

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

**FLORESANS ÖMÜR DAĞILIMI KULLANILARAK POLİAKRİLİK ASİT-
TRİPSİN KONJUGATI VE SERBEST TRİPSİNİN PROTEOLİTİK
AKTİVİTESİNDEKİ DEĞİŞİMLERİN İNCELENMESİ**

ÜMMÜGÜLSÜM POLAT

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
BİYOKİMYA PROGRAMI**

**DANIŞMAN
PROF. DR. EMİNE KARAKUŞ**

İSTANBUL, 2017

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FLORESANS ÖMÜR DAĞILIMI KULLANILARAK POLİAKRİLİK ASİT-
TRİPSİN KONJUGATI VE SERBEST TRİPSİNİN PROTEOLİTİK
AKTİVİTESİNDEKİ DEĞİŞİMLERİN İNCELENMESİ**

Ümmügölsüm POLAT tarafından hazırlanan tez çalışması 22/12/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Emine KARAKUŞ
Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Emine KARAKUŞ
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Barbaros NALBANTOĞLU
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Ayşe OGAN
Marmara Üniversitesi

ÖNSÖZ

Bu araştırma konusunu yüksek lisans tezi olarak öneren, beni yüksek lisans öğrencisi ve asistanı olarak kabul eden, yüksek lisans eğitimim boyunca sabrı, dostluğu, samimiyeti, anneliği, yakın ilgi ve desteğini benden esirgemeyen değerli deneyim ve bilgilerinden her daim faydalandığım Sevgili Hocam Sayın Prof. Dr. Emine KARAKUŞ'a

Laboratuar çalışmalarımda her zaman yanımda olan; bilgi ve birikimini büyük bir sabırla bana aktaran Sevgili Hocam Dr. İbrahim Ethem ÖZYİĞİT'e

Benden yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini esirgemeyen Sevgili Hocam Prof. Dr. Barbaros NALBANTOĞLU'na

Eğitim hayatımda her zaman bana yardımcı olan Sevgili Ablam Dr. Leyla POLAT KÖSE'ye,
Bana güvenen, destek veren, beni bu yaşıma getiren değerli annem Ayten POLAT'a,
babam Hakkı POLAT'a ve diğer kardeşlerime

Tez yazımında bana yardımlarını esirgemeyen Sevgili Arkadaşlarım; Arş. Gör. Dr. Özge KOYUN, Alihan KOCABAŞ ve Arş. Gör. Sultan ŞAHİN'e

Tez yazımım süresince bana inanan, güvenen, yardımını esirgemeyen Yoncalı Yârim'e teşekkür ederim.

Aralık, 2017

Ümmügülsüm POLAT

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE LİSTESİ.....	viii
KISALTMA LİSTESİ.....	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xii
ÖZET.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
BÖLÜM 1	
GİRİŞ.....	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı	2
1.3 Hipotez	3
BÖLÜM 2	
GENEL BİLGİLER.....	4
2.1 Enzimlerin Yapısal Birimleri.....	4
2.2 Aminoasitler ve peptid bağı	5
2.3 Proteinlerin Yapısal Özellikleri	8
2.3.1 Birincil (Primer) Protein Yapısı.....	9
2.3.2 İkincil (Sekonder) Protein Yapısı.....	9
2.3.2.1 α -Heliks Yapısı.....	9
2.3.2.2 β -Katlanmış Tabaka Yapısı.....	10
2.3.2.3 Üçüncül (Tersiyer) Protein Yapısı.....	11
2.3.2.4 Dördüncül (Kuaterner) Protein Yapısı.....	12
2.4 Enzim Yapısı ve Katalitik Etki	13
2.5 Enzimlerin Adlandırılması	17

2.6 Enzimlerin Sınıflandırılması	17
2.6.1 Ana Sınıf 1 - Oksidoredüktazlar (E.C.1)	18
2.6.2 Ana Sınıf 2 - Transferazlar (E.C.2)	18
2.6.3 Ana Sınıf 3 - Hidrolazlar (E.C.3)	18
2.6.4 Ana Sınıf 4 - İyazlar (E.C.4)	19
2.6.5 Ana Sınıf 5 - İzomerazlar (E.C.5)	19
2.6.6 Ana Sınıf 6 - Ligazlar (E.C.6)	19
2.7 Proteazlar (E.C.3.4)	19
2.7.1 Ekzopeptidazlar	20
2.7.2 Endopeptidazlar	21
2.8 Serin Proteazlar	22
2.8.1 Tripsin (E.C.3.4.21.4)	22
2.8.2 Kimotripsin (E.C.3.4.21.1)	23
2.9 Serin Proteazlarının Katalitik Mekanizması	23
2.10 Enzim Kinetiği	24
2.10.1 Hızlı Dengelenme Modeli	26
2.10.2 Kararlı Hal Modeli	27
2.11 Biyokonjugasyon	30
2.11.1 Polimerlerin EDC Kullanılarak Proteinlerle Kovalent Biyokonjugasyonu	31
2.12 Enzim Aktivitesini Tayininde Kullanılan Spektrofotometrik Yöntemler	32
2.12.1 UV-Görünür Bölge Spektroskopisi	32
2.12.2 Floresans Spektroskopisi	35
2.12.2.1 Kararlı Hal Floresans Spektroskopisi	39
2.12.2.2 Zaman Ayrımlı Floresans Spektroskopisi	40
2.12.2.3 Üstel seriler yöntemi (ESM)	41
2.13 Eksimer Yapıları	43
2.14 Jel Filtrasyon Kromatografisi	44
2.14.1 Jel Filtrasyon Kromatografisi ile Protein Saflaştırma	44
2.14.2 Jel Filtrasyon Kromatografisinin Mekanizması	46
2.15 Reaktif Protein Grupları ve Modifiye Edici Ajanları	47
BÖLÜM 3	
MATERYAL VE YÖNTEM	52

3.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar	52
3.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler	52
3.1.2 Kullanılan Cihazlar	53
3.2 Çalışmanın Amacı, Kapsamı ve Uygulanan Yöntem	53
BÖLÜM 4	
DENEYSEL BÖLÜM.....	56
4.1 N-(1-pirenil)maleimid (PM)'in Absorpsiyon ve Emisyon Özelliklerinin Belirlenmesi.....	58
4.2 BSA'nın Absorpsiyon ve Emisyon Özellikleri	62
4.3 PM-BSA Kompleksinin Sentezi	65
4.4 PM-BSA'nın Saflaştırılması	67
4.5 PM-BSA Kompleksinde PM/BSA Mol Oranının Hesaplanması.....	67
4.6 PM-BSA kompleksinin Floresans Özellikleri	72
4.7 PAA–tripsin konjugatının sentezi	75
İle İncelenmesi.....	75
4.9 PM-BSA Kompleksi Üzerine PAA-Tripsin Konjugat Etkisinin Zaman Ayrımlı Floresans Tekniği İle İncelenmesi.....	76
BÖLÜM 5	
SONUÇ VE ÖNERİLER	81
KAYNAKLAR.....	85
ÖZGEÇMİŞ.....	89

SİMGE LİSTESİ

K_d	Sabit ve hareketli fazlar arasındaki dağılım katsayısı
Q_f	Kuantum verimi
$F(t)$	Floresans şiddeti
I_a	Absorbsiyon şiddeti
S_0	Temel hal
S_1	Uyarılmış singlet hal
s	Saniye
T	Triplet hal
V_0	Kolon içinde Jel dolguyu saran boşluk hacmi
V_R	Alıkonma hacmi
V_g	Jel kütlesi hacmi
V_i	Toplam jel gözenek hacmi
V_t	Toplam kolon hacmi
τ	Floresans ömür
α_i	Ön üstel faktör
PM-BSA	N-(1-Pirenil)maleimid-Sığır Serum Albumin

KISALTMA LİSTESİ

Akb	Atomik kütle birimi
Asp	Asparajin amino asidi
BSA	Sığır serum albumin (Bovine Serum Albumine)
Cys	Sistein amino grup 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
UV-Vis	Morötesi-Görünür Bölge Işımları (Ultraviolet-Visible)

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1	Aminoasitlerin hücresel fonksiyonları	4
Şekil 2.2	Aminoasitlerin genel yapısı.....	5
Şekil 2.3	Proteinlerin yapısını oluşturan 20 L- α -aminoasit	6
Şekil 2.4	İki aminoasidin peptid bağı oluşumu.....	7
Şekil 2.5	Amid genel yapısı.....	7
Şekil 2.6	Peptid bağındaki cis ve trans konfigürasyonları	8
Şekil 2.7	Birincil protein yapısı [21].....	9
Şekil 2.8	α -heliks yapısı	10
Şekil 2.9	Paralel β -katlanmış tabakaların yapısı.....	10
Şekil 2.10	Antiparalel β -katlanmış tabakaların yapısı	11
Şekil 2.11	Bir polipeptidin üçüncül yapıda katlanması	11
Şekil 2.12	Globüler proteinler.....	12
Şekil 2.13	Fibröz proteinler	12
Şekil 2.14	Protein yapısının dört şekli [26]	13
Şekil 2.15	Aktif merkez ve substrat arasında üç uçlu bağlanmanın düzlemsel gösterimi.....	14
Şekil 2.16	Fischer'in Anahtar-Kilit Modeli.....	14
Şekil 2.17	Haldane'ın geçiş hali tamamlayıcılık modeli'ne göre ES kompleksinin oluşumu	15
Şekil 2.18	B.M. Britt'in Değişken Özgüllük modeli.....	15
Şekil 2.19	Enzim Kataliz Modelleri	16
Şekil 2.20	Bazı enzim kofaktörleri.....	17
Şekil 2.21	Proteoliz olayı	20
Şekil 2.22	Ekzopeptidazların mekanizması	21
Şekil 2.23	Endopeptidazların mekanizması	21
Şekil 2.24	Tripsin, Kimotripsin ve elastazın substrat bağlayıcı cepleri [31]	22
Şekil 2.25	Serin proteazların (tripsin, kimotripsin ve elastaz) spesifisiteleri	24
Şekil 2.26	Enzim katalizli bir reaksiyonun zamana göre serbest entalpi değişimi.....	25
Şekil 2.27	Biyokonjugasyon olayının şematik gösterimi	30
Şekil 2.28	Bir karboksilat ve bir amin grupları içeren iki molekülün bir amid bağı oluşturmak üzere EDC kullanılarak konjugasyonu.....	32
Şekil 2.29	Bir spektrofotometrenin genel şeması [43]	33
Şekil 2.30	Lambert-Beer yasasından sapma[20].....	34

Şekil 2.31 Spektrofotometrenin genel çalışma prensibi[35].....	35
Şekil 2.32 Jablonski Diyagramı.....	36
Şekil 2.33 Stokes kayması [41].....	37
Şekil 2.34 Kararlı hal florimetresinin görünümü.....	40
Şekil 2.35 Atım yöntemi ile ölçülen floresans ömür dağılımının şematik görünümü.....	41
Şekil 2.36 Piren eksimeri oluşumu. Ex: Uyarma, Em: Emisyon [43].....	43
Şekil 2.37 Proteinin Jel Filtrasyon Kromatografisi ile saflaştırılması	45
Şekil 2.38 Jel filtreleme kromatografisinde kullanılan sütunun ayırma profilindeki iki uç.....	46
Şekil 2.39 Bir jel filtrasyon kolonuna dair hacim açıklaması[56].....	47
Şekil 2.40 Aktif yan zincirlerin kimyasalreaksiyonları[58].....	48
Şekil 2.41 Nükleofilik yer değiştirme reaksiyonu.....	48
Şekil 2.42 N-etilmaleimidin (NEM) sülfidril grubu ile reaksiyonu.....	49
Şekil 2.43 N-maleimidlerin protein amino grupları ile reaksiyonları [60]	50
Şekil 2.44 Amino gruplarının açılma reaksiyonları.	51
Şekil 4.1 N- (1-pirenil)maleimid (PM)	58
Şekil 4.2 Tris-HCl tamponunda(0,025M, 0,1M NaCl, 0, 005M CaCl ₂ , pH:8)hazırlanan 8x10 ⁻⁵ M PM'in absorbands spektrumu A ₂₈₀ = 1,0291; A ₃₄₄ = 1,0548; Kör: 1,994 mL Tris-HCl (pH:8) ve 6µL DMSO (%0,3) karışımı.....	59
Şekil 4.3 Tris-HCl tamponunda (pH:8) 0,025 M, 0,1 M NaCl, 0,005 M CaCl ₂ , 5x10 ⁻⁵ M PM'in zaman ayırmalı floresans spektrumu.(λ _{exc} : 337 nm; λ _{emis-max-monomer} : 382 nm; İntegrasyon süresi: 0,1 s; İlerleme sayısı: 0,25; Geciktirme süresi: 117 ns; Tekrarlama sayısı: 3.....	60
Şekil 4.4 Tris-HCl tamponunda (0,025 M, 0,1 M NaCl, 0,005 M 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} : 337 nm; λ _{emis.max} : 382 nm; İntegrasyon süresi: 0,1; Kanal sayısı: 400; Tekrarlama : 3.....	61
Şekil 4.5 Tris-HCl tamponunda 3x10 ⁻⁵ M BSA (pH:8, 0,025 M, 0,1 M NaCl, 0,005 M CaCl ₂)absorbans spektrumu	63
Şekil 4.6 Tris-HCl tamponunda (pH:8, 0,025 M, 0,1 M NaCl, 0,005 M CaCl ₂ ,) 8x10 ⁻⁵ M BSA zaman ayırmalı floresans spektrumu λ _{emis.max} : 334 nm, λ _{exc} : 295 nm ; İntegrasyonsüresi: 0,1; İlerleme sayısı: 0,25; Geciktirme süresi : 117 ns; Tekrarlama sayısı : 3.....	64
Şekil 4.7 Tris-HCl tamponunda (pH:8 ; 0,025 M, 0,1 M NaCl, 0,005M CaCl ₂) 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 verir. λ _{emis.max} : 334 nm ; λ _{exc} : 295 nm; İntegrasyonsüresi : 0,1; Kanal sayısı: 400; Tekrarlama sayısı:3.....	65
Şekil 4.8 PM ile BSA'nın konjugasyon reaksiyonu mekanizması.....	66
Şekil 4.9 Tris-HCl tamponunda (pH:8 ,0,025 M, 0,1 M NaCl, 0,005 M CaCl ₂ ,) PM-BSA kompleksi absorbands spektrumu : A _{Toplam(280 nm)} =1,4687; A _{344nm} =1,2007;Kör : Tris-HCl (pH:8).....	68
Şekil 4.10 Tris-HCl tamponunda (pH:8 0,025 M, 0,1 M NaCl, 0,005 M CaCl ₂ , pH:8) BSA standart absorbands eğrisi.....	70

