

TC
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SOYA BİTKİSİNDEN (*Glycine max* L.) GLUTATYON REDÜKTAZ
ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI AĞIR METALLERİN
İNİBİSYON KİNETİĞİNİN İNCELENMESİ

Gürkan BİLİR

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

SAMSUN

2017

Her hakkı saklıdır.

Programı : Herhangi Program

TEZ ONAYI

Gürkan BİLİR tarafından hazırlanan “Soya Bitkisinden (*Glycine max* L.) Glutasyon Redüktaz Enziminin Safaştırılması ve Bazı Ağır Metallerin İnhibisyon Kinetiğinin İncelenmesi” adlı tez çalışması 20/01/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı’nda **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman

Doç. Dr. Deniz EKİNCİ
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Jüri Üyeleri

Başkan

Doç. Dr. Murat ŞENTÜRK
Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi
Kimya Anabilim Dalı

Üye

Doç. Dr. Deniz EKİNCİ
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Üye

Yrd. Doç. Dr. Levent MERCAN
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylım. .../.../2017

Prof. Dr. Bahtiyar ÖZTÜRK
Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

20/01/2017

Gürkan BİLİR

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

SOYA BİTKİSİNDEN (*Glycine max* L.) GLUTATYON REDÜKTAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI AĞIR METALLERİN İNHİBİSYON KİNETİĞİNİN İNCELENMESİ

Gürkan BİLİR

Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Deniz EKİNCİ

Bu çalışmada, önemli fonksiyonlarda görev alan glutatyon redüktaz (Glutatyon: NADP⁺ oksidoredüktaz, E.C. 1.8.1.7: GR) enzimi soya tohumundan saflaştırılmıştır. Saflaştırma işleminde homojenatın hazırlanmasının ardından amonyum sülfat çöktürmesi ve afinite kromatografisi metodları kullanılmıştır. Saflaştırılan soya glutatyon redüktaz enzimi SDS poliakrilamid jel elektroforezinde yaklaşık 75 kDa molekül ağırlığında tek bant şeklinde görüntülenmiştir. Soya tohumu glutatyon redüktaz enzimi için optimum iyonik şiddet, pH ve substrat miktarı araştırılmıştır. Enzimin optimum iyonik şiddeti 300 mM Tris, optimum pH değeri 8.5 ve optimum substrat miktarı 90 mM olarak bulunmuştur. Doğada bulunan ağır metallere gümüş, mangan, kadmiyum, bakır, çinko, nikel, krom, magnezyum ve baryum'un saflaştırılmış soya tohumu glutatyon redüktaz enzim aktivitesi üzerine inhibitör etkileri araştırılmıştır. Bu ağır metallere her birinin enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir ve I₅₀ değerleri hesaplanmıştır. Soya tohumu GR enzimi için bu ağır metallere I₅₀ değerleri sırasıyla 0.00025 mM, 3.305 mM, 0.0016 mM, 0.318 mM, 0.015 mM, 0.21 mM, 2.394 mM, 3.881 mM ve 1.576 mM olarak belirlenmiştir.

Ocak 2017, 61 sayfa

Anahtar Kelimeler: Glutatyon redüktaz, Karakterizasyon, Saflaştırma, Soya, Ağır metallere

ABSTRACT

Master's Thesis

PURIFICATION OF GLUTATHIONE REDUCTASE ENZYME FROM SOYBEAN (*Glycine max* L.) AND INVESTIGATION OF INHIBITION KINETICS OF SOME HEAVY METALS

Gürkan BİLİR

Ondokuz Mayıs University
Graduate School of Sciences
Department of Agricultural Biotechnology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Deniz EKİNCİ

In this study, glutathione reductase (Glutathione: NADP⁺ oxireductase, E.C. 1.8.1.7: GR), an enzyme involved in significant functions, has been isolated from soybean seeds. Following the preparation of the homogenate, ammonium sulphate precipitation and affinity chromatography methods were performed for purification. Purificated soybean glutathione reductase enzyme was screened as a single band of about 75 kDa molecular weight in polyacrylamide gel electrophoresis. Optimum ionic strength, pH and substrate amounts were examined for soybean seed glutathione reductase enzyme. These values were found to be 300 mM for optimum ionic strength, 8.5 for pH and 90 mM for Tris. Inhibitory effects of some of the common heavy metals in nature, namely silver, manganese, cadmium, copper, zinc, nickel, chromium, magnesium and barium on the purified soybean seed glutathione reductase enzyme were investigated. Each of the heavy metals showed inhibitory effect on enzyme activity. I₅₀ values of these heavy metals were determined as 0.00025 mM, 3.305 mM, 0.0016 mM, 0.318 mM, 0.015 mM, 0.21 mM, 2.394 mM, 3.881 mM and 1.576 mM, respectively.

January 2017, 61 pages

Keywords: Glutathione reductase, Characterization, Purification, Soybean, Heavy metals

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmalarım boyunca bilimsel düşünce, bilgi birikimi ve tecrübelerini benden esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Deniz EKİNCİ'ye sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım. Aynı zamanda hoşgörülerini ve bilgilerini esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Levent MERCAN hocama ve diğer bölüm hocalarıma teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmaları esnasındaki yardımlarından ve değerli katkılarından dolayı Sayın Doç. Dr. Murat ŞENTÜRK hocama derin minnet ve şükranlarımı sunarım.

Beni bugünlere getirmek için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan, her konuda maddi ve manevi desteğini hissettiğim, tecrübeleriyle yolumu aydınlatıp bugünlere gelmemde çok büyük emeği olan sevgili aileme sonsuz teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca, bilgi ve deneyimlerimizi paylaştığımız ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Arş. Gör. Ahmet Can OLCAY'a ve lisansüstü arkadaşlarım Ömer TAŞ ve Mustafa DENİZ'e teşekkürlerimi sunarım. Bana sağladığı çalışma olanaklarından dolayı Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü'ne ve laboratuvar arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı tarafı aracılığıyla desteklendiği için her daim bilim ve bilim insanının destekçisi olan TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığına teşekkür ederim.

Ocak 2017, Samsun

Gürkan BİLİR

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET	İ
ABSTRACT	İİ
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	İİİ
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	İV
SİMGELER VE KISALTMALAR	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
ÇİZELGELER DİZİNİ	VIII
1. GİRİŞ	1
2. MATERYAL VE YÖNTEM	15
2.1. Materyal	15
2.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler	15
2.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar	16
2.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması	16
2.1.3.1. Aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler	16
2.1.3.2. Amonyum sülfat çökeltisinin çözünmesi ve diyaliz için kullanılan tamponlar	17
2.1.3.3. Afinite kromatografisi kolonunda kullanılan çözeltiler	17
2.1.3.4. Elektroforez için kullanılan çözeltiler	18
2.1.3.5. Kullanılan ağır metallerin stok çözeltileri	19
2.2. Yöntem	20
2.2.1. Soya tohumu glutatyon redüktaz enziminin aktivitesinin ölçümü	20
2.2.2. Soya tohumundan glutatyon redüktaz enziminin saflaştırılması ile ilgili yöntemler	21
2.2.2.1. Homojenat hazırlanması	21
2.2.2.2. Amonyum sülfat çöktürme ve diyaliz	21
2.2.2.3. Afinite kolonunun hazırlanması ve soya tohumu glutatyon redüktaz enziminin saflaştırılması	22
2.2.2.4. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzim saflığının kontrolü	23
2.2.3. Soya tohumu glutatyon redüktaz enziminin karakterizasyon çalışmaları	24
2.2.3.1. Soya tohumundan saflaştırılan glutatyon redüktaz enzimi için optimum iyonik şiddetin belirlenmesine yönelik çalışmalar	24
2.2.3.2. Soya tohumundan saflaştırılan glutatyon redüktaz enzimi için optimum pH değerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar	25
2.2.3.3. Soya tohumundan saflaştırılan glutatyon redüktaz enzimi için optimum substrat miktarının belirlenmesine yönelik çalışmalar	27
2.2.4. Soya tohumundan saflaştırılan glutatyon redüktaz enzimiyle ilgili yapılan kinetik çalışmalar	27
2.2.4.1. Bazı metal iyonlarının soya tohumundan saflaştırılan glutatyon redüktaz enzimi aktivitesi üzerine inhibitör etkilerinin belirlenmesi	27
2.2.4.2. İnhibitör etkisi gösteren metal iyonları için I_{50} değerlerinin belirlenmesi	28
3. BULGULAR	33
3.1. Soya Tohumu GR Enziminin Saflaştırılması Sonuçları	33

3.1.1. Amonyum sülfat çöktürmesi sonuçları	33
3.1.2. Afinite kromatografisi sonuçları	33
3.2. Soya Tohumundan Safaştırılan GR Enziminin Sodyum Dodesil Sülfat- Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) İle Saflık Kontrolü	33
3.3. Soya Tohumundan Safaştırılan GR Enziminin Optimum Şartlarının Belirlenmesi Yönelik Sonuçlar	34
3.3.1. Soya tohumundan safaştırılan GR enziminin optimum iyonik şiddetin belirlenmesine yönelik sonuçlar	34
3.3.2. Soya tohumundan safaştırılan GR enziminin optimum pH değerinin belirlenmesine yönelik sonuçlar	35
3.3.3. Soya tohumundan safaştırılan GR enziminin optimum substrat miktarının belirlenmesine yönelik sonuçlar	35
3.4. Soya Tohumundan Safaştırılan GR Enzimi Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının İnhibitör Etkilerinin Sonuçları	36
4. TARTIŞMA	47
5. SONUÇ	50
KAYNAKLAR	51
ÖZGEÇMİŞ	61

SİMGELER VE KISALTMALAR

SİMGELER

dk	Dakika
I ₅₀	Enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
kDa	Kilodalton
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
µl	Mikrolitre
µmol	Mikromol
rpm	Dakikadaki devir sayısı
°C	Santigrat

KISALTMALAR

EC	Enzim Kodu
EDTA	Etilendiamin Tetra Asetik Asit
FAD	Flavin Adenin Dinükleotid
GR	Glutasyon Redüktaz
GSH	Redükte Glutasyon
GSSG	Glutasyon Disülfid
NADP ⁺	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat (Okside Form)
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat (Redükte Form)
TEMED	N,N,N',N'- Tetrametilendiamin
Tris	Trihidroksimetil Amino Metan
PAGE	Poliakrilamid Jel Elektroforezi
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Glutasyon redüktaz'ın 3 boyutlu yapısı.....	3
Şekil 1.2. Glutasyon redüktaz tarafından katalizlenen genel reaksiyon	4
Şekil 2.1. Çalışmada kullanılan soya tohumları.....	15
Şekil 3.1. SDS-PAGE yöntemi ile soya tohumu glutasyon redüktaz enziminin alt birim molekül ağırlığının belirlenmesi.....	34
Şekil 3.2. Gümüş'ün soya tohumu GR enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	37
Şekil 3.3. Mangân'ın soya tohumu GR enzim aktivitesi üzerine etkisi	38
Şekil 3.4. Kadmiyum'un soya tohumu GR enzim aktivitesi üzerine etkisi	39
Şekil 3.5. Bakır'ın soya tohumu GR enzim aktivitesi üzerine etkisi	40
Şekil 3.6. Çinko'nun soya tohumu GR enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	41
Şekil 3.7. Nikel'in soya tohumu GR enzim aktivitesi üzerine etkisi	42
Şekil 3.8. Krom'un soya tohumu GR enzim aktivitesi üzerine etkisi	43
Şekil 3.9. Magnezyum'un soya tohumu GR enzim aktivitesi üzerine etkisi	44
Şekil 3.10. Baryum'un soya tohumu GR enzim aktivitesi üzerine etkisi	45

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Bazı bitkilerden saflaştırılan GR enziminin moleküler ağırlıkları.....	6
Çizelge 2.1. GR aktivite ölçümü için kontrol ve numune küveti içeriği.....	20
Çizelge 2.2. Potasyum fosfat tampon optimizasyonu için kontrol ve numune küvet içerikleri	25
Çizelge 2.3. Tris tampon optimizasyonu için kontrol ve numune küvet içerikleri	25
Çizelge 2.4. pH optimizasyonu (Tris) için kontrol ve numune küvet içerikleri.....	26
Çizelge 2.4. pH optimizasyonu (KH ₂ PO ₄) için kontrol ve numune küvet içerikleri .	26
Çizelge 2.5. Substrat optimizasyonu için kontrol ve numune küvet içerikleri	27
Çizelge 2.6. İnhibisyon etkileri ölçülürken kontrol ve numune küvet içerikleri.....	28
Çizelge 2.7. Soya tohumundan saflaştırılan GR enzimi üzerinde Ag(NO ₃) ₃ 'ün I ₅₀ değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	29
Çizelge 2.8. Soya tohumundan saflaştırılan GR enzimi üzerinde Mn(NO ₃) ₂ 'ün I ₅₀ değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	29
Çizelge 2.9. Soya tohumundan saflaştırılan GR enzimi üzerinde Cd(NO ₃) ₂ 'ün I ₅₀ değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	30
Çizelge 2.10. Soya tohumundan saflaştırılan GR enzimi üzerinde Cu(NO ₃) ₂ 'ün I ₅₀ değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	30
Çizelge 2.11. Soya tohumundan saflaştırılan GR enzimi üzerinde Zn(NO ₃) ₂ 'ün I ₅₀ değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	30
Çizelge 2.12. Soya tohumundan saflaştırılan GR enzimi üzerinde Ni(NO ₃) ₂ 'ün I ₅₀ değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	31
Çizelge 2.13. Soya tohumundan saflaştırılan GR enzimi üzerinde Cr(NO ₃) ₃ 'ün I ₅₀ değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	31
Çizelge 2.14. Soya tohumundan saflaştırılan GR enzimi üzerinde Mg(NO ₃) ₂ 'ün I ₅₀ değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	31
Çizelge 2.15. Soya tohumundan saflaştırılan GR enzimi üzerinde BaCl ₂ 'ün I ₅₀ değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	32
Çizelge 3.1. Soya tohumu GR enzimi optimum iyonik şiddet için Tris tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	34
Çizelge 3.2. Soya tohumu GR enzimi optimum iyonik şiddet için KH ₂ PO ₄ tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	35

Çizelge 3.3. Soya tohumu GR enzimi optimum pH değeri için Tris (300 mM) tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları	35
Çizelge 3.4. Soya tohumu GR enzimi optimum pH değeri için KH_2PO_4 (300 mM) tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	35
Çizelge 3.5. Soya tohumu GR enzimi optimum substrat miktarı için 300 mM Tris (pH=8.5) tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları	36
Çizelge 3.6. Gümüş'ün soya tohumu GR enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	37
Çizelge 3.7. Mangan'ın soya tohumu GR enzim aktivitesi üzerine etkisi	38
Çizelge 3.8. Kadmiyum'un soya tohumu GR enzim aktivitesi üzerine etkisi	39
Çizelge 3.9. Bakır'ın soya tohumu GR enzim aktivitesi üzerine etkisi	40
Çizelge 3.10. Çinko'nun soya tohumu GR enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	41
Çizelge 3.11. Nikel'in soya tohumu GR enzim aktivitesi üzerine etkisi	42
Çizelge 3.12. Krom'un soya tohumu GR enzim aktivitesi üzerine etkisi	43
Çizelge 3.13. Magnezyum'un soya tohumu GR enzim aktivitesi üzerine etkisi	44
Çizelge 3.14. Baryum'un soya tohumu GR enzim aktivitesi üzerine etkisi	45
Çizelge 3.15. Soya tohumu GR enzimi için metal iyonlarına ait I_{50} değerleri.....	46

1. GİRİŞ

Enzimler, canlı organizmalarda oluşan bütün reaksiyonların ılımlı koşullarda gerçekleşmesini sağlayan ve bu reaksiyonları koordine eden protein yapısındaki spesifik biyokatalizörlerdir. Tüm canlı organizmalarda bulunan enzimler, hücrede gerçekleşen binlerce biyokimyasal reaksiyonun katalizini canlılığa zarar vermeden ve çok hızlı bir şekilde gerçekleştirirler.

Biyolojik reaksiyonların katalizörü olan enzimlerin bazıları bu fonksiyonlarını gerçekleştirirken amino asit kalıntıları dışında aktivite için kimyasal gruplara ihtiyaç duymazken, bazıları ise yapılarında bulunmayan ve kofaktör denen moleküllere ihtiyaç duyarlar. Kofaktör metal iyonu (Mg^{+2} , Fe^{+2} , Zn^{+2} vb.) olabileceği gibi koenzim denen kompleks organik moleküller de (NAD; Nikotinamid adenin dinükleotid, FAD; Flavin adenin dinükleotid, Koenzim A) olabilir. Metal iyonları ile veya koenzimiyle birlikte katalitik olarak aktif olan bir enzim holoenzim olarak adlandırılırken bu gibi enzimlerin sadece protein kısmı apoenzim veya apoprotein olarak adlandırılmaktadır.

Enzimlerin klasik kimyasal katalizatörlere kıyasla önemli bir farkı, sahip oldukları özgünlükleridir. Enzimler hem katalizledikleri reaksiyon tipine hem de ürüne dönüştürdükleri substratlarına karşı son derece seçicidirler. Özgünlüğün derecesi enzimden enzime farklılık gösterir.

Enzimler bir reaksiyonun hızını enzimatik olmayan bir reaksiyona kıyasla 10^5 - 10^{17} kat arttırabilmektedir (Radzicka & Wolfenden, 1995). Enzimlerin reaksiyon hızına bu ölçüde fazla etkilemelerine imkân sağlayan başlıca etmenler; reaksiyon ortaklarının konum olarak birbirine yaklaşması, substrat molekülünün deformasyonu, enzim reaktif grupların ortak etkileşmesi ve bazen substratın kovalent olarak bağlanması olarak verilebilir.

Bir enzimin aktivitesi, o enzimin katalizlediği reaksiyonun hızının bir ölçüsüdür. Uluslararası Biyokimya Birliği Enzim Komisyonunun tanımladığı aktivite birimi “Uluslararası Birim” Ünite (U)’dir. Enzim Ünitesi (EU), standart koşullar altında dakikada bir mikromol (μmol) substratı ürüne dönüştüren enzim miktarıdır. Diğer aktivite birimleri ise spesifik aktivite, katalitik merkez aktivitesi ve moleküler aktivite (Turnover sayısı)’dir.

Enzim aktivitesinin belirlenmesi aslında enzimatik reaksiyonun hızının belirlenmesidir. Enzim aktivite ölçümünde ya substratın zamana bağlı azalışı ya da zamana bağlı olarak ürün oluşumu ölçülür. Aktivite ölçümünde genellikle absorpsiyon fotometri yöntemi (spektrofotometrik) kullanılmasının yanı sıra, titrimetri, florimetri, polarimetri ve kolorimetri gibi yöntemler de kullanılmaktadır.

Enzimatik reaksiyonların hızı yani aktivitesi sıcaklık, pH, enzim ve substrat konsantrasyonu, iyonik şiddet, aktivatör ve inhibitörlerin varlığı gibi birçok faktörlerden etkilenmektedir.

Enzimin katalizör olarak görev aldığı reaksiyonların hızını azaltan veya durduran maddelere inhibitör ve oluşturdukları etkiye inhibisyon denir. Enzim aktivitesinin inhibisyonu biyolojik sistemlerde önemli bir kontrol mekanizmasıdır. İnhibisyon çalışmaları enzimlerin seçiciliği, aktif merkezin fiziksel ve kimyasal yapısı ve enzimatik reaksiyonun mekanizması hakkında bilgi veren önemli bir olaydır. İnhibitörler genel olarak tersinir (dönüşümlü) ve tersinmez (dönüşümsüz) olarak iki başlık altında toplanabilir. Tersinmez inhibitörler, enzim aktif merkezine kovalent olarak bağlanırlar, enzimin konformasyonunu değiştirerek katalitik aktiviteyi tamamen yok ederler. Tersinir inhibitörlerde ise enzim ile inhibitör arasında bir denge kurulur. Bu inhibitörlerin oluşturduğu dört tip inhibisyon mevcuttur. Bunlar; yarışmalı, yarışmasız, yarı yarışmalı ve karışık tip inhibisyonlardır (Yıldırım vd, 2010).

Bir tripeptid olan glutatyon, hem prokaryot hem de ökaryot hücrelerde, hücre içi serbest sülfhidril gruplarının büyük bir bölümünü oluşturan ve protein yapısında olmayan önemli bir tiyoldür.

