

T. C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ FAKÜLTESİ

283821

# İnsan Akyuvar Glutasyon Redüktazının Safılaştırılması ve Özellikleri

Biyokimya Programı

DOKTORA TEZİ

Ay Akgün

Ankara - 1975

T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ FAKÜLTESİ

İnsan Akyuvar Glutatyon Redüktazının  
Saflaştırılması ve Özellikleri

BİYOKİMYA PROGRAMI  
DOKTORA TEZİ

Ay Akgün

Rehber Öğretim Üyesi: Dr.Ferhan Tezcan

ANKARA 1975

## İ Ç İ N D E K İ L E R

GİRİŞ .....	1
MATERYAL, ARAÇ ve YÖNTEMLER .....	5
Akyuvar ayırması .....	5
Enzim ve protein tayini .....	6
Amonyum sülfat çöktürmesi .....	7
Absorbsiyon kromatografisi .....	7
Afinite kromatografisi .....	7
Klorür tayini .....	9
Akrilamid jel elektroforezi.....	11
SDS akrilamid jel elektroforezi .....	11
Sephadex G-200 kolon analizi .....	12
BULGULAR .....	14
Kontrol deneyleri .....	14
Saflaştırma .....	15
Enzimin iki substrat kinetiği .....	25
NEM inhibisyonu .....	32
Fosfat tamponunun anyonik etkisi .....	34
pH 'nın etkisi .....	35
Sephadex G-200 kolon analizi .....	36
SDS akrilamid jel elektroforezi ile enzimin alt birim molekül ağırlığı tayini..	37
TARTIŞMA .....	38
ÖZET .....	43
KISALTMALAR LİSTESİ .....	44
BİYOKİMYASAL KAYNAKLAR .....	45

## G İ R İ Ő

Glutatyon Redüktaz (NADPH = okside glutatyon oksidoredüktaz, EC 1.6.4.2).

$GSSG + NADPH + H^+ \rightleftharpoons 2GSH + NADP^+$  tepkimesini katalize eder.

Maya<sup>1</sup>, alyuvar<sup>2</sup>, fare Erlich tümör hücresi<sup>3</sup>, ve göz merceğinden<sup>4</sup> elde edilip saflaştırılan enzim, prostetik grup olarak flavin adenin dinükleotid taşıyan bir flavoproteindir. Glutatyon Redüktaz (GSSGR) bir başka flavoprotein enzim olan Lipoyldehidrogenaza benzetilmiş ve S-S köprülerinin indirgenmesini katalize eden bu iki enzimin ortak yönleri araştırılmıştır<sup>2,5</sup>. Her ikisinin aktif merkezlerinde reaktif bir disülfid grubu bulunmuştur. GSSGR'ın iki molekül FAD içerdiği ve iki polipeptid zincirinden oluştuğu kanısına varılmıştır. Lipoyldehidrogenazda olduğu gibi apoenzimin bir monomer olduğuna dair bulgu yoktur.

Bu konudaki çalışmaların önemli bir kısmı alyuvarlarda yapılmıştır<sup>5,6,8</sup>. Alyuvar GSSGR'nın molekül ağırlığı  $115\ 000 \pm 4000$  olarak saptanmıştır. Anyon katyon değiştiricileri kullanarak dokuz basamaklı bir saflaştırılmaya gidilmiştir. Alyuvarlarda düşük GSSGR etkinliği, ilk kez Carson<sup>7</sup> tarafından saptanmıştır, fakat

böyle bir eksiklikte enzimin niteliklerinde değişiklik bulunamamıştır. Son yıllarda ise alyuvar enziminin değişik bir tipi ortaya konmuştur<sup>8</sup>. Bu tipde GSSG ve NADPH için  $K_m$  aynı kalmakla beraber FAD'nin apoproteine bağlanma değerinin düştüğü saptanmıştır.

Değişik kaynaklardan elde edilen GSSGR'ın kinetik davranışları için önerilen çeşitli mekanizmalar vardır. Mayada yapılan kinetik çalışmada Massey ve Williams<sup>9</sup> "ping-pong" mekanizmasını önermişlerdir. Staal ve Veeger<sup>6</sup> alyuvarlarda "düzenli", Mannervik<sup>10</sup> ise mayada ikisinin karışımı bir dallanma mekanizmasını savunmuşlardır. Ayrıca alyuvar ve maya enzimlerinin değişik iyon duyarlılıkları bulunmuştur.

GSSGR tepkimesinin ürünü olan  $NADP^+$ , heksoz monofosfat (HMP) yolunun düzenlenmesinde görevlidir. Diğer bir ürün olan GSH alyuvar zar yapısının, hemoglobinin ve -SH gruplu enzimlerin dayanıklılığını sağlar. GSH yoksunluğu hemolitik anemilere yol açar. Başlıca karaciğer ve böbrekte, enzimin önemli bir rolü de insülin etkisizleştirilmesi için gerekli GSH'ı oluşturmasıdır<sup>11</sup>. GSH insulini, S-S köprülerini kırarak  $\alpha$  ve  $\beta$  zincirlerine ayırır. Oluşan  $\beta$  zincirinin ise GSSGR'ı etkisizleştirdiği bulunmuştur. Bu nedenle insülin kendi etkisizleştirilmesini kontrol eder (feed back).

GSSGR'a ait bir diğer bulgu da alyuvarlarda enzimin primer gut ile ilgili bir varyantının bulunmasıdır<sup>12,13</sup>. Bir kaç gut hastasının GSSGR etkinliğinde artış izlenmiştir. Bu artış, fazla NADPH gerektirdiğinden, HMP'ı NADPH yönünden zorlar. HMP yolundaki sitümlasyon riboz 5-fosfat (R-5-P) sentezini hızlandırır. R-5-P'dan pürin nükleotid sentezi için gerekli 5-fosforibozil-1-



Bu amaçla çalışmada insan kanı kullanılmış, enzim akyuvarlardan elde edilerek kısmen saflaştırılmış ve kinetik özellikleri saptanmaya çalışılmıştır. Biyokimyasal kaynaklardan alyuvar ve maya glutatyon redüktazı için elde edilen bulgular göz önüne alınarak tartışması yapılacaktır.

## MATERYAL, ARAÇ ve YÖNTEMLER

Akrilamid, amonyum persulfat, NN'-metilen bis akrilamid, NNN'N'-tetra-metil-1,2-diaminoetan, tampon tuzları, BDH firmasından; Bromfenol mavisi, Coomasie brilliant mavisi, fenol ayıracı, 1,6 diaminohexsan Fisher firmasından; 1-etil-3-(3-dimetil propil) karbodiimid Merck; Glutatyon, CM-Sephadex, NADPH, Sepharose 4B, sodyumdodesil sülfat Sigma'dan sağlandı.

Akrilamid jel elektroforezi için kullanılan araç Buchler firmasına aittir. Deneylerde Zeiss PMQ II tipi spektrofotometre, Lourdes firmasına ait AX tipi santrifuj, Diaflo ultrafiltrasyon ve Branson sonikasyon araçları kullanılmıştır.

Enzimin Elde Edilmesi ve Saflaştırılmasında Kullanılan Yöntemler.

### 1. Akyuvar ayırması :

Enzim insan akyuvarlarından elde edilmiştir. Kan, Hacettepe Kan Bankası vericilerinden sağlanmıştır.

Akyuvarlar Dextran çöktürme<sup>15</sup> yöntemiyle ayrılmıştır. Plastik bir tübe kan alma çözeltilisi konarak, kan bu çözeltilinin üstüne



alınır. Tüpler oda sıcaklığında düşey olarak 60-90 dak. bekletilir. Üstte kalan (supernatant), plastik bir pipetle kuru bir plastik tübe alınır. 300 xg'de 10 dakika santrifüj edilir. Üstte kalan atılır. Çökelek içindeki alyuvarlar osmotik şok<sup>16</sup> ile parçalanır.

Osmotik şok işlemi : Tüpün içindeki çökelek el ile fiskeler vurularak iyice kaldırılır. 20 saniye içinde 2 ml distile su süratle pipetlenir, bu süre dolarken 2 ml (2 kez değişik) Hank çözeltisi yine hızla pipetlenir. Üzerine 10 ml normal Hank çözeltisi konur ve 300 xg'de 10 dakika santrifüj edilir, üstte kalan atılır, tüpün dibine yapışan akyuvarlar serum fizyolojik ile yıkanır. Çökelek akyuvar homojenizasyon solusyonu ve 10 mM NaPO<sub>4</sub> pH 6,6 tamponuyla 50-60 watt'da 3 dakika sonike edilir. Bir kez dondurup çözülür ve 20 000 xg 'de 20 dakika santrifüj edilip üstte kalan alınır.

## 2. Enzim ve Protein Tayini :

Enzim etkinliğinin saptanması Zeiss spektrofotometresinde yapılmıştır. NADPH'nın yükseltgenmesi 340 nm'de izlenmiştir. Alıcı molekül GSSG'dir. Enzim etkinliği 0,1 M NaPO<sub>4</sub> pH 6,8, 1 mM GSSG, 120 mM NADPH, 5 mM EDTA içeren ve 2,5 ml 'ye tamamlanan çözeltide saptanmıştır. Bir enzim birimi bu koşullarda bir  $\mu$ mol NADPH'yi bir dakikada yükseltgeyen enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Spesifik aktivite, birim/mg protein'dir.

Protein miktarı Warburg, Christian<sup>17</sup> ve Folin, Lowry<sup>18</sup> yöntemleriyle saptanmıştır. İkinci yöntem birinciye göre 20 kez daha duyarlıdır. Protein standardı olarak sığır serum albumini (BSA) kullanılmıştır.

### 3. Amonyum Sülfat Çöktürmesi :

İyonik kuvvetin dar sınırlar içinde değiştirilmesi, proteinlerin çözünürlüklerinde büyük farklar oluşturur. Bu bulgudan yararlanarak % 35-70 amonyum sülfat kesitinde enzimin pek çok proteinden uzaklaştırılması sağlanmıştır.

### 4. Absorbsiyon Kromatografisi :

Kromatografide klasik yöntemle rejenere edilen CM-50-Sephadex kullanıldı. Karboksi metil gurupları içeren bu substitüe Sepharose'a bağlanan enzim, pH değiştirilerek elue edildi.

### 5. Afinite Kromatografisi :

Enzimlerin ve pek çok makromoleküllerin afinite kromatografisi ile ayırımı ve saflaştırılması, son yıllarda önem kazanan bir yöntemdir<sup>19</sup>. Durgun faz, jel ya da çapraz bağlantılı bir polimerdir. Buna enzimle ilintisi olan uygun bir ligand takılır. Ligand enzimin substratı, kompetitif inhibitörü, kofaktörüyle ilgili bir nükleotid olabilir. Kolondan geçen protein karışımı arasından, enzim özgül olarak matrikse bağlanır. Ligandla ilintisi olmayan diğer proteinler ise uzaklaşır. Elusyon için genellikle iyonik gradyen uygulanır. Bazı durumlarda, tamamlayıcı nükleotid, substrat, ya da kompetitif inhibitörün varlığı elusyon için gereklidir. pH ve sıcaklık gradyeni de uygulanabilir. Biyokimyasal kaynaklardaki yeni çalışmalar birden fazla enzime özgül adsorbantların geliştirilmesi üzerinedir<sup>20</sup>.

### CNBr Etkinleştirmesi :

Cuatrecasas ve Anfinsen<sup>21</sup> 'nin tanımladığı yöntem ile,

Sepharose 4B CNBr kullanılarak etkinleştirilmiştir. İyi yıkanmış 50 ml Sepharose su ile karıştırılır. Paketlenmiş mililitre Sepharose başına, 50-300 mg CNBr karıştırılarak çözeltiye süratle eklenir. 2M NaOH ile karışım pH 11 'e getirilir ve bu pH 'da tutulur. Sıcaklığın 20°C 'ın üzerine çıkmaması gereklidir. Tepkime 8-12 dak. arasında son bulur, bu da proton çıkışının durması ile anlaşılır. Süspansiyona süratle buz eklenerek Buchner hunisine aktarılır. Vakumda 0,1M pH 9,5 sodyum borat tamponu ile çökelek yıkanır.

