

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

**GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİMİNİN TAVUK
TAŞLIĞINDAN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ramazan OKAN

KİMYA ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ

BİNGÖL-2025

**GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİMİNİN TAVUK
TAŞLIĞINDAN SAFLAŞTIRILMASI VE
KARAKTERİZASYONU**

Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ danışmanlığında, Ramazan OKAN tarafından hazırlanan bu çalışma 27/02/2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan	: Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ	İmza	:
Üye	: Doç. Dr. Pınar GÜLLER	İmza	:
Üye	: Doç. Dr. Yusuf TEMEL	İmza	:

Yukarıdaki sonuç;

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

Prof. Dr. Zafer ŞİAR
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimime başladığım ilk günden bu yana teorik ve uygulamalı derslerimde bana her konuda yardımcı olan, bilgi, deneyim ve tecrübelerinden mutlak surette faydalanmamı sağlayan danışman hocam, Bingöl Üniversitesi Veteriner Fakültesi öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ'ye, bilgilerinden çokça istifade ettiğim Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Yusuf TEMEL ve Doç. Dr. Adnan AYNA'ya ve desteklerinden dolayı Kimya bölümünde görevli öğretim üyelerine ayrıca eğitim hayatım boyunca desteklerini esirgemeyen aileme ve laboratuvar çalışmalarını birlikte sürdürdüğümüz öğrenci arkadaşlarıma teşekkür ederim. Ayrıca tez çalışmama desteklerinden dolayı Bingöl Üniversitesi Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine (BAP-FEF-2024-004) teşekkürlerimi sunarım.

Ramazan OKAN

Bingöl 2025

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ŞEKİLLER LİSTESİ	iv
TABLolar LİSTESİ.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	vii
ÖZET.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Enzimler.....	1
1.2. Glutasyon.....	5
1.3. Glutasyon S- Transferaz.....	6
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	16
3. MATERYAL VE YÖNTEMLER.....	22
3.1. Materyaller.....	22
3.1.1. Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	22
3.1.2. Faydalanılan Cihaz ve Aletler.....	22
3.1.3. Çalışmalar İçin Hazırlanan Çözeltiler.....	23
3.1.3.1. Enzim Aktivite Ölçümü İçin Hazırlanan Çözeltiler.....	23
3.1.3.2. Homojenat Tamponu.....	23
3.1.3.3. Enzim Saflaştırılmasında Kullanılan Çözeltiler.....	23
3.1.3.4. Bradford Yöntemiyle Protein Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler.....	24
3.1.3.5. Elektrophorez İşlemi İçin Hazırlanan Çözeltiler.....	24
3.2. Yöntemler.....	25
3.2.1. Protein Tayini.....	25
3.2.1.1. Kalitatif Protein Tayini.....	25
3.2.1.2. Bradford Yöntemi ile Protein Tayini.....	26
3.2.2. Glutasyon S-Transferaz Enziminin Aktivite Tayini.....	26
3.2.3. GST Enzimi İçin Afinite Jelinin Hazırlanması.....	28

3.2.4. Tavuk Taşlığından GST Enziminin Saflaştırılması.....	28
3.2.4.1. Tavuk Taşlığı Temini ve Homojenat Hazırlanması.....	28
3.2.4.2. Amonyum Sülfat Çöktürmesi.....	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 Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları.....	31
3.3.1. Optimum pH'nın Belirlenmesi.....	31
3.3.2. Stabil pH'nın Belirlenmesi.....	31
3.3.3. Optimum İyonik Şiddetin Belirlenmesi.....	32
3.3.4. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi.....	32
3.3.5. GST Substratları İçin K_M ve V_{max} Değerlerinin Bulunmasına Yönelik Çalışmalar.....	32
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	33
4.1. $(NH_4)_2SO_4$ Çöktürmesi.....	33
4.2. Protein Tayini Sonuçları.....	34
4.3. Enzim Elüsyonunun Sonuçları.....	34
4.4. Enziminin Saflaştırılması Esnasında Elde Edilen Sonuçlar.....	35
4.5. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Filtrasyonu Metodu Kullanılarak Enzim Saflık Derecesinin Tespiti Sonuçları.....	35
4.6. Tavuk Taşlık Dokusundan Saflaştırılan Enziminin Molekül Ağırlığının Tespitine Dair Sonuçlar.....	36
4.7. Enzimin Karakterizasyon Çalışmaları.....	37
4.7.1. Optimum pH Çalışmalarının Sonuçları.....	37
4.7.2. Stabil pH'nın Belirlenmesi İçin Yapılan Çalışma Sonuçları.....	38
4.7.3. Optimum İyonik Şiddetin Hesaplanması İçin Elde Edilen Sonuçlar.....	40
4.7.4. Sıcaklığın Enzim Aktivitesine Etkisinin Belirlenmesi Sonuçları.....	40
4.7.5. Kinetik Çalışma Sonuçları.....	41
5. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	44
KAYNAKLAR.....	52

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. GSH'Yapısı.....	6
Şekil 1.2. Dimerik Glutatyon S-Tansferaz enziminin aktif bölgelerinin gösterimi (Ji et al 1994).....	8
Şekil 1.3. Detoksifikasyonda Faz I, Faz II ve Faz III reaksiyonları (Aydoğdu2012)....	10
Şekil 1.4. Glutatyon S-transferaz enziminin katalizlediği reaksiyon (Habdous et al 2002).....	11
Şekil 1.5. Glutatyon S-tranferazın katalizlediği reaksiyonlardan biri.....	13
Şekil 1.6. Glutatyon S-transferazın enzimlerinin katalizlediği bazı reaksiyonların tepkimleri.....	14
Şekil 3.1. Spektrofotometrik olarak GST enziminin aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan ürünün oluşum mekanizması (Habdous et al 2002).....	27
Şekil 4.1. (NH ₄) ₂ SO ₄ çöktürmesi sonuçları grafiği.....	33
Şekil 4.2. Kantitatif protein tayini için oluşturulan Absorbans – Protein miktarı Grafiği.....	34
Şekil 4.3. Afinite kolonundan enzim saflaştırılırken elde edilen elüsyon grafi.....	35
Şekil 4.4. Saf enzim ve standartlar için elde edilen elektroforez fotoğrafı (1. ve 2. kuyu: Saf enzim, 3: Standart proteinler (175-130-95-70-62-51-42-29-22-14-10,5 kDa).....	36
Şekil 4.5. Enzimin molekül kütlesinin hesaplanmasında kullanılan Log _{MR} - R _f Grafiği.....	37
Şekil 4.6. Optimum pH'nın bulunması için elde edilen aktivite ölçüm sonuçları Grafiği.....	38
Şekil 4.7. Stabil pH'nın belirlenmesi için KH ₂ PO ₄ tamponu ile elde edilen aktivite Sonuçları Grafiği.....	39
Şekil 4.8. Stabil pH'nın belirlenmesi amacıyla Tris-HCl tamponu kullanılarak elde edilen Zaman-Aktivite grafiği.....	39

Şekil 4.9. Enzimin optimum iyonik şiddetinin belirlenmesinde kullanılan Tris-HCl tamponu ile elde edilen ölçüm sonuçları grafiği.....	40
Şekil 4.10. Enzim için belirlenen sıcaklık - aktivite grafiği.....	41
Şekil 4.11. CDNB substratı için K_M ve V_{max} 'ın tespit edilmesi için çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	42
Şekil 4.12. GSH substratı için K_M ve V_{max} 'ın tespit edilmesi için çizilen Lineweaver- Burk grafiği.....	42

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 1.1. Glutatyon S-transferaz enziminin aminoasit içeriği (molekül başına) (Fleischn et al. 1976; Baş 2006).....	9
Tablo 1.2. Sitosolik glutatyon S-transferaz enziminin sınıfları, bulunduğu yerler.....	11
Tablo 1.3. Glutatyon S-transferazın bazı substratları.....	13
Tablo 1.4. Glutatyon S-transferazın enzimlerinin görev yaptığı reaksiyon örnekleri....	14
Tablo 3.1. GST enziminin aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler ve miktarları.....	27
Tablo 4.1. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürmesinin verileri.....	33
Tablo 4.2. Enzimin saflaştırma parametreleri.....	35
Tablo 4.3. Optimum pH'nın bulunması için elde edilen aktivite ölçüm sonuçları.....	37
Tablo 4.4. Stabil pH'nın belirlenmesi için KH_2PO_4 tamponu ile elde edilen aktivite Sonuçları.....	38
Tablo 4.5. Stabil pH'nın belirlenmesi için Tris-HCl tamponu kullanılarak ölçülen aktivite sonuçları.....	39
Tablo 4.6. Enzimin optimum iyonik şiddetinin belirlenmesinde kullanılan Tris-HCl tamponu ile elde edilen ölçüm sonuçları.....	40
Tablo 4.7. Sıcaklığın enzim aktivitesine etkisinin sonuçlarının verileri.....	41
Tablo 4.8. CDNB ve GSH substratları için hesaplanan V_{max} ve K_M değerleri.....	43
Tablo 6.1. Tavuk taşığı GST enzimi için karakterizasyon sonuçları.....	51

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

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	: İndirgenmiş glutasyon
RNA	: Ribonükleik asit
Da	: Dalton
E	: Enzim
EC	: Enzim kodu
ES	: Enzim Substrat kompleksi
I	: İnhibitör
IC ₅₀	: Maksimum hızı yarıya indiren inhibitör konsantrasyonu
K _i	: Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti
kDa	: Kilodalton
MK	: Molekül kütlesi
S	: Substrat
V _{max}	: Maksimum hız
mL	: Mili Litre
mg	: Mili gram
mM	: Mili molar

GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİMİNİN TAVUK TAŞLIĞINDAN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

ÖZET

Glutasyon S-transferaz (GST; EC 2.5.1.18) enzimini tavuk taşığında saflaştırmak için gerçekleştirilen bu çalışmada yöntem olarak glutasyon-agaroz afinite kromatografisi ve amonyum sülfat çöktürmesinden faydalanıldı. Çalışma neticesinde 69,17 EÜ/mg protein, spesifik aktiviteyle %85,42 verim elde edilerek, 1441 kat saflaştırıldı. Tek bantlı görüntü elde etmek, alt birim molekül kütlelerini belirlemek ve enzim saflığını kontrol etmek için SDS-PAGE çalışması gerçekleştirildi. Çalışma sonunda görüntü tek bant olarak elde edildi. Alt birim molekül kütlesi yaklaşık 25,66 kDa olarak belirlenen tavuk taşığı GST enzimi için karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Karakterizasyon çalışmalarıyla birlikte optimum iyonik şiddet, Tris-HCl tamponunda 300 mM olarak belirlendi. Optimum pH, K-fosfat tamponunda pH= 7,5 iken optimum sıcaklıkta 40 °C olarak bulundu. Stabil pH ise K-fosfat tamponunda pH= 7,0-7,5 olarak elde edildi. Saflaştırılan enzim için K_M ve V_{max} değerleri belirlendi. Değerler belirlenirken Lineweaver-Burk grafiğinden yararlanıldı. CDNB substratında K_M , 11,4761 mM iken V_{max} , 0,5837 EÜ/mL olarak belirlendi. GSH substratında ise K_M , 11,1348 mM, V_{max} ise 0,75205 EÜ/mL olacak şekilde sonuçlandırıldı.

Anahtar Kelimeler: Tavuk taşığı, Karakterizasyon Çalışmaları, Glutasyon S-Transferaz (GST) enzimi, Saflaştırma.

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASE ENZYME FROM CHICKEN GIZZARD

ABSTRACT

In this study, which was carried out to purify the glutathione S-transferase (GST; EC 2.5.1.18) enzyme from chicken gizzard, glutathione-agarose affinity chromatography and ammonium sulfate precipitation were used as methods. As a result of the study, 69.17 EU/mg protein was purified 1441 times, achieving 85.42% yield with specific activity. SDS-PAGE study was performed to obtain single-band image, determine subunit molecular masses and check enzyme purity. At the end of the study, the image was obtained as a single band. Characterization studies were carried out for the Chicken gizzard GST enzyme, whose subunit molecular mass was determined to be approximately 25.66 kDa. With the characterization studies, the optimum ionic strength was determined as 300 mM in Tris-HCl buffer. The optimum pH was found to be pH= 7.5 in K-fosfat buffer and the optimum temperature was 40 °C. Stable pH was obtained as pH= 7.0-7.5 in K-fosfat buffer. K_M and V_{max} values were determined for the purified enzyme. The Lineweaver-Burk chart was used to determine the values. While K_M was determined as 11.4761 mM in CDNB substrate, V_{max} was determined as 0.5837 EU/mL. For GSH substrate, K_M was found to be 11.1348 mM and V_{max} was 0.75205 EU/mL.

Keywords: Chicken gizzard, Characterization Studies, Glutathione S-Transferase (GST) Enzyme, Purification.

1. GİRİŞ

1.1 Enzimler

Enzimler spesifik ve stabil biyokatalizörlerdir. Yakın geçmişte farklı endüstriyel üretimlerde çevre dostu biyoteknolojik sahada kullanımları yaygın bir hal almıştır. Bundan ötürü farklı ürünlerin üretilmesinin hızlandırılmasında daha verimli enzimlerin ve enzim çeşidinin bulunması son derece önemlidir (Pandey ve ark., 2017).

Bütün canlıların hayatîyetlerini sürdürebilmeleri adına dış kaynaklardan aldıkları besinleri yapılarıyla uyumlu biyomoleküllere dönüştürme işlemini seçici ve etkili bir şekilde yapmaları gerekir. Enzimler canlılarda, bu dönüştürme işlemi sırasında meydana gelen kimyasal reaksiyonları hızlandırma görevini üstlenip, herhangi bir yan ürün olmaksızın %100'lük verim oranı olan biyolojik katalizörlerdir. Proteinlerin en kompleks ve özelleşmiş hali enzimlerdir. Bilinen bütün enzimler protein yapısındayken, küçük bir RNA grubu bu protein yapısının dışındadır ve bu küçük RNA grubu katalitik aktivite gösterir (Nelson and Cox, 2004).

Enzimler, hücre içerisindeki varyasyonlar, parçalanmalar, biyosentezler gibi birçok faaliyette yer alan, farklı amaçlarla işlev gören biyolojik katalizörlerdir. Enzimlerin keşfedilme süreci 1700'li yılların sonunda başlamıştır. Bu süreçte midede bulunan salgıların etin sindirimine nasıl etki ettiğinin araştırılma çalışmaları sonucunda tespit edilmiştir (Nelson ve Cox, 2016). 1835 yılında katalizör bir terim olarak ilk defa kullanılmıştır. Bu terimi kullanan ilk bilim adamı da Jöns Jacob Berzelius olarak bilim tarihine geçmiştir.(Marks vd, 1996).

Katalizleme fonksiyonları iki ayrı şekilde yapılabilir. Bazı enzimler yalnızca protein yapılarıyla bu işlemi gerçekleştirirken bazı enzimlerde protein yapısı olmadan gerçekleştirebilir. Ancak bunu yapabilmek için kofaktör olarak adlandırılan ek gruplara ihtiyaç duyarlar. Katalizleme fonksiyonlarının gerçekleşebilmesi için ihtiyaç duyulan kofaktör sabit değildir. Bazen bir metal iyonu olan kofaktör bazen de koenzim diye

adlandırılan kompleks bir organik bileşiktir. Bazı durumlardada aktivitenin olabilmesi için her ikisininde olması gerekebilir (Onat, 1996).

Haloenzim, enzim kofaktör kompleksinin katalitik olarak aktif olan kısmıdır. Kofaktörsüz protein apoprotein olarak adlandırılırken, kofaktörsüz enzime apoenzim denir (Onat, 1996). Apoenzim olarak adlandırılan enzimler katalitik olarak inaktif olan gruptur. Kofaktörlü enzimlerin, kofaktörlerine karşı afinite dereceleri aynı değildir. Afinite dereceleri farklı olan bu kofaktörlerin arındırılmaları diyaliz yoluyla mümkündür. Ancak bu işlem bütün kofaktörler için geçerli olmayabilir. Örneğin kovalent yapıda olan kofaktörler ya da diyaliz yoluyla uzaklaştırılamayacak derecede sıkı bağlanmış kofaktörlerde bulunmaktadır. Bu tarz gruplara prostetik gruplar denilmektedir. Bu şekilde kofaktörü kendisinden uzaklaştırılmış olan enzimler aktivite kaybına uğrar (Lehninger 2000; Keha ve Küfrevioğlu, 2004).

Bazı bileşiklerin enzim aktivitesini olumlu yönde etkiledikleri bilinmektedir. Bu bileşiklere aktivatör adı verilir. Aktivatörler genel anlamda küçük iyonlardan oluşmaktadır. Aktivatörler kofaktörler gibi kataliz olayına daima dâhil olmazlar. İki grup aktivatörden bahsetmek mümkündür. Aktivatör rolünü yalnızca substratla birleşerek gerçekleştirenler ve bu rolü serbest enzimle birleşerek gerçekleştiren bileşikler olarak ikiye ayırabiliriz (Gözükara, 1989).

Bazı bileşikler enzimlerin “*in vivo*” ve “*in vitro*” aktivitelerini yavaşlatılır veya durdurur. Bu olaya “inhibisyon” denir. Bu olayı gerçekleştiren bileşiklerde “inhibitör” olarak tanımlanır. İnhibitörler sıklıkla molekül kütlesi küçük bileşikler ya da iyonlardan oluşur. Enzimatik inhibisyon olayı dönüşümlü ve dönüşümsüz inhibisyon olarak başlıca ikiye ayrılır. Dönüşümsüz inhibisyon gerçekleşirken enzimin sahip olduğu bir ya da birden fazla fonksiyon gösteren grup etkilenir. İnhibitör, enzimle ya kovalent bağ kurar veyahut kompleks oluşturur. Bu durumda V_{max} ’ın azaldığı görülürken, K_M değişime uğramaz. Dönüşümlü inhibisyonunda ise dönüşümsüz inhibisyonun tam tersi olarak enzim ile inhibitör etkileşmesinin bir denge tepkimesi şeklinde gerçekleştiği görülür (Özaslan, 2014).

Kinetik yönüyle oldukça kararlı olan biyomoleküller, kendi başlarına reaksiyon vermezler, bundan dolayı hücrelerde gerçekleşen bütün kimyasal reaksiyonlar enzimler aracılığıyla gerçekleşmektedir. Enzimler, protein yapısında olup amino asit sıralaması tamamen DNA üzerindeki kodonlara bağlı olarak oluşturulur. Böylelikle gerçekleşen protein sentez olaylarının tamamı DNA molekülünde bulunana şifreler çerçevesinde düzenlendiği ve kontrol edildiği sonucuna ortaya çıkar. Hücreleri birbirinden ayıran özelliklerine ait bilgilerin DNA'dan aktarılmasını sağlayan en önemli ajan enzimlerdir (Türkan, 2015).

Enzimlerin adlandırılması aktiflik ya da inaktiflik durumlarına göre yapılır. Eğer enzim inaktif ise substrat molekülünün sonuna “jen” eki getirilip adlandırma yapılır. Aktif olan enzimlerde ise katalizinde bulundukları reaksiyonun türüne göre substratın sonuna “ase=az” eki getirilerek isimlendirme yapılır (Sümengen, 2011).

Yapılan çalışmalar neticesinde var olduğu bilinen enzim sayısının şuanda 2000'i geçtiği bilinmektedir. Reaksiyon ve substrat spesifikliği dikkate alınarak enzimler için bir sınıflandırma tekniği geliştirilmiştir. Bu sınıflandırma şeklinde 6 temel sınıf vardır. Sınıflandırmaya enzimler EC koduyla girerler. EC kodu dört basamaklı bir sayıdan oluşur. Dört basamaklı sayıdan ilki bahsedilen 6 temel sınıftan birine üyeliğini gösterir. İkinci basamak alt sınıfı gösterirken üçüncü basamak alt-alt sınıfları temsil eder. Enzimin alt sınıftaki sırasını ise son basamak gösterir. Bu temel sınıflar hiçbir şekilde farklı reaksiyon spesifikliğine sahip enzimleri içermezler her biri aynı reaksiyon spesifikliğine sahip enzimleri bulundurur (Koolman et al 2003; Keha ve Küfrevioğlu, 2012). Enzimlerin sınıflandırılması aşağıdaki şekilde ön görülmüştür.

