

Glutasyon Redüktaz (GR) Enziminin Japon Bildırcın (*Coturnix coturnix japonica*) Eritrositlerinden Saflaştırılması ve Karakterizasyonu

Yusuf TEMEL¹, Taner BOZKUŞ², Yusuf KARAGÖZOĞLU², Mehmet ÇİFTÇİ²

ÖZET: Glutasyon (γ -L-glutamil-L-cysteinyll-glycine) organizmanın hücre içi okside moleküllerin zararlı etkisinden korunmasında görevli düşük molekül ağırlıklı bir tiyoldür. Glutasyon redüktaz (GR) enzimi glutasyon metabolizmasında yer alan temel enzimdir. Bu çalışma kapsamında GR enzimi japon bildırcın eritrositlerinden saflaştırılarak karakterize edilmiştir. Saflaştırma işlemi hemolizatın hazırlanması ve 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi olmak üzere 2 basamakta gerçekleştirilmiştir. GR enzimi bildırcın eritrositlerinden 33.75 EÜ m g⁻¹ protein spesifik aktivite ile %46.2 verimle, 1 028 kat saflaştırılmıştır. Enzim saflığı SDS-PAGE ile kontrol edilmiştir alt birimlerinin molekül ağırlığı aynı yöntemle 78.7 kDa olarak bulunmuştur. Daha sonra çalışma kapsamında saflaştırılan enzimin karakteristik ve kinetik özellikleri tesbit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Bildırcın, eritrosit, glutasyon redüktaz, karakterizasyon, saflaştırma

Purification and Characterization of Glutathion Reductase Enzyme From Japanese Quail (*Coturnix coturnix japonica*) Erythrocytes

ABSTRACT: Glutathione (γ -L-glutamyl-L-cysteinyll-glycine) is a low molecular weight thiol which protects organism from harmful effect of oxidized molecules in cell. Glutathione reductase (GR) is a key enzyme involved in the glutathione metabolism. In the present study GR enzyme has been purified and characterized from Japanese quail erythrocytes. The purification proses consisted of two steps, which include preparation of hemolysate, and 2',5'-ADP Sepharose 4B affinity chromatography. The japanese quail erythrocytes GR enzyme had specific activity of 33.75 EU m g⁻¹ proteins, with a yield of 46.2% and 1 028 purification fold. Enzyme purity and molecular weight of subunits were determined by SDS-PAGE method as 78.7 kDa. Then, characteristics and kinetic properties of the purified enzyme was determined.

Key words: Characterization, erythrocyte, glutathion reductase, purification, quail

¹ Bingöl Üniversitesi, Solhan Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Bingöl, Türkiye

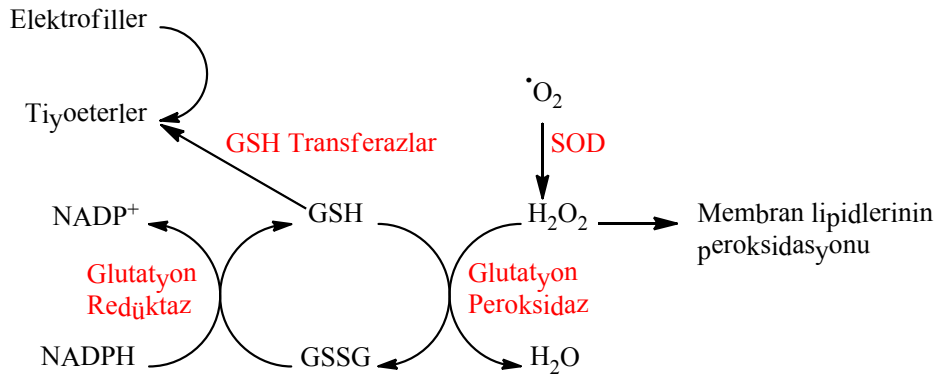
² Bingöl Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya bölümü, Bingöl, Türkiye

Sorumlu yazar/Corresponding Author: Mehmet ÇİFTÇİ, mciftci@bingol.edu.tr

GİRİŞ

Prokaryotik ve ökaryotik tüm hücrelerde bulunan glutatyon, tripeptid (γ -glutamil-sisteinil-glisin) yapısında olan önemli bir tiyoldür ve hücre içi serbest sülfhidril gruplarının büyük bir bölümünü oluşturmaktadır. İlk olarak 1888 yılında maya hücresinde bulunduktan sonra 1921'de Hopkins tarafından saflaştırılarak karakterize edilmiştir (Açan, 1990). Glutatyon, yapısında bulunan $-SH$ grupları ile okside moleküllerin zararlı etkilerine karşı hücreyi korumaktadır. Glutatyon'un başlıca görevleri şunlardır: hücre içindeki serbest radikallerin ve reaktif oksijen ürünlerinin zararsızlaştırılması, hemoglobin ve spektrin gibi membran proteinleri ve çeşitli enzimlerin tiyol gruplarının korunması, DNA ve protein sentezi, ksenobiyotiklerin, bazı antineoplastik ilaçların ve bazı metabolik son ürünlerin konjugasyonla detoksifikasyonu, aminoasit transportu, insülin gibi bazı proteinlerin disülfür bağlarının

