

Atıf İçin: Yüksel F, Temel Y, 2022. Glutasyon S-transferaz: Koyun Dalak Dokusundan Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 12(4): 2352 - 2363.

To Cite: Yüksel F, Temel Y, 2022. Glutathione S-transferase: Purification and Characterization from Sheep Spleen Tissue. Journal of the Institute of Science and Technology, 12(4): 2352 - 2363.

Glutasyon S-transferaz: Koyun Dalak Dokusundan Saflaştırılması ve Karakterizasyonu

Fatih YÜKSEL¹, Yusuf TEMEL^{2*}

ÖZET: Bu çalışmada, hücre içi majör antioksidan sistem olan glutasyon antioksidan sisteminin önemli enzimlerinden glutasyon S-transferaz (GST; EC 2.5.1.18) sitozolik enzimi koyun dalak dokusundan homojenat hazırlanması, *salting out* (amonyum sülfat tuzu ile çöktürme yöntemi) ve afinite kromatografisi (glutasyon-agaroz) olmak üzere üç adımda 3.67 EÜ mg⁻¹ protein değeri (spesifik aktivite) ve %3.73 verim ile 122.3 kat saflaştırıldı. Koyun dalak dokusundan saflaştırılan GST enziminin saflık derecesini belirlemek ve doğal alt birim molekül kütlelerinin tespitinde sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) metodu kullanıldı. Koyun dalak dokusu GST enziminin alt birimlerine ait molekül kütlesi yaklaşık olarak 26.36 kDa hesaplandı. Koyun dalak dokusundan saflaştırılan GST enziminin karakterizasyonu için gerçekleştirilen çalışmalarda; optimum pH, K-fosfat tamponu pH=8.0, optimum aktivite gösterdiği iyonik şiddet, K-fosfat tampon çözeltisi 1.0 M, stabil pH, K-fosfat tampon çözeltisi pH = 7.0 ve optimum sıcaklığı 60 °C olarak bulundu. Koyun dalak dokusundan saflaştırılan GST enzime ait K_M ve V_{max} değerlerini belirlemek için yapılan kinetik çalışmalarda Lineweaver-Burk grafiklerinden yararlanıldı. Enzimin substratları olan indirgenmiş glutasyon (GSH) ve 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) için yürütülen kinetik çalışmalarda; GSH için K_M değeri 0.629 mM, V_{max} değeri 0.056 EÜ mL⁻¹; CDNB için K_M değeri 0.321 mM, V_{max} değeri 0.129 EÜ mL⁻¹ olarak belirlendi.

Anahtar Kelimeler: GST, saflaştırma, karakterizasyon, koyun, dalak

Glutathione S-transferase: Purification and Characterization from Sheep Spleen Tissue

ABSTRACT: In this study, glutathione S-transferase (GST; EC 2.5.1.18), which is the important enzyme of the glutathione antioxidant system, which is the main intracellular antioxidant system, was purified in three steps from sheep spleen tissue; using homogenate preparation, ammonium sulfate precipitation method and affinity chromatography (glutathione-agarose) with a specific activity value of 3.67 EU mg⁻¹, 122.3 protein fold and 3.73% yield. SDS-PAGE method was used to determine the purity level and to determine the natural molecular mass of subunits of the GST enzyme, purified from sheep spleen tissue. The molecular mass of the subunits of the sheep spleen tissue GST enzyme was calculated as approximately 26.36 kDa. In the studies carried out for the characterization of the GST enzyme purified from sheep spleen tissue; optimum pH, K-phosphate buffer pH=8.0, optimum ionic strength, K-phosphate buffer 1.0 M, stable pH, K-phosphate buffer pH = 7.0 and optimum temperature 60 °C. Lineweaver-Burk graphs were used in kinetic studies to determine the K_M and V_{max} values of the GST enzyme purified from sheep spleen tissue. In the kinetic studies carried out for reduced glutathione (GSH) and 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), which are the substrates of the GST Enzyme; for GSH the K_M value 0.629 mM, the V_{max} value 0.056 EU mL⁻¹, for CDNB the K_M value 0.321 mM, and the V_{max} value 0.129 EU mL⁻¹ were determined.

Keywords: GST, purification, characterization, sheep, spleen

¹ Fatih YÜKSEL ([Orcid ID: 0000-0003-0022-4170](https://orcid.org/0000-0003-0022-4170)), Bingöl Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Bingöl, Türkiye

² Yusuf TEMEL ([Orcid ID: 0000-0001-8148-3718](https://orcid.org/0000-0001-8148-3718)), Bingöl Üniversitesi, Solhan Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, Bingöl, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Yusuf TEMEL, e-mail: ytemel@bingol.edu.tr

Bu çalışma Fatih YÜKSEL'in Yüksek Lisans tezinden üretilmiştir.

GİRİŞ

Reaktif oksijen türleri (ROS), hem oksijen radikallerini hem de oksitleyici ajanlar olan veya kolayca radikallere dönüştürülen (HOCl , O_3 , $^1\text{O}_2$, H_2O_2) bazı radikal olmayan türleri kapsayan genel bir terimdir. Reaktif nitrojen türleri (RNS) nitrik oksit ve nitrojen dioksit radikallerinin yanı sıra HNO_2 ve N_2O_4 gibi radikal olmayan türleri kapsayan genel bir terimdir. ROS ve RNS normal fizyolojik olaylar sırasında ve çeşitli dış kaynakların etkisiyle sürekli olarak üretilir ve membran lipidlerinin peroksidasyonunu başlatarak lipid peroksitlerin birikmesine yol açabilir. Ayrıca DNA, RNA lipidler, proteinler, çoklu doymamış yağ asitleri, karbonhidratlar gibi önemli makromolekül ve biyomoleküllere zarar verebilir, mutasyonlara yol açabilecek DNA hasarına neden olabilirler. Yapılan araştırmalar, ROS ve RNS oluşumunun, gıda ürünlerinin oksidatif bozulmasının yanı sıra ateroskleroz, diabetes mellitus, kronik inflamasyon, nörodejeneratif bozukluklar ve belirli kanser türleri gibi çeşitli insan hastalıklarının patogeneğinde yer aldığını göstermektedir (De Koning ve De Koning, 2005; Gülçin, 2010, 2012; Shahıdı, 2015; Kopustinskiene ve ark., 2020). Antioksidanlar, diğer moleküllerin oksidasyonunu inhibe edebilen moleküllerdir. Antioksidanlar, gıdaların işlenmesi ve depolanması sırasında ve farmasötik ürünlerin bozulmasının ana sebeplerinde biri olan lipid peroksidasyonunu geciktirerek serbest radikalleri temizleyebilir ve raf ömrünü uzatabilir. Antioksidanlar insan vücudunu serbest radikallerden ve ROS etkilerinden koruyabilir. Lipid peroksidasyonunun yanı sıra birçok kronik hastalığın ilerlemesini geciktirirler (Kuchibhotla ve Rao, 1995). Fizyolojik olarak üretilen ROS ve RNS normal olarak glutasyon (GSH), tiyoredoksin (Trx), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve peroksidazlar gibi enzimatik ve enzimatik olmayan anti-oksidize edici ajanlar tarafından azaltılır. Redoks durumundaki bir dengesizlik hücrel oksidatif strese yol açar. Oksidatif stres hücrel antioksidan ajanlar tarafından detoksifiye edilmeyen daha yüksek ROS seviyelerine maruz kalmaktan kaynaklanır (Wang ve Yi, 2008).