Şekil 4.11 Tris-HCl tamponunda (pH:8 0,025 M, 0,1 M NaCl, 0,005 M CaCl ₂ , pH:8) PM standart absorbans eğrisi.....	71
Şekil 4.12 Tris-HCl tamponunda (0,025 M, 0,1 M NaCl, 0,005 M CaCl ₂ , pH:8) PM-BSA çözeltisinin zaman ayrımlı floresans spektrumu. λ_{exc} : 337nm; $\lambda_{emis.max}$: 384 nm(monomer); $\lambda_{emis.max}$: 462 nm (eksimer); İntegrasyon Süresi : 0,1; İlerleme sayısı: 0,25; Geciktirme süresi: 60 ns; Tekrarlama sayısı: 3.....	73
Şekil 4.13 Tris-HCl tamponunda (0,025 M, 0,1 M NaCl, 0,005 M 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} : 337 nm; $\lambda_{eksimer.max}$: 462 nm; İntegrasyon süresi : 0,1; Kanal sayısı : 700; Tekrarlama: 3.....	74
Şekil 4.14 PAA-tripsin konjugatı ile PM-BSA kompleksinin hidrolizlenmesinden elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.....	76
Şekil 4.15 Tris-HCl (0,025 M, 0,1 M NaCl, 0,005 M CaCl ₂ , pH: 8) tamponunda serbest tripsin ve PAA-tripsin konjugatıyla PM-BSA çözeltisiyle muamele öncesi ve sonrasında alınan zaman ayrımlı floresans spektrumları 2 mL. λ_{exc} : 337 nm $\lambda_{emis.max}$: 384 nm (monomer); $\lambda_{emis.max}$: 464nm(eksimer).....	77
Şekil 4.16 Tris-HCl tamponunda (0,025 M, 0,1 M NaCl, 0,005 M CaCl ₂ , pH:8) serbest tripsin etkisinde PM-BSA'dan elde edilen hidrolizata ait floresans bozunma eğrisi, bozunma verilerinin eğriye uyarlanması ve floresans ömür dağılımı (ESM, Ki-kare: 1,07). Soldaki saçıcı eğri, lamba pulslarının zamana göre değişimini vermektedir. λ_{exc} : 337 nm; $\lambda_{eksimer.max}$: 462 nm; İntegrasyon süresi : 0,1; Kanal sayısı :700; Tekrarlama:3.....	78
Şekil 4.17 Tris-HCl tamponunda (0,025 M, 0,1 M NaCl, 0,005 M CaCl ₂ , pH:8) PAA-tripsin konjugatı etkisinde PM-BSA'dan elde edilen hidrolizata ait floresans bozunma eğrisi, bozunma verilerinin eğriye uyarlanması ve floresans ömür dağılımı (ESM, Ki-kare: 0,9657). Soldaki saçıcı eğri, lamba pulslarının zamana göre değişimini vermektedir. λ_{exc} : 337 nm; $\lambda_{eksimer.max}$: 464 nm; İntegrasyon süresi : 0,1; Kanal sayısı : 700; Tekrarlama:3.....	79
Şekil 5.1 Tris-HCl (0.025 M, 0,1 M NaCl, 0.005 M CaCl ₂ , pH: 8) tamponunda serbest tripsin ve PAA-tripsin konjugatıyla PM-BSA çözeltisiyle muamele öncesi ve sonrasında alınan zaman ayrımlı floresans spektrumları 2ml. λ_{exc} : 337 nm $\lambda_{emis.max}$: 384 nm (monomer); $\lambda_{emis.max}$: 464nm (eksimer).....	82
Şekil 5.2 PM-BSA'nın ve serbest tripsin ve PAA-tripsin konjugatından üretilen hidrolizatlarının floresans ömür dağılımlarının karşılaştırılması, $\lambda_{uyarılma}$ = 337 nm, $\lambda_{max. monomer}$ = 384nm, $\lambda_{max. eksimer}$ = 464 nm, integrasyon süresi = 0,1s Tekrarlama sayısı.....	83
Şekil 5.3 PM-BSA'nın ve serbest kimotripsin ve PAA-kimotripsin konjugatından üretilen hidrolizatlarının floresans ömür dağılımlarının karşılaştırılması, $\lambda_{uyarılma}$ = 337 nm, $\lambda_{max. monomer}$ = 384nm, $\lambda_{max. eksimer}$ = 464 nm, integrasyon süresi = 0,1s[62].....	84

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 1.1 Karbon-oksijen ve karbon-azot bağ uzunlukları.....	7
Çizelge 3.1 Kullanılan kimyasal maddeler.....	52
Çizelge 4.1 Konsantrasyon değerlerine göre BSA'nın 280 nm'deki absorbands değerleri.....	70
Çizelge 4.2 PM'in konsantrasyon değerlerine göre 344 nm'deki absorbands değerleri.....	71

**FLORESANS ÖMÜR DAĞILIMI KULLANILARAK POLİAKRİLİK ASİT-
TRİPSİN KONJUGATI VE SERBEST TRİPSİNİN PROTEOLİTİK
AKTİVİTESİNDEKİ DEĞİŞİMLERİN İNCELENMESİ**

Ümmügülsüm POLAT

Kimya Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Emine KARAKUŞ

Proteinlerin polimer konjugatları, kararlılıklarını arttırmak ve uygulama alanlarını genişletmek için sentezlenir. Amino, hidroksil, karboksil, fenol vb. grupları içeren bir dizi fonksiyonel grup enzimlerin kovalent konjugasyonu için kullanılır. Enzimleri sabitlemek için sentetik organik polimerler, biyopolimerler, hidrojel, inorganik destekler ve akıllı polimerler de dahil olmak üzere birçok malzeme kullanılır ve bu uygulamalar sonucu iyi aktivite tutma ve gelişmiş termo kararlılık sıklıkla gözlemlenir. Bağlanacak polimerin kimyasal bileşimi ve fiziksel yapısı immobilize edilecek biyomakromolekülün mikro ortamını ve dolayısıyla biyolojik özelliklerini etkiler.

Floresans ömür dağılım profilleri, polimerler ile konjugasyon sonucu enzim aktivitesindeki değişiklikleri izlemek için kullanılabilir. Proteinlerin farklı bölgelerinde gömülü olan floresan gruplar farklı kimyasal ortamlara sahiptirler ve yapılarında yer aldıkları proteine özgün olarak çeşitlenen floresans ömür dağılım profilleri sergilerler. Bu dağılımların, proteazların serbest halleri ve polimer konjugatları etkisinde göstereceği değişimler arasındaki farklılıklar, protein substratın hidroliz süreci ve sentezlenen "Polimer-Proteaz" konjugatının aktivitesi ve kararlılığı hakkında faydalı bilgiler sağlayabilir. Proteinlerin denatürasyonuna son derece duyarlı olan eksimerlerle modifiye edilmiş protein substratlardan elde edilen floresans ömür dağılım profilleri,

proteazların serbest halleri ile polimer konjugatları arasındaki proteolitik farklılıkları çok daha hassas olarak belirlemede kullanılabilir.

Bu çalışmamızda; Tripsin enziminin serbest hali ile Poliakrilik asit konjugatının (PAA-Tripsin) proteolitik aktiviteleri arasındaki farklılıklar, bazik pH'da (pH:9) "N-(1-Pirenil)maleimid; (PM)" ile modifiye edilerek 464 nm civarında maximum eksimer emisyonu sergileme yeteneği kazandırılmış "Sığır Serum Albümin (Bovine Serum Albumin; BSA)"inin floresans ömür dağılımlarındaki değişimlerle incelendi. Konjugasyonun tripsin aktivitesinde önemli derecede azalmaya neden olması sonucu floresans spektrumunda eksimer emisyonunda dikkate değer bir değişim gözlemlenemedi; ancak, floresans ömür dağılımlarında büyük değişimler elde edildi. Bu sonuçlar, floresans ömür dağılımı analizinin; proteazların hidrolitik aktivitelerinin farklılıklarına göre belirlenmesinde ve birbirlerinden ayrıştırılmalarında son derece hassas bir yöntem olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Floresans ömür dağılımı, N-(1-Pirenil)maleimid, eksimer, sığır serum albümin, tripsin

ABSTRACT

INVESTIGATION OF CHANGES IN THE PROTEOLYTIC ACTIVITY OF POLYACRYLIC ACID- TRYPSIN CONJUGATE AND FREE TRYPSIN USING FLUORESANS LIFE DISTRIBUTION

Ümmügülsüm POLAT

Department of Chemistry

MSc. Thesis

Adviser: Prof. Dr. Emine KARAKUŞ

Polymer conjugates of proteins are synthesized to increase their stability and expand their application area. A range of functional groups, which can be used in the covalent conjugation of enzymes, including amino, hydroxyl, carboxyl and phenolic groups. There are many materials, including synthetic organic polymers, biopolymers, hydrogels, inorganic supports, and smart polymers, to be used to immobilize enzymes, and good activity retention, and enhanced thermo-stability are often observed. The physical structure and chemical composition of support can also influence the microenvironment of the immobilized species and consequently their biological properties. Fluorescence lifetime distributions may be useful tool to monitor the changes of enzyme activity by the conjugation with polymers. Fluorescent groups embedded in different regions of proteins have different chemical environments and exhibit varying fluorescence lifetime profiles specific to the protein they are involved in. The differences of the changes of the distributions by free and conjugated protease activity may provide useful information about the hydrolysis process of the protein substrate and the activity and stability of “Polymer-Protase” conjugate.

Fluorescence lifetime distribution profiles obtained from protein substrates modified with excimers that are extremely sensitive to protein denaturation can be used to more precisely determine the proteolytic differences between the free natural states of proteases and polymer conjugates of proteases.

In this study; the differences between the proteolytic activities of free trypsin enzyme and polyacrylic acid conjugated trypsin (PAA-Trypsin) were examined with the fluorescence lifetime distribution changes of Bovine Serum Albumin (BSA), which was gained the ability to exhibit excimer emission around the maximum 464 nm, by modifying with N-(1-Pyrenyl) maleimide (PM) at basic pH (pH 9). Because the conjugation reaction caused decreasing in enzyme activity, a significant change in excimer emission could not be observed in the resultant fluorescence spectrum, however, large changes in fluorescence lifetime distributions were obtained. These results showed that the analysis of fluorescence lifetime distribution can be used as an extremely sensitive method for determination and distinguishing of proteases from each other, according to the differences of their hydrolytic activities.

Keywords: Fluorescence lifetime distribution, N-(1-pyrenyl)maleimide, excimer, bovine serum albumin, trypsin

1.1 Literatür Özeti

1950'lerin öncesinden başlayarak, biyolojik olarak aktif moleküller işaretlenerek kantitatif veya kalitatif tayin amaçlı kullanılmışlardır. 1960 yılından itibaren de radyoaktif madde kullanarak antikör ya da antijenler işaretlenerek immünolojik kitler geliştirilmiştir. Daha sonra enzim ve floresan madde işaretli biyomoleküllerin kullanılması popülerite kazanmıştır ve klinik tanı kitleri geliştirmek için kullanılmıştır. Bu gelişmelerde çeşitli floresan işaretleyiciler kullanılmıştır. Yüksek hassasiyetli klinik tanı kitlerinin geliştirilmesinde uzun ömürlü floresan maddelerin işaretleme işleminde kullanılması ve zaman ayrımlı floresans (time-resolved fluorescence) cihazı ile analiz yapmaya olanak sağlamasının önemli bir rolü olmuştur. Floresans spektroskopisi birçok biyomolekülün yapısını aydınlatarak girdiği reaksiyonlarda takibinin kolaylaştırılması ile biyokimyasal araştırmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Zaman ayrımlı floresans tekniği ise emisyon bozunum profilleri ve zamanı dikkate alan spektrumların gözlemlenmesine olanak tanımaktadır. Bu sebeple floresans ömrü hesaplanabilir ve moleküller arası etkileşimler, çözücü etkileri gözlemlenebilir [1-6].

Substratlar üzerindeki enzimatik aktivitenin florometrik yöntemlerle belirlenmesi; substratların doğal yapısında bulunan veya substrat yapısına ilave edilen floresan moleküllerin enzimatik faaliyetler sonucu floresans özelliklerindeki değişimlerinden elde edilen fotofiziksel verilerin değerlendirilmesiyle sağlanır. Floresan maddenin emisyon şiddetindeki artma, azalma, floresans emisyonunun bozunması, emisyon spektrumunda

maksimum emisyon dalga boyundaki değişimler, floresans bozunumun zamana göre değişimi ve floresans ömrün değişimi florometrik verileri oluşturur [1-6].

Proteolitik enzimleri ve inhibitörleri canlı organizma metabolizmasında hayati öneme sahiptir. Bu önemli metabolik olayların bazıları; hücre döngüsünün kontrolü, hücrenin büyümesi ve farklılaşması, gen anlatımı, enzim modifikasyonu, immün reaksiyonlar, doku biçimlendirme ve apoptosis gibi metabolik aktivitelerdir [7, 8, 9].

Piren türevleri biyomoleküllerin biyokimyasal fonksiyonlarındaki değişim parametrelerini belirlemede ve izlemede floresan özellik olarak kullanılır. Gözlemlenen bu parametreler; biyomoleküllerin fonksiyonel grup miktarı [1], membran geçirgenliği [2], [10], [11], enzim kinetiği [12], konformasyonel değişimler [13], [14], alt birimler arası etkileşimler [15] ve alt birimlerin işlevleridir. Örnek vermek gerekirse, pirenin maleimid türevi nötral pH seviyesindeki reaksiyon koşulları altında serbest sülfhidril (-SH) gruplarının seçimli işaretlenmesinde floresan etiket olarak kullanılır [1]. Floresans ölçüm yöntemleri ile enzim etkisi sonucu substrat dinamiğindeki ufak değişimler duyarlı olarak saptanabilmektedir. Protein-protein, polimer-protein, küçük molekül-protein gibi iki biyomolekülün bağlanarak konjugasyon yapması bikonjugasyon olarak tanımlanır ve bikonjugasyon karbonhidratlar, proteinler, peptidler, enzimler, antikorlar, nükleik asitler ve oligonükleotidler gibi biyomoleküllere sentetik etiketler (izotop etiketler, floresan boyalar, afinite etiketleri, biyotin) eklenmesini de kapsar [16]. Protein-polimer konjugatları biyohibrid materyallerdir ve her iki birleşenin ayrı ayrı avantajlarından yararlanılacağı gibi bu bileşenlerin ayrı kullanılmasının getirdiği dezavantajları da önlemektedir. Mesela, proteinler polimerlerle konjugat formundayken daha yüksek kimyasal ve termal kararlılık ortaya çıkarabilmektedirler. Konjugasyonun bütün bu avantajlarına karşın bağlanma bölgelerine, katalitik merkezleri kapatarak veya bağlanma için gerekli aminoasit rezidülerini kullanarak ortaya çıkabilecek yanlış bir bağlanma, proteinin biyoaktivitesini düşürebilir veya inaktif olmasına sebep olabilir. Bu noktada doğru konjugasyon metodu ve uygun polimer seçimi çok önemlidir [18], [17].

1.2 Tezin Amacı

Bu tez çalışmasının amacı, serin proteazlar sınıfından olan sindirim enzimi tripsinin serbest halde ve yüksek moleküler ağırlıklı poliakrilikasit (PAA) ile biyokonjugasyon

formunda N-(1-pirenil)maleimid ile modifiye edilmiş BSA (PM-BSA) üzerindeki proteolitik etkilerinin farklılığını floresans ömür dağılımlarındaki değişimlerle göstermektedir.

1.3 Hipotez

1911 yılında biyomoleküllerin polimerlerle konjugasyonu biyomoleküllerin etrafında yeni bir kimyasal form oluşturur. Bu yeni yapı ile; çözücü kabının tahrip edici etkilerine ve enzimatik bozunmaya karşı daha kararlı olmayı amaçlamaktadır. Bu bilgiyle biyomoleküllerin konjugasyonları üzerine daha geniş çaplı araştırmalar yapılması gereksinim haline gelmiştir.

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 dağılım spektrumları sergiler [2]. Bu floresans ömür çeşitliliğinde, protein substrata özgü bir floresans ömür dağılımı oluşturur.