#### 1,6 Diaminoheksan eklenmesi :

Hunideki çökelti bir plastik behere aktarılıp üzerine 0,1M sodyum borat pH 9,5 tamponu içinde 6,96 g 1,6 diaminoheksan eklenir. Tepkime 4°C 'da 16 saat sürer. Aktive Sepharose dayanıklı olmadığından yıkama ve 1,6 diaminoheksan eklenmesi 90 saniyeden fazla almamalıdır.

#### GSSG eklenmesi :

300 mg GSSG yukarıdaki karışıma eklenip HCl ile pH 4,7 'ye getirilir. 500 mg 1-etil -3-(3 dimetilaminopropil) karbodiimid 5 dak. içinde çözeltiye eklenir. Tepkime, reaktif agaros gruplarının tamamen kaybolması için 4°C da 20 saat sürdürülür. Bu sürenin sonunda substitüe Sepharose bol su ve tamponla yıkanır. Yıkama işlemi ile ligandın fazlasının, üre türevlerinin ve tepkimeye girmemiş karbodiimidin uzaklaşması gereklidir. Deneyde, genellikle amid bağlarının oluşmasında kullanılan disikloheksil-karbodiimid (DCC) yerine başka bir karbodiimid türevi kullanılmıştır. Bunun nedeni, DCC'den oluşan N,N' disikloheksil ürenin

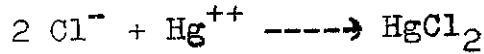
suda az çözünmesidir. 1-etil -3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid'in üre türevi suda çözünür ve kolayca yıkama ile uzaklaştırılır. Bu tepkimelerin sonunda hazırlanan türev Sepharose - NH (CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-NH-GSSG'dur. Kimyasal tepkimeler Şekil-2 'de verilmiştir.

Kolona bağlanan GSSG'nin ölçülmesi :

Sepharose-NH (CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> -NH-GSSG türevinin indirgenmesinden oluşan GSH miktarı ölçülür<sup>22</sup>. Kolon materyalinin 0,5 ml'sine 40 mg NaBH<sub>4</sub> içeren 2 ml, 1M, pH 9,0 Tris tamponu ilave edilir. Karışım, bir saat 20°C 'da bekletilir. Santrifüj edilip üstte kalana 0,1 ml 5,5'-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) konarak 412 nm'de absorbans ölçülür.

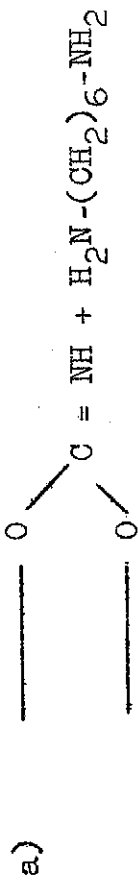
6. Klorür Tayini : (Merkürük titrasyon yöntemi)

Klorür tayini Schales'in<sup>23</sup> modifiye yöntemi ile yapılmıştır.

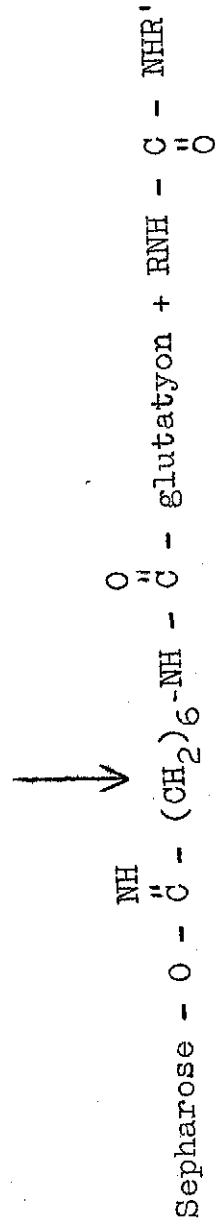
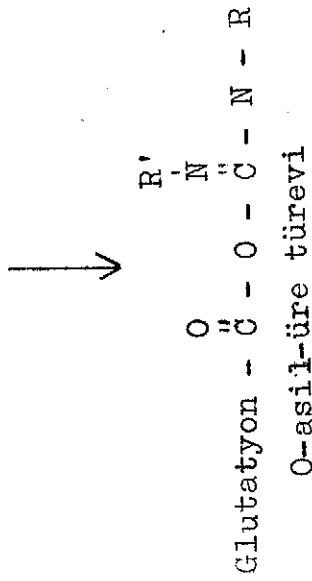
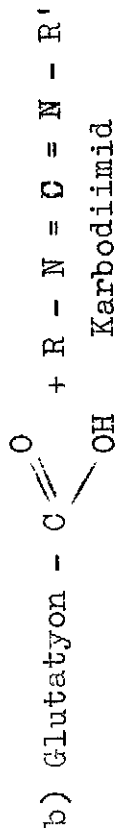


Bütün klorür iyonları, Hg<sup>++</sup> ile birleştikten sonra, Hg<sup>++</sup> 'nin fazlası difenil karbazon indikatörü ile birleşerek mor bir kompleks verir. Renk oluşması titrasyonun bitim noktası olarak alınır. Klorür standardı olarak mililitresinde 100 mEq. NaCl içeren çözelti kullanılır.

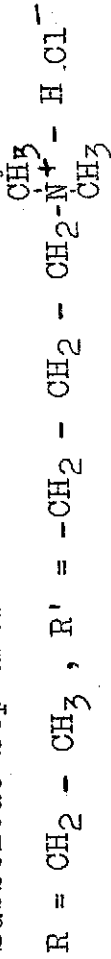
$$\text{mEq/L} = \frac{\text{Örnek için kullanılan HgNO}_3 \text{ ml}}{\text{Standard için kullanılan HgNO}_3 \text{ ml}} \times 100$$



Sepharose imidokarbonat 1,6 diaminoheksan gurupları



ŞEKİL-2. Substitue Sepharose türevinin hazırlanışındaki tepkimeler.



### 7. Akrilamid Jel Elektroforezi :

Basit inorganik iyonlar gibi, proteinler de elektriksel alanda hareket ederler. Bir proteinin elektriksel alandaki hareketi, molekülün üstündeki net yüke, difüzyon sabitine, molekül ağırlığı ve biçimine bağlıdır. Akrilamid disk elektroforezi proteinlerin birbirlerinden ayrılması ve molekül ağırlıklarınının saptanmasında kullanılan iyi bir yöntemdir<sup>24</sup>.

Akrilamid jel kolonu polietilen tübler (26 cm X 1 cm) içerisinde üç tabaka olarak hazırlanır. Örneği içeren büyük gözenekli jel, akrilamid ve bisakrilamidin beyaz ışık altında polimerize edilmesi ile oluşturulur. Hızlandırıcı olarak riboflavin kullanılır. Örneğin deriştirilmesi için tekrar büyük gözenekli jel tabakası, mobilitelerine göre ayrılması için ise küçük gözenekli jel tabakası gerekir. Küçük gözenekli jel, akrilamid ve bisakrilamidin persülfat hızlandırıcısı ile polimerleşmesinden elde edilir. Tüp başına 5 mA akım verilir. Yürüme bromfenol mavisi bandı ile izlenir.

Jeller elektroforeden sonra Amido siyahı boyasında bir kaç saat bırakılır. Su ile yıkanarak ve elektroforetik olarak boyanın fazlası uzaklaştırılır.

### 8. SDS Akrilamid Jel Elektroforezi :

Shapiro<sup>25</sup> proteinlerin SDS'li ortamda akrilamid jel elektroforezi ile ayrılmalarının polipeptid zincirlerinin farklı molekül ağırlıklarına bağlı olduğunu göstermiştir. Bu teknikle polipeptid molekül ağırlıkları  $\pm$  % 10 yanılıyla saptanır.

Protein % 10 SDS , % 10 merkaptoetanol içeren sodyum fosfat

tamponunda 37°C 'de iki saat inkübe edilir. Kullanılan jel akrilamid ve bisakrilamidin persülfat ve TEMED ile polimerleşmesinden elde edilir. Jel, cam tüpler (6 mm X 10 cm) içerisinde hazırlanır. Bromfenol mavisi, gliserol, merkaptoetanol karışımı içinde hazırlanan kör ve enzim örnekleri jel üzerine yerleştirilir. Rezervuarlara takılarak tüp başına 8 mA akım geçirilir.

Elektroforez bittikten sonra jeller metanol, asetik asit karışımında hazırlanan "Coomassie brilliant" mavisi ile oda ısısında boyanır (2-10 saat). Boya elektroforetik olarak ya da % 7 asetik asit içerisinde jeller kaynatılarak akıtılır. Jel boyu ve "marker"ın yürüdüğü yol, boyamadan önce ve boya akıtıldıktan sonra ölçülür. Proteinin yürüdüğü yol da ölçülerek mobilite hesaplanır.

$$\text{Mobilite} = \frac{\text{Protein bandı (cm)}}{\text{Boya akıtılmış jel boyu}} \times \frac{\text{Boyadan önce jel boyu}}{\text{Marker (cm)}}$$

Semilogaritmik olarak mobiliteye karşı bilinen molekül ağırlığında proteinler grafiklenir. Bu grafikten enzimin polipeptid molekül ağırlığı bulunur<sup>26</sup>.

#### 9. Sephadex G-200 İle Protein Molekül Ağırlığının Bulunması:

Sephadex, şeker fermentasyonundan elde edilen modifiye bir dextran tipidir. Hidroksil grupları nedeniyle hidrofildir. Su ve elektrolit çözeltilerde şişer. Moleküler elek olarak kullanılır.

Çalışmada enzimin molekül ağırlığı Sephadex G-200 kullanılarak bulunmuştur<sup>27</sup>. Bilinen molekül ağırlığındaki proteinler önce kolondan geçirilerek, semilogaritmik olarak molekül ağırlıklarına

karşı elusyon hacmi grafiklenmiş ve standard eğri elde edilmiştir. Kolon homojenliği "Blue Dextran 2000" ile kontrol edilmiştir. Glutatyon redüktaz "Blue Dextran" ile çözünür kompleks yaptığından enzim geçirilmeden önce kolon iyice yıkanmıştır.



## B U L G U L A R

### I- Kontrol Deneyleri :

Enzim etkinliğinin değişik koşullarda dayanıklılığı araştırıldı.

1. Akyuvar GSSGR'ı 0,1M NaPO<sub>4</sub> pH 6,6 tamponunda 30 dakika, 55°C 'da ısıtmaya dayanıklıdır.
2. Beş gün içinde şu koşullarda buz dolabında saklanan enzimin (20 000 xg supernatantı, 120 X/ml) aktivite kaybı izlenmedi.
  - a) pH 6,6 10 mM NaPO<sub>4</sub> tamponunda,
  - b) pH 6,6 70 mM NaPO<sub>4</sub> tamponunda,
  - c) 4,5 X 10<sup>-4</sup> M EDTA, 10 mM pH 6,6 NaPO<sub>4</sub> içeren ortamda,
  - d) 4,5 X 10<sup>-4</sup> M EDTA, % 0,1 merkaptotanol içeren 10 mM pH 6,6 NaPO<sub>4</sub> tamponunda,
  - e) pH 8,0 10 mM NaPO<sub>4</sub> tamponunda,
  - f) 4,5 X 10<sup>-4</sup> M EDTA, % 0,1 merkaptotanol içeren pH 8,0 10 mM NaPO<sub>4</sub> tamponunda,
  - g) 1M NaCl içeren pH 6,6 70 mM NaPO<sub>4</sub> tamponunda saklandığında,
  - h) Dondurup, çözme ile.

