

**T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PİRENİL TÜREVLERİ İLE MODİFİYE EDİLMİŞ FLORESAN KARAKTERLİ
PEPTİD VE PROTEİN SUBSTRATLARA PROTEAZ ETKİSİNİN FLOROMETRİK
YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ**

İBRAHİM ETHEM ÖZYİĞİT

**DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
BİYOKİMYA PROGRAMI**

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. EMİNE KARAKUŞ**

İSTANBUL, 2015

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PİRENİL TÜREVLERİ İLE MODİFİYE EDİLMİŞ FLORESAN KARAKTERLİ
PEPTİD VE PROTEİN SUBSTRATLARA PROTEAZ ETKİSİNİN FLOROMETRİK
YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ**

İbrahim Ethem ÖZYİĞİT tarafından hazırlanan tez çalışması 09.02.2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Emine KARAKUŞ
Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Emine KARAKUŞ
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Barbaros NALBANTOĞLU
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Volkan SÖZER
Yıldız Teknik Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Mesut KARAHAN
Üsküdar Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Vildan ENİSOĞLU ATALAY
Üsküdar Üniversitesi



Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü' nün 27-01-02-03 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Doktora tez çalışmamın tamamlanmasında gösterdikleri maddî manevî büyük destek ve ilgilerinden dolayı danışman hocam sayın Doç. Dr. Emine KARAKUŞ'a, tezimin hazırlanmasında bana bilgi ve tecrübelerini sınırsız bir özveri ile aktaran sayın hocam Prof. Dr. Önder PEKCAN ve Doç. Dr. Ebru Demet AKTEN'e, bu tezin konusunun temel gerekliliği olan zaman ayrımlı floresans cihazının onarımında ve yeniden kurulumunda gösterdiği büyük hassasiyet, ilgi ve destekleri için sayın hocam Prof. Dr. Ulvi AVCIATA'ya, lisansüstü eğitim hayatıma yön veren sevgili hocam merhume Prof. Dr. Huriye KUZU'ya, yardımlarını esirgemeyen sayın hocalarım Yrd. Doç. Dr. Zeynep AKDESTE ve eşleri merhum sayın hocam Prof. Dr. Mehmet Mustafa AKDESTE'ye, tezimin desteklendiği projenin yürütücülüğünü yapmış olan değerli hocam Prof. Dr. İnci ARISAN'a, ihtiyaç duyduğum konularda yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Barbaros NALBANTOĞLU, Doç. Dr. Volkan SÖZER, Prof. Dr. Ayşegül PEKSEL'e, çalışmalarımın kolaylaşmasına katkıda bulunan tüm öğretim elemanı arkadaşlarıma, çalışmalarına gönüllü olarak katılıp destek veren tüm öğrencilerimize ve de varlıkları hayatımı yaşanılır, anlamlı, değerli kılan o güzel aileme ve dostlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Şubat, 2015

İbrahim Ethem ÖZYİĞİT

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE LİSTESİ	viii
KISALTMA LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
ÇİZELGE LİSTESİ	xiv
ÖZET	xv
ABSTRACT	xvii
BÖLÜM 1	
GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı	2
1.3 Hipotez	2
BÖLÜM 2	
GENEL BİLGİ	4
2.1 Enzimlerin Yapısal Birimleri: Aminoasitler, Peptid Bağı ve Protein Yapıları	4
2.1.1 Amino Asitler ve Peptid Bağı.....	4
2.1.2 Proteinlerin Yapısal Özellikleri	8
2.1.2.1 Birincil (Primer) Protein Yapısı	8
2.1.2.2 İkincil (Sekonder) Protein Yapıları	8
2.1.2.2.1 α -Heliks Yapısı	8
2.1.2.2.2 β -Katlanmış Tabaka Yapısı.....	9
2.1.2.3 Üçüncül (Tersiyer) Protein Yapıları	10
2.1.2.4 Dördüncül (Kuaterner) Protein Yapısı	11
2.2 Enzim Yapısı ve Katalitik Etki	12
2.3 Enzimlerin Adlandırılması	17
2.4 Enzimlerin Sınıflandırılması	17

2.4.1	Ana Sınıf 1 - Oksidoredüktazlar (E.C.1)	17
2.4.2	Ana Sınıf 2 - Transferazlar (E.C.2).....	18
2.4.3	Ana Sınıf 3 - Hidrolazlar (E.C.3)	19
2.4.4	Ana Sınıf 4 - liyazlar (E.C.4)	20
2.4.5	Ana Sınıf 5 - İzomerazlar (E.C.5).....	20
2.4.6	Ana Sınıf 6 - Ligazlar (E.C.6).....	21
2.5	Proteazlar (E.C.3.4)	22
2.5.1	Tripsin (E.C.3.4.21.4).....	24
2.5.2	Kimotripsin (E.C.3.4.21.1)	25
2.6	Serin Proteazların Katalitik Mekanizması	25
2.7	Enzim Kinetiği.....	28
2.7.1	Hızlı Dengelenme (Fast Equilibrium) Modeli	29
2.7.2	Kararlı Hal (Steady State) Modeli.....	31
2.8	Enzim Aktivitesi Tayininde Kullanılan Spektrofotometrik Yöntemler.....	33
2.8.1	Ultraviyole-Görünür (UV-Visible) Bölge Absorpsiyon Spektroskopisi	34
2.8.2	Floresans Spektroskopisi.....	38
2.8.2.1	Kararlı Hal Floresans Spektroskopisi	42
2.8.2.2	Zaman Ayrımlı Floresans Spektroskopisi ve Ekspansiyel Seriler Yöntemi ile Floresans Ömür Dağılımları Analizi.....	43
2.8.2.3	Ekspansiyel Seriler Yöntemi	45
2.8.2.4	Zaman Ayrımlı Floresans Ölçüm Teknikleri	47
2.8.2.4.1	Faz ve Modülasyon Ölçme Tekniği	48
2.8.2.4.2	Tek Foton Sayma Yöntemi	48
2.8.2.4.3	Stroboskopik Yöntem.....	48
2.9	Eksimer Yapılar	48
2.10	Jel Filtrasyon Kromatografisi.....	50
2.10.1	Jel Filtrasyon Kromatografisi ile Protein Saflaştırma	50
2.10.2	Jel Filtrasyon Kromatografisi ile Molekül Ağırlığı (Mw) Tayini.....	52
2.11	Tepken (Reaktif) Protein Grupları ve Modifikasyonları	55

BÖLÜM 3

MATERYAL ve YÖNTEM.....	60
-------------------------	----

3.1	Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar	60
3.1.1	Kullanılan Kimyasal Maddeler	60
3.1.2	Kullanılan Cihazlar	61
3.2	Çalışmanın Amacı, Kapsamı ve Uygulanan Yöntem.....	61

BÖLÜM 4

DENEYSEL BÖLÜM.....	63
---------------------	----

4.1	N-(1-pirenil)maleimid (PM)'in Absorpsiyon ve Emisyon Özelliklerinin Belirlenmesi	66
4.2	BSA'nın Absorpsiyon ve Emisyon Özellikleri.....	70
4.3	PM-BSA Kompleksinin Sentezi	73
4.4	PM-BSA'nın Saflaştırılması	74
4.5	PM-BSA Kompleksinde PM/BSA Mol Oranının Hesaplanması	74

4.6	PM-BSA kompleksinin Floresans Özellikleri.....	79
4.7	PM-BSA Kompleksi Üzerinde Tripsin Etkisinin Zaman Ayrımlı Floresans Tekniği İle İncelenmesi.....	81
4.8	PM-BSA Kompleksi Üzerinde Kimotripsin Etkisinin Zaman Ayrımlı Floresans Tekniği İle İncelenmesi	88
BÖLÜM 5		94
SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....		94
KAYNAKLAR		97
ÖZGEÇMİŞ		100



SİMGE LİSTESİ

Ev	Vibrasyonel enerji
Er	Rotasyonel enerji
F(t)	Floresans şiddeti
Ia	Absorbsiyon şiddeti
Kav	Sabit ve hareketli fazlar arasındaki dağılım katsayısı
Kd	Sabit ve hareketli fazlar arasındaki dağılım katsayısı
Mw	Molekül ağırlığı
ns	Nanosaniye
PM-BSA	N-(1-Pirenil)maleimid-Sığır Serum Albumin Kompleksi
Qf	Kuantum verimi
So	Temel hal
S1	Uyarılmış singlet hal
s	Saniye
T	Triplet hal
V0	Kolon içinde Jel dolguyu saran boşluk hacmi
Ve	Elüsyon hacmi
Vg	Jel kütlesi hacmi
Vi	Toplam jel gözenek hacmi
Vt	Toplam kolon hacmi
τ	Floresans ömür
α	ön üstel faktör

KISALTMA LİSTESİ

Akb	Atomik kütle birimi
BSA	Siğır serum albumin (Bovine Serum Albumine)
Cys	Sistein amino asidi
Da	Dalton
DF	Düzeltilme faktörü
DMSO	Dimetil sülfoksit
ESM	Ekspansiyel Seriler Yöntemi (Exponential Series Method)
Lys	Lizin amino asidi
ns	Nanosaniye
PBS	Fosfat tamponu (Phosphate buffer solution)
PM	N-(1-Pirenil)maleimid
Tris.HCl	Tris(hidroksimetil)aminometan
UV-VIS	Morötesi-Görünür Bölge Işımları (Ultraviolet-Visible)

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2. 1 Amino asitlerin genel yapısı ve lizin amino asidi.....	4
Şekil 2. 2 Yirmi doğal amino asidin yanzincir (-R) yapıları, adları, üç harfli ve tek harfli kısaltmaları. Prolin amino asidi bütün olarak gösterilmiştir [16].....	5
Şekil 2. 3 Peptid bağı oluşumu (a) ve amid genel yapısı (b)	6
Şekil 2. 4 Peptid bağı rezonans yapıları, (a) π sistemi delokalizasyonu ve (b) peptid düzlemi.....	7
Şekil 2. 5 Birincil protein yapısı.....	8
Şekil 2. 6 α -heliks (Sağ el) Sol - Sağ α -heliks	9
Şekil 2. 7 anti-paralel β -katlanmış tabaka yapısı	9
Şekil 2. 8 anti-paralel β -katlanmış tabaka yapısı ve paralel β -katlanmış tabaka yapısı [15]	10
Şekil 2. 9 Üçüncül (tersiyer) yapıyı oluşturan bağlar	10
Şekil 2. 10 Kimotripsin'in üçüncül (tersiyer) yapısı [17]	11
Şekil 2. 11 Bir polipeptid zincirinin katlanarak üçüncül yapıya dönüşmesi ve Birden fazla üçüncül yapının bir araya gelerek dördüncül yapıyı oluşturmaları [16] ..	11
Şekil 2. 12 Aktif merkez ve substrat arasında üç uçlu bağlanmanın düzlemsel gösterimi [17]	12
Şekil 2. 13 Fischer'in Anahtar-Kilit Modeli (solda) ve Koshland'in Uyarılmış Şekilsel Uyum (Induced fit) (sağda) modeline göre Enzim-Substrat (ES) kompleksinin oluşumu.	13
Şekil 2. 14 Haldane'ın geçiş hali tamamlayıcılık modeli'ne göre ES kompleksinin oluşumu [19]	14
Şekil 2. 15 Enzim-Substrat etkileşiminin Uyarılmış Gerilme (Induced-strain) Modeli ve kataliz: 1. Çözeltide Serbest enzim ve substrat, 2. Substrat bükülmesi olmaksızın ES kompleksini oluşturan ilk bağlanma, 3. Enzim substratla daha iyi bağlanmak üzere konformasyonel değişim gösterir [Uyarılmış Şekilsel Uyum (Induced fit)], 4. Enzim, Substratı temel halden geçiş haline doğru bükme ve substrat içinde gerilim oluşturan ileri konformasyonel değişimlere gider, 5. Uyarılmış gerilim bağ kırılmasına ve iki hidrolitik ürün oluşumuna neden olur, A ve B [16]	15
Şekil 2. 16 B.M.Britt'in Değişken Özgüllük modeli. Fischer'in Anahtar-Kilit Modeline göre oluşan ES kompleksinin, tepkimenin geçiş basamağı sonunda uğradığı küresel biçim değişimi ve aktif bölge özgüllüğünün geçiş haline uyarlanması [19]	16

Şekil 2. 17	Bazı enzim kofaktörleri [16]	17
Şekil 2. 18	Proteolitik enzimlerin sınıflandırılması [7]	22
Şekil 2. 19	Serin proteazların genel açıl transfer mekanizması [16]	26
Şekil 2. 20	Tripsin-benzeri serin proteazlarda substrat-aktif bölge etkileşimi [16]	27
Şekil 2. 21	Enzim katalizli bir reaksiyonun zamana göre serbest entalpi değişimi	28
Şekil 2. 22	Lambert-Beer yasasına göre ışık absorpsiyonu.....	35
Şekil 2. 23	Absorpsiyon spektrofotometrelerinin genel şeması ve absorbans hesabı [4]	36
Şekil 2. 24	Lambert-Beer yasasından sapma [16]	37
Şekil 2. 25	Enzimatik bir reaksiyonda zamana göre absorbans değişimi [16].....	38
Şekil 2. 26	Jablonski Diyagramı. S: Singlet hal, T: Triplet hal, VD: Vibrasyonlu durulma [Vibrational relaxation(VR)], İG: İç geçiş [Internal Conversion(IC)], SAG: Sistemler arası geçiş [Intersystem crossing(ISC)] [2-4]	39
Şekil 2. 27	Stokes kayması (Stokes shift). Emisyon, absorpsiyona göre daha uzun dalgalarda gerçekleşir [2-4]	40
Şekil 2. 28	Kararlı hal (steady-state) florometrelerine ait genel optik şema[24].....	43
Şekil 2. 29	Floresans bozunma eğrisi R(t) ve Lamba puls fonksiyonu L(t)	46
Şekil 2. 30	Nanoflaş stroboskopik sistem [28]	49
Şekil 2. 31	Eksimer yapı. Solda, uyarılmış nötral piren molekülü (S1) ile temel haldeki (S0) piren'in karşılaşması sonucu; sağda, piren radikal katyonu ile piren anyonunun karşılaşması sonucu piren eksimerinin (dimerik uyarılmış hal kompleksi) oluşumu [30].....	50
Şekil 2. 32	Dekstranın çapraz bağlı polimer yapısı ve jel boncuklarının filtrasyon etkisi	51
Şekil 2. 33	Jel filtrasyon sistemi.....	52
Şekil 2. 34	Jel filtrasyon kolonunda hacim tanımlamaları.....	53
Şekil 2. 35	Jel filtrasyon kromatografisi için "M _w -V _e " ve "K _{av} -logM _w " kalibrasyon eğrileri	54
Şekil 2. 36	Amino asitlerin yan zincirlerinde yer alan reaktif gruplar	56
Şekil 2. 37	Nükleofilik yerdeğiştirme reaksiyonu, SN2 mekanizması [35]	56
Şekil 2. 38	Protein üzerinde tiyol gruplarının reaksiyonları. α-Haloasetil bileşikler (I), Maleimid türevleri (II) ve Cıva içerikli bileşiklerle (III) verdikleri reaksiyonların şemaları [17].....	58
Şekil 2. 39	Amino gruplarının maleimidlerle reaksiyonlarında izlenebilecek iki muhtemel yol[17]	59
Şekil 2. 40	Amino gruplarının izosiyanat ve izotiyosiyanatlarla verdikleri tepkimeler .	59
Şekil 4. 1	N-(1-pirenil)maleimid (Pyr-maleimid, PM)	67
Şekil 4. 2	Tris.HCl tamponunda (0,025M, 0,1M NaCl, 0,005M CaCl ₂ , pH:8) hazırlanan 8x10 ⁻⁵ M PM'in absorbans spektrumu A ₂₈₀ = 1.0291; A ₃₄₄ = 1,0548; Kör: 1,994ml Tris.HCl (pH:8) ve 6µl DMSO(%0,3) karışımı	67
Şekil 4. 3	Tris.HCl tamponunda (0,025M, 0,1M NaCl, 0,005M CaCl ₂ , pH:8) 5x10 ⁻⁵ M PM'in zaman ayırmalı floresans spektrumu.(λ _{exc} : 337nm; λ _{emis-max-monomer} : 382nm; İntegrasyon süresi (Int. time): 0,1s; İlerleme sayısı (step size): 0,25; Geciktirme süresi (delay time): 117ns; Tekrarlama (averages: 3)	68

Şekil 4. 4	Tris.HCl tamponunda (0,025M, 0,1M NaCl, 0,005M CaCl ₂ , pH:8) 3x10 ⁻⁵ M PM floresans bozunma eğrisi, bozunma verilerinin eğriye uyarlanması ve floresans ömür dağılımı(ESM, Ki-kare:1,007). Saçıcı eğrisi, lamba pulslarının zamana göre azalma profilini vermektedir. λ_{exc} : 337nm; $\lambda_{emis.max}$: 382nm; İntegrasyon süresi (Int. time): 0,1; Kanal sayısı(Channels): 400; Tekrarlama (averages: 3).....	69
Şekil 4. 5	Tris.HCl tamponunda (0,025M, 0,1M NaCl, 0,005M CaCl ₂ , pH:8) 3x10 ⁻⁵ M BSA absorbans spektrumu	70
Şekil 4. 6	Tris.HCl tamponunda (0,025M, 0,1M NaCl, 0,005M CaCl ₂ , pH:8) 8x10 ⁻⁵ M. BSA zaman ayrımlı floresans spektrumu. λ_{exc} : 295nm; $\lambda_{emis.max}$: 334nm; İntegrasyon. Süresi (Int. time): 0,1; İlerleme sayısı (step size): 0,25; Geciktirme süresi (delay time): 117ns; Tekrarlama (averages: 3)	71
Şekil 4. 7	Tris.HCl tamponunda (0,025M, 0,1M NaCl, 0,005M CaCl ₂ , pH:8) 8x10 ⁻⁵ M. BSA floresans bozunma eğrisi, bozunma verilerinin eğriye uyarlanması ve floresans ömür dağılımı(ESM, Ki-kare:0,9949). Soldaki saçıcı eğri, lamba pulslarının zamana göre değişimini vermektedir. λ_{exc} : 295nm; $\lambda_{emis.max}$: 334nm; İntegrasyon süresi (Int. time): 0,1; Kanal sayısı(Channels): 400; Tekrarlama (averages: 3)	72
Şekil 4. 8	Tris.HCl tamponunda (0,025M, 0,1M NaCl, 0,005M CaCl ₂ , pH:8) PM-BSA kompleksi absorbans spektrumu. $A_{Toplam(280nm)}=1,4687$; $A_{344nm}=1,2007$; Kör: Tris.HCl (pH:8)	74
Şekil 4. 9	Tris.HCl tamponunda (0,025M, 0,1M NaCl, 0,005M CaCl ₂ , pH:8) BSA standart absorbans eğrisi.....	77
Şekil 4. 10	Tris.HCl tamponunda (0,025M, 0,1M NaCl, 0,005M CaCl ₂ , pH:8) PM standart absorbans eğrisi.....	78
Şekil 4. 11	Tris.HCl tamponunda (0,025M, 0,1M NaCl, 0,005M CaCl ₂ , pH:8) PM-BSA çözeltisinin zaman ayrımlı floresans spektrumu. λ_{exc} : 337nm; $\lambda_{emis.max}$: 384nm(monomer); $\lambda_{emis.max}$: 462nm.(eksimer); İntegrasyon. Süresi (Int. time): 0,1; İlerleme sayısı (step size): 0,25; Geciktirme süresi (delay time): 60ns; Tekrarlama (averages: 3).....	79
Şekil 4. 12	Tris.HCl tamponunda (0,025M, 0,1M NaCl, 0,005M CaCl ₂ , pH:8) PM-BSA çözeltisinin floresans bozunma eğrisi, bozunma verilerinin eğriye uyarlanması ve floresans ömür dağılımı(ESM, Ki-kare:1,017). Soldaki saçıcı eğri, lamba pulslarının zamana göre değişimini vermektedir. λ_{exc} : 337nm; $\lambda_{eksimer.max}$: 462nm; İntegrasyon süresi (Int. time): 0,1; Kanal sayısı (Channels): 700; Tekrarlama (averages: 3)	80
Şekil 4. 13	Tris.HCl tamponunda tamponunda (0,025M, 0,1M NaCl, 0,005M CaCl ₂ , pH:8) 3ml. PM-BSA çözeltisinin tripsin muamelesi öncesinde ve sonrasında alınan zaman ayrımlı floresans spektrumları. λ_{exc} : 337nm; $\lambda_{emis.max}$: 382nm (monomer); $\lambda_{emis.max}$: 462nm.(eksimer); İntegrasyon. Süresi (Int. time): 0,1s; İlerleme sayısı (step size): 0,25; Geciktirme süresi: 60ns; Tekrarlama (averages: 3).....	82
Şekil 4. 14	Tris.HCl tamponunda (0,025M, 0,1M NaCl, 0,005M CaCl ₂ , pH:8) 3ml. PM-BSA çözeltisinin tripsin muamelesinden 24saat sonra alınan floresans bozunma eğrisi bozunma verilerinin eğriye uyarlanması ve floresans ömür dağılımı(ESM, Ki-kare:1,07). λ_{exc} : 337nm; $\lambda_{eksimer-max}$: 462nm; İntegrasyon	

	süresi (Int. time): 0,1; Kanal sayısı(Channels): 700; Tekrarlama (averages: 3)	83
Şekil 4. 15	PM-BSA kompleksi floresans ömür dağılımı ile triptik hidrolizatının floresans ömür dağılımının karşılaştırılması	84
Şekil 4. 16	Üstte, Tris.HCl tamponunda (pH=8) PM-BSA kompleksi ile BSA'ya ait Jel Geçirgenlik Kromatografisi verileri. Cihaz: Viscotek GPC max VE 2001. Kolon: Shimadzu Shim-Pack 300 diol	85
Şekil 4. 17	Üstte, Tris.HCl tamponunda (pH:8) tripsin enzimine ait jel Geçirgenlik Kromatografisi verileri. Cihaz: Viscotek GPC max VE 2001. Kolon: Shimadzu Shim-Pack 300 diol	86
Şekil 4. 18	Üstte, Tris-HCl tamponunda (pH:8) PM-BSA çözeltisinin tripsin ile muamelesinden 24 saat sonra alınan Jel Geçirgenlik Kromatografisi verileri görülmektedir. Cihaz: Viscotek GPC max VE 2001. Kolon: Shimadzu Shim-Pack 300 diol	87
Şekil 4. 19	Tris.HCl tamponunda tamponunda (0,025M, 0,1M NaCl, 0,005M CaCl ₂ , pH:8) 3ml. PM-BSA çözeltisinin kimotripsin muamelesi öncesinde ve sonrasında alınan zaman ayrımlı floresans spektrumları. λ_{exc} : 337nm; $\lambda_{emis.max}$: 382nm (monomer); $\lambda_{emis.max}$: 462nm.(eksimer); İntegrasyon süresi (Int. time): 0,1s; İlerleme sayısı (step size): 0,25; Geciktirme süresi: 60ns; Tekrarlama (averages: 3)	89
Şekil 4. 20	Tris.HCl tamponunda (0,025M, 0,1M NaCl, 0,005M CaCl ₂ , pH:8) 3ml. PM-BSA çözeltisinin kimotripsin muamelesinden 24saat sonra alınan floresans bozunma eğrisi, bozunma verilerinin eğriye uyarlanması ve floresans ömür dağılımı (ESM, Ki-kare:1,004). λ_{exc} : 337nm; $\lambda_{eksimer-max}$: 462nm; İntegrasyon süresi (Int. time): 0,1; Kanal sayısı(Channels): 700; Tekrarlama (averages: 3)	90
Şekil 4. 21	PM-BSA kompleksi floresans ömür dağılımı ile kimotriptik hidrolizatının floresans ömür dağılımının karşılaştırılması	91
Şekil 4. 22	Tris-HCl tamponunda (pH=7,8) kimotripsin enzimine ait Jel Geçirgenlik Kromatografisi verileri. Cihaz: Viscotek GPC max VE 2001. Kolon: Shimadzu Shim-Pack 300 diol	92
Şekil 4. 23	Tris-HCl tamponunda (pH=7,8) PM-BSA çözeltisinin kimotripsin muamelesinden 24 saat sonra alınan Jel Geçirgenlik Kromatografisi verileri görülmektedir. Cihaz: Viscotek GPC max VE 2001. Kolon: Shimadzu Shim-Pack 300 diol	93
Şekil 5. 1	Kimotripsin ve Tripsin enzimlerinin hidrolizi sonucu PM-BSA'nın zaman ayrımlı floresans spektrumunun değişimi, $\lambda_{excitation}$ = 337nm, $\lambda_{monomer-max}$ = 382nm, $\lambda_{excimer-max}$ = 462nm, integration time = 0,1s	94
Şekil 5. 2	PM-BSA'nın (proteoliz öncesi) ve proteazların hidrolizi sonrası floresans ömür dağılımları karşılaştırması	95

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 2. 1	Karbon-oksijen ve karbon-azot bağ uzunlukları [16] 7
Çizelge 2. 2	EC sistemine göre peptidazların sınıflandırılması [7] 23
Çizelge 2. 3	Üç farklı serin proteaz türüne ait katalizde görevli aktif bölge amino asitleri [6] 27
Çizelge 2. 4	peptidlerin yapısında bulunan amino asitlerin yan gruplarına bağlanan grup spesifik reaktifler [35] 57
Çizelge 4. 1	BSA'nın konsantrasyona göre 280nm'de absorbands değerleri 76
Çizelge 4. 2	PM'in konsantrasyona göre 344nm'de absorbands değerleri 77

**PİRENİL TÜREVLERİ İLE MODİFİYE EDİLMİŞ FLORESAN KARAKTERLİ
PEPTİD VE PROTEİN SUBSTRATLARA PROTEAZ ETKİSİNİN FLOROMETRİK
YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ**

İbrahim Ethem ÖZYİĞİT

Kimya Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Emine KARAKUŞ

Spektroflorometrik yöntemler çok sayıda değişik enzimlerin aktivitelerinin incelenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Enzim aktivitesinin florometrik olarak gösterilmesi, doğrudan enzimlerin substratlarından ya da substratlarının floresan türevlerinden elde edilen emisyon sinyallerinin yorumlanmasıyla gerçekleştirilir. Böylece enzim-substrat komplekslerinin oluşumu, konformasyonel değişimleri, enzim faaliyetinin durdurulması ve enzimatik reaksiyon kinetiği florometrik verilerle hassas olarak izlenebilmektedir.

Piren, floresein, rodamin, antrasen vb. floresan karakterli çok sayıda organik madde; yapılarında gerçekleştirilen uygun kimyasal değişikliklerle, proteinleri oluşturan L- α -amino asitlerin alkil yan zincirlerinde bulunan $-COOH$, $-NH_2$, $-OH$, $-SH$ gibi işlevsel gruplara kovalent olarak bağlanabilmektedir.

Bu çalışmada, kimotripsin ve tripsin enzimlerinin aktivitelerinin, N-(1-pirenil)maleimid ile modifiye edilmiş sığır serum albumininin floresans ömür dağılımları üzerindeki etkileri incelendi. Floresans ömür dağılımlarındaki değişimleri elde etmek amacıyla Ekspansiyon Seriler Yöntemi (ESM) ile analiz edilen floresans bozunma verilerini görüntülemek için zaman ayırmalı spektrofloreometre kullanıldı. Sentezlenen substrat PM-BSA'nın proteazlara maruziyeti sonrası floresans ömür dağılımları, proteazların farklı aktivitelerine atfedilen özgün yapılar sergiledi. Bu olgu fizyolojik etkinliklerinin yanı sıra kanser, AIDS, SARS vb. birçok hastalıkta kilit rolü olan proteazların

aktivitelerinin belirlenmesi ve birbirlerinden ayrıştırılması için geliştirilebilecek yeni tetkik yöntemlerine kapı aralamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Floresans ömür dağılımı, N-(1-pirenil)maleimid, eksimer, sığır serum albumin, kimotripsin, Tripsin



**EXAMINATION OF PROTEASE EFFECTS ON FLUORESCENT PEPTID AND
PROTEIN SUBSTRATES MODIFIED WITH PYRENYL DERIVATIVES BY
FLUOROMETRIC METHODS**

İbrahim Ethem ÖZYİĞİT
Department of Chemistry
PhD Thesis

Adviser: Assoc. Prof. Dr. Emine KARAKUŞ

Spectrofluorometric methods are widely used for examination of activities of many various enzymes. Monitoring of enzyme activity in fluorometric examinations are performed by evaluation of changes of the emission signals obtained directly from the substrates of enzymes or from the fluorescent derivatives of their substrates. Thus it can sensitively be succeeded that the formation of Enzyme – Substrate complexes, conformational changes and enzymatic reaction kinetics by evaluation of fluorometric data.

Many fluorescent organic substances, such as pyrene, fluorescein, rhodamin, anthracene, etc. can be covalently bound to the functional groups such as –COOH, -NH₂, -OH, -SH existing in alkyl side chains of L-α-amino acids by the way of proper chemical changes performed in their structures.

In this study, the effects of activities of chymotrypsin and trypsin enzymes on fluorescence lifetime distributions of the substrat Bovine Serum Albumin (BSA) modified with N-(1-pyrenyl)maleimide (PM) were examined. The time resolved spectrofluorometer was used to monitor fluorescence decays, which were analysed by using the Exponential Series Method (ESM) to obtain the changes of fluorescence lifetime distributions. After the exposure of the synthesized substrat PM-BSA to the proteases, the fluorescence lifetime distributions exhibited specific structures, which are attributed to the different activities of the proteases. This phenomenon opens the door to new assay methods which would be developed to determine and to distinguish

the activities of proteases which have key roles in many diseases like cancer, AIDS, SARS, etc.

Keywords: Fluorescence lifetime distribution, N-(1-pyrenyl)maleimide, Excimer, Bovine serum albumin, Chymotrypsin, Trypsin



1.1 Literatür Özeti

Biyolojik olarak aktif moleküllerin işaretlenmesi ve bunların özellikle kantitatif veya kalitatif tayin amaçlı kullanılması 1950 yılı öncesine kadar gitmektedir. Radyoaktif madde kullanarak antijen ya da antikorların işaretlenmesi ve bunların kullanılması ile immunolojik kitlerin hazırlanması 1960 yılı ve sonrasında gerçekleştirilmiştir. Daha sonraki yıllarda enzim ve floresan madde işaretli biyolojik moleküllerin kullanılması ile klinik tayinlerde kullanılan kitlerin geliştirilmesi konusu oldukça fazla hız kazanmıştır ve çeşitli özellikte floresan maddeler işaretlemede kullanılmıştır. Uzun ömürlü floresan maddelerin işaretleme işleminde yer alması ve zaman ayrımlı floresans yöntemi ile ölçüme olanak sağlayan florometrelerin geliştirilmesi, çok hassas klinik kitlerinin hazırlanmasını gündeme getirmiştir. Floresans spektroskopisi özellikle biyolojik moleküllerin yapılarının aydınlatılmasında, birçok reaksiyonun izlenmesinde araştırma amaçlı olarak yer almaktadır. Son yıllarda yaygın olarak kullanılmakta olan zaman-ayrımlı floresans tekniği (Time-resolved fluorescence), emisyonun bozunma profillerini ve zamanı dikkate alan spektrumların alınmasına imkân sağlamaktadır. Böylece floresans ömür hesaplanabildiği gibi, moleküller arası etkileşimler, solvent etkisi ve reaksiyonlar izlenebilmektedir [1-6].

Enzimlerin substratları üzerindeki etkinliklerinin florometrik yöntemlerle belirlenmesi; substratlarının yapısında doğal olarak bulunan veya substrat yapısına sonradan eklenen floresan moleküllerin, enzim faaliyeti sonucu floresans özelliklerindeki değişimlerinden elde edilen fotofiziksel verilerin değerlendirilmesi ile gerçekleştirilir. Florometrik

veriler; floresan maddenin emisyon şiddetinde artma, azalma, floresans emisyonun sönümlenmesi, emisyon spektrumunda maksimum emisyon dalgaboyundaki kaymalar, floresans bozunmanın zamana göre değişimi, floresans ömrün değişimi ve çeşitlenmesi gibi farklı parametrelerden elde edilir [1-6].

Proteolitik enzimler ve inhibitörleri, hücre çevriminin kontrolü, büyüme ve farklılaşma, gen anlatımı, enzim modifikasyonu, immün reaksiyonlar, doku biçimlendirme, apoptosis gibi canlı organizmaların metabolizmik aktivitelerinde temel ve hayati rol oynarlar [7,8,9].

Piren türevleri biyomoleküllerin, fonksiyonel grup miktarı [1], membran geçirgenliği [2,10,11], enzimlerin kinetik parametreleri [12], konformasyonel değişimler [13,14], alt birimler arası etkileşimler[15] ve alt birimlerin işlevleri gibi biyokimyasal fonksiyonları etkileyen yapısal durumlarının ve parametrelerinin belirlenmesi ve izlenmesinde floresan eklentiler olarak kullanılır. Pirenin maleimid türevi nötral pH civarındaki reaksiyon koşulları altında serbest sülfhidril (-SH) gruplarının seçimli işaretlenmesinde floresan etiket olarak kullanılır [1]. Enzim etkisi sonucu substrat dinamiğinde eser miktarlardaki değişimler, diğer organik maddeler ve tuzlar ortamda yüksek konsantrasyonlarda olsalar bile floresans ölçüm yöntemleri ile duyarlı olarak saptanabilmektedir.

1.2 Tezin Amacı

Bu çalışmanın amacı, serin proteazlar sınıfından olan sindirim enzimleri tripsin ve kimotripsinin, N-(1-pirenil)maleimid ile modifiye edilmiş BSA (PM-BSA) üzerindeki aktivitelerinin farklılığını floresans ömür dağılımlarındaki değişimlerle göstermek ve böylece proteazların tanılanması ve aktivitelerinin birbirlerinden ayrıştırılmasına yönelik geliştirilebilecek yeni tetkik yöntemlerine kapı aralamaktır.

1.3 Hipotez

Proteazların doğal substratları olan proteinlerin karmaşık üç boyutlu yapıları, içinde bulundukları çözücü ile etkileşim dereceleri farklı kimyasal bölgeler içerir. Bu bölgelerde özel gruplara uygun reaksiyonlarla bağlanabilen floresan moleküller

birbirlerinden farklı floresans ömür sergilerler [2]. Bu floresans ömür çeşitliliği, protein substrata özgü bir floresans ömür dağılımı oluşturur.

Proteazların belli bir protein substrattan ürettiği proteolitik hidrolizatlar peptid içerikleri bakımından birbirlerinden farklıdır. Her bir hidrolizattaki peptidlerin yapısında yer alan amino asitlerin türleri, sayıları, ve dizilimlerinin farklılığı peptidlerin şekillerini, boyutlarını, konformasyonlarını, elektriksel yüklerini, polaritelerini ve de kimyasal çevrelerini özgün kılar ve bu özgünlük aynı zamanda proteazın sözkonusu protein substrat üzerindeki özgün aktivitesinin bir sonucudur. Bu durumda peptidlerin üzerindeki floresan moleküllerin floresans ömür dağılımları da, kimyasal çevreleri ile etkileşimlerinin üzerinde bulundukları peptide bağlı olarak şekillenmesinden dolayı proteazın özgün hidroliz karakterinin özgün sonucu olarak ortaya çıkar. Proteolitik hidrolizatların floresans ömür dağılımlarındaki bu özgün farklılıklar, proteazların aktivitelerini tanılamak ve birbirlerinden ayırtırmak için geliştirilebilecek tetkik yöntemlerine temel oluşturma potansiyeli taşımaktadır.

BÖLÜM 2

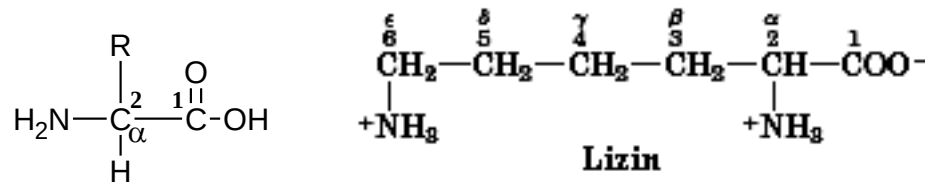
GENEL BİLGİ

2.1 Enzimlerin Yapısal Birimleri: Amino asitler, Peptid Bağı ve Protein Yapıları

Enzimler, anayapısını proteinlerin oluşturduğu biyokatalizörlerdir. Bu nedenle enzimlerin yapı ve işlevlerini anlayabilmek için önce protein yapısını oluşturan amino asitleri ve amino asit birimlerinin kendi aralarında özel bağlanmalarla birleşerek meydana getirdikleri protein yapı çeşitliliğini incelemek gerekir.

2.1.1 Amino Asitler ve Peptid Bağı

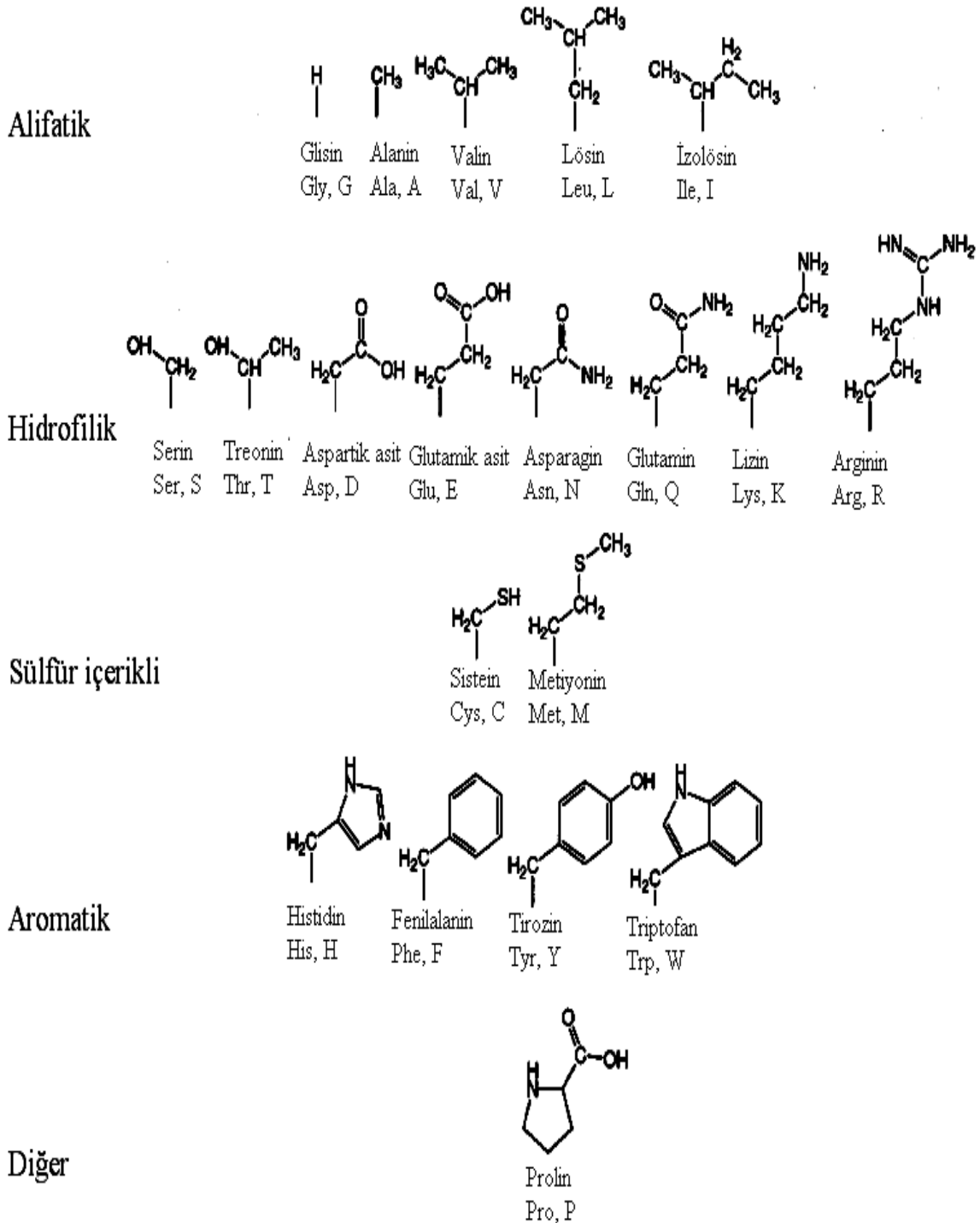
Amino asitler, yapılarında amino (-NH₂) ve karboksilik asit (-COOH) gruplarını içeren moleküllerdir ve canlılarda çok değişik fonksiyonlara sahiptirler. Genelde biz onları sadece proteinlerin monomerleri olarak biliriz ama doğada bulunan 300 amino asidin yalnızca 20'si proteinlerde bulunur (Şekil 2.2).



Şekil 2. 1 Amino asitlerin genel yapısı ve lizin amino asidi

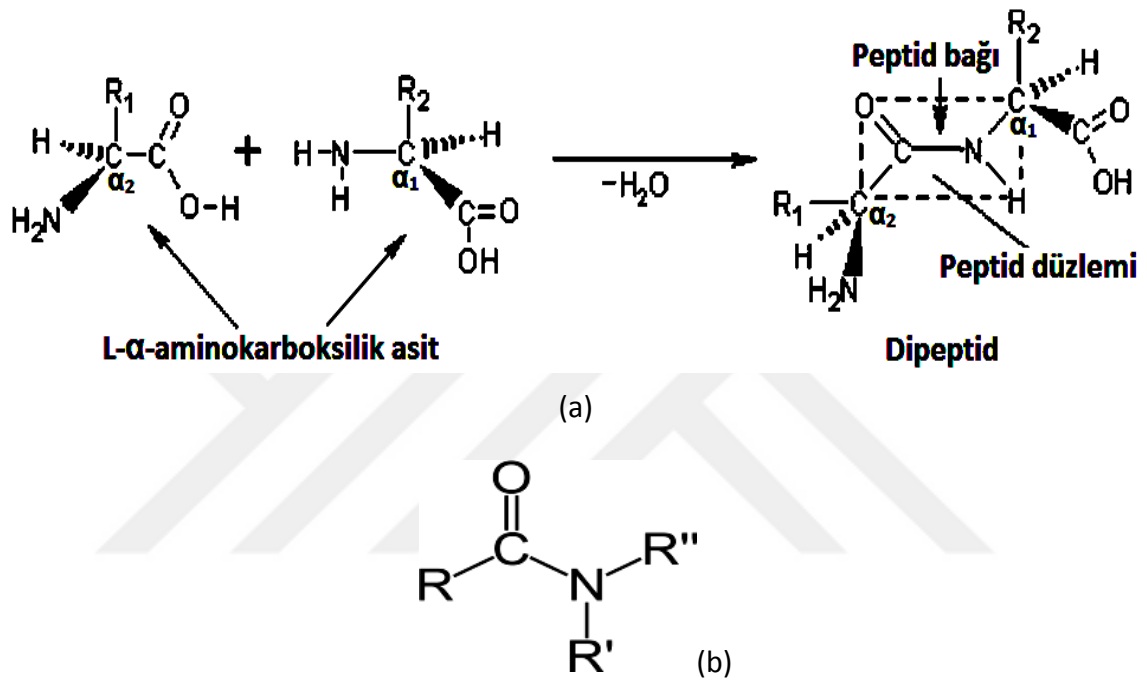
Proteinlerin yapısında bulunan bu 20 amino asit L-α-amino asit olarak adlandırılırlar. Buradaki α ön eki, moleküldeki α- karbonuna hem amino hem de karboksilik asit gruplarının bağlı olduğunu gösterir. L- ön eki ise, daha ziyade molekülün stereokimyasıyla alakalıdır. Şekil 2.1'de görüldüğü üzere α karbonuna -H, -NH₂, -COOH ve bir de -R grubu bağlıdır ve bu karbon R grubunun -H olduğu glisin dışında diğer tüm

amino asitlerde, 4 farklı grubun bağlı olduğu bir stereojenik merkezdir. Bu yüzden bu α -amino asitler kiraldır ve L- ön eki sola çeviren anlamına gelen Levorotatory'den gelir; molekülün de L-gliseraldehit ile aynı mutlak konfigürasyona sahip olduğunu gösterir (Şekil 2.3).