İndirgenmiş glutasyon (GSH, γ -glutamil-sisteinil-glisin), hemen hemen tüm hücrelerde bulunan doğal bir tripeptiddir. Glutasyon oldukça reaktiftir ve genellikle sülfhidril kısmı aracılığıyla diğer moleküllerle konjugasyon yapar. Antioksidasyon, redoks durumunun korunması, bağışıklık tepkisinin modülasyonu ve ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu dahil olmak üzere bir hücre içinde hayati roller oynar (Balendiran ve ark., 2004). Glutasyon S-transferazlar, geleneksel olarak faz II hücrel detoksifikasyon sistemi enzimleri olarak tanınan, bir dizi katalitik ve katalitik olmayan işlemlerde yer alan çok işlevli enzimlerdir. Çok çeşitli polar olmayan eksojen (kimyasal kanserojenler, çevresel kirleticiler ve hatta antitümör ajanları) ve endojen bileşiklere nükleofilik glutasyonun (GSH) bağlanmasını katalize ederler. Böylece suda daha fazla çözünür ürünler oluştururlar ve dolayısıyla bunların ortadan kaldırılmasını sağlarlar (Pljesa-Ercegovac ve ark., 2018). Ayrıca hidrofobik bileşiklerin hücre içi bağlanması ve taşınması, ksenobiyotiklerin ve endojen bileşiklerin metabolizması, lökotrienlerin, prostaglandinlerin ve steroid hormonları sentezindeki temel adımların katalizi, tirozinin bozulması, oksidatif stres yan ürünlerinin inaktivasyonu ve hücre sinyalleşmenin düzenlenmesi (protein-protein etkileşimleri) gibi pek çok hücre içi reaksiyonda görev alırlar (Pljesa-Ercegovac ve ark., 2018; Ulusu, 2005).

Yapılan literatür taramalarında, GST enziminin birçok dokudan saflaştırılarak karakterizasyonunun yapıldığı, bazı ilaç ve kimyasalların GST enzim aktivitesi üzerine inhibisyon çalışmalarının gerçekleştirildiği (Akkemik ve ark., 2012a; Aksoy ve ark., 2016; Özaslan ve ark., 2018a, 2018b; Temel ve ark., 2018; Taysi ve Temel, 2021; Türkan ve ark., 2019, 2020), fakat bu enzimin koyun dalak dokusundan saflaştırılmadığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada metabolizmadaki önemi vurgulanan GST enziminin koyun dalak dokusundan saflaştırılması ve karakterizasyon özelliklerinin araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Materyal

SDS-PAGE protein standartları Applied Biological Materials Inc (Richmond, BC, Canada), glutasyon-agaroz afinite jeli, CDNB, GSSG (yükseltgenmiş glutasyon), GSH, TEMED, EDTA (Etilendiamintetraasedik asid), elektroforez kimyasalları, ve diğer kimyasal ve numuneler Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO) veya Merck'den (Darmstadt, Germany) temin edilmiştir.

Homojenat Hazırlama

Bu çalışmada kullanılan koyun dalağı Bingöl İli Et ve Süt Kurumundan temin edilmiştir. Koyun dalak dokusundan homojenat hazırlamak amacıyla 5 gram alınarak küçük parçalara ayrılmıştır. Homojenizasyonu sağlamak için 15 mL 1 mM DTT (Ditiyotretol), 1 mM PMSF (proteaz inhibitörü), 1 mM EDTA ihtiva eden 50 mM Tris-HCl çözeltisi (pH: 7,2) üzerine ilave edilerek, bu doku ultraturaks ile süspanse işlemi yapılmıştır. Elde edilen süspanسیون 10.000 xg de 1 saat süreyle santrifüj edilerek süpernatant ayrılarak çökelek atılmıştır. Ayrılan süpernatant homojenat olarak kullanılmıştır. (Taysi ve Temel, 2021; Temel ve ark., 2017; Temel ve Kocayigit, 2017b) .

GST Enzim Aktivitesi Ölçümü

GST enziminin aktivite ölçümü, CDNB substratının GSH ile reaksiyonu sonucu ortamda elde edilen DNB-SG (yükseltgenmiş, dinitrobenzen S-glutasyon) ürününün 340 nanometre dalga boyunda absorpsiyon göstermesi esasına dayanır. Bu çalışmada GST enziminin aktivite ölçümü 340 nm dalga boyundaki absorbans artışından yararlanılarak spektrofotometrik olarak gerçekleştirilmiştir (Habig ve ark., 1974). Enzim ünitesi hesaplanırken aşağıdaki formül kullanıldı.

$$E\ddot{U} = (\Delta OD / 9,6) \times (V_T / V_E) \times SF$$

EÜ : 1 mL'deki enzim ünitesi; ΔOD : Spektrofotometrik analizde bir dakikada meydana gelen absorbans değişimi; 9,6 : Molar ekstinksiyon katsayısı; V_T : Ölçümün yapıldığı küvetin toplam hacmi

V_E : Ölçüm yapılan küvete ilave edilen enzim numunesinin hacmi; SF : Seyreltme faktörü

Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Diyaliz

GST enziminin koyun dalağından saflaştırılması amacıyla homojenat hazırlanması sonrası amonyum sülfat tuzu ile çöktürme işlemi salting-out metodu esas alınarak yapılmıştır. GST enzimi için en uygun çöktürme aralığının tespiti için % 0-20, %30, %40, %50, %60, %70, %80 doyunlukta amonyum sülfat çöktürmesi işlemleri yapılmıştır. En uygun çöktürme aralığı %50-70 olarak tespit edilmiş ve tüm işlemler +4 °C'de gerçekleştirilmiştir (Keha ve Küfrevioğlu, 2010).

