

Ağır Metallerin *Pinus brutia* Ten. İğne Yapraklarında, Glutasyon S-Transferaz Enzimleri Üzerindeki Tekil ve Bazı Bütünleşik İnhibisyonları

Can YILMAZ*1

¹Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, 65080, Van

(Alınış / Received: 21.09.2016, Kabul / Accepted: 23.12.2016, Online Yayınlanma / Published Online: 18.02.2017)

Anahtar Kelimeler

Pinus brutia Ten.,
Glutasyon S-transferaz,
Ağır metal,
İnhibisyon mekanizması

Özet: Bu çalışmada 6 farklı ağır metal iyonunun toplam glutasyon S-transferaz enzim aktivitesi üzerine tekli ve ikili inhibitör mekanizmaları Türkiye'ye özgü bir çam türü olan *Pinus brutia* Ten. (kızılçam) iğne yapraklarından elde edilen homojenatlarda incelenmiştir. Bu amaçla Cu^{+2} , Ni^{+2} , Pb^{+2} , Zn^{+2} , Cd^{+2} ve Hg^{+2} ağır metal iyonlarının tekli inhibisyon etkisi kullanılan substratın, 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB), farklı konsantrasyonları için ölçülmüştür. CDNB'nin üç farklı konsantrasyonu için (0,50 mM, 0,75 mM, 1,0 mM) dört farklı ağır metal ikilisinin (Ni^{+2} - Cd^{+2} , Ni^{+2} - Zn^{+2} , Pb^{+2} - Cu^{+2} , Pb^{+2} - Hg^{+2}) yine 3 farklı karışım kombinasyonunun (2A+B, A+B, A+2B) etkileri de ölçülmüştür. Cu^{+2} , Ni^{+2} , Pb^{+2} , Zn^{+2} , Cd^{+2} ve Hg^{+2} ağır metal iyonları için sırasıyla yarışmalı-tersinmez (K_i : 0,1794 mM), kısmi yarışmalı (K_i : 50,5 mM), tam karışık (K_i : 1140,6 mM), kısmi yarışmalı (K_i : 23,9 mM), kısmi karışık (K_i : 205,2 mM) ve tam yarışmalı (K_i : 27,2 mM) modeller belirlenmiştir. Ni^{+2} - Cd^{+2} , Ni^{+2} - Zn^{+2} , Pb^{+2} - Cu^{+2} , Pb^{+2} - Hg^{+2} ağır metal çiftleri için ise {2A+B/A+B/A+2B} sırasıyla {kısmi bağımlı (K_i : 69,9 mM) / kısmi bağımlı (K_i : 58,7 mM) / tam yarışmasız (K_i : 530,3 mM)}, {kısmi karışık (K_i : 34,5 mM) / kısmi karışık (K_i : 23,2 mM) / kısmi karışık (K_i : 72,3 mM)}, {kısmi yarışmasız (K_i : 123,9 mM) / tam bağımlı (K_i : 360,1 mM) / tersinmez (K_i : 32,1 mM)}, {tam bağımlı (K_i : 316,1 mM) / tam yarışmalı (K_i : 117,6 mM) / tersinmez (K_i : 8,6 mM)} sonuçları bulunmuştur. Literatürde ilk defa yayınlanan ikili etki sonuçları iyonların konsantrasyonları arasındaki ilişkinin ortaklaşa yarattıkları inhibisyon modelinde belirleyici olduğunu göstermektedir.

Singular and Coupled Inhibition of Some Heavy Metal Ions on Glutathione S-Transferases of *Pinus brutia* Ten. Needles

Keywords

Pinus brutia Ten.,
Glutathione S-transferase,
Heavy metal,
Inhibition mechanism

Abstract: In this study, singular and coupled inhibitory mechanisms of 6 different heavy metal ions on total glutathione S-transferase enzyme activity were examined by needle homogenates of *Pinus brutia* Ten. (Turkish redpine) which is a pine species specific to Turkey. For this purpose, Cu^{+2} , Ni^{+2} , Pb^{+2} , Zn^{+2} , Cd^{+2} ve Hg^{+2} ions' singular effects were measured at different concentrations of the substrate (CDNB). For three concentrations of CDNB (0,50 mM, 0,75 mM, 1,0 mM), the effects of three mix-combinations (2A+B, A+B, A+2B) of four heavy metal couples (Ni^{+2} - Cd^{+2} , Ni^{+2} - Zn^{+2} , Pb^{+2} - Cu^{+2} , Pb^{+2} - Hg^{+2}) were measured. For Cu^{+2} , Ni^{+2} , Pb^{+2} , Zn^{+2} , Cd^{+2} ve Hg^{+2} ions; competitive-irreversible (K_i : 0,1794 mM), partially-competitive (K_i : 50,5 mM), fully-mixed (K_i : 1140,6 mM), partially-competitive (K_i : 23,9 mM), partially-mixed (K_i : 205,2 mM) and fully-competitive (K_i : 7,2 mM) models were determined, respectively. For Ni^{+2} - Cd^{+2} , Ni^{+2} - Zn^{+2} , Pb^{+2} - Cu^{+2} , Pb^{+2} - Hg^{+2} couples with the {2A+B/A+B/A+2B} order; {partially uncompetitive (K_i : 69,9 mM) / partially uncompetitive (K_i : 58,7 mM) / fully noncompetitive (K_i : 530,3 mM)}, {partially mixed (K_i : 34,5 mM) / partially mixed (K_i : 23,2 mM) / partially mixed (K_i : 72,3 mM)}, {partially noncompetitive (K_i : 123,9 mM) / fully uncompetitive (K_i : 360,1 mM) / irreversible (K_i : 32,1 mM)}, {fully uncompetitive (K_i : 316,1 mM) / fully competitive (K_i : 117,6 mM) / irreversible (K_i : 8,6 mM)} models were stated, respectively. Coupled effect results, which were the first in the literature, demonstrated that the relationship inbetween the concentrations of the ions were determinative in inhibition model that they created together.

1. Giriş

Bitkiler ağır metalleri çoğunlukla kök ve gövdelerinde biriktirir, ya da daha sonra kullanmak veya farklı organlara yönlendirmek üzere toksik olmayan bir formda yapraklarında depolarlar [1]. Ağır metallerin bitki fizyolojisi ve biyokimyası üzerine etkilerini konu alan çalışmaların büyük bir bölümü doz-etkili değişimleri takip eden [2,3] veya ağır metallerin organizmanın farklı kısımlarında ne oranlarda biriktirildiğini inceleyen analitik araştırmalardır [4,5,6]. Doz-etkili çalışmalarda uygulanan metot kontrollü çevre koşulları sağlayan seralar içerisinde bitki örneklerine farklı miktarlarda ve sürelerde ağır metallerin uygulanması sonucunda açığa çıkan baskı faktörlerindeki değişikliklerin, çeşitli kimyasal ve moleküler tekniklerle takip edilmesi esasına dayanmaktadır. İzlenen metabolik faktörler ve enzimlerdeki değişimler ise toplam metabolizmanın bu baskı koşullarına olan genel ve spesifik yanıtı olmaktadır. Ancak, tüm bu çalışmalar arasında, ağır metallerin doğrudan enzim molekülleri üzerine etkilerini, inhibisyon modellemeleri yaparak ortaya koyan çok az sayıda güncel çalışma mevcuttur. Bunların içerisinde orman ağaçlarını, özellikle çam türlerini konu edinenler ise yok denecek kadar az sayıdadır [7]. Oysaki, serbest metal iyonu karışımlarının bitki metabolizması ve özellikle uzun süre bu tür etkenlere maruz kalan ağaç türlerindeki mevcut toksisitelerinin ve karşılıklı etkileşimlerinin belirlenmesi, son derece kritik öneme sahip olmakla birlikte kinetik hesaplamaları açısından da bir o kadar zordur [8].

Faz-I ve Faz-II enzimlerinin, doğal metabolik fonksiyonlar neticesinde tüm organizmada açığa çıkan, reaktif oksijen türlerinin yarattığı zararlı etkilerin ortadan kaldırılmasındaki önemi göz önünde tutulduğunda, bahsi geçen bu konuda ağır metal iyonlarının biyokimyasal yollar üzerine doğrudan veya dolaylı olmak üzere mevcut etkilerinin ve etki derecelerinin tespiti büyük önem arz etmektedir [9].

Amino asit dizileri temel alındığında bitkiler aleminde dört ana Glutasyon S-transferaz (GST) izozim sınıfı bulunmaktadır: hayvanlar aleminde de bulunan GST- θ ve GST-z ile sadece bitkiler alemine özel olan GST- τ ve GST- ϕ 'dir [10,11]. Son yıllardaki çalışmalarda GST- ϕ ekspresyonunun kuraklık, yaralanma, aktif oksijen türleri, patojenlerin saldırısı gibi çevresel etkenlerce artırıldığı; GST- τ izoziminin miktarının ve aktifliğinin ise çeşitli fitohormonlar ve ağır metaller ile yine patojenler etkisiyle değiştiği bildirilmiştir [12,13]. Bu durum, bu izozimlerin bitkilerde, hücre döngüsünün tüm aşamalarında, tüm biyotik ve abiyotik baskı koşullarında hali hazırda belirli bir seviyede bulduklarını kanıtlamaktadır.

Hücre içerisinde GST'lerin en popüler rolü glutasyon (GSH) ile konjuge ederek nükleofilik ksenobiyotikleri detoksifiye etmektir. GSH, aktif oksijen türlerine karşı

geliştirilen koruma mekanizması içerisinde önemli bir moleküldür. Çözünür glutasyon S-konjugeleri pek çok metabolik detoksifikasyon işlemlerine ve oksidatif baskıya karşı devreye giren mekanizmalara katılan ve bitkilerin ikincil metabolizmaları dahilinde sayılan Faz-II enzimlerini içeren kofullarda bulunurlar [14,15,16]. Bu sitozolik savunma sistemi, normal metabolizma sürecinde açığa çıkan elektrofilleri, GSH molekülünü ya kosubstrat ya da koenzim olarak kullanmak yoluyla bağlar [17]. Bitki GST'lerinin dört grubu da GSH'nin tiyolat formuyla konjugasyon, peroksidaz ve izomeraz reaksiyonları gerçekleştirecek şekilde serin aktif bölgesinde bir serin yapısı bulundurmaktadırlar.

Bakır ve çinko gibi bazı ağır metallerin düşük konsantrasyonları bitki metabolizması içerisinde önemli enzimlerin kofaktörleri olarak önem arz etse de [7], nispeten daha yüksek konsantrasyonlarda GST'ler tarafından gerçekleştirilen GSH konjugasyonunu da içeren pek çok enzimsel reaksiyonu inhibe edebilirler.

GST'nin katalitik aktivitesi glutatyondaki sülfür atomunun çok çeşitli substratlarda elektrofilik merkeze nükleofilik etkileşimine dayanır. 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) GST aktivitesinin ölçülmesinde kullanılan genel substrattır ve bitkilerdeki ana GST izozimleri için bu substrat ile GSH molekülü arasındaki konjugasyon tepkimesi diğer substratların verdikleri reaksiyonlar içerisinde ilk sırada bulunmaktadır [12,18,19].

