



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**



DOKTORA TEZİ

**GÖKKUŞAĞI ALABALIK (*Oncorhynchus mykiss*)
KARACİĞERİNDEN GLUTAMAT DEHİDROJENAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

Onur ERTİK

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Refiye YANARDAĞ**

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Programı

İSTANBUL-2021

Bu çalışma, 15.12.2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Refiye YANARDAĞ(Danışman)
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Mühendislik Fakültesi

Prof. Dr. Nuriye AKEV
İstanbul Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi

Prof. Dr. Ayşen YARAT
Marmara Üniversitesi
Diş Hekimliği Fakültesi

Prof. Dr. Özlem SAÇAN
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Mühendislik Fakültesi

Prof. Dr. Sevim TUNALI
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Mühendislik Fakültesi



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa’nın abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Lisansüstü Eğitim Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 32877 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Doktora tezimin planlaması ve gerçekleştirilmesi esnasında, bugünlere gelmemizde bilgi ve birikimini bizden hiçbir zaman esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Refiye YANARDAĞ'a en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Tüm bu çalışma boyunca yardımseverliği ve hoşgörüsü ile bizlere yardım eden, bugünlere gelmemizde bilgi ve birikimini bizden hiçbir zaman esirgemeyen hocam Sayın Prof. Dr. Özlem SAÇAN çok teşekkür ederim. Bu süreçteki desteklerinden dolayı Prof. Dr. Sevim TUNALI'ya, Dr. Öğr. Üyesi. Bertan Boran BAYRAK'a ve Dr. Öğr. Üyesi İsmet Burcu TÜRKYILMAZ'a teşekkür ederim. Tez boyunca beraber çalıştığım Arş. Gör. Eda DAĞSUYU'na çok teşekkür ederim.

Yarınlara dair tohumların yeşermesine umut olan, hayatı yaşanır kılan hayat arkadaşım, yoldaşım, eşim Duygu ERTİK'e destek ve yardımlarından dolayı tüm samimiyetimle çok teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde alın terlerini hiç eksik etmemiş olan sevgili babam Kemal ERTİK'e, annem Asuman ERTİK'e, ablam Duygu ÖZTEPE'ye, her zaman yanımda olan eniştem Orhan Yücel ÖZTEPE'ye ve sevgili yeğenim Deniz ÖZTEPE'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora sırasında destek ve yardımlarının yanı sıra afinite kolonunun temin edilmesinde yardımlarını esirgemeyen İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine ve Prof. Dr. Nurten ÖZSOY'a teşekkürlerimi sunarım.

Balıkların temin edilmesinde yardımlarını esirgemeyen İ.Ü. Su Bilimleri Fakültesi Su Ürünleri Yetiştiriciliği ve Hastalıkları Bölümü'nden Sayın Arş. Gör. Gökhan TUNÇELLİ'ye teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamın uygulama kısmını destekleyen İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

Aralık 2021

Onur ERTİK

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	ix
TABLO LİSTESİ.....	xiv
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xv
ÖZET	xvii
SUMMARY	xix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	3
2.1. PROTEİNLER.....	3
2.1.1. Proteinlerin ve Amino Asitlerin Yıkımı	5
2.1.1.1. Transaminasyon.....	7
2.1.1.2. Oksidatif Deaminasyon.....	8
2.1.1.3. Nonoksidatif Deaminasyon	9
2.2. AMONYAK METABOLİZMASI	9
2.2.1. Amonyak Atılım Yolları.....	13
2.2.1.1. Üre Siklusu.....	13
2.2.1.2. Glutamin Sentezi	14
2.2.1.3. Alanin Sentezi.....	14
2.3. ENZİMLER VE GENEL ÖZELLİKLERİ	15
2.3.1. Enzim İnhibisyonu.....	17
2.3.1.1. Reversibl (Geri Dönüşümlü) Enzim İnhibisyonu	18
2.3.1.2. İrreversibl (Geri Dönüşümsüz) Enzim İnhibisyonu	21
2.4. GLUTAMAT DEHİDROJENAZ ENZİMİ VE ÖZELLİKLERİ	22
2.4.1. Glutamat Dehidrojenaz Enziminin Regülasyonu	25
2.4.2. Glutamat Dehidrojenaz Enziminin İnsülin Sekresyonuna Etkisi	27
2.4.3. Glutamat Dehidrojenaz Enziminin Tümör Büyümesi ve Sinirsel Gelişimdeki Rolü	29
2.4.4. İnsan Testis ve Böbrek Dokularında Glutamat Dehidrojenaz Enziminin Etkileri	31

2.4.5. Glutamat Dehidrojenaz Enziminin Saflaştırılmasına ait Kaynak Özeti	32
2.5. PROTEİNLERİN SAFLAŞTIRILMASI.....	33
2.5.1. Kromatografik Yöntemler	34
2.5.1.1. Afinite Kromatografisi	35
2.5.2. Elektroforetik Yöntemler.....	39
2.6. GÖKKUŞAĞI ALABALIKLARININ (ONCORHYNCHUS MYKISS) GENEL ÖZELLİKLERİ.....	40
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	43
3.1. MATERYAL.....	43
3.1.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler	43
3.1.2. Deneylerde Kullanılan Alet ve Cihazlar	45
3.1.3. Gökkuşağı Alabalıklarının Temini	46
3.1.4. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları	49
3.1.4.1. Glutamat Dehidrojenaz Enzim Aktivitesi için Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	49
3.1.4.2. Gökkuşağı Alabalık Karaciğer Homojenizatının Hazırlanması için Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	49
3.1.4.3. Gökkuşağı Alabalık Karaciğer Homojenizatından Glutamat Dehidrojenaz Enziminin 2',5'-ADP-Sepharose 4B Afinite Kolonu ile Saflaştırılması için Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	50
3.1.4.4. Kantitatif Protein Tayini için Bradford Reaktifinin Hazırlanması.....	50
3.1.4.5. Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE) için Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	50
3.1.4.6. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) için Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	51
3.1.4.7. Gökkuşağı Alabalık Karaciğer Homojenizatından Saflaştırılan Glutamat Dehidrojenaz Enziminin İnhibisyonunda Kullanılan Bazı Metal İyonları ve Vitamin Çözeltilerinin Hazırlanması.....	52
3.2. YÖNTEM.....	53
3.2.1. Glutamat Dehidrojenaz Enziminin Aktivitesinin Tayin Yöntemi	53
3.2.2. Protein Tayin Yöntemleri	54
3.2.2.1. Kalitatif Protein Tayini	54
3.2.2.2. Kantitatif Protein Tayini	54
3.2.2.3. Kantitatif Protein için Kullanılan Standart Eğri Grafiği	55
3.2.3. Gökkuşağı Alabalık Karaciğerinden Glutamat Dehidrojenaz Enziminin Saflaştırılması	55
3.2.3.1. Gökkuşağı Alabalık Karaciğer Homojenizatının Hazırlanması.....	55

3.2.3.2. 2',5'-ADP Sepharose 4B Afinite Kolonunun Hazırlanması ve Gökkuşığı Alabalık Karaciğer Homojenizatından Glutamat Dehidrojenaz Enziminin Saflaştırılması	56
3.2.3.3. Saflaştırılan Glutamat Dehidrojenaz Enzime Diyaliz İşleminin Uygulanması	58
3.2.3.4. 2',5'-ADP Sepharose 4B Afinite Kolonunun Rejenerasyonu	58
3.2.4. Poliakrilamid Jel Elektrophorezi (PAGE) ile Enzim Saflığının Kontrolü	58
3.2.5. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektrophorezi (SDS-PAGE)	59
3.2.6. Gökkuşığı Alabalık Karaciğerinden Saflaştırılan Glutamat Dehidrojenaz Enziminin Karakterizasyon Çalışmaları	60
3.2.6.1. Gökkuşığı Alabalık Karaciğerinden Saflaştırılan Glutamat Dehidrojenaz Enziminin Optimum Sıcaklığının Bulunması	60
3.2.6.2. Gökkuşığı Alabalık Karaciğerinden Saflaştırılan Glutamat Dehidrojenaz Enziminin Optimum pH'ının Bulunması	60
3.2.6.3. Gökkuşığı Alabalık Karaciğerinden Saflaştırılan Glutamat Dehidrojenaz Enzimi için Optimum İyonik Şiddetin Bulunması.....	60
3.2.6.4. Gökkuşığı Alabalık Karaciğerinden Saflaştırılan Glutamat Dehidrojenaz Enziminin Substratları için K_m ve V_{max} Değerlerinin bulunması	61
3.2.6.5. Gökkuşığı Alabalık Karaciğerinden Saflaştırılan Glutamat Dehidrojenaz Enziminin Depo Kararlılığının Bulunması	61
3.2.6.6. Gökkuşığı Alabalık Karaciğerinden Saflaştırılan Glutamat Dehidrojenaz Enziminin Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonları ve Vitaminlerin Etkilerinin İncelenmesi	61
3.2.6.7. Gökkuşığı Alabalık Karaciğerinden Saflaştırılan Glutamat Dehidrojenaz Enziminin Aktivitesi Üzerine Bazı Çözücülerin Etkilerinin İncelenmesi	63
4. BULGULAR.....	64
4.1. GÖKKUŞAĞI ALABALIK KARACİĞERİNDEN GLUTAMAT DEHİDROJENAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRMA SONUÇLARI	64
4.1.1. Afinite Kolon Kromatografisi Sonuçları	64
4.1.2. Gökkuşığı Alabalık Karaciğerinden Saflaştırılan Glutamat Dehidrojenaz Enziminin PAGE Sonuçları	66
4.1.3. Gökkuşığı Alabalık Karaciğerinden Saflaştırılan Glutamat Dehidrojenaz Enziminin SDS-PAGE Sonuçları	67
4.2. GÖKKUŞAĞI ALABALIK KARACİĞERİNDEN SAFLAŞTIRILAN GLUTAMAT DEHİDROJENAZ ENZİMİNİN KARAKTERİZASYON SONUÇLARI.....	68
4.2.1. Gökkuşığı Alabalık Karaciğerinden Saflaştırılan Glutamat Dehidrojenaz Enziminin Optimum Sıcaklığının Bulunmasına Yönelik Çalışmaların Sonuçları	68

4.2.2. Gökkuşığı Alabalık Karaciğerinden Safılaştırılan Glutamat Dehidrojenaz Enziminin Optimum pH'ının Bulunmasına Yönelik Çalışmaların Sonuçları	69
4.2.3. Gökkuşığı Alabalık Karaciğerinden Safılaştırılan Glutamat Dehidrojenaz Enziminin Optimum İyonik Şiddetin Bulunmasına Yönelik Çalışmaların Sonuçları	70
4.2.4. Gökkuşığı Alabalık Karaciğerinden Safılaştırılan Glutamat Dehidrojenaz Enziminin Substratları için K_m ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesine Yönelik Çalışmaların Sonuçları.....	71
4.2.5. Gökkuşığı Alabalık Karaciğerinden Safılaştırılan Glutamat Dehidrojenaz Enziminin Depo Kararlılığının Bulunmasına Yönelik Çalışmaların Sonuçları	76
4.2.6. Gökkuşığı Alabalık Karaciğerinden Safılaştırılan Glutamat Dehidrojenaz Enziminin Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonları ve Vitaminlerin Etkilerinin Belirlenmesine Yönelik Çalışmaların Sonuçları	79
4.2.7. Gökkuşığı Alabalık Karaciğerinden Safılaştırılan Glutamat Dehidrojenaz Enziminin Aktivitesi Üzerine Bazı Çözücülerin Etkilerinin Bulunmasına Yönelik Çalışmaların Sonuçları.....	96
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	98
KAYNAKLAR.....	113
ÖZGEÇMİŞ	122

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 2.1: Amino asit havuzunun oluşumu ve kullanımı	6
Şekil 2.2: Amino asitlerin amino gruplarının metabolizması	7
Şekil 2.3: Alanin ve aspartat aminotransferaz enzimlerinin katalizlediği reaksiyon	8
Şekil 2.4: Oksidatif deaminasyon reaksiyonu	8
Şekil 2.5: Glutamat dehidrojenaz enziminin kataliz ettiği reaksiyon	9
Şekil 2.6: Amonyak kaynakları.....	10
Şekil 2.7: Glutamat metabolizması	12
Şekil 2.8: Üre siklusu	13
Şekil 2.9: Glutamin oluşum reaksiyonu.....	14
Şekil 2.10: Pirüvat-alanin döngüsü.....	15
Şekil 2.11: Yarışmalı enzim inhibisyonuna ait Lineweaver-Burk grafiği	19
Şekil 2.12: Yarışmasız enzim inhibisyonuna ait Lineweaver-Burk grafiği	19
Şekil 2.13: Yarı-yarışmalı enzim inhibisyonuna ait Lineweaver-Burk grafiği.....	20
Şekil 2.14: Karışık (Miks) tip enzim inhibisyonuna ait Lineweaver-Burk grafikleri	21
Şekil 2.15: Glutamat dehidrojenaz enziminin katalizlediği reaksiyon.....	22
Şekil 2.16: Koenzim bağımlılığına göre glutamat dehidrojenaz enziminin reaksiyonları	23
Şekil 2.17: İnsan glutamat dehidrojenaz-1 enziminin yapısı	24
Şekil 2.18: Glutamat dehidrojenaz enzimi ve bağlanma bölgeleri	26
Şekil 2.19: Glutamat dehidrojenaz enziminin insülin salınımı üzerine etkisi.....	28
Şekil 2.20: Glutaminoliz reaksiyonları	30
Şekil 2.21: Afinite kromatografisinin uygulanması	36
Şekil 2.22: Afinite kromatografisi prensibi.....	36

Şekil 2.23: Sepharose 4B yapısı.....	37
Şekil 2.24: Afinite kromatografisinde uzantı kolu.....	38
Şekil 2.25: 2',5'-ADP Sepharose 4B kolon dolgu maddesi ve NADP ⁺ 'ın kimyasal yapısı.	39
Şekil 2.26: Gökkuşaağı alabalığının (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) genel görünümü.	40
Şekil 2.27: Balıkların iç ve dış anatomisine dair genel görünüm	41
Şekil 3.1: İstanbul Üniversitesi Su Bilimleri Fakültesi Sapanca İçsu Ürünleri Üretimi Araştırma ve Uygulama Birimi balık tesisi.	47
Şekil 3.2: Gökkuşaağı alabalıkları.	48
Şekil 3.3: Bradford yöntemine göre protein tayininde kullanılan standart eğri grafiği.	55
Şekil 3.4: Gökkuşaağı alabalıklarının karaciğerleri.....	56
Şekil 3.5: Gökkuşaağı alabalık karaciğer homojenizatının afinite kolonuna uygulanması.	57
Şekil 4.1: Gökkuşaağı alabalık karaciğerinden glutamat dehidrojenaz enziminin 2',5'- ADP Sepharose 4B afinite kolonu ile saflaştırılması sonucu elde edilen elüatların aktivite değerleri ve 280 nm'deki absorbans değerleri.....	64
Şekil 4.2: Standart ve gökkuşaağı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzime ait PAGE jelinin görüntüsü.	66
Şekil 4.3: Standart ve gökkuşaağı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzime ait SDS-PAGE jelinin görüntüsü.	67
Şekil 4.4: SDS-PAGE standartlarına ait logMA-Rf grafiği.	68
Şekil 4.5: Gökkuşaağı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için hazırlanan aktivite-sıcaklık grafiği.....	69
Şekil 4.6: Gökkuşaağı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enziminin optimum pH'ını belirlemek için hazırlanan aktivite-pH grafiği.....	70
Şekil 4.7: Gökkuşaağı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enziminin optimum iyonik şiddetinin belirlemek için hazırlanan aktivite-iyonik şiddet grafiği.	71
Şekil 4.8: Gökkuşaağı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enziminin NAD ⁺ substratının 5 farklı konsantrasyonunda aktivite ölçülerek çizilen Lineweaver-Burk grafiği.	72
Şekil 4.9: Gökkuşaağı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enziminin NADH + H ⁺ substratının 5 farklı konsantrasyonunda aktivite ölçülerek çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	72

Şekil 4.10: Gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enziminin NADP^+ substratının 5 farklı konsantrasyonunda aktivite ölçülerek çizilen Lineweaver-Burk grafiği.	73
Şekil 4.11: Gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enziminin $\text{NADPH} + \text{H}^+$ substratının 5 farklı konsantrasyonunda aktivite ölçülerek çizilen Lineweaver-Burk grafiği.	73
Şekil 4.12: Gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enziminin NH_4^+ substratının 5 farklı konsantrasyonunda aktivite ölçülerek çizilen Lineweaver-Burk grafiği.	74
Şekil 4.13: Gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enziminin L-glutamat substratının 5 farklı konsantrasyonunda aktivite ölçülerek çizilen Lineweaver-Burk grafiği.	74
Şekil 4.14: Gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enziminin α -ketoglutarat substratının 5 farklı konsantrasyonunda aktivite ölçülerek çizilen Lineweaver-Burk grafiği.	75
Şekil 4.15: Gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enziminin $+4^\circ\text{C}$ 'deki depo kararlılığı için hazırlanan aktivite-gün grafiği.	77
Şekil 4.16: Gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enziminin -20°C 'deki depo kararlılığı için hazırlanan aktivite-gün grafiği.	77
Şekil 4.17: Gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enziminin -80°C 'deki depo kararlılığı için hazırlanan aktivite-gün grafiği.	78
Şekil 4.18: Ag^+ metal iyonunun gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi aktivitesi üzerine etkisi.	80
Şekil 4.19: Cu^{2+} metal iyonunun gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi aktivitesi üzerine etkisi.	80
Şekil 4.20: Zn^{2+} metal iyonunun gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi aktivitesi üzerine etkisi.	81
Şekil 4.21: Ni^{2+} metal iyonunun gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi aktivitesi üzerine etkisi.	81
Şekil 4.22: Fe^{2+} metal iyonunun gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi aktivitesi üzerine etkisi.	82
Şekil 4.23: Mn^{2+} metal iyonunun gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi aktivitesi üzerine etkisi.	82
Şekil 4.24: Co^{2+} metal iyonunun gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi aktivitesi üzerine etkisi.	83

Şekil 4.25: Mg^{2+} metal iyonunun gökkuşağı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi aktivitesi üzerine etkisi.	83
Şekil 4.26: Fe^{3+} metal iyonunun gökkuşağı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi aktivitesi üzerine etkisi.	84
Şekil 4.27: Cr^{3+} metal iyonunun gökkuşağı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi aktivitesi üzerine etkisi.	84
Şekil 4.28: Ca^{2+} metal iyonunun gökkuşağı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi aktivitesi üzerine etkisi.	85
Şekil 4.29: V^{4+} metal iyonunun gökkuşağı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi aktivitesi üzerine etkisi.	85
Şekil 4.30: Ag^+ iyonunun gökkuşağı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi için inhibisyonu türünü gösteren grafik.	86
Şekil 4.31: Cu^{2+} iyonunun gökkuşağı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi için inhibisyonu türünü gösteren grafik.	86
Şekil 4.32: Zn^{2+} iyonunun gökkuşağı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi için inhibisyonu türünü gösteren grafik.	87
Şekil 4.33: Ni^{2+} iyonunun gökkuşağı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi için inhibisyonu türünü gösteren grafik.	87
Şekil 4.34: Fe^{2+} iyonunun gökkuşağı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi için inhibisyonu türünü gösteren grafik.	88
Şekil 4.35: Mn^{2+} iyonunun gökkuşağı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi için inhibisyonu türünü gösteren grafik.	88
Şekil 4.36: Co^{2+} iyonunun gökkuşağı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi için inhibisyonu türünü gösteren grafik.	89
Şekil 4.37: Mg^{2+} iyonunun gökkuşağı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi için inhibisyonu türünü gösteren grafik.	89
Şekil 4.38: Fe^{3+} iyonunun gökkuşağı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi için inhibisyonu türünü gösteren grafik.	90
Şekil 4.39: Cr^{3+} iyonunun gökkuşağı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi için inhibisyonu türünü gösteren grafik.	90
Şekil 4.40: B_6 vitamininin gökkuşağı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi aktivitesi üzerine etkisi.	91
Şekil 4.41: B_1 vitamininin gökkuşağı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi aktivitesi üzerine etkisi.	91

Şekil 4.42: U vitamininin gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi aktivitesi üzerine etkisi.	92
Şekil 4.43: B ₂ vitamininin gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi aktivitesi üzerine etkisi.	92
Şekil 4.44: B ₆ vitamininin gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi için inhibisyon türünü gösteren grafik.	93
Şekil 4.45: B ₁ vitamininin gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi için inhibisyon türünü gösteren grafik.	93
Şekil 4.46: U vitamininin gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi için inhibisyon türünü gösteren grafik.	94
Şekil 4.47: Bazı çözücülerin gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi aktivitesi üzerine etkileri.	97

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Proteinlerin sınıflandırılması.....	3
Tablo 3.1: Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler.	43
Tablo 3.2: Deneylerde kullanılan alet ve cihazlar.	45
Tablo 3.3: Glutamat dehidrojenaz enzim aktivitesinin (Aminasyon) tayin yöntemi.....	53
Tablo 3.4: Glutamat dehidrojenaz enzim aktivitesinin (Deaminasyon) tayin yöntemi.	53
Tablo 3.5: Basamaklı elüsyon işlemi için kullanılan çözeltiler.	58
Tablo 3.6: Gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enziminin aktivitesi üzerine bazı metal iyonları ve vitaminlerin etkilerinin incelenmesi.	61
Tablo 3.7: Gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enziminin aktivitesi üzerine bazı çözücülerin etkilerinin incelenmesi.	63
Tablo 4.1: Gökkuşığı alabalık karaciğerinden glutamat dehidrojenazın saflaştırma basamakları.	65
Tablo 4.2: Gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enziminin substratlarına ait K_m - V_{max} değerleri.....	75
Tablo 4.3: Gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enziminin +4°C, -20°C ve -80°C'deki depo kararlılığının 13. gün sonundaki % aktivite tablosu.....	78
Tablo 4.4: Gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enziminin karakterizasyon çalışmaları	79
Tablo 4.5: Gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi için bazı metal iyonlarının IC_{50} , K_i değerleri ve inhibisyon türleri.	94
Tablo 4.6: Gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi için bazı vitaminlerin IC_{50} , K_i değerleri ve inhibisyon türleri.	95
Tablo 5.1: Gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi için bulunan karakterizasyon sonuçları, IC_{50} değerleri, K_i sabitleri ve inhibisyon türleri.	111

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
μM	: Mikromolar
kDa	: Kilodalton
M	: Molar
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
nm	: Nanometre
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrad
$\Delta\psi$	: Membran potansiyeli

Kısaltmalar	Açıklama
ADP	: Adenozin difosfat
ALT	: Alanin aminotransferaz
ANT	: Adenin nükleotid translokator
AST	: Aspartat aminotransferaz
ATP	: Adenozin trifosfat
BSA	: Bovine serum albumin
DFP	: Diizopropil florofosfat
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DTT	: 1,4-Ditiyoeritritol
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
EtOH	: Etil alkol
FMN	: Flavin mononükleotid
GABA	: γ -Amino bütirik asit
GDH	: Glutamat dehidrojenaz
GLUD1	: Glutamat dehidrojenaz 1
GDP	: Guanozin difosfat
GTP	: Guanozin trifosfat

H₂O₂	: Hidrojen peroksit
hGDH1	: Human glutamat dehidrojenaz 1
hGDH2	: Human glutamat dehidrojenaz 2
HI/HA	: Hiperinsülinizm-hiperamonemi sendromu
I	: İnhibitör
K_m	: Michaelis-Menten sabiti
MetOH	: Metil Alkol
mTORC 1	: Rapamisin kompleks 1
NAD⁺	: Nikotinamid adenin dinükleotid (okside)
NADH+H⁺	: Nikotinamid adenin dinükleotid (redükte)
NADP⁺	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (okside)
NADPH+H⁺	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (redükte)
R_f	: Reaktif göç hızı
RNA	: Ribonükleik asit
S	: Substrat
SIRT4	: Sirtuin 4
TCA	: Trikarboksilik asit
TEMED	: N,N,N',N'-Tetrametil Etilen Diamin
Tris	: 2-Amino-2-hidroksimetil- propan-1,3-diol
tRNA	: Transfer-ribonükleik asit
V_{max}	: Maksimum reaksiyon hızı

ÖZET

DOKTORA TEZİ

GÖKKUŞAĞI ALABALIK (*Oncorhynchus mykiss*) KARACİĞERİNDEN GLUTAMAT DEHİDROJENAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

Onur ERTİK

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Refiye YANARDAĞ

Glutamat dehidrojenaz (GDH) enzimi hem proteinlerin enerji metabolizmasına katılmasında hem de organizma için önemli olan metabolitlerin sentezinde görev almasından dolayı oldukça önemlidir. GDH enziminin katalizlediği reaksiyonun iki yönlü olması enzimin bulunduğu dokunun ihtiyacına ve görevine göre özelleşebilir. Tüm bu nedenlerden dolayı GDH enziminin saflaştırılması hem dokular hem de canlılar arasında bu enzimin fonksiyonel farklılıklarının anlaşılması için oldukça önemlidir. Bu çalışmada gökkuşağı alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) karaciğerinden GDH enzimi 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi ile tek basamakta saflaştırılmıştır. Bu saflaştırma işleminin sonucunda GDH enzimi 5.38 U/mg protein spesifik aktiviteyle 171 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırılan GDH enziminin karakterizasyon deneyleri sonucunda depo kararlılığının -80°C ; optimum sıcaklığın 40°C ; optimum iyonik şiddetin 100 mM fosfat tamponu ve optimum pH'nın 8.0 olduğu tespit edilmiştir. PAGE ve SDS-PAGE çalışmaları sonucunda saflaştırılan GDH her bir alt ünitesinin 53.71 kDa ve mol kütlelerinin 346.74 kDa olduğu bulunmuştur. Gökkuşağı alabalık karaciğerinden saflaştırılan GDH enziminin substratları ve koenzimleri olan NAD^+ , NADP^+ , $\text{NADH}+\text{H}^+$, $\text{NADPH}+\text{H}^+$, L-glutamat, α -ketoglutarat ve NH_4^+ için K_m değerleri sırasıyla 1.86, 2.17, 2.98, 6.25, 15.15, 4.82 mM ve 1.73 M ve $V_{\max}$ değerleri ise sırasıyla 0.11, 0.05, 0.44, 0.43, 0.12, 0.42 and 1.79 U/mL olarak bulunmuştur. Saflaştırılan GDH enziminin aktivitesi üzerine bazı metal iyonları ve vitaminlerin etkisi incelendiğinde, GDH enzimi üzerine metal iyonlarından Ag^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} , Cr^{3+} iyonlarının inhibitör, Ca^{2+} ve V^{4+} iyonlarının aktivatör etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Na^+ ve Li^+ metal iyonlarının ise saflaştırılan GDH enziminin

aktivitesi üzerine bir etkisi olmadığı tespit edilmiştir. Bazı vitaminlerin saflaştırılan GDH enziminin aktivitesi üzerine etkileri incelendiğinde B₁, B₆ ve U vitaminlerinin inhibitör ve B₂ vitaminin aktivatör etkisinin, B₃ ve C vitaminlerinin ise GDH aktivitesi üzerine etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. İnhibisyon etkisi gösteren metallerin ve vitaminlerin IC₅₀ değerleri, inhibisyon türleri tespit edilmiş ve K_i değerlerinin hesaplanması ile Lineweaver-Burk grafikleri çizilmiştir. Bazı kimyasal çözücülerin saflaştırılan GDH enziminin aktivitesi üzerine olan etkilerine bakılmış, yapılan deneyler sonucunda n-propanol ve sikloheksanon çözücülerinin GDH aktivitesini büyük oranda inhibe ettiği bulunmuştur.

Aralık 2021, 145. sayfa.

Anahtar kelimeler: Glutamat dehidrojenaz, gökkuşağı alabalığı, karaciğer, inhibisyon, saflaştırma.



SUMMARY

Ph.D. THESIS

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF GLUTAMATE DEHYDROGENASE FROM RAINBOW TROUT (*Oncorhynchus mykiss*) LIVER

Onur ERTIK

Istanbul University-Cerrahpasa

Institute of Graduate Studies

Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Refiye YANARDAG

Glutamate dehydrogenase (GDH) enzyme is very important because it participates in the energy metabolism of proteins and the synthesis of metabolites important for the organism. The bidirectional nature of the reaction catalyzed by the GDH enzyme can be customized according to the needs and function of the tissue in which the enzyme is located. For that reason, the purification of the GDH enzyme is very important for understanding the functional differences of this enzyme both between tissues and living things. In this study, GDH enzyme was purified from the liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by 2',5'-ADP Sepharose 4B affinity chromatography in one step. As a result of this purification process, GDH enzyme was purified 171-fold with 5.38 U/mg protein-specific activity. As a result of the characterization experiments, the storage stability of the purified GDH enzyme was determined as -80°C; optimum temperature 40°C; it was determined that the optimum ionic strength was 100 mM phosphate buffer and the optimum pH was 8.00. As a result of SDS-PAGE and PAGE studies, it was determined that the natural molar mass of the purified GDH enzyme was 346.74 kDa and the molar mass of its subunits was 53.71 kDa. K_m values for substrates and coenzymes of GDH enzyme purified from rainbow trout liver are found that NAD^+ , $NADP^+$, $NADH+H^+$, $NADPH+H^+$, L-glutamate, α -ketoglutarate and NH_4^+ are 1.86, 2.17, 2.98, 6.25, 15.15, 4.82 mM and 1.73 M and V_{max} values are found that 0.11, 0.05, 0.44, 0.43, 0.12, 0.42 and 1.79 U / mL, respectively. The effects of some metal ions and vitamins on the activity of the purified GDH enzyme were investigated. As a result of these experiments, it was found that metal ions Ag^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} , Cr^{3+} ions had inhibitory effect and Ca^{2+} and V^{4+} ions had an activator effect on the GDH enzyme. It has been determined that Na^+ and Li^+ metal

ions have no effect on the activity of the purified GDH enzyme. Likewise, the effects of some vitamins on the activity of the purified GDH enzyme were examined, and as a result of the experiments, it was determined that B₁, B₆, and U vitamins had an inhibitory effect and vitamin B₂ had an activator effect. B₃ and C vitamins were found to have no effect on GDH activity. IC₅₀ values of metals and vitamins showing inhibition effect were determined, Lineweaver-Burk plots were drawn by calculating the inhibition type and K_i values. The effects of some chemical solvents on the activity of the purified GDH enzyme were examined, and as a result of the experiments, it was found that n-propanol and cyclohexanone solvents inhibit GDH activity to a great extent.

December 2021, 145 pages.

Keywords: Glutamate dehydrogenase, rainbow trout, liver, inhibition, purification.



1. GİRİŞ

Biyolojik makromoleküller olan proteinler biyoteknolojide, eczacılıkta ve kozmetik endüstrisinde oldukça önemlidir. Proteinlerin yapılarının ve işlevlerinin belirlenmesi tüm bu alanların ihtiyaçlarına yönelik çalışmalar için önemlidir. Bir hücre içerisinde binlerce farklı çeşit ve görevde protein bulunabilir. Tüm bu proteinlerin biyolojik işlevleri yüksek çeşitlilik gösterebilmektedir. Bu kadar geniş bir alana sahip olan proteinler, içerisinde yer alan enzimler sayesinde reaksiyon katalizleme görevi de görmektedirler. Biyolojik sistemlerde katalizör görevi yapan enzimler canlılığın devamı için gerekli olan tüm reaksiyonlarda görev alır ve ribozim hariç bugüne kadar bulunan tüm enzimler protein yapısındadır.

Enzimler canlı organizmalarda kimyasal reaksiyonu hızlandıran ve bunu yaparken hiçbir yan ürün oluşumuna izin vermeyen, %100 verim sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Enzimlerin keşfi ve enzimolojinin gelişmesiyle birlikte çalışma ve kullanım alanları genişlemiş ve genişlemeye devam etmektedir. Hastalıkların tedavisinde, tanı teşhisinde, endüstriyel uygulamalardan kozmetik ürün üretimine kadar çok geniş bir alanda kullanılan enzimler aynı zamanda canlı organizmaların metabolizmaları hakkında bilgi vermesi gibi açılardan dolayı gelişmekte olan bir alandır. Bu sebeplerden dolayı enzimlerin bulundukları dokuların ve hücre içi lokalizasyonlarının belirlenmesi, biyokimyasal tepkimelerde işlevlerinin ortaya çıkarılması ve etki mekanizmaları ile kinetik özelliklerinin belirlenmesi için enzimlerin saflaştırılması yüksek oranda önem taşımaktadır. Proteinlerin ve enzimlerin saflaştırılması için birçok yöntem geliştirilmiş, zaman ve maliyeti düşürmek için yöntemler geliştirilmeye devam etmektedir (Küfrevioğlu ve Keha, 2014).

Proteinlerin organizma içinde bir görevi de uzun süreli açlıkta canlılığın devamı için enerji kaynağı olarak kullanılmasıdır. Organizmanın en son tercih ettiği enerji kaynağı olmasına karşın diyetle alınabilecek proteinlerin ihtiyaç fazlası enerji elde edilmesinde kullanılmaktadır. Bu anlamda proteinlerin sindirimleri sonucunda açığa çıkan amino asitler biyolojik sentezlerde, protein sentezinde ve enerji elde edilmesinde kullanılabilirler. Proteinlerin karbon iskeletinden yararlanılabilmesi için ilk olarak amino gruplarının uzaklaştırılması gerekmektedir. Amino gruplarının uzaklaştırılması işlemi transaminasyon, oksidatif deaminasyon ve nonoksidatif deaminasyon reaksiyonları ile gerçekleşir. Oksidatif deaminasyon reaksiyonlarından biri de

sistematik ismi L-glutamat:NAD(P)⁺ oksidoredüktaz olan ancak genel olarak glutamat dehidrojenaz (GDH) olarak adlandırılan ve glutamatın α -ketoglutarat ve amonyağa hidrolizini kataliz eden enzim tarafından gerçekleşir. GDH enzimi iki yönlü çalışabilmektedir ve amonyağın kullanıldığı yön aminasyon, amonyağın oluştuğu yön ise deaminasyon olarak isimlendirilir. Bu reaksiyonlar olurken koenzim olarak reaksiyon yönüne göre NAD(H) ya da NADP(H) kullanır. GDH enzimi organizmada hem NAD(H) hem de NADP(H)'ı kullanabilen tek enzim olma özelliğindedir. Ayrıca proteinlerin trikarboksilik asit (TCA) siklusu ile bağlantı kurmasını sağlayan bir enzimdir. GDH enzimi ayrıca nörotransmitter sentezinde, insülin salınımında ve tümör büyümesindeki rolleri düşünüldüğünde çok yönlü bir enzimdir. Canlıdan canlıya farklı yapısal ve kinetik özellik göstermesi GDH enzimini daha da ilginç kılmaktadır. Diyabet hastalığının tedavisinde yeni yaklaşımların geliştirilmesinde de oldukça yüksek öneme sahiptir.

GDH, tüm canlılarda bulunan ve bulunduğu canlının ihtiyacına, bulunduğu dokuya göre reaksiyon yönü ve kinetik özellikleri değişebilen bir enzimdir. Örneğin prokaryot canlılarda daha çok enerji elde edilmesi için kullanıldığından reaksiyon genellikle deaminasyon yönünde gerçekleşmektedir. İnsan beyninde glutamat sentezi için aminasyon yönünde çalışırken diğer dokularda iki yönlü olarak çalışmaktadırlar. GDH enziminin tüm bu özellikleri göz önüne alındığında çok önemli olduğu anlaşılmaktadır (Güler, 2014).

GDH enzimi bugüne kadar mantar, bakteri, bitki ve kısımları, hayvansal dokulardan ve insanlardan saflaştırılmış ve kinetik özellikleri araştırılmıştır. Bu kaynakların yanında balıklar da kaynak olarak kullanılmış ve köpek balığı, tuna balığı ve güney kutup balığından GDH enzimi saflaştırılmıştır. Bu balıkların ortak özellikleri tuzlu su balıkları olmasıdır. Yapılan literatür taramasında gökkuşağı alabalığından saflaştırılmış GDH enzimine ait bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu açıdan tatlı su balığı olan ve kültür ortamında yetiştirilebilen gökkuşağı alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) karaciğerinden saflaştırılan GDH enziminin yapısal ve kinetik özelliklerinin incelenmesi, tatlı ve tuzlu su balıkları arasındaki farklılıkların görülmesi ve anlaşılması açısından bir yaklaşım sağlayabilir. Aynı zamanda diğer canlı türleri ile olan GDH farklılıklarının anlaşılmasına katkı sağlayabilir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. PROTEİNLER

Proteinler canlılığın oluşumu ve devamı için oldukça önem taşıyan makromoleküller olup, tüm canlılarda yaşamsal döngünün devamlılığı için mutlak ihtiyaç duyulan maddelerdir. Eski Yunanca’da *proteios* kelimesinden gelen ve kelime anlamı “önde gelen, ilk sırada yer alan” olan proteinler, yaşam için de taşıdığı anlam kadar önemlidir (Satyanarayana ve Chakrapani, 2013). Hemen hemen tüm biyolojik olaylarda görevi bulunan proteinler organizmada en çok bulunan biyomoleküllerdir. Proteinler, diğer proteinlerin sentezlenmesinde, hücre metabolizmasında, bazı moleküllerin hareketlerinin düzenlenmesinde, hücresel enerjinin depolanmasında, bazı moleküllerin taşınmasında ve daha birçok biyolojik olayda görev almaktadırlar. Tüm bu aldıkları görevler düşünüldüğünde proteinler yaşamın devamlılığı için ne kadar önemli olduğu anlaşılmaktadır (Öncel, 2017).

Proteinler yapılarında karbon, hidrojen, oksijen ve azot atomlarını farklı oranlarda bulundurmaktadırlar. Bu oranlar her proteinde farklılık gösterse de genel olarak %50-55 karbon, %6-8 hidrojen, %19-24 oksijen, %13-19 azot ve %0-4 kükürt atomu şeklindedir. Diğer makromoleküllere kıyasla azot atomunu daha yüksek oranda içerdiği görülmektedir (Satyanarayana ve Chakrapani, 2013).

Proteinlerin bu kadar büyük bir grup ve birçok farklı görevde olmasından dolayı ayrımlarının daha iyi yapılabilmesi için sınıflandırılmaya gidilmiştir (Tablo 2.1).

Tablo 2.1: Proteinlerin sınıflandırılması (Satyanarayana ve Chakrapani, 2013).

1) Yapılarına Göre Proteinlerin Sınıflandırılması
• Basit Proteinler: Yapılarında yalnızca amino asit bulunan proteinlerdir. Basit proteinler de kendi içinde iki gruba ayrılmaktadır. a) <i>Globuler Proteinler:</i> Bu grup proteinlere örnek olarak; Albuminler, Globulinler, Glutenler, Histonlar, Globinler, Lektinler verilir. b) <i>Fibriler Proteinler:</i> Bu grup proteinlere örnek olarak; Kollajenler, Elastinler ve Keratinler verilir.

Tablo 2.1 (Devam): Proteinlerin sınıflandırılması (Satyanarayana ve Chakrapani, 2013).

- **Konjuge Proteinler:** Yapılarında amino asitlerden başka prostetik grup olarak amino asit yapısında olmayan maddeler içeren proteinlerdir. İçerdikleri prostetik grubun yapısına göre kendi içerisinde altı gruba ayrılmıştır.
 - a) *Nükleoproteinler:* Prostetik grup olarak nükleik asit içeren proteinlerdir (Örn: Nükleohistonlar).
 - b) *Glikoproteinler:* Prostetik grup olarak karbohidrat içeren proteinlerdir (Örn: Musin).
 - c) *Lipoproteinler:* Prostetik grup olarak lipit içeren proteinlerdir (Örn: Serum lipoproteinleri):
 - d) *Fosfoproteinler:* Prostetik grup olarak fosforik asit içeren proteinlerdir (Örn: Kazein).
 - e) *Kromoproteinler:* Prostetik grubu renkli olan proteinlerdir (Örn: Hemoglobinler).
 - f) *Metalloproteinler:* Prostetik grup olarak Fe, Co, Zn, Cu, Mn gibi metal iyonu içeren proteinlerdir [Örn: Karbonik anhidraz (Zn)].
- **Türev Proteinler:** Basit ve bileşik proteinlerin kimyasal ve fiziksel değişikliklere uğramalarıyla meydana gelen maddelerdir. Örnek olarak proteinlerin denatürasyonu ile oluşan *denatüre proteinler* verilebilir.

2) Fonksiyonlarına Göre Proteinlerin Sınıflandırılması

- **Yapısal Proteinler:** Deri, kemik ve saç gibi yapıların oluşumunda yer alan proteinlerdir. Bu grup proteinlere örnek olarak keratin ve kollajen örnek verilebilir.
- **Katalitik Proteinler:** Reaksiyon katalizleme özelliği olan proteinler bu sınıfa girer. Protein yapısında olan enzimler bu sınıfta yer almaktadır. Bu grup proteinlere örnek olarak heksokinaz ve pepsin enzimleri örnek verilebilir.
- **Transport Proteinler:** Küçük moleküllerin organizmada taşınmasında görevli olan proteinlerdir. Bu grup proteinlere örnek olarak hemoglobin ve serum albumin örnek verilebilir.
- **Hormonal Proteinler:** Biyolojik olayların gerçekleşmesinde rol oynayan protein yapılı hormonlar bu sınıfa girer. Bu grup proteinlere örnek olarak insülin ve büyüme hormonu örnek verilebilir.

Tablo 2.1 (Devam): Proteinlerin sınıflandırılması (Satyanarayana ve Chakrapani, 2013).

-
- **Kas Proteinleri:** Kas yapısında yer alan proteinler bu sınıfa girer. Bu grup proteinlere örnek olarak aktin ve miyosin örnek verilebilir.
 - **Depo Proteinler:** Bu grup proteinlere örnek olarak ovalbumin ve glutelin örnek verilebilir.
 - **Genetik Proteinler:** Genetik materyallerde görev alan proteinler bu gruptadır. Bu grup proteinlere örnek olarak nükleoproteinler örnek verilebilir.
 - **Savunma Proteinleri:** İmmün sistemde görev alan proteinler bu sınıfa girer. Bu grup proteinlere örnek olarak immünoglobulinler örnek verilebilir.
 - **Reseptör Proteinler:** Hormonları ve virüslerin bağlanmasında görev alan proteinlerdir.
-

Proteinler makromolekülerdir ve bu makromoleküllerin oluşumunu sağlayan daha küçük yapılar bulunmaktadır. Proteinlerin hidrolizi sonucu daha küçük yapı birimleri olan amino asitler meydana gelir. Bunun bir sonucu olarak proteinler amino asit polimerleri olarak tanımlanabilir. Proteinler organizmada sentez edilen ve aynı zamanda organizmada ihtiyaç durumuna göre yıkıma uğrayan biyomoleküllerdir. Organizmada bulunan proteinler;

Bazı önemli metabolik reaksiyonlarda görev alan enzimler çevre şartlarına ve metabolitik cevap ve ihtiyaç için aktivitelerinin düzenlenmesinden dolayı,

Besin yetersizliğine bağlı enerji ihtiyacı durumunda enerji kaynağı olması bakımından,

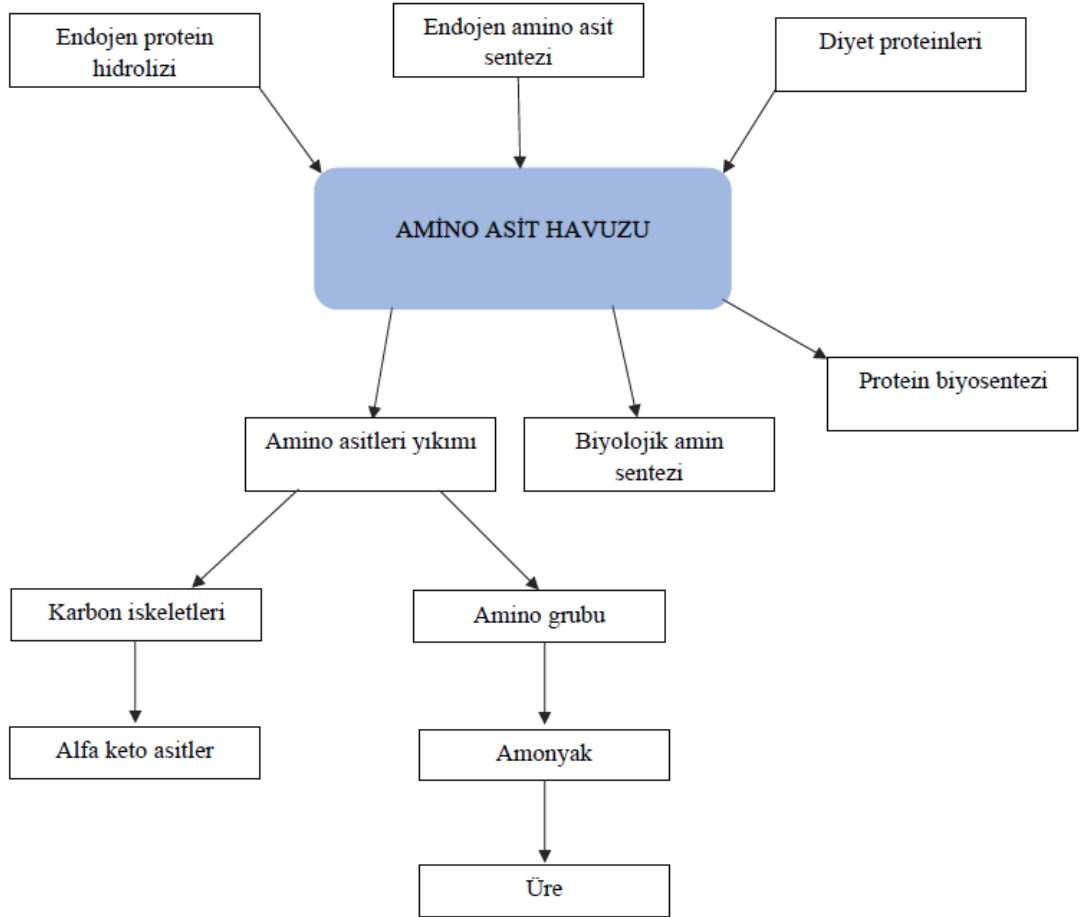
Protein sentezi için gerekli olabilecek bazı amino asitlerin sentezi için,

Transkripsiyonel veya translasyonel hatalardan kaynaklanan hasarlı veya işlevsiz proteinlerin uzaklaştırılması için yıkıma uğramaktadırlar. Tüm bu sebeplerin yanında besinlerle alınan proteinlerin de vücudun ihtiyacına göre kullanılması için yıkıma uğrayıp sindirilirler (Schimke,1976).

2.1.1. Proteinlerin ve Amino Asitlerin Yıkımı

Besinlerle vücuda alınan proteinlerin sindirimi ve ardından Emilimi, endojen protein hidrolizi ve endojen amino asit sentezleri sonucunda bir amino asit havuzu oluşur. Bu havuz

kanda, hücrelerde ve hücreler arası sıvılarda bulunan serbest amino asitlerin toplamıdır. Amino asit havuzunun devamlılığında kaslar ve karaciğer oldukça önemli rol oynamaktadır. Kaslar amino asit havuzunun yaklaşık yarısını sağlayan dokudur. Bu yüzden uzun süreli açlıkta ilk protein yıkımları kaslardan başlamaktadır (Öncel, 2017). Kanda bulunan bu serbest amino asitler karaciğere taşınır ve burada amino grubu uzaklaştırılır. Fazla olan azot üreye dönüştürülerek vücuttan atılır (Şekil 2.1).

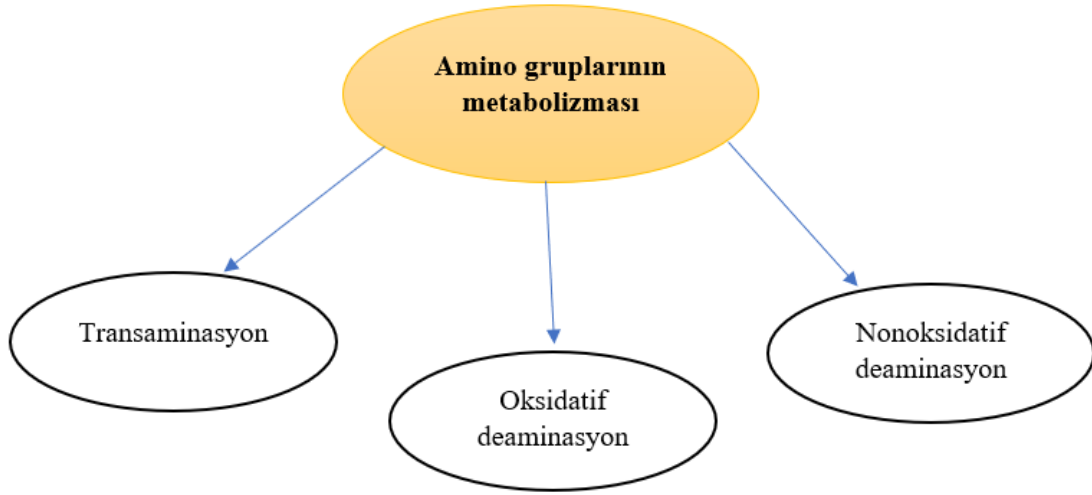


Şekil 2.1: Amino asit havuzunun oluşumu ve kullanımı (Öncel, 2017).

Uzun süreli açlıkta, endojen amino asit sentezinde ve biyojen aminlerin sentezi için gerekli olan amin grubu bulunmadığı zaman vücutta amino asit yıkımı hızlanır. Amino asitlerin başlıca yıkım yolları amino gruplarının uzaklaşması ile karbon iskeletinden yararlanılmasını sağlayan α -keto asitlere dönüşümüdür. Karbon iskeleti enerji elde edilmesinde kullanılır. Örneğin daha

çok enerji verebilmelerinden dolayı dallı amino asitlerin yıkımı beyin ve kas gibi hayati dokularda daha fazla ve hızlı olmaktadır (Murray ve diğ., 2009).

Amino asitlerin amino grubunun metabolizması transaminasyon, oksidatif deaminasyon ve nonoksidatif deaminasyon reaksiyonları ile sağlanır (Şekil 2.2).

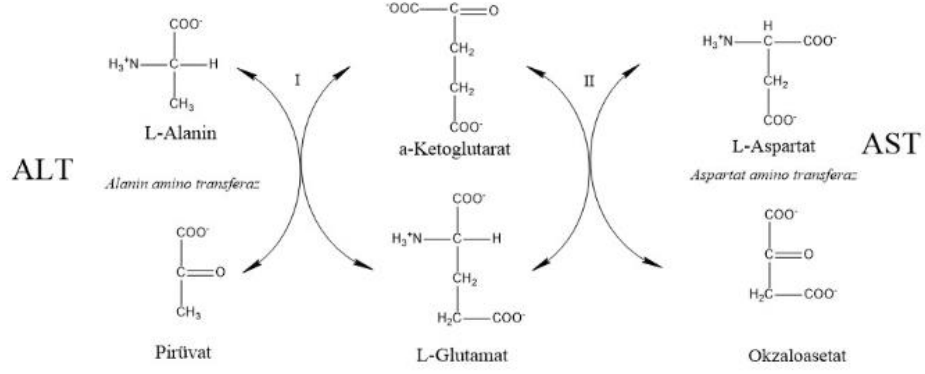


Şekil 2.2: Amino asitlerin amino gruplarının metabolizması (Murray ve diğ., 2009).

