

ESRA ACAR

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2013

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

MİDYE (*MYTILUS GALLOPROVİNCİALİS* LAM.)
HEPATOPANKREASINDAN TİYOREDOKSİN
REDÜKTAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE
KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

ESRA ACAR

DANIŞMAN
DOÇ.DR.NURTEN ÖZSOY

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
BİYOKİMYA YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

İSTANBUL-2013

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı Biyokimya Yüksek Lisans Programında Esra ACAR tarafından hazırlanan "Midye (*Mytilus galloprovincialis* Lam.) Hepatopankreasından Tioredoksin Redüktaz Enziminin Saflaştırılması ve Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi" başlıklı Yüksek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

15 / 07 / 2013

Tez Sınav Jürisi

- | Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı) | İmzası |
|---|---|
| 1.Prof. Dr. Ayşe CAN (Danışman) (İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biokimya Anabilim Dalı) |  |
| 2.Prof. Dr. Nuriye AKEV (İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biokimya Anabilim Dalı) |  |
| 3.Doç.Dr. Nurten ÖZSOY (İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biokimya Anabilim Dalı) |  |
| 4.Doç.Dr. Pınar AKSOY SAĞIRLI (İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biokimya Anabilim Dalı) |  |
| 5.Prof. Dr. Refiye YANARDAĞ (İstanbul Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Bölümü Biokimya Anabilim Dalı) |  |

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.



Esra ACAR

İTHAF

Bu tez çalışmasını bana her zaman güvenen ve beni her konuda destekleyip yalnız bırakmayan Eşim'e ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımda ve tez yazım sırasında bana bütün azmi ve enerjisiyle yardım eden danışman hocam Sayın Doç. Dr. Nurten Özsoy’a,

Lisansüstü eğitim sürecinde bilgi birikimlerini bizden esirgemeyen, her koşulda bize yeni bilgiler öğretmeyi hedeflemiş olan Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ayşe Can ve Sayın Prof. Dr. Nuriye Akev hocalarıma,

İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı’ndan desteklerinden ötürü Doç. Dr. Pınar Aksoy Sağırlı, Dr. Özlem Kurt Şirin ve Dr. Tuğba Yılmaz Özden’e,

Lisans eğitimimden bu yana yollarımızın hiç ayrılmadığı, her koşulda benim yanımda olan ve bundan sonraki yıllarda da hep beraber olacağımıza emin olduğum sevgili arkadaşım Biyolog Gözde Hasbal’a, yardımlarından ötürü Uzman Biyolog Eda Çandöken ve Biyolog Gülsüm Altıparmak’a ve ayrıca Anabilim Dalı sekreterimiz Ali Kemal Demir’e,

Beni hedeflerime ulaşmam konusunda maddi ve manevi olarak desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen ve bana sonsuz güven veren aileme çok teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No:27103

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI.....	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİ
ÖZET	XV
ABSTRACT.....	XVİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tioredoksin Sistemi	3
2.2. Tioredoksin Redüktaz	3
2.3. Tioredoksinin Yapısı.....	6
2.4. Tioredoksin Katlanması	7
2.5. Tioredoksin Redüktazın Etki Mekanizması.....	10
2.6. TrxR/ Trx Sisteminin Biyolojik Aktiviteleri.....	11
2.6.1. DNA Sentezindeki Rolü.....	11
2.6.2. Tioredoksin Sistemi ve Oksidatif Stres.....	12
2.6.3. Tioredoksinlerin Metiyonin Sülfoksidi İndirgeme Kapasiteleri	15
2.6.4. Transkripsiyon Faktör Aktivitelerinin (Nf-kB, Nükleer reseptör, AP-1) Uyarılması.....	16
2.6.5. Tioredoksin Sistemi ve Hücre Çoğalmasının Uyarılması (Apoptozun İnhibisyonu)	17
2.6.5.1. Apoptozisin İndüklenme Mekanizması.....	17
2.6.5.2. Hücre Siklusu İle Apoptozisin Entegrasyonu	19
2.6.5.3. Apoptozisin Tioredoksin Redüktaz Tarafından İnhibisyonu	21
2.6.6. Vasküler Endotelyum ve Düz Kas Hücrelerindeki Tioredoksinin Görevi	22
2.7. Kanserde Tioredoksinin Rolü	23
2.8. Tedavide Tioredoksin Redüktazın Hedef Olarak Kullanılması.....	24

2.9. Tioredoksinlerin Antioksidan Etkileri	25
2.10. Midye (<i>Mytilus galloprovincialis</i> Lam.)’nin Özellikleri	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	30
3.1. Kullanılan Gereçler	30
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	30
3.3. Kullanılan Çözeltiler	31
3.4. Kullanılan Yöntemler.....	34
3.4.1. Midye Hepatopankreas Dokusu Tioredoksin Redüktazın Elde Edilmesi	34
3.4.2. Ham Ekstrenin Hazırlanması	35
3.4.3. Midye Hepatopankreas Dokusu Tioredoksin Redüktazın % 80 Amonyum Sülfat Kesitinin Elde Edilmesi.....	35
3.4.4. Protein Miktar Tayini.....	35
3.4.4.1. Sığır Serum Albumini Standart Eğri Denkleminin Elde Edilmesi.....	36
3.4.5. Tioredoksin Redüktaz (TrxR) Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi	36
3.4.5.1. 5,5-Dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) İndirgeme Metodu	36
3.4.5.2. Son Nokta İnsulin Bağımlı DTNB Aktivite Tayini	37
3.4.6. Glutasyon Redüktaz (GR) Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi.....	39
3.4.7. Tioredoksin Redüktazın Saflaştırılması	39
3.4.7.1. DEAE Sefaroz CL-6B Anyon Değiştirici Kromatografisi.....	39
3.4.7.2. Afinite Kromatografisi	40
3.4.8. Poliakrilamid Jel Elektrophorezi (PAGE)	40
3.4.8.1. Sodyum Dodesil Sülfatlı Poliakrilamid Jel Elektrophorezi (SDS-PAGE).....	40
3.4.9. Tioredoksin Redüktazın Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi.....	43
3.4.10. Enzim Aktivitesi Üzerine pH’nın Etkisinin İncelenmesi.....	44
3.4.11. Enzim Aktivitesi Üzerine Temperaturün Etkisinin İncelenmesi	44
3.4.12. Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisinin İncelenmesi	44
4. BULGULAR.....	45
5.TARTIŞMA.....	53
KAYNAKLAR.....	58
ÖZGEÇMİŞ.....	66

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2-1: Tioredoksin redüktazların bazı özellikleri (Williams ve ark. 2000).	4
Tablo 2-2: <i>In vitro</i> ve <i>in vivo</i> olarak oluşan reaktif oksijen türleri (Stadtman 2004).	13
Tablo 3-1: 96 kuyucuklu mikrolakalarda DTNB indirgeme deneyi.....	37
Tablo 3-2: 0,25 M Tris - HCl'deki (pH 8,8) % 12,5'lik ayrıştırma jelinin hazırlanması	42
Tablo 3-3: 0,125 M Tris - HCl'deki (pH 6,8) % 4,5'lik sıkılaştırma jelinin hazırlanması	42
Tablo 4-1: Midye hepatopankreas tioredoksin redüktazının elde edilme aşamaları.	46

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: <i>E.coli</i> ve insan tiyoredoksin redüktazın yapısı (Mustacich ve Powis 2000)...	5
Şekil 2-2: İnsan ve <i>E.coli</i> Trx ve TrxR'ların karşılaştırılması (Powis ve Montford 2001)	7
Şekil 2-3: Tiyoredoksinin ikincil yapılarında β -tabakalarının katlanması (Martin 1995)	8
Şekil 2-4: Tiyoredoksin katlanmasını içeren proteinler (Martin 1995)	9
Şekil 2-5: Memeli tiyoredoksin redüktazın etki mekanizması (Sandalova ve ark. 2001)	10
Şekil 2-6: Tiyoredoksin sistemi (tiyoredoksin, tiyoredoksin redüktaz ve NADPH) tarafından kataliz edilen redoks reaksiyonları (Holmgren ve Lu 2010).	11
Şekil 2-7: Oksidatif heksozmonofosfat siklusuna TrxR'nin etki mekanizması (Peters ve Van Noorden 2009).	12
Şekil 2-8: Normal metabolizma sonucunda oluşan serbest oksijen radikalleri (Ames ve ark. 1993).	12
Şekil 2-9: ROT'ların sebep olduğu okside proteinlerin oluşum yolları (Stadtman 2004).	14
Şekil 2-10: Metiyoninin ve metiyonin sülfoksidin R- ve S- izomerlerinin birbirine dönüşmesi siklusu (Stadtman 2004)	15
Şekil 2-11: Tiyoredoksin ve transkripsiyon faktörlerinin redoks sinyal transdüksiyonu (Karlenius ve Tonissen 2010)	16
Şekil 2-12: Apoptozun indüklenme mekanizması (Wei ve ark. 2008)	19
Şekil 2-13: TNF tarafından ASK-1'in regülasyonu ve TRAF2, GCK/GCKR ve MEKK1 yolu (Liu ve ark. 2000)	21
Şekil 2-14: İnsan pankreatik kanser hücrelerinde indolkinonların apoptozu uyarıcı mekanizması (Yan ve ark. 2012).	22
Şekil 2-15: Oksidatif strese karşı enzimatik antioksidan savunma mekanizmaları (Bentley ve ark. 2008)	25
Şekil 2-16: Tiyoredoksin peroksidazın H_2O_2 gibi ROT'lerini gidermesi (Yamawaki 2003).	26
Şekil 2-17: DHA (dehidroaskorbik asid), TrxR tarafından askorbik aside indirgenmesi (Nordberg ve Arner 2001).	27

Şekil 2-18: <i>Mytilus galloprovincialis</i> Lam. midyesi ve iç organlarının şematik şekli ...	28
Şekil 3-1: Sığır serum albumini standart eğrisi ve regresyon denklemi	36
Şekil 3-2: İnsan insulinin yapısındaki disülfür bağların redüklenmesi.....	38
Şekil 3-3: Vertikal (dikey) jel elektroforez cam plaka sisteminin hazırlanışı	41
Şekil 3-4: Vertikal jel elektroforezi düzeneği (Lehninger ve ark. 1993).....	43
Şekil 4-1: Midye hepatopankreası ham ektresi %80 amonyum sülfat kesitinin DEAE-Sefaroz CL-6B kolonundaki elüsyon grafiği.....	47
Şekil 4-2: DEAE-Sefaroz CL-6B kolon kromatografisiyle elde edilen 10 mM elüatın 2',5'ADP-agaroz kolonundaki elüsyon grafiği.....	48
Şekil 4-3: Afinite kromatografisi ile elde edilen F1 elüatının SDS-PAGE görüntüsü..	49
Şekil 4-4: Tiyoredoksin redüktaz aktivitesine temperaturün etkisi.....	50
Şekil 4-5: Tiyoredoksin redüktaz aktivitesine pH'nin etkisi.....	50
Şekil 4-6: NADPH konsantrasyonun tiyoredoksin redüktaz aktivitesi üzerine etkisi....	51
Şekil 4-7: Şekil 0-1: DTNB konsantrasyonun tiyoredoksin redüktaz aktivitesi üzerine etkisi.....	52
Şekil 5-1: Ribonükleidlerin redüksiyonunda görev alan tiyoredoksin ve glutatyon sistemleri.....	53

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ADP	: Adenozin difosfat
AIF	: Apoptoz-indükleyici faktör (apoptosis-inducing factor)
AP-1	: Aktivatör protein-1
AP-2	: Aktivatör protein-2
Apaf-1	: Apoptotik-proteaz aktive edici faktör-1 (Apoptotic protease activating factor- 1)
ASK-1	: Apoptoz sinyal regülatör kinaz-1 (apoptosis signal-regulating kinase-1)
Asn	: Asparagin
ATO	: Arsenik trioksit
BRUCE	: BIR tekrar içeren ibukuitin bağlayıcı enzim (BIR repeat-containing ubiquitin conjugating enzyme)
CAD	: Kaspazla-aktifleşen deoksiribonükleaz (caspase-activated deoxyribonuclease)
CAT	: Katalaz
CDK	: Siklin-bağımlı kinaz (cyclin-dependent kinase)
c-IAP1	: Hücrel-IAP1 (cellular-IAP1)
c-IAP2	: Hücrel-IAP2 (cellular-IAP2)
CKI	: Siklin kinaz inhibitörü (cyclin kinase inhibitor)
Cu/ Zn SOD	: Bakır çinko süperoksit dismutaz
Cys	: Sistein
Cyto C	: Sitokrom C (cytochrome c)
DEAE	: Dietilaminoetil
DHA	: Dehidroaskorbik asid
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DTNB	: 5,5'-Ditiobis(2-Nitrobenzoik) asid
E2F	: Transkripsiyon faktör
ECs	: Endotelial hücreler
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asid
eNOS	: Endotelial nitrik oksit sentaz
ERK	: Ekstraselüler sinyal regüle edici kinaz (Extracellular signal regulated kinase)

FAD	: Flavin adenin dinükleotid
FADD	: Fas ilişkili ölüm alanı (Fas associated death domain)
Fas	:Tümör nekrozis faktörüne bağlı transmembran reseptörü (Transmembrane receptor belonging to the tumor necrosis factor (APO-1, CD95) receptor (TNF/NGF) superfamily)
FasL	: Fas ligandı
FLICE	: Kaspaz 8
FLIP	: FLICE-inhibitör proteini
G6P	: Glukoz-6 fosfat
G6PD	: Glukoz-6-fosfat dehidrojenaz
GCK	: Germinal merkezi kinaz (Germinal center kinase)
GCKR	: GCK ailesiyle ilişkili üyesi (GCK-related members of the GCK family)
GCL	: Glutamat-sistein ligaz
GGT	: Gamma-glutamil transferaz
GL	: Glukonolaktonaz
Glu	: Glutamat
Gly	: Glisin
GPx	: Glutasyon peroksidaz
GR	: Glutasyon redüktaz
GRX	: Glutaredoksin
GSH	: Glutasyon
GSS	: Glutasyon sentetaz
GSSG	: Glutasyon disülfid
GST	: Glutasyon-S-transferaz
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksid
HEPES	: (4-(2-Hidroksietil) piperazin-1-etansülfonik asid
HIF1 α	: Hipoksi uyarıcı faktör-1 alfa
HtrA2	: Yüksek sıcaklık ile ilişkili A2 (High-temperature-regulated A2)
IAP	: Apoptozis protein inhibitörü (inhibitor of apoptosis protein)
ICAD	:Kaspazla-aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörü (inhibitor of caspase- activated deoxyribonuclease)
ICAM-1	: Hücrelerarası adezyon molekülü-1
ICE	: İnterlökin 1- β dönüştürücü enzim

IL	: İnterlökin
ILP2	: IAP-benzeri protein 2 (IAP-like protein 2)
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
JNK	: c-Jun NH ₂ - terminal kinaz (c-Jun N-terminal kinases)
MAPK	: MAP kinazlar (Mitogen-aktive edici protein kinazlar)
MCP	: Monosit kemotaktik protein-1
MEK	: Mitojen ekstraselüler sinyal regüle edici kinaz
MEKK1	: MAPK/ERK kinaz kinaz-1
MetO-R	: Metiyonin sülfoksidin R epimeri
MetO-S	: Metiyonin sülfoksidin S epimeri
MKK	: MAPK kinaz
ML-IAP	: Melanoma IAP
Mn-SOD	: Manganez süperoksit dismutaz
Msr	: Metiyonin sülfoksid redüktaz
NADPH	: β -Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat, indirgenmiş şekli
NAIP	: Nöronal apoptosiz inhibitor proteini
NF- κ B	: Nükleer faktör- κ B (nuclear factor- κ B)
NIK	: Nükleer faktör- κ B indükleyici kinaz (NF- κ B inducing kinase)
NO	: Nitrik oksit
O ₂ ⁻	: Süperoksit anyon radikali
p38	: p38 kinaz
p53	: Tümör supresör gen ürünü bir protein
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
PARP	: Poli (ADP-riboz) polimeraz
PDGF	: Trombositten türeyen büyüme faktörü
PI3K	: Fosfoinozid- 3-kinaz
PKC	: Protein kinaz C
pRb	: Retinoblastoma proteini
Pro	: Prolin
Prx	: Peroksiredoksin
PUFA	: Çoklu doymamış yağ asitleri
R5P	: Ribuloz-5-fosfat
Ref-1	: Nükleer redoks faktörü

ROT	: Reaktif oksijen türleri
R-S ₂	: Disülfid
R-SH	: Redüklenmiş tiyol
SAPK	: Stres aktive edici protein kinaz (Stress-activated protein kinase)
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
Se	: Selenyum
Smac	: İkinci kaspazların mitokondrial aktivatörü (Second mitochondrial activator of caspases)
STAT	: Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü (Signal transducer and activator of transcription)
TE	: Tris-EDTA
TEMED	: Tetrametiletilediamin
TGF β	: Transforme edici büyüme faktörü- β
TNF	: Tümör nekroz faktörü (tumor necrosis factor)
TNFR1	: Tümör nekroz faktör reseptörü-1 (tumor necrosis factor receptor-1)
TNFR-2	: Tümör nekroz faktör reseptörü-2 (tumor necrosis factor receptor-2)
TP53	: Tümör protein TP53
TRADD	: Tümör nekroz faktör ilişkili ölüm alanı (Tumour necrosis factor receptor-associated death domain)
TRAFs	: Tümör nekroz faktörü ilişkili faktörler (Tumor necrosis factor receptor associated factors)
Trp	: Triptofan
Trx (TXN _{red})	: Redüklenmiş tiyoredoksin
TrxO(TXN _{ox})	: Okside tiyoredoksin
TrxR(TXNRD)	: Tiyoredoksin redüktaz
VCAM-1	: Vasküler hücre adezyon molekülü-1
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
VSMCs	: Vasküler düz kas hücreleri
XAF1	: X-bağılantılı IAP ilişkili faktör-1
XIAP	: X-kromozom bağlantılı-IAP

ÖZET

Acar, E. (2013). Midye (*Mytilus galloprovincialis* Lam.) Hepatopankreasından Tioredoksin Redüktaz Enziminin Saflaştırılması ve Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.

Tioredoksin redüktaz (TrxR, EC 1.6.4.5), tioredoksinin (Trx) indirgenmesini katalizleyen homodimerik bir flavoenzimdir. TrxR'nin DNA sentezi, redoks sinyali, antioksidatif savunma, selenyum metabolizması ve apoptozun düzenlenmesi gibi birçok hücrel fonksiyonları vardır.

Tioredoksin redüktaz, bakteri, bitki ve memeliler gibi birçok türden saflaştırılmasına rağmen, bugüne kadar *M. galloprovincialis* Lam. hepatopankreasından TrxR'nin saflaştırılmasına ilişkin bir bilgi literatürde yer almamaktadır. Bunu göz önünde bulundurarak bu çalışmada *Mytilus galloprovincialis* L. midye türünün hepatopankreas ham ekstresinden enzimin saf olarak elde edilmesi ve bazı kinetik özelliklerinin incelenmesi amaçlandı.

Yenikapı'daki Su Ürünleri Hali'nden alınan midyelerin kabukları çıkartıldıktan sonra hepatopankreas dokusu ayrılarak homojenize edildi. Tioredoksin redüktaz aktivitesi gösteren fraksiyon, midye hepatopankreas homojenizatının santrifüje edilmesiyle elde edilen ham ekstreden % 80 amonyum sülfat konsantrasyonunda çöktürülmesi suretiyle ayrıldı, diyaliz edildi ve ilk önce DEAE-Sefaroz CL-6B anyon değiştirici kolonundan 10 mM TE tamponu (pH 7,5) ile daha sonra 2',5'-ADP-agaroz kolonundan 400 mM NaCl içeren 10 mM TE tamponu (pH 7,5) ile elüe edilerek saflaştırıldıktan sonra bazı kinetik özellikleri incelendi.

Enzimin en yüksek aktivitesini pH 7,0 değerinde gösterdiği, optimum temperaturünü ise 60 °C olduğu belirlendi, NADPH ve DTNB'e karşı gösterdiği en yüksek reaksiyon hızının (V_{max}) sırasıyla 4,82 $\mu\text{mol/dak/mg}$ ve 1,32 $\mu\text{mol/dak/mg}$, K_m değerinin ise sırasıyla 85 μmol ve 193 μmol olduğu bulundu.

Anahtar kelimeler: tioredoksin redüktaz, *Mytilus galloprovincialis*, enzim saflaştırması, kinetik özellikler.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 27103

ABSTRACT

Acar, E. (2013). Purification of Thioredoxin Reductase from the Hepatopancreas of the Mollusc (*Mytilus galloprovincialis* Lam.) and Investigation of its Kinetic Properties. Istanbul University, Institute of Health Sciences, Faculty of Pharmacy, Department of Biochemistry, Master of Science Thesis, Istanbul.

Thioredoxin reductase (TrxR, EC 1.6.4.5) is a homodimeric flavoenzyme that catalyzes the reduction of thioredoxin (Trx). TrxR is involved in many cellular functions including DNA synthesis, redox signaling, antioxidative defence, selenium metabolism and regulation of apoptosis.

Although TrxR has been purified and characterized from different bacteria, plants and mammalian organisms, a survey of the literature revealed that no studies on the purification and characterization of TrxR from mussel (*Mytilus galloprovincialis* Lam.) have been undertaken. Accordingly, our objective was to isolate and highly purify the enzyme from the hepatopancreas tissue of *Mytilus galloprovincialis* Lam. and examine some of its kinetic properties.

After removing the shells of the mollusc bought from Su Ürünleri Hali in Yenikapi seaboard, the hepatopancreas tissue was separated and homogenized. The crude extract of the hepatopancreas tissue obtained by centrifugation was precipitated at 80 % ammonium sulphate concentration. The fraction applied on DEAE-Sepharose CL-6B column was eluted with 10 mM TE buffer pH (7,5) and further purified by elution with 400 mM NaCl in 10 mM TE buffer (pH 7,5) on 2',5'-ADP-agarose chromatography column. Kinetic properties of the purified enzyme were investigated.

Optimum pH and temperature were found to be 7,0 and 60°C, respectively. K_m and V_{max} for NADPH were found to be 85 μmol and 4,82 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$, respectively, K_m and V_{max} for DTNB were found to be 193 μmol and 1,32 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ respectively.

Key Words: thioredoxin reductase, *Mytilus galloprovincialis* Lam., enzyme purification, kinetic properties.

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No.27103

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser hücrelerinin, kontrolsüz çoğalması, farklılaşmanın bloke edilmesi, azalmış apoptoz, değişmiş doku yapısı gibi karakteristik özellikleri dolayısıyla kanser yolaklarının aktivitesi artar veya inaktive olur. Bazı "kanser yolakları" spesifik bir kanser türüne dahil olurken, diğerleri habis tümörlerin geniş bir aralığında kritik rollere sahip olabilirler. Bu yolaklar aynı zamanda normal hücrelerin de akıbetini, yaşamını, çoğalmasını, farklılaşmasını ve fonksiyonunu düzenleyen sistemlerdir. Bir "kanser yolağı", en azından bir kanser türünün gelişimi için bir genetik veya epigenetik mutasyonla aktivasyonu veya inaktivasyonunda gerekli olan bir hücresel regülatör sistemdir. Tipik olarak kanser yolakları bir kanser tipine veya farklı kanser tiplerine sahip bireylerde aynı regülatör sistemlerin farklı komponentlerindeki değişimlerle ortaya çıkabilirler. Bunlar fosfoinozitid 3-kinaz (PI3K) yolağı, protein kinaz-C (PKC) yolağı, sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü (STAT) yolağı, nükleer faktör κ -B (NF κ B) yolağı ve transforme edici büyüme faktörü- β (TGF β) yanıt yolağı ile bağlantılı olan mitojen aktive edici protein kinaz (MAPK) yolağı, tümör protein-53 (TP53) regülatör sistemi ve retinoblastoma proteini (RB1) etrafında yoğunlaşmış olan hücre döngüsü regülatör ağından oluşmaktadır. Bu yolakların hepsi birbiri ile etkileşim halindedir (Pazarbaşı ve ark. 2011).

Kanser gelişiminde önemli bir rolü olduğu son zamanlarda ortaya atılan tiyoredoksin sisteminin de bu yolakların üzerinde etkili olduğu ileri sürülmüştür. Teorik olarak, tiyoredoksin sistemi, kanser hücrelerinde normalden fazla salınarak fonksiyonlarındaki artma nedeniyle, ribonükleotid redüktaz enzim sistemlerine elektron vericiliği yapar ve mutajenik, dengesiz dinükleotid protein yapılarının artmasına neden olur. Bu biyolojik dengenin, belirgin genetik değişimlere yol açarak doku büyüme kontrolünün tamamen kaybı ve tedaviye direnç gelişimi ile sonuçlandığı düşünülmektedir (Arnér ve Holmgren 2006). Tüm bu reaksiyonlar sonucunda habis fenotip gelişimi hızlanabilir.

Tiyoredoksin redüktaz, bakteri, bitki ve memeliler gibi birçok türde bulunan bir redoks proteindir (Luthman ve Holmgren 1982; Williams 1995; Horecká ve ark. 1998; Watabe ve ark. 1999; Maggioli ve ark. 2004; Yang ve Ma 2010).

Mytilus galloprovincialis Lam.'ın dahil olduğu Mollusca filumunun Bivalvia (iki kabuklular) sınıfı içinde yer alan *Mytilidae* familyası geniş bir yayılım alanına sahiptir. Bu familyanın en önemli türlerinden olan *Mytilus galloprovincialis* Lam. (kara midye veya Akdeniz midyesi) ülkemiz kıyılarında yaygın olarak bulunmaktadır (Tosyalı 2005).

M. galloprovincialis Lam. hepatopankreasından tiyoredoksin redüktazın saflaştırılmasına ilişkin bir bilgi literatürde yer almamakla birlikte adı geçen türde hepatopankreas dokusu ekstresi ile yapılan bir çalışmada tiyoredoksin redüktaz aktivitesinin deniz kirliliği göstergesi olarak arttığı saptanmıştır (Sureda ve ark. 2011).

