

283883

T. C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ FAKÜLTESİ

SIĞIR AKCİĞER GLUTATYON REDÜKTAZI
ve
ÖZELLİKLERİ

BİYOKİMYA PROGRAMI
BİLİM UZMANLIĞI TEZİ

SELAHATTİN MUHAMMED

ANKARA — 1981

67

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ FAKÜLTESİ

SIĞIR AKCİĞER GLUTATYON REDÜKTAZI
ve
ÖZELLİKLERİ

BIYOKİMYA PROGRAMI
BİLİM UZMANLIĞI TEZİ

SELAHATTİN MUHAMMED

Rehber Öğretim Üyesi : Prof. Dr. E. FERHAN TEZCAN

ANKARA - 1981

İ Ç İ N D E K İ L E R

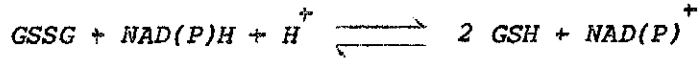
Sayfa

GİRİŞ	1
GSSGR'nın Hücredeki Görevi	1
GSH'nın Hücre Zarı Üzerindeki Koruyucu Etkisi	2
GSH'nın Detoksifikasyondaki Yeri	6
GSH'nın Amino Asit Transportundaki Yeri	9
GSH'nın Sistein Deposu Olarak Kullanılması	9
GSH'nın Prostaglandin Endoperoksit Metabolizmasındaki Yeri	9
GSSGR'nın Genetik Özellikleri	10
GSSGR'nın Çeşitli Kaynaklardan Saflaştırılması, Moleküler Yapısı ve Kinetik Özellikleri	12
Akciğer Dokusunda Yapılan GSSGR ve GSH ile İlgili Çalışmalar	18
AMAÇ	19
ARAÇ, GEREÇ ve YÖNTEMLER	20
Araçlar	20
Gereçler	20
Yöntemler	21
Enzim Aktivitesinin Saptanması	21
Protein Miktarlarının Saptanması	21
Sephadex G-150 Jel Elemesi Yöntemi ile Enzimin Molekül Ağırlığının Saptanması	22
Poliakrilamid Jel Elektroforezi	23
BULGULAR	25
GSSGR'in Saflaştırılması	25

	<u>Sayfa</u>
GSSGR İsoenzimlerinin Molekül Ağırlıklarının Saptanması _ _ _ _ _	44
GSSGR İsoenzimlerinin Saflığının Poliakrilamid Jel Elektroforezi Yöntemi ile Kontrolü _ _ _ _ _	47
TARTIŞMA _ _ _ _ _	49
ÖZET _ _ _ _ _	53
ÖZET (İngilizce) _ _ _ _ _	54
KAYNAKLAR _ _ _ _ _	55
KISALTMALAR _ _ _ _ _	68

G İ R İ Ő

Glutathon redüktaz (GSSGR) [NAD(P)H : oksideglutasyon oksidoredüktaz, EC 1.6.4.2] okside glutasyon (GSSG) ile, redükte nikotinamid adenin dinucleotid (fosfat) [NAD(P)H] arasındaki tepkimeyi katalize eder :



Bir flavoprotein olan enzim, elektron vericisi olarak NADPH ya da NADH'yu kullanabilir. Fakat NADH'ya olan afinitesi daha azdır (1).

NADPH, sitosolde başlıca pentoz fosfat yolu, isositrat dehidrogenaz ve malik enzim tarafından katalize edilen tepkimelerle elde edilir.

Tepkime sonunda oluşan redükte glutasyon (GSH) biyolojik sistemler için önemli bir bileşiktir; γ -glutamil-sisteinil-glisin yapısında üçlü bir peptiddir.

GSSGR'nin Hücredeki Görevi :

Enzimin hücredeki görevi GSH : GSSG oranını kontrol ederek, GSH düzeyinin yüksek kalmasını sağlamaktır ve genel olarak bu oran 20:1 dir (2). Bu nedenle enzimin görevi, GSH'nın hücredeki önemi tartışılarak açıklanabilir.

GSH'nın özellikle zar yapısını koruduğu (3); karaciğerde detoksifi-

kasyon tepkimelerinde (4,5); böbrekte amino asit transportunda (6,7) yer aldığı ve tüm hücrelerde sistein deposu (8) olarak görev gördüğü bilinmektedir.

GSH'nın Hücre Zarı Üzerindeki Koruyucu Etkisi :

Bu etki iki şekilde kendini gösterir :

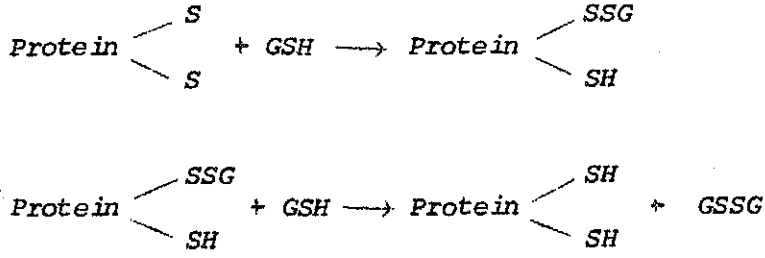
- a) GSH zar proteinlerinin tiyol (-SH) gruplarını stabil hale getirir.*
- b) GSH hidroperoksit metabolizmasını düzenleyerek, zarın lipit kısmının peroksidasyonunu önler.*

a) GSH, tüm hücrelerde, özellikle protein sentezinin olmadığı alyuvarlarda, önem taşır. Alyuvar zar proteinlerinin, hemoglobin ve hücredeki diğer proteinlerin tiyol (-SH) gruplarını stabil hale getirerek, hücrenin canlılığını koruduğu ileri sürülmektedir (9,10).

Genel olarak, hücrelerde NADPH ya da NADH kullanarak disülfid (-S-S-) bağlarını redükleyen üç enzimatik aktivite yer alır : lipoamid dehidrogenaz, tiyoredoksin redüktaz ve GSSGR. Her üç enzim de substratları açısından özgüdür ve proteine bağlı (-S-S-) bağlarını redükleyebildiklerini gösteren yayın yoktur (11,12).

Yalnız, Carlberg ve Mannervik (13) tarafından Koenzim-A ve GSH'dan oluşan karışık bir disülfidin, maya GSSGR'ı tarafından substrat olarak kullanıldığı saptanmıştır.

Son yıllarda, sitosolde bulunan tiyol-transferazın aşağıdaki tepkimeleri katalize ettiği gözlemlendi (14).



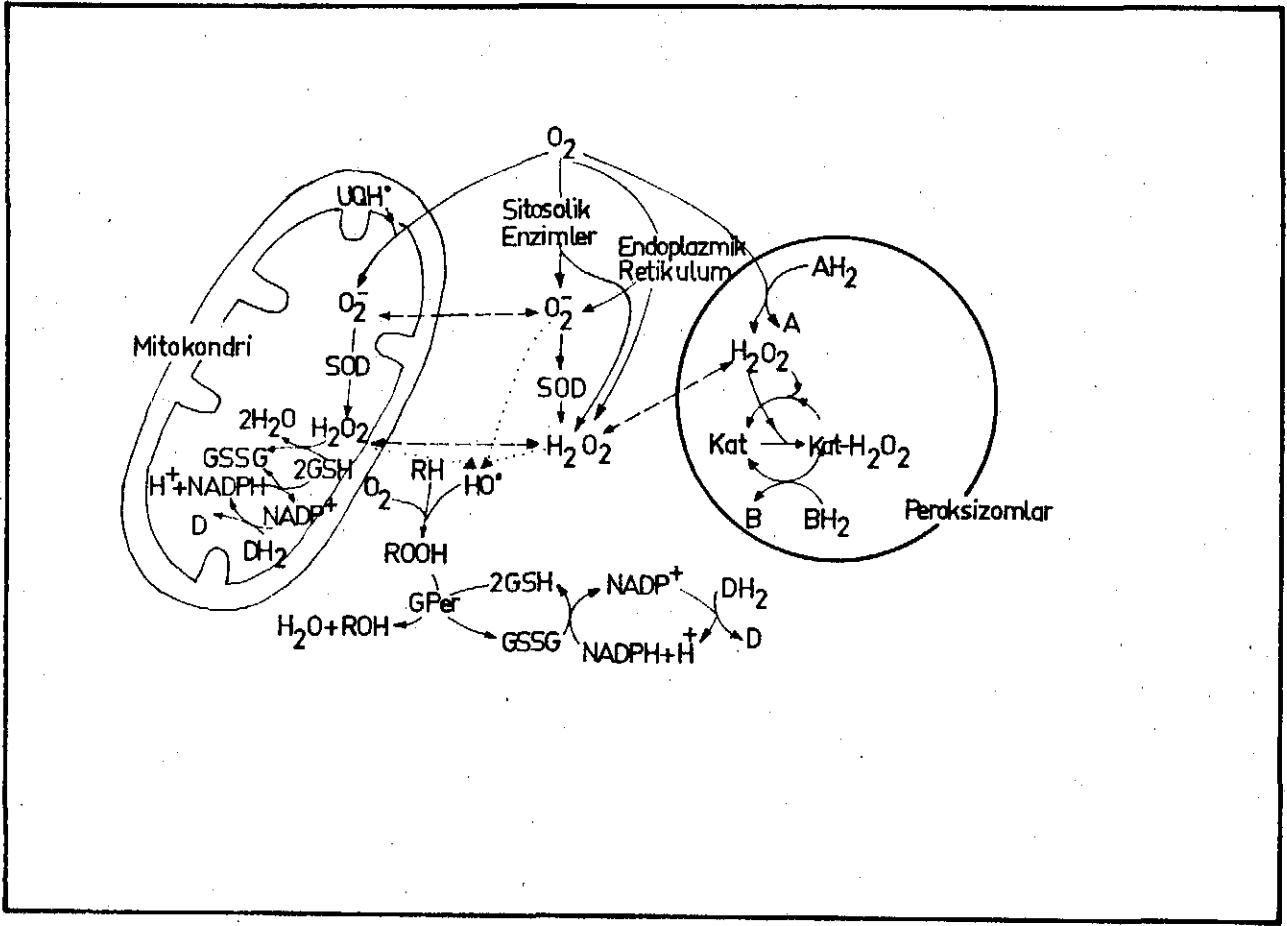
Bu bulguya göre, GSSGR'in protein (-SH) gruplarının redüklenmesindeki rolü, yukardaki tepkimelerle açığa çıkan GSSG moleküllerinden tekrar GSH'nın oluşmasını katalize etmektedir.

Yayınlanan bir çalışmada GSH, proteinlere ait (-SH) grupları ve proteinle GSH dan oluşan karışık disulfid konsantrasyonlarının, hücrede "diurnal" bir değişim gösterdiği; buna bağlı olarak proteinlerdeki disulfid : tiyol oranının değişerek, proteinleri oksitlenme ya da redüklenmeye karşı koruduğu savunulmaktadır (15).

Fare karaciğer mitokondrilerinde de düşük konsantrasyonda GSH (4-8 n mol/mg protein), GSSGR ve glutatyon peroksidaz (GPer)'in bulunduğu gösterilmiştir (16-18). Bunların gerçek görevleri tam olarak bilinmemektedir. Vignais ve Vignais (19)'e göre, GSH sitosolde olduğu gibi oksidanların (20) etkisini tamponlayarak, mitokondri proteinlerinin (-SH) gruplarını redükte halde tutar. GSH'nın proteinlerdeki (-SH) gruplarını modifiye ederek mitokondri iç zarının geçirgenliğini değiştirdiği de vurgulanmaktadır (19).

b) Tiyol oksidanlardan olan hidrojen peroksit (H_2O_2) ve superoksit anyonu (O_2^-), az konsantrasyonda da olsa, aerobik hücrelerin normal metabolitleri arasındadır (Şekil-1).

Hücre içinde H_2O_2 ve O_2^- nin artması, HO^\cdot ve O_2^\cdot radikallerinin



SEKİL-1. Hidroperoksit metabolizması. Kısaltmalar : UQH•, ubikinon radikali; O₂⁻, superoksit anyonu ; HO•, hidroksil radikali; ROOH, alkil peroksit; AH₂, BH₂, DH₂ redüktan bileşikler. [Chance (17)'den alınmıştır.]

oluşmasına neden olur. Bu yapılar, serbest radikal zincir tepkimelerini başlatarak, organik peroksitlerin sentezine ve zarın lipit kısmındaki doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonuna yol açarlar (21). Sonuç olarak zar yapısı bozulur.

Hücrede H_2O_2 'i ve O_2^- çeşitli kaynaklardan elde edilir. Örneğin sıçan karaciğerinde, peroksizomlar hücre H_2O_2 için ana kaynaktır. Oksidaz tepkimeleri sonunda oluşan bu bileşik, genel olarak organel içinde katalaz (Kat) tepkimesi ile yıkılır (22). Çok az miktarda H_2O_2 sitosole diffüze olur.

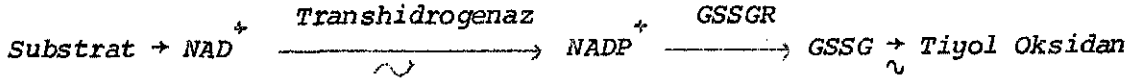
Sitosoldeki H_2O_2 'in ana kaynağının mitokondri (23) ve endoplazmik retikulum (24) olduğu gösterilmiştir. Ksantin oksidaz ve aldehit oksidaz tepkimelerinin katkısı önemsizdir.

Sitosolde O_2^- , flavin ve demir-sülfür içeren enzimler aracılığı ile (25), mitokondride ise redükte ubikinonun oto-oksidasyonu (26) sırasında oluşur.

Bu yapıların hücre içi konsantrasyonları superoksit dismutaz (SOD), Kat ve GPer ile kontrol edilir.

GPer sitosol ve mitokondrideki organik peroksit ve H_2O_2 'yi metabolize ederek, zar lipitlerinin peroksidasyonunu önler. Açığa çıkan GSSG, GSSGR tarafından tekrar GSH'ya dönüştürülür.

Son yıllarda, Jocelyn (27) tarafından GSH'nın mitokondride hidropersitleri GPer'e gerek duymadan redükleyebildiği gösterilmiştir. Mitokondride, tiyol oksidanlar olarak çeşitli diazen ve hidropersitler kullanılarak yapılan bir diğer çalışmada da, bu oksidanların aşağıda verilen redoks sistemi ile redüklenerek etkisiz hale getirildiği saptanmıştır (28).



Çalışmada, redüksiyonun enerji isteyen bir olay olduğu, (-SH) gruplarına bağlanan N-etilmalimid (NEM) ve p-hidroksimerküribenzoat, ayrıca malonat ve "uncoupler"lar tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir.

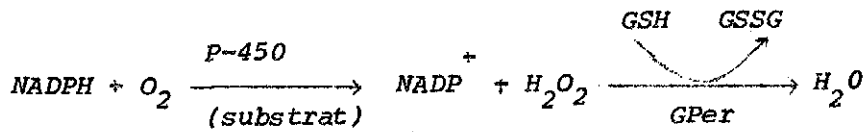
Redoks sisteminde transhidrogenaz tepkimesi ve tiyol oksidanın redüklenmesi enerji isteyen kademelerdir. Bu iki kademede moleküler yapıları tariflenmeyen yüksek enerjili ara bileşiklere gerek duyulduğu sanılmaktadır.

GSH'nın Detoksifikasyondaki Yeri :

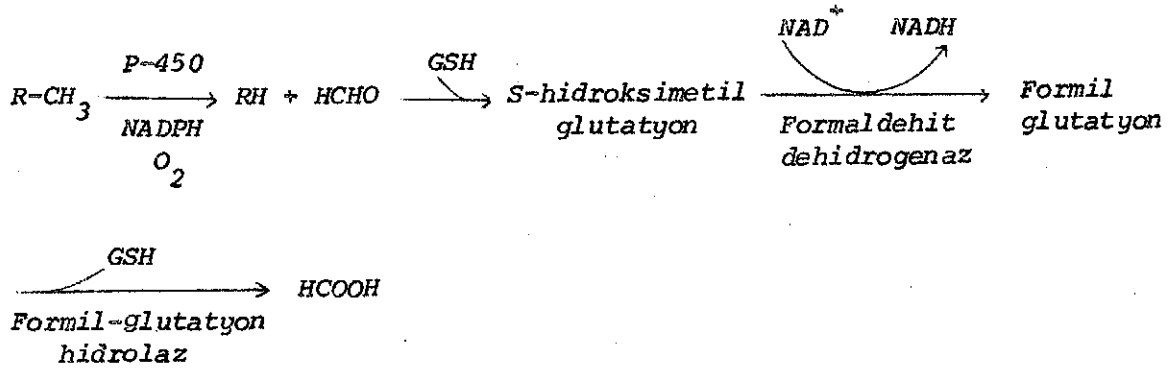
Bazı ilaç ve bileşiklerin karaciğerde P-450 monooksijenaz sistemi ile oksidasyonu sırasında, hücrede toksik etki gösteren H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$, aldehit ve epoksit gibi ürünler oluşur ve GSH'nın katıldığı tepkimelerle detoksifiye edilirler (5,22,29).

GSH bu tepkimelerde :

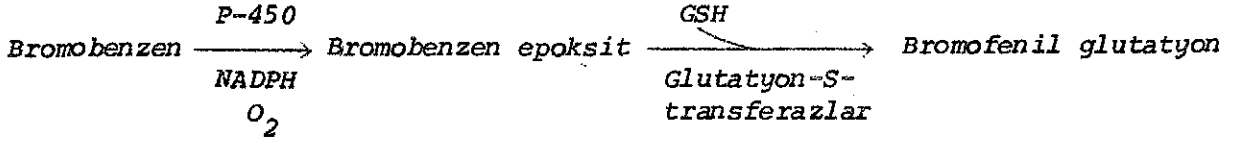
1. Reduktan olarak yer alır (peroksit redüksiyonu)



2. Kofaktör olarak yer alır (aldehit ve α -ketoaldehit oksidasyonu)



3. Nukleofil olarak yer alır (ilaç konjugasyonu)



Çalışmalar genellikle, fenobarbital verilerek P-450 sistemleri indüklenmiş (30) sıçanlardan elde edilen hepatositlerde yapılmıştır.

Hepatositlerin bulunduğu ortama H_2O_2 oluşumuna yol açan etilmorfin, aminopirin ve perfluoro-n-heksan ilave edildiğinde, ortama GSSG salındığı gözlenmiştir (22). Bu bulgu oluşan H_2O_2 nin GPer tepkimesi ile redüklenmesine bağlıdır ve ortama GSSG verilir.

Dietilmaleat (DEM) verilerek karaciğer GSH seviyesi % 80-90 kadar düşürülmüş deney hayvanlarından elde edilen hepatositlerde deney tekrarlandığında hepatositlerde H_2O_2 konsantrasyonunun arttığı, GSSG salınımının ise olmadığı gözlenmiştir (31). Ortamda GSH olmadığı için H_2O_2 , GPer tepkimesi ile yıkılamamıştır.

İlaçların N-demetilasyonu sırasında açığa çıkan ve toksik olan formaldehit, GSH'nin kofaktör olarak girdiği tepkimeler dizisi ile formik aside dönüştürülür (32). Hepatositler DEM ile inkübe edildikten sonra, formaldehit konsantrasyonundaki düşme incelenmiş ve ortamdaki GSH konsantrasyonunun azalması nedeniyle düşüşün kontrole nazaran daha yavaş olduğu saptanmıştır (33).

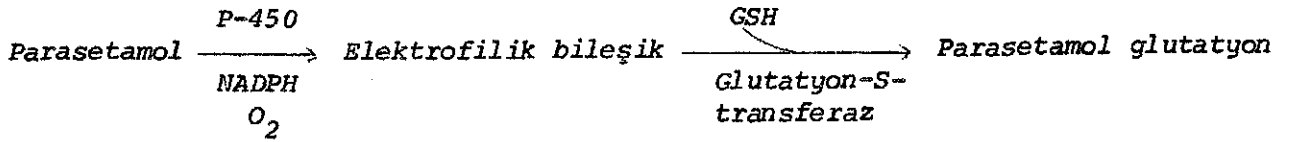
Bazı bileşik ya da ilaçlar da P-450 sistemi ile oksitlendiklerinde (ya da başka tepkimelerle) elektrofilik metabolitler oluştururlar. Bu konuda yapılan çalışmalarda model bileşik olarak bromobenzen ve asetaminofen kullanılmıştır. Bromobenzen P-450 sistemi ile, sitotoksik etki gösteren,

elektrofilik 3,4-bromobenzen epoksite dönüşür (34,35). Bu bileşik glutatyon-S-transferazlar aracılığı ile GSH ile konjuge olarak detoksifiye edilir.