2.1.1.1. Transaminasyon

Bir amino asidin α -amino grubunun bir α -keto aside aktarılması reaksiyonudur. Bu reaksiyonu katalizleyen enzimler aminotransferazlardır ve bu enzimler B₆ vitamininin fosfatlı halini (piridoksal fosfat) koenzim olarak kullanır. Transaminasyon reaksiyonları reversibl (geri dönüşümlü) ve amfibolik (hem anabolik hem de katabolik yol) bir reaksiyondur. Transaminazlar birçok dokuda bulunmakla birlikte böbrek, iskelet kası, kalp kası ve karaciğerde yaygındırlar. Arginin, lizin, treonin, prolin ve hidroksiprolin spesifik aminotransferaz enzimi olmadığı için transaminasyona uğramazlar. Diğer tüm amino asitler ise transaminasyona uğrarlar. Transaminasyon reaksiyonları sonucunda tüm amino asitlerin amino grupları glutamatta toplanır. Glutamat daha sonra organizmada bir amino grubu vericisi olarak biyosentez reaksiyonlarında görev alır (Lennarz ve Lane, 2013). En çok bilinen transferaz (transaminaz) enzimleri aspartat aminotransferaz (AST/glutamat oksalasetat transaminaz,

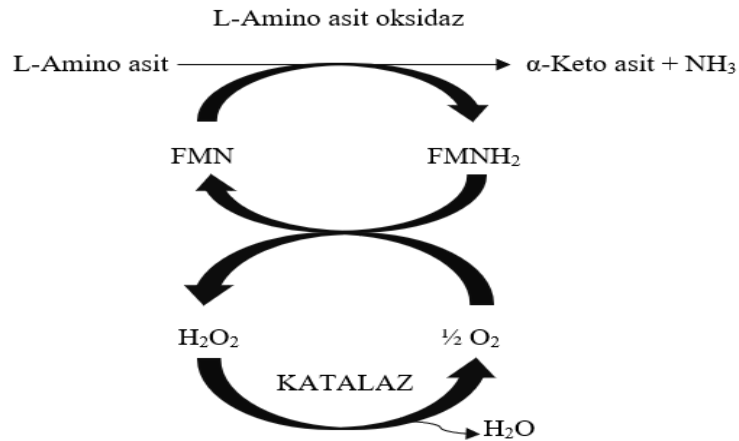
GOT) ve alanin aminotransferazdır (ALT/glutamat pirüvat transaminaz, GPT). Şekil 2.3'te AST ve ALT enzimlerinin transaminasyon reaksiyonları verilmiştir.



Şekil 2.3: Alanin ve aspartat aminotransferaz enzimlerinin katalizlediği reaksiyon (Öncel, 2017).

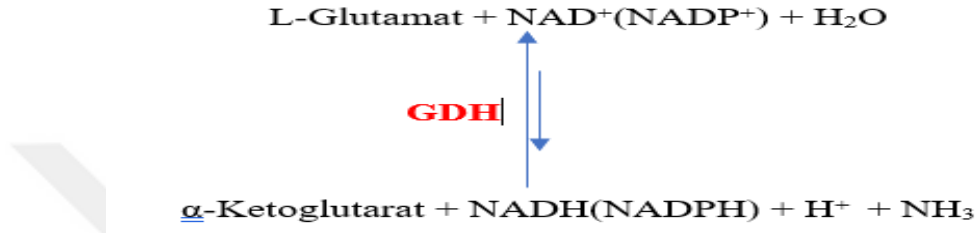
2.1.1.2. Oksidatif Deaminasyon

L-Amino asit oksidazların katalizlediği reaksiyon sonucunda amino asitten amonyak çıkmasıyla oluşan deaminasyon yoludur. Bu oksidaz enzimleri koenzim olarak flavin mononükleotit (FMN) kullanırlar. Reaksiyon sonucu α-keto asit, amonyak ve hidrojen peroksit (H₂O₂) oluşur (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: Oksidatif deaminasyon reaksiyonu (Öncel, 2017).

Ancak hem oksidatif deaminasyon sınıfında olup hem de diğer L-amino asit oksidazların kullandığı koenzimi kullanmayan bir enzim bulunmaktadır. Glutamata transaminasyon reaksiyonları sonucunda taşınan amino grupları glutamat dehidrojenaz (GDH) enzimi ile oksidatif deaminasyona uğrar (Şekil 2.5). Bu reaksiyon sırasında koenzim olarak NAD^+ ya da NADP^+ kullanılabilir. Organizmada hem NAD^+ hem de NADP^+ 'yi koenzim olarak kullanabilen tek enzim GDH enzimidir.



Şekil 2.5: Glutamat dehidrojenaz enziminin kataliz ettiği reaksiyon (Öncel, 2017).

2.1.1.3. Nonoksidatif Deaminasyon

Özellikle hidroksil grubu içeren serin ve treonin amino asitleri ve kükürtlü amino asit olan sistein ve homosistein için geçerli olan bir yoldur. Karaciğerde bulunan serin dehidrataz ve treonin dehidrataz enzimlerinin katalizlediği reaksiyon sonucu bir mol su çıkışı ile serbest NH_3 oluşur. Desülfatazların katalizlediği reaksiyon sonucu sistein ve homosisteinden α -keto asit, NH_3 ve H_2S oluşur. Desülfatazlar daha çok bağırsak bakterilerinde etkili olup oksijene ihtiyaçları yoktur (Öncel, 2017).

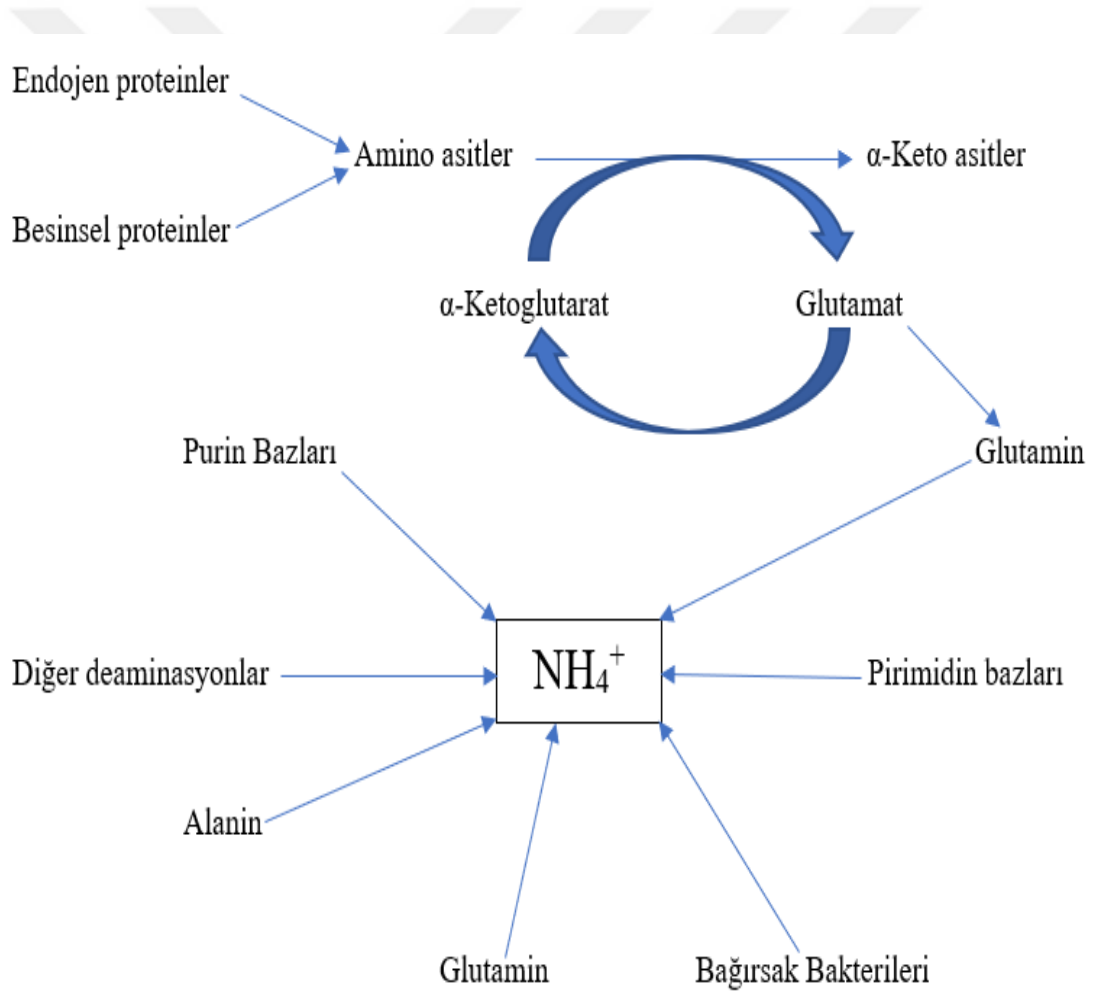
2.2. AMONYAK METABOLİZMASI

Amonyak toksik etkilerinden dolayı organizmada istenmeyen metabolitlerdendir. Dolaşımda oldukça az düzeylerde amonyak bulunmaktadır (10-20 mg/dL). Bunun başlıca sebebi amonyağın oluşumunun hemen ardından karaciğerin amonyağı hızlıca uzaklaştırması ve beyin, kas gibi dokularda serbest amonyaktan çok glutamin ve alanin olarak açığa çıkarmalarıdır. Bunun sonucunda kanda amonyak seviyesi düşük tutulur. Ayrıca diğer dokulardan glukoz-alanin döngüsü sayesinde amonyak karaciğere taşınır ve burada metabolize olur.

Amonyak birden fazla etkenle organizmada kendiliğinden oluşmaktadır (Şekil 2.6). Bunlar;

- Amino asitler
- Glutamin
- Bağırsak bakterileri
- Aminler
- Pürin ve pirimidin bazlarından

oluşabilmektedir (Öncel, 2017).



Şekil 2.6: Amonyak kaynakları (Öncel, 2017).

Amino asitler: Transaminasyon ve oksidatif deaminasyon reaksiyonları sonucunda amonyak oluşmaktadır.

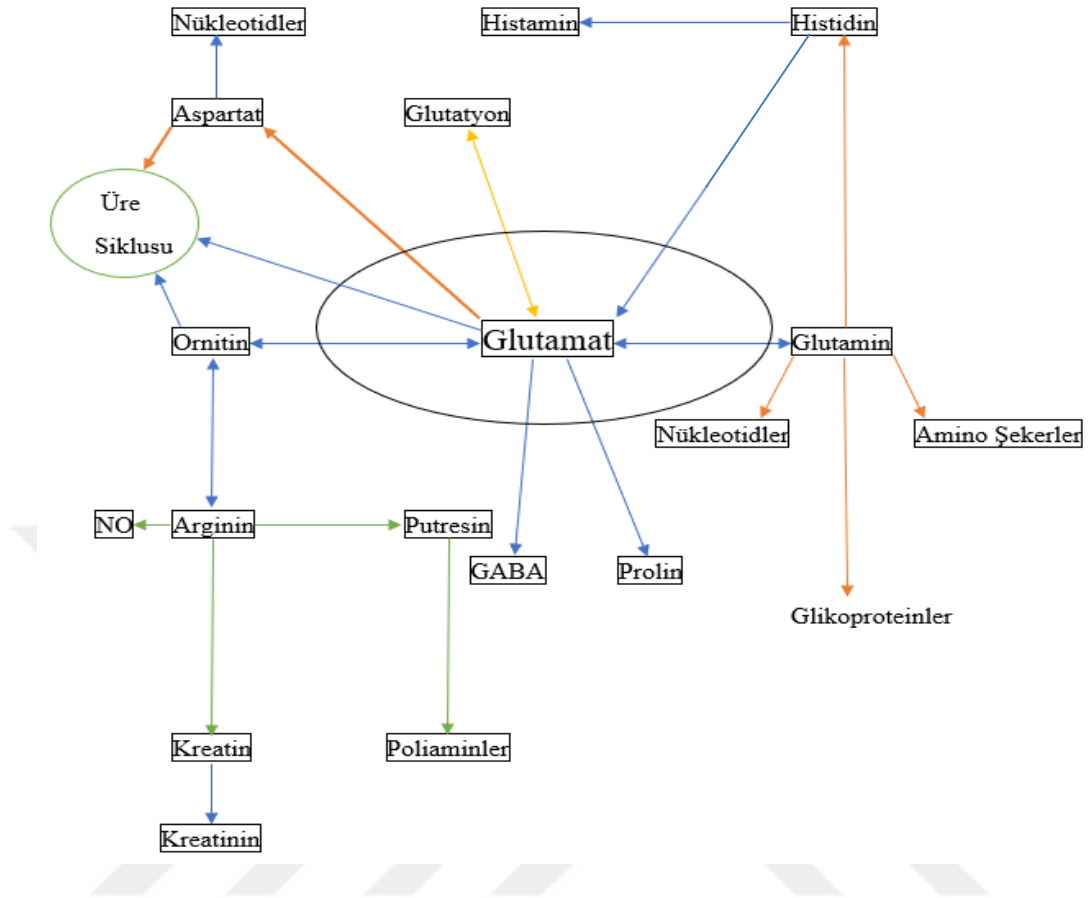
Glutamin: Böbrek ve bağırsaklarda glutamin amino asidinin üzerinden amonyak oluşumu gerçekleşir. Glutaminaz enziminin kataliz ettiği bu reaksiyon ile amonyak ve glutamat oluşur. Böbreklerde oluşan amonyak idrarla atılır.

Bağırsak bakterileri: Bağırsak bakterilerinde bulunan bir enzim olan üreaz sayesinde üre molekülleri amonyaka parçalanırlar.

Aminler: Monoamin oksidazın etkisi ile besinlerle alınan, hormon veya nörotransmitter olan aminlerden amonyak oluşur.

Pürin ve pirimidinler: Pürinlerden adenzin deaminaz, miyoadenilat deaminaz gibi enzimlerin etkisiyle, pirimidinlerden ise β -amino asitleri oluşturan reaksiyonlar sonucunda amonyak oluşur.

Amonyak miktarının artması organizmada bazı durumların oluşmasına sebep olmaktadır. Amonyak miktarının artmasıyla mitokondride bulunan GDH enzimi aminasyon yönünde çalışır ve bu reaksiyon sonucu glutamat oluşur. Oluşan glutamat vücutta çeşitli maddelerin oluşumunda kullanılır (Şekil 2.7). Glutamat konsantrasyonunun artması substratlardan biri olan α -ketoglutaratın tüketiminin artmasına neden olacaktır. α -Ketoglutarat trikarboksilik asit (TCA) siklusu maddesi olduğundan TCA'nın çalışmasını yavaşlatacak ve ayrıca oksido-redüktaz enzimleri için önemli olan NADH miktarının azalmasına neden olacaktır. Ayrıca artan glutamat konsantrasyonu glutamin oluşumunu arttıracak, glutamin ise hücre içi osmotik basıncı arttıracaktır (Satyanarayana ve Chakrapani, 2013; Öncel, 2017).



Şekil 2.7: Glutamat metabolizması (Öncel, 2017).

Amonyak artışı beyin için uyarıcı etki yapan bir nörotransmitter olan glutamat ve inhibitör nörotransmitter olan γ -amino bütirik asit (GABA) düzeylerinin azalmasına yol açmaktadır. Bundan dolayı beyinde glutamat azlığına bağlı olarak letarji (halsizlik) görülür. Amonyak K^+ ve Cl^- iyonlarının geçirgenliğini arttırarak iyonik dengeyi bozar. Amonyakın bir başka etkisi de aromatik amino asitlerin kan-beyin bariyerinden geçişlerini kolaylaştırmaktır. Bunun sonucu olarak beyinde serotonin artışı görülür ve bu artışa bağlı olarak anoreksi görülür.

Kan amonyak düzeyinin aşırı artışı hiperamonyemi olarak tanımlanır. Amonyak giderilme mekanizmalarında oluşan genetik ya da sonradan oluşabilecek durumlar sebebiyle kan pH'ında yükselme yani alkaloz görülür. Hiperamonyemi, hepatitler ve alkolizm yüzünden de oluşabilmektedir. Hiperamonyemiye bağlı olarak hepatik koma veya zekâ geriliği görülebilmektedir (Satyanarayana ve Chakrapani, 2013).

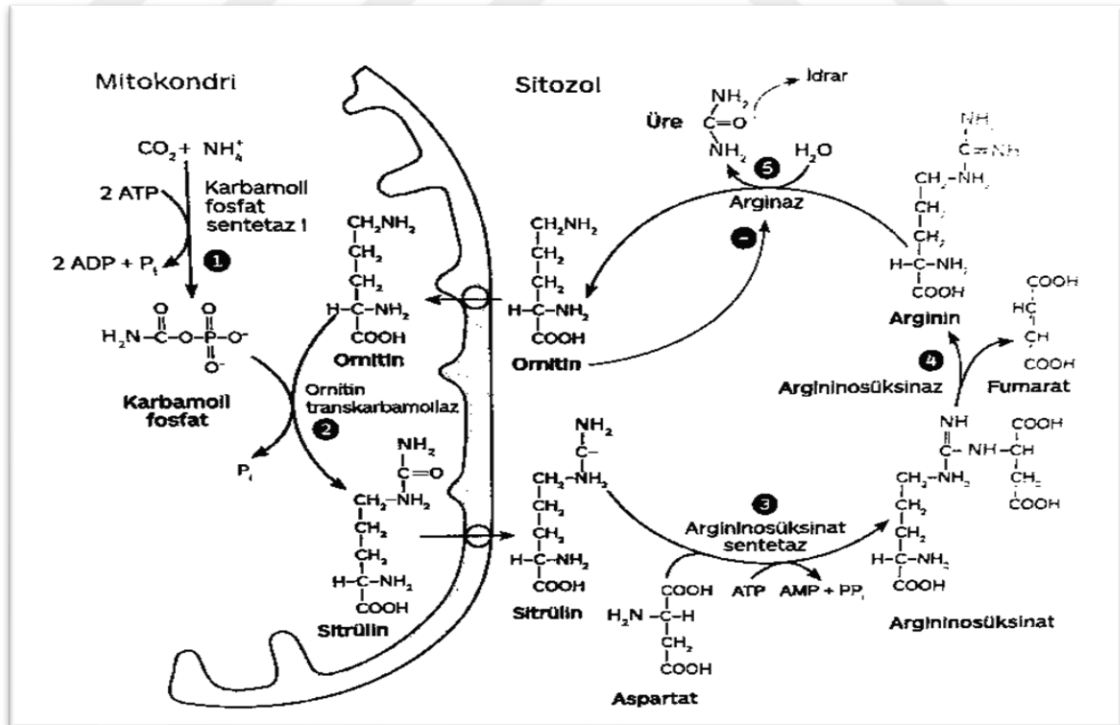
2.2.1. Amonyak Atılım Yolları

Organizmada çeşitli yollardan oluşan ve vücut için toksik, olumsuz yönde etkili olan amonyağın atılması için birden fazla yol bulunmaktadır. Bunlar;

- Üre siklusu
- Glutamin sentezi
- Alanin sentezi

2.2.1.1. Üre Siklusu

Üre suda çözünebilen ve geri emilimi düşük olan, amino asitlerin amino gruplarının vücuttan atılmalarının başlıca yoludur. Üre siklusu başlıca böbrek ve karaciğerde meydana gelmektedir. Üre siklusu hücrenin iki komponentinde gerçekleşir. Siklus ilk olarak mitokondride başlar ve daha sonra sitozolde devam eden reaksiyonlar sonucu son ürünler olan üre ve ornitin oluşarak tamamlanır. Üre vücuttan atılırken ornitin tekrar mitokondriye geçerek sıklusa katılır (Şekil 2.8).

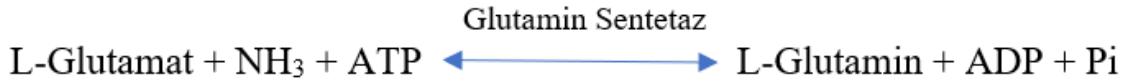


Şekil 2.8: Üre siklusu (Öncel, 2017).

Üre siklusunun asıl amacı vücutta oluşan amonyağın vücuttan atılması ve bikarbonatı harcayarak pH'ın düzenlenmesidir. Temel olarak üre siklusu dört basamakta gerçekleşir. Bunlar sırasıyla; transaminasyon, glutamatın oksidatif deaminasyonu, amonyağın taşınması ve son olarak da üre siklusunun reaksiyonlarıdır (Öncel, 2017).

2.2.1.2. Glutamin Sentezi

GDH enzimi sayesinde oluşan glutamat molekülü daha sonra glutamin sentetaz enzimi katalizi ile glutamine dönüşür (Şekil 2.9). Organizmada glutamin sentezinin iki amacı bulunmaktadır. İlki amonyağın zehirsizleştirilmesidir. İkinci olarak da azotlu bileşiklerin sentezi için gerekli olan amino grubunun sağlayıcısı olmasıdır.

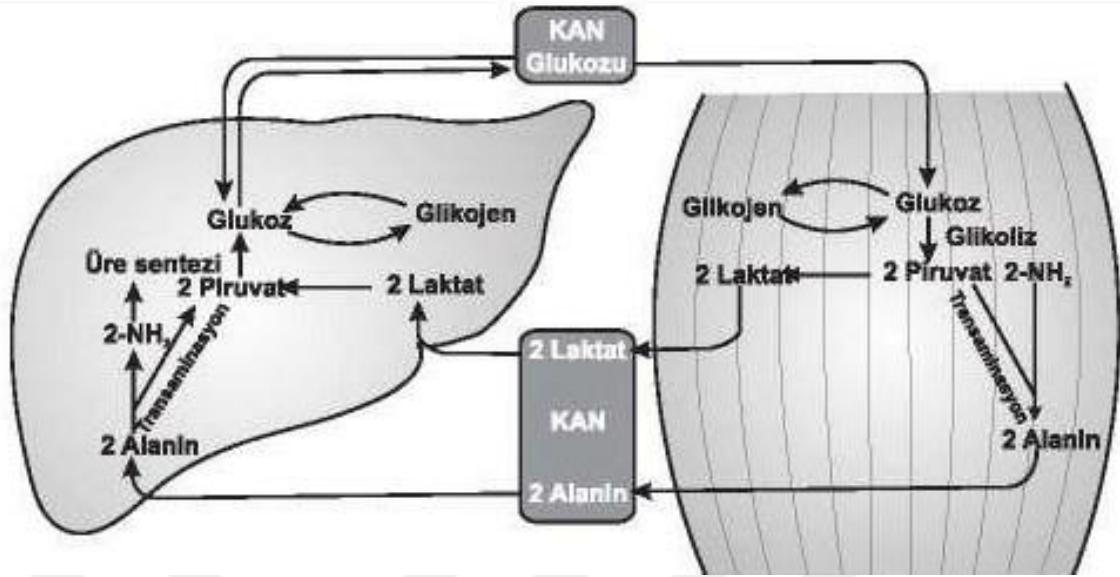


Şekil 2.9: Glutamin oluşum reaksiyonu.

Glutamin sentezi organizmada başlıca karaciğer, böbrek, beyin ve kaslarda meydana gelmektedir. Glutaminin kan düzeyindeki oranı diğer amino asitlere kıyasla daha fazladır.

2.2.1.3. Alanin Sentezi

Kaslarda oluşan amonyak, pirüvat-alanin (glukoz-alanin) döngüsü sayesinde üre siklusuna katılabilmesi için kaslardan karaciğere taşınır. Glikoliz reaksiyonları sonucunda oluşan pirüvat molekülü ALT (Alanin aminotransferaz) enzimi sayesinde alanine dönüşür. Alanin karaciğere gittiği zaman yine aynı enzim tarafından, ters yönde reaksiyon gerçekleştirilerek glutamat ve pirüvat oluşur. Glutamatta bulunan amonyak, GDH enzimi ile hidroliz edilir ve üre siklusunda zehirsizleştirilir. Pirüvat ise glukoneojenez reaksiyonları ile tekrar enerji eldesinde kullanılmaya hazır hale getirilir (Şekil 2.10) (Satyanarayana ve Chakrapani, 2013; Öncel, 2017).



Şekil 2.10: Piruvat-alanin döngüsü (Onat ve diğ, 2002).

2.3. ENZİMLER VE GENEL ÖZELLİKLERİ

Enzimler organizmada reaksiyonları hızlandıran biyolojik katalizörlerdir. İntron ve tRNA'nın işlenmesine katkıda bulunan ve RNA molekülü olan ribozimler dışında protein yapısındadırlar. Enzimlere ait bazı kavramlar ve tanımları şu şekildedir;

- *Substrat*: Enzimlerin kataliz ettikleri moleküllere verilen addır.
- *Koenzim*: Bazı enzimler aktivitelerini gösterebilmeleri için amino asit dışında başka organik maddelere ihtiyaç duyabilirler. Bu organik maddelere koenzim denilir.
- *Kofaktör*: Bazı enzimler aktivitelerini gösterebilmeleri için amino asit dışında başka metal iyonlarına ihtiyaç duyabilirler. Bu metal iyonlarına genel olarak kofaktör denir.
- *Prostetik grup*: Enzimlere kovalent olarak bağlanmış, diyaliz işlemiyle uzaklaştırılamayan ve ısı kararlı nonprotein yapılu gruplara prostetik grup denir.
- *Apoenzim*: Aktivitesi için koenzime ihtiyaç duyan bir enzimin, koenzim bağlanmamış protein kısmına verilen isimdir.

- *Holoenzim*: Apoenzim ile koenzimin oluşturduğu yapıya denir. Kelime anlamı bileşik enzimdir (Küfrevioğlu ve Keha, 2014).

2008 yılından günümüze kadar yaklaşık olarak 170000'den fazla enzim saptanmıştır. Bu sayı her geçen gün daha da artmaktadır. Bu sayılar nedeniyle enzimlerin görevlerine, diğer bir ifade ile kataliz ettikleri reaksiyon çeşitlerine göre sınıflandırılmaları yapılmıştır. Tablo 2.2'de sistematik enzim sınıflandırılması ve bu sınıfa ait enzimlerin kataliz ettikleri reaksiyon türleri verilmiştir (İlhan, 2017).

Tablo 2.2: Enzimlerin sınıflandırılması (İlhan, 2017).

Grup	Kataliz Edilen reaksiyon	Reaksiyon Gösterimi	Örnek Enzim
EC.1 Oksidoredüktazlar	Redoks reaksiyonları katalizlenir.	$AH+B \longrightarrow A+BH$ $A + O \longrightarrow AO$	Dehidrojenazlar, oksidazlar, peroksidazlar, oksijenazlar vb.
EC.2 Transferazlar	Bir fonksiyonel grubun bir bileşikten bir başka bileşiğe aktarımını katalizlerler.	$AB+C \longrightarrow A+BC$	Transaminazlar, kinazlar, fosfomutazlar vb.
EC.3 Hidrolazlar	Substrata su ekleyerek neden olan, bir substrattan iki ürün oluşumunu kataliz ederler.	$AB+H_2O$ $\downarrow$ $AOH+BH$	Esteraz, lipaz, fosfataz, peptidaz, nükleaz, amilaz, üreaz vb.
EC.4 Liyazlar	C-C, C-N, C-O ve C-S bağlarının kopmasını veya oluşmasını hidrolitik olmayan yollarla kataliz eden enzimlerdir.	$RCOCOOH$ $\downarrow$ $RCOH + CO_2$	Dekarboksilazlar, aldolaz, hidrataz, dehidrataz, sentaz enzimleri vb.
EC.5 İzomerazlar	Molekül içi yapılanmayı kataliz eden enzimlerdir.	$AB \longrightarrow BA$	Resamazlar, izomerazlar, epimerazlar vb.
EC.6 Ligazlar	C-C, C-N, C-O ve C-S bağlarının oluşumunu, ATP'nin parçalanmasından gelen enerji ile kataliz eden enzimlerdir.	$X + Y + ATP$ $\downarrow$ $XY + ADP + Pi$	Sentetazlar, karboksilazlar vb.

Enzimlerin aktivitelerini gösterebilmeleri için bazı şartların etkisi de bulunmaktadır. Her enzimin maksimum aktivitesi için bu şartlar değişebilmekle beraber, enzimin bulunduğu doku ve görevi de bu maksimum aktivitenin belirlenmesinde önemlidir. Enzimlerin çalışmasını etkileyen faktörler;

- *Sıcaklık*: Her enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerine optimum sıcaklık değeri denir. Bu değer her enzim için farklı olabilir. Çok yüksek sıcaklık değerlerinde proteinlerin denatüre olmalarından kaynaklı olarak aktivite geri dönüşümsüz olarak kaybedilir.
- *pH*: H^+ iyonlarının konsantrasyonu, substratların iyonizasyonunda enzimlerin aktif bölgesinde yer alan asidik ve bazik grupların substrat ile etkileşimleri için önemlidir. Çok yüksek veya çok düşük pH değerlerinde enzimin iyonik karakteri değişeceğinden aktivitesi de değişmektedir. Enzimlerinin maksimum aktivite gösterdikleri pH değerine optimum pH değeri denilmektedir.
- *İyon etkisi*: Metal iyonları bazı enzimler için kofaktör olarak görev yapar ve aktivitenin olmasını sağlar. Ancak bazı metaller belli konsantrasyon değerlerine ulaştıklarında enzimlerin aktivitelerinin azalmasına veya durmasına neden olabilmektedir.
- *Enzim konsantrasyonu*: Yeterli substrat olduğu durumlarda, ortamda ne kadar çok reaksiyona giren enzim bulunursa reaksiyon hızı da o oranda doğrusal olarak artmaktadır.
- *Substrat konsantrasyonu*: Sabit enzim konsantrasyonunun bulunduğu bir ortamda substrat konsantrasyonunun artmasıyla enzim reaksiyonunun hızı belirli bir noktaya kadar artış gösterir, daha sonra hız sabit kalmaktadır.
- *Işık*: Enzimlerin aktiviteleri ışık tarafından artar ya da azalır. Bu durum enzimlerin hangi biyolojik olayda görev yaptıklarına göre değişiklik gösterebilir. Örneğin fotosentez enzimlerinin aktiviteleri ışık altında artmaktadır. UV ışığı ise bazı enzimlerin aktivitesinin azalmasına neden olabilmektedir (Onat ve diğ., 2002; İlhan, 2017; Can ve Akev, 2021).

2.3.1. Enzim İnhibisyonu

Enzimatik bir reaksiyonun hızını, katalitik etkinliğini azaltabilen veya tamamen durdurabilen maddelere inhibitör, bu gerçekleşen olay ise enzim inhibisyonu denmektedir.

Enzim inhibisyonu birçok hastalığın tedavisi için oldukça önemli ve her geçen gün popülerliğini koruyan bir çalışma alanıdır.

Enzim inhibisyonu farklı mekanizmalar üzerinden gerçekleşebilmekte ve bu mekanizmalara göre enzim inhibisyonu iki grupta incelenmektedir. Bunlar;

A) Reversibl (Geri Dönüşümlü) Enzim İnhibisyonu

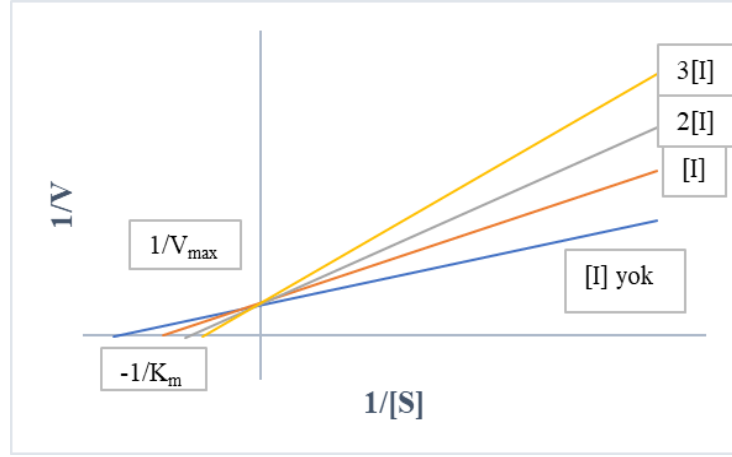
- Kompetitif (yarışmalı) enzim inhibisyonu
- Nonkompetitif (yarişmasız) enzim inhibisyonu
- Ankompetitif (yarı-yarışmalı) enzim inhibisyonu
- Karışık Tip (Miks) enzim inhibisyonu

B) İrreversibl (Geri Dönüşümsüz) Enzim İnhibisyonu (İlhan, 2017).

2.3.1.1. *Reversibl (Geri Dönüşümlü) Enzim İnhibisyonu*

2.3.1.1.1. *Kompetitif (Yarışmalı) Enzim İnhibisyonu*

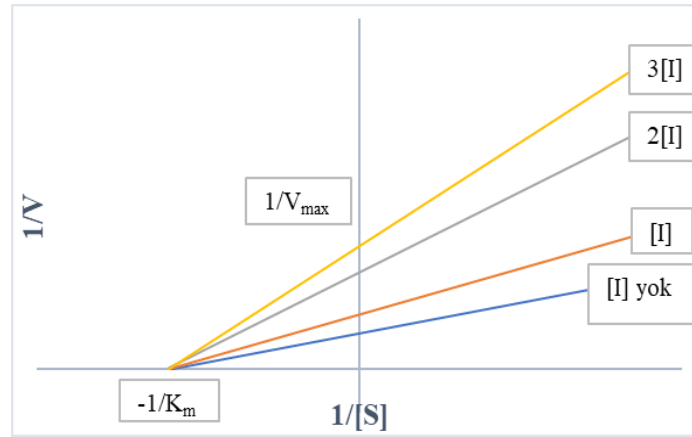
İnhibe edilmek istenen enzimin kullandığı substrata yapısal olarak benzeyen inhibitörlerin olduğu inhibisyon çeşididir. İsminden de anlaşılacağı gibi inhibitör madde substratla yarışarak enzimin aktif merkezine girmeye çalışır. Bu yüzden substratın enzime olan ilgisini gösteren K_m değerinin artmasına yani substratın enzime olan ilgisinin azalmasına neden olur. Ortamdaki substrat konsantrasyonunun artması inhibitör maddenin etkinliğini azaltabilmektedir ve inhibisyon bu şekilde tersine çevrilebilir. Yarışmalı inhibisyon türüne en iyi örnek olarak, süksinata kimyasal yapı olarak çok benzeyen malonat, glutarat, oksalat ve oksalasetatın süksinat dehidrojenaz enziminin inhibitörü olması verilebilir. Yarışmalı inhibisyon türünde K_m değeri artarken V_{max} değerinde herhangi bir değişim gözlenmez (İlhan, 2017). Yarışmalı inhibisyon türüne ait Lineweaver-Burk grafiği Şekil 2.11’de verilmiştir.



Şekil 2.11: Yarışmalı enzim inhibisyonuna ait Lineweaver-Burk grafiği (İlhan, 2017).

2.3.1.1.2. Nonkompetitif (Yarışmasız) Enzim İnhibisyonu

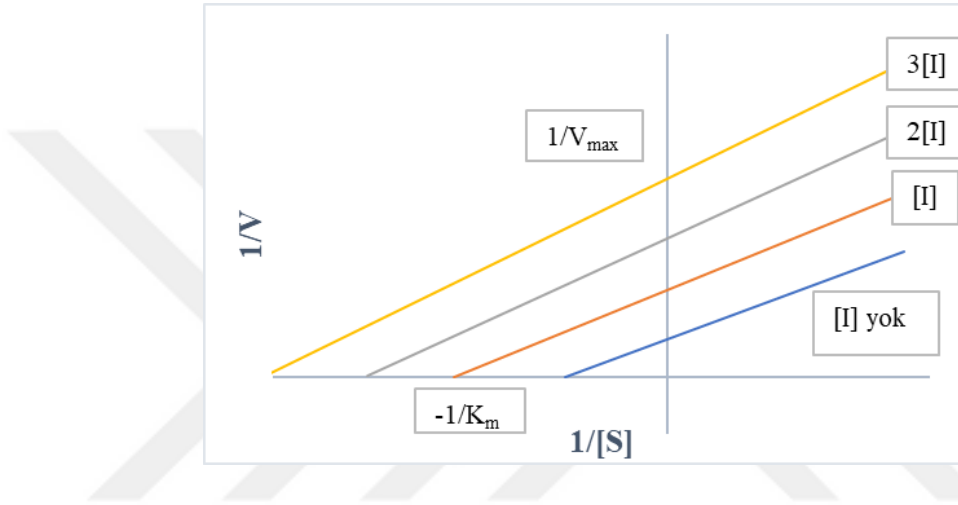
Bir inhibitörün substratın bağlanma bölgesi dışında spesifik bir başka bağlanma bölgesine enzim serbest halde iken enzime ya da enzim-substrat kompleksine bağlanabildiği inhibisyon türüdür. Genelde bu tip inhibisyon gösteren inhibitörler yapısal olarak substratlara benzemezler. Serbest enzime ya da enzim-substrat kompleksine bağlanabildiği ve bu karmaşıklık yüzünden nonkompetitif (yarışmasız) inhibisyon türü son yıllarda miks inhibisyon içinde değerlendirilmektedir. Reaksiyon kinetiğinde inhibitör madde substratla yarışmadığı için substratın enzime olan ilgisini değiştirmez, yani K_m değeri değişmez. V_{max} değeri ise azalmaktadır. Nonkompetitif (yarışmasız) inhibisyon türüne ait Lineweaver-Burk grafiği Şekil 2.12’de verilmiştir (İlhan, 2017).



Şekil 2.12: Yarışmasız enzim inhibisyonuna ait Lineweaver-Burk grafiği (İlhan, 2017).

2.3.1.1.3. Ankompetitif (Yarı-Yarışmalı) Enzim İnhibisyonu

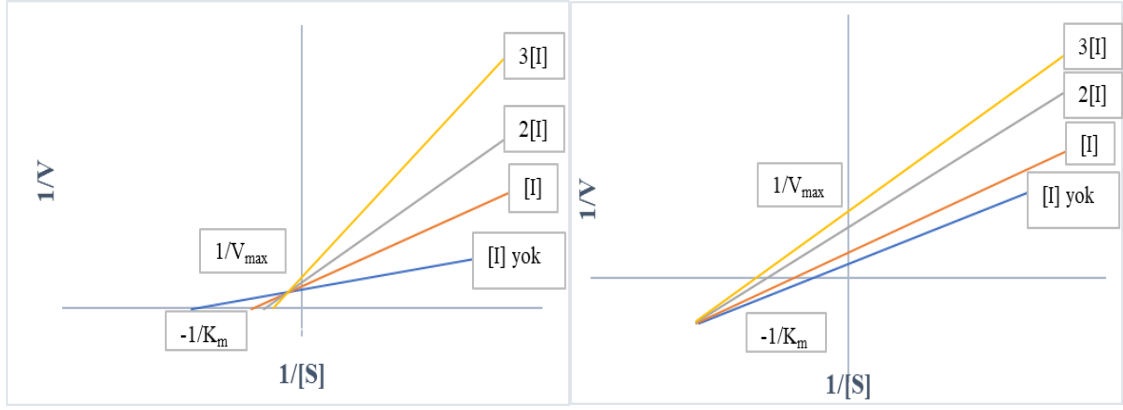
İnhibitör maddenin sadece enzim-substrat kompleksine bağlandığı inhibisyon türüdür ve bu kompleksten ürün meydana gelememektedir. İnhibitör madde yapısal olarak substrata benzememektedir ve substratın bağlandığı yerin dışında bir yere bağlanmaktadır ve enzimin aktivitesi bu şekilde azalmaktadır. Ankompetitif inhibisyon türünde K_m ve V_{max} değerleri inhibitör varlığında azalmaktadır (İlhan, 2017). Ankompetitif (yarı-yarışmalı) enzim inhibisyonuna ait Lineweaver-Burk grafiği Şekil 2.13'te verilmiştir.



Şekil 2.13: Yarı-yarışmalı enzim inhibisyonuna ait Lineweaver-Burk grafiği (İlhan, 2017).

2.3.1.1.4. Karışık (Miks) Enzim İnhibisyonu

Bu inhibisyon türünde inhibitör madde enzim aktif bölgesine bağlanabildiği gibi enzim-substrat kompleksine de bağlanabilmektedir. Bu tip inhibisyonda substrat konsantrasyonunun artırılmasıyla inhibisyon azaltılabilir ancak tamamen durdurulamaz. İnhibitörün aktif merkeze de bağlanabilmesinden dolayı substratın enzime olan ilgisi, yani K_m değeri, artabilir ya da azalabilir. V_{max} değeri ise daima azalmaktadır. Karışık Tip (Miks) enzim inhibisyonuna ait Lineweaver-Burk grafiği Şekil 2.14'te verilmiştir (Küfrevioğlu ve Keha, 2014; İlhan, 2017).



Şekil 2.14: Karışık (Miks) tip enzim inhibisyonuna ait Lineweaver-Burk grafikleri (İlhan, 2017).

2.3.1.2. İrreversibl (Geri Dönüşümsüz) Enzim İnhibisyonu

Geri dönüşümsüz inhibisyon türünde inhibitör madde enzimin kataliz ettiği reaksiyon için gerekli olan bir fonksiyonel gruba kovalent olarak bağlanır. Bu bağlanmanın etkisiyle enzimin aktif merkezinin yapısı bozulur ve substratın bağlanması gerçekleşmez. Bu inhibisyon türü adını parçalanması kolay olmayan ve inhibitör ile enzim arasında oluşan kovalent bağdan adını almaktadır. İnhibisyon başlangıçta tam anlamıyla oluşmaz ancak zamana bağlı olarak artar.

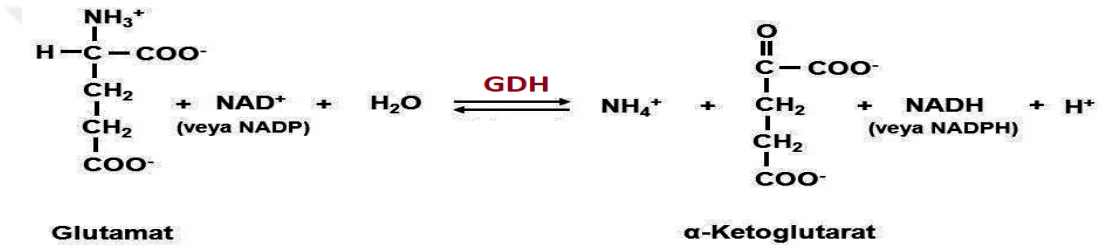
Bu tip inhibisyona en iyi örneklerden biri, İkinci Dünya Savaşı'nda sinir gazı olarak bilinen ve kullanılan diizopropil florofosfat (DFP) adlı bileşiktir. DFP, asetilkolin esteraz enziminin aktif merkezindeki serin amino asidinin hidroksil grubuna kovalent bağlanarak, substrat olan asetilkolinin enzimin aktif merkezine bağlanmasını engeller. Bu engellemeyle sinir uyarıları bloke edilir ve böylece bu maddeye maruz kalanlarda felç görülür.

Son yıllarda bu inhibisyon türünün önemi oldukça artmıştır. Geri dönüşümsüz inhibisyon türünün bir alt sınıfı olan ve intihar inhibitörleri olarak isimlendirilen bu maddeler, tedavi amaçlı üretim için yapılan araştırma alanını oldukça genişletmiştir. Bu tarz bir inhibitör madde hedef enziminin aktif merkezine bağlanıncaya dek oldukça tepkisizdir. Bu tip inhibitörler enzimin aktif bölgesi ile kovalent olarak geri dönüşümsüz bağlanırken, inhibitör aynı zamanda enzim tarafından da parçalanır. Bu parçalanma ürünleri de enzimin aktif merkezine kovalent olarak bağlanarak inhibisyonu gerçekleştirir. Bu reaksiyon özelliklerinden dolayı intihar inhibitörleri akıllı ilaç tasarımlarında önemli rol oynamaktadırlar. Örneğin; beta laktamaz inhibitörleri etkilerini enzimin aktif merkezine bağlanarak gösterirler. Bu bağlanmanın

gerçekleşmesinden sonra enzim inhibitörün parçalanmasına da neden olur ve oluşan ürünler beta laktamaz enziminin aktif merkezine kovalent olarak bağlanır (İlhan, 2017).

2.4. GLUTAMAT DEHİDROJENAZ ENZİMİ VE ÖZELLİKLERİ

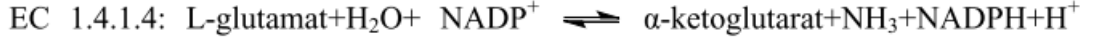
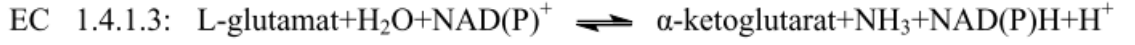
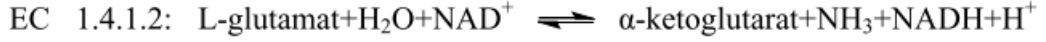
GDH enzimi yaşayan bütün canlı türlerinde bulunan, çift yönlü reaksiyonla L-glutamattan α -ketoglutarat oluşumunu katalizleyen ve bu reaksiyon sırasında reaksiyonun yönüne göre NAD^+ (NADP^+) ya da NADH (NADPH) + H^+ moleküllerini aynı anda kullanabilen tek enzimdir (Şekil 2.15) (Hudson ve Daniel, 1993).



Şekil 2.15: Glutamat dehidrojenaz enziminin katalizlediği reaksiyon (Hudson ve Daniel, 1993).

GDH enzimi hemen hemen bütün canlılarda homoheksamerik bir yapıya sahiptir ve hücrenin mitokondrisinde bulunmaktadır. Bazı memeli hücrelerinde GDH, mitokondriyal matristeki proteinin %10'una karşılık gelebilmektedir (Rothe ve diğ., 1994). GDH enzimi memeli hayvanlarda yaklaşık 500 amino asitten oluşurken, diğer canlılarda yaklaşık 450 amino asitten oluşmuştur. Reaksiyonel olarak GDH enzimi tüm canlılarda aynı reaksiyonu katalizlemesine rağmen metabolitik etkileri ve aldığı roller canlıdan canlıya değişebilmektedir. Bakteri gibi prokaryot canlılarda GDH enziminin görevi protein sentezi ve diğer hücresel prosesler için gerekli olan glutamat üretimini sağlamaktır.

GDH enziminin koenzim bağımlılığına göre üç türü bulunmaktadır. Bunlar NAD^+ -bağımlı, NAD(P)^+ -bağımlı ve NADP^+ -bağımlı olarak isimlendirilmektedir (Şekil 2.16).

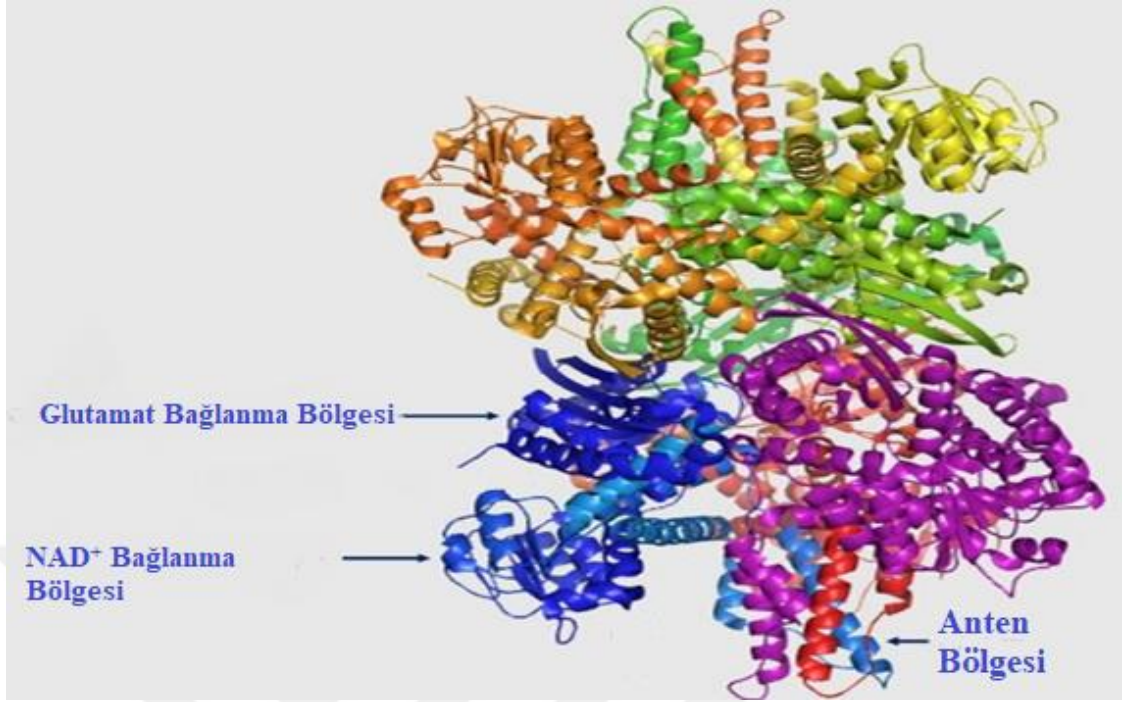


Şekil 2.16: Koenzim bağımlılığına göre glutamat dehidrojenaz enziminin reaksiyonları (Güler, 2014).

Bakteri gibi düşük yaşam formlarında genellikle NAD^+ için koenzim özgülüğü gösteren farklı GDH izoenzimleri bulunmaktadır. Genelde NAD^+ bağımlı GDH enzimleri katabolitik ihtiyaçlarda, NADP^+ bağımlı GDH enzimleri ise biyosentez reaksiyonları için kullanıldıkları ileri sürülmüştür. Diğer yandan inorganik azotları (nitrat veya amonyak olarak) kullanabilen *Escherichia coli* gibi organizmalar sentez ihtiyaçları için NADP^+ bağımlı GDH kullanırlar (Engel, 2014). Bitkilerde GDH enziminin NAD^+ bağımlı ve NADP^+ bağımlı izoenzimlerinin her ikisi de bulunmaktadır. Genelde NAD^+ bağımlı GDH enzimi bitkilerin floem (soymuk borusu) yapısında bulunan hücrelerin mitokondrisine lokalize olurlar (Labboun ve diğ., 2009).

Prokaryot canlılarda GDH enziminin aktivitesinin düzenlenmesi allosterik olarak gerçekleşmemektedir. Ancak evrimsel süreçle birlikte GDH enzimi katabolik bir fonksiyon kazanarak, glutamatın enerji eldesi için TCA siklusuna girmesini sağlayacak şekilde evrimleşmiştir. Bu özelliğin kazanılması GDH'nin allosterik regülasyonunun ortaya çıkmasıyla ilişkilendirilmiştir. Allosterik bir enzim olan GDH'nin regülasyonu bu yüzden organizma için oldukça önemlidir (Smith ve Stanley, 2008).

Memelilerde GDH enzimi hücrenin mitokondrisinde bulunur ve regüle edilen allosterik bir enzimdir. Memeli GDH1'in (insandaki adı hGDH1, PDB code: 1L1F) hem NAD^+ hem de NADP^+ 'yi kullanabilmesi, enzimin hem katabolik hem de hücresel sentez işlemlerde rol oynamasını sağlamaktadır. Şekil 2.17'de gösterilmiş olduğu üzere GDH1 enzimi spesifik bir allosterik regülasyon sistemine sahiptir. Bu özelliğini evrimsel süreçte "antenna" olarak isimlendirilen ve kelime anlamı İngilizcede "anten" olan bir bölgeden ileri geldiği düşünülmektedir (Peterson ve Smith, 1999; Smith ve diğ., 2002; Banerjee ve diğ., 2003).



Şekil 2.17: İnsan glutamat dehidrojenaz-1enziminin yapısı (Smith ve diğ., 2002).

İnsanlarda ve primatlarda GDH enziminin iki formu bulunmaktadır. Bunlar GDH1 ve GDH2'dir. GDH2'nin 23 milyon yıldan daha az bir süre önce GDH1'in yeniden düzenlenmesinden kaynaklandığı düşünölen, intronsuz bir GDH biçimi olduğu düşünölmektedir (Shashidharan ve diğ., 1997; Burki ve Kaessmann, 2004). GDH2 genellikle nöronal ve testis dokusunda bulunmaktadır ve GDH1 gibi GDH2'de hücrenin mitokondrisinde bulunmaktadır (Mastorodemos ve diğ., 2005).

İnsan GDH izoenzimleri olan hGDH1 ve hGDH2, substratlarına karşı farklı K_m değerlerine sahiptirler. Yapılan bir çalışmada hGDH1 ve hGDH2 enzimlerinin ortamda aktivatör olarak 0.1 mM ADP bulunduğu koşullarda substratlarına ait K_m değerlerini sırasıyla glutamat: 7.6 ve 2.4 mM; α -ketoglutarat: 0.9 ve 1.5 mM olarak bulunmuştur. Bu değerlerden de anlaşılacağı üzere hGDH1 enziminin aminasyon yönündeki reaksiyon etkisi hGDH2'ye kıyasla daha güçlüdür (Plaitakis ve diğ., 2000). Her iki izoenzim de pozitif regölatör olan ADP tarafından aktive edilirler ancak hGDH2 için ADP aktivasyonu daha güçlüdür (Plaitakis ve diğ., 2000; Plaitakis ve Zaganas, 2001).

