ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KOMPOST SOLUCANINDAN GLUTATYON REDÜKTAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE BİYOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU

Hüseyin CAYMAK

KİMYA ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2021

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Hüseyin CAYMAK tarafından hazırlanan **"Kompost Solucanından Glutatyon Redüktaz Enziminin Saflaştırılması ve Biyokimyasal Karakterizasyonu"** adlı tez çalışması 10/09/2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Şevki ADEM

Jüri Üyeleri

Başkan **:** Doç. Dr. Volkan EYÜPOĞLU
Kimya Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye **:** Dr. Öğr. Üyesi Ümit YIRTICI
Tıbbi Laboratuvar Teknikleri Programı
Kırıkkale Üniversitesi

Üye **:** Doç. Dr. Şevki ADEM
Kimya Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. İbrahim ÇİFTÇİ

Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum **"Kompost Solucanından Glutatyon Redüktaz Enziminin Saflaştırılması ve Biyokimyasal Karakterizasyonu"** konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan "Bilimsel İntihal Tespit Programı"yla tarandığını, "intihal içermediğini" beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim. (10/09/2021).

Hüseyin CAYMAK

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KOMPOST SOLUCANINDAN GLUTATYON REDÜKTAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE BİYOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU

Hüseyin CAYMAK

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Şevki ADEM

Glutatyon hücre içi metabolik proseslerde görev alan çok önemli bir metabolittir. Onun hücre içi seviyesinin korunmasında glutatyon redüktaz enzimi önemli katkı sağlamaktadır. Yapılan çalışmada *Eisenia fetida* türü toprak solucanından glutatyon redüktaz enziminin saflaştırılması, biyokimyasal olarak karakterize edilmesi ve bazı toprak kirletici metallerin enzim aktivitesi üzerinde etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Tez çalışmasının sonunda, enzim 652,27 kat saflaştırılmıştır. Enzimin optimum pH'sı 8,5 ve optimum iyonik Tris tamponunda 75 mM olarak bulunmuştur. Enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık 40 ^{0}C olarak belirlenirken, aynı sıcaklıkta enzim aktivitesini koruduğu tespit edilmiştir. Enzimin substrata ve koenzime karşı K_m ve V_{max} değerleri belirlenmiştir. Enzim kativitesi üzerinde Pb^{+2}, Cu^{+2} Fe^{+3} ve Zn^{+2} iyonlarının inhibisyon etkisi gözlemlenmiştir.
.

2021, 36 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: Glutatyon, Glutatyon Redüktaz, *Eisenia fetida*, Saflaştırma, Metal iyonları, İnhibisyon

ABSTRACT

Master of Science Thesis

PURIFICATION AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF THE GLUTATHIONE REDUCTASE ENZYME FROM WORM COMPOST

Hüseyin CAYMAK

Çankırı Karatekin University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Şevki ADEM

Glutathione is a very important metabolite that takes part in intracellular metabolic processes. The enzyme glutathione reductase makes an important contribution to the maintenance of its intracellular level. In this study, it was aimed to purify and biochemically characterize glutathione reductase enzyme from the earthworm species *Eisenia fetida* and to investigate the effect of some soil polluting metals on enzyme activity. At the end of the thesis study, the enzyme was purified 397 times. The optimum pH of the enzyme was found to be 8.5 and the optimum ionic Tris buffer was 75 mM. While the temperature at which the enzyme shows optimum activity was determined as 40 ^{0}C, it was determined that the enzyme kept its activity at the same temperature. K_m and V_{max} values of the enzyme against substrate and coenzyme were determined. The inhibition effect of Pb^{+2}, Cu^{+2}, Fe^{+3} and Zn^{+2} ions on enzyme activity was observed.

2021, 36 pages

KeyWords: Glutathione, Glutathione Reductase, *Eisenia fetida*, purification, Metal ions, Inhibition

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmalarımda bilgilerini ve tecrübelerini benden esirgemeyip, sürekli yanımda olan; beni, sabırla ve adım adım takip eden kıymetli hocam sayın Doç. Dr. Şevki ADEM'e, tezim için gerekli olan laboratuvar çalışmalarımda destek veren Naciye KAYHAN'a ve Çağlar GÜLER'e, hayatımda ve yüksek lisans çalışmalarımda sürekli yanımda olan eşim Elif DEMİRBAŞ CAYMAK'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hüseyin CAYMAK
Çankırı, Eylül 2021

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR ..... **iii**
SİMGELER DİZİNİ ..... **v**
KISALTMALAR DİZİNİ ..... **vi**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **vii**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **viii**
1. GİRİŞ **1**
1.1 Glutatyon redüktaz **3**
2. LİTERATÜR ÖZETİ **6**
3. MATERYAL VE YÖNTEM **9**
3.1 Materyal **9**
3.1.1 Deneysel çalışmalarda yararlanılan kimyasallar **9**
3.1.2 Deneylerde faydalanılan cihazlar ve laboratuvar malzemeleri **9**
3.1.3 Deneysel çalışmalarda kullanılan çözeltilerin hazırlanması **10**
3.2 Yöntem **11**
3.2.1 Kompost solucan dokularından enzimlerin saflaştırılması çalışmaları **11**
3.2.2 Kantitatif protein tayini **14**
3.2.3 Kompost solucan dokularından saflaştırılan enzimlerin karakterizasyon ve kinetik çalışmaları **15**
4. BULGULAR **17**
4.1 Kantitatif protein tayini için kullanılan standart grafik **17**
4.2 Kompost solucan dokusundan saflaştırılan GR enziminin optimum şartlarının belirlenmesine yönelik sonuçlar **18**
4.3 Substrat ve Coenzim İçin Km ve Vmax Değerlerinin Belirlenmesi **22**
4.4 Kompost Solucan Dokusundan Saflaştırılan GR Enzimi Aktivitesine Bazı Metal İyonlarının İnhibitör Etkilerinin Sonuçları **24**
5. TARTIŞMA VE SONUÇ **27**
KAYNAKLAR **31**
ÖZGEÇMİŞ **36**

SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
±	Artı-Eski
°C	Santigrat derece
Å	Bağ uzunluğu
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
M	Molar
mM	Milimolar
µM	Mikromolar
L	Litre
µg	Mikrogram
g	Gram
nm	Nanometre
pH	Bir çözeltinin asitlik veya bazlık derecesinin nicel gösterimidir.

KISALTMALAR DİZİNİ

EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
IC_{50}	Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
K_i	İnhibisyon katsayısı
Km	Enzimin aktif bölgelerinin yarısının dolduğu subsrat konsantrasyonu
$NADP^+$	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (okside form)
Tris	Trihidroksimetil amino metan
Vmax	Maksimum hız
DMS	Dimetil Sülfat
PMSF	Fenilmetilsülfonil florid
SDS	Sodyum dodesil sülfat
ATP	Adenin trifostat
NaCl	Sodyum klorür
$NADP^+$	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
$MgCl_2$	Magnezyum klorür

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 İndirgenmiş glutatyon yapısı 3
Şekil 1.2 Okside glutatyon yapısı 4
Şekil 1.3 GSH'ın biyokimyasal yolu 5
Şekil 4.1 Kantitatif protein tayini grafiği 17
Şekil 4.2 2',5'-ADP sepharose afinite kromotografisiden saflaştırılan GR enziminin grafiği 18
Şekil 4.3 GR enziminin iyonik şiddetinin belirlenmesi amacıyla çizilen grafik..... 19
Şekil 4.4 GR enziminin optimum pH'sının belirlenmesine yönelik aktivite ölçüm sonucu grafiği..... 20
Şekil 4.5 Farklı pH değerlerine sahip 50 mM tris HCL tampon çözeltisindeki GR enzimine ait elde edilen stabil pH grafiği 20
Şekil 4.6 GR enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesi için çizilen grafik..... 21
Şekil 4.7 GR enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesi için çizilen grafik..... 21
Şekil 4.8 5 farklı NADPH derişimi kullanılarak GR enzimi için çizilen grafik 23
Şekil 4.9 5 farklı GSSG derişimi kullanılarak GR enzimi için çizilen grafik..... 23
Şekil 4.10 5 farklı Zn^{+2} konsantrasyonundaki GR enzimine ait %aktivite grafiği 24
Şekil 4.11 5 farklı Pb^{+2} konsantrasyonundaki GR enzimine ait %aktivite grafiği..... 25
Şekil 4.12 5 farklı Cu^{+2} konsantrasyonundaki GR enzimine ait %aktivite grafiği 25
Şekil 4.13 5 farklı Fe^{+3} konsantrasyonundaki GR enzimine ait %aktivite grafiği..... 26

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Farklı türlere ait GR enziminin molekül kütleleri ve alt birim yapısı..... 6
Çizelge 2.2 Farklı türlere ait GR enziminin kinetik özellikleri..... 7
Çizelge 3.1 GR enziminin aktivite küvet ölçüm içeriği 13
Çizelge 4.1 Kompost solucan GR enziminin saflaştırma basamakları tablosu..... 18
Çizelge 4.2 Kompost solucan dokusu GR enzimi K_m ve V_{max} değerleri ..... .22

1. GİRİŞ

Canlı hücrelerde önemli bir yere sahip olan enzimler biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen bir molekül olup yapısında ise protein barındır. Bu yüzden her canlı hayati önem taşıyan biyokimyasal reaksiyonların sürekliliği için aldıkları besinleri kendi organizmasının yapısına uygun bir şekilde biyolojik bileşiklere dönüştürmesi gerekir. Canlı organizmalarda uygun biyolojik moleküllere dönüşümünü sağlarken reaksiyonları hızlandırır. %100 verim sağlayan ve yan ürün oluşturmayan biyolojik katalizörlere enzim denir. Enzimler katalizleme yaparken spesifik olmaları en önemli özelliklerinden biridir. Küçük bir RNA grubu dışında katalitik aktivite gösteren enzimler büyük bir çoğunluğa protein yapısında olup hepsi özelleşmiştir (Nelson *et al.* 2008).

Canlı hücreler tarafından sentezlenen enzimler hücre içindeki gerçekleşen binlerce tepkimenin hızını ve özgüllüğünü koruyarak %100'lük verimle değişikliğe uğratmadan gerçekleştirir. Enzimin kimyasal reaksiyonda bağlandığı maddeye subsrat denir. Kimyasal reaksiyon sonucu oluşan maddelere ürün adı verilir. Canlı organizmadaki kimyasal reaksiyonda enzimler subsratı başka ürüne çevirmek için çalışmaya devam eder (Bhat 2000). Enzimler hücre içinde üretilir ancak hücre dışında da aktivite gösterdikleri çalışırlar.

Biyokimyasal reaksiyonlarda katalizör olarak görev yapan enzimler katalizör görevini protein yapıları sayesinde gerçekleştirir. Ancak bazı enzimler ise kofaktör molekülü ile gerçekleştirir. Kofaktörler Mg^{+2}, Fe^{+2}, Zn^{+2} metal iyonları olabileceği gibi kompleks organik moleküller NAD^{+}, FAD, Koenzim A gibi organik yapıları da bulunur. Bazı enzimler her ikisine de ihtiyaç duyar. Koenzimler vitaminlerden türetilir. Kofaktörlü enzimlere holoenzimler olarak adlandırılırken enzimin protein kısmına apoenzim denir (Nelson *et al.* 2008).

Biyokimyanın eski zamanlardan beri araştırmalarının konusunun çoğunluğu enzimler üzerinedir (Fujiwara *et al.* 1989, Keha and Küfrevioğlu 2004). Günlük yaşamı yakından ilgilendiren sağlık, hastalık, çeşitli tedavi yöntemlerinde hastalıklara tanı konulmasında

enzimlerin rolü büyük önem arz eder (Onat 1996). Şimdiye kadar yaklaşık olarak 2000 kadar enzimler bilinmektedir. Bu enzimlerin birçoğu saflaştırılıp özellikleri ayırt edilmiştir. Bunun yanı sıra sayısı 200'den fazla enzim kristallendirilmiştir (Fujiwara *et al.* 1989, Keha and Küfrevioğlu 2004).