2. Materyal ve Metot

2.1. Kullanılan kimyasallar

1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) (Sigma, min 98%), indirgenmiş glutasyon (GSH) (Sigma, min 99%), PVP-K30 (Fluka), hidrosimetil aminometan (Tris) (Sigma, min 99.99%), nonidet P-40 (Sigma), sığır serum albümini (BSA) (Sigma), etanol (Riedel-de Haën, %99.8), Folin-Ciocalteu fenol solüsyonu (Sigma), bakır sülfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) (Riedel-de Haën, extra pure), sodyum-potasyum tartarat (Fluka, min. 99%), sodyum hidrosit (Merck), dipotasyum hidrojen fosfat (Merck, extra pure), potasyum dihidrojen fosfat (Fluka, min. 99%), sodyum karbonat (Riedel-de Haën, extra pure), 2-merkaptotanol (Merck, min. 98%), pepstatin (Fluka), hidroklorik asit (Merck, 37%), bakır (III) klorür (Fluka), civa (II) klorür (Sigma, 99.999%), çinko klorür (Sigma, 99.999%), kadmiyum klorür (Sigma, 98%), kurşun (II) klorür, nikel (II) klorür, P-PER bitki protein ekstraksiyon kiti. Bütün kimyasal malzemeler analitik kalitededir ve mümkün olan en yüksek saflıkta olmak üzere ticari firmalardan temin edilmiştir.

2.2. İğne yapraklardan sitozolik homojenat eldesi

P. brutia Ten. iğne yaprakları 30 farklı sağlıklı bireyden olmak üzere ODTÜ arazisi içerisinde

Yalıncağ mevkiinde bulunan yerel bir popülasyondan Mayıs ayı sonlarında toplanmıştır. Toplama esnasında distile su ile yıkanıp kurulanan iğne yapraklar özel şişeler içerisinde sıvı azot tankına bırakılarak dondurulmuş ve laboratuvarındaki -80°C dondurucuya yerleştirilinceye kadar soğuk zincir bozulmamıştır. Seramik havan-havan eli ile, sıvı azot marifetiyle dondurulan iğne yapraklar toz haline getirilmiş ve 30 örnek homojen tek bir havuz oluşturacak şekilde karıştırılarak tekrar -80°C dondurucuya yerleştirilmiştir.

Homojenatlar P-PER bitki ekstraksiyon kiti ile, kit içerisindeki talimatlar takip edilerek elde edilmiştir. Son santrifüj sonrası elde edilen süpernatant, 500µl hacimlere ayrılarak -80°C dondurucuda saklanmıştır.

2.3. Toplam GST enzim aktivitesi ve kinetik ölçümler

Toplam GST enzim aktivitesi spektrofotometrik yöntemlerle, reaksiyon ortamında tiyo-eter oluşumunun takibi esasına dayalı olarak gerçekleştirilmiştir. 340 nm'de, substrat olarak CDNB kullanılarak, Habig ve ark. (1974) [20] önerdiği metodun ELISA mikropilaka okuyucu sisteme göre optimize edilmiş haliyle yapılmıştır [21]. Her bir reaksiyon ortamı, yani her bir kuyucuk 100 mM, pH: 7,8 potasyum fosfat tampon, GSH (1 mM), CDNB'nin farklı konsantrasyonları, ağır metal veya ağır metal çiftinin farklı konsantrasyonları ile 3,5-6 mg/ml konsantrasyon aralığında (değerler bulgular kısmında verilmektedir) homojenat içermektedir.

Tekli metal inhibisyonunun ölçülmesinde CDNB'nin 6 farklı konsantrasyon değeri (0,25-1,5 mM) ile ağır metallerin 5-7 farklı derişim değeri (10-1000 µM) ölçülmüştür. Her ölçüm üçlü tekrar esasına uygun olarak yapılmıştır. İkili etki ölçümlerinde ise ağır metal çiftlerinin 6 farklı konsantrasyon değeri (10-500 µM) için 3 farklı kombinasyon (2A+B, A+B, A+2B) hazırlanmış; bunlar da CDNB'nin bu defa 3 farklı konsantrasyonunda (0,50-1,0 mM) üçlü tekrar esasına uygun olarak ölçülmüştür. İkili metal çiftleri Nikel-Kadmiyum, Nikel-Çinko, Kurşun-Bakır ve Kurşun-Civa olarak tasarlanmıştır. Tekrarlarla birlikte, kör kuyucukları hariç, toplamda yaklaşık 5000 ayrı kuyucukta ölçüm yapılmıştır. Her ölçüm grubu için kontrol grupları da tasarlanmış ve enzim aktivitesi ölçümleri 10dk içerisinde 20 ölçüm olacak şekilde programlanmış mikropilaka okuyucuda, 25°C'de, 340 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Absorbans değerleri aşağıdaki formül ile spesifik enzim aktivitesi olarak hesaplanmıştır:

$$\left[\frac{dA}{dt} \right] \times DF \times \left(\frac{1}{\varepsilon(mM^{-1}) \times ml} \right) \quad (1)$$

dA/dt birim zamanda (ms) absorbansdaki değişimi (mOD), ε ekstinksiyon sabitini (ε = 9.6 mM⁻¹cm⁻¹) ve DF ise dilüsyon faktörünü simgelemektedir.

Protein miktarları ise Lowry'nin metodu ile [22], ELISA mikropilaka okuyucuya uyarlanmış prosedür üzerinden ölçülmüştür.

2.4. İstatistiksel hesaplamalar

Enzim spesifik aktiviteleri kayıtlı ve lisanslı SIGMA Plot 13.0 ile –“Enzyme Kinetics Module” kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kullanılan yazılım seçilen tersinir ve tersinmez inhibisyon seçeneklerine göre yine tercih edilen modellere (yarışmalı, yarışmasız, karışık ve bağımlı inhibisyon) ve bunların kısmi (partial) şekillerine uygun olacak hesaplamaları gerçekleştirmekte ve ilgili grafikleri çizmektedir (Michaelis-Menton, Lineweaver-Burk, Dixon, Hill, Hanes-Woolf, ve diğerleri). Bu sayısal hesaplamalar neticesinde her bir model ve şekli için R² ve Akaike Information Criterion (AICc) değerlerini içeren bir sıralama yapmaktadır. Bu sıralamada öncelik, literatürde de belirtildiği üzere, AICc değerine tanınmıştır. En düşük AICc değerine sahip olan model inhibisyon modeli olarak kabul edilmiştir ancak 2 veya daha az sayısal fark olması durumunda R² değeri de dikkate alınmıştır. AICc değerinin negatif çıkması durumunda cebirsel olarak daha küçük olan, yani “daha negatif” olanına sahip model geçerli inhibisyon modeli olarak bildirilmiştir. Bu kriterlerle istatistiksel olarak farklı denilemeyen modeller birlikte değerlendirilmiştir.

3. Bulgular

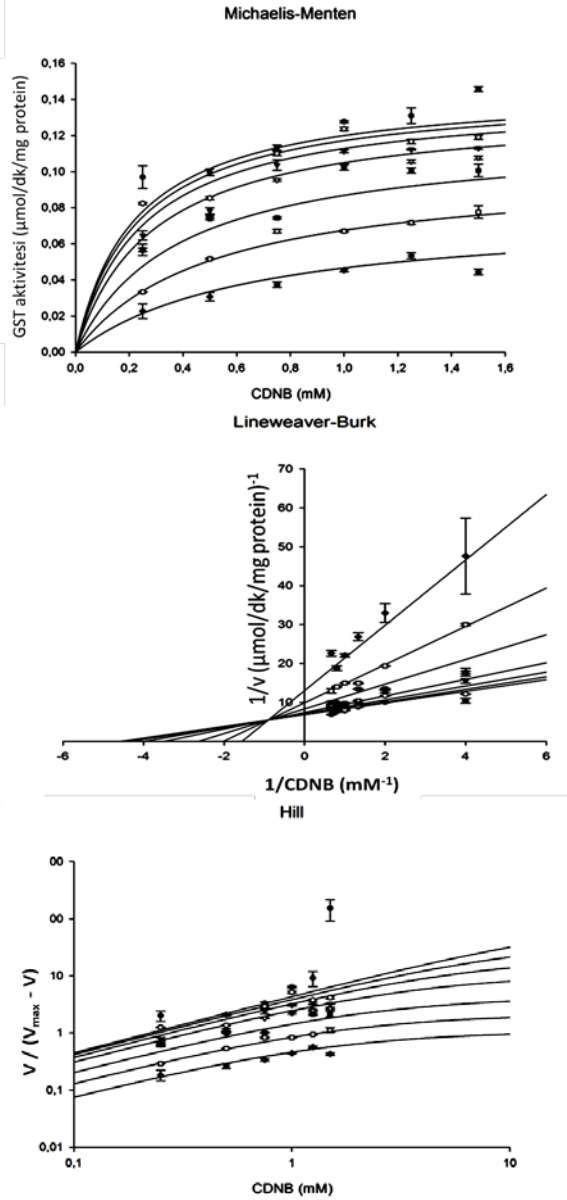
3.1. Tekli ağır metal inhibisyonuna ilişkin kinetik modeller

Tekli ağır metal inhibisyonunun çözümüne ilişkin yapılan enzim aktivitesi ölçümleri sonucunda, bu ilişkiyi AICc ve R² değerleri ile birlikte ifade edebilecek grafik kümeleri oluşturulmuştur. Kadmiyum için çizdirilen Michaelis-Menten (MM), Lineweaver-Burk (LB) ve Hill grafikleri, hem tersinir hem de tersinmez inhibisyon modellerinde kısmi karışık inhibisyonu göstermektedir (Şekil 1).

Bakır için çizdirilen grafikler ve istatistiksel hesaplamalar tersinir ve tersinmez inhibisyon modelleri için, AICc değerleri göz önüne alındığında, ayırt edici bir fark ortaya koyamamakla birlikte, R² değerleri bakır iyonlarının tersinmez inhibisyon yarattığını ve bu ağır metal iyonlarının CDNB substratı ile yarışarak bağlandığı bölgede geri dönüşümsüz bir kompleks oluşturduğunu göstermektedir (Şekil 2).

Civa ağır metal iyonu kullanılarak tamamlanan tekil etki ölçümlerinde ise çizdirilen grafiklerden elde edilen veriler ve kinetik hesaplamalar tam yarışmalı modeli ifade etmiştir (Şekil 3).

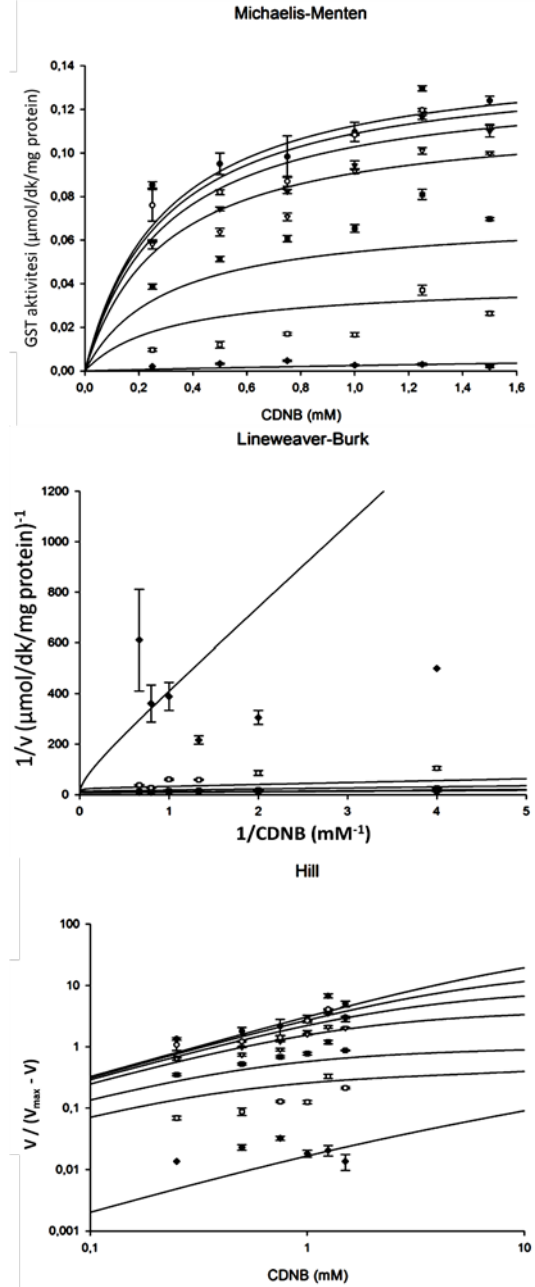
Nikel kullanılarak yapılan ölçümlerin sonuçları için çizdirilen grafiklerden ve önerilen modellerden istatistiksel olarak anlamlı bir farkla en uygun olanı kısmi yarışmalı modeldir (Şekil 4).