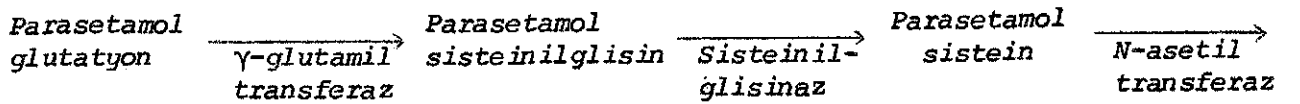
Hepatositlerde hücre zarı NADH'ya geçirgen değildir. Sıçanlara DEM verildiğinde, 3,4-bromobenzen epoksitin sitotoksik etkisi nedeniyle, zarın NADH'yı geçirdiği (36); ortama GSH sentezine yol açan sistein ya da metiyonin (sistatyonin metabolik yolu ile metiyoninden sistein sentezlenebilir) ilave edildiğinde ise bu etkinin azaldığı gözlenmiştir (37).

Karaciğerde sentezlenen konjuge bileşikler, böbrek hücrelerinde merkapturik asit türevlerine dönüşerek atılırlar. Parasetamol kullanılarak yapılan bir çalışma (38) ile, aşağıda gösterildiği gibi karaciğerde, parasetamol-glutatyon konjuge bileşiğinin sentezlendiği, böbrekte ise bir seri tepkime sonunda parasetamol-N-asetilsisteine dönüşerek, atıldığı saptanmıştır.

K a r a c i ğ e r d e



B ö b r e k t e



Parasetamol
N-asetilsistein

Sonuç olarak, ilaçların metabolizması sırasında P-450 sistemi tarafından oluşturulan bileşiklerin sitotoksik etkisinin GSH tarafından önlenildiği savunulabilir.

GSH'nın Amino Asit Transportundaki Yeri :

γ -Glutamil döngüsü Meister ve arkadaşları (39,40) tarafından bir amino asit transport mekanizması olarak sunulmuştur. Glutasyon sentez ve yıkımı ile ilgili tepkimeleri içerir (41). GSH dan γ -glutamil kalıntısının hücre dışı amino aside transferini katalizleyen γ -glutamil transpeptidazın zarsal bir enzim olduğu ve transporttan sorumlu hücre zarlarına (jejunal villi, proksimal renal tübül) bağlı olarak bulunduğu gösterilmiştir (42).

Döngüyle ilgili son çalışmalar özellikle bir anahtar enzim olan γ -glutamil transpeptidazla ilgilidir. Zar üzerindeki konumu, amino asit özgülüğü ve kinetik özellikleri araştırılmaktadır (43,44).

GSH'nın Sistein Deposu Olarak Kullanılması :

Sisteinin sulu ortamda çözünürlüğü azdır. Bu nedenle GSH'nın γ -glutamil döngüsünde yıkılması ile açığa çıkan sisteinin protein sentezinde kullanıldığı savunulmaktadır (8,45).

Protein sentezi için gerekli diğer amino asitlerin, hücre içine aynı döngü ile taşınabileceği düşünülürse, bu olayın sistein oluşumunu hızlandıracağı söylenebilir.

GSH'nın Prostaglandin Endoperoksit Metabolizmasındaki Yeri :

İlk kez 1964 de GSH'nın prostaglandin metabolizması için gerekli ko-faktör olduğu ileri sürülmüştür. Prostaglandin endoperoksit metabolizmasında GSH'ya bağımlı dört enzim yer alır.

1. Prostaglandin endoperoksit E-isomeras : Labil bir enzimdir ve GSH'nın enzimi inaktivasyondan koruduğu düşünülmektedir (46).

2. Prostaglandin endoperoksit D-isomeras : GSH yı kofaktör olarak kullandığı gösterilmiştir (47).

3. Glutasyon-S-transferazlar : Transferazın tipine bağlı olarak, endoperoksitten prostaglandin F, E ve D karışımlarının oluşumunu katalize ederler (48).

4. GPer : 15-hidroperoksi-prostaglandinlerin 15-hidroksi prostaglandinlere dönüşümünü katalize eder. Bununla beraber, son yıllarda prostaglandin endoperoksit sentetazın aynı zamanda GPer'e benzer aktivite gösterdiği saptandığından GPer'e gerek olmadığı savunulmaktadır (49).

GSSGR'ın Genetik Özellikleri :

Enzimin insanda polimorfizm gösterdiği ve autosomal olarak kalıtıldığı ilk kez Long (50) tarafından gösterilmiş ve selüloz asetat elektroforesi ile, alyuvarlarda S, FS ve F olmak üzere üç fenotip saptanmıştır. S, sıklıkla karşılaşılan ve elektroforezde yavaş yürüyen varyantı gösterir. F, ender rastlanan, elektroforezde hızlı yürüyen varyanttır ve aynı araştırmacı tarafından spesifik aktivitesinin S'e kayısla yüksek olduğu bulunmuştur.

Alyuvar çalışmaları ile S, F ya da FS varyantına sahip oldukları saptanan bireylerin, alyuvarlarında yapılan elektroforez çalışmaları da aynı sonucu vermiştir (51). Bu bulgu her iki tip hücrede, enzimin aynı genetik kontrol altında olduğunu gösterir.

Primer gutta F ve FS sıklığı artar (50). Buna bağlı olarak, hastalarda gözlenen alyuvar GSSGR aktivitesindeki artış diğer hücrelerde de beklenebilir (aynı genetik kontrol altında olduğu düşünülürse) ve aşırı NADPH ge-

reksinimine yol açar. Pentoz fosfat yolu hızlanarak (52), hücrelerde bu yolun diğer ürünü olan pentoz 5-fosfatın konsantrasyonu artar ve aşırı miktarda purin nükleotidler sentezlenir.

Primer gutta gözlenen urisemi, yukarda anlatılan mekanizma ile purin nükleotidlerin fazla sentezine ve yıkılarak ürik asit oluşturmasına bağlanmaktadır.

Ev farelerinde (*Mus Musculus*) yapılan bir çalışmada, böbrekten alınan örneklerde GSSGR geninin kromozom üzerindeki yeri saptandı (53). GSSGR geninin (*Gr-1*) sekizinci kromozomda, sentromerde esteraz-1 (*Es-1*) ve glutamat oksaloasetat transaminaz-2 (*Got-2*) ile yanyana, *Es-1-Got-2-Gr-1* şeklinde yer aldığı gösterildi. Ev faresinin çeşitli türlerinde, insandakine benzer şekilde *Gr-1^a*, *Gr-1^b* ve *Gr-1^{ab}* allellerinin ve buna bağlı olarak *GR-1A* (hızlı), *GR-1B* (yavaş) ve *GR-1AB* (orta hızda) fenotiplerinin bulunduğu saptandı.

Firth ve arkadaşları (54) ise, farelerde GSSGR'ın böbrek, karaciğer, beyin ve alyuvar tiplerini araştırarak, bu dört kaynakta, enzimin aynı genetik kontrol altında olduğunu buldular.

Enzim eksikliği vakaları da yayınlanmış ve enzim eksikliğinin non-sferositik anemi ile elele gittiği gösterilmiştir (55).

Riboflavin eksikliğinde de, apoenzimin FAD doygunluğu azaldığından anemi gözlenebilir (56).

Alyuvar ve akyuvar GSSGR aktivitesinin, bir antitümoral ilaç olan 1,3-bis(kloroetil)-1-nitrozoüre ile tedaviden sonra, azaldığı bildirilmiştir (57). Aktivitedeki azalma ilacın GSSGR'ı alkilleyerek inhibe etmesine bağlanmaktadır.

GSSGR'in Çeşitli Kaynaklardan Saflaştırılması, Moleküler Yapısı ve Kinetik

Özellikleri :

Enzimle ilgili çalışmalar başlıca insan alyuvarlarında yapılmış, alyuvar GSSGR'inin fizikokimyasal (58), katalitik (59,60) ve immunolojik özellikleri (60) saptanmıştır.

Alyuvar GSSGR'ı ilk kez Scott ve arkadaşları (61) tarafından, $(NH_4)_2SO_4$ kesidi ve $Ca_3(PO_4)_2$ jeli kullanılarak, kolon kromatografisi ile 18 000 kez saflaştırıldı. Prostetik grup olarak flavin adenin dinükleotid (FAD) içeren ve daha az aktif olmak üzere NADH ile de tepkimeye girebilen enzimin katalitik özellikleri incelendiğinde, lipoamid dehidrogenaza benzediği gözlemlendi.

Staal ve arkadaşları (62), aynı kaynaktan GSSGR'ı 47 000 kez saflaştırdılar ve içerdiği flavin miktarını ölçerek, 56 600 molekül ağırlığındaki iki alt birimden oluşabileceğini vurguladılar. Enzimin toplam molekül ağırlığını ise Sephadex G-200 jel elemesi yöntemi ile $115\ 000 \pm 4\ 000$ olarak saptadılar.

Massey ve Williams (63) tarafından mayadan saflaştırılan GSSGR'ın alt birim molekül ağırlığı da içerdiği flavin miktarından 56 500 olarak bulundu. Mavis ve Stellwagen (64) ise, sedimentasyon dengesi ve osmatik basınç çalışmaları ile enzimin toplam molekül ağırlığını $120\ 000 \pm 5\ 000$ olarak buldular. Ortama 5 M guanidin hidroklorür katarak yaptıkları sedimentasyon çalışması ile, alt birim molekül ağırlığını $51\ 500 \pm 3\ 000$ olarak saptadılar.

Worthington ve arkadaşları (65) alyuvar hemolizatına 6 μ M FAD eklediğinde, aktivitenin % 40 arttığını gözlediler ve enzimi 40 000 kez saflaştırarak, kristallendirdiler.

İnsan alyuvar GSSGR'ı bölümümüzde yapılan çalışmalarla da saflaştırıldı (66) ve bazı moleküler özellikleri (67) araştırıldı. Enzimin N-ucu amino asidi, dansilleme yöntemi ile aspartik asit olarak tanımlandı ve sodyum dodesil sulfat (SDS)'lı ortamda 10 mol (-SH) grubu içerdiği saptandı.

Enzim, % 1 SDS ve % 1 2-merkaptoetanol içeren ortamda inkübe edilerek, % 10 luk poliakrilamid jel elektroforezine uygulandığında $68\ 300 \pm 7\ 400$ molekül ağırlığındaki alt birimlere ayrıştığı gözlemlendi.

SDS'li ortamda yapılan Sephadex G-100 jel elemesi yöntemiyle ise, alt birim molekül ağırlığı $69\ 500 \pm 1\ 800$ olarak bulundu.

Enzimin kinetik özellikleri de etraflı olarak incelenmiş ve alyuvar GSSGR'ının "düzenli" bisubstrat kinetiğine uyduğu gösterilmiştir (68).

Maya enzimi için Massey ve Williams (63) tarafından "ping-pong", Mannervik (69) tarafından ise "ping-pong" ve "düzenli" mekanizmaların karışımına uyan bir kinetik davranış önerilmiştir.

Bölümümüzde ayrıca yapılan çalışmalarla, $GSSG-NH(CH_2)_6-NH$ -agarose kolonu kullanılarak, afinite kromatografisi ile, insan alyuvar GSSGR'ı da saflaştırıldı (70).

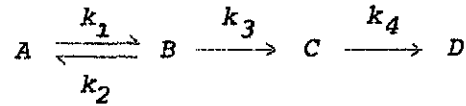
Sephadex G-200 jel elemesi yöntemi ile, alyuvar GSSGR'ının molekül ağırlığı $120\ 000 \pm 2\ 000$; % 1 SDS ve % 1 2-merkaptoetanollü ortamda inkübe edilerek, SDS-jel elektroforezi uygulandığında ise, alt birim molekül ağırlığı $19\ 000 \pm 2\ 000$ olarak saptandı (71).

Alyuvar GSSGR'ının bisubstrat kinetiği incelendiğinde, yüksek NADPH konsantrasyonunda "ping-pong", düşük NADPH konsantrasyonunda "düzenli" mekanizmaya uygun davrandığı gözlemlendi (72).

Enzim NEM ile inhibe edilerek, aktif merkezinde (-SH) gruplarının varlığı gösterildi (73). NEM'in enzimi, NADPH ile inkübe edildikten sonra, inhibe ettiği saptandı ve bu özelliğe dayanarak, enzimin kinetik davranışı için bir mekanizma önerildi.

Çeşitli iyonların alyuvar (61,68) ve maya (74) GSSGR'nın aktivitesi üzerine olan etkisi de araştırılmış; maya enzimi için enzim aktif merkezi ya da yakınında en az iki anyon bağlama bölgesinin bulunabileceği ileri sürülmüştür.

Mayada, NADPH'dan aktif merkeze elektron transferinin mekanizması "stop-flow" kinetik yöntemiyle incelenmiş ve kinetik olarak birbirinden ayırdedilen üç kademenin olduğu gözlenmiştir (75).



Kinetik modelde, enzimin okside şekli olan A, enzim-substrat kompleksi B (E-NADPH) ile "hızlı denge"ye girer. C, NADPH'dan enzime hidrit transferi ile oluşan redükte enzim formunu, D ise, redükte enzimle NADPH'nın oluşturduğu EH_2 -NADPH kompleksini gösterir. Bu durumda tepkime için 2 NADPH molekülüne gerek vardır. Fakat EH_2 'ye NADPH'nın bağlandığını saptayan bir çalışma yoktur. Verilen modelin, tepkimenin tümü için hız kısıtlayıcı kademe olduğu ileri sürülmektedir.

Lipoamid dehidrogenazda ise hız kısıtlayıcı kademe EH_2 nin lipoamid tarafından tekrar oksidasyonu kademesidir (76). Bu nedenle iki enzim birbirinden farklıdır.

Alyuvar enziminin iki alt birimden (58,77) oluştuğu kesinleştikten sonra, molekül yapısını aydınlatmak için daha etraflı çalışmalar yapıldı.

Enzimin alt birimlerinin boyutu 5.5 x 5.0 x 4.5 nm olarak saptanarak, NADPH ve GSSG bağlama bölgelerinin bir alt birim üzerinde birbirlerine zıt yönde yer aldığı gösterildi (78).

Krohne ve arkadaşları (79), adenosine-2',5'-difosfat-Sepharose 4B kullanarak, afinite kromatografisi ile, 90 litre alyuvardan 200 mg kristal halde enzim elde ettiler. X-ışını difraksiyon analizinde de kullanılacak saflıkta olan bu enzim örneğini, karboksimetilleyerek, CN-Br'le parçaladılar ve alyuvar GSSGR'ının aktif merkezindeki amino asitlerin aşağıdaki şekilde dizildiğini saptadılar.

Leu-Gly-Gly-Thr-Cys-Val-Asn-Val-Gly-Cys-Val-Pro-Lys-

Maya GSSGR'ının ve lipoamid dehidrogenazın aktif merkez amino asit dizisi de aynıdır (2). Bu sonuç, 1963 de yayınlanan Scott ve arkadaşları (61)'nin bulgularını desteklemektedir.

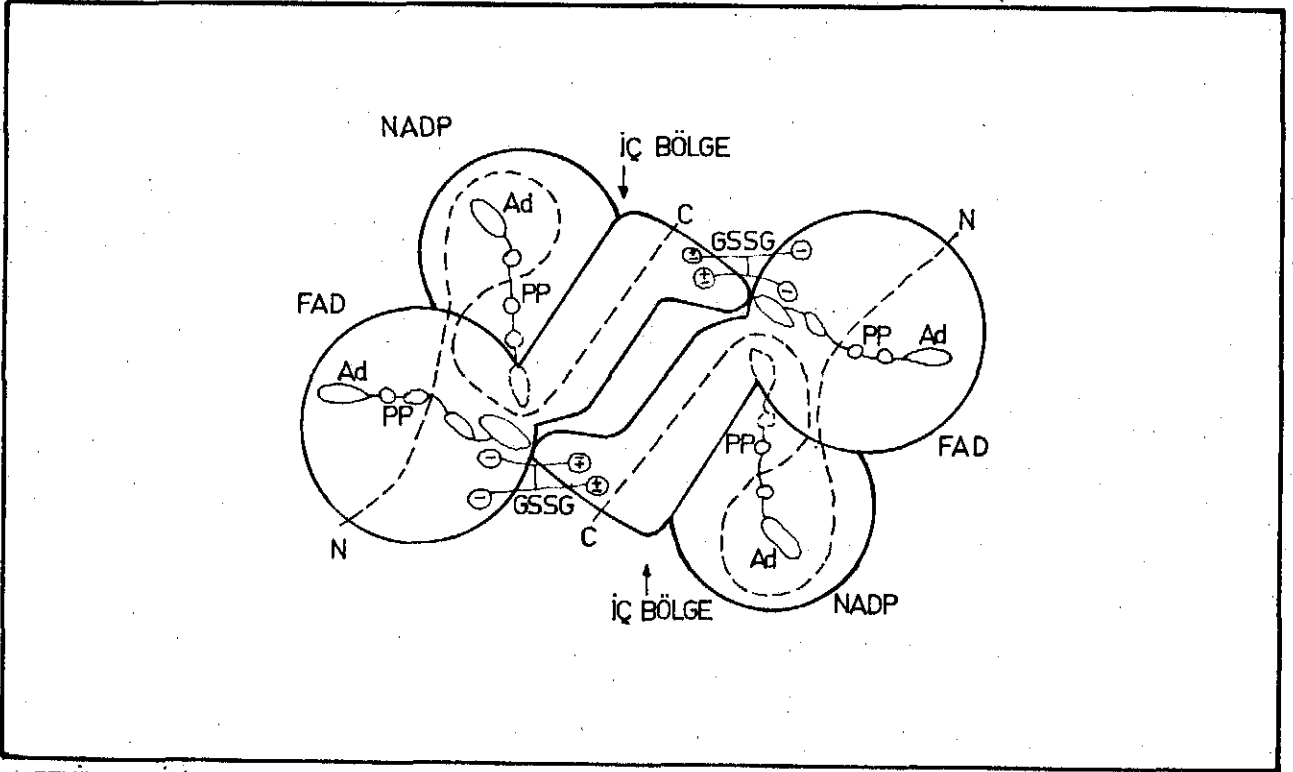
Schulz ve arkadaşları (80), elde ettikleri kristal haldeki GSSGR (79)'a, X-ışını difraksiyon analizini uygulayarak, elektron dansite haritasını hazırladılar ve konformasyonunu aydınlattılar.

Alyuvar GSSGR'ının konformasyonu, prostetik grup FAD'nin yeri, NADPH ve GSSG bağlama bölgeleri Şekil 2'de görülmektedir.

