

**GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI (*Oncorhynchus mykiss*)  
KARACİĞER DOKUSUNDAN MİTOKONDRIYAL  
TİYOREDOKSİN REDÜKTAZ ENZİMİNİN  
SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE  
BAZI METAL İYONLARININ ENZİM AKTİVİTESİ  
ÜZERİNE *İN VİTRO* ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**İlknur ÖZGENÇLİ**

**Doktora Tezi  
Kimya Anabilim Dalı  
Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ  
2014**

**Her hakkı saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI (*Oncorhynchus mykiss*) KARACİĞER  
DOKUSUNDAN MİTOKONDRIYAL TİYOREDOKSİN  
REDÜKTAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI,  
KARAKTERİZASYONU VE BAZI METAL İYONLARININ ENZİM  
AKTİVİTESİ ÜZERİNE *İN VİTRO* ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

İlknur ÖZGENÇLİ

KİMYA ANABİLİM DALI

ERZURUM  
2014

Her hakkı saklıdır



T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**GÖKKUŞAĞI ALABALIK (*oncorhynchus mykiss*) KARACİĞER  
DOKUSUNDAN MİTOKONDRIYAL TİYOREDOKSİN REDÜKTAZ  
ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE BAZI  
METAL İYONLARININ ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE *İN VİTRO*  
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ danışmanlığında, İlknur ÖZGENÇLİ tarafından hazırlanan bu çalışma 03.../05.../2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı'nda Doktora tezi olarak oybirliği/oy çokluğu (.../...) ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU

İmza

Üye : Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ

İmza

Üye : Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

İmza

Üye : Doç. Dr. Ercan BURSAL

İmza

Üye : Yrd. Doç. Dr. Harun BUDAK

İmza

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 15.05.2014 tarih ve 20/636 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. İhsan EFEOĞLU  
Enstitü Müdürü

Bu çalışma BAP, projeleri kapsamında desteklenmiştir.  
Proje No: 2012/150

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.



## ÖZET

Doktora Tezi

### **GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI (*Oncorhynchus mykiss*) KARACİĞER DOKUSUNDAN MITOKONDRIYAL TİYOREDOKSİN REDÜKTAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE BAZI METAL İYONLARININ ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE *İN VİTRO* ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

İlknur ÖZGENÇLİ

Atatürk Ünivesitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ

Tiyoredoksin redüktaz (E.C 1.6.4.5.; TrxR) enzimi piridin nükleotid-disülfid oksidoredüktazların flavoprotein ailesine bağlı bir enzimdir. Bu tez kapsamında mitokondriyal TrxR enzimi gökkuşağı alabalığı karaciğerinden saflaştırıldı. Saflaştırma işlemi; homojenatın hazırlanması ve 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi olmak üzere 2 aşamada gerçekleştirildi. Enzim 11,9 EÜ/mg protein spesifik aktiviteyle, %2,38 verimle ve 672 kat saflaştırıldı. Enzimin saflığı SDS-PAGE ile kontrol edilerek alt biriminin molekül kütlesi yaklaşık 70 kDa olarak hesaplandı. Enzim için optimum pH fosfat tamponunda pH: 7,5; stabil pH, fosfat tamponunda pH: 8,0; optimum sıcaklık 0°C ve optimum iyonik şiddet 0,5 M fosfat tamponunda pH: 7,5 olarak belirlendi. Enzimin doğal molekül kütlesi jel filtrasyon kromatografisi metoduyla 151 kDa olarak bulundu. Ayrıca NADPH substratı için  $K_M$  sabiti 12,65  $\mu\text{M}$  ve  $V_{max}$  değeri 0,51 EÜ/ml; DTNB substratı için  $K_M$  sabiti 0,83  $\mu\text{M}$  ve  $V_{max}$  değeri 0,079 EÜ/ml olarak belirlendi. Gökkuşağı alabalığı karaciğerinden saflaştırılan mitokondriyal TrxR enzim aktivitesi üzerine  $\text{Se}^{+4}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$  ve  $\text{Al}^{+3}$  metal iyonlarının inhibisyon etkisi *in vitro* olarak araştırıldı.  $\text{Se}^{+4}$  iyonu enzim aktivitesini artırırken metal iyonlarının tamamı inhibisyon etkisi gösterdi. İnhibisyon etkisi gösteren diğer metal iyonlarının Lineweaver-Burk grafikleri yardımıyla  $K_i$  sabitleri ve inhibisyon türleri belirlendi.  $K_i$  sabitleri sırayla  $\text{Al}^{+3}$  için  $0,14\pm 0,026$  mM,  $\text{Co}^{+2}$  için  $0,17\pm 0,033$  mM,  $\text{Fe}^{+3}$  için  $0,34\pm 0,025$  mM,  $\text{Cu}^{+2}$  için  $0,85\pm 0,045$  mM ve  $\text{Ni}^{+2}$  için  $1,60\pm 0,285$  mM olarak hesaplandı. Ayrıca DTNB için özgülük sabiti ( $V_0$ )  $44\times 10^3$  dk<sup>-1</sup>  $\mu\text{M}^{-1}$  ve turnover sayısı (kcat) değeri  $36,2\times 10^3$  dk<sup>-1</sup> olarak bulundu.

**2014, 83 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Tiyoredoksin redüktaz, karakterizasyon, saflaştırma, gökkuşağı alabalığı, metal iyonları

## ABSTRACT

Ph. D. Thesis

### **PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF MITOCHONDRIAL THIOREDOXIN REDUCTASE ENZYME FROM RAINBOW TROUT (*Oncorhynchus mykiss*) LIVER TISSUE AND INVESTIGATION THE EFFECT OF SOME METAL IONS ON ENZYME ACTIVITY ON *IN VITRO***

İlknur ÖZGENÇLİ

Atatürk University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ

Thioredoxin reductase (E.C 1.6.4.5.; TrxR) is an enzyme belonging to flavoprotein family of pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductases. In this thesis, mitochondrial TrxR enzyme was purified from rainbow trout liver. The purification of the enzyme was performed by two steps procedure as preparation of homogenate and 2',5'-ADP Sepharose 4B affinity chromatography. Enzyme was obtained having a spesific activity of 11.9 EU/ml proteins with a yield of 2,38% and 672 of purification fold. The purity of the enzyme was controlled and molecular weight of its subunits were calculated as 70 kDa by SDS-PAGE. Optimal pH, optimal ionic strenght, optimal temperature, stable pH for enzyme were determined as pH 7.5 at 500 mM phosphate buffer, 0°C and pH 8.0 at phosphate buffer, respectively. The native moleculer mass of the enzyme was found to be approximately 151 kDa by gel filtration chromatography. Besides,  $K_M$  constants and  $V_{max}$  values for both substrates, DTNB and NADPH, were calculated as 0.828  $\mu\text{M}$  and 0.079 EU/ml and 12.65  $\mu\text{M}$  and 0.513 EU/ml. Respectively *in vitro* effects of  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Se}^{4+}$  metal ions on the enzyme activity were examined.  $K_i$  constants for metal ions inhibiting enzyme were determined as  $0.14 \pm 0.026$  mM,  $0.17 \pm 0.033$  mM,  $0.34 \pm 0.025$  mM,  $0.85 \pm 0.045$  mM and  $1.60 \pm 0.285$  mM.  $V_0$  values and turnover number ( $K_{cat}$ ) for DTNB were calculated as  $44 \times 10^3 \text{ min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$  and  $36.2 \times 10^3 \text{ min}^{-1}$

**2014, 83 pages**

**Keywords:** Thioredoxin reductase, characterization, purification, rainbow trout, metal ions

## TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışma Sayın Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ yönetiminde, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. İlk olarak; çalışmalarımda her daim bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, hiçbir zaman yardım ve desteklerini esirgemeyen değerli hocam, Bingöl Üniversitesi Rektör Yardımcısı Sayın Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ'ye sonsuz minnet ve şükranlarımı sunarım.

Bu süreçte bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen biyokimya çalışma gurubu hocalarımdan Atatürk Üniversitesi Rektör Yardımcısı Sayın Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU'na, Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR'e, Sayın Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR'e, Sayın Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN'e ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Harun BUDAK'a teşekkür ederim. Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Dekanı Sayın Prof. Dr. Yavuz ONGANER' e ve Kimya Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Abdullah MENZEK' e teşekkür ederim. Bu çalışmam sırasında ihtiyaç duyduğum her an yanımda olan arkadaşlarım Siirt Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Öğretim Üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Ebru AKKEMİK'e ve Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nde Araştırma Görevlisi Sayın Arş. Gör. Pınar TAŞER'e çok teşekkür ederim.

Halen memur olarak görev yaptığım Toprak Mahsulleri Ofisi Erzurum Şube Müdürlüğü'nde bulunan Şube Müdürüm Sayın Necati TEMİR'e tez çalışmalarım göstermiş olduğu iyi niyet ve anlayış için içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımın her aşamasında hiç koşulsuz yanımda olan, sevgi ve desteklerinden beni yoksun bırakmayan, bugünlere gelmemi sağlayan, her şeyimi borçlu olduğum anneme ve kardeşlerime derin minnet ve şükranlarımı sunarım. Ayrıca varlığıyla bana güç veren, bu süreçte her daim sabır ve anlayışla yanımda olan eşime ve beni hayata sıkı sıkıya bağlayan, huzur kaynağım olan çocuklarım Ahmet Tunahan ve Ömer'e can-ı gönülden teşekkür ederim.

Doktora tezimi proje olarak destekleyen Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim. (Proje No:2012/150).

***BU TEZ; 48 YAŞINDA, GÖREVİ BAŞINDAYKEN ŞEHİT OLAN CANIM BABAM HÜSEYİN ÖZTÜRK'e İTHAFIMDIR...***

**İlknur ÖZGENÇLİ**  
**Mayıs, 2014**

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1. Tiyoredoksin Redüktaz Enziminin Yapısı.....	1
1.2. Tiyoredoksin Redüktaz Enziminin Fonksiyonları.....	9
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ.....</b>	<b>15</b>
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM.....</b>	<b>29</b>
3.1. Materyal.....	29
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	29
3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar.....	29
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması.....	30
3.2. Yöntemler.....	33
3.2.1. Tiyoredoksin redüktaz enziminin aktivite ölçümü.....	33
3.2.2. Protein tayini.....	35
3.2.2.a. Kalitatif protein tayini.....	35
3.2.2.b. Bradford yöntemiyle protein tayini.....	35
3.2.3. Gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondriyal tiyoredoksin redüktaz enziminin saflaştırılması.....	36
3.2.3.a. Gökkuşığı alabalığı karaciğerinden homojenat hazırlanması.....	36
3.2.3.b. 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonunun hazırlanması ve gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondriyal tiyoredoksin redüktaz enziminin saflaştırılması.....	36
3.2.4. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzim saflığının kontrolü.....	37
3.2.5. Gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enzimi için karakterizasyon çalışmaları.....	38



3.2.5.a. Sephadexs G-150 jel filtrasyon kromatografisi kolonunun hazırlanması ve gökkuşağı alabalığı karaciğer mitokondriyal tiyoredoksin redüktaz enziminin molekül kütesinin tayini.....	38
3.2.5.b. Gökkuşağı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enziminin alt birimlerinin molekül kütesinin SDS-PAGE ile tayini.....	40
3.2.5.c. Gökkuşağı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enzimi için optimum pH bulunmasına yönelik çalışmalar .....	40
3.2.5.d. Gökkuşağı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enzimi için optimum iyonik şiddetin belirlenmesine yönelik çalışmalar.....	41
3.2.5.e. Gökkuşağı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enzimi için optimum sıcaklığın belirlenmesine yönelik çalışmalar .....	41
3.2.5.f. Gökkuşağı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enzimi için stabil pH bulunmasına yönelik çalışmalar .....	41
3.2.5.g. NADPH ve DTNB substratları için $K_M$ sabiti, $V_{max}$ , turnover sayısı ( $k_{cat}$ ) özgülük sabitinin ( $V_0$ ) değerlerinin bulunmasına yönelik çalışmalar .....	42
3.2.6. Gökkuşağı alabalığı karaciğerinden saflaştırılan mitokondriyal tiyoredoksin redüktaz enzimi için inhibisyon çalışmaları.....	42
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....</b>	<b>43</b>
4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik.....	43
4.2. Gökkuşağı Alabalığı Karaciğer Mitokondriyal Tiyoredoksin Redüktaz Enziminin Saflaştırması ile İlgili Sonuçlar .....	43
4.2.1. Gökkuşağı alabalığı karaciğer mitokondriyal tiyoredoksin redüktaz enziminin SDS-PAGE ile saflık kontrolü .....	44
4.3. Gökkuşağı Alabalığı Karaciğer Mitokondrilerinden Saflaştırılan Tiyoredoksin Redüktaz Enzimi İçin Karakterizasyon Çalışmalarından Elde Edilen Sonuçlar .....	45
4.3.1. Jel filtrasyon kromatografisi ile molekül kütesi tayinine yönelik sonuçlar ....	45

4.3.2. Gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enziminin SDS-PAGE ile molekül kütlesinin belirlenmesine yönelik çalışma sonuçları .....	47
4.3.3. Gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enzimi için optimum pH bulunmasına yönelik çalışma sonuçları.....	48
4.3.4. Gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enzimi için optimum iyonik şiddetin belirlenmesine yönelik çalışma sonuçları.....	50
4.3.5. Gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enziminin stabil pH'sının belirlenmesine yönelik çalışmalar .....	51
4.3.6. Gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enzimi için optimum sıcaklığın belirlenmesine yönelik çalışma sonuçları .....	53
4.3.7. Gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enzimi için $Q_{10}$ değerlerinin hesaplanması.....	54
4.3.8. NADPH ve DTNB substratları için $K_M$ sabiti, $V_{max}$ değeri, turnover sayısı ( $k_{cat}$ ) ve özgülük sabiti ( $V_0$ ) değerlerinin belirlenmesine yönelik sonuçlar ....	54
4.4. Gökkuşığı Alabalığı Karaciğer Mitokondrilerinden Saflaştırılan Tiyoredoksin Redüktaz Enzimi Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkilerinin Belirlenmesine Yönelik Çalışmalar .....	56
4.5. Gökkuşığı Alabalığı Karaciğer Dokusundan Saflaştırılan Mitokondriyal Tiyoredoksin Redüktaz Enzimini İnhibe eden bazı metal İyonları İçin $K_i$ Sabitlerinin Belirlenmesine Yönelik Çalışmaların Sonuçları .....	62
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....</b>	<b>66</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>79</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>84</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Sıçan TrxR' sinin dimerik şerit gösterimi .....	3
Şekil 1.2. İnsan TrxR1, TrxR2, <i>E. Coli</i> TrxR ve insan glutatyon redüktaz enzimlerinin domain yapısı. ....	5
Şekil 1.3. TrxR/Trx ve glutatyon redüktaz/glutatyon sistemlerin karşılaştırılması .....	6
Şekil 1.4. TrxR/ Trx sisteminin fotosentez reaksiyonlarındaki rolü .....	8
Şekil 1.5. Tiyoredoksin redüktaz enziminin metabolizmadaki ana fonksiyonu .....	9
Şekil 2.1. C138S (FO) ve C135S (FR) in kristal yapılarına dayalı, TrxR'nin FO (sol) ve FR (sağ) konformasyonlarının çizimi.....	18
Şekil 2.2. Glutatyon redüktaz ve tiyoredoksin redüktaz enzimlerinin reaksiyon mekanizmalarının karşılaştırılması.....	20
Şekil 4.1. Bradford yöntemiyle proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan standart grafik.....	43
Şekil 4.2. Mitokondriyal TrxR'nin 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisinden elüsyon grafiği .....	44
Şekil 4.3. 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonundan gökkuşacağı alabalığı karaciğer mitokondriyal tiyoredoksin redüktaz enziminin SDS-PAGE fotoğrafı .....	45
Şekil 4.4. Jel filtrasyon kolonundan alınan standart proteinlerin tüp sayısına karşılık 280 nm'deki absorpsiyon değerleri.....	46
Şekil 4.5. Jel filtrasyon kromatografisi sonucu çizilen $K_{av}$ - log $M_K$ grafiği .....	46
Şekil 4.6. Jel filtrasyon kolonundan alınan gökkuşacağı alabalığı karaciğer mitokondriyal TrxR enzimin aktivite-tüp sayısı grafiği .....	47
Şekil 4.7. SDS-PAGE sonucu çizilen log $M_K$ - $R_f$ grafiği .....	48
Şekil 4.8. Gökkuşacağı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enziminin optimum pH'sını belirlemek için çizilen aktivite (EÜ/ml)-pH grafiği .....	49
Şekil 4.9. Gökkuşacağı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enziminin optimum iyonik şiddetini belirlemek için çizilen Aktivite (EÜ/ml)-[ $KH_2PO_4$ ] (mM) grafiği .....	50

<b>Şekil 4.10.</b> Gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enzimi için farklı pH'lardaki fosfat tamponu ile belirlenen zaman-aktivite grafiği .....	52
<b>Şekil 4.11.</b> Gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enzimi için farklı pH lardaki Tris-HCl tamponu ile belirlenen zaman- aktivite grafiği .....	52
<b>Şekil 4.12.</b> Gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için çizilen Aktivite (EÜ/ml)-sıcaklık (°C) grafiği.....	53
<b>Şekil 4.13.</b> NADPH substratı için $K_M$ sabiti ve $V_{max}$ değeri bulunmasına yönelik $1/V - 1/[NADPH]$ çizilen Lineweaver-Burk grafiği .....	55
<b>Şekil 4.14.</b> DTNB substratı için $K_M$ sabiti ve $V_{max}$ değerinin bulunmasına yönelik $1/V - 1/[DTNB]$ çizilen Lineweaver-Burk grafiği .....	56
<b>Şekil 4.15.</b> $Al^{+3}$ 'ün gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz aktivitesi üzerine etkisi .....	57
<b>Şekil 4.16.</b> $Co^{+2}$ 'nin gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz aktivitesi üzerine etkisi .....	58
<b>Şekil 4.17.</b> $Fe^{+3}$ 'ün gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz aktivitesi üzerine etkisi .....	59
<b>Şekil 4.18.</b> $Cu^{+2}$ 'nin gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz aktivitesi üzerine etkisi .....	60
<b>Şekil 4.19.</b> $Ni^{+2}$ 'nin gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz aktivitesi üzerine etkisi .....	61
<b>Şekil 4.20.</b> $Se^{+4}$ ün gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz üzerine etkisi.....	62
<b>Şekil 4.21.</b> $Al^{+3}$ 'ün gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz üzerine etkisi.....	62
<b>Şekil 4.22.</b> $Co^{+2}$ 'nin gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz üzerine inhibisyon türünü gösteren grafik.....	63
<b>Şekil 4.23.</b> $Fe^{+3}$ 'nin gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz üzerine inhibisyon türünü gösteren grafik.....	63

- Şekil 4.24.**  $\text{Cu}^{+2}$ 'nin gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz üzerine inhibisyon türünü gösteren grafik.....64
- Şekil 4.25.**  $\text{Ni}^{+2}$ 'nin gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz üzerine inhibisyon türünü gösteren grafik.....64

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 3.1</b> Tiyoredoksin redüktaz enziminin aktivite ölçüm prosedürü .....	34
<b>Çizelge 4.1.</b> Gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondriyal tiyoredoksin redüktaz enziminin saflaştırma basamakları.....	44
<b>Çizelge 4.2.</b> 0,1 M fosfat tamponu kullanılarak gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	49
<b>Çizelge 4.3.</b> 0,1 M Tris-HCl tamponu kullanılarak gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	49
<b>Çizelge 4.4.</b> Gökkuşığı alabalığı karaciğeri mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enzimini optimum iyonik şiddet için K-fosfat (pH 7,5) tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları ..	50
<b>Çizelge 4.5.</b> Gökkuşığı alabalığı karaciğeri mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enzimi stabil pH değerini belirlemek için K-fosfat ve Tris-HCl tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	51
<b>Çizelge 4.6.</b> Gökkuşığı alabalığı karaciğeri mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enziminin optimum sıcaklığı için sıcaklık aktivite ölçüm sonuçları.....	53
<b>Çizelge 4.7.</b> Gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enziminin DTNB ve NADPH substratları için $K_M$ sabiti $V_{max}$ değerleri, DTNB substratı için $k_{cat}$ ve $V_0$ değerleri .....	56
<b>Çizelge 4.8.</b> Gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enzim aktivitesi üzerine $Al^{+3}$ 'ün etkisi.....	57
<b>Çizelge 4.9.</b> Gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enzim aktivitesi üzerine $Co^{+2}$ 'nin etkisi.....	58
<b>Çizelge 4.10.</b> Gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enzim aktivitesi üzerine $Fe^{+3}$ 'ün etkisi.....	58

<b>Çizelge 4.11.</b> Gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enzim aktivitesi üzerine $\text{Cu}^{+2}$ 'nin etkisi.....	59
<b>Çizelge 4.12.</b> Gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enzim aktivitesi üzerine $\text{Ni}^{+2}$ 'nin etkisi.....	60
<b>Çizelge 4.13.</b> Gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enzim aktivitesi üzerine $\text{Se}^{+4}$ 'ün etkisi.....	61
<b>Çizelge 4.14.</b> Gökkuşığı alabalığı karaciğeri dokusundan saflaştırılan mitokondriyal TrxR enzimi üzerine bazı metal iyonlarının etkilerinin toplu sonuçları....	65
<b>Çizelge 5.1.</b> Gökkuşığı alabalığı karaciğeri mitokondriyal tiyoredoksin redüktaz enzimi için bulunan $K_i$ sabitleri .....	71





## 1. GİRİŞ

### 1.1. Tiyoredoksin Redüktaz Enziminin Yapısı

Tiyoredoksin redüktazlar (EC 1.6.4.5); lipoamid dehidrogenaz, glutatyon redüktaz, civa redüktaz enzimlerini içine alan ‘piridin nükleotid-disülfid oksidoredüktazların’ flavoprotein ailesine ait enzimlerdir (Mustacich and Powis 2000).

Flavin nükleotidler; (FMN ve FAD) oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerde prostetik grup olarak rol oynarlar. Bu enzimlere flavoenzimler ya da flavoproteinler denir. Bu enzimler piruvatın, yağ asitlerinin ve amino asitlerin oksidatif degradasyonunda rol oynadıkları gibi, elektron transport zincirinde de görev alırlar. Flavoproteinler daha kuvvetli elektron akseptörü olduklarından elektronları piridin nükleotidlerden çok kolaylıkla almaktadırlar. Flavin nükleotidler, flavo enzimlere kuvvetlice fakat kovalent olmayan bir şekilde bağlanmaktadır (Gözükara 2011). Söz konusu olan piridin nükleotid, tiyoredoksin redüktaz (TrxR) enzimi için nikotinamid adenin dinükleotid fosfat’tır (NADPH). NADPH tamamen indirgeyici biyosentez olaylarında görev alırken bunu koenzim olarak kullanan enzimlere ‘redüktazlar’ denir (Keha ve Küfrevioğlu 2012).

Tiyoredoksin redüktazlar (TrxR) her bir monomerinde, bir FAD prostetik grup, bir NADPH bağlanma bölümü ve redoks aktif disülfid içeren aktif bir bölgesi bulunan homodimerik proteinlerdir. Elektronlar NADPH’dan TrxR’nin aktif bölgesine FAD aracılığıyla transfer edilirler (Williams 1995). TrxR enziminin aktivitesi; oksidatif heksos monofosfat (HMPS) döngüsünün kontrol noktası enzimi olan glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) enzimi ile üretilen NADPH tarafından düzenlenir (Biaglow and Miller 2005).

Enzim birçok organizmadan karakterize edilmiş, bakteri ve memeli olmak üzere iki sınıfta toplanmıştır. Ancak bu sınıflandırma kullanımı günümüzde yaygın değildir.

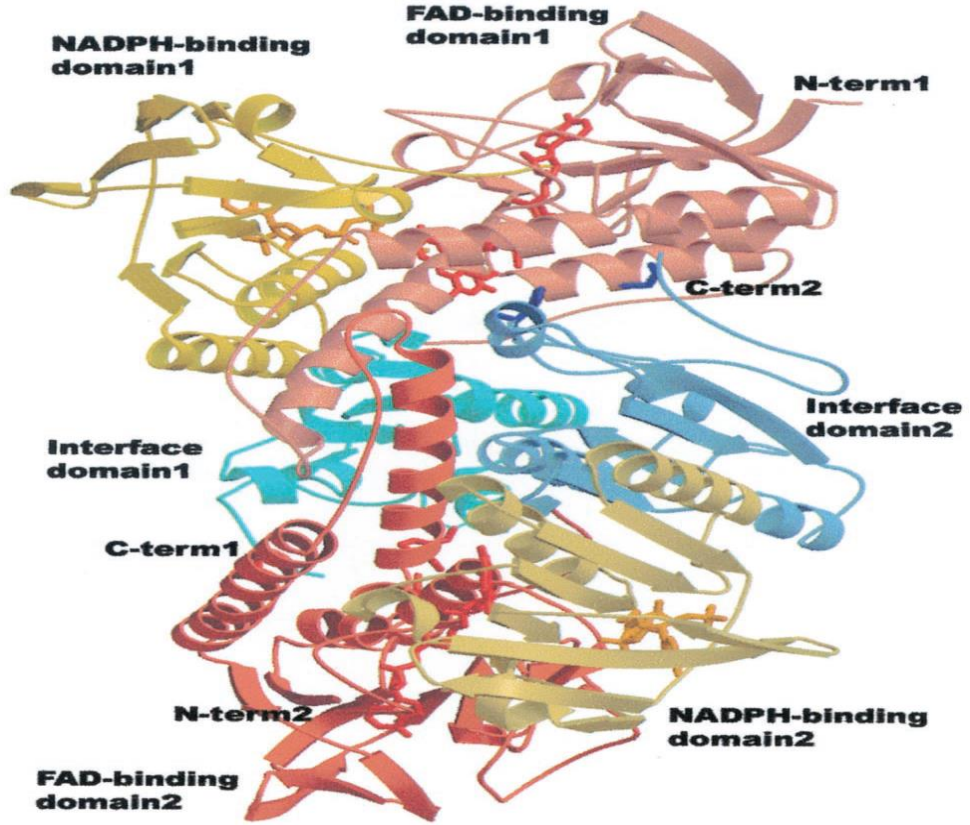
Günümüzde TrxR'nin sınıflandırması molekül kütlelerine göre yapılmaktadır. Küçük TrxR'ler (alt birim molekül kütlesi yaklaşık 35 kDa olanlar) ve büyük TrxR'ler (alt birim molekül kütlesi yaklaşık 55 kDa olanlar) (Tandoğan ve Ulusu 2011). Alt birim molekül kütlesi yaklaşık olarak 55 kDa olan TrxR'ler (insan ve *Plasmodium falciparum*'dan izole edilen TrxR'ler) her bir alt biriminde bir FAD prostetik grup, bir redoks aktif disülfid ve bir de redoks aktif grup içerirler. Bu redoks aktif grup insanda selenilsülfid; *Plasmodium falciparum*'da ise disülfiddir. Yaklaşık 35 kDa molekül kütlelerinde alt birimleri olan TrxR'ler (*E.coli* ve diğer prokaryotlar, maya, *Miso plasmas*, *Giardia duodenalis*, *Arabidopsis thaliana* ve *Methanococcus jannaschii* den izole edilenler) ise her bir alt biriminde bir FAD prostetik grup ve redoks aktif disülfid bulunduran homodimerik proteinlerdir (Williams Jr *et al.* 2000).

Enzimin mitokondriyal ve sitozolik olmak üzere iki formu vardır (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 uçta tetrapeptid –Gly-Cys-Sec-Gly-COOH motifi içinde bulunan, kolaylıkla erişilebilen bir selenosistein (Sec) rezidüsünü bulundurlar. 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 (Witte *et al.* 2005).

*E.coli* ve maya hücrelerinden saflaştırılan TrxR'lerin aksine memelilerde bulunan TrxR'ler daha büyük ve selenosistein rezidüsü içerirler. *Plasmodium Falciparum*, memeli TrxR ailesi ile yüksek derecede benzerlik gösterir fakat SeCys rezidüsünden yoksundur. Bunun yerine –Cys-x-x-x-x-Cys-Gly- dizisinde bulunan iki sistein rezidüsü vardır. Çeşitli türden araştırmalar gösteriyor ki; C-terminal Cys-SeCys çifti katalizde

önemli bir rol oynar. Karboksi peptidaz ve sindirim enzimi olan tripsin tarafından sınırlanan SeCys rezidüsünün kısmi çıkarılması TrxR'nin aktivitesinin azalmasına neden olur (Bar-Noy 2000).



**Şekil 1.1.** Sıçan TrxR'sinin dimerik şerit gösterimi (Sandalova *et al.* 2001).

Şekil 1.1'de sıçan TrxR'nin dimerik şerit şekli verilmiştir. İki alt birim sırasıyla açık veya koyu olarak gösterilmiştir. Kırmızı FAD domain, sarı NADPH domain, mavi ara bölge domain, FAD ve NADPH bağı yuvarlak ve çubuk modellerle gösterilmiştir.

Selenyum (Se) enzim aktivitesi için gereklidir ve kültür hücreleri ortamına  $1\mu\text{M}$  selenyum eklenmesiyle TrxR aktivitesi 40 misli kadar artar. İlginç bir şekilde, epitel hücrelerle kıyaslandığında daha düşük TrxR seviyesine sahip lenf kökenli hücrelerde ortama selenyum eklendiğinde TrxR aktivitesinde çok az artış olur ya da hiç olmaz (Gallegos *et al.* 1997). Yapılan çalışmalara göre; kültür ortamına  $\text{Se}^{+4}$  eklenmesini

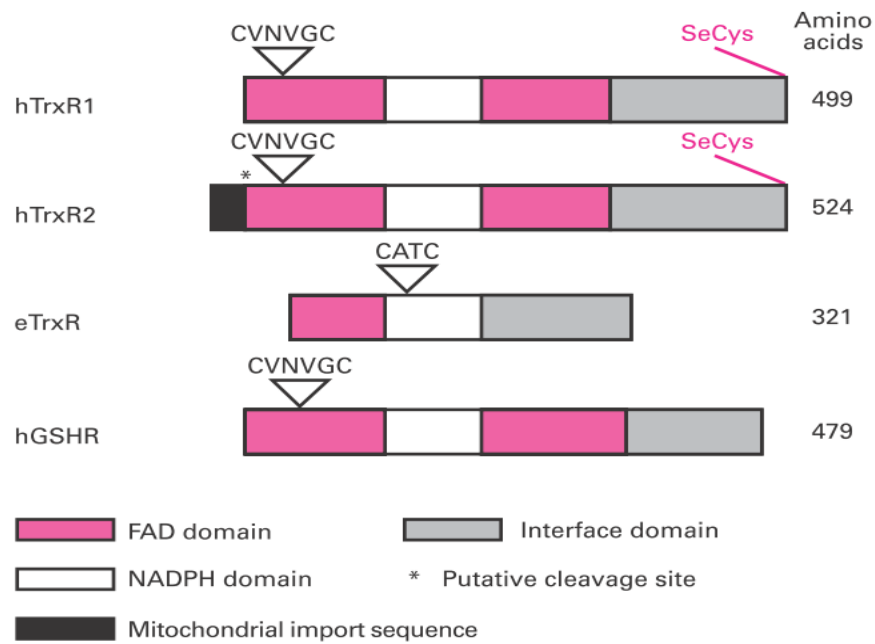
takiben TrxR aktivitesinde görülen artışların çoğu TrxR'ye selenyum dahil edilmesinin artmasıyla ilişkili olarak enzimin spesifik aktivitesindeki artışa bağlıdır. Selenyum, selenosistein halinde glutatyon peroksidaz, iyodotreonin deiyodinaz ve tiyoredoksin redüktaz enzimlerinin yapısında bulunur (Nelson *et al.* 1995).