Şekil 1. Kadmiyum iyonlarının, kızılçam iğne yapraklarında toplam GST enzim aktivitesi üzerindeki kısmi karışık inhibisyon etkisi. Hesaplanan V_{max} değeri 0.1477 $\mu\text{mol/dk/mg protein}$ 'dir. K_m değeri 0.2112 mM, K_i değeri ise 205.2 mM olarak hesaplanmıştır. SigmaPlot 13.0 Enzyme Kinetics yazılımı tarafından, -1201.945 AICc değeri ve 0,92907 R^2 değeri ile önerilen inhibisyon modeli kısmi karışık modeldir.

Kurşun için tekrarlanan ölçümleri sonuçları için çizdirilen çift-ters grafikler ve yapılan istatistiksel hesaplamalar tam karışık inhibisyon modelinin diğerlerine oranla daha uygun olduğunu ortaya koymuştur (Şekil 5).

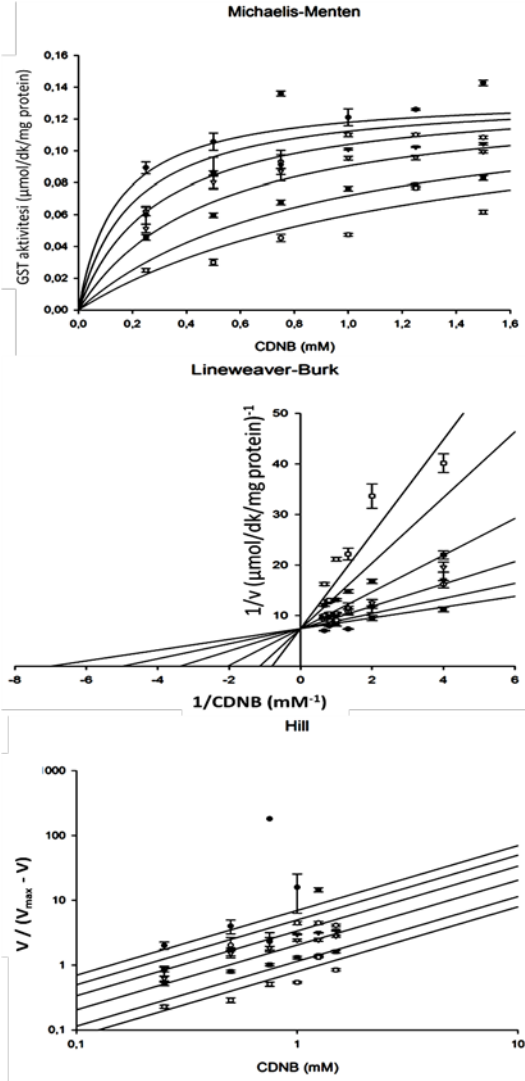
Çinko için gerçekleştirilen ölçümler ve çizdirilen grafikler, iki farklı tersinmez modeli, birbirlerine oldukça yakın oranlarda işaret etmiştir; ancak, tersinmez model için yürütülen yazılım, aynı enzim aktivitesi değerleri için, tersinmez model kadar düşük AICc değeri sağlamasa da, tersinir modellerden hangisinin daha uygun olduğuna dair ipucu oluşturacak nitelikte kısmi yarışmalı modeli ön plana çıkarmıştır (Şekil 6).



Şekil 2. Bakır iyonlarının, kızılçam iğne yapraklarında toplam GST enzim aktivitesi üzerindeki tersinmez inhibisyon etkisi. Hesaplanan V_{max} değeri 0.1491 $\mu\text{mol/dk/mg protein}$ 'dir. K_m değeri 0.2968 mM, K_i değeri ise 0.1794 mM olarak hesaplanmıştır. SigmaPlot 13.0 Enzyme Kinetics yazılımı tarafından, -1201,945 AICc değeri ve 0,94190 R^2 değeri ile tersinmez inhibisyon modeli önerilmiştir. AICc değeri olarak tersinir model ile fark bulunmamasıyla birlikte, R^2 değeri açık bir şekilde bu inhibisyon modelini işaret etmiştir.

3.2. İkili ağır metal inhibisyonuna ilişkin kinetik modeller

İkili ağır metal inhibisyonunun çözümüne ilişkin yapılan enzim aktivitesi ölçümlerinde izlenen temel yol her iki ağır metal iyonunun birbirlerine oranlarını değiştirerek ancak total ağır metal konsantrasyonunu da sabit tutmak suretiyle, metal çiftinin birbirlerinin tekil olarak yarattığı etkiyi nasıl değiştirdiğini veya tamamen ayrı bir model mi yarattıklarını keşfetmekti.



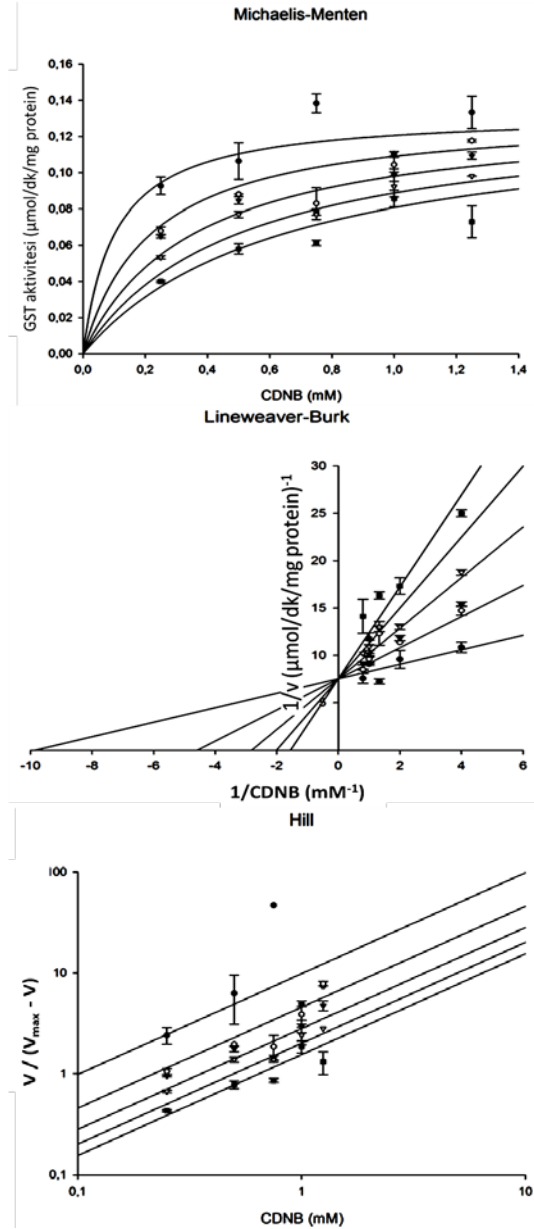
Şekil 3. Cıva iyonlarının, kızılçam iğne yapraklarında toplam GST enzim aktivitesi üzerindeki tam yarışmalı inhibisyon etkisi. Yazılıma hesaplatılan V_{max} değeri 0.1347 $\mu\text{mol/dk/mg protein}$ 'dir. K_m değeri 0.1047 mM, K_i değeri ise 27,2 mM olarak hesaplanmıştır. SigmaPlot 13.0 Enzyme Kinetics yazılımı tarafından, -986,237 AICc değeri ile tam yarışmalı inhibisyon modeli önerilmiştir.

3.2.1. Ni-Cd ağır metal çiftinin inhibisyon etkisi ve kinetik modeli

Nikel ve Kadmiyum iyonlarının inhibisyon etkisi üç farklı kombinasyon için ölçülmüştür. (2A+B) kombinasyonu için yapılan ölçümlerin ve çizdirilen grafiklerin (Şekil 7) sonucunda önerilen kinetik model kısmi bağımlıdır.

(A+B) kombinasyonu için yapılan enzim aktivitesi ölçümlerinin sonucu yazılımda işlendiğinde ve ilgili grafikler çizdirildiğinde (Şekil 8) yine kısmi bağımlı model önerilmiştir.

(A+2B) şeklinde sembolize edilen ve kadmiyum iyon konsantrasyonunun nikelinkinin iki katı olduğu durumda ise, çizdirilen grafikler (Şekil 9) ve kinetik hesaplamalar sonucunda anlaşıldığı üzere, inhibisyon modeli kısmi bağımlıdan tam yarışmasız modele dönüşmüştür.

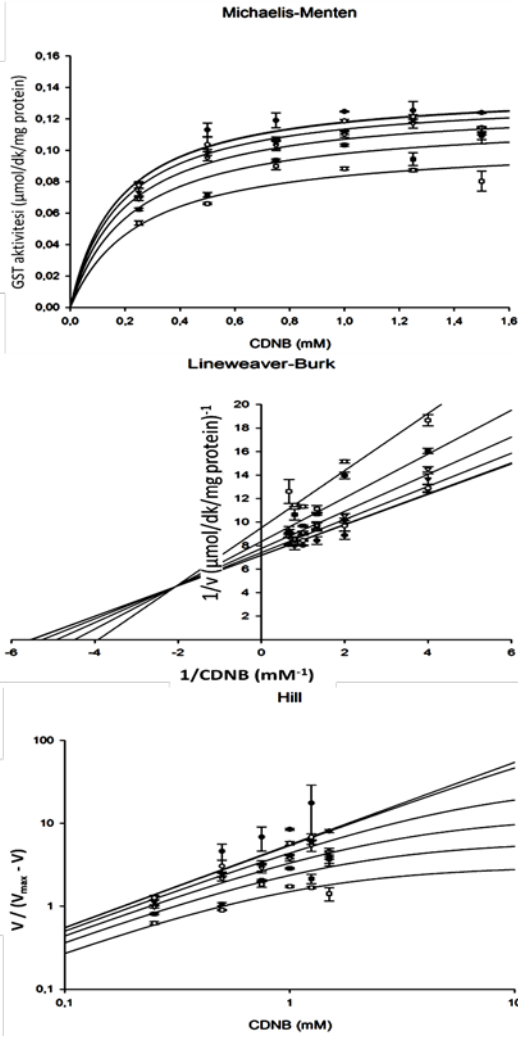


Şekil 4. Nikel iyonlarının, kızılçam iğne yapraklarında toplam GST enzim aktivitesi üzerindeki kısmi yarışmalı inhibisyon etkisi. Hesaplanan V_{max} değeri 0.1328 $\mu\text{mol/dk/mg protein}$ 'dir. K_m değeri 0.6627 mM, K_i değeri ise 50.5 mM olarak hesaplanmıştır. SigmaPlot 13.0 Enzyme Kinetics yazılımı tarafından, -664,878 AICc değeri hesaplanmıştır ve bu değer inhibisyon modelinin açık bir şekilde kısmi yarışmalı model olduğunu ortaya koymuştur.