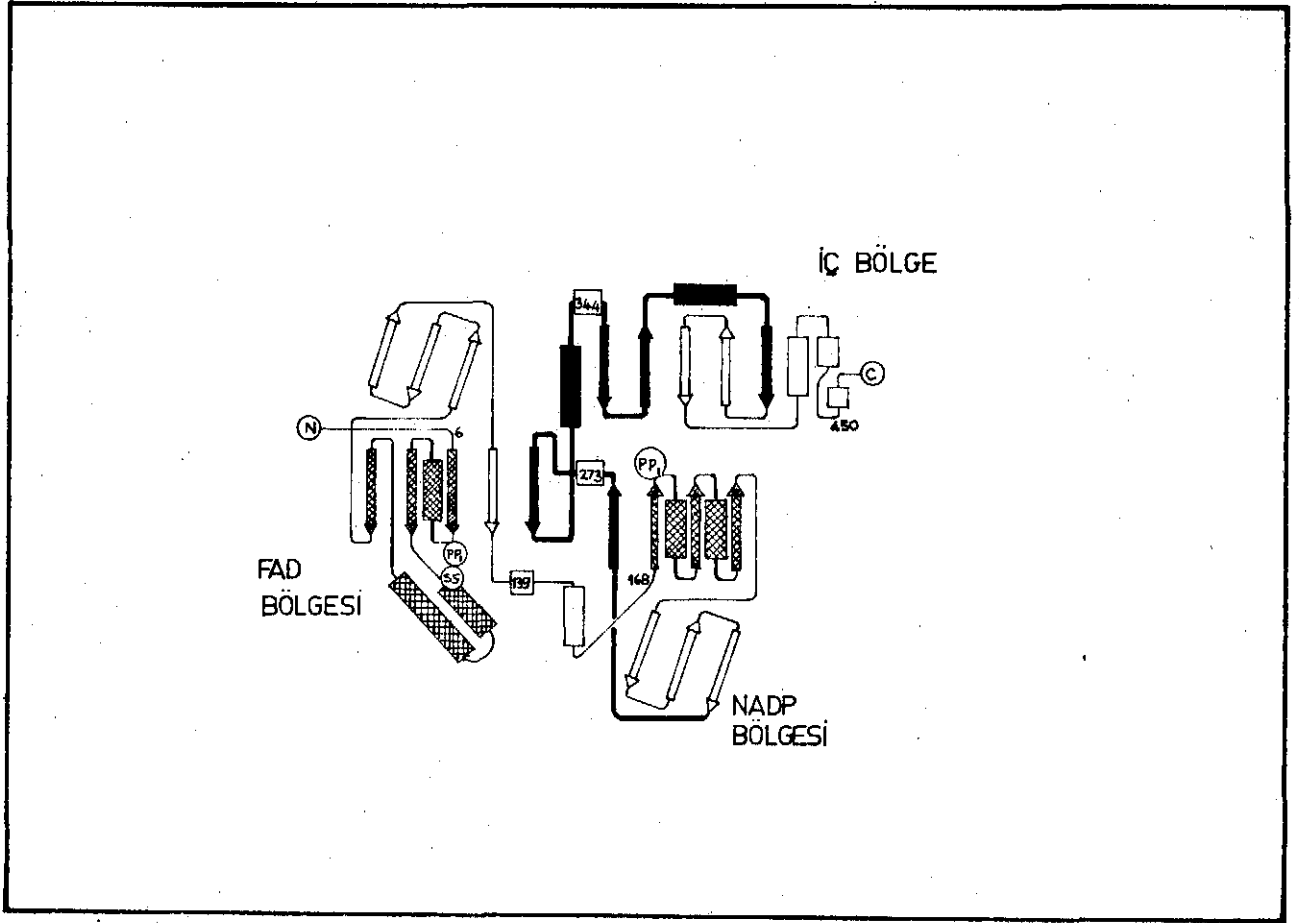
Enzimin ikincil (sekonder) yapısının % 31'ini heliks, % 28'ini ise β -tabakalı yapı oluşturmaktadır (Şekil 3).

Aynı araştırmacı grubu (81) tarafından, enzim tripsin, kimotripsin ve termolisinle parçalara ayrılarak, bu peptitler saflaştırılmış; amino asit dizisinin büyük bir kısmı saptanmıştır.

Alyuvar GSSGR'ının 450. amino asidi olan histidinin de katalizde yer aldığı ileri sürülmektedir (82).



ŞEKİL-2. İki alt birimden oluşan alyuvar GSSGR'nin konformasyonu. Ad ve PP_i, NADPH ve FAD'ye ait adenin ve pirofosfat gruplarının bağlanma bölgelerini gösterir.
 [Schulz (80)'den alınmıştır.]



ŞEKİL_3. Alyuvar GSSGR'ına ait biralt birimin ikincil yapısı. Heliks yapısı dikdörtgenlerle, β -tabakalı yapı oklarla gösterilmiştir. Kareli bölgeler Rossmann bükümleridir. Koyu bölgelerin amino asit dizisi [Schutz (81) tarafından saptanmıştır.]

Enzim, ayrıca insan lensi (83); domuz alyuvarları (84); sıçan, fare ve tavşan karaciğeri (85-87) ile sığır akciğeri (88)'nden saflaştırılarak, moleküler ve kinetik özellikleri üzerinde araştırmalar yapılmıştır. Çeşitli türlerde karaciğerden saflaştırılan GSSGR'nin alt birim yapısı açısından, alyuvar enzimine benzediği anlaşılmıştır.

Son yıllarda, mayadan saflaştırılan GSSGR'nin, Koenzim-A ve GSH'dan oluşan karışık bir disülfidi de substrat olarak kullanabildiği gösterilmiştir (13).

Akciğer Dokusunda Yapılan GSSGR ve GSH ile İlgili Çalışmalar :

Literatürde akciğer GSSGR'ı ile yapılmış etraflı bir çalışma yoktur. Yalnız Moron ve arkadaşları (89) tarafından sıçan akciğer GSSGR'ının seviyesi ölçülerek yayınlanmıştır.

Akciğerde GSSGR aktivitesi, çözünebilir proteinin miligramı başına 0.0418 ± 0.0147 Ü, karaciğerde ise 0.0569 ± 0.0071 Ü olarak saptanmıştır. Karaciğerin protein içeriği daha yüksek olduğu için, verilen bulgularla iki dokudaki enzim aktivitelerini karşılaştırmak hatalı sonuç verir. Gerçekten de akciğerde, yaş ağırlığın gramı başına total protein, 91.8 ± 23.7 mg; karaciğerde 151 ± 26 mg olarak bulunmuştur. Akciğerde çözünebilir protein yüzdesi % 24, karaciğerde ise % 47 dir.

GSH, akciğerde çözünebilir proteinin miligramı başına 0.0714 ± 0.016 µmol, karaciğerde 0.0949 ± 0.0206 µmol olarak saptanmıştır. Total akciğer glutatyonunun % 6 sı GSSG şeklindedir. Çalışmada, in vivo şartlarda enzim aktivitesinin bu dengeyi koruyabildiği savunulmaktadır.

Akciğer glutatyon-S-transferaz aktiviteleri de, karaciğere kıyasla düşüktür. Buna karşılık, aren oksitleri (polisiklik hidrokarbonların

karsinojenik metabolitleri) detoksifiye eden benzpiren oksijenaz aktivitesi, bu bileşiklerle karşılaşma olasılığı fazla olan, akciğerde daha yüksektir.

Yayınlanan bir histokimyasal çalışmada (90) da, GSH'ın özellikle interalveolar epitel hücrelerinde lokalize olduğu gösterilmiştir.

A M A Ç

Sunulan çalışma, siğir akciğer GSSGR'nin saflaştırılması ve bazı moleküler özelliklerinin saptanması için yapılmıştır.

Siğir akciğerinde, iyonik özellikleri açısından farklı, dört GSSGR isoenziminin bulunduğu anlaşılmaktadır. Değişik fizyolojik göreve sahip hücreler (91-94)'in oluşturduğu bir organ olan akciğerin, birden fazla GSSGR isoenzimini içermesi doğaldır.

Daha saf enzim örnekleri elde etmek ve isoenzimlerin özellikle, kinetik davranışlarını saptamak amacıyla çalışmalara devam edilmektedir.

ARAÇ , GEREÇ ve YÖNTEMLER

Araçlar :

Çalışmada yapılan santrifüjleme işlemlerinde, 80 000 g için Beckman Model L3-50 ultrasantrifüjü; 5 000 g - 20 000 g arasında Sorvall Model SS-3 Superspeed santrifüjü; diğerlerinde ise Size-2 Model K International santrifüjü kullanıldı.

Protein ölçümleri ve A_{280} okumaları Zeiss PMQ II spektrofotometresinde yapıldı. Aktiviteler Beckman Model 25 spektrofotometresinde saptandı.

Poliakrilamid jel elektroforezi Buchler Firması'na ait elektroforez aracı ile uygulandı.

Kolon kromatografileri Pharmacia Fine Chemicals Firması'ndan sağlanan kolonlarla yapıldı.

Gereçler :

Çalışmada kullanılan bileşikler kimyasal olarak saftır.

Sığır serum albumini, Armour Pharmaceutical Chicago, Amerika'dan; laktik dehidrogenaz (LDH), NADPH, Boehringer, Mannheim, Batı Almanya'dan; bromfenol mavisi, fenol ayracı, Fisher Sci. Comp., Waltham, Amerika'dan; CM-Sephadex C-50, Sephadex G-150, mavi dekstran 2000, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, İsveç'den; Amido siyahı B, 2-merkaptoetanol, Serva

Fine Biochemica, Heidelberg, Batı Almanya'dan; GSSG, tris (hidroksimetil) aminometan (Tris), aldolaz, enolaz, fenilmetilsulfonil fluorür (PMSF), Sigma Chem. Comp. Saint Louis, Amerika'dan; DE-32 sellüloz Whatman Inc., New Jersey, Amerika'dan; akrilamid, amonyum persulfat, N,N'-metilenbisakrilamid, N,N,N',N'-tetrametiletilediamin (TEMED), riboflavin, heksokinaz, etilediamintetraasetik asit (EDTA) ve tampon çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan diğer bileşikler British Drug Houses Ltd., Poole, İngiltere'den sağlanmıştır.

Enzim Kaynağı : Enzim kaynağı olarak mezbahada yeni kesilen sığırlardan alınan akciğerler kullanıldı.

Yöntemler :

Enzim Aktivitesinin Saptanması :

Staal ve arkadaşları (62) tarafından önerilen yöntem değiştirilerek kullanıldı. 100 mM sodyum fosfat tamponu pH 6.5 , 5 mM EDTA, 1 mM GSSG, 0.12 mM NADPH ve yeterli enzim örneği içeren bir ortamda, 37°C'da NADPH'nin oksitlenmesi, 340 nm de spektrofotometrede, 3 dakika izlendi.

Enzim Ünitesi : Yukardaki koşullarda, dakikada 1 μ mol NADPH'yi oksitleyen enzim miktarı olarak tanımlandı.

Spesifik Aktivite : Bir miligram protein başına düşen enzim ünitesi olarak tarif edildi.

Protein Miktarlarının Saptanması :

Warburg (95) tarafından önerilen yöntem kullanıldı. Örneklerin, spektrofotometrede 260 nm ve 280 nm'de optik dansite (O.D.) olarak absorbansları

ölçüldü ve aşağıdaki eşitlik yardımıyla, içerdikleri protein miktarları hesaplandı.

$$1.55 \times (O.D.)_{280} - 0.76 \times (O.D.)_{260} = \text{mg protein/ml örnek}$$

Spesifik aktivitelerin hesaplanmasında kullanılan protein miktarları Lowry (96) yöntemi ile saptandı. Bu yöntem, yukarda tariflenen yöntemden 10-20 kez daha hassastır.

Yaklaşık olarak 5-100 gamma protein içeren 0.02 ml örneğe, 2.5 ml bazik bakır sulfat ayracı (yöntemde tariflendiği şekilde tartarat içinde hazırlanmış) ilave edildi. On dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 0.25 ml 1 N fenol ayracı (97) ilave edilerek, 30 dakika sonra 750 nm'de spektrofotometrede okundu. Standart olarak siğir serum albumini kullanıldı.

Sephadex G-150 Jel Elemesi Yöntemiyle Enzimin Molekül Ağırlığının Saptanması :

Çalışmada Andrews (98)'un tariflediği yöntem kullanıldı. Bu yöntem özellikle globular yapıdaki proteinlerin molekül ağırlıklarının saptanmasında doğru sonuç verir. Molekül ağırlığı bilinen proteinlerin molekül ağırlıklarının logaritması ile, jel-kolonunda ölçülen yıkama hacimleri arasında standart grafiği çizilir. Molekül ağırlığı saptanacak proteinin yıkama hacmine karşıt gelen molekül ağırlığı, standart grafiğinden bulunur.

Yıkama hacimleri, proteinlerin varsa aktiviteleri ölçülerek ya da mor ötesi (U.V.) dalga boylarındaki maksimum absorbanlarından yararlanarak saptanır.

Çalışmada jel olarak Sephadex G-150 kullanıldı. Standart grafiğini çizmek için, parantez içinde molekül ağırlıkları verilen albumin (68 000), heksokinaz (102 000), LDH (140 000), aldolaz (156 000) ile enolaz (200 000)'ın

herbirinden 2 mg tartıldı ve 2 ml, 100 mM sodyum fosfat tamponu pH 7.5 da çözümlenerek ayrı, ayrı Sephadex G-150 kolonuna (1 x 25 cm) uygulandı.

Mavi dekstran ve GSSGR örnekleri de ayrı ayrı uygulandı.

Jelin dengelenmesinde ve yıkamalarda % 0.1 2-merkaptoetanol içeren 100 mM sodyum fosfat tamponu pH 7.5 kullanıldı.

Yıkamalarda akış hızı 21 ml/saat olarak düzenlendi ve 2.5 ml'lik fraksiyonlar toplandı.

Enzim örnekleri için, yıkama hacimlerinin bulunmasında aktivitelerinden, standart proteinlerin 280 nm ve mavi dekstranın 625 nm'deki maksimum absorbanlarından yararlanıldı.

Poliakrilamid Jel Elektroforezi :

Poliakrilamid jel elektroforezi, proteinleri elektriksel yüklerine, molekül büyüklüğü ve şekline bağlı olarak birbirlerinden ayırdetmek için kullanılır (99).

Jel, akrilamid ve bağlayıcı (cross-linker) olarak kullanılan bis akrilamid (N,N'-metilenbisakrilamid)'in polimerizasyonu ile oluşur. Riboflavin-TEMED ya da persulfat-TEMED karışımları katalizör olarak kullanılır.

Jelin gözenek büyüklüğü akrilamid ve bisakrilamidin konsantrasyonlarına bağlı olarak değişir.

Çalışmada Davis (100) tarafından önerilen yöntem kullanıldı.

Jeller 0.9 cm x 10 cm boyutlarındaki polietilen tüplerde oluşturuldu ve üç tabaka olarak hazırlandı.

1. Örnek içeren tabaka : Bu tabaka % 2.5 akrilamid jeli içerecek şekilde hazırlandı ve katalizör olarak riboflavin-TEMED karışımı kullanıldı.

2. Geniş gözenekli jel tabakası : Örneğin konsantre olabilmesi için, % 2.5 akrilamid jeli içerecek şekilde hazırlandı.

3. Küçük gözenekli jel tabakası : Proteinlerin birbirinden ayrılmasını sağlayan bu tabaka % 10 akrilamid jeli içerecek şekilde hazırlandı. Jel oluşumu persulfat-TEMED karışımı ile katalize edildi.

Elektroforez tampon çözeltisi olarak 25 mM Tris-glisin tamponu pH 8.3 kullanıldı. Elektroforez öncül bileşiği olarak katodun batırıldığı tampon çözeltinin litresine 1 ml % 0.001 bromfenol mavisi ilave edildi.

Elektroforez tüp başına 5 mA akım verilerek yapıldı.

Protein bantları % 7 asetik asit içinde hazırlanmış % 1 Amido siyahı B ile bir saat süreyle boyandı ve elektroforez çözeltisi olarak % 7 asetik asit kullanılarak, proteinlere bağlanmayan boya, jelden elektroforezle uzaklaştırıldı. Elektroforez sırasında tüp başına 10 mA akım verildi.

Jeller % 7 asetik asit içinde soğukta saklandı.

B U L G U L A R

GSSGR'in Saflaştırılması :

Sığır akciğer GSSGR'ı aşağıdaki kademelerle kısmen saflaştırıldı.
Deneyler 4°C da yapıldı.

1. Akciğer Homojenatının Hazırlanması :

Mezbahada yeni kesilen sığırlardan alınan akciğer örnekleri kıyma makinesinde, kıyma haline getirildi. Kanı uzaklaştırmak için, 1 mM EDTA içeren 50 mM sodyum fosfat tamponu pH 6.8 ile yıkanarak, Buchner hunisinden süzöldü.

Bir kısım yağ ağırlık başına, üç kısım 1 mM EDTA içeren 50 mM sodyum fosfat tamponu pH 6.8 katılarak, "Waring Blender" ile 5 dakika homojenize edildi.

2. Santrifüjleme :

Homojenat önce 2500 rpm'de santrifüj edilerek, hücre parçacıkları atıldı. Sonra 14 000 g'de 30 dakika, ardından 80 000 g'de iki saat santrifüj edildi. Supernatan bir sonraki kademede kullanıldı.

Bu işlemlerle 1.5 kez saflaştırma sağlandı.

Elde edilen supernatandan alınan bir örnekte, kontrol deneyleri

yapılarak, enzim aktivitesinin saptanabilmesi için gerekli en uygun şartlar araştırıldı.

Kontrol deneyleri :

a) GSSGR aktivitesi üzerine pH'nın etkisi :

Bunun için, pH 4.0 ve pH 5.0 'de, 0.2 M H_3PO_4 ile 0.2 M NaH_2PO_4 ; pH 6.0 - pH 7.5 'de 0.2 M NaH_2PO_4 ile 0.2 M Na_2HPO_4 ; pH 9.0 ve pH 10.0 da ise 0.2 M Na_2HPO_4 ile 0.2 M Na_3PO_4 karışımları tampon olarak kullanıldı (101).

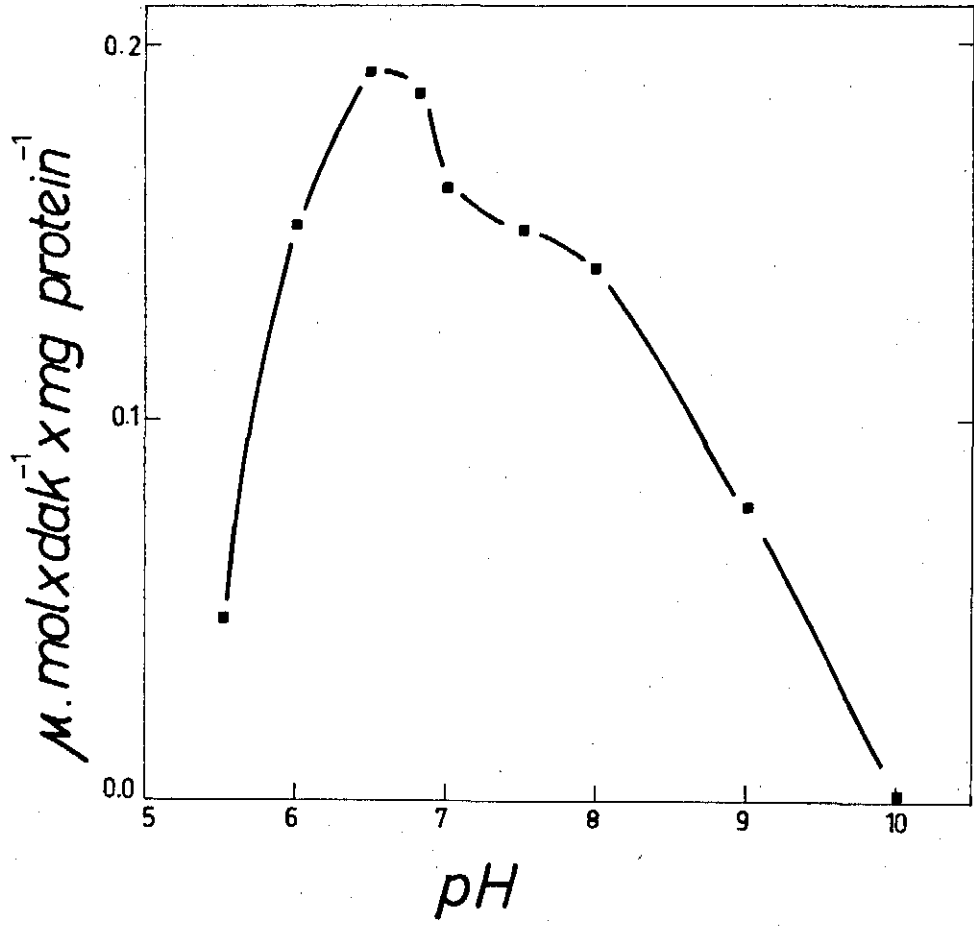
Hız ve pH arasında çizilen eğri iki platoya sahiptir (Şekil 4). Bu tip eğriler "diprotik" sistemlerde görülür ve birden fazla aktif enzim formunun bulunduğunu gösterir.