Şekil 2. 2 Yirmi doğal amino asidin yanzincir (-R) yapıları, adları, üç harfli ve tek harfli kısaltmaları. Prolin amino asidi bütün olarak gösterilmiştir [16]

Canlı organizmalarda, yapılarındaki alkil (–R) yan zincirlerinin farklılığından dolayı yirmi değişik çeşidine rastlanan “**L-α-amino karboksilik asit**” moleküllerinin 100’den fazlasının, farklı dizilimlerde peptid bağlarıyla biraraya gelerek oluşturdukları makromoleküllere **protein** denir. **Enzimler**; üç boyutlu yapıları biyokimyasal reaksiyonları katalizlemek üzere özelleşmiş önemli bir protein alt grubudur. 1-100 arası sayıda “L- α-amino asit” birimlerinin oluşturduğu zincirlere **peptid** adı verilir. Proteinler aynı zamanda polipeptid yapılı biyomakromoleküllerdir.



Şekil 2. 3 Peptid bağı oluşumu (a) ve amid genel yapısı (b)

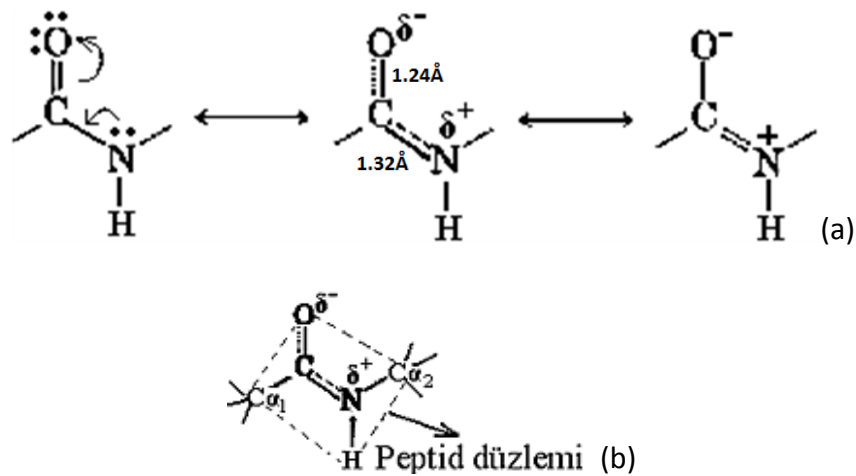
Peptid bağı; en az iki “L-α-amino asit” molekülünün karboksilik asit ve amin grupları arasında bir molekül su çıkışıyla gerçekleşen kondensasyon reaksiyonu sonucu oluşan amid bağıdır. Peptid bağı, peptid düzleminde yer alan O-C-N atomları üzerindeki π sistemi delokalizasyonu nedeniyle gösterdiği rezonans yapılarından dolayı kısmî çifte bağ yapısı sergiler (Şekil 2.4).

Küçük peptidler üzerinde yapılan x-ray kristalografi çalışmaları, peptid bünyesindeki C-N ve C-O yapılarının, tek bağlı (C-N, C-O) ve çift bağlı (C=N, C=O) hallerinin arasında bir bağ uzunluğuna sahip olduklarını ortaya koymuş ve elde edilen bu bağ uzunlukları verilerine göre peptid bağının %60 C=O ve %40 C=N karakteri gösterdiği sonucuna varılmıştır (Çizelge 2.1) [16].

Çizelge 2. 1 Karbon-oksijen ve karbon-azot bağ uzunlukları [16]

Bağ Tipi	Bağ Uzunluğu (Å)
C—O	1.27
C=O	1.22
C=O(Peptid)	1.24
C—N	1.45
C=N	1.25
C=N(Peptid)	1.32

C-N eksenini boyunca oluşan %40'lık çifte bağ karakterinin peptid bağına kazandırdığı kararlılık peptid bağı etrafındaki dönme hareketini (rotation) engeller. Bu nedenle peptid ünitesinde yer alan altı atom düzlemsel bir dizilim düzeni oluşturarak peptid düzlemini meydana getirirler. Bu düzlemsel yapı peptidin kendini uyarlayabileceği uzaysal şekillenmelerin sayısına sınırlama getirir. Peptid düzleminde karbonil oksijeni ile azot protonunun, C-N bağının tanımladığı eksenin aynı tarafında yerleşmeleri ile *cis*, zıt taraflarında yerleşmeleri ile *trans* stereoizomerleri oluşabilir. Ancak amino asitlerin yan zincirlerinin sterik engellemeleri *cis* stereoizomer yapısının oluşmasına izin vermez. Bu nedenle hemen hemen tüm doğal peptidler *trans* stereoizomer yapısında sentezlenir (Şekil 2.4). Cis- izomer yapı bu genel kurala; Prolil-Peptid bağı şeklinde, ribonükleaz-S (Pro 93'ten önce ve Pro 114'ten önce), subtilisin (Pro 168'den önce) ve Staphylococcal nükleaz (Pro 116'dan önce) olmak üzere sadece üç enzimde bilinen istisnaları oluşturur [16].



Şekil 2. 4 Peptid bağı rezonans yapıları, (a) π sistemi delokalizasyonu ve (b) peptid düzlemi

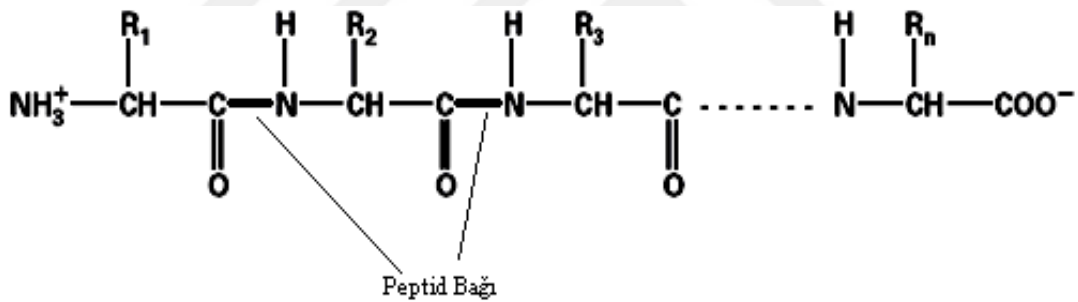
Proteinleri birbirlerinden farklı kılan özellikler; içerdikleri amino asitlerin çeşitliliği, amino asitlerin polipeptid zinciri içerisindeki dizilim sıraları, protein yapısındaki toplam amino asit sayısı ve de karbohidratlar ve yağlar gibi protein olmayan moleküllerle yaptıkları komplekslerdir [16].

2.1.2 Proteinlerin Yapısal Özellikleri

Proteinler; birincil (primer), ikincil (sekonder), üçüncül (tersiyer) ve dördüncül (kuaterner) olmak üzere dört farklı yapısal çeşitlilik gösterirler.

2.1.2.1 Birincil (Primer) Protein Yapısı

DNA yapısındaki genetik kodlara göre polipeptid zinciri içerisindeki dizilim sıraları belirlenen amino asitlerin peptid bağlarıyla biraraya gelerek oluşturdukları katlanmamış, tek ve açık zincirli yapıdır. Birincil protein yapısındaki amino asitlerin çeşitleri, dizilim sıraları ve sayıları üçüncül protein yapısının şeklini belirler (Şekil 2.5).



Şekil 2. 5 Birincil protein yapısı [16]

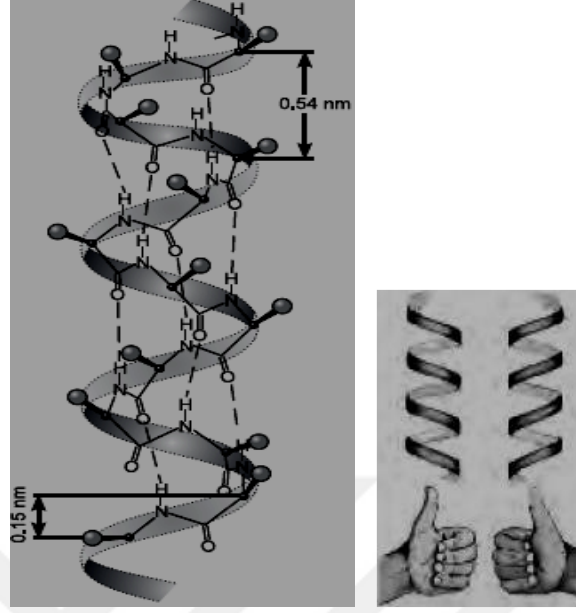
2.1.2.2 İkincil (Sekonder) Protein Yapıları

Sadece bir polipeptid zincirinin kıvrılmasından oluşan “α-heliks”, birden fazla polipeptid zincirinin yanyana gelerek oluşturduğu “β-katlanmış tabaka yapıları” olmak üzere, proteinler iki çeşit sekonder yapı gösterirler.

2.1.2.2.1 α-Heliks Yapısı

Bir polipeptid zincirinin bir eksen etrafında sağ el kavrayışı yönünde kıvrılmasıyla meydana gelen sekonder yapı şeklidir. Heliks yapının her döngüsü 3.6 amino asit içerir ve kıvrımlar arası mesafe yaklaşık 0.54 nm’dir. Kıvrımlar arası uzanan -CO ve -NH

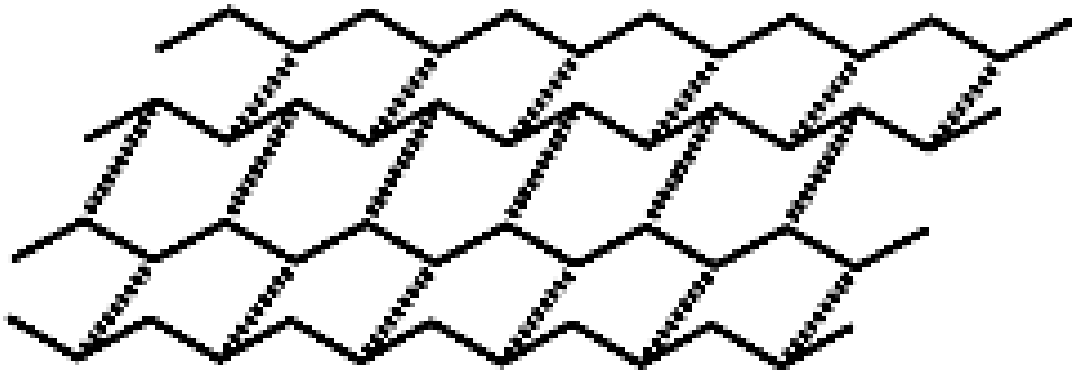
grupları arasında oluşan hidrojen bağları yapının kararlılığını sağlar. Peptid zincirinin içerdği -R grupları heliks yapının dışına doğru uzanır (Şekil 2.6).



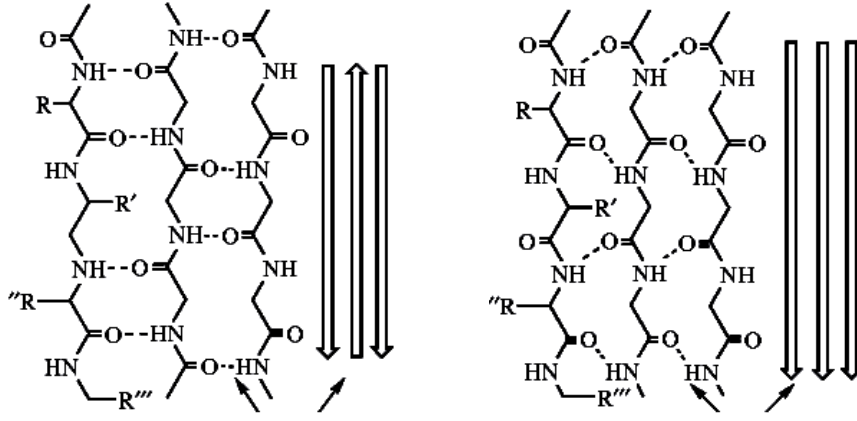
Şekil 2. 6 α -heliks (Sağ el) Sol - Sağ α -heliks

2.1.2.2.2 β -Katlanmış Tabaka Yapısı

İki ya da daha fazla sayıda polipeptid zincirinin yan yana paralel olarak, karşılıklı $-NH$ ve $-CO$ grupları arasında kurulan hidrojen köprü bağları ile biraraya gelmeleri sonucu β -katlanmış tabaka yapıları oluşur. Bu komşu zincirlerin $-NH$ ve $-CO$ grupları arasında oluşan hidrojen bağları yapıya kararlılık kazandırır. İki çeşit β -katlanmış tabaka yapısı vardır. Yanyana gelen polipeptid zincirlerinin $-NH_2$ veya $-CO$ uçları aynı yönde uzanıyorsa paralel β -katlanmış tabaka yapısı, zıt yönde uzanıyorsa anti-paralel β -katlanmış tabaka yapısı ortaya çıkar (Şekil 2.7 ve Şekil 2.8).



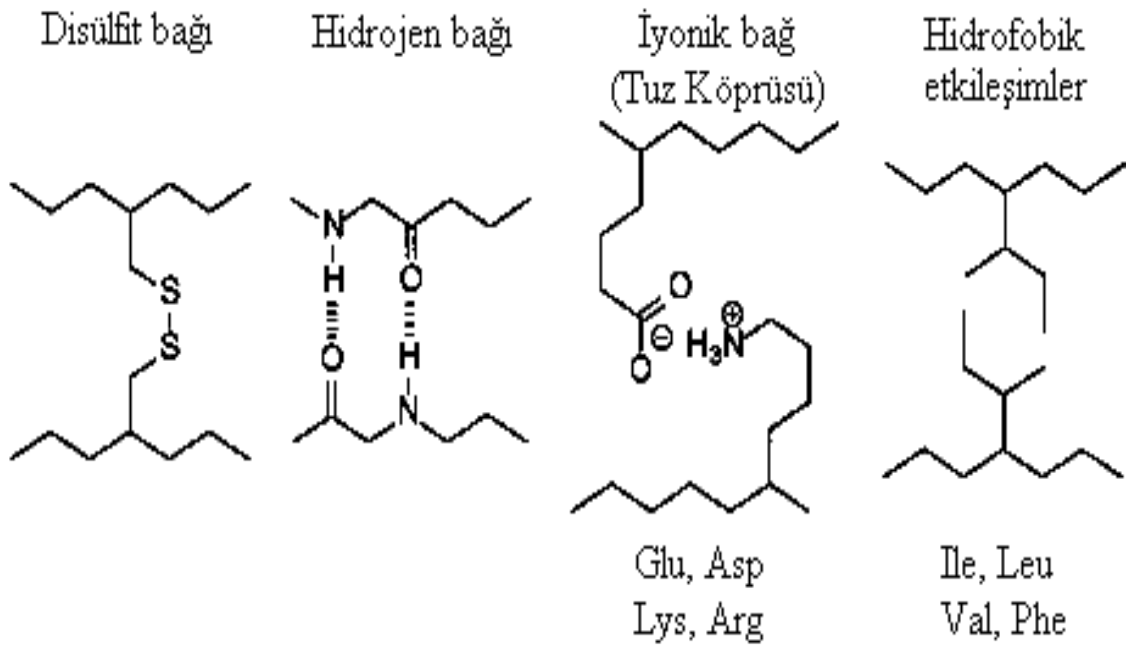
Şekil 2. 7 anti-paralel β -katlanmış tabaka yapısı [16]



Şekil 2. 8 anti-paralel β -katlanmış tabaka yapısı ve paralel β -katlanmış tabaka yapısı [16]

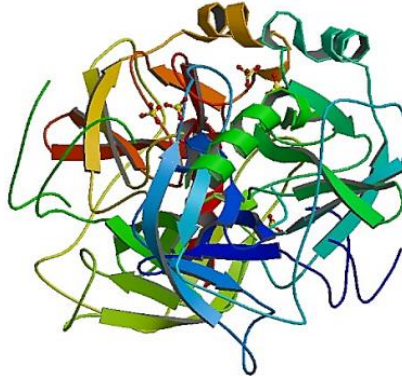
2.1.2.3 Üçüncül (Tersiyer) Protein Yapıları

İkincil (sekonder) yapılar (α -Heliks ve β -Katlanmış Tabaka Yapıları) içeren bir polipeptid zincirindeki çeşitli R gruplarının kendi aralarında van der Waals kuvvetleri, hidrofobik etkileşimler, iyonik bağlar, kovalent bağlar (disülfid köprüleri) ve hidrojen bağlarıyla etkileşimleri sonucu polipeptid zincirinin belli bir düzende katlanmasıyla oluşan işlevsel üç boyutlu protein yapılarıdır. Her proteinin üçüncül yapısı kendine özgüdür. Bu özellik proteinlerin organizmadaki işlevlerinin de özgün olmasını, bir başka deyişle organizmada belirli görevler üzerinde özelleşmelerini sağlar (Şekil 2.9).



Şekil 2. 9 Üçüncül (tersiyer) yapıyı oluşturan bağlar

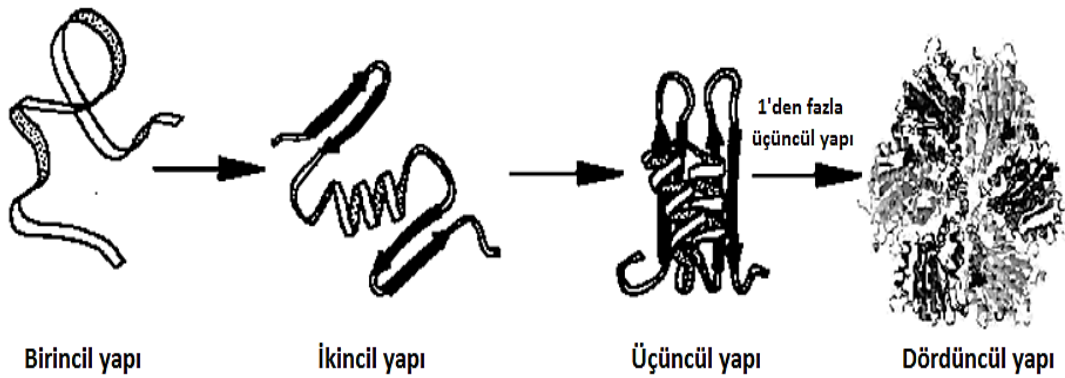
Katlanma sonucu oluşan yapı genellikle küreseldir. Katlanma işlemi genelde hidrofilik gruplar küre yüzeyinde, hidrofobik gruplar ise küre merkezine doğru yer alacak şekilde gerçekleşir (Şekil 2.10).



Şekil 2. 10 Kimotripsin'in üçüncül (tersiyer) yapısı [17]

2.1.2.4 Dördüncül (Kuaterner) Protein Yapısı

Her işlevsel protein sadece tek bir katlanmış polipeptid zincirinden ibaret değildir. Dördüncül protein yapıları; 1'den fazla tersiyer yapı polipeptid zincirlerinin kovalent bağlar, iyonik bağlar, van der Waals kuvvetleri ve hidrofobik etkileşimlerle bir araya gelerek oluşturdukları ve organizmada belli görevler üzerinde özelleşmiş yapılardır. Kuaterner yapıda yer alan her bir üçüncül yapı polipeptid zinciri alt birim (subunit) olarak adlandırılır. Alt birimler birbirlerinden ayrıldığında protein işlevi kaybolur. Kuaterner yapıya bilinen en iyi örnekler, her ikisi de oksijen ile tersinir bağlanmalar yapan; kan dokusunda eritrosit hücrelerinde bulunan hemoglobin ve kas dokusunda bulunan miyoglobin adlı iki proteindir (Şekil 2.11).

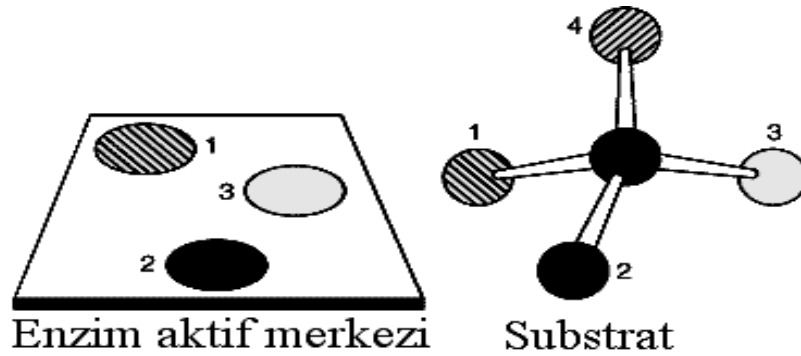


Şekil 2. 11 Bir polipeptid zincirinin katlanarak üçüncül yapıya dönüşmesi ve Birden fazla üçüncül yapının bir araya gelerek dördüncül yapıyı oluşturması [16]

2.2 Enzim Yapısı ve Katalitik Etki

Üç boyutlu yapıları biyokimyasal reaksiyonları katalizlemek üzere özelleşmiş proteinlere enzim denir. Enzimlerin katalizör olarak etki ettiği maddelere substrat adı verilir. Hayatın varlığı ve devamı enzimler vasıtasıyla hızlandırılan karmaşık biyokimyasal reaksiyon ağlarına bağlıdır. Enzim kelimesi mayada bulunan anlamına gelir. Enzimlerle ilgili ilk çalışmalar 1897’de E. Buchner’in maya ekstraktı kullanarak fermantasyonla alkol elde etmesi ile başlamıştır. 1926 yılında Sumner üreaz enzimini fasulyeden izole ederek kristallendirmeyi başarmıştır. Enzimlerin Protein yapısında oldukları 1930-1936 yılları arasında John Northrop’un pepsin, tripsin ve kimotripsin enzimlerini saflaştırıp kristal halde elde etmesi ile kesinlik kazanmıştır [16].

Enzimlerin mol kütleleri 10^4 - 10^6 akb [atomik kütle birimi(akb), atomic mass unit (amu) veya Dalton (Da)] arasında değişir. Bu büyük moleküllerin “aktif merkez” adıyla bilinen küçük ve özel bir kısmı katalizde görev alır. Enzimatik reaksiyonlardaki hız artışını anlayabilmek için bu aktif merkezin yapısını ve substratla etkileşimini incelemek gerekir. Bununla beraber bir bütün olarak enzimin üç boyutlu doğal yapısı da katalitik aktivitesinde ve substrat spesifikliğinde etkilidir. Enzimler, aktif merkezlerin özel tasarımı nedeniyle hem reaksiyon tipleri hem de substratlara seçimlilik gösteren çok spesifik katalizörlerdir. Bir enzim için substrat sayısı bir veya birkaç tane olabilir. Enzimlerin substratları için seçimlilik göstermeleri aktif merkezin yapısı ile ilgilidir. Çoğunlukla asimetrik bir oyuk veya cep şeklinde olan aktif merkezin geometrisi, bu bölgeye girişini kolaylaştıracak şekilde, substratının üç boyutlu yapısıyla uyumluluk gösterir [16].

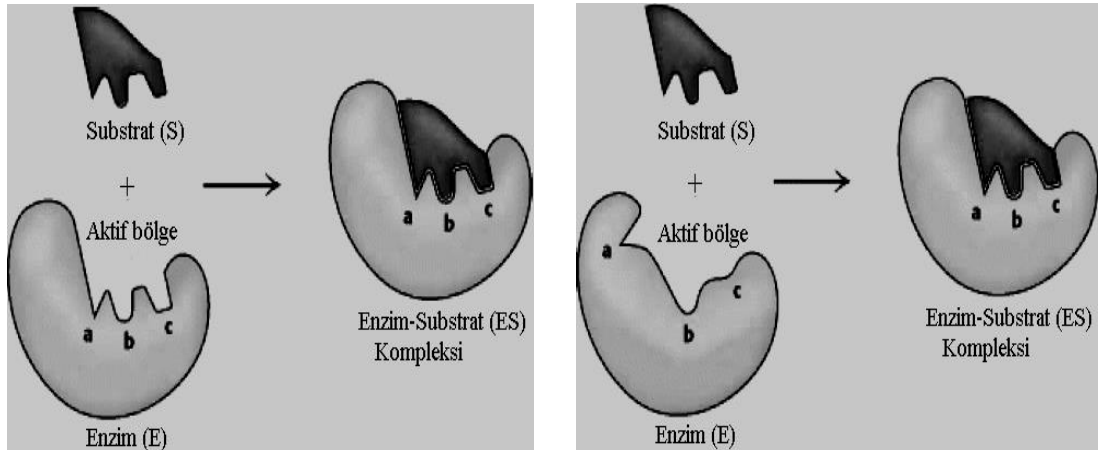


Şekil 2. 12 Aktif merkez ve substrat arasında üç uçlu bağlanmanın düzlemsel gösterimi [18]

Fiziksel yapı uygunluğunun yanı sıra aktif bölge, polarlık ve elektriksel yük bakımından da substratın kolayca bağlanmasını sağlayacak özelliktedir. Substrat molekülü, aktif bölgeyi şekillendiren amino asitlerin alkil yan zincirlerinde yer alan $-NH_3^+$ ve $-COO^-$ grupları ile elektrostatik etkileşmeler (tuz köprüleri) yapabilir; $-OH$, $=NH$, $=N-$ vb gruplarla hidrojen köprü bağları kurabilir ve de hidrofobik etkileşmeler gösterebilir.

Alkol dehidrojenazlarla yapılan çalışmalar; substratın enzim tarafından tanınabilmesi için, enzimle substrat arasında en az üç noktada bağlanmanın gerçekleşmesi gerektiğini ortaya koydu [16, 18]. Şekil 2.12’de 1 ve 4 no’lu atomlar özdeş olduğu halde, ancak 2 ve 3 no’lu atomların enzim üzerindeki tamamlayıcı bölgelerine bir kez bağlanmaları durumunda 1 no’lu atomun bağlanma yapabileceğini göstermektedir. Böylece enzime bağlanma, özdeş atomların stereospesifik olarak birbirlerinden ayırt edilebilmelerine imkân tanır.

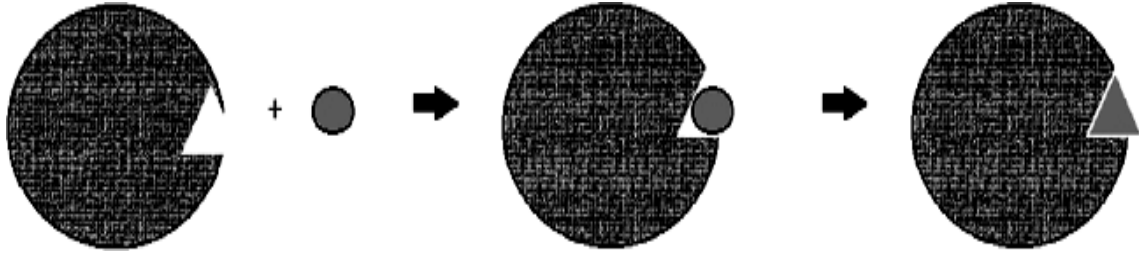
Enzim ile Substratın üç boyutlu uzaysal şekil uyumu göstererek bağlanmalarını ve kataliz mekanizmasını açıklamak için ileri sürülen beş model bulunmaktadır. 1890’larda Fischer’in öne sürdüğü ve **Anahtar-Kilit modeli** olarak adlandırılan ilk modelde enzimin aktif bölgesi substrat ile üç boyutlu biçimsel tamamlayıcılık ve kimyasal uyum gösterir, birbirine yaklaşan “enzim-substrat” ikilisi ES kompleksini oluşturur (Şekil 2.13), [19].



Şekil 2. 13 Fischer’in Anahtar-Kilit Modeli (solda) ve Koshland’ın Uyarılmış Şekilsel Uyum (Induced fit) (sağda) modeline göre Enzim-Substrat (ES) kompleksinin oluşumu.

1930’da Haldane zayıf bağlanmaların kataliz sürecinde esas unsurlar olabileceğini keşfetti ve bu keşif enzimatik katalizin açıklanmasında temel rol oynadı. 1948’de Pauling, artan geçiş hali kararlılığının ürüne dönüşümü hızlandırıldığını ileri sürdü ve bu

hipotez benzer geçiş hal yapılarına sahip farklı kararlılıkta komplekslerin kullanıldığı deneylerle doğrulandı.



Şekil 2. 14 Haldane'ın geçiş hali tamamlayıcılık modeli'ne göre ES kompleksinin oluşumu [19]

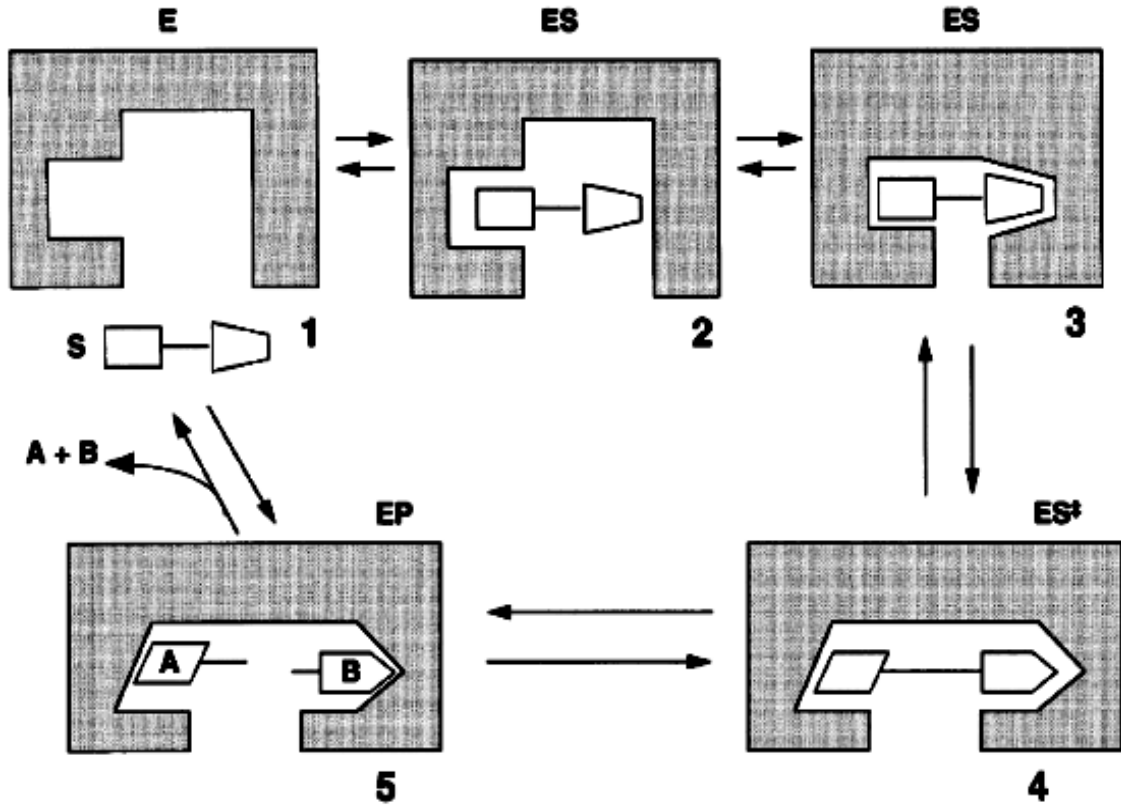
Haldane aynı yıllarda enzimin aktif bölgesinin sabit yapılı olduğunu varsayarak; zayıf bağla enzime bağlanan substratın üzerinde oluşan bir gerilme nedeniyle ilgili bir bağının zayıflayacağını ve sonuçta substratın aktif bölgeye göre şekil değişimine uğrayacağını öngördüğü geçiş hali tamamlayıcılık modeli'ni ortaya attı (Şekil 2.14).

1958'de Koshland, uyarılmış (indüklenmiş) şekilsel uyum modeli'nde, başlangıçta biçimsel uyuma sahip olmayan enzim aktif bölgesinin, substratın yaklaşarak bağlanmasından sonra bu bağ oluşumunun tetiklediği, biçimsel bütünlük oluşturmak üzere substratı kavramaya yönelik üç boyutlu yapısal uyarılama sürecinden geçtiğini öne sürerek Haldane'ın modeline bir değişim getirdi (Şekil 2.13), [19].

Bu modeller, enzim özgülüğüne bazı yaklaşımlar getirmelerine karşın katalitik tepkime hızının nasıl arttığına dair fikir vermezler. Kantitatif enzimatik reaksiyon çalışmaları gözlenen hız artışının, sadece reaktiflerin birbirine yaklaşması ve de ES kompleksinin kararlılığını arttırarak tepkime hızına pozitif katkı yaptığı düşünölen aktif bölgedeki özel bağlanmalarla [hidrojen bağları, tuz köprüleri (elektrostatik etkileşimler), kovalent bağlar] açıklanamayacağını göstermiştir. Bu durum yeni bir modele ihtiyaç doğurdu.

Enzimler de dahil olmak üzere çok sayıda protein dinamik konformasyonel yapı gösterir; bir başka deyişle proteinler yapısal esneklik sergiler. Proteinlerin bu yapısal esnekliği Fischer ve Haldane'ın modelinde hiç dikkate alınmazken Koshland'ın modelinde sadece aktif bölgedeki küçük değişmelerle sınırlı kalmıştır. 1969'da Jencks, tersinir enzimatik reaksiyonlarda ES kompleksinin bükölme hareketinin katalizin önemli bir unsuru olduğunu kanıtladı. 1975'te Segel uyarılmış gerilme hipotezi'ni öne sürdü.

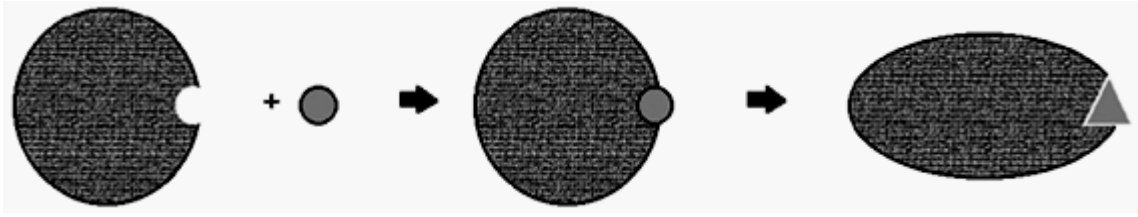
Bu modelde, ES kompleksi oluştuktan sonra enzim Koshland'in modelini de kapsayacak şekilde bir seri konformasyonel düzenlemelerden geçer. Bu hareket ilgili bağda gerilim oluşturur, temel haldeki substrat geçiş halini alır ve bu uyarılmış gerilim bağda kırılmayla sonuçlanarak ürün oluşur (Şekil 2.15), [16].



Şekil 2. 15 Enzim-Substrat etkileşiminin Uyarılmış Gerilme (Induced-strain) Modeli ve kataliz: 1. Çözeltide Serbest enzim ve substrat, 2. Substrat bükülmesi olmaksızın ES kompleksini oluşturan ilk bağlanma, 3. Enzim substratla daha iyi bağlanmak üzere konformasyonel değişim gösterir [Uyarılmış Şekilsel Uyum (Induced fit)], 4. Enzim, Substratı temel halden geçiş haline doğru bükerek ve substrat içinde gerilim oluşturan ileri konformasyonel değişimlere gider, 5. Uyarılmış gerilim bağ kırılmasına ve iki hidrolitik ürün oluşumuna neden olur, A ve B [16].

1993'te Billy Mark Britt, **Değişken Özgüllük Modeli (Shifting Specificity Model; SSM)** adıyla yeni bir model önerdi [19]. Bu modele göre; kendi fizyolojik basınç, sıcaklık ve pH koşullarında katlanarak şekillenmiş temel haldeki (Ground state) doğal enzim, Fischer'in anahtar-kilit modelindeki gibi substratına tam biçimsel uyum gösteren değişmemiş aktif bölgesinde, substratı ile kurduğu zayıf bağlar üzerinden ES kompleksini oluşturur. Bu bağlanma **tüm enzim kütlesi üzerinde küresel biçim değişimi**'ne yol açan bir burulma hareketini tetikler. Aktif bölgenin şekli ancak bu

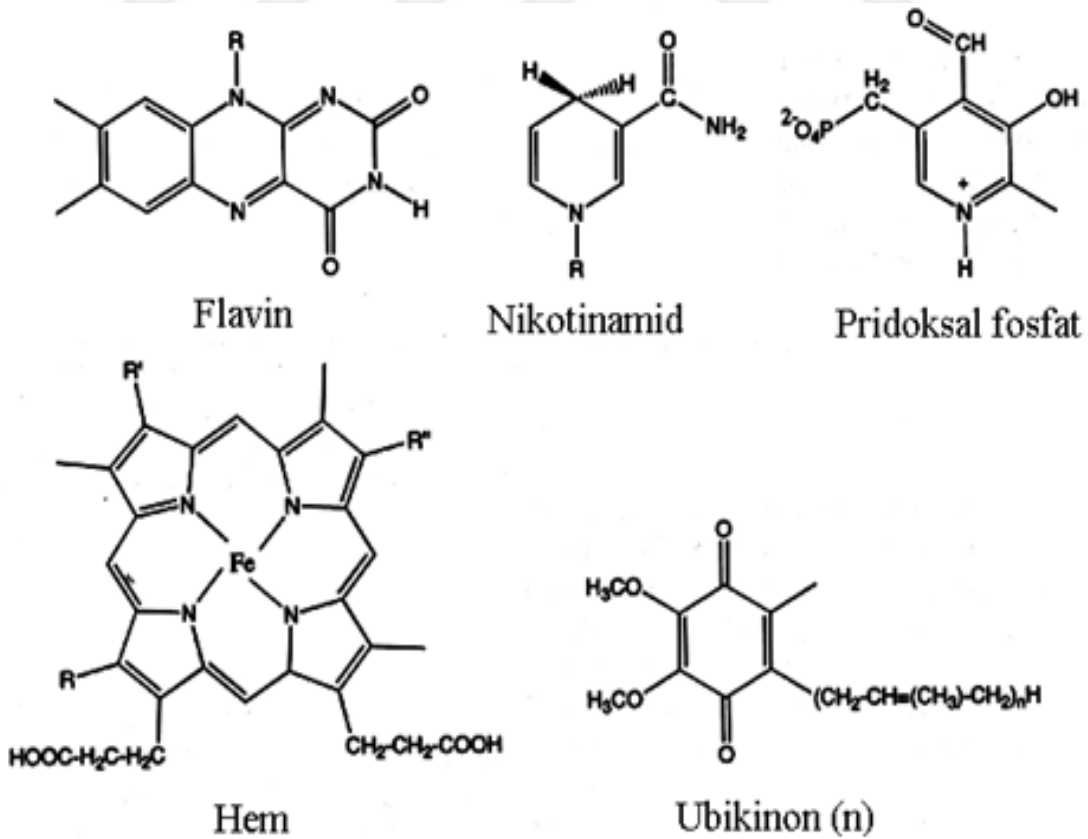
burulma hareketi ile değişirken, temel halde substrata olan özgülüğü de konformasyonel değişim sonucu geçiş haline uyarlanır (Şekil 2.16), [19].



Şekil 2. 16 B.M.Britt'in Değişken Özgülük modeli. Fischer'in Anahtar-Kilit Modeline göre oluşan ES kompleksinin, tepkimenin geçiş basamağı sonunda uğradığı küresel biçim değişimi ve aktif bölge özgülüğünün geçiş haline uyarlanması [19]

Bazı enzimler tek başlarına katalizör olarak etki edebildikleri halde bazıları katalitik etkinlik için protein yapısında olmayan ve **kofaktör** adı verilen yardımcı maddelere ihtiyaç duyarlar.

Kofaktörler; *Metal İyonları* (Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , K^+ vb.) ve *Koenzim* adı verilen küçük organik moleküller olmak üzere iki grupta incelenir. Enzimin yapısına kovalent bağlarla katılan koenzimlere *prostetik grup* denir (Şekil 2.17).



Şekil 2. 17 Bazı enzim kofaktörleri [16]

Bazı enzimler bu iki tür kofaktörü birlikte kullanırlar. Enzim-Kofaktör kompleksi **holoenzim** olarak adlandırılır. Enzimin kofaktörsüz kendi başına biyolojik aktivite göstermeyen protein kısmına **apoenzim** denir.

2.3 Enzimlerin Adlandırılması

Enzimler ya kataliz ettikleri reaksiyonun ya da etki ettikleri substratın adının sonuna “az” eki getirilerek adlandırılırlar. Örneğin; Dekarboksilaz, deaminaz, dehidrojenaz, fosforilaz(fosfor ekleyen enzim), fosfataz (fosfat bağını hidrolizleyen enzim), peptidaz, glikozidaz, laktaz, lipaz vb.

Peptidazlardan olan pepsin, tripsin, kimotripsin enzimlerinde olduğu gibi enzimlere özel adlar da verilmektedir [20].

2.4 Enzimlerin Sınıflandırılması

Enzimler; IUPAC-IUBMB (International Union of Pure and Applied Chemistry - International Union of Biochemistry and Molecular Biology) Birleşik Komitesi'ne bağlı Enzim komisyonu (Enzyme Commission; E.C.) standartlarına göre, etki ettikleri reaksiyon tipleri dikkate alınarak adlandırılıp numaralandırılarak altı ana sınıfa ayrılmışlardır. Aşağıda numaralandırma sistemi gösterilmekte ve ana sınıflar bazı alt sınıflarıyla beraber verilmektedir [20].

E.C.a.b.c.d [E.C.(Enzyme Commission), a: Temel enzim sınıfı, b: Enzim alt sınıfı, c: Enzim alt-alt sınıfı, d:Enzim alt-alt-alt sınıfı]

2.4.1 Ana Sınıf 1 - Oksidoredüktazlar (E.C.1)

Substratlar arasında H, O, e⁻ transferini katalizlerler. Numaralandırmada *ikinci basamak*, indirgeyici eşdeğer veren (H veya e⁻ Donör) substratı; *üçüncü basamak*, H veya e⁻ alıcı substratı (H veya e⁻ akseptör) belirtir.

E:C.1.1 >CHOH (Alkol)

E:C.1.1.1 NAD⁺ veya NADP⁺

E.C 1.1.2 Fe³⁺ (örn; sitokromlar)

E.C 1.1.3 O₂

E.C.1.2 Aldehit veya keton (>C=O)

E:C.1.3 –CH₂, -CH

E.C.1.4 Birincil amin (-CHNH₂ veya –CHNH₃⁺)

E.C.1.5 İkincil amin (>CHNH-)

E:C.1.6 NADH veya NADPH

2.4.2 Ana Sınıf 2 - Transferazlar (E.C.2)

Bu enzimler aşağıdaki genel reaksiyon denkleminde görüldüğü gibi grup transferini katalizlerler. Sınıflandırmada ikinci basamak transfer edilen grubu tanımlar.



X: Transfer edilen grup; Enzim adı: X-transferaz

E.C.2.1 Tek karbonlu grup aktaran enzimler

E.C.2.1.1 Metil(-CH₃) transferazlar

E.C.2.1.2 Hidroksimetil(-CH₂OH) transferazlar

E.C.2.1.3 Karboksil (-COOH) veya Karbamoil (-CONH₂) transferazlar

E.C.2.2 Aldehit ve keton grubu transfer eden enzimler

E.C.2.3 Açıl grubu transfer eden enzimler

E.C.2.4 Glikozil transferi yapan enzimler

E.C.2.4.1 Heksozil transferazlar

E.C.2.4.2 Pentozil transferazlar

E.C.2.6 Azotlu grupları aktaran transferazlar

E.C.2.6.1.2 Alaninamino transferaz

E.C.2.7 Fosfat transferi yapan enzimler (Kinaz ile sonlanan adlarla tanınan enzimler)

E.C.2.7.1 Alkol grubunun alıcı olduğu fosfotransferazlar

E.C.2.7.1.2 Glukoz-6-fosfotransferaz (Glukokinaz)

E.C.2.7.2 Karboksil grubunun alıcı olduğu fosfotransferazlar

E.C.2.7.3 Azot grubunun alıcı olduğu fosfotransferazlar

E.C.2.8 Kükürtlü grupları aktaran transferazlar

2.4.3 Ana Sınıf 3 - Hidrolazlar (E.C.3)

Hidrolazlar aşağıdaki genel hidroliz reaksiyonu denkleminde gösterildiğı gibi ilgili bağa su katarak bağ kırılmasını katalizleyen enzimlerdir. Adlandırılmaları etki ettikleri substratın sonuna “az” eki getirilerek yapılır. Örneğın, peptidaz, esteraz, glikozidaz, fosfataz vb.



