

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TRANSGLUTAMİNAZIN FLOROJENİK SUBSTRATLARININ VE YENİ
İNHİBİTÖRLERİNİN KARAKTERİZASYONU**

Gözde F. SARICAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Danışman: Prof. Dr. Yeşim YEŞİLOĞLU

EDİRNE-2014

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü onayı



Prof. Dr. Mustafa ÖZCAN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tezin yüksek lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.



Prof. Dr. Mehmet İŞCAN
Kimya Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Yeşim YEŞİLOĞLU
Tez Danışmanı

Bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Kimya Anabilim Dalında bir yüksek lisans tezi olarak oy birliğiyle kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Prof. Dr. Yeşim YEŞİLOĞLU

Prof. Dr. Yüksel BAYRAK

Yrd. Doç. Dr. Sedat ŞENGÜL



Tarih: 18/12/2014

T.Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
DOĞRULUK BEYANI

İlgili tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını beyan ederim.

2014

GÖZDE SARICAN



Master of Science Thesis

Gözde F. SARICAN

Trakya University Institute of Natural Sciences

Department of Chemistry

ABSTRACT

Tissue transglutaminase (TG2; Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2, EC 2.3.2.13), member of the Transglutaminase family, is a multidomain enzyme with many interesting properties resulting in versatile roles in both physiology and pathophysiology [1]. One of its functions is to catalyze the Ca^{2+} -dependent transamidation of protein-bound glutamine residues (donor substrate) leading to an inter- and intramolecular irreversible crosslinking of proteins. It is involved in multiple physiological processes including inflammation, wound healing, cell migration, angiogenesis, and apoptosis [2] and it is implicated in a wide range of diseases. Its implication in the pathophysiology of tumours is still matter of debate [3], but upregulation of TGase-2 in malignant cells has been demonstrated [4].

Despite recent progress in unraveling the different cellular functions of TG2, several questions remain. Thus, Transglutaminase 2 features in both confirmed and some still ambiguous roles within pathological conditions, raising interest in developing inhibitors and imaging probes which target this enzyme [1].

This thesis contains a study of TG2 activity, using fluorescence based (high throughput enabled screening assay) determination of fluorogenic synthetic substrates and substrate-related new inhibitors' investigation. A continuous fluorometric assay, to determine the activity of TG2 as described by Gillet et al [5], has been used in order to measure the activity of TG2. with RW129/12 and RW 130/12 as donor substrate provided by Dr. Reik Löser Institute of Radiopharmaceutical Cancer Research,

Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf, Germany. Aminoacetonitrile was used as acceptor substrate. 7-hydroxycoumarin and 7-hydroxy-4-methyl-coumarin are the products, respectively, which are released upon the interaction of TGase with the substrates

During validation of the method, precipitation occurred. In order to dissipate precipitation solubility it is needed to increase solubility in the assay mixture. With the help of using different solvents and lower substrate concentrations, optimum conditions were determined and precipitation was dissipated. Even using TritonX-100 and NMP was increased solubility, precipitation had still slightly occurred, besides, it was observed that the presence of TritonX-100 and NMP inhibits the reaction. Optimum conditions different from the described method have been determined and measurements were performed in the presence of 10% (v/v) DMSO and 5 μ M donor substrate.

After the optimization of the conditions, inhibition of TG2 was validated with the literature-known inhibitor iodoacetamide and applicability of the substrates for TG2 inhibition assay was determined. Substrate-related molecules act as inhibitors were characterized. RW131/12 showed inhibition characteristics rather than substrate property due to the replacement of the ester moiety (cleaved by TG2) by an amide bond. Inhibition tendency of RW144/12 and RW145/12 were determined according to the assay. However IC₅₀ values have not been determined due to the structure's reported unstability.

Year : 2014

Number of Pages : 47

Keywords : Transglutaminase-2, substrates, inhibitors, activity assays, enzyme activity, continuous spectrophotometric analysis,

Yüksek Lisans Tezi

Gözde F. SARICAN

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

ÖZET

Transglutaminaz ailesinin bir üyesi olan doku Transglutaminazı (TG2, protein-glutamin gama-glutamilttransferaz 2, EC 2.3.2.13) hem fizyolojide hem patofizyolojide farklı roller almasıyla sonuçlanan birçok ilginç özellikliğe sahip, çoklu bölgeci bir enzimdir [1]. Görevlerinden bir tanesi proteine bağlı glutamin gruplarının Ca^{2+} bağımlı transamidasyon reaksiyonlarını katalizleyip, proteinin geri dönüşümsüz çapraz bağlanmasına yol açmaktadır.

İnflamasyon, yara iyileşmesi, hücre göçü, anjiyogenez ve apoptozis [2] gibi birçok fizyolojik sürece katılmaktadır ve etki ettiği hastalık aralığı oldukça geniştir. Tümör patofizyolojisine etkisi hala şüpheli görünse de [3], malign hücrelerdeki artışı kanıtlanmıştır [4].

Son zamanlarda TG2'nin çeşitli hücreli fonksiyonlarının aydınlatılmasındaki gelişmelere rağmen, hala akıllarda bazı sorular kalmaktadır. Bu nedenle TG2'nin patolojik koşullardaki hem kanıtlanmış hem de hala bilinmeyen yönleri, enzimi hedef alan inhibitörlerin ve görüntüleme problemlerinin geliştirilmesine ilgiyi arttırmaktadır[1].

Bu tez TG2 aktivitesini fluorosans bazlı (HTS) tayinle, fluorojenik sentetik substratlar kullanarak gerçekleştiren ve bu substratlarla ilişkili yeni inhibitörleri araştıran bir çalışmayı içermektedir. TG2 aktivitesini Gillet et al [5] tarafından tanımlanmış RW129/12 ile ve Dr. Reik Löser (Institute of Radiopharmaceutical Cancer Research, Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf, Almanya) tarafından sağlanan RW130/12 substratları ile belirlemeye yönelik bir sürekli florometrik analiz, 96

kuyucuklu mikrotabaka okuyucuda gerçekleştirilmiştir. Akseptör substrat olarak aminoasetonitril kullanılmıştır. 7-hidroksikumarin (HC), 7-hidroksi-4-metil-kumarin (HMC), TG2 ile substratların ayrı ayrı etkileşimi doğrultusunda salınan reaksiyon ürünleridir.

Var olan yöntemin validasyonu ile başlanan analizlerde proteinin belirtilen koşullarda çökelti oluşturduğu tespit edildi. Bunu gidermek amacıyla çözünürlüğü arttırmaya yönelik yöntemler uygulandı. Farklı çözücüler denenerek ve daha düşük substrat konsantrasyonlarında çalışılarak çökelmenin giderildiği optimum koşul belirlendi. TritonX-100 ve NMP kullanılsa bile az da olsa bir çökeltme olduğu gözlemlendi, ayrıca TritonX-100 ve NMP'nin varlığının reaksiyon verimini azaltıcı etki gösterdiği tespit edildi. Optimum koşulun, var olan yöntemden farklı olarak, %10 (v/v) DMSO kullandığı ve RW130/12 substratının $5\mu\text{M}$ 'ı geçmeyecek konsantrasyonlarında çalışılan koşullar olduğu belirlendi.

Yapılan optimizasyonların ardından, TG2 inhibisyonu referans inhibitör iyodoasetamid ile valide edildi ve substratların inhibisyon analizlerine uyarlanabilirliği tespit edildi. RW131/12'nin substrat özelliği göstermezken, substratlarda bulunan ester kısmının (TG2 tarafından kırılan) burada amid bağıyla yer değiştirmesi nedeniyle inhibitör özelliği gösterdiği bulundu. Yine denenen inhibitörlerden RW144/12 RW145/12'nin inhibisyona yatkınlıkları tespit edildi. Ancak IC50 değerleri yapıların stabil olmadığı raporlandığından hesaplanmadı.

Yıl : 2014

Sayfa Sayısı : 47

Anahtar Kelimeler : Transglutaminaz-2, aktivite deneyleri, enzim aktivitesi, inhibitörler, sürekli spektrofotometrik analiz.

TEŞEKKÜR

Öncelikle danışmanın Prof. Dr. Yeşim Yeşiloğlu'na desteği ve rehberliği için en derin teşekkürlerimi sunuyorum. Ayrıca hem danışmanımın hem de bölüm hocalarımın destekleyici görüşlerine ve eğitimine sahip olduğum için kendimi çok şanslı hissediyorum. Onların bilimsel yaklaşımları ve bilgileri hem aldığım derslerde hem de tezim esnasında bana her zaman bir rehber oldu.

Dr. Markus Pietsch'e tez çalışmamı bir Erasmus öğrencisi olarak laboratuvarında yürütme imkanı sunduğu için ve araştırmalarımın her aşamasında bana destek olup yol gösterdiği için teşekkürü bir borç bilirim. Bana karşı her zaman hoşgörülü, sabırlı ve cesaret verici olmuştur.

Köln Üniversitesi, Farmakoloji Bölümü yetkililerine özellikle de Prof. Dr. Stefan Herzig'e, bölümün tüm imkanlarından yararlanma olanağı sundukları, toplantılarına katılmamı sağladıkları ve beni aileden biri olarak gördükleri için teşekkür ediyorum.

Ayrıca Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf, Radyofarmasötik Kanser Araştırmaları Enstitüsü'nden Dr. Reik Löser'e rehberliği ve projeye katkılarından dolayı teşekkürü borç bilirim.

Meslektaşlarım Miriam Sheikh ve Michaela Steinkrüger'a da teşekkür etmeden geçemeyeceğim, yardımları ve desteklerini eksik etmedikleri için ve değerli bilgilerini, deneyimlerini benimle paylaşmaktan çekinmedikleri için ne kadar teşekkür etsem azdır.

Beni bu günlere getiren aileme sonsuz destekleri, cesaretlendirmeleri ve hayatımın her döneminde bana inanmayı bir kez olsun bırakmadıkları için tüm kalbimle teşekkür ederim. Son olarak tüm arkadaşlarıma sonsuz destekleri ve sabırları için çok teşekkür ediyorum.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
SEMBOLLER VE KISALTMALAR.....	viii
Tablolar Dizini.....	x
Şekiller Dizini	xi
BÖLÜM 1.....	1
1. GİRİŞ	1
BÖLÜM 2.....	3
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Enzim Sistemleri.....	3
2.1.1. Enzimlerin Sınıflandırılması	4
2.1.1.1. Transferazlar	5
2.1.1.1.1. Tek Karbonlu Grupları Aktaran Enzimler	5
2.1.1.1.2. Aldehit veya Keton Gruplarını Aktaran Enzimler	5
2.1.1.1.3. Açıl Transferazlar	6
2.1.1.1.4. Glikozil Transferazlar.....	6
2.1.1.1.5. Alkil ve Bununla İlgili Grupları Aktaran Enzimler.....	6
2.1.1.1.6. Azotlu Grupları Aktaran Enzimler (Transaminazlar).....	6
2.1.1.1.7. Fosfotransferazlar (Transfosforilazlar)	7
2.1.1.1.8. Sülfür ve Sülfotransferazlar	7
2.1.1.2. İzomerazlar	7
2.1.1.2.1. İnamoleküler Transferazlar	7
2.1.2. Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi.....	7
2.1.3. Enzim İnhibitörleri ve İnhibisyonu	9
2.1.4. Enzimler ve İlaçların Etkisi.....	10
2.1.5. Enzimlerden Hastalık Tanısında ve Tedavisinde Yararlanma	11
2.2. TG2'nin Yapısı ve Fonksiyonları.....	11
2.3. Transglutaminazların Reaksiyonları.....	14

2.4. Hastalıklar ve Hastalıkların TG2 ile İlişkisi	16
2.5. Kanser Biyokimyası	17
2.7. Prensibe Genel Bir Bakış	19
BÖLÜM 3.....	20
3. MATERYAL VE METODLAR	20
3.1. Materyaller.....	20
3.1.1. Kimyasallar	20
3.1.2. Cihazlar ve Diğer Materyaller	20
3.1.3 Hazırlanan Çözeltiler	21
3.1.3.1. Assay Tamponu	21
3.1.3.2. Enzim Tamponu	21
3.1.3.3 Enzim Çözeltileri, Diğer Stok Çözeltiler ve Hazırlanan Diğer Çözeltiler ...	21
3.2. Metod	22
3.2.1. Genel Prosedür	22
3.2.2. Floresans Katsayısı.....	24
3.2.3. Enzim Aktivitesi (Enzim Miktarı Optimizasyonu)	24
3.2.4. Km Değerinin Saptanması.....	25
3.2.5. Substrat Miktarı Optimizasyonu ve Çökelmenin Giderilmesi.....	25
3.2.6. İnhibisyon Çalışmaları.....	26
BÖLÜM 4.....	27
4. DENEY SONUÇLARI VE BULGULAR	27
4.1. Lineer Aralığın Belirlenmesi (Ürün Oluşumu).....	27
4.2. Enzim Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	28
4.3. Km-Değerinin Saptanması ve Çökelmenin Giderilmesi-Metod Optimizasyonu	30
4.4. İnhibisyon Çalışmaları.....	35
BÖLÜM 5.....	39
TARTIŞMA	39
KAYNAKLAR	41
ÖZGEÇMİŞ.....	47

SEMBOLLER VE KISALTMALAR

AH	: Alzheimer Hastalığı
AMC	: 7-amino-4-metil-kumarin
DMF	: <i>N,N</i> -dimetilformamid
DTT	: 1,4-ditiyotreitol
EDTA	: etilendiamin tetraasetik asit
et al	: et alia; ve diğerleri
HC	: 7-hidroksikumarin
HH	: Huntington Hastalığı
HMC	: 7-hidroksi-4-metil-kumarin
HTS	: yüksek verimli tarama (high throughput screening)
IC ₅₀	: %50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonu
K _m	: michaelis sabiti
MOPS	: 3-(<i>N</i> -morfolino) propan sülfonik asit
NMP	: <i>N</i> -metilpirolidon
PH	: Parkinson Hastalığı
RFU	: rölatif floresans birimi
RW129/12	: 4-(<i>N</i> -karbobenzoksi-L-fenilalanil-amino)bütrik asit kumarin-7-il ester
RW130/12	: 4-(<i>N</i> -karbobenzoksi-L-fenilalanil-amino)bütrik asit 4-metil-kumarin-7-yl ester
RW131/12	: 4-(<i>N</i> -karbobenzoksi-L-fenilalanil-amino)bütrik asit 4-metil-kumarin-7-il amid
RW144/12	: <i>N</i> -benziloksikarbonil-L-fenilalanin-3-(fenoksi-karbonilamino)propilamid
RW145/12	: <i>N</i> benziloksikarbonil-L-fenilalanin-3-(4-nitrofenoksi-karbonilamino)propilamid
SD	: standart sapma
SEM	: ortalama standart sapma (standard error of the mean)

TG2 : Transglutaminaz-2, doku transglutaminazı
U : birim (ünite)
 V_{\max} : maximum hız

Tablolar Dizini

Tablo 3.1. Deney Koşulları.....	23
Tablo 3.2. Enzim Aktivite Tayini İçin Deney Koşulları.....	25
Tablo 3.3. Çökelmenin Giderilmesi Deney Koşulları.....	26
Tablo 3. 4. İnhibisyon Çalışmaları Deney Koşulları.....	26
Tablo 4.1. Her bir reaksiyon ürünü için bağıl floresans birim değerleri.....	27

Şekiller Dizini

Şekil 2.1. TG2 tarafından katalizlenen genel bir reaksiyon.....	14
Şekil 2.2. İnsan TG2 ının kapalı ve açık konformasyonun X-ışını kristal yapıları.....	15
Şekil 2.3. İnaktif TG 2 proteininin Ribbon ve silindir diyagramı.....	16
Şekil 2.4 Transglutaminaz ile Katalizlenen Mekanizmalar.....	17
Şekil 4.1. RW130/12 için RFU faktörün belirlenmesi.....	28
Şekil 4.2. TG2 konsantrasyonunun belirlenmesi.....	28
Şekil 4.3. Donör substratlar RW129/12 ve RW130/12'nin yapısı.....	29
Şekil 4.4. RW129/12, RW130/12, ve RW131/12'nin substrat aktivitelerinin karşılaştırılması.....	30
Şekil.4.5. RW129/12 Substratının enzimli ve enzimsiz koşullarda harcanma hızını gösteren grafik.....	31
Şekil 4.6. RW129/12'nin substrat-ürün grafiği.....	32
Şekil 4.7. RW129/12'nin yüksek konsantrasyonlarının dahil edilmediği substrat-ürün grafiği.....	32
Şekil 4.8. RW129/12 Substratının ürün oluşturma grafiği.....	33
Şekil.4.9. Farklı çözücülerin farklı miktarları için zamana bağlı ürün oluşum grafiği...34	
Şekil 4.10. İyodoasetamitin inhibisyon grafiği ve IC50 değerleri.....	35
Şekil 4.11. İyodoasetamid'in yapısı.....	36
Şekil 4.12. RW131/12, RW144/12 ve RW145/12 moleküllerinin yapısı.....	36
Şekil 4.13. İyodoasetamidin İnhibisyon İstatistiği.....	37
Şekil.4.14. RW131/12'nin bağıl inhibisyon grafiği ve değerleri.....	37
Şekil.4.15. RW145/12'nin bağıl inhibisyon grafiği ve değerleri.....	43
Şekil.4.16. RW144/12'nin bağıl inhibisyon grafiği.....	44

BÖLÜM 1

1. GİRİŞ

Enzimler biyolojik katalizör olarak canlı hücrelerde çok önemli roller üstlenmiştir. Bu nedenle üzerinde çok çalışılan değerli ilaç hedefleridir. Bugün hali hazırdaki birçok ilaç, hastalık fenotiplerini bağdaştıran enzimleri inhibe ederek işlev gösterir Yüksek verimli tarama (HTS) uygulamaları için doğruluğu yüksek enzimatik analizlerin dizaynı, geliştirilmesi ve hayata geçirilmesi için enzim biyokimyasını ve enzim kinetiğini iyi kavramış olmak büyük bir önem taşır. Enzim kinetiğinde, analiz dizaynı için uygun substratların seçilmesi ve Km ile Vmax değerlerinin doğru tahmini, enzim hedeflerinin esas kinetik parametreleri gibi kavramlar ilaç keşifleri ve HTS analizlerin geliştirilmesi için son derece önemlidir [6,7].