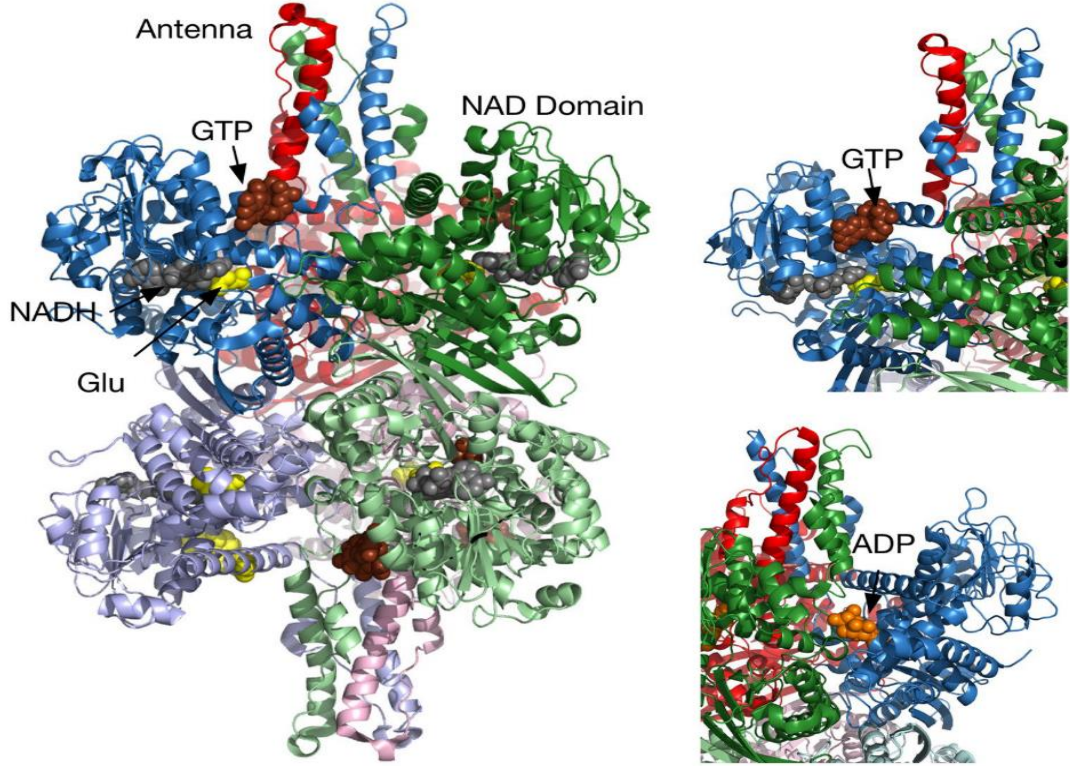
İnsanlarda bulunan hGDH1 ve hGDH2 izoenzimleri organizmada bulunan metabolitler olan steroid hormonlar, poliaminler ve nöroleptik (antipsikotik) ilaçlar tarafından da inhibe edilmektedirler (Plaitakis ve diğ., 2013). Dişi cinsiyet hormonları hGDH2 enzimini hGDH1'e kıyasla 20 kat daha fazla inhibe etmektedir. 17- β -östradiol hormonun IC₅₀ değeri hGDH1 enzimi için 26.94 μ M iken hGDH2 enzimi için 1.53 μ M olarak bulunmuştur (Borompokas ve diğ., 2010). Endojen bir poliamin olan spermidin, organizmada bir başka endojen GDH inhibitörüdür. Spermidin özellikle hGDH2 enzimi üzerine etkilidir. hGDH1 için spermidinin IC₅₀ değeri 6.3 mM olarak bulunurken, hGDH2 için 2.8 mM olarak bulunmuştur (Spanaki ve diğ., 2012). Nöroleptik ilaçlar genellikle psikoza tedavisinde kullanılan bir ilaç grubudur. Haloperidol, şizofreni, Tourette sendromunda tikler, bipolar bozuklukta mani, bulantı ve kusma, deliryum, ajitasyon, akut psikoz ve alkol yoksunluğunda halüsinasyonların tedavisinde kullanılmaktadır. Haloperidol ilacının kuvvetli bir hGDH2 inhibitörü olduğu bulunmuştur ve hGDH1 için IC₅₀ değeri 121.59 μ M, hGDH2 için IC₅₀ değeri 25.62 μ M olarak bulunmuştur. Benzer şekilde perfeanazin ilacı da hGDH2 için kuvvetli bir inhibitördür. Bu ilacın hGDH1 için IC₅₀ değeri 193.90 μ M, hGDH2 için IC₅₀ değeri 31.12 μ M olarak bulunmuştur (Plaitakis ve diğ., 2013).

2.4.1. Glutamat Dehidrojenaz Enziminin Regülasyonu

Memelilerde GDH enzimi iki ana regülatör olan adenosin difosfat (ADP) ve guanozin trifosfat (GTP) tarafından regüle edilir. Memelilerde ATP/ADP oranı enerji ihtiyacının bir göstergesi olarak kabul edilmekte olup enerji metabolizma reaksiyonları için regüle edici özelliğe sahiptir. Bu oranın artması organizmanın enerji ihtiyacı olmadığı, bu oranın azalması ise organizmanın enerjiye ihtiyacı olduğu anlamına gelmektedir. ADP konsantrasyonunun artması bu oranın azalmasına ve enerji elde edilmesi için yıkım reaksiyonlarının artmasına sebep olmaktadır. Amino asitler transaminasyon reaksiyonları sonucu glutamat olarak toplanır ve ardından GDH enziminin katalitik etkisiyle α -ketoglutarat oluşur. Oluşan α -ketoglutarat TCA siklusuna girer ve böylece amino asitlerin karbon iskeleti ile enerji metabolizması arasında bağlantı kurulmuş olur. ADP'nin bu şekilde etki göstermesinden dolayı ADP, GDH enzimi için pozitif modülatördür (Ming ve diğ., 2014).

TCA siklusunda GTP molekülü süksinil-KoA sentetaz enziminin reaksiyonu sonucunda oluşmaktadır. GTP/GDP oranının yüksekliği TCA siklusunun hızlı çalıştığı ve buna bağlı olarak enerji ihtiyacının bulunduğu anlamına gelmektedir. Oluşan GTP enerji elde edilmesinde

ATP gibi kullanılmadığı için GTP fosfat grubunu ADP'ye vererek ATP oluşumuna ve böylece enerji ihtiyacının karşılanmasına yönelik görev alır. GTP' nin ATP'ye dönüşmemesi ise organizmanın enerji ihtiyacı olmadığı anlamına gelir ve bu durum da GTP, GDH için negatif modölatör olarak görev alır ve GDH enzimini inhibe eder. GTP bu inhibisyon etkisini GDH enziminde özel bir yere bağlanarak yapmaktadır. GTP, “antenna” olarak adlandırılan bölgenin tabanına bağlanır ve bu bağlanma ile katalitik yarık açılması ile ilişkili NAD^+ alanının hareketini önler (Şekil 2.18) (Peterson ve Smith, 1999; Smith ve diğ., 2001). GTP'nin bu hareketi inhibisyonu substrat ve koenzimin bağlanma afinitesini arttırmak ve ürün salımını yavaşlatma yoluyla yaptığı düşünülmektedir (Frieden, 1963; Iwatsubo ve Pantaloni, 1967; Koberstein ve Sund, 1973).



Şekil 2.18: Glutamat dehidrojenaz enzimi ve bağlanma bölgeleri (Smith ve diğ., 2017).

GDH enziminde meydana gelen ve GTP bağlanma bölgesinin mutasyona uğraması sonucunda allosterik bağlanma bölgesinin yeri değişir. Bu durum GDH enziminin sürekli aktive olmasına neden olarak hiperinsülinizm-hiperamonemi sendromu (HI/HA) olarak adlandırılan genetik bir hastalığın oluşmasına neden olmaktadır. Bu sendrom kan içinde yüksek düzeyde amonyak miktarının bulunması ve buna eşlik eden hipoglisemi ile karakteristiktir. HI/HA

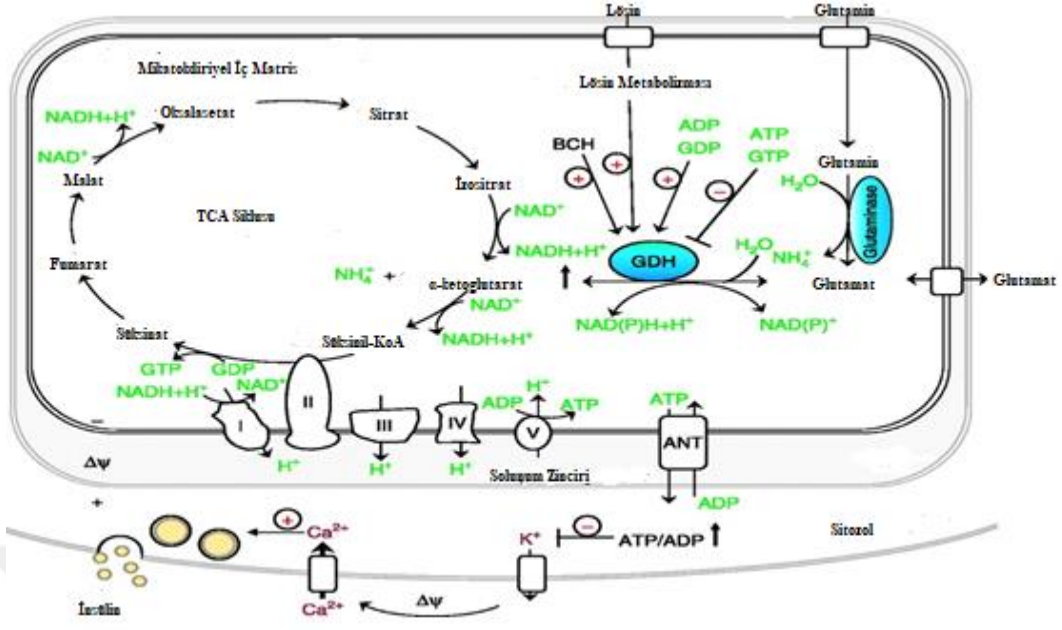
sendromu glutamat dehidrojenaz 1 (GLUD1) genindeki fonksiyon mutasyonlarının oluşmasına bağlı olarak, GTP'nin GDH enzimi üzerindeki inhibitör etkisinin azalmasına ve aktivasyona neden olmasından kaynaklanmaktadır. GDH'nin yüksek aktiviteye sahip olması reaksiyonun α -ketoglutarat yönünde olmasına neden olur ve buna bağlı olarak yüksek miktarda amonyak gözlemlenir (Lonlay ve diğ., 2001; Hong ve diğ., 2019).

Pankreas β -hücrelerinde, α -ketoglutarat, TCA döngüsünde metabolize edilir ve ATP'ye duyarlı potasyum kanallarını kapatan hücre ATP konsantrasyonunu artırır. Oluşan hücre depolarizasyonu sonucunda kalsiyum kanallarından Ca^{2+} geçişi ve insülin salınımı gerçekleşir. GDH'nin aşırı çalışmasıyla ve bu mekanizmanın gerçekleşmesiyle de insülinin fazla miktarda salgılanmasına bağlı olarak hiperinsülinizm görülür. GDH enziminin inhibisyonu HI/HA sendromuna sahip hastalarda tedavilerine yardımcı olmak amacıyla kullanılabilir (Ashcroft, 2005).

Dallı yapıda bir amino asit olan L-lösin, GDH enzimi için pozitif bir modülatördür. Yapılan çalışmalar, L-lösinin ADP ile aynı bölgeye bağlandığını göstermektedir (Prough ve diğ., 1973). Herrero-Yralo ve arkadaşlarının (2001) yaptığı bir çalışmada insan mitokondriyal ADP-ribozil transferaz enzimi olan sirtuin 4 (SIRT4)'ün, negatif modülatör etkisi ile GDH enzimini inhibe ettiği ve bunu yaparken de enzime NAD^+ aracılı ADP-ribozilasyonunu gerçekleştirdiği saptanmıştır (Herrero-Yralo ve diğ., 2001).

2.4.2. Glutamat Dehidrojenaz Enziminin İnsülin Sekresyonuna Etkisi

Pankreasta bulunan β -hücrelerin mitokondrilerinin insülin sekresyonunda önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. β -hücrelerin hücre içi ATP/ADP oranının artması membran yüzeyinde bulunan K^+ /ATP kanallarının açılmasına ve buna bağlı olarak hücre içinden K^+ iyonlarının çıkışına neden olmaktadır. Hücreden K^+ iyonlarının çıkmasına bağlı olarak elektriksel bir fark oluşur. Bu voltaj farkı Ca^{2+} kanallarının açılmasına, hücre içine Ca^{2+} iyonlarının geçişine ve böylece hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonunun artışına sebep olur. Hücre içi serbest sitoplazmik Ca^{2+} konsantrasyonunun artışı insülinin hücre içerisinden kana salınımını artırır (Şekil 2.19).



Şekil 2.19: Glutamat dehidrojenaz enziminin insülin salınımı üzerine etkisi (Isabel ve Hindrik, 2012).

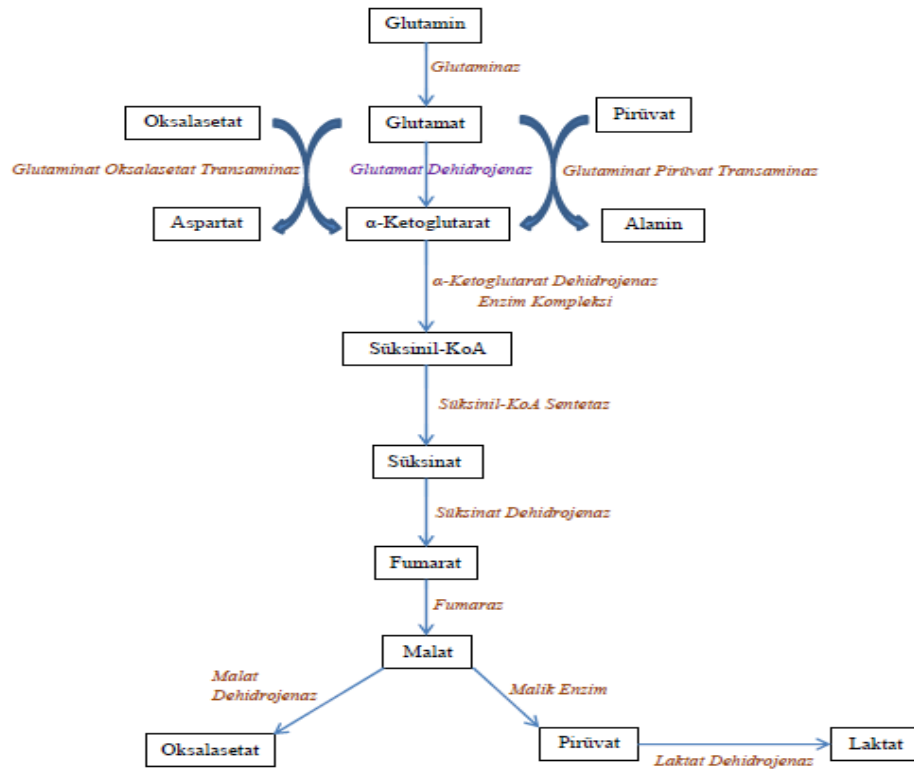
HI/HA sendromuna sahip hastalarda GDH aktivitesi hücre içi Ca^{2+} iyon konsantrasyonunun artışına bağlı olarak hiperinsülinizm görülür. GDH aktivitesinin insülin üzerine olan bu etkisi diyabet hastalığının tedavisinde yeni bir yöntem olarak öne sürülebilir. GDH aktivitesinin yüksek olması ATP/ADP oranının yükselmesine yol açacağından hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonunun artışına ve insülin salınımının artmasına neden olacaktır. Bu açıdan düşünüldüğünde kan şekerinin yüksekliğine bağlı olarak oluşan Tip II diyabet hastalığının tedavisi için GDH aktivitesinin artması tedavi yöntemi olabilir. Ayrıca lösin gibi BCH (β -2-amino bisiklo (2.2.1)-heptan-2-karboksiklik asit) GDH enzimi için bir aktivatördür ve diyabet modeli uygulanmış farelerde pankreas β -hücrelerini koruduğu tespit edilmiştir (Han ve diğ., 2012).

Hipoglisemi hastalarında yüksek insülin seviyesine bağlı olarak kan şekerinin hızlı düşüşü görülmektedir. Bu düşüşe müdahale edilmezse hipoglisemik kişilerde konsantrasyon güçlüğü, uyku hali ve hatta komaya kadar gidebilen ağır nörolojik belirtiler ortaya çıkabilir. Hipoglisemi hastalarında insülin seviyesini düşürmek için regülasyon yolu olarak GDH enziminin inhibisyonu tercih edilebilecek bir yol olarak düşünülmektedir. GDH enziminin kontrollü inhibisyonu bu tip rahatsızlığa sahip bireylerin tedavisinde bir yöntem olabilir. GDH

inhibisyonu ile hücre içi ATP/ADP oranının düşmesine bağlı olarak hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonunun azalmasına ve insülin salınımının azalmasına neden olarak hipoglisemik hastalara yeni bir yaklaşım sağlamaktadır (Stanley ve diğ., 1998; Stanley ve diğ., 2000; MacMullen ve diğ., 2001).

2.4.3. Glutamat Dehidrojenaz Enziminin Tümör Büyümesi ve Sinirsel Gelişimdeki Rolü

Metabolizmanın korunmasında GDH enziminin artan bir rolü olduğu her geçen gün yapılan araştırmalarla ortaya konulmaktadır. DeBerardinis ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptıkları çalışmada ^{13}C NMR spektroskopisi kullanılarak, glutaminolizinden oluşan indirgeyici güç ve pirüvat üzerinden oluşan asetil koenzim A'nın yağ asidi biyosentezinde kullanıldıkları bulunmuştur (DeBerardinis ve diğ., 2007). Glutaminoliz reaksiyonları, glutaminden başlayarak TCA siklusu ara maddelerinin, malat-aspartat mekik sistemi ve tümör hücrelerinde aşırı eksprese edilen enzimlerin gerçekleştirdiği reaksiyonlardır. Glutaminden gelen amino gruplarının çoğu metabolize edilirken, karbon omurgası biyosentetik reaksiyonlar için TCA siklusu ara maddeleri ile birleştirilir. Şekil 2.20'de glutaminoliz reaksiyonları gösterilmiştir.



Şekil 2.20: Glutaminoliz reaksiyonları (Yang ve diğ., 2017).

Benzer şekilde, glioblastom hücrelerinin (kötü huylu beyin tümörü hücreleri) bozulmuş glukoz metabolizmasında veya Akt sinyalinde hayatta kalması için GDH'nin gerekli olduğu bulunmuştur (Yang ve diğ., 2009). Bu çalışmada glioblastom hücrelerinin GDH aktivitesinin bozulmasıyla glukoz kullanabildiğini, hücreler glukozdan yoksun bırakılır ya da glukoz metabolizması bozulursa hücrelerin büyümesi için GDH aktivitesine ihtiyaç duymaktadır. Bu ihtiyaç GDH aktivitesinin sonucunda TCA siklusu ara maddelerinin oluşmasına bağlı olarak enerji metabolizmasının devamlılığını sağlamasından ileri gelmektedir.

Son çalışmalar, diğer mitokondriyal enzimlerin GDH aracılı glutaminolizi düzenlemede nasıl önemli bir rol oynadığını da göstermiştir (Csibi ve diğ., 2013). Bu çalışmada memelilerde besin, enerji, redoks sensörü olarak işlev gören ve protein sentezini kontrol eden bir protein kompleksi olan rapamisin kompleks 1'in (mTORC1) aktivasyonunun sirtuini (SIRT4) bastırarak glutaminolizi arttırdığını göstermiştir. SIRT4'ün GDH enziminin negatif modülatörü olduğu düşünüldüğünde bu durumda GDH aktivitesi artacaktır. SIRT4 aşırı eksprese edildiğinde, hücre proliferasyonu, tümör gelişimi ve transformasyonun tümü inhibe edilir. Bu

etkiden dolayı GDH enziminin aktivitesinin düşmesi tümör gelişimini önlemek açısından önemli olabilmektedir.

Tümörlerde gözlenen artmış GDH aktivitesinin kolorektal kanser hastalarında olası bir prognostik belirteç olduğu ve metastazın göstergesi olduğu gösterilmiştir (Liu ve diğ., 2015). Tüm bu çalışmalar GDH enziminin hücre proliferasyonunun ve gelişiminin düzenlenmesinde regülasyonunun çok önemli olduğunu doğrudan göstermektedir.

Amonyak hücre metabolizmasında oluşan bir ürün olmasına karşın, özellikle kanserde amonyak üretiminin biyolojik sonuçları bugüne kadar tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak Spinelli ve arkadaşlarının 2017 yılında yaptıkları çalışmanın sonucunda, amonyağın sadece bir atık ürün olmadığını, aynı zamanda tümör biyokütlesini destekleyebilen temel bir azot kaynağı olduğunu göstermişlerdir. Yaptıkları çalışmada farelerde meme kanseri çevresinde bulunan amonyağın GDH aktivitesine bağlı olarak amino asit üretimi ve bu yolla tümör biyokütlesinin artmasına neden olduğunu göstermişlerdir (Spinelli ve diğ., 2017).

2.4.4. İnsan Testis ve Böbrek Dokularında Glutamat Dehidrojenaz Enziminin Etkileri

İnsan testis dokusunda bulunan Sertoli hücrelerinde hGDH2 enziminin yoğun ekspresyonu spermatidlerin beslenmesinde destekleyici rolü bulunmaktadır. Sertoli hücreleri laktat ve diğer metabolitlerle spermatid sağlamaktadır. Laktat ise glukoneojenez reaksiyonları sonucunda oluşmaktadır. Bu açıdan bakıldığında GDH enziminin deaminasyon yönünde çalışmasıyla α -ketoglutarat oluşarak laktat sentezini destekleyecektir (Spanaki ve diğ., 2010; Spanaki ve diğ., 2015).

İnsan böbrek dokusunda GDH enziminin özellikle asidik koşullar altında asit-baz homeostazının düzenlenmesinde rol oynadığı düşünülmektedir. Normal asit-baz dengesine sahip bireylerde enzim aktivitesi nispeten düşük olurken akut ya da kronik sorunlara bağlı olarak ortaya çıkabilecek asidoz durumlarında GDH aktivitesi artmaktadır. Artan GDH aktivitesi ortam pH'ını dengelemek için deaminasyon yönünde çalışır ve bu sayede asit-baz dengesinin oluşmasına katkı sağlar (Van De Poll ve diğ., 2004).

2.4.5. Glutamat Dehidrojenaz Enziminin Saflaştırılmasına ait Kaynak Özeti

Metabolitik önemi düşünüldüğünde GDH enziminin yapısının araştırılması oldukça önemlidir. Hem iki yönlü reaksiyon olması hem de NAD(H)^+ ve NADP(H)^{+} 'ı kullanabilmesinden dolayı GDH enzimi bulunduğu lokasyon ve canlı türüne göre farklılık göstermektedir. Bu yüzden GDH enziminin farklı canlı ve dokulardan saflaştırılması ve karakterizasyonu oldukça önem arz etmektedir.

Yapılan literatür taramaları sonucunda bugüne kadar birçok farklı kaynaktan ve dokudan GDH enziminin saflaştırılmış olduğu tespit edilmiştir. GDH enzimi bugüne kadar *Neurospora crassa* (Sanwal ve Lata, 1961), *Saccharomyces cerevisiae* (Grisolia ve diğ., 1964), *Candida utilis* (Hemmings, 1980), *Agaricus bisporus* (Baars ve diğ., 1995), *Laccaria laccata* (Burn ve diğ., 1992), *Geotrichum candidum* (Zhu ve diğ., 2017) mantarlarından, *Thermophilic bacillus* (Epstein and Grossowicz, 1975), *Paracoccus denitrificans* (Kremeckova ve diğ., 1992) bakterilerlerinden, *Thermococcus litoralis* (Ma ve diğ., 1994) *Halobacterium* (Leicht ve diğ., 1978) arkealarından ve *Chlorella sorokiniana* (Meredith ve diğ., 1978) mikroalginden saflaştırılmıştır.

Mantar, bakteri, arkea ve mikroalg dışında GDH enzimi bitki ve bitki kısımlarından da başarıyla saflaştırılmıştır. Su mercimeği (Stewart ve Rhodes, 1977), bezelye yaprak ve kökleri (Pahlich ve Joy, 1971; Kindt ve diğ., 1980), soya fideleri (Turano ve diğ., 1996), kanola yaprakları (Watanabe ve diğ., 1999), tritikale kökleri (Kwinta ve diğ., 2001), bunlardan bazılarıdır.

GDH enzimi balıklardan, kuşlardan ve memelilerden de saflaştırılmış bir enzimdir. Tavuk karaciğerinden (Snoke, 1956), öküz karaciğerinden (Frieden, 1959), kurbağa karaciğerinden (Fahien ve diğ., 1965), köpek balığı karaciğerinden (Corman ve diğ., 1967), tuna balığı karaciğerinden (Veronese ve diğ., 1976), öküz karaciğer ve beyininden (Mccharty, 1980), yılan balığı karaciğerinden (Hayashi ve diğ., 1982), insan beyininden (Hussain ve diğ., 1989), timsah buz balıklarının (*Chaenocephalus aceratus*) karaciğerinden (Ciardiello ve diğ., 1997) ve koyun karaciğerinden (Güler, 2014) saflaştırılmıştır.

2.5. PROTEİNLERİN SAFLAŞTIRILMASI

Proteinlerin saflaştırılması, yapılarının aydınlatılması, fonksiyonlarının belirlenmesi ve biyolojik önemlerinin incelenmesi açısından oldukça büyük önem arz etmektedir. Hedeflenen bir proteinin saflaştırılması her zaman tek basamakta gerçekleşmeyebilir. Bundan dolayı farklı yöntemler kullanılarak saflaştırma oranları daha da arttırılabilir.

Saflaştırılacak protein için en temel yaklaşım maliyet ve sürenin düşürülmesidir. Hem hızlı hem de verimli bir yöntem kullanmak en temel yaklaşımı oluşturmaktadır. Saflaştırılacak proteinin belirlenmesinden sonra ikinci aşama kaynak belirlenmesidir. Kaynak belirlenmesinde en önemli parametre ucuz ve saflaştırılacak proteinin kaynakta yüksek oranda bulunmasıdır. Seçilen kaynakta saflaştırılacak proteinin nerede bulunduğu tespit edilmeli ve saflaştırma basamakları ona göre belirlenmelidir (Angal ve Harris, 1990). Saflaştırılacak protein hücre içerisinde ise hücre zarının (varsa hücre duvarının) parçalanması gerekmektedir. Bu işlem için iki farklı yöntem kullanılır;

Kimyasal yöntemler: Uygun tampon içerisinde hücre zarının kimyasal ajanlarla parçalanması işlemidir. Bu işlem deterjanlar, organik çözücüler ve bazı enzimlerle muamele edilerek gerçekleştirilir.

Fiziksel yöntemler: Doku ya da hücreden saflaştırılacak proteinin hücre içerisinden çıkarılması için fiziksel yöntemler kullanılarak hedeflenen proteinin tampon çözeltiye geçirilmesi yöntemleridir. Fiziksel yöntemleri içinde; dondurma ve çözündürme, osmotik basıncın ani değiştirilmesi, ultrasonik dalgalar, cam homojenizatör kullanılarak yapılan parçalamalar, yüksek basınç, cam bilyelerle yapılan homojenizasyon bulunur.

Hücre içinden kimyasal veya fiziksel yöntemlerle çıkarılan saflaştırılacak protein ileri saflaştırma basamaklarına hazır hale getirilmiş olur. Bu basamakların tümünde saflaştırılacak olan proteinin aktivite kaybına uğramaması için doğru tampon konsantrasyonu, pH, sıcaklık gibi parametreler literatüre uygun şekilde gerçekleştirilmelidir (Angal ve Harris, 1990).

Saflaştırılacak olan biyolojik materyal kaynağından izole edildikten sonra bazı ara işlemler yapılabilmektedir. Bunlardan başlıcaları santifüj işlemi, amonyum sülfat çöktürme ve diyalizdir.

Santrifüj: Bu işlem merkez-kaç kuvvetine dayanan ve bir sıvı içerisinde bulunan farklı kütle veya yoğunluktaki taneciklerin birbirinden ayrılmasını sağlayan işlemdir. Saflaştırma basamaklarının arasında bir veya daha çok kez yapılabilmektedir. Saflaştırılacak materyalin biyolojik aktivitesinin azalmaması veya kaybolmaması için 0-4°C’de santrifüj işlemi yapılır.

Amonyum Sülfat Çöktürmesi: Bir karışım içerisinde protein olduğu biliniyorsa bu karışıma artan miktarlarda amonyum sülfat ilavesi yapılması farklı proteinlerin farklı tuz miktarında çökmesi sağlanır. Amonyum sülfatın suda iyi çözünmesi ve enzim aktivitesinin geri kazanımının yüksek olması bu yöntemin tercih edilmesinin başlıca nedenlerindendir.

Diyaliz: Bu işlem amonyum sülfat çöktürmesinden sonra uygulandığı gibi gradient elüsyonda tuz kullanıldığında da uygulanan bir işlemdir. Enzim ile bir arada bulunan tuz iyonlarının ortamdan uzaklaştırılması için uygulanır. Diyaliz işleminde bu amaçla yarı geçirgen zarlar kullanılır (Ay ve diğ., 2010).

2.5.1. Kromatografik Yöntemler

Kromatografi kelimesi eski Yunanca’dan gelmekte olup, renk anlamına gelen “chroma” ve yazmak anlamına gelen “graphein” kelimelerinden türemiştir. Kromatografi birbirinden farklı bileşiklerin farklı fazlarda birbirinden dağılmasına dayanan bir sistemdir. Tüm kromatografik işlemlerde bir sabit faz (stasyoner faz) ve hareketli faz (mobil faz) bulunmaktadır. Saflaştırılacak bileşenlerle sabit faz arasındaki etkileşim şekline göre farklı kromatografik yöntemler mevcuttur. Bunlar;

İyon değiştirme kromatografisi: Bu kromatografi yöntemi elektrostatik çekime dayanan bir adsorpsiyon yöntemidir. Proteinlerin yapısında bulunan amino asitlerin tür ve sayılarına göre oluşan elektriksel yükten yararlanılarak uygulanan bir kromatografi yöntemidir.

Jel filtrasyon kromatografisi: Jel filtrasyon kromatografisi aynı zamanda moleküler eleme kromatografisi olarak da bilinir. Bu kromatografi yöntemi molekülleri boyutlarına göre ayırma esasına dayanır. Proteinler boyutlarının farklılıklarından ötürü bu kromatografik yöntemle birbirlerinden ayrılabilir.

Hidrofobik etkileşim kromatografisi: Proteinlerin büyük bir kısmı hidrofobik özellik göstermekte ve her bir protein için bu hidrofobik özellik birbirinden farklı olmaktadır. Bu

kromatografi yönteminde hidrofobik özelliği yüksek olan protein sabit fazda daha fazla tutunur ve kolondan geç çıkar.

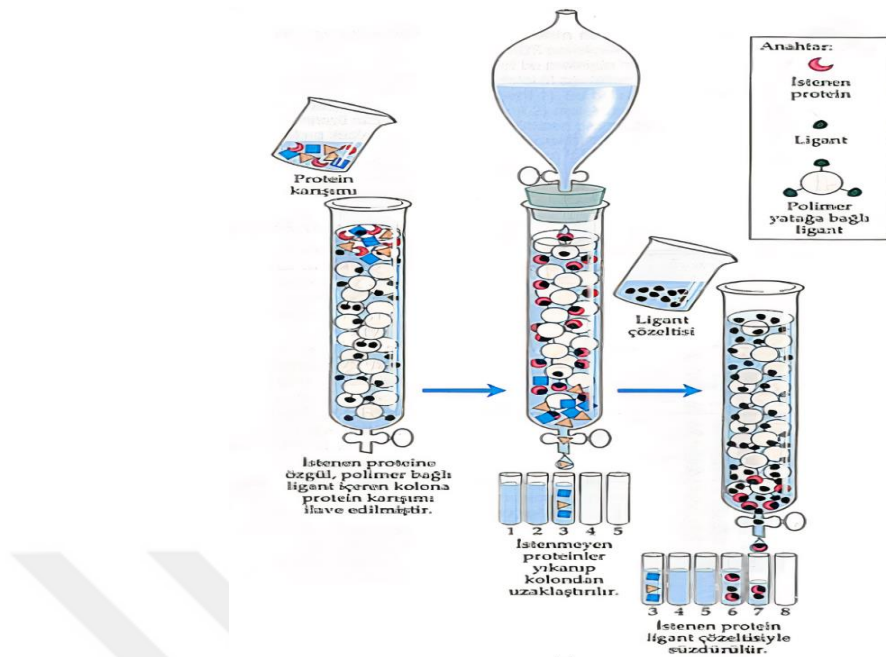
Afinite kromatografisi: Bu kromatografi yöntemi proteinleri biyolojik fonksiyonlarına göre ayırmayı sağlayan bir yöntemdir. Bu özelliğinden dolayı yüksek bir seçicilik özelliğine sahip, hızlı bir yöntemdir (Konak ve diğ., 2014).

2.5.1.1. Afinite Kromatografisi

Afinite kromatografisi bir adsorpsiyon tekniği olup, saflaştırılması amaçlanan biyolojik materyal matriks'e kovalent olarak bağlanmış olan bir liganda spesifik ve tersinir bağlanmış olduğu bir tekniktir. Afinite kromatografisinin en iyi özelliği birçok basamakla saflaştırılacak olan biyolojik materyalin tek bir basamakta saflaştırabiliyor olmasıdır. Bu yüzden hızlı bir kromatografik yöntemdir ve birçok biyolojik materyali içeren bir karışımdan hedefleneni çok yüksek bir verimde saflaştırabilmektedir.

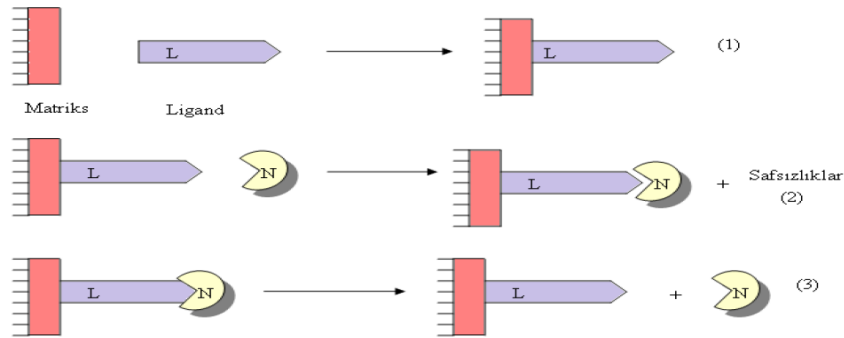
2.5.1.1.1. Afinite Kromatografisinin Temel Prensipleri

Afinite kromatografisi genellikle enzimlerin, hormonların, antikorların ve nükleik asit gibi biyolojik materyallerin saflaştırılmasında kullanılan bir yöntemdir. Kelime anlamı “ilgi” olan afinite kromatografisinde saflaştırılmak istenen biyolojik materyal ile kompleks oluşturabilen bir ligand kolon dolgu maddesine bağlanmaktadır. Bu özellik sayesinde ligand ile kompleks oluşturabilen biyolojik materyal kolona tutunurken, oluşturamayanlar kolondan ayrılır (Şekil 2.21).



Şekil 2.21: Afinite kromatografisinin uygulanması (Lehninger, 2005).

Şekil 2.22’de gösterildiği üzere (1)’de ligand matrikse kovalent olarak bağlanır. (2)’de karışım içerisindeki saflaştırılacak olan biyolojik materyal kolona adsorbe olur ve olamayanlar kolondan ayrılır. (3)’de kolona tutuklanmış olan biyolojik materyal elüe edilerek kolondan alınır (Atasever, 2010).



Şekil 2.22: Afinite kromatografisi prensibi (Atasever, 2010).

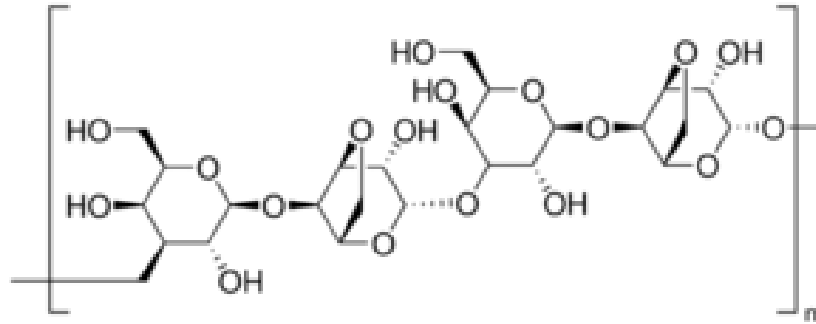
Afinite kromatografisinin sıklıkla kullanıldığı biyolojik sistemler ve bu saflaştırılacak biyolojik sistemler için kullanılan ligandlar Tablo 2.3’de verilmiştir.

Tablo 2.3: Afinite kromatografisinin kullanıldığı biyolojik sistemler ve ligandları (Atasever, 2010).

Saflaştırılacak Madde	Ligand
Enzim	Substrat, inhibitör, kofaktör
Antikor	Antijen, virüs, hücre
Lektin	Polisakkarit, glikoprotein, hücre, hücre yüzey reseptörü
Nükleik Asit	Komplementer baz dizisi, histon, nükleik asit
Hormon	Reseptör, taşıyıcı protein
Hücre	Hücre yüzeyi spesifik protein, lektin

Saflaştırılacak biyolojik materyalin özelliklerine göre matriks ve ligand seçimi oldukça önemlidir.

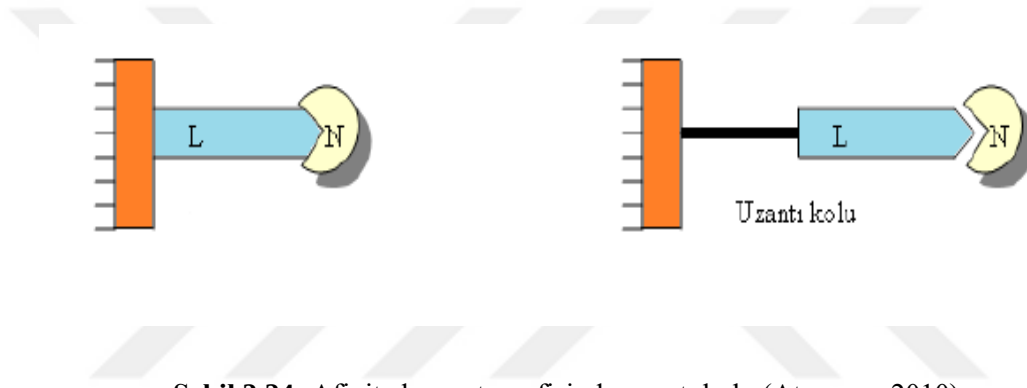
Matriks: Afinite kromatografisinde matriks olarak Sephadex, Sepharose, Bio-jel vb. birçok jel kullanılmaktadır. Ancak bunların içinde Sepharose en yaygın olarak kullanılanıdır. Sepharose yapısal olarak bir polisakkarit olan agaroz jelidir ve biyolojik materyallerin afinite kromatografisi ile saflaştırılmasında başarılı bir matrikstir. Agaroz yapısında bulunan monosakkaritlere hidroksil gruplarının bağlanması bir ligandın kovalent olarak bağlanmasını sağlamaktadır. Sepharose 4B en çok kullanılanlar arasındadır (Şekil 2.23). Bu jelin ince yapılı olması afinite kromatografisi için çok iyi bir akış sağladığı için iyi bir saflaştırmaya olanak tanımaktadır (Cuatrecasas, 1970).

**Şekil 2.23:** Sepharose 4B yapısı.

Ligand: Afinite kromatografisinde matrikse “ligand” olarak isimlendirilen özel bir molekül bağlanır. Ligand seçiminde önemli olan husus saflaştırılacak biyolojik materyale spesifik ve

tersinir bağlanma özelliği göstermesidir (Cuatrecasas ve diğ., 1968). Biyolojik materyale göre ligand türleri Tablo 2.3'te verilmiştir.

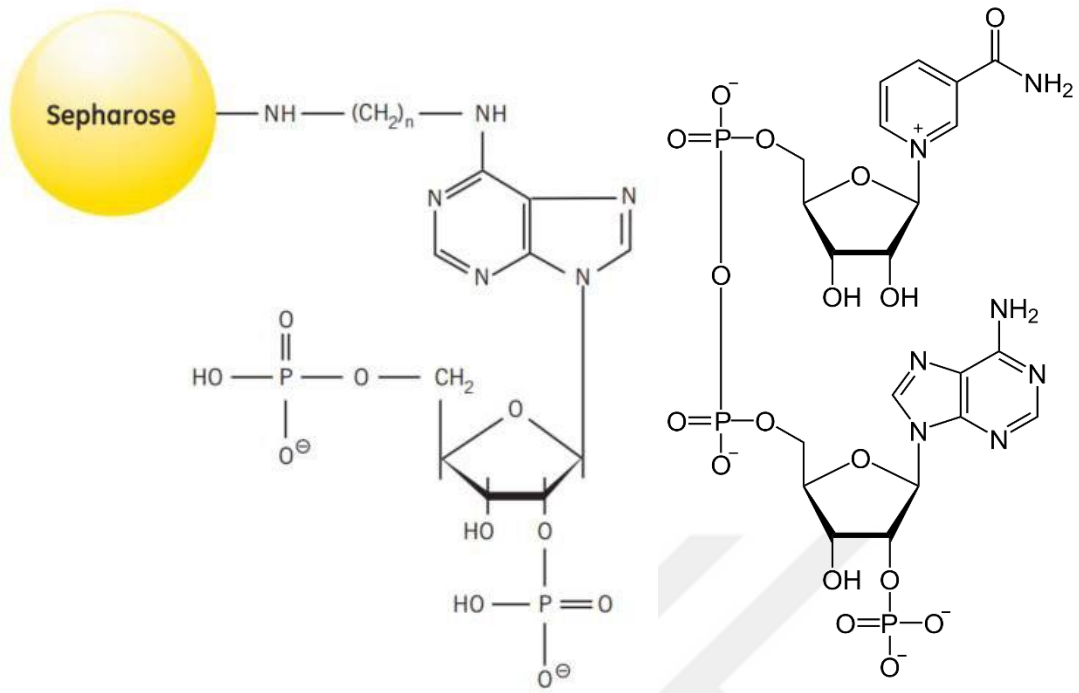
Uzantı Kolu: Afinite kromatografisinde bazı durumlarda sterik engel saflaştırma işlemini güçleştirmektedir. Bu sterik engel saflaştırılmak istenen biyolojik materyalin liganda bağlanmasını engeller ve saflaştırma verimini düşürür. Bu sorunu ortadan kaldırmak için matriksle ligand arasına uygun bir yapı bağlanır. Bu yapıya genel olarak “uzantı kolu” denilir (Şekil 2.24). Uzantı kolunda dikkat edilecek husus ise bu kolun uzunluğudur. Uzantı kolunun çok kısa olması durumunda kol etkisiz olmakta, çok uzun olduğu zaman ise ayırmanın seçiciliği azalmaktadır (Ocarra ve Barry, 1974).



Şekil 2.24: Afinite kromatografisinde uzantı kolu (Atasever, 2010).

2.5.1.1.2. *NADP⁺-Bağımlı Dehidrojenaz Enzimleri İçin 2',5'-ADP Sepharose 4B Kolon Dolgu Maddesi*

2',5'-ADP Sepharose 4B kolon dolgu maddesi dehidrojenaz sınıfı enzimler için yüksek spesifikliğe sahiptir. Koenzim olarak NADP^{+} 'ı kullanan enzimlerin saflaştırılmasında kullanılmaktadır. 2',5'-ADP Sepharose 4B üzerine immobilize edilmiştir. 2',5'-ADP aynı zamanda NADP^{+} 'ın yapısal analogu olmasından dolayı dehidrojenazlar için spesifiklik göstermektedir (Şekil 2.25). Bu spesifiklik sayesinde kolondan geçen dehidrojenaz enzimleri 2',5'-ADP Sepharose 4B'ye yüksek bir afinite gösterir.



Şekil 2.25: 2',5'-ADP Sepharose 4B kolon dolgu maddesi ve NADP⁺'ın kimyasal yapısı.

2.5.2. Elektroforetik Yöntemler

Elektroforez yüklü moleküllerin elektriksel alanda hareketliliklerinin izlenmesi esasına dayanan bir tekniktir. Proteinlerin saflaştırılmasında birçok basamakta kullanılabilen elektroforez tekniği saflaştırılan proteinin saflığının kontrolünde, yaklaşık molekül ağırlığının belirlenmesinde ve izoelektrik noktanın tayininde kullanılabilmektedir. Bu amaçla birbirinden farklı elektroforez yöntemleri bulunmaktadır. Elektroforez türleri;

- Kâğıt Elektroforezi
- Selüloz Asetat Elektroforezi
- Jel Elektroforezi
 - Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE)
 - Agaroz jel elektroforezi
- Kapiler Elektroforez

PAGE işleminde proteinler ya da nükleik asitler elektrisel alandaki hareketliliklerine göre ayrışırlar. Bu elektroforetik hareketlilik moleküllerin yükleri, boyutları ve üç boyutlu

konformasyonlarına bağılı olarak değişiklik göstermektedir. Bu nedenlerden dolayı her protein için elektroforez sonucunda kendine özgü bir bant oluşur. PAGE işleminde proteinler denatüre edilmez ve bu sayede yaklaşık toplam molekül ağırlıkları hesaplanır. Eğer bir protein birden fazla alt birim içeriyorsa bu yöntemle alt birimlerinin ağırlıkları belirlenemez. Bu işlem için bir deterjan olan sodyum dodesil sülfat (SDS) kullanılır. SDS kullanıldığı için bu işleme SDS-PAGE denilmektedir.

SDS-PAGE işleminde SDS ile proteinin üç boyutlu yapısı bozularak denatüre edilir. Negatif yüklü deterjan molekülleri ile kaplanan protein yük açısından aynı olur ve bu yüzden sadece molekül ağırlığına göre ayrılırlar. SDS-PAGE işlemi bir proteinin yapısında bulunan alt birimlerin sayısını ve bu alt birimlerin ağırlıklarının ne olduğunu bulunmasında rol oynar (Bollag ve diğ., 1996).

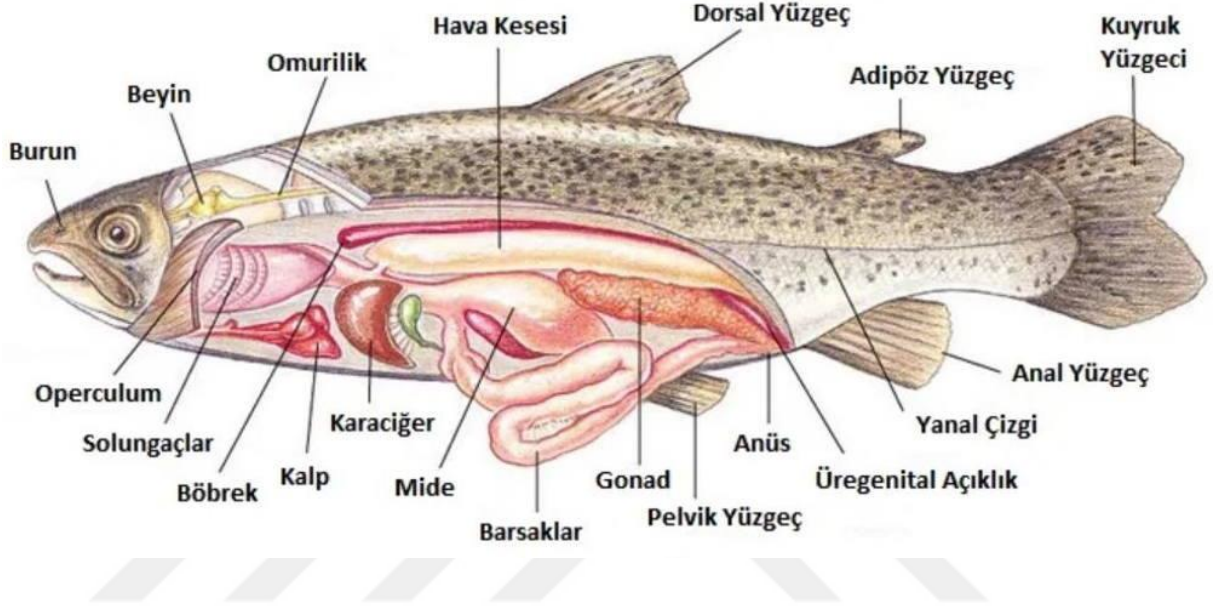
2.6. GÖKKUŞAĞI ALABALIKLARININ (*Oncorhynchus Mykiss*) GENEL ÖZELLİKLERİ

Kuzey Amerika kökenli olan gökkuşaağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) pasifik salmon cinsi, üzerinde benekleri bulunan, tıknaz bir balıktır. Yan taraflarında gökkuşaağına benzer renkler bulunduğu için ayırt edilmesi oldukça kolay bir balık türüdür. Ayrıca sırt kısımlarında yeşilden kahverengiye kadar farklı tonlar görülmektedir. Bu renklenmeler yaşa göre farklılıklar gösterebilmektedir (Şekil 2.26).



Şekil 2.26: Gökkuşaağı alabalığının (*Oncorhynchus mykiss*) genel görünümü.

Gökkuşığı alabalığı geniş bir sıcaklık aralığında yaşamını sürdürebilen ve yüksek seviyelerde oksijenli suya ihtiyaç duyan bir türdür. Tatlı, tuzlu ve acı sularda yaşayabilmelerinin yanısıra büyümeleri için ideal olan sıcaklık 13-18°C arasındadır. Gökkuşığı alabalığının yiyecek kaynakları doğal ortamlarda oldukça fazladır. Küçük böcekler, planktonlar, salyangozlar, sülükler ve balık yumurtaları bunlardan bazılarıdır (Staley ve Mueller, 2000).



Şekil 2.27: Balıkların iç ve dış anatomisine dair genel görünüm (Kırım, 2005).

Gökkuşığı alabalıklarının bulundukları çevresel koşullara yüksek adaptasyon göstermesi, hızlı büyümeleri ve hastalıklara karşı yüksek direnç göstermelerinden dolayı Dünya’da ve Türkiye’de kültürü en fazla olan balık türlerinden biridir ve ülkemizde 1970’li yıllardan itibaren üretimi yaygınlaşmaya başlamıştır (Akbulut ve Keten, 2001).

Gökkuşığı alabalıklarının derisi iki katmandan oluşmaktadır. En üstte bulunan katman (epidermis) oldukça ince bir yapıya sahip olup, glikoprotein yapısındaki mukosal madde salgılayan hücreler bulundurmaktadır (goblet ve mukus hücreleri). Bu mukozal sıvı salgılanımından dolayı gökkuşığı alabalıklarının yüzeyleri oldukça kaygandır. Epidermisin altından ikinci katman bulunur (dermis) ve bu yapı daha kalın ve karmaşık bir yapıya sahiptir. Dermis özellikle pulların oluşumunda önemli rol oynar (Sarıeyyüpoğlu ve diğ., 2017). Bu deri tabakalarının altında ise iç organlar bulunmaktadır. Şekil 2.27’de balıklara ait iç ve dış anatomisinin genel görüntüsü verilmiştir.