E.C.3.1 Esterazlar

E.C.3.1.1 Karboksilik esterazlar

E.C.3.1.1.7 Asetilkolinesteraz

E.C.3.1.2 Tiyol esterazlar

E.C.3.1.3 Fosforik monoesterazlar

E.C.3.1.4 Fosforik diesterazlar

E.C.3.2 Glikozidazlar

E.C.3.2.1.1 α-1,4-Glikan-4-glikanohidrolaz (α-Amilaz)

E.C.3.4 Peptid bağlarını hidrolizleyen enzimler (Proteazlar)

E.C.3.4.1.1 Peptid peptidohidrolaz (Pepsin)

E.C.3.4.4.4 Peptid peptidohidrolaz (Tripsin)

E.C.3.4.4.5 Peptid peptidohidrolaz (Kimotripsin)

E.C.3.5 Diğer C-N bağlarını hidrolizleyen enzimler

E.C.3.5.1.1 Üri amidohidrolaz (Üreaz)

E.C.3.6 Asitanhidrit bağlarını hidrolizleyen enzimler

E.C.3.6.1.3 ATP fosfohidrolaz (ATPaz)

2.4.4 Ana Sınıf 4 - liyazlar (E.C.4)

Bu sınıftaki enzimler ya eliminasyon mekanizmasıyla substratlarından grupları uzaklaştırarak çift bağ oluşumunu ya da bunun tersine çift bağa trans katılmaları katalizlerler(Sentetazlar). Çift bağa su ekleyen liyazlar “Hidrataz” adıyla da bilinirler. Sistematik adlandırmada ikinci basamak kırılan bağ, üçüncü basamak uzaklaştırılan grupları belirtir.

E.C.4.1 C-C bağını kıran liyazlar

E.C.4.1.1.4 Asetoasetat karboksiliyaz (Asetoasetat dekarboksilaz)

E.C.4.1.1.7 Ketoz-1-fosfat aldehit liyaz (aldolaz)

E.C.4.2 C-O bağını kıran liyazlar

E.C.4.2.1.4 Sitrat Hidroliyaz (Sitrat dehidrojenaz)

E.C.3.1.4 Fosforik diesterazlar

E.C.4.3 C-N bağını kıran liyazlar

E.C.4.3.1.1 L-aspartat amonyak liyaz

2.4.5 Ana Sınıf 5 - İzomerazlar (E.C.5)

Bu sınıftaki enzimler “cis- $\leftrightarrow$ trans-” dönüşümü veya “D- $\leftrightarrow$ L-” dönüşümü gibi izomerizasyon reaksiyonlarını katalizlerler. Sistematik adlandırmada ikinci basamak izomerizasyon reaksiyonunun türünü, üçüncü basamak izomerizasyona uğrayan molekülü belirtir.

E.C.5.1 Rasemizasyon veya Epimerizasyon (Asimetrik karbon atomunda inversiyon)

E.C.5.1.1.1 Alanin rasemaz

E.C.5.1.2.1 Laktat rasemaz

E.C.5.1.3.1 D-Ribüloz-5-fosfat-3-epimeraz(Ribüloz fosfat epimeraz)

E.C.5.2 cis-trans izomerazlar

E.C.5.3 Molekül içi (intramoleküler) oksidoredüktazlar

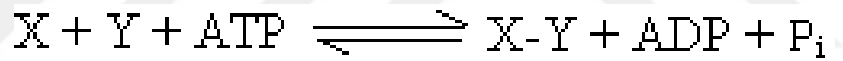
E.C.5.4 molekül içi transfer yapan izomerazlar

E.C.4.3 C-N bağı kırarak katanalazlar

Üçüncü basamaktaki 1 numara aminoasitlere, 2 numara hidroksi asitlere, 3 numara karbohidratlara karşılık gelir.

2.4.6 Ana Sınıf 6 - Ligazlar (E.C.6)

Bu enzimler ATP'nin ya da diğer nükleozid trifosfatların kırılması sonucu açığa çıkan bağ enerjisini kullanarak birleşen yeni bağların sentezini katalizlerler. Sistematiği adlandırmada ikinci basamak sentezlenen bağın türünü gösterir. Katalizledikleri tepkimelerin genel denklemleri aşağıda verilmektedir.



E.C.6.1 C-O bağı sentezleyen ligazlar

E.C.6.1.1.7 L-Alanin-tRNA ligaz (Alanin-tRNA sentetaz)

E.C.6.2 CO-O ester, C-S bağlarını sentezleyen ligazlar

E.C.6.2.2.2 Asetil-CoA sentetaz

E.C.6.3 C-N bağı sentezleyen ligazlar

E.C.6.3.1 Asit-amonyak ligazlar (amid, -CONH₂, sentetazlar)

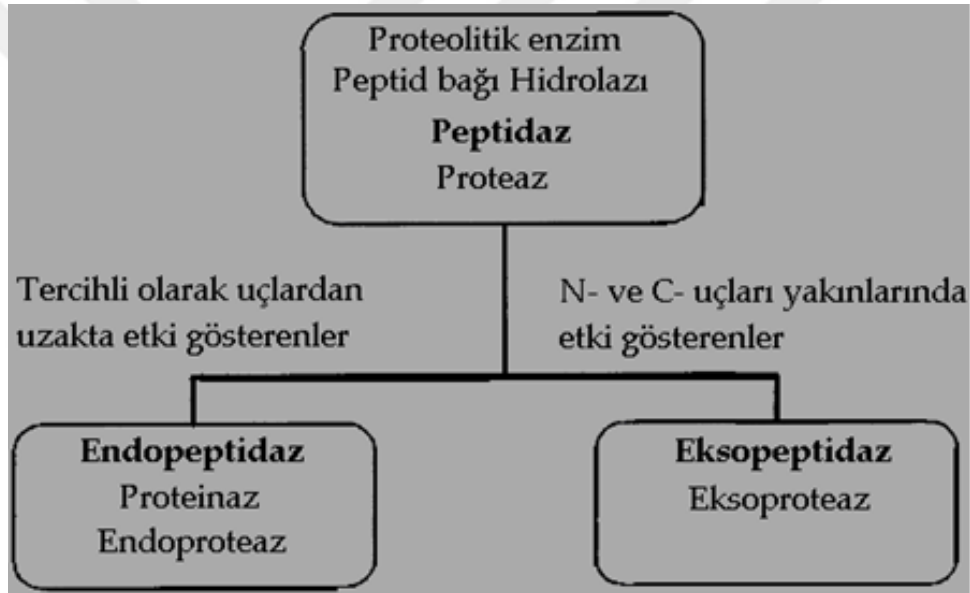
E.C.6.3.2 Asit-aminoasit ligazlar (Peptid, -CONH-, sentetazlar)

E.C.6.4 C-C bağlarını sentezleyen ligazlar [20].

2.5 Proteazlar (E.C.3.4)

Canlılıklarda çeşitli fizyolojik ve patolojik olguların düzenlenmesinde merkezi bir role sahip proteolizis süreçlerinde görev alan proteolitik enzimler bilimsel literatürde proteazlar, proteinazlar, peptidazlar genel isimleriyle anılırlar. Bu enzimler peptidlerde ve proteinlerde peptid bağlarının hidroliz reaksiyonlarını katalizlerler.

“Proteaz” terimi, XIX. yüzyılın ikinci yarısında Alman fizyolojik kimya literatüründe proteolitik enzimleri belirtmek için kullanılmıştır. 1930’lu yıllar ve sonrasında farkedilen değişik proteaz aktivitelerini ayırdetmek amacıyla; bu enzimler etki özgüllüklerine göre sınıflandırılarak adlandırılmışlardır [7]. Şekil 2.18’de proteolitik enzim sınıfları gösterilmektedir.



Şekil 2. 18 Proteolitik enzimlerin sınıflandırılması [7]

EC listesinde peptidazlar 13 alt-alt sınıf içerir (Çizelge 2.2). Bu alt-alt sınıflar, eksopeptidazlar (3.4.11-19) ve endopeptidazlar (3.4.21-24 ve 3.4.99) olarak başlıca iki büyük grup altında toplanır. Eksopeptidazlar polipeptid zincirinin sadece uç noktalarına yakın bölgelerde etkinlik gösterirler. Serbest N-Ucundan etkiyenler, ya tek bir amino asit (*aminopeptidazlar*, 3.4.11), ya bir dipeptid veya bir tripeptid (dipeptidil-peptidazlar ve tripeptidil-peptidazlar, 3.4.14) serbestleştirirler. Serbest C-Ucundan etkiyenler, tek bir amino asit (Karboksi-peptidazlar, 3.4.16-18) veya bir dipeptid (peptidil-dipeptidazlar) salımını sağlarlar.

Endopeptidazlar polipeptid zincirinde iç peptid bağlarının yarılmasını katalizlerler. Endopeptidazlar EC listesinde katalitik mekanizmalarına göre alt-alt sınıflara ayrılmışlardır ve özgüllükleri sadece grup içindeki özel enzimleri tanımlamak amacıyla kullanılır. Serin endopeptidazlar (E.C.3.4.21), aktif merkezlerinde katalitik süreçte işlev gören bir serin amino asidi içerirler. Benzer şekilde sistein endopeptidazların (E.C.3.4.22) aktif merkezlerinde bir sistein amino asidi, aspartik endopeptidazların aktif merkezlerinde de bir aspartik asit yer alır. Metaloenopeptidazlar katalitik mekanizmada bir metal iyonu kullanır ve bu metal iyonu her zaman olmasa da genellikle Zn^{2+} iyonudur [7]. EC sistemine göre peptidazların sınıflandırılması Çizelge 2.2’de sunulmuştur.

Çizelge 2. 2 EC sistemine göre peptidazların sınıflandırılması [7]

Alt-alt sınıf	Peptidaz türü
3.4.11	Aminopeptidazlar
3.4.13	Dipeptidazlar
3.4.14	Dipeptidil-peptidazlar
3.4.15	Peptidil-dipeptidazlar
3.4.16	Serin-karboksiptidazlar
3.4.17	Metalokarboksiptidazlar
3.4.18	Sistein-karboksiptidazlar
3.4.19	Omega peptidazlar
3.4.21	Serin endopeptidazlar
3.4.22	Sistein endopeptidazlar
3.4.23	Aspartik endopeptidazlar
3.4.24	Metaloenopeptidazlar
3.4.99	Türü bilinmeyen endopeptidazlar

Proteolitik enzimler ve bu enzimlerin inhibitörleri; hücre çevriminin kontrolü, hücre büyümesi, farklılaşması ve apoptosis, gen anlatımı, enzim modifikasyonu, bağışıklık reaksiyonları, doku biçimlendirme gibi organizma yaşamının sürekliliğini sağlayan kritik metabolizma faaliyetlerinde temel ve hayati önem taşırlar [8,9].

KontROLSÜZ proteolizis, mükemmel bir şekilde ayarlanmış hücre metabolizmasında ve dokularda patofizyolojik durumlara ve hatta organizmanın ölümüne yol açabilecek ciddi hasarlara neden olur. Tüm bakteri türlerinde yaygın olarak bulunan proteazlar kolonileşme, konak bağışıklık sistemini atlatma, büyüme ve çoğalma için gıda edinimi, yayılmayı kolaylaştırma ve enfeksiyon döneminde doku hasarı oluşumu gibi patojenik faaliyetlerin en önemli öğeleridir. Proteolitik işlemler birçok virüsün yaşam çevriminin temel parçasıdır. Hücre dışı matriks ve temel membranların bozunmasında yeralan proteaz türleri kanser gelişiminde anahtar etkenlerdir [8,9].

Proteazların hücrede sentezlenen özel proteinlerle inhibisyonu canlılarda proteaz aktivitesini düzenleyen en önemli kontrol mekanizmalarından biridir. Doğal kaynaklardan ya da sentetik yollarla elde edilen peptid veya organik yapıli inhibitörlerle proteolitik enzimlerin inhibisyonu istilacı patojenlerin ölümüyle sonuçlanabilmektedir. Bu bilgi yeni tür antibiyotiklerin geliştirilmesine konu olmuştur [8,9].

Enzim-Inhibitör komplekslerinin oluşumu, konformasyonel değişimleri ve reaksiyon kinetiği proteinin içerdii floresan karakterli aminoasitlerden ya da floresan özellik kazandırılmış inhibitörlerden elde edilen florometrik verilerdeki değişimlerle hassas olarak izlenebilmektedir. Yeni sentezlenen inhibitörlerin floresans tekniğine uyarlanabilirliğı enzim faaliyetlerinin çok daha duyarlı yöntemlerle izlenmesini olanaklı kılmaktadır [8,9].

2.5.1 Tripsin (E.C.3.4.21.4)

Serin proteazlar (Serin endopeptidazlar) alt-alt sınıfından olan tripsin enzimi, pankreastan salgılanan ve ince bağırsakta, besinlerdeki proteinlerin organizmaya alımı için gerekli olan protein parçalama sürecinde işlev gören bir sindirim enzimidir. Tripsin enzimi peptid zincirlerini genellikle, lizin ve arginin amino asitlerinin karboksil tarafından yarılıma uğratar. Tripsin enzimi pankreasta, inaktif zimojen formu tripsinojen olarak üretilir ve ince bağırsağı salgılanır. Tripsinojen burada enterokinaz enzimi tarafından proteolitik yarılımla tripsine dönüştürölerek aktifleştirilir. Oluşan tripsinler otokataliz sonucu ortamdaki diğler tripsinojenleri tripsine dönüştürölerek aktivasyonu hızlandırırılar. Sonuç olarak reaksiyonun başlaması için sadece çok az bir miktar enterokinaz enzimi yeterli olmaktadır. Bu aktivasyon mekanizması serin proteazlar için

ortaktır ve pankreasın otosindirimini engeller. Aktif tripsin enzimleri proteolitik etkinlik gösterecekleri, mide ile ince bağırsak bağlantısını sağlayan duodenum kanalına (oniki parmak bağırsağı) bırakılır [7,8,9].

2.5.2 Kimotripsin (E.C.3.4.21.1)

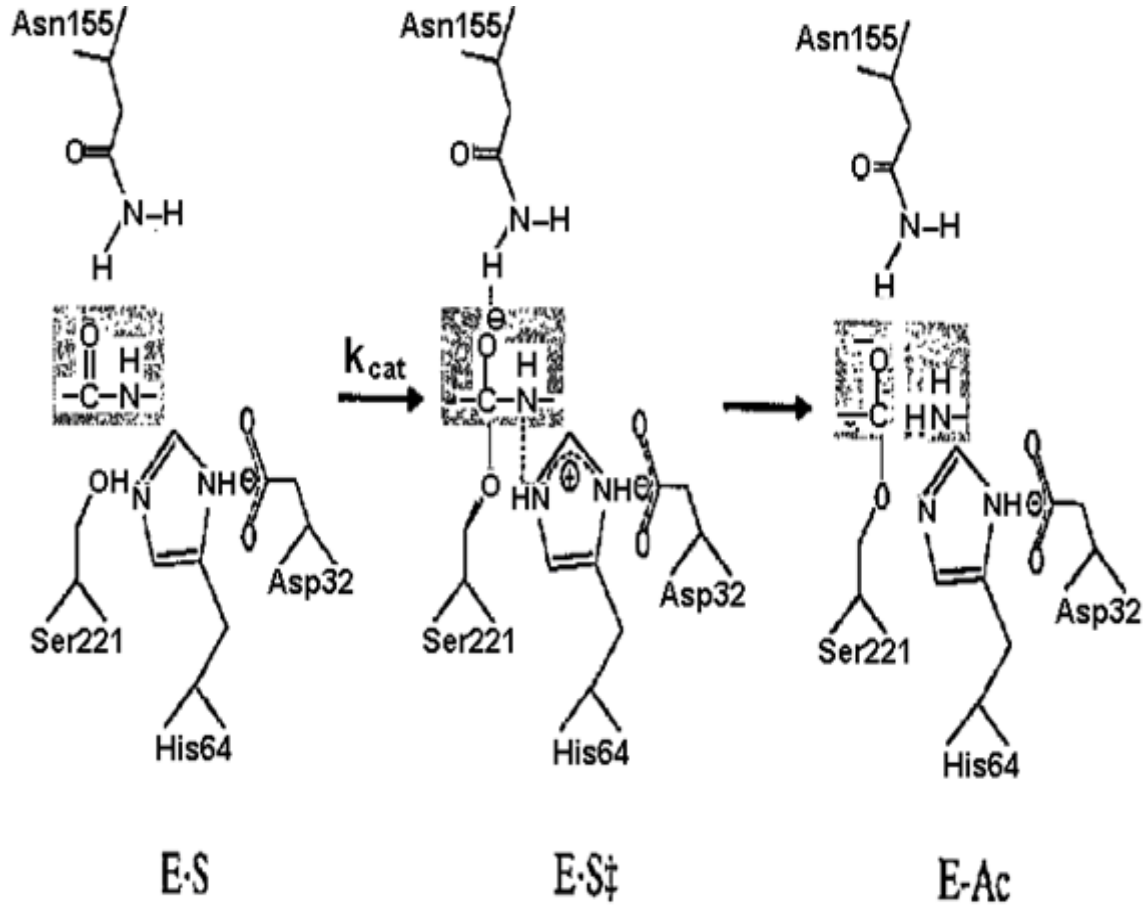
Serin Proteazlar sınıfından olan kimotripsin pankreasta asinüs hücrelerinde, kimotripsinojen adı ile bilinen ve etkin olmayan bir öncül yapı halinde sentezlenir. Bu öncül yapı tripsin tarafından iki parçaya ayrılmak üzere bölünmeye uğratılır, ancak bu parçalar bir disülfid (-S-S-) bağı ile hala birbirlerine bağlı olduklarından dolayı tam olarak ayrılmazlar. Bu iki parça, *trans-proteolizis* adı verilen karşılıklı bir hidroliz mekanizması ile birbirleri üzerinden küçük peptid parçaları ayırarak birbirlerini etkinleştirirler. Sonuçta oluşan molekül etkin kimotripsindir. Kimotripsin enzimi, peptidleri içerdikleri triptofan, tirozin, fenilalanin, lösin ve metiyonin amino asitlerinin karboksil tarafından hidrolitik yarılıma uğratır[7,8,9].

2.6 Serin Proteazların Katalitik Mekanizması

Proteazlar peptid bağlarını kırma işlevini, polipeptid zinciri üzerinde kıracakları bağı içeren belli bir bölgeyi tanıyıp bağ kurarak gerçekleştirirler. Her bir proteazın substrat üzerinde kendine özel bölgeyi tanıması, yapılarındaki tanıma dizelerini oluşturan polipeptid zincir uzunluklarının farklılığından kaynaklanır. Yapısal özellikleri temelinde serin proteazlar üç sınıfta incelenir; Kimotripsin-benzeri (Chymotrypsin-like), Subtilisin-benzeri (Subtilisin-like) ve Karboksipeptidaz II-benzeri (Carboxypeptidase II-benzeri). Bu üç sınıf, ikincil ve üçüncül protein yapıları bakımından birbirlerinden hayli farklıdır, ancak her bir sınıf kendi aktif bölgesinde serin, histidin ve aspartat amino asitlerini içerir ve de ortak bir katalitik mekanizma kullanırlar. Tüm bu enzimler aynı açıl transfer mekanizmasını uygulayarak peptid ve ester bağı hidrolizini gerçekleştirirler (Şekil 2.19). Reaksiyonu, Katalizsizinine göre 10^9 kat veya daha fazla bir oranda hızlandırır.

ES kompleksi oluşumu sonrası, aktif bölge serin amino asidi, kırılacak peptid bağının karbonil karbonuna; karbonil karbonu üzerindeki bir oksianyonik merkezle reaksiyonun geçiş halini anımsatan tetrahedral bir arahal oluşturarak nükleofilik atak yapar (Bu

şekilde aktif bölge serin amino asidinin birincil nükleofilik karakteri nedeniyle bu gruptaki enzimler serin proteazlar olarak adlandırılır) (Şekil 2.19) [16].



Şekil 2. 19 Serin proteazların genel açıl transfer mekanizması [16]

Aktif bölgede bulunan serin amino asidinin gösterdiği bu etkinliğin nedeni; yapısındaki β -hidroksi grubunun zayıf alkali koşullar altında nükleofilik karakter kazanmasından kaynaklanır. Bu geçiş hali, substratın oksianyonik merkezi ve aktif bölge amino asitleri arasında kurulan özgül hidrojen bağları ile kararlılaştırılır. Aktif bölge serin amino asidinin nükleofilik karakteri, aspartat yan zinciri ile etkileşim halinde bulunan histidin yan zinciri ile yaptığı özgül etkileşimler vasıtasıyla artar. Aktif bölge histidinin substratın peptid bağı amin grubuna bir proton aktarımı ile reaksiyonun ilk ürününün ayrılması sonucu geçiş hali azalır ve bunu eşzamanlı olarak aktif bölge serin amino asidine bağlanan bir açıl grubu ile kurulan kovalent arahal takip eder. İlk peptid ürününün ayrılması ile meydana gelen boşluktan enzim aktif bölgesine giren bir su molekülü nükleofilik atakla enzimi deaçilasyona uğratır. Deaçilasyon reaksiyonu,

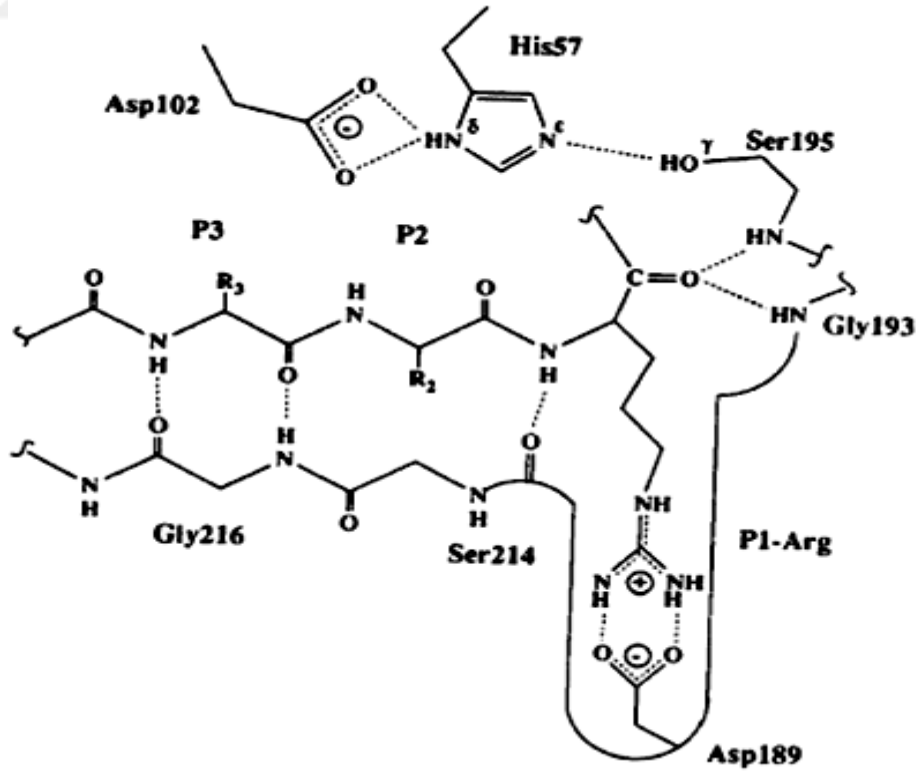
enzimle aynı kararlılaştırıcı hidrojen bağları kurularak, açılasyon reaksiyonundakine çok benzer bir başka tetrahedral geçiş hali oluşumu ile yürür. Bu geçiş hali aktif bölge histidine proton aktararak azalır ve ikinci peptid ürününün serbestleşmesini sağlar [16].

Üç farklı serin proteaz türüne ait katalizde görevli aktif bölge amino asitler Çizelge 2.3’de verilmiştir.

Çizelge 2. 3 Üç farklı serin proteaz türüne ait katalizde görevli aktif bölge amino asitleri [6]

Enzim	E.C. numarası	Ser	His	Asp/Glu
Tripsin	3.4.21.4	Ser195	57	Asp189
α -Kimotripsin	3.4.21.1	Ser195	57	Asp102
Subtilisin Carlsberg	3.4.21.62	Ser221	64	Asp32

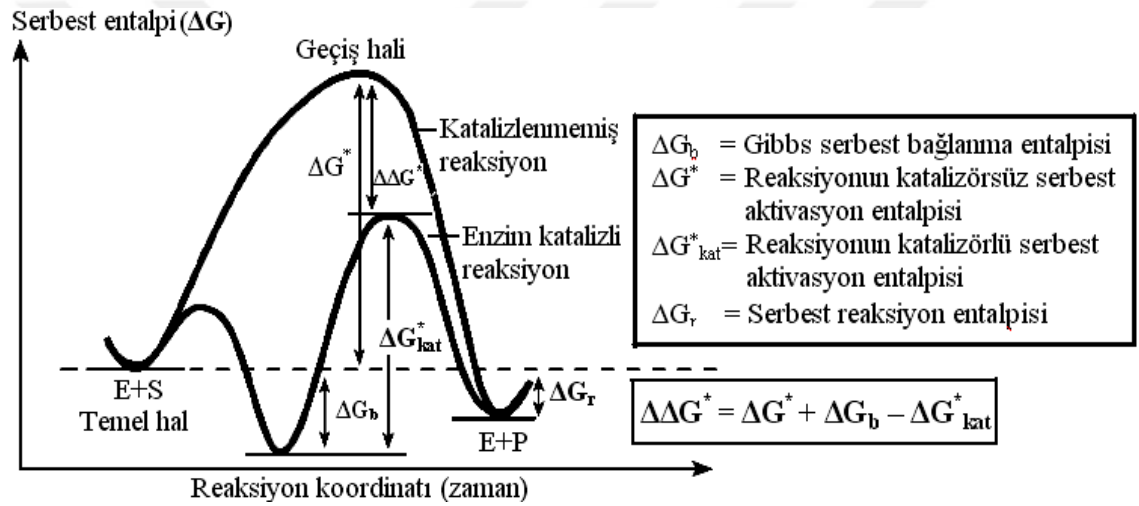
Tripsin benzeri serin proteazlarda substrat-aktif bölge etkileşimi Şekil 2.20’de görülmektedir [16].



Şekil 2. 20 Tripsin-benzeri serin proteazlarda substrat-aktif bölge etkileşimi [16]

2.7 Enzim Kinetiği

Hemen her tür kimyasal reaksiyon; tepken maddelerin ürünlere dönüşüm sürecinde, oluşumu belirli bir aktivasyon enerjisi gerektiren kararsız ve geçici ara bir ürün olarak meydana gelen aktifleşmiş kompleksler üzerinden yürür. Enzim katalizli reaksiyonlarda aynı tepkime süreci, substratlarıyla oluşturdukları ES ara hal kompleksleriyle ilerler. Ürünlere dönüşüm bu aktivasyon enerjisi farkının (ΔG^*) aşılmasını gerektirir. Denge reaksiyonlarında bu enerji oldukça küçüktür ve çevre sıcaklığı ile sağlanır. Enzimatik reaksiyonlarda oluşan ES kompleksleri, aktivasyon enerjisini azaltarak reaksiyon hızını artırır ve aynı zamanda ürün oluşumunun daha düşük sıcaklıklarda gerçekleşmesini sağlar (Şekil 2.21) [21,22].



Şekil 2. 21 Enzim katalizli bir reaksiyonun zamana göre serbest entalpi değişimi

1902'de Brown, enzim katalizli reaksiyonlar için aşağıdaki reaksiyon mekanizmasını önerdi.



Burada enzimin ürüne (P) olan ilgisinin substrata (S) olan ilgisi gibi özgül olamayacağı düşünüldüğünde, ürünlerden ES oluşum hız sabiti k_{-2} 'nin ihmal edilebilecek kadar küçük olduğu ($k_{-2} \ll k_2$) varsayılabilir ve reaksiyon denklemi aşağıdaki gibi sadeleştirilebilir.



2.2 no'lu reaksiyon denklemi dikkate alınarak enzim kinetiğini açıklamak amacıyla geliştirilmiş, aşağıda konu ettiğimiz iki önemli kinetik model vardır.

2.7.1 Hızlı Dengelenme (Fast Equilibrium) Modeli

Sıfırıncı dereceden reaksiyonlar hariç bir reaksiyonun hızı, reaksiyona giren maddelerin konsantrasyonları ile orantılıdır. Hızlı dengelenme modeli ilk olarak 1903'te Henri tarafından önerildi ve ardından 1913'te Michaelis ve Menten tarafından geliştirilerek son şekli verildi. Bu modele göre tepken maddeler (E+S) ve bunların oluşturdukları ES kompleksi arasında hızlı bir denge kurulur ve reaksiyon kısa sürede kararlı hale geçer. Hızlıca kurulan bu dengede iki yönlü reaksiyon hızlarını birbirine eşitlersek,

$$k_1[E_s][S] = k_{-1}[ES] \quad (2.3)$$

ifadesini elde ederiz. ES kompleksinin ileri yönde ürünlere dönüşümü, geri yönde serbest enzim ve substrata dönüşümünden daha yavaştır ($k_2 \ll k_1$ ve k_{-1}). ES kompleksinin reaksiyona giren maddelere (E ve S reaktiflerine) ayrışma sabiti K_s aşağıdaki şekilde yazılır.

$$K_s = \frac{[E_s][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad (2.4)$$

E: Toplam enzim, E_s : Serbest enzim, S: Toplam substrat, S_s : Serbest substrat, ES: Enzim-substrat kompleksi.

Burada; Substrat enzime oranla çok daha büyük miktarda olduğu için serbest substrat konsantrasyonunun toplam substrat konsantrasyonuna yaklaşık eşit olduğu kabul edilebilir ($[S_s] \approx [S]$). Serbest enzim miktarı ise, toplam enzim miktarı ile kompleks bünyesinde yer alan bağlı enzim miktarı arasındaki farka eşittir.

$$[E_s] = [E] - [ES] \quad (2.5)$$

2.5 no'lu denklemdeki $[E_s]$ teriminin karşılığını 2.4 no'lu denklemde yerine yazarsak,

$$K_s = \frac{([E] - [ES])[S]}{[ES]} \quad (2.6)$$

eşitliğini elde eder ve 2.6 no'lu eşitlikte de $[ES]$ terimini sol tarafta yalnız bırakırsak,

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_s + [S]} \quad (2.7)$$

ifadesine ulaşırız. 2.2 no'lu reaksiyon denkleminde ES kompleksinin ürünlere çevrildiği hız tayin edici basamağa göre tüm reaksiyonun hızını,

$$V = k_2[ES] \quad (2.8)$$

şeklinde yazabiliriz. 2.7 no'lu eşitlikteki [ES] teriminin karşılığını 2.8 no'lu eşitlikte yerine yazarsak,

$$V = k_2 \frac{[E][S]}{K_s + [S]} \quad (2.9)$$

eşitliğine ulaşırız. Reaksiyon ortamında tüm enzimi doyuracak kadar substrat bulunduğu zaman hiç serbest enzim kalmayacağı düşünüldüğünde, toplam enzim konsantrasyonunun Enzim–Substrat kompleksi konsantrasyonuna eşit olacağı sonucuna varılabilir ([E] = [ES]) ve reaksiyonun hızı maksimuma ulaşır. Buna göre 2.8 no'lu eşitlikte [ES] yerine [E] yazarsak maksimum hız,

$$V_{\max} = k_2[E] \quad (2.10)$$

eşitliğini elde eder ve bu eşitliği 2.9 no'lu eşitlikte yerine yazarak

$$V = \frac{V_{\max}[S]}{K_s + [S]} = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_s}{[S]}} \quad (2.11)$$

ifadesini çıkartmış oluruz. Eşitlik 2.11, Henri, Michaelis ve Menten'in bağımsız olarak ulaştıkları son kinetik ifadedir.

2.7.2 Kararlı Hal (Steady State) Modeli

1925'te Briggs ve Haldane, ES kompleksi biriktikçe ES'nin oluşma hızının bir süre sonra, hem ileri yönde ürünlere doğru hem de geri yönde reaktiflere doğru bozunma hızlarının toplamıyla eşitlenerek dengeleneceğini; bir başka deyişle ES kompleksi konsantrasyonunun reaksiyon süreci içinde zamanla belirli bir miktarda sabitlenerek kararlılığa ulaşacağını ve böylece ES konsantrasyonu değişiminin zamana göre sıfırlanacağını $[(d[ES]/dt) = 0]$ farkettiler. Bu nedenle ileri sürdükleri model, Henri-

Michaelis-Menten modelindeki $k_2 \ll k_{-1}$ kabulünü gerektirmemektedir. Ancak her ne kadar farklı kabullerle geliştirilmiş olsalar da aşağıda izlenen yola göre ulaşılan hız ifadesinin Henri-Michaelis-Menten modeline çok benzer olduğu görülecektir.

E: Toplam enzim, E_s : Serbest enzim, S: Toplam substrat, S_s : Serbest substrat, ES: Enzim-substrat kompleksi.

2.2 no'lu reaksiyon denklemi dikkate alınarak kararlı hal modeline göre ES kompleksi oluşum hızı,

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E_s][S_s] \quad (2.12)$$

ve ES kompleksi yıkım hızı,

$$-\frac{d[ES]}{dt} = (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (2.13)$$

eşitlikleriyle verilir. Denge durumunda oluşum ve yıkım hızları eşitleneceği için,

$$k_1[E_s][S_s] = (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (2.14)$$

olur. Bu eşitlik [ES] terimi için,

$$[ES] = \frac{[E_s][S_s]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1}} \quad (2.15)$$

Şeklinde yeniden düzenlenebilir. Paydaki kesirli ifadeyi,

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (2.16)$$

şeklinde kısaltarak, 2.15 no'lu eşitliği aşağıdaki gibi sadeleştirebiliriz.

$$[ES] = \frac{[E_s][S_s]}{K_m} \quad (2.17)$$

Denge halinde substrat tüketimi çok düşük miktarda olacağı için serbest substrat konsantrasyonunun toplam substrat konsantrasyonuna yaklaşık eşit olduğu kabul

edilebilir ($[S_s] \cong [S]$). Ayrıca E_s teriminin 2.5 no'lu eşitlikteki karşılığı dikkate alınırsa, 2.17 no'lu eşitlik ,

$$[ES] = [E] \frac{[S]}{[S] + K_m} \quad (2.18)$$

şeklinde yeniden yazılabilir. 2.18 no'lu ifade, reaksiyon hızını tayin edici basamağa göre oluşturulan 2.8 no'lu hız denkleminde yerine yazılırsa,

$$V = k_2[E] \frac{[S]}{[S] + K_m} \quad (2.19)$$

eşitliğini elde ederiz. Eşitlik 2.19'u; k_2 yerine, k_2 'yi kataliz basamağı hız sabiti olduğunu açıklayıcı k_{kat} ifadesiyle belirterek aşağıdaki gibi genelleştirebiliriz.

$$V = k_{kat}[E] \frac{[S]}{[S] + K_m} \quad (2.20)$$

Bu ifadenin kesirli teriminin, substrat konsantrasyonu sonsuza giderken L'Hospital kuralına göre limiti 1'e eşit olur.

$$\lim_{[S] \rightarrow \infty} \frac{[S]}{[S] + K_m} = \frac{\infty}{\infty} \Rightarrow \lim_{[S] \rightarrow \infty} \frac{([S])'}{([S] + K_m)'} = \lim_{[S] \rightarrow \infty} \frac{1}{1} = 1 \quad (2.21)$$

Bu sonucu 2.20 no'lu eşitlikte yerine yazdığımızda, eşitlik 2.10'da verilen maksimum hız ifadesi elde edilir.

$$V_{max} = k_{kat}[E] \quad (2.22)$$

Eşitlik 2.22'yi eşitlik 2.20 ile birleştirirsek Henri-Michaelis-Menten modelindekine çok benzer aşağıdaki 2.23 no'lu eşitliğe ulaşırız.

$$V = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_m}{[S]}} \quad (2.23)$$

2.23 no'lu eşitlik kararlı hal enzim kinetiği modelinin temel eşitliğidir.

V hızının, maksimum hızın yarısına ulaştığını gösteren 2.24 no'lu eşitliğin sol tarafına eşitlik

$$V = \frac{V_{\max}}{2} \quad (2.24)$$

2.23'teki karşılığı yazıldığında 2.25 no'lu denklem elde edilir.

$$\frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]} = \frac{V_{\max}}{2} \quad (2.25)$$

Bu eşitlik sadeleştirilerek yeniden düzenlenirse,

$$K_m = [S] \quad (2.26)$$

ifadesine ulaşılır. Bu sonuç; maksimum hızın yarısına karşılık gelen substrat konsantrasyonunun K_m değerine eşit olduğunu gösterir [16,18,20-22].

2.8 Enzim Aktivitesi Tayininde Kullanılan Spektrofotometrik Yöntemler

Bir enzimatik reaksiyona ait K_m ve k_{kat} kinetik sabitlerinin belirlenmesi; reaksiyonun ilk hızını iyi kontrol edilen şartlarda tam olarak ölçebilme yeteneğine dayanır. Enzimatik reaksiyon hızı pH, sıcaklık ve çözücü bileşenleri gibi etkenlere son derece duyarlıdır ve bu durum, kullanılacak aktivite tayin yönteminden anlamlı veri elde edebilmek için sözkonusu etkenlerin tam kontrolünü zorunlu kılar.

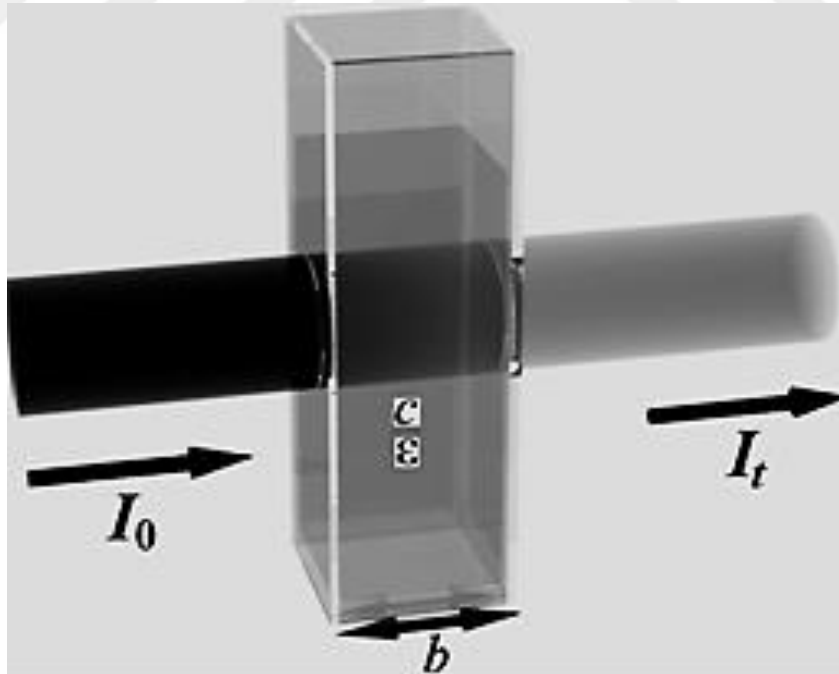
Bir reaksiyona ait hız ölçümü; zamana göre oluşan ürün miktarına ya da zamana göre azalan substrat miktarına karşılık gelen bir sinyal takibi ile yapılır. Sinyalin türü tayin yöntemine göre çeşitlilik gösterir. Genel olarak, doğrudan ya da dolaylı çoğu enzim analizlerinde reaksiyonun ilerleyişini takip etmek amacıyla, başlıca aşağıdaki belirleme ve ayırma yöntemleri kullanılır:

- Spektroskopi
- Polarografi
- Radyoaktif bozunma
- Elektroforetik ayırma
- Kromatografik ayırma
- İmmünolojik tepkirlilik (Immunological reactivity) [16]

Bu bölümde, çalışmamız açısından önem arz eden, aktivite tayin yöntemleri olarak “Ultraviyole–görünür bölge (UV-Visible) absorpsiyon spektroskopisi” ve “floresans spektroskopisi” ile ayırma yöntemi olarak “Jel Filtrasyon Kromatografisi” üzerinde durulacaktır.

2.8.1 Ultraviyole-Görünür (UV-Visible) Bölge Absorpsiyon Spektroskopisi

Absorpsiyon, belli enerjilere sahip fotonların, çarpıştıkları atom ya da molekül elektronlarının bünyesinde emilime uğramaları ve bu esnada elektronları üst enerji seviyelerine çıkarmaları sürecidir. Absorpsiyon spektroskopisi bu emilimin gerçekleştiği dalgalı boy larını ve emilim miktarını belirlemek üzere tasarlanmış cihazlarla yapılır. Ultraviyole-görünür bölge Absorpsiyon spektroskopisi, elektromanyetik spektrumda mor ötesi ve görünür bölgedeki dalgalı boy larına karşılık gelen ışımaların maddeler tarafından absorplanma özelliklerini inceler. Absorpsiyon spektroskopisinin analitik bir araç olarak önemi; miktar analizi yapılacak bir maddenin belirli bir dalga boy undaki ışık absorpsiyonunun, maddenin ortamdaki konsantrasyonu ile ilişkilendirilebilmesinden ileri gelir.



Şekil 2. 22 Lambert-Beer yasasına göre ışık absorpsiyonu

Işığın içinden geçtiği maddenin özellikleriyle absorpsiyon arasındaki ilişki, deneysel gözlemler sonucu elde edilen bulgulara dayalı olarak türetilen Lambert-Beer yasasıyla

açıklanır. 1760’larda Johann Heinrich Lambert; ışığın şiddetinin, içinden geçtiği ortamın uzunluğu arttıkça üstel olarak azaldığını ispatladı ve ondan çok daha sonraları 1852’de August Beer, absorplayıcı ortamın konsantrasyonundaki artışın da ışığın şiddetini üstel olarak azaltacağını ortaya koydu. Lambert ve Beer’in elde ettiği sonuçlar, “Lambert-Beer Yasası” adıyla bilinen aşağıdaki genel absorpsiyon eşitliğinde birleştirilerek ifade edilir (Şekil 2.22).