Selenosistein bir amino asittir, yapıca sisteine benzer, tek fark sülfür yerine selenyum içermesidir. Selenosisteinin bir genetik kodu olmadığından biyolojik sistemlerdeki diğer aminoasitler gibi kodlanmaz. Selenosistein normalde bitiş kodonu olan UGA kodonu tarafından kodlanır. Yapısında selenosistein içeren enzimlerin sentezi sırasında selenosisteine özgü tRNA aracılığı ile mRNA'daki kodon modifikasyona uğratılarak selenosistein kodonu olarak kullanılmakta ve sentez gerçekleşmektedir (Gürdol ve Ademoğlu 2010). SeCys'nin selenoprotein içine dahil edilmesi protein sentezlerinin bitiş işaretini veren bir UGA kodonu tarafından sağlanır. Translasyon boyunca UGA'nın bir SeCys kodonu olarak okuma işlemi; spesifik 3' UTR (Untranslated Region) de SECIS (Selenocystein Insertion Sequence-selenosistein ekleme dizisi) elemanları olarak adlandırılan mRNA ikincil yapıların varlığında meydana gelir. Potansiyel SECIS elemanları TrxR1 ve TrxR2 enzimlerinin 3' UTR'lerinde tanımlanmıştır (Mustacich and Powis 2000).

Bakteri ve memeli TrxR'leri elektronları FAD bağlama bölgesinden proteine aktarırken meydana gelen katalitik mekanizmalarıyla birbirinden farklıdır. Düşük molekül kütleli enzimde flavin aracılığıyla disülfidin indirgenmesi sonucu piridin nükleotid bölgesi flavin bölgesine doğru dönmelidir. Bu dönüşle piridin halkası flavin halkasına bitişik olarak yeni bir pozisyona taşınır ve tiyoredoksinle reaksiyona girmesi için yeni oluşmuş bir ditiyol ortaya çıkar (Tandoğan ve Ulusu 2011). Homodimerik olan memeli TrxR'leri N-terminal redoks aktif tiyolün bulunduğu bir alt birim ve C-terminal selenol-tiyol bölgesinin bulunduğu diğer bir alt birim olmak üzere iki alt birimden oluşur (Sandalova *et al.* 2001). Memeli TrxR'lerinde önerilen mekanizma; N-terminal aktif bölgedeki disülfidin NADPH tarafından enzime bağlı FAD aracılığıyla indirgenmesini, elektronların N-terminal ditiyolden C-terminal selenilsülfide transfer edilmesini ve sonunda substratın C-terminal selenol-tiyol tarafından indirgenmesini içerir (Zhong *et al.*

2000). TrxR'lerin N-terminal bölgelerinde farklılık gösteren çok çeşitli formları görülmektedir. TrxR3'ün diğer TrxR'lerden farkı; aynı zamanda C-terminal selenotiyolle indirgenebilen bir N-terminal glutaredoksin bölgesinin olmasıdır (Turanov *et al.* 2010). Bu izoenzim hem glutatyon hem de tiyoredoksindeki disülfidleri doğrudan indirgeyebildiğinden dolayı tiyoredoksin ve glutatyon redüktaz için 'TGR' olarak da bilinir (Crosley *et al.* 2007).

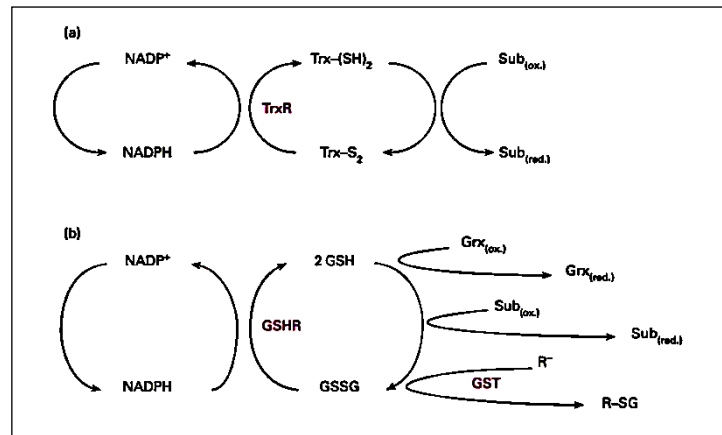
Klonlanan ilk memeli TrxR enzimi olan insan plasentasından TrxR1'in, prokaryotik TrxR'lerle sadece %31 sekans özdeşliği olduğu fakat ökaryotik ve prokaryotik glutatyon redüktazla (GR) %44 özdeşliğe sahip olduğu bulunmuştur. İnsan TrxR enziminde bulunan -Cys-Val-Asn-Val-Gly-Cys- katalitik bölgesi aynı zamanda insan GR enziminde de bulunur ve enzimin FAD bölgesinde konumlanmıştır. Halbu ki; *E.coli* de bulunan TrxR enziminde katalitik bölge -Cys-Ala-Thr-Cys- motifinden oluşur ve NADPH bölgesinin bir parçasıdır (Gasdaska *et al.* 1995). İnsanda bulunan TrxR1 ve TrxR2 ve glutatyon redüktaz enzimleri ile *E. Coli*'de bulunan TrxR enzimlerinin domain yapıları Şekil 1.2'de gösterilmiştir.



**Şekil 1.2.** İnsan TrxR1, TrxR2, *E. Coli* TrxR ve insan glutatyon redüktaz enzimlerinin domain yapısı (Mustacich and Powis 2000).

Tiyoredoksin sistem TrxR ve onun ana protein substratı olan tiyoredoksin (Trx) den oluşur. Tiyoredoksin sistem glutatyon sistemle birlikte hücreler arası redoks çevresinin ana düzenleyicisi olarak kabul edilir. Tiyoredoksin redüktaz ile glutatyon redüktaz aynı enzim ailesinin flavoproteinleridir fakat TrxR bir selenoproteindir (Witte *et al.* 2005). Trx/TrxR gibi substratları indirgemek için NADPH kullanan diğer bir redoks sistem Glutatyon (GSH)/Glutatyon redüktaz (GR) sistemidir. Bu iki sistem arasındaki fonksiyonel etkileşim bilinmemektedir. Glutatyon sistem; hücrel makromolekülleri reaktif oksijen türlerinden (ROS), elektrofilik türlerden ve bunların türevlerinden ötürü oluşabilecek zararlardan korumada anahtar bir rol oynar. Glutatyon ve tiyoredoksin sistemlerin ortak özellikleri şunlardır;

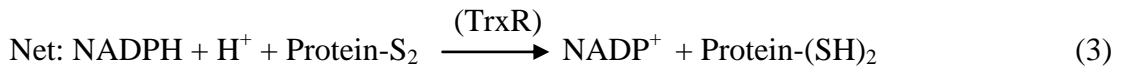
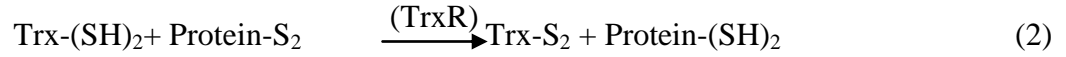
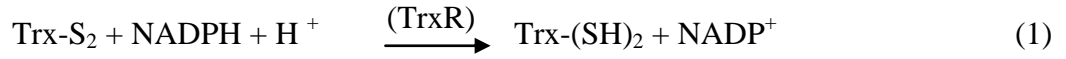
- Piridin nükleotid di-sülfid oksidoredüktaz ailesinin birer üyesidirler.
  - Ana substratlar olan tiyoredoksin ve glutatyon küçük birer redoks aktif proteindir.
  - Tiyol/di-sülfid değişimini dönüşümlü olarak gerçekleştirme kabiliyetine sahiptirler.
- Farklılıkları ise;
- Yalnızca glutatyonu indirgeyen GR'nin sınırlı substrat spesifitesi,
  - Hem spontan hemde glutatyon transferazın katalizlediği mekanizmalar aracılığıyla elektrofilleri uzaklaştıran indirgenmiş glutatyonun yüksek intraselüler seviyesidir (Mustacich and Powis 2000). TrxR/Trx sistemiyle glutatyon GR/GSH sistemlerinin karşılaştırılması Şekil 1.3'de gösterilmiştir.



**Şekil 1.3.** a) TrxR/Trx ve b) GR/GSH sistemlerin karşılaştırılması (Mustacich and Powis 2000).

Enzimin en önemli fonksiyonu tiyoredoksin (Trx) proteininin NADPH'a bağımlı olarak indirgenmesini katalizlemektir. Bu reaksiyonda elektronlar NADPH'tan enzimin prostetik grubu olan FAD aracılığıyla enzimin substratı olan Trx'e akar ve substratı indirger (Williams 1992). TrxR'ler okside tiyoredoksinleri indirgeme kabiliyetleri sebebiyle bu isimle adlandırılmışlardır.

Tiyoredoksinler –Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-Lys- amino asit dizisinden oluşan bir katalitik bölüm içeren 10-12 kDa luk bir protein ailesidir. Bu proteinlerin iki sistein grubu geri dönüşümlü oksidasyon/redüksiyona uğrar. Trx'in redükte olmuş ditiyol formu [Trx-(SH)<sub>2</sub>] disülfid grubu içeren okside protein substratlarını redükte eder. Okside disülfid formu [Trx-(S-S)] ise TrxR tarafından düzenlenen NADPH'a bağımlı bir yolla sıklusa geri katılır (Nishinaka *et al.* 2001). Bu mekanizma;

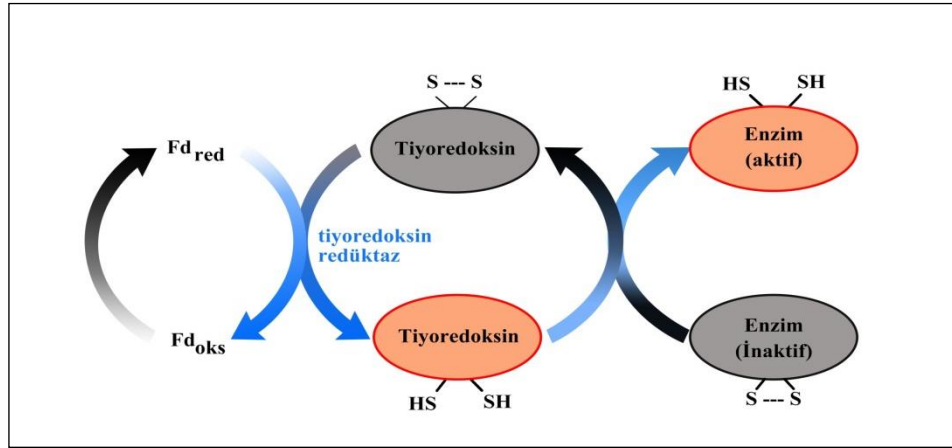


şeklinde özetlenebilir.

Trx proteininin iki esas formu tespit edilmiş ve klonlanmıştır. 104 amino asitten oluşan Tiyoredoksin 1 (Trx1) proteini tipik olarak stoplazmada bulunur fakat aynı zamanda nükleustan da elde edilmiştir. Tiyoredoksin 2 (Trx2) proteini ise 166 amino asitten oluşur ve mitokondriyal bir proteindir (Biaglow and Miller 2005).

Tiyoredoksinler; ribonükleotid redüktaz, tiyoredoksin peroksidaz ve metiyonin sülfoksit redüktazlar gibi enzimlerde elektron donörü görevini yaptığı için protein disülfid redüktazların ana hücrel proteinidir. Tiyoredoksin izoformları değişik tiyoredoksin sistemlere sahip birçok organizma ve mitokondride bulunur. Mesela bitkilerde kloroplast tiyoredoksinleri vardır. TrxR'ler, ferrodoksin aracılığıyla fotosentetik enzimleri ışık ile düzenlerler (Arner and Holmgren 2000). Calvin Döngüsünün 4 esansiyel enziminin aktivitesi ışıkla özgün bir şekilde düzenlenir. Karanlıkta bu Cys

rezidüleri oksitlenince enzimler inaktiftir. Işıklandırmayla elektronlar fotosistem I den ferrodoksinde akar. Orada küçük çözümlü ve disülfid içeren bir protein olan tiyoredoksinde geçer. Tiyoredoksin, elektronları ışıkla aktifleşmiş enzimlerin disülfid bağlarına aktararak bunları indirger ve bunun sonucu olarak enzimlerde konfigürasyon değişikliği olur ve aktivite artar. Tiyoredoksin, tiyoredoksin redüktazla katalizlenen bir disülfid değişimiyle yeniden aktifleştirilir. Gece olduğunda Cys kalıntıları tekrar disülfid formlarına oksitlenerek, calvin siklüsünün 4 enzimini inaktifleştirilir ve ATP, CO<sub>2</sub> asimilasyonunda harcanmaz. Bunun yerine gündüz sentezlenerek depolanmış olan nişasta yıkılarak glikoliz başlatılır (Şekil 1.4) (Lehninger *et al.* 2000).



**Şekil 1.4.** TrxR/ Trx sisteminin fotosentez reaksiyonlarındaki rolü

Tiyoredoksinler protein fonksiyonlarının redoks düzenlemesi ve tiyol redoks kontrol aracılığıyla sinyalizasyon açısından da önemlidir. NF- $\kappa$ B ya da Ref-1 e bağımlı AP1 in de dahil olduğu artan sayıda transkripsiyon faktörü, DNA bağlanması için tiyoredoksinin indirgenmesine ihtiyaç duyar. Sitolik memeli tiyoredoksinlerinin oksidatif strese karşı koruma, büyüme ve apoptozun kontrolünde çok sayıda fonksiyonu vardır (Arner and Holmgren 2000).

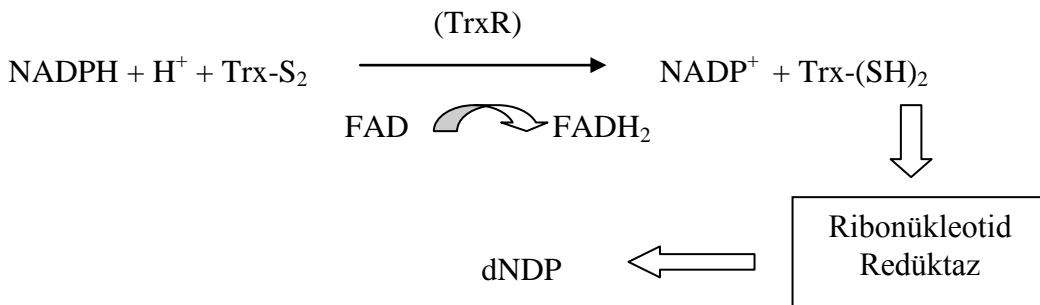
Trx'lerin yanısıra TrxR için başka endojen substratlarda belirlenmiştir. Lipoik asit, lipid hidroperoksit, sitotoksik peptid NK-lisin, vitamin K<sub>3</sub>, dehidroaskorbik asit, askorbil serbest radikal ve p53 tümör-supresör proteini enzimin bilinen diğer substratlarıdır.



(Mustacich and Powis 2000). Bunların dışında küçük moleküller olarak; 5,5' dithiobis (2-nitrobenzoate) (DTNB), alloksan, selenodiglutasyon, metilseleninat, S-nitrozoglutasyon ve ebselen enzimin substratlarıdır (Witte *et al.* 2005). Bunların aksine TrxR aynı zamanda hidroperoksitler, vitamin C ya da selenitler gibi disülfid yapıda olmayan substratları da indirger (Arner and Holmgren 2000). TrxR selenosistein içeren aktif bölgesiyle beraber çok sayıda substratın indirgenmesini sağlayabilir fakat selenolat parçasının olağanüstü yüksek reaktivitesi yüzünden elektrofilik bileşikler tarafından kolaylıkla hedeflenebilir (Witte *et al.* 2005).

## 1.2. Tiyoredoksin Redüktaz Enziminin Fonksiyonları

TrxR/Trx sisteminin metabolizmadaki temel işlevi; DNA sentezi ve hücre çoğalması için gerekli olan deoksiribonükleotidlerin yapımında kritik bir rol oynamalarıdır. Trx, ribonükleotid difosfatların deoksiribonükleotidlere dönüşümünü katalizleyen bir enzim olan ribonükleotid redüktazın, ribozu indirgemesi için gerekli olan elektronları sağlar (Jordan and Reichard 1998). Ribonükleotitlerin D-Riboz kısmının 2' Deoksiriboza indirgenmesi bir ara hidrojen taşıyıcı proteini olan tiyoredoksin aracılığıyla NADPH tarafından verilen bir çift hidrojen atomuna gereksinim duyar. Tiyoredoksin NADPH'dan ribonükleotid difosfata H atomları taşıyan -SH grubu çiftlerine sahiptir. Oksitlenmiş ya da disülfid formu tiyoredoksin redüktazla katalizlenen bir tepkimeyle NADPH tarafından indirgenir. İndirgenmiş tiyoredoksin, ribonükleotid redüktaz tarafından ribonükleozit difosfatları (NDP) deoksiribonükleozitdifosfatlara (dNDP) indirgemede kullanılır (Şekil 1.5) (Lehninger *et al.* 2000).



**Şekil 1.5.** Tiyoredoksin redüktaz enziminin metabolizmadaki ana fonksiyonu

Memeli hücrelerindeki membran bağlantılı bir TrxR; NK-lisin gibi son derece toksik maddelerin etkilerini hapseden fizyolojik bir koruyucu olarak görev yapar. TrxR içeren tümör hücreleri aynı zamanda NK-lisine karşı korunmalıdır. NK-lisin 9 kDa ağırlığında doğal öldürücü hücreler tarafından salgılanan gözenek oluşturucu bir peptiddir. İnsan TrxR'si ile birlikte etkin bir şekilde indirgenir ve inaktive edilir (Becker *et al.* 2000).

TrxR enziminin fizyolojik substratı olan Trx'in hücre büyümesinin düzenlemede ve apoptozu inhibe etmede çok önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Trx'in bu reaksiyonda kullanılabilmesi için indirgenmiş bir formda bulunması gerekmektedir. Trx'in mutant redoks-inaktif formu hücre büyümesi ya da apoptoz inhibisyonunu uyarmak için yetersizdir. Trx'in indirgenmesi için bilinen tek mekanizma; TrxR tarafından NADPH'a bağımlı indirgeme aracılığıyla olanıdır. İşte bu yüzden TrxR'lerin de aynı zamanda hücre büyümesini düzenlemede rol oynadığı düşünülmektedir (Mustacich and Powis 2000). TrxR enzimleri peroksitleri detoksifiye eder ve transkripsiyon faktörlerinin indirgenmiş durumunu korur. Bu etkileri ile hücre büyümesi ve yaşamasının düzenlenmesinde esansiyel konumdadır (Şimşir vd 2010).

Apoptoz; çeşitli travmatik hücre dışı lezyonlar ya da genetik faktörlerle aktive edilen ve hücrenin kendisi tarafından programlanmış bir mekanizma vasıtasıyla hücre ölümünü kontrol eden aktif bir işlem olup, hücrenin intiharı olarak tanımlanabilir (Altunkaynak ve Özbek 2008). Trx apoptoz sinyal-regülatörü kinaz 1 gibi proapoptotik proteinleri doğrudan inhibe eder. TrxR'nin katalitik SeC rezidüsündeki mutasyonlar p53 geninde yapısal bozukluklara ve apoptoz indüksiyonuna yol açar (Tandoğan ve Ulusu 2011).

Düşük seviyede ROS (reaktif oksijen türleri) un sürekli oluşumu O<sub>2</sub> metabolizmasının bir parçasıdır. Ancak ROS üretimindeki artış ya da hücrelerde var olan koruyucu sistemlerin bir ya da birkaçındaki fonksiyonel bir azalış; tamir edilemez, apoptoz dahil patolojik proselere sebep olan protein tiyollerinin oksidasyonu gibi makromoleküler zararlarla sonuçlanabilir (Mustacich and Powis 2000). Artmış ROS nedeniyle oluşan biyomoleküler hasar, lipid peroksidasyonu, DNA mutasyonu ya da kırılması, enzim aktivasyonu ya da inaktivasyonu, protein oksidasyonu ya da yıkılmasıyla sonuçlanır.

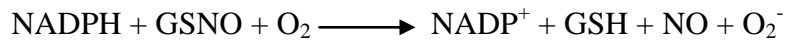
Yüksek molekül kütleli hücrel major antioksidan enzimler ve proteinler ROS'un ya da ürünlerinin etkilerini düzenlerler. Bu moleküller, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR), tiyoredoksin/tiyoredoksin redüktaz sistem, metallotioninler ve ferritinden oluşur. Tiyoredoksin/tiyoredoksin redüktaz sistem serbest radikalleri azaltır ve okside askorbat resiklusunda fonksiyon görür. Tiyoredoksin redüktaz NADPH varlığında okside tiyoredoksini indirger. İndirgenmiş tiyoredoksin elektron alıcısı olarak rol oynar ve tiyoredoksin peroksidaz hidrojen peroksidi suya indirger (Karaca vd 2009).

Serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek üzere organizmada, antioksidan savunma sistemleri veya kısaca antioksidanlar olarak adlandırılan çeşitli savunma mekanizmaları gelişmiştir. Serbest radikallerin ve antioksidanların düzeyleri arasındaki hassas denge korunamadığı takdirde, hücre hasarına kadar giden birçok patolojik değişiklik ortaya çıkmaktadır. İnsanlar; oksidatif stresten hücreleri koruyan önemli bir antioksidan olan askorbik asit sentezleme kabiliyetine gereksinim duyarlar. Bu yüzden diyetle alınması ve serbest okside formlarından askorbata geri dönüşümü hücre içi askorbat seviyelerinin korunması için gereklidir (Yapar 2006).

Okside formlarından askorbik asite geri dönüşüm birçok hücrede hücre içi vitamin depolarının korunması için gereklidir. Dehidroaskorbik asit (DHA), serbest askorbil radikallerinin dismutasyonu ile üretilir ve TrxR DHA'yı askorbata indirgeyebilir. Birçok memeli hücresi dokulararası boşluk ya da plazma çevresindekinden çok daha fazla hücre içi askorbik asit ya da vitamin C konsantrasyonunu korurlar. Çekirdekli hücrelerde bu konsantrasyon gradienti yüksek enerji bağımlı bir taşıyıcı üzerinde askorbatın alınmasıyla oluşur. Hücre içinde askorbat mitokondriyal metabolizmada üretilen serbest radikaller ya da hemoglobin gibi demir içerikli proteinler tarafından oksidasyona tabidir. Bu tek elektron oksidasyonları ilk olarak askorbil serbest radikalleri üretir. DHA da bu askorbil serbest radikallerin dismutasyonu ile oluşur. Bu gradiente katkıda bulunan diğer bir mekanizma askorbatın 2 elektronlu oksidize formunu olan DHA'nın taşıyıcıyla kolaylaştırılmış difüzyonla alınmasıdır (May *et al.* 1998).

Karaciğer birçok memelide askorbik asit biyosentezinin gerçekleştiği yerdir. Karaciğer aynı zamanda askorbik asitin iki elektronlu okside formu olan dehidroaskorbattan vitamin formuna dönüştürme kabiliyetine sahiptir. Glutasyon (GSH), DHA'yı direk olarak indirgeyebilir ya da glutaredoksin ve protein disülfid izomeraz gibi enzimler aracılığıyla DHA'nın indirgenmesi için kofaktör olarak davranır. Karaciğerde bunun yanında NADPH'a bağımlı DHA indirgenmesi saptanmıştır ve 3 $\alpha$ -hidroksisteroid dehidrogenaz ve selenoenzim tiyoredoksin redüktaz aracılığıyla gerçekleştiği bulunmuştur. TrxR aynı zamanda serbest askorbil radikallerini de karaciğerde indirger (Li *et al.* 2001).

S-nitrozoglutasyon (GSNO) önemli bir metabolit ve nitrikoksitin taşınma şeklidir. Aynı zamanda memeli TrxR'nin substratıdır. Ancak Trx aracılığıyla dolaylı indirgenme, GSNO'nun TrxR ile direk indirgenmesinden daha fazla GSNO akışı sağlayabilir.



Trx aracılı reaksiyon sadece daha hızlı değil aynı zamanda TrxR'yi yüksek reaktif peroksinitrite (ONOO<sup>-</sup>) kolaylıkla bağlanabilen NO ve O<sub>2</sub><sup>-</sup> reaksiyon ürünlerinin inaktif edici etkisinden korur (Nikitovic and Holmgren 1996).

Malin bir hastalıkla ilgili olarak klinik hekim üç temel yönden kaygı duyar. Bunlar hastalığı önleme, erken teşhis ve etkili bir tedavidir. Tiyoredoksin sistemi bu üç aşamanın tamamında rol oynar. Oksidatif stres DNA hasarı için önemli bir faktör olarak kabul edilir. Bu nedenle antioksidan tiyoredoksin sistem bir tümör önleyici sistem olarak kabul edilebilir. Bu sadece reaktif oksijen metabolitlerinin detoksifikasyonunda değil aynı zamanda sinyalizasyon proseslerinde de geçerlidir. Yapılan son çalışmalar TrxR'nin selenol grubunun mutajenik H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> için primer sensör olarak işlev görebildiğini ve antioksidatif proteinleri kodlayan genlerin transkripsiyonuna yol açan bir sinyal akışını başlattığını göstermiştir. Ayrıca NF-kB, NF-Y gibi transkripsiyon faktörleri ve p53 tümör baskılayıcı proteini kendi aktiviterinde redoks bağımlıdır (Becker *et al.* 2000).

p53 bir tümör baskılayıcı proteindir ve bir dizi insan kanserinde silinir. p53 hücre döngüsünü düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür. Birçok organizmada kanserin baskılanmasında rolü olan çok önemli bir proteindir. p53 proteini hücre büyümesinin durdurulması, apoptoz, hücre farklılaşması ve DNA tamir mekanizmasının başlatılmasında rol alır. p53 mutant hücre çoğalmasına karşı genomun korunmasında önemli bir rol oynar (Cabadak 2008). Bununla birlikte bilinir ki; p53 geninin DNA'ya bağlanma becerisi oksidize koşullar tarafından inhibe edilir ve p53 ekspresyonu TrxR ekspresyonunda dahil olduğu bir dizi redoks genlerinin ekspresyonunda değişikliklere yol açar (Polyak *et al.* 1997).

Lipoik asit (disülfidliipoat) periferel nöropatiyle diyabetik hastaların tedavisinde ve akut mantar zehirlenmesi olan kişilerin farmakolojik tedavisinde kullanılan bir bileşiktir. Lipoat disülfid hücre içinde metabolik açıdan aktif formuna TrxR tarafından indirgenir. Bununla birlikte lipoik asitle ilgili klinik sonuçlar henüz bu bileşikle ilgili beklentileri karşılayamamıştır (Becker *et al.* 2000). İnsan plasentası, sığır timusu, sığır karaciğeri ve sıçan karaciğerinden elde edilen TrxR'nin hem lipoik asiti hemde lipoamidi etkili bir şekilde indirgediği belirlenmiştir (Arner *et al.* 1996).

Tiyoredoksin sistem anjiyogenezi de uyarmaktadır. İnsan meme kanseri MCF-7, kolon kanseri ve murin lenfoma hücreleri gibi çeşitli değişik 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 engellediği görülmüştür (Kemerdere 2008).

Anjiyogenez önceden var olan bir damarlanma yapısı içerisinde yeni damar oluşumu işlemi olup kanser büyümesi ve yayılımı için gerekli bir basamaktır, çünkü solid bir tümör dokusunun 2 mm çapa erişmesinden sonra canlı kalabilmesi için gereksinimlerini difüzyon karşılayamaz ve bu aşamada anjiyogenez kaçınılmazdır (Türkbey vd 2008).

Tiyoredoksin hipoksi-indükleyici faktörü uyarır. Kanser hücreleri, neredeyse her solid tümörde görülen hipoksik şartlara adapte olabilecek durumdadırlar. Hipoksi, kanser

fenotipinin gelişmesinde rol alan bir transkripsiyon faktörü olan hipoksi-indükte edilebilir faktörün (HIF-1) aktivasyonuna neden olur. HIF özellikle, hipoksiye cevap elementlerine (HRE) bağlanarak, anjiyogenez (VEGF), metabolik adaptasyon (GLUT taşıyıcıları, heksokinaz ve diğer glikolitik enzimler) ve hücre çoğalması ile yaşam süresini uzatıcı bir takım genlerin oluşmasını uyarır. Trx'nin aşırı salınımının hem normoksik ve hem de hipoksik şartlarda HIF-1a'yı önemli oranda arttırdığı gösterilmiştir (Biaglow and Miller 2005).

Trx salınımının, muhtemelen protein yapı ve fonksiyonundaki değişikliklere bağlı olarak, akciğer, kolorektal, servikal, hepatik ve pankreas kanseri gibi birçok insan kanser türünde arttığı gösterilmiştir. Trx salınım yokluğu bu kanser türlerinde, lenf nod negatifliği ve daha iyi klinik sonuç ile birliktelik göstermiş, bununla beraber tümörün derecesi, evre ve histolojisinden bağımsız olduğu gösterilmiştir. Araştırmacılara göre, bu sonuçlar Trx'in bazı insan kanserlerindeki tahmin edilen büyüme arttırıcı rolünü desteklemektedir ve aşırı salınımı daha malin bir tümör fenotipinin göstergesi olabilir. TrxR aktivitesi ve tümör büyümesi arasındaki ilişki çok net değildir. Katalitik aktivitesi fonksiyonel olarak artsa da, tümör hücrelerinin TrxR enzim salınımını arttırmaları gerekmeyebilir (Kemerdere 2008).

AIDS'li hastalarda selenyum durumu ve hastalığın ilerlemesi arasında negatif bir korelasyon gözlenmiştir. Çalışmalar; insan Jurkat lösemi T hücrelerinin HIV ile enfeksiyonun, selenyumun TrxR dahil bir dizi selenoproteine bağlanmasını azalttığını göstermiştir. Selenoproteinlerden selenyumun kaybindan kaynaklanan oksidatif stresi kapsayan bir mekanizma öngörülmüştür (Gladyshev *et al.* 1999).

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Tiyoredoksin redüktaz NADPH'a bağımlı, tiyoredoksin ve bazı diğer substratları indirgeme kabiliyeti olan bir oksidoredüktazdır. Memelilerde 55-57 kDa arası molekül kütlelerinde değişik izoformları vardır ve hepsi enzimin katalitik döngüsünü gerçekleştiren C-terminal tetrapeptid yapıda katalitik bölgeye sahiptir. Bunun aksine prokaryot izoformları daha düşük molekül ağırlığa (35 kDa) sahip ve selenosistein içeren C- terminal uzantılı katalitik bölgeden yoksundur (Rigobello *et al.* 2006).