Floresans ömür dağılımları; polimerlerle konjuge olmuş biyomoleküllerin enzim aktivitesindeki değişimlerin izlenmesinde faydalı bir araç olabilmektedir. Proteinlerin farklı bölgelerinde gömülü floroforlar farklı kimyasal çevrelere sahiptir ve spesifik bir floresans ömür dağılım profili oluşturup daha sonra belirli sürelerde değişebilen floresans ömürlerini gösterir. Proteolitik enzim (proteaz) aktivitesi tarafından dağılım değişimleri protein substratının hidroliz süreci hakkında faydalı bir bilgi sağlamaktadır. Hidroliz floroforları çözücüye daha fazla maruz bırakır ve daha kısa bölgede ömür dağılım kayması yapar. Bu mekanizmayı kullanarak, serbest tripsinin ve biyokonjuge “PAA-Tripsin” in proteolitik enzim aktiviteleri arasındaki farklar, eğer iki hidrolizattan biri peptid içeriği olarak floresans ömür farklılıklarına sebep olan floroforların civarında farklı kimyasal çevreler oluşturan bir diğerinden önemli ölçüde farklılık gösteriyorsa tripsinin iki formu ile üretilen PM-BSA proteolitik hidrolizatların ömür dağılımları arasındaki fark ile gösterilebilirler.

GENEL BİLGİLER

2.1 Enzimlerin Yapısal Birimleri

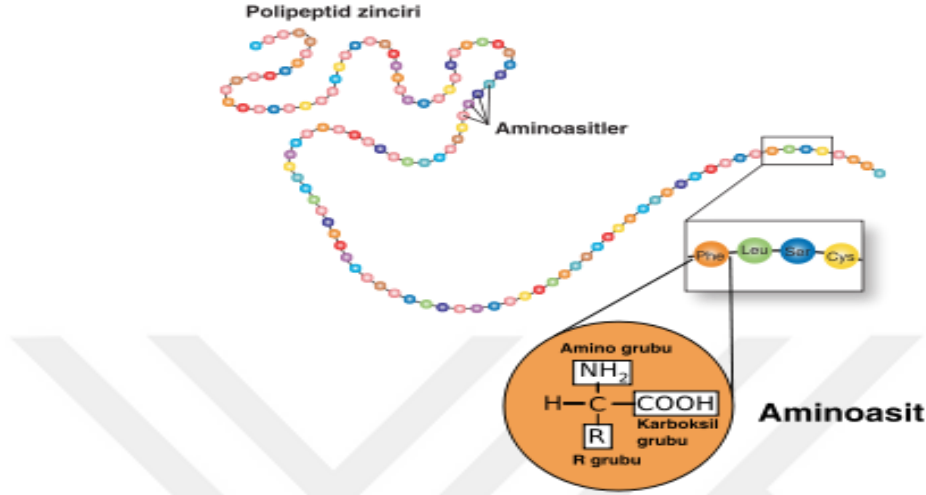
Enzimler; protein yapılı biyokatalizörlerdir. Bu sebeple enzimlerin yapısını ve fonksiyonlarını anlamak için protein yapısını ve proteinleri oluşturan aminoasitlerin yapısını ve aynı zamanda aminoasit birimlerinin diğerleriyle yaptığı özel bağlanmaların açıklanması gereklidir. Çünkü amino grup asitlerin her biri hücrede farklı ve önemli fonksiyonu olan yapıtaş molekülüdür (Şekil 2,1).



Şekil 2.1 Aminoasitlerin hücresel fonksiyonları

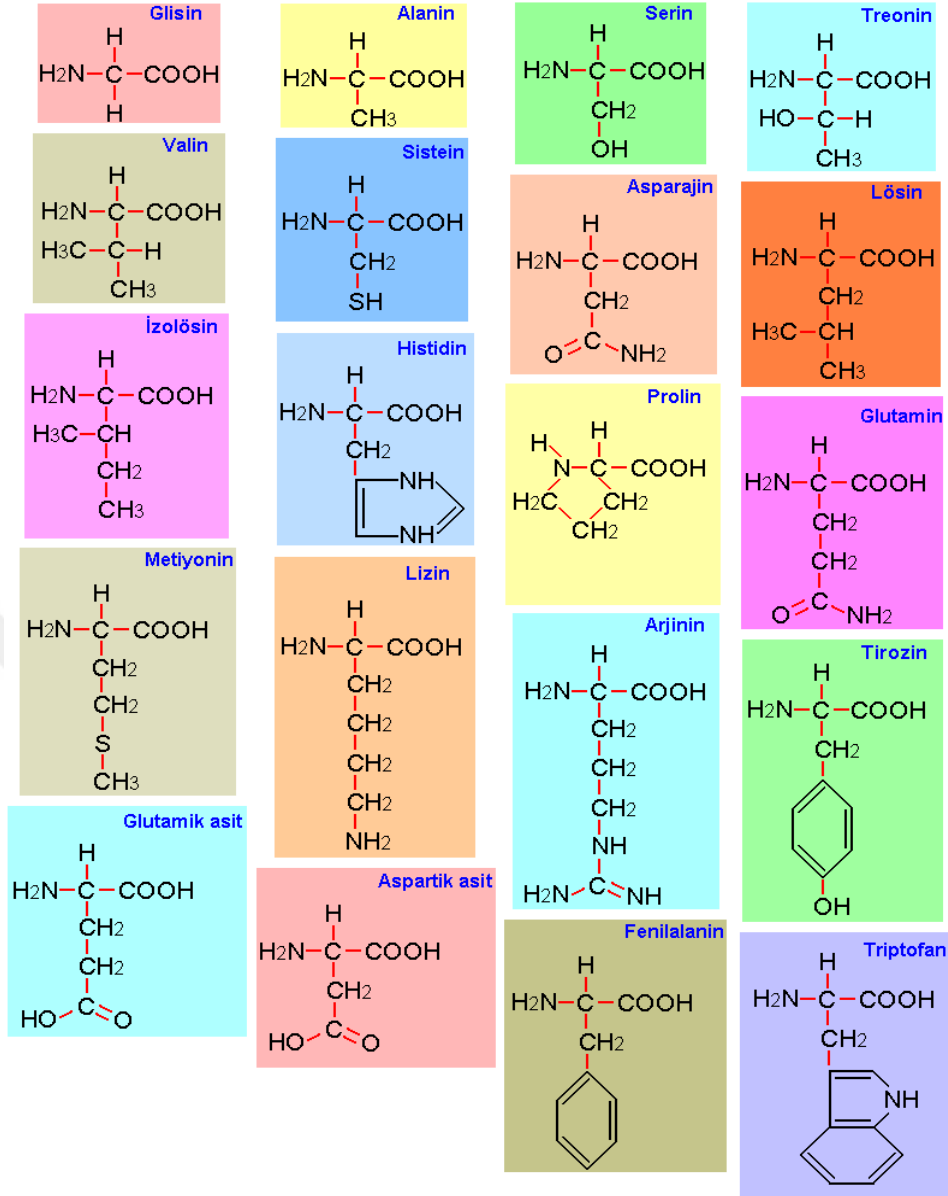
2.2 Aminoasitler ve peptid bağı

Proteinlerin yapıtaşı olan aminoasitler, merkez alfa karbon atomuna (C- α) bağlı **amino** grubu ($-\text{NH}_2$), **karboksilik asit** ($-\text{COOH}$) gruplarının ve bir radikal ($-\text{R}$) grubun bağlanmasıyla oluşan protein monomerleridir (Şekil 2.2).



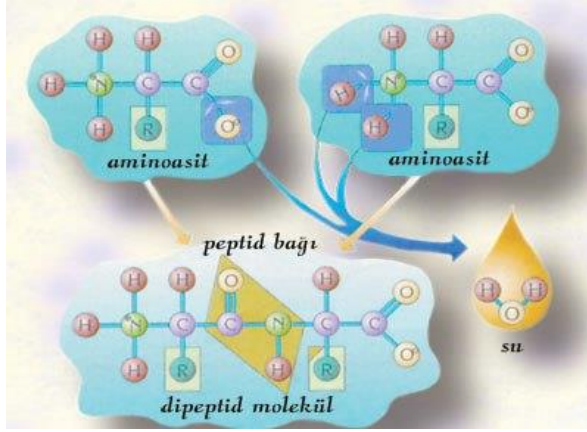
Şekil 2.2 Aminoasitlerin genel yapısı

Doğada genel olarak 300 tane aminoasit vardır, fakat bunlardan 20 tanesi proteinlerin yapısında bulunmaktadır (Şekil 2.3). Hemen hemen bütün aminoasitler D ve L- α -aminoasitleri formları olmak üzere iki formda bulunabilmektedir fakat glisin (R) grubunda $-\text{H}$ bulundurması sebebiyle istisna oluşturmaktadır. Proteinlerin yapısında bulunabilen bu aminoasitler L- α -aminasitleri olarak isimlendirilirler. Yirmi doğal L- α -aminasitlerinin yapıları (R) gruplarının polarite farklılıkları ile çeşitlilik gösterirler. Peptidlerin yapısındaki aminoasitlerin gösteriminde aminoasitler üç harf ve tek harf kısaltmalarıyla sembolleştirilirler [20].

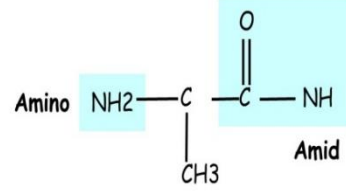


Şekil 2.3 Proteinlerin yapısını oluşturan 20 L-α-aminoasit

L-α-aminoasitleri bir dipeptit formu oluşturabilmek için bir molekül su açığa çıkarmasıyla peptid bağlarını oluşturarak aminoasitlerin α-karboksil grubu ve α-amino grubunun kondenzasyon reaksiyonu ile birbirleri arasında bağ yaparlar (Şekil 2.4, Şekil 2.5)



Şekil 2.4 İki aminoasidin peptid bağı oluşturmaları



Şekil 2.5 Amid genel yapısı

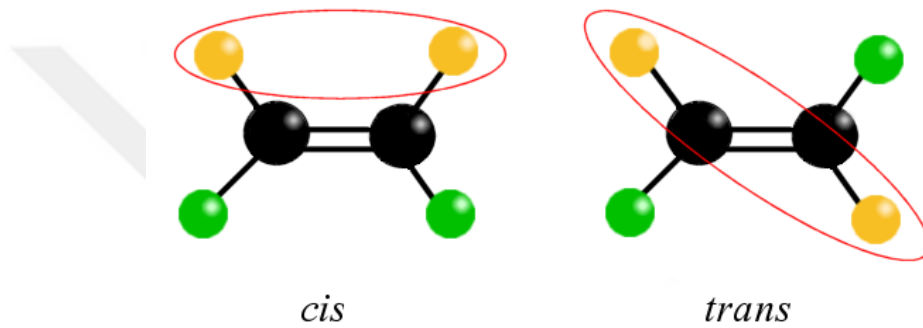
Pepditlerdeki CN ve CO tek bağların ve C = N, C = O çift bağların bağ uzunluğu ile küçük peptitler üzerinde X-ray kristalografi çalışmaları C-N ve C-O yapılarını açığa çıkarmaktadır. Peptid bağ uzunluğu dağılımı Çizelge 2.1’de gözüktüğü üzere 60% C = O ve 40% C = N dir [21].

Çizelge 2.1 Karbon-oksijen ve karbon-azot bağ uzunlukları [21]

BAĞ TİPİ	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

40% oranında peptit bağına C-N çift bağ formunun oluşturduğu kararlılık, peptit bağının rotasyon yapmasını engeller. Bu sebeple peptit biriminde altı atom merkeze peptit yüzeyini getirerek yüzeylerin düzlemsel dizilişini oluşturur. Bu düzlemsel yapılar peptitin kendini adapte edebildiği konfigürasyonların sayısı ile sınırlıdır.

Peptid bağları rezonans yapıları dolayısıyla çift bağ karakterine sahip olur ve bu çift bağ kovalent yapıdaki tekli bağdan daha kuvvetlidir. Peptit düzleminin iki stereoizomeri karbonil oksijen ve azot protonunun lokasyonuna bağlı olarak oluşturulurlar: **cis** stereoizomer, gruplar C-N bağının aynı tarafında konumlanmış ise, **trans** stereoizomer ise gruplar C-N bağının karşı taraflarında konumlandığında oluşur. Bununla birlikte, cis stereoizomer yapısındaki aminoasitlerin yan zincirlerinin yapısal konumu bütün doğal peptidlerin cis yapısından daha uygun olduğu için trans stereoizomer olarak sentezlenmesini sağlar (Şekil 2.6).



Şekil 2.6 Peptid bağındaki cis ve trans konfigürasyonları

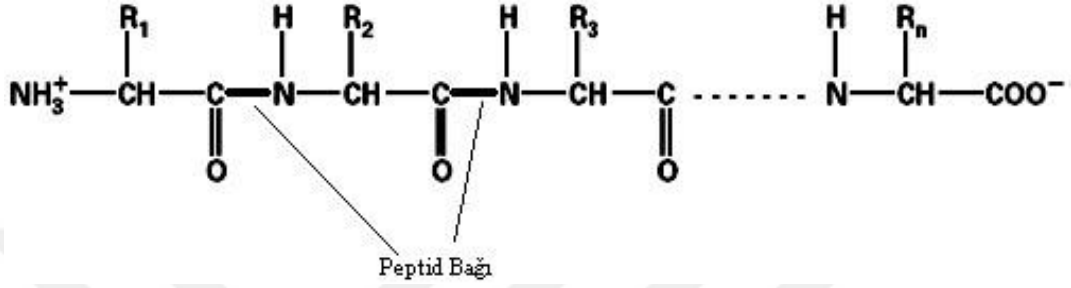
Polipeptid zincirindeki aminoasitlerin dizilişleri, protein yapısındaki toplam aminoasit sayısı ve karbohidrat ve lipit gibi protein olmayan biyomolekülleriyle kompleks oluşturabilmesi özellikleri ile bir protein molekülünün diğerinden farklı olmasına sebep olur [21].

2.3 Proteinlerin Yapısal Özellikleri

Peptidlerin biyolojik sistemlerdeki şaperonlar aracılığıyla katlanması sonucu proteinler oluşmaktadır. Her protein molekülünün doğal durumdayken karakteristik üç boyutlu forma sahip olmasına protein konformasyonu denir. Proteinlerin konformasyonu, aminoasitlerin dizilimi sırasında karşılıklı ilişkilerine bağlı olarak dört farklı yapı ile ifade edilir. Bunlar; birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapılarıdır [22].

2.3.1 Birincil (Primer) Protein Yapısı

Bir proteinin yapısı ve reaktivitesi zincirdeki aminoasitlerin sırasına bağlı olarak ve polipeptit zincirini oluşturan aminoasitlerin belirlenmesi ile tanımlanır. Birincil yapı; amino asitlerin peptit bağlarıyla birbirlerine bağlanması sonucu oluşturdukları düz zincirli yapıdır [23]. Genel yapı, dizinin sol taraftaki N-ucundan başlayarak yazılır (Şekil 2.7).



Şekil 2.7 Birincil protein yapısı [21]

Polipeptit zincirindeki aminoasitlerin dizilişlerinin sırası DNA yapısındaki genetik koda göre belirlenir. Bu genetik koda meydana gelebilecek herhangi bir değişiklik, proteindeki aminoasitlerin dizilişindeki değişime yol açar. Bir protein dizisinde, bir aminoasitte değişiklik olsa bile proteinin yapısı ve fonksiyonu üzerine etki gösterebilir [21].