Şeffaf bir kap içindeki çözeltiden geçen monokromatik dalgaboylu bir ışın demetinin, çözelti ile etkileşimi öncesi sahip olduğu I_0 başlangıç şiddetinde (foton miktarı), çözelti ortamında aldığı yol boyunca maruz kaldığı emilim (absorpsiyon) nedeniyle bir azalma görülür. Işının çözelti ile etkileşiminden önceki ve sonraki şiddetlerinin (I_0 ve I_t) oranına “Geçirgenlik” denir.

$$T = \frac{I_t}{I_0} (\leq 1) \quad (2.27)$$

(T: Geçirgenlik, I_0 : Örnek ortamına gelen ışık şiddeti, I_t : Örnek ortamından çıkan ışık şiddeti)

Bir maddenin ışık geçirgenliği genellikle yüzde olarak ifade edilir.

$$\%T = \frac{I_t}{I_0} \cdot 100 \quad (2.28)$$

Işığa karşı geçirgenlik arttıkça absorpsiyon azalır ve bu ilişki,

$$A = -\log T = -\log \frac{I_t}{I_0} = \log \frac{I_0}{I_t} (\geq 0) \quad (2.29)$$

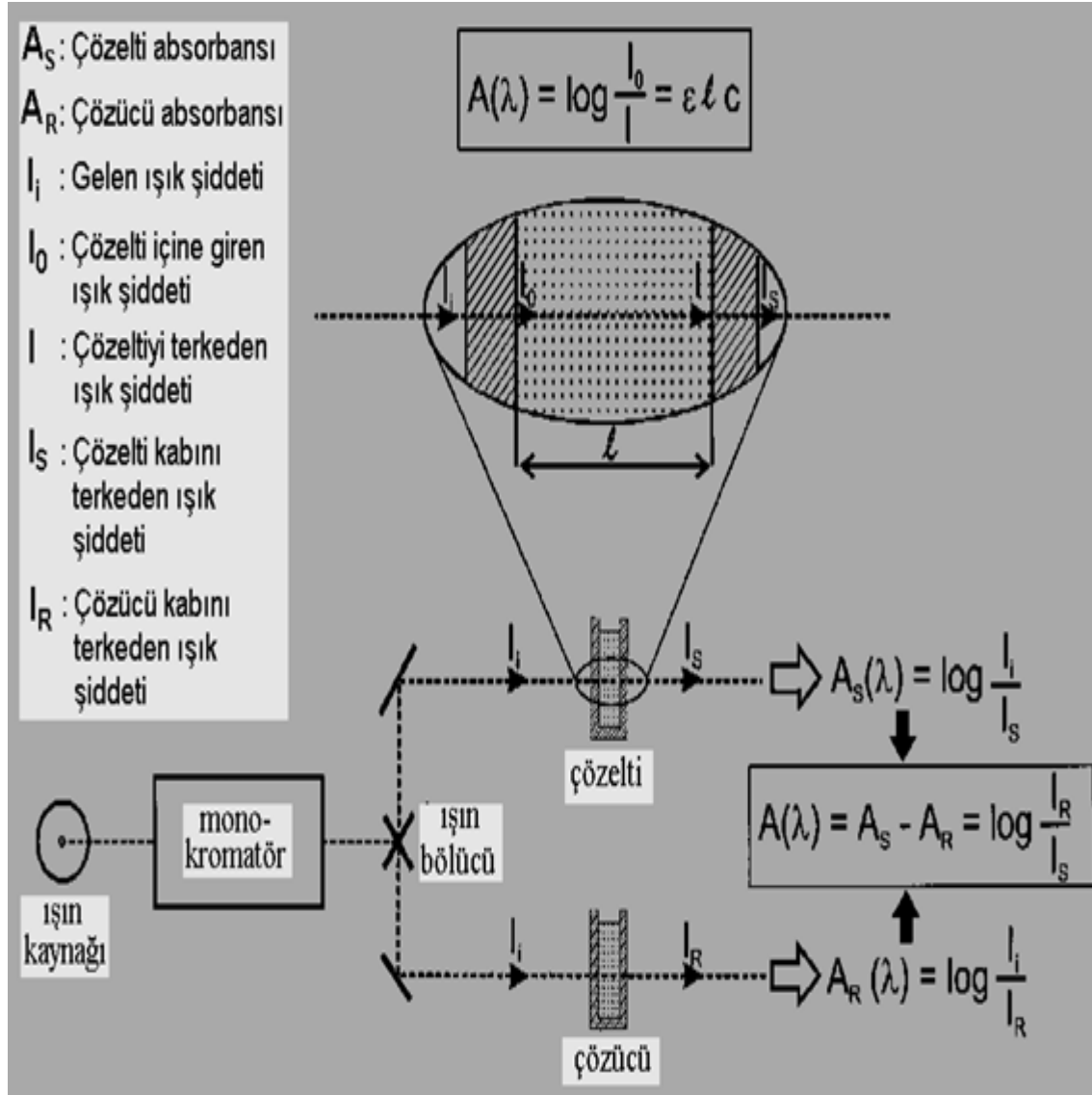
eşitliği ile verilir.

Bir moleküle ait molar absorptivite ve ışığın örnek kabı içinde izlediği yolun uzunluğu bilinirse, absorbans ölçümü yapılarak molekülün çözelti içindeki konsantrasyonunu hesaplamak mümkün olur.

$$A = \epsilon b C (\geq 0) \quad (2.30)$$

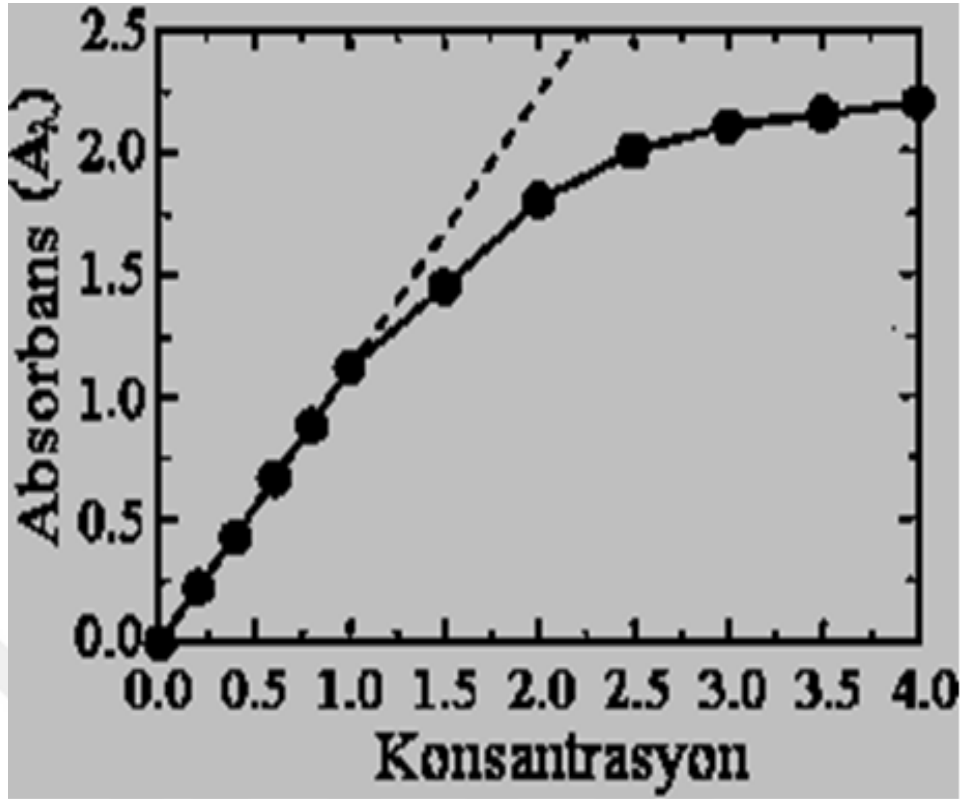
A: Belirli bir dalgaboyundaki örnek absorpsiyonu, ϵ : Molar absorptivite ($M^{-1}cm^{-1}$), b: Işığın örnek ortamından geçerken aldığı yolun uzunluğu, c: Örneğe ait molar konsantrasyon.

Absorpsiyon spektrofotometrelerinin genel şeması ve absorpsiyon hesabı Şekil 2.23’de verilmiştir.



Şekil 2. 23 Absorpsiyon spektrofotometrelerinin genel şeması ve absorpsiyon hesabı [4]

Çözelti içinde madde konsantrasyonu arttıkça Lambert-Beer yasasına göre absorpsiyon da artar. Ancak bu artış, absorpsiyon ölçümü yapan cihazların kapasiteleri nedeniyle sonlu konsantrasyon aralığında doğrusaldır. Genellikle 1’in üzerinde absorpsiyon değeri gösteren konsantrasyonlarda doğrusallıktan, bir başka deyişle Lambert-Beer yasasından sapma görülür (Şekil 2. 24).



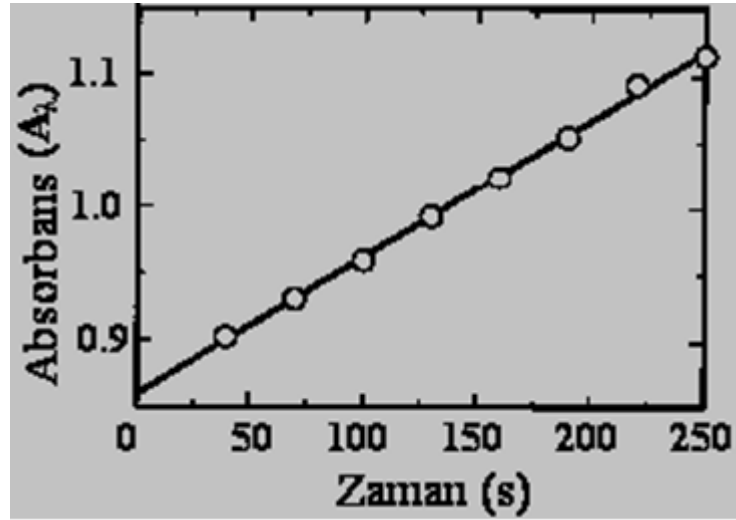
Şekil 2. 24 Lambert-Beer yasasından sapma [16]

Ayrıca sıfıra çok yakın absorbans değerlerini de, cihazlardan kaynaklanan gürültü sinyalleri girişimleri nedeniyle doğru olarak okumak çok zordur. Bundan dolayı kinetik analizi yapılacak bir maddenin çözeltideki konsantrasyonu genelde 0.05-1.0 aralığında absorbans verecek şekilde ayarlanır.

Enzimatik bir reaksiyon sürecinde ışık absorplama yeteneğine sahip substrat ya da ürün miktarında meydana gelen değişime bağlı olarak absorbans değeri de zamanla değişim gösterebilir. Bu değişimi, Lambert-Beer yasasından (eşitlik 2.30) konsantrasyonun absorbansa bağlı karşılığını " $c = \frac{A}{\epsilon \cdot b}$ " hız denkleminde $\left(V = \pm \frac{dc}{dt} \right)$ yerine yazarak gösterirsek,

$$V = \pm \frac{dc}{dt} = \pm \frac{\Delta A}{\epsilon b \Delta t} \text{ (konsantrasyon / zaman)} \quad (2.31)$$

kinetik eşitliğini elde ederiz. Enzimatik bir reaksiyonda zamana göre absorbans değişimi Şekil 2.25'de görülmektedir.



Şekil 2. 25 Enzimatik bir reaksiyonda zamana göre absorbans değişimi [16]

Enzim kinetiğini belirlemek için kullanılacak analitik dalgaboyunun seçimi; reaksiyonda yeralan substrat veya ürün moleküllerinin hem absorbansları arasındaki en büyük farkı hem de spektral örtüşme olmaması için dalgaboyları arasındaki en büyük farkı sağlayacak şekilde belirlenmiş, kuvvetli absorbans gösterdikleri bir dalgaboyunda olmalıdır. Bu seçimde karar verilen dalgaboyu genelde substratın ya da ürünün maksimum absorbans verdiği dalgaboyudur [16].

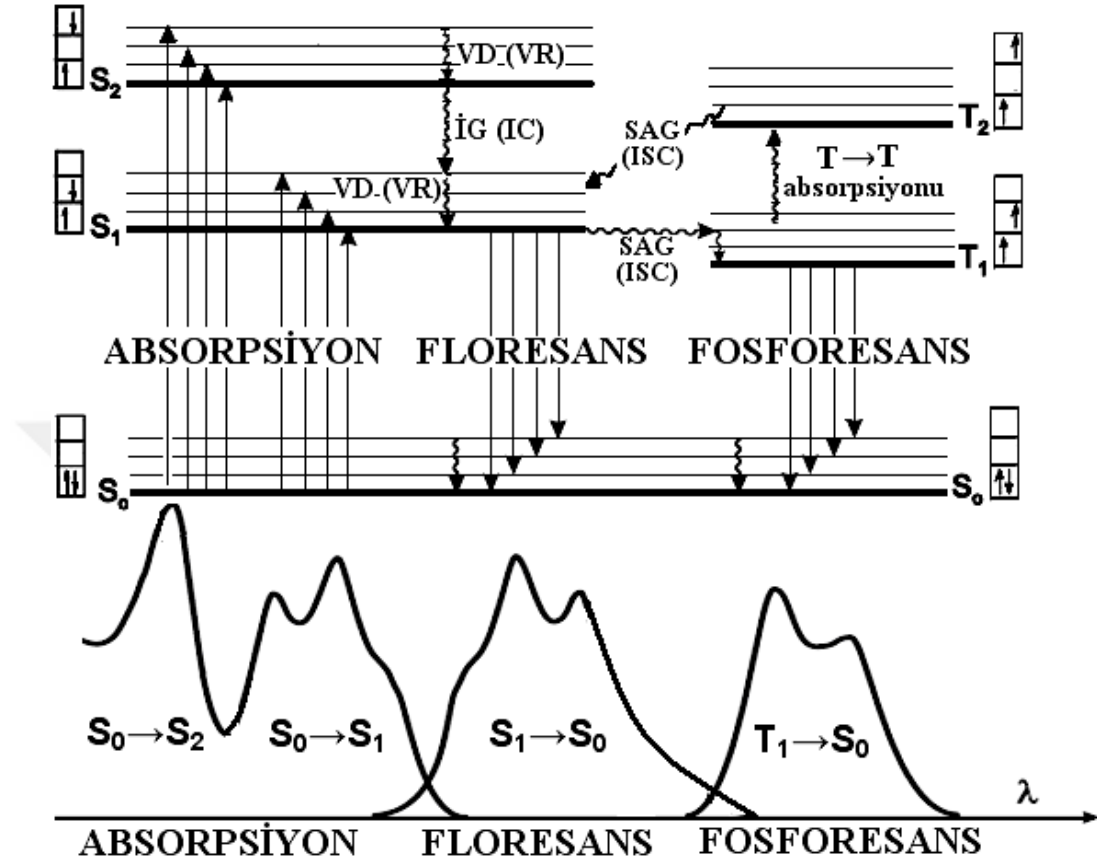
2.8.2 Floresans Spektroskopisi

Bir molekülün enerjisi elektronik (E_o), vibrasyonal (E_v) ve rotasyonal (E_r) enerjilerin toplamından oluşmaktadır. Herbir elektronik enerji seviyesi bir seri vibrasyonal seviye ve her bir vibrasyonal seviye de birbirine oldukça yakın olarak yer alan rotasyonal seviyeler içerir.

Genel bir kural olarak, oda sıcaklığında moleküllerin çoğunun temel elektronik halin en düşük vibrasyonal seviyelerinde bulunduğu kabul edilmektedir. Moleküler orbitalde spinleri antiparalel olarak yerleşmiş elektron çiftinin durumu singlet hal (S) olarak adlandırılmaktadır. Bu elektronların spinlerinin paralel olduğu durum ise triplet hal (T) şeklinde ifade edilmektedir.

Işık enerjisi absorplandığında temel singlet hal S_0 'dan yukarı doğru enerji geçişleri meydana gelir. Absorpsiyonun geçiş süresi yaklaşık 10^{-15} s civarındadır. Absorpsiyon spektrumunda birbirine çok yakın olarak yer alan rotasyonal seviyeler arası geçişler

algılanamaz. Bazı moleküllerde vibrasyonel seviyelerin yerleşimi çok karmaşık değildir. Bu moleküllerdeki vibrasyonel seviyeler absorpsiyon spektrumunda bir seri maksimum noktası şeklinde izlenebilir (Şekil 2.26).

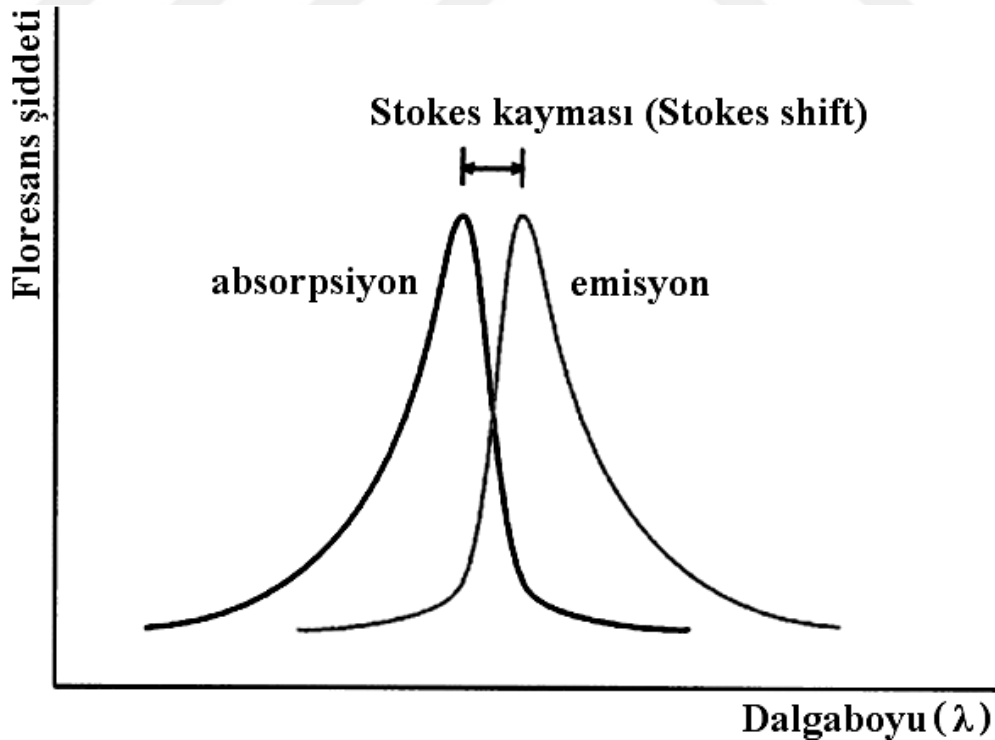


Şekil 2. 26 Jablonski Diyagramı. S: Singlet hal, T: Triplet hal, VD: Vibrasyonel durulma [Vibrational relaxation(VR)], İG: İç geçiş [Internal Conversion(IC)], SAG: Sistemler arası geçiş [Intersystem crossing(ISC)] [2-4]

Herhangibir uyarılmış halin üst vibrasyonel seviyelerinde bulunan bir molekül, fazla vibrasyonel enerjisini çevresindeki moleküller ile çarpışma sırasında verebilir. Bu işlem vibrasyonel durulma (vibrational relaxation, VR) olarak adlandırılmaktadır. Vibrasyonel durulma 10^{-12} - 10^{-10} saniyeler arasında gerçekleşir. Bir molekülün yüksek elektronik seviyesinin düşük vibrasyonel seviyesinden, düşük elektronik seviyesinin üst vibrasyonel seviyelerine geçişi ise "iç geçiş" (internal conversion, IC) olarak adlandırılmaktadır (Şekil 2.23). İç geçişler 10^{-11} - 10^{-9} saniyeler arasında gerçekleşir. Kural olarak molekül en düşük uyarılmış hal S_1 'in, en düşük vibrasyonel seviyesine düşer. S_1 uyarılmış halde kalma süresi (lifetime of S_1 state) 10^{-10} - 10^{-7} saniye iken daha üst seviyelerde 10^{-12} saniye olmaktadır [2-4].

Uyarılmış singlet hal S_1 'in en düşük vibrasyonal seviyesinden temel hal S_0 'ın herhangi vibrasyonal-rotasyonal seviyelerine geçişte verilen emisyon **floresans** olarak adlandırılmaktadır. Triplet halden temel singlet hale geçişte oluşan emisyonu da fosforesans denir (Şekil 2.1). Floresan maddenin uyarılmış halde kalma süresi, “floresans ömrü (Fluorescence lifetime)” şeklinde isimlendirilmektedir. Floresans emisyon ömrü 10^{-10} - 10^{-7} s kadardır. Fosforesansta emisyon daha uzun sürede gerçekleşmekte ve ömür 10^{-6} - 1s düzeylerine çıkmaktadır [2-4].

Atom içi temel ve uyarılmış hallerin çekirdeğe göre mesafelerinin farklı olması ve de temel hale dönüş sürecinde daha yüksek enerjili vibrasyonal alt seviyelerden geçerken enerjide meydana gelen kayıplar nedeniyle; elektronun temel hale dönerken yayımladığı foton, uyarma işini yapan fotona göre daha düşük enerjili ve de $E=hc/\lambda$ [E: Enerji, h: Planck sabiti ($\cong 6,62 \times 10^{-34}$ j.s $^{-1}$), c: ışık hızı, λ :dalgaboyu] enerji eşitliği uyarınca daha uzun dalgaboyludur. Emisyonda gerçekleşen bu dalgaboyu uzaması ilk defa 1852 yılında George G. Stokes tarafından izlendiği için “Stokes kayması (Stokes shift)” adını almıştır. Solvent etkisi ve uyarılmış halde gerçekleşen reaksiyonlar nedeniyle Stokes kayması nisbeten daha uzun dalgaboylarında gözlenebilir (Şekil 2.27).



Şekil 2. 27 Stokes kayması (Stokes shift). Emisyon, absorpsiyona göre daha uzun dalgaboylarında gerçekleşir [2-4]

Çok sayıda enzim substratı veya enzimatik reaksiyon ürünü madde doğal floresan karakter sergiler ve reaksiyon sürecinde, çözelti içinde tükenişlerini veya oluşumlarını izlememizi sağlayacak uygun floresans sinyaller üretirler. Eğer bu moleküllerin yapıları floresan özellik göstermiyorsa, çalışma koşulları altında enzimle etkileşimlerini önemli derecede bozmaksızın, yapılarına kovalent bağlanmalarla floresan gruplar takılarak floresan türevleri oluşturulabilir.

Floresans sinyalleri, sınırlı bir konsantrasyon aralığında floresan maddenin konsantrasyonu ile doğrusal kantitatif bir ilişki sergiler. Floresans sinyallerinin şiddeti floresan madde konsantrasyonu ile, Absorpsiyonun (A) Kuantum verimi (Q_f) ile yer değiştirdiği Lambert-Beer yasasına benzer bir ilişki içinde değişim gösterir. Kuantum verimi, yayımlanan foton miktarının absorplanan foton miktarına oranıdır.

$$Q_f = \frac{\text{yayımlanan foton miktarı; floresans şiddeti } (I_f)}{\text{absorplanan foton miktarı } (I_a)} \quad (2.32)$$

$$\text{Burada, } I_a = I_0 - I_t \text{ dir.} \quad (2.33)$$

I_0 : Örnek ortamına gelen ışık şiddeti, I_t : Örnek ortamından çıkan ışık şiddeti

Eşitlik 2.29'dan yararlanarak I_t terimini,

$$I_t = I_0 \cdot 10^{-\epsilon b C} \quad (2.34)$$

şeklinde yazabiliriz ve bu ifadeyi 2.33 no'lu eşitlikte yerine yazarak,

$$I_a = I_0 \cdot (1 - 10^{-\epsilon b C}) \quad (2.35)$$

Eşitliğini elde ederiz. 2.32 ve 2.34 no'lu eşitliklerden yararlanarak,

$$I_f = Q_f \cdot I_a = Q_f \cdot I_0 \cdot (1 - 10^{-\epsilon b C}) \quad (2.36)$$

floresan madde konsantrasyonu ile floresans şiddeti arasındaki ilişkiyi veren denklemi elde etmiş oluruz [5].

Eşitlik 2.36 da Q_f , I_0 , ϵ ve b terimleri belirli koşullar altında hem bilinmeyen hem de standart örnekler için genellikle aynıdır. $(1 - 10^{-\epsilon b C})$ terimi aşağıdaki gibi kuvvet serilerine (Taylor serisi) açılabilir.

$$1 - 10^{-\varepsilon b C} = 2,3\varepsilon.b.C - \frac{(2,3\varepsilon.b.C)^2}{2!} + \frac{(2,3\varepsilon.b.C)^3}{3!} - \frac{(2,3\varepsilon.b.C)^4}{4!} + \dots \quad (2.37)$$

Eğer $\varepsilon b C$ terimi çok küçük ise ($\leq 0,02$), $(1 - 10^{-\varepsilon b C})$ terimi;

$$1 - 10^{-\varepsilon b C} = 2,3\varepsilon.b.C \quad (2.38)$$

ifadesine indirgenebilir. Bu ifadeyi 2.36 no'lu eşitlikte yerine yazarak;

$$I_f = 2,3.Q_f.I_0.\varepsilon.b.C \quad (2.39)$$

floresans şiddetini veren 2.39 no'lu eşitlikteki gibi basitleştirebiliriz.

Burada I_f değerinin; absorplayıcı türlerin (temel haldeki türler) molar absorptivitesi(ε) ile floresans yayım yapan türlerin (uyarılmış haldeki türler) floresans kuantum verimi(Q_f)'ne bağlı olduğu anlaşılmaktadır. Belirli eksitasyon koşulları altında $Q_f.I_0$, ε ve b , bilinmeyen ve standart örnekler için genellikle aynıdır. Bundan faydalanarak bilinmeyen ve standart örneklerin konsantrasyonları ile floresans şiddetleri arasında aşağıdaki oransal ilişki kurulabilir.

$$\frac{I_{fb}}{I_{fs}} = \frac{C_b}{C_s} \quad (2.40)$$

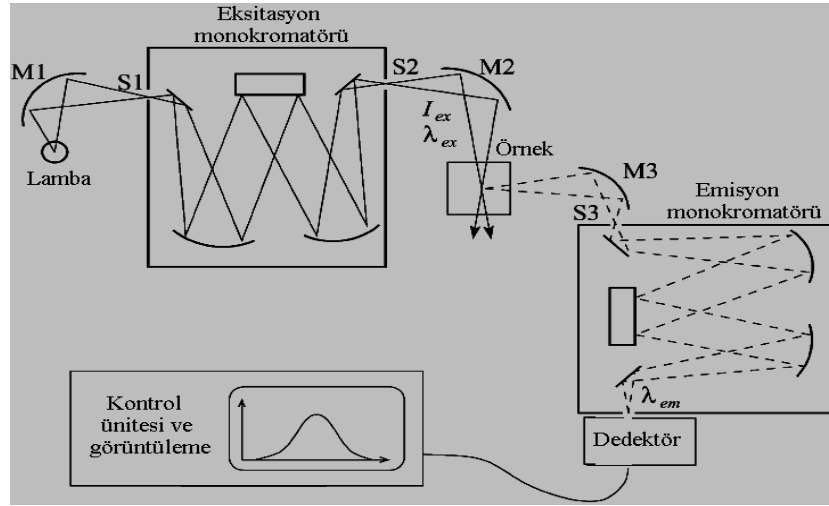
Burada I_{fb} ve I_{fs} , bilinmeyen ve standart örneklerin deneysel olarak belirlenmiş floresans şiddetleri; C_b ve C_s ise konsantrasyonlarıdır [5,23].

Floresans spektrodokopisi genel olarak iki kısımda sınıflandırılır;

- 1) Kararlı Hal (Steady state) Floresans Spektroskopisi,
- 2) Zaman Ayrımlı Floresans Spektroskopisi (Time Resolved Fluorescence Spectroscopy).

2.8.2.1 Kararlı Hal Floresans Spektroskopisi

Kararlı hal ölçümleri, sabit bir ışık şiddeti ile sürekli aydınlatma yapan, bir başka deyişle sabit bir ışık şiddeti ile kesiksiz uyarma yapan bir ışık kaynağı ve sürekli okuma yapan



Şekil 2. 28 Kararlı hal (steady-state) florometrelerine ait genel optik şema [24]

bir dedektör ile gerçekleştirilir. Sürekli aydınlatma altında tutulan örnek ortamında uyarılmış haldeki moleküllerin sayısı yani konsantrasyonu sabittir, zamana göre değişmez ve bu nedenle kararlı hal adı ile anılan söz konusu yöntem uyarılmış haldeki moleküllerin nanosaniye veya daha kısa zaman ölçeklerinde gerçekleşen temel hale dönüşlerini, floresans şiddetlerinin zamana ve floresans ömre bağımlı fonksiyonları olarak belirlenmesine imkan tanımaz. Kararlı hal (Steady-state) florometrelerine ait genel optik şema Şekil 2.28’de görülmektedir [2-4,24].

2.8.2.2 Zaman Ayrımlı Floresans Spektroskopisi ve Ekspansiyel Seriler Yöntemi ile Floresans Ömür Dağılımları Analizi

Zaman ayrımlı ölçümler nanosaniyelik veya daha küçük zaman ölçeklerinde,

- I. Molekül elektronlarının uyarılmış halde kalma sürelerini (Floresans Ömür, Fluorescence Lifetime; τ),
- II. Uyarılmış örnek moleküllerinin tamamı temel hale dönene kadar geçen süreyi (Floresans Bozunma Süresi, Fluorescence Decay time) hesaplamak amacıyla kullanılır. Bir atom veya molekülün orbital elektronunun uyarılmış halde kalma süresi olarak tanımlanan “floresans ömür” maddenin türüne, uyarılmış haldeki moleküllerin tamamının temel hale dönüş sürecini ifade eden “floresans bozunma süresi” ise maddenin hem türüne hem de konsantrasyonuna bağlıdır. Her iki parametre de maddenin içinde bulunduğu ortamın fiziksel ve kimyasal özelliklerinden ve ortamın

içerdiği diğer floresan maddelerin varlığından etkilenir. Bu veriler floresan maddenin çevresi ile etkileşimleri hakkında detaylı bilgiler sağlar. Mesela; bir proteinin hidrofobik ve hidrofilik bölgelerinde yer alan triptofan amino asitlerinin çevreleri ile etkileşimlerinin farklılığı nedeniyle floresans bozunma süreleri, floresans ömürleri ve floresans spektrumları değişik karakterler sergiler. Genellikle proteinlerde, çözücü moleküllerine karşı korunumlu bulunan hidrofobik bölgede yerleşik floresan moleküllerin emisyon maksimumları daha kısa dalgalı boylarındadır ve floresans ömürleri daha uzundur. Protein yapısının; sıcaklık, pH, yüzey aktif madde, hidroliz vb. etkiler sonucu değişime uğramasıyla hidrofilik ortama açılan, bir başka deyişle çözücü molekülleri ile etkileşimi artan protein bünyesindeki floresan grupların uyarılmış hal enerji seviyeleri düşer, emisyon maksimumları uzun dalgalı boylarına kayar ve floresans ömürleri kısalır [2-4,24].

Floresans ömür; ekponansiyel azalma gösteren ve matematiksel analiz modellerinden [çoklu üstel analiz(eşitlik 2.42), Ekspansiyel seriler yöntemi(eşitlik 2.43)] biri ile tanımlanan floresans bozunma verilerinin ki-kare (χ^2) istatistiksel analizi (eşitlik 2.45, 2.46) ile optimizasyonundan (Eğriye uyarılama) elde edilen eğriye ait verilerden hesaplanır.

Floresans şiddetinin, zaman (t) ve floresans ömür (τ) ile arasındaki ilişki,

$$F(t) = F(0)\exp(-t/\tau) \quad (\text{Tekli üstel bozunma}) \quad (2.41)$$

eşitliği ile verilir. Burada F(t), t anındaki floresans şiddetini; F(0), t = 0 anındaki floresans şiddetini; τ , floresans ömrü simgelemektedir.

Çevresinde polarite çeşitliliği olmayan floresan bir molekül bulunduğu ortamda belirli tek bir floresans ömür sergiler. Bu olgu, floresansın zamana göre ekponansiyel bir azalma göstereceğini ifade eden tekli üstel bozunma (Single-exponential fluorescence decay) eşitliği (eşitlik 2.41) ile ifade edilir.

Florofofor çevresinde polarite çeşitliliği varsa floresans ömür de çeşitlenme gösterir ve bu durumda gözlenen floresans bozunma; birden fazla floresan türün bozunmalarının toplamını tanımlayan, sınırlı sayıda, ayırık ve de her biri özgün floresans ömür (τ) içeren üstel terimlerden oluşan çoklu üstel bozunmalar toplamı (Sum of multi-exponential

decays) ile ifade edilir (eşitlik 2.42). Bu modelde Her bir terim, farklı polaritelere sahip, farklı serbestlik derecelerinde çözücü ile etkileşimi olan sözkonusu moleküldeki birbirinden ayrık çevrelerden kaynaklanan yerel emisyonların bozunmalarına karşılık gelebilir.

$$F(t) = \sum_{i=1}^N a_i \exp(-t / \tau_i), \quad \sum_i a_i = 1,0 \quad (2.42)$$

Burada a_i , “ön üstel (pre-exponential) faktör” olarak adlandırılır ve τ_i ömürlü bileşenin gözlenen floresans bozunmaya yaptığı kısmî katkısı verir.

Proteinler gibi büyük ve karmaşık moleküllerin farklı kısımlarında polarite çeşitliliği gösteren bölgelerin fazlalığından dolayı çoklu üstel analiz modeli proteinlerdeki floresans ömür çeşitliliği hakkında kapsayıcı bilgi sağlamaz. Bu noktada dağılımsal yaklaşım modeli devreye girer [2-4,10,24-27].

2.8.2.3 Ekspansiyel Seriler Yöntemi

Dağılımsal yaklaşım modelinde integraller üstel terimlerin sonlu toplamı yerine geçer ve terimlerin toplam bozunmaya yaptığı kısmî katkısı belirten ön üstel faktörler kesiksiz ömür çeşitlenmelerinin dağılımsal fonksiyonlarına dönüşür - ki model bu nedenle “floresans ömür dağılımları – Dağılımsal yaklaşım modeli” olarak adlandırılır – ama bu şekilde de hala her bir özel floresans ömrün toplam bozunmaya yaptığı kısmî katkı olarak işlev görür.

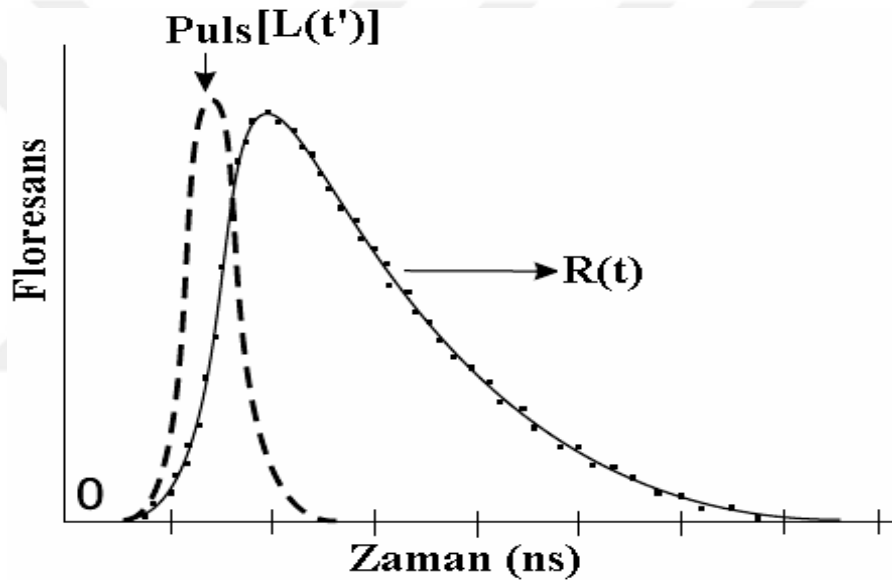
$$F(t) = \int_0^{\infty} a(\tau) \exp(-t / \tau) d\tau \quad (2.43)$$

$a(\tau)$: Sürekli floresans ömür çeşitlenmelerinin dağılım fonksiyonu, $\int a(\tau) d\tau = 1,0$.

Ekspansiyel seriler yöntemi; a_i ve τ_i dağılımını elde etmek amacıyla, belirli floresans ömürler (τ_i) ve değişken ön-üstel faktörler (a_i) içeren ve de en fazla 200 terimli olan bir üstel serinin araştırma fonksiyonu (probe function) olarak kullanıldığı matematiksel analiz yöntemidir. Araştırma fonksiyonunun sadece a_i değerleri, ki-kare fonksiyonu 1’e en yakın değere ulaşana kadar yenilenecek (iterative reconvolution) eğriye uyarlama işlemi (fitting procedure) sürekli tekrarlanır. Sonuçta, deneysel bozunma verilerine en

uygun eğri elde edilir. Bu eğriye ait α_i ve τ_i değerleri floresans ömür dağılımını oluşturur [2,25-27].

Fonksiyonu Lamba Cevabı [$L(t)$, Instrument Response Function, IRF] olarak adlandırılan lamba pulsunun bozunma süreci, sonlu bir genişliğe sahip olduğundan deneysel olarak elde edilen örneğe ait floresans bozunma eğrisini gerçek biçiminden saptırır. Bir başka deyişle; cihazda gözlenen zaman ayrımlı floresans bozunma eğrileri, lamba pulslarının genişliğinden dolayı bükümlüdür (convoluted). Yani madde floresansına ait pulsların bozunma süresi ile kısmî girişim yapan lamba pulsları, madde floresansının bozunma sürecinin kendi doğal süresi sonunda tamamlamasını engelleyerek geciktirir ve bu da floresans bozunma eğrisinde belli bir sapmaya neden olur (Şekil 2.29).



Şekil 2. 29 Floresans bozunma eğrisi $R(t)$ ve Lamba puls fonksiyonu $L(t)$

Bu bükme etkisinin matematiksel ifadesi, bükülme integrali (Convolution Integral) [$R(t)$] ile verilir (eşitlik 2.44).

$$R(t) = \int_0^t L(t')F(t-t')dt' \quad (2.44)$$

Burada $R(t)$, gözlenen floresans bozunma; $L(t)$, lamba cevabı, bir başka deyişle lamba puls şiddetinin zamana göre azalma fonksiyonu (Impulse Response Function, IRF); $F(t)$ maddeye ait floresans bozunma fonksiyonudur. $(t-t')$ tanımı maddeye ait bozunma sürecinin eksitasyon zamanına göreceli olduğunu ifade eder.

Lamba pulslarının genişliği bu bükme etkisinin deneysel olarak giderilmesine imkan tanımaz. Bunun yerine $L(t)$ fonksiyonu; örnek floresansının bozunma ölçümünden hemen önce ayrı bir deneyle, saçıcı bir çözelti kullanılarak uyarma dalgaboyunda lamba ışımından oluşturulan saçılma pulslarının dedektörde okunması sonucu bilgisayarda çizdirilen grafik olarak elde edilir. Bu deneysel $L(t)$, örneğe ait floresans bozunma verilerine en uygun eğriyi, çoklu üstel analiz eşitliği (eşitlik 2.45) ile veya ESM yöntemi (eşitlik 2.46) ile tanımlanmış floresans bozunma verilerinin indirgenmiş ki-kare analizi ile elde etmek için kullanılır [2,25-27]. Genellikle en iyi sonuçlar “ $0,9 < \chi^2 < 1,2$ ” aralığında elde edilir [2-4,10]. Bu çalışmada $L(t)$ seyreltik $Al(OH)_3$ çözeltisi ile belirlendi ve ESM yöntemi ile tanımlanmış floresans bozunma verilerine uygulandı.

Tekrarlamalarla hesaplanan en iyi eğriden sapmalar, eşitlik 2.4’de verilen “indirgenmiş ki-kare (reduced chi-square) istatistiği, χ^2 ” ile belirlenir [2-4,10,24-27].

$$\chi^2 = \frac{1}{N-n-1} \sum_{i=1}^N \frac{\left(R_i(t)_{\text{hesaplanan}(\text{calc})} - R_i(t)_{\text{deneysel}(\text{exper})} \right)^2}{s_i^2} \quad (2.45)$$

(Çoklu üstel bozunma için ki-kare analizi)

N: Kanal sayısı, n: Eğriye uyarlama parametrelerinin sayısı, s_i : Standart sapma.

$$C = \left(\frac{1}{n} \right) \sum_{k=1}^n \frac{\left(Y_{k_{\text{exp}}} - Y_{k_{\text{calc}}} \right)^2}{\sigma_k^2} = \left(\frac{1}{n} \right) \sum_{k=1}^N \frac{\left(Y_{k_{\text{exp}}} - \sum_{i=1}^N D_{ki} a_i \right)^2}{\sigma_k^2} \approx 1,0 \quad (2.46)$$

(ESM yöntemi için ki-kare analizi)

, $Y_{k_{\text{exp}}}$: k’inci kanalda gözlemlenen floresans şiddeti, n: Kanal sayısı, σ : k’inci kanaldaki standart sapma,

D_{ki} : Bükülme matrisi, $D_{ki} = \int_0^{t_k} L(t_k - t) \exp\left(\frac{-t}{\tau_i}\right) dt$

2.8.2.4 Zaman Ayrımlı Floresans Ölçüm Teknikleri

Zaman ayrımlı ölçümlerle $F(t)$ ’yi (eşitlik 2.42, 2.43) belirleyen floresans cihazları, içerdikleri uyarma ve belirleme sistemlerine göre genel olarak iki yöntemsel gruba ayrılır:

I. Faz ve modülasyon ölçüm yöntemleri

II. Puls (sinyal atım) ömür ölçüm yöntemleri (Pulse lifetime measurements);

a) Tek foton sayma yöntemi (Single photon counting method)

b) Stroboskopik yöntem (Stroboscopic method)

2.8.2.4.1 Faz ve Modülasyon Ölçme Tekniği

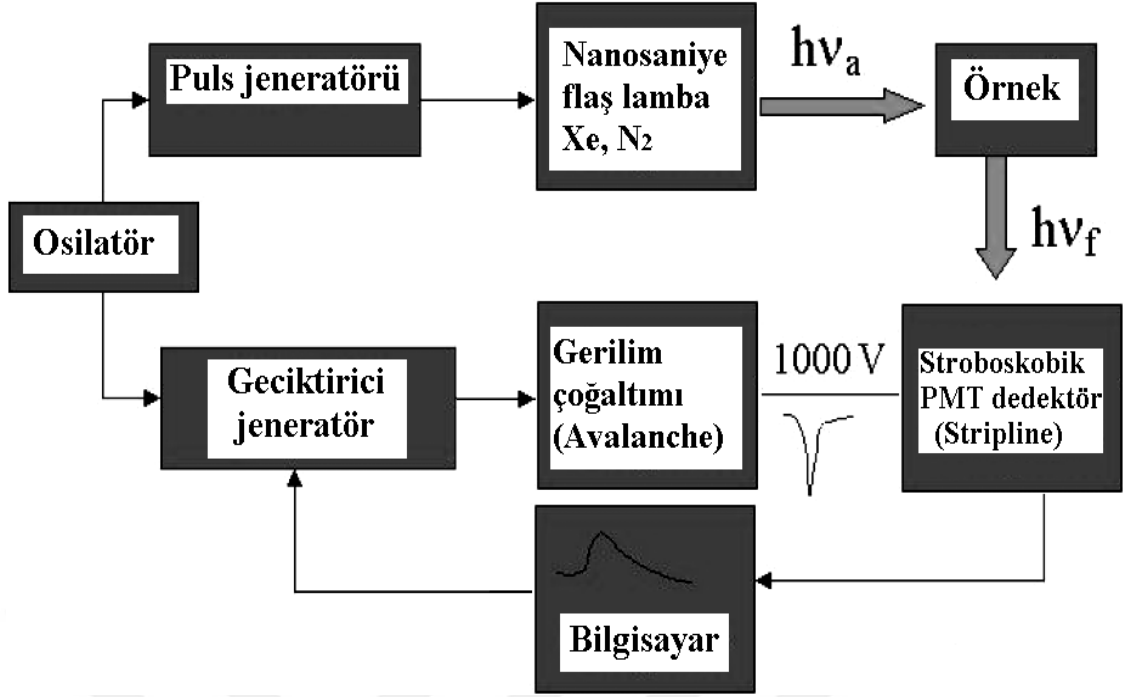
Bu teknikte puls üreten bir kaynak yerine, şiddeti nanosaniyeler seviyesinde zamana göre sinüsoidal olarak 480 nm'e edilen bir ışık kaynağı kullanılır. Bu uyarma sonucu örnekten alınan 480 nm'e emisyon cevabı, uyarılmış hallerin sonlu ömürlü olmasından dolayı eksitasyona göre bir faz gecikmesi ile dedektörde algılanır [2,4,24].

2.8.2.4.2 Tek Foton Sayma Yöntemi

Bu yöntemde örnek, nanosaniyeler mertebesinde parlama süreleriyle uyarıcı pulslar oluşturan nanoflaş lamba veya bir lazer kaynakla uyarılır. Dedektör sistemi bu uyarıcı pulsun parlama anı ile ilk emisyon fotonunun dedektöre ulaştığı an arasındaki zaman farkını ölçer. Çok sayıda foton - genel olarak 10^6 - için bu zaman farkı ölçülür ve elde edilen varış sürelerinin dağılımı bozunma eğrisini ifade eder [2,4,24].

2.8.2.4.3 Stroboskopik Yöntem

Bu yöntemde de nanosaniyeler mertebesinde parlamalarla uyarıcı pulslar oluşturan nanoflaş lamba veya lazer kaynaklar kullanılarak örnekten emisyon pulslarının yayımlanması sağlanır. Oluşturulan bu floresans pulslarının şiddeti, uyarıcı pulslardan sonra farklı gecikmelerle ölçülerek floresans bozunma eğrisi elde edilir. Aslında bu teknikte dedektörün belirlediği, uyarma sonrası örnekten gelen emisyon pulslarının PMT dedektöründe oluşturduğu kısa süreli voltaj puls şiddetlerinin nanosaniyeler mertebesinde uygulanan gecikmelerle zamana göre ölçülen değişimleridir. Ölçülen voltajın büyüklüğü floresans emisyon şiddeti ile, bir başka deyişle dedektöre ulaşan örnek emisyon pulslarının taşıdığı foton miktarıyla orantılıdır. Bu tezde tripsin ve kimotripsin aktivitesi, stroboskopik tekniğe göre dizayn edilmiş (Şekil 2.30) "PTI C 71" marka zaman ayrımlı floresans cihazı ile izlendi [2,4,24].



