



**TİYOREDOKSİN REDÜKTAZ ENZİMİNİN GÖKKUŞAĞI
ALABALIĞI SOLUNGAÇ DOKULARINDAN SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI
AĞIR METAL İYONLARININ ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Hatice AKYOL

Yüksek Lisans Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Müslüm KUZU

2019

Her hakkı saklıdır

T.C.
AĞRI İBRAHİM ÇEÇEN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TİYOREDOKSİN REDÜKTAZ ENZİMİNİN GÖKKUŞAĞI
ALABALIĞI SOLUNGAÇ DOKULARINDAN SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI
AĞIR METAL İYONLARININ ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

HATİCE AKYOL

AĞRI

2019

Her hakkı saklıdır

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum “Tiyoredoksin Redüktaz Enziminin Gökkuşığı Alabaliği Solungaç Dokularından Saflaştırılması ve Bazı Ağır Metal İyonlarının Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi.” adlı tezin tamamen kendi çalışmam olduğunu ve her alıntıya kaynak gösterdiğimi taahhüt eder, tezimin kâğıt ve elektronik kopyalarının Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü arşivlerinde aşağıda belirttiğim koşullarda saklanmasına izin verdiğimi onaylarım.

Lisansüstü Eğitim-Öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim.

Tezimin tamamı her yerden erişime açılabilir.

Tezim sadece Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi yerleşkelerinden erişime açılabilir.

Tezimin yıl süreyle erişime açılmasını istemiyorum. Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin tamamı her yerden erişime açılabilir.

16.07.2019

Hatice AKYOL



T.C.
AĞRI İBRAHİM ÇEÇEN ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü



TEZ ONAY FORMU

TİYOREDOKSİN REDÜKTAZ ENZİMİNİN GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI SOLUNGAÇ
DOKULARINDAN SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI AĞIR METAL İYONLARININ ENZİM
AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Doç. Dr. Müslüm KUZU danışmanlığında, Hatice AKYOL tarafından hazırlanan bu çalışma, 16/07/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Doç. Dr. Veysel ÇOMAKLI

İmza :

Üye : Doç. Dr. Müslüm KUZU

İmza :

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Namık KILINÇ

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu .../.../201.. tarih ve / nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. İbrahim HAN
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan diğer ve başka kaynaklardan yapılan bildiri, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5816 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TİYOREDOKSİN REDÜKTAZ ENZİMİNİN GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI SOLUNGAÇ DOKULARINDAN SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI AĞIR METAL İYONLARININ ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Hatice AKYOL

Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Müslüm KUZU

Tioredoksin sistemi, tioredoksin redüktaz (E.C 1.6.4.5; TrxR), tioredoksin (Trx) ve nikotinamid adenin dinükleotit fosfatından (NADPH) oluşur ve hücre büyümesine, apoptoz, antioksidan savunma, redoks sinyallemesine vb. katılır. Bu çalışmada, sitoplazmik TrxR enzimi, gökkuşağı alabalığı solungaç dokusundan ısı denatürasyonu ve 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi teknikleri kullanılarak saflaştırılmıştır. Enzimin saflığı ve monomer moleküler ağırlığı, SDS PAGE ile belirlendi. Enzimin substratları olan NADPH ve 5,5' Dithiobis (2-nitrobenzoik asit) için K_M ile V_{max} değerleri, Lineweaver-Burk grafiği ile hesaplandı. Optimum pH ve optimum iyonik şiddet değerleri sırasıyla 7.75 ve 300 mM olarak tespit edildi. Daha sonra Ni^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Sr^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Cr^{3+} , Fe^{3+} , Al^{3+} ve Ag^+ metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerindeki *in vitro* etkileri analiz edildi. İnhibisyon etkisi gösteren iyonlar için IC_{50} değerleri belirlendi ve K_i değerleri Cheng Prusoff denklemi ile hesaplandı.

2019, 86 sayfa

Anahtar kelimeler: Tioredoksin Redüktaz, Enzim, saflaştırma, ağır metal, inhibisyon

ABSTRACT

MS. Thesis

PURIFICATION OF THIOREDOXIN REDUCTASE ENZYME FROM RAINBOVV TROUTH GILL TISSUE AND INVESTIGATION THE EFFECTS OF SOME HEAVY METAL IONS ON THE ENZYME ACTIVITY

Hatice AKYOL

Ağrı İbrahim Çeçen University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Müslüm KUZU

Thioredoxin system is formed of thioredoxin reductase (E.C 1.6.4.5; TrxR), thioredoxin (Trx) and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), and participates in cell growth, apoptosis, antioxidant defense, redox signaling, etc. In this study, cytoplasmic TrxR enzyme was purified by using heat denaturation and 2',5'-ADP Sepharose 4B affinity chromatograph techniques from rainbow trout gill tissues. The purity and the monomer molecular weight of the enzyme were determined with SDS-PAGE. K_M and V_{max} values for NADPH and 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid), the substrates of the enzyme, were calculated by means of Lineweaver-Burk graphic. Optimal pH and optimal ionic strength values were determined as 7,75 and 300 mM, respectively. Then, *in vitro* effects of the Ni^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Sr^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Cr^{3+} , Fe^{3+} , Al^{3+} and Ag^+ metal ions on the activity of enzyme were analyzed. IC_{50} values were determined for the ones showing inhibition effect and their K_i values were calculated by means of Cheng-Prusoff equation.

2019, 86 pages

Keywords: Thioredoxin Reductase, Purification, Heavy Metal, Inhibition, Enzyme

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Çalışmalarım esnasında bilgi, tecrübesi ve yönlendirici telkinleri ile benden yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Müslüm KUZU'ya, laboratuvar çalışmalarındaki yardımlarından dolayı Sayın Doç. Dr. Ramazan DEMİRDAĞ'a, bu süreçte desteğini esirgemeyip bana yol gösteren Sayın Yılmaz SABUNCU'ya teşekkürlerimi borç bilirim.

Öğrenimim boyunca benden destek, sabır ve anlayışını esirgemeyen, hayatımın bütün dönemlerinde aldığım kararlarda arkamda duran ve desteğini sunan aileme gönülden teşekkürlerimi sunarım.

HATİCE AKYOL

Temmuz 2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ÇİZELGE LİSTESİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar LİSTESİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Enzimler	1
1.1.1. Enzimlerin Kimyasal Yapıları	4
1.1.2. Kofaktör, Koenzim ve Apoenzim	4
1.1.3. Enzimlerin Adlandırılmaları ve Sınıflandırılmaları	5
1.1.4. Enzim İnhibisyonu	6
1.2. Tiyoredoksin Sistemi.....	8
1.3. Tiyoredoksin Redüktaz.....	13
1.3.1. Tiyoredoksin Redüktaz Yapısı.....	17
1.4. TrxR/ Trx Sisteminin Biyolojik Aktiviteleri	17
1.4.1. DNA Sentezindeki ve Diğer Rollerini	17
1.4.2. Tiyoredoksin Sistemi ve Oksidatif Stres.....	19
1.5. Kanser ve Tiyoredoksin.....	20
1.6. Tedavide Tiyoredoksin Redüktazın Hedef Olarak Kullanılması	21
1.7. Ağır Metaller	22
2. KAYNAK ÖZETLERİ	24
3. MATERYAL VE YÖNTEM	29
3.1 Materyal.....	29
3.1.1 Kullanılan kimyasal maddeler	29
3.1.2 Kullanılan alet ve cihazlar	29
3.1.3 Kullanılan çözeltiler ve hazırlanmaları	30
3.1.3.a Aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler	30
3.1.3.b. Solungaç dokusundan homojenat hazırlamak için kullanılan çözeltiler.....	30
3.1.3.c. Afinite kolonunda kullanılan çözeltiler.....	30

3.1.3.d. Bradford yöntemiyle protein tayini için kullanılan çözeltiler....	31
3.1.3.e. Elektroforez için kullanılan çözeltiler.....	31
3.2 Yöntemler	32
3.2.1. Tiyoredoksin Redüktaz enziminin aktivite tayini	32
3.2.2 Protein Tayini.....	33
3.2.2.a Kalitatif protein tayini	33
3.2.2.b Bradford yöntemiyle protein tayini.....	33
3.2.3. Gökkuşığı alabalığının solungaç dokusundan TrxR enziminin saflaştırılması	34
3.2.3.a. Solungaç dokusunun temini ve homojenat hazırlanması.....	34
3.2.3.b. TrxR enzimi için afinite jelinin hazırlanması ve TrxR enziminin saflaştırılması	34
3.2.4. SDS-PAGE ile enzim saflığının kontrolü.....	35
3.3. Gökkuşığı alabalığı solungacından saflaştırılan TrxR enzimiyle ilgili yapılan karakterizasyon çalışmaları.....	36
3.3.1. Gökkuşığı alabalığı solungacından saflaştırılan TrxR enziminin molekül kütlesinin SDS-PAGE ile tayini.....	36
3.3.2. Gökkuşığı alabalık solungaç dokusundan saflaştırılan TrxR enzimi için optimum pH'nın bulunmasına yönelik çalışmalar.....	37
3.3.3. Gökkuşığı alabalık solungaç dokusundan saflaştırılan TrxR enzimi için optimum iyonik şiddetin bulunmasına yönelik çalışmalar	37
3.3.6. DTNB ve NADPH substratları için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik çalışmalar.....	37
4.BULGULAR VE YORUM.....	39
4.1.Kantitatif protein tayini için kullanılan standart grafik.....	39
4.2. Gökkuşığı Alabalık Solungaç Dokusundan TrxR Enziminin Saflaştırılması Sonuçları	39
4.2.1. Afinite kromatografisi sonuçları.....	39
4.2.2. Gökkuşığı Alabalık Solungaç Dokusundan Saflaştırılan TrxR Enziminin SDS-PAGE İle Saflık kontrolü.....	40
4.3. Gökkuşığı Alabalık Solungaç Dokusundan Saflaştırılan TrxR Enziminin Karakterizasyon Çalışmalarının Sonuçları.....	41
4.3.1. Gökkuşığı alabalık solungaç dokusundan TrxR enziminin alt birimlerinin SDS-PAGE ile molekül kütlesinin belirlenmesi sonuçları.....	41
4.3.2. Gökkuşığı Alabalık Solungaç dokusundan saflaştırılan TrxR Enzimi için optimum pH bulunmasına yönelik sonuçlar.....	41

4.3.3. Gökkuşığı Alabalık Solungaç dokusundan saflaştırılan TrxR enziminin optimum iyonik şiddetinin belirlenmesine yönelik sonuçlar	42
4.3.4. DTNB ve NADPH substratları için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesine yönelik sonuçlar.....	43
4.4.1. Gökkuşığı Alabalığı solungaç dokusundan saflaştırılan TrxR enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren metal iyonları için IC_{50} ve K_i değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışmaların sonuçları	45
4.4.1.a. Ag^+ iyonunun gökkuşığı alabalığı solungaç TrxR enzimi aktivitesi üzerine etkisi.....	46
4.4.1.b. Ni^{2+} iyonunun Gökkuşığı Alabalığı solungaç TrxR enzimi aktivitesi üzerine etkisi.....	47
4.4.1.c. Pb^{2+} iyonunun Gökkuşığı Alabalığı solungaç TrxR enzimi aktivitesi üzerine etkisi.....	48
4.4.1.d. Fe^{3+} iyonunun Gökkuşığı Alabalığı solungaç TrxR enzimi aktivitesi üzerine etkisi.....	49
4.4.1.e. Cu^{2+} iyonunun Gökkuşığı Alabalığı solungaç TrxR enzimi aktivitesi üzerine etkisi.....	50
4.4.1.f. Cr^{3+} iyonunun Gökkuşığı Alabalığı solungaç TrxR enzimi aktivitesi üzerine etkisi.....	51
5. SONUÇ ve TARTIŞMA	53
KAYNAKÇA	59
ÖZGEÇMİŞ.....	72

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ATO	: Arsenik trioksidin
DTNB	: 5,5'-Dithiobis(2-Nitrobenzoik) asit
EDTA	: Etilen daimin tetraasetikasit
EGF	:Epidermal büyüme faktörü
ES	: Enzim substrat kompleksi
FAD	: Flavin adenin dinükleotid
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: İndirgenmiş glutasyon
IC ₅₀	: Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
K _i	: Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma denge sabiti
K _M	: Michaelis-Menten sabiti
NADH	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
RNA	: Ribonükleikasit
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
TCA	: Triklor asetik asit
TEMED	: N,N,N',N'-tetrametiletildiamin
TGR	: Tiyoredoksin ve glutasyon redüktaz
TNF α	: Tümör nekrozis faktör alfa
Tris	: Trihidroksimetil aminometan
TRX	:Tiyoredoksin
TrxR	: Tiyoredoksin redüktaz

UV : Ultraviyole
VEBF : Vasküler endotel büyüme faktörü
Vmax : Maksimum hız



ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 4.1. TrxR Enziminin saflaştırma tablosu	40
Çizelge 4.2. Gökkuşığı alabalık solungaç TrxR enziminin optimum pH'sını belirlemek için yapılan aktivite ölçüm sonuçları.	42
Çizelge 4.3. Gökkuşığı Alabalık solungaç TrxR enziminin optimum iyonik şiddeti için KH_2PO_4 tamponu kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları. 43	
Çizelge 4.4. Gökkuşığı alabalığı solungaç dokusu TrxR enziminin NADPH substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik çalışma sonuçları	44
Çizelge 4.5. Gökkuşığı alabalığı solungaç dokusu TrxR enziminin DTNB substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik çalışma sonuçları	44
Çizelge 4.6. Ag^+ iyonunun Gökkuşığı Alabalığı solungaç TrxR enzimi aktivitesi üzerine etkisi.....	46
Çizelge 4.7. Ni^{2+} iyonunun Gökkuşığı Alabalığı solungaç TrxR enzimi aktivitesi üzerine etkisi.....	47
Çizelge 4.8. Pb^{2+} iyonunun Gökkuşığı Alabalığı solungaç TrxR enzimi aktivitesi üzerine etkisi.....	48
Çizelge 4.9. Fe^{3+} iyonunun Gökkuşığı Alabalığı solungaç TrxR enzimi aktivitesi üzerine etkisi.....	49
Çizelge 4.10. Cu^{2+} iyonunun Gökkuşığı Alabalığı solungaç TrxR enzimi aktivitesi üzerine etkisi.....	50
Çizelge 4.11. Cr^{3+} iyonunun Gökkuşığı Alabalığı solungaç TrxR enzimi aktivitesi üzerine etkisi.....	51

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Holoenzim ve apoenzim yapıları	5
Şekil 1.2. Tersinir ve tersinmez inhibitör şeması	8
Şekil 1.3. Tiyoredoksin sistem	10
Şekil 1.4. Küçük ve büyük TrxR'lerin bölge organizasyonunun karşılaştırılması	14
Şekil 4.5. Proteinlerin Bradford yöntemiyle kantitatif tayininde kullanılan standart grafik.....	39
Şekil 4.6. Afinite kromatografisi ile saflaştırılan TrxR enziminin SDS-PAGE ile saflık kontrolü. 2. kuyu ve 3. Kuyu saflaştırılan TrxR, 1 kuyu standart proteinler (E. Coli b-galaktosidaz 116 kDa, insan sütü laktoferrin 90 kDa, tavşan kası piruvat kinaz 58 kDa, domuz kalp fumaraz 48.5 kDa ve tavşan kası triosefosfat izomeraz 26.6 kDa).....	40
Şekil 4.7. SDS-PAGE sonucu çizilen R _f - log MA grafiği	41
Şekil 4.8. TrxR enzimi için pH-aktivite grafiği (kullanılan tamponlar 300 mM K-fosfat, pH 6.5, 6.75, 7.0, 7.25, 7.5, 7.75, 8.0)	42
Şekil 4.9. Değişik konsantrasyonlardaki KH ₂ PO ₄ tamponu kullanılarak Gökkuşacağı Alabalık solungaç TrxR enzimi için yapılan iyonik şiddet-aktivite grafiği.	43
Şekil 4.10. NADPH için K _M ve V _{max} değerlerinin belirlenmesi için kullanılan grafik	44
Şekil 4.11. DTNB için K _M ve V _{max} değerlerinin belirlenmesi için kullanılan grafik	45
Şekil 4.12. Gökkuşacağı Alabalığı solungaç TrxR enzimi üzerine Ag ⁺ iyonunu inhibisyon etkisini gösteren grafik	47
Şekil 4.13. Gökkuşacağı Alabalığı solungaç TrxR enzimi üzerine Ni ²⁺ iyonunu inhibisyon etkisini gösteren grafik	48

Şekil 4.14. Gökkuşığı Alabalığı solungaç TrxR enzimi üzerine Pb^{2+} iyonunu inhibisyon etkisini gösteren grafik	49
Şekil 4.15. Gökkuşığı Alabalığı solungaç TrxR enzimi üzerine Fe^{3+} iyonunu inhibisyon etkisini gösteren grafik	50
Şekil 4.16. Gökkuşığı Alabalığı solungaç TrxR enzimi üzerine Cu^{2+} iyonunu inhibisyon etkisini gösteren grafik	51
Şekil 4.17. Gökkuşığı Alabalığı solungaç TrxR enzimi üzerine Cr^{3+} iyonunu inhibisyon etkisini gösteren grafik	52



TABLULAR LİSTESİ

Tablo 1.1. Çeşitli organizmalarda tiyoredoksinin görevi.....	12
Tablo 1.2. Tiyoredoksin redüktazların bazı özellikleri	16
Tablo 3.1. Aktivite ölçümündeki kuvvet içeritkleri.	33
Tablo 3.2. SDS Page Tablosu.....	36
Tablo 4.1. IC ₅₀ ve K _i Değerleri Tablosu.....	45



1. GİRİŞ

1.1. Enzimler

Enzimlere genel olarak bakıldığında, canlı organizmalarca üretilen spesifik katalitik fonksiyonlara sahip ve büyük çoğunluğu protein yapısında olan moleküller olduğu anlaşılmaktadır.

Hücrelerden oluşmuş canlılar, durup dinlenmeden reaksiyonlar gerçekleştiren kimyasal laboratuvarlar gibidir. Bu laboratuvarlarda iş gören kimyagerler ise enzim olarak adlandırılan biyomakromoleküllerdir. Biyokimya tarihinde en fazla yer alan çalışmalar enzimler üzerinde yapılmıştır (Lehninger 2005, Demirdağ, 2012).

Canlıların hayati fonksiyonlarını gerçekleştirebilmeleri ve sürdürebilmeleri için elzem olan biyokimyasal reaksiyonlardan enzimler sorumludurlar. Enzimleri protein yapısında olmalarına rağmen biyokimyasal reaksiyonları katalize etme özelliği onları diğer protein moleküllerinden ayırır. Enzimler katalizör görevleri nedeniyle oldukça fazla çalışma alanı için ilgi odağı olmuştur (Enzyme Technical Association, 2001). Genel olarak enzimlerin katalize ettiği reaksiyonlarda bir spesifite görülmektedir ve enzimlerin üretimi genetik olarak kontrol altındadır. (Pandey and Ramachandran, 2006).

Enzimler suda çözünebilme özelliğinin yanı sıra genel olarak renksizdirler. Enzimlerin katalizledikleri reaksiyonlarda reaksiyona giren maddeye substrat denir. Reaksiyon esnasında enzim substratına tersinir olarak aktif bölgeden bağlanarak enzim-substrat kompleksi (ES) teşekkül etmektedir. Bu aşamadan sonra ise substrat, bir veya birden fazla ürüne dönüşebilmekte iken enzimler ise herhangi bir değişime uğramadan reaksiyondan çıktıklarından tekrar tekrar kullanılabilirlerdir. Aktif bir enzimin fonksiyonlarına bakıldığında; aslında enzimlerin, belirli atomlardan teşekkül eden ve biyokimyasal olayların canlı bünyesinde diğer yaşamsal fonksiyonlar ile uyum içerisinde vuku bulmasını sağlayan biyolojik sistemlerdeki reaksiyon katalizörleri olduğu görülmektedir (Karademir vd. 2002, Nelson ve Cox, 2004).

Canlılarda her hücrenin aslında kendi enzimini sentezlediği anlaşılmaktadır. Protein yapısında bulunan bu enzimler, olağanüstü bir durum olmadıkça hücre dışarısına çıkamamaktadır. Bu tip enzimlere intrasellüler enzimler denilmektedir. Bu tür enzimler de hücre içinde sentezlenmelerine karşın, dışarı çıkmayarak burada dissimilasyon ve assimilasyon reaksiyonlarında etkinlik göstermektedirler (John, 1987; Furlan ve Pant, 2006). Bazı belirli enzimler ise hücrede sentezi müteakip serbest hale geçmektedirler. Bu tip enzimlere de ekstrasellüler enzimler (Ekzoenzimler) denilmektedir. Bu enzimler hücrede üretildikten sonra hücre dışına salgılanarak aktivite gösterirler. Hücre dışındaki görevleri ise besinlerin hücre içerisine girebilecek kadar küçük moleküllere parçalanmalarını katalize etmektedir (Madsen vd. 1973; Kalisz, 1988; John ve Sons, 1998).

Enzimlerin tarihi süreci binlerce yıl öncesine dayanmaktadır. İnsanoğlu enzimlerden hep yararlanmışır. İlk biyoteknolojik işlemler alkol fermentasyonu, bira ve ekmek yapımı olarak bilinmektedir. Şarap üretiminde ilk olarak M.Ö. 2100 yıllarında Hammurabi Yasalarında bahsi geçen mayalardan yararlanmanın eski bir teknik olduğu anlatılmaktadır. Bununla birlikte ham enzim ekstratlarının kullanılması canlı organizmaların bütünüünün kullanımından çok daha öncedir. Homerus'un M.Ö. 600 yılında Truva destanında peynir yapımı işleminde sütün kesilmesini sağlamak "ficin" adı verilen incir ağacından hazırlanan ekstraktan (incir enzimi) yararlanıldığına dair bilgiler vardır (Buxbaum, 2007).

Enzim ve enzim üreten organizmalar binlerce yıl öncesinde kullanılırken, enzimler hakkında bilimsel araştırma ve bulgular 20. yüzyılda hız kazanmıştır (Ekren, 2013). Enzim özgülüğünü ilk kez 18. Yüzyılda Fransız kimyager Reamur, atmaca kuşunun mide suyunun kemiği yumuşatıp eti sindirebilirken mide suyu ile muamele edilen bitki preparatlarının değışime uğramadan kaldığını tespit etmek suretiyle kanıtlamıştır (Buxbaum, 2007). Kirchoff ise 1811'de, buğday nişastasının bir süre sonra dekstrin ve şekerlere dönüştüğünü belirlemesi, enzimoloji konusundaki ilk çalışmalar ise 1830'da Robiquet, Boutron ve Chalan'ın acıbadem tohumlarından

izole edilen bir glikozid olan amigdalinin acı badem özütü tarafından hidrolize edildiğini keşfetmesi olarak gösterilmiştir (Telefoncu, 1986).

Fransız kimyagerlerden Payen ile Persoz 1833 yılında, nişastayı hidroliz etmekte asitten daha kuvvetli olan ve filizlenmiş arpadan elde edilen bir maddeyi tespit etmişlerdir (Buxbaum, 2007). 1835'te Berzelius, nişastanın hidrolizini günümüzde amilaz olarak adlandırılan diastaz ile yapmayı başarmıştır. Daha sonra ise 1838'de önceleri ferment olarak isimlendirilen enzimler için, katalizör ifadesini ileri sürmüştür. Louise Pasteur 1850 yıllarında mayalar kullanılarak şekerin alkole dönüşümünü "fermentler" vasıtasıyla gerçekleştirildiği sonucuna ulaşmıştır. 1878 yılında Frederick W. Kühne burada kullanılan ve ferment adı verilen moleküllere "enzim" ismini vermiştir (Nelson ve Cox, 2004; Whitehurst ve van Oort, 2010).

1894 yılında Fischer, enzim ile substratları arasındaki özgüllüğü belirterek, anahtar-kilit modelini ileri sürmüştür ve böylece bir kısım temel kavramlar enzimolojiye girmiştir. 1897 yılında Alman bilim insanları canlı organizmalar olmadan da maya ekstratları ile şekerin alkole fermente olabileceğini bulmuşlar ve bu olayı gerçekleştiren moleküllerin hücre dışında da etkilerini sürdürebildiklerini kanıtlamışlardır (Nelson ve Cox, 2004; Buxbaum, 2007).

