 4.6.a.	GST enziminin stabil pH'sının belirlenmesi için yapılan K-fosfat aktivite ölçüm sonuçları.....	40
Tablo 4.6.b.	GST enziminin stabil pH'sının belirlenmesi için yapılan Tris-HCl aktivite ölçüm sonuçları.....	40
Tablo 4.7.	GST enziminin GSH ve CDNB substratları için K_M ve $V_{\max}$ değerleri.....	43
Tablo 6.1.	Bıldırcın karaciğeri GST enzimi için karakterizasyon sonuçları.....	51

GLUTATYON S-TRANSFERAZ (GST) ENZİMİNİN JAPON BILDIRCIN (*Coturnix coturnix japonica*) KARACİĞERİNDEN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

ÖZET

Bu çalışmada, glutatyon S-transferaz (GST; EC 2.5.1.18) enzimi bildircin karaciğerinden amonyum sülfat çöktürmesi ve glutatyon-agaroz afinite kromatografisi kullanılarak 15,86 EÜ/mg protein spesifik aktivite ile %12,36 verimle 46,1 kat saflaştırıldı. Enzim saflığını kontrol etmek ve alt birim molekül kütlelerini belirlemek amacıyla SDS-PAGE yapıldı ve tek bant elde edildi. Bildircin karaciğerinden saflaştırılan GST enziminin alt birim molekül kütlesi yaklaşık olarak 25,1 kDa belirlendi. Bildircin karaciğerinden saflaştırılan GST enzimi için yapılan karakterizasyon çalışmalarında; optimum pH, Tris-HCl tamponu pH=8,5, optimum iyonik şiddet, Tris-HCl tamponu 1,4 M, stabil pH, Tris-HCl tamponu pH = 8,5 ve optimum sıcaklık 55°C olarak bulundu. Saf enzime ait K_M ve V_{max} değerleri Lineweaver-Burk grafiklerinden faydalanılarak GSH substratı için K_M , 0,114 mM, V_{max} 0,672 EÜ/mL; CDNB substratı için K_M , 0,048 mM, V_{max} , 0,047 EÜ/ mL olarak hesaplandı.

Anahtar Kelimeler: Glutatyon S-transferaz, bildircin karaciğeri, saflaştırma, karakterizasyon.

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF GLUTATHION S-TRANSFERASE ENZYME FROM QUAIL (*Coturnix coturnix japonica*) LIVER

ABSTRACT

In the present study, glutathione S-transferase enzyme (GST; EC 2.5.1.18) was purified from quail (*Coturnix, coturnix japonica*) liver with 15.86 EU/mg specific activity, in a yield of 12.36%, 46.1 purification fold, by ammonium sulfate precipitation and glutathione agarose affinity chromatography. SDS-PAGE was performed to control enzyme purity and to determine subunit molecular masses and single band was obtained. The subunit molecular mass of the GST enzyme purified from the quail liver was determined as approximately 25.1 kDa. Quail liver GST enzyme characterization studies carried out; optimum pH, Tris-HCl buffer pH = 8.5, optimum ionic strength, Tris-HCl buffer 1.4 M, stable pH, Tris-HCl buffer pH = 8.5 and optimum temperature was found as 55 °C. K_M and V_{max} values of pure enzyme were obtained from Lineweaver-Burk graphs. For the GSH substrate, K_M 0.114 mM, V_{max} 0.672 EU / mL, for CDNB substrate, K_M 0.048 mM, V_{max} 0.047 EU / mL was calculated respectively.

Keywords: Glutathione S-Transferase, Enzyme, Purification, Caracterization, Metal, Inhibition, Quail, Liver

1. GİRİŞ

1.1. Enzimler

Biyolojik kataliz, 1700'lerin sonunda midenin salgılarıyla etin sindirimi üzerine yapılan çalışmalar sonucunda bulunmuştur. 1800'lerde yürütülen çalışmalarda tükürük ve çeşitli bitki özütleriyle nişastanın şekere parçalanması gerçekleştirildi (Lehninger et al 2005).

1835 yılında Jöns Jacob Berzelius, katalizörleri kimyasal tepkimeleri seri ve aktif hale getiren maddeler olarak belirlemiştir (Ann-Sofie 2002). Enzimlerin etki ettiği maddeler substrat olarak adlandırılır. Substratlar ürüne dönüştükten sonra ürün ve enzim ayrılır. Enzimler reaksiyon boyunca değişime uğrayabilir fakat tepkime tamamlandıktan sonra ilk hallerine dönerler. Enzimler reaksiyonların hızlarını artırmalarının yanı sıra hücrede metabolik yollar için önemli birçok reaksiyonun hızını düzenleme mekanizmasında da görev alırlar (Dawn et al 1996).

Louis Pasteur 1850'lerde şekerin maya vasıtasıyla alkole fermantasyonunun “fermentler” tarafından gerçekleştirildiği kanısına vardı. Eduard Buchner 1897'de maya özütlerinin şekeri alkole fermentlediğini, bu durumu fermantasyon olayının hücreden uzaklaştırıldığında hala işlevsel olan moleküller tarafından gerçekleştirildiğini keşfetti. Frederic W. Kühne bu molekülleri enzim diye isimlendirdi (Lehninger et al 2005).

Enzimlerle ilgi yapılan araştırmalara göre pek çok enzim proteinlerle ilişkiliydi. Nobel ödüllü Richard Willstätter'in de aralarında bulunduğu bazı bilim adamları proteinlerin sadece enzimleri taşıyan moleküller olduğunu ve proteinlerin kendi başlarına kataliz olayını gerçekleştiremeyeceğini söylemiştir. Ancak, enzimoloji alanında en önemli gelişme 1926 yılında James B. Sumner'in üreaz enzimini “Jack bean” bitkisinden elde edip kristallendirdikten sonra protein yapısında bir bileşik olduğunu ortaya koymasıdır. Northrop ve Stanley sindirim enzimleri olan “tripsin” ve “kimotripsin” üzerinde yaptıkları deneyler sonucu, saf proteinlerin enzim olduklarını kesin olarak gösterdi. Daha

sonra bu üç bilim adamı 1946 yılında Nobel kimya ödülünü kazandılar (Nobel Lecture 1907).

Canlıların, hayatlarını sürdürebilmeleri için dışarıdan aldığı besinleri kendi yapısına uygun biyolojik moleküllere aktif bir şekilde dönüştürmesi gerekmektedir. Canlı organizmalarda, bu dönüşümün meydana geldiği kimyasal tepkimeleri çabuklaştıran ve yan ürün oluşmaksızın %100'lük verim oluşturan biyolojik katalizörlere enzim denir. Enzimler proteinlerin en büyük ve özelleşmiş şeklidir. Katalitik aktivite gösteren küçük bir RNA grubu dışında, bütün enzimler protein yapısındadır (Nelson and Cox 2004).

Enzimler protein yapısında oldukları için proteinlerin bütün özelliklerini içerirler. Enzimler büyük moleküllü olup kolodyum zarlarından geçemezler, ısı ile kolaylıkla bozulabilirler. Ortamın asit veya alkali olmasına karşı duyarlıdırlar. 0°C ile 40°C arasında sıcaklığın artması, enzimin etki hızını artırır. Fakat bu sıcaklıkların üzerinde ki sıcaklıklar denatürasyona neden olur (Gözükara 1997; Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Genel olarak enzimlerin özellikleri şu şekilde sıralanabilir;

1. Enzimlerin büyük çoğunluğu protein yapısındadırlar.
2. Aynı tür reaksiyonlar enzimler tarafından defalarca gerçekleştirilebilir.
3. Bir enzim daima bir çeşit veya aynı tip benzer reaksiyonları katalizler.
4. Katalizledikleri reaksiyonların aktivasyon enerjisini düşürürler.
5. Enzimler gerçekleşecek reaksiyonun çabuk dengeye ulaşmasını sağlarlar.
6. Enzimler canlı ortamda olduğu gibi cansız ortamda da görev yaparlar

Canlıları oluşturan biyomoleküller kinetik yönden oldukça kararlıdırlar, kendiliğinden kolayca reaksiyon vermezler. Bundan dolayı hücrede oluşabilecek olan tüm kimyasal reaksiyonlar enzimler aracılığıyla gerçekleştirilmektedir. Yani kendiliğinden reaksiyonlar meydana gelmez. Enzimler protein yapısında olduğu ve DNA tarafından şifrelendiği için, bir hücredeki tüm olaylar DNA seviyesinde düzenlenip, kontrol edilmektedir (Keha ve Küfrevioğlu 2012).

Enzimler, hücre içindeki tepkimelerin hızını ve özgüllüğünü koruyarak, kendisi herhangi bir değişime uğramadan gerçekleşir. Enzimin etki ettiği madde substrat olarak adlandırılır.

Reaksiyon sonucu oluşan maddeye ürün denir. Ürün açığa çıktıktan sonra enzim başka bir substrat molekülünü ürüne dönüştürmek suretiyle çalışmaya devam eder (Bhat 2000). Enzimler hücre içinde üretilmelerine karşın hücre dışında da aktivite gösterebilmektedir. Günümüzde 2000'den fazla farklı enzim bilinmektedir. Enzimlerin hem reaksiyon spesifikliğini hem de substrat spesifikliğini dikkate alan bir sınıflandırma geliştirilmiştir. Tüm enzimler enzim kataloğuna, dört basamaklı bir sayı olan EC numarası altında girerler. İlk basamak 6 temel sınıftan birine üyeliği belirtir. Sonraki ikisi alt sınıfları ve alt-alt sınıfları belirtir. Son basamak ise enzimin alt sınıftaki sırasını gösterir. Altı temel sınıfın her biri, aynı reaksiyon spesifikliğine sahip enzimleri içerir (Koolman et al 2003; Keha ve Küfrevioğlu 2012).

1-Oksidoredüktazlar: Substratlar arasındaki indirgenme-yükseltgenme tepkimelerini katalizleyen enzim sınıfıdır.

2-Transferazlar: Substratlar arasında hidrojen dışındaki grupların transferini katalizleyen enzim sınıfıdır.

3-Hidrolazlar: Ester, eter, peptit, glikozit, anhidrit, karbon-halojenür veya fosfor-azot bağlarının bir H_2O molekülünün katılmasıyla gerçekleşen hidroliz reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.

4-Liyazlar: Hidroliz dışında farklı bir mekanizma ile substratlarda grupların uzaklaştırılarak aralarında çift bağların meydana geldiği reaksiyonları katalizleyen enzim sınıfıdır.

5-İzomerazlar: Yapısal izomerler, geometrik izomerler yada optik izomerlerin birbirine dönüşüm reaksiyonlarını katalizleyen enzim sınıfıdır.

6-Ligazlar: Yüksek enerjili fosfat bileşikleri olan ATP ve GTP gibi moleküllerden fosfat bağının kopması sonucu ortaya çıkan enerjiyi kullanarak iki molekülün bağlanması reaksiyonları katalizleyen enzim sınıfıdır (Keha ve Küfrevioğlu 2012).

Enzimler substratlarına ve katalizledikleri tepkimenin tiplerine son derece özgündürler. Bir enzim sadece bir tane kimyasal tepkimeyi veya aynı tip benzer tepkimeyi katalizler. Örneğin, proteolitik enzimler peptit bağlarının hidrolizini gerçekleştirirler. Bu enzimlerin substrat özgüllükleri birbirinden farklıdır. Tripsin sadece lisin veya arginin rezüdülerinin karboksil grubu tarafındaki peptit bağlarını parçalar. Bazı enzimler ise substrat molekülünün D- formunu ürüne çevirirlerken, bir kısmı da L-formunu ürüne dönüştüren tepkimeyi katalizlemektedirler (Lehninger 2005; Keha ve Küfrevioğlu 2012). Bununla birlikte, aynı canlı türünde aynı reaksiyonu katalizleyen ancak farklı kimyasal ve fiziksel özellikleri olan enzimler de vardır. Bu tip enzimlere izoenzim denir. İzoenzimlerin substratlarına, kofaktörlerine ve inhibitörlerine karşı ilgileri farklıdır. İzoenzimlerin önemli özellikleri arasında aminoasit sayı ve sırasının farklı olması, izoelektrik noktalarının farklı olması, her bir izoenzimin farklı geninin olması ve elektroforetik hareketliliklerinin farklı olması sayılabilir. İzoenzimler farklı dokularda lokalize olabileceği gibi, bir hücrenin farklı subsellüler fraksiyonlarında da yerleşebilirler. İzoenzimlere örnek karbonik anhidraz, laktat dehidrogenaz, alkalen fosfataz ve glutatyon S-transferazlar verilebilir (Devlin 2002).

Biyolojik reaksiyonların katalizörü olan enzimlerin bazıları bu fonksiyonlarını protein yapıları ile gerçekleştirirken, bazıları ise yapılarında bulunmayan ve kofaktör denen moleküllere ihtiyaç duyarlar. Kofaktör metal iyonu (Mg^{+2} , Fe^{+2} , Zn^{+2} vb.) olabileceği gibi koenzim denen kompleks organik moleküller de (NAD^+ , FAD^+ , Koenzim A) olabilir. Bazı enzimler her ikisine de ihtiyaç duyar. Koenzimlerin çoğu vitaminlerden ve genellikle B grubu vitaminlerinden türetilmiştir. Koenzimler proteinin denatüre olması ile bozulmazlar ve defalarca kullanılabilirler. Kofaktörlü enzimlere holoenzim, enzimin protein kısmına ise apoenzim denir (Onat 1996).

Enzimlerin kinetik özellikleri Michaelis-Menten eşitliğinde yer alan değerlerle ifade edilir. Bu denklemdeki K_M sabiti enzimin substrata ilgisini ifade ederken, V_{max} enzimin katalitik aktivitesini gösterir. Enzim aktivitesi "Enzim Ünitesi" ile ifade edilir. "Enzim Ünitesi", 25°C'de ve optimal şartlarda 1 μ mol substratı bir dakikada ürüne dönüştüren enzim miktarı şeklinde tanımlanır. Birim zamanın saniye olduğu uluslararası ölçü birimine göre, saniyede 1 mol madde dönüşümüne sebep olan enzime 1 katal enzim denir. "Spesifik aktivite" 1 mg protein başına enzim ünitesi olarak tanımlanmaktadır.

Spesifik aktivite enzim saflığının bir ölçüsüdür ve saflaştırma basamaklarında maksimum ve sabit bir değere ulaşması ile enzimin saf hale geldiği anlaşılır (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Biyokimya tarihindeki bilimsel araştırma konularının çoğunluğunu enzimler oluşturmaktadır (Keha ve Küfrevioğlu 2009). Enzimlerin sağlıkta, hastalıkta, tanıda ve tedavide son derece önemli görev ve katkıları bulunmaktadır. Enzimlerin kalitatif ve kantitatif tayinleri yapılarak pek çok kalıtsal bozukluğun ve hastalığın teşhisi konulmakta, hastalığın geleceği ile ilgili emareler elde edilmektedir (Onat 1996). Günümüzde yaklaşık olarak 2000 kadar enzim tanımlanmış, çok sayıda saflaştırılmış, karakterize edilmiş ve 200'den fazla enzim de kristallendirilmiştir (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Enzimleri saflaştırmak oldukça güç bir işlemdir. Enzimlerin büyük bir kısmı protein yapısında olduğundan şartların değişmesine karşı oldukça duyarlıdırlar. Bu yüzden bir çözeltideki enzim varlığı, enzimin etki ettiği substrat molekülü veya reaksiyon sonucu oluşan ürün ya da enzimatik reaksiyona aracılık eden diğer değişkenler üzerinden tespit edilmektedir (Söyüt 2006).

Enzim aktivitesine etki eden faktörleri şöyle sıralayabiliriz:

1. Substrat konsantrasyonu
2. Enzim konsantrasyonu
3. pH
4. İyonik şiddet
5. İnhibitor ve aktivatörlerin varlığı
6. Sıcaklık

1.2. Glutasyon

Glutasyon, glutamik asit, sistein ve glisin aminoasitlerinden oluşmuş bir tripeptittir (Herschbach and Rennenberg 1994; Karam 1996). Glutasyonun iki peptid bağı, iki karboksil grubu, bir amino grubu ve bir tiyol grubu vardır. Glutasyon, redükte glutasyon (GSH) ve okside glutasyon (GSSG veya glutasyon disülfid) olmak üzere iki farklı formda bulunur. GSH'a antioksidan özelliğini sisteinin tiyol grubu kazandırır. Hidrofilik grupların fazla olması ve molekül kütlesinin küçük olması glutasyonun sudaki

çözünürlüğünün artmasını sağlar. GSH'nın bu yapısı molekülün sürekliliğinde ve savunmasında önemli rol oynamaktadır (Kosower 1976; Kidd 1999).

Bitki, hayvan ve mikroorganizmaların hücre sitozolünde bol miktarda bulunan glutatyonun çok önemli iki görevi vardır. Birincisi hücreden zehirli metabolitleri uzaklaştırmak, ikincisi redükte formu sayesinde hücrelerdeki sülfhidril grubunun sürekliliğini sağlamaktır (Liebman and Greenberg 1988).

Alyuvarlarda glutatyonun indirgenmiş şekli (GSH), hemoglobin ve diğer eritrosit proteinlerinde bulunan sistein rezidülerini indirgenmiş halde tutarak sülfhidril tamponu işlevini görür. Kırmızı kan hücrelerinde GSH/GSSG oranı yaklaşık 500'dür. (Keha ve Küfrevioğlu 2012). GSH, mitokondri, nukleus ve sitoplazmada çok bulunan ve hücre kompartmanlarında çözünebilir önemli bir antioksidandır (Alcher 1989).

Glutatyon (GSH), OH^- ve singlet oksijen gibi reaktif oksijen türevlerinin temizleyicisidir. Serbest radikallerle ve peroksitlerle tepkimeye girerek hücreleri oksidatif zararlardan korur. Bunun dışında GSH proteinlerin yapısındaki $-\text{SH}$ gruplarını indirgenmiş halde ve demirin de ferröz (Fe^{+2}) halinde tutulmasını sağlayarak çoğu proteinin ve enzimin inaktivasyonunu önleyebilir ve üstelik rejenere olmalarını sağlayabilir (Drog 1997; Schröder 2001; Geçkil 2012). Aminoasitlerin taşınmasını sağlar. GSH, bu özelliklerinin yanında elektrofilik bileşiklerin detoksifikasyonunda GST arabuluculuğunda bir kofaktör görevi görmektedir (Yalçın 1998; Blokhina vd 2002).

