ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KOMPOST SOLUCANINDAN 6-FOSFOGLUKONAT DEHİDROGENAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE BAZI TOPRAK KİRLETİCİLERİN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Uğur TOPSAKAL

KİMYA ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2019

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Uğur TOPSAKAL tarafından hazırlanan "**KOMPOST SOLUCANINDAN 6-FOSFOGLUKONAT DEHİDROGENAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE BAZI TOPRAK KİRLETİCİLERİN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**" adlı tez çalışması 28/03/2019 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. Şevki ADEM

Üye: Doç.Dr. Volkan EYÜPOĞLU

Üye: Dr. Öğr. Üyesi. Beytullah EREN

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Tamer KEÇELİ

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KOMPOST SOLUCANINDAN 6-FOSFOGLUKONAT DEHİDROGENAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE BAZI TOPRAK KİRLETİCİLERİN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Uğur TOPSAKAL

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Şevki ADEM

Sunulan bu tez kapsamında, kompost solucanından 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enziminin saflaştırılmıştır. Optimum pH, optimum iyonik şiddet, optimum aktivite gösterdiği sıcaklık, KM ve Vmax değerlerinin belirlenmesi, gibi biyokimyasal karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır.

Ayrıca oxamyl, carbaryl, diniconazole, metalaxyl, methomyl, carbofuran, simazine, tebuconazol, atrazine, propoxur, 1- naphthol, 2,4 – D gibi pestisitlerinin ve $Pb(NO_3)_2$, $Cr(NO_3)_2$, $HgCI_2$, $FeSO_4$, $Ni(NO_3)_2$, $Cd(NO_3)_2$, $Co(NO_3)_2$, $AI(NO_3)_3$ metal iyonlarının *Eisenia Foetida* saflaştırılan glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enziminin aktivitesi üzerinde etkilerini araştırdık. Bu kirleticilerin çalışılan konsantrasyonlarda herhangi bir etkisi tespit edilmedi. Ayrıca bazı organik çözücülerin etkileri araştırıldı. Bunlardan etanol, asetonitril, bütanolün inhibisyon etkisi gösteririken, DMSO enzim üzerinde aktivasyon etkisi göstermiştir.

2019, …….. sayfa

Anahtar Kelimeler: 6-fosfoglukonat dehidrogenaz, saflaştırma, karakterizasyon inhibisyon, pestisit, metal iyonu, organik çözücü

ABSTRACT

MSc. Thesis

PURIFICATION, CHARACTERIZATION OF THE 6-PHOSPHOGLUCONATE DEHYDROGENASE (6PGD) ENZYME FROM THE COMPOST SOLUTION AND THE INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF SOME SOIL POLLUTERS

Uğur TOPSAKAL

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

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Şevki ADEM

Within the scope of this thesis, the glucose-6-phosphate dehydrogenase enzyme from the compost worm was purified. Biochemical characterization studies of the enzyme such as optimum pH, optimum ionic intensity, optimum activity display temperature, content of K_M and V_{max}, were determined.

Also, the effects of pesticides such as oxamyl, carbaryl, dinaconazole, metalaxyl, methomyl, carbofuran, simazine, tebuconazole, atrazine, propoxur, 1- naphthol, 2,4-D and metal ions such as $Pb(NO_3)_2$, $Cr(NO_3)_2$, $HgC1_2$, $FeS0_4$, $Ni(NO_3)_2$, $Cd(NO_3)_2$, $Co(NO_3)_2$, $AI(NO_3)_3$ on the activity of *Eisenia Foetida* glucose-6-phosphate dehydrogenase activity were investigated. No effect of determined concentrations of these pollutants could be detected. In addition, the effects of some organic solvents were investigated. While ethanol, acetonitrile, ethanol showed inhibition effect, DMSO showed activation effect on the enzyme.

2019, 58 page

Key Words: glucose - 6-phosphate dehydrogenase, purification, characterization inhibition, pesticide, metal ion, organic solvents

ÖNSÖZ

Enzimler biyolojik katalizörlerdir. Canlılarda meydana gelen kimyasal reaksiyonların büyük bir çoğunluğu enzimlerin kontrolünde gerçekleşmektedir. Bu nedenle biyokimya çalışmalarında çok önemli bir yer tutmaktadır. Bu tez kapsamında, bir kompost solucanı olan *Eisenia Fetida* (Savingy, 1826) 6-fosfaoglukonat dehidrogenaz enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Enzimlerin saflıkları SDS-PAGE ile kontrol edilmiştir. Saflaştırılmış enzimin hangi pH'da optimum aktivite gösterdiği, tuz konsantrasyonunun enzim aktivitesini nasıl etkilediği, enzimin substrat ve koenzime karşı ilgisi, enzim aktivitesinin sıcaklık karşısında nasıl bir değişim gösterdiğinin belirlenme çalışmaları tez kapsamında yapılmıştır.

Ayrıca tez kapsamında; pestisit, metal iyonları ve bazı organik çözücülerin enzim aktivitesi üzerinde etkileri araştırılmıştır.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca, tüm bilgi ve birikimiyle yanımda olan benden desteğini esirgemeyen tez yazımında büyük yardımlarını gördüğüm değerli danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Şevki ADEM' e,

Kendisinin tüm laboratuvar imkanlarından yararlanmamı sağlayan sayın Doç. Dr. Volkan EYÜPOĞLU' na

Tez çalışmalarım boyunca bana yardımlarını esirgemeyen Naciye KAYHAN ve Çağlar GÜLER'e ,

Beni her zaman destekleyen ve yanımda olan eşim Kübra Gülnur TOPSAKAL ve canım kızım Zeynep Derin TOPSAKAL'a teşekkürü borç bilirim.

Bu çalışma Çankırı Karatekin Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü Araştırma Laboratuvarında yapılmıştır. Çalışmalara desteklerinden dolayı bölüm çalışanlarına teşekkür ederim.

Bu çalışma Çankırı Karatekin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Birimi tarafından desteklenmiştir.

Uğur TOPSAKAL
ÇANKIRI, 2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET i
ABSTRACT ii
ÖNSÖZ iii
TEŞEKKÜR iv
SİMGELER DİZİNİ vi
ŞEKİLLER DİZİNİ vii
ÇİZELGELER DİZİNİ viii
1. GİRİŞ 1
1.1. GENEL BİLGİLER 2
Pentoz Fosfat Yolu ve 6-Fosfoglukonat dehidrogenaz 4
2. LİTERATÜR ÖZETİ 7
3. GEREÇ VE YÖNTEM 10
3.1. Gereç 10
3.2. Yöntem 16
3.2.1. Enzim saflaştırılması çalışmaları 16
3.2.2. SDS- Poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim saflığının belirlenmesi 17
3.2.3. Enzim aktivitelerinin ölçülmesi 18
3.2.4. Kantitatif protein tayini 19
3.2.5. Enzimlerin biyokimyasal karakterizasyonu 20
3.2.6. Kirleticilerin etkilerinin belirlenmesi 21
4. BULGULAR 22
5. TARTIŞMA ve SONUÇ 29
KAYNAKLAR 32

SİMGELER DİZİNİ

mM	Milimolar
µM	Mikromolar
gr	Gram
mL	Mililitre
mg	Miligram
%	Yüzde
EÜ	Enzim Ünitesi
ES	Enzim substrat kompleksi
GSH	İndirgenmiş Glutatyon
Ki	İnhibisyon katsayısı
Km	Enzimin aktif bölgelerinin yarısının dolduğu subsrat konsantrasyonu
Vmax	Maksimum hız
G6PD	Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz
6PGD	6-Fosfoglukonat dehidrogenaz
$NADP^+$	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (okside form)
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
IC_{50}	Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
BSA	Bovin serum albümin
DTT	Dityotretiol
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilendiamin
Tris	Trihidroksimetil amino metan

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. Kantitatif protein tayininde kullanılan standart grafik……..……..…23

Şekil 4.2. Solucan G6PD enziminin 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi ile saflaştırılması grafiği……...……24

Şekil 4.3. Solucan saflaştırılan 6PGD enziminin SDS-PAGE fotoğrafı ……....25

Şekil 4.4. Enziminin optimum pH'sının belirlenmesine yönelik aktivite ölçümlerinin sonucunu gösteren grafik……..…...26

Şekil 4.5. Enzimin optimum tuz konsantrasyonun belirlenmesi amacıyla çizilen grafik……..…….26.

Şekil 4.6. Enzimin sıcaklık aktivitesinin belirlenmesi amacıyla çizilen grafik…….…...27

Şekil 4.7. Solucan 6PGD enziminin KM ve Vmax değerlerini bulmak için 5 farklı G6P derişimi kullanılarak çizilen grafik……..28

Şekil 4.8. Solucan 6GPD enziminin KM ve Vmax değerlerini bulmak için 5 farklı NADP+ derişimi kullanılarak çizilen grafik……..….28

Şekil 4.9. Solucan 6PGD enzimi üzerine organik çözücülerin etkisi……..29

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Farklı türlere ait 6PGD enziminin molekül kütleleri ve alt birim yapısı…..7

Çizelge 2.2. Farklı türlere ait 6PGD enziminin bazı kinetik özellikleri……9

Çizelge 3.1. 6PGD enziminin aktivite ölçüm küveti içeriği……19

Çizelge 3.2. Pestisitlerin ve metal iyonlarının çalışılan konsantrasyonu……22

Çizelge 4.1. Solucan G6PD enziminin saflaştırılması basamakları……24

Çizelge 4.2. G6PD enziminin optimum şartlarının belirlenmesine yönelik çalışmaların sonuçları……..25

Çizelge 4.3. Solucan G6PD enziminin subsratları için bulunan KM ve V max değerleri……..…27

1. GİRİŞ

Sanayileşmenin hızla artması ve nüfus popülasyonun artması günümüzde çevre kirliliğine neden olmaktadır. Bu kirlilik dolaylı olarak her bir canlıyı etkilemektedir. Çevre kirliliği hem toprak, hem hava, hem de su kirlili olarak doğada meydana gelmektedir. Ancak son zamanlarda toprak kirliliği küresel bir sorun haline gelmektedir. Bu sorunun genellikle tarımda etkisini büyük bir oranda göstermektedir. Oysa ki toprak insanlar için önemli bir besin kaynaklarından biridir. Başlıca toprak kirleticileri, ağır metaller, pestisitler, organik bileşikler ve radyoaktif hidrokarbon yanma ürünleri tarafından oluşturulduğu bilim adamları tarafından bildirilmektedir. Ağır metaller, pestisitler ve diğer kirleticilerle kirletilmiş topraklarda tarımsal verimlilikte meydana getirdiği düşüklüğü ve beslenmedeki olumsuz etkileri birlikte düşünüldüğünde tüm canlı sistemlerini etkilediği gerçeği ortaya çıkmaktadır. Bu kirleticiler çevremizde yaşayan canlılarında hayatını ve hayat kalitelerini önemli oranda tehdit etmektedir. Toprağın verimliliğini içindeki canlıların toprağa olan katkısı ile artmakta ve canlılığın devamı oranında kalitesi de artmaktadır. Kompost solucanı toprak biyosisteminin önemli bir parçasıdır. Onun hayatını tehdit eden etmenler toprağıda etkilemekte ve toprağın verimini düşürmektedir.

