

## GLUKOZ-6-FOSFAT DEHİDROGENAZ ENZİMİNİN İNSAN ERİTROSİTLERİNDEN SAFLAŞTIRILMASI

Dr. Turhan SOYSAL (x)  
Dr. Mustafa ÜNALDI (xx)  
Kimy. Ebubekir BAKAN (xxx)  
Kimy. Zeki ARI (xxxx)  
Kimy. Orhan DEĞER (xxxx)

### Ö Z E T

Bu çalışmada glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi insan eritrositlerinden saflaştırıldı. Saflaştırmada DEAE-sellüloz, CM-sefadeks (C-50-120) ve DEAE-sefadeks (A-50-120) kromatografisi kullanıldı. Ayrıca sefadeks (G-200) jel elemesi ile poliakrilamid ve SDS-akrilamid jel elektroforez işlemleri uygulandı. Neticede 488 özgül aktivite, 65.000 saflaştırma katsayısı ve % 3 verimle elde edilen enzimin N-ucu amino asit tayini yapıldı. Enzimin kinetik parametreleri araştırıldı.

Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G-6-PD) ( $\beta$ -D-glukoz-6-P: NADP oksidoredüktaz, E.C. 1.1.1.49) enzimi, hücrede glukozun oksidatif yıkım yolu olan heksos-monofosfat (HMP) metabolik yolunda görev gören ilk enzimdir. Substratı glukoz-6-fosfat (G-6-P), koenzimi okside nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP<sup>+</sup>) ve aktivatörü Mg<sup>2+</sup> olan G-6-PD allosterik bir enzimdir. Bu bakımdan HMP yolunda düzenleyici bir rol oynamaktadır (1,2,3,4,5). Bu enzimin eritrosit içinde fazla miktarda bulunması klinikte oldukça önemlidir (6,7).

G-6-PD enzimi ilk defa 1931 yılında Warburg ve Christian tarafından keşfedilmiş ve buna o zaman "zwischenferment" denilmiştir (8). Daha sonra çeşitli materyallerde değişik araştırmacılar tarafından (9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30) kinetik ve saflaştırma çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalar kronolojik olarak tablo 1'de gösterilmiştir.

Bu çalışmada G-6-PD enzimi insan eritrositlerinden saflaştırıldı ve kinetik özellikleri incelendi.

- (x) A.Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Doçenti.  
(xx) A.Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Doçenti.  
(xxx) A.Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Uzmanı.  
(xxxx) A.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Uzmanı.  
(xxxxx) A.Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi.

Tablo I- G-6-PD'in Saflaştırılması Çalışmaları

Yıllar	Canlı ve Doku	Özgül Aktivite	Saflaştırma Oranı	Referans No.
1955	L. Mesenteroides	16,5	10	11
1955	Bira mayası	5,4	14,5	12
1961	İnek meme bezi	420	68	13
1961	Bira mayası		667	14
1961	İnsan eritrositi	64	64.500	15
1963	İnsan eritrositi	113	43.500	16
1966	İnsan eritrositi	730	258.000	17
1967	İnsan eritrositi	900	55.300	18
1968	İnsan eritrositi	27	36.000	19
1968	İnsan eritrositi	180	72.000	20
1969	İnsan eritrositi	189	86.393	21
1972	Sıçan karaciğeri	142	390	22
1972	P. dupont	66	550	23
1973	C. utilis	540	1300	24
1974	Sıçan meme bezi	104	364	25
1974	Fare karaciğeri	116	750	26
1975	L. Mesenteroides	256	110	27
1975	Balina adrenal korteks	326	2500	28
1976	Domuz karaciğeri	124	1130	29
1976	Kobay lensi	11,7	686	30
1977	Sığır eritrositi	143		31
1978	Sığır eritrositi	130	43.900	32

### MATERYAL VE METOD

Fakültemizde okuyan sağlıklı dokuz öğrencinin kanında eritrosit sayımı, hemoglobin ve hematokrit tayini yapıldıktan sonra 60 ml ACD-A çözeltisi üzerine her bir donörden 400 ml kan alındı. Enzimin saflaştırma işlemleri dahil bundan sonraki bütün deneyler sıcaklığı 0-4°C arasında olan soğuk odada yapıldı. Plastik bir kovada birleştirilen kanlar 30 ml'lik plastik deney tüplerine taksim edildikten sonra 3000 g'de 15 dakika santrifüj edildi. Supernatant atıldıktan sonra 0,156 M KCl ve 1 mM EDTA ihtiva eden izotonik çözelti ile iki defa yıkama yapıldı. Bu işlem sonunda 3600 ml total kandan 1560 ml eritrosit elde edildi.

Eritrositler üzerine 2/3 oranında, hemoliz edici çözelti (litresinde; 50 ml toluen, 1 mol -amino kaproik asit, % 0,1 2-merkaptöetanol (2-ME), 1 mmol EDTA ve 10 µmol NADP+ ihtiva eder) ilâve edilerek 2 dakika süreyle hızlıca çalkalandı. Hemolizat santrifüj edildikten (3000 g, 20 dak) sonra supernatant toplandı. Çö-

keltiye, içerisinde 5 mM fosfat, 10  $\mu$  M NADP<sup>+</sup>, % 0,1 2-ME, 1 mM amino kaproik asit bulunan tampon çözeltiden (tampon-1, pH 6,5) 1/1 oranında ilâve edilerek yıkandı. Supernatant elde edildikten sonra öncesine eklendi (toplam hacim 3700 ml.).