koparılması ve böylece proteinlerin konformasyonlarının değişmesi, hücre içerisinde sistein deposu olarak bulunması ve bazı enzimlerin reaksiyonlarında rol oynamasıdır. Üstlendiği bu önemli görevleri dolayısıyla hücrede glutatyon'un düşük konsantrasyonda bulunması sonucunda bazı metabolik olumsuzluklar meydana gelebilmektedir (Knapen et al., 1999). Glutatyon redüktaz (NADPH: GSSG oksidoredüktaz, EC 1.8.1.7) ilk defa 1951'de keşfedilmiştir. Bu enzim düşük veya yüksek molekül ağırlıklı disülfür substratları ile indirgenmiş piridin nükleotidleri arasında elektron transferini katalizler. GR enziminin katalizlediği reaksiyonun bilinen en önemli hedeflerinden biri hücre ortamındaki indirgenmiş glutatyon/yükseltgenmiş glutatyon (GSH/GSSG) oranını korumaktır. Bu oran eritrosit hücrelerinde yaklaşık 500/1'dir. Bu oranın düşmesi halinde eritrosit hücreleri hemolize uğramaktadır (Keha ve Küfrelioğlu, 2010).



Şekil 1. Glutatyonun tripeptidinin ve glutatyon redüktaz enziminin hücredeki rolü.

Antioksidan bir enzim olan glutatyon peroksidaz (GPx) enziminin katalizlediği reaksiyonlarda, özellikle hidroperoksitlerin detoksifikasyonu ve diğer bazı bileşiklerin indirgenmesi sonucu GSSG oluştuğu için glutatyon redüktaz hücre içi glutatyon indirgeme-yükseltgeme olayında merkezi bir role sahiptir. Glutatyon redüktaz, GSH/GSSG oranını yükselterek hücre içi $-SH/-SS$ oranını korur (Toribio et al., 1996). Aynı zamanda GR enziminin klinik olarak karaciğer ve kanser hastalıklarının teşhisinde, beslenmede, riboflavin yetersizliğinin ölçümünde ve bazı genetik bozuklukların belirlenmesinde yararlanılmaktadır (Beütler, 1969).

Daha önce yapılan çalışmalarda GR enzimi prokaryotik ve ökaryotik pek çok kaynaktan saflaştırılarak karakterize edilmiştir. Bu kaynakları; domuz eritrositi, sığır eritrositi, sıçan karaciğeri, sığır karaciğeri, koyun beyini, koyun karaciğeri gibi memeli dokuları, gökkuşuğu alabalığı ve hindi karaciğer dokusu, mantarlar, siyanobakteri gibi mikroorganizmalar, buğday, mısır, bezelye ve ıspanak gibi bitkisel kaynaklar oluşturmaktadır (Worhington and Rosemeyer, 1976; Boggaramand and Brobjer, 1979; Carlberg and Mannervik, 1981; Acan ve Tezcan, 1989; McCallum and Barrett, 1995; Jiang et al., 1995;

Mullineaux et al., 1996; Patel et al., 1998; Lamotte et al., 2000; Erat, 2002; Uluşu ve ark., 2005; Uluşu ve Tandoğan, 2007; Tekman et al., 2008; Taşer and Çiftci, 2012). Saffaştırılan kaynaklarda GR enziminin moleköl kütleşi 70-140 kDa arasında değiştiiği, homodimerik bir enzim olduğu ve her bir alt birimine bir FAD'nin bağlandığı rapor edilmiştir (Douglas, 1987). Son olarak Taher tarafından yapılan çalışmada GR enzimi bildircin karaciğer dokularından saffaştırılarak karakterize edilmiş ve enzimin alt birimlerinin moleköl kütleşi 59 kDa olarak hesaplanmıştır (Taher, 2017).

Bu çalışmanın amacı hücre içi glutasyon metabolizmasının düzenlenmesinde, hücrenin okside moleküllerin zararlarına karşı korunmasında, DNA ve protein sentezinde, aminoasit transportunda önemli görevler üstlenen glutasyon redüktaz enziminin bildircin eritrosit dokusundan saffaştırılması ve enzime ait karakteristik özelliklerinin belirlenmesidir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Kimyasallar

Yapılan çalışmalarda kullanılan (NADPH), (NADP⁺), (GSSG), (GSH), (TEMED), sodyum bikarbonat ve (EDTA) Sigma Chem. Comp.'den. 2',5'-ADP-Sepharose 4B Pharmacia'dan diğer kimyasallar E.Merc AG'den temin edildi.