3. Enzim homojenatının buz dolabında saklandığında, 18 gün içerisinde aktivitesinin (O.D./dak/ml) % 47 'sini, 4 saat dializ süresinin sonunda ise % 15 'ini kaybettiği gözlemlendi.
4. "Centriflow" ile yoğunlaştırmada aktivitenin % 13 'ü alta geçti.

## II- Saflaştırma :

Enzim saflaştırması iki şekilde yürütülmüştür :

1. Amonyum sülfat, ısıtma, dializ, **CM-Sephadex**, afinite kromatografisi.
2. Afinite kromatografisi.

### Amonyum Sülfat Kesiti, Isıtma ve Dializ :

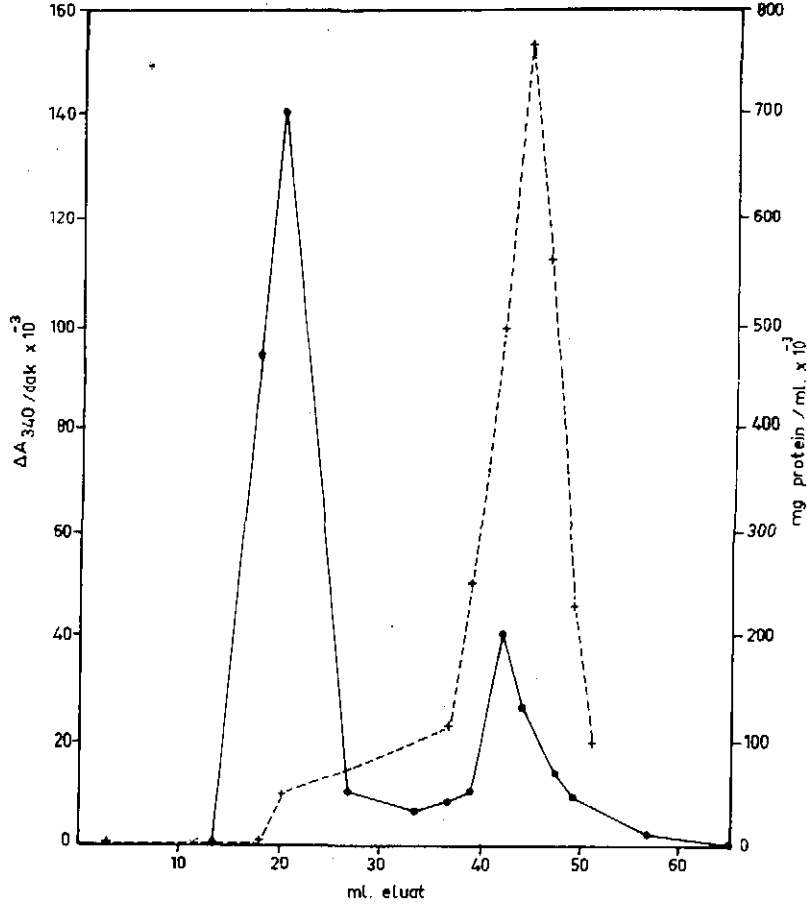
İnsan akyuvar homojenatı 20 000 xg'de santrifüjlenip süpernatant susuz amonyum sülfatla % 35 saturasyona getirildi. 14 000 xg 'de 20 dakika santrifüj edilerek inaktif çökelek atıldı. Süpernatant amonyum sülfatla % 70 saturasyona getirildi ve 14 000 xg 'de 20 dakika santrifüjlendi. Aktif çökelek 10 mM pH 7,2 NaPO<sub>4</sub> tamponunda çözüldü.

Enzimin ısı dayanıklılığından yararlanarak, 55°C 'da 30 dakika su banyosunda bekletildi. Bu ısıda denatüre olan yabancı proteinler 14 000 xg 'de santrifüjle uzaklaştırıldı. Süpernatant 10 mM pH 7,3 NaPO<sub>4</sub> tamponuna karşı 4 saat dializ edildi. Bu aşamada elde edilen enzim 4,62 kez daha saftır ve protein verimi % 21 'dir. Total homojenata göre ise saflık 9,24 kezdir.

CM-Sephadex Absorbsiyon Kromatografisi :

(20 cm X 1,5 cm) CM-Sephadex kolonu, pH 6,6 10 mM NaPO<sub>4</sub> tamponuyla dengelendi. Dializ sonrası enzim 20 000 xg 'de sant-rifüj edilerek kolona uygulandı. Dengeleme tamponu ile (5-10 ml) yıkandıktan sonra, pH 8,0 10 mM NaPO<sub>4</sub> ile elusyona geçildi. 2,5 ml 'lik fraksiyonlar halinde toplanan tüplerde protein miktarına ve aktiviteye bakıldı. Aktivitenin 40-50 ml tampon geçirildikten sonra elue olduğu izlendi. Tüplerde aktivite ve protein tayini yapılarak, enzim aktivitesi olan ve olmayan iki protein doruğu saptandı. Protein tayininde kolon taramada Warburg<sup>17</sup>, kolon analizinde Folin<sup>18</sup> yöntemi uygulandı. Protein verimi % 44,6 olan bu aşamada (Şekil-3) enzim 4 kez daha saf olarak elde edildi.

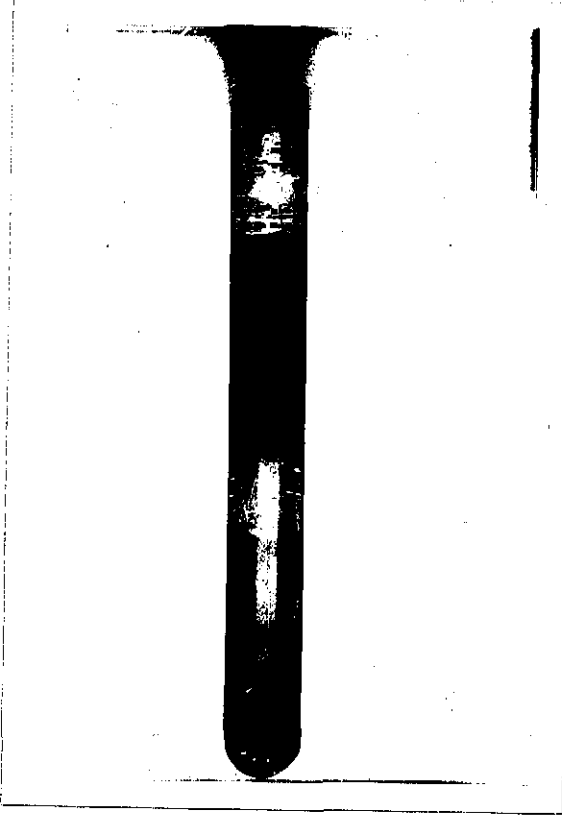
Amonyum sülfat ve CM-Sephadex sonrası enzim preparatları ile uygulanan akrilamid jel elektroforezi sonuçları resim (1 a, 1 b) 'de verildi.



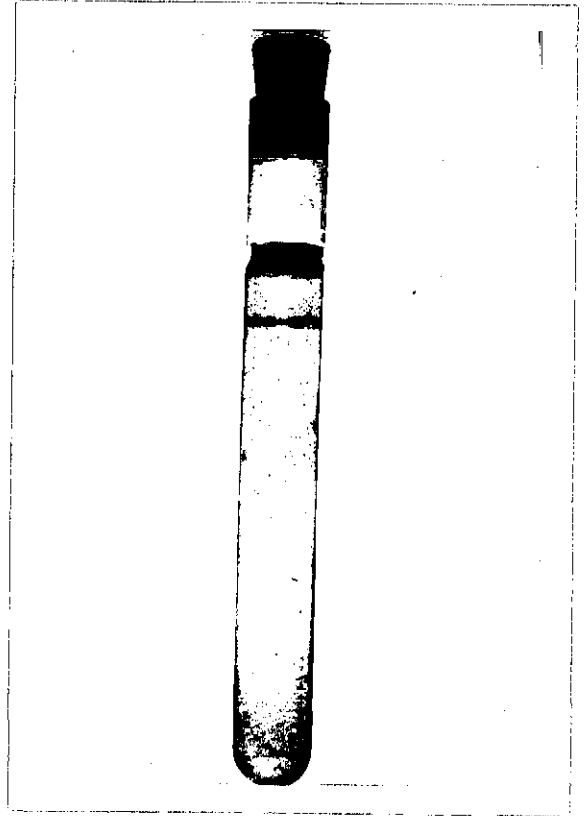
ŞEKİL-3. Glutatyon Redüktazın CM-Sephadex kolonundan elusyonu; kolon boyutları (20 cm X 1,5 cm); akış hızı 12 ml/60 dak; elusyon tamponu 10 mM NaPO<sub>4</sub> pH 8,0 .  
+ O.D./dak/ml  
● mg protein/ml

RESİM-1. Akrilamid Jel Elektrofözezi.

- a) 20 000 xg supernetanı,  $(NH_4)_2 SO_4$ , ısıtma, dializ sonrası. 200  $\gamma$  protein ile çalışıldı.
- b) CM-Sephadex sonrası enzim örneği. 85  $\gamma$  prote-in ile çalışıldı.



(a)



(b)

Afinite Kromatografisi :

Yöntemde tanımlandığı gibi Sepharose-NH (CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> N-GSG türevi kolon materyali olarak kullanıldı. Kolona bağlanan GSSG miktarı 0,74 mol GSH/ml olarak bulundu. Kolon (4,5 cm X 0,5 cm) oda sıcaklığında paketlenildi ve pH 7,5 0,1M NaPO<sub>4</sub> tamponu ile dengelendi. PM 10 Diaflo ultrafiltrasyon filtresi (zar filtresi) ile konsantre edilen GSSGR kolona uygulandı.

Öncül deney olarak enzimin kolondan salınma durumu incelendi (Şekil-4). 0,1M NaPO<sub>4</sub> pH 7,5 'da kolona tutunan enzim üzerine sırayla şu tamponlar uygulandı.

- a) 0,1M NaPO<sub>4</sub> pH 7,5
- b) 1 mM GSSG içeren 0,1M NaPO<sub>4</sub> pH 7,5
- c) 0,1M NaCl içeren 0,1M NaPO<sub>4</sub> pH 7,5
- d) 0,5M NaCl içeren 0,1M NaPO<sub>4</sub> pH 7,5 .