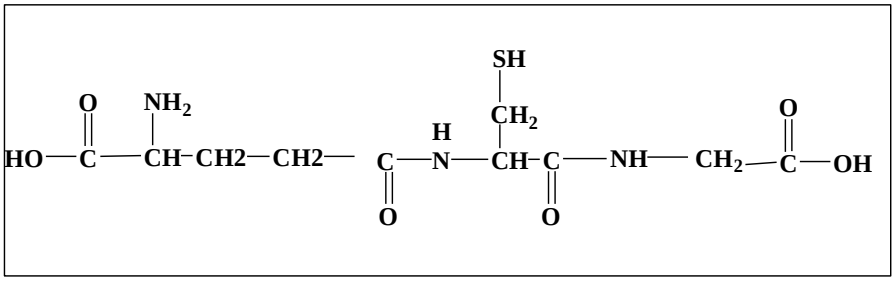
İnhibisyon, inhibitör maddeler, enzimlerin *in vivo* ve *in vitro* aktivitelerinin azalmasına sebep olurlar. Hatta bazen bu maddeler enzim aktivitesinin tamamen yok olmasına da sebebiyet verirler. Bu maddelerin yapısını iyonlar veya küçük moleküller oluşturur. Canlı organizmasında kontrol mekanizması olan enzim inhibisyonu canlı yaşamı için daha da önemli bir yer teşkil ederken toksik maddelerin ilaçların çeşitli kimyasalların etkilerini bu yolla gösterir (Fujiwara *et al.* 1989, Keha and Küfrevioğlu 2004).

Enzim inhibisyonu dönüşümlü ve dönüşümsüz olarak sınıflandırılır. İnhibitörler enzime bağlanırken ya kovalet bağ oluşturur ya da kompleks oluşturarak bağlanarak kolay kolay enzimden ayrılmaz. Dönüşümlü inhibisyon ise dönüşümsüz inhibüsyondan farklı olarak denge tepkimesi oluşturur. Dönüşümlü inhibüsyon yarışmalı, yarışmasız ve yarı yarışmalı olarak üç guruba ayrılır. Dönüşümlü inhibisyonun yarışmalı inhibisyonu en yalın olanıdır. Yarışmalı inhibisyon substrata yapı olarak benzerlik gösterdiği için enzimin aktif bölgesine bağlanır. Tabiki subsrat konsantrasyonu artırılarak bu sorun minimize edilebilir. Enzimin V_{max} değeri değişmemekle beraber K_m değeri artar.

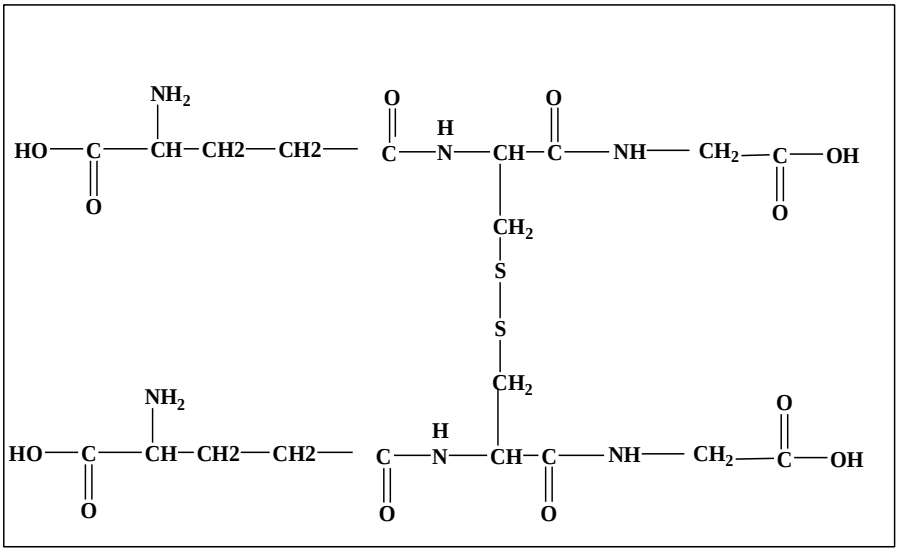
Dönüşümlü olan diğer bir inhibisyon türü de yarışmasız inhibisyondur. Bu inihibisyon türünde inhibitör substratın bağlandığı bölgenin dışında farklı bir bölgeye bağlanır. Yarışmasız inhibitör enzimin aktivitesini düşürerek etkisini gösterir. Substratla inhibitör arasında yarışma söz konusu olmadığı için yarışmalı inhibisyondaki gibi substratın kontrasyonun arttırılması ile inhibisyon olayı ortadan kalkması olası değildir. Bu yüzden V_{max} değeri azalırken K_m değeri sabit kalır. Diğer inhibisyon türü ise yarı yarışmalı olanıdır. Bunun çalışma şeklinde inhibitör serbest enzime bağlanmayıp, substrat kompleksine bağlanır (Fujiwara *et al.* 1989, Keha and Küfrevioğlu 2004).

1.1 Glutatyon redüktaz

Glutatyon (γ-glutamilsisteinilglisin) hayvansal hücrelerde, bitkilerin çoğunda bulunup bakterilerde bulunduğu saptanmıştır. Glutatyon, 100 yılı aşkın süredir bilinmektedir ve kimyasal yapısı ise 1935 yılında aydınlanmıştır (Meister 1988). GSH atipik bir tripeptit bağına sahip olup kan hücreleri ve diğer hücrelerde bulunur. Sistein amino asidindeki amino grubu sayesinde peptid bağında L-glutamik asitin γ-karboksil grubu yer alır (Montgomery 1996). Glutatyonun canlı hücrede pek çok işlevi olduğu bilinmektedir. Serbest radikallerin ve reaktif oksijen ürünlerinin inaktivasyonunu sağlamak, DNA ve protein sentezi, aminoasit transportu sağlamak hücre içinde sistein deposu olarak bulunmak, insülin gibi bazı proteinlerin disülfür bağlarının koparılmasını sağlayıp proteinlerin konformasyonlarının değişmesini sağlamak, hemoglobin ve spektrin gibi membran proteinleri ve çeşitli enzim proteinlerinin tiyol guruplarının korunmasını sağlamak gibi önemli özellikleri vardır. Bu enzim indirgenmiş ve okside gibi iki yapıya sahiptir (Şekil 1.1 ve 1.2). Ray-Pailhade, 1888 yılında maya hücresinde bulduğunu rapor etmiştir, ve "filothion" olarak adlandırılmıştır. Hopkins 1921'de saflaştırılarak kristallendirip bu isim verilmiştir (Zubay 1988).



Şekil 1.1 İndirgenmiş glutatyon yapısı, GSH, (L-γ-glutamil-L-sisteinil-glisin)



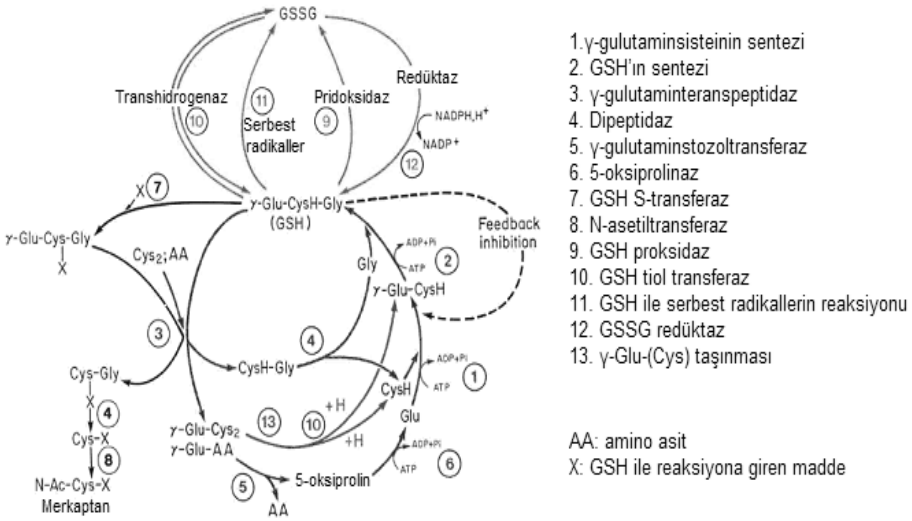
Şekil 1.2 Okside glutatyonun yapısı, GSSG, 2(L-γ-glutamil-L-sisteinil-glisin)

Glutatyon, ATP gerektiren iki ardışık reaksiyonla hücrenin stozolünde sentezlenmektedir. Bu reaksiyonları, γ-glutamil sistein sentetaz (γ-GSS) ve glutatyon sentetaz (GS) enzimleri tarafından katalize edilir (Richman and Meister 1975, Toribio *et al.* 1996).

Normal şartlarda indirgenmiş glutatyon miktarı hücrelere göre değişmekle beraber 0,5–10 mM arasında bulunur. Glutatyon eritrositlerde genellikle indirgenmiş halde bulunur. Eritrositlerde GSH yaklaşık 2 mM gibi yüksek derişimlerde bulunmaktadır. Yaklaşık olarak GSSG derişimi ise 4 μM civarındadır. İnsan kırmızı kan hücrelerinde GSH/GSSG oranı yaklaşık 500/1 ve yarı ömrü 96 saattir (Arrick and Nathan 1984, Cooper 1997, Fujiwara *et al.* 1989, Shohet and Beütler 1986)

İndirgenmiş glutatyon enzimatik olmayan ya da enzimatik yollarla okside glutatyona (GSSG) dönüşür. Bu dönüşüm bilhassa peroksitlerin parçalanmasında ve enzimatik trans hidrojenasyon neticesinde gerçekleşmektedir (Şekil 1.3).

Glutatyon redüktaz, glutatyon disülfiti (GSSG) indirgeyerek glutatyona (GSH) dönüştüren önemli bir antioksidan enzimdir (MANNERVIK 1987, Meister 1988).



Şekil 1.3 GSH'ın biyokimyasal yolu *(Meister 1988)

Eritrositlerdeki H_2O_2 gibi organik peroksitlerin indirgenmesi glutatyonun artması ile sağlanır. Biyokimyasal reaksiyondaki enzim glutatyon peroksidaz olarak adlandırılır. Okside glutatyonu indirgenmiş forma glutatyon redüktaz dönüştürür. Bu dönüşüm sağlandığında GSH/GSSG oranın yükselir (Fujiwara *et al.* 1989, Keha and Küfrevioğlu 2004).

Glutatyon enziminin canlı organizma için önemi oksitleyici ajanlarını yapısında bulunun –SH grupları sayesinde korumaktır. Bu sebeple glutatyonun konsantrasyonu düşük olunca olumsuzluklar yaşanır. Glutatyonun organizmadaki görevleri çoktur. Örneğin; reaktif oksijen ürünleri ve serbest radikallerin inaktivasyonunda, hemoglabin ve spektrin gibi membran proteinleri ve enzim proteinlerinin tiyol gruplarının korunmasında, DNA ve protein sentezinde, aminoasit tranportunda, insülin gibi bazı proteinlerin disülfür bağını koparması sonucu protein konformasyonunun sağlamasında, sistein deposu hücre içinde oluşturması ve enzim reaksiyonlarındaki bazı görevleri mevcuttur (DEMİR *et al.* 2007, Knapen *et al.* 1999).

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Enzimler farklı kromatoğrafik yöntemlerle birçok biyolojik kaynaktan saflaştırılmış, optimum pH, stabil pH, optimum iyonik şiddet, optimum sıcaklık, molekül kütlesi ve alt birimlerinin tespiti, amino asit bileşimi ve farklı genetik varyantlarının belirlenmesi gibi çalışmalar yapılmıştır. Enzim subsratlarının K_M ve V_{max} değerleri ile ürünlerin K_i sabitleri ve inhibisyon türleri belirlenmiştir. Biyolojik moleküller, iyonlar ve ilaçların enzim aktivitesi üzerinde etkisini gösteren birçok çalışma yayınlanmıştır. GR enzimi için en verimli ve en hızlı bir şekilde 2′, 5′-ADP-Sepharose 4B afinite kromatografisi ile saflaştırılmıştır (Erat 2004).