Şekil 2. 30 Nanoflaş stroboskopik sistem [28]

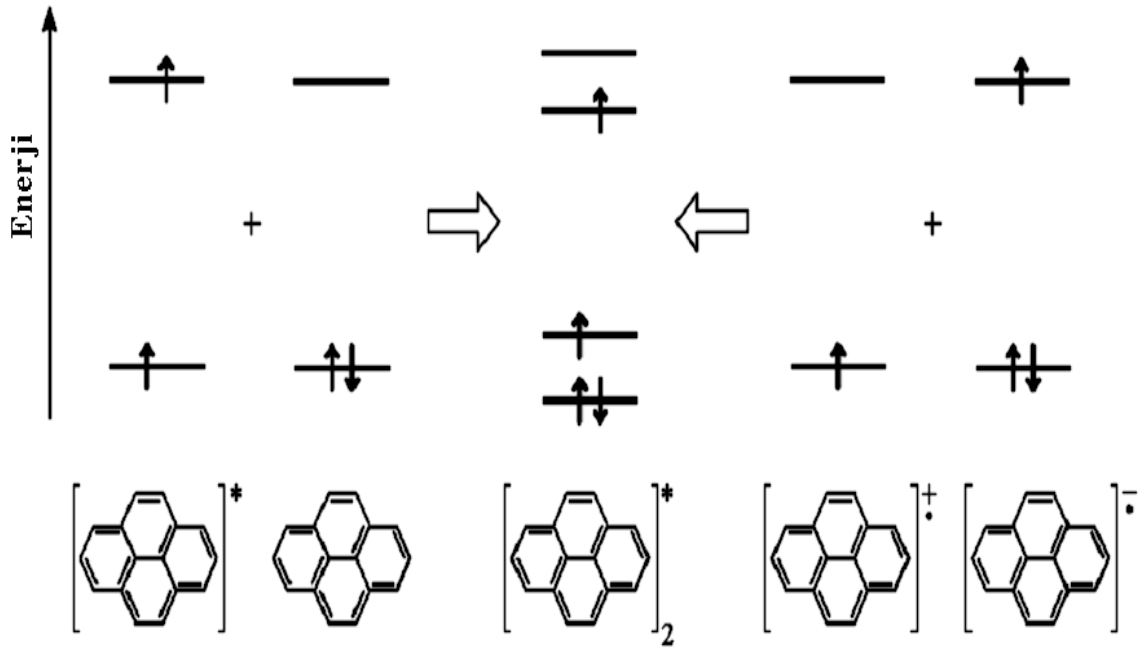
2.9 Eksimer Yapılar

Eksimer yapılar, uyarma esnasında meydana gelen reaksiyonlarla ortaya çıkan ve sadece uyarma süresince var olan dimerik uyarılmış hal kompleksleridir. Eksimer emisyonu floresans spektrumunda monomerinkine görece daha uzun dalgaboylarında yeni ve yaygın bir pik şeklinde belirir. Eksimer yapılara bilinen en iyi örneklerden birini piren molekülü oluşturur.

Eksimer oluşumu iki yolla gerçekleşir. Birincisi, nötral temel haldeki bir monomerin nötral uyarılmış haldeki eşi ile karşılaşmasıdır. İkincisi ise, temel halde radikal anyonun temel halde radikal katyon ile karşılaşması sonucu ortaya çıkar (Şekil 2.31).

Bir çözeltideki monomer ve eksimer floresansı çarpışma oranına ve de moleküller arasındaki mesafeye bağlıdır. Eksimer oluşturan gruplar arasındaki mesafe 0,3nm veya bundan daha kısadır. Bu özelliklerden faydalanarak proteolitik enzimler için eksimer floresan karakterli peptid substratlar geliştirmek mümkündür [12,29-31].

Bu tez çalışmasında, maleimid bağlı piren molekülü, BSA proteini üzerinde eksimer yapılar oluşturacak şekilde reaksiyona sokularak floresan proteolitik enzim substratı hazırlanmıştır.



Şekil 2. 31 Eksimer yapı. Solda, uyarılmış nötral piren molekülü (S_1) ile temel haldeki (S_0) piren'in karşılaşması sonucu; sağda, piren radikal katyonu ile piren anyonunun karşılaşması sonucu piren eksimerinin (dimerik uyarılmış hal kompleksi) oluşumu [30].

2.10 Jel Filtrasyon Kromatografisi

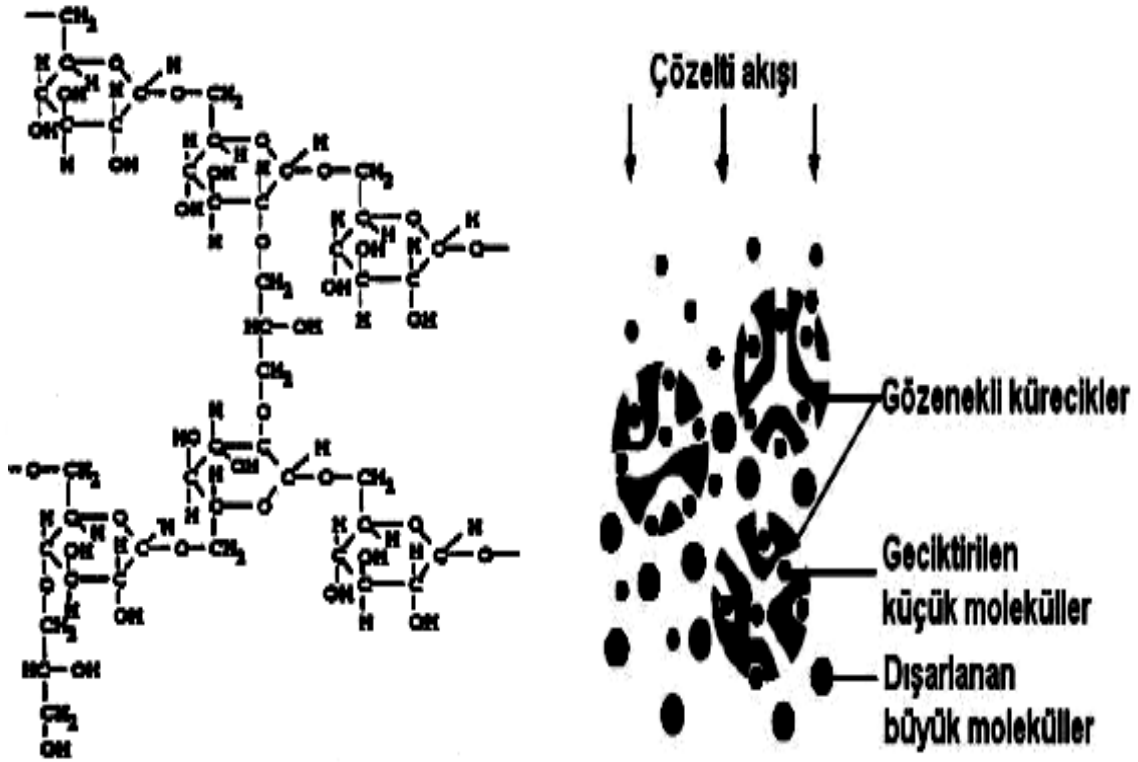
Moleküler Eleme Kromatografisi adıyla da bilinen Jel Filtrasyon İşlemi, moleküllerin boyut farklılıklarına göre ayrılmalarını sağlayan bir kromatografi tekniğidir. Bu yöntem biyokimya çalışmalarında peptidler, proteinler, DNA parçaları, enzimler vb. biyomakromoleküllerin ayrılmalarında, saflaştırılmalarında, yaklaşık molekül ağırlıklarının tayininde ve yaklaşık Stokes Çapları'nın belirlenmesinde kullanılır.

2.10.1 Jel Filtrasyon Kromatografisi ile Protein Saflaştırma

Jel filtrasyon sisteminde kolon dolgu maddesini oluşturan jel sabit faz; başlıca dekstran, agaroz, poliakrilamid, vinil vb. polimerik moleküllerden çapraz bağlarla üç boyutlu ağ yapı halinde sentezlenen, çapları belirli büyüklüklerde gözenekler (porlar) içeren, mikron boyutlarında ve tepkisiz (inert) polimer küreciklerden oluşur. Dekstranın çapraz bağlı polimer yapısı ve jel boncuklarının filtrasyon etkisi Şekil 2.32'de görülmektedir.

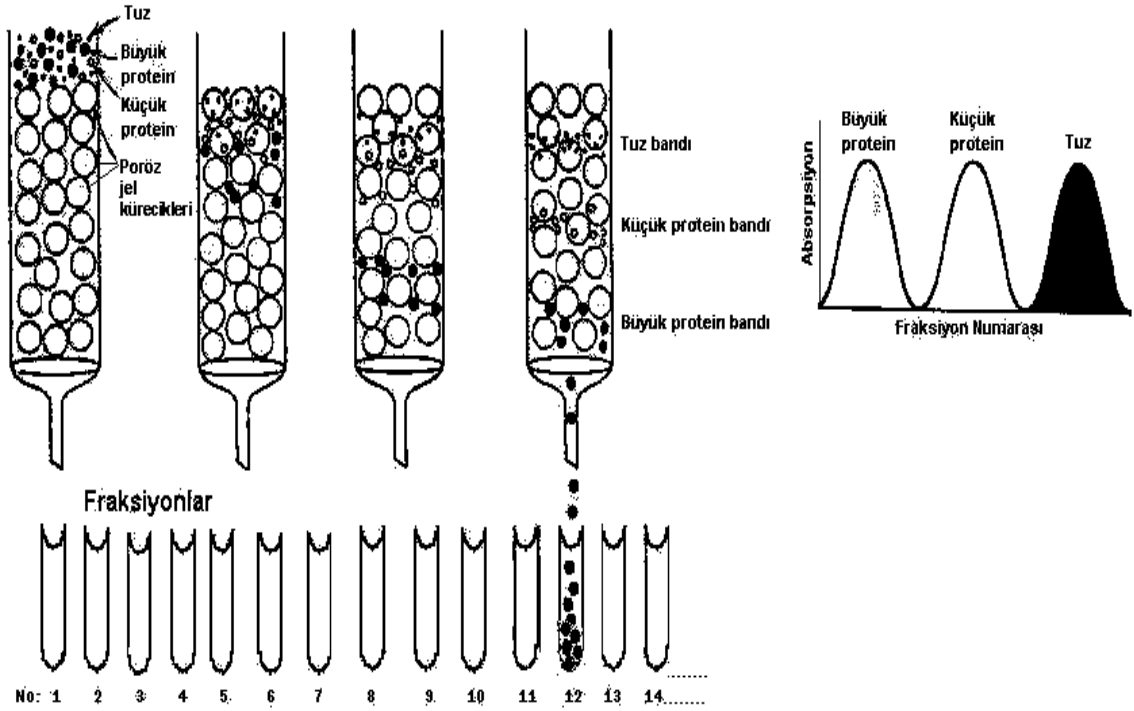
Kolon içinde sabit faz üzerinden moleküllerin akışını sağlayan hareketli faz, jel filtrasyon kolonuna uygulanacak örnek karışımındaki moleküllerin özellikleri dikkate alınarak hazırlanan bir tampon çözeltidir. Örnek molekülleri hareketli fazın sürüklemesiyle sabit

faz içinden geçerken polimer boncukların yapısında bulunan gözenekler içine molekül boyutlarına göre değişen hacimlerde alınırlar; başka bir deyişle, gözenekler içindeki toplam sıvı hacminin belli bir kısmı ($K_d V_i$) ile taşınırlar. Bu nedenle kolon boyunca



Şekil 2. 32 Dekstranın çapraz bağlı polimer yapısı ve jel boncuklarının filtrasyon etkisi

alınacak yolun toplam uzunluğu ve kolon çıkış hacmi (**elüsyon hacmi**; $V_e = V_0 + K_d V_i$) moleküle özgü olarak farklılık gösterir. Jel boncuk gözenekleri içinde kolaylıkla dağılarak daha büyük hacim kapladıkları ve dolayısıyla sabit fazda daha çok oyalandıkları için, küçük çaplı moleküllerin kolon boyunca akışı yavaşlar ve böylece kolondan çıkışları (elüsyon) sabit faz vasıtasıyla geciktirilmiş olur. Molekülün çap büyüklüğü arttıkça jel kürecikleri gözeneklerine girişi boyutlarının elverdiği ölçüde sınırlı miktarda gerçekleşir. Buna bağlı olarak jel fazında oyalanma süresi kısalmır ve kolon sistemi daha çabuk terkedilir. Jel filtrasyon sistemine uygulanan örnek içeriğinde, çapları jel küreciklerinin gözenek çaplarından daha büyük olan ve bu nedenle tamamen dışarılandıkları için sabit faz tarafından gecikmeye uğratılamayan moleküller sistemi en önce terkederek. Böylece sırasıyla, çapları en büyük moleküller en önde, sonra orta çaplı moleküller ve en arkada küçük moleküller olacak şekilde jel filtrasyon kolonunu terk eden ve ayrı ayrı tüplerde toplanan örnek molekülleri boyutlarına göre ayrılmış olur (Şekil 2.33).



Şekil 2. 33 Jel filtrasyon sistemi

Kolondan çıkan moleküllerin belirlenmesi, genellikle ve yaygın olarak “Ultraviyole-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektrofotometre Tekniği” kullanılarak elde edilen kromatogramlarla yapılır [16].

2.10.2 Jel Filtrasyon Kromatografisi ile Molekül Ağırlığı (M_w) Tayini

Jel filtrasyon kromatografisi ile bilinmeyen bir proteinin Molekül Ağırlığı (M_w) tayin edilebilir. Bu amaçla moleküllerin kolon içinde hareketlerini tanımlayan, aşağıda verilen parametrelerden yararlanır.

K_d , K_{av} : Sabit ve hareketli fazlar arasındaki dağılım katsayısı.

V_0 : Kolon içinde Jel dolguyu saran boşluk hacmi.

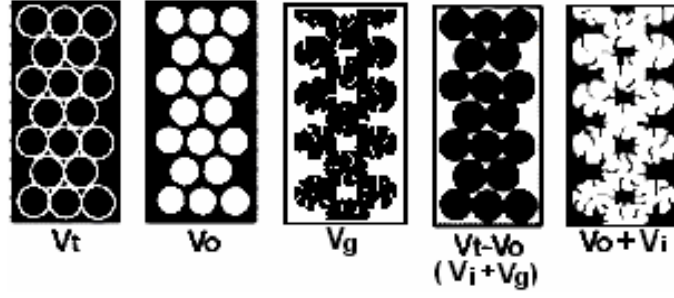
V_t : Toplam kolon hacmi.

V_i : Toplam jel gözenek hacmi.

V_g : Jel kütlesi hacmi.

V_e : Elüsyon hacmi.

Jel filtrasyon kolonunda hacim tanımlamaları Şekil 2.34’de sunulmuştur.



Şekil 2. 34 Jel filtrasyon kolonunda hacim tanımlamaları

Molekül ağırlığı tayini için ilk olarak molekül ağırlıkları bilinen bazı proteinleri içeren çözelti karışımı kolon sistemine uygulanır ve her bir proteine ait elüsyon hacimleri (V_e) elde edilir. V_e değerleri ve diğer parametreler kullanılarak bu proteinlere ait sabit ve hareketli fazlar arasındaki dağılım katsayıları (K_d veya K_{av} ; aralarındaki fark aşağıda açıklanacak.) hesaplanır ve sonra “ K_{av} - $\log M_w$ ” veya “ $\log M_w$ - V_e ” grafiklerinden elde edilen standart eğrilerden faydalanarak bilinmeyen proteinin molekül ağırlığı bulunur.

Belli bir moleküle ait elüsyon hacmi,

$$V_e = V_0 + K_d V_i \quad (2.47)$$

ifadesi ile verilir; buradan,

$$K_d = (V_e - V_0) / V_i \quad (2.48)$$

eşitliği elde edilir. Toplam kolon hacmi,

$$V_t = V_0 + V_g + V_i \text{ dir.} \quad (2.49)$$

Bu ifadeden toplam gözenek hacmini veren,

$$V_i = V_t - V_0 - V_g \quad (2.50)$$

eşitliğine ulaşılır ve bu eşitlik 2.48 no’lu denklemde yerine konulursa,

$$K_d = (V_e - V_0) / (V_t - V_0 - V_g) \quad (2.51)$$

ifadesi elde edilir. Toplam jel kütlesi hacmi (V_g), ölçümü zor ve de tüm çözünmüş moleküller için aynı değerde olduğundan ihmal edilebilir; böylece (2.49), (2.50) ve (2.51) eşitlikleri sırasıyla;

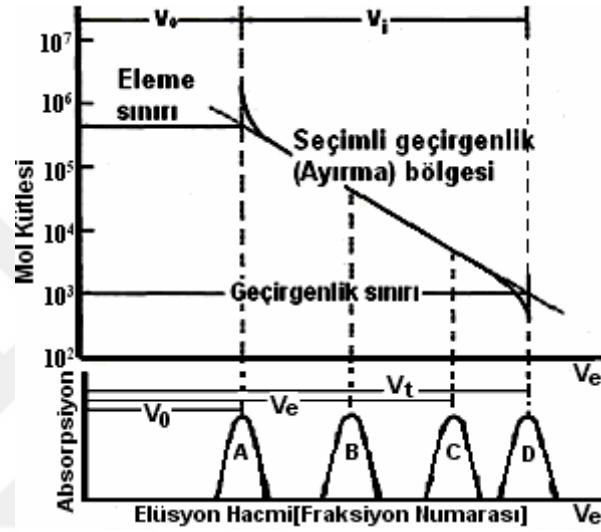
$$V_t = V_0 + V_i \quad (2.52)$$

$$V_i = V_t - V_0 \quad (2.53)$$

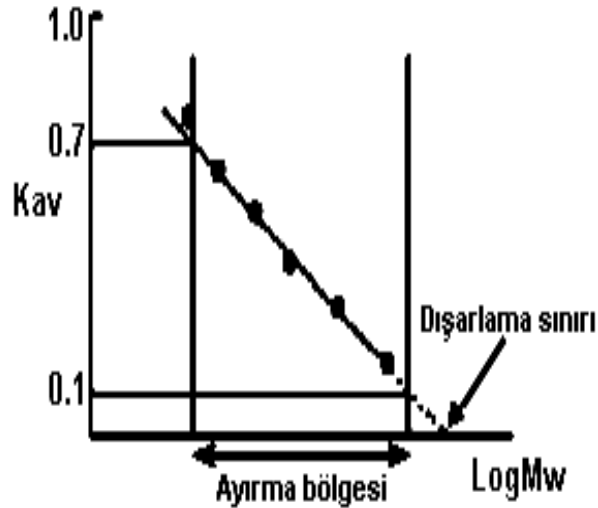
$$K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0) \quad (2.54)$$

ifadelerine dönüşür. $(V_e - V_0)$ terimi aslında moleküle özgü gözenek hacminin ifadesidir. K_{av} gerçek dağılım (difüzyon) katsayısı olmamasına rağmen V_e ile doğrusallık gösterir.

V_0 hacmi, mavi dekstran vb. tamamen dışarılanan yüksek molekül ağırlıklı maddelerin elüsyon hacimleri ile; V_t hacmi ise, $V_t = \pi r^2 h$ formülünden kolon hacmi hesaplanarak veya aseton, riboflavin, renkli tuzlar [ferrosiyanür $[(Fe(CN)_6]^{3-}$, potasyum kromat (K_2CrO_4), vb.] gibi çok küçük moleküllerin elüsyon hacimleri ile belirlenir.



Kromatogram



Şekil 2. 35 Jel filtrasyon kromatografisi için “ $M_w - V_e$ ” ve “ $K_{av} - \log M_w$ ” kalibrasyon eğrileri

Şekil 2.35’de, yukarıdaki kalibrasyon eğrisinin altında verilen absorpsiyon kromatogramında; A eğrisi, mol kütlesi eleme sınırından daha büyük olan bütün

bileşikleri; B ve C eğrileri, ayırmaya tabi tutulan bileşikleri ve D eğrisi, geçirgenlik sınırından daha küçük olan bütün bileşikleri içerir.

2.48 no'lu eşitlikte K_d yerine K_{av} yazarsak,

$$V_e = V_0 + K_{av}V_i \quad (2.55)$$

ifadesini elde ederiz. Buna göre K_{av} ; $K_{av} = (V_e - V_0) / V_i$ olduğundan $0 < K_{av} < 1$ aralığında değişir. $K_{av} = 0$ ise $V_e = V_0$ ve $K_{av} = 1$ ise $V_e = V_t$ olur. Bu sonuçlara göre filtrasyona tabi tutulan moleküllerin elüsyon hacimleri V_0 ile V_t hacimleri arasında değişim gösterir [16].

Jel filtrasyon kromatografisi için " $M_w - V_e$ " ve " $K_{av} - \log M_w$ " kalibrasyon eğrileri Şekil 2.35'de görülmektedir.

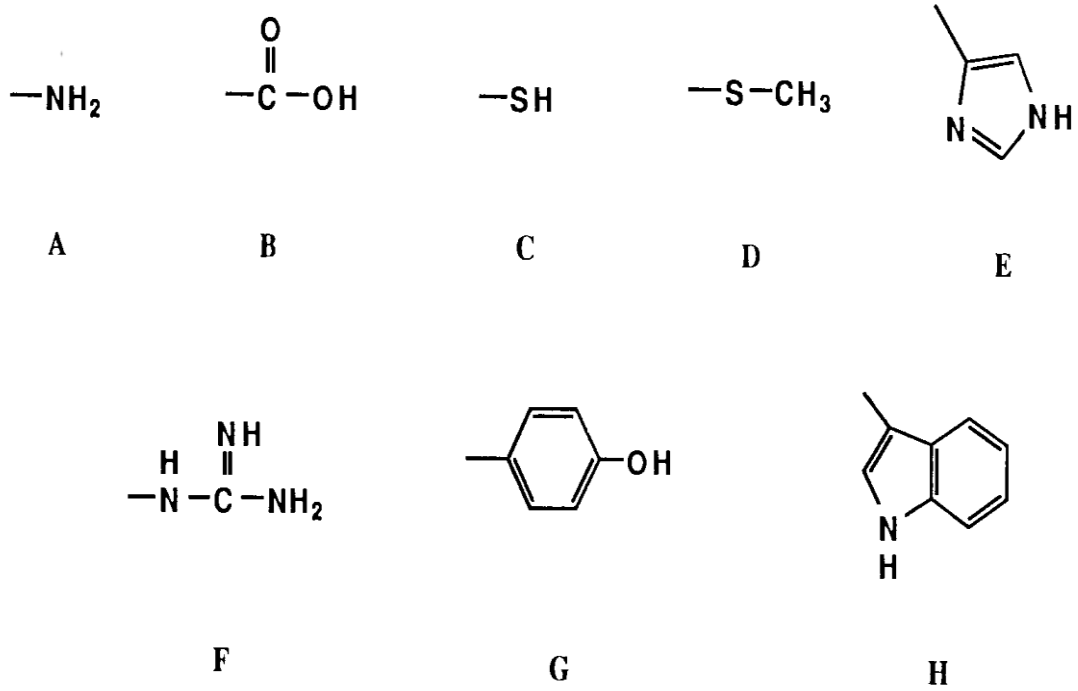
Bu çalışmada, N-(1-pirenil)maleimid (PM) ile floresan türevi hazırlanan sığır serum albümin jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırıldıktan sonra proteaz substratı olarak kullanıldı [32-34].

2.11 Tepken (Reaktif) Protein Grupları ve Modifikasyonları

Proteinlerin kimyasal reaktiviteleri, amino asit içeriklerinin yan zincirlerinde yer alan gruplara dayanır. Alanin, valin, lösin, izolösin amino asitlerinin hidrofobik karakterli yan zincirleri kimyasal olarak inertsir. Serin ve treoninde bulunan alifatik hidroksil gruplar düşük reaktivite gösterirler.

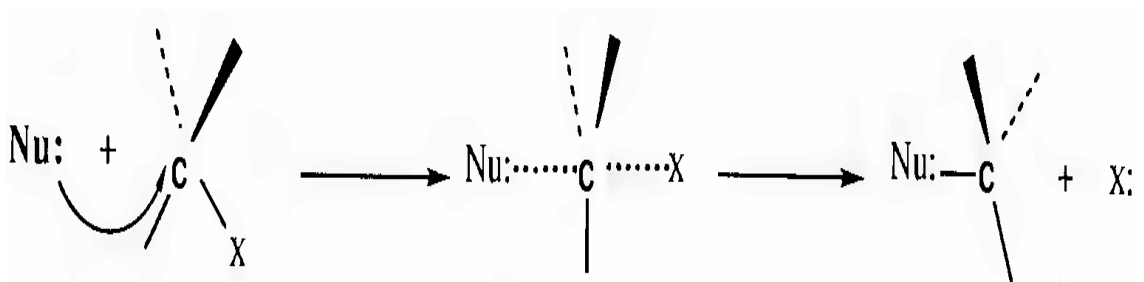
Amino asitlerde sadece sekiz hidrofilik yan zincir aktif kimyasal karakter sergiler. Bunlar Şekil 2.36'da gösterilmektedir: argininin guanidinil grubu (F), glutamik ve aspartik asitlerin γ - ve β - karboksil grupları (B), sisteinin sülfhidril grubu (C), histidinin imidazolil grubu (E), lizinin ϵ -amino grubu (A), metiyoninin tiyoeter içeriği (D), triptofanın indolil grubu (H) ve tirozinin fenolik hidroksil grubu (G). A ile F arasındaki gruplar en aktif olanlarıdır. G ve H gruplarının aktiviteleri nisbeten daha düşüktür [35].

Bu fonksiyonel gruplara, farklı reaktif gruplar kimyasal olarak eklenebilir. Protein modifikasyonlarının çoğu; kolay ayrılan bir grubun, amino asitlerin yan zincirlerindeki nükleofil karakterli reaktif gruplar tarafından uzaklaştırılmasını içeren nükleofilik atak reaksiyonlarıdır.



Şekil 2. 36 Amino asitlerin yan zincirlerinde yer alan reaktif gruplar

Bu modifikasyonlar; spektroskopik tayinler, kromatografik ayırmalar, proteinlerin özgülüklerinin değiştirilmesi, reaktivliklerinin artırılması vb. amaçlar için uygun reaksiyon koşulları (pH, sıcaklık, konsantrasyon) altında yapılır. Peptitlerin yapısında bulunan aminoasitlerin yan gruplarına bağlanma reaksiyonları genellikle nükleofilik yerdeğiştirme reaksiyonu (S_N2) mekanizmasına göre gerçekleşir (Şekil 2.37) [35].

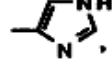
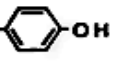
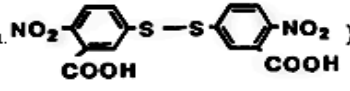
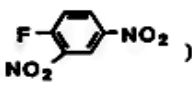
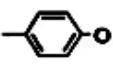
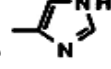
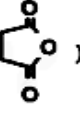
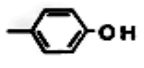
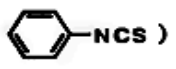
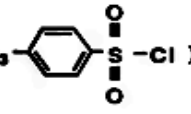
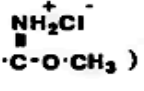
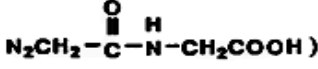
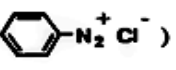
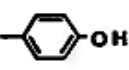
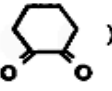
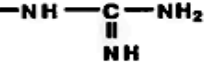


Şekil 2. 37 Nükleofilik yerdeğiştirme reaksiyonu, S_N2 mekanizması [35]

Peptitlerin yapısında bulunan aminoasitlerin yan gruplarına bağlanan grup spesifik reaktifler Çizelge 2.4'de verilmektedir.

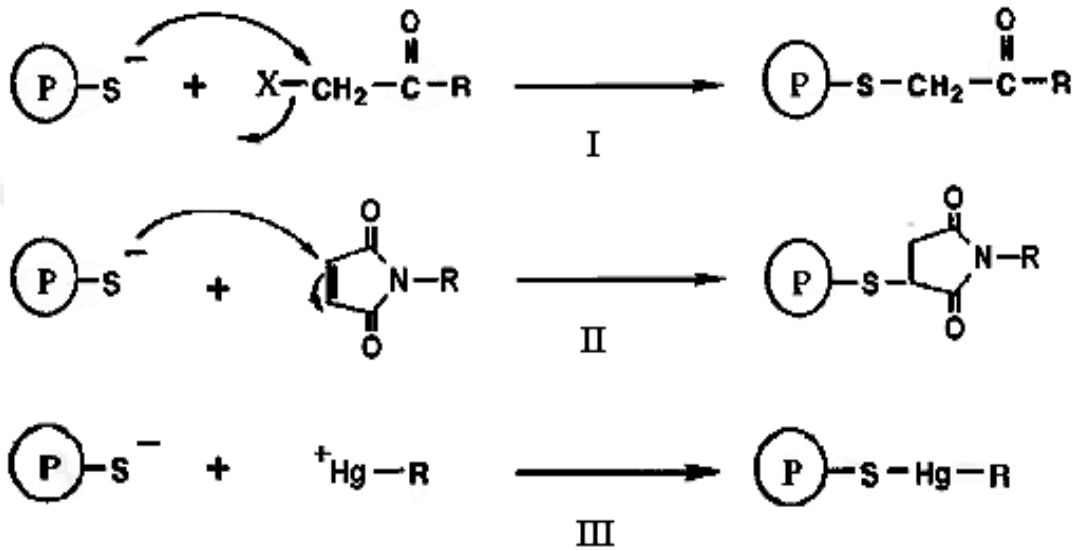
Çizelge 2. 4 Peptitlerin yapısında bulunan aminoasitlerin yan gruplarına bağlanan grup spesifik reaktifler [35]

GRUP SPESİFİK REAKTİFLERE ÖRNEKLER

Reaktif	Grup spesifitesi
α -Haloasetil bileşikler (örn. ICH₂COOH)	-SH,  , -S-CH ₃ , -NH ₂ , 
N-Maleimidler (örn. N-etilmaleimid)	-SH, -NH ₂
Cıvalı bileşikler (örn. ClHg  COOH)	-SH
Disülfidler (örn. )	-SH
Aril halojenürler (örn. )	-SH, -NH ₂ ,  , 
Asit anhidritler (örn. )	-NH ₂ , 
İzosiyanatlar (örn. HNCO)	-NH ₂
İzotiyosiyanatlar (örn. )	-NH ₂
Sülfonil halojenürler (örn. )	-NH ₂
İmidoesterler (örn. )	-NH ₂
Diazoasetatlar (örn. )	-COOH, -SH
Diazonyum tuzları (örn. )	 , 
Dikarbonil bileşiği (örn. )	

Bazı reaktifler, amino asit yan zincirindeki belirli bir gruba seçici olarak daha hızlı tepkime verir. Örneğin, siyanik asit (NCOH) proteinlerin amino, sülfhidril, imidazolil, tirozil ve karboksil grupları ile tepkime verir, ancak sadece amino grupları ile verdikleri reaksiyon kararlı bir ürün oluşumu ile sonuçlanır. Böylece belirli koşullar altında bu maddelerin göreceli aktiviteleri, protein üzerinde özel bir grubu seçimli olarak modifiye etmek için kullanılabilir [35].

Sülfhidril grubu, Maleimid türevleri (N-etilmaleimid, N-pirenilmaleimid vb.) ile nötral pH'da amino gruplarına göre çok daha hızlı reaksiyona girer [35]. Oluşan tiyoeter bağı oldukça karardır ve fizyolojik koşullar altında bölünemez. Maleimidlerin tiyollerle verdikleri reaksiyon, tiyol gruplarının spektrofotometrik kantitatif tayinleri için önem taşımaktadır. Örneğin; seyreltik bir çözeltide, pH:6'da N-etilmaleimid'in 300nm'de absorpsiyonundaki azalma tiyol gruplarının kantitatif tahmini için kullanılabilir [35]. Protein üzerinde tiyol gruplarının reaksiyonları Şekil 2.38'de görülmektedir.

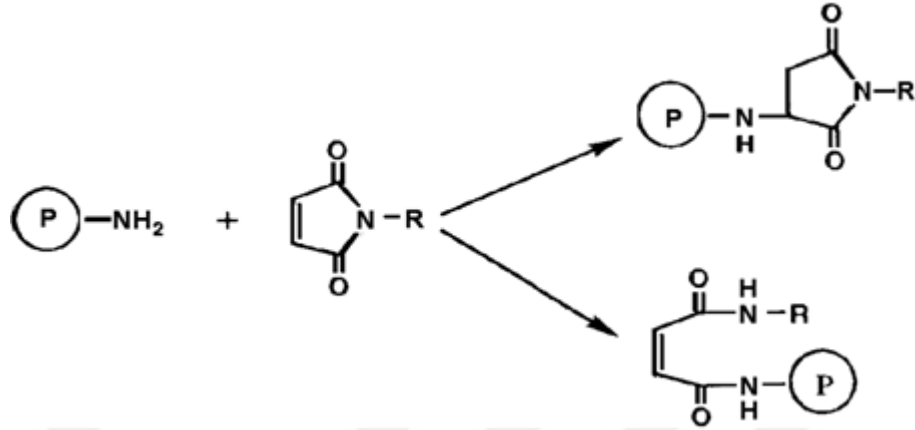


Şekil 2. 38 Protein üzerinde tiyol gruplarının reaksiyonları. α -Haloasetil bileşikleri (I), Maleimid türevleri (II) ve Cıva içerikli bileşiklerle (III) verdikleri reaksiyonların şemaları [17]

Amino grubu, protein yapısında bulunan diğer güçlü bir nükleofildir. Amino grubunun protein bünyesindeki bolluğu, onu en önemli kimyasal modifikasyon hedefi kılmaktadır. Sülfhidril grupları ile karşılaştırıldığında, amino grupları α -Haloasetil bileşikleri ile çok yavaş ve yüksek pH'da reaksiyon verirler. Proteinlerde serbest sülfhidril gruplarının olmadığı veya tiyol grubunun protein içine gömülü olduğu durumlarda amino gruplarının α -Haloasetil bileşikleri ile vereceği reaksiyonlar önem kazanır [35].

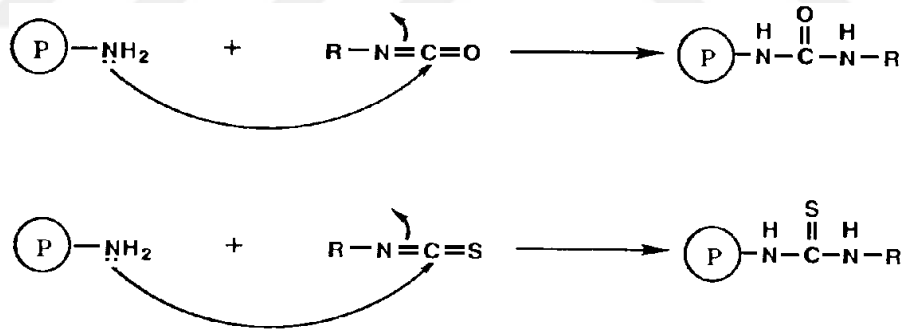
Maleimid türevleri, ancak alkali pH koşullarında amino grupları ile reaksiyona girerler [35]. Amino gruplarının maleimidlerle reaksiyonlarında izleyebilecekleri iki düşünülebilir yol bulunmaktadır. Amin azotu, maleimid halkası çifte bağına katılma

yapabilir veya halka açılmasını takiben karbonil grubuna katılarak bir açilasyona uğrar. Reaksiyon yolu ne olursa olsun maleimidlerin aminlerle reaksiyonları nötral derecenin üstündeki pH değerlerinde önem arzeder (Şekil 2.39) [35].



Şekil 2. 39 Amino gruplarının maleimidlerle reaksiyonlarında izlenebilecek iki muhtemel yol [17]

İzosiyanatlar ve izotiyosiyanatlar, proteinlerin amino, sülfhidril, imidazolil, tirozil ve karboksil grupları ile tepkimeye girerler, ancak sadece amino grupları ile kararlı ürünler oluştururlar (Şekil 2.40).



Şekil 2. 40 Amino gruplarının izosiyanat ve izotiyosiyanatlarla verdikleri tepkimeler

BÖLÜM 3

MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

3.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Madde adı	Firma adı	Katalog No
Dimetil sulfoksit (DMSO)	Fluka	34943
Siğır serum albümin (BSA)	Fluka	05488
Sodyumdihidrojenfosfatdihidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Fluka	71505
Sefadeks G-75	Sigma	17-0050-01
Sodyum klorür	Sigma	
Sodyum hidroksit (NaOH)	Fluka	71689
Kimotripsin	Fluka	27270
Tripsin	Fluka	93610
N-(1-Pirenil)maleimid (PM)	Fluka	82656
Metil alkol	Merck	106008
Etil alkol	Merck	818761
Kloroform	Merck	822265
Aseton	Merck	802912

3.1.2 Kullanılan Cihazlar

- UV/Vis spektrofotometre: UNICAM UV/Vis Spectrometer UV2 (YTÜ), Küvet Hellma, 104-QS (YTÜ).
- UV/Vis spektrofotometre: Perkin Elmer Lambda 25 UV/Vis Spectrophotometer (YTÜ), Küvet Hellma, 104-QS (YTÜ).
- Distile su cihazı: Maxima Ultra-Pure Water (YTÜ).
- Analitik Terazı: Sartorius ED224S (YTÜ).
- Zaman ayrımlı floresans spektrofotometresi: PTI C-71 Time Master System (YTÜ), Küvet: Hellma 111-QS (YTÜ), Hellma 119.000F-QS (YTÜ).
- Sıcaklık kontrollü çalkalamalı inkübatör: Sartorius Certomat IS (YTÜ).
- Jel Geçirgenlik Kromatografisi Cihazı: Viscotek GPC max VE 2001 GPC Solvent/Sample Module. Kolon: Shimadzu Shim-Pack 300 diol (YTÜ).
- Ultrasantrifüj: Sigma-3K30 (YTÜ).

3.2 Çalışmanın Amacı, Kapsamı ve Uygulanan Yöntem

Proteolitik enzimler fizyolojik etkinliklerinin yanı sıra AIDS, kanser, SARS vb. birçok hastalıkta temel rol oynamaktadır [7-9]. Örneğin kanser hücreleri kendilerine çoğalma ve yayılma alanı açmak amacıyla çevre dokuları tahrip etmek için kendi salgıladıkları proteazları kullanırlar. Farklı kanser hücrelerinin, birçok zararlı bakteri ve virüsün ürettiği proteazların tespit edilmesi, günümüz hastalıklarının önüne geçilmesinde ve teşhisinde büyük önem taşımaktadır. Bu konuda birtakım proteaz türlerinin aktivitesinin belirlenmesi ve tanınması için mikroanaliz yöntemleri geliştirilmiştir [9].

Proteolitik enzimlerin özellikle endopeptidazların aktivitelerinin izlenmesinde karşılaşılan en önemli sorunlar substrat seçimi ve uygulanan tetkik yönteminin duyarlılığıdır [7]. Tarihine bakıldığında hemoglobin ve kazein, ucuz olmaları ve kolay elde edilebilmeleri nedeniyle proteolitik enzim tetkiklerinde en çok kullanılan substratlar olarak göze çarpar [7]. Proteazların doğal substratları genellikle bir organik

madde ile kompleksleştirilerek absorpsiyon veya emisyon spektroskopisinde, uyarma sonucu gözlemlenebilecek özel sinyaller üretebilen bir yapıya kavuşturulur. Bu işlem, proteolitik enzimin etki mekanizması dikkate alınarak sentezlenen sentetik peptid substratlara da uygulanabilir. Burada amaçlanan; sinyallerin göstereceği karakteristik değişimleri, enzim etkinliğine kalitatif veya kantitatif karşılıklar olarak yansıtabilmektir [7-9].

Piren, Floresein, Rodamin, Antrasen vb. floresan karakterli çok sayıda organik madde; yapılarında gerçekleştirilen uygun kimyasal değişikliklerle, proteinleri oluşturan L- α -aminoasitlerin alkil yan zincirlerinde bulunan $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$, $-\text{SH}$ gibi işlevsel gruplara kovalent olarak bağlanabilmektedir. Bu Kompleksler; enzim etkinliğinin izlenmesi, proteinlerin çözelti ortamındaki yapılarının incelenmesi, membran geçirgenliği, klinik tetkikler, vb. amaçlar için sentezlenmektedir.

Çalışmamızda serin proteazlar sınıfından kimotripsin ve tripsin enzimlerinin sığır serum albümini (BSA) üzerindeki proteolitik aktivitelerini florometrik yöntemle belirlemek ve aktivitelerinin farklılığını ortaya çıkarabilmek amacıyla N-1-pirenilmaleimid (PM) maddesi BSA'ya bir önceki bölümde bahsedilen uygun reaksiyon koşullarında bağlanarak PM-BSA kompleksi sentezlendi. Bağlanma reaksiyonu, PM-BSA üzerinde proteaz etkisini hassas olarak gözlemlememizi sağlayan eksimerleri oluşturacak şekilde gerçekleştirildi. Jel filtrasyon işleminin ardından soğutmalı santrifüjde ultrafiltrasyonla iki kez saflaştırılan PM-BSA kompleksi üzerinde belli floresans ömür özellikleri gösteren eksimerlerin, proteoliz sonrası hidrolizatlarda sergilediği yeni floresans ömürler proteazların özgün aktivitelerinin belirteci olarak değerlendirildi.

N-1-pirenilmaleimid (PM) nötral pH'da seçici olarak serbest sülfhidril ($-\text{SH}$) gruplarına bağlanır ve bu özelliği proteinlerde serbest $-\text{SH}$ gruplarının ve dolayısıyla sistein amino asitlerinin kantitatif tayini için kullanılır [1,35]. BSA'da 35 sistein amino asidi vardır ve bunlardan 34 no'lu sistein (Cys34) hariç diğerleri 17 disülfid bağı ile sistinleri oluşturarak BSA yapısının kararlılığını arttıırırlar [36]. Buna göre eksimer emisyonu elde etmek için iki piren halka sisteminin BSA üzerinde uygun pozisyonlarda 0.3-0.5 nm mesafede karşılıklı konumlanmaları gerektiğinden [29-31], BSA yapısında Cys34 üzerindeki tek serbest $-\text{SH}$ grubunun PM ile modifikasyonu eksimer emisyonu üretmeye imkan

tanıamaz. Bu çalışmamızda eksimer emisyonu eldesi için PM'in bazik koşullarda (pH:9), hem serbest –SH hem de serbest –NH₂ gruplarına bağlanabilme (Şekil 2.38, Şekil 2.39) özelliğinden [35] faydalandık ve Şekil 4.11, 4.13 ve 4.19'daki floresans spektrumlarında 450-470 nm arasında yeni ve yaygın bir pik şeklinde beliren eksimer emisyonları [12-14,29-31] amin grupları üzerindeki bu modifikasyonun gerçekleştiğini kanıtladı. Ayrıca sentez sonrası PM-BSA kompleksi ve BSA örneklerinin jel geçirgenlik kromatografisi ile analizlerinden elde edilen kromatogramlar karşılaştırıldığında (Şekil 4.16), kompleksin BSA'ya görece daha büyük olması nedeniyle beklendiği gibi daha küçük hacimlerde elüsyonu floresans spektrumlarından elde edilen bulguları destekledi. PM-BSA'nın tripsin ve kimotripsin ile hidrolizi "Viscotek GPC max VE 2001 GPC" marka jel geçirgenlik kromatografisi cihazı ve Shimadzu Shim-Pack 300 diol kolonu kullanılarak belirlendi.

Eksimer pikinin maksimum emisyon verdiği dalgaboylarından zaman ayrımlı floresans ölçüm tekniği ile elde edilen floresans bozunma verilerinin ekponansiyel seriler yöntemi (ESM) ile analizinden elde edilen floresans ömür dağılımlarındaki değişimlerin de proteaz aktivitesine özgünlük gösterdiği gözlemlendi ve bu özelliğin proteazlar için geliştirilecek yeni tetkik yöntemlerine temel oluşturabileceği sonucuna varıldı.

