

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

**GLUTATYON S-TRANSFERAZ (GST) ENZİMİNİN TAVUK
YÜREĞİNDEN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SUAT ZOR

KİMYA ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. MEHMET ÇİFTÇİ

BİNGÖL-2023

**GLUTATYON S- TRANSFERAZ (GST) ENZİMİNİN TAVUK YÜREĞİNDEN
SAFLAŞTIRILMASI VE KAREKTERİZASYONU**

Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ danışmanlığında, **Suat ZOR** tarafından hazırlanan bu çalışma 21/06/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından KİMYA Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak ~~oybirliği/oy çokluğu~~ (3/0) ile kabul edilmiştir.

Başkan	: Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ	İmza	:
Üye	: Doç. Dr. Yusuf TEMEL	İmza	:
Üye	: Doç. Dr. Ebru AKKEMİK	İmza	:

Yukarıdaki sonuç;

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

Prof. Dr. Zafer ŞİAR
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans çalışmalarımın verimli bir şekilde gerçekleşmesi için ders döneminden deneysel çalışmaların yapılmasına ve tez yazım aşamasına kadar her türlü olanağı sağlayan Bingöl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Öğretim Üyesi ve danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ Bey başta olmak üzere; Yüksek Lisans çalışmalarımın teorik ve deneysel kısmının bütün aşamalarında her türlü yönlendirmeyi yapan değerli hocam Sayın Doç. Dr. Yusuf TEMEL bey'e ve bu aşamada sabırlarından dolayı değerli aileme çok teşekkür ediyorum. Bu çalışmanın verimli bir şekilde bitmesi adına destek almış olduğum Bingöl üniversitesini değerli öğretim üyelerine teşekkürü bir borç bilirim.

Suat ZOR

Bingöl 2023

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	v
TABLolar LİSTESİ.....	vi
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Enzimler.....	1
1.2. Glutasyon.....	8
1.3. Glutasyon S- Transferaz Enzimi.....	9
1.3.1. Tarihçesi.....	9
1.3.2. Yapısı ve Biyokimyasal Tepkimeleri.....	9
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	18
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	23
3.1. Materyal.....	23
3.1.1. Gerekli Kimyasal Maddeler.....	23
3.1.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar.....	23
3.1.3. Çözeltilerin Hazırlanması.....	24
3.1.3.1. Aktivite Ölçümü İçin Hazırlanan Çözeltiler.....	24
3.1.3.2. Homojenatın Hazırlanması İçin Gerekli Çözeltiler.....	24
3.1.3.3. Saflaştırma İşlemi İçin Gerekli Çözeltiler.....	24
3.1.3.4. Bradford Metoduyla Protein Tayininde Gerekli Olan Çözeltiler.....	25
3.1.3.5. SDS-PAGE İçin Hazırlanan Çözeltiler.....	25
3.2. Uygulanan Metodlar.....	26
3.2.1. Proteinin Tayini.....	26
3.2.1.1. Kalitatif Protein Tayini.....	26
3.2.1.2. Kantitatif Protein Tayini.....	26
3.2.2. GST Enzimi İçin Aktivite Tayini.....	27

3.2.3. GST Enziminin Saflaştırılması İçin Kolon Jelinin Hazırlanması.....	29
3.2.4. GST Enziminin Tavuk Yüreğinden Saflaştırılması.....	29
3.2.4.1. Tavuk Yüreğinin Tedarik Edilmesi ve Homojenatin Hazırlanması....	29
3.2.4.2. Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Diyaliz İşlemleri.....	29
3.2.4.3. Afinite Kromatografisi ile Enzimin Saflaştırılması.....	30
3.2.5. Enzim Saflığının Kontrolü.....	30
3.2.6. SDS-PAGE Yöntemi ile GST Enziminin Molekül Kütlesinin Tayini..	32
3.3. Karakterizasyon Çalışmalar.....	32
3.3.1. Optimum pH'nın Belirlenmesine Yönelik Çalışmalar.....	32
3.3.2. Stabil pH'nın Belirlenmesine Yönelik Çalışmalar.....	32
3.3.3. Optimum İyonik Şiddetin Belirlenmesine Yönelik Çalışmalar.....	33
3.3.4. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesine Yönelik Çalışmalar.....	33
3.3.5. Enzimin Substratları Olan GSH ve CDNB için K_M ve V_{max} Değerlerinin Elde Edilmesine Yönelik Çalışmalar.....	33
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	34
4.1. Bulgular.....	34
4.1.1. Amonyum Sülfat Çöktürme İşlemi Sonuçları.....	34
4.1.2. Kantitatif Protein Tayininde Kullanılan Standart Grafik.....	35
4.1.3. Afinite Kromatografisi Aktivite Sonuçları.....	37
4.1.4. Saflaştırma Sonuçları.....	38
4.1.5. SDS-PAGE Yöntemi ile Enzim Saflığının Kontrolü.....	38
4.1.6. Enzimin Alt Birimlerinin Mol Kütlelerinin Belirlenmesine Dair Sonuçlar....	39
4.2. Karakterizasyon Çalışmalarına Dair Sonuçlar.....	40
4.2.1. Optimum pH'nın Ölçülmesine Dair Çalışma Sonuçları.....	40
4.2.2. Stabil pH'nın Ölçülmesine Dair Çalışma Sonuçları.....	41
4.2.3. Optimum İyonik Şiddetin Ölçülmesine Dair Sonuçlar.....	43
4.2.4. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesine Dair Sonuçlar.....	44
4.2.5. Enzimin Substratları İçin K_M ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesine Dair Sonuçlar.....	45
4.3. Tartışma.....	47
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	51
KAYNAKLAR.....	53
ÖZGEÇMİŞ.....	59

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

Da	: Dalton
BSA	: Sığır serumu albümin proteini
RNA	: Ribonükleik asit
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
Tris	: Trihidroksimetil amino metan
DTT	: Ditiyotritol
TCA	: Triklor asetik asit
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
EDTA	: Etilendiamin tetra asetik asit
TEMED	: N,N,N',N'-tetrametilendiamin
CDNB	: 1-kloro- 2,4- dinitrobenzen
GST	: Glutasyon S- transferaz enzimi
GSH	: İndirgenmiş glutasyon
GSSG	: Yükseltgenmiş glutasyon
Tris	: Trihidroksimetil amino metan
E	: Enzim
EC	: Enzim komisyon numarası
ES	: Enzim Substrat kompleksi
I	: İnhibitör
IC ₅₀	: Enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör derişimi
K _i	: Enzim inhibitör kompleksinin denge sabiti
kDa	: Kilodalton
M _K	: Molekül kütlesi
S	: Substrat
V _{max}	: Maksimum hız
mL	: Mililitre
mg	: Miligram
mM	: Milimolar

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Enzim miktarının reaksiyon hızına etkisi.....	3
Şekil 1.2. Substrat miktarının reaksiyon hızına etkisi.....	4
Şekil 1.3. Sıcaklığın reaksiyon hızına etkisi.....	4
Şekil 1.4. pH'nın reaksiyon hızına etkisi.....	5
Şekil 1.5. İndirgenmiş glutatyonun kimyasal formülü.....	8
Şekil 1.6. Zehirsizleştirilme reaksiyonları.....	11
Şekil 1.7. GST enziminin katalizlediği reaksiyon.....	12
Şekil 1.8. Elektrofilik substrat metabolizmasında glutatyon S-transferazların rolü ...	13
Şekil 1.9. GST yoluyla bir ksenobiyotiğe (X) glutatyon- S konjugatının oluşması....	15
Şekil 1.10. Glutatyon konjugatlarının metabolizması.....	15
Şekil 1.11. (a) GST enziminin yapısı, (b) Hidrofobik yüzey alanı görünümü.....	16
Şekil 1.12. GST enziminin aktif bölgelerinin gösterimi.....	16
Şekil 3.1. GST'nin aktivite ölçümünde kullanılan ürün oluşum mekanizması.....	28
Şekil 4.1. Amonyum sülfat çöktürmesi grafiği.....	35
Şekil 4.2. Kantitatif protein tayini için kullanılan standart grafik.....	36
Şekil 4.3. GST enziminin afinite kolonundan saflaştırılması grafiği.....	37
Şekil 4.4. Saf GST enziminin SDS- PAGE fotoğrafı.....	39
Şekil 4.5. Alt birimlerinin mol kütlelerini hesaplamak için çizilen LogM _K -R _f grafiği....	40
Şekil 4.6. Optimum pH'nın hesaplanmasında kullanılan aktivite-pH grafiği.....	41
Şekil 4.7. Fosfat tamponu içinde Stabil pH'nın belirlenmesinde kullanılan grafik.....	42
Şekil 4.8. Tris-HCl tamponu içinde Stabil pH'nın belirlenmesinde kullanılan grafik..	43
Şekil 4.9. İyonik şiddetin belirlenmesinde kullanılan aktivite-konsantrasyon grafiği...	44
Şekil 4.10. Optimum sıcaklığın belirlenmesinde kullanılan aktivite-sıcaklık grafiği...	45
Şekil 4.11. CDNB substratı için K _M ve V _{max} değerleri için çizilen grafik.....	46
Şekil 4.12. GSH substratı için K _M ve V _{max} değerleri için çizilen grafik.....	46

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1.1. Enzimlerin uluslararası sınıflandırılması.....	7
Tablo 1.2. Serbest radikal kaynakları.....	10
Tablo 3.1. Aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler ve miktarları.....	28
Tablo 3.2. Elektroforez işleminde kullanılan çözeltiler ve miktarları.....	31
Tablo 4.1. Amonyum sülfat çöktürmesi işleminin sonuçları.....	34
Tablo 4.2. Kantitatif protein tayininde BSA çözelti miktarları ve absorbensları.....	36
Tablo 4.3. Elüatlardaki aktivite değerleri.....	37
Tablo 4.4. Saflaştırma sonuçları.....	38
Tablo 4.5. Optimum pH tespiti için elde edilen aktivite sonuçları.....	40
Tablo 4.6. Stabil pH tespiti için K-fosfat ile elde edilen aktivite sonuçları.....	41
Tablo 4.7. Stabil pH tespiti için Tris-HCl ile elde edilen aktivite sonuçları.....	42
Tablo 4.8. Optimum iyonik şiddetin için elde edilen aktivite ölçüm sonuçları.....	43
Tablo 4.9. Optimum sıcaklığın belirlenmesi için elde edilen aktivite ölçüm sonuçları...	44
Tablo 4.10. GSH ve CDNB substratları için elde edilen K_M ve V_{max} değerleri.....	47

GLUTATYON S-TRANSFERAZ (GST) ENZİMİNİN TAVUK YÜREĞİNDEN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

ÖZET

Glutasyon S-transferaz enzimi (GST; EC 2.5.1.18) metabolizmada önemli bir antioksidan enzimdir ve glutasyonun toksisite oluşturabilecek birçok metabolitle konjugasyonunu sağlayan reaksiyonlarda görev alır. Bu tez kapsamında, GST enzimi tavuk yüreğinden homojenatın hazırlanması, amonyum sülfat çöktürmesi ve glutasyon-agaroz afinite kromatografisi vasıtasıyla 9,048 EÜ/mg protein spesifik aktivite ve %40 verimle 20,99 kat saflaştırıldı. Daha sonra enzim saflığının kontrol edilmesi ve alt birim molekül kütlelerinin belirlenmesi amacıyla sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yapılarak tek bant elde edildi. SDS-PAGE ile saflaştırılan GST enziminin alt birim molekül kütleleri yaklaşık 20,94 kDa olarak bulundu. Saflaştırılan GST enzimi için yapılan karakterizasyon çalışmalarında optimum pH, (Tris-HCl tamponunda) pH= 8,5, optimum iyonik şiddet, (Tris-HCl tamponunda) 0,2 M, stabil pH, (Tris-HCl tamponunda) pH = 8,5 ve optimum sıcaklık 60 °C olarak bulundu. Ayrıca Lineweaver-Burk grafiklerinden faydalanılarak enzime ait K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla GSH substratı için K_M , 0,087 mM, V_{max} 0,625 EÜ/mL; CDNB substratı için K_M , 0,798 mM, V_{max} , 1,141 EÜ/ mL olarak hesaplandı.

Anahtar Kelimeler: Glutasyon S-Transferaz, Enzim, Saflaştırma, Karakterizasyon, Tavuk Yüreği

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

ABSTRACT

Glutathione S-transferase enzyme (GST; EC 2.5.1.18) is an important antioxidant enzyme in metabolism and takes part in reactions that provide conjugation of glutathione with many metabolites that may cause toxicity. Within the scope of this thesis, the GST enzyme, which has 9,048 EU/mg protein specific activity, was purified 20.99-fold with 40% yield by means of preparation of homogenate from chicken heart, ammonium sulfate precipitation and glutathione-agarose affinity chromatography. Then, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed to control the enzyme purity and to determine the subunit molecular mass, and a single band was obtained. The subunit molecular mass of the GST enzyme purified by SDS-PAGE was found to be approximately 20.94 kDa. In the characterization studies for the additionally purified GST enzyme, optimum pH (in Tris-HCl buffer) pH= 8.5, optimum ionic strength (in Tris-HCl buffer) 0.2 M, stable pH, (in Tris-HCl buffer) pH = 8, 5 and the optimum temperature is 60 °C; also, using Lineweaver-Burk graphs, the K_M and V_{max} values of the enzyme were determined as K_M , 0.087 mM, V_{max} 0.625 EU/mL for the GSH substrate; For CDNB substrate, K_M was calculated as 0.798 mM, V_{max} was calculated as 1.141 EU/mL.

Keywords: Glutathione S-Transferase, Enzyme, Purification, Characterization, Chicken Heart

1.GİRİŞ

1.1. Enzimler

Berzelius, 1835 yılında tepkimelerin hızını arttıran maddeleri katalizör olarak adlandırmıştır (Ann-Sofie, 2002). Katalizör, tepkimenin hızını, eşik enerjisi düşük olan ara ürünlerin oluşumuna sebep olarak arttıran ancak reaksiyondan değişmeden çıkan maddedir. Katalizör dengede bulunan bir tepkimenin hızını etkilemez (Smith, 1981; Fogler, 1999).

Enzimler biyolojik katalizördürler (Yıldız, 2007). Biyolojik katalizörler de kimyasal katalizörlerin temel fonksiyonlarına sahiptirler. Başlamış ve dengeye gelmemiş bir tepkimenin hızlı bir şekilde dengeye gelmesini sağlarlar (Aravindan vd. 2007). Canlı yapısında meydana gelen biyokimyasal reaksiyonlar, biyolojik katalizörler olan enzimler tarafından gerçekleştirilir. Enzimler tarafından katalizlenen moleküllere substrat denir. Enzimler üç boyutlu yapılarına uygun olan substratlar ile reaksiyona girerler. Bu sebepten dolayı her enzim sadece belirli tipte bulunan substrata etki eder (Erkaya vd. 2006). Dolayısıyla bir biyokimyasal reaksiyonun mekanizması incelenirken öncelikli olarak o reaksiyona etki eden enzimi çok iyi analiz etmek gerekir.

Biyokimya bilim dalı, enzimlerin fonksiyonel yapılarını ortaya koymak üzere araştırma yapan bir disiplin olarak ifade edilebilir. Nitekim enzim araştırmaları biyokimya tarihini meydana getirmiştir. Bu tarihi sürece baktığımızda 18. yüzyılın sonlarına doğru, mide salgıları ile etin sindirimi üzerindeki biyokimyasal etkilerin araştırıldığını görüyoruz. Bu çalışmalarla birlikte ilk biyolojik katalizör tanımı da yapılmıştır. 1800'lerde yapılan çalışmalarda, ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen bitki özütleri ve tükürük kullanılarak, nişastanın şekere dönüşümü gerçekleştirildi (Lehninger et al. 2005). Louis Pasteur 1850'lerde yapmış olduğu çalışmalar sonucunda maya kullanarak şekerin fermentlenmesinin fermentler tarafından gerçekleştirildiğini ileri sürdü. Eduard Buchner, 1897 yılında maya fermentasyonu hücrelerden uzaklaştırıldığında dahi bu fonksiyonu sürdüren bazı moleküllerin olduğu sonucuna ulaştı. Frederic W. Kühne bu organik maddeleri enzim olarak isimlendirdi (Nelson ve Cox 2005).

Enzimlerin canlı metabolizmada sebep olduğu bu olağanüstü katalizleme olaylarının durması veya kısmen aksaması durumunda canlıların yaşaması mümkün değildir. Biyokatalizörler olarak tanımlanan enzimler kimyasal tepkimelere katalitik olarak etki eden biyolojik polimerlerdir. Enzimler bütün fizyolojik olayların hızlarını kontrol ederek canlı yaşamının tam merkezinde bulunurlar. Enzimlerin büyük bir kısmı protein yapısındadır. Ancak katalitik RNA gibi yapılar protein yapısında değildir (Murray ve ark. 1998). Daha açık bir şekilde ifade edilirse, enzimlerin tamamına yakını protein yapısındadır (Temel vd, 2017). Enzimlerin en önemli özelliklerinden birisi de biyokimyasal reaksiyonlarda %100'lük ürün oluşmasını sağlayarak yan ürün oluşmasını engellemeleridir. Enzimler, özelleşmiş bir moleküler yapı içerisinde oldukça büyük protein gruplarını oluştururlar. Hücre içerisinde oluşan bütün olaylar deoksiribo nükleik asit (DNA) tarafından düzenlenerek kontrol edilir. Yukarıda da ifade edildiği gibi enzimler protein yapısındadırlar ve proteinler de DNA tarafından şifrelendiklerinden bu durumda enzimler bir hücreye ait DNA'daki genetik bilgilerin, ribonükleik asitler (RNA) tarafından taşınması sonucu ribozomlarda sentezlenen en önemli moleküllerdir (Keha ve Küfrevioğlu 2000). Tarihi süreç içerisinde ilk kez kristallenen enzim üreazdır. Üreaz enzimini ilk olarak James B. Sumner, 1926 yılında kristalize etmiştir (Güleşci, 2013).

Enzimler protein yapısında oldukları için çok yüksek sıcaklıklarda üç boyutlu yapıları bozunur. Dolayısıyla enzim ile katalizlenen bir reaksiyonda 40 °C'ye kadar genelde reaksiyon hızı artar. Ancak sıcaklık 40 C°'nin üstüne çıkarsa enzimin üç boyutlu yapısı zarar görmeye başlayarak tepkime hızında azalma gözlenir. Sıcaklık 60 C°'nin üstüne çıktığında ise enzim denatüre olur (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Her enzim belirli bir pH değerinde maksimum aktivite gösterir. Bu optimal değer üstünde ve altında enzimin aktivitesi azalır. Enzimlerin etkin aktivitede bulundukları pH değerleri aynı değildir (Bhat, 2000).

Enzimler, in vivo ve in vitro ortamlarda etkilidirler (Keha ve Küfrevioğlu, 2018; Koolman ve Röhm, 2003). Katalitik etki gösteren enzimlerin bazıları sadece protein şeklinde bulunurken, diğerleri ise ancak kofaktör yardımıyla bu işlevini yerine getirebilir. Kofaktörler inorganik olan metal iyonlarından (Mg^{+2} , Fe^{+2} , Zn^{+2} , vb.) oluşmaktadır. Koenzim adı verilen kompleks organik bileşik ise (NAD^{+} , FAD^{+} , Koenzim A, vb.) olarak

da enzimin yapısında bulunabilir. Kofaktör içeren enzime holoenzim denirken, kofaktör içermeyen enzime ise apoenzim denir (Onat, 1996).

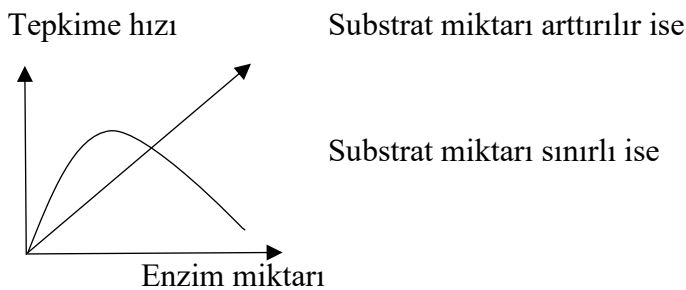
Enzime bağlanan kofaktörler genellikle diyaliz ile ayrılabilirler. Ancak bazı gruplar kovalent bağlarla enzime bağlanarak ayrılmazlar. Bu tür gruplara prostetik grup denir (Lehninger 2000).