Transglutaminaz ailesi, dokuları güçlendiren ağları oluşturmak için proteinleri çapraz bağlayıcı özelliğiyle bilinir [8]. Transglutaminazlar (TG) Ca²⁺-bağımlı çok domainli enzimlerdir, açıl transfer reaksiyonlarını katalizler, proteinlerin posttranslasyonel modifikasyonundan sorumludurlar [9]. Tek hücreli organizmalardan bitkilere ve memelilere kadar geniş bir alanda tanımlanmış enzimlerdir [10]. Doku transglutaminazı olarak da bilinen TG2 (EC2.3.2.13) proteinlerin Ca²⁺ ve tiyol bağımlı açıl transfer reaksiyonlarını [1], glutamin ve lizin yan zincirleri arasında moleküllerarası ve molekülüçi [11,12,8] izopeptid bağları oluşumunu katalizleyen, birden çok bölgeli ve çok fonksiyonlu bir enzimdir [13]. Bu enzimin hücre dışı matris formasyonu, integrin aracılığıyla sinyal ileme, ve sinyal aktarımını sağlayan 7-transmembran reseptörlerini kapsayan çeşitli biyolojik fonksiyonlarda rolü vardır. Normal fizyolojik koşullar altında

TG2'nin bir takım fonksiyonları halen belirsiz kalsa da, bu proteinin çölyak, nörolojik dejeneratif hastalıklar ve bazı kanser tipleri dahil birbirinden bağımsız birçok hastalığın patojenesisine katıldığı düşünülmektedir [9, 14, 1, 15].

TGların ilk olarak, 1950'li yıllarda memeli karaciğerinde bulunan enzimin homojenleştirilmesiyle, düşük moleküllü aminler ile bazı proteinlerin kalsiyum-bağımlı kovalent bağlarının katalizini ve bu reaksiyon ile amonyak salınımını gerçekleştirdiği keşfedilmiştir [16, 17]. Sonrasında TG enzim ailesine 9 üye katılmıştır, bunlar; TG1-7, faktor XIIIa ve enzimatik olarak inaktif olan eritrosit band 4.2'dir [18, 2]. Bu 9 üyeden TG2 (ayrıca doku transglutaminaz, transglutaminaz C, tTG, gibi adlandırmaları da mevcuttur), vücut dokularında en çok bulunandır ve çölyak sprue [19], Alzheimer, Parkinson, Huntington hastalığı [14] ve bazı kanser tipleri [20] gibi hastalıklarda rol oynaması nedeniyle aralarında en çok çalışılan ve biyolojik olarak en fazla karakterize edilendir [1, 21].

Sakat bırakıcı ve genelde ölümcül hastalıkları tedavide, TG2'nin enzimatik aktivitesini bloklayabilen küçük molekül ya da peptidomimetik inhibitörler tasarlanmakta ve biyokimyasal olarak karakterize edilmektedir [15].

BÖLÜM 2

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Enzim Sistemleri

Enzimler; canlıların hücrelerinde gerçekleşen, hücre içi ve hücre dışı etki gösteren biyolojik katalizörleridir. Enzimler hücre içinde, ilk enzimin reaksiyon ürünü kendisinden sonra gelen enzimin substratı olacak şekilde, birbirini izleyen bir sıra ile ve hep birlikte çalışırlar [22]. Biyokimyasal tepkimelerin daha hızlı gerçekleşmesini sağlarlar ve kendileri tepkime sonunda değişmeden kalır. Enzim sistemlerinin molekül yapıları oldukça karışıktır, bileşik ya da basit protein yapıdadırlar.

Enzimlerin en önemli özelliklerinden bir tanesi de yüksek spesifite göstermeleridir. Her enzim sadece bir çeşit reaksiyonu katalizler ve o reaksiyonun substrat (reaktan) ve ürünlerine karşı özel spesifite gösterir. Örneğin, tripsin enzimi bir polipeptidi daima lizin veya arjinin amino asitlerinin bulunduğu yerden keser. Kimotripsin ise aynı işi fenilalanin, tirozin ve triptofan bölgelerinden yapar [23].

Hücrede birçok enzim sentezlenir. Ayrıca, birçok enzim doku veya organ spesifitesi gösterirler. Yani, belli enzimler belli doku veya organlar tarafından daha çok sentezlenirler. Bazı enzimlerin hücrede sürekli üretilmesi gerekir (örneğin, enerji üretiminden sorumlu enzimler). Hücre termodinamik yapı ve fonksiyonunu bu şekilde korur. Diğer bazı enzimler ise ancak gerekli oldukları zaman yapılırlar (DNA replikasyonu için gerekli enzimler) [23].

En basit enzim sisteminde enzimlerden her biri sitoplazmada serbest molekül halinde bulunur, diğer bir deyişle, birbirleriyle fiziksel olarak birleşmiş (assosiye olmuş) değildirler ve reaksiyon esnasında da birleşmezler. Bu sebeple küçük moleküllü substratlar, difüzyon hızlarının büyük olması dolayısıyla, bir enzim molekülünden diğerine geçerken yollarını hızlıca bulabilirler [22]. Diğer bazı enzim

sistemlerinde enzimlerden her biri serbest olmayıp assosiyeye olmuşlardır ve hep birlikte enzim kompleksleri halinde faaliyet gösterirler [24]. Örneğin özellikle karaciğer ve yağ dokusu hücrelerinin sitosol kısmında yağ asidlerinin, asetil-CoA moleküllerinden sentezini kataliz eden (yağ asidi sentetaz) enzim sistemi birbirine sımsıkı bir şekilde bağlanarak demet teşkil etmiş yedi farklı tipte enzim molekülünden ibarettir. Bu kompleks ayrı enzim moleküllerine dissosiyeye olmaz ve kompleksteki enzim molekülleri tek başlarına aktivite göstermezler [25]. Enzim moleküllerinin dissosiyeye olmayan kompleks halinde bir sistem teşkil etmeleri, substrat moleküllerinin reaksiyon esnasında yayılmaları gereken mesafeyi sınırladığı için biyolojik bakımdan yararlıdır. Nitekim, yağ asidi sentetaz sistemi içinde ara ürün olarak meydana gelen substratlar kompleksten asla ayrılamazlar.

Birçok enzim sistemleri ise birbirlerine yanyana ve ayrıca herbiri zarlara veya ribozomlara bağlı olarak bulunurlar. Substrattan hava oksijenine elektron aktaran solunum zinciri enzimleri örnek olarak gösterilebilir, bu enzim moleküllerinden her biri mitokondrilerin iç zarına bağlıdır [22].

2.1.1. Enzimlerin Sınıflandırılması

Uzun zamandan beri bilinen birçok enzim hala onları bulan kişilerin ilk isimleriyle anılmaktadır. Örneğin pepsin, tripsin vb.. Bundan başka, enzimin etki ettiği substratın tipi de enzimin isimlendirilmesinde temel teşkil edebilir ve enzimler bu kelimenin son hecesi yerine veya sonuna –az veya –olitik eki getirilerek de adlandırılır. Örneğin amilaz, lipaz, proteinaz, veya amilolitik, lipolitik, proteolitik enzimler sırasıyla nişasta, yağ ve proteinlere etki ederler. Adlandırmada enzimin kaynağı da belirtilmelidir, örneğin (pankreas lipazı) veya (mide özsuyunun proteolitik enzimleri) gibi. Bununla beraber enzimler, genel olarak, kataliz ettikleri reaksiyonlara göre adlandırılır.

Uluslararası Biyokimya Birliği Enzim Komisyonu enzimleri, katalizledikleri ana reaksiyon tipine göre

- 1.Oksidoredüktazlar
- 2.Transferazlar
- 3.Hidrolazlar

4.Liyazlar

5.İzomerazlar

6.Ligazlar

altı ana sınıfa ve bu sınıfları da alt sınıflara ayırmıştır.

Bundan başka, aynı komisyon, enzimleri sistematik olarak numaralandırmıştır. Her enzimin numarası birbirinden nokta ile ayrılmış dört sayı içerir. Bu sayılardan birincisi enzimin adları geçen bu altı sınıftan hangisine ait olduğunu, ikincisi alt sınıfını, üçüncüsü alt-alt sınıfını gösterir. Dördüncü sayı ise enzimin özel adı içindir. Örneğin 3.1.2.1 sayıları asetil-CoA hidrolazın enzim komisyonu (EC) numarasıdır. Bu numaranın ilk sayısı (3) adı geçen enzimin hidrolazlar sınıfından, ikinci sayısı (1) hidrolazların ester bağlarına etki eden hidrolazlar alt sınıfından, üçüncü sayısı (2) tiolesterhidrolazlar alt-alt sınıfından ve dördüncü sayı (1) bu alt-alt sınıfının ilk enzimi olduğunu göstermektedir. Yine aynı sınıf, alt sınıf ve alt-alt sınıfa ait suksinil-CoA hidrolazın enzim komisyonu numarası 3.1.2.3 tür [22, 23].

2.1.1.1. Transferazlar

Bazı grupların bir bileşikten diğerine aktarılmasını kataliz eden enzimlerdir.

2.1.1.1.1. Tek Karbonlu Grupları Aktaran Enzimler

Metil (-CH₃), hidroksimetil (-CH₂OH), formil (-CHO) ve formimino (-CH=NH) transferazlardır. Bu grupların aktarılmasında rolü olan koenzim, tetrahidrofolik asittir. Bu enzimler özellikle purin, pirimidin ve aminoasit biyosentezinde önemlidirler.

2.1.1.1.2. Aldehit veya Keton Gruplarını Aktaran Enzimler

Transaldolaz dihidroksiaseton grubunun bir aldoza ve transketolaz ise glikolaldehit grubunun verici molekülden alıcı bir aldehite aktarılmasını kataliz eder. Her iki enzimin de glukozun pentoz fosfat yolunda yükseltgenmesinde rolü vardır [22].

2.1.1.1.3. Açıl Transferazlar

Asetil ve daha yüksek açıl gruplarını bir molekülden diğerine aktaran enzimlerdir. Bu enzimler özellikle lipid metabolizmasında önemli olup koenzim kısımları CoA'dır. Koenzim A molekülünün ucundaki tiol grubu enzimin aktif kısmıdır. Örneğin asetil -CoA'nın asetil grubunu diğer bir açıl -CoA'ya aktaran asetil -CoA açıltransferaz [22].

Açilin karbonil grubu CoA'nın sülfhidril (-SH) grubuna tiolester bağı oluşturmak üzere bağlanır. Meydana gelen bağ yüksek enerjili bir bağıdır.

2.1.1.1.4. Glikozil Transferazlar

Şeker birimlerini çeşitli alıcılara ve özellikle diğer bir karbohidratın -OH grubuna, bir fosfat birimine veya heterosiklik bir halkanın azot atomuna aktarırlar. Örneğin bir glukoz molekülünü glikojen zincirine aktaran enzim olan UDP-glukoz-glikojen glukoziltransferazdır. Buna çok defa glikojen sentaz da denir, kofaktörü UDP'tır [22].

2.1.1.1.5. Alkil ve Bununla İlgili Grupları Aktaran Enzimler

Özellikle karotenoidlerin, steroidlerin ve übikinonların biyosentezinde önemli rol oynarlar. Örneğin kolesterol sentezinde iki izoprenoid pirofosfat türevinin, pirofosfat ayrılması ve daha büyük moleküllü izopren türevlerini oluşturmak üzere kondansasyonu ile sonuçlanan birçok reaksiyon meydana gelir. Bu reaksiyonları katalizleyen enzime preniltransferaz adı verilir.

2.1.1.1.6. Azotlu Grupları Aktaran Enzimler (Transaminazlar)

Aminoasit ve protein metabolizmasında önemli rol oynarlar. Bu grubun en iyi bilinen enzimleri glutamatın amino grubunun, aspartat oluşturmak üzere, okzalasetata aktarılmasını kataliz eden glutamat-okzalasetat transaminaz (GOT) ve alanin oluşturmak üzere piruvata aktarılmasını kataliz eden glutamat -piruvat transaminaz (GPT)'dir [22,24].

2.1.1.1.7. Fosfotransferazlar (Transfosforilazlar)

Fosfat gruplarının bir molekülden diğerine aktarılmasını katalizleyen transfosforilazların özellikle karbohidrat metabolizmasında önemi vardır.

2.1.1.1.8.Sülfür ve Sülfotransferazlar

Kükürt (sülfür veya sülfü) ihtiva eden grupları bir molekülden diğerine aktaran enzimlerdir. Bu gruptaki enzimlerden bazılarının organizmada zehirsizleştirme reaksiyonlarında (örn. fenollerin sülfatla birleştirilmesinde) bazılarının ise bazı heteropolisakkaritlerin biyosentezinde rolleri vardır.

2.1.1.2. İzomerazlar

Substratın molekül içi değişikliklerini kataliz eden enzimlerdir. Rasemazlar ve epimerazlar, cis-trans izomerazlar, intramoleküler oksidoredüktazlar, intramoleküler transferazlar, intramoleküler ligazlar adlarını taşıyan alt sınıflara ayrılırlar:

2.1.1.2.1. İnamoleküler Transferazlar

Bu enzimler açıl, fosfat, amino vb. grupların molekül içinde bir yerden bir yere aktarılmasını kataliz ederler. Örneğin 2-fosfogliseratı 3-fosfogliserata tersinir olarak dönüştüren D-fosfogliserat 2,3-fosfomutaz ve metil-malonil-CoA'nın suksinil-CoA'ya çevrilmesi reaksiyonunu tersinir olarak kataliz eden metilmalonil-CoA CoA-karbonilmutaz [22].

2.1.2. Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi

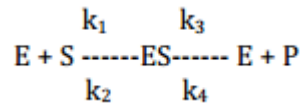
Enzimlerin doku ve hücrelerdeki konsantrasyonu son derece az olduğundan miktarlarını ölçmek çok güçtür. Bu nedenle, enzimin miktarı aktivite cinsinden ifade edilir. Aktivite genellikle ünite olarak verilir. Buna göre bir mikromol (10^{-6} mol) substratın, belirli ve özel şartlar altında, değişikliğe uğramasını kataliz eden enzim miktarına **bir ünite enzim aktivitesi** denir [23].

