

T. C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GLUKOZ-6-FOSFAT DEHİDROGENAZIN KOYUN BEYNİNDEN
SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI ÖZELLİKLERİNİN SAPTANMASI

Cihangir ŞENGEZER

Biyokimya Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. N. Nuray ULUSU

ANKARA
2010

TEŞEKKÜR

Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda sürdürdüğüm yüksek lisans eğitimim süresince göstermiş oldukları destek ve katkılarından dolayı tüm Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı çalışanlarına teşekkür ederim.

Biyokimya'nın karmaşık bölümlerinden biri olan enzimolojinin temellerini oluşturan enzim saflaştırılması ve karakterizasyonu konusuyla beni tanıştıran, klinik açıdan son derece önemli olan glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi ile çalışmamı sağlayan, enzimlerle ilgili temel bilgileri edinmemde büyük emeği geçen ve çalışma disiplini bana kazandırdığı için Prof. Dr. N. Nuray ULUSU'ya içtenlikle teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana göstermiş oldukları ilgi ve destek için Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı araştırma görevlileri ve çalışanlarına teşekkür ederim.

Tüm eğitim yaşamım süresince bana gösterdikleri sevgi, anlayış ve her türlü ekonomik destekleri sayesinde beni bugünlere getiren babam, annem ve kardeşime teşekkür ederim. Ayrıca şu an aramızda olmayan ama varlığını hep hissettiğim, bu yolda ilerlememi öğütleyen sevgili dedeme teşekkür ederim.

Rosmarinik asiti veren Doç. Dr. Ayşe Kuruüzüm-Uz'a ve Novartis İlaç Firması; Imatinib, Dr. F. Frik İlaç Firması ise Kolşisin vererek Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz konusunda daha zengin araştırma olanağı sağladıkları için teşekkür ederim.

Projelerimin gerçekleşmesinde yardımcı olan Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimine teşekkür ederim. Bu tez Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenmiştir (H.Ü.B.A.B. 09D05101001 ve 0701101011).

ÖZET

Şengezer, C. Glukoz-6-fosfat dehidrogenazın koyun beyninden saflaştırılması ve bazı özelliklerinin saptanması. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara 2010. Koyun beyin korteksi glukoz-6-fosfat dehidrogenazı (D-glukoz-6-fosfat: NADP⁺ oksidoredüktaz, E.C. 1. 1. 1. 49) 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite ve DEAE Sepharose Fast Flow iyon değiştirici kromatografisi kullanılarak % 68.33 verimle 9439.61 kez saflaştırıldı. Enzimin molekül ağırlığı, Sephadex G-200 jel elemesi yöntemiyle 64.5 kDa olarak saptandı. SDS poliakrilamid slab jel elektroforezi yöntemi kullanıldığında 61.2 kDa'lık bir tek band elde edildi. Arrhenius eşitliğinden, enzimin aktivasyon entalpisi (ΔH) 6.026 kcal/mol, aktivasyon enerjisi (E_a) 6.689 kcal/mol, sıcaklık artma faktörü Q_{10} ise 1.442 olarak saptandı. Enzimin değişik pH'larda hızları ölçüldüğünde pH 8.0'de maksimum aktivite gösterdiği bulundu. Enzimin kinetik mekanizmasının "Ordered Bi Bi"ye uyduğu belirlenerek, $K_{m_{NADP^+}}$ ve $K_{m_{G6P}}$ sırasıyla 0.0128 ± 0.001 mM, 0.11978 ± 0.010 mM olarak saptandı. Enzimi, NADPH'nin NADP⁺ ile kompetitif tipte, G6P ile kompetitif tipte; 6-PGA'nin de NADP⁺ ile nonkompetitif tipte, G6P ile kompetitif olarak inhibe ettiği ve K_i 'lerinin sırasıyla 0.024 ± 0.008 mM, 0.042 ± 0.002 mM ve 1.96 ± 0.001 mM, 3.579 ± 0.024 mM olduğu saptandı. Ayrıca, koyun beyin korteksi glukoz-6-fosfat dehidrogenazının Cd^{+2} , Hg^{+2} , Pb gibi ağır metal iyonlarından ve Zn^{+2} , Cu^{+2} , Ni^{+2} gibi metal iyonlarından nasıl etkilendiği araştırıldı. Son olarak, Rosmarinik Asit, İmatinib ve Kolşisin gibi ilaç etken maddelerinin enzimi nasıl etkilediği de araştırıldı.

Anahtar Kelimeler: Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, koyun beyin korteksi, saflaştırma, kinetik ve inhibisyon.

Destekleyen Kurumlar: H.Ü.B.A.B., Tez Destekleme (09D05101001 ve 0701101011).

ABSTRACT

Şengezer, C. Purification and characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase from sheep brain. Hacettepe University Institute of Health Sciences, Master of Science Thesis in Biochemistry, Ankara 2010. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (E.C. 1. 1. 1. 49., D-glucose-6-phosphate: NADP⁺ oxidoreductase) was purified from sheep brain cortex, using 2', 5'-ADP Sepharose 4B affinity and DEAE Sepharose Fast Flow ion-exchange chromatography with an overall yield 68.33 % and about 9439.61 fold. The molecular weight of the enzyme was found to be 64.5 kDa by Sephadex G-200 gel filtration chromatography. The purified enzyme gave a single band on SDS polyacrylamide slab gel electrophoresis which corresponded to a molecular weight of 61.2 kDa. From Arrhenius plot; E_a , ΔH and Q_{10} were found to be 6.689 kcal/mole, 6.026 kcal/mole and 1.442, respectively. The enzyme was assayed at different pH and found to be the most active at pH 8.0. The enzyme displayed "Ordered Bi Bi" mechanism; $K_{m_{NADP^+}}$ and $K_{m_{G6P}}$ were found to be 0.0128 ± 0.001 mM, 0.120 ± 0.010 mM, respectively. The inhibition of G6PD by NADPH was found to be competitive with respect to NADP⁺, competitive with respect to G6P whereas 6-PGA inhibition with respect to NADP⁺ was noncompetitive, competitive with respect to G6P and K_i values for NADPH and 6-PGA were 0.024 ± 0.008 mM, 0.042 ± 0.002 mM and 1.96 ± 0.001 mM, 3.579 ± 0.024 mM, respectively. In addition, effects of heavy metal ions as Cd⁺², Hg⁺², Pb and effects of metal ions Zn⁺², Cu⁺², Ni⁺² on sheep brain cortex glucose-6-phosphate dehydrogenase activity were investigated. Finally, effects of some active ingredients in drugs like Rosmarinic Acid, Imatinib and Colchicine on purified enzyme activity were investigated also.

Key Words: Glucose-6-phosphate dehydrogenase, sheep brain cortex, purification, kinetics and inhibition.

Supported by H.Ü.B.A.B., M. Sc. Thesis Grant (09D05101001 ve 0701101011).

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Pentoz Fosfat Yolu (PFY)	2
2.2. Tarihçe	6
2.3. G6PD Enziminin PFY’deki Önemi	8
2.3.1. Anahtar Düzenleyici Olarak Glukoz-6-fosfat Dehidrogenaz	8
2.3.2. Pentoz Fosfat Yolunun Aktivasyonu	8
2.3.3. Oksidatif Stres ve NADPH’in Önemi	9
2.4. G6PD Varyantları	10
2.5. G6PD’nin Klinik Önemi	11
2.5.1. Enzim Eksikliğinin Diğer Etkileri	13
2.6. G6PD Aktivitesinin Düzenlenmesi	14
2.7. G6PD ve Hücrel Büyüme	14
2.8. G6PD’nin Saflaştırılması	15
2.9. G6PD’nin Yapısal Özellikleri	16
2.10. G6PD’nin Substrat Özgüllüğü	19
2.11. G6PD’nin Genel Özellikleri	20
2.11.1. Optimum pH	20
2.11.2. Optimum Sıcaklığı	20
2.11.3. G6PD Enziminin Kinetik Mekanizması	21
2.12. G6PD Enziminin İnhibitörleri	23
2.12.1. G6PD Enzimi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi	23

2.12.2. G6PD Enzimi Üzerine Bazı İlaçların Etkisi	24
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	26
3.1. Araç ve Gereçler	26
3.2. Yöntemler	27
3.2.1. G6PD Enziminin Saflaştırılması	27
3.2.2. G6PD Enziminin Aktivitesinin Saptanması	28
3.2.3. 6-fosfoglukonat Dehidrogenaz Aktivitesinin Saptanması	29
3.2.4. Protein Miktarının Saptanması	29
3.2.4.1. G6PD Enziminin Alt Birim Molekül Ağırlığının SDS-PAGE Yöntemi ile Saptanması	29
3.2.4.2. Glukoz-6-fosfat Dehidrogenaz Enziminin Molekül Ağırlığının Sephadex G-200 Jel Eleme Yöntemi ile Saptanması	30
3.2.5. İstatistiksel Değerlendirme	31
4. BULGULAR	32
4.1. Koyun Beyin Korteksi G6PD Enziminin Saflaştırılması	32
4.2. Koyun Beyin Korteksi G6PD Enziminin Molekül Ağırlığının Saptanması	35
4.2.1. SDS Poliakrilamid Jel Elektrophorezi Yöntemi	35
4.2.2. Sephadex G-200 Jel Elemesi Yöntemi	36
4.3. Koyun Beyin Korteksi G6PD Enziminin Aktivasyon Enerjisinin Saptanması	38
4.4. Koyun Beyin Korteksi G6PD Enzimi Aktivitesi Üzerine pH'ın Etkisi	39
4.5. Koyun Beyin Korteksi G6PD Enziminin Kinetik Davranışı	40
4.5.1. Koyun Beyin Korteksi G6PD Enziminin NADPH ile İnhibisyonu	44
4.5.2. Koyun Beyin Korteksi G6PD Enziminin 6-PGA ile İnhibisyonu	45
4.6. Koyun Beyin Korteksi G6PD Enziminin Bazı Metallerle İnhibisyonu	49
4.6.1. Koyun Beyin Korteksi G6PD Enziminin Çinko(Zn^{+2}) ile İnhibisyonu	49
4.6.2. Koyun Beyin Korteksi G6PD Enziminin Bakır (Cu^{+2}) ile İnhibisyonu	51
4.6.3. Koyun Beyin Korteksi G6PD Enziminin Nikel (Ni^{+2}) ile İnhibisyonu	54

4.6.4. Koyun Beyin Korteksi G6PD Enziminin Kadmiyum (Cd^{+2}) ile İnhibisyonu	56
4.6.5. Koyun Beyin Korteksi G6PD Enziminin Kurşun (Pb) ile İnhibisyonu	59
4.6.6. Koyun Beyin Korteksi G6PD Enziminin Civa (Hg^{+2}) ile İnhibisyonu	60
4.7. Koyun Beyin Korteksi G6PD Enziminin Bazı İlaçlarla İnhibisyonu	64
4.7.1. Koyun Beyin Korteksi G6PD Enziminin Rosmarinik Asit (RA) ile İnhibisyonu	64
4.7.2. Koyun Beyin Korteksi G6PD Enziminin İmatinib ile İnhibisyonu	66
4.7.3. Koyun Beyin Korteksi G6PD Enziminin Kolşisin ile İnhibisyonu	69
5. TARTIŞMA	72
6. ÖZGEÇMİŞ	83
KAYNAKLAR	85
EKLER	101
EK. 1. Değişik İnhibisyon Tiplerinin Formülleri	101

SİMGELER VE KISALTMALAR

2,3-DPGA	: 2,3-difosfogliserik asit
2-dG6P	: 2-deoksiglukoz-6-fosfat
2-ME	: 2-Merkaptoetanol
6-PGD	: 6-fosfoglukonat Dehidrogenaz
6-PGA	: 6-fosfoglukonat
ADP	: Adenozin difosfat
AHA	: Akut Hemolitik Anemi
ATP	: Adenozin trifosfat
Al ⁺³	: Alüminyum
Ca ₃ (PO ₄) ₂	: Kalsiyum fosfat
Cd ⁺²	: Kadmiyum
Co ⁺²	: Kobalt
CO ₂	: Karbon dioksit
Cu ⁺²	: Bakır
DEAE	: Dietilaminoetil
DNA	: Deoksiribonükleik asit
E-4P	: Eritroz-4-fosfat
EDTA	: Etilen diamin tetraasetik asit
EGF	: Epidermal Growth Factor
ERK	: Ekstra sellüler sinyal-regüle edilen kinaz
Fe ⁺²	: Demir
G6P	: Glukoz-6-fosfat
G6PD	: Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz
GA3P	: Gliseraldehit-3-fosfat
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: Redükte glutasyon

GSSG	: Okside glutatyon
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
H ₂ KPO ₄	: Amonyum sülfat
Hg ⁺²	: Civa
L-DOPA	: L-3,4-dihidroksifenilalanin
Mg ⁺²	: Magnezyum
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
Mn ⁺²	: Mangan
NAD ⁺	: Okside nikotinamid adenin dinükleotit
NADP ⁺	: Okside nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NADPH	: Redükte nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
Ni ⁺²	: Nikel
NO	: Nitrik oksit
Pb	: Kurşun
PDGFR	: Trombosit-ilışkili büyüme faktörü reseptörü
PMS	: Fenazin sülfat
PRPP	: 5-fosforibozil-1-pirofosfat
PFY	: Pentoz Fosfat Yolu
ROT	: Reaktif oksijen türevleri
RNA	: Ribonükleik asit
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat – Poliakrilamid jel elektroforezi
Zn ⁺²	: Çinko
ZnSO ₄	: Çinko sülfat

ŞEKİLLER

	Sayfa
1.1. Pentoz Fosfat Metabolik Yolu	2
2.1. PFY'nin oksidatif bölümü	5
2.2. PFY'nin oksidatif olmayan bölümü	6
4.1. Koyun beyin korteksi G6PD enziminin 2', 5'-ADP Sepharose 4B kolonundan elüsyon profili	33
4.2. Koyun beyin korteksi G6PD enziminin DEAE Sepharose Fast Flow kolonundan elüsyon profili	34
4.3. Koyun beyin korteksi G6PD enziminin SDS-PAGE elektroforegramı	35
4.4. Koyun beyin korteksi G6PD enziminin SDS-PAGE yöntemi ile molekül ağırlığının belirlenmesi	36
4.5. Sephadex G-200 jel elemesi yöntemi ile koyun beyin korteksi G6PD enziminin elüsyon profili	37
4.6. Sephadex G-200 jel elemesi yöntemi ile koyun beyin korteksi G6PD enziminin molekül ağırlığının belirlenmesi	37
4.7. Koyun beyin korteksi G6PD enzimi için Arrhenius grafiği	39
4.8. Koyun beyin korteksi G6PD enzimi için pH grafiği	39
4.9. Koyun beyin korteksi G6PD enziminin hız (v) – NADP⁺, Michaelis – Menten grafiği	40
4.10. Koyun beyin korteksi G6PD enziminin hız (v) – G6P, Michaelis – Menten grafiği	41
4.11. Koyun beyin korteksi G6PD enzimi için, sabit NADP⁺ derişimlerinde 1/[G6P]'ye karşı 1/v değerleri grafiği	41
4.12. Koyun beyin korteksi G6PD enzimi için, sabit NADP⁺ derişimlerinde 1/[NADP⁺]'ye karşı 1/v değerleri grafiği	42
4.13. “Bi Bi” mekanizmaları	46

4.14. Sabit G6P derişiminde (0.4 mM), NADPH'nin, NADP^{+} 'nin enzime bağlanmasına olan etkisi	47
4.15. Sabit NADP^{+} derişiminde (0.2 mM), NADPH'nin, G6P'nin enzime bağlanmasına olan etkisi	47
4.16. Sabit G6P derişiminde (0.4 mM), 6-PGA'nın, NADP^{+} 'nin enzime bağlanmasına olan etkisi	48
4.17. Sabit NADP^{+} derişiminde (0.2 mM), 6-PGA'nın, G6P'nin enzime bağlanmasına olan etkisi	48
4.18. Koyun beyin korteksi G6PD enziminin Zn^{+2} ile inhibisyonu	50
4.19. Sabit NADP^{+} derişiminde (0.1 mM), değişken G6P ve Zn^{+2} konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiği	50
4.20. Sabit G6P derişiminde (0.4 mM), değişken NADP^{+} ve Zn^{+2} konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiği	51
4.21. Koyun beyin korteksi G6PD enziminin Cu^{+2} ile inhibisyonu	52
4.22. Sabit NADP^{+} derişiminde (0.1 mM), değişken G6P ve Cu^{+2} konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiği	53
4.23. Sabit G6P derişiminde (0.4 mM), değişken NADP^{+} ve Cu^{+2} konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiği	53
4.24. Koyun beyin korteksi G6PD enziminin Ni^{+2} ile inhibisyonu	55
4.25. Sabit NADP^{+} derişiminde (0.1 mM), değişken G6P ve Ni^{+2} konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiği	55
4.26. Sabit G6P derişiminde (0.4 mM), değişken NADP^{+} ve Ni^{+2} konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiği	56
4.27. Koyun beyin korteksi G6PD enziminin Cd^{+2} ile inhibisyonu	57
4.28. Sabit NADP^{+} derişiminde (0.1 mM), değişken G6P ve Cd^{+2} konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiği	58
4.29. Sabit G6P derişiminde (0.4 mM), değişken NADP^{+} ve Cd^{+2} konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiği	58
4.30. Koyun beyin korteksi G6PD enziminin Pb ile inhibisyonu	60
4.31. Sabit NADP^{+} derişiminde (0.1 mM), değişken G6P ve Pb konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiği	60

4.32. Sabit G6P derişiminde (0.4 mM), değişken NADP ⁺ ve Pb konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiği	61
4.33. Koyun beyin korteksi G6PD enziminin Hg ⁺² ile inhibisyonu	62
4.34. Sabit NADP ⁺ derişiminde (0.1 mM), değişken G6P ve Hg ⁺² konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiği	63
4.35. Sabit G6P derişiminde (0.4 mM), değişken NADP ⁺ ve Hg ⁺² konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiği	63
4.36. Koyun beyin korteksi G6PD enziminin RA ile inhibisyonu	65
4.37. Sabit NADP ⁺ derişiminde (0.1 mM), değişken G6P ve RA konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiği	65
4.38. Sabit G6P derişiminde (0.4 mM), değişken NADP ⁺ ve RA konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiği	66
4.39. Koyun beyin korteksi G6PD enziminin Imatinib ile inhibisyonu	67
4.40. Sabit NADP ⁺ derişiminde (0.1 mM), değişken G6P ve Imatinib konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiği	68
4.41. Sabit G6P derişiminde (0.4 mM), değişken NADP ⁺ ve Imatinib konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiği	68
4.42. Koyun beyin korteksi G6PD enziminin Kolşisin ile inhibisyonu	70
4.43. Sabit NADP ⁺ derişiminde (0.1 mM), değişken G6P ve Kolşisin konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiği	70
4.44. Sabit G6P derişiminde (0.4 mM), değişken NADP ⁺ ve Kolşisin konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiği	71

TABLOLAR

	Sayfa
2.1. Çeşitli kaynaklardan saflaştırılan G6PD’lerin özgül aktiviteleri ve saflaştırma oranları	7
2.2. G6PD eksikliği olan kişilerde alınmaması gereken ilaç ve kimyasallar	12
2.3. Değişik kaynaklardan saflaştırılan G6PD’lerin monomer, dimer ve tetramer formlarının molekül ağırlıkları (dalton)	18
2.4. Değişik kaynaklı G6PD’lerin kinetik parametreleri	22
4.1. Koyun beyin korteksinden G6PD enziminin saflaştırılması	34
4.2. Statistica istatistik paket programı kullanılarak G6PD enzimi için ölçülen hızların uyguladığı mekanizmalar, kinetik sabitler ve “loss” değerleri	43
5.1. G6PD ‘nin katalizlediği tepkime için ürün inhibisyonu tipleri (G6P birinci substrat olarak alındığında)	76
5.2. G6PD ‘nin katalizlediği tepkime için ürün inhibisyonu tipleri (NADP ⁺ birinci substrat olduğunda)	77

1. GİRİŞ

Pentoz fosfat yolu (PFY), indirgeyici güç olarak kullanılan ve oksidatif hasara karşı korunmada önemli olan NADPH'nin ve nükleik asit sentezi için gerekli olan riboz-5-fosfat'ın sentezlendiği sitozolik bir yoldur (1).

Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) (D-glukoz-6-fosfat; NADP^+ oksidoredüktaz, EC 1. 1. 1. 49) PFY'nin oksidatif bölümünde yer alan bir enzimdir. G6PD, glukoz-6-fosfat'ın (G6P) oksitlenerek, molekül içi ester olan 6-fosfoglukono- δ -laktone dönüşümünü katalizler. NADP^+ elektron alıcısıdır ve tüm denge NADPH üretimi yönündedir (2, 3). G6PD tarafından katalizlenen reaksiyon, G6P'nin pentoz fosfat yoluna girişini kontrol eder ve geri dönüşümsüzdür. G6PD enziminin kontrolünde $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ 'in oranı önemlidir (4). NADP^+ , G6PD enzimi için oldukça özgül bir koenzimdir. Enzimin katalizlediği reaksiyonun en önemli ürünü NADPH'dir. Bu ürün hücrede yağ asitlerinin, kolesterolün, steroidlerin, bazı amino asitlerin sentezi ve glutatyon'un (GSH) indirgenmesinde görev alır. Böylece hücrede oksidatif strese karşı savunucu görev üstlenir (3, 4).

Beyin dokusunda yağ asitleri, glukozdan sentez edilir (5). Beyin hücresi, yüksek miktarda lipid içermesi ve oksijen kullanımının çok fazla olması nedeniyle, lipid peroksidasyon hızı en yüksek olan dokulardan biridir (6-8). Alzheimer, Parkinson ve Multiple Skleroz gibi çeşitli hastalıklarda serbest radikallerin artmasına bağlı olarak gelişen lipid peroksidasyonunun önemli rol oynadığı ileri sürülmektedir (6, 9).

G6PD aktivitesi nöron tiplerine göre farklılık göstermekle birlikte, bu değişkenlik hücre içerisindeki NADPH bağımlı reaksiyonların artışına, bu reaksiyonların sayısına ve oksidatif stresin seviyesine paralel olarak değişmektedir (10).

Tümör hücrelerinde, nükleik asitlerin sentezi için glukoz kullanılır. Nükleik asitlerin şeker bileşeni riboz, PFY veya glikolitik ara ürünlerden sentezlenir (11). PFY'yi düzenleyen G6PD enzimi, tümör hücrelerinde yüksek aktivite gösterir (12).

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Pentoz Fosfat Yolu (PFY):

Pentoz Fosfat Yolu'nun (PFY) mikroorganizmalarda, bitkilerde ve hayvanlarda bulunduğu gösterilmiştir (13). PFY ' da bulunan enzimler tüm dokularda, çoğunlukla sitozol olmak üzere; endoplazmik retikulum, peroksizom, kloroplast, lizozom ve mitokondri gibi çeşitli organellerde bulunmaktadır (13-16). PFY, yağ asidi ve steroid sentezinin yoğun olduğu böbrek üstü bezi, süt veren meme dokusu, adipoz dokusunda, adrenal korteks ve karaciğerde en yüksek aktiviteye sahiptir. Ayrıca; akciğer, beyin, böbrek, bağırsak mukozasında da oldukça aktiftir. Yağ sentezinin düşük olduğu kas gibi dokularda PFY'nin aktivitesi düşüktür (17).

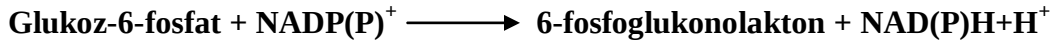
PFY, iki özgül işlevi yerine getiren iki farklı evreden oluşur. Birinci evre, oksidatif ve geri dönüşümsüz evredir; G6P'yi pentoz fosfat'a ve CO₂'ye çevirirken NADP⁺'nin NADPH'a indirgenmesini sağlar. İkinci evre, oksidatif olmayan geri dönüşümlü evredir; pentoz fosfatları glikolitik ara ürünlere dönüşmesini sağlar (3). PFY'deki reaksiyonların hızı ve yönü, döngüdeki ara ürünlere olan gereksinime bağlı olarak değişiklik gösterir (4). PFY'nin bir diğer işlevi, DNA ve RNA sentezi için gerekli olan riboz-5-fosfat'ı sağlar. Hızlı çoğalan tümör hücrelerinde PFY'nun hızı yüksektir. Ayrıca, aromatik amino asit ve vitamin sentezinde gerekli eritroz-4-fosfat, bakteri hücre duvarının bir bileşeni olan sedoheptuloz-7-fosfat gibi fosforile karbohidratlar da bu metabolik yol ile sentezlenir (3).

NADPH indirgeyici güç formunda kimyasal enerji taşır ve anabolik tepkimelerde indirgeyici olarak kullanılır (3).

PFY iki evreden oluşur (3) :

1. Oksidasyon evresi:

PFY'nun oksidatif evresi G6P'nin dehidrogenasyonu ile başlar. Reaksiyon G6PD enzimiyle katalizlenir ve NADP^+ indirgenerek NADPH oluşturulur. G6PD PFY oksidatif evresinde yer alan ilk ve hız-kısıtlayıcı bir enzim olup, G6P'nin 6-fosfoglukonolaktona

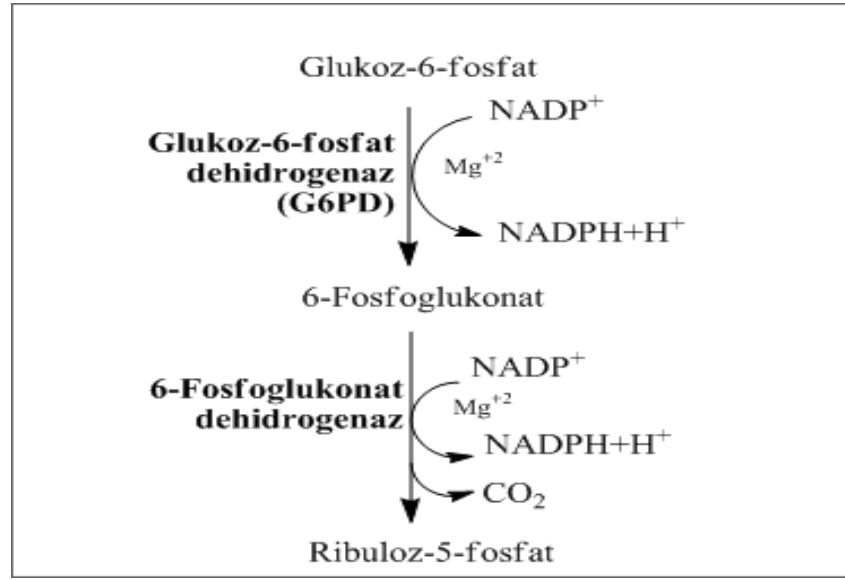


dönüşümünü katalizler (3). Bu tepkimede oluşan 6-fosfoglukonolakton, hızlı ve geri-dönüşümsüz olarak özgül bir laktonaz ile 6-fosfoglukonata dönüşür. Takip eden tepkime ise 6-fosfoglukonat dehidrogenaz (6-PGD) tarafından katalizlenir (1):



Tepkimelerde kullanılan NADP^+ , proton ve elektron alıcısıdır ve sonuç olarak iki mol NADPH sentezlenir. Sentezlenen ketopentoz ribuloz-5-P'nin bir kısmı fosfopentoz epimeraz ile ksiloz-5-fosfat'a dönüşürken bir kısmı da, fosfopentoz izomeraz enzimi ile bir aldoz izomeri olan riboz-5-fosfat'a dönüşür (Şekil 2.1.). Bazı dokularda PFY bu noktada son bulur (3) ve toplam tepkime aşağıda gösterilmektedir:



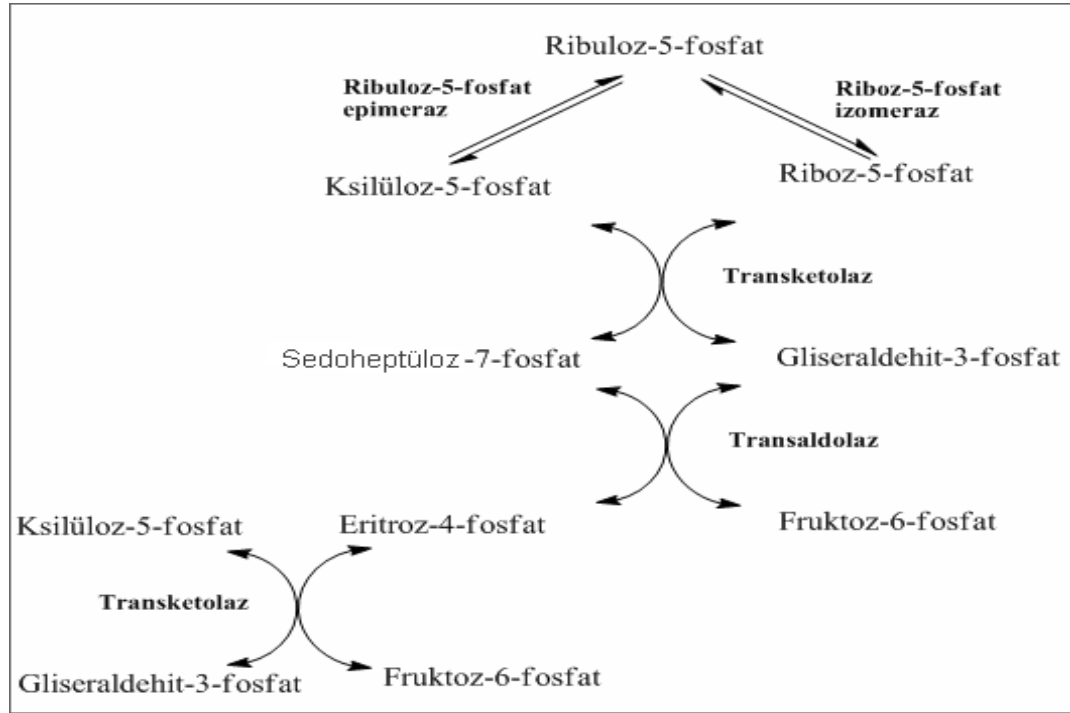


Şekil 2.1. PFY'nin oksidatif bölümü (3).

Bazı dokularda ise PFY bu noktada sonlanmaz ve oksidatif olmayan tepkimelerde şeker fosfatlar sentezlenir (3).

2.) Oksidatif Olmayan Evre:

Oksidatif olmayan evrede 3, 4, 5, 6 ve 7 karbonlu şeker fosfatlar sentezlenir. PFY'nin bu evresinde oksidatif faz ile oluşan ribuloz-5-fosfat, riboz-5-fosfat izomeraz enzimi ile riboz-5-fosfat'a izomerize olur. Aynı zamanda ribuloz-5-fosfat epimeraz enzimiyle de ksiluloz-5-fosfat'a geri dönüşümlü olarak epimerize olur. Riboz-5-fosfat, nükleotidlerin ve nükleik asitlerin içeriğine katılır (3). PFY'de oksidatif evrenin aktivitesi her zaman oksidatif olmayan evrenin aktivitesinden daha yüksektir. Çünkü NADPH'a duyulan gereksinim, riboz fosfata duyulan gereksinimden fazladır (17). Oksidatif olmayan kademedeki tepkimeler tersinirdir. Bu sayede heksoz fosfatlar ve pentoz fosfatlar birbirine dönüştürülür. Böylece canlılar, NADPH ve pentoz gereksinimlerini karşılamış olur ve PFY tepkimeleriyle glikoliz ara bileşikleri de sentezlenmiş olur (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. PFY'nin oksidatif olmayan bölümü (3).

2.2. Tarihçe

PFY'nin ilk basamağını katalizleyen, hız-kısıtlayıcı özellikteki G6PD, 1931 yılında ilk önce at eritrositlerinde daha sonra memeli eritrositlerinde ve bira mayasında gösterilmiştir. Bu çalışmada enzim "*Zwischenferment*" olarak isimlendirmiştir (13). G6PD eksikliği 1950'li yılların başında sıtma ilacı olan primakin alımından sonra hemolitik kriz geçiren hasta grubunda tanımlanmıştır. G6PD eksikliği, keşfinden sonraki ilk 10 yılda daha çok klinik olarak incelenmiş, daha sonraki yıllarda ise enzimin çeşitli varyantları araştırılmaya başlanmıştır (18). Enzim saf olarak ilk kez 1960'lı yıllarda bira mayasından Noltmann, Glibler ve Kuby tarafından; sığır meme bezinden, Julian, Wolfe ve Reithel tarafından kristal formda elde edilmiştir (19, 20). McKerns ve Kaleita, Marks ve Banks ise steroid hormonların G6PD enzimi üzerinde *in vitro* etkilerini göstermişlerdir (20). Enzimin en yüksek saflık derecesinde saflaştırılması 1966 yılında Yoshida tarafından yapılmıştır (21). Bu çalışmaların ardından çeşitli bitki, hayvan ve

mikroorganizmalardan bu enzimin saflaştırılması ve kinetikleri üzerine çalışmalar başlatılmıştır. Değişik canlılardan elde edilen G6PD'lar ile ilgili bilgiler toplu olarak Tablo 2.1.'de verilmiştir.