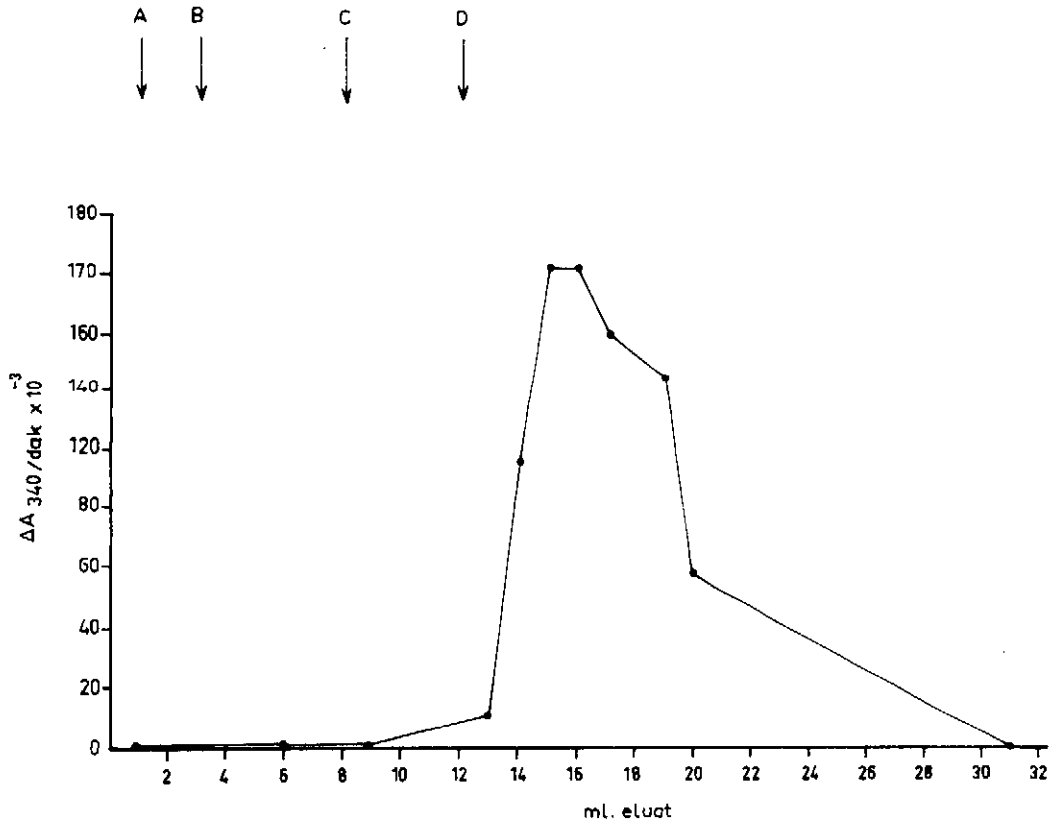
Aktivite 0,5M NaCl içeren 0,1M NaPO<sub>4</sub> pH 7,5 ile elue olan tüplerde gözlemlendi (Şekil-4).

Aktivite doruğundaki tüpdeki NaCl derişimi, bağlanma kuvveti ( $\beta$ ) olarak tanımlanır. Klorür tayini yapılarak<sup>23</sup> bu deneyde  $\beta$  0,453M olarak bulundu. Bundan sonraki deneyde elusyon yalnız 0,5M NaCl içeren 0,1M pH 7,5 NaPO<sub>4</sub> tamponu ile yapıldı (Şekil-5).

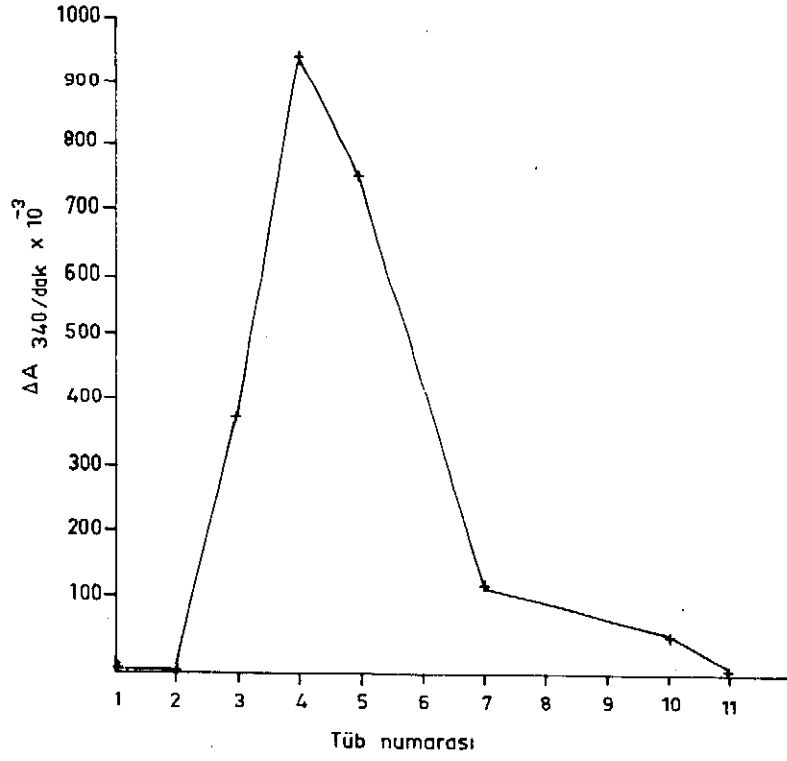
Amonyum sülfat, ısıtma, dializ ve CM-Sephadex sonrası preparat bu yöntemle saflaştırıldı. Kolona 50  $\mu$ l, 2,7 EB ile girildi. 0,5 'er ml'lik fraksiyonlar toplanarak her bir tüpte aktiviteye bakıldı ve Folin<sup>18</sup> yöntemi ile protein miktarı tayin edildi. Ortalama 23 kez daha saf preparat elde edildi (Şekil-6).

Ana homojenatta başlanarak aynı yöntem uygulandığında 44,8 kez daha saf enzim elde edildi (Şekil-7).

Her iki deney için alınan sonuçlar Tablo I ve Tablo II 'de özetlenmiştir.

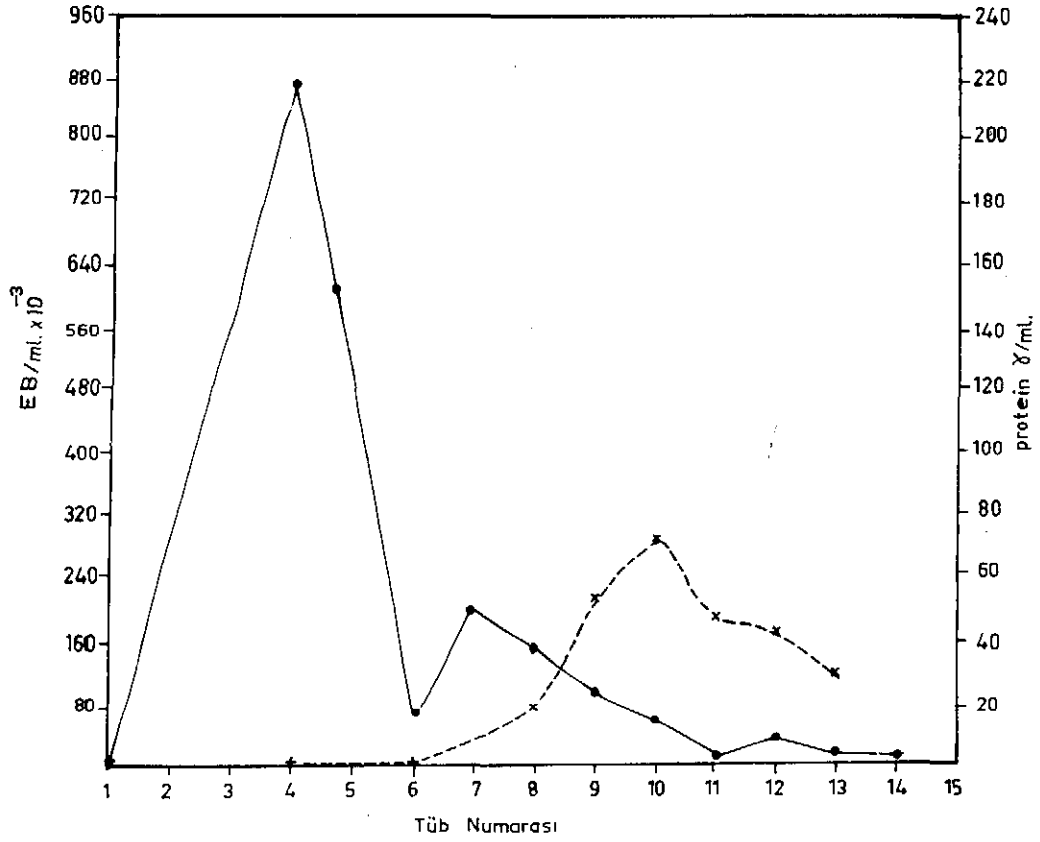


ŞEKİL-4. Akyuvar glutatyon redüktazının afinite kolonundan (4,5 X 0,5 cm) elusyon koşulu; akış hızı 0,3 ml/dak; A :  $\text{NaPO}_4$  0,1M pH 7,5 ; B : 1 mM GSSG ; C : 0,1M NaCl pH 7,5 0,1M  $\text{NaPO}_4$  tamponunda; D : 0,5M NaCl aynı tamponda.



ŞEKİL-5. Afinite kolonundan (4,5 X 0,5 cm) glutatyon redüktazın 0,5M NaCl içeren 50 mM pH 7,5 NaPO<sub>4</sub> tamponuyla elusyonu; 0,5 'er ml'lik fraksiyonlar toplandı.

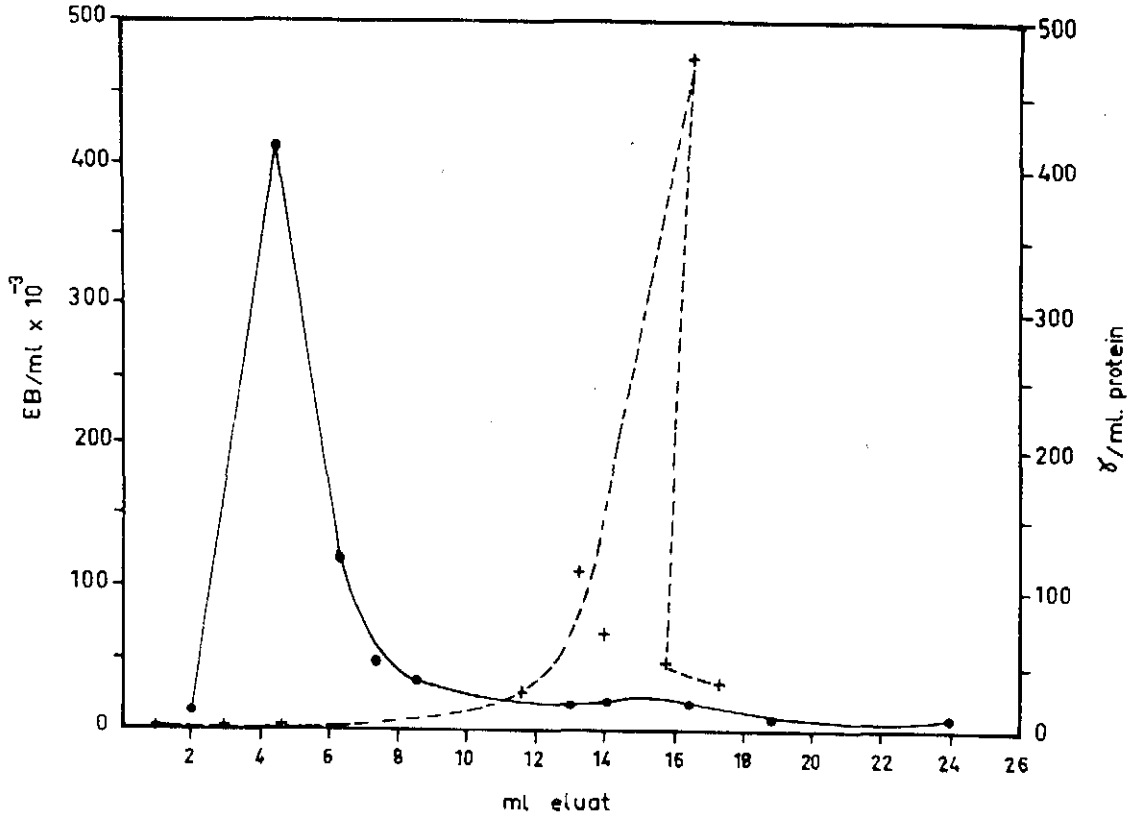




ŞEKİL-6. Akyuvar glutatyon redüktazının (CM-Sephadex sonrası) afinite kolonu analizi; akış hızı 0.4 ml/dak; elusyon tamponu 0.5M NaCl içeren 50 mM NaPO<sub>4</sub> pH 7,5 ; 0.5 'er mililitrelik fraksiyonlar toplandı.