Memeli TrxR'leri yapı ve özellik bakımından bakteri, mantar ve bitkilerden farklıdır. Memeli TrxR enziminin 3 değişik izoformu vardır. Bunlar; sitozolden izole edilen TrxR1, mitokondriden elde edilen TrxR2 ve testis-spesifik TGR (trx ve GSH indirgeyici) dir (Wang *et al.* 2008). Memeli TrxR enzimlerinin ana fonksiyonu tiyoredoksinleri indirgenmiş halde korumaktır. TrxR'ler alt birimlerinin birinde N-terminal redoks aktif ditiyol bulunan diğerinde C-terminal selenoltyol bulunan homodimerik proteinlerdir (Sandalova *et al.* 2001).

TrxR (E.C 1.6.4.5) piridin nükleotid disülfid oksidoredüktazların flavoprotein ailesine ait enzimlerdir. *E. Coli*'den elde edilen TrxR'nin 35,3 kDa molekül kütledeki her bir monomeri bir FAD ve bir redoks aktif disülfid içerir. TrxR tarafından katalizlenen reaksiyon, protein substrat tiyoredoksinin NADPH aracılığıyla indirgenmesidir. İndirgenmiş tiyoredoksinler ribonükleotidlerin indirgenmesi gibi diğer hücresel işlemlerde elektron kaynağı olarak davranır (Lennon 1999).

Tiyoredoksin redüktaz, tiyoredoksin ve NADPH'ın da dahil olduğu tiyoredoksin sistemin bir parçası olarak hücre içi redoks evrelerini düzenler. Bu redoks sistem hem prokaryot hem de ökaryot hücrelerde bulunur. TrxR'ler redoks düzenlemesinde ve hücre sinyalizasyonunda önemli bir rol oynayan selenoproteinlerdir (Crosley *et al.* 2007).

Selenoproteinler hayatın tüm alanlarında pek çok organizmada bulunan proteinlerin bir sınıfıdır. İnsanda tespit edilen 25 selenoprotein kodlayıcı genin bazılarının insan sağlığı ve hastalığı için önemli olduğu bilinmektedir. 3 memeli selenoproteini bu sebeple embriyonun gelişimi için gerekli olduğu fare modelleri kullanılarak tespit edilmiştir. Bu selenoproteinler fosfolipid glutatyon peroksidaz, sitozolik TrxR ve mitokondriyal TrxR'dir. Selenoproteinler selenyumun sülfürün yerini aldığı, sisteine benzer ve 21. aminoasit sırasında selenosistein içerirler. Bu selenyum sülfür değişimi selenosisteini daha düşük bir pKa değerine sahip yüksek ölçüde reaktif bir nükleofil yapar. Sec'in serbest selenolatı ya selenenik ya da seleninik formuna kolayca oksitlenebilir, alternatif olarak, diğer Sec ya da Cys rezidüleriyle sırasıyla diseleninit ya da selenilsülfid oluşturabilirler. Diseleninit ya da selenosülfid ile bağlı bileşikler, peptidler ya da proteinler genellikle disülfid varyantlarına göre daha az indirgeme potansiyeli sergilerler (Cheng *et al.* 2008).

Tiyoredoksin tiyol transfer reaksiyonlarında glutatyona benzer şekilde TrxR'nin katalizlediği pek çok indirgeme reaksiyonunda kofaktör olarak görev yapar. Örneğin tiyoredoksin protein disülfid indirgenmesi ve DNA sentezinde kofaktördür fakat bağımsız olarak; apoptozu inhibe eder, hücre çoğalması ve anjiyogenezi uyarır ve transkripsiyon faktör etkinliğini artırır. TrxR/Trx sisteminin işlevi HMPS tarafından üretilen NADPH'nin elektronlarının sağladığı indirgeme kapasitesi tarafından sınırlanır. Tiyoredoksin komşu sülfhidrillerinin indirgeme kapasitesi tarafından sınırlanır ve disülfidleri indirgemek için Trx çiftli sisteminden ve HMPS'den gelen elektron kaynaklarına ihtiyaç duyar. Oksidize tiyoredoksin TrxR ve NADPH tarafından indirgenir (Biaglow and Miller 2005).

Trx insülini indirgeme kabiliyetine bağlı olarak çok çeşitli kaynaklardan izole edilmiş ve incelenmiştir. Örneğin Trx dana karaciğer homojenatından; TrxR'nin ortamda varlığıyla ve NADPH aracılığıyla insülin disülfidini indirgeme kapasitesine dayalı bir deneyle saf olarak izole edilmiştir (Holmgren 1979).

İnsülin doğrudan ya da dolaylı olarak vücuttaki bütün dokuları etkileyen glukoz,

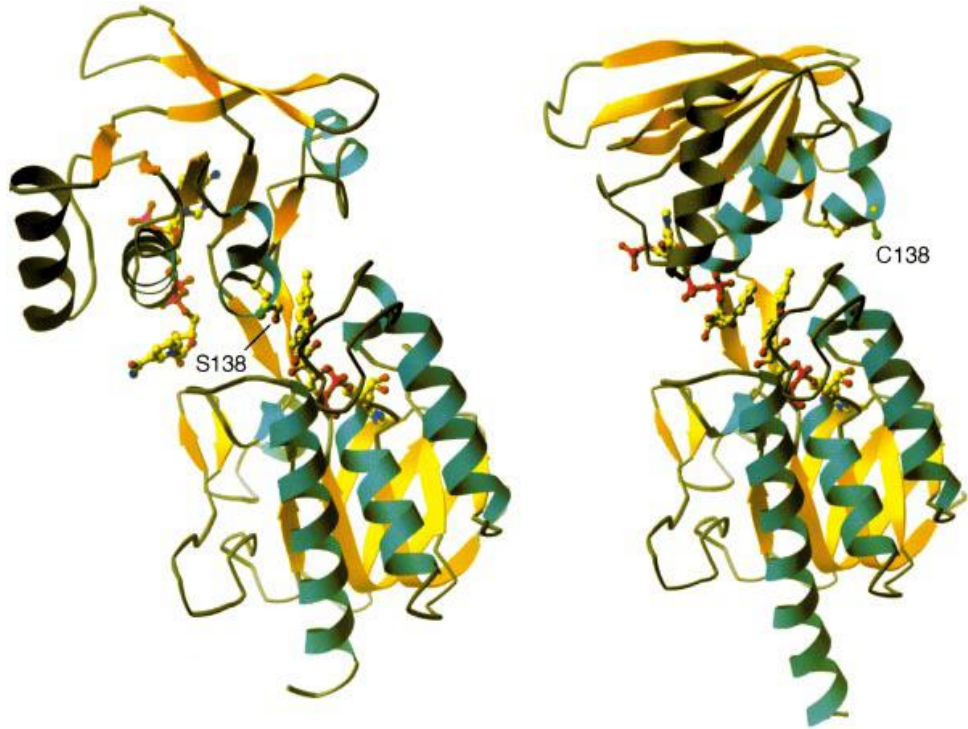


aminoasit ve lipidler gibi besin olarak alınan maddelerin çoğunun hücre içine alınıp depo edilmesini sağlayan, hemostazine katkıda bulunan anabolik ve antikatabolik bir hormondur. İnsülin karaciğerde glikojen sentez ve depolanmasını arttırıp, glikojenolizi inhibe ederek anabolik etki gösterirken, VLDL yapımı, protein ve trigliserid sentezini de arttırır. Kas doku da ribozomal protein sentezi ve aminoasit transportunu arttırarak protein sentezini uyarır (Greespan *et al.* 2004).

Yapılan başka bir çalışmada ıspanak yapraklarında 3 çeşit Trx bulunmuştur. İki kloroplastların içinde (trx f ve trx m) diğeri kloroplastların dışında muhtemelen stoplazmada bulunur (trx c). Hem ferrodoksin ve ferrodoksin tiyoredoksin redüktaz aracılığıyla fotokimyasal olarak hemde ditiyotreitole karanlıkta kimyasal olarak indirgendiği zaman iki kloroplast tiyoredoksini kloroplast enzimlerine bağlı tiyoredoksinin aktivasyonunda etkili olmuştur (Wolosiuk *et al.* 1979).

*E.coli*'de Cys 135 ve Cys 138 rezidüleri aracılığıyla oluşan redoks aktif disülfid, flavin halkasının yanında yer alır. Bu konformasyon flavinle disülfid arasında elektron transferine imkan tanır ve enzimin disülfidi aracılığıyla flavin oksidasyonuna izin verdiği bu yapı FO konformasyon olarak adlandırılır. Bunun yanında aktif disülfid bölge bu yapının içine gömülüdür ve tiyoredoksin proteini ile reaksiyon için uygun değildir. NADPH'nin nikotinamid halkası FAD'dan uzakta, piridin nükleotid ve flavin arasında hidrür transferini engelleyen konumdadır. Bu nedenle bu sorunun çözümü açısından modeli geliştiren tarafından alternatif bir yapı türetilmiştir. NADPH'nin etki alanının rotasyonu; NADPH'nin nikotinamid halkasını flavine hidrür transferi için uygun bir pozisyona getirmektedir. Aynı yeniden düzenlemede aktif sisteinler kısmı enzimin iç bölgesinden tiyoredoksinle reaksiyona girebilecek yüzeyde bir alana hareket eder. Bu model konformasyon piridin nükleotid aracılığıyla flavinin indirgenmesine imkan verdiği için FR konformasyon olarak adlandırılır. Enzim FAD'nin hem NADPH oksidasyonu hem de disülfid indirgenmesine aracılık ettiği genel reaksiyonun katalizi için FO ve FR konformasyonlar arasında bir geçiş gereksinim duyar (Lennon *et al.* 1999).

*E.coli* de bulunan (Şekil 2.1) FR (sağ) konformasyonda TrxR'nin yapısında; disülfid çarpraz bağlarla stabilize edilmiş olan Trx ve TrxR komplekslerinin reaktiflikleri ve özellikleri bu komplekslerin FR konformasyonda kilitlendiğini ve FO (sol) konformasyon oluşturmak için dönüşüme uğramadıklarını göstermiştir. Gözlemlenen FR (sağ) konformasyon yapısında NADPH alanı yaklaşık  $66^\circ$  kendi çevresinde modelde öne sürüldüğü gibi döndürülmüştür. Şayet NADPH yerine bağlı olsaydı, FAD'ın izoalloksazin halkasına karşılık, etki alanının yeniden düzenlenmesinin piridin nükleotid anayapısının piridin halkasına eş zamanlı yığıldığı, AADP<sup>+</sup>; kataliz süresince hidrür transferine izin verirdi. Enzimin her iki konformasyonu katalitik döngünün tamamlanması için gereklidir. FR konformasyonunda NADPH aracılığıyla flavinin indirgenmesi ve enzimin ditiyolu aracılığıyla büyük protein substratı olan tiyoredoksinin indirgemesi gereklidir. FO konformasyonda ise elektronların flavinden enzim disülfide transferi gereklidir (Williams 2000).

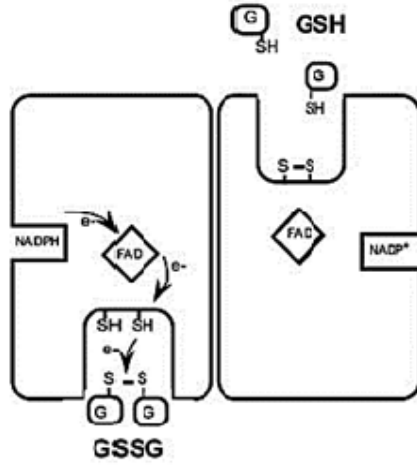
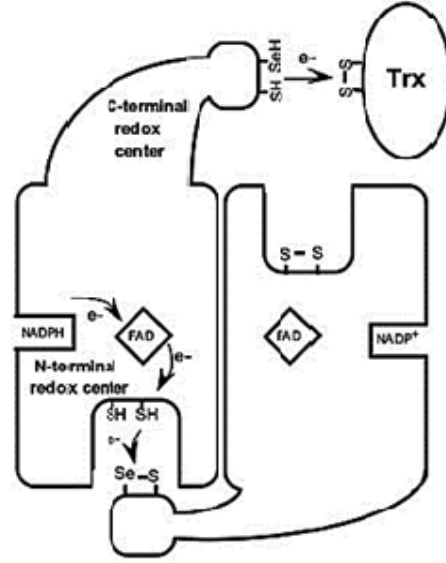


**Şekil 2.1.** C138S (FO) ve C135S (FR) in kristal yapılarına dayalı, TrxR'nin FO (sol) ve FR (sağ) konformasyonlarının çizimi (Williams Jr. 2000).

Şekil 2.2'de gösterildiği gibi TrxR'nin moleküler yapısı ve reaksiyon mekanizması GR

ile benzerdir fakat substrat spesifitesi mutlaklır. Memelilerden klonlanan stozolik TrxR (TrxR1) ve mitokondriyal TrxR (TrxR2) de yapısal olarak birbirlerine benzerler fakat bir sinyal peptidi olan TrxR3 diğerlerinden farklıdır. Memeli TrxR'lerinin spesifiteleri C- terminal redoks merkez tarafından desteklenir. GR aktif merkezin, enzimin N-terminal ucunda konumlanmasına rağmen memeli TrxR enzimlerinde N-terminal aktif merkeze ilaveten Sec rezidüsü iğereren ve C-terminal uçta bulunan başka bir aktif merkez daha vardır. Sec ve yakınındaki Cys rezidülerinin mutasyonu TrxR aktivitesini azaltır. Bunu belirleyen bu Sec ve Cys rezidülerinin koordineli olarak okside tiyoredoksinlerin indirgenmesi için ihtiyaç duyulan ikinci aktif merkezi oluşturmalarındır (Fujii *et al.* 2003).

Hem tiyoredoksin hem de glutaredoksin; *E.coli* ribonükleotid redüktaz için ditiyol elektron vericisi olarak belirlenmiştir. Hücrelerde aktif bir CXXC bölgede, katalitik olarak aktif sistein tiyollerle beraber çok iyi bilinen multifonksiyonel tiyol bağımlı redoksinler olarakta bilinirler. Okside Trx flavoprotein TrxR üzerinden NADPH aracılığıyla indirgenir. Bunun aksine okside Grx'deki disülfid ise iki molekül monotiyol GSH ile indirgenir. Sonuğta oluşan GSSG ise NADPH ve GR vasıtasıyla indirgenir (Avval and Holmgren 2009). İnsan kanser hücrelerinde hücresele ribonükleotid redüktazın konsantrasyona bağlı inhibisyonu sonucu diazikuan ve doksorubisinin Trx/TrxR sistemini inhibe ettiği gösterilmiştir. Glutaredoxin/Glutatyon sistemi reaksiyonuda aynı zamanda ribonükleotid redüktaz için indirgenmiş eşdeğerlerini karşılamaktadır. Glutatyonun tükenmesi DNA sentezini inhibe eder ve bir dizi kanser hücre hatlarında apoptoza sebep olur (Biaglow and Miller 2005).

**GLUTATYON REDÜKTAZ****TİYOREDOKSİN REDÜKTAZ**

**Şekil 2.2.** Glutasyon redüktaz ve tiyoredoksin redüktaz enzimlerinin reaksiyon mekanizmalarının karşılaştırılması (Fujii *et al.* 2003).

TrxR / Trx'nin biyolojik aktiviteleri ve saldırgan tümör büyümesi ile olan bağlantısı, bu sistemin kanser terapisi için önemli bir hedef olduğunu düşündürür. Hem enzim hem de substratı değiştirilebilir. Glutaredoksin içermeyen hücrelerde, HMPS/TrxR/Trx çiftli reaksiyonlarının engellenmesi için HMPS sonucu oluşan NADPH'nin tükenmesi ya da Trx veya TrxR'in direkt teması, doğru bir yaklaşım olabilir (Kemerdere 2008).

Trx ekspresyonu protein yapı ve fonksiyon değişiklikleriyle ilişkili olan akciğer, koleraktal, boyun, hepatik ve pankreatik kanserden oluşan çeşitli insan malignitelerinde artar. Pankreatik duktal karsinom dokusunda; Trx seviyeleri normal pankreas dokusuyla karşılaştırıldığında 32 vakadan 24'ünde yüksek bulunmuştur. Glutaredoksin seviyeleride 29'unda yüksek bulunmuştur. Benzer şekilde birincil kolorektal kanseri ya da lenf nod metastazında doku örneklerinde Trx-1 seviyeleri normal kolonik mukozza ya da kolorektal adenomatus foliplerinden önemli ölçüde daha yüksektir. Bu çalışmalar neticesinde Trx ekspresyonu tümör büyümesi ve kötü prognazla ilişkilendirilmiştir (Biaglow and Miller 2005).

İnsan TrxR sistemi kanser hücre büyümesi ve anti apoptoz prosesle ilişkilendirilmiştir. GSH ve TrxR metabolizması bazı malin akciğer hastalıklarında, kanser hücre hatlarında ve çeşitli kanser tiplerinde çalışılmıştır. Bu çalışmaların hepsinde bu sistemin kanserdeki rolü ve oksidatif stresteki önemi vurgulanmaktadır. Trx apoptoz sinyal düzenleyici kinaz 1 gibi proapoptopik proteinleri direk olarak inhibe edebilir. TrxR'nin katalitik Sec rezidüsündeki mutasyon p53 yapısal bozukluğuna ve apoptoz indüksiyonuna yol açar. TrxR aktivitesi tümör hücrelerinde artar ve fenotip değişikliği gibi poliferasyonlarını uyarır (Tandoğan ve Ulusu 2011).

Son zamanlarda incelenmeye başlanan TrxR aktivitesinin düzenlenmesinin yanı sıra, hem hücre içi hemde hücre kültüründe TrxR aktivitesinin ve TrxR'lere selenyum dahil edilmesinin mekanizmasının belirlenmesinde selenyumun varlığı önemli bir anahtardır. Hücre fonksiyonlarında birçok açıdan Trx'i önemli kılan büyük olasılıkla onun oksidatif hasara karşı koruma, hücre büyümesi, transformasyon ve okside formlarından askorbata dönüşümde önemli bir rol oynamasıdır. Enzim Trx'den başka birtakım substratları da indirgeyebildiği için muhtemelen gelecekte başka biyolojik etkileride keşfedilecektir. Bunun yanında ilaçlarla TrxR inhibisyonu kanser, AIDS ve otoimmün hastalıklar gibi insan hastalıklarında yeni tedavilere yol gösterebilir (Mustacich and Powis 2000).

Sığır karaciğer ve timusundan TrxR enziminin analizi ve saflaştırılması enzimin NADPH'a bağımlı olarak disülfid indirgemesini katalizleme kapasitesine dayalı olarak yapılmıştır. Sığır karaciğer enzimi genişçe bir disülfid substrat spesifitesi gösteren aracı bir elektron taşıyıcı olan Trx olmaksızın direk olarak DTNB'yi indirgeyebilir. İyi bir verim elde edebilmek amacıyla optimize edilen enzim preparatı DEAE selülöz iyon değişim kromatografisine tatbik edilmiş ve fraksiyonlarda yapılan analiz sonuzu iki pik gözlemlenmiştir. Enzim aktivitesinin %30 civarını temsil eden ilk pik 0,03 M lık düşük tuz konsantrasyonunda elüe edildikten sonra enzimin ikinci ana piki 0,15 M sodyum asetat konsantrasyonunda elüe edilmiştir ve 0,13 M konsantrasyonda pik gösteren tiyoredoksin aktivitesiyle çakışmıştır. DEAE selülöz kromatografisi sonrası elde edilen ana havuzun bu yüzden hem Trx hem de TrxR ihtiva ettiği belirlenmiştir. Trx ile TrxR enziminin ayrılması Sephadex G-50 kromatografisiyle elde edilmiştir. Bu aşamadan

sonra TEAE-selülöz ve sephadex G-200 kromatografisinin kullanıldığı sonraki iki adım da TrxR'nin saflaştırıldığı basamaklardır. Sephadex G-200 kromatografisinden sonra enzim ham ekstraktan 1000 kat saflaştırılmış olup PAGE sonrası enzimin %10 verimden daha iyi bir sonuçla elde edildiği belirlenmiştir. Timusda ise sephadex G-100 kromatografisi uygulanmıştır. Elde edilen saf enzimin doğal molekül kütlesi her bir alt biriminki 66 kDa olmak üzere 112 kDa olarak belirlenmiştir (Holmgren 1977).

Sıçan karaciğerinde yapılan çalışmalarda asit ve ısıyla muamele edilen homojenat ilk olarak %85 doygunlukta amonyum sülfatla çöktürülüp çökelek formu diyaliz edilmiştir. Sonra DEAE selüloz iyon değişim kromatografisi uygulanmıştır. Yine Trx ve TrxR'nin 0,15 M NaCl doygunluğunda piklerinin çakışması ortamda her ikisinin varlığının kanıtı olmuştur. DTT ile inkübe edilen preparat CM-selülöz ve sephadex G-50 kolonuna tatbik edilmiştir. Bu basamaklardan sonra Trx 2000 kat %24 saflıkta elde edilmiştir. DEAE selüloz iyon değişim ve sephadex G-50 kromatografileri sonrası toplanan fraksiyonlar sonraki basamakta 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisine uygulanmış ve TrxR enzimi 4000 kat %18 saflıkta elde edilmiştir. Elde edilen enzimin doğal molekül kütlesi her bir alt birim 58 kDa olmak üzere toplam 116 kDa olarak bulunmuştur (Luthman and Holmgren 1982).

*E.coli*'den TrxR'nin saflaştırılması için yapılan çalışmalarda ise enzim preparatı sephadex G-100 kolonuna uygulandıktan sonra %40-%65 amonyum sülfat doygunluğu arasında çöktürme işlemi yapılmıştır. Diyaliz edildikten sonra kalsiyum fosfat jel kromatografisi uygulanmıştır. Fraksiyonlar toplanarak tekrar diyaliz edildikten sonra enzim saflaştırılmıştır. *E.Coli*'den elde edilen enzimin her bir alt biriminin doğal molekül kütlesi 34 kDa olarak bulunmuştur (Williams *et al.* 1967).

Rigobello ve arkadaşları 1997 yılında Luthman ve Holmgren'in sıçan karaciğerinden sitozolik TrxR saflaştırmak için kullandıkları metodu modifiye ederek sıçan karaciğeri mitokondrisinden mitokondriyal TrxR elde etmişlerdir. İlk olarak diferansiyel santrifüjleme yapılarak kademeli olarak mitokondriye ulaşılmaya çalışılmıştır. Daha sonra mitokondriyal peleti elde etmek amacıyla dondurup çözme ve sonikatörle

muamele edilmiştir. %50 doygunluklarında amanyum sülfat çöktürmesi uygulanarak oluşan çekelek diyaliz edilmiştir. Fraksiyonlar 60°C'ye kadar ısıtılıp hızlıca 4°C'ye soğutulmuştur. Sonraki basamakta enzim muhtevası DEAE selülöz iyon değişim kolonuna tatbik edilmiştir. İyon değişim kromatografisi sonrası diyaliz edilen fraksiyonlar son olarak 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisine uygulanarak saf enzim elde edilmiştir. Dimerik proteinin molekül kütlesi yaklaşık 108 kDa olarak belirlendiğinden dolayı sıçan karaciğerinden saflaştırılan sitozolik TrxR enziminin molekül ağırlığından daha düşük olduğu ortaya konmuştur (Rigobello *et al.* 1997).

İnsan TrxR1 enzimi için tahmin edilen moleküler kütle; her bir alt birim için 54,6 kDa dur. İnsan enzim preparatının kütle-spektral analizleri, kütlelerin N-terminal Met ve Asn rezidüleri olmayan ve plasentadan saflaştırılan TrxR1 de 54,6 kDa iken T hücrelerinden saflaştırılan TrxR1 de 56 kDa a kadar değiştiğini ortaya koyar (Gladyshev *et al.* 1996).

TrxR sistemin metabolizmadaki fonksiyonlarıyla ilgili akılda kalan soruları netliğe kavuşturmak için yapılan çarpıcı çalışmalardan biri de TrxR'nin karaciğerdeki okside formlarından askorbata geri dönüşümüne önemli bir katkıda bulunup bulunmadığını anlamak için selenyum üzerinden yapılan bir çalışmadır. TrxR bir selenoenzim ve selenyumsuz inaktif olduğundan kültür ortamında ya da hayvanda mevcut selenyum miktarının azaltılmasıyla aktivitesi düşürülebilir. Sıçanlarda diyetle alınımındaki yoksunluğa bağlı selenyum azalmasında; diyaliz edilmiş ciğer ekstraktlarında kontrol grubuna oranla TrxR'ye bağımlı DHA indirgenmesinin kontrol grubunun %25'i kadar olduğu belirlenmiştir (Li *et al.* 2001).

Memeli TrxR enziminin katalitik döngüsü; disülfid ve selenilsülfid arasında selenoltyol/selenilsülfid reaksiyonları değişimi yoluyla elektron transferinden ibarettir. Serbest selenosistein selenolü 5,2 pKa değerine sahiptir ve fizyolojik pH da tamamen iyonize haldedir. Memeli TrxR enzimidaki selenosistein rezidüsü sadece substratları indirgeyen bir katalizör değil aynı zamanda moteksafin godolinyum, cis-diamindikloroplatin II ve arsenik trioksit gibi belirli inhibitörler için hedeftir. Normal hücrelerle mukayese edildiğinde insan karsinoma dokularında, kanser hücrelerinin

büyümesini ve kemoterapiye direnç kazanmasına teşvik ettiği sanılan tiyoredoksin sistemin artan seviyeleri gözlemlenmiştir. Kimyasal ajanlarla TrxR'nin inhibisyonu genellikle hücre büyümesini azaltır ve incelenmiş hücre dizilerinde apoptozu indükler. Bu bulgular TrxR'yi kanserin önlenmesi ve tedavisi için ilaçların geliştirilmesinde etkili bir hedef haline getirmiştir (Wang *et al.* 2008).

Memeli TrxR'leri güçlü nükleofil ve yüksek reaktif amino asit olan selenosistein içerirler. SeC aktivitesi memeli TrxR'lerinde doğal aktivite için gereklidir. Ancak enzimin C- terminal kısmında kolaylıkla ulaşılabilen SeC, enzimi geridönüşümsüz inhibisyona duyarlı kılar. Tiyoredoksin sistemi aslında yaygın olarak kullanılan elektrofilik antikanser ajanlar için hedef olabilir ve bunun yanı sıra inhibitörleri geliştirmektedir. Bu sebepten dolayı saflaştırma, karakterizasyon ve bu enzimin fonksiyonlarının ve yeni özelliklerinin anlaşılması son yıllarda oldukça önem kazanmaktadır. Özellikle karsinojik süreç ve kanserin invazif fenotipinde bilinen bir çok rolünden dolayı TrxR kemoterapi için ilginç bir hedef olarak kabul edilir. Aynı zamanda birçok hastalığın, patogenezin ve kliniksel olarak kullanılan ilaçların etkilerinde rol oynayabilirler. TrxR inhibitörlerinin gelişiminin sonucu kanser, otoimmün hastalıklar ve enfektif hastalıkları önlemede faydalı olacaktır (Tandoğan ve Ulusu 2011).

TrxR'nin inhibisyonu ile ilgili literatürler incelendiğinde; nitrojen mustardlardan klorambusil ve melfalan, alkil sülfanatlardan bisülfan ve karmustinin etkili bir şekilde TrxR'yi inhibe ettiği saptanmıştır. Sisplatin, klasik alkilleme ajanlarına ilave olarak TrxR'yi inhibe ettiği bilinen yaygın olarak kullanılan elektrofilik bir bileşiktir. Buradan yola çıkarak platin içeren bileşiklerle ilgili yapılan araştırmalarda monohidrat kompleksi ve okzaliptatinin TrxR'yi etkili bir şekilde inhibe ettiği bunun aksine karboplatinin TrxR'yi inhibe etmediği belirlenmiştir (Witte *et al.* 2005).

Lipid peroksidasyonunun temel bir son ürünü olan 4-hidroksi-2-nonenal'ın (HNE) uyguladığı çoklu biyolojik etkileri bilinmektedir ve DNA dahil çok sayıda hücrenel bileşene karşı yüksek reaktiviteye sahiptir. TrxR'nin aktif bölgesindeki selenosistein ve sistein rezidüleri (Cys-496/SeC-497) ve Trx'deki bir sistein çifti (Cys-32/Cys-35) çeşitli



alkali ajanlara karşı duyarlıdır. HNE nin sıçan TrxR enzimini inhibe ettiği belirlenmiştir. Bunun yanı sıra HNE indirgenmiş *E.coli* Trx proteinini de geri dönüşümsüz olarak inhibe eder (Fang and Holmgren 2006).

PX-12, Trx-1'in cys rezidüsünü thioalkilleyerek inhibe eder. PX-12'nin MCF-7 meme kanser hücrelerinin ve HT-29 kolon kanser hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir. PX-12, bu hücrelerde hipoksi indükleyici faktör-1 alfa (HIF-1) seviyesinde hipoksiye bağlı artışı engeller ve HIF aktivitesini, VEGF yapımını, indüklenebilen nitrik oksit sentaz (iNOS) ekspresyonunu azaltır (Baker *et al.* 2006).

Trx/TrxR sisteminin en önemli inhibitörlerinden biri de moteksafin gadolinyumdur. Moteksafin gadolinyum (MG),  $Gd^{+3}$  içeren genişlemiş bir porfirindir. Askorbat, NADPH, glutasyon, Trx gibi çeşitli hücre içi metabolitlerden elektron kabul ederek katalitik aktivasyon gösterir. MG, TrxR aktivitesini direk inhibe eder, ancak ayrıca glutasyon/glutaredoksin reaksiyonlarını da, muhtemelen reaktif oksijen ürünü yapımıyla ya da hidrojen peroksit ile GSH'nin tüketilmesiyle engelleyebilir. Bu etkilerin bir sonucu olarak, MG kanser hücresi içindeki metabolizmayı bozar, DNA tamirini engeller ve hücre ölümünü kolaylaştırır (Magda *et al.* 2001).

Arsenik trioksit (ATO) akut promiyelositik lösemi için tedavi edici bir kanser ilacıdır ve solid tümörlerin çoğuna karşı potansiyel antikanser aktivitesine sahiptir. ATO esas olarak yüksek oksidatif stres sırasında etki gösterir fakat mekanizması tam olarak bilinmemektedir. ATO mikromolar düzeyde bir  $IC_{50}$  değeriyle geri dönüşümsüz olarak memeli TrxR'lerini inhibe eder. Hem N-terminal redoks aktif ditiyol hemde C-terminal selenoltiliyol-aktif bölge ATO ile reaksiyona katılabilir (Lu *et al.* 2007).

Tiyoller ve selenoller  $Hg^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ,  $Co^{+2}$  ve  $Mn^{+2}$  gibi ağır metal iyonlarıyla kolaylıkla kompleks oluşturabilirler.  $Cd^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$  ve  $Zn^{+2}$  gibi iki değerlikli metal iyonlarının memeli ve maya GR enzimi üzerinde inhibisyon etkisi olduğu gösterilmiştir. GR ve TrxR yapısal olarak benzerdirler bu yüzden iki değerlikli metal iyonlar aynı zamanda TrxR'yi de inhibe edebilirler (Tandoğan ve Ulusu 2007).

İnsan plasentası, dana timusu ve insan melanom dokularından elde edilen mitokondriyal TrxR enzimleri CDNB ve 13-*cis* retinoik asit tarafından inhibe edilirler.  $Mn^{+2}$  ve  $Zn^{+2}$  iyonları enzimi kuvvetlice inhibe ederler. İlginç biçimde; Lenartowicz ve Wudarczyk (1996)'a göre mitokondrinin hazırlığı ve enzim deneyi süresince TrxR aktivitesinin varlığı için ortamda katyon şelatörü olması gereklidir. Bu da ADP, ATP ve sitrat gibi mitokondriyal fizyolojik şelatörlerin TrxR aktivitesini arttırarak ve mitokondriyal sülfhidril gruplarının sağlam dengesini koruyarak geçirgenliği önleyebildiği anlamına gelir (Rigobello *et al.* 1997).