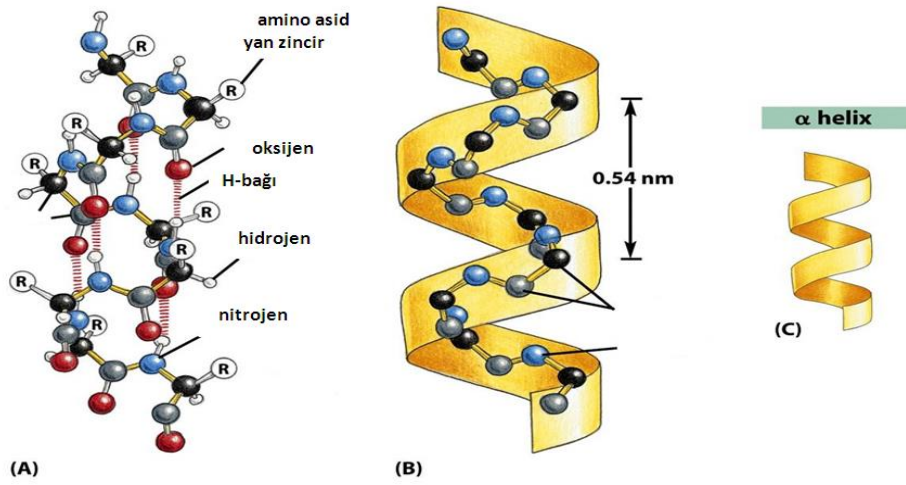
2.3.2 İkincil (Sekonder) Protein Yapısı

Proteinler iki tip ikincil yapı gösterirler. Bunlar; "α-heliks" ve "β-katlanmış tabaka" yapılarıdır. Eğer; aynı polipeptid zinciri üzerinde hidrojen bağları oluşursa α-heliks, farklı polipeptid zinciri üzerinde hidrojen bağları oluşursa β-katlanmış tabaka yapısı meydana gelir [24]. Herhangi bir proteinin konformasyonunda bu her iki yapı da büyük bir öneme sahiptir.

2.3.2.1 α-Heliks Yapısı

Sağ elin kıvrılmasıyla meydana gelen α-heliks sekonder yapı; (C=O) grubunun oksijeni ve (N-H) grubunun hidrojeni arasında uzanan hidrojen bağları ile oluşan kıvrımların yapının kararlılığını sağlamasıyla oluşur. α-heliks yapının her döngüsü 3-6 amino asit içerir ve

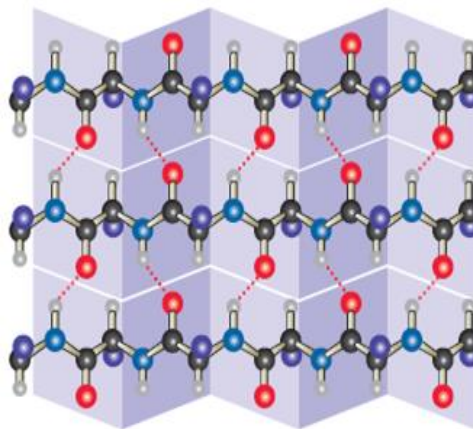
kıvrımlar arası mesafe yaklaşık 0,54 nm'dir. Her bir rezidü için yatay uzunluk ve dikey uzunluk oranı 0,15 nm/rezidü'dür (0,54nm/3,6 rezidü) (Şekil 2.8) [20].



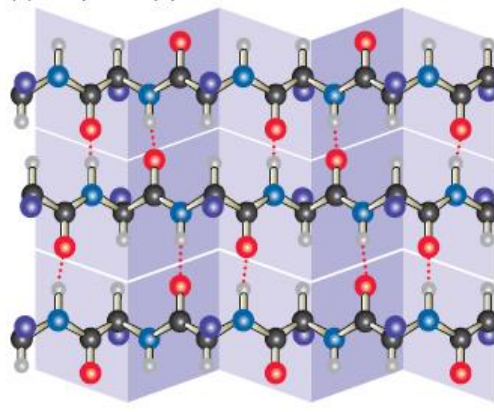
Şekil 2.8 α-heliks yapısı

2.3.2.2 β-Katlanmış Tabaka Yapısı

Yan yana paralel olarak iki veya daha fazla polipeptid zinciri katmanları karşılıklı –NH ve –CO grupları arasında kurulan hidrojen bağları ile bir araya gelerek β-katlanmış tabaka yapısını oluşturur. Komşu zincirlerin –NH ve –CO grupları arasında oluşan hidrojen bağları yapıya kararlılık kazandırır [20]. Eğer yanyana gelen polipeptid zincirlerinin –NH veya –CO uçları aynı yönde uzanmış ise; β-katlanmış tabaka yapısı paraleldir (Şekil 2.9), ya da zıt yönlü uzanıyorsa anti-paralel β-katlanmış tabaka yapısı oluşur (Şekil 2.10) .



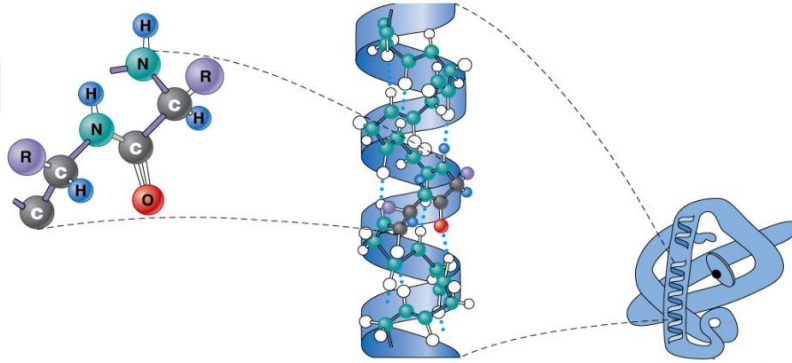
Şekil 2.9 Paralel β-katlanmış tabakaların yapısı



Şekil 2.10 Antiparalel β -katlanmış tabakaların yapısı

2.3.2.3 Üçüncül (Tersiyer) Protein Yapısı

Poliipeptid zincirinde bulunan aminoasitlerin yapısında bulunan R grupları birbirleri ile etkileşir ve bu etkileşim sonucu proteinin yapısında katlanma ve kıvrılmalar meydana gelmektedir (Şekil 2.11).

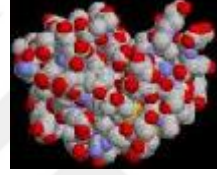
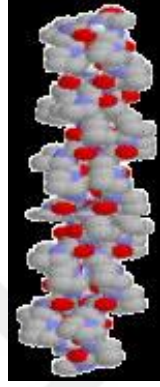


Şekil 2.11 Bir poliipeptidin üçüncül yapıda katlanması

Bu özel yapıyı proteinin üç boyutlu yapısında kararlılığını arttıran çeşitli R gruplarının kendi aralarında van der Waals kuvvetleri, hidrofobik etkileşimler, iyonik bağlar, kovalent bağlar (disülfid köprüleri) ve hidrojen bağlarıyla etkileşimler mevcuttur. Her proteinin üçüncül yapısı kendine özgüdür; bu özellik proteinlerin organizmadaki işlevlerine de özgünlük getirir yani belli işlevlere spesifik fonksiyon kazanır [20].

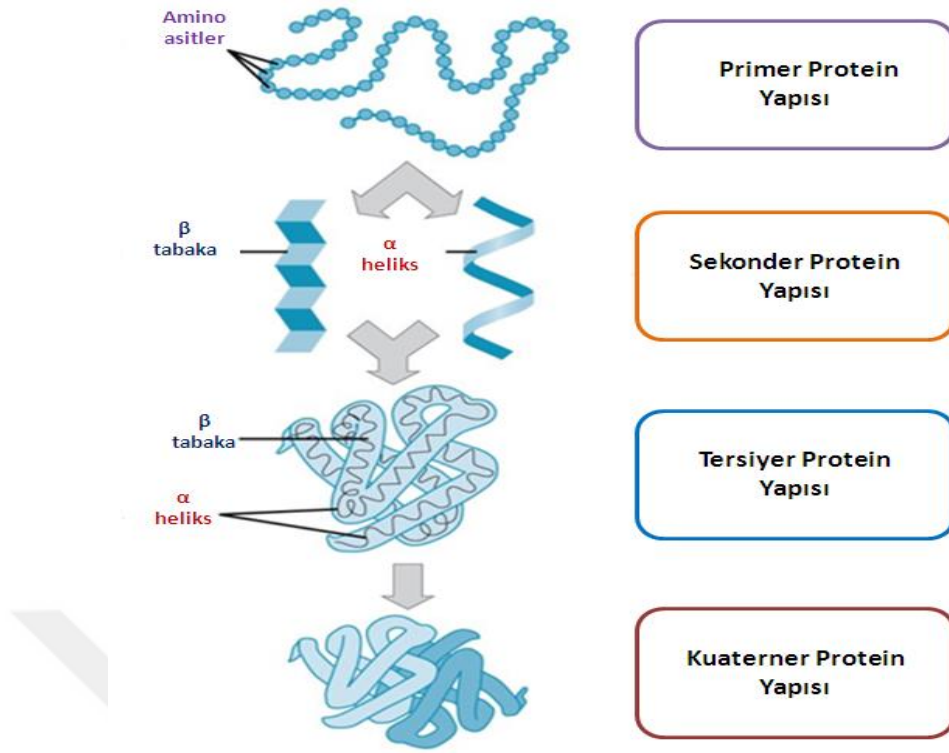
2.3.2.4 Dördüncül (Kuaterner) Protein Yapısı

Proteinlerin dördüncül yapısı; birden fazla katlanmış durumdaki polipeptid zincirlerinin kovalent bağlar, iyonik bağlar, van der Waals kuvvetleri ve hidrofobik etkileşimlerle bir araya gelerek oluşturdukları yapılardır. Dördüncül yapıdaki her bir polipeptid zincirine alt birim (subunit) denir. Alt birimlerin konumlarının farklılaşmasıyla ortaya iki yapı meydana gelir. Bu protein yapıları; fibröz ve globüler proteinlerdir (Şekil 2.12, 2.13).



Şekil 2.12 Globüler proteinler Şekil 2.13 Fibröz proteinler

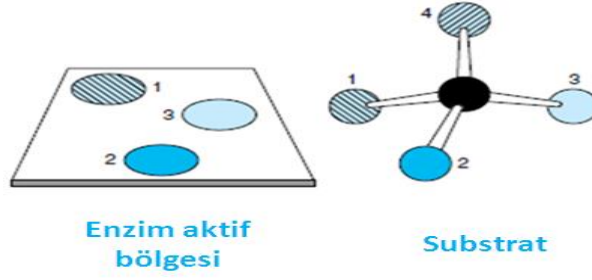
Proteinin alt birimleri birbirlerinden ayrıldığında proteinin fonksiyonu kaybolur. Alt birimler arasındaki hidrojen bağları, tuz köprüsü formasyonu ve hidrofobik etkileşimler gibi kovalent olmayan kuvvetler protein yapısının bütününde kararlılığa yardımcı olur. Kuaterner yapıya örnek vermek gerekirse: kaslara akciğerlerden oksijen taşıyan hemoglobin protein molekülüdür [20]. Proteinlerin dört yapısı (Şekil 2.14)'de gösterilmiştir.



Şekil 2.14 Protein yapısının dört şekli [26]

2.4 Enzim Yapısı ve Katalitik Etki

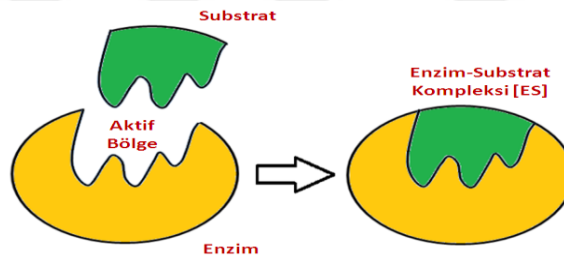
Biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen üç boyutlu özelleşmiş protein yapıları moleküllere enzim denir. Enzimlerin katalizlediği maddelere substrat adı verilir. Enzimin substratı bağladığı kısma enzimin aktif bölgesi denir. Enzimatik reaksiyonların hızındaki artışı anlayabilmek için aktif bölgenin yapısını ve bu bölgenin substrat ile reaksiyonunun incelenmesine ihtiyaç vardır. Bunun yanında, ayrıca enzimin üç boyutlu doğası bir bütün olarak katalitik aktivitesi ve substrat spesifitesi tarafından etkilenir. Enzimler aktif bölgenin spesifik yapıya sahip olmasından dolayı; hem reaksiyon tiplerine hem de substratlara özgü seçiciliği olan çok spesifik katalizörlerdir. Substrat sayısı bir enzim için bir veya birkaç tane olabilir. Enzimlerin substrat seçiciliği aktif bölgenin yapısı ile ilgilidir. Aktif bölgenin geometrisi çoğunlukla asimetric bir oyuk veya cep şeklinde olup substratın üç boyutlu yapısının aktif bölgeye spesifik bir şekilde yerleşmesini kolaylaştırır (Şekil 2.15) [20].



Şekil 2.15 Aktif merkez ve substrat arasında üç uçlu bağlanmanın düzlemsel gösterimi

Şekil 2.12’de atom 1 ve 4 özdeşdir, atom 2 ve 3 enzim üzerindeki tamamlayıcı bölgelere bağlıdır, yalnızca atom 1 bağ yapabilir. Böylece diğerlerinden stereospesifik olarak ayırt edebilmek için enzim özdeş atomların bağlanmasına izin vermektedir [19].

Enzim ve substratın aktif bölgeye bağlanma uyumunu ve kataliz mekanizmalarını açıklayabilmek için ileri sürülen beş model bulunmaktadır (Şekil 2.19). 1894’te Fischer **Anahtar-Kilit modeli** olarak bildiğimiz; enzim fonksiyonunu açıklayan ilk modelde enzimin aktif bölgesi substrat ile uyumluluk gösterir (Şekil 2.16).



Şekil 2.16 Fischer’in Anahtar-Kilit Modeli

Şekil 2.16’de gösterildiği gibi bu modelde; substrat enzimin aktif bölgesine bir kilidin anahtara uygunluk göstermesi gibi bağlanır ve sonuç olarak “enzim-substrat” ikilisi ES kompleksini oluşturur.

1930’da Haldane zayıf bağlanmaların kataliz sırasında temel unsurlar olabileceğini keşfetti ve böylece çalışma enzimatik katalizin açıklanmasında önemli rol oynadı. Haldane enzimin aktif bölgesinin geçiş halinde daha iyi bir afiniteye sahip olduğunu ve bu durumun enzimin katalitik kuvvetini ve kararlılığını arttırdığı sonucuna varmıştır. Haldane daha sonra enzimin aktif bölgesinin sabit yapıldığını ve zayıf bağ ile enzime bağlanan substratın üzerinde meydana gelen bir gerilmeden dolayı bir bağının

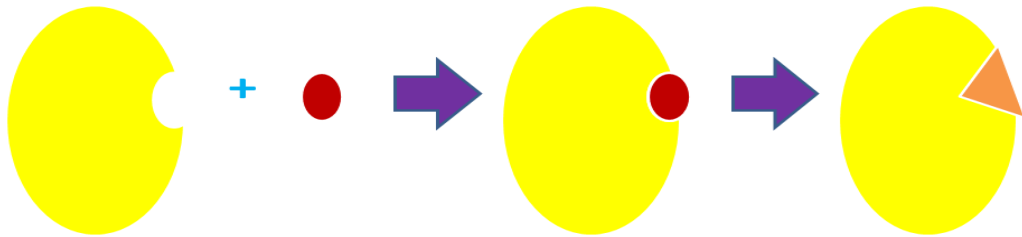
zayıflayacağını, böylelikle substratın aktif bölgeye uyumlu olarak şekil değişimine uğrayacağı öngörüsüyle geçiş hali tamamlayıcılık modeli'ni ortaya attı (Şekil 2.17).



Şekil 2.17 Haldane'ın geçiş hali tamamlayıcılık modeli'ne göre ES kompleksinin oluşumu

1948'de Pauling, artan geçiş hali kararlılığının ürün oluşumunu hızlandığını ileri sürdü ve bu hipotez; benzer geçiş hal yapısına sahip ve farklı kararlılıkta komplekslerin kullanıldığı deneylerle doğrulandı.