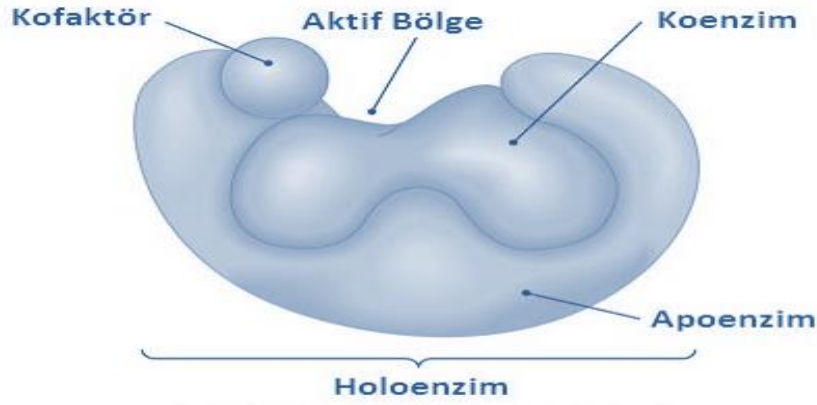
1950 ile 1960 yılları arasında yapılan enzimolojik çalışmalarda, Koshland 1958 yılında, enzimlerin yapılarının esnek olduğunu gösteren bilgilerin eldesi ile enzimlerin katalitik gücünü ve spesifikliğini açıklayabilmek için, indüklenmiş uyum (induced-fit) modelini öne sürmüştür. 1950'lerde, enzimlerin immobilizasyon işlemi gerçekleştirilmeye başlanmıştır. Glukozdan fruktoz eldesi (yüksek oranda früktoz içeren mısır şurubu eldesi), optik saf aminoasit eldesi ve penisilin G hidrolizi immobilize enzimlerin ilk endüstriyel uygulaması olarak bilinmektedir. 1950 yılından sonra 1960 yılına kadar enzimlerin çeşitli endüstri dallarında kullanılmaya başlanması ile, enzim teknolojisinde oldukça önemli ilerlemeler sağlanmıştır. Bu dönemde çok sayıda enzim saflaştırılarak karakterize edilmiştir (Ekren, 2013).

1.1.1. Enzimlerin Kimyasal Yapıları

Enzimlerin geneline bakıldığında, küçük bir kısım RNA molekülleri haricinde diğer tüm enzimlerin protein yapıda olduğu bilinmektedir. Enzimlerin katalitik aktivitelerini gösterebilmeleri için doğal konformasyonlarının korunmuş olması gerekmektedir. Yani bir enzim doğal üç boyutlu yapısını kaybederse veya alt birimlerine yıkılırsa katalitik aktivitesinin genellikle kaybolduğu anlaşılmıştır. Bunun için enzimin doğal konformasyonunun korunumu temeldir. Enzimlerin molekül ağırlıkları, diğer proteinlere benzer şekilde 12.000 daltondan başlayıp 1.000.000 daltonun üzerinde olabilmektedir (Nelson ve Cox, 2004).

1.1.2. Kofaktör, Koenzim ve Apoenzim

Bu üç kavram birbiriyle ilgilidir. Koenzimler, enzime geri dönüşümlü olarak bağlanmakta ve prosese doğrudan katılmaktadırlar. Apoenzime sıkı bağlı olmadıkları için, ürün oluşumundan hemen sonra ayrılmaktadırlar. Bazı enzimler sadece proteinden oluşurken çoğu enzim yapısı ve görevi itibarıyla farklı iki gruptan meydana gelmektedir. Bu iki gruptan biri olan apoenzim; enzimin özgüllüğünü sağlayan protein yapısındaki bölümü olarak tanımlanabilir. Dolayısıyla ısı ile kolayca denatüre olduğu görülmektedir. Bazı enzimlerin protein yapısında bulunmayan bileşenlere ihtiyaçları bulunabilir. Bazı enzimlerin yapısında bulunan ikinci bir grubu oluşturan bu bileşenler ise kofaktör olarak adlandırılır ve Fe^{+2} , Zn^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} gibi bir metal iyonu olabileceği gibi kompleks bir organik molekül de olabilir ki bu durumda koenzim olarak adlandırılır. Kofaktörsüz enzime apoenzim denir ve tek başına katalitik aktivite göstermez. En önemli yardımcı enzim grubu vitaminlerdir. Koenzimler proteinine sıkı sıkıya bağlı olduğu durumda prostetik grup olarak adlandırılmaktadır. Koenzimle apoenzimin oluşturduğu yapının bütününe ise holoenzim denilmektedir (Pandey ve Ramachandran, 2006).



Şekil 1.1. Holoenzim ve apoenzim yapıları
(<http://academic.pgcc.edu/~kroberts/Lecture/Chapter%205/enzymes.html>)

1.1.3. Enzimlerin Adlandırılmaları ve Sınıflandırılmaları

Enzimler aktif ya da inaktif olduğu durumlarına göre adlandırılmaktadır. Enzimin inaktif olduğunda substrat olarak kullandığı molekülün adının sonuna “jen” son eki getirilmek suretiyle isimlendirilmektedir. Katalitik olarak aktif olan enzimlerin adlandırılması ise substratının sonuna “ase=az” eklenerek katalize ettikleri reaksiyon türüne göre adlandırılmaktadır. Enzimlerin adlandırılmalarında bazı sıkıntılarının olması sebebiyle Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB)’nin önerdiği sistematik isimlendirmede ise enzimlerin altı ana sınıfa ayrıldığı görülmektedir (Sümengen, 2011). Bu enzimlerin sınıflandırılmalarına bakıldığında şu şekilde açıklamak mümkündür;

1. Oksidoredüktazlar: Enzimlerin bu sınıfı, yükseltgenme-indirgenme tepkimelerini katalizleyen enzimleri kapsamaktadır. Dehidrogenaz adı önerilmekle birlikte redüktaz ismi de kullanılabilir. Oksidaz ismi oksijen kullanılıyor ise kullanılmaktadır.

2. Transferazlar: Transferazlar proton dışındaki belirli grupların transferini katalizleyen enzimlerdir.

3. Hidrolazlar: Hidrolazlar, peptid, ester, glikoz, eter, asitanhidrit, C-O, C-N, C-C bağlarının bir su molekülünün katılmasıyla hidroliz

etmektedirler. Sistematik isimlendirilmesi daima hidrolaz içermekte ve beş alt gruptan oluşmaktadır:

- Proteazlar: Proteinler ile peptitlerin hidrolizini katalizlemektedir.
- Esteraz ve Lipazlar: Lipid ya da esterleri alkol veya asite hidroliz etmektedirler.
- Karbohidrazlar: Şekerler ya da şekerlerle alkoller arasındaki glikozid bağlarını hidrolizlemektedirler.
- Fosfatazlar: Fosforik asit-ester ile anhidritleri hidroliz etmektedirler.
- Amilazlar: Çeşitli amidleri ve peptid bağlarını hidroliz etmektedirler.

4. Liyazlar: Hidrolizden farklı susuz ortamda bulunan grupların uzaklaştırılmasını katalizleyen enzimlerdir. Ayrıca dekarboksilaz, dehidrataz ve aldolaz gibi isimleri vardır.

5. İzomerazlar: Bir moleküldeki yapısal ve geometrik dönüşümleri katalize eden enzimlerdir.

6. Ligazlar: Yüksek enerjili bağ içeren bir molekül kullanarak iki bileşiğin bağlanma reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir (Gerze, 2003).

1.1.5. Enzim İnhibisyonu

Enzim inhibisyonu bir inhibitör aracılığı ile enzimin etkinliğinin azaltılması olarak adlandırılır. Enzimin etkinliğini azaltan inhibitörler, bir patojeni öldürebildiği veya bir metabolizma ile alakalı dengesizliği sonlandırabildiği için çoğu ilacın da etken maddesi enzim inhibitör moleküllerinden teşekkül etmektedir. Bir inhibitörün enzime bağlanmasıyla bir substratın ilgili enzimin aktif bölgesi veyahut da enzimin kataliz bölgesine girmesi durdurabilmektedir. Bu inhibitör bağlanması ise iki şekilde meydana gelmektedir:

1) Tersinir inhibitör bağlanma:

Tersinir inhibitörler non-kovalent olarak enzime bağlanmaktadır. İnhibitör enzime, enzim-substrat kompleksine veya uygun olarak her ikisine de olmak üzere üç farklı tipte bağlanabilmektedir. Bu bağlanma şekilleri ise aşağıda açıklanan enzim inhibisyon türünü belirler.

Yarışmalı inhibisyon: Yarışmalı inhibisyonda inhibitör ve substrat enzim yapısındaki aktif bölgeye bağlanmak için yarışır. Yarışmalı inhibitörler genelde enzimin asıl substratına benzemektedir. Yarışmalı inhibisyonda V_{max} değişmemekle birlikte maksimum hıza ulaşmak için gerekli olan substrat miktarı artacağından görünür K_M artmaktadır (<http://www.turkcewiki.org/wiki/Enzim>, Erişim Tarihi: 27.01.2019).

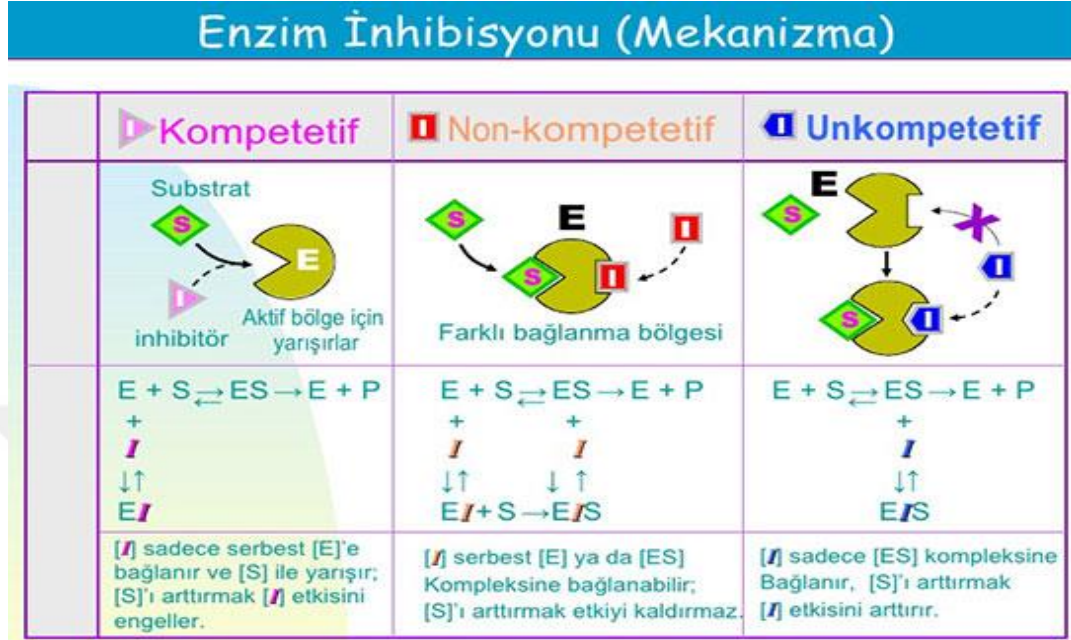
Sınırlı yarışmalı inhibisyon: Bir diğer adıyla yarı-yarışmalı inhibisyon türünde, inhibitör enzime aktif bölgesinin dışındaki bir bölgeden ve ES-kompleksine bağlanabilmektedir. Oluşan ESI-kompleksi ise katalizleme özelliği açısından inaktiftir. Bu tarz inhibisyona nadir rastlanmakla birlikte multimerik enzimlerde olabilmektedir (<http://www.turkcewiki.org/wiki/Enzim>, Erişim Tarihi: 27.01.2019).

Yarışmasız inhibisyon: Yarışmasız inhibisyon türünde inhibitör enzime substratla aynı anda bağlanabilir, yani bu tanım gereği, aktif merkeze dışında başka bir bölgeye bağlanırlar. Yarışmalı inhibisyon türünden farkı substrat konsantrasyonunun artırılması suretiyle inhibitörün bağlanması engellenemez ve V_{max} azalır. Ama V_{max} 'ın tersine substrat inhibitörden farklı bir bölgeden enzime bağlandığı için K_M değişim göstermez (Keha ve Küfrevioğlu, 2011).

2) Tersinmez inhibitör bağlanma

Tersinmez bağlantılarda inhibitörler genellikle enzim ile reaksiyona girerek onu kimyasal olarak değiştirmektedir. Bu tür inhibisyonda inhibitörler, enzimin aktivitesi için gerekli olan amino asitleri ve onların kalıntılarını değişime

uğratmaktadırlar (<http://www.enzimler.gen.tr/enzim-inhibisyonu.html> Erişim Tarihi: 27.01.2019).



Şekil 1. 2. Tersinir ve tersinmez inhibitör şeması (<http://www.enzimler.gen.tr/enzim-inhibisyonu.html>)

1.2. Tiyoredoksin Sistemi

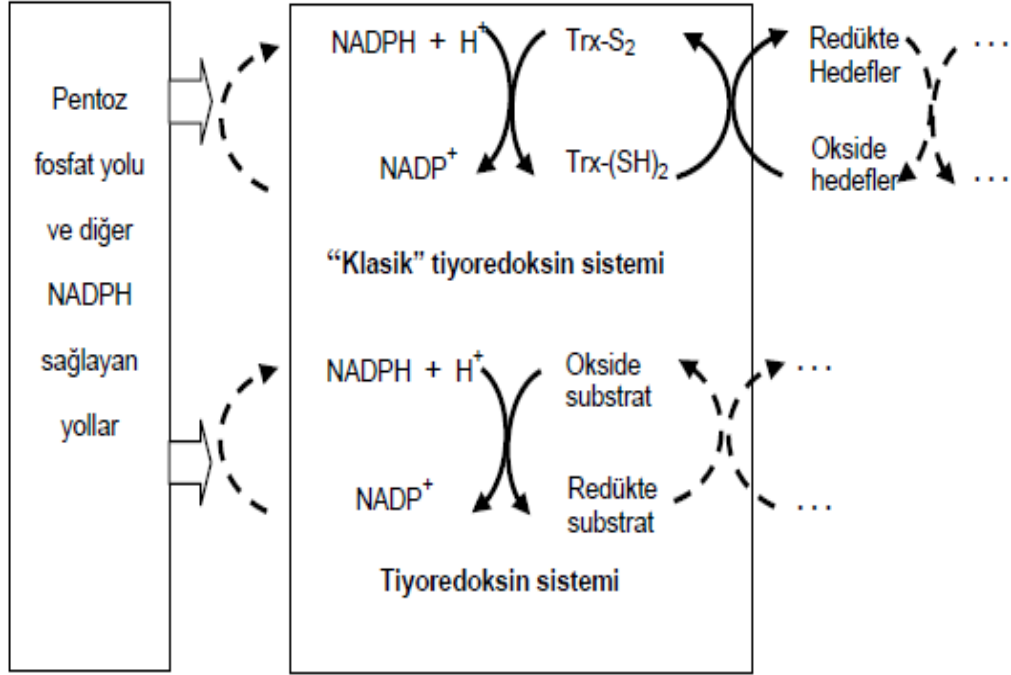
Genel olarak bakıldığında tiyoredoksin sistemi iki antioksidan protein olan tiyoredoksin (Trx), tiyoredoksin redüktaz (TrxR) ve NADPH'den oluşmaktadır. TrxR, NADPH'yi kullanarak Trx yapısındaki aktif bölge disülfidlerinin redüksiyonunu katalizler. Birçok fonksiyonu yanında redükte Trx, genel protein disülfid indirgeyicisidir (Nordberg, 2001). TrxR hücre büyümesi ve oksidatif strese karşı koruma gibi çeşitli biyolojik fonksiyonlara sahiptir, bu rollerinin çoğunu Trx'i redükleyerek yapmaktadır (Mustacich ve Powis, 2000). Trx sistemin iskemik strese koruyucu etkisi vardır ve bu etkisi antioksidan ve antiapoptotik fonksiyonlarıyla ilgili olmaktadır (Yost ve Fridovich, 1973).

TrxR'ler okside tiyoredoksinleri regüksiyona uğrattıklarından bu şekilde adlandırılmışlardır. Tiyoredoksinler yaklaşık 10-12 kDa'luk proteinlerdir ve redoks-aktif proteinler olarak adlandırılmışlardır. Aktif bölge -Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-Lys-sekansı (tiyoredoksin motifi) içermektedir. Triptofan ve lizin, genellikle tiyoredoksin

motif oluşumu için gerekli değildir. Disülfit oluşturan bu aktif bölge sisteinleri, TrxR tarafından redüklenmektedir. Bu redükte protein, klasik olarak redükleyici ekivalanları ribonükleotid redüktaza transfer etme eğilimindedir. Katalitik bölgenin redoks aktivitesi, Trx'in biyolojik aktivitesi için gereklidir. Bir organizma içinde farklı tiyoredoksinler çeşitli fonksiyonlara hizmet edebilirler (Laurent, Moore ve Reichard, 1964, Demirbilek, 2007).

Hücrel redoks çevre çoğunlukla iki enzim vasıtasıyla sürdürülen sistemler ile düzenlenmektedir (Nakamura, Nakamura ve Yodoi, 1997). Sistein ihtiva eden üçlü peptid olan glutatyon (γ -glutamil-sisteinil-glisin) hücrel antioksidanların ana komponentinden biridir. Trx ise aktif bölgesinde iki adet redoks-aktif sistein aminoasidi içeren düşük moleküllü proteindir (Schafer ve Buettner, 2001). TrxR enzimi homodimer yapıdadır ve kendisini oluşturan her bir alt birimde FAD prostetik grubu, NADPH molekülünün bağlandığı bölge ve redoks aktif disülfitleri ihtiva eden aktif bölge vardır. Elektronlar FAD marifetiyle NADPH molekülünden TrxR'nin aktif bölge disülfitlerine aktarılmakta, substrat böylece indirgenmektedir. Karakteristik substratı olan redoks aktif protein tiyoredoksin (Trx), hedef moleküllere redükleyici ekivalanları verirken kendisi okside forma dönüşmektedir.

PFY-enzimler ve diğerleri	TrxR	Enzimler ve/ya spontan olarak	Enzimler ve/ya spontan olarak
---------------------------	------	-------------------------------	-------------------------------



Şekil 1. 3. Tiyoredoksin sistem (Arscott, Gromer, Schirmer, Becker ve Williams, 1997).

Tiyoredoksin sistemin keşfi 1960’larda gerçekleşmiştir. İlk zamanlarda çalışmalarda daha çok bakteriyel sistemlere odaklanılmıştır. Tamura ve Stadtman 1966’da memeli TrxR’lerin selenoenzimler olduğunu keşfetmiştir (Tamura ve Stadtman, 1996). Bir diğer çalışmada ise Laurent ve arkadaşları 1964 yılında E. coli’de sitidin deoksiribonükleotid sentezini kataliz eden ribonükleotid redüktaz için hidrojen verici olarak görev yapan tiyoredoksin sistemini keşfetmişler ve tiyoredoksin redüktaz enzimini yüksek derecede saflaştırmışlardır. Ayrıca okside proteinlerin disülfid gruplarını redükleyen tiyoredoksinin redükte ditiyol formunun (Trx-(SH)₂) NADP-bağımlı bir yolla oksitleyerek disülfid formuna (Trx-‘S-S’) dönüştüren ve döngüye geri katılmasını sağlayan tiyoredoksin redüktaz enzimini karakterize etmişlerdir (Laurent vd, 1964).

108 amino asitten oluşan *E.coli* Tiyoredoksin-1 (Trx-1)'in amino asitlerin diziliş sırası 1968 yılında belirlenmiş ve proteinin karakteristik özelliği aktif bölgesindeki Cys-Gly-Pro-Cys motifinden ileri geldiği ifade edilmiştir. Tiyoredoksinin üç boyutlu yapısı kristalografi ile 1975 yılında belirlenmiştir. Başlangıçta, deoksinükleotidlerin sentezi için gerekli olan ribonükleotid redüktaz enzimine hidrojen sağlayan tek proteinin Trx olduğu düşünülmüştür. Fakat *E.coli*'de tiyoredoksin-1 geni eksik olan hücrelerin geliştirilmesiyle ribonükleotid redüktaz için GSH-bağımlı hidrojen verici olan ve tiyoredoksinlerin fonksiyonlarıyla örtüşen glutaredoksinler keşfedilmiştir (Holmgren ve Lu 2006). Tiyoredoksinler, genellikle hedef proteinlerin disülfid köprülerini kırabilen disülfid redüktazlar olarak çalışmaktadırlar. Fakat *in vitro* koşullarda disülfid köprü oluşumunun teşvikinde de görev alabilmiştir (Sahrawy et al, 1996). Redoks aktif disülfidler, tiyol-disülfid değişim reaksiyonları üzerinde elektron taşınması için gereklidir (Elias, Arne and Holmgren, 2000). Başlangıçta tiyoredoksinlerin hücrede, DNA'nın iskeletine bağlanan deoksiribonükleotitleri ribonükleotitlere çeviren temel enzim olan ribonükleotid redüktaz için hidrojen verici olarak görev aldığına inanılmıştır (Jacquoti, Lancelin and Meyer, 1997).

E.coli'de tiyoredoksin geni eksik olan hücreler geliştirilerek, tiyoredoksinin gerçek işlevlerinin sadece ribonükleotid redüktaz için hidrojen verici olmadığı, ayrıca glutaredoksinin ribonükleotid için alternatif elektron vericisi işlevi olduğu belirlenmiştir. Disülfidlerin indirgenmesi durumunda proteinlerin korunmasından sorumlu temel disülfid redüktaz, tiyoredoksin redüktaz yardımıyla NADPH'dan alınan elektronlar ile indirgenen tiyoredoksindir. Genellikle hücre içerisinde yüksek seviyede serbest -SH seviyesinden ve düşük redoks potansiyelinden sorumlu diğer temel faktör olan glutatyon redüktaz ise NADPH yardımıyla okside glutatyonu (GSSG) glutatyon (GSH) indirger (Holmgren, 1985).

Hayvanlar elektron kaynağı olarak NADPH kullanan bir flavoenzim olan tiyoredoksin redüktaz tarafından indirgenen ve tek bir tiyoredoksin sınıfından oluşan tiyoredoksin sistemi içermektedir. Hayvan hücreleri içerisinde tiyoredoksinlerin,

hücrel proteinlerinin antioksidan koruması ve transkripsiyon faktörlerinin redoks düzenlenmesi gibi çeşitli süreçlerde gerekli olduğu belirtilmiştir (Besse, I. and Buchanan, 1997).

Son yıllarda tiyoredoksin ailesinin yeni üyeleri keşfedilmiştir. Tiyoredoksinler, aminoasit dizilerine göre iki aileye ayrılmaktadır. Aile I, belirgin bir tiyoredoksin domaini barındıran proteinleri içerirken Aile II ise bir veya daha fazla tiyoredoksin domainin birleşimi olan ilave domainler ile füzyon proteinlerinin karışımını içermektedir. Örneğin *Arabidopsis thaliana*'nın genomunda en az 20 gen belirlenmesi sebebiyle tiyoredoksin aile I, diğer organizmalarla kıyasla özellikle bitkiler âlemi için önemlidir. Bununla birlikte memelilerde 2 mayada 3 ve *Escherichia coli*' de 2 adet tiyoredoksin proteini tespit edilmiştir (Gan, 1991).