Tablo 2.1. Çeşitli kaynaklardan saflaştırılan G6PD'lerin özgül aktiviteleri ve saflaştırma oranları.

Yıllar	Canlı ve Doku	Özgül Aktivite	Saflaştırma Oranı	Kaynak
1955	<i>L.mesenteroides</i>	16.5	10	22
1966	İnsan Eritrositi	730	258000	21
1972	<i>Penicillium</i>	66	34	23
1973	<i>C. utilis</i>	510	1300	24
1974	Rat meme bezi	104	18	25
1984	Maya	370	2308	26
1985	<i>B. stearothermophilus</i>	100	3177	2
1996	Rat Beyini	428	12969	27
1999	Şıyr Lensi	2.64	19700	28
2001	Tavşan Beyini	227	4053	29
2002	Köpek Karaciğeri	130	2000	30
2003	<i>Bubalus bubalis</i> Eritrositi	70	650	31
2005	Kuzu Böbreği	16.81	4202	32
2006	Koyun Böbreği	27.69	1384	33

2.3. G6PD Enziminin PFY'deki Yeri ve Önemi

2.3.1. Anahtar düzenleyici olarak G6PD

PFY'nin ana düzenleyicisi G6PD'dir. Bu enzim, G6P'nin PFY'ye geçişini kontrol eder. G6PD aktivitesi; bütün hücre tiplerinde ve dokularda, hormonlar, besinler ya da oksidatif stres gibi dış uyarıcı faktörlere bağlı olarak değişir. Bununla birlikte beyin G6PD'si için, bu faktörlere bağlı enzim düzenlemelerine ilişkin sınırlı bilgi mevcuttur (34). G6PD aktivitesi, substratları G6P ve NADP^+ ve NADPH 'nin hücresel değişimiyle kontrol edilir. NADPH , beyin G6PD'nin etkili bir kompetitif inhibitörüdür. NADPH 'in K_i değeri NADP^+ 'nin K_m değerinden daha düşüktür. Bu nedenle sitozolik $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ oranı G6PD aracılığıyla metabolitlerin PFY'ye akışını belirler (27). PFY normal koşullarda, beyindeki toplam G6P tüketiminin yalnız bir kısmından sorumludur (34). PFY, beyin hücrelerinde nitrik oksit (NO) ve nitrosatif stresten etkilenir (35).

2.3.2. Pentoz Fosfat Yolunun Aktivasyonu

Hücredeki NADPH 'in oksidasyonu, eş zamanlı olarak G6PD inhibitörü olan NADPH 'i azaltır ve NADP^+ 'in hücresel konsantrasyonunu artırarak G6PD aktivitesinde artışa neden olur. G6PD aktivitesindeki artış, PFY'nin aktivasyonuna neden olur. NADPH 'i kimyasal olarak oksitleyebilen fenazin metasülfatın (PMS) beyin dokusunda *in vivo* (36), beyin kesitlerini *in vitro* olarak (37) aktive ettiği saptanmış. Diğer araştırmacılar tarafından PMS ile yapılan çalışmalarda sinaptozomda da PFY'lunu aktive ettiği belirtilmiştir (38).

2.3.3. Oksidatif Stres ve NADPH'ın Önemi

İnsanlarda reaktif oksijen türevleri (ROT); aterom, astım, eklem hastalıkları, yaşlanma ve kanser gibi çeşitli nedenlere ile oluşur (39). ROT'ları nükleik asitler, lipitler ve proteinler ile tepkimeye girerek yapı ve fonksiyon kayıplarına uğramasına yol açar (40). Oksidatif ajanlardan kaynaklanan hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit anyonu (O_2^-) ve serbest hidroksil radikalleri (OH^-) hücre için son derece toksiktir (41). Oksijenli solunum metabolizması esnasında, peroksitler ve oksijen radikalleri gibi ROT'lar, memeli hücrelerinde solunum zinciri ürünleri ile sürekli olarak üretilir (42).

PFY'nin oksidatif kısmı geri-dönüşümsüz iki reaksiyonda oluşan redükte NADPH'lar;

- Okside glutatyonun (GSSG) indirgenmesinde,
- DNA, RNA ve nükleotid koenzimlerin sentezi sırasında ribonükleotidlerin deoksiribonükleotidlere dönüştürülmesinde,
- Nörotransmitter sentezinde [nitrik oksit (NO)],
- Yağ asitlerinin biyosentezi ve zincir uzatma reaksiyonlarında,
- Kolesterol sentezinde,
- Steroidlerin biyosentezinde,
- Bazı aromatik amino asitlerin biyosentezinde,
- Peroksitlerin, ilaçların ve ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda,
- Methemoglobinin hemoglobine dönüşümünde,
- Glukuronik asit yolunda,
- L-askorbik asit sentezinde,
- Hücre zarının bütünlüğünün korunmasında kullanılır (1, 3, 4, 43).

2. 4. G6PD Varyantları

G6PD'nin yapısını oluşturan gen X kromozomunun q28 lokusunda yerleşmiştir. G6PD geni 13 eksondan ve 12 introndan oluşur (44). Genin tam sekans analizi, 1991 yılında Chen ve diğ. (45) tarafından yapıp tanımlanmıştır.

Mutant genler, normal enzim yerine varyant enzim sentezlerler. Dünyada 400'den fazla anormal varyant saptanmış ve bu anormal varyantların özellikleri tanımlanmıştır (46). Normal aktivite gösteren enzim G6PDB+'dır. En çok rastlanılan varyantlar G6PDA, G6PDA⁻ ve Akdeniz (Mediterranean) varyantlardır (47). DNA düzeyinde meydana gelen çeşitli nokta mutasyonlar çoğunlukla enzimin substrat bağlanma bölgesinde yer alan aminoasitleri etkiler ve enzimin aktivite göstermesi için gereken protein katlanmalarına ve dimerizasyonuna engel olur (48).

G6PD varyantları, enzim aktivitesi ve neden oldukları hastalıklara göre 5 sınıfa ayrılır (49):

1. Kalıtsal non-sferositik hemolitik anemiye neden olan varyantlar
2. Hemolitik aneminin görülmediği varyantlar
3. Enzim aktivitesinde hafif derecede düşüş gösteren varyantlar
4. Enzim eksikliği görülmeyen varyantlar
5. Enzim aktivitesi yüksek olan varyantlar

2.5. G6PD'nin Klinik Önemi

G6PD eksikliği dünyada en yaygın olarak görülen enzim hastalığıdır ve 400 milyondan fazla sayıda insanı etkilemektedir (50). G6PD eksikliği 1956 yılında bulunmuştur. G6PD eksikliğinin en önemli belirtileri neonatal sarılık, favizm ve hemolitik anemidir. Şiddetli eksikliğinde ise kronik non-sferositik anemi görülür (49).

G6PD eksikliğine sahip olan insanların hemen hemen tamamında klinik anlamda belirti görülmez. Bu bireyler oksidatif strese maruz kaldıklarında veya bazı ilaçları kullandıklarında semptomlar açığa çıkar. G6PD eksikliğinin, bu enzimin varyantlarını taşıyan bireylerin yaşam süreleri üzerine etkisi yoktur (51).

Taze bakla başta olmak üzere, kurutulmuş veya dondurulmuş bakla yedikten 24 saat sonra hemoglobinüri şeklinde kendini gösteren Akut Hemolitik Anemi (AHA) olgusuna “favizm” denir (52). Bu kişilerde G6PD aktivitesi düşüktür. G6PD aktivitesi düşük olan kişiler yeteri kadar NADPH sentezleyemedikleri için oksidatif strese karşı oldukça dayanıksızdırlar. Bu nedenle diyetle bakla alan kişilerde, baklanın yapısında bulunan *divicine* ve *izouramil* gibi oksidan bileşikler, hücrelerdeki indirgenmiş glutatyonu (GSH) tüketir ve akut hemolitik anemiye neden olur. Aslında *divicine* ve *izouramil* baklanın yapısında yoktur. Baklanın yapısında inaktif β -glikozidler olan *vicine* ve *convicine* vardır. Bu bileşikler β -glikozidaz enzimi tarafından parçalandığında aktif *divicine* ve *izouramil* açığa çıkar (53, 54). Bu bileşikler redoks siklusuna girip redükte glutatyonu tüketir, bu sayede serbest radikal ve H_2O_2 oluşumuna yol açarlar. G6PD enzim eksikliğinde yeterli miktarda NADPH yapılamaz ve GSSG, GSH haline dönemediğinden, hücre ROT'lara maruz kalır. Bunun sonucunda hemoglobinin hem yapısının iç kısmında aminoasit yer değişimlerine neden olur. Aminoasit yer değişimleri ise hemoglobinin ikincil ve tersiyer yapısını değiştirerek Heinz cisimcikleri halinde çökmesine sebep olur. Heinz cisimcikleri eritrosit membranına yapışarak hemolize neden olur (54, 55).

G6PD eksikliği olan kişiler bazı ilaçları kullandıklarında hemoliz meydana gelir. İlaç kullanımına bağlı olarak oluşan belirtiler favizmdekine benzerdir. Hemolizi gerçekleştiren ilaçların (Tablo 2.2.) temel özelliği oksidan ajan olmalarıdır (56).

Tablo 2.2. G6PD eksikliği olan kişilerde alınmaması gereken ilaç ve kimyasallar (53).

Asetanilid	Sulfasetamid
Furazolidon (Furoxone)	Sulfametoksazol
Metilen Mavisi	Sulfanilamid
Nalidiksik asit (NegGram)	Sulfapiridin
Naftalen	Tiyazolsulfan
Niridazol	Toludin Mavisi
İzobütil nitrat	Trinitrotoluen (TNT)
Nitrofurantoin (Furadantin)	Ürat oksidaz
Fenazopiridin (Piridium)	Fenilhidrazin
Primakin	

Neonatal sarılık, yaşamı ve sağlığı en çok tehdit eden G6PD enzimopati sonuçlarından biridir ve tedavi edilmediğinde özellikle bebeklerde bilirubin ensefalopatisine (kernikterus) neden olabilir. Bu ciddi sağlık sorunları, erken dönemde fototerapi ile önlenmektedir. Sıklıkla Akdeniz ve Asya’da görülmektedir (52, 57).

G6PD enziminin şiddetli eksikliğinde kronik non-sferositik hemolitik anemi meydana gelir. İnsan G6PD geninde 130’dan fazla mutasyon tanımlanmış ve 80’den fazla varyant ise kronik non-sferositik anemi ile ilişkilendirilmiştir. Kronik hemoliz, genelde hafif veya orta şiddette ortaya çıkar. Ancak seyrek rastlanan bazı G6PD varyantlarında, sürekli kan transfüzyonu gerektirecek kadar şiddetli olabilen hemolitik krizler görülmektedir. Mutasyonlar, korunmuş aminoasitlerin değişimi ile sonuçlanır. Kronik non-sferositik anemiye neden olan G6PD varyantlarındaki mutasyonların büyük bir kısmı, enzimin substrat bağlama bölgesinde bulunur. Bu mutasyonlara sahip eritrositlerde küresel yapı bozulur, anemi ve bilirubin değerleri artar (51).

Afrika’da G6PD-A⁻ varyantı yaygın olarak görülür. Bu alelleri taşıyan heterozigot bayanlar ve hemizigot erkeklerde, *P. falciparum* sıtmasına karşı koruduğu ileri sürülmüştür (49). G6PD eksikliğinin olduğu eritrositlerdeki sıtma parazitin gelişiminin normal eritrositlerden daha yavaş olduğu saptanmıştır (52).

2.5.1. Enzim Eksikliğinin Diğer Etkileri

Oksidatif stresin artması aynı zamanda NO sentezinin veya salınımının azalması sonucunda oluşan hipertansiyon, *diabetes mellitus* ve ateroskleroz gibi patolojik durumların ortaya çıkması G6PD enzim eksikliğinden kaynaklanır. Poliol metabolik yolunda, G6PD eksikliği ise hiperglisemiye yol açar (58).

Enzim eksikliği olan bireylerde bakteriyel ve viral enfeksiyonların örneğin; hepatit A ve hepatit E’nin yol açtığı oksidatif metabolitlerin hemolize neden olduğu belirtilmiştir (59).

Alzheimer hastalarının temporal korteks kısmında lipit peroksidasyonundaki artışla paralel olarak G6PD aktivitesinde de artış gözlemlenirken, aynı kişilerin hipokampus bölgelerinde G6PD aktivitesinde bir düşüş gözlemlenmiştir. Alzheimer hastalarının hipokampus ve serebellumlarında artış gösteren G6PD immünoaktivitesinin ve tüm beyin dokularında gözlenen yüksek G6PD aktivitesinin, antioksidan savunmada gerekli olan NADPH ihtiyacının dengelenmesi için gerekli olduğu düşünülmektedir (60, 61).

G6PD’nin önemli bir görevi de, özellikle çoğalan hücrelerde nükleik asitlerin yapısına giren ribozu ve deoksiribozu sağlamaktır (62). Roth ve diğ. (63), G6PD eksikliği görülen alyuvarlarda, PFY aktivitesinde görülebilecek bir azalmaya bağlı olarak, nükleotid üretiminde kilit metabolit olan riboz ya da riboz türevlerinin metabolik yolda hasarlı üretimiyle sonuçlanabildiğini gösterdiler (63).

2.6. G6PD Aktivitesinin Düzenlenmesi

G6PD aktivitesinin düzenlenmesi; NADPH konsantrasyonu, diyet ve hormonal faktörlere bağlı olarak gerçekleşir (34). İnsulin ve glukokortikoidler G6PD regülasyonu ile ilişkili hormonlardır; ayrıca tiroid gibi diğer hormonlar da G6PD salınımını uyarır. Substrat seviyesindeki kontrol ise $[NADP^+ / NADPH]$ oranına bağlı olup kısa sürede etki eder (4, 64). Karbonhidrattan zengin beslenme G6PD aktivitesini artırırken, poliansatüre yağ içeren diyetler G6PD aktivitesini inhibe eder. Glukoz ve fruktoz hepatik G6PD aktivitesini hormonlardan bağımsız olarak yükseltir (65). G6PD regülasyonunda açlık ve tokluk durumlarında insülin ve glukagon rol oynar. Tiroid ve adrenal bezlerdeki hormonlarda G6PD aktivitesini düzenler. İnsülin ve triiyodotironin (T_3), G6PD aktivitesini ve mRNA ekspresyonunu artırırken, glukagon ise ters etki gösterir (66). Rat iskelet kasındaki G6PD, nötrofik faktörlerce sağlanan aksonal büyümeyle ilgili olarak kontrol edilir (67).

2.7. G6PD ve Hücresel Büyüme

G6PD aktivitesindeki değişiklikler hücre büyüme hızındaki değişikliklerle paraleldir. Nükleotid biyosentezi için riboz 5-fosfatın sentezi gereklidir. Hücrenin redoks durumunu düzenlenmesinde G6PD rol oynar. G6PD aktivitesinin çoğalan nodüller ve tümörlerde arttığı saptanmıştır (68, 69). Serum Epidermal Growth Faktör (EGF) ve platelet büyüme faktörü gibi büyümeyi uyaran faktörler, fibroblastta ve epitelial hücre hatlarında G6PD aktivitesini ve DNA sentezini artırır (70, 71). EGF'de olduğu gibi hepatosit büyüme faktörünün uyarılması da G6PD aktivitesinde ve DNA sentezinde paralel değişikliklerle sonuçlanır (72, 73). G6PD aktivitesinin büyüme faktörleri tarafından düzenlendiği saptanmış; fakat bu düzenlenmenin 6-PGD enzimi için geçerli olmadığı saptanmıştır. Büyüme reseptörlerinin (EGF ve PDGF) tirozin kinaz aktivitesi olduğu için G6PD regülasyonunda farklı bir kontrol mekanizma ile regüle edildiği düşünülmektedir. G-proteinleri enzimin regülasyonunda görev almaktadır (70).

2.8. G6PD'nin Saflaştırılması

Enzimin saflaştırılmasında ilk yıllarda kalsiyum fosfat $[Ca_3(PO_4)_2]$ jel adsorbsiyonu (22), takip eden çalışmalarda ise DEAE-selüloz (74), karboksimetil selüloz (21), DEAE-Sephadex, CM-Sephadex, Sephadex G-200 kolonları kullanılmıştır (75, 76). Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda, yukarıdaki yöntemlere ilave olarak, jel filtrasyon kromatografisi, hidroksiapatit kolon kromatografisi, etanol çöktürmesi ile ultrasantrifügasyon metodları uygulanmıştır (25, 77). Enzimin saflaştırılmasında tamponun pH'sı, konsantrasyonu, akış hızı, kolona yüklenen protein miktarı, ligandların geliştirilmesiyle birlikte G6PD enzimi kısa sürede ve daha iyi bir verimle saflaştırılabilmektedir (78).

Afinite kromatografisi kolonlarından $NADP^+$ -Sephrose-4B (79) ve 2'-5'-ADP-Sephrose 4B (80) kullanılarak enzim çok kısa sürede ve yüksek aktiviteyle saflaştırıldığı çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir. Enzimin afinite kolonundan elüsyonu ise $NADP^+$ ile yapılmaktadır (78). G6PD ayrıca, Purwantini ve Daniels (81) tarafından *Mycobacterium smegmatis*'den; Fenil-Sephrose, F_{420} -eter-bağlı aminoheksil-Sephrose-4B afinite kromatografisi ve kuaterner aminoetil-Sephadex kolon kromatografisi kullanılarak da saflaştırılmıştır. Cibacron blue F3G-A Sephadex, red triazine, Procion Yellow He-3G, Matrex gel Orange B, 8-(6-amino heksil) amino-2'-fosfoadenozin difosforiboz, 8-(6-amino heksil) amino-2', 5'-ADP, 8-(6-amino heksil) amino- $NADP^+$ ve N6-(6- amino heksil) amino 2',5'-ADP gibi çeşitli afinite kromatografi materyalleri de G6PD'nin saflaştırılmasında de kullanılmaktadır (26, 58, 82-85). Ayrıca rekombinant enzim metal afinite kromatografisi yöntemi olan nikel-şelat kolonu kullanılarak saflaştırılmıştır (86). Askar ve diğ. tarafından yapılan çalışmada, enzim LKB 2135-360 TSK G-3000 SW jel filtrasyon kolonu kullanılarak 'HPLC' yüksek performans sıvı kromatografisi yapılmıştır (27).

2.9. G6PD'nin Yapısal Özellikleri

G6PD monomeri yaklaşık 515 amino asitten oluşur. enzimin altbirim molekül ağırlıkları türlere ve saflaştırıldığı dokuya göre değişiklik göstermekle birlikte molekül ağırlığı, mikrobiyal türlerde 50 – 60 kDa, memeli türlerde 58 – 67 kDa arasında değişiklik gösterir (13).

G6PD, ortam pH'sı iyonik kuvvet ve protein derişimlerine bağılı olarak çeşitli oligomerik formlarda bulunur (21). Cohen ve Rosemeyer (87) G6PD monomerlerinin, dimer ve tetramer oluşturduğunu ileri sürmüş, bu dönüşümleri etkileyen faktörleri NADP^+ , seyrelme, iyonik kuvvet ve pH olarak belirtmiştir. pH 6'in altında tetramer, pH 8'in üzerinde ise dimer formu baskın olduğu ileri sürülmüştür (21). Enzim genellikle aktif olarak dimer yapı gösterir. Enzimin dimerik ya da tetramerik formunu sıcaklık, NADP^+ , $\text{NADPH} + \text{H}^+$ enzim konsantrasyonu gibi çeşitli faktörler etkiler. Yüksek iyonik kuvvet ve yüksek pH değerleri enzimin dimer forma dönüşmesine neden olurken; düşük pH, düşük iyonik kuvvet ve ortamda Mg^{2+} , Mn^{2+} gibi iki değerlikli katyonların bulunması durumunda tetramer yapı gözlemlenir (13). Değişik kaynaklardan saflaştırılan G6PD'lerin monomer, dimer ve tetramer formlarının molekül ağırlıkları Tablo 2.3.'de verilmiştir.

Rowland ve diğ. (88) tarafından *L. mesenteroides*'ten elde edilen G6PD enziminin dimer yapıda olduğu ve monomerlerin bir tane aktif bölge içerdiği belirtilmiştir. 1996 yılında sığır lensinden saflaştırılan G6PD enziminin aktif yapısının monomerik olduğu gösterilmiş (28); 1999 - 2000 yıllarında ise insandan saflaştırılan bu enzimin tetramer yapıda olduğu gösterilmiştir (89).

L. mesenteroides'den ve insandan elde edilen G6PD enziminin yapıları benzer olup, her monomerde bir koenzim bağlama bölgesi ve bir substrat bağlama bölgesi bulunur. Dimer arayüz geniş olup 31'i hidrofobik karakterde toplam 57 amino asit kalıntısı içerir. Bu amino asit kalıntıları bakteri ve insan G6PD yapıları arasında korunmasa da; arayüz yapısı korunmaktadır. *L. mesenteroides* G6PD'sinde bulunmamasına rağmen, insan G6PD'sinin her alt biriminde bulunan yapısal NADP^+

molekölü, enzimin kararlılığı için gereklidir. İkinci NADP^+ bağlama bölgesi, enzimin katalitik aktivitesi için gerekli olan “Koenzim NADP^+ ” molekülünün enzimle etkileşimini sağlar. Etkileşimde, NADP^+ molekülü enzimdeki dinükleotid bağlanma bölgesinde bulunan 41. aminoasit olan Glisin’e (Glisin-41) ve Aspartik asit-42’ye bağlanır. Yapısal NADP^+ molekülünün adenini, Tirozin-503 ve Arginin-487 arasında; nikotinamid molekülü ise Triptofan-509 ile Tirozin-401 arasında enzime bağlanır. Bu Yapısal NADP^+ molekülünün 2’-fosfat grubu Arginin-487, Arginin-357, Lizin-238 ve Lizin-366 ile hidrojen bağı oluştururken, Arjinin-393 ve Aspartik Asit-421 nikotinamidin amid grubu ile etkileşimdeyken bisfosfat grubu, Arginin-370 ile etkileşim halindedir. Aspartik Asit-421 dimer arayüzün merkezinde bulunmaktadır. Bu etkileşimler birlikte düşünüldüğünde, yapısal NADP^+ ’nin ortamdan ayrılması enzimdeki alt birimlerin yapısal bütünlüğünü ve konformasyonunu bozacaktır (90). G6PD enzimi üzerine yapılan çeşitli kinetik çalışmalar ve amino asitlerin kimyasal modifikasyonları sonucu lizin (91), arjinin (92), histidin (93) ve sistein (94) amino asitlerinin katalitik bölgesinde bulunduğu gösterilmiştir. Yoshida (21) tarafından yapılan çalışmada enzimin tripsin ile sindirimi sonucunda yaklaşık 40 peptid açığa çıkmış ve bunların amino asit analizi yapılmıştır. Buna göre enzimin % 6.22’sinin lizinden, % 7.02’sinin ise arjininden oluştuğu saptanmıştır. İnsan G6PD’sinin 205. pozisyonundaki lizin amino asiti, substrat bağlama bölgesine çok yakın ve katalitik aktivite için gereklidir (91). Sığır adrenal G6PD’sinde katalitik bölgede yer alan sistein, Koenzim NADP^+ ’nin bağlanmasında etkilidir (94, 95). İnsan G6PD’sinde lizin ise hem NADP^+ hem de G6P bağlama bölgesinde yer alır (96). Histidin-240 G6P’nin birinci karbonunun hidroksil grubuyla proton alışverişinde, Histidin-178 ise fosfat grubunu bağlamada rol oynar (93). Ayrıca, insan G6PD’si ile büyük benzerliklere sahip olan *L. mesenteroides* G6PD’si ile yapılan kinetik analizlerde Arjinin-46’nın NADP^+ , Lizin-343’ün ise G6P bağlanmasında işlev gördüğü ortaya çıkmıştır (97).

Tablo 2.3. Değişik kaynaklardan saflaştırılan G6PD'lerin monomer, dimer ve tetramer formlarının molekül ağırlıkları (dalton).

Enzim Kaynağı	Monomer	Dimer	Tetramer	Kaynak
<i>E. coli</i>	52000	-	-	13
<i>P. multivorans</i>	60000	120000	-	13
<i>V. alginolyticus</i>	53000	100000	190000	13
<i>C. utilis</i>	49000 – 61000	110000	220000	13
Fare Karaciğeri	62000	121 000	231000	13
Sıçan Karaciğeri	64000	130000	280000	13
Sıçan meme bezi	60200	124000	-	13
Domuz Karaciğeri	67000	133000	-	13
Sığır adrenal	64400	-	284000	13
Sığır alyuvarı	59500	114000	-	13
İnsan karaciğeri	65100	118000	-	13
İnsan adrenali	58000	113000	-	13
İnsan trombosit	59300	120000	-	13
İnsan alyuvarı	59000	120000	-	13
İnsan plasentası	54000	-	-	13
Köpek karaciğeri	52500	-	-	30
<i>Bubalus bubalis</i>	64500	-	-	31

2.10. G6PD'nin Substrat Özgüllüğü

G6PD enziminin doğal substratı D-glukoz-6-fosfattır ve bu enzimle ilgili olarak yapılan bütün çalışmalarda, D-glukoz-6-fosfat için en yüksek V_{max} ve en düşük K_m değeri bulunmuştur. Ancak enzim 2-deoksiglukoz 6-fosfat, 2-deoksi-2-floroglukoz-6-fosfat, 2-deoksi-2-kloroglukoz-6-fosfat, mannoz-6-fosfat, 3-deoksiglukoz-6-fosfat gibi substrat analoglarını da belirli oranlarda kullanabilmektedir (13). 2-deoksiglukoz-6-fosfat ve galaktoz-6-fosfat, birçok G6PD enzimi için zayıf bir substrattır. Substrat analogu olan glukozamin-6-fosfat ise bazı G6PD enzimleri için substrat değil, inhibitördür. Substratın yapısında bulunan anomerik C atomundaki değişikliklerin enzimde aktivite kaybına neden olduğu Levy (13) tarafından belirtilmiştir. Glukoz-6-fosfat'ın ana yapısındaki bazı değişiklikler substratın enzime bağlanmasını etkileyerek aktivite kaybına neden olur. G6PD enzimlerinin büyük bir çoğunluğunun substrat-seçici olduğu sonucuna varılabilir.

Çeşitli türlerden elde edilen enzim, koenzim özelliği bakımından beş gruba ayrılır (13);

1. $NADP^+$ -Spesifik G6PD Enzimleri: Bu enzimler NAD^+ ile reaksiyon vermezler. Koenzim olarak sadece $NADP^+$ 'yi kullanırlar.
 2. $NADP^+$ -tercih eden G6PD Enzimleri: Bu enzimler yüksek konsantrasyonda NAD^+ 'yi kullanabilirler, ancak fizyolojik koşullar altında $NADP^+$ 'yi tercih ederler.
 3. Hem $NADP^+$ 'yi hem de NAD^+ 'yi kullananlar: Bu enzimler, çift koenzim özgüllüğüne sahiptir. Fizyolojik koşullar altında koenzim olarak her iki molekülü de kullanırlar.
 4. NAD^+ -tercih eden G6PD Enzimleri: Bu enzimler, hem NAD^+ 'yi hem de $NADP^+$ 'yi koenzim olarak kullanabilirler, fakat fizyolojik şartlarda sadece NAD^+ ile reaksiyon verirler.
 5. NAD^+ -Spesifik G6PD Enzimleri: Bu enzimler sadece NAD^+ ile reaksiyona girerler.
- G6PD enzimlerinin çoğunluğu ilk üç gruba dahildir.

2.11. G6PD'nin Genel Özellikleri

2.11.1. Optimum pH

G6PD aktivitesi ortamın pH'sı ile ilgilidir (98). İnsan alyuvar G6PD'ı Tris/HCl tamponunda pH 7.00 – 9.00, glisin tamponunda pH 9.00 – 10.00 (21), fare karaciğeri G6PD'si pH 7.5 – 9.5 (99). *L. mesenteriodes* G6PD'si Tris/HCl tamponunda pH 7.52 – 9.05, Amediol/HCl tamponunda ise pH 8.46 – 9.90 (100) arasındadır, ayrıca optimum pH'sı 9.0'ın üstündedir. *N. crassa* G6PD'si aktivitesi farklı pH aralığına sahip tamponlar kullanılarak ölçülmüş ve 0.1 M Tris / HCl tamponu kullanılarak, optimum pH aralığının 7.4 – 8.2 arasında olduğu bildirilmiştir (74). *S. cerevisiae* G6PD enzimi değişik pH'larda (4.0 – 9.5) 51 saat Tris / HCl tamponlarında bekletildiğinde; 4. saatte, pH 4.0'de aktivitenin düştüğü buna karşılık pH 7.0'de ise arttığı, 51 saatin sonunda ise pH 7.0 ve 9.5 aralığında enzimin aktivitesini koruduğu gözlenmiştir (101). G6PD enziminin optimum pH'sinin, sığır lensinde (28) bifazik olmak üzere pH 7.7 ve pH 9.6; tavşan beyinde (29) bifazik olarak pH 7.5 ve pH 9.2, köpek karaciğerinde (30) monofazik olarak pH 7.8, *Bubalus bubalis*'de pH 8.0 ve sabit pH'si 9.0, koyun böbrek korteksinde (33) pH 7.4, kuzu böbrek korteksinde (32) ise pH 7.7 olduğu saptanmıştır. Ayrıca Corpas ve diğ. (102), rat karaciğeri ve böbreği ile yaptıkları çalışmada da saflaştırılan G6PD enziminin optimum pH'sının her iki dokuda da 9.4 olduğunu bulmuşlardır.

2.11.2. Optimum Sıcaklık

Rat böbrek korteksi ve karaciğeri G6PD'si için aktivite gösterdiği optimum sıcaklık 37 °C olarak belirlenmiştir (102). Sığır lensi (28), koyun böbrek korteksi (33), *Bubalus bubali* (31) optimum sıcaklıkları sırasıyla, 25 °C, 45 °C ve 60 °C'dir. Şimdiye kadar tanımlanan en termoaktif G6PD enzim olan *T. maritima* G6PD'sinin optimum sıcaklığı 92 °C'dir (103). Enzimin 25°C'de stabilitesini koruduğu gözlemlenmiştir (20, 21, 102, 103).

2.11.3. G6PD Enziminin Kinetik Mekanizması

G6PD enzimi çeşitli türlerden ve tür içi değişik dokulardan saflaştırılarak, kinetik mekanizması çalışılmıştır. Yapılan bu çalışmalarda G6PD enziminin genel olarak sıralı (sequential) mekanizmaya uygun olduğu saptanmıştır. Bu çalışmalarda, enzimin koenzimi olan NADP^+ ya da NAD^+ ikinci bir substrat gibi düşünüldüğünden, G6PD'nin katalize ettiği tepkime bir "Bi Bi" tepkimesi olarak ele alınır.

S. carlsbergensis ve *P. duponti*'de yapılan çalışmalarda, G6PD enziminin "rapid-equilibrium random" mekanizmasına uygun olduğu bildirilmiştir (13). Ayrıca, sığır adrenal bezi, sıçan meme bezi, köpek karaciğeri ve tavşan eritrositinden saflaştırılan G6PD enziminin, insan rekombinant G6PD enzimin de "rapid-equilibrium random" mekanizmasına uygun olduğu gösterilmiştir (13, 30, 104, 105). Bu mekanizmada NADP^+ ve G6P birbirinden bağımsız olarak enzime bağlanmakta, NADPH hem NADP^+ hem de G6P'a karşı kompetitif inhibisyon göstermektedir (13).

Levy ve diğ.'nin *L. mesenteroides*'den saflaştırdıkları G6PD'nin çift koenzim özgülüğüne sahip olduğunu, koenzim olarak NAD^+ kullanıldığında "random", NADP^+ kullanıldığında ise "sequential-ordered" mekanizmasına uygun bir kinetik davranış gösterdiğini bulmuşlardır (13, 106).

Son yıllarda yapılan kinetik çalışmalarda enzim: fare karaciğeri (107), rat karaciğeri, insan eritrositi, *Vibrio alginolyticus* (1), *Saccharomyces cerevisiae* (108) ve *Schizosaccharomyces pombe* (109) gibi kaynaklardan elde edilmiş ve "Ordered Bi Bi" mekanizmasına sahip olduğu gösterilmiştir. Mekanizmada NADP^+ bağlanan ilk substrat ve NADPH salınan son üründür (110).