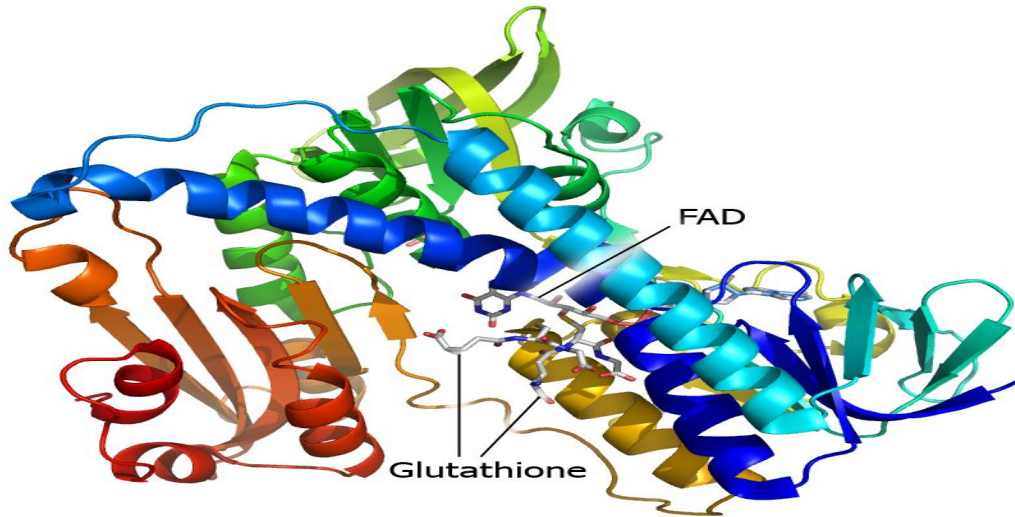
Glutatyon (GSH); glutamat (Glu), sistein (Cys) ve glisin (Gly) tarafından oluşturulan düşük molekül ağırlıklı bir tripeptididir. Glutatyonun yapısında bulunan sistein amino asitinin sülfhidril (-SH) grubunu ihtiva etmesinden dolayı GSH olarak kısaltılabilmektedir. Glutatyon okside (GSSG) ve redükte (GSH) olmak üzere iki formda bulunur (Gill vd, 2013).

İndirgenmiş glutatyon enzimatik ya da enzimatik olmayan yollarla okside glutatyon (GSSG) dönüşür. Okside glutatyon bir glutatyon dimeridir ve oksidasyon sırasında sistein sülfhidril yan zincirleri arasında bir disülfid (S-S) bağı ile oluşturulur.

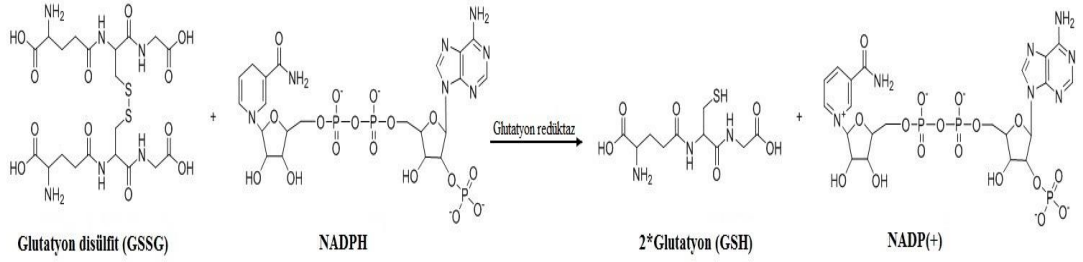
Bu dönüşüm özellikle peroksitlerin parçalanmasında ve enzimatik transhidrojenasyon sonucu gerçekleşmektedir.

İndirgenmiş glutatyon antioksidatif reaksiyonlarda önemli görevler yaptığı için oksidasyona sebep olan serbest radikaller ile reaktif oksijen ürünlerinin ve de metabolizmadaki rollerinin bilinmesi gerekir. Enzimatik savunma sistemlerinde süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon perokidaz ve glutatyon redüktaz gibi enzimler rol oynamaktadır.

Glutatyon redüktaz (Glutatyon: NADP⁺ oksidoredüktaz, E.C. 1.8.1.7: GR), piridin nükleotid-disülfid oksidoredüktazın bir üyesidir (Şekil 1.1.) (Taser & Ciftci, 2012). Glutatyon redüktaz, okside glutatyonun (GSSG) redükte glutatyon (GSH) dönüştürülmesini katalizleyen ve GSH/GSSG oranının belirli bir seviyede kalmasını sağlayan önemli bir enzimdir (Şekil 1.2.). Ancak reaksiyonun gerçekleşmesi için NADPH'a ihtiyaç vardır. Gerekli olan NADPH pentoz fosfat yolundan elde edilir. Burada glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) enzimi ile glutatyon redüktaz enzimi arasındaki ilişki ortaya çıkar. G6PD enziminin çalışmaması, NADPH üretimini; NADPH üretiminin azalması glutatyon redüktazın işlerliğini; GR aktivitesinin düşmesi de GSH oluşumunu etkiler (Ciftci vd, 2000; Keha & Küfrevioğlu, 2004). Bu biyokimyasal süreç DNA biyosentezi, çeşitli oksidatif stres tiplerine karşı hücrenin korunması, reaktif oksijen tiplerinin ve serbest radikallerin detoksifikasyonunun yanı sıra hücre içi sinyal iletimi ve gen regülasyonu için de gereklidir (Tunc vd, 2015).



Şekil 1.1. Glutatyon redüktaz'ın 3 boyutlu yapısı (Couto vd, 2016)



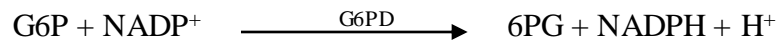
Şekil 1.2. Glutatyon redüktaz tarafından katalizlenen genel reaksiyon

GR enziminin katalizlediği tepkime (Şekil 1.2.), hücrel redoks durumunun göstergesi kabul edilen GSH/GSSG oranının (~100:1) korunmasını sağlar ve bu nedenle büyük önem taşır (Meister, 1983; Wu vd, 2004).

Glutatyon redüktazın katalizlediği tepkimede NADPH koenzimine olan ihtiyaç hayvan ve bitki dokularında bazı enzim sistemleri yoluyla sağlanır. Bu sistemlerden en iyi bilineni pentoz fosfat metabolik yoludur (Halliwell & Gutteridge, 2011).

Pentoz fosfat metabolik yolu, oksidatif ve oksidatif olmayan iki evreden oluşur (Cabezas vd, 1999). Oksidatif evre hücrelerdeki NADPH'nin kaynağıdır. Bu evredeki tepkimelerde glukoz-6-fosfat molekülü başına bir molekül riboz-5-fosfat, bir molekül karbondioksit (CO₂) ve iki molekül NADPH oluşur (Champe vd, 2007).

Oksidatif evrenin ilk tepkimesini katalizleyen enzim glukoz-6-fosfat dehidrogenazdır (G6PD). Tepkime glukoz-6-fosfat'ın (G6P) 6-fosfo-D-glukonat'a (6PG) dönüşümünü katalizler (Champe vd, 2007).



Oksidatif evrenin ikinci tepkimesi 6-fosfoglukonat dehidrogenaz (6PGD) ile katalizlenir (Champe vd, 2007).



Pentoz fosfat metabolik yolunun hızı, G6PD enzime NADP⁺ sağlanmasıyla kontrol edilir. Glutatyon redüktaz enziminin katalizlediği tepkimede NADPH'nin okside olması ve buna bağlı olarak [NADPH]/[NADP⁺] oranının düşmesi durumunda metabolik yolun hızı NADPH'yi yenileme yönünde artırılır (Halliwell & Gutteridge, 2011).

Pentoz fosfat metabolik yolunun yanı sıra, malik enzimin katalizlediği malattan piruvat oluşumu tepkimesiyle de sitozolik NADPH üretilir (Aksoy, 2000).



Glutasyon redüktaz hayvanlarda, bakterilerde, mantarlarda ve bitkilerde bulunan bir flavoprotein oksidoredüktazdır (Deng vd, 2015). Bitki glutasyon redüktazı ilk kez 1951'de rapor edilmesinden sonra (Conn & Vennesland, 1951); *Zea mays* (Mahan & Burke, 1987), *Pisum sativum* (Creissen vd, 1992; Stevens vd, 1997), *Arabidopsis thaliana* (Kubo vd, 1993), *Nicotiana tabacum* (Creissen & Mullineaux, 1995), *Oryza sativa* (Kaminaka vd, 1998; Wu vd, 2013), *Populus trichocarpa* (Rouhier vd, 2006) ve *Vigna unguiculata* (Contour-Ansel vd, 2006) gibi çeşitli bitkilerden birçok GR saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir.

Glutasyon redüktaz enziminin fizyolojik pH'sının 7.5 olduğu bildirilmiştir, ancak enzimin optimum pH'ı organizmaya bağlı olarak farklılık göstermektedir (Al-Senaidy, 2010; Can vd, 2010). Tandoğan & Ulusu (2007), çeşitli tampon sisteminde, enzim aktivitesinin pH'mı 5.0 - 10.0 aralığında rapor etmişlerdir. Willmore & Storey (2007), GR'nin, pH 4.0 - 10.0 arasında biraz daha geniş çaplı enzim aktivitesi sergilediğini kanıtlamıştır.

İzoelektrik nokta (pI), molekülün pozitif ve negatif yükünün sıfır olduğu, elektrik alanında molekülün hareket etmediği pH derecesidir. Glutasyon redüktaz pI'sının insanda 6.75, fare karaciğerinde 6.4, *A. thaliana*'da 4.8, bezelyede 5.4 olarak bildirilmiştir ve hayvansal dokularda bitkisel dokulara göre daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (Kubo vd, 1993; Romero-Puertas vd, 2006).

GR aktivitesi sıcaklığa bağlı olarak değişirken, enzim 60°C'ye kadar optimum aktivite sergilemekte daha sonra sıcaklık arttıkça enzim aktivitesi düşmektedir (Ulus vd, 2005). Buna karşılık, koyun ve sığır karaciğeri için en yüksek aktivitenin sırasıyla 60°C ve 50°C'de gerçekleştiği bildirilmiştir (Ulus & Tandoğan, 2007). Bitki sistemlerinde GR, yüksek ve düşük sıcaklıklara karşı oldukça dirençlidir ve GR'nin enzimatik aktivitesi 20°C ile 55°C arasında gerçekleştiği bildirilmiştir (de Lamotte vd, 2000).

Çoğu bitkide glutasyon redüktazlar, monomer başına bir FAD içeren, 100 ile 150 kDa arasında değişen moleküler kütleye sahip ve birkaç istisna dışında yaklaşık 55

kDa'lık altbirimler içeren homodimerik proteindir (Libreros-Minotta vd, 1992; Gill vd, 2013).

Çizelge 1.1. Bazı bitkilerden saflaştırılan GR enziminin moleküler ağırlıkları

Organizma	Konum	Moleküler Ağırlık (kDa)	Kaynak
<i>Pisum sativum</i> L.	Kloroplast ve sitoplazma	55	(Madamanchi vd, 1992; Mullineaux vd, 1996)
<i>Brassica campestris</i> L.	Kloroplast	54-55	(Pilon-Smits vd, 2000; Lee vd, 2002; Kim vd, 2009)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Mitokondri, kloroplast ve peroksizom	54	(Kubo vd, 1993; Sato vd, 2000)
<i>Nicotiana tabacum</i>	Kloroplast ve sitoplazma	60	(Creissen vd, 1992)
<i>Oryza sativa</i> L.	Sitoplazma	53-54	(Kaminaka vd, 1998; Lee vd, 2002; Hong vd, 2009)
<i>Triticum durum</i>	Endosperm, sitoplazma ve kloroplast	60	(de Lamotte vd, 2000; Lascano vd, 2001)

Glutasyon redüktazların çoğu kloroplastta bulunur ancak bazıları sitozol, mitokondri ve peroksizomlarda da bulunmuştur. Glutasyon redüktaz kloroplastlarda, sitozolde ve mitokondride bulunsa da, fotosentetik dokularda aktivitesinin %80'inden fazlasının kloroplastik izoform olduğu rapor edilmiştir (Edwards vd, 1990; Ashraf, 2009). Glutasyon redüktazın yaralanma (Romero-Puertas vd, 2006), ozon (Kubo vd,

1995), kuraklık (Contour-Ansel vd, 2006; Torres-Franklin vd, 2008), ağır metaller (Xiang & Oliver, 1998; Yamarelli vd, 2007; Le Martret vd, 2011), tuzluluk (Le Martret vd, 2011; Wu vd, 2013) ve jasmonik asit (Xiang & Oliver, 1998) gibi stres ve fitohormonlarla düzenlendiği bildirilmiştir (Deng vd, 2015).

Kuraklık, sıcaklık, tuzluluk, ultraviyole (UV), iyonlaştırıcı radyasyon, metal, ozon ve patojen saldırısı gibi çeşitli çevresel streslerle (abiyotik ve biyotik) yetişen bitkiler, dünya gıda güvenliği için ciddi tehditler oluşturmaktadır (Suzuki vd, 2012). Stres altında reaktif oksijen türleri (ROT) üretimi, genetik stres ve hücre ölümüyle sonuçlanan ve ürün verimi kaybına yol açan lipid, protein ve DNA da dahil olmak üzere bir dizi hücresel hedefe zarar veren genel bir semptomdur (Bray & West, 2005). Bitkiler, hücresel sistemde enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanların aktivasyonu yoluyla oksidatif stresle savaşmak için benzersiz savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir (Foyer & Noctor, 2011). Glutasyon (GSH), önemli ve işlevsel bir şekilde düşük molekül ağırlıklı çözümlü antioksidandır ve bitkileri reaktif oksijen türleri, ksenobiyotikler ve ağır metaller gibi çevresel faktörlerden korumak için önemli bir rol oynamaktadır (Sytar vd, 2013).

Düşük reaktif oksijen türlerinin seviyeleri, büyüme, hücre döngüsü, programlanmış hücre ölümü, abiyotik stres tepkileri, patojen savunma, sistemik sinyalizasyon ve gelişme gibi hayati süreçleri düzenleyen ve koordine eden sinyal molekülleri olarak görev yapmaktadır. Oysaki reaktif oksijen türleri ve bunların reaksiyon ürünlerinin yükselen seviyeleri, oksidatif strese yol açacak kadar reaktif ve toksiktir. Bu bağlamda, birçok sayıda rapor ve araştırma sonucunda reaktif oksijen türlerinin ve reaksiyon ürünlerinin lipitlere, proteinlere, karbonhidratlar ve nükleik asitlere oksidatif hasarda bulunduğu ve bunun sonucunda hücre işleyişine veya ölümüne sebep olduğu doğrulanmıştır. Bu nedenle, hücre hayati metabolik işlevlerini yerine getirmek için, bitkilerde reaktif oksijen türlerinin üretimi ve metabolizması ile reaksiyon ürünlerinin dengesi iyi korunmalıdır (Gechev vd, 2006; Gill & Tuteja, 2010; Anjum vd, 2012; Gill vd, 2012).

Hücrelerdeki dengenin bozulması sonucu oksidatif stres meydana getiren reaktif oksijen türleri (ROT); genel olarak oksijenin (O_2) uyarılmasıyla singlet oksijen (O_2^1) oluşması ve sırasıyla oksijene 1, 2 ya da 3 elektronun transferi sonucunda süperoksit ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH^{\cdot}) oluşmaktadır (Halliwell &

Gutteridge, 2011). Oluşan bu reaktif oksijen türlerinin membran lipitleri, nükleik asitleri ve proteinleri oksidatif yıkıma uğratarak, hücre bileşenlerinin yapısını bozdukları bilinmektedir (Davies, 1987; Wise & Naylor, 1987; Imlay & Linn, 1988; McKersie & Lesheim, 2013).

Bu arada kısmi redüksiyonla da çok sayıda reaktif oksijen türleri oluşmaktadır. Meydana gelen bu reaktif ara ürünlerin hepsi radikal değildir. Oluşan her oksijen metaboliti için serbest oksijen radikali demek yanlış bir sınıflandırma olmaktadır. Reaktif oksijen türleri olarak isimlendirmek hem $O_2^{\cdot-}$ ve OH^{\cdot} gibi radikalleri hem de H_2O_2 , O_2^1 gibi reaktif fakat radikal olmayan türleri kapsamaktadır. H_2O_2 bir radikal değildir, fakat kuvvetli bir oksidandır. O_2^1 bir radikal olmadığı için doğrudan zincir reaksiyonlar başlatamamaktadır. Ama oksidan etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Halliwell & Gutteridge, 2011).

Glutasyon redüktaz, reaktif oksijen türlerinin detoksifikasyonunda ve GSH yenilenmesinde önemli rol oynar ve bu olay bitkilerde abiyotik stres toleransını sağlamaktadır (Hasanuzzaman vd, 2010; Hasanuzzaman vd, 2012). Artan GR aktivitesi, stres toleransını sağlar ve elektron taşıma zincirinin önemli bileşenlerinin redoks durumunu değiştirme yeteneğine sahiptir. Stres toleransını kazanılmasında GR'nin önemli bir şekilde yer alması, GSH'nin geri dönüşümü ve bitki hücresinde GSH/GSSG oranının korunması önemli rol oynamaktadır (Rao & Reddy, 2008; Pang & Wang, 2010).

Siyanobakterilerde ve *Brassica* türlerinde glutasyon redüktaz aktivitesinin yüksek kloroplastik/mitokondriyal ekspresyonu, ozon, tuz, hidrojen peroksit, soğukluk, absisik asit (ABA), ısı işlem, ağır metaller ve pestisitler gibi çeşitli strese karşı fotoinhibisyon direncini arttırdığı ve toleransa katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Lee vd, 2002; Kim vd, 2009). Tuz stresi, tuz toleranslı transgenik bitki ile karşılaştırıldığında, hücrel glutasyon seviyesini açıkça tetiklediği; artan glutasyon içeriğinin, organizmayı oksidatif stresden koruduğunu bildirilmiştir (Ruiz & Blumwald, 2002). Ayrıca, kloroplastta glutasyon redüktaz veya glutasyon sentezinin aşırı ekspresyonu, antioksidan kapasitesini arttırdığı ve kontrol ile karşılaştırıldığında, *N. tabacum* ve *T. aestivum* bitkilerinde, fotoinhibisyon faktörlere karşı toleransı arttırdığı bildirilmektedir (Foyer vd, 1995; Melchiorre vd, 2009).

Hücrede GR ve GSH eksikliği oksidatif hasara yol açarak Alzheimer, Parkinson, karaciğer ve akciğer hastalıkları, kistik fibrozis, orak hücreli anemi, HIV, AIDS, kanser, ateroskleroz, felç, şizofreni, epilepsi ve diyabet gibi birçok hastalığa neden olur (Townsend vd, 2003; Wu vd, 2004). GR eksikliğinin en önemli belirtileri neonatal sarılık, favizm ve hemolitik anemidir (Kamerbeek vd, 2007).

Fotosentez, fosforilasyon, hücresel adezyon, metabolizma, antioksidan aktivite gibi bir çok hücresel fonksiyonda adı geçen Zn^{+2} , Cu^{+2} , Ca^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} ve Fe^{+2} gibi metal iyonları enzim aktivitesinde önemli bir kofaktör görevi görmektedir (Engle vd, 2000; Faixová & Faix, 2002). Protein içindeki metal veya metal iyonları aktiviteyi arttırsa da, çeşitli metaller hücre içi ve dışı membranda ve proteinlerde toksik etkilere neden olmaktadır. Örneğin, Cd^{+2} , Ni^{+2} , Hg^{+2} ve Cu^{+2} enzim aktivitesini güçlü bir şekilde inhibe etmektedir (Al-Senaïdy, 2010). Glutasyon redüktaz enzimi, GSSG konsantrasyonu düşük olduğunda metal iyonlarına oldukça duyarlı olduğu bilinmektedir (Garcia-Alfonso vd, 1993).

Metal iyonları, GSH'nin geçici olarak tükenmesine ve diğer antioksidan enzimlerin inhibisyonuna neden olan enzim aktivitesini etkilemektedir. Ağır metaller ve metal iyonları, enzim-substrat ve kofaktör afinitesini değiştiren konformasyonel değişiklikler üzerindeki etkisinden dolayı enzim aktivitesini etkilemektedir (Tandogan & Ulusu, 2010).