Elde edilen supernatant, 4x20 cm boyutlarında DEAE-sellüloz kolonu tampon-1 ile doyurulduktan sonra, kolondan geçirildi. Sonra bu kolon, 5 mM fosfat, 10  $\mu$  M NADP<sup>+</sup>, 1 mM EDTA, 2 mM-amino kaproik asit ve 0,5 M NaCl ihtiva eden tampon çözeltisi (tampon-2, pH 5,8) ile yıkanarak 5 ml lik fraksiyonlar halinde fraksiyon toplayıcısında elüe edildi. Tüplerde Warburg ve Christian (29); gerektiğinde Lowry (30) metodlarına göre protein tayin edildi. Protein ihtiva eden tüplerde Yoshida'nın metodu (15), küçük bir modifikasyonla, uygulanarak G-6-PD enzim aktivitesi tayin edildi. G-6-PD ihtiva eden tüpler birleştirildi (toplam hacim 320 ml.) Bu aktif çözelti 20 misli hacim tampon-2'ye karşı 7 saat diyaliz edildi. İşlem 3 defa tekrarlandı ve santrifüj edildi (20.000 g, 30 dak). 0.5 M asetik asit eklemek suretiyle pH'sı 5,8'e ayarlandı ve CM-sefadedeks (C-50-120) Katyon değiştirici kromatografi kolonuna (4x20 cm) tatbik edildi. Tampon-2 ile (protein çıkışı bitinceye kadar) yıkandı. Tampon-3 (pH 7,0; 1mM EDTA, % 0,1 2-ME, 10  $\mu$ M NADP<sup>+</sup>, 50 mM fosfat ve 0,3 mM NaCl) kolona ilâve edilerek bağlı olan enzim elüe edildi. Aktif fraksiyonlar toplandı (toplam hacim 150 ml.).

Enzimi ihtiva eden bu çözelti tampon-4 (pH 6,5; 1 mM EDTA, % 0,1 2-ME, 20 mM fosfat 10  $\mu$ M NADP<sup>+</sup>)'e karşı yukarıdaki gibi diyalizlendi. Diyalizet, 25 ml kalıncaya kadar vakumda değiştirildi, tekrar diyalizlendi. 20.000 g de santrifüj edilerek DEAE-sefadedeks (A-50-120) kolonuna (2,5x25 cm) tatbik edildi. Tampon-4 ile yıkandı. İçerisine 500 mM NaCl ilave edilmiş tampon-4 ile tuz gradienti uygulandıktan sonra elüe edildi. Tampon-2'ye karşı diyalizlendikten sonra (yukarıdaki gibi iki defa) santrifüj edilerek (20.000 g) supernatant ayrıldı.

Hazırlanan CM-sefadedeks (C-50-120) kolonuna (1,2x40) numune tatbik edildi ve 280 nm'de okuma vermeyinceye kadar tampon-2 ile yıkandı. Sonra her hücre si 250 ml çözelti içeren bir gradient mikser kullanılarak tampon-2 0,01 MKCl ile tampon-1 - 0,6 M KCl arasında linear tuz ve pH gradienti yapıldı. Fraksiyon halinde toplandıktan sonra aktif kısımlar birleştirildi (toplam hacim 100 ml.).

Elde edilen enzim çözeltisi, Green metoduna göre (31) önce % 30'luk tuz ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) çöktürmesi, sonra % 50'lik tuz çöktürmesi yapılarak enzimin çökeltide kalması sağlandı. Çökelti mümkün olan en az hacimde tampon-5 (pH 6,0; 10  $\mu$ M NADP<sup>+</sup>, % 0,1 2-ME, 50 mM fosfat, 1 mM EDTA) kullanılarak çözüldü. Santrifüj edildikten (20.000 g) sonra aynı tampona karşı 3 defa diyalizlendi. Santrifüj edildikten (20.000 g, 30 dak) 5 ml supernatant elde edilmiş oldu.

Sefadedeks G-200 jel elemesi ile proteinin molekül ağırlığı, alt birim sayısı ve bunların molekül ağırlıkları tayin edildi. (32,33,34,35,36,37). Molekül ağırlığı

tayininde kullanılmak üzere standart eğri, molekül ağırlıkları bilinen üreaz (480.000), alkalin fosfataz (80.000) sığır serum albumini (67,500), glukoz oksidaz (154.000) ve peroksidaz (44,000) proteinleri yardımıyla hazırlandı.

Enzimin saflığını kontrol etmek için normal poliakrilamid (38,39) ve SDS-akrilamid jel elektroforezi uygulandı (40). Ayrıca yine saflık kontrolü ile alt birim yapısının ve kısmen primer yapının aydınlatılması için N-ucu amino asit tayini yapıldı (41,42,43).

G-6-PD'nin maksimum aktivite gösterdiği şartları araştırmak için enzim-substrat ve enzim-koenzim ilişkileri, aktivatörler ve aktiviteye pH'nın etkisi incelendi.

## BULGULAR

Enzim saflaştırılması ile ilgili bulgular Tablo-II'de toplu olarak gösterildi. 3600 ml kandan % 33 verimle enzim elde edildi. Saflaştırma katsayısının 65.100 bulunduğu bu çalışmada 488 değerinde bir özgül aktiviteye ulaşıldı. DEAE-sefades kromatografisi basamaklarında 6-fosfo glukonat dehidrogenaz (6-PGD) uzaklaştırıldı.

Tabloda 2 de her saflaştırma basamağına ait total protein, total G-6 PD ve 6-PGD aktiviteleri ile bu iki enzimin birbirlerine oranları, özgül aktivite, saflaştırma katsayısı, verim ve aktif kısmın hacmi verildi.

Hemolizatta total protein  $5,62 \times 10^5$  mg, total G-6-PD aktivitesi 4212 Ünite (U), 6-PGD aktivitesi 1137 U bulundu. Özgül aktivite ise 0,00749 olarak hesaplandı.

DEAE-sellüloz kromatografisinin protein ve enzim çizimleri şekil 1'de gösterildi. Kolondan enzim 19-51 inci tüpler arasında 320 ml hacim içerisinde geldi. CM-sefades kromatografisi ile ilgili sonuçlar Şekil-2'de gösterildi. Bu basamakta enzim 58-73 üncü tüpler arasında kolondan geldi.