Aktivite ölçüsü için kullanışlı bir birim de spesifik aktivite'dir. Spesifik aktivite 1 mg enzim proteininin aktivitesidir. Spesifik aktivite herhangi bir enzim preparatının saflık derecesi hakkında fikir verir [26].

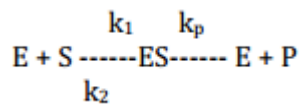
Her enzim kendine has spesifik bir aktiviteye ve dolayısı ile turnover sayısı (kcat)'na sahiptir. Bir enzimin turnover sayısı, 1 mol enzim tarafından dakikada çevrilen mol substrat sayısıdır (veya 1 µmol enzim tarafından dakikada çevrilen µmol substrat sayısıdır). Diğer bir deyişle bu sayı $V_{max}/[E]_t$ 'a eşittir ($[E]_t$ = ortamdaki toplam enzim, yani $[ES]+[E]$). Ancak, çoğu zaman bir enzime birden fazla substrat bağlanabilir, yani enzim, birden fazla katalitik bölge taşıyabilir. Bu durumda, esas turnover sayısı 1 mol katalitik bölge tarafından çevrilen mol substrat sayısı olarak ifade edilebilir.

Enzim reaksiyonlarının anlaşılması, enzim aktivitesi, bu aktivitelerin değişik şartlar altında (pH, ısı, inhibitör, vb) nasıl etkilendiğini aydınlatmak amacıyla enzimatik reaksiyonlar üzerine çalışmalar yapılır. Enzimle katalize olan bir reaksiyonda, enzimin etki edip bir ürüne (P) çevirdiği maddeye substrat (S) denir. Her enzim spesifik bir substratı işleyebilir. Enzim ile substrat arasındaki komplekse enzim-substrat kompleksi denir. Enzimler reaksiyon hızını milyonlarca kere arttırırken, reaksiyonların enerji seviyelerine ve hangi yönde olacaklarına etki etmezler.

Enzim olamadan bir reaksiyonun kimyasal katalizasyonu oldukça yüksek sıcaklıkları ($\gg 100$) ve ekstrem şartları (ör, H) gerektirir. Optimum ısılarda reaksiyonlar ancak enzimler aracılığı ile olur. Enzimler reaksiyona girecek maddenin (yani substrat veya reaktan) aktivasyon enerjisini düşürerek fonksiyon yaparlar. Substratın tranzisyon durumuna geçip ürüne dönüşmesi için gerekli enerji seviyesine aktivasyon enerjisi denir. En basit enzimatik reaksiyon, bir substratın bir ürüne (P) çevrildiği reaksiyon seklidir.



k_1 ve k_4 ES kompleksinin oluşma sabiteleri (her biri farklı değere sahiptir), k_2 ve k_3 ES kompleksinin ayrışma sabitelerine denk gelir ve bunlar da farklı değerlerdedir. Çoğu reaksiyonda $k_4 \ll k_3$ olduğundan, $k_3 = k_p$ olarak ifade edilir (k_4 ihmal edilecek derecededir). Dolayısı ile k_p (ürün oluşma sabitesi) ile yukarıdaki reaksiyon esas olarak



şeklindedir.

Bu son reaksiyondan enzim aktivitelerini bulmak için kullanılan eşitlik Michaelis Menten eşitliğidir.

$$v = V_{\max} [S] / (K_m + [S])$$

Burada K_m 'e Michaelis Menten sabiti denir. K_m reaksiyonun maksimum hızının (V_{\max}) yarısına eşit olan substrat konsantrasyonudur. Birçok enzim için K_m değeri 10^{-1} ila 10^{-6} M arasında değişir. Enzimatik reaksiyonlarda K_m en önemli reaksiyon sabitidir. Bu sabit ile reaksiyon hızı (v) ve substrat konsantrasyonu $[S]$ anlaşılabilir gibi, enzimin substrata olan ilgisi de anlaşılır. K_m değerinin bilinmesi ile hücre içi $[S]$ konsantrasyonunun belirlenmesi mümkündür [24].

Spesifik bir enzimin alternatif substratlarının bulunup bulunmadığını da K_m 'i bilmekle mümkün olur. Olanlardır. En düşük K_m 'e sahip reaksiyonlarda enzimin substrata olan ilgisi en yüksek derecededir. Dolayısı ile en spesifik enzimler en büyük V_{\max}/K_m oranına sahip olanlardır [23].

Bir enzimin etkisini arttıran maddelere bu enzimin **aktivatörleri**, daha doğru bir deyişle, **akseleratörleri** denir. Bu aktivatör veya akseleratörler çok defa inorganik iyonlar ve bazen de organik gruplardır. Propepsinin H^+ iyonları tarafından aktive edilmesiyle aktif şekli olan pepsin meydana gelir. Moleküllerinde etkili serbest sülfidril grupları içeren enzimler H_2S , KCN, glutation veya sistein gibi indirgen maddelerle aktive edilirler. Böyle enzimlere örnek olarak katepsinler, papain ve fibrini stabilize eden faktör gösterilebilir. Tükürük amilazını klorür, fosfatı magnezyum iyonları aktive eder. Enzimler de başka enzimlerin proenzimlerini veya kendi proenzimlerini aktif hale getirebilirler. Örneğin pepsin propepsini pepsine, enterokinaz protripsini tripsine çevirir [22].

2.1.3. Enzim İnhibitörleri ve İnhibisyonu

İnhibitörler bir enzimin etkisini azlatan maddelerdir. Enzim reaksiyonları ürünlerinden başka enzimleri inhibe eden birçok madde vardır. İnhibitörler **yarışmalı (kompetitif) inhibitörler, yarışmalı olmayan (kompetitif olmayan) inhibitörler ve diğer inhibitörler** olmak üzere gruplara ayrılabilir.

Yarışmalı inhibitörler, kimyasal yapıları bakımından substrata benzediklerinden enzimin karşısında substratla rekabet halindedirler. Yani enzimin normal substratla birleşeceğine ortamda bulunan inhibitör molekülleri ile birleşmesi

sonucu da (**enzim-inhibitör kompleksi**) meydana gelir. Bu tip inhibisyona **yarışmal inhibisyon** denir. Belirli bir reaksiyonda inhibisyon oranı normal substrat molekülleri ile inhibitör moleküllerinin enzime olan ilgilerine ve reaksiyona giren moleküllerin konsantrasyonuna bağlıdır. Kompetitif inhibisyon tersinirdir yani ortamda yeteri kadar normal substrat bulunursa inhibisyon geri döndürülebilir. Kompetitif inhibisyona örnek, malonik asidin suksinat dehidrojenazı inhibe etmesidir. Yapısı suksinik aside çok benzeyen malonik asid enzimle birleşerek **enzim-inhibitör kompleksini** meydana getirir [22].

Yarışmalı olmayan inhibitörlerin enzimle meydana getirdiği kompleks tersinmez olup bu inhibisyona **yarışmalı olmayan inhibisyon** adı verilir. Bu tip inhibisyon normal substrat konsantrasyonunun arttırılmasıyla geri dönmez. Kompetitif olmayan inhibitörlerin bazıları enzimin prostetik grubuna bazıları ise apoenzim kısmına etki ederler. Prostetik gruba etki edenlere örnek olarak CO, CN⁻ ve H₂S verilebilir. Bunlar prostetik grubu demir-porfirin kelat kompleksi olan enzimleri inhibe ederler. Yükseltgen ve indirgen maddeler de prostetik gruba etki ederek enzimleri inhibisyona uğratırlar.

Yarışmalı ve yarışmalı olmayan inhibitörlerden başka inhibitörler de vardır. Bazı proteinler bazı enzimleri inhibe ederler. Örneğin soya fasulyesinde ve diğer baklagillerin tanelerinde tripsini inhibe eden globulinler bulunur. Sindirimi güç olan yağlar, lipaz tarafından çok daha kolay sindirebilen yağların sindirimini inhibe ederler [22].

2.1.4. Enzimler ve İlaçların Etkisi

İlaçlar, hayvanların ve mikroorganizmaların metabolizmasını bozabildiğine göre, bu etkilerinin enzimlerle uzak veya yakından ilgili olması gerekir. İlaçların farmakolojik etkileri, çok defa enzim inhibisyonuna dayanır. Örneğin mikroorganizmaların üreme faktörleri ve bir koenzim olan folik asidi sentezlemeleri sırasında moleküle PABA yerine, yarışmalı inhibisyon sonucunda, sülfanilamidin girmesiyle koenzim inaktive olur. Folik asid sentezi durduğu için bakteriler üreyemez. Antibiyotikler de mikroorganizmaların, bazı enzim sistemlerini inhibe ederek, üremelerini önlerler. Narkotiklerin, dehidrojenazların aktivitesini azalttıkları bilinmektedir.

2.1.5. Enzimlerden Hastalık Tanısında ve Tedavisinde Yararlanma

Enzimlerden bazı hastalıkların tedavisinde yararlanıldığı gibi, enzimlerin nitel ve nicel analizlerinden tanı amacıyla da yararlanır. Bazı patolojik durumlarda hücrelerarası sıvısındaki veya kan plazmasındaki enzim düzeyi artar. Bunun sebebi enzim sentezinin artması olacağı gibi, hücre zarının geçirgenliğinin artması veya hücrenin parçalanması da olabilir. Kan plazmasında enzim düzeyinin belirlenmesi ile hastalık kolayca tanınabilir.

Pankreas iltihaplarında serum pankreas amilazı, prostat kanserlerinde serum asit fosfataz (optimum pH'sı 5) ve kemik hastalıklarında alkali fosfataz (optimum pH'sı 8-10) miktarları normal düzeyin üstüne çıkar.

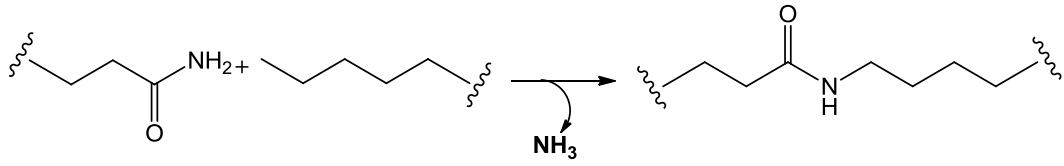
Kalp ve karaciğer vb. bozukluklarında laktat dehidrojenaz'ın, karaciğer bozukluğunda glutamat piruvat trasaminaz'ın, karaciğer hücrelerinin mitokondri bozukluklarında glutamat dehidrojenaz'ın, kalp kası infarktüsünde ve karaciğer hastalıklarında glutamat okzalasetat transaminaz'ın, kas distrofisinde ve kalp kası infarktüsünde kreatin kinaz'ın kan plazmasındaki miktarları artar vb...

Doğuştan veya kalıtsal enzim eksikliği veya yokluğu karbohidrat, lipid ve amino asit metabolizmalarında bozukluklara sebep olur. Fakat, eksik olan böyle bir enzimi yerine koymak suretiyle bir tedavi şekli henüz bilinmemektedir. Ancak sindirim bozukluklarının tedavisinde amilaz, pepsin, tripsin, lipaz vb. enzimlerden yararlanılmaktadır [22].

2.2. TG2'nin Yapısı ve Fonksiyonları

Transglutaminaz ailesi dokuları güçlendiren ağları oluşturmak için proteinleri çapraz bağlayıcı özelliğiyle bilinir [8]. Doku transglutaminazı olarak da bilinen TG2 ailesi (EC2.3.2.13) Ca^{2+} ve tiyol bağımlı açıl transfer reaksiyonlarını katalizler, izopeptid bağları oluşumuyla proteinlerin posttranslasyonel modifikasyonunu sağlar [1]. TG2, 80kD'luk bir enzim olup çeşitli yollarla Çölyak, kanser ve Huntington (HH), Alzheimer (AH), Parkinson (PH) gibi nörodejenaratif hastalıklara dahil olmaktadır [9]. İnsanda var olan transglutaminaz ailesinin 9 translutaminazından bir tanesidir [27]. Bir çok dokuda görülmektedir ve beyinde transglutaminaz ailesine ait diğer proteinlerden çok daha yüksek miktarlarda eksprese olmaktadır [28]. TG2 ağırlıklı olarak sitozolde eksprese olduğu gibi plasma ve nükleer membranlarda da bulunmaktadır [2].

TG2'nin birçok biyolojik fonksiyonu vardır, bunlardan başlıcaları açıl transferaz aktivitesi, hücre farklılaşmasında, apoptosiste ve diğer hücrel proseslerdeki rolüdür [29]. Ayrıca GTPaz olarak fonksiyon göstererek sinyal transductionda fosfolipaz C¹⁹ları aktive etmede rol oynamaktadır. Bunlardan farklı olarak serin proteazların kataliz reaksiyonlarına [27] benzer bir yolla kalsiyum bağımlı protein çapraz bağlanma reaksiyonlarını katalizlemektedir [8]. Özellikle glutamin ve lizinleri, lizinin ε-amino grubu ile glutaminin γ-karboksamid grubundan çapraz bağlar ve ürün olarak amonyak salınır (Şekil 2.1.).

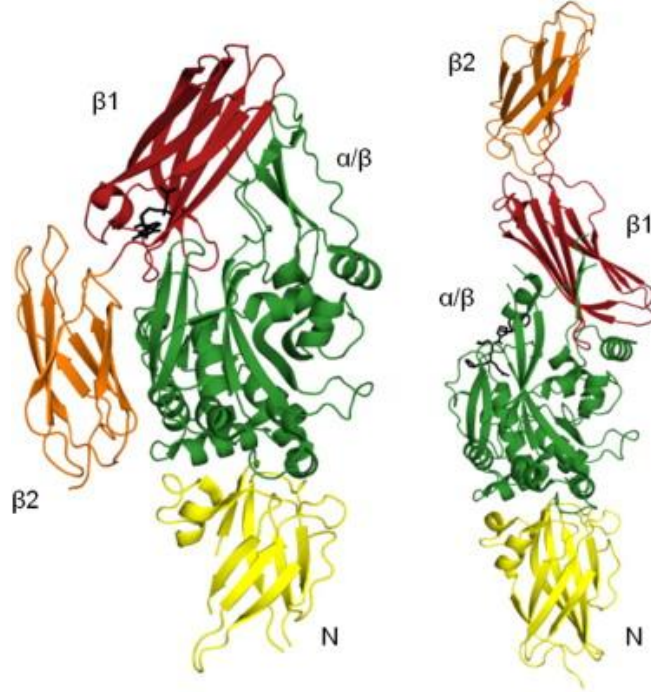


Şekil 2.1. TG2 tarafından katalizlenen genel bir reaksiyon

Spesifik glutamin zincirlerinde transamidasyon (amin katılımı, lizin residülerine çapraz bağlanma, açılasyon) esterifikasyon ve hidroliz (deamidasyon, isopeptid ayrılması); bunun gibi, glutaminin c-karboksamid grubu ile epeptit bağı lizinin e-amino grubu arasındaki Ca²⁺ bağımlı oluşumlar, faktör XIIIa tarafından fibrin pıhtılarının stabilizasyonu için son derece önemlidir [16, 30].

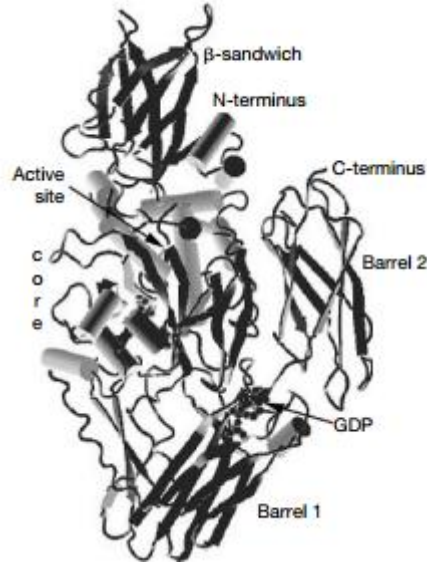
TG2 nin yapısı ve enzimatik mekanizması kristalografik çalışmalarca aydınlatılmıştır. TG2 belli başlı 4 bölge içermektedir, amin terminalinde bir β-sandviç bölgesi, bir katalitik iç bölgesi core domaini ve karboksi terminalinde iki β-tabaka bölgesi [31]. Bu enzim ailesinin üyeleri birbirlerine çok yüksek benzerlik göstermekle beraber, en büyük farklılıkları ağırlıklı olarak iki bölge üzerindedir [31, 32]. Katalitik iç bölgesi iki aktif bölgeye sahiptir, bunlardan biri katalitik triad olarak Asp358, Cys277, ve His335 [31, 33] den oluşan transamidaz aktivitesinden sorumluyken, Lys173, Phe174, Arg476, Ser482, Met483, Arg478, Val479, Arg580, ve Tyr583 residülerini [29] içeren diğeri β-tabaka bölgesi olarak bir GTPaz bölgesidir[34]. TG2'nin ayrıca transglutaminaz enzim ailesinin diğeri üyelerinden farklı olarak GTPaz aktivitesi bulunmaktadır [29] ve G-proteinleri gibi sinyal iletim yolağında görev almaktadır [2].