Adediran tarafından insan eritrositi G6PD yapılan bir başka çalışmada ise enzimin "Sigmoidal" kinetiğe uyduğu gösterilmiştir (111).

Grubumuzun daha önce yaptığı çalışmalarda ise: enzim, sığır lense (28), kuzu böbreği (32) ve koyun böbrek korteksi (33)'nden saflaştırılmış, sırasıyla "Ordered Bi Bi"

ve “Ping Pong Bi Bi” mekanizmalarına sahip oldukları gösterilmiştir. Çeşitli türlerden saflaştırılan enzimlerin kinetik sabitleri Tablo 2.4.’de gösterilmiştir.

Tablo 2.4. Değişik kaynaklı G6PD’lerin kinetik parametreleri

Enzimin Kaynağı	K_m (G6P, mM)	K_m (NADP ⁺ , μ M)	K_M (NAD ⁺ , mM)	K_i (NADPH, μ M)	K_i (NADP ⁺ , μ M)	Kaynak
<i>E. coli</i>	0.135	10	1.67	10	0,25	3
Maya	0,28	29	-	-	-	2
<i>C.utilis</i> A-s75	0,23	67	-	-	-	3
Krebs ascites tumor	0,133	57	-	-	-	3
Sıçan hepatoma 3924a	0,054	13	-	-	-	3
Sıçan karaciğeri	0,029	2,0	-	13	16	3
Sıçan kası	0,034	2,1	-	100	-	3
Sıçan yağ dokusu	0,035	1,7	-	150	-	3
Sıçan meme bezi	0,3-0,48	8,9	15	-	-	3
Artık tilki alyuvarı	0,074	62	-	-	-	3
Domuz karaciğeri	0,036	4,8	-	9-	9,0	3
Sığır arteri	0,038	62,5	-	-	-	3
Sığır adreneli	0.6-019	3.8	2.36	-	-	3
İnsan alyuvarı	0,05-0,07	2,0-4.4	4,0	9	-	3
İnsan alyuvarı (B varyantı)	0,034	8	-	-	-	3
İnsan lökosit	0-0.4	6-12	-	20	-	3
İnsan trombosit	0.012	-	-	6	6,0	3
Fare testisi	0,05	10	-	-	-	84
İnsan testisi	0,098	69	-	-	-	3
İnsan alyuvarı	0,039	4,4	-	-	-	22
Köpek karaciğeri	122	10	-	12	-	30
<i>Bubalus bubalis</i> alyuvarı	0,106	0,87	-	-	0,53	31

2.12. G6PD Enziminin İnhibitörleri

2.12.1. G6PD Enzimi Üzerine Bazı Metal İyonların Etkisi

Pentoz fosfat ve diğer metabolik yolların denetlenmesinde büyük rol oynayan G6PD'nin aktivitesi fizyolojik koşullar ile düzenlenir (13). Genel olarak G6PD inhibisyonu hücredeki redoks potansiyelini olumsuz yönde etkilediğinden hücre ölümüne “apoptozis”, aktivitesindeki artış ise hücre büyümesine neden olur (112). Çeşitli türlerden elde edilen G6PD enzim örneklerinin katalizlediği tepkimeleri NADPH inhibe eder (27, 113). Çeşitli sülfidril reaktifleri, fosfat iyonları, pridoksal fosfat ve çeşitli adenozin nükleotidleri G6PD'ı inhibe eder.

ATP, fizyolojik koşullar altında gliseraldehit-3-fosfat (GA3P) ve yüksek konsantrasyonda 2,3-difosfoglisarik asit (2,3-DPGA) enzimin inhibitörüdür (114).

Canlılar için, civa (Hg) ve kurşun (Pb) ile beraber kadmiyum (Cd), “üç büyük” metal zehirlerinden biridir. Cd'nin vücutta birkaç enzimi etkilediği bilinmektedir. Nikel'in insanlar için gerekliliği henüz kesin olarak tanımlanamamasına rağmen diyet için gerekli bir eser element olduğu öne sürülmemektedir (115). Kadmiyuma maruz kalan yengeçler ile yapılan bir çalışmada hepatopankreas dokularında G6PD aktivitesinin artışına bağlı olarak NADPH'nin arttığı saptanmıştır (116). Serafini ve diğ. (117), 1.0 mM Cd^{+2} 'nin G6PD enzimini inhibe ettiğini, inhibisyon tipinin unkompetitif karakterde olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, G6P değişken substrat olarak alındığında, karışık-tip inhibisyonun karakteri kompetitifdir.

Kurşun (Pb) çevrede sık bulunan ağır bir metaldir. Pb'nin –SH gruplarına olan afinitesi, Cd^{+2} ve Hg^{+2} kadar fazla değildir (115). Lachant ve diğ. (118), alyuvar G6PD enzimi ile yaptıkları çalışmada, Pb'nin G6PD için, G6P ve $NADP^{+}$ 'nin nonkompetitif inhibitörü olduğunu göstermişlerdir.

Zn^{+2} , G6PD'nin koenzimi olan G6P'yi kompetitif olarak inhibe etmektedir. Diğer divalent katyonlardan Ni^{+2} , Cd^{+2} ve Co^{+2} enzimin güçlü inhibitörleridir (119).

Carattino ve diğ. (120), yaptığı *in vitro* çalışmada, Cu^{+2} ve Cd^{+2} 'nin G6PD aktivitesini düşürerek anlamlı olarak inhibe ettiğini göstermişlerdir. İnsan eritrosit G6PD enzimi üzerine yapılan bir diğer çalışmada ise, Cd^{+2} 'nin, NADP^{+} 'yi ve G6P'yi non-kompetitif olarak, Ni^{+2} 'nin ise NADP^{+} 'yi kompetitif, G6P'yi ise karışık tipte inhibe ettiği gösterilmiştir (121). Alüminyum toksik metal iyonu olarak bilinmektedir, domuz ve insan beyni G6PD'si üzerine etkisi incelenmiş ve G6PD üzerinde inhibisyon etkisinin olduğu ortaya çıkarılmıştır. "Circular dichroism" çalışmalarında Al^{+3} 'ün enzime bağlanmasıyla α -heliks, β -plakalı yapıların azalması ve "Random-coil" yapıların artması gibi konformasyonel değişimlerin meydana geldiği gösterilmiştir (122).

G6PD enzimi, p-kloromercuri benzoat (PCMB) gibi metal şelat ajanları (sülfidril inhibe edici ajanlar) ile inhibe olmaktadır (77).

2.12.2. G6PD Enzimi Üzerine Bazı İlaçların Etkisi

Genellikle gut hastalığının tedavisinde kullanılan kolşisin Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA) gibi enflamatuvar hastalıklarda da kullanılır (123). Kolşisin, yüksek derecede toksik bir bitki hormonu olup *Colchicum autumnale* bitkisinden izole edilmektedir (124). Kolşisinin lökosit G6PD enzimi üzerinde inhibisyon etkisi DeChatelet ve diğ. (125) tarafından gösterilmiştir. Bu çalışmaya göre; 0.20 mM Kolşisin enzimi % 100 inhibe etmektedir.

İmatinib (Gleevec), bcr-abl (füzyon protein), c-kit (sitokin reseptör) ve PDGFR (trombosit ilişkili büyüme faktörü reseptörü) tirozin kinazlarına karşı bir tirozin kinaz inhibitörüdür (126, 127). İmatinib, kronik miyelojen löseminin, gastrointestinal stromal tümörlerin ve birçok tümörün tedavisinde kullanılmaktadır (127-130). Boren ve diğ. imatinib tedavisinin, proliferasyonu ve birincil hedef olarak G6PD enzimi olarak glukoz-türevli RNA sentezini azalttığını göstermişlerdir (131).

Rosmarinik Asit (RA), antioksidan aktivitesi yüksek fenolik bir karboksilik asit olup, *Salvia* cinsi bitkilerde bulunur (132). RA ayrıca, ROT'ların ve malondialdehit'in miktarını azaltarak hücrel oksidatif stresi zayıflatmaktadır (133). Xavier ve diğ.'nin

yaptığı çalışmada RA'nın, HCT15 hücrelerinde ERK'yı (ekstrasellüler sinyal-regüle edilen kinaz) inhibe ederek hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini ve hem HCT15 hemde CO115 hücrelerinde apoptozu indüklediğini saptamışlardır (134). RA'nın PFY'de bulunan enzimler üzerine etkileri bilinmemektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Araç ve Gereçler:

Taze koyun beyini Mısırdalı mezbahasından alındı. Mezbahadan yeni kesilmiş koyunlardan elde edilen beyinler kuru buz içeren konteyner (yaklaşık olarak -20 °C) içerisinde laboratuvara getirildi. Beyin zarı ve beyaz cevherden temizlendikten sonra gri cevheri içeren korteks tabakası alınarak saflaştırma işlemi yapılana kadar -20 °C’de korundu.

G6P, NADP⁺, NADPH, 6-PGA, heksokinaz, DEAE-Sepharose Fast Flow, Sephadex G-200, Tris [Tris (hidroksimetil) aminometan], 2-Merkaptoethanol Sigma Chemical Company, ABD’den; 2’, 5’-ADP-Sepharose 4B, Blue Dextran 2000, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, İsveç’ten; sığır serum albumini, CdCl₂ BDH İngiltere’den; analitik saflıktaki ZnSO₄ Analar, Hopkin & Williams Ltd. İngiltere’den; Glisin, hidroklorik asit, akrilamid, bisakrilamid British Drug House Ltd. İngiltere’den; Gliserol, amonyum sülfat, bromfenol mavisi, metanol, sodyum fosfat, fosforik asit Merck-Almanya’dan; asetik asit, etanol, Riedel De Haën A.G. Almanya’dan; Prestained Protein Marker’ı Biolabs, ABD’den; diğer analitik saflıktaki kimyasal maddeler Merck Almanya’dan sağlandı.

Beyin korteksinin homojenizasyonu Ika-Werke ultra-turrax homojenizatör kullanılarak yapıldı.

Santrifüj işlemi Beckmann L7 ultrasantrifüjü ve tip 40 rotoru kullanılarak yapıldı.

Aktivite ve protein tayinleri ve A₂₈₀ takipleri için Amersham Biosciences Ultrospec™ 2100 pro (UV/visible) spektrofotometrisi kullanıldı. Poliakrilamid jel elektroforezi, BioRad Mini Protean III sistemi kullanılarak gerçekleştirildi.

3.2. Yöntemler

3.2.1. G6PD Enziminin Saflaştırılması:

Koyun beyin korteksi G6PD enziminin en verimli saflaştırma metodunun saptanması amacıyla; 2', 5'-ADP-Sepharose 4B afinite ve DEAE Sepharose Fast Flow iyon değiştirici kromatografilerinin farklı sıralamaları kullanılarak saflaştırmalar yapıldı. Birinci saflaştırma protokolünde, ultrasantrifügasyondan sonra enzim önce afinite kromatografi kolonu ve ardından DEAE iyon değiştirici kromatografi kolonuna yüklendi. İkinci saflaştırma protokolünde, ultrasantrifügasyon basamağından sonra süpernatant diyaliz edilerek iyon değiştirici kromatografisine yüklendi. Enzim, KCl gradienti kullanılarak elüe edildi. G6PD aktivitesi içeren tüpler toplanıp diyaliz edildikten sonra afinite kromatografi kolonuna yüklendi. Üçüncü protokol birincisiyle benzer olup sadece ultrasantrifügasyondan sonra bir diyaliz basamağı içermektedir.

Bütün işlemler +4 °C'de yapıldı. Mezbahada yeni kesilen koyunlardan alınan beyinler, kuru buz içerisinde laboratuara getirildi ve saflaştırma işlemi yapılana kadar -20 °C'de bekletildi. Beyin zarı ve beyaz cevherden temizlendikten sonra gri cevheri içeren korteks tabakası alındı ve 1 mM 2-ME ve 1 mM EDTA içeren 10 mM Tris / HCl tamponu pH 7.60 (tampon A) ile 3 – 4 kez yıkanarak, makas ile küçük parçalara bölünüp tartıldı. Homojenizasyon, 3 ml / gr (hacim / ağırlık) olacak şekilde tampon A eklenerek “ultra-turrax” tipi büyük başlıklı homojenizatör ile 10 000 rpm / dk devirde yapıldı. Homojenat cam pamuktan süzüldü ve daha sonra 105 000 x g'de 60 dakika santrifüj edildi. Ultrasantrifüj sonrasında elde edilen süpernatant tampon A ile dengelenmiş 2', 5' – ADP Sepharose 4B afinite kolonuna (1.5 x 6.5 cm) 9.6 ml / saat akış hızı ile uygulandı. Kolon, tampon A ile kolon çıkış çözeltisinin A₂₈₀ değeri takip edilerek yıkandı. Afinite kolonuna bağlanan enzim 0.1 mM NADP⁺ içeren tampon A ile elüe edildi. Fraksiyonlar aktivite ve A₂₈₀ ölçülerek G6PD aktivitesi gösteren tüpler toplandı. 2', 5' - ADP Sepharose 4B afinite kolonunda yükleme ve yıkama sırasında fraksiyon hacmi sırasıyla 3.2 ve 2.8 ml, elüsyon sırasında ise 1.8 ml sabit tutuldu.

G6PD aktivitesi saptanan tüpler toplanarak 5 mM potasyum fosfat tamponu pH 6.90 (tampon B) ile dengelenmiş DEAE – Sepharose Fast Flow iyon değıştirici kolonuna (1.5 x 7.5 cm) 8.4 ml / saat akış hızı ile uygulandı. DEAE – Sepharose Fast Flow kolonu tampon B ile yıkandı ve 1.7 ml’lik fraksiyonlar toplandı. Fraksiyonlarda enzim aktiviteleri ve A_{280} değeri ölçülerek enzimin iyon değıştirici kolona bağlanıp bağlanmadığı belirlendi. Enzimin kolondan 0 - 300 mM KCl içeren tampon B ile lineer tuz gradiyenti yapılarak elüe edildi. G6PD aktivitesinin gözlendiğı 1.7 ml’lik tüpler toplandı ve enzim örneğı + 4 °C’de saklandı.

3.2.2. G6PD Enziminin Aktivitesinin Saptanması

G6PD enzim aktivitesinin ölçümü WHO (World Health Organisation)’nun önerdiği spektrofotometrik yöntem kullanılarak ölçüldü (135). Deney, son derişim 0.1 M Tris / HCl (pH 8.0), 0.2 mM NADP^+ , 0.6 mM G6P, 10 mM MgCl_2 ve yeterli miktarda enzim içeren 500 μl tepkime ortamında 37 °C’de, NADP^+ ’nin G6P ile indirgenmesine bağlı absorpsiyon artışı 340 nm’de 1 dakika süre ile izlenerek gerçekleştirildi. NADP^+ ’nin molar absorpsiyon katsayısı $\epsilon_{340} = 6.22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ olarak kullanıldı.

Enzim kinetiğı çalışmalarında hızlar aynı tepkime ortamında değışen konsantrasyonlarda G6P, NADP^+ , 6-PGA ve NADPH yeterli miktarda enzim içeren 500 μl tepkime ortamında ölçüldü.

Bir Enzim Ünitesi: Yukarıda belirtilen koşullarda 37 °C’de ve pH 8.0’de dakikada 1 μmol NADP^+ ’yi indirgeyen enzim miktarı olarak tanımlandı.

Spesifik Aktivite: Bir miligram protein başına düşen enzim ünitesi olarak tarif edildi (ünite / mg protein).

3.2.3. 6-fosfoglukonat Dehidrogenaz Aktivitesinin Saptanması

6-PGD enzim aktivitelerinin ölçümünde Rippa ve Signorini (136) tarafından önerilen spektrofotometrik yöntem kullanıldı. Ölçümler, 0.1 M Tris / HCl tamponu (pH 8.00), 0.2 mM NADP⁺, 0.6 mM 6-PGA, 10 mM MgCl₂ ve yeterli miktarda enzim içeren 500 µl tepkime ortamında 37 °C'de, NADP⁺'nin 6-PGA ile indirgenmesine bağlı absorpsiyon artışının 340 nm'de 1 dakika süre izlenmesi ile gerçekleştirildi. NADP⁺'nin molar absorpsiyon katsayısı $\epsilon_{340} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ olarak kullanıldı.

3.2.4. Protein Miktarının Saptanması

Enzimin saflaştırılması basamaklarında toplanan fraksiyonlarda protein derişimi 280 nm'deki absorpsansları ölçülerek hesaplandı. Hassas olarak protein tayini yapılması gerektiğinde protein derişimi, Bradford yöntemi kullanılarak hesaplandı (137).

3.2.5. G6PD Enziminin Alt Birim Molekül Ağırlığının SDS-PAGE Yöntemi ile Saptanması

Jellerin hazırlanması Laemmli yöntemine göre yapıldı (138). Bu yöntemde proteinler alt birimlerine ayrılarak alt birim molekül ağırlıkları saptanmaktadır. Ayırıcı jel % 10, yükleme jeli ise % 5'lik olarak hazırlandı. Deneylerde 0.75 mm x 70 mm x 100 mm boyutlarındaki slab jel kasetine; 100 ml deiyonize suya 29.2 gr akrilamid ve 0.8 gr bisakrilamid konularak elde edilen % 30'luk akrilamid / bisakrilamid stok çözeltisinden 3.3 ml, 1.5 M Tris / HCl tamponundan (pH 8.8) 2.5 ml, % 10'luk SDS'den 0.1 ml, % 10'luk amonyum persülfat'tan (APS) 50 µl, TEMED'den 5 µl ve 4.1 ml deiyonize su eklenerek hazırlanan % 10'luk ayırıcı jeli ve % 30'luk akrilamid / bisakrilamid stok çözeltisinden 1.7 ml, 0.5 M Tris / HCl tamponundan (pH 6.8) 2.5 ml, % 10'luk SDS'den 0.1 ml, % 10'luk APS'den 50 µl, TEMED'den 10 µl ve 5.7 ml deiyonize su eklenerek hazırlanan % 5'lik yükleme jeli döküldü.

Örnekler jele uygulanmadan önce, 3.55 ml deiyonize su; 0.5 M Tris / HCl tamponundan (pH 6.8) 1.25 ml; gliserolden 2.5 ml; % 10'luk (ağırlık / hacim) SDS çözeltisinden 2.0 ml; 2-ME'den 0.4 ml; % 0.5'lik Bromfenol Blue'dan 0.2 ml alınarak hazırlanmış çözelti, saflaştırma basamaklarına ait enzim örnekleri ve saflaştırılmış enzimi içeren örneklerin miktarlarına yeterli olacak şekilde ayrı ayrı Eppendorf tüplerine ayrıldı. Her bir tüp vorteks karıştırıcıda karıştırılarak 95 °C'de 4 dakika ısıtıldı ve proteinler denatüre edildi.

Standart olarak 7-175 kDa genişliğinde Prestained Protein Marker: (MBP = Maltose-binding protein, CBD= a chitin binding domain) MBP- β -galaktosidaz (175 kDa), MBP-paramiyozin (80 kDa), MBP-CBD (58 kDa), CBD-Mxe Intein-2CBD (46 kDa), CBD-Mxe Intein (30 kDa), CBD-BmFKBP13 (25 kDa), Lizozim (17 kDa), Aprotinin (7 kDa) kullanıldı.

Elektroforez tamponu olarak 3.5 mM SDS içeren 25 mM Tris ve 192 mM glisinden oluşan Tris / glisin tamponu (pH 8.3) kullanıldı.

Örnekler ayırıcı jele girene kadar jel başına 80 V, girdikten sonra da 120 V gerilim uygulandı. Jel'de protein boyaması için Merril ve diğ.'nin gümüş boyama yöntemi kullanıldı (139).

3.2.6. G6PD Enziminin Molekül Ağırlığının Sephadex G – 200 Jel Eleme Yöntemi ile Saptanması

Enzimin molekül ağırlığının belirlenmesi amacıyla Andrews'in (140) önerdiği Sephadex G-200 jel eleme yöntemi kullanıldı. Bu yöntem kolona uygulanan proteinlerin molekül büyüklüklerine göre kolondan farklı hacimlerde elüe olması esasına dayanmaktadır. Elüsyon hacmi molekül ağırlığının logaritması ile ters ilişkilidir.

Standart olarak; sığır serum albumini (dimer 128 kDa, monomer 66 kDa), heksokinaz (105 kDa), ovalbumin (45 kDa), sitokrom c (12 kDa) olarak kullanıldı. Sephadex G-200 kolonuna (2.25 x 50 cm) BSA 4 mg/ml, heksokinaz, sitokrom c,

ovalbumin ve blue dekstran ise 2.5 mg/ml derişiminde her birinden ayrı ayrı 2 ml örnek uygulandı.

Molekül ağırlıklarının logaritması ise eşitlik 3.1'e göre hesaplanan K_{av} değerleri alınarak standart grafik çizildi.

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o} \quad (\text{Eşitlik 3.1.})$$

V_o = Ölü Hacim

V_e = Elüsyon Hacmi

V_t = Kolon Yatak Hacmi

V_o , Blue Dekstran 2000 (2000 kDa) 625 nm'deki absorbansı ölçülerek saptandı. Hekzokinaz, sitokrom c, sığır serum albumini ve ovalbuminin elüsyon hacimlerinin bulunması için ise absorbans ölçümleri 280 nm'de yapıldı.

Çalışmada Sephadex G-200 kolonu, 0.1 M KCl içeren 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.5) ile dengelendi ve elüe edildi. İşlemler sırasında akış hızı 10.2 ml/saat olarak tutuldu ve 1.7 ml'lik fraksiyonlar toplandı.

3. 2. 7. İstatistiksel Değerlendirme

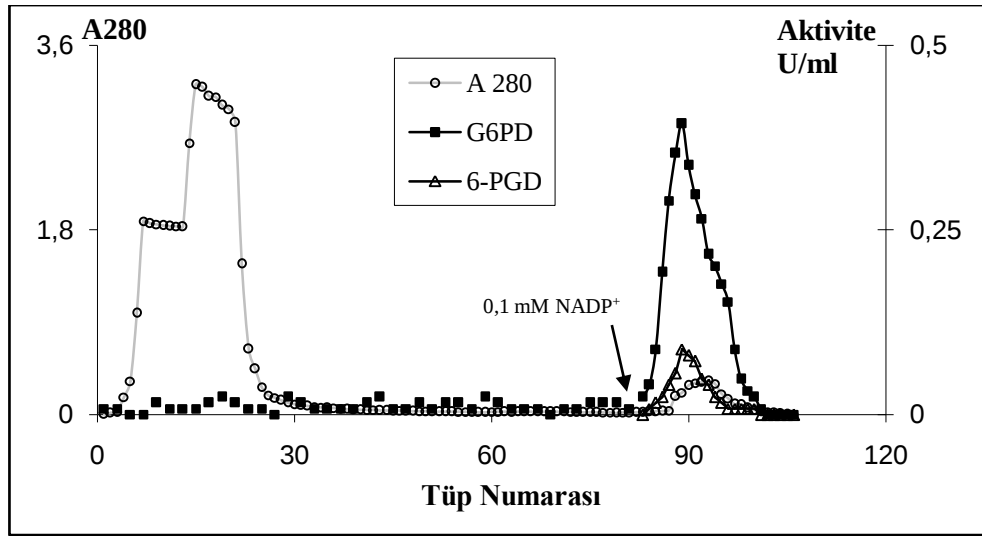
Enzim kinetiğinin belirlenmesine yönelik deneylerin değerlendirilmesinde "Statistica" istatistik paket programının "nonlinear estimation" modülü kullanıldı ve elde edilen tüm sonuçlar SPSS 11.5 istatistik paket programının "nonlinear" modülünde de kontrol edildi.

Bu farklı üç yöntem; spesifik aktivite, verim, saflaştırma oranı, enzim aktivitesi ve saflaştırma süresi gibi kantitatif değerler göz önüne alınarak değerlendirildi (141). En verimli protokolün birinci protokol olduğu kabul edilerek enzimin özellikleri değerlendirildi (141).

4. BULGULAR

4.1. Koyun Beyin Korteksi G6PD enziminin Saflaştırılması

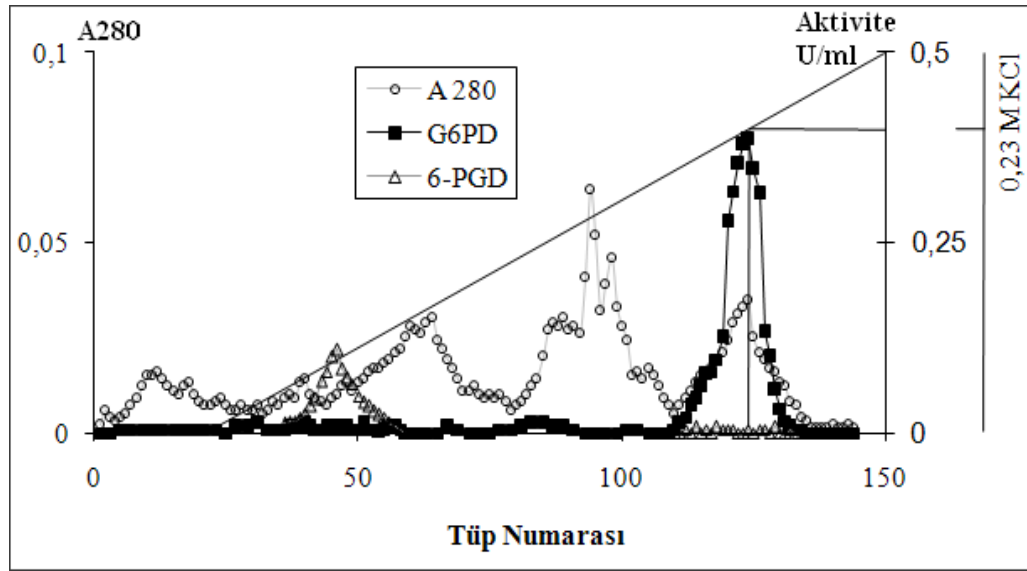
Mezbahadan yeni kesilmiş koyunlardan elde edilen beyinler kuru buz içeren konteyner (yaklaşık olarak -20°C) içerisinde laboratuvara getirildi ve beyin zarı ve beyaz cevherden temizlendikten sonra gri cevheri içeren korteks tabakası alınarak saflaştırma işlemi yapılana kadar -20°C 'de muhafaza edildi. Bundan sonraki bütün saflaştırma basamakları $+4^{\circ}\text{C}$ 'de yapıldı. Homojenizasyon işlemine geçilmeden önce, beyin korteksi 1 mM 2-ME ve 1 mM EDTA içeren 10 mM Tris/HCl tamponu pH 7.6 (tampon A) ile 3 - 4 kez yıkanarak, küçük parçalara bölünerek tartıldı. Elde edilen 12.3 gr dokuya 3 ml/gr olacak şekilde tampon A eklendi ve "ultra-turrax" tipi homojenizatör kullanılarak 5000 rpm/dak devirde homojenize edildi. Homojenat (45 ml) cam pamuktan 2 defa süzüldü ve daha sonra $105\ 000 \times g$ 'de 60 dakika santrifüj edildi. Ultrasantrifüj sonrasında elde edilen süpernatant (32 ml) tampon A ile dengelenmiş 2', 5' - ADP Sepharose 4B afinite kolonuna (1.5 x 6.5 cm) 9.6 ml/saat akış hızı ile uygulandı, pelet ise atıldı. Kolon, istenmeyen proteinlerden kurtulmak amacıyla tampon A ile kolon çıkış çözeltisinin A_{280} değeri 0.019 olana kadar yıkandı. Enzimi kolona yükleme sırasında ve kolonun tampon A ile yıkama sırasında toplanan fraksiyonlarında G6PD aktivitesi gözlenmedi. G6PD enziminin, 2', 5' - ADP Sepharose 4B afinite kolonundan elüsyonu 10.8 ml/saat akış hızı ile tampon A içerisinde 0.1 mM NADP^+ kullanılarak gerçekleştirildi. Fraksiyonlarda aktivite ve A_{280} ölçülerek G6PD aktivitesi gösteren 1.8 ml'lik tüpler toplandı (Şekil 4.1.). 2', 5' - ADP Sepharose 4B afinite kolonuna G6PD yüklenmesi sırasında ve tampon A ile yıkama sırasında toplanan fraksiyonlarda 6-PGD aktivitesi de ayrıca ölçüldü ve 6-PGD'nin kolona bağlandığı ve elüsyon sırasında da G6PD ile birlikte elüe olduğu belirlendi.



Şekil 4.1. Koyun beyin korteksi G6PD enziminin 2', 5' – ADP Sepharose 4B kolonundan elüsyonu

Aynı koenzimi indirgeyen G6PD ve 6-PGD'yi birbirlerinden ayırmak için afinite elüatı 5 mM potasyum fosfat tamponu pH 6.9 (tampon B) ile dengelenmiş DEAE-Sepharose Fast Flow iyon değiştirici kolonuna (1.5 x 7.5 cm) 8.4 ml/saat akış hızı ile uygulandı. DEAE-Sepharose Fast Flow kolonu tampon B ile yıkandı ve 2.8 ml'lik fraksiyonlar toplandı. Fraksiyonlarda enzim aktiviteleri ve A₂₈₀ değerleri ölçülerek G6PD ve 6-PGD'nin iyon değiştirici kolona bağlandıkları saptandı. Kolonun yıkama işlemine A₂₈₀ 0.002 olana kadar devam edildi. DEAE-Sepharose Fast Flow iyon değiştirici kolonuna, tampon B içinde hazırlanan lineer tuz gradiyenti (0 - 300 mM KCl) uygulanarak, enzimler birbirlerinden ayrıldı (Şekil 4.2.). G6PD ve 6-PGD aktivitesinin gözlendiği tüpler ayrı ayrı toplandı ve 4 °C'de saklandı.

Bu şekilde, G6PD enzimi % 68,33 verimle 9439.61 kez saflaştırılmış oldu (Tablo 4.1.).



Şekil 4.2. Koyun beyin korteksi G6PD enziminin DEAE Sepharose Fast Flow kolonundan elüsyonu.

Tablo 4.1. Koyun beyin korteksinden G6PD enziminin saflaştırılması

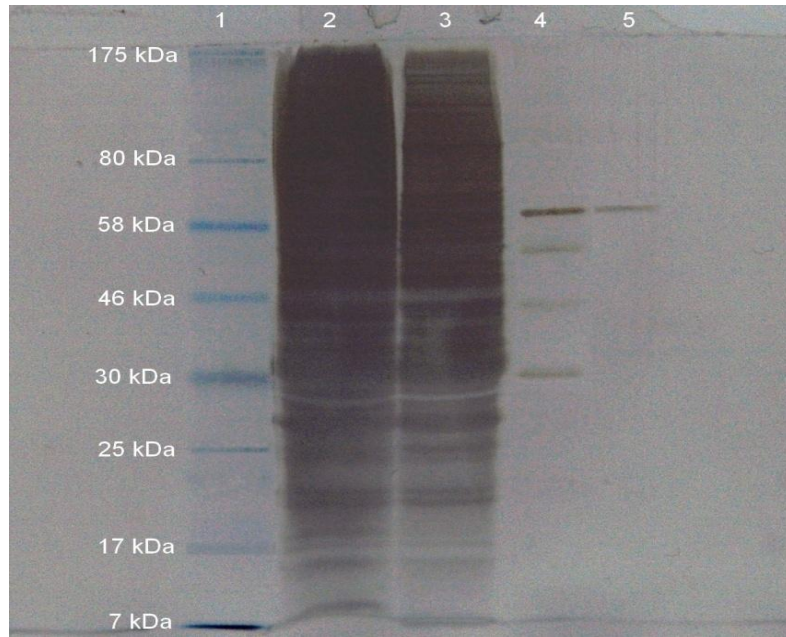
Saflaştırma Basamakları	Hacim (ml)	G6PD Aktivite (U/ml)	G6PD T. Aktivite (U)	Protein (mg/ml)	Total Protein (mg)	Özgül Aktivite (U/mg protein)	Verim (%)	Saflaştırma Oranı
Homojenat	45.000	0.160	7.200	29.470	1326.150	0.005	100.000	1.000
105.000 x g Süpernatant	32.000	0.200	6.400	3.420	109.440	0.059	88.890	10.770
2', 5' – ADP Sepharose 4B Elüantı	19.000	0.265	5.040	0.021	0.400	12.620	69.930	2324.270
DEAE Sepharose Fast Flow Elüantı	12.000	0.410	4.920	0.008	0.100	51.250	68.330	9439.610

4.2. Koyun Beyin Korteksi G6PD Enziminin Molekül Ağırlığının Belirlenmesi

Enzimin molekül ağırlığı iki farklı yöntemle saptandı.