DEAE-sefades uygulamasının sonuçları Şekil-3'te verildi. Enzim kolondan 123-144 üncü tüpler arasında toplandı. CM-sefades kromatografisinin grafiği Şekil-4'de gösterildi. Enzim kolondan 64-84 üncü tüpler arasında elüe edildi.

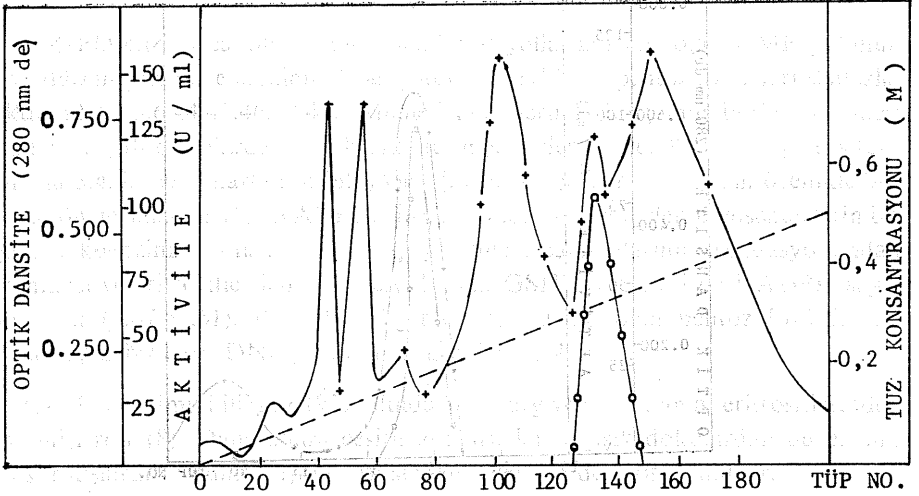
Sefadeks G-200 kromatografisinin bulguları Şekil-5'de verildi. Enzim 23-29 uncu tüpler arasında toplandı.

Sefadeks G-200 ile 5 defa tekrarlanarak protein tayini yapıldı. Sonuçlar daha önce hazırlanan standart grafikten değerlendirildi. Molekül ağırlığı  $184.000 \pm 6.000$  olarak bulundu (Şekil-6). 6 M guanidinli ortamda sefadesks G-200 ile alt birim ağırlığı da  $48.000 \pm 5.000$  olarak bulundu. Yapılan N-ucu tayininden amino asitlerin tirozin ve alanin (Rf değerleri sırasıyla, 0,60 ve 0,34) olduğu anlaşıldı.

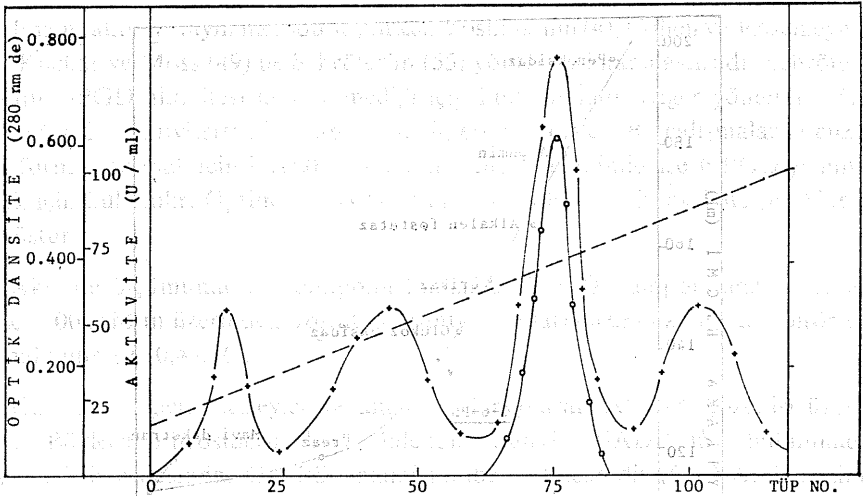
Tablo: 11 G-6-PD ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI.

Başamak No.	Saflaştırma Basamakları	Hacim (ml)	Total Protein (mg)	Total G-6-PD (ünite)	Total 6-PGD (ünite)	6-PGD G-6-PD	G-6-PD'in Özgül aktivitesi	Saflaşma Katsayısı	% Verim
1	Kan alınması	3.600							
2	Eritrosit ayrılması	1.560	5.62x10 <sup>5</sup>	4.212	1137	0.27			
3	Hemolizat	3.700	5.62x10 <sup>5</sup>	4.212	1137	0.27	0.00749	1	100
4	DEAE-Sellüloz yıkantısı	320	5.82x10 <sup>3</sup>	3.760	90	0.024	0.646	86	89
5	CM-sefadeks yıkantısı	150	425	3.142	6	<0.002	7.4	987	75
6	DEAE-sefadeks yıkantısı	105	75	2.750	0	0	36.7	4.895	65
7	CM-sefadeks yıkantısı	100	21	2.375			113	15.100	56
8	% 30-% 50 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> kesiti	5	7.7	1.916			249	33.244	45
9	Sefadeks G-200 elemesi	12	3.9	1.536			393	52.549	36
10	% 43-% 44 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> göktürmesi	5	3.0	1.415			488	65.100	33