Organik kirleticilerin aksine ağır metaller, mikroorganizmalar tarafından kimyasal veya biyolojik olarak parçalanamamaktadır. Bazı ağır metaller, normal seviyelerde mevcut olduklarında bitki büyümesi için gereklidir; fakat fazla miktarda bulunurlarsa, bitki büyümesi üzerine toksik etkilere neden olmakta daha sonra verimin düşmesi veya bitki ölümü ile sonuçlanmaktadır (Rao & Reddy, 2008).

Ağır metaller, yoğunluğu sudan en az beş kat daha fazla olan kimyasal elementler olarak adlandırılır ya da başka bir ifadeyle yoğunluğu 5 g ml^{-1} 'den fazla olan metaller için kullanılan bir kavramdır (Kvesitadze vd, 2006). Kobalt, bakır, demir, mangan, molibden, nikel ve çinko gibi bazı ağır metal özelliği gösteren elementler bitkiler için temel mikro besin elementlerindedir. Fakat yüksek konsantrasyonda bitki için toksik etki yapmaktadırlar ve akut veya kronik zehirlenmelere yol açmaktadırlar (Kvesitadze vd, 2006). Kadmiyum, kurşun, krom, uranyum, cıva, gümüş ve altın gibi

diğer ağır metaller bitkiler için esansiyel besin elementleri olmadığı gibi çok küçük konsantrasyonları bile toksik etkiler yapmaktadır (Lambers vd, 2008).

Bitkiler için gerekli olan ve ortamda uygun miktarlarda bulunduğunda olumlu ve önemli etkiler yapan metaller, fazla miktarlarda bulunduğunda bitkilerde toksisiteye neden olabilmektedir (Steffens, 1990; Asri & Sönmez, 2006). Ağır metallerin bitki doku ve organlarında aşırı birikimi strese neden olmakta, büyüme ve gelişme, mineral besin alımı, transpirasyon, fotosentez, enzim aktivitesi, klorofil biyosentezi ve çimlenme gibi çok sayıda morfolojik ve fizyolojik olayı olumsuz yönde etkilemektedir (Kennedy & Gonsalves, 1987; Ouzounidou, 1994; Gür vd, 2004).

Bitkilerde ağır metal toksisitesinin büyüme ve gelişmede yavaşlama, enzim aktivitesinde bozulma, kökte hasar, depolama faaliyetlerinde bozulma, fotosentez aktivitesinde gerileme, besin elementlerinin alınımında yavaşlama ve verimde düşme gibi zararlara neden olduğu bilinmektedir (Yağdı vd, 2000).

Ağır metallerin toksisitesi mikroorganizmalar ve bitkiler üzerinde büyüme ve gelişmede azalma şeklinde kendini gösterirken, insan ve hayvan sağlığı üzerinde ise çeşitli zararla karakterize edilmektedir. Özellikle ağır metaller merkezi sinir sisteminin normal fonksiyonunu bozabilmektedir, kan içeriğinde değişikliklere neden olurlar ve akciğerler, böbrekler, karaciğer ve diğer organların işleyişini olumsuz yönde etkilemektedir. Ağır metallerin uzun süreli etkisi kanser gelişimine, alerjiye, distrofiye, alzheimer ve parkinson gibi nörolojik hastalıklara neden olabilmektedir (Kvesitadze vd, 2006).

Gümüş (Ag), ağır metal iyonları arasında yüksek antibakteriyel aktivitesi olan ve canlı organizmalar üzerinde minimum düzeyde toksisitesi olmasından dolayı tıpta kullanılmaktadır (Schierholz vd, 1998). Antibakteriyel etkisini proteinlerin sülfhidril grupları ile reaksiyona girerek zar geçirgenliğini düşürdüğü ve bunun sonucunda bakteri hücrelerinin ölümüne neden olduğu bildirilmektedir (Durán vd, 2010). Gümüşün toksisitesi sadece açık yaraların tedavisinde yüksek miktarda kullanılması durumunda mavi deri hastalığı (arjirizm) ortaya çıktığı bildirilmektedir. Gümüş alerjisine ilişkin net bir bilgi yoktur (Özcan, 2015). Bununla birlikte bazı araştırmacılar yaptıkları çalışmalarda farklı boyutlardaki gümüş nanopartiküllerinin sıçan karaciğer hücreleri üzerine etkilerini incelemişler ve 24 saatlik bir süre ile gümüş iyonlarına maruz kalan

siçan karaciğer hücrelerinde anormal boyut, hücre küçülmesi ve düzensiz şekil olduğunu belirlemişlerdir (Hussain vd, 2005).

Mangan (Mn) nehir, göl ve yer altı sularında doğal olarak bulunur ve sudaki bitkiler tarafından bir miktar alınarak birikebilmektedir. İnsanlarda genellikle karaciğer, böbrek ve pankreasta birikim göstermektedir (Çalışkan, 2005). Mangan genç hayvanların kemik doku metabolizması, ineklerde fertilizasyonun düzenlenmesi, reproduksiyon ve santral sinir sistemi fonksiyonları için önemli bir iz elementtir. Birçok enzimin aktivatörüdür ve metalloenzimlerin önemli bir ögesidir. Bağışıklık sisteminde fonksiyonu vardır ve ayrıca beyin fonksiyonlarını etkilemektedir. Lipid ve karbonhidrat metabolizmasına, hücre fonksiyonlarına ve hücre zarının yapımına katılmaktadır (Arthington, 2000; Akın, 2004; Al-Qudah vd, 2010).

Kadmiyum (Cd) insan, hayvan ve bitkiler için oldukça toksik etkili bir ağır metaldir. Bitki bünyesinde azot ve karbonhidrat metabolizmalarını değiştirmesi nedeniyle birçok fizyolojik değişikliğe sebep olmaktadır. Proteinlerin -SH gruplarındaki enzimleri inaktive etmekte, protoklorofil redüktaz ile aminolevulinik asit sentezini bozup fotosentezi engellemekte ve stomaların kapanmasına, transpirasyon ile su kaybının azalmasına neden olmaktadır (Sheoran vd, 1990; Zengin & Munzuroğlu, 2005). İnsanlarda diyabetik böbrek komplikasyonları, yüksek tansiyon, osteoporozis, böbreklerde taş oluşumu, lösemi, akciğer, böbrek, idrar kesesi, pankreas, göğüs ve prostat gibi bazı organlarda kanser gelişimine neden olduğu yapılan bazı araştırmalarda ortaya konmuştur (Schwartz & Reis, 2000; Saffron, 2001). Kadmiyum tiyollerle veya reaktif moleküllere karşı korunmada görevli enzimlerle reaksiyona girmelerinin bir sonucu olarak serbest radikallerin oluşumunu tetikler. Kadmiyumun plazma membranındaki sülfidril grubu gibi organik ligantlara bağlanmak sureti ile membranda yapısal lezyonların oluşumunu tetiklediği düşünülmektedir (Malik, 2004).

Bakır (Cu) bitki bünyesinde enzim aktivasyonu, karbonhidrat ve lipid metabolizmasında yer alması nedeniyle önemli bir elementtir (Asri & Sönmez, 2006; Kacar & Katkat, 2006). Bakırın toksisitesi temel olarak serbest iyonlarla ilişkilidir. Bakır bir redoks metalidir ve hidroksil, peroksi ve alkoksi radikalleri gibi serbest radikallerin oluşmasını katalizler. Bu sebeple, hücrede oksidatif strese neden olur (Mazhoudi vd, 1997). Bakırın membrandaki proteinlerin sülfidril gruplarına

bağlanarak membrana zarar verdiği bilinmektedir. Ayrıca bakırın lipit peroksidasyonunu da tetiklediği bilgiler arasındadır (Chen vd, 2000). Bakır toksisitesi genellikle bitki kök sistemlerinde açığa çıkar ve bitki bünyesinde protein sentezi, fotosentez, solunum, iyon alımı ve hücre membran stabilitesi gibi bazı fizyolojik olayların bozulmasına neden olur (Sossé vd, 2004; Asri & Sönmez, 2006). Herhangi bir yolla vücuda alınan fazla bakır, vücutta toksik etki oluşturabilmektedir. Yüksek konsantrasyonlarda alınan bakır, hiperkupremiye neden olmaktadır. Ayrıca bakır karaciğer ve beyin dokularında birikerek sinir sisteminin bozulması, gözlerde renk halkalarının oluşması gibi belirtilerle ortaya çıkan Wilsons hastalığına ve siroza yol açmaktadır (Yüzbaşı & Sezgin, 2002; Bayşu Sözbilir & Bayşu, 2008).

Çinko (Zn) insanlar ve tüm bitki formları ile hayvan yaşamları için önemli ve yaşamsal eser elementlerden biridir ve günlük dozu 10 - 20 mg'dır. Çinkonun birçok hücrel proteini özellikle aktif merkezinde sistein bulunan enzimleri etkilediği bilinmektedir (Perry vd, 1997; Wu vd, 1999; Haase & Maret, 2003). Hücrede çinko derişiminin artması sonucu özellikle GR önemli ölçüde etkilenmektedir. Çinko toksik derişimlerde bulunduğunda GR inhibisyonuna bağlı olarak GSH derişiminde bir azalma GSSG'de ise bir artış meydana gelmektedir (Walther vd, 2000). Çinko astrositlerde GR' yi inaktive ederek GSSG/GSH oranının artmasına ve hücre içi ROT üretimine neden olmaktadır (Bishop vd, 2007). Çinko, bitkilerde de çok çeşitli ve önemli metabolik işlevlere sahiptir. Protein ve karbonhidrat sentezine katılmasının yanı sıra, enzim aktivasyonu, fotosentez, solunum ve biyolojik membran stabilitesi üzerine etkileri nedeniyle üretilen ürün miktarı ve kalitesini direkt olarak etkilemektedir (Asri & Sönmez, 2006; Rout & Das, 2009).

Nikel (Ni)'in alerjik özelliği bulunmasının yanı sıra akciğer kanseri, cilt hastalıkları, astım, merkezi sinir sistemi bozuklukları gibi olumsuz etkiler neden olduğu bildirilmiştir (Garner, 2004; Costa vd, 2005). Redoks aktif bir metal olan nikel peroksidasyona karşı koruyucu hücrel antioksidan savunma mekanizmalarına zarar vermektedir (Athar vd, 1987; Misra vd, 1990). Nikel hücrede ROT üretimini ve lipit peroksidasyonunu arttırarak redoks dengesi bozmaktadır ve bunun sonucunda hücrel proteinlere zarar vermektedir (Shankin-Kestenbaum vd, 1991). Bitkiler tarafından alınan nikel besin zincirine dâhil olmakta ve yüksek düzeylerde nikel canlılara zehir etkisi göstermektedir.

Krom doğal olarak birçok bitki, meyve, et ve mayanın yapısında bulunduğu için insanlar kromun büyük bir kısmını bu yiyeceklerden alırlar (Çınar, 2008). Ana materyale göre değişmekle birlikte toprakta 5-100 ppm oranlarında doğal olarak bulunur. Bitkide kuru madde de 100 ppm bulunması birçok yüksek bitki için toksik değer olarak kabul edilmektedir. Bitki bünyesinde toksik seviyeye ulaşan kromun bitkide etkilediği ilk fizyolojik olay tohum çimlenmesidir (Astri & Sönmez, 2006). Krom vücutta birçok fizyolojik fonksiyona sahip olup karbonhidrat, yağ ve proteinlerin normal metabolizması için esansiyel bir elementtir. Biyolojik olarak aktif olan krom insülinin kofaktörüdür (Noyan, 2003). Kolesterol, yağ ve protein sentezi için hayati bir mineral olan krom, kan şekeri düzeyinin sabit kalmasını sağlamaktadır.

Magnezyum (Mg), vücut ağırlığının % 0.05'i kadar bir miktarda bulunmasına karşın vücudumuzdaki yüzlerce enzim reaksiyonuna katılmaktadır. Topraklardaki magnezyum bitkiler tarafından kullanılmaktadır. Magnezyum bitki dünyasının demiridir. İnsanlardaki demir-hemoglobin ilişkisine benzer şekilde, bitkilerde magnezyum klorofil yapısına girer (Görmüş & Ergene, 2003). Besleyici çözeltilerde makro element olarak bulunan magnezyum bitkiler için oldukça önemli bir elementtir. Fotosentez reaksiyonlarında görevli klorofil molekülünün yapısında ve birçok enzimde kofaktör olarak yer alır. ATP üretiminde görevlidir ve bitkilerin fosfor alımında etkilidir.

Baryum'un suda çözünen baryum sülfür gibi bileşikleri zehirlidir. Baryum sülfat gibi suda ve asitte çözünmeyen baryum tuzları normal koşullarda zehirsizdir. Düşük dozlarda, baryum iyonları bir kas uyarıcı olarak hareket eder ve yüksek dozlar sinir sistemini etkiler ve kalp düzensizliklerine, titreme, zayıflık, kaygı, nefes darlığı ve felç oluşturmaktadır. Bu toksisiteye, baryumun sinir sisteminin düzgün işleyişi için kritik olan potasyum iyon kanallarını engellemesi neden olduğu bildirilmektedir. Baryum kanserojen olmadığı ve biyolojik olarak birikim yapmadığı düşünülmektedir (Patnaik, 2003; Moore, 2012).

Bu çalışmada, besin ve ekonomik değeri yüksek bir bitki olan soyadan glutatyon redüktaz (GR) enziminin varlığı ve kinetik özellikleri çalışılmıştır. Leguminosae (baklagiller) familyasına dâhil tek yıllık bir bitki olan soya fasulyesi (*Glycine max* L.), içerdiği %20 oranındaki yağın yanı sıra yapısında %40 oranında protein, %35 oranında karbonhidrat, %5 oranında lif, çeşitli mineral ve vitaminler, lesitin, folik asit ve

isoflavonlar gibi çeşitli yararlı molekülleri bulundurmakta, bu özelliklerinden dolayı besin, yem ve endüstrinin farklı kollarında birçok kullanım alanına sahiptir (Bakoğlu & Ayçiçek, 2005; Jenks vd, 2007; Sincik vd, 2008).

Bu çalışmada, soya bitkisinin tohumundan glutatyon redüktaz (GR) enziminin saflaştırılması, enzim aktivitesinin üzerine bazı ağır metal iyonlarının inhibisyon etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.



2. MATERİYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

Bu tez çalışmasında materyal olarak soya bitkisinin (*Glycine max* L.) tohumları kullanılmıştır (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. Çalışmada kullanılan soya tohumları

2.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin (TEMED), Ditiyotreititol (DTT), okside glutatyon (GSSG), triklor asetik asit (TCA), akrilamid, N,N'-metilen bisakrilamid, brom timol mavisi, sodyum dodesil sülfat (SDS), amonyum persülfat, etilendiamintetraasetikasit (EDTA), trihidroksimetilaminometan (Tris), β -nikotinamidadeninükleotid fosfat (redükte form) (NADPH), sodyum hidroksit, amonyum sülfat, hidroklorik asit, glisin, gliserin, potasyum fosfat (KH_2PO_4), potasyum asetat ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$), potasyum klorür (KCl), sodyum asetat ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$), sodyum klorür (NaCl), etanol, metanol, asetik asit, izopropanol, 2',5' ADP-Sepharose 4B, coomassie brillant blue G-250, sıvı azot, standart protein (Biorad, 1610375), gümüş nitrat ($\text{Ag}(\text{NO}_3)$), mangan nitrat ($\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$), kadmiyum nitrat ($\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$), bakır nitrat ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$), çinko nitrat ($\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$), nikel nitrat ($\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$), krom nitrat ($\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$), magnezyum nitrat ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$) ve baryum klorür (BaCl_2) bu tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddelerdir.

2.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar

Çalışmalar esnasında aşağıdaki alet ve cihazlar kullanılmıştır.

Çalkalayıcı	: Benchmark Incu-Shaker Mini
Hassas Terazi	: Ohaus-Pioneer
Soğutmalı santrifüj	: Eppendorf Centrifuge 5804R, Thermo SL 16R
Mini santrifüj	: Tomos micro santrifüj
pH metre	: Thermo Scientific Orion Star A211
Saf su cihazı	: Nüve Water Disteller ND12
Spektrofotometre	: Shimadzu UV-1800
Karıştırıcı (Vorteks)	: Velp Scientific Orion Star A211
Otomatik Pipet	: Gilson, Transferpette, ISOLAB, Thermo
Manyetik karıştırıcı	: Ika Topolmo S1
Buzdolabı (+4°C)	: Bosch KSU40623NE
Derin dondurucu (-20°C)	: Bosch GSV33vW30
Peristaltik pompa	: Gilson Minipuls 3
Afinite kolunu	: Kapalı sistem oluşturucu ve soğutmalı (1x10), sigma (ABD)
Elektroforez tankı	: Bio Rad (dikey)
Güç kaynağı	: Bio Rad Power Pac Basic
Buz makinası	: Scotsman AF 80

2.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

Çözeltilerin hazırlanması esnasında kullanılan su, saf ve deiyonize sudur.

2.1.3.1. Aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler

1. 1 M 100 ml Tris (pH=7.6) tampon çözeltisi: 12.11 g Tris alınarak 90 ml saf suda çözüldü. HCl ile pH'sı 7.6'ya ayarlandı ve saf su ile son hacmi 100 ml'ye tamamlandı.

2. 1 M 100 ml KH_2PO_4 (pH=7.6) tampon çözeltisi: 13.60 g KH_2PO_4 alınarak 80 ml saf suda çözüldü. pH'sı 7.6'ya ayarlandı ve saf su ile son hacmi 100 ml'ye tamamlandı.
3. 2 mM 2 ml GSSG çözeltisi: 2.45 mg okside glutatyon (GSSG) alınarak bir miktar saf suda çözüldü ve saf su ile son hacmi 2 ml'ye tamamlandı.
4. 2 mM 2 ml NADPH çözeltisi: 3.33 mg NADPH alınarak bir miktar saf suda çözüldü ve saf su ile son hacmi 2 ml'ye tamamlandı.

2.1.3.2. Amonyum sülfat çökeltisinin çözünmesi ve diyaliz için kullanılan tamponlar

1. 300 mM 100 ml Tris (pH=7.6) tampon çözeltisi: 3.63 g Tris alınarak 90 ml saf suda çözüldü. HCl ile pH'sı 7.6'ya ayarlandı ve saf su ile son hacmi 100 ml'ye tamamlandı.
2. 100 mM 100 ml Tris (pH=7.6) diyaliz çözeltisi: 1.21 g Tris alınarak 90 ml saf suda çözüldü. HCl ile pH'sı 7.6'ya ayarlandı ve saf su ile son hacmi 100 ml'ye tamamlandı.

2.1.3.3. Afinite kromatografisi kolonunda kullanılan çözeltiler

1. 300 mM Tris/1 mM EDTA, 1mM DDT (pH=7.3) kolonun paketlenmesi ve dengelenmesi için kullanılan tampon: 3.63 g Tris, 0.292 g EDTA ve 0.152 g DTT alınarak 90 ml saf su ile çözüldü ve pH'sı 7.3'e ayarlandıktan sonra son hacmi 100 ml'ye tamamlandı.
2. 0.1 M K-asetat/0,1 M K-fosfat, (pH=7.85) numune tatbik ettikten sonra afinite kolonunun yıkanması için kullanılan 1.tampon: 0.98 g K-asetat ve 1.36 g K-fosfat karışımı 80 ml saf su ile çözüldü ve pH'sı 7.85'e ayarlandıktan sonra son hacmi 100 ml'ye tamamlandı.
3. 0.1 M K-fosfat/0.1 M KCl, (pH=7.85) numune tatbik edildikten sonra afinite kolonunun yıkanması için kullanılan 2.tampon: 1.36 g K-fosfat ve 0.74 g KCl karışımı 80 ml saf su ile çözüldü ve pH'sı 7.85'e ayarlandıktan sonra son hacmi 100 ml'ye tamamlandı.
4. 50 mM K-fosfat/1 mM EDTA, 1mM GSSG ve 0.5 mM NADPH, (pH=7.3) afinite jeline tutunmuş olan glutatyon redüktaz enziminin elüsyonu için kullanılan tampon:

0.34 g K-fosfat, 0.0146 g EDTA, 0.0310 g GSSG, 0.02075 g NADPH karışımı 45 ml su ile çözüldü ve pH'sı 7.3'e ayarlandıktan sonra son hacmi 50 ml'ye tamamlandı.