+ EB/ml

● Protein derişimi  $\gamma/ml$



ŞEKİL-7. Akyuvar glutatyon redüktazının (20 000 g supernatanı) afinite kolonundan (4,5 X 0,5 cm) elusyonu ; akış hızı 0,3 ml/dak ; elusyon tamponu 0,5M NaCl içeren 50 mM NaPO<sub>4</sub> pH 7,5 , 0,5 'er mililitrelik fraksiyonlar toplandı.

+ EB/ml

● Protein derişimi γ/ml

TABLO I.

Akyuvar glutatyon redüktazı saflaştırması özeti.

	Miktar/ml	Birim/ml	Total B/ml	Protein mg/ml	Protein Total mg	Spesifik Aktivite EB/mg Prot.	Kolon Verimi (%)	Saflaşma (kez)
Total homojenat	8,4	0,715	6,0	7,52	63,2	0,094	100	-
10 000 rpm supernatanı	8,1	0,715	5,79	5,95	48,2	0,120	97	1,28
Amonyum sülfat	1,96	2,77	5,44	5,16	10,12	0,554	94	4,62
CM-Sephadex	7,5	0,285	2,14	0,60	4,51	2,27	39,4	4,1
Afinite kromatografisi	1,8	1,39	2,51	0,026	0,048	52,2	90	23
<b>T O P L A M</b>								<b>557</b>

TABLO II.

Akyuvar glutatyon redüktazının afinite kromatografisi ile tek basamakda saflaştırılması özeti .

	Miktar/ml	Birim/ml	Total B/ml	Protein mg/ml	Protein Total mg	Spesifik Aktivite EB/mg Protein	Kolon verimi (%)	Saflaşma (kez)
Afinite kromatografisi tek basamak	0,8	0,0059	0,0475	0,0225	0,018	2,64	94	44,8

## Enzimin Kinetik Özellikleri

### İki Substrat Kinetiği

Enzimatik tepkimelerin çoğu birden fazla substrat kullanırlar. İki substratlı tepkimeler genel olarak  $A+B \rightleftharpoons P + Q$  gibi tersinir bir tepkimeyle gösterilebilir.

İleri hız B derişimi sabit tutulduğunda A'nın fonksiyonu, A derişimi sabit tutulduğunda ise B'nin fonksiyonudur.

$$(V_1)_B \text{ sabit} = f(A)$$

$$(V_1)_A \text{ sabit} = f(B)$$

Teorinin dayandığı deneysel bulgular, tek substrat tepkimesi gibi bir Michaelis-Menten kinetiği önerir. Sabit substrat derişiminin ilk enzim derişiminin üstünde olması gerekir, ( $S_{\text{sabit}} \gg E_0$ ).

Hız denklemleri, genel çift substrat tepkimesi için şudur.

$$\frac{V_1}{V_1} = 1 + \frac{K_A}{A} + \frac{K_B}{B} + \frac{K_A K_B}{AB}$$

Burada A ve B, substratları;  $\bar{K}$ , disosiasyon sabitini;  $K$ , Michaelis-Menten sabitini;  $v_1$  ileri hızı;  $V_1$ , maksimal hızı gösterir. Bu denklemden dört bilinmeyen vardır.  $V_1$ ,  $K_A$ ,  $K_B$ ,  $\bar{K}_A$ .

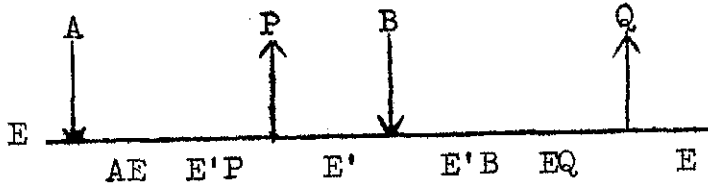
$1/v$  'ye karşı  $1/A$  ya da  $1/B$ ; eğime karşı  $1/A$  ya da  $1/B$  grafiklenerek bu parametreler bulunabilir.

Bütün enzimatik tepkimeler aynı tip Lineweaver Burke doğruları vermezler. Şimdiye kadar çalışılmış çift substrat enzimatik

tepkime mekanizmalarını dört grup altında toplayabiliriz :

1. Ping-Pong Mekanizması,
2. Düzenli Mekanizma (ordered),
3. Düzensiz Mekanizma (random),
4. Theorell-Chance Mekanizması.

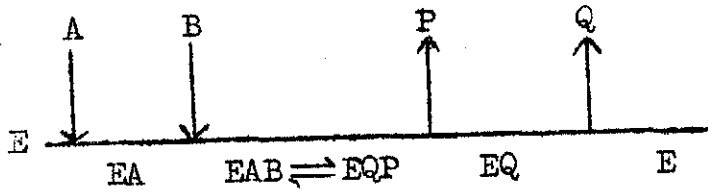
Ping-Pong mekanizması çeşitli transaminazların ve flavin koenzimi içeren dehidrogenazların izlediği tip bir mekanizmadır. Şematik olarak şu şekilde özetlenebilir.



Hız denklemi  $V_1/v_1 = 1 + \frac{K_A}{A} + \frac{K_B}{B}$  olarak elde edilir.

$K_A$   $K_B$  sifara eşittir.  $1/v$  'ye karşı  $1/A$  ya da  $1/B$  grafiklendiğinde birbirine paralel doğrular elde edilir.

Düzenli mekanizmada şu şekilde bir enzimatik davranış izlenir.



Akyuvar glutatyon redüktazının iki substrat kinetiği CM-Sephadex sonrası enzim eldesi ile yapıldı. Okside glutatyon değişken substrat iken  $1/v$  'ye karşı  $1/(NADPH)$  , NADPH değişken substrat iken  $1/v$  'ye karşı  $1/(GSSG)$  grafiklenerek enzimin Lineweaver-Burke doğruları elde edildi.

0,1M  $NaPO_4$  pH 6,8 'de 150  $\mu$ M, 120  $\mu$ M NADPH derişimlerinde  $1/v$  'ye karşı  $1/(GSSG)$  çizildiğinde birbirine paralel doğrular

bulundu (Tablo III, Şekil-8). Bunun dışında paralellikten sapma görüldü. Enzimin GSSG için  $K_m$  'mi 120  $\mu$ M NADPH'da 92,68 olarak hesaplandı. NADPH değişken substrat iken 1000  $\mu$ M, 500  $\mu$ M ve 250  $\mu$ M GSSG derişimlerinde, 5  $\mu$ M ile 120  $\mu$ M NADPH derişimi arasında birbirine yakın paralel doğrular bulundu. 240  $\mu$ M NADPH'da bütün GSSG derişimlerinde inhibisyon gözlemlendi. Enzimin NADPH için  $K_m$  değeri, 1000  $\mu$ M GSSG derişiminde 8,006  $\mu$ M olarak hesaplandı (Tablo IV, Şekil-9).

Doğruların ordinat ve absisi kestiği noktalar "Least Square"<sup>29</sup> yöntemine göre bulundu.

TABLO III.

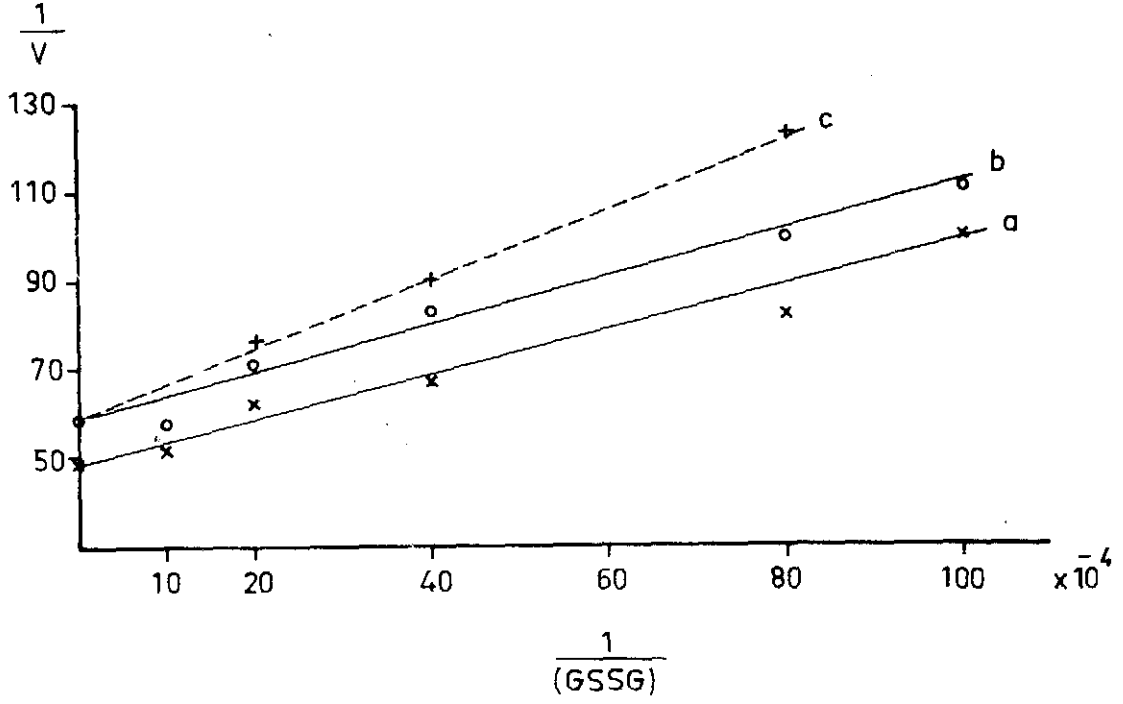
0,1M NaPO<sub>4</sub> pH 6,8 'de sabit NADPH derişimlerinde, GSSG değişken substrat iken bulunan 1/v değerleri. v= EB/ml.

(NADPH)	150 MM	120 MM	90 MM
(GSSG) MM	1/v	1/v	1/v
1000	52,63	52,82	55,56
500	62,50	71,42	76,92
250	66,67	83,33	90,91
125	83,33	100,00	125,00
100	100,00	111,00	100,00

TABLO IV.

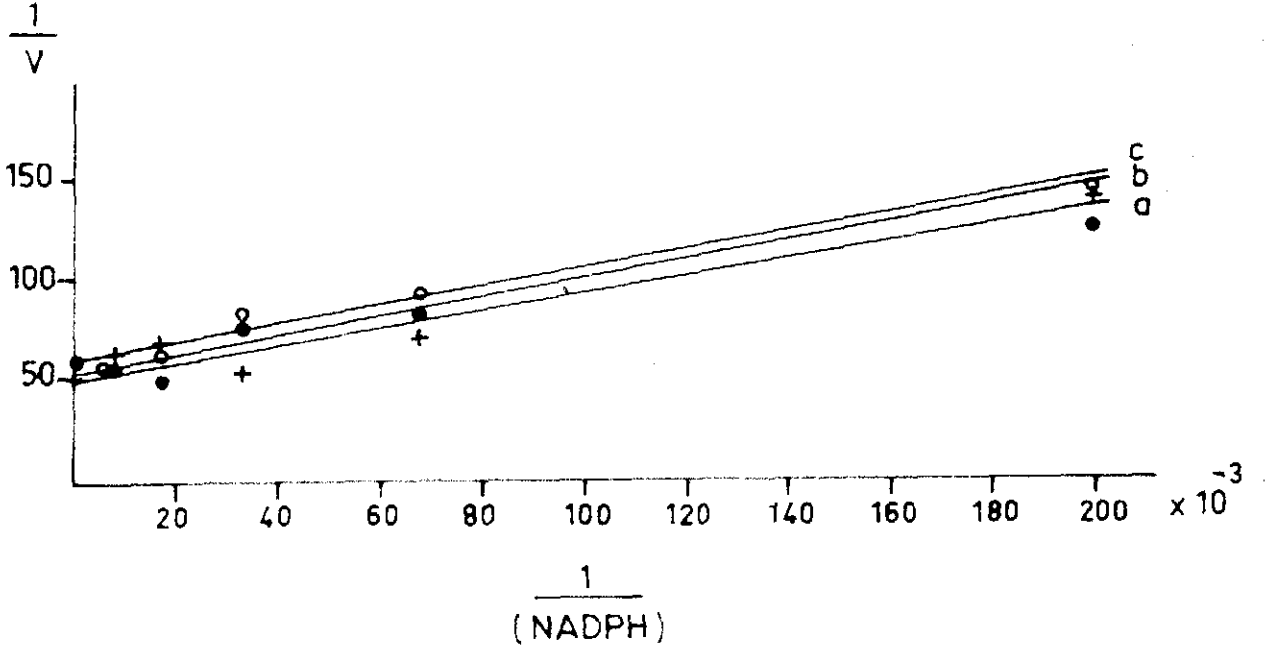
0,1M NaPO<sub>4</sub> pH 6,8 'de sabit GSSG derişimlerinde, NADPH değişken substrat olarak bulunan 1/v değerleri. v= EB/ml.