Pentoz fosfat yolunun ikinci enzimi olan 6-fosfoglukonat dehidrogenaz (EC 1.1.1.44; 6PGD) NADP+ varlığında 6-fosfoglukonat bileşiğini, ribuloz-5-fosfat bileşiğine dönüştürür. Reaksiyon sonucu birçok biyokimyasal reaksiyonda indirgeyici güç olarak kullanılan NADPH oluşur. Oluşan NADPH hücre içinde antioksidan metabolizmasından, yağların sentezine kadar birçok metabolik proseste görev almaktadır . Bu nedenle glukoz 6-fosfat dehidrogenaz metabolik olarak önemli bir yere sahiptir (Stanton, 2012).

Birçok araştırmacı pestisit ve metal iyonlarının farklı canlılardan saflaştırılan enzimler üzerinde etkisini araştırmıştır ve olumlu ya da olumsuz etkilerini rapor etmiştir. Bu çalışmada kompost solucanı olan *Eisenia Fetida* pentoz fosfat yolunun ilk enzimi 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enzimin saflaştırılması, karakterizasyonu ve saflaştırılan

enzimin aktivitesi üzerinde bazı metal iyonları, organik çözücü ve pestisitler etkisi araştırılmıştır.

1.1. GENEL BİLGİLER

Enzimler makromoleküllü biyolijk katalizörlerdir. Kimyasal katalizörler gibi reaksiyonu hızlandıran moleküllerdir. Genel olarak enzimler belirli maddeler arasıdaki belirli reaksiyonları katalize ederler. Hücrelerde organik maddelerin yapılması ve yıkılması sindirim kas kasılması hücre solunumu gibi önemli faaliyetler çeşitli metabolizma reaksiyonlarının sonucudur ve bu reaksiyonlar enzimlerin katalik etkisiyle mümkün olmaktadır. Enzimlerin kimyasal katalizörlerden en önemli farkı özgül(spesifik)olmalıdır.

Canlıları oluşturan moleküller, yani biyomoleküller kinetik yönden oldukça kararlı olup, kendiliğinden kolayca reaksiyon vermezler. Bir hücredeki tüm kimyasal olaylar enzimler aracılığıyla gerçekleştirilir. Biyomoleküllerin kararlılığı şu önemli sonucu sağlamaktadır. Hücre içinde enzimi olmayan bir reaksiyon hemen hemen vuku bulmaz, kendiliğinden reaksiyonlar meydana gelmez. Bunun anlamı, enzimler protein yapısında olduğu ve DNA tarafından şifrelendiği için, bir hücredeki tüm olaylar DNA seviyesinde düzenlenip, kontrol edilmektedir. Buradan enzimleri sadece katalizör özelliği ile nitelemenin eksik bir tanımlama olacağı anlaşılmaktadır. Gerçekten, bu moleküller bir hücreyi diğerlerinden farklı kılan özelliklerine ait bilgilerin DNA' dan aktarılmasının en önemli araçlarındandır (Lehninger 2008).

Proteinler gibi enzimler de basit ve bileşik olarak sınıflandırılabilirler. Bazı enzimler katalizleme fonksiyonlarını yalnız protein yapılarıyla yerine getirebilirken, bazıları da protein yapısında olmayan 'kofaktör' adı verilen gruplara ihtiyaç duyaralar. Kofaktör bir metal iyonu olabildiği gibi, 'koenzim' denilen kompleks bir organik bileşikte olabilir. Bazen aktivite için ikisi de gerekebilir. Enzimler sıcaklıkla denatüre olurken, kofaktörler ısıya dayanıklıdırlar. Katalitik olarak aktif olan enzim-kofaktör kompleksine haloenzim adı verilir. Kofaktörsüz proteine poprotein, enzime ise apoenzim denir. Enzimlerin bir çoğu protein özellikte olup bazı nükleotid yapılı enzimler de

bulunmaktadır. Örneğin ribozomun sentezlenmesini sağlayan RNA yapıya sahip Ribozim isimli enzimler gibi. Bu enzimler hücre içindeki binlerce tepkimenin hızını ve özgüllüğünü kendisini değişikliğe uğratmadan gerçekleştirir. Enzimin etki ettiği bu maddelere de subsrat olarak adlandırılır. Bu tepkimeler sonucunda enzimler substratları farklı moleküller halinde yeni ürünlere dönüştürür. Reaksiyon sonucu oluşan maddeye de ürün denir. Ürün açığa çıktıktan sonra enzim başka bir subsrat molekülünü ürüne dönüştürmek suretiyle çalışmaya devam eder (Granner et al. 2003). Enzimler hücre içinde üretilmelerine karşın hücre dışında da aktivite gösterebilmektedir. Substratlar büyük ya da küçük yapılı olabilirler. Tepkime sonucu oluşturacakları yeni ürünler de büyük ya da küçük olabilirler. Substratların yeni ve farklı ürünlere hızlı bir şekilde dönüştürülmesi için canlı bir hücrede enzimlerin varlığına mutlaka ihtiyaç duyulur. Enzimler belli substratların varlığında çalışır. Kendi substratını seçici özelliktedirler diyebiliriz. Olabilecek tepkimeler arasında belli başlı tepkimleleri hızlandırırlar. Genel olarak çalışma prensibi tepkimenin ihtiyaç duyduğu başlangıç enerjisini azaltmak üzerinedir. Ayrıca enzimler girdikleri tepkimelerden yine bozulmadan ve eksilmeden çıkarlar (Cook and Cleland 2007).

Enzimler katalizledikleri reaksiyonlarını hızlarının enzimlerin kinetik özelliklerinden yararlanarak ifade edilirler. Enzimlerin kinetik özelliğini açıklamada Michaelis-Menten eşitliğinde yer alan değerlerle ifade edilmektedir. KM sabiti enzimin substrata ilgisini ifade ederken, Vmax enzimin katalitik aktivitesini gösterir. Enzim aktivitesi "Enzim Ünitesi" ile ifade edilir. "Enzim Ünitesi", 25°C'de ve optimal şartlarda 1 μmol substratı bir dakikada ürüne dönüştüren enzim miktarı şeklinde tanımlanır. Birim zamanın saniye olduğu uluslararası ölçü birimine göre, saniyede 1 mol madde dönüşümüne sebep olan enzime 1 katal enzim denir. "Spesifik aktivite" 1 mg protein başına enzim ünitesi olarak tanımlanmaktadır. Spesifik aktivite enzim saflığının bir ölçüsüdür ve saflaştırma basamaklarında maksimum ve sabit bir değere ulaşması ile enzimin saf hale geldiği anlaşılır (Keha and Küfrevioğlu 2004).

Dönüşümlü inhibisyonda enzim-inhibitör etkileşmeleri bir denge reaksiyonudur. Bu inhibisyon yarışmalı, yarışmasız veya yarı yarışmalı olabilir. Yarışmalı inhibisyonda inhibitör ile substrat enzimin aynı aktif bölgesine bağlanmakta yarışırlar. İnhibisyon

etkisi, substrat konsantrasyonu arttıkça azalmaktadır. Yarışmalı inhibisyonda KM değeri artar Vmax değişmez. Yarışmasız inhibisyonda, inhibitör ile substrat enzimin farklı bölgelerine bağlandığından genelde inhibisyon etkisi substrat konsantrasyonundan bağımsızdır. Bu inhibisyonda Vmax düşerken KM değişmez. Yarı yarışmalı inhibisyonda, inhibitör ES (enzim-substrat) kompleksine bağlanır. Bu inhibisyonda Vmax ve KM azalır. İnhibitör etkilerini genel olarak yarışmalı ve yarışmasız olarak kesin sınırlarla birbirinden ayırmak mümkün değildir. Genel olarak karışık inhibisyon gözlenir(Keha and Küfrevioğlu 2004).

Pentoz Fosfat Yolu ve 6-Fosfoglukonat dehidrogenaz

Pentoz fosfat yolu adlandırılırken pentoz yan yolu, heksoz mono fosfat yolu ya da fosfoglukonat oksidatif yolu olarakta adlandırılmaktadır.Pentoz fosfat yolu reaksiyon serisinin aydınlatımasında ilk kez 1931 yılında Otto Warburg tarafından atılmış ve tamamı Fritz Lipmann, Frank Dickens, Bernard Horecker ve Efraim Racker isimli biyokimyacılar tarafından ifade edilmiştir (Keha and Küfrevioğlu 2004).

Hücrelerde glikoz NADPH ve riboz-5-fosfat üretmek için kullanılan prosese pentoz fosfat yolu denir. Zararlı maddeleri yararlı hale getirme reaksiyonudur.Pentoz fosfat yolu iki aşamada gerçekleşir. I.aşamaya oksidatif faz; II.aşamaya oksidatif olmayan faz denir.Oksidatif reaksiyonların sonunda NADPH ve riboz—fosfatsentezlenir.NADPH indirgeyici biyosentez reaksiyonlarında indirgeyici güç olarak kullanılır.Riboz-5-fosfat ATP, RNA, DNA, CoA, FAD, NAD^+ gibi biyomoleküller in bileşenidir. Oksidatif reaksiyonları aşağıdaki gibidir.

Pentoz fosfat yolunun amaçlarından biri olan NADPH üretimi bu iki enzimin katalizlediği reaksiyonlarda gerçekleşir. Bu iki enzimin eksikliği oranında NADPH ve riboz-5-fosfat eksikliği oluşacaktır (Granner et al. 2003)

Pentoz fosfat yoluna giren glukoz 6-fosfat hücre içindeki kullanımı NADPH, riboz-5-fosfat ve ATP ihtiyacına göre dört fizyolojik şekilde reaksiyona girer. Bu reaksiyonları inceleyelim:

I. Riboz-5-fosfata NADPH' dan daha fazla ihtiyaçta, glukoz 6-fosfatın çoğu glikolizle fruktoz-6- fosfat ve gliseraldehid-3- fosfata çevrilir. Bu çevrilmeden sonra transketolaz ve transaldolaz enzimleriyle reaksiyonların dönüşümlü işlemesi sonucu bir molekül gliseraldehid-3- fosfat ve iki molekül fruktoz-6-fosfat, üç molekül riboz-5- fosfata dönüştürülür ve bu dönüşümün stokiyometrik denklemi şöyledir:

$$5 \text{ glukoz-6-fosfat} + ATP \longrightarrow 6 \text{ Riboz 5-fosfat} + ADP + H^+$$

II. Riboz-5- fosfat ve NADPH ihtiyacının eşit olduğunda; pentoz fosfat yolunun oksidatif reaksiyonları devreye girer ve reaksiyonın stokiyometrik denklemi şöyledir:

$$\text{Glukoz-6-fosfat} + 2NADP^+ + H_2O \rightarrow \text{Riboz-5-fosfat} + 2NADPH + 2H^+ + CO_2$$

III. NADPH'a riboz-5-fosfattan daha fazla ihtiyaçta ; glukoz-6-fosfat tamamen CO_2'ye yükseltgenir ve bu durumda üç grup reaksiyonla gerçekleştirilir. Birincisinde iki NADPH ve bir riboz-5-fosfat oksidatif olarak sentezlenir ve sonrasında riboz-5-fosfat, transketolaz ve transaldolaz enzimleriyle fruktoz-6-fosfat ve gliseraldehid-3-fosfata dönüştürülür. Son olarak da glukoneogenez reaksiyonlarıyla 3 -fosfat ve fruktoz-6-fosfattan glukoz-6-fosfat yeniden sentezlenir. Sentezlenen üç reaksiyonun stokiyometrik denklemi şöyledir:

$$6 \text{ Glukoz 6-fosfat} + 12NADP^+ + 6H_2O \longrightarrow 6\text{Riboz 5 fosfat} + 12 \text{ NADPH} + 12 H^+ + 6CO_2$$

$$6 \text{ Riboz 5-fosfat} \longrightarrow 4 \text{ Fruktoz 6- fosfat} + 2\text{Gliseraldehid 3-fosfat}$$

$$4 \text{ Fruktoz 6- fosfat} + 2\text{Gliseraldehid 3- fosfat} + H_2O \longrightarrow 5\text{Glukoz 6-fosfat} + P_i$$

