

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

**VAN GÖLÜ BALIĞI KARACİĞERİ 6-FOSFOGLUKONAT
DEHİDROGENAZIN (EC.1.1.1.44; 6 PGD) AFİNİTE
KROMATOĞRAFİSİ İLE SAFLAŞTIRILMASI VE
KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Muhammet GÜLER
DANIŞMAN: Doç.Dr. Vedat TÜRKOĞLU

VAN-2010

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

**VAN GÖLÜ BALIĞI KARACİĞERİ 6-FOSFOGLUKONAT
DEHİDROGENAZIN (EC.1.1.1.44; 6 PGD) AFİNİTE
KROMATOĞRAFİSİ İLE SAFLAŞTIRILMASI VE
KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Muhammet GÜLER

VAN-2010

Bu çalışma Y.Y.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığının 2009-FBE-YL002
nolu projesiyle desteklenmiştir.

ÖZET

VAN GÖLÜ BALIĞI KARACİĞERİ 6-FOSFOGLUKONAT DEHİDROGENAZIN (EC1.1.1.44; 6 PGD) AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ İLE SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

GÜLER, Muhammet

Yüksek Lisans Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Vedat Türkoğlu

Haziran 2010, 56 sayfa

Bu çalışmada Van Gölü balığı karaciğeri 6-fosfoglukonat dehidrogenaz (EC 1.1.1.44; 6PGD) enzimi afinite kromatografisi metoduyla saflaştırıldı. Bu çalışmada önce balık karaciğeri uygun bir şekilde alınarak homojenat hazırlandı. Hazırlanan homojenat dengeleme tamponu ile dengelenen afinite kolonuna tatbik edildi. Kolon, absorbans değeri 0,01 nm'den küçük olana kadar yıkama tamponu ile yıkandı. Son olarak kolona elüsyon tamponu tatbik edilerek ayrılan enzim fraksiyonları elüsyonlar halinde alındı. Her bir elüsyonun 280 nm'de kalitatif protein tayinleri, 595 nm'de kantitatif protein tayinleri ve 340 nm'de aktivite tayinleri yapıldı. Enzimin saflığını kontrol etmek için Sodyumdodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) metodu kullanıldı. Elektroforez jelinin fotoğrafı çekildi ve tek protein bandı görüldü. Saflaştırma oranı 446.5-kat olarak hesaplandı. SDS-PAGE ile enzimin alt biriminin molekül ağırlığı 57 kDa olarak belirlendi. Enzimin optimum sıcaklığı ve optimum pH'si sırasıyla 35-40 °C, 8-9 aralığında bulundu. İyonik şiddet etkisinin araştırıldığı bu çalışmada enzimin maksimum aktivite gösterdiği tuz [(NH₄)₂SO₄] konsantrasyonu 0.02 M olarak bulundu.

Anahtar kelimeler: 6-Fosfoglukonat Dehidrogenaz, Saflaştırma

ABSTRACT

PURIFICATION, CHARACTERIZATION OF 6- PHOSPHOGLUCONATE DEHYDROGENASE (EC 1.1.1.44; 6PGD) FROM LAKE VAN FISH LIVER BY AFFINITY CHROMATOGRAPHY

GÜLER, Muhammet

Msc Thesis, Biochemistry Science

Supervisor: Assos. Prof. Dr. Vedat Türkoğlu

June 2010, 56 pages

In this study 6-phosphogluconate dehydrogenase (EC 1.1.1.44; 6PGD) was purified from Lake Van fish liver by means of affinity chromatography method. In the study at first fish liver was properly removed and homogenate was prepared. The homogenate was loaded onto the affinity column which was equilibrated with equilibration buffer. The column was washed with washing buffer until the absorbance value dropped below 0.01 nm. Finally the elution buffer was loaded onto the column and the separated fractions of enzyme were taken as elutions. Each of the elutions was done qualitative protein determination at 280 nm, quantitative protein determination at 595 nm and activity assays at 340 nm. To check the purity of the enzyme SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) was used. The photo of the electrophoresis was taken and seen one protein band. The purification rate was calculated to be 446.5-fold. The molecular mass of the subunit was estimated to be 57000 Da by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Optimal temperature and optimal pH of the enzyme were determined between 35-40 °C and 8-9 respectively. This study which effect of ionic strenght was searched in the enzyme shown optimal activity in 0.02 M salt [(NH₄)₂SO₄].

Key Words: 6-Phosphogluconate Dehydrogenase, Purification.

ÖN SÖZ

Yüksek lisans tezi olarak yürütölen bu çalışma, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Edebiyat Faköltesi Kimya Bölümü Biyokimya öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Vedat TÜRKOĞLU yönetiminde Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Edebiyat Faköltesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma laboratuvarında yapılmıştır. Çalışmanın planlanması, uygulanması ve değerlendirilmesi esnasında karşılaştığım her türlü problemlerin çözümü için bilgi, deneyim ve özverisini esirgemeyen saygı değer hocam Doç. Dr. Vedat TÜRKOĞLU'na teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca çalışmamı gerçekleştirebilmem için gerekli kimyasal malzemeyi temin etmek amacıyla vermiş olduğumuz projemizi destekleyen Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Daire Başkanlığına teşekkür ederim. Çalışmamda bana yardımcı olan Metin ERTAŐ ve Mehmet Rıza KIVANÇ arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Muhammet GÜLER

İÇİNDEKİLER

	sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	iv
ÖN SÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Enzimler	1
1.2. Enzimlerin Adlandırılmaları	2
1.3. Enzimlerde Aktif Yer Kavramı ve Enzim-Substrat Kompleksi	3
1.3.1. Anahtar kilit modeli (Fischer)	3
1.3.2. Uyum oluşturma modeli (El-eldiven modeli-Koshland)	4
1.4. Enzim Aktiviteleri	4
1.5. Enzimlerin Aktivitesini Etkileyen Faktörler	5
1.5.1. Enzim konsantrasyonu	5
1.5.2. Substrat konsantrasyonu	6
1.5.3. Sıcaklık	7
1.5.4. pH	8
1.5.5. Hormonlar	8
1.5.6. Zaman	8
1.5.7. Fiziksel faktörler ve su	9
1.5.8. Çeşitli iyonlar	9
1.6. 6-Fosfoglukonat Dehidrogenaz Enzimi	9
1.7. Pentoz Fosfat Yolu	9
1.7.1. Pentoz fosfat yolu tepkimeleri	10

1.7.2. Pentoz fosfat yolunun metabolik önemi	13
2. KAYNAK BİLDİRİŞİ	14
3. KULLANILAN MATERYALLER	19
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	19
3.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar	19
3.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	20
3.3.1. Eritrositlerin yıkanması için kullanılan çözelti	20
3.3.2. Aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler	20
3.3.3. Afinite kromatografi kolonunda kullanılan çözeltiler	21
3.3.4. Elektroforez için kullanılan çözeltiler	22
4. KULLANILAN YÖNTEMLER	23
4.1. Kalitatif Protein Tayini	23
4.2. Bradford Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini	23
4.3. Balık Karaciğeri Eldesi	24
4.3.1. Karaciğer numunelerinin alınması ve homojenat eldesi	24
4.3.2. Afinite kolonunun hazırlanması	25
4.3.3..Karaciğer homojenatının afinite kolonuna tatbiki ve elüsyonların alınması	25
4.3.3. Enzim aktivitesinin ölçüm	26
4.3.4. SDS-Poliakrilamid jel elektroforeziyle (SDS-PAGE) enzim saflığının kontrolü	28
4.4. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	29
4.5. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi	30
4.6. Enzim Aktivitesi Üzerine İyonik Şiddet'in Etkisi	30
5. BULGULAR	31
5.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Grafik	31
5.2. Karaciğer 6-Fosfoglukonat Dehidrogenaz Enziminin Afinite Kromatografisi İle Saflaştırma Sonuçları	32
5.3. Karaciğerden Saflaştırılan Enzimin Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi Sonuçları	34

5.4. Karaciğerden Saflaştırılan Enzimin Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi Sonuçları	35
5.5. Karaciğerden Saflaştırılan Enzimin Aktivitesi Üzerine İyonik Şiddet'in Etkisi Sonuçları	37
5.6. Balık Karaciğeri 6PGD Enziminin SDS-PAGE ile Saflığının Kontrolü	39
6. TARTIŞMA ve SONUÇ	41
KAYNAKLAR	47
ÖZ GEÇMİŞ	56

ŞEKİLLER DİZİNİ

	sayfa
Şekil 1.1. Enzimatik olarak katalizlenen bir reaksiyonun hızına substrat konsantrasyonunun etkisi	7
Şekil 1.2. Pentoz Fosfat Metabolik Yolunun Oksidatif Faz Reaksiyonları	11
Şekil 1.3. Pentoz Fosfat Metabolik Yolunun Non-Oksidatif Faz Reaksiyonları	12
Şekil 5.1. Bradford yöntemiyle proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan standart grafik	31
Şekil 5.2. Afinite kolonundan alınan fraksiyonların kalitatif protein tayinleri ve aktivite değerleri.	34
Şekil 5.3. Balık Karaciğeri 6-Fosfoglukonat Dehidrogenaz'ın sıcaklık-% aktivite grafiği	35
Şekil 5.4. Balık Karaciğeri 6-Fosfoglukonat Dehidrogenaz'ın pH-% aktivite grafiği	36
Şekil 5.5. Balık Karaciğeri 6-Fosfoglukonat Dehidrogenaz'ın Tuz Konsantrasyonu-% aktivite grafiği	38
Şekil 5.6. Van Gölü Balığı karaciğerinden saflaştırılan 6PGD enziminin SDS-PAGE bantları (1.bant protein standartı, 2., 3., 4. bantlar Saflaştırılan 6PGD)	39
Şekil 5.7. SDS-PAGE ile elde edilen protein standartı bandı yardımıyla elde edilen $\log M_A$ -Göreceli göç grafiği.	40

ÇİZELGELER DİZİNİ

	sayfa
Çizelge 4.1. 6PGD enziminin aktivite ölçümdeki kuvvet içeriği	27
Çizelge 5.1. Balık Karaciğeri 6-Fosfoglukonat Dehidrogenaz'ın sıcaklık, aktivite ve % aktivite değerleri	35
Çizelge 5.2. Balık Karaciğeri 6-Fosfoglukonat Dehidrogenaz'ın pH, aktivite ve % aktivite değerleri	36
Çizelge 5.3. Balık Karaciğeri 6-Fosfoglukonat Dehidrogenaz'ın tuz konsantrasyonu aktivite ve % aktivite değerleri	38

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

kcal	Kilokalori
mg	Miligram
μmol	Mikromol
°C	Santigrat derece
nm	Nanometre
Da	Dalton
kDa	Kilodalton
g	Gram
dk	Dakika
ml	mililitre
μg	Mikrogram
M	Molar

Kısaltmalar

6PG	6-Fosfoglukonat
6PGD	6-Fosfoglukonat Dehidrogenaz
Akt	Aktivite
ATP	Adenozintrifosfat
CAT	Katalaz
CoA	Coenzim-A
CM	Karboksimetil
DEAE	Dietilaminoetil
DNA	Deoksiribonükleik Asit
E	Enzim
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
ES	Enzim-Substrat Kompleksi

EU	Enzim Ünitesi
FAD	Flavin Adenin Dinükleotid
Fe ⁺²	Demir (II) İyonu
GR	Glutatyon Redüktaz
GSH	Redükte Glutatyon
GSH-Px	Glutatyon peroksidaz
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
NAD ⁺	Nikotinamid Adenin Dinükleotit (okside form)
NADP ⁺	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat (okside form)
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat (redükte form)
RNA	Ribonükleik Asit
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
S	Substrat
SOD	Süper Oksit Dismutaz
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
TCA	Triklor Asetik Asit
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametil Etilendiamin
Tris	Trihidroksimetilaminometan
V _{max}	Maksimum Hız

1. GİRİŞ

1.1. Enzimler

Canlı organizmalarda, kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve yan ürün oluşmaksızın % 100'lük verim sağlayan biyolojik katalizörlere enzim denir (Lehninger, 2000). Enzimler proteinlerin en büyük ve özelleşmiş şeklidirler. Katalitik aktivite gösteren küçük bir RNA grubu dışında, bütün enzimler protein yapısındadır (Lehninger, 2000).

Enzimlerin bazıları katalizleme fonksiyonlarını protein yapıları ile gerçekleştirirken, bazıları ise enzimlerin yapılarında bulunmayan ve kofaktör denen moleküllere ihtiyaç duyarlar. Kofaktör metal iyonu (Mg^{+2} , Fe^{+2} , Zn^{+2} vb.) olabileceği gibi koenzim denen kompleks organik moleküller de (NAD^+ , FAD, KoenzimA) olabilir. Bazı enzimler her ikisine de ihtiyaç duyarlar. Koenzimlerin çoğu vitaminlerden ve özellikle B grubu vitaminlerinden türetilmişlerdir. Koenzimler proteinin denatüre olması ile bozulmazlar ve defalarca kullanılabilirler. Kofaktörlü enzimlere holoenzim, enzimin protein kısmına ise apoenzim denir (Onat, 1996).

Enzimlerin kinetik özellikleri hakkındaki bilgiler Michaelin-Menten eşitliğinde yer alan enzimin substrata ilgisini ifade eden K_M sabiti ve enzimin katalitik aktivitesini ifade eden V_{max} değerlerinden anlaşılır. Enzim aktivitesi "Enzim Ünitesi" ile ifade edilir. "Enzim Ünitesi", 25°C'de ve optimal şartlarda 1µmol substratı bir dakikada ürüne dönüştüren enzim miktarı şeklinde tanımlanır. Birim zamanın saniye olduğu uluslararası ölçü birimine göre, saniyede 1 mol madde dönüşümüne sebep olan enzime 1 katal enzim denir. "Spesifik aktivite" 1 mg protein başına enzim ünitesi olarak tanımlanmaktadır. Spesifik aktivite enzim saflığının bir ölçüsüdür ve saflaştırma basamaklarında maksimum ve sabit bir değere ulaşması ile enzimin saf hale geldiği anlaşılır (Keha ve Küfrevioğlu, 2004).

Biyokimya tarihindeki bilimsel araştırma konularının çoğunluğunu enzimler oluşturmaktadır (Keha ve Küfrevioğlu, 2004). Enzimlerin sağlıkta, hastalıkta, tanıda ve tedavide son derece önemli görevleri ve katkıları bulunmaktadır. Enzimlerin niteliksel ve niceliksel tayinleri yapılarak pek çok kalıtsal bozukluğun tanısı konulmakta ve hastalığın geleceği ile ilgili ipuçları edinilmektedir (Onat, 1996). Günümüzde yaklaşık olarak 2000 kadar enzim tanımlanmış, birçoğu saflaştırılmış, karakterize edilmiş ve 200'den fazla enzim de kristallendirilmiştir (Keha ve Küfrevioğlu, 2004).

1.2. Enzimlerin Adlandırılmaları

Enzimler genellikle rol aldıkları kimyasal grup veya substratının sonuna – az eki getirilerek isimlendirilir. Mesela üreyi hidroliz eden enzim üreaz olarak isimlendirilir. Bu terminolojiden hariç olarak tripsin, pepsin ve papain gibi basit isimlendirilen enzimler keşfedenin bildirdiği şekilde adlandırılmaktadır. Ancak enzim sayısının hızla artmasından dolayı enzimlerin katalizledikleri reaksiyonların tipi ve mekanizmalarının açıkça anlaşılabilir ifade edilmesi için sistematik isimlendirme uygun görülmüştür. Enzimlerin sistematik isimlendirmesi Uluslararası Biyokimya Birliği Enzim Komisyonu tarafından oluşturulur. Bu sistem halen bilinen tüm enzimlerin yeni enzimmiş gibi ayırımı için pratik ve rasyonel bir kaynak sağlamaktadır.

Sistematik isim; substrat, katalizlenen reaksiyonun doğası ve diğer karakteristikleri ifade etmektedir. Örneğin EC 4.2.1.1 ile ifade edilen enzim için ön ek EC “Enzim kod numarasını” belirtir. Birinci rakam enzimlere ait sınıfı belirtir. Bilindiği üzere tüm enzimler katalizledikleri reaksiyon türü ile belirlenen altı sınıftan birine aittir. Bunlar; (1) oksidoredüktazlar, (2) transferazlar, (3) hidrolazlar, (4) liyazlar, (5) izomerazlar ve (6) ligazlar’dır. İsimlendirmede ikinci rakam alt sınıfı, üçüncü rakam grubunu, dördüncü rakam da her enzimin kendine özgü seri numarasını vermektedir (Bhagavan, 2002). EC tarafından

önerilmemesine karşın, belirli enzimler adlandırılırken büyük harfli kısaltma ifadesi (örneğin, alanin amino transferaz için ALT) yaygın bir şekilde uygulanmaktadır. Yine birçok biyokimyacı tarafından geleneksel isimler hala kullanılmakta, sistematik isimleri de parantez içinde verilmektedir (Keha ve Küfrevioğlu, 2004; Burtis ve Ashwood, 2005).