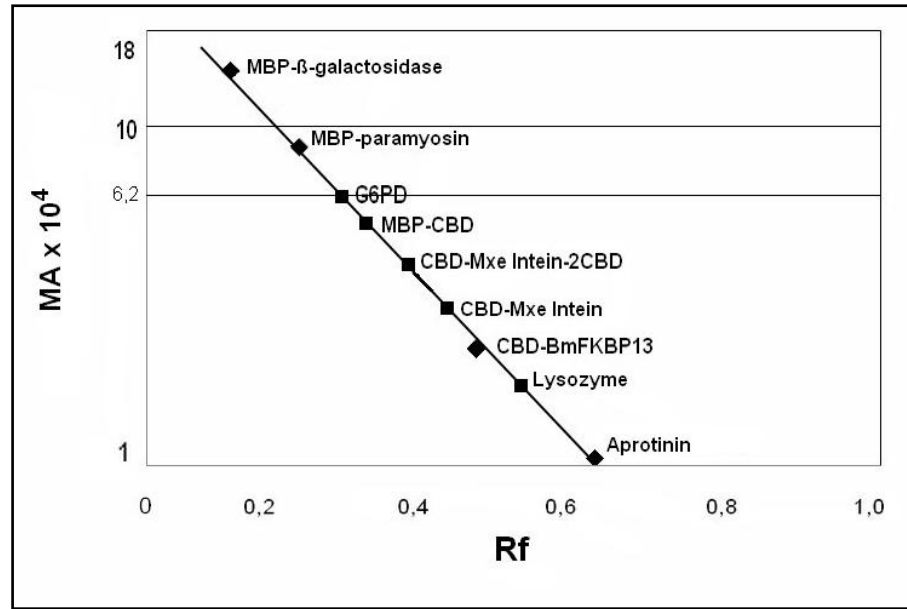
4.2.1. SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi Yöntemi

Koyun beyin korteksi G6PD'nin alt birim MA'sı yöntemler bölümünde anlatıldığı gibi çalışılarak, SDS poliakrilamid jel elektroforezi yöntemi ile saptandı. Şekil 4.3.'de SDS poliakrilamid jel elektroforezi sonucu görülmektedir. Koyun beyin korteksi G6PD'ı SDS poliakrilamid jel elektroforezinde tek protein bandı olarak görüntülendi.



Şekil 4.3. SDS poliakrilamid jel elektroforezi yöntemi ile koyun beyin korteksi G6PD'sinin MA'sının saptanması. 1; Standart proteinler [MBP- β -galaktosidaz (175 kDa), MBP-paramiyozin (80 kDa), MBP-CBD (58 kDa), CBD-Mxe Intein-2CBD (46 kDa), CBD-Mxe Intein (30 kDa), CBD-BmFKBP13 (25 kDa), Lysozyme (17 kDa), Aprotinin (7 kDa)], 2; Homojenat, 3; 105 000 x g supernatant, 4; 2', 5'-ADP Sepharose 4B kromatografi elüantı, 5; DEAE Sepharose Fast Flow kromatografi elüantı.

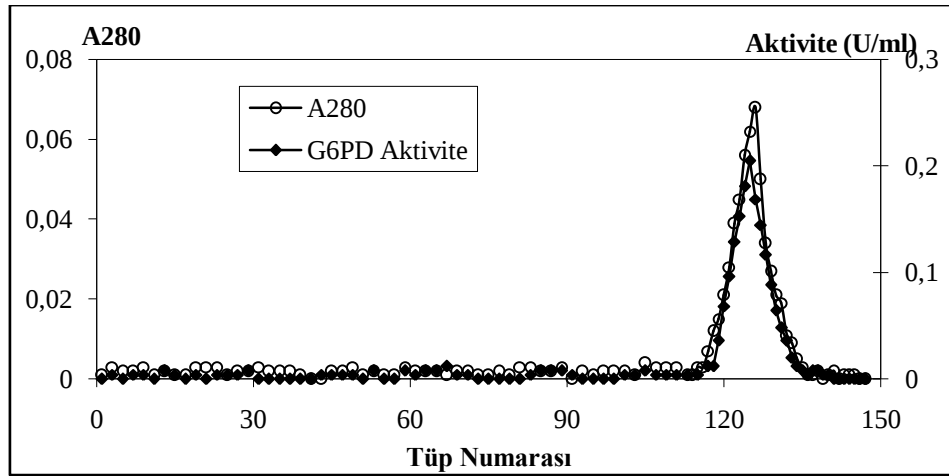
Standart proteinlerin jel üzerinde kat ettikleri mesafeler, bromfenol mavisinin kat ettiği mesafeye bölünerek, ortalama R_f değerleri hesaplandı. R_f değerleri ile standart proteinlerin molekül ağırlıklarının logaritması arasında, standart grafiği (Şekil 4.4.) çizilerek, bu grafikten koyun beyin korteksi G6PD'sinin molekül ağırlığı 61.2 kDa olarak bulundu.



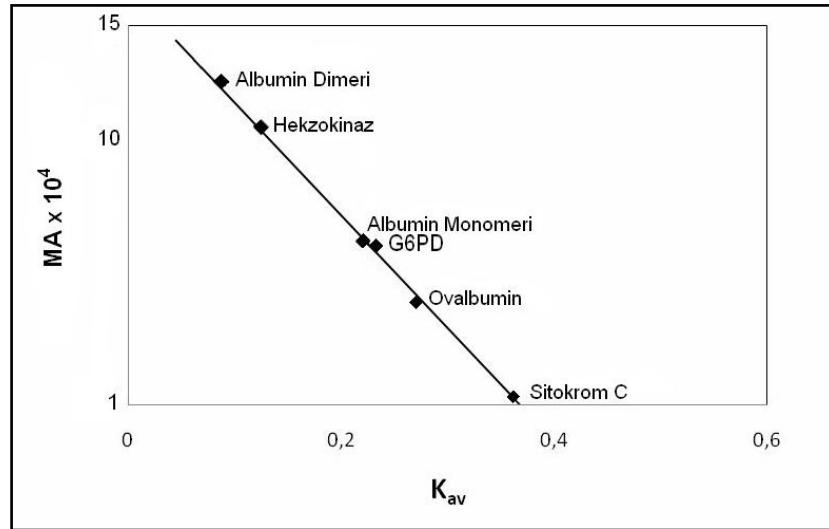
Şekil 4.4. SDS poliakrilamid jel elektroforezi yöntemi ile koyun beyin korteksi G6PD'sinin MA'sının saptanması. R_f değerleri ile standart proteinlerin molekül ağırlıklarının logaritması arasında çizilen standart grafik.

4. 2. 2. Sephadex G-200 Jel Elemesi Yöntemi

Koyun beyin korteksinden saflaştırılan G6PD'ın MA'sı yöntemler bölümünde anlatılan Sephadex G-200 jel elemesi yöntemi kullanılarak saptandı. Ezim kolondan tek protein piki olarak elüe oldu (Şekil 4.5). Standart olarak kullanılan proteinler için hesaplanan K_{av} değerleri ile proteinlerin MA'larının logaritması arasında çizilen standart grafiğinden (Şekil 4. 6.), G6PD'ın MA'sı 64.5 kDa olarak bulundu.



Şekil 4.5. Sephadex G-200 jel eleme yöntemi ile koyun beyin korteksi G6PD enziminin elüsyon profili.



Şekil 4.6. Sephadex G-200 jel eleme yöntemi ile koyun beyin korteksi G6PD'sinin MA'sının saptanması. Sığır serum albumini (dimer 128 kDa, monomer 66 kDa), hekzokinaz (105 kDa), ovalbumin (45 kDa), sitokrom C (12 kDa).

4.3. Koyun Beyin Korteksi G6PD Enziminin Aktivasyon Enerjisinin Saptanması

Değişik sıcaklıklarda ölçülen aktiviteler Arrhenius'un aktivasyon enerjisi denklemi ($k=A.e^{-E_a/R.T}$) kullanılarak grafiklendi (144).

Bu eşitliğin lineer formu şu şekilde gösterilebilir (Eş.4. 1.):

$$\log k = \frac{-E_a}{2.303R} \times \frac{1}{T} + \log A \quad (\text{Eş. 4.1.})$$

Eşitlikte:

E_a = Aktivasyon enerjisi

T = Mutlak sıcaklık (Kelvin)

R = Gaz sabiti 1,98 kal/derece. mol

A = Arrhenius katsayısı

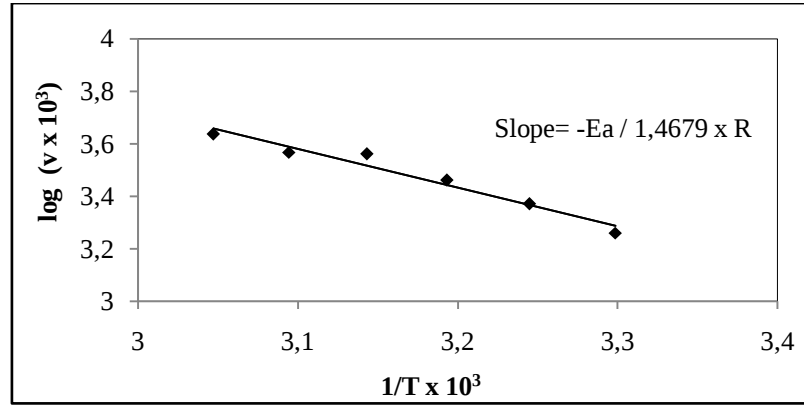
k = Hız sabiti

Arrhenius denkleminde hız sabitinin logaritması ($\log k$), $1/T$ 'ye karşı grafiklendiğinde E_a , aktivasyon enerjisi, elde edilen doğrunun eğiminden hesaplanabilir. Bu nedenle, enzimin aktivitesi 30 °C ile 55 °C arasında ölçülerek, $1/T$ 'ye karşılık, aktivitelerin logaritması grafiklendi (Şekil 4. 7.).

Burada, E_a , 6.689 kcal/mol olarak saptandı. Aktivite artma faktörü (Q_{10}), aşağıdaki eşitlikten (Eş. 4. 2.) yararlanılarak hesaplandı ve 30 - 40 °C sıcaklık aralığı için Q_{10} : 1,913 olarak bulundu.

$$\log Q = \frac{10 \times E_a}{2.303 \times R \times T \times T_2} \quad (\text{Eş. 4. 2.})$$

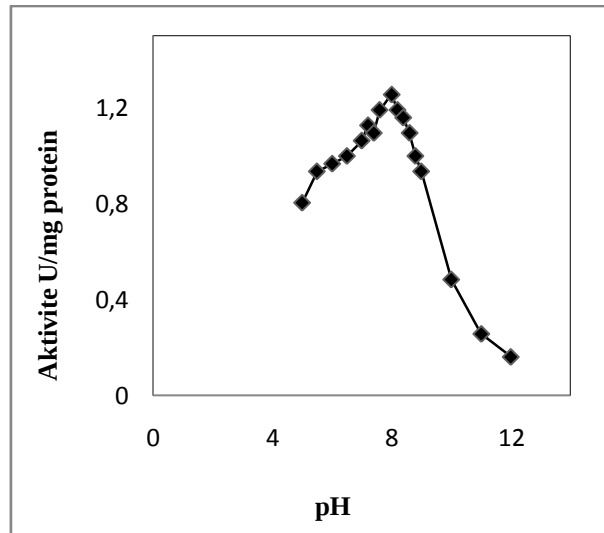
G6PD'nin aktivasyon entalpisi (ısısı) ise, $\Delta H = E_a - R \times T$ denkleminde hesaplandı ve 6.026 kcal/mol olarak saptandı.



Şekil 4.7. Koyun Beyin Korteksi G6PD enzimi için Arrhenius grafiği.

4. 4. Koyun Beyin Korteksi G6PD Enzimi Aktivitesi Üzerine pH'ın Etkisi

Ortamin pH değişiminin enzim aktivitesi üzerindeki etkisini incelemek ve enzimin optimum pH'sını saptamak amacıyla pH 5.0 ile pH 12.0 aralığında potasyum fosfat (10 mM) tamponu kullanılarak enzim aktiviteleri ölçüldü. Değişen pH değerlerine karşılık hızlar grafiklendi (Şekil 4. 8.). Enzim pH 8.0' de maksimum aktivite gösterdi.



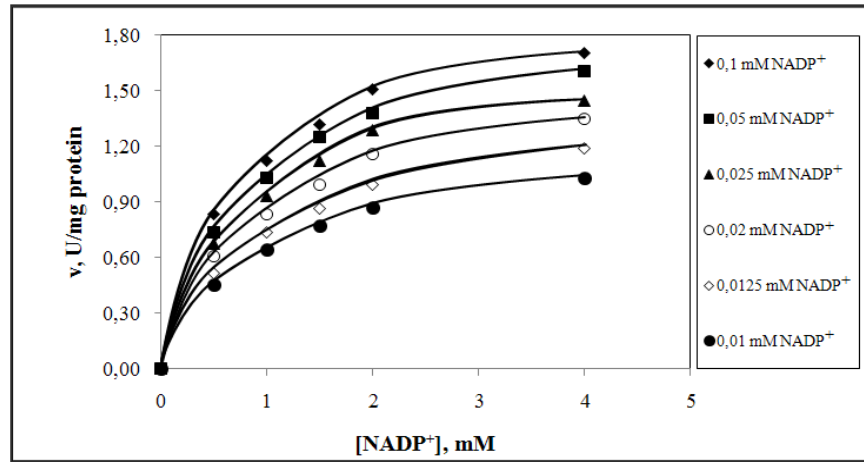
Şekil 4. 8. Koyun beyin korteksi G6PD enzimi için pH grafiği

4.5. Koyun Beyin Korteksi G6PD Enziminin Kinetik Davranışı

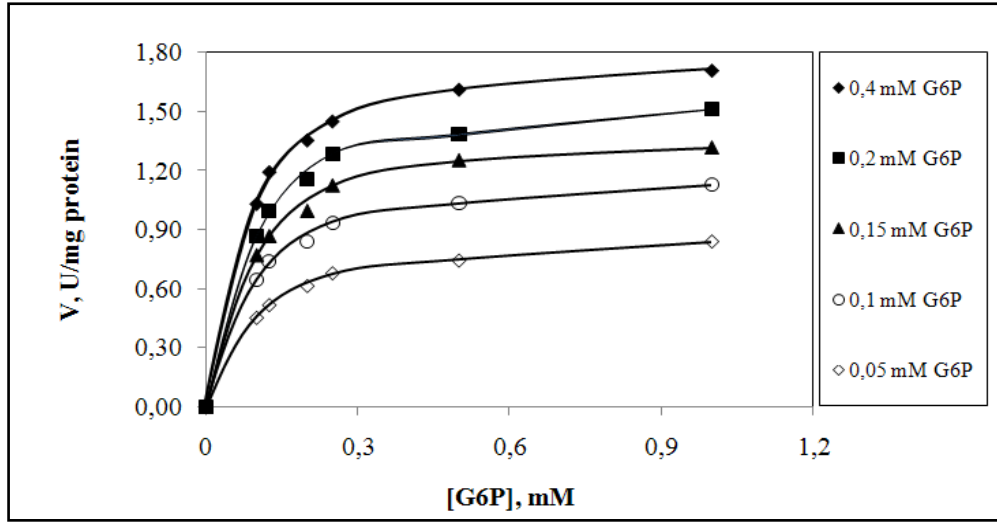
Birçok enzimatik reaksiyon iki ya da üç substrat ve ürünlerden meydana gelmektedir. Çoklu substrat kinetik mekanizmaları ve hız eşitlikleri çok daha kompleks ve çeşitlidir (142).

İki substratla (A ve B) başlayan ve iki ürünle (P ve Q) sonuçlanan tepkimeler “Bi Bi” tepkimesidir. Koyun beyin korteksi G6PD enziminin katalizlediği tepkime A, G6P; B, NADP^+ ; P, 6-PGA; Q, NADPH olmak üzere tepkime bir “Bi Bi” tepkimesi olup, mekanizmasını ve kinetik sabitlerini saptamak için G6P sabit substrat olarak kabul edilip, değişen NADP^+ derişimlerinde; daha sonra NADP^+ sabit substrat olarak kabul edilip, değişen G6P derişimlerinde hızlar ölçüldü.

G6PD enziminin doğal substratı olan G6P için kullanılan substrat aralığında (0.05 mM – 0.4 mM), kinetiğin hiperbolik Michaelis-Menten modeline uyduğu saptandı (Şekil 4. 9.). Artan derişimlerde NADP^+ kullanıldığında enzimin kinetik davranışını değiştirmedeği, Michaelis-Menten modeline uyduğu Şekil 4. 10.’den saptandı.

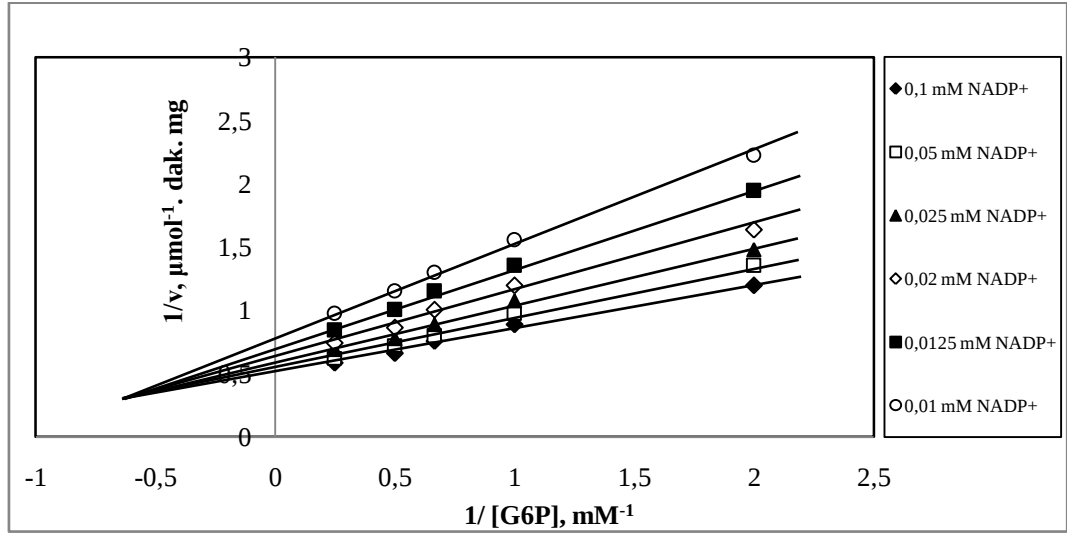


Şekil 4.9. Koyun beyin korteksi G6PD enziminin hız (v)- NADP^+ , Michaelis-Menten grafiği (Sabit substrat NADP^+ , değişken substrat G6P).

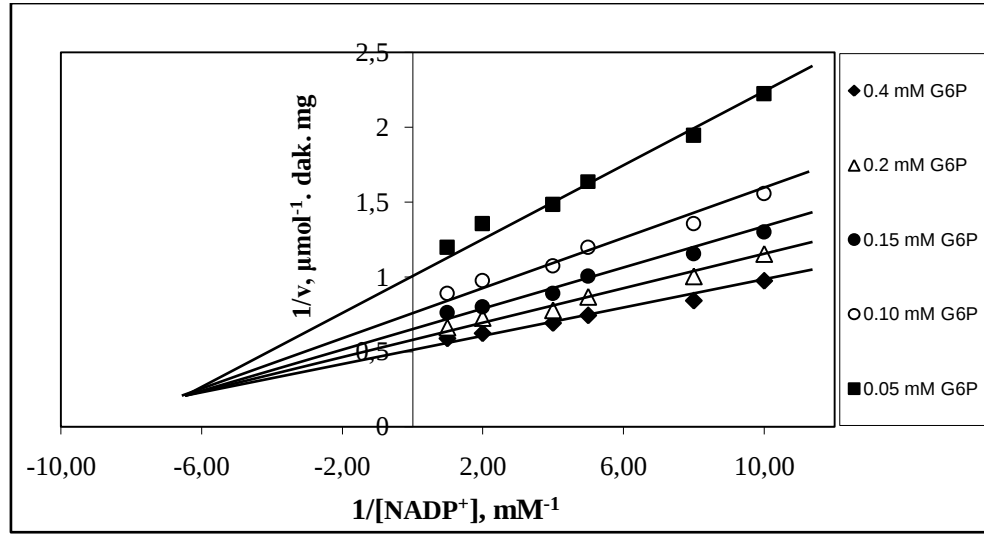


Şekil 4.10. Koyun beyin korteksi G6PD enziminin hız (v)-G6P, Michaelis-Menten grafiği (Sabit substrat G6P, değişken substrat NADP^+).

Sabit NADP^+ derişimlerinde $1/[\text{G6P}]$ 'ye karşı $1/v$ değerleri (Şekil 4. 11.) ve sabit G6P derişimlerinde $1/[\text{NADP}^+]$ değerlerine karşılık $1/v$ değerleri (Şekil 4. 12.) grafikleğinde, doğruların $1/[\text{S}]$ ekseninin yukarısında bir noktada kesiştiği gözlemlendi.



Şekil 4.11. Koyun beyin korteksi G6PD enzimi için, sabit NADP^+ derişimlerinde $1/[\text{G6P}]$ 'ye karşı $1/v$ değerleri grafiği



Şekil 4.12. Koyun beyin korteksi G6PD enzimi için, sabit G6P derişimlerinde $1/[NADP^+]$ 'ye karşı $1/v$ değerleri grafiğı

“Ordered Bi Bi”, “Ping Pong Bi Bi”, “Theorell-Chance Bi Bi” ya da “Random Bi Bi” tepkimelerinde değışken substrat hızlarının sabit substrat konsantrasyonuna bağı resiprokal grafiklerinde doğırların kesiştiğı yer $1/[S]$ ekseninin yukarısında bir noktada kesişmektedir (144). Bu nedenle, G6PD enziminin kinetik mekanizmasının bahsedilen mekanizmalardan biri olabileceğı düşünöldü. Enzimin bu mekanizmalardan hangisine uygun olduğınu saptamak için Eş. 4. 3. ve Eş. 4. 4.’de verilen hız eşitlikleri ile regresyon analizleri yapıldı ve sonuçlar Mannervik (143) tarafından önerilen prensiplere göre değıerlendirildi.

“Ping-Pong Bi Bi” mekanizmaları için hız eşitliğı:

$$\frac{v}{V_m} = \frac{[A][B]}{K_{m_B}[A] + K_{m_A}[B] + [A][B]} \quad (\text{Eş. 4. 3.})$$

Sıralı mekanizmalar için hız eşitliği:

$$\frac{v}{V_m} = \frac{[A][B]}{K_{ia} \cdot K_{m_B} + K_{m_B}[A] + K_{m_A}[B] + [A][B]} \quad (\text{Eş. 4. 4.})$$

Eş. 4. 4.'de K_{ia} , enzime önce bağlanan substratın enzimle yaptığı kompleksin dissosiasyon (ayırışma) sabitidir.

Substrat olarak G6P ve NADP^+ 'nin değişen derişimleri kullanılarak elde edilen hızlar yukarıda verilen eşitliklere uygulanarak enzimin kinetik sabitleri ve “loss” değerleri bulundu (Tablo 4. 2.).

Tablo 4. 2. Statistica ve SPSS 11,5 istatistik paket programları kullanılarak, G6PD için ölçülen hızların uygulandığı mekanizmalar, kinetik sabitler ve “loss” değerleri (* $\mu\text{mol/dak/mg}$ enzim, **mM).

Mekanizma	Uygulanan Eşitlik	Kinetik Sabitleri	Loss Değeri
Ping-Pong Bi Bi	Eş. 4. 3.	$*V_m = 2.5484 \pm 0.105$ $**K_{m_{\text{NADP}^+}} = 0.01275 \pm 0.00115$ $**K_{m_{\text{G6P}}} = 0.11978 \pm 0.01038$	0.08254
Sıralı Mekanizmalar	Eş. 4. 4.	$*V_m = 2.18196 \pm 0.06465$ $**K_{m_{\text{NADP}^+}} = 0.064 \pm 0.0009$ $**K_{m_{\text{G6P}}} = 0.0729 \pm 0.00694$ $K_{i_{\text{NADP}^+}} = 0.056 \pm 0.001$ $K_{i_{\text{G6P}}} = 0.074 \pm 0.03$	0.02257

Tablo 4. 2.'den görüldüğü gibi, sıralı mekanizmalar için elde edilen “loss” değeri, “Ping-Pong Bi Bi” için elde edilen “loss” değerinden daha küçük bir değerde olduğu için, G6PD enziminin “Ping-Pong Bi Bi” mekanizmasına uygun olmadığı, sıralı mekanizmalardan birine uygun bir kinetik davranışa sahip olabileceğine karar verildi. “Ordered Bi Bi”, “Random Bi Bi” ya da “Theorell-Chance” mekanizmalarının üçü için de, Eş. 4. 4. benzer bir hız eşitliği geçerlidir ve elde edilen grafikler benzerdir (144). Bu nedenle, enzimin bu mekanizmalardan hangisine uygun bir kinetik davranışa sahip olduğunu anlamak için NADPH ve 6-PGA ile enzimin ürün inhibisyon deneyleri yapıldı.

4.5.1. Koyun Beyin Korteksi G6PD Enziminin NADPH ile inhibisyonu

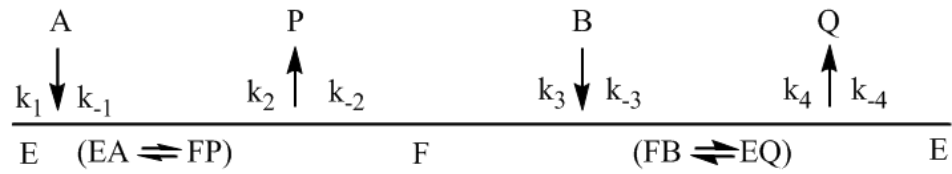
- a) Değişken substrat olarak NADP^+ alınarak, sabit G6P derişiminde (0.4 mM), 0.025, 0.05, 0.075, 0.1 mM NADPH derişimlerinde hızlar ölçüldü. $1/[\text{NADP}^+]$ değerleri ile $1/v$ 'ler arasında grafik çizildiğinde (Şekil 4.14.) doğruların $1/[S]$ eksenini yukarısında bir noktada kesiştiği gözlemlendi. “Statistica” ve “SPSS 11.5” programlarında hız eşitliklerinin regresyon analizi yapılarak NADPH'nin NADP^+ 'ye karşı inhibisyonunun kompetitif tipte olduğu bulundu ve $K_i = 0.024 \pm 0.008$ mM olarak hesaplandı.
- b) Daha sonra değişken substrat olarak G6P alınarak, sabit NADP^+ (0.2 mM) derişiminde, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1 mM NADPH derişimlerinde hızlar ölçülerek, $1/[G6P]$ değerleri ile $1/v$ 'ler grafiklendi (Şekil 4. 15.). Grafiğin değerlendirilmesi ve regresyon analizlerinin yapılması sonucunda G6P'ye karşı NADPH'nin enzimi kompetitif tipte inhibe ettiği sonucuna varıldı ve $K_i = 0.042 \pm 0.0023$ mM olarak hesaplandı.

4.5.2. Koyun Beyin Korteksi G6PD Enziminin 6-PGA ile inhibisyonu

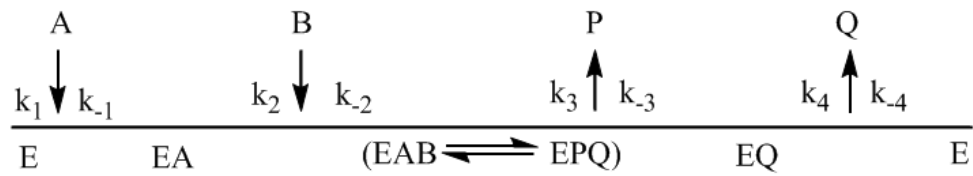
- a)** Değişken substrat olarak NADP^+ alınarak, sabit G6P (0.6 mM) derişiminde, 0.4, 0.6, 0.8 mM 6-PGA derişimlerinde hızlar ölçüldü ve $1/[\text{NADP}^+]$ değerleri ile $1/v$ 'ler arasında grafik çizildi (Şekil 4. 16). Sonuçlar değerlendirildiğinde 6-PGA inhibisyonunun NADP^+ 'ye karşı non-kompetetif tipte, K_i değeri ise 1.96 ± 0.0011 mM olarak hesaplandı.
- b)** Daha sonra değişken substrat olarak G6P alındı, sabit NADP^+ (0.2 mM) derişiminde, 0.4, 0.6, 0.8 mM 6-PGA kullanılarak hızlar ölçüldü. Elde edilen sonuçlar $1/[\text{G6P}]$ değerleri ile $1/v$ 'ler arasında çizilen grafikte gösterildi (Şekil 4. 17). 6-PGA inhibisyonu aynı şekilde G6P'ye karşı kompetetif tipte olduğu bulunup, $K_i = 3.579 \pm 0.024$ mM olarak hesaplandı.

Ürün inhibisyonu tiplerinden enzimin kinetik davranışının "Theorell-Chance"e uyduğu anlaşıldı. Ayrıca birinci substratın G6P, NADP^+ 'nin ise ikinci substrat olduğu, enzimden ayrılan birinci ürünün 6-PGA ve ikinci ürünün ise NADPH olduğu anlaşıldı.

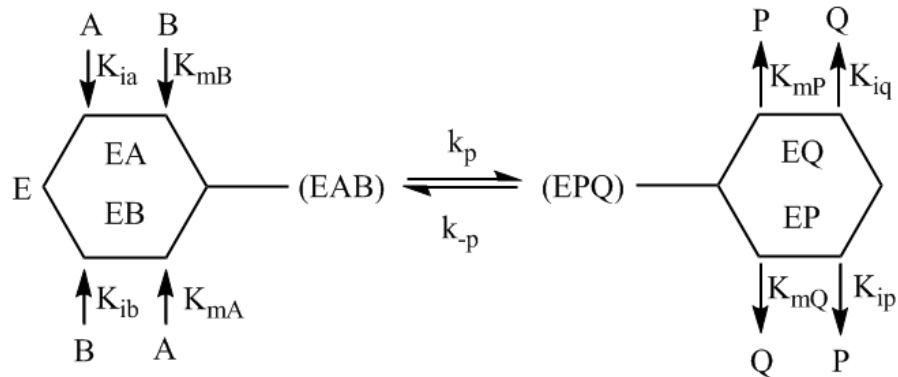
“Ping Pong Bi Bi” Sistemi:



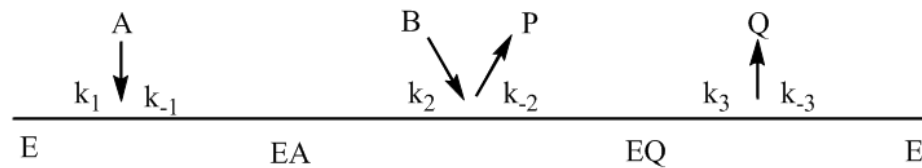
“Ordered Bi Bi” Sistemi:



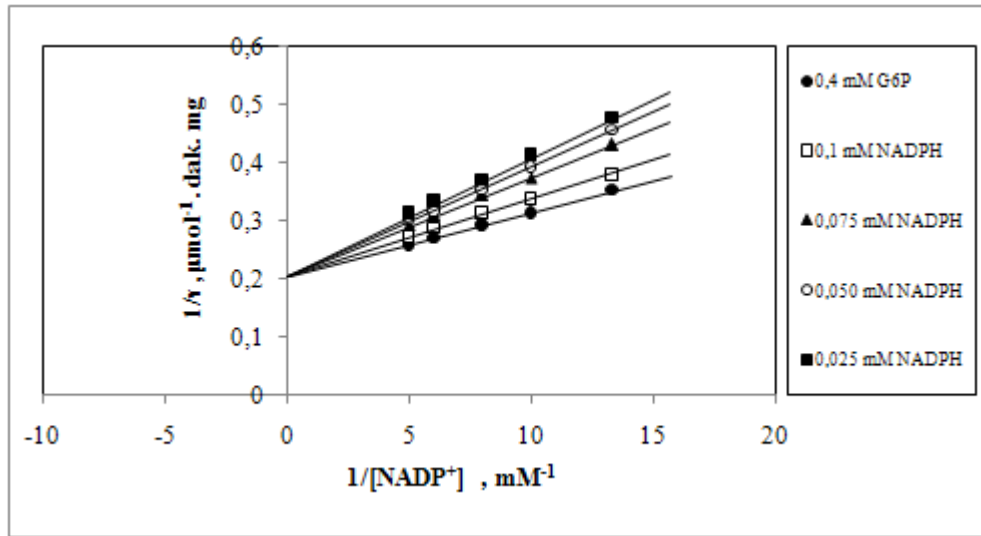
“Random Bi Bi” Sistemi:



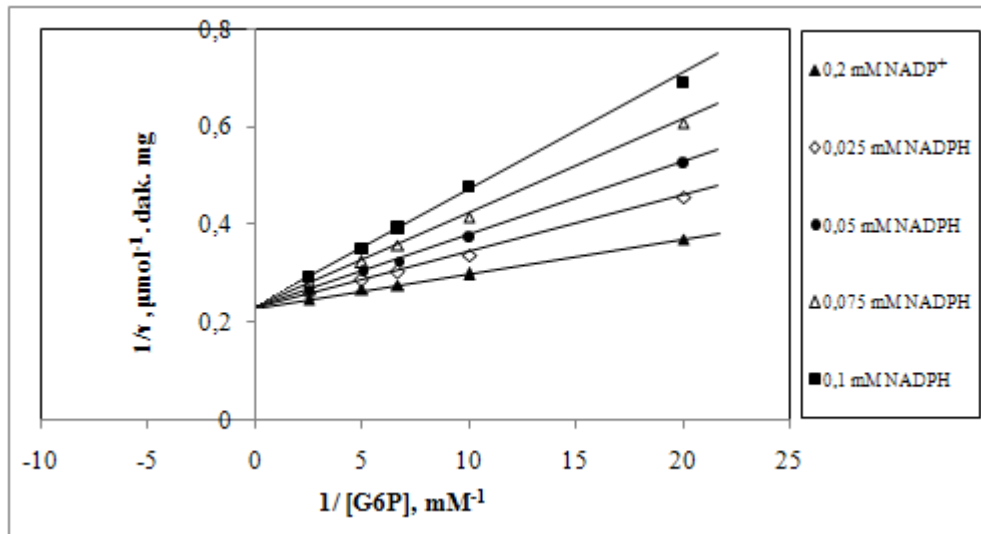
“Theorell-Chance” Sistemi:



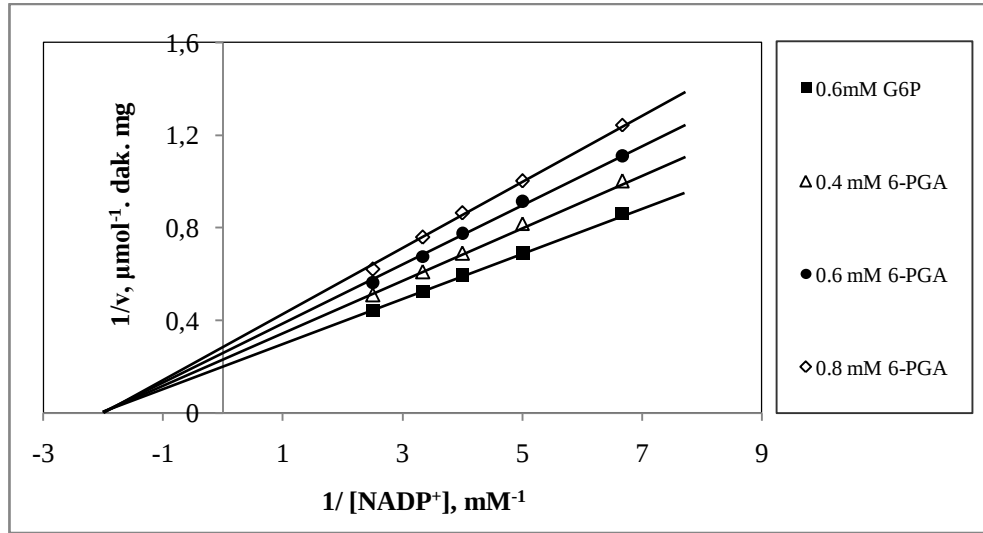
Şekil 4. 13. “Bi Bi” mekanizmaları (144).