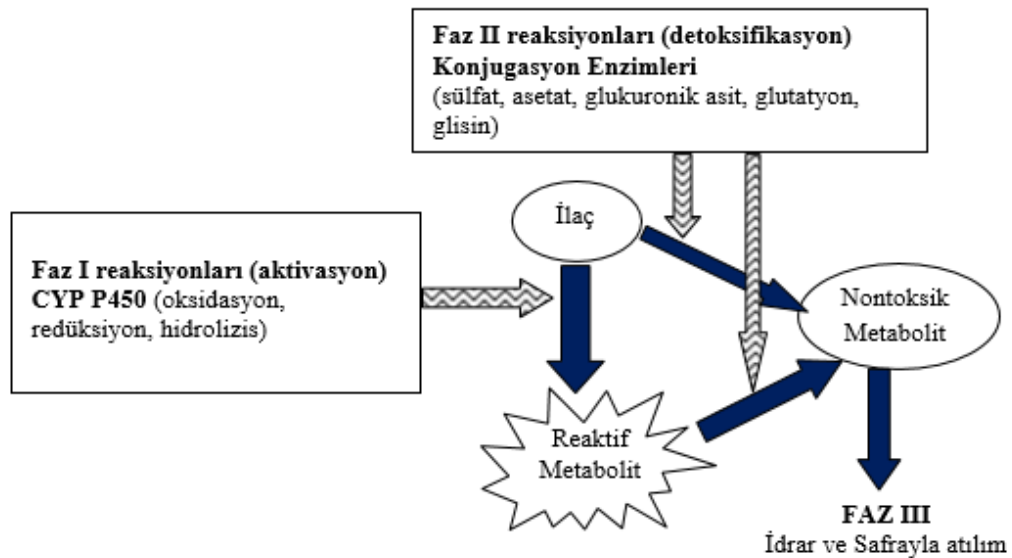
Glutatyonun hayvanlardaki işlevleri şu şekilde sıralanabilir;

- Aminoasit taşınımı
- Enzim regülasyonu
- Peroksidaz metabolizması
- Sinyal molekülü
- Xenobiyotiklerin detoksifikasyonu

1.3. Glutatyon S- Transferaz

Hayatımız boyunca toksik bileşiklerle ya direk ya da besinler yoluyla temas halindeyiz. Bazı metabolik yollarla üretilen toksik moleküller, sanayileşmenin getirdiği

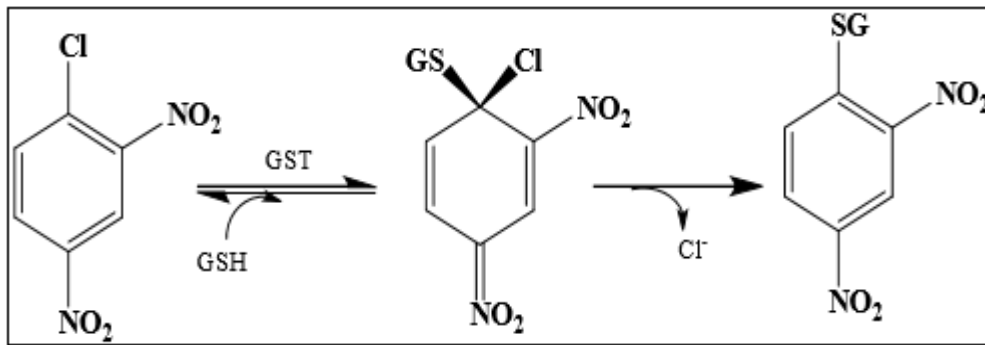
olumsuzluklar nedeniyle çok daha fazla zehirli moleküllere dönüşmektedir. Örneğin reaktif oksijen, vücudumuzda normal oksijen metabolizması içerisinde üretilmektedir. Zehirli moleküller organizmada DNA ve proteinlerin yapılarına zarar vererek metabolizmanın bozulmasına ve hücrenin ölümüne neden olmaktadır. Bu tarz toksik çevresel şartlar altında yaşamın devamı için vücudumuzda detoksifikasyon sistemleri mevcuttur. Besinle alınan doğal bileşikler dışında kalan ve çeşitli yollardan canlı vücuduna giren kimyasal maddeler olan ksenobiyotiklerin enzimatik detoksifikasyonu üç farklı fazda gerçekleşmektedir. Faz I tepkimeleri redoks, hidroliz ve benzer tepkimeler ile substrata aktif gruplar katarak, faz II konjugasyon tepkimelerine substrat hazırlar. Faz III'de faz II'de oluşan daha fazla suda eriyebilen nonpolar ksenobiyotikler ve doğrudan doğruya daha az toksik olan metabolitler edilirler (Şekil 1.2) (Autrup 2000; Sheehan et al 2001; Lee 2003).



Şekil 1.2. Detoksifikasyon reaksiyonları (Faz I, Faz II, Faz III) (Aydoğdu 2013)

GST'ler (GST; EC 2.5.1.18) kataliz tepkimelerinde, glutatyon (GSH) tripeptidin elektrofilik substratlar üzerine nükleofilik atak reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir. GST'ler detoksifikasyon metabolizmasında, suda çözünebilen son ürün olan merkapturik asit oluşum reaksiyonlarının birinci basamağını katalizleyerek, homeostasinin sağlanmasında çok önemli işlev gören bir enzimdir. GST tarafından katalizlenen reaksiyonların bu ilk basamağında, glutatyon (GSH) ile iç ya da dış kaynaklı hidrofobik elektrofillerin bağlanma olayı gerçekleşir. GSH, GST enziminin çalışabilmesi için tepkime ortamında mutlaka bulunmalıdır. GST enzimi, GSH bağımlı çalıştığı için,

GSH'a kosubstratta denmektedir. GSH dışındaki diğer substratlar, oldukça geniş bir alan gösterdiklerinden dolayı, GST enzimi, kısmi substrat özgüllüğü gösteren bir enzimdir. Bununla birlikte oksidasyonla meydana gelen ürünlerin veya dışarıdan alınan bilinmeyen zehirli maddelerin, vücutta yer alan diğer küçük moleküller ile bir araya gelmesini engelleyip, hücre unsurlarına zarar vermeden vücuttan atılmasını sağlarlar. Bundan dolayı GST'ler, hücrede önemli roller üstlenen enzim gruplarındandır. Proteinlerin 3 büyük ailesi sitozolik, mitokondrial ve mikrozomal GST'lerdir (Armstrong 1997; Hayes et al 2005; Baş 2006).



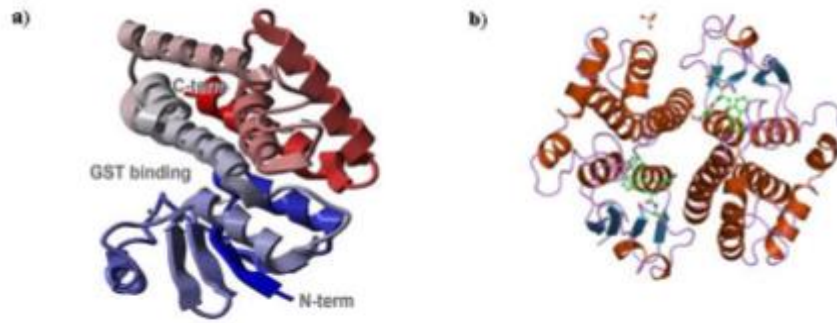
Şekil 1.3. GST enziminin katalizlediği reaksiyon (Habdous et al 2002)

Hidrofilik ve elektrofilik karakterli moleküllerin glutatyon ile reaksiyonunu katalizleyen böylece hücresel makromolekülleri reaktif elektrofillerin zararlı etkilerine karşı koruyan GST'ler Faz-II detoksifikasyon reaksiyonlarının önemli enzimlerindendir. GST'lerin molekül kütleleri 20-25 kDa ve alt birimler 200-240 aminoasit dizisinden oluşmaktadır (Hayes et al 2005) (Şekil 1.4).

Escherichia coli'den memelilere kadar birçok organizmada bulunan GST izoenzimleri ilk defa sıçan karaciğerinde Boyland ve arkadaşları tarafından keşfedilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda insan karaciğeri, sığır, sıçan, fare, gibi hayvanların akciğer, karaciğer plasenta, eritrosit, barsak mukozası dokularından ve ayrıca crustacea'dan, planaria'dan, mikroorganizmalardan ve bu organizmaların bazı dokularından izole edilerek çalışılmıştır GST'nin en çok bulunduğu organlar karaciğer, böbrek, incebağırsak, kalınbağırsak, akciğer ve meme gibi organlardır. GST enzimi, bu organların sitozollerinin toplam protein içeriğinin %5'ini oluşturmaktadır. Bu organlarda yüksek oranda

bulunmasının nedeni; sözü edilen organların dışarıdan alınan ksenobiyotikler ile doğrudan temas halinde bulunmalarıdır (Gyamfi et al 2004; Hayes vd 2005; Baş 2006).

GST'ler membran komponentlerini lipid peroksidasyonundan korurken aynı zamanda lipid peroksidasyonunun aldehit yapıdaki ürünlerinden 4-hidroksi alkenallerin GSH ile konjugasyonunu sağlarlar. Mikrozomal fraksiyonda bulunan GST izoenzimleri ise peroksidaz aktivitesiyle lipid peroksitlere türevlerine karşı koruma sağlar. GST izoenzimleri antikanser ilaçlar, kimyasal kanserojenler, herbisid, pestisid ve çevresel kirlilikler gibi elektrofilik ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda da büyük bir öneme sahiptir. Bu özelliklerinden dolayı doğal koruyucu sistemlerden biri olarak da kabul edilirler (Gyamfi et al 2004).



Şekil 1.4. *Anopheles cracens*'den saflaştırılan GST enziminin kristallografik yapısı (a) GSH bağlanma bölgesi ve (b) substrat bağlanma bölgesi (Ji et al. 1994; Udomsinprasert et al 2005)

Glutatyon S-transferazlar laktonlar, alkoller, aril halidler, kinonlar, epoksitler, esterler gibi farklı özellikteki substratların detoksifikasyon reaksiyonlarının çoğunu katalizleyebildiklerinden dolayı, günümüzde bu enzimler üzerine çok sayıda araştırma yapılmaktadır. GST'lerin substratların sayısı çok fazla olmasına rağmen, çoğu hidrofilik özelliktedir ve elektrofilik bir merkez taşımaktadır (Coşkun 2007).

Her bir altbiriminde katalitik bölgeye sahip olan GST'ler globular yapıda dimerik proteinlerdir. Molekül kütleleri genellikle 23-29 kDa arasındadır. Alt birimler 200-240 aminoasit dizisinden oluşmaktadır. Her bir GST alt birimi kısa bağlayıcı bölgelerce birleştirilen iki domainden oluşan polipeptid zincirine sahiptir. N-terminal domain bir β -tabaka ve üç α -heliks yapısında düzenlenmiş yaklaşık 80 aminoasitten oluşan GSH'nin

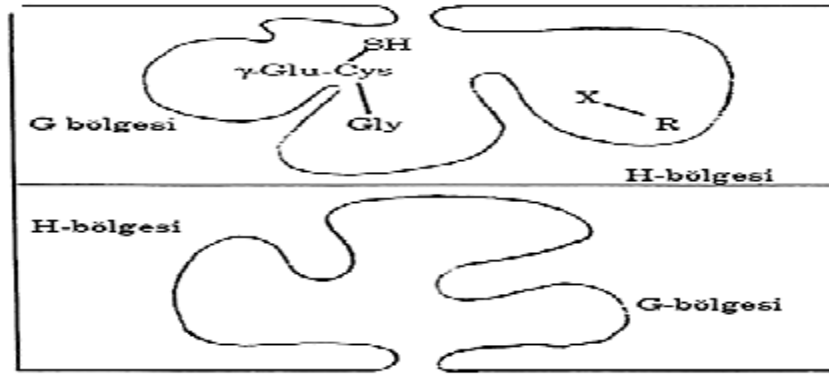
bağlanma bölgesi (G bölgesi) ve hidrofobik elektrofillerin bağlanma bölgesi H bölgesinden oluşmaktadır. C terminal domain ise 5 veya 6 α -heliks yapısındaki amino asitten oluşmaktadır (Tuna 2008).

Enzimlerin yapısını oluşturan aminoasitlerin içeriği oldukça önemlidir. İnsan ve sıçan GST enzimlerinde, en fazla bulunan amino asitler aspartik asit, glutamik asit ve lösin dir. Triptofan ve sistein aminoasitleri ise, sıçanda çok düşük miktarlarda bulunurken, insanda hiç bulunmamaktadır (Fleischn et al 1976; Baş 2006).

Tablo 1.1. GST enziminin aminoasit analizi (mol başına) (Fleischn et al 1976; Baş 2006)

Amino Asit Adı	Sıçan	İnsan	Amino Asit Adı	Sıçan	İnsan
Alanin	25	27	Lösin	48	58
Arginin	22	23	Metionin	9	13
Aspartat	41	34	Prolin	21	21
Fenilalanin	19	18	Serin	19	20
Glisin	20	20	Tirozin	18	18
Glutamat	44	52	Treonin	12	6
Histidin	6	6	Triptofan	8	-
İzölösin	20	28	Valin	18	14
Lizin	35	44	Sistein	5	-

GSH'nin elektrofilik bileşiklerle konjugasyonu enzim üzerindeki G ve H olmak üzere iki farklı bölge ile katalizlenmektedir. G bölgesi GSH'nin, H bölgesi ise elektrofilik bileşiklerin bağlanma bölgesidir (Şekil 1.5) (Aliya et al. 2003). Tüm GST'lerde G bölgesi yüksek GSH spesifitesi ile oldukça benzerdir. H bölgesi ise GST' ler arasında oldukça farklıdır. Enzimin substrat bağlama kapasitesi ve çeşitliliği bu bölgenin farklılığından kaynaklanmaktadır (Armstrong 1997).



Şekil 1.5. Dimerik bir GST molekülünün iki aktif bölgesinin gösterimi (Ji et al. 1994)

GST'lerin enzimatik fonksiyonlarının dışında önemli olan ikinci bir görevi ise bazı endojen ve ekzojen kaynaklı maddeleri (hem ve metabolitleri, steroidler ve metabolitleri, ilaçlar ve anyonlar) katalitik olmayan yolla bağlayarak bunların hücre içi taşınımını sağlamaktadır (Boyer and Kenney 1985). Enzim üzerinde bu maddelerin bağlandığı seçici olmayan hidrofobik bir bağlanma bölgesi vardır (Vessey and Boyer 1988).

Elektrofilik hareketliliğe karşı organizmanın koruyucusu durumunda olan GST'lerin organizma açısından önemli olan bu fonksiyonlarına karşın aynı mekanizmayla biyoaktivasyonun yanında neden oldukları başka sorunlarda vardır. Bu sorunlar GST'lerin klinikte çoklu ilaç direnci (Multidrug resistance) olarak bilinen vaziyetleriyle olan ilişkileridir. Çoklu ilaç direnci günümüzde kanser tedavisinde en büyük sorunu oluşturmaktadır. GST'nin kazanılmış direnç ile ilişkisinin düşünülmesi tümör hücrelerinde GST Pi'nin çokça artmasından kaynaklanmaktadır (Aliya et al 2003). GST'yi baskılayan maddelerin çoklu ilaç direncinde kullanılabileceği öne sürülmektedir. Sonuçta GST'ler kanser gelişiminde iki farklı role sahiptir. Bunlardan birincisi epoksitler benzeri başlatıcı ajanları inaktive ederek tümör oluşumunu önlemek, ikincisi ise kanser hücrelerinin kemoterapötiklere karşı dirençli hale gelmesine yardımcı olarak istemsiz halde kanser hücrelerine koruma sağlamasıdır (Hayes and Pulford 1995).

Memeli GST'ler yedi gruba ayrılır. Bu enzim gruplarından beş tanesi sitozolik, iki tanesi ise membrana bağlıdır. Sitozolik enzim grupları 13 adet alt birimi bulunmaktadır. Bunlar alfa, beta, delta, epsilon, zeta, theta, mu, nu, pi, sigma, tau, phi ve omega'dır (Wormhuds et al 1989; Carver and Hines 2002). Aynı GST grubundan olan alt birimler kendi

aralarında dimer oluşturabilirken farklı grupta bulunan alt birimlerle dimer oluşturamazlar (Carver and Hines 2002). Sitozolik GST'ler dimerik proteinlerdir ve her bir alt birimin yaklaşık olarak molekül kütlesi 25 kDa'dur. GST proteinlerinin büyük bir kısmı karaciğerde bulunur ve toplam çözüner proteinin %3-5'ini teşkil eder (Seidegard and Ekström 1997).

GST aktivitesi iki yöntemle ölçülür. Birinci yöntem spektrofotometriktir. Bu yöntem Habig ve arkadaşları ile Howie ve arkadaşlarının önermiş oldukları GST nin hücre içi substratı olan GSH'nin konjugasyonu sonucu oluşan bileşiğin renk şiddetinin ölçülmesine dayanan yöntemdir. İkinci ise, serum doku örneklerinde ki GST aktivitesinin ölçülmesinde kullanılan immünoradiyometrik yöntemdir (Howie et al 1988).

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Both vd (1961), GST izoenzimleri ilk olarak sıçan karaciğerinde tanımlanmış ve farklı substrat spesifikliklerine göre sınıflandırılması yapılmıştır. GST'ler epoksit transferaz, aril transferaz, alkil transferaz, alken transferaz ve aralkil transferaz şeklinde beş grup altında sınıflandırmışlardır.

Pabst vd (1974), tarafından GST enzimi DEAE-selüloz anyon değişim kromatografisi, amonyum sülfat çöktürmesi, CM-selüloz katyon değişim kromatografisi ve hidroksilepatit kolonu kullanılarak 4,1 EÜ/mg spesifik aktiviteyle sıçan karaciğerinden saflaştırılmıştır. Enzimin fosfat tamponu pH 7,0'da stabil olduğu belirlenmiştir. CDNB için K_M sabiti 0,006 mM, GSH için ise 0,02 mM'dır. Ayrıca enzimin homodimer (alt biriminin molekül ağırlığı 25 kDa) olduğu ve molekül ağırlığının 45 kDa olduğu bulunmuştur.