Enzimlere ait olan ortak özellikler şöyledir;

1. Genelde enzimler protein yapısındadır.
2. Bir enzimin katalizlediği kimyasal veya biokimyasal tepkimeler benzerdir.
3. Enzimler reaksiyonların aktivasyon enerjisini düşürerek etki ederler.
4. Aynı türde olan reaksiyonlar enzimler tarafından defalarca gerçekleştirilebilir.
5. Enzimler etki ettikleri reaksiyonları kısa sürede dengeye getirirler.
6. Enzimler in vivo ve in vitro ortamlarda katalitik etkide bulunurlar.

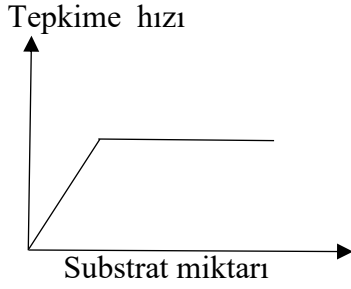
Enzim aktivitesini etkileyen faktörler şöyle sıralanabilir;

1-Enzim konsantrasyonu: Reaksiyon gerçekleşirken substrat miktarı yeterli ise; tepkime hızının enzim derişimiyle doğru orantılı olduğu gözlenir. Substrata ait olan miktar sınırlı ise tepkimenin hızı önce artar sonra azalır. Enzim miktarının reaksiyon hızına etkisi şekil 1.1. de verilmiştir.



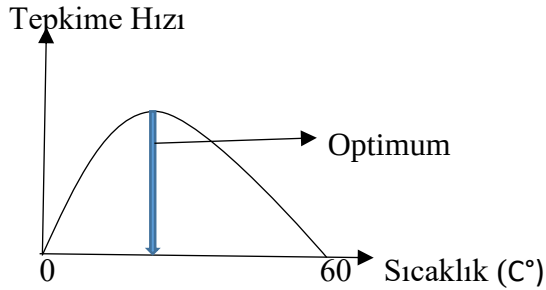
Şekil 1.1. Enzim miktarının reaksiyon hızına etkisi

2-Substrat konsantrasyonu: Enzim miktarı yetersizse substrat miktarı artsa dahi tepkimenin hızı önce artar sonra sabit kalır. Çünkü ortamda bulunan enzimin tamamı tüketilmiş olur (Tekman ve Öner, 1994). Substrat miktarının reaksiyon hızına etkisi Şekil 1.2.'de verilmiştir.



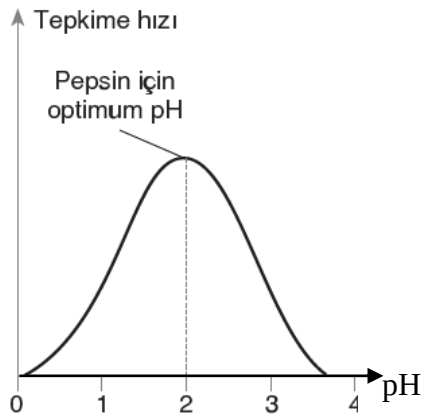
Şekil 1.2. Substrat miktarının reaksiyon hızına etkisi

3-Sıcaklık: Vücut sıcaklığı optimal sıcaklık olarak değerlendirilebilir. Bu sıcaklıkta enzimatik tepkimelerin hızı oldukça yüksektir. Sıcaklık eğer azalırse enzimatik tepkimelerinde hızı azalır. Tepkimelerin hızı sıcaklık arttıkça artar. Sıcaklık değeri 45-55 C° aralığının üstüne çıkarsa protein yapısında bulunan enzimlerin üç boyutlu yapıları bozulacaktır. Bu da reaksiyonun durmasına neden olur. Sıcaklık düşürüldüğünde ise tepkime hızı azalsa da enzimin üç boyutlu yapısında bozulma olmayacaktır (Nelson ve Cox, 2005). Sıcaklığın reaksiyon hızına etkisi Şekil 1.3.'de verilmiştir.



Şekil 1.3. Sıcaklığın reaksiyon hızına etkisi

4-pH: Enzimler optimal pH aralıklarına sahiptirler. Bu değerler genelde nötr bölgeye yakın olsada optimal pH'sı 7'nin üstünde veya 7'nin altında olan enzimler bulunmaktadır (Gözükara, 2011).



Şekil 1.4. pH'nın reaksiyon hızına etkisi (Gözükara, 1990).

5-İnhibitörler: Enzimlerin tepkime hızlarını azaltan veya tamamen engelleyen maddelerdir. Substratlara benzerler bu özelliklerinden dolayı enzimlerle birleşerek, enzimi etkisizleştirirler.

6-Aktivatörler: Reaksiyonları hızlarını arttıran maddelere aktivatör denir.

7-İyonik şiddet: Enzimin bulunduğu ortamda bulunan osmolariteyi ifade eder.

Günümüzde yaklaşık olarak 5000'e yakın enzim tanımlanmıştır. İzole edilen bu enzimlerden 200'e yakını kristalize edilmiştir (Gözükara, 1997).

Enzim sayısının çok fazla olmasından dolayı sistematik bir adlandırmaya ihtiyaç duyulmuştur. Enzimlere en başta özel adlar verilmiştir. Özel adlandırmalar yapılırken enzimlerin çoğu etki ettikleri substratların adına veya o reaksiyonu tanımlayan kelimelere "az" son eki getirilerek yapılmıştır. Örneğin ürenin hidrolizini katalize eden enzime üreaz adı verilmiştir. Bu tür adlandırmalar sistematik olmadığından dolayı pek çok problem ortaya çıkmıştır. Zaman içerisinde çok sayıda enzimin tanımlanmasından dolayı da bu problem daha da karmaşık bir hal almıştır. Bu sorunu çözmek için Uluslararası Biyokimya

ve Moleküler Biyoloji Birlięi (IUBMB) tarafından enzimlerin sistematik olarak adlandırılması ve sınıflandırılmasıyla ilgili belirli kurallar ortaya konmuştur. Bu kurallar şöyledir;

a) Enzimlere ‘-az’ son eki verilir. Enzim sayısı birden fazla ise ‘-az sistem’ olarak adlandırma yapılır. Substratı tanımlamak için; heksokinaz, üreaz, amilaz, arjinaz, proteaz ve lipaz gibi. Tepkimeyi tanımlamak için; DNA polimeraz, glukoz izomeraz, laktat dehidrojenaz ve adenilat siklaz gibi.

b) Enzimlerin ve substratların kimyasal yapıları ve özellikleri değerlendirilerek katalizlenen reaksiyona göre adlandırılırlar. Enzimlerin elde edildiği kaynaklar farklı olsa da aynı katalitik etkiyi gösteren enzimler genel olarak aynı adı alırlar.

c) Her enzimin sistematik bir adı ve dört rakamdan oluşan bir enzim komisyon numarası (E.C) vardır. Enzimlere ait kod numaraları 4 rakam ile tanımlanır.

1. Rakam, enzime ait olan sınıfı temsil eder,
2. Rakam, enzimin hangi fonksiyonel grup ve hangi kimyasal yapıyla etkileştiğini temsil eder,
3. Rakam, alt sınıfını,
4. Rakam, enzimin alt alt grubunu gösterir.

Örneğin E.C.1.1.1.49

1. Rakam, esas sınıf (Oksidoredüktazlar)
2. Rakam, alt sınıf ve etkilediğı bağ
3. Rakam, akseptör NAD^+ veya NADP^+
4. Rakam, alt alt grupta enzimin sıra numarası

Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birlięi (IUBMB) tarafından ortaya konulan bu yeni sistemde enzimler, katalizledikleri spesifik reaksiyon tipleri ele alınarak altı ana sınıfa ayrılmışlardır (Gözükara, 2011; Whitford, 2005).

Tablo 1.1. Enzimlerin uluslararası sınıflandırılması (Whitford, 2005).

Sınıf	İsim	Katalize Ettiği Reaksiyon Tipi
1	Oksidoredüktazlar	Oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları, elektronların transferi (hidrit iyonları ve H atomları ile)
2	Transferazlar	Grup-transfer tepkimeleri, fonksiyonel bir grubu bir donörden bir akseptöre transfer eden enzimlerdir
3	Hidrolazlar	Hidroliz tepkimeleri (işlevsel grupların suya transferi) çeşitli bağları hidroliz eder örneğin C-O, C-N, C-C
4	Liyazlar	Grupların ilavesi ve grupların yer değiştirmesiyle çift bağların oluşması (Substrattan C-O, C-N, C-C arasındaki bağları oksidasyon ve hidroliz yolu dışındaki bir yolla kırarak atomlar arasına çift bağ ekler)
5	İzomerazlar	İzomerik formları oluşturmak üzere moleküller içinde grupların transferi (izomerizasyon reaksiyonlarını yani bir molekül içindeki yapısal ve geometrik değişiklikleri katalize eder)
6	Ligazlar	ATP'nin harcanmasıyla C-C, C-S, C-O ve C-N bağlarının oluşması sağlar

1. Oksidoredüktazlar: Redoks tepkimelerini katalizlerler. Bunların isimleri; Redüktaz veya dehidrogenaz olarak ifade edilirler. Oksijenin, elektron veya hidrojen alması söz konusu ise ismi oksidaz olarak ifade edilir.

2. Transferazlar: Hidrojen dışında bir fonksiyonel gurubun substrata transfer edilmesinde katalizör olarak görev yapan enzimlerdir.

3. Hidrolazlar: Su moleküllerinin tepkimeye girmesiyle oluşan ayrışma veya kondenzasyon tepkimelerine katalitik olarak etki eden enzimlerdir.

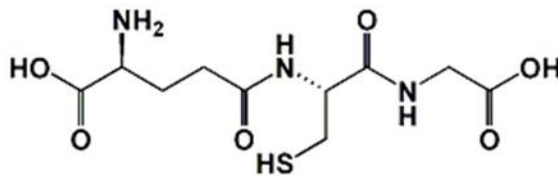
4. Liyazlar: Oksidasyon ve hidroliz yolu dışındaki bir kimyasal etkileşim ile çift bağların meydana gelmesini ve çift bağlara katılmaların görüldüğü tepkimeleri katalizlerler.

5. İzomerazlar: Molekülün kendi içerisinde düzenlenmesini katalize ederler. Böylece molekülün geometrik veya yapısal çevrilmesi gerçekleşir.

6. Ligazlar: Enzimlerin katalitik etkisi altında iki farklı molekülün bağ oluşturmak üzere birleşmesini katalize ederler. ATP veya GTP gibi oldukça yüksek enerjili bileşiklerden fosfat bağı koptuğunda oluşan enerji ile iki molekülün bağlanması gerçekleşir. Bu tür reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir (Keha ve Küfrevioğlu, 2012).

1.2. Glutasyon

γ -glutamil-sisteinil-glisin şeklinde adlandırılan glutasyon, glutamat yan zincirinin karboksil grubu ile sistein aminoasidinin amin grubu arasında bir gama peptit bağına sahip olan bir tripeptittir. Sisteinin karboksil grubu, bir glisin aminoasidine normal peptit bağı ile bağlanır (Sharma et al., 1989). GSH endojen olarak karaciğerde üç farklı amino asit kullanılarak anabolik yollarla sentezlenir. Bu aminoasitler glutamik asit, sistein ve glisindir (Lu 2009). İndirgenmiş glutasyon (GSH; Şekil 1.5.) bakterilerden memelilere kadar (bazı bakteriler ve amipler hariç) canlı hücrelerin tamamına yakınında bulunan molekül kütlesi büyük olmayan, tiyol içeren bir tripeptittir (Hamilton et al., 2014).



Şekil 1.5. İndirgenmiş glutasyonun kimyasal formülü

Glutasyon (GSH), ksenobiyotiklere maruz kalan organları koruması ve dokulara ciddi düzeyde zarar veren H_2O_2 gibi serbest radikallerin ortadan kalkmasını sağlamasından dolayı oldukça önemli bir antioksidan olarak bilinir (Giblin, 2000). Eğer GSH düzeyinde bir azalma gözlenirse pek çok dejeneratif hastalığın başlaması ve ilerlemesi söz konusu olur (Flagg et al., 1994).

Glutasyon, reaktif oksijen türlerinin (ROS) dokularda hasara yol açacak etkilerini ortadan kaldıran bir antioksidandır. Oksidatif stresin ortadan kalkması için peroksit ve serbest radikal gruplarıyla etkileşerek hücre ve dokuları oksidatif zararlardan korur. GSH, aynı zamanda aminoasitlerin taşınmasında görev almaktadır. GSH'nın diğer bir görevi de elektrofilik bileşiklerin detoksifikasyonunda kofaktör olarak rol oynamasıdır (Blokchina vd., 2003).

GSH; bitki, hayvan ve mikroorganizmaların hücre sitozolünde oldukça yüksek düzeyde bulunarak iki önemli görevi yerine getirir. Birincisi, hücrede bulunan toksik metabolitleri hücreden uzaklaştırır. İkinci görevi ise indirgenmiş yapısını kullanarak hücrelerde bulunan sülfhidril grubunun etkinliğini ve sürekliliğini devam ettirir (Liebman and Greenberg, 1988). GSH'ın yayında hücrelerde birde okside glutatyom (GSSG) mevcuttur. Bu iki formun oranı hücredeki oksidatif stres ile ilgili bilgi verebilir. GSH/GSSG oranı eritrositlerde yaklaşık 500'dür. Düşük bir GSH/GSSG oranı, yaşlanma sürecinin ve diyabet, böbrek yetmezliği, pnömoni, malignite, amiotrofik lateral skleroz, Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı ve katarakt dahil olmak pek çok hastalığın belirtisi olarak değerlendirilir (Ballatori et al.,2009).

Glutatyonun hayvanlardaki işlevlerini yukarıda verdiğimiz bilgilere göre şöyle sıralayabiliriz;

- a) Aminoasitlerin transportunda,
- b) Enzimlerin regülasyonunda,
- c) Peroksidaz metabolizması,
- d) Hücreler arası iletişimde görevli molekülün işlevinde,
- e) Ksenobiyotiklerin detoksifiye edilmesinde.

1.3. Glutatyon S- Transferaz Enzimi

1.3.1. Tarihçesi

Meister ve arkadaşları tarafından 1879 yılında yapılan çalışmalar sonucunda glutatyon S-transferaz enziminin varlığı dolaylı olarak saptanmıştır. 1959 yılına gelindiğinde ise GST enzimi tarafından glutatyon konjugatlarının katalizlenme reaksiyonlarının gerçekleştiği Barnes ve arkadaşları tarafından ortaya konulmuştur (Güven, 2003). GST'lerin enzim olduğu ise ilk olarak 1961'de keşfedilmiştir (Booth et al., 1961).

1.3.2. Yapısı ve Biyokimyasal Tepkimeleri

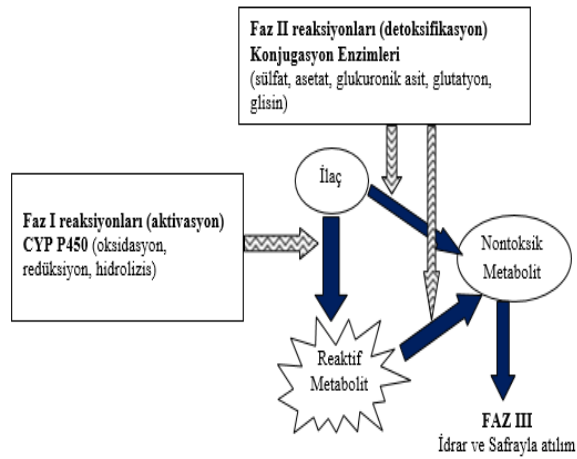
Canlılar yaşamları boyunca toksik maddelere maruz kalırlar. Bu maddeler yapısal özelliklerinden dolayı canlı organizma üzerinde pek çok hasara neden olabilirler. Özellikle serbest radikaller bu sıralamada başat rol oynamaktadırlar. Reaktif oksijen türleri (ROS), serbest radikaller içerisinde oldukça tehlike arzeden bir sınıftır. Bunların dış

yörüngelerinde ortaklaşmamış tek elektron bulunduğundan dolayı kararsız bir yapıya sahiptirler. Kararlı bir yapıya ulaşmak için etraflarındaki moleküllerden elektron kopartmak isterler. Böylece diğer moleküllerin kimyasal yapılarını bozarlar. (Demir 2019; Gülçin ve Beydemir, 2013). Ancak ROS derişimi belli bir değerin üzerine çıktığında oksidatif stres meydana gelir. Böylece proteinler, lipitler ve DNA gibi önemli biyomoleküllerin oksidatif olarak bozunmaları söz konusu olur. (Gülçin vd., 2006; Kırıcı vd., 2016). Serbest radikallerin meydana gelmesinde zararlı güneş ışınları, radyasyona maruz kalma, sigara dumanı, kimyasallar gibi ekzojen etkenler sayılabilir. Serbest radikal kaynakları tablo 1.2’de gösterilmiştir.

Tablo 1.2. Serbest radikal kaynakları (Aksoy, 2002)

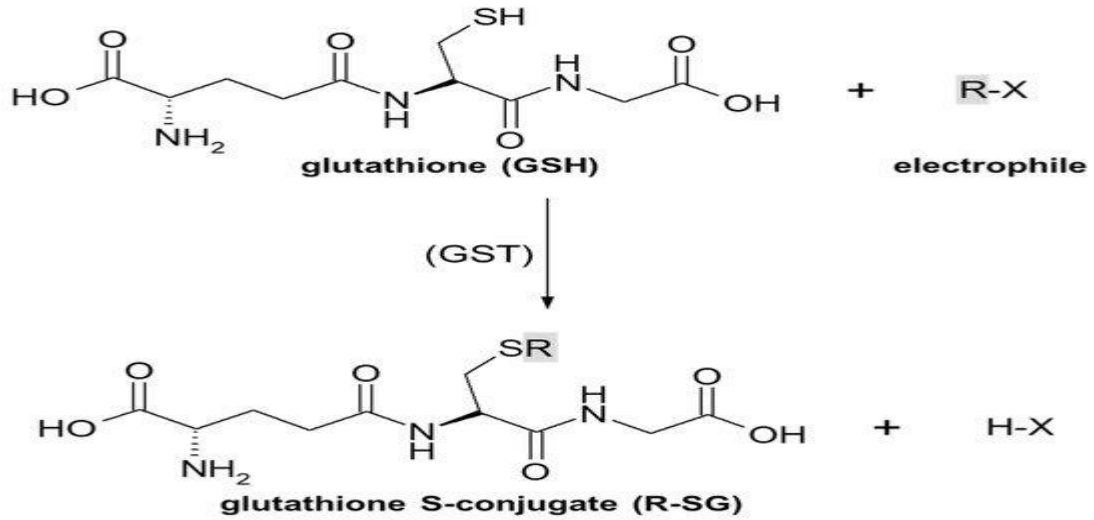
Endojen Kaynaklar	Eksojen Kaynaklar
Fagositik ve endotelial hücreler	Zararlı ışınlar (x-ray, UV)
Oksidatif reaksiyonlar	Sigara dumanı
Araşidonik asit metabolizması	Organik solventler
Mitokondriyal elektron transport zinciri	Diyet faktörleri
Otooksidasyon reaksiyonları	İlaçlar
Enzimler (Ksantin oksidaz, NADPH oksidaz vs.)	Ksenobiyotikler
Redoks reaksiyonları	Pestisitler

Canlı yaşamının devamı için gerekli olan detoksifikasyon sistemleri vardır. Bu sistemler vasıtasıyla pek çok yol ile canlının vücuduna giren ksenobiyotiklerin detoksifiye edilmesi temelde üç farklı faz ile oluşur. Bu tepkimeler; Faz I, Faz II ve Faz III olarak adlandırılmıştır. Faz I tepkimelerinde substrat ile etkileşecek aktivitesi yüksek gruplar substrata katılırlar devamında ise faz II konjugasyon tepkimeleri gerçekleşir. Sitokrom P450 sistemi faz I tepkimelerini katalizler. Faz III tepkimelerinde zararlı maddelerin vücuttan rahat atılabilmesi için su içerisinde daha çok çözünebilen nonpolar ksenobiyotikler ve nontoksik olan metabolitler elde edilirler. GST, 3000 civarında maddeyi substrat şeklinde görerek onlarla etkileşime girmiştir. Yine GST, endojen ve eksojen kaynaklardan ortaya çıkan bileşiklerle detoksifikasyon tepkimelerini gerçekleştirmek için pek çok organik yapıdaki anyonla bağlanabilmektedir (Rebeck, 1997).