Tablo 1. 1. Çeşitli organizmalarda tiyoredoksinin görevi (Schobert vd., 1998)

Tüm organizmalar	Protein disülfid indirgeme	Hidrojen verici . İndirgenen hücre içi protein disülfidlerin korunmasında anahtar rol oynar.
Çoğu organizmalar	H ₂ O ₂ 'nin indirgenmesi Metiyonin sülfoksit indirgenmesi ile protein tamiri.	H ₂ O ₂ 'yi indirgemelerini katalizleyen ve böylece oksidatif stresi engelleyen ve apoptozisi tetikleyen çoğu peroksidazları Trx ile indirgenir.
E. Coli fajları	T7 DNA polimerazın alt ünitesi Faj iplikçilerin oluşumuna katılmak	İşlevliğin artmasıyla oksidoredüktaz aktivitesi gerekmeden tiyoredoksin -SH ₂ için spesifik Faj yapımı ve dışa atımı için gereken E. coli proteinin tek konakçısı
Bakteri ve maya	3'-fosfoadenilsülfat (PAPS) redüktaz için hidrejen verici	Sülfür indirgenmesi için sülfat tarafından sülfür sentezi.
Bitkiler	Kloroplast fotosentetik enzimler ile indirgenme	Ferredoksin yoluyla fotosentezin düzenlenmesi.

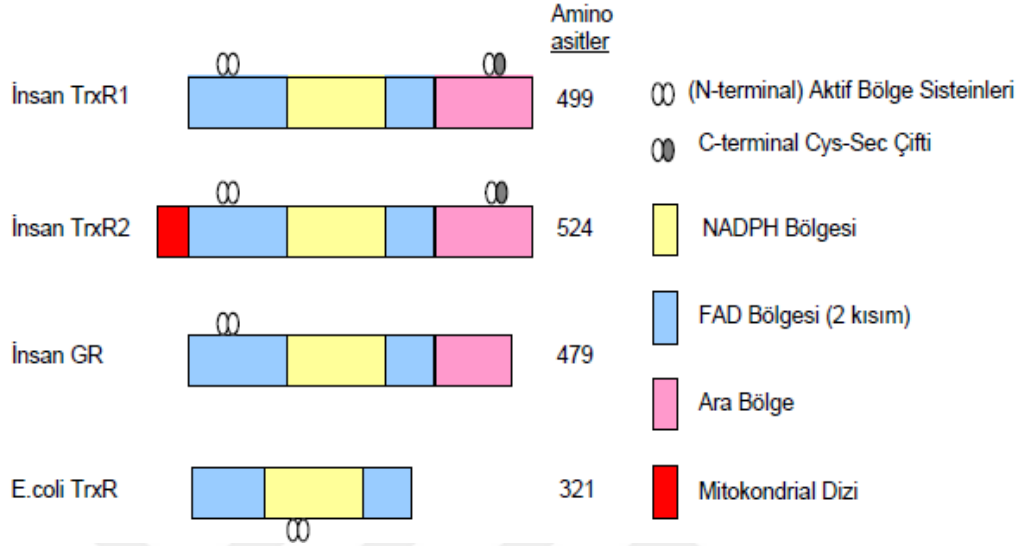
Memeliler	Transkripsiyon faktörlerinin redoks düzenlemeleri	Farklı transkripsiyon faktörleri çekirdek ve sitoplazma karşılaştırmada farklı aktiviteler uygulayan tiyoredoksin tarafından aktivite ya da inaktivite edilir.
	Apoptosis düzenlenmesi	Tiyoredoksin-SH ₂ apoptozis için aşağı sinyal engelleyici ASK1 ile bir karışım yapar.
	Bağışıklık sisteminin gücünü artırma veya azaltma	Hücre dışı tiyoredoksin hem bir ko-sitokin ve bir kemokin hem de uyarılmış eozinofillerden kesilmiştir.
	Gebelik	Sitotroblastlarda tiyoredoksinin hücre içi ve hücre dışı sentezi gebelik tespitine yardım eder.
	Doğum	Tiyoredoksinin uyarılmasıyla doğumda hiperoksiyandan korur.
	Merkezi sinir sistemi (CNS).	Sinir hücrelerinden salınan tiyoredoksin iskemiya/reperfüzyona teşvik eder.

1.3. Tiyoredoksin Redüktaz

Tiyoredoksin redüktaz (TrxR, E.C 1.6.4.5), glutatyon redüktaz, lipoamid dehidrogenaz, civa iyonu redüktaz ve tripanotion disülfid redüktaz enzimlerini kapsayan piridin nükleotid-disülfid oksidoredüktaz ailesine ait bir enzimdir. Aynı zamanda TrxR her altbiriminde bir redoks-aktif disülfid bağı ve sıkı bağlanmış FAD molekülü içeren, tiyoredoksinin indirgenmesini katalizleyen homodimerik bir flavoenzimdir (Williams 1992; Sandalova vd. 2001). Bu ailenin bütün üyelerinin altbirimleri redoks aktif ditiyol/disülfid bağı içerdiği anlaşılmaktadır. Memeli TrxR'nin bütün altbirimleri FAD bağlama bölgesi, NADPH bağlama bölgesi ve yüzey etkileşim alanı bulundurmaktadır (Sandalova vd. 2001).

Demirbilek'in (2007) belirttiği gibi TrxR, ilk olarak *Escherichia coli*'de (*E.coli*) çalışılmıştır. Bakteriyel TrxR'nin ailenin diğer üyelerinden pek çok yönden farklı olduğu, en belirgin farkın subünite boyutu olduğu ifade edilmektedir. GR ve lipoamid dehidrojenazın subünite ağırlığı ortalama 55 kDa civarında iken bakteriyel TrxR'lerde, subünite başına ortalama moleküler ağırlık 35 kDa'dur. NADPH ve FAD bağlama bölgeleri gibi ortak yapısal ünitelerinin bakteriyel TrxR'de

varolmasına rağmen (Şekil 1.4.) fark edilir derecede azdır. E.coli TrxR'nin 3 boyutlu yapısının, ilgili flavoenzimlerden anlamlı derecede farklı olduğu görülmektedir (Thelander, 1967).



Şekil 1.4. Küçük ve büyük TrxR'lerin bölge organizasyonunun karşılaştırılması (Gromer, Schirmer ve Becker, 1999)

Tiyoredoksin redüktaz bir selenoenzimdir. Beyin travmalarında ve beyin iskemisinde meydana gelen beyin hasarında selenoproteinlerin varlığıyla, redoks durum dengede tutulmaya çalışılmaktadır. TrxR'nin ekspresyonunun artması nöroprotektiftir. TrxR'nin inhibisyonu, oksidatif strese karşı antioksidan savunma sistemini zayıflatabilmektedir. Ayrıca mitokondrial kaynaklardan reaktif oksijen türleri (ROS) birikimi görülmektedir (Fang, Jun ve Holmgren, 2005).

Enzimin mitokondriyal ve sitozolik olmak üzere iki formu bulunmaktadır (Mustacich and Powis 2000). Ancak memeli TrxR'lerinin üç değişik izoformu bulunur. Bunlar; sitozol/nükleustan izole edilen TrxR1, (Holmgren and Bjornstedt 1995), mitokondriden izole edilen TrxR2 ve testislerden saflaştırılan TrxR3'dür (Gasdaska *et al.* 1999). Memelilerde bulunan TrxR'ler selenyum içeren piridin nükleotid-disülfid oksidoredüktazlardır ve Cys-Val-Asn-Val-Gly-Cys amino asit dizisinden oluşan redoks katalitik bölge bulundurlar (Mustacich and Powis 2000). Diğer aktif bölgede ise C terminal ucunda tetrapeptid –Gly-Cys-Sec-Gly-COOH motifi içinde bulunan, kolaylıkla erişilebilen bir selenosistein (Sec) rezidüsünü

bulundurmaktadırlar. Komşu sisteinlerle beraber elektronları, dimerik enzimin diğer alt biriminin N-terminal ucunda bulunan, redoks aktif Cys-Val-Asn-Val-Gly-Cys motifinden alan selenilsülfid / selenotiyol oluştururlar (Wittle *et al.* 2005).

İnsan TXNRD2 geni ve çeşitli varyantları 22. kromozom üzerinde lokalizedir (Arner, 2009; Vizuete, 1999). Esas olarak mitokondriyal bölgede bulunan insan TrxR2 enzimi (UniProtKB - Q9NNW7), 36 amino asitlik bir N-terminal mitokondriyal hedefleme dizisine sahip molekül ağırlığı 56,507 Da olan 524 amino asitten oluşur (Vizuete, 1999; Rackham vd. 2011). Substrat ve inhibitör özellikleri, insan sitozolik ve mitokondriyal tiyoredoksin redüktazlar arasında farklılık gösterir. İki izoform arasındaki ana fark Rackham ve ark. tarafından yapılan bir çalışma ile, TrxR2'nin mitokondriyal endojen substratı için TrxR1'den daha fazla afiniteye sahip olduğu ve mitokondriyal matriksin daha yüksek pH değerlerinde katalitik olarak daha verimli olduğu gösterilmiştir. 2005 yılında elde edilen TrxR2 proteininin yüksek çözünürlüklü kristal yapısı, TrxR2'nin, aktif bölgedeki bazı artıklarda TrxR1'den farklı olduğuna işaret ettiği belirtilmiştir (Rackham vd. 2011)

Özellikle, hem sıçan TrxR1 (Tyr-116) hem de insan GR'sinde (Tyr-114) mevcut olan ve katalizle ilişkili olduğu gösterilen korunmuş bir tirozin kalıntısı, farenin TrxR2'sinde (His-143) bir histidin ile değiştirildiği belirtilmektedir (Biterova vd. 2005, Krauth vd. 1998). Bu değişikliğin mitokondriyal TrxR'nin sitozolik TrxR'a göre katalitik aktivitesini farklılaştırabileceği belirtilmiştir. Ek olarak, yükseltgenmiş ve indirgenmiş TrxR2'nin kristal yapıları, reaksiyon mekanizmasının moleküler detaylarını sağladığı bildirilmiştir (Biterova vd. 2005). NADPH bağlanması üzerine konformasyonel değişiklikler gözlemlendiği bildirilmiştir ve TrxR2'nin esnek C-terminal kolundaki varyasyonlar, sitozolik ve mitokondriyal TrxR arasındaki aktivitelerdeki olası farkları ortaya koymuştur. Ayrıca iki izoform, TrxR1'in güçlü bir inhibitörü olup TrxR2'nin olmayan, kalsiyum iyonu bakımından farklı davranışlar sergilemektedir (Rigobello vd. 2006).

TrxR'lerin N-terminal bölgelerinde farklılık gösteren çok çeşitli formları bilinmektedir. TrxR3'ün diğer TrxR'lerden farkı; aynı zamanda C-terminal selenotiyolle indirgenebilen bir N-terminal glutaredoksin bölgesinin olmasıdır

(Turanov *et al.* 2010). Bu izoenzim glutasyon ve tiyoredoksindeki disülfidleri doğrudan indirgeyebildiğinden dolayı tiyoredoksin ve glutasyon redüktaz (TGR) olarak da bilinir (Crosley *et al.* 2007).

İlk sınıflandırma girişimleri, “bakteriyel TrxR” ve “memeli TrxR” terimleri şeklinde meydana gelmiştir. Bununla birlikte aslında bakteriyel TrxR sadece bakteride değil, aynı zamanda bitkilerde, mantarlarda ve bazı protozoalarda da olduğu görülmüştür (Gromer, Schirmer ve Becker, 1999).

Prokaryotlarda, ilkel ökaryotik canlılarda ve arkeobakterilerde tiyoredoksin redüktaz enziminin altbirimlerinin molekül ağırlıklarının 35 kDa olduğu ve yüzey domaini içermediği de ortaya konmuştur. Yüksek ökaryotlarda ise okside tiyoredoksinin yanında selenit, K3 vitamini, lipoik asid, lipid hidroperoksidler gibi düşük molekül ağırlıklı bileşikler ile sitotoksik peptid NK-lizin, tümör supressör protein p53 gibi proteinleri ve bazı ekzojen maddeleri redükleyebilen çok geniş spesifitesi olan, sitoplazmada 54 kDa ağırlığında ve mitokondride 56 kDa ağırlığında olmak üzere iki farklı TrxR klonlanmıştır (Mustacich ve Powis 2000). Prokaryotik ve ökaryotik TrxR enziminin bazı özellikleri Tablo 1.2’de özetlenmiştir.

Tablo 1. 2. Tiyoredoksin redüktazların bazı özellikleri (Williams ve ark. 2000)

Ökaryotik Ağırlıklı TrxR	
	Altbirim molekül ağırlığı 55 kDa civarında (insan ve plasmodium falciparum)
	Her altbirimde bir FAD, bir redoks-aktif disülfid ve insan TrxR’da selenilsülfid, plasmodium falciparum’da ise disülfid olmak üzere üçüncü redoks aktif grubu içeren dimerik protein
Prokaryotik Ağırlıklı TrxR	
	Altbirim molekül ağırlığı 35 kDa civarında (E.coli ve diğer prokaryotlar, küf mantarı, mikoplazmalar, Giardia duodenalis, Arabidopsis thaliana and Methanococcus janaschii)
	Her altbirim de bir FAD ve bir redoks aktif grubu içeren dimerik protein

1.3.1. Tiyoredoksin Redüktaz Yapısı

Hem prokaryot hem de ökaryot TrxR'ları redükleyici ekivalanları NADPH' tan redoks aktif disülfide kofaktör FAD aracılığı ile aktararak katalitik aktivite göstermektedirler. *E.coli* TrxR'ında NADPH bölgesi FAD bölgesine göre 66°'lik bir dönüş yaparak NADPH'nin nikotinamid halkası FAD bölgesinin izoalloksazin halkasına bağlanmaktadır. Bu şekilde elektronlar NADPH bölgesinden FAD bölgesine oradan da redoks aktif disülfid bölgesine aktarılmaktadır. Aktif merkezinin redüklenmesi sonucunda yüzeyinde meydana gelen konformasyonel değişiklik redüklenmiş disülfitin okside tiyoredoksin ile temasını kolaylaştırmaktadır (Mustacich and Powis 2000).

Zhong vd (2000) Edman parçalama ve kütle spektrometresi yöntemlerini kullanarak okside sığır TrxR'ın C-terminal SeCys kalıntısı komşu Cys kalıntısı ile selenilsülfid oluşturduğu ve enzimin aktif merkezindeki selenosülfidin selenotiyol formu, tiyoredoksinin ve DTNB gibi enzimin aktivite tayininde kullanılan substratların redüksiyonunda görev aldığı sonucuna ulaşmışlardır. SeCys-Cys dipeptidi içermeyen veya SeCys kalıntısı yerine redoks-inaktif Ser içeren enzimin inaktif olduğu belirtilmiştir.

1.4. TrxR/ Trx Sisteminin Biyolojik Aktiviteleri

1.4.1. DNA Sentezindeki ve Diğer Roller

Trx ve TrxR, büyümenin kolaylaştırılması, programlanmış hücre ölümü ve hücrenin korunması gibi hücre içi proseste rol alan redoks aktif proteinlerdir (Tandoğan ve Ulusu 2011). Trx sisteminin biyolojik aktivitelerinden bir tanesi deoksiribonükleik asit (DNA) sentezindeki kofaktör rolüdür. Bu açıdan TrxR/Trx sistemi, DNA'nın sentezinde ve hücre proliferasyonunda ihtiyaç duyulan deoksiribonükleotidlerin üretiminde kritik öneme sahiptir. Trx, ribonükleotid redüktazın ribozu redükte etmesi için ihtiyaç duyulan elektronları sağlamaktadır (Jordan and Reichard, 1998).

Ayrıca, Trx-1'in lenfoid hücre kültürüne eklendiğinde ya da geni bu hücrelere aktarıldığında hücre ölümünü engellediği gösterilmiştir. Trx-1'in hücre ölümüne karşı hangi mekanizma ile koruma sağladığı henüz bilinmemektedir (Powis *et all*, 1998).

Meme kanseri MCF-7 hücre hattında yapılan bir çalışmada ise, kolon kanseri ve murin lenfoma hücreleri gibi çeşitli hücre serilerinin insan Trx-1 ile enfekte edilmesi sonrası VEBF (vasküler endotel büyüme faktörü) sekresyonunda önemli oranda artış görülmüştür. Buna karşın, redoks inaktif mutant Trx ile enfekte edilmesinin VEBF yapımını kısmi olarak engellemiştir (Welsh *et all*, 2002).

Hücre çoğalmasının uyarılmasına olan etkilerinin incelendiği bir çalışmada da Trx-1'e maruz kalan lenfositler, fibroblastlar ve birçok lösemik ve solid tümör hücre serilerinin büyüme hızında artış görülmüştür. Bu çoğaltıcı etkinin mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte sitokin (IL-1, IL-2 ve TNF-a) üretimindeki ve büyüme faktör (temel fibroblast büyüme faktörü) aktivitesindeki artışa bağlı olabileceği bildirilmiştir (Powis and Montfort, 2001).

Transkripsiyon faktör aktivitesinin uyarılması açısından ise Trx, NF-kB, AP-1 ve AP-2 gibi bir dizi transkripsiyon faktörünün ve glukokortikoid ve östrojen gibi nükleer reseptörlerinin DNA-bağlama aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir. Sitoplazmada ise Trx, ilginç bir şekilde NF-kB'yi engellemektedir. Trx'nin bazı transkripsiyon faktörleri üzerindeki etkisi, DNA-tamir endonükleaz aktivitesi de olan 37 kDa'luk bir protein olan Ref-1'in redüksiyonu ile olmaktadır (Nishinaka *et all*, 2001).

Redükte olmuş Trx-1 fonksiyonunu bir çok proteine bağlanarak gösterir. Trx, apoptoz sinyal regüle edici kinaz-1 (ASK1)'e, protein kinaz C'nin çeşitli izoformlarına, p40 fagosit oksidaza, nükleer glukokortikoid reseptörüne ve lipokaline bağlanmaktadır. Oksidatif stres durumlarında ise Trx'ini oksidize eden ve böylece ASK-1'den ayrılmasını artıran ve ASK1'in aktive olmasını sağlayan reaktif oksijen ürünleri üretilmektedir (Acar, 2013).

1.4.2. Tiyoredoksin Sistemi ve Oksidatif Stres

Bütün diğer aerobik canlılarda olduğu gibi insan da enerji ihtiyacını oksidatif metabolizma tarafından kontrol edilen reaksiyonlar ile karşılamakta ve O₂ kullanımı neticesinde reaktif oksijen türleri (ROT) oluşmaktadır (Acar, 2013).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, artmış serbest oksijen radikallerin bazı hastalıkların patogenezinde yer aldığını göstermiştir. Kalp ile ilgili bazı hastalıklar, sinirsel hastalıklar, astım, şeker hastalığı, romatolojik hastalıklar, yaşlanma ve kanser gibi hastalıkların oksidatif stres ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Rahman 2007; Valko vd. 2007).

Tiyoredoksinlerin antioksidan etkilerinde glutatyon peroksidaz ve hücre zarı peroksidazlarının, hücrenin oksijen radikalleri ve peroksitlerin zararlı etkilerine karşı korunmasında önemli rolü bulunmaktadır. Bu enzimler, reaktif oksijen ürünlerini gidermek için tiyol gruplarını elektron kaynağı olarak kullanmaktadırlar. Trx, antioksidan etkilerini başlıca tiyoredoksin peroksidazlara elektron sağlayarak yapmaktadır. Oksidize olmuş peroksitleri indirgeyerek enzimin monomerik formunu geri kazandırır ve böylece oksiradikal toplama görevine devam sağlanmış olur. Trx, tiyoredoksin peroksidaz salınımını da arttırmaktadır (Berggren *et all*, 2001).

Metiyoninin oksidasyonu sonucunda oluşan metiyonin sülfoksidin S- ve R-epimerleri (MetO-S ve MetO-R) proteinlerin biyolojik aktiviteleri etkilediği gösterilmiştir. Metiyonin sülfoksid birçok bakteri ve hayvan dokusunda bulunan ve redükte ditiyol tiyoredoksini (Trx-(SH)₂) kullanan metiyonin sülfoksid redüktaz tarafından tekrar fonksiyonel metiyonine dönüşmektedir. Ortaya çıkan okside disülfid (Trx-(S-S)) tiyoredoksin ise tiyoredoksin redüktaz enzimi tarafından NADP-bağımlı bir yolla ditiyol tiyoredoksine (Trx-(SH)₂) redüklenerek sıklusa geri katılmaktadır. Böyle meydana gelen bir siklik oksido-redüksiyon antioksidan sistemi oksidatif strese maruz kalan hücreleri korumaktadır (Stadtman, 2004).

Koç ve arkadaşları (2006) tarafından yapılan çalışmada, genomundan TrxR 1, Trx 1 ve Trx 2 genleri çıkartılmış maya (*Saccharomyces cerevisiae*) hücrelerinin

metiyonin sülfoksit indirgeme kapasitelerini incelemiştir. İki tiyoredoksini aynı anda çıkartılmış mutant hücrelerde metiyonin sülfoksitin indirgenme ürünü olan metiyonin oluşmadığı görülürken, Trx-1 geni çıkartılmış hücrelerin metiyonin oluşturabildikleri görülmüştür. Bu durum da maya mantarında metiyonin sülfoksit redüktaz enzimi için elzem olan elektronların tiyoredoksinlerden sağlandığını göstermektedir. Ayrıca metiyonin sülfoksitin indirgenmesi için gerekli olan elektronların TrxR-1 olmadan NADP'den tiyoredoksin proteinine transfer edilebileceği bildirilmiştir. Aynı sonuç sülfatın indirgenip metiyonin sentezinde kullanılmasında rol alan 3-fosfoadenozin 5-fosfosülfat redüktaz enzim aktivitesi için de gözlenmemiştir. Her iki deneyin sonuçlarına bakıldığında, TrxR'ın yokluğunda tiyoredoksinler için gerekli olan elektronların ikinci bir donör tarafından sağlandığına dair delillerin olduğu görülmüştür.

1.5. Kanser ve Tiyoredoksin

Neoplazinin anlamına bakıldığında, kontrolsüz hücre çoğalmasıyla vuku bulan ve apoptozun gerçekleşmemesi ile ortaya çıkan normalin dışında oluşan doku kitlesi olarak tanımlanmaktadır. Kanser meydana gelmesi ve çoğalması olayına bakıldığında neoplazi, bir doku ya da organı oluşturan hücrelerin anormal ve kontrolsüz bir şekilde çoğalmasıyla ortaya çıkan bir durumdur. Neoplazmalar çoğu zaman ayırt edilebilmesi mümkün kitleler yani tümörler oluşturmak suretiyle büyümektedirler. Kötü huylu olarak isimlendirilen neoplazmalar çok fazla değişim göstermektedirler ve lenf sistemi ve kan dolaşımı yolu ile metastaz oluşturmaktadırlar. Ayrıca ikincil organlara yayılarak vücudu işgal etmektedirler. Kanser deyimi neoplazmayla hemen hemen eş anlamlıdır ve kontrol edilemez, anormal hücre çoğalmasıyla karakterize edilen birçok patojenik durum için kullanılan genel bir terimdir (Ünal, 2012).

Trx salınımı, muhtemelen proteinin yapısı ve fonksiyonundaki değişiklikler ile ilişkili olarak akciğer, servikal, kolorektal, pankreas ve hepatik kanser gibi insan

kanser türünde arttığı görülmüştür (Tamura ve Stadtman 1996; Söberg ve vd. 2000; Yoo ve vd. 2006; Cadenas vd. 2010; Yan vd. 2012).

Kanser hücreleri, hipoksik şartlara adapte olabilecek türde hücrelerdir. Hipoksi durumunda, kanser fenotipinin gelişmesinde rol alan bir transkripsiyon faktörü olan hipokside-indüklenebilen factor-1 (HIF-1) aktive olur. HIF-1 özellikle; anjiyogenez, metabolik adaptasyon, hücre çoğalması ve yaşam süresinin uzatılması ile alakalı genlerin aktivasyonuna neden olur. İşte Trx'in aşırı salınımı HIF-1 ve vasküler endotelial büyüme faktörünü (VEGF) önemli oranda arttırmaktadır (Arnér ve Holmgren 2006; Karlenius ve Tonissen 2010).

1.6. Tedavide Tiyoredoksin Redüktazın Hedef Olarak Kullanılması

TrxR/Trx'nin biyolojik aktiviteleri ve saldırgan tümör büyümesi ile olan bağlantısı, bu sistemin kanser terapisi için önemli bir hedef olduğunu düşündürmektedir. Çeşitli Trx/TrxR sistem inhibitörleri tanımlanmıştır. Flavonoidler, arsenik trioksit, antralin, 13-cis retinoik asit, sülfid iyonları, nitrozoüreler, ağır metal iyonları, aurafin, motexafin gadolinium, plörotin literatürde yer alan Trx ve TrxR inhibitörleridir (Mukherjee ve Martin 2008). Uzun yıllardan beri antikanser ilacı olarak kullanılan arsenik trioksidin (ATO) güçlü bir memeli TrxR inhibitörü olduğu gösterilmiştir. TrxR inhibisyonunun bütün Trx sistemini inaktive etmesi ATO'nun antikanser aktivitesiyle ilişkilendirildiği söylenebilir (b vd., 2009).