Awasthi vd (1980), yaptığı bir çalışmada insan karaciğerinden GST'nin katyonik ve anyonik izoformlarını saflaştırmıştır. Amonyum sülfatla fraksiyonlama sırasında anyonik GST için numune %65 amonyum sülfat doygunluğuna getirilmiştir daha sonra bu yeni anyonik GST ω ve ψ DEAE- selüloz anyon değişim kromatografisi, sephadex G-200 jel filtrasyon kromatografisi ve izoelektrik fokuslamayla birbirinden ayrılmıştır. Benzer prosedürle katyonik GST için numune %80 amonyum sülfat doygunluğuna getirilerek saflaştırılmıştır. ω ve ψ GST'nin alt biriminin molekül ağırlığı 22,5 kDa iken katyonik GST'nin alt biriminin molekül ağırlığı 24,5 kDa olarak bulunmuştur.

Boyer ve Morgenstem (1985-1988), enzimin sınıflandırılmasında proteinin fiziksel ve yapısal özelliklerini esas almıştır. Glutatyon S-transferaz enziminin daha çok hücrelerin sitozolünde bulunduğu. Ancak, karaciğer hücrelerinin mikrozomal kısmında da glutatyon S-transferaz aktivitesine rastlandığı, bu kısımdaki enzimin mikrozomal membrana sıkı bir

şekilde bağlı olduğu ve sitozolik formundan farklı özelliklere sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Loscalzo ve Freedman (1986), tarafından GST enzimini insan trombositinden saflaştırılmıştır. Saflaştırma işleminde CM-selüloz, Sephadex G-75, afinite kromatografisi, amonyum sülfat çöktürmesi yöntemleri kullanılmıştır. 7,5 EÜ/mg spesifik aktiviteyle 1071,4 kat saflaştırılan enzimin izoelektrik pH'sı 4,6, molekül ağırlığı 48 kDa olarak bulunmuştur. Ayrıca SDS-PAGE yöntemiyle de alt birimlerinin molekül ağırlığı 25 kDa olarak bulunmuştur.

Asaoka vd (1983), GST enzimi sığır karaciğerinden orange-A agaroz afinite kromatografisiyle saflaştırılmıştır. DEAE-sephagel ile iki temel izoenzim ayrılmış ve bu iki formun izoelektrik pH'ları sırasıyla 6,7 ve 6,1'olarak bulunmuştur. İki izoenzimin aktivitesinin de Cu^{+2} , Hg^{+2} , Cd^{+2} , Zn^{+2} iyonları tarafından inhibe edildiği görülmüştür. Bu iki izoenzimin alt birimleri SDS-PAGE ile 27 kDa, jel filtrasyon kromatografisiyle tabii molekül ağırlığı ise 49 kDa bulunmuştur. Bu sonuçlar gösteriyor ki her iki formda birbirine nonkovalent bağla bağlı iki alt birimden oluşmaktadır. GSH ve CDNB için 1. izoenzimin K_M , $V_{\max}$ değerleri ve spesifik aktiviteleri sırasıyla 0,55 mM, 0,10 mM ve 320 EÜ/mg, 6,9 EÜ/mg, 2. izoenzimin K_M , $V_{\max}$ değerleri ve spesifik aktiviteleri 0,83 mM, 0,165 mM ve 380 EÜ/mg, 0,86 EÜ/mg olarak bulunmuştur.

Catherine vd (1984), insan akciğerinden GST'nin iki farklı formlarını çalışmış ve bu formların izoelektrik pH'larını sırasıyla 4,9 ve 9,2 olarak bulmuştur. Bu anyonik ve katyonik formlar toplam GST aktivitesinin %98 ve %2'sini göstermektedir. Katyonik form insan akciğerinde toplam GST aktivesinin sadece %2'sini göstermesine rağmen akciğerdeki proteinlerin %28'ini ihtiva eder. Bu iki formun alt brimlerinin molekül kütleleri sırasıyla 22 kDa ve 24 kDa ve ikisi de homodimer olduğu bulunmuştur.

Jaght vd (1985), yaptığı çalışmada GST'nin farklı 13 formunu insan karaciğerinden glutatyon- afinite kromatografisi ve kromatofocuslama yöntemiyle yüksek verimde izole etmiştir. Saflaştırılan enzimin izoelektrik pH'sının 4,9 ile 8,9 arasında değiştiği bulunmuştur. Bu farklı 13 form substrat olarak CDNB ile benzer aktivite sergilemiştir ve spesifik aktivitesi 33-94 EÜ/mg arasında değişmektedir. Benzer şekilde bu formlar

kümen hidroperoksit ile 1,5-8,3 EÜ/mg spesifik aktiviteyle peroksidaz aktivitesi göstermiştir.

Singh vd (1987), yapılan başka bir çalışmada GST enziminin 3 önemli sınıfı (α , μ , π) insan böbreğinden saflaştırılmış ve incelenmiştir. Bu çalışmaya göre 3 sınıfın izoenzimlerinin yapısal, immunolojik ve fonksiyonel özellikleri birbirinden önemli ölçüde farklı iken aynı sınıfa bağlı izoenzimler benzer özellik göstermiştir. İnsan böbreğinin tüm katyonik GST izoenzimlerinden izoelektrik pH'sı 9,1 olan hariç diğerlerinin, heterodimer olduğu bulunmuştur. Alt birimlerinin molekül ağırlığı 26,5 kDa- 24,5 kDa'dur. GST 9,1' in alt birim 24,5 kDa'dur ve homodimerdir. Saflaştırma amacıyla epoksi ile aktifleştirilmiş Sepheroz-6B'ye bağlı GSH afinite kolonu kullanılmıştır. CDNB substratına karşı afinite sıralaması GST 6,6> GST 5,45> GST 4,9 ya da GST 4,7> katyonik izoenzimler olarak bulunmuştur.

Oshino vd (1989), yaptıkları çalışmada dört tip GST enzimini saflaştırmışlardır. Saflaştırma işleminde DEAE selüloz iyon değişim, Sephadex G- 75 jel filtrasyon, CM selüloz katyon değişim ve afinite kromatografisi olmak üzere 4 çeşit kromatografi tekniğini art arda kullanmışlardır. Bu dört tip GST enzimini homodimer olarak belirlemiş ve sırasıyla a, b, c, d olarak adlandırılmışlardır. Yapılan bu çalışmada b, c, d izoenzimlerinin birbirine benzer 50 kDa molekül ağırlığında olduğu, a izomerinin ise (alt birimi 23,5 kDa) 45 kDa ağırlığında olduğu, a enziminin diğerlerine göre 100 kat daha fazla peroksidaz aktivitesi gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca GSTa ve GSTb'nin aminoasit birleşimi araştırılmış GSTa'nın 408 aminoasitten, GSTb'nin 424 aminoasitten oluştuğu gözlenmiştir. Yapılan çalışmada GSTa ve GSTb'nin substratlarına olan ilgisine bakılmıştır. GSTa'nın CDNB ve GSH substratları için K_M sabitleri sırasıyla 0,35 mM ve 0,10 mM, GSTb'nin ise 0,35 mM ve 0,14 mM olarak bulunmuştur.

Young ve Briedis (1989), GST enzimi sıgır beyninden kalsiyum fosfat jeli, amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE selüloz iyon değişim kromatografisi ve GSH-sepharose afinite yöntemleri kullanılarak 500 kat saflaştırılmıştır. Enzimin izoelektrik pH'sı $7,39 \pm 0,02$ olarak, alt birimlerinin molekül ağırlığı 22 kDa ve 24 kDa olarak bulunmuştur. İnhibisyon çalışmalarında ise uzun zincirli yağ asitlerinin enzimin iyi bir inhibitörü

olduğunu bulunmuştur. Ayrıca inhibitörlerin CDNB ve GSH'a göre inhibisyon türleri belirlenmiştir.

Izuka vd (1989), GST enzimini E.coli ekstraktlarından %7,5 verimle yaklaşık olarak 2300 kat saflaştırılmıştır. Molekül ağırlığı 45 kDa olan enzimin iki eş alt biriminden oluştuğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada enzimin substratları olan CDNB ve GSH için K_M sabitlerini sırasıyla 1,43 mM ve 0,33 mM olarak bulunmuştur. Enzimin optimum pH değeri 7,0, optimum sıcaklık değeri 50°C ve stabil pH değer 5 ile 11 arasında geniş bir pH aralığı olarak belirlenmiştir.

Arca vd (1990), E.coli'den yaptıkları bir çalışmada GST enzimini %11 verimle 800 kat DEAE-sephagel ve glutatyon agaroz afinite kolunu kullanılarak saflaştırılmıştır. Enzim 24 kDa molekül ağırlığına sahip alt birimle homodimerdir. GSH ve CDNB için K_M değeri sırasıyla 0,25 ve 1,5 mM olarak bulunmuştur. Optimum pH 7,5, optimum sıcaklık 35°C olarak tesbit edilmiştir. N-terminal aminoasit dizisi Met-Leu-Leu-Phe-Ile-Leu-Pro-Gly-Ala olarak aydınlatılmıştır. Ayrıca EDTA'nın aktiviteyi %30 oranında arttırdığını rapor etmişlerdir.

Kashiwade vd (1991), İnsan cenin karaciğerinden yapılan bir çalışmada GST'nin asidik bir formu afinite kromatografisiyle ve kromatofocuslama ile saflaştırılmıştır. Bu asidik GST homodimerdir ve alt birimini molekül ağırlığı 23 kDa olarak bulunmuştur. mRNA ve protein seviyesinde incelendiğinde GST asidik formunun ekspresyon seviyesinin yetişkin insan ve cenin karaciğerinde farklı olduğu görülmüştür.

Çetinkaya vd (1993), tarafından bazı elektrofilik bileşiklerin metabolitleri GST aktivitesini artırabildiği ya da azaltabildiği rapor edilmiştir. Yapılan bir araştırmada brombenzen ve karbontetraklorür ratlara uygulanarak GST aktivitesindeki değişiklikler incelenmiştir. Uygulama sonrası karaciğer GST aktivitesinin azaldığı, serum GST aktivitesinin ise arttığı gözlenmiştir.

Orhan vd (1994), Antiinflamatuvar ilaç grubundan olan indometazinin sıçan karaciğer GST ve insan eritrosit GST izozimleri üzerine in vitro etkilerini incelemek için yapılan

çalışmalarda bu ilacın sıçan karaciğer GST üzerine inhisyon etkisi gösterdiği, ancak insan eritrosit izoenzimlerinin aktivitesinde ise artışa neden olduğu rapor edilmiştir.

Luty vd (1998), tarafından yapılan bir başka çalışmada DDVP sıçanlara intraperitoneal olarak 0-72 saatlik periyotlarda diklarvos 4 mg/kg dozajında uygulanmıştır. GST aktivitesinin karaciğerde diğer dokulara oranla daha çok arttığı görülmüştür. GST aktivitesindeki değişikliğin sebebinin hücre membranının geçirgenliğinin değişmesi veya hücre bozulmasının olabileceği düşünölmüştür.

Eaton ve Bammler (1999), ise sitozolik, mitokondrial ve MAPEG GST süper ailesinin sınıflandırılmasında protein dizisinin ve yapısının önemli bir kriter olduğunu rapor etmişlerdir. Sitozolik GST süper ailesinin sekansı %40'dan fazla homoloji gösterdiğini, diğerlerinin ise %20 homoloji gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca yapılarına göre sitozolik GST'ler alfa, beta, delta, epsilon, zeta, theta, mu, nu, pi, sigma, tau, phi, ve omega olmak üzere 13 sınıfa ayrıldığını, mitokondrial GST'lerin ise kappa sınıfından olduğunu, mikrozomal GST'lerin MAPEG süper ailesinden aminoasit dizisi %20'den az benzerlik gösteren I-IV arası belirlenen alt gruplardan oluştuğunu, insan sitozolik GST'lerin ise alfa, zeta, theta, mu, pi, sigma, ve omega sınıfından oluşan 6 izoenzim MAPEG süper ailesinin I, II ve IV. sınıfına bağlı olduğunu bildirmişlerdir.

Cnubben vd (2001), Glutatyon S-transferaz enzim ailesinin çok fazla sayıda ve yapısal olarak farklı elektrofilik bileşiklerin GSH ile konjugasyonunu sağladığını bildirmişlerdir. Bunun sebebinin GST nin yapısında spesifik olmayan hidrofobik substrat bağlanma bölgesinin olduğu ve çok sayıda izoenziminin bulunmasından kaynaklandığını rapor etmişlerdir. Bu nedenle GST izoenzimlerinin çevresel kirleticileri, karsinogenik bileşikleri, ilaç kalıntılarını ve diğer birçok bileşiği substrat olarak kullanmakta olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca GST izoenzimlerinin her birinin iki protein alt biriminden oluştuğunu bu proteinlerin GSH bağlanma bölgesi olan G bölgesi ve elektrofilik substratların bağlandığı H bölgesi olmak üzere birer bağlanma bölgesi bulundurduğunu bildirmişlerdir.

Novoa ve Valinas (2001), sitozolik GST'yi Atlantik somunun ve kahverengi alabalığın karaciğer ve böbreklerinden HCPLC ve glutatyon agaroz afinite kromatografisi

kullanarak saflaştırmıştır. Enzimi Atlantik somunun karaciğerinden $0,26 \pm 0,081$ EÜ/mg spesifik aktivite ile %70,58 verimle 57,2 kat, böbreğinden ise $37,50 \pm 5,39$ EÜ/mg spesifik aktivite ile %86,9 verimle 187 kat saflaştırmışlardır. Kahverengi alabalık karaciğerinden $27,69 \pm 3,34$ EÜ/mg spesifik aktiviteyle %74,54 verimle 42,66 kat, böbreğinden ise $21,96 \pm 4,531$ EÜ/mL spesifik aktivite ile %67,48 verimle 56,30 kat saflaştırmışlardır.

Çelik vd (2003), glutatyon S-transferaz (GST- π) enzimini normal doğum yapmış hastanın plasentasından glutatyon-agaroz affinite kolonu kullanarak. 2.628 EÜ/mg spesifik aktivite ve %0,5 verimle 16 kat saflaştırmıştır. Enzimin substratı olan GSH için K_M sabiti 2 mM, V_{max} değeri 11,1 EÜ/mg; CDNB için K_M sabiti 0,55 mM, V_{max} değeri 35 EÜ/mg olarak bulunmuştur. Saflaştırılan enzimin aktivitesi üzerine ilaçların etkisinin incelenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda antibakteriyel bir ilaç olan Ampisilin'in %50-55 oranında enzim aktivitesini in vitro olarak inhibe ettiği gözlenmiştir.

Gyamfi vd (2004), başka bir çalışmada, şifalı bir bitki olan *Thonningia sanguinea*'dan izole edilen ve antioksidan bir madde olan thonningianin A (ThA), in vitro olarak karaciğer sitozolik GST ile etkileştirildiğinde kuvvetli inhibitör etkisi yaptığı tespit edilmiştir.

Casalino vd (2004), başka bir çalışmada doğada biriken ve canlılarda ağır metal zehirlenmelerine neden olan Cd^{+2} ve Mn^{+2} metal iyonlarının sıçan karaciğer GST enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir. $CdCl_2$ ($2,5 \text{ mg.kg}^{-1}$) ya da $MnCl_2$ ($2,0 \text{ mg.kg}^{-1}$) miktarları tek doz olarak verildiğinde, enzim aktivitesinin bir gün sonra %36 oranında arttığı belirtilmiştir.

Hamed vd (2004), tarafından GST enzimi Tilapia (*Oreochromis niloticus*) balığının karaciğerinden glutatyon-sepharoz affinite kolonuyla saflaştırılmıştır. SDS-PAGE yardımıyla enzimin alt biriminin molekül ağırlığı 25,460 kDa ve enzimin optimum pH'sı 8 olarak belirlenmiştir. Michaelis-Menten grafiği yardımıyla enzimin substratları olan GSH ve CDNB için K_M sabitlerinin yaklaşık olarak 0,35 mM ve 0,42 mM olarak bulunduğu rapor edilmiştir.

Martinez ve Lara (1997), kefal balığı karaciğerinden anyon değişim kromatografisi yardımıyla GST'nin 14 izoformu saflaştırılmıştır. Dimerik yapıda bulunan her bir GST izoformunun alt birimlerinin molekül kütlelerinin 23 ile 28 kDa arasında olduğu belirlenmiştir.

Türkanoglu vd (2005), yaptıkları çalışmada insan kan serumdan GST enzimini saflaştırılarak karakterize edilmiştir. Yapılan çalışmada GST enzimine ait optimum iyonik şiddeti 2 mM potasyum fosfat tamponu, optimum pH'yı 5,5 optimum sıcaklığı 65°C olarak belirlenmiştir. Ayrıca aktivite ölçümünde kullanılan substratları CDNB ve GSH için K_M ve V_{max} değerlerini ise sırasıyla 2,8 mM ve 0,43 nmol/dk.mg; 4,11 mM ve 0,23 nmol/dk.mg protein olarak belirlenmiştir.

Hee ve Joong (2005), tarafında GST enzimi maruldan (*Lactuca sativa*'dan) DEAE-sephadex ve glutatyon-sepharose kolon kromatografisi ile %9,6 verimle yaklaşık olarak 403 kat saflaştırılmıştır. Yapılan bu çalışmada enzimin molekül ağırlığı SDS-PAGE ile 23 kDa, jel filtrasyon kromatografisi ile yaklaşık olarak 48 kDa olarak belirlenmiştir.

Al ve Mustafa (2006), metal iyonlarının in-vitro şatlarda insan eritrositlerine etkilerini incelemek için yaptıkları bir çalışmada Cr^{+6} metal iyonunun glutatyon peroksidaz enzim aktivitesini artırırken, glutatyon redüktaz aktivitesini azaltmakta olduğu, GST ve katalaz enzim aktivitelerinde ise bir farklılık oluşturmadığı bildirmiştir.