Kritik olarak GTP ve GDP bağlanmaları TG2'nin transamidaz aktivitesini inhibe eder [15, 29]. Kalsiyum bağlanması da enzimin katalitik aktivitesini inhibe etmektedir ve GTP-bağlanma kapasitesi ayrıca kalsiyum bağlanma kapasitesi ile de kontrol edilmektedir [2, 31].



Şekil 2. 2. hTG2'nin kapalı (solda) ve açık (sağda) konformasyonunun X-ışını kristal yapıları [1]

Enzimin bir kapalı bir de açık konformasyonu olmak üzere belli başlı iki konformasyonu bulunmaktadır, açık konformasyonu peptidik substratlarca stabilize hale gelir [8] İnsan TG2 enziminin açık ve kapalı konformasyonun X- ışını kristal yapıları Şekil 2.2.'de gösterilmiştir. Kapalı konformasyonda GDP ile ve açık konformasyonda peptidik inhibitör Ac-P(DON)LPF-NH₂ (DON: 6-diazo-5-okso-L-norlösin) ile kompleks yaptığı durum bir grafik sistem yardımıyla oluşturulmuştur [1].

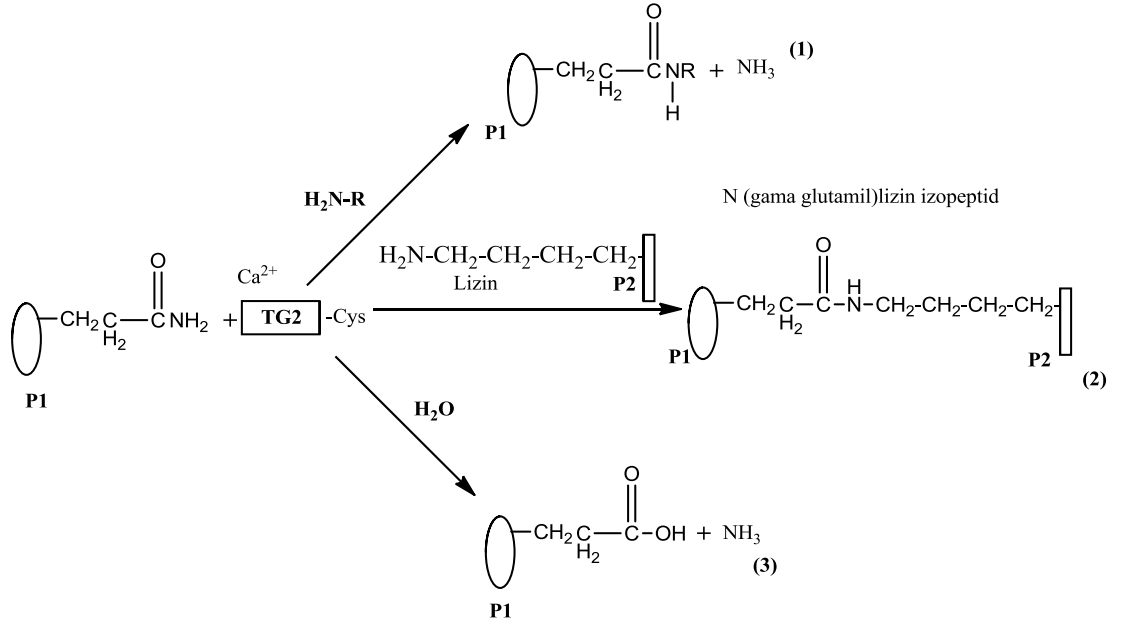


Şekil 2.3. İnaktif TG 2 proteininin Ribbon ve silindir diyagramı

Şekil 2.3.'de inaktif TG2 yapısı görülmektedir. GDP bağlı ve Ca^{+2} içermeyen. β -dizileri şeritlerle, α -heliksler silindirlerle gösterilmiştir. Mobil terminaller ve bağlantı ilmekleri X-ray difraksiyon modeli ile çok zayıf olarak gözlenir ya da hiç belirlenemez [10].

2.3. Transglutaminazların Reaksiyonları

TG, primer aminleri, glutamin kalıntılarını γ -karboksilamid grubu ile farklı primer aminler arasında katalizleyerek birleştirir. Eğer ortamda amin yoksa, enzim, su moleküllerini kullanarak açıl transferiyle glutaminin deamidasyonunu gerçekleştirir. ϵ -lisindeki çapraz bağlar molekül içi ve molekül dışı olabilir ve özellikle lizin ve glutamin içeren proteince zengin gıdalarda fiziksel değişikliklere neden olabilmektedir [10]. TG aynı zamanda proteinlerdeki diğer bağlara da etki edebilmektedir (örneğin et ve soya proteinleri, kazein ile gluten arasındaki bağlar). Bunun yanında TG, polifenoloksidaz ve lipoksigenaz eklendiğinde enzimlerin sülfidril ve disülfid bağlarına etki ederek çapraz bağ dizilimini oluşturabilmektedir [9, 10, 35].



Şekil 2.4 Transglutaminaz ile Katalizlenen Mekanizmalar 1) Açıl transfer 2) Protein veya peptidlerde Gln Lsn çapraz bağlantısı 3) Deamidasyon

TGlar, proteinlerin içinde glutamin ve lizin arasında kalan kısma izopeptid bağlarla bağlanarak, hücre içi ve hücreler arası kovalent çapraz bağlar meydana getirirler [36]. Proteinlerin çapraz bağlanması yüksek molekül ağırlıklı polimerlerin oluşmasına sebep olur. Bu reaksiyonun yanı sıra TG tarafından katalizlenen iki reaksiyon daha vardır.

Bunlardan birincisi; TGların primer aminlerin bulunduğu ortamlarda proteinin glutaminlerini aminlere çapraz bağlayabildiği açıl transfer reaksiyonlarıdır.

İkincisi ise; lizin ve primer aminlerin bulunmadığı ortamlarda suyun nükleotid gibi reaksiyona girmesi ve glutaminlerin deaminasyonudur. Bu üç TG reaksiyonu gıda proteinlerinin fonksiyonel özelliklerini modifiye etmede kullanılır.

TG enzimi proteinlerin modifikasyonunda yukarıda da belirtildiği gibi genel olarak üç önemli reaksiyonu katalizlemektedir;

- Peptid veya proteine bağlı glutamin'in karboksiamid'i ile primer amin arasında açıl transfer reaksiyonunu katalizler,
- Protein veya peptidlerin glutamin ve lizin amino asitleri arasında glutamin-lizin çapraz bağının (G-L bağı) oluşumunu katalizler,

- Ortamda uygun bir primer amin bulunmaması veya lizin'in amin grubunun belirli ajanlarla bağlanması durumunda suyun kullanımını katalizlemektedirler [37, 38].

2.4. Hastalıklar ve Hastalıkların TG2 ile İlişkisi

TG2'nin en baskın fonksiyonlarından biri olan proteinleri çapraz bağlayıcı aktivitesi hem yaraların iyileşmesinde hem de nörodejeneratif hastalıklarda ayrı ayrı kendini göstermektedir. Moleküllerarası çapraz bağlanmanın yararlı etkileri olduğu gibi bir takım zararlı etkileri de mevcuttur [39, 40]. Bir yandan proteinlerin çapraz bağlanması dokuları güçlendirirken, yaraların iyileşmesine yarar sağlayan degradasyonu zorlaştırmaktadır [41]. TG2 ekspresyonu yaralanma sonrası çözünmeyen çapraz bağlı yapıların oluşumuna aracılık eder [42].

Bu çapraz bağlayıcı fonksiyon aynı zamanda bir diğer yandan nörodejeneratif hastalıklarda potansiyel problemlere sebep olur. Nörodejenerasyonun karakteristik özelliklerinden biri beyinde protein agregatlarının oluşumudur. AH, HH ve PH olan hastaların post mortem beyin dokusunda TG2 aktivitesinin artış gösterdiğini kanıtlayan çalışmalar, bu enzimin nörolojik bozukluklarla ilişkisi olduğunu göstermektedir [43].

TG2 ek olarak PH ile ilişkili bir protein olan α -sinükleini polimerize eder [44], bu proteinin 6 adet glutamin residüsü bulunmaktadır, TG2 çok büyük olasılıkla bu bölgelerde bir ya da birden fazla bağlanmayı katalizleyerek polimerizasyona sebep olmaktadır. TG2'nin α -sinükleinde hem moleküller arası hem de molekül içi çapraz bağlanmayı katalizlediği gösterilmiştir

TG2 ayrıca alerjik hastalıkların oluşunda da bir takım rollere sahiptir. Buğday alerjisi; buğday proteinlerine karşı oluşan immünolojik bir reaksiyondur. Deri, gastrointestinal bölgesini veya respiratuvar bölgeyi tetikleyen klasik yiyeceklerden kaynaklı alerjidir. Baker's astım, rinit ve kontakt ürtiker görülür. Bu hastalıkların patogenezinde IgE antikorları rol oynamaktadır.

Baker's astımı ve rinit tahıl unu veya tozunun inhalasyonu ile oluşan alerjik bir reaksiyondur. Teşhis genellikle deri prick testi ve serumda spesifik IgE testlerinin bulunması ile konur.

Bununla birlikte, Baker's astımında IgE ile bağlanan; buğday aglutinin, peroksidaz ve non-spesifik lipid transfer proteinleri (LTPs) gibi buğdayda bulunan başka proteinler de saptanmıştır.

Gluten Enteropatisi (Çölyak Hastalığı, ÇH); genetik olarak duyarlı kişilerde başlıca buğdaydaki gluten ve arpa, çavdar, yulaf gibi tahıllardaki gluten benzeri diğer tahıl proteinlerine karşı kalıcı intolerans olarak gelişen proksimal ince bağırsak [40] hastalığıdır. Otoimmün mekanizmalar ile gelişir, başlangıç testi olarak insidansının TG2'ye karşı IgA antikorlarının ölçümü tavsiye edilir. Dermatitis Herpetiformis ise; çölyak hastalarında; kızarıklık, kabarma ve patolojik IgA birikintileri şeklinde kendini gösteren deri hastalığıdır. Glutene Bağlı Ataksi, gluten sensitizasyonu için pozitif serolojik markerler içeren idiopatik sporadik ataksi'dir. Çölyak gibi otoimmün bir hastalıktır, beyincik hasarına ve ataksiye yol açar.

Orta çağlara kadar yetiştirilen ve genelde insanlar için kullanılan *Triticum monococcum* ve *T. dicoccum* gibi buğday türleri 33-mer denilen çok zararlı gluten peptidten daha az içermektedir.

İnsan organizması bu protein kompleksinin zararlı etkilerine açıktır. Protein özellikle de gastrointestinal ve immünolojik tepkilere neden olmaktadır. Özellikle Avrupa orjinli toplumlarda gluten en çok kullanılan yiyecek tipidir. Avrupa'da genel nüfusun günlük ortalama gluten kullanımı 10- 20 g arasındadır ve günlük 50 g ve üstünde tüketenler de mevcuttur. Bu yüzden tüm bireyler, hatta düşük risk grubunda olanlar bile, hayatlarının bir döneminde herhangi bir çeşit gluten reaksiyonu göstermeye yatkındır. Son 50 yıl içinde epidemik denilecek kadar çok sayıda Çölyak Hastasına, özellikle yeni tanımlanan GS'ne (gluten sensitivesi-duyarlılığı-) şahit olmamız hiç şaşırtıcı değildir.

2.5. Kanser Biyokimyası

Organ veya organizmanın büyümesi ile ilgili faktörler 3 ana sınıfta incelenbilir:

1. Mitojenler: Hücre döngüsünü negatif yönde etkileyen kontrolleri kıyarak hücre bölünmesini stimüle ederler.

2. Büyüme faktörleri: Protein ve diğer makromoleküllerin sentezini arttırıp yıkılmalarını azaltarak hücre büyümesini stimüle ederler (hücre kütlesinde artış).

3. Hayatta kalma faktörleri: Hücrenin yaşamasını indüklerken apoptosisi baskırlar

Birçok kanser tipi telomeraz aktivitesine sahiptir. Böylece, kanser hücreleri "senescence (yaşlanmayı)"i atlarlar ve ölümsüzlük "immortalite" kazanırlar.

Telomeraz inhibisyonu kanser tedavisinde gelecek vaadeden ve araştırılan yeni bir yöntemdir.

Somatik hücrelerin çoğunda telomeraz enziminin bulunmaması, kanser gibi kontrolsüz hücre çoğalması gösteren hastalıkların tedavi edilebilmesi yönünde yeni araştırmaların yapılmasını sağlamıştır. Kanser hücreleri normalde telomeraz enzimi taşırlar ve dolayısı ile bu hücreler bölündükçe telomer fonksiyonunda bir bozukluk veya azalma olmaz. Bunun sonucu olarak kanser hücreleri replikatif yaşlanma göstermezler. Telomeraz geninin normal fibroblast hücrelerine klonlanıp ekspresyonunun yapılması kanserli hücrelerdeki gibi bir durumla kendini göstermiştir.

İnsan somatik hücrelerinin tersine, normal kemirici (rodent) hücreleri telomeraz aktivitesine sahip olup replikatif yaşlanma göstermezler. Ancak, bu hücrelerin de bölünmesi değişik mekanizmalarla belli sayıdan sonra durur. Bu kontrol noktalarını inaktive eden mutasyonlar oluşturulduğunda hücreler ölümsüz (ing. immortal) yapılabilir [25].

Hücre dışı büyüme faktörleri hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanarak hücre içi sinyal yollarını aktive eder ve böylece hücrenin büyümesini stimüle ederler. Bu sinyallerle proteinler ve diğer makromoleküller birikir. Aynı zamanda bu sinyallerle hücre içi protein ve diğer makromoleküllerin parçalanması da baskılanır. Bunun sonucu olarak hücre büyür ve belli bir büyüklük ve kütleyle ulaşıncaya bölünür.

Son yıllarda bazı kanserlerin bu şekilde, yani epigenetik faktörlerle ilgili oldukları ve DNA'da bir hasar olmadığı halde ortaya çıktıkları belirlenmiştir. Ancak, kanserlerin çoğunun DNA dizisinde meydana gelen değişimler sonucu ortaya çıktığı kabul edilmektedir. Kansere sebep olan birçok kimyasal ve fiziksel maddenin (kanserojen) aynı zamanda genetik değişimlere de (DNA'da mutasyonlara) neden olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle kanserojen maddelerle mutajen maddeler arasında önemli ilişki vardır. Dolayısı ile, kanser genetik bir hastalıktır ve somatik hücrelerde meydana gelen mutasyonlar sonucu ortaya çıkarlar [25].

Hatta mutajenlerden arındırılmış bir ortamda bile spontan mutasyonların ortaya çıktığı belirlenmiştir. Örneğin, DNA replikasyonu ve tamirindeki kısmi hatalardan dolayı her gen için hücre bölünmesi başına milyonda bir mutasyon (10⁻⁶) ihtimali vardır. Bu nedenle bir insanda hayat boyu, her gen 1010 kez mutasyona uğrayabilir.

Açıkça görülmektedir ki, eğer her mutasyonla genin fonksiyonu değişseydi bizim yaşayan canlılar olarak devam etmemiz mümkün olmayacaktı.