3.2.2. Ni-Zn ağır metal çiftinin inhibisyon etkisi ve kinetik modeli

Benzer ölçümler Nikel-Çinko çiftinin üç farklı kombinasyonu için de tekrarlanmıştır. (2A+B) kombinasyonu için yapılan ölçümler sonucu çizdirilen grafikler (Şekil 10) ve kinetik hesaplamalar açık şekilde kısmi karışık modeli ortaya koymuştur.

(A+B) şeklindeki her iki iyonun eş konsantrasyonları ile hazırlanan karışımın enzim aktivitesine etkisi çizdirilen grafikler (Şekil 11) ve yapılan hesaplamalar sonucu yazılım tarafından kısmi karışık olarak önerilmiştir.



Şekil 5. Kurşun iyonlarının, kızılçam iğne yapraklarında toplam GST enzim aktivitesi üzerindeki tam karışık inhibisyon etkisi. V_{max} değeri $0.1328 \mu\text{mol/dk/mg}$ protein'dir. K_m değeri 0.6627 mM , K_i değeri ise 50.5 mM olarak hesaplanmıştır. SigmaPlot 13.0 Enzyme Kinetics yazılımı tarafından hesaplanan AICc değeri $-1.072,991$ 'dir ve tersinmez modele karşı, güvenli ve anlamlı istatistiksel aralıkta tam karışık modeli önermiştir.

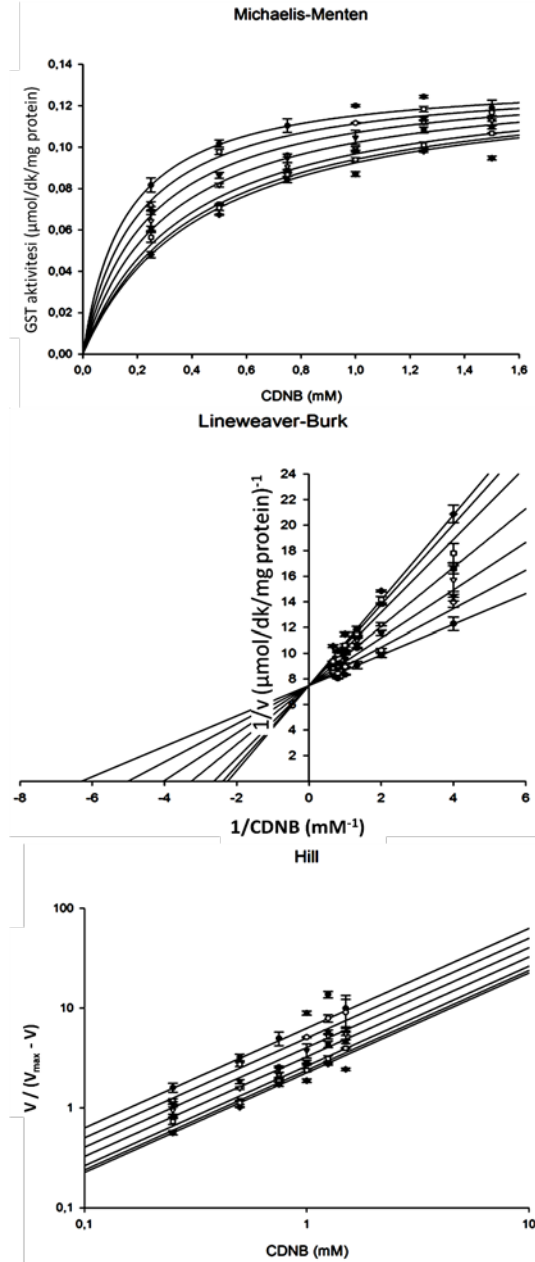
(A+2B) kombinasyonunun enzim aktivitesine etkisi çizdirilen grafikler (Şekil 12) ve yapılan kinetik hesaplamalar sonucu yazılım tarafından kısmi karışık olarak önerilmiştir.

3.2.3. Pb-Cu ağır metal çiftinin inhibisyon etkisi ve kinetik modeli

Kurşun-Bakır çifti için de 3 farklı konsantrasyon kombinasyonu hazırlanarak tüm ölçümler tekrarlanmıştır. İlk olarak (2A+B) için alınan değerlerin oluşturduğu grafikler (Şekil 13) ve kinetik hesaplamalar kısmi yarışmasız modeli göstermiştir.

Aynı ağır metal çiftinin (A+B) kombinasyonu için çizdirilen grafikler (Şekil 14) ve kinetik hesaplamalar tam bağımlı modeli işaret etmektedir.

(A+2B) kombinasyonu için alınan değerler, tersinmez inhibisyonu işaret eden grafiklerle (Şekil 15) ve kinetik hesaplamalarla sonuçlanmıştır.

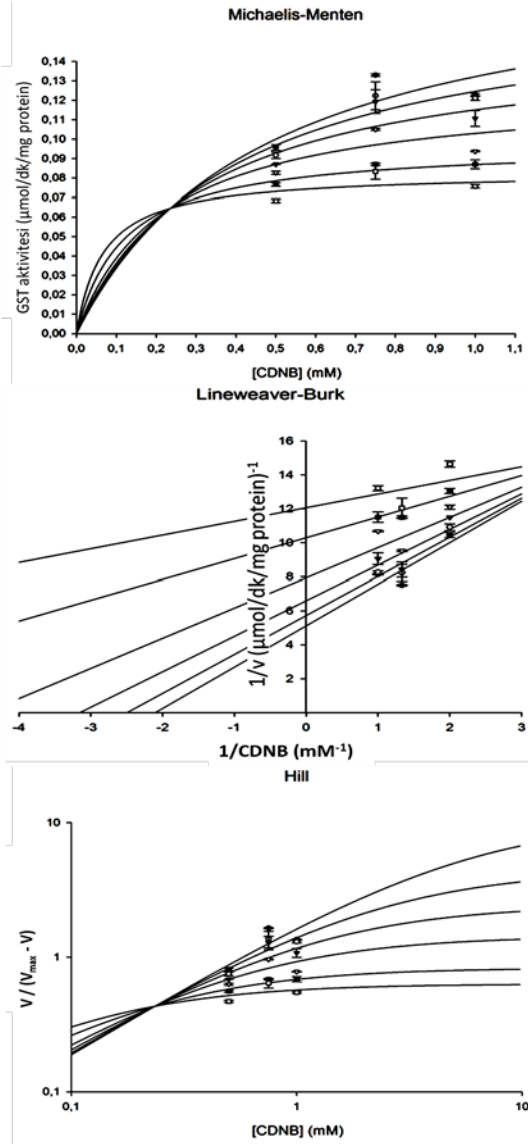


Şekil 6. Çinko ağır metal iyonlarının, kızılçam iğne yapraklarında toplam GST enzim aktivitesi üzerindeki kısmi yarışmalı inhibisyon etkisi. Yazılım tarafından hesaplanan V_{max} değeri $0.1328 \mu\text{mol/dk/mg}$ protein'dir. K_m değeri 0.6627 mM , K_i değeri ise 50.5 mM olarak hesaplanmıştır. AICc değeri $-1.342,973$, R^2 değeri ise $0,94129$ 'dir.

3.2.4. Pb-Hg ağır metal çiftinin etkisi ve kinetik modeli

Son ağır metal çifti olarak, kurşun ve cıvanın farklı konsantrasyon kombinasyonları hazırlanarak diğerleriyle benzer ölçümler yapılmıştır. (2A+B) için yazılıma çizdirilen grafikler (Şekil 16) ve kinetik hesaplamalar tam bağımlı modeli önermiştir.

Aynı metal çiftinin (A+B) konsantrasyon kombinasyonuna ait ölçümlerin değerleri yazılım tarafından işlenip kinetik hesaplamalar ve grafikler (Şekil 17) oluşturulduğunda en uygun inhibisyon modeli tam yarışmalı model olarak belirlenmiştir.



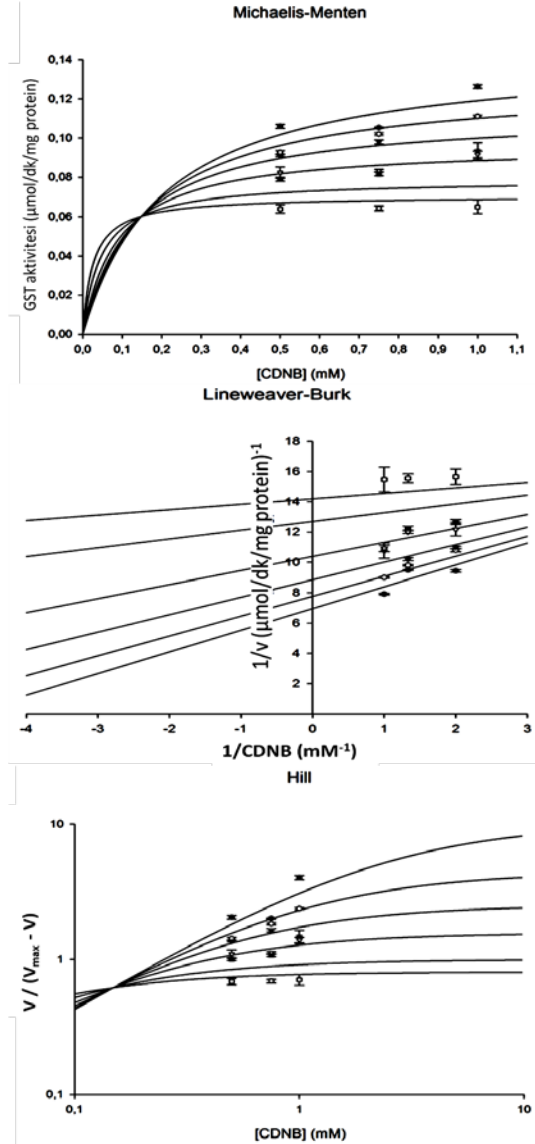
Şekil 7. Nikel-Kadmium ağır metal çiftinin (2A+B) kombinasyonunun, kızılçam iğne yapraklarında toplam GST enzim aktivitesi üzerindeki kısmi bağımlı inhibisyon etkisi. Yazılım tarafından hesaplanan V_{max} değeri 0.2138 $\mu\text{mol/dk/mg protein}$ 'dir. K_m değeri 0.5444 mM, K_i değeri ise 69.9 mM olarak hesaplanmıştır. Modele ait AICc değeri -509,935 olarak hesaplanmıştır ve tersinmez modelden de istatistiksel olarak anlamlı biçimde farklı olacak şekilde ölçülen değerlere daha uygundur.

Çalışmanın son ölçümleri kurşun civa ağır metal çiftinin (A+2B) kombinasyonu için yapılmış ve çizdirilen grafikler (Şekil 18) ve kinetik hesaplamalar tersinmez inhibisyonu göstermiştir.