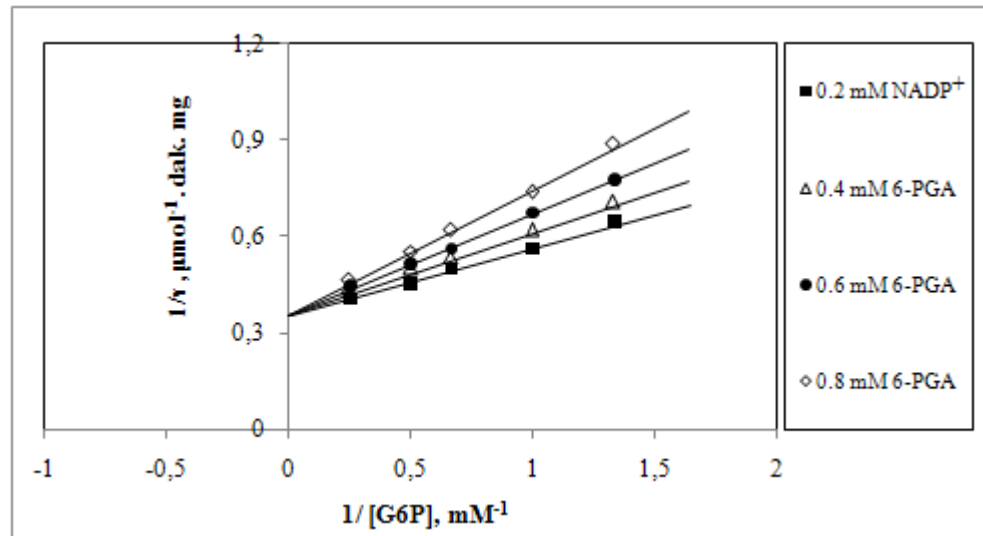
Şekil 4.14. Sabit G6P derişiminde (0.4 mM), NADPH'nin, NADP^+ 'nin enzime bağlanmasına olan etkisi



Şekil 4.15. Sabit NADP^+ derişiminde (0.2 mM), NADPH'nin, G6P'nin enzime bağlanmasına etkisi.



Şekil 4.16. Sabit G6P derişiminde (0.6 mM), 6-PGA'nın, $NADP^+$ 'nin enzime bağlanmasına olan etkisi



Şekil 4.17. Sabit $NADP^+$ derişiminde (0.2 mM), 6-PGA'nın, G6P'nin enzime bağlanmasına etkisi.

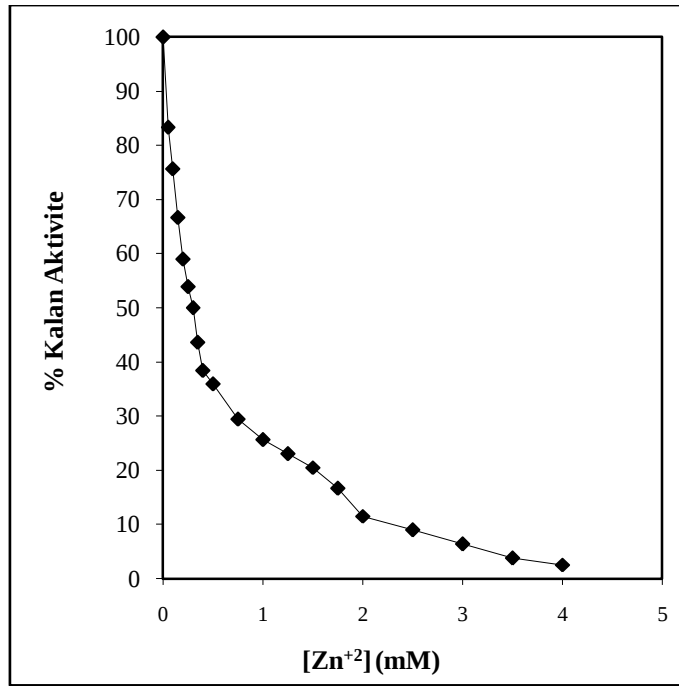
4.6. Koyun Beyin Korteksi G6PD Enziminin Bazı Metallerle İnhibisyonu

4.6.1. Koyun Beyin Korteksi G6PD Enziminin Çinko (Zn^{+2}) ile İnhibisyonu

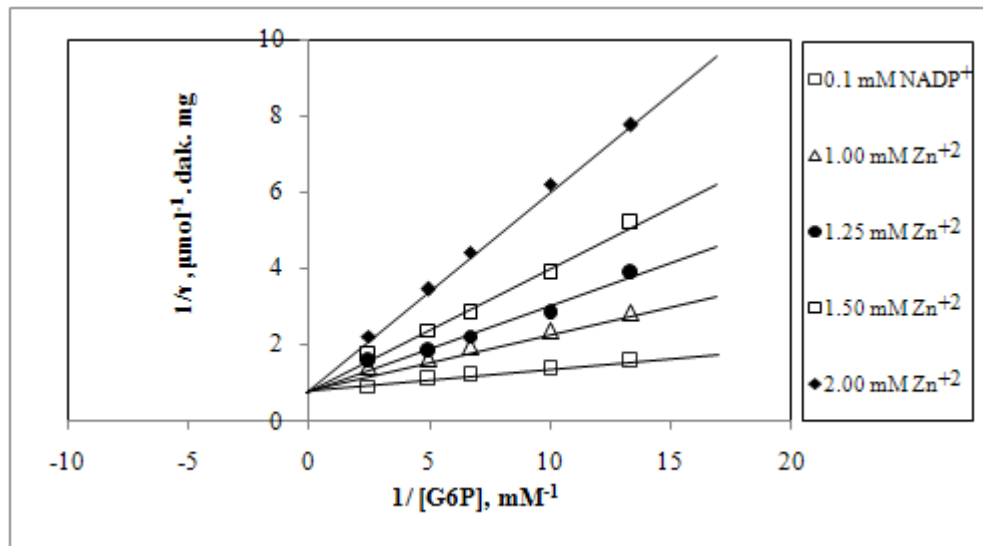
Koyun beyin korteksinden saflaştırılan G6PD enzimi üzerine Zn^{+2} 'nin etkisi, 0.05 – 4.00 mM arasında değişen konsantrasyonlarda Zn^{+2} deney ortamına ilave edilerek gösterildi (Şekil 4.18.). G6PD enziminin, Zn^{+2} ile IC_{50} değeri 0.32 ± 0.010 mM olarak saptandı.

a.) G6P değişken, $NADP^+$ sabit (0.1 mM) içeren deney ortamlarına değişik konsantrasyonlarda (1.0, 1.25, 1.5, 2.0 mM) Zn^{+2} ilave edilerek ilk hızlar ölçüldü ve Lineweaver-Burk grafiği çizildi (Şekil 4.19.). Çinko iyonunun enzimi kompetitif olarak inhibe ettiği saptandı. Enzimin K_m G6P değeri 0.0603 ± 0.02 mM olarak alınıp Statistica programında K_i değeri 0.301 ± 0.076 mM olarak hesaplandı.

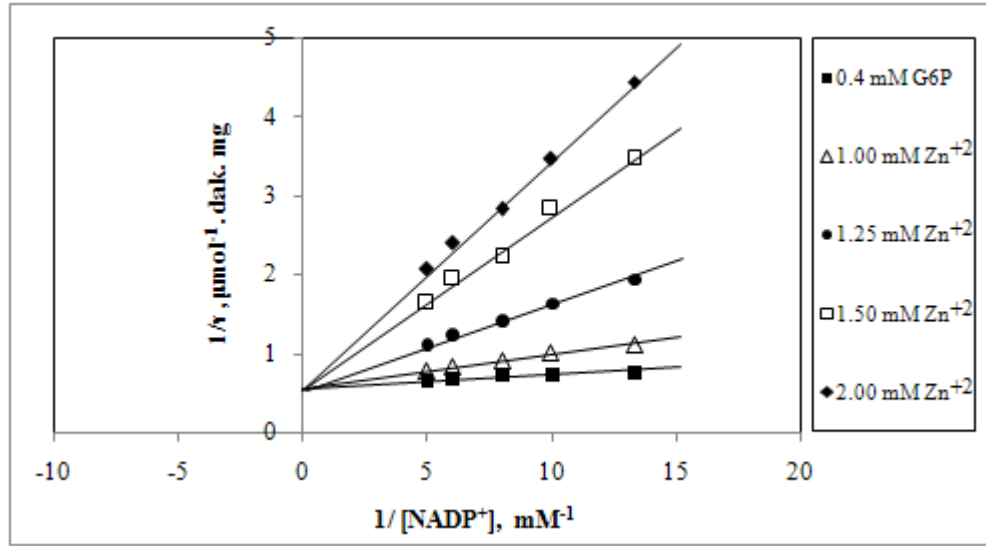
b.) $NADP^+$ değişken substrat, G6P sabit (0.4 mM) konsantrasyonunda deney ortamına değişik konsantrasyonlarda (1.0, 1.25, 1.5, 2.0 mM) Zn^{+2} ilave edilerek deney tekrarlandı (Şekil 4.20.). Çinko iyonunun $NADP^+$ bağlanmasını da kompetitif olarak inhibe ettiği bulundu ve K_m $NADP^+$ değeri 0.039 ± 0.064 olarak alınıp K_i değeri 0.269 ± 0.34 olarak hesaplandı.



Şekil 4.18. Koyun beyin korteksi G6PD enziminin Zn^{+2} ile inhibisyonu



Şekil 4.19. Sabit $NADP^+$ derişiminde (0.1 mM), değişken G6P ve Zn^{+2} konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiğı



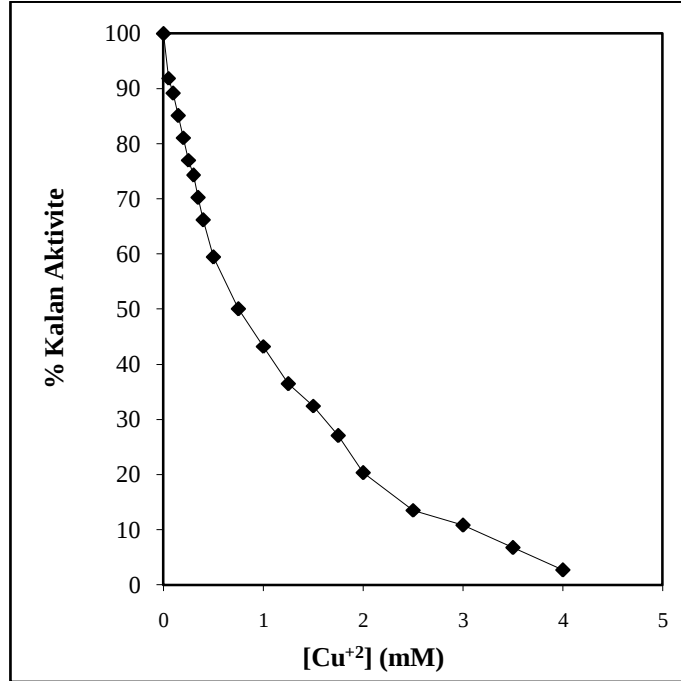
Şekil 4.20. Sabit G6P derişiminde (0.4 mM), değişken NADP⁺ ve Zn⁺² konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiği

4.6.2. Koyun Beyin Korteksi G6PD Enziminin Bakır (Cu⁺²) ile İnhibisyonu

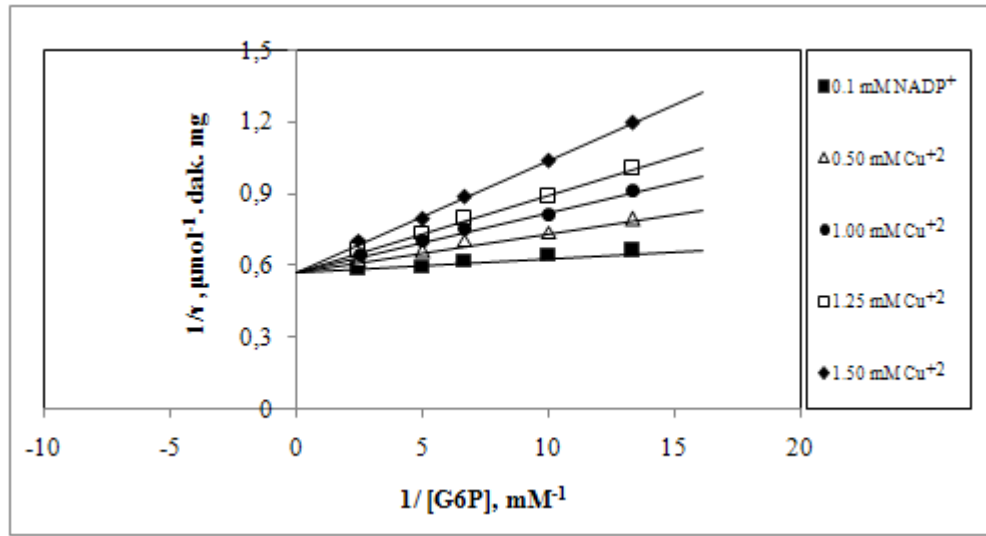
Koyun beyin korteksinden saflaştırılan G6PD enzimi üzerine Cu⁺²'nin etkisi, 0.05 – 4.00 mM arasında değişen konsantrasyonlarda Cu⁺² deney ortamına ilave edilerek gösterildi (Şekil 4.21.). G6PD enziminin, Cu⁺² ile IC₅₀ değeri 0.72 ± 0.042 mM olarak saptandı.

- a.) G6P değişken, NADP⁺ sabit (0.1 mM) içeren deney ortamlarına değişik konsantrasyonlarda (0.5, 1.0, 1.25, 1.5 mM) Cu⁺² ilave edilerek ilk hızlar ölçüldü ve Lineweaver-Burk grafiği çizildi (Şekil 4.22.). Bakır iyonunun enzimi kompetitif olarak inhibe ettiği saptandı. Enzimin K_m G6P değeri 0.0101 ± 0.009 mM olarak saptanırken, Statistica programında K_i değeri 0.235 ± 0.012 mM olarak hesaplandı.

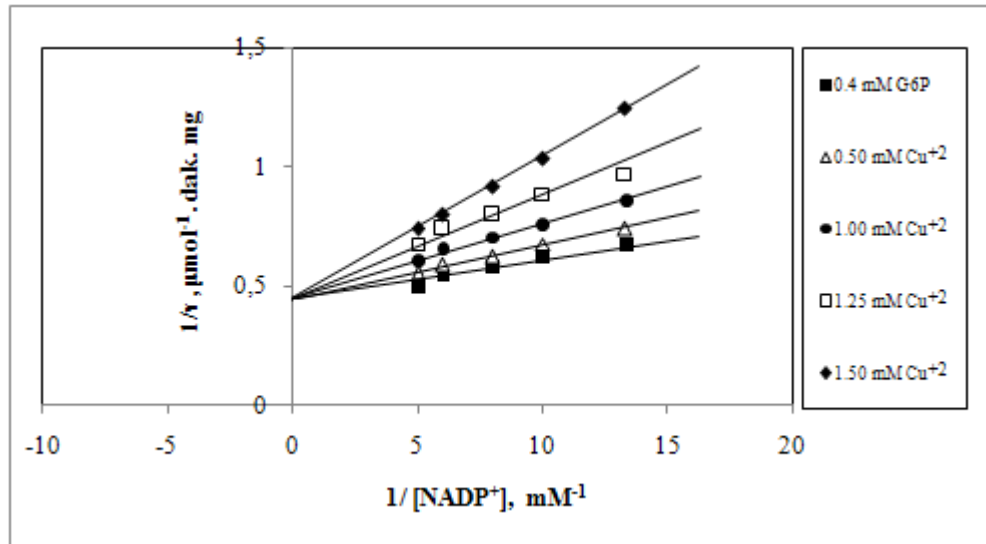
b.) NADP^+ değişken substrat, G6P sabit (0.4 mM) konsantrasyonunda deney ortamına değişik konsantrasyonlarda (0.5, 1.0, 1.25, 1.5 mM) Cu^{+2} ilave edilerek deney tekrarlandı (Şekil 4.23.). Bakır iyonunun NADP^+ bağlanmasını da kompetitif olarak inhibe ettiği bulundu ve $K_m \text{NADP}^+$ değeri 0.0442 ± 0.004 mM olarak belirlenirken, K_i değeri 0.773 ± 0.009 mM olarak hesaplandı.



Şekil 4.21. Koyun beyin korteksi G6PD enziminin Cu^{+2} ile inhibisyonu



Şekil 4.22. Sabit NADP^+ derişiminde (0.1 mM), değişken G6P ve Cu^{+2} konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiği

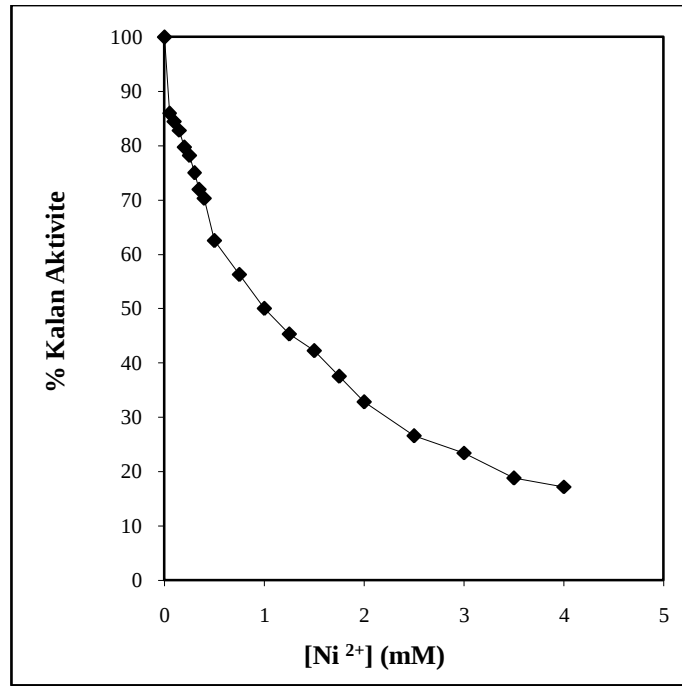


Şekil 4.23. Sabit G6P derişiminde (0.4 mM), değişken NADP^+ ve Cu^{+2} konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiği

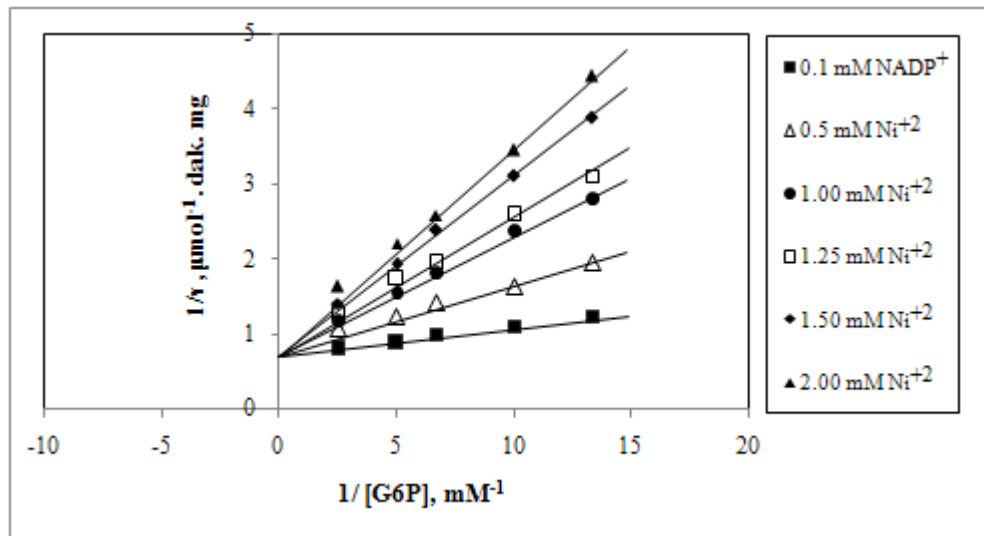
4.6.3. Koyun Beyin Korteksi G6PD Enziminin Nikel (Ni^{+2}) ile İnhibisyonu

Koyun beyin korteksinden saflaştırılan G6PD enzimi üzerine Ni^{+2} 'nin etkisi, 0.05 – 4.00 mM arasında değişen konsantrasyonlarda Ni^{+2} deney ortamına ilave edilerek gösterildi (Şekil 4.24.). G6PD enziminin, Ni^{+2} ile IC_{50} değeri 0.98 ± 0.034 mM olarak saptandı.

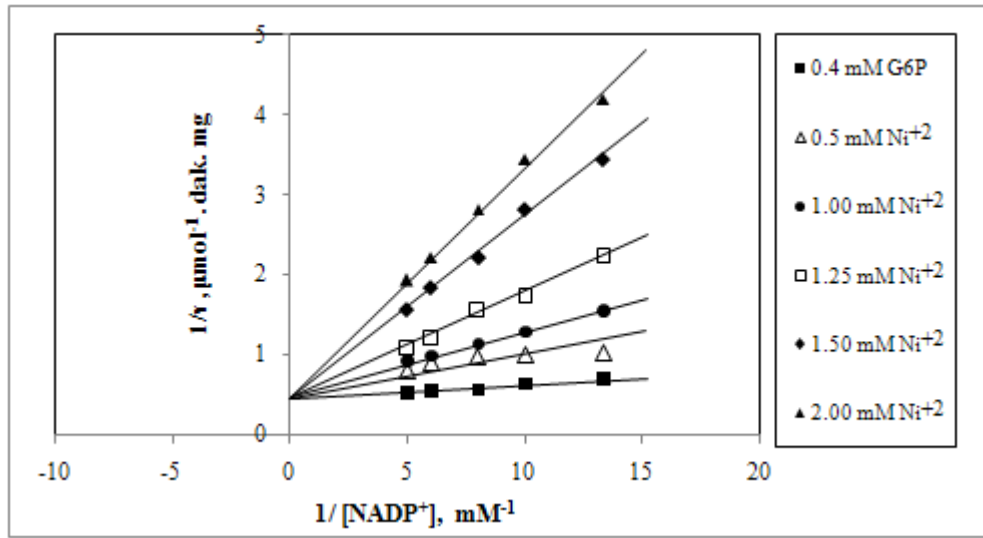
- a.) G6P değişken, NADP^+ sabit (0.1 mM) içeren deney ortamlarına değişik konsantrasyonlarda (0.5, 1.0, 1.25, 1.5, 2.0 mM) Ni^{+2} ilave edilerek ilk hızlar ölçüldü ve Lineweaver-Burk grafiği çizildi (Şekil 4.25.). Nikel iyonunun enzimi kompetitif olarak inhibe ettiği saptandı. Enzimin K_m G6P değeri 0.040 ± 0.029 mM olarak saptanıp, Statistica programında K_i değeri 0.177 ± 0.010 mM olarak hesaplandı.
- b.) NADP^+ değişken substrat, G6P sabit (0.4 mM) konsantrasyonunda deney ortamına değişik konsantrasyonlarda (0.5, 1.0, 1.25, 1.5, 2.0 mM) Ni^{+2} ilave edilerek deney tekrarlandı (Şekil 4.26.). Nikel iyonunun NADP^+ bağlanmasını da kompetitif olarak inhibe ettiği bulundu ve $K_m \text{NADP}^+$ değeri 0.036 ± 0.022 olarak belirlendi ve K_i değeri 0.168 ± 0.008 olarak hesaplandı.



Şekil 4.24. Koyun beyin korteksi G6PD enziminin Ni^{2+} ile inhibisyonu



Şekil 4.25. Sabit NADP^+ derişiminde (0.1 mM), değişken G6P ve Ni^{2+} konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiğı



Şekil 4.26. Sabit G6P derişiminde (0.4 mM), değişken NADP^+ ve Ni^{+2} konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiği

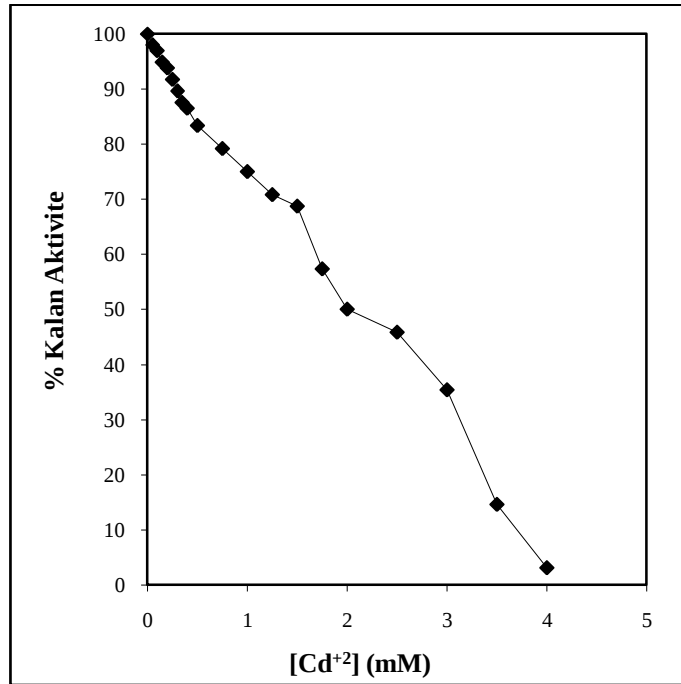
4.6.4. Koyun Beyin Korteksi G6PD Enziminin Kadmiyum (Cd^{+2}) ile İnhibisyonu

Koyun beyin korteksinden saflaştırılan G6PD enzimi üzerine Cd^{+2} 'nin etkisi, 0.05 – 4.00 mM arasında değişen konsantrasyonlarda Cd^{+2} deney ortamına ilave edilerek gösterildi (Şekil 4.27.). G6PD enziminin, Cd^{+2} ile IC_{50} değeri 0.20 ± 0.021 mM olarak saptandı.

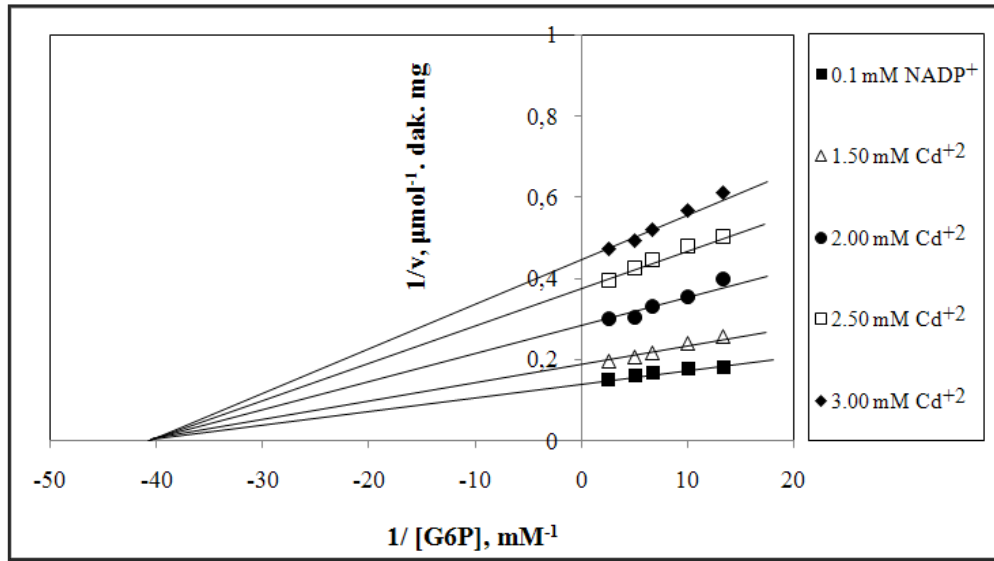
a.) G6P değişken, NADP^+ sabit (0.1 mM) içeren deney ortamlarına değişik konsantrasyonlarda (0.15, 0.20, 0.25, 0.30 mM) Cd^{+2} ilave edilerek ilk hızlar ölçüldü ve Lineweaver-Burk grafiği çizildi (Şekil 4.28.). Kadmiyum iyonunun enzimi non-kompetetif olarak inhibe ettiği saptandı. Enzimin K_m

G6P değeri 0.024 ± 0.012 mM olarak gözlenirken, Statistica programında K_i değeri 1.98 ± 0.02 mM olarak hesaplandı.