İnsan kanserlerinin önemli kısmı dramatik şekilde artmış bir mutasyon oranına sahiptir. Yani, bu hücreler genetik olarak oldukça karasızdırlar. Bu durum bu hücrelerin lokal DNA hasarlarını düzeltme yeteneklerindeki azalmada ve kromozom bütünlüklerini korumadaki gevşekliklerinden kaynaklanır [48, 49, 50].

2.7. Prensibe Genel Bir Bakış

Bu çalışmanın amacı Gillet ve arkadaşları [5,10]nın uyguladığı metodun, farklı donör substrat ile TG2 inhibisyon çalışmasına uygulanabilirliğini analiz etmek, metodu bu enzim için inhibitör etkisi bilinen iyodoasetamid [51] kullanarak optimize edip inhibisyon potansiyeli olan yeni molekülleri araştırmak için bu çalışmaya uygulamaktır.

BÖLÜM 3

3. MATERYAL VE METODLAR

3.1. Materyaller

3.1.1. Kimyasallar

Tüm kimyasallar Sigma-Aldrich (Schnelldorf Almanya), Carl Roth (Karlsruhe, Almanya), ve Alfa Aesar (Ward Hill, ABD)'den temin edilmiştir. İleri saflaştırma gerekli değildir.

RW129/12, RW130/12, RW131/12, RW144/12, RW 145/12 maddelerinin sentezi, Radyofarmasötik Kanser Araştırma Enstitüsü, Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf, Almanya'da Dr. Reik Löser ve araştırma grubu tarafından yürütülmüştür.

Gine domuzu karaciğeri TG2'ı ilk olarak Sigma-Aldrich'den (0.9 U /mg katı, 4.6 U/mg protein, 2 ünite) ve sonra Zedira (Darmstadt, Germany)'dan (0.31 mg protein içeriği, 5.3 U viyal içeriği, 17.2 U /mg spesifik aktivite) temin edilmiştir .

3.1.2. Cihazlar ve Diğer Materyaller

Bütün ölçümler, bir multimod mikrolaka okuyucusu Synergy™ 2, BioTek (Bad Friedrichshall, Almanya) ile şeffaf F-dipli kuyucuğa (Wertheim, Almanya) sahip BRANDplates® 96 kuyucuklu mikrolakalarda gerçekleştirilmiştir. Ön seyreltme için Eppendorf (Hamburg, Almanya) pipetler kullanılmıştır. Farklı hacimlerdeki pipet uçları Sarstedt (Nümbrecht, Almanya)'dan satın alınmıştır. Gilson Inc. (Middleton, ABD)'den temin edilen Gilson DISTRITIPS® şırınga ile birlikte kullanılan Gilson DistriMan® isimli stepper, çözeltileri kuyucuklara pipetlemek için kullanılmıştır.

Ölçülen veriler Gen5 (BioTek Winooski, ABD) programı yardımıyla kaydedilmiştir. Daha sonra, GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, ABD) ve Excel 2007 veya 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, ABD) programları kullanılarak analizi gerçekleştirilmiştir. Diğer kullanılan araçlar; Laboratuvar tipi pH metre (Metrohm- Herisau, Switzerland), su banyosu, derin dondurucu (-80 ° C), hassas terazi, terazi, ısıtıcı ve manyetik karıştırıcı, vorteks, milipore membran. Su, Millipore BIOCELL sistemi kullanılarak saflaştırılmıştır

3.1.3 Hazırlanan Çözeltiler

3.1.3.1. Assay Tamponu

Bütün ölçümler için standart bir stok çözeltisi, deney tamponu olarak 1 litre saf su içerisinde 100 mM MOPS, 3 mM CaCl₂, 50 µM EDTA kullanılarak hazırlanmıştır. Tamponun pH değeri 8.0'e ayarlanmış, milipore membranlar kullanarak filtre edilmiştir. 0 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.1.3.2. Enzim Tamponu

Enzim tamponu, 100 mL saf su içinde 100 mM MOPS, 3 mM CaCl₂, 10 mM DTT, % 20 (V / V) gliserol içerir. Milipore membranlar kullanarak filtre edilmiş ve 0 °C de muhafaza edilmiştir.

3.1.3.3 Enzim Çözeltisi, Diğer Stok Çözeltiler ve Hazırlanan Diğer Çözeltiler

Enzim tamponu ile hazırlanan TG2 stok çözeltisi (1 mg / mL), 25 µL'lik parçalar halinde bölünmüş ve -80 °C'de saklanmıştır.

HC, HMC ve AMC (herbiri 10 mM) stok çözeltileri her ölçüm için ayrı ayrı DMSO içinde taze bir şekilde hazırlandı. Stok çözeltileri; RW 129/12, RW 130/12 ve RW 131/12 (herbiri 10 mM) ve aminoasetonitril (20 mM) deney koşullarına göre ya DMSO ya DMF ya da NMP içinde hazırlandı veya 20-30 µL'lik bölümlere ayrıtıp -80 °C'de saklandı.

İyodoasetamid, RW144/12, RW145/12 (her biri 10 mM) stok çözeltileri, %10 (V / V) DMSO içinde taze olarak hazırlanmıştır.

Deney tamponu stoğunda % 0.2 Triton X -100 çözeltisi, % 1 (v/v) Triton X -100 çözeltisinden başlanarak hazırlandı. 0 °C'de saklandı.

Bütün ölçümler, % 5 veya % 10 (v/v) DMSO varlığında, 30 °C 'de yapılmıştır.

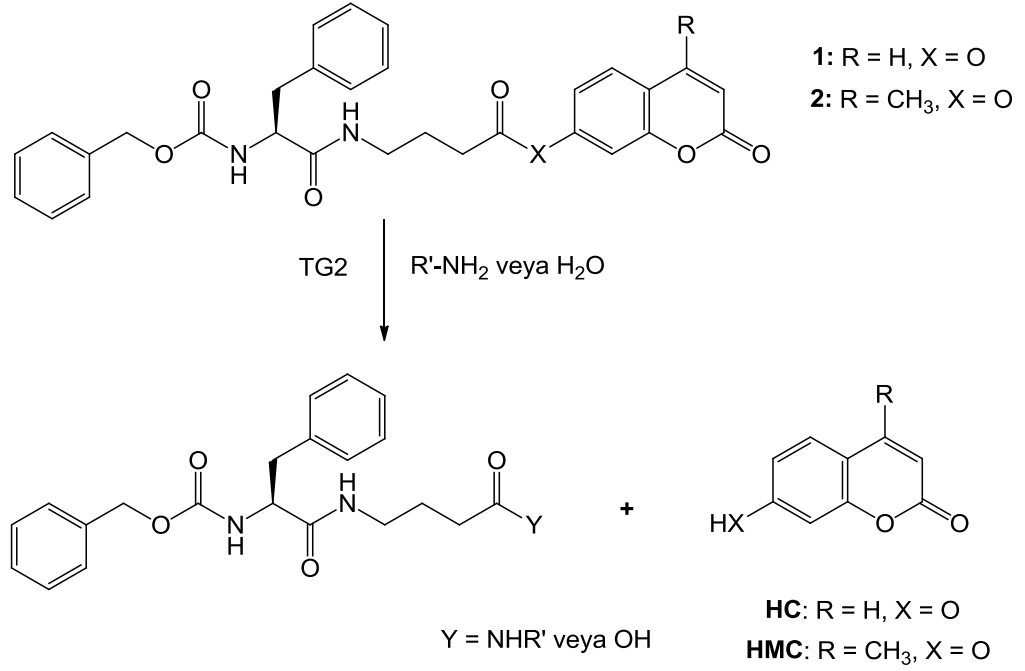
3.2. Metod

Bu çalışmada Gillet et al [5] tarafından tanımlanmış bir metod, doğrudan ve sürekli bir florometrik yöntem ile TG2 aktivitesini ve yeni poliamin donör substratlar ile belirlemek ve yeni inhibitörleri araştırmak üzere deneye uygulanmıştır. Metodun prosedürü aşağıda açıklanmaktadır.

3.2.1. Genel Prosedür

Deney dizaynı donör substratlar ile akseptör substratlar arasındaki TG2-katalizli reaksiyondan çıkan ürün miktarının ile zamana karşı ölçülmesi prensibine dayanır. Bunun için, bir transparan F-tabanlı 96 kuyucuklu plaka ile kombine haldeki çoklu mod mikropilaka okuyucusu, florometrik ürünleri görüntüleme için kullanılmıştır.

İlk olarak reaksiyon ürünlerini karşılayan yapılar (HC, HMC, AMC) ayrı ayrı test edilerek, RFU değerleri hesaplanır. Analizler gine domuzu karaciğeri TG2'ı ile ve farklı substratlar kullanarak gerçekleştirip, geçerliliği literatürde [5] RW129/12 (akseptör substrat olarak da aminoasetonitril kullanılmıştır) substratıyla yapılan ölçümlerle karşılaştırılarak kanıtlanmıştır. Donör substrat RW129/12'nin amin substratıyla TG2-katalitik reaksiyonu sonucu floresans özellikteki 7-hidroksikumarin salınır. Ayrıca, RW129/12'de olduğu gibi, Dr. Löser tarafından temin edilen RW130/12 ve RW131/12 donör substratlarının aminoasetonitril ile reaksiyonu sonucu sırasıyla yine floresans özellikteki 7-hidroksi-4-metil-kumarin (HMC) ve 7-amino-4-metil-kumarin (AMC) salınır. Ölçümlerde bu ürünlerin floresans özelliğinden yararlanılmaktadır. Bütün geçerli deneyler 10% (v/v) DMSO varlığında, 30 °C'de gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonun temel özellikleri ve analiz prensibi Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. TG2'nin transamidaz aktivitesinin tayini için floresans deneyi

Zamanla 7-hidroksikumarin (HC), 7-hidroksi-4-metilkumarin (HMC) ve 7-amino-4-metil-kumarin (AMC) salınımları ile floresansın artışı ölçülmektedir. Aynı prensip inhibitörlerle yapılan çalışmalar için de geçerlidir (Kullanılan TG2, guinea pig (gine domuzu) karaciğeri TG'ıdır.).

Tablo 3.1. deneyde kullanılan çözeltilerin her bir kuyucuk içindeki hacimlerinin genel ifadesidir.

Tablo 3.1. Deney Koşulları

Deney karışımı (her bir kuyucuk 5 % DMSO 10 % DMSO için)

<i>Deney tamponu</i>	<i>180 µL</i>	<i>170 µL</i>
<i>Donör Substrat</i>	<i>5 µL</i>	<i>10 µL</i>
<i>Akseptör Substrat</i>	<i>5 µL</i>	
<i>TG2(tamponda) ya da Enzim</i>	<i>10 µL</i>	<i>10 µL</i>
<i>tamponu</i>	<i>-</i>	<i>10 µL</i>
<i>DMSO</i>		
<i>Toplam</i>	<i>200 µL</i>	<i>200 µL</i>

3.2.2. Floresans Katsayısı

Floresans katsayılarını belirlemek amacıyla, enzim reaksiyonundan serbest bırakılan ürünler ölçülmüştür. Deneyler, 200 µL'lik hacime sahip mikropılaka kuyucuklarda yapılmıştır. Deney tamponunun 180 µL'si, DMSO içinde 10 µL hidroksikumarin çözeltisi ve 10 µL enzim tamponu içermektedir. HC konsantrasyonu 2-20 µM aralığında bulunur, kuyucuktaki karışım ise % 5 DMSO konsantrasyonuna sahiptir. Deney HMC ve AMC için ayrı ayrı tekrarlanmıştır. Optimal koşullar belirlendikten sonra deney % 10 DMSO (170 µL deney tamponu 10 µL HMC, 10 µL enzim tamponu, 10 µL DMSO) içinde HMC için tekrarlanmıştır. Tablo 3.1'de floresans katsayısı tayini için kullanılan deney koşulları gösterilmektedir.

3.2.3. Enzim Aktivitesi (Enzim Miktarı Optimizasyonu)

Enzimin optimal konsantrasyonunu saptamak amacıyla öncelikle anlamlı değerler verdiği aralığı bulmak için 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 3.33, 10 µg/mL enzim konsantrasyonlarında her kuyucukta 400 µM aminoasetonitril, 30 µM donör substrat. olan %5 hem %10 DMSO ile ayrı ayrı çalışılmıştır (donör substrat olarak her iki substrat da ayrı ayrı kullanılmıştır) Ardından lineer aralığı saptayarak uygun enzim konsantrasyonunu bulmak amacıyla "0,25, 0,50, 1,00, 2,00" and "2.0, 1,6, 1,4, 1,2, 1,0, 0,8, ,0,4, 0,2, 0,1" µg/mL enzim konsantrasyonlarında yukarıda belirtilen koşullarda çalışılmıştır. Tablo 3.2.'de verilen hacimlerde çözeltiler kullanılarak, ve spontane hidrolizi de gözlemleyecek şekilde (enzimli ve enzimsiz) analiz gerçekleştirilmiştir. Donör substrat olarak RW129/12 ve RW130/12 ayrı ayrı kullanılmıştır ve akseptör substrat aminoasetonitrildir. Donör substratların yapısı Şekil 4.6'da gösterilmektedir. Donör substrat konsantrasyonu ilk analizler için 30 µM iken, optimizasyon sonrası 20 ve 5 µM'a düşürülmüştür.

Tablo 3.2. Enzim Aktivite Tayini İçin Deney Koşulları

<i>Assay karışımı (her bir kuyucuk için)</i>	<i>10 % DMSO</i>
<i>Assay tamponu</i>	<i>170 μL</i>
<i>Akseptör substrat</i>	<i>5 μL</i>
<i>Donör substrat</i>	<i>5 μL</i>
<i>TG2 (tamponda) ya da Enzim tamponu</i>	<i>10 μL</i>
<i>DMSO</i>	<i>10 μL</i>
<i>Toplam</i>	<i>200 μL</i>

3.2.4. Km Değerinin Saptanması

Km değerini saptamak için yapılan çalışmalarda da Tablo 3.2.'deki hacimlerde çalışılmıştır. Akseptör substratın hacmi değişmezken donör substrat hacimleri ayrı ayrı 10 mM'dan 5 mM'a seyreltilerek ve kuyucuktaki konsantrasyonu 70 μ M'dan 5 μ M'a inecek şekilde seyreltilmiştir. Ölçümler için gereken 2 μ g/mL'lik TG2 çözeltisi 1mg/mL'lik stok çözeltiden, ara stok kullanılarak hazırlanmıştır. Enzimatik hızlar her substrat konsantrasyonu için değerlendirilmiştir.

3.2.5. Substrat Miktarı Optimizasyonu ve Çökelmenin Giderilmesi

Enzim aktivitesinin ve Km değerinin belirlenmesi çalışmalarının ön denemelerinde gözlenen çökelmenin giderilebilmesi için deney koşulları öncelikle optimize edilmiştir. Çözücü olarak %10(v/v) DMSO kullanıldığı gibi, hem DMSO'nun %5 ve %15 (v/v) konsantrasyonları hem de NMP ve DMF çözücülerinin %5-10-15 (v/v) konsantrasyonları kullanılmıştır. Ayrıca çözünürlüğü arttırmak için %0.2 (v/v) TritonX-100'den yararlanılan çalışmalar da yapılmıştır.

Tablo 3.3. Çökeltmenin Giderilmesi Deney Koşulları

<i>Assay karışımı</i>	<i>5%DMSO/NMP/DMF</i>	<i>10%DMSO/NMP/DMF</i>	<i>15%DMSO/NMP/DMF</i>
<i>(her bir kuyucuk için)</i>			
<i>Assay tamponu</i>	<i>180 µL</i>	<i>170 µL</i>	<i>160 µL</i>
<i>Donör substrat</i>	<i>5 µL</i>	<i>5 µL</i>	<i>5 µL</i>
<i>Akseptör substrat</i>	<i>5 µL</i>	<i>5 µL</i>	<i>5 µL</i>
<i>TG2(Enzim Tamponunda)</i>	<i>10 µL</i>	<i>10 µL</i>	<i>10 µL</i>
<i>DMSO/NMP/DMF</i>	<i>-</i>	<i>10 µL</i>	<i>20 µL</i>
<i>Toplam</i>	<i>200 µL</i>	<i>200 µL</i>	<i>200 µL</i>

3.2.6. İnhibisyon Çalışmaları

Öncelikle inhibitör özelliği bilinen iyodoasetamid kullanılarak deney valide edilmiştir. Substrat özelliği göstermediği bulunan RW131/12 bileşiğinin inhibisyon potansiyeli incelenip ardından yine sentezlenen RW144/12 ve RW 145/12 bileşikleri aşağıda verilen deney koşullarında ve farklı konsantrasyonlarda test edilmiştir.