1. Oksidoredüktazlar: Yükseltgenme ve indirgenme tepkimelerini katalizleyen enzimler bu sınıfta yer alır.

2. Transferazlar: Hidrojen haricindeki verici bir molekülden alıcı bir moleküle fonksiyonel grupların transferini sağlayan enzim grubudur.

3. Hidrolazlar: Bağılara su ekleyerek ester, eter, glikozit, anhidrit veya P-N vb. bağlarının kırılmasını sağlayan enzimlerdir.

4. Liyazlar: Bu enzim grubu hidrolizden farklı olarak susuz ortamda yer alan grupların uzaklaştırılmasını katalizler. Liyazların kullanılan ismi dışında dekarboksilaz, dehidrataz ve aldolaz gibi isimleri de bulunmaktadır.

5. İzomerazlar: İzomerlerin geometrik, yapısal ve optik olanlarının birbirlerine dönüşüm reaksiyonlarını katalizlerler.

6. Ligazlar: ATP ve GTP fosfat bileşikleri enerjisi yüksek bileşiklerdir. Bu bileşiklerdeki fosfat bağının kopması sonucu ortaya yüksek bir enerji çıkar. Ortaya çıkan bu yüksek enerjiyle iki molekülün bağlanması reaksiyonlarını katalizleyen gruba da ligazlar denir (Keha ve Küfrevioğlu, 2012).

Enzim saflaştırma işlemi bilindiği üzere kolay bir işlem değildir. İşlemin zorluğundan ötürü bir çözültideki enzim varlığı tespit edilirken birçok değişkene bakılır. Bu değişkenlerin başında enzimin etkilediği substrat molekülü yahut reaksiyondan sonra oluşan ürün gelir. Bunların dışında enzimatik reaksiyona aracılık eden diğer değişkenlere bakılır (Söyüt, 2006). Enzim aktivitesini etkileyen faktörleri belirtmek gerekirse; sıcaklık substrat konsantrasyonu, inhibitör varlığı ve aktivatörlerin varlığı, iyonik şiddet, pH ve enzim konsantrasyonu olarak sayılabilir.

Enzimlerin bu çağda hemen her alanda yarar sağladığı bilinmektedir. Endüstriyel alanlardan birkaç örnek vermek gerekirse ilaç, kimya ve gıda gibi alanlarda; boya üretiminden dericiliğe kadar birçok alanda; biyoteknolojik alanlardan tıp, tarım ve veterinerliğe kadar birçok konuda enzimlerden fayda sağlanmaktadır. Bilimsel araştırmalarda enzimler büyük yer edinmektedir. Biyokimyasal araştırmaların tarihi sürecinde araştırma konularının çoğunda enzimleri görmek mümkündür (Keha ve Küfrevioğlu, 2009). Bugün tıp alanında enzimlerin ayrıcalıklı bir yeri olduğunu kabul etmek gerekir. Sağlık, hastalık, tanı ve tedavi gibi süreçlerde enzimlerin vazgeçilmez

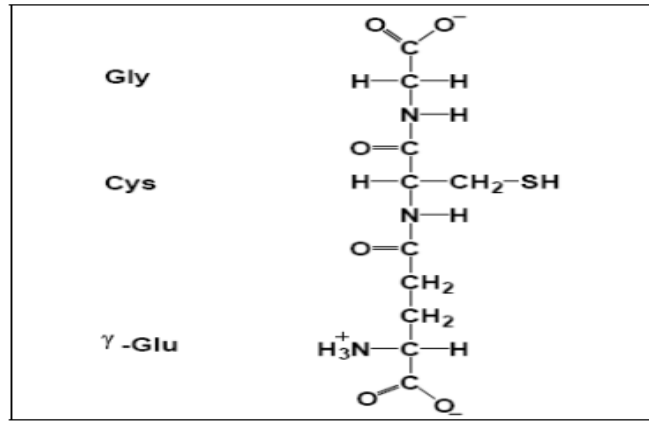
görev ve katkıları vardır. Birçok kalıtsal bozukluğun tespitinde ve hastalıkların tanısı koyulurken enzimlerin kalitatif ve kantitatif tayinlerine başvurulur. Bu tayinler sonucunda hastalığın ilerleyişi ve geleceği gibi bulguları tespit edilmektedir (Onat, 1996). Şu ana kadar tanımlanan 2000'e yakın enzim vardır. Bu enzimleri kristallendirmek için birçok çalışma yapılmıştır. Yapılan çalışmalar neticesinde birçok enzim saflaştırma işleminden geçerek karakterizasyonu yapılmıştır. Saflaştırma ve karakterizasyon işlemlerinden sonra 200'den fazla enzim kristal olarak elde edilmiştir (Keha ve Küfrevioğlu, 2009).

1.2. Glutasyon

Redükte glutasyon (GSH) hemen hemen bütün canlılarda bulunan ve iyi bilinen bir tripeptiddir. Glutasyonun yapısında 2 adet peptit bağı, 2 adet karboksil grubu, 1 adet amino grubu ve 1 adet tiyol grubu içermektedir. Polar uçlarının çok olması ve molekülünün küçük mol ağırlığına sahip olması onun sudaki çözünürlüğünün pozitif yönde artmasına yardımcı olmaktadır (Kosower, 1976).

Glutasyon bitki, hayvan ve mikroorganizmaların hücre sitozollerinde fazla miktarda yer alır. Glutasyonun bilinen önemli görevleri olarak hücreyi zehirli metabolitlerden temizlemek ve hücrelerde bulunan sülfhidril grubunun devamlılığını sağlamak olduğunu belirtmek mümkündür (Liebman, 1988)

(GSH) alyuvarlarda sülfhidril tamponu olarak görev yapar. Bu görevi hemoglobin ve eritrosit proteinlerinin içerisinde bulunan sistein rezidülerini indirgenmiş halde tutarak yapmaktadır. GSH/GSSG oranı kırmızı kan hücrelerinde belli bir orandadır. Bu oran yaklaşık olarak 500'dür. Glutasyon peroksidaz enzimi indirgenmiş glutasyonu katalizleyerek hidrojen peroksit ve organik peroksitlerle reaksiyona girer. Bu reaksiyon sonucunda indirgenmiş glutasyon antioksidant etki gösterir (Keha ve Küfrevioğlu, 2004).



Şekil 1.1. GSH'ın yapısı

İndirgenmiş glutatyon, hücreleri oksidatif zararlardan korumak için serbest radikallerle ve peroksitlerle tepkimeye girer. Bunun dışında GSH proteinlerin yapısındaki –SH gruplarını indirgenme görevini üstlenir. Birden fazla proteinin ve enzimin inaktivasyonunu da demiri ferröz halde tutarak sağlar. Böylece bu enzim ve proteinlerin rejenerasyonunu sağlayabilir (Drog, 1997; Schröder 2001; Geçkil, 2012). Belirtilen bu özellikler dışında GSH, elektrofilik bileşiklerin detoksifikasyonunda da görev alır. Detoksifikasyon görevini yerine getirirken GST'ye bir kofaktör olarak görev alır (Yalçın 1998; Blokhina vd, 2002).

1.3. Glutatyon S- Transferaz

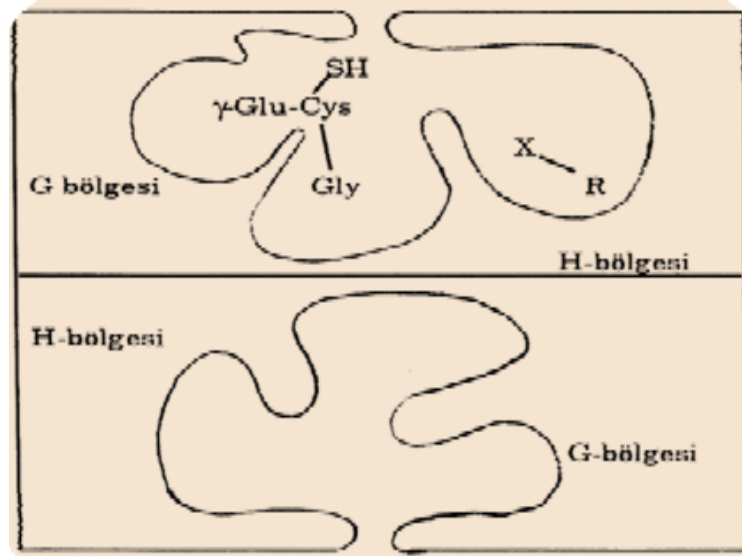
GST izoenzimlerine ait ilk çalışmalar sıçan karaciğerinde yapılmıştır. Yapılan çalışmaları Boyland ve arkadaşları birlikte gerçekleştirmiştir. Çalışmalar olumlu sonuçlanmış olup GST izoenzimleri ilk kez sıçan karaciğerinde tespit edilmiştir. Bu çalışmalar ışığında daha sonra birçok canlı ve mikroorganizmadanda olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Çalışmalar canlıların akciğer, karaciğer, plasenta ve eritrosit gibi dokuları üzerinden gerçekleştirilmiştir. Brom benzil merkaptürik asit glutatyonun bazı konjugasyon ürünlerinin son aşamasıdır. Meister ve arkadaşları 1879 yılında buna yönelik bir çalışma gerçekleştirerek köpek idrarından izole edilmesini başarmışlardır. İzolasyonun gerçekleşmesiyle birlikte GST enzimlerinin varlığı dolaylı olarak da olsa tespit edilmiştir. (Güven, 2003). 1959 yılında GST enzimi tarafından katalizlenen reaksiyonların temelini Glutatyon konjugatlarının oluşturduğunu Barnes ve arkadaşları ile Bray bildirmiştir

(Güven, 2003). 1961 yılında fare karaciğerinde yapılan çalışmalar neticesinde glutatyon konjugasyonu gözlemlenmiştir. Böylece memelilerde bulunan glutatyon S transferaz enzimlerinin yapısı hakkında ilk bilgiler verilmiştir. GST'lerin saflaştırma işlemi 1974 yılında olup ilk kez Habig tarafından yapılmıştır(Güven,2003).

Çok fonksiyonlu polimorfik bir izoenzim ailesinden olan Glutatyon S-transferaz enzimleri (GST; EC 2.5.1.18) hücreyi sitotoksik ve genotoksik streslere karşı koruma altına alır (Habdous ve diğ., 2002, Iverson ve diğ., 2010).

Glutatyon S-transferaz enzimlerinin yaklaşık olarak bütün bitkilerde, omurgalılarda, böceklerde, memelilerde, maya ve bakterilerde yer alır (Güven, 2003). GST'ler memelilerin birçok organ ve dokusunda yer alır. GST'lerin oransal olarak büyük kısmı karaciğerdedir. GST enziminin bulunduğu diğer organ ve dokulara ise böbrekler, akciğerler, intestinal kanal, testisler ve adrenal bezler örnek verilebilir. GST enzimleri suda çözünen enzimler olmakla birlikte organizma içerisinde suda çözünen toplam protein miktarının %4'ten fazlasını oluştururlar (Gümüş, 2005).

Enzim ailesi olarak nitelendirilen Glutatyon S-transferaz'lar iki alt birimden meydana gelir (Altınışık, 1999). GST'ler alt birimlerinin her biri için katalitik bölgesi olan küresel dimerik proteinlerdir. Genelde 23-29 kDa arasında değişen molekül kütlelerinde. Aminoasit sayısı her bir alt birimi için 200 ile 240 arasında değişkenlik göstermektedir. GST alt birimlerinin her biri iki bölgeden oluşur. Bu bölgeler polipeptid zinciri kısa bağlayıcılarıyla birleştirilir. GSH'ı oluşturan bu bölgeler G ve H bölgeleridir. G; GSH'ın bağlanması bölgesi iken, H; hidrofobik elektrofillerin bağlanma bölgesidir. Bu bölgeleri oluşturan GSH, N-terminal domain bir β -tabaka ve üç α -heliks yapısında düzenlenmiş olan yaklaşık 80 aminoasitten meydana gelir. Kalan 5 veya 6 α -heliks yapısındaki aminoasit ise C-terminal bölge oluşturur (Tuna, 2008)



Şekil 1.2. Dimerik Glutatyon S-transferaz enziminin aktif bölgelerinin gösterimi. (Ji et al. 1994)

Aminoasitler enzimlerin yapısını oluştururken bu aminoasitlerin içeriğinin oldukça önemli olduğunu belirtmek gerekir. Aspartik asit, glutamik asit ve lösin önem arz eden aminoasitlerdir. İnsan ve sıçan GST enzimlerinde de miktar olarak en fazla bu üç aminoasit bulunmaktadır. Sıçanda çok düşük miktarlarda bulunan iki aminoasit triptofan ve sistein aminoasitleri iken, bu aminoasitlere insanda hiç rastlanmamaktadır (Fleisch et al. 1976; Baş, 2006).

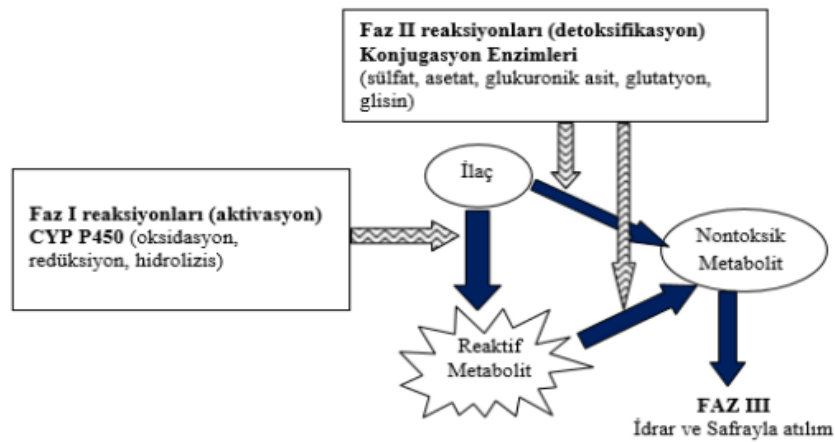
Tablo 1.1. Glutatyon S-transferaz enziminin aminoasit içeriği (molekül başına) (Fleischn et al. 1976; Baş, 2006)

Aminoasit adı	Sıçan	İnsan	Aminoasit 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	-

Canlılar hayat boyu toksik bileşiklere doğrudan yahut beslenme yoluyla dolaylı bir şekilde maruz kalmaktadır. Endüstriyel hayat, doğal hayatla beraber çok sayıda zehirli molekülün ortama salınmasına sebep olmaktadır. Ayrıca reaktif oksijen türleri ve benzeri reaktif maddeler vücutta normal oksijen metabolizması içerisinde üretilmektedir. Bu toksik ve reaktif ürünlerin bertaraf edilebilmesi için metabolizmada detoksifikasyon sistemleri mevcuttur. Bertaraf edilmediği takdirde toksik maddeler proteinleri ve DNA'yı bozarak hücrenin ve metabolizmanın ölümüne sebebiyet verebilir.

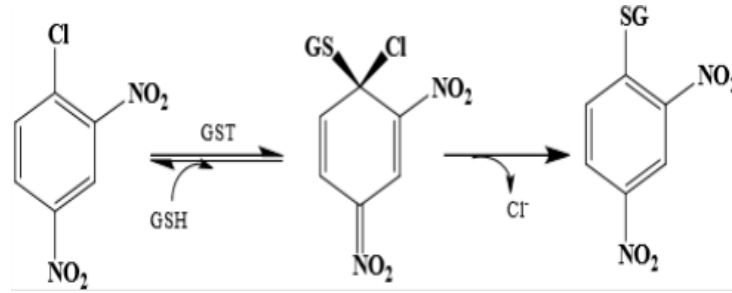
GST'lerin en önemli ve başlıca görevi hücreyi oksidatif zararlardan korumaktır. GST'ler hücrede çok önemli bir savunma mekanizması oluştururlar. Bu mekanizma ksenobiyotiklere karşı oluşturulan en önemli savunma mekanizmasıdır. Glutatyonun ksenobiyotik metabolizmasındaki rolü açıklamak gerekirse; faz I enzimleri reaktif türleri oluşturarak glutatyonla konjugasyona girer ve bu şekilde hücre makromolekülleri olarak bilinen DNA, RNA ve proteinle bağlanmasına engel olarak hücreyi hasardan koruması şeklindedir. Bir proteinin antijenik özelliği ksenobiyotik reaktif türlerinin proteine bağlanmasıyla değiştirilebilir. Ksenobiyotikler hücreyi hasara antikorla birleşerek götürür. Bu etkiyi de yalnız olarak antikorların sentezini uyarmayan bir molekül şeklinde göstererek icra eder (Board, P., Coggan, M. 1990).

Ksenobiyotikler kimyasallar maddelerdir. Ksenobiyotikler doğal bileşikler gibi besin yoluyla vücuda alınmazlar. Vücuda besin yolu dışında değişik yollarla giren bu kimyasal maddeler olan ksenobiyotiklerin enzimatik detoksifikasyonu faz-I,faz-II,faz-III olmak üzere üç fazdan oluşur. Faz I de substrata redoks, hidroliz ve benzer tepkimelerle aktif gruplar katılır, faz II de konjugasyon tepkimeleri için substrat hazırlama görevi üstlenir. Faz III'te ise faz II'de ortaya çıkan ve suda çözünürlüğü daha fazla olan nonpolar ksenobiyotikler ve toksisitesi düşük olan metabolitlerin atılması sağlanır (Şekil 1.4) (Autrup 2000; Sheehan et al 2001; Lee 2003).



Şekil 1.3. Detoksifikasyonda Faz I, Faz II ve Faz III reaksiyonları (Aydoğdu 2013)

GST'ler birçok farklı farklı bileşiğin zehirsizleştirilmesini sağlayan çok özellikli enzimlerdir ve redükte glutatyonun -SH grubunun başka bir substratın elektrofilik kısmına konjugasyon tepkimelerini katalizlemeye görevlidirler. Sonuçta oluşan ara bileşik öncekine göre biraz daha zararsızdır ve daha çözünür halde olup kolayca uzaklaştırılır. GST'ler C, N ve S atomlarını içeren apolar bileşiklere redükte glutatyonun nükleofilik reaksiyonlarını da hızlandırırlar. Bu grup enzimler substrat olarak arenoksitler, halojen içeren nitrobenzenler, kinonlar, ve α , β -doymamış karbonil gruplarını içeren bileşikleri barındırır. GST oksidatif stres ve oksijen toksisitesinin etkilerini minimuma düşürmek amacıyla sinyal iletimine de aracılık eder. Bundan dolayı, GST hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda yer alır (Ozaslan ve ark. 2018). GST enzimlerinin sitozolik, mitokondrial ve mikrozomal olmak üzere 3 büyük ailesi mevcuttur (Hayes et al., 2005)



Şekil 1.4. Glutasyon S-transferaz enziminin katalizlediği reaksiyon (Habdous et al, 2002)

Sitozolik GST'ler

Memeli sitozolik GST'ler yapı bakımından dimeriktir. Uzunlukları 199-244 aminoasit kadardır. Memelilerde 7 ayrı sitozolik sınıflandırma yapılmıştır. Aminoasit dizilim benzerliği baz alınarak oluşturulan sınıflandırmada Pi, Alfa, Omega, Mü, Sigma, Teta ve Zeta sınıfları yer alır. Memeliler dışında kalan türlerde yer alan diğer sitozolik GST'ler de vardır. Bunlar Lambda, Beta, Tau, Delta, Epsilon, Phi ve U olarak adlandırılmıştır. Sitozolik GST izozimleri insanda minimum 16, sıçanda ise 12 olarak tanımlanmıştır. Bu sitozolik GST izoenzimlerinin ekseriyeti hücrenin sitoplazmasında yer almaktadır. Fakat insanlar ve farelerde α sınıfı GSTA4-4 izoenzimlerinin membran ve mitokondride de bulunduğu tahmin edilmektedir (Hayes et al, 2005).