Metabolizma için önemli bir enzim olan glutatyon redüktaz (Glutatyon; $NADP^+$ oksidoredüktaz, EC 1.8.1.7: GR) glutatyon disülfiti (GSSG) indirgenmiş glutatyona (NADPH ya da NADH'ı indirgeyici molekül olaraki kullanarak) indirgenmesini katalizler (Gul *et al.* 2000, Muller 2018). Glutatyon redüktaz birçok hayvan dokusunda, bitkide ve mikroorganizmada bulunmaktadır. Yapısı 1935 yılında aydınlatılmıştır (Meister 1988).

Enzim birçok kaynaktan saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Enzimin molekül kütlesi 70–140 kDa arasında değişmektedir. Genelde özdeş iki alt birimden oluşmaktadır (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1 Farklı türlere ait GR enziminin molekül kütleleri ve alt birim yapısı

Enzim kaynağı	Molekül kütlesi kDa	Alt birim molekül kütlesi ve yapısı kDa	Kaynak
Sıçan karaciğeri	125	60 homodimer	(Carlberg and Mannervik 1975)
Alabalık karaciğeri	105	53 homodimer	(Tekman *et al.* 2008)
İnsan eritrositi	100	50 homodimer	(WORTHINGTON and ROSEMEYER 1976)
Sığır eritrositi	118	58 homodimer	(Erat 2002a)
Sığır beyni	116	64 homodimer	(Acan and Tezcan 1989)

Enzimin optimum aktivite gösterdiği pH aralığı kaynaktan kaynağa farklılık gösterdiği için 6,5-9 arasında bulunmuştur. Bu değer; domuz eritrositleri için 7,0, insan eritrositi için 8,0, *Cyanobacterium anabaena sp.* strain 7119 9,0, sığır eritrositleri için 7,3, koyun karaciğeri 8,0, solucan dokusu için de 8,0 olarak belirlenmiştir. (Boggaram *et al.* 1979, Scott *et al.* 1963) (Serrano *et al.* 1984) (Erat and Çİftçİ 2003, Tekman *et al.* 2008, Ulusu *et al.* 2005). Stabil pH ile ilgili yapılan çalışmalarda sığır eritrositi 7,3, koyun karaciğeri 5,5, solucan dokusu 8,0 olarak rapor edilmiştir (Erat 2002a, Tekman *et al.* 2008, Ulusu *et al.* 2005).

GR ısıya dayanıklı bir enzim olarak bilinmektedir. Fare karaciğerinde GSSG ile yapılan ölçümlerde 80ºC'ye kadar aktivitesini koruduğu belirtilmiştir (LÓPEZ- BAREA and LEE 1979). Optimum aktivite gösterdiği bazı sıcaklık değerleri sığır eritrositi 55ºC, koyun karacigeri 60ºC, sığır karaciğeri 55ºC, alabalık karaciğeri 10ºC'dir (Erat 2002a, Tekman *et al.* 2008, Ulusu *et al.* 2005, Ulusu and Tandoğan 2007).

Çeşitli kaynaklardan enzim subsratı olan GSSG ve NADPH için K_M ve V_{max} değerleri belirlenmiştir. $NADP^+$ ve GSH için K_i değerleri ve inhibisyon türleri ile ilgili çalışmalar da yapılmıştır(Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2 Farklı türlere ait GR enziminin bazı kinetik özellikleri

Enzim kaynağı	Subsratlar				Ürünler				Kaynak
	GSSG		NADPH		GSH		$NADP^+$		
	K_M (mM)	V_{max} (EU/ml)	K_M (mM)	V_{max} (EU/ml)	K_i (mM)	İnhibisyon türü	K_i (mM)	İnhibisyon türü	
Balık karaciğeri	0,025	0,098	0,055	0,143	10,17	Yarışmalı	0,295	Yarışmalı	(Tekman *et al.* 2008)
Sığır eritrosit	0,149	0,676	0,0714	0,0931	7,841	Yarışmasız	0,248	Yarışmalı	(Erat 2002a)
Koyun karaciğer	0,0239	0,255	0,0258	0,266	0,4055	Yarışmasız	4,367	Yarışmalı	(Ulusu *et al.* 2005)
Sığır karaciğer	0,154	-	0,063	-	7,985	Yarı yarışmalı	0,043	Yarışmalı	(Ulusu and Tandoğan 2007)

GR enziminin saflaştırılması için birçok kromatografik teknik kullanılmıştır. GR saflaştırılmasında CM-selüloz, Sephacryl S-200, DEAE-Sephadex, Sephadex G-100, hydroxyapatite, Sephadex G-75, and DEAE-Sepharose kolonları kullanılmıştır (Carlberg and Mannervik 1975, Carlberg and Mannervik 1981, Ulusu and Tandoğan 2007). Enzim en hızlı ve en yüksek verimle 2',5'-ADP-Sepharose 4B afinite kolonuyla saflaştırılmaktadır. Ayrıca hızlı protein iyon kromatografisi (FPLC)-anyon değiştirici, and FPLC-hidrofobik etkileşim kromatografisi, Reactive Red-120-Agarose, Sephacryl S–300 teknikleriyle de saflaştırılmıştır (García-Alfonso *et al.* 1993, Madamanchi *et al.* 1992).

Önemli kirleticiler olan pestisit ve ağır metal iyonları toprağa ve suya girdiklerinde doğrudan veya dolaylı olarak insan sağlığı ve doğal ekosistem için ciddi tehditler oluşturmaktadır (Tang *et al.* 2014, Zeng *et al.* 2013a, Zeng *et al.* 2013b). Özelikle toprakta yaşayan ve toprak bio-verimliliğinin artırılmasında önemli rol oynayan toprak solucanları tarımsal ve endüstriyel faaliyetler sonucu toprakta yaygın olarak bulunan pestisid ve ağır metal kirleticilerinin etkisine maruz kalırlar (Amador and Görres 2007, Banni *et al.* 2014). Pestisitler, zararlılara karşı biyolojik ajan, antimikrobiyal ve dezenfektan olarak kullanılan kimyasal maddelerdir. Bunların bazıları toprağı ve çevrenin kontaminasyonuna katkıda bulunan organik kirleticilerdir. Ayrıca, bitki kirliliğinin oluşmasında önemli rol oynamaktadırlar (Ekinci *et al.* 2012). Çoğu durumda, pestisitler ve fungisitler çevreyle etkileşmeleri sonucu o çevrede yaşayan canlılardaki biyokimyasal reaksiyonları katalizini gerçekleştiren spesifik proteinler için tehlikeli olabilir. Bazı pestisitlerin, ratların karaciğer ve serum üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar ksenobiyotik metabolizmasında önemli bir sistem olan P450 protein genleri üzerine toksik etki yaptıklarını göstermiştir (Gao *et al.* 2013).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Deneysel çalışmalarda yararlanılan kimyasallar

Çalışmalar için N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin (TEMED), serum albümin(standart) diyaliz torbaları, β-nikotinamidadenindinükleotidfosfat (indirgenmiş form) (NADPH), okside glutatyon (GSSG), indirgenmiş glutatyon (GSH), 6-fosfoglukonat (mono Na tuzu), ve etilendiamintetraasetikasit (EDTA) Sigma Chemical Comp.'den; triklor asetik asit, sodyum hidroksit, trihidroksimetilaminometan (Tris), potasyum klorür, sodyum klorür, sodyum asetat, hidroklorik asit, glisin, sodyum azodür, fosforik asit, gliserin, potasyum fosfat, potasyum bisfosfat, potasyum asetat, sodyum asetat, izopropanol Sigma'dan; akrialmid, N,N'-metilen bisakrilamid, sodyum dodesil sülfat (SDS), brom timol mavisi, Coomassie Brillant Blue G-250, sephadex-G150 ve 2', 5' ADP-Sepharose 4B Pharmacia'dan temin edilmiştir.

3.1.2 Deneylerde faydalanılan cihazlar ve laboratuvar malzemeleri

Deneylerde için yararlanılan laboratuvar malzemeleri ve cihazlar aşağıda liste halinde verilmiştir;

Yararlanılan Alet ve Cihazlar:

1) Spektrofotometre: Rayleigh UV-2601
2) pH metre: Mettler Toledo
3) Kuvars küvetler: Hellma Analytics
4) Vorteks
5) Manyetik Karıştırıcı
6) Piset
7) Otomatik pipet
8) Hassas terazi
9) Saf su cihazı
10) Buzdolabı

11) Ependorf tüpleri
12) Beher
13) Spatul
14) Falkon

3.1.3 Deneysel çalışmalarda kullanılan çözeltilerin hazırlanması

Çözelti hazırlamak amacıyla saf su kullanılmıştır.

Homojenat hazırlanması için kullanılan çözelti

A) 20 mM Tris-HCl + 2 mM DDT + 1mM EDTA (pH= 7,5): 0,605 g Tris-HCl, 0,017 g DDT, 0,073 g EDTA saf suda çözülüp pH'sı 0,1 M HCI çözeltisi yardımıyla ayarlandıktan sonra saf su yardımıyla 250 mL'ye tamamlandı.

Aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler

A) 5mM EDTA + 1 M Tris-HCl (pH= 8,0): 0,06057 g (5 mmol) Tris ve 0,0292 g (0,1 mmol) EDTA 90 mL saf suda çözülüp 0,1 M HCl çözeltisi yardımıyla pH 8,0'a ayarlandıktan sonra saf su ile 50 mL'ye tamamlandı.

B) 20 mM GSSG Çözeltisi: 61,84 mg okside glutatyon (0,1 mmol) alınarak bir miktar suda çözüldü, toplam hacim suyla 5 mL'ye tamamlandı.

C) 2mM NADPH Çözeltisi: 8,4 mg NADPH ($9{,}9 \times 10^{-3}$ mmol) alınarak hacmi suyla 5 mL'ye tamamlandı.

Diyaliz ve amonyum sülfat çökeltisinin çözünmesi için kullanılan tamponlar

A) 50 mM KH_2PO_4 (Amonyum sülfat çökeltisinin çözünmesi için): 0,69 g KH_2PO_4 (5×10^3 mol) alınıp 82 mL saf suda çözüldü. pH'sı 0,1 M KOH yardımıyla 7,5'e ayarlanıp toplam hacim saf su eklenerek 100 mL'ye tamamlandı.

B) 10 mM Tris-HCl + 1 mM EDTA (Diyaliz çözeltisi): 1,211 g Tris, 0,29225 g EDTA alınarak 975 mL saf suda çözüldü, pH'sı 0,1 M HCI ile 7,5'e ayarlanıp destile su ile 1 L'ye tamamlandı.

Afinite kolonu için gerekli olan çözeltiler

A) 50 mM KH_2PO_4 + 1mM DTT + 1 mM EDTA, pH=7,3 (Afinite jelinin paketlenmesi, yıkanması ve dengelenmesi içi): 6,8 g KH_2PO_4, 0,292 g EDTA ve 0,152 g DTT alınarak 950 mL destile suda çözüldü. pH'sı 0,1 M KOH 7,3'e ayarlandı ve deiyonize su kullanılarak toplam hacim 1 L'ye tamamlandı.

B) 50 mM KH_2PO_4 + 80 mM KCI + 1 mM EDTA + 1mM DTT, pH=7,3 (Kolonun yıkanması için kullanılan tampon): 6,8 g KH_2PO_4, 0,292 g EDTA, 0,298 KCI ve 0,152 g DTT alınarak 950 mL suda çözüldü. pH'sı 0,1 M KOH 7,3'e ayarlandıktan sonra 1 L'ye tamamlandı.

C) 50 mM K-fosfat + 1 mM EDTA + 1mM GSH + 0,5 mM NADPH (Kolona tutunmuş olan glutatyon redüktaz enziminin elüsyonu için kullanılan tampon): 0,34 g K-fosfat, 0,0146 g EDTA, 0,0307 g GSH, 0,02075 g NADPH karışımı 45 mL suda çözüldü. pH'sı 0,1 M KOH ile 7,3'e ayarlanıp saf su yardımı ile 50 mL'ye tamamlandı.