1.3. Enzimlerde Aktif Yer Kavramı ve Enzim-Substrat Kompleksi

Enzim molekülü üzerinde substrat bağlama özelliğine sahip özel bölgeye aktif merkez adı verilmektedir. Özellikleri:

- Bağlanma ve katalitik aktivite bölgeleri vardır.
- Özel amino asit dizilimi vardır (Fonksiyonel yan gruplu; lizin, histidin, sistein, trozin).
- Bağlanma zayıf karakterlidir (2-3 kcal).
- Bağlanma değişik kuvvetlerle olur.

Aktif merkez için, enzim-substrat bağlanmasını açıklayan iki model öne sürülmektedir:

1.3.1. Anahtar-kilit modeli (Fischer)

Bu modelde substrat ve enzimin aktif yerinin birbirine uyacak şekilde önceden belirlenmiş olduğu varsayılmaktadır (Bakan, 2004; Kutay, 2002).

1.3.2. Uyum oluşturma modeli (El-eldiven modeli-Koshland)

Bu modelde aktif merkez esnek yapıdadır. Proteinin tersiyer yapısında oluşan bir değişiklik ile enzim, substratını katalize uygun ve en doğru biçimde bağlayacak şekilde değişikliğe uğramaktadır (Bakan, 2004; Kutay, 2002).

1.4. Enzim Aktivitesi

Enzimlerin miktarlarını saptamak zor olduğundan ve birçok enzimin saf örnekleri olmadığından, enzim miktarı yerine aktivite ünitesi kullanılmaktadır. Enzim aktivitesi turnover sayısı ile ifade edilir. Belirli koşullarda (25 °C'de) bir saniyede 1 mol enzim tarafından ürüne dönüştürülen substratın mol sayısına o enzimin turnover sayısı denir. Birçok enzimin turnover sayısı 1×10^4 tür. Bazı enzimler 1×10^5 turnover sayısına sahiptir (Bhagavan, 2002). Bilinen en yüksek turnover sayısı 40.000.000'lik değerle katalaza aittir. İkinci olarak en yüksek değere 400.000 ile karbonik anhidraz sahiptir.4 Turnover sayısı sadece saf enzim için ifade edildiğinden enzim aktivitesi spesifik aktivite ile belirtilir. Spesifik aktivite 1 mg protein başına enzim ünitesi (EU/mg protein) olarak tarif edilir. Klinikte, biyolojik sıvılarda ölçülen enzim aktiviteleri optimum Şartlarda 1 saniyede 1 μ mol substratı ürüne dönüşümünü katalizleyen enzim miktarı olarak tanımlanır. Bu birim, uluslararası birim (katal) olarak kabul edilir (Bhagavan, 2002).

Klinikte enzim çalışmaları çok büyük pratik öneme sahiptir. Bazı hastalıkların etiyojijisinde özellikle kalıtsal genetik hastalıklarda enzim eksikliği veya bir ya da daha fazla enzimin total azalması veya enzimin fazla aktivitesinin bazı hastalıklara neden olduğu düşünölmektedir. Kan plazması, eritrosit veya doku numunesinde bulunan enzimin aktivite ölçümü kesin hastalık tanısı için oldukça önemlidir. Bununla birlikte günümüzde enzimler sadece tıpta değil, aynı zamanda kimyasal endüstri, gıda prosesi ve ziraatta da kullanılan önemli pratik

araçlardır (Lehninger, 2000). Bugün yaklaşık 2000 kadar enzim tanımlanmış bunların birçoğu saf elde edilerek kinetikleri incelenmiş ve 200'den fazlası kristallendirilmiştir. Ancak yapılan genetik çalışmalar henüz tespit edilmemiş birçok enzimin var olduğunu göstermektedir (Keha ve Küfrevioğlu, 2004).

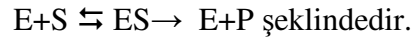
1.5. Enzimlerin Aktivitesini Etkileyen Faktörler

Enzim aktivitesi çeşitli iyonlar, zaman, fiziksel ve allosterik etkiler, enzim konsantrasyonu, substrat konsantrasyonu, hormonlar, su, pH, sıcaklık gibi faktörler tarafından etkilenmektedir.

1.5.1. Enzim konsantrasyonu:

Enzimatik bir tepkime ortamında fazla miktarda substrat bulunması halinde tepkimenin hızı, enzim konsantrasyonu ile orantılı olarak artmaktadır. Denge halinde enzim konsantrasyonunun denge sabiti üzerine etkisi yoktur.

Genel bir enzimatik reaksiyon;



Hız ile enzim konsantrasyonu arasındaki ilişki incelendiğinde,

$$Hız_1 = k_1 \cdot [E] [S]$$

$$Hız_2 = k_2 \cdot [E] [P]$$

$$k_1 \cdot [E] [S] = k_2 \cdot [E] [P]$$

Denge halinde tepkimenin sağa doğru olan hızı (hız sabiti= k_1), sola doğru olan hızına (hız sabiti= k_2) eşittir. Yani dengeye erişildiğinde $Hız_1 = Hız_2$ olmaktadır. $K_{denge} = k_1/k_2 = [P]/[S]$ Bu eşitlikten de görüldüğü gibi, denge sabiti enzim

konsantrasyonu tarafından etkilenmemektedir. Dolayısıyla enzimler, hız ve denge sabitlerini değiştirmemektedirler.

1.5.2. Substrat konsantrasyonu:

Ortamda bulunan enzim konsantrasyonu ve diğer koşullar değişmediğinde tepkimenin hızı, başlangığta substrat konsantrasyonunun artırılması ile doğrusal bir artış göstermektedir. Fakat substrat eklendiğe hız yavaşlayarak artar ve belirli bir substrat konsantrasyonunda maksimum hıza ulaşır. Maksimum hıza ulaşıldığında substrat konsantrasyonu artırılrsa da tepkime hızı değişmez.

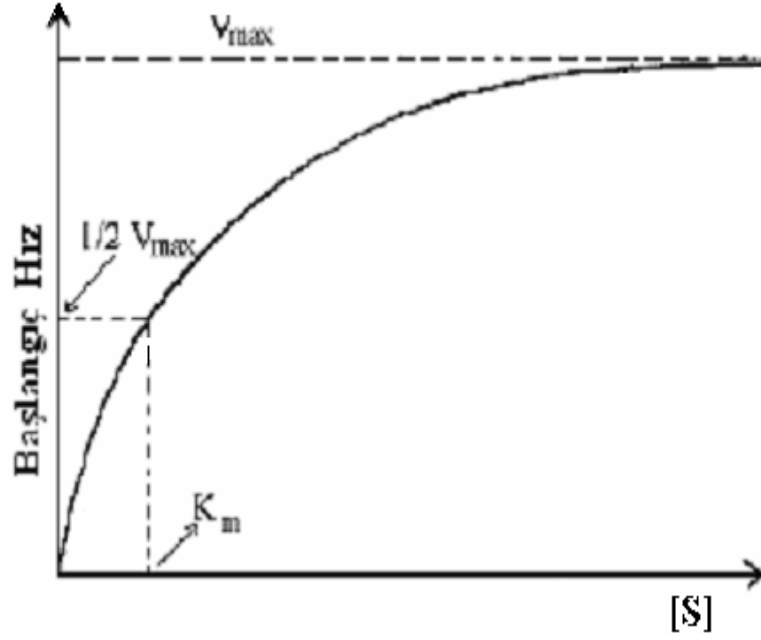


Başlangığta artan [S], enzim molekülleri ile bağlanarak [ES] kompleksi oluşturmaktadır. Maksimum kapasiteye ulaşıldığında enzimde substrat bağlayacak tüm boş yerler dolduğunda, eklenen substrat artık [ES] kompleksi oluşturamayacağı için enzimatik tepkimenin hızı (V_{max}) değişmemektedir. Bu eşitlik:

$$V = \frac{V_{max}[S]}{[s] + K_m}$$

şeklindedir.

Eşitlikte herhangi bir enzim için V_{max} , K_m değerleri sabit olduğundan, bu eşitlik enzimatik reaksiyon hızını substrat konsantrasyonundaki değişime bağlayan ifadedir. Bu eşitlikten hareketle, substrat konsantrasyonuna karşı hızdaki değişimlerin birleştirilmesiyle hiperbolik bir grafik ortaya çıkmaktadır (Kutay, 2002



Şekil 1.1. Enzimatik olarak katalizlenen bir reaksiyonun hızına substrat konsantrasyonunun etkisi

1.5.3. Sıcaklık:

Enzimatik tepkimelerde sıcaklığın artması ile moleküller arası çarpışmanın artışına bağlı olarak genellikle tepkimenin hızı artmaktadır. Tepkime hızının yükselmesi sıcaklıkla doğru orantılıdır. Ancak maksimum hıza ulaşıldıktan sonra sıcaklığın artışı ile hızda tekrar bir azalma gözlenmektedir. Enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklığa optimum sıcaklık denir. Yüksek ısılarda ($55-60^{\circ}\text{C}$) enzimler etkisizdirler. Düşük sıcaklıkların enzimin etkinliğini azalttığı fakat yapısını bozduğu görülmemiştir. Sabit sıcaklıklı canlılarda enzimler çoğunlukla 37°C 'de optimum etkindirler.

1.5.4. pH:

Enzimlerin aktiviteleri ortamın H^+ iyonu konsantrasyonuna bağlı olarak değişmektedir. Her enzimin optimum pH aralığı vardır. pH değişikliği ile amino asit zincirinin iyonik özellikleri değiştii için denatüre olan enzimin katalitik aktivitesi kaybolmaktadır. Aktif merkezin iyonizasyonu bozulabildiğinden enzim ile substrat etkileşimi değişmekte veya substrat molekülünün çözünürlüğünü değiştiren pH, [ES] oluşumunu etkilemektedir (Kutay ve Onat, 2002). Enzimler genellikle vücut sıvısının pH'sı ile aynı pH'da fonksiyon görürler. Bu yüzden çoğu enzim en yüksek aktiviteyi pH 6-8 arasında gösterir. Buna rağmen gastrik sıvısının düşük pH'sında fonksiyon yapan pepsin maksimum aktiviteyi pH 2'de gösterir (Bhagavan, 2002)

1.5.5. Hormonlar:

Hormonlar ve bazen aminoasitler gibi biyomoleküller, enzimin durumunu değiştirmektedirler. Özellikle steroid yapılı hormonlar birden fazla alt ünitesi olan enzimlerin yapılarını bozarak etki etmektedirler. Yine aminoasitler gibi bazı küçük moleküller enzimin yapısını düzeltme etkisine sahiptirler

1.5.6. Zaman:

Enzimatik reaksiyonun hızı zamana bağlıdır. Reaksiyon boyunca enzimin zamanla inaktive olması, reaksiyonu önleyen maddelerin oluşumu, ürünlerin birleşerek aksi yöndeki reaksiyonu işletmeleri ve substratın tükenmesinden dolayı enzimatik reaksiyonun hızı azalır.

1.5.7. Fiziksel faktörler ve su:

Işık ve radyasyon gibi fiziksel faktörler tarafından enzim aktivitesi değişebilmektedir. Örneğin tükürük amilazının aktivitesi kırmızı ve mavi ışıkta artarken U.V. ışınlarında azalmaktadır. Ayrıca enzimler işlevlerini sulu ortamda gerçekleştirdiklerinden, suyun miktarı da enzimleri etkilemektedir. Genellikle %15'in altında su içeren ortamlarda enzimler işlev görmezler.

1.5.8. Çeşitli iyonlar:

Enzim aktivitesi için gerekli olan kofaktörün ortamda varlığı veya yokluğu ve konsantrasyonu enzimatik aktiviteyi etkilemektedir.

1.6. 6-Fosfoglukonat Dehidrogenaz Enzimi

6-Fosfoglukonat dehidrogenaz enzimi, pentoz fosfat yolunun 3. enzimidir. 6-Fosfoglukonat dehidrogenaz enziminin katalizlediği reaksiyon dönüşümlü olup NADP^+ varlığında 6-fosfoglukonat, ribuloz-5-fosfata dönüşür ve NADPH oluşur. Bu iki ürün hakkında detaylı bilgi ileriki konularda verilecektir.

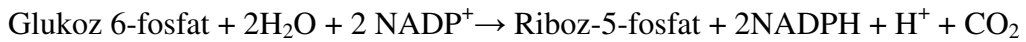
1.7. Pentoz Fosfat Yolu

Pentoz yan yolu, heksoz mono fosfat yolu ya da fosfoglukonat oksidatif yolu olarak da bilinmektedir. İlk kez 1931 yılında Otto Warburg tarafından ortaya atılmış ve tamamı Fritz Lipmann, Frank Dinckens, Bernard Horecker ve Efrahim Rocher isimli biyokimyacılar tarafından aydınlatılmıştır (Keha ve Küfrevioğlu, 2004).

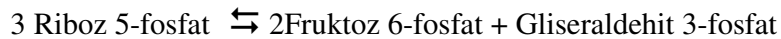
1.7.1. Pentoz fosfat yolu tepkimeleri

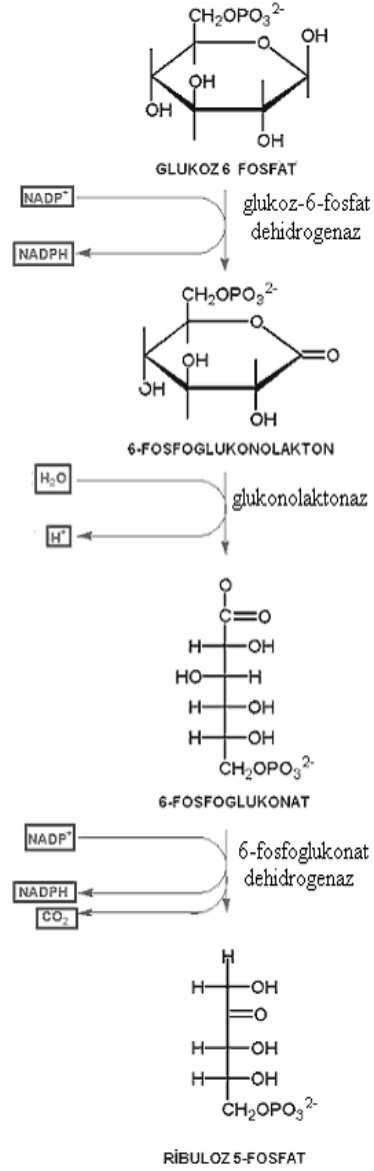
Pentoz fosfat yolu oksidatif ve oksidatif olmayan olmak üzere iki aşamadan oluşur. Sitozolda oluşan bu metabolik yolun amacı indirgeyici biyosentez olayları için NADPH ve birçok bileşiğin yapısında bulunan riboz-5-fosfat üretmektir. Bu yolda; üç, dört, beş, altı ve yedi karbonlu şekerler oksidatif olmayan reaksiyonlar serisi ile birbirlerine dönüştürülür (Keha ve Küfrevioğlu, 2004).

Oksidatif reaksiyonlar; 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enziminin, glukoz 6-fosfat'ın bir no'lu karbonunun dehidrogenasyonu sonucu 6-fosfoglukono-1,5-lakton'a dönüştürülmesi ile başlar. İkinci olarak fosfoglukono-1,5-lakton, laktonaz enzimi tarafından 6-fosfoglukonat'a dönüştürülürken, burada oluşan ürün 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enziminin ribuloz 5-fosfat'a, oluşan bu molekül de fosfopentoz izomeraz enzimi tarafından riboz 5-fosfat'a dönüştürülür. Bu tepkimeler sonucunda D-riboz-5-fosfat ve CO₂ oluşur. NADPH birinci ve üçüncü reaksiyonlarda oluşur. Reaksiyonun net denklemi aşağıdaki şekildedir (Kutay, 2002).