Tablo 3.4. İnhibisyon Çalışmaları Deney Koşulları

<i>Assay karışımı</i>	<i>5 % DMSO</i>	<i>10 % DMSO</i>
<i>(her bir kuyucuk için)</i>		
<i>Assay tamponu</i>	<i>180µL</i>	<i>170 µL</i>
<i>Inhibitör</i>	<i>10 µL</i>	<i>10 µL</i>
<i>Akseptör substrat</i>	<i>5 µL</i>	<i>5 µL</i>
<i>Donör substrat</i>	<i>5 µL</i>	<i>5 µL</i>
<i>TGase-2(Enzim tamponunda)</i>	<i>10 µL</i>	<i>10 µL</i>
<i>DMSO/NMP/DMF</i>	<i>-</i>	<i>10 µL</i>
<i>Toplam</i>	<i>200 µL</i>	<i>200 µL</i>

BÖLÜM 4

4. DENEY SONUÇLARI VE BULGULAR

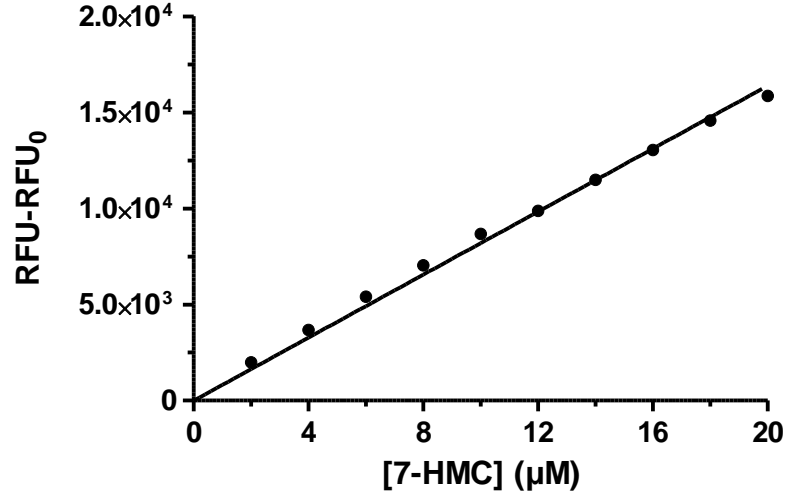
4.1. Lineer Aralığın Belirlenmesi (Ürün Oluşumu)

Ürün oluşumu ölçümlerinde, tayinlerin ilk setleri, iyi anlaşılır ölçümler elde edebilmek amacıyla yapılmıştır. Bu tayinlerin çıktıları RFU/s (Saniyedeki bağlı floresans birimi) veya RFU (Bağlı floresans birimi) gibi anlaşılır değerlere dönüştürülür ($\mu\text{M}/\text{min}$ ya da μM). Çevirme faktörü oluşan ürün miktarının ölçülmesiyle belirlenir. Ürün miktarı için bir konsantrasyon aralığı ölçülerek bulunmuş, HMC molekülü için 2-20 μM floresans olarak belirlenmiştir. Floresans bağımlılığı ürünün konsantrasyonu ile belirlenmiştir.

HMC için 10% DMSO varlığındaki RFU faktor 1 RFU = 1.223 ± 0.034 nM 7-HMC (mean \pm SEM, n = 6). Diğerleri 4.1.de verilmiştir.

Tablo 4.1. Her bir reaksiyon ürünü için bağlı floresans birim değerleri

	5 % DMSO	10 % DMSO
HC	0.728 ± 0.020 nM	-
HMC	0.847 ± 0.014 nM	1.223 ± 0.034 nM
AMC	0.347 ± 0.019 nM	-

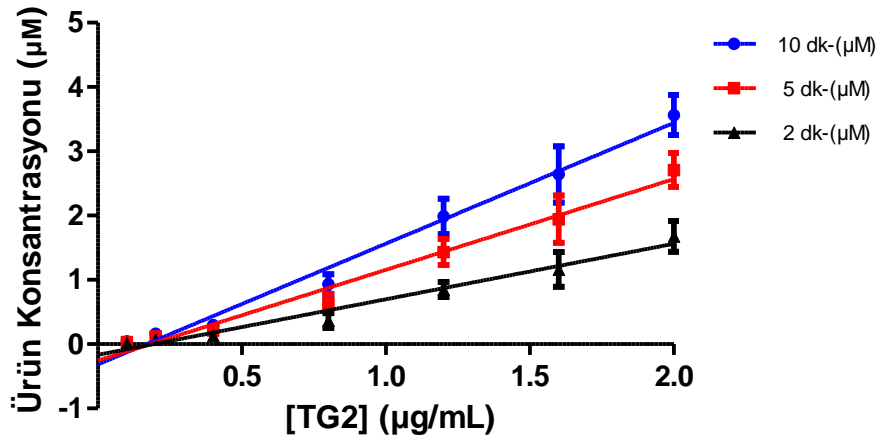


Şekil 4.1. RW130/12 için RFU faktörün belirlenmesi

Şekil 4.1.'de gösterilen bütün ölçümler, 20-200 mikron aralığında 7-HMC konsantrasyonları ile yapılmıştır. Noktalar ortalama değer \pm SEM (n = 6)'i ifade etmektedir. Eğim = 821.2 ± 23.73 RFU/ μ M, örn. 1 μ M 7-HMC = 1182 ± 20 RFU, 1 RFU = 1.223 ± 0.034 nM 7-HMC (n = 6)

4.2. Enzim Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Metodlar bölümünde belirtilen farklı konsantrasyondaki enzim çözeltileriyle gerçekleştirilen ölçümler sonucunda enzim konsantrasyonunun lineer artış gösterdiği bölge belirlenmiş ve 2.0 μ g/mL enzim konsantrasyonunda çalışılmasına karar verilmiştir.

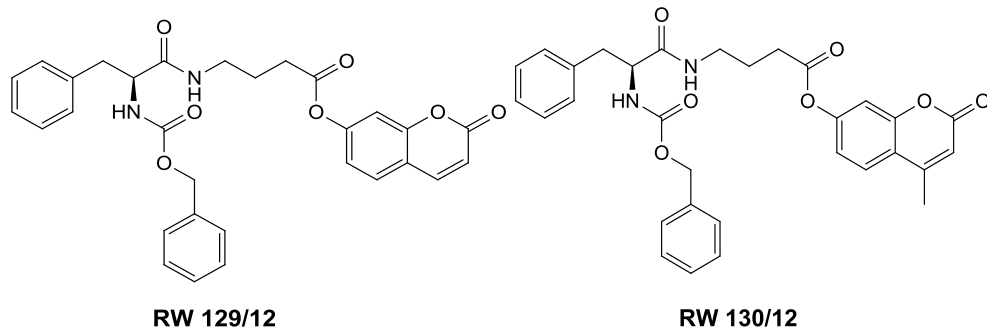


Şekil 4.2. TG2 konsantrasyonunun belirlenmesi

Şekil 4.2.'de Ölçümler [RW130/12] substratının 5 µM konsantrasyonunda TG2'nin 0.1-2.0 µg/mL aralığında 7 konsantrasyonuyla ve hem enzim varlığında hem de yokluğunda gerçekleştirilmiştir Şekil 4.2.'de belirtilen noktalar üç tekrarlı ölçümün 2-5 ve 10.dk.'lar için ayrı ayrı standart sapmaları da hesaplanmış ortalamasıdır.

Bu lineerlik inhibitör testleri için, enzimin çalışıldığı konsantrasyonda yarı-inhibisyonunun gerçekleşmiş olduğundan emin olmak adına önemlidir. Böylece TG2 konsantrasyonunun enzimatik substrat devir hızı ile orantılı olduğunu bölge ve denemede kullanılacak optimum substrat konsantrasyonu belirlenebilir.

Enzim konsantrasyonu belirlendikten sonra Km (Michaelis sabiti) ve Vmax (maksimum hız) parametrelerinin hem RW129/12 hem RW130/12 için tespit edilmesi istenmektedir. Km değeri substratın çekim kuvveti hakkında bilgi verir ve enzimin yarı-maksimum hız ile çalıştığı değer substrat konsantrasyonu olarak tanımlanır. Vmax, substratın önceden belirlenen enzim konsantrasyonundaki ulaşılabilen en yüksek oranıdır.

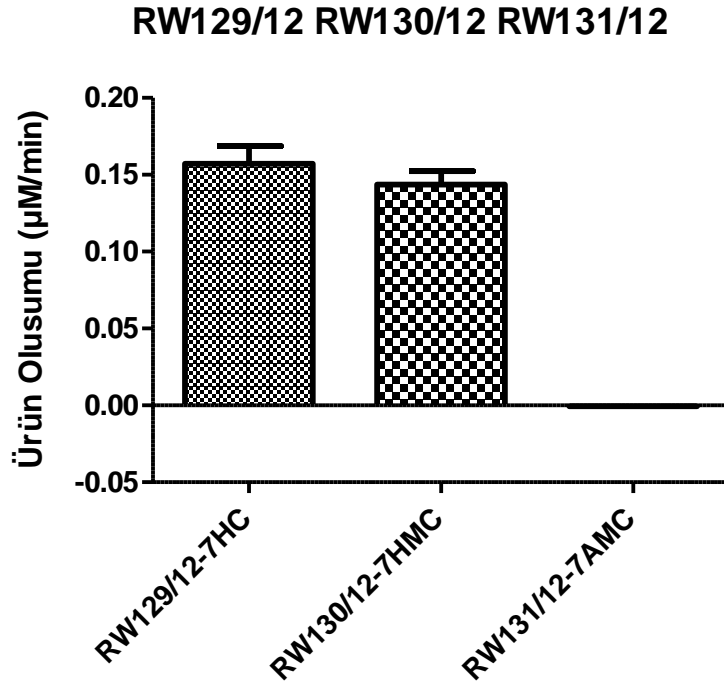


Şekil 4.3. Donör substratlar RW129/12 ve RW130/12'nin yapısı

4-(*N*-karbobenzoksi-*L*-fenilalanilamino)butirik asit kumarin-7-il ester (RW129/12), 4-(*N*-karbobenzoksi-*L*-fenilalanilamino)butirik asit 4-metil-kumarin-7-il ester (RW130/12) donör substratlardır.

4.3. Km-Değerinin Saptanması ve Çökelmenin Giderilmesi-Metod Optimizasyonu

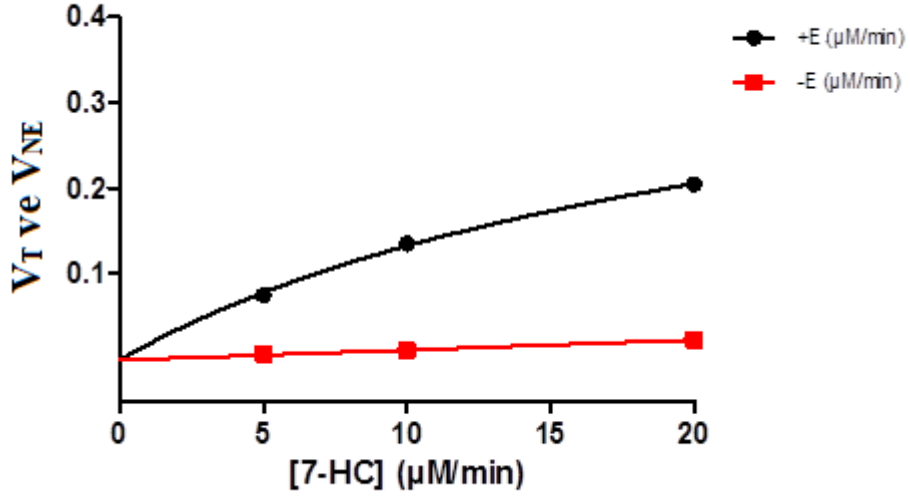
Km ve Vmax parametrelerini belirlemek için öncelikli olarak RW129/12 ve sonra RW130/12 substratıyla ve aynı zamanda RW131/12 ile çalışılmıştır. Deney koşulları Bölüm 3.2.4'te verilmiştir Substrat konsantrasyonu 70-5 μM 'dir. DMSO miktarı %5 veya 10 ve enzim konsantrasyonu 2 $\mu\text{g/mL}$ 'dir.



Şekil 4.4. RW129/12, RW130/12, ve RW131/12'nin substrat aktivitelerinin karşılaştırılması

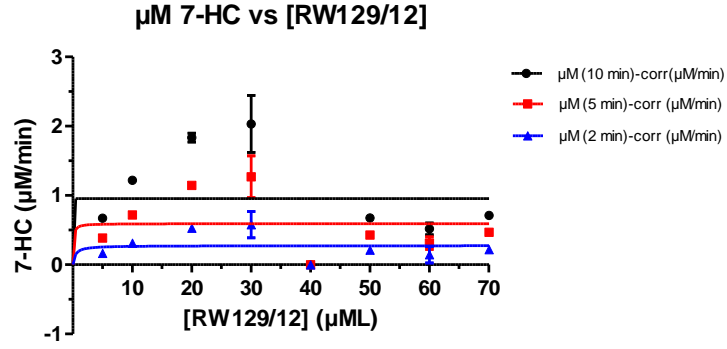
Şekil 4.4.'te RW129/12, RW130/12, ve RW131/12'nin tek yönlü varyans analizi ile substrat aktivitelerinin ürün oluşumu hızları üzerinden karşılaştırılması yapılmıştır. Grafikten de görüldüğü gibi substrat olarak tasarlanmış RW131/12 molekülü enzimi aktive etmemekte ve ürün oluşumu gözlenmediğinden, aminoasetonitril ile TG2 katalizli reaksiyona katılmadığı anlaşılmaktadır. Bu molekülün inhibisyon çalışmaları Bölüm 4.4'te verilmiştir.

Enzim aktivitesinin ve Km değerinin belirlenmesi çalışmalarının ön denemelerinde plakanın kuyucuklarındaki deney karışımında çökelme gözlemediğinden, bunun giderilerek metodun optimize edilmesi gerekmiştir.



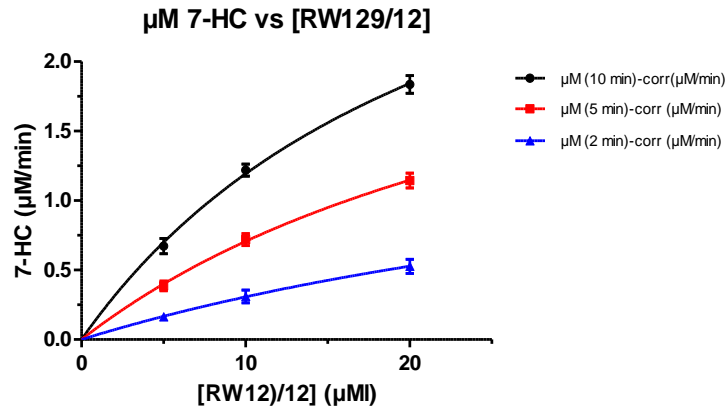
Şekil.4.5. RW129/12 substratının enzimli ve enzimsiz koşullarda harcanma hızını gösteren bir grafik

Şekil 4.5'te çökeltmenin varlığı fark edilmeden önce yapılmış Km belirleme çalışmalarından bir örnek gösterilmiştir. Burada toplam hız ve enzimatik olmayan hızdan bahsedilebilirken, çökeltme gözlemlendikten sonra tüm ölçümlerin sonuçları, 10 dk.lık ölçümlerin 2. 5. ve 10 dk.larından alınan RFU/s değerlerinin yukarıda verilen RFU faktörleri ile mikromolar cinsinden ürün konsantrasyonun çevrilmesiyle hesaplanıp elde edildiğinden, hız yerine ürün miktarları üzerinden yorumlanmıştır.