4. Tartışma ve Sonuç

4.1. Ağır metallerin kızılçam iğne yaprağındaki toplam GST aktivitesi üzerine tekil inhibisyon modelleri

Ağır metallerin enzimler üzerine hem tersinir hem de tersinmez inhibisyon etkileri olduğu hali hazırda literatürde de belirtilen bir durumdur. Ancak, bu durum konsantrasyon değerleriyle de doğrudan ilişkilidir. Şöyle ki, yüksek ağır metal

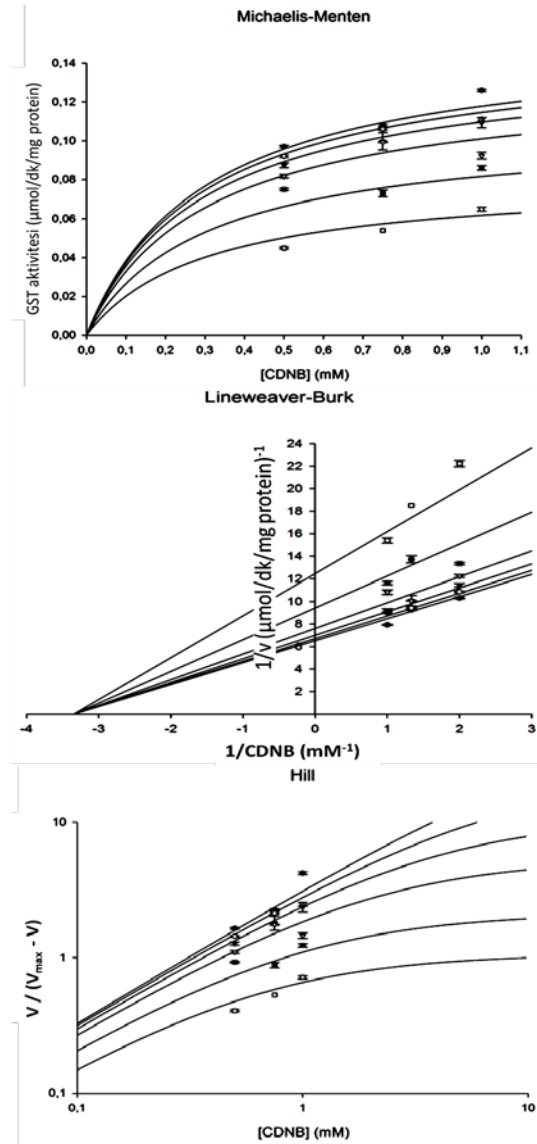


Şekil 8. Nikel-Kadmium ağır metal çiftinin (A+B) kombinasyonunun, kızılçam iğne yapraklarında toplam GST enzim aktivitesi üzerindeki kısmi bağımlı inhibisyon etkisi. V_{max} değeri 0.1577 $\mu\text{mol/dk/mg protein}$ 'dir. K_m değeri 0.2403 mM, K_i değeri ise 58.7 mM olarak hesaplanmıştır. Modele ait AICc değeri -524,653 olarak hesaplanmıştır ve tersinmez modelin değerine nazaran istatistiksel olarak çok daha anlamlıdır.

konsantrasyonlarında tersinmez inhibisyon oranının, diğerinin belirlenmesini ve ölçülmesini engelleyecek oranda büyük olduğu araştırmacı tarafından da gözlenmiştir. Kullanılan en yüksek ağır metal konsantrasyonlarının bazı ağır metallerde diğerlerinden daha düşük olmasının temel nedeni de budur. Örneğin nikel için uygulanan 1000 μM konsantrasyonda, mikropilaka kuyucuklarında anında bir kararırma ve sonrasındaki incelemede muhtemel bir protein çökmesi izlenmiştir. Ayrıca, bu çalışmanın ana amacı, çok düşük konsantrasyonlardaki inhibisyon modellerini belirlemek ve hatta eğer var ise, daha evvel bazı çalışmalarda da belirlendiği üzere, kimi ağır metaller için düşük derişimlerdeki aktivasyon etkisini de gözlemleyebilmektir. Ancak, böyle bir durum mevcut ölçümlerde gözlenememiştir. Ağır metal iyonlarının

tümü, uygulanan bütün konsantrasyonlarda inhibisyon gerçekleştirmiştir; ancak, bazı metal iyonları ve yine bazı derişim değerleri için yazılım tarafından belirlenen inhibisyon modeli tersinir veya tersinmez nitelikte olabilmektedir (Tablo 1).

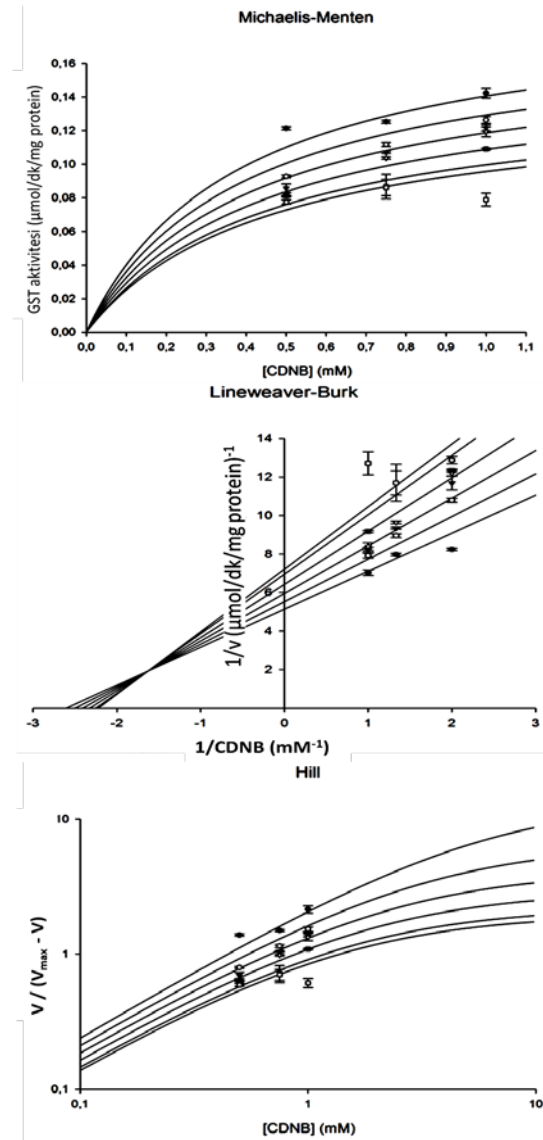
Civa, nikel ve çinko iyonları için belirlenen model tersinir yarışmalı modeldir. Bu modelde enzime aktif bölgeden veya allosterik nitelikte olan ve bağlanması durumunda aktif bölgeyi başka bir molekülün bağlanmasına kapatan ikinci bir bölgeye bağlanabilmek için substrat ve metal iyonu yarışmaktadır. Çinko biyolojik makromoleküllerin yapısına katılması ve özellikle bazı proteinlerin fonksiyonlarını gerçekleştirme noktasında varlığı zorunlu bir element olması açısından bu tür bir durum için esasında beklenebilecek bir sonuç doğurmuştur. Nikel iyonları için de benzer bir durumun söz konusu olabileceğini söyleyebiliriz;



Şekil 9. Nikel-Kadmiyum ağır metal çiftinin (A+2B) kombinasyonunun, kızılçam iğne yapraklarında toplam GST enzim aktivitesi üzerindeki kısmi bağımlı inhibisyon etkisi. V_{max} değeri, $0.1559 \mu\text{mol/dk/mg protein}$ 'dir. K_m değeri ve 530.3 mM K_i değeri ile tam yarışmasız model önerilmektedir. Modele ait AICc değeri $-565,451$ 'dir.

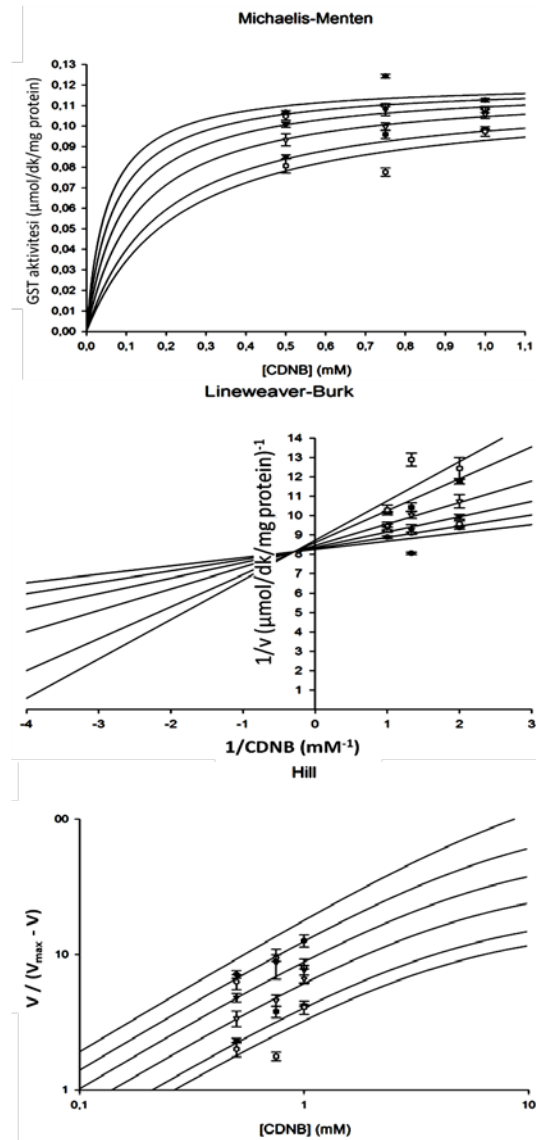
nikel iyonları metabolizmaya dahil oldukları zaman temelde 7 ana enzim tarafından bağlanabilirler: bunlar üreaz, hidrogenaz, CO-dehidrogenaz, metilkoenzim M redüktaz, Ni-superoksit dismutaz, glioksalaz I ve sis-trans izomerazdır [23]. Benzer bir etkileşimin GST aktif bölgesi (veya muhtemel allosterik bölge) ile gerçekleşip gerçekleşmediği başka bir araştırma projesinin konusunu teşkil etmektedir.