Kan temini ve hemolizatın hazırlanması

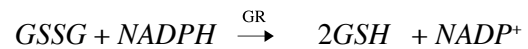
Çalışmada, Bingöl Üniversitesi Ziraat Fakültesi çiftliğinde yetiştirilen bildircinlerden taze kan örnekleri görevliler yardımıyla temin edildi. Alınan taze kan 15 dakika 2 500 × g'de santrifüj edildi. Tüplerin üst kısmında kalan plazma ve lökosit tabakası damlalıkla dikkatli bir şekilde alındı. Tüplerin altında kalan eritrosit peleti 0.16 M (izotonik) KCl çözeltisi ile üç defa yıkandı. Her defasında 2 500 × g'de 15 dakika santrifüj edildi. Elde edilen eritrositler hacimlerinin 5 katı kadar buzlu su ile hemoliz edildi. Hemolizat içerisinde bulunan eritrosit hücre zarlarını uzaklaştırmak için +4°C'de 10 000 × g'de 30 dakika santrifüj yapıldı. Üst kısımdaki hemolizat sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere damlalıkla dikkatli bir şekilde alındıktan sonra çökelek kısmı uzaklaştırdı. Böylece hemolizat elde edildi (Hunaiti and Soud, 2000)

Afinite kolonunun hazırlanması ve bildircin eritrosit GR enziminin saffaştırılması

2 g kuru 2',5'-ADP sepharose 4B jeli tartıldı ve 400 ml deiyonize su ile safsızlıkların uzaklaştırmaları için birkaç defa yıkandı (10 ml'lik kolon yatak hacmi için). Yıkama esnasında jel şişirilmiş oldu. Şişirilmiş jelin havası su trombu kullanılarak vakum ile alındıktan sonra dengeleme tamponu (50 mM KH₂PO₄, 1 mM EDTA, 1mM DTT, pH 7.3) ilave edilerek jel süspanse edildi. Süspanse edilmiş jel, 1 × 10 cm'lik kapalı sistemden oluşan soğutmalı afinite kromatografisi kolonuna paketlenildi. Jel çöktükten sonra peristaltik pompa kullanılarak dengeleme tamponu ile yıkandı. Kolonun dengelenmiş olduğuna eluat ile tamponun 280 nm'de absorbanslarının ve pH'larının eşitlenmesi sonucu karar verildi. Böylece afinite kolonu hazırlanmış oldu. Hazırlanan hemolizat 2',5'- ADP- sepharose 4B afinite kolonuna uygulandı. Enzim çözeltisinin tamamı kolondan geçtikten sonra kolondan 0.4 M KH₂PO₄ tamponu (pH 7.3) geçirilerek yıkandı. Bu yıkama, spektrofotometrede takip edilerek absorbans değerlerinin köre eşit olmasıyla belirlendi. Kolon yıkandıktan sonra GR enzimi elüsyon tamponu (50 mM KH₂PO₄, 1 mM EDTA, 1 mM GSH ve 0.5 mM NADPH, pH 7.3) ile afinite kolonundan elüe edildi (Carlberg and Mannervik, 1981).

GR enziminin aktivitesinin ölçümü

GR enziminin aktivite ölçümünde reaksiyona giren NADPH'ın 340 nm'de maksimum absorbans vermesi esnasından yararlanıldı. GR enzimi katalizlediği reaksiyonda NADPH'ın azalmasına sebep olmaktadır. Bu azalma spektrofotometrik olarak 340 nm'de takip edilerek enzim aktivitesi belirlendi (Carlberg and Mannervik, 1981).



Protein tayini

Kantitatif protein tayini Bradford metoduna göre yapıldı (Bradford, 1976). Standart protein olarak sığır serum albümin kullanıldı.

SDS-PAGE ile enzim saflılığının kontrolü

Enzim saffaştırıldıktan sonra %3-8 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-

PAGE) Laemmli metoduna göre yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi (Laemmli, 1970).

Optimum iyonik şiddetin belirlenmesi

Bıldırcın eritrositlerinden saflaştırılan GR enzimi için optimum aktivite sağlayan iyonik şiddetinin belirlenmesi amacıyla 1mM EDTA içeren 10, 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1 000 mM KH_2PO_4 (pH 7.5) tamponları kullanıldı.

Bıldırcın eritrositlerinden saflaştırılan GR enziminin optimum pH'sını belirlemek amacıyla 7.5-9.0 pH'sı aralığında olan 400 mM Tris-HCl ve pH'sı 5.5-8.0 aralığında olan 400 mM KH_2PO_4 tampon çözeltileri kullanıldı. Enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak belirlendi.

Stabil pH belirlenmesi

Bıldırcın eritrosit GR enziminin stabil pH'ı belirlemek amacıyla pH 'ları 7.5, 8.0, 8.5, ve 9.0 aralığında 400 mM Tris-HCl ve pH 'ları 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 aralığında 400 mM KH_2PO_4 tampon çözeltileri kullanıldı. Belirtilen pH'lardaki tampon çözeltilerinin 2 mL si 1 mL enzim çözeltisi ile karıştırılarak +4°C'de muhafaza edildi. 6 gün boyunca 24 saat aryla yapılan aktivite ölçümünde enzimin stabil olduğu pH belirlendi.