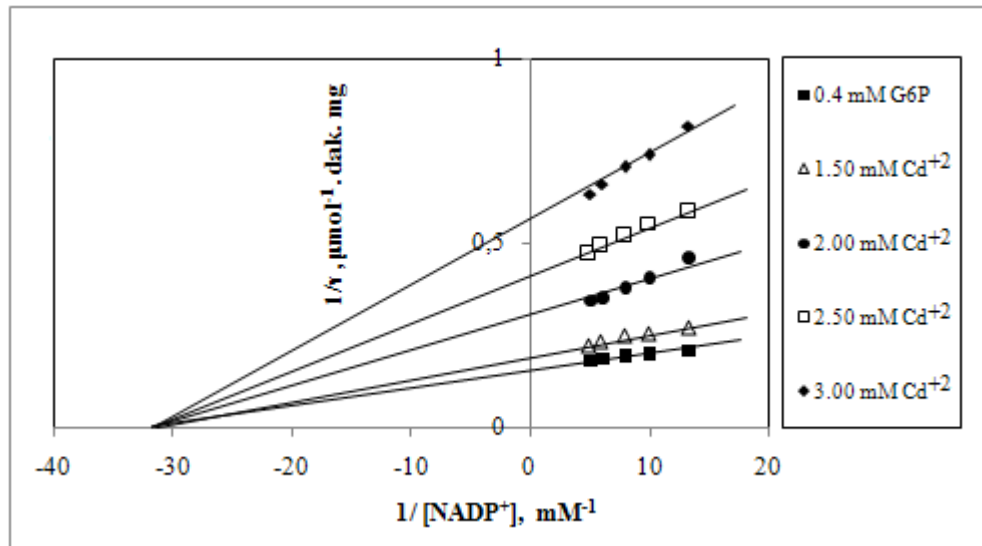
b.) NADP^+ değişken substrat, G6P sabit (0.4 mM) konsantrasyonunda deney ortamına değişik konsantrasyonlarda (0.15, 0.20, 0.25, 0.30 mM) Cd^{+2} ilave edilerek deney tekrarlandı (Şekil 4. 29.). Kadmiyum iyonunun NADP^+ bağlanmasını da non-kompetitif olarak inhibe ettiği bulundu ve K_m NADP^+ değeri $0,031 \pm 0.002$ olarak saptandı, K_i değeri ise 1.97 ± 0.06 olarak hesaplandı.



Şekil 4.27. Koyun beyin korteksi G6PD enziminin Cd^{+2} ile inhibisyonu



Şekil 4.28. Sabit NADP^+ derişiminde (0.1 mM), değişken G6P ve Cd^{+2} konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiği



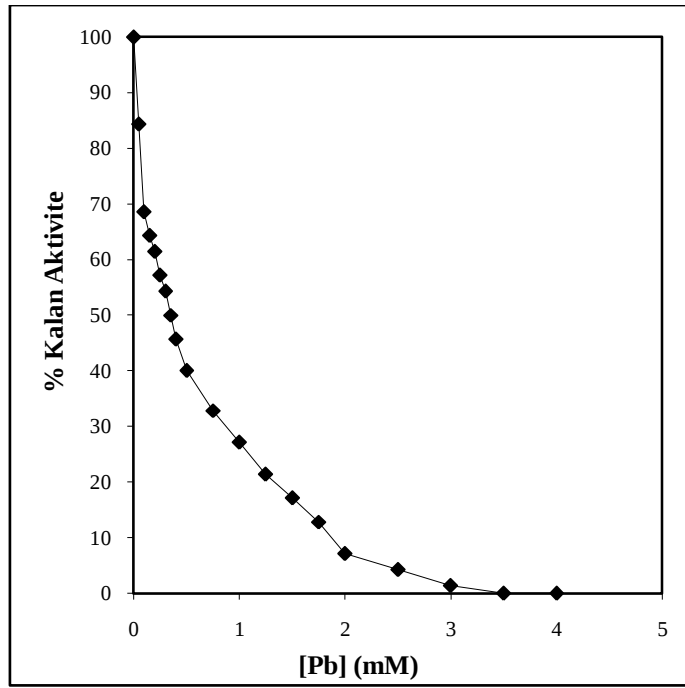
Şekil 4.29. Sabit G6P derişiminde (0.4 mM), değişken NADP^+ ve Cd^{+2} konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiği

4.6.5. Koyun Beyin Korteksi G6PD Enziminin Kurşun (Pb) ile İnhibisyonu

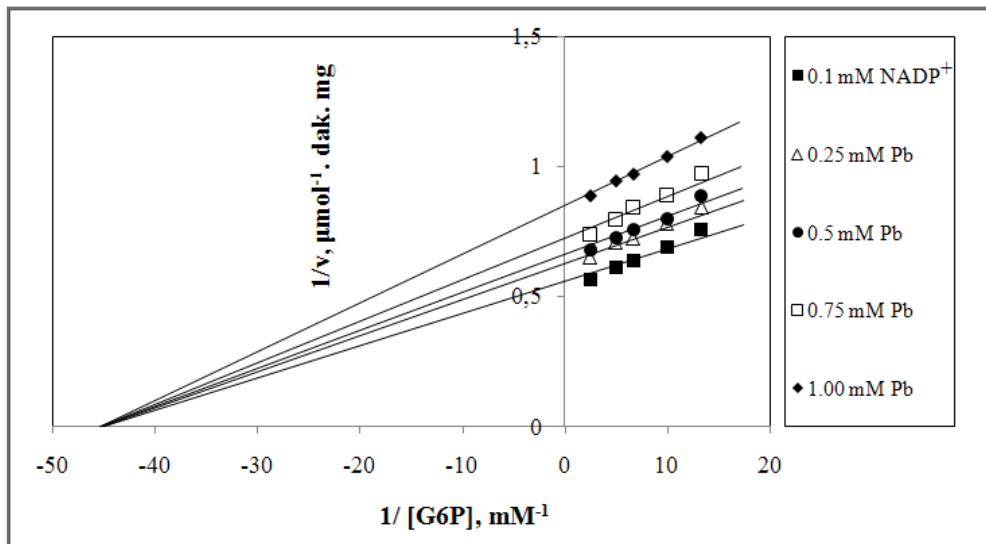
Koyun beyin korteksinden saflaştırılan G6PD enzimi üzerine Pb'nin etkisi, 0.05 – 4.00 mM arasında değişen konsantrasyonlarda Pb deney ortamına ilave edilerek gösterildi (Şekil 4.30.). G6PD enziminin, Pb ile IC_{50} değeri 0.31 ± 0.012 mM olarak saptandı.

a.) G6P değişken, $NADP^+$ sabit (0.1 mM) içeren deney ortamlarına değişik konsantrasyonlarda (0.25, 0.50, 0.75, 1.00 mM) Pb ilave edilerek ilk hızlar ölçüldü ve Lineweaver-Burk grafiği çizildi (Şekil 4.31.). Kurşun iyonunun enzimi non-kompetitif olarak inhibe ettiği saptandı. Enzimin K_{mG6P} değeri 0.035 ± 0.005 mM olarak belirlenirken, Statistica programında K_i değeri 2.22 ± 0.19 mM olarak hesaplandı.

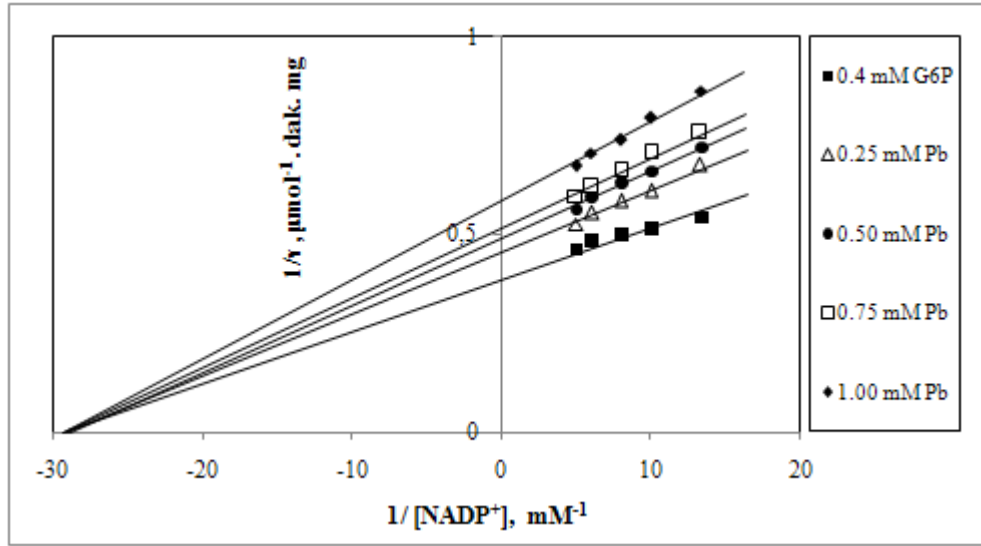
b.) $NADP^+$ değişken substrat, G6P sabit (0.4 mM) konsantrasyonunda deney ortamına değişik konsantrasyonlarda (0.25, 0.50, 0.75, 1.00 mM) Pb ilave edilerek deney tekrarlandı (Şekil 4.32.). Kurşun iyonunun $NADP^+$ bağlanmasını da non-kompetitif olarak inhibe ettiği bulundu ve $K_m NADP^+$ değeri 0.034 ± 0.007 , K_i değeri ise 2.168 ± 0.056 olarak hesaplandı.



Şekil 4.30. Koyun beyin korteksi G6PD enziminin Pb ile inhibisyonu



Şekil 4.31. Sabit NADP^+ derişiminde (0.1 mM), değişken G6P ve Pb konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.32. Sabit G6P derişiminde (0.4 mM), değişken $NADP^+$ ve Pb konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiği

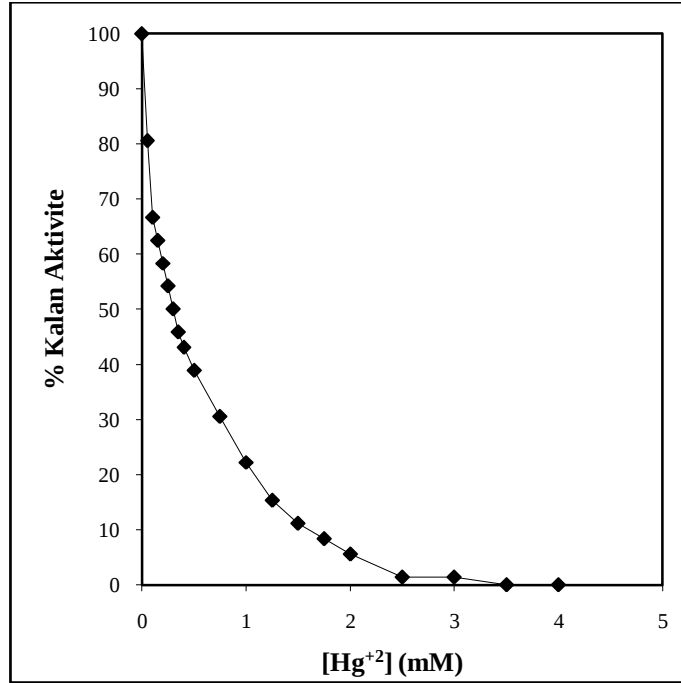
4.6.6. Koyun Beyin Korteksi G6PD Enziminin Civa (Hg^{+2}) ile İnhibisyonu

Koyun beyin korteksinden saflaştırılan G6PD enzimi üzerine Hg^{+2} 'nin etkisi, 0.05 – 4.00 mM arasında değişen konsantrasyonlarda Hg^{+2} deney ortamına ilave edilerek gösterildi (Şekil 4.33.). G6PD enziminin, Hg^{+2} ile IC_{50} değeri 0.26 ± 0.011 mM olarak saptandı.

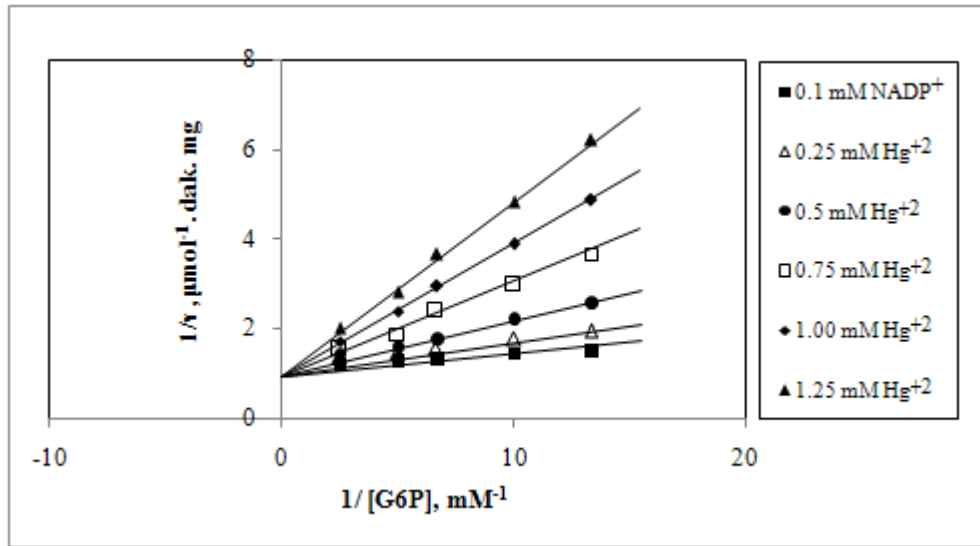
a.) G6P değişken, $NADP^+$ sabit (0.1 mM) içeren deney ortamlarına değişik konsantrasyonlarda (0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25 mM) Hg^{+2} ilave edilerek ilk hızlar ölçüldü ve Lineweaver-Burk grafiği çizildi (Şekil 4.34.). Civa iyonunun enzimi kompetitif olarak inhibe ettiği saptandı. Enzimin K_{mG6P}

değeri 0.031 ± 0.025 mM, Statistica programında K_i değeri 0.165 ± 0.12 mM olarak hesaplandı.

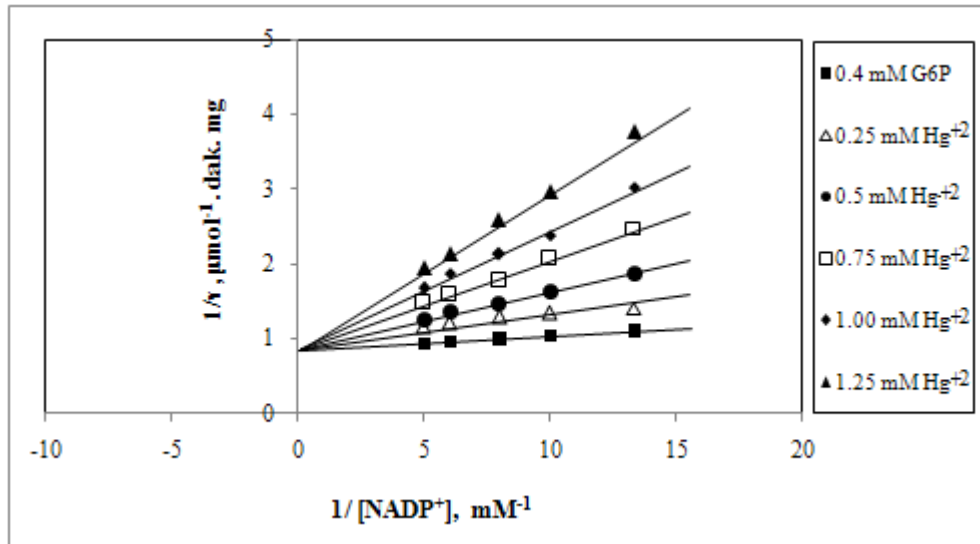
b.) NADP^+ değişken substrat, G6P sabit (0.4 mM) konsantrasyonunda deney ortamına değişik konsantrasyonlarda (0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25 mM) Hg^{+2} ilave edilerek deney tekrarlandı (Şekil 4.35.). Civa iyonunun NADP^+ bağlanmasını da kompetitif olarak inhibe ettiği bulundu ve $K_{m\text{NADP}^+}$ değeri 0.034 ± 0.007 , K_i değeri 2.168 ± 0.056 olarak hesaplandı.



Şekil 4.33. Koyun beyin korteksi G6PD enziminin Hg^{+2} ile inhibisyonu



Şekil 4.34. Sabit NADP^+ derişiminde (0.1 mM), değişken G6P ve Hg^{+2} konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.35. Sabit G6P derişiminde (0.4 mM), değişken NADP^+ ve Hg^{+2} konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiği

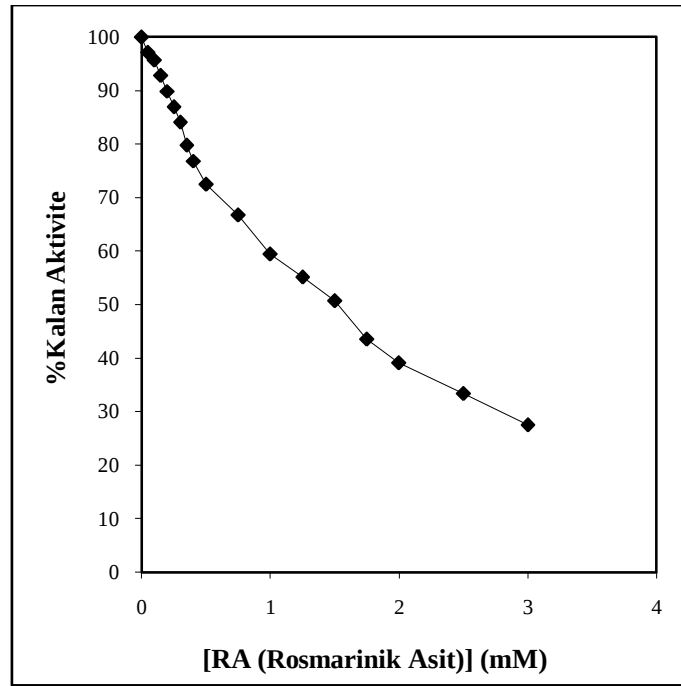
4.7. Koyun Beyin Korteksi G6PD Enziminin Bazı İlaçlarla İnhibisyonu

4.7.1. Koyun Beyin Korteksi G6PD Enziminin Rosmarinik Asit (RA) ile İnhibisyonu

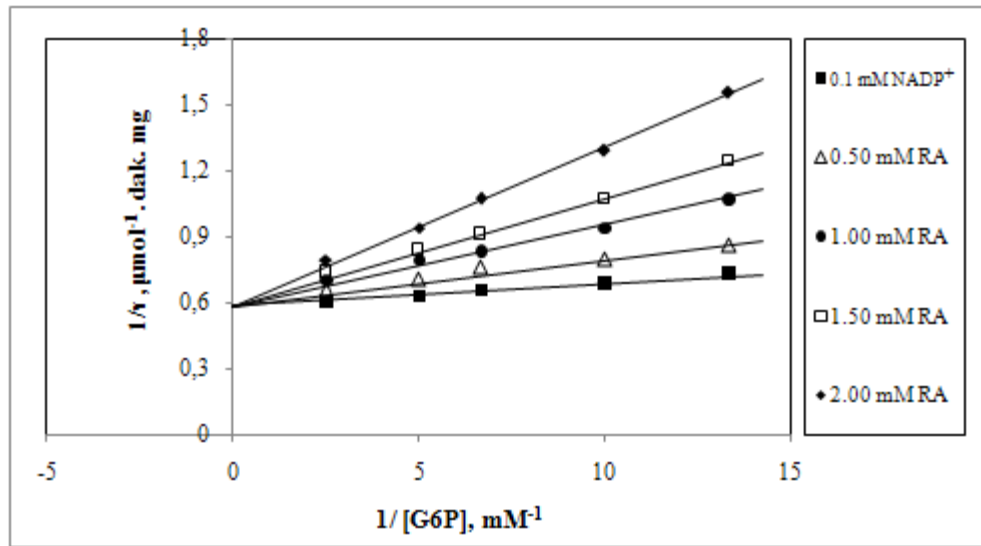
Koyun beyin korteksinden saflaştırılan G6PD enzimi üzerine RA'nın etkisi, 0.05 – 3.00 mM arasında değişen konsantrasyonlarda RA deney ortamına ilave edilerek gösterildi (Şekil 4.36.). G6PD enziminin, RA ile IC_{50} değeri 1.52 ± 0.012 mM olarak saptandı.

a.) G6P değişken, $NADP^+$ sabit (0.1 mM) içeren deney ortamlarına değişik konsantrasyonlarda (0.50, 1.00, 1.50, 2.0 mM) RA ilave edilerek ilk hızlar ölçüldü ve Lineweaver-Burk grafiği çizildi (Şekil 4.37.). Rosmarinik asit'in enzimi kompetitif olarak inhibe ettiği saptandı. Enzimin K_m G6P değeri 0.041 ± 0.007 mM, Statistica programında K_i değeri 0.165 ± 0.12 mM olarak hesaplandı.

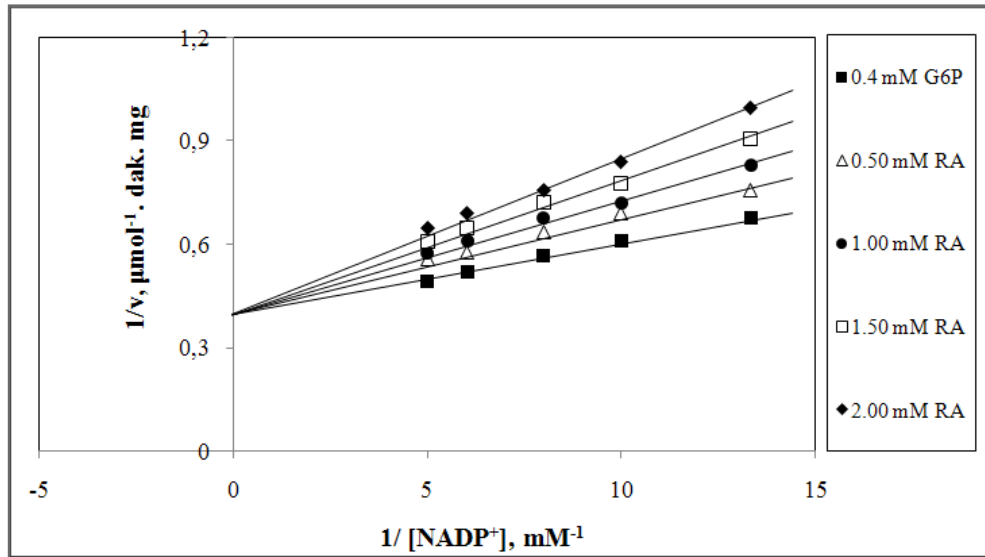
b.) $NADP^+$ değişken substrat, G6P sabit (0.4 mM) konsantrasyonunda deney ortamına değişik konsantrasyonlarda (0.50, 1.00, 1.50, 2.0 mM) RA ilave edilerek deney tekrarlandı (Şekil 4.38.). Rosmarinik Asit'in $NADP^+$ bağlanmasını da kompetitif olarak inhibe ettiği bulundu ve K_m $NADP^+$ değeri 0.036 ± 0.002 olarak saptandı, K_i değeri ise 1.268 ± 0.009 mM olarak hesaplandı.



Şekil 4.36. Koyun beyin korteksi G6PD enziminin RA ile inhibisyonu



Şekil 4.37. Sabit NADP^+ derişiminde (0.1 mM), değişken G6P ve RA konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiğı



Şekil 4.38. Sabit G6P derişiminde (0.4 mM), değişken NADP⁺ ve RA konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiği

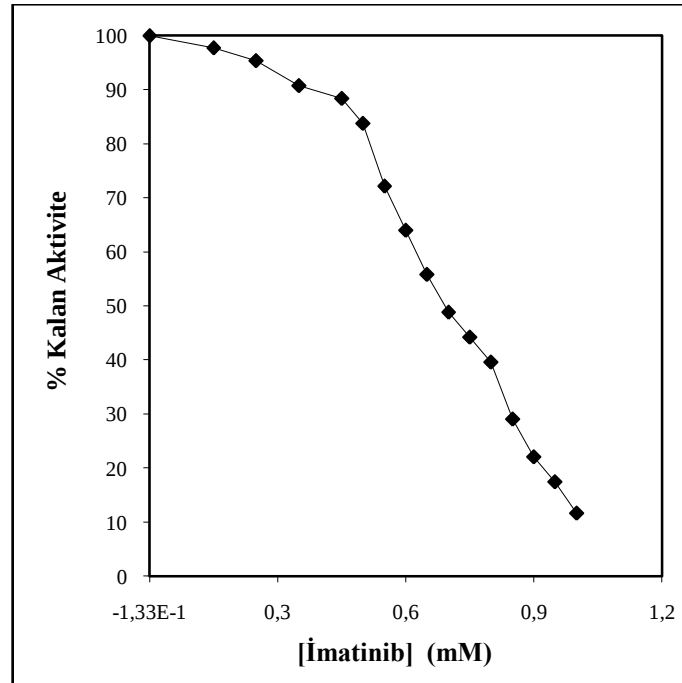
4.7.2. Koyun Beyin Korteksi G6PD Enziminin İmatinib ile İnhibisyonu

Koyun beyin korteksinden saflaştırılan G6PD enzimi üzerine İmatinib'in etkisi, 0.05 – 3.00 mM arasında değişen konsantrasyonlarda İmatinib deney ortamına ilave edilerek gösterildi (Şekil 4.39.). G6PD enziminin, İmatinib ile IC₅₀ değeri 0.74 ± 0.014 mM olarak saptandı.

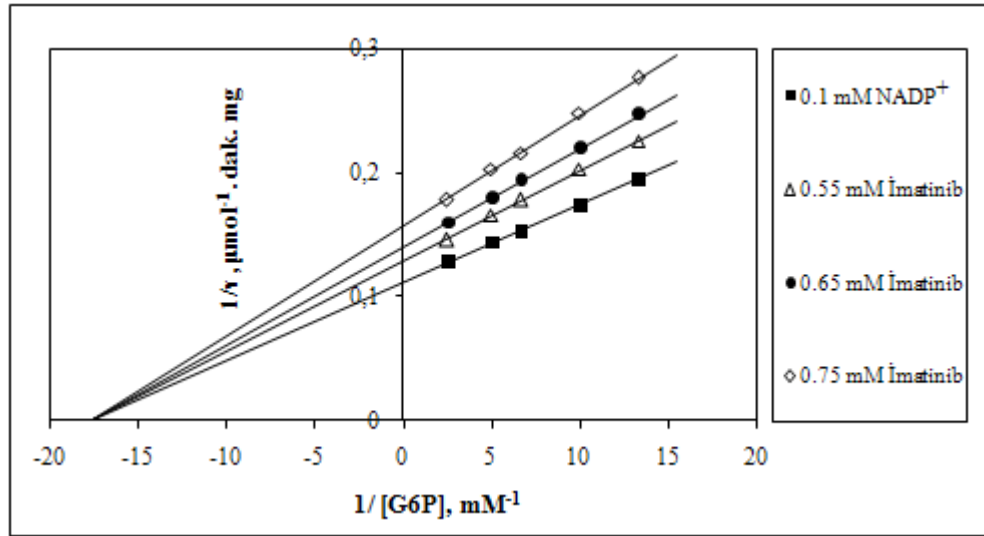
- a.) G6P değişken, NADP⁺ sabit (0.1 mM) içeren deney ortamlarına değişik konsantrasyonlarda (0.55, 0.65, 0.75 mM) İmatinib ilave edilerek ilk hızlar ölçüldü ve Lineweaver-Burk grafiği çizildi (Şekil 4.40.). İmatinib'in enzimi non-kompetitif olarak inhibe ettiği saptandı. Enzimin K_{mG6P} değeri 0.060 ±

0.005 mM, Statistica programında K_i değeri 2.32 ± 0.21 mM olarak hesaplandı.

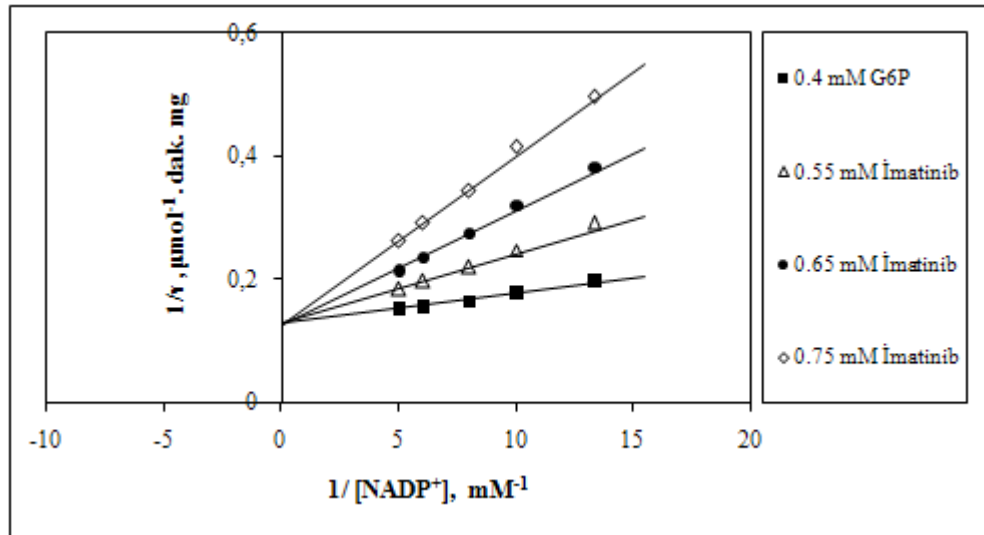
b.) NADP^+ değişken substrat, G6P sabit (0.4 mM) konsantrasyonunda deney ortamına değişik konsantrasyonlarda (0.55, 0.65, 0.75 mM) İmatinib ilave edilerek deney tekrarlandı (Şekil 4.41.). İmatinib'in NADP^+ bağlanmasını ise kompetitif olarak inhibe ettiği bulundu ve K_{mNADP^+} değeri 0.056 ± 0.0009 olarak belirlendi ve K_i değeri 0.311 ± 0.002 olarak hesaplandı.



Şekil 4.39. Koyun beyin korteksi G6PD enziminin İmatinib ile inhibisyonu



Şekil 4.40. Sabit NADP^+ derişiminde (0.1 mM), değişken G6P ve İmatinib konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiği

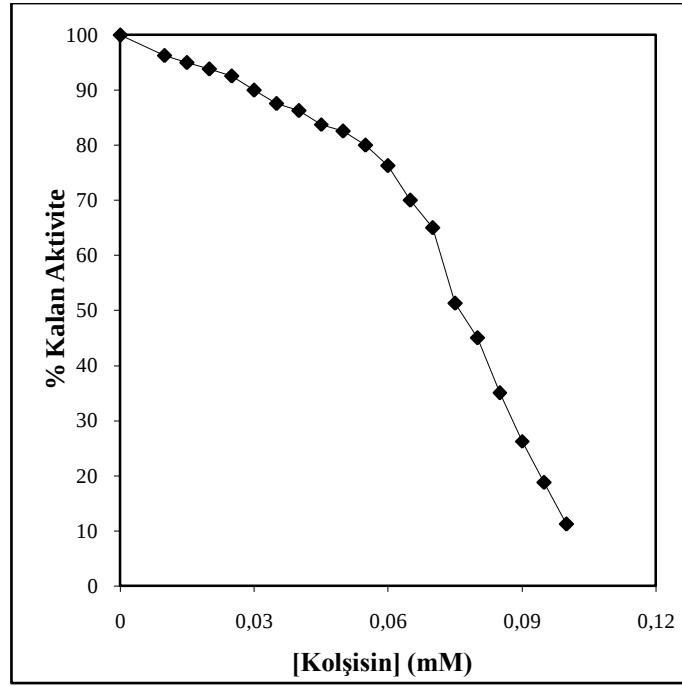


Şekil 4.41. Sabit G6P derişiminde (0.4 mM), değişken NADP^+ ve İmatinib konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiği

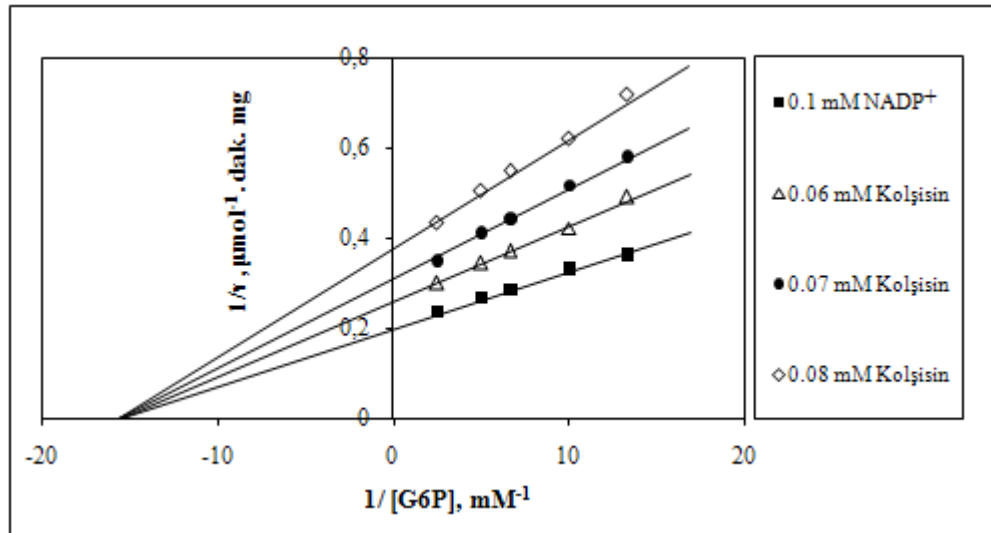
4.7.3. Koyun Beyin Korteksi G6PD Enziminin Kolşisin ile İnhibisyonu

Koyun beyin korteksinden saflaştırılan G6PD enzimi üzerine Kolşisin'in etkisi, 0.010 – 0.100 mM arasında değişen konsantrasyonlarda Kolşisin deney ortamına ilave edilerek gösterildi (Şekil 4.42.). G6PD enziminin, Kolşisin ile IC_{50} değeri 0.073 ± 0.021 mM olarak saptandı.