Afinite Kromatografisi Yöntemiyle GST Enziminin Saflaştırılması

Amonyum sülfat çöktürmesiyle kısmen saflaştırılan (semi-purification) GST enzimi için glutasyon-agaroz afinite kromatografisi kolonu kullanılarak saflaştırma işlemleri yapılmıştır. Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz işlemleri (homojenat tamponu 10 kat seyreltilerek elde edilen diyaliz tamponuyla 2 saat boyunca gerçekleştirildi) sonrasında elde edilen numune saatteki akış hızı 20 mL olan peristaltik pompa vasıtasıyla ayarlanan glutasyon-agaroz afinite kromatografisi kolonuna yüklenmiştir. Glutasyon-agaroz afinite kromatografisi kolonu 10 mM K-fosfat ve 0,1M KCl çözeltisi (pH=8) içeren tampon ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Yıkama işlemi spektrofotometre ile takip edildi. Yıkama işlemi fraksiyonlardaki absorbans değerlerinin kör olarak kullanılan yıkama tamponuna karşı 0,05 olmasıyla tamamlandı. Glutasyon-agaroz afinite kromatografisi kolonuna 10 mM K-fosfat ve 0,1M KCl, (pH=8) tamponu kullanılarak dengeleme işlemi yapıldı. Dengeleme işlemi sonrası gradientli elüsyon işlemi yapılarak GST enzimi saflaştırıldı. Elüsyon tamponları için 50 mM Tris-HCl çözeltisi ve 1-10 mM GSH çözeltisi (pH=9) içeren gradient oluşturuldu. Elde edilen elüatlar 1.5 mL hacminde eppendorf

tüplerde toplanarak 340 nm dalga boyunda her biri için ayrı ayrı aktivite ölçümü gerçekleştirildi (Toribio ve ark., 1996).

SDS-PAGE

Enzimlerin saf olarak elde edilip edilmediğinin kontrolü için kesikli (akrilamid yoğunluğu yığma jelinde %3, ayırma jelinde %8) SDS-PAGE metodundan yararlanıldı (Laemmli, 1970).

Kantitatif Protein Tayini

Saflaştırmanın her aşamasında elde edilen numunelerdeki proteinlerin kantitatif miktarı Bradford metodu kullanılarak belirlendi. Bu yöntemde boya olarak kullanılan Coomassie brilliant blue G-250 reaktifinin proteine bağlanması ve oluşan protein-boya kompleksinin 595 nm'de maksimum derecede absorbans göstermesi esas alındı. Homojenatta ve tüm saflaştırma işlemleri sonucu elde edilen numunelerde ayrı ayrı protein tayini gerçekleştirildi. Standart olarak sığır serum albümini (BSA) kullanıldı (Bradford, 1976).

Optimum pH Belirlenmesi

Koyun dalak dokusundan saflaştırılan GST enzim aktivitesinin optimum pH değerini belirlemek için 7.5-9.0 pH aralığında 1 M Tris-HCl tampon çözeltileri ve 5.5-8.0 pH aralığında 1 M KH₂PO₄ tampon çözeltileri kullanıldı. GST enziminin her pH'da gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak tespit edildi.

Optimum İyonik Şiddetin Belirlenmesi

Koyun dalak dokularından saflaştırılan GST enzim aktivitesinin optimum olduğu iyonik şiddeti belirlemek için 1mM EDTA içeren 0.5-1.6 M KH₂PO₄ (pH 8.0) tamponları kullanıldı.

Stabil pH belirlenmesi

Koyun dalak GST enziminin aktivitesinin en stabil olduğu pH değerinin tespiti için 7.5, 8.0, 8.5, ve 9.0 pH değerlerinde 1 M Tris-HCl tampon çözeltileri ve 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 pH değerlerinde değişen 1 M KH₂PO₄ tampon çözeltilerinden yararlanıldı. Bu pH'larda hazırlanan tampon çözeltileri 2/1 hacim oranında enzim çözeltileri ile karıştırılarak 3 gün süre ve 12 saat arayla yapılan aktivite ölçümünde enzim aktivitesinin stabil olduğu pH değeri belirlendi. Enzim numuneleri +4°C'de muhafaza edildi.

Optimum sıcaklığın belirlenmesi

Koyun dalak GST enziminin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklığın belirlenmesi amacıyla 0°C ile 90°C aralığında her 10 °C'de bir saf GST enzime ait aktivite spektrofotometrik yöntemle tespit edildi. Enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık belirlendi.

Molekül ağırlığının belirlenmesi

Koyun dalak dokusundan saflaştırılan GST enzime ait alt birimlerin molekül kütleleri SDS-PAGE metodu kullanılarak belirlendi (Laemmli, 1970). Kullanılan standart proteinlerin molekül kütleleri 14-130 kDa aralığında değişmektedir.

Kinetik çalışmalar

Koyun dalak GST sitozolik enzimi için gerçekleştirilen kinetik çalışmalarda enzimin substratları olan CDNB ve GSH için K_M ve V_{max} değerleri belirlendi. GSH substratına ait K_M ve V_{max} kinetik değerlerinin tespit edilmesi amacıyla sabit CDNB substrat konsantrasyonunda GSH'ın 5 farklı konsantrasyon değeri hazırlanarak aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen aktivite değerleriyle Lineweaver-Burk grafiği oluşturuldu. Bu grafik esas alınarak GSH substratı için K_M ve V_{max} kinetik değerleri ayrı ayrı tespit edildi. Benzer biçimde GSH substratına ait konsantrasyon değeri sabit tutularak CDNB'nin 5 farklı konsantrasyon değeri ile aktiviteler ölçülerek Lineweaver-Burk grafiği hazırlandı.