Optimum sıcaklığın belirlenmesine yönelik çalışmalar

Bıldırcın eritrosit GR enziminin optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla 0°C ile 90°C arasında 10 ar °C aralıklarla enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Molekül ağırlığının belirlenmesi

GR enziminin alt birimlerinin molekül kütleleri (SDS-PAGE) Laemmli yöntemiyle belirlendi (Laemmli, 1970). Standart protein olarak 120 kda E. Coli β -galaktozidaz, 85 kda sığır serum albumin, 50 kda tavuk yumurtası ovalbumin, 35 kda sığır eritrosit karbonik anhidraz kullanıldı.

Kinetik çalışmalar

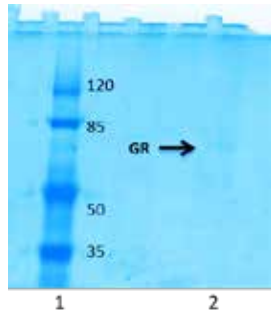
Bıldırcın eritrosit GR enziminin GSSG ve NADPH substratları için K_M ve V_{max} Değerlerini belirlemek için sabit GSSG konsantrasyonunda NADPH'ın 5 farklı konsantrasyonlarıyla aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen değerlerle Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Bu grafikten yararlanarak NADPH için K_M ve V_{max} değerleri belirlendi. Aynı şekilde NADPH'ın sabit konsantrasyonunda GSSG'nin 5 farklı konsantrasyonlarıyla aktivite ölçümleri yapılarak Lineweaver-Burk grafiği oluşturuldu ve GSSG için K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı. Aktivite ölçümleri optimal şartlarda gerçekleştirildi (Lineweaver and Burk, 1934).

BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışma kapsamında glutatyon redüktaz enzimi bıldırcın eritrosit dokularından, hemolizattan hazırlanması ve 2', 5' ADP Sepharose-4B afinité kromatografisi yöntemi kullanılarak 33.75 EÜ m g^{-1} spesifik aktivite ile % 46.2 verimle tek adımda 1 028 kat saflaştırıldı. Bu yöntemle kısa zamanda ve yüksek saflıkta enzim elde edildi. Enziminin saflık derecesi SDS-PAGE yöntemiyle kontrol edildi (Şekil 2) ve sonuçlar çizelge 1'de verildi.

Çizelge 1. Bıldırcın eritrositlerinden saflaştırılan GR enziminin saflaştırma basamakları

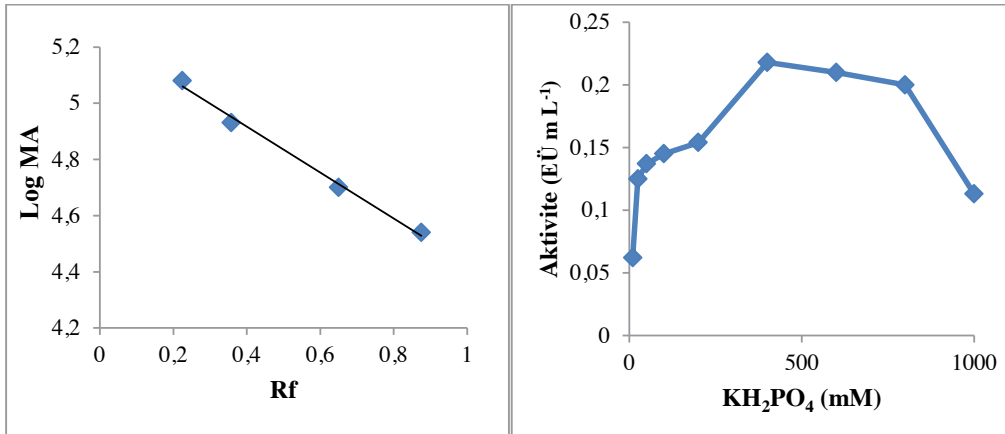
Saflaştırma Basamağı	Toplam Hacim (mL)	Aktivite (EÜ m L^{-1})	Protein (mg m L^{-1})	Toplam Aktivite (EÜ)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (EÜ m g^{-1})	% Verim	Saflaştırma Katsayısı
Hemolizat	8	0.292	8.303	2.336	66.4	0.035	100	1
2',5'-ADP sepharose 4B	3	0.360	0.010	1.08	0.032	33.75	46.2	1 028