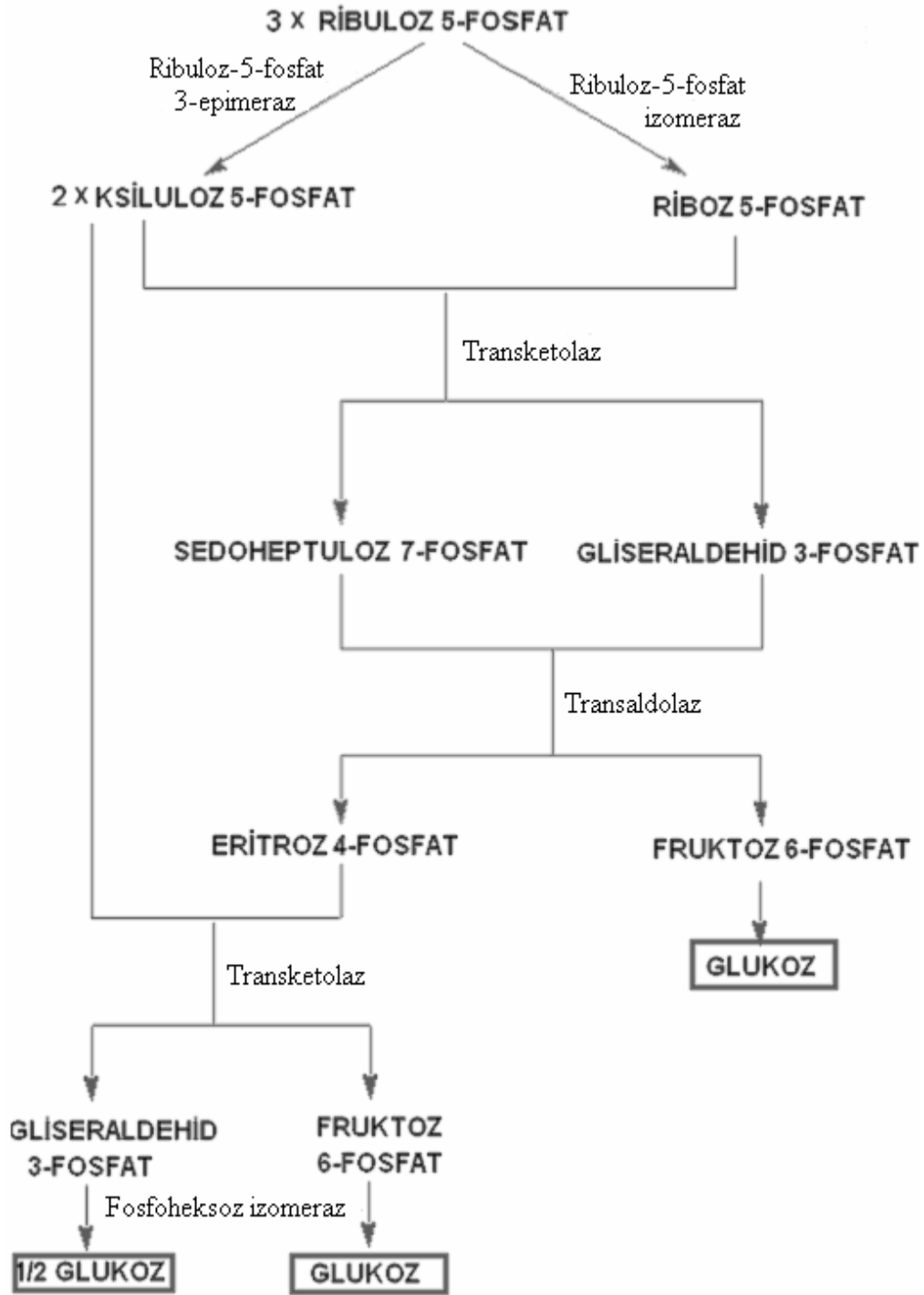


Oksidatif olmayan bölümde; ksiluloz 5-fosfat ve riboz 5-fosfattan transketolaz enzimi ile gliseraldehit 3-fosfat ve sedoheptuloz 7-fosfat oluşması ile başlar. Oluşan bu iki ürün transaldolaz enzimi ile eritroz 4-fosfata ve fruktoz 6-fosfata, bu bileşikler de transketolaz tarafından gliseraldehit 3-fosfat ve fruktoz 6-fosfata dönüştürülmektedir. Böylece pentoz fosfat yoluyla oluşan riboz 5-fosfat glikoliz yolu ara bileşiklerine dönüştürülmüş olur. Oksidatif olmayan bölümün net reaksiyon denklemi aşağıdaki gibidir (Keha ve Küfrevioğlu, 2004).





Şekil 1.2. Pentoz Fosfat Metabolik Yolunun Oksidatif Faz Reaksiyonları



Şekil 1.3. Pentoz Fosfat Metabolik Yolunun Non-Oksidatif Faz Reaksiyonları

1.7.2. Pentoz fosfat yolunun metabolik önemi

Pentoz fosfat yolu; hücrede RNA, DNA ve nükleotid sentezi için gerekli riboz-5-fosfat ve redüktif biyosentezlerde indirgeyici güç olan NADPH'ları sentezlemek gibi başlıca iki işlevi vardır (Krebs ve Eggleston, 1978). Ayrıca, aromatik aminoasit ve vitamin sentezinde gerekli eritroz-4-fosfat, bakteri hücre duvarının bir bileşeni olan sedoheptuloz-7-fosfat gibi fosforile karbonhidratlar bu yolda sentezlenmektedir (Wood, 1986).

NADPH hücrede yağ asidi, kolesterol, L-askorbik asit, nitrik oksit biyosentezi, glutatyonun indirgenmesi, ilaç ve ksenobiyotik detoksifikasyonu ve peroksitlerin indirgenmesinde rol alır (Wood 1986; Nelson ve Cox, 2000). Eritrositlerde pentoz fosfat yolu okside glutatyonun indirgenmesinde kullanılan NADPH'yı sağlar. Redükte glutatyon (GSH) ve GSH-bağımlı enzimler hücreyi iç ve dış kaynaklı toksik bileşiklerden ve reaktif oksijen türlerinden (ROS) korur (Siems ve ark., 2000). Fagositlerde oksijen tüketimi ve H₂O₂ oluşumu fazla olduğundan pentoz fosfat yolunun aktivitesi de fazladır (Borregaard ve ark., 1984). Ksenobiyotikler, glutatyon peroksidaz, sitokrom P-450 detoksifikasyon sistemleri ile NADPH kullanılarak zararsız hale getirilir (Hollenberg, 1992). NADPH'nın damar düz kas hücrelerinde iyon kanallarının aktivitesini kontrol ettiği öne sürülmüştür. NADPH'nın azalması özellikle V-tipi potasyum (K⁺) kanallarının açılmasına ve vazodilatasyona neden olur (Gupte ve ark., 2002). Sorbitol yolunun önemli enzimlerinden aldoz redüktaz da NADPH kullanır (Grunewald, 1993). DNA sentezi için ribonükleotidlerin (ribonükleotid redüktaz ile) deoksiribonükleotidlere dönüşmesini sağlar. NADPH suda çözünmeyen birçok bileşik için de gereklidir. Diğer ürün riboz-5-fosfat; ATP, FAD, NAD⁺, NADP⁺, DNA, RNA, CoA yapısına girer (Keha ve Küfrevioğlu, 2004).

2. KAYNAK BİLDİRİŞİ

Eritrositlerde glukoz 6-fosfat dehidrogenazın kalıtsal eksikliği ya da değişik varyantlarının bulunması, ileri seviyelerde anemiye yol açmaktadır. Tiamin eksikliğinde ortaya çıkan ve bellek kaybı ile kısmi paralizin birlikte görüldüğü Wernicke-Karsokoff sendromu, pentoz fosfat yolundaki transketolaz aktivitesindeki değişimlere de bağlanmaktadır (Kutay, 2002). Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz ve 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enzimlerinin eksikliğinde anemi görülür (Ajmar, 1979).

Mikroorganizma, bitki ve hayvan hücrelerinde bulunan 6PGD pentoz fosfat yolunda üretilen NADPH'ların %50'sini sentezlemektedir (Dyson ve ark., 1973).

6PGD ilk kez Villet ve Dalziel tarafından bir memeli dokusundan izole edilmiştir. Sonraki yıllarda DEAE-Sephadex, CM-Sephadex, DEAE-Cellulose ve DEAE-Toopearl Kolonlarını kullanarak iyon değişim materyallerinden saflaştırılmıştır (Silverberg ve Dalziel, 1973; Weisz ve ark., 1985; Sawa ve ark., 1985).

1961 yılında *Candida utilis* ile yapılan çalışmada enzimin kinetik mekanizmasının random olduğu gösterilmiştir (Berdis ve Cook, 1993).

6PGD (6-Fosfoglukonat dehidrogenaz) ve GR (Glutasyon redüktaz) metabolizmada önemli antioksidan ajanlar olduğundan dolayı, bu enzimlerin inhibisyonu antioksidan savunma sisteminde önemlidir. Bu yüzden dorzolamid gibi sulfonamidler tedavide kullanılacaksa, 6PGD ve GR enzimleri dikkate alınmalıdır (Bülbül ve Erat, 2008).

Erat ve Şakiroğlu 2007 yılında yaptıkları bir çalışmada, tavuk karaciğeri 6PGD enzimi üzerine ofloxacin, cefepime, cefazolin ve ampicillin antibiyotiklerinin inhibitör etkileri araştırılmışlardır. Birkaç saflaştırma adımıyla 535 kat saflaştırılan bu enzime yukarıda isimleri verilen antibiyotiklerden; ofloxacin ve cefepime inhibitör etkisi göstermiş iken, diğer iki antibiyotik ne

inhibitör nede aktivator etkisi göstermiştir. (Erat ve Şakiroğlu, 2007).

Nikotin ve vitamin E'nin bazı fare dokularındaki 6-Fosfoglukonat dehidrogenaz (6PGD) enziminin aktivitesi üzerine in vivo ve in vitro etkisi araştırılmıştır. In vivo çalışmalarının sonuçlarında nikotinin, kas, akciğer ve testislerde 6PGD enzimini aktifleştirdiği fakat kalp ve karaciğer 6PGD aktivitesi üzerine hiçbir etkisinin olmadığı bulunmuştur. Ayrıca nikotin+vitamin E'nin kas, testis ve karaciğer 6PGD enzimini aktifleştirdiği, ancak bu kombinasyonun kalp ve akciğer üzerine in vivo etki göstermemiştir. Ayrıca vitamin E'nin 6PGD enziminin aktivitesini arttırdığı bulunmuştur (Çiftçi ve ark., 2008).

2005 yılında tavuk karaciğeri 6-fosfat dehidrogenaz enziminin saflaştırılması sonucunda enzimin spesifik aktivitesi 61 U/mgprotein, saflaştırma katsayısı 344 ve verim % 5.57 olarak hesaplanmıştır (Erat, 2005).

Karbonik anhidraz inhibitörleri olan bazı değişik sülfonamid türevlerinin glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, 6PGD ve glutasyon redüktaz üzerinde in vitro etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla insan eritrositlerinden bu üç enzim saflaştırılmış, araştırma sonucunda bu bileşiklerin 6PGD üzerine inhibisyon etkisi gösterdikleri bulunmuştur (Bülbül ve Erat, 2008).

Fare eritrositlerindeki 6PGD'nin saflaştırılması, karakteriasyonu ve kinetik özellikleri üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda verim % 78.4 ve enzimin spesifik aktivitesi 5.15 EU/mgprotein olarak hesaplanmıştır. Tabii enzimin molekül ağırlığı jel filtrasyon kolon kromatografisi yardımıyla 111.000 Da olarak bulunmuştur. Enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH değeri 7 ve maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık ise 45 santigrat derece olarak bulunmuştur (Beydemir ve ark., 2004).

Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz ve 6PGD, gelişmiş bitkilerin yeşil yapraklarındaki kloroplast ve stozolde bulunur. 6PGD enzimi *Petroselinum hortense* yapraklarından saflaştırılmış ve enzimin kinetik davranış analizleri ile bazı özellikleri araştırılmıştır. Enzim, %49'luk bir verimle elde edilmiş ve enzimin spesifik aktivitesi 18.3EU/mg protein olarak bulunmuştur (Demir ve ark., 2003).

6PGD defektif varyantları, ilk olarak 1969 yılında siyah bir Amerikan ailesinden tanımlanmış ancak fertlerde hemolitik anemi saptanmıştır (Brewer ve ark., 1964). Enzimin eksikliği sonucunda oluşan kronik hemolitik anemi vakaları ise daha sonraki yıllarda rapor edilmiştir (Caprarri, 2001; Corrons ve ark., 1996).

6-Fosfoglukonat dehidrogenaz (EC1.1.1.44; 6PGD) NADP⁺ varlığında 6-fosfoglukonat bileşimini D-ribuloz 5-fosfata dönüştüren pentoz fosfat yolunun üçüncü enzimidir. Reaksiyon sonucu birçok biyomolekülün yapısına giren riboz 5-fosfatın izomeri D-ribuloz 5-fosfat ve birçok biyokimyasal reaksiyonda indirgeyici güç olarak kullanılan NADPH oluşur. Enzimin önemi NADP⁺'yi NADPH'ye indirgesinden kaynaklanmaktadır. Birçok mikroorganizmada glukoz ve glukonat katabolik enzimi olarak görev alır (Yoshida ve ark., 1997). Enzim glukoz 6-fosfatın, glikolitik ve pentoz fosfat yolu arasındaki dengesinin korunmasında önemlidir (Del Mar ve ark., 1986).

Enzimin eksikliğinde hemolitik anemi, retikulosit sayısında eksiklik, sarılık ve episodik hemolitik olaylar tespit edilmiştir. Enzimin eksikliği ile beraber piruvat kinaz aktivitesi artmakta ve GSH seviyesinde ise azalma gözlenmektedir. Bu durum da eritrositlerin ömürlerini kısaltmaktadır. 6PGD'nin doğal substrat'ı 6-fosfoglukonat'tır. Enzimin NADP⁺'ye olan ilgisi genelde substrat'ı olan 6-fosfoglukonat'tan daha fazladır (Topham ve Dalziel 1986). Ayrıca NADPH spesifik 6PGD'nin insan eritrositi, kuzu karaciğeri, *Trypanosoma Brucei* ve *Candida utilis*' de substrat olarak 2-deoksi-6-fosfoglukonat ve 3-keto-6-fosfoglukonat'ı kullanabildiği çalışmalarda rapor edilmiştir (Hanau ve ark., 1992; Rippa ve ark., 1998).

Enzimin koenzim spesifikliği; spesifik olarak NAD⁺ kullananlar, spesifik olarak NADP⁺ kullananlar, spesifik olmayanlar olmak üzere üç farklı şekilde belirlenmiştir (Ohara ve ark., 1996). Koenzim kullanımı türe göre değişmekle beraber memeliler ve mayalar genelde NADP⁺ spesifik, bakterilerde hem NADP⁺ hem de NAD⁺ spesifikliği belirlenmiştir.

Günümüzde en az 20 farklı kaynaktan elde edilen enzimin amino asit dizisi belirlenmiştir. Enzimlerin ortalama 400 civarında amino asitten oluştuğu

tespit edilmiştir (Hutchison ve ark., 1984). Örneğin; insan 6PGD enzimi 484 amino asitten oluşur. Enzimlerin amino asit dizilimi kaynağına göre değişmektedir.

Değişik kaynaklarda yapılan çalışmalarda 6PGD geninin yapısı aydınlatılmış, nükleotid sırası belirlenmiş ve genler klonlanmıştır. Örneğin insanda 1. domateste 4. 5. ve 12. kromozomlarda bulunan 3 geni vardır. Yapılan X-ray kristalografik incelemelerde aktif bölgede proton alıcısı ve vericisi olarak rol oynayan bir çok amino asit rezidüsüne rastlanmıştır. Koyun karaciğerinde; enzimin aktif bölgesi, tirozin 196, glutamat 195 ve glutamat 222 substrat bağlanma yeri olarak düşünülen bir cepte bulunmaktadır. Enzimin substrata bağlanması aktif bölgesinde yer alan histidin iyonizasyonu, koenzimin bağlanması ise tirozin iyonizasyonu ile enzim kaynağı sağlanır. Aktivite için histidin gerekliliği laboratuvar çalışmaları ile ispatlanmıştır (Topham ve Dalziel, 1986).

Yapılan X-ray çalışmalarında enzimin eşkenar dörtgen şeklinde kristalize olduğu gösterilmiştir. *Lactococcus lactis*' de aynı yapı gözlemlenirken; *trypanosoma brucei*'de kristalin üçgen şeklinde olduğu belirlenmiştir. Sığır enzimi kristalize elde edilmiş ve üç boyutlu yapısı incelenmiştir. Enzimin homodimer olduğu ve her alt birimin α - β - α - β bölgelerinden oluştuğu ve bu bölgelerin NADP⁺ bağladıkları gösterilmiştir (Adams ve ark., 1991).

6-fosfoglukanat dehidrogenazın molekül kütlesi kaynağına göre 80-152 kDa, alt birimlerinin molekül kütlesi ise 33-55 kDa arasında değişmektedir. Bazı canlılarda homodimer, bazılarında homotetramer bir yapıya sahiptir. İnsanda homodimer bir yapıya sahip enzimin alt biriminin molekül kütlesi 53 kDa olduğu deneysel verilerle gösterilmiştir. Türüne göre değişmekle beraber enzimin optimum pH aralığı 5.5-9.6 aralığında değişmektedir. Enzim aktivitesinin pH 7.6-9.2 aralığında arttığı, 9.3'ten sonra ise aktivitesini kaybettiği bildirilmiştir (Barenghi ve ark., 1987).

Enzimin doğal halinin optimum pH'sı; insan beyinde 8.6 (Weisz ve ark., 1985), sıçan eritrositlerinde 7.0 (Beydemir, 2003) ve sıçan böbrek korteksinde 8.0 olarak belirlenmiştir (Corpas ve ark.,1995).

Enzimin reaksiyon mekanizmasının ardışık/düzensiz olduğu tespit edilmiştir (Dallocchio ve ark., 1985). Bu mekanizmada enzime bağlanan substratlardan biri diğerinin bağlanmasını kolaylaştırır. Substratların bağlandığı üçlü ara kompleksten, ürünlerin bağlandığı üçlü kompleks oluşur ve ürünler sırayla ayrılırlar (Kutay, 2002).

Enzimin saflaştırılmasında karşılaşılan problemler enzimin kararsızlığı ve stabilizasyonudur. Aktivite kaybının en aza indirilmesi için genelde çalışmalar +4 °C'de yapılmaktadır. Tampona 2-merkaptoetanol, EDTA, NADP⁺, fenilmetilsulfonilflorür ilavesiyle stabilizasyon sağlanmıştır (Toews ve ark., 1976; Carne, 1982; Pearse ve Rosemeyer, 1974). Bakteriyel kaynaklı 6-PGD enzimler, hayvansal kaynaklı enzimlerden daha kararlıdır (Menezes ve ark., 1989).