D) 0,1 M Na-asetat + 0,5 M NaCl (Afinite kolonunun yenilenmesi için gerekli olan tampon): 4,1 g Na-asetat (50 mmol) ve 14,62 g NaCl (0,25 mol) alınıp saf suda çözüldü, pH= 4,5'e ayarlanıp saf su yardımı 500 mL'ye tamamlandı.

E) 0,1 M Tris + 0,5 M NaCl 6,05 g Tris ve 14,61 g NaCI saf suda ile çözme işlemi gerçekleştirildikten sonra pH'sı 0,1 M HCI ile 8,5'e ayarlanıp destile su ile 500 mL'ye tamamlandı. Bu çözeltinin hazırlanma amacı kolonun yenilenmesi içindir.

F) % 0,02'lik NaN_3 çözeltisi hazırlamak için10 mg NaN_3 tartılıp 50 mL saf suda çözündükten sonra çözelti hazırlandı. Bu çözelti kolonun bakterilerden korunması için hazırlandı.

3.2 Yöntem

3.2.1 Kompost solucan dokularından enzimlerin saflaştırılması çalışmaları

Homojenatın hazırlanması: Homojenatın hazırlanması: solucanlar bir gün suda bekletilerek içlerindeki toprak ve diğer sindirilmemiş besinleri çıkarması beklendi. Daha sonra küçük parçalara ayrıldı ve donma çözme yöntemi ile hücrelerin parçalanması sağlandı. Her dondurma işleminden sonra havanda solucan parçaları iyice ezildi. Elde

edilen parçalanmış hücre peleti 5 hacim 20 mM Tris-HCl, 2 mM DTT, 1 mM EDTA içeren soğuk çözelti içinde süspanse edildi. Daha sonra süspansiyon 13.000 rpm'de +4 °C sıcaklıkta 15 dakika santrifüj edildi ve alttaki çökelti atıldı.

2', 5' ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi: 10 mL'lik yatak hacmi için 2 g kuru 2', 5'-ADP Sepharose 4B jeli tartıldı. Daha sonra katı maddelerin uzaklaştırılması için 400 mL destile su kullanılarak birkaç defa yıkama işlemi sağlandı. Yıkama ile şişirilen jelin içindeki hava su trombu kullanılarak vakum ile alındı ve paketleme tamponu ilave edilerek jel süspanse edildi. Hazırlanan jel, 1x10 cm'lik kolona paketlendi. Jel tamamen çöktükten sonra peristaltik pompa yardımıyla dengeleme ve yıkama tamponu ile muamele edildi. Kolonun dengelenmesi, eluat ile tamponun 280 nM'de absorbanslarının ve pH'larının aynı değere sahip olmasından anlaşıldı. Böylece afinite enzim saflaştırma için hazırlanmış oldu.

Tamponla muamele edilip santrüfüjle arıtıkları çöktürülen solucan homojenatı 2', 5'-ADP sepharose 4B afinite kolonuna tatbik edildi. Enzim çözeltisinin tamamı kolondan geçirildikten sonra yıkama işlemi yapıldı. Yıkama işleminden sonra dengeleme tamponu geçirildi ve bu tamponun geçmesi spektrofotometrede takip edilerek absorbans değerlerinin köre eşit olmasıyla durduruldu. Kolon yıkandıktan sonra; GR elüsyon çözeltileri geçirilerek enzimler 1,5 ml'lik tüplere ayrı ayrı alındı. Her bir tüpteki enzimlerin aktivitelerine bakılarak enzim ünitesi-tüp sayısı grafiği hazırlandı (Boggaram *et al.* 1979, Carlberg and Mannervik 1981, Danner *et al.* 1977).

Enzim aktivitelerinin ölçülmesi: Glutatyon redüktaz enziminin aktivite ölçümünde spektrofotometrik metod kullanıldı. Carlberg and Mannervik'in tanımladığı gibi 1 mL'lik küvetlerle yapıldı (Carlberg and Mannervik 1985). Bu metod GSSG varlığında NADPH'ın yükseltgenmesinden dolayı azalan NADPH'ın 340 nM'de absorbans vermesi esasına dayanır. 1 dakikalık zaman aralıklarında absorbans azalışı kaydedildi (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1 GR enziminin aktivite ölçüm küvet içeriği

Stok çözeltileri	Kontrol küveti	Numune küveti
	Hacim (µL)	Hacim(µL)
1mM Tris-HCl, 5 mM EDTA (pH= 8)	200	200
20 mM GSSG	100	100
2mM NADPH	100	100
Su	600	570
Enzim numunesi	-	30

Enzim ünitesi hesaplamaları için kullanılan formül.

$$EÜ/ml = \frac{\Delta OD}{6,22} \times \frac{V_T}{V_E} \times S_F \qquad (3.1)$$

Burada yer alan simgeler aşağıda açıklandı;

EÜ/ml : Enzim ünitesi(1 mL)

ΔOD : Absorbans değişimi(1 dk)

6,22 : Ekstinksiyon katsayısı

V_T : Toplam küvet hacmi

V_E : Reaksiyon ortamına ilave edilen enzim miktarı

S_F : Seyreltme faktörü

3.2.2 Kantitatif protein tayini

Homojenat, amonyum sülfat çöktürmesi sonucu afinite kromatografisi sayesinde saflaştırılmış enzimin çözeltilerindeki protein miktarı tespit edildi. Renk amaçlı kullanılan boyar madde Coomassie Brillant Blue G-250 negatif bir yükle yüklenmiş olup proteindeki pozitif yükle yüklenmiş kısım ile etkileşim sağlar. Kullanılan boyar maddenin kırmızı (λ_{max}= 465 nM) ile mavi (λ_{max}= 595 nM) yapısında bulunur. Proteinin bağlanınca sonucu kırmızı maviye dönüşür. Böylece reaksiyonun hızlandığı gözlenir. Yaklaşık olarak süre tutulduğunda 2 dakika civarı olduğu anlaşılır. Daha sonra renkteki kararlılığın sağlanması için iki saatten daha fazla işlemlere devam edilir (Bradford 1976). Bozucu etkilere karşı hassasiyeti çok az olan bir yöntem olup bu değer 1-100 µg arasıdır.

Protein tayini yapmak amacıyla 1,0 mg standart sığır albümin protein 1,0 mL saf suda çözünerek hazırlandı. Daha sonra sırasıyla tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µL alındı. Destile su kullanılarak tüplerin içindeki çözelti hacmi 0,1 mL'ye tamamlandı. 5 mL Coomassie Brillant Blue G-250 çözeltisi ilave edilip vorteks ile karıştırıldı. 10 dakikalık inkübasyondan sonra 595 nm'de 1 mL'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri alındı. Kör olarak da 0,1 mL enzim numunesi olan tampon çözelti ile 5 mL Coomassie Brillant Blue G-250 çözeltisi alındı ve bu karışım ile çalışıldı. Not edilen absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri kullanılarak standart grafik bir grafik çizildi.

Homojenat ve afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltilerindeki enzim numunelerinden 0,1 mL alınarak deney tüplerine konularak hazırlanmış olan Coomassie Brillant Blue G-250 reaktifi 5' er mL eklendi. Vorteks ile karışımından sonra 10 dakika inkübasyon için bırakıldı. 595 nM'deki absorbans değerleri not edilerek grafik çizilip grafiğe göre protein miktarı tespit edildi.

3.2.3 Kompost solucan dokularından saflaştırılan enzimlerin karakterizasyon ve kinetik çalışmaları

Enzimlerin optimum pH'larının belirlenmesi

Enzimlerin optimum pH'larını belirlemek amacıyla 25 mM H_3PO_4 -25 mM H_3BO_3 ile pH 5-10 arası 0,5 artışla tampon çözeltiler hazırlandı. Her bir pH'da enzim aktivelerine bakıldı. Belirlene optimum pH'da aynı tuz konsantrasyonunda Tris-HCl ve fosfat tamponları ile de aktivitelerine bakıldı. Aktivite ölçümlerinde en iyi aktivite gösteren tamponlarla çalışmalara devam edildi.

Enzimlerin optimum iyonik şiddet derişimlerinin belirlenmesi

Enzimlerin en iyi aktivite gösterdiği tampon konsantrayonunu belirlenmesi için tespit edilen optimum pH'da 10, 25, 50, 10, 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1000 mM Tris-HCl veya fosfat tamponları kullanılarak belirlendi. Belirlenen değerlerle enzim aktivitesi-küvet içi konsantrasyon grafikleri çizildi.

Enzimlerin optimum aktivite gösterdiği sıcaklıklarının belirlenmesi

Enzimlerin en iyi aktivite gösterdiği sıcaklıklarını tespit edilmesi amacıyla enzim hariç diğer aktivite çözeltileri 0-90 ^oC arasında 10 ^oC artışla ısıtıldı ve her 10 ^oC'de aktiviteleri ölçüldü. Enzim aktivitesi-sıcaklık grafikleri çizildi.

Stabil pH'nın belirlenmesi

Stabil pH'yı tespit etmek için fosfat 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8 ve Tris-HCl 7,5, 8, 8,5, 9 tamponları hazırlandı. 0,5 mL enzim 0,5 mL bu tamponlardan olmak üzere ependorf tüplerine alındı. 12 saat arayla aktivite ölçümleri yapıldı. Enzim aktivitesi-saat grafiği çizilerek sonuçlar değerlendirildi.

K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi

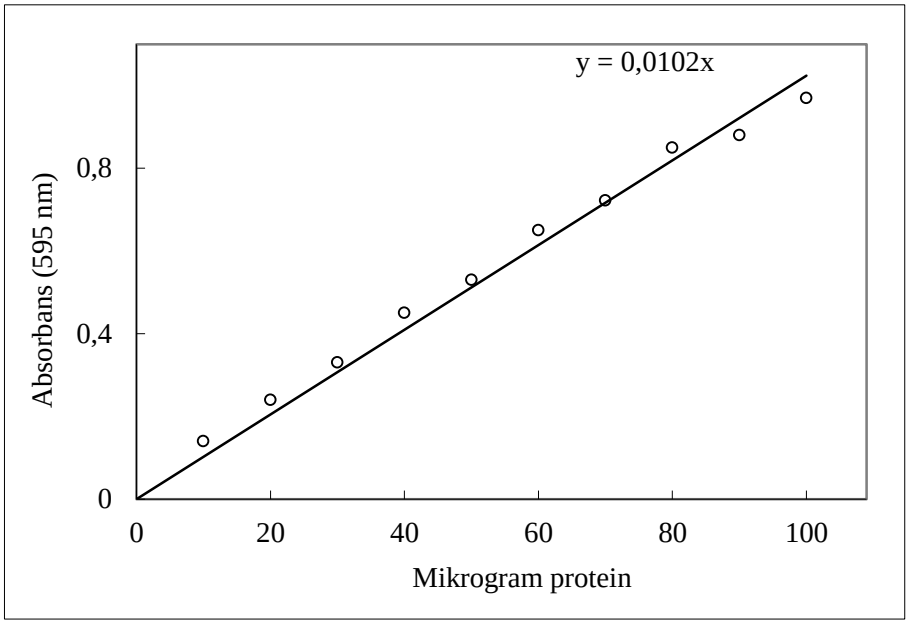
Enzimlerin K_m ve V_{max} değerlerinin tespiti için subsratların 100 kat seyreltilmiş çözeltilerinden 5 farklı konsantrasyonu kullanılarak aktivite ölçümü yapıldı. Elde edilen değerlerle Microdoft Excell kullanılarak Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Grafikten elde edilen eğrinin denkleminden K_m ve V_{max} değerleri belirlendi. $NADP^+$, NADPH ve GSSG için GR enzimlerinde K_m ve V_{max} değerleri belirlendi.

GR Enzimine bazı Metal İyonlarının İnhibisyon Etkisi: Bilimin gelişmesiyle sanayi ve teknolojik olaylar artması nedeniyle günümüzde pek çok canlı, metallerin etkilerine maruz kalabilmektedir. Yapılan bu çalışmalar kapsamındaki metallerin kompost solucan dokusundan afinite kromotografisiyle saflaştırılan GR enzimi aktivitesi üzerindeki etkileri araştırıldı. Enzimi inhibeye uğratan bu metaller $Cu(NO_3)_2.3H_2O$, $ZnSO_4.7H_2O$, $Fe(NO_3)_3.9H_2O$ ve $Pb(NO_3)_2$ kullanılarak substratın konsantrasyonu sabit tutulup beş farklı inhibitör konsantrasyonu içindeki IC_{50} değerleri ile % aktivite-[I] grafikleri çizildi.