+

$$\text{Glukoz 6-fosfat} + 12\ NADP^+ + 7H_2O \longrightarrow 6CO_2 + 12\ NADPH + 12H^+ + P_i$$

IV. Riboz-5-fosfattan daha fazla NADPH'a ve bununla birlikte ATP'ye ihtiyaçta; glukoz-6-fosfat piruvata dönüşür ve bu dönüşümde Riboz-5-fosfattan türetilen fruktoz-6-fosfat ve gliseraldehit-3-fosfat glukoneogenez yerine glikoliz yoluyla piruvata kadar yükseltgenir. Bu arada NADPH ve ATP bereberce sentezlenmiş olur ve sentezlenmenin stokiyometrik denklemi şöyledir:

$$3\text{Glukoz 6-fosfat} + 6NADP^+ + 5NAD^+ + 5\ P_i + 8ADP \longrightarrow$$
$$5\text{Piruvat} + 3CO_2 + 6NADPH + 5NADH + 8ATP + 2H_2O + 8H^+$$

Pentoz Yolunun bazı doku ve hücreler için önemi; pentoz fosfat yolu ürünlerinden olan NADPH yağ asitlerinin sentezinde büyük miktarda kullanılmaktadır. Bu nedenle yağ asitlerinin sentezlediği yağ dokusu, karaciğer ve süt bezlerinde sentezlerinden pentoz fosfat yolu çok aktiftir. NADPH 'ın kullanıldığı diğer hayati bir reaksiyonla glukatotyonun indirgemesidir. Glutatyon aşağıda belirtilen metabolik prosesler için gereklidir(Keha and Küfrevioğlu 2004).

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Pentoz fosfat yolunun üçüncü enzimi olan 6-fosfoglukonat dehidrogenaz (E.C.1.1.1.44; 6PGD) NADP+ varlığında 6-fosfoglukonat bileşiğini D-ribuloz 5-fosfata dönüştüren bir enzimdir. Reaksiyon sonucu birçok biyomolekülün yapısına giren riboz 5-fosfatın izomeri D-ribuloz 5-fosfat ve birçok biyokimyasal reaksiyonda indirgeyici güç olarak kullanılan NADPH oluşur. Enzim glukoz 6-fosfatın, glikolitik ve pentoz fosfat yolu arasındaki dengesinin korunmasında önemli bir rol oynamaktadır(Garrido-Pertierra 1986).

6PGD'nin doğal substratı 6-fosfoglukonat koenzimi NADP+'dır. Enzimin koenzime olan ilgisi genelde substratı olan 6-fosfoglukonat'tan daha fazladır(Topham and Dalziel 1986). Ayrıca NADPH spesifik 6PGD'nin insan eritrositi, kuzu karaciğeri, Trypanosoma Brucei ve Candida utilis' de substrat olarak 2-deoksi-6-fosfoglukonat ve 3-keto-6-fosfoglukonatı kullanabildiği de çalışmalarda rapor edilmiştir(Rippa, Picco et al. 1971, Hanau, Rippa et al. 1996).

Çizelge 2.1. Farklı türlere ait 6PGD enziminin molekül kütleleri ve alt birim yapısı

Enzim kaynağı	Molekül kütlesi (kDa)	Alt birim molekül kütlesi (kDa) ve yapısı	Kaynak
Koyun karaciğeri	94	47, homodimer	(Betts and Mayer 1975)
Sıçan karaciğeri	102	52, dimer	(Procsal and Holten 1972)
Sıçan incebağırsak	-	52, dimer	(Danişan et al. 2005)
Leuconostoc lactis SHO-54	140	32,8, tetramer	(Russell et al. 2004)

6-fosfoglukanat dehidrogenazın molekül kütlesi kaynağına göre 80-152 kDa, alt birimlerinin molekül kütlesi ise 31-70 kDa arasında değişmektedir. Bazı canlılarda homodimer, bazılarında homotetramer bir yapıya sahiptir. Günümüzde birçok farklı kaynaktan elde edilen enzimin amino asit dizisi belirlenmiştir. Enzimlerin ortalama 400 civarında amino asitten oluştuğu tespit edilmiştir (Winberry et al. 1984).

Enzimin optimum pH aralığı 5,5–10 aralığında değişmekte olup aktivitesinin pH 7–9,2 aralığında arttığı, 9,3'ten sonra ise aktivitesini kaybettiği bildirilmiştir(Ceriotti et al. 1987) (Barenghi et al. 1987). Enzimin doğal halinin optimum pH'sı; insan beyninde 8,6, sıçan böbrek korteksi ve karaciğerinde 8,0, sıçan eritrositlerinde 7,0, sıçan ince bağırsağında 7,3 olarak belirlenmiştir(Schofield et al. 1985, García-Salguero et al. 1994, Çiftçi et al. 2004, Danişan et al. 2005). Enzimin stabil pH'sı sıçan eritrositlerinde 8,0, tavuk karaciğerinde 8,5 olduğu rapor edilmiştir (Çiftçi et al. 2004, Erat 2005).

Enzim aktivitesi sıcaklıkla değişmektedir. Enzim aktivitesinin 20-30 ^{o}C'de 30 dakikada kaybolmadığı, 50 ^{o}C de 20 dakika bekleme ile %85 aktivite kaybettiği ifade edilmiştir. Bazı optimum sıcaklık değerleri; sıçan eritrositlerinde 45^{o}C ve sıçan ince bağırsağında 49,2 ^{o}C olarak belirlenmiştir (Çiftçi et al. 2004, Danişan et al. 2005).

Enzim subsratı olan NADP+ ve 6PGA için KM ve Vmax değerleri belirlenmiştir. Katalizlenen reaksiyonun ürünü olan NADPH için Ki değerleri ve inhibisyon türleri ile ilgili çalışmalar da yapılmıştır.

Çizelge 2.2. Farklı türlere ait 6PGD enziminin bazı kinetik özellikleri

Enzim kaynağı	Subsratlar				Ürün		Kaynak
	$NADP^+$		6PGA		NADPH		
	K_M (mM)	V_{max} (EU/ml)	K_M (mM)	V_{max} (EU/ml)	K_i (mM)	İnhibisyon türü	
Tavuk karaciğeri	0,6211	0,0273	0,0343	0,0317	3,244 ± 1,094	Yarışmalı	(Erat 2005)
Sıçan eritrositi	0,059	0,063	0,194	0,054	0,052 ± 0,007	Yarışmasız	(Çiftçi et al. 2004)
Sıçan incebağırsak	0,053	-	0,595	-	0,031 ±0,003	Yarışmalı	(Danişan et al. 2005)
Sıçan böbrek	0,056	-	0,049	-	0,041	Yarışmalı	(García-Salguero et al. 1994)
Sıçan karaciğer	0,258	-	0,157		0,021	Yarışmalı	(García-Salguero et al. 1994)

Enzimin saflaştırılmasında karşılaşılan problemler enzimin kararsızlığı ve stabilizasyonudur. Aktivite kaybının en aza indirilmesi için genelde çalışmalar +4°C'de yapılmaktadır. Tampona 2-merkaptoetanol, EDTA, NADP+, fenilmetilsulfonilflorür ilavesiyle stabilizasyon sağlanmıştır (Pearse and Rosemeyer 1975, Toews, Kanji et al. 1976, Carne 1982). Bakteriyel kaynaklı 6-PGD enzimler, hayvansal kaynaklı enzimlerden daha kararlıdır (Menezes, Kelkar et al. 1989).

Enzim; amonyum sülfat çöktürmesi, yüksek hızda santrifüj, DE-52 kolonu, SP-Sephadex, DEAE selüloz, CM-selüloz, DEAE-Sephadex, CM-Sephadex, hidroksiapatit ve NADP+-Sepharose, 2' 5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi, NADP+-Agaroz vb. yöntemlerle saflaştırılmıştır (Adem and Ciftci 2016).

Roark and Brown (1996) tarafından yapılan çalışmada bazı metal iyonlarının potansiyel inhibitör olduğu belirtilmiş ve Zn+2, Cu+2, Cd+2 inhibisyonları tespit edilmiştir. Birçok anyon inhibisyon etkisi gösterir. Ancak asetat inhibisyon etkisi göstermediğinden diğer anyonların etkileri incelenirken sabit iyonik şiddet oluşturmakta kullanılabilir(Procsal and Holten 1972). Ayrıca enzim aktivitesi düşük Mg+2 konsantrasyonunda artarken, yüksek Mg+2 konsantrasyonunda ise düştüğü belirtilmiştir (Pearse and Harris 1973). Bazı türlerde okzalasetat, glukoz-6P, okzalat, fruktoz-6-P, fruktoz-1-P, glukoz-1,6 bisfosfat, PPi, Pi, Phi (fosfanat), sitrat ve sülfatın ibhibisyon etkisi gösterdiği belirtilmiştir (Nordenberg, Aviram et al. 1984)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

Kullanılan Maddeler

- Standart serum albümin
- N,N,N’,N’-tetrametil etilendiamin (TEMED)
- Diyaliz torbaları
- β-nikotinamidadenindinükleotidfosfat (indirgenmiş form) (NADPH)
- β-nikotinamidadenindinükleotidfosfat (Na tuzu) (NADP+)
- okside glutatyon (GSSG)
- glukoz 6-fosfat (mono Na tuzu)
- etilendiamintetraasetikasit (EDTA)
- triklor asetik asit
- sodyum hidroksit
- trihidroksimetilaminometan (Tris)
- potasyum klorür
- sodyum klorür
- sodyum asetat
- hidroklorik asit
- glisin
- fosforik asit
- sodyum azotür
- gliserin
- potasyum fosfat
- potasyum bisfosfat
- potasyum asetat
- potasyum klorür
- etanol
- metanol
- asetik asit
- sodyum asetat
- izopropanol
- akrialmid, N,N’-metilen bisakrilamid
- Coomassie Brillant Blue G-250
- brom timol mavisi
- sodyum dodesil sülfat (SDS)
- sephadex-G150 ve 2', 5' ADP-Sepharose 4B

Yararlanılan Alet ve Cihazlar

- Vorteks
- Spektrofotometre
- pH metre
- Otomatik pipet
- Kuvars küvetler
- Manyetik Karıştırıcı
- Sonikasyon Cihazı
- Saf su cihazı
- Buzdolapları

Kullanılan çözelti ve kimyasalların hazırlanışı:

Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

Çözelti hazırlamak amacıyla kullanılan su, saf sudur.

Homojenat hazırlanması için kullanılan çözelti

1. 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 alınarak bir miktar saf suda çözündü. pH'sı 0,1 M HCI ile ayarlandı. Hacmi saf su ile 250 ml'ye tamamlandı.

Aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler:

1. 1 M Tris-HCl + 5mM EDTA (pH= 8,0): 0,06057 g (5 mmol) Tris ve 0,0292 g (0,1 mmol) EDTA alınarak 90 ml destile suda çözüldü. 0,1 M HCl çözeltisi ile pH 8,0'a ayarlandı. Daha sonra toplam hacim su ile 50 ml'ye tamamlandı.