6PGD ile yapılan kinetik çalışmalar sonucunda enzim aktivitesinin bazı ara bileşikler, nukleositler, metal iyonları, NADPH, bazı ilaç ve kimyasal maddeler, pH, iki değerlikli iyonlar tarafından etkilendiği tespit edilmiştir (Dyson ve ark., 1973; Gaitonde ve Murray, 1991; Hong ve Copeland, 1992; Pearse ve Rosemeyer, 1974; Rippa ve ark., 1998).

Van Gölü, pek çok koyu bulunan ve yüz ölçümü 3.713 km² olan volkanik bir göldür. Suları tuzlu ve sodalıdır. Göl suyunun tuzluluk oranı % 0.19 olup pH değeri 9.8 dir. Gölün su seviyesi mevsimlere bağlı olarak değişebilir. Ortalama derinliği 171 m'dir. Van Gölü'nün dışarıya akıntısı olmadığından sular ancak buharlaşma ile kaybolmakta ve buharlaşmanın sonucunda gölde tuz birikmektedir. Gölü besleyen dereler volkanik arazilerden geçtikleri için fazla miktarda sodyum karbonat getirirler. Bundan dolayı göle sodalı göl denir. Yaz aylarında göl kenarında biriken soda birikintileri toplanıp satılır. Gölün tuzlu– sodalı suları biyolojik çeşitliliği sınırlamaktadır. Gölde tek bir balık türü olarak inci kefali yaşamaktadır. İnci kefali gölde yaşamasına rağmen üremek için yaz aylarında akarsulara göç ederler. İnci kefali planktonlarla beslenir. Balık aynı zamanda bitkisel kökenli Diatome ve diğer alglerle de beslenir (Akyurt ve Sarı, 1991).

3. KULLANILAN MATERYALLER

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmalarımızda kullanılan N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin (TEMED), 6-fosfoglukonat (mono Na tuzu), triklor asetik asit (TCA), glisin, potasyum asetat, N,N'-metilen bisakrilamid, brom timol mavisi, sodyum dodesil sülfat (SDS), amonyum persülfat, AppliChem GmbH'den; Serum albumin, etilendiamintetraasetikasit (EDTA), trihidroksimetilaminometan (Tris), potasyum fosfat, potasyum klorür, izopropanol, β -merkпто etanol, magnezyum klorür, Sigma Chemical Comp.'den; sodyum bikarbonat, sodyum hidroksit, amonyum sülfat, sodyum klorür, sodyum asetat, hidroklorik asit, fosforik asit, sodyum azotür, gliserin, potasyum dihidrojenfosfat, etanol, metanol, asetik asit, Coomassie brilliant blue G-250, E. Merck AG'den; β -nikotinamidadenindinükleotidfosfat (Na tuzu), E. Fluka Chemical Corp.'dan; ve 2' 5' ADP-Sepharose 4B Amersham biosciences'den alındı.

3.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Klinik santrifüj: Hettich EBA 3 S

Klinik santrifüj: Centurion 4000 r

Spektrofotometre: Shimadzu UV Spectrophotometer UV-1800

pH metre: Inolab WTW series pH 720

Elektroforez tankı: BIO RAD (dikey)

Güç kaynağı: Thermo scientific

Peristaltik pompa: Eylea Micro Tube Pump MP-3

Karıştırıcı (Vorteks) : Mixer VX 20

Hassas terazi: Gec Avery

Kromatografi kolonu: Sigma 1.3×60

Otomatik pipetler: Eppendorf, Volac R 880/A,880/D, 880/E

İnkübatör: G24 Enviromental İncubatur Shaker

Homojenizatör: Jencons (scientific) Ltd. England

Parçalayıcı mikser: Warning Commercial Laboratory Blender. Country of origin U.S.A.

Sabit sıcaklık sirkülasyon banyosu: Julabo Labortechnik GMBH D-7633

Sabit sıcaklık sirkülasyon banyosu: Grand Technical. Specification LTD 6G-20 to 100°C

Soğutmalı santrifüj: Hermle Z 370 K Germany

3.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Çözelti hazırlamak amacıyla kullanılan su, saf ve de iyonize sudur.

3.3.1. Eritrositlerin yıkanması için kullanılan çözelti

0.16 M KCl: 11.92 g KCl (0.16 mol) alınarak su ile 1 L'ye tamamlandı.

3.3.2. Aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler

1. 1 M Tris-HCl/ 5mM EDTA (pH= 8.0): 0.6057 g (5 mmol) Tris ve 0.0292 g (0.1 mmol) EDTA alınarak 90 ml destile suda çözüldü. HCl çözeltisi ile pH 8.0'a ayarlandı. Daha sonra toplam hacim su ile 50 ml'ye tamamlandı.

2. 0.1 M MgCl₂: 0.475 g (5 mmol) alınıp bir miktar saf suda çözüldükten sonra hacim 50 ml'ye tamamlandı.

3. 6 mM 6PGA: 0.091 g (0.3 mmol) 6PGA alınıp bir miktar suda çözüldü. Hacmi su ile 50 ml'ye tamamlandı.

4. 2mM NADP⁺ Çözeltisi: 0.0765 g NADP⁺ (0.1 mmol) alınarak bir miktar suda çözüldü. Hacim suyla 50 ml'ye tamamlandı.

3.3.3. Afinite kromatografisi kolonunda kullanılan çözeltiler

1. 0.1 M K-asetat/0.1 M K-fosfat, pH= 6 (Kolonunun paketlenmesi ve dengelenmesi için kullanılan tampon): 9.8 g K-asetat (0.1 mol) ve 13.6 g K-fosfat (0.1 mol) karışımı 800 ml suda çözüldü. pH'sı 6'ya ayarlandıktan sonra toplam hacim 1L'ye tamamlandı.

2. 0.1 M K-asetat/0.1 M K-fosfat, pH= 7.85 (Afinite kromatografisi kolonunun yıkanması için kullanılan tampon): 9.8 g K-asetat (0.1 mol) ve 13.6 g K-fosfat (0.1 mol) karışımı 800 ml destile suda çözüldü. pH= 7.85'e ayarlandıktan sonra toplam hacim

1L'ye tamamlandı.

3. 0.1 M K-fosfat/0.1 M KCl, pH= 7.85 (Numune tatbik ettikten sonra afinite kolonunun yıkanması için kullanılan tampon): 13.6 K-fosfat (0.1 mol) ve 7.45 g (0.1 mol) KCl karışımının hacmi su ile 800 ml'ye tamamlandı. pH'sı 7.85'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 1L'ye tamamlandı.

4. 80 mM K-fosfat + 10 mM EDTA (pH= 7.85) + 80 mM KCl + 5 mM NADP⁺ (Afinite jeline tutunmuş olan 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enziminin elüsyonu için kullanılan tampon): 0.544 g K-fosfat, 0.121g EDTA, 0.298 KCl ve 0.1913 g NADP⁺ karışımı 40 ml suda çözüldü. pH= 7.8'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 50 ml'ye tamamlandı.

5. 0.1 M Na-asetat/0.5 M NaCl (pH= 4.5) (Afinite kromatografisi kolonunun rejenerasyonu için kullanılan tampon): 4.1 g Na-asetat(50 mmol) ve 14.61 g NaCl (0.25 mol) alınıp suda çözüldü, pH= 4.5'e ayarlandı ve toplam hacim suyla 500 ml'ye tamamlandı.

6. 0.1 M Tris + 0.5 M NaCl (pH= 8.5) (Afinite kromatografisi kolonunun rejenerasyonu için) 6.05 g Tris ve 14.61 g NaCl bir miktar suda çözüldükten sonra pH= 8.5'e ayarlandı. Daha sonra hacim 500 ml'ye tamamlandı.

7. % 0.02'lik NaN₃ çözeltisi (Kromatografi kolon meteryallerini bakterilerden korumak için): 10 mg NaN₃ alınarak 50 ml suda çözüldü.

3.3.4. Elektroferez için kullanılan çözeltiler

1. 1M Tris-HCl (pH= 8.8): 12,11 g Tris (0.1 mol) tartılarak 80 ml suda çözüldü, pH ayarı yapıldıktan sonra 100 ml'ye tamamlandı.
2. 1 M Tris-HCl (pH= 6.8): 12,11 g Tris (0.1 mol) tartılarak 80 ml suda çözüldü, pH ayarı yapıldıktan sonra 100 ml'ye tamamlandı.
3. % 30 Akrilamid % 0.8 Bisakrilamid çözeltisi: 15 g akrilamid, 0.4 g bisakrilamid alınarak hacmi su ile 100 ml'ye tamamlandı.
4. % 10'luk amonyum persülfat çözeltisi: 1 g amonyum persülfat tartılarak su ile 10 ml'ye tamamlandı.
5. % 10'luk SDS: 1 g SDS'nin hacmi su ile 10 ml'ye tamamlandı.
6. Yürütme tamponu: 1.51 g Tris (12.5 mmol) ve 7.51 g glisin (0.1 mol) tartılarak 450 ml suda çözüldü % 10'luk SDS'den 5 ml ilave edildi, pH= 8.3'e ayarlandı ve toplam hacim 500 ml'ye tamamlandı.
7. Numune tamponu: 1 M Tris-HCl (pH= 8)'den 0.5 ml, % 10'luk SDS'den 1 ml, % 100'lük gliserinden 1 ml ve % 0.1'lik bromtimol mavisinden 1 ml alınarak suyla 10 ml'ye tamamlandı. Bu tampona kullanılmadan önce 950 µl numune tamponundan 50 µl olacak şekilde β-merkaptoetanol ilave edildi.
8. Sabitleştirme çözeltisi (Jelde yürütülen proteinlerin sabitleştirilmesi için kullanılan çözelti): % 50 izopropanol, % 10 TCA ve % 40 su olacak şekilde karıştırılarak hazırlandı.
9. Jel boyama çözeltisi: 50 ml metanol, 10 ml asetik asit ve 40 ml su içerisinde 0.1 g Coomassie brilliant blue R-250 reaktifinin çözülmesiyle hazırlandı.
10. Jel yıkama çözeltisi: 50 ml metanol, 10 ml asetik asit ve 40 ml su karıştırılarak elde edildi
11. % 0.04'lük brom timol mavisi çözeltisi: 0.1 indikatör 0.01 M 16 ml NaOH içerisinde çözüldü ve toplam hacim saf suyla 250 ml'ye tamamlandı.

4. KULLANILAN YÖNTEMLER

4.1. Kalitatif Protein Tayini

Afinite kolonundan elde edilen fraksiyonların her birinin kalitativ protein tayinleri yapıldı. Kalitatif protein tayini, 280 nm'de proteinlerin yapısında bulunan triptofan ve tirozinin maksimum absorbands göstermesi esasına dayanmaktadır (Segel, 1968). Fraksiyonlar kuvars küvetlere alınarak absorbandsları köre karşı okundu. Köre olarak elüsyon tamponu kullanıldı.

4.2. Bradford Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini

Afinite kolonundan elde edilen fraksiyonların her birinin kantitatif protein tayinleri yapıldı. Bu yöntem o-fosforik asitli ortamda proteinlerin Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi ile kompleks oluşturması ve bu kompleksin 595 nm'de maksimum absorbands göstermesi esasına dayanır. Proteine boyanın bağlanması çok hızlı gelişir (ortalama 2 dk.). Protein-boya kompleksi çözeltilerde uzun süre kalır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır (Bradford, 1976).

Ölçüm şu şekilde gerçekleştirildi; 1 ml'sinde 1mg protein ihtiva eden standart sığır albumin çözeltilerinde tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µl alındı. Saf su ile tüm tüplerin hacmi 0.1 ml'ye tamamlandı. 5 ml Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi tüplere ilave edildi ve vortex mikser ile karıştırıldı. 10 dk inkubasyondan sonra 595 nm'de 3 ml'lik küvetlerde köre karşı absorbands değerleri okundu. Köre olarak 0.1 ml aynı tampon ve 5 ml Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifinden oluşan karışım kullanıldı. Okunan absorbands değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri standart grafik halinde verildi.

Hazırlanan enzim çözeltilerinden (her bir fraksiyondan) ayrı ayrı 0.1ml alındı. 5 ml Coomassie reaktifi ilave edildi ve vortex ile karıştırılarak 10 dk.

inkübasyona bırakıldı. Yine kör olarak 0.1 ml aynı tampon ve 5 ml Coomassie reaktifinden oluşan karışım kullanılarak 595 nm’de absorbans değerleri okundu. Her bir fraksiyon için bulunan absorbans değerleri standart grafikten $\mu\text{g}.$ protein değerine çevrildi.

4.3. Balık Karaciğeri Eldesi

Bu amaçla Van Gölü’nden avlanan taze balıklar alındı. Taze balıklar uygun bir şekilde kesilerek karaciğerleri dikkatli bir çıkarıldı. Yaklaşık 8-10 g karaciğer elde edilinceye kadar balık işlendi.

4.3.1. Karaciğer numunelerinin alınması ve homojenat eldesi

Önce balıklardan alınan karaciğerden bir bıçak bisturi yardımıyla küçük kübik parçalara bölündü. Bu şekilde yeterli miktarda karaciğer hazırlandı. Karaciğer sulu çözeltisinin hazırlanması için; 100ml’lik hacimde 0.356g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve 8.25g sakkaroz ihtiva eden 0.02 M sodyum fosfat tamponun (pH = 7.4), 8-10 g ciğere ilave edildi. Bu karışım mikser yardımıyla 3 dk parçalanmaya maruz bırakıldı. Bu esnada mikserin etrafına buz konularak ısınması önlendi. Elde edilen homojenat daha ileri bir parçalanma için ultrasonik homojenizatörde 10-15 dk tutuldu. Yine ısınmayı önlemek için kabın etrafına buz konuldu. Bu homojenat daha sonra santrifüj tüplerine alınarak 1500 rpm’de 20 dk santrifüj edildi. Kan hücreleri ve hücresel yıkıntıları ihtiva eden çökelek atıldı. Elde edilen süpernatantlar toplanarak 60 dk boyunca $+4^\circ\text{C}$ ‘de 12000 rpm’de yüksek devirli santrifüjde santrifüj edildi. Üsteki berrak homojenat dikkatli bir şekilde alındı, kalan çökelti atıldı. Enzim aktivite ölçümlerinde bu homojenat kullanıldı.

4.3.2. Afinite kolonunun hazırlanması

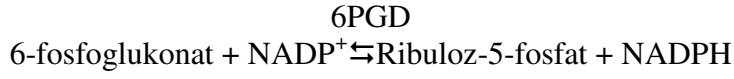
10 ml'lik yatak hacmi için 2 g kuru 2',5'-ADP Sepharose 4B jeli tartılarak, 400 ml destile su ile katı maddelerin uzaklaştırılması için birkaç defa yıkandı. Yıkama esnasında jel sisirilmiş oldu. Sisirilmiş jelin havası su trompu kullanılarak vakum ile alındıktan sonra yıkama ve dengeleme tamponu (0,1 mM K-fosfat / 0,1 mM K-asetat, pH= 6) ilave edilerek jel süspanse edildi. Süspanse edilmiş jel, 1x10 cm'lik kapalı sistemden oluşan soğutmalı kolona paketlenildi. Jel çöktükten sonra peristaltik pompanın hızı 5 rpm'de yıkama ve dengeleme tamponu ile yıkama yapıldı. (Ninfali ve ark., 1990).

4.3.3. Karaciğer homojenatının afinite kolonuna tatbiki ve elüsyonların alınması

Hazırlanan afinite jeli $1.3 \text{ cm}^2 \times 10 \text{ cm}$ boyutundaki bir kolona paketlenerek dengeleme tamponu ile 4 gün boyunca dengelendi. Yukarıda hazırlanan homojenat kolona tatbik edildi. Tüm homojenatın kolondan geçmesinden sonra yarım saat süreyle beklendi. Bu sürenin sonunda dengeleme tamponu (pH:6) kolona verildi. Giriş ve çıkış absorbans farkı spektrofotometrede, 280 nm'de izlendi fark 0,1'in altına düşünceye kadar bu işleme devam edildi. Daha sonra kolona 25 ml yıkama tamponu (pH: 7.85), son olarak ta 25 ml diğer yıkama tamponu (pH:7.85) gönderildi. İşlemlerden sonra 280 nm'deki absorbans farkı 0.05'e yaklaştı. Böylece enzimin büyük bir kısmı jele tutunmuş ve diğer safsızlıklar uzaklaştırılmış oldu. Bütün bu işlemler +4 °C 'de ve akış hızı 50 ml/st olacak şekilde gerçekleştirildi (Ninfali ve ark., 1990; Morelle ve ark., 1978). Elüsyon tamponu (pH: 7.85) kolona akış hızı 20 ml/h olacak şekilde gönderildi, bu esnada 4'er ml'lik olmak üzere fraksiyonlar toplandı. Bütün fraksiyonların tek tek 280 nm'de kalitatif protein tayinleri, 6-Fosfo Glukonat Dehidrojenaz aktiviteleri ve coomassie blue yöntemiyle kantitatif protein miktarları tayin edildi.