Enzim aktivitesi için en uygun (optimum) pH 6.5 olarak saptandı ve aktivite ölçümlerinde ortam, pH 6.5 'da tutuldu.

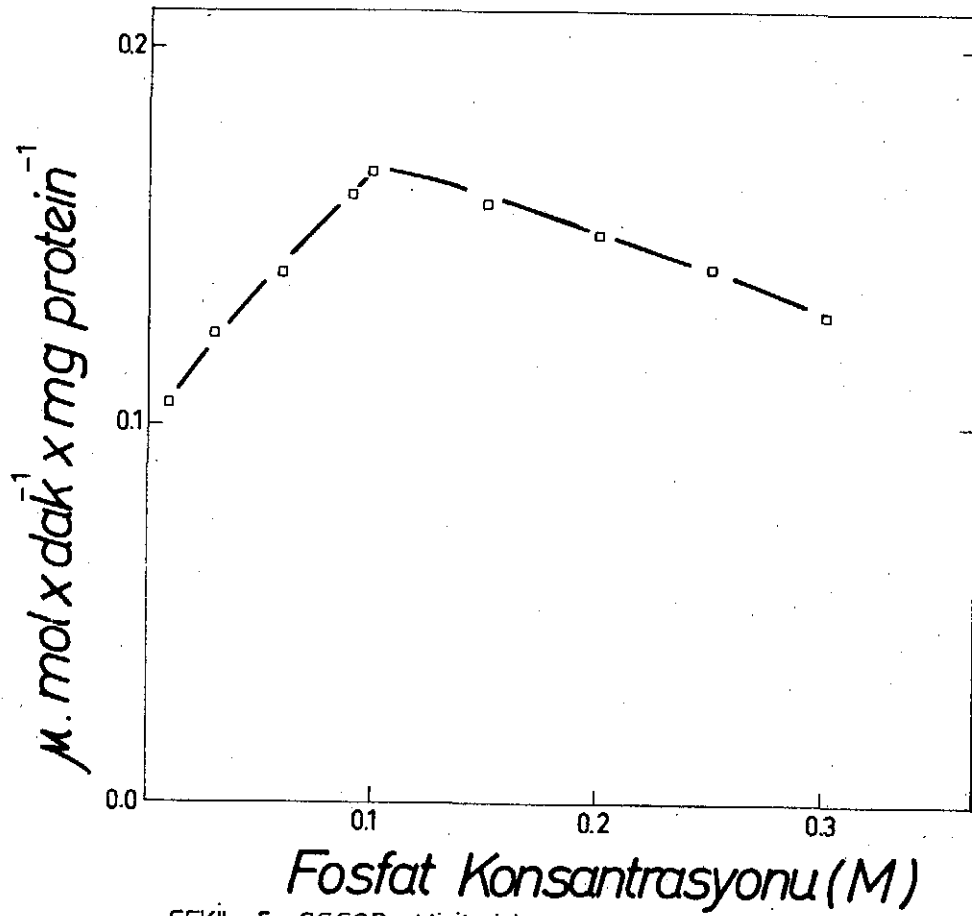
b) GSSGR aktivitesi üzerine sodyum fosfat tamponu konsantrasyonunun etkisi : pH 6.5'de araştırıldı ve düşük sodyum fosfat konsantrasyonunda aktivasyon, yüksek konsantrasyonda ise inhibisyon gözlemlendi (Şekil 5).

Enzim aktivitesi için en uygun (optimum) tampon konsantrasyonu 0.1 M olarak saptandı ve aktivite ölçümlerinde, sodyum fosfat tamponunun konsantrasyonu 0.1 M'da tutuldu.

c) Akciğer dokusunda bulunan proteazların enzim aktivitesini inhibe etme olasılığına karşı, homojenatın mililitresine 50 µg PMSF (proteaz inhibitörü) (102) ilave edildi ve on gün süreyle spesifik aktivitedeki değişim incelendi. Proteaz inhibitörü içeren ve içermeyen örneklerin spesifik aktiviteleri arasında önemli bir farklılık saptanmadığından, diğer kademe-lerde ortama PMSF ilave edilmedi.



ŞEKİL_ 4. GSSGR aktivitesinin pH ile değişimi.



ŞEKİL_ 5. GSSGR aktivitesinin sodyum fosfat tamponu konsantrasyonu ile değişimi.

3. Hemoglobinin uzaklaştırılması :

Birinci kademe de yıkama ile uzaklaştırılmayan kandan gelen hemoglobinin ayrılabilmesi için DE-32 sellülozdan yararlanıldı.

a) DE-32 sellüloz kolon kromatografisi ve lineer NaCl gradyeni kullanılarak hemoglobinin uzaklaştırılması : İkinci kademedен elde edilen enzim örneği "Centriflo, CF 50A" zar konileri kullanılarak konsantre edildi ve hacminin 100 katı hacımda, 10 mM sodyum fosfat tamponu pH 7.0 'ye karşı diyaliz edildi.

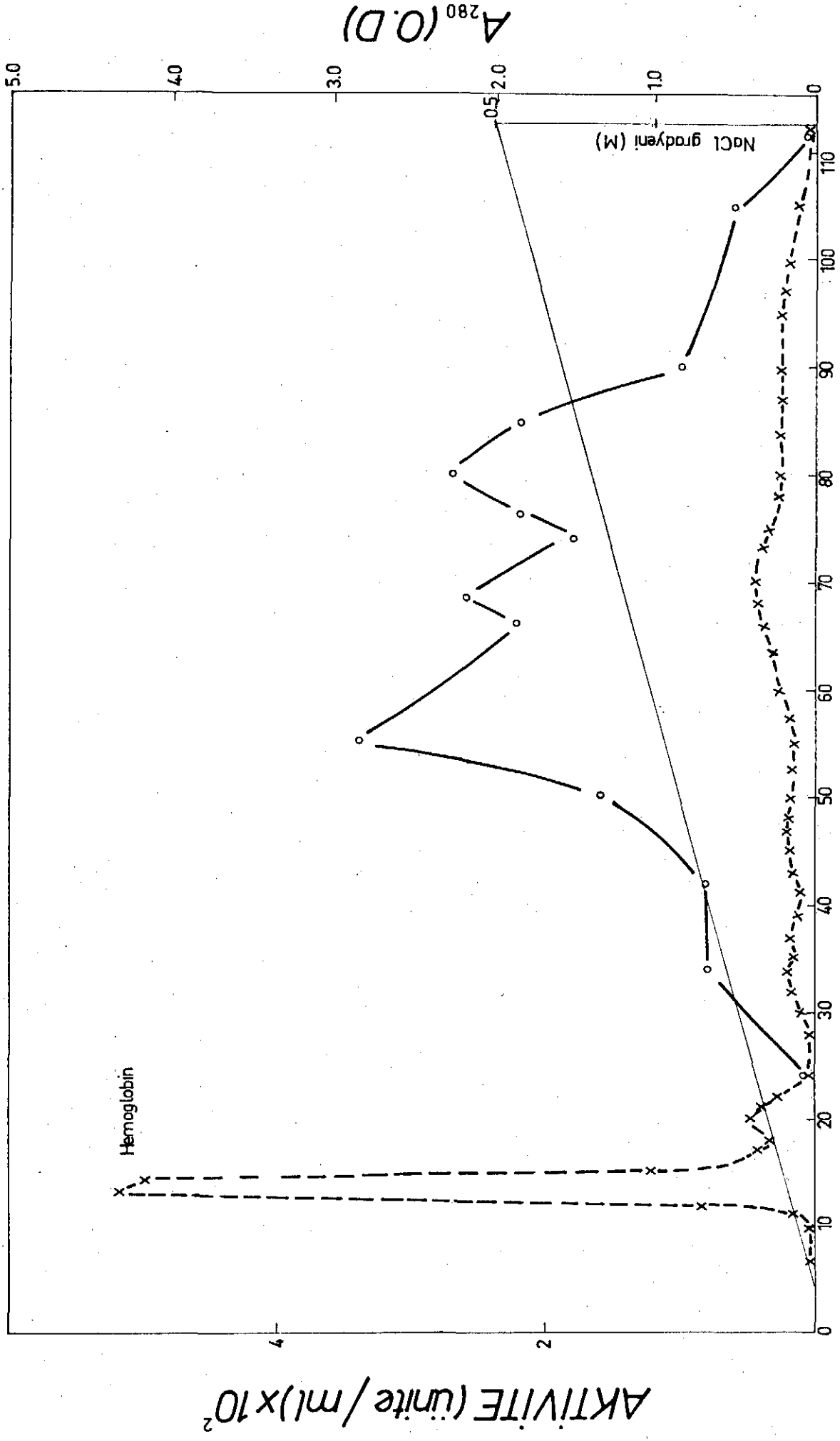
Diyalizat 10 mM sodyum fosfat tamponu pH 7.0 ile dengelenmiş, DE-32 sellüloz kolonuna (2.5 x 50 cm) uygulandı.

Enzim kolondan, 10 mM sodyum fosfat tamponu pH 7.0 içinde hazırlanmış 0 - 0.5 M NaCl lineer gradyeni kullanılarak elue edildi (Şekil 6). Akış hızı 24 ml/saat olarak ayarlandı ve 2.5 ml'lik fraksiyonlar halinde toplanarak, örneklerde aktivite tayini yapıldı ve A_{280} değerleri saptandı.

Lineer gradyen uygulanarak, hemoglobin tamamen uzaklaştırılabildi. Fakat, aktivite dağınık bir şekilde elue oldu. Bu nedenle aşağı konkav bir NaCl gradyeni denenerek, çalışma tekrarlandı.

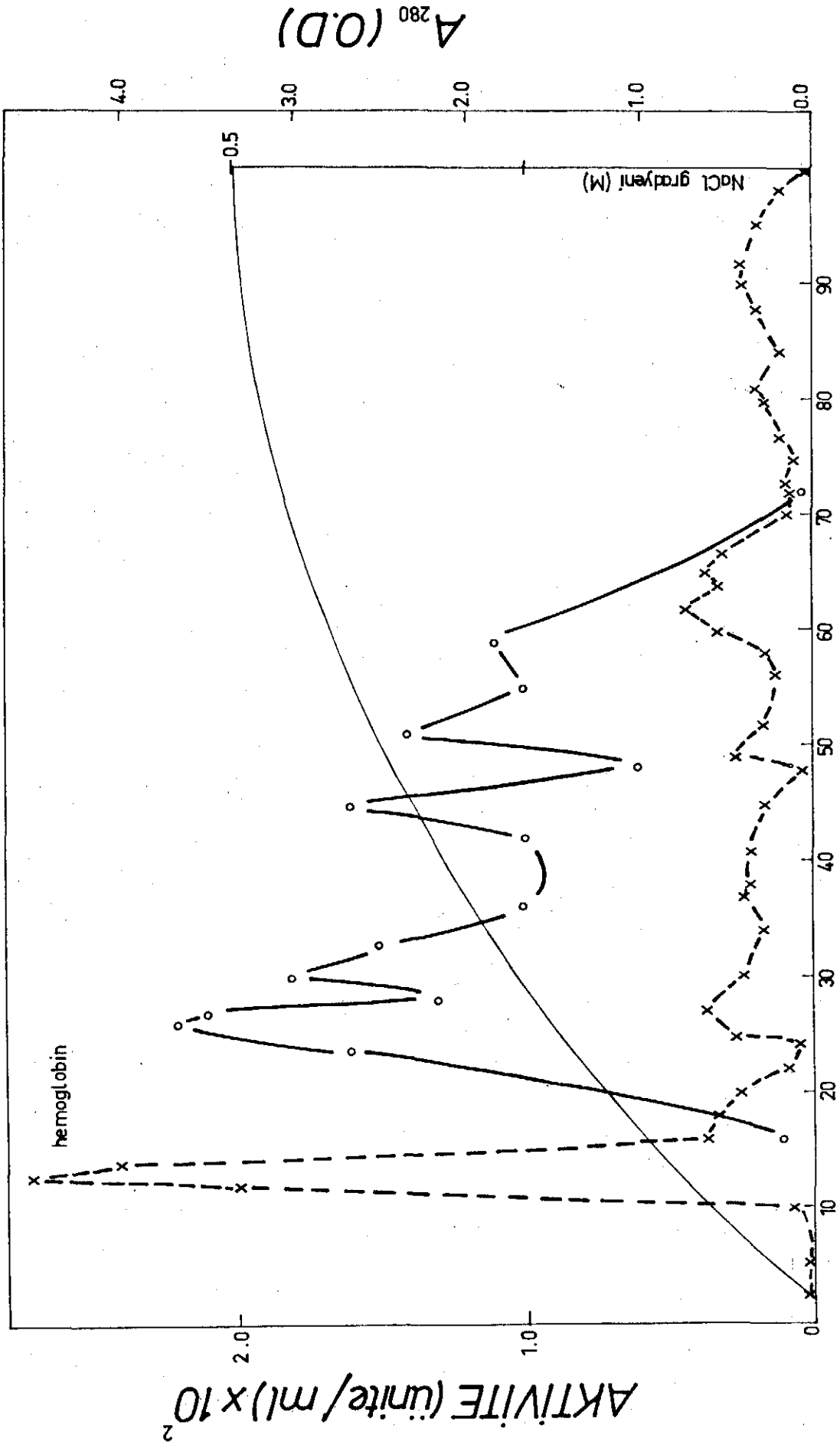
b) DE-32 sellüloz kolon kromatografisi ve aşağı konkav NaCl gradyeni kullanarak, hemoglobinin uzaklaştırılması : Aşağı konkav gradyen Bock (103) tarafından tariflenen ve kesitlerinin oranı ($A_2 : A_1$) iki olan, silindirik kaplarda hazırlandı.

GSSGR, yukarda anlatıldığı şekilde, DE-32 sellüloz kolonundan 25 mM sodyum fosfat tamponu pH 7.0 içinde oluşturulan 0 - 0.5 M NaCl konkav gradyeni kullanılarak elue edildi (Şekil 7).



TÜP NUMARASI

ŞEKİL - 6. DE - 32 sellüloz kolon kromatografisi profili. (x--x), A₂₈₀ değerleri; (o---o), enzim aktivitesi.



TÜP NUMARASI

SEKİL _7. DE _32 sellüloz kolon kromatografisi profili. (x--x), A₂₈₀ değerleri; (o---o), enzim aktivitesi.

Birden fazla aktivite piki vererek elue olan enzimin DE-32 sellüloza "non-spesifik" olarak bağlanabileceği düşünülerek, "batch wise" yöntemi uygulandı.

c) "Batch wise" yöntemi ile hemoglobinin uzaklaştırılması : İkinci kademedan elde edilen supernatana eşit hacimde DE-32 sellüloz suspansiyonu (10 mM sodyum fosfat tamponu pH 7.0 içinde dengelenmiş) katılarak bir saat, manyetik karıştırıcı ile soğukta karıştırıldı. Buchner hunisinde, 10 mM sodyum fosfat tamponu pH 7.0 ile süzüntü renksiz olana kadar yıkandı.

Bu işlemle, enzim DE-32 sellüloza bağlanır (62), hemoglobin ise bağlanmaz ve yıkama ile büyük kısmı uzaklaştırılabilir.

DE-32 sellüloza bağlı enzim, supernatan hacminin iki katı hacimde 0.5 M NaCl içeren 10 mM sodyum fosfat tamponu pH 6.6 ile elue edildi.

4. $(NH_4)_2SO_4$ çöktürmesi :

En uygun $(NH_4)_2SO_4$ kesidini saptayabilmek için, mililitresinde 0.26 mg protein ve 0.57 Ü enzim bulunan bir örnekten, 30 ml'lik kısımlar alınarak, $(NH_4)_2SO_4$ açısından % 30 - % 70 doygunluğa getirildi. Soğukta iki saat manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak 14 000 g'de 20 dakika santrifüj edildi. Supernatanlarda Warburg (95) yöntemi kullanılarak protein miktarları ve ayrıca aktiviteler saptandı.

Görüldüğü gibi (Tablo-I) enzim aktivitesinin büyük kısmını içeren bir kesit almak zordur. Enzimin tümü % 70 $(NH_4)_2SO_4$ doygunluğunda çökmektedir. Bu nedenle % 0 - % 70 $(NH_4)_2SO_4$ kesidi kullanıldı. GSSGR geniş bir $(NH_4)_2SO_4$ doygunluğunda çöktüğü için, işlem bir saflaştırma kademesi olarak değil, enzimi konsantre etmekte kullanıldı.

Tablo-I : Akciğer GSSGR'ının $(NH_4)_2SO_4$ ile çöktürülmesi.

$(NH_4)_2SO_4$ doygunluğu (%)	Supernatan Hacmi (ml)	Protein (mg/ml)	Total Protein (mg)	Aktivite (Ü/ml)	Total Aktivite (Ü)	Spesifik Aktivite (Ü/mg protein)
0	30	0.26	7.8	0.5700	17.100	2.200
30	30	0.25	7.5	0.4800	14.400	1.920
35	30	0.24	7.2	0.4400	13.200	1.830
40	30	0.23	6.9	0.4000	12.000	1.740
50	30	0.22	6.6	0.3800	11.400	1.720
55	30	0.20	6.0	0.2900	8.700	1.450
60	20	0.19	3.8	0.2300	4.600	1.210
70	20	0.18	3.6	0.0002	0.004	0.001

Üçüncü kademedan elde edilen eluat % 70 $(NH_4)_2SO_4$ doygunluğuna getirildi. Bir saat manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak, 14 000 g'de 20 dakika santrifüj edildi. Enzimi içeren aktif çökelti 10 mM sodyum fosfat tamponu pH 6.6 içinde çözüldü ve örnek aynı tampona karşı diyaliz edildi.

Son iki kademedeki saflaşma 18 kez olarak saptandı. Birinci kademedeki saflaşma ile beraber yaklaşık 30 kez saflaşma elde edildi (Tablo-II).