Asya'nın tropikal bölgelerinde yaygın olarak yetişen bir tıbbi bitki olan *Curcuma longa* ya da bilinen adıyla zerdeçaldan izole edilen curcuminin son yıllarda antioksidan, antikanser ve TrxR inhibitör aktivitesi olduğu tespit edilmiştir. Memeli TrxR'nin redoks aktif kısımları kurkumin analoglarının hedefidir. TrxR'nin süreye bağlı, geri dönüşümsüz olarak kovalent modifikasyon ile kurkumin analogları tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir (Liu vd. 2008; Qui vd. 2008).

1.7. Ağır Metaller

Terim olarak bakıldığında ağır metal terimi son zamanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Genel olarak kontaminasyon ve potansiyel toksisite ile ekotoksisiteyle ilişkilendirilen metaller ya da yarı-metaller metalloidler olarak tanımlanmaktadır. Ağır metal, metalik özellikler gösteren elementlerden oluşan, net bir tanımı olmayan elementlere verilen isimdir. Bu gruba geçiş metalleri, lantanitler ve aktinitler ile bazı yarı metaller dahildir. Ağır metal tanımı ile ilgili olarak bazen yoğunluk, bazen atomik ağırlık, bazen de kimyasal özellikler ya da toksisitenin baz alınarak yapıldığı bir çok tanımlama görülmektedir. Tutarsız tanımlamalar ve tutarlı bir bilimsel temeli olmaması nedeniyle IUPAC'ın bir teknik raporunda ağır metal kavramının anlamsız ve yanlış yönlendirici olduğu ifade edilmiştir. Duruma göre ağır metaller karbondan hafif elementleri içerdiği gibi en ağır metallerin bazılarını dışarıda tutabilmektedir (Duffus, 2002).

Ağır metaller canlı bünyesine ağız yolu, solunum ve deri absorpsiyon ile alınmakta ve boşaltım sistemleri ile (böbrek, karaciğer, barsak, akciğer, deri) vücuttan atılamamaktadır. Bu sebepten dolayı ağır metallerin fazlaca bir kısmı, canlı bünyesinde birikmektedir. Bu biyobirikim neticesinde ağır metal yoğunluğu artmakta ve toksik doz seviyesine çıktığında ciddi rahatsızlıklara hatta ölümlere sebep olabilmektedirler (Özbolat ve Tuli, 2016).

Ağır metallerin bir tanımı ise özkütlesi 5g/cm^3 'den daha fazla olan metaller şeklinde ifade edilmektedir. Tıpta literatüründe ise toksik etki gösteren tüm metaller atom ağırlıklarına bakılmaksızın ağır metal olarak sınıflandırılır. En sık rastlanan ve en çok bilinen Civa (Hg), Mangan (Mn), Kobalt (Co), Nikel (Ni), Demir (Fe), Çinko (Zn), Bakır (Cu), Arsenik (As), Kadmiyum (Cd), Kurşun (Pb), Krom (Cr), Gümüş (Ag) ve Selenyum (Se) ağır metallere örnek verilebilir (Kahvecioğlu, Kartal, Güven ve Timur, 2009). Bu metaller yerkürede geniş çapta bulunurlar ve doğada biyobozunmaya uğramazlar (Gautam, Sharma, Mahiya ve Chattopadhyaya, 2014). Bütün ağır metaller düşük seviyelerde maruz kalma durumunda çoğu organizma için potansiyel olarak zararlıdır. Belirli çevresel durumlarda ağır metaller toksik

konsantrasyonlara ulaşır ve ekolojik zarara yol açar (Gümgüm, Tez ve Gülsün, 1994).

Ağır metallerin doğada bulunmaları volkanik patlamalar ve erozyon gibi doğal sebeplerle olabildiği gibi çoğunlukla endüstriyel atıklardan kaynaklanır. Balık, sucul besin zincirinin genellikle en üstünde bulunur ve yaşadığı ortamdan kaynaklı metal birikimine maruz kalabilir. Bunun sonucu olarak besin yoluyla bu metaller insan vücuduna dahil olurlar. Biyolojik sistemlerdeki biyobirikim özelliklerinden dolayı farklı gıdalarda metallerin bulunması göreceleri seviyelerine göre ciddi sağlık sorunları oluşturur (Gautam, Sharma, Mahiya ve Chattopadhyaya, 2014; akt, Mansour ve Sidky, 2002).

Ağır metal kontaminasyonunun çevrenin ekolojik dengesi ve sucul organizma çeşitliliği üzerine yıkıcı etkileri vardır. Hayvan türleri arasında balıklar bu kirleticilerin zararlı etkilerinden kaçamayan canlılardır. Çeşitli balık türleri üzerine yapılan çalışmalarda ağır metallerin hem dokularda hem de kanda bazı biyokimyasal parametreleri ve fizyolojik aktiviteleri değiştirebileceği gösterilmiştir. Solungaç, ağır metallerin vücuda girişi için önemli bölgedir ve bu durum lezyonlara ve solungaç hasarlarına neden olur (Vinodhini ve Narayanan, 2008).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

TrxR enzimi Trx'in indirgeyici substrat olarak görev aldığı bütün metabolik olaylarda gereklidir. Bu, ribonükleotidlerin deoksiribonükleotidlere indirgenmesinden oksidant ve radikallerin detoksifikasyonu olaylarını kapsar. Ayrıca apoptosiz, kanser, parazitozlar, kronik inflamasyon, otoimmün hastalıklar ve nörodejeneratif hastalıklar gibi çeşitli fizyolojik ve patolojik durumlarda rol aldığı bildirilmiştir (Saccoccia vd. 2014).

Memeli TrxR izoenzimleri katalitik fonksiyonlarını sürdürmek için selenoprotein olan selenosistein rezidüsüne gereksinim duymaktadır. Bu durum ise Trx'in bütün fonksiyonları selenyuma bağlandığı anlamına gelmektedir. Bundan dolayı selenyumun besinsel seviyesindeki büyük değişimler Trx sisteminin fonksiyonlarını bütünüyle etkilemektedir (Acar, 2013). Memeli tiyoredoksin redüktaz, glutasyon redüktaza homolog olan ve C terminalinin uzantısında Gly-Cys-SeCys-Gly dizisinden oluşan selenosistein kalıntısını içeren bir homodimerdir. Kimyasal modifikasyon ve peptid dizileme yöntemleri kullanılarak okside enzimin iki flavin olmayan redoks merkezi içerdiği bulunmuştur; biri glutasyon redüktazın aktif merkezine benzer olan ve disülfid şeklindeki Cys59-Val-Asn-Val-Gly-Cys54 dizisinden, diğeri ise kütle spektrometrisi yöntemi ile de kanıtlanmış olan ve selenosülfid şeklindeki Cys497-SeCys498 dizisinden oluşmaktadır. NADPH tarafından redüklenmiş enzimde bu iki merkez sırasıyla ditiyol ve selenotiyol şeklinde bulunmaktadır (Sandalova vd. 2001).

Demirbilek tarafından yapılan çalışmada kalıcı serebral iskemi oluşturulan ve taklit operasyonu yapılan sıçanlarda iskemik bölgede ve periiskemik normal dokuda TrxR (tiyoredoksin redüktaz) aktivitesi, EGF (epidermal büyüme faktörü) ve TNF- α (Tümör nekrozis faktör- α) düzeyleri incelenmiştir. Ayrıca aynı yönde çalışan Trx (tiyoredoksin) sistem ve EGF ile zıt yönde etki gösteren TNF- α düzeylerini iskeminin uzak saatlerinde karşılaştırarak inceleme tamamlanmıştır. İskemik hasarla oluşturulan oksidatif stres ile TrxR aktivitesinde kontrol grubuna göre, "iskeminin 48. saatinde istatistiksel olarak anlamlı azalma tespit edildiği bildirilmiştir. Sonuç olarak beyin iskemisi ile oluşturulan oksidatif stresin TrxR'yi azalttığı ifade

edilmiştir. EGF düzeyleri artmış ve TNF- α düzeyleri değişmemiştir. TrxR enzim aktivitesinin oluşan oksidatif stres ile azaldığını, diğer yandan EGF'nin nörotrofik ve nöroprotektif etki göstermek amacıyla artmış olabileceği ifade edilmiştir (Demirbilek, 2007).

TrxR enziminin DNA sentezi, antioksidatif savunma, redoks sinyali, selenyum metabolizması ve programlanmış hücre ölümünün düzenlenmesi gibi farklı hücrel görevleri bulunmaktadır. *Mytilus galloprovincialis* L. midye türünün hepatopankreas ham ekstresinden TrxR enziminin saf olarak elde edildiği ve bazı kinetik özelliklerinin incelendiği bir çalışmada saflaştırma basamaklarını amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-Sefaroz CL-6B iyon değişim kromatografisi ve -2',5'-ADP-agaroz afinite kromatografisinin oluşturmuştur. Çalışmada, enzim için optimum pH 7,0 olarak bulunmuş, optimum sıcaklığının ise 60 °C olduğu belirtilmiş, NADPH ve DTNB'e karşı gösterdiği en yüksek reaksiyon hızının (V_{max}) sırasıyla 4,82 ve 1,32 $\mu\text{mol/dak/mg}$, K_M değerinin ise sırasıyla 85 ve 193 μmol olduğu bildirilmiştir (Acar, 2013).

Memeli TrxR, monomerlerin birbirine paralel olarak hizalanmış olduğu bir homodimerdir. TrxR-1'in C-terminal redoks merkezi, oksitlenmiş Trx ile tiyol-disülfid değişimine uğrar. Yakın zamanda algal toksini brevetoksinin TrxR-1'in eşsiz ve güçlü bir inhibitör olduğu belirtilmiştir. Boyut ve işlevsellik bakımından benzer olan diğer moleküllerin benzer şekilde davranabileceği düşünülmüştür (Chen vd. 2017).

Yapılan diğer bir çalışmada, tümör büyümesinde rolü olduğu düşünülen tiyoredoksin redüktazın, glioblastom multiformeli (GBM) hastaların tümör dokularında ve serum örneklerindeki değerleri incelenmiştir. Buna göre örneklemini 27 hastanın oluşturduğu bu çalışmada tiyoredoksin redüktaz değerleri, ölümlerinin ilk dört saatinde gelmiş 12 otopsi vakasının normal beyin dokularında, ayrıca 12 sağlıklı insandan alınan serum örnekleri ile kıyaslanmıştır. Elde edilen sonuçlardan tiyoredoksin redüktaz düzeyinin GBM'lerde (74.5 ± 14.9 U/gr) normal beyin dokularına (14.8 ± 3.4 U/gr) göre oldukça yüksek olduğu, GBM'li hastalardaki

serum tiyoredoksin redüktaz ortalama değerinin (296.3 ± 43.6 U/ml) kontrollere (203.0 ± 11.3 U/ml) göre belirgin olarak arttığı bildirilmiştir. Aynı zamanda, hasta serum ve doku tiyoredoksin redüktaz değerleri arasında anlamlı bir korelasyon olmadığı bildirilmiştir. Sonuç olarak da GBM'in malignite özelliği ve oluşum mekanizması içinde artmış tiyoredoksin redüktaz değerlerinin etkili olabileceği ifade edilmiştir (Kemerdere, 2008).

Kükürt atomlarının altın ve diğer soy metallerle yüksek afiniteli olduğu bilgisi, çeşitli soy metal içeren TrxR inhibitörlerinin keşfedilmesine yol açmıştır. Bu inhibitörler genellikle oldukça güçlüdür ve IC_{50} değerleri nanomolar aralığındadır. Literatürde altın, platin, rutenyum, gadolinyum kompleksleri ile bazı civa, sülfür, selenyum ve tellür bileşiklerinin enzim aktivitesini inhibe ettiği nakladilmiştir. Bunun yanında bazı polifenoller, kinonlar, kuinolle ve flavanoidler gibi doğal ürün ve analoklarının da enzim aktivitesi üzerine inhibisyon erkisi gösterdiği bildirilmiştir (Cai vd. 2012).

Hindi karaciğer dokularından mitokondriyal tiyoredoksin redüktaz (TrxR) enziminin saflaştırılması çalışmasında ise enzim $3,07$ EU x mg^{-1} spesifik aktiviteyle ve %2,05 verimle gradientli santrifügasyon ile homojenizasyon ve 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırılmıştır. Hindi karaciğer dokularından saflaştırılan enzim için saflaştırma kat sayısı 990 olarak bildirilmiştir. SDS poliakrilamid jel elektroforezi ile enzimin alt birim molekül kütlesi yaklaşık 45,5 kDa, doğal molekül kütlesi ise Sephadex-G 150 jel filtrasyon kromatografisi ile 88 kDa olarak bulunduğu aktarılmıştır. Enzim için optimum iyonik şiddet değeri 600 mM potasyum fosfat tamponu, optimum pH 7,5 ve stabil pH ise 7,2 olarak bildirilmiştir. TrxR için, optimum sıcaklığın $50^{\circ}C$ olduğu, k_{cat} değerlerinin DTNB için $87,8$ s^{-1} , NADPH için $109,75$ s^{-1} olduğu bildirilmiştir. Daha sonra hindi karaciğeri TrxR enziminin aktivitesi üzerine bazı ağır metallerin (Cu^{+2} , Cd^{+2} , Ag^{+} , Zn^{+2} , Fe^{+3} ve Pb^{+2}) inhibitör *in vitro* şartlarda incelenmiştir (Temel, 2014).

TrxR'nin protein kimyası ve aktif kısmındaki selenosistein kalıntılarının ilk keşfinden bu yana, altın bileşikleri (zellikle altın (I) ve altın (II) bileşikleri) güçlü

enzim inhibitörleri gibi davranabilecekleri ifade edilmiştir (Bindoli vd. 2009). Son yıllarda ise altın (III) bileşikleri tarafından TrxR inhibisyonuna ilişkin çalışmalar yapılmıştır (Engman vd. 2006). Moteksafin gadolinyum ise TrxR aktivitesini inhibe eden Gd^{+3} içeren bir porfirin olduğu belirtilmiştir (Karlenius ve Tonissen 2010). Myricetin (IC_{50} 0,62 (mol/L) ve quercetin (IC_{50} 0,97 (mol/L) TrxR'ın güçlü inhibitörleri oldukları bildirilmiştir (Lu vd. 2006).

Yapılan bir diğer çalışmada ise suda çözünebilen ve palmarumisin türevi olan PX-916 maddesinin insan tiyoredoksin redüktaz-1'in 0.28 μM IC_{50} değeri ile inhibe ettiği, ayrıca bu maddenin 0.25 μM IC_{50} değeri ile de MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde tiyoredoksin redüktaz-1 aktivitesini de inhibe ettiği, aynı hücrelerde 3.1 μM IC_{50} değeri ile hücre büyümesini durdurduğu bildirilmiştir. PX-916 maddesinin NADPH ve zamana bağlı olarak muhtemelen selenosistein içeren katalitik bölge ile reaksiyona girerek tioredoksin redüktaz-1'i dönüşümsüz olarak inhibe ettiği ifade edilmiştir. Bununla birlikte 100 kat daha yüksek konsantrasyonlarda bile insan glutatyon redüktaz ve sitokrom P450 redüktaz enzimlerini inhibe etmediği tespit edilmiştir (Powis vd. 2006).

Parrilha ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada 2-asetilpridin-N(4)-ortoklorofeniltiyosemikarbazon ile antimon (III), kalay (IV), galyum (III), bizmut (III) ve altın (III) komplekslerinin MCF-7 ve HT29 hücrelerine yüksek derecede sitotoksik olduğu, paladyum (II) ve platin (II) komplekslerinin bunlar kadar etkili olmadığı bildirilmiş, bileşikler için sitotoksik etkinin mekanizmaları muhtemelen çok farklı olabileceği vurgulanmıştır. Serbest tiyosemikarbazon ile galyum (III) ve kalay (IV) kompleksleri TrxR veya GR'yi inhibe etmezken, bizmut (III), paladyum (II) ve platin (II) komplekslerinin TrxR'yi inhibe ettiği fakat GR'yi inhibe etmediği bildirilmiştir. Antimon (III) ve altın (III) komplekslerinin her iki enzimi de inhibe ettiği, bununla birlikte TrxR üzerine çok daha fazla etki ettiği tespit edilmiştir. Bu komplekslerin TrxR için seçiciliği, enzimin aktif bölgesindeki bir selenol kalıntısına bağlanmasından kaynaklanabileceği ifade edilmiştir. TrxR'nin seçici inhibisyonu bu komplekslerin farmakolojik profillerini destekleyen yeni bir mekanizma eklemekte

böylece bu komplekslerin kanser kemoterapisi için çok amaçlı metaloilaçların geliştirilmesinde bir öncül olabileceği vurgulanmıştır (Parrilha vd. 2014).



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Kullanılan kimyasal maddeler

Sodyum dodesil sülfat (SDS), sodyum asetat, sodyum klorür, hidroklorik asit, fosforik asit, metanol, etanol, izopropanol, asetik asit, potasyum klorür E. Merck AG'den; Etilendiamintetraasetik asit (EDTA), β -merkaptetoetanol, gümüş nitrat ve formaldehit Fluka'dan, protein marker V peqGOLD/peqlab'dan, sodyum hidroksit, potasyum fosfat Riedel de Haen'den, glisin ICN Biomedicals Inc'den, çalışmada kullanılan diğer kimyasallar ise Sigma Chemical Co.'dan temin edildi.

3.1.2 Kullanılan alet ve cihazlar

Çalışmalar sırasında aşağıdaki cihaz ve aletlerden faydalanılmıştır.

Soğutmalı santrifüj: ThermoSL 16R

Spektrofotometre: SHIMADZU UV-1800

pH metre : İnoLab pH-MeterCG840

Elektroforez tankı: Consort EV265

Peristaltik pompa: GILSON

Karıştırıcı (Shaker) : COMBI-Shaker

Karıştırıcı (Vorteks) : WiseMix

Hassas terazi: OHAUS pioneer

Otomatik pipet: Eppendorf

Magnetik karıştırıcı: BioCote

Safsu cihazı: UltraPure (Typ1) Water

Güçkaynağı: 1-Bio Rad Power Pac 3000 2-Apparatus

Buzdolapları: Arçelik

Derindondurucu (-20°C) : Arçelik

3.1.3 Kullanılan çözeltiler ve hazırlanmaları

Çözelti hazırlamak amacıyla saf su kullanılmıştır.

3.1.3.a Aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler

1. 0,5 M KH_2PO_4 (pH:7,5): 13,6 g KH_2PO_4 tartılarak 180 mL saf su içinde çözülerek pH 7,5'a ayarlandı. Toplam hacim 200 mL'ye saf su ile tamamlandı.

2. BSA çözeltisi: 200 mg BSA tartılarak 100 mL saf su içinde çözüldü.

3. 5 mM DTNB (5,5'-Ditiyobis(2-Nitrobenzoik asit) çözeltisi: 0,198 gr DTNB tartılarak 0.1 mM EDTA içeren 0,1 M K-fosfat tamponu (pH: 7,2) içinde çözüldükten sonra son hacim 100 mL'ye saf su kullanılarak tamamlandı.

4. 2 mM NADPH çözeltisi: 0,0743 g NADPH tartılarak bir miktar saf su içerisinde çözüldükten sonra son hacim 50 mL'ye saf su ile tamamlandı.

5. 50 mM EDTA ve 1 M KH_2PO_4 (pH: 7,75): 4,65 gr EDTA ve 34 gr KH_2PO_4 tartılarak bir miktar saf su içerisinde çözüldükten sonra pH 7,75'e ayarlandı. Toplam hacim saf su ile 250 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.b. Solungaç dokusundan homojenat hazırlamak için kullanılan çözeltiler

10 mM Tris/HCl ve 1mM EDTA (pH: 7, 5) Tamponu: 1,21 g Tris ile 0,3724 g EDTA 950 mL suda çözüldü daha sonra pH 7,5'e ayarlandı ve hacmi saf su ile 1000 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.c. Afinite kolonunda kullanılan çözeltiler

1. Rejenere I çözeltisi : 0,1 M Tris/HCl ve 0,5 M NaCl (pH:8,5) : 3,25 g Tris/HCl ile 7,305 g NaCl 240 mL suda çözüldü daha sonra pH 8,5'e ayarlandı ve hacmi saf su ile 250 mL'ye tamamlandı.

2. Rejenere II çözeltisi : 0,1 M NaCH_3COO ve 0,5 M NaCl, pH: 4,5 (Asetat Tamponu) (Afinite kolonunun rejenerasyonu için kullanılan tampon) : 3,4 g NaCH_3COO ve 7,305 g NaCl alınarak 230 mL saf suda çözülüp pH: 4,5'e ayarlandıktan sonra hacim saf su ile 250 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.d. Bradford yöntemiyle protein tayini için kullanılan çözeltiler

1. Coomassie Brilliant Blue çözeltisi: %95 'lik etanol içerisinde 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi çözüldükten sonra 100 mL %95 'lik H₃PO₄ eklendi ve saf su ile bir litreye tamamlandı. Çözelti ışık olmayan ortamda saklandı.

3.1.3.e. Elektroforez için kullanılan çözeltiler

1. 1 M Tris-HCl (pH: 8, 8): 12,11 g Tris-HCl tartılarak 80 mL suda çözüldü ve pH metre ile pH 8,8'e ayarlandı. Hazırlanan çözeltinin hacmi saf su eklenerek 100 mL'ye tamamlandı.

2. 1 M Tris-HCl (pH: 6, 8): 12,11 g Tris-HCl tartılarak 80 mL suda çözüldü ve pH metre ile pH 6,8'e ayarlandı. Hazırlanan çözeltinin hacmi saf su eklenerek 100 mL'ye tamamlandı.

3. %0,8 Bisakrilamid -%30 Akrilamid çözeltisi: 0,4 g bisakrilamid ve 15 g akrilamid tartıldıktan sonra bir miktar saf su eklenerek çözüldü. Hazırlanan çözeltiye saf su eklenerek son hacmi 50 mL'ye tamamlandı.

4. %10'luk SDS çözeltisi: 1 g sodyum dodesil sülfat reaktifi tartıldıktan sonra üzerine 9 mL saf su eklenerek çözüldü ve son hacmi saf su ile 10 mL olacak şekilde tamamlandı.

5. %10'luk amonyum persülfat çözeltisi: 1 g sodyum amonyum persülfat reaktifi tartıldıktan sonra üzerine 9 mL saf su eklenerek çözüldü ve son hacmi saf su ile 10 mL olacak şekilde tamamlandı.

6. Yürütme tamponu: 1,51 g Tris ve 7,51 g glisin tartıldıktan sonra 450 ml saf su içerisinde çözüldü. Önceden hazırlanmış olan %10'luk SDS çözeltisinden 5 ml eklenerek çözelti pH'sı 8,8'e ayarlanarak çözeltinin toplam hacmi saf su ilavesi ile 500 ml olarak elde edildi.

7. Örnek tamponu: Önceden hazırlanan pH'sı 6,8 olan 1 M derişimdeki Tris-HCl çözeltisinden 0,65 mL, %100 'lük gliserinden 1 mL, %0,1'lik bromtimol mavisi

çözeltisinden 1 mL ve %10'luk SDS çözeltisinden 1 mL alınıp karıştırıldıktan sonra çözeltinin toplam hacmi saf su ilavesi ile 10 mL'ye tamamlandı. Deney sırasında kullanımından önce 950 µl örnek hacmi için 50 µl β- merkaptto etanol eklendi.

8. Sabitleştirme çözeltisi: Jelde yürütülen proteinleri jele sabitlemek maksatıyla %50 izopropanol, %10 TCA ile %40 su ihtiva eden bir çözelti hazırlandı.

9. Jel boyama çözeltisi: Çeker ocak içerisinde 50 mL metil alkol, 10 mL asetik asit ve 40 mL saf su karıştırıldı. Bu solüsyon içerisinde 0,1 g Coomassie Brilliant Blue R-250 reaktifi tartılıp eklendi ve çözülmesi sağlandı.