Aktivite gösteren fraksiyonlar birleştirilerek, saf enzim ve homojenatta Coomassine Blue yöntemi ile toplam protein miktarı ve ayrıca her ikisi için 6PGD aktivitesi belirlendi. Daha sonra ayrı ayrı spesifik aktiviteleri hesaplanarak saflaştırma oranı bulundu.

4.3.4. Enzim aktivitesinin ölçümü



Reaksiyonda da görüldüğü gibi 6-fosfoglukonat dehidrogenaz, 6-fosfoglukonat varlığında; NADP⁺'yi NADPH, 6-fosfoglukonat'ı riboz-5-fosfat'a indirgemektedir. NADPH'ın oluşumu 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enziminin aktivitesine bağlıdır (Beutler 1971). NADPH'ın 340 nm'de absorbans verdiği bilinmektedir. Enzim aktivitesi 340 nm'de NADPH'ın spektrofotometrik olarak artışı ile tespit edildi. Aktivite ölçümleri aşağıdaki tabloya göre yapıldı. 5 dakikada absorbans değerleri kaydedildi.

Enzim ünitesi hesaplamalarında aşağıdaki formül kullanıldı.

$$A = \frac{\Delta OD}{6,22} \times \frac{V_c}{V_e} \times f$$

formülü kullanılarak ml başına enzim ünitesi hesaplandı.

A = ml başına enzim ünitesi (EU)

ΔOD = 340 nm'de optik dansitenin dk. başına değişimi

V_c = Küvet hacmi

V_e = Küvetteki saf enzim çözeltisi hacmi

f = Seyreltme faktörü

6.22 = 340 nm'de ve 37⁰ C de 1 mM NADP⁺ indirgenmesi sonucu okunan OD, sabit değerdir.

Bir enzim ünitesi (EU) 1µmol NADP⁺'ın indirgenmesi için gerekli olan enzim miktarını ifade eder. Spesifik aktivite proteinin 1 mg'ı başına düşen ünite olarak tarif edilir

Çizelge 4.1. 6PGD enziminin aktivite ölçümdeki küvet içeriği

<u>Kontrol olarak kullanılan küvet</u>	<u>Numune olarak kullanılan küvet</u>
1 M Tris-HCl, 5 mM EDTA = 100 µl	1 M Tris-HCl, 5 mM EDTA = 100 µl
0.1 M MgCl ₂ = 100 µl	0.1 M MgCl ₂ = 100 µl
2 mM NADP ⁺ = 100 µl	2 mM NADP ⁺ = 100 µl
Homojenat = 50 µl	Homojenat = 50 µl
Saf su = 650 µl	Saf su = 550µl
On dakika inkübasyon	
6-PG –	= 100µl

Hazırlanan çözeltiler 37⁰C de 10 dk boyunca inkübe edildi. Sonra kontrole karşı numunenin her yarım dakikada bir (30 sn) olmak üzere toplam 5 dk süreyle izlenerek absorbans artışları kaydedildi.

4.3.5. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzim saflığının kontrolü

Enzim saflaştırıldıktan sonra %3-8 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) Laemmli metoduna göre yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi (Laemmli 1970). Bunun için elektroforez plakaları önce su ile sonra alkol ile iyice yıkandı. Her iki kenarında aralık oluşturu bir plaka ile düz bir plaka üst üste getirilerek kısıkaçlarla tutturuldu. Sabitleştirilen plakalar, içerisinde sızdırmayı önleyen sünger ihtiva eden jel hazırlama kabinine konuldu. Önce ayırma jeli hazırlandı ve enjektörle plakaların arasına üst kesimde 0.5 cm kalıncaya kadar dolduruldu. Ayırma jelinin donması beklenirken üzerine ince bir n-bütanol tabakası dökülerek jelin pürüzsüz olması sağlandı. İki saat jelin donması beklendi, ayırma jelinin katılaştığından emin olunduktan sonra yağma jeli hazırlandı. Jelin üst kısmındaki boşluğa dolduruldu ve numune kuyucuklarının oluşması için tarak dikkatlice yerleştirildi. Yağma jelinin katılaşması beklenirken ıslatılmış süzgeç kâğıdı sistemin üzerine kapatıldı ve kuruması önlendi. Yağma jeli katılaştıktan sonra tarak dikkatlice çıkartılarak numune kuyuları belirlendi. Önce saf su, sonra da yürütme tamponuyla yıkandı ve jel plakalarla birlikte elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu dolduruldu. Enzim örnekleri yaklaşık 20 µg protein olacak şekilde hazırlandı. Toplam hacim 50 µl olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu katıldı. Üç dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi. Numuneler kuyulara enjekte edildi. Elektroforez tankı kapatılarak alt tarafından (+) anot, üst taraftan ise (-) katot yerleştirildi. Önce 40 voltta 20 dakika yürütüldü ve örnekler ayırma jeline kadar gelip yığıldı. Sonra akım 80 volt'a çıkartılarak numunelerin jelin alt sınırına gelmesine kadar yürütüldü. Numunelerin takip edilmesi, numune tamponuna katılan brom timol mavisi yardımıyla yapıldı. Yürütme işlemi bittikten sonra akım kesilerek plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı ve sabitleştirme çözeltisine konuldu. Sabitleştirme çözeltisinde 20 dakika bekletilen jel, çıkarılarak boyama çözeltisine konuldu ve çalkalayıcı üzerinde 2

saat bekletildi. Jel boyandıktan sonra çıkarılarak yıkama çözeltisine konuldu. Rengi açılıp, protein bantları belirginleşene kadar çalkalayıcı üzerinde yıkanan jel çıkarılarak fotoğrafı çekildi.

Ayırma jeli şöyle hazırlandı: 3.75 ml 1M Tris-HCl (pH= 8.8), 3,3 ml %30 akrilamid-% 0.8 bisakrilamid, 0.15 ml % 10'luk SDS, 0.1 ml % 5'lik TEMED, 0.2 ml % 1.5'lik PER ve 2.35 ml saf su karıştırıldı.

Yığıma jeli şöyle hazırlandı: 0.31 ml 1 M Tris-HCl (pH= 6.8), 0.3325 ml % 30 akrilamid % 0.8 bisakrilamid, 0.025 ml % 10'luk SDS, 0.025 ml % 5'lik TEMED, 0.05 ml % 1.5'lik PER ve 1.84 ml saf su karıştırıldı. PER çözeltisi taze hazırlandı ve karıştırıldığında hemen PER döküldü.

4.4. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Proteinlerin denatürasyonu peptid bağları hidrolize olmadan, protein yapısını çözülüp, disorganize olması sonucu oluşur (Champe ve Harvey, 1997). Denatüre edici faktörler arasında sıcaklık, organik çözücüler, mekanik karıştırma, kuvvetli asit veya bazlar, deterjanlar ve kurşun ile civa gibi ağır metaller yer alır.

Enzim aktivitesine etki eden faktörlerden biri sıcaklık parametresidir. Enzimin aktivitesinin en hızlı olduğu sıcaklığa "optimum sıcaklık" denir. Optimum sıcaklık inkübasyon süresine çok bağlıdır. Inkübasyon süresi ne kadar uzatılırsa optimum sıcaklıkta aynı şekilde düşer.

Optimum sıcaklık tayini için 5-70⁰ C arasında, sabit pH da (8.00) 1 M Tris-HCl tamponu kullanılarak 15 dakika inkübatörde bekletilerek aktivite tayinleri yapıldı.

4.5. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi.

Bir enzimin reaksiyonu en fazla hızlandırdığı pH ya “optimum pH” denir. PH enzim üzerindeki iyonize olabilen grupların yüklerini değiştirerek enzim aktivitesini etkiler. Optimum pH dışında hız gitgide azalır ve belirli bir pH'da enzim tamamen inaktif hale gelir ki bu pH'ya “izoelektrik pH” denir. Bu nedenle enzim çalışmalarında, enzimi optimum veya hiç değilse optimuma en yakın pH'da tutabilmek için tampon çözeltiler kullanılabilir. Bu amaçla Tris-HCl tampon'unun pH'sı 5.5 ve 9.5 aralığında değiştirilerek sabit sıcaklıkta (37⁰C) aktivite tayinleri yapıldı.

4.6. Enzim Aktivitesi Üzerine İyonik Şiddet'in Etkisi.

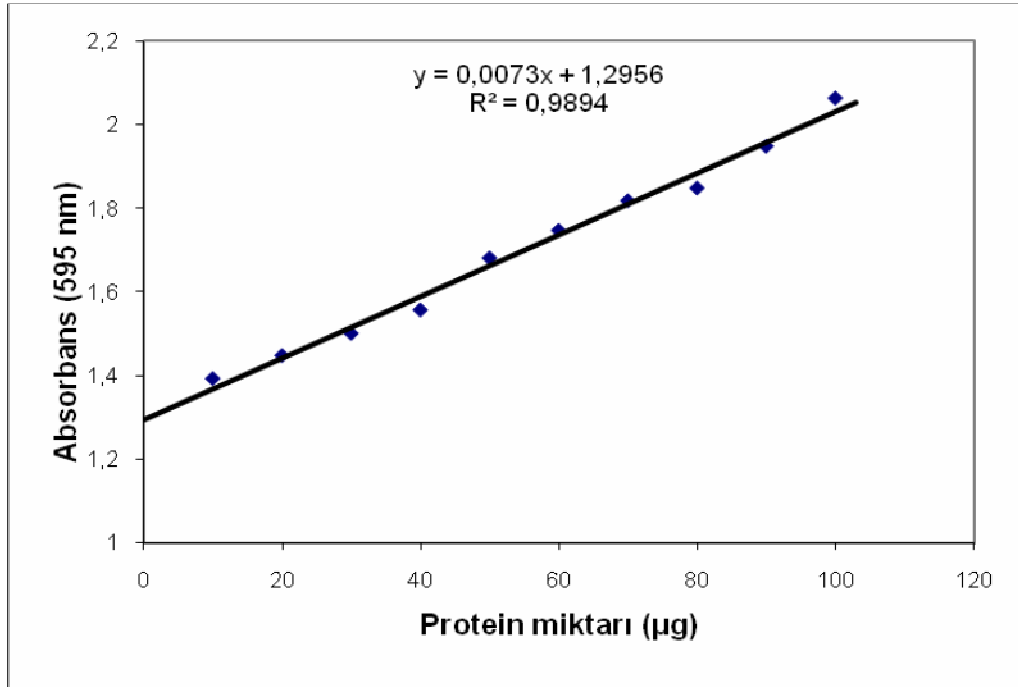
Enzim aktivitesi üzerine iyonik şiddetin etkisini belirlemek için sabit pH'da (8.00) ve sabit sıcaklıkta (37⁰C); 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25 ve 0.3 M konsantrasyonlarında amonyum sulfat reaksiyon ortamına katılarak aktivite tayinleri yapıldı.

5. BULGULAR

5.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Grafik

Kantitatif protein tayininde Bradford yöntemi kullanıldı. Yöntemle tayin yapabilmek için önceden standart bir grafik hazırlandı. Bu grafik bilgisayar ortamında MICROSOFT EXCEL 8.0 hazır programına göre çizildi. Değişik µg protein/ml konsantrasyonlardaki protein çözeltilerinin 595 nm'deki absorbansları arasında çizilen bu standart grafik yardımıyla hem homojenatlar hem de saf enzim çözeltilerindeki protein miktarı belirlendi.

Standart grafik çiziminde kullanılan protein çözeltilerinin konsantrasyonları ve bu konsantrasyonlara karşılık gelen 595 nm'deki absorbans değerleri şekil 5.1'de gösterilmiştir.



Şekil 5.1. Bradford yöntemiyle proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan standart grafik

5.2. Karaciğer 6-Fosfoglukonat Dehidrogenaz Enziminin Afinite Kromatoğrafisi ile Saflaştırma Sonuçları

Yapılan Çalışmada balık karaciğeri 6-Fosfoglukonat Dehidrogenaz Enziminin Afinite kromatoğrafisi aşamasından sonra elde edilen sonuçlar şekil 5.2'de bir araya getirilmiştir. Afinite kolonunun 48 saat dengeleme tamponu ile dengelenmesinden sonra kolon kullanıma hazır hale geldi. Araştırma için seçilen karaciğer hemen işlenmeye başlandı ve yaklaşık 40 ml Homojenat kolona uygulandı. Homojenatın geçmesiyle birlikte yıkama tamponuyla kolon yıkandı. Kolonun yıkanıp yıkanmadığını anlamak için spektrofotometrede 280 nm'de 0.1'den küçük olması durumunda yıkama işlemine son verildi. Sonra elüsyon tamponu geçirilerek fraksiyonlar toplandı. Fraksiyonların her birinin 280 nm'deki absorpsanları ölçülerek kalitatif protein tayinleri ve 6-Fosfoglukonat Dehidrogenaz aktiviteleri belirlendi. Bu işlemin sonuçları şekil 5.2'de gösterilmiştir.

Karaciğer homojenat için ml enzim ünitesi 0.340 ml'deki protein miktarı 6.550 mg protein/ml olarak bulundu.

Karaciğer homojenatı için spesifik aktivite;

$$\frac{\text{EU/ml}}{\text{mg protein/ml}} = \frac{0.340}{6.550} = 0.0519$$

Karaciğerden saflaştırılan enzim çözeltisinin de coomassie blue yöntemi ile kantitatif protein tayini yapıldı. Ayrıca bu çözeltinin 6-Fosfoglukonat Dehidrogenaz aktivitesi tayin edilerek enzim ünitesi EU/ml cinsinden bulundu. 6-Fosfoglukonat Dehidrogenaz'ın enzim ünitesi hem ham Homojenat hem de saflaştırma sonunda elde edilen çözeltide belirlenmiştir. Karaciğerden saflaştırılan enzim çözeltisi için ml'deki enzim ünitesi 0.7427 EU, ml'deki protein miktarı da

0.0321 mg olarak bulundu.

Safılaştırılan karaciğer 6-Fosfoglukonat Dehidrogenaz için spesifik aktivite;

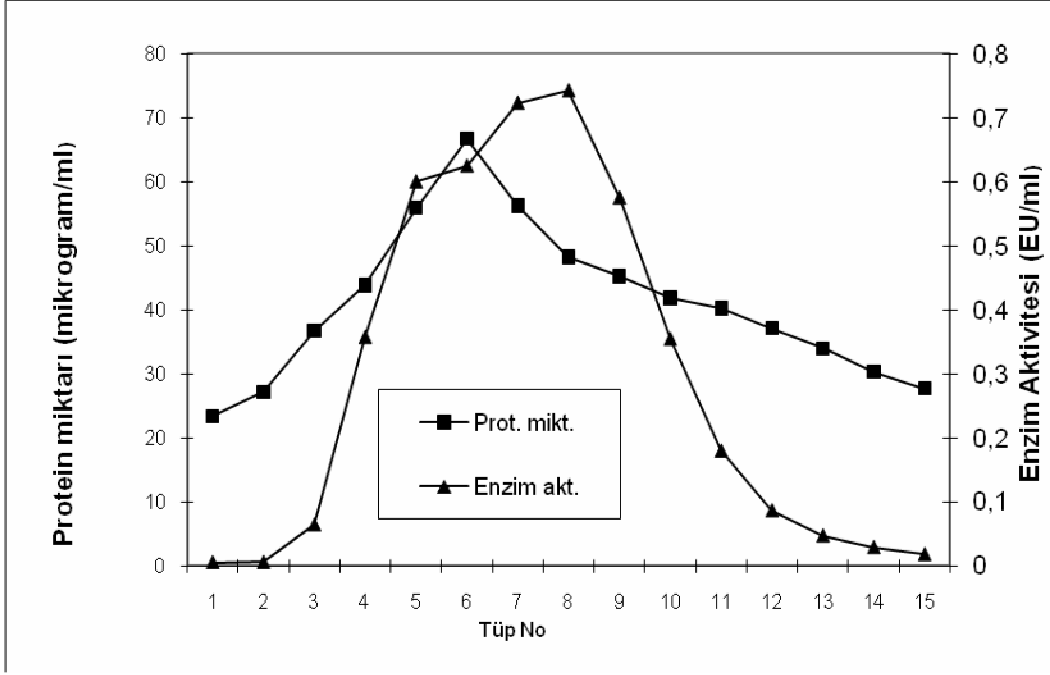
$$\frac{\text{EU/ml}}{\text{mg protein/ml}} = \frac{0.7427}{0.0321} = 23.173$$

Safılaştırma oranını bulmak için safılaştırma sonucundaki spesifik aktivite değeri başlangıçtaki spesifik aktivite değerine bölünür.

$$\text{Safılaştırma Oranı} = \frac{23.173}{0.0519} = 446.49$$

Bu değere göre homojenatın doğrudan Afinite kolonuna uygulanması sonucunda homojenattan enzim 446.49 kat safılaştırılmış oldu.

Enzim aktivitesine karşı 595 nm'de verilen standart eğrinin regresyon denkleminde her bir fraksiyona karşı x eksenine belirmen $\mu\text{g/ml}$ protein miktarları bulundu. Aktivite ve absorbans profili grafiği diğer çalışmalarla uyum içindedir. Gerçektende absorbansın en yüksek olduğu fraksiyon numarası yüksek aktivite gösteren fraksiyon ile tutarlılık göstermektedir.