Civa, kurşun ve kadmiyum diğerlerine nazaran çok daha "reaktif" ağır metal ajanlardır; çünkü transsülferasyon mekanizmasının herhangi bir noktasından, kükürt iyonlarına olan yoğun ilgileri münasebetiyle devreye girebilmektedirler. Civa için belirlenen yarışmalı model ile diğer ikisi için yazılımın önerdiği karışık modeller aslında aynı noktaya çıkıyor diyebiliriz: aktif/allosterik bölgeye



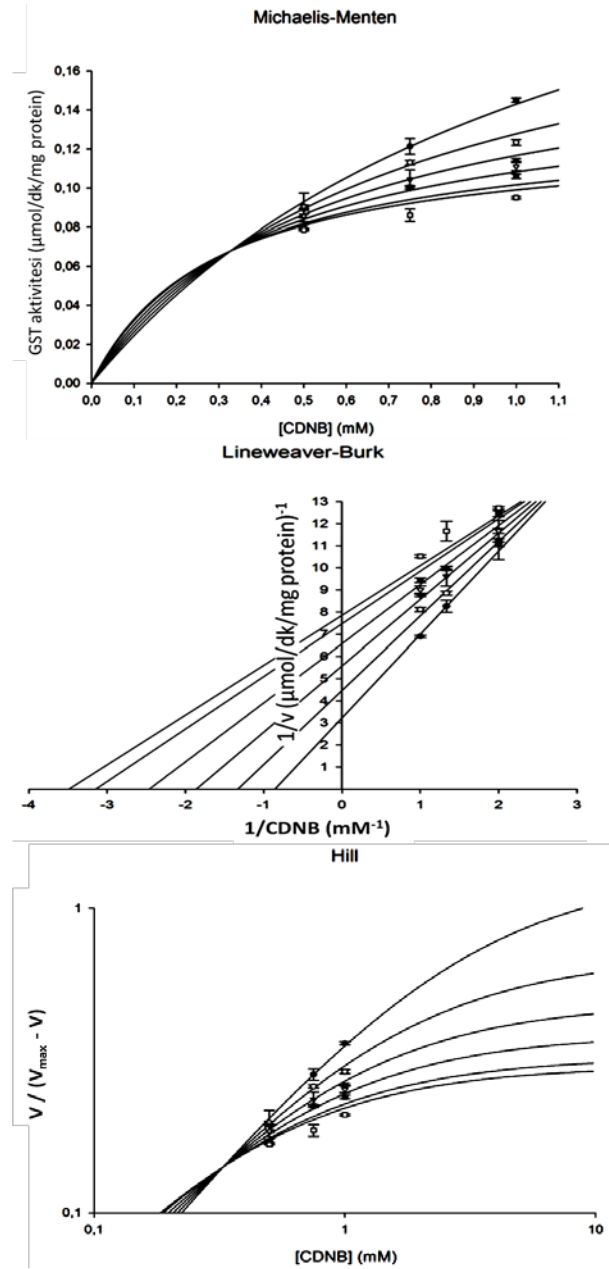
Şekil 10. Nikel-Çinko ağır metal çiftinin (2A+B) kombinasyonunun, kızılçam iğne yapraklarında toplam GST enzim aktivitesi üzerindeki kısmi karışık inhibisyon etkisi. Yazılım tarafından hesaplanan V_{max} değeri $0.2089 \mu\text{mol/dk/mg protein}$ 'dir. K_m değeri 0.3664 mM , K_i değeri ise 34.5 mM olarak hesaplanmıştır. Modele ait AICc değeri $509,441$ olarak hesaplanmıştır.

bağlanmak için değişen oranlarda bir yarış göstermektedirler-ki bu da GST enzimlerinin oldukça korunumlu yapısal benzerlik gösterdiği aktif bölgelerinde bulunan sistin amino asitlerinden kaynaklanmaktadır. GSH molekülündeki -SH grubunu taşıma işlevlerinde muhakkak büyük bir sorumluluk üstlenen bu aktif bölge sistin amino asidi her üç ağır metal iyonu için de muhtemel bir hedef, bir bağlanma noktası oluşturmaktadır. Nitekim kurşun iyonlarının bazı proteinler tarafından bağlandığı veya bu iyonların proteinlerin aktif bölgelerindeki etkileşimlerde devreye girdiği daha evvelki çalışmalarda da bildirilmiştir [24]. Çalışmamızda böyle bir durumun olup olmadığını, yani aktif bölgedeki sistin amino asidinin/amino asitlerinin civa, kurşun ve kadmiyum tarafından bağlanıp bağlanmadığını ancak ileri analiz yöntemleri ve cihazlarıyla kontrol edebiliriz.

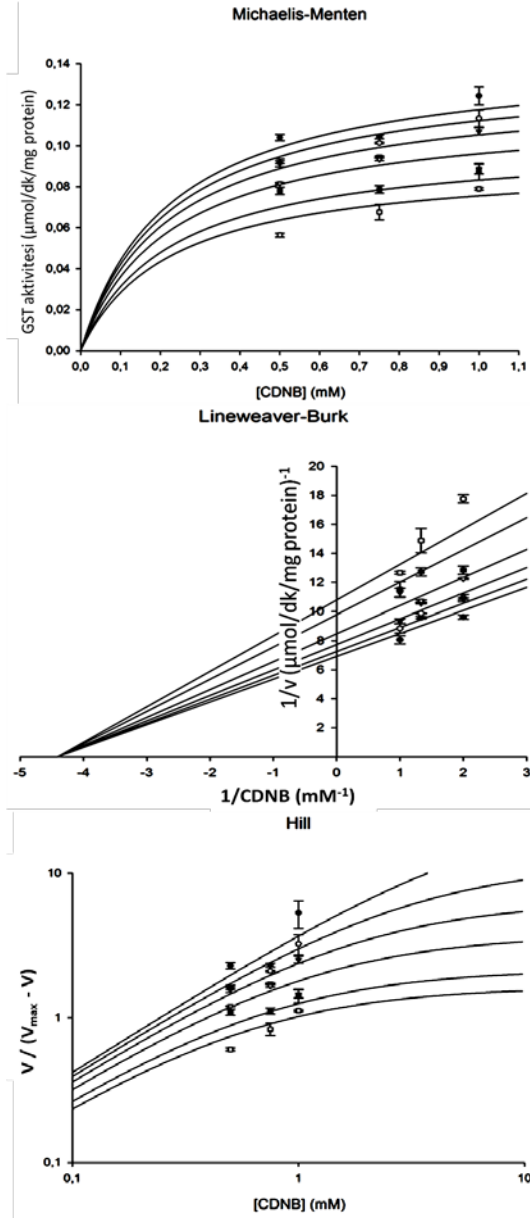


Şekil 11. Nikel-Çinko ağır metal çiftinin (A+B) kombinasyonunun, kızılçam iğne yapraklarında toplam GST enzim aktivitesi üzerindeki kısmi karışık inhibisyon etkisi. Yazılım tarafından hesaplanan V_{max} değeri 0.1217 $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein'dir. K_m değeri 0.0380 mM, K_i değeri ise 23.2 mM olarak hesaplanmıştır. Modele ait AICc değeri -560,480 olarak hesaplanmıştır.

Bakır iyonları, diğer ağır metal iyonlarından farklı olarak, tersinmez reaksiyon gerçekleştirmişlerdir. Burada ilk akla gelen, daha da düşük konsantrasyon değerleri için sonucun nasıl çıkacağı yönünde olabilir. Çünkü literatürde bu iyonların GST enzimlerinin aktif bölgelerinde bulunan tiyol gruplarına doz-bağımlı olarak ve hatta ortamdaki diğer bazı antioksidanların konsantrasyonlarına bağımlı şekilde bağlandığını göstermiştir [25]. Çalışmanın bu kısmının farklı ağır metal iyonu derişimleri aralığında ve askorbik asit gibi bir antioksidan maddenin farklı konsantrasyonlarında tekrarlanması tersinmez inhibisyon karakterinin açığa çıkarılmasını sağlayacaktır.



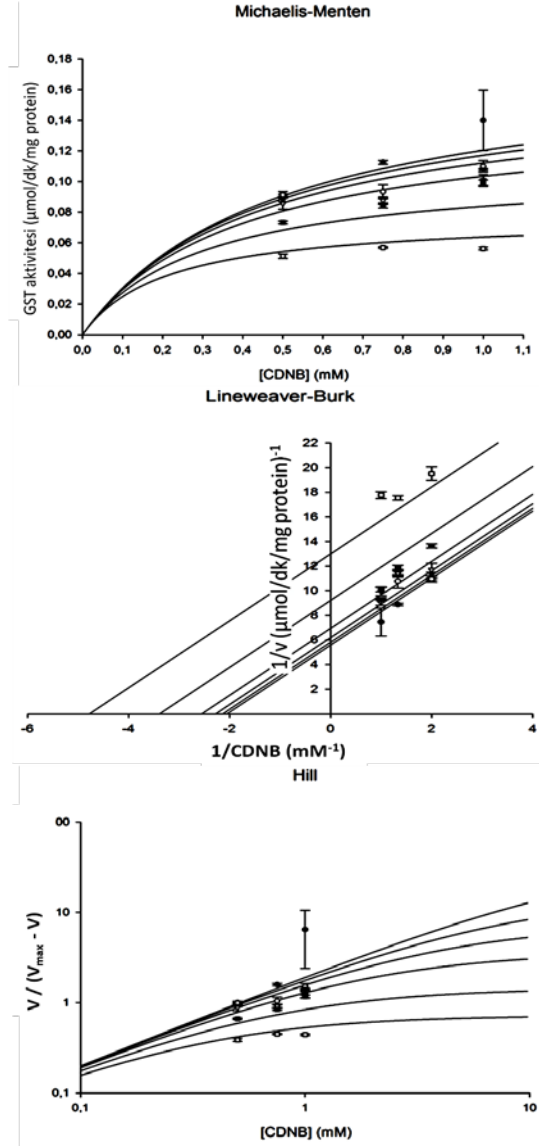
Şekil 12. Nikel-Çinko ağır metal çiftinin (A+2B) kombinasyonunun, kızılçam iğne yapraklarında toplam GST enzim aktivitesi üzerindeki kısmi karışık inhibisyon etkisi. V_{max} değeri 0.5476 $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein'dir. K_m değeri 2.3 mM, K_i değeri ise 72.3 mM olarak bulunmuştur. Modele ait AICc değeri ise -562,381 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 13. Kurşun-Bakır ağır metal çiftinin (2A+B) kombinasyonunun, kızılçam iğne yapraklarında toplam GST enzim aktivitesi üzerindeki kısmi yarışmasız inhibisyon etkisi. Yazılımca hesaplanan V_{max} değeri 0.1496 $\mu\text{mol/dk/mg protein}$ 'dir. K_m değeri 0.2269 mM, K_i değeri ise 123.9 mM olarak bulunmuştur. Modele ait AICc değeri olarak -548,033 hesaplanmıştır ve en yakın aday modelinkinden güvenli aralıkta farklıdır.

4.2. Ağır metallerin kızılçam iğne yaprağındaki toplam GST aktivitesi üzerine bütünleşik inhibisyon modelleri

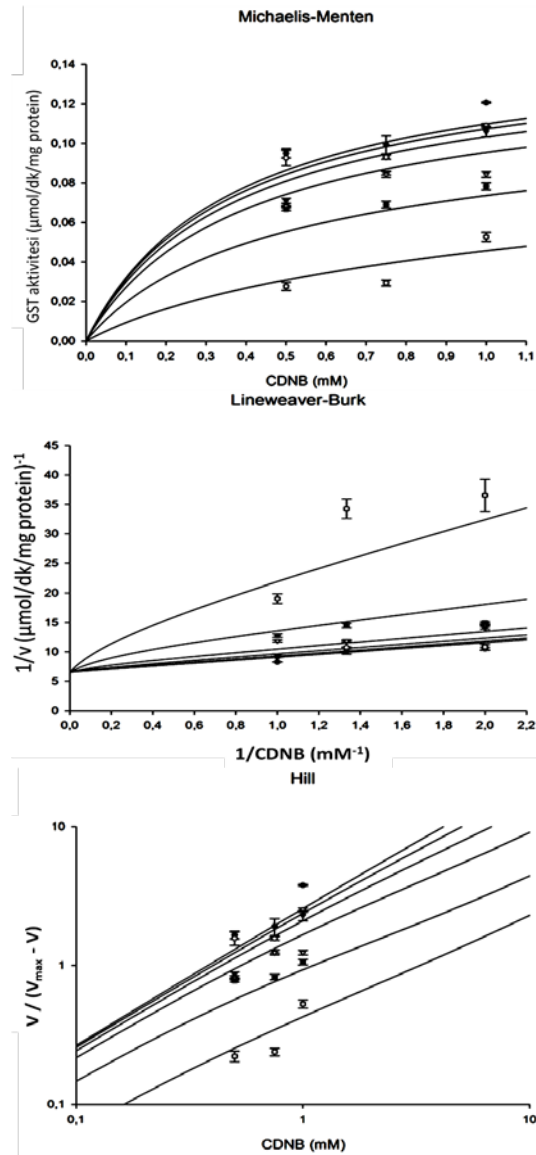
Ağır metal çiftlerinin birbirlerine karşı olan farklı konsantrasyon oranları için bulunan inhibisyon modelleri incelendiğinde ilk göze çarpan, ağır metal çiftlerinin, karışım içerisindeki oranları ne olursa olsun mevcut ikilinin tekil inhibisyon testleri içinde gözlemlenmeyen modelleri de yaratmış olmalarıdır. Bir başka ifadeyle, tek başlarına uygulandıklarında ortaya koydukları inhibisyon modellerinden farklı, hatta bir üçüncü modeli ortaya çıkarabilmektedirler (Tablo 2).