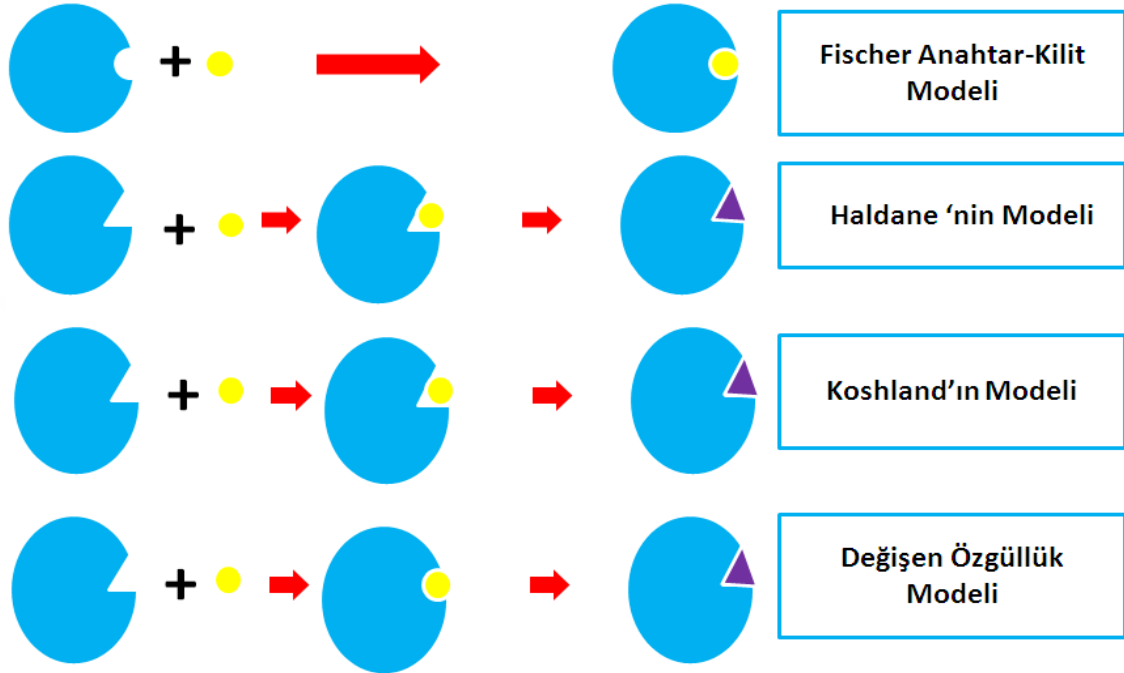
Daha sonra 1960'da Koshland Helen Haldane'in modelinde değişiklik önerisinde bulundu. Yeni modelde (Koshland/ Haldane modeli) temel halde enzim bağlanmasından sonra enzim aktivitesinde artış olur. Bu fikrin temeli bağlanma esnasındaki mutlaka birbirinden etkilenecek olan enzim ve substrat arasındaki kimyasal gücün ortaya çıkarılmasını geliştirmektir. Bu modellerin enzim spesifikliği açısından bazı yaklaşımların olmasına rağmen katalitik reaksiyon hızının nasıl arttırılacağına dair net bir fikir ortaya koyamadılar. 1993'te Billy Mark Britt, adı **Değişken Özgüllük Modeli** olan yeni bir model ileri sürdü (Şekil 2.18).



Şekil 2.18 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

Bu modele göre; doğal enzim (native enzyme) (fizyolojik basınç, sıcaklık ve pH koşullarında katlanarak doğal halini alan enzim) Fischer'in anahtar-kilit modelindeki gibi substratına tam olarak uyumluluk gösteren değişmemiş aktif bölgesinde, substratı ile

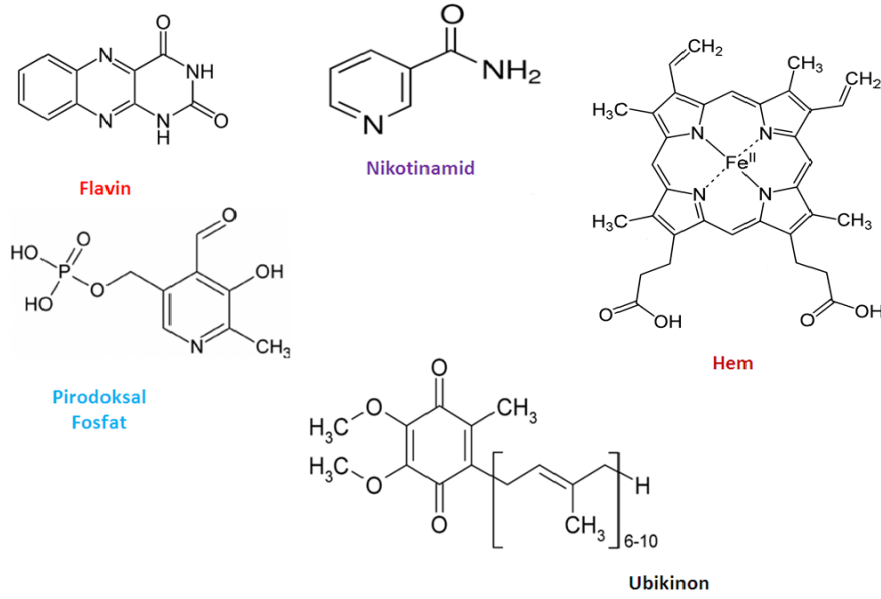
kurduğu zayıf bağlar sayesinde ES kompleksini oluşturarak katlanmış formuna ulaşır. Bu bağlanma tüm enzim kütlesinin üç boyutlu yapısının oluşmasına yol açan bir burkulma hareketini tetikler. Aktif bölgenin şekli yalnızca bu burulma hareketi ile değişirken, temel halde substratın seçiciliği aynı zamanda konformasyonel değişim sonucu geçiş haline adapte edilir (Şekil 2.19) [27].



Şekil 2.19 Enzim Kataliz Modelleri

Bazı enzimler tek başlarına katalizör olarak reaksiyonlarda yer alabilirler fakat bazıları katalitik aktiviteyi sağlayabilmek için protein yapısında bulunmayan ve **kofaktör** adı verilen yardımcı maddelere ihtiyaç duyarlar (Şekil 2.20) .

İki grup kofaktör vardır, bunlar; Mg^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} vb. gibi metal iyonları ve **koenzim** adı verilen küçük organik moleküllerdir. Enzimin yapısına kovalent bağlarla katılan koenzimlere **prostetik grup** denir.



Şekil 2.20 Bazı enzim kofaktörleri

Enzim eğer kofaktöründen ayrı ise **apoenzim** olarak, kofaktöre bağlı ise **haloenzim** olarak isimlendirilir. Koenzim ve kofaktör her ikisi de enzimin kararlılığını ve etkisini arttıran önemli birleşenlerdir [26].

2.5 Enzimlerin Adlandırılması

Enzimlerin isimlendirilmesi kataliz ettiği reaksiyonun veya enzimle etkileşime giren substratın adının sonuna “az” eki getirilerek yapılır. Örnek vermek gerekirse; dehidrogenaz, fosforilaz (fosfor ekleyen enzim), fosfataz (fosfat bağına hidroliz eden enzim), peptidaz, glikozidaz, laktaz, lipaz, tripsin, pepsin ve kimotripsin gibi bazı enzimlerin de spesifik isimleri vardır [26].

2.6 Enzimlerin Sınıflandırılması

Enzimler genel olarak 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 altı grupta sınıflandırılmıştır. Bu gruplar etki ettikleri reaksiyon tipleri dikkate alınarak adlandırılıp, numaralandırılmıştır [27]. Bu grupların alt grupları da EC'den sonra 4 sayının arka arkaya yazılmasıyla kısaltılarak belirtilmiştir.

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

Redoks reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir. Genellikle -dehidrogenaz ve -redüktaz olarak bilinirler. Elektron, O₂ ve hidrojen alıcısı olarak görev alırlarsa oksidaz ismiyle bilinir.

Örnek:

(a) EC 1.1.1.27 – laktat dehidrogenaz

(b) EC 1.4.1.9 - lösin dehidrogenaz (indirgeyici aminasyon)

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

Transferazlar verici üzerindeki bir fonksiyonel grubun alıcı substrat molekülüne taşınmasını katalizleyen enzimdir. Aşağıda da gösterildiği gibi grup transferi katalizlenir.



X: transfer edilen grup;

Enzimin adı: X-transferaz

Örnek:

(a) EC 2.1.1.20 Glisin-N-metiltransferaz

(b) E.C.2.1.2 Hidroksimetil(-CH₂OH) transferazlar

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

Aşağıdaki reaksiyonda da gösterildiği gibi suyun katıldığı kondenzasyon ve parçalanma reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir. Glikozid, ester, peptid vb. bağları parçalar. Etki ettikleri substratın sonuna -az eki getirilerek adlandırılırlar.



(a) EC 3.1.1 lipaz

(b) EC 3.5.5.1 nitrilaz

2.6.4 Ana Sınıf 4 - liyazlar (E.C.4)

Liyazlar substratlarından bazı grupları elimine ederek çift bağ oluşumunu katalizleyen enzimlerdir; bunlar oksidatif veya hidrolitik olmayan bir çeşit eliminasyon mekanizmalarıdır. 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. Zıt reaksiyonu çift bağın olduğu yere grup eklenmesini sağlar.

Örnek:

(a) EC 4.3.1.1 Aspartat amonyak liyaz (aspartaz)

(b) EC 4.1.1.12 L-Asp-β-dekarboksilaz

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

Moleküllerde atomlarının geometrik veya yapısal yer değişikliği yapmasını katalizleyen enzimlerdir.

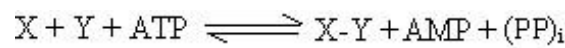
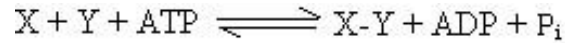
Örnek:

(a) EC 5.3.1.1 Trioz fosfat isomeraz

(b) EC 5.1.1.1 Alanin rasemaz

2.6.6 Ana Sınıf 6 - Ligazlar (E.C.6)

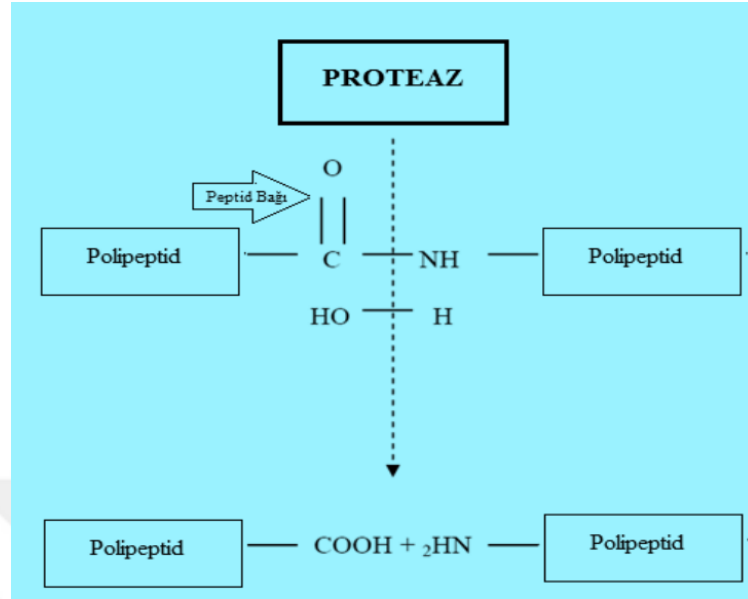
Bu enzimler ATP'nin ya da diğer nükleozid trifosfatların kırılması sonucu açığa çıkan bağ enerjisini kullanarak birleşen yeni bağların sentezini katalizlerler.



2.7 Proteazlar (E.C.3.4)

Proteolitik enzimler canlıların fizyolojik ve patolojik olaylarının birçoğunun regülasyonunda önemli bir rol oynamaktadır ve bilim literatüründe peptidaz, proteinaz ve proteaz olarak bilinmektedir. Proteolitik enzimler proteinlerin ve peptidlerin peptid bağlarının hidroliz reaksiyonlarını katalizler. Proteoliz olarak adlandırılan peptid

bağlarının proteazlar tarafından hidrolizi Şekil 2.21’de görüldüğü gibidir. Proteolizin ürünleri protein, peptid fragmentleri ve serbest aminoasitlerdir [28].

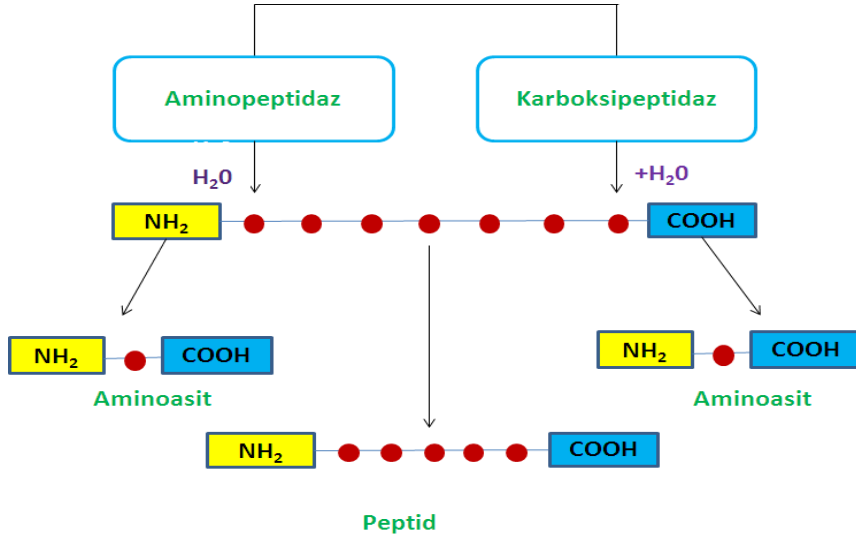


Şekil 2.21 Proteoliz olayı (peptid bağlarının proteazlar tarafından katalizi)

EC sisteminde, ekzopeptidazlar (E.C 3.4.21-99) ve endopeptidazlar (E.C 3.4.11-19) olmak üzere iki gruba ayrılmışlardır [29].

2.7.1 Ekzopeptidazlar

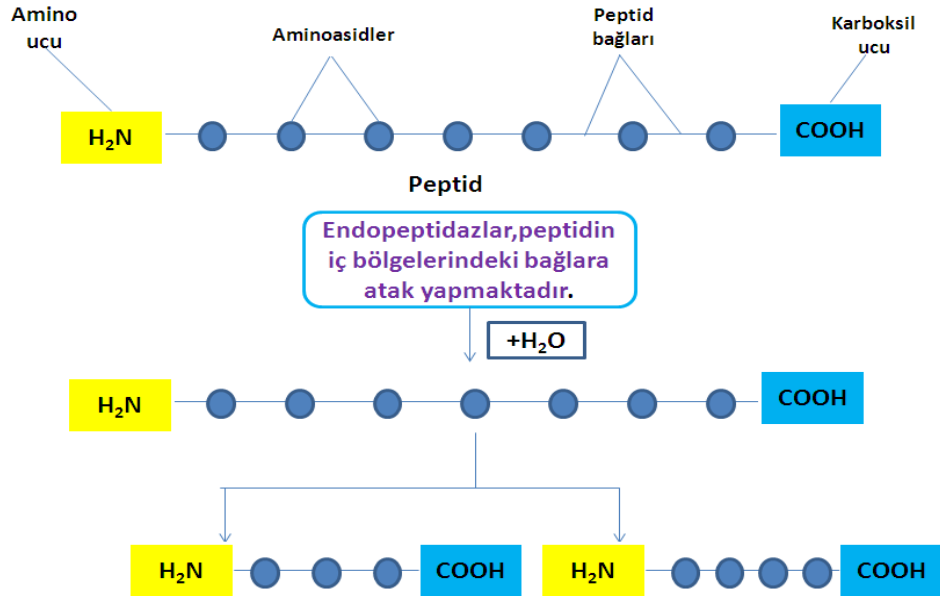
Ekzopeptidazlar; polipeptid zincirlerinin uçlarındaki serbest amino (N) ya da karboksil (C) gruplarına atak yapmaktadırlar. Ekzopeptidazlar etki ettikleri protein zincirinin sonundaki grup serbest amino grubu ise aminopeptidaz, serbest karboksil ise karboksipeptidaz, olarak adlandırılmaktadır (Şekil 2.22).