Gökkuşağı alabalıklarının kolay yetiştirilmesi ve tüketimlerine bağlı olarak ortaya çıkan iç organlarının enzim ve protein saflaştırılmasında kullanılması önemli bir özellik ve kolaylık sağlamaktadır. Bu çalışmada gökkuşağı alabalık karaciğerinden GDH enziminin saflaştırılması ve saflaştırma basamakları en aza indirilerek en yüksek verim eldesi yaklaşımı amaçlanmıştır. Ayrıca saflaştırılan GDH enziminin kinetik özellikleri de incelenecektir. Canlıdan canlıya ve dokudan dokuya farklılık gösteren GDH enziminin özelliklerinin gökkuşağı alabalıklarında nasıl olduğunun anlaşılması diğer canlılarla karşılaştırma bakımından önemlidir.



3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. MATERYAL

3.1.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tablo 3.1’de deneyler sırasında kullanılan kimyasal maddelerin listesi verilmiştir.

Tablo 3.1: Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler.

2',5'-ADP Sepharose 4B	Merck GE17-0700-01
AgNO ₃	Sigma-Aldrich 209139
Akrilamid	Merck 800830
Amonyum Persülfat	Merck 101200
Asetik Asit	Merck 100056
Aseton	Merck 100020
B ₁ Vitamini (Tiamin.HCl)	Fluka 95160
B ₂ Vitamini (Riboflavin)	Sigma-Aldrich R4500
B ₃ Vitamini (Niasin)	Sigma-Aldrich 72340
B ₆ Vitamini (Piridoksin.HCl)	Sigma-Aldrich 47862
Brom Timol Mavisi	Merck 103026
C Vitamini (Askorbik Asit)	Merck 5156
Coomassie Brilliant Blue G- 250	Fluka 27815
CoSO ₄	Merck 2555
Cr ₂ (SO ₄) ₃	Fluka 21185
Dimetil Sülfoksit	Merck 802912
1,4-Ditiyoeritritol	Merck 124511
EDTA	Fluka 35322
Eter	La Chema 50142
Etil Alkol	Merck 100971

Tablo 3.1 (Devam): Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler.

FeCl ₃	Merck 3943
FeSO ₄	Merck 3967
Glisin	Merck 500190
HCl	Merck 100314
Hekzan	Merck 104368
KCl	Fluka 60340
KH ₂ PO ₄	Merck 104873
L-Glutamat	Merck 100291
Metil Alkol	Merck 106009
MgSO ₄	Sigma-Aldrich M7506
MnSO ₄	Merck 5961
N,N,N',N'-Tetrametil Etilen Diamin (TEMED)	Fluka 87687
N,N'-Metilendiakrilamid	Merck 805968
Na ₂ HPO ₄	Fluka 71642
NaCl	Merck 106400
NAD ⁺	Sigma-Aldrich 43410
NADH+H ⁺	Sigma-Aldrich N6005
NADP ⁺	Sigma-Aldrich N5755
NADPH+H ⁺	Sigma-Aldrich N1630
NaOH	Merck 6462
(NH ₄) ₂ SO ₄	Merck 101217
n-Bütanol	Merck 100988
NiSO ₄	Merck 6726
n-Propanol	Merck 996
PAGE Standart	Sigma MW-ND-500
Potasyum Ferrisiyanür	Riedel de Haën 12643
SDS Standart Kiti	Sigma MW-SDS-70L
Sikloheksanon	Merck 102888

Tablo 3.1 (Devam): Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler.

Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	Fluka 71725
Tris (2-Amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol)	Merck 108382
U Vitamini (DL-metiyonin metilsülfonyum klorür)	Sigma-Aldrich 64382
VOSO ₄	Riedel de Hæn 14229
ZnSO ₄	Merck 8881
α -Ketoglutarat	Merck 5194
β -Dimetilaminopropiyonitril	Sigma D-7924
β -Merkapto Etanol	Merck 805740

3.1.2. Deneylerde Kullanılan Alet ve Cihazlar

Tablo 3.2’de deneyler sırasında kullanılan alet ve cihazların listesi verilmiştir.

Tablo 3.2: Deneylerde kullanılan alet ve cihazlar.

Buzdolabı	Arçelik
Derin Dondurucu (-20°C)	Beko -20°C Derin Dondurucu
Derin Dondurucu (-80°C)	New-Brunswick Scientific -76°C
Distile Su Cihazı	Brand MonoDest 3000
Elektroforez	Thermo EC120-2 Mini Vertical Gel System
Etüv	Nüve FN500
Isıtıcı	Electromantle
Güç Kaynağı	Micro-Bio-Tec Brand
Hassas Terazî	Radwag XA 60/220/X ve Radwag XA AS 220/C/2 Hassas Terazî
Kromatografi Kolonu	Pharmacia Fine Chemicals
Magnetik Karıştırıcı	Chiltern Hotplate HS 31
Mikroplate okuyucu	BioTek ELx808 Absorbance Microplate Reader
pH metre	Hanna pH/ORPvMeter HI 2211
Saf Su Cihazı	Brand MonoDest 3000
Santrifüj	Denley BS400

Tablo 3.2 (Devam): Deneylerde kullanılan alet ve cihazlar.

Soğutmalı Santrifüj	Sigma Laboratory Centrifuges 3K30
Sonikatör	Bandelin Sonarex
Spektrofotometre	Shimadzu UV-Mini-1240
Su Banyosu	Memmert WB 14
Terazi	Radwag AS 220/C/2 Hassas Terazi
Terazi	Radwag XA 60/220/X Hassas Terazi
Vorteks Cihazı	Fison Whirlimixer

3.1.3. Gökkuşığı Alabalıklarının Temini

Gökkuşığı alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*) İstanbul Üniversitesi Su Bilimleri Fakültesi Sapanca İçsu Ürünleri Üretimi Araştırma ve Uygulama Biriminden temin edilmiştir (Şekil 3.1). Alınan balıklar erkek olup yaklaşık kiloları 1-1.5 kg, boyları 40-55 cm arasındadır (Şekil 3.2). Balıklar temininin aynı günü kesilmiş ve karaciğerleri serum fizyolojik çözeltisi ile yıkanmış ve deneyler yapılana dek -80°C'de saklanmıştır.



Şekil 3.1: İstanbul Üniversitesi Su Bilimleri Fakültesi Sapanca İçsu Ürünleri Üretimi Araştırma ve Uygulama Birimi balık tesisi.



Şekil 3.2: Gökuşağı alabalıkları.

3.1.4. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları

3.1.4.1. *Glutamat Dehidrojenaz Enzim Aktivitesi için Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması*

- **50 mM Fosfat Tamponu (pH 7.4):** 0.68 g KH_2PO_4 ve 0.71 g Na_2HPO_4 tartıldı ve her iki madde bir miktar distile su ile çözüldükten sonra son hacimleri 100 mL'ye tamamlandı. Daha sonra 19.8 mL 50 mM KH_2PO_4 ile 80.2 mL 50 mM Na_2HPO_4 karıştırılarak pH 7.4 olan tampon çözelti hazırlandı.
- **50 mM α -Ketoglutarat:** 73.05 mg α -ketoglutarat 5 mL distile suda çözüldü ve pH 7.4'e 1N NaOH ile ayarlandı. Son hacim 10 mL'ye distile su ile tamamlandı.
- **50 mM L-Glutamat:** 84.56 mg L-glutamat 5 mL distile su ile çözüldü ve pH 7.4'e 1N NaOH ile ayarlandı. Son hacim 10 mL'ye distile su ile tamamlandı.
- **0.5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$:** 6.61 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ tartıldı ve bir miktar distile suda çözüldü. Son hacim 100 mL'ye tamamlandı.
- **10 mM NAD^+ :** 66.34 mg NAD^+ 10 mL distile suda çözüldü.
- **10 mM $\text{NADH}+\text{H}^+$:** 74.16 mg $\text{NADH}+\text{H}^+$ 10 mL distile suda çözüldü.
- **10 mM NADP^+ :** 78.74 mg NADP^+ 10 mL distile suda çözüldü.
- **10 mM $\text{NADPH}+\text{H}^+$:** 83.34 mg $\text{NADPH}+\text{H}^+$ 10 mL distile suda çözüldü.

3.1.4.2. *Gökkuşáğı Alabalık Karaciğer Homojenizatının Hazırlanması için Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması*

- **Doku Yıkama Çözeltisi:** 1 mM EDTA içeren %1.5'lik KCl çözeltisi; 37.22 mg EDTA ve 1.5 g KCl tartıldı ve bir miktar distile suda çözüldü. Son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.
- **Homojenizasyon Çözeltisi:** 1 mM DTT ve 1 mM EDTA içeren 50 mM fosfat tamponu pH 7.4; 15.43 mg DTT, 37.22 mg EDTA ve 0.68 g KH_2PO_4 tartıldı ve bir miktar distile suda

çözüldü. pH 7.0'ye 1N NaOH ile ayarlandıktan sonra son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

3.1.4.3. Gökkuşığı Alabalık Karaciğer Homojenizatından Glutamat Dehidrojenaz Enziminin 2',5'-ADP-Sepharose 4B Afinite Kolonu ile Saflaştırılması için Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

- **Dengeleme Tamponu:** 1 mM DTT ve 1 mM EDTA içeren 50 mM fosfat tamponu pH 7.4; 15.43 mg DTT, 37.22 mg EDTA ve 0.68 g KH_2PO_4 tartıldı ve bir miktar distile suda çözüldü. pH 7.0'ye 1N NaOH ile ayarlandıktan sonra son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.
- **1.2 M KCl:** 8.95 g KCl bir miktar distile suda çözüldükten sonra son hacmi distile su ile 100 mL'ye tamamlandı. Basamaklı elüsyon işlemi için gerekli olan diğer elüsyon çözeltileri bu çözeltiden seyreltilerek hazırlandı.
- **Rejenere-1 Çözeltisi:** 0.5 M NaCl içeren 0.1 M Na-asetat/asetik asit pH 4.5 tamponu; 2.92 g NaCl ve 0.82 g Na-asetat bir miktar distile suda çözüldü ve 0.1 M asetik asit ile pH 4.5'e ayarlandı. Son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.
- **Rejenere-2 Çözeltisi:** 0.5 M NaCl içeren 0.1 M Tris/HCl pH 8.5 tamponu; 2.92 g NaCl ve 1.21 g Tris tartıldı ve 50 mL distile suda çözüldü. 0.1 M HCl ile pH 8.5'e ayarlandıktan sonra son hacim distile su ile 100mL'ye tamamlandı.
- **Saklama Çözeltisi:** %0.1 NaN_3 içeren %20 etil alkol çözeltisi; 0.1 g NaN_3 tartıldı ve 100 mL %20 etil alkol çözeltisinde çözüldü.

3.1.4.4. Kantitatif Protein Tayini için Bradford Reaktifinin Hazırlanması

- **Bradford Reaktifi:** 10 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi 5 mL %95'lik etanolde çözüldü. Çözeltiye %95'lik 11.5 mL fosforik asit ilave edildi. Son hacim 100 mL'ye distile su ile tamamlandı.

3.1.4.5. Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE) için Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

- **Tampon Çözeltisi:** Tris–glisin tamponu (pH 8.5): 3 g Tris, 14.4 g glisin 100 mL'lik balon jöjeye distile su yardımı ile aktarıldı ve kaynar su banyosunda çözüldü. Soğutulduktan sonra

hacmi distile su ile 100 mL'ye tamamlandı. Bu stok çözelti kullanılmadan önce 10 kez seyreltildi.

- **Stok Jel Çözeltileri:** Akrilamid/bisakrilamid çözeltisi: 100 mL'sinde 30 g akrilamid, 0.8 g N, N'-metilen bis akrilamid içeren çözelti. β -Dimetilaminopropionitril çözeltisi: 2.5 kez seyreltilmiş stok Tris-glisin tampon çözeltisinin 100 mL'sinde 1.6 g β -dimetilaminopropiyonitril içeren çözelti. Potasyum ferrisiyanür çözeltisi (%0.03): 0.03 g potasyum ferrisiyanürün 100 mL distile sudaki çözeltisi. Amonyum persülfat çözeltisi (%0.7): 0.7 g amonyum persülfatın 100 mL distile sudaki günlük çözeltisi.
- **Boya Çözeltisi:** %0.25 Coomassie Brilliant Blue G-250'nin metanol: distile su: asetik asit (45.4:45.4:9.2) karışımındaki çözeltisi.
- **Dekoloran Çözeltisi:** 10 kısım metanol, 7 kısım derişik asetik asit ve 83 kısım distile su.
- **Saklama Çözeltisi:** 5 kısım metanol, 10 kısım derişik asetik asit ve 85 kısım distile su.

3.1.4.6. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamit Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) için Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

- **1 M Tris-HCl Tamponu (pH 8.8):** 12.114 g (0.1 M) Tris 80 mL distile suda çözüldü. 1N HCl ile pH 8.8'e ayarlandı. Toplam hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.
- **1 M Tris-HCl tamponu (pH 6.8):** 12.114 g (0.1 M) Tris 80 mL distile suda çözüldü. 1N HCl ile pH 6.8'e ayarlandı. Toplam hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.
- **Numune Tamponu:** 0.65 mL 1M Tris-HCl (pH 6.8), 3 mL %10'luk SDS ve 1 mL %87 gliserin, 1 mL %0.1'lik brom timol mavisi karıştırılarak son hacim distile su ile 10 mL'ye tamamlanmasıyla hazırlandı. Bu tampona kullanmadan hemen önce 950 μ L numune tamponunda 50 μ L olacak şekilde β -merkaptoetanol ilave edildi.
- **Yürütme Tamponu:** 1.5 g Tris ve 7.2 g glisin 50 mL distile suda çözüldü, 5 mL %10'luk SDS ilave edilerek toplam hacim distile su ile 500 mL'ye tamamlandı.
- **Renklendirme Çözeltisi:** 0.66 g Coomassie Brilliant Blue G-250'nin 120 mL metanolde çözünmesi ve bunun üzerine 24 mL saf asetik asit ile 120 mL distile su ilavesiyle hazırlandı.

- **Renksizleştirme Çözeltisi:** 7.5 kısım asetik asit, 5 kısım metanol ve 87.5 kısım distile suyun karıştırılmasıyla hazırlandı.

SDS-PAGE için gerekli olan jeller;

- **Ayırma Jeli:** 3.74 mL 1 M Tris-HCl (pH 8.8), 3.3 mL %30 akrilamid-%0.8'lik bisakrilamid, 0.15 mL %10'luk SDS, 0.1 mL N,N,N',N'-tetrametil etilen diamin (TEMED) ve 2.41 mL distile su karıştırıldı. Bu karışımın üzerine son olarak 0.3 mL %5'lik taze hazırlanmış amonyum persülfat çözeltisi ilave edildi.
- **Yığma Jeli:** 1 M Tris-HCl (pH 6.8)'den 1.24 mL, %30 akrilamid-%0.8'lik bisakrilamid'den 1 mL, %10'luk SDS'den 0.1 mL, TEMED'den 0.02 mL ve distile sudan 7.14 mL alınarak karıştırıldı. Son olarak taze hazırlanmış %1.5'lik amonyum persülfat çözeltisinden 0.5 mL ilave edildi.

3.1.4.7. Gökkuşığı Alabalık Karaciğer Homojenizatından Saflaştırılan Glutamat Dehidrojenaz Enziminin İnhibisyonunda Kullanılan Bazı Metal İyonları ve Vitamin Çözeltilerinin Hazırlanması

İnhibisyon çalışmalarında kullanılan metal çözeltileri kullanılacak metalin klorür tuzu 1 M konsantrasyonlarda distile suda hazırlandı ve kullanım durumuna göre seyreltildi.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Glutamat Dehidrojenaz Enziminin Aktivitesinin Tayin Yöntemi

GDH enziminin aktivite tayini McCarthy ve arkadaşlarının (1980) yöntemine göre bazı değişiklikler yapılarak spektrofotometrik olarak belirlendi. Tablo 3.3'te aminasyon deneyi için kullanılan çözeltiler ve kullanılan miktarlar belirtilmiştir (McCarthy ve diğ., 1980).

Tablo 3.3: Glutamat dehidrojenaz enzim aktivitesinin (Aminasyon) tayin yöntemi.

	Numune	Kör
Homojenizat	4 µL	-
50 mM α-ketoglutarat (pH 7.4)	4 µL	4 µL
0.5 M (NH₄)₂SO₄	4 µL	4 µL
50 mM Pi Tamponu (pH 7.4)	182 µL	186 µL
10 mM NADH + H⁺ (NADPH+H⁺)	6 µL	6 µL

Tablo 3.4'de deaminasyon deneyi için kullanılan çözeltiler ve kullanılan miktarlar belirtilmiştir.

Tablo 3.4: Glutamat dehidrojenaz enzim aktivitesinin (Deaminasyon) tayin yöntemi.

	Numune	Kör
Homojenizat	4 µL	-
50 mM L-Glutamat (pH 7.4)	4 µL	4 µL
50 mM Pi Tamponu (pH 7.4)	186 µL	190 µL
10 mM NAD⁺ (NADP⁺)	6 µL	6 µL

Aminasyon reaksiyonu NADH + H⁺ (NADPH + H⁺), deaminasyon reaksiyonu ise NAD⁺ (NADP⁺) ilavesiyle başlar. Bu çözeltiler ilave edildikten sonra 3 dakika boyunca absorbans değişimi ölçüldü. Aminasyon reaksiyonunda absorbans azalışı, deaminasyon reaksiyonunda absorbans artışı 340 nm'de mikropate spektrofotometre kullanılarak ölçüldü. Bu absorbans değişiminden aşağıdaki formülden yararlanılarak enzimin ünite hesabı hesaplandı.

$$U/mL = \frac{\left(\frac{\Delta OD}{dk}\right)}{6.22} \times \frac{V_{top}}{V_{enz}} \times Sf$$

ΔOD : 3 dakika sonundaki absorbans değişimi.

6.22: 1 mM NADH'ın oluşturduğu absorbans değeri.

V_{top} : Absorbans ölçümünün yapıldığı toplam hacim.

V_{enz} : Absorbans ölçümünün yapıldığı kuyucuktaki enzim miktarının hacmi.

Sf: Seyreltme faktörü (seyreltme yapıldıysa kullanılır).

3.2.2. Protein Tayin Yöntemleri

3.2.2.1. Kalitatif Protein Tayini

280 nm'de proteinler yapılarında bulunan tirozin, triptofan ve fenilalanin amino asitlerinin miktarlarına göre absorbans değeri göstermektedir. Afinite kolon kromatografisinin gerçekleştirilmesinden sonra elüsyon işleminde, her bir elüsyonun kalitatif protein değeri bu yönteme göre belirlenmiştir. Elüatlar kuvartz küvetlere alınarak absorbansları spektrofotometrede köre (tampon) karşı okundu.

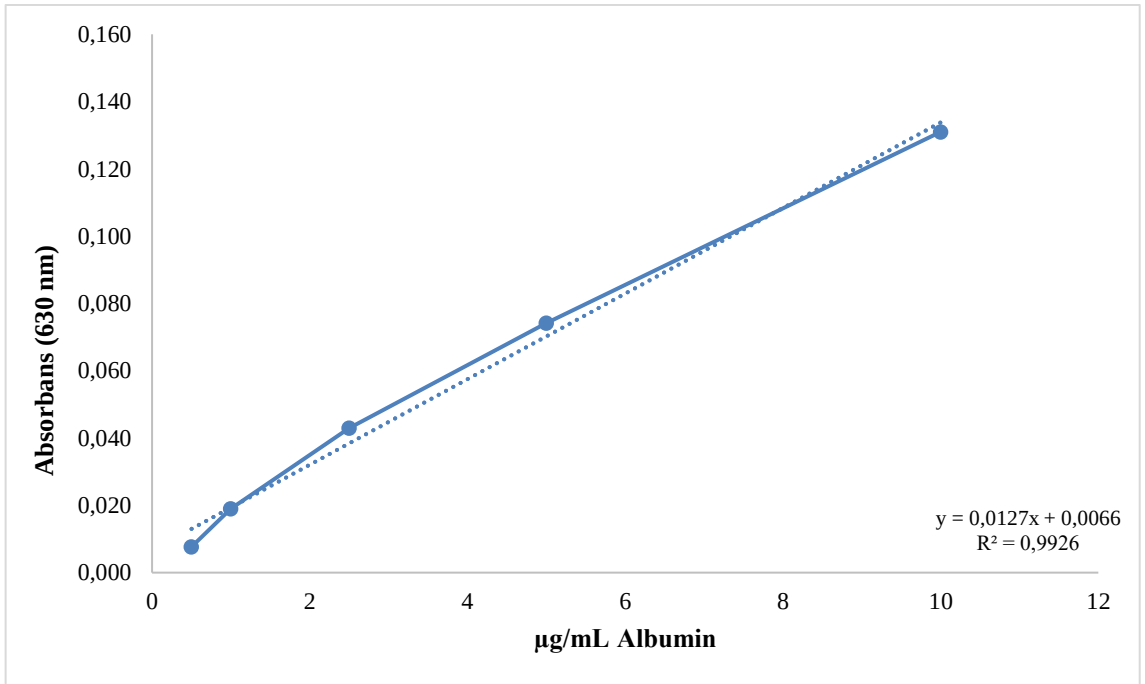
3.2.2.2. Kantitatif Protein Tayini

Hazırlanan homojenizatların, saflaştırılmış enzimin ve diğer tüm basamaklarda protein miktarının tayini Bradford yöntemine göre belirlendi (Bradford, 1976). Yöntem oldukça hızlı ve tekrarlanabilirliği yüksektir. Bradford yönteminde Coomassie Brilliant Blue G-250 boyama reaktifi kullanılır ve bu kimyasal negatif bir yüke sahiptir. Bu negatif yüklü yapı protein üzerindeki pozitif yüklere bağlanır ve protein miktarının belirlenmesini sağlar.

Bradford yöntemine göre protein miktarının belirlenmesinde standart eğri grafiği kullanıldı. Bu grafiğin hazırlanmasında kullanılan albumin çözeltisinin konsantrasyonları 0.5, 1, 2.5, 5 ve 10 $\mu\text{g/mL}$ olacak şekilde distile suda hazırlandı. 50 μL standart üzerine 200 μL Bradford reaktifi ilave edildi. 10 dakika karanlıkta inkübe edildikten sonra 595 nm'de mikropate okuyucuda absorbans değerleri alındı. Aynı şekilde saflaştırma işlemleri sırasında protein miktarı belirlenecek örneklerden 50 μL alındı ve üzerlerine 200 μL Bradford reaktifi ilave edildikten sonra 10 dakika boyunca karanlıkta inkübe edildi. Bu sürenin sonunda 630 nm'de mikropate okuyucuda absorbans değeri ölçüldü. Tüm işlemler 3 kere yapıldı ve bu 3 değerin aritmetik ortalaması alınarak hesaplamalar yapıldı.

3.2.2.3. Kantitatif Protein için Kullanılan Standart Eğri Grafiği

Saflaştırma işlemlerinden sonra elde edilen enzim çözeltilerindeki kantitatif protein tayini Bradford yöntemi kullanılarak yapıldı. Standartlar Bölüm 3.2.2.2.'de anlatıldığı gibi hazırlandı. Ham homojenizat, afinite kolonu ve diyaliz işlemleri sonrasında elde edilen enzim çözeltilerindeki protein miktarı bu standart grafikten yararlanılarak bulundu. Standart çözeltilerin μg proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 3.3'te gösterildi.



Şekil 3.3: Bradford yöntemine göre protein tayininde kullanılan standart eğri grafiği.

3.2.3. Gökkuşığı Alabalık Karaciğerinden Glutamat Dehidrojenaz Enziminin Saflaştırılması

3.2.3.1. Gökkuşığı Alabalık Karaciğer Homojenizatının Hazırlanması

20 g karaciğer dokusu ilk olarak küçük parçalara ayrıldı ve yıkama çözeltisi olan 1 mM EDTA içeren %1.5'lik KCl çözeltisi ile yıkandı (Şekil 3.4). Yıkama işleminin ardından

dokunun kuruması için süzgeç kağıdında kuruması beklendi. Kuruduktan sonra karaciğer dokusu daha da küçük parçalara ayrıldı ve homojenizatör yardımıyla homojenize edildi. Homojenizasyon çözeltisi olarak 1 mM DTT ve 1 mM EDTA içeren 50 mM K-fosfat tampon çözeltisi (pH 7.0)'nden 40 mL alınarak doku homojenize edildi. Elde edilen homojenizat 480xg'de 10 dakika boyunca santrifüje edilerek kaba parçaların ayrılması sağlandı. Santrifüj işlemi sonrası üst kısım dikkatlice başka yere aktarıldı ve bir gün boyunca -80°C'de bekletildi. Ertesi gün doku -20°C'ye konuldu ve +4°C'ye alınarak çözünmesi beklendi. Çözünen homojenizat kolona yüklenmeden önce 6000xg'de 30 dakika boyunca santrifüje edildi ve üst kısım afinite kolonunda kullanılmak üzere ayrıldı.



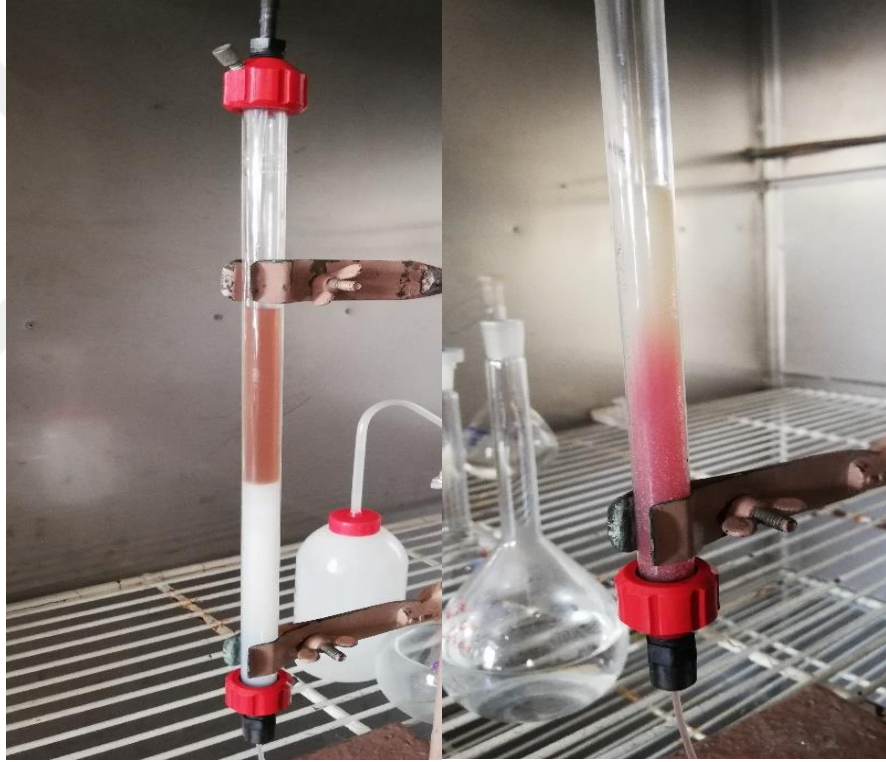
Şekil 3.4: Gökkuşaağı alabalıklarının karaciğerleri.

3.2.3.2. 2',5'-ADP Sepharose 4B Afinite Kolonunun Hazırlanması ve Gökkuşaağı Alabalık Karaciğer Homojenizatından Glutamat Dehidrojenaz Enziminin Saflaştırılması

2 g kuru 2',5'-ADP Sepharose 4B jeli tartıldı ve distile su ile birkaç kere yıkandı ve kolona aktarıldı. Bu yıkama işlemi sayesinde jel şişirilmiş oldu. Şişirilen jelin içerisinde kalmış olan

hava su trompu kullanılarak vakum ile alındı. Daha sonra dengeleme tamponu olan 1 mM DTT ve 1 mM EDTA içeren 50 mM K-fosfat (pH 7.0) ile kolon dengelendi. Böylece çapı 1 cm olan kapalı sistem kolonda 10 cm'lik yükseklik elde edilmiş oldu.

Dengeye gelmiş olan kolona 10 mL ham homojenizat çözeltisi ilave edildi ve homojenizatın kolondan geçmesi beklendi (Şekil 3.5). Kolondan geçme işleminin bittiğini 280 nm'deki protein absorbans değerleri okunarak belirlendi. Dengeleme tamponunun havaya karşı olan absorbans değeri ile kolondan çıkan elüsyonların absorbans değerleri aynı oluncaya kadar kolondan tampon çözelti geçirildi. Aynı absorbans değeri elde edilince kolondan tampon geçirme işlemi bitirildi ve basamaklı elüsyon işlemine geçildi.



Şekil 3.5: Gökkuşáğı alabalık karaciğer homojenizatının afinite kolonuna uygulanması.

Basamaklı elüsyon işlemi için aşağıdaki Tablo 3.5'te belirtilen elüsyon çözeltileri kullanıldı. Tüm elüsyon çözeltilerinden 5'er mL kolona yüklendi ve elüatlar 0.5 mL olacak şekilde toplandı.

Tablo 3.5: Basamaklı elüsyon işlemi için kullanılan çözeltiler.

Çözelti	1. Elüsyon çözeltisi	2. Elüsyon çözeltisi	3. Elüsyon çözeltisi	4. Elüsyon çözeltisi	5. Elüsyon çözeltisi	6. Elüsyon çözeltisi
KCl	0.2 M	0.4 M	0.6 M	0.8 M	1 M	1.2 M

3.2.3.3. Saflaştırılan Glutamat Dehidrojenaz Enzimine Diyaliz İşleminin Uygulanması

Basamaklı elüsyon sonucunda aktivitesi yüksek olan elüatların birleştirilmesinden sonra diyaliz işlemi uygulandı. Diyaliz tüpüne konulan elüat +4°C’de, 1 mM K-fosfat (pH 7.0) tampon çözeltisi içinde diyaliz işlemine tabi tutuldu. Diyaliz işleminin bitmesi ortama 1M AgNO₃ ilavesiyle kontrol edildi. Diyaliz işlemi sonrası aktivite tayini yapıldı ve saflaştırılan GDH enzimi için karakterizasyon işlemlerine geçildi.

3.2.3.4. 2',5'-ADP Sepharose 4B Afinite Kolonunun Rejenerasyonu

Saflaştırma işlemlerinden sonra kolon dolgu maddesi olan 2',5'-ADP Sepharose 4B’nin tekrar kullanılabilmesi için rejenerasyon işlemi yapıldı. Bunun için hazırlanan rejenerasyon-1 ve rejenerasyon-2 çözeltileri ardı ardına olmak üzere 10’ar mL ve 3 kere geçirildi. Daha sonra saklama çözeltisi içerisinde bir sonraki saflaştırma işlemine kadar +4°C’de saklandı.

3.2.4. Poliakrilamid Jel Elektrofrez (PAGE) ile Enzim Saflığının Kontrolü

Afinite kolonundan geçirilerek saflaştırılan GDH enziminin saflığının kontrolü Ornstein (1964) ve Davis (1964)’in PAGE yöntemi kullanılarak yapıldı.

Elektrofrez işlemi yapılmadan önce cam plakalar yıkandı ve ardından etil alkol ile iyice temizlendi. Daha sonra iki cam plaka arasına boşluk oluşturucu konuldu ve özel kısıkaçları sayesinde sıkıştırıldı. Ardından PAGE için hazırlanan stok jel çözeltilerinden eşit hacimlerde alınarak karıştırıldı ve enjektör yardımıyla hava kabarcığı kalmayacak şekilde döküldü. Örnek ve standartların yüklenebilmesi için gerekli olan kuyucukların oluşmasını sağlayan elektrofrez tırağı da cam plakalar arasına konuldu ve jelin polimerleşmesi beklendi. Yaklaşık 1 saat sonra polimerleşen jelden elektrofrez tırağı kuyucuklara zarar vermeden dikkatli bir biçimde

çıkarıldı. Kuyucuklara ham homojenizat, elüat ve molekül ağırlıkları bilinen standart protein çözeltileri enjektör ile yüklendi. Her bir kuyucuğa yüklenen çözeltinin yoğun olabilmesi için gliserin eklendi. Elektroforez tankına soğuk yürütme tamponu konuldu ve 40 mA/jel olacak şekilde akımdan geçirildi. Yürümenin bitmesinin ardından PAGE jeli dikkatli bir şekilde cam plakalardan ayrıldı. Protein bantlarının tespiti için Coomassie Brilliant Blue G-250 ile boyandı. Boyanan jel dekloran çözeltisiyle, ara ara değiştirilerek renkli protein bantlarının oluşması sağlandı. Bu işlemten sonra jel saklama çözeltisine konuldu. GDH enziminin molekül ağırlığı standart molekül ağırlığı kitleri ile çizilen grafikten hesaplandı.

3.2.5. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

Saflaştırılan GDH enziminin saflık kontrolü Laemmli (1970) tarafından belirtilen yöntemle, iki farklı akrilamid konsantrasyonunda; yığma jeli %3, ayırma jeli %10 konsantrasyonlarında olacak şekilde kesikli SDS-PAGE jel elektroforezi ile yapıldı.

Elektroforez işlemi yapılmadan önce cam plakalar yıkandı ve ardından etil alkol ile iyice temizlendi. Daha sonra iki cam plaka arasına boşluk oluşturucu konuldu ve özel kısıkaçları sayesinde sıkıştırıldı. İlk olarak ayırma jeli enjektör yardımıyla hava kabarcığı kalmayacak şekilde plakanın yarısına kadar döküldü. Daha sonra jelin üst kısmının düzgün olması için çok az miktarda n-bütanol ile edilerek yüzey düzeltilti. Polimerizasyon işlemi tamamlandıktan sonra ayırma jelinin üstüne yığma jeli yine enjektör yardımıyla, hava kabarcığı kalmayacak şekilde döküldü. Ardında numunelerin konulması için gerekli olan kuyucukları oluşturmak için elektroforez tarağı yerleştirilerek jelin polimerleşmesi bekledi. Polimerleşmenin ardından elektroforez tarağı çıkarılarak SDS-PAGE jeli hazırlanmış oldu.

SDS-PAGE standardı için içerisinde 200 µg protein olacak şekilde standart protein çözeltisi ve örnek kuyucuk için saflaştırılan GDH enzimi 100 µL olacak şekilde 1:1 oranında numune tamponu ile karıştırıldı. Jele yüklenecek örnek ve standart numuneleri yüklenmeden önce 3 dakika kaynar su banyosunda bekletildi. Standart ve örnek dikkatlice jele yüklendikten sonra elektroforez tankına soğuk yürütme tamponu konuldu. 40 mA akım altında brom timol mavisinden kaynaklanan mavi bant jelin altına geldiği zaman yürütme durduruldu. Bu işlemten sonra jel çıkarıldı ve yığma jeli ile ayırma jeli birbirinden ayrıldı. Ayırma jeli renklendirme çözeltisine konulurken, yığma jeli ise atıldı. Ayırma jeli 1 gece renklendirme çözeltisinde ve

+4°C’de bekletildi. Ertesi gün jel üzerinde bulunan renklerin giderilmesi için jel renksizleştirme çözeltisine konularak bekletildi.

Saflaştırılan GDH enziminin tabii molekül ağırlığı standart proteinlerin molekül ağırlıklarından yararlanılarak çizilen grafik yardımı ile hesaplandı. Bantların orijine göre R_f değerleri bulundu. Hesaplanan R_f değerleri apsise, protein bantlarına karşılık gelen molekül ağırlıklarının logaritması da ordinata yazılarak molekül ağırlığı grafiği elde edildi. Aynı şekilde GDH enziminin R_f değeri hesaplanarak, grafikten molekül ağırlığı tayin edildi.

3.2.6. Gökkuşuğu Alabalık Karaciğerinden Saflaştırılan Glutamat Dehidrojenaz Enziminin Karakterizasyon Çalışmaları

3.2.6.1. Gökkuşuğu Alabalık Karaciğerinden Saflaştırılan Glutamat Dehidrojenaz Enziminin Optimum Sıcaklığının Bulunması

Gökkuşuğu alabalık karaciğerinden saflaştırılan GDH enzimin optimum sıcaklığının belirlenmesi için sıcaklığa ve zamana bağlı olarak enzim aktivitesi ölçüldü. Sıcaklıklar 0°C ile 90°C arasında her defasında 10’ar °C derece artırmak suretiyle aktivite tayini yapıldı. Zaman için ise 5, 10 ve 15 dakika olarak enzim aktivitesi belirlendi.

3.2.6.2. Gökkuşuğu Alabalık Karaciğerinden Saflaştırılan Glutamat Dehidrojenaz Enziminin Optimum pH’ının Bulunması

Gökkuşuğu alabalık karaciğerinden saflaştırılan GDH enzimin optimum pH’ını bulmak için 50 mM olacak şekilde farklı tampon çözeltiler hazırlandı. pH 5.0 için Na-asetat/asetik asit tamponu, pH 6.0, 7.0 ve 8.0 için fosfat tamponu, pH 9.0 ve 10.0 için glisin-NaOH tampon çözeltileri kullanıldı. Her bir tampon çözeltisi ile enzim aktivitesi ölçüldü.

3.2.6.3. Gökkuşuğu Alabalık Karaciğerinden Saflaştırılan Glutamat Dehidrojenaz Enzimi için Optimum İyonik Şiddetin Bulunması

Gökkuşuğu alabalık karaciğerinden saflaştırılan GDH enzimin optimum iyonik şiddetinin belirlenmesi için aktivite deneyi farklı konsantrasyonlardaki tampon çözelti kullanılarak tayin edildi. Bunun için aktivite tayin yönteminde kullanılan fosfat tamponunun (pH 7.4) 1, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500 mM konsantrasyonları ile aktivite tayini yapıldı.

3.2.6.4. Gökkuşığı Alabalık Karaciğerinden Saflaştırılan Glutamat Dehidrojenaz Enziminin Substratları için K_m ve V_{max} Değerlerinin bulunması

Gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan GDH enziminin substrat olarak kullandığı NAD^+ , $NADH + H^+$, $NADP^+$, $NADPH + H^+$, NH_4^+ , α -ketoglutarat ve L-glutamat'ın K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenebilmesi için farklı 6 substrat konsantrasyonu kullanılarak enzim aktiviteleri ölçüldü. Elde edilen verilerle Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Bu grafikten yararlanarak tüm substratlar için ayrı ayrı K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı (Lineweaver ve Burk, 1934).

3.2.6.5. Gökkuşığı Alabalık Karaciğerinden Saflaştırılan Glutamat Dehidrojenaz Enziminin Depo Kararlılığının Bulunması

Gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan GDH enziminin depo kararlılığının bulunabilmesi için saflaştırılan GDH enzimi $+4^\circ C$, $-20^\circ C$ ve $-80^\circ C$ derin dondurucuda tutulmuş ve 13 gün boyunca enzim aktivitesi ölçülmüştür.

3.2.6.6. Gökkuşığı Alabalık Karaciğerinden Saflaştırılan Glutamat Dehidrojenaz Enziminin Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonları ve Vitaminlerin Etkilerinin İncelenmesi

Gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan GDH enziminin aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının ve bazı vitaminlerin etkilerinin incelenmesinde tüm bu maddelerin farklı konsantrasyonlarda aktivite ölçümü yapıldı. Bu aktivite ölçümü Tablo 3.6'da verildiği gibi yapıldı.

Tablo 3.6: Gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enziminin aktivitesi üzerine bazı metal iyonları ve vitaminlerin etkilerinin incelenmesi.

	Numune	Kontrol	Kör
Homojenizat	4 μL	4 μL	-
Metal İyonu/Vitamin Çözeltileri	4 μL	-	4 μL
50 mM α -ketoglutarat (pH 7.4)	4 μL	4 μL	4 μL
0.5 M $(NH_4)_2SO_4$	4 μL	4 μL	4 μL
50 mM P_i Tamponu (pH 7.4)	178 μL	182 μL	182 μL
10 mM $NADH + H^+$ ($NADPH + H^+$)	6 μL	6 μL	6 μL

NADH + H⁺'ın ilavesiyle birlikte 3 dakika boyunca 340 nm'de absorpsiyon değişimi ölçüldü ve aktivite hesaplandı. Kontrolün aktivitesi %100 olarak kabul edildi ve incelenecek olan maddelerin aktivitelerinin sonuçları kontrol değeri ile karşılaştırıldı. Bu karşılaştırmayla incelenen maddelerin saflaştırılan GDH aktivitesi üzerine etkilerinin inhibisyon, aktivasyon ya da etkisiz olduğuna karar verildi. İncelenen maddelerin aktivitesi %100'ün üzerinde bir değere sahip ise aktivasyon, %100'ün altında bir değere sahip ise inhibisyon, kontrol aktivitesi ile aynı ise aktivite üzerine etkisiz olarak değerlendirilmiştir. İnhibisyon etkisi gösteren maddelerin denemelerde kullanılan konsantrasyonlarına karşı % aktivite grafikleri çizildi ve enzimin aktivitesini yarıya indiren inhibitör konsantrasyonları (IC₅₀ değerleri) hesaplandı.

İnhibisyon etkisi gösteren metal iyonları ve vitaminlerin inhibisyon tiplerini ve K_i değerlerini belirleyebilmek için 6 farklı substrat konsantrasyonunda 3 farklı inhibitör konsantrasyonunun aktivite ölçümleri yapıldı. Bu aktivite ölçümlerinden yararlanılarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Bu grafikler sayesinde inhibisyon türleri ve K_i değerleri hesaplandı. K_i değerlerinin hesaplanmasında aşağıdaki denklemlerden yararlanıldı.

Yarışmalı (Kompetitif) inhibisyon gösteren maddelerin K_i değerlerinin hesaplanmasında kullanılan formül:

$$K_i = \frac{K_m \cdot [I]}{(K_m' - K_m)}$$

Yarı-yarışmalı, yarışmasız ve karışık (miks) inhibisyon türü gösteren maddelerin K_i değerlerinin hesaplanmasında kullanılan formül:

$$K_i = \frac{V_{max}' \cdot [I]}{(V_{max} - V_{max}')}$$

[I]: İnhibitör konsantrasyonu

V_{max}: Kontrol deneyinin V_{max} değeri

K_m: Kontrol deneyinin K_m değeri

V_{max}': İnhibitör eklenen deneyin V_{max} değeri

K_m': İnhibitör eklenen deneyin K_m değeri

3.2.6.7. Gökkuşığı Alabalık Karaciğerinden Saflaştırılan Glutamat Dehidrojenaz Enziminin Aktivitesi Üzerine Bazı Çözücülerin Etkilerinin İncelenmesi

Bazı çözücülerin gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan GDH enzim aktivitesi üzerine etkileri Tablo 3.7’de belirtildiği gibi yapıldı.

Tablo 3.7: Gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enziminin aktivitesi üzerine bazı çözücülerin etkilerinin incelenmesi.

	Numune	Kontrol	Kör
Homojenizat	4 µL	4 µL	-
Çözücü	4 µL	-	4 µL
50 mM α-ketoglutarat (pH:7.40)	4 µL	4 µL	4 µL
0.5 M (NH₄)₂SO₄	4 µL	4 µL	4 µL
50 mM P_i Tamponu (pH:7.40)	178 µL	182 µL	182 µL
10 mM NADH + H⁺	6 µL	6 µL	6 µL

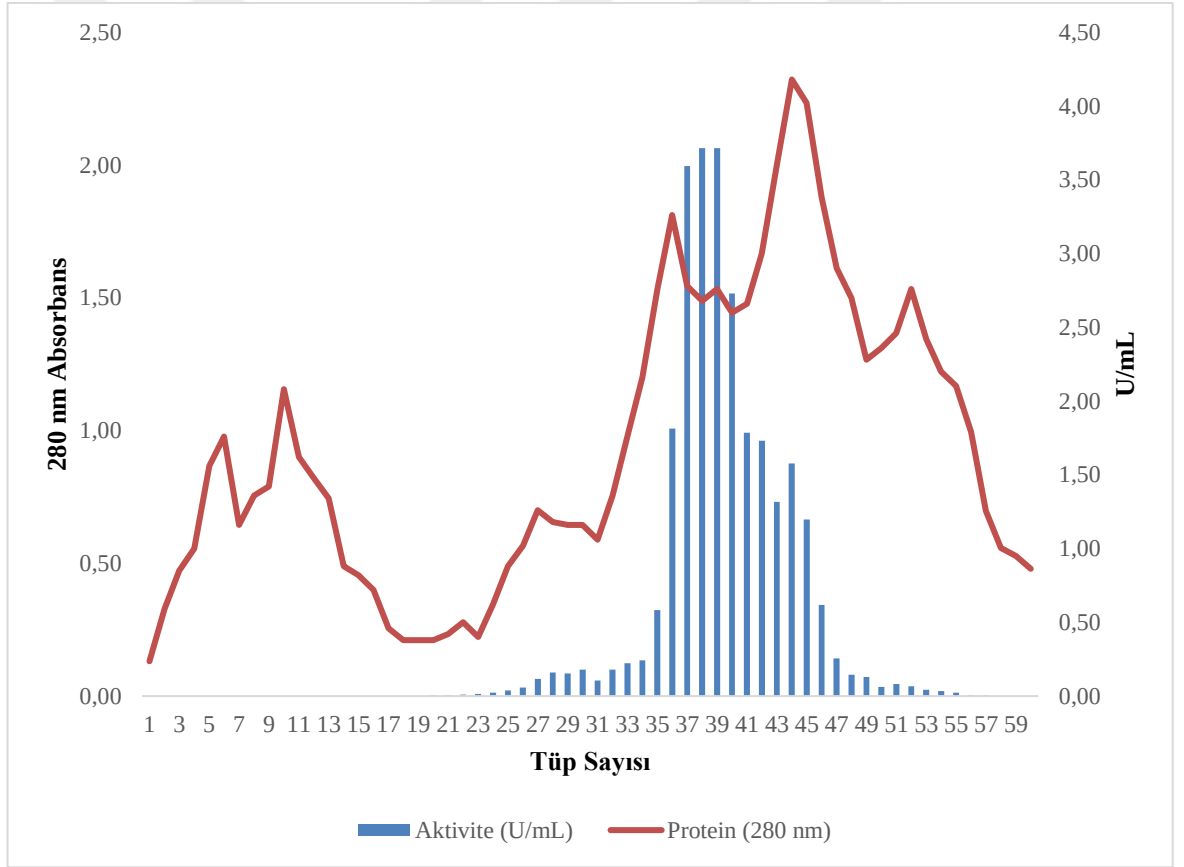
NADH + H⁺’ın ilavesiyle birlikte 3 dakika boyunca spektrofotometrede 340 nm’de absorbans değişimi ölçüldü ve aktivite hesaplandı. Kontrol tüpünden çıkan sonuç ve aktivite hesabı %100 olarak kabul edildi ve incelenecek olan maddelerin aktivitelerinin sonuçları kontrol tüpüyle karşılaştırıldı.

4. BULGULAR

4.1. GÖKKUŞAĞI ALABALIK KARACİĞERİNDEN GLUTAMAT DEHİDROJENAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRMA SONUÇLARI

4.1.1. Afinite Kolon Kromatografisi Sonuçları

Hazırlanan gökkuşağı alabalık karaciğer homojenizatı 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonuna yüklendi ve uygun çözeltiler ile basamaklı elüsyon yapıldı ve elüatlardaki GDH enzimine ait aktivite değerleri ve tüm elüatların 280 nm’de absorbands değerlerine bakıldı ve bu değerler Şekil 4.1’de verildi.



Şekil 4.1: Gökkuşağı alabalık karaciğerinden glutamat dehidrojenaz enziminin 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonu ile saflaştırılması sonucu elde edilen elüatların aktivite değerleri ve 280 nm’deki absorbands değerleri.

Tablo 4.1’de her bir saflaştırma basamağına ait spesifik aktivite değerleri ve saflaştırma katsayıları verildi.

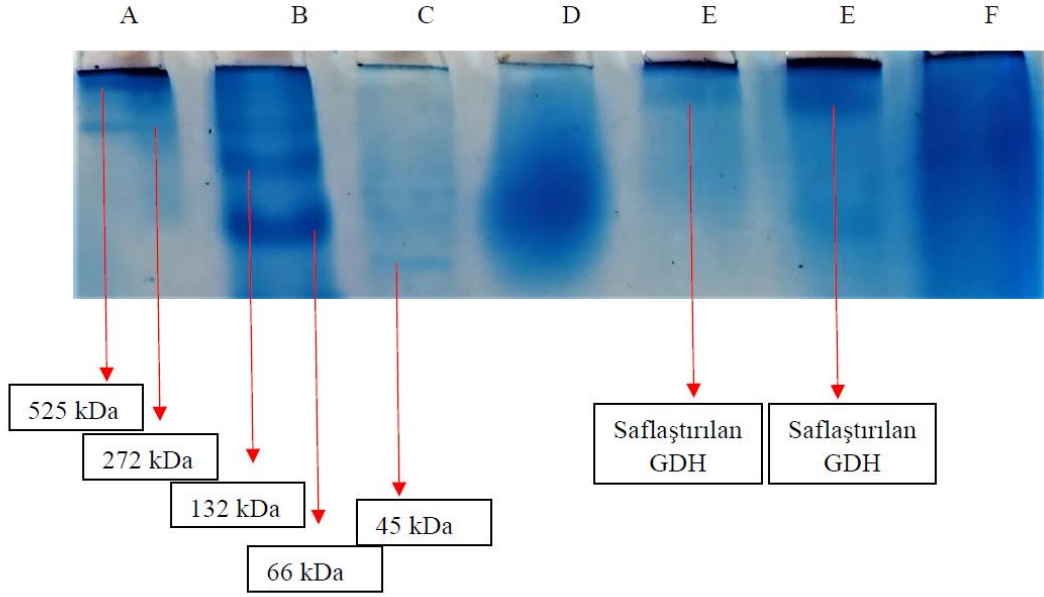
Tablo 4.1: Gökkuşığı alabalık karaciğerinden glutamat dehidrojenazın saflaştırma basamakları.

	Toplam Hacim (mL)	Toplam Aktivite (U/mL)	Toplam Protein (mg/mL)	Aktivite (U/mL)	Protein (mg/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg protein)	Verim (%)	Saflaştırma Katsayısı
Ham Homojenizat	10.00	24.5	716.10	2.45	71.61	0.03	100	1
Affinite Kromatografisi	5.50	4.13	0.72	0.75	0.13	5.77	16.86	169
Dializ İşlemi	5.00	3.50	0.60	0.70	0.12	5.83	14.29	171

Afinite kromatografisi ve diyaliz işleminin sonucunda gökkuşığı alabalık karaciğerinden GDH enzimi %14.29 verimle 171 kat saflaştırılmış ve saflaştırılan GDH enziminin spesifik aktivitesi 5.83 U/mg protein olarak bulunmuştur.

4.1.2. Gökkuşığı Alabalık Karaciğerinden Saflaştırılan Glutamat Dehidrojenaz Enziminin PAGE Sonuçları

PAGE deneyi Bölüm 3.2.4.'de anlatıldığı gibi gerçekleştirildi ve deney sonucunda elde edilen standart ve gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan GDH enzimine ait bantlar Şekil 4.2'de verildi.