Tablo 1.2. Sitozolik glutasyon S-transferaz enziminin sınıfları, bulunduğu yerler

Sitozolik GST sınıfları	Sitozolik GST alt birimleri	Bulunduğu dokular
Alfa	GSTA1, GSTA2, GSTA3, GSTA4,	Karaciğer, böbrek, beyin, testis
Mu	GSTM1, GSTM2, GSTM3, GSTM4, GSTM5	Karaciğer, beyin, testis
Pi	GSTP1	Karaciğer, beyin, testis
Tata	GSTT1, GSTT2	Karaciğer
Sigma		Dalak

Mitokondride Bulunan Glutasyon S-Transferazlar

Yapı olarak memeli canlılarda bulunan mitokondriyal κ sınıfı GST izoenzimleri de dimer haldedir. Alt ünitelerini 226 aminoasit oluşturur. İnsan, sıçan ve sıçanlarda yalnızca Kappa sınıfı GST yer alır (Jowsey, I.R., Thomson 2003, Morel, F., Rauch, C., Petit, 2004). Kappa sınıfı izozimlerin aril halidlere karşı aktiviteleri yüksektir. CuOOH (bakır hidroperoksit) ve (S)-15-hidroperoksi 5,8,11,13- eikozatetraenoik asidi indirgeyebilirler (Morel, F., Rauch, C., Petit, 2004).

Mikrozomal GST'ler

MAPEG ailesine üye olan mikrozomal GST'lar yapıları bakımından çözünebilir GST'lardan ayrılırlar. Bu enzimler, çoğu proteinin de bulunduğu eikozonoid üretiminde görev üstlenirler. 1980'de MAPEG ailesinin ilk enzimi tanımlanmıştır. Bu enzimlerin sınıflandırılması prostaglandin E sentaz, lökotrien C4 sentaz, S-lipoksigenaz aktivite edici protein ve Mikrozomal GST 1, 2, 3 olarak yapılmıştır. Bu sınıflardan Mikrozomal GST 1,2 ve 3 detoksifikasyon enzimleri olarak bilinir. Bunun haricinde glutasyon bağlı peroksidazlar gibi işlev görürler. Araşidonik asitten lökotrien A4 oluşumunu S-lipoksigenaz katalizler. Lökotrien A4'ün, lökotrien C4'e dönüşümünü lökotrien C4 sentaz sağlar. Prostaglandin E sentazda PGH₂'den PGE₂'nin izomerizasyonunu katalizler (Jakobsson, P.J., Morgenstern, 1999).

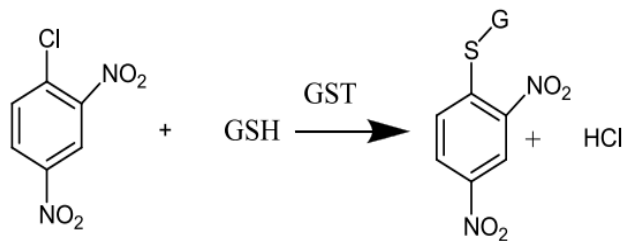
GST'lar yapı olarak değişik olan birçok substratı katalizleyebilirler. Bunlara örnek olarak alkiller, aril halidler, laktonlar, epoksitler, kinonlar, esterler ve aktiflenmiş aklenler sayılabilir. GST'lar birçok substratı tanımlarına rağmen, genelinin hidrofilik oluşu ve elektrofilik bir merkez taşımaları substratların ortak özellikleri arasındadır. GST'lar aynı zamanda hücre ve organizmaların ilaç, pestisit, herbisit ve antibiyotikler için direnç gelişiminde katkı verirler. GSH yani diğer adıyla kosubstratın olmadığı tepkimelerde GST enziminin işlemesi mümkün değildir. Az miktarda substrat özelliğide gösteren GST oksidasyonla birlikte oluşan ürün yahut dış kaynaklardan alınan toksik maddelerin, vücutta bulunan küçük moleküllere rastlamasını engeller. Bu şekilde vücuttan atılımını sağlayarak hücrenin zarar görmesini engeller (Baş vd, 2006).

GST enzimi, G ve H bölgelerinden katalizleme işlemine katılır. Bağlanma bölgesine GSH G bölgesi ile bağlanırken, elektrofilik bileşiklerinde bağlanma bölgesi H bölgesidir. GST'ların hepsinde G bölgesi yüksek GSH spesifitesi ile mümkün olduğu kadar benzerdir. Tam tersi H bölgeside GST'lar arasında olabildiğince farklılık gösterir. Bu bölgedeki farklılıktan dolayı enzimlerin substrat bağlama kapasitesi ve çeşitlilikleri değişkenlik göstermektedir. GST'lar çok geniş substrat özgüllüğüne sahiptirler. CDNB elektrofilik merkeze sahip olup GST enziminin en yaygın substratıdır. GST aktivitesi belirlenirken CDNB'nin GSH ile konjugasyon reaksiyonuna bakılır (Commandeur, 1995).

Tablo 1.3. Glutatyon S-transferazın bazı substratları

GST substratları			
Eksojen kaynaklı	Endojen kaynaklı	İlaçlar	Pestisitler
Bütadien	Dopamin	Sisplatin	Lindan
Alfatoksin	Prostaglandin	Klorambusil	Atrazin
Etilen oksit	Kolesterol-5-oksit	Fosfomisin	DDT
Metilen klorür	Katekol	Nitrogliserin	
	Östrojen		

GST'lar CDNB'yi substrat olarak kullanabilirler ve CDNB GST'ların aktifliğinin ölçümünde önemli bir araç olarak kullanılır. Sonuç olarak, aktif bölgeye bağlanabilen ve yeterince elektrofilik olan tüm aril veya alkil halid GST'lar tarafından substrat olarak kullanılabilir.

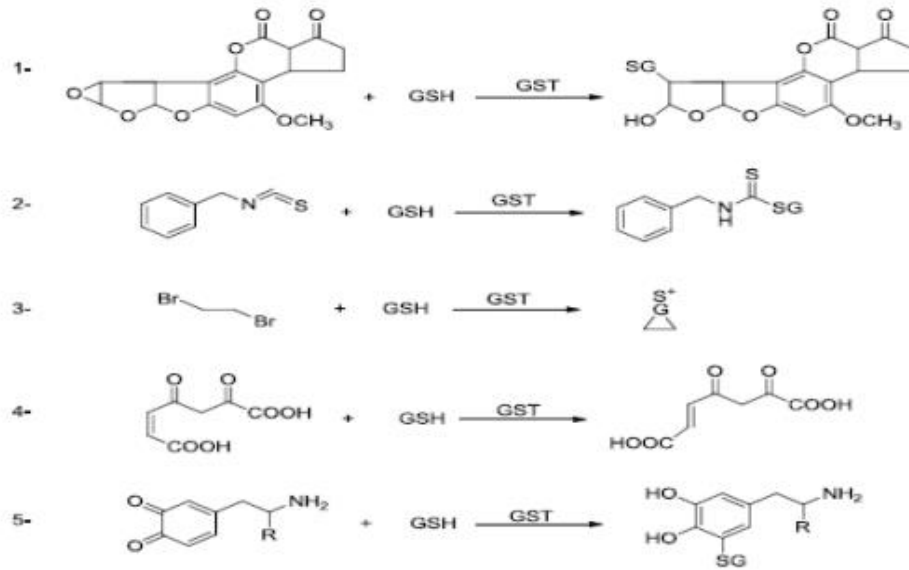


Şekil 1.5. Glutatyon S-transferazın katalizlediği reaksiyonlardan biri

GST'ların katalizlediği temel reaksiyonları; oksiran halkasının nükleofilik açılımı, nükleofilik yer değiştirme, polarize çift bağlara Michael katımı reaksiyonları diye saymak mümkündür (Morgenstern, 1988).

Tablo 1.4. Glutatyon S-transferazın enzimlerinin görev yaptığı reaksiyon örnekleri

Reaksiyon şekli	Substrat
Michael katılımı	N-asetilbenzokinonmin
Oksiran halkasına atak	1-nitropiren-4,5 oksit
Nükleofilik yer değiştirme	1-kloro-2,4-dinitrobenzen
Organik hidroksiperoksitin indirgenmesi	Linoleik asit hidroperoksit
Organik nitratin indirgenmesi	Nitrogliserin ve türevleri



Şekil 1.6. Glutatyon S-transferazın enzimlerinin katalizlediği bazı reaksiyonların tepkimeleri

Lindan ve benzeri pestisitlerin zehirsizleştirilmesini, GST substratları olan 4 hidroksil-2-noneal, ve benzeri endojen moleküller sağlar. Öncelikle plastik bazlı kanser ilaçlarından cis platin başta olmak üzere, siklosofamid, klorombusil, etakrinik asit, adriamisin gibi

ilaçların inhibisyonunu sağlarlar. Böylece bu ilaçların hücre içerisinde dirençli olmaları sağlarlar (Kaya Koçdoğan, A. 2016).

GST'ların enzimatik fonksiyonlarının yanında önem arz eden bir diğer görevi de bazı endojen ve ekzojen kaynaklı maddeleri katalitik yollar dışında bağlayarak bu maddelerin hücre içerisindeki taşınmalarını sağlamaktadırlar (Boyer and Kenney, 1985).

Bu maddelerin enzimde bağlandığı bir bölge vardır ve bu bölge seçici olmayan hidrofobik bir bağlanma bölgesidir (Vessey and Boyer, 1988). Elektrofilik hareketlilikte organizmanın koruma görevinde olan GST'ların organizma yönünden önem arz eden bu işlemlerine karşı aynı mekanizmayla biyoaktivasyonun yanında ortaya çıkardıkları başka sorunlarda bilinmektedir. Bu sorunların ortaya çıkması GST'ların klinikte çoklu ilaç direnci (Multidrug resistance) olarak yer edinen durumlarıyla ilişkilerine bağlıdır. Güncel hayatta kanser tedavisindeki en önemli sorun multidrug resistance olarak görülmektedir. Tümör hücrelerinde GST Pi'nin çokça artması GST'nin kazanılmış direnç ile ilişkisini düşündürmüştür (Aliya et al, 2003). Çoklu ilaç direncinde GST'yi baskı altına alan maddelerin kullanılabileceği düşünülmektedir. Sonuç olarak GST'lar kanser oluşum sürecinde farklı iki role sahiptir. Bu rollerden ilki epoksitler benzeri başlatıcı ajanları inaktivasyonunu sağlayarak tümör oluşumunu engellemek, ikinci rolü de kanser hücresinin kemoterapötik ilaçlara karşı direnç oluşumuna yardım ederek istem dışı bir şekilde kanser hücresini koruma altına almasıdır (Hayes and Pulford, 1995).

GST aktivite ölçümü iki yöntemle yapılabilir. Bu yöntemler immünoradiyometrik ve spektrofotometriktir. Spektrofotometre Habig ve Howie ile arkadaşlarının tavsiye ettikleri yöntemdir. Bu yöntemde GST'nin hücre içi substratı olan GSH'ın konjugasyonu ile birlikte meydana gelen bileşiğin renk şiddetinin ölçülmesine bağlı olarak ölçüm yapılır. İmmünoradiyometrik yöntem ise serum doku örneklerindeki GST aktivitesinin ölçülmesidir (Howie et al, 1988).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Arca vd. (1990), E.Coli'den GST enzimini saflaştırırken DEAE Sephajel ve glutatyon-agaroz afinite kolonlarını kullanmıştır. Bu saflaştırma işlemini %11 verimle yaklaşık olarak 800 kat olacak şekilde gerçekleştirmiştir. Bu çalışmada K_M sabitlerini glutatyon için 0,25 olarak bulurken, 1-kloro-2,4-dinitrobenzen için 1,5 mM olarak bulmuştur. Enzimin alt birim molekül kütlesi 24 kDa iken, enzim homodimerdir. Enzim için optimum pH 7,5 olarak hesaplanırken optimum sıcaklığında 35 °C'dir.

Özaslan (2014) yaptığı tez çalışmasında Van Gölü Balığı karaciğerinden faydalanmıştır. Protein spesifik aktivitesi 29,304 EÜ/mg olarak belirlenmiştir. Enzim %37,36 verim ile 316,11 kat saflaştırılmıştır. Enzimin molekül kütlesi 62,35 kDa olarak bulunurken bu işlem sırasında jel filtrasyon kromatografisinden faydalanılmıştır. SDS-PAGE kullanılarak alt birimlerinin molekül kütlesi belirlenmiştir. Alt birim molekül kütleleri de 28 kDa ve 33,8 kDa olarak bulunmuştur. Karakterizasyon çalışmaları sırasında enzime ait optimum pH'sı, optimum sıcaklığı, stabil pH'sı belirlenmiştir. Ayrıca substratlarında K_M ve V_{max} değerleri tespit edilmiştir.

Casalino vd. (2004), çalışmasını gerçekleştirirken Cd^{+2} ve Mn^{+2} gibi metal iyonlarının saflaştırma işlemi sıçan karaciğerinden yapılan GST enzimi aktivitesine olan etkilerini incelemiştir.

Marler vd. (2010), bazı bileşikler sentezlemişlerdir. Bu bileşikleri kinon oksidoredüktaz 1, GST ve GSH seviyelerinde meydana gelen değişimi araştırmak amacıyla karaciğer hücre kültürüne uygulamıştır. Bu bileşikler 14-klorometil-12H-5,11 adiazadibenzo[b,h]florene-11-on ve 2,4-dibromo-1-hidroksifenazindir.

Awasthi vd. (1980), çalışmasında insan karaciğerinden faydalanmıştır. Çalışma neticesinde GST'ye ait katyonik ve anyonik izoformları saflaştırmayı başarmıştır. Amonyum sülfatla fraksiyonlama gerçekleştirmiştir. Bu işlem sırasında anyonik GST

için numunenin amonyum sülfat doygunluğu %65'e olarak uygulanmıştır. Daha sonra bu yeni anyonik GST enzimi çeşitli kromatografik işlemler kullanılarak saflaştırılmıştır. Buna yakın bir prosedür uygulanarak katyonik GST için numunenin amonyum sülfat doygunluğu %80'e getirilip saflaştırma işlemi uygulanmıştır. Çalışmalar neticesinde ω ve ψ GST'nin alt birim molekül kütlesi 22,5 kDa olarak belirlenmiştir. Katyonik GST'ye ait alt birim molekül kütlesi ise 24,5 kDa olarak sonuçlandırılmıştır.

Loscalzo ve Freedman (1986), çalışmalarını yaparken insan trombositlerinden faydalanmışlardır. Saflaştırma çalışmaları sırasında birden fazla yöntem kullanmışlardır. CM-selüloz, Sephadex G-75, afinite kromatografisi, amonyum sülfat çöktürmesi gibi yöntemlerden faydalanılarak GST enzimini saflaştırılmıştır. 7,5 EÜ/mg spesifik aktiviteye sahip enzim 1071,4 kat saflaştırılmıştır. Ayrıca enzime ait molekül kütlesi ve izoelektrik pH'sı da tespit edilmiştir.

Asaoka vd. (1983), GST enzimini saflaştırırken sığır karaciğerinden faydalanmıştır. Yöntem olarak orange-A agaroz afinite kromatografisiyle kullanarak saflaştırma işlemi yapmıştır. İki temel izoenzim ayrılırken DEAE-sephagel kullanılmıştır. Ayrılan bu iki forma ait izoelektrik pH'ları 6,7 ve 6,1 olacak şekilde belirlenmiştir. Bunun dışında Cu^{+2} , Hg^{+2} , Cd^{+2} , Zn^{+2} iyonlarının her iki izoenzimin aktivitesini inhibe ettiği belirlenmiştir. İzoenzimlere ait alt birimlerinin mol kütleleri belirlenirken SDS-PAGE den faydalanılmıştır. Alt birim molekül kütlesi 27 kDa olarak belirlenirken, tabii molekül kütleleri için jel filtrasyon kromatografisi kullanılmıştır. Tabii molekül kütlesi de 49 kDa olacak şekilde bulunmuştur. Ayrıca GSH ve CDNB için K_M 0,55 mM, V_{max} 0,10 mM olarak bulunurken, spesifik aktiviteleri sırasıyla, 320 EÜ/mg ve 6,9 EÜ/mg olacak şekilde belirlenmiştir. 2. İzoenzim için ise K_M 0,83 mM, V_{max} 0,165 mM olarak ve spesifik aktiviteleri ise sırasıyla ve 380 EÜ/mg, 0,86 EÜ/mg olacak şekilde hesaplanmıştır.

Singh vd. (1987), çalışması sırasında insan böbreğinden faydalanmıştır. Bu çalışmada GST enzime ait 3 önemli sınıf enzimlerini (α , μ , π) saflaştırmıştır. Bazı kinetik özelliklerde incelenmeye tabi tutulmuştur. Yapılan çalışma neticesinde bu 3 sınıf izoenzimin önemli derecede farklılık gösterdiği konular yapısal, immunolojik ve fonksiyonel özellikler olarak belirlenirken, aynı sınıfa bağlı izoenzimlerin benzerlik

gösterdiği tespit edilmiştir. Saflaştırma işlemi yapılırken epoksiyle aktifleştirilmiş Sepharoz-6B'ye bağlı GSH afinite kolonundan yararlanılmıştır. Aksoy (2018) yaptığı çalışmada, detoksifikasyon başta olmak üzere birden fazla biyolojik fonksiyonu bulunan GST enzimine bazı flavonoidlerin etkisini incelemiştir. Holştayn karaciğerinden GST enziminin saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Çalışma sırasında saflaştırma işlemi hidrofobik etkileşim kromatografisi (HEK) ile yapılmıştır. Böylece enzimin saflığı kontrol edilirken Sepharose 4B-L-tirozin-9- naftilamin jel kullanılarak SDS- PAGE yapılmıştır. K_M ve V_{max} değerleri belirlenirken Linewear- Burk yönteminden faydalanılmıştır. Substrat olarak CDNB ve GSH substratları kullanılmıştır. Bu değerler CDNB için 1,34 mM, 1,89 EÜ/ mL olarak belirlenirken; GSH için 1,11 mM, 3,06 EÜ/ mL belirlenmiştir. Araştırmada çalışılan flavonoidlerin, hGST üzerinde etkileri araştırılmıştır. Çalışmada bazı maddelerin enzim üzerindeki etkileri araştırılmış ve bu amaçla maddeler için %50 inhibisyona neden olan inhibitör konsantrasyonları (IC_{50}) tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlarla en güçlü inhibitörün 4'-(4- nitrofeniltiyoürenil)-6- hidroksi-apigenidin ve değerinin 2,1 mM IC_{50} olduğu tespit edilmiştir.

Çomaklı vd. (2011) çalışmalarını gökkuşağı alabalık eritrositleri üzerinden yapmışlardır. Çalışmalar neticesinde saflaştırılan glutatyon S-transferaz enziminin bazı antibiyotiklere etkilerini araştırmışlardır. Enzim saflaştırılırken glutatyon–agaroz afinite kromatografisi tekniği kullanılmıştır. Bu teknikle enzim %90 verim elde edilerek 8.714 kat saflaştırılmıştır. SDS-PAGE ile enzim saflığının kontrolü gerçekleştirilmiştir, neticede tek bant görüntüsü elde edilmiştir. Enzime ait molekül ağırlığı yaklaşık olarak 23 kDa olarak tespit edilmiştir. Bunun haricinde antibiyotiklerin enzim aktivitesinin inhibisyon etkilerine bakılmıştır. Gentamisin, amikasin, sefuroksim sodyum, ampisilin gibi antibiyotikler işlemde kullanılmıştır. Çalışma ışığında yüksek inhibisyona sebep olan antibiyotiklerin IC_{50} değerleri, K_i sabitleri ve inhibisyon tipleri tespit edilmiştir.