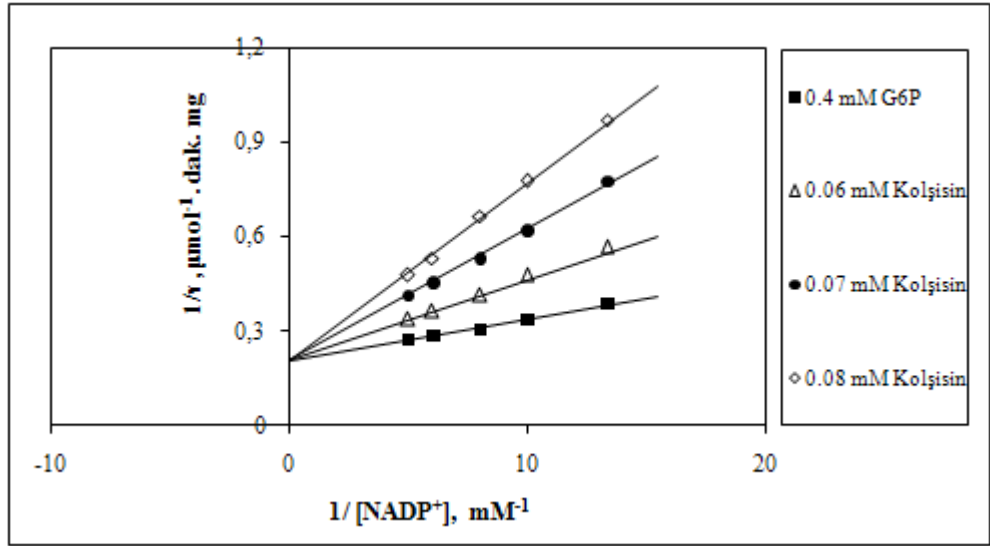
- a.) G6P değişken, $NADP^+$ sabit (0.1 mM) içeren deney ortamlarına değişik konsantrasyonlarda (0.06, 0.07, 0.08 mM) Kolşisin ilave edilerek ilk hızlar ölçüldü ve Lineweaver-Burk grafiği çizildi (Şekil 4.43.). Kolşisin'in enzimi non-kompetitif olarak inhibe ettiği saptandı. Enzimin K_m G6P değeri 0.058 ± 0.018 mM, Statistica programında K_i değeri 0.036 ± 0.015 mM olarak hesaplandı.
- b.) $NADP^+$ değişken substrat, G6P sabit (0.4 mM) konsantrasyonunda deney ortamına değişik konsantrasyonlarda (0.06, 0.07, 0.08 mM) Kolşisin ilave edilerek deney tekrarlandı (Şekil 4.44.). Kolşisin'in $NADP^+$ bağlanmasını ise kompetitif olarak inhibe ettiği bulundu ve K_m $NADP^+$ değeri 0.064 ± 0.005 , K_i değeri 0.128 ± 0.015 olarak hesaplandı.



Şekil 4.42. Koyun beyin korteksi G6PD enziminin Kolşisin ile inhibisyonu



Şekil 4.43. Sabit NADP^+ derişiminde (0.1 mM), değişken G6P ve Kolşisin konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.44. Sabit G6P derişiminde (0.4 mM), değişken $NADP^+$ ve Kolşisin konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiği

5. TARTIŞMA

Literatürde koyun beyninden G6PD saflaştırılması ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Enzimin insanlarda, gerek eksikliğinde meydana gelen hastalıklar gerekse beyinde oluşan patolojik olgularla ilişkili olması ve ayrıca koyun filogenetiğinin insana yakın olması nedeniyle (145) beyin dokusundan G6PD saflaştırılmasında denek olarak koyun (*Ovis sp.*) tercih ettik.

Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD), koyun beyin korteksinden 2', 5'-ADP-Sepharose 4B afinite kolonu, DEAE-Sepharose Fast Flow iyon-değiştirici kolonu kromatografisi yöntemleri kullanılarak % 68.33 verimle 51.25 ünite/mg protein'lik bir spesifik aktivite ile 9439.61 kez saflaştırdık (Tablo 4. 1.).

Enzimin saflık derecesinin ve spesifik aktivitesinin yüksek olması amacıyla, 2', 5'- ADP Sepharose 4B kolonundan G6PD'nin elüsyonunda düşük derişimde (0.1 mM) NADP^+ kullanıldı. Saflaştırma sürecinde, temel saflaştırma basamağını 2', 5'- ADP Sepharose 4B afinite kolonu basamağı oluşturdu. Fakat 6-PGD'nin de G6PD gibi 2', 5'- ADP Sepharose 4B jeline yüksek afinite göstererek bağlanması ve jelden G6PD'nin elüe olduğu koenzim derişiminde elüe olması nedeni ile saflaştırma çalışmalarında, elüatın 6-PGD aktivitesinden ayrılması gereklidir. 2', 5'- ADP Sepharose 4B afinite kolonuna uygulama ile proteinin % 92'si atıldı.

G6PD saflaştırılmasında bütün basamaklarda enzimin stabilizasyonu için antioksidan olarak 1mM 2-ME ve proteazlara karşı korumada 1mM EDTA kullanıldı. DEAE Sepharose Fast Flow kromatografisi sırasında düşük iyonik kuvvet sağlamak amacıyla 5 mM potasyum fosfat (pH 6.9) tamponu kullanıldı. Ayrıca DEAE-Sepharose Fast Flow iyon değiştirici kolonuna, 5 mM potasyum fosfat (pH 6.9) tamponu içinde hazırlanan lineer tuz gradiyenti (0 - 300 mM KCl) uygulanarak, 6-PGD'nin, diğer proteinlerin ve bir önceki basamakta enzimin elüsyonunda kullanılan NADP^+ 'nin uzaklaştırılması sağlandı ve G6PD enzimi saflaştırıldı. Ortamda bulunan NADP^+ , G6PD

enziminin kinetik davranışını etkileyebileceğinden ve NADP^+ 'nin diyaliz ile uzaklaştırılması sırasında enzim inaktive olduğundan, bu saflaştırma basamağı, NADP^+ 'nin uzaklaştırılması açısından bir avantaj sağlamadı (146).

Cohen ve Rosemeyer, saflaştırılmış enzimin saklanması sırasında $10 \mu\text{M}$ NADP^+ içeren tampon sistemleri kullanmışlardır (87). Sunulan çalışmada, enzimin $2'$, $5'$ - ADP Sepharose 4B kolonundan elüe edilmesi dışında, tamponlara NADP^+ ilave edilmemiştir. Enzimin $+4^\circ \text{C}$ 'de, bir hafta süre ile saklandığında, aktivitesini kaybetmediği gözlemlendi. Bu nedenle saflaştırılan enzim örnekleri ile ilgili yapısal ve kinetik çalışmalar üç gün içinde, enzim aktivitesinde herhangi bir kayıp meydana gelmeden yapıldı.

Çalışmamızda tamponunun derişimi, iyonik kuvveti düşük tutmak amacıyla 10 mM Tris/HCl pH 7.6 ve 5 mM potasyum fosfat pH 6.9 tamponlarını kullanıldı. Birçok araştırmacı tampon seçiminde Tris / HCl tamponu kullanmış ve tampon derişimini $5 - 100 \text{ mM}$ arasında tercih etmiştir. (2, 19, 21, 84, 100).

Sephadex G-200 jel elemesi yöntemi ve SDS poliakrilamid jel elektroforezi yöntemlerini kullanarak koyun beyin korteksi G6PD enziminin molekül ağırlığını saptadık. Sephadex G-200 jel elemesi yöntemi ile, enzimin molekül ağırlığı 64.5 kDa , SDS poliakrilamid jel elektroforezi ile 61.2 kDa olarak bulduk. İlk yöntem 2 kez, ikincisi 4 kez tekrarlandı. Kullandığımız bu metodlar ile enzimin molekül ağırlığının yanı sıra saflığının da kontrolünü yaptık. Sephadex G-200 jel elemesi yöntemi ile G6PD'nin molekül ağırlığının saptanmasında, enzimin simetrik tek bir protein piki olarak kolondan elüe olması ve Coomassie Brilliant Blue R-250 protein boyasına göre daha hassas olan gümüş boyama yöntemi ile de tek bir protein bandı vermesi enzimin saf olduğunu gösteren önemli kriterlerdir. Her iki yöntemde elde edilen değerlerin birbirlerine yakın olması, literatürde verilen G6PD enziminin alt birim molekül ağırlıklarına yakın değerlerin bulunması, koyun beyin korteksinden saflaştırılan G6PD enziminin çalışma şartlarımızda monomer formunda olduğunu göstermektedir. Levy (13) tarafından yapılan derlemede, beyinde olduğu gibi, monomer formundaki enzimin de aktif olabileceği, BALB/c faresinin meme bezindeki hiperplastik alveolar nodüllerde ve

adenokarsinomalarda gösterilmiştir. Grubumuzun sığır lensinden saflaştırdığı G6PD enziminde monomer formda aktif olarak Sephadex G-200 jel elemesi yönteminde 60 kDa ve SDS poliakrilamid jel elektroforezinde 64 kDa olarak bulundu (28).

G6PD enziminin ortam pH'sı ile etkileşimini incelemek amacıyla yapılan çalışmalarda 3 değişik Ka değerine sahip olan, bu nedenle pH 2 – 12 arasında tampon çözelti hazırlanmasına imkan veren fosforik asitten türetilen potasyum fosfat tamponu kullanıldı. Enzimin pH 8.0'de en yüksek aktiviteyi gösterdiği bulundu (Şekil 4.8.). Enzimde sıcaklığa bağlı bir konformasyonel değişikliğin olup olmadığını anlamak için değişik sıcaklıklarda hızlar ölçüldü ve Arrhenius grafiği çizildi. Çizilen Arrhenius grafiğinin (Şekil 4.7.) lineer olması, 30 °C ile 55 °C arasında enzimde konformasyonel bir değişim olmadığını göstermektedir.

G6PD enziminin katalizlediği tepkime, G6P birinci substrat, Koenzim NADP^+ ise ikinci substrat olarak düşünüldüğünde, bir “Bi Bi” tepkimesidir. Birden fazla substratın yer aldığı ve ürünün oluştuğu tepkimeler iki gruba ayrılırlar:

- a. Sıralı (sequential) mekanizmalar
- b. Ping Pong mekanizmalar

Sıralı mekanizmalarda, tepkimelerin oluşabilmesi için, önce tüm substratlar enzimle bir kompleks oluştururlar. Bu tip mekanizmalar da iki grup altında incelenebilir:

- a. Düzenli (Ordered)
- b. Düzensiz (Random)

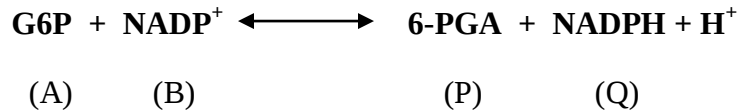
“Ping Pong” mekanizmaların ise, tepkimelerin oluşabilmesi için enzime tüm substratların bağlanmasına ve bir kompleks meydana getirmesine gerek yoktur. substratların enzime bağlanması sırasında ürün ya da ürünler oluşur.

“Bi Bi” mekanizmaları için başlıca dört mekanizmadan bahsedebiliriz:

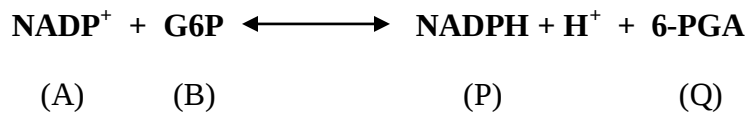
1. Ordered Bi Bi
2. Theorell-Chance (Ordered Bi Bi’nin özel şekli)
3. Random Bi Bi
4. Ping Pong Bi Bi

Yukarıdaki nedenlerle ilk olarak tepkimenin mekanizmasının “Ping Pong” ya da sıralı mekanizmalardan hangisine uygun olduğu saptandı. Bunun için önce sabit G6P ve değişen NADP^+ derişiminde daha sonra NADP^+ sabit substrat olarak kabul edilip değişen G6P derişiminde hızlar ölçüldü. Hız eşitlikleri ile regresyon analizleri yapıldı, “Loss” değerleri esas alınarak hangi mekanizmanın geçerli olduğu bulundu.

Enzim kinetiğinin “Loss” değeri küçük olan sıralı mekanizmalara uygun olduğu sonucuna varıldı. Enzimle ürün inhibisyonu deneyleri yapıldığında bulunan sonuçlardan Tablo 5.1.’deki “Theorell-Chance” mekanizmasına uyduğundan, tepkimenin mekanizmasının aşağıda verildiği gibi bir “Theorell-Chance” tepkimesi olduğu; enzime bağlanan birinci substratın G6P, ikinci substratın ise NADP^+ olduğu, enzimden ayrılan birinci ürünün 6-PGA ve ikinci ürünün ise NADPH olduğu anlaşıldı.



Eğer, G6PD’ye önce NADP^+ ’nin bağlandığı düşünülürse, enzim için şu tepkime sırası geçerli olacaktır:



İkinci varsayım göz önüne alınarak Tablo 5. 2. hazırlandı. Tablo incelendiğinde, elde edilen ürün inhibisyonu bulgularına uygun bir mekanizmanın bulunmadığı görüldü.

Tablo 5.1. G6PD ‘nin katalizlediği tepkime için ürün inhibisyonu tipleri (G6P birinci substrat olarak alındığında)

Mekanizma	Ürün (İnhibitör)	Değişken substrat A (G6P) Doymamış B (NADP ⁺)	Değişken substrat B (NADP ⁺) Doymamış A (G6P)
Ping – Pong Bi Bi			
	6-PGA (P)	-	C
	NADPH (Q)	C	-
Ordered Bi Bi			
	6-PGA (P)	UC	MT
	NADPH (Q)	C	-
Theorell - Chance			
	6-PGA (P)	-	C
	NADPH (Q)	C	-
Random Bi Bi			
	6-PGA (P)	MT	MT
	NADPH (Q)	MT	MT

Segel (147)’de yer alan çizelgeye göre düzenlenmiştir.

C : “Competitive”, UC : “Uncompetitive”, MT : “Mixed-type”

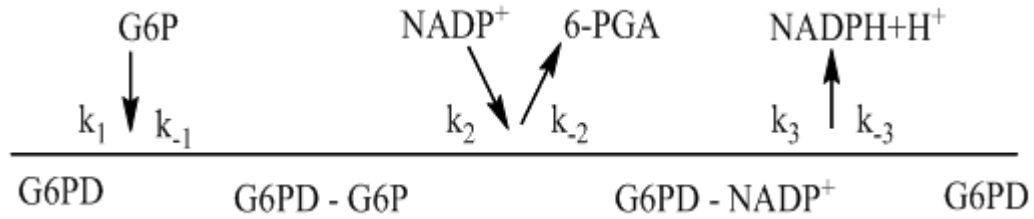
Tablo 5.2. G6PD ‘nin katalizlediği tepkime için ürün inhibisyonu tipleri (NADP⁺ birinci substrat olduğunda)

Mekanizma	Ürün (İnhibitör)	Değişken substrat A (NADP ⁺) Doymamış B (G6P)	Değişken substrat B (G6P) Doymamış A (NADP ⁺)
Ping – Pong Bi Bi			
	6-PGA (P)	-	C
	NADPH (Q)	C	-
Ordered Bi Bi			
	6-PGA (P)	UC	MT
	NADPH (Q)	C	-
Theorell - Chance			
	6-PGA (P)	-	C
	NADPH (Q)	C	-
Random Bi Bi			
	6-PGA (P)	MT	MT
	NADPH (Q)	MT	MT

Segel (147)’de yer alan çizelgeye göre düzenlenmiştir.

C : “Competitive”, UC : “Uncompetitive”, MT : “Mixed-type”

Sonuç olarak, G6P'nin enzime ilk bağlanan substrat, ikinci bağlanan substratın ise NADP^+ olduğuna, ayrıca enzimden ayrılan birinci ürünün 6-PGA ve ikinci ürünün ise NADPH olduğuna karar verildi. Tepkime aşağıda verilmiştir (Şekil 5. 1.).



Şekil 5.1. Koyun Beyin Korteksi G6PD enziminin “Theorell-Chance” kinetik mekanizması ve reaksiyon

Koyun beyin korteksi G6PD enzimine Zn^{+2} , Cu^{+2} ve Ni^{+2} etkisi (sırasıyla Şekil 4. 19., Şekil 4. 22., Şekil 4. 25.) incelendiğinde, bu iyonların enzimi inhibe ettiğini belirledik ve IC_{50} değerlerini sırasıyla; 0.30 mM, 0.75 mM ve 0.25 mM olarak bulduk.

Çinko, bakır ve nikel inhibisyon kinetiğini araştırmak amacıyla yapılan deneylerde, bu iyonların G6P ve NADP^+ bağlanmasını kompetitif olarak inhibe ettiğini bulduk. Buna bağlı olarak Zn^{+2} , Cu^{+2} ve Ni^{+2} 'nin enzimin aktif merkezinde bir bölgeye bağlanıp substratların bağlanmasını engelleyerek kompetitif inhibisyon yarattığını düşünmekteyiz. Genel olarak, Zn^{+2} ve Ni^{+2} iyonlarının enzimlerde sisteine ve histidine bağlandığı, Cu^{+2} iyonunun da özellikle histidin rezidüleriyle etkileşime girdiği bilinmektedir. Patates plastidleri rekombinant G6PD'ları üzerinde yapılan çalışmada, enzimin aktif merkezinde, NADP^+ bağlama domaininde 149. ve 157. amino asitlerinin sistein olduğu gösterilmiştir (94). Koyun beyin korteksi G6PD enziminde de çinko iyonunun enzimin aktif merkezinde bulunan sistein ve histidin rezidülerine bağlanarak G6P ve NADP^+ 'nin bağlanması kompetitif olarak inhibe ettiğini düşünmekteyiz. Fare Leydig hücrelerinde *in vitro* yapılan çalışmada, Ni^{+2} iyonunun testosteron üretimindeki inhibitör etkisinin

önlenmesi için hücre kültürüne nikel iyonu ile eşit miktarda histidin ve sistein eklenmiş ve bu amino asitlerin Ni^{+2} iyonunun inhibitör etkisini azalttığını göstermişlerdir (148). Nikel iyonu da G6PD enziminin aktif merkezinde substrat bağlama bölgesindeki sistein ve histidin rezidülerine bağlandığını ve substratlarının bağlanmasını engelleyerek kompetitif inhibisyona neden olduğunu düşünüyoruz. Bir grup patojenik bakteriden saflaştırılan Cu, Zn – süperoksit dismutazlar üzerinde yapılan çalışmada, Cu^{+2} iyonlarının enzimin aktif merkezinde histidin rezidüleriyle etkileşime girdiği bulunmuştur. Özellikle bu bölgede histidin amino asitlerinin imidazol gruplarıyla histidin köprüleri kurduğu saptanmıştır (149). Koyun beyin korteksi G6PD enzimi aktif merkezinde de Cu^{+2} iyonlarının substrat bağlama bölgesindeki histidin rezidülerine bağlanarak, G6P ve NADP^+ reaktiflerini kompetitif olarak inhibe ettiğini ve katalitik merkezde Cu^{+2} özgül bağlama bölgesinin olduğunu düşünmekteyiz. Beyinde sinaptik aktarım modülatörü olarak işlev gören Zn^{+2} iyonunun (150), belirli konsantrasyon değerlerini aşan düzeylerde Zn^{+2} alınımına bağlı olarak G6PD aktivitesini inhibe etmesi, G6PD eksikliği bulunan bireylerde bazı nörolojik hasarlara yol açabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, biyokimyasal süreçlerde gerekli olan bakır, nikel ve çinko iyonlarının yüksek dozda alınımı, G6PD enzimini dolayısıyla NADPH rejenerasyonunu engeller. Oksidatif stresle sonuçlanabilen bu durum hücrede fonksiyonel bozuklukların oluşumuna yol açar.

Koyun beyin korteksi G6PD enzimine Cd^{+2} , Pb ve Hg^{+2} gibi ağır metallerin etkisi (sırasıyla Şekil 4. 28., Şekil 4. 31., Şekil 4. 34.) incelendiğinde ise, bu iyonların da enzimi inhibe ettiğini saptadık ve IC_{50} değerlerini sırasıyla; 0.20 mM, 0.35 mM ve 0.30 mM olarak bulduk.

Koyun beyin korteksi G6PD enzimi üzerine Cd^{+2} , Pb ve Hg^{+2} iyonlarının etkisini belirlemek üzere yapılan deneylerde, Cd^{+2} ve Pb iyonlarının G6P ve NADP^+ ye karşı non-kompetitif inhibisyon yaptığını, Hg^{+2} iyonunun diğer ikisinden farklı olarak kompetitif inhibisyon yaptığını saptadık. Cd^{+2} ve Pb inhibisyon deneylerinde inhibisyonun non-kompetitif olması nedeniyle, bu iyonların katalitik bölge ya da dışında

bulunan bir bölgeye bağlandığını; bununla birlikte, Hg^{+2} iyonlarının enzimin aktif merkezinde bir bölgeyle etkileşime girdiğini düşünmekteyiz.

Kadmiyum ile yapılan çalışmalarda, Cd^{+2} iyonunun histidin ve sisteince zengin bölgelere bağlandığı belirlenmiştir. Koyun beyin korteksi G6PD enzimi üzerinde non-kompetitif inhibisyon oluşturduğu için, Cd^{+2} iyonunun saflaştırdığımız G6PD enziminin katalitik bölge dışındaki bir histidine veya sisteine bağlandığını düşünmekteyiz. Canlılar için sitotoksik olan Cd^{+2} , hücrede apoptozis ile ilişkili birçok patolojik durumun ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Ayrıca, Cd^{+2} 'nin G6PD üzerinde inhibisyon etkisinin olduğu da düşünülerek, aşırı konsantrasyonlarda Cd^{+2} alınımına bağlı olarak hücrelerde oksidatif stresin artmasına yol açacaktır ve bu durum, nörodejeneratif süreçlerin gelişmesine yol açacaktır. Kurşun ve civa, sisteinil rezidülerin tiyol gruplarıyla etkileşime girmektedirler. Çünkü sisteinlerdeki tiyol grupları bu metaller için yüksek afiniteye sahiptir. Kurşun proteinlerde bulunan sülfür gruplarına bağlanarak, bu biyomolekülleri inaktive etmektedir. Koyun beyin korteksi G6PD enzimi üzerine Pb etkisi çalışmamız, iyonun enzimi non-kompetitif olarak inhibe ettiğini göstermiştir. Pb iyonlarının, enziminin katalitik bölgesi dışındaki sistein gruplarıyla etkileşim kurarak enzimi inhibe ettiğini düşünmekteyiz. Bu etkileşim civa için de geçerlidir; fakat, civanın enzimi kompetitif olarak inhibe etmesi nedeniyle sisteinlerle olan etkileşimin enzimin aktif merkezinde gerçekleştiğini düşünmekteyiz. Pb ve Hg^{+2} 'nin G6PD üzerine inhibisyon etkisiyle ilgili direkt bir çalışma bulunmamaktadır.

Koyun beyin korteksi G6PD enzime RA etkisi incelendiğinde RA'nın enzimi kompetitif olarak inhibe ettiğini bulduk. Sonuçlarımız, RA inhibisyonunun enzim yüzeyinde bulunan duyarlı-SH gruplarıyla RA'nın etkileşiminden kaynaklandığını göstermektedir. SH-gruplarının eksiksizliği G6PD aktivitesi için önemli olduğundan dolayı; RA'nın inhibitör etkisi, enzimde yer alan tiyol gruplarına RA'nın bağlanmasıyla oluşmaktadır. Substratta bulunan amino asit rezidüleri ve $NADP^{+}$ bağlama bölgesi ya da katalitik bölge dikkate alındığında, sistein rezidüleri G6PD'nin aktivasyonunda önemli rol oynamaktadır (94).

Imatinib, uzun zamandan beri birçok kanser tipinde tedavi amaçlı olarak kullanılmaktadır. G6PD, detoksifikasyonda, biyosentezde ve hücre proliferasyonunda, kilit noktada yer alır. İlaç metabolizması ve hücre proliferasyonu oranının kanser tedavisinde son derece önemli olduğu bilinmektedir. Toksik elektrofilleri üreten anti-kanser ilaçlarının tiyol-aracılı detoksifikasyonunun önemi birçok araştırmacının ilgisini çekmektedir. Araştırmacıların çoğu, GSH'ın ilaç direncinde rolü olduğunu kabul ederken, aynı durum GSH-ilişli enzimler için tartışmalıdır (151.). Koyun G6PD'sinin (her iki izoform) ve memeli G6PD proteinlerinin iki NADP^+ bağlama bölgesi içerdikleri rapor edilmiştir. Koyun NADP^+ bağlama bölgesindeki Arg ile insandaki His arasındaki yer değişme gözlemlendiğinde, Arg ile kıyaslandığında His'in H^+ için görece olarak daha az afinite göstererek bu bağlama bölgesinde büyük olasılıkla elektrostatik potansiyeli değiştirdiği saptanmıştır. Lizin diğer amino asitlerle yer değişimi sırasında NADP^+ bağlama bölgesi yanında substratı başka amino asitlere yönlendirir; substrat bağlanmasında gerekli değildir (152). Bu nedenle, imatinib'in NADP^+ bağlama bölgesindeki His amino asidiyle etkileşime girdiğini düşünebiliriz. G6P, katalitik bölgede ya da dışında bir yerdeki fosfat bağlama bölgesiyle etkileşim kurmuş olabilir. NADPH-G6P tersiyer kompleksinde, β -1-hidroksil'den katalitik baz His240'a proton transferi için G6P'nin uygun yerleşim yeri fosfat bölgesidir (153). Bu nedenle, imatinib büyük bir olasılıkla G6PD enziminin yüzeyindeki histidin ve sistein amino asitlerine bağlanmıştır. G6PD enzimi üzerine imatinib inhibisyonu G6P için non-kompetitif karakterde iken, bu durum NADP^+ için kompetitif karakterdedir.

Koyun beyin korteksi G6PD enzimi üzerine kolşisinin etkisini belirlemek amacıyla yapılan çalışmada değişken G6P konsantrasyonlarında kolşisinin enzimi non-kompetitif, değişken NADP^+ konsantrasyonlarında ise kolşisinin enzimi kompetitif olarak inhibe ettiği bulunmuştur. β -tübülün'in 239. sisteini, kolşisin için β -tübülün'in tanıma bölgesi olduğu ve kolşisinin, 239. sisteindeki alkilasyonu engellediği Shan ve diğ. tarafından gösterilmiştir (154). Kolşisinin, G6PD enziminde bağlandığı bölgeler tam olarak bilinmemektedir; fakat, inhibisyon çalışmalarından kolşisinin enzimin katalitik

bölgesinde bulunan veya katalitik bölge dışında konumlanan sistein amino asitlerine bağlandığını söyleyebiliriz.

G6PD aktivitesinin inhibisyonu, PFY'de önemli rollere sahip olması ve antioksidan etkileri düşünüldüğünde tüm organizmalar için fizyolojik ve biyokimyasal olarak birçok anahtar fonksiyona sahiptir. Organizmalardaki bu doğal ürünlerin patofizyolojik etkilerini ve bu etkilerin tesirlerini açıklamak için farmakodinamik, toksikolojik ve klinik çalışmalar yapılmalıdır. G6PD eksikliğinin, en genel enzimopati olduğu gerçeği bu noktada unutulmamalıdır. Beyin G6PD'si ile yapılacak kristalografik ve üç boyutlu modelleme çalışmaları bu enzimin beyindeki fonksiyonları ile ilgili daha ayrıntılı ve önemli bilgiler verecektir.

6. ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı	Cihangir Şengezer	
Doğum	Yeri : Ankara	Tarihi : 19.07.1981

EĞİTİM-ÖĞRENİM YAPTIĞI KURUMLAR:

	Okul / Yıllar
Lise	Mimar Sinan Süper Lisesi / 1999
Lisans	Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü / 2005

İş Deneyimi ve Stajlar:

Ekim 2006-Ağustos 2007: Bilgi Tıp Merkezi Biyokimya-Mikrobiyoloji-Hematoloji Laboratuvarı

Temmuz 2004-Eylül 2004: Adli Tıp Kurumu Ankara, Biyoloji-Morg İhtisas Daireleri (Staj)

Temmuz 2002-Ağustos 2002: Mersin Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji-İmmünoloji Kliniği (Staj)

Sunumlar:

Mayıs 2008: “Cihangir Şengezer, N. Nuray Uluşu; Glukoz-6-fosfat dehidrogenazın koyun beyninden saflaştırılması; 4. Ulusal Afinite Teknikleri Kongresi”

Mayıs 2008: “Cihangir Şengezer, N. Nuray Uluşu; Koyun Beyin Korteksinden saflaştırılan Glukoz-6-fosfat dehidrogenazın kinetik davranışlarının saptanması 4. Ulusal Afinite Teknikleri Kongresi, Marmaris-Muğla”

Mayıs 2008: “Cihangir Şengezer, N. Nuray Uluşu; Koyun Beyin Korteksinden saflaştırılan Glukoz-6-fosfat dehidrogenazın Nikel ile inhibisyonu; 4. Ulusal Afinite Teknikleri Kongresi

Haziran 2008: “ Cihangir Şengezer, N. Nuray Uluşu; Koyun Beyin Korteksinden Saflaştırılan Glukoz-6-fosfat Dehidrogenaz enziminin Kadmiyum ile inhibisyonu; Metabolizmanın Regülasyonu ve Metabolik Regülasyon Kongresi, Trabzon”

Haziran 2008: “Cihangir Şengezer, N. Nuray Uluşu; Koyun Beyin Korteksi β -D-Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enziminin Çinko ile inhibisyonu; Metabolizmanın Regülasyonu ve Metabolik Regülasyon Kongresi, Trabzon”

Eylül 2008: “ Cihangir Şengezer and N. Nuray Uluşu, Three different purification step orders in purification of G6PD from sheep brain cortex Same chromatographic columns in different orders in purification of Glucose-6-phosphate dehydrogenase; XX. Ulusal Biyokimya Kongresi, Kapadokya, Nevşehir.”

Yayınlar:

Şengezer, C., Uluşu, N. N. Three Different Purification Protocols in Purification of G6PD from Sheep Brain Cortex. FABAD J. Pharm. Sci., 32, 65 – 72, 2007.

KAYNAKLAR

1. Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., Rodwell, V. W. (2003). *Harper's Illustrated Biochemistry* (16. bs., s.163 -172). ABD: McGraw-Hill Companies.
2. Okuno, H., Nagata, K., Nakajima, H. (1985). Purification and Properties of Glucose-6-phosphate Dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*. *Journal of Applied Biochemistry*, 7, 192–201.
3. Nelson, D. L. ve Cox, M. M. (2004). *Lehninger Principles of Biochemistry* (4. bs., 558–561). New York, ABD: W. H. Freeman & Co..
4. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L. (2006). *Biochemistry* (6. bs., 564-574). New York, ABD: W. H. Freeman..
5. Carey, E. M. (1975). A Comparative study of the metabolism of *de novo* synthesized fatty acids from acetate and glucose, and exogenous fatty acids, in slices of rabbit cerebral cortex during development. *Journal of Neurochemistry*, 24 (2), 237-244.
6. Adibhatla, R. M. ve Hatcher, F. (2008). Altered lipid metabolism in brain injury and disorders. *Subcellular Biochemistry*, 49, 241-268.
7. Aspberg, A. ve Totmar, O. (1994). Oxidative stress decreases antioxidant enzyme activities in reaggregation cultures of rat brain cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 17(6), 511-516.
8. Dringen, R. (2000). Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in Neurobiology*, 62(6), 649-671.
9. Balazs, L. ve Leon, M. (1994). Evidence of an oxidative challenge in the Alzheimer's brain. *Neurochemical Research*, 19(9), 1131-1137.
10. Biagiotti, E., Guidi, L., Grande, D. P., Ninfali, P. (2003). Glucose-6-phosphate dehydrogenase expression associated with NADPH-dependent reactions in cerebellar neurons. *The Cerebellum*, 2, 178-183.
11. Boros, L. G., Lee, P. W. N., Brandes, J. L., Cascante, M., Muscarella, P., Schirmer, W. J., Melvin, W. S., Ellison, E. C. (1998). Nonoxidative pentose phosphate pathways and their direct role in ribose synthesis in tumors: is cancer a disease of cellular glucose metabolism? *Medical Hypotheses*, 50(1), 55-59.