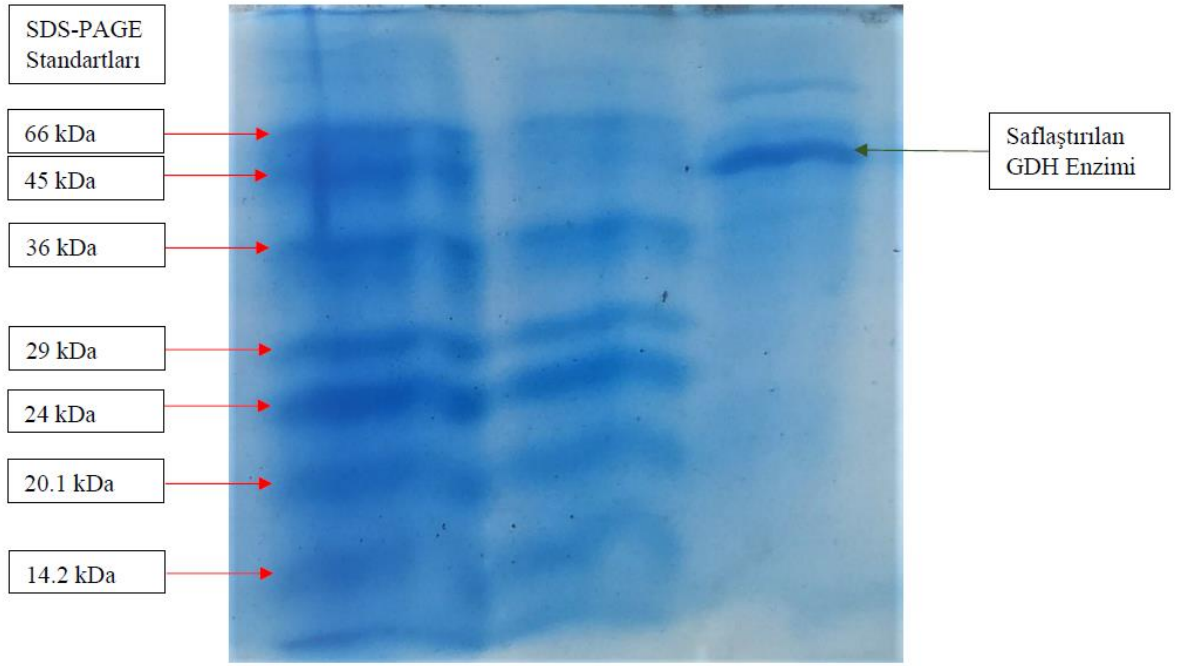
Şekil 4.2: Standart ve gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimine ait PAGE jelinin görüntüsü.

- A) Üreaz (Jack Bean, Trimer Mr = 272 kDa ve Hekzamer Mr = 545 kDa)
- B) Albumin (Bovine Serum, Monomer= 66 kDa ve Dimer = 132 kDa)
- C) Albumin (Chicken Egg, 45 kDa)
- D) Diyalizat
- E) Diyalizat
- F) Ham Homojenizat

Standart eğri grafiği yardımıyla gökkuşığı alabalığı karaciğerinden saflaştırılan GDH enziminin toplam molekül kütleinin 346.74 kDa olduğu bulunmuştur.

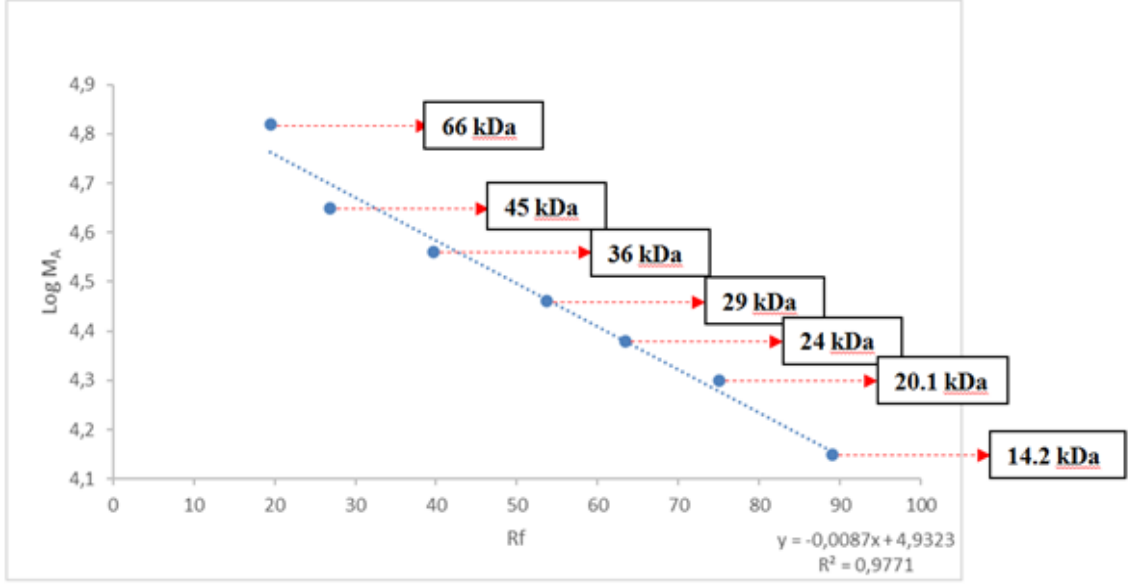
4.1.3. Gökkuşığı Alabalık Karaciğerinden Saflaştırılan Glutamat Dehidrojenaz Enziminin SDS-PAGE Sonuçları

SDS-PAGE deneyi Bölüm 3.2.5.'de anlatıldığı gibi gerçekleştirildi ve deney sonucunda elde edilen standart ve gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan GDH enzimine ait bantlar Şekil 4.3'te verildi.



Şekil 4.3: Standart ve gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimine ait SDS-PAGE jelinin görüntüsü.

SDS-PAGE deneyleri sonucunda gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan GDH enziminin alt birimlerinin molekül ağırlığının belirlenmesinde standartların logMA-Rf çizildi. Saflaştırılan GDH enziminin Rf değeri ilgili grafikten elde edilen denklemde yerine yazılarak hesaplandı. SDS-PAGE standartları için kullanılan logMA-Rf grafiği Şekil 4.4'te verildi. SDS-PAGE standartları için albümin (Bovine, 66 kDa), ovalbumin (Chicken, 45 kDa), gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz (Rabbit, 36 kDa), karbonik anhidraz (Bovine, 29 kDa), tripsinojen (Bovine, 24 kDa), tripsin inhibitörü (Soybean, 20.1 kDa) ve laktalbumin (Bovine, 14.2 kDa) içeren ticari molekül ağırlığı tayin kiti kullanıldı.



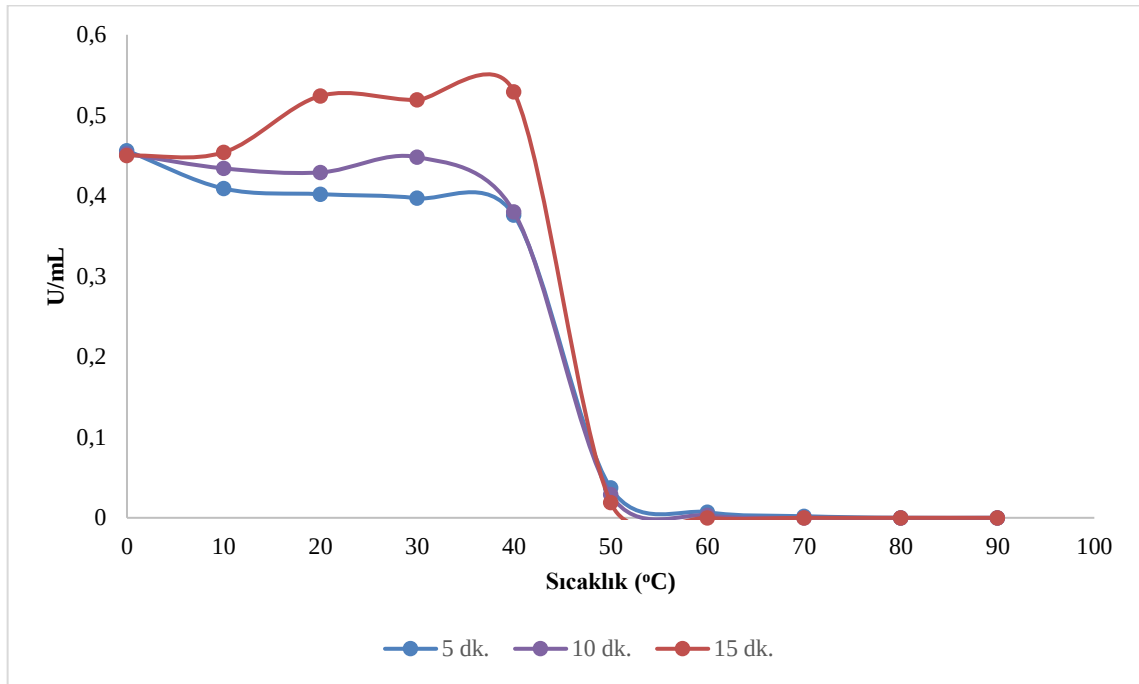
Şekil 4.4: SDS-PAGE standartlarına ait logMA-Rf grafiği.

Standart eğri grafiği yardımıyla gökkuşağı alabalığı karaciğerinden saflaştırılan GDH enziminin alt birimlerinin molekül kütlelerinin 53.71 kDa olduğu bulunmuştur (Şekil 4.4). PAGE ve SDS-PAGE deneyleri sonucunda gökkuşağı alabalık karaciğerinden saflaştırılan GDH enziminin toplam molekül kütlelerinin 346.74 kDa, alt birimlerinin molekül kütlelerinin 53.71 kDa olduğu bulunmuş ve saflaştırılan GDH enziminin hekzamerik yapıda olduğu belirlenmiştir.

4.2. GÖKKUŞAĞI ALABALIK KARACİĞERİNDEN SAFLAŞTIRILAN GLUTAMAT DEHİDROJENAZ ENZİMİNİN KARAKTERİZASYON SONUÇLARI

4.2.1. Gökkuşağı Alabalık Karaciğerinden Saflaştırılan Glutamat Dehidrojenaz Enziminin Optimum Sıcaklığının Bulunmasına Yönelik Çalışmaların Sonuçları

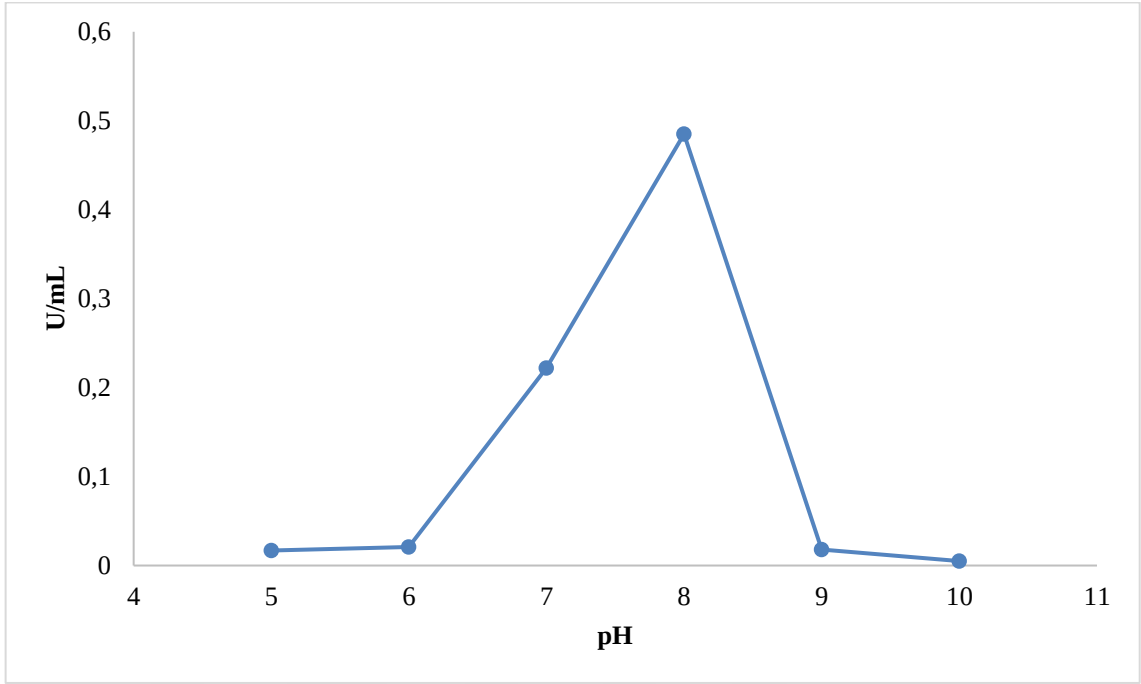
Gökkuşağı alabalık karaciğer GDH enziminin optimum sıcaklığı Bölüm 3.2.6.1’de belirtildiği üzere yapılan aktivite ölçümleri ile tespit edildi. Sıcaklık değerleri aynı zamanda zamana göre de ölçüldü. Elde edilen değerler ile Şekil 4.5’te gösterilen grafik çizildi. Bu çalışmalar sonucunda enzimin optimum sıcaklığının 40°C ve zamanın ise 15 dakika olduğu tespit edildi.



Şekil 4.5: Gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için hazırlanan aktivite-sıcaklık grafiği.

4.2.2. Gökkuşığı Alabalık Karaciğerinden Saflaştırılan Glutamat Dehidrojenaz Enziminin Optimum pH'ının Bulunmasına Yönelik Çalışmaların Sonuçları

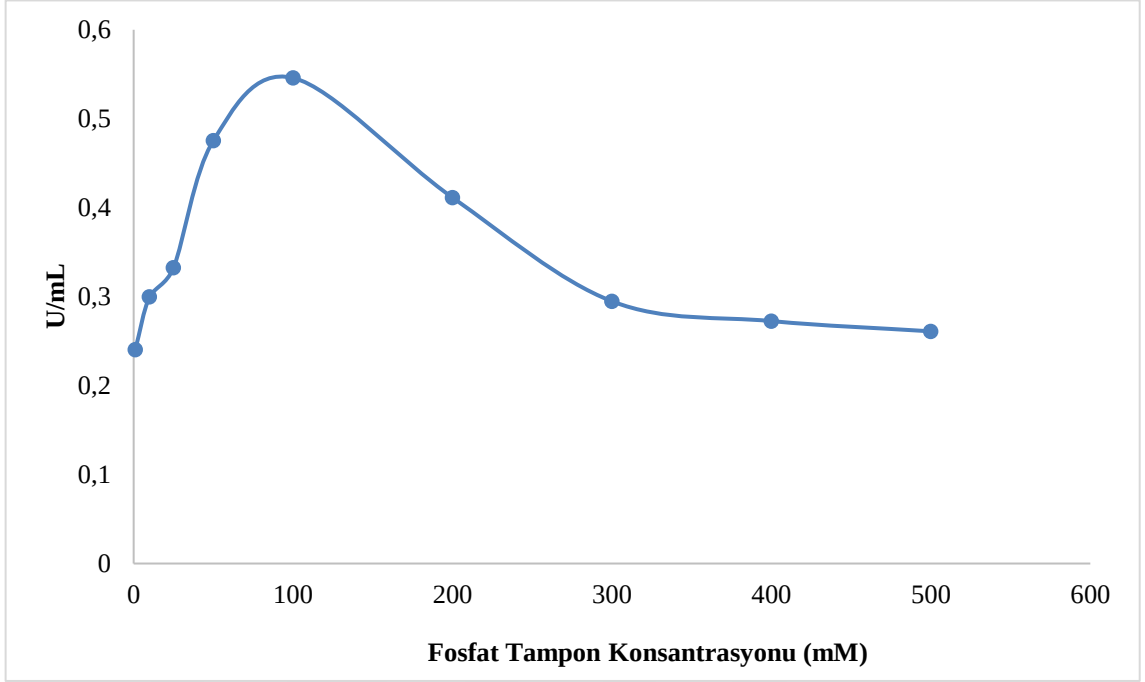
Gökkuşığı alabalık karaciğer GDH enziminin optimum pH'ı Bölüm 3.2.6.2'de belirtildiği gibi pH 5.0 için 50 mM Na-asetat/asetik asit tamponu, pH 6.0, 7.0 ve 8.0 için 50 mM fosfat tamponu, pH 9.0 ve 10.0 için 50 mM glisin-NaOH tampon çözeltileri kullanıldı. Şekil 4.6'da tüm bu tampon çözeltilerine ait aktivite grafiği verildi ve gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan GDH enziminin optimum pH'ının 8.0 olduğu bulundu.



Şekil 4.6: Gökkuşuğu alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enziminin optimum pH'ını belirlemek için hazırlanan aktivite-pH grafiği.

4.2.3. Gökkuşuğu Alabalık Karaciğerinden Saflaştırılan Glutamat Dehidrojenaz Enziminin Optimum İyonik Şiddetin Bulunmasına Yönelik Çalışmaların Sonuçları

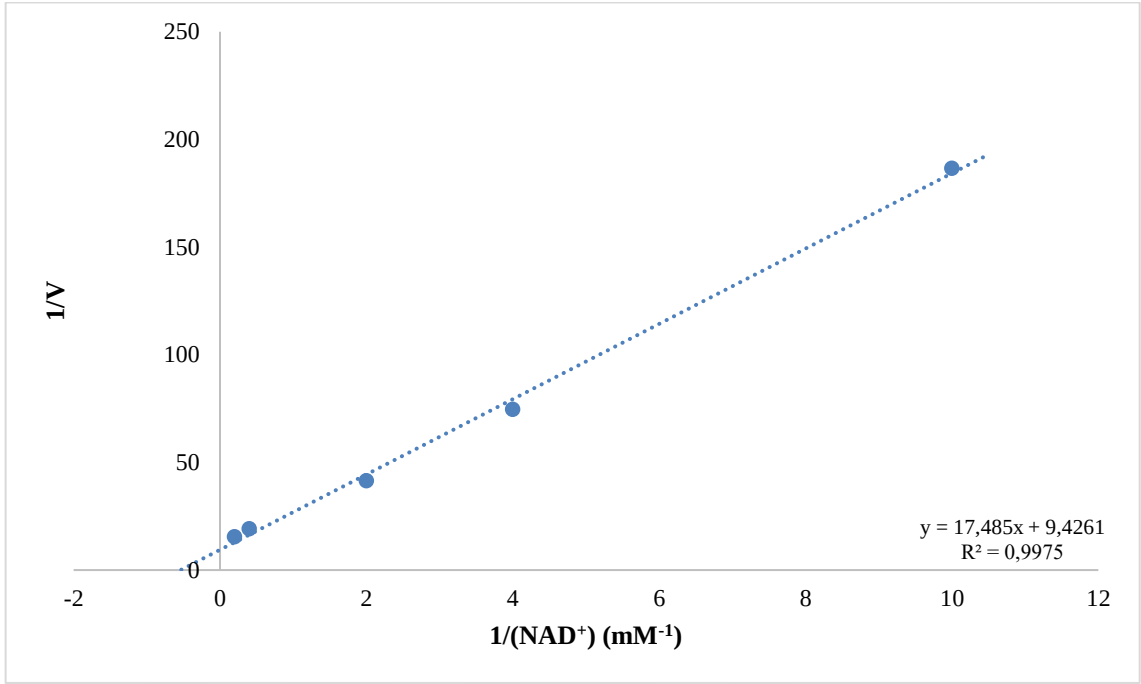
Gökkuşuğu alabalık karaciğer GDH enziminin optimum iyonik şiddetinin bulunması Bölüm 3.2.6.3'te belirtildiği gibi fosfat tamponunun farklı konsantrasyonları ile denenerek yapıldı. Aktivite ölçümlerinin ardından optimum iyonik şiddetin 100 mM olduğu tespit edildi (Şekil 4.7).



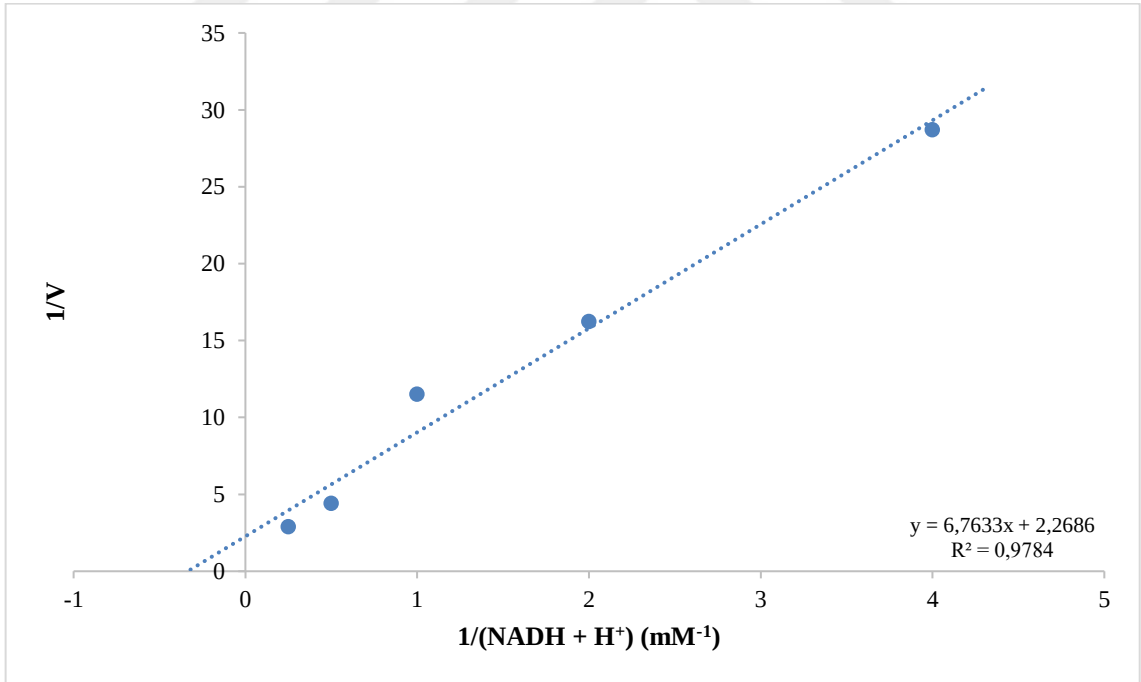
Şekil 4.7: Gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enziminin optimum iyonik şiddetinin belirlemek için hazırlanan aktivite-iyonik şiddet grafiği.

4.2.4. Gökkuşığı Alabalık Karaciğerinden Saflaştırılan Glutamat Dehidrojenaz Enziminin Substratları için K_m ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesine Yönelik Çalışmaların Sonuçları

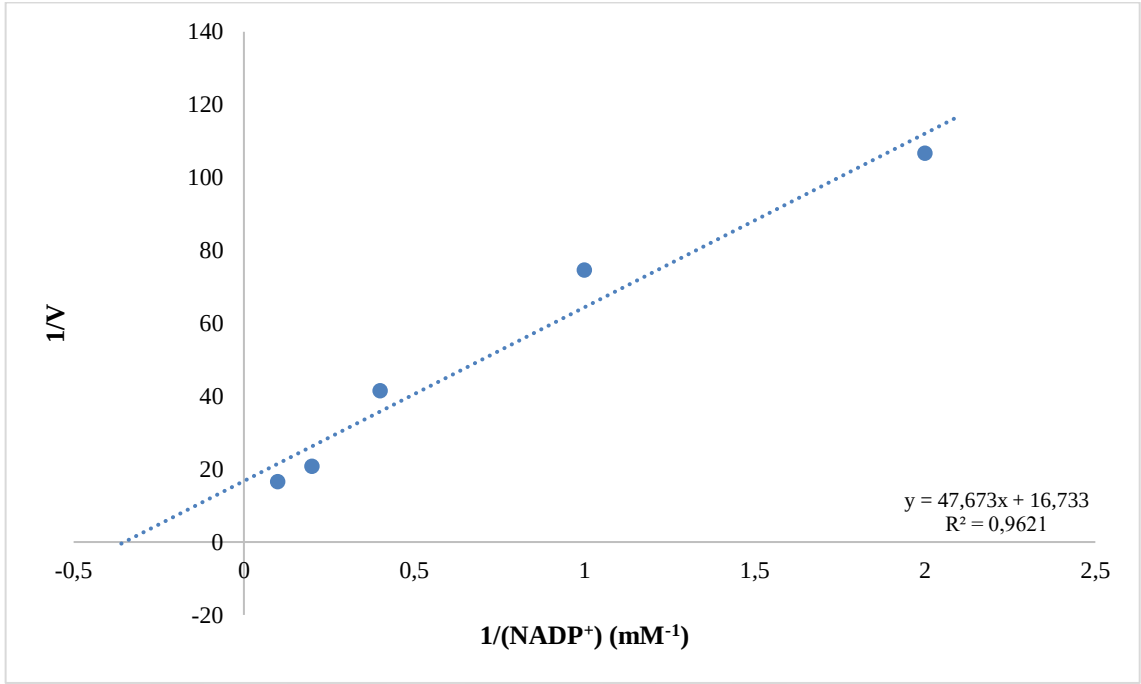
Gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan GDH enziminin substratları olan NAD^+ , $NADP^+$, $NADH + H^+$, $NADPH + H^+$, NH_4^+ , L-glutamat ve α -ketoglutarat için K_m ve V_{max} değerlerini belirlemek için Lineweaver-Burk grafiği çizildi ve bu grafiklerden tüm substratlar için ayrı ayrı K_m ve V_{max} değerleri belirlendi (Şekil 4.8-14).



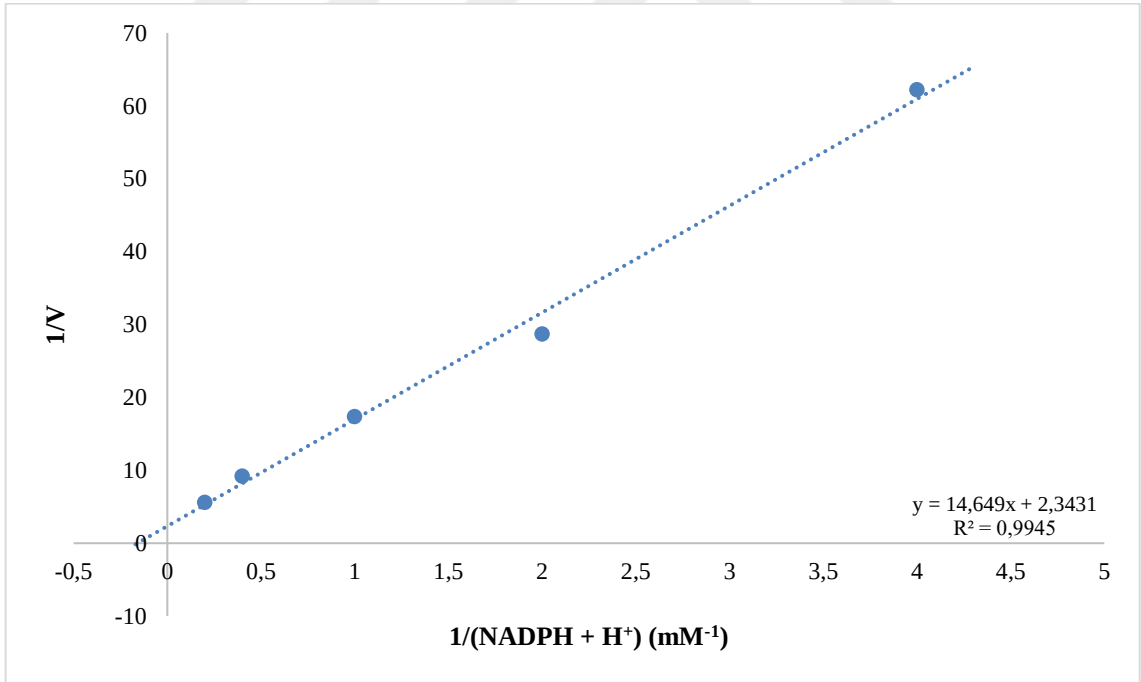
Şekil 4.8: Gökkuşaağı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enziminin NAD^+ substratının 5 farklı konsantrasyonunda aktivite ölçülerek çizilen Lineweaver-Burk grafiği.



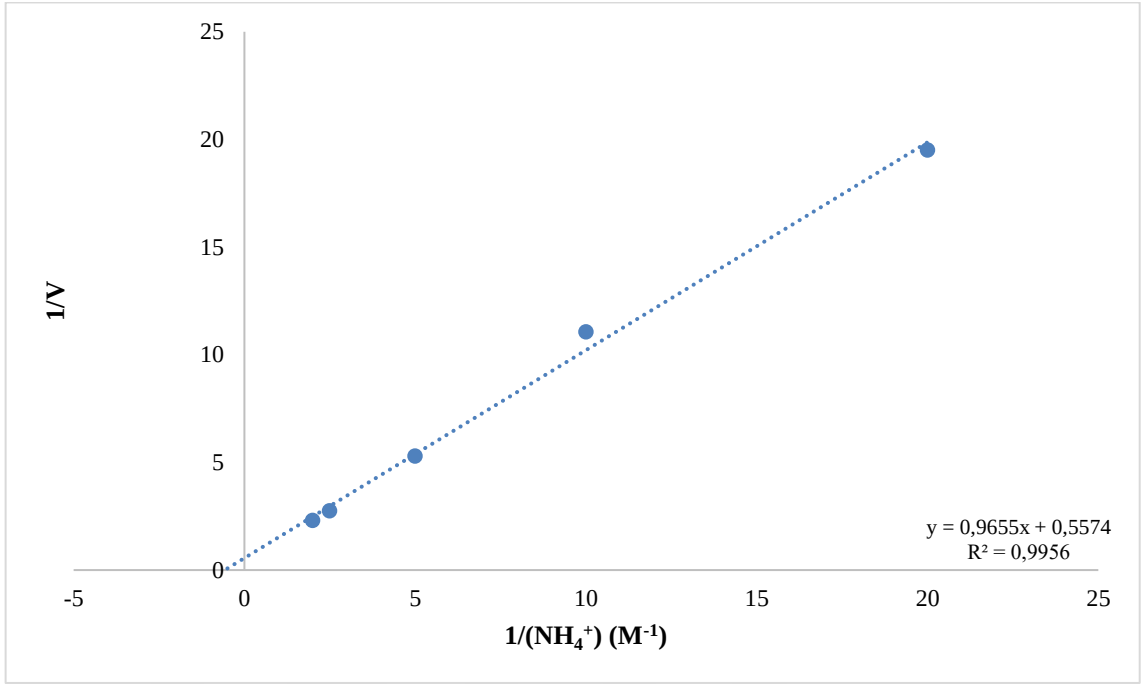
Şekil 4.9: Gökkuşaağı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enziminin $NADH + H^+$ substratının 5 farklı konsantrasyonunda aktivite ölçülerek çizilen Lineweaver-Burk grafiği.



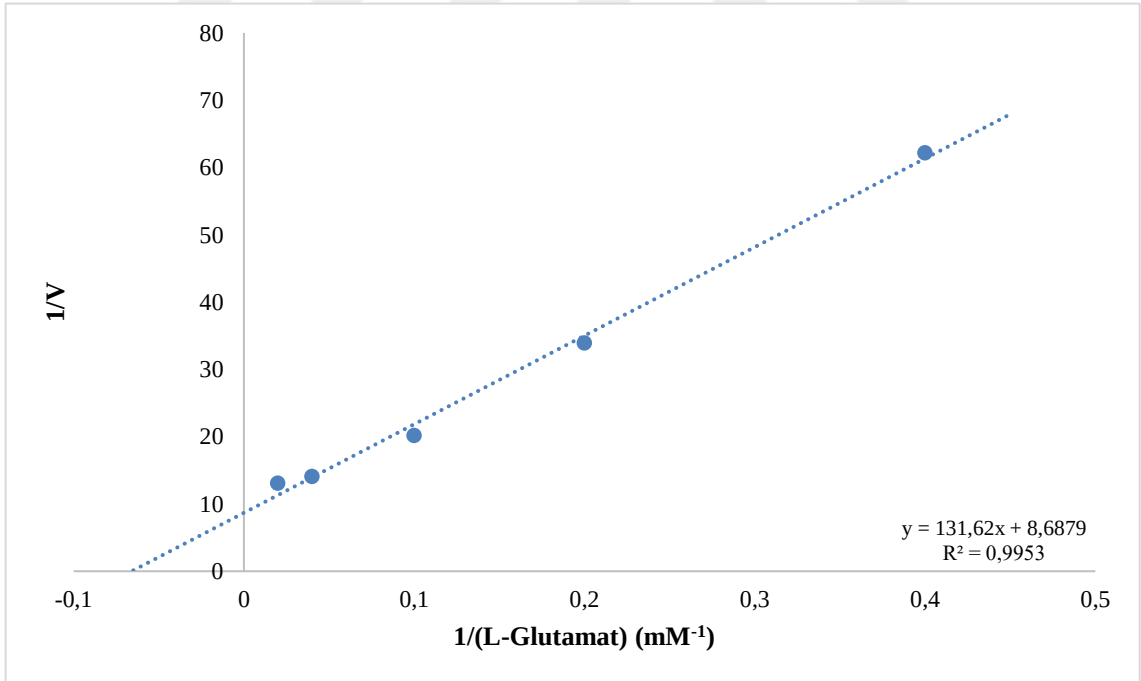
Şekil 4.10: Gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enziminin $NADP^+$ substratının 5 farklı konsantrasyonunda aktivite ölçülerek çizilen Lineweaver-Burk grafiği.



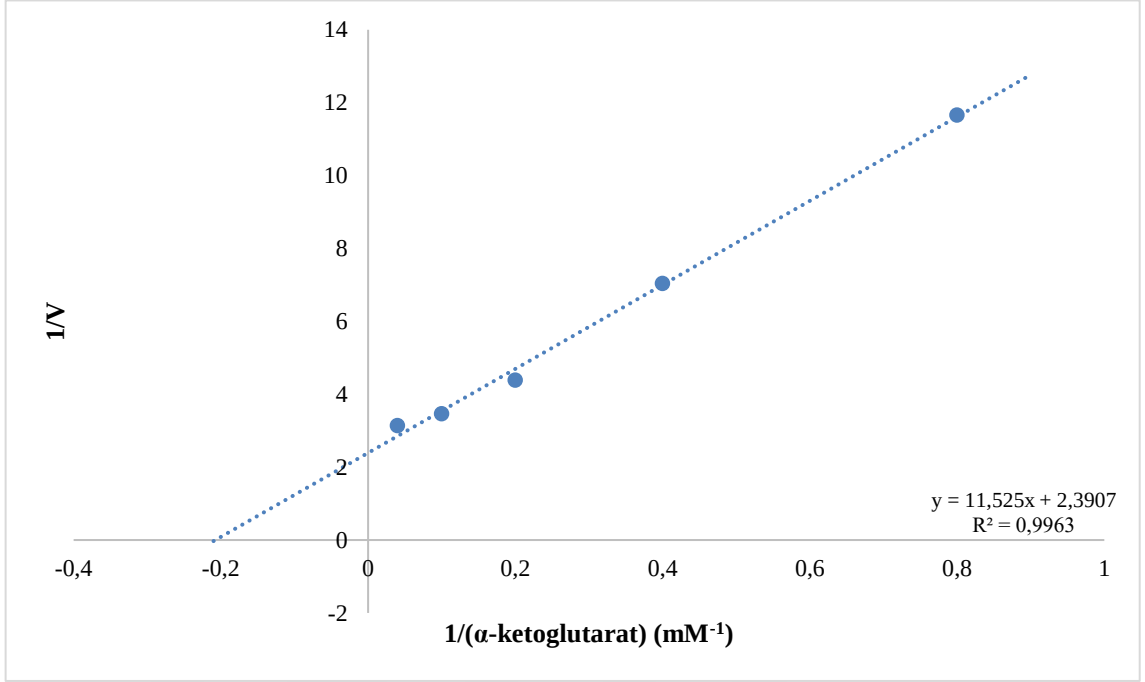
Şekil 4.11: Gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enziminin $NADPH + H^+$ substratının 5 farklı konsantrasyonunda aktivite ölçülerek çizilen Lineweaver-Burk grafiği.



Şekil 4.12: Gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enziminin NH_4^+ substratının 5 farklı konsantrasyonunda aktivite ölçülerek çizilen Lineweaver-Burk grafiği.



Şekil 4.13: Gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enziminin L-glutamat substratının 5 farklı konsantrasyonunda aktivite ölçülerek çizilen Lineweaver-Burk grafiği.



Şekil 4.14: Gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enziminin α -ketoglutarat substratının 5 farklı konsantrasyonunda aktivite ölçülerek çizilen Lineweaver-Burk grafiği.

Tablo 4.2’de gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan GDH enziminin substratlarına ait K_m - V_{max} değerleri verildi.

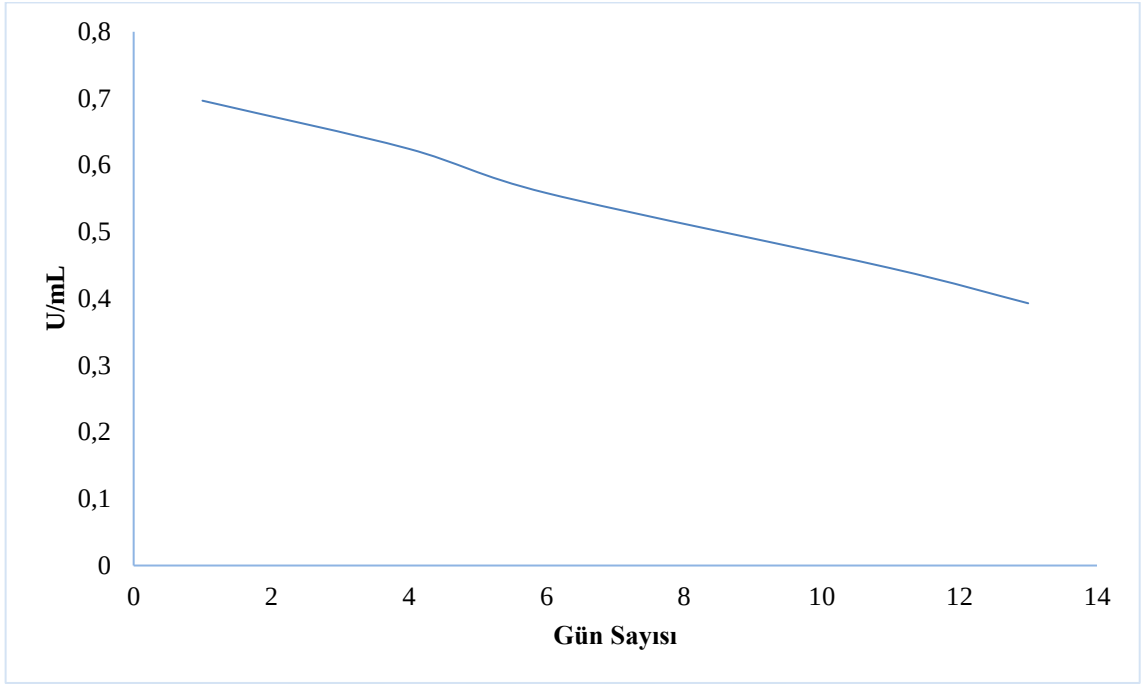
Tablo 4.2: Gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enziminin substratlarına ait K_m - V_{max} değerleri.

		K_m	V_{max}
K_m - V_{max} Çalışmaları	NAD^+	1.86 mM	0.11 U/mL
	$\text{NADH}+\text{H}^+$	2.98 mM	0.44 U/mL
	NADP^+	2.17 mM	0.05 U/mL
	$\text{NADPH}+\text{H}^+$	6.25 mM	0.43 U/mL
	NH_4^+	1.73 M	1.79 U/mL
	L-Glutamat	15.15 mM	0.12 U/mL
	α -Ketoglutarat	4.82 mM	0.42 U/mL

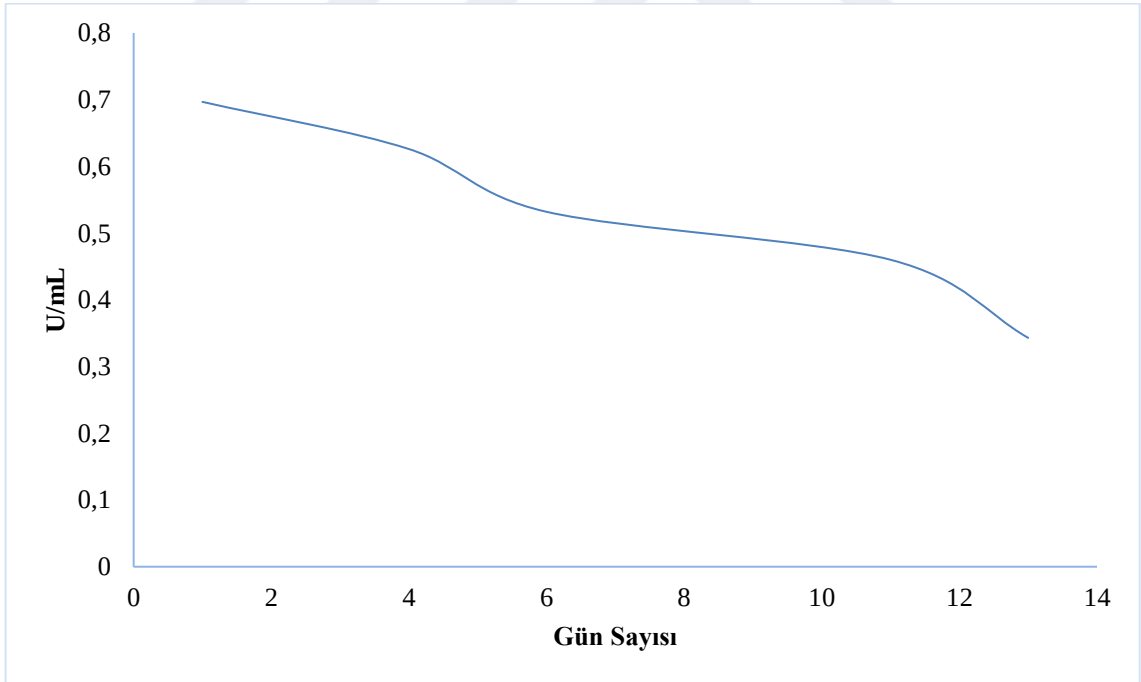
K_m enzimatik reaksiyonun hızının, maksimum hızın yarısına eşit olduğu andaki substrat konsantrasyonu olarak tanımlanır. Her enzim için spesifik bir K_m değeri bulunmakta ve birden fazla substratı olan enzimlerin herbir substratı için karakteristik K_m değeri bulunmaktadır. K_m değeri substratın enzime olan ilgisini göstermektedir (Can ve Akev, 2021). Gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan GDH enziminin substratları ve koenzimleri olan NAD^+ , $NADP^+$, $NADH+H^+$, $NADPH+H^+$, L-glutamat, α -ketoglutarat ve NH_4^+ için K_m değerleri sırasıyla 1.86, 2.17, 2.98, 6.25, 15.15, 4.82 mM ve 1.73 M ve V_{max} değerleri ise sırasıyla 0.11, 0.05, 0.44, 0.43, 0.12, 0.42 and 1.79 U/mL olarak bulunmuştur (Tablo 4.2). Saflaştırılan GDH enzimi için K_m değeri en düşük olan substrat NAD^+ olarak bulunmuştur. Gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan GDH enzimi NAD^+ substratına olan ilgisi $NADP^+$ 'ye oranla daha yüksek bulunmuştur. Aynı şekilde $NADH+H^+$ substratına olan ilgisi $NADPH+H^+$ kıyasla daha yüksek olduğu bulunmuştur. Gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan GDH enziminin $NAD(P)^+$ -bağımlı olduğu tespit edilmiş ve reaksiyonun iki yönlü olarak çalıştığı tespit edilmiştir.

4.2.5. Gökkuşığı Alabalık Karaciğerinden Saflaştırılan Glutamat Dehidrojenaz Enziminin Depo Kararlılığının Bulunmasına Yönelik Çalışmaların Sonuçları

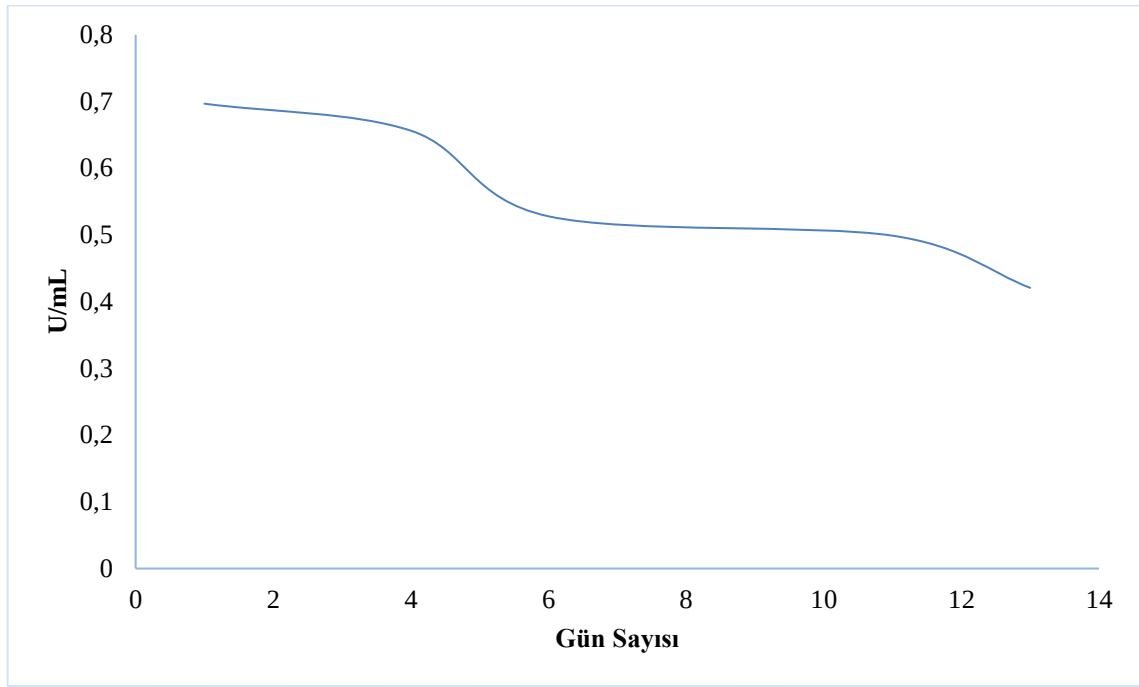
Gökkuşığı alabalık karaciğer saflaştırılan GDH enziminin depo kararlılığı Bölüm 3.2.6.5'te belirtildiği gibi aktivite ölçümleri yapılarak tespit edildi. $+4^\circ C$ buzdolabında, $-20^\circ C$ ve $-80^\circ C$ derin dondurucularda tutulmuş olan GDH enzimlerinin 13 gün boyunca GDH aktiviteleri ölçüldü ve depo kararlılığının en iyi olduğu sıcaklık değeri $-80^\circ C$ olarak bulundu. $+4^\circ C$, $-20^\circ C$ ve $-80^\circ C$ 'ye ait aktivite değerlerine ait grafik ve tablolar sırasıyla Şekil 4.15-17 ve Tablo 4.3'te verildi.



Şekil 4.15: Gökkuşuğu alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enziminin +4°C'deki depo kararlılığı için hazırlanan aktivite-gün grafiği.



Şekil 4.16: Gökkuşuğu alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enziminin -20°C'deki depo kararlılığı için hazırlanan aktivite-gün grafiği.



Şekil 4.17: Gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enziminin -80°C'deki depo kararlılığı için hazırlanan aktivite-gün grafiği.

Tablo 4.3'te gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enziminin +4°C, -20°C ve -80°C'deki depo kararlılığının 13. gün sonundaki % aktivite tablosu verildi.

Tablo 4.3: Gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enziminin +4°C, -20°C ve -80°C'deki depo kararlılığının 13. gün sonundaki % aktivite tablosu.

	+4°C (% Aktivite)	-20°C (% Aktivite)	-80°C (% Aktivite)
1.Gün	%100	%100	%100
13.Gün	%56.41	%49.20	%60.38

Tablo 4.4'te gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan GDH enziminin karakterizasyon çalışmaları sonucunda belirlenen toplam molekül kütlesi, alt birimlerin molekül kütlesi, optimum sıcaklık, optimum pH, optimum iyonik şiddet ve depo kararlılığına ait sonuçlar verilmiştir. Gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan GDH enziminin toplam molekül kütlesinin 346.74 kDa, alt birimlerinin molekül kütlesinin 53.71 kDa, optimum sıcaklığının

40°C, optimum pH'nin 8.0, optimum iyonik şiddetinin 100 mM fosfat tamponu ve depo kararlılığının -80 °C olduğu yapılan deneyler sonucunda bulunmuştur.

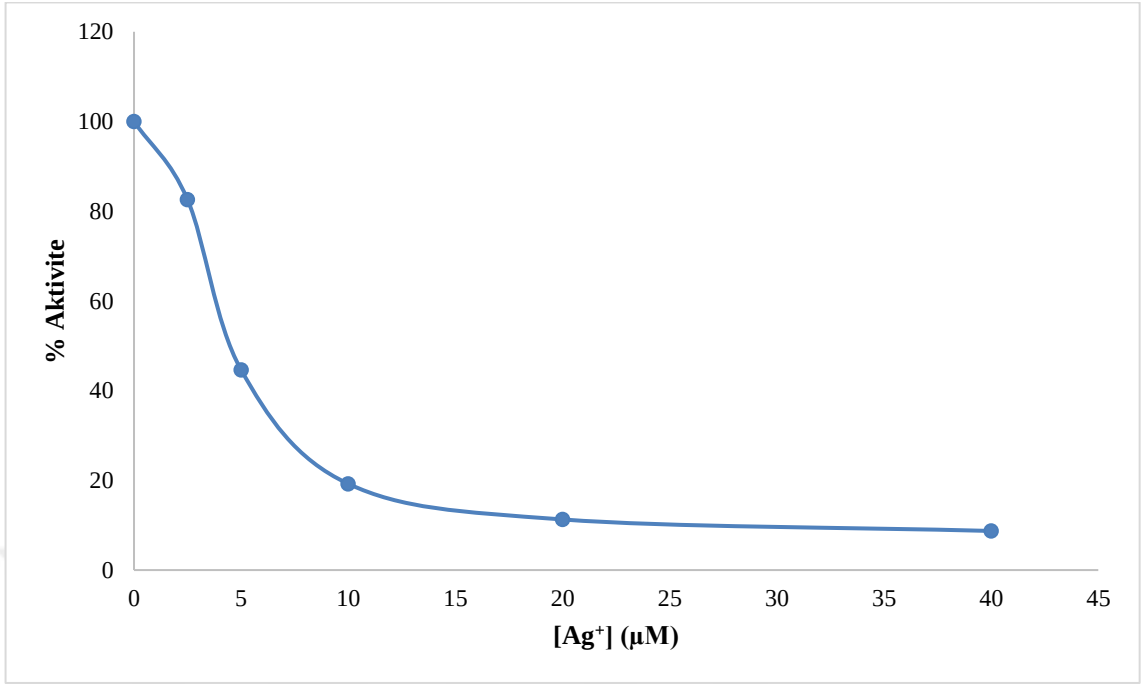
Tablo 4.4: Gökkuşuğu alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enziminin karakterizasyon çalışmaları

	Çalışma	Değer
Karakterizasyon	Toplam molekül kütlesi	346.74 kDa
	Alt birimlerin molekül kütlesi	53.71 kDa
	Optimum sıcaklık	40°C
	Optimum pH	8.0
	Optimum iyonik şiddet	100 mM
	Depo kararlılığı	-80 °C

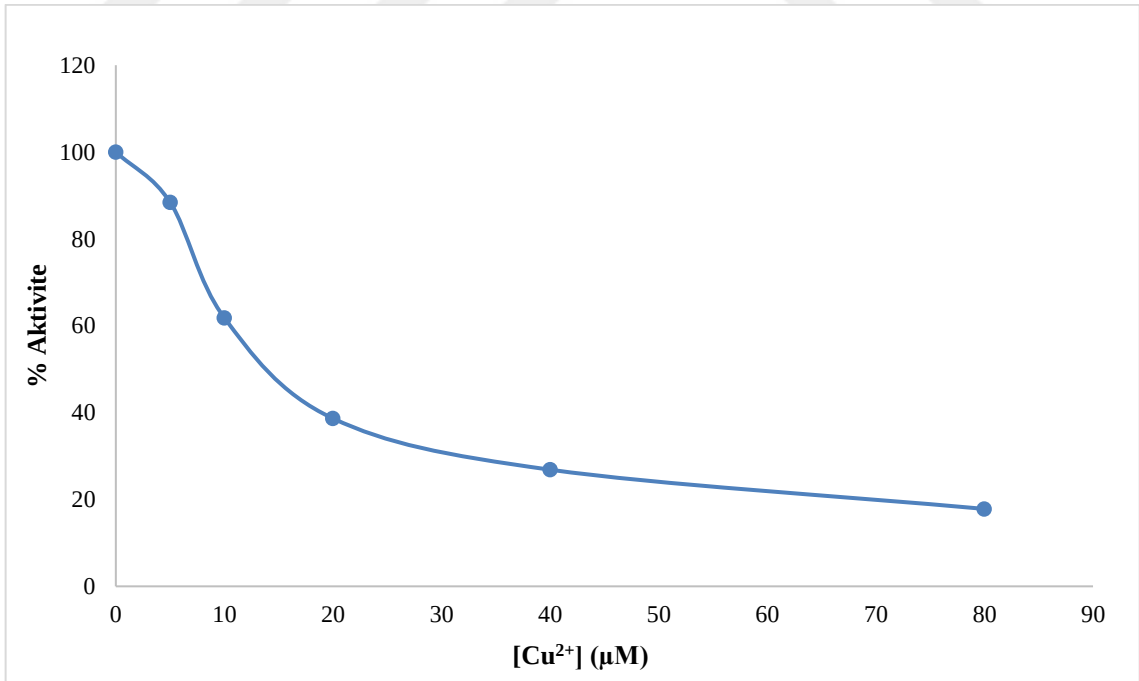
4.2.6. Gökkuşuğu Alabalık Karaciğerinden Saflaştırılan Glutamat Dehidrojenaz Enziminin Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonları ve Vitaminlerin Etkilerinin Belirlenmesine Yönelik Çalışmaların Sonuçları

Gökkuşuğu alabalık karaciğerinden saflaştırılan GDH enziminin aktivitesi üzerine bazı metal iyonları ve vitaminlerin etkileri incelendi. Saflaştırılan GDH enzimi üzerine etkileri incelenen metal iyonları; Na^+ , Li^+ , Ag^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , Cr^{3+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} ve V^{4+} vitaminler ise B₁ vitamini (tiamin), B₂ vitamini (riboflavin), B₃ vitamini (niasin), B₆ vitamini (piridoksin), C vitamini (askorbik asit) ve U vitamini (DL-metiyonin metilsülfonyum klorür) dir.