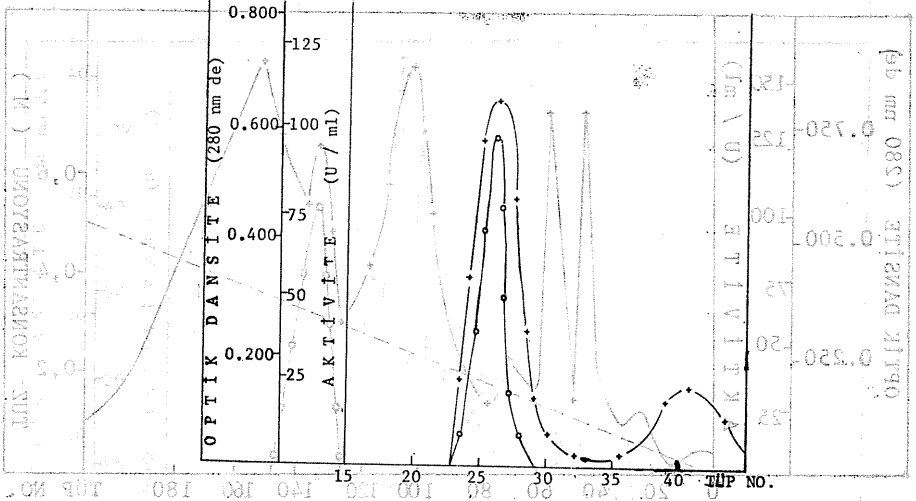


Şekil 3. DEAE-Sefadexs (A-50-120) Kromatografisi (6.basamak). Fraksiyon hacmi 5 ml; (---): 280 nm okuması (---): aktivite (U/ml); (---): NaCl tuz gradienti.



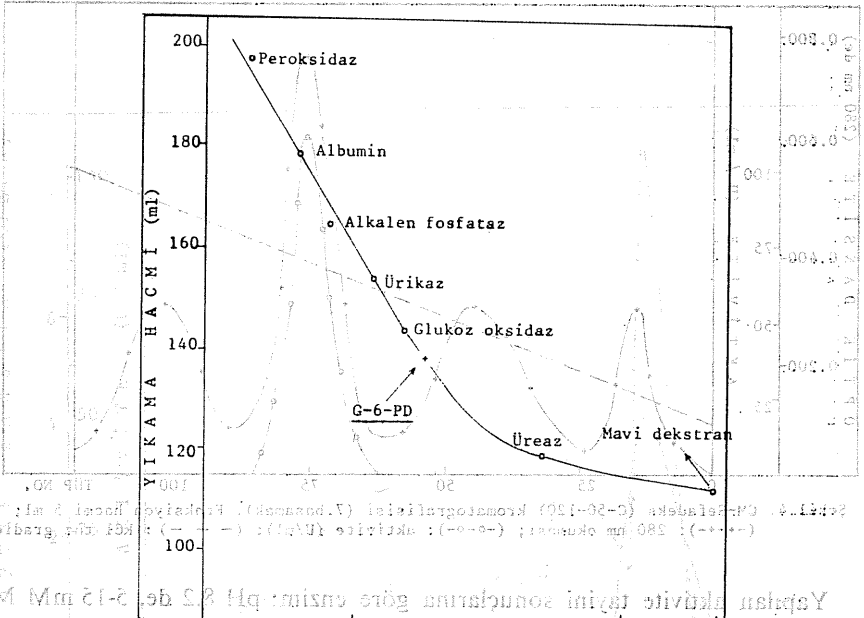
Şekil 4. CM-Sefadexs (C-50-120) kromatografisi (7.basamak). Fraksiyon hacmi 5 ml; (---): 280 nm okuması; (---): aktivite (U/ml); (---): KCl tuz gradienti

Yapılan aktivite tayini sonuçlarına göre enzim; pH 8.2 de, 5-15 mM  $Mg^{+2}$  iyonu konsantrasyonunda maksimum aktivite göstermektedir. G-6-PD Hız eğrisinden  $K_m = 4,1 \times 10^{-5}$  ve  $V_m = 440$  mM/dak.; NAD<sup>+</sup> - Hız eğrisinden  $K_m = 8 \times 10^{-6}$  M ve  $V_m = 460$  mM/dak ve NAD<sup>+</sup> - Hız eğrisinden  $K_m = 4,3 \times 10^{-3}$  M ve  $V_m = 35$  mM/dak. olarak bulundu.



Şekil 5. Sefadex G-200 kromatografisi (9.basamak)

Fraksiyon hacmi 2 ml: (---) 280 nm okuması, (---) aktivite (U/ml).



Şekil 6. G-6-PD'nin sefadex G-200 ile molekül ağırlığının tayini (Akış hızı 24 ml/saatte, kolon boyutu 2,5 x 75 cm).



## TARTIŞMA

G-6-PD enzimi canlılarda ana metabolik yollardan biri olan HMP yolunun ilk ve düzenleyici bir enzimidir. Esas görevi NADPH ve pentoz fosfatları sentezlemektir. (2,3,4,5,6,44,45,46,47,48). Memeli hücrelerinde bu yolun bütün enzimleri vardır ve çeşitli dokularda değişik aktivite gösterirler (3,4,6,49). HMP yolu sitoplazmada 3,4,5,6 ve 7 karbonlu bileşikleri birbirine çevirir. Bu durum özellikle bitkilerde önem kazanır (5). NADPH, sitoplazmada cereyan eden biyosentezlerin bir çoğunda koenzim olarak gereklidir. Çeşitli hücre elemanlarının oksidasyonundan korunması ve eritrositler için çok gerekli olan GSH'nın sentezi de NADPH sayesinde olur (7,47,50,51). Bu yolun diğer önemli ürünü olan pentoz fosfatlar da nükleotid, RNA ve DNA yapımına girerler (3,4,5,47).

G-6-PD enzimini ilk kez 1931 yılında Warburg ve Christian at eritrositlerinden keşfetmişlerdir (8). Daha sonra çeşitli araştırmacılar değişik dokulardan bu enzimi saflaştırmışlardır. Buna ilişkin çalışmalar Tablo-I'de gösterilmiştir.