	μM (10 min)-corr ($\mu\text{M}/\text{min}$)	μM (5 min)-corr ($\mu\text{M}/\text{min}$)	μM (2 min)-corr ($\mu\text{M}/\text{min}$)
Michaelis-Menten			
Best-fit values			
Vmax	0.9541	0.5929	0.2750
Km	9.390e-012	0.07925	0.3881
Std. Error			
Vmax	0.2103	0.1228	0.05971
Km	5.070	2.550	2.897

Şekil 4.6. RW129/12'nin substrat-ürün grafiği

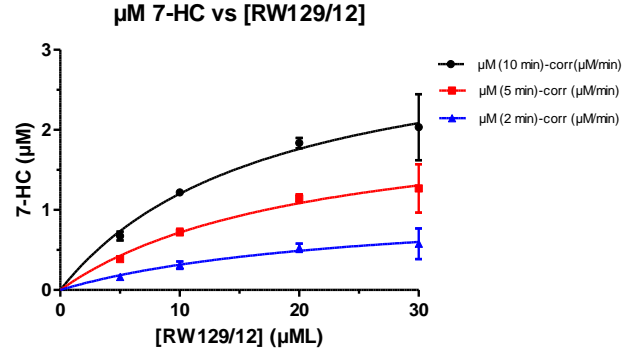


	μM (10 min)-corr ($\mu\text{M}/\text{min}$)	μM (5 min)-corr ($\mu\text{M}/\text{min}$)	μM (2 min)-corr ($\mu\text{M}/\text{min}$)
Michaelis-Menten			
Best-fit values			
Vmax	4.054	3.043	1.876
Km	23.99	33.07	51.10
Std. Error			
Vmax	0.3663	0.4422	0.7831
Km	3.486	7.019	27.97

Şekil 4.7. RW129/12'nin yüksek konsantrasyonlarının dahil edilmediği substrat-ürün grafiği

Şekil 4.6. ve 4.7.'de substrat olarak RW129/12 ve % 10 (v/v) DMF, varlığında gerçekleştirilen ölçümün sonuçları görülmektedir. Her iki grafik de aynı sonuçtan

alınmıştır, Şekil 4. 7’de 70, 60, 40, mikromolar konsantrasyonundaki çalışmalar ihmal edilerek grafiğin tekrar çizildiği şekil görülmektedir, eğrinin gözlemlenebildiği açıkça görülmektedir, ve yüksek konsantrasyonlarda aktivitenin birden düşüş gösterdiği anlaşılmaktadır. Mikrotabanın kuyucukları deney sonrasında kontrol edildiğinde özellikle çalışılan konsantrasyon aralığının yüksek substrat konsantrasyonları kullanıldığında kuyucuklarda çökeltme tespit edilmiştir.



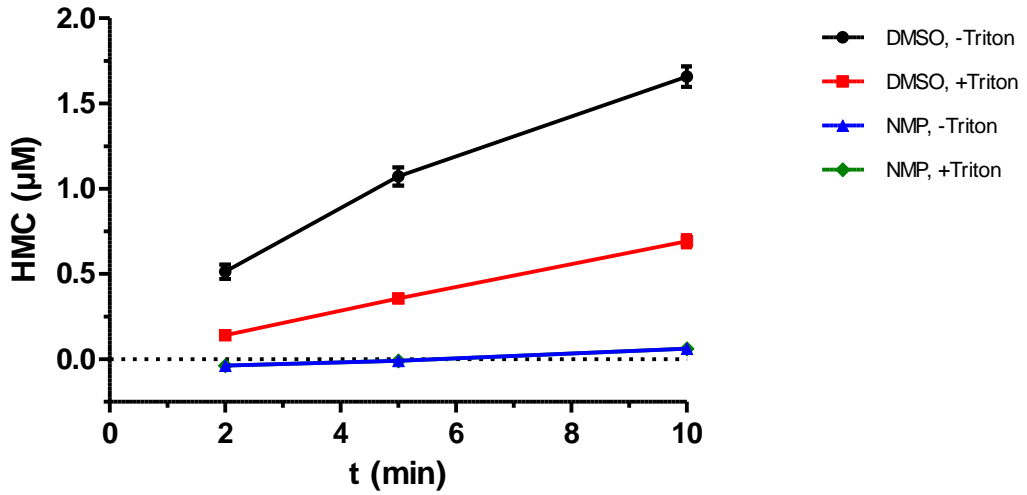
	μM (10 min)-corr ($\mu\text{M}/\text{min}$)	μM (5 min)-corr ($\mu\text{M}/\text{min}$)	μM (2 min)-corr ($\mu\text{M}/\text{min}$)
Michaelis-Menten			
Best-fit values			
Vmax	3.295	2.219	1.090
Km	17.42	20.95	24.58
Std. Error			
Vmax	0.4914	0.4458	0.3513
Km	5.420	8.167	14.47

Şekil 4.8..RW129/12 Substratının ürün oluşturma grafiği

Şekil 4.8.’de yine, RW129/12 substratı ile %5 DMSO varlığında gerçekleştirilen bir çalışma görülmektedir. Hesaplanan Km ve Vmax. değerleri beklenen değerlerle uyumluluk göstermektedir. Fakat çökeltme gözlemlendiğinden bu değerleri göz önünde bulundurmak doğru olmayacaktır.

Çökeltmenin giderilip çözünürlüğünün artırılması için öncelikle karışımdaki DMSO miktarı iki katına çıkarılmış ve deneyler tekrar edilmiştir. Hala çökeltmenin var olduğu ve deney sonuçlarında sapmalar olduğu tespit edilmiş ve substrat konsantrasyonunun düşürülmesi yoluna gidilmiştir. Substrat konsantrasyonu azaldığında çökeltmenin de azaldığı fakat hala bir miktar var olduğu gözlenmiştir. Buraya kadar bahsedilen çökeltmenin giderilmesi denemelerinde donör substrat olarak sadece RW129/12 substratı ile çalışılmış, bundan sonraki DMSO yerine farklı çözücülerin kullanıldığı ve yine düşük konsantrasyonda substrat ile çalışılan

denemelerde ise hem RW129/12 hem de RW130/12 ile denemeler yürütülmüştür. DMSO yerine NMP ve DMF çözücüleri de ayrı ayrı kullanılarak çözünürlüğün daha da artırılması amaçlanmıştır. Burada %5'lik, %10luk ve %15'lik çözücü konsantrasyonlarında ayrı ayrı çalışılmıştır. Daha yüksek substrat konsantrasyonları tercih edildiği için ayrıca deney karışımına TritonX-100'ün %2'lik çözeltisinden eklenmiş (kuyucuklardaki son konsantrasyonu %0.1'dir) ve substrat konsantrasyonu 50-40-30-20 μM 'a çıkarılmıştır. Deney öncesi ve sonrasında kuyucuklar kontrol edilmiş ve çökelmenin gidişatı takip edilmiştir.



Şekil 4.9. Farklı çözücülerin farklı miktarları için zamana karşı ürün oluşum grafiği

Şekil 4.9, DMSO ve NMP çözücülerinin 0.2 % TritonX-100 varlığı ve yokluğu koşullarında alınan ölçümler sonucu karşılaştırılmasını göstermektedir. Kuyucuklardaki konsantrasyonlar aminoasetonitril 400 μM , 20 μM RW 130/12, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TG2. Substratlar DMSO ve NMP'de ayrı ayrı hazırlanmıştır ve kuyucuklardaki solvent konsantrasyonu %10 (v/v)'dir.

Bu gözlemlerin ve yapılan deneylerin ışığında sonraki denemelerde %10 (V/V) DMSO VE 5 μM donör substrat kullanılmasına karar verilmiştir.

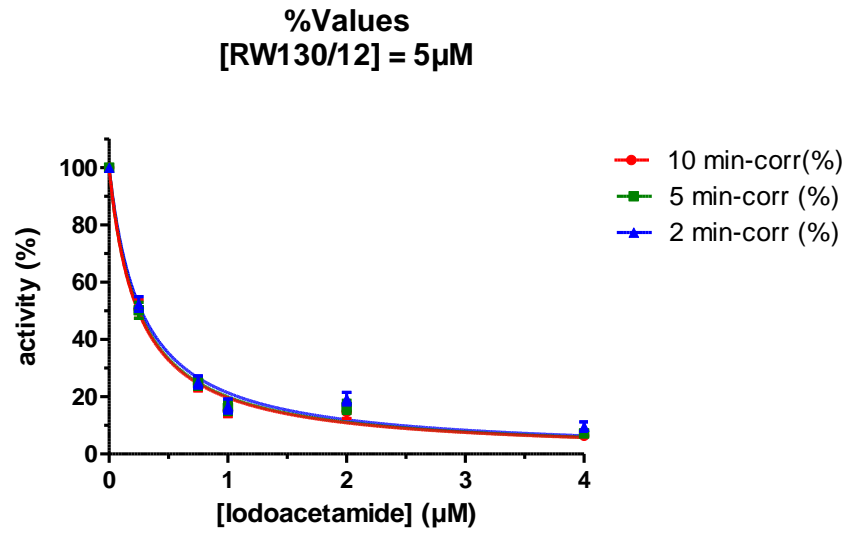
Aşağıda verilen Michaelis Menten eşitliğine göre substratların K_m değerleri hesaplanmaktadır.

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}$$

Ancak çok düşük substrat konsantrasyonlarında, $[S] \ll K_m$, $[S]$ ifadesi eşitlikte ihmal edilir ve eşitlik $V = V_{max}/K_m$ şekline dönüşür. Buradan K_m değerleri hesaplanamaz.

4.4. İnhibisyon Çalışmaları

TG2'nin inhibisyon çalışmaları için öncelikle metodun inhibitör etkinliği bilinen bir bileşikle valide edilmesi gerekmekte ve literatürde bulunan değerlerle sağlayacağı uyumun yüksek olması istenmektedir. Bu nedenle ilk olarak iyodoasetamit inhibitörüyle çalışılmıştır. Deney koşulları Bölüm 3.2.5'te (metodlar bölümünde) verilmiştir.



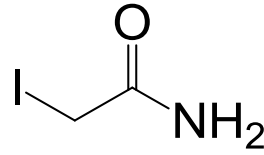
	10 min-corr (%)	5 min-corr (%)	2 min-corr (%)
v0	100.2	99.96	99.90
IC50	0.2436	0.2495	0.2722
Std. Error			
v0	2.246	2.225	2.451

Şekil.4.10. İyodoasetamitin İnhibisyon grafiği ve IC50 değerleri.

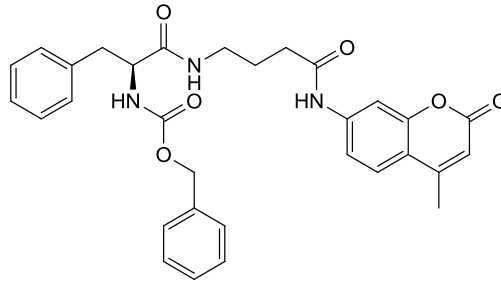
Şekil 4.10.'da verilen IC50 değerlerinden ve inhibisyon grafiğinden görülmektedir ki metod uygundur ve iyodoasetamitin IC50 değerleri literatürle örtüşmektedir.

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[S]}{K_m}}$$

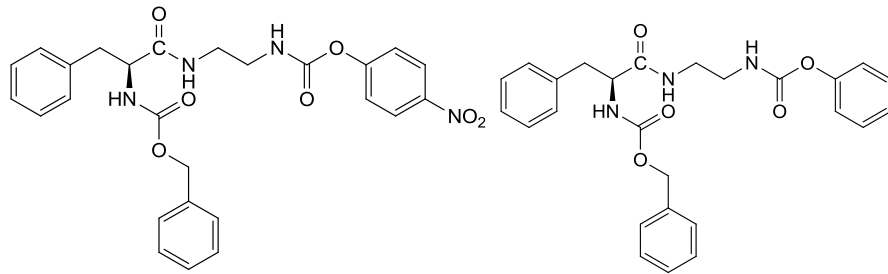
Yukarıda verilen eşitlikte yine $[S] \ll K_m$ koşuluna göre $[S]$ ihmal edildiğinde $K_i = IC_{50}$ eşitliği elde edilmektedir ve bu K_i değerleri literatürle uygunluk göstermektedir [5].



Şekil 4.11. İyodoasetamid'in yapısı



RW 131/12

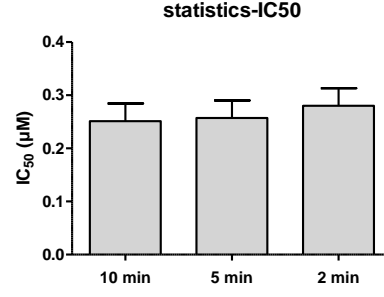


RW 144/12

RW 145/12

Şekil 4.12. RW131/12, RW144/12 ve RW145/12 moleküllerinin yapısı

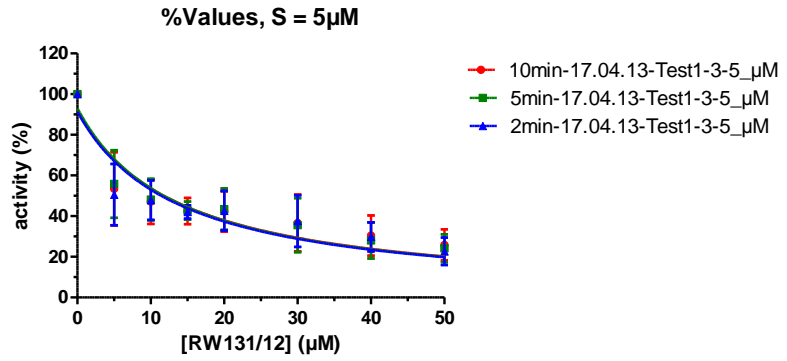
Aşağıdaki grafikler RW131/12, RW144 ve RW145/12 moleküllerinin TG2 inhibisyonunu bağıl konsantrasyon cinsinden ifade etmektedir.



	10 min	5 min	2 min
Number of values	6	6	6
Mean	0.2510	0.2572	0.2801
Std. Deviation	0.08222	0.08062	0.08105
Std. Error	0.03357	0.03291	0.03309

Şekil 4.13. İyodoasetamidin İnhibisyon İstatistiği

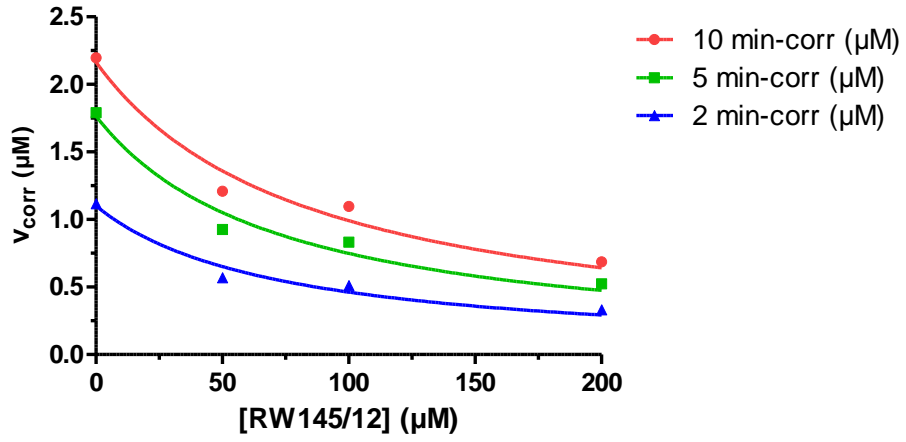
Şekil 4.13. İyodoasetamid inhibisyonunun zamandan bağımsız gerçekleştiğini ifade etmektedir.