Bu çalışmanın amacı, literatürde pek az araştırılmış olan *Mytilus galloprovincialis* L. hepatopankreas dokusu ham ekstresinden tiyoredoksin redüktazın (TrxR) sırayla amonyum sülfatla çöktürme, DEAE-Sefaroz CL-6B ve 2',5'-ADP-agarose affinite kromatografileri uygulanarak elde edilmesi ve ileri derecede saflaştırılarak bazı kinetik özelliklerinin incelenmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tioredoksin Sistemi

Laurent ve ark. 1964 yılında *E.coli*'de sitidin dezoksiribonükleotid sentezini kataliz eden ribonükleotid redüktaz için hidrojen verici olarak görev yapan tioredoksin sistemini (tioredoksin, tioredoksin redüktaz ve NADPH) keşfetmişler ve tioredoksin redüktaz enzimini yüksek derecede saflaştırarak, okside proteinlerin disülfid gruplarını redükleyen tioredoksinin redükte ditiyol formunun [Trx-(SH)₂] NADP-bağımlı bir yolla oksitleyerek disülfid formuna [Trx-(S-S)] dönüştüren ve siklusa geri katılmasını sağlayan tioredoksin redüktaz enzimini karakterize etmişlerdir. 108 amino asitten oluşan *E.coli* Tioredoksin-1 (Trx-1)'in amino asitlerin diziliş sırası 1968 yılında belirlenmiş ve proteinin karakteristik özelliği aktif bölgesindeki Cys-Gly-Pro-Cys motifinden ileri geldiği bildirilmiştir. Tioredoksinin üç boyutlu yapısı kristalografi ile 1975 yılında belirlenmiştir. Başlangıçta, deoksinükleotidlerin sentezi için gerekli olan ribonükleotid redüktaz enzimine hidrojen sağlayan tek proteinin Trx olduğu düşünülmüştür. Fakat *E.coli*'de tioredoksin-1 geni eksik olan hücrelerin geliştirilmesiyle ribonükleotid redüktaz için GSH-bağımlı hidrojen verici olan ve tioredoksinlerin fonksiyonlarıyla örtüşen glutaredoksinler keşfedilmiştir (Holmgren ve Lu 2010).

2.2. Tioredoksin Redüktaz

Tioredoksin redüktaz (TrxR, EC 1.6.4.5), glutatyon redüktaz, lipoamid dehidrojenaz, civa iyonu redüktaz ve tripanotion disülfid redüktaz enzimlerini kapsayan piridin nükleotid-disülfid oksidoredüktaz ailesine ait bir enzimdir. TrxR her altbiriminde bir redoks-aktif disülfid bağı ve sıkı bağlanmış FAD molekülü içeren, tioredoksinin indirgenmesini katalizleyen homodimerik bir flavoenzimdir (Williams 1992; Sandalova ve ark. 2001).

Bu ailenin bütün üyelerinin altbirimleri redoks aktif ditiyol/disülfid bağı içermektedir. Memeli TrxR'nin bütün altbirimleri FAD bağlama bölgesi, NADPH bağlama bölgesi ve yüzey etkileşim alanı içermektedir (Sandalova ve ark. 2001).

Tioredoksin redüktazlar birçok prokaryot ve ökaryot canlılarda karakterize edilmiştir. Arkeobakteri, prokaryot ve ilkel ökaryotlarda tioredoksin redüktazların

altbirim molekül ağırlığının 35 kDa olduğu ve yüzey domaini içermediği bulunmuştur (Tablo 2-1). Yüksek ökaryotlarda ise okside tiyoredoksinin yanında selenit, K₃ vitamini, lipoik asid, lipid hidroperoksidler gibi düşük molekül ağırlıklı bileşikler ile sitotoksik peptid NK-lizin, tümör supressör protein p53 gibi proteinleri ve bazı ekzojen maddeleri redükleyebilen çok geniş spesifisitesi olan, sitoplazmada 54 kDa'luk ve mitokondride 56 kDa'luk iki TrxR klonlanmıştır (Mustacich ve Powis 2000).

Tablo 2-1: Tiyoredoksin redüktazların bazı özellikleri (Williams ve ark. 2000).

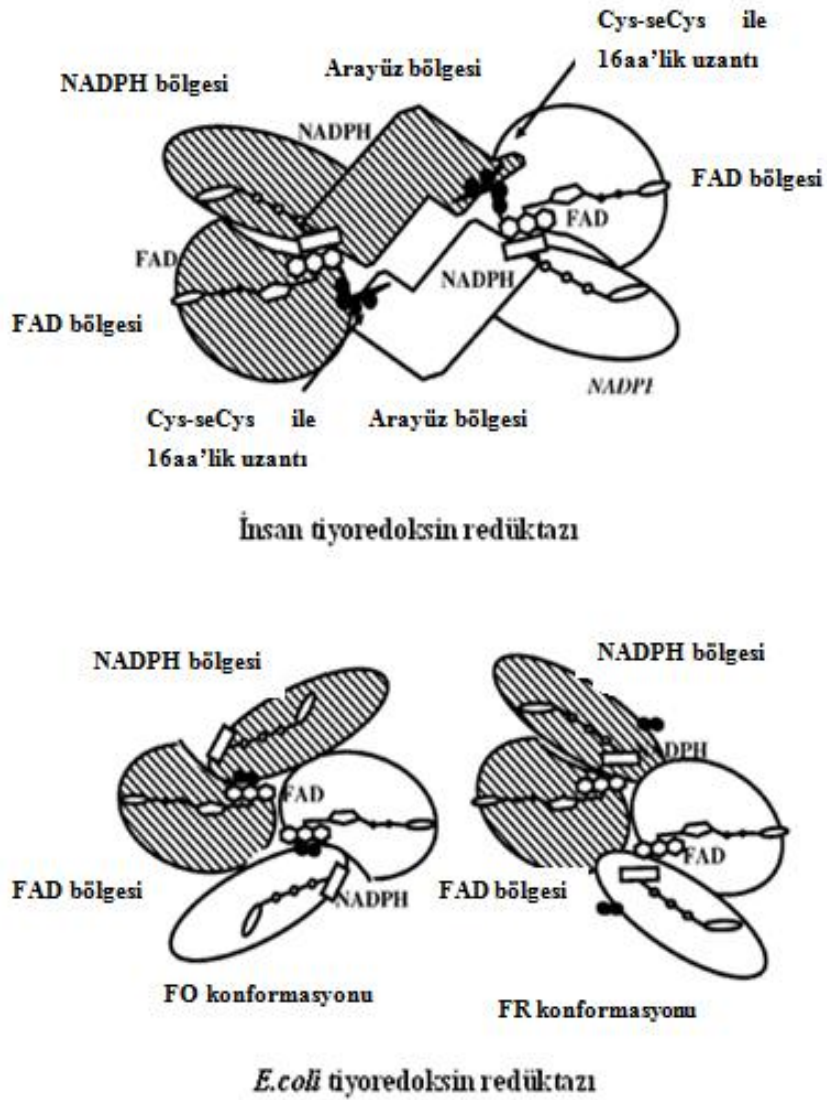
Yüksek molekül ağırlıklı TrxR

- A. Altbirim molekül ağırlığı 55 kDa civarında (insan ve *Plasmodium falciparum*)
 - B. Her altbirimde bir FAD, bir redoks-aktif disülfid ve insan TrxR'da selenilsülfid, *Plasmodium falciparum*'da ise disülfid olmak üzere üçüncü redoks aktif grubu içeren dimerik protein
-

Düşük molekül ağırlıklı TrxR

- A. Altbirim molekül ağırlığı 35 kDa civarında (*E.coli* ve diğer prokaryotlar, küf mantarı, mikoplazmalar, *Giardia duodenalis*, *Arabidopsis thaliana*, and *Methanococcus janaschii*)
 - B. Her altbirimde bir FAD ve bir redoks aktif grubu içeren dimerik protein
-

Hem prokaryot hem de ökaryot TrxR'ları redükleyici ekivalanları NADPH' tan redoks aktif disülfide kofaktör FAD aracılığı ile aktararak katalitik aktivite gösterirler. *E.coli* TrxR'ında NADPH bölgesi FAD bölgesine göre 66°'lik bir dönüş yaparak NADPH'nin nikotinamid halkası FAD bölgesinin izoalloksazin halkasına bağlanır. Bu şekilde elektronlar NADPH bölgesinden FAD bölgesine oradan da redoks aktif disülfid bölgesine aktarılır. Aktif merkezinin redüklenmesi sonucunda yüzeyinde meydana gelen konformasyonel değişiklik redüklenmiş disülfitin okside tiyoredoksin ile temasını kolaylaştırır (Şekil 2-1) (Mustacich ve Powis 2000).



Şekil 2-1: *E.coli* ve insan tiyoredoksin redüktazın yapısı (Mustacich ve Powis 2000).

Memeli Trx izoenzimleri katalitik fonksiyonlarını sürdürmek için selenoprotein olan selenosistein kalıntılarına ihtiyaç duyar. Bu da, Trx'in bütün fonksiyonları selenyuma bağlıdır anlamına gelir. Bu nedenle selenyumun besinsel seviyesindeki büyük değişimler Trx sisteminin fonksiyonlarını bütünüyle etkiler.

Memeli tiyoredoksin redüktaz, glutatyon redüktaza homolog olan ve C terminalinin uzantısında Gly-Cys-SeCys-Gly dizisinden oluşan selenosistein kalıntısını içeren bir homodimerdir. Kimyasal modifikasyon ve peptid dizileme yöntemleri kullanılarak okside enzimin iki flavin olmayan redoks merkezi içerdiği bulunmuştur; biri glutatyon redüktazın aktif merkezine benzer olan ve disülfid şeklindeki Cys⁵⁹-Val-

Asn-Val-Gly-Cys⁵⁴ dizisinden, diğeri ise kütle spektrometrisi yöntemi ile de kanıtlanmış olan ve selenosülfid şeklindeki Cys⁴⁹⁷-SeCys⁴⁹⁸ dizisinden oluşur. NADPH tarafından redüklenmiş enzimde bu iki merkez sırasıyla ditiyol ve selenotiyol şeklindedirler. Glutasyon redüktaz (GR) yapısı gözönünde bulundurularak, TrxR oluşturan iki monomerden birinin C-terminal Cys⁴⁹⁷-SeCys⁴⁹⁸ kalıntısının diğeri monomerin Cys⁵⁹ ve Cys⁶⁴ kalıntısına yakın bulunduğu ileri sürülmüştür (Sandalova ve ark. 2001).

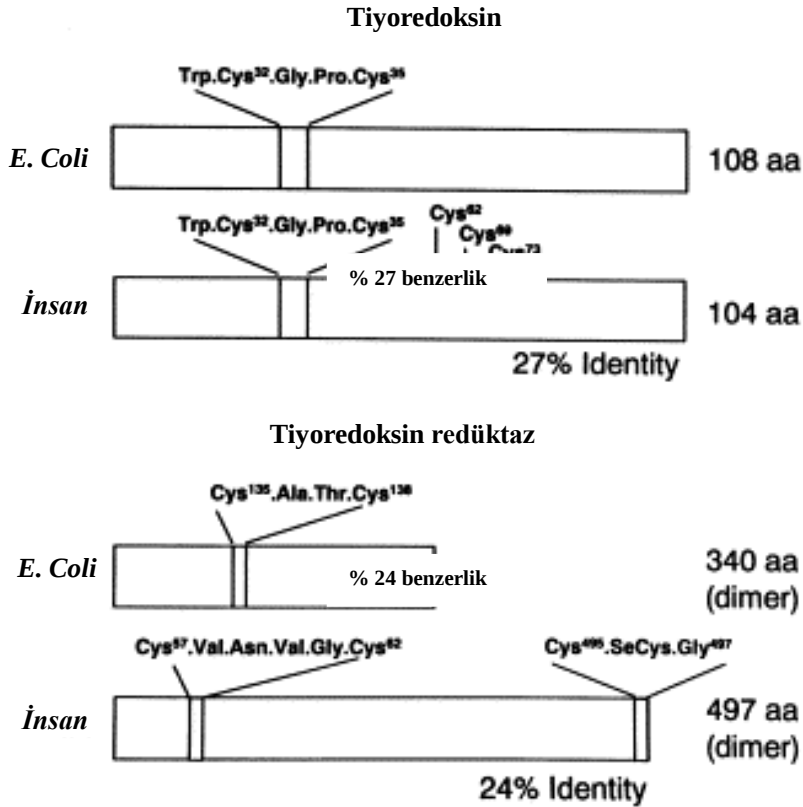
Zhong ve ark. (2000) Edman parçalama ve kütle spektrometresi yöntemlerini kullanarak okside sığır TrxR'ın C-terminal SeCys kalıntısı komşu Cys kalıntısı ile selenilsülfid oluşturduğu ve enzimin aktif merkezindeki selenosülfidin selenotiyol formu, tiyoredoksinin ve DTNB gibi enzimin aktivite tayininde kullanılan substratların redüksiyonunda görev aldığı sonucuna varmışlardır. Se-Cys-Cys dipeptidi içermeyen veya SeCys kalıntısı yerine redoks-inaktif Ser içeren enzimin inaktif olduğu bildirilmiştir.

2.3. Tiyoredoksinin Yapısı

Tiyoredoksin (Trx) geni, ilk olarak *Escherichia coli*'de bulunmuştur (Holmgren 1968). Tiyoredoksinler birçok prokaryot ve ökaryot canlılarda karakterize edilmiştir (Holmgren 1985; Gleason ve Holmgren 1988). Tiyoredoksinler Trp-Cys³²-Gly-Pro-Cys³⁵ katalitik bölümü içeren ve iki sistein grubu dönüşümlü oksidasyon/redüksiyona uğrayan 10-12 kDa'luk multifonksiyonel proteinlerdir.

Memeli Trx'in iki temel şekli klonlanmıştır. Trx-1 tipik olarak sitoplazmada, ayrıca normal endometriyal stromal hücrelerin, tümör hücreleri ve primer solid tümörlerin çekirdeğinde bulunan 104 amino asitli bir proteindir. Trx-1 proteini kromozom 9q32 üzerindeki *TXN* geni tarafından kodlanmaktadır. Trx-2 mitokondride bulunan 166 amino asitli bir proteindir. Trx-2 proteini kromozom 22q13.12 üzerindeki *TXN2*, MT-*TXN* geni tarafından kodlanmaktadır.

Şekil 2-2'de insan ve *E.coli* Trx, TrxR'ın benzerlikleri karşılaştırılmıştır (Arnér ve Holmgren 2000b).

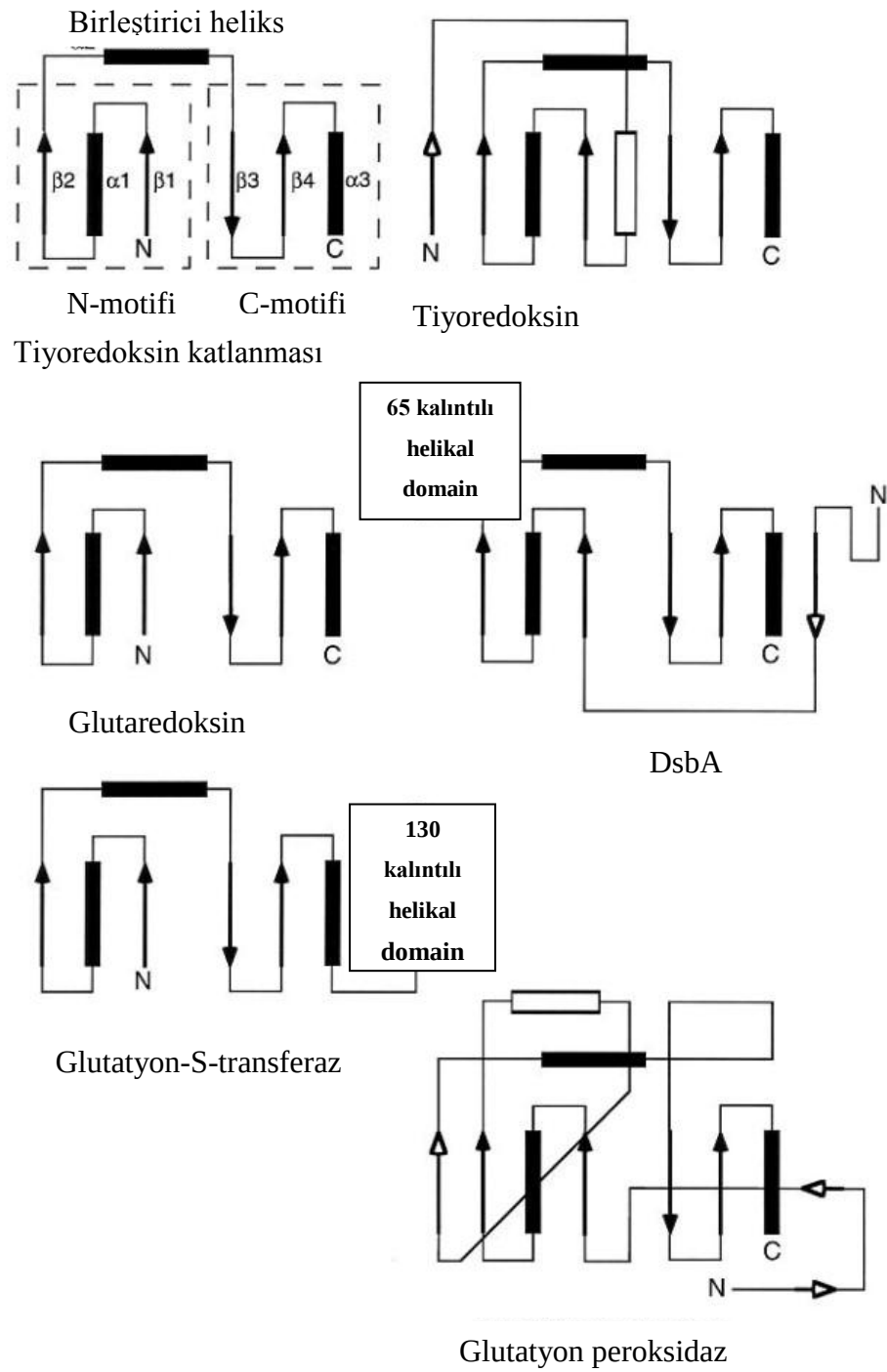


Şekil 2-2: İnsan ve *E.coli* Trx ve TrxR'ların karşılaştırılması (Powis ve Montford 2001)

2.4. Tiyoredoksin Katlanması

Tiyoredoksinler, glutaredoksinler, DsbA, protein disülfid izomeraz, glutatyon S-transferaz ve glutatyon peroksidazdan oluşan 6 protein sınıfının dizilerinin belirlenmesi, birbirleri arasında yakın bir yapısal benzerlik olmadığını ve 6 proteinin tümünde ortak olan katalitik ve biyolojik fonksiyon bulunmadığını göstermiştir. Biyolojik fonksiyon benzerliği bulunan tiyoredoksin (Cys - Gly - Pro - Cys), glutaredoksin (Cys - Pro - Tyr - Cys) ve DsbA (Cys - Pro - His - Cys) protein sınıflarında aktif bölgedeki iki sistein arasındaki amino asitler oldukça belirgindir (Martin 1995). Tiyoredoksin, glutaredoksin, DsbA ve protein disülfid izomerazlar Cys – X – X - Cys (X olarak gösterilen herhangi bir amino asit) aktif bölge motifi içeren redoks proteinleridir.

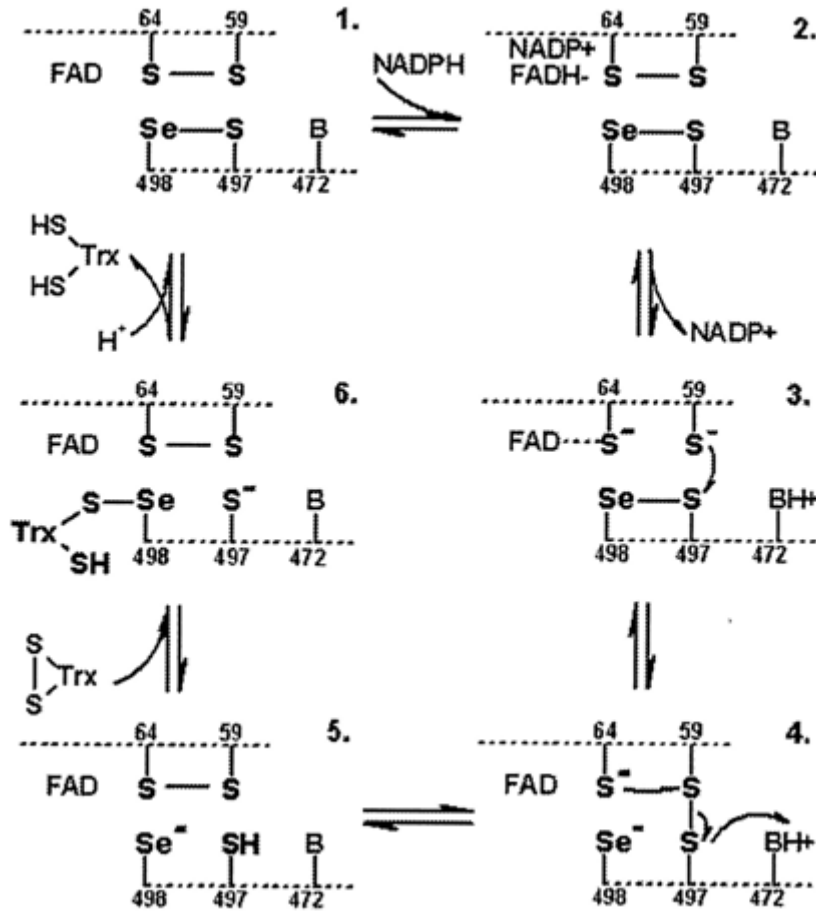
Diğer iki protein sınıfı, glutatyon transferaz ve glutatyon peroksidaz, Cys – X – X - Cys motifini içermedikleri zaman glutaredoksinler gibi sistein içeren glutatyon substratı ile spesifik olarak etkileşirler (Arnér ve Holmgren 2000b).



Şekil 2-4: Tiyoredoksin katlanmasını içeren proteinler (Martin 1995)

2.5. Tiyoredoksin Redüktazın Etki Mekanizması

Sandalova ve ark. 2001'de memeli tiyoredoksin redüktaz için Şekil 2-5'te gösterilen etki mekanizmasını önermişlerdir. NADP'ın redüksiyonunu ve yüklü ara ürününün oluşumunu kapsayan birinci basamak GR ve TrxR içi ortaktır ve Se-Cys-Gly dipeptid varlığına bağlı değildir. Reaksiyonun ikinci basamağında ise, okside enzimdeki Cys-497 ve SeCys-498 arasındaki selenildisülfid bağı NADPH tarafından redüklenir. Sandalova ve ark. 2001, memeli TrxR'deki korunmuş Cys-497-Se-Cys-498 motifinin ikinci redoks merkezi olarak görev gördüğü ve elektronların redoks-aktif disülfid'ten substrata C-terminaldeki aktif merkezi aracılığı ile aktarılabilceğini ileri sürmüşlerdir. Bu esnada meydana gelen konformasyon değişikliği ile C-terminal Cys-59-Cys-64, redoks-aktif disülfidine yaklaşıp Cys-59 ve Cys-497 arasındaki mesafenin 12 Å'tan 3 Å'a kısaldığını göstermişlerdir.



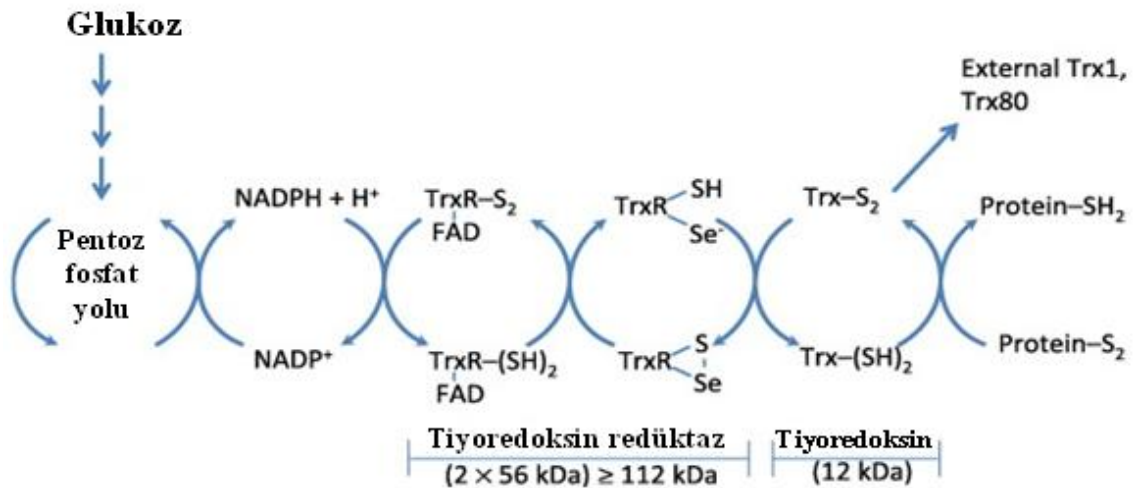
Şekil 2-5: Memeli tiyoredoksin redüktazın etki mekanizması (Sandalova ve ark. 2001)

2.6. TrxR/ Trx Sisteminin Biyolojik Aktiviteleri

Trx ve TrxR, büyümenin kolaylaştırılması, apoptoz ve hücre korunması gibi birçok hücre içi olayda görev alan redoks aktif proteinlerdir (Tandoğan ve Ulusu 2011).

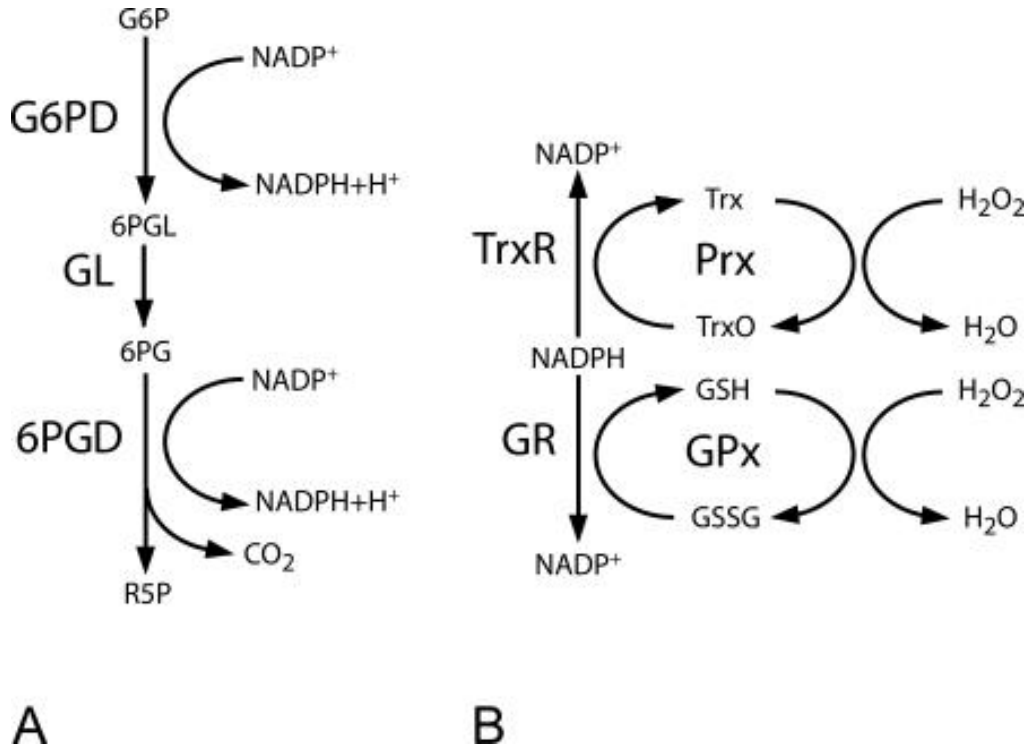
2.6.1. DNA Sentezindeki Rolü

TrxR/Trx sistemi (Şekil 2-6), DNA üretimi için gerekli olan deoksiribonükleotid sentezinde görevlidir. Bu işlemi, deoksiribonükleotid sentezini katalizleyen ribonükleotid redüktaza elektron sağlayarak gerçekleştirir.