Şekil 1.6. Zehirsizleştirme reaksiyonları (Temel vd., 2017)

Glutatyon S-transferazlar, Faz-II detoksifikasyon enzim ailesidir. Faz-II reaksiyonları sonucunda ksentebiyotikler vücuttan kolay atılan ve toksisitesi daha düşük metabolitlere dönüşürler.

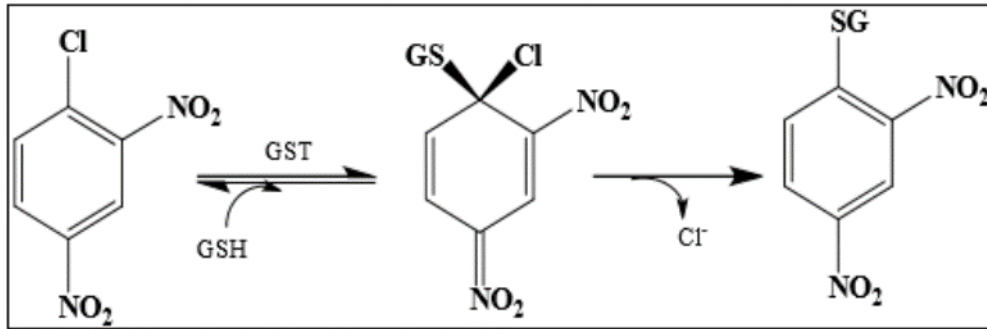


Glutatyon S-konjugatını (R-SG) oluşturmak üzere bir elektrofil (RX) ile glutatyon (GSH) konjugasyonunun genel şeması. Reaksiyon, (GST) enzimi tarafından katalizlenmektedir. (Ketterer et al.,1983)

Glutatyonun konjugasyon reaksiyonları incelendiğinde bu etkileşimlerin büyük bir kısmında GST enzimlerinin rol aldığı gözlenir. Faz II reaksiyonları neticesinde organizma

oldukça reaktif elektrofilik özellikteki zararlı maddelerin saldırılarından korunmuş olur (Awasthi et al. 1980).

Enzim mekanizması: GST, öncelikle glutatyon ile substratı birbirlerine yaklaştırmak üzere aktif bölgesine bağlar (Eaton and Bammler, 1999). Amaç GSH üzerinde bulunan sülfidril grubunun aktifleştirilmesidir. Bu şekilde GSH ile saldırgan elektrofilik substrat etkilişime girer. (Armstrong, 1997).

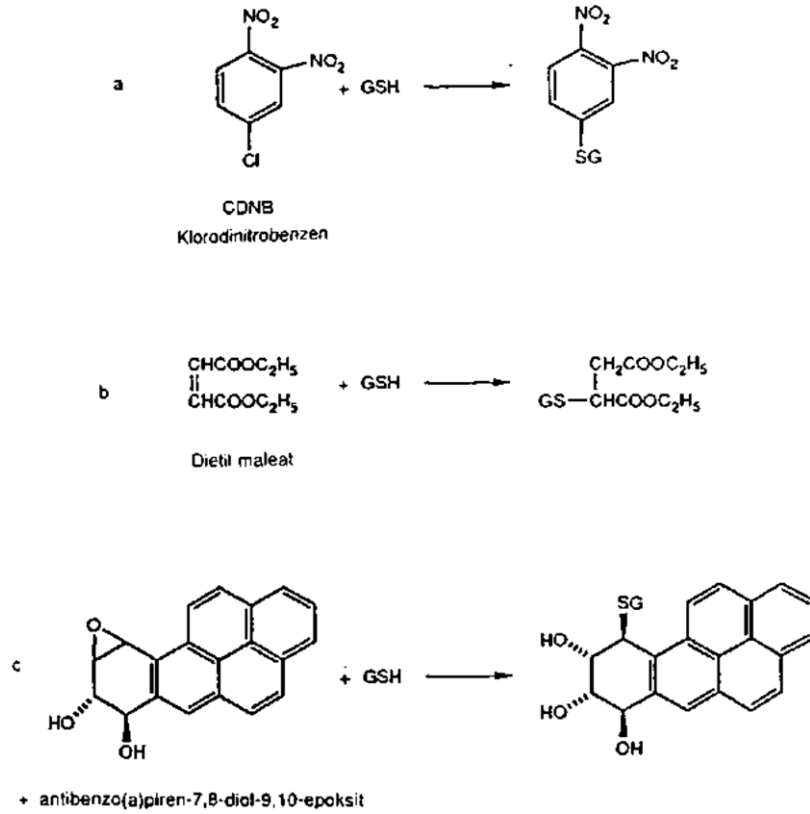


Şekil 1.7. GST enziminin katalizlediği reaksiyon (Habdous et al., 2002)

GST enzimleri; Epoksit bileşiklerin halka açılmaları, nükleofilik yapıda bulunan aromatik geçiş tepkimelerini miçel eklenmesi tepkimesi ve bazı peroksitlerin detoksifiye reaksiyonlarını katalizlerler (Eaton and Bammler, 1999).

Boyland ve arkadaşları sıçanlar üzerinde yaptıkları çalışmalar sonucunda GST izoenzimlerini sıçan karaciğerinde ilk kez keşfetmişlerdi. Daha sonraki çalışmalar neticesinde pek çok canlının akciğerinde, karaciğerinde ve buna benzer dokularından da elde edilmiştir. Aynı zamanda mikroorganizmalardan da GST enzimleri saflaştırılmıştır. GST'ler akciğer, karaciğer, böbrek, incebağırsak ve kalınbağırsak gibi organların sitozollerinde bulunan toplam proteinin %5'ini teşkil ederler. Canlı vücuduna dışarıdan giren ksenobiyotiklerden dolayı bu organların dışarıyla teması sonucunda, bu tür organlarda GST miktarının artmış olduğu tespit edilmiştir (Gyamfi et al 2004). GST'ler membranı oluşturan maddeleri lipid peroksidasyonuna karşı korurlar. Lipid peroksidasyonu sonucunda aldehit formundaki ürünlerinden birisi olan 4-hidroksi alkenallerin GSH ile konjuge hale gelmesini sağlarlar. GST'ye ait izoenzimler, toksik maddelerin elektrofilik ksenobiyotik detoksifikasyon tepkimesinde rol oynar. Bu özelliklerinden dolayı GST'yi doğal koruyucu olarak nitelendirebiliriz (Gyamfi vd, 2004). Glutatyonla enzimatik olarak konjuge olan bileşiklere örnek olarak epoksitler, alkanlar, nitroalkanlar, haloalkanlar, metil

sülfoksit bileşikleri, organofosfatlar, aromatik halo ve nitro bileşikleri gösterilebilirler (Hodgson and Levi, 1994). Şekil 1.8'de görüldüğü gibi bu tepkimeler; nükleofilik yer değiştirme tepkimesi, Michael eklenmesi tepkimesi ve konfigürasyonu değişmiş oksiran halkasına nükleofilik atak tepkimesi şeklinde olur.



Şekil 1.8. Elektrofilik substrat metabolizmasında glutatyon S-transferazların rolü (Hodgson and Levi, 1994)
a: Nükleofilik yer değiştirme, b: Michael eklenmesi, c: Konfigürasyonu değişmiş oksiran halkasına nükleofilik atak

Glutatyon S-transferazların organizmada üç önemli işlevi vardır;

1. Detoksifikasyondaki rolü: GST enzimi katalizörlüğünde ksenobiyotiklerin GSH ile konjugasyon tepkimeleri vermeleri ve bunu müteakiben markaptürik asiti meydana getiren reaksiyonların hepsine birden detoksifikasyon tepkimeleri adı verilmektedir. GST'nin detoksifikasyondaki rolü konjugasyon ve indirgenme özelliği olarak iki kısma ayrılır.

a. Konjugasyon

i) Katalitik konjugasyon

ii) Katalitik olmayan konjugasyon

b. İndirgeme özelliği

2. Hücre içi taşıyıcı protein olarak rolü
3. Organa özgü toksisite oluşumuna katkı sağlama rolü

1. Detoksifikasyondaki rolü: Bu tepkimelerin mekanizmalarına daha yakından bakalım.

a. Konjugasyon

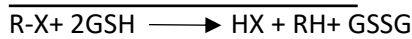
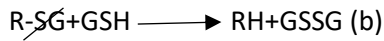
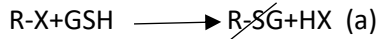
i) Katalitik konjugasyon

Endojen bir tripeptid olan GSH ile elektrofilik atak yapan ksenobiyotik ve faz I reaksiyonu sonucunda oluşan ara ürünlerin GST enzimi katalizörlüğündeki tepkimelerine katalitik konjugasyon denir (Hayes at al., 1987). GST'in katalizörlüğündeki bu reaksiyon aşağıda şematik olarak gösterilmiştir. İki tip reaksiyon gözlenir.

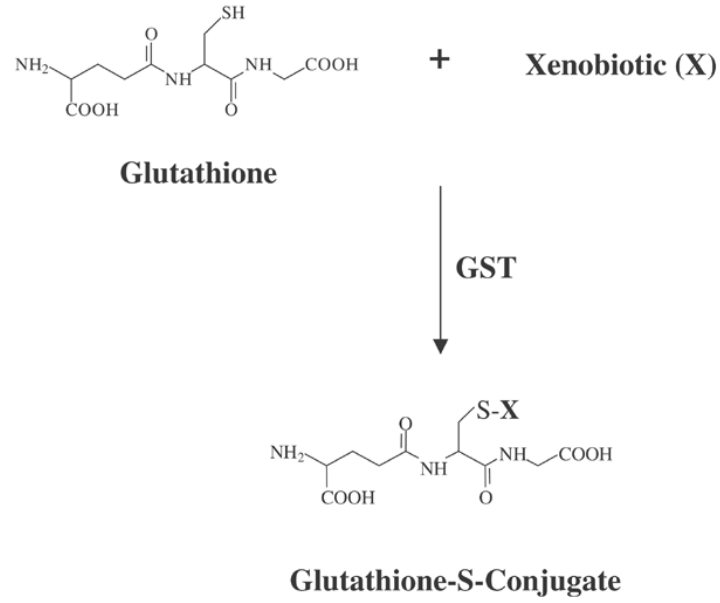


Bu reaksiyonda GSH'nin nükleofilik olarak elektrofilik özellikte olan bir merkeze bağlanması sonucu oldukça kararlı bir GSH konjugatı meydana gelir. Şekil 1.9 GSH konjugatlarının metabolizmasını göstermektedir.

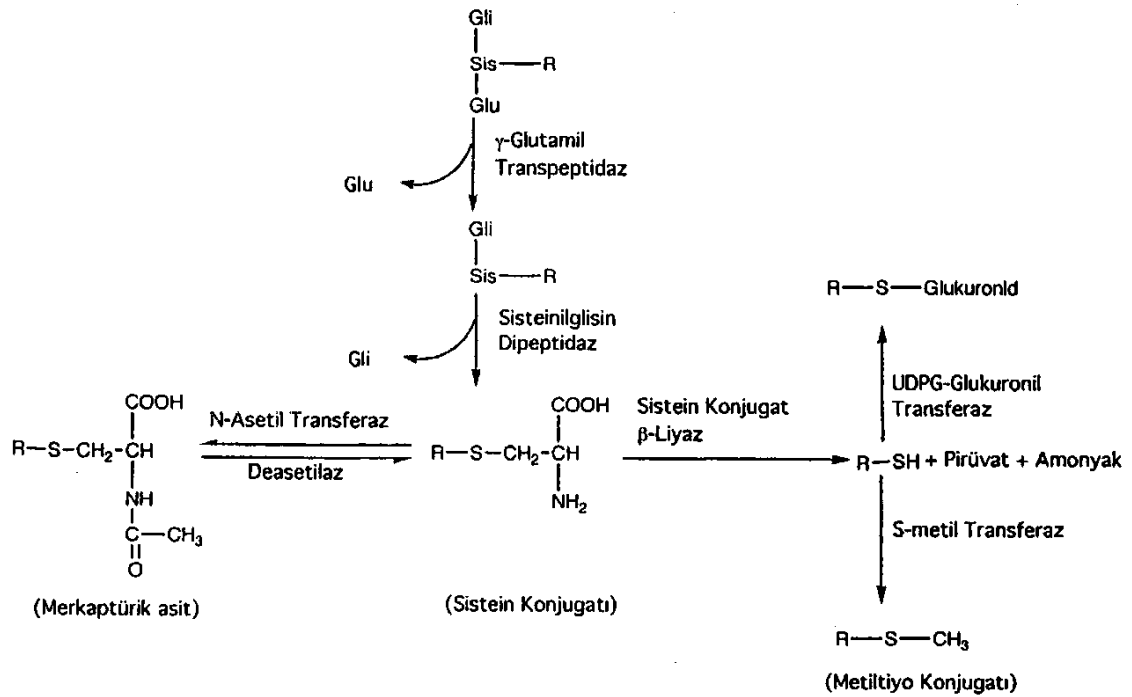
İkinci tip reaksiyonda ise yükseltgenmiş glutatyon (GSSG) ve indirgenmiş bir ara ürün oluşur. Önce kolay bozunan bir R-SG ara ürünü enzimatik olarak meydana gelir (a). İkinci bir GSH molekülünün enzimatik olmayan tepkimesi ile RH ve GSSG oluşur (b) .



GSH, böyle tepkimelerde substrat gibi değilde bir koenzim gibi hareket eder (Boyer, 1989).



Şekil 1.9. GST yoluyla bir ksenobiyotiğe (X) glutatyon konjugasyonu, bir glutatyon- S konjugatının oluşması



Şekil 1.10. Glutatyon konjugatlarının metabolizması (Pickett and Lu,1980)

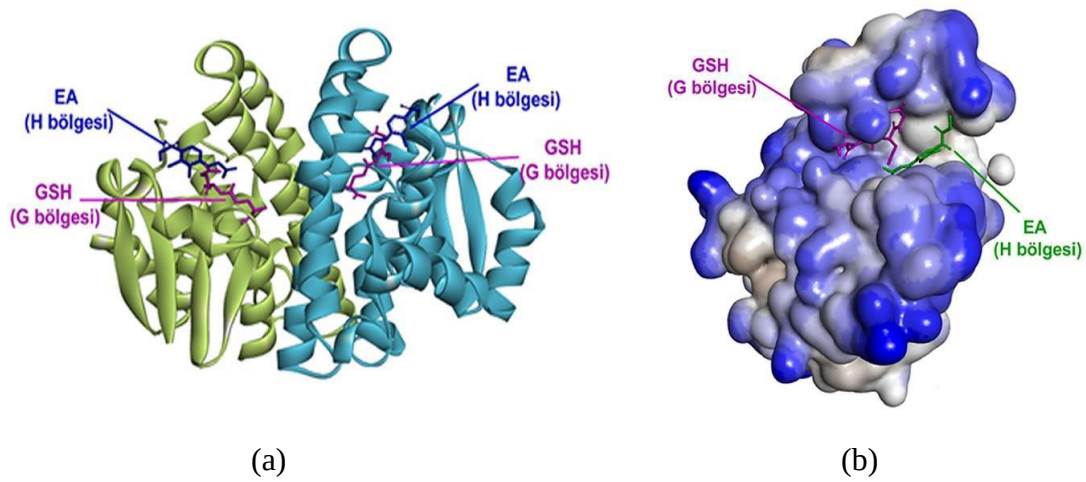
ii) Katalitik olmayan konjugasyon

GST'ler elektrofilik bileşiklerle doğrudan kovalent bağlarla bağlanabilirler(Chasseaud, 1979). Bu bağlanma neticesinde hücre bileşenleri korunmuş olur.

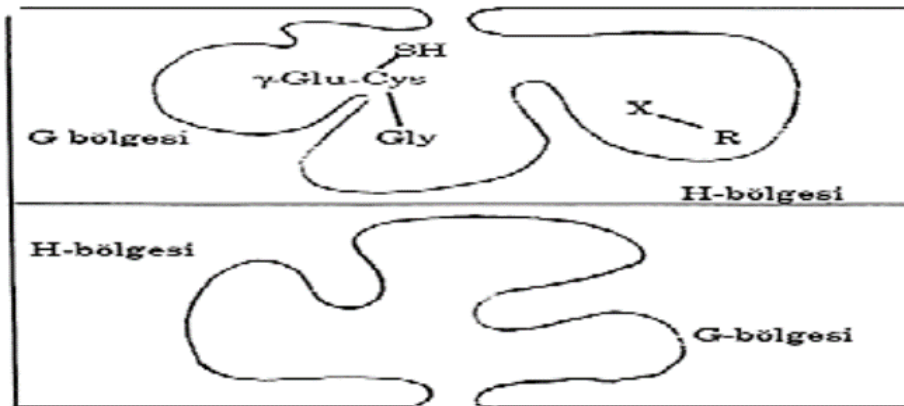
b. Glutatyon S-transferazların indirgeme Özelliği

GST'ler redüksiyon özelliği sayesinde membran bileşenlerini lipit peroksidasyonundan korumuş olurlar. (Rietjens at al., 1987).

GST enzimlerinin molekül kütleleri yaklaşık olarak 20-25 kDa'dur. Bu enzimlerin alt birimlerinde ise 200-240 aminoasit dizisinin var olduğu rapor edilmiştir (Hayes et al 2005). GST alt birimleri polipeptid bağları ile bir araya getirilen iki domainden meydana gelir. Bu yapıya biraz daha detaylı olarak baktığımızda önemli iki bölgenin olduğunu görüyoruz. Bunlardan ilki GSH'nin bağlandığı G bölgesidir. G bölgesi yaklaşık 80 aminoasitten oluşmaktadır. Bu bölgede N-terminal domain bir β -tabaka ve üç α -heliks yapısı beraber bulunmaktadır. H bölgesine ise Hidrofobik elektrofillerin bağlanmaktadır. Ayrıca α -helikal yapılardan meydana gelen C-terminal domain kısmı vardır (Tuna, 2008).



Şekil 1.11. (a) Dimerik GST enziminin yapısı ve (b) Hidrofobik yüzey alanı görünümü (Armstrong, 1997; Oakley, 2011).



Şekil 1.12. GST enziminin aktif bölgelerinin gösterimi (Çomaklı, 2011)

GST'ler en az dört ana protein ailesine ayrılır. Dört ana grubu oluşturan temel faktörler ise aminoasit dizileri ve etkileşime girdiği maddelerin özelliklerine göre oluşturulmuştur. Gruplar oluşturulurken kimyasal affiniteleri ve kimyasal davranış şekilleride belirleyici olmuştur. Bunlar; Sitozolik GST'ler, mitokondriyal GST'ler, mikrozomal GST'ler ve bakteriyel fosfomisin dirençli proteinlerdir (Oakley, 2005; Allocati et al., 2009). Mitokondriyal ve sitozolik GST'ler üç boyutlu bir yapıda katlanmalarından dolayı benzerlikleri söz konusudur. Bu gruptaki GST'lerin fazla sayıda izoenzimleri mevcuttur. Bu türdeki GST izoenzimlerinin birbirlerinden ayrılması için, izoelektrik noktalarına ve aminoasit dizilerinde görülen farklılıklara bakmak gerekir. Mikrozomal GST'ler ise (MAPEG) çözünebilen GST'lere yapı itibarıyla benzerlik göstermezler (Hayes et al., 2005). Sitozolik GST'ler 7 sınıfa ayrılırlar;

GST Alfa (GSTA1-1, GSTA2-2, GSTA3-3, GSTA4-4, GSTA5-5),

GST Mü (GSTM1-1, GSTM 2-2, GSTM3-3, GSTM4-4, GSTM5-5),

GST Pi (GSTP1-1),

GST Sigma (GSTS11),

GST Teta (GSTT1-1, GSTT2-2),

GST Zeta (GSTZ1-1),

GST Omega (GSTO1-1, GSTO2-2)

Mikrozomal GST'ler ise MGST1, MGST2 ve MGST3 şeklinde üç sınıfa ayrılır.