10min-17.04.13-Test1-3-5_µM	5min-17.04.13-Test1-3-5_µM	2min-17.04.13-Test1-3-5_µM
91.67	93.09	91.32
14.15	13.70	13.81
9.467	8.708	8.571
4.025	3.512	3.558

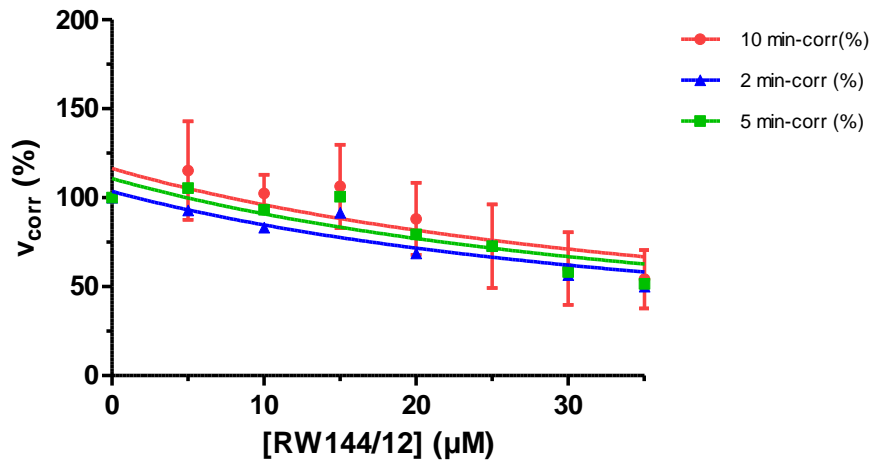
Şekil.4.14. RW131/12'nin bağıl inhibisyon grafiği ve değerleri

I = RW145/12 23-05-13



Şekil.4.15. RW145/12'nin bağıl inhibisyon grafiği

%Values, RW144/12 23-05-13



	10 min-corr (%)	5 min-corr (%)	2 min-corr (%)
v versus I			
Best-fit values			
v0	116.4	110.8	103.6
IC50	47.10	45.70	44.91
Std. Error			
v0	14.23	13.09	12.22
IC50	23.86	22.03	21.42

Şekil.4.16. RW144/12'nin bağıl inhibisyon grafiği ve değerleri

BÖLÜM 5

5. TARTIŞMA

Bu sonuçların ışığında, yapılan denemelerde TG2 aktivite tayini için Gillet et al. [5] tarafından tanımlanan metodta belirtilen koşullarda, mikropolanın kuyucukları incelendiğinde, çözelti ortamında çökmenin olduğu gözlenmiştir. Bu çökmeyi gidermek için yapılan çalışmalarda, ortamdaki çözücü konsantrasyonunu arttırıp, substrat konsantrasyonunu azaltmanın çözünürlüğe olumlu etki gösterdiği anlaşılmıştır. Triton X 100'ün varlığının çökmenin giderilmesine olumlu bir etki sağlamadığı anlaşılmıştır ve ayrıca çözücü olarak denenen NMP ile beraber reaksiyonu yavaşlatıcı özellik gösterdiği anlaşılmıştır. 5 µM'dan yüksek substrat konsantrasyonlarında belirtilen yöntem koşullarında gerçekleşen çökme giderilememiştir. Optimum koşulun RW130/12 substratının 5 µM'ı geçmeyecek konsantrasyonları ve çözücü olarak %10 (v/v) DMSO kullanıldığı koşul olduğu belirlenmiş ve inhibisyon çalışmaları için bu koşul kullanılmıştır.

Michaelis-Menten eşitliğine göre çok düşük substrat konsantrasyonlarında eşitlikteki substrat konsantrasyonu ihmal edilir. Buradan $V=V_{max}/K_m$ eşitliği elde edilir, bu koşullar için K_m değeri hesaplanamamaktadır.

İnhibisyon deneyleri öncelikle TG2'nin literatürce [5, 10, 51].bilinen inhibitörü iyodoasetamid ile valide edilmiştir. İyodoasetamid, TG2'nin yapısal olarak en basit inhibitörüdür. İyot bölgesi, TG2'nin tiyol aktif bölgesinin inhibitör ile daha kararlı bir tiyo-eter bağı yapmasını sağlayan kolay ayrılabilen bir gruptur. Çok reaktif olmasına rağmen, yapısının küçük olması iyodoasetamidin enzimle çok fazla bağlantı kurmasını engelleyerek onu sistemin aktif bölgelerinin spesifik olmayan inhibitörü yapmaktadır

RW131/12 substratının öngörülen aksine, substrat etkisi değil inhibitör etkisi gösterdiği anlaşılmıştır, ve yeni inhibitör potansiyeline sahip olduğu bulunmuştur. Aynı deney koşullarında farklı substratlar kullanılarak bu molekülün

inhibisyon çalışmalarına devam edilebileceği anlaşılmıştır. Ayrıca daha spesifik TG2 inhibitörlerinin dizaynı için bu inhibitörün yapısı baz alınarak benzer moleküller üzerinde tarama çalışmaları yapılabilir.

Yine sentez ürünü olan RW144/12 ve RW145/12 moleküllerinin valide edilmiş koşullarda TG2'ı inhibe ettiği sonucuna varılmış fakat Dr. Markus Pietsch ve grubu tarafından yapılan HPLC analizlerinde bu moleküllerin stabil olmadığı anlaşıldığından ileriki çalışmalarda bu moleküllerin kullanılmamasına karar verilmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] Pietsch, M., Wodtke, R., Pietzsch, J., Löser, R., *Tissue transglutaminase: An emerging target for therapy and imaging* Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 23, 6528–6543, (2013).
- [2] Lorand, L., Graham, R. M. *Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions*. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 4, 140, (2003)
- [3] Chhabra, A., Verma, A., Mehta, K. *Tissue transglutaminase promotes or suppresses tumors depending on cell context*. Anticancer Res. 29, 1909, (2009).
- [4] Satpathy, M. Cao, L., Pincheira, R., Emerson, R., Bigsby, R., Nakshatri, H., Matei, D., *Enhanced peritoneal ovarian tumor dissemination by tissue transglutaminase*. Cancer Res., 67, 7194, (2007)
- [5] Gillet, S. M. F. G., Pelletier, J. N., & Keillor, J. W. *A direct fluorometric assay for tissue transglutaminase*. *Analytical Biochemistry*, 347(2), 221–6, (2005).
- [6] Brooks, H. B., Geeganage, S., Kahl, S. D., Montrose, C., Smith, C., Weidner, J. R. *Basics of Enzymatic Assays for HTS*. Eli Lilly & Company, Indianapolis, (2012)
- [7] Fersht, Alan. *Enzyme Structure and Mechanism*. WH Freeman and Co., NY, 327-330, (1985)
- [8] Pinkas, D. M., Strop, P., Brunger, A.T., Khosla, C. *Transglutaminase 2 Undergoes a Large Conformational Change upon Activation*. PLoS Biology, 5,12, e327, 2007

- [9] Mehta, K., Kumar, A., Kim, H. I., *Transglutaminase 2: A multi-tasking protein in the complex circuitry of inflammation and cancer*. *Biochemical Pharmacology*, 80, 1921–1929, (2010).
- [10] Mehta, K., Eckert, R. *Transglutaminases family of enzyme with diverse functions*. *Progress in experimental tumor research*, 38, Karger (2005)
- [11] Folk, J. E. *Mechanism and basis for specificity of transglutaminase-catalyzed epsilon-(gamma-glutamyl) lysine bond formation*. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 54, 1–56, (1983).
- [12] Greenberg, C.S., Birchbichler, P. J., Rice, R. H. *Transglutaminases: multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissues*. *FASEB J.*5:3071–3077, (1991).
- [13] De Macédo, P., Marrano, C., & Keillor, J. W. *A direct continuous spectrophotometric assay for transglutaminase activity*. *Analytical biochemistry*, 285(1), 16–20, (2000).
- [14] Hoffner G., Djian P., *Transglutaminase and diseases of the central nervous system*. *Front Biosci.* 10, 3078–3092, (2005).
- [15] Siegel M., Khosla C., *Transglutaminase 2 Inhibitors and their Therapeutic Role in Disease States*. *Pharmacol Ther.* 115(2), 232–245, (2007)
- [16] Borsook H, Deasy CL, Haagen-Smit AJ, Keighley G, Lowy PH. *The Incorporation of Labeled Lysine into the Proteins of Guinea Pig Liver Homogenate*. *J Biol Chem*,179:689–704,(1949).
- [17] Clarke DD, Mycek MJ, Neidle A, Waelsch H. *The Incorporation of Amines into Protein*. *Arch Biochem. Biophys*, 79:338–354, (1959).
- [18] Griffin M., Casadio R, Bergamini C., M., *Transglutaminases: Nature's biological glues*. *Biochem J.* 368, 377–396, (2002)

- [19] Molberg O, McAdam S., N., Sollid L., M., ***Role of tissue transglutaminase in celiac disease.*** J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 30(3), 232–240, (2000).
- [20] Mangala L. S., Mehta K. ***Tissue transglutaminase (TG2) in cancer biology.*** Prog Exp Tumor Res 2005;38:125–138. [PubMed: 15746533]
- [21] Fesus L, Thomazy V, Falus A. ***Induction and activation of tissue transglutaminase during programmed cell death.*** FEBS Lett. 224(1), 104–108, (1987).
- [22] Tekman, G., Öner, N., ***Genel Biyokimya.*** İstanbul Üniversitesi Yayınları, 1994
- [23] Geçkil H., ***Biyokimya I.*** İnönü Üniversitesi Yayınları, 2012
- [24] David L. Nelson ve Micheal M.Cox, ***Biyokimya İlkeleri,*** Lehninger Palme Yayıncılık 3.Basım Çeviri
- [25] Geçkil H., ***Biyokimya II.*** İnönü Üniversitesi Yayınları, 2012
- [26] Kalaycıoğlu L., Serpek B., Nizamlıoğlu M., ***Biyokimya.*** Nobel yayın Dağıtım 3.Baskı
- [27] Citron, B.A., Suo, Z., SantaCruz, K., Davies, P.J.A., Qin, F., Festoff, B.W., ***Protein crosslinking, tissue transglutaminase, alternative splicing and neurodegeneration.*** Neurochem. Int, 40, 69-78, (2002).
- [28] Dedeoğlu, A., Kubilus, J.K., Jeitner, T.M., Matson, S.A., Bogdanov, M., Kowall, N.W., Matson, W.R. Cooper, A.J.L., Ratan, R.R., Beal, M.F., Hersch, S.M., Ferrante, R.. ***Therapeutic effects of cystamine in a murine model of Huntington's Disease.*** J. Neurosci. 22 (20), 8942-8950, (2002).
- [29] Liu, S., Cerione, R.A., Clardy, J. ***Structural basis for the guanine nucleotide binding activity of tissue transglutaminase and its regulation of transamidation activity.*** Biochemistry, 99, 2743-2747, (2002).

- [30] Perez Alea, M., Kitamura, M., Martin, G., Thomas, V., Hitomi, K., & El Alaoui, S. *Development of an isoenzyme-specific colorimetric assay for tissue transglutaminase 2 cross-linking activity*. Analytical Biochemistry, 389(2), 150–6, (2009).
- [31] Lismaa, S.E., Chung, L., Wu, M.-J., Teller, D.C., Yee, V.C., Graham, R.M. *The core domain of the tissue transglutaminase hydrolyzes GTP and ATP*. Biochemistry, 36, 11655-11664, (1997).
- [32] Folk, J.E., Cole, P. W., *Mechanism of action of guinea pig liver transglutaminase. VIII Active Side Studies with 'Reported' Group-Labeled Halomethyl Ketones*. J. Biol Chem., 246, 21, 6683-6691, (1971).
- [33] Kim, S., Kim, I., Chung, S., Steinerts, P. M. *The Structure of the Transglutaminase 1 Enzyme*. J Biol Chem, 269(45), 27979–27986, (1994).
- [34] Chica, R. A., Gagnon, P., Keillor, J. W., Pelletier, J. N. *Tissue transglutaminase acylation : Proposed role of conserved active site Tyr and Trp residues revealed by molecular modeling of peptide substrate binding*. Protein Science, 13 979–991, (2004). doi:10.1110/ps.03433304.
- [35] Chung, S. I., Shrager, R. I. & Folk, J. E., *Mechanism of Action of Guinea Pig Liver Transglutaminase*. The Journal of Biological Chemistry 245(23), Issue of December 10, 6424-6435, (1970)
- [36] Gundemir, S., Colak, G., Tucholski, J., Johnson, G. V. W. *Transglutaminase 2: a molecular Swiss army knife*. Biochimica et Biophysica Acta, 1823(2), 406–19, (2012). doi:10.1016/j.bbamcr.2011.09.012
- [37] Gillet, S. M. F. G., Chica R. A., Keillor, J. W. & Pelletier, J. N., *Expression and rapid purification of highly active hexahistidine-tagged guinea pig liver transglutaminase* Protein Expression and Purification, 33, 256–264, (2004).

- [38] Chica, R. A., Gagnon, P., Keillor, J. W., Pelletier, J. N. ***Tissue transglutaminase acylation : Proposed role of conserved active site Tyr and Trp residues revealed by molecular modeling of peptide substrate binding.*** Protein Science, 13 979–991, (2004). doi:10.1110/ps.03433304.
- [39] Caccamo, D., Currò, M., Ientile, R., ***Potential of transglutaminase 2 as a therapeutic target. Expert Opinion on Therapeutic Targets,*** 14(9), 989–1003, (2010).
- [40] Elli, L., Bergamini, C. M., Bardella, M. T., & Schuppan, D. ***Transglutaminases in inflammation and fibrosis of the gastrointestinal tract and the liver. Digestive and Liver Disease.*** Official Journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver, 41(8), 541–50, (2009).
- [41] Akimov, S. S., Krylov, D., Fleishman, L. F., Belkin, A. M. ***Tissue transglutaminase is an integrin-binding adhesion coreceptor for fibronectin.*** J. Cell. Biol. 148(4), 825-83, (2000).
- [42] Nicholas, B., Smethurst, P., Verderio, E., Jones, R., Griffin, M. ***Cross-linking of cellular proteins by tissue transglutaminase during necrotic cell death: a mechanism for maintaining tissue integrity.*** Biochem. J. 371, 413-422, (2003).
- [43] Steinman, L, Karpuj, M. ***The multifaceted role of transglutaminase in neurodegeneration: review article.*** Amino Acids. 26, 373-379, (2004).
- [44] Schmid, A.W., Chiappe, D., Pignat, W., Grimminger, V., Hang, I., Moniatte, M., and Lashuel, H. ***Dissecting the mechanisms of tissue transglutaminase-induced cross-linking of α -synuclein: implications for the pathogenesis of Parkinson's Disease.*** J.Biol. Chem. 284(19), 13128-42 (2009).

- [45] Molberg O, McAdam S., N., Sollid L., M., ***Role of tissue transglutaminase in celiac disease.*** J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 30(3), 232–240, (2000).
- [46] Lindemann, I., Böttcher, J., Oertel, K., Weber, J., Hils, M., Pasternack, R., Klebe, G. ***Inhibitors of transglutaminase 2 : A therapeutic option in celiac disease,*** 2747, (2007).
- [47] Gundemir, S., Colak, G., Tucholski, J., Johnson, G. V. W. ***Transglutaminase 2: a molecular Swiss army knife.*** Biochimica et Biophysica Acta, 1823(2), 406–19, (2012). doi:10.1016/j.bbamcr.2011.09.012
- [48] Hanahan D, Weinberg RA: ***The hallmarks of cancer.*** Cell 100:57–70, (2000).
- [49] Stewart BW, Kleihues P (eds): ***World Cancer Report.*** Lyon, IARC Press, (2003).
- [50] Igney FH, Krammer PH: ***Death and anti-death: Tumour resistance to apoptosis.*** Nature Rev 2:277–288,(2002)
- [51] Wu, Y.-W., Tsai, Y.-H. ***A rapid transglutaminase assay for high-throughput screening applications.*** Journal of Biomolecular Screening, 11(7), 836–43, (2006).

ÖZGEÇMİŞ

1986 Edirne doğumluyum. İlköğrenimimi İpsala Atatürk İlkokulu'nda, ortaöğrenimimi Keşan Anadolu Lisesi ve sonrasında Edirne Anadolu Lisesi'nde tamamladım. 2005 yılında Ege Üniversitesi Kimya Bölümü'nde lisans eğitimine başlayıp, 2009 yılında mezun oldum. 2010 yılında 21.Yüzyıl Ar-Ge Şirketinde kimyager olarak çalışmaya başladım, aynı zamanda Ege Üniversitesi'nde Nükleer Kimya alanında bir yüksek lisans programında eğitimime devam ettim. 2011 yılında başladığım Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine devam ederken 2012 yılında Erasmus Hayat Boyu Öğrenme Programı kapsamında 9 ay süresince Köln Üniversitesi'nde yüksek lisans tez projemi gerçekleştirdim. 2013 yılı Aralık ayından beri Koçak Farma'da araştırmacı olarak çalışmaktayım.