4. BULGULAR

4.1 Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik

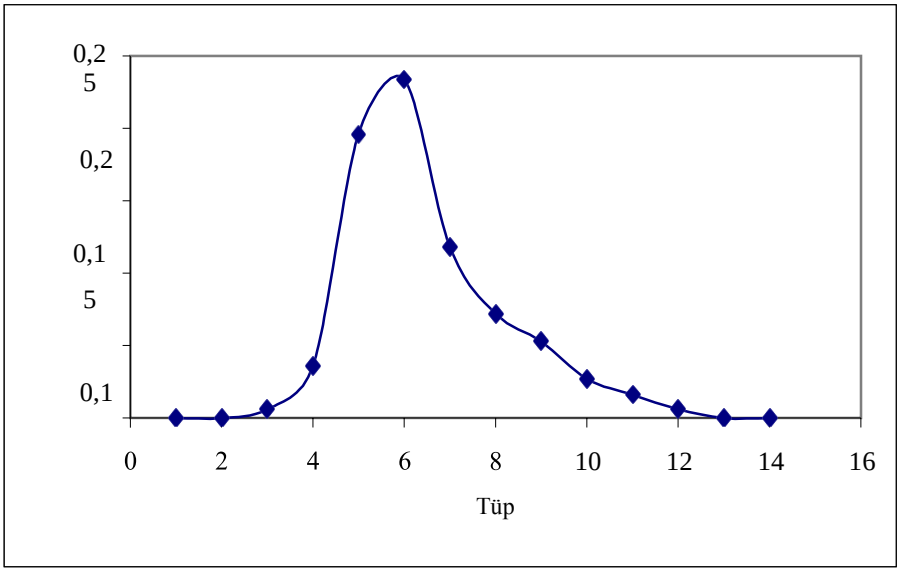
Afinite kromotografisinden elde edilen enzim elüatlarında kantitatif protein miktarı Şekil 4.1'deki grafikten yararlanılarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.1 Kantitatif protein tayini grafiği.

Saflaştırma sonuçları: Hazırlanan homojenat süzüldükten sonra afinite kolonuna uygulandı. Yıkama işleminden sonra GR enzimi elüsyonlama yapıldı. Elüatlar ependorf tüplerine 1,5 mL'lik hacimlerle alındı. Elüatlarda 340 nM'de enzim aktiviteleri ölçüldü ve aktivite gösteren tüpler birleştirildi. Enzim ünitesi-tüp sayısı grafikleri aşağıda verilmiştir. Saflaştırma basamakları ve saflaştırma değerleri çizelgeler halinde verilmiştir

Kompost solucan dokusundan saflaştırılan GR enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılması ile ilgili elüsyon grafiği Şekil 4.2'de ve saflaştırma basamaklarının sonuçları Şekil 4.3'de verilmiştir.



Şekil 4.2 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisinden saflaştırılan GR enziminin grafiği.

Çizelge 4.1 Kompost solucan GR enziminin saflaştırılması basamakları ve tablosu

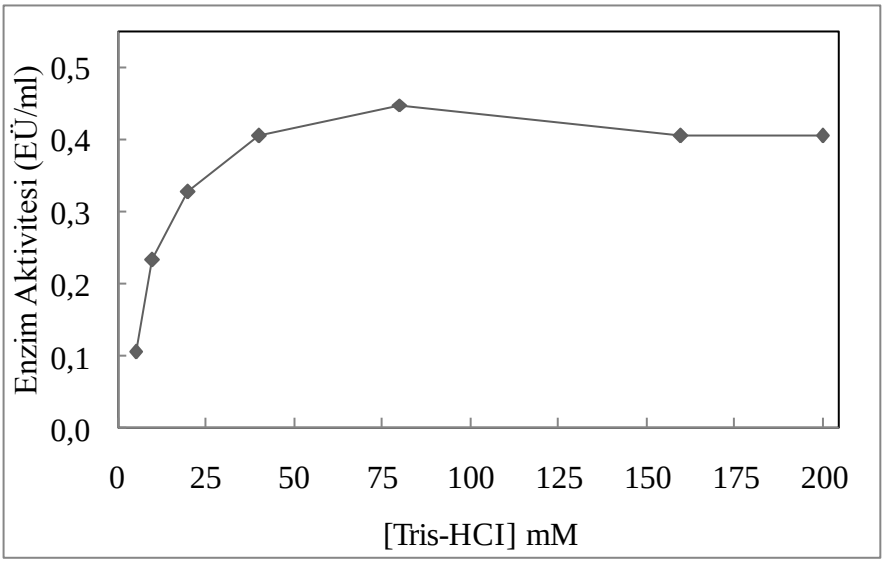
Saflaştırma basamakları	Toplam hacim (ml)	Aktivite (EÜ/ml)	Toplam aktivite (EÜ)	Protein miktarı (mg/ml)	Spesifik aktivite (EÜ/mg)	% verim	Saflaştırma katsayısı
Homojenat	16	0,06	0,96	0,515	0,12	100	1
Afinite kromatografisi	6	0,11	0,67	0,001	81,51	69,17	652,27

Yapılan çalışma sonucunda, enzim %69,17 verim ile 652,27 kat saflaştırılmıştır.

4.2 Kompost Solucan Dokusundan Saflaştırılan GR Enziminin Optimum Şartlarının Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar

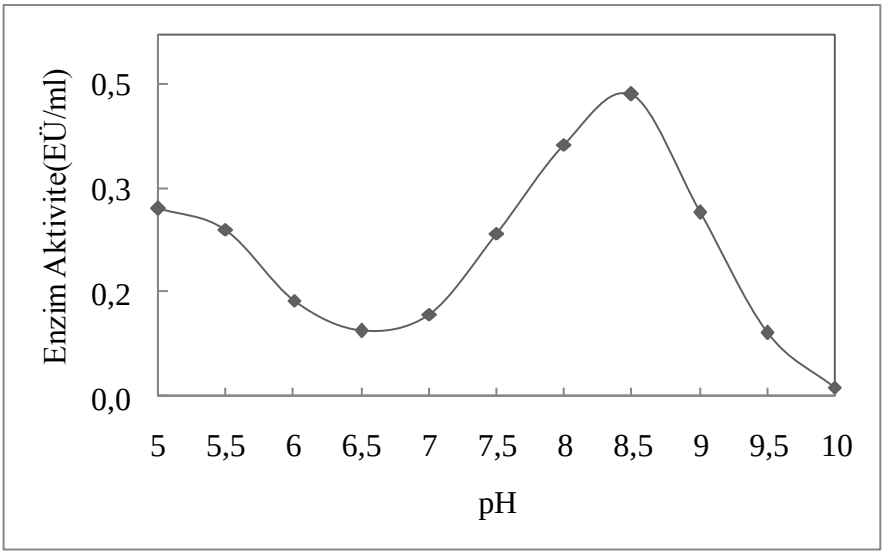
Kompost solucan dokusundan saflaştırılan GR enziminin optimum iyonik şiddetine ait sonuçlar: Kompost solucan dokusundan elde edilen GR enziminin aktivitesinin belirlenmesinde uygun olan iyonik şiddeti bulmak amacıyla daha önceki çalışmalardaki

uygun olarak belirlenen Tris-HCl tamponunun gerekli olan pH'daki farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan konsantrasyonlardaki aktivite ölçümlerine dayanarak bir grafik çizildi. Yukarıdaki anlatılanlardaki çalışmalar sonucunda kompost solucan dokusu GR enzimine ait uygun olan tampon derişimi 50 mM Tris-HCl, pH=8,0 tamponu olduğu belirlenmiştir. Grafiği şekil 4.3'de verilmiştir.



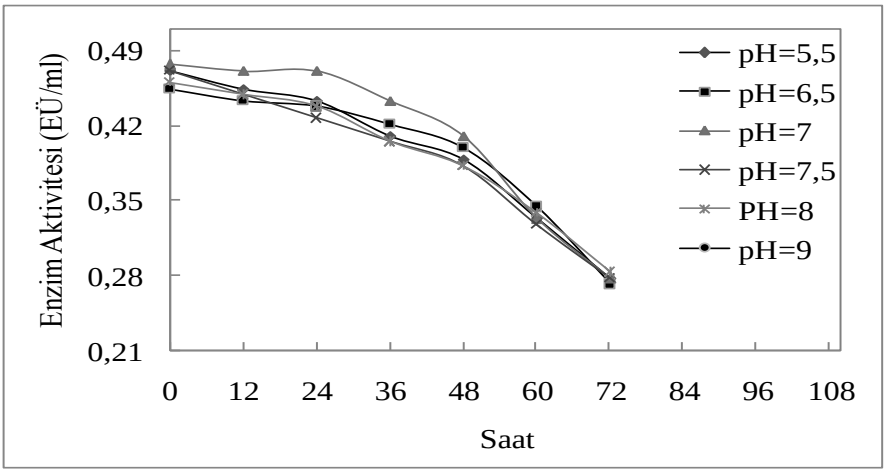
Şekil 4.3 GR enziminin iyonik şiddetin belirlenmesi amacıyla çizilen grafik

Kompost solucan dokusundan saflaştırılan GR enziminin optimum pH' sına ait sonuçlar: Kompost solucan dokusundan elde edilen gulutatyon redüktaz enziminin optimum pH'sı; 7,5-9,0 aralığında 50 mM Tris-HCl ve pH'sı 5,5-8,0 aralığında 50 mM potasyum fosfat tampon çözeltilerindeki enzimin aktivitelerinin spektrofotometrik sonuçlara göre kompost solucan dokusu GR enziminin 50 mM Tris-HCl pH=8,0 olarak belirlenmiştir. Grafik şekil 4.4'de verilmiştir.



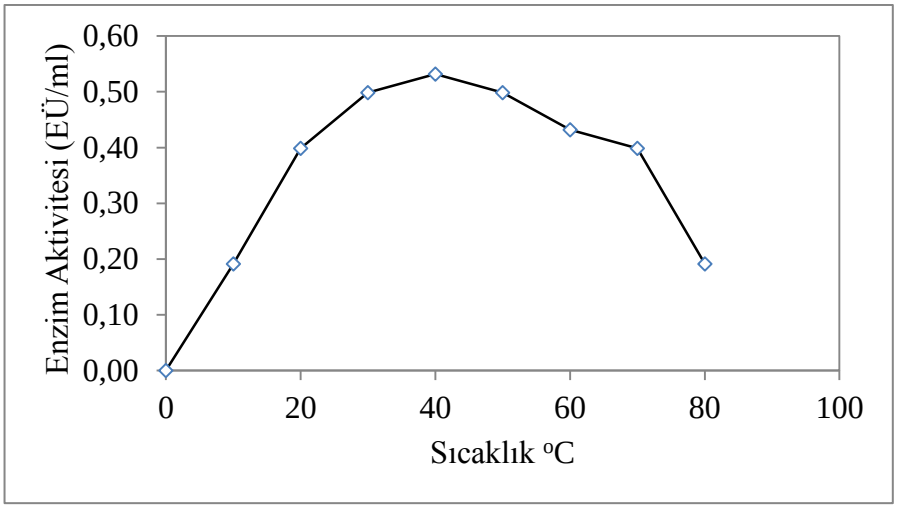
Şekil 4.4 GR enziminin optimum pH'sının belirlenmesine yönelik aktivite ölçümlerinin sonucunu gösteren grafik

Kompost solucan dokusundan saflaştırılan GR enziminin stabil pH' sına ait sonuçlar: bu enzimin optimum pH'sı; 7,5, 8,0, 8,5, ve 9,0 değerlerinde 50 mM Tris-HCl ve pH 'ları 5,5, 6,0, 7,0, 7,5, 8,0 aralığında 50 mM potasyum fosfat tampon çözeltileri içindeki enzimin aktiviteler sonuçlara göre kompost solucan dokusu glutatyon redüktaz enziminin stabil pH' sı 50 mM Tris-HCl tamponununda 8,5 olarak bulunmuştur. Grafiği şekil 4.5'de verilmiştir.