GST enziminin aktivite ölçümünde iki yöntem kullanılır. Birinci yöntem spektrofotometriktir. Bu yöntem de GST nin substratı olan GSH'ın konjuge edilmesine bağlı olarak meydana gelen konjugatın renk şiddeti veya absorbansının ölçülmesi esas alınır. Diğer yöntemde ise, serum dokusundan alınan numunelerdeki GST enzimine ait aktivitenin tespit edilmesinde başvurulan immünoradiyometrik yöntemdir (Howie et al., 1988).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

GST izoenzimleri ilk defa Both vd. (1961), tarafından sıçan karaciğerinden alınan dokuda tanımlanarak, epoksit transferaz, aril transferaz, alkil transferaz, alken transferaz ve aralkil transferaz olmak üzere beş ayrı sınıfa ayırmışlardır.

Pabst vd. (1974), enzimin birçok formunun saflaştırarak bu formların karakterizasyon özelliklerini incelemişlerdir. Sonuç olarak substrat spesifitelerinin olduğu anlaşılmıştır.

Awasthi vd. (1980), gerçekleştirdiği bir çalışma sonucunda GST enzimini insan karaciğerinden anyonik izoformları saflaştırarak elde etmiştir.

Asaoka (1983), GST enzimini, orange-A agaroz afinite kromatografisiyle yöntemini kullanarak sığır karaciğer dokusundan izole etmiştir.

Young ve Briedis (1989), yaptıkları çalışmalar sonucunda, GST enzimini sığır beyin dokusundan, belirli yöntemler kullanarak yaklaşık 500 kat saflaştırmışlardır.

Jagt vd. (1985), GST ait 13 farklı yapıyı insan karaciğer dokusundan hareketle saflaştırmıştır. Saflaştırma yöntemi olarak ise GSH-afinite kromatografisi ve kromatofocuslama kullanılmıştır. Bu 13 yapı incelendiğinde substrat olarak CDNB'ye benzer aktivitede oldukları saptanmıştır. Enzimin spesifik aktivitesi de 33-94 EÜ/mg arasında değişmektedir.

Singh vd. (1987), çalışmalarında GST'nin 3 önemli sınıfını (α , μ , π) insan böbreğinden saflaştırılmışlardır. İzoelektrik pH'sı 9,1 olan GST izoenzimi dışında İnsan böbreğindeki katyonik GST izoenzimlerinin heterodimer özellikte oldukları bulunmuştur. Alt birimlerine ait molekül kütleleri 26,5 kDa-24,5 kDa arasında tespit edilmiştir.

Oshino vd. (1989), yaptıkları çalışmalarda dört farklı tipteki GST enzimlerini izole etmişlerdir. İzalasyon işleminde 4 farklı kromatografi tekniğini peşpeşe kullanmışlardır. Homodimer olarak belirlenen GST enzimleri sırasıyla a, b, c, d olarak adlandırılmışlardır.

Sonuç olarak 50 kDa molekül kütlesine sahip ve yapı itibariyle birbirine benzeyen b, c, d izoenzimleri belirlenmiştir. Yine a enziminin b,c,d enzimlerine göre 100 katın üzerinde peroksidaz aktivitesine sahip olduğu rapor edilmiştir. Aminoasit sayıları GSTa'da 408, GSTb'de 424 olduğu bulunmuştur. GSTa ile GSTb'nin CDNB ve GSH substratlarına dair KM değerleri de bulunmuştur.

Izuka vd. (1989), GST'yi E.coli ekstraktları kullanarak %7,5 verimle takriben 2300 kat civarında saflaştırmışlardır. Enzimin molekül kütlesi 45 kDa olarak tespit edilerek bu enzime ait iki eş alt birimin olduğu rapor edilmiştir. Enzime ait substratların CDNB ve GSH için K_M sabitleri ise sırasıyla 1,43 mM ve 0,33 mM şeklinde hesaplanmıştır. Optimum pH: 7, stabil pH değeri 5 ile 11 arasında ve optimum sıcaklığın ise 50°C olduğu belirlenmiştir.

Izuka vd. (1989), E.coli ekstraktlarından elde edilen GST enziminin aktivitesi ile ilgili belirli metal iyonlarına karşı etkilerini incelemişlerdir. Sonuç olarak demir ve çinko kationlarının oldukça düşük derişimleri enzimde inhibasyon meydana getirirken, Ca, Mg, Co, Mn ve Ni metallerine ait iyonların ise inhibasyon etkisi oluşturmadığı gözlemlenmiştir. Wareing vd (1993), çalışmalarında α ve π sınıfına giren GST'lerin CDNB'ye karşı direnç gösterdiklerini, CDNB uygulaması sonucu GST'nin aktivitesinde 1,5 kat civarında bir artış olduğunu rapor etmişlerdir.

Peters vd. (1995), insan lenfositleri üzerindeki çalışmalarında ise, yaşlanmaya bağlı olarak GST-GSH sisteminin belirli ölçüde azaldığını rapor etmişlerdir.

Temellini vd. (1995), çalışmalarında karaciğerdeki GST aktivitesin yaşlanmaya bağlı olarak azaldığını ancak bu durumun kalınbağırsak, renal korteks ve akciğerde oluşmadığını tespit etmişlerdir.

Nishihira vd. (1995), GST π enziminin elektrofilik substratı bağladığı bölge ile ilgili yaptıkları çalışmalarda, kullanılan GSH analogu, GSH ve CDNB substratlarına karşı yarışmalı bir inhibasyon ile katalitik olarak aktiviteyi inhibe ettiğini de tespit etmişlerdir.

Sluis-Cremer vd. (1996), GST π üzerindeki çalışmalarında, oksidatif inaktivasyon işleminden sonra eski konformasyonuna geri döndüğünü tespit etmişlerdir.

Ploemen vd. (1996), alkol bağımlılığında tedavi amaçla kullanılan disülfiram (DSF) ilacını ve onun indirgenmiş yapıda bulunan dietilditiyokarbomatın (DDTC), insan ve sıçan karaciğer GST enzimi ile ilgili tepkimesinin geri dönüşümlü inhibisyonu ve zamana bağlı olarak inaktivasyonu ile ilgili çalışmışlardır. Sonuç olarak en yüksek hassasiyetin, sistein bulundurmeyen, insan GST α 2–2 izoenziminde olduğu raporlanmıştır.

Luty vd. (1998), DDVP sıçanlara, 0-72 saat aralıklarında diklarvos 4 mg/kg doz intraperitoneal vermişlerdir. Sonuçta karaciğerden alınan dokularda diğerlerine göre yüksek oranda GST enzim aktivitesinin artmış olduğu görülmüştür. GST aktivitesindeki farklılığın sebebi olarak ise hücre membranının yapısı ile ilgili yorum yapılmıştır.

Eaton ve Bammler (1999), yaptıkları çalışmada sitozolik, mitokondrial ve MAPEG GST enzim süper ailesine dair sınıflandırılma işleminde protein yapısının ve dizisinin belirleyici bir özellik gösterdiğini belirtmişlerdir. Bu enzim sınıfları yapılarına göre incelendiğinde; sitozolik GST'lerin 13 sınıfa ayrıldığı tespit edilmiştir. Bu sınıflar alfa, beta, delta, epsilon, zeta, theta, mu, nu, pi, sigma, tau, phi, ve omegadır. Mitokondrial GST'ler kappa sınıfına dahil edilirken, mikrozomal GST'lerin MAPEG süper ailesine ait alt gruplardan oluştuğu rapor edilmiştir.

Gadagbui vd. (2000), kedi balığının bağırsak dokulardan elde edilen GST'yi saflaştırıp incelemişlerdir. Yapılan çalışma sonucunda enzim 107 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ spesifik aktivitede, yaklaşık olarak %87 verimle 100 kat saflaştırmışlardır. Enzimin molekül kütlesi takriben 26,7 kDa civarında olduğu tespit edilmiştir. Molekül kütlesi iki alt birimden oluşmaktadır. Enzimin substratları ile yapılan çalışmalarda ise GSH ve CDNB'ye ait K_M değerlerini 0,19 mM ve 0,43 mM olduğunu ölçmüşlerdir.

Çelik vd (2003), plasental GST- π enzimini, 2,628 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ spesifik aktivite ve yaklaşık % 0,5 verimle 16 kat olarak saf hale getirmişlerdir. Karakterizasyon çalışmaları neticesinde substrat olarak kullanılan GSH'nin K_M 'si 2 mM, V_{max} ise 11,1 EÜ/mgdk, diğer bir substrat olan CDNB'ye ait K_M değeri 0,55 mM, V_{max} ise 35 EÜ/mgdk olduğu belirlenmiştir. Saf hale getirilen enzimin aktivitesi bazı ilaçlarla incelenmiştir.

Ampisilinin, dış ortamda ortamda enzime dair aktiviteyi yaklaşık olarak %50-55 oranında inhibasyona uğrattığı rapor edilmiştir.

Casalino vd. (2004), tabiatın kirletilmesi sonucu meydana gelen ağır metal zehirlenmeleriyle ilgili çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada Cd ve Mn ağır metal katyonları ile sıçandan alınan karaciğer dokusu üzerinde çalışılmış ve bu iyonların karaciğerde bulunan GST enziminin aktivitesine olan etkisi incelenmiştir. Sıçana 2,5 mg/kg CdCl₂ veya 2,0 mg/kg MnCl₂ tuzları tek doz olarak verilmiştir. Sonuç itibarıyla sonraki günde enzim aktivitesinin yaklaşık olarak %36 oranında artış gösterdiği ölçülmüştür.

Gyamfi vd. (2004), bir bitkiden saflaştırdıkları thonningianin A (ThA), laboratuvar ortamında karaciğerde bulunan sitozolik GST ile muamele etmişlerdir. Sonuçta oldukça kuvvetli bir inhibitör etkisi meydana getirdiğini rapor etmişlerdir.

Hee ve Joong (2005), GST enzimi maruldan saflaştırarak elde etmişlerdir. Bu enzimi yaklaşık olarak % 9,6 verimle, 403 kat saflaştırarak izole etmişlerdir. Enzimin molekül kütlesi, 23 kDa düzeyinde olduğu tespit edilirken jel filtrasyon kromatografisi metodu ile 48 kDa civarında bir değer bulunmuştur.

Al-Mustafa (2006), metal iyonlarını kullanarak laboratuvar ortamında insan eritrositleri üzerindeki etkileşimlerini incelemiştir. Bu çalışmada Cr⁺⁶ metal katyonunun glutatyon peroksidaz enzimine ait aktiviteyi artırdığı gözlenmiştir. Glutatyon redüktaz aktivitesi üzerinde ise negatif bir etki ortaya koyarak aktiviteyi düşürmüştür. Deney sonucunda yine hem GST ve hem de katalaz enzim aktivitelerinin değişmediği rapor edilmiştir.

Türkanoglu (2007), insan kan serumdan izole edilen GST enzimi aktivitesi bazı metal iyonlarının etkilerini incelenmiştir. Deney sonucunda Cd⁺², Hg⁺² ve Ni⁺² katyonların GST enziminin aktivitesini azalttığı rapor edilmiştir.

Chun-hua Zhang vd (2013) pirinç kullanılarak izole edilen GST ile olan Cd^{+2} katyonunun inhibisyona dair etkilerini incelemişlerdir. Yapılan çalışmada Cd^{+2} katyonunun enzimi inhibasyona uğrattığı rapor edilmiştir.

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Gerekli Kimyasal Maddeler

Yaptığımız deneysel çalışmalarda kullanılan TEMED, CDNB, GSH, sodyum dodesil sülfat (SDS), trihidroksimetilaminometan (Tris), Sephadex G-150, Coomassie Brilliant Blue G-250, brom timol mavisi, akrilamid, N, N'-metilen bisakrilamid, amonyum persülfat, glutatyon agaroz, β -merkaptotanol, sodyum hidroksit, sodyum klorür, sodyum asetat, hidroklorik asit, fosforik asit, asetik asit, glisin, gliserin, potasyum fosfat, potasyum bisfosfat, potasyum asetat, potasyum klorür, izopropanol, etanol, metanol, Sigma ve MERCK'den temin edildi.

3.1.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar

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

Çözeltilerde saf ve deiyonize su kullanılmıştır.

3.1.3. Çözeltilerin Hazırlanması

3.1.3.1. Aktivite Ölçümü İçin Hazırlanan Çözeltiler

1. 25 mM CDNB Çözeltisi: 101,29 mg 1-kloro 2,4 dinitrobenzen tartılarak %95'lik etanol çözeltisinde çözülüp son hacim etanol ile 20 mL'ye kadar çıkarıldı.
2. 20 mM GSH Çözeltisi: 123,0 mg GSH alınıp saf su içerisinde çözülerek son hacmi 20 mL yapıldı.
3. KH_2PO_4 (0,1 M, pH: 6,5): 1,36 g KH_2PO_4 ve 0,028 g EDTA tartılıp 60 mL saf suda içerisinde çözülerek pH değeri 6,5 olarak sabitlendi. Saf suyla çözeltinin hacmi 100 mL'ye getirildi.

3.1.3.2. Homojenatın Hazırlanması İçin Gerekli Çözeltiler

1. 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF içeren 50 mM Tris-HCl (pH: 7,2) Tamponu: 1,21g Tris 160 mL çözülerek çözelti içerisine 0,03 g DTT, 0,054 g EDTA ve 2 mL propanol içerisinde çözülen 0,034 g PMSF ilave edildi. Çözeltinin pH'sı 7,2 yapılarak son hacim saf suyla 200 mL yapıldı.

3.1.3.3. Saflaştırma İşlemi İçin Gerekli Çözeltiler

1. 150 mM NaCl ve 10 mM KH_2PO_4 , (pH:7,4) (Kolonunun paketlenmesi, dengelenmesi ve yıkanması için kullanılan çözelti): 5,22 g NaCl ve 0,8 g KH_2PO_4 alınarak öncelikle 400 mL su içerisinde çözüldü. Çözeltinin pH'ı 7,4 sabitlenip, çözelti hacmi su kullanılarak 500 mL'ye getirildi.
2. 2,5 mM, 5 mM ve 10 mM GSH çözeltisi içeren 50 mM Tris-HCl Tamponu (pH:9,5) (Afinite jeline tutunmuş olan GST elüsyonu için kullanılan tampon): 50 mM Tris-HCl çözeltisi (pH:9,5) içinde GSH çözülerek 10 mM GSH çözeltisi elde edildi. Sonrasında 5 tüp olacak şekilde gelen gradient oluşturuldu. Düşük derişimlerden başlanarak belli bir sıra içerisinde kolona uygulandı.
3. 0,5 M NaCl ve 0,1 M H_3BO_3 pH: 8,5 (borat tamponu) (afinite kolonunu rejenere etmek için kullanılan tampon 1): 2,92 g NaCl ve 0,62 g H_3BO_3 alınıp 80 mL saf su içerisinde çözüldü. pH 8,5'e ayarlanarak çözelti hacmi saf suyla 100 mL'ye getirildi.
4. 0,1 M NaCH_3COO ve 0,5 M NaCl, pH:4,5 (Asetat Tamponu) (glutasyon agaroz afinite kolonunu rejenere etmek için kullanılan tampon 2): 0,82 g NaCH_3COO ve 2,92

g NaCl alınıp 80 mL su içerisinde çözöldü. pH: 4,5'e ayarlanarak çözöltinin son hacmi saf kullanılarak 100 mL'ye getirildi.

5. %0,02 NaN₃ çözöltisi (Kromatografi kolon materyallerini bakterilerden korumak için kullanılan çözölti): 20 mg NaN₃ alınıp su içerisinde çözöldü. Çözöltinin hacmi su kullanılarak 100 mL'ye getirildi.

3.1.3.4. Bradford Metoduyla Protein Tayininde Gerekli Olan Çözöltiler

1. Sığır Serum Albümin çözöltisi: 1 mg sığır albümin alınıp 1 mL suda çözöölerek hazırlandı.
2. Boyama Çözöltisi (Coomassie Brilliant Blue): Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifinden 200 mg alınıp %95'lik 100 mL etanolde çözöldü. Bu çözölti içerisinde %95'lik fosforik asitten 200 mL eklendi. Saf su kullanılarak çözölti hacmi 2000 mL'ye getirildi. Çözölti ışıktan etkilendiğinden dolayı karanlık bir ortamda saklandı.

3.1.3.5. SDS-PAGE İçin Hazırlanan Çözöltiler

1. 1 M Tris-HCl (pH:8,8): 24,22 g Tris tartılıp 140 mL suda çözöldü. pH 8,8'e ayarlanarak çözöltinin son hacmi saf suyla 200 mL'ye getirildi.
2. 1 M Tris-HCl (pH:6,8): 24,22 g Tris tartılarak 140 mL suda çözöölerek pH 6,8'e ayarlandı. Çözöltinin hacmi su kullanılarak 200 mL'ye getirildi.
3. %30 Akrilamid-%0,8 Bisakrilamid çözöltisi: 0,8 g bisakrilamid ve 30 g akrilamid tartılarak 69,2 mL saf su içerisinde çözöldü. Bu çözöltinin hacmi su kullanılarak 100 mL'ye getirildi.
4. %10'luk SDS çözöltisi: 2 g sodyum dodesil sülfat, 18 mL su içinde çözöölerek çözöltinin son hacmi su kullanılarak 20 mL'ye getirildi.
5. %10'luk amonyum persülfat çözöltisi: 2 g amonyum persülfat, 16 mL su içerisinde çözöölerek son hacim su kullanılarak 20 mL'ye getirildi.
6. Jel yürütme tamponu: 3,02 g Tris ve 15 g glisin ve alınarak 900 mL saf suda çözöölmesi sağlandı. Bu çözölti içerisinde 10 mL %10'luk SDS eklenerek pH 8,5'e sabitlendi. Son hacim saf kullanılarak 1000 mL'ye tamamlandı.

7. Numune tamponu: 1 mL %10'luk SDS, 0,5 mL, 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 1 mL %100'lük gliserin ve 1 mL %0,1'lik bromtimol mavisi kullanılarak hepsinin karıştırılmasıyla çözelti oluşturuldu. Su ile çözelti hacmi 10 mL'ye getirildi. Elde edilen bu çözelti kullanılmaya başlamadan önce 950 µL numune için 50 µL β-merkapto etanol ilave edildi.
8. Sabitleştirme çözeltisi: Jel kromatografisi içinde yürütülmüş olan proteinleri sabitleştirmek için %50 izopropanol, %10 TCA, ve %40 su ihtiva eden karışım meydana getirildi.
9. Jel boyama çözeltisi: 20 mL asetik asit içerisinde 0,2 g Coomassie Brilliant Blue R250 reaktifi çözülerek elde edilen çözeltiye 100 mL metanol ve 80 mL saf su eklenerek çözelti oluşturuldu.
10. Jel yıkama çözeltisi: 100 mL metanol ile 20 mL asetik asit karıştırılıp bu karışıma 80 mL saf su eklenerek çözelti oluşturuldu.
11. Bromtimol mavisi çözeltisi (% 0,1'lik) : 32 mL, 0,01 M NaOH bazı içerisine 0,2 gram bromtimol mavisi eklendi. Oluşan çözeltinin hacmi saf su ile 200 mL ye getirildi.

3.2. Uygulanan Metodlar

3.2.1. Protein Tayini

3.2.1.1. Kalitatif Protein Tayini

Triptofan ve tirozin aminoasitlerinin maksimum olarak absorbans gösterdiği değer 280 nm'dir. Proteinlerin yapılarında bulunan bu aminoasitlerin kalitatif tayinleri absorbans değerlerinin ölçümü ile yapılmaktadır (Segel, 1968). Eşit hacimde hazırlanan numunelerin kalitatif protein tayinleri, kuvarz küvetlere konulan numunelerin absorbans değerleri spektrofotometrik yöntemle ölçülerek yapıldı.