2. 6 mM 6PGA: 9,1 mg (0,3 mmol) G6P alınıp bir miktar suda çözüldü. Hacmi su ile 5 ml'ye tamamlandı.

3. 2mM $NADP^+$ Çözeltisi: 7,65 g $NADP^+$ (0,1 mmol) alınarak bir miktar suda çözüldü. Hacim suyla 5 ml'ye tamamlandı.

Diyaliz için kullanılan tampon:

1. 10 mM Tris-HCl + 1 mM EDTA (Diyaliz çözeltisi): 1,211 g Tris, 0,29225 g EDTA alınarak 975 ml suda çözüldü, pH'sı 0,1 M HCI ile 7,5'e ayarlandı ve toplam hacim 1 L'ye tamamlandı.

Afinite kromatografisi kolonunda kullanılan çözeltiler:

1. 50 mM KH_2PO_4 + 1 mM EDTA + 1mM DTT, pH=7,3 (Kolonun paketlenmesi, yıkanması ve dengelenmesi için kullanılan tampon): 6,8 g KH_2PO_4, 0,292 g EDTA 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.

2. 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.

3. 80 mM KH_2PO_4+ 10 mM EDTA + 80 mM KCI + 5 mM $NADP^+$ (Afinite jeline tutunmuş olan 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enziminin elüsyonu için kullanılan tampon): 0,544 g KH_2PO_4, 0,121g EDTA, 0,298 KCI ve 0,1913 g $NADP^+$ karışımı 40 ml suda çözüldü. pH'sı 0,1 M KOH 7,8'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 50 ml'ye tamamlandı.

4. 0,1 M Na-asetat + 0,5 M NaCl (Afinite kromatografisi kolonunun rejenerasyonu için kullanılan tampon): 4,1 g Na-asetat (50 mmol) ve 14,61 g NaCl (0,25 mol) alınıp suda çözüldü, pH= 4,5'e ayarlandı ve toplam hacim suyla 500 ml'ye tamamlandı.

5. 0,1 M Tris + 0,5 M NaCl (Afinite kromatografisi kolonunun rejeneresyonu için) 6,05 g Tris ve 14,61 g NaCI bir miktar suda çözündükten sonra pH'sı 0,1 M HCI ile 8,5'e ayarlandı. Daha sonra hacim suyla 500 ml'ye tamamlandı.

6. % 0,02'lik NaN_3 çözeltisi (Kromatografi kolon materyallerini bakterilerden korumak için): 10 mg NaN_3 alınarak 50 ml suda çözüldü.

Elektroforez için kullanılan çözeltiler:

1. 1M Tris-HCl (pH= 8,8): 12,11 g Tris (0,1 mol) tartılarak 80 ml suda çözüldü, pH ayarı 0,1 M HCI ile yapıldıktan sora 100 ml'ye tamamlandı.

2. 1 M Tris-HCl (pH= 6,8): 12,11 g Tris (0,1 mol) tartılarak 80 ml suda çözüldü, pH ayarı 0,1 M HCI ile yapıldıktan sonra 100 ml'ye tamamlandı.

3. %30 Akrilamid %0,8 Bisakrilamid çözeltisi: 15 g akrilamid, 0,4 g bisakrilamid alınarak hacmi su ile 50 ml'ye tamamlandı.

4. %10'luk amonyum persülfat çözeltisi: 1 g amonyum persülfat tartılarak su ile 10 ml'ye tamamlandı.

5. %10'luk SDS: 1 g SDS'nin hacmi su ile 10 ml'ye tamamlandı.

6. Yürütme tamponu: 1,51 g Tris (12,5 mmol) ve 7,51 g glisin (0,1 mol) tartılarak 450 ml suda çözüldü %10'luk SDS'den 5 ml ilave edildi, pH 0,1 M HCI ile 8,3'e ayarlandı ve toplam hacim 500 ml'ye tamamlandı.

7. Numune tamponu: 1 M Tris-HCl (pH= 8)'den 0,5 ml, %10'luk SDS'den 1 ml, %100'lük gliserinden 1 ml ve %0,1'lik bromtimol mavisinden 1 ml alınarak suyla 10 ml'ye tamamlandı. Bu tampona kullanılmadan önce 950 µl numune tamponundan 50 µl olacak şekilde β-merkaptoetanol ilave edildi.

8. Sabitleştirme çözeltisi (Jelde yürütülen proteinlerin sabitleştirilmesi için kullanılan çözelti): %50 izopropanol, %10 TCA ve %40 su olacak şekilde karıştırılarak hazırlandı.

9. Jel boyama çözeltisi: 50 ml metanol, 10 ml asetik asit ve 40 ml su içerisinde 0,1 g Coomassie Brillant Blue R-250 reaktifinin çözülmesiyle hazırlandı.

10. Jel yıkama çözeltisi: 50 ml metanol, 10 ml asetik asit ve 40 ml su karıştırılarak elde edildi.

12. %0,04'lük brom timol mavisi çözeltisi: 0,1 indikatör 0,01 M 16 ml NaOH içerisinde çözündü ve toplam hacim saf suyla 250 ml'ye tamamlandı.

Ayırma jeli

1M Tris-HCl (pH=8,8)	5 ml
%30 Akrilamid-%0,8 bisakrilamid	4,4 ml
%10'luk SDS	0,2 ml
%5'lik TEMED	0,13 ml
Saf su	3,13 ml
PER	katı

Yığma jeli

1M Tris-HCl (pH=6,8)	0,41 ml
%30 Akrilamid-%0,8 bisakrilamid	0,800 ml
%10'luk SDS	0,03 ml
%5'lik TEMED	0,03 ml
Saf su	2,45 ml
PER	katı

Proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti

Coomassie Brillant Blue G-250 reaktifi: 100 mg Coomassie Brillant Blue G-250, 50 ml %95'lik etanolde çözüldü. Bu çözeltiye %95'lik 100 ml fosforik asit ilave edildi. Çözeltinin hacmi suyla 1 L'ye tamamlandı.

Pestisitlerin ve metal iyonlarının çözeltileri

Oxamyl: 1 mg tartılıp bir miktar saf suda çözülüp hacmi 1 mL' ye tamamlandı. Saf su ile 10 kat seyreltildi.

Carbaryl: 1 mg tartılıp bir miktar saf suda çözülüp hacmi 1 mL' ye tamamlandı. Saf su ile 10 kat seyreltildi.

Diniconazole: 1 mg tartılıp bir miktar saf suda çözülüp hacmi 1 mL' ye tamamlandı. Saf su ile 10 kat seyreltildi.

Metalaxyl: 1 mg tartılıp bir miktar saf suda çözülüp hacmi 1 mL' ye tamamlandı. Saf su ile 10 kat seyreltildi.

Methomyl: 1 mg tartılıp bir miktar saf suda çözülüp hacmi 1 mL' ye tamamlandı. Saf su ile 10 kat seyreltildi.

Carbofuran: 1 mg tartılıp bir miktar saf suda çözülüp hacmi 1 mL' ye tamamlandı. Saf su ile 10 kat seyreltildi.

Simazine: 1 mg tartılıp bir miktar saf suda çözülüp hacmi 1 mL' ye tamamlandı. Saf su ile 10 kat seyreltildi.

Tebuconazol: 1 mg tartılıp bir miktar saf suda çözülüp hacmi 1 mL' ye tamamlandı. Saf su ile 10 kat seyreltildi.

Atrazine: 1 mg tartılıp bir miktar saf suda çözülüp hacmi 1 mL' ye tamamlandı. Saf su ile 10 kat seyreltildi.

Propoxur: 1 mg tartılıp bir miktar saf suda çözülüp hacmi 1 mL' ye tamamlandı. Saf su ile 10 kat seyreltildi.

1-naphthol: 1 mg tartılıp bir miktar saf suda çözülüp hacmi 1 mL' ye tamamlandı. Saf su ile 10 kat seyreltildi.

2,4-D: 1 mg tartılıp bir miktar saf suda çözülüp hacmi 1 mL' ye tamamlandı. Saf su ile 10 kat seyreltildi.

$Pb(NO_3)_2$: 1 mg tartılıp bir miktar saf suda çözülüp hacmi 1 mL' ye tamamlandı. Saf su ile 10 kat seyreltildi.

$Cr(NO_3)_2$: 1 mg tartılıp bir miktar saf suda çözülüp hacmi 1 mL' ye tamamlandı. Saf su ile 10 kat seyreltildi.

$HgCl_2$: 1 mg tartılıp bir miktar saf suda çözülüp hacmi 1 mL' ye tamamlandı. Saf su ile 10 kat seyreltildi.

$FeSO_4$: 1 mg tartılıp bir miktar saf suda çözülüp hacmi 1 mL' ye tamamlandı. Saf su ile 10 kat seyreltildi.

$Ni(NO_3)_2$: 1 mg tartılıp bir miktar saf suda çözülüp hacmi 1 mL' ye tamamlandı. Saf su ile 10 kat seyreltildi.

$Cd(NO_3)_2$: 1 mg tartılıp bir miktar saf suda çözülüp hacmi 1 mL' ye tamamlandı. Saf su ile 10 kat seyreltildi.

3.2. Yöntem

3.2.1. Enzim saflaştırılması çalışmaları

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 4.000 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 ve 400 ml destile su ile katı maddelerin uzaklaştırılması için birkaç defa yıkandı. Yıkama esnasında jel şişirilmiş oldu. Şişirilmiş jelin havası su trombu kullanılarak vakum ile alındı ve paketleme tamponu ilave edilerek jel süspanse edildi. Süspanse edilmiş jel, 1x10 cm'lik kapalı sistemden oluşan soğutmalı kolona paketlendi. Jel çöktükten sonra peristaltik pompa yardımıyla yıkama ve dengeleme tamponu ile yıkandı. Kolonun dengelenmiş olduğu, eluat ile tamponun 280 nm'de absorbanslarının ve pH'larının eşitlenmesinden anlaşıldı. Böylece afinite kolonu hazırlanmış oldu(Adem and Ciftci 2016).

Hazırlanan homojenat 2', 5'-ADP sepharose 4B afinite kolonuna uygulandı. 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, 6PGD elüsyon çözeltisi geçirilerek enzimler 1,5 ml'lik tüplere ayrı ayrı alındı. Her bir tüpdeki enzimlerin aktivitelerine bakılarak enzim ünitesi-tüp sayısı grafiği hazırlandı (Adem and Ciftci 2016)

Afinite sonrası enzim örneklerinin saflık kontrolü için SDS-PAGE yapıldı.

3.2.2. SDS- Poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim saflığının belirlenmesi

Afinite kolonundan alınan numunelerin saf olup olmadığının kontrolü %3-10 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile Laemmli tarafından anlatıldığı gibi yapıldı(Laemmli 1970). Standtart olarak Myosin,rabbit muscle, 212,000, MBP-ß-galactosidase, E. coli, 158,194; ß-Galactosidase, E. coli, 116,351 Phosphorylase b, rabbit muscle, 97,184, Serum albumin, bovine, 66,409; Glutamic dehydrogenase, bovine liver, 55,561; MBP2*, E. coli, 42,710; Thioredoxin reductase, E. coli, 34,622; Triosephosphate isomerase, E. coli, 26,972; Trypsin inhibitor, soybean, 20,100; Lysozyme, chicken egg white, 14,313 kullanıldı.