Tablo-II : Akciğer GSSGR'nın saflaştırılması.*

Kademeler	Hacim (ml)	Protein (mg/ml)	Total Protein (mg)	Aktivite (Ü/ml)	Total Aktivite (Ü)	Spesifik Aktivite (Ü/mg)	Saflaşma (Kez)	Total Saflaşma (Kez)
2500 rpm'de santrifüjleme	440	5.11	2248.40	0.082	36.08	0.016	-	
14 000 g ve 80 000 g'de santrifüjleme	362	3.31	1198.22	0.066	23.96	0.020	1.5	1.5
"Batch wise" (DE-32 sellüloz) (NH ₄) ₂ SO ₄ ile çöktürme	22	2.72	59.84	0.984	21.65	0.362	18.1	27.2

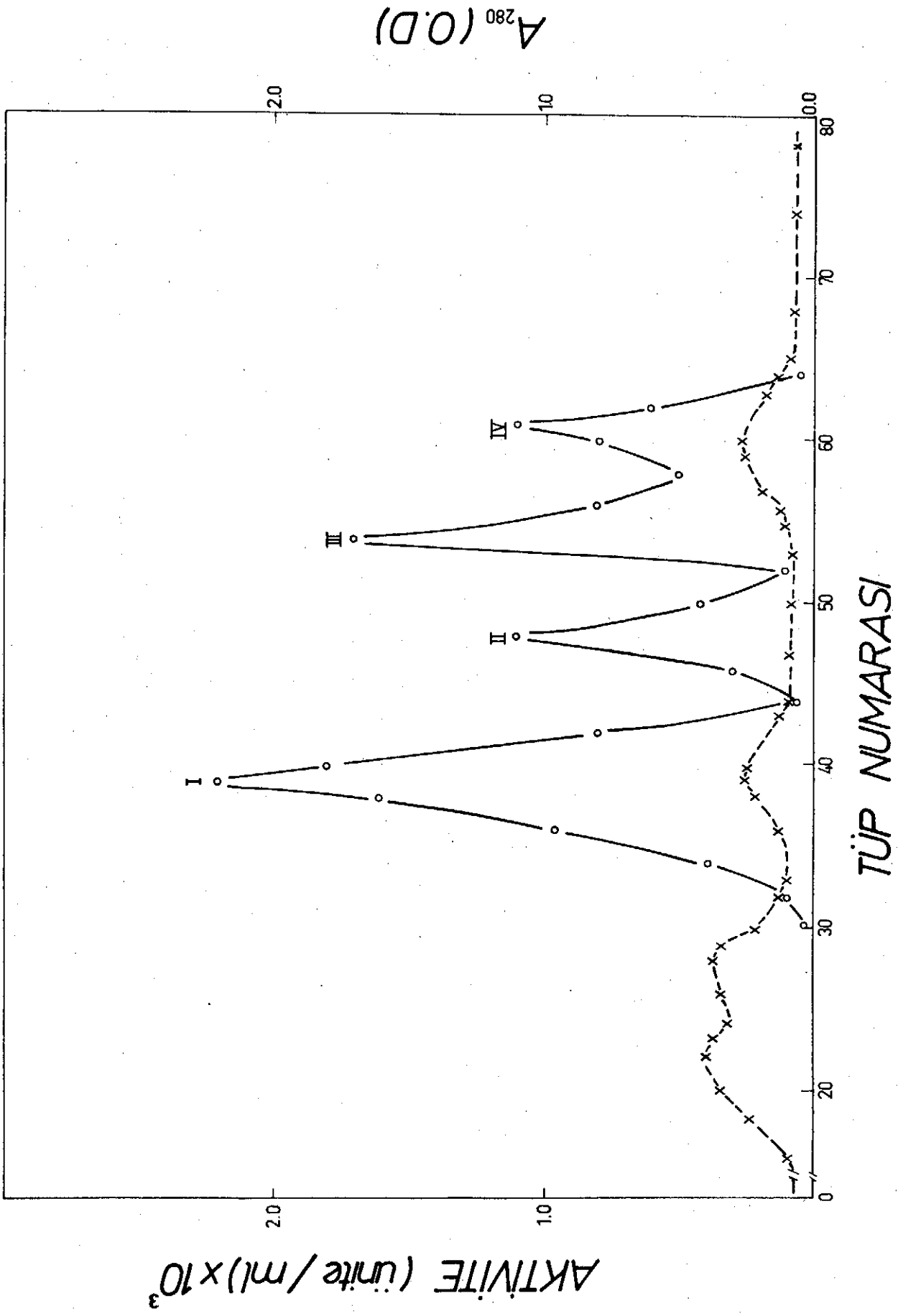
* 150 gr sığır akciğer kıyması ile başlandı.

5. CM-Sephadex C-50 kolon kromatografisi :

Dördüncü kademedan elde edilen diyalizat 10 mM sodyum fosfat tamponu pH 6.6 ile dengelenmiş CM-Sephadex C-50 kolonuna (2.5 x 50 cm) uygulandı. Kolon 10 mM sodyum fosfat tamponu pH 8.0 ile yıkandı. Akış hızı 24 ml/saat olarak ayarlandı ve 4 ml'lik fraksiyonlar halinde toplanarak, örneklerde aktivite tayini yapıldı ve A₂₈₀ değerleri saptandı.

Enzim kolondan I, II, III ve IV olmak üzere dört aktivite piki şeklinde elue oldu (Şekil 8).

Daha iyi bir ayırım elde edebilmek için CM-Sephadex C-50 kolon kromatografisi çalışmaları geliştirildi.



ŞEKİL-8. CM-Sephadex C-50 kolon kromatografisi profili. (x--x), A²⁸⁰ değerleri; (o—o), enzim aktivitesi.

Bu nedenle, dördüncü kademedan elde edilen diyalizat, yukarıda anlatıldığı şekilde hazırlanmış CM-Sephadex C-50 kolonuna (2.5 x 50 cm) uygulandı. Kolon, jelin dengelenmesinde kullanılan 10 mM sodyum fosfat tamponu pH 6.6 ile yıkandı. Yıkama sırasında alınan örneklerde, spektrofotometrede A_{280} değerleri ölçüldü ve yıkamaya Şekil-9 da görülen I ve II izoenzimlerine ait proteinlerin elue olmasına kadar devam edildi (yaklaşık 100 ml).

Sonra, kolon 10 mM sodyum fosfat tamponu pH 8.0 ile III. ve IV. izoenzimler elue olana kadar yıkandı.

Kolon kromatografisi süresince akış hızı 18 ml/saat olarak ayarlandı. 3 ml'lik fraksiyonlar toplandı.

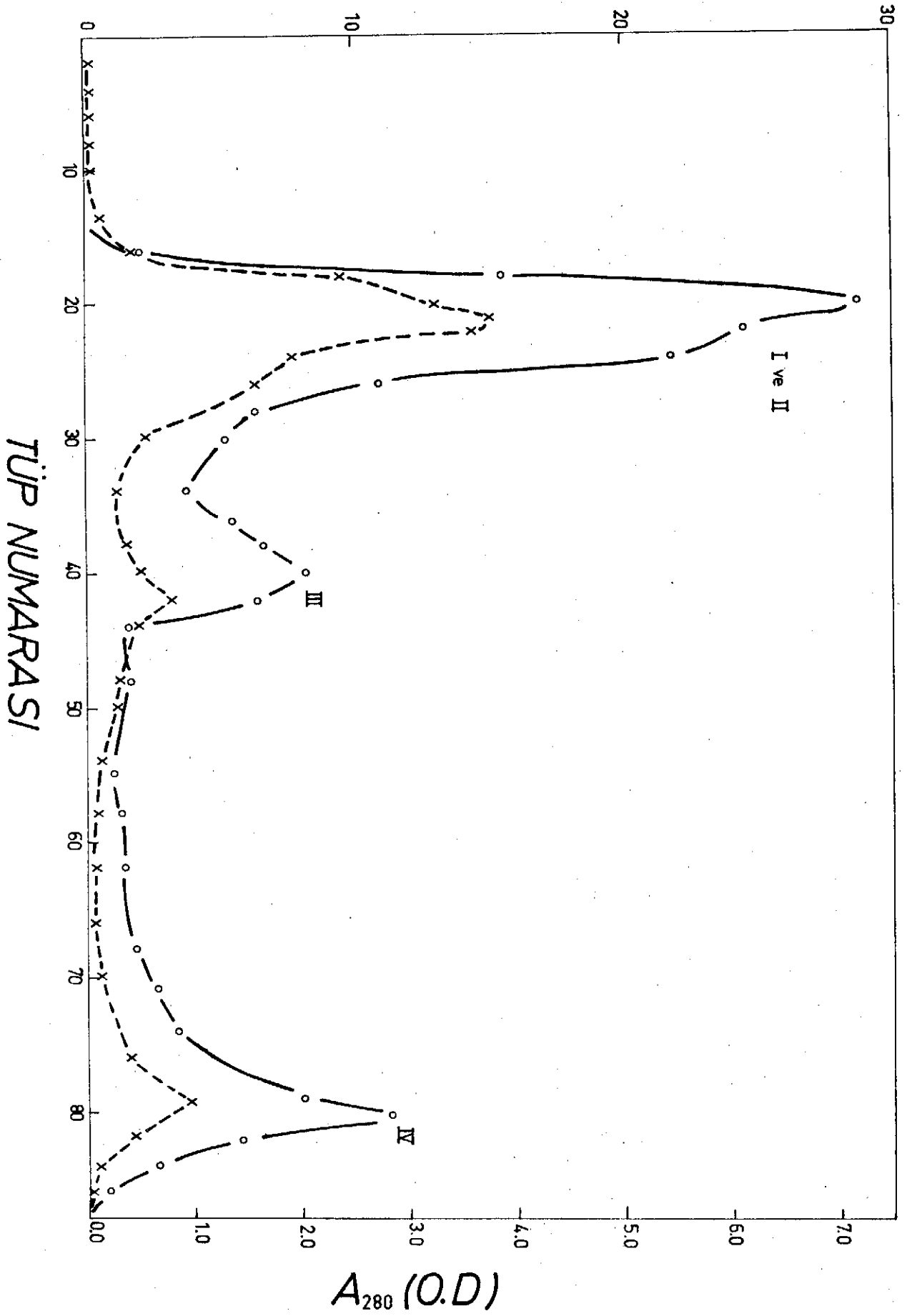
6. DE-32 sellüloz kolon kromatografisi ile I ve II numaralı izoenzimlerin birbirinden ayrılması :

Beşinci kademedan elde edilen ve üst üste çakışan I ile II numaralı izoenzimlere ait aktif fraksiyonlar birleştirilerek, 10 mM sodyum fosfat tamponu pH 7.0'ye karşı diyaliz edildi ve 5 000 g'de santrifüjlendi.

Diyalizat 10 mM sodyum fosfat tamponu pH 7.0 ile dengelenmiş, DE-32 sellüloz kolonuna (1 x 25 cm) uygulandı.

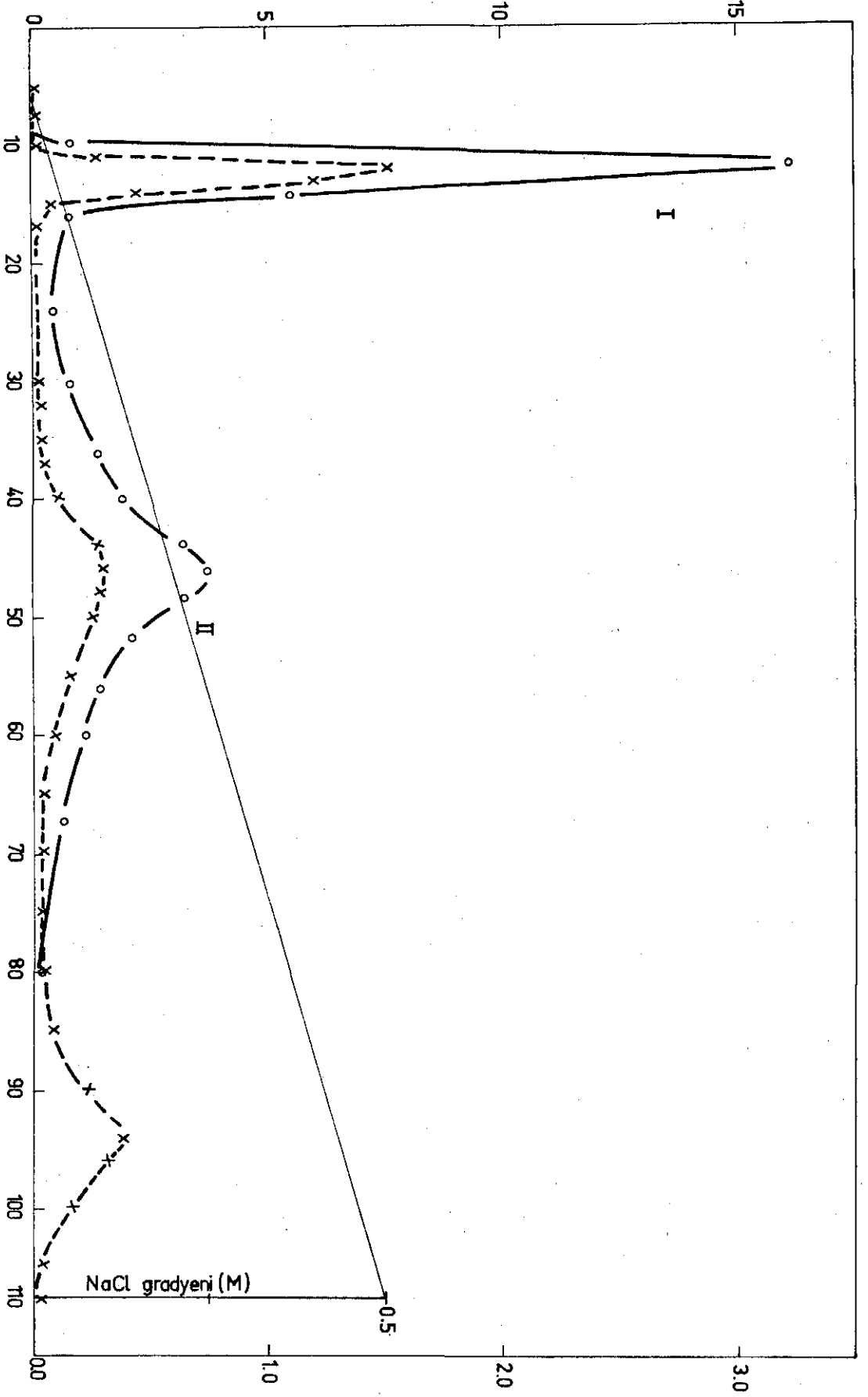
I ve II numaralı izoenzimler, kolondan 10 mM sodyum fosfat tamponu pH 7.0 içinde hazırlanmış 0 - 0.5 M NaCl lineer gradyeni kullanılarak elue edildi. Akış hızı 12 ml/saat olarak ayarlandı ve 2.5 ml'lik fraksiyonlar halinde toplanan örneklerde aktivite tayini ve A_{280} değerleri saptandı (Şekil 10).

AKTIVITE (ünite / ml) $\times 10^{-2}$



SEKİL 9. CM - Sephadex C-50 kolon kromatografisi profili. (x-x-x), A_{280} değerleri; (o-o-o) enzim aktivitesi.

AKTIVITE (ünite/ml) x 10²



TÜP NUMARASI

SEKİL 10. DE-32 sellüloz kolon kromatografisi profili. (x—x), A₂₈₀ değerleri; (o—o), enzim aktivitesi.

A₂₈₀ (O.D)

7. Sephadex G-150 jel elemesi yöntemiyle isoenzimlerin saflaştırılması :

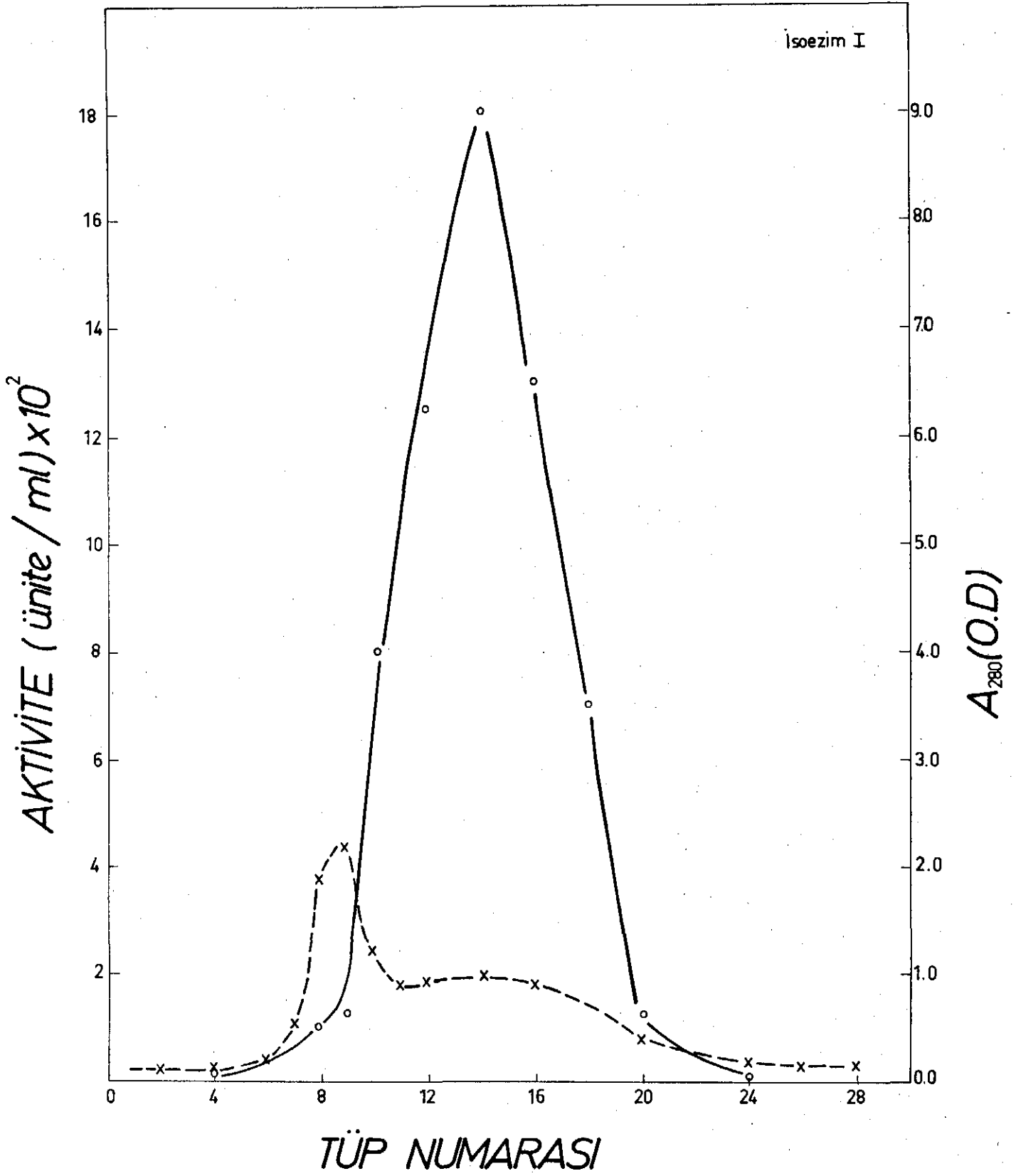
Kademe 5 ve 6 dan elde edilen isoenzim I, II, III ve IV'e ait aktif fraksiyonlar ayrı, ayrı Sephadex G-150 jel kolonuna (1 x 25 cm) uygulandı (Şekil 11 a-d). Akış hızı 21 ml/saat olarak ayarlandı ve 2.5 ml'lik fraksiyonlar şeklinde toplandı.

Bu kademede iki tip dengeleme ve yıkama tamponu kullanıldı.

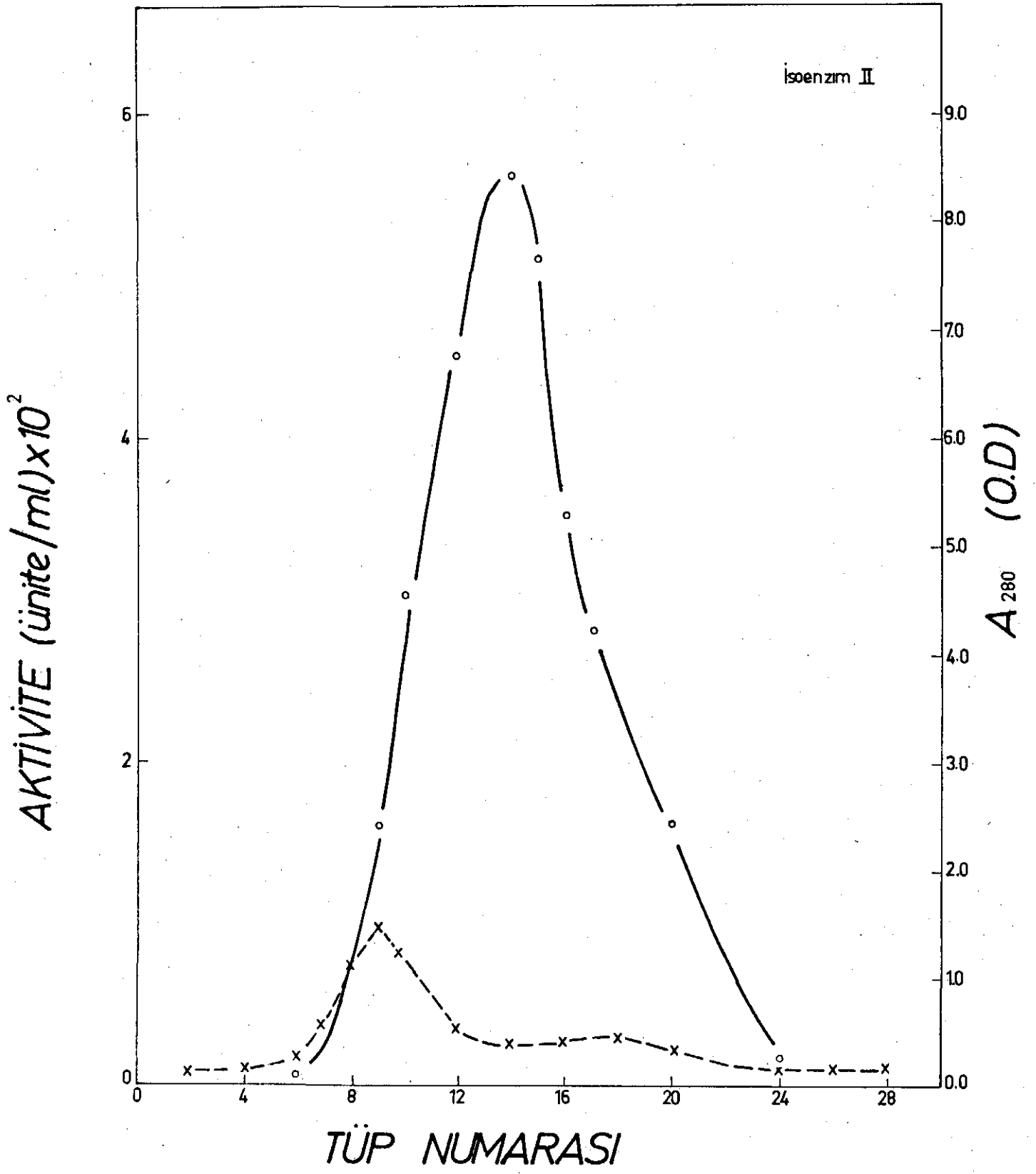
a) 0.1 M KCl içeren, 100 mM Tris-HCl tamponu pH 7.5 : Jelin dengelenmesinde ve yıkamalarda bu tamponla çalışıldığında, yaygın aktivite pikleri elde edildiğinden, aşağıdaki tampon kullanıldı.

b) % 0.1 2-Merkaptoetanol içeren 100 mM sodyum fosfat tamponu pH 7.5.