3.2.1.2. Kantitatif Protein Tayini

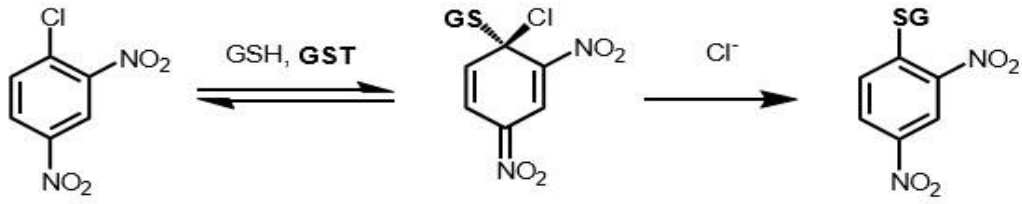
Bradford yöntemi kullanılarak proteinlerin kantitatif tayini yapıldı. Yöntemin mekanizması Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifinin proteinle kompleks oluşturması prensibine bağlıdır. Eksi yüklü Coomassie Brilliant Blue G-250, artı yüklü durumdaki proteine bağlanarak kompleks oluşturur. Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifinin kırmızı renkte iken $\lambda_{max}=465$ nm dalga boyunda ve mavi renkte iken ise $\lambda_{max}=595$ nm dalga boyunda

iki farklı yapıda bulunur. Proteinin ile tepkimesi sonucunda kırmızı renk mavi renge dönüşür. Protein ile boya çok hızlı bir şekilde kompleks bir yapı oluşturma kabiliyetine sahiptirler. Meydana gelen protein-boya kompleksinin maksimum absorbans gösterdiği değer 595 nm'dir. Bu yöntem ile protein tayini 1-100 mg aralıklarında çok hassas ve sağlıklı bir şekilde yapılmaktadır (Bradford, 1976).

Kantitatif protein tayininde takib edilen prosedür şöyledir: Öncelikle standart sığır albümin çözeltisi hazırlandı. 1 ml'sinde 1 mg protein içeren standart sığır albüminden alınarak tüpler içerisine 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µl konuldu. Daha sonra saf su kullanılarak mevcut tüplerin hacmi 100 µL yapıldı. Yine her tüpün içerisine 4,9 mL renklendirme reaktifi ilave edilerek vorteks kullanılarak iyice karıştırılması sağlandı. Bu karışımlara 10 dakika süresince inkübasyon yapıldı. Sonrasında absorbans değerleri ölçümü için spektrofotometre uygun dalga boyuna getirildi. Spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda 3 mL'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri ölçüldü. 100 µL tampon ve 4,9 mL renklendirme reaktifi kör olarak kullanıldı. Elde edilen absorbans değerleri dikkate alınarak bunların karşılığındaki mg protein değerleri ile birlikte standart grafik hazırlandı. Numuneler üzerinede yapılan çalışmalarda ise 100 kat seyreltilmiş homojenat, amonyum sülfat çöktürmesi ve saflaştırılmış olduğumuz enzim çözeltileri kullanılarak tüpler hazırlanmış oldu. Bu tüplerin vorteks ile karıştırılıp 10 dakika süresince inkübasyon işlemine tabi tutulması sağlandı. Spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü. Bu işlem 3 kez tekrarlanarak ölçümlerin aritmetik ortalaması alındı. Ele geçen değerler ile standart grafik hazırlanarak protein miktarları ölçüldü.

3.2.2. GST Enzimi İçin Aktivite Tayini

Glutasyon S-transferaz (GST) enzimi, glutasyonun bir aromatik elektrofil ile konjugat oluşturma tepkimesini katalizler. CDNB sıklıkla aromatik elektrofil olarak kullanılır. Meydana gelen dinitrobenzen S-glutasyon (DNBSG) konjugatı 340 nm dalga boyunda maksimum bir değere sahiptir. Aktivite ölçümü işlemi bu dalga boyundaki değişim ölçülerek gerçekleştirilir. Yukarıda mekanizmasını verdiğimiz bu yöntemle aktivite ölçümü yapıldı.



Şekil 3.1. GST enzimine dair aktivitenin Spektrofotometrik yöntemle belirlenmesinde kullanılan ürünün oluşum mekanizması (Habdous et al., 2002).

CDNB, GSH ortamda bulunmadığında çok yüksek bir hızla GST'nin aktivitesini düşüreceğinden, tepkimenin CDNB ile başlatılması zaruridir. Aktivitenin ölçülmesi amacıyla hacmin tamamı 1mL'ye tamamlanacak şekilde Tablo 3.1'de verilen çözeltiler oluşturuldu. Sonrasında küvetlerin spektrofotometreye yerleştirilip okunmasıyla değerler elde edildi. Spektrofotometre ile üç dakika süresince aktivite ölçümleri yapıldı. Başlangıç ve sonuç değerleri kaydedildi. (Habig et al., 1974).

Tablo 3.1. Aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler ve miktarları

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

Enzim ünitesi aşağıdaki formül ile hesaplandı.

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

EÜ: 1 mL'deki enzim ünitesi

ΔOD : Bir dakika içerisinde oluşan absorbans değişimi miktarı

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

V_T : Ölçülen küvetlerin toplam hacimleri

V_E : Ölçülen küvet içerisine eklenen enzimin hacmi

SF: Seyreltilme işlemi yapılan örnekler için kullanılan seyreltme faktörü

3.2.3. GST Enziminin Saflaştırılması İçin Kolon Jelinin Hazırlanması

Enzimin saflaştırılmasında afinite kromatografisi yöntemini kullandık. Öncelikle katı partikülleri uzaklaştırıldı. Bunun için 10 mL hacmindeki bir kolon için 1 g nem içermeyen glutatyon- agarose, 200 mL saf suyla karıştırılarak iki üç defa yıkama gerçekleştirildi. Yıkama süreci sonrasında jel şişirilmiş oldu. Şişirilmiş olan jelin havasını almak üzere su trompu kullanıldı. Jeli süspanse etmek amacıyla belirli ölçüde dengeleme tamponu (0,05 M K-fosfat pH: 7,4, 1 mM EDTA ve 1 mM DTT) eklendi. Daha sonra hazırlanan jelin soğutmalı kolona paketlenmesi sağlandı. Paketlenmiş olan jelin yıkanması ve dengelenmesi peristaltik pompa kullanılarak gerçekleştirildi. Eluatın ve tampon çözeltinin absorbans ve pH değerlerinin yaklaşık olarak eşit hale getirilmesiyle kolon dengeye getirilerek hazırlandı. (Güvercin et al., 2008).

3.2.4. GST Enziminin Tavuk Yüreğinden Saflaştırılması

3.2.4.1. Tavuk Yüreğinin Tedarik Edilmesi ve Homojenatın Hazırlanması

Deneylerde kullanılan yürek Bingöl et ve süt kurumundan soğuk zincir kurallarına göre temin edildi ve -20°C’de derin dondurucuda muhafaza edildi. Homojenat çözeltisi hazırlamak için donmuş yürek küçük parçalara ayrıldı. Daha sonra 5 gr tavuk yüreği alındı. Alınan yürek miktarının üzerine 3 katı miktarında homojenat tamponu eklenerek buz kalıbı içerisinde homojenizatör kullanılarak homojen hale getirildi. Sonrasında elde edilen homojenat endpörf tüpleri içerisine konularak 13.000 x g de bir saat süresince santrifüjleme işlemi gerçekleştirildi. Bu işlemten sonra çökelek kısmı ayrılarak homojenatın elde edilmesi sağlandı. Yukarıda anlatılan işlemler +4 °C sıcaklıkta yapıldı.

3.2.4.2. Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Diyaliz İşlemleri

Elde edilen homojenat için %0-20, %20-30, %30-40, %40-50, %50-60, %60-70, %70-80, %80-90 ve %90-100 değerleri arasında katı amonyum sülfat çöktürmesi yapılarak tavuk GST’nin çöktürme aralığı belirlendi. Çöktürme işlemi yapılırken; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = 1,77 \cdot V \cdot (S_2 - S_1) / (3,54 - S_2)$ denklemi kullanıldı (V: Hacim, S1: İlk yüzde, S2: Son yüzde). Çöktürme işlemi yapılırken katı $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ kontrollü bir şekilde homojenata ilave ederek

manyetik karıştırıcı ile tamamen çözüldü. Her basamakta tuzlu homojenat 13500xg'de 15 dakika süreyle santrifüj edildi. Bu şekilde safsızlıklara neden olan proteinlerin çökmesi gerçekleştirildi. Bu işlemler esnasında her aşamada çökeleğin ve süpernatantın aktiviteleri ölçüldü. Böylece Aktiviteye sahip olan tüpler tespit edildi. Çöktürme işlemi sonucunda oluşan karışım diyaliz torbası içerisinde yaklaşık olarak iki saat boyunca diyaliz tamponuna (10 mM K-fosfat, 1 mM EDTA pH=7,5) karşı diyaliz işlemi gerçekleştirildi. Bu işlemler yine +4 °C'de yapıldı.

3.2.4.3. Afinite Kromatografisi ile Enzimin Saflaştırılması

Çöktürme işlemi ve diyalizden sonra elde edilen enzim numunesi peristaltik pompa ile akış hızı 20 mL/saat yapılan ve 10 mM KH₂PO₄ ve 0,1M KCl, pH: 8,0 tamponu ile dengelenmiş olan glutatyon agaroz afinite kolonuna uygulandı. Sonra kolon yıkama işlemine tabi tutldu. Bu işlem 10 mM KH₂PO₄ ve 0,1M KCl, pH: 8,0 tampon çözeltisiyle gerçekleştirildi. Spektrofotometrik ölçüm esnasında fraksiyonlarda ölçülen absorbans değerlerinin köre yaklaşık olarak eşitlenmesi sonrasında yıkama işlemi tamamlandı. Enzimin saf olarak elde edilmesi için gradientli elüsyon yapıldı. Hazırlanan Elüsyona ait çözelti, 50 mM Tris-HCl ve (1,25-10 mM, pH: 9,5) GSH içeren çözeltiden meydana getirildi. Sonrasında elde edilen elüatların eppendorf tüplerine konularak 340 nm dalga boyuna ayarlanan spektrofotometrede aktiviteleri ölçüldü (Toribio et al., 1996).

3.2.5. Enzim Saflığının Kontrolü

Laemmli'nin önerdiği metodla enzimin saflık derecesinin kontrolü gerçekleştirildi. Bunun için %3-15 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) gerçekleştirildi. İşleme başlamadan önce alkol ve su kullanılarak elektroforez plakalarının temizlenmesi gerçekleştirildi. Sabitleme işleminden sonra plakalar jel hazırlama kabineye yerleştirildi. Sonrasında ayırma jeli hazırlanarak dikkatli bir şekilde plakalara üst taraftan 5 cm'lik mesafe olacak şekilde yavaş yavaş doldurma işlemi yapıldı. Sonrada ayırma jelinin katılaştığı gözlemlendi. Yığma jeli Tablo 3.2'de ifade edildiği gibi hazırlandı. Yığma jel plakaların üst kısmında bulunan boşluğa doldurulup dikkatli bir şekilde tarak yerleştirildi. Bu şekilde kuyular oluşturulmaya çalışıldı. Jelin katılma süreci tamamlandıktan sonra tarak çekilip alınarak numune kuyucukları elde edildi. Kuyulara

konulacak Enzim numuneleri 100 μ L enzim, 100 μ L numune tamponu ve 50 μ L gliserin alınarak hazırlandı. Bu numuneler 5 dakika süresince kaynamakta olan su banyosunda tutuldu. Sonrasında bu kuyucuklara konulacak standart proteinlerin ve enzim numunelerinin hangi kuyuya yerleştirileceği tespit edilerek yükleme işlemi yapıldı. Hazırlanan jel plakaları elektroforez tankına konularak tankın içerisine belirli bir hacimde yürütme tamponu eklendi. Bu şekilde elektroforez işlemine geçildi. Bunun için 80 voltluk akım altında 25 dakika süresince yürütölme sağlandı. Bu şekilde kuyucuklara uygulanan standart ve enzim numunelerinin ayırma jeline ulaşmaları gerçekleştirildi. Sonrasında akım 120 volt'ta çıkarılarak elektroforez işlemine devam edildi. Bu işlem enzim numunelerinin jelin alt kısmına gelinceye kadar devam edildi. Numune tamponuna eklenen brom timol mavisi ile numune takibi yapıldı. Numunelerin hareketleri sabitleşince işlem bitirilerek akım kesildi. Oldukça dikkatli bir şekilde plakalar arasındaki jeller çıkartılıp sabitleştirme çözeltisi içerisine konuldu. Sabitleştirme işlemi 30 dakika süresince devam etti. Böylece jelde bulunan proteinlerin sabitleştirilmesi gerçekleştirildi. Bu işlemden sonra jel boyama çözeltisine konularak çalkalama cihazı ile 120 dakika süresince boyama yapılmış oldu. Boyama işleminden sonra yıkama işlemi gerçekleştirildi. Jel yıkama çözeltisi içerisinde çalkalayıcı cihazda belli bir süre tutuldu. Sonuçta protein bantlarının tamamen belirgin hale gelmesi sağlandı. Yıkama çözeltisinden çıkartılan jelin fotoğrafı çekilerek deney bitirilmiş oldu.

Tablo 3.2. Elektroforez işleminde kullanılan çözelti ve miktarları

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

3.2.6. SDS-PAGE ile GST Enziminin Molekül Kütlesinin Tayini

Laemmli (1970), metodu uygulanarak izole edilen GST enziminin molekül ağırlığı belirlendi. Standart protein olarak, 10,5, 14, 22, 29, 42, 51, 62,70, 95, 130 ve 175 kDa ağırlığındaki standart proteinler kullanıldı. Önceden elde etmiş olduğumuz jel fotoğrafı yardımıyla standart proteinlere ait olan R_f değerlerinin elde edilmesiyle R_f -log M_A standart grafiği hazırlandı. Yine elde edilen jel fotoğrafı kullanılarak tavuk yüreğinden saflaştırdığımız GST enzimine ait alt birimlerin R_f değeri bulundu. Bulunan bu değerler kullanılarak standart grafik üzerinden log M_A değeri bulundu. Bu değer antilogaritması hesaplanarak saflaştırmış olduğumuz enzimin molekül ağırlığı bulundu. Proteinlere ait olan R_f değerleri; $R_f = X_e / X_{boya}$ formülü sayesinde tespit edildi. X_e = Proteinin yürüme mesafesi, X_{boya} = Boyanın yürüme mesafesi.

$R_f = X_e / X_{boya}$ formülünden hareketle hesaplandı.

X_e = Proteinine ait olan yürüme mesafesi,

X_{boya} = Boyaya ait olan yürüme mesafesi

3.3. Karakterizasyon Çalışmaları

3.3.1. Optimum pH'nın Belirlenmesine Yönelik Çalışmalar

Tavuk yüreğinden izole edilen GST'nin optimum pH'sını tespit etmek üzere pH'sı 7,0, 7,5, 8,0, 8,5 ve 9,0 olan potasyum fosfat ve pH'sı 7,5, 8,0, 8,5 ve 9,0 değerlerinde Tris-HCl, tampon çözeltileri oluşturuldu. Bu tampon çözeltiler kullanılarak enzime dair aktivite değerleri ölçüldü.

3.3.2. Stabil pH'nın Belirlenmesine Yönelik Çalışmalar

Tavuk yüreğinden saflaştırılarak elde edilen GST enziminin stabil pH'sını elde etmek amacıyla pH'ları 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 ve 8,0 olan potasyum fosfat ve 7,5, 8,0, 8,5 ve 9,0 olan Tris-HCl tampon çözeltileri oluşturuldu. Daha sonra ependorf tüpler içerisine 750 μ L hazırlanmış olan tampon çözeltisi ve 250 μ L enzim ilave edilerek aktivite ölçümleri

yapıldı. Her gün aynı saatlerde olmak üzere ölçümler 3 gün boyunca 12 saat aralıklarla gerçekleştirildi. Bu ölçümler neticesinde enzime ait olan stabil pH belirlendi.

3.3.3. Optimum İyonik Şiddetin Belirlenmesine Yönelik Çalışmalar

İzole edilen GST'nin optimum aktivitede hareket edeceği iyonik şiddetin belirlenebilmesi amacıyla 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 mM Tris-HCl ve K-fosfat tampon çözeltileri oluşturuldu. Hazırlanan bu tampon çözeltilerin pH'ları, optimal pH değeri dikkate alınarak aktivite değerleri ölçüldü.

3.3.4. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesine Yönelik Çalışmalar

Saflaştırılan GST enzimine ait optimum sıcaklık ölçümünü yapmak üzere ısıtma ve soğutma özelliği olan su banyosunda işlemler yapıldı. Optimum pH ve optimum iyonik şiddeti belirlenmiş olan çözeltiler hazırlandıktan sonra su banyosu istenilen sıcaklığa getirildi. Aktivitesi ölçülecek olan tampon ve substratlar küvet içerisine konularak su banyosunda yaklaşık 5 dakika bekletildi. Bu küvet üzerine enzim eklenerek aktivite ölçümü yapıldı. 0 °C ile 80 °C dahil olmak üzere ve her 10 °C aralığında aktivite ölçümleri gerçekleştirildi.

3.3.6. Enzimin Substratları Olan GSH ve CDNB için K_M ve V_{max} Değerlerinin Elde Edilmesine Yönelik Çalışmalar

Saflaştırılmış olan GST enziminin substratları olan GSH ve CDNB için K_M ve V_{max} değerlerinin tespit edilmesi amacıyla her birinin konsantrasyonu sabit tutularak optimal şartlarda aktivite ölçümleri gerçekleştirildi. Öncelikli olarak GSH konsantrasyonu sabit tutularak CDNB'nin 5 farklı konsantrasyonu ile aktiviteler ölçüldü. Ölçülen değerler kullanılarak Lineweaver-Burk grafiği oluşturuldu. CDNB'ye ait olan K_M ve V_{max} değerleri bu grafik vasıtasıyla belirlendi. Aynı işlemler CDNB derişimi sabit alınarak tekrarlandı. 5 farklı ölçümden sonra yine Lineweaver-Burk grafiği elde edilerek GSH'a ait olan K_M ve V_{max} değerleri bulundu. Aktivite ölçümleri optimal şartlarda gerçekleştirildi (Lineweaver and Burk 1934).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

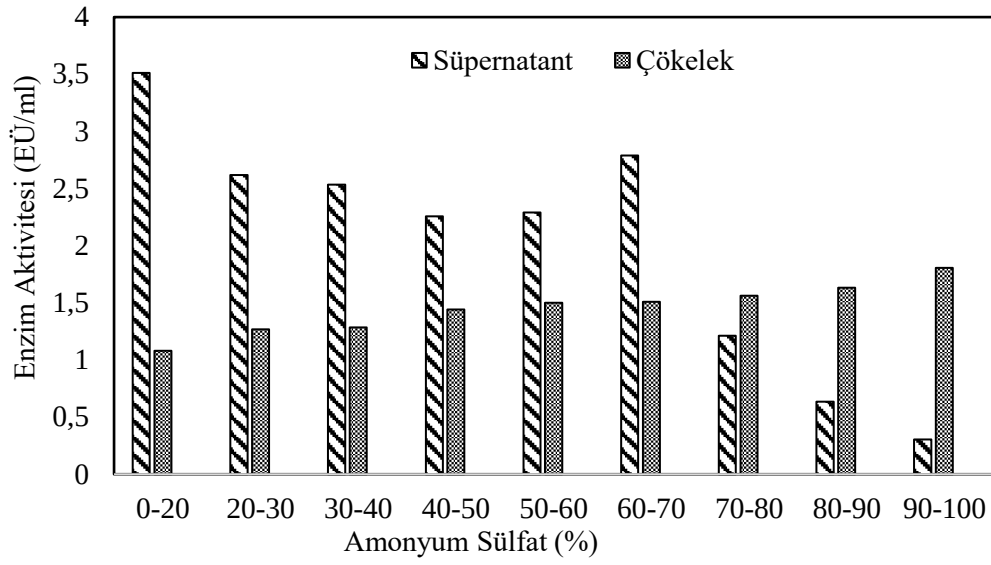
4.1. Bulgular

4.1.1. Amonyum Sülfat Çöktürme İşlemi Sonuçları

İzole edilen GST'nin çöktürmesine dair işlem bölüm 3.2.4.2'de ifade edildiği üzere gerçekleştirildi. Bu enzimin çöktürülmesine ait olan aralık Tablo 4.1 ve şekil 4.1'deki değerler kapsamında %20-80 aralığında yaklaşık olarak tespit edilmiş oldu.