Şekil 2-6: Tiyoredoksin Sistemi (tiyoredoksin, tiyoredoksin redüktaz ve NADPH) tarafından kataliz edilen redoks reaksiyonları (Holmgren ve Lu 2010).

TrxR aktivitesi, oksidatif heksozmonofosfat siklusunun hız azaltıcı enzimi olan glukoz-6-fosfat dehidrojenaz (G6PD) ile üretilen NADPH tarafından düzenlenir (Şekil 2-7).

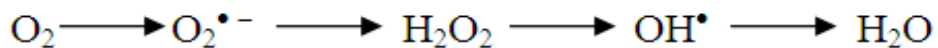


Şekil 2-7: Oksidatif heksozmonofosfat siklusuna TrxR'nin etki mekanizması (Peters ve Van Noorden 2009).

A. Oksidatif heksozmonofosfat siklusunun hız azaltıcı enzimi olan glukoz-6 fosfat dehidrojenaz'ın etkisi ile NADPH'nin üretimi. **B.** H₂O₂ detoksifikasyonunda görev alan redüklenmiş Trx ve glutatyon oluşumu için NADPH'nin kullanımı. (6PG: 6-fosfoglukonat, GR: glutatyon redüktaz, 6PGD: 6-fosfoglukonat dehidrojenaz, GSH: glutatyon, 6PGL: 6-fosfoglukonat, GSSG: glutatyon disülfid, G6P: glukoz-6 fosfat, Prx: peroksiredoksin, G6PD: glukoz-6-fosfat dehidrojenaz, R5P: ribuloz-5-fosfat GL: glukonolaktonez, Trx: redüklenmiş tiyoredoksin, GPx: glutatyon peroksidaz, TrxO: okside tiyoredoksin, TrxR: tiyoredoksin redüktaz).

2.6.2. Tiyoredoksin Sistemi ve Oksidatif Stres

Tüm diğer aerobik canlılar gibi, yaşamak için oksijene ihtiyaç duyan insanlar da, enerji gereksinimini, oksidatif metabolizma yani aerobik metabolizma tarafından kontrol edilen reaksiyonlar sonucu elde eder. Aerobik organizmalarda oksijen kullanımının doğal sonucu olarak **reaktif oksijen türleri (ROT)** meydana gelir (Şekil 2-8)



Şekil 2-8: Normal metabolizma sonucunda oluşan serbest oksijen radikalleri (Ames ve ark. 1993)

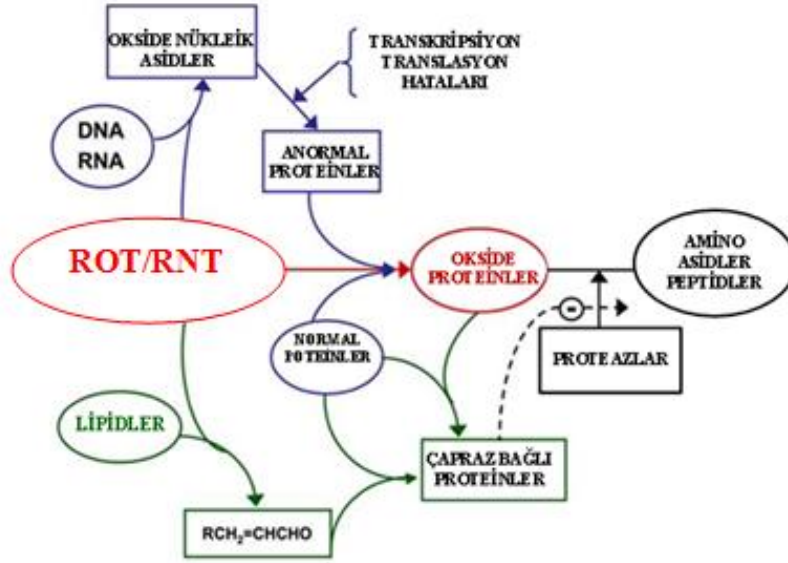
Son yıllarda yapılan çalışmalar, artmış serbest oksijen radikallerin birçok hastalığın patogeneğinde rol aldığını göstermektedir. Miyokard enfarktüsü gibi kardiyolojik hastalıklar, nörolojik hastalıklar, astım, diabetes mellitus, romatoid artrit gibi romatolojik hastalıklar, kanser ve yaşlanma dahil birçok hastalığın oksidatif stres ile ilişkisi gösterilmiştir (Rahman 2007; Valko ve ark. 2007).

ROT'ların etkilerini ve oluşum yollarına yol açan etkenleri daha iyi anlamak ve bu radikalleri yok edip vücudu zararlı etkilerinden korumak amacıyla yeni metodların geliştirmesi, gelecekte oksidatif stres ile ilişkili hastalıkların ve yaşlanmanın temelinde yatan nedenlerin araştırılmasında büyük önem taşımaktadır. Hava kirliliği, radyasyon gibi bazı sebeplerden oluşan ROT türleri Tablo 2-2'de gösterilmiştir.

Tablo 2-2: *In vitro* ve *in vivo* olarak oluşan reaktif oksijen türleri (Stadtman 2004).

Nedenleri	ROT
Hava kirliliği	CO; ozon; NO ₂
Elektron taşıma zincirinin yan ürünleri	O ₂ ^{•-}
Radyasyon (X,γ,UV)	O ₂ ^{•-} ; OH [•] ; ¹ O ₂
Fenton reaksiyonu	OH [•] ; H ₂ O ₂ ; Ferril iyonu
İnflamasyon (Nötrofil ve makrofajlar)	O ₂ ^{•-} ; H ₂ O ₂ ; OCl ⁻ ; NO; ONOO ⁻
Oksidazlar	H ₂ O ₂
Arginin metabolizması	NO

Serbest radikaller antioksidan sistemlerin yetersiz kalması durumunda DNA, protein ve lipid makromoleküllerinin oksidasyonuna neden olurlar. Oksidatif strese bağlı olarak oluşan *in vivo* DNA ve protein hasarının lipidlerdeki hasardan daha önemli olduğu ileri sürülmektedir. Reaktif oksijen türlerinin üretimine neden olan tüm reaksiyonlar ve ajanlar protein oksidasyonuna yol açabilmektedir (Büyükgözel 2013). Proteinlerin ROT'lar tarafından oksidasyona uğrama yolları Şekil 2-9'da gösterilmiştir.



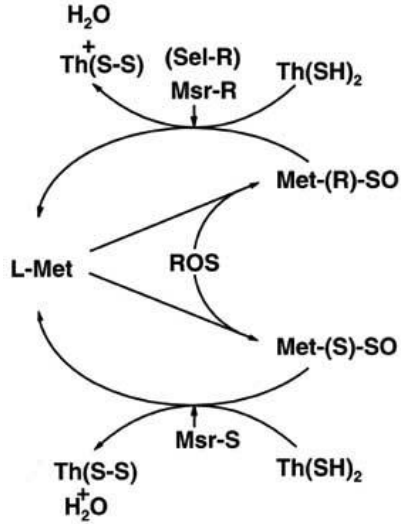
Şekil 2-9: ROT'ların sebep olduğu okside proteinlerin oluşum yolları (Stadtman 2004).

ROT'lar çok reaktiftir ve hücreiçi proteinleri ve nükleik asidleri okside ederek fizyolojik önemi olan birçok enzimin yapı ve fonksiyonlarını geri dönüşümsüz olarak değiştirebilirler. Oksidatif hasara uğrayan nükleik asidlerin birçok tamir mekanizmaları bilinirken okside proteinleri tamir eden benzer mekanizmalar her zaman mevcut değildir. Normal fizyolojik şartlar altında, oksidatif hasara uğrayan proteinler proteoliz ile uzaklaştırılmaktadır. Bu nedenle hücredeki oksidatif hasara uğramış proteinlerin miktarı proteolizin azaldığı durumlarda artmaktadır.

Serbest radikallerin proteinlerdeki sülfür içeren amino asitlerin tiyol (-SH) gruplarının oksidasyonuna yol açtığı ve bunun da protein oksidasyonunun en erken gözlenebilen belirtisi olduğu bilinmektedir. Sistein amino asidinin -SH grubu oksidatif atağa oldukça yatkındır ve -SH gruplarından değişik mekanizmalarla oluşan tiyil radikali (-S[•]) proteinlerdeki disülfid bağlarının oluşumuna öncülük eder (Büyükgüzel 2013).

Metiyoninin oksidasyonu sonucunda oluşan metiyonin sülfoksidin R- ve S- epimerleri (MetO-R ve MetO-S) proteinlerin biyolojik aktivitelerini etkileyebilir. Metiyonin sülfoksid birçok bakteri ve hayvan dokusunda bulunan ve redükte ditiyol tiyoredoksini [Trx-(SH)₂] kullanan metiyonin sülfoksid redüktaz tarafından tekrar fonksiyonel metiyonine dönüşür, meydana gelen okside disülfid [Trx-(S-S)] tiyoredoksin ise tiyoredoksin redüktaz enzimi tarafından NADP-bağımlı bir yolla ditiyol

tiyoredoksine [Trx-(SH)₂] redüklenerek siklusa geri katılır. Bu şekilde oluşan bir siklik oksido-redüksiyon antioksidan sistemi oksidatif strese maruz kalan hücreleri korur (Şekil 2-10) (Stadtman 2004).



Şekil 2-10: Metiyoninin ve metiyonin sülfoksidin R- ve S- izomerlerinin birbirine dönüşmesi siklusu (Stadtman 2004)

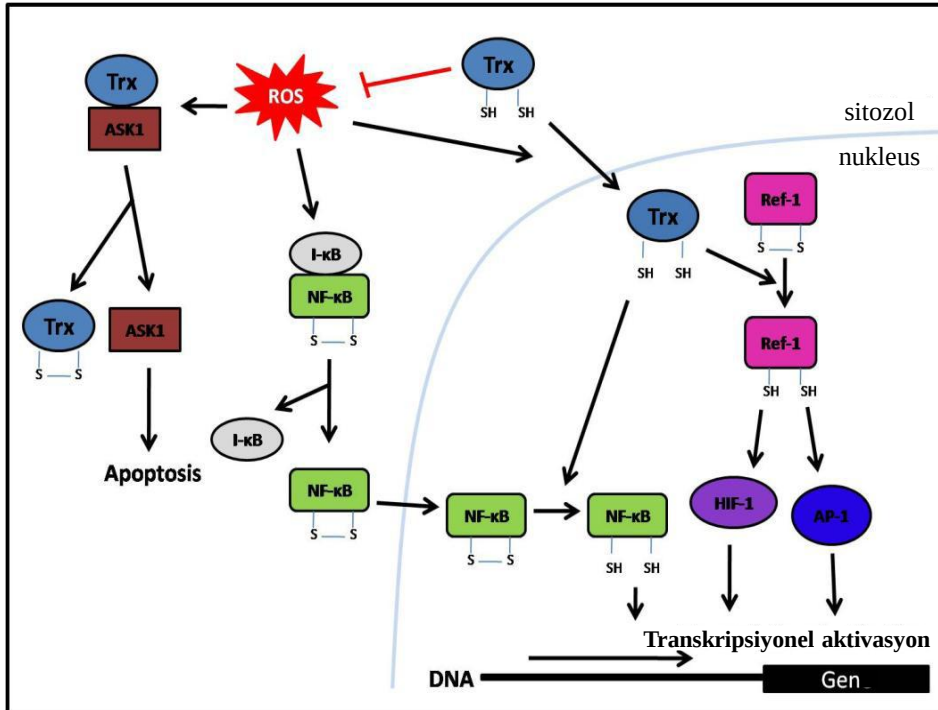
2.6.3. Tiyoredoksinlerin Metiyonin Sülfoksidi İndirgeme Kapasiteleri

Koç ve ark. (2006) genomundan TrxR 1, Trx 1 ve Trx 2 genleri çıkartılmış maya (*Saccharomyces cerevisiae*) hücrelerinin metiyonin sülfoksit indirgeme kapasitelerini incelemiştir. İki tiyoredoksini aynı anda çıkartılmış mutant hücreler metiyonin sülfoksiti indirgeyip metiyonin oluşturmazken, Trx-1 geni çıkartılmış hücrelerin metiyonin oluşturabildikleri görülmüştür. Bu, maya mantarında metiyonin sülfoksit redüktazlar için gerekli olan elektronların tiyoredoksinlerden sağlandığını göstermektedir. Ayrıca metiyonin sülfoksitin indirgenmesi için gerekli olan elektronların TrxR-1 olmadan NADP'den tiyoredoksine transfer edilebileceği bildirilmiştir. Aynı sonuç sülfatın indirgenip metiyonin sentezinde kullanılmasında rol oynayan 3-fosfoadenozin 5-fosfosülfat redüktaz enzim aktivitesi için de gözlenmemiştir. Her iki deneyin sonuçlarına göre, TrxR'ın yokluğunda tiyoredoksinler için gerekli olan elektronların ikinci bir donör tarafından sağlandığına dair deliller sunulmuştur.

2.6.4. Transkripsiyon Faktör Aktivitelerinin (Nf-κB, Nükleer reseptör, AP-1) Uyarılması

Oksidatif strese Nükleer faktör- κB (NF-κB) transkripsiyonu ve aktivator protein-1 (AP-1) yanıtları aktive olmaktadır. Bu da NF-κB ve mitojen aktive protein kinaz sinyallerine yol açarak, mitokondri veya NADPH fonksiyonlarını değiştirmekte ve pro-inflamatuar sitokinlerin (örn: TNF-a, IL-8 ve IL-6) ve adezyon moleküllerini kodlayan genlerin ekspresyonunu artırmaktadır. Herhangi bir artmış inflammatuar yanıt ek ROT oluşumuna ve ek oksidatif DNA hasarına yol açmaktadır (Romieu ve ark. 2008).

Trx, NF-κB, AP-1 ve AP-2 gibi bir dizi transkripsiyon faktörünün ve glukokortikoid ve östrojen gibi nükleer reseptörlerinin DNA-bağlama aktivitesini artırır. Tiyoredoksinlerin NF-κB transkripsiyon faktörünün transkripsiyonel aktivitesini NF-κB p50 altbirimindeki Cys62'yi redüklemek suretiyle yükselttiği bildirilmiştir. Ek olarak başka bir transkripsiyon faktörünün (AP-1) DNA bağlama aktivitesini nükleer redoks faktörü (ref-1)'ne bağlanarak dolaylı olarak arttırdığı bildirilmiştir (Yamawaki ve ark. 2003) (Şekil 2-11).



Şekil 2-11: Tiyoredoksin ve transkripsiyon faktörlerinin redoks sinyal transdüksiyonu (Karlenius ve Tonissen 2010)

2.6.5. Tiyoredoksin Sistemi ve Hücre Çoğalmasının Uyarılması (Apoptozun İnhibisyonu)

Etki mekanizması tam olarak bilinmemesine rağmen, Trx-1'e maruz bırakılan lenfositlerin, fibroblastların ve birçok lösemik tümör serilerinin büyüme hızında artış bildirilmiştir (Powis ve ark. 1998; Powis ve Montford 2001).

2.6.5.1. Apoptozisin İndüklenme Mekanizması

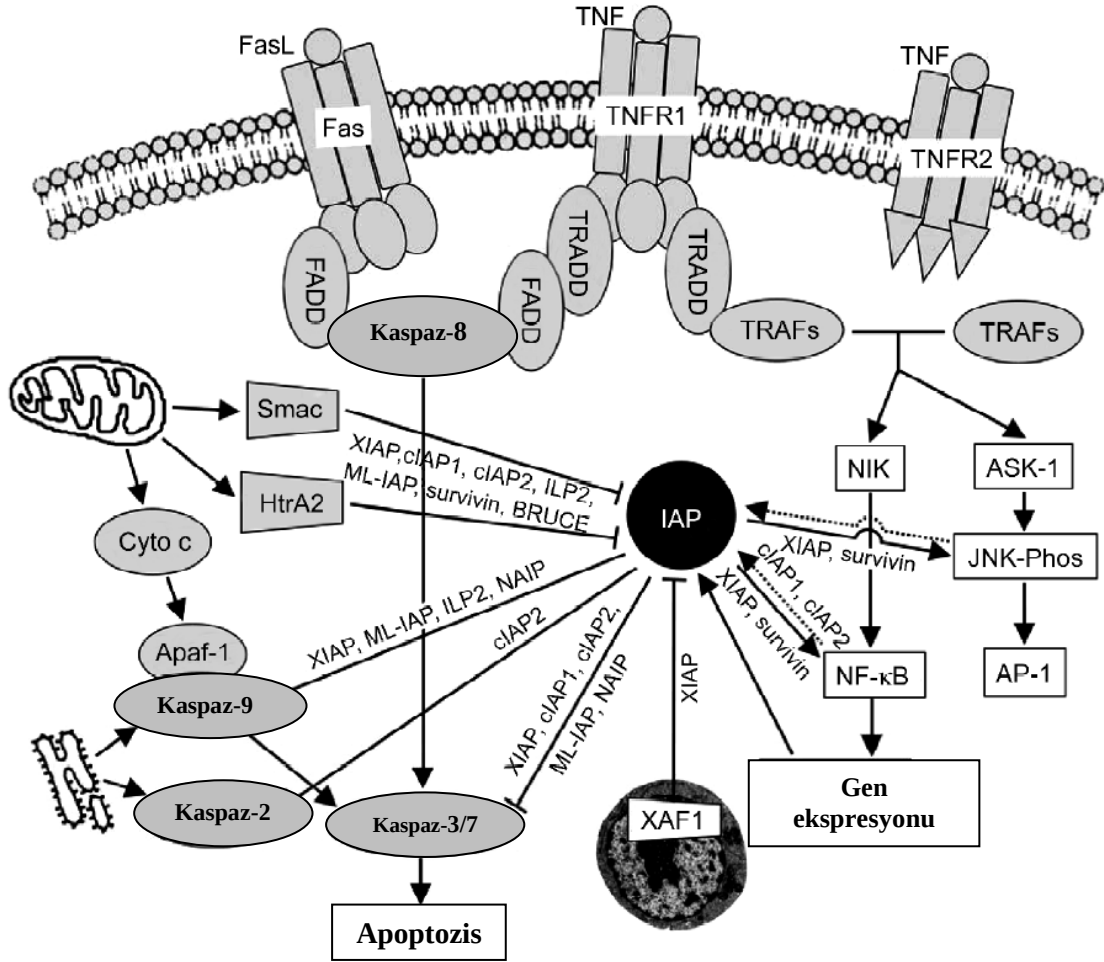
Apoptozis klasik olarak, hücre ölüm reseptörleri olarak bilinen Fas (diğer isimleriyle APO-1, CD95) ve tümör nekroz faktör reseptörü-1 (TNFR-1)'in ilgili ligandları ile etkileşime girmesi (uyarılmaları) sonucu indüklenir. Bu hücre yüzey reseptörleri membranda bulunur ve TNFR ailesinin üyesidirler. Fas'lar lenfoid hücrelerde, hepatositlerde, bazı tümör hücrelerinde, akciğerlerde, hatta miyokarda bulunurlar. İlgili ligandlarına Fas ligand (FasL) denir. FasL, tümör nekroz faktör (TNF) ailesinin bir üyesidir. FasL sitotoksik T lenfositlerinde ve “natural killer” hücrelerde bulunur. Fas ve TNFR-1, ligandlarıyla bağlandıklarında ölüm uyarısı almış olduklarından bir seri protein:protein etkileşimlerinden geçerler. Öncelikle kendilerine doğal olarak bağlı bulunan ve ölüm bölgeleri (“death domain”) adı verilen TRADD (“TNFR-1 associated death domain”) ve FADD (“Fas associated death domain”) ile etkileşime girerler. Bu ölüm bölgeleri ise prokaspaz 8'i aktiveleştirerek kaspazların kaskad tarzında aktivasyonlarını başlatırlar. Hücre içinde ayrıca bu ölüm bölgelerini inhibe eden proteinler de bulunmaktadır. Örneğin, kaspaz 8 (FLICE) FLIP (“FLICE-inhibitory protein”)’i inhibe eder.

Apoptozis ayrıca reaktif oksijen radikallerinin (oksidatif stress) hem mitokondri hem plazma membranı hem de genom üzerinde oluşturabileceği hasarlara bağlı olarak da başlatılabilir. Son yıllarda apoptozis sürecinde merkezi bir konuma oturmuş olan sitokrom c, mitokondri iç membranında bulunan elektron transport zincirinin bir proteinidir. Bu yüzden de sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınması apoptozis yoluna girmiş bir hücrede geri dönüşümsüz bir döneme girildiğini işaret eder. Sitokrom c, mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamış bir şekilde mitokondriden apoptozis-indükleyici faktör (“AIF, apoptosis-inducing factor”) ile birlikte sitoplazmaya salınır. Sitokrom c sitoplazmik protein olan Apaf-1 (“apoptotic protease activating factor-1”)’e bağlanır ve onu aktive eder, ardından ATP'nin de katılımıyla apoptozom

adı verilen bir kompleks oluşur. Bu kompleks inaktif olan prokaspaz-9'un aktif kaspaz-9 (şelale tarzı reaksiyon dizisi-9) haline dönüşmesini sağlar. Aktif kaspaz-9 ise efektör kaspazlardan prokaspaz 3'ü aktive eder. Aktif kaspaz 3, kaspazla-aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörünü ("ICAD, inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease") inaktifleştirir, böylece ICAD'ünün bağladığı kaspazla-aktifleşen deoksiribonükleaz ("CAD, caspase-activated deoxyribonuclease") serbestleşir ve bu da apoptozisin karakteristik bulgularından biri olan kromatin kondensasyonuna ve oligonükleozomal DNA fragmentasyonuna neden olur.

Kaspaz ("caspase")'lar, zimojen (inaktif prekürsör) olarak sitoplazmada bulunan ve aktif merkezlerinde sistein yer aldığından sistein proteazlar olarak adlandırılan bir grup enzimlerdir. Şu ana kadar 14 tanesi tanımlanmıştır ve çoğu apoptozisde rol almaktadır. Kaspazlar birbirlerini aktifleştirerek proteolitik bir kaskada neden olurlar. Kaspazların bazıları (Kaspaz 2, 8, 9, 10) başlatıcı kaspazlar olarak bilinirken bazıları da (3, 6, 7) efektör kaspazlar olarak bilinir. Başlatıcı kaspazlar apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara naklederler. Efektör kaspazlar ise ilgili proteinleri (örneğin, hücre iskeleti proteinleri aktin veya fodrin, nükleer membran proteini lamin A, DNA tamirinde rol alan poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar. İlk tanımlanan enzim ICE (interlökin 1- β dönüştürücü enzim)'dir ve prokaspaz 1 olarak bilinir.

Bir kaspaz inhibitörleri ailesi olan apoptoz inhibitörleri (IAP) kaspazları selektif olarak inhibe ederler, böylece apoptotic mekanizmayı durdururlar. Bu inhibitörler birçok habis hücreler tarafından aşırı olarak eksprese edilmektedirler. IAP'leri ayrıca hücre siklusunu da etkileyerek apoptozisi durdurabilirler. Kaspazlardaki defektler otoimmün hastalıklara, kansere ve bazı nörolojik bozuklukların oluşumuna sebep olabilir (Ulukaya; Sanmartin ve ark. 2012) (Şekil 2-12).