Tripsin ve kimotripsin aktivitelerinden elde edilen sonuçlar, protein yapısında oluşturulan uyarılmış hal komplekslerinin floresans ömür dağılımlarının proteindeki yapısal bozulmalara karşı gösterdiği duyarlı değişimlerin proteazların aktivitelerinin tahmini, tayini ve birbirlerinden ayrıştırılmasında kullanılabileceğini göstermektedir.

Mikroanaliz ve benzeri yöntemlerin hiçbirisinin, proteazların özgün hidrolitik ürünlerini esas almamış olması ve literatürde tripsin ve kimotripsin proteazlarının N-1-pirenilmaleimid (PM) bağlı sığır serum albümin (BSA) proteinini hidrolizlemesi sonucu eksimer emisyonuna ait floresans ömür dağılımının proteaz aktivitesine özgün olarak değiştiğini gösteren herhangi bir çalışmaya rastlanmamış olması bu doktora tez çalışmasının özgün olduğunu göstermektedir.

BÖLÜM 4

DENEYSEL BÖLÜM

Çalışmamızın amacı, BSA'nın kimotripsin ve tripsin proteazlarının etkisi sonucu oluşan proteolitik hidrolizatlarına ait floresans ömür dağılımlarının ilgili proteaz aktivitesinin özgün birer sonucu olduğunu ortaya koymaktır. Bunun gerçekleşmesi için BSA'nın yapısına ekleyebileceğimiz ve proteaz etkisi ile BSA'nın geçireceği yapısal değişimlere son derece duyarlı floresans sinyaller üreten floresan özellikli bir molekül kullanılması gerekir. Bölüm 2'de bahsettiğimiz şekilde piren, antrasen, vb. düzlemsel moleküller, yapılarına eklenen özel gruplarla proteinlerdeki amino asitlerin yan zincirlerindeki serbest $-NH_2$, $-SH$, $-COOH$, $-OH$, vb. gruplara uygun reaksiyon koşullarında kovalent olarak bağlanması sonucu uyarılmış hal dimeri oluşturacak şekilde uygun mesafelerde birbirlerine karşı yüz yüze konumlandırılabilirler. Protein yapısında oluşturulabilen bu uyarılmış hal komplekslerinin, proteinin üç boyutlu yapısında meydana gelebilecek küçük bozulmalarla bile pozisyonlarını kolaylıkla kaybedebilmelerinden kaynaklanan floresans emisyonlarındaki son derece duyarlı değişimlerin izlenmesi ve yorumlanması bu tez çalışmasının yukarıda belirtilen amacını gerçekleştirmeye yönelik deneysel çalışmaların temelini oluşturmaktadır.

Uyarılmış hal kompleksleri, sadece uyarma süresince varlıklarını sürdürürler. Uyarma kesildiğinde, dimerler monomerlerine bozularak uyarılmış dimerik hal kaybolur. Aynı moleküllerin oluşturduğu uyarılmış hal dimerlerine eksimer, farklı moleküllerin oluşturturduğu uyarılmış hal dimerlerine eksipleks denir [2-5, 29,30].

Tez çalışmamızda, floresan bir molekül olan pirenin maleimid türevi N-(1-pirenil)maleimidi (PM) BSA'nın yapısındaki serbest $-SH$ ve $-NH_2$ gruplarına bağlamak

amacıyla kullandık. Pirenin maleimid türevi nötral pH'da serbest –SH gruplarının seçimli olarak işaretlenmesi için kullanılır. Ancak piren yapısına eklenmiş olan maleimid grubunun bazik pH koşullarında amin gruplarına da bağlanma özelliği, BSA yapısına maksimum miktarda piren molekülü bağlamamızı ve maksimum miktarda eksimer emisyonu elde etmemizi mümkün kıldı. Sentez sonrası saflaştırdığımız PM-BSA kompleksinin floresans spektrumunda PM'ninkine görece daha uzun dalga boylarında yeni olarak ortaya çıkan yaygın pik oluşumunun gözlenmesi, N-(1-pirenil)maleimidi (PM), bazik pH (pH:9) koşulları altında BSA'nın yapısında uygun mesafelerde, eksimerler oluşturacak şekilde yüzyüze konumlandırmayı başardığımızı kanıtladı [12-14,29-31].

Uyarılmış hal dimeri olan eksimer emisyonunun herhangi bir etki ile proteinin üç boyutlu yapısında ortaya çıkabilecek değişikliklerden kolaylıkla etkilenmesi özelliğinden dolayı proteinlerin denatürasyonları ve hidrolizleri hakkında detaylı bilgi edinilmektedir [12-14,29-31].

Çalışmamız, aşağıda belirtildiği şekilde bir yol izlenerek gerçekleştirilmiştir:

- PM-BSA sentezi öncesi, kullanılan reaktifler olan PM ve BSA'nın absorbands ve "PTI Time Master C 71" marka zaman ayırmalı spektrofloretrade floresans özellikleri (floresans spektrumları, floresans bozunma eğrileri, floresans ömür dağılımları) belirlendi.
- Uygun reaksiyon koşullarında (pH:9, +37°C) PM-BSA kompleksi sentezlendi ve sentezlenen kompleksin absorbands ve floresans özellikleri belirlendi.
- Uygun reaksiyon koşullarında sentezlenen PM-BSA kompleksi, önce jel filtrasyon kromatografisi ve sonra ultra filtrasyonla saflaştırıldı.
- Saflaştırılan PM-BSA örneğinde PM/BSA mol oranı hesaplanarak her iki molekülün birbirine bağlanma oranı belirlendi.

- Saflaştırılan PM-BSA örneği, ayrı ayrı tripsin ve kimotripsin proteazlarının etkisine bırakıldı.
- Proteoliz sonrası oluşan her iki proteaz ürünü hidrolizatların ayrı ayrı floresans spektrumları, floresans bozunma eğrileri belirlendi ve bu eğrilere ait verilerden faydalanarak, cihaza bağlı bilgisayara kurulu olan ve cihaza bilgisayarla kumanda etmemizi sağlayan Felix32 programında yer alan eksponansiyel seriler yöntemi ile floresans ömür dağılımları belirlendi.

Hidroliz öncesi ve sonrası elde edilen floresans ömür dağılımları karşılaştırdığında; aynı substrattan (PM-BSA) iki farklı proteaz (tripsin ve kimotripsin) etkisi sonucu elde edilen hidrolizatlara ait floresans ömür dağılımlarının belirgin farklılıklar sergilediği ortaya çıkarıldı. Floresans ömür dağılımlarındaki bu farklılıkların hidrolizatlardaki peptid içeriklerinin farklılığından kaynaklandığı ve bu nedenle ilgili proteazın aktivitesine özgün olduğu ve proteazlar için birer parmak izi işlevi görebileceği sonucuna ulaşıldı.

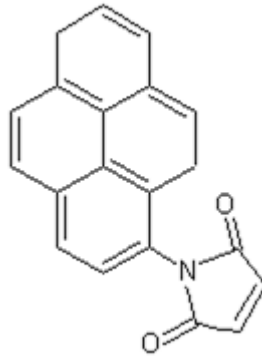
Elde edilen bulguların kanser, AIDS, SARS gibi proteaz ilgili hastalıklarda özgün proteaz aktivitesinin teşhisinde, tıp, ilaç, ziraat, tarım-hayvancılık, mandıra ve gıda araştırmalarında proteolitik süreçlerle ilgili yeni tetkik yöntemlerinin geliştirilmesinde kullanılabileceği düşünülmektedir.

Yukarıda maddeler halinde sıraladığımız çalışmamızın aşamaları aşağıda detayları ile sunulmaktadır.

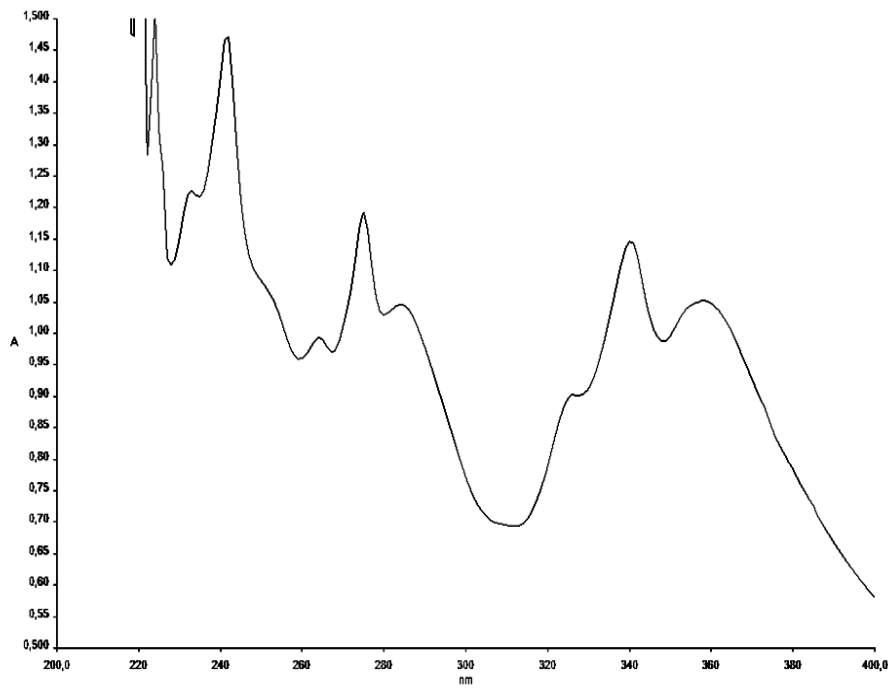
4.1 N-(1-pirenil)maleimid (PM)'in Absorpsiyon ve Emisyon Özelliklerinin Belirlenmesi

PM-BSA sentezi sonrası bağlanma oranlarını belirlemek amacıyla molekül yapısı Şekil 4.1'de görülen PM'in "8mg PM/ml DMSO" stok çözeltisinden, Tris.HCl tamponunda (0,025M, 0,1M NaCl, 0,005M CaCl₂, pH:8) hazırlanan 8x10⁻⁵M çözeltisinin absorbands

spektrumu “Perkin Elmer Lambda 25 UV/Vis Spectrophotometer” cihazında Hellma 104-QS Küvet kullanılarak alındı (Şekil 4.2).



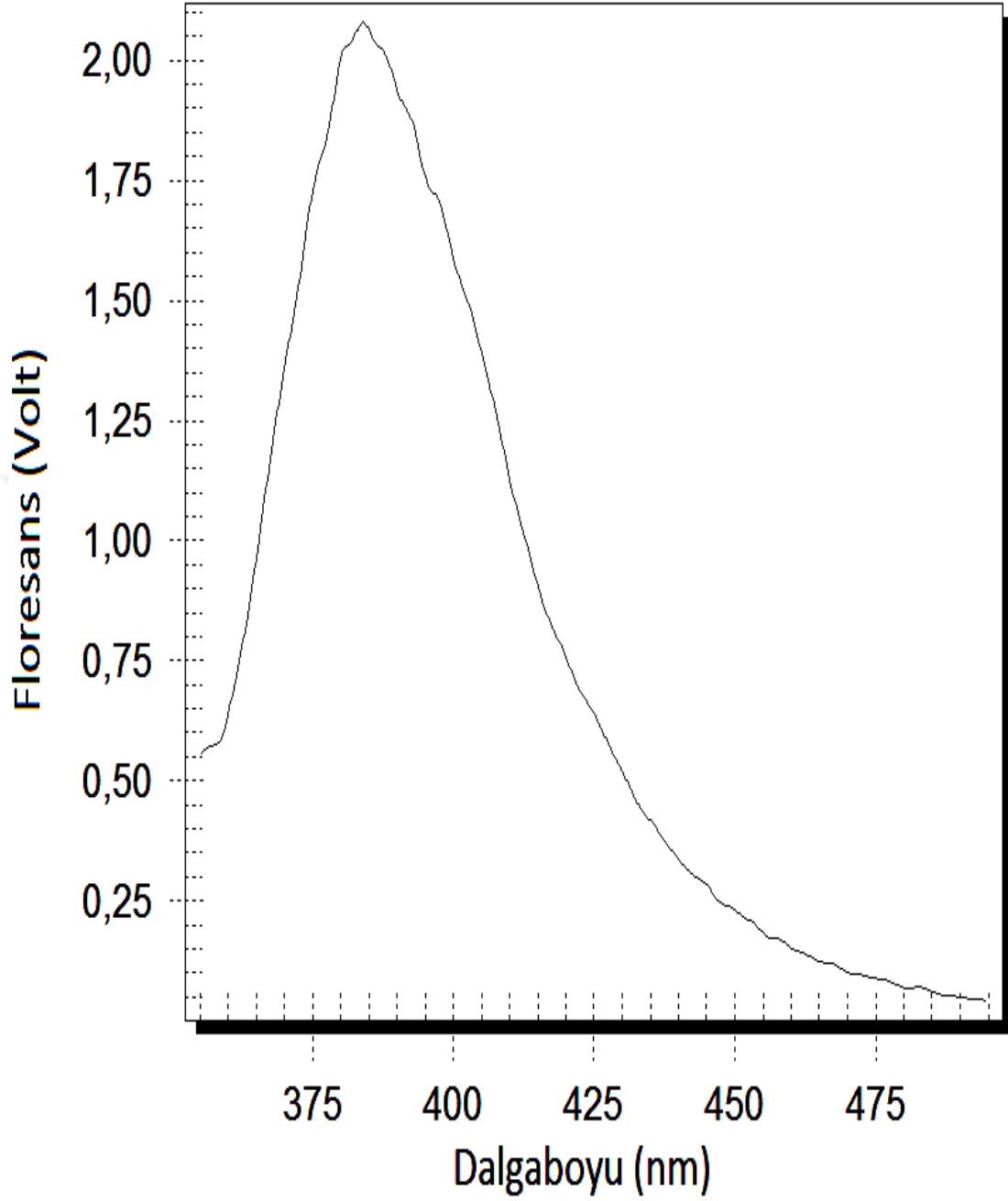
Şekil 4. 1 N-(1-pirenil)maleimid (Pyr-maleimid, PM)



Şekil 4. 2 Tris.HCl tamponunda (0,025M, 0,1M NaCl, 0,005M CaCl₂, pH:8) hazırlanan 8×10^{-5} M PM'in absorbans spektrumu $A_{280} = 1.0291$; $A_{344} = 1.0548$; Kör: 1,994ml Tris.HCl (pH:8) ve 6µl DMSO(%0,3) karışımı.

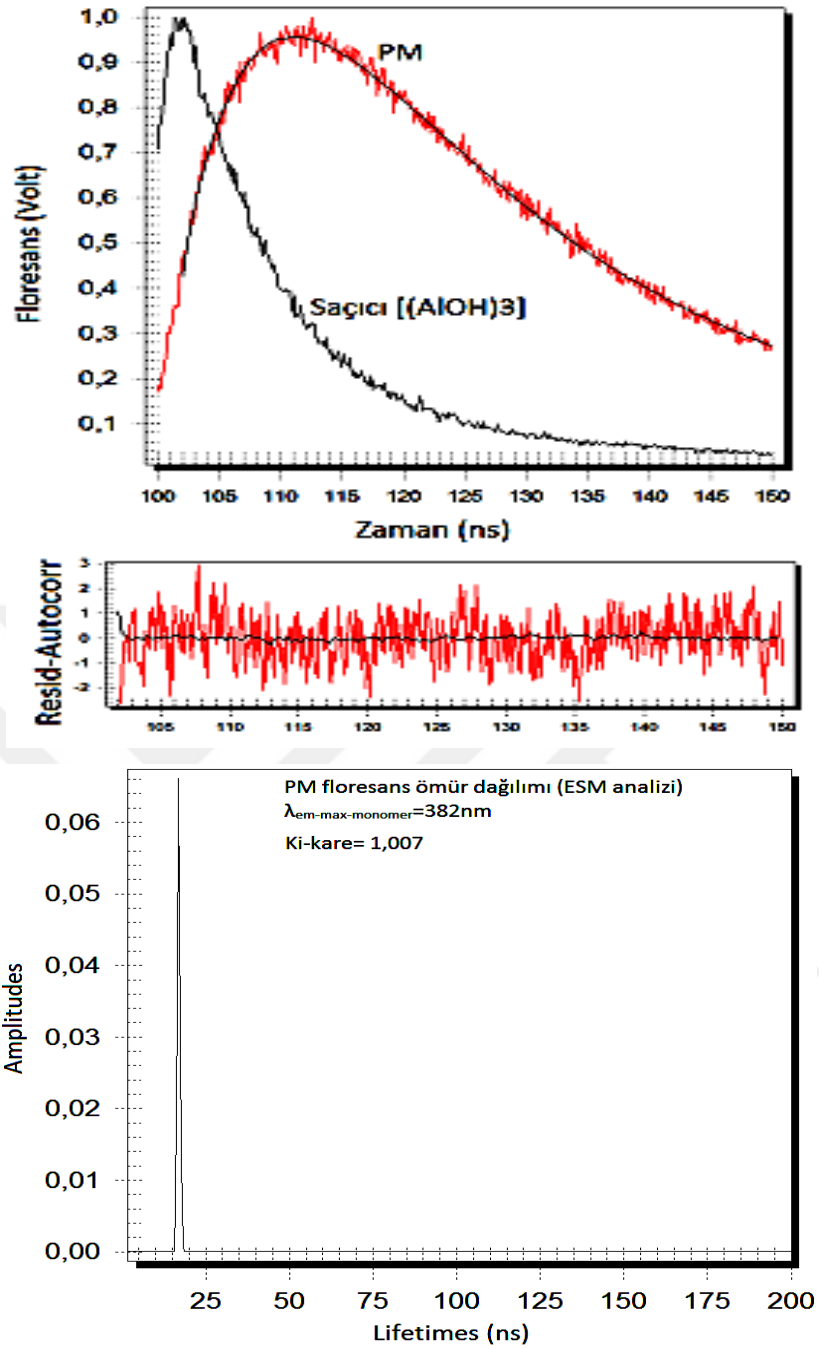
Şekil 4.2'de PM'in 280nm'de absorbansının olduğu görülmektedir. Bu absorbans, PM-BSA'nın 280 nm'de protein içeriğinden kaynaklanan karakteristik absorbansı (Şekil 4.10) ile çakışır. PM-BSA kompleksi sentezlendikten sonra, PM/BSA mol oranı hesaplanırken PM'in PM-BSA absorbansına yaptığı katkı, düzeltme faktörü ($DF = A_{PM-280nm} / A_{PM-344nm} = 1.0291/1.0548 = 0.976$) kullanılarak giderilmiştir.

PM'nin zaman ayrımlı emisyon spektrumu, aynı şartlar altında alındı (Şekil 4.3).



Şekil 4. 3 Tris.HCl tamponunda (0,025M, 0,1M NaCl, 0,005M CaCl₂, pH:8) 5x10⁻⁵M PM'in zaman ayrımlı floresans spektrumu. (λ_{exc} : 337nm; $\lambda_{emis-max-monomer}$: 382nm; İntegrasyon süresi (Int. time): 0,1s; İlerleme sayısı (step size): 0,25; Geciktirme süresi (delay time): 117ns; Tekrarlama (averages): 3.

Şekil 4.3'ten de görüldüğü gibi PM'in karakteristik monomer emisyon piki 382 nm civarında gözlenmiştir. 382 nm dalga boyundaki PM floresansının zamana göre bozunumu Şekil 4.4'de verilmektedir.



Şekil 4. 4 Tris.HCl tamponunda (0,025M, 0,1M NaCl, 0,005M CaCl₂, pH:8) 3×10^{-5} M PM floresans bozunma eğrisi, bozunma verilerinin eğriye uyarlanması ve floresans ömür dağılımı(ESM, Ki-kare:1,007). Saçıcı eğrisi, lamba pulslarının zamana göre azalma profilini vermektedir. λ_{exc} : 337nm; $\lambda_{emis.max}$: 382nm; İntegrasyon süresi (Int. time): 0,1; Kanal sayısı(Channels): 400; Tekrarlama (averages): 3.

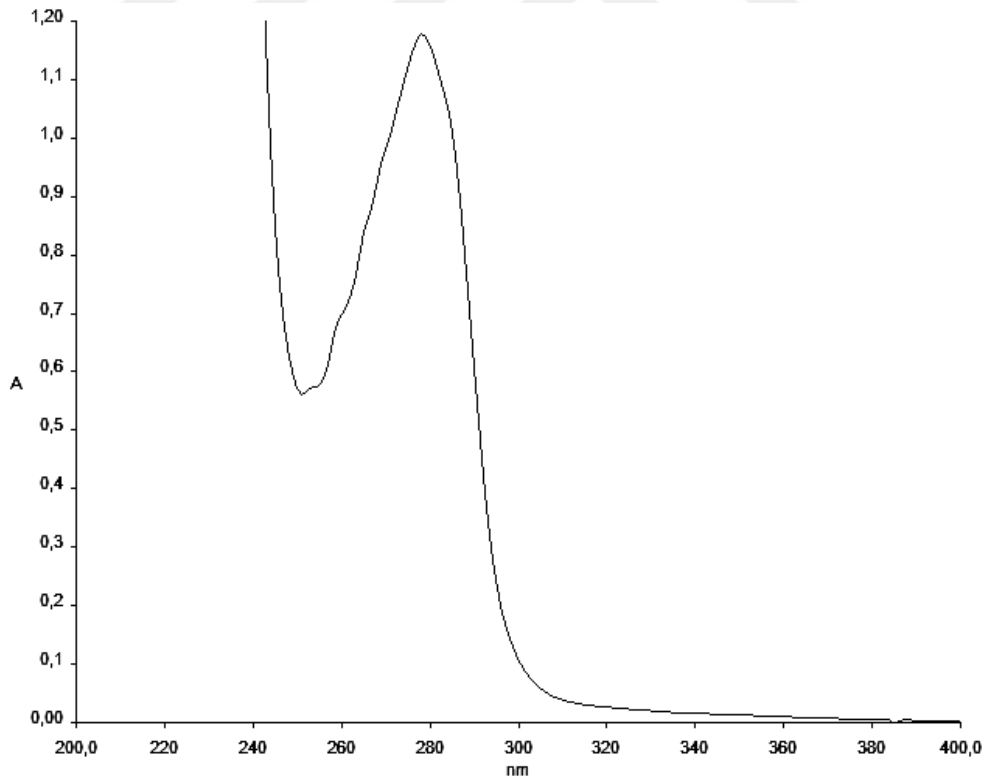
PM floresans bozunma grafiğinden elde edilen verilere, "PTI Time Master C-71" marka floresans cihazı ile birlikte gelen Felix32 programında gömülü ESM analizi prosedürü uygulandı. Buna göre bozunma verilerine en uygun eğri ve bu eğrinin verilerine göre floresans ömür dağılımı ESM yöntemi için uygulanan Ki-kare analizi (Eşitlik 2.46) ile Ki-

kare=1,007 değerine ulaşarak elde edildi. PM'in floresans ömür dağılımının 15-20ns arasında olduğu Şekil 4.4'te görülmektedir.

4.2 BSA'nın Absorpsiyon ve Emisyon Özellikleri

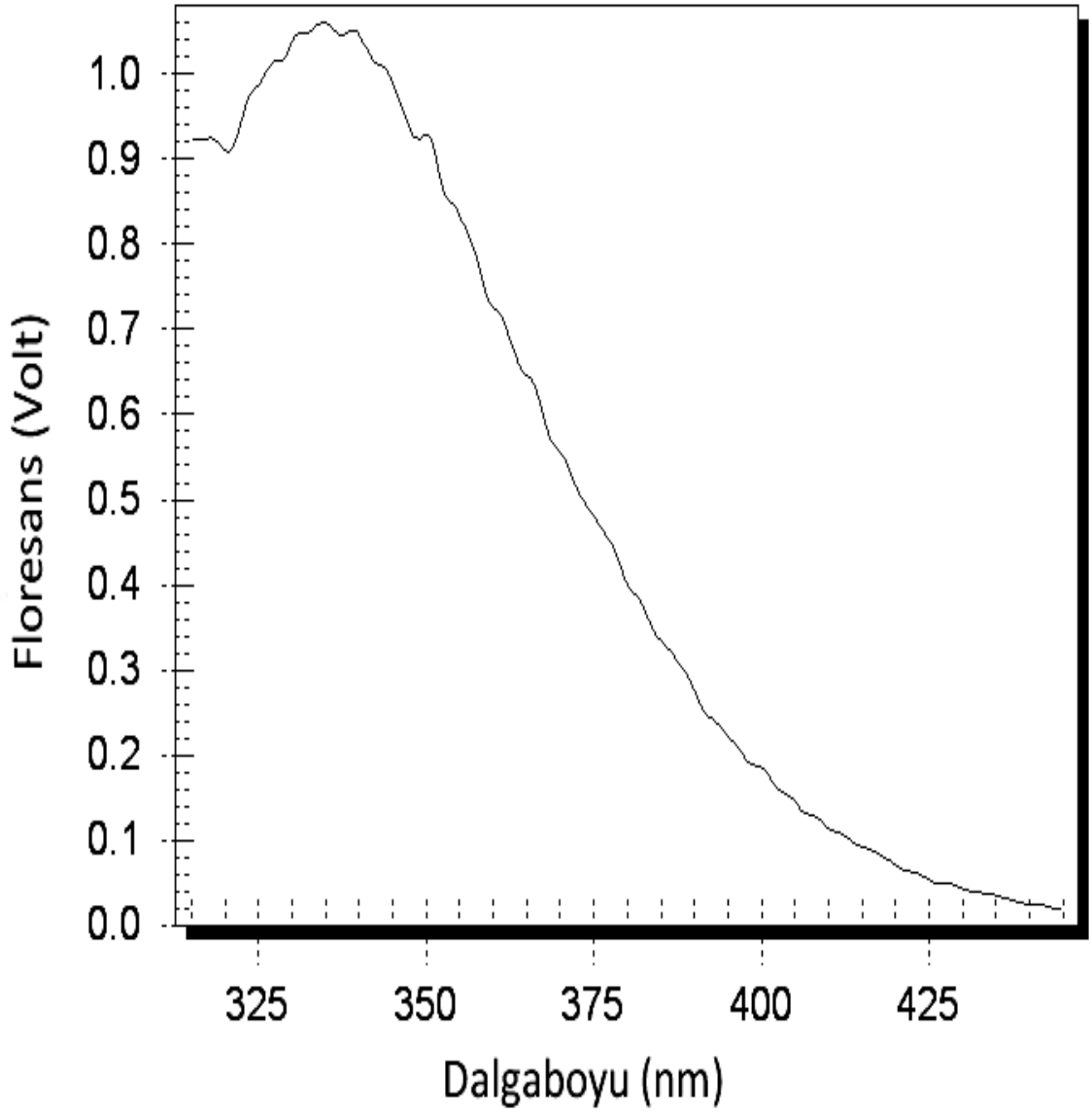
BSA'nın Tris.HCl tamponunda (pH:8) alınan absorpsiyon spektrumunda (Şekil 4.5) görüldüğü gibi proteinler yapılarında yer alan üç halkalı aminoasit (triptofan, tirozin, fenilalanin) sayesinde UV bölgede 280nm civarında maksimum pik verirler. Triptofanın absorpsiyon şiddeti, belirli koşullar altında ve eşit konsantrasyonlarda tirozine oranla yaklaşık dört kat daha güçlüdür.

Absorpsiyonda olduğu gibi floresansta da triptofan diğer iki aminoaside göre baskın karakter taşır. Triptofan kaynaklı protein floresansı, triptofanın protein yapısında yerleştiği konumun çevresel koşullarına göre değişim gösterir. Proteinin konformasyonel dönüşümleri, alt birimler arası ilişkiler, substrat bağlanması ve denaturasyon triptofanın bulunduğu çevre koşullarını etkileyen başlıca faktörlerdir.



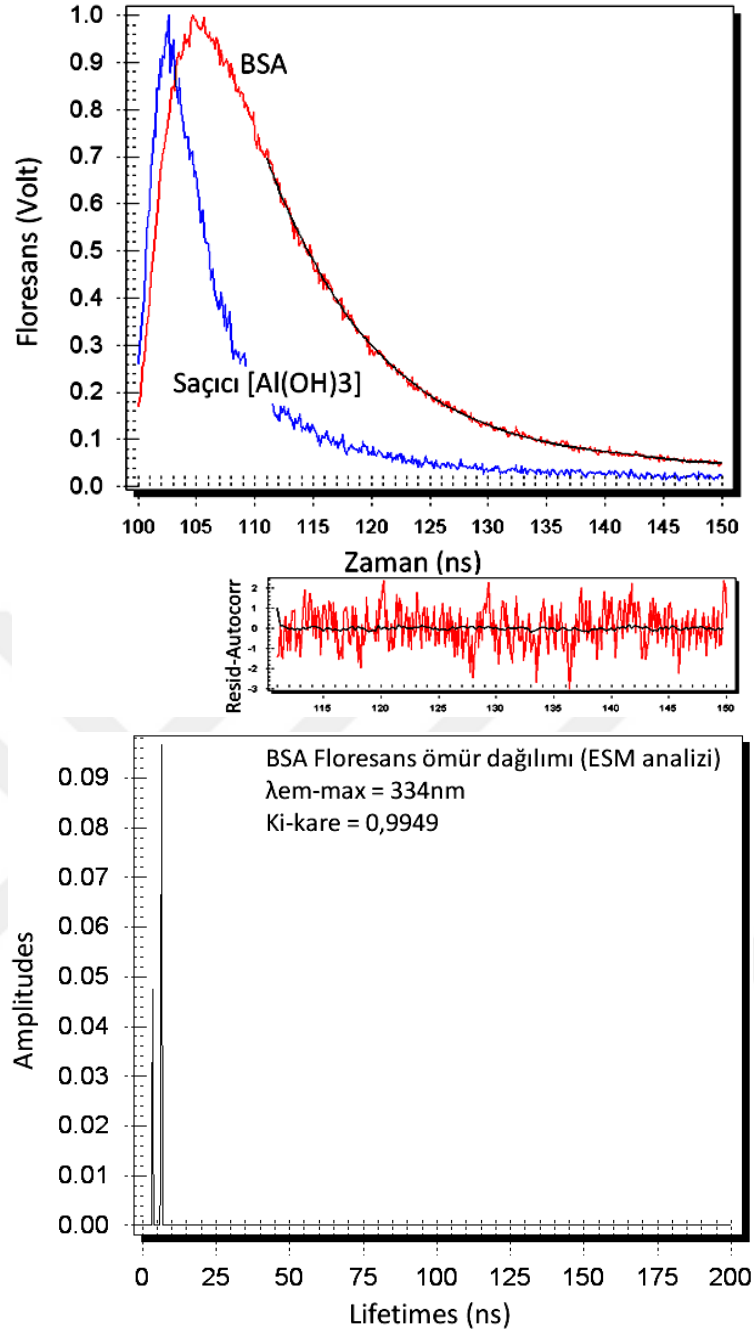
Şekil 4. 5 Tris.HCl tamponunda (0,025M, 0,1M NaCl, 0,005M CaCl₂, pH:8) 3x10⁻⁵M BSA absorbans spektrumu

PM ile aynı şartlarda alınan BSA'nın floresans spektrumu Şekil 4.6'da görülmektedir.



Şekil 4. 6 Tris.HCl tamponunda (0,025M, 0,1M NaCl, 0,005M CaCl₂, pH:8) 8x10⁻⁵M. BSA zaman ayrımlı floresans spektrumu. λ_{exc} : 295nm; $\lambda_{emis.max}$: 334nm; İntegrasyon. Süresi (Int. time): 0,1; İlerleme sayısı (step size): 0,25; Geciktirme süresi (delay time): 117ns; Tekrarlama (averages): 3.

BSA'nın Tris.HCl tamponunda (0,025M, 0,1M NaCl, 0,005M CaCl₂, pH:8) alınan zaman ayrımlı floresans spektrumunda 334nm civarında maksimum floresans emisyonu gözlenmektedir (Şekil 4.6). Bu maksimum emisyon dalgaboyunda alınan floresans bozunma grafiğinden, Felix 32 programının içerdiği ESM analizi prosedürü kullanılarak bozunma verilerine en uygun eğri ve bu eğrinin verilerine göre BSA'nın floresans ömür dağılımı ESM yöntemi için uygulanan Ki-kare analizi (Eşitlik 2.46) ile Ki-kare: 0,9949 değerine ulaşarak elde edildi (Şekil 4.7). BSA'nın floresans ömrünün 4ns ve 6ns civarında iki pik şeklinde dağılım gösterdiği Şekil 4.7'de verilmektedir.



Şekil 4. 7 Tris.HCl tamponunda (0,025M, 0,1M NaCl, 0,005M CaCl₂, pH:8) 8×10^{-5} M. BSA floresans bozunma eğrisi, bozunma verilerinin eğriye uyarlanması ve floresans ömür dağılımı(ESM, Ki-kare:0,9949). Soldaki saçıcı eğri, lamba pulslarının zamana göre değişimini vermektedir. λ_{exc} : 295nm; $\lambda_{emis.max}$: 334nm; İntegrasyon süresi (Int. time): 0,1; Kanal sayısı(Channels): 400; Tekrarlama (averages): 3.

4.3 PM-BSA Kompleksinin Sentezi

Literatürde floresan maddelerle proteinlerin modifikasyon reaksiyonlarında kullanılan protein miktarı genellikle “1mg Protein/ml” veya daha üzeridir [14,31,37]. Bu çalışmada eksimer floresansı oluşturmak amacıyla, BSA’nın serbest -SH ve -NH₂

gruplarıyla maksimum miktarda PM bağlamasını sağlayacak fosfat tamponunda [38] (PBS; 0,01M NaH₂PO₄, 0,15M NaCl, pH:9) “**20mg BSA/ml**” stok BSA çözeltisi hazırlandı. PM stok çözeltisi, dimetilsülfoksit (DMSO) içinde “**8mg.PM/ml.DMSO**” konsantrasyonunda hazırlanıp +4°C’de uzun süreli kullanımlar için saklandı.

PM ile BSA işaretleme reaksiyonu için, toplam reaksiyon hacmi 1000µL olacak şekilde bir Eppendorf tüpü içinde,

I. 250 µl. “20mg.BSA/ml PBS” stok BSA çözeltisi,

$$n_{BSA} = \frac{m_{BSA}}{MA_{BSA}} = \frac{20 \times 10^{-3}(g) \times \frac{250\mu l}{1000\mu l}}{66000} \cong 7,58 \times 10^{-8} mol \text{ BSA}/250\mu l \text{ PBS} \quad (4.1)$$

II. 563 µl. “8mg.PM/ml.DMSO” stok PM çözeltisi, (MA_{PM} = 297,32)

PM mol oranı, BSA’nın 200 katı seçildi. Bu mol fazlası seçiminde amaçlanan, BSA yapısında yer alan tek serbest –SH içeren sistein-34 amino asid ile beraber 60 lizin amino asidinin serbest ε-NH₂ uçlarını olabildiğince yüksek oranda PM ile modifiye etmektir. Bu amaçla PM stok çöz.’den alınacak hacim hesaplandı.

Buna göre, $n_{PM} = n_{BSA} \times 200 = 7,58 \times 10^{-8} \times 200 = 1,516 \times 10^{-5} mol$ PM alabilmek için stok PM çöz.’den çekilmesi gereken hacim;

$$V = \frac{1,516 \times 10^{-5} \times 1000\mu l.(DMSO)}{\frac{8 \times 10^{-3}(g)PM}{297,32}} = 56342\mu l \cong 563\mu l. \text{ “Stok PM”dir.} \quad (4.2)$$

III. 215µl PBS tamponu (0,01M NaH₂PO₄, 0,15M NaCl, pH:9)

kariştirildi.

Reaksiyon karışımı +37°C’de 24 saat süre ile çalkalamalı inkübatörde tepkimeye bırakıldı.

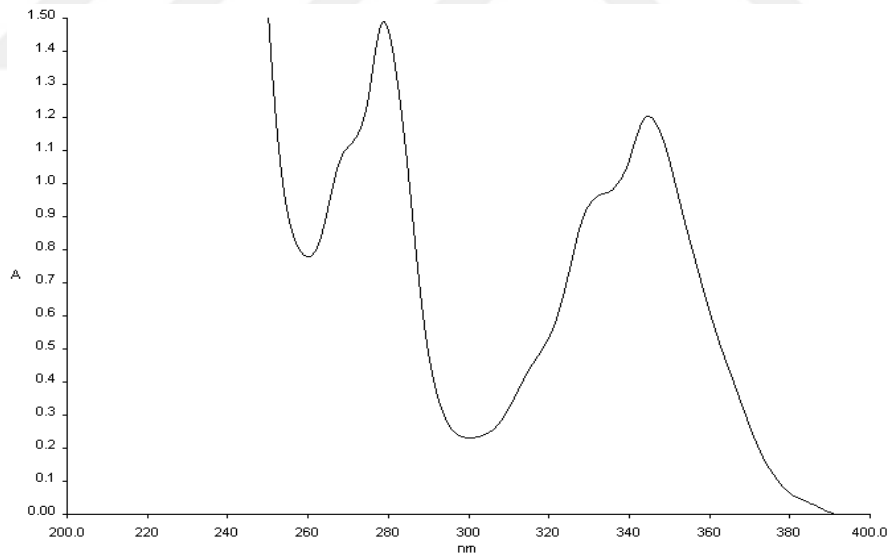
4.4 PM-BSA’nın Saflaştırılması

Reaksiyon karışımından PM-BSA kompleksini ayırmak için 1,5x20 cm boyutlarında sephadex G-75 jeliyle dolu ayırma kolonu kullanıldı. Hareketli faz olarak bidistile su

kolona uygulandı ve fraksiyonlar 2 ml'lik hacimler halinde tüplere alındı. UV/Vis spektrofotometresi kullanılarak 344nm.de PM-BSA içerdiği belirlenen fraksiyonlar "Vivaspin 6 Centrifugal Concentrator (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Vivaproducts)" konsantratörde 6ml hacimde birleştirilip "SIGMA 3K30" marka soğutmalı santrifüjde +4°C'de 10000 rpm'de 2 saat süre ile santrifüjlenerek çözücüsü uzaklaştırıldı. Elde edilen saf PM-BSA örneği triptik ve kimotriptik hidroliz için uygun Tris.HCl (0,025M, 0,1M NaCl, 0, 005M CaCl₂, pH:8) tamponunda çözülerek 6ml stok PM-BSA çözeltisi hazırlandı. Kaynak 39'daki yöntem uygulanarak yapılan mol oranı hesaplamaları sonucu bir BSA molekülünün 9 molekül PM bağladığı belirlendi.

4.5 PM-BSA Kompleksinde PM/BSA Mol Oranının Hesaplanması

Saflaştırma işlemi sonunda elde edilen PM-BSA stok çözeltisinden 1ml alınıp Tris.HCl tamponu (0,025M, 0,1M NaCl, 0, 005M CaCl₂, pH:8) ile 3ml.'ye seyreltili. Bu seyreltik çözelti UV/Vis spektrofotometrede, $A_{\text{Toplam}(280\text{nm})}=1,4687$ ve $A_{344\text{nm}}=1,2007$ absorbans değerleri gösterdi (Şekil 4.8).



Şekil 4. 8 Tris.HCl tamponunda (0,025M, 0,1M NaCl, 0,005M CaCl₂, pH:8) PM-BSA kompleksi absorbans spektrumu. $A_{\text{Toplam}(280\text{nm})}=1,4687$; $A_{344\text{nm}}=1,2007$; Kör: Tris.HCl (pH:8).

Eşitlik 2.30 Lambert-Beer yasası'ndan konsantrasyonun absorpsiyon cinsinden ifadesi,

$$C = \frac{A}{\epsilon \times b} \text{ 'dir.} \quad (4.3)$$

PM-BSA kompleksindeki PM ve BSA'nın konsantrasyonlarını oranlarsak,

$$\frac{C_{PM}}{C_{BSA}} = \frac{\frac{n_{PM}}{V(l)} = \frac{A_{PM(344nm)}}{\epsilon_{PM(344nm)} \times b}}{\frac{n_{BSA}}{V(l)} = \frac{A_{BSA(280nm)}}{\epsilon_{BSA(280nm)} \times b}} \quad (4.4)$$

eşitliğini yazabiliriz. Burada hacimler (V) ve ışığın kuvvet içinde izlediği yol (b=1cm) aynı olduğundan bu ifade, 4.5 no'lu eşitlikte gösterildiği gibi sadeleştirilebilir.

$$\frac{C_{PM}}{C_{BSA}} = \frac{n_{PM}}{n_{BSA}} = \frac{\frac{A_{PM(344nm)}}{\epsilon_{PM(344nm)}}}{\frac{A_{BSA(280nm)}}{\epsilon_{BSA(280nm)}}} \quad (4.5)$$

Şekil 4.2'de PM'nin 280nm'de absorplama yaptığı görülmektedir. Bu durumda PM-BSA kompleksine ait 280nm.de gözlenen absorpsiyon, 4.6 no'lu eşitlikte verilen absorpsiyonlar toplamına eşittir.

$$A_{PM-BSA(280nm)} = A_{BSA(280nm)} + A_{PM(280nm)} \quad (4.6)$$

Eşitlik 4.6'dan BSA'ya ait absorpsiyonu çekersek,

$$A_{BSA(280nm)} = A_{PM-BSA(280nm)} - A_{PM(280nm)} \quad (4.7)$$

eşitliğini elde ederiz. PM-BSA kompleksi bünyesindeki PM'den kaynaklanan ($A_{PM(280nm)}$) absorbans katkısını belirlemek için, BSA absorpsiyonunun kompleks oluşumu ile değişmediğini kabul ederek saf PM'e ait absorbans değerlerinden faydalanabiliriz [39]. Şekil 4.2'de Tris.HCl tamponunda (pH:8) $8 \times 10^{-5}M$ PM absorbans spektrumunda molekülün 280nm ve 344nm dalgaboylarındaki absorbans pik değerleri sırasıyla $A_{280}=1,0291$ ve $A_{344}=1,0548$ 'dir. Saf PM'e ait bu absorbans değerleri birbirine oranlandığında,

$$\frac{A_{PM(280nm)}}{A_{PM(344nm)}} = \frac{1,0291}{1,0548} = 0,975635191 \approx 0,976 \quad (4.8)$$

sabiti elde edilir ve bu sabiti düzeltme faktörü (DF) olarak kullanıp eşitlik 4.8'den;

$$A_{PM(280nm)} = 0,976 \times A_{PM(344nm)} \quad (4.9)$$

eşitlik 4.9'da görüldüğü gibi, PM'in 280 nm'deki absorbansını 344nm'deki absorbansı cinsinden ifade edebiliriz. Buna göre 4.7 no'lu eşitlik,

$$A_{BSA(280nm)} = A_{PM-BSA(280nm)} - 0,976 \times A_{PM(344nm)} \quad (4.10)$$

olarak yeniden yazılabilir. PM-BSA kompleksinin sadece BSA kaynaklı 280nm'deki absorbansını veren bu eşitlik, mol oranlarını ifade eden 4.5 no'lu denklemde yerine yazıldığında,

$$\frac{C_{PM}}{C_{BSA}} = \frac{n_{PM}}{n_{BSA}} = \frac{\frac{A_{PM(344nm)}}{\epsilon_{PM(344nm)}}}{\frac{A_{PM-BSA(280nm)} - 0,976 \times A_{PM(344)}}{\epsilon_{BSA(280nm)}}} \quad (4.11)$$

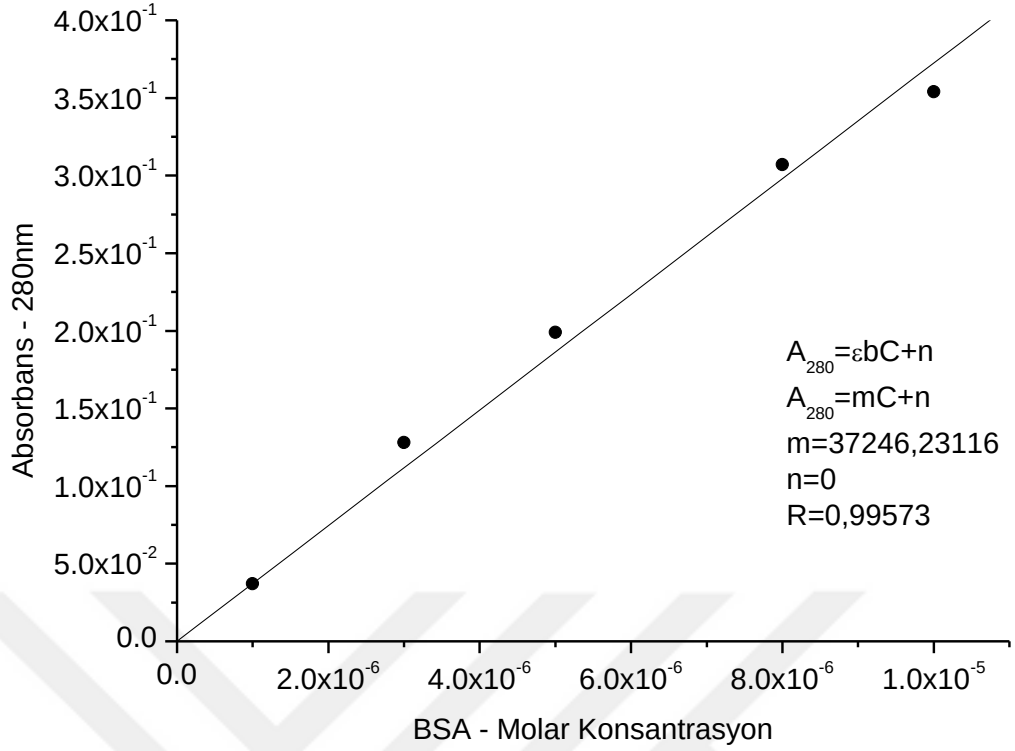
denkleme ulaşılır.