(GSSG)	1000 MM	500 MM	250 MM
(NADPH) MM	1/v	1/v	1/v
5	143	125	143
15	71	83,3	89
30	54	75,8	83
60	70	51,3	63
120	66	58,1	58

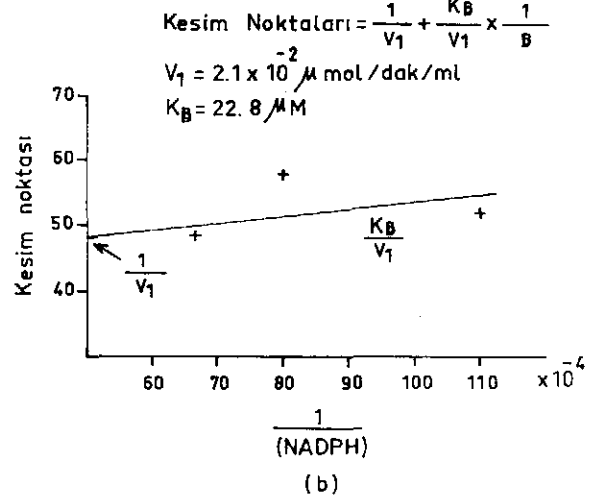
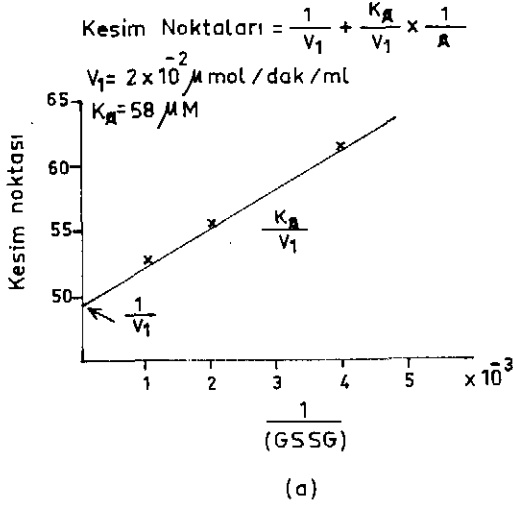


ŞEKİL-8. 0,1M NaPO<sub>4</sub> pH 6,8 'de, GSSG' değişken substrat iken elde edilen Lineweaver-Burke doğruları. a : NADPH 150/μM; b : NADPH 120/μM; c : NADPH 90/μM; v : dak/ml'de yükseltgenen μmol NADPH.





ŞEKİL-9. 0,1M NaPO<sub>4</sub> pH 6,8 'de, NADPH değişken substrat iken elde edilen Lineweaver-Burke doğruları; a : GSSG 1000  $\mu$ M ; b : GSSG 500  $\mu$ M ; c : GSSG 250  $\mu$ M ; v : dak/ml 'de yükseltgenen  $\mu$ mol NADPH.



ŞEKİL-10. (a)  $1/v$  'ye karşı  $1/\text{NADPH}$  grafiğinin ordi-  
natı kestiği noktaların  $1/\text{GSSG}$  'ye kar-  
şı grafiği.

(b)  $1/v$  'ye karşı  $1/\text{GSSG}$  grafiğinin ordi-  
natı kestiği noktaların  $1/\text{NADPH}$ 'ye kar-  
şı grafiği.

N-Etilmaleimidin İnhibisyonu Etkisi :

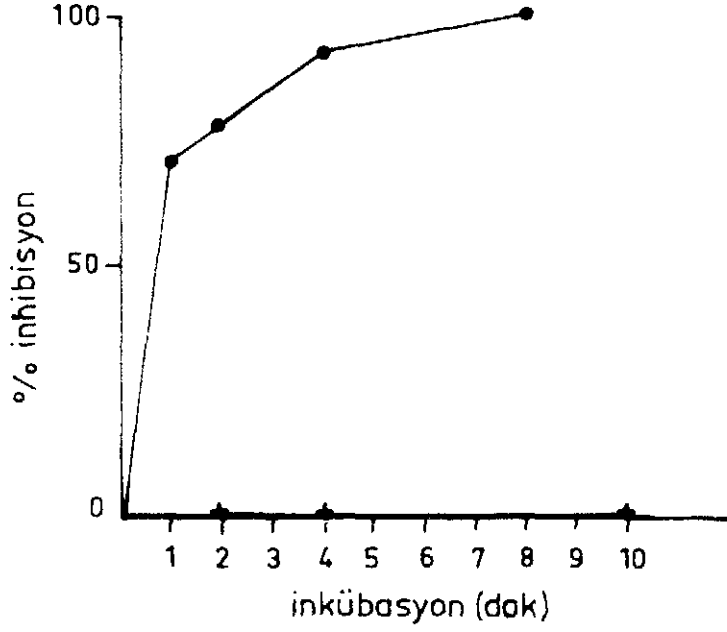
N-Etilmaleimid (NEM) tiyollerle dayanıklı bileşikler oluşturarak enzim inhibisyonuna yol açar.

NEM ile iki gurup deney yapıldı :

a) Enzim önce NEM ve NADPH ile 1', 2', 4' ve 8' inkübe edildi, tepkime bu sürenin sonunda başlatıldı.

b) Enzim, NEM ile 1', 2', 4', 8', 10' inkübe edildi. GSSG ve NADPH eklenerek tepkime başlatıldı.

Elde edilen bulgulardan (Şekil-11), enzimin NADPH ile inkübasyonunun NEM inhibisyonu için gerekli olduğu saptandı. Birinci gurup, deneyde enzimin NEM ve NADPH ile inkübasyonunun sonunda başlatılan tepkimedey % 72, 8' da ise % 100 inhibisyon gözlemlendi. Enzimin sadece NEM ile inkübasyonunun sonunda başlatılan tepkimedey, 10' inkübe edilen örnekte dahi hiç bir inhibisyon gözlemlenmedi.

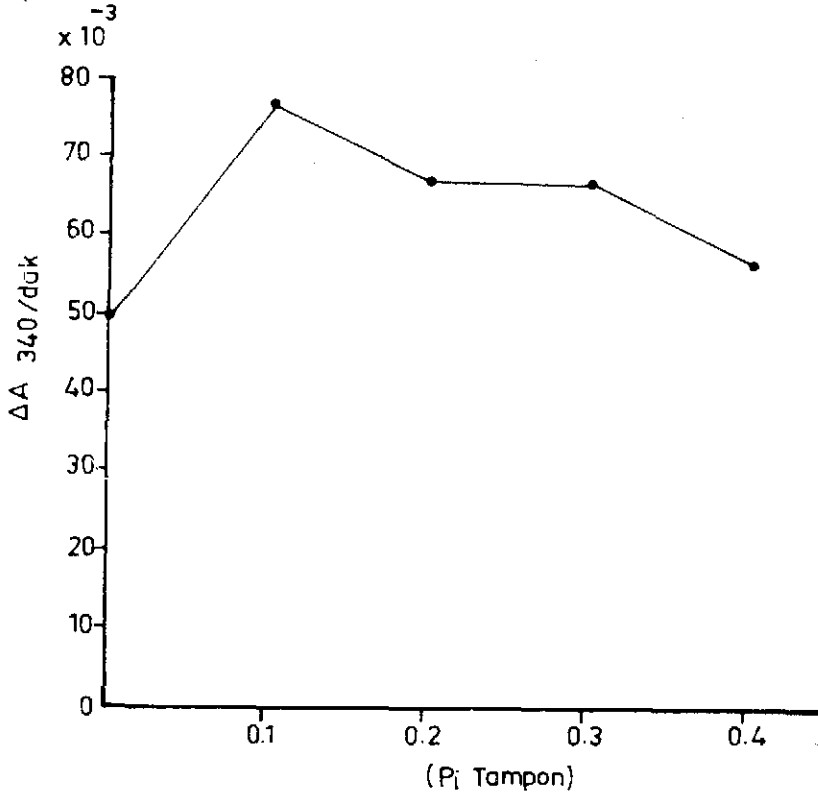


ŞEKİL-11. Akyuvar glutatyon redüktazının NEM inhibisyonu.

- NADPH ile indirgenmiş enzimin NEM inhibisyonu.
- + İndirgenmemiş enzimin NEM inhibisyonu.

Enzim Aktivitesine Fosfat Tamponunun Anyonik Etkisi :

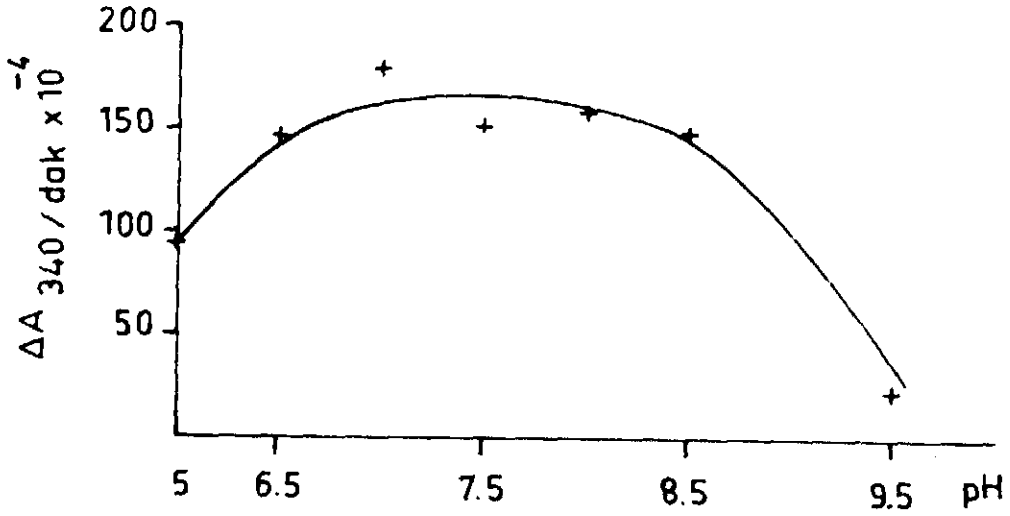
Akyuvar glutatyon redüktazının katalitik etkinliği fosfat tamponu derişimine duyarlı bulunmuştur (Şekil-12). 0,1M NaPO<sub>4</sub> derişimine kadar aktivasyon, daha yüksek derişimde inhibisyon gözlenir.



ŞEKİL-12. Fosfat iyonunun glutatyon redüktaz etkinliğine etkisi; deney karışımı, NaPO<sub>4</sub> pH 6,8, EDTA 5 mM, GSSG 1 mM, NADPH 120 μM.

pH 'nın Enzim Üzerine Etkisi :

Akyuvar GSSGR'ı üzerinde pH 'nın etkisi araştırılmış ve enzimin geniş bir pH optimumu olduğu bulunmuştur (Şekil-13) .