10. Jel yıkama çözeltisi: 40 mL su, 50 mL metanol ilr 10 mL asetik asitten teşekkül eden çözelti hazırlandı.

11. %0,1'lik bromtimol mavisi: 0,1 gram indikatör tartılarak 0,01 M 16 mL NaOH çözeltisi içerisinde çözüldükten sonra son hacim saf su ile 100 mL'ye ayarlandı.

3.2 Yöntemler

3.2.1. Tiyoredoksin Redüktaz enziminin aktivite tayini

Tiyoredoksin redüktaz enziminin aktivitesi ölçülürken Holmgren tarafından geliştirilen yöntem küçük modifikasyonlar yapılarak kullanıldı. Bu yöntemde tiyoredoksin redüktaz enziminin NADPH bağımlı olarak DTNB'deki disülfid bağlarının indirgenmesini katalizlemesi esas alındı (Holmgren 1977). Aktivite ölçümü 50 mM EDTA içeren ve pH'sı 7,75 olan 1,0 M potasyum fosfat tamponu, 2 mM NADPH, 0,2 mg/mL sığır serum albümin ve 5 mM DTNB çözeltileri kullanılarak gerçekleştirildi. 1000 µl'lik küvetteki karışıma enzim eklendi (tablo 3.1) ve 412 nm'de absorbans artışı her 60 saniyede bir 3 dakika boyunca ölçüldü. Çalışmada aktivite ölçümleri oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

Tablo 3. 1. Aktivite ölçümündeki küvet içerikleri.

Kullanılan çözelti	Alınan hacim (Numune)	Alınan hacim (Kör)
Aktivite tamponu (1 M K-P, 50 mM EDTA pH:7,75)	300	300
5 mM DTNB (0,1 mM EDTA ,0,1 M K-P pH:7,2)	200	200
2 mg/ml BSA	100	100
2 mM NADPH	100	100
Saf su	280	300
Enzim numunesi	20	

3.2.2 Protein Tayini

3.2.2.a Kalitatif protein tayini

Preparatlardaki proteinlerin kalitatif tayini, 280 nm dalga boyunda proteinlerin yapısındaki triptofan ve tirozin aminoasitlerinin maksimum absorbands göstermesine bağlıdır (Segel 1968). Kromatografi işlemi sonrası toplanan elüatlar kuvarz küvetler kullanılarak, absorbandsları spektrofotometre cihazı vasıtasıyla köre (elüsyon tamponuna) karşı okundu.

3.2.2.b Bradford yöntemiyle protein tayini

Afinite kromatografisi metoduyla saflaştırılan enzim çözeltisi ve homojenattaki protein miktarı Bradford yöntemiyle bulundu. Proteine, Coomassie brilliant blue G-250'nin bağlanması olayına dayanan bu yöntemde, oluşan kompleks 595 nm'de maksimum absorbands verir. Boyanın proteine bağlanmasının çok hızlı gerçekleştiği bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasında değişkenlik gösterir (Bradford 1976).

Tayin işlemlerinde prosedür şu şekilde gerçekleştirildi; 1mL'sinde 1 mg protein içeren standart homojenat çözeltisi tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90,

100 µl olmak üzere sırası ile konuldu. Tüm tüpler ve saf su ile birlikte hacim toplam 100 µl'ye tamamlandı. Tüplere 4,9 mL renklendirici eklendi ve vorteks ile birlikte karıştırıldı. İnkübasyonda 10 dakika bekletilmesinin ardından 595 nm'de 3 mL'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerlerinin ölçümleri yapıldı. Karışımın içinde 4,9 mL renklendirici ve kör olarak 100 µl saf su bulunur ve absorbans değerlerine denk olan mg protein değerleri, standart grafik olarak çizildi. Numune çalışmaları için, 10 kat seyreltilmiş solungaç homojenatı ve saf enzim elüatları için benzer şekilde tüpler hazırlandı. Vorteks ile karıştırılan tüpler 10 dakika boyunca inkübe edildi. 595 nm'de absorbans değerleri okutuldu. Bu işlem 3 defa tekrarlandı ve 3 farklı ölçüm elde edildi ve bu ölçümlerin aritmetik ortalamaları alındı. Protein miktarları standart grafik sayesinde belirlendi.

3.2.3. Gökkuşığı alabalığının solungaç dokusundan TrxR enziminin saflaştırılması

3.2.3.a. Solungaç dokusunun temini ve homojenat hazırlanması

Gökkuşığı Alabalık çiftliği'nden temin edilen gökkuşığı alabalıkları soğuk zincir ilkelerine göre Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarına getirildi. Balıkların solungaç dokuları 1 mM etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) içeren 10 mM Tris/HCl tamponu (pH 7,5) ile yıkandıktan sonra kıkırdak kısmı ayrıldı ve bıçak yardımıyla mümkün olduğunca küçük parçalara ayrıldı. Yine aynı tamponla homojenizatör cihazı yardımıyla homojenat hazırlandı. Hazırlanan homojenat 12700 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi. Oluşan çökelek atılarak süpernatant alındı. Elde edilen süpernatant su banyosunda 60 °C'de 6-7 dakika bekletildikten sonra tekrar 12700 rpm'de 30 dakika santrifüj edilerek tekrar süpernatant alındı ve çökelek atıldı. Elde edilen süpernatant süzgeç kâğıdı kullanılarak süzüldükten sonra 2',5'-ADP Sepharose 4B affinity kolonuna tatbik edildi.

3.2.3.b. TrxR enzimi için afinite jelinin hazırlanması ve TrxR enziminin saflaştırılması

Enzimi saflaştırmada kullanmak üzere 2',5'-ADP Sepharose 4B jeli 2 gram tartılarak 300 mL saf su ile safsızlıkları uzaklaştırmak için birkaç defa yıkandı.

Yıkama sırasında jelin şişmesi sağlandı. Hazırlanan jel, kapalı bir sistem olan 1x10 cm'lik kolona paketlenildi. Jelin çöküşü ile birlikte peristaltik pompa yardımıyla 1 mM EDTA ihtiva eden 10 mM Tris/HCl tamponu (pH 7.5) ile dengelendi. Kolonun dengelendiği elüat ve dengeleme tamponunun 280 nm'de absorban farkının 0,05'in altına düşmesinden anlaşıldı. Böylece afinite kolonu hazırlanmış oldu.

Önceden hazırlanan homojenat dengelenen 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite jeli bulunan kolona tatbik edildi. Numune tatbikini sonrasında 280 nm'de elüsyonlardaki absorban farkı 0,05 olana dek kolon dengeleme tamponu ile yıkamaya bırakıldı. Sonra 2 mM EDTA içeren 0,15 M K-Fosfat (pH=7,5) tamponu içerisinde 0-10 mM arasında NADP⁺ gradienti uygulanarak elüsyon yapıldı ve elüatlar 1,5 mL halinde tüplere alınarak herbirinde aktivite tayini yapıldı. Sonraki çalışmalar için aktif elüsyonlar birleştirildi.

3.2.4. SDS-PAGE ile enzim saflığının kontrolü

Saflaştırılan enzimin saflık derecesinin kontrol edilmesi amacıyla %3-10 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS- PAGE) Laemmli metoduna göre uygulandı (Laemmli 1970).

İlk olarak elektroforez plakaları su ve alkol ile yıkandı. Düz bir plaka ile kenarlarda aralık oluşturmayı sağlayarak bir diğer plaka üst üste koyularak kısıkaçlar ile tutturuldu. Bu plakalar sızdırma önleyici sünger içeren jel hazırlama kabine konuldu. Ayırma jeli hazırlandıktan sonra enjektör yardımı ile iki plakanın arasına üst kesimde 0,5 cm kalıncaya kadar enjekte edildi. Jelin donması için iki saat beklendikten sonra ayırma jelinin katılığı kontrol edilip yığma jeli hazırlandı. Hazırlanan jel üst bölgedeki boşluğu dolduracak şekilde konuldu ve örneklerin uygulanacağı kuyucukların oluşması için tarak yerleştirildi. Kuyucukların oluşması için jelin katılaşması beklenirken kurumaması için ıslak süzgeç kağıdı ile sistemin üstü kapandı. Katılaşmanın ardından tarak jeli bozmadan yavaş ve dikkatli şekilde çıkartıldı. Kuyucuklara eklenecek enzim örneğine bire bir oranda önceden hazırlanmış olan örnek tamponu ilave edildi. İnkübasyon için sıcak su banyosunda üç dakika bekletildi.

Elektroforez tankının alt kısmı ile üst kısmı yürütme tamponuyla doldurulduktan sonra enzim örnekleri ve standart proteinler numune kuyucuklarına

dikkatli bir şekilde yüklendi. İlk olarak örneğin 80 voltta 30 dakika yürütmesi beklendikten sonra örnek ayırma jeline kadar ulaşmış oldu. Bu aşamanın ardından gerilim 120 volta yükseltilerek örneklerin jelin alt sınırına gelmesine kadar yürütmeye devam edildi.

Örneklerin jel üzerindeki ilerlemesinin gözlenmesi örnek tamponuna ilave edilmiş olan brom timol mavisi ile sağlandı. Yürütülme tamamlandıktan sonra akım kesildi ve plakalar arasındaki jel yavaş ve dikkatli bir şekilde çıkarıldı. Jel, sabitleştirme çözeltisinde 20 dakika bekletildikten sonra çalkalayıcı üzerinde boyama çözeltisi içerisinde 2 saat bekletildi. Jelin boyanmasından sonra boyama çözeltisinden çıkarılıp yıkama çözeltisine konuldu. Protein bantları belirginleşip, rengi açılana kadar yıkanan jel, çalkalayıcıdan çıkarılıp oluşan bantların fotoğrafı çekildi.

Tablo 3.2. SDS Page Tablosu

Yığıma jeli	Ayırma jeli
5 mL 1 M Tris/HCl pH:8,8	0,41 mL 1 M Tris/HCl pH:6,8
6,53 mL %30'luk akrilamid - %0,8 bisakrilamid	0,8 mL %30'luk akrilamid - %0,8 bisakrilamid
0,2 mL %0,1'lik SDS	0,03 mL %0,1'lik SDS
0,13 mL %5'lik TEMED	0,03 mL %10'luk TEMED
0,2 mL %10'luk PER	0,07 mL %5'lik PER
1 mL saf su	2,45 mL saf su

3.3. Gökkuşuğu alabalığı solungacından saflaştırılan TrxR enzimiyle ilgili yapılan karakterizasyon çalışmaları

3.3.1. Gökkuşuğu alabalığı solungacından saflaştırılan TrxR enziminin molekül kütlesinin SDS-PAGE ile tayini

Laemmli (1970) metodu kullanılarak molekül kütlesi tayini yapıldı. Standart protein olarak 116 kDa, 90 kDa, 58 kDa, 48,5 kDa, 26,5 kDa'lık proteinler kullanıldı. Gökkuşuğu alabalık solungacı için elektroforez işlemleri uygulandı. Daha

sonra Rf-log MA grafiği, standart proteinlerin Rf değerlerinin hesaplanması ile grafik çizildi. Balık solungacından sağlanan TrxR enziminin alt birimlerinin Rf değerleri hesaplandı. Bu değerler standart grafikte yerine konularak log MA değeri tayin edildi. Son olarak, antilogaritması alınarak numunenin molekül ağırlığı tespit edildi. Proteinlerin Rf değerleri aşağıdaki formülün kullanılmasıyla belirlendi;

$$Rf = X_e / X_{boya}$$

X_e = Proteinin yürüme mesafesi X_{boya} = Boyanın yürüme mesafesi

3.3.2. Gökkuşağı alabalık solungaç dokusundan saflaştırılan TrxR enzimi için optimum pH'nın bulunmasına yönelik çalışmalar

Gökkuşağı alabalık solungacından TrxR enziminin optimum pH'sını belirlemek amacıyla pH'sı 6,5, 6,75, 7,0, 7,25, 7,50, 7,75, 8,0 olan K-fosfat tamponu hazırlandı ve her bir tamponda enzim aktivitesi belirlendi.

3.3.3. Gökkuşağı alabalık solungaç dokusundan saflaştırılan TrxR enzimi için optimum iyonik şiddetin bulunmasına yönelik çalışmalar

Gökkuşağı alabalık solungacından TrxR enzimi için optimum iyonik şiddetin belirlenmesi amacıyla 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 550 mM arasında değişen konsantrasyonlarda K-fosfat tamponları kullanılarak optimum iyonik şiddet tespit edildi.

3.3.6. DTNB ve NADPH substratları için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik çalışmalar

Gökkuşağı alabalığı solungacı TrxR enziminin DTNB ve NADPH substratları için K_M ve V_{max} değerlerinin tespiti amacıyla sabit DTNB konsantrasyonunda NADPH substratının 5 farklı konsantrasyonuyla aktivite ölçümü gerçekleştirildi. Bulunan değer kullanılarak Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Böylece NADPH için K_M ve V_{max} değerleri bu grafikten belirlendi. Benzer biçimde NADPH'nın sabit konsantrasyonunda DTNB'nin 5 farklı konsantrasyonuyla aktivite ölçümü yapılarak Lineweaver-Burk grafiği çizildi ve DTNB için K_M ve V_{max} değerleri belirlendi.

3.4. Gökkuşığı alabalığı solungaç dokusundan saflaştırılan TrxR enzim aktivitesi üzerine bazı ağır metal iyonlarının in vitro etkilerinin incelenmesi

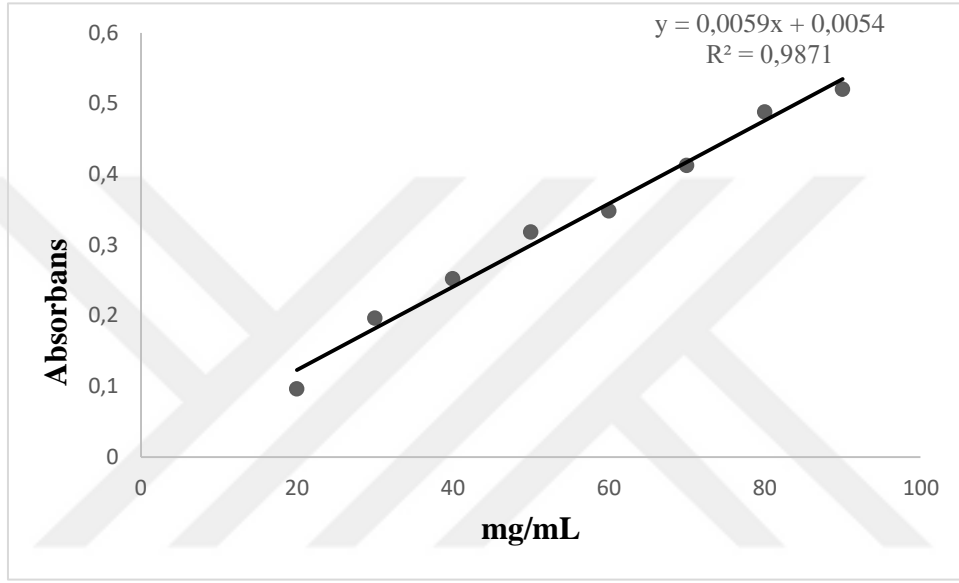
Ağır metallerin enzim aktivitesi üzerindeki etkilerini belirlemek için enzim aktivitesi, doymuş substrat konsantrasyonu ve beş farklı ağır metal konsantrasyonu ile ölçüldü. Enzim aktivitesinin yarıya düşmesine neden olan ağır metal konsantrasyonları (IC_{50}), % aktivite-ağır metal konsantrasyon grafikleri çizilerek belirlendi. K_i sabitleri Cheng-Prusoff denklemi kullanılarak hesaplandı.(Yung-Chi,C. and Prusoff, W.H. 1973)



4.BULGULAR VE YORUM

4.1.Kantitatif protein tayini için kullanılan standart grafik

Elde ettiğimiz enzim çözeltilerindeki kantitatif protein tayini Bradford yöntemiyle yapıldı. Öncelikle standart grafik hazırlandı. Enzim çözeltilerindeki kantitatif protein tayini bu standart grafikten faydalanılarak bulundu. Standart çözeltilerin µg proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 4.5’de gösterildi.



Şekil
4. 5.

Proteinlerin Bradford yöntemiyle kantitatif tayininde kullanılan standart grafik

4.2. Gökkuşığı Alabalık Solungaç Dokusundan TrxR Enziminin Saflaştırılması Sonuçları

4.2.1. Afinite kromotografisi sonuçları

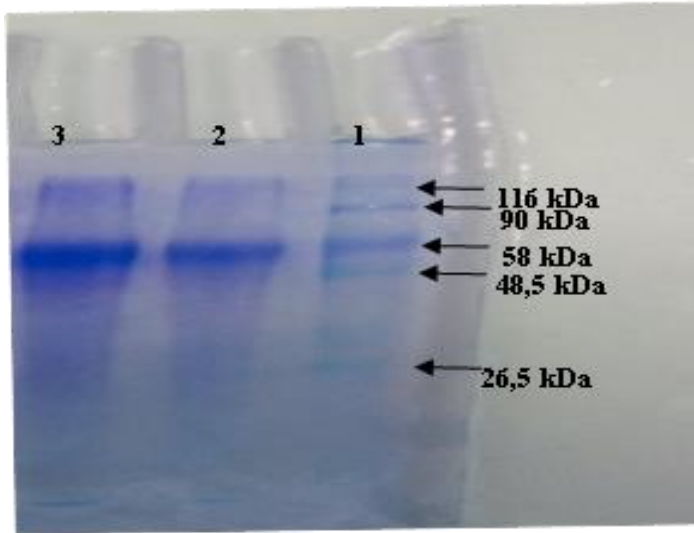
Hazırlanan homojenat dengelenen 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonuna yüklenerek kolon uygun tamponla yıkandı ve enzim gradientli elüsyon yapılarak 1.0435 EÜ/mg spesifik aktiviteyle % 26.19 verimle 184.1 kat saflıkla elde edildi. Saflaştırma basamakları Çizelge 4.1’de gösterildi.

Çizelge 4.1. TrxR Enziminin saflaştırma tablosu

Numune türü	Aktivite (EÜ/ml)	Toplam hacim (ml)	Protein (mg/ml)	Toplam aktivite (EÜ)	Spesifik aktivite (EÜ/mg protein)	Verim %	Saflaştırma katsayısı
Homojenat	0,042	12	7,41	0,504	0,0057	100	1
Isı denatürasyonu	0,04	10	1,27	0,4	0,0315	79,37	5,6
Afinite kromatografisi	0,024	5,5	0,023	0,132	1,0435	26,19	184,1

4.2.2. Gökkuşluğu Alabalık Solungaç Dokusundan Saflaştırılan TrxR Enziminin SDS-PAGE İle Saflık Kontrolü

Gökkuşluğu alabalık solungaç dokusundan afinite kromatografisinden elde edilen TrxR enzim saflığını kontrol etmek için SDS-PAGE metodu kullanıldı. Bu amaçla elektroforez sistemi kurularak sırasıyla enzim numuneleri kuyulara uygulanarak yürütüldü. Elde edilen bantların fotoğrafı çekilerek şekil 4.6’da verildi.

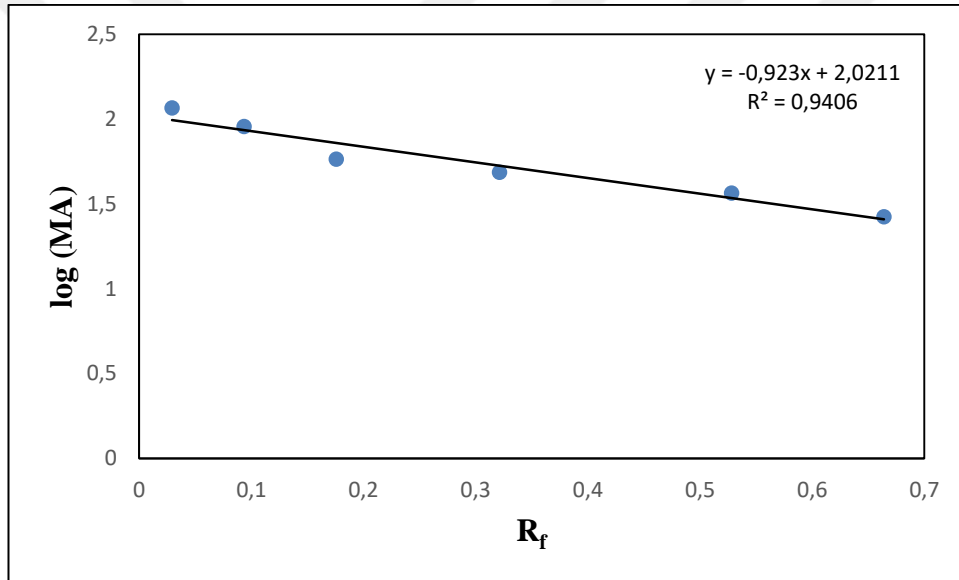


Şekil 4. 6. Afinite kromatografisi ile saflaştırılan TrxR enziminin SDS-PAGE ile saflık kontrolü. 2. kuyu ve 3. Kuyu saflaştırılan TrxR, 1 kuyu standart proteinler (E. Coli b-galaktosidaz 116 kDa, insan sütü laktoferrin 90 kDa, tavşan kası piruvat kinaz 58 kDa, domuz kalp fumaraz 48.5 kDa ve tavşan kası triosefosfat izomeraz 26.6 kDa).

4.3. Gökkuşığı Alabalık Solungaç Dokusundan Saflaştırılan TrxR Enziminin Karakterizasyon Çalışmalarının Sonuçları

4.3.1. Gökkuşığı alabalık solungaç dokusundan TrxR enziminin alt birimlerinin SDS-PAGE ile molekül kütlesinin belirlenmesi sonuçları

Afinite kolonundan alınan enzim SDS-PAGE’de yürütüldükten sonra fotoğrafı çekildi (Şekil 4.3). Standart proteinlerin ve enzimin jelde yürüdükleri mesafeler ölçüldü ve R_f değerleri hesaplandı. R_f-log MA grafiği çizildi (Şekil 4.7). Molekül ağırlığı ise yaklaşık 64,1 kDa olarak bulundu.



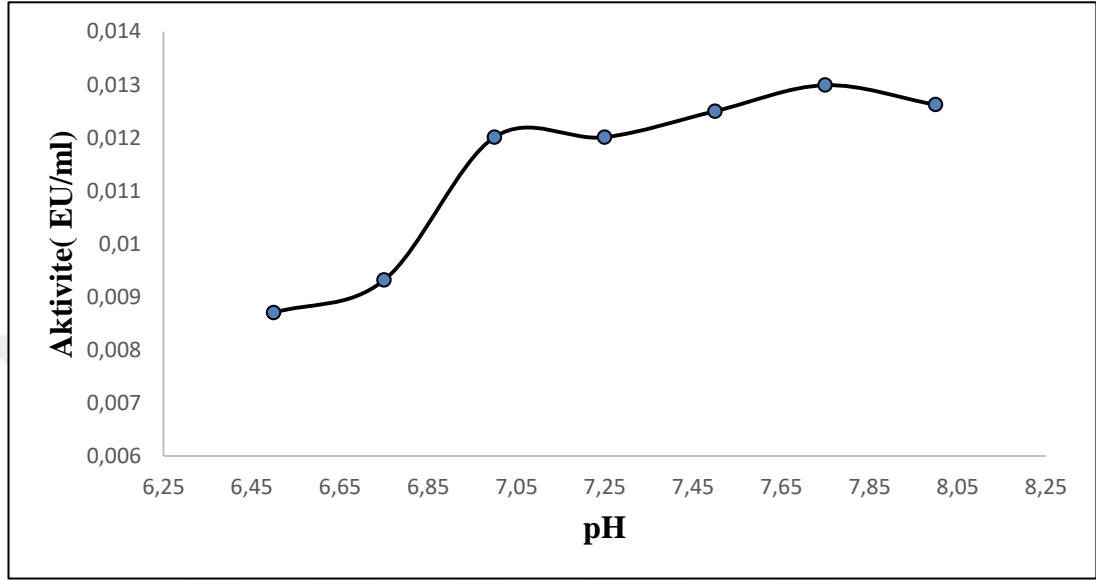
Şekil 4. 7. SDS-PAGE sonucu çizilen R_f - log MA grafiği

4.3.2. Gökkuşığı Alabalık Solungaç dokusundan saflaştırılan TrxR Enzimi için optimum pH bulunmasına yönelik sonuçlar

Gökkuşığı alabalık solungaç dokusundan saflaştırılan TrxR enziminin optimum pH'sını tespiti için pH değeri 6,5 ile 8,0 arasında değişen K-fosfat tamponlarından oluşan 7 farklı tampon çözelti kullanılarak enzimin aktivitesi belirlendi. Enzim için optimum pH 7,75 olarak belirlendi.