Elektroforez plakaları önce su, sonra alkol ile iyice yıkandı. Plakaları birleştiren mikalara vazelin ince tabaka halinde sürüldü. İki cam plaka birbiri üstüne konuldu ve kıskaçlarla tutturularak jel hazırlama cihazına yerleştirildi. Ayırma jeli hazırlanarak plakalar arasına pipetle bir tabaka oluşacak şekilde ilave edildi. Jel donduktan sonra üste yığma jel ilave edildi. Jel donmadan dikkatlice tarak yerleştirildi. Jel tamamen donunca tarak dikkatlice çıkarıldı. Oluşan jel plakalarla beraber elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konuldu.

Numuneler her birinde 20µg protein (BSA eşdeğer) olacak şekilde hazırlandı. Toplam hacim 100µl olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu konuldu. 3 dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi. Numuneler soğutularak, jeldeki yerine ince bir enjektörle tatbik edildi. Tank kapağı kapatılarak ‘‘anot’’ ve ‘‘katot’’ kabloları yerleştirildi. Önce 80 voltta 25 dakika, daha sonra 120 volta ayarlanarak 2,5 saat oda sıcaklığında yürütme işlemi gerçekleştirildi. Akım kesilerek, cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı. Plakalar arasından çıkarılan jel 30 dakika sabitleştirmede, 2 saat boyamada ve 30 dakikada yıkama çözeltilerinin içinde karıştırıcının üzerinde bekletildi. Daha sonra suyun içine alınan jelin, fotoğrafı çekildi.

Elektroforez sırasında kullanılan yürütme tamponu, boyama ve sabitleştirme çözeltileri tekrar kullanılmak üzere kaplarına alındı. Yıkama çözeltisi ise aktif karbondan geçirilerek kabına alındı.

Molekül kütlesinin belirlenmesi; molekül kütleleri belli standartlar ile bilinmeyen proteinlerinin aynı jelde yürütülmesiyle belirlenir. Molekül kütlesi hesaplamada proteinin yürüdüğü uzaklığın boyanın yürüdüğü uzaklığa oranını ifade eden ve alıkoyma veya yavaşlatma faktörü (retardation factor) olarak adlandırılan Rf değeri esas alınır. Standartların Rf değerleri belirlenir. LogMA-Rf değeri grafiği çizilerek bu garafikten Rf değeri belli enzimin veya proteinin molekül kütlesi hesaplanır.

3.2.3. Enzim aktivitelerinin ölçülmesi

6-Fosfoglukonat dehidrogenaz enziminin aktivitesi spektrofotometrede 37°C'de Beutler metoduna göre ölçüldü. Bu metot glukoz 6-fosfat varlığında $NADP^+$'nın indirgenmesinden dolayı oluşan NADPH'ın 340 nm'de absorbans vermesi esasına dayanır. Aktivite ölçümleri her numune için 3 kez tekrarlandı(Beutler 1971). Küvet içeriği Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. 6PGD enziminin aktivite ölçüm küveti içeriği

Stok çözeltiler	Kontrol küveti	Numune küveti
	Hacim (µl)	Hacim (µl)
40 M Fosfat, (pH=7,5)	200	200
2 mM $NADP^+$	100	100
Saf su	660	560
Enzim örneği	40	40
10 dakika inkübasyon		
6PGA	-	100

Enzim ünitesi hesaplamalarında aşağıdaki formül kullanıldı.

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

Burada yer alan simgeler aşağıda açıklandı;

EÜ/ml : 1 ml'deki enzim ünitesi
ΔOD : Bir dakikadaki absorbans değişimi
6,22 : Ekstinksiyon katsayısı
V_T : Ölçümün yapıldığı toplam küvet hacmi
V_E : Ölçümün yapıldığı küvete ilave edilen enzim numunesinin hacmi
S_F : Seyreltme faktörü (seyreltilen örnek için kullanılır)

3.2.4. Kantitatif protein tayini

Homojenat, amonyum sülfat çöktürmesi ve afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltilerindeki protein miktarı bu yöntemle belirlendi. Bu yöntemde boya olarak kullanılan Coomassie Brillant Blue G-250 negatif bir yüke sahiptir ve protein üzerindeki pozitif yüke bağlanır. Boyanın kırmızı (λ_{max}= 465 nm) ve mavi (λ_{max}= 595 nm) formu mevcuttur. Proteinin bağlanması sonucu kırmızı form mavi forma dönüşür. Reaksiyon hızı yüksektir ve iki dakikada tamamlanır. Renk stabilitesi iki saat'in üzerinde devam edebilir (Bradford 1976). Bu yöntemin bozucu faktörlere hassasiyeti çok azdır (1-100 µg arası).

Bu yöntem ile protein tayini yapabilmek için standart bir grafik gereklidir. Bu amaçla 1 ml'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albümin çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µl alındı. Saf su ile bütün tüplerin hacmi 0,1 ml'ye tamamlandı ve 5 ml Coomassie Brillant Blue G-250 çözeltisi ilave edilip vorteks ile karıştırıldı. 10 dakika inkübe edildikten sonra 595 nm'de 3 ml'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak, 0,1 ml enzim numunesinin içinde bulunduğu tampondan ve 5 ml Coomassie Brillant Blue G-250 çözeltisinden oluşan karışım

kullanıldı. Absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri standart grafik haline getirildi.

Homojenat ve afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltilerindeki enzim numunelerinden 0,1 ml alınarak tüplere konuldu ve üzerine 5'er ml Coomassie Brillant Blue G-250 reaktifi ilave edildi. Vorteks ile karıştırıldıktan sonra 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Sonrasında 595 nm'de absorbans değerleri okundu. Her bir numune için üçer adet deneme yapılarak bu üç değerin aritmetik ortalaması alındı. Standart grafikten yararlanılarak, elde edilen bu değerlere göre protein miktarları belirlendi.

3.2.5. Enzimlerin biyokimyasal karakterizasyonu

Enzimlerin optimum pH'larının belirlenmesi: Enzimlerin optimum pH'larını belirlemek amacıyla 100 mM fosfat ile 100 mM Tris-HCl pH 6-9 arası 0,5 artışla tampon çözeltiler hazırlandı. Her bir pH'da enzim aktivelerine bakıldı. Aktivite ölçümlerinde en iyi aktivite gösteren tamponlarla çalışmalara devam edildi.

Enzimlerin optimum iyonik şiddetlerinin belirlenmesi: Enzimlerin optimum aktivite sağladığı iyonik şiddetin belirlenmesi için belirlenen optimum pH'da 5, 10, 25, 50, 10, 25, 50, mM fosfat tamponları kullanılarak belirlendi. Ölçülen değerlerle enzim aktivitesi-küvet içi konsantrasyon grafikleri çizildi.

Enzimlerin optimum sıcaklıklarının belirlenmesi: Enzimlerin optimum sıcaklıklarını belirlenmesi amacıyla enzim hariç diğer aktivite çözeltileri 20-60^{o}C arasında 10^{o}C artışla ısıtıldı ve her 10^{o}C'de aktiviteleri ölçüldü. Enzim aktivitesi-sıcaklık grafikleri çizildi.

Enzimin K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi: Enzimin K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi amacıyla subsratların 10 kat seyreltilmiş çözeltilerinden 5 farklı konsantrasyonu ile aktivite ölçümü yapıldı. Elde edilen değerlerle Lineweaver-Burk

grafiği çizildi. Grafikten yararlanarak $NADP^+$ ve G6P için K_m ve V_{max} değerleri belirlendi.

3.2.6. Kirleticilerin etkilerinin belirlenmesi

Bazı pestisitlerin ve metal iyonlarının *in vitro* etkilerinin belirlenmesi: Pestisitlerin ve metal iyonlarının enzimin aktivitesi üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla küvet ortamına farklı konsantrasyonlarda katılarak aktivite değerleri okundu. Maddelerin inhibisyon etkileri mümkün olan en yüksek konsantrasyonlarda ön denemelerle belirlendi. IC_{50} değerlerin belirlenmesi için % aktivite-[I] inhibitör konsantarasyonu grafiği çizilerek belirlendi. Bu amaçla 5 farlı inhibitör konsantrasyonuyla aktivite ölçümleri yapıldı.

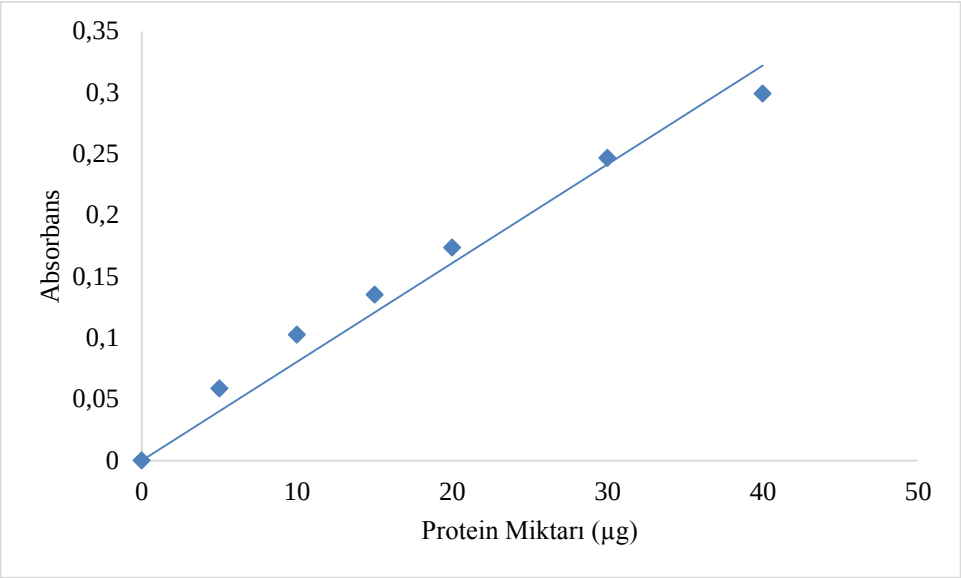
Çizelge 3.2. Pestisitlerin ve metal iyonlarının çalışılan konsantrasyonu

Madde	Çalışılan aralık	Madde	Çalışılan Aralık
1. Oxamyl	1-180	**1.** $Pb(NO_3)_2$	1-151
2. Carboryl	1-20	**2.** $Cr(NO_3)_2$	1-210
3. Diniconazole	1-15	**3.** $HgCl_2$	1-184
4. Metalaxyl	1-20	**4.** $FeSO_4$	1-179
5. Methomyl	1-20	**5.** $Ni(NO_3)_2$	1-90
6. Carbofuran	1-45	**6.** $Cd(NO_3)_2$	1-211
7. Simazine	1-50	**7.** $Co(NO_3)_2$	1-274
8. Tebuconazol	1-100	**8.** $Al(NO_3)_3$	1-235
9. Atrazine	1-140		
10. Propoxur	1-140		
11. 1- naphthol	1-200		
12. 2,4 – D	1-140		

Organik çözücülerin etkilerinin belirlenmesi için toplam reaksiyon hacminin %10 oranında organik çözücüler reaksiyon ortamına eklenerek aktivite ölçümleri yapıldı. Sonuçlar kontrol ile kıyaslanarak inhibisyon ve aktivasyon oranları belirlendi.