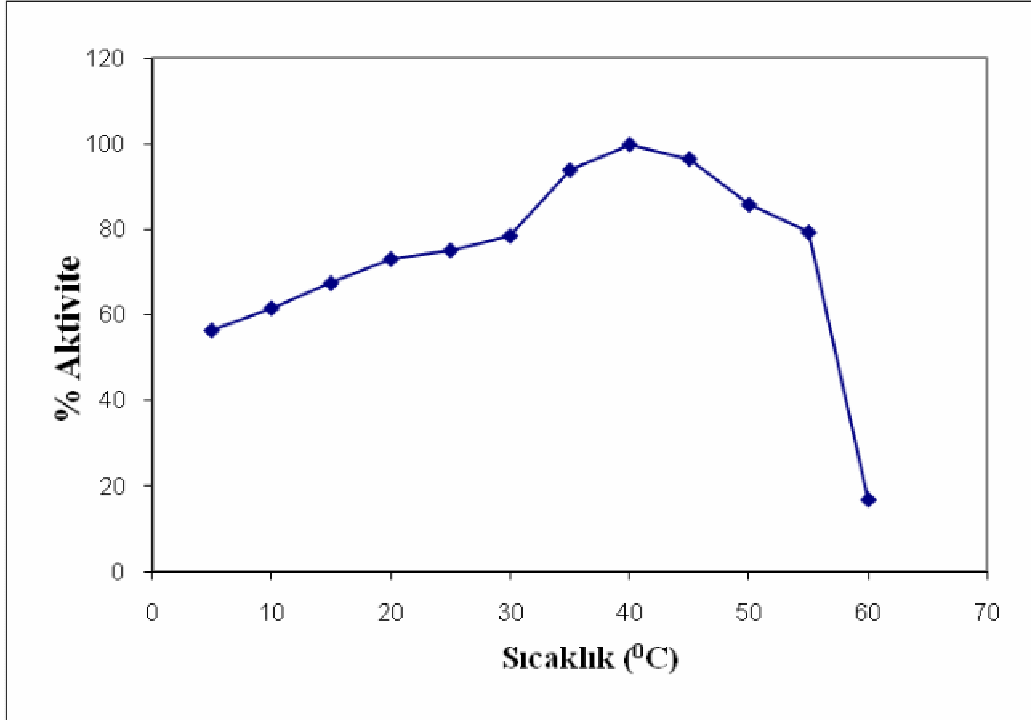
Şekil 5.2. Afinite kolonundan alınan fraksiyonların Kalitatif protein tayinleri ve Aktivite değerleri.

5.3. Karaciğerden Saflaştırılan Enzimin Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi Sonuçları

Sıcaklık, enzimlerin katalizlediği tepkimelerin hızını etkilemektedir. Enzimin katalizlediği tepkimenin hızı, genellikle sıcaklığın optimum noktaya kadar yükselmesiyle birlikte artmaktadır. Başlangıçta sıcaklığın artmasıyla reaksiyon ortamında kinetik enerji artar buna paralel olarak hızda artar. Belli bir sıcaklıkta ise enzimin sekonder ve tersiyer yapılarının bozulmasıyla aktivitede azalmalar meydana gelir. Değişik sıcaklıklarda gerçekleştirilen aktivite tayin çalışmaları çizelge 5.1'de verilmiştir. Buna göre enzimin aktivitesinin en yüksek olduğu sıcaklık 40 °C olarak bulunmuştur.

Çizelge 5.1. Balık Karaciğeri 6-Fosfoglukonat Dehidrogenaz'ın sıcaklık, aktivite ve % aktivite değerleri

(°C)	5	10	35	40	45	50	55	60
EU	0.698	0.762	1.161	1.235	1.193	1.061	0.981	0.209
%Akt.	56.52	61.70	94.00	100	96.60	85.91	79.43	16.91



Şekil 5.3. Balık Karaciğeri 6-Fosfoglukonat Dehidrogenaz'ın sıcaklık-% aktivite grafiği

5.4. Karaciğerden Saflaştırılan Enzimin Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi Sonuçları

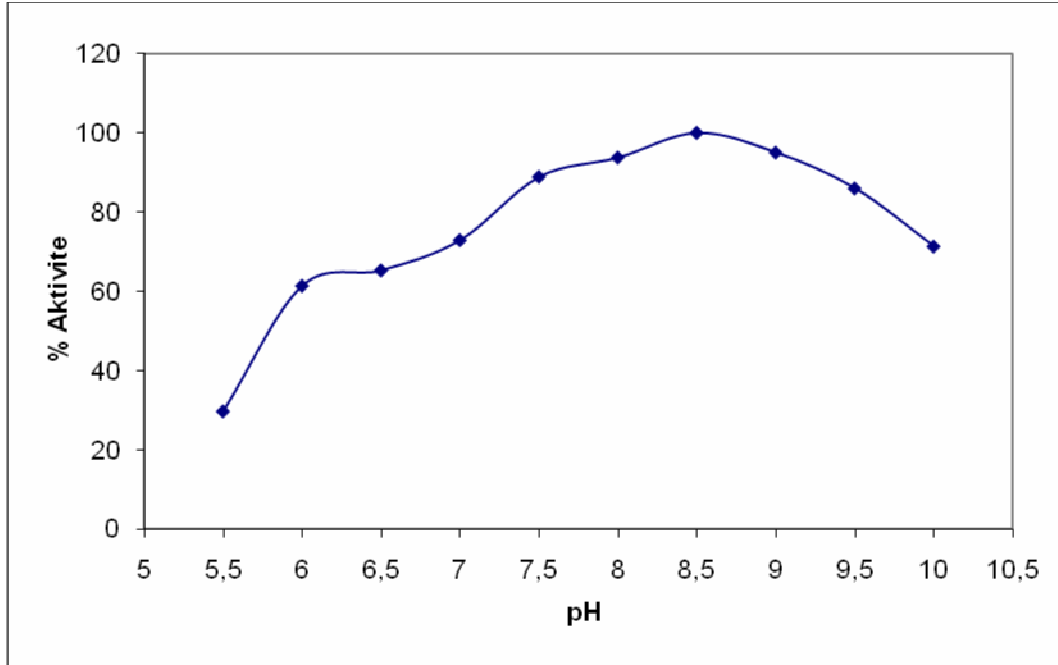
pH değişiklikleri enzimlerin katalizlediği tepkimelerin hızlarını etkilemektedir. pH daki bir değişiklik substratın iyonizasyon durumunda, enzim bağlanma bölgesinde ve katalitik aktivitesinde değişikliklere neden olmaktadır. Enzimler pH değiştiği zaman biçimsel değişikliklere de uğrarlar. Negatif yüklü enzim ve pozitif yüklü substrat örnek olarak verilirse; düşük pH da enzim

protonlanacak ve kendi negatif yükünü kaybedecektir, yüksek pH da ise substrat iyonize olacak ve kendi pozitif yükünü kaybedecektir. Enzimin katalitik grubuna yakın olan ve bağlamada rol alan amino asit rezidüleri üzerindeki bu yük değişimi enzim aktivitesini mutlaka değiştirecektir.

Karaciğerden saflaştırılan enzimin pH değişimine karşı gösterdiği davranışlardan elde edilen sonuçlar şekil 5.4’de görüldüğü gibi grafik haline getirilmiştir. Enzim aktivitesi farklı pH değerlerinde ölçüldüğü zaman optimum aktivite genel olarak pH 8 ile 9 değerleri arasında bulunmuştur.

Çizelge 5.2. Balık Karaciğeri 6-Fosfoglukonat Dehidrogenaz’ın pH, aktivite ve % aktivite değerleri

pH	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	9.5
EU	0.212	0.442	0.470	0.525	0.640	0.675	0.720	0.684	0.619
%Akt.	29.72	61.19	65.28	72.92	88.89	93.75	100	95.00	85.97



Şekil 5.4. Balık Karaciğeri 6-Fosfoglukonat Dehidrogenaz’ın pH-% aktivite grafiği

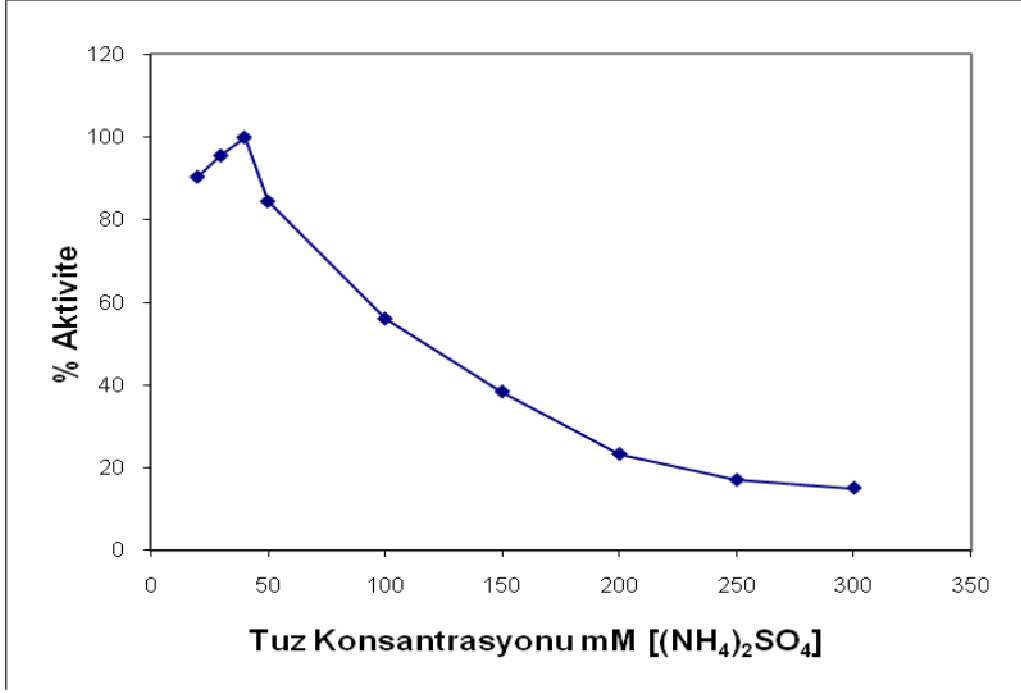
5.5. Karaciğerden Safılaştırılan Enzim Aktivitesi Üzerine İyonik Şiddet'in Etkisi Sonuçları

Her bir protein farklı iyonik şiddetli ortamda çökelme gösterdiğinden bu yolla proteinlerin birbirinden ayrılması mümkündür. Proteinler salting-out sırasında konformasyonlarını korurlar ve uygun bir ortamda tekrar çözelti fazına alınabilirler. İşte enzimler en uygun tuz konsantrasyonunda maksimum aktivite gösterirler.

Enzimin iyonik şiddete karşı davranışlar şekil 5.5'de gösterilmiştir. Buna göre en yüksek aktivite 0.04 Molar $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ konsantrasyonunda göstermektedir.

Çizelge 5.3. Balık Karaciğeri 6-Fosfoglukonat Dehidrogenaz'ın tuz konsantrasyonu, aktivite ve % aktivite değerleri

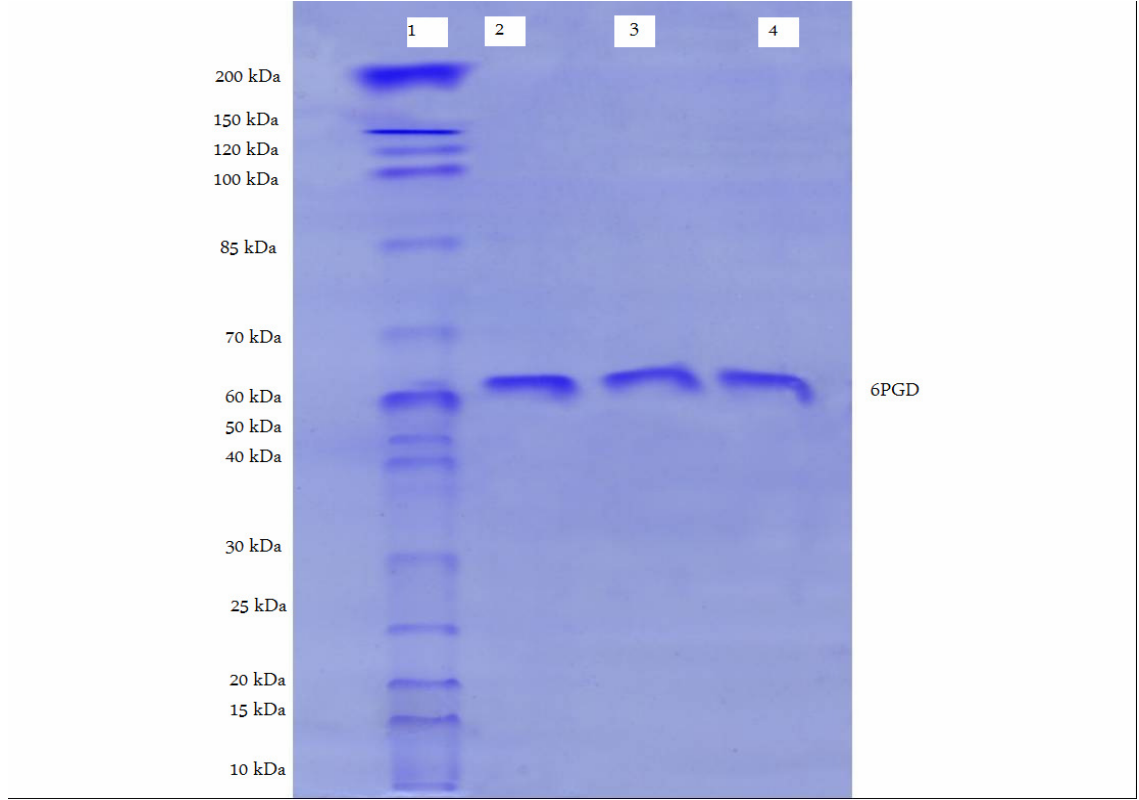
[M]	0.02	0.03	0.04	0.05	0.1	0.15	0.20	0.25	0.30
EU	0.368	0.389	0.407	0.344	0.225	0.156	0.094	0.069	0.061
%Akt.	90.42	95.58	100	84.52	56.02	38.33	23.24	16.95	14.99



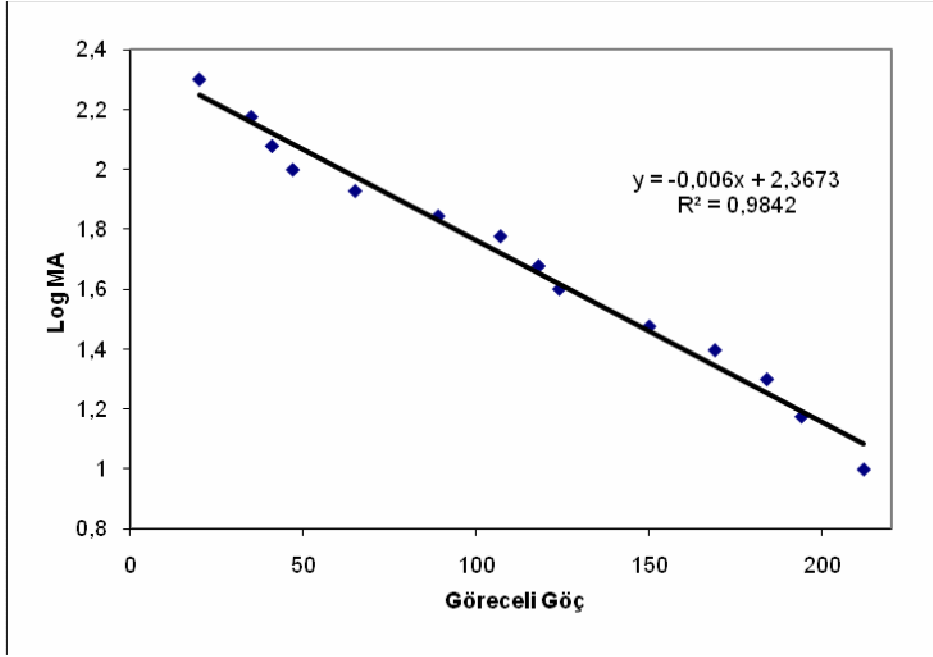
Şekil 5.5. Balık Karaciğeri 6-Fosfoglukonat Dehidrogenaz'ın Tuz Konsantrasyonu-% aktivite grafiği

5.6. Balık karaciğeri 6PGD Enziminin SDS-PAGE ile Saflığının Kontrolü

Karaciğerden elde edilen 6PGD enzimi numunelerinin, homojenat ve afinite ile elde edilen elüatlardaki enzimlerin saflığını kontrol etmek için SDS-PAGE yöntemi kullanıldı. Bu amaçla elektroforez sistemi kurularak enzim numuneleri sırayla kuyulara uygulandı ve yürütüldü. Elde edilen bantları gösteren fotoğraf şekil 5.6'da gösterilmektedir.