Çizelge 4.2. Gökkuşığı alabalık solungaç TrxR enziminin optimum pH'sını belirlemek için yapılan aktivite ölçüm sonuçları.

pH	6,5	6,75	7,0	7,25	7,5	7,75	8,0
Aktivite (EÜ/ml)	0,0087	0,0093	0,0120	0,0120	0,0125	0,0130	0,0126



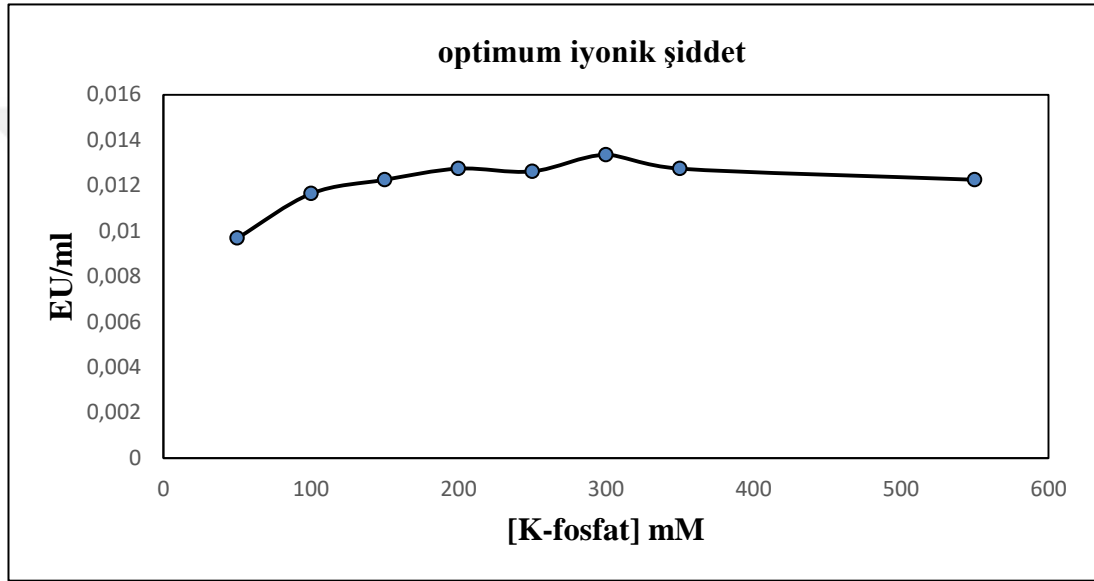
Şekil 4. 8. TrxR enzimi için pH-aktivite grafiği (kullanılan tamponlar 300 mM K-fosfat, pH 6.5, 6.75, 7.0, 7.25, 7.5, 7.75, 8.0)

4.3.3. Gökkuşığı Alabalık Solungaç dokusundan saflaştırılan TrxR enziminin optimum iyonik şiddetinin belirlenmesine yönelik sonuçlar

TrxR enziminin aktivite ölçümünde en uygun iyonik şiddetinin belirlenmesi için önceki çalışmalar sayesinde uygunluğu tespit edilen optimum pH' ya sahip K-fosfat tamponunun küvet içi konsantrasyonunun 50-550 mM arasında olduğu aktivite ölçümlerinde enzim aktivitesinin belirli aralıklarla stabil kaldığı görülmekle birlikte en yüksek aktivitenin 300 mM K-fosfat tamponunda olduğu belirlendi. (Çizelge 4.3.ve Şekil 4.9.)

Çizelge 4.3. Gökkuşığı Alabalık solungaç TrxR enziminin optimum iyonik şiddeti için KH_2PO_4 tamponu kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

$[\text{KH}_2\text{PO}_4](\text{mM})$ (küvet içi konsantrasyon)	50	100	150	200	250	300	350	550
Aktivite (EÜ/ml)	0,00968	0,01164	0,01225	0,01275	0,01262	0,01336	0,01275	0,01225



Şekil4. 9. Değişik konsantrasyonlardaki KH_2PO_4 tamponu kullanılarak Gökkuşığı Alabalık solungaç TrxR enzimi için yapılan iyonik şiddet-aktivite grafiği.

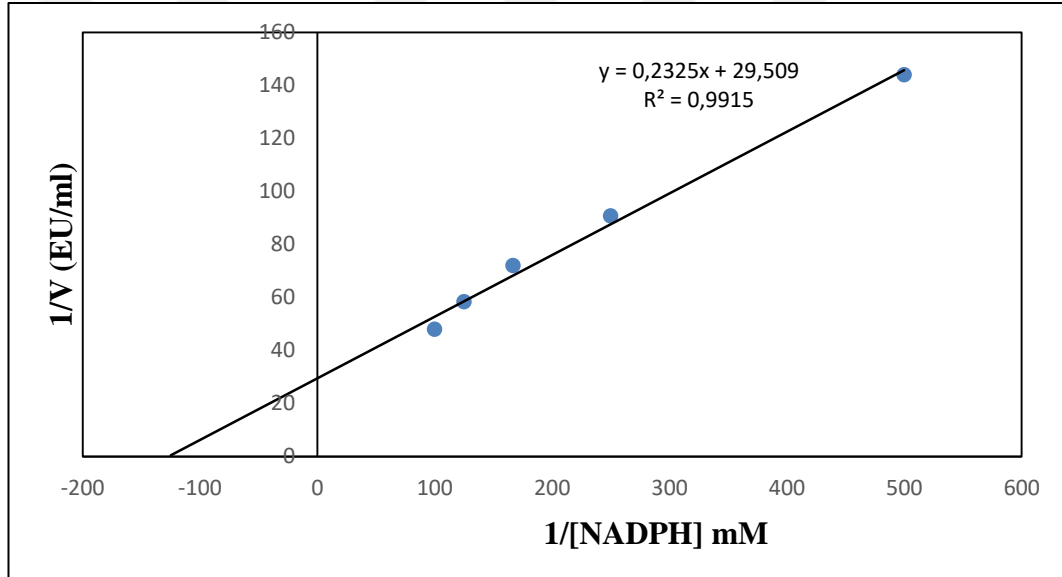
4.3.4. DTNB ve NADPH substratları için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesine yönelik sonuçlar

Gökkuşığı alabalığı solungaç TrxR enziminin DTNB ve NADPH substratları için K_M ve V_{max} değerlerini belirlemek için sabit TrxR konsantrasyonunda DTNB'nin 5 farklı konsantrasyonlarıyla aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen değerlerle $1/[\text{DTNB}]$ değerine karşılık $1/V$ için Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Bu grafikten yararlanarak DTNB için K_M ve V_{max} değerleri belirlendi. Aynı şekilde DTNB'nin sabit konsantrasyonunda NADPH'ın 5 farklı konsantrasyonlarıyla aktivite ölçümleri yapılarak $1/[\text{NADPH}]-1/V$ değerleri kullanılarak Lineweaver-Burk grafiği oluşturuldu ve NADPH için K_M ve V_{max}

değerleri hesaplandı. Bu çalışmalar sonucunda DTNB için K_M değeri 0,25 mM ve V_{max} değeri 0,011 EÜ/ml olarak; NADPH için ise, K_M değeri 7,88 mM ve V_{max} değeri 0,034 EÜ/ml olarak tespit edildi. Aktivite ölçümleri optimal şartlarda gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.4-4.5 ve Şekil 4.10-4.11’de gösterildi.

Çizelge 4.4. Gökkuşığı alabalığı solungaç dokusu TrxR enziminin NADPH substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik çalışma sonuçları

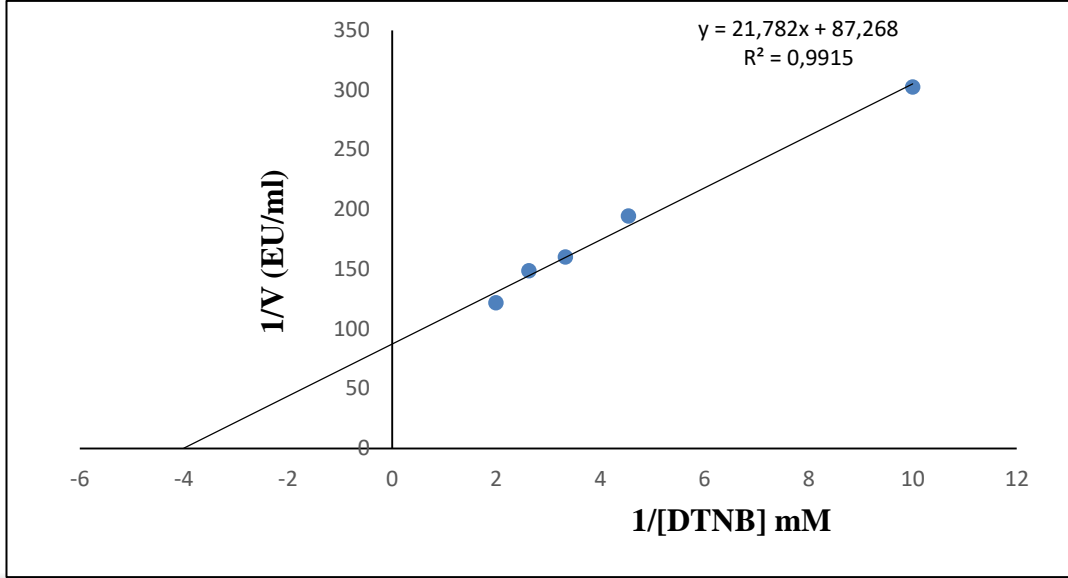
[NADPH] (μ M) (1/S)	100	125	166,667	250	500
Aktivite (EÜ/ml) (1/V)	48	58,2857	72	90,6667	144



Şekil 4. 10. NADPH için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi için kullanılan grafik

Çizelge 4.5. Gökkuşığı alabalığı solungaç dokusu TrxR enziminin DTNB substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik çalışma sonuçları

[DTNB] (mM)	2	2,63158	3,33333	4,54545	10
Aktivite (EÜ/ml)	121,791	148,364	160	194,286	302,222



Şekil 4. 11. DTNB için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi için kullanılan grafik

4.4.1. Gökkuşığı Alabalığı solungaç dokusundan saflaştırılan TrxR enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren metal iyonları için IC_{50} ve K_i değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışmaların sonuçları

Çalışılan ağır metaller arasında gökkuşığı alabalığı solungaç TrxR enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösterenler için en az 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapıldı. Daha sonra inhibitör konsantrasyonuna karşı % Aktivite grafikleri çizilerek grafik denkleminde inhibisyon etkisi gösteren metal iyonları için IC_{50} değerleri hesaplandı. Elde edilen sonuçlar tablo 4.1’de özetlendi.

Tablo 4.1. IC_{50} ve K_i Değerleri Tablosu

Metal iyonu	Konsantrasyon aralığı μM	IC_{50} μM	K_i μM
Ag^+	0,0005-0,015	0,00582	0,000647
Ni^{2+}	5-80	40	4,44
Pb^{2+}	10-240	149	16,56
Fe^{3+}	100-2000	561	62
Cu^{2+}	100-1200	720	80
Cr^{3+}	500-1500	871	97

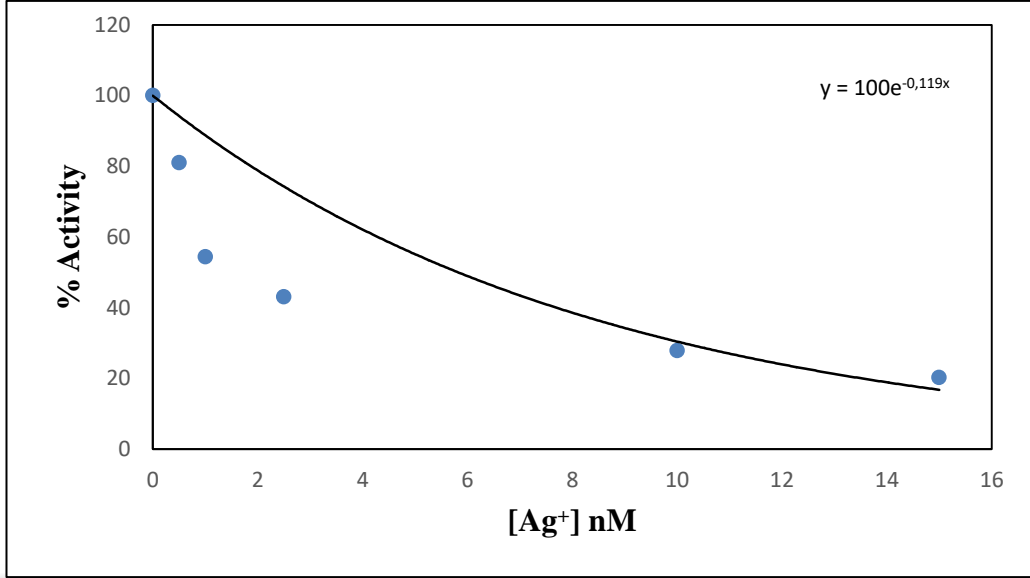
Cd^{2+}	500-10000	İnhibisyon görülmedi	
Sr^{2+}	1000-15000	İnhibisyon görülmedi	
Zn^{2+}	500-5000	İnhibisyon görülmedi	
Mg^{2+}	500-20000	İnhibisyon görülmedi	
Al^{3+}	10-300	İnhibisyon görülmedi	

4.4.1.a. Ag^+ iyonunun gökkuşığı alabalığı solungaç TrxR enzimi aktivitesi üzerine etkisi

Yapılan çalışma kapsamında gökkuşığı alabalığı solungaçlarından saflaştırılan sitozolik TrxR enzim aktivitesi üzerine Ag^+ iyonların etkisi incelendiğinde % aktivite- [metal iyonu] grafiği yardımıyla hesaplanan IC_{50} değeri 0,00582 nm olarak bulundu. Hesaplanan K_i değerinin ise 0,000647 nm olduğu belirlendi. Elde edilen sonuçlar çizelge 4.6 şekil 4.12’de verildi.

Çizelge 4.6. Ag^+ iyonunun Gökkuşığı Alabalığı solungaç TrxR enzimi aktivitesi üzerine etkisi

Konsantrasyon nM	% Aktivite
0	100
0,5	81,0123
1	54,4304
2,5	43,0379
10	27,8481
15	20,2532



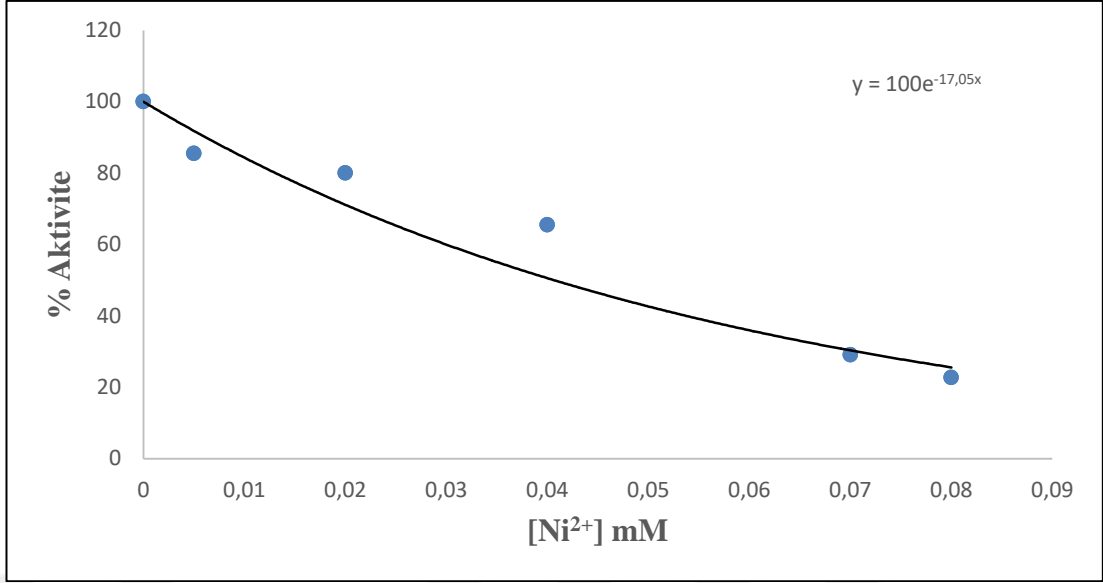
Şekil 4. 12. Gökkuşuğu Alabalığı solungaç TrxR enzimi üzerine Ag^+ iyonunu inhibisyon etkisini gösteren grafik

4.4.1.b. Ni^{2+} iyonunun Gökkuşuğu Alabalığı solungaç TrxR enzimi aktivitesi üzerine etkisi

Laboratuvar ortamında gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda gökkuşuğu alabalığı solungaç dokularından saflaştırılan sitozolik TrxR enzim aktivitesi üzerine Ni^{2+} iyon etkisi incelendiğinde %aktivite-[metal iyonu] grafiğiyle (Şekil 4.13) hesaplanan IC_{50} değeri $40 \mu M$ olarak bulundu. Hesaplanan K_i değeri ise $4,44 \mu M$ olarak belirlendi. Elde edilen sonuçlar çizelge 4.7 şekil 4.13'te verildi.

Çizelge 4.7. Ni^{2+} iyonunun Gökkuşuğu Alabalığı solungaç TrxR enzimi aktivitesi üzerine etkisi

Konsantrasyon mM	% Aktivite
0	100
0,005	85,4545
0,02	80
0,04	65,4545
0,07	29,0909
0,08	22,7273



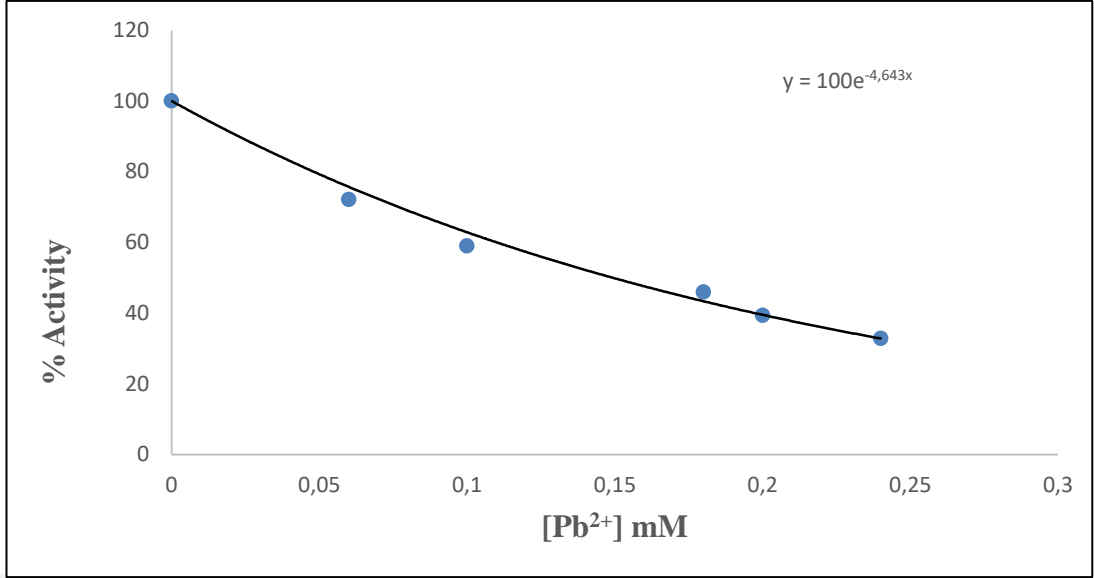
Şekil 4.13. Gökkuşığı Alabalığı solungaç TrxR enzimi üzerine Ni²⁺ iyonunu inhibisyon etkisini gösteren grafik

4.4.1.c. Pb²⁺ iyonunun Gökkuşığı Alabalığı solungaç TrxR enzimi aktivitesi üzerine etkisi

Çalışma sonucunda gökkuşığı alabalığı solungaç dokularından saflaştırılan sitozolik TrxR enzim aktivitesi üzerine Pb²⁺ iyon etkisi incelendiğinde % aktivite-[metal iyonu] grafiğiyle hesaplanan IC₅₀ değeri 149 µM olarak bulundu. Hesaplanan K_i değeri ise 16,56 µM olarak belirlendi. Elde edilen sonuçlar çizelge 4.8 şekil 4.14'te verildi.

Çizelge 4.8. Pb²⁺ iyonunun Gökkuşığı Alabalığı solungaç TrxR enzimi aktivitesi üzerine etkisi

Konsantrasyon mM	% Aktivite
0	100
0,06	72,13
0,1	59,02
0,18	45,90
0,2	39,34
0,24	32,77



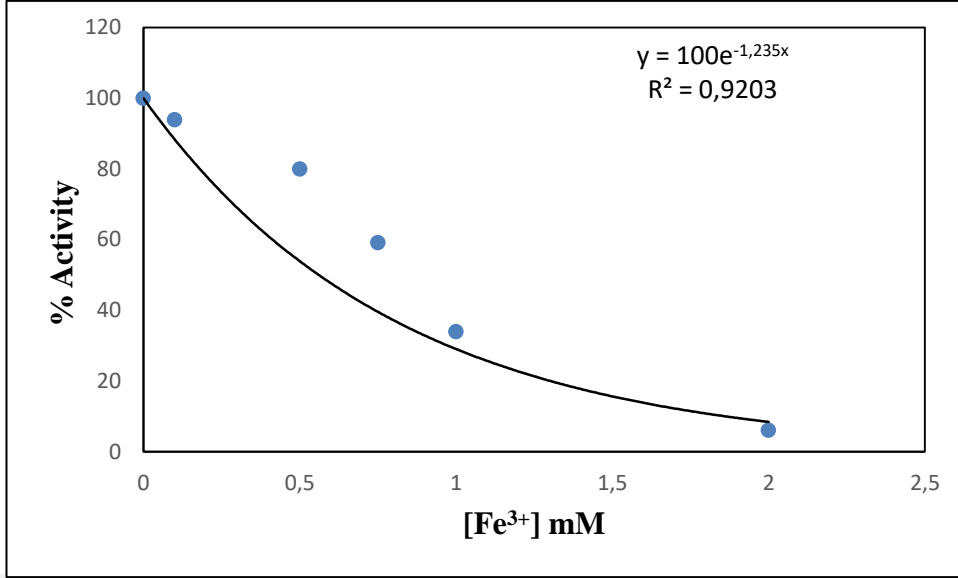
Şekil 4.14. Gökkuşığı Alabalığı solungaç TrxR enzimi üzerine Pb²⁺ iyonunu inhibisyon etkisini gösteren grafik

4.4.1.d. Fe³⁺ iyonunun Gökkuşığı Alabalığı solungaç TrxR enzimi aktivitesi üzerine etkisi

Yapılan deneylerde gökkuşığı alabalığı solungaç dokularından saflaştırılan sitozolik TrxR enzim aktivitesi üzerine Fe³⁺ iyon etkisi incelendiğinde %aktivite-[metal iyonu] grafiğiyle hesaplanan IC₅₀ değeri 561µM olarak bulundu. Hesaplanan K_i değeri ise 62 µM olarak hesaplandı. Elde edilen sonuçlar çizelge 4.9 şekil 4.15'te verildi.