Şekil 2-12: Apoptozun indüklenme mekanizması (Wei ve ark. 2008)

IAP	: Apoptozis protein inhibitörü	FADD	: Fas ilişkili ölüm alanı
Smac	: İkinci kaspazların mitokondrial aktivatörü	FasL	: Fas ligandı
HtrA2	: Yüksek-temperatür-ilişkili A2	ILP2	: IAP-benzeri protein 2
XAF1	: X-bağlantılı IAP ilişkili faktör 1	ML-IAP	: Melanoma IAP
NF-κB	: Nükleer faktör κB	NAIP	: Nöronal apoptoz inhibitör proteini
JNK	: c-Jun N-terminal kinaz	NIK	: NF-κB indükleyici kinaz
AP-1	: Aktivatör protein-1	TNF	: Tümör nekroz faktör
Apaf-1	: Apoptotik proteaz aktivatör faktör 1	TNFR1	: Tümör nekroz faktör reseptör 1
ASK-1	: Apoptoz sinyal-regüle edici kinaz-1	TNFR2	: Tümör nekroz faktör reseptör 2
BRUCE	: BIR tekrar içeren ibukuitin bağlayıcı enzim	Cyto C	: Sitokrom c
c-IAP1	: Hücrel IAP 1	c-IAP2	: Hücrel IAP 2
TRAFs	: The tumor necrosis factor receptor associated factors	XIAP	: X-chromosome-linked IAP
TRADD	: Tümör nekroz ilişkili ölüm alanı		

2.6.5.2. Hücre Siklusu ile Apoptozisin Entegrasyonu

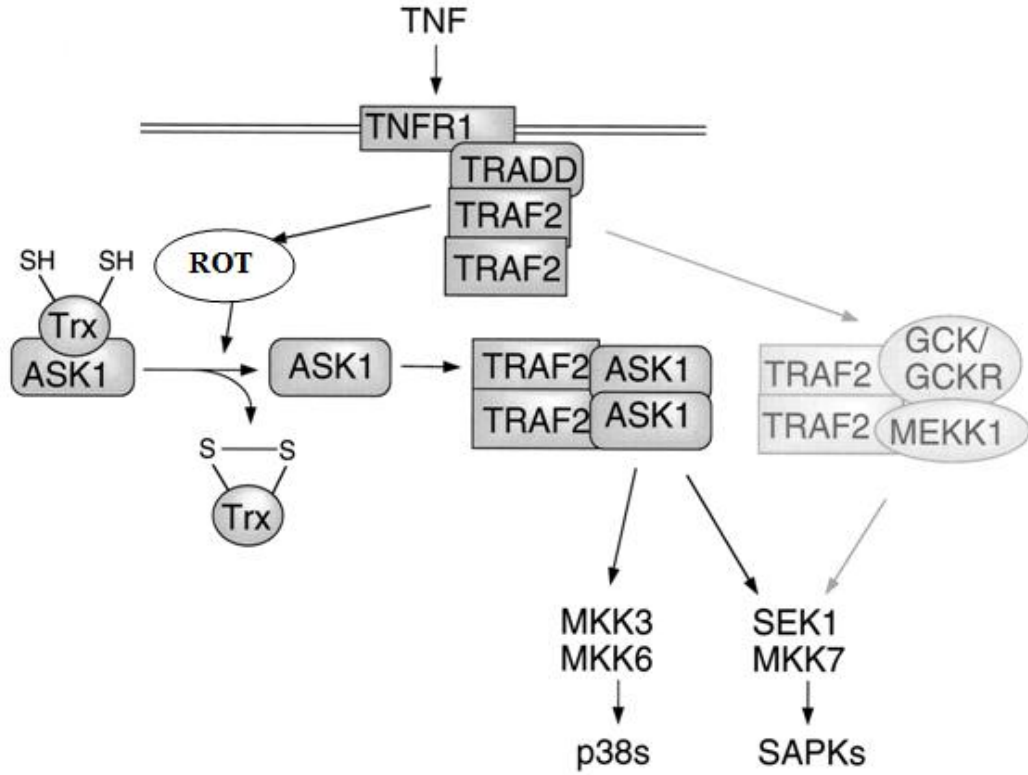
Apoptozis, genotoksik ajanların etkisiyle yaratılan ağır DNA hasarına yanıt olarak tümör supressör gen ürünü bir protein olan p53'ün aktivasyonu ile başlatılabilir. Normalde esas fonksiyonu, radyasyon veya bazı ilaçların etkisiyle DNA hasarlandığı zaman, hücre siklusunu (proliferasyonunu) durdurup hücrenin hasarlanmış DNA'sını tamir etmesi için ona zaman kazandırmasıdır. Bu yüzden gen koruyucusu “guardian of

the genome” olarak da tanımlanır. p53 bilindiği gibi kanser hastalarında mutasyonu en sık görülen proteindir ve kanserlerin % 50-55’inde mutanttır. p53 normal olarak bir **siklin** bağımlı kinaz inhibitörü (CKI) olan p21’in sentezini artırarak proliferasyonu bloke eder. p21, siklin bağımlı kinaz (siklin-CDK) kompleksini bağlanarak inaktive eder. Böylece, bu kompleks pRb’yi fosforile edemeyeceğinden E2F ailesi de pRb’den ayrılamayacağı için siklus ilerletici işlevini yerine getiremez ve sonuçta hücre siklusu durur. Hücre siklusunun durması hücreye zaman kazandırır ve hücre hasarlanmış DNA’sını tamir eder. Ama hasar tamir edilemeyecek kadar büyükse bu kez p53 hücreyi apoptozise götürür.

Hücreyi bölünmeye sevkeden sinyaller (örneğin, büyüme faktörleri, sitokinler veya mitojenler) çok çeşitlidir. Hücre bölünme sinyalini aldığı anda sinyal ileti kaskadı “signal transduction cascade” adı verilen bir ileti mekanizması (örneğin, MAP kinaz, Protein Kinaz C veya JAK/STAT yolları) devreye girer. Bu ileti mekanizması ya transkripsiyonu, hücre siklusunu veya hücre iskeletini kontrol eden bir substratı fosforiller yada nukleusa ulaşıp (STAT’da olduğu gibi) doğrudan transkripsiyonu modüle eder. Böylece, hücre siklusa sokularak bölünmeye (mitozise) sevk edilmiş olur. Hücre siklusuna giren bir hücre DNA sentezi yapar, böylece DNA’sını replike eder (ikiye katlar) ve ardından da DNA mitozisle iki yavru hücreye eşit olarak dağılır. Genel olarak, G1 fazı DNA sentezine (S fazına) ve G2 fazı ise mitozise (M fazına) hazırlık fazlarıdır. Bu fazlarda RNA ve protein sentezleri yapılır ve ayrıca hücre kendisini bölünme için yeniden organize eder.

G1 fazı, hücre siklusunun süresi açısından en değişkenlik gösteren fazıdır. Bu fazın süresi siklusun en önemli belirleyicisidir. Bu fazda hücre ya bölünmek, ya diferansiye olmak, ya da ölmek için karar verir ve bazı genlerde değişiklikler başlar. Örneğin, bölünecek hücrede DNA polimeraz veya nükleotid sentezinde gerekli olan dihidrofolat redüktaz gibi bazı enzimlerin genlerindeki aktivasyonları takiben bu genlerin ürünleri G1/S sınırında artmaya başlar. Bu fazda gerçekleşen değişiklikler başlıca c-fos, c-myc ve c-jun gibi transkripsiyon faktörlerinin genlerinde görülür. Bu transkripsiyon faktörleri AP1 bölgeleri olarak da bilinen regülatör DNA dizilerine bağlanırlar. Böylece, AP1 bölgelerini taşıyan genlerin aktivasyonu sonucu siklin ve CDK’ların aktivasyonları sağlanır. Bunlardan c-myc ve c-jun aynı zamanda onkojen olarak da bilinirler. Ayrıca hücre-spesifik bir onkojen ürünü olan c-myb de

hematopoetik hücrelerde bu fazda artış gösterir. İnhibitör sinyaller CKI ailesi üzerinden etki gösterirler (Ulukaya; Wei ve ark. 2008) (Şekil 2-13).



Şekil 2-13: TNF tarafından ASK-1'in regülasyonu ve TRAF2, GCK/GCKR ve MEKK1 yolu (Liu ve ark. 2000)

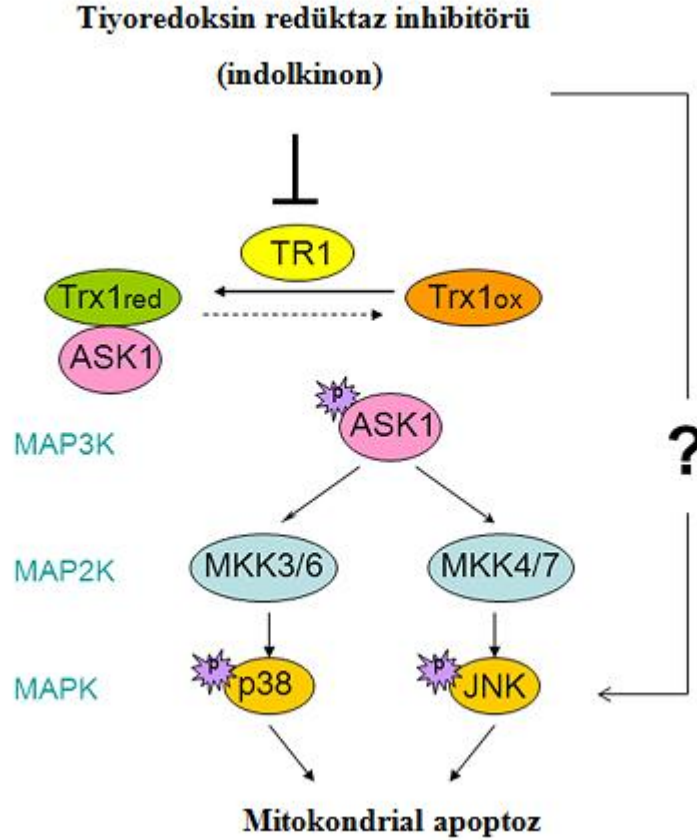
ASK-1 : Apoptoz sinyal-regüle edici kinaz-1
 ERK : Ekstraselüler sinyal regüle edici kinaz
 GCK : Germinal merkez kinaz
 GCKR : GCK-ailesiyle ilişkili üyesi
 MAPK : Mitojen aktive edici kinazlar
 MEK : Mitojen ekstraselüler sinyal regüle edici kinaz
 MEKK1 : MAPK/ERK kinaz kinaz1
 MKK3 : MAPK kinaz 3
 TRAFs : Tümör nekroz faktörü ilişkili faktörler
 TRADD : Tümör nekroz faktörü ilişkili ölüm alanı

MKK3 : MAPK kinaz3
 MKK6 : MAPK kinaz 6
 MKK7 : MAPK kinaz 7
 p38 : p38 kinaz
 SAPK : Stres aktive edici protein kinaz
 SEK1 : SAPK/ERK kinaz
 TNF : Tümör nekroz faktör
 TNFR1 : Tümör nekroz faktör 1
 Trx : Tiyoredoksin

2.6.5.3. Apoptozisin Tiyoredoksin Redüktaz Tarafından İnhibisyonu

ASK-1 çeşitli MAP kinazların aktivasyonunu regüle eden ve stresle aktive olan protein kinaz ailesine ait olan bir proteindir. Saitoh ve ark. 1998 yılında küf mantarı ikili-hibrid sistemini inceleyerek apoptoz sinyal regülatör kinaz (ASK-1) düzenleyici proteinini ve fosforilasyon reaksiyonlarında meydana gelen Trx/ASK-1 kompleksine anahtar olarak etki eden tiyoredoksini tanımlamıştır. Oksidatif streste tiyoredoksinin

oksidasyonu Trx ve ASK -1 dimerin dissosiyonuna neden olmaktadır. ASK-1, MAPK sinyal transdüksiyon kaskadında yer alan p38/JNK'yı aktive ederek apoptoz indüklenir. Tioredoksin redüktaz inhibitörleri Trx/ASK-1 kompleksinin dissosiyasyonunu inhibe ederek apoptozisin indüklenmesine yol açar. Yan ve ark. (2012) insan pankreatik kanserin tedavisinde tioredoksin redüktaz inhibitörü olarak indolkinonların kullanılabileceği ileri sürmüşlerdir (Şekil 2-14) (Yan ve ark. 2012).



Şekil 2-14: İnsan pankreatik kanser hücrelerinde indolkinonların apoptozu uyarıcı mekanizması (Yan ve ark. 2012).

2.6.6. Vasküler Endotelyum ve Düz Kas Hücrelerindeki Tioredoksinin Görevi

Oksidatif stres durumunda endotel hücreleri de koruyucu fenotiplerini kaybederek proinflamatuvar moleküller sentezlerler. Bunlar arasında vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1), hücrelerarası adezyon molekülü-1 (ICAM-1) ve monosit kemotaktik protein-1 yer almaktadır. Reaktif oksijen türleri NO inaktivasyonunu hızlandırarak vazomotor fonksiyonunu bozar, endotel hücrelerinden

büyüme faktörlerinin sekresyonunu hızlandırarak endotel hücre proliferasyonuna yol açar. Ayrıca apoptotik sinyal aktivasyonu ile endotel hücre kaybına yol açar (Welsh ve ark. 2002).

Yaygın olarak tiyoredoksin endotel hücrelerinde (ECs) ifade edildiği ve ECs'yi H_2O_2 -uyarılmış sitotoksiteden koruduğu bildirilmiştir (Yamavaki ve ark. 2003). H_2O_2 'in etkisi ile ECs'lerde tiyoredoksinin ekspresyonu arttığı için Trx'in oksidatif stresle indüklenebilen protein olabileceği ileri sürülmüştür. Ejima ve ark. (1999) çalışmalarında H_2O_2 'ye karşı östrojen aracılı koruma için Trx ve TrxR indüksiyonun gerekli olduğunu göstermişlerdir. Das ve ark. (1997) insan akciğer mikrovasküler ECs'de eksojen Trx'nin mitokondriyal manganez süperoksit dismutazı (Mn SOD) indüklediğini, bakır çinko SOD (Cu/ Zn SOD) ve katalaz gibi diğer antioksidan enzimlerin indüklenmedikleri için Trx tarafından Mn-SOD'nin indüklenmesi spesifik olduğunu bildirmişlerdir. Trx, aşırı NO'nin indüklediği endotel nitrik oksit sentazın (eNOS) degradasyonunu koruduğu için nitrosatif stresden ECs'nin korunmasında bir role sahip olabileceği ileri sürmüştür.

Trx'in aynı zamanda normal arterlerin vasküler düz kas hücrelerinde (VSMCs) yaygın olarak eksprese edildiği bildirilmiştir. Schulze ve ark. (2002) tarafından adenoviral gen transferi ile insan aortik VSMCs'de Trx'in enzim aktivitesinde ve önemli ölçüde DNA sentezinde artış gözlenmiştir ve VSMC proliferasyonunda Trx'in bir rolü olabileceği sonucuna varılmıştır. H_2O_2 veya trombositlerden türeyen büyüme faktörü (PDGF) ile muameleden sonra Trx ekspresyonu gözlenmediği için ECs'nin aksine, VSMC'lerde tiyoredoksinin ekspresyonu ROS tarafından regüle edilmediği bildirilmiştir.

2.7. Kanserde Tiyoredoksinin Rolü

Trx salınımı, muhtemelen protein yapı ve fonksiyonundaki değişikliklere bağlı olarak akciğer, kolorektal, servikal, hepatik ve pankreas kanseri gibi birçok insan kanser türünde artmış olarak bulunmuştur (Tamura ve Stadtman 1996; Södborg ve ark. 2000; Yoo ve ark. 2006; Cadenas ve ark. 2010; Yan ve ark. 2012).

Kanser hücreleri, hipoksik şartlara adapte olabilecek türde hücrelerdir. Hipoksi durumunda, kanser fenotipinin gelişmesinde rol alan bir transkripsiyon faktörü olan hipokside-indüklenebilen factor-1 (HIF-1) aktive olur. HIF-1 özellikle; anjiyogenez, metabolik adaptasyon, hücre çoğalması ve yaşam süresinin uzatılması ile alakalı

genlerin aktivasyonuna neden olur. İşte Trx'in aşırı salınımı HIF-1 ve vasküler endotelial büyüme faktörünü (VEGF)'yi önemli oranda arttırmaktadır (Arnér ve Holmgren 2006; Karlenius ve Tonissen 2010).

Trx'in aşırı ifade edilmesi ya kanser hücre büyümesinin doğrudan uyarılmasını ya da kanser hücre apoptozunun inhibisyonuna yol açtığı birçok çalışmada gösterilmiştir. Trx ekspresyonunun yüksek seviyesi *in vitro* ve *in vivo* olarak invaziv ve metastatic tümör aktivitesi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Chaiswing ve ark. 2007; Ceccarelli ve ark. 2008).

2.8. Tedavide Tiyoredoksin Redüktazın Hedef Olarak Kullanılması

TrxR/Trx'nin biyolojik aktiviteleri ve saldırgan tümör büyümesi ile olan bağlantısı, bu sistemin kanser terapisi için önemli bir hedef olduğunu düşündürür. Çeşitli Trx/TrxR sistem inhibitörleri tanımlanmıştır. Flavonoidler, arsenik trioksit, antralin, 13-cis retinoik asit, sülfid iyonları, nitrozoüreler, ağır metal iyonları, aurafin, motexafin gadolinium, plörotin literatürde yer alan Trx ve TrxR inhibitörleridir (Mukherjee ve Martin 2008).

Uzun yıllardan beri antikanser ilacı olarak kullanılan arsenik trioksidin (ATO) güçlü bir memeli TrxR inhibitörü olduğu gösterilmiştir. TrxR inhibisyonunun bütün Trx sistemini inaktive etmesi ATO'nun antikanser aktivitesiyle ilişkilendirilmiştir.

TrxR'nin protein kimyası ve aktif kısmındaki selenosistein kalıntılarının ilk keşfinden bu yana, altın bileşikler (özellikle altın (I) ve altın (II) bileşikler) güçlü enzim inhibitörleri gibi davranabilecekleri ileri sürülmüştür (Bindoli ve ark. 2009). Son yıllarda ise altın (III) bileşikler tarafından TrxR inhibisyonuna ilişkin çalışmalar yapılmaktadır (Engman ve ark. 2006). Moteksafin gadolinyum ise TrxR aktivitesini inhibe eden Gd^{+3} içeren bir porfirindir (Karlenius ve Tonissen 2010).

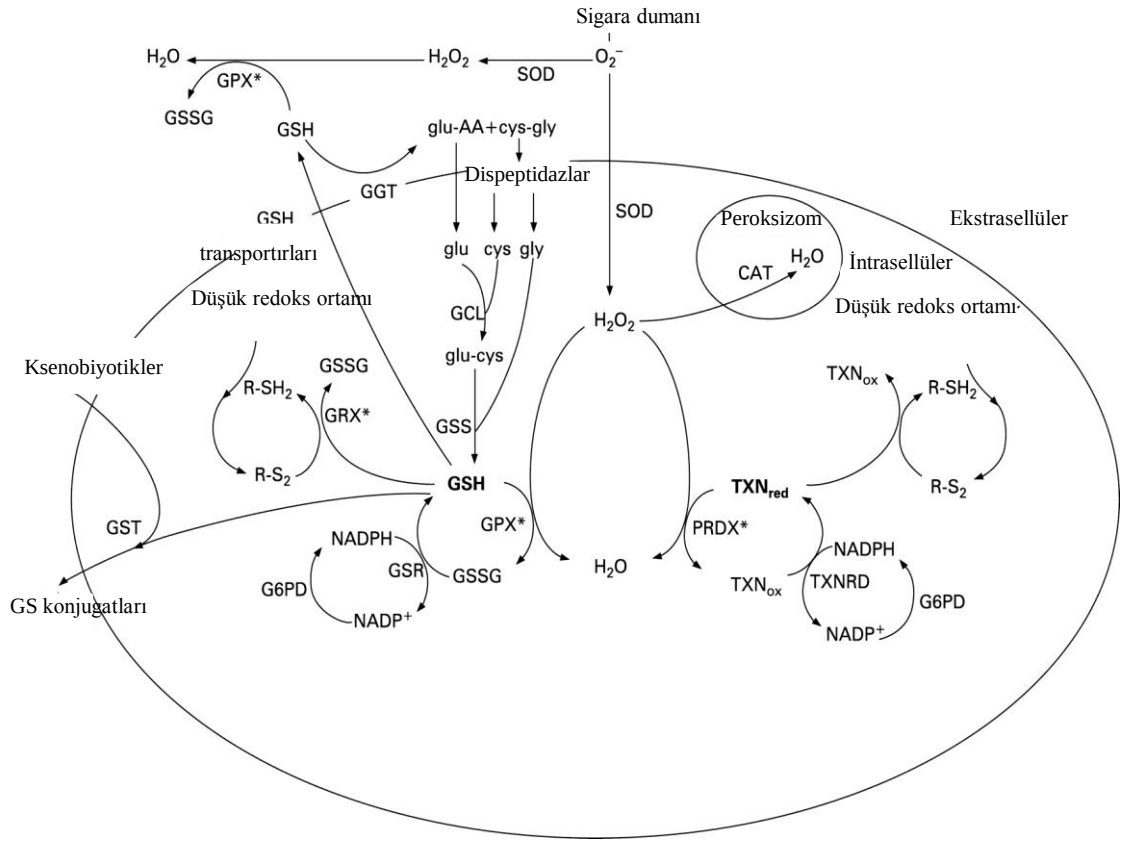
Fenolik bileşikler ve onların bazı türleri otooksidasyonun önlenmesinde çok etkilidirler. Tüm flavonoidler, 3'-4'dihidroksi konfigürasyonu ile antioksidan aktiviteye sahiptir. Ksantin oksidaz, glutatyon redüktaz, NADH oksidaz ve protein kinaz enzimlerini inhibe ettiklerine dair veriler mevcuttur (Çimen 1999). Myricetin (IC_{50} 0,62 μ mol/L) ve quercetin (IC_{50} 0,97 μ mol/L) TrxR'nin güçlü inhibitörleri oldukları bildirilmiştir (Lu ve ark. 2006).

Asya'nın tropikal bölgelerinde yaygın olarak yetişen bir tıbbi bitki olan *Curcuma longa* ya da bilinen adıyla zerdeçaldan izole edilen curcuminin son yıllarda

antioksidan, antikanser ve TrxR inhibitör aktivitesi tespit edilmiştir. Memeli TrxR'nin redoks aktif kısımları kurkumin analoglarının hedefidir. TrxR'nin süreye bağlı, geri dönüşümsüz olarak kovalent modifikasyon ile kurkumin analogları tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir (Liu ve ark. 2008; Qui ve ark. 2008). Sonuç olarak bu sistemlerin inhibisyonu mükemmel bir kemoterapik strateji sağlanmasına yol açabilir.

2.9. Tioredoksinlerin Antioksidan Etkileri

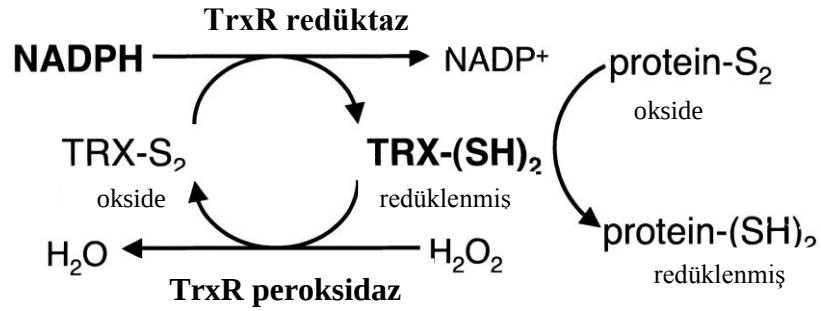
Serbest radikallerin oluşumunu ve meydana getireceği hasarı önlemek için vücutta bir çok savunma mekanizmaları gelişmiştir (Şekil 2-15).



Şekil 2-15: Oksidatif strese karşı enzimatik antioksidan savunma mekanizmaları (Bentley ve ark. 2008)

CAT: katalaz, GSR: glutatyon redüktaz, Cys: sistein, GSSG: okside glutatyon, G6PD: glukoz-6-fosfat dehidrojenaz, GSS: glutatyon sentetaz, GCL: glutamat-sistein ligaz, GST: glutatyon-S-transferaz, GGT: gamma-glutamil transferaz, GPX: glutatyon peroksidaz, R-S₂: disülfid, SOD: süperoksid dismutaz, R-SH: redüklenmiş tiyol, TXN_{ox}: okside tiyoredoksin, Glu: glutamat, TXN_{red}: redüklenmiş tiyoredoksin, Gly: glisin, GRX: glutaredoksin, GSH: redüklenmiş glutatyon, TXNRD: tiyoredoksin redüktaz.

Tiyoredoksinin antioksidan özellikleri, redükleyici ekivalan olarak tiyol gruplarını (SH) kullanan tiyoredoksin peroksidaz enzimin etkisiyle ortaya çıkmaktadır. Peroksidazlar; hücreleri, peroksitlerin ve reaktif oksijen radikallerinin zararlı etkilerinden koruyan enzimlerdir. Tiyoredoksin, tiyoredoksin peroksidazın okside formunu redükleyerek H_2O_2 gibi ROT türlerinin giderilmesine olanak sağlar (Şekil 2-16). Tiyoredoksinin serum plazma düzeyleri enfeksiyon, iskemi-reperfüzyon ve diğer oksidatif streslerle yükselir ve oksidatif stresi takip etmede iyi bir göstergedir.



Şekil 2-16: Tiyoredoksin peroksidazın H_2O_2 gibi ROT'lerini gidermesi (Yamawaki 2003)

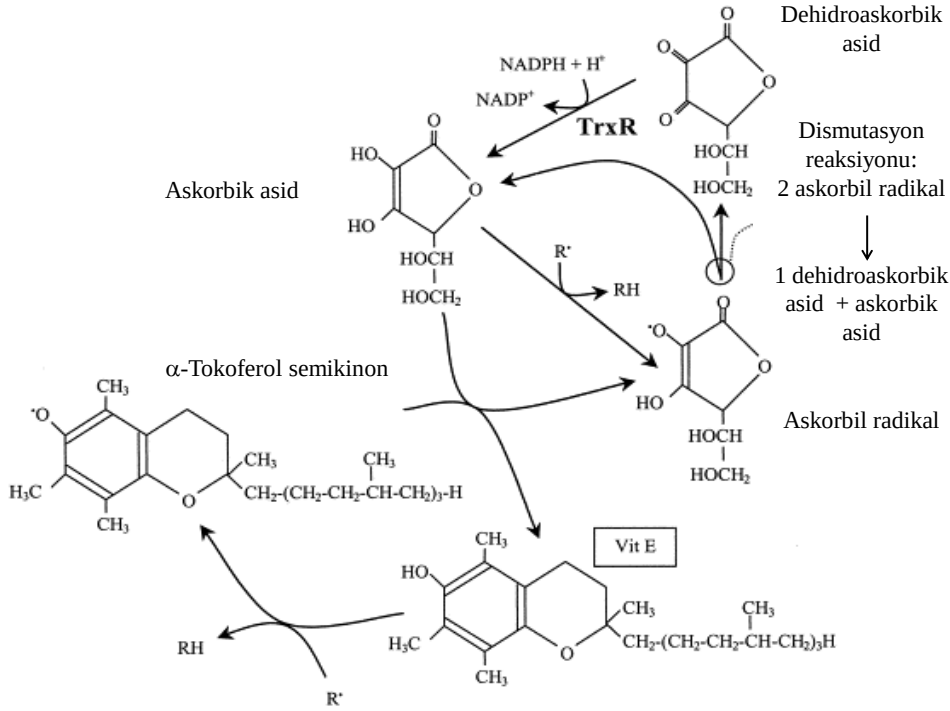
Tiyoredoksin sistemi α -tokoferol ve askorbik asid gibi vitaminlerin rejenere edilmesinde görev alır.

α -Tokoferol zincir kırıcı antioksidatif etkinliği ile membran fosfolipitlerinde bulunan çoklu doymamış yağ asitlerini (PUFA) serbest radikal hasarından koruyan ilk savunma hattını oluşturur.

Suda çözünebilen bir vitamin olan vitamin C vücutta yaygın olarak bulunur. Askorbat mükemmel bir redüktandır ve serbest radikal oksidanları ortadan kaldırır. *In vitro* kanıtlar vitamin C'nin hem intraselüler hem ekstraselüler ortamlarda kimyasal redüktan olarak rol oynayabileceğini göstermektedir. Hücre içi vitamin C protein oksidasyonunu engelleyebilir ve gen ekspresyonu ve mRNA translasyonunu düzenleyebilir. Ekstraselüler vitamin C oksidanlara ve oksidan aracılı hasara karşı korur. *In vitro* olarak, süperoksit radikal (O_2^-), peroksil radikalleri, hidrojen peroksit, hipoklorik asit, tek elektronlu oksijen, oksidan hava kirleticiler ve aktive edilmiş nötrofil ve makrofajlardan sızan oksidanlar gibi bir grup serbest radikal ve oksidanı uzaklaştırarak antioksidan aktiviteye katkıda bulunur (Romieu ve ark. 2008).