Türkiye'de G-6-PD enziminin saflaştırılması Kobay lensinde (28,52) ve sığır eritrositlerinde (53) çalışılmıştır. Normal, senil kataraktlı ve diabetik kataraktlı insan lensinde de kısmen saflaştırılmıştır (54). İnsan eritrositlerinde ise bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Enzim aktivite tayin metodu seçilirken Yoshida'nın (4), Cohen ve Rosemeyer'in (47), Kachar ve Moss (49) ile Schröter'in (55) yöntemleri karşılaştırıldı. Schröter'in metodu 6-PGD aktivitesi tayin etmediği için kullanılmadı. Diğer yöntemler G-6-PD ile 6-PGD aktivitelerini beraberce tayin etmektedirler. Bu çalışmalarda enzimi aktif formda tutmak için NADP<sup>+</sup> kullanılmıştır. Maleinimid ise 6-PGD'yi inhibe etmek için kullanılır. Optimum pH 8-8,5 arasında olduğu için aktivite pH 8'de ölçülmüştür.

Aktivite ölçümünde tris tamponu kullanılarak fosfat tamponundan kaçınıldı. Çünkü 100 mM'ın üzerindeki fosfat konsantrasyonları enzim üzerine inhibitör etki yapmaktadır (9,10,49,56).

Kan başlangıçta besleyici ve antikoagulan olarak ACD-A çözeltisi üzerine alındı. Böylece eritrositlerin lizisi önlendi. Çünkü NADP<sup>+</sup>'nin bulunmadığı ortamda lizis esnasında, G-6-PD enzimi inhibe edilmektedir (6). NADP enzimin dimer ve polimer birimlerine bağlanarak monomer ünitelerine dissosiasyonunu önlemekte ve aktif yapı kararlı kalmaktadır. Onun için saflaştırmanın her kademesinde NADP<sup>+</sup> kullanıldı (6,15,18,19,21,23,28,44,56,57,59,60). Saflaştırma esnasında pH 7.2'nin altında tutuldu. Çünkü enzim pH 7.2'nin altında dimer ve tetramer yapıya, yani aktif forma eğilim gösterir (61).

Ortamda iyon kuvvetinin yükselmesi de polimer yapıya zarar verdiğiinden purifikasyonda düşük tuz konsantrasyonu kullanıldı (23) ve fazla tuzu uzaklaş-

tırmak için sık sık diyaliz yapıldı. Kısaca saflaştırmada NADP<sup>+</sup>, fosfat konsantrasyonu, ortamın pH'sı gibi faktörlerin enzimin yapı ve aktivitesine etkileri yönünden en uygun şartların araştırılması gerekmektedir.

Toluen hemolizatin hava ile ilgisini keşmettedir. Bu amaçla kullanılarak enzimin -SH grupları gibi okside olabilen grupları oksidasyondan korunmuş oldu. Çünkü -SH grupları korunmaz ise enzim monomerlerine parçalanır ve aktivitesi kaybolur. ε-Amino kaproik asit, proteaz inhibitörü olarak ortama kondu. Değilse ortamda bulunan proteazlar enzimleri parçalayabilir. Ortama koyduğumuz EDTA ise enzimi metal iyonlarının zehir etkisinden korumaktadır.

Bu bilgilerin ışığında hareket edilerek DEAE-sellüloz kolon saflaştırma bamağında pH 5,8, NADP<sup>+</sup> konsantrasyonu 10 mM ve tampon konsantrasyonu 5 mM olarak alındı ve fazla tuz ile fazla fosfat konsantrasyonundan kaçınıldı.

Sonuçta elde edilen enzim, normal poliakrilamid jel elektroforezi ile, tek band verdi. Bu, elde edilen enzimin saflığına işaretler. Enzimin moleköl ağırlığı sefa-deks G-200 ile 184.000 ± 6.000 ve alt birim moleköl ağırlığı da 48.000 ± 5.000 bulundu. Bundan enzimin eşit büyüklükte dört adet alt birimden oluştuğu anlaşılmaktadır. Zaten enzimin elektromikroskopik olarak 4 alt birime sahip olduğu tesbit edilmiştir (13,59).

DANS-Cl ile enzimin N-ucunda tirozin ve alanin amino asitleri tesbit edildi. Bu, enzimin iki zincirden yapıldığını göstermektedir (18,20,23,25,27).

G-6-PD enzimi aktivitesinin NADP<sup>+</sup>/NADPH oranı tarafından düzenlendiği (15,21,23,27,44,49,57,58,59,61,62,63,64,65,66,67,68,69) bilinmektedir. İnsan eritrositi içinde,

$$\frac{NADP^+}{NADPH} = 2,1 \text{ ve } NADP^+ + NADPH = 25 \mu\text{M}$$

dür. G-6-PD'nin katalizlediği enzimatik reaksiyonun denge sabiti.

$$K = \frac{[NADPH][H^+][6-PGA]}{[NADP^+][G-6-P]} = 1,22 \text{ (28°C ve pH 6,4)}$$

şekindedir. NADP konsantrasyonu yüksekse, denge sabitine ulaşılabilmesi için, G-6-P yıkılacaktır. NADPH arttığı zaman G-6-P parçalanmayacak, yani enzimin katalizleme hızı düşecektir. Yaptığımız aktivite tayinlerinde NADP<sup>+</sup>/NADPH oranı artırıldıkça aktivitenin de lineere yakın artma gösterdiği gözlemlendi.

#### PURIFICATION OF G-6-PD FROM HUMAN ERYTHROCYTES

**SUMMARY:** In present study, glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes was purified. DEAE-cellulose, CM-sephadex (C-50-120), and

DEAE-sephadex chromatographies were used in purification. In addition, the sephadex G-200 gel filtration and polyacrylamide and SDS-acrylamide gel electrophoresis were applied. At the end, a specific activity of 488, a purification coefficient of 65,100, and a yielding of 33 % were reached. The N-terminal amino acid of the enzyme was determined. The kinetic parameters of the enzyme was studied.