Çetinkaya vd. (1993), yaptıkları çalışmalarda bazı elektrofilik bileşiklerin metabolitleri GST aktivitesinde artış ya da azaltmaya neden olduğu bildirilmiştir. Gerçekleştirilen bir çalışmada GST aktivitesine ait değişiklikler brombenzen ve karbontetraklorürün ratlara uygulanmasıyla araştırılmıştır. Uygulamadan sonra karaciğerdeki GST aktivitesinde azalma, serumdaki GST aktivitesinde de artış olduğu gözlemlenmiştir.

Eaton ve Bammler (1999), ise mitokondrial, sitoplazmik ve MAPEG GST ailesinin sınıflandırılmasında proteinlerin amino asit sıralamsının kriter olarak önemli bir yer tuttuğunu bildirmişlerdir. Sitozolik GST ailesinin gösterdiği homoloji sekansı %40'dan fazla iken diğerlerinin %20 olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca sitozolik GST'lerin yapılarına göre 13 sınıfa ayrıldığını belirlemişlerdir. Bu sınıflarda alfa, beta, delta, epsilon, zeta, teta, mu, nu, pi, sigma, tau, phi, ve omega bulunurken, mitokondrial GST'lerinde kappa sınıfının içinde yer aldığını, mikrozomal GST'lerin MAPEG süper ailesinden olduklarını bildirmişlerdir. Ve bu mikrozomal GST'lerin aminoasit dizisi %20'den az benzerlik gösteren I-IV arası belirlenen alt gruplardan meydana geldiğini tespit etmişlerdir. İnsan sitozolik GST'lerinde alfa, zeta, theta, mu, pi, sigma, ve omega sınıflarının oluşturduğu 6 izoenzim MAPEG süper ailesinin I, II ve IV. sınıfına bağlı olduğunu tespit etmişlerdir.

Çelik vd. (2003), çalışmalarını normal doğum gerçekleştiren bir hastanın plasentasını kullanarak yapmışlardır.(GST- π) enzimi saflaştırılırken glutatyon-agaroz affinite kolonundan faydalanılmıştır. Enzim saflaştırma sırasında 2,628 EÜ/mg spesifik aktivite elde edilmiştir. %0,5 verimle 16 kat olarak saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Enzim ait substrat olan GSH için K_M sabiti ve V_{max} değerleri sırasıyla 2 mM, 11,1 EÜ/mg olarak belirlenirken; bu sonuçlar CDNB için K_M sabiti 0,55 mM, V_{max} değeri de 35 EÜ/mg olacak şekilde belirlenmiştir. Saflaştırılan enzimin aktivitesine ampisilinin etkilerinin incelenmesi için çalışma yapılmıştır. Böylece antibakteriyel grubundan bir ilaç olan ampisilinin enzim aktivitesi üzerine in vitro etkisi olduğu gözlemlenmiştir. İn vitro oranı %50-55 olacak şekilde enzimi inhibe ettiği sonucuna ulaşılmıştır.

Martinez ve Lara (1997), GST'nin 14 izoformunun saflaştırıldığı bu çalışmada kefal balığı karaciğerinden faydalanılmıştır. Saflaştırma işlemi anyon değişim kromatografisiyle yapılmıştır. GST izoformlarının her birinin alt birimlerinin molekül kütleleri 23 ile 28 kDa arasında olacak şekilde bulunurken, izoenzimlerin dimerik yapıda olduğu belirlenmiştir.

Al ve Mustafa (2006), çalışmalarında metal iyonlarının in vitro şartlarda insan eritrosit GST enzimine olan etkilerini araştırmışlardır. Yaptıkları çalışmada Cr^{+6} metal iyonunun glutatyon peroksidaz enziminin aktivitesini arttırdığını belirlemişlerdir. Yine glutatyon

redüktaz enziminin aktivitesini azaltırken, GST ve katalaz enzimlerinin aktivite oranlarında herhangi bir değişiklik oluşturmadığı sonucuna varılmışlardır.

Erat ve Şakiroğlu (2012), GST enzimini saflaştırırken çalışmalarında insan eritrositlerinden faydalanmışlardır. Saflaştırma işlemi sırasında yöntem olarak glutatyon agaroz afinite kromatografisi kullanılmıştır. Sonuç olarak 16,00 EÜ/mg protein spesifik aktivite elde edilerek, %80 verimle 1.143 kat saflaştırılmıştır. Bu işlemde sonra bazı kimyasalların enzime ait aktivite üzerine etkilerine yönelik çalışma yapılmıştır. IC₅₀ değeri Paclitaxel için 0,23 mM bulunurken, cyclophosphamide için 5,75 mM, gemciabine için 6,35 mM olacak şekilde bulunmuştur. Bu ilaçların doğal substratı olan GSH ile inhibisyon çalışmaları yapılmıştır. Çalışma neticesinde K_i sabitleri sırasıyla olacak şekilde paclitaxel için 0,182±0,028 mM, cyclophosphamide için 6,97±0,49 mM, gemciabine için 6,71±0,31 mM olmak üzere hesaplanmıştır.

Gyamfi vd. (2004), çalışmalarında sıçan karaciğeri GST ve insan GST P1-1 enzimleri üzerine inhibitör etkilerini incelemek amacıyla şifalı bitkilerden izole edilen ve yeni bir antioksidan olan thonningianin A'(Th A)'dan yararlanmıştır. Çalışma sırasında substrat olarak CDNB kullanılmıştır. ThA'nın sıçan karaciğer sitozolik GST aktivitesini inhibe ettiği tespit edilmiştir ve IC₅₀ 1,1 uM olduğu belirlenmiştir. CDNB'ye karşı yarışmalı inhibisyon gösterdiği belirlenmiştir. ThA'nın insan GST P1-1 GSH substratına karşı yarışmasız inhibisyon sergilediği belirlenmiştir. Çalışma sonunda ThA'nın yeni bir güçlü GST in vitro inhibitör bildirilmiştir.

Pabst vd. (1974), çalışmalarında sıçan karaciğerinden faydalanmışlardır. Bu çalışma yapılırken GST enziminin saflaştırılması için DEAE-selüloz anyon değişim kromatografisi, amonyum sülfat çöktürmesi, CM-selüloz katyon değişim kromatografisi ve hidroksilapatit kolonundan yararlanılmıştır. Sonuç olarak enzim 4,1 EÜ/mg spesifik aktivite elde edilerek saflaştırılmıştır. Enzime ait stabil pH değeri fosfat tamponu içinde 7,0 olarak bulunmuştur. Ayrıca CDNB ve GSH için K_M sabiti belirlenmiştir. Çalışmayla birlikte K_M sabiti sırasıyla 0,006 mM, 0,02 mM olarak bulunmuştur. İlaveten enzime ait alt biriminin molekül kütlesinin yaklaşık olarak 25 kDa olduğu belirlenirken, molekül kütlesinin yaklaşık 45 kDa olduğu tespit edilmiştir. Neticede enzimin homodimer olduğu belirlenmiştir.

Cnubben vd. (2001), yaptıkları araştırmada GST enzim ailesinin birçok farklı elektrofilik bileşik ile GSH'ın konjugasyonunu sağladığını belirtmişlerdir. Sebep olarak ta glutatyon S-transferaz'ın yapısında spesifik olmayan hidrofobik substrat bağlanma bölgesinin bulunduğu ve çok sayıda izoenziminin yer almasından kaynaklandığını söylemişlerdir. Böylece GST izoenzimlerinin birçok bileşiği sustrat olarak kullandıklarını belirtmişlerdir. Bu bileşiklere çevresel kirleticiler, karsinojenik bileşikler, ilaç kalıntıları ve diğer birçok bileşik örnek gösterilebilir. Çalışma neticesinde G ve H bölgelerinin olduğu tespit edilmiştir. G bölgesi proteinlerin bağlanma bölgesi olarak belirlenirken, H bölgesinde substratların bağlandığı bölge olarak raporlandırılmıştır. GST izoenzimlerinin her birinin iki alt biriminden meydana geldiği bildirilmiştir.

Iizuka vd. (1989), çalışmalarında GST enzimini saflaştırırken E.coli ekstraktlarından faydalanmışlardır. Çalışmada saflaştırma işlemi %7,5 verim sağlanarak yaklaşık olarak 2.300 kat saflaştırmışlardır. Bu çalışmada, yazarlar molekül kütlelerini 45 kDa olarak belirlerken enzimin iki aynı alt biriminden meydana geldiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca enzime ait substratlar olan GSH ve CDNB için K_M sabit çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda K_M sabiti sırasıyla 0,33 mM ve 1,43 mM olmak üzere hesaplanmıştır. enzim için optimum pH değeri 7,0 bulunurken, optimum sıcaklık değeri 50°C olarak belirlenmiştir. Stabil pH değeride geniş bir pH aralığı olan 5 ile 11 arasında bulunmuştur.

Offei-Oknyne vd. (2015), antioksidatif enzimlerden olan glutatyon redüktaz, glutatyon S-transferaz, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz enzimlerinin aktiviteleri ve glutatyon seviyelerini incelemek üzerine çalışma yapmışlardır. Yapılan çalışmada HepG2 karaciğer hücrelerine kurutulmuş, dondurulmuş ve taze zencefilin metanol ekstraktı uygulanmıştır. Ekstrat 12 saat ve 24 saat boyunca birleştirilerek birleştirme sonucu araştırılmıştır. Enzim aktiviteleri 24 saatin sonunda 12 saate kıyasla daha yüksek etki ettikleri sonucuna ulaşmışlardır. Bu sonuç GSH seviyesi içinde aynı olmuştur.

3. MATERİYAL VE YÖNTEMLER

3.1. Materyaller

3.1.1. Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tez çalışmasında kullanılan BSA, Coomassie Brilliant Blue G-250, N, N, N', N'-tetrametil etilendiamin, GSH, glisin, 1- kloro 2,4 dinitrobenzen, N, N'-metilen bisakrilamid, Tris, ilgili substratlar ve diğer reaktiflerin bir kısmı Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarından temin edildi. Diğer kısmı ise Sigma Chemical'den temin edilmiştir.

3.1.2. Faydalanılan Cihaz ve Aletler

Homojenizatör	: KA T 25 Ultra-Turrax
Otomatik pipet	: Transferpette, Eppendorf
Spektrofotometre	: UV-1800, Shimadzu CC-10
Elektroforez cihazı	: Bio Rad
Kesintisiz güç kaynağı	: EC 300 XL
Pompa	: ATTA SJ-1220
Çalkalayıcı	: Lab. Companion SK-300 22
Manyetik mikser	: IKA C-MAG HS 7
Soğutmalı santrifüj	: Universal 320 R, Hettich
pH metre	: Thermo Orion 3 Star
Buzdolabı	: Arçelik
Karıştırıcı	: SK-300
Vorteks	: Velp Scientifica SK-300
Hassas terazi	: Denver Instrument SI-234
Kar makinesi	: Hoshizaki Ice Maker FM-80EE

3.1.3. Çalışmalar İçin Hazırlanan Çözeltiler

3.1.3.1. Enzim Aktivite Ölçümü İçin Hazırlanan Çözeltiler

- a) 0,02 M GSH Çözeltisi: 30 mg GSH alınarak 4 mL saf suda çözdürüldü ve daha sonra hacmi saf su ile 5 mL'ye tamamlandı.
- b) 0,025 mM CDNB Çözeltisi: 25 mg CDNB alınarak 4 mL %95'lik etanolde çözdürüldü ve toplam hacim yine %95'lik etanol ile 5 mL'ye tamamlandı.
- c) Fosfat Tamponu Çözeltisi (0,1 M, pH: 6,5): 680 mg KH_2PO_4 ve 14 mg EDTA tartılarak 40 mL saf suda çözdürüldü ve daha sonra ilgili reaktiflerle pH'sı 6,5'a ayarlandı ve toplam hacim saf su ile 50 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.2. Homojenat Tamponu

- a) Tris-HCl (pH: 7,2) Tamponu: 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF içeren 50 mM Öncelikle 605 mg Tris 80 mL suda çözüldü daha sonra bu çözeltiye 15 mg DTT, 27 mg EDTA ve 17 mg/mL propanol PMSF (1 mL) eklendi ve pH 7,2'ye ayarlan. Daha sonra toplam hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı

3.1.3.3. Enzim Saflaştırılmasında Kullanılan Çözeltiler

- b) Dengeleme ve Yıkama Tamponu (0,01 M KH_2PO_4 + 0,15 M NaCl, (pH: 7,4): 0,4 g KH_2PO_4 ve 2,61 g NaCl alınarak yaklaşık 200 mL suda çözdürüldü ve pH 7,4'e ayarlandı. Daha sonra toplam hacim saf su ile 250 mL'ye tamamlandı.
- c) Elüsyon Tamponu (50 mM Tris- HCl çözeltisi, pH: 9,5): İçinde 10 mM GSH bulunduran 50 mM'lık Tris- HCl çözeltisi hazırlandı ve bu çözelti gradientli elüsyonda kullanıldı.
- d) Rejenerasyon Tamponu 1 (0,5 M NaCl + 0,1 M H_3BO_3 (pH: 8,5): 0,62 gram H_3BO_3 ve 2,92 gram NaCl alındı ve 90 mL saf su içerisinde çözüldükten sonra pH'sı 8,5'e ayarlandı. Daha sonra toplam saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

- e) Rejenerasyon Tamponu 2 (0,1 M NaCH_3COO + 0,5 M NaCl (pH: 4,5): 0,82 gram NaCH_3COO ve 2,92 gram NaCl alınarak 90 mL saf suda çözündürüldü ve daha sonra pH'sı 4,5'a ayarlandı. Son olarak toplam hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.
- f) %0,02 NaN_3 çözeltisi (Kolon materyalinde bakterin ürememesi için): 0,02 gram NaN_3 alınarak hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı ve çözündürülmesi sağlandı.

3.1.3.4. Bradford Yöntemiyle Protein Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler

- a) Boyama çözeltisi (Coommassie Brilliant Blue): %95'lik 50 mL etanol içerisinde 100 mg Coommassie Brilliant Blue G-250 reaktifi çözündürüldü. Dah sonra çözeltiye 100 mL %95'lik fosforik asitten eklendi. Çözeltinin hacmi saf su eklenerek 1000 mL'ye tamamlandı ve karanlık bir ortama bırakılarak ışıktan korundu.
- b) BSA çözeltisi: 1 mg BSA alınarak hacim saf su ile 1 mL'ye tamamlandı ve çözünmesi sağlandı.

3.1.3.5. Elektroforez İşlemi İçin Hazırlanan Çözeltiler

- a) Tris-HCl Tamponu (1 M Tris-HCl, pH: 8,8): 12,11 gram Tris 75 mL saf suda çözdürüldükten sonra pH'sı HCl ile 8,8'e ayarlandı. Daha sonra toplam hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.
- b) Akrilamid - bisakrilamid çözeltisi (%30 akrilamid + %0,8 bisakrilamid): 0,4 g bisakrilamid ve 15 g akrilamid alınarak 35 mL saf suda çözdürüldü ve daha sonra toplam hacim saf su ile 50 mL'e tamamlandı.
- c) SDS çözeltisi (%10): 1 gram SDS alınarak 9 mL saf suda çözdürüldü ve daha sonra toplam hacim saf su 10 mL'ye tamamlandı.
- d) Amonyum persülfat çözeltisi (%10): 1 g amonyum persülfat 8 mL saf suda çözüldü ve daha sonra toplam hacim saf su ile 10 mL'ye tamamlandı.

- e) Yürütme tamponu: 1,51 g Tris ve 7,51 g glisin alınarak 450 mL saf suda çözüldü. Daha sonra bu çözeltiye 5 mL %10'luk SDS'den eklendi ve pH'sı 8,5'e ayarlandı. En sonunda toplam hacim saf su ile 500 mL'ye tamamlandı.
- f) Numune tamponu: 1 mL %100'lük gliserin, 0,5 mL 1 M Tris-HCl (pH: 6,8), 1 mL %10'luk SDS ve 1 mL %0,1'lik bromtimol mavisi karıştırılarak toplam hacim saf su ile 10 mL'ye tamamlandı.
- g) Sabitleştirme çözeltisi: Elektroforezde yürütülen proteinlerin yerlerinin sabitleştirilmesi için %10 TCA, %50 izopropanol ve %40 saf su olacak şekilde bir çözelti hazırlandı.
- h) Jel boyama çözeltisi: 100 mg Coomassie Brilliant Blue R-250 reaktifi alınarak 10 mL asetik asit içinde çözdürüldü daha sonra hazırlanan bu karışıma 50 mL CH₃OH ve 40 mL saf su eklenerek çözelti hazırlanmış oldu.
- i) Jel yıkama çözeltisi: 10 mL CH₃COOH ve 50 mL CH₃OH alınarak toplam hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.
- j) Bromtimol mavisi çözeltisi (%0,1): 0,1 gram bromtimol mavisi, 16 mL 0,01 M NaOH çözeltisi içerisinde çözüldü ve toplam hacim saf suyla 100 mL'ye tamamlandı.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Protein Tayini

3.2.1.1. Kalitatif Protein Tayini

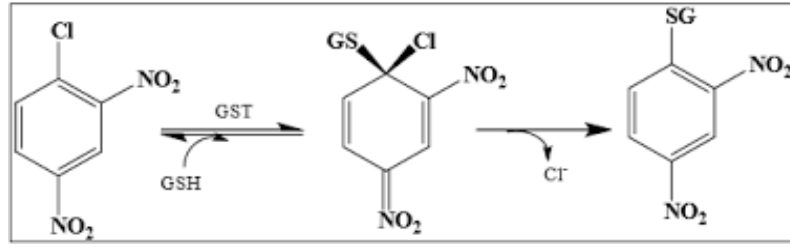
Çalışmamızdaki bütün numunelerin kalitatif protein tayini Segel'in 1968 yılında gerçekleştirmiş olduğu çalışma temel alınarak yapılmıştır. Segel'e göre proteinlerde bulunan triptofan, tirozin, fenil alanin amino asitleri maksimum absorbanlarını 280 nm'de gösterirler.

3.2.1.2. Bradford Yöntemi ile Protein Tayini

Glutasyon agaroz afinite kromatografisi ve homojenat kullanılarak saflaştırılmış enzimlerin bulunduğu çözeltilerdeki protein miktarı Bradford yöntemi aracılığıyla belirlendi. Bradford yöntemi, Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının proteinle etkileşime girdikten sonra oluşturduğu renkli kompleksin 595 nm dalga boyunda absorbans ölçümü temeline dayanır. Protein ve boyanın bağlanma işlemi hızlı bir şekilde gerçekleşir. Çalışma gerçekleştirilirken ilk aşama olarak standart çözelti hazırlandı. 1 mL’inde 1 mg sığır serum albümin bulunan standart çözeltilerden 10 ile 100 μ L aralığında (10 μ L, 20 μ L, 30 μ L, ... 100 μ L) farklı hacimlerde on tüp alındı ve tüplere eklendi. Tüm tüplerin hacmi saf su ile 100 μ L’ye tamamlanarak renklendirme aşamasına geçildi. Bu aşamada her bir tüpe 4,9 mL Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi eklendi. Tüpler vorteks cihazında karıştırıldı. Sonrasında inkübasyon ve ölçüm aşamasına geçildi. Tüpler renk oluşumu için 10 dakika boyunca 595 nm’de 3 mL’lik küvetlerde inkübe edildi. 100 μ L tampon ve 4,9 mL renklendirme reaktifinin bulunduğu karışım kör olarak kullanıldı. Kör karışımına karşı okuma gerçekleştirildi. Spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri yapıldıktan sonra absorbans değerlerine karşılık mg protein değerleri belirlendi ve bu değerlerle standart grafik oluşturuldu. Numune çalışmalarında, tavuk taşlık homojenatı, amonyum sülfat çöktürmesi ve afinite kromatografisinden saflaştırılan enzim çözeltileri 100 kat seyreltilerek analiz edildi. Inkübasyon işlemi vorteks ile 10 dakika karıştırılarak gerçekleştirildi. 595 nm dalga boyunda köre karşı absorbans ölçümleri yapıldı. Sonuçların doğru bir şekilde hesaplanması için absorbans değerleri üç tekrar olarak yapıldı ve ölçümlerin aritmetik ortalaması alındı. Standart grafik yardımıyla protein miktarları belirlendi.