TrxR enziminin inhibitörlerini araştırmaya yönelik yapılan bir çalışmada etken maddesi glifosat izopropilamin, fenoksaprop-p-etil, 2,4-diklorofenoksiasetik asit dimetil amin tuzu ve haloksifop-p-metil ester olan 4 çeşit herbisit ve etken maddesi diklorvos, lambda siyalotrin, sipermetrin, klorpirifos olan 4 çeşit insektisit enzim aktivitesi üzerine *in vitro* etkisi incelenmiştir. Tüm pesitisitlerin enzim aktivitesi üzerinde  $\mu M$  düzeyinde inhibisyon etkisi tespit edilmiştir (Özgençli *et al.* 2013).

Rigobello *et al.* (2006) kalsiyum iyonlarının TrxR enziminin üç değişik izoformunda etkisini incelemişlerdir. Sitozolik, mitokondriyal ve *E.coli* enzimleri incelendi ve mukayese edildi. Çalışma şartlarında sitozolik enzimin 160 nM  $IC_{50}$  değeriyle  $Ca^{+2}$  iyonuna karşı son derece duyarlı olduğu belirlenirken bu iyonun mitokondriyal enzim üzerine inhibisyon etkisi oldukça azdır. *E.coli*'den izole edilen enzimin ise kalsiyum iyonlarına karşı tamamen duyarsız olduğu tespit edilmiştir (Rigobello *et al.* 2006).

Antioksidan etkilerinden dolayı kanser kemopreventif ajanlar olduğu varsayılan flavonoidler tarafından memeli TrxR enziminin inhibisyonu incelenmiştir. Birer flavonoid olan mirisetin ve kesretinin TrxR üzerinde sırasıyla 0,62 ve 0,97 $\mu M$   $IC_{50}$  değeriyle kuvvetli inhibisyon etkisi bulunmuştur. İnhibisyonun konsantrasyona, NADPH'a ve zamana bağlı olduğu ayrıca enzimin indirgenmiş C-terminal aktif bölgesi üzerinde bir etkiyle ilgili olduğu belirlenmiştir (Lu *et al.* 2006).

İnsan TrxR enzimi elektronları NADPH'dan FAD aracılığıyla redoks aktif disülfide

transfer eden bir mekanizmayla okside tiyoredoksindeki disülfidin indirgenmesini katalizleyen dimerik bir enzimdir. 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) hücre içi GSH'ı tüketmede kullanılan ve aynı zamanda farklı immünomodülatör özellikler gösteren alkali bir ajandır. CDNB'nin düşük konsantrasyonlarda insan ve sığır TrxR enzimini inhibe ettiği belirlenmiştir. CDNB glutatyon redüktazdan 100 kat daha hızlı reaksiyona girdiği memeli TrxR enziminin spesifik bir inhibitörüdür. CDNB aynı zamanda Glutatyon S-Transferazın belirlenmesi için yapılan deneylerde substrat olarak kullanılan SH gruplarını alkilleyen elektrofilik bir bileşiktir. Son zamanlarda CDNB, AIDS tedavilerinde immünoşimilatör ajan olarak hedeflenmiştir (Arner *et al.* 1994).

Çeşitli türden kaynaklar gösteriyor ki bugün tiyoredoksin sistem yeni antikanser ajanların gelişmesi için etkili bir hedeftir. Buna uygun olarak önceden bilinen antikanser ajanların birçoğunun TrxR'nin kuvvetli inhibitörü olduğu ve şiddetli oksidatif strese sebep olduğu bulunmuştur. Son on yılda çeşitli altın bileşikleri, hem Au (I) hem de Au (II) nin olağanüstü antitümör özellikler gösterdiği ve deneysel antikanser ajanların umut verici bir sınıfını oluşturduğu bildirilmiştir. Yeni çalışmalarda çeşitli sitotoksik altın bileşiklerinin kuvvetli TrxR inhibitörleri olduğu ortaya koyulmuştur (Bindoli *et al.* 2009). Auranofin TrxR'yi inhibe eden bir altın bileşigidir. Bu inhibisyon, romatoid artrit tedavisinde auranofinin teropötik yararı kuşku duyulan bir mekanizmadır. Altın bileşiklerinin kanser ya da enflamatuvar bir hastalığın tedavisi için kullanılması onların TrxR'yi inhibe etme kabiliyetlerine dayandırılabilir (Omata *et al.* 2006).

Yapılan bir çalışmada toksik olmayan bir inhibitörün, yeşil çayın enzim üzerinde inhibisyon etkisi araştırıldı. TrxR1'in 256 µg/ml IC<sub>50</sub> değeriyle yeşil çay ekstraktları tarafından inhibe edildiği tespit edilmiştir. Katekinler yeşil çay ekstraktlarının ana bileşenleridir burada epigallokatekin 3-galat diğer katekin testlerinden daha kuvvetli bir inhibisyon etkisi göstermiştir (Wang *et al.* 2008). Yeşil çayın biyolojik aktivitelerinin büyük çoğunluğundan flavanoid içeriği sorumludur. Çayda bulunan flavanoidlerin büyük kısmı flavanol olan katekinlerdir. Katekinler çayın kuru ağırlığının %25-35'ini oluşturmaktadır ve suda çözünen renksiz bileşiklerdir. Katekinler biyolojik sistemlerde antioksidan etkiye sahiptirler. EGCG, singlet oksijen, süperoksit anyon radikali (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>),

peroksil radikali, hidroksil radikalinin ( $\text{OH}\cdot$ ) dahil olduğu çok geniş bir ROS süpürücü etki göstermektedir. Yapısındaki C halkasında gallat grubunun varlığı ve daha fazla hidroksil grubu içermesi EGCG'a daha etkin antioksidan işlev kazandırmaktadır (Koza 1993).

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerden EDTA, DTNB (5,5<sup>1</sup> Dithiobis (2 Nitro Benzoik Asit), DTT, Potasyum Fosfat, NADPH, Etanol, Poliakrilamid Jel, Coomassie Brilliant blue, Sodyum Dodesil Sülfat, Sodyum Asetat, Tris, 2',5' ADP Sepharose 4B, Katı amonyum Sülfat Sigmadan; sğır serum albümin, hidrojen klorür, NADP<sup>+</sup>, sodyum klorür, sodyum hidroksit, fosforik asit, akrilamid, bisakrilamid, amonyum persülfat, glisin, brom timol mavisi, gliserin,  $\beta$ -merkaptöetanol, sodyum tiyosülfat, glutalaldehit, gümüş nitrat, formaldehit, sodyum karbonat, asetik asit, potasyum klorür ve diğer kimyasal maddeler Atatürk Üniversitesi Biyokimya araştırma laboratuvarından temin edilmiştir.

##### 3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar

Çalışmalar esnasında aşağıdaki alet ve cihazlardan faydalanılmıştır.

Soğutmalı satrifüj	: Hermle Z 323 K(Germany)
Ultrasatrifüj	: Beackman Coulter (Optima LE-SOK Ultracentrifuge)
Spektrofotometre	: Beckman Coultur
pH metre	: Schott pH-Meter CG840
Elektroforez tankı	: BIO RAD (dikey)
Peristaltik pompa	: Ismatec
Karıştırıcı (Shaker)	: GFL 3025
Karıştırıcı (Vorteks)	: Fisons Whirlimixer
Hassas terazi	: Gec Avery

Afinite kolonu	: Kapalı sistem oluşturucu ve soğutmalı (1x10), sigma (ABD)
Otomatik pipet	: Eppendorf
Çalkalayıcı	: Midi Dual 14
Magnetik karıştırıcı	: Chiltern Hotplate Magnetic Stirrer HSBI
Saf su cihazı	: Barnstead Easy Pure UV/UF
Su banyosu	: Nüve
Kar makinesi	: Scotsman AF-20
Güç kaynağı	: 1-Bio Rad Power Pac 3000 2-Apparatus Corporation EC 135
Buzdolapları	: Siemens
Derindondurucu	
(-20°C'ye kadar)	: Sanyo Medical Freezer
(-85°C'ye kadar)	: Sanyo Ultra Low

### 3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

#### Aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler:

1. 100 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH: 7,0) /10 mM EDTA: 6,8 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ve 1,46 g EDTA tartılarak 90 ml saf suda çözüldü, pH 7'ye ayarlandı ve toplam hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.
2. 0,2 mM NADPH çözeltisi: NADPH dan 0,0083 g tartılarak bir miktar saf suda çözüldü, hacim saf su ile 5 ml'ye tamamlandı.
3. 0,2 mg/ml sığır serum albümin çözeltisi: 1 mg sığır serum albümin alınarak hacim saf su ile 5 ml'ye tamamlandı.
4. %1'lik etanol çözeltisi: %95'lik etanolden 1,05 ml alınarak hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.
5. 5 mM DTNB çözeltisi: 0,0991g DTNB tartılarak üzerine %98'lik etanolden 5 ml ilave edildi. Vortekslenerek iyice çözünmesi sağlandı.

**Gökkuşağı alabalığı karaciğer dokusundan homojenat hazırlanmasında kullanılan çözelti:**

1. 50 mM Tris/ HCl (pH: 7,5) / 1 mM EDTA / 1 mM DTT: 6,055 g Tris, 0,292 g EDTA ve 0,154 g DTT tartılarak 900 ml saf suda çözüldü. pH HCl ile 7,5'a ayarlandıktan sonra hacmi saf suyla 1L'ye tamamlandı.

**Afinite kolonunda kullanılan çözeltiler:**

1. Afinite kolonunun dengelenmesinde kullanılan çözelti: (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA pH 7,4): 2,422 g Tris, 0,5845 g EDTA tartılarak 1900 ml saf suda çözüldü HCl ile pH 7,4'e ayarlanarak toplam hacim saf su ile 2 litreye tamamlandı.

2. Afinite kolonundan enzimin elüsyonu için kullanılan çözelti: 20 ml enzim için 5 farklı konsantrasyonda NADP<sup>+</sup> çözeltisi kullanıldı. 2 şer ml lik 2 mM, 4 mM, 6 mM, 8 mM ve 10 mM lık NADP<sup>+</sup> çözeltileri hazırlandı.

3. Afinite kolonunun rejenerasyonunda kullanılan I. çözelti: (0,1 M Tris/HCl, 0,5 M NaCl, pH 8,5): 3,03 g Tris ve 7,30 g NaCl tartılarak 200 ml saf suda çözüldü. HCl ile pH sı 8,5 e ayarlandıktan sonra hacmi saf suyla 250 ml'ye tamamlandı.

4. Afinite kolonunun rejenerasyonunda kullanılan II. çözelti: (0,1 M Sodyum asetat, 0,5 M NaCl, pH 4,5): 2,05 g sodyum asetat ve 7,30 g NaCl tartılarak 200 ml saf suda çözüldü. pH sı 4,5 e ayarlandıktan sonra hacmi saf suyla 250 ml'ye tamamlandı.

**Bradford yöntemiyle protein tayini için kullanılan çözelti:**

Coommassie Brilliant Blue çözeltisi: 100 mg Coommassie Brilliant Blue G-250 reaktifi 50 ml %95'lik etanolde çözüldü. Çözeltiye %95'lik 100 ml fosforik asit ilave edildi. Çözeltinin hacmi saf su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti karanlık ortamda muhafaza edildi.

**Elektroforez için kullanılan çözeltiler:**

1. 1 M Tris-HCl (pH 8,8): 12,11 g Tris tartılarak 80 ml saf suda çözüldü, pH'sı HCl ile 8,8'e ayarlandıktan sonra toplam hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.
2. 1 M Tris-HCl (pH 6,8): 12,11 g Tris tartılarak 80 ml saf suda çözüldü, pH'sı HCl ile 6,8'e ayarlandıktan sonra toplam hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.
3. %30 Akrlamid-%0,8 Bisakrlamid çözeltisi: 15 g akrilamid, 0,4 g bisakrlamid ve 34,6 g saf su karıştırılarak çözüldü.
4. %10'luk amonyum persulfat çözeltisi: 1 g amonyum persulfat tartılarak 9 g saf suda çözüldü.
5. %10'luk SDS: 1 g SDS 9 g saf suda çözülerek elde edildi.
6. Yürütme tamponu: 1,51 g Tris ve 7,51 g glisin tartılarak 450 ml saf suda çözüldü. %10'luk SDS'den 5 ml ilave edildi, pH 8,3'e ayarlandı ve toplam hacim saf su ile 500 ml'ye tamamlandı.
7. %0,04'lük brom timol mavisi çözeltisi: 0,1 g indikatör 0,01 M 16 ml NaOH içerisinde çözüldü ve toplam hacim saf suyla 250 ml'ye tamamlandı.
8. Numune tamponu: 1 M Tris-HCl (pH 8)'den 0,5 ml, %10'luk SDS'den 1 ml, %100'lük gliserinden 1 ml ve %0,1'lik bromtimol mavisinden 1 ml alınarak saf suyla 10 ml'ye tamamlandı. Bu tampona kullanılmadan önce 950 µl numune tamponundan 50 µl olacak şekilde β-merkaptoetanol ilave edildi.

**Gümüş Boyamada Kullanılan Çözelti:**

1. Tespit çözeltisi: 60 ml saf su, 30 ml %96'lik etanol, 10 ml asetik asit
2. Redüksiyon çözeltisi: 4,8 g Sodyum asetat, 45 ml Etanol ve 80 ml saf su karıştırıldı, pH 6'ya asetik asitle ayarlandıktan sonra 150 mg sodyum tiyosulfat, 3 ml glutalaldehit eklenip hacim saf su ile 150 ml'ye tamamlandı.
3. Boyama çözeltisi: 150 mg gümüş nitrat 150 ml saf suda çözüldü üzerine 30 µl formaldehit eklendi.
4. Yıkama Çözeltisi 1: 3,75 g sodyum karbonat 270 ml saf suda çözüldü ve üzerine 120 µl formaldehit eklendi.



5. Yıkama çözeltisi 2: 150 ml saf su içerisinde 12,5 ml %5'lik asetik asit, 1 ml gliserin konarak hacim saf suyla 250 ml'ye tamamlandı.

### **Jel filtrasyon kromatografisinde kullanılan çözeltiler**

1. 50 mM Tris-HCl, 100 mM KCl pH 7,5 (kolonun paketlenmesi, dengelenmesi ve standartların çözülmesi için kullanılan tampon): 6,055 g Tris, 7,45 g KCl alınarak 950 ml saf suda çözüldü. pH 7,5'e ayarlandıktan sonra toplam hacim saf su ile 1 L'ye tamamlandı.

### **Çalışmamızda kullanılan metal çözeltiler**

0,1 M  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  çözeltisi: 0,241 gr  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  tartılıp hacmi saf suyla 10 ml ye tamamlandı.

0,1 M  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$  çözeltisi: 0,183 gr  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$  alınıp hacmi saf suyla 10 ml ye tamamlandı.

0,1 M  $\text{FeCl}_3$  çözeltisi: 0,162 gr  $\text{FeCl}_3$  tartılıp hacmi saf suyla 10 ml ye tamamlandı.

0,1 M  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  çözeltisi: 0,249 gr  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  tartılıp hacmi saf suyla 10 ml ye tamamlandı.

0,1 M  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  çözeltisi: 0,237 gr  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  tartılıp hacmi saf suyla 10 ml ye tamamlandı.

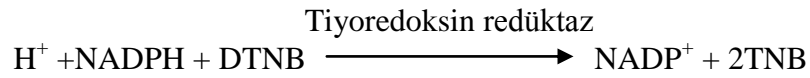
0,1 M  $\text{SeO}_2$  çözeltisi: 0,111 gr  $\text{SeO}_2$  tartılıp hacmi saf suyla 10 ml ye tamamlandı.

## **3.2. Yöntemler**

### **3.2.1. Tiyoredoksin redüktaz enziminin aktivite ölçümü**

Tiyoredoksin redüktaz enziminin aktivitesi ölçülürken Holmgren 1977'nin belirlediği yöntem kullanıldı. Bu yöntemde tiyoredoksin redüktaz enziminin NADPH bağımlı

olarak DTNB'deki disülfid bağlarının redüksiyonunu katalizlemesi esas alındı (Holmgren 1977). Deneyde 100 mM potasyum fosfat, pH 7'de, 10 mM EDTA, 0,2 mM NADPH, 0,2 mg/ml sığır serum albümin, %1 etanol ve 5 mM DTNB karışıma eklendi. 1000 µl'lik küvetteki karışıma enzim (1-50µl), eklendi (Çizelge 3.1) ve 412 nm'de absorbans artışı her 60 saniyede bir 3 dakika boyunca ölçüldü. Çalışmada aktivite ölçümleri 25°C'de gerçekleştirildi. Daha sonra Lambert-Beer denklemi kullanılarak 1 dakikada harcanan NADPH miktarı belirlendi.



**Çizelge 3.1.** Tiyoredoksin redüktaz enziminin aktivite ölçüm prosedürü

	Numune (µl)	Kör (µl)
<b>100 mM K-Fosfat/10 mM EDTA tamponu</b>	200	200
<b>%1'lik Etanol</b>	100	100
<b>Sığır Serum Albumin</b>	100	100
<b>Enzim çözeltisi</b>	50	-
<b>Saf su</b>	350	400
<b>NADPH</b>	100	100
<b>DTNB</b>	100	100

$$\text{EÜ/ml} = \frac{[(\Delta_{412}/\text{min Num} - \Delta_{412}/\text{min Kör}) / 3] (1) (df)}{(13,6) V_e} \times 1/2$$

1= Toplam hacim (ml)

df= Seyreltme faktörü

(13,6)= Ekstriksiyon katsayısı

$V_e$  = kullanılan enzim miktarı (ml)

### **3.2.2. Protein tayini**

#### **3.2.2.a. Kalitatif protein tayini**

Kalitatif protein tayini, 280 nm'de proteinlerin yapısında bulunan triptofan, trozin ve fenilalanin amino asitlerinin maksimum absorbands göstermesi esasına dayanır (Segel 1968). Jel filtrasyon kromatografisinden sonra elüe edilen standart proteinlerde kalitatif protein tayini yapıldı. Fraksiyonlar kuvarz küvetlere alınarak, absorbandsları spektrofotometrede köre karşı okundu.

#### **3.2.2.b. Bradford yöntemiyle protein tayini**

Hazırlanan homojenat ve 2',5' ADP-Sepharose 4B afinite kromatografisi yöntemiyle saflaştırılmış enzim için kantitatif protein miktarı Bradford (1976) metoduna göre belirlendi. Bu yöntemde boya olarak Coomassie Brilliant Blue G-250 kullanılır, bu boya negatif bir yüke sahiptir ve protein üzerindeki pozitif yüke bağlanır. Boyanın kırmızı ( $\lambda_{max}=465$  nm) ve mavi ( $\lambda_{max}=595$  nm) formu mevcuttur. Proteinin bağlanması, kırmızı formun mavi forma dönüşümünü sağlar. Bu yöntemin bozucu faktörlere karşı hassasiyeti oldukça azdır (1-100  $\mu$ g arası). Reaksiyon yüksek oranda tekrarlanabilir ve hızlı cereyan eder, iki dakikada tamamlanır. Tayin işlemleri şu prosedüre göre gerçekleştirildi: 1 ml'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albumin çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100  $\mu$ l kondu. Saf su ile bütün tüplerin hacmi 0,1 ml'ye tamamlandı ve 5 ml Coomessie brilliant blue G-250 çözeltisi ilave edilerek vorteks ile karıştırıldı. 10 dakika inkübe edildikten sonra 595 nm'de 3 ml'lik küvetlerde köre karşı absorbands değerleri okundu. Kör olarak, 0,1 ml enzim numunesinin içinde bulunduğu tampondan ve 5 ml Coomessie brilliant blue G-250 çözeltisinden oluşan karışım kullanıldı. Elde edilen sonuçlardan absorbands değerlerine karşılık gelen  $\mu$ g protein değerleri standart grafik haline getirildi. Saflaştırmanın her aşamasında ortamdaki protein miktarını belirlemek için enzim numuneleri 20 kat veya daha çok seyreltme yapılarak elde edilen seyreltilmiş çözeltisinden 3 ayrı tüpe sırasıyla 50, 100 ve 200  $\mu$ l alınarak üzerlerine 5'er ml renklendirme reaktifi eklendi. Vorteks ile

karıştırıldıktan sonra 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Sonra 595 nm’de absorbans değerleri okundu. Bu işlem 3 defa tekrarlanarak 3 ayrı ölçümün aritmetik ortalaması alınıp standart grafikten protein miktarları belirlendi.

### **3.2.3. Gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondriyal tiyoredoksin redüktaz enziminin saflaştırılması**

#### **3.2.3.a. Gökkuşığı alabalığı karaciğerinden homojenat hazırlanması**

Homojenat hazırlamak için gökkuşığı alabalığı karaciğeri (40 g) bıçak yardımıyla küçük parçalara ayrıldı. Parçalanmış karaciğer, ultratüraks ile homojenize edildi. Üzerine 120 ml 0,05 M Tris HCl (pH 7,5) ve içerisinde 0,1 M DTT ihtiva eden homojenat tamponu ilave edilerek süspansiyon edildi. Karaciğer mitokondri organeli elde edebilmek için gradientli santrifüj yapıldı. Öncelikle 6000xg’de 30 dk santrifüj yapıp elde edilen süpernatant 22000xg’de 30 dk santrifüj edildi. Çökelek homojenat tamponuna alınarak 22000xg’de 30 dk santrifüj yapıldı. Çökelek 3 defa 20’şer saniyelik periyotlarla sonikatore konuldu. Sonikatore parçalanmış çökelek 24000xg’de 30 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant diğer saflaştırma basamaklarında kullanılmak üzere +4°C’de muhafaza edildi.

#### **3.2.3.b. 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonunun hazırlanması ve gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondriyal tiyoredoksin redüktaz enziminin saflaştırılması**

10 ml’lik yatak hacmi için 2 g kuru 2',5'-ADP Sepharose 4B jeli tartularak, 400 ml destile su ile katı maddelerin uzaklaştırılması için birkaç defa yıkandı. Yıkama esnasında jel şişirilmiş oldu. Şişirilmiş jelin havası su trompu kullanılarak vakum ile alındı ve daha sonra dengeleme tamponu ilave edilerek jel süspansiyon edildi. Süspansiyon edilmiş jel, 1x10 cm’lik kapalı sistemden oluşan soğutmalı kolona paketlenildi. Jel çöktükten sonra peristaltik pompa yardımıyla dengeleme tamponu ile yıkanarak kolon dengelendi. Kolonun dengelenmiş olduğu elüat ile tampon çözeltide 280 nm’de absorbanslarının ve pH’larının eşitlenmesinden anlaşıldı. Böylece afinite kolonu

hazırlanmış oldu. Bölüm 3.2.3.a'da anlatıldığı şekilde hazırlanan homojenat kolona yüklendi. Kolon örnek numune geçişi tamamlandıktan sonra dengeleme tamponu ile 280 nm'de absorbans farkı görmeyinceye kadar yıkandı. Yıkma işlemi tamamlandıktan sonra sırasıyla 2 mM NADP<sup>+</sup>, 4 mM NADP<sup>+</sup>, 6 mM NADP<sup>+</sup>, 8 mM NADP<sup>+</sup>, 10 mM NADP<sup>+</sup> çözeltilerinden 2'şer ml kullanılarak basamaklı elüsyon işlemi gerçekleştirildi. Elüatlar 0,5 ml olarak toplandı. Toplanan elüatlarda Bölüm 3.2.1.'de anlatıldığı gibi enzim aktivitesi bakıldı.

#### **3.2.4. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzim saflığının kontrolü**

Enzim saflaştırıldıktan sonra %3-10 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) Laemmli (1970) metoduna göre yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi. Bunun için elektroforez plakaları önce su ile iyice yıkandı. Her iki kenarında aralık oluşturucu bir plaka ile düz bir plaka üst üste getirilerek kısaçaklarla tutturuldu. Ayırma jeli hazırlanarak sabitleştirilen plakalar arasına enjektörle üst kesimde 0,5 cm kalıncaya kadar dolduruldu. Belli bir süre jelin donması beklendi, ayırma jelinin katılaştığından emin olunduktan sonra yığma jeli hazırlandı. Numune kuyucuklarının oluşması için tarak dikkatlice yerleştirildi. Yığma jelinin katılması beklenirken ıslatılmış süzgeç kağıdı sistemin üzerine kapatılacak ve kuruması önlenildi. Yığma jeli katılaştıktan sonra tarak dikkatlice çıkartılarak numune kuyuları belirlendi. Önce saf su, sonra da yürütme tamponuyla yıkandı ve jel plakalarla birlikte elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu dolduruldu. Enzim örnekleri kuyulara toplam hacim 50 µl olacak şekilde eklendi. Elektroforez tankı kapatılarak alt tarafından (+) anot, üst taraftan ise (-) katot yerleştirildi. Önce 80 voltta 20 dakika yürütüldü ve örnek ayırma jeline kadar gelip yığıldı. Sonra akım 120 volta çıkartılarak numunelerin jelin alt sınırına gelmesine kadar yürütüldü. Numunelerin takip edilmesi, numune tamponuna katılan brom timol mavisi yardımıyla anlaşıldı. Yürütme işlemi bittikten sonra akım kesilerek plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı ve sabitleştirme çözeltilisine konuldu. Sabitleştirme çözeltilisinde 20 dakika bekletilen jel, çıkarılarak boyama çözeltilisine konuldu ve çalkalayıcı üzerinde

2 saat bekletildi. Jel boyandıktan sonra çıkarılarak yıkama çözeltisine konuldu. Rengi açılıp, protein bantları belirginleşene kadar çalkalayıcı üzerinde yıkanan jel çıkarılarak fotoğrafı çekildi.

Ayrırma jeli şöyle hazırlandı: 5 ml 1 M Tris-HCl (pH 8,8), 4,4 ml %30 akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 0,2 ml %10'luk SDS, 0,130 ml %5'lik TEMED, 0,2 ml %10''luk PER ve 3,13 ml saf su karıştırıldı.

Yığıma jeli şöyle hazırlandı: 0,41 ml 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,4 ml %30 akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 0,030 ml %10'luk SDS, 0,03 ml %5'lik TEMED, 0,05 ml %10'luk PER ve 2,45 ml saf su karıştırılacak. PER çözeltisi taze hazırlandı.

Elektroforez bittikten sonra cam plaklardan çıkartılan jeller 30 dakika karıştırıcıda tespit çözeltisiyle muamele edildi. Daha sonra 30 dakikada redüksiyon çözeltisiyle karıştırıcıda bekletildi. Bu süre sonunda jeller 3'er defa saf su ile iyice yıkandı. Daha sonra 20 dakika gümüş nitrat çözeltisiyle karıştırıcının üstünde boyandı. Bu boya kısa bir süre önce hazırlanıp karanlıkta bekletildi. Banyo çözeltisiyle kısa ve çabukça yıkayıp siyahlaşan sıvı döküldü. Bantlar görülünce jel karıştırıcının üstünde 1 ml gliserin ve 250 ml %5'lik asetik asitten oluşan çözeltiyle iyice yıkandı.

### **3.2.5. Gökkuşuğu alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enzimi için karakterizasyon çalışmaları**

#### **3.2.5.a. Sephadexs G-150 jel filtrasyon kromatografisi kolonunun hazırlanması ve gökkuşuğu alabalığı karaciğer mitokondriyal tiyoredoksin redüktaz enziminin molekül kütlesinin tayini**

Jel filtrasyon kromatografisi ile molekül kütlelerinin tayini için önceden 40 ml yatak hacmi elde etmek için 3 g Sephadexs G-150, 500 ml saf su içine alındı. 90°C'de su banyosunda bekletilerek polimer materyal (Sephadexs G-150) şişirildi. Şişirilmiş materyalin içindeki hava, su trompu kullanılarak vakumla uzaklaştırıldı. Şişirilmiş ve

havası uzaklaştırılmış polimer materyali 50 mM Tris-HCl, 100 mM KCl pH 7,5 tamponuyla dolu kolona, içinde hava kabarcığı kalmayacak şekilde paketlenerek aynı tamponla dengeleme işlemi yapıldı. Kolonun dengelendiğini tespit etmek için, üstten ilave edilen tamponla alttan alınan tamponun pH ve 280 nm'de absorban değerleri aralıklarla ölçüldü ve bu değer aynı oluncaya kadar dengeleme işlemine devam edildi. Kolonun akış hızı 3 ml/h olarak ayarlandı. Gökkuşuğu alabalığı karaciğer mitokondriyal tiyoredoksin redüktaz enziminin molekül kütlesi tayininde kullanılacak olan standart grafiği elde edebilmek için kolondan önce standart proteinler geçirildi.

Elüsyon hacmi için dengelenen kolonun, jel üzerindeki tampon çözeltisi jel seviyesine indirildi. Kolona her bir protein çözeltisinden 2 ml tatbik edildi. Kolona uygulanan protein çözeltisi jel tarafından tamamen emildikten sonra üzerine birkaç ml elüsyon tamponu 50 mM Tris-HCl, 100 mM KCl (pH 7,5) ilave edilerek tekrar jele emdirildi. Daha sonra kolonun üstü elüsyon tamponuyla doldurularak, elüatlar 1'er ml olacak şekilde tüplere toplandı. Elüsyon tamponu kör olarak kullanılacak ve toplanan elüatların 280 nm'de absorbanları ölçülerek kaydedildi. Elüsyon işlemine 280 nm'deki absorban değerleri 0 oluncaya kadar devam edildi. Enzim elüe edilirken tüplerde 412 nm'de aktivite ölçümleri yapıldı. 280 nm'de kalitatif ölçüm için alınan absorban değerleri tüp sayısına karşı grafiğe geçirildi. Daha sonra enzimin molekül kütlesini belirlemek için her bir protein için ayrı ayrı  $K_{av}$  değerleri ve  $\text{Log } M_K$  değerleri hesaplandı.  $\text{Log } M_K$ - $K_{av}$  grafiği bilgisayarda çizildi. Son olarak gökkuşuğu alabalığı karaciğer mitokondriyal Tiyoredoksin Redüktaz enziminin  $K_{av}$  değeri belirlenerek grafik vasıtasıyla enzimin doğal halinin molekül kütlesi hesaplandı.

Aşağıdaki formül kullanılarak  $K_{av}$  değeri hesaplandı ve  $\text{Log } M_K$ - $K_{av}$  grafiği çizildi.

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_T - V_0}$$

$V_0$ = void hacim,  $V_e$ = elüsyon,  $V_T$ = kolon yatak hacmi

### 3.2.5.b. Gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enziminin alt birimlerinin molekül kütlelerinin SDS-PAGE ile tayini

Laemmli (1970), metoduna göre molekül kütlesi tayini şu şekilde yapıldı; standart protein olarak, 120 kDa, 85 kDa, 50 kDa, 35 kDa, 20 kDa'lık proteinler kullanıldı. Gökkuşığı alabalık karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enzimi için gerçekleştirilen elektroforez işlemlerinden sonra standart proteinlerin  $R_f$  değerleri hesaplanarak  $R_f$ -log  $M_K$  grafiği çizildi. Daha sonra balık karaciğerinden elde edilen TrxR enziminin alt birimlerinin  $R_f$  değeri hesaplandı ve standart grafikte yerine konularak log  $M_K$ 'sı belirlendi. Bu değerlerin antilogaritması alınarak numunenin molekül kütlesi tespit edildi. Proteinlerin  $R_f$  değerleri;

$$R_f = \frac{X_e}{X_{boya}}$$

formülü kullanılarak belirlendi.