Huang vd (2008), bir balık türü olan *monopterus albus* karaciğerinden GST enzimini afinite kromatografisi ile saflaştırıp karakterize etmişlerdir. Enzimi, glutatyon, sepharoz-6B afinite kolonuyla 13,07 μ mol/mg spesifik aktiviteyle, %14 verimle, 300 kat saflaştırmışlardır. Saflaştırılan enzimin SDS-PAGE ile molekül ağırlığının 26 kDa olan iki alt birimden oluştuğunu (homodimer) belirlemişlerdir. Enzimin optimum pH'sını 7,0-7,5 arasında, optimum sıcaklığını 45°C olarak bulmuşlardır. Yaptıkları kinetik çalışmalarda ise enzimin substratları olan GSH ve CDNB için K_M sabitlerini sırasıyla 0,20 mM ve 0,28 mM olarak V_{max} değerlerini ise 7,57 μ mol/mg ve 15,68 μ mol/mg olarak belirlemişlerdir.

Erat ve Şakiroğlu (2012), tarafından yapılan bir çalışmada insan eritrositlerinden GST enzimi glutatyon agaroz afinite kromatografisi yöntemi kullanılarak 16,00 EÜ/mg protein spesifik aktiviteyle ve %80 verimle 1143 kat saflaştırılmıştır. Daha sonra enzim aktivitesi üzerine bazı kimyasalların etkilerine bakılmıştır. Paclitaxel için IC_{50} değeri 0,23 mM, cyclophosphamide için 5,75 mM, gemciabine için 6,35 mM olarak hesaplanmıştır. Ayrıca bu ilaçların doğal substratı olan GSH ile yapılan inhibisyon çalışmalarından K_i sabitleri sırasıyla paclitaxel için $0,182 \pm 0,028$ mM, cyclophosphamide için $6,97 \pm 0,49$ mM, gemciabine için 6,71 mM olarak bulunmuştur.

3. MATERYALLER VE METODLAR

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmalarımızda kullanılan standart serum albümin, N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin (TEMED), indirgenmiş glutatyon (GSH), 1- kloro 2,4 dinitrobenzen (CDNB), Sephadex G-150, akrilamid, N,N'-metilen bisakrilamid, coomassie brilliant blue G-250, brom timol mavisi, sodyum dodesil sülfat (SDS), amonyum persülfat, β -merkaptetoetanol, glutatyon agaroz, sodyum hidroksit, trihidroksimetilaminometan (Tris), sodyum klorür, sodyum asetat, hidroklorik asit, glisin, fosforik asit, gliserin, potasyum fosfat, potasyum bisfosfat, potasyum asetat, potasyum klorür, etanol, metanol, asetik asit, sodyum asetat, izopropanol, Sigma Chemical Comp.'den temin edilmiştir.

3.1.2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar

Soğutmalı santrifüj	:Universal 320 R, Hettich
Spektrofotometre	:UV-1800, Shimadzu CC-10
pH metre	:Thermo Orion 3 Star
Homojenizatör	:KA T 25 Ultra-Turrax
Elektroforez tankı	:Bio Rad
Elektroforez güç kaynağı	:EC 300 XL
Peristaltik pompa	:ATTA SJ-1220
Karıştırıcı	:SK-300
Vorteks	:Velp Scientifica SK-300
Hassas terazi	:Denver Instrument SI-234
Kar makinesi	:Hoshizaki Ice Maker FM-80EE
Otomatik pipet	:Transferpette, Eppendorf
Çalkalayıcı	:Lab. Companion SK-300

Manyetik karıştırıcı :IKA C-MAG HS 7

Buzdolabı :Arçelik

Çözelti hazırlamak amacıyla kullanılan su, saf ve deiyonize sudur.

3.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanmaları

3.1.3.1. Aktivite Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

1. KH_2PO_4 (0,1 M, pH:6,5): 0,68 g KH_2PO_4 ve 0,014 g EDTA hassas terazi ile tartılarak 30 mL saf su içerisinde çözüldü ve pH 6,5'a ayarlandı. Son hacim saf su ile 50 mL'ye tamamlandı.
2. 20 mM GSH Çözeltisi: 0,03 g indirgenmiş glutatyon alınarak bir miktar saf suda çözüldü ve hacim saf kullanılarak 5 mL'ye tamamlandı.
3. 25 mM CDNB Çözeltisi: 0,025 g 1-kloro 2,4 dinitrobenzen alınarak bir miktar %95'lik etanol çözeltisi içerisinde çözüldü ve hacmi etanol ile 5 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.2. Karaciğer Dokusundan Homojenat Hazırlamak İçin Kullanılan Çözeltiler

1. 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF içeren 50 mM Tris-HCl (pH: 7,2) Tamponu: 0,605g Tris 80 mL çözüldü daha sonra bu çözeltiliye 0,015 g DTT, 0,027 g EDTA ve 1 mL propanol'de çözülen 0,017 g PMSF eklendi pH 7,2'ye ayarlanarak son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.3. Afinite Kolonunda Kullanılan Çözeltiler

1. 10 mM KH_2PO_4 ve 150 mM NaCl, (pH:7,4) (Afinite kolonunu paketlemek, dengelemek ve yıkamak amacıyla kullanılan çözelti): 0,4 g KH_2PO_4 ve 2,61 g NaCl alınarak 200 mL suda çözülüp pH 7,4'e getirildikten sonra saf su ile 250 mL'ye tamamlandı.

2. 2,5 mM, 5 mM ve 10 mM GSH çözeltisi içeren 50 mM Tris-HCl Tamponu (pH:9,5) (Afinite jeline tutunan GST enziminin elüsyonu için kullanılan tampon): 50 mM Tris- HCl çözeltisi (pH:9,5) içerisinde katı olarak GSH çözülerek 10 mM'lık GSH çözeltisi hazırlandıktan sonra 5 tüpten oluşan gradient oluşturuldu ve düşük konsantrasyondan başlanarak sırayla afinite kolonuna uygulandı.
3. 0,5 M NaCl ve 0,1 M H₃BO₃ pH: 8,5 (borat Tamponu) (afinite kolonunu rejenere etmek için kullanılan tampon 1): 0,62 g H₃BO₃ ve 2,92 g NaCl alınarak 80 mL saf su da çözülüp, pH 8,5'e ayarlandıktan sonra çözelti hacimi saf su kullanılarak 100 mL'ye tamamlandı.
4. 0,1 M NaCH₃COO ve 0,5 M NaCl, pH:4,5 (Asetat Tamponu) (glutatyon agaroz afinite kolonunu rejenere etmek için kullanılan tampon 2): 0,82 g NaCH₃COO ve 2,92 g NaCl alınarak 80 mL saf su da çözülüp pH: 4,5'e ayarlandıktan sonra hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.
5. %0,02 NaN₃ çözeltisi (Kromatografi kolon materyallerini bakterilerden korumak için kullanılan çözelti): 20 mg NaN₃ alınarak saf suda çözülüp ve hacmi yine saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.4. Bradford Yöntemiyle Protein Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler

1. Boyama Çözeltisi (Coommassie Brilliant Blue): Coommassie Brilliant Blue G-250 reaktifinden 100 mg alınarak %95'lik 50 mL etanol içerisinde çözüldü. Hazırlanan bu çözeltiye %95'lik fosforik asitten 100 mL ilave edildi. Çözeltinin son hacmi saf su kullanılarak 1000 mL'ye tamamlandı. Bu çözelti ışıktan etkilenmemesi amacıyla karanlık ortamda muhafaza edildi.
2. Sığır Serum Albümin çözeltisi: 1 mg sığır albümin alınır 1 mL suda çözülerek hazırlandı.

3.1.3.5. Elektroforez İçin Kullanılan Çözeltiler

1. 1 M Tris-HCl (pH:8,8): 12,11 g Tris tartılarak 70 mL suda çözülüp pH 8,8'e ayarlandı daha sonra çözelti hacmi saf su kullanılarak 100 mL'ye tamamlandı.
2. 1 M Tris-HCl (pH:6,8): 12,11 g Tris tartılarak 70 mL suda çözüldü toplam hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlanmadan önce pH 6,8'e ayarlandı.
3. %30 Akrilamid-%0,8 Bisakrilamid çözeltisi: önce 0,4 g bisakrilamid daha sonra 15 g akrilamid hassas terazi ile tartılarak 34,6 mL saf su içerisinde çözüldü daha sonra çözelti hacmi saf su ile 50 mL'ye tamamlandı.
4. %10'luk SDS çözeltisi: 9 mL saf su içerisinde 1 g sodyum dodesil sülfat çözüldü ve çözelti hacmi 10 mL'ye tamamlandı.
5. %10'luk amonyum persülfat çözeltisi: 8 mL saf su içerisinde 1 g amonyum persülfat çözülerek çözelti hacmi 10 mL'ye tamamlandı.
6. Jel yürütme tamponu: 1,51 g Tris ve 7,51 g glisin alınarak 450 mL su içerisinde çözüldü. Bu çözeltiye 5 mL %10'luk SDS'den ilave edilerek pH 8,5'e ayarlandı ve çözelti hacmi saf su kullanılarak 500 mL'ye tamamlandı.
7. Numune tamponu: 0,5 mL, 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 1 mL %10'luk SDS, 1 mL %100'lük gliserin ve 1 mL %0,1'lik bromtimol mavisinden alınarak çözeltinin son hacmi saf su kullanılarak 10 mL'ye tamamlandı. Bu çözelti kullanılmadan önce 950 µL numuneye için 50 µL β-merkapto etanol ilave edildi.
8. Sabitleştirme çözeltisi: Jel de yürütülen proteinleri sabitleştirmek amacıyla %10 TCA, %50 izopropanol ve %40 su içeren bir karışım hazırlandı.
9. Jel boyama çözeltisi: 10 mL asetik asit içerisine 0,1 g Coomassie Brilliant Blue R-250 reaktifi eklenerek çözüldü, bu çözelti üzerine 50 mL metanol ve 40 mL saf su ilave edilerek hazırlandı.

10. Jel yıkama çözeltisi: 10 mL asetik asit ve 50 mL metanol karıştırıldıktan sonra üzerine 40 mL su ilave edilerek hazırlandı.

11. Bromtimol mavisi çözeltisi (% 0,1'lik) : 16 mL, 0,01 M NaOH alınarak içerisinde 0,1 gram bromtimol mavisi çözüldü toplam hacmi saf su kullanılarak 100 mL ye tamamlandı.

3.2. Metod

3.2.1. Protein Tayini

3.2.1.1. Kalitatif Protein Tayini

Proteinlerin yapısında bulunan triptofan ve tirozin amino asitleri 280 nm'de maksimum absorbans gösterirler. Proteinlerin kalitatif tayini bu esasa dayanmaktadır (Segel 1968). Bu çalışmada kromatografi işlemlerinde eşit hacimde alınan bütün numunelerde kalitatif protein tayini yapıldı. Kuvarz küvetlere alınan numunelerin absorbansları spektrofotometrik yöntemle ölçüldü.

3.2.1.2. Bradford Yöntemi ile Protein Tayini

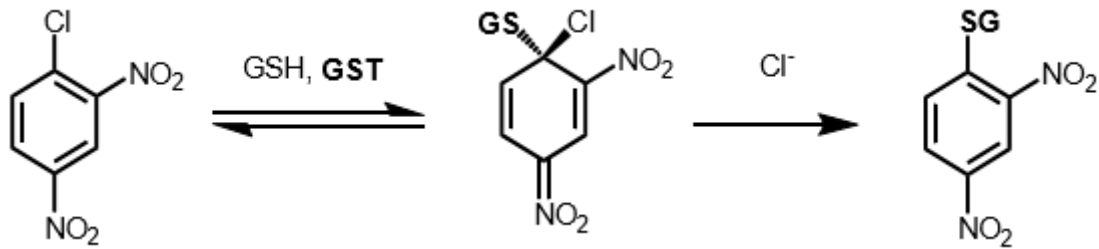
Homojenattaki ve glutatyon agaroz afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırılan enzim çözeltilerindeki proteinlerin kantitatif tayini Bradford yöntemiyle yapıldı. Bu yöntemde Coomassie brilliant blue G-250 reaktifinin proteine bağlanması esas alındı. Bu yöntemde oluşan protein-boya kompleksi 595 nm'de maksimum derecede absorbans gösterir. Protein ile boyanın bağlanması çok hızlı gelişir. Bu yöntemle 1-100 mg hassasiyeti ile protein tayini yapılabilmektedir (Bradford 1976).

Tayin işlemlerinde şu prosedür takip edildi standart sığır albümin çözeltisi hazırlamak için 1 mL'sinde 1 mg sığır serum albümin ihtiva eden 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µL tüpler alındı. Saf su ile tüm tüplerin hacmi 100 µL'ye tamamlandı ve 4,9 mL renklendirme reaktifi tüplere ilave edilip vorteks ile karıştırıldı. 595 nm'de 3 mL'lik

küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okunmadan önce 10 dakika inkübasyon yapıldı. Kör olarak 100 μ L tampon ve 4,9 mL renklendirme reaktifinden oluşan karışım kullanıldı. Spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldı. Bu absorbans değerlerine karşılık gelen mg protein değerleri ile standart grafik hazırlandı. Numune çalışmaları için, 100 kat seyreltilmiş karaciğer homojenatı, amonyum sülfat çöktürmesi ve afinite kromatografisinden elüe edilen saflaştırılmış enzim çözeltileri ile aynı şekilde tüpler hazırlandı. Hazırlanan tüpler vorteks ile karıştırılarak 10 dakika inkübasyon yapıldı. Daha sonra 595 nm’de köre karşı absorbans ölçümü gerçekleştirildi. Bu prosedür 3 defa tekrarlandı ve bu 3 farklı ölçümün aritmetik ortalaması kullanılarak standart grafikten protein miktarları belirlendi.

3.2.2. Glutasyon S-Transferaz Aktivite Tayini

Glutasyon S-transferaz (GST) enzimi bir glutasyon molekülü ile bir aromatik elektrofilin konjugasyonunu katalizler. En çok kullanılan aromatik elektrofil 1-kloro-2,4-dinitrobenzen’dir. Bu substratın kullanılmasıyla oluşan dinitrobenzen S-glutasyon (DNB-SG) ürünü 340 nm’de maksimum absorbans gösterir. Böylece bu dalga boyundaki absorbans artışından yararlanılarak aktivite ölçümü yapılabilir. Biz de bu ölçüm metoduna göre çalışmalarımızda aktivite ölçümünü gerçekleştirdik.



Şekil 3.1. Spektrofotometrik olarak GST enziminin aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan ürünün oluşum mekanizması (Habdous et al 2002)

GSH’ın yokluğunda, CDNB hızlı bir şekilde glutasyon S-transferazı inaktive eder. Bu sebepten dolayı reaksiyonun CDNB ile başlatılması gerekir. Aktivite ölçümü için toplam hacim 1ml olacak şekilde Çizelge 3.1’de verilen çözelti ortamı hazırlandı. Küvetler spektrofotometreye yerleştirilip okuma başlatıldı. Kronometre kullanılarak başlangıçta ve

dakikada bir olmak üzere üç dakika süresince absorbans değerleri ölçülüp kaydedildi (Habig et al 1974).

Tablo 3.1. GST enziminin aktivite ölçümünde kullanılan prosedür

Küvet İçeriği	Kör	Numune
0,5 M aktivite tamponu	200 µL	200 µL
25 mM CDNB	20 µL	20 µL
20 mM GSH	50 µL	50 µL
Saf su	730 µL	720 µL
Enzim numunesi	-	10 µL

Bir Enzim Ünitesi: Bir dakikada, 25°C’de ve optimum şartlarda 1µmol substratı ürüne dönüştüren enzim aktivitesi olarak tanımlanır. Enzim ünitesi hesaplanırken aşağıdaki formül kullanıldı.

$$E\ddot{U} = (\Delta OD / 9,6) \times (V_T / V_E) \times SF$$

$E\ddot{U}$: 1 mL’deki enzim ünitesi

ΔOD : Spektrofotometrik analizde bir dakikada meydana gelen absorbans değişimi

9,6 : Ekstinksiyon katsayısı (1 mM DNB-SG’nin oluşturduğu absorbans değeri)

V_T : Ölçümün yapıldığı küvetin toplam hacmi

V_E : Ölçüm yapılan küvete ilave edilen enzim numunesinin hacmi

SF : Seyreltme faktörü (seyreltilen örnekler için kullanılır)

3.2.3. GST Enzimi İçin Afinite Jelinin Hazırlanması

Enzim saflaştırmada en çok kullanılan ve bizim de kullandığımız yöntem afinite kromatografisi yöntemidir. Bu amaçla 10 mL’lik kolon hacmi için 1 g kuru glutatyon-agarose tozu tartılarak, 200 mL saf su ile birkaç defa yıkanarak katı partiküller uzaklaştırıldı. Yıkama sırasında jel şişirilmiş oldu. Su trompu vasıtasıyla şişirilmiş jelin havası vakum ile alındı ve üzerine dengeleme tamponu (0,05 M K-fosfat pH:7,4, 1 mM EDTA ve 1 mM DTT) ilave edilerek jel süspanse edildi. 1x10 cm’lik kapalı sistemden

oluşan soğutmalı kolona hazırlanan jel, paketleni. Kolona paketlenen jel peristaltik pompa yardımıyla dengeleme tamponu ile yıkandı. Eluat ve tamponun absorbanlarının ve pH'larının eşitlenmesinden kolonun dengelenmiş olduğı anlaşıldı. Glutasyon agaroz afinite kolonu bu işlemler sonunda hazırlanmış oldu (Güvercin et al 2008; Toribio et al 1996).

3.2.4. Bıldırcın Karaciğerinden GST'nin Saflaştırılması

3.2.4.1. Bıldırcın Karaciğeri Temini ve Homojenat Hazırlanması

Deneylerde kullanılan bıldırcınlar Bingöl Üniversitesi Uygulama çiftliğinden taze olarak temin edildi. Görevliler yardımıyla alınan bıldırcın dokuları soğuk zincir kuralına göre laboratuvara getirilerek -20°C'de derin dondurucuda muhafaza edildi. Deneylerde donmuş karaciğer küçük parçalara ayrılarak, alınan karaciğerin 3 katı kadar homojenat tamponu eklendi ve buz kalıbı içerisinde homojenizatörle homojenize edildi. Daha sonra ependörf tüplerine alınan homojenat 13.000 x g de 60 dakika santrifüj edildi ve çökelek atıldı. Böylece homojenat elde edildi. Bu işlemlerin hepsi +4 °C'de gerçekleştirildi.