Tablo 4.1. Amonyum sülfat çöktürmesi işleminin sonuçları

Amonyum Sülfat (%)	Süpernatant (EÜ/mL)	Çökelek (EÜ/mL)
0-20	3,513	1,081
20-30	2,618	1,267
30-40	2,534	1,284
40-50	2,256	1,441
50-60	2,291	1,501
60-70	2,788	1,51
70-80	1,211	1,562
80-90	0,635	1,631
90-100	0,305	1,805



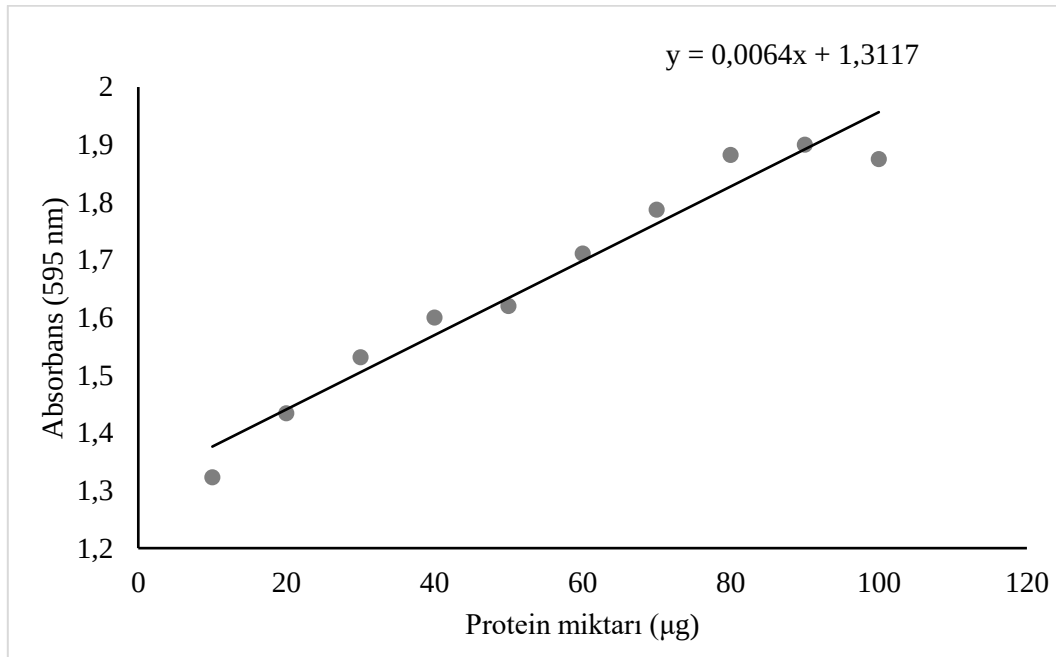
Şekil 4.1. Amonyum sülfat çöktürmesi grafiği

4.1.2. Kantitatif Protein Tayininde Kullanılan Standart Grafik

Bradford yöntemi kullanılarak homojenattan ve afinite kromatografisi sonucu edilen numuneler üzerinden kantitatif protein tayini gerçekleştirildi. Standart grafik çizimi ise bölüm 3.2.1.2.'de ifade edildiği gibi oluşturuldu. Sığır serum albümin çözeltileri standart grafik oluşturmak üzere hazırlandı. Bu çözeltilerdeki μg proteine karşılık elde edilen spektrofotometrik ölçümler Şekil 4.2'de gösterildi.

Tablo 4.2. Kantitatif protein tayininde kullanılan BSA çözelti miktarları ve absorbansları

BSA (µg)	Absorbans (nm)
10	1,323
20	1,434
30	1,531
40	1,600
50	1,620
60	1,711
70	1,787
80	1,882
90	1,900
100	1,875



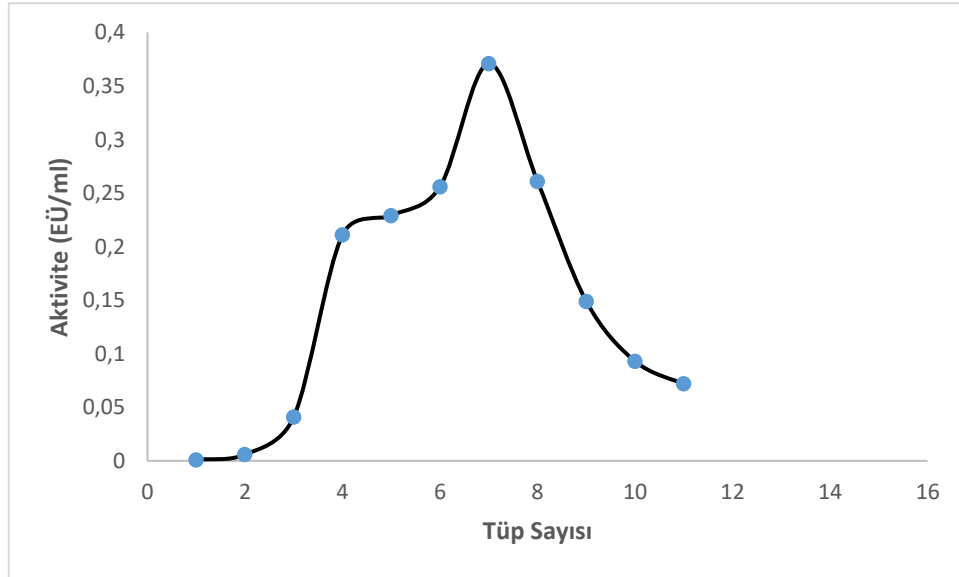
Şekil 4.2. Kantitatif protein tayini için kullanılan standart grafik

4.1.3. Afinite Kromatografisi Aktivite Sonuçları

Hazırlanmış olan homojenatın amonyum sülfat ile muamele edilmesiyle çöktürme işlemi gerçekleştirildi. Daha sonrasında kolona yükleme işlemi yapıldı. Bölüm 3.2.4.3'te ifade edildiği üzere gradientli elüsyon ile elde edilen elüatlar kullanılarak enzimlerin aktiviteleri ölçüldü. Ölçümlere ait değerler Şekil 4.3'de gösterildi.

Tablo 4.3. Elüatlardaki aktivite değerleri

Tüp Sayısı	Aktivite (EÜ/mL)
1	0,001
2	0,006
3	0,041
4	0,211
5	0,229
6	0,256
7	0,371
8	0,261
9	0,149
10	0,093
11	0,072



Şekil 4.3. GST enziminin afinite kolonundan saflaştırılması grafiği

4.1.4. Saflaştırma Sonuçları

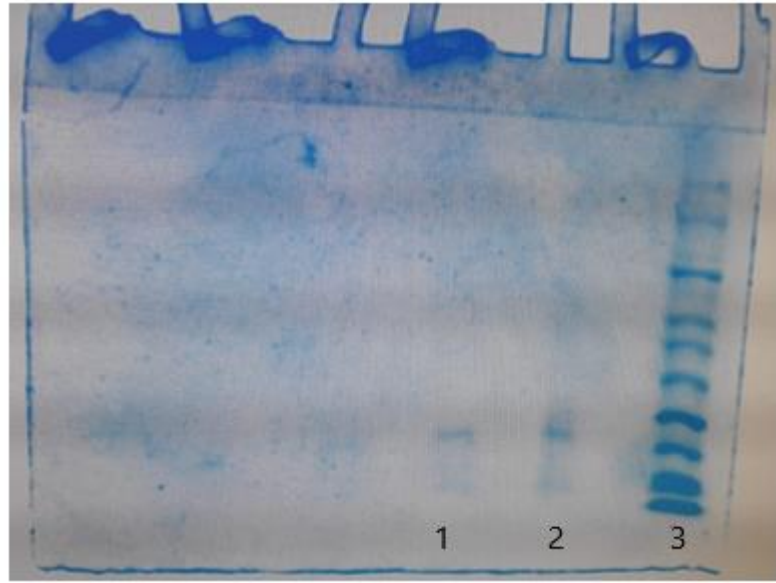
Yapılan ölçümlerden sonra saflaştırma tablosu oluşturuldu. Bu tablo oluşturulurken tavuk yüreği homojenatı ve afinite kromatografisi sonunuda elde edilen saf enzim için aktivite, protein, toplam protein, toplam aktivite, spesifik aktivite, yüzde verim, saflaştırma katsayısı gibi pek çok değer hesaplanarak bu sonuçlar Tablo 4.4'te gösterildi.

Tablo 4.4. Saflaştırma sonuçları

Numune Türü	Toplam Hacim (mL)	Aktivite (EÜ/mL)	Protein (mg/mL)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (EÜ)	Spesifik Aktivite (EÜ/mg)	% Verim	Saflaştırma Katsayısı
Homojenat	11	1,010	2,34	25,74	11,11	0,431	100	1
Amonyum sülfat	6	1,456	3,25	19,50	8,73	0,448	78,57	1,039
Afinite Kromatografisi	12	0,371	0,041	0,492	4,452	9,048	40	20,99

4.1.5. SDS-PAGE Yöntemi ile Enzim Saflığının Kontrolü

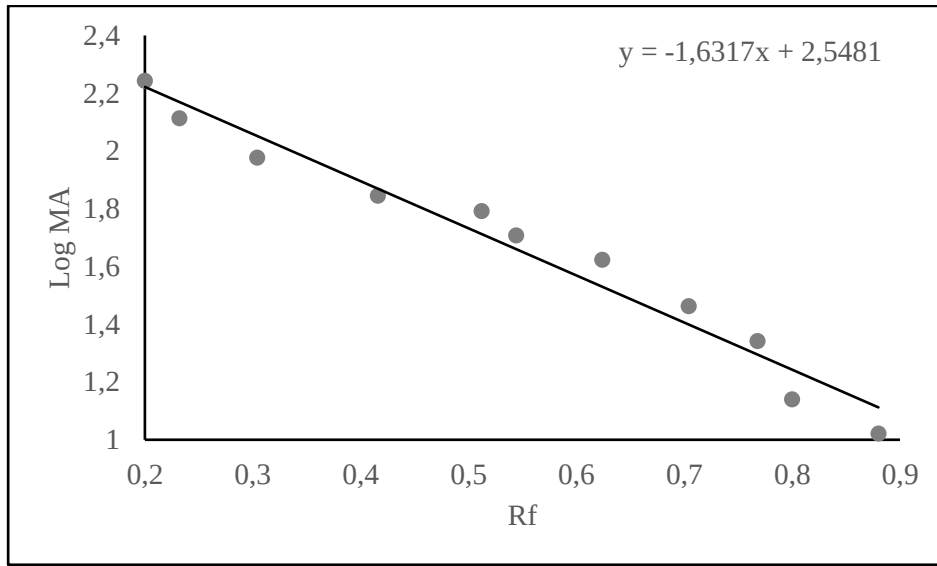
Çöktürme ve afinite kromatografisi basamaklarından sonra ele geçen GST'nin saflığını tespit etmek için bölüm 3.2.5'te ifade edildiği gibi SDS-PAGE yöntemi kullanıldı. Elektroforez işleminde standart proteinler ve GST'ye ait olan enzim numuneleri dikkatli bir şekilde ve belirli bir sırayla kuyulara tatbik edildi ve yürütme gerçekleştirildi. Sonuçta saflaştırılan enzim ve standart proteinleri gösteren bantlar elde edildi. Elde edilen jelin bantları gösteren fotoğrafı elde edilerek Şekil 4.4'de verildi.



Şekil 4.4. Saf GST enziminin SDS- PAGE fotoğrafı (Kuyu 1 ve 2: Saf enzim, Kuyu 3: Standartlar (Protein Marker PS11): 10,5, 14, 22, 29, 42,51, 62,70, 95, 130 ve 175 kDa)

4.1.6. Enzimin Alt Birimlerinin Mol Kütlelerinin Belirlenmesine Dair Sonuçlar

Tavuk yüreğinden izole edilen GST enzimine ait olan alt birimlerinin mol kütlelerini tespit etmek için bölüm 3.3.5'te açıklandığı gibi saflaştırılmış olan enzim kesikli SDS-PAGE'de yürütülerek bantlar oluşturuldu. Oluşan bantlara ait fotoğraf Şekil 4.4'de gibi elde edildi. Bu fotoğraf kullanılarak standart proteinlere ve enzime ait R_f değeri ölçüldü. Bu ölçümler sonucunda çizilen log MK- R_f standart grafiği Şekil 4.5.'teki gibi oluşturuldu. Elde edilen grafik kullanılarak tavuk yüreğinden saflaştırılan glutatyon S-transferaz enzimine ait olan alt birimlerinin mol kütlesi ise 20,94 kDa olarak bulunmuş oldu.



Şekil 4.5. Enzimin alt birimlerinin mol kütlesinin hesaplanması için çizilen $\text{Log}M_K\text{-}R_f$ grafiği

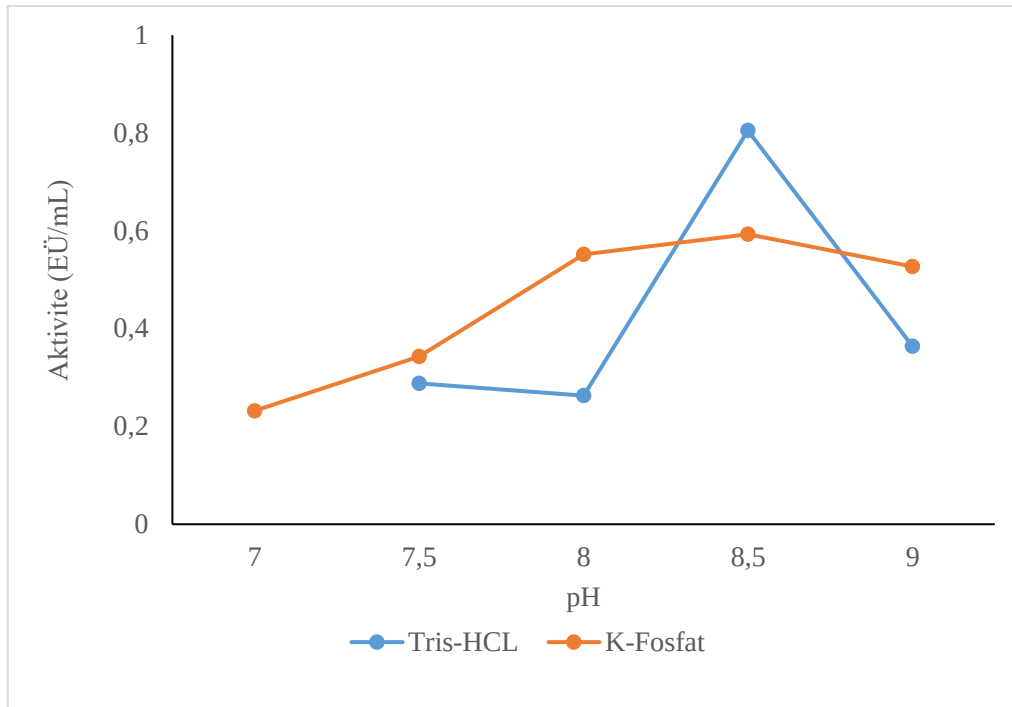
4.2. Karakterizasyon Çalışmalarına Dair Sonuçlar

4.2.1. Optimum pH'nın Ölçülmesine Dair Çalışma Sonuçları

Tavuk yüreğinden saflaştırılan GST enzimine ait olan optimum pH değerini belirlemek için 3.3.1'de anlatıldığı gibi pH değeri 7,0, 7,5, 8,0, 8,5 ve 9,0 olan potasyum fosfat ve pH değeri 7,5, 8,0, 8,5 ve 9,0 olan Tris-HCl tamponlardan müteşekkil çözeltiler kullanıldı. GST enzimine ait her bir tamponun aktivite değerleri spektrofotometre ile ölçüldü. GST enzimine ait optimum pH değeri ise Tablo 4.5 ve Şekil 4.6'da gösterilmiş olduğu üzere Tris-HCl tamponu için $\text{pH} = 8,5$ olarak bulundu.

Tablo 4.5. Optimum pH tespiti için elde edilen aktivite sonuçları

pH	Tris-HCl	pH	K-Fosfat
7	-	7	0,232
7,5	0,288	7,5	0,343
8	0,263	8	0,552
8,5	0,805	8,5	0,593
9	0,364	9	0,527



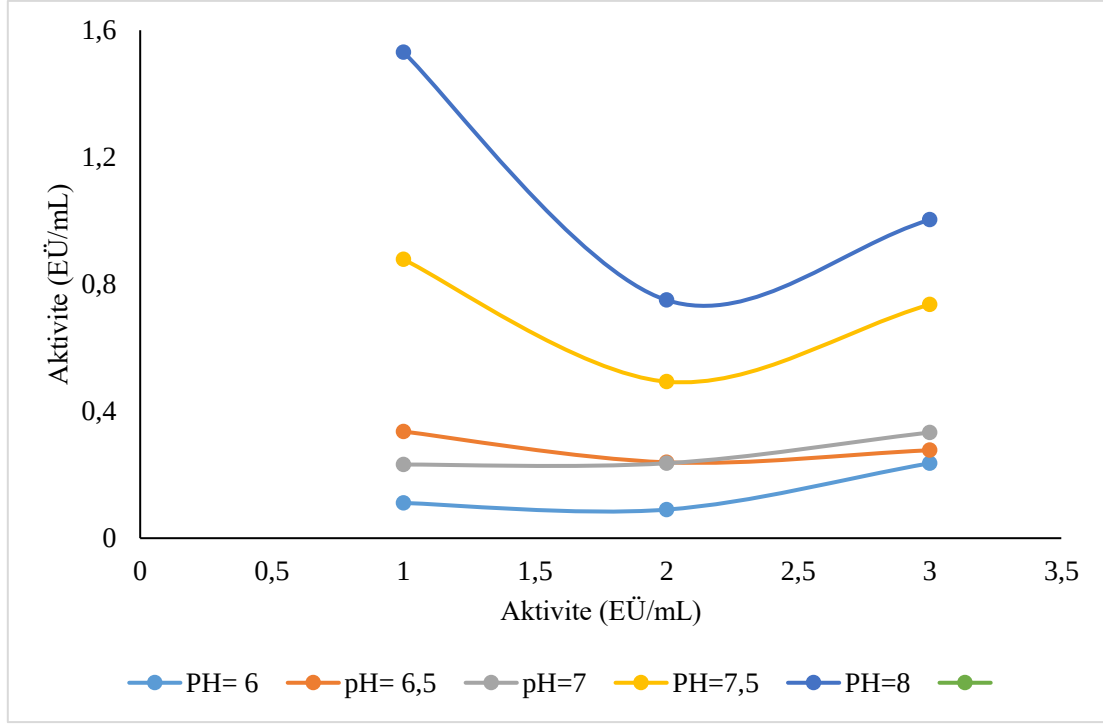
Şekil 4.6. Optimum pH'nın hesaplanmasında kullanılan aktivite-pH grafiği

4.2.2. Stabil pH'nın Ölçülmesine Dair Çalışma Sonuçları

Tavuk yüreğinden saflaştırılan GST enzimine ait olan stabil pH'nın belirlenebilmesi için uygun iyonik şiddette ve birbirinden farklı pH değerlerinde tampon çözeltiler hazırlandı. Bu çözeltilerin hazırlanmaları bölüm 3.3.2'de ifade edildi. Bu tamponlardaki enzimlere ait aktiviteler her gün aynı saatte olmak üzere 3 gün boyunca 24 saatte bir spektrofotometre ile ölçüldü. Ölçümler neticesinde GST enzimine ait stabil pH değeri Tris-HCl için pH: 8,5 olarak saptandı. Bu çalışmaya ait olan değerler Tablo 4.6 ve Şekil 4.7'da gösterildiği gibidir.