Şekil 14. Kurşun-Bakır ağır metal çiftinin (A+B) kombinasyonunun, kızılçam iğne yapraklarında toplam GST enzim aktivitesi üzerindeki tam bağımlı inhibisyon etkisi. Hesaplanan V_{max} değeri 0.1839 $\mu\text{mol/dk/mg protein}$ 'dir. K_m değeri 0.4998 mM, K_i değeri ise 360.1 mM olarak bulunmuştur. Modele ait AICc değeri olarak -476,816, R^2 değeri olarak da 0,75067 hesaplanmıştır ve en yakın aday inhibisyon modeline ait değerlerden istatistiksel olarak çok da anlamlı olmamakla birlikte farklıdır.

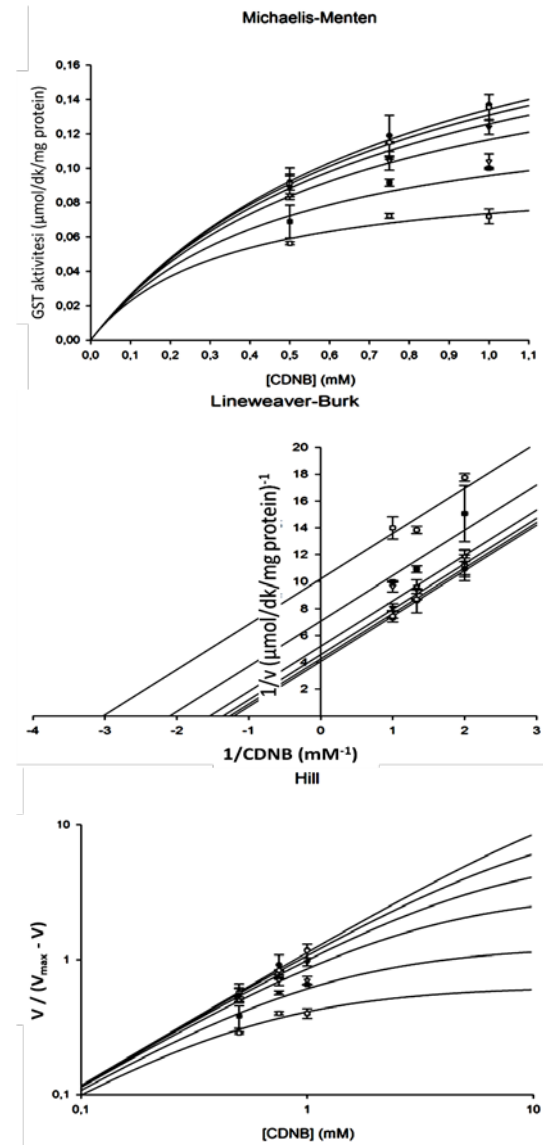
Örneğin, nikel kadmiyum ikilisinin (2A+B) ve (A+B) derişimsel oranlarında ortaya çıkan tersinir bağımlı model bu iki ağır metalin tekil inhibisyon etkilerinin ölçüldüğü birinci aşama deneylerinde gözlemlenmemiştir. Kadmiyumun karışım içerisindeki artan oranı ise tek başınayken gösterdiği karışık modeli (muhtemelen nikelin nispi etkisiyle) yarışmasız inhibisyon modeline taşımıştır. Ağır metal iyonları genel olarak protein yapısındaki sülfidril grupları kendilerine ilk hedef olarak görür ve birbirlerinden farklı afinitelerde, ortam koşullarına ve değişen konsantrasyonlarına bağlı olacak şekilde değişen oranlarda bağlanırlar. GST enzimleri aktif bölgeleri haricinde de bu tür sülfidril gruplarını yapılarında ihtiva etmektedirler [26,27]. Böyle bir durumda, hangi ağır metal iyonunun, hangi bölge ya

da bölgelere bağlanıp, ne türde bir inhibisyon göstereceğini belirlemek için doz bağımlı olmak üzere ve yine ileri görüntüleme ve analiz metod ve teçhizatlarının kullanılmasını gerektiren testler yapılmalıdır. Çalışmamızın ortaya çıkardığı gerçek, ağır metallerin tekil etkilerinin haricinde, ikili (ve muhtemelen daha fazlasını içeren) gruplar olarak tasarlanıp uygulandıklarında farklı inhibisyon modellerine göre etkilerini gösterebilecekleridir. Bu yönüyle, doğada, çevre kirliliğinin etkisiyle canlı varlıklarda ortaya çıkan durumun bir benzeri de yansıtılmaktadır; çünkü, doğada canlılar bu ağır metal iyonlarına ve diğer pek çok inhibitör maddeye aynı anda ve değişen oranlarda maruz kalmaktadırlar.



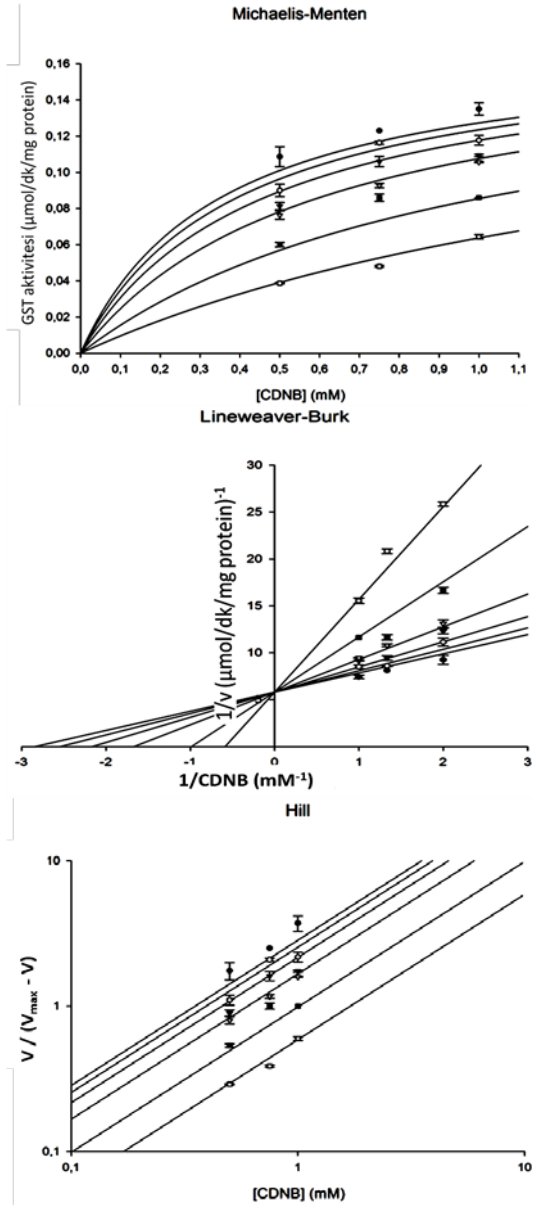
Şekil 15. Kurşun-Bakır ağır metal çiftinin (A+2B) kombinasyonunun, kızılçam iğne yapraklarında toplam GST enzim aktivitesi üzerindeki tersinmez (geri dönüşümsüz) inhibisyon etkisi. Hesaplanan V_{max} değeri 0.1525 $\mu\text{mol/dk/mg protein'dir}$. K_m değeri 0.3687 mM, K_i değeri ise 32.1 mM olarak bulunmuştur. Modele ait AICc değeri olarak -511,597 hesaplanmıştır ve en yakın aday inhibisyon modeline ait değerlerden istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklıdır.

Bütünleşik etki testlerinde bağımlı modelin, tekil uygulamalarda gözlemlenmemesine rağmen, bu derece fazla oranda kendini göstermesi, yine aynı ağır metalin hem aktif bölge -S grupları üzerinde hem de yapıdaki diğer sülfidril gruplarındaki inhibisyon etkisinin "bütünleşik" bir sonucu olabilir. Örneğin, kurşun-civa çiftinde kurşunun oranı fazlayken gözlenen model tam bağımlı modeldir. Kurşun tek başına tam karışık inhibisyon göstermekte; bir bakıma bağımlı ve yarışmalı modelleri ortaya koyabilme potansiyelini birbirlerine karşı farklı derecelerde muhafaza etmektedir. Ortama civa eklendiğinde, toplam ağır metal konsantrasyonunu artırmamış olsak bile, inhibisyon modeli karışık olan bu modelden bağımlıya dönüşmekte, bu da yarışmalı



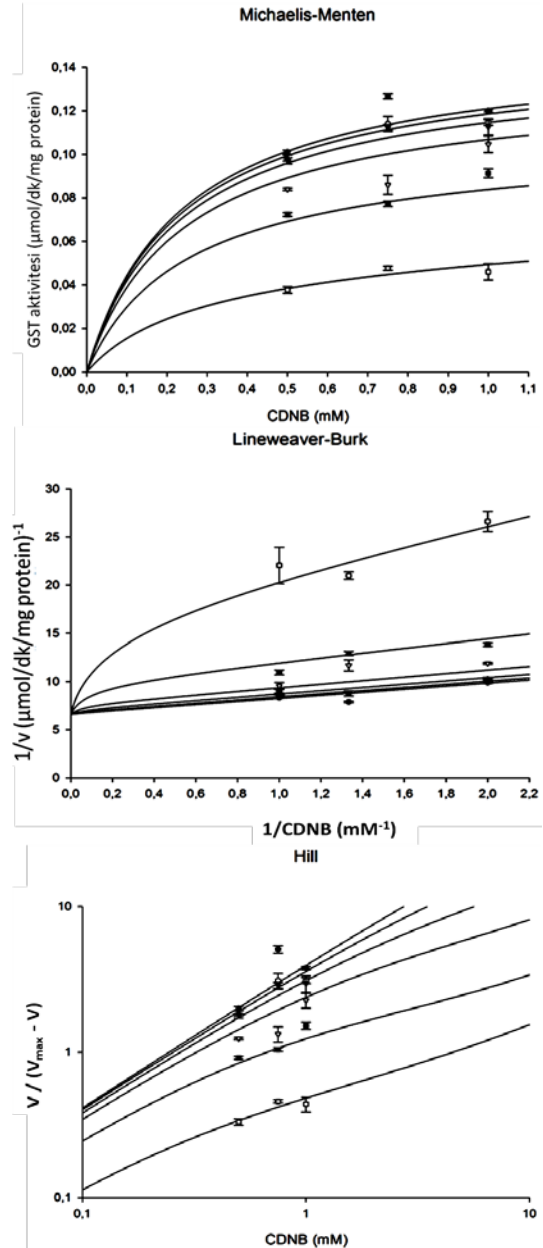
Şekil 16. Kurşun-Civa ağır metal çiftinin (2A+B) kombinasyonunun, kızılçam iğne yapraklarında toplam GST enzim aktivitesi üzerindeki tam bağımlı inhibisyon etkisi. Grafiklerin üzerinde isimleri yazılı bulunmaktadır. V_{max} , K_m ve K_i değerleri şekilde belirtilmiştir. V_{max} değeri 0.253 $\mu\text{mol/dk/mg protein'dir}$. K_m değeri 0.853 mM, K_i değeri ise 316.1 mM olarak bulunmuştur. Modele ait AICc değeri olarak -502,948 hesaplanmıştır ve en yakın aday inhibisyon modeline ait değerlerden istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklıdır.

modele ait olan aktif bölge için "yarışma" kavramını devreden çıkarmaktadır. Muhtemelen, civa iyonları aktif bölgeyi daha fazla meşgul etmekte, civa ise substratla bu defa yalnızca bağımlı modelde tanımlandığı şekilde bir ilişki içerisinde bulunmaktadır: aktif bölgeye birinin bağlanabilmesi için diğerinin aktif bölge haricinde bir allosterik bölgeye bağlanması gerekmektedir. Artan civa oranı, bu defa toplamdaki etkinin, tekil durumdayken kendisinin gösterdiği gibi yarışmalıya dönüşmesine neden olmaktadır. Ancak, toplamdaki ağır metal miktarı aynı kaldığı halde artırılan civa miktarının toplamdaki inhibisyon modelini tersinmez dönüşürmesi, ileri metotlarla araştırılması gereken bir diğer noktadır.