α -Tokoferol serbest radikallerle reaksiyona girerek oluşan α -tokoferol semikinon askorbik asid tarafından tekrar α -tokoferole indirgenirken askorbil serbest radikaller

oluşmaktadır. İki askorbil radikalın dismutasyonu ile bir dehidroaskorbik asid (DHA) ve bir askorbik asid oluşmaktadır. DHA, TrxR tarafından askorbik aside indirgenmektedir, askorbik asid ise α -tokoferolün rejenerasyonunu kontrol etmektedir. Bu mekanizmanın oluşum yolu Şekil 2-17’de gösterilmiştir.

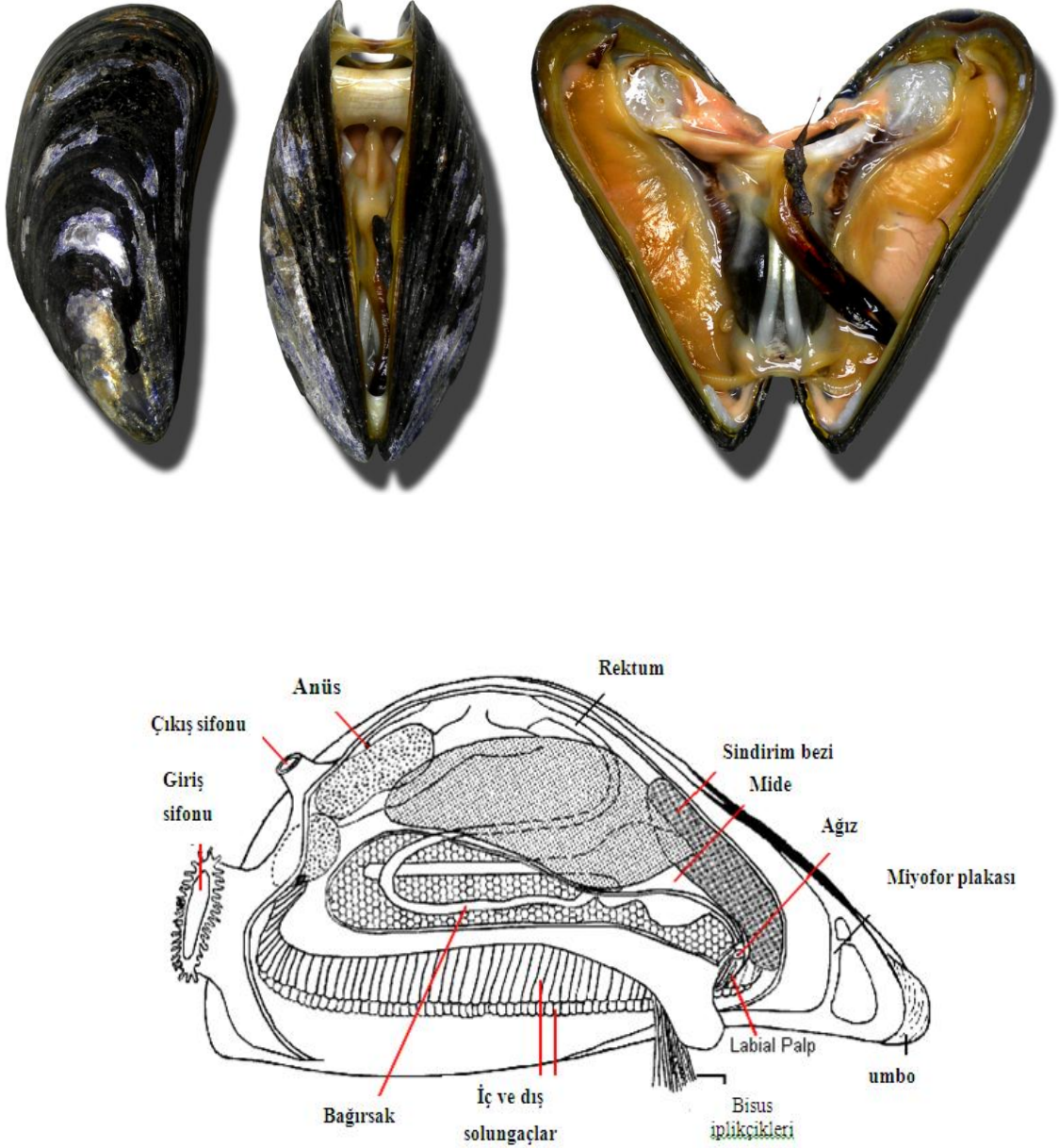


Şekil 2-17: DHA (dehidroaskorbik asid), TrxR tarafından askorbik aside indirgenmesi (Nordberg ve Arner 2001).

2.10. Midye (*Mytilus galloprovincialis* Lam.)’nin Özellikleri

Mollusca filumunun Bivalvia klasisi içinde yer alan *Mytilidae* familyası geniş bir yayılım alanına sahiptir. Bu familyanın en önemli türleri ise *Mytilus galloprovincialis* Lam. (kara midyesi veya Akdeniz midyesi), *Mytilus edulis* (mavi midye veya Avrupa midyesi), *Modiolus barbatus* (at midyesi) ve *Perna* sp. (Afrika midyesi)’dir. Ülkemiz sularında ise *Mytilidae* familyasının ekonomik olarak değerlendirilen yukarıdaki türlerinden *Mytilus galloprovincialis* Lam. ve *Modiolus barbatus* olmak üzere iki türü bulunmaktadır. *Mytilus galloprovincialis* Lam. İzmir’den Karadeniz sularına kadar toplanırken, *Modiolus barbatus* avcılığı en fazla Ayvalık ve civarında yapılmaktadır. (Alpbaz 1993; Alpbaz 1997).

Mytilus galloprovincialis Lam. ve bazı organlarının şematik şekli Şekil 2.18’de gösterilmiştir.



Şekil 2-18: *Mytilus galloprovincialis* Lam. midyesi ve iç organlarının şematik şekli
(https://it.wikipedia.org/wiki/Mytilus_galloprovincialis)

Mytilus galloprovincialis Lam., bakteriyel enfeksiyon ve çevre kirliliği gibi ciddi problemlere duyarlıdır (Canesi ve ark. 2010). Fakat çoğu midye gibi güçlü immun

sistem ve detoksifikasyon kabiliyetine sahip olduğu için yaşıadığı ortamda hayatta kalabilmektedir (Cellura ve ark. 2006). Bu yüzden patojenik enfeksiyon ve oksidatif hasarı araştırmak için midyelerin direnç mekanizmalarını incelemek ilgi çekicidir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Gereçler

Aktivite tayinlerinde, su banyoları (Thermomix BU ve Grant SB2)
 Çalkalayıcı (IKA KS260)
 Cam kolon (Pharmacia Fine Chemicals, Upsala, Sweden)
 Derin dondurucu (Bosch)
 ELISA reader (mikroplaka okuyucu) (BioTek Eon)
 Etüv (Heraeus)
 Fraksiyon toplayıcı (Gilson FC 204)
 Görüntüleme cihazı (VILBER LOURMAT Model: FUSION FX)
 Homojenizatör (Art-MİCCRA D-1)
 Kromatografi kolonları (Pharmacia Fine Chemicals)
 Manyetik karıştırıcı (Kermanlar)
 Otomatik pipet takımı (Gilson ve Eppendorf)
 pH metre (Radiometer 92)
 Soğuk dolap (Nuare)
 Soğutuculu santrifüj (Heraeus-Megafuge 1.OR)
 Spektrofotometre (Shimadzu UV-1208)
 Ultrafiltrasyon hücresi (Millipore Corporation, Bedford, MA 01730 U.S.A.) ve
 ultrafiltrasyon membranı (Amicon, PM 10)
 Vertikal jel elektroforezi cihazı ve güç kaynağı (BIO RAD Mini PROTEAN Tetra Cell)
 Vorteks karıştırıcı (VELP Shientifica)

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Amonyum sülfatla çöktürmede amonyum sülfat $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$; Merck 101217] kullanıldı.

Protein miktar tayininde Bradford ayırıcı (Bradford Reagent; Sigma Aldrich B6916), standart olarak sığır serum albümini (Fluka-05470), Coomassie Brilliant Blue G-250 (Merck 1.15444).

Tamponların hazırlanmasında sodyum fosfat dibazik ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; Riedel 04272), sodyum fosfat monobazik (NaH_2PO_4 ; Riedel 04270), potasyum dihidrojen

fosfat (KH_2PO_4 ; Merck 4873), dipotasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4 ; Merck 105101), Tris baz (Sigma T6066), sodyum klorür (NaCl ; Sigma S9625) kullanıldı.

5,5-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) indirgeme metodunda tiyoredoksin redüktaz kit'in (Sigma CS0170) içindeki tiyoredoksin redüktaz inhibitör solüsyonu (Sigma T9199), β -nikotinamid adenin dinükleotid fosfat, indirgenmiş şekli, tetrasodyum tuzu hidrat ($\text{Na}_4\text{NADPH} \times \text{H}_2\text{O}$; Sigma N1630), 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic)acid (DTNB) (Sigma D8130), etilendiamintetraasetik asit disodium tuzu ($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Sigma E 5134), dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma D 8418) ve pozitif control olarak tiyoredoksin redüktaz (Sigma T 9074) kullanıldı.

Son nokta insulin bağımlı DTNB aktivite deneyinde HEPES sodyum tuzu, (4-(2-Hidroksietil)piperazin-1- etansülfonik asid sodyum tuzu; Sigma H3375), insan insulin çözeltisi (Sigma I9278), *Escherichia coli* tiyoredoksini (Sigma T0910).

Anyon değiştirici iyon kromatografisinde dolgu maddesi olarak DEAE-sefaroze CL-6B (Fluka 30473), affinite kromatografisinde ise adenosin 2',5'-difosfat-agaroz (Sigma A3515) kullanıldı.

Glutasyon aktivite tayininde okside glutasyon (Sigma G4376) kullanıldı.

Poliakrilamid jel elektorforezinde agaroz (Sigma A5093), N,N'-metilenbisakrilamid (Fluka 66669), akrilamid (Fluka 01699), sodyum dodesil sülfat (SDS; Sigma L4390), amonyum peroksodisülfat (Merck 101200), tetrametiletildiamin (TEMED; AppliChem A1148), 2-merkaptöetanol (Merck 805740), gliserol (Merck 104093), bromfenolmavisi (Merck 108122), Coomassie brilliant blue R-250 (Fluka 27816), Wide range kalibrasyon kiti (Sigma S8445) kullanıldı.

3.3. Kullanılan Çözeltiler

5,5-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) indirgeme metodunda kullanılan çözeltiler:

➤ **5 x Deney tamponun (50 mM EDTA içeren 500 mM potasyum fosfat tampon ($\text{K}_2\text{HPO}_4 / \text{KH}_2\text{PO}_4$, pH 7,0) hazırlanması:**

- **500 mM potasyum fosfat tamponun ($\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$) (pH 7,0) hazırlanması:** 6,805 g KH_2PO_4 ve 8,709 g K_2HPO_4 600 ml distile suda çözüldü. pH'sı N HCl veya N NaOH ile 7,0'e ayarlandı. Hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

- **50 mM Na₂EDTA.2H₂O çözeltisinin hazırlanması:** 1,86 g Na₂EDTA.2H₂O 500 mM K fosfat tamponunda çözündü ve 100 ml'ye tampon ile tamamlandı.
- **1 x Deney tamponun (10 mM EDTA içeren 100 mM potasyum fosfat tamponun (K₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 7,0) hazırlanması:** 5 x deney tamponun 5 kez seyreltilmesiyle hazırlandı.
- **48 mM β-Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat, redüklenmiş şekli (Na₄β-NADPH.H₂O), tetrasodyum tuzu hidrat çözeltisinin hazırlanması:** 25 mg Na₄β-NADPH.H₂O 0,625 ml distile suda çözündü (2-8°C'de 5 saat, -20°C'de 6 ay dayanıklı).
- **Çalışma tamponu (0,24 mM NADPH, 10 mM EDTA içeren 100 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ tamponun (pH 7.0) hazırlanması (2 saat oda ısısında dayanıklı):** 50 µl Na₄β-NADPH.H₂O'a 2 ml Stok 50 mM Na₂EDTA.2H₂O içeren 500 mM potasyum fosfat tamponu (K₂HPO₄ / KH₂PO₄) (pH 7,0) ilave edildi, 10 ml'ye distile su ile tamamlandı.
- **100 mM DTNB çözeltisinin hazırlanması:** 39,6 mg DTNB 1 ml DMSO'da çözündü (bir gün önce hazırlanıp 2-8°C'dereceleri arasında dayanıklıdır).
- **Tiyoredoksin redüktaz inhibitör çözeltisinin hazırlanması:** 10 µl tiyoredoksin redüktaz inhibitör solüsyonundan alındı, 200 µL'ye DMSO ile tamamlandı. 20 kez seyreltilmiş inhibitör solüsyonu 4 hafta -20°C'de bekletilebilir. 1 ml reaksiyon karışımına 20 µl seyreltilmiş inhibitör solüsyonun ilavesiyle TrxR aktivitesi tamamen inhibe olur.
- **Tiyoredoksin redüktaz pozitif kontrol çözeltisinin hazırlanması:** 5 µl'si 20 kez stok tampon çözeltisiyle seyreltildi (2 saat 2-8°C dereceleri arasında dayanıklı).

Son nokta insulin bağımlı DTNB aktivite deneyinde kullanılan çözeltiler:

- **200 mM HEPES-NaOH, pH 7,6 tamponun hazırlanması:** 20 ml 1 M HEPES-NaOH, pH 7,6 tamponu 100 ml'ye distile su ile tamamlandı. 4°C'de saklandı.
- **1 M HEPES-NaOH, pH 7,6 tamponun hazırlanması:** 23,80 g HEPES ve 5,5 g NaOH 70 ml distile suda çözüldü. pH'sı N HCl veya N NaOH ile 7,6'ya ayarlandı. Hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.
- **50 mM Na₂EDTA.2H₂O çözeltisinin hazırlanması:** 0,744 g Na₂EDTA.2H₂O 10 ml TE tamponunda (pH 7,5) çözüldü.

- **50 mM Na₄NADPH.H₂O çözeltisinin hazırlanması:** 4,16 mg Na₄NADPH.H₂O 0,1 ml 10 mM TE tamponunda (pH 7,5) çözöldü.
- **85,47 µM *E.coli* tiyoredoksin (11,7 kDa) çözeltisinin hazırlanması:** 1 mg tiyoredoksin 1 ml 10 mM TE tamponunda (pH 7,5) çözöldü.
- **10 mM Tris - HCl tamponun (pH 7,5) (TE) hazırlanması:** 10 ml 1 M Tris - HCl tamponu alındı ve 100 ml'ye distile su ile tamamlandı.
 - **1 M Tris - HCl tamponun (pH 7,5) hazırlanması:**
12,1 g Tris baz 50 ml distile suda çözöldü, 39 ml HCl ilave edildi ve pH'sı N HCl veya N NaOH ile 7,5'e ayarlandı. Hacim 100 ml'ye distile su ile tamamlandı. 4°C'de saklandı.
- **6 M guanidin-HCl içeren 0,2 M Tris-HCl (pH 8,0), hazırlanması:** 57,3 g guanidin-HCl 100 ml 200 mM Tris – HCl (pH 8,0)'de çözöldü.
 - **1 mM Tris - HCl tamponun (pH 8,0) hazırlanması:** 12,1 g Tris baz 50 ml distile suda çözöldü, 29 ml 1 M HCl ilave edildi ve pH'sı N HCl veya N NaOH ile 8,0'e ayarlandı. Hacim 100 ml'ye distile su ile tamamlandı. 4°C'de saklandı.
 - **200 mM Tris-HCl (pH 8,0) tamponun hazırlanması:** 20 ml 1 M Tris-HCl (pH 8,0) tamponundan alındı 100 ml'ye distile su ile tamamlandı.
- **10 mM DTNB - 6 M guanidine-HCl içeren 0,2 M Tris-HCl (pH 8,0) hazırlanması:** 8 mg DTNB 2 ml 6 M guanidine-HCl içeren 0,2 M Tris-HCl (pH 8,0)'de çözöldü.
- **2 mM Na₂EDTA.2H₂O'nun 10 mM TE tamponundaki (pH 7,5) çözeltisinin hazırlanması:** 7,4 mg Na₂EDTA.2H₂O 10 ml 10 mM Tris - HCl tamponunda (pH 7,5) çözöldü.

Glutatyon redüktaz aktivite tayininde kullanılan çözeltiiler:

- **1,035 mM Na₂EDTA.2H₂O içeren 51,6 mM Tris-HCl tamponunun (pH 8,0) hazırlanması:** 0,038 g Na₂EDTA.2H₂O tartıldı 100 ml'ye 51,6 mM Tris-HCl tamponu (pH 8,0) ile tamamlandı
 - **51,6 mM Tris-HCl tamponunun (pH 8,0) hazırlanması:** 5,16 ml 1 M Tris-HCl tampon alındı 100 ml'ye distile su ile tamamlandı

➤ **20 mM okside glutatyonun (G-S-S-G) 1,035 mM Na₂EDTA.2H₂O içeren 51,6 mM Tris-HCl tamponunun (pH 8,0)'daki çözeltisinin hazırlanması:** 0,012 g GSSG tartıldı 1 ml tamponda çözündü.

➤ **2 mM Na₄NADPH.H₂O' in 1,035 mM Na₂EDTA.2H₂O içeren 51,6 mM Tris-HCl tamponunun (pH 8,0)'daki çözeltisinin hazırlanması:** 1,6 mg Na₄NADPH.H₂O tartıldı 1 ml tamponda çöündü.

Poliakrilamid jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler:

➤ **Akrilamid çözeltisi:** 40 g akrilamid ve 1,09 g N, N'-bisakrilamit 60 ml distile suda çözöldü. Hacim 100 ml'ye distile su ile tamamlandı. 4°C'de saklandı.

➤ **Ayrıştırma (Resolving) Jeli Tamponu (1 M Tris - HCl Tamponu, pH 8,8):** 12,1 g Tris baz 60 ml distile suda çözöldü, pH'sı N HCl veya N NaOH ile 8,8'e ayarlandı. Hacim 100 ml'ye distile su ile tamamlandı. 4°C'de saklandı.

➤ **Sıkılaştırma (Stacking) Jeli Tamponu (1 M Tris - HCl Tamponu, pH 6,8):** 12,1 g Tris baz 60 ml distile suda çözöldü, pH'sı N HCl veya N NaOH ile 6,8'e ayarlandı. Hacim 100 ml'ye distile su ile tamamlandı. 4°C'de saklandı.

➤ **% 10 Sodyum Dodesil Sülfat:** 10 g SDS 60 ml distile suda çözöldü. Hacim 100 ml'ye distile su ile tamamlandı.

➤ **% 1 Amonyum Persülfat:** 1 g amonyum persülfat 60 ml distile suda çözöldü. Hacim 100 ml'ye distile su ile tamamlandı. Taze hazırlandı.

➤ Örnek Yükleme Tamponu

4,8 ml distile su; 2,0 ml % 10 SDS; 1,2 ml 1 M Tris - HCl tamponu (pH 6,8); 1,0 ml gliserol; 0,5 ml % 0,5 bromfenol mavisi karıştırılarak hazırlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

➤ **Elektroforez Yürütme Tamponu (10 x):** 14,4 g glisin, 3 g Tris baz ve 10 g SDS 60 ml distile suda çözöldü. pH'sı N HCl veya N NaOH ile 8,3'e ayarlandı. Hacim 100 ml'ye distile su ile tamamlandı. Kullanılmadan önce 10 kez seyreltildi.

3.4. Kullanılan Yöntemler

3.4.1. Midye Hepatopankreas Dokusu Tioredoksin Redüktazın Elde Edilmesi

Mytilus galloprovincialis Lam. hepatopankreas dokusu tioredoksin redüktazı, midyenin hepatopankreasından hazırlanan homojenattan tioredoksin redüktaz

aktivitesi gösteren fraksiyonun en uygun amonyum sülfat konsantrasyonunda çöktürülerek, elde edilen % 80 kesitinin 10 mM TE tamponuna karşı (pH 7,5) dializ edildikten sonra anyon değiştirici (DEAE-Sefaroz CL-6B) ve afinite (2',5'-ADP-agaroz) kromatografileri uygulanmasıyla elde edildi.

3.4.2. Ham Ekstrenin Hazırlanması

Midyeler deneyin yapılacağı gün Yenikapı'daki Su Ürünleri Hali'nden alındı, kabukları çıkarıldıktan sonra hepatopankreasları ayrılarak distile su ile yıkandı. Toplam 60 midyeden elde edilen 73,5 g ağırlığındaki hepatopankreaslar, 200 ml % 10'luk TE tamponu (pH 7,5) içeren ve buz içine yerleştirilmiş olan 500 ml'lik behere aktarıldı ve homojenize edildikten sonra 13 000 devir/dakikada soğutuculu santrifüjde 20 dakika santrifüje edildi, elde edilen sıvı kısım alındı ve bu şekilde **ham ekstre** elde edildi.

3.4.3. Midye hepatopankreas dokusu tiyoredoksin redüktazın % 80 amonyum sülfat kesitinin elde edilmesi

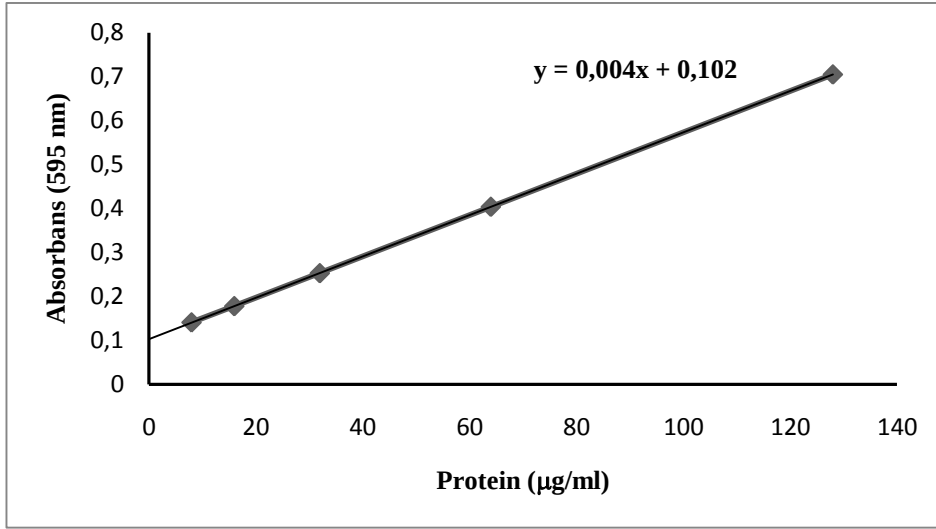
Ham ekstreye ortamdaki konsantrasyonu % 80 olacak şekilde havanda toz haline getirilmiş amonyum sülfat yavaş yavaş ilave edildi. Karışım soğukta manyetik karıştırıcıda 30 dakika karıştırıldıktan sonra bir gece buzdolabında bekletildi, ertesi gün 13 000 devir/dakikada 20 dakika süreyle 4°C'de santrifüje edildi. Çökelti, çözünebileceği en az miktardaki 10 mM TE tamponunda (pH 7,5) çözüldü. 56°C'de 10 dakika ısıtıldı ve tekrar 13 000 devir/dakikada 15 dakika süreyle 4°C'de santrifüje edildi. % 80 amonyum sülfat kesiti olarak adlandırılan bu çözelti, 4°C'de 10 mM tamponuna (pH 7,5) karşı diyaliz edildikten sonra protein miktarı ile tiyoredoksin aktivitesi tayinleri yapıldı.

3.4.4. Protein Miktar Tayini

TrxR saflaştırma aşamalarında elde edilen çözeltilerde protein miktar tayinleri 96 kuyucuklu mikropalakalarda mikro-Bradford (Bradford 1976) yöntemi ile belirlendi. Kuyucuklara 100 µl örnek ve 150 µl protein boyası konuldu. Örneğin boyayla reaksiyona girmesi için 5 dk. oda sıcaklığında bekledikten sonra mikropalaka okuyucuda 595 nm'deki absorbansı, ayıraç körüne karşı okundu. Bu absorbans değerinin, sıgır serum albumini standart eğrisine uygulanmasıyla, protein miktarı µg/ml olarak belirlendi.

3.4.4.1. Sığır Serum Albumini Standart Eğri Denkleminin Elde Edilmesi

Sığır serum albuminin distile sudaki 128 µg/ml’lik çözeltisi hazırlandı. Daha sonra bu çözeltinin distile su ile seyreltilmesiyle konsantrasyonları 8 µg/ml, 16 µg/ml, 32 µg/ml ve 64 µg/ml olan çözeltiler elde edildi. Çözeltilere, ayrı ayrı, Bradford deneyi uygulandı. Ölçülen absorbans değerlerine en küçük kareler yönteminin uygulanması ile sığır serum albumini standart eğrisi çizildi ve regresyon denklemi elde edildi (Şekil 3-1).



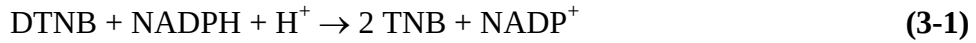
Şekil 3-1: Sığır serum albumini standart eğrisi ve regresyon denklemi

3.4.5. Tioredoksin Redüktaz (TrxR) Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi

3.4.5.1. 5,5-Dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) İndirgeme Metodu

Tioredoksin redüktaz DTNB gibi bazı sentetik bileşiklerin disülfid bağlarını NADPH-bağımlı redüksiyonla redükleyebilir. Biyolojik örneklerde glutatyon redüktaz ve glutatyon peroksidaz gibi diğer enzimler de DTNB’yi redüklediğinden dolayı, DTNB indirgenmesinde gözlenen oran daha yüksek görülür. Çalışma esnasında homojenize doku örneklerinde sadece tioredoksin redüktaz aktivitesine bağlı DTNB indirgenmesini tayin etmek amacıyla spesifik inhibitör solüsyonu kullanılarak iki ölçüm yapıldı. İlkinde örnekteki total DTNB indirgenmesi, ikincisinde ise tioredoksin redüktazın inhibitör solüsyonu varlığındaki aktivitesi tayin edildi. Her iki ölçüm arasındaki fark tioredoksin redüktaz aktivitesine bağlı DTNB indirgenmesini göstermektedir.