3.2.2. Glutasyon S-Transferaz Enziminin Aktivite Tayini

Glutasyon S-transferaz enzimi glutasyon molekülünü, elektrofille birleştirerek konjugat oluşturmak üzere kullanabilir. Konjugasyon da en çok tercih edilen hoş kokulu aromatik elektrofil 1-kloro-2,4- dinitrobenzen’dir. Reaksiyon sonucu oluşan dinitrobenzen S-glutasyon (DNB-SG) ürünü, 340 nm’deki absorbansta maksimum değeri gösterir. Böylece 340 nm’deki gösterilen maksimum absorbans aracılığıyla aktivite ölçümü gerçekleştirildi. Çalışmamızda aktivite ölçümleri bu metod temel alınarak gerçekleştirildi.



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

Aşağıda gösterilen değerlere göre çözelti hazırlandı. Toplam çözelti hacmi 1 mL olacak şekilde ayarlandı. Spektrofotometreye küvetler uygun olarak yerleştirildikten sonra aktivite ölçümü yapıldı. Absorbans değerleri toplamda üç dakika ölçülürken dakikada bir ölçüm gerçekleştirildi. Ölçüm sonuçları kaydedildi. (Habig et al, 1974).

Tablo 3.1. GST enziminin aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler ve miktarları

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

Enzim ünitesi hesaplanırken aşağıda belirtilen formül kullanıldı.

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

$$E\ddot{U} : 1 \text{ mL'de yer alan enzim ünitesi}$$

$$9,6 : \text{Ekstinksiyon sabit katsayısı}$$

$$\Delta OD : \text{Spektrofotometrik analiz sırasında dakikada oluşan absorbans değişimi}$$

$$V_T : \text{Ölçüm sırasında kullanılan küvete ait toplam hacmi}$$

$$SF : \text{Seyreltme faktörü}$$

$$V_E : \text{Ölçümde kullanılan küvete eklenen enzim numunesine ait hacim}$$

3.2.3. GST Enzimi İçin Afinite Jelinin Hazırlanması

Enzim saflaştırılmasında sık olarak kullanılan yöntemlerden biri afinite kromatografisidir. Bu yöntemi kullanmak için kolonda bulunan katı partiküller temizlenmelidir. 10 mL'lik hacmi olan kolonu temizlemek için 1 g kuru glutatyon-agarose tozu alındı. Kolon 200 mL saf suyla birkaç kere yıkandı. Yıkama gerçekleşirken aynı zamanda jel şişirilmiş oldu. Şişirilmiş jelin havasını almak için su trompu kullanıldı. Sonraki aşamada jeli süspanse etmek için dengeleme tamponu olan 0,05 M K-fosfat pH:7,4, 1 mM EDTA ve 1 mM DTT eklendi. Böylece 1x10 cm ölçüsünde kapalı bir sistemin oluşturduğu soğutmalı kolona hazırlanan jel paketlenildi. Paketlenen jel dengeleme tamponu ile yıkanırken peristaltik pompadan yararlanıldı. Elüat ve tampona ait absorbans ve pH'ların eşitlenmesiyle kolonun dengelenmiş olduğu belirlendi. Bu şekilde Glutatyon-agaroz afinite kolonunun hazırlığı tamamlanmış oldu (Güvercin et al 2008; Toribio et al, 1996).

3.2.4. Tavuk Taşlığından GST Enziminin Saflaştırılması

3.2.4.1. Tavuk Taşlığı Temini ve Homojenat Hazırlanması

Çalışmamızda yer alan tavuk taşlığı taze bir şekilde temin edildi. Tavuk taşlık dokuları çalışma için laboratuara getirilirken soğuk zincir kuralına uygun davranıldı. Getirilen doku -20°C'de korundu. Daha sonra donan tavuk taşlığı yabancı dokulardan elimine edilerek ufak parçalara ayrıldı. Çalışma için ayrılan tavuk taşlığın üzerine üç katı olacak şekilde homojenat tamponu ilave edildi. Homojenisasyonu sağlamak için homojenizatör kullanıldı. Ependorf tüplerine homojenat eklenerek santrifüj gerçekleştirildi. 60 dakika süren santrifüj 13.000 x g hızında gerçekleştirildi ve oluşan çökelek kısım uzaklaştırıldı. Bu şekilde homojenat oluşurken çalışma sırasındaki işlemlerin tümü +4 °C'de yapıldı.

3.2.4.2. Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Çöktürme sırasında kullanılan katı $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ homojenata yavaş yavaş eklenerek manyetik karıştırıcıyla çözünme işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra %0-20 ,%20-30, %30-40, %40-50, %50-60, %60-70, %70-80, %80-90, doyguluklarında amonyum sülfat çöktürmeleri gerçekleştirildi. Her yüzdelik dilimde santrifüj tüplerine eklenen tuzlu homojenat için 13500xg hızında 30 dakika boyunca santrifüj yapıldı. Amonyum sülfat

çöktürmesinin her basamağında çökelek ve süpernatantta aktivite tayini gerçekleştirildi. Bu işlemlerin tamamı +4 °C’de gerçekleştirildi.

3.2.4.3. Homojenattaki Enzimin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması

Amonyum sülfat çöktürmesinden elde edilen enzim numunesi glutatyon-agaroz afinite kolonuna uygulanırken peristaltik pompadan faydalanıldı. Kolonun akış hızı 20 mL/saat’e ayarlandı. Cihaz dejenerasyonu için borat, asetat ve dengeleme tamponları hazırlandı. Dejenerasyon aşamasında borat ve asetat tamponları ile agaroz afinite cihazı her defasında sırayla 15 mL borat ve 15 mL asetat uygulanmak üzere 3 tekrar ile yıkandı. Yıkama işlemi spektrofotometrik olarak fraksiyonlardaki absorbans değerlerinin köre eşit olmasıyla tamamlanmış oldu. Afinite kolonunun dengelenmesi aynı tamponla gerçekleştirildi. Dondurucuya alınan numuneler aktivite kaybına uğramaması için çıkarıldıktan sonra buzda bekletilerek yavaş yavaş cihazdan geçirildi. Numune geçişinden sonra cihaz tekrar dengeleme tamponuyla yıkandı. Elüsyon için 1,25-10 mM aralığında GSH içeren 50 mM Tris-HCl (pH: 9,5) derişimşi farklı iki çözelti hazırlandı. Derişimi az olan çözelti geçirildikten sonra derişimi yüksek olan çözelti içinde gradientli elüsyon yapılarak enzim saflaştırıldı. Saflaştırılan enzim hacmi 1,5 mL olan ependorf tüplerine eklenerek 340 nm dalga boyunda aktivite tayini gerçekleştirilmiş oldu (Toribio et al, 1996).

3.2.5. SDS-PAGE ile Enzim Saflığının Kontrolü

Enzim saflık derecesi belirlenirken, proteinlerin ağırlıklarına göre ayrılmasını sağlayan yaygın bir teknik olan %3-15 kesikli SDS-PAGE (Sodyum Dodesilsülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi)’ den yararlanıldı (Laemmli, 1970). Önceki çalışmalardan kalan kir, protein artıkları ve kimyasal maddelerin temizlenmesi için plaklar su ve alkol kullanılarak temizlendi. Temizlenmiş plaklar sabitlendikten sonra jel hazırlama kabininin içine yerleştirildi. İlk aşamada ayırma jeli hazırlandı. Üst tarafta 2 cm mesafe bırakılacak şekilde hazırlanan jel plakların arasına dolduruldu. Bu süreçte ayırma jeli katılaşırken yığma jelinin hazırlık aşamasına geçildi. Yığma jeli ekleyerek üst kısmındaki boşluk dolduruldu, tarak özenli ve dikkatli bir şekilde yerleştirilerek numune kuyucukları oluşturuldu. Yığma jelinin de katılaşma süreci tamamlandıktan sonra tarak dikkatli bir şekilde çıkartılarak numune kuyularının oluşumu gerçekleştirildi. Enzim örnekleri

denatüre edildi. Denatürasyon aşamasında numune tamponundan 100 µL, enzimden 100 µL, gliserinden de 50 µL kullanıldı. Numuneler hazırlandıktan sonra beş dakika süreyle kaynar suda kaynatıldı. Bu süreçte kuyucuklar oluştu. Kuyucuklara enzim ve standart protein örnekleri yüklendi. Taşma olmaması için maksimum özen gösterildi. Elektroforez tankına jel plakaları yerleştirildi. Elektroforez işlemini başlatabilmek için tanka hacmi belirlenen yürütme tamponu eklendi. Daha sonra elektroforez tankı kapatıldı. Güç kaynağına bağlanan tank için işlemin başında 80 voltajlık güçte 25 dakika yürütme gerçekleştirildi. Böylece kuyularda bulunan numuneler ayırma jeline kadar yürüyerek yığılmış oldu. Ardından işleme numuneler jelin en alt kısmına yürüyene kadar 120 voltajlık güçle devam edildi. Elektroforez işleminin sonlandırılmasıyla birlikte akım kesildi. Jelleri plaklardan tek parça halinde çıkarmak için dikkat edildi. Dağılmadan çıkarılan jeller sabitleştirme çözeltisine yerleştirildi. Jeldeki proteinlerin sabitleştirme işlemi 30 dk boyunca sağlandı. Jel sabitleştirmeden alınarak boyama için çözeltiye konuldu. Boyama işlemi çalkalayıcıda iki saat boyunca devam etti. Süre sonunda jel boyanmış bir şekilde yıkama çözeltisine konuldu. Protein bantlarının belirginleşmesiyle birlikte jel çıkarıldı, fotoğraflar çekilerek kaydedildi (Laemmli, 1970).

Tablo 3.2. Elektroforez jellerinin hazırlanması için kullanılan çözeltiler ve miktarları

Yığma jeli	Ayırma jeli
1M Tris-HCl pH: 6,8'den 440 µL	1 M Tris-HCl pH: 8,8 ,5 mL
%0,8'lik bisakrilamid ve 800 µL	%0,8'lik bisakrilamid ve 800 µL
%30'luk akrilamid	%30'luk akrilamid 4,4 mL
%10'luk SDS, 30 µL	%10'luk SDS, 200 µL
TEMED, 30µL	TEMED, 130 µL
Saf su, 2,450 mL	Saf su, 3130 mL
%10'luk PER, 30-50 µL	%10'luk PER, 100 µL

3.2.6. GST Enziminin Molekül Kütlesinin SDS-PAGE ile Tayini

Tavuk taşığından saf olarak elde edilen GST enzime ait molekül kütlesinin belirlenmesi için saflaştırmada 175-130-95-70-62-51-42-29-22-14-10,5 kDa kütlelerine sahip standart

proteinler kullanıldı. Tavuk taşlık GST enzimi için yapılan elektroforez işleminden sonra oluşan jel fotoğrafına bakılarak standart proteinlerin R_f değerlerinin hesaplanması gerçekleştirildi. R_f -log M_K standart grafiğinin çizim aşamasında excel programından faydalanıldı. Aynı jel fotoğrafından faydalanarak tavuk taşlığından saflaştırılan GST enziminin alt biriminin R_f değeri de hesaplandı. Hesaplanan değer grafik denkleminde yerine yazılarak log M_K değeri hesaplandı. Hesaplanan log M_K değerinin antilogaritması alınıp enzim örneğinin molekül kütlesi bulundu. Proteinlerin R_f değerleri;

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

Formülüyle elde edildi. Bu formülde proteinin yürüme mesafesini; X_e , boyanın yürüme mesafesini; X_{boya} temsil etmektedir.

3.3. GST Enzimiyle İlgili Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları

3.3.1. Optimum pH'nın Belirlenmesi

Tavuk taşlığından saflaştırma işlemi gerçekleştirilen GST enzime ait optimum pH değerinin belirlenmesi için belli aralıklarda iki tampon hazırlandı. Bu tamponlardan ilki olan potasyum fosfat'ın pH aralığı 5,5, 6,0, 6,5, 7, 7,5 ve 8,0 iken Tris-HCl tamponu için pH 8,0, 8,5, 9,0 aralığındadır. Enzim aktivite ölçümleri her tampon için ayrı olacak şekilde gerçekleştirildi.

3.3.2. Stabil pH'nın Belirlenmesi

Tavuk taşlığından saflaştırma işlemi gerçekleştirilen GST enzime ait stabil pH değerini belirlemek için iki ayrı çözelti hazırlandı. Çözeltilerden Potasyum fosfat çözeltisinin pH aralığı 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0 iken Tris-HCl çözeltisinin pH aralığı 7,5, 8,0, 8,5 ve 9,0'dur. Ependorf tüplerine 750 μ L hazırlanmış çözelti alınıp üzerine 250 μ L enzim eklendi. Bu şekilde tüplerin aktivite ölçümleri gerçekleştirildi ve ependorf tüpleri +4°C derecelik sıcaklıkta saklandı. Enzim kaynağı olarak bu çözeltiler kullanıldı. Aktivite ölçümleri belli aralıklarda olacak şekilde 60 saat süreyle her 12 saatte bir ölçüm yapıldı. Enzime ait stabil pH değeri yapılan bu aktivite ölçümleriyle belirlendi.

3.3.3. Optimum İyonik Şiddetin Belirlenmesi

Tavuk taşığından saf olarak elde edilen GST enzimine ait optimum iyonik şiddeti bulmak için gerçekleştirilen çalışmada derişimi 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 mM olan Tris-HCl ile K-fosfat tamponları hazır bulunduruldu. Optimal pH değerine ayarlanan her tampon için ayrı ayrı aktivite ölçümü gerçekleştirildi.

3.3.4. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi

Tavuk taşığından saf bir şekilde elde edilen GST enzimine ait optimum sıcaklık değeri belirlenirken ısıtma-soğutma özelliği olan elektronik su banyosundan yararlanıldı. Daha sonra optimum sıcaklığı elde etmek için optimum pH da aktivite ölçümü için kullanılan çözelti ve substratları içerisinde bulunduran karışım küvette su banyosunda ayarlanmış sıcaklıkta bekletildi. İstenen sıcaklık değerinde beş dakikalık süre boyunca bekletilen küvete enzim pipetlendi ve hızlıca okuma gerçekleştirildi. 10 °C' de bir olmak üzere 0 °C ile 90 °C arasında aktivite ölçümleri gerçekleştirildi.

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

Tavuk taşığından saf olarak elde edilen GST enzimine ait K_M ve V_{max} değerleri belirlenirken CDNB ve GSH substratlarından faydalanıldı. İlk olarak GSH konsantrasyonu sabit tutularak CDNB'nin beş farklı konsantrasyonu için aktivite ölçümü yapıldı. Ölçümlerin sonucunda oluşan değerlerle Lineweaver-Burk standart grafiği oluşturuldu. CDNB substratına ait K_M ve V_{max} değerleri elde edilen grafik aracılığıyla hesaplandı. Bu yöntemle aktivite ölçümleri CDNB substrat konsantrasyonu sabit olacak şekilde beş ayrı GSH konsantrasyonu ile da gerçekleştirildi. Ölçümlerin sonucunda oluşan değerlerle Lineweaver-Burk standart grafiği oluşturuldu. GSH substratına ait K_M ve V_{max} değerleri elde edilen grafik aracılığıyla hesaplandı. Böylece aktivite ölçümlerinin tümü optimal şartlar altında gerçekleştirilmiş oldu (Lineweaver and Burk, 1934).

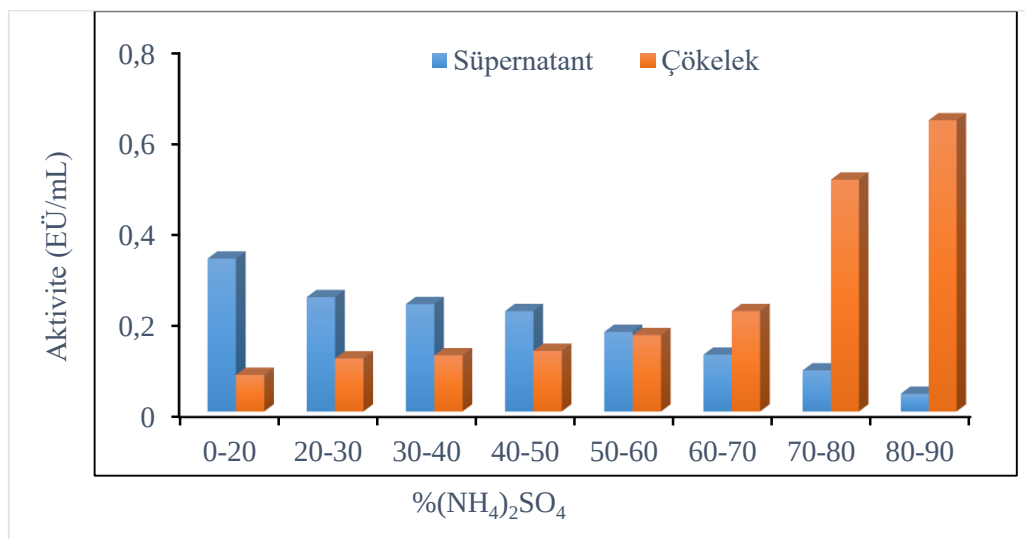
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

4.1. (NH₄)₂SO₄ Çöktürmesi

Tavuk taşığından saflaştırılan glutatyon S-transferaz enziminin (NH₄)₂SO₄ çöktürme işlemi 3.2.4.2’de anlatılan şekilde gerçekleştirildi. Tablo 4.1 ve Şekil 4.1’deki veriler kullanılarak çökme aralığı %60-90 olarak bulundu.