CDNB substratına ait K_M ve V_{max} kinetik değerleri ayrı ayrı elde edildi. Aktivite ölçümleri optimum şartlar altında gerçekleştirildi (Lineweaver ve Burk, 1934).

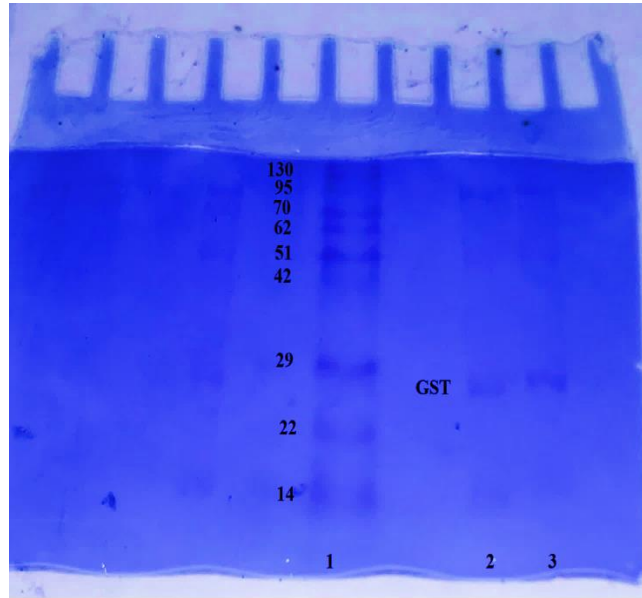
BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada glutasyon S-transferaz enzimi koyun dalak dokularından, hemolizat hazırlanması, *salting out* (amonyum sülfat çöktürme metodu) ve afinite kromatografisi (glutasyon agaroz) yöntemleri vasıtasıyla 3.67 EU mg^{-1} spesifik aktivite ve %3.73 verim ile 122.3 kat saflaştırılmıştır. Kullanılan yöntemlerle kısa zamanda ve saflık derecesi yüksek GST enzimi elde edilmiştir. Sonuçlar çizelge 1'de gösterilmiştir.

Çizelge 1. Koyun dalak dokusu GST enziminin saflaştırma basamakları.

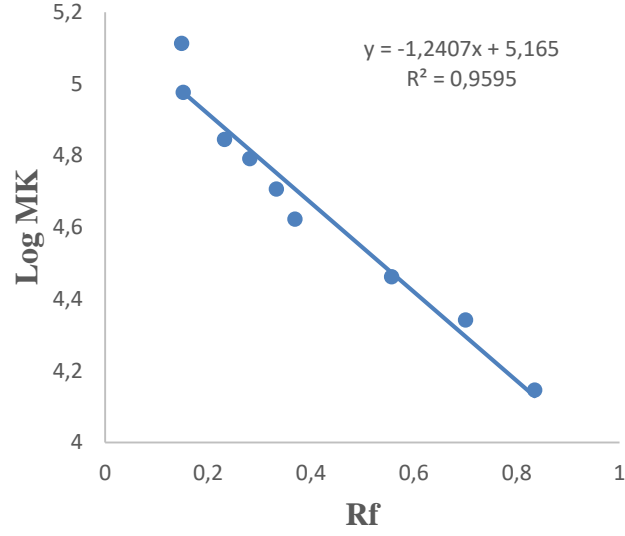
Numune Türü	Toplam Hacim (mL)	Aktivite (EU mL^{-1})	Protein (mg mL^{-1})	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (EU)	Spesifik Aktivite (EU mg^{-1})	% Verim	Saflaştırma Kat Sayısı
Homojenat	17.50	1.27	39.64	693.70	22.23	0.03	100.00	1.00
Amonyum sülfat çöktürmesi sonrası	2.00	0.62	0.54	1.08	1.24	1.15	5.58	35.83
Afinite Kromatografisi sonrası	1.50	0.55	0.15	0.23	0.83	3.67	3.73	122.30

Enzimin saflık derecesi SDS-PAGE yöntemiyle kontrol edilerek SDS-PAGE fotoğrafı Şekil 1'de gösterilmiştir.

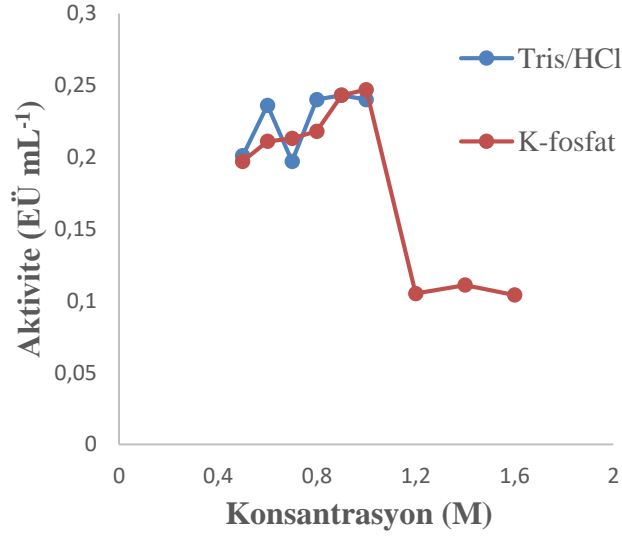
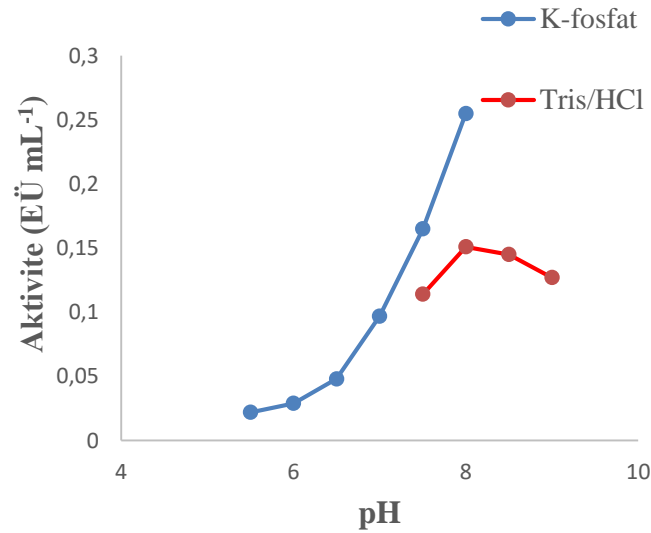