Tablo 4.6. Stabil pH tespiti için K-fosfat ile elde edilen aktivite sonuçları

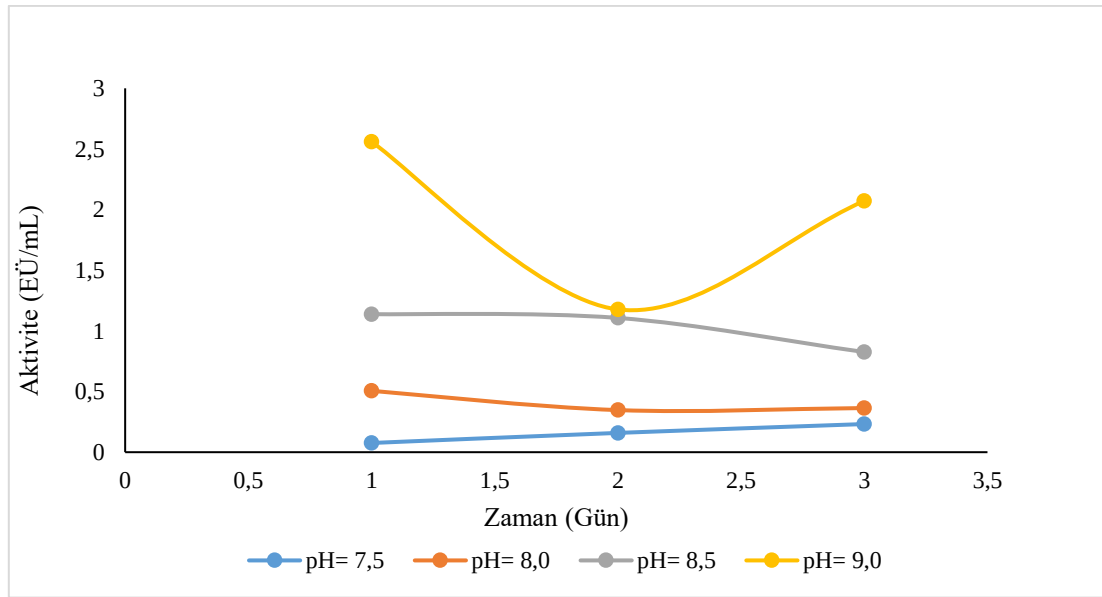
Zaman (Gün)	PH= 5,5	PH= 6	PH= 6,5	PH= 7	PH= 7,5	PH= 8
1	0,041	0,111	0,336	0,232	0,878	1,531
2	0,065	0,09	0,239	0,236	0,493	0,75
3	0,076	0,236	0,277	0,333	0,736	1,003



Şekil 4.7. Fosfat tamponu içinde Stabil pH'nın belirlenmesinde kullanılan grafik

Tablo 4.7. Stabil pH tespiti için Tris-HCl ile elde edilen aktivite sonuçları

Zaman (Gün)	pH= 7,5	pH= 8,0	pH= 8,5	pH= 9,0
1	0,076	0,506	1,138	2,559
2	0,159	0,347	1,107	1,177
3	0,232	0,364	0,826	2,072



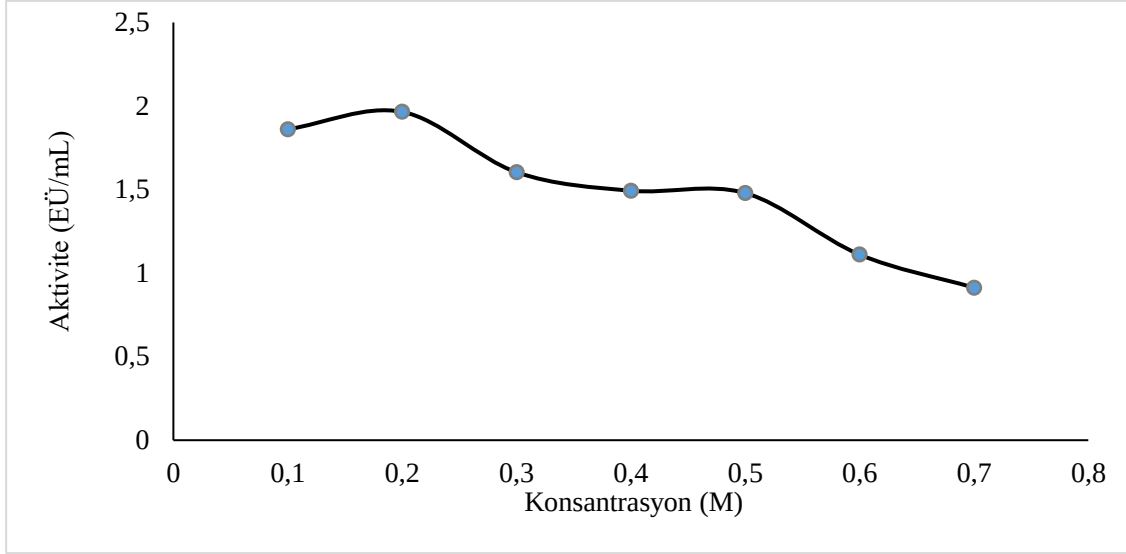
Şekil 4.8. Tris-HCl tamponu içinde Stabil pH'nın belirlenmesinde kullanılan grafik

4.2.3. Optimum İyonik Şiddetin Ölçülmesine Dair Sonuçlar

Tavuk yüreğinden izole edilen GST enziminin aktivite ölçümü yapılırken uygun olan iyonik şiddetin belirlenebilmesi amacıyla daha önceden yapılan çalışmalar sonucunda bulunan optimum pH'da K-fosfat ve Tris-HCl tamponlarının farklı konsantrasyonlardaki çözeltiler Bölüm 3.3.3'te ifade edildiği gibi oluşturuldu. Konsantrasyonları farklı olan KH_2PO_4 ve Tris/HCl tampon çözeltilerindeki enzim aktiviteleri spektrofotometreyle ölçüldü. Tavuk yüreğinden izole edilen GST enzimine ait iyonik şiddet değeri Tablo 4.8 ve Şekil 4.9'de olduğu gibi Tris-HCl tampon çözeltisinde 0,2 M olarak belirlendi.

Tablo 4.8. Optimum iyonik şiddetin için elde edilen aktivite ölçüm sonuçları

İyonik Şiddet (M)	Aktivite (EÜ/mL)
0,1	1,861
0,2	1,965
0,3	1,604
0,4	1,493
0,5	1,479
0,6	1,111
0,7	0,913



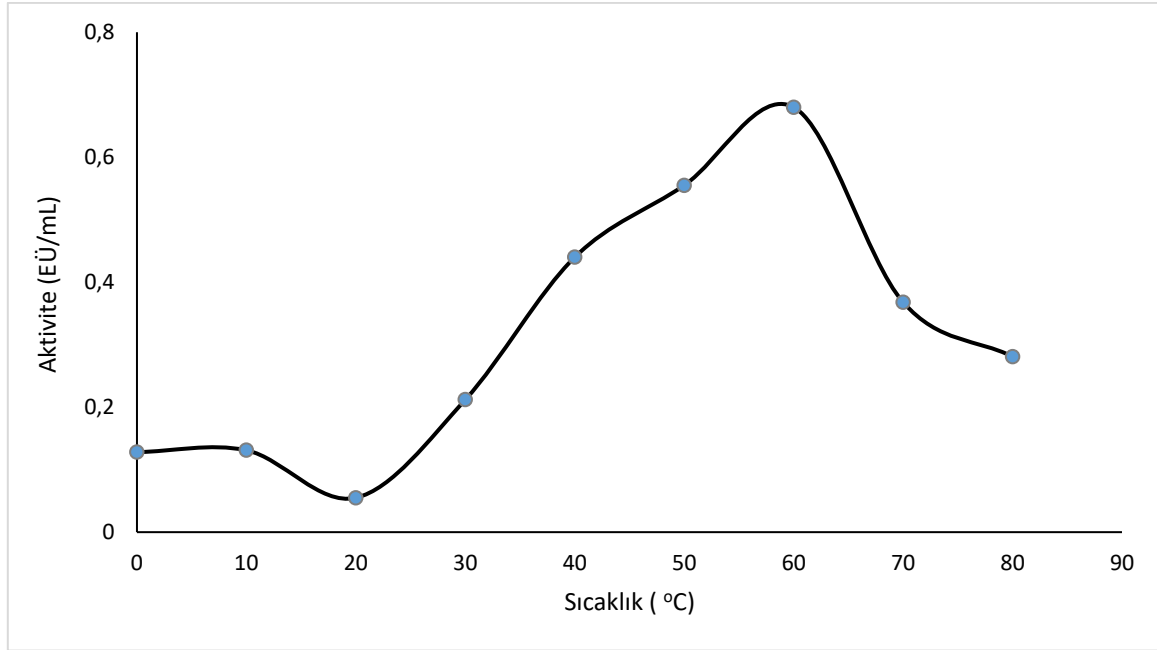
Şekil 4.9. İyonik şiddetin belirlenmesinde kullanılan aktivite-konsantrasyon grafiği

4.2.4. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesine Dair Sonuçlar

İzole edilen GST'nin optimum sıcaklığını tespit etmek için optimum pH'da ve optimum iyonik şiddette tamponlar hazırlandı. Bölüm 3.3.4'de anlatıldığı üzere 0 °C ile 80 °C değerleri arasında 10 °C'lık artışlar yapılarak aktiviteler ölçüldü. GST enzimine ait olan optimum sıcaklık değeri Tablo 4.9 ve Şekil 4.10'de ortaya konulduğu gibi 55°C olarak saptandı.

Tablo 4.9. Optimum sıcaklığın belirlenmesi için elde edilen aktivite ölçüm sonuçları

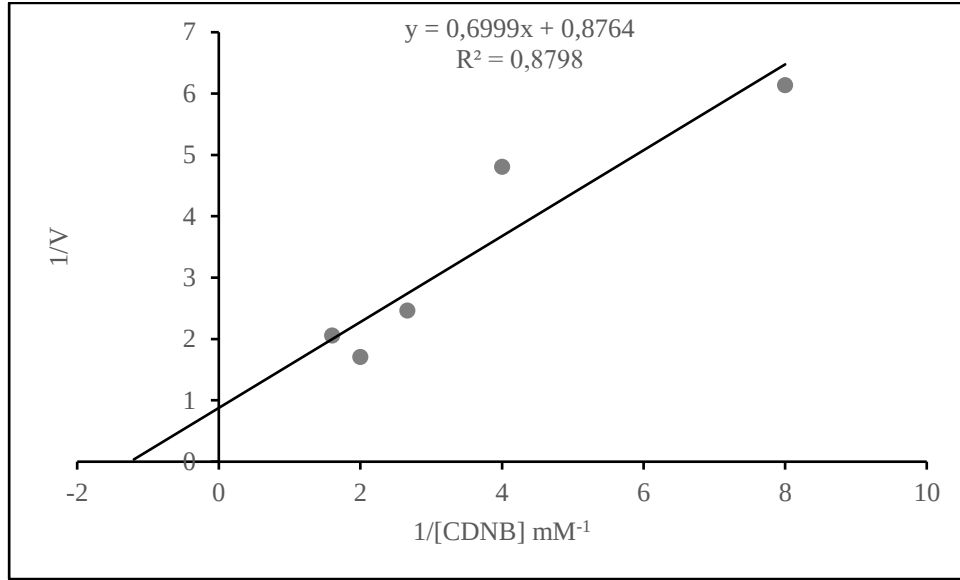
Sıcaklık (°C)	Aktivite (EÜ/mL)
0	0,128
10	0,131
20	0,055
30	0,212
40	0,44
50	0,555
60	0,68
70	0,368
80	0,281



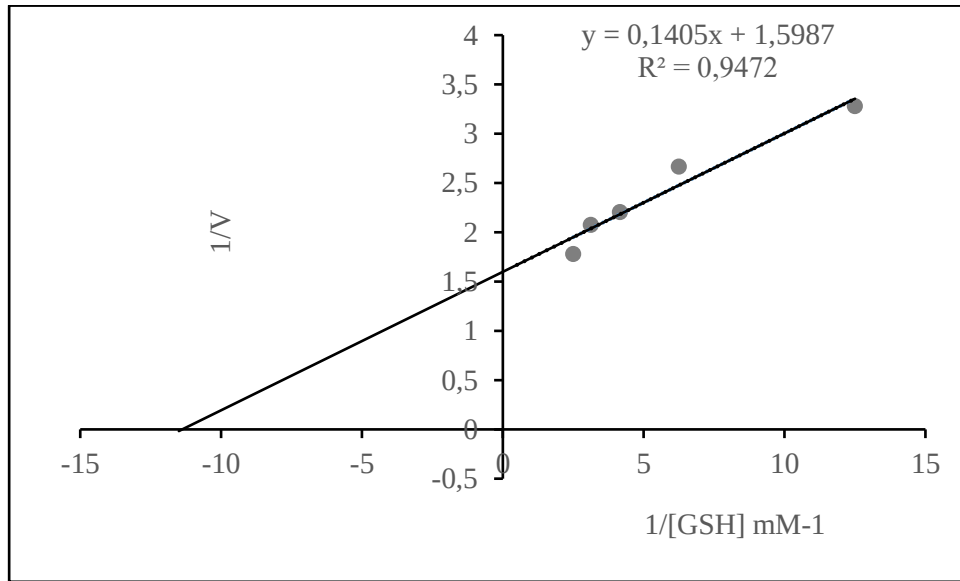
Şekil 4.10. Optimum sıcaklığın belirlenmesinde kullanılan aktivite-sıcaklık grafiği

4.2.5. Enzimin Substratları İçin K_M ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesine Dair Sonuçlar

Saflaştırılmış olan GST enzimine ait olan GSH ve CDNB substratları için K_M ve V_{max} değerlerinin sayısal olarak bulunması işlemi bölüm 3.3.6'de ifade edildiği gibi gerçekleştirildi. Bu işlem için CDNB'nin konsantrasyonu 25 mM' da sabit tutularak buna karşılık 5 farklı GSH konsantrasyonu ile aktivite ölçümleri yapıldı. Bulunan değerler kullanılarak $1/[GSH]-1/V$ grafiği oluşturuldu. Elde edilen grafik yardımıyla K_M ve V_{max} değerleri elde edildi. CDNB'nin K_M ve V_{max} değerlerini bulmak amacıyla bölüm 3.3.6'da belirtildiği gibi GSH'ın 20 mM'lık sabit derişimine karşılık 5 farklı CDNB konsantrasyonu ile aktivite ölçüldü. Bu ölçümlerden hareketle $1/[CDNB]-1/V$ grafiği hazırlandı. Bu grafik kullanılarak K_M ve V_{max} değerleri belirlendi. Hesaplanan değerler Şekil 4.11, Şekil 4.12 ve Tablo 4.10 verildi (Lineweaver and Burk 1934).



Şekil 4.11. CDNB substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesine yönelik çizilen grafik



Şekil 4.12. GSH substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesine yönelik çizilen grafik

Tablo 4.10. GSH ve CDNB substratları için elde edilen K_M ve V_{max} değerleri

Substrat	K_M (mM)	V_{max} (EÜ/mL)
CDNB	0,798	1,141
GSH	0,087	0,625

4.3. Tartışma

Günümüz dünyasında yiyecek ve içecekten giydiğimiz eşyalara kadar pek çok ürün sentetik olarak üretildiği için yüksek oranda zararlı kimyasal maddeler bu üretim sürecinde kullanılmaktadır. Bu kimyasal maddelerin insan ve çevreye ciddi düzeyde zarar verdiği yapılan birçok bilimsel çalışmayla ortaya konulmuştur. Özellikle yüksek sıcaklıkta işlem görmüş olan karbonhidrat ve protein gibi organik maddelerin kansorejen bir etkiye bulundukları rapor edilmiştir (Senyuva and Gökmen, 2005). Teknolojinin gelişmesine paralel olarak bu süreç içerisinde insanı ve çevreyi tehdit eden pek çok toksik maddenin de miktarı kaçınılmaz olarak artmıştır. Örnek olarak ağır metaller, plastik maddeler, ilaç artıkları, böcek ilaçları ve bitkisel ilaçlar gibi maddeler verilebilir (Üçüncü 2010). Bu toksisiteyi meydana getiren kaynaklardan birisi de serbest radikallerdir. Endojen ve eksojen kaynaklardan meydana gelen serbest radikallerin oluşmasında eksojen kaynaklardan gelen ksenobiyotikler de bulunmaktadır (Aksoy 2002). Bu tezin ana konusu olan GST enziminin temel fonksiyonlarından birisi de vücuda giren bu toksik maddeleri detoksifikasyon reaksiyonları ile zararsız hale getirmesidir. (Rebbeck, 1997). Faz II tepkimesi sonucunda canlı organizmanın reaktif özellikteki elektrofilik saldırılardan korunması GST enzimi sayesinde gerçekleşir (Awasthi et al. 1980). Akciğer, karaciğer, böbrek ve incebağırsak gibi organlarda GST oranının yüksek olmasının nedeni ise vücuda giren ksenobiyotiklerdir (Gyamfi et al 2004). Bu zararlı maddeleri bir takım kimyasal tepkimeler sonucunda ortadan kaldırması nedeniyle GST enzimi doğal koruyucu bir antioksidan olarak kabul edilmiştir.

Literatüre baktığımızda GST enzimi ilk defa Meister ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarla 1897 yılında dolaylı olarak saptansa da GST'nin enzim olduğuna dair çalışma ilk olarak 1961'de ortaya konmuştur (Booth et al., 1961).

Tablo 4.1 ve Şekil 4.1'den görüldüğü gibi elde edilen amonyum sülfat çöktürmesi sonuçlarında enzim hemen hemen tüm aralıklarda hem çökelti ve hem de süpernatantta önemli miktarda aktiviteye sahip olduğundan çalışmamızda daha dar bir aralıkta çöktürme aralığı tespit edilemedi.

Kalitatif tayin proteinlerin yapısında bulunan Triptofan ve tirozin aminoasitlerinin 280 nm'de maksimum absorbans değerleri ölçülerek yapıldı (Segel 1968). Bu aminoasitler 280 nm'de maksimum absorbans değerlerine sahiptirler. GST enziminin kantitatif tayini ise Bradford yöntemine göre yapıldı. Bu yöntem araştırmalarda kullanılan diğer yöntemlere göre daha spesifik sonuçlar vermektedir. Yine bu yöntem kullanılan diğer yöntemlere göre tekrarlanabilir ve süreç içerisinde bozulmaya karşı daha dirençlidir (Bradford 1976).

Tablo 4.3 ve Şekil 4.3'teki elüsyon değerlerinden görüldüğü gibi ilk üç ve son iki elüatta kayda değer bir aktivitenin bulunmadığı ve aktivitenin 7. tüpte maksimuma ulaştığı ve daha sonra azaldığı görülmektedir. Bu aktivite değerleri dikkate alınarak kinetik çalışmalarda kullanılan enzim havuzu için 4., 5., 6., 7., 8. ve 9. tüpler kullanıldı.

Şekil 4.4'ten görüldüğü gibi 1. ve 2. kuyuya tatbik edilen saf enzim çözeltisi tek banda sahiptir ve dolayısı ile enzimin kullanılan kromatografik metot ile başarılı bir şekilde saflaştırılmış olduğu anlaşılmaktadır. 3. kuyuda ise yine tatbik edilen standart proteinlerin her birinin net bantlara sahip olması, hem SDS-PAGE ve hem de elektroforez deney şartlarının kontrolü açısından önemlidir.