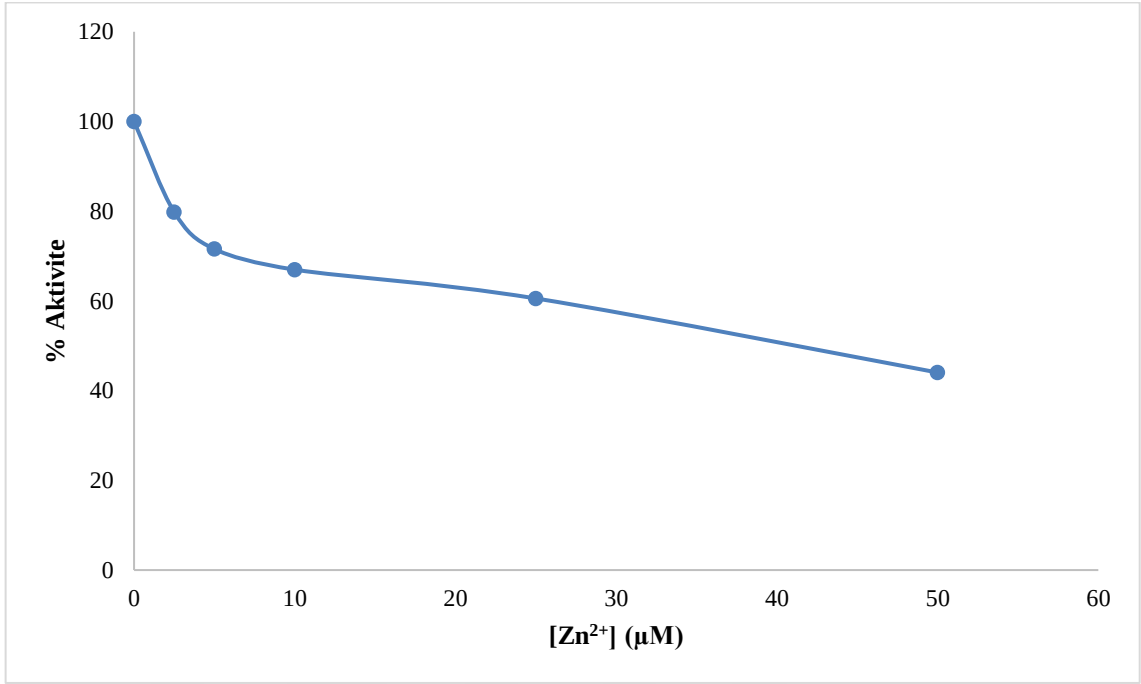
İnhibisyon etkisi gösteren metal iyonları ve vitaminler için % aktivite-[metal iyon] (Şekil 4.18-29) ve % aktivite-[vitamin] (Şekil 4.40-43) grafikleri çizildi. K_i sabitini ve inhibisyon türünü belirlemek amacıyla inhibisyon etkisi gösteren metal iyonları ve vitaminlerin Lineweaver-Burk grafikleri çizildi (Şekil 4.30-4.39 ve 4.44-4.46) ve bu grafiklerden ve denklemlerden yararlanılarak K_i sabiti ve inhibisyon türleri belirlendi. IC_{50} değeri (enzimin %50 inhibisyon etkisi göstermesi için gerekli madde miktarı) absise madde miktarı, ordinata % enzim inhibisyonu aktivitesi verilerinin uygulaması ile çizilen eğrinin lineer kesiminden elde edilen regresyon denkleminde hesaplandı.



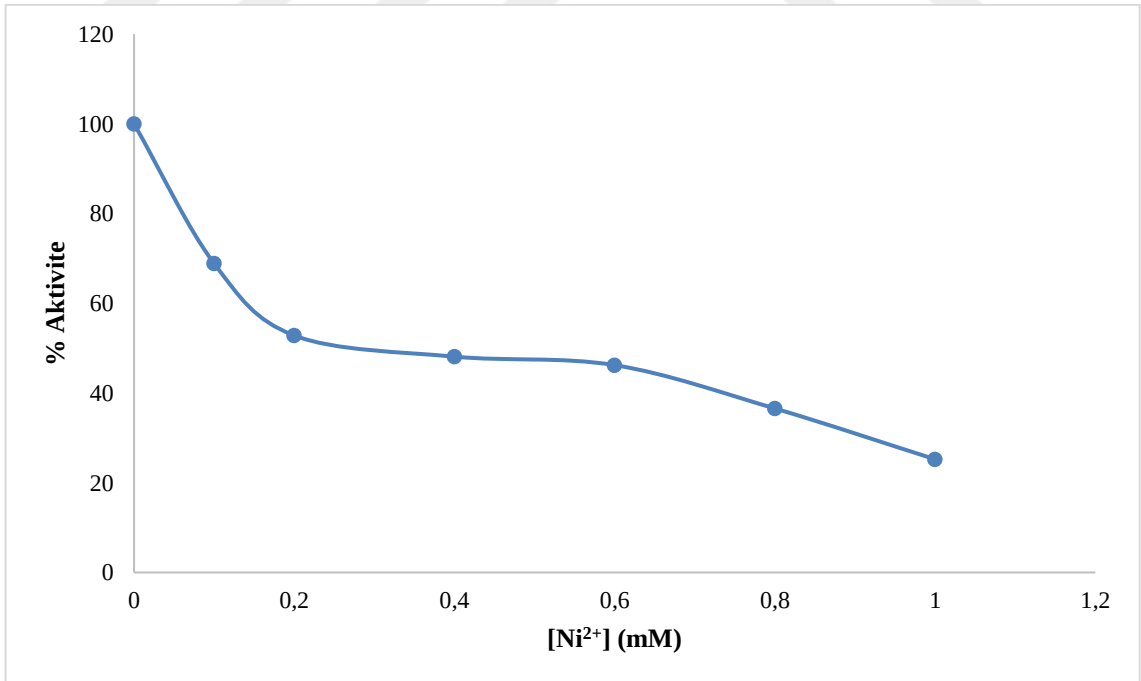
Şekil 4.18: Ag⁺ metal iyonunun gökkuşuğu alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi aktivitesi üzerine etkisi



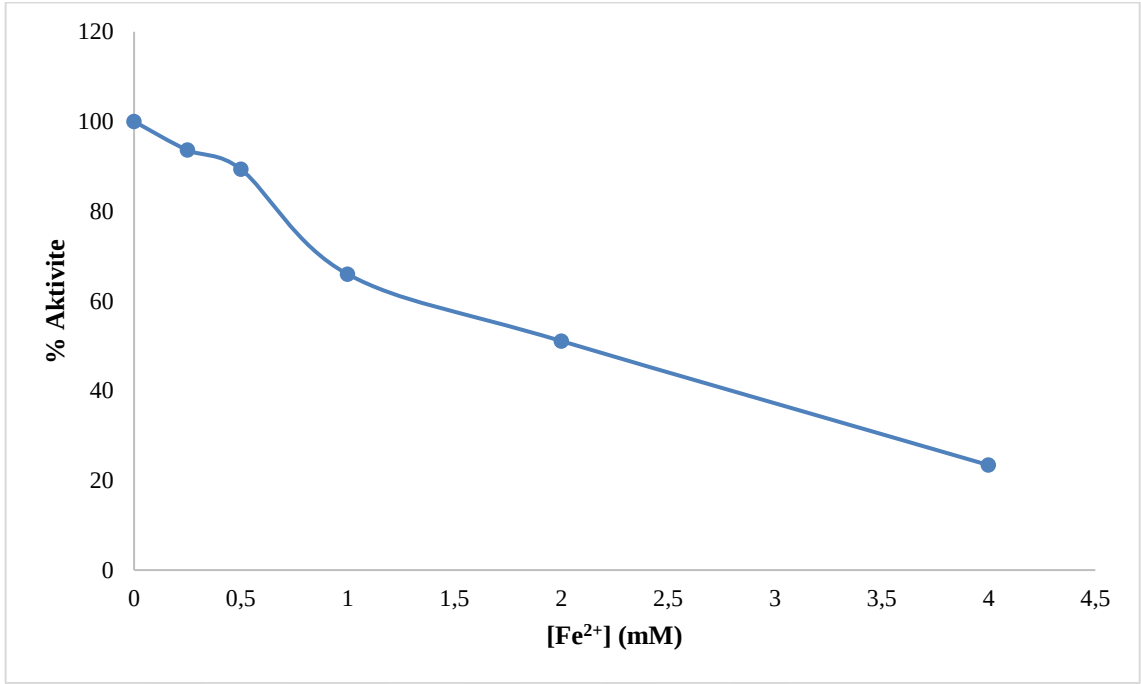
Şekil 4.19: Cu²⁺ metal iyonunun gökkuşuğu alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi aktivitesi üzerine etkisi.



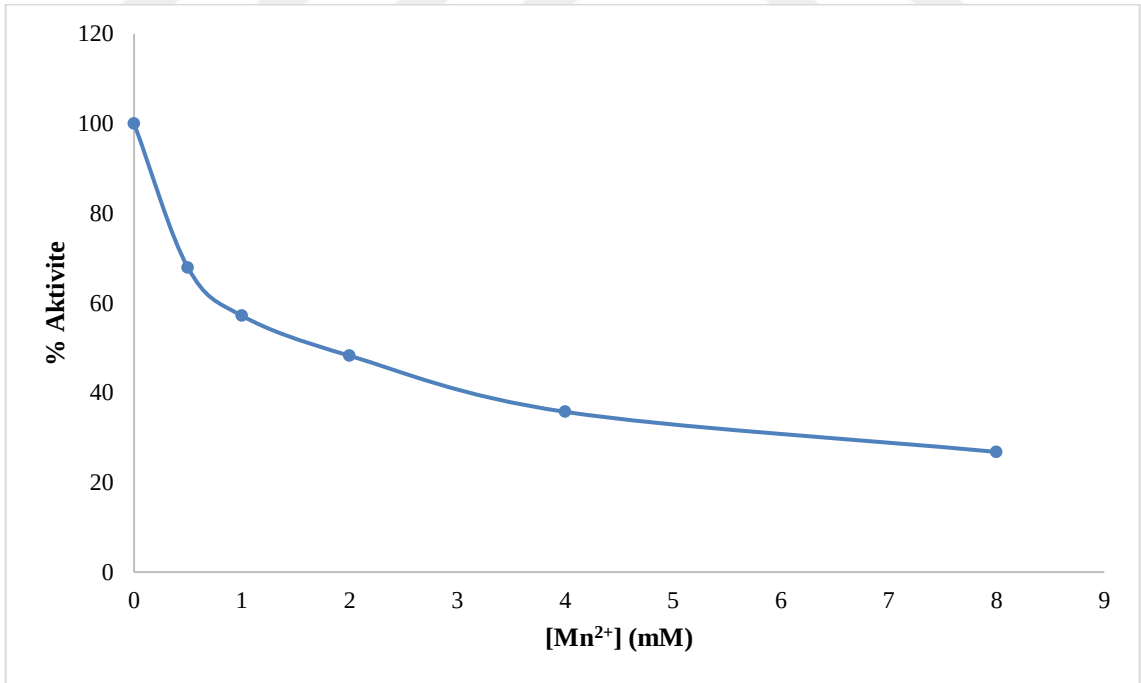
Şekil 4.20: Zn²⁺ metal iyonunun gökkuşağı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi aktivitesi üzerine etkisi.



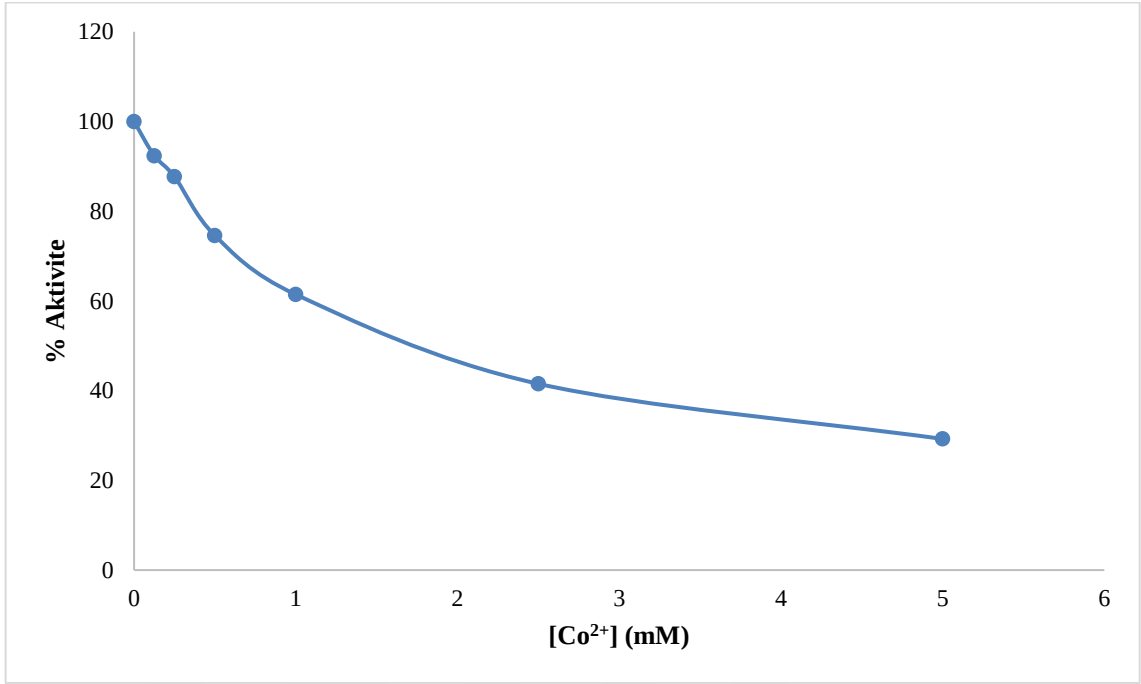
Şekil 4.21: Ni²⁺ metal iyonunun gökkuşağı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi aktivitesi üzerine etkisi.



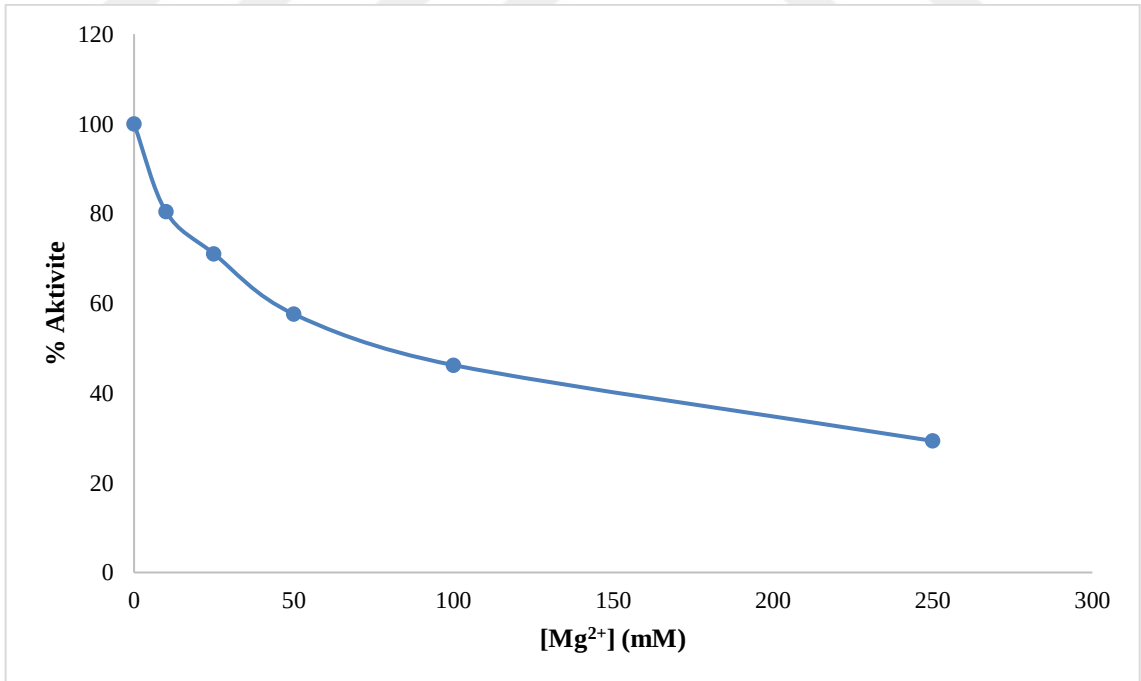
Şekil 4.22: Fe²⁺ metal iyonunun gökkuşağı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi aktivitesi üzerine etkisi.



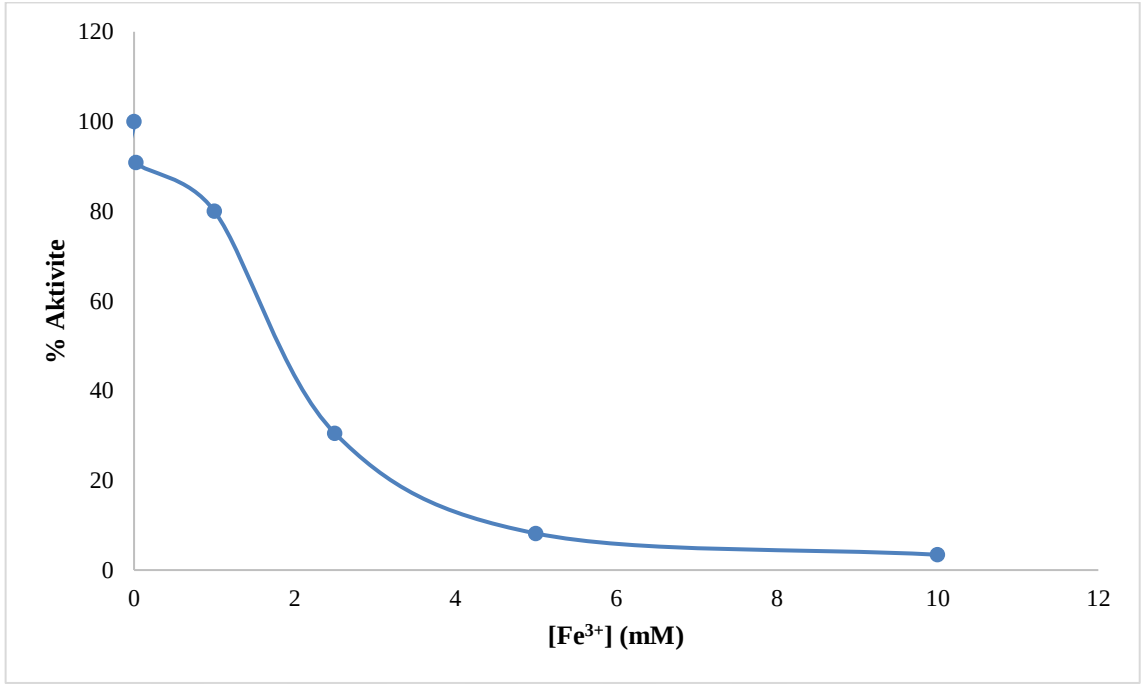
Şekil 4.23: Mn²⁺ metal iyonunun gökkuşağı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi aktivitesi üzerine etkisi.



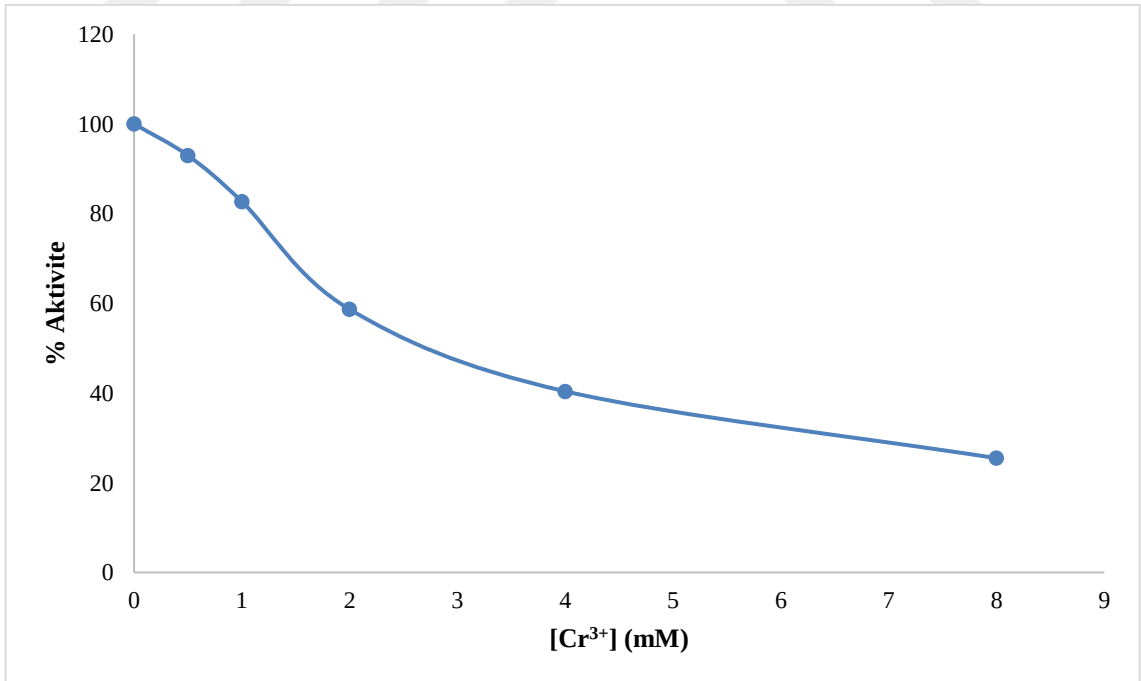
Şekil 4.24: Co²⁺ metal iyonunun gökkuşağı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi aktivitesi üzerine etkisi.



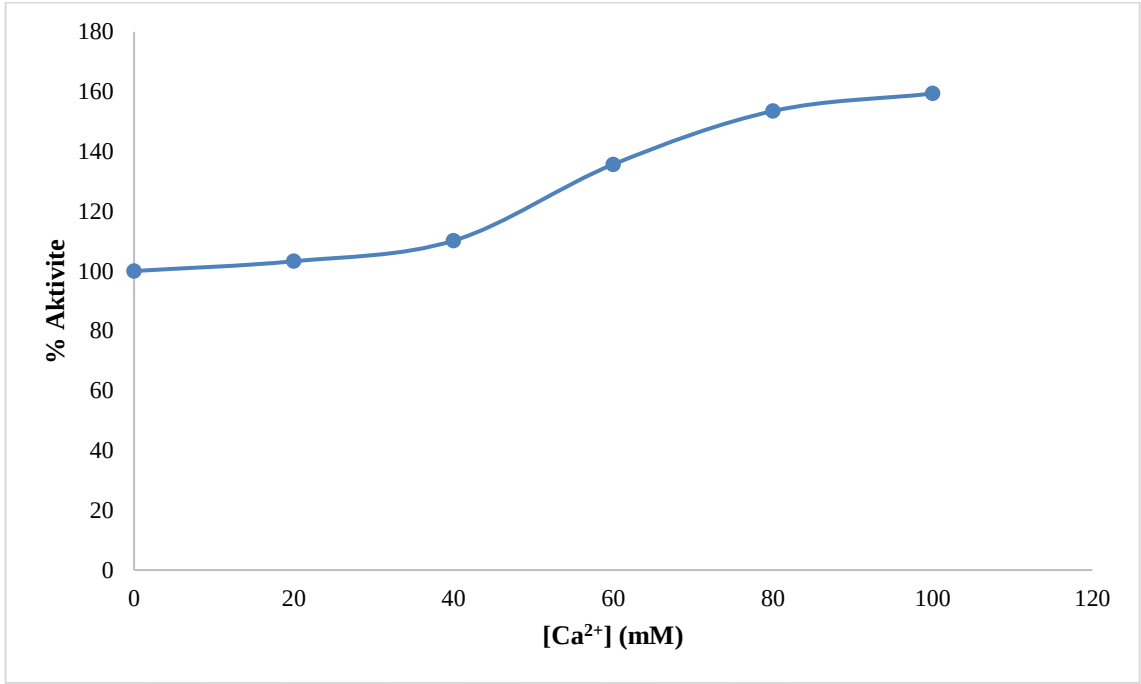
Şekil 4.25: Mg²⁺ metal iyonunun gökkuşağı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi aktivitesi üzerine etkisi.



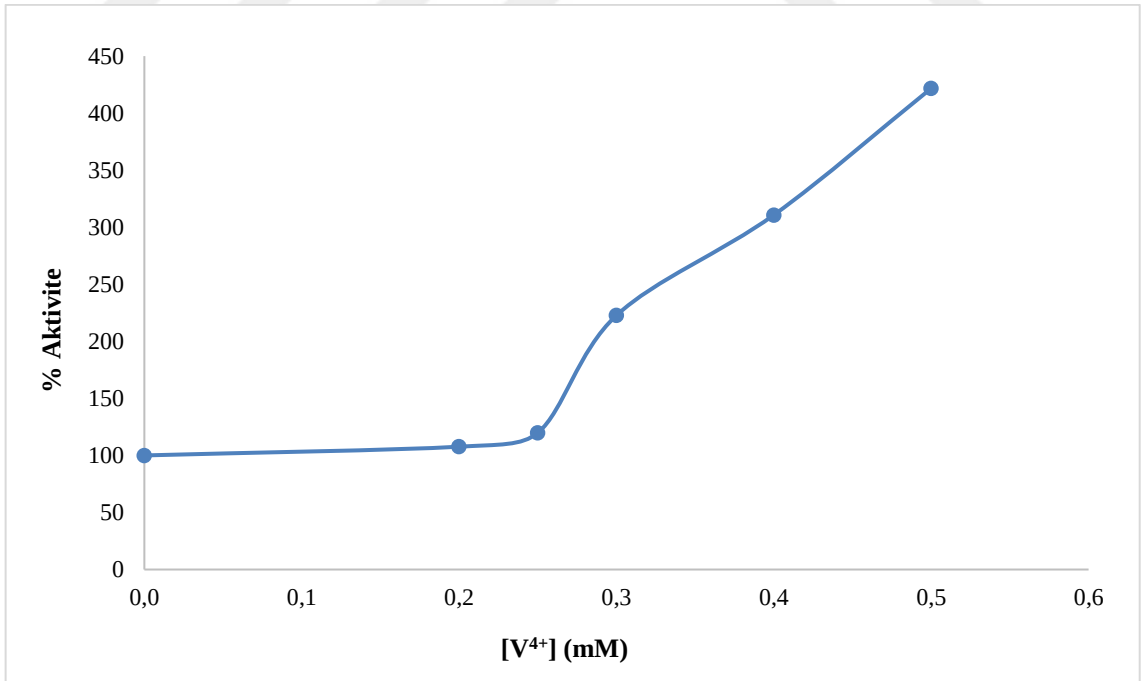
Şekil 4.26: Fe³⁺ metal iyonunun gökkuşağı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi aktivitesi üzerine etkisi.



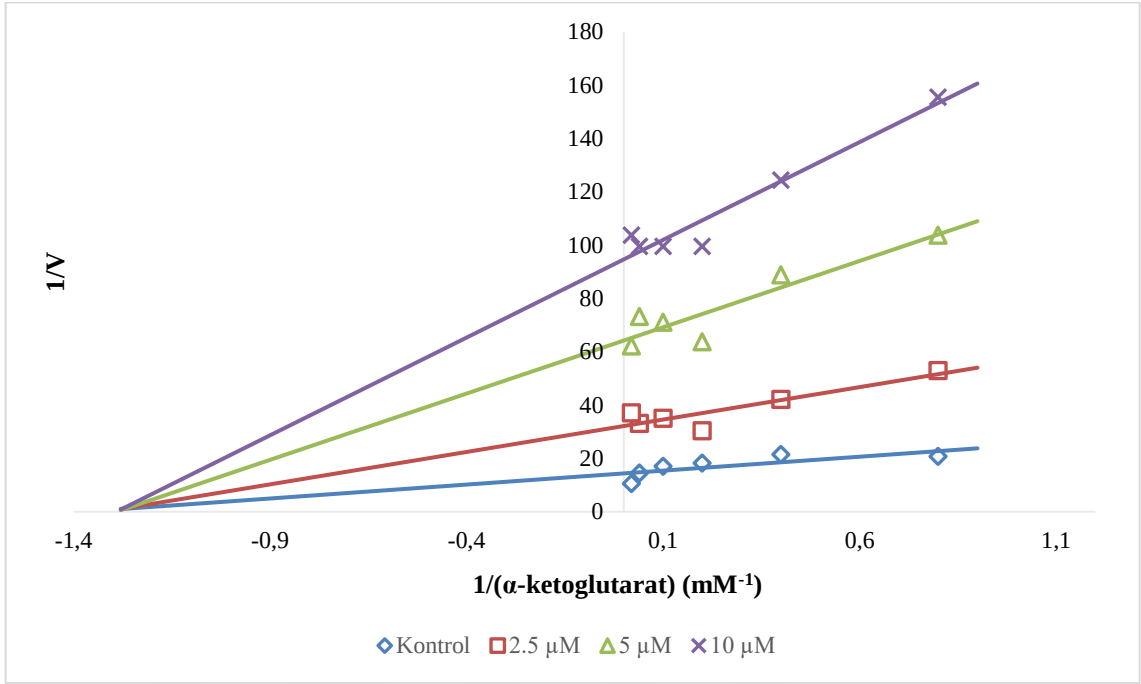
Şekil 4.27: Cr³⁺ metal iyonunun gökkuşağı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi aktivitesi üzerine etkisi.



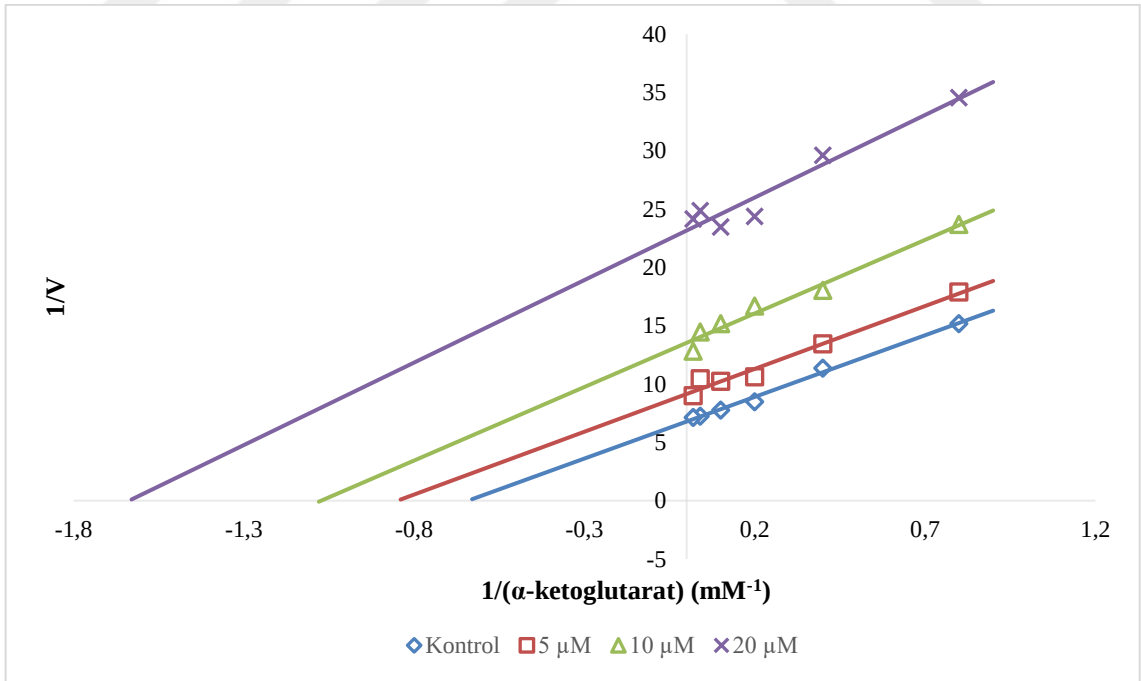
Şekil 4.28: Ca²⁺ metal iyonunun gökkuşağı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi aktivitesi üzerine etkisi.



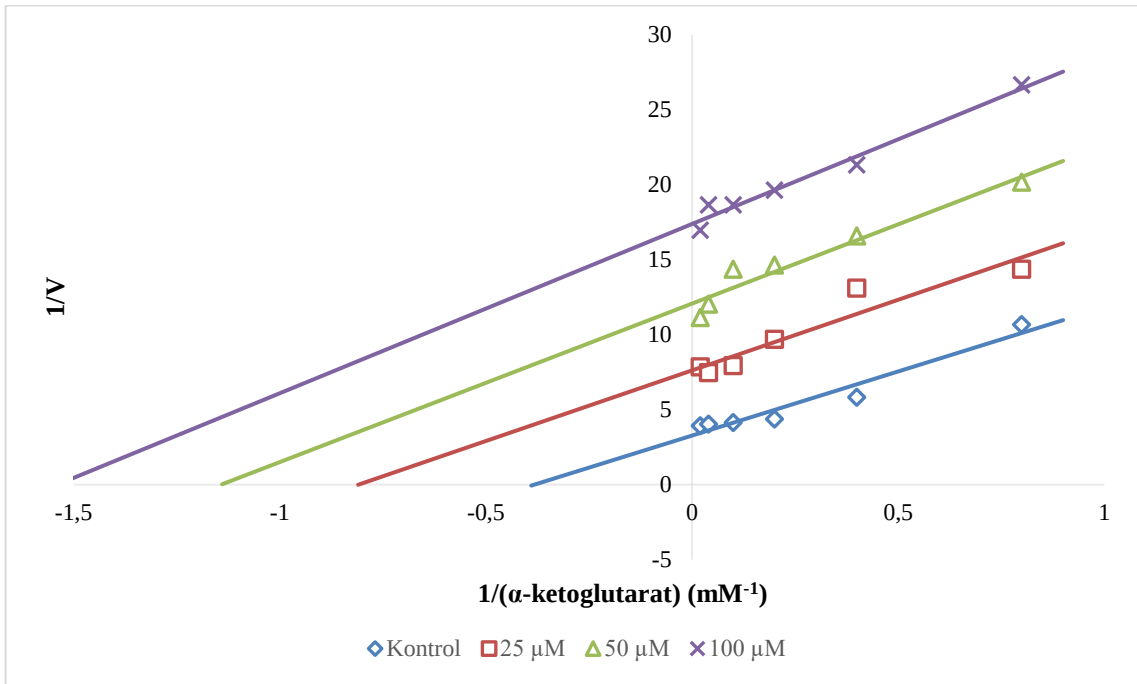
Şekil 4.29: V⁴⁺ metal iyonunun gökkuşağı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi aktivitesi üzerine etkisi.



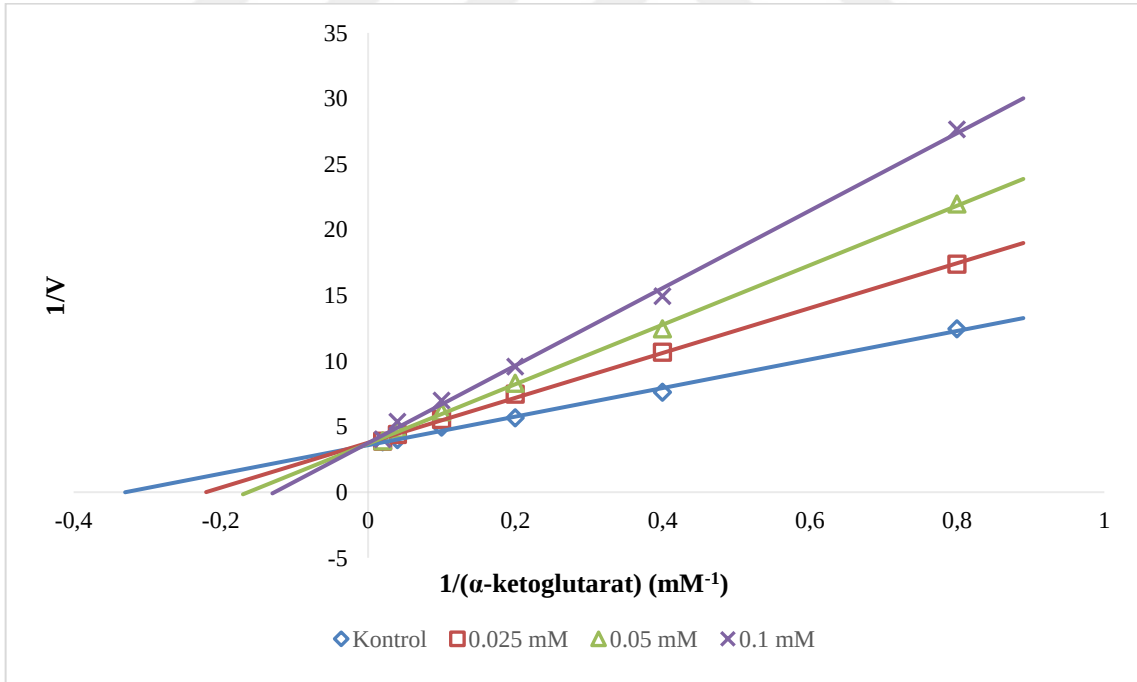
Şekil 4.30: Ag^+ iyonunun gökkuşağı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi için inhibisyonu türünü gösteren grafik.



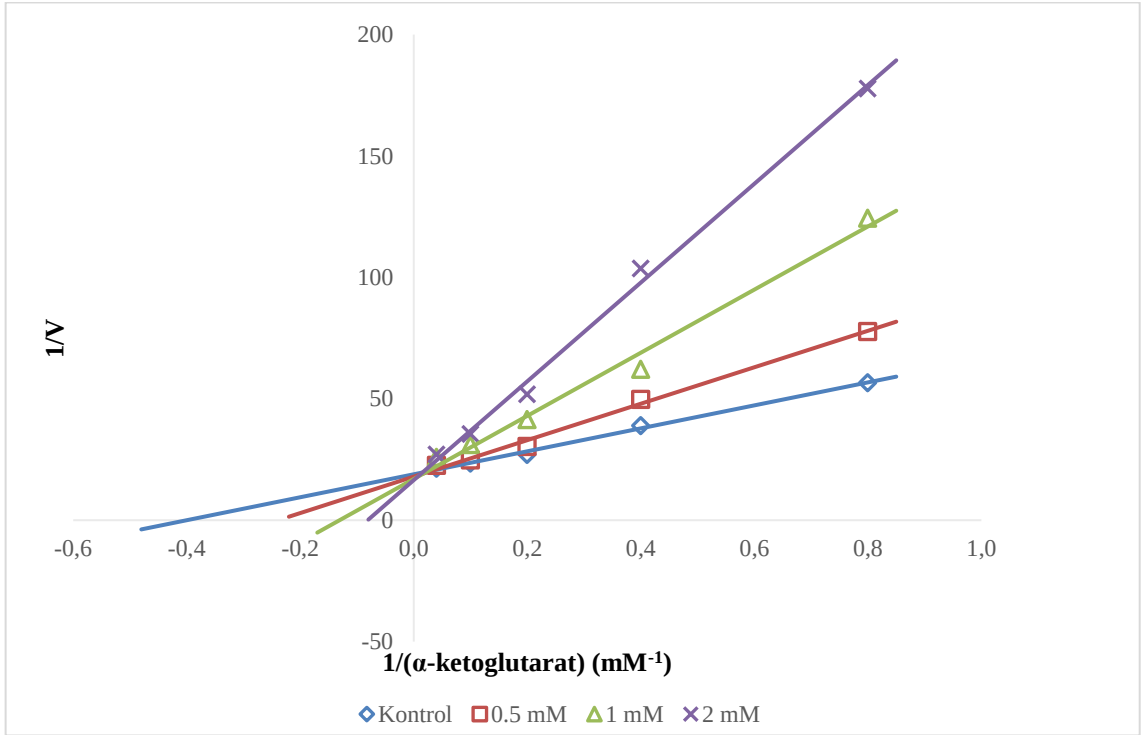
Şekil 4.31: Cu^{2+} iyonunun gökkuşağı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi için inhibisyonu türünü gösteren grafik.



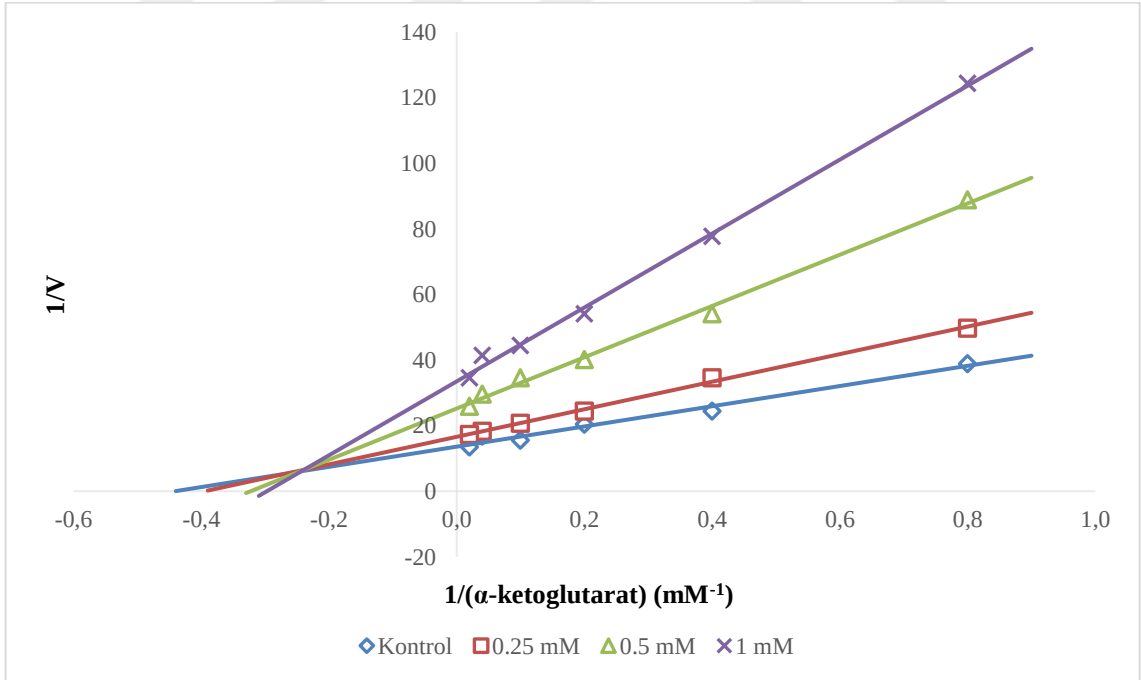
Şekil 4.32: Zn^{2+} iyonunun gökkuşuğu alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi için inhibisyonu türünü gösteren grafik.



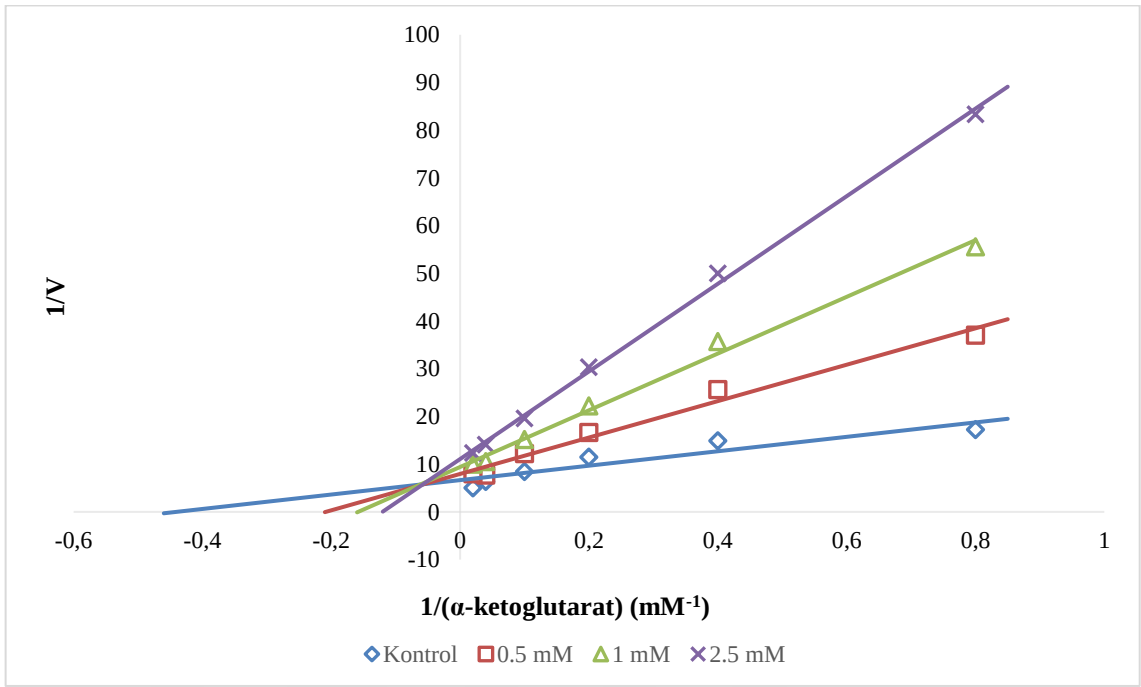
Şekil 4.33: Ni^{2+} iyonunun gökkuşuğu alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi için inhibisyonu türünü gösteren grafik.



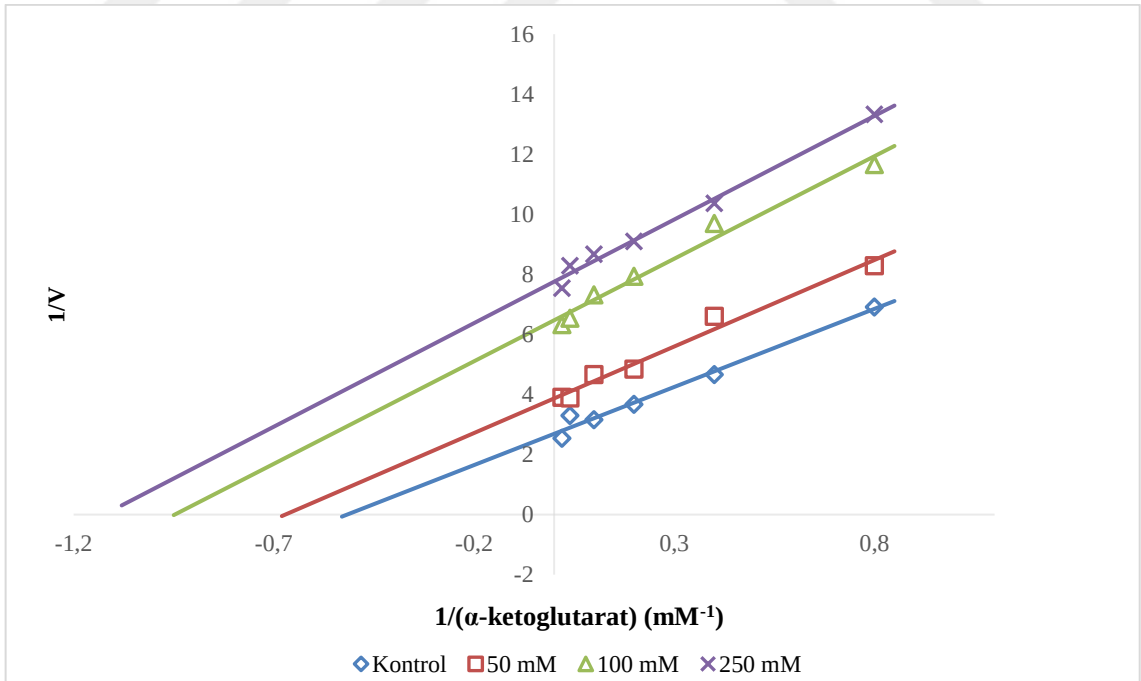
Şekil 4.34: Fe^{2+} iyonunun gökkuşuğu alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi için inhibisyonu türünü gösteren grafik.



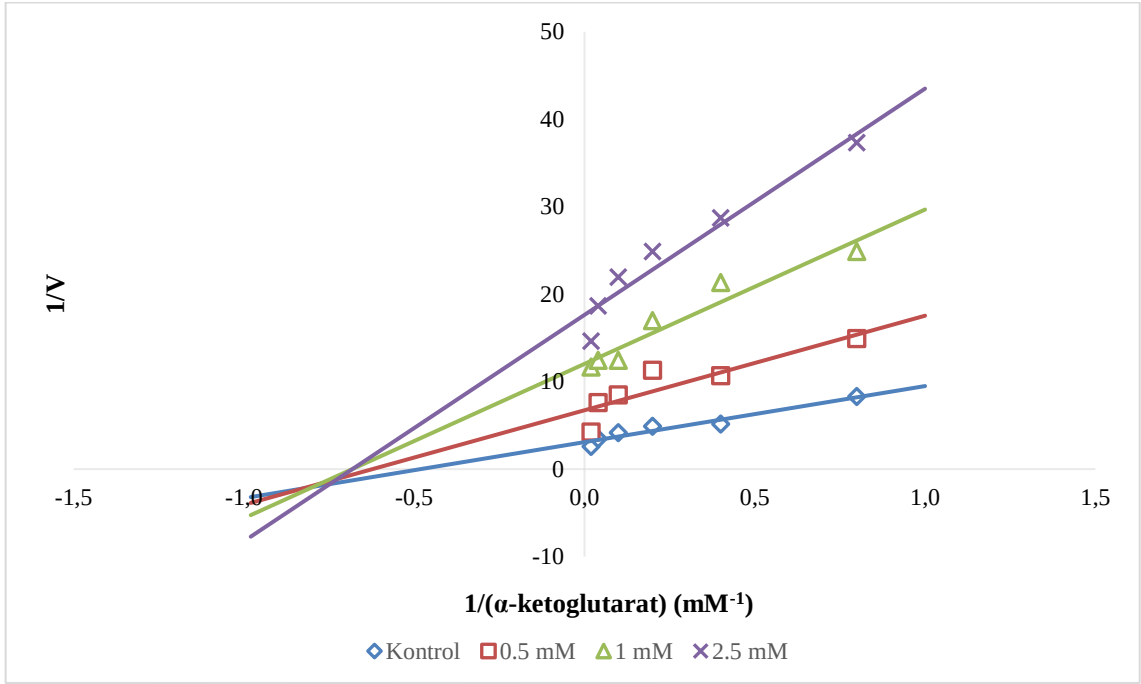
Şekil 4.35: Mn^{2+} iyonunun gökkuşuğu alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi için inhibisyonu türünü gösteren grafik.