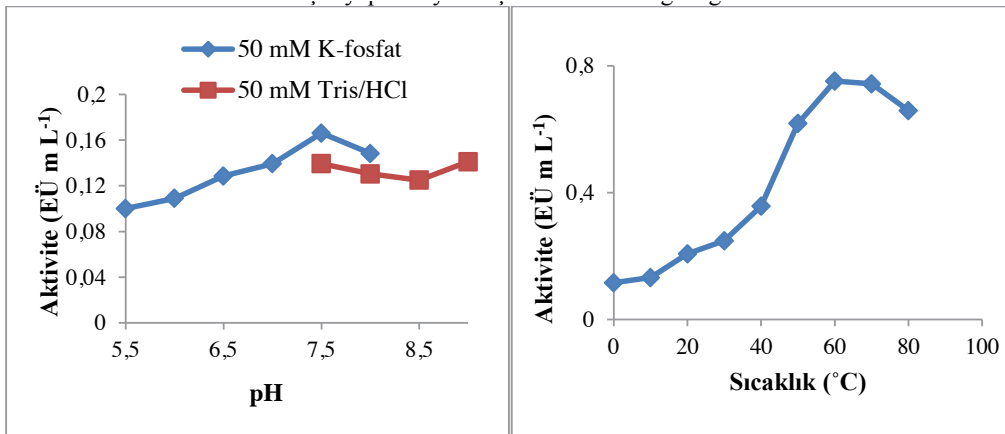
Şekil 2. Afinite kolonundan elüe edilen bildircin eritrosit GR enziminin SDS-PAGE ile saflık kontrolü *1. kuyu: Standart proteinler (120 kda E. Coli β -galaktozidaz, 85 kda sığır serum albumin, 50 kda tavuk yumurtası ovalbumin, 35 kda sığır eritrosit karbonik anhidraz) 2. kuyu: Afinite kolonundan elüe edilen saf GR enzimi.

Enzimin alt birimlerinin mol kütesinin hesaplanması için SDS-PAGE fotoğrafından yararlanılarak her bir standart protein ve GR enzimi için R_f değerleri hesaplanarak Log MA - R_f grafiği çizildi. Bu grafik kullanılarak Laemmli metoduna göre enzimin alt birimlerinin molekül kütesi yaklaşık olarak

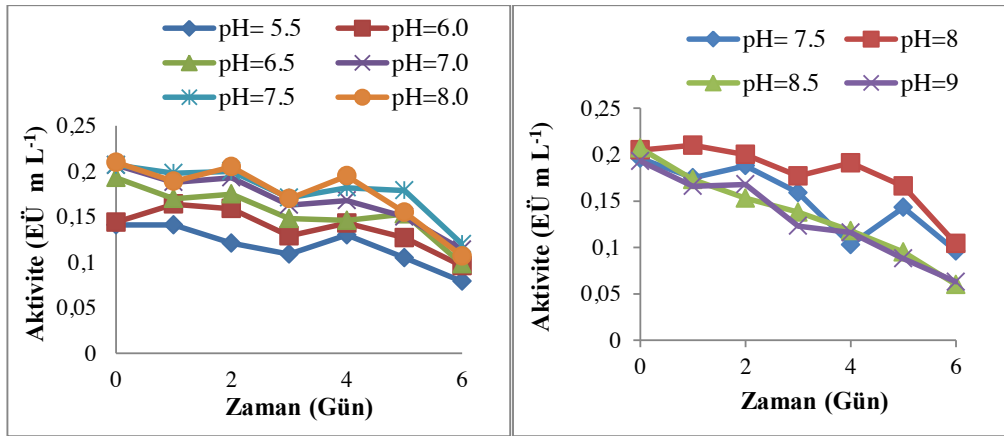
78.7 kDa olarak belirlendi (Şekil 3). Bildircin eritrosit GR enzim aktivitesi için en uygun iyonik şiddet 400 mM KH_2PO_4 (Şekil 4), optimum pH, 400 mM KH_2PO_4 tamponu pH 7.5 (Şekil 5), optimum sıcaklık 60 °C (Şekil 6), stabil pH, 400 mM KH_2PO_4 tamponu pH 6.0 (Şekil 7 / Şekil 8) olarak belirlendi.



Şekil 3. Bildircin eritrosit GR enziminin SDS-PAGE sonucu molekül kütesini bulmak için çizilen LogMA- R_f grafiği. **Şekil 4.** Değişik konsantrasyonlardaki KH_2PO_4 tampon çözeltileri kullanılarak bildircin eritrosit GR enzimi için yapılan iyonik şiddet - aktivite grafiği.



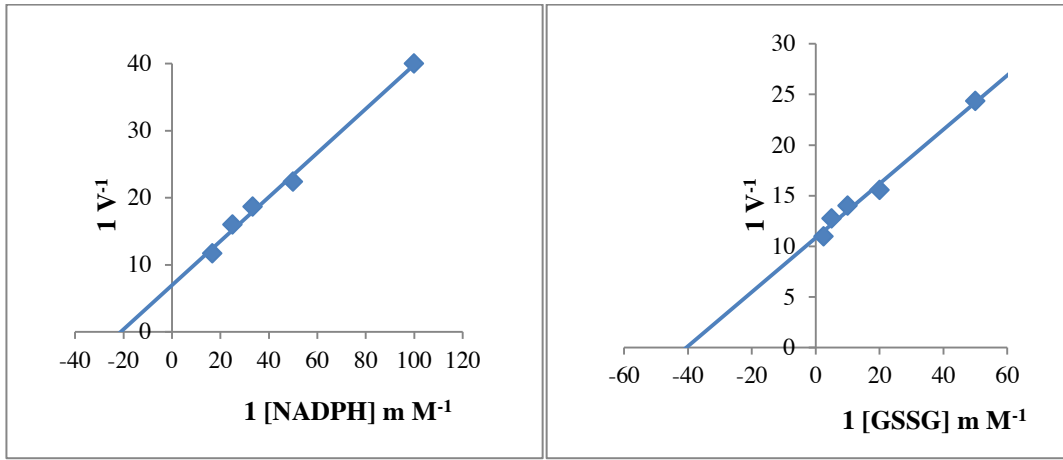
Şekil 5. Bildircin eritrosit GR enzimi için yapılan optimum pH çalışmasının sonucuna yönelik pH - aktivite grafiği **Şekil 6.** Bildircin eritrosit GR enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için çizilen sıcaklık-aktivite grafiği.