Şekil 1. 1. kuyu: standart proteinler (14kDa - 130 kDa), 2. ve 3. kuyu: glutasyon agaroz afinite kolonundan elde edilen saf GST enzimi

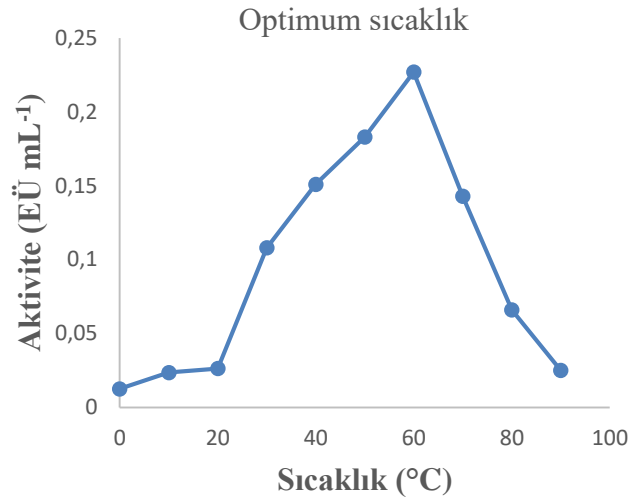
Enzimin alt birimlerine ait molekül kütlesi değerinin hesaplanması için SDS-PAGE görüntüsünden faydalanılmıştır. Elektroforezde kullanılan her bir standart protein ve koyun dalak dokusundan saflaştırılan GST enzimi için Rf değerleri bulunarak Log MK-Rf grafiği oluşturulmuştur. Bu grafikten yararlanılarak Laemmli (SDS-PAGE) metoduna göre koyun dalağı GST enzimine ait alt birimlerinin molekül kütlesi değeri yaklaşık 26.36 kDa olarak bulundu (Şekil 2). Koyun dalak dokusu GST enziminin en iyi aktivite gösterdiği iyonik şiddet 1 M KH_2PO_4 tamponu olarak belirlendi (Şekil 3).



Şekil 2. SDS-PAGE sonucu elde edilen LogMK-Rf grafiği

Şekil 3. KH₂PO₄ ve Tris/HCl tampon çözeltileri kullanılarak elde edilen iyonik şiddet grafiği

Şekil 4. GST enzimi için oluşturulan optimum pH grafiği

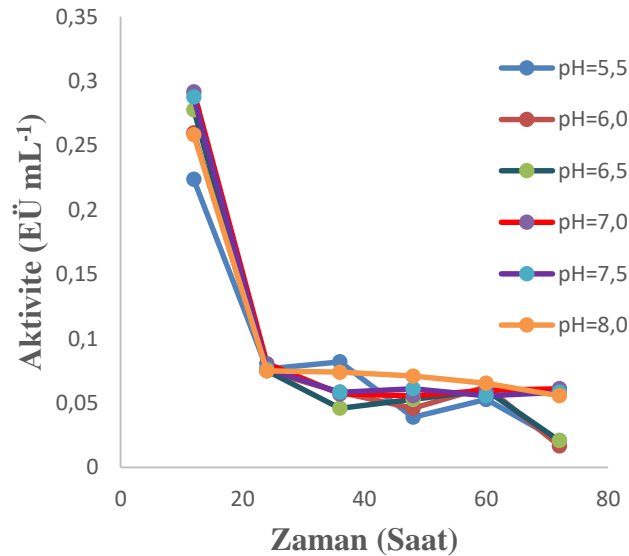


Şekil 5. GST enziminin optimum sıcaklığının tespiti için oluşturulan sıcaklık-aktivite grafiği

Koyun dalak dokusu GST enzimi için optimum pH, 1 M KH₂PO₄ tampon çözeltisi pH=8.0 (Şekil 4), optimum aktivite gösterdiği sıcaklık 60 °C (Şekil 5) olarak belirlendi.

Koyun dalak GST enzimi için stabil pH, 1 M KH₂PO₄ tampon çözeltisi pH 7.0 (Şekil 6) olarak belirlendi.

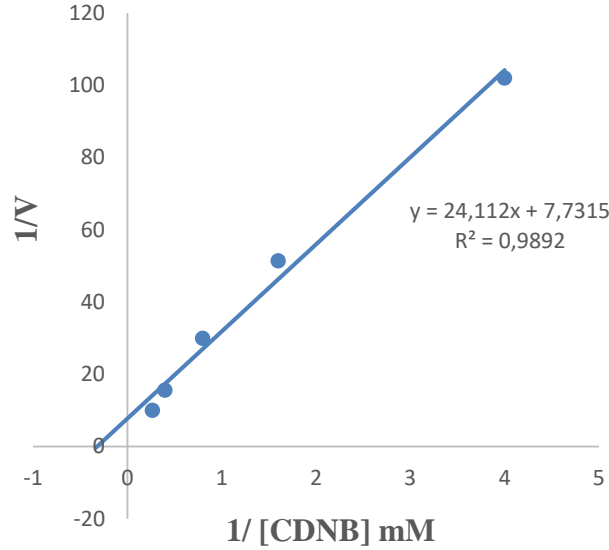
Koyun dalak dokusundan üç adımda saf olarak elde edilen GST enzimi üzerine yürütülen *in vitro* kinetik çalışmalarda CDNB ve GSH substratları için K_M ve V_{max} kinetik değerleri Lineweaver- Burk grafiklerinden elde edilmiştir. GSH substratı için K_M ve V_{max} sırasıyla 0.629 mM, 0.056 EÜ mL⁻¹; CDNB substratı için K_M ve V_{max} sırasıyla 0.321 mM, 0.129 EU mL⁻¹ olarak hesaplandı (Şekil 7 ve 8).