$X_e$  = Proteinin yürüme mesafesi

$X_{boya}$  = Boyanın yürüme mesafesi

### 3.2.5.c. Gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enzimi için optimum pH bulunmasına yönelik çalışmalar

Gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enziminin optimum pH'sını belirlemek amacıyla pH'sı 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0 olan 0,1 M fosfat tamponu, pH'sı 7,5, 8,0, 8,5 9,0 olan 0,1 M Tris-HCl tamponu hazırlandı. Her bir tamponda ayrı ayrı enzim aktivitesi bakıldı.



#### **3.2.5.d. Gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enzimi için optimum iyonik şiddetin belirlenmesine yönelik çalışmalar**

Gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enziminin optimum aktivite gösterdiği iyonik şiddetin belirlenmesi amacıyla optimum pH belirlendikten sonra optimum pH'da 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 mM'lık fosfat tamponları hazırlandı. Her bir tampon konsantrasyonunda ayrı ayrı enzim aktivitesine bakıldı.

#### **3.2.5.e. Gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enzimi için optimum sıcaklığın belirlenmesine yönelik çalışmalar**

Gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla ısıtılmalı soğutmalı su banyosu kullanıldı. Aktivite ölçümü için gerekli olan tampon ve substratları ihtiva eden karışım kuvvet içerisinde ilgili sıcaklığa ayarlı su banyosunda bekletildi. 0°C ile 80°C arasında 10 ar °C aralıklarla aktivite ölçümü yapıldı.

#### **3.2.5.f. Gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enzimi için stabil pH bulunmasına yönelik çalışmalar**

Enzimin stabil olduğu pH'yı tespit etmek için pH'ları 7,5, 8,0, 8,5 ve 9,0 olan Tris-HCl ve pH'ları 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 ve 8,0 olan fosfat tamponları kullanıldı. Belirtilen pH'lardaki tampon çözeltilerinin 1 ml si 0,5 ml enzim çözeltisi karıştırılarak +4°C'de muhafaza edildi. 5 gün boyunca 24 saat arayla yapılan aktivite ölçümünde enzimin stabil olduğu pH belirlendi.

### **3.2.5.g. NADPH ve DTNB substratları için $K_M$ sabiti, $V_{max}$ , turnover sayısı ( $k_{cat}$ ) özgülük sabitinin ( $V_0$ ) değerlerinin bulunmasına yönelik çalışmalar**

Gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondriyal tiyoredoksin redüktaz enziminin DTNB ve NADPH substratları için  $K_M$  sabitleri ve  $V_{max}$  değerlerini belirlemek için sabit DTNB konsantrasyonunda NADPH'ın 5 farklı konsantrasyonlarıyla aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen değerlerle Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Bu grafikten yararlanarak NADPH için  $K_M$  sabiti ve  $V_{max}$  değerleri belirlendi. Aynı şekilde NADPH'ın sabit konsantrasyonunda DTNB'nin 5 farklı konsantrasyonlarıyla aktivite ölçümleri yapılarak Lineweaver-Burk grafiği oluşturuldu ve DTNB için  $K_M$  sabiti ve  $V_{max}$  değerleri hesaplandı. Aktivite ölçümleri optimal şartlarda gerçekleştirildi (Lineweaver and Burk 1934).

### **3.2.6. Gökkuşığı alabalığı karaciğerinden saflaştırılan mitokondriyal tiyoredoksin redüktaz enzimi için inhibisyon çalışmaları**

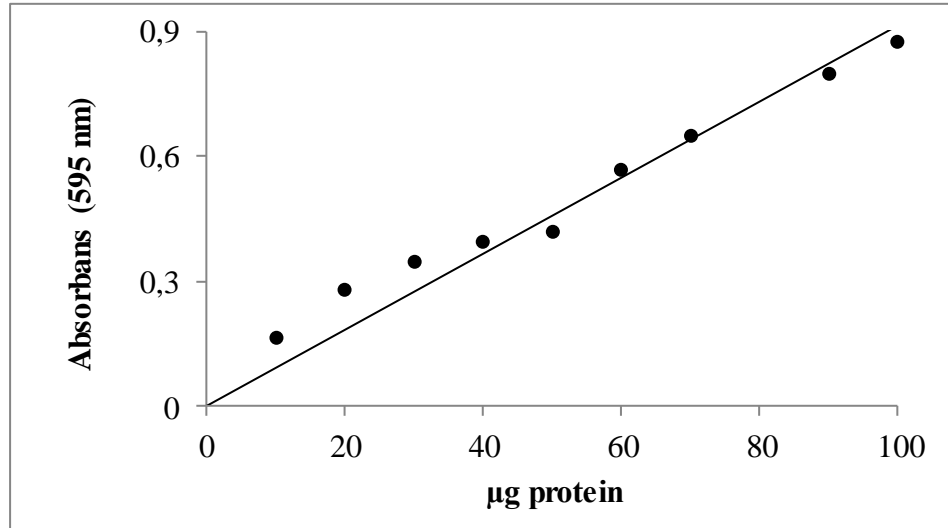
Gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enzim aktivitesi üzerine  $Al^{+3}$ ,  $Fe^{+3}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$  ve  $Se^{+4}$  metal iyonlarının inhibisyon etkisi *in vitro* şartlarda araştırıldı. Öncelikle metal iyonlarının en az 5 farklı konsantrasyonunda enzim aktivitesi ölçüldü. İnhibisyon gösteren metal iyonları için % Aktivite-[I] grafikleri çizilerek  $IC_{50}$  değerleri hesaplandı. Aktivatör etkisi gösteren  $Se^{+4}$  için ise içinde aktivasyon eğrisi çizildi.

Ayrıca inhibisyon etkisi gösteren metallerin inhibisyon tipi ve  $K_i$  sabiti üç farklı inhibitör ve beş farklı substrat konsantrasyonunda aktivite ölçülerek Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek belirlendi (Lineweaver-Burk 1934).

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik

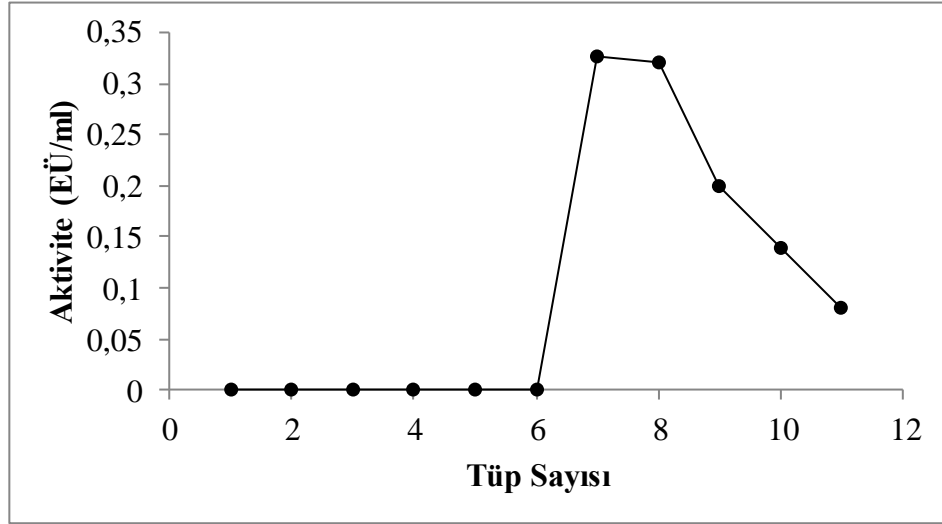
Elde ettiğimiz enzim çözeltilerindeki kantitatif protein tayini Bradford yöntemiyle belirlendi. Standart grafik Bölüm 3.2.2.b'de anlatıldığı gibi hazırlandı. Homojenat, ve afinite kromatografisi sonucu elde edilen enzim çözeltilerindeki kantitatif protein tayini bu standart grafikten faydalanılarak bulundu. Standart çözeltilerin  $\mu\text{g}$  proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 4.1'de gösterildi.



**Şekil 4.1.** Bradford yöntemiyle proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan standart grafik

### 4.2. Gökkuşığı Alabalığı Karaciğer Mitokondriyal Tiyoredoksin Redüktaz Enziminin Saflaştırması ile İlgili Sonuçlar

Hazırlanan homojenat gradientli santrifüj ve sonikatöre tabi tutulma işlemlerinden sonra 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonuna yüklendi. Daha sonra basamaklı elüsyon gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.2 ve Çizelge 4.1'de gösterildi.



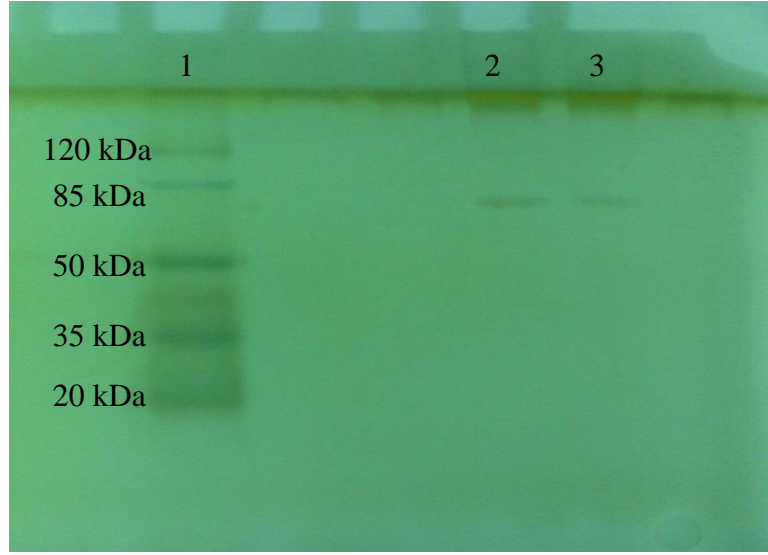
**Şekil 4.2.** Mitokondriyal TrxR' nin 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kromotografisinden elüsyon grafiği

**Çizelge 4.1.** Gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondriyal tiyoredoksin redüktaz enziminin saflaştırma basamakları

Numune Türü	Toplam Hacim (ml)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (EÜ)	Spesifik Aktivite (EÜ/mg)	% Verim	Saflaştırma Katsayısı
Homojenat	60	744,8	13,2	0,0177	100	1
2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kromotografisi	8	0,0264	0,314	11,9	2,38	672

#### 4.2.1. Gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondriyal tiyoredoksin redüktaz enziminin SDS-PAGE ile saflık kontrolü

Gökkuşığı alabalığı karaciğeri mitokondriyal tiyoredoksin redüktaz enziminin 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite sonucu elde edilen elüatlardaki enzimin saflığını kontrol etmek için SDS-PAGE kullanıldı. Bu amaçla elektroforez sistemi kurularak enzim numuneleri sırayla 20 şer ml olarak kuyulara uygulandı ve yürütüldü. Elde edilen fotoğraf Şekil 4.3'de gösterildi.



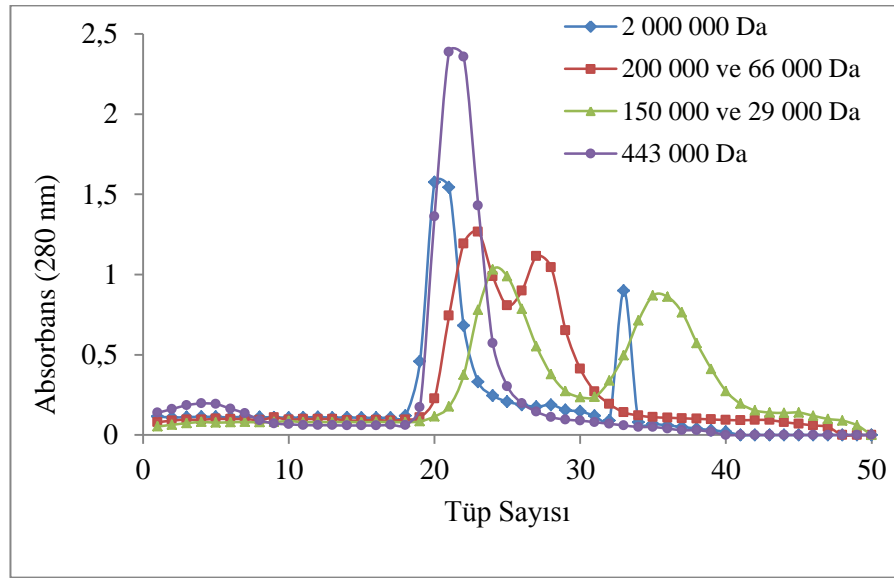
**Şekil 4.3.** 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonundan gökkuşacağı alabalığı karaciğer mitokondriyal tiyoredoksin redüktaz enziminin SDS-PAGE fotoğrafı

\*( 2. ve 3. kuyu: Afinite kolonundan alınan tiyoredoksin redüktaz enzimi, 3. kuyu: standart proteinler ( $\beta$ -galaktosidaz: 120 kDa, BSA: 85 kDa, ovalbumin: 50 kDa, CA: 35 kDa,  $\beta$ -laktoglobulin: 25 kDa, lizozim: 20 kDa) 2, 3: 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonunda elde edilen gökkuşacağı alabalığı karaciğer mitokondriyal TrxR enzimi)

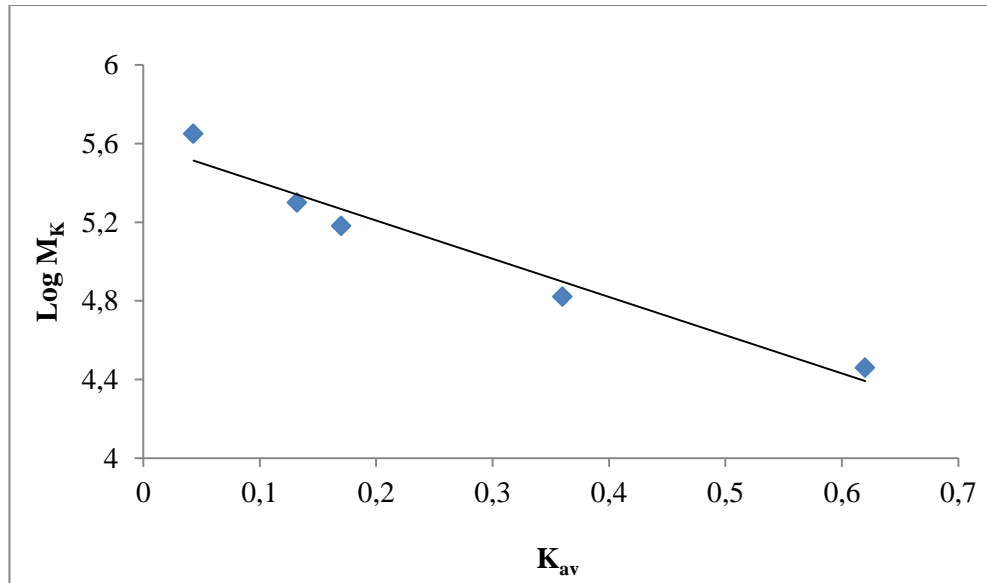
### 4.3. Gökkuşacağı Alabalığı Karaciğer Mitokondrilerinden Saflaştırılan Tiyoredoksin Redüktaz Enzimi İçin Karakterizasyon Çalışmalarından Elde Edilen Sonuçlar

#### 4.3.1. Jel filtrasyon kromatografisi ile molekül kütlesi tayinine yönelik sonuçlar

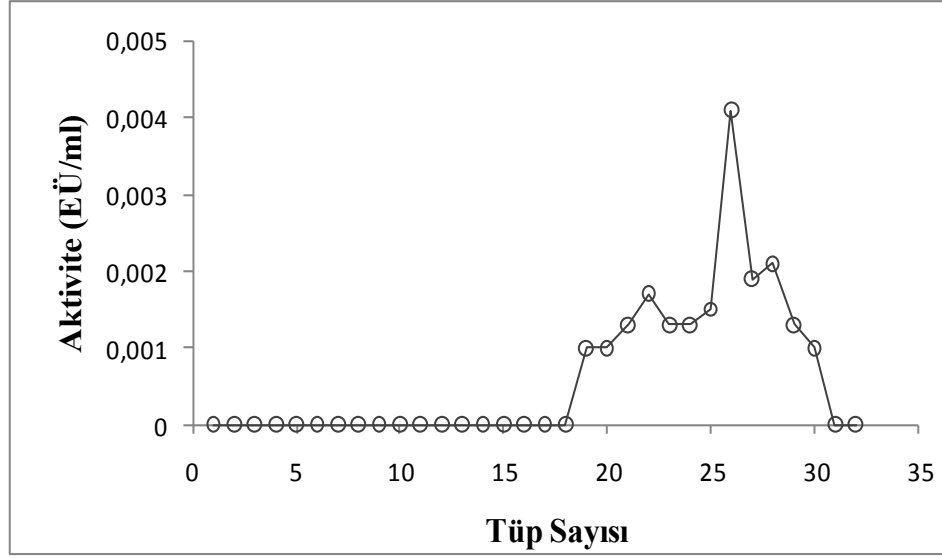
Jel filtrasyon kolonundan önce blue dekstran sonra standart proteinler daha sonra ise afinite kolonundan elüe edilen enzim çözeltisi Bölüm 3.2.5.a'da anlatıldığı şekilde yüklendi. Elüe edilen numunelerde 280 nm'de absorbans ölçümü ve TrxR'nin hem 280 nm'de absorbansı hem de 412 nm'de aktivite ölçümü yapılarak Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'deki grafik çizildi. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda Şekil 4.5'de log  $M_K$ - $K_{av}$  grafiği çizildi. Bu grafikten faydalanarak enzimin  $K_{av}$  değeri denklemde yerine konulduğunda enzimin tabii molekül kütlesi yaklaşık olarak 151 kDa olarak bulundu.



Şekil 4.4. Jel filtrasyon kolonundan alınan standart proteinlerin tüp sayısına karşılık 280 nm'deki absorban değerleri



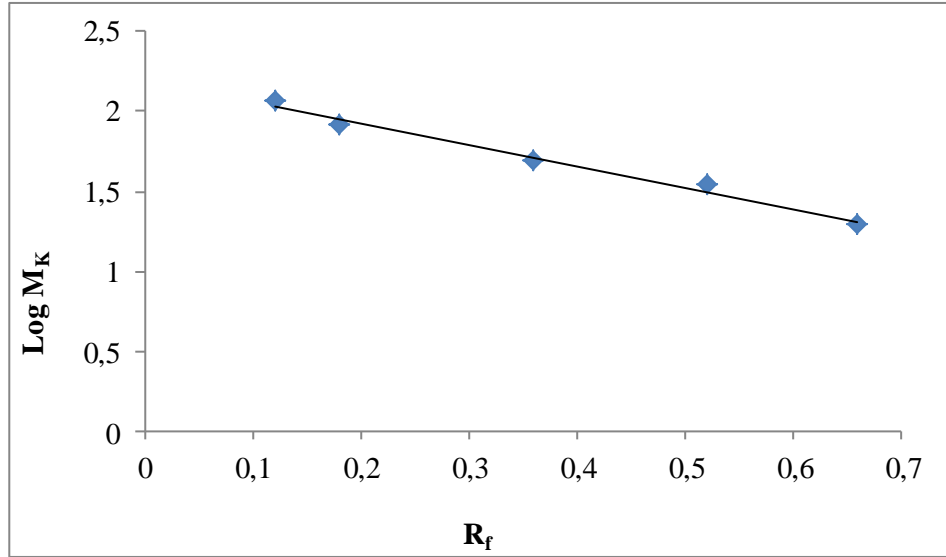
Şekil 4.5. Jel filtrasyon kromatografisi sonucu çizilen  $K_{av}$ -  $\log M_K$  grafiği



**Şekil 4.6.** Jel filtrasyon kolonundan alınan gökkuşacağı alabalığı karaciğer mitokondriyal TrxR enzimin aktivite-tüp sayısı grafiği

#### 4.3.2. Gökkuşacağı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enziminin SDS-PAGE ile molekül kütlelerinin belirlenmesine yönelik çalışma sonuçları

Elde edilen saf enzim SDS-PAGE’de yürütüldükten sonra fotoğrafı çekildi (Şekil 4.3). Standart proteinlerin ve enzimin jelde yürüdükleri mesafeler ölçülerek  $R_f$  değerleri hesaplandı.  $\log M_K - R_f$  değerleri ile grafik çizildi (Şekil 4.7). Grafikten faydalanarak gökkuşacağı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enziminin alt birimlerinin molekül kütlesi yaklaşık olarak 70 kDa olarak hesaplandı.



Şekil 4.7. SDS-PAGE sonucu çizilen  $\log M_K$ - $R_f$  grafiği

#### 4.3.3. Gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enzimi için optimum pH bulunmasına yönelik çalışma sonuçları

Gökkuşığı alabalık karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enziminin optimum pH'sını belirlemek amacıyla pH'sı 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0 olan 0.1 M fosfat tamponu, pH'sı 7,5, 8,0, 8,5 9,0 olan 0,1 M Tris-HCl tamponu hazırlandı. Her bir tamponda ayrı ayrı enzim aktivitesi bakıldı. Sonuçlar Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3'de verildi. pH değerlerine karşılık aktivite grafiği (Şekil 4.8) çizildi. Yapılan çalışmalar sonucu gökkuşığı alabalık karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enziminin optimum pH'sı 7,5 olan fosfat tamponu olarak belirlendi.

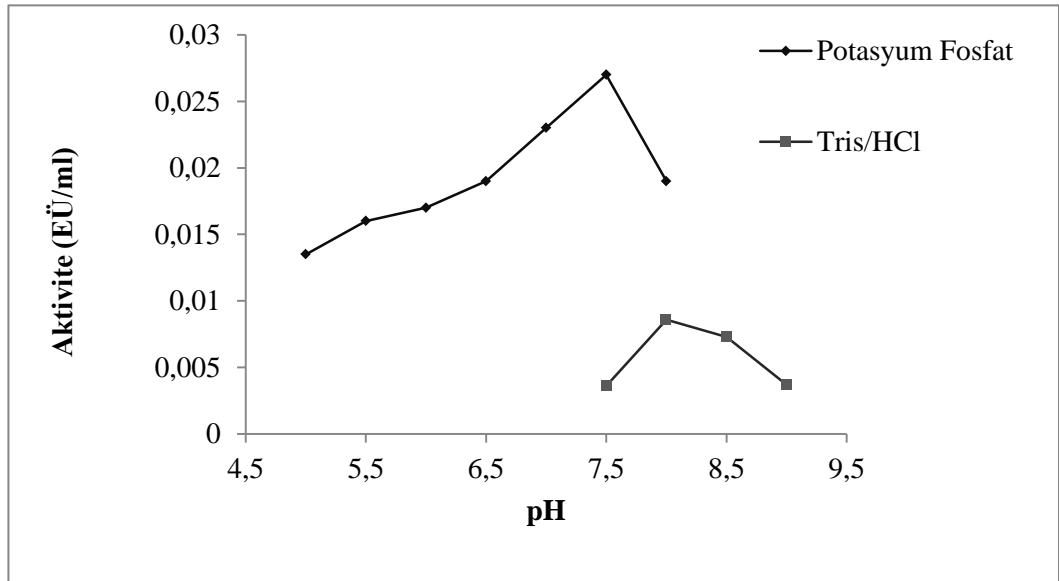


**Çizelge 4.2.** 0,1 M fosfat tamponu kullanılarak gökkuşuğu alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları

pH	Aktivite (EÜ/ml)
5,0	0,013
5,5	0,016
6,0	0,017
6,5	0,019
7,0	0,023
7,5	0,027
8,0	0,019

**Çizelge 4.3.** 0,1 M Tris-HCl tamponu kullanılarak gökkuşuğu alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları

pH	Aktivite (EÜ/ml)
7,5	0,0036
8,0	0,0086
8,5	0,0073
9,0	0,0037



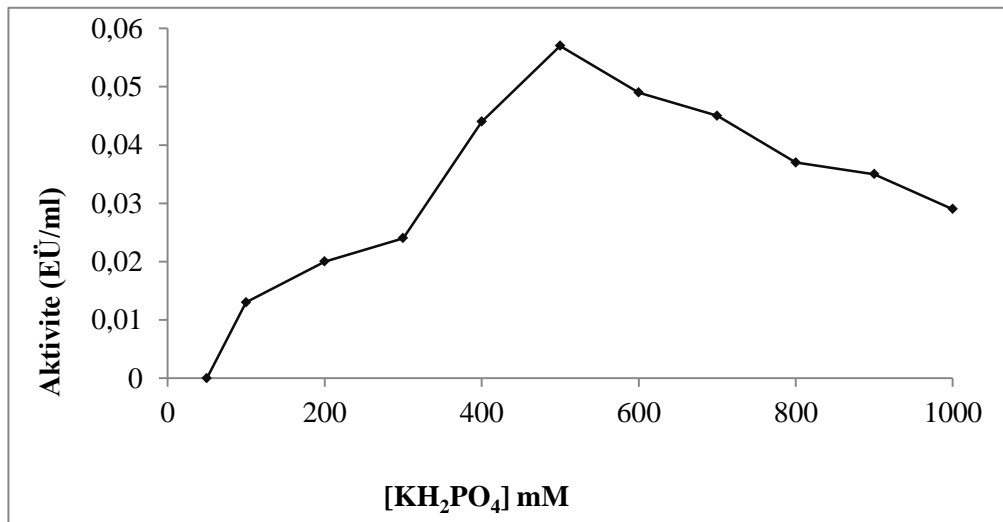
**Şekil 4.8.** Gökkuşuğu alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enziminin optimum pH'sını belirlemek için çizilen aktivite (EÜ/ml)-pH grafiği

#### 4.3.4. Gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enzimi için optimum iyonik şiddetin belirlenmesine yönelik çalışma sonuçları

Gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enziminin optimum aktivite gösterdiği iyonik şiddetinin belirlenmesi amacıyla optimum pH belirlendikten sonra optimum pH'da 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 mM'lık K-Fosfat tamponları kullanılarak belirlendi. Farklı K-fosfat konsantrasyonlarında aktivite ölçümleri yapıldı. Sonuçlar Çizelge 4.4'de ve Şekil 4.9'da verildi. Yapılan çalışmalar sonucu gökkuşığı alabalık karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enziminin optimum iyonik şiddeti 500 mM fosfat (pH 7,5) tamponu olarak tespit edildi.

**Çizelge 4.4.** Gökkuşığı alabalığı karaciğeri mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enzimini optimum iyonik şiddet için K-fosfat (pH 7,5) tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

[K-fosfat] mM	50	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000
Aktivite (EÜ/ml)	0	0,013	0,02	0,024	0,044	0,057	0,049	0,045	0,037	0,035	0,029



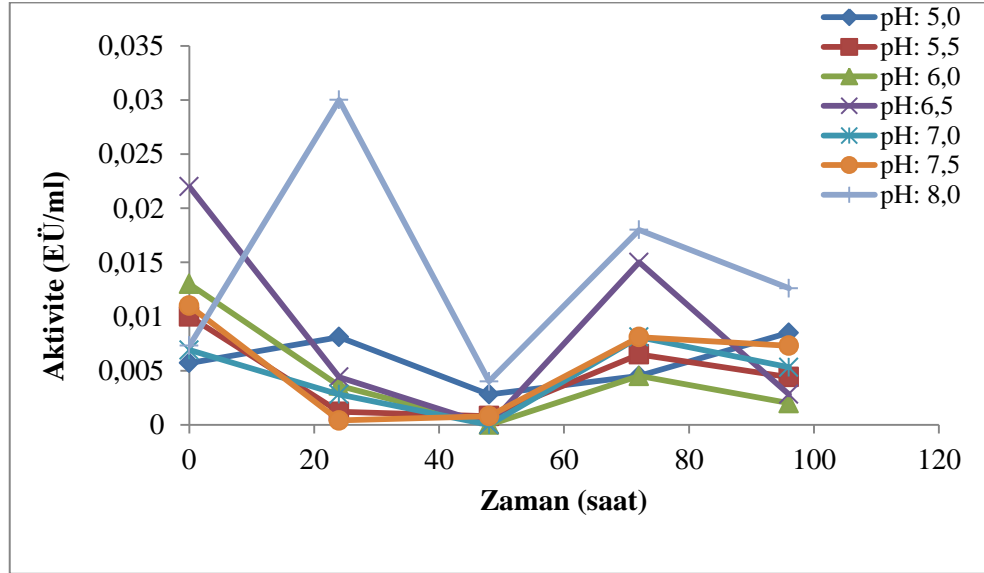
**Şekil 4.9.** Gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enziminin optimum iyonik şiddetini belirlemek için çizilen aktivite (EÜ/ml)-[KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] (mM) grafiği

#### 4.3.5. Gökkuşuğu alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enziminin stabil pH'sının belirlenmesine yönelik çalışmalar

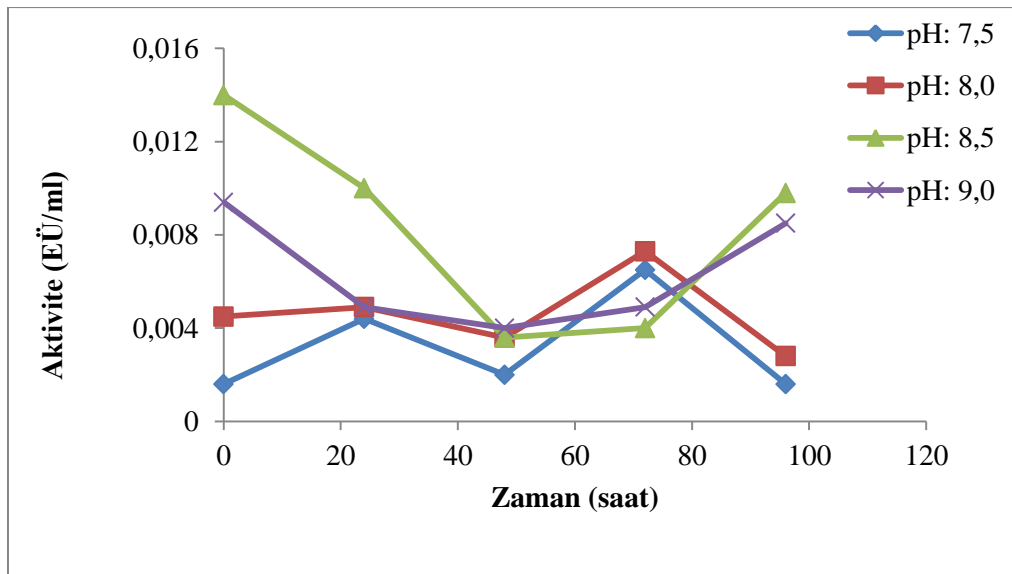
Enzimin stabil olduğu pH'yı tespit etmek için pH'sı 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0 olan 0,1 M fosfat tamponu, pH'sı 7,5, 8,0, 8,5 9,0 olan 0,1 M Tris-HCl tamponu kullanıldı. 3.2.5.e'de anlatıldığı gibi karışımlar hazırlandı. Tampon çözeltiler enzimle 1:1 oranında karıştırıldı ve 5 gün boyunca aktivite ölçümü yapıldı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.5 ve Şekil 4.11 ve Şekil 4.12'de gösterildi. Enzimin stabil olduğu pH fosfat tamponunda pH 8,0 olarak belirlendi.