Şekil 7. GR enzimi için farklı pH'lardaki 400 mM KH_2PO_4 tampon çözeltileri kullanılarak elde edilen stabil pH grafiği Şekil 8. GR enzimi için farklı pH'lardaki 400 mM Tris/HCl tampon çözeltileri kullanılarak elde edilen stabil pH grafiği.

GR enziminin GSSG ve NADPH substratları için K_M ve V_{max} değerlerini belirlemek için Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Bu grafiklerden yararlanarak NADPH için K_M değeri 0.047 mM ve V_{max} değeri 1.45

EÜ m L^{-1} olarak; GSSG için ise, K_M değeri 0.025 mM ve V_{max} değeri 0.092 EÜ m L^{-1} olarak tespit edildi. Aktivite ölçümleri optimal şartlarda gerçekleştirildi (Şekil 9 / Şekil 10).



Şekil 9. NADPH için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi Şekil 10. GSSG için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi grafiği.

Antioksidan, okside molekülleri ve serbest radikalleri hücre hasarına neden olmadan zararsızlaştıran moleküllere denir. Vücudumuzda gerçekleşen redoks reaksiyonları sonucunda kararsız ve yüksek aktiviteye sahip serbest radikaller oluşabilmektedir. Bu tür moleküller dengeye ulaşabilmek için makromoleküllere (proteinler, lipidler ve DNA gibi) saldırırlar ve hücelere zarar veren zincir reaksiyonlarını başlatabilirler (Deepali et al., 2013).

Antioksidan savunma sistemleri, serbest radikal oluşumunu önleyerek ya da okside molekülleri indirgeyerek vücudun oksidatif stresten korumasını sağlar (Genestra, 2007). İki çeşit antioksidan savunma sistemi vardır. Bunların ilki; süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz gibi enzimlerin oluşturduğu enzimatik antioksidanlardan, ikincisi ise askorbik asid (Vitamin C), tokoferoller (Vitamin E) ve karotenoidler gibi diyetle alınan enzimatik olmayan

antioksidanlardan oluşur. Glutasyon enzimatik olmayan bir antioksidandır, vücutta aminoasitlerden sentezlenebildiğinden diyetle alınması zorunlu değildir (Valko et al., 2007). Glutasyon redüktaz, tiyoredoksin redüktaz ve lipoamid dehidrogenaz'ı da içeren piridin nükleotid disülfid oksidoredüktaz ailesine mensup bir flavoenzimdir (Bohme et al., 2000; Temel ve ark., 2017). GR enzimi, hücre içi redoks dengesinin sağlanmasında, protein ve diğer makro moleküllerin okside moleküllerin zararlarına karşı korunmasında ve glutasyon bağımlı antioksidan sistem için anahtar rol oynar (Kanzok et al., 2001).

GR enzimi keşfedildikten sonra hücrede üstlendiği fonksiyonları ve metabolizma açısından önemini belirlemek için çeşitli kaynaklardan saflaştırılarak karakterize edilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda GR enziminin saflaştırılmasında DEAE-Sephadex A-50, CM-Sephadex C-50 gibi farklı iyon değişim kromatografi metodları, Sephadex G-200 jel filtrasyon kromatografisi, GSSG-NH(CH₂)₆NH-agaroz jel, GSSG(N)-sTT-selüloz matriksi, ADP-agaroz ve 2',5'-ADP Sepharose-4B afinite kromatografisi gibi farklı yöntemler kullanılmışlardır (Harding, 1973; Worthington and Rosemeyer, 1976; Mannervik et al., 1976; Connell and Mullet, 1986; Adem and Çiftci, 2016). Bu çalışmada bildircin eritrosit glutasyon redüktaz enzimi, 2', 5' ADP Sepharose-4B afinite kromatografisi kullanılarak tek adımda ve çok kısa sürede yüksek saflıkta elde edilmiştir. Bu yöntem önceki yöntemlerle karşılaştırıldığında daha ekonomik ve etkilidir.