Tablo 4.1. (NH₄)₂SO₄ çöktürmesinin verileri

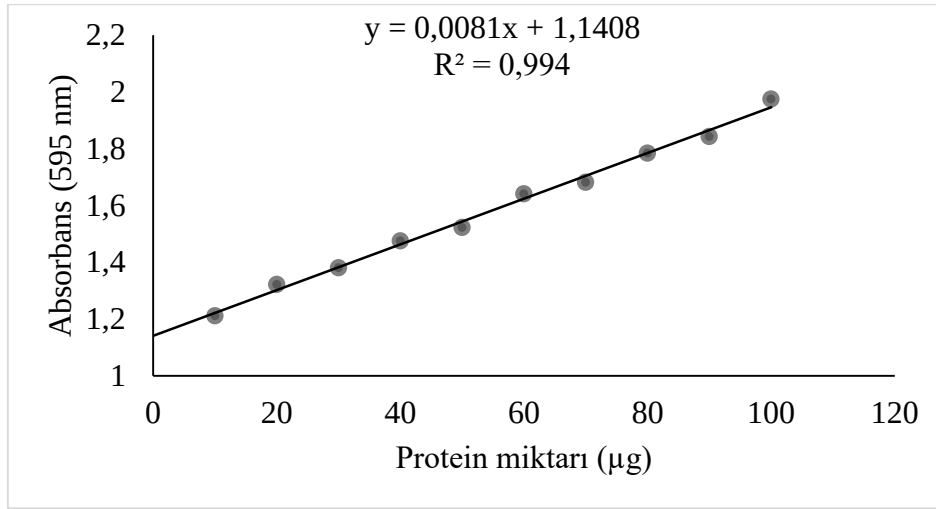
%(NH ₄) ₂ SO ₄	Süpernatant (EÜ/mL)	Çökelti (EÜ/mL)
0-20	0,336	0,080
20-30	0,251	0,116
30-40	0,236	0,123
40-50	0,220	0,133
50-60	0,175	0,168
60-70	0,125	0,220
70-80	0,090	0,509
80-90	0,038	0,640



Şekil 4.1. (NH₄)₂SO₄ çöktürmesi sonuçları grafiği

4.2. Protein Tayini Sonuçları

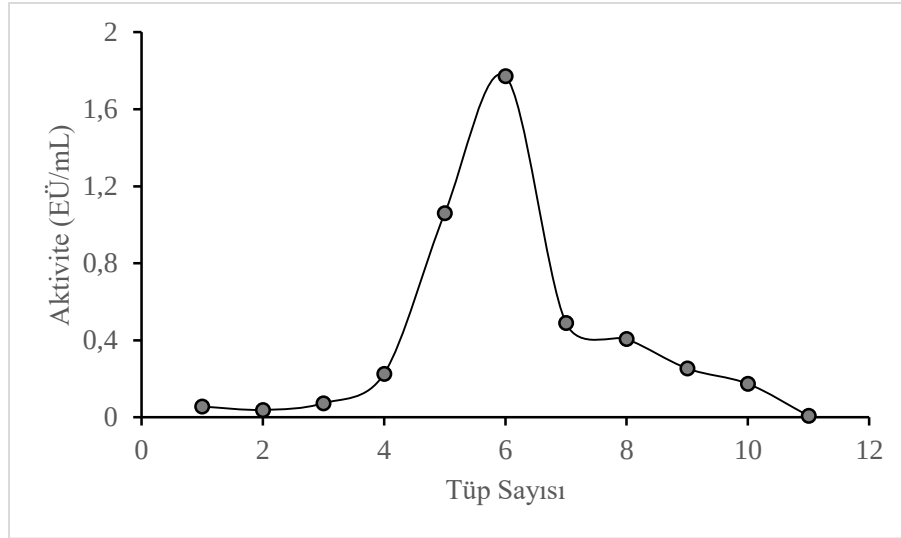
Numunelerdeki kantitatif protein tayini Bradford yöntemine göre yapıldı. Standart grafik Bölüm 3.2.1.2’de anlatılan şekilde çizildi. Tüm saflaştırma aşamalarındaki numunelerde proteinlerin kantitatif tayini, çizilen standart grafik aracılığıyla hesaplandı. Oluşturulan standart grafik Şekil 4.2’deki gösterildi.



Şekil 4.2. Kantitatif protein tayini için oluşturulan Absorbans – Protein miktarı grafiği

4.3. Enzim Elüsyonunun Sonuçları

Bölüm 3.2.4.3’te anlatıldığı gibi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürmesi sonucu elde edilen enzim numunesi afinite kolonuna yüklendi. Daha sonra gradientli elüsyon gerçekleştirildi. Elüatlardaki enzim enzim aktivitesi ölçülerek Şekil 4.3’te verildi.



Şekil 4.3. Afinite kolonundan enzim saflaştırılırken elde edilen elüsyon grafiği

4.4. Enziminin Saflaştırılması Esnasında Elde Edilen Sonuçlar

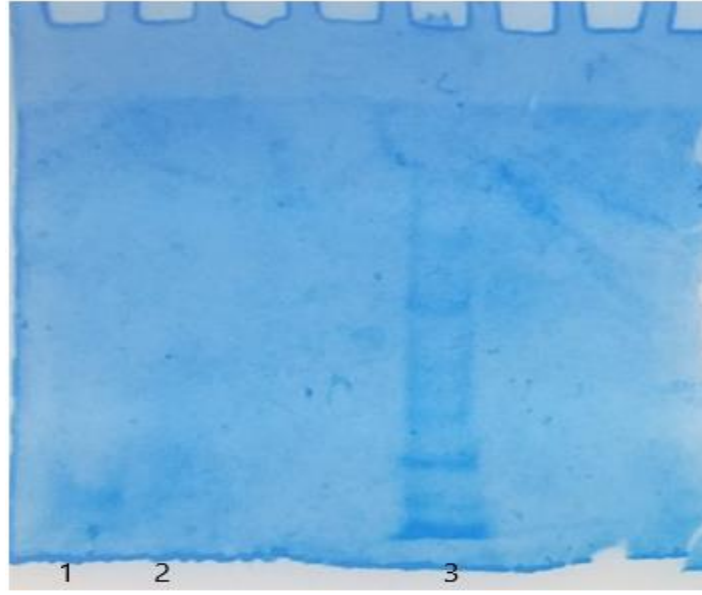
Elde edilen saf enzimin saflaştırma parametreleri hesaplanarak Tablo 4.2’de gösterildi.

Tablo 4.2. Enzimin saflaştırma parametreleri

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	20	0,1475	3,0500	61,00	2,95	0,048	100	1
Amonyum sülfat	4	0,6400	4,5700	18,28	2,56	0,140	86,77	2,92
Afinite Kromatografisi	5	0,5050	0,0073	0,036	2,52	69,17	85,42	1441

4.5. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez Metodu Kullanılarak Enzim Saflık Derecesinin tespiti Sonuçları

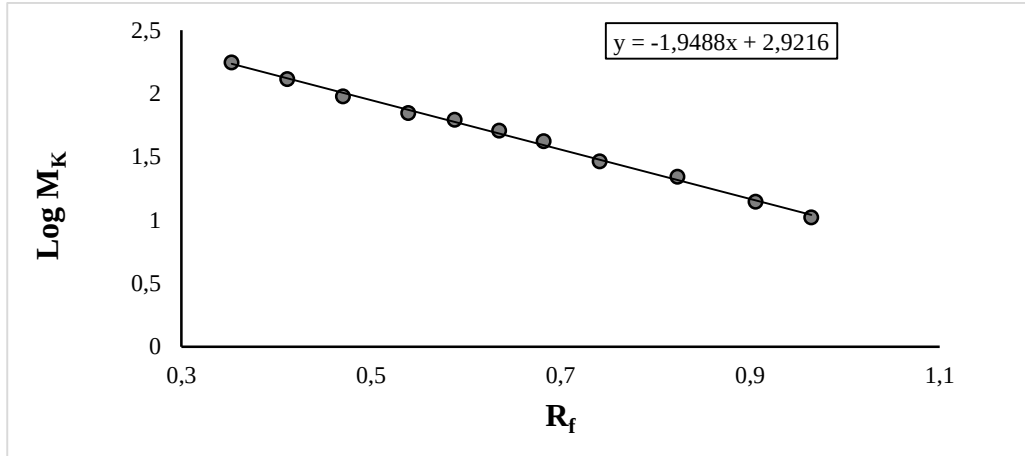
Tavuk taşlık dokusundan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürmesi ve afinite kromatografisiyle kullanılarak saf halde elde edilen enziminin saflık derecesinin kontrolü için bölüm 3.2.5’te anlatıldığı gibi SDS-PAGE yönteminden faydalanıldı. Sonuçta saf enzim ve standart protein bantlarını içeren resim Şekil 4 .4’te gösterildi.



Şekil 4.4. Saf enzim ve standartlar için elde edilen elektroforez fotoğrafı (1. ve 2. kuyu: Saf enzim, 3: Standart proteinler (175-130-95-70-62-51-42-29-22-14-10,5 kDa))

4.6. Tavuk Taşlık Dokusundan Saflaştırılan Enziminin Molekül Ağırlığının Tespitine Dair Sonuçlar

Tavuk taşlık dokusundan saflaştırılan GST enziminin molekül ağırlığının belirlenmesi amacıyla bölüm 3.2.6'da anlatıldığı gibi saf enzim ve standart proteinler SDS içeren PAGE'de yürütüldü ve daha sonra elde edilen görüntü Şekil 4.4'te gösterildi. Standart proteinlerin ve saf enzimin yürüdükleri mesafe hesaplanarak R_f değerleri ölçüldü ve $\log M_K - R_f$ standart grafiği çizildi (Şekil 4.5). Bu grafik yardımıyla saf enziminin molekül kütlesi yaklaşık olarak 25,66 kDa olarak tespit edildi.



Şekil 4.5. Enzimin molekül kütlesinin hesaplanmasında kullanılan LogMK - R_f grafiği

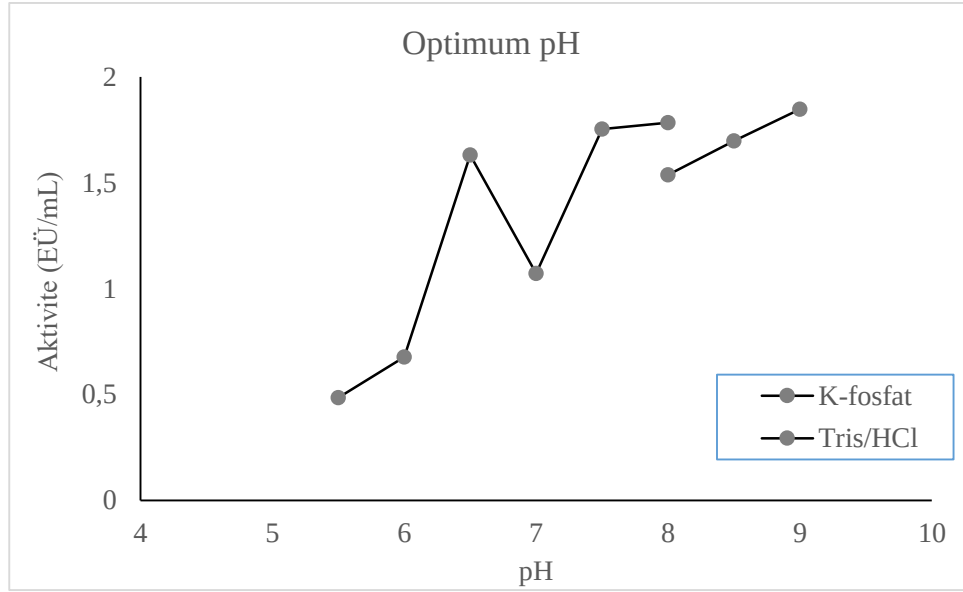
4.7. Enzimin Karakterizasyon Çalışmaları

4.7.1. Optimum pH Çalışmalarının Sonuçları

Enzimin optimum pH'sının belirlenmesi amacıyla bölüm 3.3.1'de anlatıldığı gibi pH'ları 5,5 ile 8,0 arasında değişen KH₂PO₄ ve pH'sı 8,0 ile 9,0 arasında değişen Tris-HCl tamponlarından oluşan 9 adet çözeltiyle enzimin aktivite ölçümleri gerçekleştirildi. Elde edilen veriler Tablo 4.3 ve Şekil 4.6'da gösterildi.

Tablo 4.3. Optimum pH'nın bulunması için elde edilen aktivite ölçüm sonuçları

K-fosfat		Tris- HCl	
pH	Aktivite (EÜ/mL)	pH	Aktivite (EÜ/mL)
5,5	0,48611	8,0	1,53819
6,0	0,67708	8,5	1,69791
6,5	1,63194	9,0	1,84722
7,0	1,07291	-	-
7,5	1,75347	-	-
8,0	1,78472	-	-



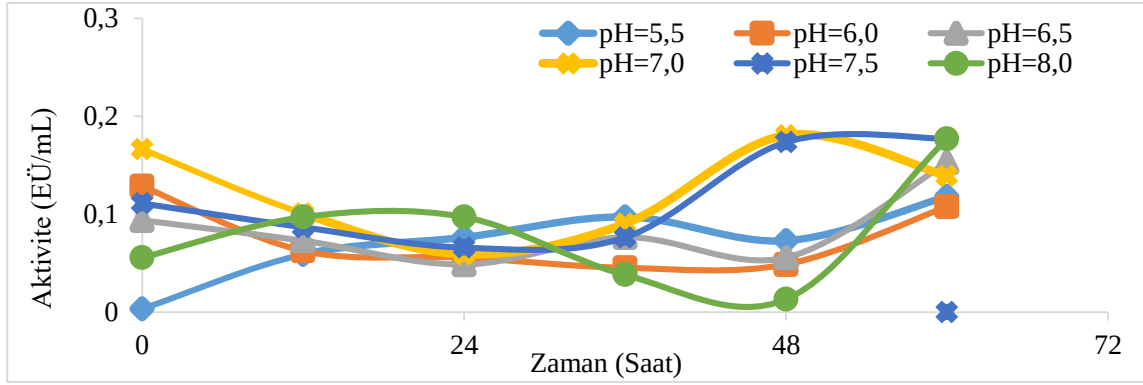
Şekil 4.6. Optimum pH'nın bulunması için elde edilen aktivite ölçüm sonuçları grafiği

4.7.2. Stabil pH'nın Belirlenmesi İçin Yapılan Çalışma Sonuçları

Tavuk taşlık dokusu glutatyon S-transferaz enziminin stabil olduğu pH'sının bulunması amacıyla uygun iyonik şiddetteki farklı pH değerlerine sahip tampon çözeltiler bölüm 3.1.3'te gösterildiği gibi hazırlandı. Söz konusu çözeltilerle aktiviteler 72 saat boyunca 12 saatte bir düzenli aralıklarla ölçüldü. Sonuçlar Tablo 4.4, Tablo 4.5, Şekil 4.7, Şekil 4.8'de gösterildi.

Tablo 4. 4. Stabil pH'nın belirlenmesi için KH₂PO₄ tamponu ile elde edilen aktivite sonuçları

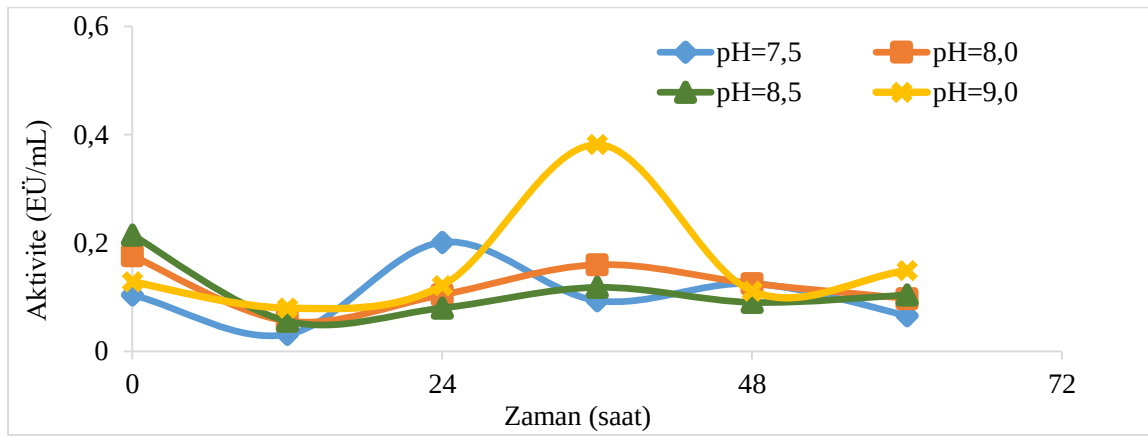
pH/Zaman	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0
0	0,00347	0,12847	0,09375	0,16666	0,11111	0,05555
12	0,05902	0,06250	0,07291	0,10069	0,08680	0,09722
24	0,07638	0,05555	0,04861	0,05902	0,06597	0,09722
36	0,09722	0,04513	0,07638	0,09027	0,07638	0,03819
48	0,07291	0,04861	0,05555	0,18055	0,17361	0,01319
60	0,11805	0,10763	0,15277	0,13888	0,17708	0,17708



Şekil 4.7. Stabil pH'nın belirlenmesi için KH₂PO₄ tamponu ile elde edilen aktivite sonuçları grafiği

Tablo 4.5. Stabil pH'nın belirlenmesi için Tris-HCl tamponu kullanılarak ölçülen aktivite sonuçları

pH/Zaman	7,5	8,0	8,5	9,0
0	0,10416	0,1761	0,215	0,12847
12	0,03125	0,05555	0,05555	0,07986
24	0,20138	0,10416	0,07986	0,12152
36	0,09375	0,15972	0,11805	0,38194
48	0,125	0,125	0,09027	0,11111
60	0,06597	0,09722	0,10416	0,1493



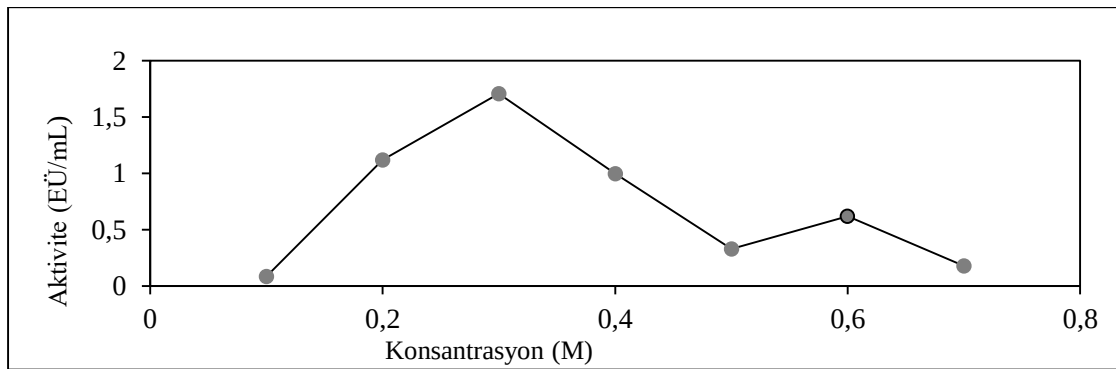
Şekil 4.8. Stabil pH'nın belirlenmesi amacıyla Tris-HCl tamponu kullanılarak elde edilen Zaman-Aktivite grafiği

4.7.3. Optimum İyonik Şiddetin Hesaplanması İçin Elde Edilen Sonuçlar

Tavuk taşlık dokusu glutatyon S-transferaz enziminin optimum iyonik şiddetinin tespit edilmesi için bölüm 3.3.3’de anlatıldığı gibi söz konusu tamponların bazı derişimleri kullanılarak enzimin aktivite ölçümleri yapıldı ve sonuçlar Tablo 4.6 ve Şekil 4.9’da gösterildi.

Tablo 4.6. Enzimin optimum iyonik şiddetinin belirlenmesinde kullanılan Tris-HCl tamponu ile elde edilen ölçüm sonuçları

İyonik şiddet (M)	Aktivite (EÜ/mL)
0,1	0,08333
0,2	1,11805
0,3	1,70833
0,4	0,99652
0,5	0,32986
0,6	0,618055
0,7	0,17708



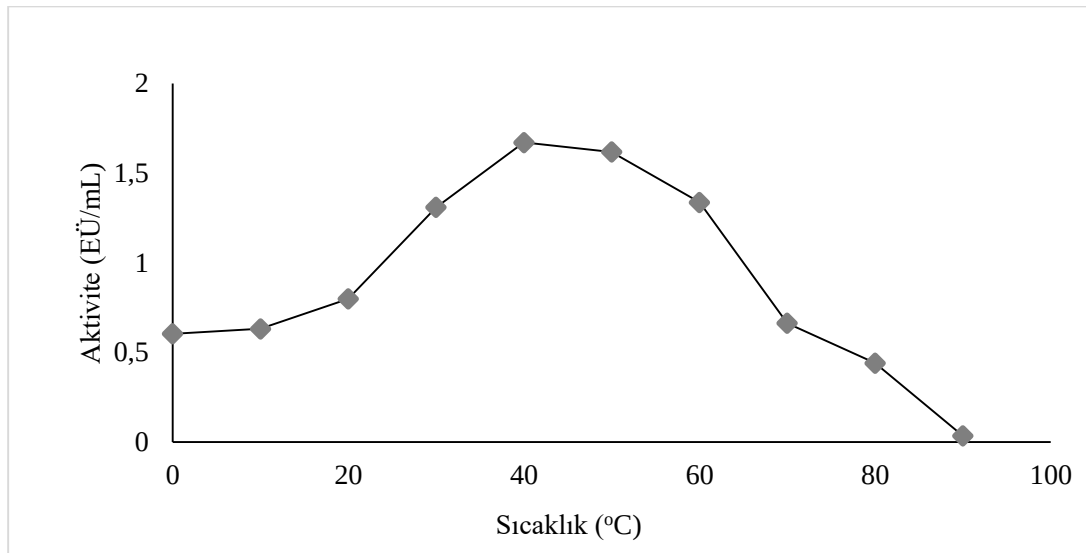
Şekil 4.9. Enzimin optimum iyonik şiddetinin belirlenmesinde kullanılan Tris-HCl tamponu ile elde edilen ölçüm sonuçları grafiği

4.7.4. Sıcaklığın Enzim Aktivitesine Etkisinin Belirlenmesi Sonuçları

Bölüm 3.3.4’te anlatıldığı gibi 0 °C ile 90 °C arasında her 10 °C de bir enzimin aktivitesi ölçülerek sonuçlar Tablo 4.7. ve Şekil 4.10.’da verildi.