Şekil 2.22 Ekzopeptidazların mekanizması

2.7.2 Endopeptidazlar

Endopeptidazlar, polipeptid zincirlerinin iç bölgelerindeki peptid bağlarını kırarak etkilerini gösterirler (Şekil 2.23). Serbest C ya da N grubunun bulunması enzimatik aktivite üzerine negatif etkiye sebep olur. Endopeptidazlar metallo, serin, aspartik ve sistein proteazlar olmak üzere dört gruba ayrılır.

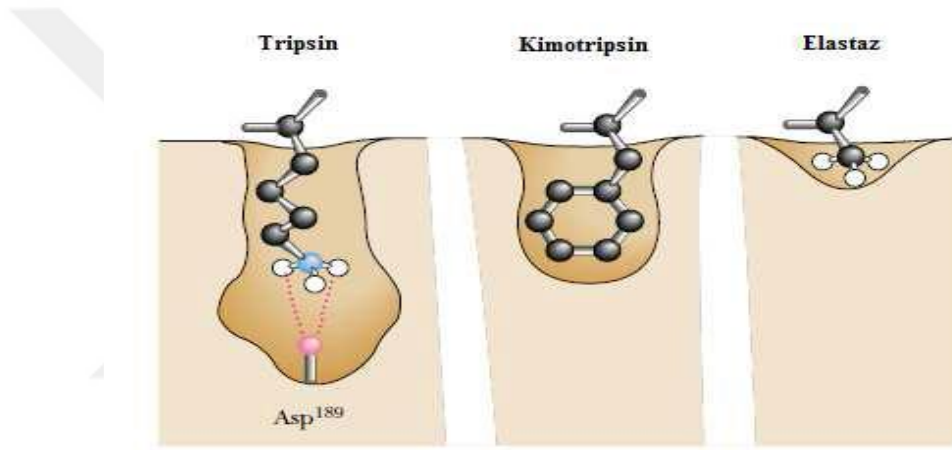


Şekil 2.23 Endopeptidazların mekanizması (Daha küçük iki farklı peptid oluşumu)

2.8 Serin Proteazlar

Serin proteazlar, aktif bölgelerinde serin amino asit içerirler. Serin proteazlar substrat seçiciliğine göre 3 gruba ayrılır (Şekil 2.24);

- Tripsin benzeri serin proteazlar; pozitif yüklü aminoasitten sonraki peptid bağına hidrolizlerler.
- Kimotripsin benzeri serin proteazlar; büyük hidroforobik aminoasitten sonraki peptid bağına hidrolizlerler.
- Elastaz benzeri serin proteazlar ise küçük hidroforobik aminoasitten sonraki peptid bağına hidrolizlemektedirler [30].



Şekil 2.24 Tripsin, Kimotripsin ve elastazın substrat bağlayıcı cepleri [31]

2.8.1 Tripsin (E.C.3.4.21.4)

Tripsin (3.4.21.4) serin proteaz ailesine sahip endopeptidaz sınıfı bir enzim olup, proteinlerin arginin ve lizin rezidülerinin karbonil uçlarının hidrolizinden sorumludur [32]. Tripsin, 6 disülfüt bağlarıyla birbirine bağlı olan 12 sistein ve 229 amino asit rezidüsü içeren monomerik bir protein yapısına sahiptir. 23,8 kDa moleküler ağırlığına sahiptir. Tripsinin izoelektrik noktası 10,5'tir ve bu yüzden alkali bir sindirim proteazıdır [33]. X-ray ile analiz edildiğinde tripsinin yaklaşık olarak 55% α -tabaka, 13% β -heliks yapısından oluştuğu gözlemlenmiştir [34].

Tripsin serin proteaz ailesinin üyesidir [35]. Bu enzim ilk hayvanların pankreas sıvısından izole edildi ve daha sonra birçok doku ve organizmalardan da elde edildi. Tripsinin başlıca

aktivitesi bağırsaklardaki gıda sindirimidir [36]. Tripsine gıda sindiriminde ihtiyaç vardır çünkü gıda alımında ve gıdanın sindirime uğramasında iletim görevi görür. Tripsin sindirimde gerekli olan pankreatik enzimlerin aktivasyonunda önemli bir fonksiyon gösterir [32].

Tripsin pankreasta, tripsinin inaktif formu olan tripsinojen olarak bulunur ve bağırsak mukozasına salgılanır. Tripsinojen enterokinaz enzimi ile aktive edilerek tripsine dönüşür [32]. Tripsin zimojen granüllerinden depolanan pankreatik akınar hücrelerinden yayılır [32], [37]. Enterokinaz enzimi (Asp) 4-Lys dizisini propeptitten ayırır ve aktif tripsini ayırmak için lizin rezidüsünden sonra bölünmeyi sağlar.

Propeptiti ortadan kaldırmak aktif bölgenin yapısını oluşturan; konformasyonel değişikliklere sebep olur. Tripsinin kendi zimojen aktivitesi vardır. Tripsin aktive edildiği zaman; daha önceden zimojen olarak sentezlenen diğer sindirim proteazlarını da aktive eder [32].

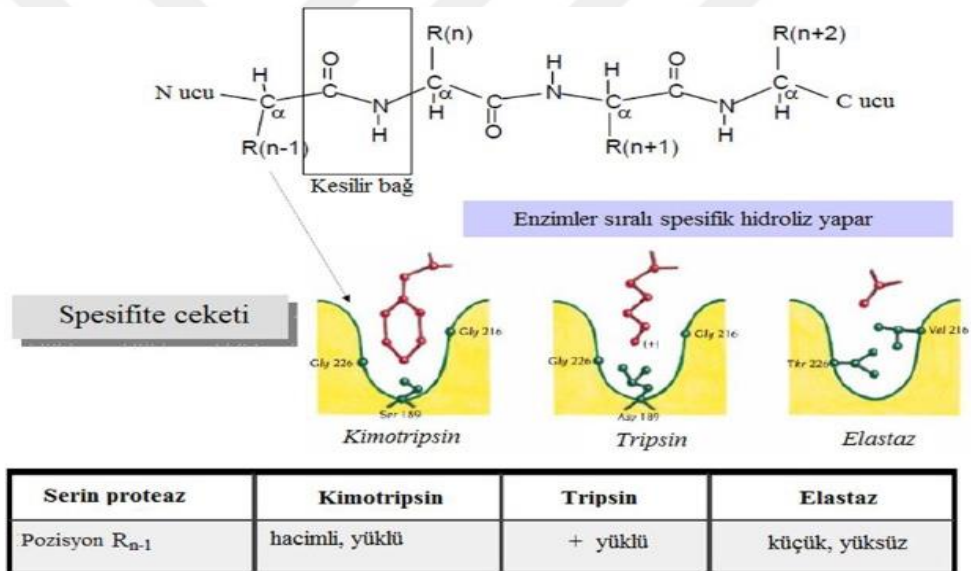
2.8.2 Kimotripsin (E.C.3.4.21.1)

Serin proteazların bir sınıfı olan kimotripsin, pankreatik akınus hücrelerinde, kimotripsinojen olarak bilinen aktif olmayan bir öncü yapı olarak sentezlenir. Bu öncül yapı; tripsin tarafından iki ayrı parçaya bölünür fakat bu meydana gelen iki ayrı parça disülfid (-S-S-) bağı ile birbirine bağlı oldukları için birbirlerinden tam olarak ayrılmamıştır. Bu iki çeşit trans-proteoliz olarak adlandırılan ortak bir hidroliz mekanizması ile birbirlerine küçük peptid fragmanlarının ayrılması birbirlerini aktive ederler. Kimotripsin enzimi ; hidrolitik olarak triptofan, tirozin, fenilalanin, lösin ve metiyonin amino asitlerinin karboksilleri ile peptidleri parçalamaktadır [7], [8], [9].

2.9 Serin Proteazlarının Katalitik Mekanizması

Aktif bölgede serin amino asidi büyük bir öneme sahip olduğu için proteaz ailesinin en önemli üyesi bakımından serin proteaz olarak adlandırılır. Serin proteazlar, polipeptit zincirindeki bağlanma alanını içeren spesifik bir bölgeyi bağlayarak ve tanımlayarak, peptit bağlarını kırma işlevi görür [38]. Yapısal özelliklerine göre serin proteazlar kimotripsin benzeri, subtilisin benzeri ve karboksipeptidaz II benzeri olmak üzere üç

sınıfta incelenir. Bu üç sınıf, ikincil ve üçüncül protein yapıları açısından birbirinden oldukça farklıdır, fakat her sınıf, aktif bölgesinde serin, histidin ve aspartat amino asitlerini içerir ve ortak bir katalitik mekanizma kullanır. Bütün bu enzimler, aynı açıl transfer mekanizmasını kullanarak peptid ve ester bağı hidrolizini yaparlar [18]. Etki mekanizmaları en iyi anlaşılan serin proteaz enzimleri; kimotripsin, tripsin ve elastazdır. Her bir enzim farklı amino asit rezidülerinin bulunduğu peptid bağlarını parçalar. Bu olayın nedeni tamamen enzimin aktif bölgesinden kaynaklanır. Örneğin; tripsin, arginin ve lizin amino asit rezidülerinin bulunduğu peptid bağına parçalarken, kimotripsinin aktif bölgesinde bulunan hidrofobik cep bu enzimin fenilalanin rezidüsünün bulunduğu peptid bağına spesifik olmasını sağlamaktadır. Elastaz ise nötral amino asitlerin oluşturdukları peptid bağlarının hidrolizini katalizlemektedir (Şekil 2.25).

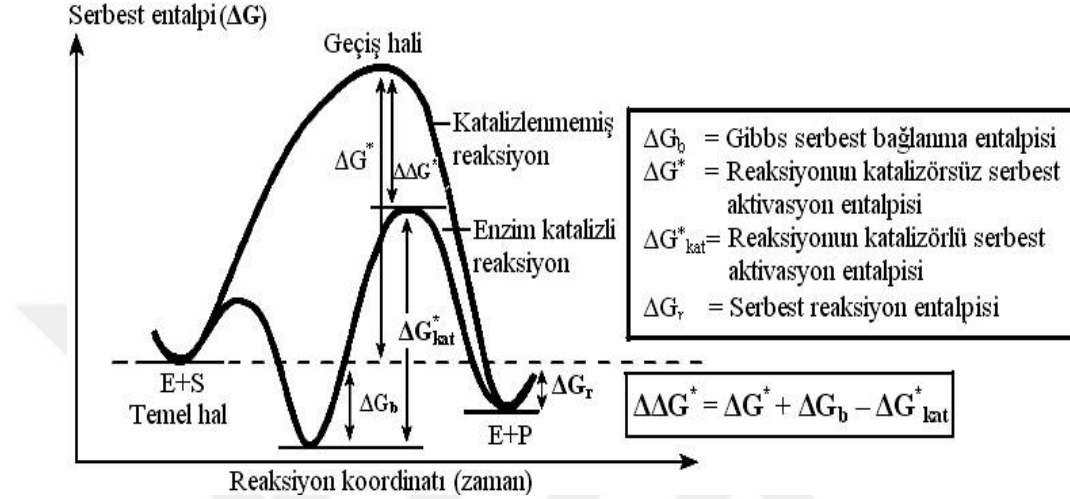


Şekil 2.25 Serin proteazların (tripsin, kimotripsin ve elastaz) spesifisiteleri

2.10 Enzim Kinetiği

Enzim kinetiği substratlar ile enzimlerin etkileşimleri ve enzimlerin mekanizması hakkında bilgi verir. Birçok kimyasal reaksiyon; tepkimeye giren maddelerin ürün oluşumu sırasında belirli bir aktivasyon enerjisi gerektiren geçici ve kararsız ara ürün olarak meydana gelen aktifleşmiş kompleksler üzerinden yürür. Reaksiyonlarda katalizör olarak enzim kullanılması durumunda aynı tepkime sırasında substratlarıyla oluşturdukları ES ara hal kompleksleriyle ilerler. Reaksiyonun ürün oluşumu bu

aktivasyon enerjisi farkının (ΔG^*) aşılmasına bağlıdır. Denge reaksiyonlarında aktivasyon enerjisi oldukça küçüktür ve reaksiyon çevre sıcaklığı ile ilerler. Enzimatik reaksiyonlarında oluşan ES kompleksleri katalizör olarak enzim kullanıldığından dolayı; aktivasyon enerjisi azalır, reaksiyon hızı artar ve reaksiyonun ürüne dönüşmesi daha düşük sıcaklıklarda meydana gelir (Şekil 2.26) [23], [25].



Şekil 2.26 Enzim katalizli bir reaksiyonun zamana göre serbest entalpi değişimi

1902’de Brown isimli bilim adamı, enzim katalizli reaksiyonlar için aşağıdaki reaksiyon mekanizmasını önerdi:



Enzimin; ürüne (P) olan ilgisinin substrata (S) olan ilgisi kadar fazla olamayacağı düşünüldüğünde, ürünlerden ES kompleksinin oluşum hız sabiti k_{-2} ’nin ihmal edilebilecek kadar küçük olduğu ($k_{-2} \ll k_2$) varsayılabilir ve reaksiyon denklemi aşağıdaki gibi sadeleştirilerek yazılabilir:



Eşitlik 2.2’deki ifadeyi açıklayabilecek iki önemli kinetik modelimiz vardır [39], [40] :

2.10.1 Hızlı Dengelenme Modeli

Sıfır derece reaksiyonlar haricindeki reaksiyon hızı, reaksiyona giren maddelerin konsantrasyonları ile orantılıdır. Hızlı dengelenme modeli 1903'te ilk olarak Henri tarafından önerildi ve ardından son şekli 1913'te Michaelis ve Menten tarafından geliştirilerek verildi. Bu modele göre tepkimeye giren maddeler (E+S) ve ES kompleksi arasında hızlı bir denge kurulur ve reaksiyon kısa sürede kararlı hale geçer. Bu denge reaksiyonunda iki yönlü reaksiyon hızlarını birbirine eşitlersek, [39]

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

ifadesini elde ederiz.

ES kompleksinin ileri yönde ürünlere dönüşüm reaksiyonu, geri yönde serbest enzim ve substrata dönüşüm reaksiyonundan 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.

ES kompleksinin ayrışma sabiti K_s aşağıdaki gibi yazılmıştır [39], [40].

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

E: Toplam enzim, S: Toplam substrat, E_s : Serbest enzim, S_s : Serbest substrat

ES: Enzimsubstrat kompleksi.

Substrat enzimden fazla miktarda olduğu için serbest substrat konsantrasyonunun toplam substrat konsantrasyonuna yaklaşık olarak eşit olduğu varsayılır ($[S_s] \approx [S]$). Serbest enzim miktarı, enzimin toplam miktarı ile kompleks içindeki bağlı enzim miktarı arasındaki farka eşittir.

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

2.5 no'lu denklemdeki $[E_s]$ terimini 2.4 no'lu denklemde yerine yazacak olursak;

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

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

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

İfadesini elde ederiz.

Eşitlik 2.2’de ES kompleksinin ürün haline getirildiği hız belirleme aşamasına göre tüm reaksiyonun hızı,

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

Eşitlik 2.7’deki [ES] kompleksi ile eşitlik 2.8’deki kompleksin yerini değiştirirsek;

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

eşitliğini elde ederiz.