Hepatopankreas dokusunda tiyoredoksin redüktaz aktivitesi Holmgren ve Bjornstedt'in (1995) geliştirdiği metoda göre ölçüldü. İlave edilen maddelerin reaksiyon ortamındaki konsantrasyonları parantez içinde gösterildi. 96 kuyucuklu mikrolaka kuyucuklarına konulan 48 mM (0,24 mM) $\text{Na}_4\text{NADPH.H}_2\text{O}$, 50 mM (10 mM) $\text{Na}_2\text{EDTA.2H}_2\text{O}$ içeren 500 mM (100 mM) potasyum fosfat tamponunun (pH 7,5) 180 μl 'sine 10 μl örnek ve 4 μl 1 x deney tamponu ilave edildi. Her bir örneğe paralel olarak 4 μl 1 x deney tamponu yerine 4 μl inhibitör çözeltisi ilave edildi. 6 μl 100 mM (3 mM) DTNB ilavesiyle reaksiyon başlatıldı (Tablo 3-1). TrxR aktivitesi, her bir mol NADPH'ın NADP'ye yükseltgenmesi sırasında ortamdaki 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoik asid)'in (DTNB) indirgenmesi ile dakikada oluşan 2 μmol sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoik asid'in (TNB) absorbansında meydana gelen artışın 412 nm'de 5 dakika süreyle her dakika mikrolaka okuyucuda ölçülmesiyle belirlendi (Denklem 3-1). Her bir örnek için TrxR aktivitesi, bu deneyde TNB için $13\,600\,\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ olarak belirlenmiş absorpsiyon katsayısını kullanarak ve yapılan seyreltmeler göz önüne alınarak hesaplandı ve U/mg doku proteini şeklinde belirtildi. 1 U TrxR, dakikada 2 μmol NADPH-bağımlı TNB oluşumunu kataliz eden enzim miktarı olarak ifade edildi.



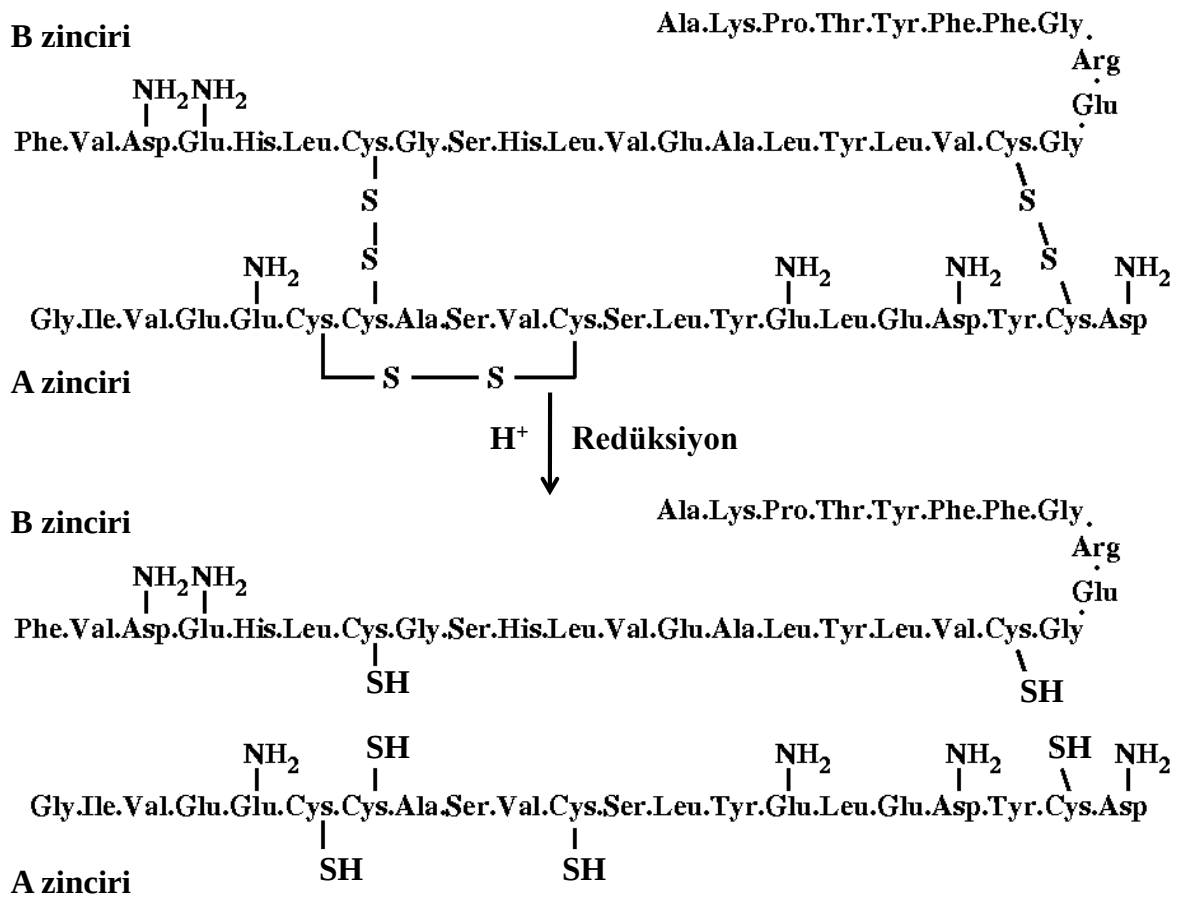
Tablo 3-1: 96 kuyucuklu mikrolakalarda DTNB indirgeme deneyi

	Enzim	1 x Deney tamponu	İnhibitör çözeltisi	Çalışma tamponu	DTNB
Kör	0	14 μl	0	180 μl	6 μl
Pozitif Kontrol	2 μl	12 μl	0	180 μl	6 μl
Örnek	10 μl	4 μl	0	180 μl	6 μl
İnhibitör içeren örnek	10 μl	0	4 μl	180 μl	6 μl

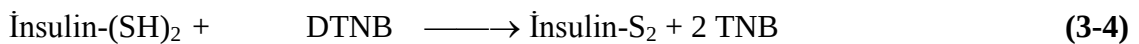
3.4.5.2. Son Nokta İnsulin Bağımlı DTNB Aktivite Tayini

Tiyoredoksin redüktaz aktivitesi tiyoredoksinin redüklenmiş şekli ($\text{Trx}-(\text{SH})_2$) ile substrat olarak kullanılan ve üç disülfid köprüsü içeren insulinin hızlı bir şekilde reaksiyona girmesi esasına dayanan son nokta insülin bağımlı DTNB aktivite deneyine (Arnér ve Holmgren 2000a) göre de yapıldı. Tiyoredoksin sistemin bir bileşeni olan

NADP'nin indirgenmesi ile oluşan NADPH'nin indirgen eşdeğerleri insulindeki disülfid bağlarını indirgeyerek serbest tiyol grupları içeren iki polipeptid zinciri oluşur. Ortam NADPH ve tiyoredoksin ile doymuş olduğu durumlarda reaksiyon hızı sadece tiyoredoksin redüktaz aktivitesine bağlıdır. Reaksiyon guanidin hidroklorür ilave edilerek durdurulur. Guanidin HCl proteinleri denatüre ederek tiyoredoksin sistemini inaktive eder. DTNB ise serbest tiyol grupları ile reaksiyona girerek renkli TNB'e indirgenir (Şekil 3-2) (Denklem 3-2; 3-3; 3-4).



Şekil 3-2: İnsan insulinin yapısındaki disülfür bağların redüklenmesi



Bu deneyde, 1295 μ l 200 mM HEPES tamponu (85 mM son), 625 μ l 1,6 mM insulin (0,3 mM son), 40 μ l 50 mM NADPH (660 μ M son) ve 40 μ l 0,2 mM EDTA (3 mM son) karıştırılması ile stok reaksiyon karışımı (2000 μ l) hazırlandı. 33 μ l stok reaksiyon karışımına 8 μ l 85 μ M tiyoredoksin ve 9 μ l örnek ilave edildi ve 37°C’de 30 dak. inkübe edildi. Reaksiyon karışımına 250 μ l 10 mM (4 mg/ml) DTNB-6 M guanidin-HCl içeren Tris-HCl (pH 8,0) eklendi ve absorbans 412 nm’de örnek dışındaki tüm bileşenleri içeren köre karşı 96 kuyucuklu mikrolakalarda ölçüldü.

3.4.6. Glutasyon Redüktaz (GR) Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi

Glutasyonun oksitlenmiş formu (GSSG) glutasyon redüktaz enzimi ile GSH’a indirgenir ve kofaktör olarak NADPH kullanılır. GR aktivitesi NADPH’ın NADP’ye yükseltgenmesi sırasındaki absorbans farkı 340 nm’de Carlberg ve Mannervik’in (1977) bildirdiği metoda göre spektrofotometrik olarak ölçülerek belirlendi. 870 μ l 1,035 mM Na₂EDTA.2H₂O (1 mM son) içeren 51,6 mM Tris-HCl tamponu (pH 8,0) (50 mM son), 50 μ l 20 mM GSSG (1 mM son) ve 2 mM NADPH (0,1 mM son) karıştırıldı. 30 μ l örnek ilavesi ile reaksiyon başlatıldı. GR aktivitesi, NADPH’ın NADP⁺’ya yükseltgenmesi sırasındaki absorbans azalmasının 340 nm’de okunmasıyla, NADPH için 6,22 mM⁻¹cm⁻¹olarak belirlenmiş absorbsiyon katsayısını kullanarak ve yapılan seyreltmeler göz önüne alınarak hesaplandı ve U/mg doku proteini şeklinde belirtildi. 1 U GR, dakikada 1 μ mol NADPH’ın yükseltgenmesini kataliz eden enzim miktarıdır.

3.4.7. Tiyoredoksin Redüktazın Saflaştırılması

3.4.7.1. DEAE Sefaroz CL-6B Anyon Değiştirici Kromatografisi

DEAE-Sefaroz CL-6B çapı 1,5 cm olan cam Pharmacia Fine Chemicals kolona yüksekliği 25 cm oluncaya kadar dolduruldu ve pH’sı 7,5 olan 10 mM TE tamponundan (pH 7,5) 3 kolon hacmi (3 x 45 ml) geçirilerek dengelendi. % 80 amonyum sülfat kesiti uygulandıktan sonra, kolondan önce, pH sı 7,5 olan 10 mM TE tamponunun, daha sonra adı geçen tampona sırasıyla konsantrasyonları 100 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM, 500 mM ve 1M olacak şekilde NaCl ilavesiyle hazırlanan tamponların geçirilmesiyle elüsyon gerçekleştirildi ve fraksiyonlar 4 ml’lik hacimler halinde 48 ml/saat akış hızı ile toplandı. Fraksiyonların 280 nm’deki absorbansları ve enzim aktiviteleri ölçüldü. En yüksek tiyoredoksin redüktaz aktivitesi gösteren tüp içerikleri biraraya getirildikten sonra 10 mM TE (pH 7,5) tamponuna karşı dializ edildi ve ultrafiltrasyon

membranından geçirilerek (Amicon, PM 10) konsantre edildi. DEAE-Sefaroz CL-6B kromatografisiyle elde edilen ve tiyoredoksin redüktaz aktivitesi gösteren fraksiyona 2',5' ADP- agaroz afinite kromatografisi uygulandı.

3.4.7.2. Afinite Kromatografisi

10 ml 2',5'-ADP-agaroz 1 cm çapında cam kolona yüksekliği 10 cm oluncaya kadar dolduruldu ve pH'sı 7,5 olan 10 mM TE tamponundan 3 kolon hacmi (3 x 10 ml) geçirilerek dengelendi. DEAE-Sefaroz CL-6B kolon kromatografisiyle elde edilen fraksiyon 2',5'- ADP-agaroz kolonuna uygulandıktan sonra, kolondan önce, pH sı 7,5 olan 10 mM TE tamponunun, daha sonra adı geçen tampona sırasıyla konsantrasyonları 100 mM, 200 mM, 300 mM ve 400 mM olacak şekilde NaCl ilavesiyle hazırlanan tamponların geçirilmesiyle elüsyon gerçekleştirildi ve fraksiyonlar 1 ml'lik hacimler halinde 1 ml/dak akış hızı ile toplandı. Fraksiyonların 280 nm'deki absorbanları ve enzim aktiviteleri ölçüldü. En yüksek tiyoredoksin redüktaz aktivitesi gösteren tüp içerikleri biraraya getirildikten sonra 10 mM TE tamponuna karşı dializ edildi, ultrafiltrasyon membranından geçirilerek (Amicon, PM 10) konsantre edildi ve deneylerde kullanılmak üzere +4°C de saklandı.

3.4.8. Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE)

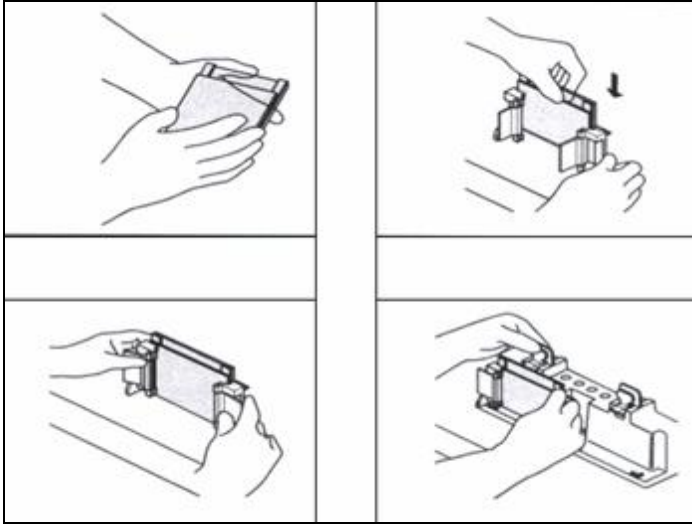
Poliakrilamid jeli, akrilamid ve bisakrilamid molekülleri arasında, amonyum persülfat (APS) aracılığıyla TEMED'in katalizörlüğünde çapraz bağların oluşması ile polimerleşen bir jeldir. Akrilamid ve bisakrilamid arasındaki oran, çapraz bağlarla oluşan porların çapını ve dolayısıyla jelin rezolüsyonunu belirler (19: 1; 29: 1; 39: 1).

3.4.8.1. Sodyum Dodesil Sülfatlı Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

Bu metod proteinlerin molekül ağırlıklarını belirlemede ve saflaştırılmış proteinlerin saflık derecelerinin tayininde de kullanılmaktadır (Weber ve Osborn 1969). Proteinler SDS varlığında jel üzerinde yürütüldü. SDS proteinlerin hidrofobik bölgelerini bağlayarak denatüre eder. SDS ayrıca denatüre olmuş proteinleri yüksek miktarda negatif yükle yükler. Bu yük normalde proteinler üzerinde bulunan yükleri maskeler ve proteinler jel üzerinde yüklerine göre değil molekül ağırlıklarına göre ayrılırlar. Eğer protein alt birimleri disülfür bağları ile bir arada tutuluyorsa, bu bağlar elektroforezden önce 2-merkaptoetanol ve ısı aracılığı ile kırılmalıdır. Her bir proteini

ve proteinlerin alt birimlerini jel üzerinde tek bant oluşturacak şekilde ayırt etmek mümkündür.

1. Cam tabakalar önce % 70'lik etanol ve sonra distile su ile temizlenerek oda sıcaklığında kurutuldu.
2. Kısa cam plaka bize doğru bakacak şekilde geniş cam plakanın üzerine yerleştirildi ve plakalar dik bir vaziyette plaka tutucuya yerleştirildi.
3. Plaka tutucusu içerisine yerleştirilen jelsiz plaka sistemi jellerin döküleceği tutucu üzerine dikkatle oturtuldu (Şekil 3-3).



Şekil 3-3: Vertikal (dikey) jel elektroforez cam plaka sisteminin hazırlanışı

SDS-PAGE elektroforez sisteminde iki tip tampon ve iki farklı jel konsantrasyonu kullanıldı. Sistemin alt kısmına pH'sı 8,8 olan ve % 12,5 akrilamit jeli içeren ayırıştırma (resolving) jeli, üst kısmına ise pH sı 6,8 olan ve % 4,5 akrilamit içeren sıkılaştırma (stacking) jeli döküldü (Rybicki ve Purves 1996)

50 ml'lik Falkon tüpü içerisinde önce ayırım yapılacak jel tabakası hazırlandı (Tablo 3-2).

Tablo 3-2: 0,25 M Tris - HCl'deki (pH 8,8) % 12,5'lik ayrıştırma jelinin hazırlanması

<i>Ayırıcılar</i>	<i>0,25 M Tris - HCl'deki (pH 8,8) % 12,5'lik ayrıştırma jelinin hazırlanması</i>
% 40 (w/v) akrilamit, % 1,09 (w/v), N, N'-bisakrilamit (38: 1; w: w)	3,1 ml
1 M Tris - HCl, pH 8,8	2,5 ml
% 10 SDS	0,1 ml
% 1 Amonyum peroksodisülfat	0,5 ml
Distile su	3,8 ml
TEMED	20 µl
Toplam hacim	10 ml

5. Enjektör aracılığı ile jel karışımı cam plakalar arasına döküldü. Jelin üst kısmının düz olması için jel daha polimerize olmadan üzerine *iso*-propil alkol ilave edildi ve jel en az 30 dakika kadar oda sıcaklığında polimerize olması için bırakıldı. Jelin polimerize olduğundan emin olduktan sonra üzerindeki *iso*-propil alkol tabakası su ile yıkanarak süzgeç kağıdı yardımıyla kurulandı ve jel yapımında ikinci adım olan sıkılaştırma jelinin yapımına geçildi (Tablo 3-3).

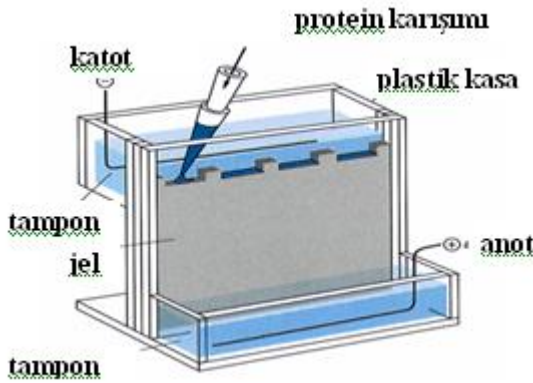
Tablo 3-3: 0,125 M Tris - HCl'deki (pH 6,8) % 4,5'lik sıkılaştırma jelinin hazırlanması

<i>Ayırıcılar</i>	<i>0,125 M Tris - HCl'deki (pH 6,8) % 4,5'lik sıkılaştırma jelin hazırlanması</i>
% 40 (w/v) akrilamit, % 1,09 (w/v) N, N'-bisakrilamit (39: 1; w: w)	1,1 ml
1 M Tris - HCl, pH 6,8	1,25 ml
% 10 SDS	0,10 ml
% 1 Amonyum peroksodisülfat	0,50 ml
Distile su	7,1 ml
TEMED	20 µl
Toplam hacim	10 ml

6. 25 ml'lik Falkon tüpü içerisinde hazırlanan karışım yukarıda hazırlanan ayrıştırma jelinin üzerine döküldü ve kuyucukları oluşturmak için jelin üzerine tarak takıldı. Jelin polimerleşmesi için en az 30 dakika beklendi.

7. Protein Örneklerinin Hazırlanması: Denatüre edici SDS-PAGE’de 950 µl örnek yükleme tamponuna (0,125 mM Tris - HCl, % 2 SDS, % 10 gliserol, % 0,02 bromfenol mavisi) 50 µl 2-merkaptoetanol ilave edildi ve protein örnekleri ile 1:1 oranında karıştırılarak 95°C’de 5 dakika ısıtıldı.

8. Jelin Yürütülmesi: Cam tabakalar içerisinde polimerize olmuş jel tank içerisine özenle yerleştirildi. Her iki tank bölmesi elektroforez yürütme tamponu (192 mM glisin; % 0,1 SDS; 25 mM Tris baz içeren elektroforez tamponu, pH 8,3) ile dolduruldu. Mikropipet kullanılarak 25’er µl affinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltisinden Şekil 3-4’de görüldüğü gibi kuyucuklara tatbik edildi. Jel 80 ile 100 volt arasında bir voltaj seçilerek jel başına 5 mA akım geçirildi. Bromfenol mavisi, ayrıştırma jelinin alt kısmına gelene kadar elektroforeze 1 saat devam edildi.



Şekil 3-4: Vertikal jel elektroforezi düzeneği (Lehninger ve ark. 1993)

9. Proteinlerin Jel Üzerinde Görünür Hale Getirilmesi - Jelin Boyanması: Cam plakalar arasından çıkartılan jel % 0,2' lik Coomassie brilliant blue R-250'nin metanol: su: asetik asit (45: 45: 10; v/v) karışımındaki çözeltisinde bir gece çalkalayıcıda oda sıcaklığında bekletildi. Jel, boyandıktan sonra boya içerisinden alınarak metanol: su: asetik asit (25: 65: 10; v/v) karışımından oluşan dekoloran çözeltide, çözelti sık sık değiştirilerek, bekletildi. Buradan alınan jeller asetik asit: metanol: su (10: 5: 85; v/v) karışımı içeren kaptaki saklandı.

3.4.9. Tiyoredoksin Redüktazın Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi

Tiyoredoksin redüktaz aktivitesi gösteren fraksiyonların optimum pH'sını, optimum temperaturünü, NADPH ve DTNB'e karşı Km değerlerini saptamak amacıyla aşağıda belirtilen incelemeler gerçekleştirildi.

3.4.10. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisinin İncelenmesi

Tiyoredoksin redüktazın optimum pH'larını saptamak için pH sınırları 6 - 10 olan 1 mM EDTA içeren 500 mM K fosfat tamponu çözeltileri kullanılarak, değişik pH değerlerinde elde edilen enzim aktiviteleri ordinatta, pH değerleri absiste gösterilerek tiyoredoksin redüktaz'a ait pH eğrisi çizildi.

3.4.11. Enzim Aktivitesi Üzerine Temperaturün Etkisinin İncelenmesi

Tiyoredoksin redüktaz optimum temperaturünü belirlemek amacıyla enzim aktivitesi 30-85°C arasında değişen sıcaklıklarda, her defasında 5°C'er derece artırmak suretiyle, "enzim aktivitesi ölçülmesi" başlığı altında belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Enzim aktivitesi ordinatta, sıcaklık ise absiste gösterilmek suretiyle tiyoredoksin redüktaza ait sıcaklık eğrisi çizildi.

3.4.12. Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisinin İncelenmesi

Tiyoredoksin redüktaz aktivitesi, enzim konsantrasyonu sabit tutularak, NADPH'nin sudaki 0,24 mM, 0,12 mM, 0,06 mM, 0,03 mM ve 0,015 mM'lık çözeltilerinde ve DTNB'nin DMSO'daki 3 mM, 1,5 mM, 0,75 mM, 0,38 mM ve 0,19 mM'lık çözeltilerinde, bundan önce aktivite ölçme deneylerinde uygulanan yöntemle tayin edildi. En küçük kareler yöntemi uygulanarak izoenzimlerin Lineweaver-Burk doğrusu çizildi ve adı geçen doğrunun denklemi elde edildi. Bu denklemden yararlanılarak tiyoredoksin redüktaz aktivitesi gösteren fraksiyonların NADPH ve DTNB'e karşı K_m ve V_{max} 'ları hesaplandı.

4. BULGULAR

Midye hepatopankreas homojenatı ham ekstresinden % 80 amonyum sülfat konsantrasyonunda çöktürmek suretiyle elde edilen ve tiyoredoksin redüktaz aktivitesi gösteren 371,3 mg protein içeren 12,5 ml hacimdeki fraksiyonun DEAE-Sepharose CL-6B kolonuna uygulanması ve pH sı 7,5 olan 10 mM TE tamponun, daha sonra adı geçen tampona sırasıyla konsantrasyonları 100 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM, 500 mM ve 1M olacak şekilde NaCl ilavesiyle hazırlanan tamponların geçirilmesiyle gerçekleştirilen elüsyon sonucunda 10 mM TE tamponla (pH 7,5) elüe olan fraksiyonda tiyoredoksin redüktaz aktivitesi bulundu (Şekil 4-1). En yüksek aktivite gösteren tüplerin birleştirilmesiyle oluşan ve 10,6 mg protein içeren 10 ml'lik fraksiyonun, 2',5'-ADP agaroz kolonuna uygulanması ve pH sı 7,5 olan 10 mM TE tamponun, daha sonra adı geçen tampona sırasıyla konsantrasyonları 50 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM ve 400 mM olacak şekilde NaCl ilavesiyle hazırlanan tamponların geçirilmesiyle yapılan afinite kromatografisinde 400 mmol NaCl içeren pH'sı 7,5 olan TE tamponuyla 1 ml'lik hacimler halinde toplanan elüatlarda enzim aktivitesi görüldü (Şekil 4-2). Tiyoredoksin redüktaz enzimi toplam 6 ml tampon ile elüe edildi. İlk 5 tüpte çok düşük, 6. tüpte ise çok yüksek tiyoredoksin redüktaz aktivitesi tespit edildi. İlk beş tüpteki elüatların birleştirilmesiyle oluşan fraksiyonda (F1) 300 µg/ml/dak. glutatyon redüktaz (GR) aktivitesi ve 116,3 µg/ml/dak tiyoredoksin redüktaz aktivitesi görüldü. 1189,8 µg/ml/dak tiyoredoksin redüktaz aktivitesi gösteren 6. tüpte (F2) ise 44 µg/ml/dak GR aktivitesi saptandı.

Midye hepatopankreas tiyoredoksin redüktazın elde edilme sürecindeki işlem basamakları Tablo 4-1'de özetlenmiştir. Tabloda sadece F2 fraksiyonu gösterildi.

Protein miktarları, Bradford metodu ile saptanan optik dansitelerin sığır serum albumini için bulunan regresyon denkleme yerleştirilmesiyle bulundu.