Tablo 4.7. Sıcaklığın enzim aktivitesine etkisinin sonuçlarının verileri

Sıcaklık (°C)	Aktivite (EÜ/mL)
0	0,60416
10	0,63194
20	0,79861
30	1,30902
40	1,67013
50	1,61805
60	1,33680
70	0,66319
80	0,44097
90	0,03472

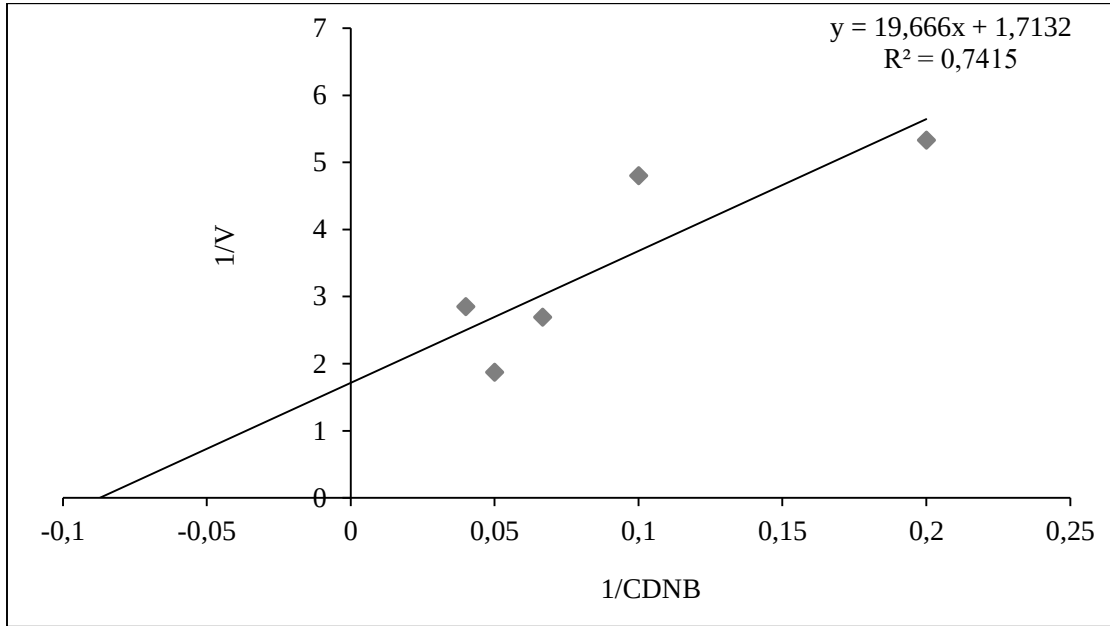


Şekil 4.10. Enzim için belirlenen sıcaklık - aktivite grafiği

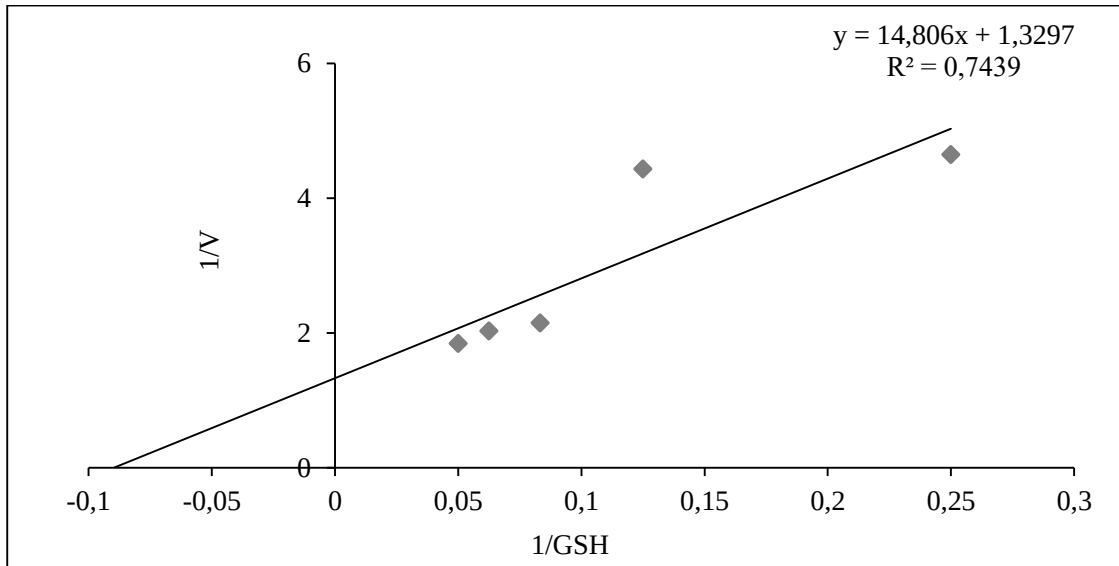
4.7.5. Kinetik Çalışma Sonuçları

CDNB ve GSH için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunması için bölüm 3.3.5'de anlatıldığı gibi CDNB'nin 25 mM'lık sabit konsantrasyonunda GSH substratının 5 ayrı konsantrasyonuyla aktivite ölçümleri yapıldı. Ölçümlerle birlikte elde edilen değerlerle $1/[GSH]-1/V$ grafiği (Şekil 4.11) çizilerek grafik denkleminde GSH için K_M ve V_{max} sırasıyla 11,134 mM ve 0,752 EÜ/mL olarak bulundu. Benzer şekilde GSH'ın 20 mM'lık sabit derişimde CDNB substratının 5 farklı derişimde aktivite ölçümleri yapıldı. Daha sonra $1/[CDNB]-1/V$ grafiği (Şekil 4.12) çizilerek grafik denkleminde CDNB için K_M

ve V_{max} sırasıyla 11,476 mM ve 0,583 EÜ/mL olarak bulundu. Bulunan değerler Tablo 4.8’de gösterildi.



Şekil 4.11. CDNB substratı için K_M ve V_{max} ’ın tespit edilmesi için çizilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.12. GSH substratı için K_M ve V_{max} ’ın tespit edilmesi için çizilen Lineweaver-Burk grafiği

Tablo 4.8. CDNB ve GSH substratları için hesaplanan Vmax ve KM değerleri

Substrat	K _M (mM)	V _{max} (EÜ/mL)
CDNB	11,476	0,583
GSH	11,134	0,752

5. BULGULAR VE TARTIŞMA

Dimerik yapıda olup geniş bir enzim ailesinden olan GST(glutatyon S-transferaz) indirgenmiş glutatyonun ksenobiyotiklere olan konjugasyonunu sağlar. İndirgenmiş glutatyon bazı nonpolar bileşiklere bağlanır. Bu bileşikler azot atomları, sülfür veya elektrofilik karbondur. Oksidatif stresle birlikte ikincil endojen bileşikler meydana gelir. GST'ler bu bileşikler, çevresel karsinojenler ve antitümör ilaçlar gibi ksenobiyotiklerin transformasyonunu faz II yoluyla sağlar. Glutatyon S-transferaz enzimi yapısı değişmiş olan ksenobiyotiklerin vücut dışına atılmasını hem hücre içi hemde hücre dışı sıvıdaki çözünürlüğünü arttırarak kolaylaştırır. Aynı zamanda canlıları sitotoksik elektrofilik kimyasallara karşıda korurlar. GST'ler oksidatif strese karşı uyum sağlayan dinamik, interaktif bir savunma mekanizmasının önemli parçaları iken ksenobiyotiklerin biyotransformasyon işlemlerinde önemli bir rol taşırlar (Hayes, J. D., Flanagan, J. U., Jowsey, I. R. (2005).

GST'ler, bitki, bakteri, böcek ve memeliler gibi kaynakların çoğundan saflaştırılmıştır. Ancak memelilerde bu çalışmalar daha ayrıntılı şekilde gerçekleştirilmiştir. Sebebi ise toksik ekzojen bileşikleri metabolize etme kabiliyetleridir. Enzime ait kinetik ve yapısal özelliklerin belirlenmesi ve farklı kaynaklardan saflaştırılma çalışmaları hala yapılmaktadır.

Günümüzde çevre kirlenmesine neden olan birçok faktör bulunmaktadır. Bunlara örnek olarak nüfusun çok hızlı bir şekilde artması, plansız kentleşme, sanayi ortamındaki artış ve teknoloji sayılabilir. Bu faktörler her ne kadar yeryüzündeki bütün canlılara tehdit oluştursada bu canlıların başında insan gelmektedir. Canlılarda bu tehditleri yok etmek için vücudun bir savunma mekanizması vardır ve bu mekanizmada çok sayıda enzim yer almaktadır. Ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunu gerçekleştiren GST bu enzimlerin en önemlilerinden biridir (Hee-Joong et al, 2005).

Glutatyon S-transferaz enziminin farklı mekanizmalarla birlikte ksenobiyotikleri metabolizmadan uzaklaştırmak gibi önemli bir özelliğe vardır. GST enzimi

ksenobiyotiklerin atılımını sağlamak için önce inaktif hale getirir. Elektrofilik ksenobiyotiklerin, indirgenmiş glutatyonla konjugasyonunu gerçekleştirerek inaktif hale getirilmesini sağlar ve metabolizmadan uzaklaştırır (Güvercin et al, 2008) GST izoenzimleri fazlaca gen lokusundan sentezlenmiş, molekül kütlesi yaklaşık 25 kDa olarak bilinen homodimerik ve heterodimerik proteinlerdir. Alt ünitelerine ait aktif formu, aynı olmayan iki fonksiyonel yapının oluşturduğu enzimlerdir. Bu fonksiyonel yapılar G ve H bölgeleridir. G bölgesi fizyolojik substratı bağlar, hidrofobik yapıda olan H bölgesi ise yapı farklılığı olan elektrofilik substratları bağlar. Hidrofobik H bölgesinde bulunan aminoasit sistemlerindeki farklılık GST izozim ailesinin substrat çeşitliliğine neden olur. Canlılar istemli veya istem dışı olarak ksenobiyotiklere maruz kalabilmektedir. Glutatyon S transferazlar bu ksenobiyotiklerin glutatyonla konjugasyonunu sağlayıp toksisite oranı daha az olan metabolitlere dönüştürülmesini sağlayan faz-II detoksifikasyon reaksiyonlarını katalizleme görevini üstlenen enzim ailesindendir (Armstrong 1997; Strange et al. 2001; Hayes et al. 2005).

Glutatyon S-transferaz enziminin metabolizmada çok önemli görevler vardır, bu enzim ilk defa sıçan karaciğerinde belirlenmiştir (Boylard and Chasseaud 1969). GST'ler'in yapı, fonksiyon ve metabolik özelliklerinin detaylıca incelenmesi için sonraki süreçlerde yapılan çalışmalarda insan, sıçan, sığır ve farelerin değişik dokularından saflaştırmalar gerçekleştirilmiştir (Hee-Joong et al, 2005).

Enzime ait formların çoğu saflaştırılmıştır. Yapısal özellikleri incelenen bu formların iç içe geçmiş substrat spesifitelerinin varolduğu kanaatine varılmıştır (Pabst et al. 1973; Askelöf et al. 1975). Enzim sınıflandırılması yapılırken proteinin fiziksel ve yapısal özellikleri temel alınmıştır. Ayrıca memelilerden bakterilere, bitkilerden balıklara kadar daha birçok canlıdan saflaştırılan GST enzimine ait karakterizasyon çalışmaları yapılmış ve kimyasal maddelerin enzim aktivitesine olan etkileri araştırılmıştır.

Glutatyon S transferaz hücre içinde antioksidan sistemlerine ait glutatyon metabolizmasının önem arz eden enzimlerinden biridir. Bu enzim aynı zamanda hücre içi detoksifikasyon reaksiyonlarında katalizler. Çalışmamızda hedeflenen amaç böyle önemli görevleri olan Glutatyon S transferaz enzimini tavuk taşlık dokusundan saflaştırmak ve karakterizasyonunu gerçekleştirmektir.

Bu çalışmada sitozolik GST enzimi tavuk taşlık dokusundan 69,17 EÜ/mg protein, spesifik aktivitesi ile %85,42 verim elde edilerek 1441 kat saflaştırma gerçekleştirildi. Çalışmada Toribo et al'ın. (1996) ve Güvercin et al'ın. (2008) saflaştırma yaparken kullandıkları prosedür uygulanmıştır. Saflaştırma işlemi prosedüre uygun olacak şekilde üç aşamada tamamlanmıştır. Birinci aşama olarak homojenat hazırlanırken, ikinci aşamada amonyum sülfat çöktürmesi gerçekleştirilmiştir. Son aşamada ise glutatyon-agaroz afinite kromatografisi uygulanmıştır. Saflaştırma çalışmalarına başlarken ilk tavuk taşlık dokusu yabancı dokulardan elimine edilerek uygun homojenat hazırlandı. Sonraki aşamada amonyum sülfat çöktürmesi uygulanarak homojenatın içerisindeki proteinleri çöktürebilmek için salting out yöntemi uygulandı. Bu süreçte çökelek ve süpernatantın enzim aktivite ölçümleri gerçekleştirildi. Amonyum sülfat çökme aralığının tespiti için yapılan ölçümler sonucunda çökme aralığı %20-90 olmak üzere belirlendi. Saflaştırmanın üçüncü aşaması olan glutatyon agaroz afinite kolonuna amonyum sülfat çöktürmesiyle elde edilen numuneler uygulanarak GST enziminin saflaştırılması gerçekleştirilmiştir.

Awasthi vd (1980), gerçekleştirdiği çalışmalardan bir tanesinde GST'ye ait katyonik ve anyonik izoformları insan karaciğerinden saflaştırmıştır. Amonyum sülfatla fraksiyonlama anında anyonik GST için numunenin amonyum sülfat doygunluğunu %65'e getirmiştir. Sonrasında yeni oluşan anyonik GST ω ve ψ DEAE- selüloz anyon değişim kromatografisi, sephadex G200 jel filtrasyon kromatografisi ve izoelektrik odaklama işlemleri uygulanarak birbirinden ayrılmıştır. Loscalzo ve Freedman (1986), çalışmalarında insan trombositinden GST enzimini saflaştırmışlardır. Saflaştırma yapılırken CM-selüloz, afinite kromatografisi, Sephadex G-75 ve amonyum sülfat çöktürmesi yöntemleriyle yapılmıştır. Arca vd (1990) saflaştırmayı E.coli'den faydalanarak gerçekleştirmişlerdir. Yöntem olarak DEAE sephagel ve glutatyon agaroz afinite kolonunu kullanmışlardır. Çelik vd (2003), normal doğum gerçekleştiren bir hastanın plasentasından glutatyon S-transferaz (GST- π) enzimini saflaştırırken glutatyon-agaroz affinite kolonundan faydalanmıştır. Huang et al. (2008), çalışma sırasında kedi balığının bağırsak mukozasından yararlanarak GST enzimini saflaştırırken yöntem olarak glutatyon sepharoz-6B afinite kolonunu kullanmışlardır (Bernard et al, 2000).

Yaptığımız GST enziminin saflaştırma çalışmasında glutatyon-agaroz afinite kromatografisi yöntem olarak kullanıldı. Bu yöntem diğer yöntemlere göre iki konuda

büyük avantaj sağlamaktadır. Birincisi saflaştırma yapılırken sürenin az olması, ikincisi saflaştırma sırasında aktivite kaybının minimal düzeyde olmasıdır. Belirtilen avantajlardan dolayı bu yöntem tercih edildi.

Tavuk taşığından saflaştırılan GST enzimi için Bradford metoduyla kantitatif tayin gerçekleştirildi. Yapılan araştırmaların çoğunda bu yöntem kullanılmıştır. Sebebi ise diğer yöntemlere göre hassasiyetinin daha yüksek olması ve ortamdaki bozucu faktörlerin minimum düzeyde etkisinde kalmasıdır. Bunun yanında uzun zaman boyunca renk stabilitesini koruyabilmekteyken tekrar edilme oranıda yüksek bir yöntemdir (Bradford, 1976)

Tavuk taşığık GST enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla SDS-PAGE işlemi gerçekleştirildi ve jelle ait fotoğrafta tek bant görüntüsü belirlendi (Şekil 4.4). İşlem sonucunda SDS-PAGE jelindeki tek bant görüntüsü saf enzimin elde edildiğini gösterdi. SDS-PAGE sonucu görüntülenen fotoğraftan faydalanarak enzim numunesinin ve standart proteinlerin R_f değerleri hesaplanarak bu değerlere göre $\log M_K - R_f$ standart grafiğinin çizimi gerçekleştirildi. Tavuk taşığık GST enziminin alt birimlerine ait molekül kütlesi elde edilen standart grafik aracılığıyla yaklaşık olarak 25,66 kDa olarak hesaplandı.

Literatürde birçok kaynaktan elde edilen GST enziminin molekül kütlesinin belirlenmesiyle alakalı farklı çalışmalar yer almaktadır. İzolasyonu E.coli'den sağlanan GST enzime ait molekül kütlesi yaklaşık 22,5 kDa olarak belirlenmiştir. (Izuka et al, 1989). Bir diğer çalışmayı gerçekleştiren Hiratsuka et al (1990) GST enzime ait molekül kütlesini sıçan karaciğerinden saflaştırarak 26 kDa olmak üzere elde etmişlerdir. (Barcena et al, 1997) çalışmalarında Kefal balığına ait karaciğerden GST enziminin molekül kütlesini homodimer olarak 23 kDa bulmuşlardır. Riol ve arkadaşlarıda gökkuşağı alabalık karaciğerinden yaptıkları çalışmada GST enziminin molekül kütlesini saf bir şekilde homodimer olarak 23 kDa bulmuşlardır(Riol et al, 2001). Yılan balığı karaciğeri üzerinden yapılan çalışmada GST enzime ait molekül kütlesi 22,3 kDa (homodimer) olarak bulunmuştur (Novoa et al, 2004). Bunun yanında Sığır eritrositlerinden ve sığır beyninden GST enzimi saflaştırılmış olup molekül kütleleri sırası ile 27 kDa (homodimer) ve 24 kDa (homodimer) olarak bildirilmiştir (Young et al,

1989; Güvercin et al, 2008). İnsan böbreğinden saflaştırılan ve moleköl kütlesi 26,5 ile 24,5 kDa'na yakın farklı iki alt birimden oluşan GST izoenzimlerinin olduğu da belirlenmiştir (Singh et al, 1987).