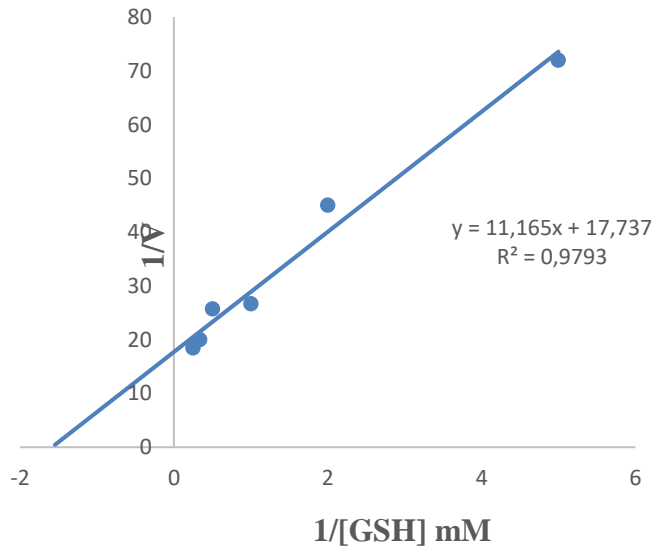
Şekil 6. Koyun dalak GST enzimi için farklı pH'lardaki 1 M KH₂PO₄ tampon çözeltileri kullanılarak elde edilen stabil pH grafiği

GSSG (GSH'nin oksitlenmiş formu), glutasyon redüktaz enzimi tarafından rejenere edilir. GSSG pentoz fosfat yolunda üretilen NADPH tarafından indirgenir (Adem ve Ciftci, 2012; Akkemik ve ark., 2011; Temel ve ark., 2017a; Temel ve ark., 2017b; Temel ve Kocyigit, 2017; Karaman ve ark., 2020; Temel ve ark., 2020). GSH ve GSH'ye bağlı enzim sistemleri hücreleri iç ve dış toksik maddelere, ilaçlara, reaktif oksijen türlerine ve ksenobiyotiklere karşı korur (Liao ve ark., 1964; Orhan ve Şahin, 1995; Akkemik ve ark., 2012a; Özasan ve ark., 2018; Temel ve Taysi, 2019; Aybek ve ark., 2020;

Türkan ve ark., 2020). GST tarafından katalize edilen reaksiyonlarda, GSH endojen ve eksojen hidrofobik elektrofilleri bağlar. GST enziminin işlev görebilmesi için reaksiyon ortamında GSH bulunmalıdır (Gulçin ve ark., 2018; Balcı ve ark., 2019; Balcı ve ark., 2021; Çetin ve ark., 2021).



Şekil 7. CDNB substratı için K_M ve V_{max} 'in hesaplanması için oluşturulan grafik



Şekil 8. GSH substratı için K_M ve V_{max} 'in hesaplanması için oluşturulan grafik için oluşturulan grafik

Metabolizmadaki öneminden dolayı, GST enzimi 1961 yılında keşfedilmesinden itibaren çeşitli bitkisel, hayvansal ve insan dokularından saflaştırılarak karakterize edilmiştir. İlk olarak sıçan karaciğerinden saflaştırılan GST enzimi sonraki yıllarda insan karaciğeri (Simons ve Wander, 1977), insan trombositleri (Loscalzo ve Freedman, 1986), sığır karaciğeri (Asaoka, 1984), insan karaciğeri (Jagt, 1985), *E Coli* ekstraktından (Izuka ve ark.,1989), Atlantik somunu ve kahverengi alabalık karaciğer ve böbrek dokularından (Novoa ve Valinas, 2001), kefal balığı karaciğerinden (Martinez ve Lara, 1997), maruldan (*Lactuca sativa*'dan) (Hee ve Joong, 2005), insan eritrositlerinden (Erat ve Şakiroğlu, 2012), tümörsüz ve tümörlü insan mide dokusundan (Demirdağ ve ark.,2013), Van Gölü Balıklarının solungaç dokusundan (Zariç ve ark., 2019), bildırcın karaciğerinden (Taysi ve Temel, 2021) saflaştırılmıştır. Bu saflaştırma işlemlerinde, amonyum sülfat çöktürmesi, anyon değişim kromatografisi (DEAE-selüloz), katyon değişim kromatografisi (CM-selüloz kromatografisi), hidroksilepatit kolon kromatografisi, jel filtrasyon kromatografisi, orange-A agaroz afinite kromatografisi, epoksi

kullanılarak aktive edilen Sepheroz-6B'ye bağlanmış GSH afinite kolon kromatografisi, GSH-sepharose afinite kromatografisi gibi metodlar kullanılmıştır. Bu çalışmada kullanılan glutasyon-agaroz afinite kromatografisi önceki yöntemlere göre hem ekonomik olması hem de kısa sürede yüksek saflıkta enzim elde edilmesi dolayısıyla daha etkili ve avantajlıdır.