4. BULGULAR

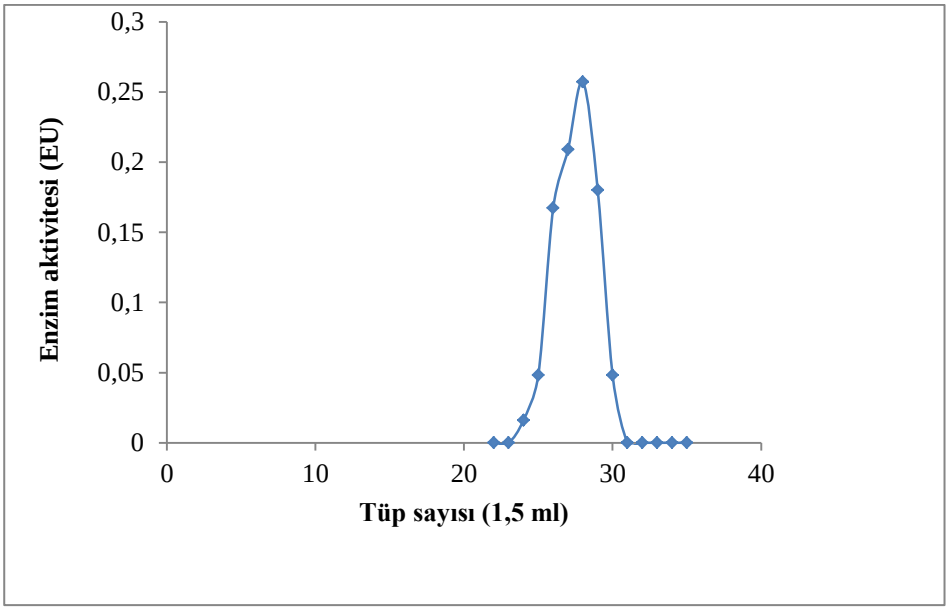
Enzim çözeltilerinin kantitatif protein tayini Bradford yöntemiyle belirlendi. Homojenat ve afinite kromatografisi sonucu elde edilen enzim çözeltilerindeki kantitatif protein tayinin bu standart grafikten faydalanılarak bulundu. Standart çözeltilerin µg proteine karşılık gelen absorbans değerleri şekil 4.1'de gösterildi.



Şekil 4.1. Kantitatif protein tayininde kullanılan standart grafik

2', 5' ADP Sepharose 4B Afinite Kromatografisi Saflaştırma Sonuçları

Hazırlanan homojenat süzüldükten sonra afinite kolonuna tatbik edildi. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra sırasıyla G6PD elüsyon çözeltisi ile elüsyon 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 Şekil 4.2.'de aşağıda verilmiştir. En zkatif tüpler 27, 28 ve 29. tüplerdir. Saflaştırma basamakları, elüsyonun sonucu ve saflaştırma değerleri Çizelge 4. 1. 'de verilmiştir.



Şekil 4.2 Solucan G6PD enziminin 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi ile saflaştırılması grafiği.

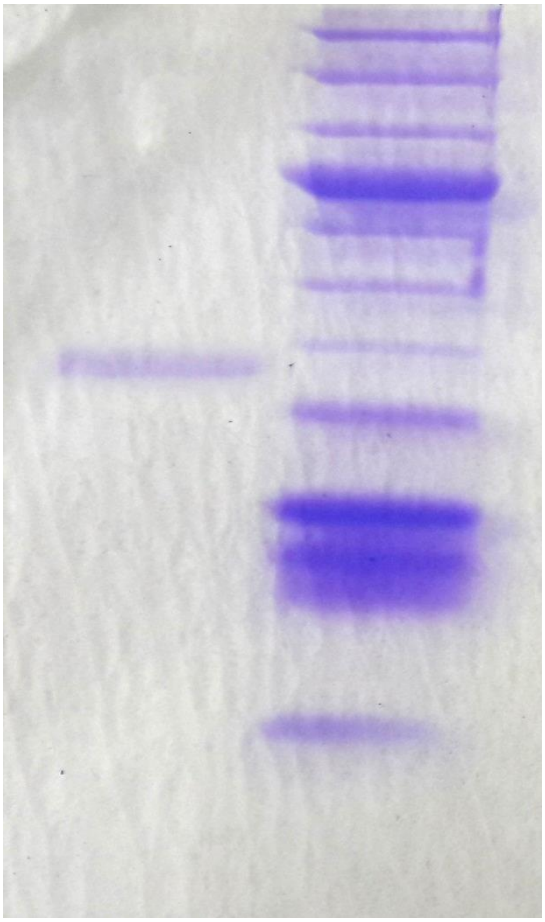
Enzim afinite kolonu kullanılarak %28 verimle 232 kat saflaştırılabilmiştir.

Çizelge 4.1. Solucan G6PD enziminin saflaştırılması basamakları

Saflaştırma basamakları	Toplam hacim (ml)	Aktivite (EÜ/ml)	Toplam aktivite (EÜ)	Protein miktarı (mg/ml)	Spesifik aktivite (EÜ/mg)	% verim	Saflaştırma katsayısı
Homojenat	50	0,133	5,6	2,240	0,050	100	1
Afinite kromatografisi	9	0,177	1,5	0,015	11,635	28	232

SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi Sonuçları

Afinite kromatografisi sonucu elde edilen enzimlerin saflığının kontrolü amacıyla SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı.



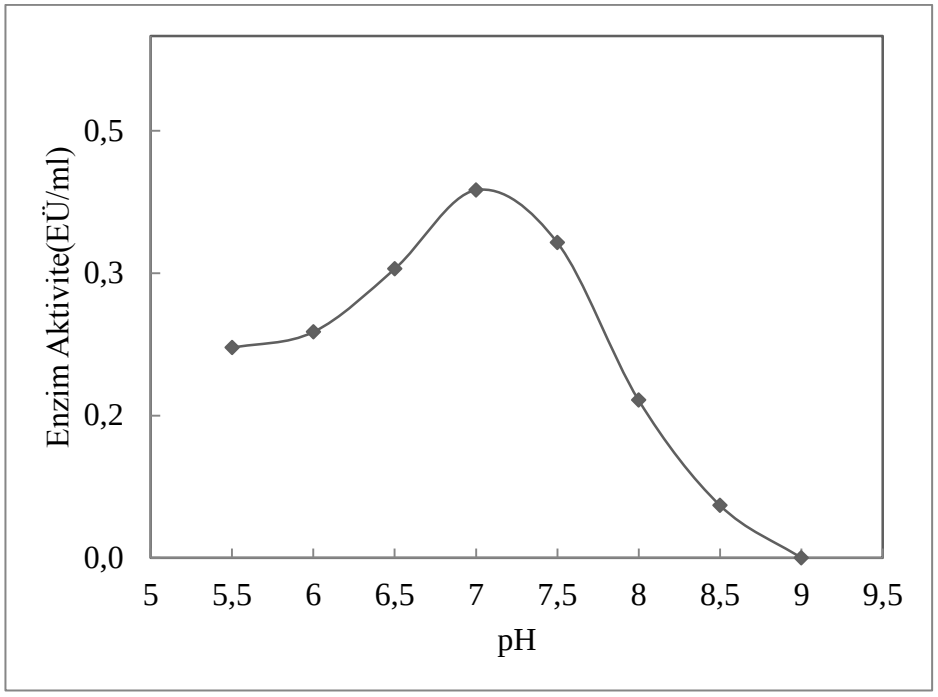
Şekil 4.3. Solucan saflaştırılan 6PGD enziminin SDS-PAGE fotoğrafı

Enzim karakterizasyon çalışmaları sonuçları

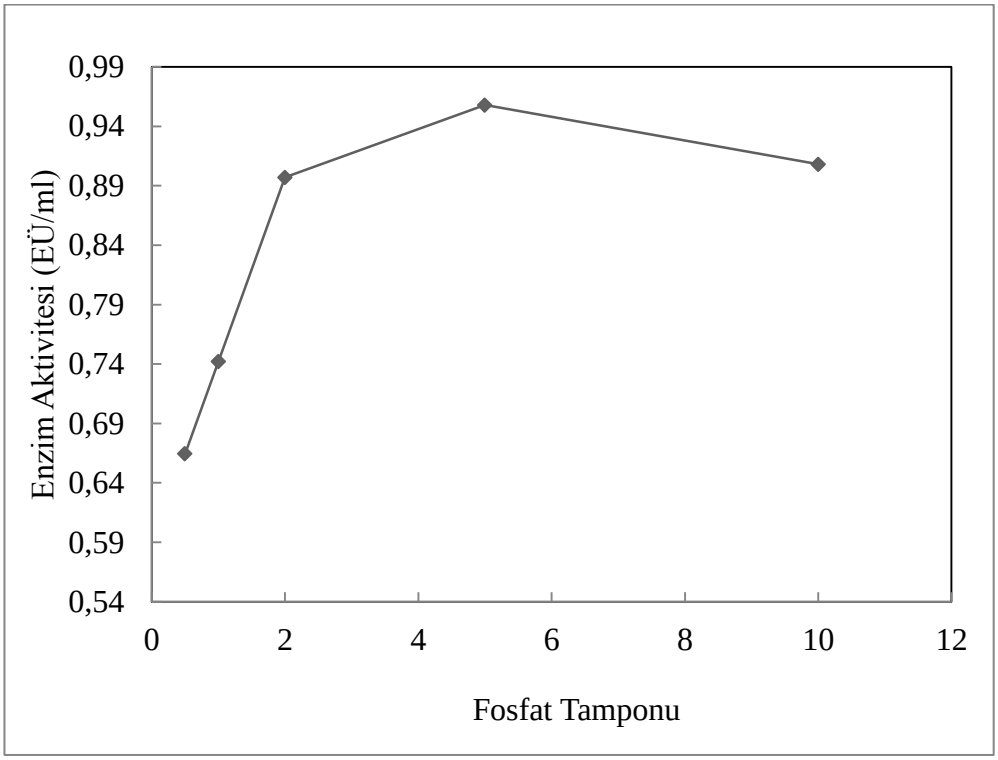
Çalışmalar bölüm 3.2.4'de belirtildiği şekliyle yapıldı. Çalışmaların sonucu elde edilen şekiller ve toplu sonuçlar çizelge 4.2' de verilmiştir.