Tavuk taşığından saf olarak elde edilen glutatyon S-transferaz enzimine yönelik karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Çalışma sonunda alkali ortamda söz konusu reaksiyon kendiliğinden yürüdüğü için enzim için optimum pH değeri K-fosfat tamponu içinde pH 7,5 olarak kabul edildi. Geçmiş çalışmalarda da çeşitli birçok kaynaktan saflaştırılan GST enzimine yönelik optimum pH çalışmaları yapılmıştır. Örneğin E.coli'den gerçekleştirilen karakterizasyon çalışmalarında GST enzimine ait optimum pH değeri 7,0 olacak şekilde bulunmuştur (Izuka et al, 1989). Karakterizasyon çalışmaları yapılan *Monopterus albus* balığı karaciğeri GST enzimine ait optimum pH değeri 7,0-7,5 olarak belirlenmiştir (Huang et al, 2008). Diğer bir çalışma olan insan kan serumu GST enzimine ait optimum pH değeri de 5,5 olarak bulunmuştur (Türkanoglu, 2007). Yapılan çalışma neticesinde tavuk taşığından saflaştırılmış GST enzimine ait optimum pH değeri diğer çalışmalarda tespit edilen optimum pH değerlerine yakın bir değer olarak belirlenmiştir.

Bu çalışmada optimum sıcaklığı belirlemek amacıyla tavuk taşığından saflaştırılan GST enzimi 0 °C-90 °C aralığında her 10 °C' de bir enzimin aktivitesi spektrofotometre aracılığıyla ölçüldü. Sonuç olarak optimum sıcaklık Şekil 4.8'de gösterilmek üzere 40 °C olarak bulundu. Karakterizasyon çalışmaları yapılan E.coli ekstraktlarında optimum sıcaklığı gösteren değer 50 °C olarak belirlenmiştir (Izuka et al, 1989). Yine *monopterus albus* karaciğerinden saflaştırılan GST enzimine ait karakterizasyon çalışmalarından sonra optimum sıcaklığın 45 °C olduğu belirlenmiştir (Huang et al, 2008). Başka bir çalışmada insana ait kan serumundan GST enzimine yönelik hesaplanan optimum sıcaklık 65 °C'olarak belirlenmiştir (Türkanoglu, 2007). Görüldüğü gibi bu çalışmada elde edilen optimum sıcaklık değeri E.Coli ve *monopterus* karaciğer GST enzimi için elde edilen optimum sıcaklığına yakın bir değerdir. Ancak insan kanında GST için hesaplanan optimum sıcaklık farklıdır.

Tavuk taşığından saf olarak elde edilen GST enziminin aktivitesi için optimum iyonik şiddet çalışması gerçekleştirildi. Enzimin aktivitesinin optimum olan değeri Tris-HCl

tamponunda 300 mM olarak bulundu. Literatüre GST enziminin optimum iyonik şiddeti (potasyum fosfat tamponunda) 2 mM olacak şekilde geçmiştir (Türkanoglu, 2007). Tavuk taşığında saf olarak elde edilen GST enzimine ait optimum iyonik şiddet diğer çalışmalarda elde edilen optimum iyonik şiddet değerinden farklı bir değer olarak bulunmuştur.

Tavuk taşığı GST enziminin stabil pH'sının bulunması için, optimum iyonik şiddeteki potasyum fosfat ve Tris-HCl tamponlarından yararlanılarak enzimin gösterdiği aktiviteler, 60 saat süreyle 12 saatte bir olacak şekilde spektrofotometrede ölçüm gerçekleştirildi. Alkali ortamda söz konusu reaksiyon kendiliğinden yürüdüğü için enzime ait stabil pH değerinin K-fosfat içinde 7,0-7,5 arasında olduğu sonucuna varıldı (Şekil 4.9). E.coli ekstraktlarından GST enzimi için karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarda enzime ait stabil pH değerinin 5-11 gibi geniş bir aralıkta olduğu tespit edilmiştir (Iizuka et al, 1989). E.Coli ekstratı GST enzimi için elde edilen stabil pH değeri ile benzerlik göstermektedir.

K_M değeri enzim kinetiğinde enzimin substrata olan ilgisini gösterir. Yaptığımız çalışmada tavuk taşığında saflaştırdığımız GST enzimine ait K_M ve V_{max} değerleri tespit edilmiştir. Bu değerler belirlenirken substrat olarak CDNB ve GSH substratları kullanılmıştır. Bu amaç doğrultusunda CDNB sabit konsantrasyonuyla, GSH'nin 5 farklı konsantrasyonu işleme dâhil edilerek spektrofotometre yöntemiyle enzimin aktivite değerleri ölçüldü. Sonasında Lineveawer-Burk grafiğı çizildi. Grafikten elde edilen verilerle GSH substratı için K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı (Şekil 4.10.a., Tablo 4.7). Aynı işlem enzime ait diğer substrat olan CDNB için uygulandı. GSH sabit konsantrasyonda iken, CDNB nin 5 farklı konsantrasyonu için spektrofotometre yöntemtemiyle enzimin aktivite değerleri ölçüldü. Bu değerlerle Lineveawer-Burk grafiğı çizildikten sonra grafiğı göre CDNB substratı içinde K_M ve V_{max} değerleri belirlendi (Şekil 4.10.b. Tablo 4.7). GSH substratına ait K_M sabit değeri 11,1348 mM iken V_{max} değeri 0,75205 EÜ/mL olarak belirlendi. CDNB substratı için K_M sabiti 11,4761 mM olarak bulunmuş olup, V_{max} değeride 0,5837 EÜ/mL olarak hesaplandı (Tablo4.6). Çalışma sonucunda GST enziminin GSH substratına ilgisinin daha fazla olduğu ve daha düşük K_M sabitine sahip olduğu belirlendi. Benzer sonuçlar monopterus albus balığı karaciğeri ve tilapia balığı karaciğeri içinde elde edilmiştir (Huang et al, 2008).

Monopterus albus karaciğerinde gerçekleştirilen çalışmada GST enzimine ait substratlardan GSH ve CDNB için K_M sabitleri belirlenmiştir. Bu değerler sırasıyla 0,20 mM, 0,28 mM iken substratlara ait V_{max} değerleride sırasıyla 7,57 $\mu\text{mol}/\text{mg}$, 15,68 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ olarak bulunmuştur (Huang et al, 2008).

Glutasyon S-transferaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu için gerçekleştirilen bir çalışmada *Tilapia* (*Oreochromis niloticus*) balığının karaciğerinden faydalanılmıştır. Çalışma neticesinde enzime ait substratlar olan GSH ve CDNB için K_M sabitleri yaklaşık 0,35 mM ve 0,42 mM olarak bulunduğu belirtilmiştir (Hamed et al, 2004). Başka bir çalışmada insan kan serumundan saflaştırılan GST enzimine ait substratlar olan CDNB için K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 2,8 mM ve 0,43 nmol/min.mg iken GSH için bu değerler 4,11 mM ve 0,23 nmol/min.mg protein olmak üzere belirlenmiştir (Türkanoglu, 2007)

Sonuç olarak;

Bu çalışmada glutasyon S-transferaz enzimini tavuk taşlık dokusundan saflaştırıldı. Amonyum sülfat çöktürmesi ve glutasyon agaroz afinite kromatografisi uygulanarak 69,17 EÜ/ mg protein, spesifik aktiviteyle %85,42 verimle tek basamakta 1441 kat saflaştırılması gerçekleştirildi. Enzimin saflık derecesini kontrol etmek için SDS-PAGE uygulandı. Böylece tavuk taşlığından saflaştırılan GST enziminin karakterizasyonuna ait çalışmalar gerçekleştirildi. Bu çalışmalar neticesinde oluşan veriler tablo halinde aşağıda özet olarak gösterilmiştir.

Tablo 6.1. Tavuk taşığı GST enzimi için karakterizasyon sonuçları

Parametreler	Sonuçlar
Optimum pH	K-fosfat içinde pH: 7,5
Optimum iyonik şiddet	Tris-HCl içinde; 0,3 mM
Stabil pH	K-fosfat içinde pH: 7,0-7,5
Optimum sıcaklık	40 °C
Alt birim molekül kütlesi	25,66 kDa
K_M GSH	11,1348 mM
V_{MAX} GSH	0,75205 EÜ/mL
K_M CDNB	11,4761 mM
V_{MAX} CDNB	0,5837 EÜ/mL

KAYNAKLAR

Aksoy, A. S. (2018). Bazı flavonoidlerin sıgır karaciğer glutatyon s-transferaz enzimi üzerine etkilerinin araştırılması. Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

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

Al-Mustafa, A. H. (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* 2, 9(14), 2586-2592.

Arca, P., García, P., Hardisson, C. and Suárez, J. E. (1990). Purification and study of a bacterial glutathione S-transferase. *FEBS letters*, 263:1, 77-79.

Armstrong, R. N. (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 S-transferases from bovine liver”, *The Journal of Biochemistry*, 95(3), 685-696.

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

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

Awasthi, Y. C., Dao, D. D. and Saneto, R. P. (1980). Interrelationship between anionic and cationic forms of glutathione S-transferases of human liver. *Biochem J*, 191, 1-10.

Baş, O. (2006). Dinitrocresol’ün (Rat Rattus Norvegicus) Sıçan Glutatyon S-Transferaz Enzim Aktivitesine Etkisi (Yüksek Lisans Tezi).

Barcena, J. A. E., Martinez-Lara, S. G. and 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.

Board, P., Coggan, M., Johnston, P., Ross, V., Suzuki, T. and Webb, G. (1990). Genetic Heterogeneity Of The Human Glutathione Transferases: A Complex of Gene Families. *Phar Ther*, Vol.48, 357- 369.

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

Boyland, E. and Chasseaud, L. F. (1969). The role of Glutathione and glutathione S transferases in mercapturic acid biosynthesis, *Adv. Enzymol.*, 32, 173-219.

Bradford, M. M. (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.

Casalino, E., Sblano, C., Landriscina, V., Calzaretto, G. and Landriscina, C. (2004). Rat liver glutathione S-transferase activity stimulation following acute cadmium or manganese intoxication. *Toxicology*, 200:1, 29-38.

Celik, V., Armutcu, F. and Aker, A. (2003). Human placental glutathione-S Transferase: Isolation, kinetic properties and in vitro interactions with several drugs. *Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 25, 187-192.

Cnubben, N. H. P., Rietjens, I. M. C. M., Wortelboer, H., Van Zanden, J. and Van Bladeren, P. J. (2001). The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 10, 141- 152.

Commandeur, J. N., Stijntjes, G. J. and Vermeulen, N. P., (1995). “Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione S-conjugates. Role in bioactivation and detoxication mechanisms of xenobiotics”, *Pharmacological Reviews*, 47(2), 271-330.

Çetinkaya, S., Pınarbaşı, H., Pınarbaşı, E., Çetinkaya, Ö. ve Atalay, A. (1993). Ranitidin verilmiş ratlarda karaciğer ve böbrek glutatyon S-transferaz aktiviteleri. *C.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi* 15(2).

Çomaklı, V. (2011). Glutatyon S-transferaz Enziminin Gökkuşığı Alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) Eritrositlerinden Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Bazı Kimyasalların Etkilerinin Araştırılması. Doktora Tezi), Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

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

Eaton, D. L. and Bammler, T. K. (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, 711-716.

Fleisch G. K., Kamisaka, I. M. and Arias I. M. (1976). Immunoloanalysis of Rats and Human Ligandins. *Glutathione: Metabolism and Function*, 229.

Gyamfi, M. A., Ohtani, I. I., Shinno, E. and Aniya, Y. (2004). Inhibition of glutathione S-transferases by thonningianin A, isolated from the African medicinal herb, *Thonningia sanguinea*, in vitro. *Food and Chemical Toxicology*, 42: 9, 1401-1408.

Gözükara, E. (1989). *Enzimler Biyokimya*. Ofset Repromat Ltd. Şti., 572-576, Ankara.

Gözükara, M. E. (1997). *Biyokimya*, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 1225.

Gümüş, N. (2005). Akciğer Kanseri Olgularında Glutathion-S-Transferaz M1 VE T1 Gen Polimorfizimlerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.

Güven, A. (2003). Kaz Karaciğerlerinde Karbon Tetraklorür ve Etil Alkol İle Oluşturulan Doku Hasarlarında Redükte Glutathion (GSH), Glutathion-S-Transferaz (GST) ve Selenyum Düzeylerinin Araştırılması, Doktora Tezi, Kafkas Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kars, Türkiye, 37-44.

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

Habdous, M., Vincent-Viry, M. Siest, Visvikis, S. and Rapid, G. (2002) spectrophotometric method for serum glutathione S-transferases activity. *Clin. Chim. Acta*, 326, 131-42.

Habig, W. H., Pabst, M. J. and Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of biological Chemistry*, 249: 22, 7130-7139.

Hamed, R. R., Maharem, T. M. and Guinidi, R. A. (2004). Glutathione and its related enzymes in the Nile fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 30: 3-4, 189-199.

Hayes, J. D., Flanagan, J. U., Jowsey, I. R. (2005). Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 51-88.

Hayes, J. D. and Pulford, D. J. (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. and Kwang-Hoon, K. (2005). Purification and Biochemical Properties of Glutathione S-Transferase from *Lactuca sativa*. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 38, No. 2, 232-237.

Hiratsuka, A., Sebata, N., Kawashima, K., Okuda, H., Ogura, K., Watabe, T., ... and Tsuchida, S Ann Ishikawa, T. A. (1990). New class of rat glutathione S-transferase Yrs-Yrs inactivating reactive sulfate esters as metabolites of carcinogenic arylmethanols. *THE Journal of Biological Chemistry*. Vol. 265, No. 20, 188, 11973-11981.

Howie, A. F., Hoyes, J.D. and Beckett, G. J. (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. and Zeng, Q. Y. (2008). Purification and partial characterization of glutathione transferase from the teleost *Monopterus albus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 147, 96-100.

Iizuka, M., Inoue, Y., Murata, K. and Kimura, A. (1989). Purification and some properties of glutathione S-transferase from *Escherichia coli* B. *Journal of bacteriology*, 171: 11, 6039-6042.

Jakobsson, P. J., Morgenstern, R., Mancini J., Ford-Hutchinson, A. and Persson, B. (1999). Common structural features of MAPEG-a widespread superfamily of membrane associated proteins with highly 57 divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism. *Protein Sci.* 8, 689-692.

Jowsey, I. R., Thomson, R. E., Orton, T. C., Elcombe, C. R. and Hayes, J. D. (2003). Biochemical and genetic characterization of a murine class Kappa glutathione S-transferase. *Biochem. J.* 373, 559-69.

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

Morel, F., Rauch, C., Petit, E., Piton, A. and Theret, N. (2004). The human glutathione transferase Kappa: gene and protein characterization and evidence for a peroxisomal localization. *J. Biol. Chem.* 279(16), 16246–53

Offei-Oknye, R., Patterson, J., Walker, L., Boateng, J. and Verghese, M. (2015). Chemopreventive potential of ginger on Hep2G cells. *International Journal of Cancer Research*, 11: 2, 52-66

Kaya Koçdoğan, A. (2016). Meme kanserli Hastalarda Glutathiyon S-Transferaz 67 İzozimlerin Çoklu İlaç Direnç Mekanizmasındaki Proteinlerle Olan İlişkisinin İncelenmesi, Kırıkkale Üniversitesi Doktora Tezi, Eylül.

Keha, E. E. ve Küfrevioğlu, Ö. İ. (2009). *Biyokimya, Aktif Yayınevi, Erzurum*, 637.

Keha, E. E. ve Küfrevioğlu, Ö. İ. (2012). *Biyokimya, Aktif yayınları, Erzurum*.

Keha, E. E. ve Küfrevioğlu, Ö. İ. (2004). *Biyokimya, Aktif yayınları, 97-125, Erzurum*.

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

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

Marks, D. B., Marks, A. D. and Smith, C. M. (1996). Basic medical biochemistry: a clinical approach. Williams & Wilkins.

Marler, L., Conda-Sheridan, M., Cinelli, M. A., Morrell, A. E., Cushman, M., Chen, L., ... and Pezzuto, J. M. (2010). Cancer chemopreventive potential of aromathecins and phenazines, novel natural product derivatives. *Anticancer research*, 30: 12, 4873-4882.

Laemmli, D. K. (1970). Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680.

Lehninger A. L. (2000). Principles of biochemistry. Newyork: Worth, Publishers Inc.

Liebman, J. F. and Greenberg, A. (1988). Mechanistic principles of enzyme activity VCH Publishers, New York.

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

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

Morel, F., Rauch, C., Petit, E., Piton, A., Theret, N. and Coles, B., (2004). Gene and protein characterization of the human glutathione S-transferase kappa and evidence for a peroxisomal localization”, *Journal of Biological Chemistry*, 279(16), 16246- 16253.

Morgenstern, R., Lundqvist, G., Hancock, V. and DePierre, J. W. (1988). Studies on the activity and activation of rat liver microsomal glutathione transferase, in particular with a substrate analogue series, *Journal of Biological Chemistry*, 263(14), 6671- 6675.

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

Nelson, D. L. and Cox, M. M. (2016). Lehninger Biyokimyanın İlkeleri (5). Palme Yayınevi, 1158.

Novoa - Valinas, M. C., Melgar - Riols, M. J., Perez - Lopez, M. (2004). Hepatic glutathione S transferases from lamprey (*Petromyzom marinus*): purification and characterization *Biochemical Systematics and Ecology*, 32, 169-178.

Onat, T. (1996). Eritrosit Biyokimyası. In Emerk K, Onat T ed. Temel Biyokimya İzmir, Saray medikal yayıncılık, 865-879.

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

Özaslan, M. S., Demir, Y., Aksoy, M., Küfrevioğlu, Ö. İ. and Beydemir, Ş. (2018). Inhibition effects of pesticides on glutathione-S-transferase enzyme activity of Van Lake fish liver. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 32(9): e22196.

Özel, R. (2006). Prostat Kanserli Olgularda GlutatyonS-Transferaz P1 Geninin ILE105VAL Polimorfizminin ve Promoter Bölge Hipermetilasyonunun Araştırılması” , Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir, Türkiye. 26-30.

Pabst, M., Habig, W. H. and Jakoby, W. B. (1973). Mercapturic acid formation: the several glutathione transferases of rat liver, *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 52, 1123.

Pandey, V. P., Awasthi, M., Singh, S., Tiwar, S. and Dwivedi, U. N. (2017). A comprehensive review on function and application of plant peroxidases. *Biochemistry and Analytical Biochemistry*, 6(1): 308.

Riol, M. J. M., Valiñas, M. C. N., Fernández, M. A. G. and López, M. P. (2001). Glutathione S-transferases from rainbow trout liver and freshly isolated hepatocytes: purification and characterization. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 128, (2) p: 227-235.

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

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

Sümengen, M. (2011). Laktik Asit Bakterilerinden Fitaz Üretimi ve Endüstriyel Kullanım Olanakları. Yüksek lisans tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana.

Toribio, F., Martinez-Lara, E., Pascual, P. and Lopez-Barea, J. (1996). Methods for purification of glutathione peroxidase and related enzymes, *Journal of Chromatography B*, 684, 77-97.

Türkan, F. (2015). Karayemiş meyvesinden (*Prunus laurocerasus* L.) Glutatyon Stransferaz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu ve kinetik özelliklerinin incelenmesi.

Tuna, Gamze. (2008). Sıçan ince bağırsak glutatyon S-transferaz enziminin saflaştırılması ve izozimlerinin hiperisin bileşiği ile bağlanma özelliklerinin incelenmesi. (Yüksek lisans tezi) Hacettepe üniversitesi, H. Ü. B. A. B. 06. D06. 101. 1001.

Türkanoglu, 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.

Vessey, D. A. and Boyer, T. D. (1988). Characterization of the activation of rat liver glutathione S transferases by nonsubstrate ligands. *Toxicol Appl Pharmacol*, 93: 275-280.

Yalçın, A. S. (1998). Antioksidanlar, Klinik Gelişim 11: 342-346.

Young, P. R. and Briedis A. V. (1989). Purification and kinetic mechanism of the major glutathione S-transferase from bovine brain. Biochem. J., 257, 541-548.