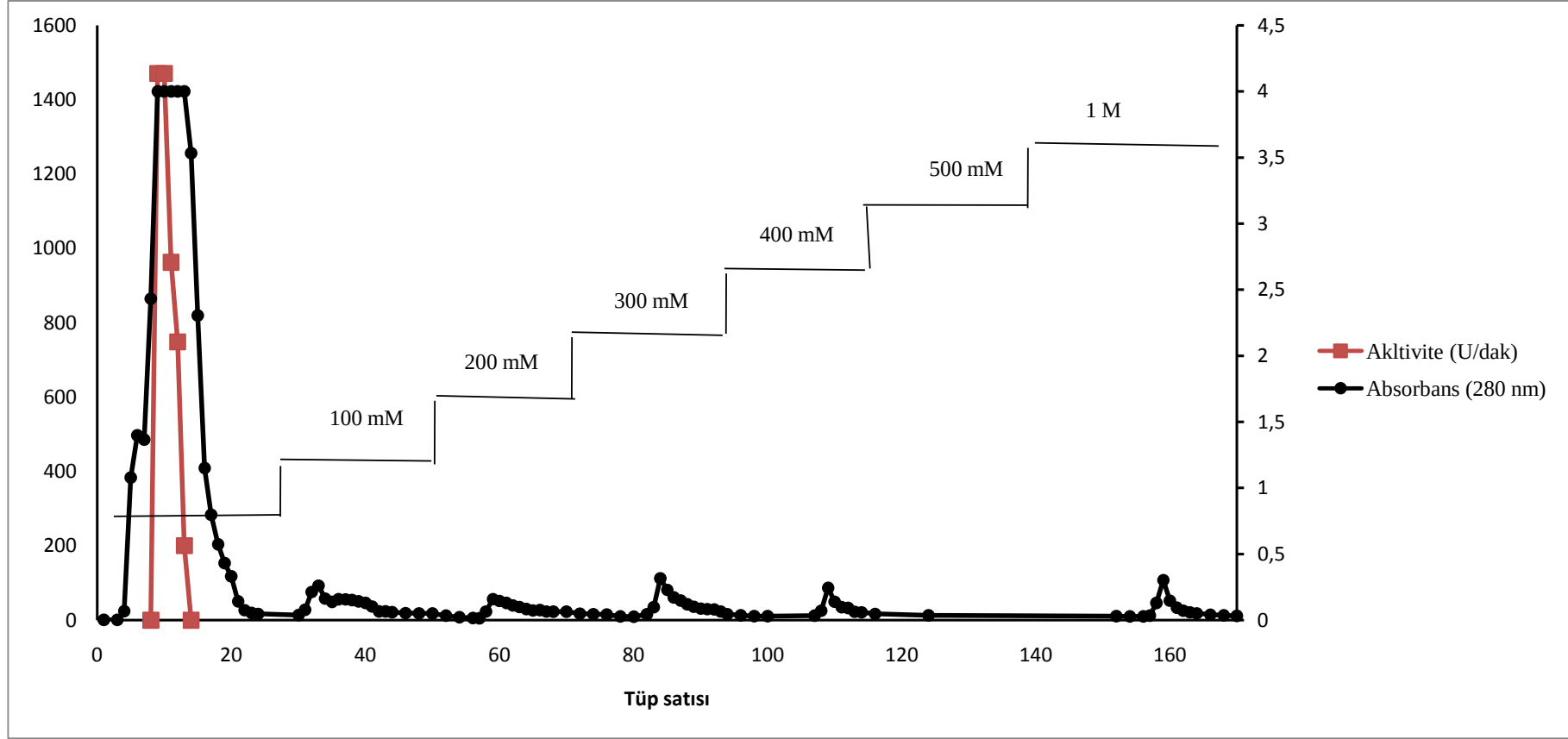
$$y = 0,004x + 0,102 (\mu\text{g/ml})$$

Tablo 4-1: Midye hepatopankreas tiyoredoksin redüktazının elde edilme aşamaları (60 midyeden 73,5 g hepatopankreas dokusu ile çalışılmıştır)

Saflaştırma basamakları	Total hacim (ml)	Total protein (mg)	Total aktivite (U) *	Spesifik aktivite (U/mg) **	Verim (%)	Saflaştırma oranı
1. Ham ekstre	200	3 642,4	112 298,0	30,8	100	-
2. % 80 Ammonyum sülfat	12,5	371,3	1 336,8	3,6	10,2	0,1
3. DEAE-Sefaroz CL-6B (10 mM)	10	10,6	775,4	73,2	0,3	2,4
4. ADP-Agaroz (400 mM)	1	0,04	1 189,8	29 745,8	0,000011	965,7

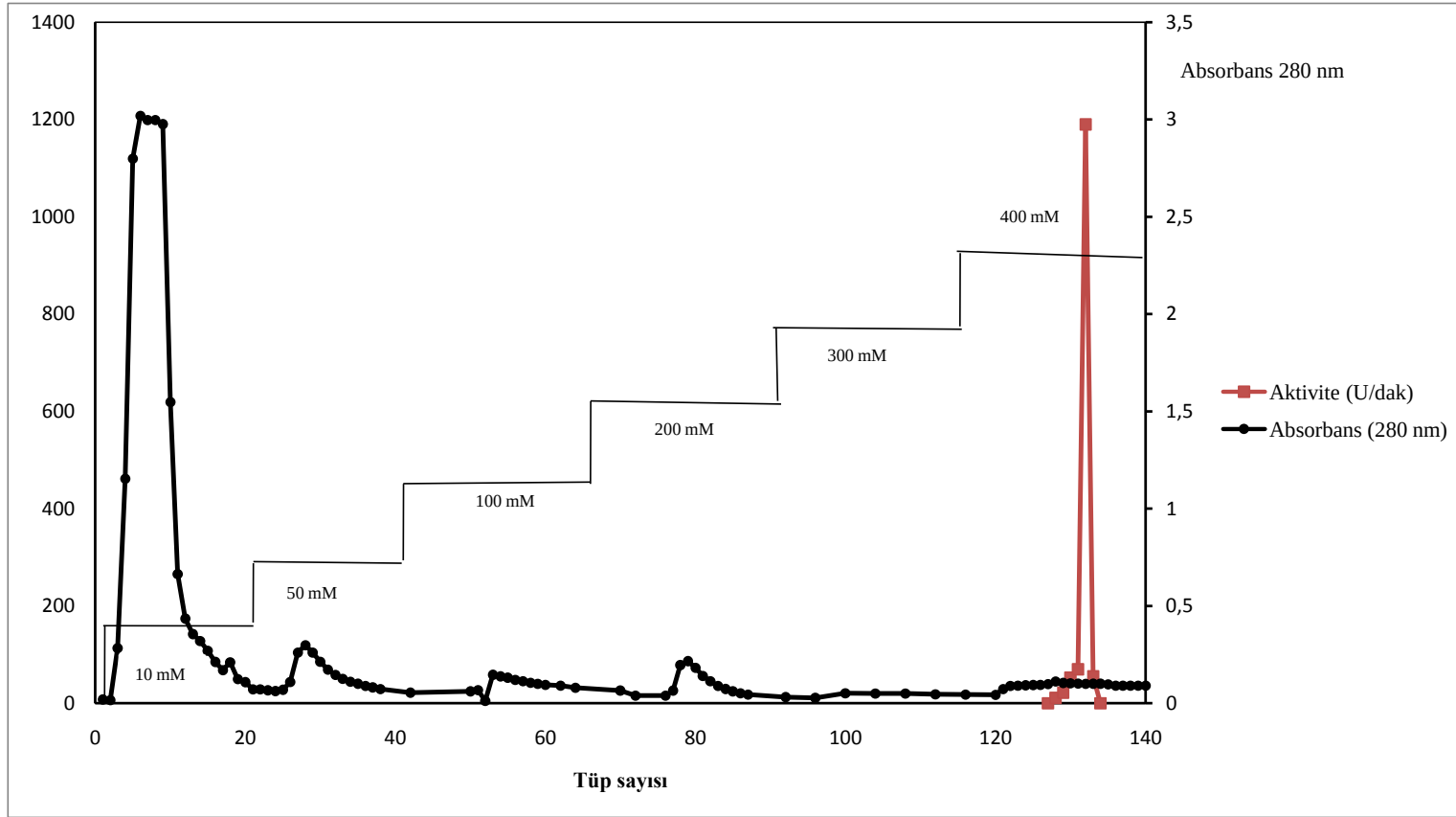
* $\mu\text{mol TNB} / \text{dak}$

** $\mu\text{mol TNB} / \text{dak} / \text{mg protein}$



Şekil 4-1: Midye hepatopankreası ham ekstresi % 80 amonyum sülfat kesitinin DEAE-Sefaroz CL-6B kolonundaki elüsyon grafiği

Kolon boyutları: 25 x 1,5 cm, örnek hacmi 12,5 ml (371,3 mg protein), akış hızı: 48 ml/saat, tamponlar: 100 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM, 500 mM ve 1 M NaCl içeren 10 mM TE (pH 7,5) tamponları.

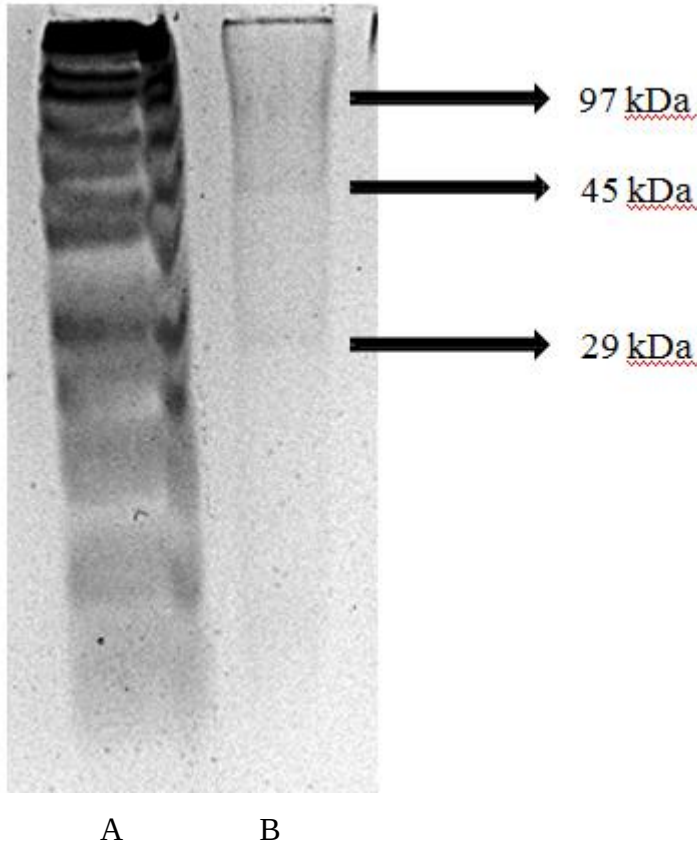


Şekil 4-2: DEAE-Sefaroz CL-6B kolon kromatografisiyle elde edilen 10 mM elüatın 2',5'-ADP-agaroz kolonundaki elüsyon grafiği

Kolon boyutları: 10 x 1 cm, örnek hacmi 1 ml (10,6 mg protein), akış hızı: 1 ml/dak, tamponlar: 50 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM NaCl içeren 10 mM TE (pH 7,5) tamponları.

Enzimlerin saflıklarını saptamak amacıyla yapılan SDS-PAGE elektroforezinde sadece F1 görüntülenebildi.

Afinite kromatografisi ile elde edilen F1 elüatının, yüksek ve düşük molekül ağırlıklı standart proteinlerle karşılaştırmalı olarak çalışılan SDS-PAGE'deki protein bantları (97 kDa, 45 kDa, 29 kDa) şekil 4-3'de gösterilmiştir.

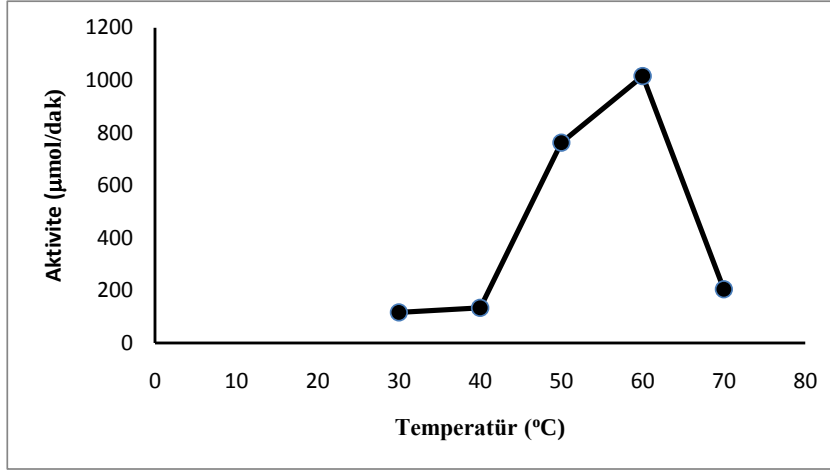


Şekil 4-3: Affinite kromatografisi ile elde edilen F1 elüatının SDS-PAGE görüntüsü

A: Yüksek ve düşük molekül ağırlıklı standart proteinler, B: F1

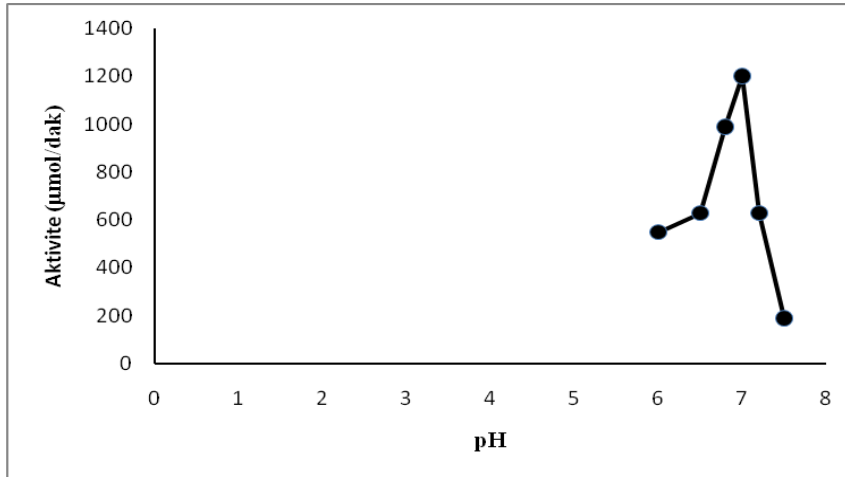
Kinetik özelliklerinin incelenmesinde F2 kullanıldı.

Tiyoredoksin redüktaz aktivitesi gösteren fraksiyonun 30°-70°C arasındaki sıcaklıklarda aktivitesinin incelenmesinde, enzimin 60°C’de en yüksek aktiviteyi gösterdiği saptandı (Şeki 4-4).



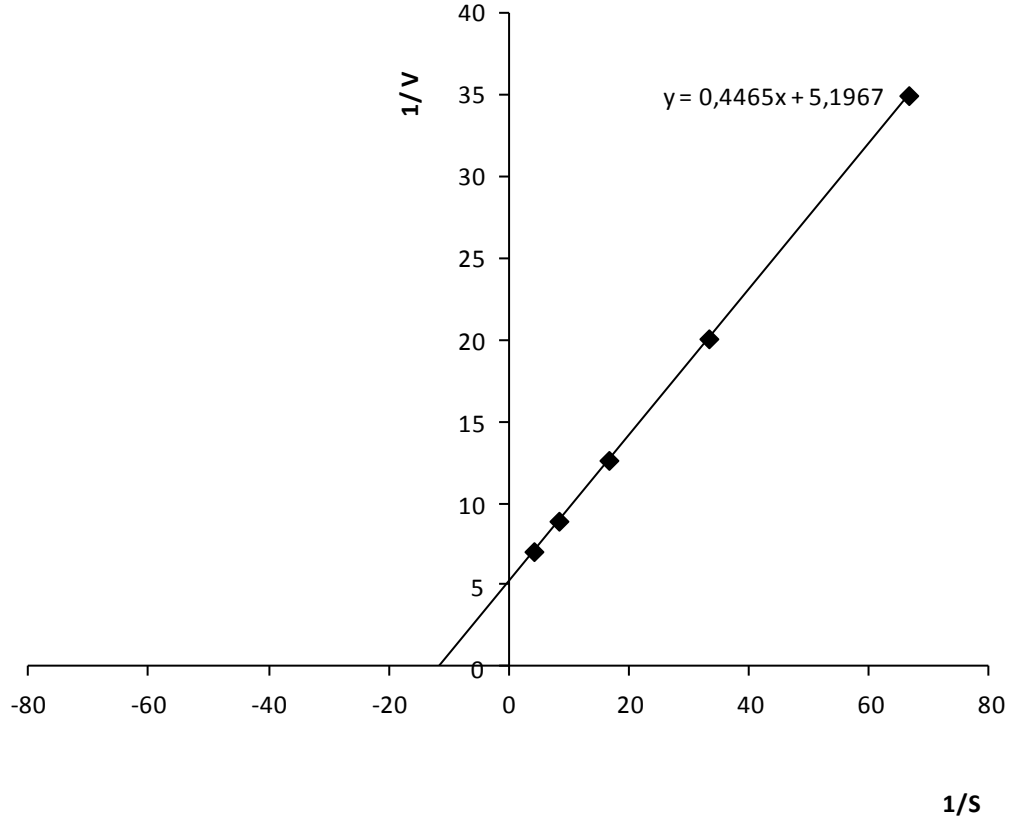
Şekil 4-4: Tiyoredoksin redüktaz aktivitesine sıcaklığın etkisi

Tiyoredoksin redüktaz aktivitesi gösteren fraksiyonun değişik pH’larda aktivitesinin incelenmesinde, pH 7,0’de en yüksek aktiviteyi gösterdiği görüldü (Şekil 4-5).



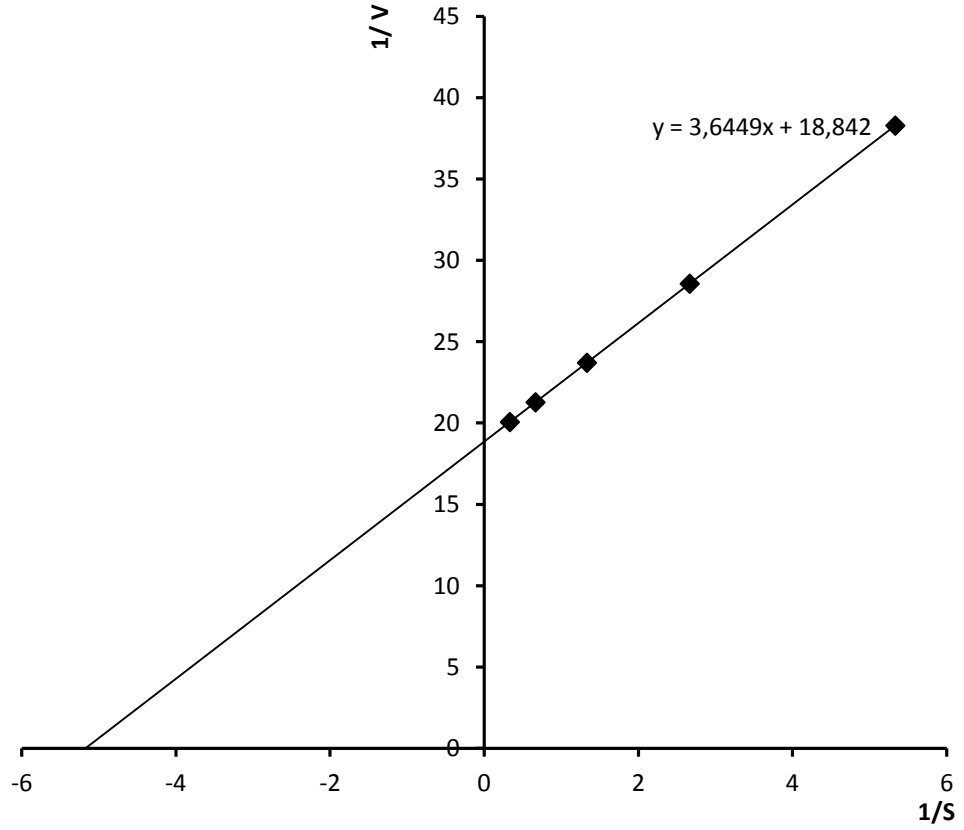
Şekil 4-5: Tiyoredoksin redüktaz aktivitesine pH’nin etkisi

Substrat konsantrasyonunun tiyoredoksin redüktaz aktivitesi üzerine etkisinin incelenmesi sonucunda, enzimin NADPH'a karşı K_m değerinin $85 \mu\text{mol}$ ve V_{max} değerinin ise $4,82 \mu\text{mol/dak/mg}$ olduğu saptandı (Şekil 4-6).



Şekil 4-6: NADPH konsantrasyonunun tiyoredoksin redüktaz aktivitesi üzerine etkisi
 (- $1/K_m = -11,76$)

Substrat konsantrasyonunun tiyoredoksin redüktaz aktivitesine etkisinin incelenmesi sonucunda enzimin DTNB'ye karşı K_m değerinin $193 \mu\text{mol}$ ve V_{max} değerinin ise $1,32 \mu\text{mol/dak/mg}$ olduğu saptandı (Şekil 4-7).

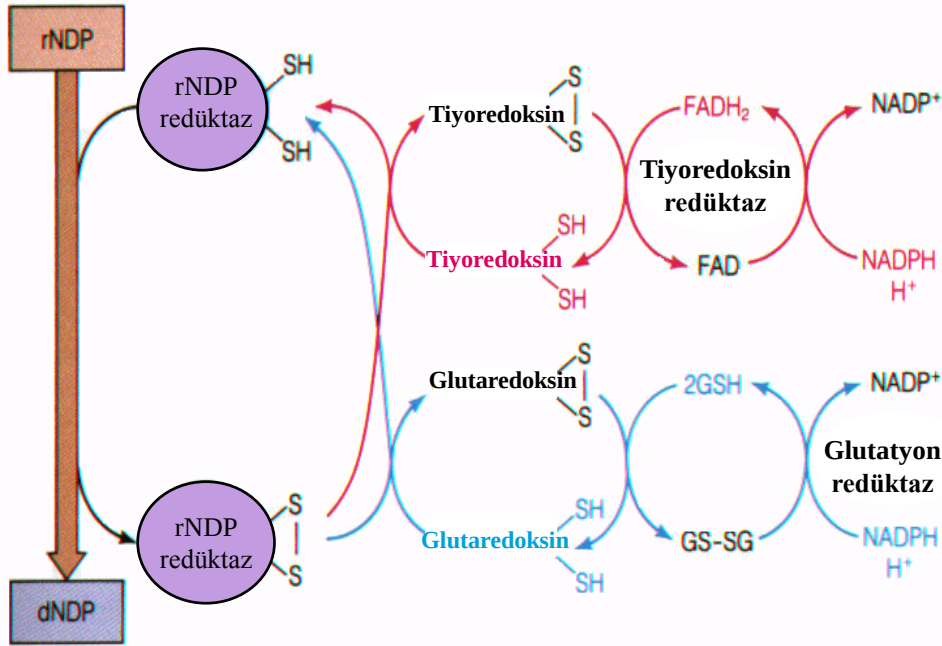


Şekil 4-7: DTNB konsantrasyonun tiyoredoksin redüktaz aktivitesi üzerine etkisi
 (- $1/K_m = -5,18$)

5. TARTIŞMA

Tiyoredoksin sistemi tiyoredoksin ve NADPH-bağımlı tiyoredoksin redüktaz olmak üzere iki proteinden oluşmaktadır. Her ikisi de katalitik merkezinde iki amino asid ile ayrılan iki disülfid bağı içeren redoks aktif proteinlerdir.

Tiyoredoksin sistemi, sülfoksitlerin tiyoeterlere, sülfatın sülfite, proteinlerdeki disülfid bağların redüklenmesinde ve faj T-7 DNA polimeraz'ın etkisi için gerekli olan bir altbirim olarak yer alması gibi birçok biyokimyasal reaksiyonda görev alırlar. Tiyoredoksin geni eksik olan bakteri mutantlarında ribonükleotidlerin redüksiyonu ile NADPH oksidasyon reaksiyonlarını birleştiren glutaredoksin adında ikinci bir proteinin varlığı tespit edilmiştir. Okside glutaredoksin glutatyon tarafından redüklenirken, oluşan okside glutatyon (GSSG) ise glutatyon redüktaz tarafından redüklenir. Yani ribonükleotidler, tiyoredoksin ve glutatyon olmak üzere iki paralel olarak çalışan sistem tarafından redüklenebilir (Şekil 5-1)(Pigiet ve Conley 1977).



Şekil 5-1: Ribonükleidlerin redüksiyonunda görev alan tiyoredoksin ve glutatyon sistemleri (<http://cs.stedwards.edu/chem/Chemistry/CHEM43/CHEM43/Thioredox/FUNCTION.HTML>)

Bu iki sistemde görev alan tiyoredoksin redüktaz ve glutatyon redüktaz enzimlerinin etki mekanizmasını daha iyi anlamak için yeni saflaştırma metodları

geliştirilerek adı geçen enzimler birçok kaynaktan izole edilip yüksek derecede saf olarak elde edilmiştir. Bu çalışmada ise *Mytilus galloprovincialis*'ten tiyoredoksin redüktaz ilk kez elde edilmiş ve başlıca kinetik özellikleri incelenmiştir.

Her iki NADP(H)-bağımlı enzimin saflaştırılma aşamalarında en uygun ilk basamak olarak ligand 2',5'-ADP kullanılan 2',5'-ADP-agaroz afinite kromatografisi yöntemi geliştirilmiştir (Brodelius ve ark. 1974). Daha sonra agaroz-hekzilamin hidrofobik kolon kromatografisi yöntemi uygulanarak bu iki enzim ayrı olarak % 80 saflıkla elde edilmiştir.

Afinite kromatografisi ilk basamağı olarak uygulandığında her iki redüktaz 300 kez saflaştırılarak elde edilmiştir. Afinite kromatografisinden önce ilk basamak olarak anyon değiştirici kromatografisinin uygulanması, afinite kolona uygulanan elüattaki redüktazların bağlanma kapasitesini arttırdığı bildirilmiştir. Örneğin 2',5'-ADP-agaroz kolonuna uygulanan ham ekstrenin uygulanması ile jelin her bir mililitresine sadece 116U GR ve 26 U TrxR bağlanırken, ilk önce DEAE kolonundan elüe edilerek elde edilen fraksiyonların 2',5'-ADP-agaroz kolonuna uygulanması ile her bir mililitresine 600 U GR ve 570 U TrxR bağlandığı bildirilmiştir. Bu durumun ham ekstrede glutatyon redüktaz ve tiyoredoksin redüktaz dışında da NADP(H)-bağlayıcı proteinlerin bulunmasından kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür (Pigiet ve Conley 1977).

Bildirilen birçok saflaştırma yönteminde kromatografi basamağından önce 70°C'de 8 dakika (Williams ve ark. 1967), 65°C'de 5 dak. (Moore ve ark. 1964), 60°C'de (Maggioli ve ark. 2004), 56°C'de 10 dakika (Lu ve ark. 2009) ısıtma ile denatürasyon basamağı uygulanmıştır. Bu çalışmada da % 80 amonyum sülfat kesiti 56°C'de 10 dakika ısıtılması ile ısıya dayanıklı olmayan bazı proteinlerin uzaklaştırılması sağlanmıştır.

TrxR, *Streptomyces aureofaciens* mayasından (Horecká ve ark. 1998) ve *Fasciola hepatica*'dan (Maggioli ve ark. 2004) amonyum sülfatla çöktürme, anyon değiştirici (DEAE-Sellüloz) ve afinite (2',5'-ADP-Sepharoz 4B) kromatografileri olmak üzere üç basamaklı prosedür ile izole edilmiş ve saflaştırılmıştır.