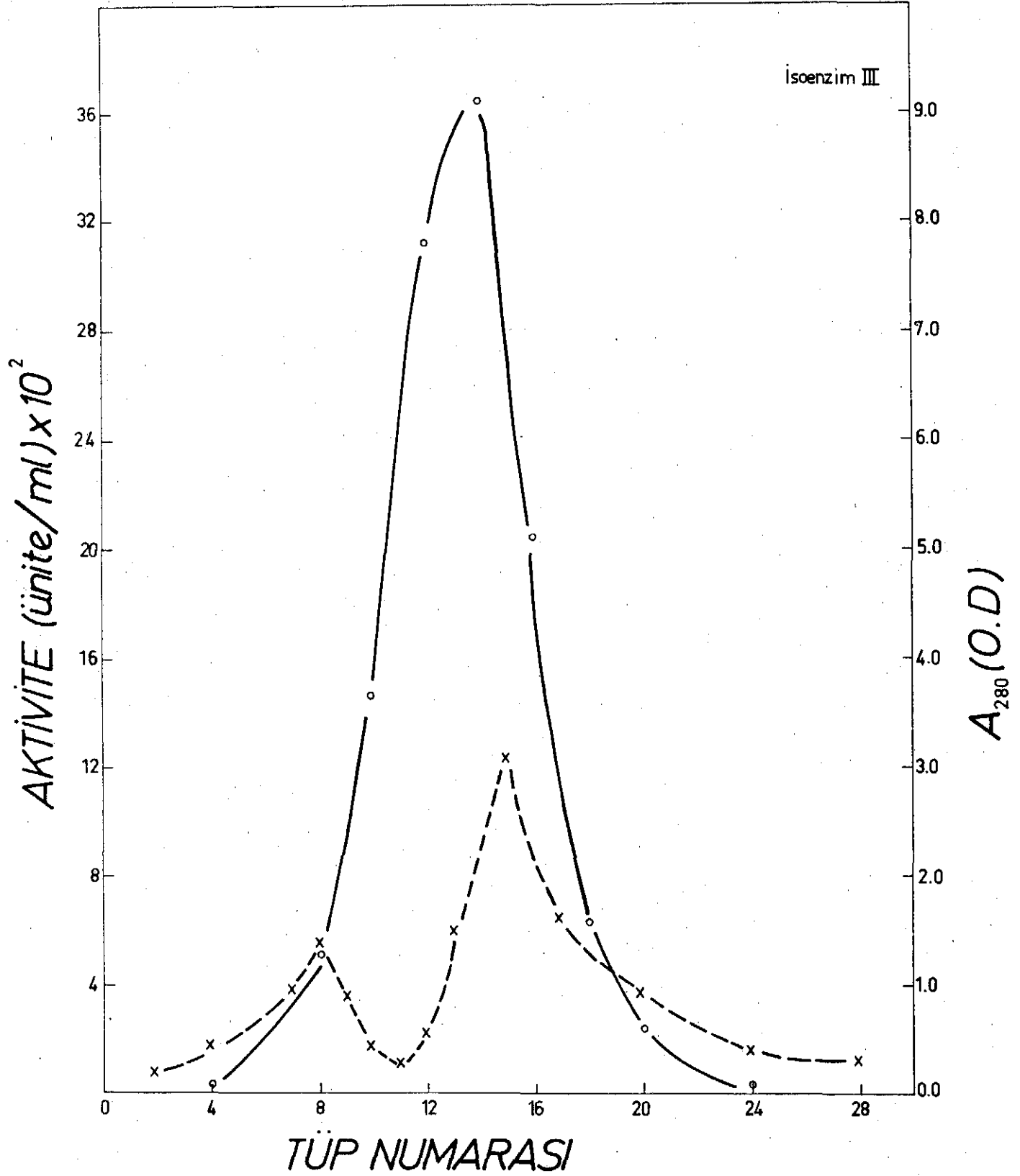
Yukarıda anlatılan saflaştırma kademeleri özet olarak Tablo-III'de verilmiştir.



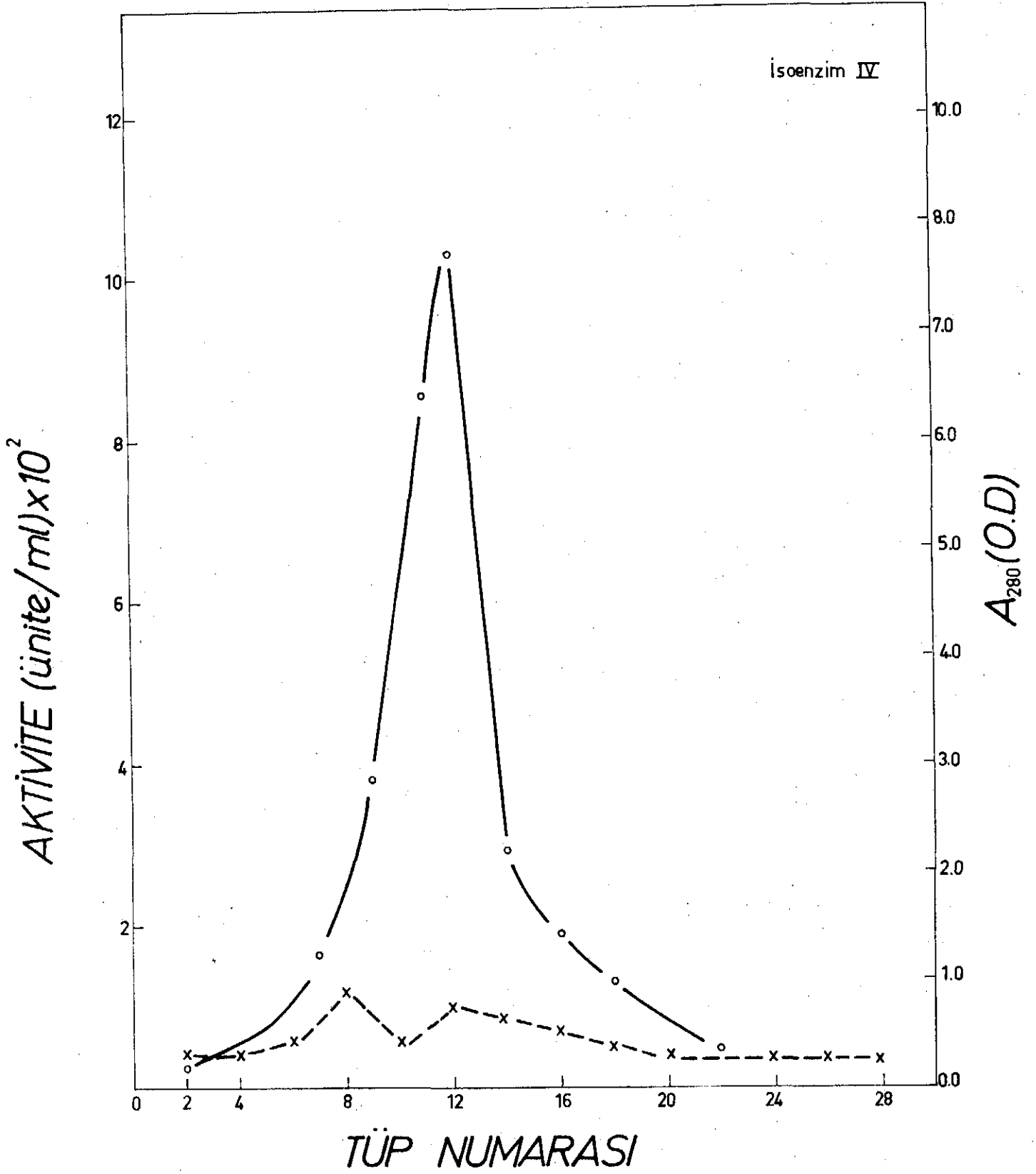
ŞEKİL - 11 a. Sephadex G-150 kolon kromatografisi profili. (x -- x), A₂₈₀ değerleri ;
(o — o), enzim aktivitesi.



ŞEKİL _11 b. Sephadex G-150 kolon kromatografisi profili. (x--x), A₂₈₀ değerleri ; (o—o), enzim aktivitesi .



ŞEKİL - 11c. Sephadex G - 150 kolon kromatografisi profili. (x -- x), A₂₈₀ değerleri; (o — o), enzim aktivitesi.



ŞEKİL - 11d. Sephadex G - 150 kolon kromatografisi profili. (x--x), A₂₈₀ değerleri; (o—o), enzim aktivitesi.

Tablo-III : Akciğer GSSGR'nın saflaştırılması.

K a d e m e l e r	Hacim (ml)	Protein (mg/ml)	Total Protein (mg)	Aktivite (U/ml)	Total Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Saflaşma (Kez)	Total Saflaşma (Kez)*
1. CM-Sephadex C-50 (5 kez tekrarlandı)								
Kolona giren	22.0	2.720	59.840	0.190	4.200	0.069	-	-
İsoenzim I ve II	9.5	3.740	35.530	0.289	2.746	0.077	1.12	30.46
İsoenzim III	9.0	0.258	2.320	0.080	0.720	0.310	4.50	122.40
İsoenzim IV	9.0	0.901	8.109	0.113	1.017	0.125	1.80	48.96
2. DE-32 sellüloz (2 kez tekrarlandı)								
Kolona giren	9.5	3.740	35.530	0.289	2.746	0.077	-	-
İsoenzim I	9.0	1.024	9.216	0.164	1.476	0.160	2.10	64.00
İsoenzim II	9.0	0.258	2.322	0.045	0.405	0.174	2.30	70.00
3. Sephadex G-150 (2 kez tekrarlandı)								
Kolona giren	9.0	1.024	9.216	0.164	1.476	0.160	-	-
İsoenzim I	7.5	0.700	5.250	0.180	1.350	0.257	1.60	102.50
Kolona giren ^{MX}	9.0	0.258	2.322	0.045	0.405	0.174	-	-
İsoenzim II	7.0	0.200	1.400	0.050	0.350	0.250	1.44	101.00
Kolona giren	4.0	4.830	19.320	0.379	1.516	0.078	-	-
İsoenzim III	2.5	1.422	3.550	0.363	0.908	0.256	3.30	404.00
Kolona giren	9.0	0.901	8.109	0.113	1.017	0.125	-	-
İsoenzim IV	2.5	0.356	0.890	0.103	0.258	0.289	2.10	103.00

* Tablo-II'deki saflaşma katsayısı kullanılarak hesaplandı.

** Farklı bir CM-Sephadex C-50 örneği kullanıldı.

GSSGR Isoenzimlerinin Molekül Ağırlıklarının Saptanması :

GSSGR'ın isoenzimlerinin molekül ağırlıkları, Andrews (98)'un önerdiği yöntem kullanılarak saptandı.

Standart grafiğinin çiziminde, molekül ağırlıkları, yöntemler bölümünde verilen sığır serum albumini, heksokinaz, LDH, aldolaz ve enolaz'dan yararlanıldı.

Mavi dekstran (molekül ağırlığı 2 000 000), bazı proteinlere bağlandığını gösteren yayınlar (62,104) nedeniyle, kolona ayrıca uygulandı.

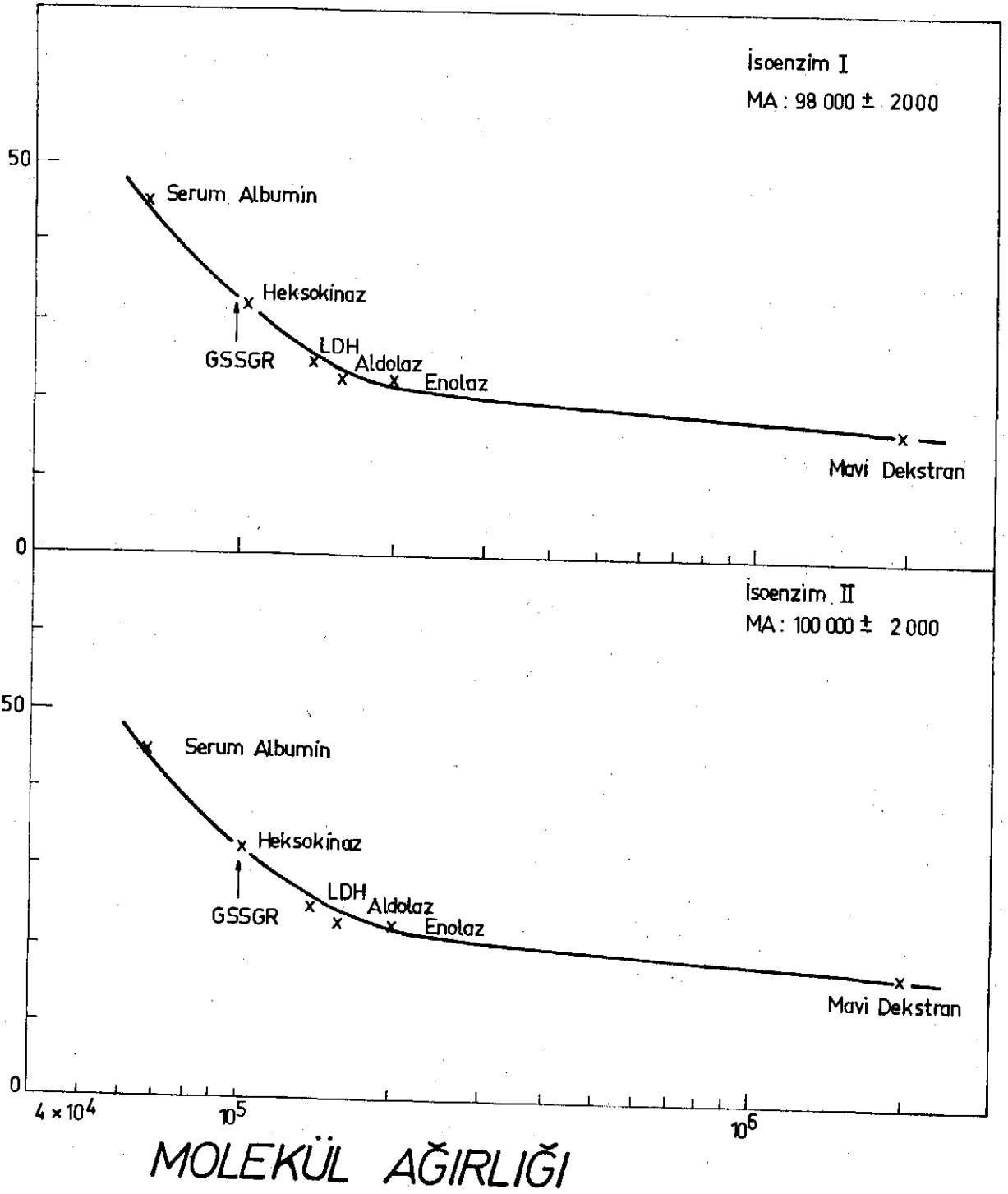
Yıkama hacımları, yöntemler bölümünde anlatıldığı gibi, standart proteinlerin 280 nm'deki, mavi dekstranın ise 625 nm'deki absorbansları ölçülerek bulundu.

Isoenzimlerin yıkama hacımları ise Şekil 11 a-d'lerde maksimum aktivite gösterdikleri tüpler yardımıyla saptandı.

Şekil 12 a,b ve Şekil 12 c,d'de, isoenzimlerin yıkama hacımlarına karşı gelen molekül ağırlıkları bulundu.

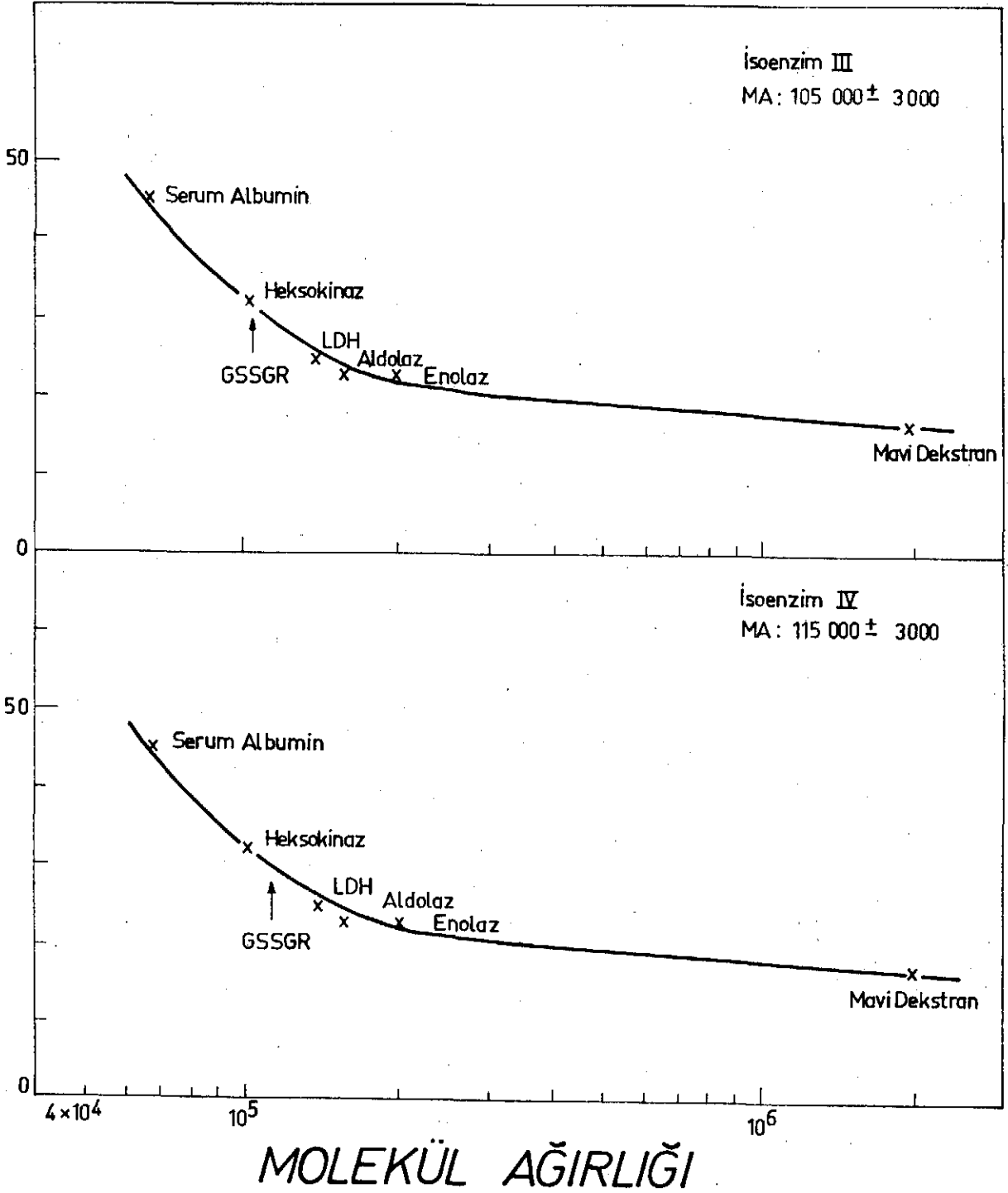
GSSGR'ın I-IV olarak gösterilen isoenzimlerinin molekül ağırlıkları sırasıyla, $98\ 000 \pm 2\ 000$; $100\ 000 \pm 2\ 000$; $105\ 000 \pm 3\ 000$ ve $115\ 000 \pm 3\ 000$ olarak hesaplandı.