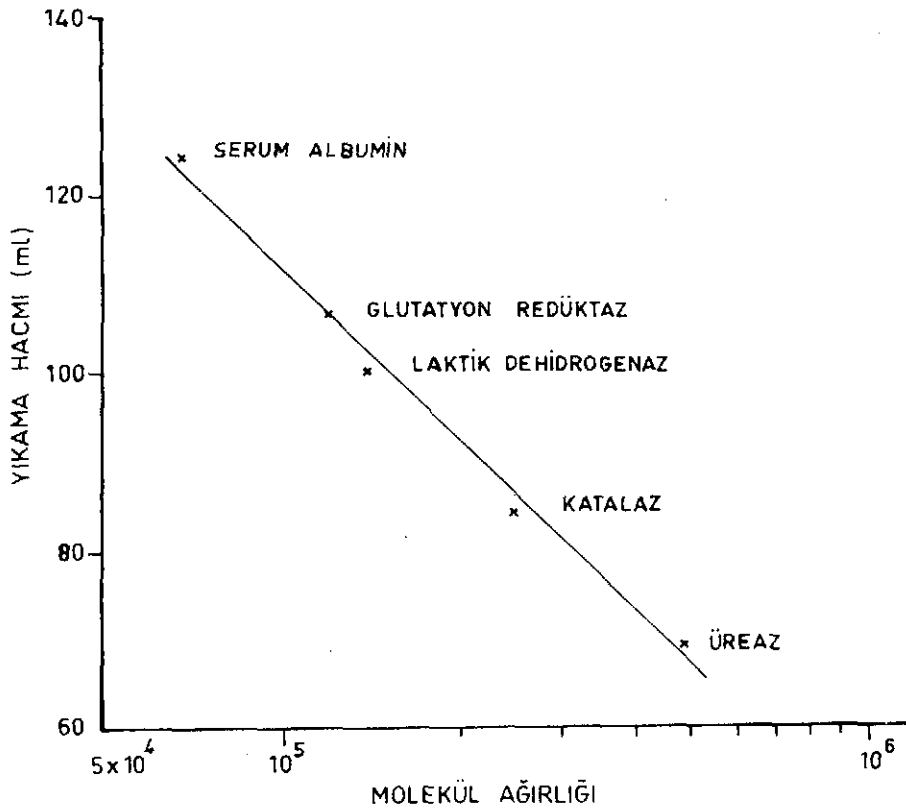


ŞEKİL-13. Akyuvar glutatyon redüktaz etkinliğinin pH ile değişimi; tepkime ortamı, 1 mM GSSG , 120 M NADPH, 5 mM EDTA, 0,1M tampon; pH 6,5-8,5 NaPO<sub>4</sub>, pH 5,0 asetat, pH 9,5 borat tamponları kullanılmıştır.

Sephadex G-200 Kolon Analizi :

Enzimin molekül ağırlığı tayini Sephadex G-200 kolonunda Andrews<sup>30</sup> yöntemine göre yapıldı. Standard protein olarak serum albumin (68 000), Laktik dehidrogenaz (140 000), Katalaz (250 000), üreaz (473 000) kullanıldı.

Enzimlerin 280 nm'de optik dansitelerinin okunması ve bilinen molekül ağırlığına karşı elusyon hacimlerinin grafiklenmesi ile standart eğri çizildi. Glutasyon redüktaz için aktivite tarandı. Enzimin molekül ağırlığı  $120\ 000 \pm 5000$  olarak saptandı (Şekil-14).



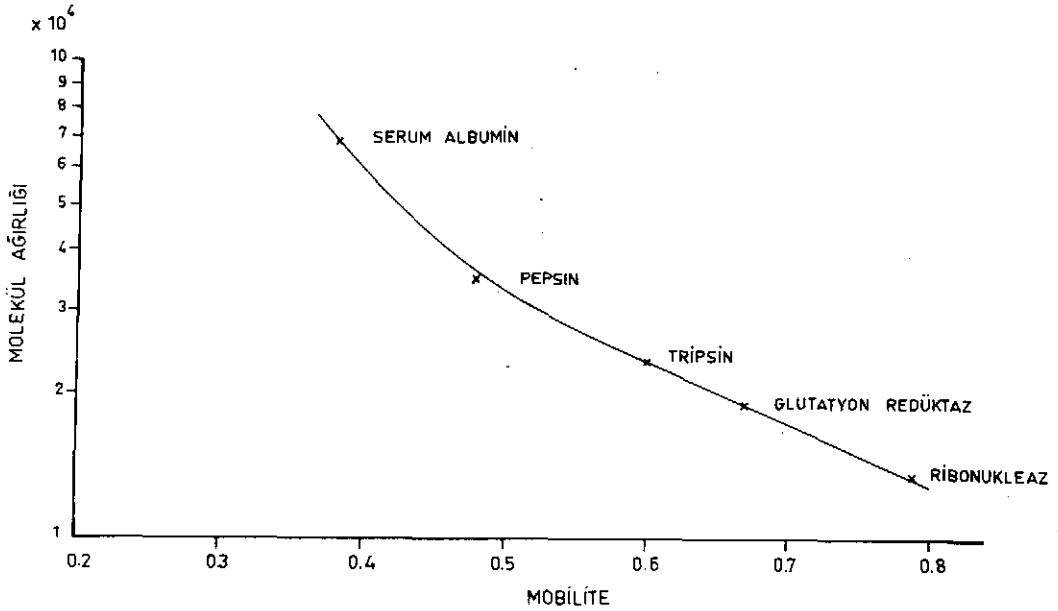
ŞEKİL-14. Sephadex G-200 kolon analizi standart grafiği; kolon (2,5 cm X 50 cm); elusyon taponu pH 7,5 0,05M Tris-Hcl; GSSGR 120 000 molekül ağırlığına karşı elue oldu.

SDS Jel Elektroforezi ile Enzimin Alt Birim Molekül

Ağırlığı Tayini :

SDS jel elektroforezi yöntemlerinde anlatıldığı şekilde<sup>26</sup> yapıldı. Standart protein olarak pepsin (35 000), tripsin (23 000), albumin (68 000), ribonükleaz (13 700) alındı.

Afinite sonrası GSSGR örneği ile çalışıldı. Yöntemlerde verilen formüle göre mobilite hesaplanarak 0.67 olarak bulundu. Standart grafikten bu mobiliteye karşı 19 000  $\pm$  2000 alt birim molekül ağırlığı saptandı (Şekil-15).



ŞEKİL-15. SDS jel elektroforezi alt birim molekül ağırlığı tayini standart grafiği; GSSGR % SDS, % 10 merkaptolanol içeren ortamda indirgendir.



## T A R T I Ş M A

İnsan akyuvar GSSGR'ı çalışmada takdim edilen yöntemlerle saflaştırıldı. Elde edilen en saf preparatın spesifik aktivitesi 52,2 olarak bulundu. Alyuvarlarda Scott<sup>31</sup> saflaştırma sonu spesifik aktiviteyi 61, Icen<sup>32</sup> 145, Staal<sup>6</sup> ise 165 olarak saptamışlardır.

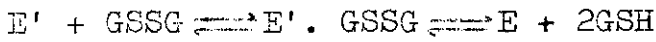
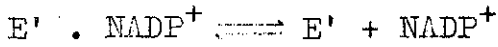
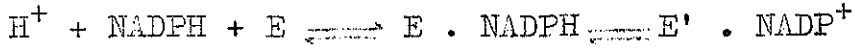
Saflaştırma işleminde alyuvar GSSGR'nin saflaştırılmasında hemoglobini uzaklaştırmak için kullanılan DEAE-Sephadex kromatografisi uygun görülmedi. Alyuvarlarda 300 gm protein ile saflaştırmaya başlayabilme olanağında bulunan araştırmacılar<sup>6</sup> çok basamaklı saflaştırma ve kolon verimi düşük olan bu yöntemi uygulamışlardır.

Saflaştırmada amonyum sülfat, ısıtma, dializ ve CM-Sephadex yöntemleri ile elde edilen örneğe akrilamid jel elektroforesi uygulandı. Resim 1-b 'de görüldüğü gibi bu örnek oldukça saftır ve kinetik çalışmaları için uygundur.

Klasik yöntemlerin yanısıra son yıllarda bazı enzim ve multienzim sistemleri için başarılı sonuçlar alınan afinite kromatografisi uygulandı. Afinite kromatografisi için hazırlanan Sepharose türevi bir kaç saflaştırma işleminin yerini alabile-

cek saflaşmayı verdi. Elusyon 0,5M NaCl içeren 0,1M pH 7,5 NaPO<sub>4</sub> tamponuyla yapıldı. Enzim bu yolla elue edilebildiğinden NADPH şoku ya da pH ve sıcaklık gradyanı uygulamak gerekmedi. Yöntemlerde anlatıldığı şekilde elde edilen Sepharose'a bağlı GSSG türevi gerektiğinde GSH türevine redüklenerek, yeni türev, glutatyon peroksidaz ve gliksalaz enzimlerinin afinite kromatografisinde kullanılabilir.

CM-Sephadex sonrası enzim eldesi ile yapılan kinetik çalışmada akyuvar enzimi için genel olarak "ping-pong" mekanizması uygun görüldü. Substratların enzim ile ikili kompleksler oluşması ve bunların parçalanmasını içeren bu mekanizmaya göre enzim şu şekilde davranır :



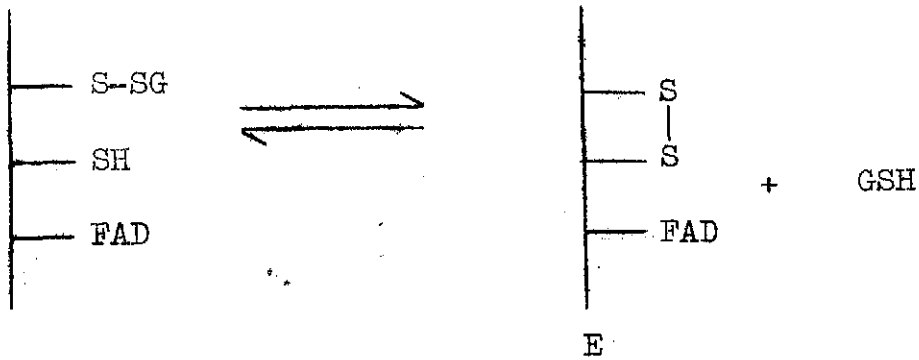
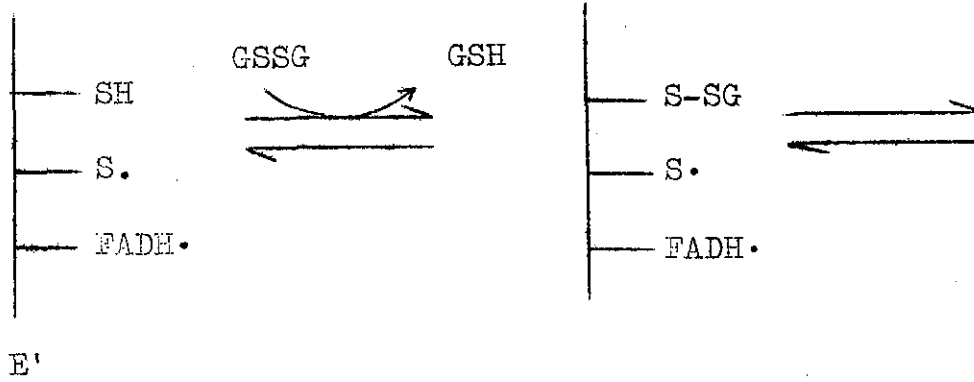
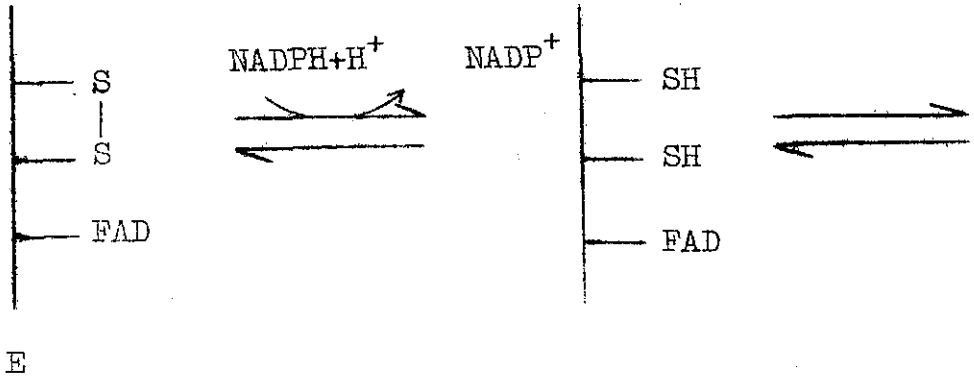
E ; enzimin okside formu