Çizelge 4.9. Fe³⁺ iyonunun Gökkuşığı Alabalığı solungaç TrxR enzimi aktivitesi üzerine etkisi

Konsantrasyon mM	% Aktivite
0	100
0,1	93,91
0,5	80
0,75	59,13
1	33,91
2	6,09



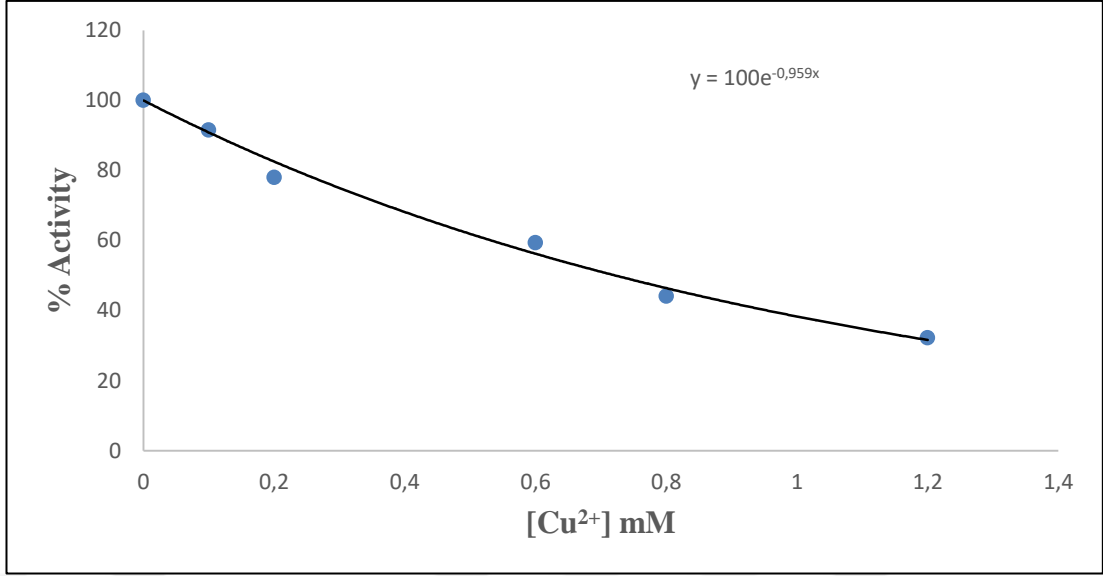
Şekil 4. 15. Gökkuşığı Alabalığı solungaç TrxR enzimi üzerine Fe³⁺ iyonunu inhibisyon etkisini gösteren grafik

4.4.1.e. Cu²⁺ iyonunun Gökkuşığı Alabalığı solungaç TrxR enzimi aktivitesi üzerine etkisi

Yapılan çalışmalarda gökkuşığı alabalığı solungaç dokularından saflaştırılan sitozolik TrxR enzim aktivitesi üzerine Cu²⁺ iyon etkisi incelendiğinde % aktivite-[metal iyonu] grafiğiyle hesaplanan IC₅₀ değeri 720 µM olarak bulundu. Hesaplanan K_i değeri ise 80 µM olarak belirlendi. Elde edilen sonuçlar çizelge 4.10 şekil 4.16'da verildi.

Çizelge 4.10. Cu²⁺ iyonunun Gökkuşığı Alabalığı solungaç TrxR enzimi aktivitesi üzerine etkisi

Konsantrasyon mM	% Aktivite
0	100
0,1	91,53
0,2	77,97
0,6	59,32
0,8	44,07
1,2	32,20



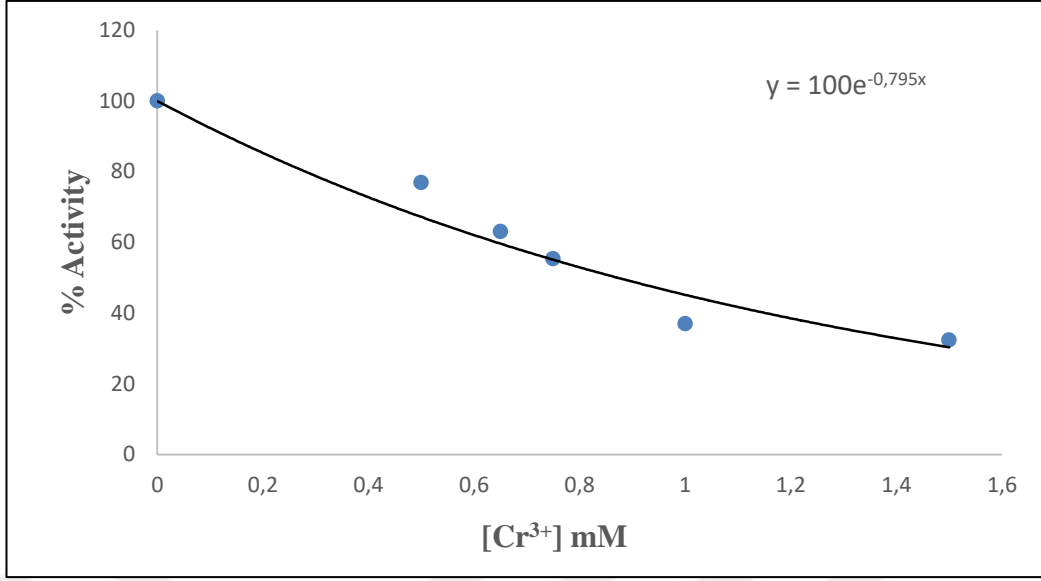
Şekil 4. 16. Gökkuşığı Alabalığı solungaç TrxR enzimi üzerine Cu²⁺ iyonunu inhibisyon etkisini gösteren grafik

4.4.1.f. Cr³⁺ iyonunun Gökkuşığı Alabalığı solungaç TrxR enzimi aktivitesi üzerine etkisi

Yapılan çalışmalarda gökkuşığı alabalığı solungaç dokularından saflaştırılan sitozolik TrxR enzim aktivitesi üzerine Cr³⁺ iyon etkisi incelendiğinde % aktivite-[metal iyonu] grafiğiyle hesaplanan IC₅₀ değeri 871 µM olarak bulundu. Hesaplanan K_i değeri ise 97 µM olarak hesaplandı. Elde edilen sonuçlar çizelge 4.11 şekil 4.17’de verildi.

Çizelge 4.11. Cr³⁺ iyonunun Gökkuşığı Alabalığı solungaç TrxR enzimi aktivitesi üzerine etkisi

Konsantrasyon mM	% Aktivite
0	100
0,5	76,92
0,65	63,08
0,75	55,38
1	36,92
1,5	32,31



Şekil 4. 17. Gökkuşığı Alabalığı solungaç TrxR enzimi üzerine Cr³⁺ iyonunu inhibisyon etkisini gösteren grafik

5. SONUÇ ve TARTIŞMA

Son yıllardaki hızlı kentleşme ve sanayideki gelişmeler çevresel bazı problemlere neden olmaktadır. Doğal akuatik sistemler evsel, endüstriyel ve diğer insan yapımı aktivitelerden dolayı büyük ölçüde kontaminasyona maruz kalmaktadır. Nehirlerdeki ağır metal kontaminasyonu, hızlı büyüyen şehirlerde bu problemlerin başında gelmektedir. Kimyasal kontaminantlar için güncel akuatik zarar tanımlama prosedürleri persistans, bioakümülyasyon ve toksisiteye dayanır. Bununla birlikte metaller için bu değerlerin kritik seviyelerinin belirlenmesi güçtür. Çünkü metaller doğal olarak çevrede kalıcıdır ve hem esansiyel hem de esansiyel olmayan metaller doğal olarak biyobirikime uğrarlar. Ayrıca metallerin toksisiteleri jeokimyasal özelliklerden oldukça etkilenirler (DeFrost vd. 2007; Vinodhini, vd. 2008; Reza, vd. 2010).

Daha önce yapılan çalışmalarda antioksidan enzim sistemlerindeki değişimler üzerine ağır metal toksisitesinin etkilerinin belirlenmesi amacıyla çalışmaların yapılması gerekliliği vurgulanmıştır (Vinodhini vd. 2008). Örneğin detoksifikasyonda görev alan bir enzim olan glutatyon S-tranferaz enzimi Ağrı Dağı alabalığı solungaç dokusundan saflaştırılmış ve Hg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} ve Se^{4+} iyonlarının enzimi inhibe ettiği belirlenmiştir (Çomaklı, V., Kuzu, M. ve Demirdağ, R. 2015). Karaciğer monooksijenaz enzim sisteminin bir bileşeni olan ve NADPH kullanan enzim olan sitokrom P450 redüktaz enzimi Van Gölü balığı karaciğer dokusundan saflaştırılmış ve Hg^{2+} , Ag^{+} ve Cu^{2+} iyonlarının enzimi in vitro ortamda inhibe ettiği bildirilmiştir (Kuzu, M. ve Çiftci, M. 2015). Bununla birlikte özellikle tiyoredoksin redükraz enzimi üzerine ağır metallerin etkileri konusunda literatürde oldukça sınırlı bilgi bulunmaktadır. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada mitokondriyel TrxR enzimi alabalık karaciğer dokularından saflaştırılmış ve karakterize edilerek bazı ağır metallerin enzim aktivitesi üzerine in vitro etkileri incelenmiştir (Özgençli ve Çiftci, 2016).

Yapılan bu çalışmada ise sitozolik TrxR enzimi alabalık solungaç dokularında saflaştırılarak ilk defa bir balık türünün solungaçlarından elektroforetik saflıkta saflaştırılmış oldu. Saflaştırma işlemi ısı denatürasyonu ve 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi teknikleri kullanılarak iki basamakta gerçekleştirildi. Afinite

kolonundan elde edilen enzimin saflığı SDS-PAGE ile kontrol edildi ve tek bant görüldü. Standart proteinler kullanarak elde edilen Rf -log MA grafiği yardımıyla enzimin monomer molekül ağırlığı ~64,1 kDa olarak hesaplandı. Daha önce yapılan diğer çalışmalarda ise mitokondriyel TrxR enzimi sığır adrenal korteksinden saflaştırılmış ve monomer molekül ağırlığı 56 kDa olarak belirlenmiştir (Watabe vd. 1999). Bu değer alabalığı karaciğer mitokondriyel TrxR için yaklaşık 70 kDa (Özgençli ve Çiftci, 2016), insan plasenta TrxR için 55,2 kDa (Gromer vd. 1998), rat karaciğer TrxR enzimi için 58 kDa olarak belirlenmiştir (Luthman ve Holmgren, 1982). Dolayısıyla alabalık solungaç sitozolik TrxR enzimin molekül ağırlığının literatür ile uyumlu olduğu söylenebilir.

Çalışma sonucunda Gökkuşığı Alabalığı solungaç dokusundan TrxR enzimi 184,1 kat saflaştırılmıştır. Diğer bir çalışma olan midye hepatopankreası tiyoredoksin redüktazının saflaştırılması ve bazı özelliklerinin incelenmesi amacıyla yapılan bir diğer çalışmada ise midye hepatopankreas ham ekstresinden sırayla amonyum sülfatla çöktürme, DEAE-Sefaroz CL-6B anyon değiştirici ve afinite (2',5'-ADP-agaroz) kromatografileri uygulanması sonucu adı geçen dokuda tiyoredoksin redüktazın 965 kez saflaştırılarak elde edildiği bildirilmiştir (Acar, 2013). TrxR enzimi daha önce sıçan karaciğerinden Sephadex jel filtrasyonu ve DEAE-selüloz kromatografileri kullanılarak 626 kat saflaştırıldığı belirtilmiştir (Larsson 1973).

2'5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi yöntemiyle gökkuşığı alabalık solungaç dokusundan saflaştırılan TrxR enziminin spesifik aktivitesi 1,0435 EÜ/mg bulundu. Literatür taraması sonucunda; Pigiet ve Conley (1977) saf tiyoredoksin redüktazın DTNB indirgeme metodu ile tayin edilen spesifik aktivitesinin 1,290 U/mg, Maggioli ve vd. (2004) 7,117/mg, Williams ve arkadaşları (1967) ise 1,020 U/mg olduğu, glutatyon redüktazının ise 214 µmol/dak (Pigiet ve Conley 1977), ve 210 µmol/dak, (Williams ve Arscott 1971) olarak belirtilmiştir. Acar'ın (2013) çalışmasında enzimin saflık derecesi, SDS-PAGE uygulanması ve spesifik aktivitenin hesaplanması ile incelendiği belirtilmiştir. Bu çalışmada TrxR enziminin spesifik aktivitesi 29,745 EU/mg protein olarak saptandığı belirtilmiştir. Bu çalışmada, saf olarak elde edilen TrxR'in spesifik aktivitesi bakımından, diğer türlerden izole edilen tiyoredoksin redüktazlarla kıyaslandığında 25 kat daha fazla

spesifik aktivite gösterdiği gözlenmektedir. Tiyoredoksin redüktaz aktivitesi DTNB bağımlı metodun yanı sıra, tiyoredoksin varlığında substrat olarak insulin kullanılan metod ile kanıtlanmıştır. Midye tiyoredoksin redüktazının, elektron vericisi olarak kullanılan NADPH varlığında insulindeki disülfid bağlarını redükleyebildiği tespit edilmiştir (Acar 2013).

Saflaştırılan enzim için optimum pH ve optimum iyonik şiddetin belirlenmesine yönelik aktivite ölçümleri yapıldı. Yapılan çalışmalar neticesinde enzimin en yüksek aktiviteyi pH 7.75 K-fosfat tamponunda gösterdiği bununla birlikte pH 7.0'dan sonra enzimin aktivitesini belirli bir düzeyde koruduğu tespit edildi. Bununla birlikte pH 7.75 ve 8.0'da Tris/HCl tampon ile yapılan aktivite ölçümlerinde ise aktivitenin K-fosfat tampon ile yapılan ölçümlere göre çok düşük olduğu görüldü. Yine farklı konsantrasyonlardaki K-fosfat tamponunda yapılan aktivite ölçümlerinde enzim aktivitesinin 300 mM küvet içi konsantrasyonunda en yüksek olduğu belirlendi. Ancak aktivitenin 150 mM konsantrasyonundan sonra 550 mM konsantrasyona kadar göreceli olarak stabil olduğu görüldü. Daha önce yapılan çalışmada alabalık mitokondriyel TrxR enzimi için optimum pH 7.50, optimum iyonik şiddet ise 500 mM olarak verilmiştir (Özgençli ve Çiftci, 2016). E.coli enzimi için ise optimum pH'nın 7.7 olduğu ve K-fosfat ile yapılan ölçümlerdeki aktivitenin Tris/HCl ile yapılan ölçümlere kıyaslandığında 2 kat fazla olduğu bildirilmiştir (Moore, Reichard ve Thelander, 1964). Enzimin substratlarına olan ilgisini gösteren K_M değerlerinin hesaplanması amacıyla beş farklı substrat konsantrasyonunda aktivite ölçümleri yapılarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Buna göre enzimin NADPH ve DTNB için K_M değerleri sırasıyla 7.88 μ M ve 0.25 mM olarak hesaplandı. Bu değerler daha önce yapılan çalışmalarda rat karaciğer TrxR için sırasıyla 6 μ M ve 0.66 mM (Luthman ve Holmgren, 1982), sığır adrenal korteksi TrxR enzimin DTNB için 3.9 mM, insan plasenta TrxR enziminin NADPH için 18 μ M olarak bildirilmiştir (Gromer vd. 1998). Bu değerlerle kıyaslandığında enzimin substratlarına ilgisi bakımından rat karaciğer enzimine benzer olduğu söylenebilir.

Sıçan karaciğerinden izole edilen tiyoredoksin redüktazın DTNB'e karşı K_M değeri 660 μ M, NADPH'a karşı 6 μ M olarak saptanmıştır (Luthman ve Holmgren 1982). *Thermotoga maritima* bakterinin (Yang ve Ma 2010) tiyoredoksin redüktazın V_{max} değeri 115 μ mol NADPH olarak bildirilmiştir. *Deinococcus radiophilus*

tiyoredoksin redüktazının NADPH'a karşı K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 12,5 μmol ve 25 $\mu\text{mol/dak.}$, DTNB'a karşı K_M ve V_{max} değerleri ise sırasıyla 463 μmol ve 756 $\mu\text{mol/dak}$ olarak tespit edilmiştir (Seo ve Lee 2010). Sıçan karaciğerinden saflaştırılan TrxR'ın NADPH'a karşı K_M değerinin 40 μmol olarak bildirilmiştir (Larsson 1973).

Oksidatif hasara karşı koruma, hücrel stres tepkisi ve protein tamiri için anahtar role sahip tiyoredoksin sisteminin bir bileşeni olan TrxR içerdiği yapısal sistein rezidülerinden dolayı oksidasyona duyarlı hale gelir (Carvalho vd. 2008). Ayrıca selenol ve tiyol gruplarından dolayı enzimin özellikle iki değerlikli metal iyonları ile kompleks oluşturarak inhibe olabileceği aktarılmıştır (Özgençli ve Çiftçi, 2016). Örneğin civanın toksik etkisini antioksidan regülasyonda gerekli olan glutatyon peroksidazı ve TrxR gibi selenoenzimleri inhibe ederek gösterebileceği vurgulanmıştır (Branco vd. 2012). Bu nedenle balık solungaç dokularında tiyoredoksin sisteminin ağır metallere nasıl etkilendiğinin belirlenmesi amacıyla TrxR enzimi üzerine in vitro etkileri incelendi. Yapılan ölçümler sonucunda Ni^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Cr^{3+} , Fe^{3+} , Ag^+ iyonlarının enzim inhibe ettiği belirlendi. Elde edilen sonuçlar kullanılarak her bir iyon için % Aktivite- metal iyonu konsantrasyonu grafiği çizildi ve buradan IC_{50} değeri bulundu. Daha sonra Cheng-Prusoff eşitliği kullanılarak K_i değerleri hesaplandı. Etkisine bakılan metaller içerisinde en kuvvetli inhibisyon etkisini Ag^+ iyonu gösterdi. Bununla birlikte yine Ni^{2+} iyonu μM düzeyde inhibisyon etkisi gösterdi.

Daha önce yapılan çalışmalarda enzim aktivitesinin Ca^{2+} ve Mg^{2+} iyonları tarafından zayıf inhibe edilirken Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} gibi iki değerlikli metal iyonları tarafından kuvvetli inhibe edildiği bildirilmiştir (Watabe vd. 1999). Yine Özgençli ve Çiftçi tarafından yapılan çalışmada Se^{4+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{3+} ve Al^{3+} iyonlarının alabalık karaciğer dokusundan saflaştırılan mitokondriyel TrxR üzerine etkileri incelenmiş Se^{4+} iyonunun enzimi aktive ettiği diğer metal iyonlarının ise mM düzeyde enzimin inhibisyonuna sebep oldukları bildirilmiştir (Özgençli ve Çiftçi, 2016). Ağır metallere biyolojik birikim özellikleri *Cyprinus carpio* türü üzerinde çalışılmış ve solungaç dokularında $\text{Cd} > \text{Pb} > \text{Ni} > \text{Cr}$ sıralamasında metallere toplanma eğiliminde olduğu belirtilmiştir (Vinodhini ve Narayanan, 2008).

Dolayısıyla ağır metallere maruz kalan balık türlerinde tiyoredoksin sisteminin bu durumdan etkileceği ve bu etkinin zamanla biyobirikimden dolayı artabileceği söylenebilir. Bu ise ağır metallerin toksik etkilerinin mekanizmalarından biri olarak değerlendirilebilir.

Hg²⁺, Cu²⁺, Se⁴⁺, Al³⁺ iyonlarının Ağrı Dağı alabalığı solungaç dokusundan saflaştırılmış glutatyon S-transferaz enzimin aktivitesi üzerine etkileri incelenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda metal iyonlarının IC₅₀ ve K_i değerleri bulunmuştur. Metal iyonlarının IC₅₀ değerleri; Hg²⁺ iyonu için 0,137 µM, Cu²⁺ iyonu için 0,159 µM, Se⁴⁺ iyonu için 0,239 µM, Al³⁺ iyonu için 4,08 µM, K_i değerleri ise; Hg²⁺ iyonu için 0,038 µM, Cu²⁺ iyonu için 0,044 µM, Se⁴⁺ iyonu için 0,066 µM, Al³⁺ iyonu için 1,134 µM olarak bildirilmiştir (Çomaklı, V., Kuzu, M. ve Demirdağ, R. 2015).

Burada Ag⁺ iyonunun inhibisyon etkisi oldukça dikkat çekicidir. Çünkü bu iyon için IC₅₀ değeri 5.82 nm olarak hesaplanmıştır. Bunun nedeninin enzimin aktif bölgesinde sistein aminoasitini içermesi olduğu düşünülmektedir. İnsan sitozolik TrxR enziminin üç tane yapısal sistein rezidüsü (Cys⁶², Cys⁶⁹ and Cys⁷³) içerdiği ve bu rezidülerin Cys⁶²-Cys⁶⁹ arasında aktivite kaybına sebep olan ikinci disülfid bağımlı oluşturarak enzimi oksidasyona dayanıksız hale getirdiği bildirilmiştir (Carvalho vd. 2008). Aktif ve katalitik bölgelerinde Cys ihtiva eden enzimler Ag⁺ ve Hg²⁺ gibi ağır metal iyonları ile -SH grubu üzerinden merkaptanlar oluşturarak inhibe oldukları bildirilmiştir (Keha ve Küfrevioğlu, 2010).

Sonuç olarak bu tez kapsamında ;

Gökkuşacağı alabalığı solungaç dokusundan TrxR enziminin saflaştırılması için 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemle enzim saf olarak elde edilmiş ve saflaştırma sonuçlarının literatürle uyumlu olduğu görülmüştür.

Çalışma sonucunda Gökkuşacağı Alabalığı solungaç dokusundan TrxR enzimi 1,0435 EU/mg spesifik aktiviteye sahip % 26,19 verimle 184,1 kat saflaştırılmıştır. Enzimin saflığı elektroforezde bulunan tek bant ile tespit edilmiştir.

Saflaştırılan Gökkuşacağı Alabalığı solungaç dokusundan TrxR enzimi için yapılan karakterizasyon çalışmalarında optimum pH 7,75, optimum iyonik şiddet 300 mM potasyum fosfat olarak belirlenmiştir.

Gökkuşağı Alabalığı solungaç dokusundan saflaştırılan TrxR enzimi üzerine bazı ağır metal iyonlarının inhibisyon etkileri incelenmiştir. Ag^+ , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Cr^{3+} metal iyonlarıyla çalışılmıştır. Metal iyonları için IC_{50} ve K_i değerleri hesaplanmıştır. İnhibisyon çalışmaları sonucunda metal iyonlarının düşük dozlarda TrxR enzimini inhibe ettiği görülmüştür.



KAYNAKÇA

- Acar, E. (2013). Midye (*Mytilus galloprovincialis* Lam.) hepatopankreasından tioredoksin redüktaz enziminin saflaştırılması ve kinetik özelliklerinin incelenmesi. İstanbul Üniversitesi / Sağlık Bilimleri Enstitüsü / Biyokimya Anabilim Dalı / Biyokimya Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- Arnér, E.S.J. ve Holmgren, A. (2006). The thioredoxin system in cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 16, 420-426.
- Arnér E.S.J., Focus on mammalian thioredoxin reductases – important selenoproteins with versatile functions, *BBA-Gen. Subj.* 2009 (1790) 495–526.
- Arcott LD, Gromer S, Schirmer RH, Becker K, Williams CHJ. The mechanism of thioredoxin reductase from human placenta is similar to the mechanisms of lipoamide dehydrogenase and glutathione reductase and is distinct from the mechanism of thioredoxin reductase from *Escherichiacoli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 3621-6.
- Berggren MI, Husbeck B, Samulitis B, Baker AF, Gallegos A, Powis G. (2001). Thioredoxin peroxidase-1 (peroxiredoxin-1) is increased in thioredoxin-1transfected cells and results in enhanced protection against apoptosis caused by hydrogen peroxide but not by other agents including dexamethasone, etoposide, and doxorubicin. *Arch Biochem Biophys* 392:103-9
- Besse, I. and Buchanan., B.B. (1997). "Thioredoxin-Linked Plant and Animal Processes: The New Generation", *Botanical Bulletin- Academia Sinica Taipei*, 38, 1-11.
- Bindoli, A., Rigobello, M.P., Scutari, G., Gabbiani, C., Casini, A., Messori, L. (2009). Thioredoxin reductase: A target for gold compounds acting as potential anticancer drugs. *Coordination Chemistry Reviews*, 253, 1692-1707.
- Branco, V., Canário, J., Lu, J., Holmgren, A., ve Carvalho, C. (2012). Mercury and selenium interaction in vivo: effects on thioredoxin reductase and glutathione peroxidase. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(4), 781-793.