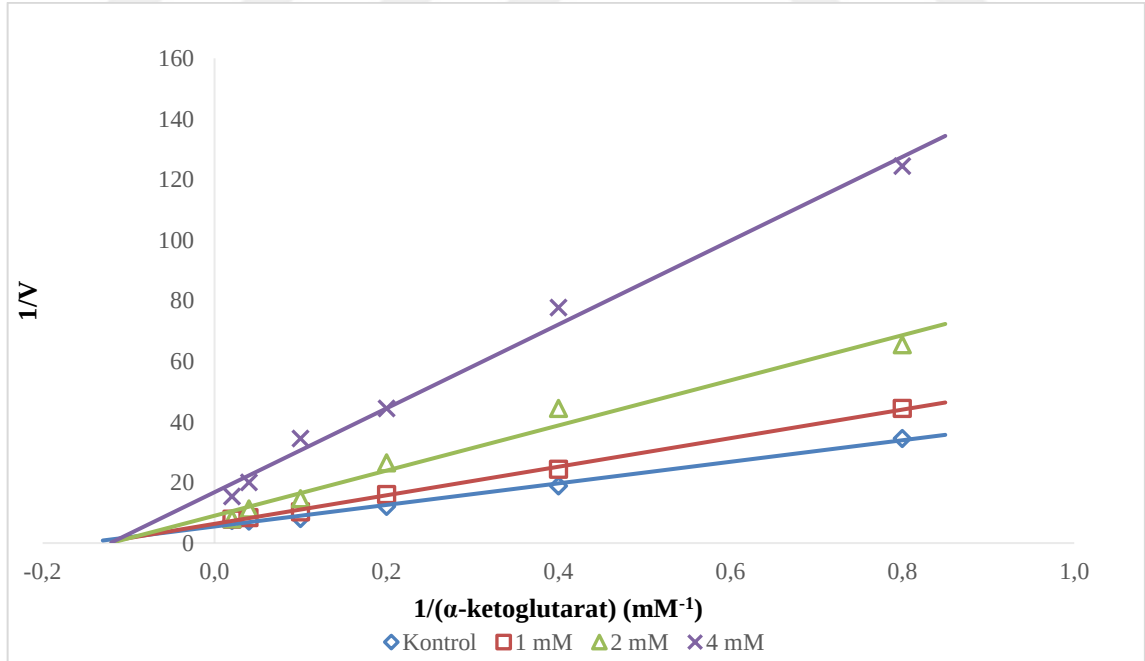
Şekil 4.36: Co^{2+} iyonunun gökkuşuğu alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi için inhibisyonu türünü gösteren grafik.



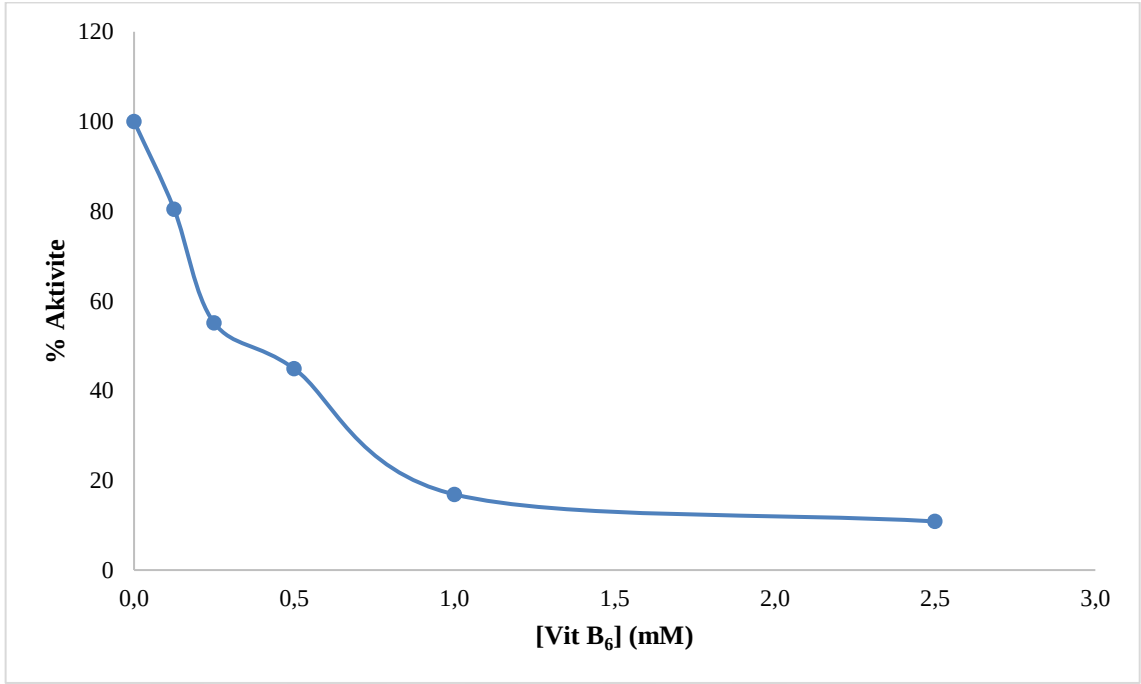
Şekil 4.37: Mg^{2+} iyonunun gökkuşuğu alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi için inhibisyonu türünü gösteren grafik.



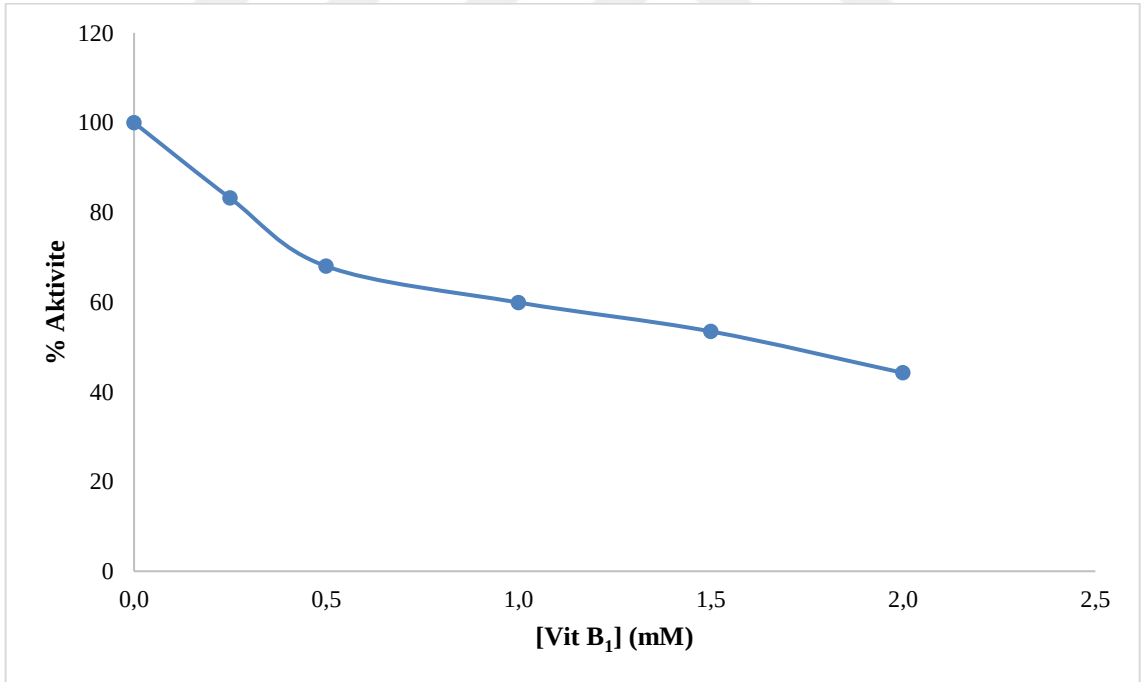
Şekil 4.38: Fe^{3+} iyonunun gökkuşağı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi için inhibisyonu türünü gösteren grafik.



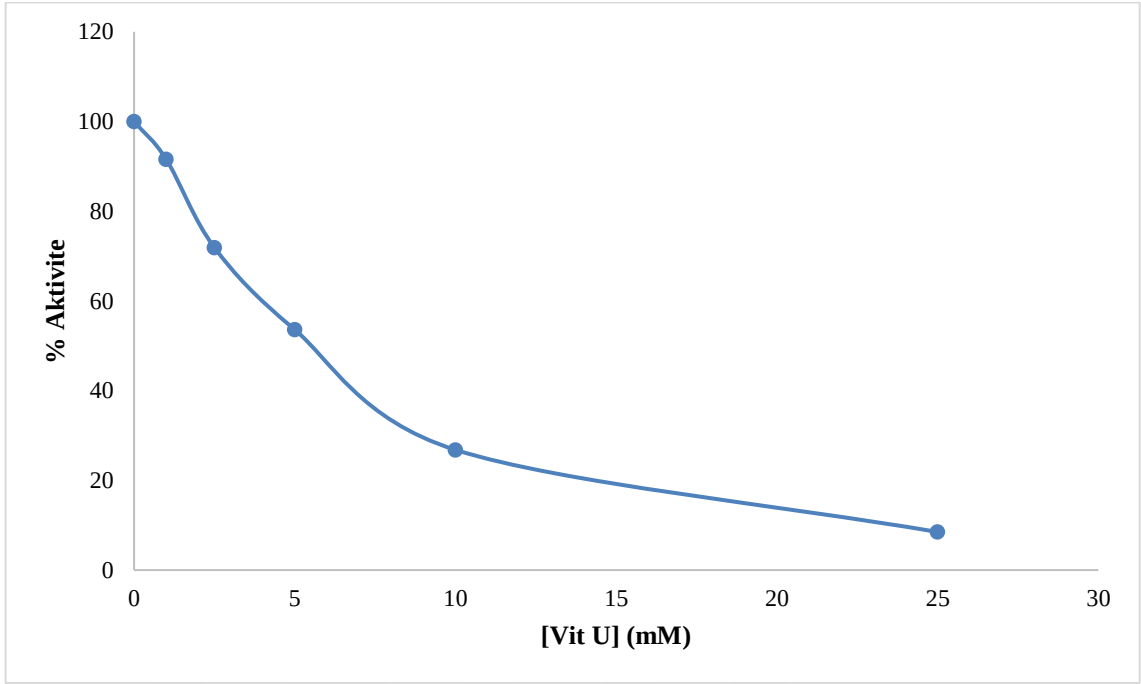
Şekil 4.39: Cr^{3+} iyonunun gökkuşağı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi için inhibisyonu türünü gösteren grafik.



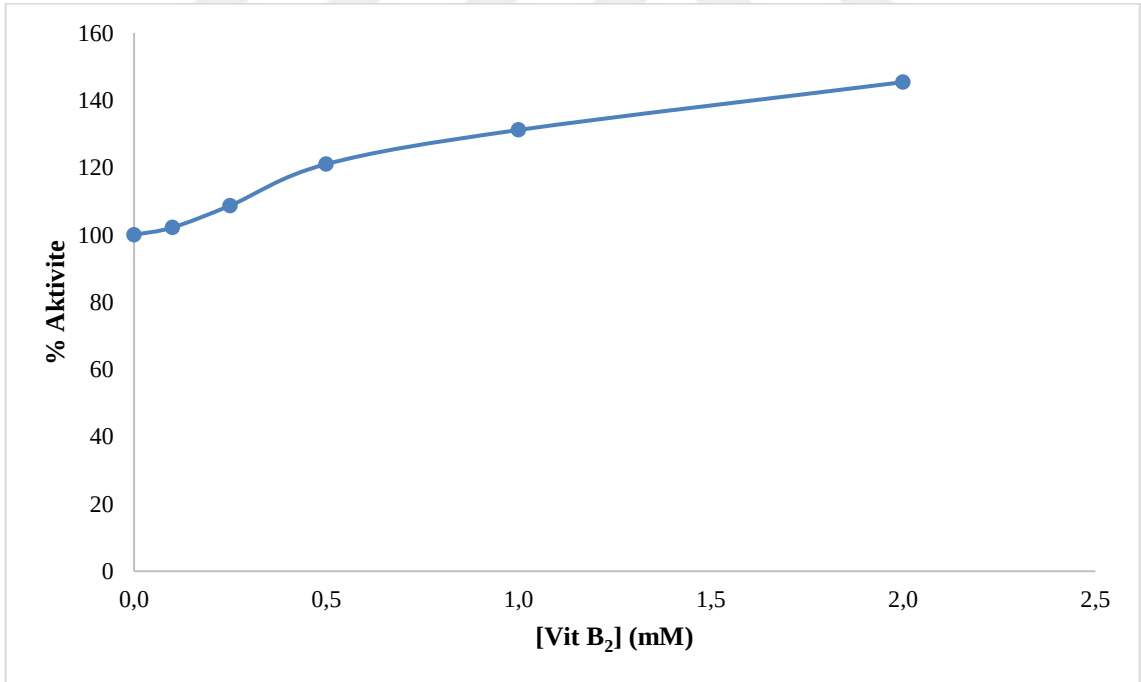
Şekil 4.40: B₆ vitamininin gökkuşuğu alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi aktivitesi üzerine etkisi.



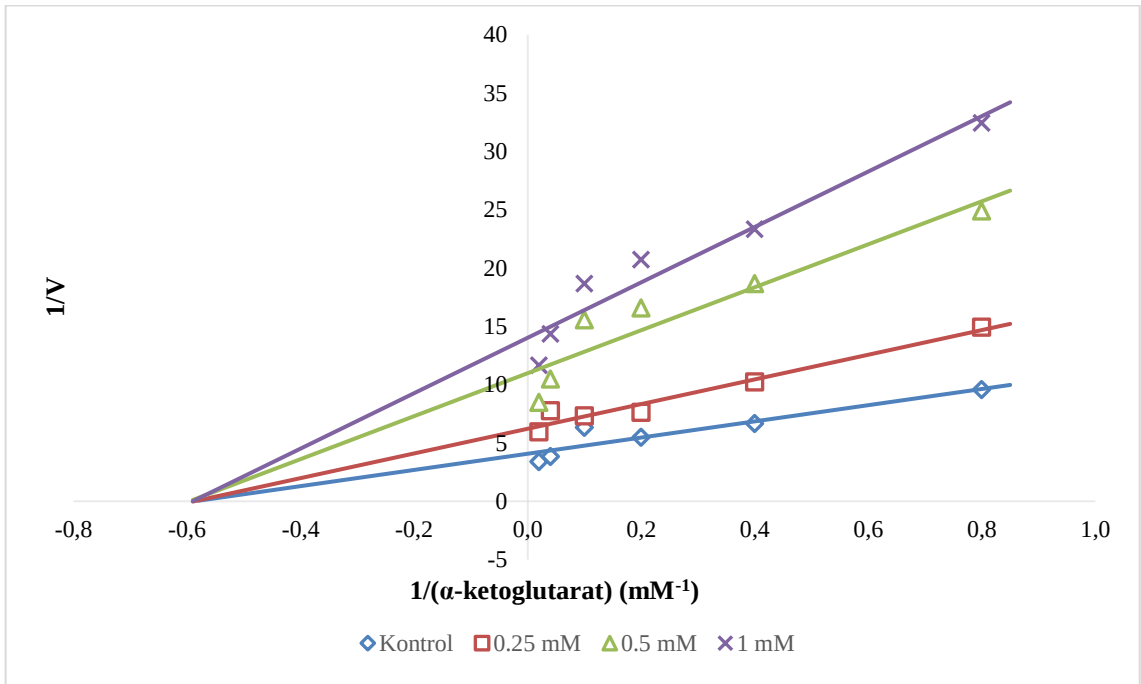
Şekil 4.41: B₁ vitamininin gökkuşuğu alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi aktivitesi üzerine etkisi.



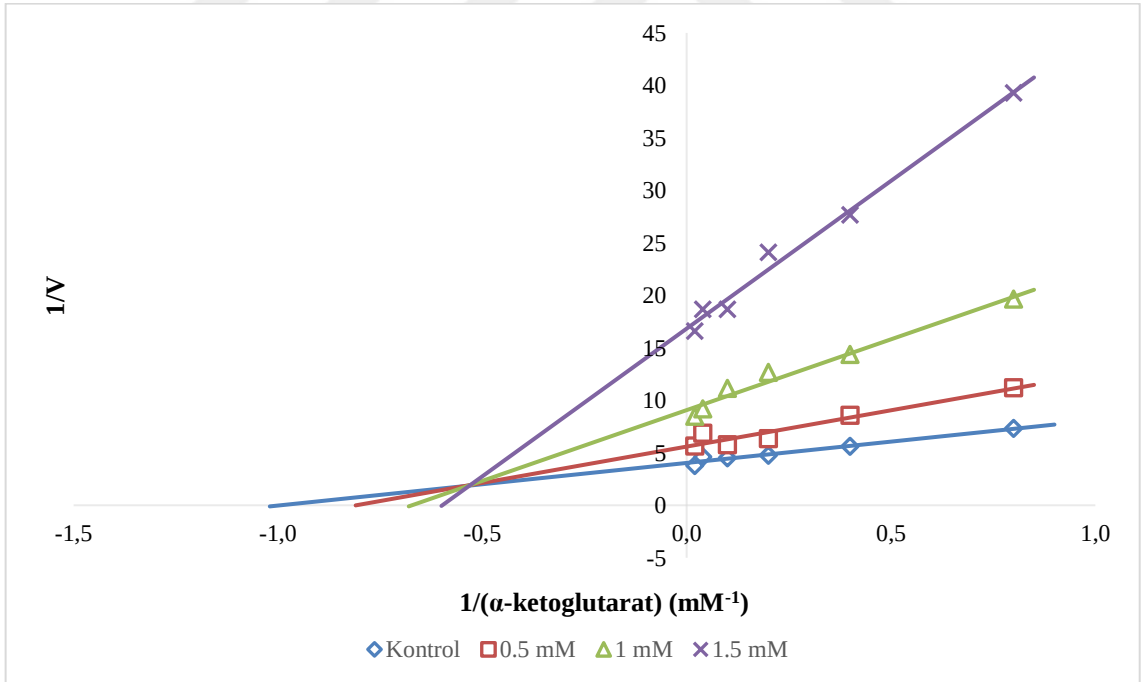
Şekil 4.42: U vitamininin gökkuşuğu alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi aktivitesi üzerine etkisi.



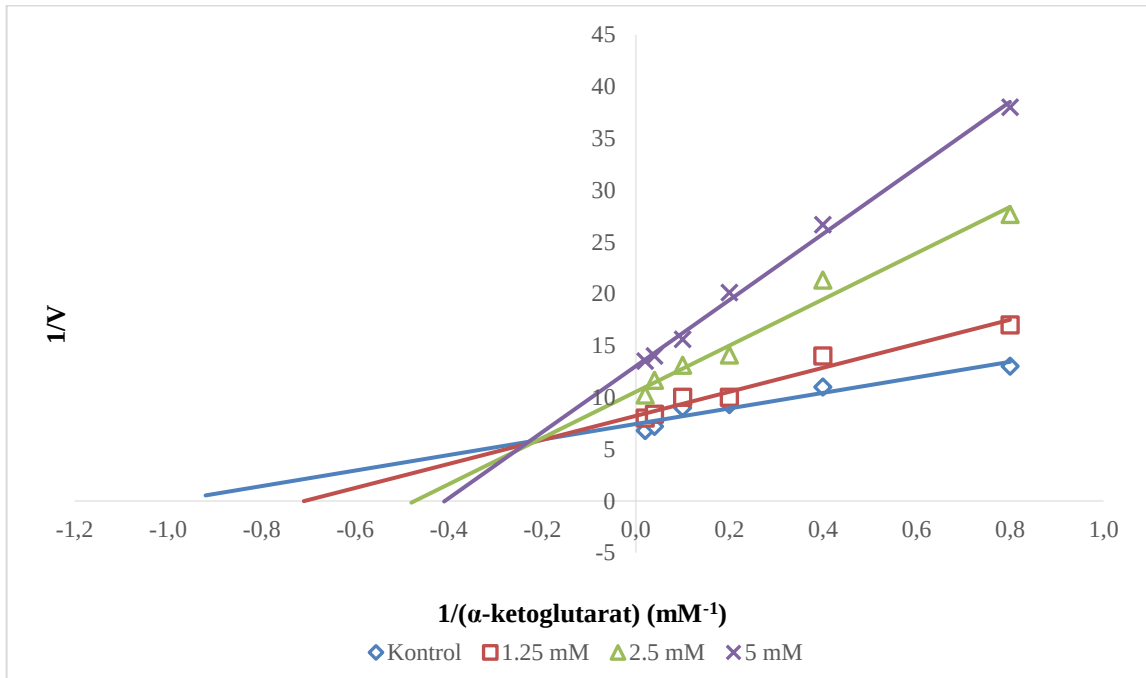
Şekil 4.43: B₂ vitamininin gökkuşuğu alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi aktivitesi üzerine etkisi.



Şekil 4.44: B₆ vitamininin gökkuşağı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi için inhibisyon türünü gösteren grafik.



Şekil 4.45: B₁ vitamininin gökkuşağı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi için inhibisyon türünü gösteren grafik.



Şekil 4.46: U vitamininin gökkuşağı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi için inhibisyon türünü gösteren grafik.

Tablo 4.5: Gökkuşağı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi için bazı metal iyonlarının IC_{50} , K_i değerleri ve inhibisyon türleri.

Metal İyonu	Etki	IC_{50}	K_i	İnhibisyon Türü
Ag^+	İnhibisyon	$8.65 \pm 1.68 \mu\text{M}$	$1.72 \pm 0.22 \mu\text{M}$	Yarışmasız
Cu^{2+}	İnhibisyon	$28.85 \pm 0.85 \mu\text{M}$	$9.21 \pm 0.93 \mu\text{M}$	Yarı Yarışmalı
Zn^{2+}	İnhibisyon	$54.98 \pm 1.99 \mu\text{M}$	$20.24 \pm 2.23 \mu\text{M}$	Yarı Yarışmalı
Ni^{+2+}	İnhibisyon	$0.43 \pm 0.02 \text{ mM}$	$0.01 \pm 0.00 \text{ mM}$	Yarışmalı
Fe^{+2+}	İnhibisyon	$2.33 \pm 0.02 \text{ mM}$	$1.98 \pm 0.44 \text{ mM}$	Yarışmalı
Mn^{2+}	İnhibisyon	$2.72 \pm 0.19 \text{ mM}$	$0.83 \pm 0.18 \text{ mM}$	Karışık (Miks)
Co^{2+}	İnhibisyon	$2.73 \pm 0.05 \text{ mM}$	$2.93 \pm 0.6 \text{ mM}$	Karışık (Miks)

Tablo 4.5 (Devam): Gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi için bazı metal iyonlarının IC_{50} , K_i değerleri ve inhibisyon türleri.

Mg²⁺	İnhibisyon	124.82 ± 14.16 mM	125.58 ± 11.94 mM	Yarı Yarışmalı
Fe³⁺	İnhibisyon	2.86 ± 0.01 mM	0.45 ± 0.08 mM	Karışık (Miks)
Cr³⁺	İnhibisyon	4.27 ± 0.08 mM	4.71 ± 1.62 mM	Yarışmasız
Ca²⁺	Aktivasyon	*****	*****	*****
V⁴⁺	Aktivasyon	*****	*****	*****
Na⁺	Etkisiz	*****	*****	*****
Li⁺	Etkisiz	*****	*****	*****

Gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan GDH enzimi üzerine metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkileri incelendi ve bunun sonucunda Ag^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} ve Fe^{3+} , Cr^{3+} iyonlarının inhibisyon etkisi olduğu, Ca^{2+} ve V^{4+} iyonunun ise aktivasyon etkisi olduğu ve Na^+ ve Li^+ iyonlarının ise GDH enziminin aktivitesi üzerine etkisinin olmadığı bulundu. Metal iyonlarının IC_{50} değerlerine göre sıralanması: $Ag^+ < Cu^{2+} < Zn^{2+} < Ni^{2+} < Fe^{2+} < Mn^{2+} < Co^{2+} < Fe^{3+} < Cr^{3+} < Mg^{2+}$ olarak bulundu (Tablo 4.5).

Tablo 4.6: Gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi için bazı vitaminlerin IC_{50} , K_i değerleri ve inhibisyon türleri.

Vitamin	Etki	IC_{50}	K_i	İnhibisyon türü
B₆ vitamini (Piridoksin)	İnhibisyon	0.77 ± 0.04 mM	0.44 ± 0.04 mM	Yarışmasız
B₁ vitamini (Tiamin)	İnhibisyon	1.58 ± 0.07 mM	0.85 ± 0.09 mM	Karışık (Miks)
U vitamini	İnhibisyon	8.12 ± 0.19 mM	5.02 ± 0.63 mM	Karışık (Miks)

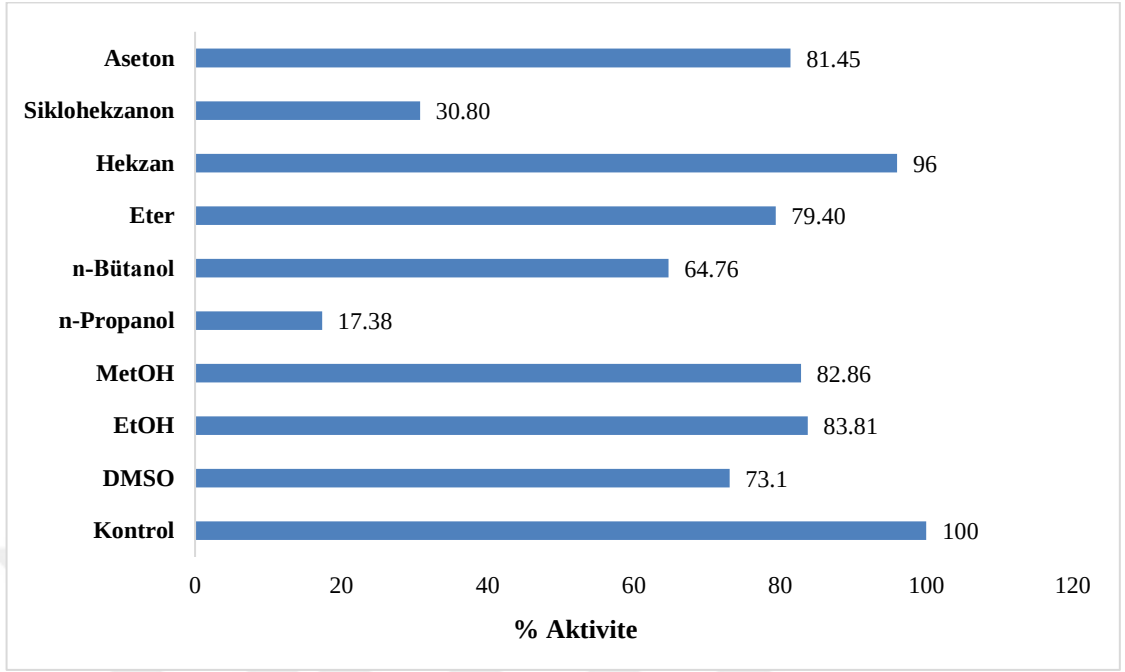
Tablo 4.6 (Devam): Gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi için bazı vitaminlerin IC₅₀, K_i değerleri ve inhibisyon türleri.

B₂ vitamini (Riboflavin)	Aktivasyon	****	****	****
B₃ vitamini (Niasin)	Etkisiz	****	****	****
C vitamini (Askorbik Asit)	Etkisiz	****	****	****

Gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan GDH enzimi üzerine B₁, B₂, B₃, B₆, C ve U vitaminlerinin enzim aktivitesi üzerine etkileri incelendi. Bunun sonucunda B₁, B₆ ve U vitamininin inhibitör etkisi, B₂ vitamininin aktivatör etkisi ve B₃ ve C vitaminlerinin aktivite üzerine etkisinin olmadığı bulundu (Tablo 4.6).

4.2.7. Gökkuşığı Alabalık Karaciğerinden Saflaştırılan Glutamat Dehidrojenaz Enziminin Aktivitesi Üzerine Bazı Çözücülerin Etkilerinin Bulunmasına Yönelik Çalışmaların Sonuçları

Gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan GDH enzimi üzerine Bölüm 3.2.5.7’de belirtildiği gibi bazı çözücülerin enzim aktivitesi üzerine etkileri incelendi. Yapılan aktivite deneyleri sonucunda çözücülerin % aktivite değerlerinin n-propanol %17.38, sikloheksanon %30.80, n-bütanol %64.76, dimetilsülfoksit (DMSO) %73.10, eter %79.40, aseton %81.45, metil alkol (MetOH) %82.86, etil alkol (EtOH) %83.81 ve hekzan %96.00 olduğu saptandı (Şekil 4.47). Gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan GDH enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren çözücülerin aktivite tayini sırasında kullanılması aktivitenin azalmasına neden olacağından GDH ile ilgili yapılan çalışmalarda inhibisyon etkisi gösteren çözücülerin ortamda bulunmaması gereklidir. Çünkü bu organik çözücüler aktivite kaybına neden olmaktadır.



Şekil 4.47: Bazı çözücülerin gökkuşuğu alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi aktivitesi üzerine etkileri.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Enzimlerin birçok farklı kaynaktan ve farklı yöntemlerle saflaştırılması uzun yıllardır popülerliğini koruyan ve önemi yıllar boyu da devam edecek bir alandır. Yeni enzimlerin yapılarının aydınlatılması hastalıkların tedavisinde yeni yaklaşımlar getirebileceği gibi, organizmanın işleyişi ve canlılar arasındaki farklılıkların anlaşılması açısından oldukça önemlidir. Ayrıca endüstriyel olarak da kullanılan enzimlerin maliyeti daha düşük yeni yöntemlerle, daha kısa sürede ve yüksek oranda saflaştırılması oldukça önemlidir. Ancak günümüz teknolojisinde enzimlerin endüstride kullanılması saflaştırılmanın maliyeti ve zamanı açısından oldukça kısıtlıdır. Son yıllarda yapılan çalışmalar genelde maliyeti ve zamanı azaltmak yönünde olmaktadır. Bu anlamda her ne kadar maliyeti yüksek olsada afinite kromatografisi oldukça hızlı saflaştırma imkânı sunmaktadır.

Glutamat dehidrojenaz (GDH) enzimi bugüne kadar birçok kaynaktan farklı yöntemlerle saflaştırılmıştır. Hem canlıdan canlıya enzimin özelliklerinin değişmesi hem de yapısal farklılıkların enzimi anlamak açısından önemli olduğu düşünüldüğünde, GDH enziminin saflaştırılması ve özelliklerinin incelenmesi oldukça önemlidir. GDH enziminin bütün canlılarda bulunan bir enzim olması evrimsel sürecin anlaşılmasında da oldukça önemli bir rol oynamaktadır. Bu yüzden hem görev hem de metabolik etkilerinin bilinmesi oldukça önemlidir. GDH enzimi bugüne kadar bitkilerden, mantarlardan, hayvansal dokulardan ve eritrositlerden saflaştırılmış ve karakterizasyonları yapılmıştır. Literatür taraması sonucunda farklı kaynaklardan saflaştırılan GDH enzimi için PAGE, SDS-PAGE, K_m , V_{max} değerleri ve optimum iyonik şiddet, pH ve sıcaklık değerleri saptanmış, bu çalışmalarda birbirinden farklı sonuçlar elde edilmiş olduğu tespit edilmiştir.

Gökkuşuğu alabalık karaciğerinden saflaştırılan GDH enziminin tabii molekül kütlesi ve alt birimlerinin molekül kütlesinin tayini için PAGE ve SDS-PAGE deneyleri yapılmıştır. Literatür taraması yapıldığında farklı kaynak ve lokasyondaki GDH enziminin PAGE ve SDS-PAGE sonuçlarının farklı sonuçlar gösterdiği tespit edilmiştir. Öküz beyninden saflaştırılan GDH enzimi için SDS-PAGE deneyi sonucunda alt birimlerinin molekül kütlesinin 55 ± 5 kDa olduğu. Saflaştırılan GDH enziminin homohekzamer yapıda olduğu bildirilmiştir (McCarthy ve diğ., 1980). Koyun karaciğerinden saflaştırılan GDH enzimi için toplam molekül ağırlığı 363 kDa, alt birimlerinin molekül ağırlığı 63 kDa ve bu veriler ışığında saflaştırılan GDH enzimini

homohekzamerik yapıda olduğu bildirilmiştir (Güler, 2014). Bezelyeden saflaştırılan hekzamer yapıdaki GDH enziminin alt birimlerinin molekül kütlesi 44 kDa, toplam molekül ağırlığını ise 260 kDa olarak bulunmuştur ve hekzamerik yapıda olduğu bildirilmiştir (Kindt ve diğ., 1980). Keith ve Kenneth'in 1982 yılında yapmış oldukları çalışmada sinek larvasından saflaştırılan GDH enzimi için toplam molekül kütlesi 350 ± 30 kDa alt birimlerinin molekül kütlesi 57 ± 5 kDa olarak bulunmuş (Keith ve Kenneth, 1982), 2001 yılında Kwinta ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada tritikale köklerinden saflaştırılan GDH enziminin molekül kütlesi 257 kDa, alt birimlerinin molekül kütlesi ise 42.5 kDa olarak (Kwinta ve diğ., 2001) bulunmuştur. Toprakta yaşayan bir amip türü olan *Dictyostelium discoideum*'dan saflaştırılan GDH enziminin toplam molekül kütlesi 356 kDa, alt birimlerinin molekül kütlesi 54 kDa olarak bulunmuş (Pamula ve Wheldrake, 1991), bir mantar türü olan *Benjaminiella poitrasii*'dan saflaştırılan GDH için toplam molekül kütlesi 371 kDa, alt birimlerinin molekül ağırlığı 97kDa olarak bulunmuştur (Joshi ve diğ., 2013).

Köpek balığı karaciğerinden saflaştırılan GDH enzimin için yapılan PAGE deneyi sonucunda GDH toplam molekül ağırlığının 330 kDa olduğu (Corman ve diğ., 1967), Tuna balığı karaciğerinden saflaştırılan GDH enzimi için toplam molekül ağırlığının 333 kDa olduğu bulunmuştur (Veronese ve diğ., 1976). Timsah buz balığı türlerinden olan *Chaenocephalus aceratus* balığının karaciğerinden saflaştırılan GDH enzimi için SDS-PAGE deneyi sonucunda GDH enziminin alt birimlerinin molekül ağırlığı 57.90 kDa olduğu ve hekzamerik yapıda olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada sonuçların tuna balığı ve köpek balığından saflaştırılan GDH enzimiyle benzer sonuçlar olduğu vurgulanmıştır (Ciardiello ve diğ., 1997).

Çalışmamızda gökkuşağı alabalık karaciğerinden saflaştırılan GDH enziminin toplam molekül kütlesinin 346.74 kDa, alt birimlerinin mol kütlesinin ise 53.71 kDa olduğu bulunmuştur. Saflaştırılan GDH enziminin hekzamerik yapıda olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçların literatür taramasında gözlemlenen sonuçlarla uyumlu olduğu bulunmuştur.

GDH enzimi bugüne kadar mantarlardan bakterilere, bakterilerden bitkilere, bitkilerden hayvanlara kadar çok geniş bir yelpazede saflaştırılmış bir enzimdir. Farklı kaynaklardan saflaştırılan GDH enziminin kinetik özelliklerinin incelenmesi bu enzimin özelliklerinin belirlenmesinde oldukça önemlidir. Bu anlamda GDH enziminin kullandığı substratların K_m değerlerinin belirlenmesi oldukça önemlidir. K_m değeri bir maddenin enzime olan ilgisini gösterdiğinden GDH enzimi için K_m değerlerinin belirlenmesi enzimin hangi yönde ve hangi

koenzime bağılı olduğunu bulmak açısından oldukça önemlidir. GDH enzimi bugüne kadar *Neurospora crassa*, *Candida utilis*, *Agaricus bisporus*, *Laccaria laccata*, *Saccharomyces cerevisiae* mantarlarından saflaştırılmış ve kinetik özellikleri incelenmiştir. *Neurospora crassa* mantarından 50 kat saflaştırılan GDH enzimi substratları için K_m değerlerini hesaplamışlar ve NAD^+ , $NADP^+$, $NADH$ ve $NADPH$ için K_m değerlerini sırasıyla 0.33, 0.05, 0.55 ve 0.13 mM olarak bulmuşlardır. *Neurospora crassa* mantarından saflaştırılan GDH enziminin reaksiyonu iki yönlü gerçekleştirdiği ve K_m değerleri göz önünde bulundurulduğunda GDH enziminin NAD^+ ve $NADP^+$ bağımlı olduğu bulunmuştur (Sanwal ve Lata, 1961). *Candida utilis* mantarından saflaştırılan GDH enziminin NAD^+ bağımlı olduğu ve koenzim olarak yalnızca NAD^+ kullandığı ve reaksiyonun sadece deaminasyon yönünden olduğu bulunmuştur. NAD^+ için K_m değeri 1.08 mM olarak bulunmuştur (Hemmings, 1980). *Agaricus bisporus* mantarından saflaştırılmış olan GDH enziminin ise $NADP^+$ bağımlı olduğu ve reaksiyonun iki yönlü gerçekleştirdiği tespit edilmiştir. $NADP^+$ ve $NADPH$ için K_m değerleri sırasıyla 0.12 ve 0.07 olarak bulunmuştur (Baars ve diğ., 1995). *Laccaria laccata* mantarında bulunan GDH enzimi koenzim olarak yalnızca $NADP^+$ ve $NADPH$ 'ı kullandığı tespit edilmiştir. K_m değerleri sırasıyla 0.03 ve 0.01 mM olarak bulunmuştur (Brun ve diğ., 1992). *Saccharomyces cerevisiae* mantarından izole edilen GDH enziminin $NADP^+$ -bağımlı olduğu bulunmuş ve $NADP^+$ ve $NADPH$ substratlarının K_m değerlerinin sırasıyla 0.07 ve 0.09 mM olduğu bulunmuştur (Grisolia ve diğ., 1964). Bir bakteri olan GWE1'den GDH enzimi 22.7 kat saflaştırmıştır. Karakterizasyon çalışmalarının sonucunda optimum pH 8.0 ve optimum sıcaklığının ise 80°C olduğu bulunmuştur. GWE'den saflaştırılan GDH enzimi 5 saat 100°C'de tutulduğunda aktivitesinin %30 azaldığı bulunmuş ve ayrıca GDH enziminin sadece deaminasyon yönünde çalıştığı bulunmuştur (Amenabar ve Blamey, 2012). 2017 yılında yapılan bir çalışmada *Geotrichum candidum* mantarından GDH enzimi 38.58 kat saflaştırılmıştır. Bu mantardan saflaştırılan GDH enziminin $NADP^+$ -bağımlı olduğu ve $NADP^+$ ve $NADPH+H^+$ için K_m değerlerinin 0.07 ve 0.083 mM olduğu bulunmuştur (Zhu ve diğ., 2017).

Thermophilic bacillus bakterisinden 353 kat saflaştırılan GDH enziminin $NADP^+$ -bağımlı olduğu bulunmuştur. GDH enziminin substrat olarak kullandığı glutamat, $NADP^+$, NH_4^+ , α -ketoglutarat ve $NADPH+H^+$ için K_m değerleri sırasıyla 0.011, 0.0003, 0.021, 0.0013 ve 0.00053 mM olarak bulunmuştur (Epstein and Grossowicz, 1975). *Paracoccus denitrificans* bakterisinden saflaştırılmış olan GDH enziminin de $NADP^+$ -bağımlı olduğu K_m değerlerinin ise glutamat: 1.5 mM, $NADP^+$: 5.9 μ M, α -ketoglutarat: 0.47 mM, $NADPH+H^+$: 12.5 μ M ve

NH_4^+ : 14 mM olarak bulunmuştur (Kremeckova ve diğ., 1992). Arkea ailesinde yer alan *Halobacterium*'dan saflaştırılan GDH enziminin kinetik özellikleri incelenmiş ve GDH enziminin NADP^+ -bağımlı olduğu bulunmuştur. Substratlar için yapılan K_m çalışmalarında α -ketoglutarat: 3 mM, NH_4^+ : 16.6 mM, $\text{NADPH}+\text{H}^+$: 0.024 mM, glutamat: 14.2 mM ve NADP^+ : 0.061 mM olduğu bulunmuştur. Yine aynı çalışmada NaCl konsantrasyonuna bağlı aktivite tayini yapılmış ve 4M NaCl çözeltisi ilavesinde aktivitenin yaklaşık olarak %50 azaldığı tespit edilmiş (Leicht ve diğ., 1978). Yine Arkea ailesinde yer alan *Thermococcus litoralis*'den saflaştırılan GDH enziminin NADP^+ -bağımlı olduğu bulunmuştur ve substratlar için K_m değerleri ise glutamat 0.22 mM, NADPH 0.029 mM, α -ketoglutarat 0.16 mM, NADPH 0.14 mM ve NH_4^+ 0.63 mM olarak bulunmuştur (Ma ve diğ., 1994). Mikroalg olan *Chlorella sorokiniana*'dan saflaştırılan GDH enzimi için substratların K_m değerleri hesaplanmış ve α -ketoglutarat: 2 mM, NH_4^+ : 40 mM, NADH: 0.15 mM, glutamat: 60 mM ve NAD^+ : 0.15 mM olduğu bulunmuştur. Bu mikroalgden saflaştırılan GDH enziminin NAD^+ -bağımlı olduğu bulunmuştur (Meredith ve diğ., 1978).

GDH enzimi mantar ve bakterilerden saflaştırıldığı gibi bitki ve bitki kısımlarından da birçok farklı kaynaktan yararlanılarak saflaştırılmıştır. Su mercimeği, tritikale kökleri, bezelye yaprak ve kökleri, bakla taneleri, turp, soya fideleri bunlardan bazılarıdır. *Lemna minör* L. (su mercimeği) bitkisinden GDH enzimi 480 kat saflaştırılmış, enzimin NAD^+ -bağımlı olduğu bulunmuştur. Saflaştırılan GDH enziminin K_m değerleri ise glutamat: 2.5 mM, α -ketoglutarat: 1.5 mM, NAD^+ : 0.18 mM, $\text{NADH}+\text{H}^+$: 0.02 mM olarak bulunmuştur. K_m değerleri değerlendirildiğinde enzimin aminasyon yönüne daha hızlı çalıştığı anlaşılmaktadır (Stewart ve Rhodes, 1977).

Tritikale köklerinden saflaştırılmış olan GDH enziminin saflaştırma katsayısı 400 olarak bulunmuş ve enzimin K_m çalışmaları sonucunda NADPH' a yüksek afinitesi olduğu tespit edilmiştir. Yapılan K_m ve V_{max} çalışmaları sonucunda substratların K_m değerleri glutamat: 18 mM α -ketoglutarat: 3 mM, NAD^+ : 0.53 mM, NADP^+ : 0.48 mM, NADPH: 0.06 mM olarak bulunmuş ve NADH için K_m değeri bulunamamıştır (Kwinta ve diğ., 2001).

GDH enziminin saflaştırılması üzerine en çok çalışılan bitkilerden biri de bezelyedir. Bezelyenin tohum ve köklerinden farklı çalışmalarla GDH enzimi saflaştırılmıştır. Bezelye tohumlarında yapılan çalışmada GDH enziminin NAD^+ -bağımlı olduğu bulunmuştur. NAD^+ ve NADH için K_m değerleri sırasıyla 0.23 mM ve 0.03 mM, glutamat: 9.3 mM, α -ketoglutarat: 2.3

mM, NH_4^+ : 52.6 mM bulunmuştur. Bezelye tohumundan saflaştırılan GDH enziminin NADP^+ ve NADPH 'ı koenzim olarak kullanmadığı tespit edilmiştir (Kindt ve diğ., 1980). Bezelyenin köklerinden yapılan GDH saflaştırılmasında ise köklerde yapılan çalışmaya benzer sonuçlar bulunmuştur. Bezelyenin köklerinden yapılan GDH enziminin de NAD^+ -bağımlı olduğu bulunmuştur ve NADP^+ , NADPH 'ı kullanmadığı bildirilmiştir. NAD^+ ve NADH için K_m değerleri sırasıyla 0.65 ve 0.86 mM, glutamat: 7.3 mM, α -ketoglutarat: 3.3 mM, NH_4^+ : 72.0 mM olarak bulunmuştur (Pahlich ve Joy, 1971). Bu sonuçlar ışığında, bezelyenin farklı kısımlarından saflaştırılan GDH enzimi ile yapılan iki çalışmada benzer özellikler görülmüştür. Itagaki ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada GDH enzimi turptan saflaştırılmış ve optimum pH'ı aminasyon yönünde 8.0 deaminasyon yönünde ise 9.5 olarak bulunmuştur. K_m değerlerinin belirlenmesine yönelik yapılan çalışmaların sonucunda NAD^+ ve NADH için sırasıyla 0.25 ve 0.06 mM, glutamat: 28.6 mM, α -ketoglutarat: 2.0 mM, NH_4^+ : 44.4 mM olarak bulunmuştur. NADP^+ ve $\text{NADPH}+\text{H}^+$ ise koenzim olarak kullanmadığı bildirilmiştir (Itagaki ve diğ., 1988).

Turano ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada soya fidelerinde bulunan GDH enziminin üç izoformu saflaştırılmış ve GDH3 adı verilen bu izoenzimin substratları için K_m değerleri hesaplanmıştır. GDH3 enziminin NAD^+ -bağımlı olduğu tespit edilmiş ve NAD^+ ve NADH için sırasıyla 0.10 ve 0.07 mM, glutamat: 15.8 mM, α -ketoglutarat: 3.6 mM, NH_4^+ : 35.5 mM olarak bulunmuştur (Turano ve diğ., 1996).

Bir başka çalışmada *Brassica nopus* (Kanola) yapraklarında saflaştırılan GDH enziminin iki izoenzimi olan GDH1 ve GDH7 için K_m değerleri araştırılmıştır GDH1 enzimi için NH_4^+ , α -ketoglutarat, glutamat, NADH ve NAD^+ için K_m sabitleri sırasıyla 6.62 mM; 0.87 mM; 3.23 mM; 0.02 mM ve 0.12 mM olarak tespit edilmiştir. GDH7 için K_m değerleri ise NH_4^+ , α -ketoglutarat, glutamat, NADH ve NAD^+ için sırasıyla 9.3; 0.64; 3.32; 0.02 ve 0.15 mM olarak bulunmuştur (Watanabe ve diğ., 1999).

GDH enzimi balıklardan, kuşlardan ve memelilerden de saflaştırılmış bir enzimdir. Saflaştırılan bu enzim için K_m değerleri hesaplanmış ve birçok farklı sonuç çıkmıştır. Fahien ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada GDH enzimi kurbağa karaciğerinden saflaştırılmış ve saflaştırılan GDH enziminin iki yönlü çalıştığı tespit edilmiştir. Yapılan K_m çalışmaları sonucunda saflaştırılan GDH enziminin NAD(P)^+ -bağımlı olduğu tespit edilmiş olup K_m değerleri NAD^+ : 0.02, NADP^+ : 0.5, NADH : 0.03, NADPH : 0.2, glutamat: 1.80 mM, α -

ketoglutarat: 5.00 mM, NH_4^+ : 0.5 mM olarak bulunmuştur. Kurbağa karaciğerinden saflaştırılan GDH enziminin daha çok deaminasyon yönünde çalıştığı ve NAD^{++} 'yı NADP^{++} 'ya kıyasla 25 kat daha fazla ilgisi olduğu tespit edilmiştir (Fahien ve diğ., 1965).

Bir başka çalışmada ise tavuk karaciğerinden saflaştırılan GDH enzimi için K_m değerlerini hesaplamak için çalışmalar yapılmış ve saflaştırılan GDH enziminin tek yönlü olarak çalıştığı tespit edilmiştir. K_m değerleri NAD^+ ve glutamat için sırasıyla 0.61 ve 2.0 mM olarak bulunmuştur. Saflaştırılan GDH enzimi koenzim olarak yalnızca NAD^+ kullandığı ve reaksiyonun yalnızca deaminasyon yönünde olduğu tespit edilmiştir (Snoke, 1956). GDH enziminin kinetik özellikleri bulunduğu canlıya ve bulunduğu dokuya göre değişebilmektedir. Farklı canlıların karaciğerinden saflaştırılan GDH enziminin daha çok deaminasyon yönünde çalıştığı ve bununda enerji eldesi için proteinlerin karbon iskeletinin kullanılması için olduğu sonucu çıkarılabilir.

Sığır karaciğerinden saflaştırılmış olan GDH enziminin NAD(P)^+ -bağımlı olduğu ve reaksiyonun iki yönlü olarak gerçekleştiği literatürde bildirilmiştir. K_m değerleri ise NAD^+ : 0.7, NADP^+ : 0.05, NADH : 0.02, NADPH : 0.03, glutamat: 1.8, α -ketoglutarat: 0.7 mM, NH_4^+ : 3.2 mM olarak bulunmuştur (Frieden, 1959). Koyun karaciğer dokusundan mitokondriyel GDH enzimi 2', 5' ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi ile 272 kat saflaştırılmış ve saflaştırılan GDH enziminin substratları için K_m değerleri NAD^+ : 1.21, NADP^+ : 0.24, NADH : 0.14, NADPH : 1.67, glutamat: 5.57, α -ketoglutarat: 0.40 mM, NH_4^+ : 12.92 mM olarak bulunmuştur (Güler, 2014). Beyin dokusunda karaciğerdeki özelliklere benzer sonuçlar çıkmamaktadır. Colon ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada sıçan beyninden saflaştırılan GDH enziminin tek yönlü çalıştığı ve bu yönün aminasyon olduğu bulunmuştur. Yapılan K_m çalışmaları sonucunda NADH : 0.08, NADPH : 0.11, α -ketoglutarat: 1.4, NH_4^+ : 18.3 mM olarak bulunmuştur (Colon ve diğ., 1986). Ayrıca insan beyninden 547 kat saflaştırılan GDH enziminin de benzer özellikler gösterdiği bulunmuştur. Saflaştırılan GDH enziminin aminasyon yönünde çalıştığı ve K_m çalışmaları sonucunda NADH : 0.08, NADPH : 0.05, α -ketoglutarat: 1.3 mM olarak bulunmuştur (Hussain ve diğ., 1989). Sıçan ve insan beyninden saflaştırılan GDH enziminin NAD(P)^+ -bağımlı olduğu görülmektedir. Beyin dokusunda GDH enzimi daha çok nörotransmitter madde olan γ -aminobütirik asit için glutamat sağlamak amacıyla aminasyon yönünde çalıştığı sonucu çıkarılabilir.

GDH enzimi ayrıca bazı balık türlerinden de saflaştırılmıştır. Bunlar köpek balığı, tuna balığı, yılanbalığı ve Antartika balıklarının karaciğerindendir. Bu balık türlerinin de ortak özelliklerinden biri hepsinin tuzlu su balığı olmasıdır. Corman ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada GDH enzimi köpek balığı karaciğerinden 150 kat saflaştırılmış ve saflaştırılan enzimin iki yönlü çalıştığı tespit edilmiştir. K_m değerlerinin belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalar sonucunda saflaştırılan GDH enziminin koenzim olarak NADP(H) kullandığı tespit edilmiştir. K_m değerleri NADP⁺: 0.08, NADPH: 0.4, glutamat: 84.0, α -ketoglutarat: 4.5 ve NH₄⁺:80 mM olarak tespit edilmiştir. İki yönlü çalışmasına karşılık köpek balığı karaciğerinden saflaştırılan GDH enziminin daha çok aminasyon yönünde çalıştığı bulunmuştur (Corman ve diğ., 1967).

Tuna balığı karaciğerinden saflaştırılan GDH enzimini için kinetik çalışmalar yapılmış ve saflaştırılan enzimin daha çok deaminasyon yönünde çalıştığı tespit edilmiştir. K_m değerleri ise NAD⁺, NADP⁺ ve glutamat için sırasıyla 0.33, 0.7 ve 1.4 mM olarak bulunmuştur. Tuna balığı karaciğerinden saflaştırılan GDH enziminin NAD⁺'yı tercih ettiği saptanmıştır (Veronese ve diğ., 1976). Ciardiello ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada GDH enziminin saflaştırılması timsah buz balığı türü olan *Chaenocephalus aceratus* balığının karaciğerinden gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılan GDH enziminin NAD⁺ yı kullandığı tespit edilmiştir (Ciardiello ve diğ., 1997). Hayashi ve diğ., 1982 yılında yaptıkları çalışmada yılanbalığı karaciğerinden GDH enzimi saflaştırılmış ve NAD⁺ ve L-glutamat için K_m değerleri sırasıyla 0.45, 3.7 mM olarak bulunmuş, saflaştırılan GDH enziminin NAD⁺'yı tercih ettiği saptanmıştır (Hayashi ve diğ., 1982).