Eğer reaksiyon ortamında tüm enzim miktarı substrat miktarını doyuracak kadar mevcutsa; toplam enzim konsantrasyonunun [ES] kompleksi konsantrasyonuna eşit olacağı düşünülür. ([E] = [ES]) ve oluşan 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 yazarsak;

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

İfadelerini elde etmiş oluruz.

2.10.2 Kararlı Hal Modeli

Briggs ve Haldane 1925 yılında, [ES] kompleksi biriktikçe ES’nin oluşma hızının belirli bir sürenin ardından hem ileri yönde ürünlere doğru hem de geri yönde reaktiflere doğru bozunma hızlarının toplamıyla eşitlenerek dengeleneceğini; yani [ES] kompleksi konsantrasyonunun reaksiyon süreci içinde zamanla belirli bir miktarda sabitlenerek kararlılığa ulaşacağını ve böylece ES konsantrasyonu değişiminin zamana göre sıfırlanacağını $[(d[ES]/dt) = 0]$ farketti. Bu yüzden bu model, Henri Michaelis-Menten modelindeki $k_2 \ll k_{-1}$ olayının gerçek olmadığını ortaya koymuştur.

Kararlı hal modelini eşitlik 2.2 baz alınarak [ES] kompleks oluşum hızı ;

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

[ES] kompleksinin yıkım hızı ;

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

Eşitliğinden elde edilir. Denge halinde reaksiyonun oluşum ve yıkım hızları eşitleneceğinden dolayı

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

olur. Bu eşitlik [ES] kompleksi için,

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

ifadeler düzenlenecek olursa;

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

Eşitlik 2.15’de eşitlik 2.16’yı yerine yazarsak;

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

Reaksiyon denge halindeyken substrat tüketimi çok düşük miktarda olacağından dolayı; serbest substrat konsantrasyonunun toplam substrat konsantrasyonuna yaklaşık olarak eşit ($[S_s] \cong [S]$) olduğu kabul edilir. Ayrıca E_s eşitlik 2.5’te göz önünde bulundurularak eşitlik 2.17’de yerine yazılırsa;

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

şeklinde tekrar yazılabilir. Eşitlik 2.18 reaksiyon hızını belirleyen basamağa göre oluşturduğumuz eşitlik 2.8 ‘deki hız denkleminde yerine yazılırsa;

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

eşitlik 2.19'daki k_2 yerine, kataliz basamağı hız sabiti olduğunu gösteren k_{cat} 'i yazarsak;

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

bu ifadenin kesirli hali; substrat konsantrasyonu sonsuz kabul edildiği zaman 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 elde edilen eşitliği 2.20'de yerine yazdığımız zaman eşitlik 2.10'daki maksimum hız ifadesini elde etmiş oluruz.

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

Eşitlik 2.22 ile eşitlik 2.23'ü birleştirirsek elde edeceğimiz eşitlik Henri-Michaelis-Menten modeline çok benzer olacaktır.

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

Eşitlik 2.23 kararlı hal enzim kinetiği modelinin temel eşitliğidir.

Eşitlik 2.24'de V hızının maksimum hızın yarısını ulaştığını gösteren;

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

Eşitliği elde ederiz. Bu eşitliği eşitlik 2.23 ile birleştirirsek;

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

Bu eşitliği de sadeleştirirsek;

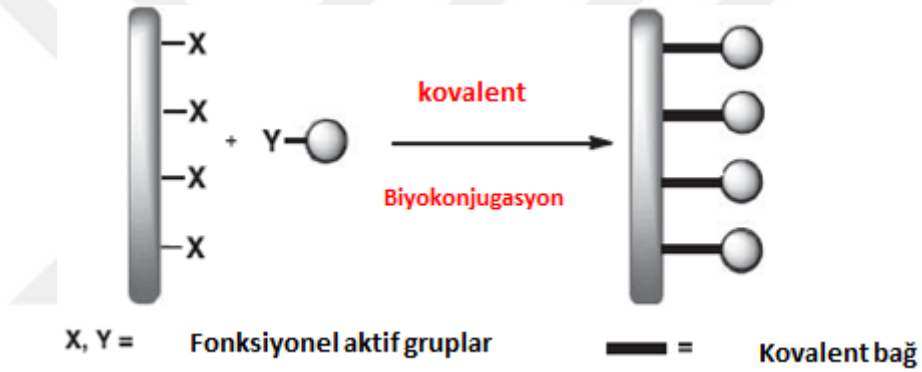
$$K_m = [S] \quad (2.26)$$

ifadesini elde ederiz. Bu sonuç; maksimum hızın yarısına karşılık gelen substrat konsantrasyonunun K_m değerine eşit olduğunu gösterir [18], [19], [26], [40].

2.11 Biyokonjugasyon

Biyokonjugasyon kimyasında kovalent reaksiyon; iki biyomolekölün birbirleriyle veya biyomoleküllerle küçük moleküllerin kovalent bağ ile bağlanarak yeni ve önemli moleküllerin oluşturulması için kullanılır (Şekil 2.27).

Reaktif moleküller (proteinler, peptidler, karbonhidratlar, nükleik asitler vb.) spesifik reaktif fonksiyonel gruplara sahiptir (karboksilik asitler, aldehytler, ketonlar, aminler, tiyoller ve alkoller). Bu süreçte elde edilen ürünler protein-protein, polimer-protein ve karbohidrat-protein yapılı olduğu için bu prosese biyokonjugat denilir.



Şekil 2.27 Biyokonjugasyon olayının şematik gösterimi

Biyokonjugasyon, kimya ve moleküler biyoloji arasında geniş bir bilim dalıdır ve günümüzde de gelişmekte olan bir araştırma alanıdır [16]. Biyokonjugasyon prosesi yeni biyomoleküllerin keşfedilmesine ve kompleks biyolojik süreçlerin açıklanmasına olanak tanımıştır ayrıca tıpta ve malzeme bilimlerinde de geniş çalışma alanına sahiptir. Tıbbi alanda ilaçların gelişimi; bazı hücre ve dokuların hastalık durumlarına karşı tedavi edici etkinliği açısından büyük oranda spesifik biyokonjugasyona bağlıdır. Bu nedenle, birçok ilaç firması, gelecekteki ürünlerini tasarlamak ve rekabette öncü olabilmek için biyokonjugasyona bağımlı çalışmalara ağırlık verdi [17]. Biz de bu çalışmamızda polimer-protein ve küçük molekül-protein biyokonjugatlarını kullandık. Kısaca polimer-protein ve küçük molekül-protein biyokonjugatını uygulama amacımızı açıklayacak olursak;

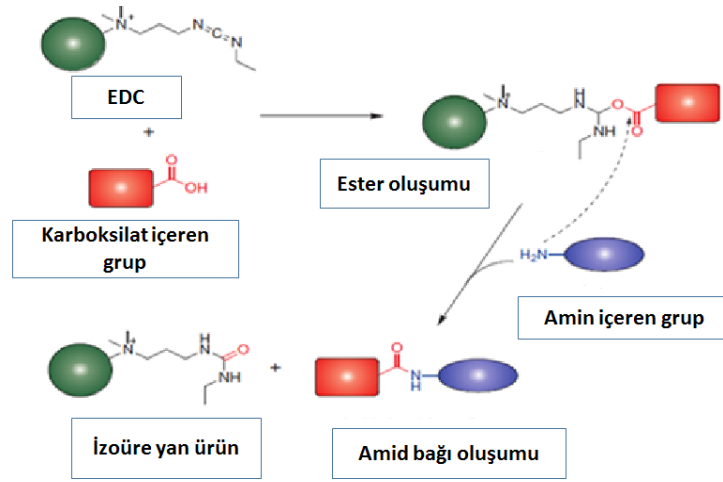
Polimer biyokonjugatların hazırlanması için en bilinen yol, proteinlerin yan zincirlerindeki amino asit ve polimer arasında bulunan aktive edilmiş esterlere benzer proteinlerin uç grupları ile polimerleri modifiye etmektir.

2.11.1 Polimerlerin EDC Kullanılarak Proteinlerle Kovalent Biyokonjugasyonu

Polimerler amino asitlerin özel alanlarına etki ederek proteinler ile konjugasyonunu sağlar [16]. Protein-polimer konjugasyonu birçok çeşitli uygulama alanına olanak sağlar. Protein bir yandan, modifiye edilmemiş proteinin, örneğin enzimatik bozunmaya karşı daha yüksek bir kararlılığa sahip olamayacağı yeni spesifik özellikler ile donatılmıştır. Konjugasyonu sağlanan proteinin en büyük avantajı, modifiye edilmemiş proteinin enzimatik bozunmaya karşı daha yüksek kararlılık gösterme özelliğine sahiptir. Konjugasyon çalışmalarında polimer kullanılmasının avantajı; protein ile kovalent konjugasyon oluştururken daha yüksek kararlılıkta konfigürasyon sağlamak için üç boyutlu bir yapı ile donatılır.

Çalışmamızda immobilizasyonu sağlamak için 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür (EDC) kullanıldı. EDC biyokonjugasyon çalışmalarında en bilinen karbodiimid türevidir. En büyük avantajlarından birisi suda çözünebilir özelliğinin olmasıdır bu da çapraz bağlama reaksiyonunda yaşanabilecek olan girişim etkisini önler. EDC'nin fazlasıyla ortamda yan ürün olarak üre türevleri oluşur fakat üre suda çözünebilir olduğundan jel filtrasyon ve diyaliz ile kolayca ortamdan uzaklaştırılabilir ve konjugatlar saflaştırılabilir. EDC kullanımında dikkat edilmesi gereken en önemli durum EDC'nin sulu ortamda kararlılığı yoktur bu yüzden -20 °C'de saklanmalıdır. EDC kullanılmadan önce oda şartlarında bir süre bekletilir ve daha sonra kapağı açılmalıdır çünkü EDC kolay bozunabilen bir kimyasaldır.

Yapısında karboksil grupları ve primer amin grupları içeren birçok molekülün EDC kullanılarak konjugasyon çalışmaları yapılmaktadır (Şekil 2.28).



Şekil 2.28 Bir karboksilat ve bir amin grupları içeren iki molekülün bir amid bağı oluşturmak üzere EDC kullanılarak konjugasyonu

Bu reaksiyon; karbon atomu ile komşu iki azot atomu arasında gerçekleşir. Azot atomları karbon atomuna göre daha elektronegatiftir bu yüzden karbon atomu katyonik forma (δ^+) geçer ve karboksilat anyonunun katyonik formdaki karbon atomuna saldırması için uygun yapı oluşur.

2.12 Enzim Aktivitesini Tayininde Kullanılan Spektrofotometrik Yöntemler

Spektrofotometrik deneyler spektrofotometri cihazıyla örnek çözeltiden geçtikten sonra çözeltinin absorbladığı ışık miktarını ölçerek etkileşim yolunu izler (Şekil 2.26). Eğer gelen ışık görünür bölgedeyse numunenin rengi değişir ve bu olaya kolorimetrik analiz denir [41]. Spektrofotometre ile bilinen numunenin konsantrasyonlarının miktarı, ışık kaynağının dalga boyu aralığına bakılıp ışığın yoğunluğunun ölçülmesi ile belirlenebilir [42].

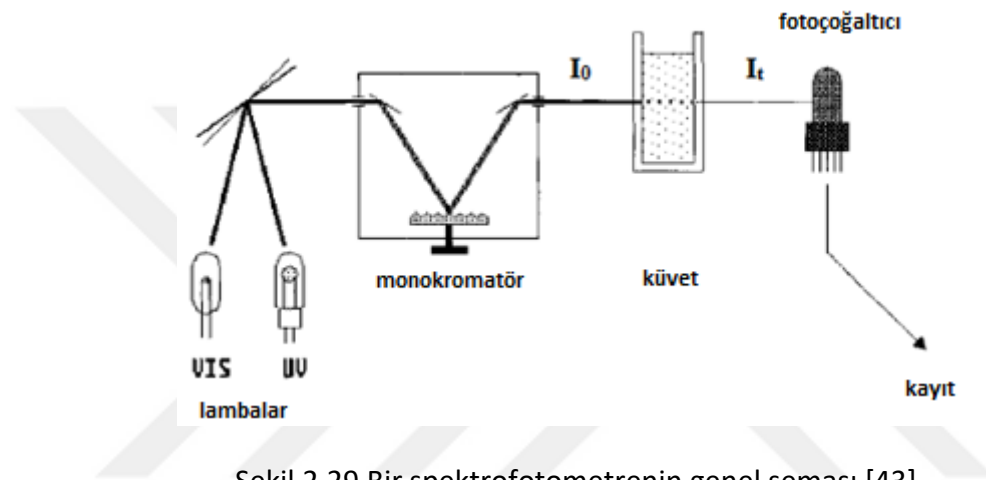
2.12.1 UV-Görünür Bölge Spektroskopisi

Belirli bir enerjiye sahip olan fotonlar, moleküllerin kendileri ile çarpışan atomları veya elektronları tarafından absorbe edilir ve bu sırada elektronlar üst enerji seviyelerine geçecek şekilde uyarılır. Absorpsiyon spektroskopisi, bu absorpsiyonun dalga boylarını ve absorbansını belirlemek üzere tasarlanmış cihazlarla gerçekleştirilir.

UV-görünür bölge absorpsiyon spektroskopisi, elektromanyetik spektrumun mor ötesi ve görünür bölgelerindeki dalga boylarına karşılık gelen maddelerin soğurulma

özelliklerini inceler. Absorpsiyon spektroskopisi, bir örnekteki belirli bir maddenin varlığını tespit etmek için kullanılan önemli bir analitik yöntemdir ve tespit edilecek maddenin ortam içerisindeki konsantrasyonunun belirlenmesini birçok farklı koşulda gerçekleştirebilir.

Örnek, bir küvet içine konur, ışık demeti monokromatöre girer ve tek dalga boyundan çıkarak örneğin bulunduğu küvetten geçer, bazı dalga boylarındaki ışık örnekle soğurulur ve absorbe edilmemiş veya iletilen ışık da spektrofotometre ile kaydedilir (Şekil 2.29) [43].



Şekil 2.29 Bir spektrofotometrenin genel şeması [43]

Yansımaları ve saçılmaları önlemek için, yüzeyleri düz olan dikdörtgen şekilli cam küvetler kullanılır. Görünür bölgede (340–800 nm) bir spektrum aralığında bu küvetlerin kalınlığı yaklaşık 1,0 cm'dir.

Örnekten geçen ışığın (iletilen ışık) yoğunluğunun "Transmitans" olarak adlandırılan ve eşitlik 2.27'ye göre belirlenen, örneğe ulaşmadan önceki ışığın (gelen ışık) yoğunluğuna oranı:

$$\text{Transmitans: } T = \frac{I_t}{I_0} \quad (2.27)$$

I_t : iletilen ışık, I_0 : gelen ışık

Bu oranı 100 ile çarparak elde ettiğimiz yüzde transmitans (%T) değerini, Eşitlik 2.28 ile gösterebiliriz.