12. Jonas, S. K., Benedetto, C., Flatman, A., Hammond, R. H., Micheletti, L., Riley, C., Riley, P. A., Spargo, D. J., Zonca, M., Slater, T. F. (1992). Increased activity of 6-phosphogluconate dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase in purified cell suspensions and single cells from the uterine cervix in cervical intraepithelial neoplasia. *British Journal of Cancer*. 66(1), 185–191.
13. Levy, H. R. (1979). Glucose-6-phosphate dehydrogenase Meister, A. (ed), *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*. John Wiley and Sons Inc., New York, 48, 97-191.
14. Bublitz, C. ve Steavenson, S. (1988). The pentose phosphate pathway in the endoplasmic reticulum. *The Journal of Biological Chemistry*. 263, 12849–12853.
15. Antonenkov, V. D. (1989). Dehydrogenases of the pentose phosphate pathway in rat liver peroxisomes. *European Journal of Biochemistry*. 183(1), 75–82.
16. Schnarrenberger, C., Flechner, A., Martin, W. (1995). Enzymatic Evidence for a Complete Oxidative Pentose Phosphate Pathway in Chloroplasts and an Incomplete Pathway in the Cytosol of Spinach Leaves; *Plant Physiology*. 108, 609–614.
17. Cabezas, H., Raposo, R. R., Meléndez-Hevia, E. (1999). Activity and metabolic roles of the pentose phosphate pathway cycle in several rat tissue. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 201, 57-63.
18. Beutler, E. (1993). Study of G-6-PD history and molecular biology. *American Journal of Hematology*. 42, 53- 8.
19. Kuby, S. A., Wu, J. T., Roy, R. N. (1974). Glucose-6-phosphate dehydrogenase from brewers' yeast (Zwischenferment). Further observations on the ligand-induced macromolecular association phenomenon: kinetic properties of the two-chain protein species; and studies on the enzyme-substrate interactions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 165, 153–178.
20. Kirkman, H. N. (1962). Glucose-6-phosphate dehydrogenase from Human Erythrocytes. *The Journal of Biological Chemistry*. 237, 2364–2370.
21. Yoshida, A. (1966), Glucose-6-phosphate dehydrogenase of human erythrocytes. I. Purification and characterization of normal (B+) enzyme. *Journal of Biological Chemistry*. 241, 4966–4976.

22. Demoss, R. D. (1955). Glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconic dehydrogenases from *Leuconostoc mesenteroides*. *Methods in Enzymology*. 1, 328-334.
23. Malcolm, A. A. ve Shepherd, M. G. (1972). Purification and properties of *Penicillium* glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Biochemical Journal*. 128(4), 817-831.
24. Bellini, T. Signorini, M., Dallochio, F., Rippa, M. (1979). Affinity labelling of the NADP⁺-binding site of glucose 6-phosphate dehydrogenase from *Candida utilis*. *Biochemical Journal*. 183(2), 297–302.
25. Nevaldine, B. H., Hyde, C. M., Levy, H. R. (1974). Mammary glucose 6-phosphate dehydrogenase. Molecular weight studies. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 165(1), 398-406.
26. Farmer, E. E. ve Easterby, J. S. (1984). The purification of yeast glucose-6-phosphate dehydrogenase by dye-ligand chromatography. *Analytical Biochemistry*. 141, 79–82.
27. Askar, M. A., Sumathy, K., Baquer, N. Z. (1996). Regulation and properties of purified glucose-6-phosphate dehydrogenase from rat brain. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*. 33, 512–518.
28. Ulusu, N. N., Kus, M. S., Acan, N. L., Tezcan, E. F. (1999). A rapid method for the purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase from bovine lens. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 31(7), 787–796.
29. Ninfali, P., Ditroilo, M., Capellaci, S., Biagiotti, E. (2001). Rabbit brain glucose-6-phosphate dehydrogenase: biochemical properties and inactivation by free radicals and 4-hydroxy-2-nonenal. *NeuroReport*. 12(18), 4149–4153.
30. Özer, N., Bilgi, C., Ögüs, İ. H. (2002). Dog liver glucose-6-phosphate dehydrogenase: purification and kinetic properties. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 34, 253–262.
31. Çiftçi, M., Beydemir, Ş. Yılmaz, H., Altıkat, S. (2003). Purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase from Buffalo (*Bubalus bubalis*) erythrocytes and investigation of some kinetic properties. *Protein Expression and Purification*. 29, 304–310.

32. Tandogan, B. ve Ulusu, N. N. (2005). Characterization of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Purified From Lamb Kidney Cortex. *Turkish Journal of Biochemistry*. 30 (2), 178-182.
33. Ulusu, N. N. ve Tandogan, B. (2006). Purification and kinetics of sheep kidney cortex glucose-6-phosphate dehydrogenase; *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*. 143, 249-255.
34. Kletzien, R. F., Harris, P. K. W., Foellmi, L. A. (1994). Glucose-6-phosphate dehydrogenase: A “housekeeping” enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrients and oxidative stres. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal (FASEB Journal)*. 8,174-181.
35. Gaitonde, M. K., Evison, E., Evans, G. M. (1983). The Rate of Utilization of Glucose Via Hexosemonophosphate Shunt in Brain. *Journal of Neurochemistry*. 41, 1253–1260.
36. Bolaños, J. P., Ciudad, P., García-Nogales, P., Delgado-Esteban, M., Fernández, E., Almeida, A. (2004). Regulation of glucose metabolism by nitrosative stress in neural cells. *Molecular Aspects of Medicine*. 25(1–2), 61–73.
37. Ben-Yoseph, O., Boxer, P. A., Ross, B. D. (1994). Oxidative stress in the central nervous system: monitoring the metabolic response using the pentose phosphate pathway. *Developmental Neuroscience*. 16(5–6), 328–336.
38. Hothersall, J. S., Baquer, N. Z., Greenbaum, A. L., McLean, P. (1979). Alternative pathways of glucose utilization in brain. Changes in the pattern of glucose utilization in brain during development and the effect of phenazine methosulfate on the integration of metabolic routes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 198(2), 478–492.
39. Hothersall, J. S., Greenbaum, A. L., McLean, P. (1982). The functional significance of the pentose phosphate pathway in synaptosomes: protection against peroxidative damage by catecholamines and oxidants. *Journal of Neurochemistry*. 39(5), 1325–1332.
40. Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M.. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. 160(1), 1-40.
41. Harrison, D. G. ve Gongora, M. C. (2009). Oxidative stress and hypertension. *Medical Clinics of North America*. 93(3), 621-635.

42. Halliwell, B. (2001). Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs & Aging*. 18(9), 685–716.
43. Hedlund, E., Gustafsson, J. A., Warner, M. (2001). Cytochrome P450 in the brain; a review. *Current Drug Metabolism*. 2(3), 245–263.
44. Martini, G., Toniolo, D., Vulliamy, T., Luzzatto, L., Dono, R., Viglietto, G., Paonessa, G., D'Urso, M., Persico, M. G. (1986). Structural analysis of the X-linked gene encoding human glucose 6-phosphate dehydrogenase. *European Molecular Biology Organization Journal (The EMBO Journal)*. 5(8), 1849–1855.
45. Chen, E. Y., Cheng, A., Lee, A., Kuang, W. J., Hillier, L., Green, P., Schlessinger, D., Ciccociola, A., D'Urso, M. (1991). Sequence of human glucose-6-phosphate dehydrogenase cloned in plasmids and a yeast artificial chromosome. *Genomics*. 10(3), 792–800.
46. Beutler, E. (1991). Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *New England Journal of Medicine*. 324(3), 169–174.
47. Warsy, A. S. ve El-Hazmi, M. A. F. (2001). G6PD deficiency, distribution and variants in Saudi Arabia: an overview. *Annals of Saudi Medicine*. 21(3-4), 174–177.
48. Gomez-Gallego, F., Garrido-Pertierra, A., Mason, P. J., Bautista, J. M. (1996). Unproductive folding of the human G6PD-deficient variant A⁻. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal (FASEB Journal)*. 10, 153–158.
49. Cappellini, M. D. ve Fiorelli, G. (2008). Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *The Lancet*. 371, 64–74.
50. Fiorelli, G., Montemuros, F., Cappellini, M. (2000). Chronic non-spherocytic haemolytic disorders associated with G6PD variants. *Baillière's Clinical Haematology*. 13(1), 39–55
51. Mehta, A., Mason, P. J., Vulliamy, T. J. (2000). Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, *Baillière's Clinical Haematology*. 13(1), 21–38.
52. McMillan, D. C., Jollow, D. J. (1999). Favism: divicine hemotoxicity in the rat. *Toxicological Sciences*. 51(2), 310–316.

53. Beutler, E. (1994). G6PD deficiency. *Blood*. 84(11), 3613-3636.
54. Eberle, S. J., Noguera, N., Calvo, K., Ojeda, M., Bragós, I., Pratti, A., Milani, A., Targovnik, H., Sciuccati, G., Díaz, L., Bonduel, M., Torres, A. F. (2009). Anemia hemolítica grave causada por hemoglobina Hammersmith. *Archives Argentinos de Pediatría*. 107(4), 347-349.
55. Sukumar, S., Colah, R., Mohanty, D. (2002). G6PD gene mutations in India producing drug-induced haemolytic anaemia. *British Journal of Haematology*. 116, 671-672.
56. Kaplan, M. ve Hammerman, C. (2004). Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a hidden risk for kernicterus. *Seminars in Perinatology*. 28(5), 356-364.
57. Edison, E. S., Melinkeri, S. R., Chandy, M. (2006). A novel missense mutation in glucose-6-phosphate dehydrogenase gene causing chronic nonspherocytic hemolytic anemia in an Indian family. *Annals of Hematology*. 85(12), 879-880.
58. Gaskin, R. S., Estwick, D., Peddi, R. (2001). G6PD deficiency: its role in the high prevalence of hypertension and diabetes mellitus. *Ethnicity & Disease*. 11(4), 749-754.
59. Abid, S. ve Khan, A. H. (2002). Severe hemolysis and renal failure in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient patients with hepatitis E. *The American Journal of Gastroenterology*. 97(6), 1544-1547.
60. Bigl, M., Brückner, M. K., Arendt, T., Bigl, V., Eschrich, K. (1999). Activities of key glycolytic enzymes in the brains of patients with Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission*. 106(5-6), 499-511.
61. Russell, R. L., Siedlak, S. L., Raina, A. K., Bautista, J. M., Smith, M. A., Perry, G. (1999). Increased neuronal glucose-6-phosphate dehydrogenase and sulfhydryl levels indicate reductive compensation to oxidative stress in Alzheimer disease. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 370(2), 236-239.
62. Biagiotti, E., Bosch, K. S., Ninfali, P., Frederiks, W. M., Van Noorden, C. J. F. (2000). Posttranslational regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in tongue epithelium. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 48(7), 971-977.
63. Roth, E. F., Ruprecht, R. M., Schulman, S., Vanderberg, J., Olson, J. A. (1986). Ribose metabolism and nucleic acid synthesis in normal and glucose-6-

- phosphate dehydrogenase-deficient human erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. *The Journal of Clinical Investigation*. 77, 1129-1135.
64. Stumpo, D. J. ve Kletzien, R. F. (2005). Regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase mRNA by insulin and the glucocorticoids in primary cultures of rat hepatocytes. *European Journal of Biochemistry*. 144(3), 497 – 502.
 65. Salati, L. M., Szeszel-Fedorowicz, W., Tao, H., Gibson, M. A., Amir-Ahmady, B., Stabile, L. P., Hodge, D. L. (2004). Nutritional regulation of mRNA processing. *Journal of Nutrition*. 134(9), 2437-2443.
 66. Ceddia, R. B., Bikopoulos, G. J., Hilliker, A. J., Sweeney, G. (2003). Insulin stimulates glucose metabolism via the pentose phosphate pathway in *Drosophila* Kc cells. *The Federation of European Biochemical Societies Letters (The FEBS Letters)*. 555(2), 307-310.
 67. Max, S. R., Deshpand, S. S., Albuquerque, E. X. (2006). Neural Regulation of Muscle Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase: Effect of Batrachotoxin and Tetrodotoxin. *Journal of Neurochemistry*. 38(2), 386 – 391.
 68. Glock, G. E. ve McLean, P. (1953). Levels of Enzymes of the Direct Oxidative Pathway of Carbohydrate Metabolism in Mammalian Tissues and Tumours. *Biochemical Journal*. 56, 171-75.
 69. Ledda-Columbano, G. M., Columbano, A., Dessì, S., Coni, P., Chiodino, C., Pani, P. (1985). Enhancement of cholesterol synthesis and pentose phosphate pathway activity in proliferating hepatocyte nodules. *Carcinogenesis*. 6, 1371-1373.
 70. Stanton, R. C., Seifter, J. L., Boxer, D. C., Zimmerman, E., Cantley, L. C.. (1991). Rapid release of bound glucose-6-phosphate dehydrogenase by growth factors. Correlation with increased enzymatic activity. *The Journal of Biological Chemistry*. 266(19), 12442-12448.
 71. Tian, W. N., Braunstein, L. D., Pang, J., Stuhlmeier, K. M., Xi, Q. C., Tian, X., Stanton, R. C. (1998). Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity for cell growth. *The Journal of Biological Chemistry*. 273(17), 10609-10617.
 72. Nakamura, T., Nakayama, Y., Ichihara, A. (1983). Reciprocal modulation of growth and liver functions of mature rat hepatocytes in primary culture by an

- extract of hepatic plasma membranes. *The Journal of Biological Chemistry*. 259(13), 8056-8058.
73. Yoshimoto, K., Nakamura, T., Ichihara, A. (1983). Reciprocal effects of epidermal growth factor on key lipogenic enzymes in primary cultures of adult rat hepatocytes. Induction of glucose-6-phosphate dehydrogenase and suppression of malic enzyme and lipogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*. 258(20), 12355-12360.
 74. Scott, W. A. ve Tatum, E. L. (1971). Purification and partial characterization of glucose 6-phosphate dehydrogenase from *Neurospora crassa*. *The Journal of Biological Chemistry*. 246(20), 6347-6352.
 75. Cohen, P., Rosemeyer, M. A. (1969). Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: purification of the erythrocyte enzyme and the influence of ions on its activity. *European Journal of Biochemistry*. 8(1), 1-7.
 76. Tabita, R. ve Lundgren, D. G. (1971). Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from the chemolithotroph *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Bacteriology*. 108(1), 343-352.
 77. McKerns, K. W. (1975). Glucose-6-phosphate dehydrogenase from cow adrenal cortex. *Methods in Enzymology*. 41, 188-196.
 78. Li, J. P., Eriksson, K. O., Hjertén, S. (1990). High-performance liquid chromatography of proteins on deformed nonporous agarose beads. Affinity chromatography of dehydrogenases based on cibacron blue-derivatized agarose. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*. 20(2), 107-121.
 79. Reuter, R., Naumann, M., Metz, P., Kopperschläger, G. (1990). Purification and characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Pseudomonas* W6. *Biomedica Biochimica ACTA*. 49(7), 539-546.
 80. Bautista, J. M., Mason, P. J., Luzzatto, L. (1992). Purification and properties of human glucose-6-phosphate dehydrogenase made in *E. coli*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1119(1), 74-80.
 81. Purwantini, E. ve Daniels, L. (1996). Purification of a novel coenzyme F₄₂₀-dependent Glucose-6-phosphate Dehydrogenase from *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Bacteriology*. 178(10), 2861-2866.

82. Johansson, G., Joelsson, M. (1987). Affinity partitioning of enzymes using dextran-bound procion yellow HE-3G. Influence of dye-ligand density. *Journal of Chromatography*. 393(2), 195-208.
83. Lee, W. T. ve Levy, H. R. (2008). Lysine-21 of *Leuconostoc mesenteroides* glucose 6-phosphate dehydrogenase participates in substrate binding through charge-charge interaction. *Protein Science*. 1(3), 329-334.
84. Lee, C. Y., Yuan, J. H., Moser, D., Kramer, J. M. (1979). Purification and characterization of mouse glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 24(2), 67-73.
85. Lee, C. (1975). Glucose-6-phosphate dehydrogenase from Mouse. Wood, A. (ed), *Methods in Enzymology*. 89, 252-257.
86. Iyer, R. B., Wang, J., Bachas, L. G. (2002). Cloning, expression, and characterization of the *gsdA* gene encoding thermophilic glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Aquifex aeolicus*. *Extremophiles*. 6(4), 283-289.
87. Cohen, P. ve Rosemeyer, M. A. (1969). Subunit Interactions of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from Human Erythrocytes. *European Journal of Biochemistry*. 8, 8-15.
88. Rowland, P., Basak, A. K., Gover, S., Levy, H. R., Adams, M. J., (1994). The three-dimensional structure of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides* refined at 2Å resolution. *Structure*. 2(11), 1073-1087.
89. Au, S. W., Gover, S., Lam, V. M., Adams, M. J. (2000). Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: the crystal structure reveals a structural NADP⁺ molecule and provides insights into enzyme deficiency. *Structure*. 8(3), 293-303.
90. Mason, P. J., Bautista, J. M., Gilsanz, F. (2007). G6PD deficiency: the genotype-phenotype association. *Blood Reviews*. 21, 267-283.
91. Bautista, J. M., Mason, P. J., Luzatto, L. (1995). Human glucose-6-phosphate dehydrogenase. Lysine 205 is dispensable for substrate binding but essential for catalysis. *The Federation of European Biochemical Societies Letters (The FEBS Letters)*. 366(1), 61-64.
92. Levy, H. R., Vought, V. E., Yin, X. (1996). Identification of an arginine residue in the dual coenzyme-specific glucose-6-phosphate dehydrogenase from *L.*

- mesenteroides* that plays a key role in binding NADP⁺ but not NAD⁺. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 326(1), 145-151.
93. Cosgrove, M. S., Naylor, C., Paludan, S., Adams, M. J., Levy, H. R. (1998). On the mechanism of the reaction catalyzed by glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry*. 37(9), 2759-2767.
 94. Wenderoth, I., Scheibe, R., Schaewen, A. (1997). Identification of the cysteine residues involved in redox modification of plant plastidic glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*. 272(43), 26985-26990.
 95. Criss, W. ve Mc Kerns. (1969). Inhibitors of the catalytic activity of bovine adrenal glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica ACTA*. 184, 486-494.
 96. Hirono, A. ve Miwa, S. (1993). Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: structure and function of normal and variant enzymes. *Haematologia (Budap)*. 25(2), 85-97.
 97. Vought, V., Ciccone, T., Davino, M. H., Fairbain, L., Lin, Y., Cosgrove, M. S., Adams, M. J., Levy, H. R. (2000). Delineation of the rules of amino acids involved in the catalytic functions of *L. mesenteroides* glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry*. 39(49), 15012-15021.
 98. Matsubara, S., Matsubara, D., Ishibashi, T., Takizawa, T. (2003). Demonstration of glucose-6-phosphate dehydrogenase in rat Kupffer cells by a newly-developed ultrastructural enzyme-cytochemistry. *European Journal of Histochemistry*. 47(2), 173-176.
 99. Hizi, A., Yagil, G. (1974). On the mechanism of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Regulation in Mouse Liver. 2.Purification and Properties of the Mouse-Liver Enzyme. *European Journal of Biochemistry*. 45, 201-209.
 100. Olive, C., Geroch, M. E., Levy, H. R. (1971). Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*. Kinetic Studies. *Journal of Biological Chemistry*. 246, 2047-2057.
 101. Souza, M. A., Ribeiro, M. Z., Silva, D. P., Pessoa, A., Vitolo, M. (2002). Effect of pH on the stability of hexokinase and glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 98-100, 265-272.
 102. Corpas, F. J., García-Salguero, L., Peragón, J., Lupiáñez, J. A. (1995). Kinetic properties of hexose-monophosphate dehydrogenases. I. Isolation and partial

- purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase from rat liver and kidney cortex. *Life Sciences*.56(3), 179-189.
103. Hansen, T., Schlichting, B., Schönheit, P. (2002). Glucose-6-phosphate dehydrogenase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: expression of the g6pd gene and characterization of an extremely thermophilic enzyme. *FEMS Microbiology Letters*. 216(2), 249-253.
 104. Schroeder, L., Christoff, M., Levy, H. R. (1984). Glucose-6-phosphate dehydrogenase from rabbit erythrocytes. *Biochimica et Biophysica ACTA*.784(1), 48-52.
 105. Wang, X. T., Au, S. W., Lam, V. M., Engel, P. C. (2002). Recombinant human glucose-6-phosphate dehydrogenase. Evidence for a rapid-equilibrium random-order mechanism. *European Journal of Biochemistry*. 269(14), 3417-3424.
 106. Levy, H. R., Christoff, M., Ingulli, J., Ho, E. M. (1983). Glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*: revised kinetic mechanism and kinetics of ATP inhibition. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 222(2), 473-488.
 107. Velasco, P., Barcia, R., Ibarguren, I., Sieiro, A. M., Ramos-Martinez, J. I. (1994). Purification, characterization and kinetic mechanism of glucose-6-phosphate dehydrogenase from mouse liver. *International Journal of Biochemistry*. 26(2), 195-200.
 108. Vaseghi, S., Baumeister, A., Rizzi, M., Reuss, M. (1999). *In vivo* dynamics of the pentose phosphate pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*. 1(2), 128-140.
 109. Tsai, C. S. ve Chen, Q. (1998). Purification and kinetic characterization of hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochemistry and Cell Biology*. 76(1), 107-113.
 110. Moritz, B., Striegel, K., De Graaf, A. A., Sahm, H. (2000). Kinetic properties of the glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenases from *Corynebacterium glutamicum* and their application for predicting pentose phosphate pathway flux *in vivo*. *European Journal of Biochemistry*. 267(12), 3442-3452.

111. Adediran, S. A. (1988). Sigmoid Kinetics of Human Erythrocyte Glucose-6-phosphate Dehydrogenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 262(1), 354-359.
112. Tian, W. N., Braunstein, L. D., Apse, K., Pang, J., Rose, M., Tian, X., Stanton, R. C. (1999). Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in cell death. *American Journal of Physiology*. 276, C1121-C1131.
113. Eggleston, L. V. ve Krebs, H. A. (1974). Regulation of the Pentose Phosphate Cycle. *Biochemical Journal*. 138, 425-435.
114. Yoshida, A. (1973). Hemolytic Anemia and G6PD deficiency. *Science*. 179, 532-537.
115. Manahan, S. E. (2003). *Toxicological Chemistry and Biochemistry* (3. bs., s. 213-225). A CRC Press Comp. USA.
116. Wang, L., Yan, B., Liu, N., Li, Y., Wang, Q. (2008). Effects of cadmium on glutathione synthesis in hepatopancreas of freshwater crab, *Sinopotamon yangtsekiense*. *Chemosphere*. 74(1), 51-56.
117. Serafini, M. T., Romeu, A., Arola, L. (1989). Zn(II), Cd(II) and Cu(II) interactions on glutathione reductase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry International*. 18(4), 793-802.
118. Lachant, N.A., Tomoda, A., Tanaka, K. R. (1984). Inhibition of the pentose phosphate shunt by lead: a potential mechanism for hemolysis in lead poisoning. *Blood*. 63(3), 518-524.
119. Niehaus, W. G., Dilts, R.P. (1984). Purification and characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Aspergillus parasiticus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 228(1), 113-119.
120. Carattino, M. D., Peralta, S., Pérez-Coll, C., Naab, F., Burlón, A., Kreiner, A. J., Preller, A. F., de Schroeder, T. M. F. (2004). Effects of long-term exposure to Cu^{2+} and Cd^{2+} on the pentose phosphate pathway dehydrogenase activities in the ovary of adult *Bufo arenarum*: possible role as biomarker for Cu^{2+} toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 57(3), 311-318.
121. Haghighi, B. ve Ilghari, D. (2004). Inhibition of Human Erythrocyte Glucose 6-Phosphate. Dehydrogenase by Cadmium, Nickel and Aluminium. *Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran*. 15(4), 315-320.

122. Cho, S. W. ve Joshi, J. G. (1989). Inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase isozymes from human and pig brain by Aluminum. *Journal of Neurochemistry*. 53(2), 616 – 621.
123. Niel, E. ve Scherrmann, J. M. (2006). Colchicine today. *Joint Bone Spine* 73, 672–678.
124. The Emergency Response Safety and Health Database NIOSH, Colchicine: biotoxin. Erişim: 11. Aralık. 2009. http://www.cdc.gov/niosh/ershdb/EmergencyResponseCard_29750016.html.
125. DeChatelet, L. R., Cooper, M. R., McCall C. E. (1971). Dissociation by Colchicine of the Hexose Monophosphate Shunt Activation from the Bactericidal Activity of the Leukocyte. *Infection and Immunity*. 3(1), 66-72.
126. Buchdunger, E., Zimmermann, J., Mett, H., Meyer, T., Müller, M., Druker, B. J., Lydon, N. B. (1996). Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Research*. 56, 100-104.
127. Van Oosterom A. T., Judson I., Verweij J., Stroobants, S., di Paola, E. D., Dimitrijevic, S., Martens, M., Webb, A., Sciot, R., Glabbeke, M. V., Silberman, S., Nielsen, O. S. (2001). Safety and efficacy of imatinib (STI571) in metastatic gastrointestinal stromal tumours: a phase I study. *The Lancet*. 358, 1421-1423.
128. Gottschalk, S., Anderson, N., Hainz, C., Eckhardt, S. G., Serkova, N. J. (2004). Imatinib (STI571)-Mediated Changes in Glucose Metabolism in Human Leukemia BCR-ABL–Positive Cells. *Clinical Cancer Research*. 10, 6661–6668.
129. Schwab, M. (2009). *Encyclopedia of Cancer*. Springer Reference (2. bs., s: 1484-1486). New York.
130. Henkes, M., van der Kuip, H., Aulitzky, W. E. (2008). Therapeutic options for chronic myeloid leukemia: focus on imatinib (Glivec[®], Gleevec[™]); *Therapeutics and Clinical Risk Management*. 4(1), 163–187.
131. Boren, J., Cascante, M., Marin, S., Comin-Anduix, B., Centelles, J. J., Lim, S., Bassilian, S., Ahmed, S., Lee, W. P., Boros, L. G. (2001). Gleevec (STI571) Influences Metabolic Enzyme Activities and Glucose Carbon Flow toward Nucleic Acid and Fatty Acid Synthesis in Myeloid Tumor Cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 276(41), 37747–37753.

132. Santos-Gomes, P. C., Seabra, R. M., Andrade, P. B., Fernandes-Ferreira, M. (2003). Determination of phenolic antioxidant compounds produced by calli and cell suspensions of sage (*Salvia officinalis* L.). *Journal of Plant Physiology*. 160(9), 1025-1032.
133. Gao, L. P., Wei, H. L., Zhao, H. S., Xiao, S. Y., Zheng, R. L. (2005). Antiapoptotic and antioxidant effects of rosmarinic acid in astrocytes. *Pharmazie*. 60(1), 62-65.
134. Xavier, C. P., Lima, C. F., Fernandes-Ferreira, M., Pereira-Wilson, C. (2009). *Salvia fruticosa*, *Salvia officinalis*, and rosmarinic acid induce apoptosis and inhibit proliferation of human colorectal cell lines: the role in MAPK/ERK pathway. *Nutrition and Cancer*. 61(4), 564-571.
135. Betke, K., Brewer, G. J., Kirkman, H. N., Luzatto, L., Motulsky, A. G. (1967). Standardized method for G6PD assay of haemoysates. *World Health Organization (WHO) Technical Report Series*. 366, 30-32.
136. Rippa, M., Signorini, M. (1975). 6-Phosphogluconate dehydrogenase from *Candida utilis*. *Methods in Enzymology*. 41, 237-240.
137. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram qualities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72, 248-254.
138. Laemli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680-685.
139. Merril, C. R., Dunau, M. L., Goldman, D. (1981). A rapid sensitive silver stain for polypeptides in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*. 110, 201-207.
140. Andrews, P. (1965). The Gel-Filtration Behaviour of Proteins Related to their Molecular Weights over a Wide Range. *Biochemical Journal*. 96(3), 595-606.
141. Şengezer, C. ve Ulus, N. N. (2007). Three Different Purification Protocols in Purification of G6PD from Sheep Brain Cortex. *FABAD Journal of Pharmaceutical Science*. 32(4), 65-72.
142. Frey, P. A. ve Hegeman, A. D. (2007). Enzymatic Reaction Mechanism, Kinetics of Enzymatic Reactions. Oxford University Press, USA, 69 – 128.
143. Mannervik, B. (1982). Regression analysis, experimental error, and statistical criteria in the design and analysis of experiments for discrimination between rival kinetic models. *Methods in Enzymology*. 87, 370-390.

144. Segel, I. R. (1975). *Enzyme Kinetics*, John Wiley and Sons Inc., Toronto.
145. Goldammer, T., Di Meo, G. P., Lühken, G., Drögemüller, C., Wu, C. H., Kijas, J., Dalrymple, B. P., Nicholas, F. W., Maddox, J. F., Iannuzzi, L., Cockett, N. E. (2009). Molecular cytogenetics and gene mapping in sheep (*Ovis aries*, $2n = 54$). *Cytogenetic Genome Research*. 126(1-2), 63-76.
146. Pittalis, S., Montemuros, F. M., Tavazzi, D., Fiorelli, G. (1992). Rapid isolation of glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes by combined affinity and anion-exchange chromatography for biochemical characterization of variants. *Journal of Chromatography*. 573, 29-34.
147. Ibid Kaynak 144, s. 560-658.
148. Paksy, K., Forgács, Z., Gáti, I. (1999). *In vitro* Comparative Effect of Cd^{2+} , Ni^{2+} , and Co^{2+} on Mouse Postblastocyst Development. *Environmental Research*. 80(4), 340-347.
149. Battistoni, A., Pacello, F., Mazzetti, A. P., Capo, C., Kroll, J. S., Langford, P. R., Sansone, A., Donnarumma, G., Valenti, P., Rotilio, G. (2001). A histidine-rich metal binding domain at the N terminus of Cu,Zn-superoxide dismutases from pathogenic bacteria: a novel strategy for metal chaperoning. *Journal of Biological Chemistry*. 276(32), 30315-30325.
150. Frederickson, C. J. ve Bush, A. I. (2001). Synaptically released zinc: Physiological functions and pathological effects. *BioMetals*. 14(3-4), 353-366.
151. Tew, K. D. (1994). Glutathione-associated Enzymes in Anticancer Drug Resistance. *Cancer Research*. 54, 4313-4320.
152. Laliotis, G. P., Argyrokastritis, A., Bizelis, I., Rogdakis, E. (2007). Cloning and characterization of an alternative transcript of ovine glucose 6-phosphate dehydrogenase gene: Comparative approach between ruminant and non-ruminant species. *Gene*. 388, 93-101.
153. Naylor, C. E., Gover, S., Basak, A. K., Cosgrove, M. S., Levy, H. R., Adams, M. J. (2001). $NADP^{+}$ and NAD^{+} binding to the dual coenzyme specific enzyme *Leuconostoc mesenteroides* glucose 6-phosphate dehydrogenase: different interdomain hinge angles are seen in different binary and ternary complexes. *ACTA Crystallographica. Section D: Biological Crystallography*. 57, 635-648.
154. Shan, B., Medina, J. C., Santha, E., Frankmaelle, W. P., Chou, T. C., Learned, R. M., Narbut, M. R., Stott, D., Wu, P., Jaen, J. C., Rosen, T., Timmermans, P.

B. M. W. M., Beckman, H. (1999). Selective, covalent modification of β -tubulin residue Cys-239 by T138067, an antitumor agent with *in vivo* efficacy against multidrug-resistant tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96(10), 5686–5691.

EKLER

EK-1. Değişik İnhibisyon Tiplerinin Formülleri

Kompetitif İnhibisyon

$$V = V_m \cdot S / (K_s \cdot (1 + I/K_i) + S)$$

Non-kompetitif İnhibisyon

$$V = ((V_m \cdot S) / (1 + (I/K_i))) / (K_m + S)$$

Linear Karışık Tip İnhibisyon

$$V = V_m \cdot S / ((K_s + K_s \cdot I/K_i) + (S + S \cdot I/(a \cdot K_i)))$$

Unkompetitif İnhibisyon

$$V = V_m \cdot S / (K_s + S(1 + I/K_i))$$

Kısmi Kompetitif İnhibisyon

$$V = V_m \cdot S / (K_s \cdot ((1 + I/K_i) / (1 + I/a \cdot K_i)) + S)$$

Kısmi Non-kompetitif İnhibisyon

$$V = V_m \cdot S / ((K_s \cdot (1 + I/K_i)) / ((1 + b \cdot I/K_i)) + (S \cdot (1 + I/K_i)) / (1 + (b \cdot I/K_i)))$$