Hemen hemen tüm canlı türlerinden saflaştırılmış olan GDH enziminin canlıdan canlıya farklı koenzim ilgisi ve kinetik özellikleri bulunduğu literatürde tespit edilmiştir. Çalışmamızda ise gökkuşağı alabalık karaciğerinden saflaştırılan GDH enzimi için K_m sabitleri belirlenmiştir. Enzimin substratlarının ve koenzimlerinin K_m sabitlerinin NAD⁺: 1.86, NADP⁺: 2.17, NADH: 2.98, NADPH: 6.25, glutamat: 15.15, α -ketoglutarat: 4.82 mM ve NH₄⁺ için K_M değeri 1.73 M olarak bulunmuştur. K_m değerlerinin sonucunda saflaştırdığımız GDH enziminin koenzimler arasında en çok ilgisinin K_m değeri en küçük olan NAD⁺'a ait olduğu belirlenmiştir. Saflaştırdığımız GDH enziminin aminasyon yönünde NADH'ı, deaminasyon yönünde ise NAD⁺'yı tercih ettiği görülmektedir. Diğer koenzimleri de kullanması nedeni ile gökkuşağı alabalık karaciğerinden saflaştırılan GDH enziminin NAD(P)⁺-bağımlı olduğu tespit edilmiştir.

Tüm koenzimleri kullanması ve K_m değerleri göz önüne alındığında gökkuşağı alabalık karaciğerinden saflaştırılan GDH enziminin çift yönlü yani hem aminasyon hem de deaminasyon yönünde çalıştığı tespit edildi.

Birçok farklı kaynaktan saflaştırılmış olan GDH enziminin K_m değerlerinin araştırılmasının yanı sıra optimal şartlarının belirlenmesine yönelik çalışmalar da yapılmıştır. Optimal şartlar canlı özelliklerine, yaşam koşullarına ve enzimin lokalizasyonuna göre de değişebilmektedir. Bu yüzden optimal şartların belirlenmesi saflaştırılan enzimlerin canlıya uyumları ve diğer canlı türleri arasındaki farklılıkların belirlenmesi açısından önem taşımaktadır. Literatür taraması işlemlerinde farklı kaynaklardan saflaştırılmış olan GDH enziminin optimal şartlarının belirlendiği tespit edildi. *Thermophilic bacillus* bakterisinden saflaştırılan GDH enziminin optimum pH çalışmalarında aminasyon yönünde 7.2, deaminasyon yönünde 8.4 olarak bulunmuştur. Sıcaklığa bağlı olarak yapılan aktivite ölçümlerinden sonra enzimin sıfırın altındaki sıcaklıklardan 70°C'ye kadar aktivitesini koruduğu bulunmuştur (Epstein and Grossowicz, 1975). *Thermococcus litoralis*'den saflaştırılan GDH enziminin optimum pH'nın 8.00, optimum sıcaklığı 80°C bulunmuştur (Ma ve diğ., 1994). Mikroalg olan *Chlorella sorokiniana*'dan saflaştırılan GDH enzimi için optimum pH çalışmalarında maksimum aktivitenin aminasyon yönü için pH 8.0, deaminasyon yönü için pH 9.0 olarak bulunmuştur (Meredith ve diğ., 1978). *Lemna minör* L. (su mercimeği) bitkisinden izole edilen GDH enziminin optimum pH'ı aminasyon yönünde 8.0, deaminasyon yönünde 9.2 olarak bulunmuştur (Stewart ve Rhodes, 1977). Itagaki ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada GDH enzimi turptan saflaştırılmış ve optimum pH'ı aminasyon yönünde 8.0 deaminasyon yönünde ise 9.5 olarak bulunmuştur (Itagaki ve diğ., 1988). Soya fidelerinden saflaştırılan GDH3 enziminin optimum pH'ı aminasyon yönünde 8.0, deaminasyon yönünde 9.3 olarak bulunmuştur (Turano ve diğ., 1996). *Brassica nopolis* yapraklarında saflaştırılan GDH1 ve GDH7 enzimlerinin aminasyon ve deaminasyon aktivitelerinin optimum pH'ları sırasıyla 9.0 ve 9.5 olarak bulunmuştur (Watanabe ve diğ., 1999).

Tavuk karaciğerinden saflaştırılmış olan GDH enzimi için yapılan optimal koşul çalışmaları sonucunda deaminasyon yönünde optimum pH'ın 8.0, aminasyon yönünde ise 7.6 olduğu tespit edilmiştir (Snoke, 1956). Koyun karaciğerinden saflaştırılan GDH enziminin ise optimum pH'ı 7.5, optimum sıcaklığının 40°C ve optimum iyonik şiddetin fosfat tamponu için 500 mM olduğu

tespit edilmiştir (Güler, 2014). Sıçan beyninden saflaştırılan GDH enziminin 45°C’de inaktif hale geldiği ve optimum pH’ı ise 7.40 olarak tespit edilmiştir (Colon ve diğ., 1986).

Timsah buz balığı türü olan *Chaenocephalus aceratus* balığının karaciğerinden saflaştırılan GDH enzimi için optimum sıcaklık değerinin 30°C olduğu tespit edilmiştir (Ciardiello ve diğ., 1997). Yılan balığı karaciğerinden saflaştırılan GDH enzimi için optimum pH aminasyon yönünde 8.0, deaminasyon yönünde 8.5 olarak bulunmuştur. Ayrıca 8°C’de 4 gün sonunda aktivitesinin %20 azaldığı tespit edilmiştir (Hayashi ve diğ., 1982). İnsanlarda bulunan hGDH1 ve hGDH2’nin aminasyon yönünde optimum pH’ları sırasıyla 8.0 ve 7.5 olarak bulunmuştur (Plaitakis ve diğ., 2003; Kanavouras ve diğ., 2007).

Çalışmamızda saflaştırılan GDH enziminin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklığın 40°C, maksimum aktivite gösterdiği pH’ın aminasyon yönünde 8.0 ve optimum iyonik şiddetin 100 mM potasyum fosfat tamponu olduğu bulunmuştur. Ayrıca yapılan depo kararlılığı çalışmasında aktivitesini en çok koruyabildiği sıcaklığın -80°C olduğu bulunmuştur. Diğer literatür çalışmalarında çıkan optimal koşullarla karşılaştırıldığında benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Çevresel ve endüstriyel şartlardan dolayı ağır metaller birçok sebeple maruz kalınan bir durum olmakta ve olmaya devam etmektedir. Bu anlamda ağır metallerin etkilerinin incelenmesi ve metabolizma üzerine olan etkileşimlerinin incelenmesi oldukça önemlidir. Ağır metaller kofaktör olarak da enzimler tarafından kullanılmaktadır ancak konsantrasyonlarının artması toksisiteye neden olabilmektedir. Bu etkilerinden dolayı bazı ağır metallerin GDH enzimi üzerine etkileri literatür taramasının yapılmasında karşılaşılmış ve gökkuşağı alabalık karaciğerinden saflaştırılan GDH enzimi üzerine de bazı ağır metallerin etkileri incelenmiştir.

Kim ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada *Klebsiella pneumoniae* bakterisinden saflaştırdıkları NADP⁺-bağımlı GDH enziminin aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisini incelemişlerdir. Yapılan çalışma sonucunda Ag⁺ iyonunun oldukça kuvvetli bir inhibitör etkisine sahip olduğu bulunmuştur. 1 mM Ag⁺ iyonunun %100 inhibisyon ettiği tespit edilmiştir. Yine 1 mM Hg²⁺ iyonunun %48, 1 mM Al³⁺ iyonunun ise %23 oranında inhibisyon gösterdiği tespit edilmiştir (Kim ve diğ., 2002). Bir başka bakteri türü olan *Janthinobacterium lividum*’dan saflaştırılmış NAD⁺-bağımlı GDH enzimi üzerine 1 mM konsantrasyonda Hg²⁺, Mn²⁺, Mg²⁺, Ni²⁺, Co²⁺ ve Zn²⁺ metal iyonlarının aktivite üzerine etkilerine bakılmış ve GDH

enziminin aktivitesi yüzde üzerinden sırasıyla 0, 52, 64, 77, 82 ve 224 olarak bulunmuştur. Zn^{+2} iyonlarının bu bakteriden saflaştırılan GDH enziminin aktivitesini yaklaşık 2.5 kat artırırken diğer metallerin inhibisyon etkilerinin olduğu tespit edilmiştir (Kawakami ve diğ., 2007). Bir mantar türü olan *Laccaria bicolor*'dan saflaştırılmış ve NAD^{+} -bağımlı olan GDH enzimi üzerine bazı metal iyonlarının etkisi incelenmiş. 1mM $CaCl_2$ ve 1 mM $CaSO_4$ aminasyon yönünde saflaştırılan GDH enzimini sırasıyla %32 ve %50 oranında aktive ettiği bulunmuştur. Aynı çalışmada Mg^{2+} , Mn^{2+} ve Cu^{2+} iyonlarının klorür ve sülfat tuzlarının GDH enziminin aktivite üzerine etkileri incelenmiş ve 0.1 mM $CuCl_2$ ve $CuSO_4$ tuzlarının sırasıyla %65 ve %60 oranında inhibisyon gerçekleştirdiği bulunmuştur. 1 mM $MnCl_2$ ve 0.1 mM $MnSO_4$ tuzlarının ise sırasıyla %12 ve %5 inhibisyona neden olduğu bulunmuştur. 1 mM $MgCl_2$ ve $MgSO_4$ tuzlarında ise oldukça değişik bir farklılık bulunmuş ve $MgCl_2$ %50 oranında aktivite artışına neden olurken, $MgSO_4$ ise aynı konsantrasyonda %22 oranında inhibisyona neden olmuştur (Garnier ve diğ., 1997).

Bacteroides fragilis bakterisinden saflaştırılmış olan NAD^{+} -bağımlı GDH enzimi üzerine 100 mM Na^{+} , K^{+} , Mg^{2+} ve Ca^{2+} iyonlarının aktivite üzerine etkilerine bakılmış ve sırasıyla %14, %8, %58 ve %52 oranında inhibisyon etkisi olduğu bulunmuştur (Abrahams ve diğ., 2001). *Agave americana* (Amerika sabırı) bitkisinin yapraklarından saflaştırılmış olan GDH enziminin aktivite üzerine Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} ve Mn^{2+} iyonlarının etkisine bakılmış ve 10 mM Zn^{2+} iyonunun yaklaşık olarak %50 oranında inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir (Ramirez ve diğ., 1977).

Geotrichum candidum mantarından saflaştırılmış GDH enzimi için Zn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Ba^{2+} , Mn^{2+} , Pb^{2+} ve Ca^{2+} iyonlarının aktivite üzerine etkilerine bakılmış ve yapılan çalışma sonucunda Zn^{2+} , Fe^{2+} iyonlarının aktivasyon, Mg^{2+} , Fe^{3+} , Ba^{2+} , Mn^{2+} , Pb^{2+} ve Ca^{2+} iyonlarının inhibisyona neden oldukları bulunmuştur. En kuvvetli inhibisyonu ise Pb^{+2} iyonu göstermiş olup, 5 mM konsantrasyonda yaklaşık olarak %80 oranında inhibisyona neden olmuştur (Zhu ve diğ., 2017). Koyun karaciğerinden saflaştırılmış olan GDH enzimi üzerine bazı metal iyonlarının etkisi incelenmiş ve Ag^{+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} ve Fe^{3+} iyonlarının aktivite üzerine inhibitör etki gösterdiği, Ca^{2+} iyonunun ise aktivasyon etksi olduğu tespit edilmiştir. İnhibisyon etkisi gösteren metal iyonlarının IC_{50} değerleri sırasıyla 0.13 μM , 11.75 μM , 26.65 μM , 1.23 mM, 0.72 mM ve 0.25 mM olarak bulunmuştur (Güler, 2014).

GDH enzimi farklı kaynaklardan saflaştırılmış ve metal iyonlarının farklı etkileri olduğu literatürde bildirilmiştir. Ancak balıklardan saflaştırılan GDH enzimi için metal iyonlarının etkisine literatürde rastlanmamıştır. Özellikle çevresel kirliliğin her geçen gün yükseldiği günümüz Dünya'sında sulara karışan ağır metallerin biyolojik etkilerinin incelenmesi oldukça önemlidir. Çalışmamızda ise gökkuşağı alabalık karaciğerinden saflaştırılan GDH enzimi üzerine Ag^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} ve Cr^{3+} iyonlarının inhibisyon etkisi olduğu, Ca^{2+} ve V^{4+} iyonlarının ise aktivasyon etkisi olduğu ve Na^+ ve Li^+ iyonlarının aktivite üzerine etkisi olmadığı bulundu. İnhibisyon etkisi gösteren metallerin IC_{50} değerleri sırasıyla 8.65 μM , 25.85 μM , 54.98 μM , 0.43 mM, 2.33 mM, 2.72 mM, 2.73 mM, 124.82 mM, 2.86 mM ve 4.27 mM olarak bulundu. İnhibisyon etkisi gösteren metallerin inhibisyon türleri belirlenmiş ve Ni^{2+} ve Fe^{2+} yarışmalı, Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} için yarı yarışmalı, Ag^+ , Cr^{3+} için yarışmasız ve Mn^{2+} , Co^{2+} ve Fe^{3+} için karışık (miks) tipi inhibisyon gösterdiği bulundu. Ayrıca çalışmamızda Ca^{2+} iyonlarının 100 mM konsantrasyonda GDH enziminin aktivitesi %160 oranında, V^{4+} iyonunun ise 0.4 mM konsantrasyonda yaklaşık olarak %300 oranında arttırdığı bulundu. Metal iyonlarının GDH enzimi üzerine olan etkilerinin incelenmesi GDH için tasarlanabilecek ligandların sentezlenmesi açısından oldukça önemlidir. GDH enziminin bulunduğu lokasyon ve görev açısından aktive ya da inhibe edilmesi istenebilir ve metal iyonlarından sentezlenebilecek anorganik bileşiklerin bu amaçla ilaç tasarımı rol alabileceği söylenebilir. Bu anlamda çalışmamızda inhibisyon açısından Ag^+ ve aktivasyon açısından V^{4+} iyonlarının ligand sentezlemede kullanılabileceği öne sürülebilir.

Vitaminler organizma için gerekli olan metabolitik reaksiyonların gerçekleşmesinde çok önemli olan ve direkt olarak enerji kaynağı olarak kullanılmayan organik moleküllerdir. Vitaminler, enzimlerin aktivitesi için gerekli olan koenzimlerin sentezi için gereklidirler ve bu anlamda organizma için düzenleyici etkileri bulunmaktadır. Yapılan literatür taramasında GDH enzimi üzerine vitaminlerin etkilerinin çok çalışılmadığı görülmüştür. *Agave americana* yapraklarından saflaştırılmış olan GDH enzimi üzerine B₆ vitamininin koenzim şekli olan piridoksal-5'-fosfatın enzim aktivitesini 0.2 mM konsantrasyonda zamana bağlı olarak inhibisyon etkisi gösterdiği ve 60 dakika sonunda yaklaşık olarak aktiviteyi %20 oranında azalttığı bildirilmiştir (Ramirez ve diğ., 1977). Mkrtchyan ve arkadaşları, 2015 yılında yaptıkları çalışmada tiamin ve tiamin türevi bileşiklerin beyin dokusunda GDH enzimini inhibe ettiklerini bulmuşlardır (Mkrtchyan ve diğ., 2015). Çalışmamızda B₁ (Tiamin), B₂ (Riboflavin), B₃ (Niasin), B₆ (Piridoksin), C (Askorbik asit) ve U vitaminin aktivite üzerine etkileri

incelenmiş, B₁, B₆ ve U vitaminlerinin inhibisyon etkisi olduğu, B₂ vitaminin aktivasyon etkisi olduğu ve B₃ ile C vitaminlerinin ise GDH enziminin aktivitesinin üzerine herhangi bir etkisi olmadığı bulundu. İnhibisyon etkisi gösteren vitaminlerin IC₅₀ değerleri sırasıyla 0.77, 1.58 ve 8.12 mM olarak bulunmuştur. B₁ ve U vitamini için miks tip, B₆ vitamini için ise inhibisyon türünün yarışmasız olduğu bulundu. Literatür taramasında U vitaminin GDH enzimi üzerine etkisi hiç incelenmemiş olup bu anlamda ilk defa çalışılmıştır. B₂ vitamini ise GDH enzimi üzerine aktivatör etki etmiş ve 2 mM konsantrasyonda yaklaşık olarak %140 aktivasyon gösterdiği bulundu. GDH enzimi koenzim olarak B₃ vitaminin koenzim halini kullanmaktadır. Ancak çalışmamızda B₃ vitaminin GDH enzim aktivitesi üzerine herhangi bir etkisi olmadığı bulunmuştur. Ayrıca C vitaminin saflaştırılmış olan GDH enziminin aktivitesine etki etmediği tespit edildi. Çalışmamızda çıkan sonuçlar göz önüne alındığında özellikle literatürde bulunmayan U vitaminin GDH enzimini inhibe etmesi, GDH enziminin aşırı çalışması durumuna bağlı olarak ortaya çıkan bazı metabolik hastalıkların, örneği HI/HA sendromu, tedavisinde ya da tedaviye yardımcı olması için kullanılabileceği ve ileri çalışmalarla daha da aydınlatılabileceği söylenebilir.

GDH enziminin aktivitesi üzerine organik çözücülerin etkileri de incelenmiş ancak literatürde bu konuyla ilgili çok fazla çalışma olmadığı tespit edilmiştir. Munwar ve Engel'in 2012 yılında yaptıkları bir çalışmada *Halobacterium salinarum*'dan saflaştırılmış GDH enzimi üzerine bazı organik çözücülerin etkilerini incelemişlerdir. Bu çalışmanın sonucunda metanol, etanol, aseton ve 2-propanolün aktivite üzerine inhibisyon etkisinin olduğunu, DMSO'nun ise aktivite üzerine etki etmediğini bulmuşlardır. Bu çalışmada deney hacmi içindeki organik çözücü hacminin %10 olarak tutmuşlar ve aktiviteye 72 saat sonra bakarak değerlendirmişlerdir. Bu koşullardan sonra GDH enziminin metanol, etanol, aseton ve 2-propanol için % aktivitelerini sırasıyla 74, 34, 38 ve 33 olarak bulmuşlardır (Munwar ve Engel, 2012). *Geotrichum candidum*'dan saflaştırılmış olan GDH enzimi üzerine bazı çözücülerin etkilerine bakılmış ve metanol, etanol, 1-propanol, n-bütanol ve izobütanolün aktivite üzerine bir etkisi olmadığını, hekzanol ve isoamil alkolün ise GDH aktivitesini inhibe ettikleri bulunmuştur (Zhu ve diğ., 2017). Çalışmamızda DMSO, etanol, metanol, n-propanol, n-bütanol, eter, hekzan, sikloheksanon ve asetonun GDH aktivitesi üzerine etkisi incelenmiş ve aktiviteleri sırasıyla %73.10, %83.81, %82.86, %17.38, %64.76, %79.40, %96.00, %30.80 ve %81.45 oranında olduğu bulundu. Denemesi yapılan tüm çözücülerin GDH enziminin

aktivitesini düşürücü yönde etki ettiği tespit edildi. En yüksek inhibisyona neden olan çözücülerin n-propanol ve sikloheksanon olduğu bulunmuştur.

Sonuç olarak; GDH enzimi gökkuşağı alabalık karaciğerinden ilk defa tek basamakta 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırılmıştır. Tek basamakta GDH enzimi 5.83 U/mg protein spesifik aktiviteyle, 171 kat saflaştırıldı. Saflaştırılan enzim için karakterizasyon işlemleri yapıldı. Yapılan deneyler sonucunda optimum pH'ı 8.0, optimum iyonik şiddeti 100 mM K-fosfat tamponu pH 7.4, optimum sıcaklığının 40°C'e ve depo kararlılığının -80°C'e olduğu bulundu. Saflaştırılan enzimin substratlarının ve koenzimlerinin K_m - V_{max} değerleri araştırılmıştır. NAD^+ , $NADH$, $NADP^+$, $NADPH$, glutamat, α -ketoglutarat için K_m değerleri sırasıyla 1.86; 2.98; 2.17; 6.25; 15.15, 4.82 mM ve NH_4^+ için 1.73 M olarak bulundu. V_{max} değerleri ise araştırılmıştır. NAD^+ , $NADH$, $NADP^+$, $NADPH$, NH_4^+ , glutamat ve α -ketoglutarat için V_{max} değerleri sırasıyla 0.11; 0.44; 0.05; 0.43; 1.79; 0.12 ve 0.42 U/mL olarak bulundu. Aktivite üzerine Na^+ , Li^+ , Ag^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} , Cr^{3+} ve V^{4+} iyonlarının etkisi incelendi. Bu inceleme sonucunda Ag^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} ve Cr^{3+} iyonlarının inhibisyon etkisi olduğu, Ca^{2+} ve V^{4+} iyonunun ise aktivasyon etkisi olduğu ve Na^+ ve Li^+ iyonlarının aktivite üzerine etkisi olmadığı bulundu. Ag^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} ve Cr^{3+} iyonlarının IC_{50} değerleri sırası ile 8.65 μ M; 25.85 μ M; 54.98 μ M; 0.43 mM; 2.33 mM; 2.72 mM; 2.73 mM; 124.82 mM; 2.86 mM ve 4.27 mM olarak bulundu. İnhibisyon etkisi gösteren metal iyonlarının inhibisyon türleri ve K_i sabitleri belirlendi. K_i sabitleri sırasıyla 1.72 μ M; 9.21 μ M; 20.24 μ M; 0.01 mM; 1.98 mM; 0.83 mM; 2.93 mM; 125.08 mM; 2.86 mM ve 4.27 mM olarak hesaplandı. Saflaştırılan GDH enzimi üzerine vitaminlerin etkisi incelendi ve B_1 , B_6 ve U vitaminlerinin inhibisyon etkisi olduğu, B_2 vitaminin aktivasyon etkisi olduğu ve B_3 ile C vitaminlerinin ise GDH enziminin aktivitesinin üzerine herhangi bir etkisi olmadığı bulundu. B_1 , B_6 ve U vitamini içi IC_{50} değerleri sırası ile 0.77; 1.58; 8.12 mM olarak bulundu ve inhibisyon türleri belirlenip K_i sabitleri 0.44 mM; 0.85 mM; 5.02 mM olarak hesaplandı. Bazı organik çözücülerin GDH enzim aktivitesi üzerine etkileri incelendi. DMSO, metanol, etanol, n-propanol, n-bütanol, eter, aseton, hekzan ve siklo hekzanon için %aktivite değerleri sırasıyla 73.10; 82.86; 83.81; 17.38; 64.76; 79.40; 81.45; 96.00 ve 30.80 olarak bulundu. Tablo 5.1'de yapılan tüm deneylere ait sonuçlar verilmiştir.

Tablo 5.1: Gökkuşuğu alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi için bulunan karakterizasyon sonuçları, IC₅₀ değerleri, K_i sabitleri ve inhibisyon türleri.

Karakterizasyon	Alt birim molekül kütlesi			
	Toplam molekül kütlesi		346.74kDa	
	Alt birim molekül kütlesi		53.71 kDa	
	Optimum pH		8.0	
	Optimum iyonik şiddet		100 mM	
	Optimum sıcaklık		40°C	
	Depo kararlılığı		-80°C	
K _m -V _{max} Çalışmaları		K _m	V _{max}	
	NAD ⁺	1.86 mM	0.11 U/mL	
	NADH+H ⁺	2.98 mM	0.44 U/mL	
	NADP ⁺	2.17 mM	0.05 U/mL	
	NADPH+H ⁺	6.25 mM	0.43 U/mL	
	NH ₄ ⁺	1.73 M	1.79 U/mL	
	L-Glutamat	15.15 mM	0.12 U/mL	
	α-Ketoglutarat	4.82 mM	0.42 U/mL	
Metal İyonlarının İnhibisyon Çalışmaları	Metal İyonu	IC ₅₀	K _i	İnhibisyon Türü
	Ag ⁺	8.65 ± 1.68 µM	1.72 ± 0.22 µM	Yarışmasız
	Cu ²⁺	28.85 ± 0.85 µM	9.21 ± 0.93 µM	Yarı Yarışmalı
	Zn ²⁺	54.98 ± 1.99 µM	20.24 ± 2.23 µM	Yarı Yarışmalı
	Ni ²⁺	0.43 ± 0.02 mM	0.01 ± 0.00 mM	Yarışmalı
	Fe ²⁺	2.33 ± 0.02 mM	1.98 ± 0.44 mM	Yarışmalı
	Mn ²⁺	2.72 ± 0.19 mM	0.83 ± 0.18 mM	Miks
	Co ²⁺	2.73 ± 0.05 mM	2.93 ± 0.60 mM	Miks
	Mg ²⁺	124.82 ± 14.16 mM	125.58 ± 11.94 mM	Yarı Yarışmalı
	Fe ³⁺	2.86 ± 0.01 mM	0.45 ± 0.08 mM	Miks
	Cr ³⁺	4.27 ± 0.08 mM	4.71 ± 1.62 mM	Yarışmasız
	Ca ²⁺	Aktivasyon	****	****
	V ⁴⁺	Aktivasyon	****	****
	Na ⁺	Etkisiz	****	****
	Li ⁺	Etkisiz	****	****
Vitaminlerin İnhibisyon Çalışmaları	Vitamin	IC ₅₀	K _i	İnhibisyon Türü
	B ₆ vitamini	0.77 ± 0.04 mM	0.44 ± 0.04	Yarışmasız
	B ₁ vitamini	1.57 ± 0.07 mM	0.85 ± 0.09	Miks
	U vitamini	8.12 ± 0.19 mM	5.02 ± 0.63	Miks
	B ₂ vitamini	Aktivasyon	****	****
	B ₃ vitamini	Etkisiz	****	****
	C vitamini	Etkisiz	****	****

Tablo 5.1 (Devam): Gökkuşığı alabalık karaciğerinden saflaştırılan glutamat dehidrojenaz enzimi için bulunan karakterizasyon sonuçları, IC₅₀ değerleri, K_i sabitleri ve inhibisyon türleri.

Çözücülerin Aktivite Üzerine Etkileri	Çözücü	% Aktivite	Aktiviteye Etkisi
	Aseton	81.45	İnhibisyon
	Sikloheksanon	30.80	İnhibisyon
	Hekzan	96	İnhibisyon
	Eter	79.40	İnhibisyon
	n-Bütanol	64.76	İnhibisyon
	n-Propanol	17.38	İnhibisyon
	MetOH	82.86	İnhibisyon
	EtOH	83.81	İnhibisyon
	DMSO	73.10	İnhibisyon

KAYNAKLAR

- Abrahams, G.L., Iles K.D., Abratt, V.R., 2001, The *Bacteroides fragilis* NAD-specific glutamate dehydrogenase enzyme is cell surface-associated and regulated by peptides at the protein level, *Anaerobe*, 7, 135–142.
- Akbulut, S., Keten, A., 2001, Düzce yöresindeki alabalık yetiştiriciliği üzerine bir çalışma, *Süleyman Demirel Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 2, 49-60.
- Amenabar, M.J., Blamey, J.M., 2012, Purification and characterization of a thermostable glutamate dehydrogenase from a thermophilic bacterium isolated from a sterilization drying oven, *BMD Reports*, 45, 91-95.
- Angal, S., Harris, E., 1990, Protein Purification Applications, IRL Press at Oxford University Press, UK.
- Ashcroft, F.M., 2005, ATP-sensitive potassium channelopathies: Focus on insulin secretion, *Journal of Clinical Investigation*, 115, 2047-2058.
- Atasever, A., 2010, *Laktoperoksidaz Enziminin Sığır Sütünden Afinite Kromatografisi Tekniği ile Saflaştırılması*, Doktora tezi, Atatürk üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü.
- Ay, T., Bingöl, G., Binici, M., Diler, S.B., Cansaran, A., Demirağ, M.K., Dere, E., Doğan, N., Doğan, B., Ekici, N., Gülnaz, O., Kanlı, A., Olguner, E., Polat, F., Sözbilen, M., Şimşekli, Y., Yıldırım, C., 2010, *Biyolojide Özel Konular*, Pegem Akademi, ISBN: 9786053640608.
- Baars, J.J., Op den Camp, H.J., Van Hoek, A.H., Van der Drift, C., Van Griensven, L.J., Visser, J., Vogels, G.D., 1995, Purification and characterization of NADP-dependent glutamate dehydrogenase from the commercial mushroom *Agaricus bisporus*, *Current Microbiology*, 30, 211–217.
- Banerjee, S., Schmidt, T., Fang, J., Stanley, C.A., Smith, T.J., 2003, Structural studies on ADP activation of mammalian glutamate dehydrogenase and the evolution of regulation. *Biochemistry*, 42, 3446–3456.
- Bollag, D.M., Rozycki, M.D., Edelstein, S.J., 1996, Protein methods, 2nd edition, Wiley-Liss, New York, ISBN: 978-0-471-11837-4.
- Borompokas, N., Papachatzaki, M.M., Kanavouras, K., Mastorodemos, V., Zaganas, I., Spanaki, C., Plaitakis, A., 2010, Estrogen modification of human glutamate dehydrogenases is linked to enzyme activation state, *Journal of Biological Chemistry*, 285, 31380–31387.
- Bradford, M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.

- Brun, A., Chalot, M., Botton, B., Martin, F., 1992, Purification and characterization of glutamine synthetase and NADP-glutamate dehydrogenase from the ectomycorrhizal fungus *Laccaria Laccata*, *Plant Physiology*, 99, 938–944.
- Burki, F., Kaessmann, H., 2004, Birth and adaptive evolution of a hominoid gene that supports high neurotransmitter flux, *Nature Genetics*, 36, 1061–1063.
- Can, A., Akev, N., 2021, Eczacılık Fakültesi Öğrencileri için Biokimya Dersleri, İstanbul Üniversitesi Yayın No:5280, İlbey Matbaa, İstanbul, ISBN: 978-605-07-0763-2.
- Ciardiello, M.A., Cumurdella, L., Carrutore, V. and Di Prisco, G., 1997, Enzymes in antarctic fish: Glucose-6-phosphate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 118A, 1031-1036.
- Colon, A.D., Plaitakis, A., Perakis, A., Berl, S., Clarke, D.D., 1986, Purification and characterization of a soluble and a particulate glutamate dehydrogenase from rat brain, *Journal of Neurochemistry*, 46, 1811–1819.
- Corman, L., Prescott, L.M., Kaplan, N.O., 1967, Purification and kinetic characteristics of dogfish liver glutamate dehydrogenase, *Journal of Biological Chemistry*, 242, 1383–1390.
- Csibi, A., Fendt, S.M., Li, C., Poulogiannis, G., Choo, A.Y., Chapski, D.J., Jeong, S.M., Dempsey, J.M., Parkhitko, A., Morrison, T., Henske, E.P., Haigis, M.C., Cantley, L.C., Stephanopoulos, G., Yu, J., Blenis, J., 2013, The mTORC1 pathway stimulates glutamine metabolism and cell proliferation by repressing SIRT4, *Cell*, 153, 840–854.
- Cuatrecasas, P., 1970, Protein purification by affinity chromatography derivatizations of agarose and polyacrylamide beads, *Journal of Biological Chemistry*, 245, 3059- 3065.
- Cuatrecasas, P., Fuchs, S., Anfinsen, C.B., 1968, The effect of a competitive inhibitor on the acetylation of tyrosyl and lysyl residues of staphylococcal nuclease, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)–Enzymology*, 159, 417- 419.
- Davies, B.J., 1964, Disc electrophoresis-II: Method and application to human serum proteins, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 321, 404-427.
- DeBerardinis, R.J., Mancuso, A., Daikhin, E., Nissim, I., Yudkoff, M., Wehrli, S., Thompson, C.B., 2007, Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 19345–19350.
- Engel, P.C., 2014, Glutamate dehydrogenases: The why and how of coenzyme specificity, *Neurochemical Research*, 39, 426–432.
- Epstein, I., Grossowicz, N., 1975, Purification and properties of glutamate dehydrogenase from a *Thermophilic Bacillus*, *Journal of Bacteriology*, 122, 1257-1264.

- Fahien, L.A., Wiggert, B.O., Cohen, P.P., 1965, Crystallization and kinetic properties of glutamate dehydrogenase from frog liver, *Journal of Biological Chemistry*, 240, 1083–1090.
- Frieden, C., 1959, Glutamic dehydrogenase. III. The order of substrate addition in the enzymatic reaction, *Journal of Biological Chemistry*, 234, 2891–2896.
- Frieden, C., 1963, Different structural forms of reversibly dissociated glutamic dehydrogenase: relation between enzymatic activity and molecular weight, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 10, 410–415.
- Garnier, A., Berredjem, A., Botton, B., 1997, Purification and characterization of the NAD-dependent glutamate dehydrogenase in the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* (maire) orton, *Fungal Genetics And Biology*, 22, 168–176.
- Grisolia, S., Quijada, C.L., Fernandez, M., 1964, Glutamate dehydrogenase from yeast and from animal tissues, *Biochimica Et Biophysica Acta*, 81, 61–70.
- Güler, U., 2014, *Mitokondrial Glutamat Dehidrogenaz Enziminin Koyun Karaciğerindensaflaştırılması, Karakterizasyonu ve Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkilerinin İncelenmesi*, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Han, S.J., Choi, S.E., Yi, S.A., Lee, S.J., Kim, H.K., Kim, D.J., Lee, H.C., Lee, K.W., Kang, Y., 2012, β -Cell-protective effect of 2-aminobi- cyclo-(2,2,1)-heptane-2-carboxylic acid as a glutamate dehydrogenase activator in db/db mice, *Journal of Endocrinology*, 212, 307–315.
- Hayashi, S., Ise, K., Itakura, T., Ooshiro, Z., 1982, Biochemical properties of glutamate dehydrogenase purified from Eel liver, *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 48, 697-701.
- Hemmings, B.A., 1980, Purification and properties of the phospho and dephospho forms of yeast NAD-dependent glutamate dehydrogenase, *Journal of Biological Chemistry*, 255, 7925–7932.
- Herrero-Yraola, A., Bakhit, S.M., Franke, P., Weise, C., Schweiger, M., Jorcke, D., Ziegler, M., 2001, Regulation of glutamate dehydrogenase by reversible ADP-ribosylation in mitochondria, *European Molecular Biology Organization Journal*, 20, 2404–2412.
- Hong, Q.S., Changhong, Li., Charles, A.S., Thomas, J.S., 2019, Glutamate dehydrogenase, a complex enzyme at a crucial metabolic branch point, *Neurochemical Research*, 44, 117-132.
- Hudson, R.C., Daniel, R.M., 1993, L-Glutamate dehydrogenases: Distribution, properties and mechanism, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 106, 767–792.
- Hussain, M.M., Zannis, V.I., Plaitakis, A., 1989, Characterization of glutamate dehydrogenase isoproteins purified from the cerebellum of normal subjects and patients with

- degenerative neurological disorders, and from human neoplastic cell lines. *Journal of Biological Chemistry*, 264, 20730–20735.
- Isabel, G., Hindrik, M., 2012, Glutamate dehydrogenase, insulin secretion, and type 2 diabetes: A new means to protect the pancreatic β -cell, *Journal of Endocrinology*, 212, 239–242.
- Itagaki, T., Dry, I.B., Wiskich, J.T., 1988, Purification and properties of NAD-glutamate dehydrogenase from turnip mitochondria, *Phytochemistry*, 27, 3373–3378.
- Iwatsubo, M., ve Pantaloni, D., 1967 Regulation de L'activite' de la glutamate dehydrogenase par les effecteurs GTP et ADP: etude par "stopped flow", *Bulletin de la Société de Chimie Biologique*, 49, 1563–1572.
- İlhan, N., 2017, *Enzimlerin Genel Özellikleri*, In: Paşaoğlu, H., (ed.) Bölüm 10, Pelikan Yayınevi, Temel/Klinik Biyokimya, Ankara, Türkiye, ISBN: 978-605-9029-81-0, 125-166.
- Joshi, C.V., Pathan, E.K., Puneekar, N.S., Tupe, S.G., Kapadnis, B.P., Deshpande, M.V., 2013, A biochemical correlate of dimorphism in a zygomycete *Benjaminiella poitrasii*: Characterization of purified NAD-dependent glutamate dehydrogenase, a target for antifungal agents, *Nederlandse Vereniging Voor Microbiologie Stichting Antonie Van Leeuwenhoek*, 104, 25-36.
- Kanavouras, K., Mastorodemos, V., Borompokas, N., Spanaki, C., Plaitakis, A., 2007, Properties and molecular evolution of human GLUD2 (neural and testicular tissue-specific) glutamate dehydrogenase, *Journal of Neuroscience Research*, 85, 1101–1109.
- Kawakami, R., Sakuraba, H., Ohshima, T., 2007, Gene cloning and characterization of the very large NAD-dependent L-glutamate dehydrogenase from the psychrophile *Janthinobacterium lividum*, isolated from cold soil, *Journal of Bacteriology*, 189, 5626-5633.
- Keith, B.M., Kenneth, B.S., 1982, Purification and properties of glutamate dehydrogenase from the cold-hardy gall fly larva, *Eurosta solidaginis*, *Insect Biochemistry*, 12, 507-514.
- Kırım, B., 2005, *Fotoperiyodun Damızlık Gökkuşuğu Alabalıklarında (Oncorhynchus Mykiss) Yumurtlama Zamanı, Yağ Asidi Kompozisyonu, Kuluçka Performansı ve Hematolojik Parametreler Üzerine Etkisi*, Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Kim, Y.J., Yoshizawa, M., Takenala, S., Murakami, S. and Aoi, K., 2002, Ammonia assimilation in *Klebsiella pneumoniae* F-5-2 that can utilize ammonium and nitrate ions simultaneously: Purification and characterization of glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 93, 6, 584-588.
- Kindt, R., Pahlich, E., Rasched, I., 1980, Glutamate dehydrogenase from peas: Isolation, quaternary structure, and influence of cations on activity, *European Journal of Biochemistry*, 112, 533–540.

- Koberstein, R., Sund, H., 1973, The influence of ADP, GTP and L-glutamate on the binding of the reduced coenzyme to beef-liver glutamate dehydrogenase, *European Journal of Biochemistry*, 36, 545–552.
- Konak, Ü.İ., Turhan, İ., Certel, M., 2014, Proteinlerin kromatografik yöntemlerle saflaştırılması, *Akademik Gıda*, 12 (2), 79-87.
- Kremeckova, H., Scrcula, B., Mikes, V., 1992, Purification and some properties of glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase from *Paracoccus Denitrificans*, *Journal of General Microbiology*, 138, 1587-1591.
- Küfrevioğlu, Ö.İ., Keha, E.E., 2014, *Enzimler*, Biyokimya, Bölüm 4, Aktif Yayınevi, İstanbul, ISBN:975-6755-20-02, 89-137.
- Kwinta, J., Bartoszewicz, W., Bielawski, W., 2001, Purification and characteristics of glutamate dehydrogenase (GDH) from triticale roots, *Acta Physiologiae Plantarum*, 23, 399-405.
- Labboun, S., Tercé-Laforgue, T., Roscher, A., Bedu, M., Restivo, F.M., Velanis, C.N., Skopelitis, D.S., Moschou, P.N., Roubelakis-Angelakis, K.A., Suzuki, A., 2009, Resolving the role of plant glutamate dehydrogenase. I. In vivo real time nuclear magnetic resonance spectroscopy experiments, *Plant and Cell Physiology*, 50, 1761–1773.
- Laemmli, U.K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680-685.
- Lehninger, A.L., 2005, *Biochemistry*, New York, Worth Publishers, Incorporated, ISBN: 1-57259-931-6.
- Leicht, W., Werber, M.M., Eisenberg, H., 1978, Purification and characterization of glutamate dehydrogenase from Halobacterium of the Dead Sea, *Biochemistry*, 17, 4004-4010.
- Lennarz, W.J. ve Lane, M.D., 2013, *Encyclopedia of biological chemistry medicine*, 2nd ed., Academic press, San Diego, 31-50.
- Lineweaver, H., Burk, D., 1934. The determination of enzyme dissociation constants, *Journal of the American Chemical Society*, 57, 685.
- Liu, G., Zhu, J., Yu, M., Cai, C., Zhou, Y., Yu, M., Fu, Z., Gong, Y., Yang, B., Li, Y., Zhou, Q., Lin, Q., Ye, H., Ye, L., Zhao, X., Li, Z., Chen, R., Han, F., Tang, C., Zeng, B., 2015, Glutamate dehydrogenase is a novel prognostic marker and predicts metastases in colorectal cancer patients, *Journal of Translational Medicine*, 13, 144-154.
- Lonlay, P.D., Benelli, C., Fouque, F., Ganguly, B., Aral, B., Dionisi-Vici, C., Touati, G., Heinrichs, C., Rabier, D., Kamoun, P., Robert, J.J., Stanley, C., Saudubray, J.M., 2001, Hyperinsulinism and hyperammonemia syndrome: Report of twelve unrelated patients, *Pediatric Research*, 50, 353-357.
- Ma, K., Robb, F.T., Adams, M.W.W., 1994, Purification and characterization of NADP-specific alcohol dehydrogenase and glutamate dehydrogenase from the

- hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*, *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 562-568.
- MacMullen, C., Fangi J., Hsu, B.Y.L., Kelly, A., deLonlay-Debeney, P., Saudubray, J.M., Ganguly, A., Smith, T.J., Stanley, C.A., 2001, The hyperinsulinism/hyperammonemia contributing investigators: hyperinsulinism/hyperammonemia syndrome in children with regulatory mutations in the inhibitory guanosine triphosphate- binding domain of glutamate dehydrogenase, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86, 1782–1787.
- Mastorodemos, V., Zaganas, I., Spanaki, C., Bessa, M., Plaitakis, A., 2005, Molecular basis of human glutamate dehydrogenase regulation under changing energy demands, *Journal of Neuroscience Research*, 79, 65–73.
- McCarthy, A.D., Walker, J.M. and Tipton, K.F., 1980, Purification of glutamate dehydrogenase from ox brain and liver, *Biochemical Journal*, 191, 605-611.
- Meredith, M.J., Gronostajski, R.M., Schmidt, R.R., 1978, Physical and kinetic properties of the nicotinamide adenine dinucleotide-specific glutamate dehydrogenase purified from *Chlorella sorokiniana*, *Plant Physiology*, 61, 967-974.
- Ming, L., Changhong, L., Aron, A., Charles A.S., Thomas, J.S., 2014, Glutamate dehydrogenase: Structure, allosteric Regulation, and role in insulin homeostasis, *Neurochemistry Research*, 39, 433–445.
- Mkrtchyan, G., Aleshin, V., Parkhomenko, Y., Kaehne, T., Luigi Di Salvo, M., Parroni, A., Contestabile, R., Vovk, A., Bettendorff, L., Bunik, V., 2015, Molecular mechanisms of the non-coenzyme action of thiamin in brain: Biochemical, structural and pathway analysis, *Science Reports*, 5, 12583-15609.
- Munwar, N., Engel, P.C., 2012, Overexpression in a non-native halophilic host and biotechnological potential of NAD⁺-dependent glutamate dehydrogenase from *Halobacterium salinarum* strain NRC-36014, *Extremophiles*, 16, 463-476.
- Murray R.K., Bender, D.A., Botham, K.M., Kennelly, P.J., Rodwell, V.W., Weil, P.A., 2009, *Harper illustrated biochemistry*, 28nd ed., Mc Graw Hill Co., New York, 51-83.
- Ocarra, P., Barry S., 1974, Griffin T spacer arms in affinity chromatography - use of hydrophilic arms to control or eliminate nonbiospecific adsorption effects, *The Federation of European Biochemical Societies Letters*, 43, 169- 175.
- Onat, T., Emerk, K., Sözmen, E.Y., 2002, *Enzimler*, İnsan Biyokimyası, Bölüm 5, Palme Yayıncılık, İstanbul, ISBN: 975-8624-20-2, 197-220.
- Ornstein, L., 1964, Disc electrophoresis-I: Background and theory, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 121, 321-349.
- Öncel, M., 2017, *Proteinlerin Yapıları*, In: Paşaoğlu, H., (ed.) Bölüm 5, Pelikan Yayınevi, Temel/Klinik Biyokimya, Ankara, Türkiye, ISBN: 978-605-9029-81-0, 64-72.

- Pahlich, E., Joy, K.W., 1971, Glutamate dehydrogenase from pea roots: Purification and properties of the enzyme, *Canadian Journal of Biochemistry*, 49, 127–138.
- Pamula, F., Wheldrake J.F., 1991, The NAD-dependent glutamate dehydrogenase from *Dictyostelium discoideum*: Purification and properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 291, 225-230.
- Peterson, P.E., Smith, T.J., 1999, The structure of bovine glutamate dehydrogenase provides insights into the mechanism of allostery, *Structure*, 7, 769–782.
- Plaitakis, A., Metaxari, M., Shashidharan, P., 2000, Nerve tissue-specific (GLUD2) and housekeeping (GLUD1) human glutamate dehydrogenases are regulated by distinct allosteric mechanisms: Implications for biologic function, *Journal of Neurochemistry*, 75, 1862–1869
- Plaitakis, A., Zaganas, I., 2001, Regulation of human glutamate dehydrogenases: Implications for glutamate, ammonia and energy metabolism in brain, *Journal of Neuroscience Research*, 66, 899–908.
- Plaitakis, A., Zaganas, I., Spanaki, C., 2013, Deregulation of glutamate dehydrogenase in human neurologic disorders, *Journal of Neuroscience Research*, 91, 1007–1017.
- Prough, R.A., Culver, J.M., Fisher, H.F., 1973, The mechanism of activation of glutamate dehydrogenase-catalyzed reactions by two different, cooperatively bound activators, *Journal of Biological Chemistry*, 248, 8528–8533.
- Ramirez, H., Delgado, M.J., Peregin, E.G., 1977, Some properties of glutamate dehydrogenase from *Agave americana* L. leaves, *Zeitschrift Für Pflanzenphysiologie*, 84, 109-119.
- Rothe, F., Brosz, M., Storm-Mathisen, J., 1994, Quantitative ultrastructural localization of glutamate dehydrogenase in the rat cerebellar cortex, *Neuroscience*, 62, 1133–1146.
- Sanwal, B.D., Lata, M., 1961, The occurrence of two different glutamic dehydrogenases in neurospora, *Canadian Journal of Microbiology*, 7, 319–328.
- Sarıeyyüpoğlu, M., Özcan, M., Barata, S., 2017, Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)’nda deri ensizyonu ile operasyon uygulanması ve balığın canlılığının kontrolü üzerine bir araştırma, *Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 29, 9-13.
- Satyanarayana, U. ve Chakrapani, U., 2013, *Proteins and amino acids*, In: Satyanarayana, U., (ed.) Section 1, Elsevier, A division of Reed Elsevier India Private Limited, Biochemisrty, West Bangal, India, ISBN: 978-81-312-3601-7, 43-68.
- Schimke, R.T., 1976, Protein degradation in vivo and its regulation, *Circulation Research*, 38, 1131-1137.
- Shashidharan, P., Clarke, D.D., Ahmed, N., Moschonas, N., Plaitakis, A., 1997, Nerve tissue-specific human glutamate dehydrogenase that is thermolabile and highly regulated by ADP, *Neurochemistry*, 68, 1804–1811.

- Smith, H.Q., Li, C., Stanley, C.A., Smith, T.J., 2017, Glutamate dehydrogenase, a complex enzyme at a crucial metabolic branch point, *Neurochemical Research*, 44, 117-132.
- Smith, T., Stanley, C., 2008, Untangling the glutamate dehydrogenase allosteric nightmare, *Trends in Biochemical Sciences*, 33, 557–564.
- Smith, T.J., Peterson, P.E., Schmidt, T., Fang, J., Stanley, C., 2001, Structures of bovine glutamate dehydrogenase complexes elucidate the mechanism of purine regulation, *Journal of Molecular Biology*, 307, 707–720.
- Smith, T.J., Schmidt, T., Fang, J., Wu, J., Siuzdak, G., Stanley, C.A., 2002, The structure of apo human glutamate dehydrogenase details subunit communication and allostery, *Journal of Molecular Biology*, 318, 765–777.
- Snoke, J.E., 1956, Chicken liver glutamic dehydrogenase, *Journal of Biological Chemistry*, 223, 271–276.
- Spanaki, C., Kotzamani, D., Petraki, Z., Drakos, E., Plaitakis, A., 2015, Expression of human GLUD1 and GLUD2vglutamate dehydrogenases in steroid producing tissues, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 415, 1–11.
- Spanaki, C., Zaganas, I., Kleopa, K.A., Plaitakis, A., 2010, Human GLUD2 glutamate dehydrogenase is expressed in neural and testicular supporting cells, *Journal of Biological Chemistry*, 285, 16748–16756.
- Spanaki, C., Zaganas, I., Kounoupa, Z., Plaitakis, A., 2012, The complex regulation of human glud1 and glud2 glutamate dehydrogenases and its implications in nerve tissue biology, *Neurochemistry International*, 61, 470–481.
- Spinelli, J.B., Yoon, H., Ringel, A.E., Jeanfavre, S., Clish, C.B., Haigis, M.C., 2017, Metabolic recycling of ammonia via glutamate dehydrogenase supports breast cancer biomass, *Science*, 358, 941-946.
- Staley, K., Mueller, J., Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*), 2000, *Natural Resources Conservation Service*, 13, 1-11.
- Stanley, C.A., Fang, J., Kutyna, K., Hsu, B.Y.L., Ming, J.E., Glaser, B., Poncz, M., 2000, Molecular basis and characterization of the hyperinsulinism/hyperammonemia syndrome of the glutamate dehydrogenase gene, *Diabetes*, 49, 667–673.
- Stanley, C.A., Lieu, Y.K., Hsu, B.Y., Burlina, A.B., Greenberg, C.R., Hopwood, N.J., Perlman, K., Rich, B.H., Zammarchi, E., Poncz, M., 1998, Hyperinsulinism and hyperammonemia in infants with regulatory mutations of the glutamate dehydrogenase gene, *The New England Journal of Medicine*, 338, 1352–1357.
- Stewart, G.R., Rhodes, D., 1977, A comparison of the characteristic of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase from *Lemna Minor* L., *New Phytologist*, 79, 257-268.

- Turano, F.J., Dashner, R., Upadhyaya, A., Caldwell, C.R., 1996, Purification of mitochondrial glutamate dehydrogenase from dark-grown soybean seedlings, *Plant Physiology*, 11, 1357-1364.
- Van De Poll, M.C.G., Soeters, P.B., Deutz, N.E.P., Fearon, K.C.H., Dejong, C.H.C., 2004 Renal metabolism of amino acids: Its role in interorgan amino acid exchange. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 185–197.
- Veronese, F.M., Bevilacqua, R., Boccu', E., Brown, D.M., 1976, Glutamate dehydrogenase from tuna liver. Purification, characteristics and sequence of a peptide containing an essential lysine residue, *Biochimica et Biophysica Acta*, 445, 1- 13.
- Watanabe, M., Hoshino, T., Kikuchi, A., Watanabe, Y., 1999. Purification and characterization of two glutamate dehydrogenase isoenzymes from *Brassica napus*, *Plant Physiology and Biochemistry*, 37, 731–739.
- Yang, C., Sudderth, J., Dang, T., Bachoo, R.G., McDonald, J.G., DeBerardinis, R.J., 2009, Glioblastoma cells require glutamate dehydrogenase to survive impairments of glucose metabolism or Akt signaling, *Cancer Research*, 69, 7986–7993.
- Yang, L., Venneti, S., Nagrath, D., 2017, Glutaminolysis: A hallmark of cancer metabolism, *Annual Review of Biomedical Engineering* 19, 163-194.
- Zhu, J., Lu, K., Xu, X., Wang, X., Shi, J., 2017, Purification and characterization of a novel glutamate dehydrogenase from *Geotrichum candidum* with higher alcohol and amino acid activity, *AMB Express*, 7, 1-13.