Yaptığımız çalışmada GST enzimi tavuk yüreğinden glutatyon-agaroz afinite kromatografisi metodu kullanılarak 9,048 EÜ/mg protein spesifik aktiviteye sahip olan enzim %40 verimle 20,99 kat saflaştırılarak elde edildi (Tablo 4.4). Önceden yapılan çalışmalara baktığımızda ise farklı sonuçlar ile karşılaşmak mümkündür. Gadagbui vd (2000), yaptıkları çalışma ile GST enzimini glutatyon-agaroz affinite kolonu kullanarak 107 µmol/ mg spesifik aktivitede, yaklaşık olarak %87 verimle 100 kat saflaştırmışlardır. Çelik vd (2003), yaptıkları çalışma sonucunda, plasental GST-π enzimini, glutatyon-agaroz affinite kolonu kullanarak 2,628 µmol/mg spesifik aktivite ve yaklaşık %0,5 verimle 16 kat

olarak saf hale getirmişlerdir. Hee ve Joong (2005), çalışmaları sonucunda GST enzimini maruldan elde ederek bu enzimi DEAE- sephadex ve glutatyon-sepharose kolon kromatografisi metoduyla % 9,6 verimle, 403 kat saflaştırarak izole etmişlerdir.

Bu çalışmada tavuk yüreğinden izole edilen GST enziminin karakterizasyon çalışmaları sonucunda enziminin alt birim molekül kütlesi yaklaşık 20,94 kDa olarak belirlendi (Şekil 4.4 ve 4.5). Literatüre baktığımızda pek çok çalışmanın yapıldığını görüyoruz. Singh vd (1987), yaptıkları çalışmalarda enzimin alt birimlerine ait molekül kütlelerini 26,5 kDa-24,5 kDa arasında tespit etmişlerdir. Başka bir çalışmada ise Gadagbui vd (2000), kedi balığının bağırsak dokularından izole edilen GST enzimin molekül kütlesini takriben 26,7 kDa civarında belirlemişlerdir. Yine başka bir çalışmada ise Hee ve Joong (2005), enzime ait molekül kütlesini 23 kDa olarak tespit etmişlerdir.

Tavuk yüreği dokusundan saflaştırdığımız GST enzimi için yapılan karakterizasyon çalışmalarında; optimum pH, (Tris-HCl tamponunda) pH= 8,5 olarak belirlendi (Tablo 4.5 ve Şekil 4.6). Iizuka vd (1989), yaptıkları çalışmalarda ise optimum pH'sı 7 olarak tespit etmişlerdir. İnsan kan serumu üzerinde yapılan çalışmada ise izole edilen GST'nin optimum pH'sı 5,5 olarak belirlenmiştir (Türkanoglu 2007). Başka bir çalışmada ise Gökkuşluğu balığının kırmızı kan hücrelerinden izole edilen GST enziminin optimum pH'sı 7,3 olarak bulunmuştur. (Çomaklı, 2011). Literatüre baktığımızda farklı optimum pH değerlerinin bulunduğu görülmüştür.

Çalışmamızda Stabil pH, (Tris-HCl tamponunda) pH = 8,5 olarak belirlendi (Tablo 4.6 ve 4.7 ve Şekil 4.7 ve 4.8). Iizuka vd (1989), yaptıkları çalışmada stabil pH'yı 5 ile 11 arasında belirlemişlerdir.

Yaptığımız karakterizasyon çalışmasında optimum iyonik şiddet, (Tris-HCl tamponunda) 200 mM, olarak tespit edildi (Tablo 4.8 ve Şekil 4.9). Çomaklı (2011), yaptığı çalışmada Gökkuşluğu alabalık kırmızı kan hücrelerinden izole ettiği GST enziminin iyonik şiddetini potasyum fosfat tamponunda 10 mM olarak tespit etmiştir.

Çalışmamızda optimum sıcaklık değeri 60 °C olarak bulundu (Tablo 4.9 ve Şekil 4.10). Literatürdeki diğer çalışmalara bakıldığında farklı sonuçlar tespit edilmiştir. Iizuka vd (1989), yaptıkları çalışmada optimum sıcaklık değerini 50 °C olarak tespit etmişlerdir.

Türkanoglu (2007) yaptığı çalışmada ise insandan alınan kan serum örneklerinden izole edilen GST enzimine ait optimum sıcaklık değerini 65 °C olarak belirlemiştir.

Yaptığımız çalışmada tavuk yüreğinden izole edilen GST enzimine ait K_M ve V_{max} değerleri Lineweaver-Burk grafiklerinden faydalanılarak GSH substratı için K_M , 0,087 mM, V_{max} 0,625 EÜ/mL; CDNB substratı için K_M , 0,798 mM, V_{max} , 1,141 EÜ/ mL olarak hesaplandı (Şekik 4.11, 4.12 ve Tablo 4.10). Bu değerlerle ilgili literatüre girmiş olan farklı çalışmalar söz konusudur. Gadagbui vd (2000), kedi balığının bağırsak dokularından izole edilen GST enzimine ait yaptıkları kinetik çalışmalar neticesinde enzimin substratları olan GSH ve CDNB'nin K_M değerlerini sırasıyla 0,19 mM ve 0,43 mM olarak tespit etmişlerdir. Çelik vd (2003), yaptıkları çalışmalar sonucunda GSH için K_M değeri 2 mM ve V_{max} değerini 11,1 EÜ/mL olarak belirlemişlerdir. CDNB için K_M değerini 0,55 mM ve V_{max} değerini ise 35 EÜ/mL olarak tespit etmişlerdir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yaşam süreleri boyunca canlıların vücutlarında birikmiş olan ksenobiyotiklerin zararsız hale getirilmesi GST enzimi tarafından katalizlenen Faz II reaksiyonları sayesinde gerçekleşmektedir. Faz II reaksiyonlarıyla birlikte canlı organizması oldukça reaktif elektrofilik özellikteki zararlı maddelerin saldırılarından korunmuş olur (Awasthi et al. 1980).

Bir şekilde canlı organizmada ortaya çıkan zararlı maddeleri ortadan kaldırmak üzere GST enzimi detoksifikasyon tepkimelerini gerçekleştirir. Bu tepkimelerde enzim pek çok organik yapıdaki anyonla bağlanabilmektedir. Tepkimenin mekanizması şöyledir; GST enzimi glutatyon ile substratı birbirlerine yaklaştırmak üzere aktif bölgesine bağlar, böylece GSH üzerinde bulunan sülfidril grubunun aktif hale gelmesi sağlanır. Sonrasında ise GSH ile saldırgan elektrofilik substrat etkilişime girerek zararlı olan bileşikler zararsız hale dönüştürülmüş olurlar. GST enzimi bu özelliği sayesinde bir antioksidan olarak kabul edilmektedir.

Canlı yapısının savunma sisteminde çok önemli görevi bulunan GST enzimi halen pek çok canlı organizmasından saflaştırılmaktadır. İzole edilen bu GST enzimlerinin karakteristik özellikleri incelenmektedir.

Sonuç itibarıyla bizim yaptığımız çalışmada da GST enzimi tavuk yüreğinden amonyum sülfat çöktürmesi ve glutatyon-agaroz afinite kromatografisi yöntemi kullanılarak 9,048 EÜ/mg protein spesifik aktivite ile % 40 verimle 20,99 kat saflaştırıldı. SDS-PAGE yöntemiyle enzimin saflık kontrol yapılarak enziminin molekül kütlesi ise takriben 20,94 kDa olarak belirlendi. Sonrasında ise karakterizasyon ve kinetik çalışmaları gerçekleştirildi. Yapılan çalışmalarda; Optimum pH, (Tris-HCl tamponunda) pH= 8,5 olarak tespit edildi. Optimum iyonik şiddet, (Tris-HCl tamponunda) 200 mM olarak hesaplandı. Stabil pH, (Tris-HCl tamponunda) pH = 8,5 ve optimum sıcaklık 60 °C olarak bulundu. Saf enzime ait K_M ve V_{max} değerleri ise GSH substratı için K_M , 0,087 mM, V_{max} 0,625 EÜ/mL; CDNB substratı için K_M , 0,798 mM, V_{max} , 1,141 EÜ/ mL olarak hesaplandı.

Tavuk yürek dokusundan hareketle saflaştırılan ve karakterizasyon çalışması yapılarak deneysel verileri ortaya konulan bu çalışmanın bundan sonraki çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Aksoy, Y. (2002). Antioksidan mekanizmada glutatyonun rolü. *T Klin Tıp Bilimleri*, 22, 442-448.
- Allocati, N., Federici, L., Masulli, M., and Di Ilio, C. (2009). Glutathione transferases in bacteria. *FEBS J.* 276, 58–75.
- 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.
- Ann-Sofie, Johansson. (2002). Exploring the functional plasticity of human glutathione transferases. *Biyokimya Programı (Doktora Tezi) Acta Universitatus Upsaliensis*. Uppsala. 1-56.
- Aravindan, R., Anbumathi, P., Viruthagiri, T. (2007). Lipase applications in food industry. *Int J Biotechnol*, 6, 141-158.
- Armstrong, R. N. (1994). Glutathione S-transferases: Structure and mechanism of an archaetypical detoxication enzyme. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* ;69:1–44.
- Armstrong, R. N. (1997). Structure, Catalytic Mechanism, and Evolution of the Glutathione Transferases. *Chem. Res. Toxiol.*, 10(1), 2-18.
- Asaoka K. (1984). Affinty Purification and Charactarization of Glutathione S-Transferases from Bovine Liver. *J. Biochem* ,95: 685-696.
- 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): 1-10
- Ballatori, N., Krance, S. M., Notenboom, S., Shi, S., Tieu, K., and Hammond, C. L. (2009). Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol. Chem.* 390, 191–214.
- Bhat, M.K., (2000). Cellulases and Related Enzymes in Biotechnology. *Biotechnology Advances* 18, 355- 383.
- Blokhina, O., Virolainen, E. and Fagerstedt, K. V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of botany*, 91:2, 179194.
- Booth, J., Boyland, E., and Sims, P. (1961). *Biochem. J.* 79:516-24.
- Boyer TD. (1989). The glutathione S-transferases. *Hepato*l 9:486-96.
- 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., Calzaretti, G., Landriscina, C. (2004). Rat Liver Glutathione S-transferase Activity Stimulation Following Acute Cadmium or Manganese Intoxication. *Toxicol.*, 200, 29-38.

Chasseaud L., F. (1979). The role of glutathione and glutathione S-transferases in the metabolism of chemical carcinogens and other electrophilic agents. *Adv Cancer Res* 29:175-255.

Chun-hua Z., W. Ze-ying, J., Ting, G. (2013). Purification and Identification of Glutathione S-transferase in Rice Root under Cadmium Stress. *Ying, Rice Science*, 20(3), 173-178.

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

Çomaklı, V., Çiftci, M., Küfrevioğlu, Ö. İ. (2011). Glutathione S-Transferase Enziminin Gökkuşluğu Alabalık Eritrositlerinden glutathione S-Transferase enziminin saflaştırılması ve bazı antibiyotiklerin enzim aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesi. *Hacettepe J. Biol. And Chem*, 39 (4): 413-419

Demir, Y., Özasan, M. S., Duran, H. E., Küfrevioğlu, Ö. İ., and Beydemir, Ş. (2019). Inhibition effects of quinones on aldose reductase: antidiabetic properties. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 70: 103195.

Diplock, A. (1998). Healthy lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients. *ILSI Europe concise monograph series*, 59.

Eaton, D.L., Bammler, T.K., 1999. Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicol Sci. Jun*; 49 (Suppl 2),156-64.

Erkaya, E., Çaylıkoca, A. B., Kalınyaprak, F. (2006). Enzimatik kataliz, Kimya Mühendisliği Uygulaması, Konya Selçuk Üniversitesi, s.78.

Flagg, E. W., Coates, R. J., and Jones, D. P. (1994). Dietary glutathione intake and the risk of oral and pharyngeal cancer. *Am J Epidemiol.* 139:453–465.

Gadagbui, B. K. M., James, M. O. (2000). Activities of affinity-isolated glutathione S-transferase (GST) from channel catfish whole intestine. *Aquatic Toxicology*, 49,27–37.

Giblin, F.J. (2000). Glutathione lens transparency: cataracts. *J Ocul Pharmacol Ther.*16:121–135.

Gözükara, E. (1990). Biyokimya. İnönü Üniv. Tıp Fak, Ofset Repromat Ltd. Şti.

Gözükara, E.M. (2011). Biyokimya, 5. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.

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

Gülçin, İ., Beydemir, S. (2013). Phenolic compounds as antioxidants: carbonic anhydrase isoenzymes inhibitors. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 13(3): 408-430.

Gülçin, İ., Elias, R., Gepdiremen, A., and Boyer, L. (2006). Antioxidant activity of lignans from fringe tree (*Chionanthus virginicus* L.) *European Food Research and Technology*, 223: 759.

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

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

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

Hamilton, C. J., Arbach, M., Groom, M. (2005). Beyond Glutathione: Different Low Molecular Weight Thiols as Mediators of Redox Regulation and Other Metabolic Functions in Lower Organisms. In *Recent Advances in Redox Active Plant and Microbial Products*; Jacob, C., Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR *Glutathione Transferases*. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* 45: 51-88.

Hayes, J. D., McLellan, L.I., Stockman, P.K., Chalmers, J., and Beckett, G. J. (1987) Glutathione S-transferases in man: The relationship between rat and human enzymes. *Biochem Soc Trans* 15:721-5.

Hayes, J. D., Pulford, D. J. (1995). The glutathione S-transferase gene family: Regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *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* 38(2): 232-237.

Hodgson, E., Levi, P. E. (1994). *Introduction to Biochemical Toxicology*. Connecticut: Appleton&Lange.

Howie, A. F., Hoyes, J. D., and Beckett, G. J. (1988). Purification of acidic glutathione Stransferase from human lung, placenta and erythrocyte and the development of a specific radioimmunoassay for their mesaurment. *Clinica Chimica Acta* 177: 65-76.

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*, Nov, 6039-6042.

İstanbul (1994).*Journal of Medical Sciences*, 22(4), 442-448, 2002.

Jagt, D. L.V., Hunsaker, L. A., Garcia, K. B., and Royer, R. E. (1985). Isolation and Characterization of Multiple Glutathione S-Transferase from Human Liver. Evidence For Unique Heme-Binding Sites 260(21): 11603-11610.

Keha, E. E., Küfrevioğlu Ö. İ., (2009). Biyokimya, 6. Baskı, Aktif Yayınevi, İstanbul.

Ketterer, B., Coles, B., and Meyer, D.J. (1983) The role of glutathione in detoxication. Environ. Health Perspect. 49, 59–69.

Kirici, M., Kirici, M., Demir, Y., Beydemir, S., and Atamanalp, M. (2016). The effect of Al³⁺ and Hg²⁺ on glucose 6-phosphate dehydrogenase from capoeta umbra kidney. Applied Ecology and Environmental Research, 14(2): 253-264.

Kirsch, G., Slusarenko, A., Winyard, P., and Burkholz, T. (2014). Eds.; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2014; ISBN 978-94-017-8925-3.

Koolman, J. and Röhm, K.-H. (2003). *Taschenatlas der Biochemie*. Georg Thieme Verlag,

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

Lehninger, A. L (2005). 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.

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

Mannervik, B. (1985). The isoenzymes of glutathione transferase. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol. 57:357–417.

Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., and Rodwell, V. W. (1998). “Harper”ın Biyokimyası, 24. Baskı”, Barış Kitabevi, İstanbul, 68-69.

N. Güleşçi, “Üreaz enziminin magnetik nanopartiküllere farklı ara kollar üzerinden immobilizasyonu ve karakterizasyonu,” Doktora Tezi, Kimya, Çukurova Üniversitesi, Adana, Türkiye, 2013.

Neeraj, J. P., Singh, S. and Singh, J. (2013). Role of free radicals and antioxidants in human health and disease. International Journal of Current Research and Review, 5:19, 14-22.

Nelson, D. L., and Cox, M. M. (2005). Lehninger Biyokimyanın İlkeleri (çeviri: Kılıç N.), 3. Baskı, Palme Yayınları, Ankara.

Nishihira, J., Sakai, S. M., and Nishi Hatanaka, Y. (1995). Identification of the Electrophilic Substrate-Binding Site of Glutathione S-Transferase P by Photoaffinity Labelling. Eur. J. Biochem. 232(1), 106-10.

- Oakley, A. J. (2005). Glutathione transferases: new functions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15, 716–723.
- Oakley, A. J. (2011). Glutathione transferases: a structural perspective. *Drug Metab. Rev.*, 43(2), 138-151.
- Onat, T. (1996). Eritrosit Biyokimyasi. In Emerk K, Onat T ed. Temel Biyokimya Izmir, Saray medikal yayincilik, 865-8797.
- Peters, M., Jones, T. W., Monks, T. J., and Lau, S. S. (1995). Cytotoxicity and Cell-Proliferation Induced by the Nephrocarcinogen Hydroquinone and Its Nephrotoxic Metabolite 2,3,5-(tris-glutathione-S-yl) hydroquinone. *Carcinogenesis* 18(12),2393-401.
- Pickett, C. B., and Lu, A. Y. H. (1989). Glutathione S-transferases: Gene structure, regulation and biological function. *Annu Rev Biochem* 58:743-64.
- Ploemen, J. P., Vaniersel, M. L., Wormhout, L. W., Commandeur, J.N., Vermeulen, N. P., and Van Bladeren, P. J. (1996). In vitro Inhibition of Rat and Human Glutathione S-transferase Isoenzymes by Disulfiram and Dietyldithiocarbamate. *Biochem. Pharmacol.* 52(2),197-204.
- Rebbeck, T.R. (1997). Molecular Epidemiology of the Human Glutathione S-Transferase Genotypes GSTM1 and GSTT1 in Cancer Susceptibility, Cancer Epidemiology, Biomarkers &Prevention,6(9),733-743.
- Rietjens, M. C. M., Lemming, H. H., Alink, G. M., and Van Bladeren, P. J. (197). The role of glutathione and glutathione S-transferases in fatty acid ozonide detoxification. *Chem Biol Interactions.* 62:3-14.
- Segel, I.H. (1968). *Biochemical Calculations*. John Wiley and Sons, Inc., 403, New York.
- Senyuva, H. Z., and Gökmen, V. (2005). Food Additives and Contaminatio 22 (3), 204-209.
- Sharma, Y. R., Vajpayee, R. B., and Bhatnagar, R. (2009). Topical glutathione therapy in senile cataracts cataract III. *Indian J Ophthalmol.* 1989 ;37:121–126.Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med.*30:42–59.
- 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.
- Sluis-Cremer, N., and Naidoo, N. (1996). Class-Pi Glutathione S-Transferase is Unable to Region Its Native Conformation after Oxidative Inactivation by Hydrogen Peroxide. *Eur. J. Biochem.* 242(2),301-7.
- Smith, J.M. (1981). “Chemical Engineering Kinetics”, McGraw-Hill, New York, 3rd ed.
- Tekman, S., ve Öner, N., Genel biyokimya dersleri. Fakülteler matbaası, 341-356,

Temel, Y., Bozkuş, T., and Çiftçi, M. (2017). Glutasyon Redüktaz (GR) Enziminin Japon Bildircın (*Coturnix coturnix japonica*) Eritrositlerinden Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 7:3, 143-150.

Temellini. A., Castiglioni, M., Giuliani, L., Mussi, A., Giulianotti, P.C., Pietrabissa, A., Angeletti, C.A., Mosca, F., and Pacifci, G.M. (1995). Glutathione Conjugation with 1-chloro-2,4-dinitrobenzene(CDNB):Interindividual Variability in Human Liver, Lung,Kidney and Intestine. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, 33(9), 495-503.

Tuna, Gamze. (2008). Sıçan ince bağırsak glutasyon 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. Ankara.

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

Üçüncü, M. (2010). Gıdaların Ambalajlanması, Ege Üniversitesi Basım Evi, İzmir, Türkiye, 656-679.

Wareing, C.J., Blavk, S.M., Hayes, J.D., and Wolf, C.R. (1993). Inceased Levels of Alpha-class and Pi-class Glutathione S-Transferases in Cell Lines resistance to 1-chloro-2,4-dinitrobenzene. *Eur. J. Biochem.*, 217(2), 671-676.

Whitford, D. (2005). *Proteins: structure and function*, 1st ed., John Wiley& Sons Ltd, USA

Yıldız, S. (2007). Enzimler, 1. Baskı, Fakülte Kitabevi.

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.