Önceki çalışmalarda GR enziminin doğal halinin molekül ağırlığının 70-150 kDa olacağı rapor edilmiştir (Harding, 1973). Bildircin eritrosit GR enziminin molekül ağırlığını hesaplamada SDS-PAGE yöntemi kullanılmış enzimin alt birimlerinin molekül ağırlığı 78.7 kDa olarak hesaplanmıştır. Bu sonuç önceki çalışmalarda benzerlik arz etmektedir. GR enzimi için optimum pH farklı kaynaklarda 6.5-9 arasında değişmektedir. Bildircin GR enzimi için optimum pH, KH₂PO₄ tamponu pH 7.5 olarak bulunmuştur. Bildircin GR enzimi için yapılan stabil pH çalışmalarında farklı kaynaklar için enzimin pH 5.5-9 aralığında stabil olduğu rapor edilmiştir (Tekman et al., 2008; Taşer and Çiftci, 2012; Taher, 2017). Bildircin GR enzimi için stabil pH, KH₂PO₄

tamponu pH 8.0 olarak hesaplandı. Bildircin GR enziminin optimum sıcaklığı 60 °C olarak bulundu. Bu sonuç önceki çalışmalarla benzerlik arz etmektedir. GR enzimi için optimum iyonik şiddet farklı kaynaklarda 40-600 mM arasında değişmektedir. Bildircin GR enzimi için optimum iyonik şiddet 400 mM KH₂PO₄ tamponu olarak belirlendi. Bu sonuç sığır eritrositlerinden saflaştırılan GR enzimi ile benzerlik arz etmektedir (Erat ve ark., 2003). Bildircin GR enzimi için yapılan kinetik çalışmalar sonucu NADPH substratı için K_M değeri 0.047 mM ve V_{max} değeri 1.45 EÜ m L⁻¹ olarak belirlendi. GSSG substratı için ise, K_M değeri 0.025 mM ve V_{max} değeri 0.092 EÜ m L⁻¹ olarak tespit edildi. Sonuçlar karşılaştırıldığında GR enzimin GSSG substratına olan afinitesinin NADPH substratına olan afinitesinden daha fazla olduğu tespit edildi.