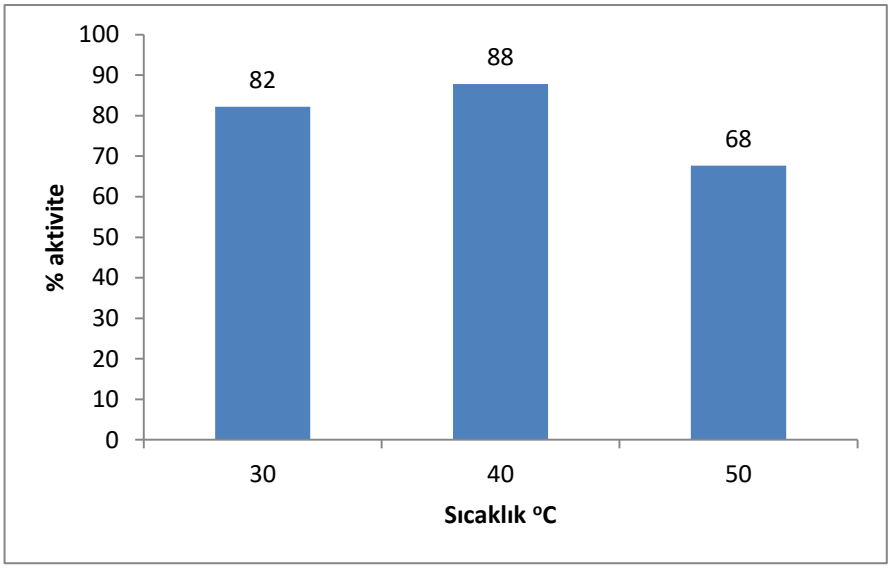


Şekil 4.5 Farklı pH değerlerine sahip 50mM Tris HCl tampon çözeltisindeki GR enzimine ait stabil pH grafiği

Optimum sıcaklığın belirlenmesi için optimum pH' ya ve ideal tampon konsantrasyonuna sahip 50 mM Tris HCl pH=8,0 tampon çözeltisi kullanıldı. 0ºC ve 90ºC arasında her 10ºC bir sonuç alınarak optimum sıcaklık 40ºC olarak belirlendi. Grafikleri şekil 4.6 ve 4.7'de verilmiştir.



Şekil 4.6 GR enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesi için çizilen grafik.



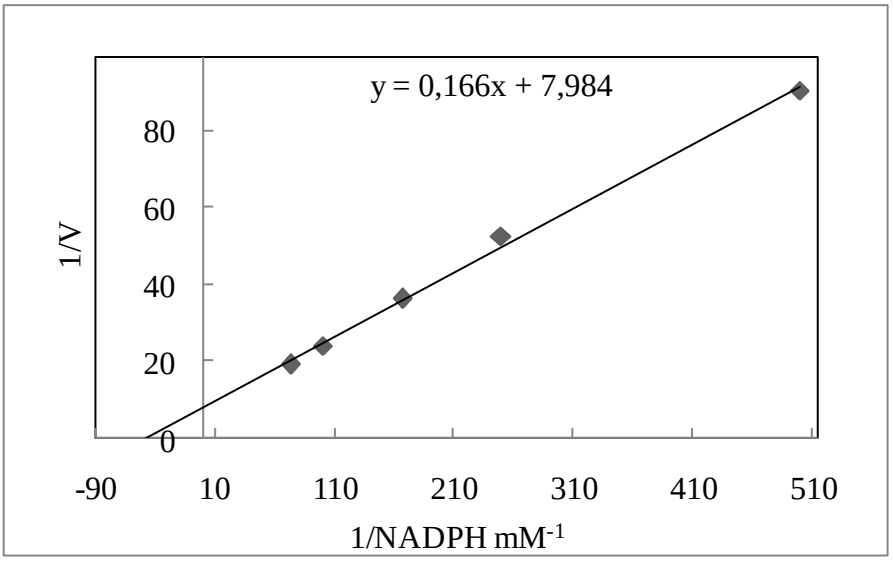
Şekil 4.7 GR enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesi için çizilen grafik

4.3 Substrat ve Coenzim İçin K_m ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi

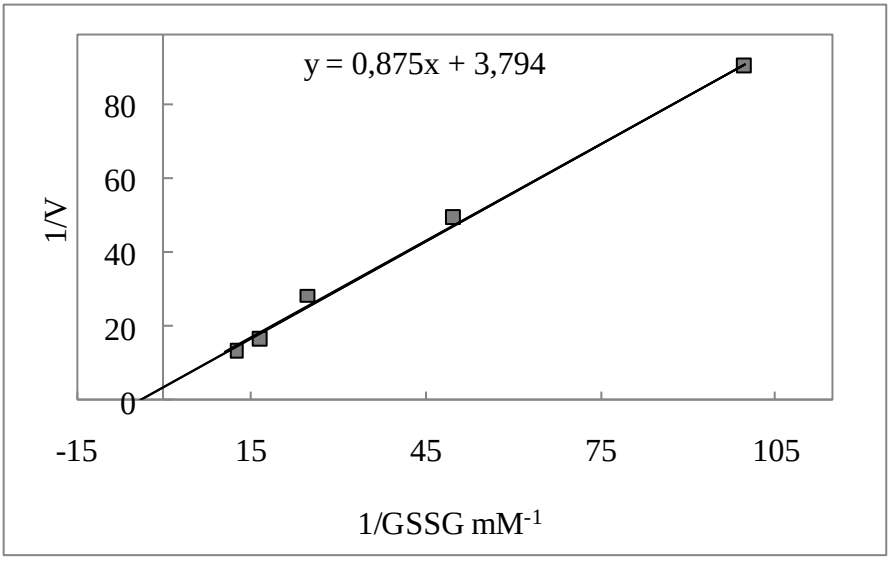
Kompost solucan dokusu glutatyon redüktaz enziminin subsratı GSSG ve coenzimi NADPH için KM ve Vmax değerlerinin belirlenmesi amacıyla, sabit GSSG derişiminde NADPH'ın 5 farklı konsantrasyonlarıyla aktivite ölçümleri yapılarak absorbans değerleri alındı. Elde edilen absorbans değerleri ile excelde 1/V-1/[NADPH] Lineweaver-Burk grafiği çizildi ve grafik üzerindeki eğrinin denklemindan yararlanarak NADPH'ın Km ve Vmax değerleri hesaplandı. Benzer bir metot ile NADPH'ın sabit derişiminde GSSG'nin 5 farklı konsantrasyonuyla aktivite ölçümleri yapılarak 1/V-1/[GSSG] Lineweaver-Burk grafiği çizildi ve GSSG için Km ve Vmax değerleri eğrilerin denkleminden elde edildi. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre NADPH için Km değeri 0,055 mM ve Vmax değeri 0,143 EÜ/mL olarak; GSSG için ise, K_m değeri 0,025 mM ve Vmax değeri 0,098 EÜ/mL olarak tespit edildi. Aktivite ölçümleri deneysel olarak belirlenen optimal koşullarda gerçekleştirildi. K_M ve V_{max} değerleri çizelge 4.2' de verilmiştir. Grafikleri şekil 4.8 ve 4.9'da verilmiştir.

Çizelge 4.2 Kompost solucan dokusu GR enziminin subsratları için bulunan K_M ve V_{max} değerleri

Substratlar	K_M (mM)	V_{max} (EÜ/mL)
NADPH	0,020	0,125
GSSG	0,230	0,263



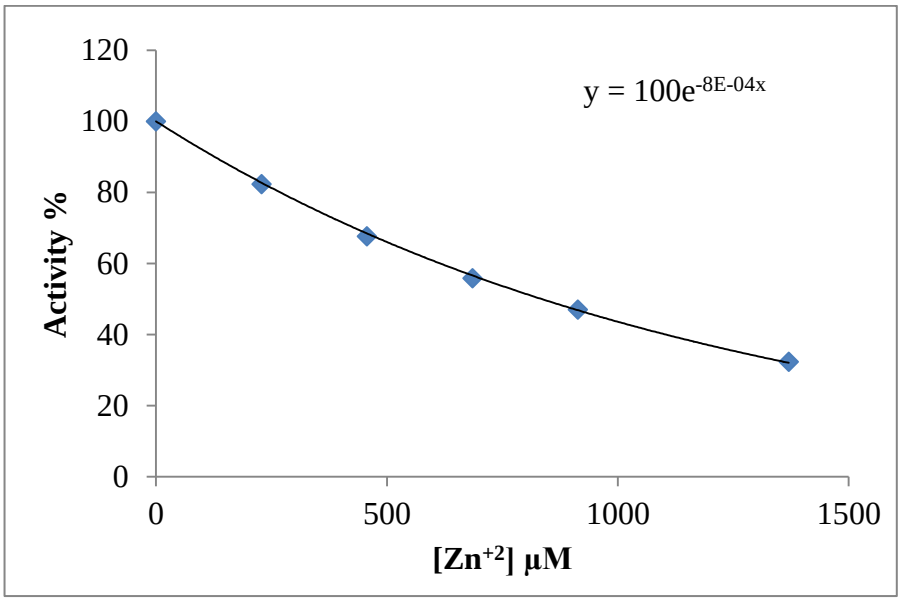
Şekil 4.8 5 farklı NADPH derişimi kullanılarak GR enzimi için çizilen grafik.



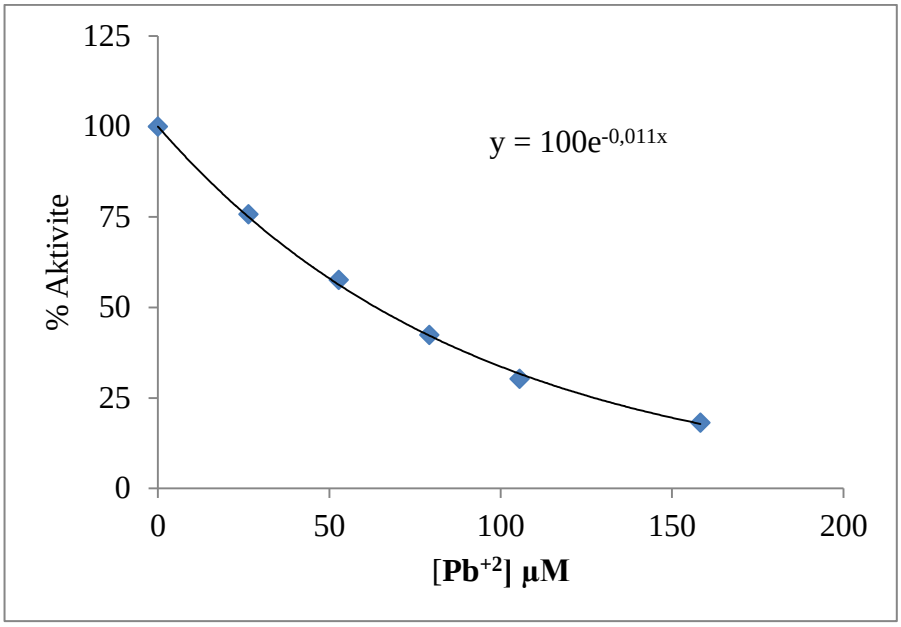
Şekil 4.9 5 farklı GSSG derişimi kullanılarak GR enzimi için çizilen grafik

4.4 Kompost Solucan Dokusundan Saflaştırılan GR Enzimi Aktivitesine Bazı Metal İyonlarının İnhibitör Etkilerinin Sonuçları