Sıçan karaciğerinden elde edilen tiyoredoksin redüktazın Sephadex jel filtrasyonu ve DEAE-sellüloz kromatografileri kullanılarak 626 kez saflaştırıldığı bildirilmiştir (Larsson 1973).

Midye hepatopankreası tiyoredoksin redüktazının saflaştırılması ve bazı özelliklerinin incelenmesi amacıyla yapılan bu çalışmamızda, midye hepatopankreas

ham ekstresinden sırayla amonyum sülfatla çöktürme, DEAE-Sefaroz CL-6B anyon değiştirici ve afinite (2',5'-ADP-agaroz) kromatografileri uygulanması sonucu adı geçen dokuda tiyoredoksin redüktazın 965 kez saflaştırılarak elde edilmesi literatür bulguları ile ileri derecede benzerlik göstermektedir.

Tiyoredoksin sisteminin bazı anaerobik bakterilerinin katabolic metabolizmasında elektron taşıyıcı olarak görev gördüğü bildirilmiştir. *Eubacterium acidaminophillum*, *Clostridium litorale*, *C. sticklandii*, *C. sporogenes*, *C. cylindrosporum* ve *Tissierella creatinophilla*'dan DEAE-Sefasel anyon değiştirici kromatografisi, asid ile muamele edilip, afinite (Porcin Red) ve jel permeasyon kromatografisi yöntemleri kullanılarak saf halde elde edilmiştir ve tiyoredoksinlerin DEAE-Sefasel kolonuna bağlanmadan elüe oldukları, afinite kolonuna (Procion Red) ise sıkı bağlanarak 500 mM KCl ile elüe oldukları bildirilmiştir (Harms ve ark. 1998). Bu çalışmada da TrxR'in anyon değiştiriciye bağlanmadığını ve afinite kromatografisine uygulanan 10 mM elüatında bulunan bu üç enzimin de (Trx, TrxR ve GR) muhtemelen afinite kolonuna bağlanarak 400 mM NaCl ile elüe oldukları görülmüştür. SDS-PAGE elektroforezinde F1'de görülen üç bant homodimerler olan TrxR, GR ve Trx altbirimlerine ait olabileceği düşünülmektedir.

Enzimin saflık derecesi, SDS-PAGE uygulanması ve spesifik aktivitenin hesaplanması ile incelenmiştir. Pigiet ve Conley (1977) saf tiyoredoksin redüktazın DTNB indirgeme metodu ile tayin edilen spesifik aktivitesinin 1,290 U/mg, Maggioli ve ark. (2004) 7,117/mg, Williams ve arkadaşları (1967) ise 1,020 U/mg olduğu, glutatyon redüktazının ise 214 µmol/dak (Pigiet ve Conley 1977), ve 210 µmol/dak, (Williams ve Arscott 1971) olarak bildirilmiştir. Bu çalışmada TrxR total aktivitesi 1,189 U olarak, spesifik aktivitesi ise 29,745 U/mg protein olarak bulunmuştur. Glutatyon redüktazın F1'deki total aktivitesi ise 300 U olarak bulunmuştur. Bu çalışmada, saf olarak elde edilen TrxR'ın spesifik aktivitesi bakımından, diğer türlerden izole edilen tiyoredoksin redüktazlarla kıyaslandığında 25 kat daha yüksek spesifik aktivite gösterdiği görülmektedir. Tiyoredoksin redüktaz aktivitesi DTNB bağımlı metodun yanı sıra, tiyoredoksin varlığında substrat olarak insulin kullanılan metod ile kanıtlanmıştır. Midye tiyoredoksin redüktazının, elektron vericisi olarak kullanılan NADPH varlığında insulindeki disülfid bağlarını redükleyebildiği saptanmıştır.

Tiyoredoksin redüktaz enziminin, elde edildiği kaynaklara göre, farklı optimum temperatur gösterdiği bildirilmiştir. Bu çalışmada midye TrxR'ın optimum temperaturü

60°C olarak saptanmış, aktivitenin 80°C'ye kadar azaldığı fakat kaybolmadığı görülmüştür. Bu bulgu *Deinococcus radiophilus* bakteriden (Seo ve Lee 2010) izole edilen TrxR'ın 70°C'e kadar stabil olduğu, *Thermotoga maritima* adlı bakteriden (Yang ve Ma 2010) elde edilen TrxR'ın ise 80°C'de 28 saat inkübasyon sonucunda aktivitesinin % 60'ını koruduğu ile ilgili araştırma sonuçlarıyla uyum göstermektedir. Diğer taraftan enzimlerin en yüksek aktivite gösterdikleri sıcaklığın belirlenmesi amacıyla yapılan araştırmalarda, optimum sıcaklıkları oldukça düşük enzimlere de rastlanmış, örneğin *Plasmodium berghei* adlı malariya paraziti (Kapoor ve Banyal 2011) izole edilen TrxR'ın ve insan TrxR'ın 40°C'ye kadar stabil oldukları ve 40°C'den sonra aktivitede azalma görüldüğü, insan TrxR'ı ise 60°C'de tamamen inaktif olduğu bildirilmiştir (Gromer ve ark. 1998).

Bu çalışmada midye TrxR'ın optimum pH'sı 7,0 olarak saptanmıştır. Bu bulgu sıgır adrenal korteksi (Watabe ve ark. 1999), *Plasmodium berghei* malariya paraziti (Kapoor ve Banyal 2011), *E.coli* (William 1995), *Thermotoga maritima* bakterisi (Yang ve Ma 2010)'den elde edilen tiyoredoksin redüktazların sırasıyla 7,5, 7,4, 7,7 ve 6,5 olarak bildirilen optimum pH'ları ile ilgili araştırma sonuçlarıyla uyum göstermektedir.

Sıçan karaciğerinden izole edilen tiyoredoksin redüktazın DTNB'e karşı Km değeri 660 µM, NADPH'a karşı 6 µM olarak bulunmuştur (Luthman ve Holmgren 1982). *Thermotoga maritima* bakterinin (Yang ve Ma 2010) tiyoredoksin redüktazın V_{max} değeri 115 µmol NADPH olarak bildirilmiştir. *Deinococcus radiophilus* tiyoredoksin redüktazının NADPH'a karşı Km ve Vmax değerleri sırasıyla 12,5 µmol ve 25 µmol/dak., DTNB'a karşı Km ve Vmax değerleri ise sırasıyla 463 µmol ve 756 µmol/dak olarak bulunmuştur (Seo ve Lee 2010). Sıçan karaciğerinden saflaştırılan TrxR'ın NADPH'a karşı Km değerinin 40 µmol olarak bildirilmiştir (Larsson 1973).

Bu çalışmada elde edilen tiyoredoksin redüktazın NADPH'a karşı Km ve Vmax değerleri sırayla 85 µmol ve 4,8 µmol/dak/mg, DTNB'ye karşı Km ve Vmax değerlerinin ise sırayla 193 µmol ve 1,32 µmol/dak/mg olarak saptandı. Bu değerler yukarıda belirtilen tiyoredoksin redüktazlarına ait Km ve Vmax sınırları arasındadır.

TrxR mekanizmasının açıklanması; normal ve patolojik hücre fonksiyonlarının, ilaçlarla inhibisyonunun, hastalık mekanizmalarının, kanser için yeni tedavilerin, otoimmün hastalıkların ve belki diğer insan hastalıklarının iç yüzünün anlaşılmasını sağlayabilir. Midye hepatopankreasından ilk kez tiyoredoksin redüktaz enziminin

saflaştırılması ve kinetik özelliklerinin incelenmesi amacıyla yapılan bu çalışmanın ise gelecek araştırmalara yardımcı olacağını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

Alpbaz, A.G. (1997). Dünyada ve Türkiye’de su ürünleri yetiştiriciliğinin dünü, bugünü ve geleceği. Akdeniz Balıkçılık Kongresi. *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayını*, 5-15.

Alpbaz, A. (1993). Kabuklu ve eklembacaklılar yetiştiriciliği. *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayını*, 26-82.

Ames, B.N., Shigenaga, M.K., Hagen, T.M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Review. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, **90**, 7915-7922.

Arnér, E.S.J. ve Holmgren, A. (2000a). Measurement of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Current Protocols in Toxicology*. Chapter 7, 7.4.1-7.4.14.

Arnér, E.S.J. ve Holmgren, A. (2000b). Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. Minireview. *European Journal of Biochemistry*, **267**, 6102-6109.

Arnér, E.S.J. ve Holmgren, A. (2006). The thioredoxin system in cancer. *Seminars in Cancer Biology*, **16**, 420-426.

Bentley, A.R., Emrani, P., Cassano, P.A. (2008). Genetic variation and gene expression in antioxidant related enzymes and risk of COPD: a systematic review. *Thorax*, **63**, 956–961.

Bindoli, A., Rigobello, M.P., Scutari, G., Gabbiani, C., Casini, A., Messori, L. (2009). Thioredoxin reductase: A target for gold compounds acting as potential anticancer drugs. *Coordination Chemistry Reviews*, **253**, 1692-1707.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254.

Brodelius, P., Larsson, P.-O., Mosbach, K. (1974). The Synthesis of three AMP-analogues: N6-(6-aminohexyl)-adenosine 5'-monophosphate, N6-(6-aminohexyl)-adenosine 2',5'-bisphosphate, and N6-(6-aminohexyl)-adenosine 3', 5'-bisphosphate and their application as general ligands in biospecific affinity chromatography. *European Journal of Biochemistry*, **47**, 81-89.

Büyükgüzel, E. (2013). Protein oksidasyonun biyokimyasal ve moleküler mekanizması. *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi*, **3**, 40-51.

Cadenas, C., Franckenstein, D., Schmidt, M., Gehrmann, M., Hermes, M., Geppert, B., Schormann, W., Maccoux, L.J., Schug, M., Schumann, A., Wilhelm, C., Freis, E., Ickstadt, K., Rahnenführer, J., Baumbach, J.I., Sickmann, A., Hengstler, J.G. (2010). Role of thioredoxin reductase 1 and thioredoxin interacting protein in prognosis of breast cancer. *Breast Cancer Research*, **12**, R44-R59.

Canesi, L., Fabbri, R., Gallo, G., Vallotto, D., Marcomini, A., Pojana, G. (2010). Biomarkers in *Mytilus galloprovincialis* exposed to suspensions of selected nanoparticles (Nano carbon black, C60, fullerene, Nano-TiO₂, Nano-SiO₂). *Aquatic toxicology*, **100**, 168-177.

Carlberg, I. ve Mannervik, B. (1985). Glutathione reductase. *Methods of Enzymology*, **113**, 484-490.

Ceccarelli, J., Delfino, L., Zappia, E., Castellani, P., Borghi, M., Ferrini, S., Tosetti, F., Rubartelli, A. (2008). The redox state of the lung cancer microenvironment depends on the levels of thioredoxin expressed by tumor cells and affect tumor progression and response to prooxidants. *International Journal of Cancer*, **123**, 1770-1778.

Cellura, C., Toubiana, M., Parrinello, N., Roch, P. (2006). *Hsp70* gene expression in *Mytilus galloprovincialis* hemocytes is triggered by moderate heat shock and *Vibrio anguillarum*, but not by *V.splendidus* or *Micrococcus lysodeikticus*. *Developmental and Comparative Immunology*, **30**, 984-997.

Chaiswing, L., Bourdeau-Heller, J.M., Zhong, W., Oberley, T.D. (2007). Characterization of redox state of two human prostate carcinoma cell lines with different degrees of aggressiveness. *Free Radical Biology and Medicine*, **43**, 202-215.

Çimen, M.B.Y. (1999). Flavonoidler ve antioksidan özellikleri. *Journal of Medical Science*, **19**, 296-304.

Das, K.C., Lewis-Molock, Y. ve White, C.W. (1997). Elevation of manganese superoxide dismutase gene expression by thioredoxin, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, **17**, 713-26.

Ejima, K., Nanri, H., Araki, M., Uchida, K., Kashimura, M., Ikeda, M. (1999). 17 β -estradiol induces protein thiol/disulfide oxidoreductases and protects cultured

bovine aortic endothelial cells from oxidative stress. *European Journal of Endocrinology*, **140**, 608–613.

Engman, L., McNaughton, M., Gajewska, M., Kumar, S., Birmingham, A., Powis, G. (2006). Thioredoxin reductase and cancer cell growth inhibition by organogold (III) compounds. *Anti-cancer Drugs*, **17**, 539-544.

Gleason, F.K. ve Holmgren, A. (1988). Thioredoxin and related proteins in procaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, **4**, 271-298.

Gromer, S., Arscott, L.D., Williams, C.H.Jr., Schrimmer, R.H., Becker, K. (1998). Human placenta thioredoxin reductase: Isolation of the selenoenzyme, steady state kinetics and inhibition by therapeutic gold compounds. *The Journal of Biological Chemistry*, **273**, 20096-20101.

Harms, C., Meyer, M.A., Andreesen, J.R. (1998). Fast purification of thioredoxin reductases and of thioredoxins with an unusual redox-active centre from anaerobic, amino-acid-utilizing bacteria. *Microbiology*, **144**, 793-800.

Holmgren, A. (1968). Thioredoxin. 6. The amino acid sequence of the protein from *Escherichia coli* B. *European Journal of Biochemistry*, **6**, 475-484.

Holmgren, A. (1985). Thioredoxin. *Annual Review of Biochemistry*, **54**, 237-271.

Holmgren, A. ve Bjorsnstedt, M. (1995). Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods in Enzymology*, **252**, 199-208.

Holmgren, A. ve Lu, J. (2010). Thioredoxin and thioredoxin reductase: Current research with special reference to human disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **396**, 120-124.

Horecká, T., Perečko, D., Kutejová, E., Mikuášová D., Kollárová, M. (1998). Purification and partial characterization of thioredoxin reductase from *Streptomyces aureofaciens*. *Biochemistry and Molecular Biology International*, **46**, 657-665.

Kapoor, G. ve Banyal, H.S. (2011). Purification and characterization of *Plasmodium berghei* thioredoxin reductase. *Asian Journal of Animal Sciences*, **5**, 145-152.

Karlenius, T.C. ve Tonissen, K.F. (2010). Thioredoxin and cancer: A role for thioredoxine in all states of tumor oxygenation. *Cancers*, **2**, 209-232.

Koç, A., Karakaya, H.Ç., Ünlü, E.S. (2006). Evidence for the presence of a second electron donor for the cytoplasmic thioredoxins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Turkish Journal of Biology*, **30**, 133-138.

Larsson, A. (1973). Thioredoxin reductase from rat liver. *European Journal of Biochemistry*, **35**, 346-349.

Laurent, T.C., Moore, T.C. ve Reichard, P. (1964). Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides. IV. Isolation and characterization of thioredoxin, the hydrogen donor from *Escherichia Coli* B. *Journal of Biological Chemistry*, **239**, 3436-3444.

Lehninger, A.L., Nelson, D.L. ve Cox, M.M. (1993). *Principles of Biochemistry*, (2nd ed.). New York: Worth Publishers, Inc.

Liu, H., Nishitoh, H., Ichijo, H., Kyriakis J.M. (2000). Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by tumor necrosis factor receptor-associated Factor 2 requires prior dissociation of the ASK1 inhibitor thioredoxin. *Molecular and Cellular Biology*, **26**, 2198-2208.

Liu, Z., Du, Z.-Y., Huang, Z.-S., Lee, K.-S., Gu, L.-Q. (2008). Inhibition of thioredoxin reductase by curcumin analogs. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **72**, 2214-2218.

Lu, J., Papp, L.V., Fang, J., Rodriguez-Nieto, S., Zhivotovsky, B., Holmgren, A. (2006). Inhibition of mammalian thioredoxin reductase by some flavonoids: Implications for myricetin and quercetin anticancer activity. *Cancer Research*, **66**, 4410-4418.

Lu, J., Chew, E.-H., Holmgren, A. (2007). Targeting thioredoxin reductase is a basis for cancer therapy by arsenic trioxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, **104**, 12288-12293.

Lu, J., Zhong, L., Lönn, M.E., Burk, R.F. Hill, K.E., Holmgren, A. (2009). Penultimate selenocysteine residue replaced by cysteine in thioredoxin reductase from selenium-deficient rat liver. *The FASEB Journal*, **23**, 2394-2402.

Luthman, M. ve Holmgren, A. (1982). Rat liver thioredoxin and thioredoxin reductase: Purification and characterization. *Biochemistry*, **21**, 6628-6633.

Maggioli, G., Piasenza, L., Carambula, B., Carmona, C. (2004). Purification, characterization and immunolocalization of a thioredoxin reductase from adult *Fasciola hepatica*. *Journal of Parasitology*, **90**, 205-211.

Martin, J.L. (1995). Thioredoxin - a fold for all reasons. *Structure*, **3**, 245-250.

Moore, E.C., Reichard P., Thelander, L. (1964). Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides: V. Purification and properties of thioredoxin reductase from *Escherichia coli* B. *Journal of Biological Chemistry*, **239**, 3445-3452.

Mukherjee, A. ve Martin, S.G. (2008). The thioredoxin system: a key target in tumor and endothelial cells. *Brazilian Journal Radiology*, **81**, S57-S68.

Mustacich, D. ve Powis, G. (2000). Thioredoxin reductase. Review article. *Biochemical Journal*, **346**, 1-8.

Nordberg, J. ve Arnér, E.S. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine*, **31**, 1287-1312.

Pazarbaşı, A., Kasap, M., Kasap, H. (2011). Kanser yolları. *Arşiv*, **20**, 187-228.

Peters, A.L. ve Van Noorden, C.J.F. (2009). Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and malaria: Cytochemical detection of heterozygous G6PD deficiency in women. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, **57**, 1003–1011.

Pigiet, V.P. ve Conley, R.R. (1977). Purification of thioredoxin, thioredoxine reductase and glutathione reductase by affinity chromatography. *The Journal of Biological Chemistry*, **252**, 6367-6372.

Powis G, Kirkpatrick DL, Angulo M, Baker A. (1998). Thioredoxin redox control of cell growth and death and the effects of inhibitors. *Chemico-Biological Interactions*, **111-112**, 23- 34.

Powis, G. ve Montford, W.R. (2001). Properties and biological activities of thioredoxins. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **41**, 261-295.

Qui, X., Liu, Z., Shao, W.-Y., Liu, X., Jing, D.-P., Yu, Y.-J., An, L.-K., Huang, S.-L., Bu, X.-Z., Huang, Z.-S., Gu, L.-Q. (2008). Synthesis and evaluation of curcumin analogues as potential thioredoxin reductase inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **16**, 8035-8041.

Rahman, K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants and co-factors. *Clinical Interventions in Aging*, **2**, 219- 236.

Romieu, I., Castro-Giner, F., Kunzli, N., Sunyer, J. (2008). Hava kirliliği, oksidatif stres ve beslenme desteği: Bir derleme. *European Respiratory Journal*, **31**, 179-196.

Rybicki, E.P. ve Purves, M. (1996). SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). İçinde V.E. Coyne, M.D. James, S.J. Reid, E.P. Rybicki (Eds.), *Molecular Biology Techniques Manual* (3th ed.). University of Cape Town: Dept Microbiology.

Saitoh, M., Nishitoh, H., Fujii, M., Takeda, K., Tobuime, K., Sawada, Y., Kawabata, M., Miyazono, K., Ichijo, H. (1998). Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *The EMBO Journal*, **17**, 2596-2606.

Sandalova, T., Zhond, L., Lindqvist, Y., Holmgren, A., Schneider, G. (2001). Three-dimensional structure of a mammalian thioredoxin reductase: Implications for mechanism and evolution of a selenocysteine-dependent enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, **98**: 9533-9538.

Sanmartin, C., Plano, D., Sharma, A.K., Palop, J.A. (2012). Selenium compounds, apoptosis and other types of cell death: An overview for cancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, **13**, 9649-9672.

Schulze, P.C., De Keulenaer, G.W., Yoshioka, J., Kassik, K.A. ve Lee, R.T. (2002). Vitamin D₃-upregulated protein-1 (VDUP-1) regulates redox-dependent vascular smooth muscle cell proliferation through interaction with thioredoxin. Superoxide dismutase gene expression by thioredoxin. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, **17**, 713–726.

Seo, H.-J. ve Lee, Y.N. (2010). Characterization of *Deinococcus radiophilus* thioredoxin reductase active with both NADH and NADPH. *The Journal of Microbiology*, **48**, 637-643.

Södberg, A., Sahaf, B., Rosén, A. (2000). Thioredoxin reductase, a redox-active selenoprotein, is secreted by normal and neoplastic cells: Presence in human plasma. *Cancer research*, **60**, 2281-2289.

Stadtman, E.R. (2004). Role of oxidant species in aging. *Current Medicinal Chemistry*, **11**, 1105-1112.

Sureda, A., Box, A., Tejada, S., Blanco, A., Caixach, J., Deudero, S. (2011). Biochemical responses of *Mytilus galloprovincialis* as biomarkers of acute environmental pollution caused by the *Don Pedro* oil spill (Eivissa Island, Spain). *Aquatic Toxicology*, **101**, 540-549.

Tamura, T. ve Stadtman, T.C. (1996). A new selenoprotein from human lung adenocarcinoma cells: Purification, properties, and thioredoxin reductase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, **93**, 1006-1011.

Tandoğan, B. ve Ulusu, N.N. (2011). Thioredoxin reductase. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, **39**, 87-92.

Tosyalı, C. (2005). *Mytilus galloprovincialis* (Lamark, 1819) midyesinde pişirmenin çeşitli ağır metal düzeylerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Kahramanmaraş.

Ulukaya, E. Akciğer kanserleri. *İçinde Tanı ve Tedavide Temel İlkeler ve Uygulamalar* (editörler Engin K, Özyardımcı N), Bölüm III (<http://biyokimya.uludag.edu.tr/CellCycleApoptosis.pdf>)

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **39**, 44-84.

Watabe, S., Makino, Y., Ogawa, K., Hiroi, T., Yamanoto, Y., Takahashi, S.Y. (1999). Mitochondrial thioredoxin reductase in bovine adrenal cortex. Its purification, properties, nucleotide/amino acid sequences and identification of selenocysteine. *European Journal of Biochemistry*, **264**, 74-84.

Weber, K. ve Osborn, M. (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *The Journal of Biological Chemistry*, **244**, 4406.

Wei, Y., Fan, T., Yu, M. (2008). Inhibitor of apoptosis proteins and apoptosis. Review. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, **40**, 278-288.

Welsh, S.J., Bellamy, W.T., Briehl, M.M., Powis, G. (2002). The redox protein thioredoxin-1 (Trx-1) increases hypoxia-inducible factor 1 α protein expression: Trx-1 overexpression results in increased vascular endothelial growth factor production and enhanced tumor angiogenesis. *Cancer Research*, **62**, 5089-5095.

Williams, C.H.Jr., Zanetti, G., Arscott, L.D., McAllister, J.K. (1967). Lipoamide dehydrogenase, glutathione reductase, thioredoxin reductase, and thioredoxin. *The Journal of Biological Chemistry*, **242**, 5226-5231.

Williams, C.H.Jr. ve Arscott, L.D. (1971). Glutathione reductase (*Escherichia coli*). *Methods in Enzymology*, **17B**, 503-509.

Williams, C.H.Jr. (1992). Lipoamide dehydrogenase, glutathione reductase, thioredoxin reductase and mercuric ion reductase - a family of flavoenzyme transhydrogenases. *Chemistry and Biochemistry of Flavor Enzymes*, **3**, 121-211.

Williams, C.H.Jr. (1995). Mechanism and structure of thioredoxin reductase from *E.coli*. *The FASEB Journal*, **9**, 1267-1276.

Williams, C.H.Jr., Arscott, L.D., Müller, S., Lennon, B.W., Ludwig, M.L., Wang, P.-F., Veine, D.M., Becker, K., Schirmer, R.H. (2000). Thioredoxin reductase. Two modes of catalysis have evolved. Minireview. *European Journal of Biochemistry*, **267**, 6110-6117.

Yamawaki, H., Haendeler, J., Berk, B.C. (2003). Thioredoxin. A key regulator of cardiovascular homeostasis. *Circulation research*, **93**, 1029-1033.

Yan, C., Siegel, D., Newsome, J., Chilloux, A., Moody, C.J., Ross, D. (2012). Antitumor indolequinones induced apoptosis in human pancreatic cancer cells via inhibition of thioredoxin reductase and activation of redox signaling. *Molecular Pharmacology*, **81**, 401-410.

Yang, X. ve Ma, K. (2010). Characterization of a thioredoxin-thioredoxin reductase system from the Hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Journal of Bacteriology*, **192**, 1370-1376.

Yoo, M.-H., Xu, X.-M., Carlson, B.A., Gladyshev, V.N., Hatfield, D.L. (2006). Thioredoxin reductase 1 deficiency reverses tumor phenotype and tumorigenicity of lung carcinoma cells. *Journal of Biological Chemistry*, **281**, 3005-13008.

Zhong, L., Arnér, E.S.J., Holmgren, A. (2000). Structure mechanism of mammalian thioredoxin reductase: The active site is a redox-active selenothiol/selenylsulfide formed from the conserved cysteine-selenocysteine sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, **97**, 5854-5859.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Esra	Soyadı	Acar
Doğ.Yeri	Üsküdar	Doğ.Tar.	01.03.1986
Uyruğu	TC	TC Kim No	37279655846
Email	esraacar@windowlive.com	Tel	05316205990

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Lisans	İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ- FEN FAKÜLTESİ- BİYOLOJİ	2010
Lise	HABİRE YAHŞİ LİSESİ (YDA)	2004

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	BİYOLOG	VSY BIOTECHNOLOGY LTD.ŞTİ.	2010-2011-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	iyi	iyi	iyi	63.75	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	77.73		
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft office	İyi
Navision	İyi

Sertifikaları

- * Merck Millipore - II. Merck millipore Akademisi Semineri (04-05.10.2012)
- * İnce Karalar - Eppendorf Pipet Semineri Katılım Sertifikası (18.09.2012)
- * İstanbul Üniversitesi - Pedagojik Formasyon Sertifikası (24.07.2010)
- * Fatih Üniversitesi - 1.Ulusal Biyoteknoloji Öğrenci Kongresi Katılım Sertifikası (08.05.2009-10.05.2009)
- * İstanbul Teknik Üniversitesi- Moleküler Biyoloji ve Genetik Öğrenci Kongresi Katılım Sertifikası (08.09.2007 - 11.09.2007)
- * İstanbul Teknik Üniversitesi - cDNA Sentezi Çalıştayı Sertifikası (08.09.2007 - 11.09.2007)
- *ISO 17025 Laboratuvar Akreditasyonu Sertifikası
- * HACCP 22000 Gıda Güvenilirliği Sertifikası

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

Bilim teknik dergileri okumak, belgesel ve film izlemek, el işleri ile uğraşmak, paten kaymak, doğa yürüyüşlerine katılmak.