5. 0.1 M Na-asetat/0.5 M NaCl (pH=4.5) afinite kolonunun rejenerasyonu için kullanılan tampon: 0.82 g Na-asetat ve 2.92 g NaCl karışımı 80 ml saf su ile çözüldü ve pH'sı 4.5'e ayarlandıktan sonra son hacmi 100 ml'ye tamamlandı.

2.1.3.4. Elektroforez için kullanılan çözeltiler

1. 1.5 M Tris-HCl (pH=8.8): 18.17 g Tris tartılarak 80 ml suda çözüldü ve pH'sı HCl ile yapıldıktan sonra son hacmi 100 ml'ye tamamlandı.

2. 1 M Tris-HCl (pH=6.8): 12.11 g Tris tartılarak 80 ml suda çözüldü ve pH'sı HCl yapıldıktan sonra son hacmi 100 ml'ye tamamlandı.

3. %30 Akrilamid-%0.8 Bisakrilamid çözeltisi: 15 g akrilamid, 0.4 g bisakrilamid ve 34.6 g su karıştırılarak çözüldü.

4. %10'luk amonyum persülfat çözeltisi: 0.1 g amonyum persülfat tartılarak su ile 1 ml'ye tamamlandı. Her kullanım için taze olarak hazırlandı.

5. %10'luk SDS: 1 g SDS, 9 g suda çözüldü. Her kullanım için taze olarak hazırlandı.

6. Yürütme tamponu: 1.51 g Tris ve 7.51 g glisin tartılarak 450 ml suda çözüldü ve üzerine %10'luk SDS'den 5 ml ilave edildi daha sonra pH'sı 8.3'e ayarlandı ve son hacmi 500 ml'ye tamamlandı.

7. Numune tamponu: 1 M Tris-HCl (pH=8)'den 0.5 ml, %10'luk SDS'den 1 ml, %100'lük gliserinden 1 ml ve %0.1'lik bromtimol mavisinden 1 ml alınarak su ile son hacmi 10 ml'ye tamamlanarak stok halinde hazırlandı. Bu stok tampon kullanılmadan önce 950 µl stok tamponuna 50 µl β-merkaptoetanol ilave edilerek numune tamponu hazırlandı.

8. Sabitleştirme çözeltisi: %50 izopropanol, %10 TCA ve %40 su olacak şekilde karıştırılarak hazırlandı.

9. Jel boyama çözeltisi: 50 ml metanol, 10 ml asetik asit ve 40 ml su içerisinde 0.1 g Coomassie brillant blue R-250 reaktifinin çözülmesiyle hazırlandı.

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

11. Ayırma jeli (%12): 2.5 ml 1.5 M Tris-HCl (pH=8.8), 4 ml %30 Akrilamid- %0.8 bisakrilamid, 0.1 ml %10'luk SDS, 4 µl %100'luk TEMED, 0.1 ml %10'lik PER ve 3.3 ml saf su karıştırıldı.

12. Yığıma jeli: 0.38 ml 1 M Tris-HCl (pH=6.8), 0.5 ml %30 Akrilamid- %0.8 bisakrilamid, 30 µl %10'luk SDS, 3 µl %100'luk TEMED, 30 µl %10'lik PER ve 2.1 ml saf su karıştırıldı.

2.1.3.5. Kullanılan ağır metallerin stok çözeltileri

1. 0.1 M 10 ml stok $\text{Ag}(\text{NO}_3)$ çözeltisi: 0.169 g $\text{Ag}(\text{NO}_3)$ tartılarak 10 ml saf su içinde çözülmesiyle hazırlandı.

2. 0.11 M 10 ml stok $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$ çözeltisi: 0.196 g $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$ tartılarak 10 ml saf su içinde çözülmesiyle hazırlandı.

3. 0.1 M 10 ml stok $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ çözeltisi: 0.236 g $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ tartılarak 10 ml saf su içinde çözülmesiyle hazırlandı.

4. 0.1 M 10 ml stok $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ çözeltisi: 0.187 g $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ tartılarak 10 ml saf su içinde çözülmesiyle hazırlandı.

5. 0.1 M 10 ml stok $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ çözeltisi: 0.189 g $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ tartılarak 10 ml saf su içinde çözülmesiyle hazırlandı.

6. 0.1 M 10 ml stok $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ çözeltisi: 0.182 g $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ tartılarak 10 ml saf su içinde çözülmesiyle hazırlandı.

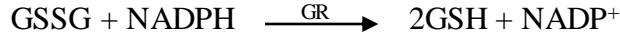
7. 0.1 M 10 ml stok $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$ çözeltisi: 0.238 g $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$ tartılarak 10 ml saf su içinde çözülmesiyle hazırlandı.

8. 0.1 M 10 ml stok $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ çözeltisi: 0.148 g $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ tartılarak 10 ml saf su içinde çözülmesiyle hazırlandı.

9. 0.1 M 10 ml stok BaCl_2 çözeltisi: 0.208 g BaCl_2 tartılarak 10 ml saf su içinde çözülmesiyle hazırlandı.

2.2. Yöntem

2.2.1. Soya tohumu glutatyon redüktaz enziminin aktivitesinin ölçümü



Glutatyon redüktaz enzim aktivitesinin belirlenmesi iki temel esasa dayanmaktadır. Birincisi; yukarıdaki reaksiyonda reaksiyona giren NADPH 340 nm’de maksimum absorbans vermektedir. Reaksiyon ortamına katılan GR enzimi NADPH’nin azalmasına sebep olmaktadır. Bu azalma spektrofotometrik olarak 340 nm’de takip edilmektedir (Carlberg & Mannervik, 1985).

İkincisi ise aynı reaksiyonda ürün olarak ortaya çıkan GSH’nin 5,5’-ditiyobis(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) ile reaksiyonu sonucu oluşturduğu bileşiğin 412 nm’de verdiği absorbansın spektrofotometrik olarak takip edilmesi esasına dayanır. GR enzimi GSH’nin zamanla artmasını sağlamakta, oluşan GSH da DTNB ile reaksiyona girerek absorbans artışına sebep olmaktadır (Goudsmit vd, 1988).

Enzim aktivitesi Shimadzu UV-1800 spektrofotometrede NADPH’nin oksitlenmesine bağlı olarak, 340 nm’deki absorbans düşüşü takip edilerek izlendi. Spektrofotometrik ölçümler Kinetics rate’de 340 nm 3 dakika boyunca yapıldı. GR aktivite ölçümü için kontrol ve numune küvet içerikleri Çizelge 2.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. GR aktivite ölçümü için kontrol ve numune küveti içeriği

Stok aktivite ölçüm çözeltileri	Kontrol Küveti		Numune Küveti	
	Hacim(µl)	Konsantrasyon	Hacim(µl)	Konsantrasyon
Saf Su	300	-	200	-
50 mM Fosfat Tamponu (pH:7,4)	500	50 mM	500	50 mM
Homojenat	-	-	100	-
Substrat (GSSG)	100	2 mM	100	2 mM
Substrat (NADPH)	100	2 mM	100	2 mM
Toplam	1000		1000	

2.2.2. Soya tohumundan glutatyon redüktaz enziminin saflaştırılması ile ilgili yöntemler

2.2.2.1. Homojenat hazırlanması

Çalışmada kullanılan soya tohumları piyasadan temin edildi. Yaklaşık 3 g soya tohumu parçalayıcı (blender) yardımıyla toz haline getirildi. Toz halindeki soya havana alınıp üzerine sıvı azot dökülerek mekanik parçalamaya devam edildi. Numune 50 ml'lik tüpe alınıp üzerine 40-45 ml 50 mM KH₂PO₄ (pH=7,6) tamponu ilave edildi. 10.000 xg ve +4 °C'de 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonunda pastör pipet ve filtre kâğıdı yardımıyla süpernatant kısmı süzülerek başka bir tüpe alındı. Böylece homojenat hazırlanmış oldu.

2.2.2.2. Amonyum sülfat çöktürme ve diyaliz

İlgili proteinin başka proteinlerden ayrılması işlemlerinde ya da proteinlerin deriştirilmesi işlemlerinde kullanılan çöktürme olayı, proteinleri saflaştırma işlemlerinin birçoğunda kullanılmaktadır. Protein moleküllerinin yüzeylerindeki hidrofilik ve hidrofobik grupların dağılımı proteinlerin çeşitli çözücülerdeki çözünürlüğünü etkilemektedir. Bu özellikleri sayesinde proteinlere amaca uygun olarak pH, ısı, organik çözücüler, organik polimerler ve yüksek tuz derişikleri gibi farklı şekillerde çöktürme işlemleri yapılmaktadır. Bunlardan en çok tercih edilen yüksek tuz derişikleri ile çöktürmedir.

Soya tohumundan hazırlanan homojenat için ayrı ayrı %0-40, %40-60 aralıklarında amonyum sülfat çöktürmeleri yapıldı. Amonyum sülfat çöktürme işlemi için kullanılan katı (NH₄)₂SO₄ yavaş yavaş katılarak manyetik karıştırıcı üzerinde ve buz içindeki homojenata eklendi. Katı amonyum sülfat miktarı, aşağıdaki formülle hesaplandı:

$$g(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = \frac{1,77 * V * (S2 - S1)}{3,54 - S1}$$

V: Enzim çözeltisinin hacmi

S1: 1'in kesri olarak çözeltideki amonyum sülfat doygunluğu

S2: 1'in kesri olarak istenilen amonyum sülfat doygunluğu

Bütün bu işlemler +4°C'de gerçekleştirildi. Her defasında homojenatlar 5.000 xg'de 15 dakika santrifüj edildi. Daha sonra süpernatant ayrı behere alındı ve çökelekler ise yeteri kadar 300 mM Tris (pH=7.6) tamponu ile çözülerek hem süpernatantta hem de çökelekte ayrı ayrı enzim aktivitesine bakıldı. Yapılan amonyum sülfat çöktürmesinin her aralığında işlemler tekrar edilip aktivite ölçümü yapılarak enzimin aktif olduğu aralık belirlendi. Bundan sonraki çalışmalarda çöktürme, belirlenen aralıkta yapıldı.

Diyaliz, protein çözeltisinin tuzlardan arındırılması için yapılan işlemdir. Osmotik basınç dengelenene kadar küçük moleküller membrandan serbestçe geçerler. Osmotik basınç dengeye ulaştığında ise moleküllerin dış tampona geçmesi durur. Buna istinaden membran içindeki tuzu tamamen uzaklaştırmak amacıyla, membran dışındaki tamponun birkaç kez değiştirilmesi gereklidir.

Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen karışım diyaliz torbasına yerleştirildi ve 100 mM Tris (pH=7.5) tamponuna karşı 2 defa değiştirilerek, 2 saat süreyle diyaliz edildi (Smith vd, 1988). Diyaliz işlemi magnetik karıştırıcı üzerinde +4°C'de gerçekleştirildi ve daha sonra aktivite tayini Bölüm 2.2.1'de izah edildiği şekilde yapıldı.

2.2.2.3. Afinite kolonunun hazırlanması ve soya tohumu glutatyon redüktaz enziminin saflaştırılması

10 ml'lik yatak hacmi için 2 g kuru 2',5'-ADP Sepharose 4B jeli tartılarak, 400 ml destile su ile katı maddelerin giderilmesi için birkaç defa yıkandı. Yıkama esnasında jel şişirilmiş oldu. Şişirilmiş jelin havası su trombu kullanılarak vakum ile alındıktan sonra dengeleme tamponu (300 mM Tris/1 mM EDTA, 1mM DTT, pH=7.3) ilave edilerek jel süspanse edildi. Süspanse edilmiş jel, 1x10 cm'lik kapalı sistemden oluşan soğutmalı kolona paketlenildi. Jel çöktükten sonra peristaltik pompa yardımıyla yıkama ve dengeleme tamponu ile yıkandı. Kolonun dengelenmiş olduğu eluat ile tamponun 280 nm'de absorbanlarının ve pH'larının eşitlenmesinden anlaşıldı. Böylece afinite kolonu hazırlanmış oldu. Belirlenen amonyum sülfat doygunluk aralığında çöktürülen numune, uygun tamponda çözülüp diyaliz edildikten sonra 2',5'-ADP sepharose 4B afinite kolonuna 2 ml uygulandı. Enzim çözeltisinin tamamı kolondan geçtikten sonra 1. ve 2. yıkama tamponunu geçirmeye devam edilerek kolonun yıkanması sağlandı.

Kolon yıkandıktan sonra elüsyon tamponu (50 mM KH_2PO_4 /1 mM EDTA, 1mM GSSG ve 0.5 mM NADPH, pH=7.3) ile 1.5 ml'lik santrifüj tüplerine elüe edildi (Carlberg & Mannervik, 1981). Elüsyon tamponuna takiben dengeleme ve rejenerasyon tamponları kolona uygulandıktan sonra en son dengeleme tamponu eklenerek jeli koruma altına alınıp kolon kapatıldı.

Elüsyonlar 1.5 ml'lik şekilde santrifüj tüplerine alındıktan sonra her birinde aktivite değerleri okundu. Bu çalışmayla elde edilen enzim örneklerinin saf olup olmadıklarını kontrol etmek amacıyla SDS-PAGE yapılarak elektroforez bantları elde edildi (Şekil 3.1.).

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

Enzimin saflığının kontrolünde ve alt birim molekül ağırlığının saptanmasında Laemmli (1970) tarafından önerilen SDS poliakrilamid jel elektroforezi yöntemi değiştirilerek kullanıldı. Bu işlem için elektroforez plakaları önce su ile sonra alkol ile yıkandı. Her iki kenarında aralık oluşturucu bir plaka ile düz bir plaka üst üste getirilerek kışkaçlarla tutturuldu. Sabitleştirilen plakalar, içerisinde sızdırmayı önleyen sünger ihtiva eden jel hazırlama kabine konuldu. Önce ayırma jeli hazırlandı ve enjektörle plakaların arasına üst kesimde 1-5 cm kalıncaya kadar dolduruldu. İki saat jelin donması beklendi, ayırma jelinin katılaştığından emin olunduktan sonra yığma jeli hazırlandı. Jelin üst kısmındaki boşluğa dolduruldu ve numune kuyucuklarının oluşması için tarak dikkatlice yerleştirildi. Yığma jelinin katılması beklenirken ıslatılmış süzgeç kâğıdı sistemin üzerine kapatıldı ve kuruması önlendi. Yığma jeli katıldıktan sonra tarak dikkatlice çıkartılarak numune kuyuları belirlendi. Önce saf su, sonra da yürütme tamponuyla yıkandı ve jel plakalarla birlikte elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu dolduruldu. Saflaştırılmış enzim örneklerinden ve gliserinden toplam hacim 150 µl olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu katıldı. 5 dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi ve kuyucuklara yüklemek için hazır hale geldi. Kuyucuklara enjektör yardımıyla numuneler yüklendi. Molekül ağırlığını belirlemek için standart proteinlerin yürütülmesi gereklidir. Bu nedenle molekül ağırlıkları 10 kDa ile 250 kDa aralığında değişen standart proteinlerden oluşan kit (Biorad, 1610375) kullanıldı. Elektroforez

tankı (+) anot ve (-) katot kısımlarına dikkat ederek kapatıldı. 80 voltta numuneler jelin alt sınırına gelinceye kadar yürütüldü. Numunelerin takip edilmesi, numune tamponuna katılan brom timol mavisi yardımıyla anlaşıldı. Yürütme işlemi bittikten sonra akım kesilerek plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı ve sabitleştirme çözeltisine konuldu. Sabitleştirme çözeltisinde 20 dakika bekletilen jel, çıkarılarak boyama çözeltisi içine konuldu ve çalkalayıcı üzerinde bir gece bekletildi. Jel boyandıktan sonra çıkarılarak yıkama çözeltisine konuldu. Rengi açılıp, protein bantları belirginleşinceye kadar çalkalayıcı üzerinde yıkanan jel çıkarılarak fotoğrafı çekildi.

2.2.3. Soya tohumu glutatyon redüktaz enziminin karakterizasyon çalışmaları

2.2.3.1. Soya tohumundan saflaştırılan glutatyon redüktaz enzimi için optimum iyonik şiddetin belirlenmesine yönelik çalışmalar

Tris ve potasyum fosfat (KH_2PO_4) tamponlarının 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM, 800 mM ve 1 M derişiklikleri kullanılarak aktivite ölçümleri yapılmıştır. Tampon optimizasyonunda kullanılan kontrol ve numune küvet içerikleri Çizelge 2.2. ve Çizelge 2.3.'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. Potasyum fosfat tampon optimizasyonu için kontrol ve numune küvet içerikleri

Stok aktivite ölçüm çözeltileri	Kontrol Küveti		Numune Küveti	
	Hacim(μ l)	Konsantrasyon	Hacim(μ l)	Konsantrasyon
Saf Su	300	-	250	-
KH ₂ PO ₄ Tamponu (pH:7.6)	500	50 mM	500	Değişken
Homojenat	-	-	50	-
Substrat (GSSG)	100	2 mM	100	2 mM
Substrat (NADPH)	100	2 mM	100	2 mM
Toplam	1000		1000	

Çizelge 2.3. Tris tampon optimizasyonu için kontrol ve numune küvet içerikleri

Stok aktivite ölçüm çözeltileri	Kontrol Küveti		Numune Küveti	
	Hacim(μ l)	Konsantrasyon	Hacim(μ l)	Konsantrasyon
Saf Su	300	-	250	-
Tris Tamponu (pH:7.6)	500	50 mM	500	Değişken
Homojenat	-	-	50	-
Substrat (GSSG)	100	2 mM	100	2 mM
Substrat (NADPH)	100	2 mM	100	2 mM
Toplam	1000		1000	

2.2.3.2. Soya tohumundan saflaştırılan glutatyon redüktaz enzimi için optimum pH değerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar

Tampon optimizasyonu sonucunda her iki tamponda en yüksek aktivite gösteren tampon konsantrasyonları pH optimizasyonunda kullanıldı. Tris tamponu 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5 ve 10 pH değerlerinde hazırlandı ve aktivite ölçümleri yapıldı. KH₂PO₄ tamponu

5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5 ve 8 pH değerlerinde hazırlandı ve aktivite ölçümleri yapıldı. pH optimizasyonu için kontrol ve numune küvet içerikleri Çizelge 2.4. ve 2.5.'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.4. pH optimizasyonu (Tris) için kontrol ve numune küvet içerikleri

Stok aktivite ölçüm çözeltileri	Kontrol Küveti		Numune Küveti	
	Hacim(μ l)	Konsantrasyon	Hacim(μ l)	Konsantrasyon
Saf Su	300	-	250	-
Tris (pH değişken)	500	300 mM	500	300 mM
Homojenat	-	-	50	-
Substrat (GSSG)	100	2 mM	100	2 mM
Substrat (NADPH)	100	2 mM	100	2 mM
Toplam	1000		1000	

Çizelge 2.4. pH optimizasyonu (KH_2PO_4) için kontrol ve numune küvet içerikleri

Stok aktivite ölçüm çözeltileri	Kontrol Küveti		Numune Küveti	
	Hacim(μ l)	Konsantrasyon	Hacim(μ l)	Konsantrasyon
Saf Su	300	-	250	-
KH_2PO_4 (pH değişken)	500	300 mM	500	300 mM
Homojenat	-	-	50	-
Substrat (GSSG)	100	2 mM	100	2 mM
Substrat (NADPH)	100	2 mM	100	2 mM
Toplam	1000		1000	

2.2.3.3. Soya tohumundan saflaştırılan glutatyon redüktaz enzimi için optimum substrat miktarının belirlenmesine yönelik çalışmalar

Optimizasyon sonucu seçilen optimum tampon konsantrasyon ve optimum pH'daki tampon ile; 20 µl, 40 µl, 60 µl, 70 µl, 80 µl, 90 µl, 100µl, 120µl, 140µl NADPH substratı kullanılarak aktivite ölçümleri yapıldı. Yapılan ölçümlerde saf su ve NADPH substratının toplam hacmi 395 µl olacak şekilde ayarlandı. Substrat optimizasyonu için kontrol ve numune küvet içerikleri Çizelge 2.5.'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.5. Substrat optimizasyonu için kontrol ve numune küvet içerikleri