**Çizelge 4.5.** Gökkuşuğu alabalığı karaciğeri mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enzimi stabil pH değerini belirlemek için K-fosfat ve Tris-HCl tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

pH		Aktivite(EÜ/ml)				
		1.gün	2.gün	3.gün	4.gün	5.gün
Fosfat Tamponu	5,0	0,0057	0,0081	0,0028	0,0045	0,0085
	5,5	0,0100	0,0012	0,0008	0,0065	0,0044
	6,0	0,0130	0,0036	0	0,0045	0,0020
	6,5	0,0220	0,0044	0	0,0150	0,0028
	7,0	0,0069	0,0028	0	0,0081	0,0053
	7,5	0,0110	0,0040	0,0008	0,0081	0,0073
	8,0	0,0073	0,3000	0,0040	0,0180	0,0126
Tris/HCl Tamponu	7,5	0,0016	0,0044	0,0002	0,0065	0,0016
	8,0	0,0045	0,0049	0,0036	0,0073	0,0028
	8,5	0,0140	0,0100	0,036	0,0040	0,0098
	9,0	0,0094	0,0049	0,0040	0,0049	0,0085



**Şekil 4.10.** Gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enzimi için farklı pH'lardaki fosfat tamponu ile belirlenen zaman-aktivite grafiği



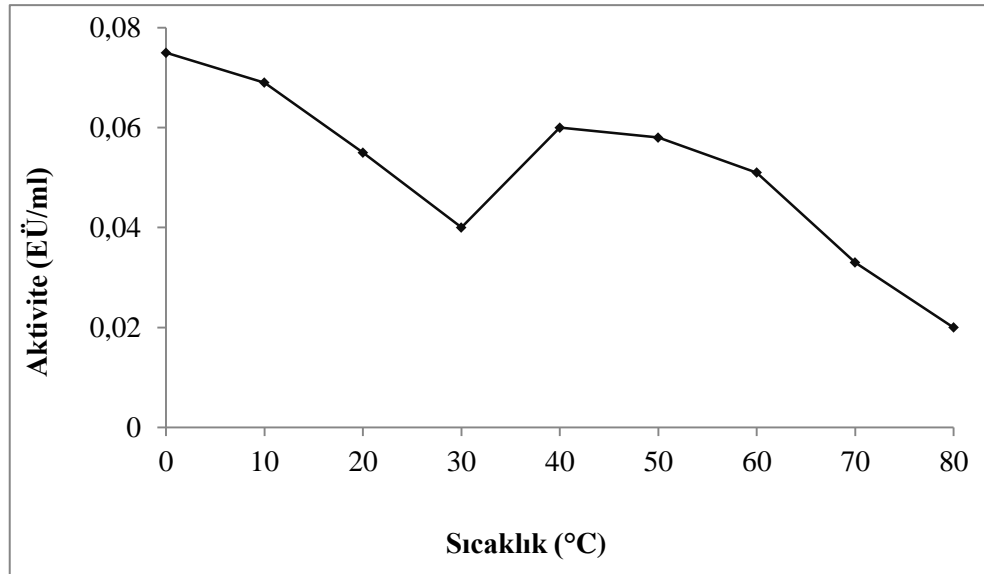
**Şekil 4.11.** Gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enzimi için farklı pH lardaki Tris-HCl tamponu ile belirlenen zaman-aktivite grafiği

#### 4.3.6. Gökkuşığı alabalık karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enzimi için optimum sıcaklığın belirlenmesine yönelik çalışma sonuçları

Gökkuşığı alabalık karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla ısıtmalı ve soğutmalı su banyosu kullanıldı. Aktivite ölçümü için gerekli olan tampon ve substratları ihtiva eden karışım küvet içersinde ilgili sıcaklığa ayarlı su banyosunda bekletildi. 0°C ile 80°C arasında 10 ar °C aralıklarla aktivite ölçümü yapıldı. Yapılan çalışmalar sonucu Gökkuşığı alabalık karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enziminin optimum sıcaklık değeri 0°C olarak belirlendi. Sonuçlar Çizelge 4.6 ve Şekil 4.13’de gösterildi.

**Çizelge 4.6.** Gökkuşığı alabalığı karaciğeri mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enziminin optimum sıcaklığı için sıcaklık aktivite ölçüm sonuçları

Sıcaklık (°C)	0	10	20	30	40	50	60	70	80
Aktivite (EÜ/ml)	0,075	0,069	0,055	0,040	0,060	0,058	0,051	0,033	0,020



**Şekil 4.12.** Gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için çizilen Aktivite (EÜ/ml)-sıcaklık (°C) grafiği

#### 4.3.7. Gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enzimi için $Q_{10}$ değerlerinin hesaplanması

Gökkuşığı alabalığı karaciğer tiyoredoksin redüktaz enziminin optimum sıcaklığı belirlendikten sonra  $Q_{10}$  değerlerinin belirlenmesi amacıyla enzim için  $10^{\circ}\text{C}$ 'lik fark olan iki aktivite değerinden yüksek olanın düşük olan aktivite değerine bölünmesi ile hesaplandı.  $Q_{10}$  değeri ise  $0,8825^{\circ}\text{C}$  olarak hesaplandı.

#### 4.3.8. NADPH ve DTNB substratları için $K_M$ sabiti, $V_{max}$ değeri, turnover sayısı ( $k_{cat}$ ) ve özgülük sabiti ( $V_0$ ) değerlerinin belirlenmesine yönelik sonuçlar

Gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enziminin NADPH ve DTNB substratları için  $K_M$  sabiti ve  $V_{max}$  değerlerini belirlemek için bölüm 3.2.5.g'de anlatıldığı gibi sabit DTNB konsantrasyonunda NADPH'ın 5 farklı konsantrasyonlarıyla aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen değerlerle  $1/V-1/[NADPH]$  Lineweaver-Burk grafiği çizildi.(Şekil 4.14) Bu grafikten yararlanarak NADPH için  $K_M$  sabiti ve  $V_{max}$  değeri değerleri belirlendi. Aynı şekilde NADPH'ın sabit konsantrasyonunda DTNB'nin 5 farklı konsantrasyonlarıyla aktivite ölçümleri yapılarak  $1/V-1/[DTNB]$ - Lineweaver-Burk grafiği oluşturuldu (Şekil 4.15) ve DTNB için  $K_M$  sabiti ve  $V_{max}$  değeri hesaplandı. Bu çalışmalar sonucunda NADPH için  $K_M$  değeri  $12,65 \mu\text{M}$  ve  $V_{max}$  değeri  $0,513 \text{ EÜ/ml}$  olarak; DTNB için ise,  $K_M$  sabiti  $0,828 \mu\text{M}$  ve  $V_{max}$  değeri  $0,079 \text{ EÜ/ml}$  olarak tespit edildi. Daha sonra bulunan  $K_M$  sabiti ve  $V_{max}$  değeri kullanılarak enzimin DTNB substratı için turnover sayısını gösteren  $k_{cat}$  değeri hesaplandı ve buradan enzimin özgülük sabiti  $V_0$  hesaplandı. Daha sonra  $K_M$  sabiti ve  $V_{max}$  değerleri hesaplaması için gerçekleştirilen deneyde kullanılan enzim çözeltilisine kantitatif protein tayini yapılarak enzim ( $E_T$ ) miktarı bulundu. Enzimin turnover sayısını gösteren  $k_{cat}$  değeri

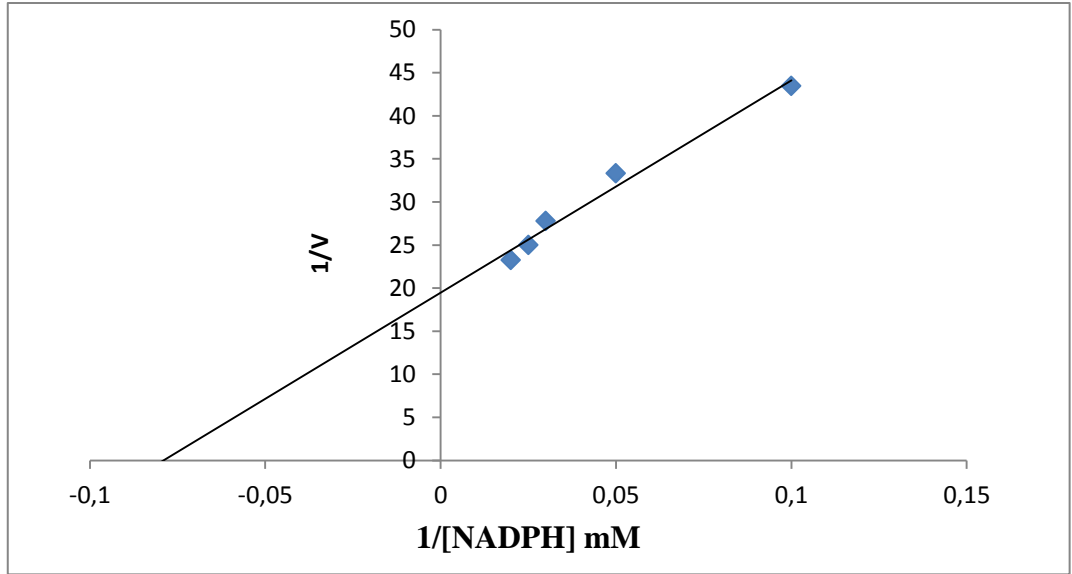
$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{E_T}$$

formülünden bulunarak hesaplandı.

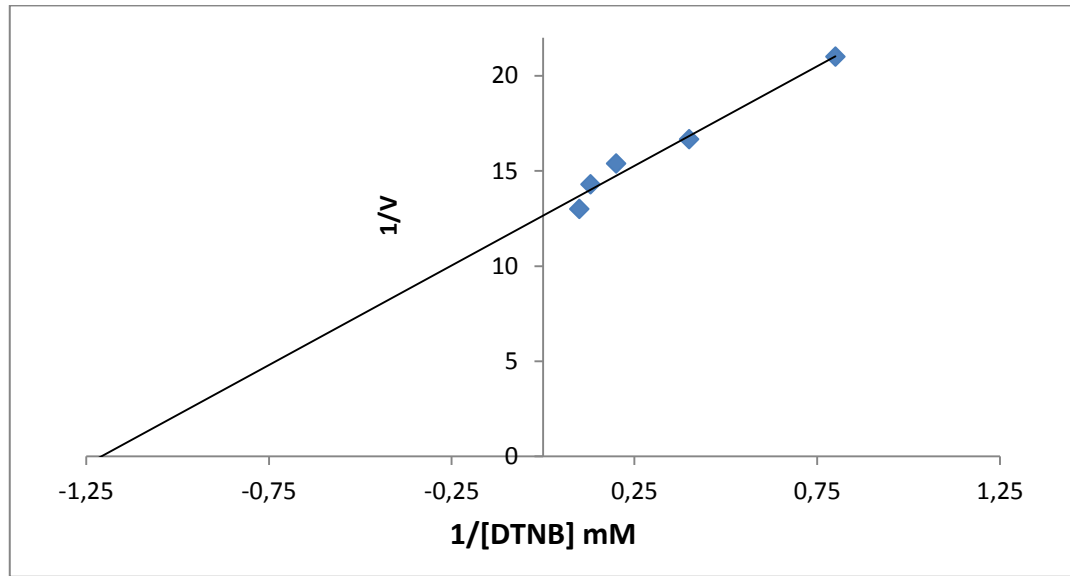
Çeşitli enzimlerin katalitik etkilerinin veya farklı substratlarının aynı enzimle ürüne dönüşümünün karşılaştırılmasının bir yolunda tepkimeler için özgüllük sabitinin ( $V_0$ ) bulunmasıdır. Özgüllük sabiti

$$V_0 = \frac{k_{cat}}{K_M}$$

formülü kullanılarak hesaplandı (Lehninger 2005).



**Şekil 4.13.** NADPH substratı için  $K_M$  sabiti ve  $V_{max}$  değeri bulunmasına yönelik  $1/V$ - $1/[NADPH]$  çizilen Lineweaver-Burk grafiği



**Şekil 4.14.** DTNB substratı için  $K_M$  sabiti ve  $V_{max}$  değerinin bulunmasına yönelik  $1/V-1/[DTNB]$  çizilen Lineweaver-Burk grafiği

**Çizelge 4.7.** Gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enziminin DTNB ve NADPH substratları için  $K_M$ , sabiti  $V_{max}$  değerleri DTNB substratı için  $k_{cat}$  ve  $V_0$  değerleri

Substrat	$K_M$ ( $\mu M$ )	$V_{max}$ (EÜ/ml)	$K_{cat}(dk^{-1})$	$V_0(\mu M^{-1}.dk^{-1})$
DTNB	0,828	0,0790	$36,2.10^3$	$44.10^3$
NADPH	12,650	0,5136	-	-

#### 4.4. Gökkuşığı Alabalığı Karaciğer Mitokondrilerinden Saflaştırılan Tiyoredoksin Redüktaz Enzimi Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkilerinin Belirlenmesine Yönelik Çalışmalar

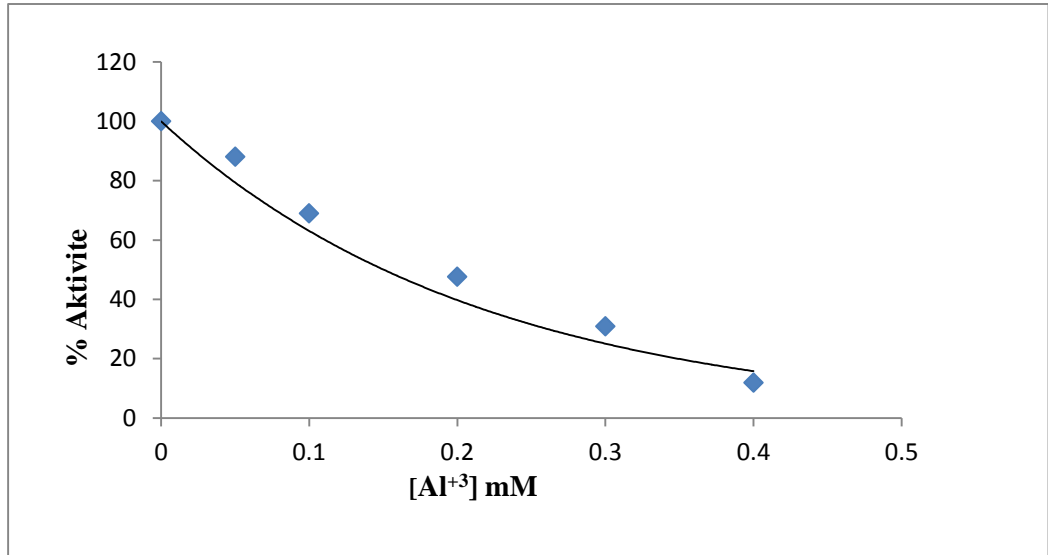
Gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enzim aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisi *in vitro* şartlarda Bölüm 3.2.6.'da anlatıldığı gibi incelenmiştir. Metallerin  $IC_{50}$  değerleri;  $Al^{+3}$  için 0,150 ,  $Co^{+2}$  için 0,186,  $Fe^{+3}$  için 0,350,  $Cu^{+2}$  için 0,930 ve  $Ni^{+2}$  için 3,270 mM olarak belirlendi (Şekil 4.16-4.20).  $K_i$  sabitleri  $Al^{+3}$  için  $0,1400 \pm 0,0264$ ,  $Co^{+2}$  için  $0,1740 \pm 0,033$ ,  $Fe^{+3}$  için  $0,3400 \pm 0,0250$ ,  $Cu^{+2}$  için  $0,8500 \pm 0,0450$  ve  $Ni^{+2}$  için  $1,606 \pm 0,2850$  mM olarak hesaplandı. Lineweaver-Burk grafiklerinden yola çıkılarak metal iyonlarının tümünün



enzimi yarışmasız olarak inhibe ettikleri belirlendi (Şekil 4.21-4.25).

**Çizelge 4.8.** Gökkuşuğu alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enzim aktivitesi üzerine  $Al^{+3}$ 'ün etkisi

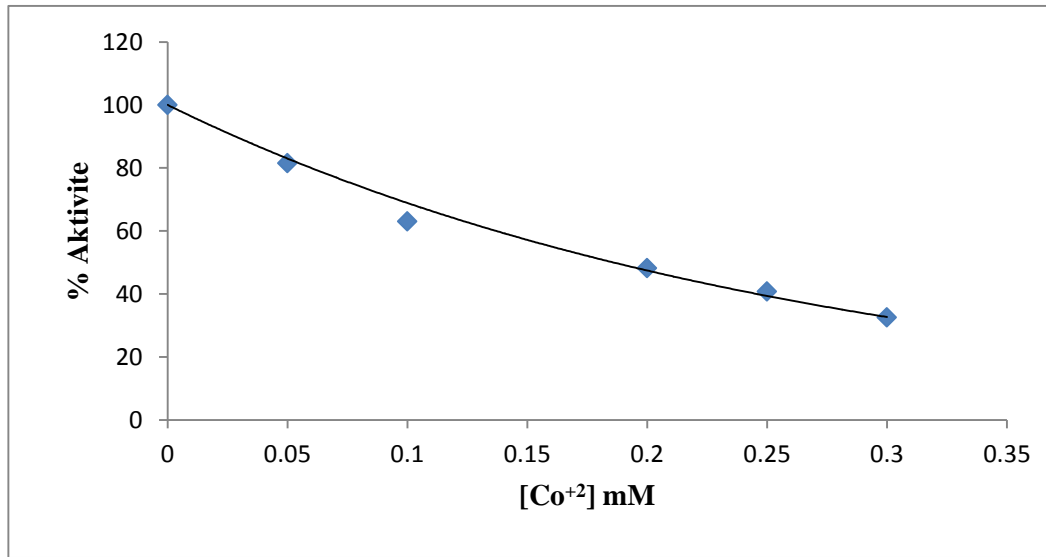
%Aktivite	[ $Al^{+3}$ ] mM
100	0
88	0,05
69	0,10
47,6	0,20
30,9	0,30
11,9	0,40



**Şekil 4.15.**  $Al^{+3}$ 'ün gökkuşuğu alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz aktivitesi üzerine etkisi

**Çizelge 4.9.** Gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enzim aktivitesi üzerine  $\text{Co}^{+2}$ 'nin etkisi

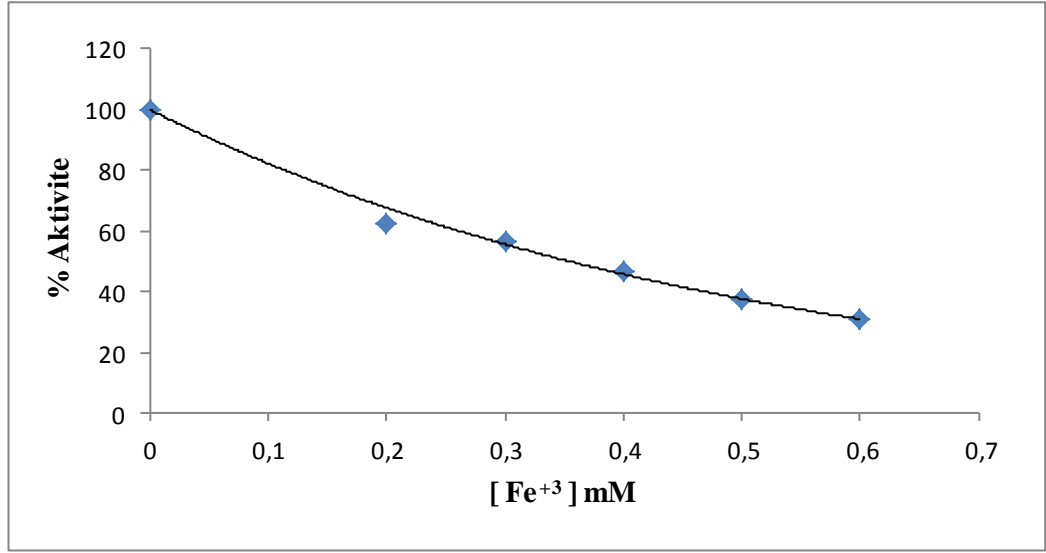
%Aktivite	$[\text{Co}^{+2}]$ mM
100	0
81,48	0,05
62,96	0,10
48,14	0,20
40,74	0,25
32,50	0,30



**Şekil 4.16.**  $\text{Co}^{+2}$ 'nin gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz aktivitesi üzerine etkisi

**Çizelge 4.10.** Gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enzim aktivitesi üzerine  $\text{Fe}^{+3}$ 'ün etkisi

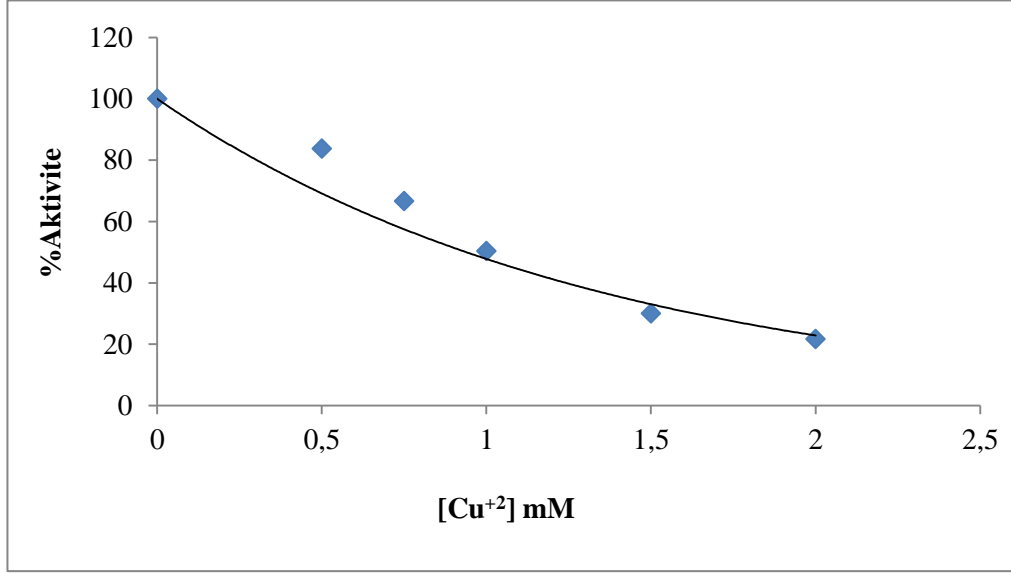
%Aktivite	$[\text{Fe}^{+3}]$ mM
100	0
62,50	0,2
56,25	0,2
46,80	0,4
37,50	0,5
31,25	0,6



**Şekil 4.17.** Fe<sup>+3</sup>'ün gökkuşağı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz aktivitesi üzerine etkisi

**Çizelge 4.11.** Gökkuşağı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enzim aktivitesi üzerine Cu<sup>+2</sup>'nin etkisi

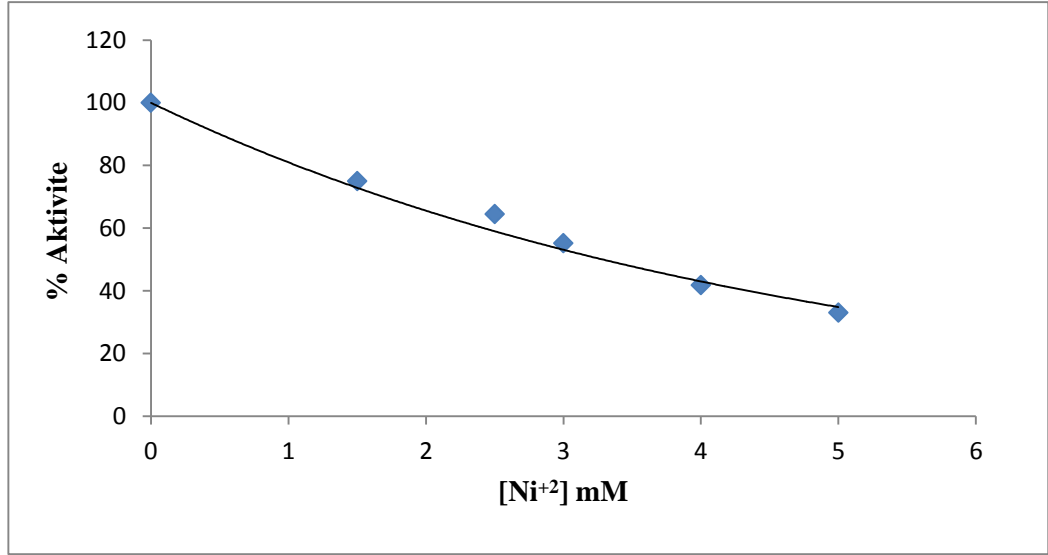
%Aktivite	[Cu <sup>+2</sup> ] mM
100	0
83,75	0,50
66,60	0,75
50,30	1,00
30	1,50
21,60	2,00



**Şekil 4.18.** Cu<sup>2+</sup>'nin gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz aktivitesi üzerine etkisi

**Çizelge 4.12.** Gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enzim aktivitesi üzerine Ni<sup>2+</sup>'nin etkisi

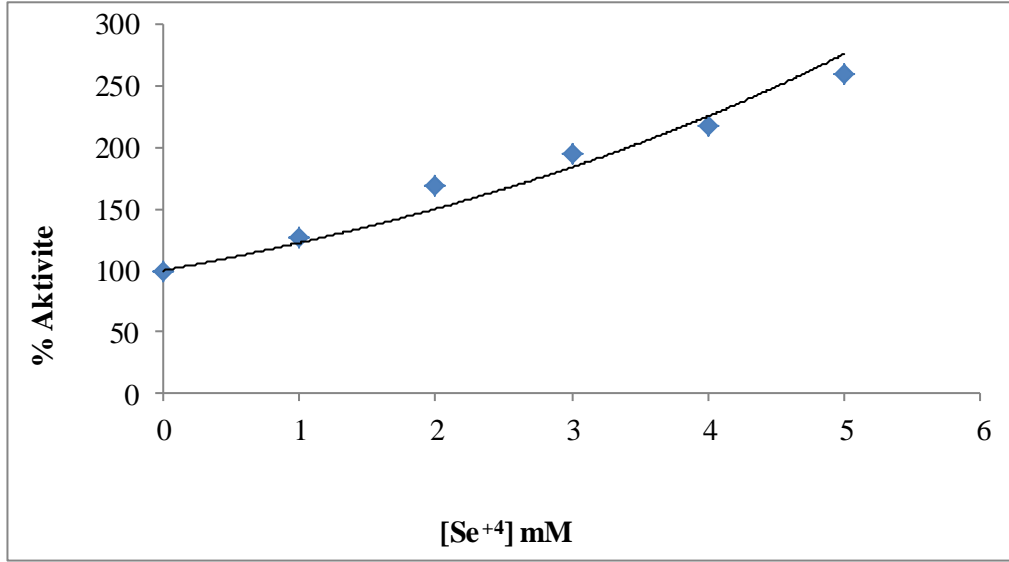
%Aktivite	[Ni <sup>2+</sup> ] mM
100	0
75	1,5
64,5	2,5
55,2	3,0
41,8	4,0
33	5,0



**Şekil 4.19.** Ni<sup>+2</sup>, nin gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz aktivitesi üzerine etkisi

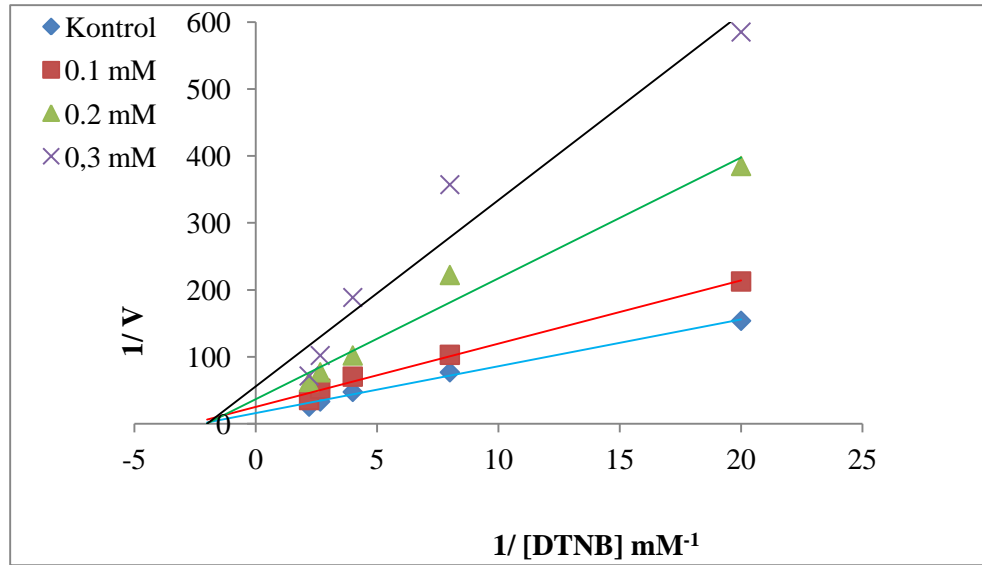
**Çizelge 4.13.** Gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz enzim aktivitesi üzerine Se<sup>+4</sup>, ün etkisi