Şekil 17. Kurşun-Civa ağır metal çiftinin (A+B) kombinasyonunun, kızılçam iğne yapraklarında toplam GST enzim aktivitesi üzerindeki tam yarışmalı inhibisyon etkisi. Hesaplanan V_{max} değeri $0.1721 \mu\text{mol/dk/mg protein}$ 'dir. K_m değeri 0.3240 mM , K_i değeri ise 117.6 mM olarak hesaplanmıştır. Modele ait AICc değeri $-534,684$ olarak hesaplanmıştır.

Sonuç olarak, bütünleşik etki mekanizması için, tekil inhibisyon modellerinden yola çıkarak basit çıkarımlarda bulunmak mümkün değildir. Ağır metal iyonlarının GST enzimleri üzerinde birden fazla noktaya, farklı oranlarda ve farklı mekanizmalar üzerinden bağlanabilecekleri göz önüne alındığında bu çalışmanın sonuçlarının basit bir şekilde yorumlanamayacağı açıktır. Bu durumda inhibisyon mekanizmasının bütünüyle aydınlatılabilmesi noktasında ağır metallerin tekil ve bütünleşik etkilerinin hem yazılım modellemeleri ile hem de kristallografi gibi daha spesifik ve hassas tekniklerle izlenmesi ve analizinin yapılması önerilebilir.



Şekil 18. Kurşun-Civa ağır metal çiftinin (A+2B) kombinasyonunun, kızılçam iğne yapraklarında toplam GST enzim aktivitesi üzerindeki tersinmez inhibisyon etkisi. Hesaplanan V_{max} değeri $0.1517 \mu\text{mol/dk/mg protein}$ 'dir. K_m değeri 0.2377 mM , K_i değeri ise 8.6 mM olarak hesaplanmıştır. Modele ait AICc değeri $-534,831$ olarak hesaplanmıştır. R^2 değeri ise $0,93938$ olarak çıkmıştır.

Tablo 1. Ağır metal iyonlarının kızılçam iğne yapraklarındaki toplam GST aktivitesi üzerine tekil etkileri.

Ağır Metal	İnhibisyon Modeli	AICc	K _i (mM)	V _{max} (μmol/dk/mg)
Cd	Kısmi Karışık	-1.201,945	205,2	0,1477
Cu	Tersinmez	-1.040,538	0,1794	0,1491
Hg	Tam Yarışmalı	-986,237	27,2	0,1347
Ni	Kısmi Yarışmalı	-664,878	50,5	0,1328
Pb	Tam Karışık	-1.072,991	1140,6	0,1394
Zn	Kısmi Yarışmalı	-1.342,343	23,9	0,1335

Tablo 2. Ağır metal çiftlerinin farklı konsantrasyon oranlarının yarattığı inhibisyon etkileri.

Ağır Metal	İnhibisyon Modeli	AICc	K _i (mM)	V _{max} (μmol/dk/mg)
Ni-Cd (2A+B)	Kısmi Bağımlı	-509,935	69,9	0,2138
Ni-Cd (A+B)	Kısmi Bağımlı	-524,653	58,7	0,1577
Ni-Cd (A+2B)	Tam Yarışmasız	-565,451	530,3	0,1559
Ni-Zn (2A+B)	Kısmi Karışık	-509,441	34,5	0,2089
Ni-Zn (A+B)	Kısmi Karışık	-560,480	23,2	0,1217
Ni-Zn (A+2B)	Kısmi Karışık	-562,381	72,3	0,5476
Pb-Cu (2A+B)	Kısmi Yarışmasız	-548,033	123,9	0,1496
Pb-Cu (A+B)	Tam Bağımlı	-476,816	360,1	0,1839
Pb-Cu (A+2B)	Tersinmez	-511,597	32,1	0,1525
Pb-Hg (2A+B)	Tam Bağımlı	-502,948	316,1	0,2530
Pb-Hg (A+B)	Tam Yarışmalı	-534,684	117,6	0,1721
Pb-Hg (A+2B)	Tersinmez	-534,831	8,6	0,1517

Teşekkür

Bu çalışma Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı'nın 2015-FEN-B136 numaralı bireysel araştırma proje desteği ile gerçekleştirilmiştir.

Kaynakça

- [1] Andreas Schützendübel, *et al.*, Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization, *J. Exp. Bot.*, (2002), Vol.53, No.372 Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants Special Issue, (1351-1365).
- [2] I. Brunner, J. Luster, M.S. Günthardt-Goerg, B. Frey, Heavy metal accumulation and phytostabilisation potential of tree fine roots in a contaminated soil, *Environ. Pollut.* (2008), 152, 559-568.
- [3] S.K. Yadav, Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants, *S. Afr. J. Bot.* 76 (2010) 167-179.
- [4] Z. Özdemir, *Pinus brutia* as a biogeochemical medium to detect iron and zinc in soil analysis, chromite deposits of the area Mersin, Turkey, *Chemie der Erde.* 65 (2005) 79-88.
- [5] G. Baycu, D. Tolunay, H. Özden, S. Günebakan, Ecophysiological and seasonal variations in Cd, Pb, Zn, and Ni concentrations in the leaves of urban deciduous trees in Istanbul, *Environ. Pollut.* 143 (2006) 545-554.
- [6] Y.W. Kuang, G.Y. Zhou, D.Z. Wen and S.Z. Liu, Heavy Metals in Bark of *Pinus massoniana* (Lamb.) as an Indicator of Atmospheric Deposition Near a Smeltery at Qujiang, China. *Env Sci Pollut Res.* 14 (2007) 270 - 275.
- [7] L. Lyubenova, C. Götz, A. Golan-Goldhirsh and P. Schröder, Direct Effect of CD on Glutathione S-Transferase and Glutathione Reductase from *Calystegia Sepium*, *Int. J. Phytorem.* 9 (2007) 465-473.
- [8] P. Aravind, M.N.V. Prasad, Cadmium-Zinc interactions in a hydroponic system using *Ceratophyllum demersum* L.: adaptive ecophysiology, biochemistry and molecular toxicology, *Braz. J. Plant Physiol.* 17 (2005) 3-20.
- [9] A. Gundogdu, D. Ozdesa, C. Durana, V.N. Bulut, M. Soylak, H. B. Senturk, Biosorption of Pb(II) ions from aqueous solution by pine bark (*Pinus brutia* Ten.), *Chem. Eng. J.* 153 (2009) 62-69.
- [10] R. Thom, I. Cummins, D.P. Dixon, R. Edwards, D.J. Cole and A.J. Laphorn, Structure of a Tau Class Glutathione S-Transferase from Wheat Active in Herbicide Detoxification, *Biochem.* 41 (2002) 7008-7020.
- [11] D.P. Dixon, B.G. Davis, R. Edwards, Plant Glutathione transferases, *Genom Biol.* 3 (2002) 3004.1-3004.10.
- [12] K.A. Marrs, The functions and regulation of Glutathione s-transferases in plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47 (1996) 127-158.

- [13] F. Droog, Plant Glutathione S-Transferases, a Tale of Theta and Tau, J. Plant Growth. Regul. 16 (1997) 95-107.
- [14] M.M. Seppanen, T. Cardi, M. B. Hyökki, E. Pehu, Characterization and expression of cold-induced glutathione S-transferase in freezing tolerant *Solanum commersonii*, sensitive *S. tuberosum* and their interspecific somatic hybrids, Plant Science. 153 (2000) 125-133.
- [15] C. Frova, Glutathione transferases in the genomics era: New insights and perspectives, Biomol Eng. 23 (2006) 149-169.
- [16] D.P. Dixon, M. Skipsey, R. Edwards, Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism, Phytochemistry. 71 (2010) 338-350.
- [17] D.P. Dixon, A. Laphorn, R. Edwards, Functional Divergence in the Glutathione Transferase Superfamily in plants, J. Biol. Chem. 277 (2002b) 30859-30869.
- [18] P. Schröder and C. Berkau, Characterization of cytosolic glutathione S-transferase in spruce needles. Part I: GST-Isozymes of healthy trees, Bot. Acta. 106 (1993) 301-306.
- [19] S. Pflugmacher, P. Schroder, Glutathione S-transferases in trees: Inducibility by various organic xenobiotics, J. Soil Sci. Plant Nutr. 158 (1995) 71-73.
- [20] W.H. Habig, M.J. Pabst and W.B. Jacoby, Glutathione S-transferase, the first enzymatic step in mercapturic acid formation, J. Biol. Chem. 249 (1974) 7130-7139.
- [21] Yılmaz, C. and İşcan M., Glutathione S-transferase activities and glutathione levels in needles of drought stressed *Pinus Brutia* Ten. trees, Turkish Journal of Biochemistry, (2014), 39 (2), 238-243.
- [22] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randal, Protein measurement with the folin phenol reagent, J Biol Chem. 248 (1951) 265-275.
- [23] Wattt RK, Ludden PW, Nickel-binding proteins, Cell Mol Life Sci. (1999), Nov 15; 56 (7-8): 604-25.
- [24] Goering PL, Lead-protein interactions as a basis for lead toxicity, Neurotoxicology, (1993), 14(2-3): 45-60.
- [25] Letelier ME, Martínez M, González-Lira V, Faúndez M, Aracena-Parks P, Inhibition of cytosolic glutathione S-transferase activity from rat liver by copper, Chem Biol Interact. (2006) 1;164(1-2):39-48.
- [26] Aaron J. Oakley, Thasaneeya Harnnoi, Rungrutai Udomsinprasert, Kanya Jirajaroenrat, Albert J. Ketterman, and Matthew C.J. Wilce, The crystal structures of glutathione S-transferases isozyms 1-3 and 1-4 from *Anopheles dirus* species B, Protein Sci. (2001) Nov; 10(11): 2176-2185.
- [27] Daniel W Nebert, Vasilis Vasiliou, Analysis of the glutathione S-transferase (GST) gene family, Human Genomics, (2004), 1:460.