Stok aktivite ölçüm çözeltileri	Kontrol Küveti		Numune Küveti	
	Hacim(µl)	Konsantrasyon	Hacim(µl)	Konsantrasyon
Saf Su	300	-	Değişken	-
Tris (pH: 8,5)	500	300 mM	500	300 mM
Homojenat	-	-	5	-
Substrat (GSSG)	100	2 mM	100	2 mM
Substrat (NADPH)	100	2 mM	Değişken	2 mM
Toplam	1000		1000	

2.2.4. Soya tohumundan saflaştırılan glutatyon redüktaz enzimiyle ilgili yapılan kinetik çalışmalar

2.2.4.1. Bazı metal iyonlarının soya tohumundan saflaştırılan glutatyon redüktaz enzimi aktivitesi üzerine inhibitör etkilerinin belirlenmesi

Soya tohumu GR enzim aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının inhibitör etkilerini belirlemek amacıyla Ag(NO₃), Mn(NO₃)₂, Cd(NO₃)₂, Cu(NO₃)₂, Zn(NO₃)₂, Ni(NO₃)₂, Cr(NO₃)₃, Mg(NO₃)₂ ve BaCl₂ çözeltileri stok olarak hazırlandı. Kullanılan metal iyonlarının farklı konsantrasyonlarını oluşturmak için stok çözeltiler seyreltildi. Yapılan ölçümlerde inhibisyonu incelenen çözelti ve suyun toplam hacmi 500 µl olacak şekilde ayarlandı. Her bir metal iyonunun küvetteki miktarı değiştirilerek ve farklı konsantrasyonları denenerek enzim aktivitesine etkileri spektrofotometre

yardımıyla 340 nm'de 3 dakika süreyle ölçüldü. GR enzimi için inhibitörlü ve inhibitörsüz ortamdaki aktivite ölçüm küvet içeriği Çizelge 2.6.'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.6. İnhibisyon etkileri ölçülürken kontrol ve numune küvet içerikleri

Stok aktivite ölçüm çözeltileri	Kontrol Küveti		Numune Küveti	
	Hacim(μ l)	Konsantrasyon	Hacim(μ l)	Konsantrasyon
Saf Su	310	-	Değişken	-
300 mM Tris (pH: 8,5)	500	150 mM	500	150 mM
Enzim numunesi	-	-	100	-
Ağır metal çözeltisi	-	-	Değişken	Değişken
2 mM GSSG	100	0.2 mM	100	0.2 mM
2 mM NADPH	90	0.18 mM	90	0.18 mM
Toplam	1000		1000	

2.2.4.2. İnhibitör etkisi gösteren metal iyonları için I_{50} değerlerinin belirlenmesi

Bu çalışma kapsamında soya tohumunda afinite kromatografisiyle saflaştırılan GR enzimi aktivitesi üzerine etkileri araştırıldı. Enzimi inhibe eden $Ag(NO_3)$, $Mn(NO_3)_2$, $Cd(NO_3)_2$, $Cu(NO_3)_2$, $Zn(NO_3)_2$, $Ni(NO_3)_2$, $Cr(NO_3)_3$, $Mg(NO_3)_2$ ve $BaCl_2$ kimyasal maddeler için sabit substrat konsantrasyonunda beş farklı inhibitör konsantrasyonu kullanılarak % aktivite-[I] grafikleri çizilerek belirlendi (Şekil 3.2. – 3.10.). Bu grafiklerin eğri denklemlerinden yararlanılarak I_{50} (Enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu) değerleri hesaplanmıştır. I_{50} değerleri belirlenirken kullanılan küvetteki çözeltilerin miktarları ve inhibitör konsantrasyonları Çizelge 2.7. – 2.15. 'da gösterilmiştir.

Çizelge 2.7. Soya tohumundan saflaştırılan GR enzimi üzerinde $\text{Ag}(\text{NO}_3)$ 'ın I_{50} değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Saf su (μl)	Tampon TRIS (300 mM) (μl)	Diyaliz sonrası enzim (μl)	İnhibitör $\text{Ag}(\text{NO}_3)$ (μl)	İnhibitör kons. (mM)	GSSG (μl)	NADPH (μl)	Top. Hacim (ml)
210	490	100	10	0.00010	100	90	1
210	480	100	20	0.00020	100	90	1
210	475	100	25	0.00025	100	90	1
210	470	100	30	0.00030	100	90	1
210	460	100	40	0.00040	100	90	1

Çizelge 2.8. Soya tohumundan saflaştırılan GR enzimi üzerinde $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$ 'ın I_{50} değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Saf su (μl)	Tampon TRIS (300 mM) (μl)	Diyaliz sonrası enzim (μl)	İnhibitör $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$ (μl)	İnhibitör kons. (mM)	GSSG (μl)	NADPH (μl)	Top. Hacim (ml)
210	490	100	10	1.1	100	90	1
210	480	100	20	2.2	100	90	1
210	470	100	30	3.3	100	90	1
210	460	100	40	4.4	100	90	1
210	450	100	50	5.5	100	90	1

Çizelge 2.9. Soya tohumundan saflaştırılan GR enzimi üzerinde $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ 'ın I_{50} değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Saf su (μl)	Tampon TRİS (300 mM) (μl)	Diyaliz sonrası enzim (μl)	İnhibitör $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ (μl)	İnhibitör kons. (mM)	GSSG (μl)	NADPH (μl)	Top. Hacim (ml)
210	495	100	10	0.0005	100	90	1
210	490	100	20	0.0010	100	90	1
210	485	100	30	0.0015	100	90	1
210	475	100	40	0.0020	100	90	1
210	470	100	50	0.0030	100	90	1

Çizelge 2.10. Soya tohumundan saflaştırılan GR enzimi üzerinde $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 'ın I_{50} değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Saf su (μl)	Tampon TRİS (300 mM) (μl)	Diyaliz sonrası enzim (μl)	İnhibitör $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ (μl)	İnhibitör kons. (mM)	GSSG (μl)	NADPH (μl)	Top. Hacim (ml)
210	495	100	5	0.05	100	90	1
210	490	100	10	0.10	100	90	1
210	480	100	20	0.20	100	90	1
210	450	100	50	0.50	100	90	1
210	425	100	75	0.75	100	90	1

Çizelge 2.11. Soya tohumundan saflaştırılan GR enzimi üzerinde $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ 'ın I_{50} değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Saf su (μl)	Tampon TRİS (300 mM) (μl)	Diyaliz sonrası enzim (μl)	İnhibitör $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ (μl)	İnhibitör kons. (mM)	GSSG (μl)	NADPH (μl)	Top. Hacim (ml)
210	495	100	5	0.005	100	90	1
210	493	100	7	0.007	100	90	1
210	490	100	10	0.010	100	90	1
210	480	100	20	0.020	100	90	1
210	460	100	40	0.040	100	90	1

Çizelge 2.12. Soya tohumundan saflaştırılan GR enzimi üzerinde $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ 'ın I_{50} değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Saf su (μl)	Tampon TRİS (300 mM) (μl)	Diyaliz sonrası enzim (μl)	İnhibitör $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ (μl)	İnhibitör kons. (mM)	GSSG (μl)	NADPH (μl)	Top. Hacim (ml)
210	495	100	5	0.05	100	90	1
210	490	100	10	0.10	100	90	1
210	485	100	15	0.15	100	90	1
210	480	100	20	0.20	100	90	1
210	450	100	50	0.50	100	90	1

Çizelge 2.13. Soya tohumundan saflaştırılan GR enzimi üzerinde $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$ 'ün I_{50} değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Saf su (μl)	Tampon TRİS (300 mM) (μl)	Diyaliz sonrası enzim (μl)	İnhibitör $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$ (μl)	İnhibitör kons. (mM)	GSSG (μl)	NADPH (μl)	Top. Hacim (ml)
210	490	100	10	1.0	100	90	1
210	480	100	20	2.0	100	90	1
210	475	100	25	2.5	100	90	1
210	470	100	30	3.0	100	90	1
210	460	100	40	4.0	100	90	1

Çizelge 2.14. Soya tohumundan saflaştırılan GR enzimi üzerinde $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 'ın I_{50} değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Saf su (μl)	Tampon TRİS (300 mM) (μl)	Diyaliz sonrası enzim (μl)	İnhibitör $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ (μl)	İnhibitör kons. (mM)	GSSG (μl)	NADPH (μl)	Top. Hacim (ml)
210	495	100	5	0.5	100	90	1
210	490	100	10	1.0	100	90	1
210	470	100	30	3.0	100	90	1
210	450	100	50	5.0	100	90	1
210	425	100	75	7.5	100	90	1

Çizelge 2.15. Soya tohumundan saflaştırılan GR enzimi üzerinde BaCl₂'ün I₅₀ değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Saf su (µl)	Tampon TRİS (300 mM) (µl)	Diyaliz sonrası enzim (µl)	İnhibitör BaCl ₂ (µl)	İnhibitör kons. (mM)	GSSG (µl)	NADPH (µl)	Top. Hacim (ml)
210	495	100	5	0.5	100	90	1
210	490	100	10	1.0	100	90	1
210	485	100	15	1.5	100	90	1
210	480	100	20	2.0	100	90	1
210	470	100	30	3.0	100	90	1

3. BULGULAR

3.1. Soya Tohumu GR Enziminin Saflaştırılması Sonuçları

3.1.1. Amonyum sülfat çöktürmesi sonuçları

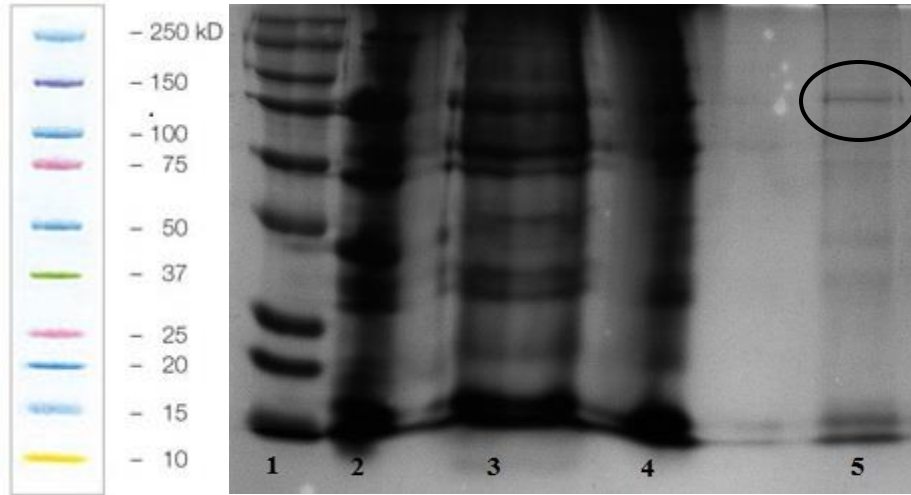
Soya tohumundan GR enzimini saflaştırmak için bölüm 2.2.2.1.'de anlatıldığı gibi hazırlanan homojenat bölüm 2.2.2.2.'de anlatıldığı gibi sırasıyla %0-40 ve %40-60 aralıklarında amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı (Erat, 2004). Elde edilen çökelek optimum tampon (300 mM Tris) çözeltisinde çözülerek bir sonraki işleme hazır hale getirildi. Bölüm 2.2.1.'de anlatıldığı gibi yapılan aktivite ölçümleri sonucunda en yüksek aktivite gösteren değer %40-60 amonyum sülfat doygunluğunda yakalandı. Daha sonra numune diyaliz edilip tekrar aktivite ölçümü yapıldı.

3.1.2. Afinite kromatografisi sonuçları

Diyaliz edilen numune afinite kolonuna tatbik edildi. Uygun tamponla elüsyon sonucu elde edilen elüatların aktivite değerleri ölçüldü.

3.2. Soya Tohumundan Saflaştırılan GR Enziminin Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) İle Saflık Kontrolü

Soya tohumundan elde edilen GR enzimi numunelerinin, homojenat, amonyum sülfat çökeleği ve afinite kromatografisi sonucu elde edilen elüatlardaki enzimlerin saflığını kontrol etmek için SDS-PAGE yöntemi kullanıldı. Bu amaçla bölüm 2.2.2.4.'de anlatılan elektrofrez sistemi kurularak enzim numuneleri sırayla kuyulara uygulandı ve yürütüldü. Elde edilen bantları ve standart proteini gösteren fotoğraf Şekil 3.1.'de gösterildi. Glutatyon redüktaz enzimi SDS poliakrilamid jel elektrofrezinde yaklaşık 75 kDa molekül ağırlığında görüntüledi.



Şekil 3.1. SDS-PAGE yöntemi ile soya tohumu glutasyon redüktaz enziminin alt birim molekül ağırlığının belirlenmesi 1: Standart Proteinler, 2: Homojenat, 3: Amonyum sülfat çökürme (%40-60, çökelek), 4: Diyaliz sonrası, 5: Afinité Kromatografisi

3.3. Soya Tohumundan Saflaştırılan GR Enziminin Optimum Şartlarının Belirlenmesi Yönelik Sonuçlar

3.3.1. Soya tohumundan saflaştırılan GR enziminin optimum iyonik şiddetin belirlenmesine yönelik sonuçlar

Soya tohumu GR enzim aktivitesi için en uygun iyonik şiddetin belirlenmesi amacıyla önceki çalışmalarla uygunluğu belirlenen Tris ve KH_2PO_4 tamponlarının değişik konsantrasyonlardaki çözeltileri bölüm 2.2.3.1.'de anlatıldığı gibi hazırlandı. Farklı Tris ve KH_2PO_4 konsantrasyonlarında aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen değerler çizelge 3.1. ve 3.2.'de gösterildi. Yapılan çalışmalar sonucu soya tohumu GR enzimi için en uygun iyonik şiddetin 300 mM Tris tamponu olarak tespit edildi.

Çizelge 3.1. Soya tohumu GR enzimi optimum iyonik şiddet için Tris tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

[mM]	10	20	30	40	50	100	200	300	400	800	1000
% Aktivite	19.1	31.3	40	34.8	53.0	79.1	87.8	100	67.6	60.9	55.6

Çizelge 3.2. Soya tohumu GR enzimi optimum iyonik şiddet için KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

[mM]	10	20	30	40	50	100	200	300	400	800	1000
% Aktivite	39.4	48.1	56.7	66.3	72.1	83.7	90.4	100	94.2	94.2	91.3

3.3.2. Soya tohumundan saflaştırılan GR enziminin optimum pH değerinin belirlenmesine yönelik sonuçlar

Soya tohumu GR enzimi optimum pH'sı bölüm 2.2.3.2.'de anlatıldığı şekilde; pH'sı 7.5-9.0 aralığında 300 mM Tris ve pH'sı 5.5-8.0 aralığında 300 mM potasyum fosfat tampon çözeltileri kullanılarak enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak belirlendi. Elde edilen değerler çizelge 3.3. ve 3.4.'de gösterilmiştir. Soya tohumu GR enzimi için optimum pH, 300 mM Tris pH=8.5 tamponu olarak belirlendi.

Çizelge 3.3. Soya tohumu GR enzimi optimum pH değeri için Tris (300 mM) tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

pH	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	9.5	10.0
%Aktivite	36.9	29.8	53.6	100.0	89.3	96.4	42.9

Çizelge 3.4. Soya tohumu GR enzimi optimum pH değeri için KH_2PO_4 (300 mM) tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

pH	5	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0
%Aktivite	-	-	-	31.0	45.5	63.6	100.0

3.3.3. Soya tohumundan saflaştırılan GR enziminin optimum substrat miktarının belirlenmesine yönelik sonuçlar

Soya tohumu GR enzimi optimum substrat miktarı bölüm 2.2.3.3.'de anlatıldığı şekilde; 20 – 140 µl miktar aralığında optimum pH'daki optimum tampon çözeltisi kullanılarak aktivite ölçümü yapıldı. Elde edilen değerler çizelge 3.5.'de gösterilmiştir. Soya tohumu GR enzimi için optimum substrat miktarı 300 mM Tris (pH=8.5) tamponunda 90 µl olarak belirlendi.

Çizelge 3.5. Soya tohumu GR enzimi optimum substrat miktarı için 300 mM Tris (pH=8.5) tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

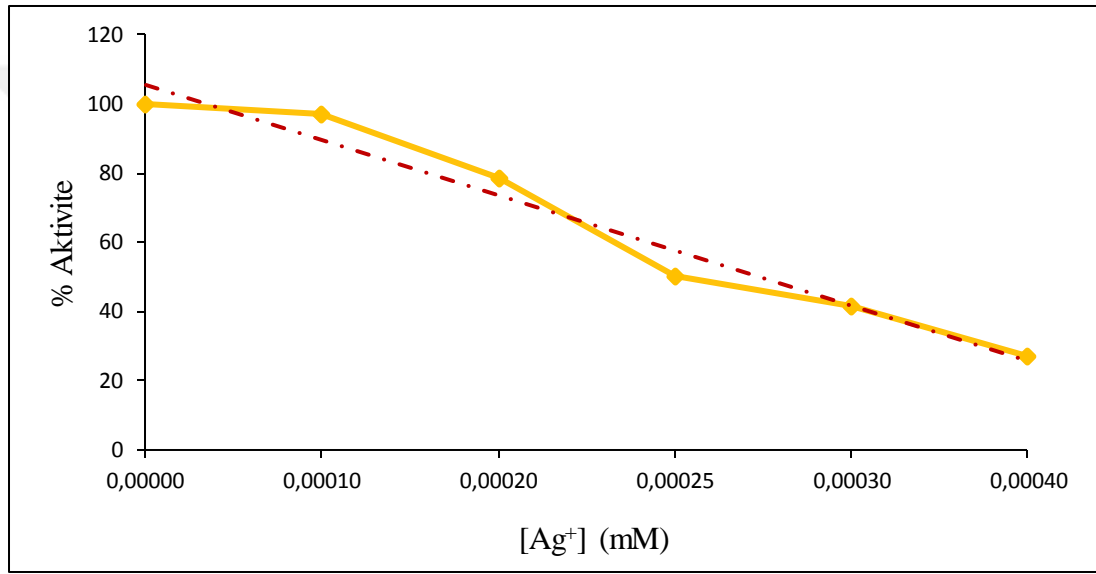
NADPH (µl)	20	40	60	70	80	90	100	120	140
% Aktivite	60.0	58.6	53.4	65.7	78.6	100.0	72.9	67.1	70.0

3.4. Soya Tohumundan Saflaştırılan GR Enzimi Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının İnhibitör Etkilerinin Sonuçları

Soya tohumundan elde edilen diyaliz numunesinde bulunan GR enzimi aktivitesi üzerine $\text{Ag}(\text{NO}_3)$, $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ ve BaCl_2 metal iyonlarının etkilerini belirlemek amacıyla bu metallerin stok çözeltileri hazırlandı ve soya tohumu GR enzim aktivitesi üzerine etkileri araştırıldı. Araştırma sonucunda elde edilen inhibisyon etkileri Çizelge 3.6. – 3.14.'de gösterilmiştir. Ayrıca metallerin farklı konsantrasyonlarına karşı bulunan % aktivite değerleri kullanılarak hazırlanan % aktivite grafikleri şekil 3.2. – 3.10.'da ve hesaplanan I_{50} değerleri Çizelge 3.15.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.6. Gümüş'ün soya tohumu GR enzim aktivitesi üzerine etkisi

Konsantrasyon (mM)	% Aktivite
0.00000	100.00
0.00010	97.14
0.00020	78.57
0.00025	50.00
0.00030	41.42
0.00040	27.14

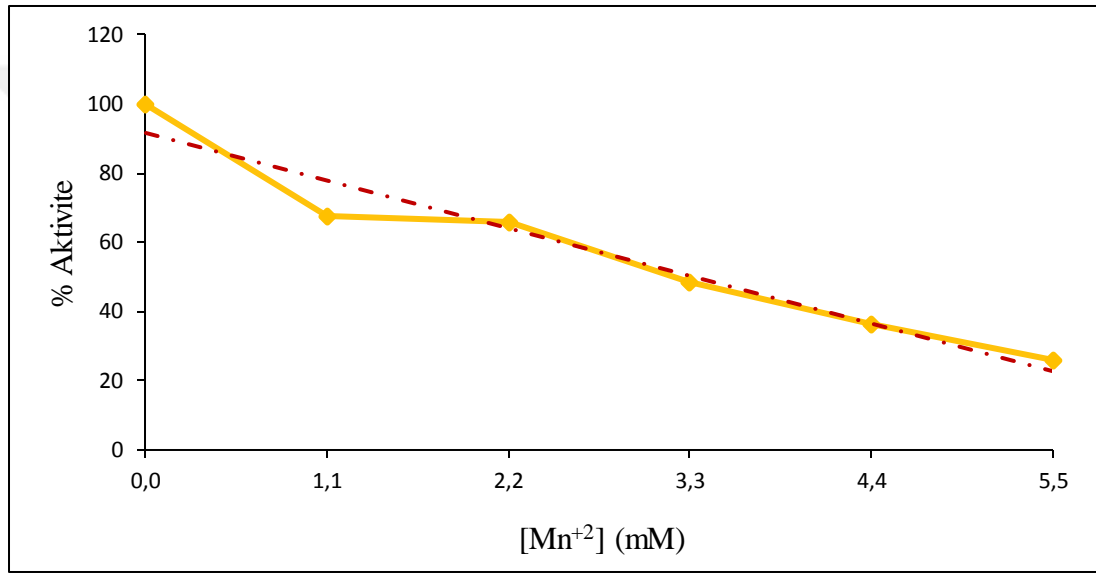


Şekil 3.2. Gümüş'ün soya tohumu GR enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 3.6.'da verilen deneysel sonuçlara göre 0.0001 ile 0.0004 mM aralığındaki konsantrasyonlarda Ag⁺ ağır metalinin, 0.18 mM NADPH substratı varlığındaki % Aktivite-[I] grafiği Şekil 3.2.'deki gibi çizilmiştir. Grafikteki doğru denkleminde yararlanarak soya glutatyon redüktaz enzim aktivitesi üzerine Ag⁺ ağır metalinin I₅₀ değeri 0.00025 mM olduğu bulunmuştur.