3.2.4.2. Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Diyaliz

Hazırlanan homojenat için %0, %20, %30, %40, %50, %60, %70, %80, %90 ve %100 aralığında katı amonyum sülfat çöktürmesi yaparak bıldırcın GST enziminin çöktürme aralığını belirledik. Çöktürme işleminde kullanılan katı (NH₄)₂SO₄ yavaş yavaş homojenata ilave edilerek manyetik karıştırıcı yardımıyla çözünmesi sağlandı. % 0-20 %30, %40, %50, %60, %70, %80 doygunlukta amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Her defasında tuzlu homojenat santrifüj tüplerine konularak 13500xg'de 15 dakika santrifüj edildi (böylece yabancı proteinlerin çökmesi sağlandı). Bu işlemin her basamağında çökelek ve süpernatantta aktivite tayini yapıldı ve aktivite bulunan tüpler tespit edildi. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen karışım diyaliz torbasına yerleştirilerek iki saat süreyle diyaliz tamponuna (10 mM K-fosfat, 1 mM EDTA pH=7,5) karşı diyaliz edildi. Bu işlemlerin tamamı +4 °C'de gerçekleştirildi.

3.2.4.3. Homojenattaki Enzimin Afinite Kromotografisi ile Saflaştırılması

Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz sonrası numune peristaltik pompa vasıtasıyla akış hızı 20 mL/saat'e ayarlanan glutatyon agaroz afinite kolonuna uygulandı. Bunu takiben kolon 10 mM KH_2PO_4 ve 0,1M KCl, pH:8 tamponu ile yıkandı. Yıkama işlemi spektrofotometrik olarak fraksiyonlardaki absorbans değerlerinin köre eşit olmasıyla tamamlandı. Afinite kolonu aynı tamponla dengelendikten sonra gradientli elüsyon yapılarak enzim saflaştırıldı. Elüsyon çözeltisi 50 mM Tris-HCl ve (1,25-10 mM, pH:9,5) GSH, içeren çözeltinin gradientinden oluşturuldu. Elüatlar 1,5 mL eppendorf tüplerine alınarak 340 nm'de aktivite tayini yapıldı (Toribio et al 1996).

3.2.5. SDS-PAGE ile Enzim Saflığının Kontrolü

Enzimin saflık derecesi Laemmli'nin önerdiği methodla %3-15 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yapılarak kontrol edildi (Laemmli 1970).

Bu yöntem için elektroforez plakaları su ve alkol ile iyice temizlendi. Temizlenen plakalar, sabitleştirilerek jel hazırlama kabinine konuldu. İlk olarak ayırma jeli hazırlandı ve plakaların arasına üst kısmında 5 cm kalıncaya kadar dolduruldu. Ayırma jelinin katılma prosesi tamamlandıktan sonra yığma jeli hazırlandı (Tablo 3.2). Hazırlanan yığma jeli plakaların üst kısmındaki boşluğa dolduruldu ve tarak dikkatlice yerleştirilerek numune kuyucuklarının oluşması sağlandı. Yığma jelinin katılma prosesi tamamlandığında tarak dikkatlice çıkartılarak numune kuyularının oluşumu sağlandı. Enzim örnekleri 100 μL numune tamponu, 100 μL enzim ve 50 μL gliserin kullanılarak hazırlandı. Hazırlanan numuneler beş dakika kaynar su banyosunda bekletildi. Enzim örnekleri ve standart proteinler kuyulara dikkatli bir şekilde yüklendi. Jel plakaları elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankına belirlenen hacimde yürütme tamponu ilave edildi. Elektroforez tankı kapatılarak güç kaynağına bağlandı. İlk olarak 80 voltta 25 dakika yürütüldü ve kuyulardaki numunelerin ayırma jeline kadar gelerek yığılması sağlandı. Daha sonra elektroforez işlemine 120 volt'ta numunelerin jelin alt sınırına gelmesine kadar devam edildi. Numunelerin takip edilmesi, numune tamponuna eklenen brom timol mavisi yardımıyla sağlandı. Elektroforez işlemi tamamlandıktan

sonra akım kesilerek plakalar arasındaki jeller dikkatlice alındı ve sabitleştirme çözeltisine konuldu. 30 dakika boyunca jeldeki proteinlerin sabitleştirme işlemi sağlandı, daha sonra sabitleşme çözeltisinden çıkarılan jel boyama çözeltisine konuldu ve çalkalayıcı üzerinde 2 saat boyunca boyama işlemi gerçekleştirildi. Boyanan jel çıkarılarak yıkama çözeltisine koyuldu. Rengi açılıp, protein bantları belirginleşene kadar çalkalayıcıda yıkanan jel çıkarılarak fotoğrafı çekildi.

Tablo 3.2. Elektroforez jellerinin hazırlanması

Yığma jeli	Ayırma jeli
1 M Tris-HCl pH:8,8 ,5 mL	1M Tris-HCl pH:6,8 440 µL
%30'luk akrilamid ve %0,8'lik bisakrilamid 4,4 mL	%30'luk akrilamid ve %0,8'lik bisakrilamid 800 µL
%10'luk SDS 200 µL	%10'luk SDS 30 µL
TEMED 130 µL	TEMED 30µL
Saf su 3,130 mL	Saf su 2,450 mL
%10'luk PER 100 µL	%10'luk PER 30-50 µL

3.2.6. GST Enziminin Molekül Kütlesinin SDS-PAGE ile Tayini

Bıldırcın karaciğerinden saflaştırılan GST enziminin molekül ağırlığı tayini Laemmli (1970), metoduna göre gerçekleştirildi; standart protein olarak, 120 kDa, 85 kDa, 50 kDa, 35 kDa ve 25 kDa ağırlığındaki proteinler kullanıldı. Bıldırcın karaciğeri GST enzimi için gerçekleştirilen elektroforez işlemi sonucu elde edilen jel fotoğrafı kullanılarak standart proteinlerin R_f değerleri hesaplandı. Microsoft excel programı kullanılarak R_f -log M_A standart grafiği çizildi. Daha sonra aynı jel fotoğrafı yardımıyla bıldırcın karaciğerinden saflaştırılan GST enziminin alt birimlerinin R_f değeri hesaplandı ve standart grafikte yerine konularak log M_A değeri hesaplandı. Daha sonra bu log M_A değerinin antilogaritması alınarak numunenin molekül ağırlığı tespit edildi. Proteinlerin R_f değerleri;

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

formülü kullanılarak belirlendi.

X_e = Proteinin yürüme mesafesi,

X_{boya} = Boyanın yürüme mesafesi

3.3. GST Enzimiyle İlgili Oarak Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları

3.3.1. Optimum pH'nın Belirlenmesi

Bıldırcın karaciğerinden saflaştırılan GST enziminin optimum pH' değerini belirlemek için pH'sı 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 ve 8,0 olan potasyum fosfat ve pH'sı 7,5, 8,0, 8,5 ve 9,0 aralığında Tris-HCl, tamponları hazırlandı. Her bir tampon ile ayrı ayrı enzim aktivite ölçümleri yapıldı.

3.3.2. Optimum İyonik Şiddetin Belirlenmesi

Bıldırcın karaciğerinden saflaştırılan GST enziminin optimum aktivite gösterdiği iyonik şiddetinin belirlenmesi için 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1500 mM Tris-HCl ve K-fosfat tamponları hazırlandı. Bu çözeltilerin pH değerleri optimal pH'a ayarlanarak her bir çözelti için aktivite ölçümleri yapıldı.

3.3.3. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi

Bıldırcın karaciğerinden saflaştırılan GST enziminin optimum sıcaklık değerini belirlemek için elektronik ısıtma ve soğutma fonksiyonlu su banyosu kullanıldı. Optimum sıcaklık belirlenirken optimum pH ve optimum iyonik şiddete sahip çözeltiler hazırlandı. Aktivite ölçümünde kullanılan tampon ve substratları ihtiva eden karışım kuvvet içerisinde istenilen sıcaklığa ayarlanmış olan su banyosunda bekletildi. İstenilen sıcaklıkta 5 dakika bekletilen kuvvet üzerine enzim pipetlenerek hemen okuma yapıldı ve su banyosuna tekrar konuldu. 0 °C ile 90 °C arasında ve her 10 °C de bir aktivite ölçümleri yapıldı.

3.3.4. Stabil pH'nın Belirlenmesi

Bıldırcın karaciğerinden saflaştırılan GST enziminin stabilitesinin en uygun olduğu pH'yı tespit etmek için pH'ları 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 ve 8,0 olan potasyum fosfat ve 7,5, 8,0, 8,5 ve 9,0 olan Tris-HCl tamponları hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltilerden 750 μ L alınarak üzerine 250 μ L enzim ilave edildi ve ependorf tüplerine konulup aktivite ölçümü yapıldıktan sonra +4°C'de muhafaza edildi. Bu çözeltiler enzim kaynağı olarak kullanıldı. Aktivite ölçümleri 6 gün boyunca 24 saat aralıklarla tekrar edildi. Aktivite ölçümleri sonucunda enzimin stabil olduğu pH belirlendi.

3.3.5 GST Substratları İçin K_M ve V_{max} Değerlerinin Bulunmasına Yönelik Çalışmalar

Bıldırcın karaciğerinden saflaştırılan GST enziminin GSH ve CDNB substratları için K_M ve V_{max} değerlerini belirlemek amacıyla sabit GSH konsantrasyonunda CDNB'nin 5 farklı konsantrasyonlarıyla aktivite ölçümleri yapıldı. Ölçüm sonucu kaydedilen değerlerle Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Bu grafik vasıtasıyla CDNB için K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı. Aynı şekilde CDNB substrat konsantrasyonu sabit tutularak GSH'ın 5 farklı konsantrasyonlarıyla aktivite ölçümleri yapıldı ve Lineweaver-Burk grafiği çizildi ve GSH substratı için K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı. Aktivite ölçümleri optimal şartlarda gerçekleştirildi (Lineweaver and Burk 1934).

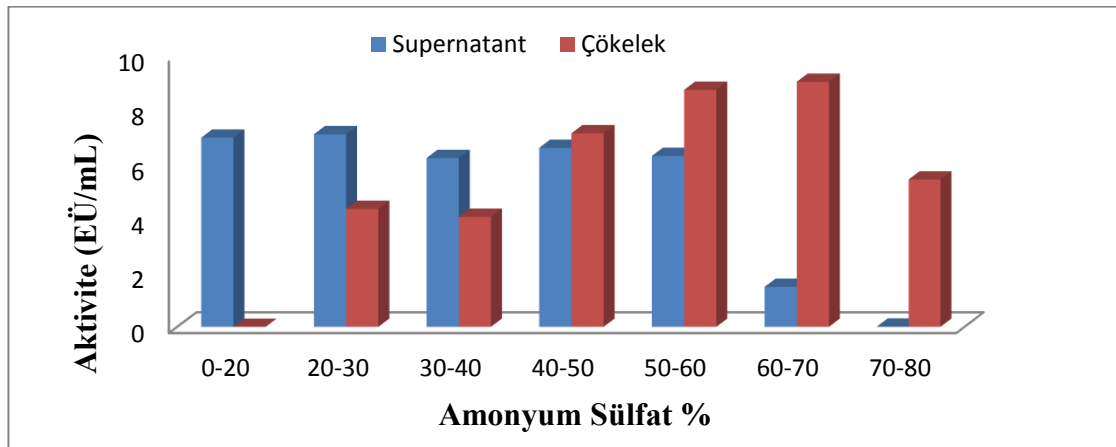
4. SONUÇLAR

4.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Bıldırcın karaciğerinden saflaştırılan GST enziminin amonyum sülfat çöktürmesi bölüm 3.2.4.2’de anlatıldığı gibi yapıldı. GST enzimi için amonyum sülfat çöktürme aralığı Tablo 4.1 ve şekil 4.1’de gösterildiği gibi %20-80 olarak belirlendi.

Tablo 4.1. GST enziminin amonyum sülfat çöktürme sonuçları

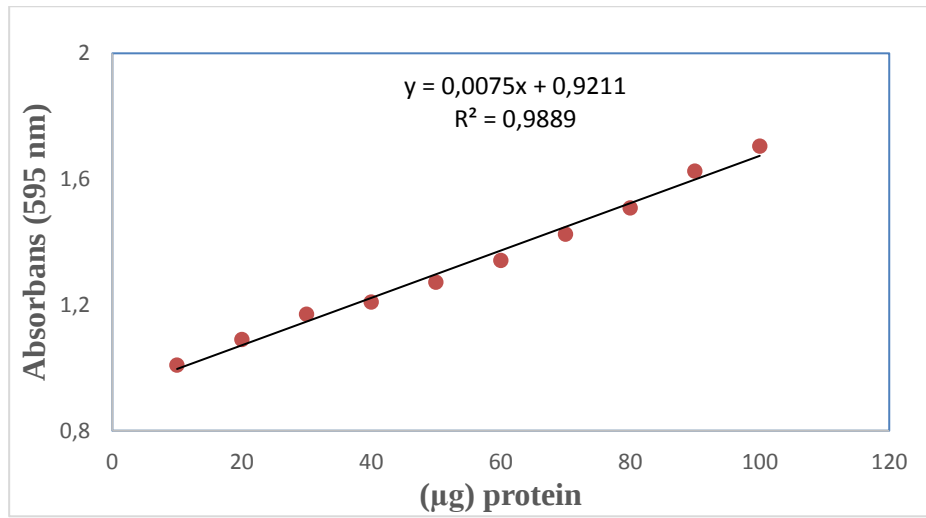
Amonyum Sülfat (%)	Süpernatant (EÜ/mL)	Çökelek (EÜ/mL)
0-20	6,9652	0
20-30	7,0902	4,3402
30-40	6,2152	4,0486
40-50	6,5902	7,1250
50-60	6,2916	8,7222
60-70	1,4722	9,0208
70-80	0,0069	5,4236



Şekil 4.1. Amonyum sülfat çöktürmesi

4.2. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik

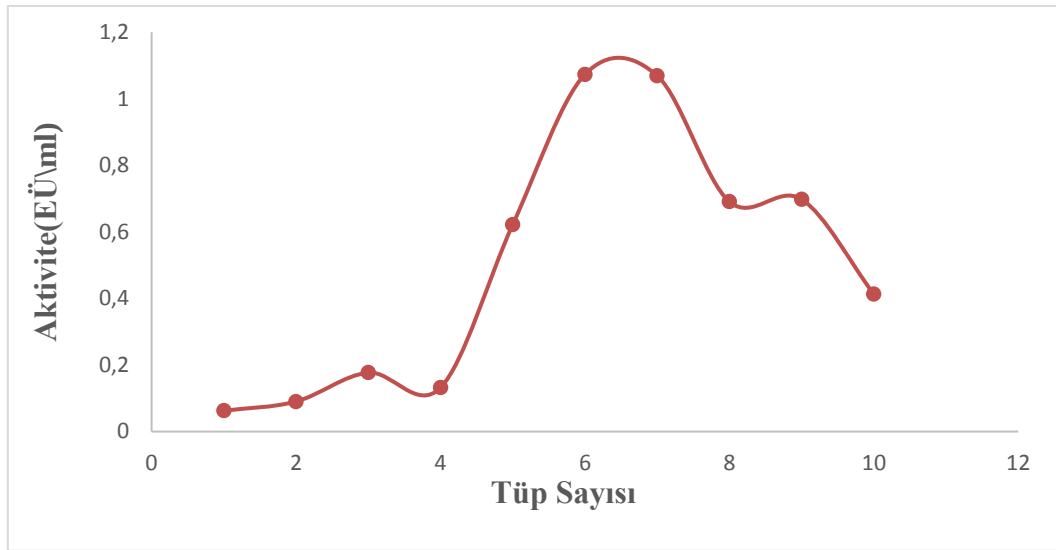
Elde edilen numunelerdeki proteinlerin kantitatif tayini Bradford yöntemiyle belirlendi. Standart grafik bölüm 3.2.1.'de anlatıldığı gibi hazırlandı. Hazırlanan homojenattaki ve glutatyon agaroz afinite kromatografisi sonrası elde edilen enzim numunelerindeki proteinlerin kantitatif tayini bu standart grafik vasıtasıyla hesaplandı. Standart olarak hazırlanan sığır serum albümin çözeltilerindeki μg proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 4.2'de gösterildi.



Şekil 4.2. Numunelerdeki proteinlerin kantitatif tayini için kullanılan standart grafik

4.3. Afinite kromatografisi sonuçları

Hazırlanan homojenat amonyum sülfat çöktürmesi sonrası glutatyon agaroz afinite kolonuna yüklendi. Bölüm 3.2.4.3 te anlatıldığı şekilde gradientli elüsyon yapıldı. Elüatlardaki enzimlerin aktivite değerleri Şekil 4.3'de gösterildi.



Şekil 4.3. Bildircin karaciğeri GST enziminin glutatyon agaroz afinite kolonundan elüsyon grafiği

4.4. GST Enziminin Saflaştırılması ile İlgili Sonuçlar

Bildircin karaciğeri homojenatı ve afinite kromatografisi sonrası elde edilen saf enzim için spesifik aktivite, yüzde verim, saflaştırma katsayısı, aktivite, protein, toplam aktivite ve toplam protein gibi önemli bazı değerler hesaplanarak Tablo 4.2’de gösterildi.

Tablo 4.2. GST enziminin 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	11	3,36	9,758	107,338	36,96	0,344	100	1
Amonyum sülfat	2	8,75	1,34	2,68	17,5	6,52	47,3	18,95
Afinite	2	2,284	0,144	0,288	4,57	15,86	12,36	46,1

4.5. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrez ile GST Enzim Saflığının Kontrolü

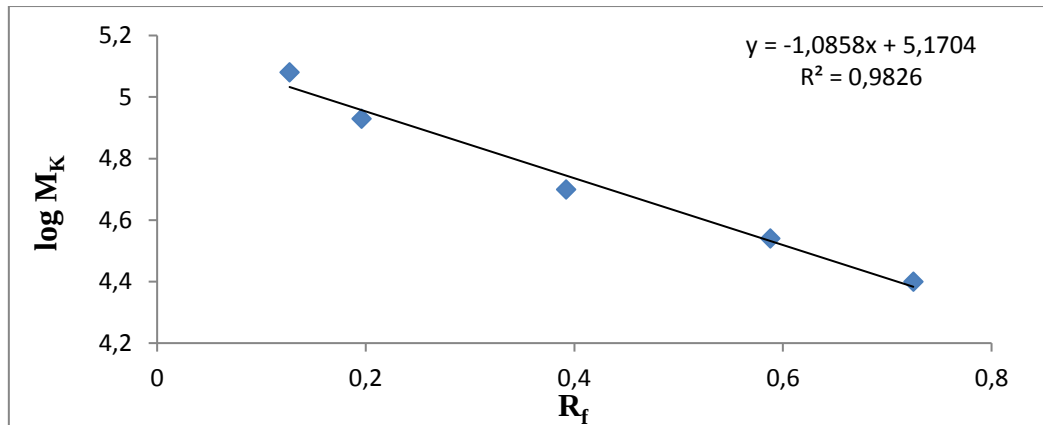
Bildircin karaciğerinden amonyum sülfat çöktürmesi ve afinite kromatografisi sonrası elde edilen elüatlardaki GST enziminin saflığını belirlemek amacıyla bölüm 3.2.5’de anlatıldığı şekilde SDS-PAGE yönteminden yararlanıldı. Elektrofrez sisteminde enzim numuneleri ve standart proteinler sırayla kuyulara uygulandı ve yürütüldü. Saf enzime ve standart proteinlere ait bantları gösteren fotoğraf Şekil 4.4’de verildi.