SONUÇ

Glutasyon hücre içerisinde; serbest radikallerin ve reaktif oksijen ürünlerinin zararsızlaştırılması, DNA ve protein sentezi, ksenobiyotiklerin, bazı antineoplastik ilaçların detoksifikasyonu, aminoasit transportu, bazı proteinlerin disülfür bağlarının koparılması hücre içerisinde sistein deposu olarak bulunması ve bazı enzimlerin reaksiyonlarında rol oynaması gibi önemli görevleri yürüten bir tiyoldür. Glutasyon redüktaz enzimi hücre içi glutasyon metabolizmasının düzenlenmesinde merkezi rol üstlenmektedir. Bu çalışma kapsamında glutasyon redüktaz enzimi japon bildircin eritrositlerinden 2', 5' ADP Sepharose-4B afinite kromatografisi yöntemi kullanılarak 33.75 EÜ m g⁻¹ spesifik aktivite ile % 46.2 verimle tek adımda 1 028 kat saflaştırıldı. Daha sonra saf enzime ait karakterizasyon özellikleri belirlendi. Elde edilen sonuçların metabolik açıdan büyük önem arz eden glutasyon redüktaz enzimi üzerine bundan sonra yapılacak çalışmalar için yol gösterici olacağı düşünülmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Bingöl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından BAP-718-289-2015 proje numarası ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Acan N.L., Tezcan E.F., 1989. Sheep brain glutathione reductase: purification and general properties. *FEBS Letter*, 250: (1) 72-74.
- Açan L. 1990. Koyun beyni glutatyon redüktazının saflaştırılması ve bazı özelliklerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 100s
- Adem S., Ciftci M. 2016. Purification and Biochemical Characterization of Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase, 6-Phosphogluconate Dehydrogenase and Glutathione Reductase from Rat Lung and Inhibition Effects of Some Antibiotics. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 31:(6) 1342-8.
- Beütler E., 1969. Effect of flavin compound on Glutathione Reductase Activity; In vivo and in vitro studies. *J Clin Invest*. 48: 1957–1966.
- Boggaram V., Brobjer K.L., Mannervik B., 1979. Purification of glutathione reductase from porcine erythrocytes by the use of affinity chromatography on 2',5'-ADP-Sepharose 4B and crystallization of the enzyme. *Anal. Biochem.*, 98: 335-340.
- Bohme C.C., Arscott D.L., Becker K., Schirmer H.R., Williams C.H., 2000. Kinetic Characterization of Glutathione Reductase from the Malarial Parasite Plasmodium Falciparum. *J. Biol. Chem*. 275 (48): 37317–23.
- Bradford M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem*. 72(1–2):248–254.
- Carlberg I., Mannervik B., 1981. Purification and characterization of glutathione reductase from calf liver. *Glutathione reductase assays*. *Methods in Enzymology*, 113: 484-495.
- Connell J. P., Mullet J. E., 1986. Pea Chloroplast Glutathione Reductase: Purification and Characterization. *Plant Physiology*. 82 : (2) 351–56.
- Deepali P., Supriya K., Neeta B., Meena K., Aditi M., Yashwant I., Varsha D., 2013. Antioxidant Defence System, Or. Maxillofacial Pathol. J. 4: (1), 309-315.
- Douglas K.T., 1987. Mechanizm of glutathione-dependent enzymes., Meister, A., (ed). *Avdan. Enzymol.*, John Wiley and Sons inc., New York. 59: 103-167.
- Erat M., 2002. İnsan ve sığır eritrosit glutatyon redüktaz enziminin saflaştırılması, bazı ilaç ve kimyasal maddelerin inhibisyon veya aktivasyon etkilerinin araştırılması. Doktora tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 154s
- Erat M., Sakiroglu H., Çiftci M., 2003. Purification and Characterization of Glutathione Reductase from Bovine Erythrocytes. *Prep. Biochem. and Biotech*. 33 (May 2014): 283–300.
- Genestra M., 2007. Oxy Radical, Redox-Sensitive Signalling Cascades and Antioxidants. *Cellular Signalling* 19 : (9) 1807–19.
- Harding J.J., 1973. Affinity Chromatography in the Purification of Glutathione Reductase. *Journal of Chromatography* 77: 191-99.
- Hunaiti A.A., Soud M., 2000. Effect of lead concentration on the level of glutathione, glutathione S-transferase, reductase and peroxidase in human blood. *Sci Total Environ*. 29: 45-50.
- Jiang F., Hellmans U., Stroga E., Bergman B., Mannervik B., 1995. Cloning, sequencing and regulation of the glutathione reductase gene from the cyanobacterium *Anabaena PCC 7120*. *J. Biol. Chem.*, 270: (39), 22882-22889.
- Kanzok S.M., Fechner A., Bauer H., Ulschmid J.K., Müller H.M., Botella-Munoz J., Schneuwly S., Schirmer R., Becker K., 2001. Substitution of the thioredoxin system for glutathione reductase in *Drosophila melanogaster*. *Science*. 26: 291(5504), 643-646.
- Keha E., Küfrevioğlu Ö.İ., 2010. *Biyokimya, Aktif Yayınevi, Erzurum*, 653s
- Knapen M.F., Zusterzeel, P.L., Peters, W.H., Steegers, E.A., 1999. Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 82: 171-184.
- Laemmli U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680–685.
- Lamotte F., Vianey-Liuau N., Duviau M.P., Kobrehel K., 2000. Glutathione reductase in wheat grain. 1. Isolation and characterization. *J. Agric. Food Chem*. 48: 4978-4983.
- Lineweaver H., Burk D., 1934. The determination of enzyme dissociation constants, *J. Am. Chem. Soc*. 57: 685.
- Mannervik B., Jacobsson K., Boggaram V., 1976. Purification of Glutathione Reductase from Erythrocytes by the Use of Affinity Chromatography on 2', 5'-ADP-Sepharose 4-B. *FEBS Letters* 66 (2): 221–24.
- McCallum M. J., Barrett, J., 1995. Purification and properties of glutathione reductase from the cestode *Moniezia expansa*. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 27: 393-401.
- Mullineaux P., Enard C., Hellens R., Creissen G., 1996. Characterization of glutathione reductase gene and its genetic locus from pea (*Pisum sativum L.*). *Planta*, 200: 186-194.
- Patel M.P., Marcinkeviciene J., Blanchard J.S., 1998. Enterococcus faecalis glutathione reductase: Purification, characterization and expression under normal and hyperbaric O₂ conditions. *FEMS Microbiology Letters*, 166: 155-163.
- Taşer P., Çiftci M., 2012. Purification and characterization of glutathione reductase from turkey liver. *Turk. J. Vet. Anim. Sci*, 36: 546-553.
- Taher S.S.M., 2017. Purification And Characterization of Glutathione Reductase From Japanese Quail (*Coturnix coturnix japonica*) Liver, Master Thesis, Bingöl University institute of science, 78p.
- Tekman B., Ozdemir H., Senturk M., Ciftci M., 2008. Purification and characterization of glutathione reductase from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver and inhibition effects of metal ions on enzyme activity.. *Comp Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol*. 148: 117-121.
- Temel Y., Küfrevioğlu O.İ., Ciftci 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. *Turk. J. Chem* 41: 48-60.
- Toribio F., Martinet L.E., Pascual P., Lopez B.J., 1996. Methods for purification of glutathione peroxidase and related enzymes, *J. Chromatog. B*. 684: 77-97.
- Ulus G., Erat M., Çiftci M., Şakiroğlu H., Bakan E., 2005. Purification and characterization of glutathione reductase from sheep liver. *Turk J. Vet. Anim Sci*. 29: 1109-1117.
- Ulus N.N., Tandoğan B., 2007. Purification and kinetic properties of glutathione reductase from bovin liver. *Mol Cell Biochem*, 303: 45-51.
- Valko M.D., Leibfritz J., Moncol M.T., Cronin M., Mazur M., Telser J., 2007. Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease. *Int.J Biochem Cell Biol*. 39 (1): 44-84.
- Worthington D.J., Rosemeyer M.A., 1976. Glutathione Reductase from Human Erythrocytes. *Catalytic Properties and Aggregation*. *Eur. J. Biochem. / FEBS*, 67 (1): 231–38.