Çizelge 3.7. Mangan'ın soya tohumu GR enzim aktivitesi üzerine etkisi

Konsantrasyon (mM)	% Aktivite
0.0	100.00
1.1	67.74
2.2	65.59
3.3	48.38
4.4	36.55
5.5	25.80

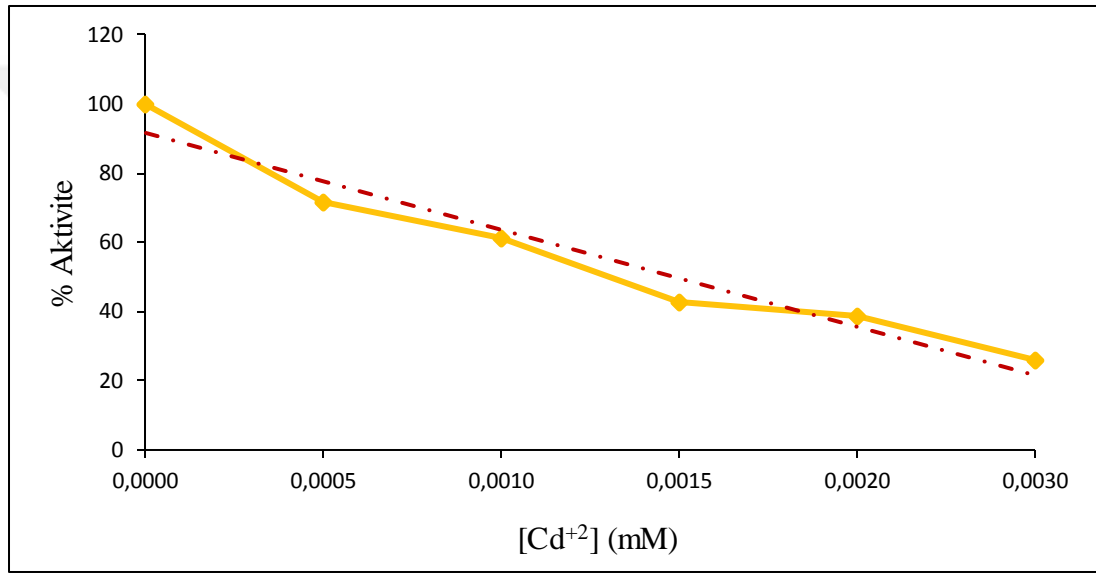


Şekil 3.3. Mangan'ın soya tohumu GR enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 3.7.'de verilen deneysel sonuçlara göre 1.1 ile 4.4 mM aralığındaki konsantrasyonlarda Mn²⁺ ağır metalinin, 0.18 mM NADPH substratı varlığındaki % Aktivite-[I] grafiği Şekil 3.3.'deki gibi çizilmiştir. Grafikteki doğru denkleminde yararlanarak soya glutatyon redüktaz enzim aktivitesi üzerine Mn²⁺ ağır metalinin I₅₀ değeri 3.305 mM olduğu bulunmuştur.

Çizelge 3.8. Kadmiyum'un soya tohumu GR enzim aktivitesi üzerine etkisi

Konsantrasyon (mM)	% Aktivite
0.0000	100.00
0.0005	71.42
0.0010	61.42
0.0015	42.85
0.0020	38.57
0.0030	25.71

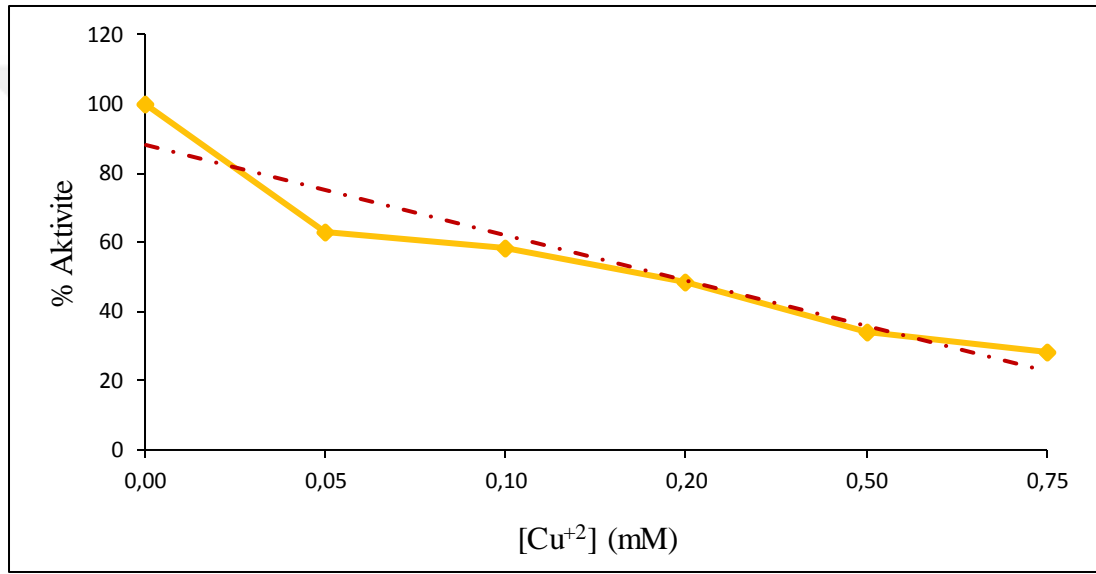


Şekil 3.4. Kadmiyum'un soya tohumu GR enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 3.8.'de verilen deneysel sonuçlara göre 0.0005 ile 0.003 mM aralığındaki konsantrasyonlarda Cd²⁺ ağır metalinin, 0.18 mM NADPH substratı varlığındaki % Aktivite-[I] grafiği Şekil 3.4.'deki gibi çizilmiştir. Grafikteki doğru denkleminen yararlanarak soya glutatyon redüktaz enzim aktivitesi üzerine Cd²⁺ ağır metalinin I₅₀ değeri 0.0016 mM olduğu bulunmuştur.

Çizelge 3.9. Bakır'ın soya tohumu GR enzim aktivitesi üzerine etkisi

Konsantrasyon (mM)	% Aktivite
0.00	100.00
0.05	62.85
0.10	58.57
0.20	48.57
0.50	34.28
0.75	28.24

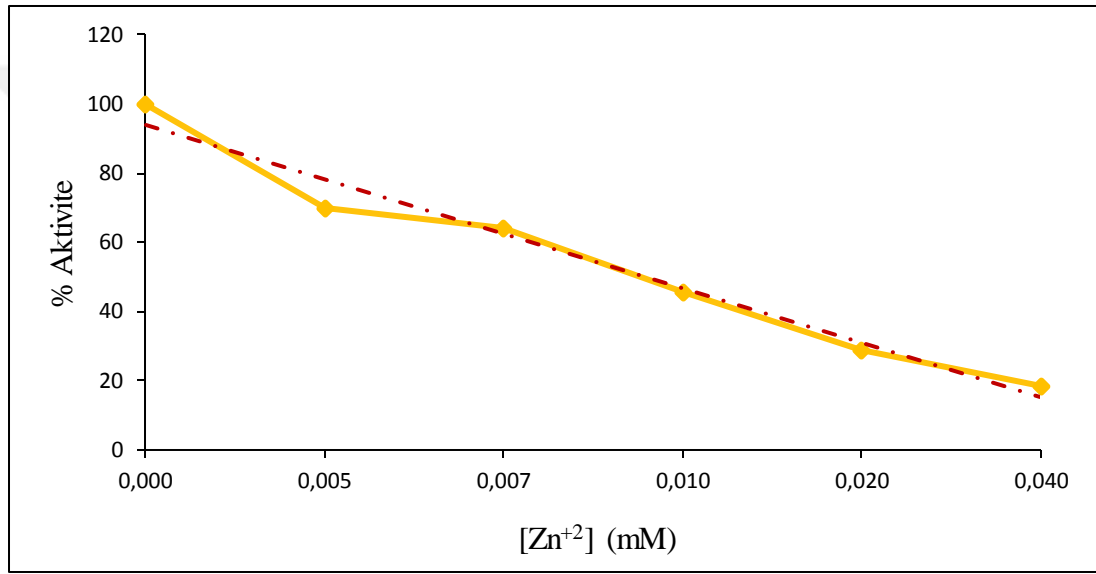


Şekil 3.5. Bakır'ın soya tohumu GR enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 3.9.'da verilen deneysel sonuçlara göre 0.05 ile 0.75 mM aralığındaki konsantrasyonlarda Cu²⁺ ağır metalinin, 0.18 mM NADPH substratı varlığındaki % Aktivite-[I] grafiği Şekil 3.5.'deki gibi çizilmiştir. Grafikteki doğru denkleminde yararlanarak soya glutatyon redüktaz enzim aktivitesi üzerine Cu²⁺ ağır metalinin I₅₀ değeri 0.318 mM olduğu bulunmuştur.

Çizelge 3.10. Çinko'nun soya tohumu GR enzim aktivitesi üzerine etkisi

Konsantrasyon (mM)	% Aktivite
0.000	100.00
0.005	70.00
0.007	64.28
0.010	45.71
0.020	28.57
0.040	18.57

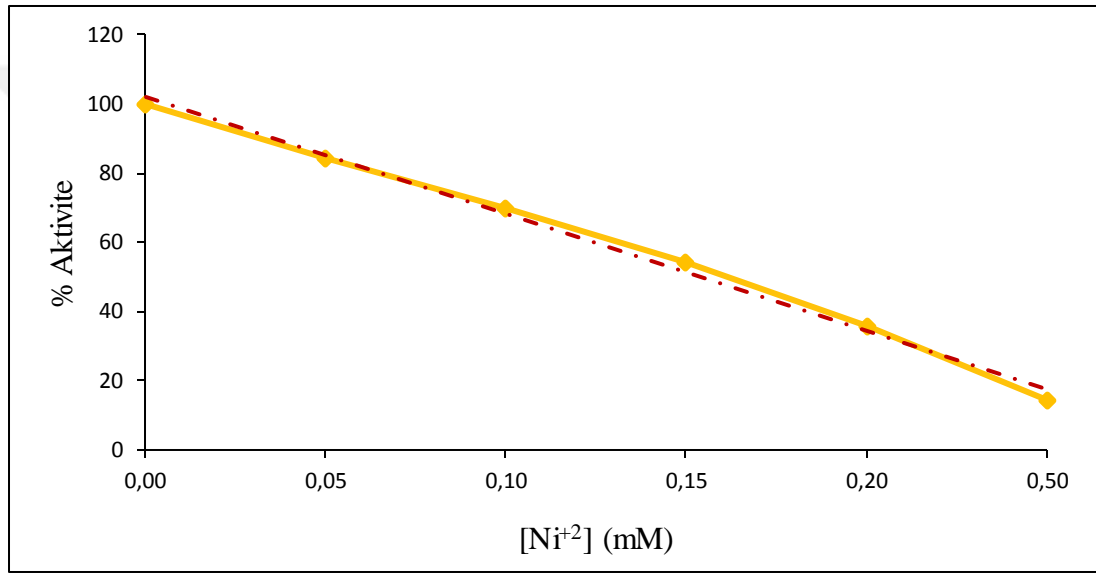


Şekil 3.6. Çinko'nun soya tohumu GR enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 3.10.'da verilen deneysel sonuçlara göre 0.005 ile 0.04 mM aralığındaki konsantrasyonlarda Zn²⁺ ağır metalinin, 0.18 mM NADPH substratı varlığındaki % Aktivite-[I] grafiği Şekil 3.6.'deki gibi çizilmiştir. Grafikteki doğru denkleminden yararlanarak soya glutatyon redüktaz enzim aktivitesi üzerine Zn²⁺ ağır metalinin I₅₀ değeri 0.015 mM olduğu bulunmuştur.

Çizelge 3.11. Nikel'in soya tohumu GR enzim aktivitesi üzerine etkisi

Konsantrasyon (mM)	% Aktivite
0.00	100.00
0.05	84.28
0.10	70.00
0.15	54.28
0.20	35.71
0.50	14.28

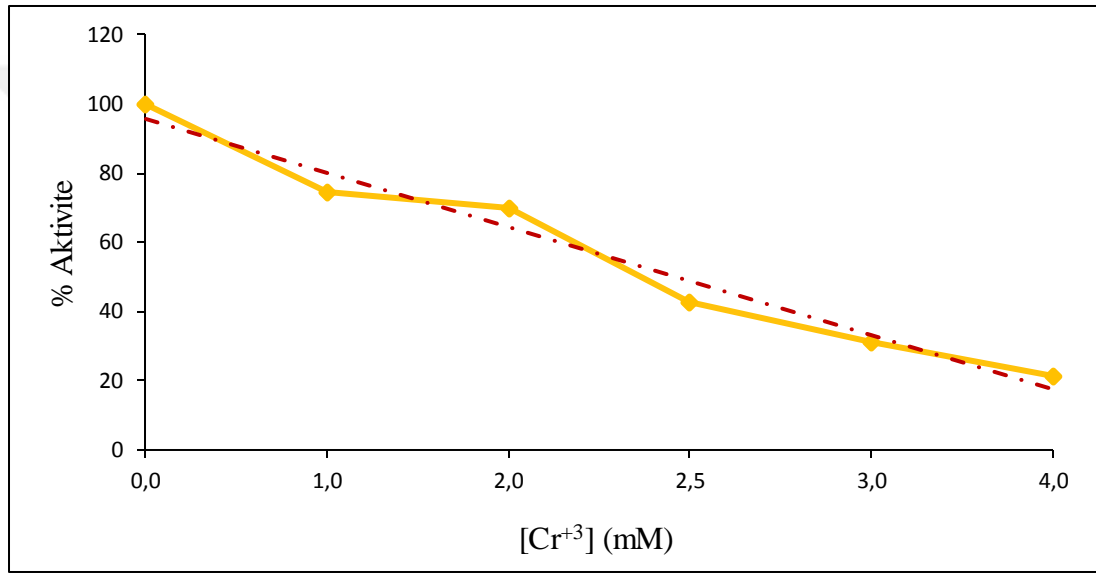


Şekil 3.7. Nikel'in soya tohumu GR enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 3.11.'de verilen deneysel sonuçlara göre 0.05 ile 0.5 mM aralığındaki konsantrasyonlarda Ni²⁺ ağır metalinin, 0.18 mM NADPH substratı varlığındaki % Aktivite-[I] grafiği Şekil 3.7.'deki gibi çizilmiştir. Grafikteki doğru denkleminden yararlanarak soya glutatyon redüktaz enzim aktivitesi üzerine Ni²⁺ ağır metalinin I₅₀ değeri 0.21 mM olduğu bulunmuştur.

Çizelge 3.12. Krom'un soya tohumu GR enzim aktivitesi üzerine etkisi

Konsantrasyon (mM)	% Aktivite
0.0	100.00
1.0	74.28
2.0	70.00
2.5	42.85
3.0	31.42
4.0	21.42

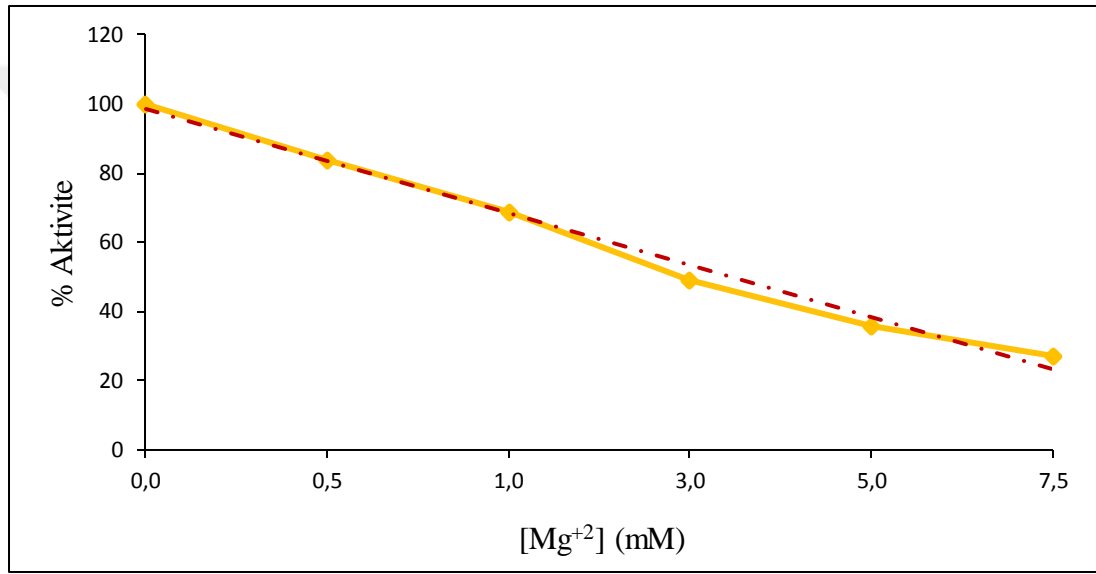


Şekil 3.8. Krom'un soya tohumu GR enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 3.12.'de verilen deneysel sonuçlara göre 1.0 ile 4.0 mM aralığındaki konsantrasyonlarda Cr^{+3} ağır metalinin, 0.18 mM NADPH substratı varlığındaki % Aktivite-[I] grafiği Şekil 3.8.'deki gibi çizilmiştir. Grafikteki doğru denkleminden yararlanarak soya glutasyon redüktaz enzim aktivitesi üzerine Cr^{+3} ağır metalinin I_{50} değeri 2.394 mM olduğu bulunmuştur.