Bu aşamadan sonra molar absorptivite belirlenmesi gerekir. Bu amaçla BSA ve PM için hazırlanan standart absorpsiyon eğrilerinden yararlanıldı (Çizelge 4.1, Şekil 4.9 ve Çizelge 4.2, Şekil 4.10).

Çizelge 4. 1 BSA'nın konsantrasyona göre 280nm'de absorbans değerleri

C_{BSA}(Molar)	A₂₈₀
1x10 ⁻⁶	0.037
3x10 ⁻⁶	0.128
5x10 ⁻⁶	0.199
8x10 ⁻⁶	0.307
1x10 ⁻⁵	0.354

BSA için, çizelge 4.1'deki konsantrasyonlara karşılık gelen absorbans değerleri "OriginPro7.0" programı kullanılarak grafiğe geçirildi ve lineer regresyon uygulandı (Şekil 4.9). R=0,99573 güvenilirlik düzeyi ile elde edilen eğrinin eğim değeri, m = 37246,23116 bulundu. Bulunan bu eğim değeri BSA için molar absorptivite ($\epsilon_{BSA(280nm)}$) olarak alındı.



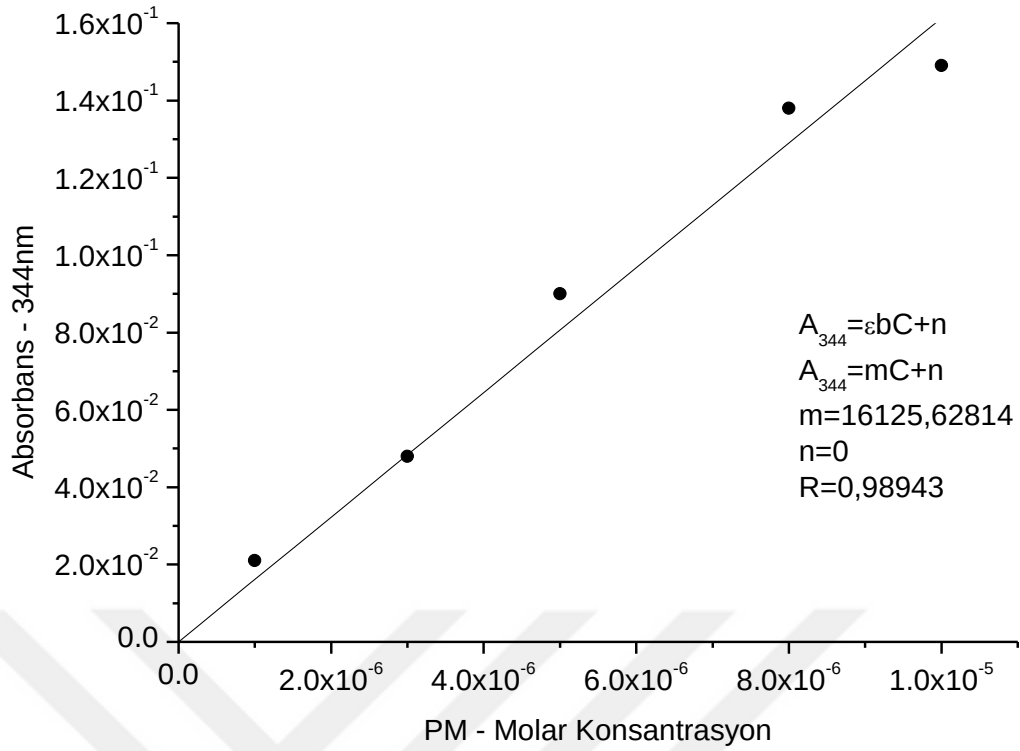
Şekil 4. 9 Tris.HCl tamponunda (0,025M, 0,1M NaCl, 0,005M CaCl₂, pH:8) BSA standart absorbans eğrisi

PM'in molar absorptivitesini belirlemek için Çizelge 4.2'deki konsantrasyonlara karşılık gelen absorbans değerleri "OriginPro7.0" programı kullanılarak grafiğe geçirildi ve lineer regresyon uygulandı (Şekil 4.10).

Çizelge 4. 2 PM'nin konsantrasyona göre 344nm'de absorbans değerleri

$C_{PM}(\text{Molar})$	A_{344}
1×10^{-6}	0,021
3×10^{-6}	0,048
5×10^{-6}	0,090
8×10^{-6}	0,138
1×10^{-5}	0,149

$R = 0,98943$ güvenilirlik düzeyi ile elde edilen eğrinin eğim değeri, $m = 16125,62814$ bulundu. Bulunan bu eğim değeri PM için molar absorptivite ($\epsilon_{PM(344nm)}$) olarak alındı.



Şekil 4. 10 Tris.HCl tamponunda (0,025M, 0,1M NaCl, 0,005M CaCl₂, pH:8) PM standart absorbans eğrisi

Standart eğrilerden hesaplanan PM ve BSA'ya ait molar absorbans değerleri eşitlik 4.11'de yerine yazıldığında eşitlik 4.12 elde edilir.

$$\frac{C_{PM}}{C_{BSA}} = \frac{n_{PM}}{n_{BSA}} = \frac{\frac{A_{PM(344nm)}}{1612562814}}{\frac{A_{PM-BSA(280nm)} - 0,976 \times A_{PM(344)}}{3724623116}} \quad (4.12)$$

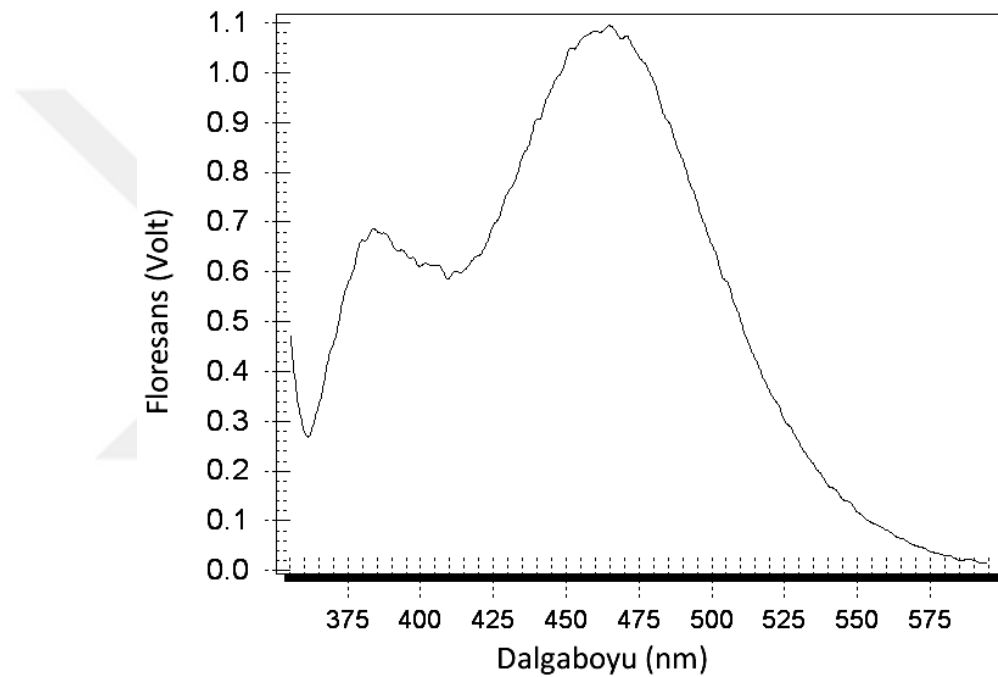
Eşitlik 4.12'de; saflaştırma sonrası hazırlanan PM-BSA çözeltisinin 280nm ve 344nm'deki absorbans değerleri yerine yazıldığında, PM-BSA kompleksinde " n_{PM}/n_{BSA} " mol oranı 9 olarak bulunmuştur (Eşitlik 4.13).

$$\frac{C_{PM}}{C_{BSA}} = \frac{n_{PM}}{n_{BSA}} = \frac{\frac{1,2007}{1612562814}}{\frac{1,4687 - 0,976 \times 1,2007}{3724623116}} = 9,343545948 \approx 9 \quad (4.13)$$

4.6 PM-BSA kompleksinin Floresans Özellikleri

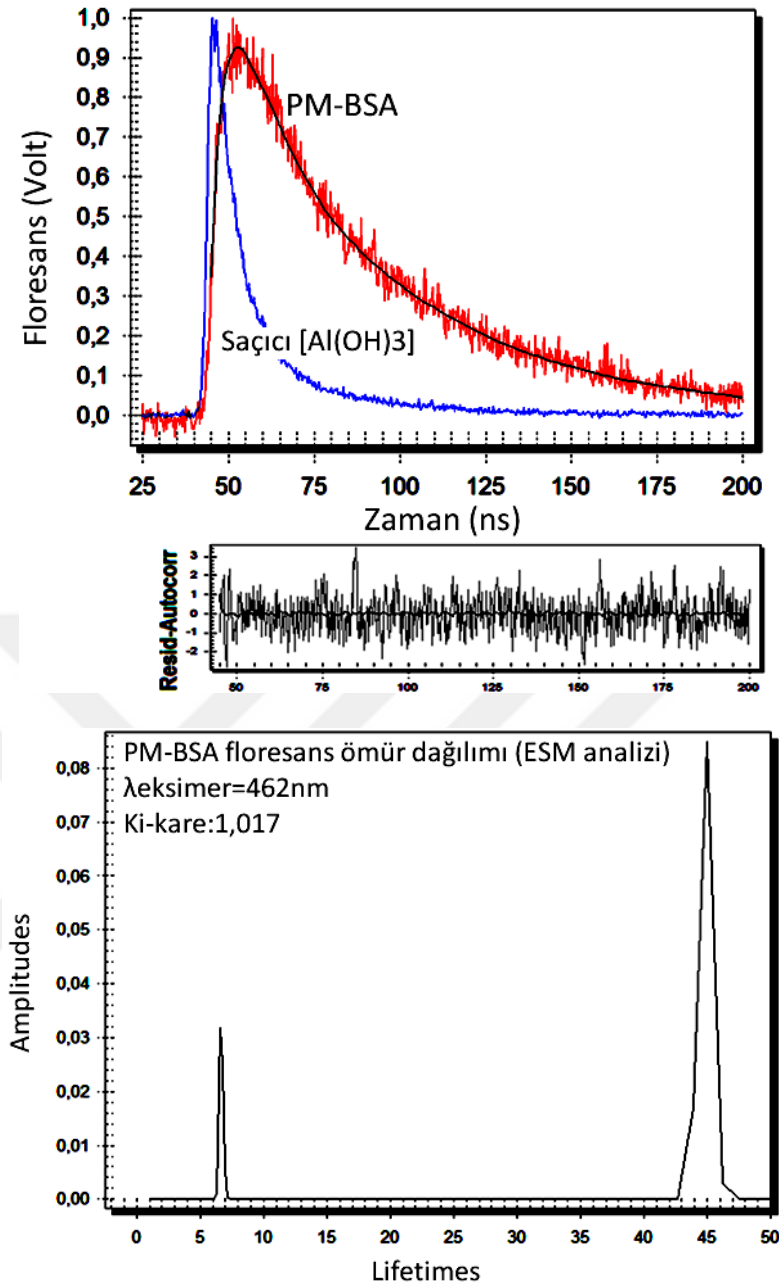
Fosfat tamponu sadece bağlanma reaksiyonu için kullanılmış olup proteazları inhibe etme özelliği olduğu tespit edildiği için PM-BSA'nın proteazlarla reaksiyonu aşamasında çalışmaya Tris.HCl tamponu kullanılarak devam edildi [12].

PM-BSA tripsin ve kimotripsin proteazlarıyla muamele edilmeden önce, bu proteazların maksimum aktivite gösterdiği şartlarda (pH:8) PM-BSA kompleksi çözeltisinin zaman ayrımlı floresans spektrumu (Şekil 4.11), floresans bozunma grafiği ve floresans ömür dağılımı (Şekil 4.12) elde edildi.



Şekil 4. 11 Tris.HCl tamponunda (0,025M, 0,1M NaCl, 0,005M CaCl₂, pH:8) PM-BSA çözeltisinin zaman ayrımlı floresans spektrumu. λ_{exc} : 337nm; $\lambda_{emis.max}$: 384nm(monomer); $\lambda_{emis.max}$: 462nm.(eksimer); İntegrasyon. Süresi (Int. time): 0,1; İlerleme sayısı (step size): 0,25; Geciktirme süresi (delay time): 60ns; Tekrarlama (averages): 3.

Şekil 4.11'de PM-BSA molekülü floresans spektrumunda, PM moleküllerinin BSA üzerinde 0,3nm veya daha yakın mesafelerde karşılıklı konumlanmaları sonucu 462nm civarında, yeni ve yaygın bir pik olarak beliren piren eksimer floresansı görülmektedir [29-31]. Buna göre nötral pH'da sadece serbest tiyol (sülfhidril) gruplarına bağlanan maleimid, bazik pH'da serbest amin gruplarına da bağlanmıştır. Oluşan bu eksimer floresansına ait floresans ömür dağılımının (Şekil 4.12) proteolitik enzim etkisi ile göstereceği değişimin proteaz aktivitesine özgünlük göstermesi sözkonusudur.



Şekil 4. 12 Tris.HCl tamponunda (0,025M, 0,1M NaCl, 0,005M CaCl₂, pH:8) PM-BSA çözeltisinin floresans bozunma eğrisi, bozunma verilerinin eğriye uyarlanması ve floresans ömür dağılımı(ESM, Ki-kare:1,017). Soldaki saçıcı eğri, lamba pulslarının zamana göre değişimini vermektedir. λ_{exc} : 337nm; $\lambda_{\text{eksimer.max}}$: 462nm; İntegrasyon süresi (Int. time): 0,1; Kanal sayısı (Channels): 700; Tekrarlama (averages): 3.

Şekil 4.12’de PM-BSA molekülünün $\lambda_{\text{eksimer.max}}$: 462nm’de eksimer emisyonuna ait floresans bozunma eğrisi, bozunma eğrisi verilerinin en iyi eğriye uyarlanması ve floresans ömür dağılımı işleminin sonuçları görülmektedir. Uzun ömürlü eksimer türlerin 45ns civarında toplandığı, kısa ömürlü eksimerlerin ise 6-7 ns civarında toplandığı görülmektedir.

PM-BSA kompleksinin floresans ömür dağılımı PM ve BSA moleküllerinin floresans ömür dağılımları (Şekil 4.4, Şekil 4.7) ile karşılaştırıldığında kompleks yapısında, 42-47ns aralığında çeşitlenerek daha uzun ömürlü floresans emisyonu gösteren sistemlerin oluştuğu görülmektedir. Kompleksin sentezi sonucu BSA bünyesinde farklı bölgelerde oluşan eksimerlerden kaynaklanan floresans ömürlerinde görülen bu çeşitlenmeyi veren dağılım grafiği PM-BSA kompleksine özgündür. Bu çalışmada sözkonusu dağılımın, kompleksin tripsin ve kimotripsin proteazlarının ayrı ayrı etkisi ile hidrolizi sonucu gösterdiği değişimin proteaz aktivitesine özgün olduğu belirlendi. Parmak izi gibi proteazların özgün aktiviteleri için belirteç olma potansiyeli taşıyan floresans ömür dağılımlarında gözlenen bu değişimler, proteazların özgün aktivitelerinin teşhisinde kullanmak üzere geliştirilecek yeni tetkik yöntemlerine kapı aralamaktadır.

4.7 PM-BSA Kompleksi Üzerinde Tripsin Etkisinin Zaman Ayrımlı Floresans Tekniği ile İncelenmesi

Bu amaçla stok PM-BSA çözeltisinden 1ml alınıp 3ml'ye seyreltilti. Bu çözeltiye ait şekil 4.8'de verilen $A_{PM-BSA(280nm)}=1,4687$ ve $A_{344nm}=1,2007$ absorpsiyon değerleri, eşitlik 4.10 ve BSA standart absorpsiyon eğrisinden (Şekil 4.9) elde edilen molar absorpsiyon değeri " $\epsilon_{BSA(280nm)}=37246,23116$ " kullanılarak PM-BSA molekülü için protein konsantrasyonu ve protein mol sayısı hesabı yapıldı. Buna göre BSA konsantrasyonu için,

$$C_{BSA} = \frac{n_{BSA}}{V(l)} = \frac{A_{BSA(280nm)}}{\epsilon_{BSA(280nm)} \times b} = \frac{A_{PM-BSA(280nm)} - 0,976 \times A_{PM(344nm)}}{\epsilon_{BSA(280nm)} \times b} \quad (4.14)$$

4.14 eşitliği yazılıp ışığın absorpsiyon kuvveti içinde izlediği yol $b=1cm$ alındı ve PM-BSA için protein konsantrasyonu molarite cinsinden,

$$C_{BSA} = \frac{A_{PM-BSA(280nm)} - 0,976 \times A_{PM(344nm)}}{\epsilon_{BSA(280nm)} \times b} = \frac{1,4687 - 0,976 \times 1,2007}{37246,23116} = 7,969042525 \times 10^{-6} M$$

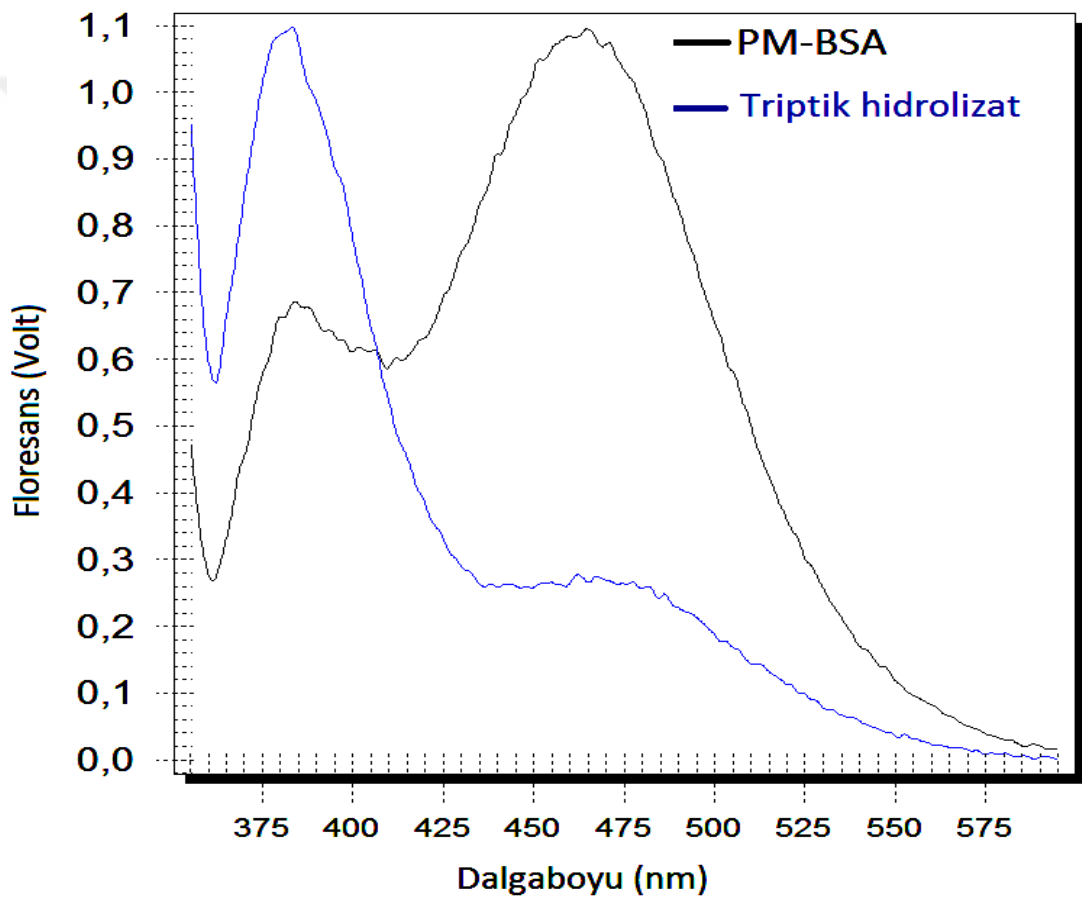
$$C_{BSA} \cong 7,97 \times 10^{-6} Molar$$

olarak hesaplandı.

Litre cinsinden çözelti hacmi olan 3×10^{-3} değeri eşitlik 4.14'te yerine yazıldığında protein mol miktarı;

$$n_{BSA} = 2,390712758 \times 10^{-8} \cong 2,391 \times 10^{-8} \text{ mol bulundu.}$$

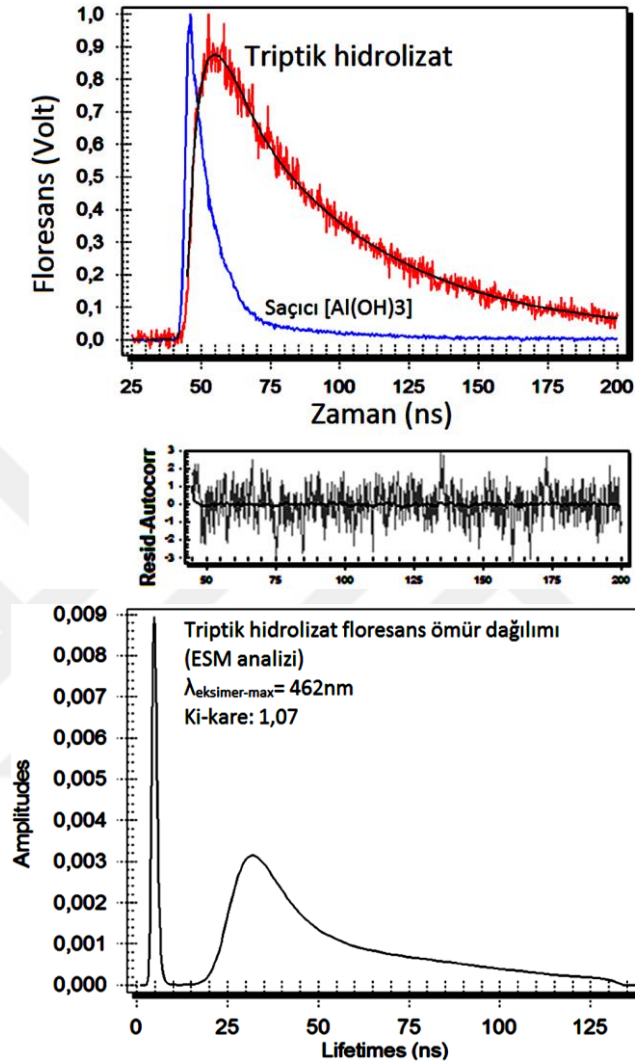
PM-BSA Kompleksinin tam hidrolizi için "Proteaz/PM-BSA" mol oranı 1:1 olarak seçildi. Buna göre 20µl.'sinde $2,391 \times 10^{-8}$ mol tripsin içerecek şekilde 0,0284529g Sığır Tripsin ($M_{\text{Tripsin}}=23800$) 1ml 0,001N HCl içinde çözüldü ve bu çözeltiden 20µl alınıp, sıcaklığı 30°C'ye sabitlenmiş su banyosunda 3ml. PM-BSA çözeltisi içine bırakıldı ve 24 saatlik inkubasyon sonrası floresans değişimler belirlendi.



Şekil 4. 13 Tris.HCl tamponunda (0,025M, 0,1M NaCl, 0,005M CaCl₂, pH:8) 3ml. PM-BSA çözeltisinin tripsin muamelesi öncesinde ve sonrasında alınan zaman ayrımlı floresans spektrumları. λ_{exc} : 337nm; $\lambda_{\text{emis.max}}$: 382nm (monomer); $\lambda_{\text{emis.max}}$: 462nm.(eksimer); İntegrasyon. Süresi (Int. time): 0,1s; İlerleme sayısı (step size): 0,25; Geciktirme süresi: 60ns; Tekrarlama (averages): 3.

PM-BSA kompleksinin tripsin etkisi öncesi ve tripsin etkisi sonrası floresans spektrumlarındaki değişimler (Şekil 4.13) karşılaştırıldığında; 462nm'de maksimum veren eksimer emisyonunun büyük miktarda azaldığı, 382nm'deki monomer

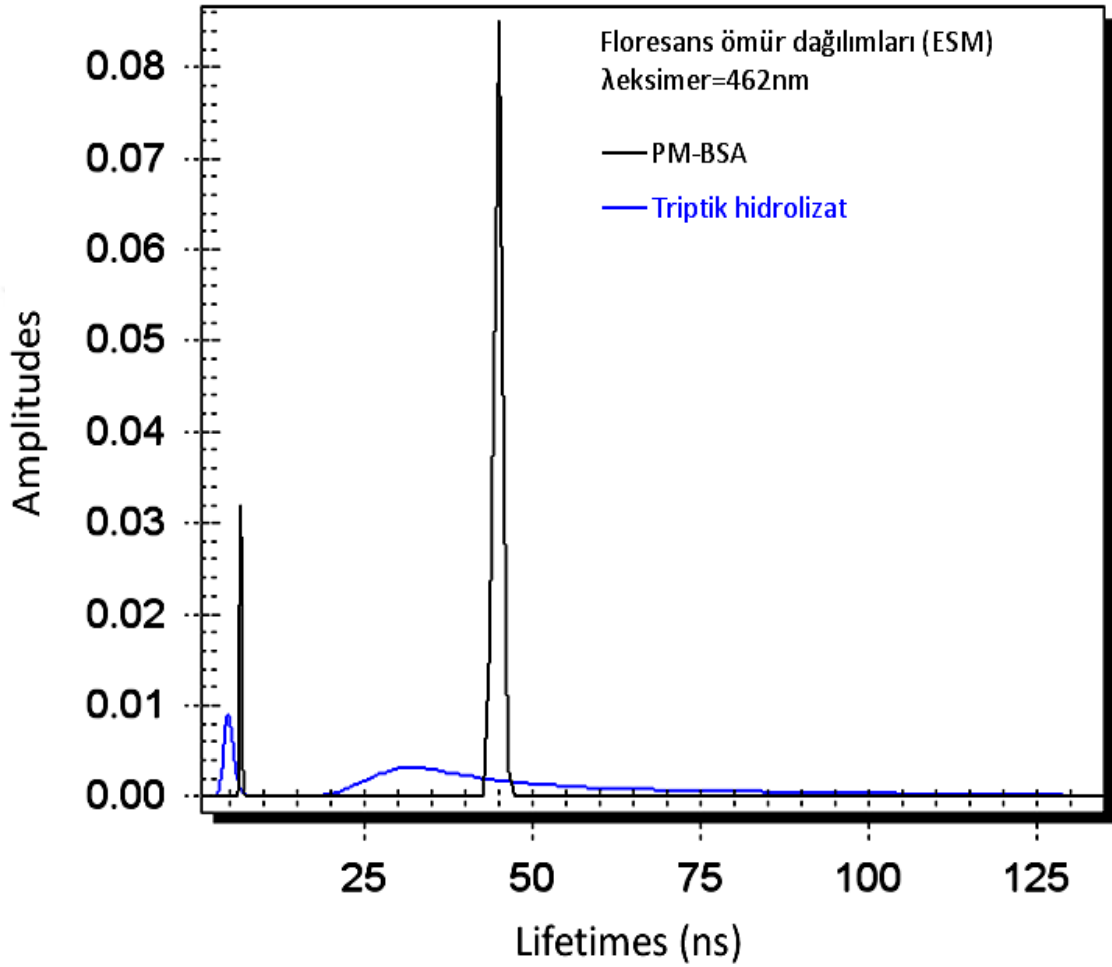
emisyonunun ise aksine arttığı görülmektedir. Bu durum, eksimer oluşturmaya uygun mesafelerde birbirlerine bakışık konumlanmış düzlemsel piren halka çiftlerinin önemli bir kısmının tripsinin hidrolitik etkisi sonucu konumlarını kaybettiğini göstermektedir.



Şekil 4. 14 Tris.HCl tamponunda (0,025M, 0,1M NaCl, 0,005M CaCl₂, pH:8) 3ml. PM-BSA çözeltisinin tripsin muamelesinden 24saat sonra alınan floresans bozunma eğrisi bozunma verilerinin eğriye uyarlanması ve floresans ömür dağılımı(ESM, Ki-kare:1,07).
 λ_{exc} : 337nm; $\lambda_{eksimer-max}$: 462nm; İntegrasyon süresi (Int. time): 0,1; Kanal sayısı(Channels): 700; Tekrarlama (averages): 3.

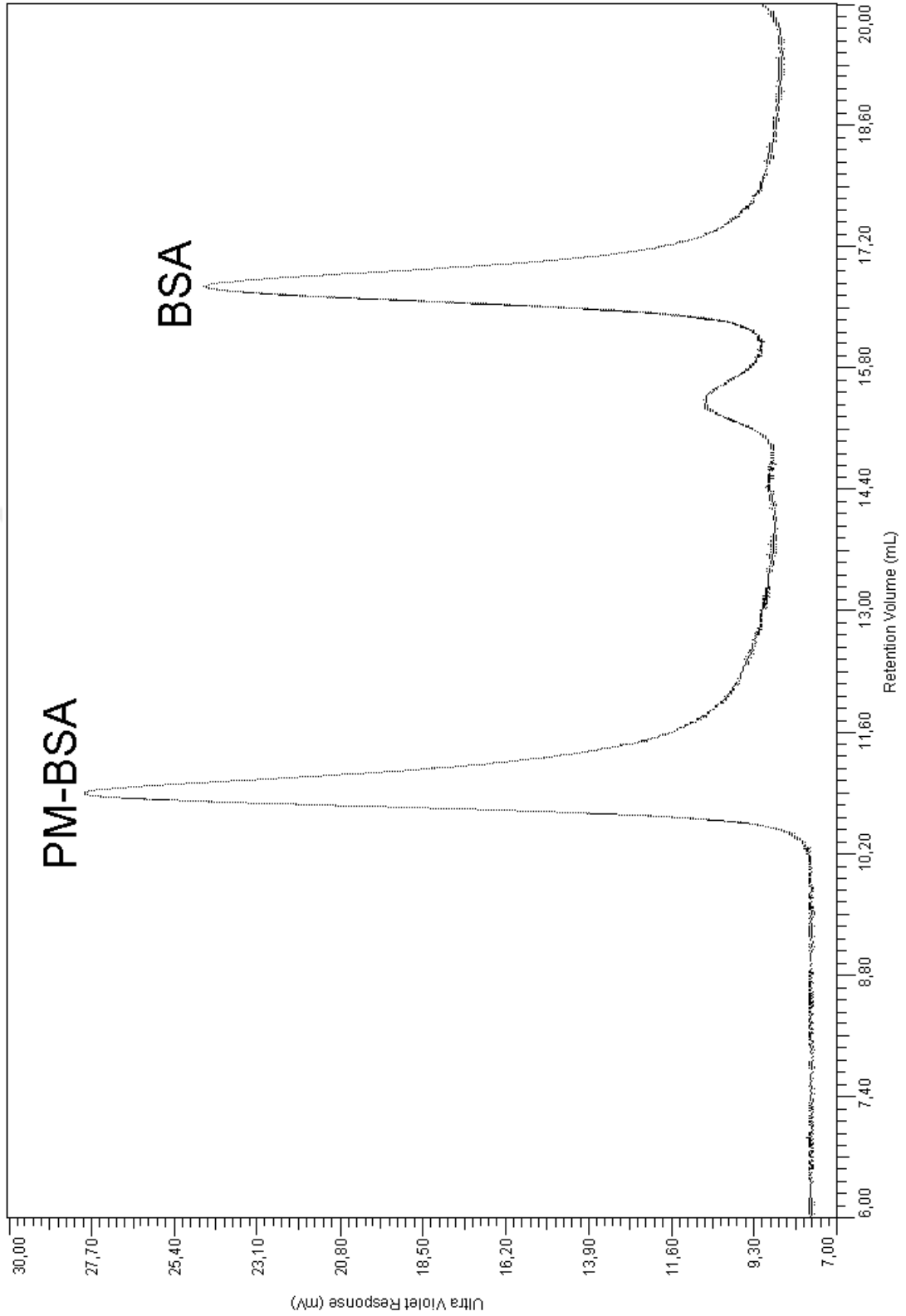
Diğer yandan, Şekil 4.14'te tripsin etkisi ile PM-BSA kompleksinden ortaya çıkan bu hidrolizata ait floresans bozunma verilerinin ESM analizinden elde edilen floresans ömür dağılımında; 25-100ns arasında geniş bir aralıkta farklı floresans ömre sahip eksimerlerin meydana geldiği ve yine bu hidrolizat içinde 35ns civarında floresans ömür gösteren eksimerlerin miktarının maksimum olduğu anlaşılmaktadır. Şekil 4.15'te ise

triptik hidrolizatın floresans ömür dağılımının PM-BSA kompleksinin floresans ömür dağılımına görece daha kısa floresans ömür bölgelerine kaydığı görülmektedir. Buna göre; bu hidrolizatta tripsin hidrolizine özgün olan bu peptid parçaları üzerindeki eksimerlerin kazandığı yeni konumların çözücü ile etkileşimlerini kolaylaştırdığı söylenebilir.

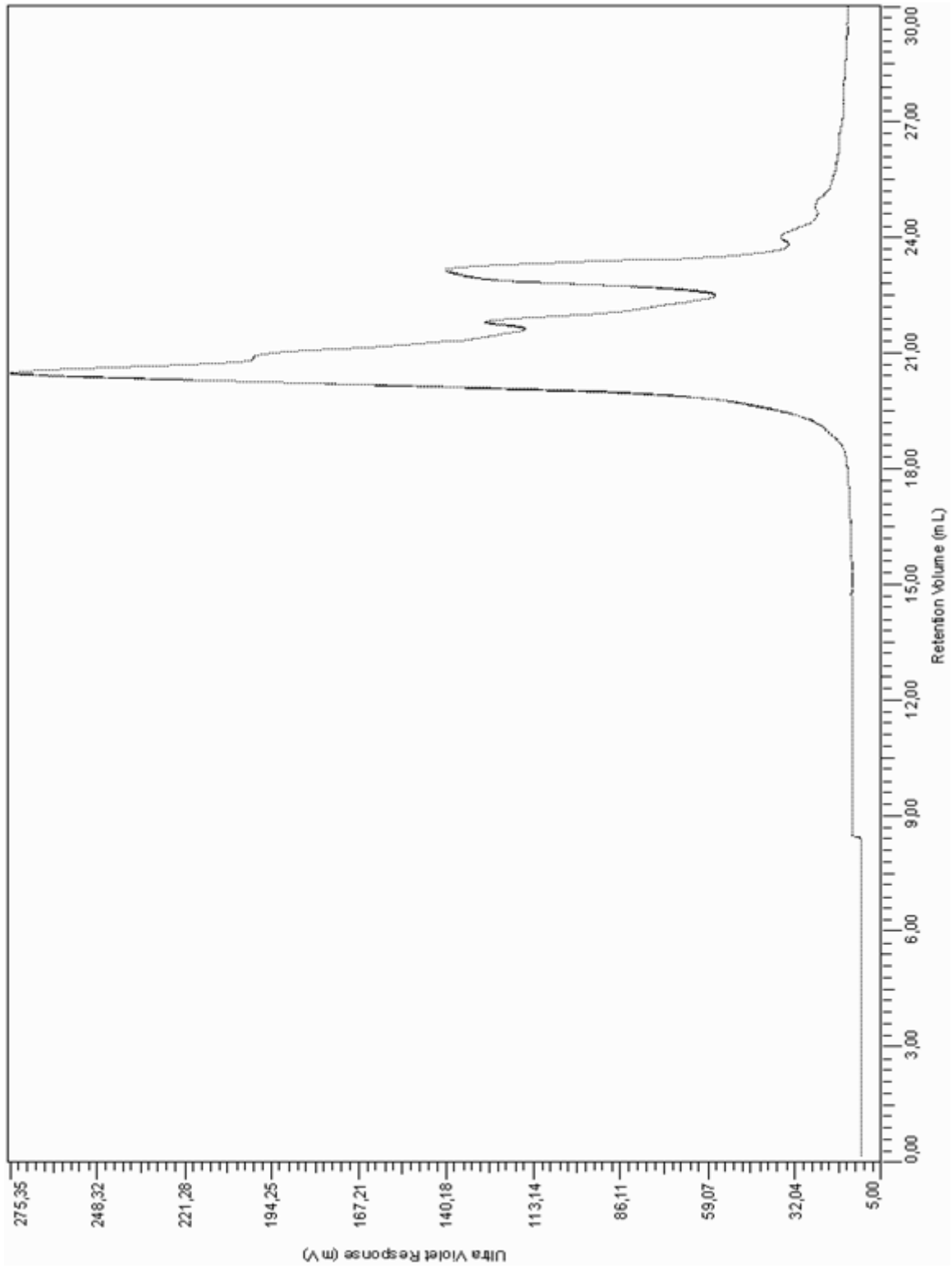


Şekil 4. 15 PM-BSA kompleksi floresans ömür dağılımı ile triptik hidrolizatının floresans ömür dağılımının karşılaştırılması.

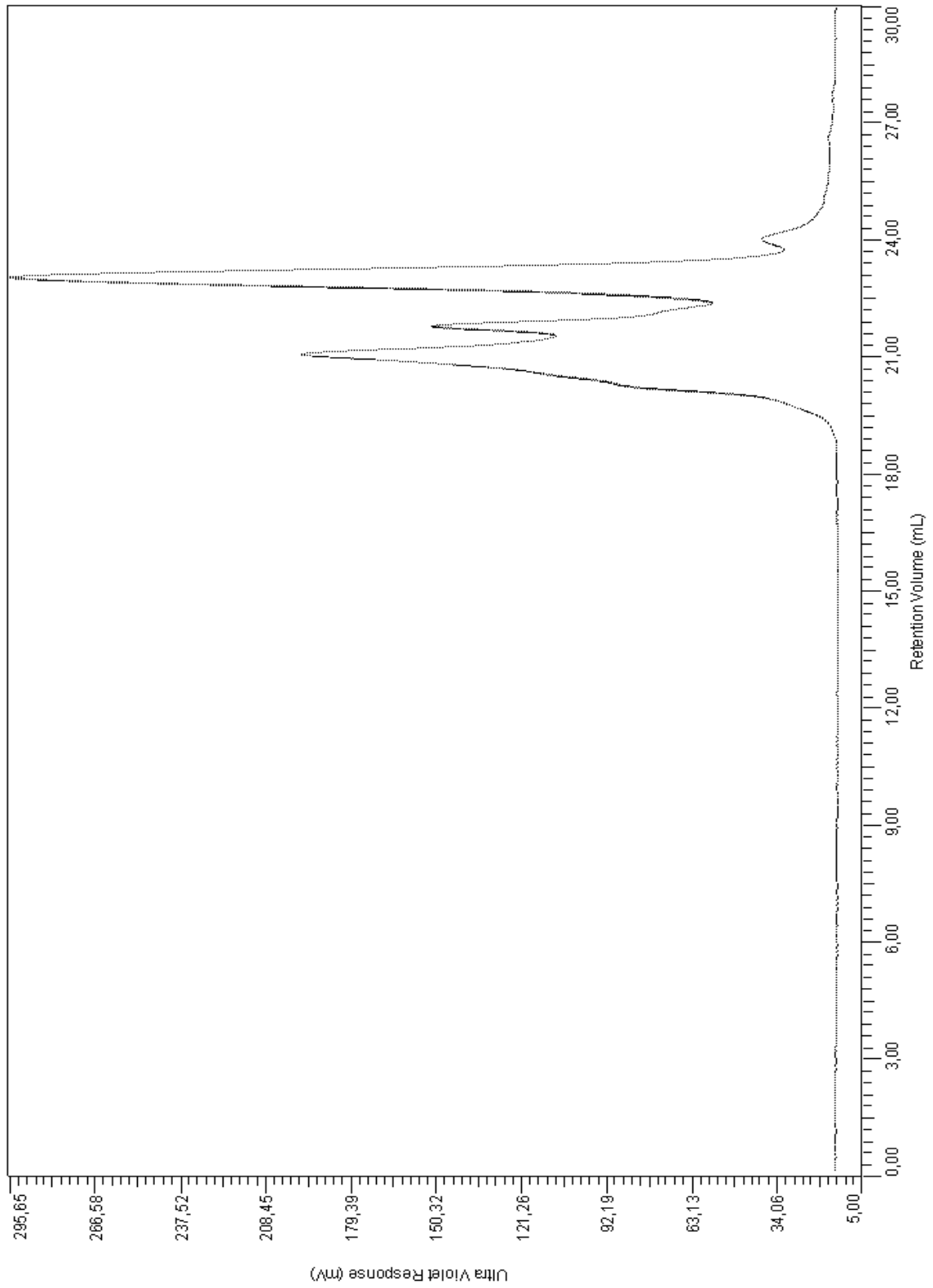
Tripsin tarafından BSA'nın hidrolizinin gerçekleşip gerçekleşmediğini anlamak için "Viscotek GPC max VE 2001" marka jel geçirgenlik kromatografisi Cihazı kullanıldı. Şekil 4.16'da BSA ile PM-BSA kompleksinin elüsyon hacimleri arasındaki fark görülmektedir. Kompleks BSA'ya göre molekül ağırlığının büyük oluşu beklendiği gibi GPC kolonundan daha erken elüsyonunu sağlamıştır. Şekil 4.18'de triptik hidrolizata ait peptid içeriğinin, kompleksin elüsyon hacmine görece daha uzun elüsyon hacimlerinde gerçekleşmesi tripsinin PM-BSA kompleksi üzerindeki hidrolitik etkisini kanıtlamaktadır.



Şekil 4. 16 Üstte, Tris.HCl tamponunda (pH=8) PM-BSA kompleksi ile BSA'ya ait Jel Geçirgenlik Kromatografisi verileri. Cihaz: Viscotek GPC max VE 2001. Kolon: Shimadzu Shim-Pack 300 diol.



Şekil 4. 17 Üstte, Tris.HCl tamponunda (pH:8) tripsin enzimine ait jel Geçirgenlik Kromatografisi verileri. Cihaz: Viscotek GPC max VE 2001. Kolon: Shimadzu Shim-Pack 300 diol.



Şekil 4. 18 Üstte, Tris-HCl tamponunda (pH:8) PM-BSA çözeltisinin tripsin ile muamelesinden 24 saat sonra alınan Jel Geçirgenlik Kromatografisi verileri görülmektedir. Cihaz: Viscotek GPC max VE 2001. Kolon: Shimadzu Shim-Pack 300 diol.