Şekil 4.4. Afinite kromatografisi ile saflaştırılan GST enziminin SDS-PAGE ile saflık kontrolü. *1. ve 2. kuyu: afinite kolonundan elüe edilen GST; 3. kuyu: homojenat; 4. kuyu: standart proteinler

4.6. Bıldırcın Karaciğerinden Saflaştırılan GST Enziminin SDS-PAGE ile Alt Birimlerinin Mol Kütlesinin Belirlenmesine Ait Sonuçlar

Bıldırcın karaciğerinden saflaştırılan GST enziminin alt birimlerinin mol kütlesinin belirlenmesi için bölüm 3.3.6'da izah edildiği gibi enzim kesikli SDS-PAGE'de yürütüldü ve elde edilen bantların fotoğrafı Şekil 4.4'de gösterildi. Yürütülen standartların ve enzimin R_f değeri ölçülüp $\log M_K$ - R_f standart grafiği çizildi Şekil 4.5. Bu grafik kullanılarak bıldırcın karaciğeri glutatyon S-transferaz enziminin alt birimlerinin mol kütlesi yaklaşık 25,1 kDa olarak hesaplandı.



Şekil 4.5. Saflaştırılan GST enzimi için $\log M_K/R_f$ grafiği

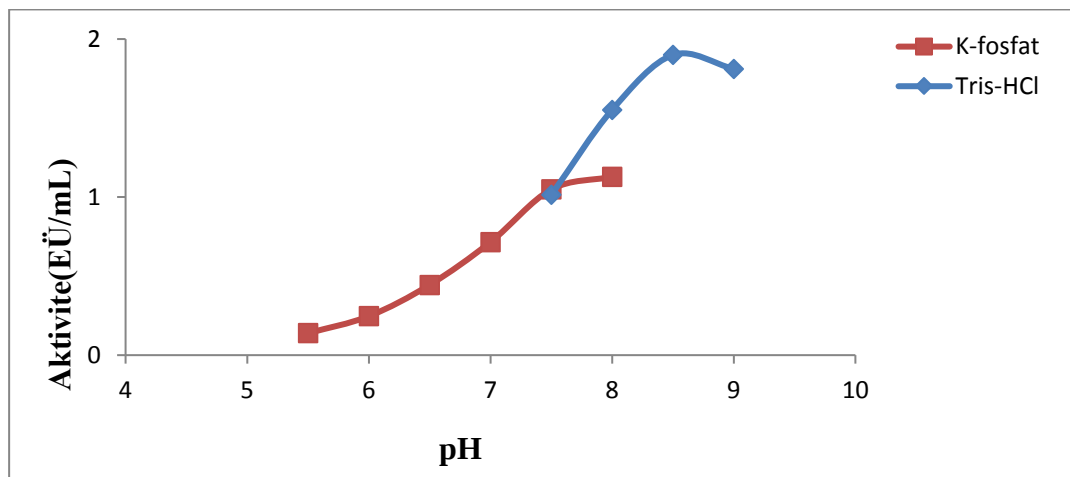
4.7. GST Enzimiyle İlgili Yapılan Karakterizasyon Çalışmalarına Ait Sonuçlar

4.7.1. Optimum pH'nın Belirlenmesi İçin Yapılan Çalışmaların Sonuçları

Bıldırcın karaciğerinden saflaştırılan GST enziminin optimum pH'sını tespit etmek için bölüm 3.3.1'de belirtildiği gibi pH değeri 5,5 ile 8,0 arasında değişen, potasyum fosfat ve pH değeri 7,5 ile 9,0 arasında değişen Tris-HCl tamponlardan oluşan 10 adet çözelti kullanıldı. Enzimin her bir tampondaki absorbans değerleri spektrofotometrik olarak ölçülerek enzim aktiviteleri hesaplandı. Bıldırcın karaciğeri GST enziminin optimum pH değeri Tablo 4.3 ve Şekil 4.6'da gösterildiği gibi Tris-HCl tamponu pH = 8,5 olarak belirlendi.

Tablo 4.3. GST enziminin optimum pH'sı için 0,1 M KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

K-fosfat		Tris- HCl	
pH	Aktivite (EÜ/mL)	pH	Aktivite (EÜ/mL)
5,5	0,1389	7,5	1,0139
6,0	0,2465	8,0	1,5520
6,5	0,4444	8,5	1,8993
7,0	0,7152	9,0	1,8112
7,5	1,0486		
8,0	1,1284		



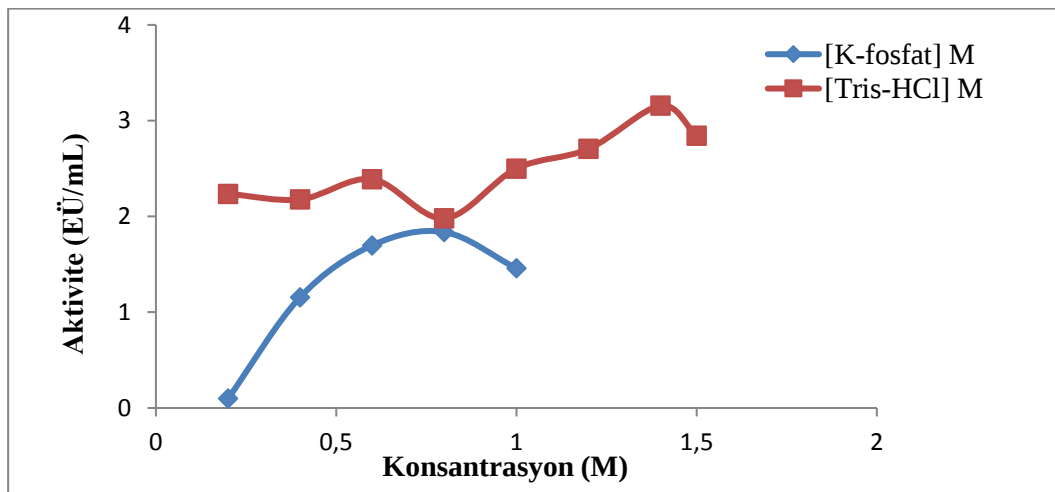
Şekil 4.6. GST enziminin K-fosfat ve Tris-HCl tamponu ile elde edilen aktivite-pH grafiği

4.7.2. Optimum İyonik Şiddetin Belirlenmesine Ait Sonuçlar

Bıldırcın karaciğerinde GST enziminin aktivite ölçümünde en uygun iyonik şiddetin belirlenmesi için önceki çalışmalar sonucu uygunluğu tespit edilen optimum pH' ya sahip K-fosfat ve Tris-HCl tamponlarıyla değişik konsantrasyonlardaki çözeltiler bölüm 3.3.2'de bahsedildiği gibi hazırlandı. Farklı konsantrasyonlarda KH_2PO_4 ve Tris/HCl tampon çözeltilerinde enzimin gösterdiği absorbans değerleri spektrofotometrik olarak ölçülerek enzim aktiviteleri hesaplandı. Bıldırcın karaciğeri GST enziminin iyonik şiddet değeri Tablo 4.4 ve Şekil 4.7'de gösterildiği gibi Tris-HCl tamponunda 1,4 M olarak belirlendi.

Tablo 4.4. GST enziminin optimum iyonik şiddetini Tris/HCl tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

Tris-HCl	
İyonik şiddet (M)	Aktivite (EÜ/mL)
0,2	2,2361
0,4	2,1770
0,6	2,3889
0,8	1,9791
1,0	2,5000
1,2	2,7048
1,4	3,1562
1,5	2,8438



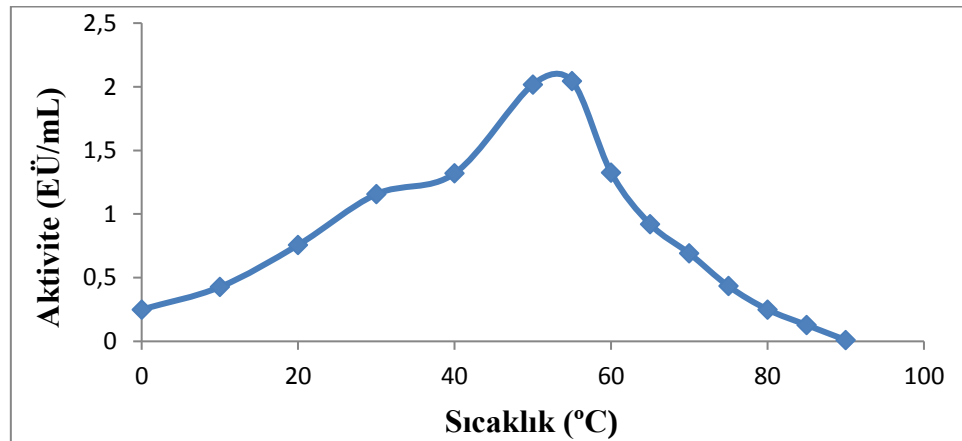
Şekil 4.7. GST enziminin farklı iyon konsantrasyonlarında ölçülen aktivite-konsantrasyon grafiği

4.7.3. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi İçin Yapılan Çalışma Sonuçları

Bıldırcın karaciğerinden saflaştırılan GST enzimi için en uygun sıcaklığı belirlemek amacı ile optimum pH ve optimum iyonik şiddeteki tampon çözeltiler kullanıldı. Bölüm 3.3.3’de belirtildiği gibi 0 °C ile 90 °C arasında her 10 °C de bir enzimin gösterdiği absorbans değerleri spektrofotometrik olarak ölçüldükten sonra enzim aktiviteleri hesaplandı. GST enziminin optimum sıcaklık değeri Tablo 4.5 ve Şekil 4.8’de gösterildiği gibi 55°C olarak belirlendi.

Tablo 4.5. GST enziminin optimum sıcaklığın belirlenmesi için yapılan aktivite ölçüm sonuçları

Sıcaklık (°C)	Aktivite (EÜ/mL)
0	0,2500
10	0,4270
20	0,7569
30	1,1562
40	1,3194
50	2,0173
55	2,0451
60	1,3263
65	0,9201
70	0,6909
75	0,4340
80	0,2500
85	0,1285
90	0,0104



Şekil 4.8. GST enziminin farklı sıcaklıklarda ölçülen aktivite-sıcaklık grafiği

4.7.4. Stabil pH'nın Belirlenmesi İçin Yapılan Çalışma Sonuçları

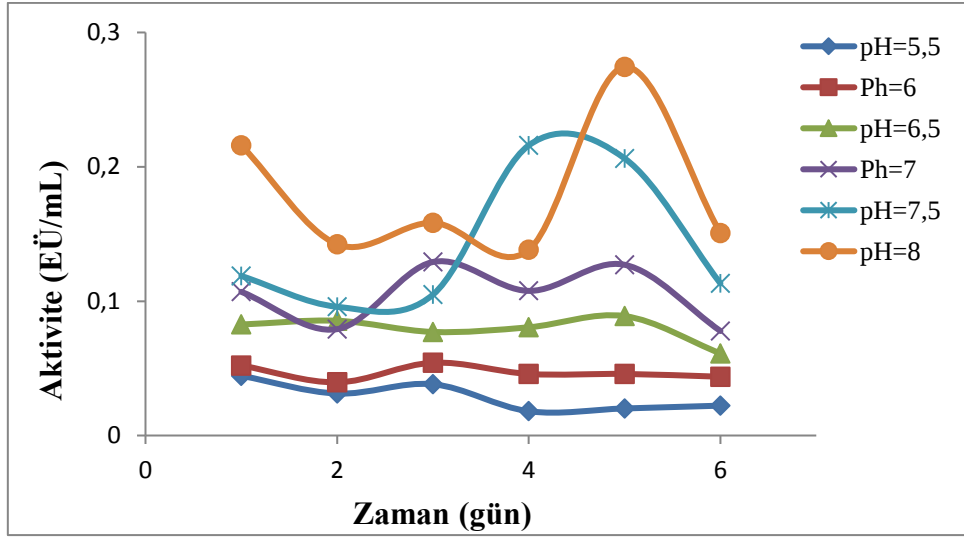
Bıldırcın karaciğeri GST enziminin stabil olduğu pH'yı belirlemek için uygun iyonik şiddete sahip değişik pH değerlerinde tampon çözeltileri bölüm 3.3.4'de anlatıldığı gibi hazırlandı. Farklı tampon çözeltilerindeki enzim aktiviteleri 6 gün boyunca 24 saatte bir olmak üzere ölçüldü. Bıldırcın karaciğeri GST enziminin stabil pH değeri Tablo 4.6 ve Şekil 4.9'da gösterildiği gibi Tris-HCl için pH: 8,5 olarak belirlendi.

Tablo 4.6.a. GST enziminin stabil pH'sının belirlenmesi için yapılan K-fosfat aktivite ölçüm sonuçları

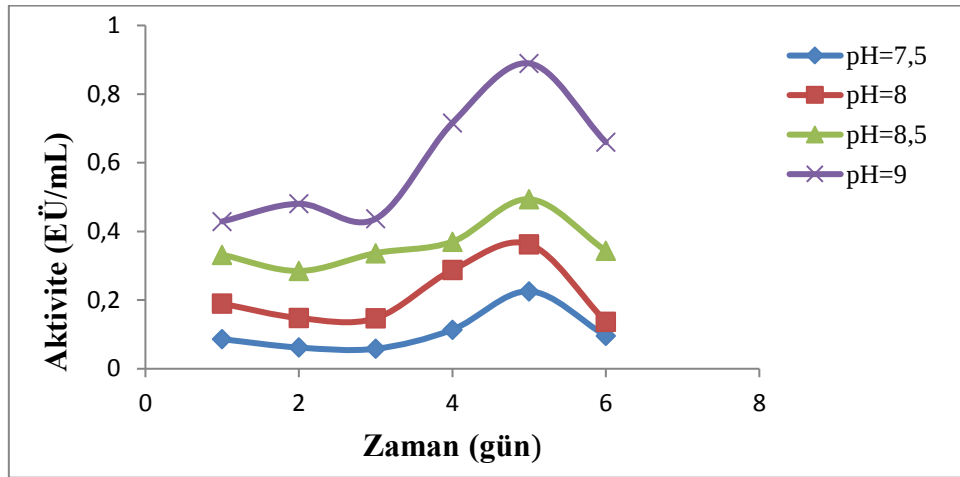
K-fosfat						
pH	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0
Zaman (Gün)	Aktivite (EÜ/ mL)					
1	0,0444	0,0520	0,0826	0,1069	0,1187	0,2159
2	0,1312	0,0395	0,0854	0,0791	0,0958	0,1423
3	0,0381	0,0541	0,0770	0,1291	0,1048	0,1583
4	0,0180	0,0458	0,0805	0,1076	0,2159	0,1381
5	0,0102	0,0458	0,0888	0,1270	0,2062	0,2743
6	0,0222	0,0437	0,0611	0,0777	0,1131	0,1506

Tablo 4.6.b. GST enziminin stabil pH'sının belirlenmesi için yapılan Tris-HCl aktivite ölçüm sonuçları

Tris-HCl				
pH	7,5	8,0	8,5	9,0
Zaman (Gün)	Aktivite (EÜ/ mL)			
1	0,0861	0,1895	0,3319	0,4291
2	0,0618	0,1479	0,2847	0,4805
3	0,0583	0,1472	0,3368	0,4368
4	0,1138	0,2875	0,3701	0,7159
5	0,2256	0,3625	0,4937	0,8895
6	0,0958	0,1368	0,3437	0,6597



Şekil 4.9.a. GST enziminin stabil pH'sını belirlemek için KH_2PO_4 tamponu ile yapılan çalışma sonucu elde edilen K-fosfat grafiği

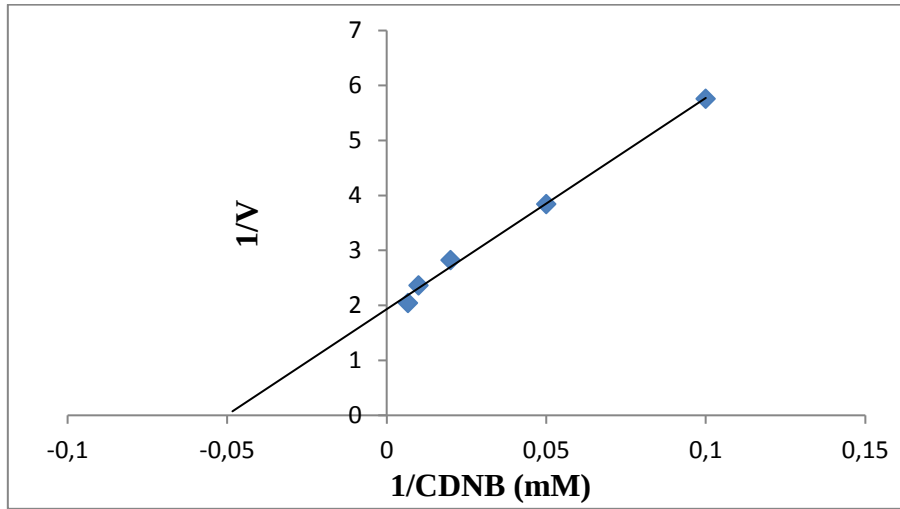


Şekil 4.9.b. GST enziminin stabil pH'sını belirlemek için Tris-HCl tamponu ile yapılan çalışma sonucu elde edilen Tris-HCl grafiği

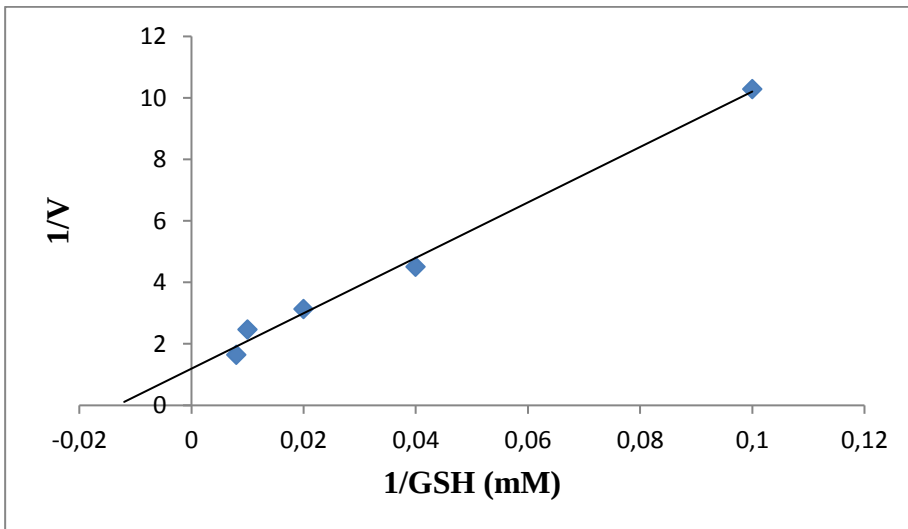
4.7.5. Bildırcın Karaciğerinden Saflaştırılan GST Enziminin GSH ve CDNB Substratları İçin K_M ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesine Ait Çalışmaların Sonuçları

Bıldırcın karaciğeri GST enziminin substratları olan GSH ve CDNB için K_M ve V_{max} değerlerini belirlemek için bölüm 3.3.5'de anlatıldığı gibi CDNB'nin 25mM'lık sabit konsantrasyonunda 5 farklı GSH konsantrasyonuyla aktivite ölçümleri gerçekleştirildi.