## KAYNAKLAR

- 1- Lehninger, A.L.: "Enzymes: Kinetics and Inhibition", Biochemistry, New York Worth Publishers, Inc., 1975, II. baskı, sayfa 183.
- 2- Bhagavan, N. V.: "Carbohydrates" Biochemistry A Comprehensive Review, Philadelphia, J. B. Lippincott Company, 1974, sayfa 131.
- 3- West, E. S., Todd, W. R., Mason, H. S., Brugfen, J.V.: "Carbohydrate Metabolism", Textbook of Biochemistry, New York, The Macmillan Company, 1968, sayfa 1036.
- 4- Mayes, P.: "Metabolisms of Carbohydrate", Harper, H. A. (Derleyen), Review of Physiological Chemistry, California, Lange Medical Publications, 1971, sayfa 227.
- 5- Lehninger, A. L.: "The Tricarboxylic Acid Cycle and the Phosphogluconate Pathway", Biochemistry, New York Worth Publishers Inc., 1975 III. Baskı, sayfa 443.
- 6- Kachar, F. J., Moss, W. D.: "Enzymes", Tietz, N. (Derleyen), Fundamentals of Clinical Chemistry, London, W. B. Saunders Company, 1976. sayfa 565.
- 7- Aksoy, M.: "Eritrositlerin Biyokimyası", Hematoloji-I Eritrosit Hastalıkları İstanbul, Sermet Matbaası, 1975, sayfa 442.
- 8- Warburg, O., Christina, W.: Über Aktivierung der Robisonchen Hexose-Mono Phosphor saure in roten Blutzellen und die Gelvinnung Aktivierender Fermentlosungen, Biochem. Z., 240: 206, (1931).
- 9- Moss, R.D.: "Glucose -6-Phosphate Dehydrogenase and -6-Phospho-Gluconic Dehydrogenase from Leuconostoc mesenteroides", Colowick, S.P., (Kaplan, N. O., (Derleyenler), Methods in Enzymology, New York Academic Press Inc., 1955, Cilt I, sayfa 328.
- 10- Kornberg, A., Horecker, B.L.: "Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase", Colowick, S.P., Kaplan, N.O. (Derleyenler), Methods in Enzymology, New York, Academic Press Inc., 1955, Cilt I, sayfa 323.
- 11- Julian, G. R., Volter, R. G., Reithel, F.J.; Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase From Bovine Mamary Gland, j. Biol. Chem., 236: 754, (1961)

- 12- Noltman, E. A., Guhlar, C. J., Kuby, S.A.: Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (Zwischenferment), I. Isolation of the Crystalline Enzyme from Yeast, *J. Biol. Chem.*, 236: 1225, (1961).
- 13- Kirkman, H.N.: Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase From Human Erythrocytes, *J. Biol. Chem.*, 237: 2364, (1961).
- 14- Chung, A.E., Langdon, R.G.: Human Erythrocyte Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase. I. Isolation and Properties of the Enzyme, *J. Biol. Chem.*, 238: 2309, (1963).
- 15- Yoshida, A.: Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase of Human Erythrocytes, I. Purification and Characterization of Normal (B<sup>+</sup>) Enzyme, *J. Biol. Chem.*, 241: 4966, (1966).
- 16- Yoshida, A.: Human Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase: Purification and Characterization of Negro, Type Variant (A<sup>+</sup>) and Comparison With Normal Enzyme (B<sup>+</sup>), *Biochem. Genet.*, 1: 81, (1967).
- 17- Kirkman, H. N., Ramot, B., Lee, J. T.: Altered Aggregational Properties in a Genetic Variant of Human Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase, *Biochem. Genet.* 3: 137, (1969).
- 18- Cohen, P., Rosemeyer, M.A.: Human Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase: Purification of the Erythrocyte Enzyme and the Influence of Ions on its Activity, *Eur. J. Biochem.* 8: 1, (1969).
- 19- Rattazzi, M.C.: Isolation and Purification of Human Erythrocyte Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from Small Amounts of Blood, *Biochem. Biophys. Acta*, 181: 91, (1969).
- 20- Watanabe, A., Taketa, K.: Purification of Rat Liver Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase by Batchwise Adsorption and Substrate Elution, *J. Biochem.*, 72: 1277, (1972).
- 21- Malcolm, A.A., Shepherd, M.G.: Purification and Properties of Penicillium Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase, *Biochem. J.*, 128: 817, (1972).
- 22- Chilla, R., Doering, M., Domagk, G.E., Rippa, M.: A Simplified Procedure for the Isolation of a Highly Active Crystalline Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from *Candida Utilis*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 159: 235, (1973).
- 23- Nevaldine, B.H., Hyde, C.M., Levy, H.R.: Mamary Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase. Molecular Weight Studies, *Arch. Biochem. Biophys.*, 165: 398, (1974).
- 24- Hizi, A., Yagil, G.: On the Mechanism of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Regulation in Mouse Liver. 2. Purification and Properties of the Mouse-Liver Enzyme, *Eur. J. Biochem.* 45: 201, (1974).