Çizelge 4.2. G6PD enziminin optimum şartlarının belirlenmesine yönelik çalışmaların sonuçları

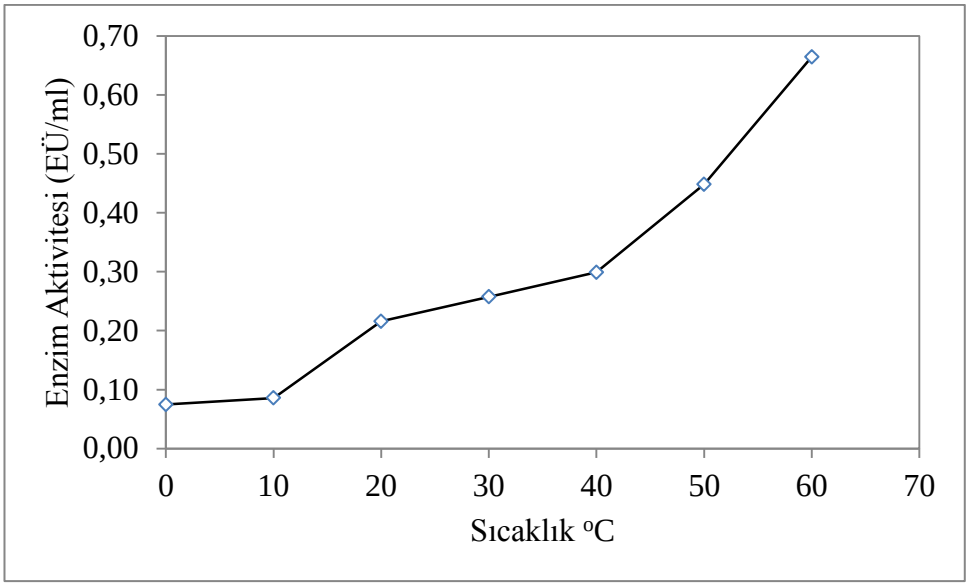
Optimum pH	Fosfat pH=7,00
İyonik Şiddet için tuz konsantrasyonu	Fosfat 6 mM
Optimum Sıcaklık	60 ^{o}C



Şekil 4.4. Enziminin optimum pH'sının belirlenmesine yönelik aktivite ölçümlerinin sonucunu gösteren grafik



Şekil 4.5. Enzimin optimum tuz konsantrasyonun belirlenmesi amacıyla çizilen grafik



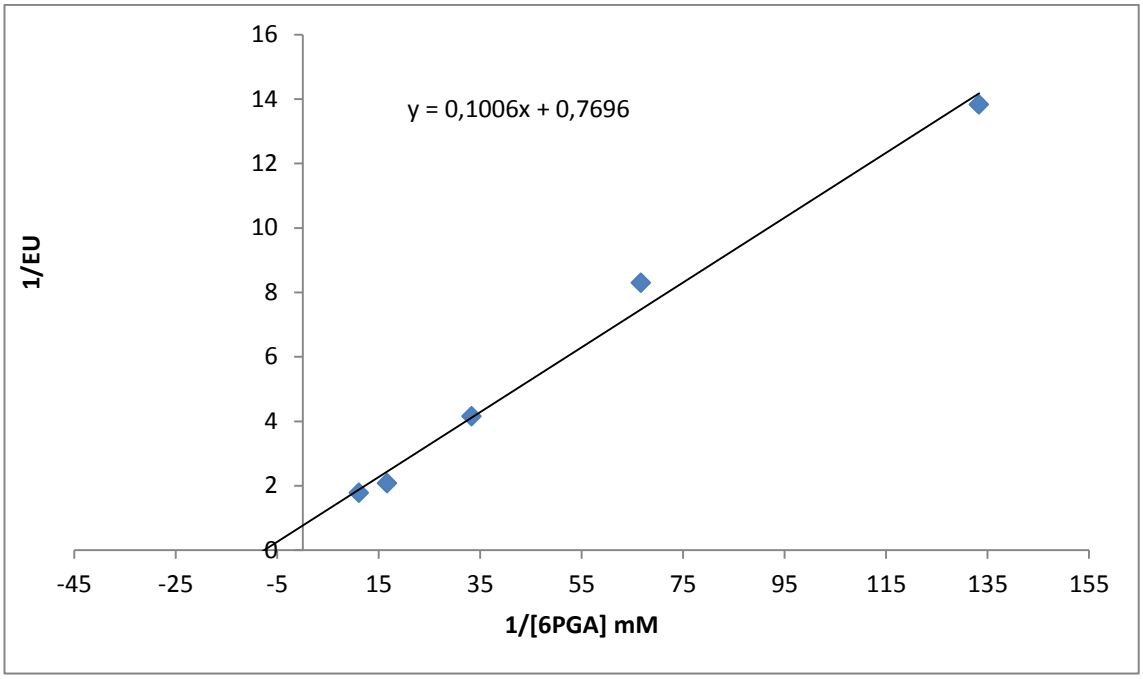
Şekil 4.6. Enzimin sıcaklık aktivitesinin belirlenmesi amacıyla çizilen grafik

Enzimin K_M ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi

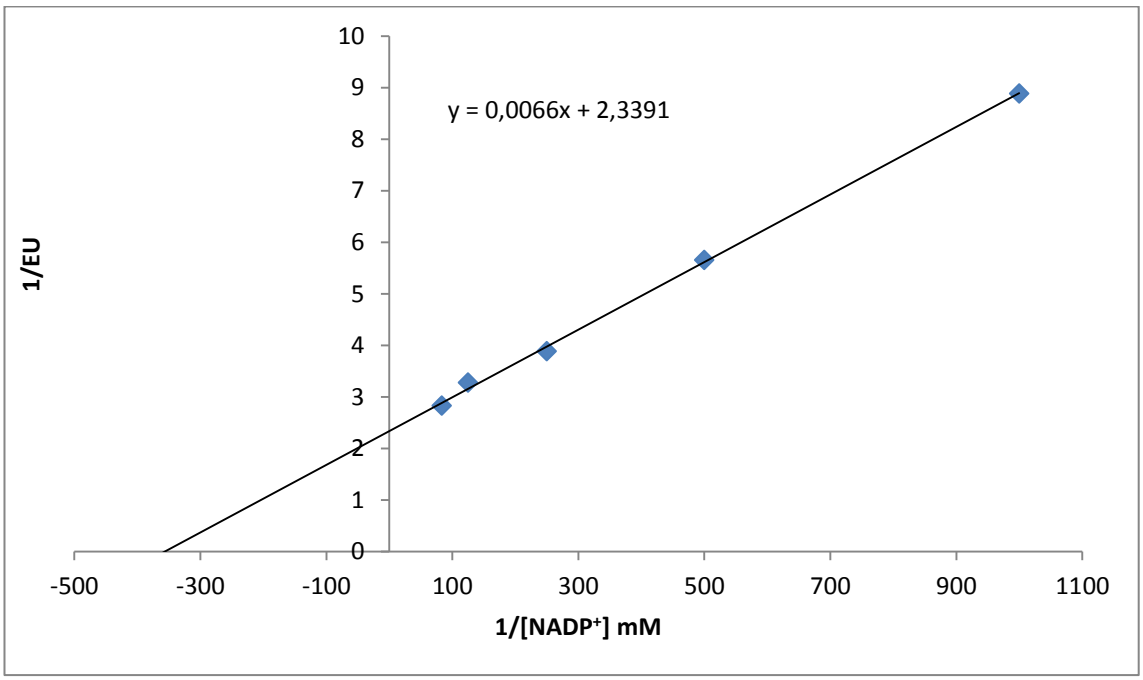
Enzimin subsrat ve Koenzim için K_M ve Vmax değerleri Linewer-Burk grafikleri ile belirlenmiştir. Çalışmaların sonucu elde edilen sonuçlar çizelge 4.3. 'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Solucan G6PD enziminin subsratları için bulunan K_M ve V_{max} değerleri

Substratlar	K_M (mM)	V_{max} (EÜ/ml)
$NADP^+$	0.0020 mM	0.42
6PGA	0.13 mM	1.29



Şekil 4.7. Solucan 6PGD enziminin KM ve Vmax değerlerini bulmak için 5 farklı G6P derişimi kullanılarak çizilen grafik.

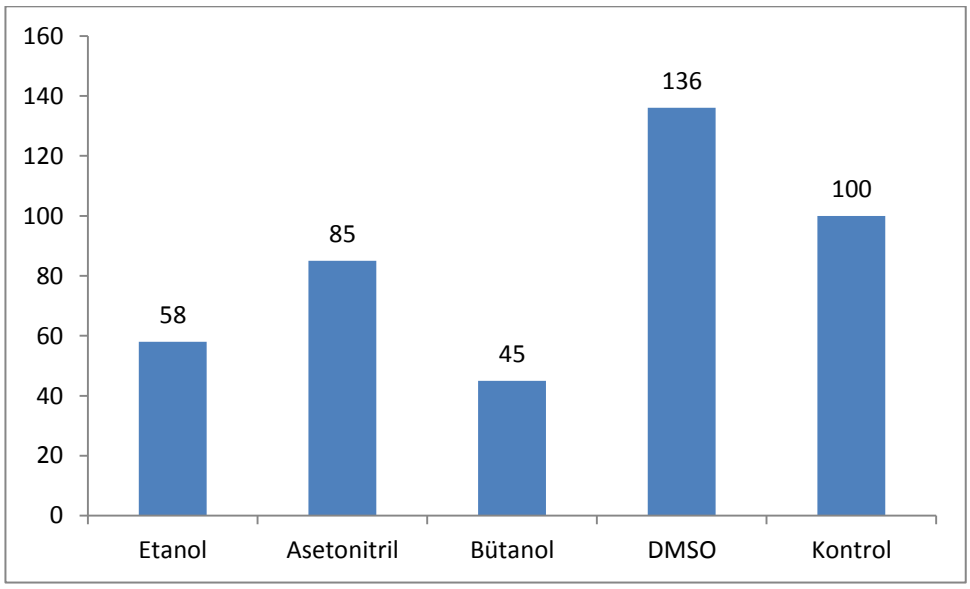


Şekil 4.8. Solucan 6GPD enziminin K_M ve V_{max} değerlerini bulmak için 5 farklı $NADP^+$ derişimi kullanılarak çizilen grafik.

Kirleticilerin Etkilerinin Belirlenmesine Ait Çalışmaların Sonuçları

Pestisitlerin ve metal iyonlarının hazırlandığı stok çözeltileri kullanılarak; solucandan saflaştırılan G6PD enzim aktivitesi üzerinede Oxamyl, Carboryl, Diniconazole, Metalaxyl, Methomyl, Carbofuran, Simazine, Tebuconazol, Atrazine, Propoxur, 1-naphthol,2,4 – D pestisitlerinin ve $Pb(NO_3)_2$, $Cr(NO_3)_2$, $HgCl_2$, $FeSO_4$, $Ni(NO_3)_2$, $Cd(NO_3)_2$, $Co(NO_3)_2$, $Al(NO_3)_3$ metal iyonlarının inhibisyon etkilerine bakıldı. Yapılan çalışmalarda test edilen konsantrasyon aralıklarında inhibisyon veya aktivasyon etkisi belirlenemedi.

Enzim aktivitesi üzerinde etanol, asetonitril, bütanol ve DMSO'nun hacim olarak %10'luk oranlarının etkisi test edildi. Şekil 4.6.'da görüldüğü gibi etanol, bütanol güçlü bir inhibisyon etkisi gösterirken, asetonitril onara göre daha az inhibisyon etkisi göstermiştir. DMSO enzim aktivitesini %136 oranında aktive etmiştir.



Şekil 4.9. Solucan 6PGD enzimi üzerine organik çözücülerin etkisi

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

6PGD enzimi canlı metabolizmanın önemli enzimlerindendir. Metabolizma için gerekli indirgeyici molekül olan NADPH ve birçok biyomolekülün yapıtaşı olan riboz-5-fosfat, G6PD ve 6-PGD enzimlerinin katelizlediği reaksiyonlar sonucu oluşur(Lehninger 2008). NADPH kullanan glutatyon redüktaz (GR), glutatyon disülfiti (GSSG) indirgeyerek glutatyona (GSH) dönüştüren antioksidan bir enzimdir(Meister 1988)

6PGD enzimi aktivite ölçümleri Beutler metoduna göre oda şartlarında yapılmıştır. Aktivite 6PGD enziminde ortamdaki NADPH oluşumuyla ölçülmüştür. Enzimlerin saflaştırılmasında, karekterizasyon işlemelerinde, kinetik çalışmalarında, maddelerin inhibisyon etkilerinin belirlenmesinde bu yöntem kullanılmıştır.