YIKAMA HACMI (ml)



ŞEKİL - 12 a,b. İsoenzim I ve II'nin molekül ağırlığının Sephadex G-150 jel elemesi yöntemi ile saptanması.

YIKAMA HACMI (ml)



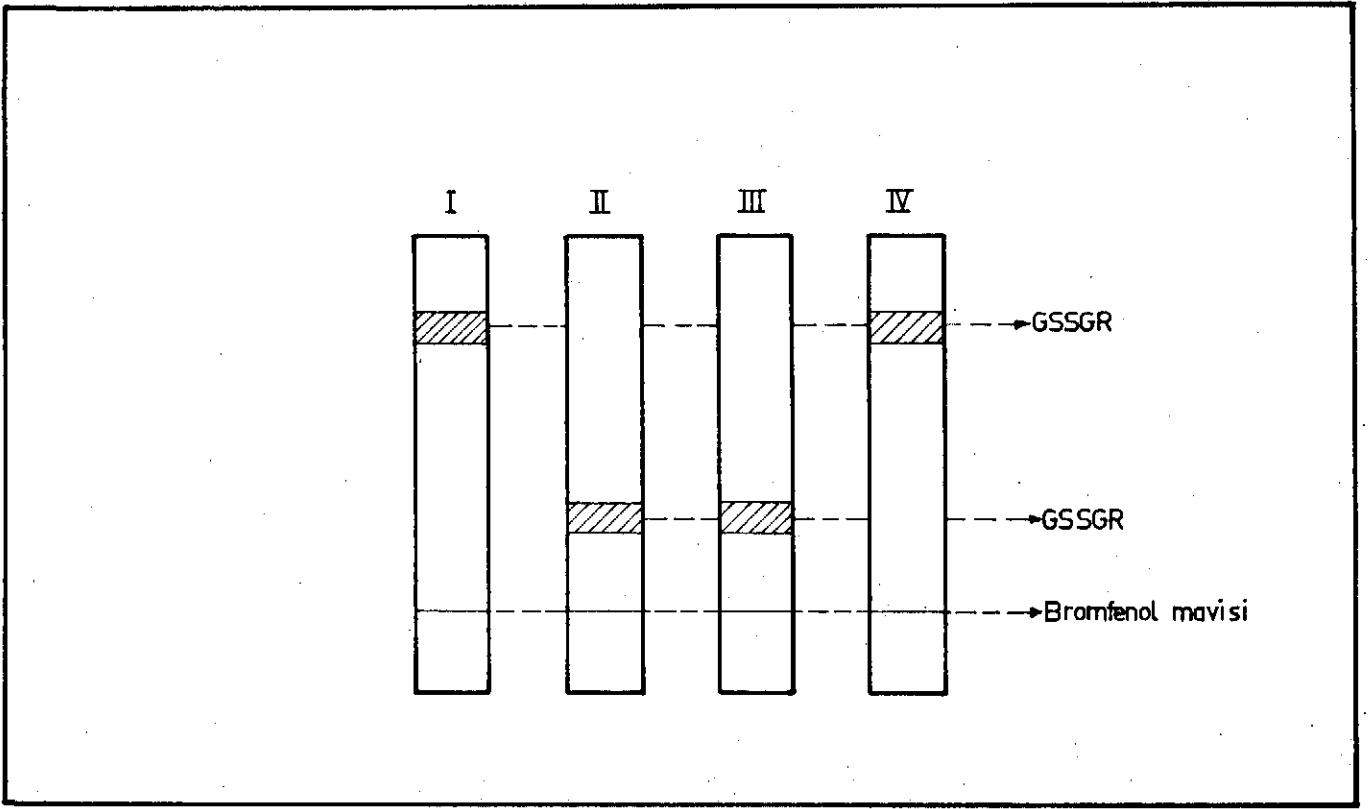
ŞEKİL-12 c,d. İsoenzim III ve IV' un molekül ağırlığının Sephadex G - 150jel elemesi yöntemi ile saptanması.

GSSGR Isoenzimlerinin Saflılığının Poliakrilamid Jel Elektrofözezi Yöntemi ile Kontrolu :

Davis (100) tarafından önerilen yöntem ile araştırıldı.

Elektrofözeze isoenzimlere ait örneklerden 80-100 µg uygulandı. Jellerde birden fazla protein bantı gözleendiğinden yeterince saf olmadığı anlaşıldı.

Bantlardan isoenzimlere ait olanları saptamak için, aynı şartlarda çift çalışma yapıldı. Jellerden bir tanesi Amido siyahı-B ile boyandı. İkinci jellerde, boyanan protein bantlarına karşı gelen kısımlar 1 mm kalınlığında kesilerek, 10 mM sodyum fosfat tamponu pH 6.5 içinde homojenize edildi. Homojenat 14 000 g'de santrifüj edilerek, GSSGR aktivitesi araştırıldı. Aktivite gözlenen bantların jel üzerindeki konumu Şekil 13'de verilmiştir. Görüldüğü gibi, isoenzim I ve IV elektrik yükleri açısından, elektrofözeze yavaş ; II ve III ise hızlı hareket etme özelliğine sahiptir.



ŞEKİL _ 13. GSSGR isoenzimlerinin poliakrilamid jel elektroforezi.

T A R T I Ő M A

GSSGR, hücre fizyolojisinde son derece önemli olan GSH : GSSG oranını kontrol eden bir enzimdir (2). Çeşitli kaynaklardan saflaştırılarak, özellikleri saptanmıştır (58-67). Akciğerde ise bu konuda yapılan çalışmalar yetersizdir (89).

Çalışmada, enzim kaynağı olarak akciğer homojenatının, mikrosomal fraksiyonu uzaklaştırılmış, 80 000 g supernatani kullanıldı. GSSGR aktivitesi, hücrenin sitosolünde ve mitokondrilerinde çözülmüş olarak bulunur (89). Bu nedenle, yalnız mitokondrileri uzaklaştırılabilen (105) 20 000 g supernatani ile yapılan deneylerde de, benzer sonuçlar elde edildi.

Çalışma sırasında akciğer GSSGR'ının aktivitesini, alyuvar (66) ve akyuvar (71) enzimlerine kıyasla, daha kısa sürede kaybettiği gözlemlendiğinden, homojenata PMSF konarak proteazların etkisi önlenilmeye çalışıldı. Fakat PMSF'in GSSGR aktivitesindeki düşüşü engellemediği saptandı.

pH'nın ve sodyum fosfat tamponu konsantrasyonunun GSSGR aktivitesi üzerine olan etkisi incelendi. Hız ve pH arasında çizilen eğride, "diprotik" sistemlere özgü iki plato ile karşılaşıldı. Bu bulgu, enzimin birden fazla aktif formunun olduğunu gösterir. Daha önce bölümümüzde akyuvar GSSGR'ı ile yapılan deneyler de aynı sonucu vermiştir.

Sodyum fosfat tamponu konsantrasyonunun, akciğer ve akyuvar enzimle-

rini, aynı şekilde etkilediği saptandı. En yüksek aktivite, 0.1 M sodyum fosfat tamponu konsantrasyonunda elde edildi. Maya GSSGR'ı için bu değer, pH 7.6 'da 0.06 M olarak bulunmuştur (74).

Enzim bulgular bölümünde anlatıldığı şekilde DE-32 sellüloz ve "batchwise" yöntemiyle yapılan kaba ayırım, $(NH_4)_2SO_4$ çöktürmesi, CM-Sephadex C-50, DE-32 sellüloz ve Sephadex G-150 kolon kromatografileri ile saflaştırıldı.

Enzim için en uygun $(NH_4)_2SO_4$ kesidini saptayabilmek için yapılan deneylerde, literatüre göre farklı sonuçlar elde edildi.

Alyuvarlarda yapılan çalışmalarda Scoot (61), Staal (62) ve Worthington (65), % 0 - % 55 ; mayada ise Mavis (64), % 45 - % 60 $(NH_4)_2SO_4$ kesidini kullanmışlardır.

Bölümümüzde yapılan çalışmalarda, alyuvar (66) ve akyuvar (71) enzimlerine % 35 - % 70 $(NH_4)_2SO_4$ kesitleri uygulandı.

Akciğer GSSGR aktivitesinin ise % 0 - % 70 gibi, geniş bir $(NH_4)_2SO_4$ doygunluğunda çöktüğü saptandı (Tablo-I). Bu nedenle işlem bir saflaştırma kademesi olarak değil, gerektiğinde enzimi konsantre etmek için kullanıldı.

Akciğer homojenatı, DE-32 sellüloz kolonuna uygulandığında (Şekil 6 ve Şekil 7) enzimin birden fazla aktivite piki şeklinde elue olduğu gözlemlendi. Literatürde ve bölümümüzde yapılan, değişik enzim kaynaklarının kullanıldığı çalışmalarda, böyle bir kolon kromatografisi profili ile karşılaşılmadığından, akciğer GSSGR'ının DE-32 sellüloza "non-spesifik" olarak bağlanabileceği düşünüldü.

Yapılan CM-Sephadex C-50 kolon kromatografisi çalışmaları (Şekil 8)

de benzer sonuçlar verdi ve akciğerde, GSSGR'ın iyonik özellikleri farklı dört isoenziminin bulunabileceği anlaşıldı.

CM-Sephadex C-50 kolonundan enzimin I ve II numaralı isoenzimleri, 10 mM sodyum fosfat tamponu pH 6.6 ile beraberce ; III ve IV numaralı iso-enzimleri ise, 10 mM sodyum fosfat tamponu pH 8.0 ile ayrı ayrı elue ol- dular (Şekil 9).

Enzimin I ve II numaralı isoenzimleri DE-32 sellüloz kolon kromato- grafisi uygulanarak birbirinden ayrıldı (Şekil 10).

Elde edilen bulgular bu dört aktivitenin iyonik özelliklerinin fark- lılığını vurgular.

Enzimin IV numaralı isoenziminin alyuvar tipi olduğu düşünülmekte- dir. Bölümümüzde, aynı şartlarda alyuvar GSSGR'ı uygulanarak yapılan CM-Sephadex C-50 kolon kromatografisi profili (66) ile, sunulan çalışma- daki profil karşılaştırıldığında, her iki enzimin konumlarının aynı oldu- ğu saptandı.

İsoenzim IV (Şekil 13) ve alyuvar GSSGR (66)'ına ait poliakrilamid jel elektroforezi sonuçları da, mobiliteleri açısından benzerlik göster- mektedir.

İsoenzim II ve III ün mobiliteleri diğerlerinden daha fazladır. Bu bulgu Long (50)'un insan alyuvarlarında ve Nichols (53)'un ev farelerin- de selüloz asetat elektroforezi ile saptadıkları hızlı varyantlara uymak- tadır.

İsoenzimlerin Sephadex G-150 jel elemesi yöntemiyle saflaştırılmasın- da, enzimin agrege olmasına engel olmak için, yıkama tamponuna 2-merkapt- etanol ilave edilmiştir.

Fizyolojik görevleri farklı (91-94), yaklaşık 40 tip hücre (89) içeren akciğer dokusunda, birden fazla GSSGR isoenziminin bulunması doğal görülmektedir.

Daha saf enzim örnekleri sağlamak ve isoenzimlerin moleküler ve kinetik özelliklerini saptamak amacıyla, çalışmalara devam edilecektir.

Ö Z E T

Sığır akciğer kaba homojenatı, 1 mM EDTA içeren 50 mM sodyum fosfat tamponu pH 6.8 içinde hazırlandı ve iki saat 80 000 g'de santrifüj edildi. Supernatan, çalışmada enzim kaynağı olarak kullanıldı.

Saflaştırma kademeleri, DE-32 sellülozla kaba ayırım, amonyum sulfat çöktürmesi, CM-Sephadex C-50 ve DE-32 sellüloz gibi iyon değiştiricilerle yapılan kolon kromatografisi ve Sephadex G-150 jel elemesi yöntemlerini içermektedir.

Enzim CM-Sephadex C-50 kolonundan, 10 mM sodyum fosfat tamponu pH 6.6 ile, başlıca bir aktivite piki olarak elue oldu. Kolon 10 mM sodyum fosfat tamponu pH 8.0 ile yıkandığında iki aktivite piki daha elde edildi.

İlk pike ait aktif fraksiyon DE-32 sellüloz kolonuna uygulandı ve 10 mM sodyum fosfat tamponu pH 7.0 içinde hazırlanan 0 - 0.5 M NaCl lineer gradyeni ile iki aktif pike ayrıldığı gözlemlendi.

Glutatyon redüktaza ait bu dört isoenzimin molekül ağırlıkları, Sephadex G-150 jel elemesi yöntemiyle araştırıldı ve $98\ 000 \pm 2\ 000$; $100\ 000 \pm 2\ 000$; $105\ 000 \pm 3\ 000$ ve $115\ 000 \pm 3\ 000$ olarak saptandı.

S U M M A R Y

The crude extract of bovine lung was prepared in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 6.8, containing 1 mM EDTA and centrifuged at 80 000 g for two hours. The supernatant has been used as the source of the enzyme in the purification.

The purification procedure involved bulk separation on DE-32 cellulose, ammonium sulfate precipitation, ion exchange chromatographies on CM-Sephadex C-50, DE-32 cellulose and gel filtration on Sephadex G-150.

The main peak of the enzyme activity was eluted from CM-Sephadex C-50 column by 10 mM sodium phosphate buffer pH 6.6. Then the second and the third peaks were obtained with 10 mM sodium phosphate buffer pH 8.0 .

When the active eluate from peak one was applied to a column of DE-32 cellulose, using a linear gradient of NaCl from 0 to 0.5 M, in 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0 , the two activity peaks of glutathione reductase were eluted.

The molecular weights of the four isoenzymes of glutathione reductase have been investigated by Sephadex G-150 gel filtration technique and found to be as $98\ 000 \pm 2\ 000$; $100\ 000 \pm 2\ 000$; $105\ 000 \pm 3\ 000$ and $115\ 000 \pm 3\ 000$.

K A Y N A K L A R

1. BULGER, J.E. ve BRANDT, K.G., *Yeast Glutathione Reductase I. Spectrophotometric and Kinetic Studies of its Interaction with Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide*, *J. Biol. Chem.*, 246, 5570-5577, (1971).
2. WILLIAMS, C.H. Jr., "Flavin-Containing Dehydrogenases", Boyer, P.D. (Derleyen), *The Enzymes*, Academic Press, Inc., New York, 1976, Cilt XIII, 3. Baskı, Sayfa 89.
3. JOCELYN, P.C., *Biochemistry of the SH Group*, Academic Press, London, 1972, Sayfa 10.
4. GILLETTE, J.R., MITCHELL, J.R. ve BRODIE, B.B., *Biochemical Mechanisms of Drug Toxicity*, *Ann. Rev. Pharmacol.*, 14, 271-289, (1975).
5. HÖGBERG, J. ve KRISTOFERSON, A., *A Correlation Between Glutathione Levels and Cellular Damage in Isolated Hepatocytes*, *Eur. J. Biochem.*, 74, 77-82, (1977).
6. PILLION, D.J., MOREE, R., ROCHA, H., PASHLEY, D., MENDICINO, J. ve LEIBACH, F.H., *The Role of Glutathione in Renal Cortical Tissue. Effects of Diamide on Na⁺ and GSSG Levels, Amino Acid Transport and Na⁺-K⁺-ATP ase Activity*, *Mol. and Cell. Biochem.*, 18, 109-115, (1977).

7. SEKURA, R. ve MEISTER, A., *Glutathione Turnover in the Kidney; Considerations Relating to the γ -glutamyl Cycle and the Transport of Amino Acids*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 71, 2404-2409, (1974).
8. HIGASHI, T., TATEISHI, N., NARUSE, A. ve SAHAMOTO, Y., *A Novel Physiologic Role of Liver Glutathione as a Reservoir of L-cysteine*, *J. Biochem.*, 82, 117-124, (1977).
9. ALLEN, D.W. ve JANDL, J.H., *Oxidative Hemolysis and Precipitation of Hemoglobin. II. Role of Thiols in Oxidant Drug Action*, *J. Clin. Invest.*, 40, 454-475, (1961).
10. JACOB, H.S. ve JANDL, J.H., *Effects of Sulfhydryl Inhibition on Red Blood Cells. I. Mechanism of Hemolysis*, *J. Clin. Invest.*, 41, 779-792, (1962).
11. WHITE, A., HANDLER, P., SMITH, E.L., *Principles of Biochemistry*, Mc Graw-Hill, Inc., New York, 1973, 5. Baskı, Sayfa 342.
12. PIGIET, V.P. ve CONLEY, R.R., *Purification of Thioredoxin, Thioredoxin Reductase, and Glutathione Reductase by Affinity Chromatography*, *J. Biol. Chem.*, 252, 6367-6372, (1977).
13. CARLBERG, I. ve MANNERVIK, B., *Purification by Affinity Chromatography of Yeast Glutathione Reductase, The Enzyme Responsible for the NADPH Dependent Reduction of the Mixed Disulfide of Coenzyme A and Glutathione*, *Biochem. Biophys. Acta*, 484, 268-274, (1977).
14. MANNERVIK, B. ve AXELSSON, K., *Reduction of Disulfide Bonds in Proteins Mixed Disulfides Catalysed by a Thioltransferase*, *Biochem. J.*, 149, 785-788, (1975).