%Aktivite	[SeO <sub>2</sub> ] mM
100	0
126	1
169	2
195,6	3
217,3	4
260	5

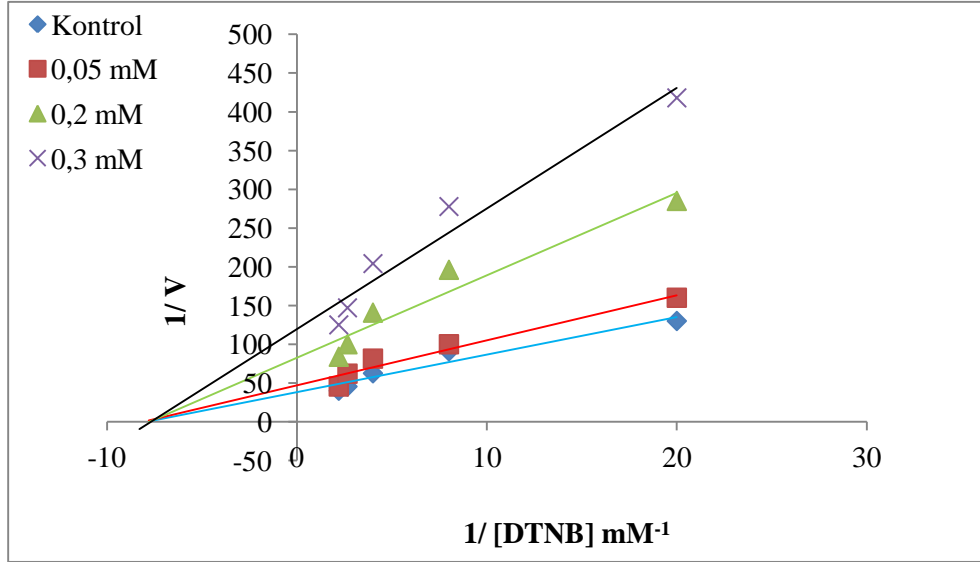


**Şekil 4.20.** Se<sup>+4</sup>'ün gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz üzerine etkisi

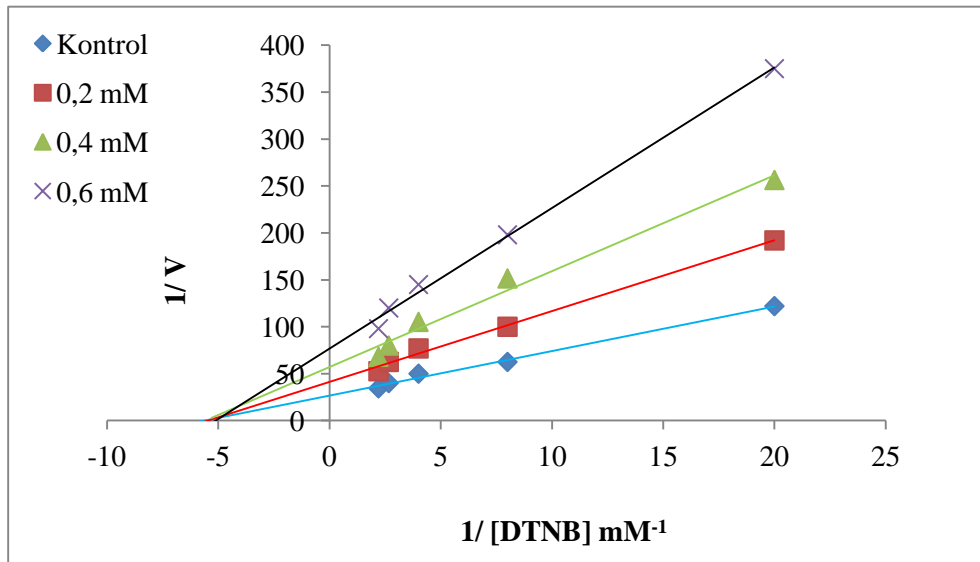
#### 4.5. Gökkuşığı Alabalığı Karaciğer Dokusundan Saflaştırılan Mitokondriyal Tiyoredoksin Redüktaz Enzimini İnhibe eden bazı metal İyonları İçin Ki Sabitlerinin Belirlenmesine Yönelik Çalışmaların Sonuçları



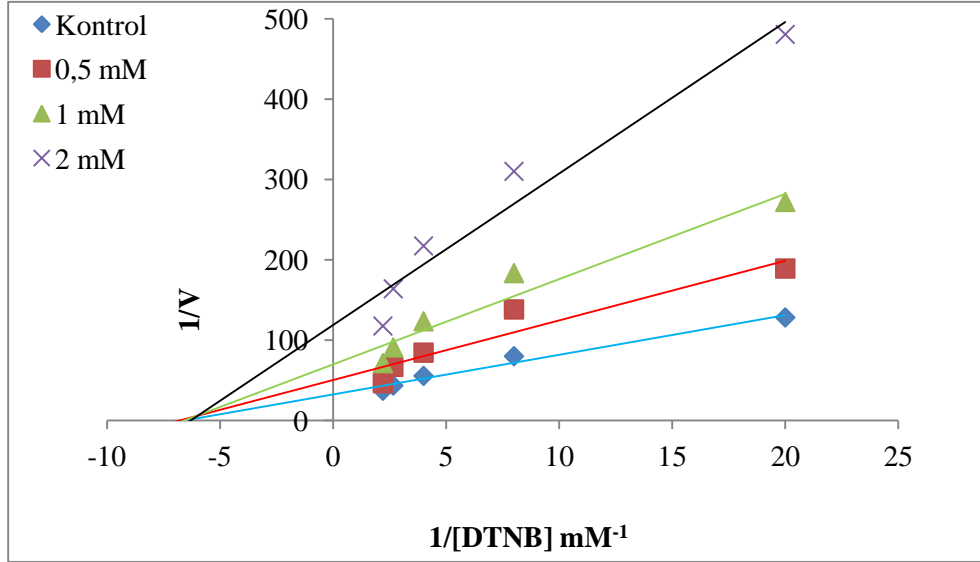
**Şekil 4.21.** Al<sup>+3</sup>'ün gökkuşığı alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz üzerine etkisi



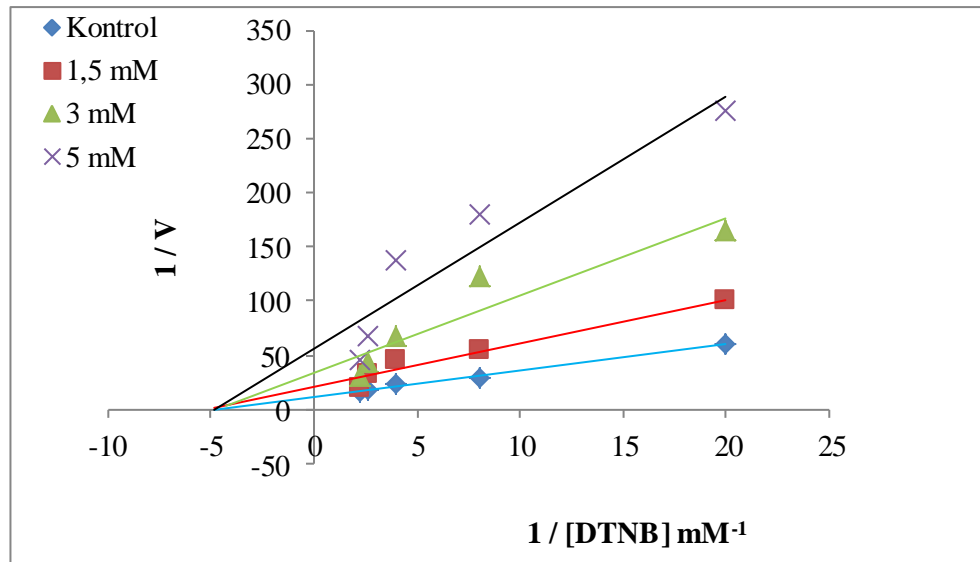
**Şekil 4.22.**  $\text{Co}^{+2}$ 'nin gökkuşuğu alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz üzerine inhibisyon türünü gösteren grafik



**Şekil 4.23.**  $\text{Fe}^{+3}$ 'ün gökkuşuğu alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz üzerine inhibisyon türünü gösteren grafik



**Şekil 4.24.**  $\text{Cu}^{+2}$ 'nin gökkuşuğu alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz üzerine inhibisyon türünü gösteren grafik



**Şekil 4.25.**  $\text{Ni}^{+2}$ 'nin gökkuşuğu alabalığı karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan tiyoredoksin redüktaz üzerine inhibisyon türünü gösteren grafik



**Çizelge 4.14.** Gökkuşığı alabalık karaciğeri dokusundan saflaştırılan mitokondriyal TrxR enzimi üzerine bazı metal iyonları etkilerinin toplu sonuçları

<b>METAL İYONLARI</b>	<b>IC<sub>50</sub> DEĞERLERİ (mM)</b>	<b>Ki SABİTLERİ (mM)</b>	<b>İNHİBİSYON TİPİ</b>
[Al <sup>+3</sup> ]	0,150	0,14±0,026 mM	Yarışmasız
[Co <sup>+2</sup> ]	0,186	0,174±0,033 mM	Yarışmasız
[Fe <sup>+3</sup> ]	0,350	0,34±0,0250mM	Yarışmasız
[Cu <sup>+2</sup> ]	0,930	0,85±0,045 mM	Yarışmasız
[Ni <sup>+2</sup> ]	3,270	1,60±0,285 mM	Yarışmasız

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Tiyoredoksin Redüktaz glutatyon redüktaz gibi flavoenzimler ailesine ait homodimerik bir proteindir. TrxR; FAD aktif bölgedeki selenosistein üzerinden tiyoredoksin ve diğer substratlardaki disülfid bağlarını NADPH'a bağımlı olarak indirgeyen bir enzimdir. Memeli TrxR enzimi oksidasyon/redüksiyon reaksiyonlarını içeren çeşitli metabolik yollarda yer alır ve yaygın olarak hücre içi reaktif oksijen türlerini azaltma merkezi olduğuna inanılır (Tibodeau *et al.* 2008).

Yapılan literatür taramasında TrxR enziminin E.coli (Williams *et al.* 1967), maya (Gonzales *et al.* 1969), sığır karaciğeri ve timusu (Holmgren 1977), ıspanak yapraklarından ferrodoksin-TrxR olarak üç çeşit Trx ile beraber (Wolosiuk *et al.* 1979) sıçan karaciğeri (Luthman and Holmgren 1982), *Saccharomyces cerevisiae* (Pedrajas *et al.* 1998), insan plasentası (Gromer *et al.* 1998), *Fasciola hepatica* (Maggioli *et al.* 2004), *Brevibacillus choshinensis* (Tonaka *et al.* 2004), domates (Dai and Wang 2011), ve insan akciğer adenokarsinoma hücreleri (Tamura and Standtman 1995) ve çeşitli kanser ve tümör hücreleri gibi kaynaklardan saflaştırıldığı ve çalışıldığı ancak gökkuşacağı alabalığı karaciğer dokusu üzerinde TrxR enzimiyle ilgili saflaştırma, karakterizasyon ve inhibisyon mahiyetinde herhangi bir çalışma olmadığı görülmüştür. Yapılan bu çalışmada gökkuşacağı alabalığı karaciğerinden mitokondriyal enzim yüksek saflıkta elde edilmiş ve karakterizasyonu yapılmıştır. Bunun yanı sıra bazı metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine *in vitro* etkileri incelenmiştir.

Çalışmada doku kaynağı olarak kullanılan gökkuşacağı alabalığı Kuzey Amerika'nın önemli bir türüdür. Günümüzde yetiştiricilik yoluyla birçok kıtaya yayılmış durumdadır. Avrupa'ya 1880, Türkiye'ye ise 1970'li yıllarda getirilmiştir. Gökkuşacağı alabalığının sistematik olarak sınıflandırması ile ilgili olarak 30'un üzerinde tür ismi tanımlanmıştır. Uzun yıllar *Salmo gairdneri* ismi ile bilinmiştir. 1988 yılında Amerika Balıkçılık Derneği Balık İsimleri Komitesi bütün Büyük Okyanus alabalık ve salmonları için *Oncorhynchus*'un cins ismi olarak kullanılmasını ve Atlantik Okyanusu alabalık ve salmonlarından ayırt edilmesine karar vermiştir. Böylece gökkuşacağı alabalığının tür

ismi *Oncorhynchus mykiss* olarak değiştirilmiştir (Bat vd 2008). Gökkuşaağı alabalığı dünyada yüzlerce yıldır kültürü yapılan çok yaygın bir balık türüdür. Su kalitesi bakımından bol oksijenli su ister ve 13-18°C’de büyüme performansları çok iyidir. Gökkuşaağı alabalıkları tatlı sularda yaşamaktadır. Fry dönemlerinde zooplanktonla beslenmekte ve büyüdükçe böcekleri, kabukluları ve diğer balıkları yem olarak tüketmektedir. Üreme doğada ilkbahar aylarında gerçekleşmektedir. Dişiler kumlu ve çakıllı yerlere yaptıkları yuvalara yumurta bırakmakta ve erkek balıklar bu yumurtaları döllemektedir. Yumurtaların gelişmeleri ve açılmaları için gerekli süre su sıcaklığı ile doğrudan ilişkilidir. Yumurtalar 10°C’de yaklaşık 30 günde açılırlar (Yanık 2009).

Yaptığımız bu çalışmada gökkuşaağı alabalığı karaciğerinden sitozolik TrxR enzimini saf olarak elde edebilmek için şu yol denendi; hazırlanan homojenatın santrifüjlendikten sonra amonyum sülfat çökme aralığının bulunmasına yönelik çalışmalar yapıldı ancak %10-90 amonyum sülfat doygunluğunun enzim için çökme aralığı olarak belirlenmesiyle amonyum sülfat çöktürmesi saflaştırma basamaklarından çıkarıldı. Homojenat süzme kolonundan geçirilerek DEAE iyon değişim kolonuna tatbik edildi. Yapılan gradientli elüsyon sonrasında alınan fraksiyonlar safsızlıklarından arındırılmak için diyaliz edildi. Diyaliz sonrasında içerisinde enzim bulunan havuz 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisine tabi tutuldu. Enzimin kolondan alınabilmesi için basamaklı elüsyon yapıldı. Enzim içeren elüatlar ve protein moleköl kütlesi standartları enzimin monomer moleköl ağırlığının belirlenmesi için SDS-PAGE’ye yüklendi. Bu çalışmanın onlarca kez farklı modifikasyonlarla tekrarlanmasına karşılık saf enzim elde edilemedi ancak kısmi saflaştırma yapılabildi.

Daha sonra mitokondriyal TrxR enzimini elde edebilmek için şöyle bir prosedür izlendi; hazırlanan homojenat diferansiyel santrifüje tabi tutuldu. Kademeli olarak mitokondriye ulaşılmaya çalışıldı. Mitokondriyal peletten mitokondriyal TrxR’ye ulaşabilmek için sonikatörle parçalama işlemi yapıldı. Tekrar santrifüj edilen preparatta süpernatant alınıp çökelek atıldı. Sonraki adımda süpernatant 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonuna yüklendi. Enzimi saf halde elüe edebilmek için gradientli elüsyon yapıldı. Elde edilen elüatlar saflık kontrolü ve alt birimlerinin moleköl kütlesinin tayini

için SDS-PAGE'ye yüklendi. PAGE jelinde tek bandın görülmesiyle enzimin saf halde elde edildiği anlaşıldı. Çalışmanın sonucundan emin olmak adına mitokondriyal TrxR'nin saflaştırılması bu metotla üç kez tekrarlandı. Saflık kontrolü ve molekül kütlesi tayini amacıyla yapılan SDS-PAGE uygulamalarının ardından üç kez aynı noktada tek bant elde edildi.

Farklı kaynaklardan saflaştırılan TrxR enziminin saflaştırılma teknikleri incelendiğinde; ısı ve asidik muameleler, amonyum sülfat çöktürmesi, diyalize tabi tutma, birbirini takip eden iyon değişim ve çoklu afinite kromatografileri, zaman alıcı inkübasyonlar gibi birçok karışık işlemde oluşan ağır ve zaman alıcı bir prosedür karşımıza çıkmaktadır. Örneğin sıçan karaciğerinden TrxR enzimini saflaştırmak için DEAE iyon değişim kromatografisinin ardından sephadex G-50, CM Selüloz ve 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisini arka arkaya uygulamak gerekmektedir. Ara işlemlerde göz önünde bulundurduğumuzda bu metotlarla enzim saflaştırmanın ne kadar zaman alıcı ve yorucu olduğunu daha iyi anlayabiliriz. Üstelik enzim stabilitesi ile zaman arasında ters bir korelasyon olması enzimi daha kısa yoldan ve daha yüksek saflıkta elde etme arayışını gerektirdi. Diğer bir sorun; bu yöntemlerle yapılan saflaştırmada enzimin sitozolik mi yoksa mitokondriyal mi olduğu konusunda net ve savunulabilir bir açıklamanın olmayıştı. Yukarıda bahsedilen birinci metotla yapılan saflaştırma işlemlerinin defalarca tekrarlanmasına rağmen enzimin kısmi olarak saflaştırılması ve tek bant elde edilememesi az zamanda kesin sonuca götüren bir metot bulmayı kaçınılmaz kıldı. Literatür taraması sonucunda elde ettiğimiz bilgileri laboratuarda deneme yanılma yöntemiyle geliştirip çeşitli modifikasyonlarla amacımıza uygun bir hale getirdik. Homojenat diferansiyel santrifüje tabi tutularak direkt olarak mitokondriler hedeflendi. Sonikatörle mitokondriler parçalandı. Daha sonra tek hamlede sadece tek bir kromatografik teknikle, çok kısa zamanda ve enzimin yüksek spesifik aktiviteyle saflaştırılması gerçekleştirildi. SDS- PAGE ile saflık kontrolünde tek bandın görülmesi hedeflediğimiz sonuçtu. Ancak bundan emin olmak adına aynı teknikle saflaştırma 3 kez denendi ve hepsinde birbiriyle uyumlu sonuçlar alındı. TrxR biyolojik fonksiyonları ve kanser, tümör gibi önem taşıyan konulardaki nitelikleri açısından incelenmesi ve her yönüyle aydınlatılması gereken çok önemli bir enzimdir. Yapılan

literatür taramalarında saflaştırma basamaklarının zorlayıcı ve zaman alıcı olmasından olsa gerek, diğer birçok enzime oranla daha az kaynaktan saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Bu çalışmada geliştirdiğimiz yöntemle enzimin daha kısa sürede ve daha kolay şekilde saflaştırılmasının mümkün olabildiği fikri savunulabilir.

Saflaştırma metodunun ilk basamağı olan homojenat hazırlanmasından 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisiyle enzimi elüe etmeye kadar geçen tüm basamaklarda enzimi stabil tutabilmek ve aktivite kaybını minimuma indirebilmek amacıyla tüm işlemler 4°C'de yapıldı. Santrifüj basamaklarında soğutmalı santrifüj kullanılarak ortam sıcaklığı 4°C'de sabit tutuldu. Tiyoredoksin redüktaz enziminin aktivitesi ölçülürken DTNB (5,5'-Ditiyobis (2-Nitro benzoik asit) yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde tiyoredoksin redüktaz enziminin NADPH bağımlı olarak DTNB'deki disülfid bağlarının redüksiyonunu katalizlemesi esas alındı (Holmgren,1977). 412 nm'de DTNB den TNB oluşumuna bağlı olarak TNB'nin artışı ölçüldü. Enzimin saflaştırılması, karakteristik ve kinetik özelliklerinin belirlenmesi ve inhibisyon çalışmalarında bu yöntemle göre aktivite ölçümü yapıldı.

Yapılan bu çalışmada bütün basamaklardaki kantitatif protein tayini Bradford metoduna göre yapıldı. Bu metodun hassasiyetinin yüksek olması (1-200 µg), boya-protein kompleksinin hızlı oluşması ve renk stabilitesinin uzun sürmesi gibi nedenlerden dolayı tüm protein tayinleri bu metoda göre yapıldı.

Mitokondriyal TrxR enzimi gökkuşacağı alabalığı karaciğer dokusu mitokondrilerinden 11,9 EÜ/ml protein spesifik aktivitesiyle %2,38 verimle ve 672 kat saflaştırıldı. Enzimin saflığı ve alt birim kütlesi SDS-PAGE ile belirlendi. SDS-PAGE jeli üzerinden enzim için R<sub>f</sub> değerine karşılık molekül kütlesi yaklaşık 70 kDa olarak belirlendi. Enzimin doğal molekül kütlesinin belirlenmesi için enzim sephadex G-150 jel filtrasyon kromatografisine tabi tutuldu. Enzim elüe edilirken tüplerde 412 nm'de aktivite ölçümleri yapıldı. 280 nm'de kalitatif ölçüm için alınan absorbans değerleri tüp sayısına karşı grafiğe geçirildi. Daha sonra enzimin molekül kütlesini belirlemek için her bir protein için ayrı ayrı K<sub>av</sub> değerleri ve Log M<sub>K</sub> değerleri hesaplandı. Log M<sub>K</sub>-K<sub>av</sub> grafiği

bilgisayarda çizildi. Son olarak gökkuşuğu alabalığı karaciğer mitokondrial tiyoredoksin redüktaz enziminin  $K_{av}$  değeri belirlenerek grafik vasıtasıyla enzimin doğal halinin molekül kütlesi yaklaşık 151 kDa olarak hesaplandı. Jel filtrasyon kromatografisi sonucu bulunan tabi molekül kütlesi, SDS-PAGE sonucu bulunan alt birimlerin molekül kütlesi ile kıyaslanınca gökkuşuğu alabalığı mitokondriyal TrxR enziminin homodimer yapıda olduğu sonucuna varıldı.

Enzimin karakteristik özelliklerinin belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalarda saf enzim kullanıldı. Enzimin optimum pH'sının bulunmasına yönelik yapılan çalışmalarda enzimin; pH'sı 7,5 olan fosfat tamponunda en yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlendi. Optimum iyonik şiddetin belirlenmesi amacıyla farklı fosfat konsantrasyonlarında yapılan aktivite ölçümlerinde en yüksek aktivite ölçümü 500 mM pH'sı 7,5 olan potasyum fosfat tamponunda görüldü. Çalışma kapsamında enzimin optimum sıcaklığının belirlenmesi için 0 ile 80°C arasında aktivite ölçümleri yapılarak enzimin optimum sıcaklığı 0°C olarak belirlendi. Enzimin stabil pH sınır belirlenebilmesi için farklı pH aralıklarında tampon çözeltilerde 4°C'de inkübe edildi. 24 saat aralıklarla yapılan aktivite ölçümleri neticesinde pH'sı 8,0 olan potasyum fosfat tamponunda enzimin en stabil kaldığı tespit edildi. Optimum sıcaklık çalışmasında elde edilen sonuçlardan enzimin  $Q_{10}$  değeri 0,8825°C olarak hesaplandı.

Kinetik özelliklerinin belirlenmesinde yine 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi sonrası elde edilen saf enzim kullanıldı. Enzimin substratlarından biri olan DTNB için  $K_M$  sabiti ve  $V_{max}$  değerlerinin hesaplanabilmesi amacıyla 5 farklı substrat konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapıldı. Elde edilen sonuçlardan Lineweaver-Burk grafiği çizilerek enzimin DTNB substratı için  $K_M$  sabiti 0,828  $\mu$ M ve  $V_{max}$  değeri 0,079 EÜ/ ml olarak bulundu. Enzimin diğer substratı olan NADPH içinde aynı işlemler yapıldı ve  $K_M$  sabiti 12,65  $\mu$ M ve  $V_{max}$  değeri 0,513 EÜ/ ml olarak belirlendi. Bu çalışmalar yapılırken  $100 K_M \leq [S]$  ilişkisi her aşamada göz önünde bulunduruldu. Enzimin substratlarının  $K_M$  sabitleri kıyaslandığında DTNB için hesaplanan  $K_M$  sabitinin (0,828  $\mu$ M) , NADPH için hesaplanan  $K_M$  sabitinden (12,65  $\mu$ M) oldukça küçük olduğu görüldü. Bu nedenle enzimin DTNB substratına olan afinitesinin daha

yüksek olduğu sonucuna varıldı. DTNB için  $V_0$  değeri  $44 \times 10^3 \text{ dk}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$  ve  $k_{\text{cat}}$  değeri  $36,2 \times 10^3 \text{ dk}^{-1}$  olarak hesaplandı. Holmgren'in 1977 yılında yaptığı çalışmada sığır karaciğerinden saflaştırılan TrxR enziminin  $K_M$  değeri NADPH için  $14 \mu\text{M}$ , DTNB için  $1,5 \mu\text{M}$  olarak belirlenmiştir (Holmgren, 1977). Yine Holmgren ve Luthman'ın sıçan karaciğerinden TrxR enzimini saflaştırılmasına yönelik çalışmalarında TrxR enziminin  $K_M$  değeri NADPH için  $6 \mu\text{M}$ , DTNB için  $0,66 \mu\text{M}$  olarak belirlenmiştir (Holmgren and Luthman 1982). Görüldüğü gibi, literatürdeki çalışmalarda da enzimin DTNB'ye olan afinitesi daha yüksektir. Çalışmamız literatürle uyumludur.

Çalışma planımızın son basamağı TrxR enzimi üzerine bazı metallerin *in vitro* etkilerini incelenmesiydi. Bu amaçla  $\text{Al}^{+3}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$ ,  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$  ve  $\text{Cu}^{+2}$  ve  $\text{Se}^{+4}$  metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkileri araştırıldı. Enzim aktivitesi üzerine etkisi çalışılan her madde için stok çözeltiler hazırlandı. Her metal için kendi stok çözeltisinden 5 farklı konsantrasyonda aktivite ölçümü yapıldı. Selenyum enzim aktivitesi için gerekli ve enzim aktivitesini arttıran bir madde olduğu için  $\text{Se}^{+4}$  iyonunun enzimi aktive etmesi bekleniyordu.  $\text{Se}^{+4}$  iyonu enzimi aktive ederken diğer tüm metal iyonlarının enzimi mM düzeyde kuvvetli bir şekilde inhibe ettikleri görüldü. İnhibisyon gösteren metal iyonları için 5 farklı DTNB konsantrasyonunda ayrı ayrı uygun olan 3 farklı inhibitör konsantrasyonu için aktivite ölçümleri yapıldı. Ölçümler sonucu elde edilen değerler kullanılarak inhibisyon etkisi gösteren her metal için Linewear-Burk grafiği çizildi. %Aktivite-[I] ve Linewear-Burk grafiklerinden faydalanılarak metallerin  $\text{IC}_{50}$  ve  $K_i$  sabitleri hesaplandı ve inhibisyon türleri belirlendi. Tüm metallerin enzimi yarışmasız olarak inhibe ettiği belirlendi. Metal iyonlarının inhibisyonuna ilişkin sonuçlar Çizelge 5.1'de özetlendi.

**Çizelge 5.1.** Gökkuşuğu alabalığı karaciğeri mitokondriyal tiyoredoksin redüktaz enzimi için bulunan  $K_i$  sabitleri

Metal İyonları	$\text{IC}_{50}$ Sabitleri (mM)	$K_i$ Sabitleri (mM)	İnhibisyon Tipleri
$[\text{Al}^{+3}]$	0,150	$0,14 \pm 0,026$	Yarışmasız
$[\text{Co}^{+2}]$	0,186	$0,17 \pm 0,033$	Yarışmasız
$[\text{Fe}^{+3}]$	0,350	$0,34 \pm 0,025$	Yarışmasız
$[\text{Cu}^{+2}]$	0,930	$0,85 \pm 0,045$	Yarışmasız
$[\text{Ni}^{+2}]$	3,270	$1,60 \pm 0,285$	Yarışmasız

Dönüşümlü bir tip olan yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyonda inhibitör ve substrat enzim moleküllerine aynı anda bağlanabilir. Bu bağlanmanın enzimin aynı bölgesine olmadığını gösterir. Yarışmasız bir inhibitör etkisini bir enzimin turnover sayısını, yani katalitik aktivitesini düşürerek gösterir. Burada substrat ve inhibitör arasında yarışma söz konusu değildir. Substrat konsantrasyonunu arttırmakla inhibisyon kaldırılamaz. Enzimin  $V_{max}$  değeri azalırken  $K_M$  değeri sabit kalır. Substrat ve inhibitör farklı bölgelere yapışabildiğinden enzimin iki çeşit inaktif kompleksi meydana gelir. EI ve ESI. ESI'dan I dönüşümlü olarak ayrışabildiğinden yine ürün meydana gelebilir fakat katalizlemede yavaşlama olur. Yarışmasız inhibisyona örnek olarak, enzimlerin aktivitelinde gerekli olan sisteinlerin  $-SH$  gruplarına bazı ağır metal iyonlarının merkaptan oluşturacak şekilde dönüşümlü olarak bağlanmalarını verebiliriz. Burada  $-SH$  grubu aktif bölgede bulunabildiği gibi enzimin üç boyutlu yapısının oluşumunda etkili olan bir bölgede de yer alabilir. Katalizlemede metal iyonlarına ihtiyacı olan enzimlerin aktiviteleri bazı bileşiklerin metal iyonlarına dönüşümlü bağlanması sonucu yarışmasız olarak inhibe edilebilirler (Keha ve Küfrevioğlu 2004).

Alüminyum iyonlarının benzersiz termodinamik özellikleri onlara hücre bileşenleriyle etkileşiminin biyokimyasal temelini oluşturan biyolojik spesifite kazandırır. Alüminyum nükleotidlerle koordinasyonda bulunabilir ya da fosfolipidlerle kompleks oluşturabilir. Bunun sonucunda sırasıyla bozulmuş gen ekspresyonu ya da alüminyum kaynaklı membran faz değişimi meydana gelir (Haug and Foy 2008). Üç değerlikli bir kation olan alüminyum bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalarda kronik sitotoksositeye sebep olabilir. Enzim aktivitesinin  $Al^{+3}$  tarafından inhibisyonuyla ilgili bugüne kadar yapılan çalışmalar bu inhibisyonun alüminyumun substrata bağlanmasıyla gerçekleştiğini gösteriyor. Birçok enzim substratları alüminyum yüksek afinitesine açık fosfat ve karboksilik gruplar içerirler. Bu gruplara alüminyumun bağlanması substratın enzime bağlanmasını bloke eder ve katalizi önler (Jones and Kochian 1998). TrxR enziminin substratlarından biri olan NADPH yapısında fosfat grubu bulunduran bir bileşiktir. Enzimin buradaki fosfata bağlandığı dolayısıyla substratın enzime bağlanmasını engelleyerek katalizi durdurduğu söylenebilir.



Kobalt insanlarda ve hayvanlarda vitamin B12 veya kobalaminle ilişkili olarak bulunur ve vitamin B12 metabolizmasında önemlidir. Günlük besin ihtiyacımızda çok küçük bir yer teskil eden kobalt, kırmızı kan hücrelerini üretiminin ve sinir düzenlenmesinde kullanılan B12 vitaminin bileşenidir (Ortaboy 2010). Yapılan literatür taramalarında kobaltın kolaylıkla kompleks oluşturan bir metal olduğu ve nikotinamidle kolaylıkla kompleks oluşturabildiği görülmüştür. TrxR'nin NADPH a bağımlı bir enzim olduğu NADPH olmadan katalizleme kabiliyetinin olmadığı bilinmektedir. Yapılan çalışmada kobaltın NADPH'ın nikotinamid halkasıyla kompleks oluşturduğu görülmüştür. Kobaltın enzimi yarışmasız inhibe etmesi substratla kompleks oluşturmaya ya da enzimin yapısında bulunan –SH gruplarıyla merkaptan oluşturmaya dayandırılabilir.

Demir pek çok canlı ve insan için yaşamsal öneme sahip temel bir elementtir. Elektron alıp verme özelliği nedeniyle oksijen taşınmasında, enerji yapımındaki birçok enzimin katalizlenmesinde (örn. sitokromlar), bağışıklık sisteminde (nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz, laktoferrin, siderokalin), deoksiribonükleik asit (DNA), ribonükleik asit (RNA) ve protein sentezinde önemli fonksiyonları vardır Demir tüm hücreler için gerekli olan esansiyel bir elementtir. En önemli görevi hemoglobin aracılığı ile oksijen taşımaktır. Diyetle alınan demir ile makrofajlardan sağlanan demir kanda transferrin (Tf) ile taşınarak büyük oranda kemik iliğine ulaştırılmaktadır. Transferin reseptörü disülfid bağlarıyla bağlı iki subünitten oluşmaktadır (Avcı 2008). Transferrinin demire bağlanma afinitesinin yüksek olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada demirin enzim aktivitesi için gerekli olan sisteinlerin –SH gruplarına bağlanarak enzimi inhibe ettiği savunulabilir.