Önceki çalışmalarda GST enziminin at birimlerinin molekül kütlelerinin 22-45 kDa aralığında olduğu rapor edilmiştir (Simons ve Wander, 1977; Iizuka ve ark.,1989; Novoa ve Valinas, 2001; Martinez ve Lara, 1997; Hee ve Joong, 2005; Erat ve Şakiroğlu, 2012; Taysi ve Temel, 2021). Bu çalışmada koyun dalağında saflaştırılan GST enzimine ait alt birimlerin molekül kütleleri SDS-PAGE metodu ile yaklaşık olarak 26.36 kDa olarak bulunmuştur. Bu değer daha önceki çalışmalarda belirlenen değerlerle uyumludur. Önceki çalışmalarda GST enzimi için optimum pH 5.5-8.5 aralığında olduğu rapor edilmiştir. Bu çalışmada koyun dalak dokusu GST enzimine ait optimum pH, KH_2PO_4 tamponu pH 8.0 olarak belirlenmiştir. Belirlenen bu değer literatürde belirlenen değer aralığındadır. Önceki çalışmalarda farklı kaynaklardan saflaştırılan GST enzimine ait optimum iyonik şiddetin 2-140 mM aralığında olduğu rapor edilmiştir. Bu çalışmada koyun dalak GST enziminin için en uygun iyonik şiddet 1 M KH_2PO_4 tamponu olarak belirlendi. Belirlenen bu değer önceki çalışmalara göre farklılık arz etmektedir. Bu farklılığın doku farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Önceki çalışmalarda farklı kaynaklardan saflaştırılan GST enzimi için stabil pH'nın 5-11 olmak üzere geniş bir aralıkta olduğu rapor edilmiştir. Bu çalışmada koyun dalak dokusu GST enzimi için stabil pH, 1 M KH_2PO_4 tamponu pH 7.0 olarak belirlenmiştir. Belirlenen bu değer literatürde belirlenen değerlerle uyum arz etmektedir. Önceki çalışmalarda farklı kaynaklardan saflaştırılan GST enzimine ait optimum sıcaklığın 35-55 °C arasında olduğu rapor edilmiştir. Bu çalışmada koyun dalak GST enzimine ait optimum sıcaklık 60 °C olarak belirlenmiştir. Belirlenen bu değer daha önceki optimum sıcaklık değerlerine yakındır. Bu çalışmada koyun dalak dokusu GST enzimi için yapılan kinetik çalışmalar sonucu GST enzimine ait K_M ve V_{max} kinetik değerleri Lineweaver-Burk grafikleri kullanılarak hesaplanmıştır. GSH substratına ait K_M ve V_{max} sırasıyla 0.629 mM, 0.056 EÜ mL^{-1} ; CDNB substratına ait K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 0.321 mM, 0.129 EÜ mL^{-1} olarak hesaplandı. Sonuçlar değerlendirildiğinde GST enzimin GSH substratına olan afinitesinin CDNB substratına olan afinitesinden daha az olduğu belirlendi.

SONUÇ

Bu çalışmada, eksojen kaynaklardan hücreye alınan ya da hücre içerisinde normal fizyolojik reaksiyonlar sonucu oluşan ROS ve RNS gibi ürünlerin zararsız hale getirilmesi, nükleik asitler ve bazı proteinlerin sentezi, ksenobiyotiklerin, bazı antineoplastik ilaç ve kimyasalların detoksifiye edilmesi, bazı aminoasitlerin transportu, hücrede sistein deposu olarak bulunması gibi hayati görevleri yerine getiren GSH metabolizmasının önemli enzimi olan GST enzimi koyun dalak dokusu sitozolünden saflaştırılarak karakterizasyon özellikleri belirlenmiştir.

Bu çalışmada kullanılan saflaştırma yöntemi birçok kez uygulanabilir oluşu, düşük maliyetli oluşu ve önemli ölçüde az zaman alması bakımından önemlidir. Bu çalışma sonuçları, GST enziminin farklı kaynaklardan saflaştırılması, yeni saflaştırma yöntemlerinin geliştirilmesi ve insan ve hayvan hekimliğinde GST enzimi üzerine yapılacak sonraki çalışmalar için yol gösterici olacaktır.

Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

KAYNAKLAR

- Adem S, Ciftci M, 2012. Purification of rat kidney glucose 6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase, and glutathione reductase enzymes using 2',5'-ADP Sepharose 4B affinity in a single chromatography step. *Protein Expression and Purification* 81(1): 1–4.
- Akkemik E, Şentürk M, Özgeriş FB, Taşer P, Çiftci M, 2011. *In vitro* effects of some drugs on human erythrocyte glutathione reductase 41(2): 235–241.
- Akkemik E, Taser P, Bayindir A, Budak H, Ciftci M, 2012a. Purification and characterization of glutathione S-transferase from turkey liver and inhibition effects of. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 34(3): 888–894.
- Akkemik E, Taser P, Bayindir A, Budak H, Ciftci M, 2012b. Purification and characterization of glutathione S-transferase from turkey liver and inhibition effects of some metal ions on enzyme activity. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 34(3): 888–894.
- Aksoy M, Ozaslan MS, Kufrevioglu OI, 2016. Purification of glutathione S-transferase from Van Lake fish (*Chalcalburnus tarichii* Pallas) muscle and investigation of some metal ions effect on enzyme activity. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 31(4): 546–550.
- Aybek H, Temel Y, Ahmed BM, Ağca CA, Çiftci M, 2020. Deciphering of The Effect of Chemotherapeutic Agents on Human Glutathione S-Transferase Enzyme and MCF-7 Cell Line. *Protein and Peptide Letters* 27(9): 888–894.
- Balcı N, Türkan F, Şakiroğlu H, Aygün A, Şen F, 2019. Purification and characterization of glutathione S-transferase from blueberry fruits (*Vaccinium arctostaphylos* L.) and investigated of some pesticide inhibition effects on enzyme activity. *Heliyon*, 5(4): e01422.
- Balcı N, Şakiroğlu H, Türkan F, Bursal E, 2021. *In vitro* and *in silico* enzyme inhibition effects of some metal ions and compounds on glutathione S-transferase enzyme purified from *Vaccinium arctostaphylos* L. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 1-7.
- Balendiran GK, Dabur R, Fraser D, 2004. The role of glutathione in cancer. *Cell Biochemistry and Function*, 22(6): 343–352.
- Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72(1-2): 248-254.
- Çetin A, Bursal E, Türkan F, 2021, 2-methylindole analogs as cholinesterases and glutathione S-transferase inhibitors: Synthesis, biological evaluation, molecular docking, and pharmacokinetic studies. *Arabian Journal of Chemistry*, 14(12): 103449.
- De Koning AJ, De Koning CB, De Koning PD, 2005. Antioxidants. *Handbook of food science, Technology, and Engineering - 4* : 1653–1662.
- Demirdag R, Yerlikaya E, Kufrevioglu O.I, Gundogdu C, 2013. Purification of glutathione S-transferase isoenzymes from tumour and nontumour human stomach and inhibitory effects of some heavy metals on enzymes activities. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 28(5): 911-915.
- Gülçin I, 2010. Antioxidant properties of resveratrol: A structure-activity insight. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11(1): 210–218.
- Gülçin I, 2012. Antioxidant activity of food constituents: An overview. *Archives of Toxicology*, 86(3): 345–391.