- Buxbaum, E. (2007). *Fundamentals of Protein Structure and Function*. Springer, pp. 59-63, West Indies.
- Cadenas, C., Franckenstein, D., Schmidt, M., Gehrman, M., Hermes, M., Geppert, B., Schormann, W., Maccoux, L.J., Schug, M., Schumann, A., Wilhelm, C., Freis, E., Ickstadt, K., Rahnenführer, J., Baumbach, J.I., Sickmann, A., Hengstler, J.G. (2010). Role of thioredoxin reductase 1 and thioredoxin interacting protein in prognosis of breast cancer. *Breast Cancer Research*, 12, R44-R59.
- Carvalho, C. M., Chew, E. H., Hashemy, S. I., Lu, J., ve Holmgren, A. (2008). Inhibition of the human thioredoxin system a molecular mechanism of mercury toxicity. *Journal of Biological Chemistry*, 283(18), 11913-11923.
- Cai, W., Zhang, L., Song, Y., Wang, B., Zhang, B., Cui, X., ... ve Fang, J. (2012). Small molecule inhibitors of mammalian thioredoxin reductase. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(2), 257-265.
- Chen, W.; Tuladhar, A.; Rolle, S.; Lai, Y.; Rodriguez del Rey, F.; Zavala, C. E.; Liu, Y.; Rein, K. S. Brevetoxin-2, is a unique inhibitor of the C-terminal redox center of mammalian thioredoxin reductase-1. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2017, 329, 58–66.
- Crosley, L.K., Meplan, C., Nicol, F., Rundlöf, A.K., Arner, E.S.J., Hesketh, J.E. and Arthur, J.R., 2007. Differential regulation of expression of cytosolic and mitochondrial thioredoxin reductase in rat liver and kidney. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 459, 178-188.
- Çomaklı, V., Kuzu, M. and Demirdağ, R. (2015). Characterization and Purification of Glutathione S-Transferase from the Liver and Gill Tissues of Ağrı Balık Lake Trout *Salmo trutta labrax* and the Effects of Heavy Metal Ions on Its Activity. *Journal of aquatic animal health*, 27, 145-151.
- DeForest, D. K., Brix, K. V., ve Adams, W. J. (2007). Assessing metal bioaccumulation in aquatic environments: the inverse relationship between

bioaccumulation factors, trophic transfer factors and exposure concentration. *Aquatic toxicology*, 84(2), 236-246.

Demirbilek, M. E. (2007). Serebral İskemi Oluşturulan Sıçanlarda Egf, Tnf-A Düzeylerinin ve Tiyoredoksin Sisteminin İncelenmesi. Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Ana Bilim Dalı, Doktora Tezi.

Demirdağ, R. (2012). Karbonik Anhidraz II ve IV İzoenzimlerinin Koyun Böbrek Dokusundan Saflaştırılması Karakterizasyonu ve Bazı Kimyasalların Etkilerinin Araştırılması. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.

Biterova E.I., Turanov A.A., Gladyshev V.N., Barycki J.J., Crystal structures of oxidized and reduced mitochondrial thioredoxin reductase provide molecular details of the reaction mechanism, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102 (2005) 15018–15023.

Ekren, G. S. (2013). Fitaz üreten fungusdan enzimin üretimi, saflaştırılması ve karakterizasyonu (Master's thesis, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü).

Elias S. J. Arne Å r and Holmgren., A., "Physiological Functions of Thioredoxin and Thioredoxin Reductase", *Eur. J. Biochem.*, 267, (2000) 6102-6109

Engman, L., McNaughton, M., Gajewska, M., Kumar, S., Birmingham, A., Powis, G. (2006). Thioredoxin reductase and cancer cell growth inhibition by organogold (III) compounds. *Anti-cancer Drugs*, 17, 539-544.

Enzyme Technical Association, 2001. *Enzymes a Primer on Use and Benefits Today and Tomorrow*. 1800 Massachusetts Avenue, N.W. Second Flor Washington, DC 20036. s.1-34.

Fang J, Jun L, Holmgren A. Thioredoxin reductase is irreversibl modified by curcumin. *J Biol Chem* 2005; 280: 25284-90.

Furlan, S.A., and Pant, H.K., 2006. *Enzyme Technology: General Properties of Enzymes*, (A. Pandey, C.Webb, C.R. Soccol and C. Larroche, editörler),

Springer Science and Business Media, Inc. And Asiatech Publishers Inc.,
New York, p 11-37.

Gasdaska, P.Y., Berggeren, M.M., Berry M.J., Powis G., 1999. Cloning, sequencing and functional expression of a novel human thioredoxin reductase. FEBS Lett, 442,105-111.

Gan, Z.R., "Yeast Thioredoxin Gene", The Journal of Biological Chemistry, 266, (1991) 1692-1696.

Gautam, R. K., Sharma, S. K., Mahiya, S., ve Chattopadhyaya, M. C. (2014). Contamination of heavy metals in aquatic media: transport, toxicity and technologies for remediation

Gerze, A. (2003). Proteaz Enziminin Bacillus Subtilis Megatherium Ve Bacillus Polymxa Bakteri Türlerinden Kısmi Saflaştırılması ve Özelliklerinin İncelenmesi (Doctoral dissertation, Fen Bilimleri Enstitüsü).

Gromer S, Schirmer RH, Becker K. News and views on thioredoxin reductases. Redox Report 1999; 4: 221-8.

Gromer, S., Arscott, L. D., Williams, C. H., Schirmer, R. H., ve Becker, K. (1998). Human placenta thioredoxin reductase isolation of the selenoenzyme, steady state kinetics, and inhibition by therapeutic gold compounds. Journal of Biological Chemistry, 273(32), 20096-20101.

Gümgüm, B., Tez, Z., ve Gülsün, Z. (1994). Heavy metal pollution in water, sediment and fish from the Tigris River in Turkey. Chemosphere, 29(1), 111-116.

Holmgren, A. ve Lu, J. (2010). Thioredoxin and thioredoxin reductase: Current research with special reference to human disease. Biochemical and Biophysical Research Communications, 396, 120-124.

Holmgren, A., "Thioredoxin", Annu. Rev. Biochem., 54, (1985) 237-271.

<http://academic.pgcc.edu/~kroberts/Lecture/Chapter%205/enzymes.html>, Erişim

Tarihi: 08.09. 2017.

http://dent.ege.edu.tr/dosyalar/kaynak/301_patoloji/12.pdf, Erişim Tarihi: 10.09.2017

<http://www.belgeci.com/enzimlerin-adlandirilmesi-ve-siniflandirilmesi.html>, Erişim Tarihi: 08.09. 2017.

<http://www.enzimler.gen.tr/enzim-inhibisyonu.html>, Erişim Tarihi: 08.09. 2017.

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Methotrexate_and_folic_acid_compared.png, Erişim Tarihi: 08.09. 2017.

<https://www.biyolojiunlugu.com>, Erişim Tarihi: 08.08. 2017.

<https://www.msxlab.org/forum/biyoloji/21021-enzim-nedir-enzimler-hakkinda.html>, Erişim Tarihi: 08.09. 2017.

Jacquoti, J.P., Lancelin, J.M., and Meyer, Y., "Thioredoxins: Structure and Function in Plant Cells", *New Phytologist*, 136, (1997) 543-570.

John H. Duffus ""Heavy metals" a meaningless term? (IUPAC Technical Report)" *Pure and Applied Chemistry*, 2002, Vol. 74, pp. 793-807

John, F.K., 1987. *Enzyme Technology* (H.J. Rehm ve G.Reed editör), *Biotechnology*, Vol.7A. New York s 37-62.

John, W., and Sons, I., 1998. *Industrial Enzymes and Their Applications*. United States of Amerika. 454p.

Jordan A, Reichard P. Ribonucleotide reductases. *Annu Rev Biochem* 67:71-98, 1998.

Kahvecioğlu Ö, Kartal G, Güven A, Timur S. Metallerin çevresel etkileri-i. *Metalurji Dergisi*. 2009; 136:47-53.

Kalısız, H. M., 1988. *Microbial enzymes*. *Advances in Biochemical Engineering, Biotechnology*, Springer, Berlin Heidelberg, New York, 36: 3-61.

Karademir, A., Akgül, M., Tutuş, A., (2002). Kâğıt Endüstrisinde Enzim Kullanımına Genel Bir Bakış: Enzimlerin Kabuk Soyma, Liflerin

Modifikasyonu, Çözünebilir Kâğıt Hamuru ve Selüloz Üretiminde Kullanımı (Bölüm 1). KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi 5(1). s.3.

Karlenius, T.C. ve Tonissen, K.F. (2010). Thioredoxin and cancer: A role for thioredoxine in all states of tumor oxygenation. *Cancers*, 2, 209-232.

Keha, E. E., ve Küfrevioğlu, Ö. İ. (2011). *Biyokimya. Aktif Yayınevi.*

Kemerdere, R. (2008). Glial tümörlerde tiyoredoksin redüktaz değerleri. İstanbul Üniversitesi / Cerrahpaşa Tıp Fakültesi / Nöroşirürji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.

Kuzu, M. and Ciftci, M. (2015) Purification and characterization of NADPH-cytochrome P450 reductase from Lake Van fish liver microsomes and investigation of some chemical and metals' effects on the enzyme activity. *Turkish Journal of Chemistry*, 39, 149-158.

Koç, A., Karakaya, H.Ç., Ünlü, E.S. (2006). Evidence for the presence of a second electron donor for the cytoplasmic thioredoxins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Turkish Journal of Biology*, 30, 133-138.

Kömürcü, H.F. (2007). Sıçanlarda İskemik Beyin Dokusunda EGF, TNF- α ve Tiyoredoksinin Zamana Bağlı Değişimi. Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı.

Krauth R.L., Siegel, L.D. Arscott, A. Schonleben-Janias, R.H. Schirmer, C.H. Williams Jr., Role of active site tyrosine residues in catalysis by human glutathione reductase, *Biochemistry* 37 (1998) 13968–13977.

Larsson, A. (1973). Thioredoxin reductase from rat liver. *European Journal of Biochemistry*, 35, 346-349.

Laurent, T.C., Moore, T.C. ve Reichard, P. (1964). Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides. IV. Isolation and characterization of thioredoxin, the hydrogen donor from *Escherichia Coli* B. *Journal of Biological Chemistry*, 239, 3436-3444.

- Liu, Z., Du, Z.-Y., Huang, Z.-S., Lee, K.-S., Gu, L.-Q. (2008). Inhibition of thioredoxin reductase by curcumin analogs. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 72, 2214-2218.
- Lu, J., Papp, L.V., Fang, J., Rodriguez-Nieto, S., Zhivotovsky, B., Holmgren, A. (2006). Inhibition of mammalian thioredoxin reductase by some flavonoids: Implications for myricetin and quercetin anticancer activity. *Cancer Research*, 66, 4410-4418.
- Luthman, M., ve Holmgren, A. (1982). Rat liver thioredoxin and thioredoxin reductase: purification and characterization. *Biochemistry*, 21(26), 6628-6633.
- Madsen, G.B., Norman, B.E., and Slott, S., 1973. A New Heat-Stable Bacterial Amylase and its Use In High-Temperature Liquefaction. *Starke* 25, 304.
- Maggioli, G., Piasenza, L., Carambula, B., Carmona, C. (2004). Purification, characterization and immunolocalization of a thioredoxin reductase from adult *Fasciola hepatica*. *Journal of Parasitology*, 90, 205-211.
- Mansour, S. A., ve Sidky, M. M. (2002). Ecotoxicological studies. 3. Heavy metals contaminating water and fish from Fayoum Governorate, Egypt. *Food Chemistry*, 78(1), 15-22.
- Miranda A.-Vizuet, Damdimopoulos A.E., Pedrajas J.R., Gustafsson J.A., Spyrou G., Human mitochondrial thioredoxin reductase cDNA cloning, expression and genomic organization, *Eur. J. Biochem.* 261 (1999) 405–412.
- Moore, E. C., Reichard, P., ve Thelander, L. (1964). Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides V. Purification and properties of thioredoxin reductase from *Escherichia coli* B. *Journal of Biological Chemistry*, 239(10), 3445-3452.
- Mukherjee, A. ve Mart'in, S.G. (2008). The thioredoxin system: a key target in tumor and endothelial cells. *Brazilian Journal Radiology*, 81, S57-S68.
- Mustacich, D. ve Powis, G. (2000). Thioredoxin reductase. Review article. *Biochemical Journal*, 346, 1-8.

- Nakamura H, Nakamura K, Yodoi J. Redox regulation of cellular activation. *Annu Rev Immunol* 1997;15:351–369.
- Nelson, D.L., Cox, M.M. 2004. *Enzymes. Lehninger Principles of Biochemistry* (Nelson, D.L., Cox, M.M). W. H. Freeman, p. 190-249, Madison.
- Nishinaka Y, Nakamura H, Masutani H, Yodoi J. Redox control of cellular function by thioredoxin: A new therapeutic direction in host defence. *Arch Immunol Ther Exp* 49:285-92, 2001.
- Nordberg J, Arnér ESJ. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol and Medicine* 2001; 31: 1287-312.
- Özbolat, G., ve Tuli, A. (2016). Ağır Metal Toksisitesinin İnsan Sağlığına Etkileri. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi. Archives Medical Review Journal*, 25(4):502-521
- Özgençli, İ., ve Çiftci, M. (2016). Purification and characterization of mitochondrial thioredoxin reductase enzyme from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver and investigation of the in vitro effects of some metal ions on the enzyme. *Turkish Journal of Chemistry*, 40(1), 174-183.
- Pandey, A., and Ramachandran, S., 2006. *Enzyme Technology: General Introduction*, (A. Pandey, C. Webb, C.R. Soccol and C. Larroche, editörler), Springer Science and Business Media, Inc. And Asiatech Publishers Inc., New York, p 1-11.
- Parrilha, G. L., Ferraz, K. S., Lessa, J. A., de Oliveira, K. N., Rodrigues, B. L., Ramos, J. P., ... ve Beraldo, H. (2014). Metal complexes with 2-acetylpyridine-N (4)-ortho-chlorophenylthiosemicarbazone: Cytotoxicity and effect on the enzymatic activity of thioredoxin reductase and glutathione reductase. *European journal of medicinal chemistry*, 84, 537-544.
- Pigiet, V.P. ve Conley, R.R. (1977). Purification of thioredoxin, thioredoxine reductase and glutathione reductase by affinity chromatography. *The Journal of Biological Chemistry*, 252, 6367-6372.

- Powis, G., Wipf, P., Lynch, S. M., Birmingham, A., ve Kirkpatrick, D. L. (2006). Molecular pharmacology and antitumor activity of palmarumycin-based inhibitors of thioredoxin reductase. *Molecular cancer therapeutics*, 5(3), 630-636.)
- Powis G, Montfort WR. Properties and biological activities of thioredoxins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41:261-95, 2001.
- Qui, X., Liu, Z., Shao, W.-Y., Liu, X., Jing, D.-P., Yu, Y.-J., An, L.-K., Huang, S.-L., Bu, X.-Z., Huang, Z.-S., Gu, L.-Q. (2008). Synthesis and evaluation of curcumin analogues as potential thioredoxin reductase inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 16, 8035-8041.
- Rahman, K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants and co-factors. *Clinical Interventions in Aging*, 2, 219- 236.
- Rackham O., Shearwood A.M.J., Thyer R., McNamara E., Davies S.M.K., Callus B.A., Miranda-Vizuete A., Berners-Price S.J., Cheng Q., Arnér E.S.J., Filipovska A., Substrate and inhibitor specificities differ between human cytosolic and mitochondrial thioredoxin reductases: implications for development of specific inhibitors, *Free Radic. Biol. Med.* 50 (2011) 689–699.
- Reza, R., ve Singh, G. (2010). Heavy metal contamination and its indexing approach for river water. *International Journal of Environmental Science ve Technology*, 7(4), 785-792.
- Rigobello M.P., Vianello F., Folda A., Roman C., Scutari G., Bindoli A., Differential effect of calcium ions on the cytosolic and mitochondrial thioredoxin reductase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 343 (2006) 873–878.
- Ringer D. P. Schnipper L.E., *Principles of Cancer Biology, Clinical Oncology* Atlanta, American Cancer Society, 21-35 (2001).
- Saccoccia, F., Angelucci, F., Boumis, G., Carotti, D., Desiato, G., E Miele, A., ve Bellelli, A. (2014). Thioredoxin reductase and its inhibitors. *Current Protein and Peptide Science*, 15(6), 621-646.

- Sahrawy, M., Hecht, V., Lopez-Jaramillo, J., Chueca, A., Chartier, Y., and Meyer, Y., "Intron Position as an Evolutionary Marker of Thioredoxins and Thioredoxin Domains", *J. Mol. Evol.*, 42, (1996) 422-431.
- Sandalova, T., Zhond, L., Lindqvist, Y., Holmgren, A., Schneider, G. (2001). Three-dimensional structure of a mammalian thioredoxin reductase: Implications for mechanism and evolution of a selenocysteine-dependent enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, 98: 9533-9538.
- Seo, H.-J. ve Lee, Y.N. (2010). Characterization of *Deinococcus radiophilus* thioredoxin reductase active with both NADH and NADPH. *The Journal of Microbiology*, 48, 637-643.
- Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* 2001; 30: 1191-212.
- Schobert, C., Baker, L., Szederkenyi, J., Grossmann, P., Komor, E., Hayashi, H., Chino, M., and Lucas, W.J., "Identification of Immunologically Related Proteins in Sieve-Tube Exudate Collected from Monocotyledonous and Dicotyledonous Plants", *Planta.*, 206, (1998) 245-252.
- Södberg, A., Sahaf, B., Rosén, A. (2000). Thioredoxin reductase, a redox-active selenoprotein, is secreted by normal and neoplastic cells: Presence in human plasma. *Cancer research*, 60, 2281-2289.
- Stadtman, E.R. (2004). Role of oxidant species in aging. *Current Medicinal Chemistry*, 11, 1105-1112.
- Sümengen, M. (2011). Laktik Asit Bakterilerinden Fitaz Üretimi ve Endüstriyel Kullanım Olanakları. Çukurova Üniversitesi / Fen Bilimleri Enstitüsü / Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- Tamura, T. ve Stadtman, T.C. (1996). A new selenoprotein from human lung adenocarcinoma cells: Purification, properties, and thioredoxin reductase

- activity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS), 93, 1006-1011.
- Tandoğan, B. ve Ulusu, N.N. (2011). Thioredoxin reductase. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 39, 87-92.
- Telefoncu, A. 1986. Temel ve Uygulamalı Enzimoloji. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskı Atölyesi, İzmir
- Temel, Y. (2014). Hindi (Meleagris gallopavo) karaciğer dokusundan tiyoredoksin redüktaz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu ve bazı metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinin incelenmesi. Atatürk Üniversitesi / Fen Bilimleri Enstitüsü / Kimya Anabilim Dalı, Doktora Tezi.
- Thelander L. Thioredoxin reductase. Characterization of a homogenous preparation from Escherichia coli B. J Biol Chem 1967; 242: 852-9
- Turanov, A.A., Hatfield, D.L. and Gladyshev, V.N., 2010. Characterization of protein targets of mammalian thioredoxin reductase. *Methods in Enzimology*, 474, 245-254.
- Ünal, T. (2012). Neoplazi.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39, 44-84.
- Vinodhini, R., ve Narayanan, M. (2008). Bioaccumulation of heavy metals in organs of fresh water fish Cyprinus carpio (Common carp). *International Journal of Environmental Science ve Technology*, 5(2), 179-182.
- Vinodhini, R., ve Narayanan, M. (2008). Bioaccumulation of heavy metals in organs of fresh water fish Cyprinus carpio (Common carp). *International Journal of Environmental Science ve Technology*, 5(2), 179-182.

- Yang, X. ve Ma, K. (2010). Characterization of a thioredoxin-thioredoxin reductase system from the Hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Journal of Bacteriology*, 192, 1370-1376.
- Watabe, S., Makino, Y., Ogawa, K., Hiroi, T., Yamamoto, Y., ve Takahashi, S. Y. (1999). Mitochondrial thioredoxin reductase in bovine adrenal cortex. *European Journal of Biochemistry*, 264(1), 74-84.
- Web 1. (2017). <http://www.enzimler.gen.tr/enzim-inhibisyonu.html>. Erişim Tarihi: 03.08.2017
- Web 2. Enzim Nedir? Enzimler Hakkında <https://www.msxlab.org/forum/biyoloji/21021-enzim-nedir-enzimler-hakkinda.html#ixzz4s0iipvnt>, Erişim Tarihi: 07.08.2017
- Web 3, <http://www.thepigsite.com/articles/3875/proceedings-of-the-1stinternational-phytase-summit-2010>, Erişim Tarihi: 08.08. 2017.
- Web 4, <http://academic.pgcc.edu/~kroberts/Lecture/Chapter%205/enzymes.html>, Erişim Tarihi: 08.08. 2017.
- Welsh SJ, Bellamy WT, Briehl MM, Powis G. The redox protein thioredoxin-1 (trx-1) increases hypoxia-inducible factor 1 protein expression: Trx-1 overexpression results in increased vascular endothelial growth factor production and enhanced tumor angiogenesis. *Cancer Res* 62:5089-95, 2002.
- Williams, C.H.Jr. (1992). Lipoamide dehydrogenase, glutathione reductase, thioredoxin reductase and mercuric ion reductase - a family of flavoenzyme transhydrogenases. *Chemistry and Biochemistry of Flavor Enzymes*, 3, 121-211.
- Williams, C.H.Jr., Arscott, L.D., Müller, S., Lennon, B.W., Ludwig, M.L., Wang, P.-F., Veine, D.M., Becker, K., Schirmer, R.H. (2000). Thioredoxin reductase. Two modes of catalysis have evolved. Minireview. *European Journal of Biochemistry*, 267, 6110-6117.

- Williams, C.H.Jr. ve Arscott, L.D. (1971). Glutathione reductase (Escherichia coli).
Methods in Enzymology, 17B, 503-509.
- Williams, C.H.Jr., Zanetti, G., Arscott, L.D., McAllister, J.K. (1967). Lipoamide
dehydrogenase, glutathione reductase, thioredoxin reductase, and thioredoxin.
The Journal of Biological Chemistry, 242, 5226-5231.
- Wittle, A.B., Anestal, K., Jerremalm, E., Ehrsson, H., Arner, E.S.J., 2005. Inhibition
of TrxR but not of GR by the major classes of alkylating and platinum-
containing anticancer compounds. Free Radical BiologyveMedicine, 39, 696-
703.
- Yazar, H (2015). Enzimler,
[http://content.lms.sabis.sakarya.edu.tr/Uploads/75501/33921/d%C4%B1.enz.
\(1\).pdf](http://content.lms.sabis.sakarya.edu.tr/Uploads/75501/33921/d%C4%B1.enz.(1).pdf).
- Yazar, H. (2015). *Enzimler*.
[http://content.lms.sabis.sakarya.edu.tr/Uploads/75501/33921/d%C4%B1.enz.
\(1\).pdf](http://content.lms.sabis.sakarya.edu.tr/Uploads/75501/33921/d%C4%B1.enz.(1).pdf).
- Yost FJJ, Fridovich I. An iron-containing superoxide dismutase from Escherichia
coli. J Biol Chem 1973; 248: 4905-8.,
- Yazar,H.(2015).*Enzimler*.[http://content.lms.sabis.sakarya.edu.tr/Uploads/75501/33921/d%C4%B1.enz.\(1\).pdf](http://content.lms.sabis.sakarya.edu.tr/Uploads/75501/33921/d%C4%B1.enz.(1).pdf).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Hatice AKYOL
Doğum yeri ve Tarihi	AĞRI / 09.08.1988
Eğitim Durumu	
Lisans Öğrenimi	Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü
Yüksek Lisans Öğrenimi	Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi /Biyokimya Ana Bilim Dalı
Bildiği Yabancı Diller	İngilizce
Bilimsel Faaliyetler	
İş Deneyimi	
Stajlar	
Projeler	
Çalıştığı Kurumlar	
İletişim	
E-posta	htc_akyl04@hotmail.com
Mezuniyet Tarihi	