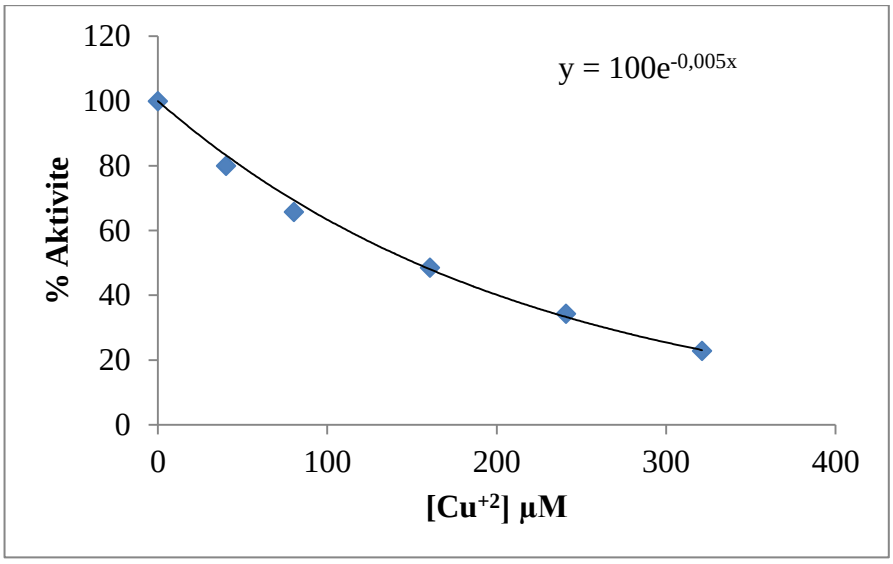
Kompost solucan dokusundan 2',5'-ADP sepharose 4B afiniti kromatografisi ile saflaştırılan GR enzimi için $Cu(NO_3)_2.3H_2O$, $Zn(NO_3)_2.6H_2O$ ve $Fe(NO_3)_3.9H_2O$ $Pb(NO_3)_2$ belirlenen stok çözeltiler hazırlandı. Bu çözeltilerdeki metal iyonlarının konsantrasyonları ve % aktivitesi değerlerinin GR enzimi üzerine inhibe etkisi araştırıldı. Grafikler Şekil 4.10, 4.11, 4.12 ve 4.13' de verilmiştir.



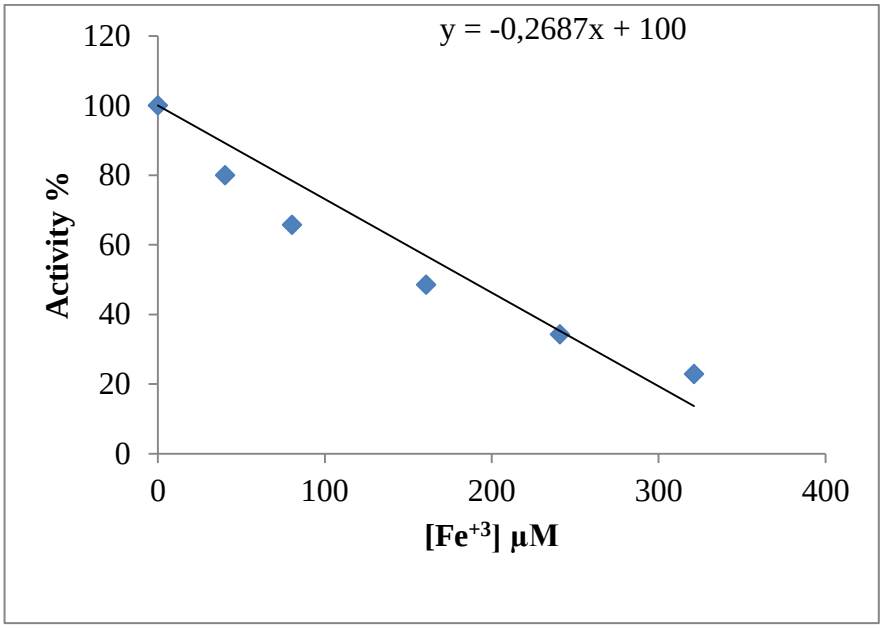
Şekil 4.10 6 farklı Zn^{+2} konsantrasyonundaki GR enzimine ait %aktivite Zn^{+2} grafiği.



Şekil 4.11 6 farklı Pb^{+2} konsantrasyonundaki GR enzimine ait %aktivite-Pb^{+2} grafiği.



Şekil 4.12 6 farklı Cu^{+2} konsantrasyonundaki GR enzimine ait %aktivite Cu^{+2} grafiği.



Şekil 4.13 6 farklı Fe^{+3} konsantrasyonundaki GR enzimine ait %aktivite F^{+3} grafiği.

.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Glutatyon canlı hücrelerdeki metabolik prosesler için hayati öneme sahip olan bir metabolittir. Aşağıda katalizlenen reaksiyon sonucu oluşmaktadır.

$$GSSG + NADPH \xrightarrow{GR} 2GSH + NADP^{+}$$

Bu reaksiyonu katalizleyerek indirgenmiş glutatyonun oluşmasını sağlayan glutatyon redüktaz enzimi üzerine yapılan çalışmalar da canlı organizmalar için oldukça önemlidir.

Reaksiyon sonucu elde edilen GSH'ın metabolizmadaki görevi metabolizmadaki görevi önemlidir. Antioksidan ajan olan GSH aynı zamanda bazı enzimlerin substratı olarak da görev yapar. Bu reaksiyonlar reaktif oksijen ürünlerinin hidrojen perokside dönüşmesi peroksit ajanlarının zehirsizleştirilmesi reaksiyonları olarak sayılabilir (Becker *et al.* 2001, Böhme *et al.* 2000, Knapen *et al.* 1999, Nordhoff *et al.* 1993, Savvides *et al.* 2002).

İnsan eritrosit GR enziminin amino asit analizi ve x-ray kristalografisi çalışmaları yapılarak enzimin yapısı belirlenmiştir. Her alt biriminin 478 amino asitten oluştuğu ve Cys-90 amino asitinin oluşturduğu disülfit bağıyla birleştiği belirlenmiştir. Enzimin aktif bölgesinin arginin, tirozin ve histidin amino asitlerinin oluşturduğu yapılan çalışmalar sonucunda saptanmıştır (Douglas and Wind 1987).

Yaptığınız çalışmalar sonucunda GR enzimini kompost solucan dokusundan saflaştırıp karakterize edildikten sonra kinetik özellikleri incelendi.

kompost solucan dokusundan GR enziminin saflaştırılması amacıyla öncelikle homojenat hazırlandı. Homojenize edilen ve santrifüjlenen numune süzüldü ve sonra 2',5'-ADP sepharose 4B afinite kolonuna uygulandı. Saflaştırma işlemleri yapılırken sıcaklığın kontrol altında tutulması gerekiyordu. Bu nedenle saflaştırma işlemleri +4 ºC'de gerçekleştirildi. Böylece mümkün olduğu kadar aktivite kaybı önlendi.

Saflaştırma basamaklarından elde edilen sonuçların literatüre uyumlu olduğu sağlandı.

Kompost solucan dokusundan saflaştırılan GR enziminin optimum pH değeri Tris-HCl tamponunda 8,0 olarak belirlendi. Literatürde domuz eritrositleri için 7,0 insan eritrositi için 8,0, buzağı karaciğeri için 7,0, sığır eritrositleri için 7,3 olduğu literatürde geçmektedir. Elde ettiğimiz değerler literatür değerleriyle benzerlik göstermektedir (Boggaram *et al.* 1979, Erat 2002b).

Kompost solucan dokusundan saflaştırılan GR enziminin stabil pH değeri Tris-HCl tamponunda pH=8,5 olarak tespit edildi. Literatürde stabil pH çalışması ile ilgili sığır eritrositleri GR enzimi için pH=7,3 olarak bulunmuştur(Erat 2002b).

Yapılan çalışmalarda enzimin optimum sıcaklığı 40 ºC olarak bulundu. Literatürde sığır eritrositlerin GR enzimi için optimum sıcaklığı 55 ºC koyun karaciğeri için 60 ºC olarak bulunmuştur (Erat 2002b). Bulduğumuz optimum sıcaklık değeri diğer değerlerle paralellik göstermektedir.

Yaptığımız çalışmalarda enzimin optimum iyonik şiddeti 50 mM Tris-HCl tamponu olarak tespit edildi. Literatürde sığır eritrositlerindeki glutatyon redüktaz enziminin optimum iyonik şiddeti 435 mM fosfat tamponu, koyun karaciğeri için 50 mM Tris olarak bulunmuştur (Erat 2002b). Yaptığımız çalışmalar sonucunda iyonik şiddeti değeri koyun karaciğeri ile aynı iken sığır eritrosit değerlerinden oldukça farklıdır.

GR enziminin doğal substratı GSSG'dir. GSSG için bulunan K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 0,025 mM ve 0,098 EÜ/mL şeklindedir. GR enziminin diğer bir substratı olan NADPH için ise bu değerler sırasıyla 0,055 mM ve 0,143 EÜ/mL olarak bulunmuştur. Literatürde sığır eritrosit GR enziminde GSSG için K_M ve V_{max} değerleri sırası ile 0,149 mM ve 0,676 EÜ/mL. NADPH için ise 0,0714 mM ve 0,0931 EÜ/mL, koyun karaciğerinde GSSG için 0,0239 mM ve 0,255 EÜ/mL, NADPH için ise 0,0258 mM ve 0,266 EÜ/mL olarak bulunmuştur (Erat 2002a).

Metaller doğada bulunmaktadırlar. Doğada bulundukları için bozulmaları beklenmez. Çeşitli yollarla canlı organizmaya girdiklerinde metabolizmaya ciddi zararları olur. Çevremizde çeşitli şekillerde bulunan metallerin kolay kolay bozulmaması ve yok edilememesi enzimlere metal iyonlarının etkisi üzerine çalışılmasını önemli bir yere getirmiştir. Çünkü havaya, nehirlere ve denizlere karışan atıklar içerisinde bulunan veya bulunabilecek metaller insanların en fazla tükettikleri balıklar gibi birçok besin maddesi vasıtası ile vücudumuza girmekte ve atılamayarak biyobirikime sebep olmaktadır. Bunun sonuçları ise günümüzde tartışılmaz boyuttadır.

Kompost solucan dokusu kullanılarak saflaştırılan GR enzimine metal iyonlarının inhibisyon etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmalar doğrultusunda $Cu(NO_3)_2.3H_2O$, $Fe(NO_3)_3.9H_2O$, $Pb(NO_3)_2$ ve $ZnSO_4.7H_2O$ maddelerinin etkisi araştırılmıştır.

Yapılan bu çalışmalar doğrultusunda yapılacak olan değerlendirmede kompost solucan dokusundan saflaştırılan GR enzimi hayati öneme sahip olan GSH/GSSG oranını kontrol altında tuttuğu için GR enzimini inhibe ederek bu dengeyi bozabilecek olan bu maddelerin kullanımında son derece dikkatli olunup kullanımına dikkat edilmelidir.

Yukarıda verilen sonuçlara göre tüm canlı organizmalarda önemli bir yere sahip olan glutatyon redüktaz enzimi kompost solucan sokusundan 2',5'- ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi sayesinde tek bir basamakta ve saflık yüzdesi olarak iyi bir değerde elde edildi. Enzimin karakteristik ve kinetik özellikleri belirlendi. Ayrıca bu dokudan elde edilen GR enzimi aktivitesi üzerine 6 farklı metal iyonunun inhibisyon etkisi araştırıldı ve düşük konsantrasyonlarda bile bu iyonların enzimi inhibisyona uğrattıkları tespit edildi. Daha sonra, Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek inhibisyon tipleri belirlendi. Bu inhibisyon alabalıklarda asit-baz dengesi, osmoregülasyon ve iyon regülasyon gibi fizyolojik fonksiyonlara zarar verebilir. Ayrıca tatlı su balıklarında GR üzerine toksikolojik bilgilerin az olmasından dolayı bu enzimin Cu^{+2}, Fe^{+3}, Pb^{+2} ve Zn^{+2} metal iyonlarına karşı duyarlılığı toksikolojik alanda bu enzim üzerine yapılacak çalışmalara temel teşkil edecektir.