15. ISAACS, J. ve BINKLEY, F., Glutathione Dependent Control of Protein Disulfide - Sulfhydryl Content by Subcellular Fractions of Hepatic Tissue, *Biochim. Biophys. Acta*, 497, 192-204, (1977).
16. JOCELYN, P.C., Some Properties of Mitochondrial Glutathione, *Biochem. Biophys. Acta*, 396, 427-436, (1975).
17. CHANCE, B., BOVERIS, A., NAKASE, Y. ve SIES, H., "Hydroperoxide Metabolism : An Overview", Sies, H. ve Wendel, A. (Derleyenler), *Functions of Glutathione in Liver and Kidney*, Springer-Verlag, Berlin, 1978, Sayfa 95.
18. SIES, H., MOSS, K.M., A Role of Mitochondrial Glutathione Peroxidase in Modulating Mitochondrial Oxidations in Liver, *Eur. J. Biochem.*, 84, 377-383, (1978).
19. VIGNAIS, P.M. ve VIGNAIS, P.V., Fucsin, an Inhibitor of Mitochondrial SH- Dependent Transport-Linked Functions, *Biochim. Biophys. Acta*, 325, 357-374, (1972).
20. BINDOLI, A., CAVALLINI, L., SILIPRANDI, N., ZOCCARATO, F., Action of Some Thiol Oxidizing Reagents on Mitochondrial Sulfhydryl Groups, *Bull. Mol. Biol. Med.*, 1, 92-96, (1976).
21. PLAA, G.L. ve WITSCHI, H., Chemicals, Drugs and Lipid Peroxidation, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 16, 125-141, (1976).
22. ORRENIUS, S. ve JONES, D.P., "Functions of Glutathione in Drug Metabolism", Sies, H. ve Wendel, A. (Derleyenler), *Functions of Glutathione in Liver and Kidney*, Springer-Verlag, Berlin, 1978, Sayfa 164.
23. BOVERIS, A. ve CHANCE, B., The Mitochondrial Generation of Hydrogen

- Peroxide. General Properties and Effect of Hyperbolic Oxygen, Biochem. J., 134, 707-716, (1973).*
24. THURMAN, R.G., LEY, H.G. ve SCHOLZ, R., *Hepatic Microsomal Ethanol Oxidation. Hydrogen Peroxide Formation and the Role of Catalase, Eur. J. Biochem., 25, 420-430, (1972).*
25. FRIDOVICH, I., *Superoxide Dismutases, Adv. Enzymol., 41, 35-97, (1974).*
26. CADENAS, E., BOVERIS, A. ve RAGAN, C.I. ve STOPPANI, A.O.M., *Production of Superoxide Radicals and Hydrogen Peroxide by NADH-Ubiquinone Reductase and Ubiquinol-Cytochrome C Reductase from Beef-Heart Mitochondria, Arch. Biochem. Biophys., 180, 248-257, (1977).*
27. JOCELYN, P.C., *Some Properties of Mitochondrial Glutathione, Biochim. Biophys. Acta, 396, 427-436, (1975).*
28. JOCELYN, P.C., "Reduction of Diazenes and Hydroperoxides by Rat Liver Mitochondria Functions of Glutathione in Liver and Kidney", Sies, H. ve Wendel, A. (Derleyenler), *Functions of Glutathione in Liver and Kidney, Springer-Verlag, Berlin, 1978, Sayfa 127.*
29. BARTOLI, G.M., GALEOTTI, T., PALOMBINI, G., PARISI, G. ve AZZI, A., *Different Contribution of Rat Liver Microsomal Pigments in the Formation of Superoxide Anions and Hydrogen Peroxide During Development, Arch. Biochem. Biophys., 184, 276-281, (1977).*
30. SIES, H., BARTOLI, G.M., BURK, R.F. ve WAYDHAS, C., *Glutathione Efflux from Perfused Rat Liver after Phenobarbital-Treatment, During Drug Oxidations and in Selenium Deficiency, Eur. J. Biochem., 89, 113-118, (1978).*

31. JONES, D.P., THOR, H., ANDERSSON, B. ve ORRENIUS, S., *Detoxification Reactions in Isolated Hepatocytes. Role of Glutathione Peroxidase, Catalase and Formaldehyde Dehydrogenase in Reactions Relating to N-Demetylation by the Cytochrome P-450 system*, *J. Biol. Chem.*, 253, 6031-6037, (1978).
32. UOTILA, L. ve KOIVUSALO, M., *Purification and Properties of S-formilglutathione Hydrolase from Human Liver*, *J. Biol. Chem.*, 249, 7664-7672, (1974).
33. WAYDHAS, C., WEIGL, K. ve SIES, H., *The Disposition of Formaldehyde and Formate Arising from Drug N-demethylations Dependent on Cytochrome P-450 in Hepatocytes and in Perfused Rat Liver*, *Eur. J. Biochem.*, 89, 143-150, (1978).
34. JOLLOW, D.J., MITCHELL, J.R., ZAMPAGLIONE, N. ve GILETTE, J.R., *Bromobenzene-Induced Liver Necrosis. Protective Role of Glutathione and Evidence for 3,4-Bromobenzene Oxide as the Hepatotoxic Metabolite*, *Pharmacology*, 11, 151-169, (1974).
35. THOR, H., MOLDEUS, P., KRISTOFERSON, A., HÖGBERG, J., REED, D.J. ve ORRENIUS, S., *Metabolic Activation and Hepatotoxicity. Metabolism of Bromobenzene in Isolated Hepatocytes*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 188, 114-121, (1978).
36. THOR, H., MOLDEUS, P., HERMANSON, R., HÖGBERG, J., REED, D.J. ve ORRENIUS, S., *Metabolic Activation and Hepatotoxicity. Toxicity of Bromobenzene in Hepatocytes Isolated from Phenobarbital- and Diethylmaleate - Treated Rats*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 188, 122-129, (1978).
37. REED, D.J. ve ORRENIUS, S., *The Role of Methionine in Glutathione*

- Biosynthesis by Isolated Hepatocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 77, 1257-1264, (1977).
38. MOLDEUS, P., JONES, D.P., ORMSTAD, K. ve ORRENIUS, S., Formation and Metabolism of a Glutathione-S-conjugate in Isolated Rat Liver and Kidney Cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 83, 195-200, (1978).
39. MEISTER, A., On the Enzymology of Amino Acid Transport, *Science*, 180, 33-39, (1973).
40. ORLOWSKI, M. ve MEISTER, A., The γ -Glutamyl Cycle; Possible Transport System for Amino Acids, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 67, 1248-1255, (1970).
41. LEHNINGER, A.L., *Biochemistry*, Worth Publishers, Inc., New York, 1975, 2. Baskı, Sayfa 795.
42. MEISTER, A. ve TATE, S.S., Glutathione and Related γ -Glutamyl Compounds, Biosynthesis and Utilization, *Ann. Rev. Biochem.*, 45, 559-604, (1976).
43. TATE, S.S. ve MEISTER, A., Serine-Borate Complex as a Transition-State Inhibitor of γ -Glutamyl Transpeptidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75, 4806-4809, (1978).
44. THOMPSON, G.A. ve MEISTER, A., Interrelationships Between the Binding Sites for Amino Acids, Dipeptides, and γ -Glutamyl Donors in γ -Glutamyl Transpeptidase, *J. Biol. Chem.*, 252, 6792-6797, (1977).
45. TATEISHI, A., HIGASHI, T., NARUSE, A., NAKASHIMA, K., SHIOZAKI, H., SAKAMOTO, Y., Rat Liver Glutathione : Possible Role as a Reservoir of Cysteine, *J. Nutrition.*, 107, 51-60, (1977).
46. OGINO, N., MIYAMOTO, T., YAMAMOTO, S. ve HAYAISHI, O., Prostaglandin

- Endoperoxide E-isomerase from Bovine Vesicular Gland Microsomes, a Glutathione-Requiring Enzyme*, *J. Biol. Chem.*, 252, 890-895, (1977).
47. CHRIST-HAZELHOF, E., NUGTEREN, D.H., Purification and Characterization of Prostaglandin Endoperoxide D-isomerase, a Cytoplasmic Glutathione-Requiring Enzyme, *Biochem. Biophys. Acta*, 572, 43-51, (1979).
48. CHRIST-HAZELHOF, E., NUGTEREN, D.H., VAN DORP, D.A., Conversions of Prostaglandin Endoperoxides by Glutathione S-Transferases and Serum Albumin, *Biochem. Biophys. Acta*, 450, 450-461, (1976).
49. VAN DER OUDERAA, F.J., BUYTENHEK, M., NUGTEREN, D.H., VAN DORP, D.A., Purification and Characterization of Prostaglandin Endoperoxide Synthetase from Sheep Vesicular Glands, *Biochem. Biophys. Acta.*, 487, 315-331, (1977).
50. LONG, W.K., *Glutathione Reductase in Red Blood Cells : Variant Associated with Gout*, *Science*, 155, 712-713, (1967).
51. KAPLAN, J.C., *Electrophoretic Study of Glutathione Reductase in Human Erythrocytes and Leucocytes*, *Nature*, 217, 256-258, (1969).
52. JACOB, H.S. ve JANDL, J.H., *Effects of Sulfhydryl Inhibition on Red Blood Cells. III. Glutathione in the Regulation of the Hexose Monophosphate Pathway*, *J. Biol. Chem.*, 241, 4243-4250, (1966).
53. NICHOLS, E.A. ve RUDDLE, F.H., *Polymorphism and Linkage of Glutathione Reductase in Mus Musculus*, *Biochem. Gen.*, 13, 323-329, (1975).
54. FIRTH, S., PETERS, J. ve BULFIELD, G., *Activity and Electrophoretic Mobility of Glutathione Reductase Allozymes in Different Tissues of the Mouse*, *Biochem. Gen.*, 17, 229-232, (1979).

55. LÖFFLER, G., Congenital, Nonspherocytic, Hemolytic Anemia Associated with Familial DPNH- and TPNH-Dependent Glutathione Reductase Deficiency in the Erythrocytes, *Klin. Wschr.*, 44, 571-573, (1966).
56. BEUTLER, E., Glutathione Reductase : Stimulation in Normal Subjects by Riboflavin Supplementation, *Science*, 168, 613-615, (1969).
57. FRISCHER, H. ve AHMAD, T., Severe Generalized Glutathione Reductase Deficiency after Antitumor Chemotherapy with BCNU' [1,3-bis(chloroethyl)-l-nitrosourea] , *J. Lab. Clin. Med.*, 89, 1080-1091, (1977).
58. WORTHINGTON, D.J. ve ROSEMEYER, M.A., Glutathione Reductase From Human Erythrocytes. Molecular Weight, Subunit Composition and Aggregation Properties, *Eur. J. Biochem.*, 60, 459-466, (1975).
59. WORTHINGTON, D.J. ve ROSEMEYER, M.A., Glutathione Reductase From Human Erythrocytes. Catalytic Properties and Aggregation, *Eur. J. Biochem.*, 67, 231-238, (1976).
60. NAKASHIMA, K., MIWA, S. ve YAMAUCHI, K., Human Erythrocyte Glutathione Reductase. I. Purification and Properties, *Biochem. Biophys. Acta*, 445, 309-323, (1976).
61. SCOTT, E.M., DUNCAN, I.W., EKSTRAND, V., Purification and Properties of Glutathione Reductase of Human Erythrocytes, *J. Biol. Chem.*, 238, 3928-3933, (1963).
62. STAAL, G.E.J., VISSER, J. ve VEEGER, C., Purification and Properties of Glutathione Reductase of Human Erythrocytes, *Biochim. Biophys. Acta*, 185, 39-48, (1969).
63. MASSEY, V., WILLIAMS, C., On the Reaction Mechanism of Yeast Glutathione Reductase, *J. Biol. Chem.*, 240, 4470-4480, (1965).

64. MAVIS, R.D. ve STELLWAGEN, E., Purification and Subunit Structure of Glutathione Reductase from Bachers Yeast, *J. Biol. Chem.*, 243, 809-814, (1968).
65. WORTHINGTON, D.J. ve ROSEMEYER, M.A., Human Glutathione Reductase : Purification of the Crystalline Enzyme From Erythrocytes, *Eur. J. Biochem.*, 48, 167-177, (1974).
66. ERDEN, M. ve TEZCAN, E.F., İnsan Alyuvar Glutatyon Redüktazının Saflaştırılması, *Biyokimya Dergisi*, 2, 80-86, (1977).
67. ERDEN, M. ve TEZCAN, E.F., İnsan Alyuvar Glutatyon Redüktazının Özellikleri, *Biyokimya Dergisi*, 2, 87-96, (1977).
68. STAAL, G.E.J. ve VEEGER, C., The Reaction Mechanism of Glutathione Reductase from Human Erythrocytes, *Biochim. Biophys. Acta*, 185, 49-62, (1969).
69. MANNERVIK, B., A Branching Reaction Mechanism of Glutathione Reductase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 53, 1151-1158, (1973).
70. ÖĞÜŞ (AKGÜN), A. ve TEZCAN, E.F., İnsan Akyuvar Glutatyon Redüktazının Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması, *Biyokimya Dergisi*, 2, 171-178, (1978).
71. ÖĞÜŞ, A. ve TEZCAN, E.F., Purification and Subunit Structure of Glutathione Reductase from Human Leukocytes, *Biochem. Med.*, 25, 81-91, (1981).
72. ÖĞÜŞ, A. ve TEZCAN, E.F., İnsan Akyuvar Glutatyon Redüktazının Tepkime Mekanizması, *Biyokimya Dergisi*, 4, 121-127, (1979).

73. ÖÇÜŞ, A. ve TEZCAN, E.F., İnsan Akyuvar Glutasyon Redüktazının Nem (N-etilmalimid) ile İnhibisyonu, *Biyokimya Dergisi*, 4, 128-132, (1979).
74. MOROFF, G. ve BRANDT, K.G., Steady State Kinetic Investigation of Specific Anion Effects on the Catalytic Activity of Yeast Glutathione Reductase, *Arch. Biochem. Biophys.*, 159, 468-474, (1973).
75. HUBER, P.W. ve BRANDT, K.G., Kinetic Studies of the Mechanism of Pyridine Nucleotide Dependent Reduction of Yeast Glutathione Reductase, *Biochemistry*, 19, 4568-4575, (1980).
76. MATHEWS, R.G., BALLOU, D.P. ve WILLIAMS, C.H.Jr., Reactions of Pig Heart Lipoamide Dehydrogenase with Pyridine Nucleotides. Evidence for an Effector Role for Bound Oxidized Pyridine Nucleotide, *J. Biol. Chem.*, 254, 4974-4981, (1979).
77. SCHULZ, G.E., ZAPPE, H.A., WORTHINGTON, D.J. ve ROSEMEYER, M.A., Crystals of Human Erythrocyte Glutathione Reductase, *FEBS Lett.*, 54, 86-88, (1975).
78. ZAPPE, H.A., KROHNE-EHRICH, G. ve SCHULZ, G.E., Low Resolution Structure of Human Erythrocyte Glutathione Reductase, *J. Mol. Biol.*, 113, 141-152, (1977).
79. KROHNE-EHRICH, G., SCHIRMER, R.H. ve UNTUCHT-GRAU, R., Glutathione Reductase from Human Erythrocytes, Isolation of the Enzyme and Sequence Analysis of Redox-Active Peptide, *Eur. J. Biochem.*, 80, 65-71, (1977).
80. SCHULZ, G.E., SCHIRMER, R.H., SACHSENHEIMER, W. ve PAI, E.F., The Structure of the Flavoenzyme Glutathione Reductase, *Nature*, 273, 120-124, (1978).

81. SCHULZ, G.E., BLATTERSPIEL, R. ve UNTUCHT-GRAU, R., Glutathione Reductase from Human Erythrocytes. Amino-Acid Sequence of a Major Fragment that Links the FAD, NADP and Interface Domains, *Eur. J. Biochem.*, 102, 269-287, (1979).
82. UNTUCHT-GRAU, R., SCHULZ, G.E. ve SCHIRMER, R.H., The C-Terminal Fragment of Human Glutathione Reductase Contains the Postulated Catalytic Histidine, *FEBS Lett.*, 105, 244-248, (1979).
83. HARDING, J.J., Affinity Chromatography in the Purification of Glutathione Reductase, *J. Chromatog.*, 77, 191-199, (1973).
84. BOGGARAM, V., BROBJER, T., LARSON, K. ve MANNERVIK, B., Purification of Glutathione Reductase from Porcine Erythrocytes by the Use of Affinity Chromatography on 2',5'-ADP-Sepharose 4B and Crystallization of the Enzyme, *Anal. Biochem.*, 98, 335-340, (1979).
85. CARLBERG, I. ve MANNERVIK, B., Purification and Characterization of the Flavoenzyme Glutathione Reductase from Rat Liver, *J. Biol. Chem.*, 250, 5475-5480, (1975).
86. BAREA, J.L. ve LEE, C.V., Mouse-Liver Glutathione Reductase, Purification, Kinetics Regulation, *Eur. J. Biochem.*, 98, 487-499, (1979).
87. ZANETTI, G., Rabbit Liver Glutathione Reductase. Purification and Properties, *Arch. Biochem. Biophys.*, 198, 241-246, (1979).
88. MUHAMMED, S. ve TEZCAN, E.F., Sığır Akciğer Glutatyon Redüktazının Kısmi Saflaştırılması, *Doğa Bilim Dergisi, Tıp*, 5, 115-118, (1981).
89. MORON, M.S., DEPIERRE, J.W. ve MANNERVIK, B., Levels of Glutathione Reductase and Glutathione S-Transferase Activities in Rat Lung and Liver, *Biochim. Biophys. Acta*, 582, 67-78, (1979).

90. ASGHAR, K., REDDY, B.G. ve KRISHNA, G., *Histochemical Localization of Glutathione in Tissues*, *J. Histochem. Cytochem.*, 23, 774-779, (1975).
91. LEWIS, R.A. ve AUSTEN, K.F., *Nonrespiratory Functions of Pulmonary Cells : The Mast Cell*, *Federation Proc.*, 36, 2676-2682, (1977).
92. RYAN, J.W. ve RYAN, U.S., *Pulmonary Endothelial Cells*, *Federation Proc.*, 36, 2683-2791, (1977).
93. MASON, R.J., DOBBS, L.G., GREENLEAF, R.D. ve WILLIAMS, M.C., *Alveolar Type II Cells*, *Federation Proc.*, 36, 2697-2702, (1977).
94. GORDON, S., *Macrophage Neutral Proteinases and Defense of the Lung*, *Federation Proc.*, 36, 2707-2711, (1977).
95. WARBURG, O. ve CHRISTIAN, W., *Biochem. Z.*, 310, 384, (1941) "Alınmıştır"
Colowich, S.P., Kaplan, N.O., *Methods in Enzymology*, Academic Press Inc., Publishers, New York, 1957, Cilt III, Sayfa 454.
96. LOWRY, O.A., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. ve RANDALL, R.J., *Protein Measurements with the Folin Phenol Reagent*, *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275, (1951).
97. FOLIN, O., CIOCALTEU, V., *J. Biol. Chem.*, 73, 627, (1927), "Alınmıştır",
Colowick, S.P., Kaplan, N.O., *Methods in Enzymology*, Academic Press Inc., Publishers, New York, 1957, Cilt III, Sayfa 467.
98. ANDREWS, P., *The Gel-Filtration Behaviour of Proteins Related to their Molecular Weights Over a Wide Range*, *Biochem. J.*, 96, 595-605, (1965).
99. ORNSTEIN, L., *Disc Electrophoresis-I. Background and Theory*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121, 321-349, (1964).

100. DAVIS, B.J., *Disc Electrophoresis-II. Method and Application to Human Serum Proteins*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121, 404-427, (1964).
101. SEGEL, I.H., *Enzyme Kinetics*, John Wiley and Sons Inc., New York, 1975, Sayfa 884.
102. RHOADS, R.E., ROBERTS, N.E. ve UDENFRIEND, S., *Collogen Proline Hydroxylase (Rat Skin)*, Colowick, S.P., Kaplan, N.O. (Derleyenler), *Methods in Enzymology*, Academic Press, Inc., Publishers, New York, 1971, Cilt XVIIIB, Sayfa 306.
103. BOCK, R.M. ve LING, N.S., *Devices for Gradient Elution in Chromatography*, *Anal. Chem.*, 26, 1543-1546, (1954).
104. STAAL, G.E.J., KOSTER, J.F. ve KAMP, H., *Human Erythrocyte Pyruvate Kinase. Its Purification and Some Properties*, *Biochim. Biophys. Acta*, 227, 86-90, (1971).
105. MAHLER, H.R. ve CORDES, E.H., *Biological Chemistry*, Harper and Row Publishers, New York, 1971, 2. Baskı, Sayfa 448.

K I S A L T M A L A R

DEM	: Dietilmaleat
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
FAD	: Flavin adenin dinukleotid
GPer	: Glutatyon peroksidaz
GSH	: Redükte Glutatyon
GSSG	: Okside Glutatyon
GSSGR	: Glutatyon redüktaz
Kat	: Katalaz
LDH	: Laktik dehidrogenaz
MA	: Molekül ağırlığı
NADH	: Redükte nikotinamid adenin dinukleotid
NADPH	: Redükte nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NEM	: N-etilmalimid
O.D.	: Optik dansite
PMSF	: Fenilmetilsulfonyl florür
SDS	: Sodyum dodesil sulfat
SOD	: Superoksit dismutaz
TEMED	: N,N,N',N',-Tetrametiletilen diamin
Tris	: Tris (hidroksimetil) amino metan
U	: Ünite