4.8 PM-BSA Kompleksi Üzerinde Kimotripsin Etkisinin Zaman Ayrımlı Floresans

Tekniği İle İncelenmesi

Bir önceki bölümde tripsin proteazı ile yapılan çalışmada olduğu gibi, stok PM-BSA çözeltisinden alınan 1ml'lik örnek Tris.HCl tamponuyla (pH:8) 3ml'ye seyreltilti. Bu çözeltiye ait şekil 4.8'de verilen $A_{PM-BSA(280nm)}=1,4687$ ve $A_{344nm}=1,2007$ absorpsiyon değerleri, eşitlik 4.10 ve BSA standart absorpsiyon eğrisinden (Şekil 4.9) elde edilen molar absorpsiyon değeri " $\epsilon_{BSA(280nm)}=37246,23116$ " kullanılarak PM-BSA molekülü için protein konsantrasyonu ve protein mol sayısı hesabı yapıldı. Buna göre BSA konsantrasyonu için,

$$C_{BSA} = \frac{n_{BSA}}{V(l)} = \frac{A_{BSA(280nm)}}{\epsilon_{BSA(280nm)} \times b} = \frac{A_{PM-BSA(280nm)} - 0,976 \times A_{PM(344nm)}}{\epsilon_{BSA(280nm)} \times b} \quad (4.14)$$

eşitliği yazılarak ışığın absorpsiyon kuvveti içinde izlediği yol $b=1cm$ alındı ve PM-BSA için protein konsantrasyonu,

$$C_{BSA} = \frac{A_{PM-BSA(280nm)} - 0,976 \times A_{PM(344nm)}}{\epsilon_{BSA(280nm)} \times b} = \frac{1,4687 - 0,976 \times 1,2007}{3724623116} = 7,969042525 \times 10^{-6} M$$

$$C_{BSA} \cong 7,97 \times 10^{-6} Molar$$

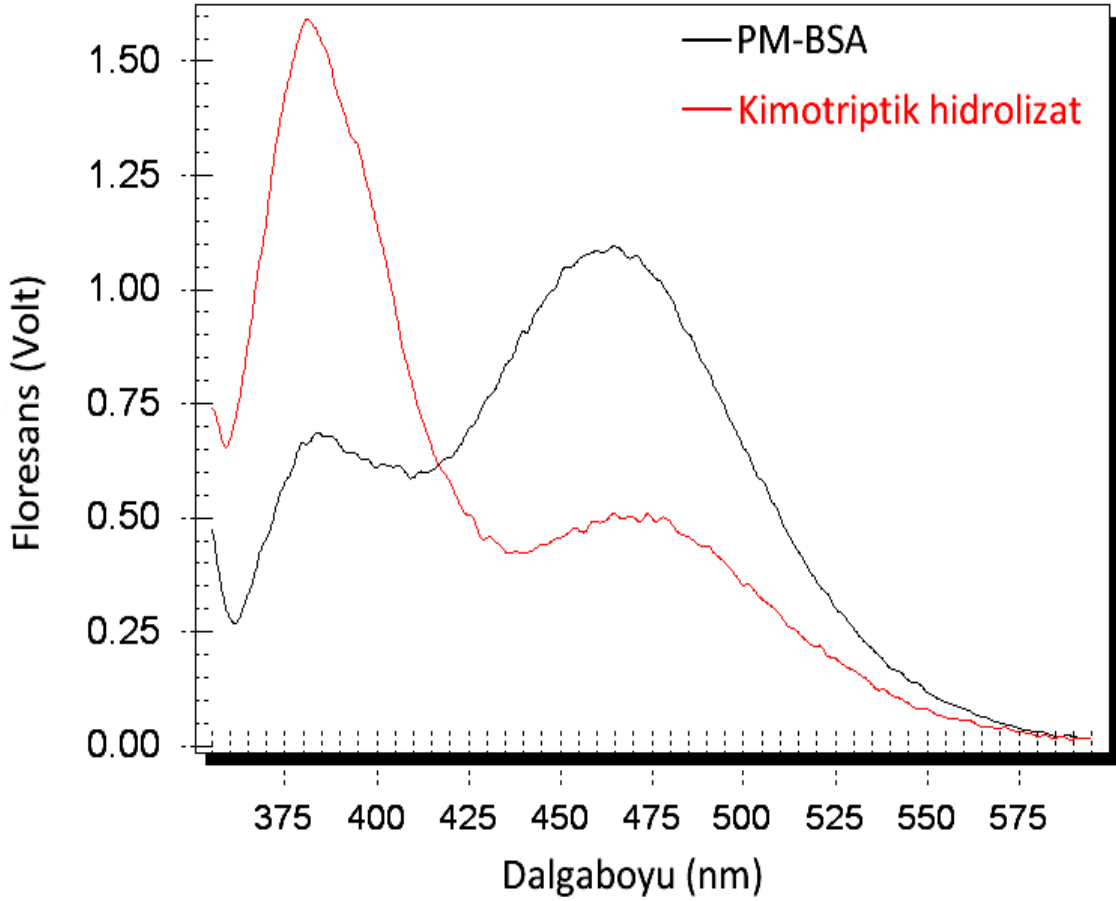
olarak hesaplandı.

Litre cinsinden çözelti hacmi değeri 3×10^{-3} eşitlik 4.14'te yerine yazıldığında protein mol miktarı;

$$n_{BSA} = 2,390712758 \times 10^{-8} \cong 2,391 \times 10^{-8} mol \text{ bulundu.}$$

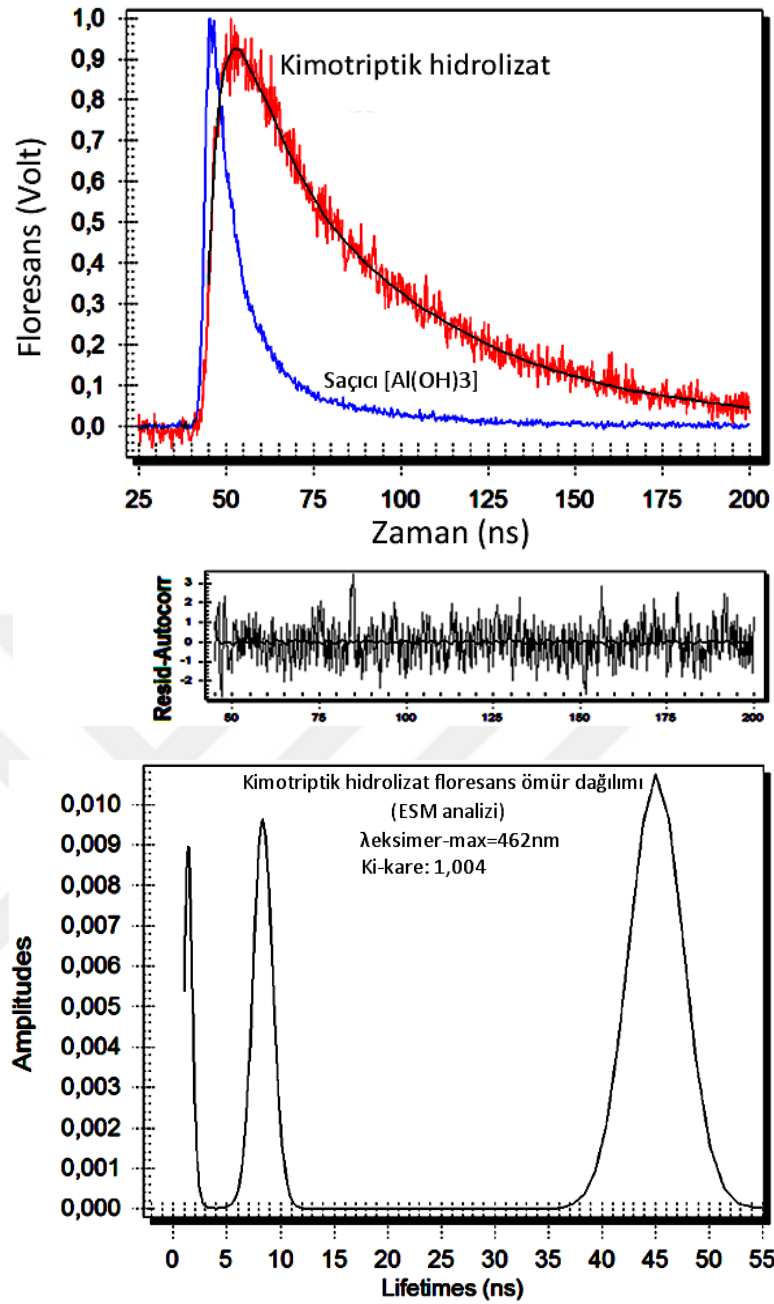
PM-BSA Kompleksinin tam hidrolizi için "Proteaz/PM-BSA" mol oranı 1:1 olarak seçildi. Buna göre 20 μ l.'sinde $2,391 \times 10^{-8}$ mol kimotripsin içerecek şekilde 0,0298875g Sığır kimotripsin ($MA_{Kimotripsin}=25000$) 1ml 0,001N HCl içinde çözöldü ve bu çözeltiden 20 μ l alınıp, sıcaklığı 30°C'ye sabitlenmiş su banyosunda 3ml. PM-BSA çözeltisi içine bırakıldı

ve 24 saatlik inkubasyon sonrası elde edilen kimotriptik hidrolizatın floresans özellikleri ölçüldü ve PM-BSA kompleksinin floresans özellikleri ile karşılaştırılarak farklılıklar belirlendi.



Şekil 4. 19 Tris.HCl tamponunda (0,025M, 0,1M NaCl, 0,005M CaCl₂, pH:8) 3ml. PM-BSA çözeltisinin kimotripsin muamelesi öncesinde ve sonrasında alınan zaman ayrımlı floresans spektrumları. λ_{exc} : 337nm; $\lambda_{emis.max}$: 382nm (monomer); $\lambda_{emis.max}$: 462nm.(eksimer); İntegrasyon. Süresi (Int. time): 0,1s; İlerleme sayısı (step size): 0,25; Geciktirme süresi: 60ns; Tekrarlama (averages): 3.

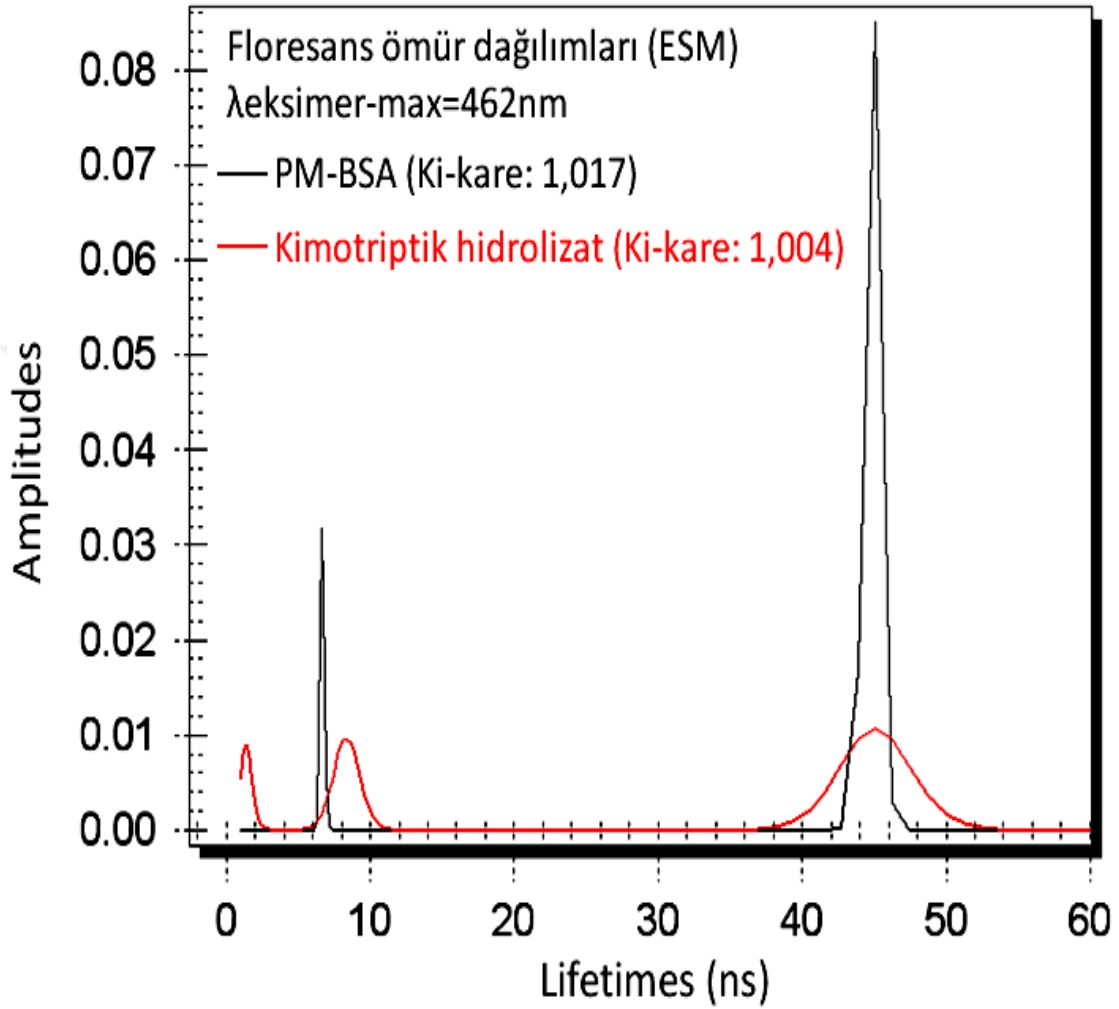
PM-BSA kompleksinin kimotripsin etkisi öncesi ve kimotripsin etkisi sonrası floresans spektrumlarındaki değişimler karşılaştırıldığında (Şekil 4.19); Tripsin ile hidrolizde gözlemlendiği gibi 462nm’de maksimum veren eksimer emisyonunun büyük miktarda azaldığı ve yine 382nm’deki monomer emisyonunun arttığı görülmektedir. Buna göre, eksimer oluşturmaya uygun mesafelerde birbirlerine bakışık konumlanmış düzlemsel piren halka çiftlerinin önemli bir kısmının, kimotripsinin hidrolitik etkisi ile pozisyonlarının bozulduğu anlaşılmaktadır.



Şekil 4. 20 Tris.HCl tamponunda (0,025M, 0,1M NaCl, 0,005M CaCl₂, pH:8) 3ml. PM-BSA çözeltisinin kimotripsin muamelesinden 24saat sonra alınan floresans bozunma eğrisi, bozunma verilerinin eğriye uyarlanması ve floresans ömür dağılımı (ESM, Ki-kare:1,004). λ_{exc} : 337nm; $\lambda_{eksimer-max}$: 462nm; İntegrasyon süresi (Int. time): 0,1; Kanal sayısı(Channels): 700; Tekrarlama (averages): 3.

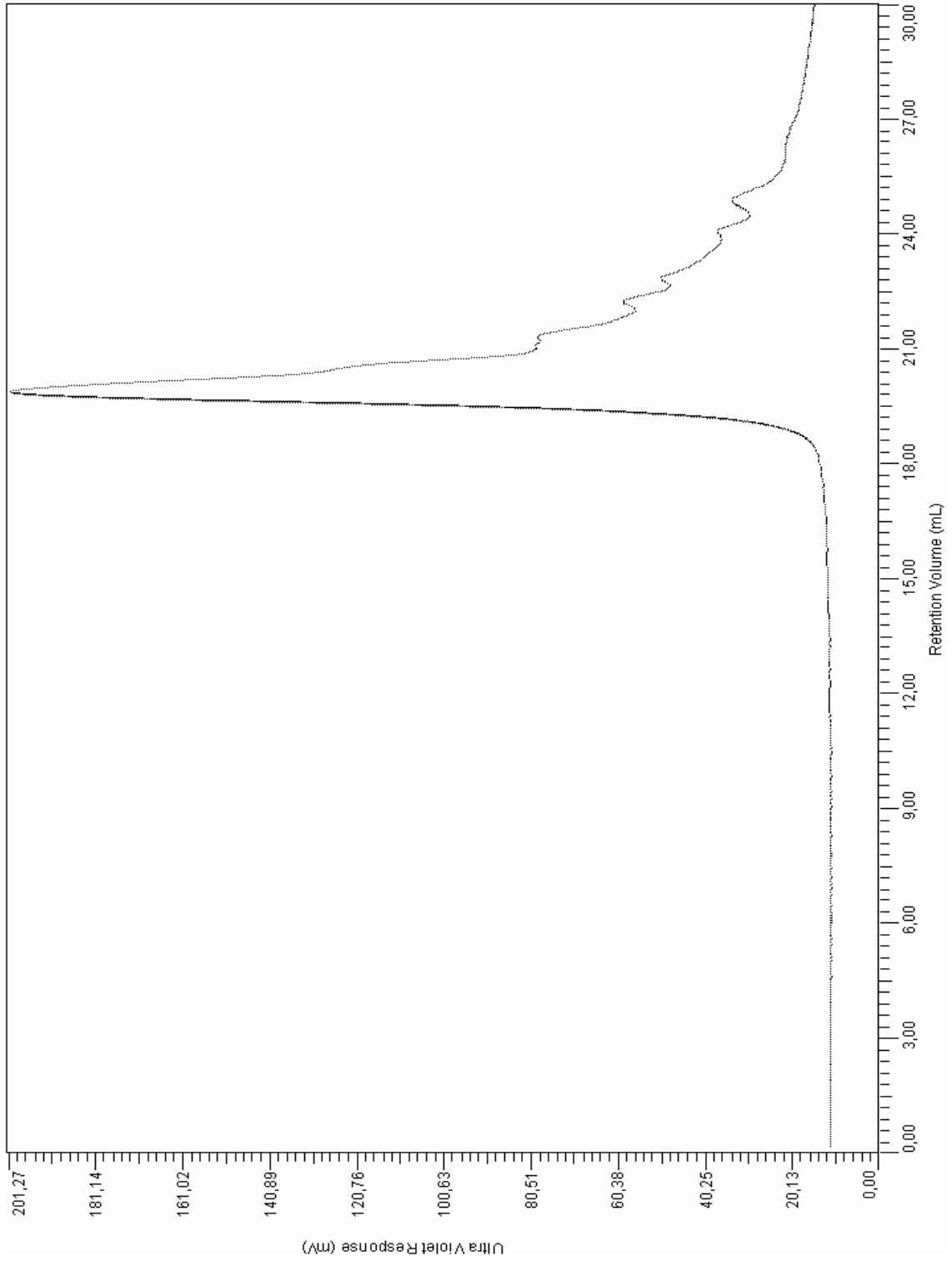
Şekil 4.20’de PM-BSA kompleksinin kimotripsin hidrolizatına ait floresans bozunma verilerinin ESM analizinden elde edilen floresans ömür dağılımı görülmektedir. Şekil 4.21’de PM-BSA kompleksi floresans ömür dağılımı ile kimotripsin hidrolizatının floresans ömür dağılımları karşılaştırılmaktadır. Buna göre 45ns civarında floresans ömür gösteren eksimerlerin hidroliz sonrası azaldığı ancak tripsindeki gibi tamamen

tükenmediği, 8-9ns ömürlü yeni eksimerlerin oluştuğu görülmektedir. Tripsin hidrolizinde rastlanan 35ns civarında floresans ömürlü eksimerler kimotripsin hidrolizatına ait floresans ömür dağılım grafiğinde görülmemektedir. Bu farklılığın kimotripsinin özgün hidrolitik karakterinden kaynaklandığı açıktır.

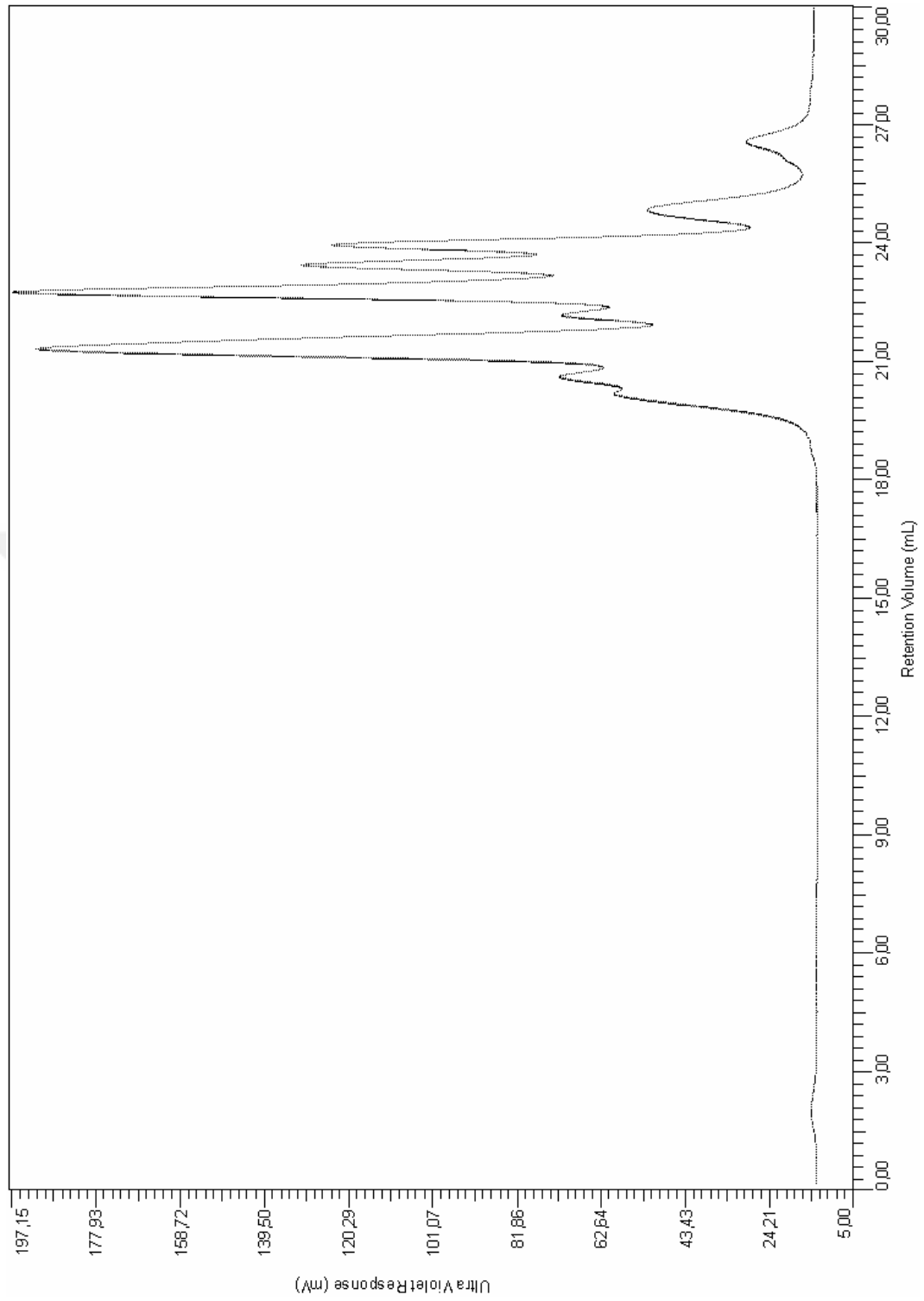


Şekil 4. 21 PM-BSA kompleksi floresans ömür dağılımı ile kimotriptik hidrolizatının floresans ömür dağılımının karşılaştırılması.

Kimotripsin ile PM-BSA'nın hidrolizinin gerçekleştiğini belirlemek için "Viscotek GPC max VE 2001" marka jel geçirgenlik kromatografisi Cihazı kullanıldı. Şekil 4.16'da PM-BSA kompleksinin elüsyon hacmi ile Şekil 4.23'de kimotripsin hidrolizatına ait peptid içeriğinin elüsyon hacimleri karşılaştırıldığında, hidrolizatın elüsyonunun daha büyük hacimlerde gerçekleştiği görülmektedir. Bu sonuçlar kimotripsinin PM-BSA kompleksi üzerindeki hidrolitik etkisini kanıtlamaktadır.



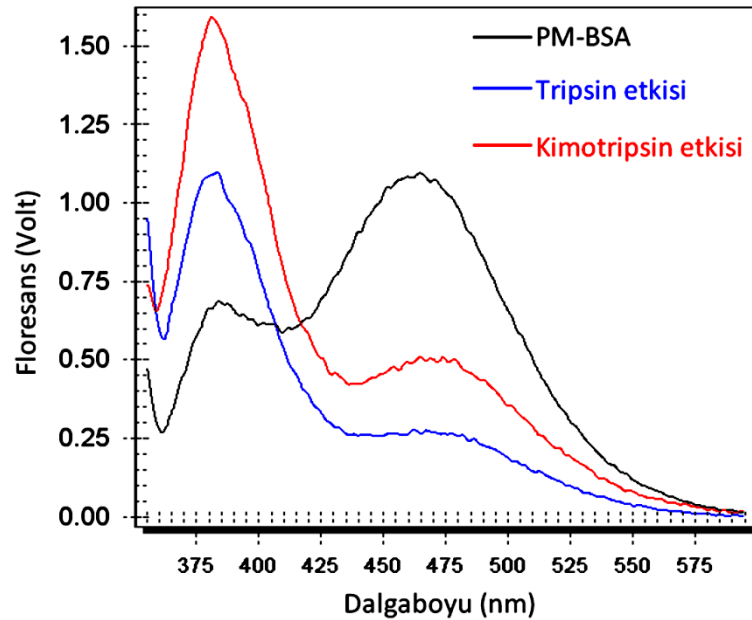
Şekil 4. 22 Tris-HCl tamponunda (pH=7,8) kimotripsin enzimine ait Jel Geçirgenlik Kromatografisi verileri. Cihaz: Viscotek GPC max VE 2001. Kolon: Shimadzu Shim-Pack 300 diol.



Şekil 4. 23 Tris-HCl tamponunda (pH=7,8) PM-BSA çözeltisinin kimotripsin muamelesinden 24 saat sonra alınan Jel Geçirgenlik Kromatografisi verileri görülmektedir. Cihaz: Viscotek GPC max VE 2001. Kolon: Shimadzu Shim-Pack 300 diol.

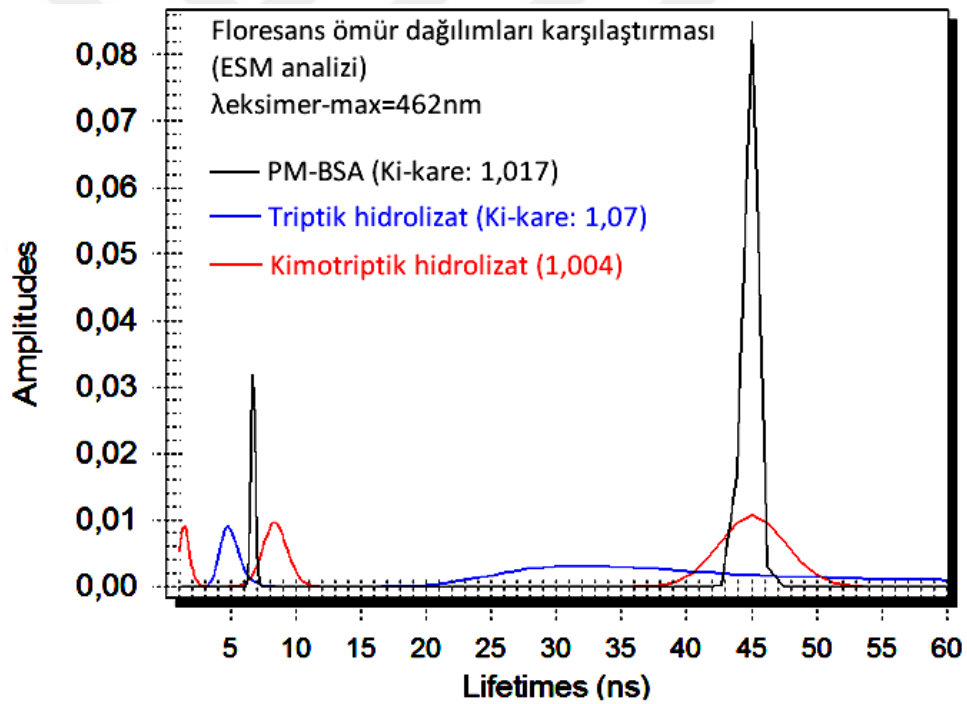
SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Proteazların hidrolitik etkilerinin özgünlüğü, belli bir proteinden ürettikleri hidrolizatlarda yer alan peptid parçalarının içerdiği amino asitlerin çeşitlerinin, sayılarının, dizilimlerinin farklılığından dolayı bu peptidlerin şekillerini, boyutlarını, konformasyonlarını, elektriksel yüklerini, polaritelerini ve tüm bunlara bağlı olarak da peptidlerin üzerindeki floresan moleküllerin kazandığı yeni kimyasal çevre koşullarını proteaz aktivitesine özgün kılar. Bu olgulara bağlı olarak floresans ömür dağılımlarındaki değişimler de proteaz aktivitesine özgün farklı şekiller alır.



Şekil 5. 1 Kimotripsin ve Tripsin enzimlerinin hidrolizi sonucu PM-BSA'nın zaman ayrımlı floresans spektrumunun değişimi, $\lambda_{excitation}=337nm$, $\lambda_{monomer-max}=382nm$, $\lambda_{excimer-max}=462nm$, integration time = 0,1s

PM-BSA kompleksinin proteoliz öncesi floresans spektrumu ile proteoliz sonrası hidrolizatlarından elde edilen floresans spektrumları arasındaki farklılıklar Şekil 5.1’de, floresans ömür dağılımı ile proteoliz sonrası hidrolizatlarından elde edilen floresans ömür dağılımları arasındaki farklılıklar karşılaştırmalı olarak Şekil 5.2’de sunulmaktadır. Proteoliz öncesi ve sonrasındaki floresans ömür dağılımları (Şekil 5.2) karşılaştırıldığında; floresans ömrü 45 ns civarında olan eksimerlerin proteaz etkinliği sonucu azaldığı, tripsin etkisi ile dağılımın 30-35 ns civarına, kimotripsin etkisinde ise 8-9 ns civarına kaydığı ve yayıldığı görülmektedir. Diğer yandan PM-BSA kompleksi bünyesinde hidroliz öncesi 7 ns civarında gözlemlenen eksimer türlerin de hidroliz sonrası azaldığı, dağılımın tripsin etkisinde daha kısa ömürlere, kimotripsin etkisinde ise daha kısa ve daha uzun olmak üzere her iki floresans ömür bölgesine kaydığı görülmektedir.



Şekil 5. 2 PM-BSA’nın (proteoliz öncesi) ve proteazların hidrolizi sonrası floresans ömür dağılımları karşılaştırması

Bu olgular üç mantıklı olasılıkla açıklanabilir:

1. PM-BSA’nın proteolitik yıkımı sonucu piren halka düzlemlerinin konumlarının bozulması ve birkaçı veya hepsinin oluşan peptid parçaları üzerinde kısa floresans ömürlü yeni eksimerler oluşturacak şekilde yeniden konumlanmaları,

2. Proteolizin, yıkıma uğramamış eksimerlerin konumlarını değil sadece çevre koşullarını değiştirmiş olması veya,

3. Yukarıdaki her iki sürecin belli bir oranda gerçekleşmesi.

PM-BSA'nın proteazlarla reaksiyonu sonrasında proteolitik hidrolizatlarından elde ettiğimiz floresans ömür çeşitlenmelerindeki dağılımsal farklılaşmaların, her bir proteaz aktivitesine özgü adeta parmak izi gibi birbirinden farklı profil sergilemeleri, bu tez çalışmamızda uyguladığımız analiz yönteminin proteazlar için geliştirilebilecek yeni tetkik sistemlerine temel oluşturabileceği; kanser, AIDS, SARS gibi proteazların önemli rol oynadığı çağımız hastalıklarının teşhisine ve önlenmesine yönelik yeni yöntemlerin keşfinde önemli bir basamak oluşturabileceğini göstermektedir.

- [1] Hermanson, G.T. (2008). Bioconjugate Techniques, second edition, Academic Press, Elsevier Inc., New York.
- [2] Lakowicz, J.R. (2006). Principles of Fluorescence Spectroscopy, third edition, Springer Science+Business Media, LLC, New York.
- [3] Albani, J.R., (2004). Structure And Dynamics of Macromolecules: Absorption and Fluorescence Studies, first edition, Elsevier B.V., Amsterdam.
- [4] Valeur, B. (2002). Molecular Fluorescence, Principles and Applications, WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim (Federal Republic of Germany).
- [5] Hemmilä, I.A. (1991). Applications of Fluorescence in Immunoassays, Chapter 5, John Wiley & Sons, Inc., New York.
- [6] Bommarius, A. S., Riebel, B.R. (2004). Biocatalysis, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Weinheim.
- [7] Beynon R. ve Bond, J.S. (2001). Proteolytic Enzymes, Second Edition, Oxford University Press, New York.
- [8] Rawlings, N.D., Salvesen, G., (2013). Handbook Of Proteolytic Enzymes, 1, third edition, Elsevier Ltd., London.
- [9] Edwards, D., Høyer-Hansen, G., Blasi, F., Sloane, B. F., (2008). The Cancer Degradome: Proteases and Cancer Biology, Springer Science+Business Media, LLC, New York.
- [10] Stubbs, C.D., Williams, B.W., (1992). "Fluorescence in Membranes", Topics in Fluorescence Spectroscopy: Biochemical Applications, 3: 231-271; Editor: Lakowicz, J.R., (1992), Plenum Press, New York.
- [11] Barrantes, F.J., Antollini, S.S., Blanton, M.P., Prieto, M., (2000). "Topography Of Nicotinic Acetylcholine Receptor Membrane-Embedded Domains", J. Biol. Chem., 275: 37333–37339.
- [12] Ahn, T., Kim, J.-S., Choi, H.-I., and Yun, C.-H., (2002). "Development of Peptide Substrates for Trypsin Based on Monomer/Excimer Fluorescence of Pyrene", Analytical Biochemistry, 306: 247–251.

- [13] Bains, G., Patel, A.B., Narayanaswami, V., (2011). "Pyrene: A Probe To Study Protein Conformation And Conformational Changes", *Molecules*, 16: 7909-7935.
- [14] Betcher-Lange, S.L., Lehrer, S.S., (1978). "Pyrene Excimer Fluorescence in Rabbit Skeletal α -tropomyosin Labeled With N-(1-Pyrene)maleimide", *J. Biol. Chem.*, 253: 757-3760.
- [15] Wagner, B.D. Ware, W.R. (1990). "Recovery Of Fluorescence Lifetime Distributions: Application To Förster Transfer in Rigid and Viscous Media", *J. Phys. Chem.*, 94: 3489-3494.
- [16] Copeland, R.A. (2000). *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*, second edition, John Wiley & Sons, Inc. Publication, New York.
- [17] <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1YPH> , 12 Kasım 2014.
- [18] Robert, K.M., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W., (2003). *Harper's Illustrated Biochemistry*, twenty-sixth edition, McGraw-Hill Companies, United States.
- [19] Britt, B.M. (2004). "Understanding Enzyme Structure And Function in Terms of The Shifting Specificity Model", *J Biochem Mol Biol*, 37: 394-401.
- [20] Palmer, T., (1991). *Understanding Enzymes*, third edition, Ellis Horwood limited, Chichester, England.
- [21] Bisswanger, H., (2008). *Enzyme Kinetics, Principles and Methods*, second edition, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- [22] Leskovac, V., (2004). *Comprehensive Enzyme Kinetics*, Kluwer Academic Publishers, New York.
- [23] Sharma, A., Schulman, S.G. (1999). *Introduction to Fluorescence Spectroscopy*, John Wiley & Sons, Inc., New York.
- [24] Tkachenko, N.V. (2006). *Optical Spectroscopy, Methods and Instrumentations*, Elsevier Science, Netherlands.
- [25] Siemiarczuk, A., Wagner, B.D., Ware, W.R., (1990). "Comparison of The Maximum Entropy and Exponential Series Methods for The Recovery of Distributions of Lifetimes From Fluorescence Lifetime Data", *J. Phy. Chem.*, 94: 1661-1666.
- [26] Pekcan, Ö. (1996). "Fluorescence Lifetime Distributions: Applications to High and Low Viscosity Media in Polymer Blend-Like Particles", *Eur. Polym. J.*, 32: 117-124.
- [27] Pekcan, Ö., (1993). "Lifetime Distribution Study on Evolution of Dimensionality in Blend-Like Polymer Films", *Chem. Phys.*, 177: 619-628.
- [28] <http://www.pti-nj.com/TechnicalNotes/Time-Resolved-Fluorescence-Techniques.pdf> , 12 Kasım 2014.

- [29] Birks, J.B. (1975). "Excimers", Rep. Prog. Phys., 38: 903-974.
- [30] Montalti, M., Credi, A., Prodi, L., Gandolfi, M. T., (2006). Handbook of Photochemistry, Chapter 1, CRC Press, Taylor & Francis Group, New York.
- [31] Panda, D., Bhattacharyya, B., (1992). "Excimer Fluorescence of Pyrene-maleimide-labeled Tubulin", Eur. J. Biochem., 204: 783-787.
- [32] Striegel, A.M., Yau, W. W., Kirkland, J. J., Bly, D. D., (2009). Modern Size-Exclusion Liquid Chromatography – Practice of Gel Permeation and Gel Filtration Chromatography, second edition, John Wiley & Sons Inc., Hoboken, New Jersey.
- [33] Trathnigg, B., Karl-Franzens-University, Graz, Austria; (2000). Size-Exclusion Chromatography of Polymers, Encyclopedia of Analytical Chemistry; Editor, R.A. Meyers, John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- [34] Podzimek, S., (2011). Light Scattering, Size Exclusion Chromatography and Asymmetric Flow Field Flow Fractionation, Powerful Tools for The Characterization of Polymers, Proteins and Nanoparticles, John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey.
- [35] Wong, S. S., (1993). Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking, CRC Press, Inc., Florida.
- [36] <http://www.friedli.com/research/PhD/chapter5a.html> , 12 Kasım 2014.
- [37] Marquez, J., Iriarte, A., Martinez-Carrion, M., (1989). "Covalent Modification of a Critical Sulfhydryl Group in the Acetylcholine Receptor: Cysteine-222 of the α -Subunit", Biochemistry, 28: 7433-7439.
- [38] Wu, C.-W., Yarbrough, L. R., Wu, F.Y.-H., (1976). "N-(1-Pyrene)maleimide: A Fluorescent Cross-Linking Reagent", Biochemistry, 15(13): 2863-2868.
- [39] The T.H., Feltkamp T.E.W., (1970). "Conjugation of Fluorescein isothiocyanate to Antibodies; I. Experiments on The Conditions of Conjugation", Immunology, 18: 865-873.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : İbrahim Ethem ÖZYİĞİT
Doğum Tarihi ve Yeri : 11-07-1969/İstanbul
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : ieozyigit@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Organik Kimya	Yıldız Teknik Üniversitesi	1997
Lisans	Kimya	Yıldız Teknik Üniversitesi	1997
Lise	Fen Bilimleri	İstanbul Vefa Lisesi	1990

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
1999-Devam Ediyor	Yıldız Teknik Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

YAYINLARI

Makale

1. Erden, İ., Özyiğit İ.E., "1,10-Fenantrolinden Elde Edilen İmidazol Ve Schiff Bazı Ligandlarının Floresans Özelliklerinin İncelenmesi", Sigma Mühendislik Ve Fen Bilimleri Dergisi, 23: 441-445, 2005.
2. Canlıca M., Beker H.K., Özyiğit İ.E., Akıncı A. and Kaban Ş., "Investigation of Spectrophotometrical and Fluorescent Behavior of 1,3-Diethyl-5-(Quinoline-2-Ylmethylene)-2-Thioxodihydropyrimidine-4,6(1H,5H)-Dione in Various Solvents; Editor, Bilge Şener, Innovations in Chemical Biology, Chapter 49" Springer Science + Business Media B.V., 411-419, 2009.
3. Özyiğit,İ. E., Karakuş, E., Pekcan, Ö., "Proteolytic Activities of Chymotrypsin and Trypsin Enzymes on "N-(1-Pyrenyl)maleimide - Bovine Serum Albumin" Complex; A Fluorescence Lifetime Distribution Study" Spectrachimica Acta Part A, under review.

Bildiri

1. Özyiğit, İ. E., Karakuş, E., Pekcan, Ö., "Examination of Lifetime Distribution Changes of Human Serum Albumin Modified With N-(1-Pyrenyl)maleimide (PM-HSA) by The Proteolytic Activities of Chymotrypsin and Trypsin" XI. Kimyasal Fizik Kongresi, İstanbul, Türkiye, 2014.
2. Özyiğit, İ. E., Karakuş, E., Pekcan, Ö., "N-(1-Pirenil)maleimid (PM) ile Modifiye Edilmiş Sığır Serum Albümin (Bovine Serum Albumin; BSA)'inin Eksimer Emisyonuna ait Floresans Ömür Dağılımının Kimotripsin ve Tripsin Etkisi İle Değişiminin İncelenmesi" 2. Ulusal Organik Kimya Kongresi, Ankara, Türkiye, 2014.
3. Özyiğit, İ. E., "N-1-Pirenilmaleimid (PM) İle Bazık pH'da Modifiye Edilmiş "Sığır Serum Albümin (Bovine Serum Albumin, BSA)"inin Floresans Özelliklerinin Zaman Ayrımlı Spektroflorometre ile İncelenmesi" XXII. Ulusal Kimya Kongresi, Mağusa, Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti, 2008.
4. Kirpi, E., Özyiğit, İ. E., Kaban, Ş., "Multikomponent Reaksiyon Yöntemi ile Elde Edilen 2,3-Dipiridin-2-İl-1,3-Tiyazolidin-4-On Bileşiğinin Floresans Özelliklerinin İncelenmesi" XXII. Ulusal Kimya Kongresi, Malatya, Türkiye, 2007.
5. Erden, İ., Özyiğit, İ. E., Demirhan, N., Avcıata, U., "1,10-Fenantrolinden Elde Edilen İmidazol ve Schiff Bazı Ligandlarının Floresans Özelliklerinin İncelenmesi" XIX. Ulusal Kimya Kongresi, Kuşadası, İzmir Türkiye, 2005.
6. Erden, İ., Özyiğit, İ. E., Demirhan, N., Avcıata, U., "Fenantrolin ve türevlerinin Floresans Özelliklerinin İncelenmesi" XVII. Ulusal Kimya Kongresi, İstanbul, Türkiye, 2003.
7. Özyiğit, İ. E., Kuzu, H., "Bazı Organik Maddeler ve NaCl Tuzunun "Pyr-ITC-BSA" Molekülünün Floresans Özellikleri Üzerine Etkileri" XVII. Ulusal Kimya Kongresi, İstanbul, Türkiye, 2003.

8. Özyiğit, İ. E., "Pyr-ITC-BSA Molekülünün Floresans Özellikleri" XVI. Ulusal Kimya Kongresi, Konya, Türkiye, 2002.
9. Özyiğit, İ. E., Kuzu-Karşılayan H., "Proteinlerin Floresan Maddelerle İşaretlenmesi" XV. Ulusal Kimya Kongresi, İstanbul, Türkiye, 2001.
10. Özyiğit, İ. E., Kuzu-Karşılayan H., "Kan Hücrelerinde CD8 Miktar Tayini" XIV. Ulusal Kimya Kongresi, Diyarbakır, Türkiye, 2000.

Proje

1. "Nanopartikül Temelli Potansiyometrik Sefalosporin Biyosensörü Hazırlanması ve Sefalosporin Tayininde Kullanımının Araştırılması" Yıldız Teknik Üniversitesi Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü, Proje No: 2012-01-02-KAP10, Proje Elemanı, (2012-devam ediyor).
2. "Çeşitli Mikroorganizma Türlerinden (Trichoderma Reesei, Hypocrea Jecorina, Aspergillus Niger Ve Polyporus Sp.) Glutaminaz Enziminin Üretimi, Saflaştırılması ve Biyosensör Yapımında Kullanımının Araştırılması" Yıldız Teknik Üniversitesi Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü, Proje No: 2011-01-02-KAP07, Proje Elemanı, (2011-devam ediyor).
3. "Enzim Aktivitelerinin Florometrik Yöntemlerle İncelenmesi" Yıldız Teknik Üniversitesi Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü, Proje No: 27-01-02-03, Proje Elemanı, Tamamalandı.
4. "Fonksiyonel Biyopolimer Sistemler" DPT, Proje No: 24-DPT-07-04-01, Proje Elemanı, Tamamalandı.