Sonuçta elde edilen değerler ile $1/[GSH]-1/V$ grafiği çizilerek reaksiyon denkleminde K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı. Enzimin diğer substratı olan CDNB için K_M ve V_{max} değerlerini hesaplamak için bölüm 3.3.5’de anlatıldığı gibi GSH’nin 20 mM’lık sabit konsantrasyonunda 5 farklı CDNB konsantrasyonuyla aktivite ölçümleri yapılarak $1/[CDNB]-1/V$ grafiği çizildi ve reaksiyon denkleminde K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı. Hesaplanan değerleri Şekil 4.10 ve Tablo 4.7 gösterildi (Lineweaver and Burk 1934).



Şekil 4.10.a. GST enzimi ile sabit GSH konsantrasyonunda CDNB için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi grafiği



Şekil 4.10.b. GST enzimi ile sabit CDNB konsantrasyonunda GSH için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi grafiği

Tablo 4.7. GST enziminin GSH ve CDNB substratları için K_M ve V_{max} değerleri

Substrat	K_M (mM)	V_{max} (EÜ/mL)
CDNB	0,048	0,047
GSH	0,114	0,672

5. TARTIŞMA

Yeryüzündeki hızlı nüfus artışı, hızlı kentleşme, sanayileşme ve teknolojik gelişmeler çevre kirlenmesine neden olmaktadır. Bu durum başta insan olmak üzere dünya üzerindeki tüm canlılar için tehdit oluşturmaktadır. Canlı organizmalarda bu tehditlere karşı vücudun savunma mekanizmasında yer alan çok sayıda enzim bulunmaktadır. Bunların en önemlilerinden biri ksenobiyotiklerin detoksifikasyonundan sorumlu olan glutatyon S-transferaz enzimidir (Hee-Joong et al 2005).

Glutatyon S-transferaz, metabolizmada birkaç mekanizmayla beraber ksenobiyotiklerin uzaklaştırılmasını sağlayan önemli bir özelliğe sahiptir. Bu enzim elektrofilik ksenobiyotiklerin, indirgenmiş glutatyonla (GSH) konjugasyonunu gerçekleştirerek inaktif hale getirdikten sonra vücuttan atılmalarını sağlamaktadır (Güvercin et al 2008) Glutatyon S-transferaz izoenzimleri çok sayıda gen lokosundan sentezlenen ve molekül kütlesi 25 kDa civarında olan homodimerik ve heterodimerik proteinlerdir. Bu enzimlere ait alt ünitelerin aktif formu iki farklı fonksiyonel yapıdan oluşmaktadır. Bu fonksiyonel yapılardan G bölgesi fizyolojik substratı bağlarken, hidrofobik H bölgesi yapısal olarak farklı elektrofilik substratları bağlamaktadır. GST izozim ailesinin substrat çeşitliliğinin sebebi hidrofobik H bölgesindeki aminoasit sistemlerinin birbirinden farklı olmasıdır. Glutatyon S-transferazlar canlıların istemli ya da istemsiz olarak maruz kaldığı ksenobiyotiklerin glutatyonla konjugasyonunu sağlayarak daha düşük toksisiteye sahip metabolitlere dönüşümünü gerçekleştiren faz-II detoksifikasyon reaksiyonlarını katalizleyen enzim ailesinin üyesidirler (Armstrong 1997; Strange et al. 2001; Hayes et al. 2005).

Canlı metabolizmasında çok önemli görevler yürüten glutatyon S-transferaz enzimi ilk olarak sıçan karaciğerinde tanımlanmıştır (Boyland and Chasseaud 1969). Daha sonraki yapılan çalışmalarda GST'ler insan, fare, sığır ve sıçanların değişik dokularından

saflaştırılarak yapıları, fonksiyonları ve metabolik özellikleri kapsamlı bir şekilde çalışılmıştır (Hee-Joong et al 2005).

Bu çalışmanın amacı hücre içi majör antioksidan sistemlerinden glutatyon metabolizmasının önemli bir enzimi olan ve hücre içi detoksifikasyon reaksiyonlarının katalizini sağlayan GST enziminin bıldırcın karaciğer dokularından saflaştırmak ve karakterize etmektir.

Bu çalışmada sitozolik GST enzimi bıldırcın karaciğer dokularından 15,86 EÜ/mg protein spesifik aktivite ile %12,36 verimle 44,1 kat saflaştırıldı. Saflaştırma işlemi, Toribo et al. (1996) ve Güvercin et al. (2008) uyguladığı prosedüre göre homojenatın hazırlanması, amonyum sülfat çöktürmesi ve glutatyon-agaroz afinite kromatografisi kullanılarak üç basamakta gerçekleştirildi. Saflaştırmanın ilk basamağında bıldırcın karaciğer dokularından homojenat hazırlandı. İkinci basamakta nötral tuz (amonyum sülfat) çöktürmesi uygulandı ve salting out yöntemiyle homojenattaki proteinlerin çöktürülmesi sağlandı. Aynı zamanda hem çökekte hemde süpernatantta enzim aktiviteleri ölçülerek GST enziminin amonyum sülfat çökme aralığı %20-80 olarak tespit edildi. Çalışmanın üçüncü basamağında ise amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen numunelerden glutatyon agaroz afinite kolonu kullanılarak GST enzimi saflaştırıldı.

Awasthi vd (1980), yaptığı çalışmada insan karaciğerinden GST'nin katyonik ve anyonik izoformlarını saflaştırmıştır. Saflaştırma işleminde, amonyum sülfatla fraksiyonlama sırasında anyonik GST için numune % 65 amonyum sülfat doygunluğuna getirilmiştir daha sonra bu yeni anyonik GST ω ve ψ DEAE- selüloz anyon değişim kromatografisi, sephadex G-200 jel filtrasyon kromatografisi ve izoelektrik fokuslamayla birbirinden ayrılmıştır. Loscalzo ve Freedman (1986), tarafından yapılan çalışmada GST enzimi insan trombositinden saflaştırılmıştır. Saflaştırma işleminde CM-selüloz, Sephadex G-75, afinite kromatografisi, amonyum sülfat çöktürmesi yöntemleri kullanılmıştır. Arca vd (1990)'nin E.coli'den yaptıkları çalışmada GST enzimini DEAE sephagel ve glutatyon agaroz afinite kolonu kullanılarak saflaştırılmıştır. Çelik vd (2003), glutatyon S-transferaz (GST- π) enzimini normal doğum yapmış hastanın plasentasından glutatyon-agaroz affinite kolonu kullanarak saflaştırmıştır. Huang et al. (2008), tarafından yapılan bir

çalışmada, kedi balığının bağırsak mukozasından GST enzimi glutatyon sepharoz-6B afinite kolonuyla saflaştırılmıştır (Bernard et al 2000). Bu çalışmada bıldırcın karaciğerinden GST enziminin saflaştırılmasında kullanılan glutatyon-agaroz afinite kromatografisi diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında saflaştırma süresinin az olması ve saflaştırma esnasında aktivite kaybının düşük olması gibi avantajlara sahiptir.

Bıldırcın karaciğerinden elde edilen GST enziminin kantitatif tayini Bradford metoduna göre yapıldı. Literatürde pek çok araştırmada kullanılan bu yöntem diğer protein tayin yöntemlerine göre hassasiyeti daha yüksektir ve ortamdaki bozucu faktörlerden daha az etkilenmektedir. Ayrıca renk stabilitesini uzun süre muhafaza etmektedir ve yüksek oranda tekrar edilebilir bir yöntemdir (Bradford 1976)

Bıldırcın karaciğeri GST enziminin saflık kontrolü için SDS-PAGE yapıldı ve jel fotoğrafında tek bant elde edildi (Şekil 4.4). SDS-PAGE jelinde tespit edilen tek bant enzimin saf olarak elde edildiğini gösterdi. Buna ilaveten SDS-PAGE sonucu elde edilen jel fotoğrafı kullanılarak hem enzim numunesinin hem de standart proteinlerin R_f değerleri hesaplandı ve $\log M_K - R_f$ standart grafiği çizildi. Çizilen bu standart grafik yardımıyla bıldırcın karaciğeri sitozolik GST enziminin alt birimlerine ait molekül kütlesi yaklaşık 25,1 kDa olarak belirlendi.

Literatürde farklı kaynaklardan elde edilen GST enziminin molekül kütlesinin belirlenmesi ile ilgili birçok çalışma mevcuttur. E.coli'den izole edilen GST enziminin molekül kütlesi yaklaşık olarak 22,5 kDa olduğu bildirilmiştir (Iizuka et al 1989). (Hiratsuka et al 1990) yaptıkları bir çalışmada rat karaciğerinden saflaştırdıkları GST enziminin molekül kütlesini 26 kDa olarak bulmuşlardır. Kefal balığı karaciğerinden saflaştırılan GST enziminin molekül kütlesi 23 kDa (homodimer) olarak bulunmuştur (Barcena et al 1997). Riol ve arkadaşları tarafından gökkuşağı alabalık karaciğerinden saflaştırılan GST enziminin molekül kütlesi 23 kDa (homodimer) olarak belirlenmiştir (Riol et al 2001). Bunun yanı sıra yılan balığı karaciğerinden elde edilen GST enziminin molekül kütlesi 22,3 kDa (homodimer) olduğu görülmüştür (Novoa et al 2004). Sığır eritrositlerinden ve sığır beyninden saflaştırılan GST enziminin molekül kütlelerinin sırasıyla 27 kDa (homodimer) ve 24 kDa (homodimer) oldukları rapor edilmiştir (Young et al 1989; Güvercin et al 2008). Ayrıca, insan böbreğinden elde edilen ve molekül

kütlesi 26,5 ile 24,5 kDa civarında olan farklı iki alt birimden oluşan GST izoenzimlerinin varlığına da rastlanmıştır (Singh et al 1987). Bıldırcın karaciğerinden saflaştırılan GST enziminin molekül ağırlığının rat karaciğeri, sığır eritrositleri, sığır beyni ve insan böbreğinden saflaştırılan GST enzimlerinin molekül ağırlıklarına yakın olduğu ve literatürde rapor edilen aralıkta olduğu tespit edilmiştir.

Bıldırcın karaciğerinden saflaştırılan glutatyon S-transferaz enzimi için yapılan karakterizasyon çalışmalarında enzime ait optimum pH Tris-HCl 8,5 olarak belirlendi. Daha önce farklı kaynaklardan saflaştırılan GST enzimi için, optimum pH çalışmaları gerçekleştirilmiştir. E.coli ekstraktlarından yapılan karakterizasyon çalışmalarında, GST enziminin optimum pH değeri 7,0 olarak bulunmuştur (Iizuka et al 1989). Monopterus albus balığı karaciğeri GST enzimi için optimum pH 7,0-7,5 olarak bulunmuştur (Huang et al 2008). İnsan kan serumu GST enziminin optimum pH'sı 5,5 olarak belirlenmiştir (Türkanoglu 2007). Bu çalışmalar değerlendirildiğinde bıldırcın karaciğerinden saflaştırılan GST enziminin optimum pH sı önceki çalışmalarda belirlenen optimum pH değerlerinden farklı bulunmuştur.

Enzim aktivitelerinin maksimum olduğu bir sıcaklık değeri vardır. Bu sıcaklığın dışında enzimin aktivitesi azalmaya başlar ve enzimin üç boyutlu yapısı denatürasyona uğrar. Çalışmamızda bıldırcın karaciğerinden saflaştırılan GST enziminin optimum olduğu sıcaklığı belirlemek için 0 °C ile 90 °C arasında her 10°C' de bir enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçüldü ve optimum sıcaklığı Şekil 4.8'de görüldüğü gibi 55°C olarak belirlendi. Şekil 4.8'de görüldüğü gibi enzim 90°C gibi yüksek bir sıcaklıkta bile aktivitesini kaybetmemesi enzimin bazı canlı dokularında sıcaklığa karşı stabil olduğunu göstermektedir. Bu görüşü önceki çalışmalarda destekler niteliktedir. Daha önce E.coli ekstraktlarından yapılan karakterizasyon çalışmalarında optimum sıcaklık değeri 50°C bulunmuştur (Iizuka et al 1989). Bir balık türü olan monopterus albus karaciğeri GST enziminin optimum sıcaklığı 45 °C olarak bulunmuştur (Huang et al 2008). İnsan kan serumdan GST enzimi için optimum sıcaklık 65 °C olarak belirlenmiştir (Türkanoglu 2007).

Bıldırcın karaciğerinden saflaştırılan GST enzimi aktivitesi üzerine yapılan optimum iyonik şiddet çalışmasında, enzim aktivitesinin optimum olduğu Tris-HCl tamponu 1,4 M

olarak belirlendi. Literatürde yapılan bazı çalışmalarda, insan kan serumdan GST saflaştırılarak karakterize edilmiştir. GST enziminin optimum iyonik şiddeti 2 mM potasyum fosfat tamponu olarak belirlemiştir (Türkanoglu 2007). Yine farklı bir enzim olan GR enziminin gökkuşağı alabalık karaciğerinde saflaştırılarak ölçülen optimum iyonik şiddet 50 mM Tris/HCl olarak belirlenmiştir (Tekman et al 2008). Bu çalışmalar değerlendirildiğinde bıldırcın karaciğerinden saflaştırılan GST enziminin optimum iyonik şiddeti önceki çalışmalarda belirlenen optimum iyonik şiddet değerlerinden farklı bulunmuştur.

Bıldırcın karaciğerinden elde ettiğimiz GST enziminin stabil pH'sını belirlemek amacıyla, optimum iyonik şiddete sahip potasyum fosfat ve Tris-HCl tamponları kullanılarak enzimin gösterdiği aktiviteler, 6 gün boyunca 24 saatte bir spektrofotometrik olarak ölçüldü ve enzimin stabil olduğu pH değeri Tris-HCl için 8,5 olduğu belirlendi (Şekil 4.9). GST enzimi için E.coli ekstraktlarından yapılan karakterizasyon çalışmalarında enzimin stabil pH değeri 5 ile 11 arasında geniş bir pH aralığında belirlenmiştir (Iizuka et al 1989). Yine farklı bir enzim olan GR enziminin gökkuşağı alabalık karaciğerinde saflaştırılarak ölçülen stabil pH değeri 8,0 olarak bulunmuştur (Tekman et al 2008). GST enziminin stabil pH değeri önceki çalışmalarda belirlenen aralıkta bulunmuştur.

Enzim kinetiğinde K_M değeri enzimin substrata olan ilgisinin bir göstergesidir. Araştırmamızda bıldırcın karaciğerinden saflaştırdığımız GST enziminin GSH ve CDNB substratları için K_M ve V_{max} değerleri belirlenmiştir. Bu amaçla sabit CDNB konsantrasyonunda, 5 farklı GSH konsantrasyonu kullanılarak spektrofotometrik metotla enzim aktiviteleri belirlendi. Lineveawer-Burk grafiği çizilerek bu grafikten GSH substratı için K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı (Şekil 4.10.a., Tablo 4.7). Enzimin diğer substratı olan CDNB için ise sabit GSH konsantrasyonunda, 5 farklı CDNB konsantrasyonu kullanılarak spektrofotometrik olarak enzim aktiviteleri belirlendi. Lineveawer-Burk grafiği çizilerek bu grafikten CDNB substratı için K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı (Şekil 4.10.b. Tablo 4.7). GSH için K_M sabiti 0,114 mM, V_{max} değeri ise 0,672 EÜ/mL olarak hesaplandı. CDNB için K_M sabiti 0,048 mM, V_{max} değeri ise 0,047 EÜ/mL olarak belirlendi (Tablo 4.6). Elde edilen sonuçlara göre GST enziminin daha düşük K_M sabitine sahip olan CDNB substratına ilgisinin daha fazla olduğu görüldü.

Yapılan çalışmalarda bir balık türü olan *monopterus albus* karaciğerinde GST enzimin substratları olan GSH ve CDNB için K_M sabitleri sırasıyla 0,20 mM, 0,28 mM olarak V_{max} değerleri ise 7,57 $\mu\text{mol}/\text{mg}$, 15,68 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ olarak belirlemişlerdir (Huang et al 2008).