Bakır insanlar için esansiyel bir elementtir. *In vivo* ortamda bulunan bakırın çok büyük bir kısmı biomoleküllerle kompleks halinde görülmektedir, az ama belirgin bir kısmı ise serbesttir ve redoks reaksiyonlarına girmeye oldukça yatkındır. Normal kan plazmasında bakırın düşük molekül kütleli fraksiyonlarının büyük bir kısmının, elektriksel olarak nötral ve bundan dolayı lipofilik ve difüze olabilir komplekslerden oluşması önemli bir gerçektir, özellikle zayıf asitlerin yer aldığı *in vivo* da Cu (II) nin aracılığıyla gerçekleşen işlemlerde, kan plazmasındaki başlıca düşük molekül kütleli

ligand olan histidin reaksiyona girmeye yatkındır (Tuncer 1999). Demir ve bakır gibi geçiş metalleri canlı organizmada serbest radikal oluşturan güçlü birer oksidatif katalist olarak görev yaparlar. Yapılan literatür taramasında bakırın nikotinamid türevleriyle kompleks oluşturduğu yine bakır tiyol komplekslerinin oluşumu görülmüştür. Bakır metalinin TrxR enzimini yarışmasız inhibe etmesi inhibitörün enzimin yapısında bulunan disülfidlere dönüşümlü olarak bağlanmasıyla açıklanabilir.

Nikel içeren ürünlerin fazla tüketimi, nikel ve bileşiklerinin üretimi, kullanımı ve geri kazanımında oluşan çevre kirliliği kaçınılmazdır. İnsanlar nikel, solunum yoluyla, ağız yoluyla, içme suyuyla, bazı gıdaların tüketimiyle ya da sigara içilmesiyle maruz kalabilmektedirler. Bu kirlilik, nikelin deriyle temasından oluşan nikel alerjisi, akciğer kanseri, gırtlak kanseri ve böbrek hastalıkları gibi önemli rahatsızlıklara yol açmaktadır. Nikelin bilinen biyolojik fonksiyonu olmamakla birlikte orta seviyede zehirleyici özelliği vardır (Kasprzak *et al.* 2003). Nikel sülfür bileşimlerinin var olması nikelin TrxR'yi inhibe etmesinin bu yönde bir etkileşime bağlı olduğu fikrini akla getirir.

Günümüzde bu enzimle ilgili çalışmaların çoğu Trx/TrxR sistemiyle ilişkilendirilen hastalıkların tedavisinde fikir belirtebilecek bileşiklerin tayin edilmesi yönündedir. Çalışmaya başlamadan önce literatür taraması yapılarak hangi madde ve bileşiklerin enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi oluşturduğu konusunda fikir edinilmiştir. Buna göre; şu anda mevcut kanser tedavisinde kullanılan ajanlardan sisplatin, PX-12 ve plörotin geri dönüşümsüz birer TrxR inhibitörleridir. Yine  $Gd^{+3}$  içeren bir porfirin olan moteksafin gadolinyum kanser hücresindeki metabolizmayı bozarak DNA tamirini engeller ve hücre ölümünü kolaylaştırır (Haunut and Miller 1993). 1-chloro-2,4-dinitrobenzene, 13-cis-retinoic acid (Rigobello *et al.* 1998), nitrojen mustardlar (*Chlorambucil*, *melphalan*), alkil sülfanatlar, daunorubisin, doksorubisin, karmustin ve platin içeren antikanser bileşiklerin enzim üzerinde inhibisyon etkisi saptanmıştır (Witte *et al.* 2005). Aurotiyooglukoz, arsenik trioksit, flavonoidler, platin ve altın bileşiklerinin yanı sıra  $Cu^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $Co^{+2}$  (Tandoğan ve Ulusu 2011),  $Hg^{+2}$  (Carvalho *et al.* 2012) gibi ağır metallerde enzim üzerinde inhibisyon etkisi saptanan metallerdir.

Selenyum memeli ve kuşlar için temel bir eser elementtir. Selenyum eksikliğine bağlı olarak hayvanlarda beyaz kas hastalıkları selenoproteinlerle ilişkilendirilmiştir. Selenoprotein keşfedilmesi selenyumun insan sağlığı açısından keşfedilmemiş biyolojik fonksiyonları hakkında önemli fikirler sağlayabilir (Tamura 1995). Selenyumun memeli TrxR katalitik bölgesindeki esas rollerini anlamak için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Supra beslenme selenyum takviyesinin birçok çalışmada tümör koruyucu etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Selenoproteinlerin düzenlenmesi ve hücre büyümesiyle büyümenin düzenlenmesi üzerine etkileri dahil tümör üzerindeki etkisini açıklamak için olası mekanizmalar ileri sürülmüştür. Birçok çalışmanın selenyumun tümör büyümesini azalttığını göstermesine rağmen selenyumun tümör önleyici etkisi hala tartışmalıdır ve selenyumun türüne, kullanılan selenyum kaynağına ve çalışılan kanser çeşidine göre değişmektedir. Yapılan bir çalışmada sıçan karaciğer örneğinde sodyum selenitin karaciğerde tümör önleyici etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Deneyde kullanılan sıçanların başlangıçtan itibaren 12 ay boyunca içme sularına 5 mg/ml eklenmesiyle tümör büyüme oranında azalma gözlemlenmiştir. Tümör azaltma etkinliğine rağmen 5 mg/ml sodyum selenit muamelesi kanserli karaciğer kütlesinin artışı ve hücre çoğalmasının oranını etkilemediği görülmüştür. Yenilenen karaciğerlerde TrxR1 sitozolik selenoenzim aktivitesi kısa süreli ve geçici olarak artar ve bu artış sodyum selenit tarafından güçlendirilir. TrxR1 selektif olarak immünohistokimyasal analizlerde gösterildiği gibi karaciğer tümör çoğalmasında fazlaca sentezlenir (Erkhambayer 2011). Selenyumun TrxR aktivitesini artıran bir madde olmasından ötürü yapılan bir çalışma sonucunda sodyum selenitin kronik karaciğer hastalığı olan hastalarda karaciğer kanserinin önlenmesi için uygun bir aday olduğu önerilmiştir. Yaptığımız bu çalışmada  $Se^{+4}$ 'ün gökkuşağı alabalığı karaciğerinden saflaştırdığımız mitokondriyal TrxR enzimini aktive etmesi, daha önce yapılan bu araştırmaların sonuçlarını destekler niteliktedir. Selenyum enzim aktivitesi için mutlak ve gerekli bir madde olduğu için ortamdaki konsantrasyonunun artırılmasıyla TrxR aktivitesinin artacağı bir kez daha ortaya konmuştur.

## Sonuç olarak;

1. Mitokondriyal tiyoredoksin redüktaz enziminin gökkuşığı alabalığı karaciğerinden saflaştırılmasında literatürdeki karmaşık ve uzun süren prosedürlerin yerine daha pratik ve daha az zamanda daha kesin sonuca götüren yeni bir yöntem uygulandı. Enzim tek basamakta 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi ile 11,9 EÜ/ ml protein spesifik aktivitesiyle, %2,38 verimle ve 672 kat saflaştırıldı. Bulduğumuz sonuçları mukayese etmek amacıyla yaptığımız literatür taramalarında TrxR enziminin sığır karaciğerinden ve timusundan 4 aşamada 1000 kat saflaştırılmış olup enzimin %10 dan daha iyi bir verimle elde edildiği görülmüştür (Holmgren 1977). Sitozolik TrxR sıçan karaciğerinden 5 basamakta % 18 saflıkta 4000 kat saflaştırılmıştır (Luthman ve Holmgren 1982). Rigobello ve arkadaşları sıçan karaciğerinden mitokondriyal TrxR enzimini 6 basamakta saflaştırmışlardır (Rigobello *et al.* 1997). En az 4 basamakta gerçekleştirilen söz konusu saflaştırma işlemlerinin oldukça karışık ve zaman alıcı olduğu görülmüştür. Bundan dolayı yaptığımız saflaştırma işlemlerinin en kısa zamanda doğru sonuca ulaştırılan prosedür olduğu sonucuna ulaşılabilir.

2. Gökkuşığı alabalığı karaciğerinden saflaştırılan mitokondriyal TrxR enziminin saflık kontrolü SDS-PAGE yöntemiyle yapıldı. Homodimerik olduğu sonucuna varılan mitokondriyal TrxR enziminin alt birim molekül kütlesi yaklaşık 70 kDa olarak belirlendi. Jel filtrasyon kromatografisiyle yapılan doğal molekül kütlesi tayininde enzimin doğal molekül kütlesi yaklaşık 151 kDa olarak hesaplandı. TrxR enziminin doğal molekül kütlesinin bulunmasına yönelik yapılan çalışmalar incelendiğinde sığır karaciğer ve timusundan saflaştırılan TrxR enziminin doğal molekül kütlesinin her bir alt birim 66 kDa olmak üzere 112 kDa olarak bulunduğu görülmüştür (Holmgren 1977). Başka bir çalışmada, sıçan karaciğerinden saflaştırılan sitozolik enzimin her bir alt birimi 54 kDa olan 116 kDa doğal molekül kütlesine sahip olduğu belirtilmiştir (Luthman ve Holmgren 1982). Aynı kaynaktan saflaştırılan mitokondriyal TrxR enziminin molekül kütlesi de 108 kDa olarak bulunmuştur (Rigobello *et al.* 1997). *E. Coli*'den elde edilen enzimde her bir alt birimin molekül kütlesinin 34 kDa olduğu belirtilmiştir (Williams *et al.* 1967). TrxR enzimlerinin sınıflandırılmasında alt birim molekül kütlesi 55 kDa civarı olanlar büyük TrxR sınıfına girdiğinden gökkuşığı

alabalığı karaciğerinden saflaştırılan ve alt birim molekül kütlesi yaklaşık 70 kDa olan bu enzimin büyük TrxR enzimleri sınıfında olduğu söylenebilir.

3. Gökkuşığı alabalığı karaciğerinden saflaştırılan mitokondriyal TrxR enzimi için optimum pH fosfat tamponunda pH 7,5 olarak belirlendi.

4. Gökkuşığı alabalığı karaciğerinden saflaştırılan mitokondriyal TrxR enzimi için optimum iyonik şiddeti 500 mM (pH'sı 7,5 olan fosfat tamponu) olarak belirlendi.

5. Gökkuşığı alabalığı karaciğerinden saflaştırılan mitokondriyal TrxR enziminin optimum sıcaklığı 0°C olarak belirlendi.

6. Gökkuşığı alabalığı karaciğerinden saflaştırılan mitokondriyal TrxR enziminin DTNB substratı için  $K_M$  sabiti 0,828  $\mu\text{M}$  ve  $V_{\text{max}}$  değeri 0,079 EÜ/ ml olarak bulundu. Enzimin diğer substratı olan NADPH içinde aynı işlemler yapıldı ve  $K_M$  sabiti 12,65  $\mu\text{M}$  ve  $V_{\text{max}}$  değeri 0,513 EÜ/ ml olarak belirlendi. DTNB için  $V_0$  değeri  $44 \times 10^3 \text{ dk}^{-1}$ ,  $\mu\text{M}^{-1}$  ve  $k_{\text{cat}}$  değeri  $36,2 \times 10^3 \text{ dk}^{-1}$  olarak hesaplandı. Holmgren'in 1977 yılında yaptığı çalışmada sığır karaciğerinden saflaştırılan TrxR enziminin  $K_M$  değeri NADPH için 14  $\mu\text{M}$ , DTNB için 1,5  $\mu\text{M}$  olarak belirlenmiştir (Holmgren, 1977). Yine Holmgren ve Luthman'ın sıçan karaciğerinden TrxR enzimini saflaştırılmasına yönelik çalışmalarında TrxR enziminin  $K_M$  değeri NADPH için 6  $\mu\text{M}$ , DTNB için 0,66  $\mu\text{M}$  olarak belirlenmiştir (Holmgren and Luthman 1982). Görüldüğü gibi, literatürdeki çalışmalarda da enzimin DTNB'ye olan afinitesi daha yüksektir. Çalışmamız literatürle uyumludur.

7. Enzim için yapılan kinetik çalışmalarda hesaplanan spesifik aktivite değeri 11,8 EÜ/ ml protein olarak belirlendi.

8.  $\text{Al}^{+3}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$ ,  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$  ve  $\text{Se}^{+4}$  metal iyonlarının Gökkuşığı alabalığı karaciğerinden saflaştırılan mitokondriyal TrxR enzim aktivitesi üzerine *in vitro* etkileri incelendi.  $\text{Se}^{+4}$  metal iyonunun enzimi aktive ettiği diğer tüm metal iyonlarının ise enzimi yarışmasız olarak inhibe ettiği bulundu. Literatürde TrxR enzimi üzerine metal iyonlarının etkisiyle ilgili olarak; tiyoller ve selenollerin  $\text{Hg}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Co}^{+2}$  ve  $\text{Mn}^{+2}$  gibi ağır metal iyonlarıyla kolaylıkla kompleks oluşturabildiği  $\text{Cd}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$  ve  $\text{Zn}^{+2}$  gibi iki değerlikli metal iyonlarının memeli ve maya GR enzimi üzerinde inhibisyon etkisi olduğu gösterdiği belirtilmiştir. GR ve TrxR yapısal olarak benzerdikleri bu yüzden iki değerlikli metal iyonlar aynı zamanda TrxR'yi de inhibe edebileceklerine değinilmiştir. (Tandoğan ve Ulusu 2007). Yine bu metallerin özellikleri incelendiğinde enzimi

kolaylıkla yarışmasız olarak inhibe edebilecek özellikler sergiledikleri görülmüştür. Dolayısıyla bulduğumuz sonuçlar literatürle uyumludur. Öte yandan Selenyum enzim aktivitesi için gereklidir ve kültür hücreleri ortamına 1  $\mu\text{M}$  Se eklenmesiyle TrxR aktivitesi 40 misli kadar artar (Gallegos *et al.* 1997). Yaptığımız çalışmada  $\text{Se}^{+4}$ 'ün enzim aktivitesini arttırmasında literatürü destekler nitelikte bir sonuçtur.

**KAYNAKLAR**

- Altunkaynak, B. ve Özbek, E., 2008. Programlanmış hücre ölümü: Apoptoz nedir?. Tıp Araştırmaları Dergisi, 6(2), 93-104.
- Arner, E.S.J., Björnstedt, M. and Holmgren, A., 1994. 1-chloro-2,4- dinitrobenzene is an irreversible inhibitor of human thioredoxin reductase. The Journal of Biological Chemistry, 270(8), 3479-3482.
- Arner, E.S.J., Nordberg, J. and Holmgren, A., 1996. Efficient reduction of lipoamide and lipoic acid by mammalian thioredoxin reductase. Biochem. Biophys. Res. Commun., 225, 268-274.
- Arner, E.S.J. and Holmgren, A., 2000. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. The FEBS Journal, 267(20), 6102-6109.
- Avcı, Z., 2008. Karaciğer Nakli Yapılan Çocuklarda Serum Prohepsidin Düzeyinin Eritrosit Göstergeleri, Serum Demir Değişkenleri ve Karaciğer Demir Yoğunluğu İle İlişkisinin Araştırılması. Uzmanlık Tezi, Başkent Üni. Tıp. Fak., Ankara.
- Avval, F.Z. and Holmgren, A., 2009. Molecular mechanisms of thioredoxin and glutaredoxin as hydrogen donors for mammalian S phase ribonucleotide reductase. The Journal of Biological Chemistry, 284, 8233-8240.
- Baker, A., Payne, C.M., Briehl, M.M. *et al.* Thioredoxin, a gene found overexpressed in human cancer, inhibits apoptosis *in vitro* and *in vivo*. Cancer Research, 57, 5162-5167.
- Bar-Noy, S., Gorlatov, S.G. and Stadtman, T.C., 2000. Overexpression of wild type and SeCys/Cys mutant of human thioredoxin reductase in *E. coli*: the role of selenocysteine in the catalytic activity. Free Radical biology and Medicine, 30(1), 51-61.
- Bat, L., Erdem, Y., Ustaoglu Tırl, S. ve Yardım, Ö., 2008. Balık Sistematığı, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara.
- Becker, K., Gromer, S., Schirmer, R.H. and Müller, S., 2000. Thioredoxin reductase as a pathophysiological factor and drug target. The FEBS Journal, 267(20), 6118-6125.
- Biaglow, J.E. and Miller, R.A., 2005. The thioredoxin reductase/Thioredoxin system. Cancer Biology & Therapy, 4(1), 6-13.
- Bradford MM., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation (quantification\*\*) of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 72, 248-251.
- Cabadak, H., 2008. Hücre siklusü ve kanser. Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fak. Dergisi, 9(3), 51-61.
- Carvalho, C. *et al.*, 2012. Biomarkers of adverse response to mercury : histopathology versus thioredoxin reductase activity. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2012, 359879-359888.
- Cheng, Q., Sandalova, T., Lindqvist, Y. and Arner, E.S.J., 2008. Crystal structure and catalysis of the selenoprotein thioredoxin reductase 1. The Journal of Biological Chemistry, 284, 3998-4008.

- 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.
- Dai, C. and Wang, M.H., 2011. Isolation and characterization of thioredoxin and NADPH-dependent thioredoxin reductase from tomato (*Solanum lycopersicum*). *Korea Science Journal*, 44(10), 692-697.
- Erkhambayer, S., Mollbrink, A. and Eriksson, L.C., 2011. The effect of sodium selenite on liver growth and thioredoxin reductase expression in regenerative and neoplastic liver cell proliferation. *Biochemical Pharmacology*, 83, 687-693.
- Fang, J. and Holmgren, A., 2006. Inhibition of Thioredoxin and Thioredoxin Reductase by 4-Hydroxy-2-nonenal in Vitro and in Vivo. *Journal of the American Chemical Society*, 128(6), 1879-1885.
- Fujii, J., Iuchi, Y., Matsuki, S. and Ishii, T., 2003. Cooperative function of antioxidant and redox systems against oxidative stress in male reproductive tissues. *Asian Journal of Andrology*, 5, 231-242.
- Gallegos, A., Berggren, M.I., Gasdaska, J.R. and Powis, G., 1997. Mechanisms of the regulation of thioredoxin reductase activity in cancer cells by the chemopreventive agent selenium. *Cancer Res.*, 57, 4965-4970.
- Gasdaska, J.R., Harney, J.W., Gasdaska, P.Y., Powis, G. and Berry, M.J., 1999. Regulation of human thioredoxin reductase expression and activity by 3'-untranslated region selenocysteine insertion sequence and mRNA instability elements. *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 25379-25385.
- Gasdaska, J.R., Berggren, M. and Powis, G., 1995. Cell growth stimulation by the redox protein thioredoxin occurs by a novel helper mechanism. *Cell Growth Differ.*, 6, 1643-1650.
- Gladyshev, V.N., Boyington, J.C., Khangulov, S.V., Grahame, D.A., Stadtman, T.C. and Sun, P.D., 1996. Characterization of crystalline formate dehydrogenase h from *escherichia coli* stabilization, epr spectroscopy, and preliminary crystallographic analysis. *J Biol. Chem*, 271, 8095-8100 .
- Gladyshev, V.N., Krause, M. & Xu, X.M., et al., 1999. Selenocysteine-containing thioredoxin reductase in *C. elegans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 259, 244-249.
- Gonzales, P.P., Baldesten, A., Reichard, P., 1970. Purification of a thioredoxin system from yeast. *Journal of Biochem.*, 245, 2363-2370.
- Greenspan, F.S. and Gardner, D.G.(eds), 2004. *Basic and clinical endocrinology*. 7 th ed, New york: Mc Grow Hill, 660-666.
- Gromer, S., Arscott, L.D., Williams Jr., C.H., Schirmer, R.H. and Becker, K., 1998. Human placenta thioredoxin reductase: isolation of the selenoenzyme steady state kinetics, and inhibition by therapeutic gold compounds. *The Journal of Biological Chem.*, 273, 20096-20101.
- Gürdöl, F., Ademoğlu, E., *Biyokimya Nobel Tıp Kitapevleri*. 2. Baskı. 2010. İstanbul.
- Hainaut, P., Miller, J., 1993. Redox modulation of p53 conformation and sequence-specific DNA binding. *Cancer Res.*, 53, 4469-4473.
- Haug, A. and Foy, C.E., 2008. Molecular aspects of aluminum toxicity. *Plant Sciences*, 1(4), 245-373.
- Holmgren, A., 1977. Bovine thioredoxin system. *The Journal of Biological Chemistry*,



- 252(13), 4600-4606.
- Holmgren, A., 1979. Reduction of disulfides by thioredoxin. Exceptional reactivity of insulin and suggested functions of thioredoxin in mechanism of hormone action. *The Journal of Biological Chem.*, 254, 9113-9119.
- Jones, D.L. and Kochian, L.V., 1995. Aluminum Inhibition of the Inositol 1,4,5-Trisphosphate Signal Transduction Pathway in Wheat Roots: A Role in Aluminum Toxicity?. *The PLANT cell*, 7(11), 1913-1922.
- Jordan, A. and Reichard, P., 1998. Ribonucleotide reductases. *Annual Review of Biochemistry*, 67, 71-98.
- Karaca, Ş., Güder, H., 2009. Dermatolojide antioksidan sistem. *Turkish Journal of Dermatology*, 3(2), 32-39.
- Kasprzak, K.S., Sunderman, Jr., F.W. and Salnikow, K., 2003. Nickel carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 553(1), 67-97.
- Keha, E. ve Küfrevioğlu, Ö.İ., 2004. *Biyokimya, Aktif Yayınevi, Erzurum.*
- Kmerdere, R., 2008. *Gliyal Tümörlerde Tiyoredoksin Redüktaz Değerleri. Uzmanlık Tezi, İstanbul Üni. Cerrahpaşa Tıp Fak., İstanbul.*
- Koza, M., 2010. *Asetaminofen İle Uyarılan Karaciğer ve Böbrek Toksisitesi Üzerinde Katekinlerin Koruyucu Etkilerinin İncelenmesi. Uzmanlık Tezi, Başkent Üni. Tıp Fak., Ankara.*
- Laemmli UK., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227,680-685.
- Lehninger AL. *Principles of biochemistry.* Newyork: Worth , Publishers Inc, 2000.
- Lennon, B.W., Williams Jr., C.H. and Ludwig, M.L., 1999. Crystal structure of reduced thioredoxin reductase from *Escherichia coli*: structural flexibility in the isoalloxazine ring of the flavin adenin dinucleotide cofactor. *Protein Science*, 8, 2366-2379.
- Lennon, B.W., Williams Jr.,C.H. and Ludwig, M.L., 1999. Crystal structure of reduced thioredoxin reductase from *Escherichia coli*: Structural flexibility in the isoalloxazine ring of the flavin adenine dinucleotide cofactor. *Protein Science*, 8(11), 2366-2379.
- Li, X., Hill, K.E., Burk, R.F. and May, J.M., 2001. Selenium spares ascorbate and  $\alpha$ -tocopherol in cultured liver cell lines under oxidant stress. *FEBS Letters*, 508, 489-492.
- Lu, J., Chew, E. and Holmgren, A., 2007. Targeting thioredoxin reductase is a basic for cancer therapy by arsenic trioxide. *PNAS*, 104(30), 12288-12293.
- Lu, J., Papp, L.V., Fang, J. *et al.*, 2006. Inhibition of mammalian thioredoxin reductase by some flavonoid; implications for myricetin and quercetin anticancer activity. *Cancer Research*, 66, 4410-4418.
- Luthman, M. and Holmgren, A., 1982. Rat liver thioredoxin and thioredoxin reductase: purification and characterization. *Biochemistry*, 21, 6628-6633.
- Magda, D., Lepp, C., Gerasimchuk, N., Lee, I., Sessler, J.L., Lin, A., Biaglow, J.E. and Miller, R.A., 2001. Redox cycling by motexafin gadolinium enhances cellular response to ionizing radiation by forming reactive oxygen species. *International Journal of Radiation Oncology\*Biolog\*Physics*, 51(4), 1025-1036.

- Maggioli, G., Piacenza, L., Carambula, B. and Carmona, C., 2004. Purification, characterization and immunolocalization of a thioredoxin reductase from *Fasciola hepatica*. *J.Parasitol*, 90, 205-211.
- May, J.M., Cobb, C.E., Mendiratta, S., Hill, K.E. and Burk, R.F., 1998. Reduction of the ascorbyl free radical to ascorbate by thioredoxin reductase. *The Journal of Biological Chemistry*, 273, 23039-23045.
- Mustacich, D. and Powis, G., 2000. Thioredoxin reductase. *Biochemical Journal*, 346, 1-8.
- Nelson, R.L., Davis, F.G., Sutter, E., Kikendall, J.W., Sobin, L.H., Milner, J.A. and Bowen, P.E., 1995. Serum selenium and colonic neoplastic risk. *Diseases of the Colon&Rectum*, 38(12), 1306-1310.
- Nikitovic, D. and Holmgren, A., 1996.  $\delta$  nitrosoglutathione is cleaved by the thioredoxin system with liberation of glutathione and redox regulating nitric oxide. *The Journal of Biological Chemistry*, 271, 19180-19185.
- Nishinaka, Y., Masutani, H. and Nakamura, J.Y., 2001. Regulatory roles of thioredoxin in oxidative stress-induced cellular responses. *Redox Report*, 6(5), 289-295.
- Omata, Y., Folan, M., Shaw, M., Messer, R.L., Lockwood, P.E., Hobbs, D., Bauillaguet, S., Sano, H., Lewis, J.B. and Wahata, J.C., 2006. Sublethal concentrations of diverse gold compounds inhibit mammalian cytosolic thioredoxin reductase (TrxR1). *Toxicology In Vitro*, 20(6), 882-890.
- Ortaboy, S., 2010. Bazı Kobalt Komplekslerinin Elektrokimyasal Davranışı ve Titanyum dioksit Üzerinde adsorpsiyonu, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Ens., İstanbul.
- Özgençli, İ., Temel, Y., Küfrevioğlu, Ö.İ. ve Çiftci, M., 2013. Bazı pestisitlerin gökkuşuğu alabalığı karaciğerinden saflaştırılan mitokondriyal tiyoredoksin redüktaz enziminin aktivitesi üzerine *in vitro* etkilerinin incelenmesi. *Muş Alparslan Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 1(2), 109-117.
- Pedrajas, J.R., Kosmidou, E., Miranda-Vizuete, A., Gustafsson, J., Wright, A., and Spyrou, G., 1998. Identification and functional characterization of a novel mitochondrial thioredoxin system in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chem.*, 274, 6366-6373.
- Polyak, K., Xia, Y., Zweler, J.L., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B., 1997. A model for p53-induced apoptosis. *Nature*, 389, 300-303.
- Rigobello, M., Vianello, F., Folda, A., Roman, C., Scutari, B. and Bindoli, A., 2006. Differential effect of calcium ions on the cytosolic and mitochondrial thioredoxin reductase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 343, 873-878.
- Rigobello, M.P., Callegaro, M.T., Barzon, E., Benetti, M. and Bindoli, A., 1998. Purification of mitochondrial thioredoxin reductase and its involvement in the regulation of membran permeability. *Free Radical Biology-Medicine*, 24, 370-376.
- Sandalova, T., Zhong, L., Lindqvist, Y., Holmgren, A. and Schneider, G., 2001. Three-dimensional structure of a mammalian thioredoxin reductase: Implications for mechanism and evolution of a selenocysteine-dependent enzyme. *PNAS*, 98(17), 9533-9538.
- Şimşir, Y. ve Özgen A.G., 2010. Tiroid ve selenyum. *Turkish Journal of Endocrinology and Metabolism*, 14, 76-79.

- Tamura, T. And Stadtman, T.C., 1995. A new selenoprotein from human lung adenocarcinoma cells: purification, properties and thioredoxin reductase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93, 1006-1011.
- Tanaka, R., Kosugi, K., Mizukami, M., Ishibashi, M., Tokunaga, H. and Tokunaga, M., 2004. Expression and purification of TrxA and TrxB from *Brevibacillus choshinensis*. *Protein Expression and Purification*, 37, 385-391.
- Tandogan, B. and Ulus, N.N., 2011. Thioredoxin reductase. *Hacettepe J. Biol. Chem.*, 39;87-92.
- Tibodeau, J.D., Benson, L.M., Isham, C.R., Owen, W.G. and Bible, K.C., 2008. The anticancer agent chaetocin is a competitive substrate and inhibitor of thioredoxin reductase. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11(5), 1096-1106.
- Turanov, A.A., Hatfield, D.L. and Gladyshev, V.N., 2010. Characterization of protein targets of mammalian thioredoxin reductase. *Methods in Enzymology*, 474, 245-254.
- Türkbey, B., Karcaaltıncaba M. ve Choyke, P.L., 2008. *In vivo* tümör anjiyogenezi görüntülemesi. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 39, 144-152.
- Wang, F., Gao, F., Lan, M., Yuan, H., Huang, Y. and Liu, J., 2008. Oxidative stress contributes to silica nanoparticle-induced cytotoxicity in human embryonic kidney cells. *Toxicology In vitro*, 23(5), 808-815.
- Wang, Y., Zhong, H., Holmgren, A., Tian, W. and Zhong, L., 2008. Inhibitory effect of green tea extract and (-)-epigallocatechin -3- gallate on mammalian thioredoxin reductase and HeLa cell viability. *Oncology Reports*, 20, 1479-1487.
- Williams, Jr., C.H., 1992. Lipoamide dehydrogenase, glutathione reductase, thioredoxin reductase and mercuric ion reductase-A family of flavoenzyme transhydrogenases. In *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes*(Müller, F., ed.), 3, 121-211.
- Williams, Jr., C.H., Arscott, L.D., Müller, S., Lennon, B.W., Ludwig, M.L., Wang, P., Veine, D.M., Becker, K. and Schirmer, R.H., 2000. Thioredoxin reductase. *European Journal of Biochemistry*, 267(20), 6110-6117.
- Williams, Jr., C.H., Zanetti, G., Arscott, L.D. and McAllister, J.K., 1967. Lipoamide dehydrogenase, glutathione reductase, thioredoxin reductase, and thioredoxin a simultaneous purification and characterization of the four proteins from *Escherichia coli* b. *The Journal of Biological Chemistry*, 242, 5226-5231.
- Wittle, A.B., Anestel, 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 Biology & Medicine*, 39, 696-703.
- Wolosiuk, R.A., Crawford, N.A., Yee, B.C. and Buchanan, B.B., 1979. Isolation of the three thioredoxins from spinach leaves. *The Journal of Biological Chemistry*, 254, 1627-1632.
- Yanık, T., 2009. Gökkuşluğu Alabalığı ve Alabalıkların Morfolojik Özellikleri Arazi Çalışmaları. *Doğal Alabalık Çalıştayı*, 22-23 Ekim.
- Yapar, S.B., 2006. Alfa Lipoik Asitin Rat Karaciğer Homojenatlarında İndüklenmiş Lipid Peroksidasyonuna Etkisi. *Uzmanlık Tezi, Trakya Üni. Tıp Fak., Edirne*.
- Zhong, L. and Holmgren, A., 2000. Essential role of selenium in the catalytic activities of mammalian thioredoxin reductase revealed by characterization of recombinant enzymes with selenocysteine mutations. *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 18121-18128.

## ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Kars'ın Sarıkamış ilçesinde doğdu. İlköğrenimi Sarıkamış, orta ve lise öğrenimini ise Erzurum'da tamamladı. 2003-2004 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi Orta Öğretim Fen ve Matematik Alanları Eğitimi Bölümü Kimya Eğitimi Anabilimdalı'ndan 2008 yılında mezun oldu. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilimdalı, Biyokimya Bilimdalı'nda doktora öğrenimine başladı. 2008 yılında Toprak Mahsulleri Ofisi Erzurum Şube Müdürlüğü' ne atandı. Halen aynı kurumda çalışmakta olan araştırmacı evli ve 2 çocuk annesidir.