- 25- Olive, C., Levy, R.: "Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from *Leuconostoc Mesenteroides*", Colowick, S.P., Kaplan, N.O. (Derleyenler), *Methods in Enzymology*, New York, Academic Press Inc., 1975, Cilt XLI, sayfa 196.
- 26- McKernes, K.W.: "Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from Cow Adrenal Cortex", Colowick, S.P., Kaplan, N.O. (Derleyenler), *Methods in Enzymology*, New York, Academic Press Inc., 1975, Cilt XLI, sayfa 188.
- 27- Kanji, M.I., Toews, M.L., Carper, W.R.: "Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase: Purification and Partial Characterization", *J. Biol. Chem.*, 251: 2255 (1976).
- 28- Yarimağan, S., Mergen, K.: "Kobay Lensi Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenazının Kinetik Özellikleri", *Biyokimya Dergisi*, 1: 53, (1976).
- 29- Layne, E.: "Spectrophotometric and Turbidimetric Methods for Measuring Proteins", Colowick, S.P., Kaplan, N.O. (Derleyenler), *Methods in Enzymology*, New York, Academic Press. Inc., 1957, Cilt III, sayfa 454.
- 30- Lowry, O.R., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.: "Protein Measurements with the folin Phenol Reagent", *J. Biol. Chem.*, 193: 265, (1951).
- 31- Grean, A.A., Hughes, W.L.: "Protein Fractionation on the Basis of Solubility in Aqueous Solutions of Salt and Organic Solvent", Colowick, S.P., Kaplan, N.O. (Derleyeler), *Methods in Enzymology*, New York, Academic Press, Inc., 1955, Cilt I, sayfa 76.
- 32- Lehninger, A.L.: "Proteins: Purification and Characterization", *Biochemistry*, New York, Worth Publishers, Inc., 1975, II. Baskı, sayfa 157.
- 33- "Gel Filtration Theory and Practice", *Pharmacia Fine Chemicals bülteni*, Uppsala, 1979.
- 34- Andrews, P.: "Estimation of Molecular Weights of Proteins by Gel Filtration", *Nature, Lond.*, 196: 36, (1962).
- 35- Whitaker, J.R.: "Determination of Molecular Weights of Proteins by Gel Filtration on Sephadex", *Anal. Chem.*, 35: 1950, (1963).
- 36- Andrews, P.: "Estimation of the Molecular Weights of Proteins by Sephadex Gel Filtration", *Biochem. J.*, 91: 222, (1964).
- 37- Ackers, G.K.: "Molecular Exclusion and Restricted Diffusion Process in Molecular Sieve Chromatography", *Biochemistry*, 3: 723, (1964).
- 38- Davies, B.J.: "Disc Electrophoresis: II. Method and Application to Human Serum Proteins", *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121: 404, (1964).
- 39- Shuster, L.: "Preparative Acrylamide Gel Electrophoresis: Functions and Techniques", Colowick, S.P., Kaplan, N.O. (Derleyenler), *Methods in Enzymology*, New York, Acad. Press, Inc., 1971, Cilt XXII, sayfa 412.

- 40- Weber, K., Osborn, M.: Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate, Polyacrylamid Gel Electrophoresis, J. Biol. Chem., 244: 4406, (1969).
- 41- Gray, W.R.: "End-Group Analysis Using Dansyl Chloride", Colowick, S.P., Kaplan, N.O. (Derleyenler), Methods in Enzymology, New York, Academic Press, Inc., 1972, Cilt XXV, sayfa 121.
- 42- Gray, W.R.: "Dansyl Chloride Procedure", Colowick, S.P., Kaplan, N.O. (Derleyenler) Methods in Enzymology New York, Academic Press, Inc., 1976 Cilt XI, s. 139.
- 43- Gray, W.R., Hartley, B.S.; Afluorescent End-Group Reagent for Proteins and Peptides, Biochem. J., 89: 59 P, (1963).
- 44- Benziman, M., Mazover, A.: Nicotinamide Adenine Dinucleotide and Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Specific Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase of Acetobacter xylinum and Their in the Regulation of the Pentose Cycle; j. Biol. Chem., 248: 1603, (1973).
- 45- Messina, A.M., Chacko, C.M., Nadler, H.L.: (Introduced by E. Buetler), Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase in the Developing Human Liver, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 139: 778, (1972).
- 46- Aksu, T.A.: Muhtelif Yaş Gruplarındaki Sağlam Şahıslarda Eritrosit Glukoz-6-Phosphate Dehidrogenaz enzimi üzerinde bir çalışma, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıp Dergisi, 5: 1, (1972).
- 47- Buddecke, E.: "Kohlenhydrate", Grundriss Der Biochemie, Berlin, Walter de Gruyter 1977, V. Baskı, sayfa 148.
- 48- Karlson, V.P.: "Der Pentosephosphate-Zyklus", Biochemie, Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 1977, X. Baskı, sayfa 241.
- 49- Löhr, G.W., Waller, H.D : "Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase", Bergmeyer, H. U. (Derleyen), Methoden Der Enzymatischen Analyse, Weinheim, Verlag, Chemie, 1974, Cilt I, sayfa 673.
- 50- Orsini, A., Varol, L., Vassal, F., Brusquet, Y.: Etude Critiques des Differentes Techniques de Depistage et de Determination des Deficites en-6-Phosphate Dehydrogenase, Mars. Med., 106: 685, (1969).
- 51- Gross, T.R., Hurwitz, R.E.: The Pentose Phosphate Pathway in Human Erythrocytes, Pediatrics, 22: 453, (1958).
- 52- Yarımağan, S.: Kobay Lensi Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenazının Safılaştırılması ve özellikleri. Ph.D. Tezi, Hacettepe Üniversitesi, 1975 (Yayınlanmıştır).
- 53- Soysal, T.: Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenazın Sığır Eritrositlerinden Safılaştırılması ve Kinetik Özellikleri, Ph.D. Tezi, Atatürk Üniversitesi Tıp Fak. 1978.