Şekil 5.6. Van Gölü Balığı karaciğerinden saflaştırılan 6PGD enziminin SDS-PAGE bantları (1.bant protein standartı, 2., 3., 4. bantlar saflaştırılan 6PGD)



Şekil 5.7. SDS-PAGE ile elde edilen protein standartı bandı yardımıyla elde edilen $\log M_A$ -Göreceli göç grafiği.

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

6-fosfoglukonat dehidrogenaz (6PGD) pentoz fosfat yolunun ikinci enzimidir. 6PGD enzimi NADP^+ varlığında 6-fosfoglukonatın dönüşümlü oksidatif dekarboksilasyon reaksiyonunu katalizler. Reaksiyon sonucunda ribuloz 5-fosfat, CO_2 ve NADPH oluşur. NADPH, redükte glutasyonu üreterek hücreyi antioksidan ajanlara karşı korur (Lehninger ve ark., 1993; Bianchi ve ark., 2001). Ribuloz 5-fosfat ise nükleotid biyosentezinde kullanılan riboz 5-fosfat ve bazı organizmalarda vitamin ve aromatik aminoasit sentezi için gerekli olan eritroz 4-fosfat oluşturmak üzere bir dizi kimyasal reaksiyona girmektedir (Miclet ve ark., 2001). NADPH aynı zamanda yağ asitleri, steroidler ve bazı amino asit gibi birtakım biyomoleküllerin sentezine katılan bir koenzimdir (Kahler ve Kirkman, 1983; Takizawa ve ark., 1986). NADPH seviyesi düştüğünde canlı sistemde redükte glutasyonun konsantrasyonu düşer ve hücrenin ölümüyle sonuçlanır. Bundan dolayı 6PGD, antioksidan enzim olarak da tanımlanabilir (Kozar ve ark., 2000; Srivastava ve Beutler, 1970). Dünyada hastalar tarafından yaygın olarak kullanılan pek çok ilaç vardır. Ancak bu ilaçların, G6PD, 6PGD, karbonik anhidaz ve glutasyon redüktaz gibi bazı enzimler üzerine pek çok yan etkisi vardır (Beutler, 1994; Husain ve ark., 2001). İlaç 6PGD'ı inhibe ederse, düşen NADPH ve GSH hücreye zarar vermeye neden olacak ve bunun sonucunda şiddetli sağlık problemleri ortaya çıkacaktır (Beutler, 1994; Morse, 1988). 6PGD enzim aktivitesi üzerine pek çok kimyasal madde ve ilacın etkisi araştırılmıştır (Çiftçi ve ark., 2002; Akyuz ve ark., 2004). Hücrelerdeki reaktif oksijen türlerinin (ROS) yapısı, metabolik yollarda serbest radikallerin oluşumuna yol açar. Bu zararlı türler lipid, protein ve nükleik asit gibi pek çok molekülün zarar görmesine neden olur. Bu zararlı etkiler hücrelerde antioksidan savunma sistemi tarafından kontrol edilir. Vücutta çeşitli dokulardaki antioksidan savunma sistemlerinin en önemli molekülü glutatyonudur (Ames ve ark., 1993; DeLeve ve Kaplowitz, 1991). Bununla birlikte, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz

(GSH-Px), glutasyon redütaz (GR), glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) ve 6PGD bu radikalleri uzaklaştırmak ve hücreleri dengede tutmak için gereklidir. Normal şartlarda, hücrenin redüktif ve oksidatif kapasitesi oksidasyon lehindedir (Halliwell ve Gutteride, 1989; Rubin, 1993). Ancak oksidatif baskı altında üretilen ROS, antioksidan savunma sistemi tarafından uzaklaştırılır. Oksidatif pentoz fosfat yolu enzim aktiviteleri, fotosentetik olmayan dokularda çimlenme ve karanlık evre esnasında artar (ap Rees, 1985; Schnarrenberger ve ark., 1975). Pentoz fosfat yolunun ilk enzimi olan G6PD, glikolitik yoldan gelen glukoz-6-fosfatın tamamını düzenler ve 6PG'ı üretir.

Pentoz fosfat yolu reaksiyonlarında meydana gelen aksaklık ileri derecede anemiye sebep olmaktadır. Bir genetik bozukluk olan glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzim eksikliği örnek olarak verilebilir. Bu enzimin eksikliği durumunda eritrositlerde yetersiz NADPH sebebiyle redükte glutasyon üretimi azalır, hücre kendisini oksidatif hasara karşı koruyamaz ve hemolitik anemi tablosu gelişir (Walzem ve ark., 1991). Yine eritrositlerde hemoglobin yapısındaki demirin Fe^{+2} formunda tutulmasında glutasyonun rolü bulunmaktadır. Fonksiyonel olmayan methemoglobin yapısındaki demirin (Fe^{+3}) indirgenmesi sırasında glutasyon tüketilmektedir. Bu nedenle eritrositlerin indirgenmiş glutatyona olan gereksinimleri fazladır. Bütün bu sebeplerden dolayı pentoz fosfat yolu eritrositlerde NADPH üretimi açısından büyük öneme sahiptir (Onat, 2002). 6PGD enziminin defektif varyantları ilk olarak siyah bir Amerikan ailesinde tanımlanmış fakat aile fertlerinde hemolitik anemi tesbit edilmemiştir (Brewer ve Dern, 1964). Daha sonraki yıllarda enzim eksikliğine bağlı kronik anemi vakaları rapor edilmiştir (Caprari ve ark., 2001; Corrons ve ark., 1996). Biyokimyasal analizler sonucu 6PGD enzim eksikliğinin “resesif” PGDO alelinden kaynaklandığı tesbit edilmiştir. 6-PGD-A fenotipini taşıyan enfekte eritrositlerin oksidan hasara karşı daha duyarlı oldukları ve erkenden fagositler tarafından uzaklaştırılmalarından dolayı eritrosit 6-PGD-A'nın malaryaya karşı koruma sağladığı belirtilmiştir (Bayoumi ve ark., 1986). Ayrıca 6PGD delesyonunun birçok organizmada öldürücülüğü ispatlanmıştır ve bunun 6-fosfoglukonatin

birikimi yüzünden olduğu kabul edilmektedir. Trypanosoma brucei ile yapılan bir çalışmada enzim eksikliği sonucu hücrede biriken 6-fosfoglukonatın, fosfoglukoz izomeraz'ı inhibe ettiği ve böylece glikolizin bloke olduğu tesbit edilmiştir (Estewe ve cazzulo, 2004). Bu nedenle kemoterapilerde 6PGD enzim inhibisyonundan faydalanılabileceği belirtilmiştir (Barrett, 1997). Teröpatik veya başka amaçlarla kullanılan birçok ilacın organizma ve enzimleri üzerinde yan etkiye sahip oldukları bilinmektedir (Çiftçi ve ark., 2002; Beydemir ve ark., 2002).

Afinite kromatoğrafisi bir çeşit adsorpsiyon kromatoğrafisi olup, saflaştırılması istenen molekül veya biyolojik ünitenin " matriks" adı verilen çözülme-yen bir kolon maddesine kovalent olarak immobilize edilmiş bir bağlanma bileşiğine (ligand), spesifik ve tersinir bağlanan bir tekniktir. Bu sayede, çok yorucu, zor ve bazı hallerde imkansız olan bir çok ayırma işlemi kısa zamanda gerçekleştirilmekte ve yüksek bir verimde binlerce defa saflaştırılan enzimler elde edilmektedir (Axen ve ark., 1967; Cuatrecases ve Anfinsen, 1971).

Bir Afinite kolonunun verimli olabilmesi için;

1. Matriks'in iyi akış özelliğine sahip ligand bağlanma ve elüsyon işlemlerine dayanıklı ve akan bileşiklerle etkileşme yapmayan bir yapıda

2. Ligand'ın ise adsorbe edeceği bileşiklerle 10^{-4} - 10^{-8} M oranında değişen bir afinitesi olmalıdır. Birçok biyolojik ligand'a bağlanacağı aktif bölgelerin 3 boyutlu yapılarının derinliklerinde olduğu için, ligand matriks'ten bir uzantı kolu ile belli bir uzaklıkta olmalıdır. Bu sağlandığı zaman kolonun kapasitesi artar. Uzantı kolu uzunluğu kriter bir değer olup, kısa kaldığında bağlanma verimsiz, gereğinden uzun olduğu zaman da, hidrofobik etkileşmelerle, istenmeyen bazı bileşiklerin de adsorpsiyonu olabilir.

Afinite kromatoğrafisinin bu üstün özellikleri göz önüne alınarak çalışmamız da bu yöntem tercih edilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda karaciğerden saflaştırılan 6PGD enziminin saflaştırma oranı 446.49 kat olarak bulunmuştur. Enzimin spesifik aktivitesi 23.173 olarak hesaplanmıştır. Enzimin saflığını kontrol etmek için SDS-PAGE ile yapılan çalışma sonucunda enzimin

molekül ağırlığı şekil 5.6'da görüldüğü gibi 57 kDa olarak hesaplandı. Elektroforez fotoğrafından da anlaşılacağı gibi saflaştırılan enzim elektroforez jeline tek bant vermiştir. Buda saflaştırma işleminin başarıyla yapıldığını ispatlamaktadır. Burada bulunan molekül ağırlığı enzimin alt birimine ait molekül ağırlığıdır. Çünkü SDS-PAGE elektroforezinde oligomerik enzimler denatüre olarak alt birimlere ayrılırlar. Muhtemelen saflaştırdığımız enzim oligomerik yapıdadır. Monomerlerinin sayısı ve tabii molekül ağırlığını bulmak için jel-filtrasyon kromatografisi uygulanmasının yapılması gerekmektedir. Ancak çalışmamızda bu yöntem uygulanamamıştır. Böylece bulunan 57 kDa değeri enzimin sadece bir alt birimine ait molekül ağırlığının değeridir.

Yapılan diğer çalışmalarda 6PGD enziminin tavuk karaciğerindeki saflaştırma oranı 344 kat olarak bulunmuş (Erat, 2005). Bir bakteri ile yapılan bir çalışmada 6PGD % 38'lik bir verimle ve spesifik aktivitesi 140,0 EU/mgprotein olarak saflaştırılan enzim tetramerik bir yapıya sahip olup her bir alt birimin molekül ağırlığı 38.8 kDa olarak bulunmuştur (Ohara ve ark., 2004). Weisz ve ark. insan beyni 6PGD enzimini amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-selüloz kolonu, Sephacryl-200 jel filtrasyon, Red A matriks jel kolon ve ultrafiltrasyon yöntemleri kullanarak % 6 verimle 530 kat saf enzim elde etmişlerdir (Weisz ve ark., 1985). Bradyrhizobium sp. 6PGD enzimini 6 basamakta saflaştırılmıştır: amonyum sülfat çöktürmesi, termal treatment, Sephadex G-200, DEAE Sephacel (gradientli pH ve gradientli KCl elüsyonu) Cibachrom Blue Sepharose. Tüm bu işlemlerden sonra 6PGD enzimini % 27 verimle 350 kat saf elde edilmiştir (Sosa-Saavedra ve ark., 2001). Ispanak yapraklarından kloroplast 6PGD enzimi polietileneimin presipitasyon, DEAE-Fractogel anyon-değişim kromatografisi, Superdex G 200 jel filtrasyon ve ADP-Agaroz afinite kromatografisi yöntemleri ile 1000 kat saflaştırılmıştır (Krepinsky ve ark., 2001). Maydanoz yapraklarından 6PGD enzimini homojenat, % 30-50 amonyum sülfat çöktürmesi ve iyon-değişim kolon kromatografileri yöntemleri kullanılarak 3 basamakta saflaştırılmıştır. Sonuçta 6PGD enzimini %49 verimle 339 kat saf elde edilmiştir.4 S. Pombe 6PGD enzimini, amonyum sülfat çöktürmesi, sephacryl S-300 jel, DE-52 anyon

değiştirici, Matrex red A jel ve AGNADP afinite kolon kromatografileri kullanılarak % 27.5 verimle 450 kat saflaştırılmıştır (Tsai ve Chen, 1998). H. İnfluenza 6PGD enzimini tuz çöktürmesi, hidrofobik ve afinite Kromatografi yöntemi kullanılarak % 16 verimle 308 kat saflaştırılabilmiştir (Yoon ve ark., 1989).

Şekil 5.2 de görüldüğü gibi afinite kolonundan alınan fraksiyonların kalitatif protein tayinleri ve enzim aktiviteleri grafik haline getirilmiştir. Grafikte 4. tüpten itibaren kolondan gelen fraksiyonlarda hem protein miktarının arttığı ve hemde enzim aktivitesinin yükseldiği görülmektedir. 6., 7. ve 8 nci tüplerde bu değerler maksimuma ulaşmakta ve daha sonraki tüplerde gittikçe düşmektedir. Yaklaşık 10-12 tüpte karakterizasyon yapılacak yükseklikte enzim aktivitesi bulunmuş oldu. Buda yeterli miktarda saf enzim elde edildiğinin işaretidir. Burada dikkat edilecek en önemli husus şudur. Maksimum aktivite gösteren tüplerle yüksek miktarda protein bulunan tüplerin aynı tüpler olmasıdır. Buda grafikte de görüldüğü gibi aşağı yukarı aynı tüplerdir.

Karakterizasyon çalışmasında saflaştırılan enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH, sıcaklık ve uygun tuz konsantrasyonu aralıkları tespit edilmiştir. Şekil 5.3 de görüldüğü gibi enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık aralığı 35-45°C dir. Ancak en yüksek aktiviteyi 40°C de vermektedir. Zira bulunan bu değer benzer çalışmalarda ki değerlerle uyumaktadır. Beydemir ve arkadaşları rat eritrositlerinden saflaştırdıkları 6PGD enziminin maksimum aktivite verdiği sıcaklığı 45°C bulurken, Sawa ve arkadaşlarının yapmış olduğu ve bir bakteriden saflaştırılan aynı enzim için bu değer 40-45°C olduğunu rapor etmişlerdir. Bir başka çalışmada Ceylan ve arkadaşları ise Rat ince bağırsaklarından saflaştırdıkları 6PGD enziminin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklığı 37,5°C olarak bulmuşlardır (Beydemir ve ark., 2002; Sawa ve ark., 1985; Ceylan ve ark., 2005).

Şekil 5.4 de görüldüğü gibi saflaştırdığımız enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH, 8.5 dir. Bu değer benzer diğer çalışmalara uygunluk göstermektedir. Nitekim normal işlemlerde kullanılan tamponun pH'sı her zaman 8 olarak alınmaktadır.

Yine Şekil 5.5 incelendiğinde enzimin en yüksek aktivite verdiği $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ konsantrasyonunun 0.04 M olduğu görülmektedir.

Sonuç olarak alıŐmamızda Van Gölü balığından 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enzimi (6PGD), 2',5'-ADP Sepharoz 4B afinite kromatografisi ile saflaştırılmış, enzimin saflığı ve alt biriminin molekül ağırlığı SDS-PAGE ile tespit edilmiş ve enzimin kinetik özellikleri belirlenmiştir. Bu çalıŐmayla pentoz fosfat yolunun önemli bir enzimi olan 6PGD nin tek adımlık bir saflaştırma yöntemiyle saflaŐtırılacaĐı gösterilmiştir. Böylece amacımıza ulaŐılmıŐtır. Çalışmamız bundan sonra yapılacak bu enzimle ilgili çalışmalara yardımcı olacağı örneğin çeşitli bitki ekstraktlarının ya da değişik ilaçların enzim üzerine etkilerinin inceleneceği, bunun yanında enzimin molekül yapısının daha ayrıntılı belirleneceği başka çalışmalara da imkn sağlayacağı grŐnde yiz. ÇalıŐmamızın bu anlamda literatüre de önemli bir katkı yaptığı da kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

- Adams, M.J., Gover, S., Leaback, R., Phillips, C., Somers, DO'N., 1991. The Structure of 6-phosphogluconate dehydrogenase refined at 2.5 Å resolution. *Acta Crystallogr. Sect B.* **47**: 817-820
- Ajmar, F., Lamedica, D., Garre, C., Ravazzolo, R., 1979. Partial deficiency of red cell 6-phosphogluconate dehydrogenase: a family study. *Hum Genet.* **52** (3), 347-51.
- Akyurt, İ., Sarı, M., 1991. Farklı Habitatlarda Yaşayan Tatlı Su Balığının (*Chalcalburnus colcooides*, Gulden staadt, 1772). Bazı Biyolojik Özelliklerinin Araştırılması, E. Ü., *Su Ürünleri Dergisi Cilt: 8*, Sayı 31-32, 87-101
- Akyuz, M., Erat, M., Çiftçi, M., Gumustekin, K., Bakan, N., 2004. *J Enz Inhib Med Chem.* **19**:361-365.
- Ames, B.N., Shigenaga, M.K., Hagen T.M., 1993. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:7915-7922.
- Ap Rees, T., 1985. The organization of glycolysis and the oxidative pentose phosphate pathway in plants. *In R Dounce, DA Day, eds, HigherPlant Cell Respiration, Encyclopedia of Plant Physiology, Vol 18.* Springer-Verlag, Berlin, New York, pp 391-417
- Axen, R., Prath, J., Ernback, S., 1967. Chemical Coupling of Peptides and Proteins to Polisaccarides by Means of Cyanogen Halides. *Nature.* **214**:1302-1304.
- Bakan, N., 2004. *Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Ders Notları.* Erzurum
- Barengi, L., Ceriotti F., Ripamonti, M., Luzzana, M., Bonini, P., 1987. Erythroctic 6-phosphogluconate dehydrogenase measured by a differential pH technique. *Clin Chem.* **33/4** 579-582.