- Gülçin İ, Taslimi P, Aygün A, Sadeghian N, Bastem E, Kufrevioğlu Oİ, Şen F, 2018. Antidiabetic and antiparasitic potentials: Inhibition effects of some natural antioxidant compounds on α -glycosidase, α -amylase and human glutathione S-transferase enzymes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 119: 741–746.
- Orhan H, Şahin G, 1995. Glutasyon S-Transferazların klinik ve toksikolojik önemi. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri*, 15: 303-15.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB, 1974. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of biological Chemistry* 249(22): 7130-7139.
- Karaman M, Temel Y, Bayindir S. (2020). Inhibition effect of rhodanines containing benzene moieties on pentose phosphate pathway enzymes and molecular docking. *Journal of Molecular Structure*, 1220: 128700.
- Kopustinskiene DM, Jakstas V, Savickas A, Bernatoniene J, 2020. Flavonoids as anticancer agents. *Nutrients*, 12(2): 1–25.
- Kuchibhotla P, Rao BD, 1995. A methodology for fast scheduling of partitioned systolic algorithms. *Journal of VLSI Signal Processing*, 10(2): 111–126.
- Laemmli UK, 1970. 1970 Nature Publishing Group. Nature Publishing Group, 228, 1979.
- Liao S, Williams-Ashman HG, 1964. Glutathione reductase. *Enzyme*, 13(1955): 888–894.
- Lineweaver H, Burk D, 1934. The Determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American Chemical Society*, 56(3): 658–666.
- Loscalzo J, Freedman J, 1986. Purification and characterization of human platelet glutathione-S-transferase. *Blood* 67(6): 1595–1599.
- Özaslan MS, Demir Y, Aksoy M., Küfrevioğlu Öİ, Beydemir Ş, 2018. Inhibition effects of pesticides on glutathione-S-transferase enzyme activity of Van Lake fish liver. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 32(9): e22196
- Özaslan MS, Demir Y, Aslan HE, Beydemir Ş, Küfrevioğlu Öİ, 2018. Evaluation of chalcones as inhibitors of glutathione S-transferase. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 32(5): 1–6.
- Pljesa-Ercegovac M, Savic-Radojevic A, Matic M, Coric V, Djukic T, Radic T, Simic T, 2018. Glutathione transferases: Potential targets to overcome chemoresistance in solid tumors. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12): 3785
- Shahidi F, 2015. Fereidoon (ed.). *Handbook of antioxidants for food preservation*. Woodhead Publishing,
- Sayın Y, 2022. Kaz Karaciğer Dokusundan Glutasyon S-Transferaz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Bazı Kimyasalların Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi, Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Ana Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi (Basılmış).
- Taysi MŞ, Temel Y, 2021. Glutathione S-transferase: Purification and characterization from quail (*Coturnix coturnix japonica*) liver and the impact of some metal ions on enzyme activity. *BioNanoScience*, 11(1): 91–98.
- Temel Y, Koçyigit UM, Taysı MŞ, Gökalp F, Gürdere MB, Budak Y, Çiftci M, 2018. Purification of glutathione S-transferase enzyme from quail liver tissue and inhibition effects of (3aR, 4S, 7R, 7aS)-2-(4-((E)-3-(aryl) acryloyl) phenyl)-3a, 4, 7, 7a-tetrahydro-1H-4, 7-methanoisoindole-1, 3 (2H)-dione derivatives on the enzyme activity. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 32(3): e22034.

- Temel Y, Kufrevioğlu ÖI, Çiftci M, 2017. Investigation of the effects of purification and characterization of turkey (*Meleagris gallopavo*) liver mitochondrial thioredoxin reductase enzyme and some metal ions on enzyme activity. *Turkish Journal of Chemistry*, 41(1):48-60
- Temel Y, Taysi MŞ, 2019. The effect of mercury chloride and boric acid on rat erythrocyte enzymes. *Biological Trace Element Research*, 191(1):177-182
- Temel Y, Bozkuş T, Karagözoğlu Y, Çiftci M, 2017a. Glutasyon redüktaz (GR) enziminin japon bildircin (*Coturnix coturnix japonica*) eritrositlerinden saflaştırılması ve karakterizasyonu *Journal of the Institute of Science and Technology*, 7(3): 143-150.
- Temel Y, Ciftci M, Akkoyun HT, Akkoyun M, 2017b. Effect of astaxanthin and aluminum chloride on erythrocyte G6PD and 6PGD enzyme activities *in vivo* and on erythrocyte G6PD *in vitro* in rats. *Journal of biochemical and molecular toxicology* 31(10): e21954.
- Temel Y, Kocyigit UM, 2017. Purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase from rat (*Rattus norvegicus*) erythrocytes and inhibition effects of some metal ions on enzyme activity. *Journal of biochemical and molecular toxicology* 31(9): e21927.
- Temel Y, Ayna A, Hamdi Shafeeq I, Ciftci M, 2020. *In vitro* effects of some antibiotics on glucose-6-phosphate dehydrogenase from rat (*Rattus norvegicus*) erythrocyte. *Drug and chemical toxicology*, 43(2): 219-223.
- Toribio F, Martínez-Lara E, Pascual P, López-Barea J, 1996. Methods for purification of glutathione peroxide and related enzymes. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*, 684(1-2): 77-97.
- Türkan F, Huyut Z, Demir Y, Ertaş F, Beydemir Ş, 2019. The effects of some cephalosporins on acetylcholinesterase and glutathione S-transferase: an *in vivo* and *in vitro* study. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 125(3): 235-243.
- Türkan F, Huyut Z, Taslimi P, Huyut MT, Gülçin İ, 2020. Investigation of the effects of cephalosporin antibiotics on glutathione S-transferase activity in different tissues of rats *in vivo* conditions in order to drug development research. *Drug and Chemical Toxicology*, 43(4): 423-428.
- Ulus G, 2005. Purification and characterization of glutathione reductase from sheep liver. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 29(5): 1109-1117.
- Wang J, Yi J, 2008. Cancer cell killing via ROS: To increase or decrease, that is a question. *Cancer Biology and Therapy*, 7(12): 1875-1884.
- Zaric Y, Yerlikaya E, Demirdag R, 2019. Purification, Characterization of Glutathione S-Transferase from the Gill Tissue of Lake Van Fish and Inhibition Effects of Some Metal Ions and Pesticides. *Fresenius Environmental Bulletin*, 28: 9004-9010.