E' ; enzimin redükte formu

GSSG değişken substrat iken NADPH derişimi düştüğünde paralellikten sapma görülmüştür. Enzimin substrat derişimine bağlı olarak hareket ettiği düşünülebilir. GSSG 'ye göre yüksek NADPH derişiminde "ping-pong" düşük NADPH derişiminde "düzenli" mekanizma önerilebilir. Enzimin bu davranışı yüzünden alyuvarlarda<sup>6</sup>, mayada<sup>9</sup> değişik mekanizma önerileri vardır.

N-etilmaleimid inhibisyonu enzimin aktif merkezi için bir düşünüyü verebilir.-SH grupları ile birleşerek enzim etkinsizliğine yol açabilen bu madde, enzimi ancak NADPH ile inkübe edil-

diğinde inhibe etmektedir. Enzimin dış yüzeyinde ya da aktif merkezden uzak bir-SH gurubu olabilir, bu-SH 'ın NEM ile birleşmesi enzimi etkisizleştirmez. NEM ile birleşerek enzim inhibisyonuna yol açan-SH gurubu, enzim aktif merkezinin NADPH ile indirgenmesi sonunda açığa çıkabilir. Enzimin bir flavoprotein olduğu göz önüne alınırsa NADPH indirgemesinin FAD içeren aktif merkezde aşağıda gösterildiği şekilde olabilmesi indirgenme, yükseltgenme potansiyelleri yönünden uygundur<sup>34</sup>.



E' üstündeki SH ile birleşen NEM enzimin ikinci substratı ile birleşip GSH vermesini önliyerek enzimi kolayca inhibe eder. Maya GSSGR'ı içinde aynı bulgu gözlenmiştir. Yalnız fare karaciğerinde enzimin NADPH ile indirgenmeden, NEM ile inhibe olduğu bulunmuştur. Bu bulgu karaciğer GSSGR'nın aktif merkezinde serbest SH grubunun olduğunu gösterir.

Deney süresince fosfat tamponu kullanıldığı için enzim etkinliği üzerine bu tamponun etkisi araştırıldı. 0,1M NaPO<sub>4</sub> derişimine kadar aktivasyon daha yüksek derişimde inhibisyon gözlendi. Bu nedenle enzim etkinliğinin ölçülmesinde maksimum hız elde edilebilen 0,1M NaPO<sub>4</sub> derişimi kullanıldı. Maya ve alyuvar GSSGR'na da fosfat tamponunun anyonik etkisi saptanmıştır<sup>35</sup>. Gözlenen bu etkinin basit ya da özgül bir anyonik etki olabileceği tartışılabilir.

$K_m$  NADPH,  $K_m$  NADH 'dan daha küçüktür<sup>2</sup>, 2'-fosfat esteri bakımından farklı olan bu iki nükleotid'den NADPH'nın 2'fosfat grubunun enzimle ilintisi bulunabilir. Yüksek fosfat derişimi NADPH'nın 2'-fosfat grubunun anyonik bölgesi için kompetitif inhibitör olabilir. 0,1M fosfat derişimine kadar enzim aktivitesindeki yükselme enzim üzerinde ikinci bir anyonik bölge olabileceğini düşündürebilir. Bu bölgeye bağlanan anyon net tepkime hızını arttırabilir.

Enzim etkinliği üzerine pH 'nın da etkisi araştırılmış ve enzim katalize tepkimenin oldukça geniş bir pH optimumu olduğu görülmüştür.

Alyuvar enziminin molekül ağırlığı Sephadex G-200 ile 120 000 ± 5000 olarak saptanmıştır. Alyuvarlarda aynı yöntemle

Staal ve Veeger<sup>6</sup> GSSGR'in molekül ağırlığını 115 000 ± 4000 olarak buldular. Mayada sedimentasyon dengesi ve osmotik basınç yöntemleriyle Mavis ve Stellwagen<sup>1</sup> tarafından maya enziminin molekül ağırlığı 126 000 olarak verilmiştir. Fare karaciğerinde Mize<sup>33</sup> nin 44 000 olarak bulduğu molekül ağırlığı enzimin bir olasılıkla, alt birimine aittir. Daha önceki araştırmacıların alyuvar GSSGR'ı için buldukları molekül ağırlığı değeri ile akyuvarlarda bulunduğu değer yaklaşık olarak aynıdır.

Alyuvarlarda flavin miktarına göre saptanan en düşük alt birim molekül ağırlığı 56 600 dür<sup>6</sup>. SDS akrilamid jel elektroforezinde bu çalışma ile saptanan en düşük molekül ağırlığı 20 000 dir. İleri bir çalışmada "afinity Labeling" yöntemi ile bu değer geçerliliği araştırılacaktır.

Biyokimyasal kaynaklarda enzimin bir çok türde saflaştırması ve kısmen kinetik çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmanın da daha önce ak yuvarlarda çalışılmamış bulunan enzimin saflaştırma ve kinetik özelliklerine katkısı bulunacaktır. Bununla beraber enzimin yapısal analizinin fonksiyonlarıyla ilintisi üzerine çeşitli yapısal analiz yöntemleri henüz hiç bir türde uygulanmamış ve ileri bir çalışmaya açıktır.

## Ö Z E T

Glutatyon redüktaz enzimi insan akyuvarlarından elde edilerek iki ayrı yöntemle saflaştırıldı.

- 1) Amonyum sülfat, ısıtma, dializ, CM-Sephadex, afinite kromatografisi.
- 2) Afinite kromatografisi.

Birinci yöntemle elde edilen enzim total homojenata göre 557 kez, ikinci yöntemle elde edilen enzim ise 44,8 kez daha saftır.

CM-Sephadex sonrası enzim örneği ile iki substrat kinetiği incelendi. Yüksek NADPH derişiminde "ping-pong" düşük NADPH derişiminde düzenli mekanizmaya uygun davrandığı görüldü.

Enzim NEM ile inhibe edilerek aktif merkezinde -SH gruplarının varlığı gösterildi. NEM inhibisyonuna dayanarak, enzimin davranışı ile ilgili bir mekanizma önerildi.

Enzimin Sephadex G-200 kromatografisi ile molekül ağırlığı 120 000  $\pm$  5000 olarak saptandı.

Enzimin SDS jel elektroforezi ile bulunan alt birim molekül ağırlığı ise 19 000  $\pm$  2000 olarak bulundu.

## KISALTMALAR LİSTESİ

BSA	Sığır serum albumin
DCC	Disikloheksil karbodiimid
EB	Enzim birimi
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
FAD	Flavin adenin dinükleotid
GGP	Glukoz 6-fosfat
GSH	Redükte glutatyon
GSSG	Okside glutatyon
GSSGR	Glutatyon redüktaz
HMP	Heksoz monofosfat yolu
NADP <sup>+</sup>	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NADPH	Redükte Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NaPO <sub>4</sub>	Sodyum fosfat tamponu
NEM	N-etilmaleimid
PRPP	5-fosforibozil-1-pirofosfat
R-5P	Riboz 5-fosfat
TEMED	N N N'N'-tetra-metil-1,2-diamino etan.

### BIYOKİMYASAL KAYNAKLAR

1. Richard D. Mavis, E. Stelwagen, J. Biol. Chem. 243 809 (1968).
2. G.E.J. Staal, J. Visser, C. Veeger, Biochim Biophys. Acta, 185 39 (1969).
3. Syun Hosoda, W. Nakamura, Biochim. Biophys. Acta, 222 53 (1970).
4. J.J. Harding, J.Chromatography, 77 191 (1973).
5. V. Massey, Charles H. Williams, Jr, J. Biol. Chem. 240 470 (1965).
6. G.E.J. Staal, C. Veeger, Biochim. Biophys. Acta. 185 804 (1961).
7. P.E. Carson, G.J. Brewer, C. Lokes, J. Lab. Clin. Med. 58 804 (1961).
8. G.E.J. Staal, P.W. Helleman, J. De Wael, C. Veeger, Biochim. Biophys. Acta 185 63 (1969).
9. Massey, V., Williams, C.H., Jr. J, Biol. Chem. 240 4470 (1965).
10. Bengt Mannervik, Biochem and Biophys. Res. Comm. 53 1151 (1973).
11. J.Jervell, Scand. J. Clin. Lab. Invest. 20, 90 (1967).



12. Walter K. Long, Science 155, 712 (1967).
13. Gerald Weissmann, Giuseppe A. Rita, 240, 167 (1972)
14. J.J. Harding, J. of Chromatography, 77, 191 (1973).
15. W.A. Skoog, W. S. Beck, Blood, 11, 436 (1956).
16. R.L. Walford, E.T. Peterson, P. Doyle, Blood. 12, 953 (1957).
17. Warburg, O., Christian, W., Biochem. J. 310, 384 (1942).
18. O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall,  
J. Biol. Chem. 193, 265 (1951).
19. P. Cuatrecasas, Annual. Rev. Biochem. 40, 259 (1971).
20. David B. Craven, Michael J. Harvey, Christopher R. Lowe,  
Eur. J. Biochem. 41, 329 (1974).
21. Cuatrecasas, Anfinsen, J. Biol. Chem. 245, 3059 (1970).
22. Ellman, G.L. Arch. Biochem. Biophys. 82, 70 (1959).
23. N.W. Tietz, Fundamentals of Clinical Chem. p. 622, 1970.
24. Davis, B.J., Ann. N.Y. Acad. Sci., 121, 404 (1964).
25. Shapiro, Vinuela, Maizel., Biochem. Biophys. Res. Commun.  
28, 815 (1967).
26. Klaus Weber, Mary Osborn, J. Biol. Chem. 244, 4406 (1969).
27. P. Andrews., Biochem. J. 96, 595 (1965).
28. Henry R. Mahler, Eugene H. Cordes, Biological Chemistry,  
Harper Row Copyright, 1966.

29. T.B. Crumpler, J.H. Yol., Chemical Computations and Errors.  
J. Wiley, N.Y. 1947.
30. P. Andrews., Biochem. J. 96, 595 (1965).
31. E. Scott, I.W. Duncan, V. Ekstrand, J. Biol. Chem., 238,  
3928 (1963).
32. A. Icen, Scand. J. Clin. Lab. Invest. 20, 66 (1967).
33. Mize, C.E., Thompson, T.E., Langdon, R.G., JBC 237, 1596  
(1962).
34. Sober, H.A., Handbook of Biochemistry. Selected Data for  
Molecular Biology. The Chemical Rubber Co., 1970.
35. Gary Moroff, Karl G. Brandt. Arch. Biochem. Biophys. 159,  
468 (1973).