Çizelge 3.13. Magnezyum'un soya tohumu GR enzim aktivitesi üzerine etkisi

Konsantrasyon (mM)	% Aktivite
0.0	100.00
0.5	83.56
1.0	68.49
3.0	49.31
5.0	35.61
7.5	27.39

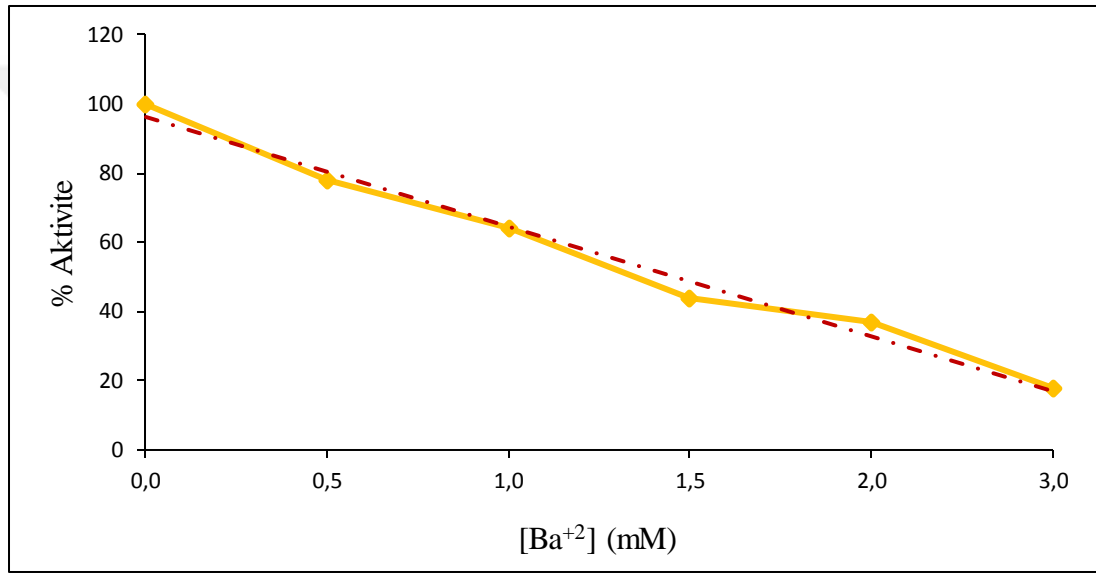


Şekil 3.9. Magnezyum'un soya tohumu GR enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 3.13.'de verilen deneysel sonuçlara göre 0.5 ile 7.5 mM aralığındaki konsantrasyonlarda Mg²⁺ ağır metalinin, 0.18 mM NADPH substratı varlığındaki % Aktivite-[I] grafiği Şekil 3.9.'deki gibi çizilmiştir. Grafikteki doğru denkleminden yararlanarak soya glutatyon redüktaz enzim aktivitesi üzerine Mg⁺ ağır metalinin I₅₀ değeri 3.881 mM olduğu bulunmuştur.

Çizelge 3.14. Baryum'un soya tohumu GR enzim aktivitesi üzerine etkisi

Konsantrasyon (mM)	% Aktivite
0.0	100.00
0.5	78.08
1.0	64.38
1.5	43.83
2.0	36.98
3.0	17.80



Şekil 3.10. Baryum'un soya tohumu GR enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 3.14.'de verilen deneysel sonuçlara göre 0.5 ile 3.0 mM aralığındaki konsantrasyonlarda Ba²⁺ ağır metalinin, 0.18 mM NADPH substratı varlığındaki % Aktivite-[I] grafiği Şekil 3.10.'deki gibi çizilmiştir. Grafikteki doğru denkleminden yararlanarak soya glutasyon redüktaz enzim aktivitesi üzerine Ba⁺ ağır metalinin I₅₀ değeri 1.576 mM olduğu bulunmuştur.

Çizelge 3.15. Soya tohumu GR enzimi için metal iyonlarına ait I₅₀ değerleri

İnhibitör	I₅₀ (mM)
Mg²⁺	3.881
Mn²⁺	3.305
Cr³⁺	2.394
Ba²⁺	1.576
Cu²⁺	0.318
Ni²⁺	0.21
Zn²⁺	0.015
Cd²⁺	0.0016
Ag⁺	0.00025

4. TARTIŞMA

Glutasyon (GSH) birçok önemli fonksiyona sahiptir. Örneğin, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda yer alan ve izomerizasyon reaksiyonlarında bir kofaktör görevi gören bir antioksidandır. Glutasyon, proteinlerin sentezinde ve bozunmasında, enzimlerin düzenlenmesinde, deoksiribonükleik asit (DNA) öncülleri olan deoksiribonükleotid oluşumunda ve hücrelerin serbest radikallere ve reaktif oksijen türlerine karşı korunmasında önemli bir role sahiptir. Glutasyon redüktaz (GR), glutasyon disülfürün (GSSG), NADPH pahasına indirgenmesini katalize eder. Glutasyon redüktaz enzimi GSH/GSSG oranını yüksek tutarak protein ve DNA biosentezinin yanı sıra reaktif oksijen türlerinin detoksifikasyonu gibi hücrenin birkaç hayati fonksiyonunun devamlılığını sağlar (Çakmak vd, 2011).

Glutasyon redüktaz enzimi üzerine bu öneminden dolayı çok sayıda çalışma yapılmış, birçok kaynaktan saflaştırılmış ve biyokimyasal özellikleri incelenmiştir. Okside glutasyonun indirgenmesini katalizleyen ve glutasyon redüktaz olarak adlandırılan enzimin varlığı 1951'de bezelye ve buğday tohumlarında (Conn & Vennesland, 1951; Mapson & Goddard, 1951), 1952'de hayvan dokularında gösterilmiştir (Rall & Lehninger, 1952). Enzimin doğası ve özellikleri üzerine ilk detaylı çalışma ise 1963 yılında çimlenmiş bezelyelerde gerçekleştirilmiştir (Mapson & Isherwood, 1963). Bunun dışında *Ricinus communis* endospermide (Klapheck vd, 1990) ve bitki köklerinde sitozol ve mitokondride enzim aktivitesine rastlanmıştır (Bielawski & Joy, 1986). Bazı kaynaklardan elde edilen enzimin aminoasit dizilimi ve aktif bölgeleri belirlenmiştir. İnsan, fare, bazı bitki ve bakteri hücrelerinden GR cDNA'ları elde edilmiş ve bazı biyokimyasal çalışmalar yapılmıştır (Jiang vd, 1995).

Bu çalışmada, tüm organizmalarda önemli işlevi olan glutasyon redüktaz enzimi soya tohumundan saflaştırılmış ve bazı karakteristik özellikleri incelenmiştir. Saflaştırma işleminde amonyum sülfat çöktürmesi ve ardından afinite kromatografisi yöntemleri uygulanmıştır. Saflaştırılan enzimin kinetik özellikleri incelenmiş ve bazı ağır metallerin enzim aktivitesi üzerine etkileri belirlenmiştir.

Soya tohumundan toplam GR enzimi saflaştırılması için ilk önce homojenat hazırlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra literatür bilgilerine dayanılarak %0-

60 aralığında amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz yaptıktan sonra numune 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonuna tatbik edilmiştir. Saflaştırma işlemi sırasında sıcaklık kontrol altında tutularak tüm işlemler +4 °C'de gerçekleştirilmiştir. Bu şekilde aktivite kaybı mümkün olduğunca engellenmiştir.

Elde edilen soya tohumu homojenatlarına %0-40, %40-60 aralıklarında amonyum sülfat çöktürmeleri yapılarak GR enziminin %40-60 aralığında çöktüğü belirlenmiştir. Amonyum sülfat çöktürmesi yıllardır bilim insanları tarafından kullanılan kısmi saflaştırma yöntemidir. Bu yöntem aracılığıyla numune içerisindeki birçok safsızlıklar giderilir ve proteinler daha derişik hale getirilir. Afinite kromatografisinden önce amonyum sülfat çöktürmesi yapılması kolonuna tatbik edilecek çözeltideki GR konsantrasyonunun yüksek olması bakımından önemlidir. Sığır ve insan eritrositlerinden elde edilen GR enzimi için amonyum sülfat çöktürme aralığı %30-70, koyun beyini için %35-55 ve koyun karaciğeri için %0-60 olarak bulunmuştur. Amonyum sülfat çöktürmesi yapıldıktan sonra diyalizin yapılması afinite kromatografisinden önce ortamdaki iyonların uzaklaştırılması açısından önemlidir (Acan & Tezcan, 1989; Erat, 2002; Ulusu vd, 2005).

2',5'-ADP Sepharose 4B afinite jelinin NADPH bağımlı enzimleri bağlayabilme özelliğine sahip olduğu bilinmektedir. Afinite kolonuna bağlanan glukoz-6-fosfat dehidrogenaz ve 6-fosfoglukonat dehidrogenaz gibi enzimlerin giderilmesi saflaştırma işleminde saflık oranının ve veriminin artmasını sağlamaktadır. Oğus & Ozer (1998), örneği afinite kolonuna yükledikten sonra enzim ile bağı reçineyi kolon çıkıtısında 280 nm'deki absorbands 0.01'in altına düşene kadar 400 mM KP (pH 7.4) tamponu ile yıkadıklarında GR enzimi dışındaki diğler enzimlerden kurtulduklarını belirtmişlerdir. Bu çalışmada da afinite kolonuna diyaliz numunesi yüklendikten sonra kolona tutunan G6PD ve 6PGD gibi enzimlerin uzaklaştırılması amacıyla bölüm 2.1.3.3.'da belirtilen 0.1 M K-asetat/0,1 M K-fosfat (pH=7.85) ve 0.1 M K-fosfat/0.1 M KCl (pH=7.85) yıkama tamponları ile yıkama yapıldı. Afinite kolonundan GR' nin elüsyonu için 0.5 mM NADPH (pH=7.3) içeren elüsyon tamponu kullanıldı.

Soya tohumu GR'sinin moleköl ağırlığını saptayabilmek için SDS poliakrila mid jel elektroforezi yöntem kullanıldı (Şekil 3.1.). Çeşitli dokularda glutasyon redüktaz ile yapılan çalışmalarda glutasyon redüktaz enziminin çoğunlukla dimerik yapıda ve alt birim moleköl ağırlığının yaklaşık 41-70 kDa arasında olduğu belirtilmektedir

(Ogus & Tezcan, 1981; Acan & Tezcan, 1989; Ogus & Ozer, 1998; Gutterer vd, 1999; Willmore & Storey, 2007). Enzimin saflığının kontrolünde ve altbirim molekül ağırlığının saptanmasında Laemmli (1970) tarafından önerilen SDS poliakrilamid jel elektroforezi yönteminin değiştirilmiş şekli kullanıldı. SDS poliakrilamid jeli ile alt birim molekül ağırlığı yaklaşık 75 kDa olarak hesaplandı.

Yapılan işlemlerle enzimin optimum iyonik şiddeti 300 mM Tris tamponu olarak tespit edildi. Literatürde sığır eritrosit GR enzimi için optimum iyonik şiddet 435 mM fosfat tamponu, koyun karaciğeri için 50 mM Tris olarak bulunmuştur (Erat, 2002; Ulusu vd, 2005).

Farklı türlerden saflaştırılan GR'lerin optimum pH'sının 6.5-8.5 aralığında olduğu rapor edilmiştir (Açan, 1990; Ögüs & Özer, 1991; Ogus & Ozer, 1998; Willmore & Storey, 2007; Tekman vd, 2008). Çalışmamızda da soya tohum GR'sinin optimum pH'si 8.5 olarak saptandı.

Glutasyon redüktazın katalizlediği tepkimede, GSSG birinci substrat, koenzim NADPH ise ikinci substrat olarak belirtilmektedir. Soya tohumu GR enzimi için optimum NADPH miktarı yapılan ölçümler sonucunda 90 µl olarak bulunmuştur.

Çevremizde bulunan ağır metallerin biyolojik sistemler için yaşamsal önemi bulunmaktadır. Organizmanın ağır metal iyonlarına devamlı olarak maruz kalması hücrede antioksidan enzimlerin inhibisyonuna ve oksidatif hasara bağlı olarak hastalıklara neden olmaktadır.

Soya tohumundan saflaştırılan glutasyon redüktaz enzimi üzerine bazı metal iyonlarının inhibisyon etkisi incelendi. Bu amaçla $Ag(NO_3)$, $Mn(NO_3)_2$, $Cd(NO_3)_2$, $Cu(NO_3)_2$, $Zn(NO_3)_2$, $Ni(NO_3)_2$, $Cr(NO_3)_3$, $Mg(NO_3)_2$ ve $BaCl_2$ maddeleri ile çalışıldı. Bu çalışmada kullanılan tüm metal iyonlarının soya tohumu glutasyon redüktaz enziminin üzerine etkisi incelendiğinde, bu iyonların enzimi derişime bağlı olarak inhibe ettiği belirlenmiştir (Şekil 3.2. - 3.10.). Soya tohumundan saflaştırılan glutasyon redüktaz enzimi için I_{50} değerleri küçükten büyüğe doğru $Ag < Cd < Zn < Ni < Cu < Ba < Cr < Mn < Mg$ şeklindedir (Çizelge 3.15.).

5. SONUÇ

Bu çalışmada, soya tohumu GR'nin metal iyonları ile inhibe olduğu saptandı. GR hücrede antioksidan savunma sisteminin önemli bir enzimidir. GR aktivitesinin çeşitli ağır metallerle inhibisyonu organizmada olumsuz fizyolojik ve biyokimyasal etkiler yaratarak birçok patolojik durumun ortaya çıkışında etkin rol oynar.

Sonuç olarak çalışmamızda soya tohumu glutatyon redüktaz (GR) enzimi, 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi ile saflaştırılmış, enzimin saflığı ve alt biriminin molekül ağırlığı SDS-PAGE ile tespit edilmiş, enzimin bazı kinetik özellikleri belirlenmiş, çeşitli ağır metallerin enzim aktivitesine etkileri incelenmiştir. Soya tohumundan saflaştırılan GR enzimi hayati öneme sahip olan GSH/GSSG oranını kontrol altında tuttuğu için GR enzimini inhibe ederek bu dengeyi bozabilecek olan bu metallerin kullanımında son derece dikkatli olunmalı ve kullanımı kontrollü olmalıdır. Bu çalışma, özellikleri bakımından besin ve ekonomik değeri yüksek bir bitki olan soya bitkisinin tohumundan GR enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu, yapısal ve kinetik özellikleri aydınlatılmaya çalışılması bakımından bir ilk çalışmadır. Elde ettiğimiz sonuçların glutatyon redüktazın, soya tohumundaki işlevinin aydınlatılmasına katkıda bulunacağını umuyoruz. Çalışmamızın, bundan sonra yapılacak glutatyon redüktaz enzimi ile ilgili çalışmalara yardımcı olacağı düşüncesindeyiz.

KAYNAKLAR

- Acan N L & Tezcan E F (1989). Sheep brain glutathione reductase: purification and general properties. *FEBS Lett*, 250(1): 72-74. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2737302>
- Açan L (1990). Koyun beyni glutatyon redüktazının saflaştırılması ve bazı özelliklerinin incelenmesi. *Doktora Tezi, Ankara*
- Akın I (2004). Sığır Tırnak Hastalıkları. *Veteriner Cerrahi Dergisi*, 10(3-4): 54-61
- Aksoy M (2000). Beslenme Biyokimyası. *Hatipoğlu Yayınlar*, 126: 161
- Al-Qudah K M, Gharaibeh A A & Maysa'a M (2010). Trace minerals status and antioxidant enzymes activities in calves with dermatophytosis. *Biological trace element research*, 136(1): 40-47
- Al-Senaidy A (2010). Purification and characterization of glutathione reductase from camel (*Camelus dromedaries*) erythrocytes. *Eur J Sci Res*, 48(1): 142-154
- Anjum N A, Ahmad I, Mohmood I, Pacheco M, Duarte A C, Pereira E, . . . Iqbal M (2012). Modulation of glutathione and its related enzymes in plants' responses to toxic metals and metalloids—a review. *Environmental and Experimental Botany*, 75: 307-324
- Arthington J D (2000). *Essential trace minerals for grazing cattle in Florida*. University of Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agriculture Sciences,
- Ashraf M (2009). Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. *Biotechnology advances*, 27(1): 84-93
- Asri F Ö & Sönmez S (2006). Ağır metal toksisitesinin bitki metabolizması üzerine etkileri. *Derim*, 23(2): 36-45
- Athar M, Hasan S K & Srivastava R C (1987). Evidence for the involvement of hydroxyl radicals in nickel mediated enhancement of lipid peroxidation: implications for nickel carcinogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 147(3): 1276-1281
- Bakoğlu A & Ayçiçek M (2005). Elazığ şartlarında Soya Fasulyesinin (*Glycine Max L.*) tarımsal özellikleri ve tohum verimi. *FÜ Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*
- Bayşu Sözbilir N & Bayşu N (2008). *Biyokimya*. Güneş Tıp Kitapevleri, Ankara.
- Bielawski W & Joy K (1986). Reduced and oxidised glutathione and glutathione-reductase activity in tissues of *Pisum sativum*. *Planta*, 169(2): 267-272
- Bishop G M, Dringen R & Robinson S R (2007). Zinc stimulates the production of toxic reactive oxygen species (ROS) and inhibits glutathione reductase in astrocytes. *Free Radical Biology and Medicine*, 42(8): 1222-1230

- Bray C M & West C E (2005). DNA repair mechanisms in plants: crucial sensors and effectors for the maintenance of genome integrity. *New phytologist*, 168(3): 511-528
- Cabezas H, Raposo R R & Meléndez-Hevia E (1999). Activity and metabolic roles of the pentose phosphate cycle in several rat tissues. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 201(1-2): 57-63
- Can B, Erkmén G K, Dalmızrak O, Oğus I H & Ozer N (2010). Purification and characterisation of rat kidney glutathione reductase. *The protein journal*, 29(4): 250-256
- Carlberg I & Mannervik B (1981). Purification and characterization of glutathione reductase from calf liver. An improved procedure for affinity chromatography on 2',5'-ADP-Sepharose 4B. *Anal Biochem*, 116(2): 531-536. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7316181>
- Carlberg I & Mannervik B (1985). [59] Glutathione reductase. *Methods in enzymology*, 113: 484-490
- Champe P C, Harvey R A & Ferrier D R (2007). *Lippincott's Illustrated reviews serisinde: Biyokimya*. Nobel Tip Kitabevi, İstanbul.
- Chen L-M, Lin C C & Kao C H (2000). Copper toxicity in rice seedlings: changes in antioxidative enzyme activities, H₂O₂ level, and cell wall peroxidase activity in roots. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 41
- Ciftci M, Kufrevioglu O I, Gundogdu M & Ozmen I (2000). Effects of some antibiotics on enzyme activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes. *Pharmacological Research*, 41(1): 109-113. Retrieved from <Go to ISI>://WOS:000084376400016
- Conn E E & Vennesland B (1951). Glutathione reductase of wheat germ. *J Biol Chem*, 192(1): 17-28. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14917646>
- Contour-Ansel D, Torres-Franklin M L, De Carvalho M H C, D'Arcy-Lameta A & Zuily-Fodil Y (2006). Glutathione reductase in leaves of cowpea: cloning of two cDNAs, expression and enzymatic activity under progressive drought stress, desiccation and abscisic acid treatment. *Annals of botany*, 98(6): 1279-1287
- Costa M, Davidson T L, Chen H, Ke Q, Zhang P, Yan Y, . . . Kluz T (2005). Nickel carcinogenesis: epigenetics and hypoxia signaling. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 592(1): 79-88
- Couto N, Wood J & Barber J (2016). The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radical Biology and Medicine*, 95: 27-42
- Creissen G, Edwards E A, Enard C, Wellburn A & Mullineaux P (1992). Molecular characterization of glutathione reductase cDNAs from pea (*Pisum sativum* L.). *The Plant Journal*, 2(1): 129-131

- Creissen G P & Mullineaux P M (1995). Cloning and characterisation of glutathione reductase cDNAs and identification of two genes encoding the tobacco enzyme. *Planta*, 197(2): 422-425
- Çakmak R, Durdagi S, Ekinci D, Şentürk M & Topal G (2011). Design, synthesis and biological evaluation of novel nitroaromatic compounds as potent glutathione reductase inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 21(18): 5398-5402
- Çalışkan E (2005). Asi Nehri'nde Su, Sediment ve Karabalık (*Clarias gariepinus* Burchell, 1822)'ta Ağır Metal Birikiminin Araştırılması. Mustafa Kemal Üniversitesi. *Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*: 75
- Çınar Ö (2008). *Çevre kirliliği ve kontrolü*. Nobel Yayın Dağıtım,
- Davies K J (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *Journal of Biological Chemistry*, 262(20): 9895-9901
- de Lamotte F, Vianey-Liaud N, Duviols M-P & Kobrehel K (2000). Glutathione reductase in wheat grain. 1. Isolation and characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(10): 4978-4983
- Deng Z, Zhao M, Liu H, Wang Y & Li D (2015). Molecular cloning, expression profiles and characterization of a glutathione reductase in *Hevea brasiliensis*. *Plant Physiol Biochem*, 96: 53-63. doi:10.1016/j.plaphy.2015.07.022
- Durán N, Marcato P D, Conti R D, Alves O L, Costa F & Brocchi M (2010). Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of action. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 21(6): 949-959
- Edwards E A, Rawsthorne S & Mullineaux P M (1990). Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta*, 180(2): 278-284
- Engle T, Spears J, Xi L & Edens F (2000). Dietary copper effects on lipid metabolism and circulating catecholamine concentrations in finishing steers. *Journal of animal science*, 78(10): 2737-2744
- Erat M (2002). İnsan ve sığır eritrosit glutatyon redüktaz enziminin saflaştırılması, bazı ilaç ve kimyasal maddelerin inhibisyon veya aktivasyon etkilerinin araştırılması. *Doktora tezi, Erzurum*
- Erat M (2004). Purification of human erythrocyte glucose 6-phosphate dehydrogenase and glutathione reductase enzymes using 2', 5'-ADP Sepharose 4B affinity column material in single chromatographic step. *Protein expression and purification*, 34(2): 257-260
- Faixová Z & Faix Š (2002). Influence of metal ions on ruminal enzyme activities. *Acta Veterinaria Brno*, 71(4): 451-455
- Foyer C H & Noctor G (2011). Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant physiology*, 155(1): 2-18
- Foyer C H, Souriau N, Perret S, Lelandais M, Kunert K-J, Pruvost C & Jouanin L (1995). Overexpression of glutathione reductase but not glutathione synthetase