Yapılan başka bir çalışmada glutatyon S-transferaz enzimi Tilapya (*Oreochromis niloticus*) balığının karaciğerinden saflaştırılmış ve enzimin substratları olan GSH ve CDNB için K_M sabitlerini yaklaşık olarak 0,35 mM ve 0,42 mM bulduklarını rapor edilmiştir (Hamed et al 2004). İnsan kan serumdan saflaştırılan GST enziminin substratları CDNB ve GSH için K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 2,8 mM ve 0,43 nmol/min.mg; 4,11 mM ve 0,23 nmol/min.mg protein olarak belirlenmiştir (Türkanoglu 2007).

6. SONUÇ

GST (GST; EC 2.5.1.18) kataliz reaksiyonlarında, elektrofilik substratlar üzerine glutatyon (GSH) tripeptidin nükleofilik atağını kataliz ederler. GST izoenzimleri İnsan, hayvan, bakteri ve bitki dokularında çoğu yerde farklı şekilde dağılır. GST'ler faz-II detoksifikasyon reaksiyonlarının önemli enzimlerindendir. Serbest radikaller gibi endojen ve eksojen ksenobiyotik toksik moleküllerin, glutatyon ile konjugasyonunu katalize ederek ve hücreleri yıkımdan koruyarak, önemli bir rol oynarlar. GST enzimi aynı zamanda C vitamini (askorbik asit), E vitamini (a-tokoferol), β -karoten, vb. gibi doğal bir anti-oksidan olarak kabul edilir.

Glutatyon S-transferaz, metabolizmada birkaç mekanizmayla beraber ksenobiyotiklerin uzaklaştırılmasını sağlayan önemli bir özelliğe sahiptir. Bu enzim elektrofilik ksenobiyotiklerin, indirgenmiş glutatyonla (GSH) konjugasyonunu gerçekleştirerek inaktif hale getirdikten sonra vücuttan atılmalarını sağlamaktadır (Güvercin et al 2008). Glutatyon S-transferaz izoenzimleri çok sayıda gen lokosundan sentezlenen ve molekül kütlesi 25 kDa civarında olan homodimerik ve heterodimerik proteinlerdir. Glutatyon S-transferazlar canlıların, istemli ya da istemsiz olarak maruz kaldığı ksenobiyotiklerin glutatyonla konjugasyonunu sağlayarak daha az toksik metabolitlere dönüşümünü gerçekleştiren faz-II detoksifikasyon enzim ailesinin üyesidirler (Hayes et al 2005).

Bu çalışmada GST enzimi, bıldırcın karaciğer dokularından, amonyum sülfat çöktürmesi ve glutatyon agaroz afinite kromatografisi kullanılarak 15,86 EÜ/ mg spesifik aktivite ile %12.36 verimle tek adımda 46,1 kat saflaştırıldı. Bu yöntemle kısa zamanda yüksek saflıkta enzim elde edildi. Enzimin saflık derecesi SDS-PAGE yöntemiyle kontrol edildi ve bu yöntemle GST enziminin molekül ağırlığı yaklaşık 25,1 kDa olarak tesbit edildi. Daha sonra saf enzim için karakterizasyon ve kinetik çalışmaları yapılmıştır.

Bıldırcın karaciğerinden saflaştırılan GST enziminin karakterizasyonuna yönelik yapılan çalışmaların sonucunda elde edilen veriler aşağıdaki tabloda özetlenmiştir.

Tablo 6.1. Bıldırcın karaciğeri GST enzimi için karakterizasyon sonuçları

Çalışma Tipi	Değerler
Optimum pH	8,5 Tris-HCl
Optimum iyonik şiddet	1,4 M Tris-HCl
Stabil pH	8,5 Tris-HCl
Optimum sıcaklık	55 °C
Alt birim mol kütlesi	25,1 kDa
GSH K_M	0,114 mM
GSH V_{max}	0,672 EÜ/mL
CDNB K_M	0,048 mM
CDNB V_{max}	0,047 EÜ/ mL

Bu çalışma sonucunda hücre içi antioksidan mekanizmasının çok önemli enzimlerinden biri olan glutatyon S-transferaz enzimi, besin değeri ve yumurtasından dolayı giderek artan bir öneme sahip olan bıldırcınların karaciğer dokularından amonyum sülfat çöktürmesi ve glutatyon agaroz afinite kromatografisi kullanılarak ilk defa saflaştırılarak ve karakterize edilmiştir. Bu çalışma sonuçları bundan sonra yapılacak olan çalışmalar için ışık tutacağından bilim dünyası, bıldırcın yetiştiricileri ve tüketicileri açısından önem arz etmektedir.

KAYNAKLAR

Alcher RG (1989) Biosynthesis and antioxidant function of glutathione in plants, *Physiol, Plant* 77: 457-464

Aliya S, Reddanna P, Thyagaraju K (2003) Does glutathione S-transferase Pi (GST-Pi) a marker protein for cancer? *Molecular and Cellular Biochemistry* 253: 319–327

Al-Mustafa AH (2006) In vitro Study Involving the Comparative Effect of Heavy Metal Ions on Antioxidant Enzymes Activity and Lipid Peroxide Levels in Human Erythrocytes. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 9(14): 2586-2592

Ann-Sofie, Johansson (2002) Exploring the functional plasticity of human glutathione transferases. *Biyokimya Programı (Doktora Tezi) Acta Universitatus Upsaliensis. Uppsala.* 1-56

Arca P, Garcida P, Hardisson C, Suarez JE (1990) Purification and study of a bacteril glutathione S- transferase *Area de Microbiologia, Faaultad de Medicina* 1: 77-79

Armstrong RN (1997) Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chemical Research in Toxicology* 10(1): 2-18

Asaoka K (1984) Affinity Purification and Characterization of Glutathione STransferases from Bovine Liver. *J. Biochem* 95: 685-696

Autrup H (2000) Genetic Polymorphism in Human xenobiotica Matebolizing Enzymes as Susceptibility Factors in Toxic Response. *Mutation Research* 464: 65-76

Awasthi YC, Dao DD, Saneto RP (1980) Interrelationship between anionic and cationic forms of glutathione S-transferases ofhuman liver. *Biochem J* 191: 1-10

Aydoğdu S (2013) Toksik Hepatit, Organ Nakil Merkezi, Çocuk Karaciğer Nakil Programı, İzmir

Barcena JAE, Martinez-Lara SG, George J, Lopez-Barea (1997) Purification and characterization of multiple glutathione s transferase isoenzymes from grey mullet liver.

CMLS, Cell. mol life sci 53: 759–768

Baş O (2006) Dinitrocresol'ün (Rat Rattus Norvegicus) Sıçan Glutasyon S-Transferaz Enzim Aktivitesine Etkisi (Yüksek Lisans Tezi)

Blokhina O, Virolinen E, Fagerstedt KV (2002) Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review. *Annals of Botany* 91: 179-194

Booth J, Boyland E and Sims P (1961) *Biochem. J* 79: 516-524

Boyer TD, Kenney WC (1985) Preparation, characterization and properties of glutathione S-transferases. In: Zakim D, Vessey DA, eds. *Biochemical pharmacology and toxicology: Methodological aspects of drug metabolizing enzymes*. New York: John Wiley&Sons Inc 297-363

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-251

Carver DG, Hines RN (2002) The Ontogeny of Human Drug-Metabolizing Enzymes: Phase II Conjugation Enzymes and Regulatory Mechanisms. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics JPET* 300: 361-366

Casalino E, Sblano C, Landriscina V, Calzaretto G, Landriscina C (2004) Rat Liver Glutathione S-transferase Activity Stimulation Following Acute Cadmium or Manganese Intoxication. *Toxicol* 200: 29-38

Catherine AP, Dao DD, Awasthi YC (1984) Glutathione S-transferases of lung: purification and characterization of human lung glutathione S-transferases, *Lung* 1(162): 27-33

Cnubben NHP, Rietjens IMCM, Wortelboer H, van Zanden J, van Bladeren PJ (2001) The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 10: 141- 152

Çelik VK, Armutcu F, Aker A (2003) Human Placental Glutathione-S-Transferase: Isolation, Kinetic Properties and in vitro Interactions with Several Drugs. *C. Ü. Tıp Fakültesi Dergisi* 25(4): 187-192

Çetinkaya S, Pınarbaşı H, Pınarbaşı E, Çetinkaya Ö, Atalay A (1993) Ranitidin verilmiş ratlarda karaciğer ve böbrek glutasyon S-transferaz aktiviteleri. *C.Ü. Tıp Fakültesi*

Dergisi 15 (2)

Çoşkun G (2007) Glutation-S-transferaz enziminin farklı taşıyıcılarda immobilizasyonu ve bazı özelliklerinin incelenmesi. (Doktora Tezi), Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir

Dawn B, Marks, Allan D, Mark, Colleen M, Smith (1996) Basic Medical Biochemistry a clinical approach. A Wawely Company

Devlin TM (2002) Biochemistry with Clinical Correlations, Kanada

Drog F (1997) Plant Glutathione S-Transferases, a Tale of Theta and Tau. J. Plant Growth Regul 16: 95-107

Eaton DL, Bammler TK (1999) Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. Toxicol Sci. Jun 49(Suppl 2): 156-64

Erat M and Şakiroğlu H (2013) The effect of some antineoplastic agents on glutathione S-transferase from human erythrocytes. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry 28(4): 711-6

Fleischn GK, Kamisaka IM, Arias (1976) Immunoloanalysis of Rats and Human Ligandins. Glutathione: Metabolism and Function, 229

Geçkil H (2012) Biyokimya I. İnönü Üniversitesi, 137

Gözükara ME (1997) Biyokimya, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 1225

Güvercin S, Erat M, Şakiroğlu H (2008) Determination of Some Kinetic and Characteristic Properties of Glutathione S-transferase from Bovine Erythrocytes. Protein & Peptide Letters 15: 000-000

Gyamfi MA, Ohtani II, Shinno E, Aniya Y (2004) Inhibition of glutathionestransferases by thonningianin A, isolated from the African medicinal herb, Thonningia sanguinea, in vitro. Food and Chemical Toxicology 42(9): 1401-1418

Habdous M, Vincent-Viry M, Visvikis S, Siest G (2002) Rapid spectrophotometric method for serum glutathione S-transferases activity. Clinica Chimica Acta 326: 131-142

Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974) Glutathione S- transferases. The first

enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 246: 7130-7139

Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR (2005) Glutathione Transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* 45: 51-88

Hayes JD, Pulford DJ (1995) The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *CRC Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol* 30: 445–600

Hee-Joong P, Hyun-Young C, Kwang-Hoon K* (2005) Purification and Biochemical Properties of Glutathione S-Transferase from *Lactuca sativa*. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 38(2): 232-237

Hiratsuka A, Sebata N, Kawashima K, Okuda H, Ogura K, Watabe T, Satoh K, Hatayama I, Tsuchida S, Ann Ishikawa TA (1990) New class of rat glutathione S-transferase Yrs-Yrs inactivating reactive sulfate esters as metabolites of carcinogenic arylmethanols. *THE Journal of Biological Chemistry* 265(20): 188, 11973-11981

Howie AF, Hoyes JD, Beckett GJ (1988) Purification of acidic glutathione S-transferase from human lung, placenta and erythrocyte and the development of a specific radioimmunoassay for their measurement. *Clinica Chimica Acta* 177: 65-76

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

Iizuka M, Inoue Y, Murata K, Kimura A (1989) Purification and Some Properties of Glutathione S-Transferase from *Escherichia coli* B. *Journal Of Bacteriology*, Nov, 6039-6042

Jagt DLV, Hunsaker LA, Garcia KB, Royer RE (1985) Isolation and Characterization of Multiple Glutathione S-Transferase from Human Liver. Evidence For Unique Heme-Binding Sites 260(21): 11603-11610

Kashiwada M, Kitada M, Shimada T, Itahashi K, Sato K, Kamataki T (1991) Purification and Characterization of Acidic Form of Glutathione S-Transferase in Human Fetal Livers. High Similarity to Placental Form *J. Biochem* 110: 743-747

Keha E, Küfrevioglu Öİ (2009) *Biyokimya, Aktif Yayınevi, Erzurum*, 637

Koolman J, Klaus-Henrich R, Jürgen W (2003) *Renkli Biyokimya Atlası, Çeviri Editörleri: Doç. Dr. Akın Yeşilkaya, Doç. Dr. Aslı Baykal, Dr Özgül Alper, Nobel Tıp*

Kitapevleri, Ankara

Kosower EM (1976) Chemical properties of glutathione. In Glutathione metabolism and function, ed. Irwin M, Arias and William B Jakoky, Raven Press, New York

Lee WM (2003) Drug-induced hepatotoxicity. N Engl J Med 349: 474-485

Lehninger AL. Principles of biochemistry. Newyork: Worth Publishers Inc (2005)

Liebman JF, Greenberg A (1988) Mechanistic principles of enzyme activity VCH Publishers, New York

Lineweaver H, Burk D (1934) The determination of enzyme dissociation constants, J. Am. Chem. Soc 57: 658-666

Loscalzo J, Freedman J (1986) Purification and characterization of human platelet glutathione-S transferase From bloodjournal.hematologylibrary.org by guest on 67: 1595-1599

Luty S, Latuszynska J, Halliop J, Tochman A, Obuchowska D, Przylepa E, Korczak E, Bychawski E (1998) Toxicity of dermally absorbed dichlorvos in rats. Ann Agric. Environ Med 5: 57-64

Martinez-Lara E, George SG, Lopez-Barea J, Barcena JA (1997) Purification and characterization of multiple glutathione S transferase isoenzymes from grey mullet liver. CMLS, Cell. mol life sci 53: 759–768

Nelson DL and Cox MM (2004) Lehninger Principles of Biochemistry, Fourth edition. W.H. Freeman and Company, New York

Nobel Lecture, James Eat the right time? from The Nobel Lecture (1974) G.E. Palade act[ing] as the overseers” - Nobel Lecture (1907)

Novoa-Valinas MC, Perez-Lopez M, Melgar MJ, (2002) Comparative study of the purification and characterization of the cytosolic Glutathione S-transferase from two salmonid species: Atlantic salmon (*Salmo solar*) and Brown trout (*Salmo Trutta*) Comparative Biochemistry and physiology, part C 131: 207-213

Onat T (1996) Eritrosit Biyokimyasi. In Emerk K, Onat T ed. Temel Biyokimya Izmir, Saray medikal yayincilik 865-879

Orhan H (1994) Sıklıkla maruz kalınabilen ya da ilaç olarak kullanılan bazı kimyasal maddelerin insan eritrosit glutatyon S-transferaz aktivitesine etkilerinin in vitro incelenmesi. (Bilim Uzmanlığı Tezi) Ankara

Oshino R, Kamei K, Nishioka ZM, Shin M (1989) Purification and Characterization of Glutathione S-Transferases from Guinea Pig Liver. *J. Biochem* 107: 105-110

Pabst MJ, Habig WH, Jakoby WB (1974) Glutathione S-Transferase A. *The Journal of Biological Chemistry* 249: 7140-7150

Riol MJM, Valiñas MCN, Fernández MAG, López MP (1989) Glutathione S-transferases from rainbow trout liver and freshly isolated hepatocytes: purification and characterization. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 128(2): 227-235

Schröder P (2001) The role of glutathione and glutathione s- transferses in plant reaction and adaption to xenobiotics, Significance of Glutathione to Plant Adaptation to the Environment *Plant Ecophysiology* 2: 155-183

Seidegard J, Ekström G (1997) The Role of Human Glutathione-S-Transferases and Epoxide Hydrolases in the Metabolism of Xenobiotics. *Environmental Health Perspectives* 105: 791-799

Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA (2001) Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of nonmammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J* 360, 116

Singh SV, Leal T, Ansari GAS, Awasthi YC (1987) Purification and characterization of glutathione S-transferases of human kidney. *Biochem. J* 246: 179-186

Söyüt H (2006) Gökkuşluğu alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) dokularından karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu ve kinetik özelliklerinin incelenmesi. (Doktora Tezi) Erzurum

Strange RC, Spiteri MA, Ramachandran S, Fryer AA (2001) Glutathione Stransferase family of enzymes. *Mutation Research* 482: 21-26

Tamaki H, Kumagai H, Tochikura T (1989) Purification and Properties of Glutathione Transferase from *Issatchenkia orientalis*. *Journal of Bacteriology* 171(2): 1173-1177

Tuna, Gamze (2008) Sıçan ince bağırsak glutatyon S-transferaz enziminin saflaştırılması

ve izozimlerinin hiperisin bileşği ile bağlanma özelliklerinin incelenmesi. (Yüksek lisans tezi) Hacettepe üniversitesi, H.Ü.B.A.B. 06. D06. 101. 1001

Türkanoğlu, Aysun (2007) Human Serum Arylesterase And Glutathione S-transferase activities in patients with ischemic stroke compared to healthy controls. Approval of the Thesis Master of Science in Biochemistry Department, Middle East Technical University.

Udomsinprasert R, Pongjaroenkit S, Wongsantichon J, Oakley AJ, Prapanthadara LA, Wilce MC, Ketterman AJ (2005) Identification, characterization and structure of a new Delta class glutathione transferase isoenzyme, Biochem. J 388: 763–71

Vessey DA, Boyer TD (1988) Characterization of the activation of rat liv glutathione S transferases by nonsubstrate ligands. Toxicol Appl Pharmacol 93: 275-280

Wormhauadt LW, Commandeur JNM, Vermeulen NPE (1999) Genetic polymorphisms of human N-acetyl-transferase, cytochrome p450, GST and Epoxide Hydrolase Enzymes: Relevance to Xenobiotic Metabolism and Toxicity. Critical Reviews in Toxicology 29: 59-124

Yalçın AS (1998) Antioksidanlar, Klinik Gelişim 11: 342-346

Young PR and Briedis AV (1989) Purification and kinetic mechanism of the major glutathione S-transferase from bovine brain. Biochem. J 257: 541- 548

ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Van'ın Muradiye ilçesinde doğdu. İlkokulu Muradiye yatılı ilköğretim bölge okulunda başlayıp Çaldıran yatılı ilköğretim bölge okulunda tamamladı. Lise öğrenimini Balıkesir lisesinde tamamladı. 2007 yılında Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Gıda Teknolojileri Bölümünü kazandı. 2011 yılında girmiş olduğu Dikey Geçiş Sınavıyla Bingöl Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünü kazandı. 2014 yılında mezun olduğu bölümden 2015-2018 yılları arasında yüksek lisansını yaptı.