Enzim inhibisyonu gibi biyokimyasal değişiklikler çevresel sağlığın indikatörleri olarak kullanılmaktadır. Biyokimyasal değişiklikler suda yaşayan organizmalar üzerine kimyasalların zararlı etkilerinin gözlemlenmesinde hızlı ve hassas araçlardır. Bu nedenle GR enzimi çevresel kirliliğin kalitatif tayininde biyomarker olarak kullanılması daha doğru bir tercih olur.

Başka bir konu ise toprak insanların yaşamı için vazgeçilmezdir. Onun kendi içindeki dengesinin bozulması toprağın verimliliğini de önemli oranda düşürecektir. Özkan ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada Antalya'da sera sebzeciliğinde, tarım ilaçlarında, önerilen dozdan daha fazlasının kullanıldığını ortaya koymuştur (ÖZKAN *et al.* 2002). Yoğun aşırı-kimyasal kullanımı çevreye ve insan sağlığına olumsuz ciddi zararları olur. Ayrıca, aşırı dozlarda uygulanan pestisitler, bitki patojen ve zararlılarında dayanıklılığı teşvik etmektedir (DELEN *et al.* 2005). Metal toksisitesi toprak için diğer önemli bir kirleticidir. Sanayideki gelişmelerle havaya ve toprağa salınan metaller, sular ve çeşitli hava olayları ile çok farklı bölgelere taşınmaktadır. Yapılan bazı çalışmalarda metal iyonlarının solucanların üzerinde olumsuz etkilerini tespit edilmiştir (Spurgeon *et al.* 1994). Toprak solucanı, toprağın biyokimyasal içeriğinin oluşmasında önemli katkısı vardır. Onun hayat kalitesinin çeşitli kirleticilerle tehdit edilmesi toprak içinde önemli tehdit oluşturmaktadır. Bu nedenle yapılan çalışma önem kazanmaktadır.

KAYNAKLAR

Acan, N. and Tezcan, E. 1989. Sheep brain glutathione reductase: purification and general properties. FEBS letters, 250, 72-74.

Amador, J.A. and Görres, J.H. 2007. Microbiological characterization of the structures built by earthworms and ants in an agricultural field. Soil biology and biochemistry, 39, 2070-2077.

Arrick, B.A. and Nathan, C.F. 1984. Glutathione metabolism as a determinant of therapeutic efficacy: a review. Cancer Research, 44, 4224-4232.

Banni, M. Hajer, A. Sforzini, S. Oliveri, C. Boussetta, H. and Viarengo, A. 2014. Transcriptional expression levels and biochemical markers of oxidative stress in Mytilus galloprovincialis exposed to nickel and heat stress. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 160, 23-29.

Becker, K. Herold-Mende, C. Park, J.J. Lowe, G. and Schirmer, R.H. 2001. Human thioredoxin reductase is efficiently inhibited by (2, 2 ‘: 6 ‘, 2 ‘‘-terpyridine) platinum (II) complexes. Possible implications for a novel antitumor strategy. Journal of medicinal chemistry, 44, 2784-2792.

Bhat, M. 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. Biotechnology advances, 18, 355-383.

Boggaram, V. Brobjer, T. Larson, K. and Mannervik, B. 1979. Purification of glutathione reductase from porcine erythrocytes by the use of affinity chromatography on 2′, 5′-ADP-Sepharose 4B and crystallization of the enzyme. Analytical biochemistry, 98, 335-340.

Böhme, C.C. Arscott, L.D. Becker, K. Schirmer, R.H. and Williams, C.H. 2000. Kinetic characterization of glutathione reductase from the malarial parasite Plasmodium falciparum: comparison with the human enzyme. Journal of Biological Chemistry, 275, 37317-37323.

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, 248-254.

Carlberg, I. and Mannervik, B. 1975. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. Journal of Biological Chemistry, 250, 5475-5480.

Carlberg, I. and Mannervik, B. 1981. Purification and characterization of glutathione reductase from calf liver. An improved procedure for affinity chromatography on 2′, 5′-ADP-Sepharose 4B. Analytical biochemistry, 116, 531-536.

Carlberg, I. and Mannervik, B. 1985. [59] Glutathione reductase, Methods in enzymology. Elsevier, 484-490.

Cooper, A.J. 1997. Glutathione in the brain: disorders of glutathione metabolism. The molecular and genetic basis of neurological disease, 1245-1245.

Danner, J. Lenhoff, H.M. and Heagy, W. 1977. Affinity chromatography of glutathione reductase: Bound by immobilized GSSG, eluted by NADPH. Analytical biochemistry, 82, 586-590.

Delen, N. Durmuşoğlu, E. Güncan, A. Güngör, N. Turgut, C. and Burçak, A. 2005. Türkiye'de Pestisit Kullanimi, Kalinti ve Organizmalarda Duyarlilik Azalişi Sorunlari. Türkiye Ziraat Mühendisliği, 6.

Demir, H. Erat, M. and Şakiroğlu, H. 2007. In vitro effects of some antibiotics on glutathione reductase obtained from chicken liver. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 30, 513-519.

Douglas, S.P. and Wind, Y. 1987. The myth of globalization. Columbia Journal of world business, 22, 19-29.

Ekinci, D. Çavdar, H. Durdagi, S. Talaz, O. Şentürk, M. and Supuran, C.T. 2012. Structure–activity relationships for the interaction of 5, 10-dihydroindeno [1, 2-b] indole derivatives with human and bovine carbonic anhydrase isoforms I, II, III, IV and VI. European journal of medicinal chemistry, 49, 68-73.

Erat, M. 2002a. İnsan ve sığır eritrosit glutatyon redüktaz enziminin saflaştırılması, bazı ilaç ve kimyasal maddelerin inhibisyon veya aktivasyon etkilerinin araştırılması. Doktora tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 154s.

Erat, M. 2002b. İnsan ve sığır eritrosit glutatyon redüktaz enziminin saflaştırılması, bazı ilaç ve kimyasal maddelerin inhibisyon veya aktivasyon etkilerinin araştırılması. Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk University, Erzurum, Turkey.

Erat, M. 2004. Purification of human erythrocyte glucose 6-phosphate dehydrogenase and glutathione reductase enzymes using 2′, 5′-ADP Sepharose 4B affinity column material in single chromatographic step. Protein expression and purification, 34, 257-260.

Erat, M. and Çİftçİ, M. 2003. In vitro effects of some antibiotics on glutathione reductase from sheep liver. Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry, 18, 545-550.

Fujiwara, Y. Kondo, T. Murakami, K. and Kawakami, Y. 1989. Decrease of the inhibition of lipid peroxidation by glutathione-dependent system in erythrocytes of non-insulin dependent diabetics. Klinische Wochenschrift, 67, 336-341.

Gao, M. Song, W. Zhang, J. and Guo, J. 2013. Effect on enzymes and histopathology in earthworm (Eisenia foetida) induced by triazole fungicides. Environmental toxicology and pharmacology, 35, 427-433.

García-Alfonso, C. Martìnez-Galisteo, E. Llobell, A. Bárcena, J.A. and Lopez-Barea, J. 1993. Horse-liver glutathione reductase: purification and characterization. The International journal of biochemistry, 25, 61-68.

Gul, M. Kutay, F.Z. Temocin, S. and Hanninen, O. 2000. Cellular and clinical implications of glutathione.

Keha, E.E. and Küfrevioğlu, Ö.İ. 2004. Biyokimya. Aktif Yayın Dağıtım.

Knapen, M.F. Zusterzeel, P.L. Peters, W.H. and Steegers, E.A. 1999. Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction: a review. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 82, 171-184.

López- barea, J. and Lee, C.Y. 1979. Mouse- Liver Glutathione Reductase: Purification, Kinetics, and Regulation. European journal of biochemistry, 98, 487-499.

Madamanchi, N.R. Anderson, J.V. Alscher, R.G. Cramer, C.L. and Hess, J.L. 1992. Purification of multiple forms of glutathione reductase from pea (Pisum sativum L.) seedlings and enzyme levels in ozone-fumigated pea leaves. Plant Physiology, 100, 138-145.

Mannervik, B. 1987. The enzymes of glutathione metabolism: an overview. Portland Press Limited.

Meister, A. 1988. Glutathione metabolism and its selective modification. Journal of biological chemistry, 263, 17205-17208.

Montgomery, R. 1996. Biochemistry: a case-oriented approach. Mosby Incorporated.

Muller, F. 2018. Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes: Volume II. CRC Press.

Nelson, D.L. Lehninger, A.L. and Cox, M.M. 2008. Lehninger principles of biochemistry. Macmillan.

Nordhoff, A. Buecheler, U.S. Werner, D. and Schirmer, R.H. 1993. Folding of the four domains and dimerization are impaired by the Gly446. fwdarw. Glu exchange in human glutathione reductase. Implications for the design of antiparasitic drugs. Biochemistry, 32, 4060-4066.

Özkan, B. Akçaöz, H.V. Karaman, S. and Taşcioğlu, Y. 2002. Antalya ilinde serada sebze üretiminde pestisit kullanımının ekonomik açıdan değerlendirilmesi. Bahçe, 31.

Richman, P. and Meister, A. 1975. Regulation of gamma-glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. Journal of Biological Chemistry, 250, 1422-1426.

Savvides, S.N. Scheiwein, M. Böhme, C.C. Arteel, G.E. Karplus, P.A. Becker, K. and Schirmer, R.H. 2002. Crystal structure of the antioxidant enzyme glutathione reductase inactivated by peroxynitrite. Journal of Biological Chemistry, 277, 2779-2784.

Scott, E.M. Duncan, I.W. and Ekstrand, V. 1963. Purification and properties of glutathione reductase of human erythrocytes. J. biol. Chem, 238, 3928-3933.

Serrano, A. Rivas, J. and Losada, M. 1984. Purification and properties of glutathione reductase from the cyanobacterium Anabaena sp. strain 7119. Journal of bacteriology, 158, 317-324.

Shohet, S. and Beütler, E. 1986. Glutathione metabolizm of the erythrocyte. Williams Hematologie. The Erythrocyte, Part Four.

Spurgeon, D. Hopkin, S. and Jones, D. 1994. Effects of cadmium, copper, lead and zinc on growth, reproduction and survival of the earthworm Eisenia fetida (Savigny): assessing the environmental impact of point-source metal contamination in terrestrial ecosystems. Environmental Pollution, 84, 123-130.

Tang, W.-W. Zeng, G.-M. Gong, J.-L. Liang, J. Xu, P. Zhang, C. and Huang, B.-B. 2014. Impact of humic/fulvic acid on the removal of heavy metals from aqueous solutions using nanomaterials: a review. Science of the total environment, 468, 1014-1027.

Tekman, B. Ozdemir, H. Senturk, M. and Ciftci, M. 2008. Purification and characterization of glutathione reductase from rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) liver and inhibition effects of metal ions on enzyme activity. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 148, 117-121.

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

Ulusu, G. Erat, M. Çiftçi, M. Şakiroğlu, H. and Bakan, E. 2005. Purification and characterization of glutathione reductase from sheep liver. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 29, 1109-1117.

Ulusu, N.N. and Tandoğan, B. 2007. Purification and kinetic properties of glutathione reductase from bovine liver. Molecular and cellular biochemistry, 303, 45-51.

Worthington, D.J. and Rosemeyer, M.A. 1976. Glutathione reductase from human erythrocytes: catalytic properties and aggregation. European Journal of Biochemistry, 67, 231-238.

Zeng, G. Chen, M. and Zeng, Z. 2013a. Risks of neonicotinoid pesticides. Science, 340, 1403.

Zeng, G. Chen, M. and Zeng, Z. 2013b. Shale gas: surface water also at risk. Nature, 499, 154-154.

Zubay, G. 1988. Biochemistry 2nd. Ed. Chapter 19: Catabolism of amino acids. Macmillan Publishing Company, New York.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Hüseyin CAYMAK

Eğitim

Yüksek Lisans	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı	2021-Halen
	Yeni Yüzyıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İş Sağlığı ve Güvenliği	2017
Lisans	Kilis 7 Aralık Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü	2009-2013

İş Deneyimi

Yıl	**Kurum**	**Görev**
2013- Halen	Özel Eğitim kurumları	Kimya Öğretmeni

Akademik Aktiviteler