- leads to increases in antioxidant capacity and resistance to photoinhibition in poplar trees. *Plant physiology*, 109(3): 1047-1057
- Garcia-Alfonso C, Martinez-Galisteo E, Llobell A, Barcena J A & Lopez-Barea J (1993). Horse-liver glutathione reductase: purification and characterization. *Int J Biochem*, 25(1): 61-68. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8432383>
- Garner L A (2004). Contact dermatitis to metals. *Dermatologic therapy*, 17(4): 321-327
- Gechev T S, Van Breusegem F, Stone J M, Denev I & Laloi C (2006). Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *Bioessays*, 28(11): 1091-1101
- Gill S S, Anjum N A, Hasanuzzaman M, Gill R, Trivedi D K, Ahmad I, . . . Tuteja N (2013). Glutathione and glutathione reductase: a boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. *Plant Physiology and Biochemistry*, 70: 204-212
- Gill S S, Khan N A & Tuteja N (2012). Cadmium at high dose perturbs growth, photosynthesis and nitrogen metabolism while at low dose it up regulates sulfur assimilation and antioxidant machinery in garden cress (*Lepidium sativum* L.). *Plant Science*, 182: 112-120
- Gill S S & Tuteja N (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12): 909-930
- Goudsmit J, Debouck C, Melen R H, Smit L, Bakker M, Asher D M, . . . Gajdusek D C (1988). Human immunodeficiency virus type 1 neutralization epitope with conserved architecture elicits early type-specific antibodies in experimentally infected chimpanzees. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(12): 4478-4482
- Görmüş I & Ergene N (2003). Magnezyumun klinik önemi. *Gen Tıp Dergisi*, 12(2): 69-75
- Gutterer J M, Dringen R, Hirrlinger J & Hamprecht B (1999). Purification of glutathione reductase from bovine brain, generation of an antiserum, and immunocytochemical localization of the enzyme in neural cells. *J Neurochem*, 73(4): 1422-1430. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10501185>
- Gür N, Topdemir A, Munzuroğlu Ö & Çobanoğlu D (2004). Ağır metal iyonlarının (Cu^{+2} , Pb^{+2} , Hg^{+2} , Cd^{+2}) *Clivia* sp. bitkisi polenlerinin çimlenmesi ve tüp büyümesi üzerine etkileri. *Fırat Üniv. Fen ve Matematik Bilimleri Dergisi*, 16: 177-182
- Haase H & Maret W (2003). Intracellular zinc fluctuations modulate protein tyrosine phosphatase activity in insulin/insulin-like growth factor-1 signaling. *Experimental cell research*, 291(2): 289-298
- Halliwell B & Gutteridge J (2011). Free radicals in biology and medicine. NY: Oxford University Press.: 968-1999

- Hasanuzzaman M, Hossain M A, da Silva J A T & Fujita M (2012). *Crop stress and its management: Perspectives and strategies*. Springer, 261-315.
- Hasanuzzaman M, Hossain M A & Fujita M (2010). Physiological and biochemical mechanisms of nitric oxide induced abiotic stress tolerance in plants. *Am J Plant Physiol*, 5(6): 295-324
- Hong C-Y, Chao Y-Y, Yang M-Y, Cheng S-Y, Cho S-C & Kao C H (2009). NaCl-induced expression of glutathione reductase in roots of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings is mediated through hydrogen peroxide but not abscisic acid. *Plant and soil*, 320(1-2): 103-115
- Hussain S, Hess K, Gearhart J, Geiss K & Schlager J (2005). In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicology in vitro*, 19(7): 975-983
- Imlay J A & Linn S (1988). DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science(Washington)*, 240(4857): 1302-1309
- Jenks M A, Hasegawa P M, Jain S M & Foolad M (2007). Advances in molecular breeding toward drought and salt tolerant crops. *Springer*: 1-32
- Jiang F, Hellman U, Sroga G E, Bergman B & Mannervik B (1995). Cloning, sequencing, and regulation of the glutathione reductase gene from the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120. *Journal of Biological Chemistry*, 270(39): 22882-22889
- Kacar B & Katkat A V (2006). *Bitki besleme*. Uludağ Üniversitesi Güçlendirme Vakfı, 849,
- Kamerbeek N M, van Zwieten R, de Boer M, Morren G, Vuil H, Bannink N, . . . Schirmer R H (2007). Molecular basis of glutathione reductase deficiency in human blood cells. *Blood*, 109(8): 3560-3566
- Kaminaka H, Morita S, Nakajima M, Masumura T & Tanaka K (1998). Gene cloning and expression of cytosolic glutathione reductase in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant and cell physiology*, 39(12): 1269-1280
- Keha E E & Küfrevioğlu Ö İ (2004). *Biyokimya*. Aktif Yayın Dağıtım,
- Kennedy C & Gonsalves F (1987). The action of divalent zinc, cadmium, mercury, copper and lead on the trans-root potential and H⁺, efflux of excised roots. *Journal of Experimental Botany*, 38(5): 800-817
- Kim I-S, Shin S-Y, Kim Y-S, Kim H-Y & Yoon H-S (2009). Expression of a glutathione reductase from *Brassica rapa* subsp. *pekinensis* enhanced cellular redox homeostasis by modulating antioxidant proteins in *Escherichia coli*. *Molecules and cells*, 28(5): 479-487
- Klapheck S, Zimmer I & Cosse H (1990). Scavenging of hydrogen peroxide in the endosperm of *Ricinus communis* by ascorbate peroxidase. *Plant and cell physiology*, 31(7): 1005-1013
- Kubo A, Saji H, Tanaka K & Kondo N (1995). Expression of *Arabidopsis* cytosolic ascorbate peroxidase gene in response to ozone or sulfur dioxide. *Plant molecular biology*, 29(3): 479-489

- Kubo A, Sano T, Saji H, Tanaka K, Kondo N & Tanaka K (1993). Primary structure and properties of glutathione reductase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant and cell physiology*, 34(8): 1259-1266
- Kvesitadze G, Khatisashvili G, Sadunishvili T & Ramsden J J (2006). Biochemical mechanisms of detoxification in higher plants: basis of phytoremediation. *Springer Science*
- Laemmli U K (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227: 680-685
- Lambers H, Chapin III F S & Pons T L (2008). *Plant physiological ecology*. Springer, 272 – 277.
- Lascano H, Casano L, Melchiorre M & Trippi V (2001). Biochemical and molecular characterisation of wheat chloroplastic glutathione reductase. *Biologia plantarum*, 44(4): 509-516
- Le Martret B, Poage M, Shiel K, Nugent G D & Dix P J (2011). Tobacco chloroplast transformants expressing genes encoding dehydroascorbate reductase, glutathione reductase, and glutathione-S-transferase, exhibit altered anti-oxidant metabolism and improved abiotic stress tolerance. *Plant biotechnology journal*, 9(6): 661-673
- Lee H, Won S-H, Lee B-H, Park H-D, Chung W-I & Jo J (2002). Genomic cloning and characterization of glutathione reductase gene from *Brassica campestris* var. *Pekinensis*. *Molecules and cells*, 13(2): 245-251
- Libreros-Minotta C A, Pardo J P, Mendoza-Hernández G & Rendón J L (1992). Purification and characterization of glutathione reductase from *Rhodospirillum rubrum*. *Archives of biochemistry and biophysics*, 298(1): 247-253
- Madamanchi N R, Anderson J V, Alscher R G, Cramer C L & Hess J L (1992). Purification of multiple forms of glutathione reductase from pea (*Pisum sativum* L.) seedlings and enzyme levels in ozone-fumigated pea leaves. *Plant physiology*, 100(1): 138-145
- Mahan J R & Burke J J (1987). Purification and Characterization of Glutathione-Reductase from Corn Mesophyll Chloroplasts. *Physiologia Plantarum*, 71(3): 352-358. doi:DOI 10.1111/j.1399-3054.1987.tb04355.x
- Malik A (2004). Metal bioremediation through growing cells. *Environment international*, 30(2): 261-278
- Mapson L & Goddard D (1951). The reduction of glutathione by plant tissues. *Biochemical Journal*, 49(5): 592
- Mapson L & Isherwood F (1963). Glutathione reductase from germinated peas. *Biochemical Journal*, 86(1): 173
- Mazhoudi S, Chaoui A, Ghorbal M H & El Ferjani E (1997). Response of antioxidant enzymes to excess copper in tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill.). *Plant Science*, 127(2): 129-137
- McKersie B D & Lesheim Y (2013). *Stress and stress coping in cultivated plants*. Springer Science & Business Media,

- Meister A (1983). Selective modification of glutathione metabolism. *Science*, 220(4596): 472-477
- Melchiorre M, Robert G, Trippi V, Racca R & Lascano H R (2009). Superoxide dismutase and glutathione reductase overexpression in wheat protoplast: photooxidative stress tolerance and changes in cellular redox state. *Plant growth regulation*, 57(1): 57-68
- Misra M, Rodriguez R E & Kasprzak K S (1990). Nickel induced lipid peroxidation in the rat: correlation with nickel effect on antioxidant defense systems. *Toxicology*, 64(1): 1-17
- Moore J W (2012). *Inorganic contaminants of surface water: research and monitoring priorities*. Springer Science & Business Media,
- Mullineaux P, Enard C, Hellens R & Creissen G (1996). Characterisation of a glutathione reductase gene and its genetic locus from pea (*Pisum sativum* L.). *Planta*, 200(2): 186-194
- Noyan A (2003). Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji 13. Baskı: 1057
- Ogus A & Tezcan E F (1981). Purification and subunit structure of glutathione reductase from human leukocytes. *Biochem Med*, 25(1): 81-91. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7225101>
- Ogus I H & Ozer N (1998). Purification of NADPH-free glutathione disulfide reductase from human erythrocytes. *Protein Expr Purif*, 13(1): 41-44. doi:10.1006/prep.1997.0865
- Ouzounidou G (1994). Copper-induced changes on growth, metal content and photosynthetic function of *Alyssum montanum* L. plants. *Environmental and Experimental Botany*, 34(2): 165-172
- Öğüs H & Özer N (1991). Human jejunal glutathione reductase: purification and evaluation of the NADPH-and glutathione-induced changes in redox state. *Biochemical medicine and metabolic biology*, 45(1): 65-73
- Özcan M A (2015). Silver Nanoparticles and Studies on Using in Poultry Nutrition. *Journal of Poultry Research*, 11(2)
- Pang C-H & Wang B-S (2010). *Role of ascorbate peroxidase and glutathione reductase in ascorbate–glutathione cycle and stress tolerance in plants*. Springer, 91-113,
- Patnaik P (2003). *Handbook of inorganic chemicals*. McGraw-Hill, New York.
- Perry D K, Smyth M J, Stennicke H R, Salvesen G S, Duriez P, Poirier G G & Hannun Y A (1997). Zinc is a potent inhibitor of the apoptotic protease, caspase-3 a novel target for zinc in the inhibition of apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 272(30): 18530-18533
- Pilon-Smits E A, Zhu Y L, Sears T & Terry N (2000). Overexpression of glutathione reductase in *Brassica juncea*: effects on cadmium accumulation and tolerance. *Physiologia Plantarum*, 110(4): 455-460
- Radzicka A & Wolfenden R (1995). A proficient enzyme. *Science*, 267(5194): 90

- Rall T W & Lehninger A L (1952). Glutathione reductase of animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 194(1): 119-130
- Rao A C & Reddy A R (2008). *Sulfur assimilation and abiotic stress in plants*. Springer, 111-147.
- Romero-Puertas M C, Corpas F J, Sandalio L M, Leterrier M, Rodríguez-Serrano M, Del Río L A & Palma J M (2006). Glutathione reductase from pea leaves: response to abiotic stress and characterization of the peroxisomal isozyme. *New phytologist*, 170(1): 43-52
- Rouhier N, Couturier J & Jacquot J-P (2006). Genome-wide analysis of plant glutaredoxin systems. *Journal of Experimental Botany*, 57(8): 1685-1696
- Rout G R & Das P (2009). *Sustainable Agriculture*. Springer, 873-884.
- Ruiz J & Blumwald E (2002). Salinity-induced glutathione synthesis in *Brassica napus*. *Planta*, 214(6): 965-969
- Saffron L (2001). Australia cuts cadmium in food. *Environmental health perspectives*, 109(4): A158
- Sato S, Nakamura Y, Kaneko T, Katoh T, Asamizu E & Tabata S (2000). Structural analysis of *Arabidopsis thaliana* chromosome 3. I. Sequence features of the regions of 4,504,864 bp covered by sixty P1 and TAC clones. *DNA research*, 7(2): 131-135
- Schierholz J, Lucas L, Rump A & Pulverer G (1998). Efficacy of silver-coated medical devices. *Journal of Hospital Infection*, 40(4): 257-262
- Schwartz G G & Reis I M (2000). Is cadmium a cause of human pancreatic cancer? *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 9(2): 139-145
- Shainkin-Kestenbaum R, Caruso C & Berlyne G (1991). Effect of chromium on oxygen free radical metabolism, inhibition of superoxide dismutase and enhancement of 6-hydroxydopamine oxidation. *Journal of trace elements and electrolytes in health and disease*, 5(3): 197-201
- Sheoran I, Aggarwal N & Singh R (1990). Effects of cadmium and nickel on in vivo carbon dioxide exchange rate of pigeon pea (*Cajanus cajan* L.). *Plant and soil*, 129(2): 243-249
- Sincik M, Oral H S, Göksoy T & Turan Z M (2008). Farklı Soya Fasulyesi (*Glycine max* L. Merr.) Hatlarının Bursa Ekolojik Koşullarında Bazı Verim ve Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 22(1)
- Smith I K, Vierheller T L & Thorne C A (1988). Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5, 5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid). *Analytical biochemistry*, 175(2): 408-413
- Sossé B, Genet P, Dunand-Vinit F, Toussaint L, Epron D & Badot P (2004). Effect of copper on growth in cucumber plants (*Cucumis sativus*) and its relationships with carbohydrate accumulation and changes in ion contents. *Plant Science*, 166(5): 1213-1218
- Steffens J (1990). The heavy metal-binding peptides of plants. *Annual review of plant biology*, 41(1): 553-575

- Stevens R G, Creissen G P & Mullineaux P M (1997). Cloning and characterisation of a cytosolic glutathione reductase cDNA from pea (*Pisum sativum* L.) and its expression in response to stress. *Plant molecular biology*, 35(5): 641-654
- Suzuki N, Koussevitzky S, Mittler R & Miller G (2012). ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant, Cell & Environment*, 35(2): 259-270
- Sytar O, Kumar A, Latowski D, Kuczynska P, Strzałka K & Prasad M (2013). Heavy metal-induced oxidative damage, defense reactions, and detoxification mechanisms in plants. *Acta physiologiae plantarum*, 35(4): 985-999
- Tandogan B & Ulusu N N (2010). Purification and kinetics of bovine kidney cortex glutathione reductase. *Protein Pept Lett*, 17(5): 667-674. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19702563>
- Tandoğan B & Ulusu N N (2007). The inhibition kinetics of yeast glutathione reductase by some metal ions. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 22(4): 489-495
- Taser P & Ciftci M (2012). Purification and characterization of glutathione reductase from turkey liver. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 36(5): 546-553. doi:10.3906/vet-1103-5
- Tekman B, Ozdemir H, Senturk M & Ciftci M (2008). Purification and characterization of glutathione reductase from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver and inhibition effects of metal ions on enzyme activity. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology*, 148(2): 117-121. doi:10.1016/j.cbpc.2008.04.005
- Torres-Franklin M L, Contour-Ansel D, Zully-Fodil Y & Pham-Thi A-T (2008). Molecular cloning of glutathione reductase cDNAs and analysis of GR gene expression in cowpea and common bean leaves during recovery from moderate drought stress. *Journal of plant physiology*, 165(5): 514-521
- Townsend D M, Tew K D & Tapiero H (2003). The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 57(3): 145-155
- Tunc T, Koc Y, Acik L, Karacan M S & Karacan N (2015). DNA cleavage, antimicrobial studies and a DFT-based QSAR study of new antimony(III) complexes as glutathione reductase inhibitor. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 136: 1418-1427. doi:10.1016/j.saa.2014.10.030
- Ulusu G, Erat M, Ciftci M, Sakiroglu H & Bakan E (2005). Purification and characterization of glutathione reductase from sheep liver. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 29(5): 1109-1117
- Ulusu N N & Tandoğan B (2007). Purification and kinetic properties of glutathione reductase from bovine liver. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 303(1-2): 45-51
- Walther U, Wilhelm B, Walther S, Mückter H & Forth W (2000). Effect of zinc chloride on GSH synthesis rates in various lung cell lines. *In Vitro & Molecular Toxicology: A Journal of Basic and Applied Research*, 13(2): 145-151

- Willmore W G & Storey K B (2007). Purification and properties of glutathione reductase from liver of the anoxia-tolerant turtle, *Trachemys scripta elegans*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 297(1-2): 139-149
- Wise R R & Naylor A W (1987). Chilling-enhanced photooxidation evidence for the role of singlet oxygen and superoxide in the breakdown of pigments and endogenous antioxidants. *Plant physiology*, 83(2): 278-282
- Wu G, Fang Y-Z, Yang S, Lupton J R & Turner N D (2004). Glutathione metabolism and its implications for health. *The Journal of nutrition*, 134(3): 489-492
- Wu T-M, Lin W-R, Kao Y-T, Hsu Y-T, Yeh C-H, Hong C-Y & Kao C H (2013). Identification and characterization of a novel chloroplast/mitochondria co-localized glutathione reductase 3 involved in salt stress response in rice. *Plant molecular biology*, 83(4-5): 379-390
- Wu W, Graves L M, Jaspers I, Devlin R B, Reed W & Samet J M (1999). Activation of the EGF receptor signaling pathway in human airway epithelial cells exposed to metals. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 277(5): L924-L931
- Xiang C & Oliver D J (1998). Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 10(9): 1539-1550
- Yağdı K, Kaçar O & Azkan N (2000). Topraklardaki Ağır Metal Kirliliği Ve Tarımsal Etkileri. *On Dokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 15(2): 108-115
- Yannarelli G G, Fernández-Alvarez A J, Santa-Cruz D M & Tomaro M L (2007). Glutathione reductase activity and isoforms in leaves and roots of wheat plants subjected to cadmium stress. *Phytochemistry*, 68(4): 505-512
- Yıldırım A, Bardakçı F, Karataş M & Tanyolaç B (2010). Moleküler Biyoloji. *Nobel Yayın Dağıtım*, 613: 249- 295
- Yüzbaşı N & Sezgin E (2002). Süt ve Ürünlerindeki Bazı Metalik Kontaminantların Toksikolojik Etkileri. *GIDA/THE JOURNAL OF FOOD*, 27(2)
- Zengin K & Munzuroğlu Ö (2005). Fasulye fidelerinin (*Phaseolus vulgaris* L. Strike) klorofil ve karotenoid miktarı üzerine bazı ağır metallerin (Ni^{+2} , Co^{+2} , Cr^{+3} , Zn^{+2}) etkileri. *FÜ Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 17(1): 164-172

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Gürkan BİLİR
Doğum Yeri : Soma
Doğum Tarihi : 01.10.1989
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Soma Linyit Lisesi (2006)
Lisans : Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü (2013)
Yüksek Lisans : Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı (Şubat, 2014 - -)

Çalıştığı Kurum

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü (Araştırma Görevlisi, 2016)

Yayımlar

Partial Purification of β -glucosidase from soybean (*Glycine max.*) and determination of inhibitory effects of two quercetin derivatives on enzyme activity, *Agronomy Research.*, 14(S2), 1419-1426, 2016.