- 54- Kuş, S.: Normal, Senil Katraklı ve Diabetik Kataraktlı İnsan Lensi G-6-PD'ünün (Iarının Kısmen Saflaştırılması ve Özelliklerinin Karşılaştırılması, Ph.D.Tezi, Hacettepe Üniversitesi 1979 (Yayınlanmıştır).
- 55- Schröter, W.: "Erythrocyte Enzymes", Curtius, H., Ch, Roth, (Derleyenler), Principles and Methods Clinical Biochemistry, New York, Walter de Gruyter, 1974, Cilt II, sayfa 1178.
- 56- Bergmayer, H. U., Gawehn, K., Grabl, M.: "Enzyme als Biochemische Reagen-tion", Bergmeyer, H.U. (Derleyen), Weinheim, Verlag Chemie, 1974, III. Baskı, Cilt I, sayfa 454.
- 57- Marks, P. A., Szeinberg, A., Banks, J.: Erythrocyte Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase of Normal and Mutant Human Subjects. Properties of the Purified Enzymes, J. Biol. Chem., 236: 10, (1961).
- 58- Yue, R. H., Noltmann, E.A., Kuby, S.A.: Glucose-6-Phosphate Dehydroge-nase from Brewers' Yeast (Zwischenferment). II. Studies on the Subunit Str-ucture and on the Molecular Association Phenomenon Induced by Tryp-hosopyridine Nucleotide, J. Biol. Chem., 244: 1353. (1969).
- 59- Kuby, S.A., Wu, T. J., Roy, R.N.: Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from Brewears' Yeast (Zwischenferment). Furter Observations on the Ligand-Induced Macromolecular Association Phenomenon: Kinetic Properties of the Two-Chain Protein Species and Studies on the Enzyme-Substrate Inte-ractions, Arch. Biochem. Biophys., 165: 153, (1974).
- 60- Luzzatto, L.: Regulation of the Activity of Glucose-6-Phosphate Dehydrogen-ase by NADP<sup>+</sup> and NADPH, Biochim. Biophys. Acta. 146: 18, (1967).
- 62- Gözükar, E.M.: Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Enziminin Özellikleri, Meta-bolik ve Klinik Açından Önemi. Biyokimya Dergisi, 2: 217, (1978).
- 63- Rozenszain, L.A., Joseph, D.: The Isosyme Patterns of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase in Blood Cells, Bone Marrow and other Human Tissues, Bi-ochim. Biophys., Acta, 364: 38, (1974).
- 61- Cohen, P., Rosemeyer, M.A.: Subunit Interactions of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from Human Erythrocytes, Eur. J. Biochem., 8: 8, (1969).
- 64- Grow, T.H., Ishaque, A., Levy, R.H.: Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from Leuconostoc Mesenteroides. Interaction of the Enzyme with Coenzymes and Coenzyme Analogs, Arch. Biochem. Biophys., 177: 307, (1976).
- 65- Goheer, M. A., Gould, B. J., Parke, D.V.: Preparation of Immobilized Baker's-Yeast Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Attached to Modified Sepharose and Sephadex and a Comparison of the properties of these Preparations with those of the Soluble Enzyme, Biochem. J., 157: 289, (1976).

66- Schaeffer, F., Stainer, R.Y.: Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase of *Anabaena* Sp. Kinetic and Molecular Properties, *Arch. Microbiol.*, 116: 9, (1978).

67- Olive, C., Georch, E.M., Levy, H. R., Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from *Leuconostoc Mesenteroides*. Kinetic Studies, *J. Biol. Chem.* 246: 2074 (1971).

68- Kirkman, H. N., Hendricson, E. M., Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from Human Erythrocytes, II. Subactive States of the Enzyme from Normal Persons, *J. Biol. Chem.*, 237: 2371, (1961).

69- Luzzato, L., Regulation of the Activity of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase by NADP<sup>+</sup> and NADPH, *Biochim. Biophys. Acta.* 46: 18 (1967).

70- Luzzato, L.: Regulation of the Activity of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase by NADP<sup>+</sup> and NADPH, *Biochim. Biophys. Acta.* 146: 18 (1967).

71- Cohen, R., Rosemary, M.A.: Subunit Interactions of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from Human Erythrocytes, *Eur. J. Biochem.* 8: (1969).

72- Gray, T.H., Ishaque, A., Levy, H.H.: Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from *Leuconostoc Mesenteroides*. Interaction of the Enzyme with Coenzymes and Coenzyme Analogs, *Arch. Biochem. Biophys.* 177: 307 (1976).

73- Gopet, A.A., Gould, B.J., Parker, D.V.: Preparation of Immobilized Baker's Yeast Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Attached to Modified Sepharose and Studies with a Comparison of the Properties of these Preparations with those of the Soluble Enzyme, *Biochem. J.* 157: 259 (1976).

74- Rosenzain, L.A., Joseph, D.: The Isozyme Patterns of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase in Blood Cells, Bone Marrow and other Human Tissues, *Biochim. Biophys. Acta.* 364: 38 (1974).

75- Gökçen, E.M.: Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Enziminin Özellikleri, Metabolik ve Klinik Açidan, *Biyokimya Dergisi* 2: 217 (1978).

76- Küpçü, S.A., Würl, J., Roy, R.N.: Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from Brewers' Yeast (Zwischenbericht). Further Observations on the Ligand-Induced Macromolecular Association Phenomenon: Kinetic Properties of the Two-Chain Protein Species and Studies of the Enzyme-Substrate Interactions, *Arch. Biochem. Biophys.* 153: 177 (1977).

77- Küpçü, S.A., Würl, J., Roy, R.N.: Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from Brewers' Yeast (Zwischenbericht). Further Observations on the Ligand-Induced Macromolecular Association Phenomenon: Kinetic Properties of the Two-Chain Protein Species and Studies of the Enzyme-Substrate Interactions, *J. Biol. Chem.* 254: 1233 (1979).

78- Yüce, R., Nollmann, E.A., Küpçü, S.A.: Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from Brewers' Yeast (Zwischenbericht). II. Studies on the Subunit Structure and on the Molecular Association Phenomenon Induced by Trypsin, *Biochim. Biophys. Acta.* 524: 123 (1978).

79- Yüce, R., Nollmann, E.A., Küpçü, S.A.: Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from Brewers' Yeast (Zwischenbericht). III. Studies on the Subunit Structure and on the Molecular Association Phenomenon Induced by Trypsin, *Biochim. Biophys. Acta.* 524: 123 (1978).