- Barrett, M.P., 1997. The pentose phosphate pathway and parasitic protozoa. *ParasitolToday*. Jan;**13**(1):11-6.
- Bayoumi, R.A., Bashir, A.H., Abdulhadi, H., 1986. Resistance to falciparum malaria among adults in central Sudan. *Am J Trop Med Hyg*. Jan; **35**(1):45-55.
- Berdis.J.A.,Cook.F., 1993. Overall kinetic mechanism of 6- PGD from *Candida utilis*, *Biochem*. **32**, 2036-2040.
- Beutler, E., 1971. Red cell metabolism. *Manual of Biochemical Methods*. Academic press. London; **12**:68-70.
- Beutler E., 1994. *Blood* .**84**:3613-3636
- Beydemir, S., Ciftci, M., Kufrevioglu, O.I., Buyukokuroglu, M.E., 2002. Effects of some drugs on rat erythrocyte 6-phosphogluconate dehydrogenase: an in vitro and in vivo study. *Pol J Pharmacol*. May-Jun; **54**(3):275-80.
- Beydemir, S., Ciftci, M., Kufrevioglu, O.I., 2002. Purification and characterization of glucose 6-phosphate dehydrogenase from sheep erythrocytes and inhibitory effects of some antibiotics on enzyme activity. *J Enzyme Inhib Med Chem*. Aug; **17**(4):271-7.
- Beydemir, S., Kulaçoglu, D.N., Çiftçi, M., Küfrevioglu, O.I., 2003. The effects of some antibiotics on sheep lens glucose 6-phosphate dehydrogenase *in vitro*. *Eur. J. Ophthalmol*. **13**, 155–161.
- Bhagavan, N.V., 2002. *Medical Biochemistry*. Fourth Edition, Canada: Harcourt/Academic press.
- Bianchi D., Bertrand O., Haupt K., Coello N., 2001. *Enzyme Microb Technol*. **28**: 754-759
- Borregaard, N., Schwartz, J.H., Tauber, A., 1984. Proton secretion by stimulated neutrophils. *J Clin Invest*. **74**:455-9.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Bioche*. **72**:248-54.
- Brewer, G.J., Dern, R., 1964. A new inherited enzymatic deficiency of human

- erythrocytes: 6-phosphogluconate dehydrogenase deficiency. *Am J Human Genet.* **16**:472-476.
- Burtis, C.A, Ashwood, E.R., 2005. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. Tercüme: Aydın H Tietz Klinik Kimyada Temel İlkeler, Ankara. Palme Yayıncılık. 163.
- Bülbül, M., Erat, M., 2008. Investigation of the effects of some sulfonamide derivatives on the activities of glucose-6-phosphogluconate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase and glutathione reductase from human erythrocytes. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry.* **23**(3):418-423.
- Caprari, P., Caforio, M.P., Ciancuilli, P., Maffi, D., Pasquino, M.T., Tarzia, A., Amadori, S., Salvati, A.M., 2001. 6-Phosphogluconate dehydrogenase deficiency in an Italian family. *Ann Hematol.* Jan; **80**(1):41-4.
- Carne, A., 1982. Purification by dye-ligand chromatography of an NADP-dependent enzyme, 6-phosphogluconate dehydrogenase from lamb's liver, *Anal Biochem.* **121**, 227-229.
- Champe, P.C., Harvey, R.A., 1997. *Lipincott*. Tercüme: Tokullugil, A., Dirican, M., Ulukaya, E., Biyokimya, İstanbul. Nobel Tıp Kitabevleri, 1997:117.
- Ceylan, D., Danişan, A., Ögüş, H., Özer, N., 2005. Purification and kinetic properties of 6-phosphogluconate dehydrogenase from rat small intestine. *The Protein Journal.* **Vol.24** No.5. 293-301
- Corpas, F.J., Garca-Salguero, L., Barroso, J.B., Aranda, F., Lupitez, J.A., 1995. Kinetic properties of hexose-monophosphate dehydrogenases. II. Isolation and partial purification of 6-phosphogluconate dehydrogenase from rat liver and kidney cortex. *Moll Cell Biochem.* **144** (2): 97-104.
- Corrons, V., Colomer, D., Pujades, A., Rovira, A., Aymerich, M., Merino, A., 1996. Congenital 6-phosphogluconate dehydrogenase deficiency associated with chronic hemolytic anemia in a Spanish family. *Am J. Hematol.* **53**:221-227.

- Ciftci, M., Kufrevioglu, O.I., Gundogdu, M., Ozmen, I., 2000. Effects of some antibiotics on enzyme activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes *Pharmacol Res.* **41**(1):109-113.
- Ciftci, M., Beydemir, S., Yılmaz, H., Bakan, E., 2002. Effects of some drugs on rat erythrocyte 6-phosphogluconate dehydrogenase: an in vitro and in vivo study. *Pol J Pharmacol.* **54**(3): 275-80.
- Ciftçi, M., Yılmaz, H., Çoban, A.T., Gul, M., Gümüştaki, K., Done, S., 2008. Effects of nikotine and vitamin E on 6- phosphogluconate dehydrogenase activity in some rat tissues in vivo and in vitro. *Journal of Enzime Inhibition and Medicial Chemistry.* **23**(2):261-265.
- Cuatrecases, P., Anfinsen, C.B., 1971. Methods in enzymology (Editors: Jacoby, W.) *Academik Pres.* New York, London. 354s
- Dalocchio, F., Matteuzzi, F., Bellini, T., 1985. Half-site reactivity in 6-phosphogluconate 117 dehydrogenase from human erythrocytes. *Biochem J.* **227**:305-310.
- DeLeve, L.D., Kaplowitz, N., 1991. *Pharmacol Ther.* **52**:287-305.
- Del Mar, M., Puerta, M., Pertierra, A.G., 1986. 6- phosphogluconate dehydrogenase from dicentrarchus labrax 1. Liver and properties of the enzyme. *Comp Biochem Physiol.* **83**(1):215-220.
- Demir, H., Çiftçi, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2003. Purification of 6-phosphogluconate dehydrogenase from parsley (*Petruselinum hortense*) leaves and investigation of some kinetic properties. *Preparative Biochemistry and Biotecnology.* **33**(1):39-52.
- Dyson, J.E., D'Orazio, R.E., Hanson, W.H., 1973. Sheep liver 6-phosphogluconat dehydrogenase: isolation procedure and effect of pH, ionic strength, and metal ions on the kinetic parameters. *Arch Biochem Biophys.* Feb; **154**(2): 623-35.
- Erat, M., 2005. Purification of 6- Phosphogluconate Dehydrogenase from Chicken Liver and Investigation of Some Kinetic Properties. *Preparative Biochemistry and Biotecnology.* **35**:53-69

- Erat, M., Şakiroğlu, H., 2007. Inhibitory Effects of ofloxacin and Ceferpime on Enzyme Activity of 6- Phosphogluconate Dehydrogenase from Chicken Liver . 6-Phosphogluconate Dehydrogenase from Chicken Liver. *Protein and Peptide Letters*. **14**,197-201.
- Estewe, M.I, Cazzulo, J.J., 2004. The 6-phosphogluconate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: the absence of two inter-subunit salt bridges as a reason for enzyme instability. *Mol Biochem Parasitol*. Feb; **133**(2):197-207.
- Gaitonde, M.K., Murray, E., 1991. Subcellular distribution profile of glucose 6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase, transketolase and phosphogluconate isomerase in rat brain. *Neurochem Int*. **19**(1/2):151-157
- Grunewald, R.W., Weber, I.I., Kinne-Saffran, E., 1993. Control of sorbitol metabolism in renal inner medulla of diabetic rats, *Biochim Biophys Acta*. **1225**, 39-47.
- Gupte, S.A., Li, K., Okada, T., Sato, K., Oka, M., 2002. Inhibitors of pentose phosphate pathway cause vasodilation: involvement of voltage-gated potassium channels. *J Pharmacol Exp Ther*. **301**:299-305.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1989. Free radicals in biology and medicine. Oxford: *Clarendon Press*.
- Hanau, S., Rippa, M., Dallochio, F., 1992. NADPH activates a decarboxylation reaction catalysed by lamb liver 6-phosphogluconate dehydrogenase, *Biochim Biophys Acta*. **1122**, 273-277.
- Hollenberg, P.F., 1992. Mechanisms of cytochrome p-450 and peroxidase-catalyzed xenobiotic metabolism. *FASEB J*. **6**:686-94.
- Hong, Z.Q., Copeland, L., 1992. Isoenzymes of 6-phosphogluconate dehydrogenase from the host fraction of soybean nodules. *J Plant Physiol*. **39**: 313-319.
- Husain, K., Scott, B.R., Reddy, S.K., Somani, S.M., 2001. *Alcohol*. **25**:89-97.

- Hutchison, J.S., Winberry, L., Nakayama, R., Holten, D., 1984. Kinetics for changes in enzyme synthesis and mRNA content and hormones required for induction of 6-phosphogluconate dehydrogenase in hepatocytes. *Biochim et Biophys Acta*. **781**:30-38.
- Kahler, S.G., Kirkman, H.N., 1983. *J Biol Chem*. **258**:717-718.
- Keha, E., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2004. *Biyokimya*. Erzurum: Aktif Yayınevi
- Kozar, R.A., Weibel, C.J., Cipolla, J., Klein, A.J., Haber, M.M., Abedin, M.Z., Trooskin, S.Z., 2000. Antioxidant enzymes are induced during recovery from acute lung injury. *Crit Care Med*. **28**:2486-2491.
- Krepinsky, K., Plaumann, M., Martin, W., Schnarrenberger, C., 2001. Purification and cloning of chloroplast 6-phosphogluconate dehydrogenase from spinach. Cyanobacterial genes for chloroplast and cytosolic isoenzymes encoded in eukaryotic chromosomes. *Eur J Biochem*. **268**(9): 2678-86.
- Krebs, H.A., Eggleston, L.V., 1978. The regulation of the pentosephosphate cycle in rat liver. *In: Weber G (ed). Adv Enzymeregul.* Oxford: Pergamon Press Ltd, **12**:421-33.
- Kutay, F., *Enzimler*. In Onat T, eds., 2002. *İnsan Biyokimyası*. Ankara: Palme Yayıncılık. 200-209.
- Kutay, F., Onat, T., 2002. *İnsan Biyokimyası*. In Onat T, Emerk K, Sözmen E.Y eds.
- Laemmli, D.K., 1970. *Cleavage of structural proteins during in assembly of the heat of bacteriophage T4*. Nature, London, 227,680. Ankara Palme Yayıncılık. **198**, 243-245.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M., 1993. *Principles of Biochemistry*. New York: Worth Publishers
- Lehninger A.L, Nelson D.L, Cox M.M., 2000. *Principles of Biochemistry*. 2nd edn. Worth Publishers Inc., New York, 558-560.
- Menezes, L., Kelkar, S.M., Kaklij, G.S., 1989. Glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase from

- lactobacillus casei: Responses with different modulators. *Ind J of Biochem Biophys.* **26**: 329-333.
- Miclet, E., Stoven, V., Michels, P.A., Opperdoes, F.R., Lallemand, J.Y., Duffieux, F., 2001. NMR spectroscopic analysis of the first two steps of the pentose-phosphate pathway elucidates the role of 6-phosphogluconolactonase. *J Biol Chem.* **276**(37):34840-6. Epub 2001 Jul 16.
- Morelli, A., Bcnatti, U., Gaetan,i G.F., De Flora, A., 1979-1983. Biochemical mechanisms of glucose 6 phophate dehydrogenase deficiency. *Proc Natl Acad Sci.* USA 1978: 75
- Morse, E.E., 1988. *Ann Clin Lab Sci.* **18**:13-18.
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2000. *Lehninger principles of biochemistry.* 3rd ed. USA: Worth Publishers, 743-4.
- Ninfali, P., Orsenigo, T., Barociani, S.R., 1990. Rapid purification of glucose 6-phosphatedehydrogenase from mammal's erythrocytes. *Prep Biochem.;* **20**: 297-309.
- Ohara, H., Uchida, K., Yahata, M., Kondo, K., 1996. NAD⁺-spesific 6-phosphoglueonate dehydrogenase in lactic acid bacteria. *Biosci Biotech Biochem.* **60** (4): 692-693.
- Ohara, H., Russell, A.R., Uchida, K., Kondo, H., 2004. Purification and characterization of NAD-spesific 6-phosphoglueonate dehydrogenase from leuconostoc lactis SHO-54. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* **Vol.98** No.2, 126-128.
- Onat, T., 1996. *Eritrosit Biyokimyasi.* In Emerk K, Onat T ed. *Temel Biyokimya* Izmir, Saray medikal yayincilik, 865-8797
- Pearse, B., Rosemeyer, M.A., 1975. Human 6- phosphogluconate dehydrogenase. Purification of the erythrocyte enzyme and the influence of ions and NADPH on its activity. *Eur J Biochem.* **42**(1): 213-223.
- Pearse, B.M., Rosemeyer, M.A., 1975. 6-phosphogluconate dehydrogenase from human erythrocytes, *Methods Enzymol.* **41**, 220-226.
- Rippa, M., Giovannini, P.P., Baret, M.P., Dallocchiof, H., 1998. 6-

- phosphogluconate dehydrogenase : the mechanism of action investigated by a comparison of the enzyme from different species. *Biochim Biophys Acta*. **1429**(1):83-92.
- Rubin, E., 1993. *Alcohol Health Res World*. **17**:272-278.
- Sawa, Y., Suzuki, K., Ochiai, H., 1985. purification and characterization of 6-phosphogluconate dehydrogenase from *Phormidium* sp. *Agric. Biol. Chem.* **49**:2543-2549.
- Schnarrenberger, C., Tetour, M., Herbert, M., 1975. Development and intracellular distribution of enzymes of the oxidative pentose phosphate cycle in radish cotyledons. *Plant Physiol.* **56**: 836-840
- Silverberg, M., Dalziel, K., 1973. Crystalline 6- phosphogluconate dehydrogenase from sheep liver. *Eur. J. Biochem.* **68**:229-238.
- Siems, W.G., Sommerburg, O., Grune, T., 2000. Erythrocyte free radical and energy metabolism. *Clin Nephrol.* **53**(Suppl 1):9-17.
- Sosa-Saavedra, F., Leon-Barrios, M., Perez-Galdona, R., 2001. Pentose phosphate pathway as the main route for hexose catabolism in *Bradyrhizobium* sp lacking Entner- Doudoroff pathway A role for NAD⁽⁺⁾-dependent 6-phosphogluconate dehydrogenase (decarboxylating). *Soil Biol Biochem.* **33**(3): 339-343
- Takizawa, T., Huang, I.V., Ikuta, T., 1986. Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: primary structure and cDNA cloning. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jun; **83**:4157-4161.
- Toews, M.L., Kanji, M., Carper, W., 1976. 6- phosphogluconate dehydrogenase purification and kinetics. *J Biol Chem.* **251**(22):7127-31.
- Toews, M.L., Kanji, M., Carper, W., 1998. 6- phosphogluconate dehydrogenase. *J Biol Chem.* **251**(22):7127-31.
- Topham, C.M., Dalziel, K., 1986. The chemical mechanism of sheep liver 6-phosphogluconate dehydrogenase. *Biochem J.* **234**: 671-677.

- Tsai, C.S., Chen, Q., 1998. Purification and kinetic characterization of 6-phosphogluconate dehydrogenase from *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem Cell Biol.* **76**(4):637-44.
- Walzem, R.L., Storebakken, T., Hung, S.S.O., Hansen, R.J., 1991. Relationship between growth and selected liver enzyme activities of individual rainbow trout. *J Nutr.* **121**(7):1090-1098.
- Weisz, K.S., Schofield, P.J., Edwards, M.R., 1985. Human brain 6-phosphogluconate dehydrogenase: purification and kinetic properties. *J. Neurochem.* **44**:510-517.
- Wood, T., 1986. Distribution of the pentose phosphate pathway in living organisms. *Cell Biochem Funct.* **4**:235-40.
- Yoon, H., Anderson, C.D., Anderson, B.M., 1989. Kinetics studies of *Haemophilus influenzae* 6 phosphogluconate dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta.* **994**(1);75-80
- Yoshida, Y., Nakano, Y., Yamashita, Y., Iwaga, T., 1997. The *gnd* gene encoding a novel 6-PGDH and its adjacent region of *actinobacillus acinomyces* chromosomal DNA. *Biochem Biophys Res Commun.* **230**: 220-225.

ÖZGEÇMİŞ

28.01.1981 tarihinde Van'ın Erciş ilçesine bağlı Hasanabdal Köyünde doğdu. İlköğrenimini burada tamamladı. Orta öğrenimini Van'da tamamladı. 2003 yılında Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünü kazandı. 2007 yılında kimya bölümünden mezun oldu. Aynı yıl tezli yüksek lisans yapmaya başladı. Haziran 2010'da tezli yüksek lisans öğrenimini bitirdi.