Sözü edilen enzim 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonuyla birçok dokudan saflaştırılmıştır(Yilmaz et al. 2003, Erat 2005). Bu çalışma kapsamında toprak solucanından 6PGD enzimi 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonu kullanılarak saflaştırıldı. Saflaştırma basamakları; homojenat hazırlama ve afinite kromatografisi olmak üzere iki basamaktan ibarettir. Saflaştırma işlemleri homojenat hazırlama dahil yaklaşık olarak 5 saat sürmekte ve sonuçta enzim kolondan edilebilmektedir. Bu işlemler sonucunda ortalama verim %28 gibi değer olarak belirlenmiştir. Saflaştırma katsayısı 232 kattır. Enzimin spesifik aktivitesi 11,63 EÜ/mg olarak ölçülmüştür. Elüsyon işlemi her bir enzim için 340 nm'de spektrofotometrik olarak takip edilmiştir. Bu saflaştırma yönteminin avantajları enzimlerin denatüre olma oranının az olması, saflaştırma süresinin kısalığı, daha az kimyasal kullanılması, çok hızlı ve yüksek verimle saflaştırma yapılmasıdır. Sözü edilen enzimlerin saflık derecesi SDS-poliakrilamid jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir. Elektroforez sonucunda 6PGD için tek bantlar elde edilmiştir.

Saflaştırma basamaklarında, sıcaklığın kontrol altında tutmak ve aktivite kaybını azaltmak için daima kar ile soğutma yapılmıştır. Çözeltilerdeki protein miktarı mg seviyesinde Brodfard yöntemiyle belirlenmiştir. Bu yöntem hassasiyeti, daha az zaman alması ve az reaktif gerektirdiği için tercih edilmiştir.

2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonundan elüsyonla alınan 6PGD enzim numunelerinin, SDS-PAGE'de tek bantları elde edilmiştir. Jel üzerinde R_f değerleri belirlenerek, standarlarla çizilen grafiğe göre molekül kütleleri hesaplanmıştır. R_f değerleri ve molekül kütleleri sıçan akciğer dokusunda 42,25 kDa olarak hesaplanmıştır.

6PGD enziminin en iyi aktivite gösterdiği pH değerleri sıçan akciğer dokusunda 7,0 (fosfat) olarak belirlenmiştir. Optimum tuz konsantrasyonu 5-40 mM aralığında fosfat için 5 mM olarak belirlenmiştir. Bu veriler enzimin düşük tuz konsantrasyonlarında aktivitesinin fazla olduğunu göstermektedir. Bu durum literatürle benzerlik göstermektedir (Adem and Ciftci 2016a, Adem and Ciftci 2016b).

6PGD enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerleri 60^oC olarak belirlenmiştir. Sıcaklıkla enzim aktivitesinin artış gösterdiği gözlenmiştir. Enzimin akciğer dokusunda belirlenen optimum sıcaklık değeri, sıçan eritrositi ile; kalp dokusu için belirlenen değer de sıçan ince bağısak dokusunda bulunan değerlerle aynıdır(Beydemir, Çiftçi et al. 2004, Ceyhan, Danişan et al. 2005)

6PGA ve $NADP^+$ subsratları için hesaplanan K_M sabitleri sırasıyla 0,13 ve 0,0030 mM; V_{max} değerleri aynı sıra ile 0,42 ve 1,29 EÜ/ml olarak tespit edilmiştir. K_M sabitlerinde görüldüğü gibi saflaştırılan 6PGD enzimlerin $NADP^+$'ya olan ilgisi 6PGA'ya göre daha fazladır. Çünkü K_M değeri daha küçüktür. Bu durum literatürle benzerlik göstermektedir (Corpas, García-Salguero et al. 1995, Danişan et al. 2005)

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.

Yapılan çalışmada 12 pestisitin, 8 metal iyonunun ve 4 organik çözücünün, solucandan saflaştırılan 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerinde etkisi araştırılmıştır. Pestisit ve metal iyonlarının çalışılan konsantrasyonlarda herhangi bi etkisi tespit edilmemiştir. Bu test edilen konsantrasyonlarda enzim aktivitesinin metal

ve pestisitlerin toksin etkisinin olmayacağı anlamına gelmektedir. Bu açıdan önemli bir sonuçtur.

Organik çözücülerde toprak için diğer bir kirletici sınıfı oluşturmaktadır. Etanol, dinitrofenil asetat ve bütanol %10 final konsantrasyonunda %58, 85 ve 45 oranında enzim aktivitesini inhibe etmiştir. DMSO ise aynı konsantrasyonda %136 oranında aktive etmiştir.

Sonuç olarak, toprağın önemli birleşeni olan toprak solucanından 6PGD enzimi saflaştırılmıştır. Enzim biyokimyasal olarak karakterize edilmiş ve bazı toprak kirleticilerinin enzimin aktivitesi üzerindeki etkisi çalışılmıştır.

KAYNAKLAR

Adem, S. and M. Ciftci (2016). "Purification and biochemical characterization of glucose 6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase and glutathione reductase from rat lung and inhibition effects of some antibiotics." Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry **31**(6): 1342-1348.

Adem, S. and M. Ciftci (2016). "Purification and Characterization of Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase, 6-Phosphogluconate Dehydrogenase, and Glutathione Reductase from Rat Heart and Inhibition Effects of Furosemide, Digoxin, and Dopamine on the Enzymes Activities." Journal of Biochemical and Molecular Toxicology **30**(6): 295-301.

Barenghi, L., et al. (1987). "Erythrocytic glucose-6-phosphate dehydrogenase measured by a differential pH technique." Clinical chemistry **33**(4): 579-582.

Betts, S. A. and R. J. Mayer (1975). "Purification and properties of 6-phosphogluconate dehydrogenase from rabbit mammary gland." Biochemical Journal **151**(2): 263-270.

Beutler, E. (1971). Red cell metabolism manual of biochemical methods. London, Academic Press.

Beydemir, Ş., et al. (2004). "6-Phosphogluconate dehydrogenase: Purification, characterization and kinetic properties from rat erythrocytes." Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences **28**(4): 707-714.

Beydemir, Ş., et al. (2003). "Purification of glucose 6-phosphate dehydrogenase from goose erythrocytes and kinetic properties." Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences **27**(5): 1179-1185.

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**(1-2): 248-254.

Carne, A. (1982). "Purification by dye-ligand chromatography of an NADP-dependent enzyme, 6-phosphogluconate dehydrogenase from lamb's liver." Analytical Biochemistry **121**(2): 227-229.

Ceyhan, D., et al. (2005). "Purification and kinetic properties of 6-phosphogluconate dehydrogenase from rat small intestine." Protein Journal **24**(5): 293-301.

Ceyhan, D., et al. (2005). "Purification and kinetic properties of 6-phosphogluconate dehydrogenase from rat small intestine." The protein journal **24**(5): 293-301.

Cook, P. F. and W. W. Cleland (2007). Enzyme kinetics and mechanism, Garland Science.

Corpas, F. J., et al. (1995). "Kinetic properties of hexose-monophosphate dehydrogenases. II. Isolation and partial purification of 6-phosphogluconate dehydrogenase from rat liver and kidney cortex." Molecular and cellular biochemistry **144**(2): 97-104.

Corpas, F. J., et al. (1994). "Kinetic properties of hexose-monophosphate dehydrogenases. I. Isolation and partial purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase from rat liver and kidney cortex." Life sciences **56**(3): 179-189.

Erat, M. (2005). "Purification of 6-phosphogluconate dehydrogenase from chicken liver and investigation of some kinetic properties." Preparative Biochemistry and Biotechnology **35**(1): 53-69.

Garrido-Pertierra, A. (1986). "Purification and properties of the enzyme 6-phosphogluconate dehydrogenase from Dicentrarchus labrax L. liver." Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry **83**(1): 215-220.

Hanau, S., et al. (1996). "6-Phosphogluconate Dehydrogenase from Trypanosoma Brucei: Kinetic Analysis and Inhibition by Trypanocidal Drugs." European Journal of Biochemistry **240**(3): 592-599.

Hutchison, J. S., et al. (1984). "Kinetics for changes in enzyme synthesis and mRNA content and hormones required for induction of 6-phosphogluconate dehydrogenase in hepatocytes." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression **781**(1-2): 30-38.

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

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.

Lehninger, A. (2008). "Lehninger Principles Of Biochemistry & EBook Author: Albert Lehninger, David L. Nelson, Michael M. Cox, Publisher: W. H."

Meister, A. (1988). "Glutathione metabolism and its selective modification." Journal of Biological Chemistry **263**(33): 17205-17208.

Menezes, L., et al. (1989). "Glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase from Lactobacillus casei: responses with different modulators." Indian journal of biochemistry & biophysics **26**(5): 329-333.

Murray, R., et al. (2003). Harper's illustrated biochemistry (LANGE basic science), McGraw-Hill Medical.

Nordenberg, J., et al. (1984). "Inhibition of 6-phosphogluconate dehydrogenase by glucose 1, 6-diphosphate in human normal and malignant colon extracts." Cancer letters **23**(2): 193-199.

Ohara, H., et al. (2004). "Purification and characterization of NAD-specific 6-phosphogluconate dehydrogenase from Leuconostoc lactis SHO-54." Journal of bioscience and bioengineering **98**(2): 126-128.

Pearse, B. and J. I. Harris (1973). "6-phosphogluconate dehydrogenase from Bacillus stearothermophilus." FEBS Letters **38**(1): 49-52.

Pearse, B. M. and M. A. Rosemeyer (1975). [49] 6-Phosphogluconate dehydrogenase from human erythrocytes. Methods in Enzymology, Elsevier. **41:** 220-226.

Procsal, D. and D. Holten (1972). "Purification and properties of rat liver 6-phosphogluconate dehydrogenase. Activity at normal in vivo concentration of coenzyme." Biochemistry **11**(7): 1310-1314.

Rippa, M., et al. (1971). "Evidence for a tyrosine residue at the triphosphopyridine nucleotide-binding site of 6-phosphogluconate dehydrogenase." Archives of Biochemistry and Biophysics **147**(2): 487-492.

Toews, M. L., et al. (1976). "6-Phosphogluconate dehydrogenase. Purification and kinetics." Journal of Biological Chemistry **251**(22): 7127-7131.

Topham, C. and K. Dalziel (1986). "The chemical mechanism of sheep liver 6-phosphogluconate dehydrogenase. A Schiff-base intermediate is not involved." Biochemical Journal **234**(3): 671-677.

Weisz, K. S., et al. (1985). "Human brain 6-phosphogluconate dehydrogenase: Purification and kinetic properties." Journal of Neurochemistry **44**(2): 510-517.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı :Uğur TOPSAKAL

Doğum Yeri : Gaziantep

Doğum Tarihi : 15.04.1989

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

Adres : Yenidoğan mah. Kılıçaslan cad. Birkent sitesi 11/33 Melikgazi/KAYSERİ

Tel : (+09) 546 486 53 34

e-mail : ugurtopsakal@hotmail.com

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Ayten-Kemal Akınal Anadolu Lisesi 2003-2007

Lisans : Selçuk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi 2008-2013

Yüksek Lisans : Çankırı Karatekin Üniversitesi Kimya-Biyokimya A.B.D. 2014-2019

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

Çankırı Ağız ve Diş Sağlığı Merkezi 2013-2015

Kayseri Nimet Bayraktar Ağız ve Diş Sağlığı Merkezi 2015-Halen