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

Önek tarafından absorbe edilen ışık miktarını belirten Absorbans değerini ise eşitlik 2.29 ile hesaplayabiliriz:

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

Işığın geçtiği örneğin absorpsiyonu ile örnekte bulunan maddenin konsantrasyonu arasındaki ilişki, eşitlik 2.30'da verilen Lambert-Beer yasası ile açıklanmaktadır:

$$A = \epsilon cl \quad (2.30)$$

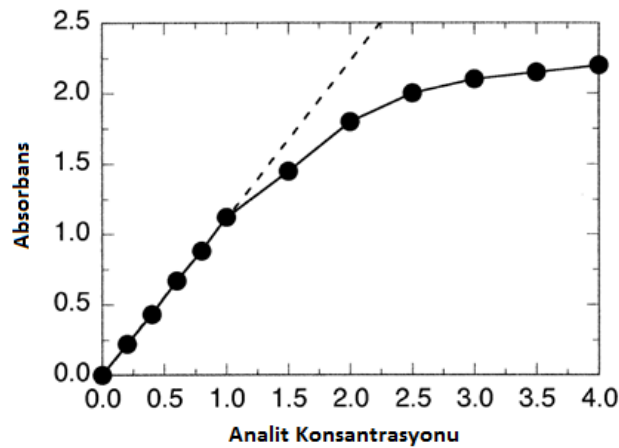
A: Seçili bir dalga boyunda örneğin absorpsiyon değeri (herhangi bir birimi yoktur)

ϵ : Molar absorptivite ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$)

c: Örneğin molar konsantrasyonu (M)

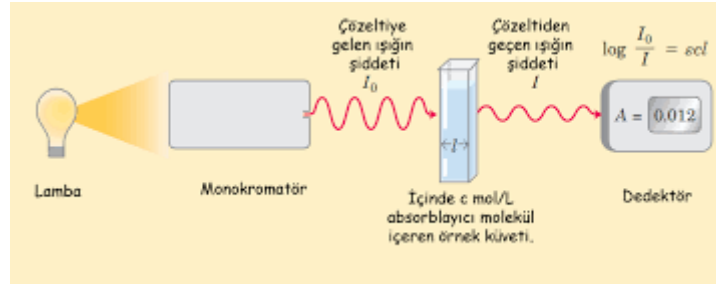
l: Işığın örnek üzerinde kat ettiği yol ya da küvetin uzunluğu (cm) [3], [20], [43].

Lambert-Beer yasasına göre, örneğin absorpsiyonu, analit konsantrasyonu ile doğrusal olarak artar. Genel olarak, konsantrasyon değeri olan $A = 1.0$ 'den arttıkça, gerçekleşen büyük sapmalar düz bir çizgide görünür. Bu nedenle, çözeltideki kinetik analize tabi tutulacak bir maddenin konsantrasyonu, genel olarak ayarlanmış bir absorbans (0,05-1,0) değerinde işleme tabi tutulur (Şekil 2.30).



Şekil 2.30 Lambert-Beer yasasından sapma [20]

Enzim kinetiğini belirlemek için kullanılacak olan analitik dalga boyunun seçimi; hem substrat hem de ürün molekülleri arasındaki absorpsiyon değerleri arasındaki en büyük farkın spektral örtüşmesini önleyebilecek bir dalga boyunda olmalıdır (Şekil 2.31). Substrat ve ürün için seçilen dalga boyu, tipik olarak her bir molekül için maksimum dalga boyudur [20].



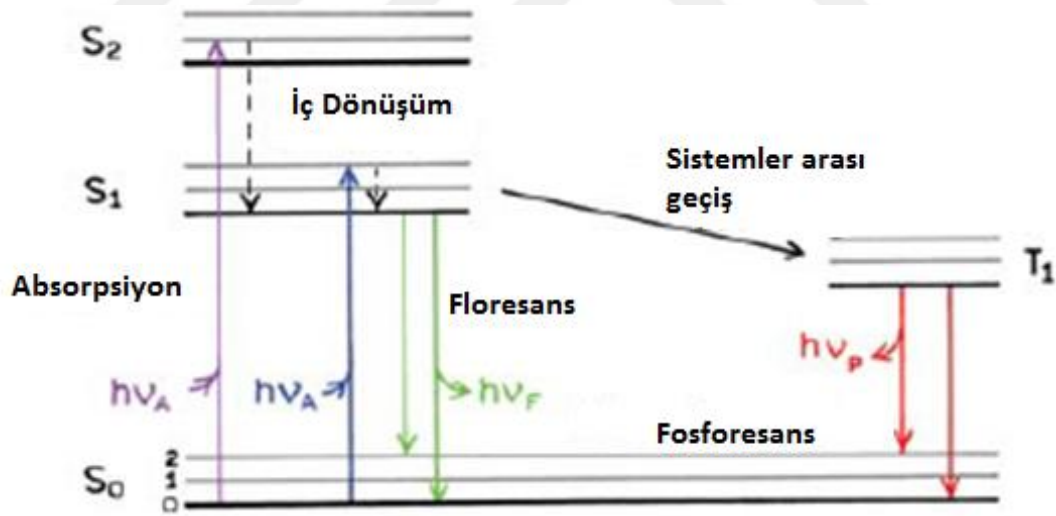
Şekil 2.31 Spektrofotometrenin genel çalışma prensibi [35]

2.12.2 Floresans Spektroskopisi

Floresans, daha yüksek bir enerji seviyesinden daha düşük bir enerji seviyesine geçişin radyasyonla eşlik edildiği bir enerji geçiş durumudur. Sadece uyarılmış durumdaki moleküller floresans yayabilirler; dolayısıyla molekülün, emisyon olayından önce daha yüksek bir enerji seviyesine getirilmesi gerekir. Elektronik ve titreşim açısından temel seviyede (S_0V_0) bulunan bir molekül, farklı ve çeşitli durumların enerji farklarına uyan fotonları soğurabilir. Gerekli olan foton enerjisi, elektronik olarak uyarılmış temel halin (S_1V_0), temel seviye titreşim durumuna erişmesi için gerekli olandan daha yüksek olmalıdır. Artan enerji, titreşim enerjisi ($V>0$) olarak soğurulur ve hızla çözücü molekülleri ile çarpışarak ısı olarak çevreye dağılır, böylece molekül titreşim olarak temel seviye durumuna geri döner (S_1V_0). Bu gevşeme ya da geriye dönme süreçleri, enerjinin bir hâlden diğerine, daha düşük enerji seviyesine yayılmadan geçişleridir ve buna "İç Dönüşüm (IC)" denir. Elektronik olarak uyarılmış temel hâlin en düşük seviyesinden, molekül ya ışık yayarak (floresans) ya da yayıcı olmayan bir geçişle temel seviye olan enerji durumuna (S_0) geri döner. Enerji geçişinin ardından molekül, temel hâl durumunun titreşim seviyelerinden herhangi birine gelebilir. Çoğu molekül, bu enerji geçişleri konusunda esnektir ve bu nedenle temel hâl durumunda çok yüksek titreşim seviyelerine sahiptir. Işınım enerjisi ile absorpsiyon karşılaştırıldığında floresans

kaybolduğundan, floresans ışığı her zaman uyarılmış ışığa göre daha uzun bir dalga boyundadır. Yayılan radyasyon, bir bant spektrumu olarak görülür, çünkü elde edilen titreşim ve dönme enerji seviyelerine bağlı olarak elde edilen dalga boyu değerleri vardır. Bir molekülün floresans spektrumu, uyarılmış dalga boyundan bağımsızdır ve absorpsiyon spektrumu ile bir ayna görüntüsü ilişkisine sahiptir. Uyarılmış elektronik hâlden temel hâle geçiş durumu, yayılan ışığın yoğunluğuyla orantılıdır. Bu bağlamda fosforesansın, triplet durumundan (T_1) elektronik (singlet) temel hâl durumuna (S_0) geçişten kaynaklandığı söylenebilir (Şekil 2.32).

Molekül, sistemler arası geçiş (ISC) ile elektronik olarak uyarılmış singlet durumdan triplet duruma geçer. Singletten triplete geçiş, kuantum mekaniği yasaları sebebiyle mümkün değildir ve bu nedenle, yalnızca elektronik yapının elverişli olduğu bazı moleküllerde, imkansız yakın derecede düşük ihtimaller ile gerçekleşebilir. Bu tür moleküller ise genellikle ağır atomlar içerir. Fosforesans için hız sabitleri çok daha büyük olur ve fosforesans, uzun bir gecikme ile gerçekleşir; uyarılmış enerji artık uygulanmadığında dahi devam eder [40].



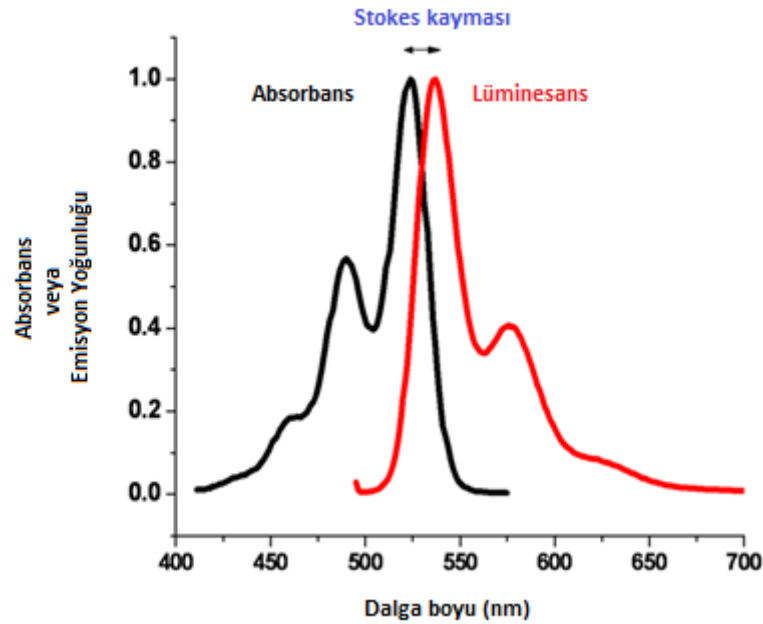
Şekil 2.32 Jablonski Diyagramı (S_0): temel hâl durumu, (S_1, S_2): uyarılmış iki singlet hâli, (T_1): triplet hâli, (v): Titreşim seviyeleri, (ISC): Sistemler arasın geçiş, (IC): İç dönüşüm

Yukarıdaki şekilde; kesintisiz dikey çizgiler radyasyon geçişlerini, noktalı çizgiler ise radyasyonsuz geçişleri göstermektedir. Absorpsiyon süresi, yaklaşık 10^{-15} s'dir, bu da, çekirdeklerin önemli oranda yer değiştirmesi için çok kısa bir süredir. Titreşimlerin durması ise 10^{-12} - 10^{-10} s arası bir zamanda gerçekleşir. Floresans ömrü tipik olarak 10^{-8} s

civarında olduğu için, sistemler arası geçiş ve fosforesans spin yönelimini gerektirmektedir. Bunun yanında, absorpsiyon ve floresans, fosforesans sürecinden çok daha hızlıdır. Fosforesans, milisaniyelerden saniyeye kadar sürebilen uzun bir geçiş sürecidir, yaklaşık 10^{-6} s^{-1} kadar sürmektedir. İç dönüşüm ise, 10^{-11} - 10^{-9} s saniye arasında gerçekleşir [2-4].

Bir molekülün floresans özellikleri, molekülün kendisinin (iç faktörler) yanı sıra, proteinin çevresi (dış faktörler) tarafından da belirlenir. Bir molekül tarafından yayılan floresans yoğunluğu, uyarılmış hâlin ömrüne bağlıdır. Uyarılmış haldeki moleküllerin sayısı zamanla, üstel olarak azalır [40].

Temel ve uyarılmış hâl arasındaki dönüşüm esnasında, yüksek enerjili titreşimsel temel hâlden geçerken, atom-İçi temel hâl ve uyarılmış hâlin farklı çekirdek aralıkları ve enerjik kayıplardan dolayı, $E = hc / \lambda$ [E: enerji, h: Planck sabiti ($6,62 \times 10^{-34} \text{ Js}^{-1}$), c: ışık hızı, λ : temel hal durumuna dönerken elektronun yaydığı fotonun dalga boyu] bağıntısına göre, yayılan fotonun dalga boyu daha büyüktür. Dalga boyundaki bu değişim, ilk kez 1852'de George G. Stokes tarafından izlendiği için, "Stokes kayması" olarak adlandırıldı. Çözücü etkisi ve uyarılmış tepkimelerden dolayı, Stokes kayması nispeten daha uzun dalga boylarında gözlenebilir (Şekil 2.33) [2].



Şekil 2.33 Stokes kayması. Absorbanstan daha büyük dalga boylarında lüminesans meydana gelir [41]

Çok sayıda enzim substratı veya enzimatik reaksiyon ürünü, doğal floresans özelliği sergiler ve reaksiyon süresince uygun bir floresans sinyali üretirler; böylece bozunmadıklarından veya dışarıda kalmadıklarından emin olunur. Bu moleküller floresans özellik sergilemiyorsa, floresan türevleri, çalışma koşulları altında enzimle olan etkileşimini önemli derecede bozmadan, kovalent bağlar altındaki yapılara floresans gruplar ekleyerek oluşturulabilir. Floresans sinyalleri, sınırlı bir konsantrasyonda, floresan maddenin konsantrasyonu ile doğrusal bir ilişki göstermektedir. Floresans sinyalleri, absorbans (A) yerine kuantum verimi (Q_f) olan Lambert-Beer yasasına benzer bir ilişki içinde floresan maddenin konsantrasyonu ile yoğunluk bakımından farklılık gösterir. Kuantum verimi, yayılan foton miktarının soğurulan fotonların miktarına oranıdır:

$$Q_f = \frac{\text{yayılan foton akışının floresans yoğunluğu (} I_f \text{)}}{\text{absorplanan foton (} I_a \text{)}} \quad (2.31)$$

$$\text{Buradan, } I_a = I_0 - I_t \quad (2.32)$$

bağıntısı yazılabilir.

I_0 : örneğin bulunduğu ortam

I_t : örneğin bulunduğu ortamdaki ışık yoğunluğu

$$I_t = I_0 \times 10^{-\epsilon bc} \text{ eşitliği de türetilebilir.} \quad (2.33)$$

Eşitlik 2.33'ü kullanarak eşitlik 2.32'i yeniden düzenlediğimizde:

$$I_a = I_0 \times (1 - 10^{-\epsilon bc}) \quad (2.34)$$

eşitliğini elde ederiz. 2.31 ve 2.33 numaralı eşitlikler kullanılarak:

$$I_f = Q_f \times I_a = Q_f \times I_0 (1 - 10^{-\epsilon bc}) \quad (2.35)$$

Floresans yoğunluğu ve floresans-substrat konsantrasyonu arasındaki bağıntıyı veren eşitliği elde ederiz [5].

Eşitlik 2.35'te, bazı terimler (I_0, ϵ ve b), belirli koşullar altında hem bilinmeyen örnek hem de standart örnekler için aynıdır. İfade, Taylor serileri kullanılarak yeniden düzenlendiğinde, eşitlik 2.36'yı elde ederiz:

$$I_f = Q_f \times I_0 \left[2.3\epsilon bc - \frac{(2.3\epsilon bc)^2}{2!} + \frac{(2.3\epsilon bc)^3}{3!} - \dots \right] \quad (2.36)$$

Eğer ϵbc değeri küçük ise (≤ 0.05), eşitlik 2.37 elde edilebilir:

$$I_f = 2.3 \times Q_f \times I_0 \epsilon bc \quad (2.37)$$

Eşitlik 2.37, floresans yoğunluğunu vermektedir.

Burada: (I_f) değerinin, soğurucu türlerin (bazal türler), molar absorptivite (ϵ), floresans yayan türler (indüklenen türler) ve floresans kuantum verimi (Q_f) ile ilişkili olduğu anlaşılmaktadır. Bazı uyarılma koşulları altında, (I_f), (Q_f), (ϵ) ve (b) değerleri genellikle bilinmeyen ve standart örnekler için aynıdır. Bunu kullanarak, bilinmeyen ve standart örnek konsantrasyonları ile floresans yoğunlukları arasında, aşağıdaki bağıntı oluşturulabilir:

$$\frac{I_{fb}}{I_{fs}} = \frac{C_b}{C_s} \quad (2.38)$$

Burada, (I_{fb}) ve (I_{fs}), bilinmeyen ve standart örneklerin deneysel olarak belirlenmiş floresans yoğunluklarıdır; (C_b) ve (C_s) de buna ait konsantrasyonları belirtmektedir [5], [44].

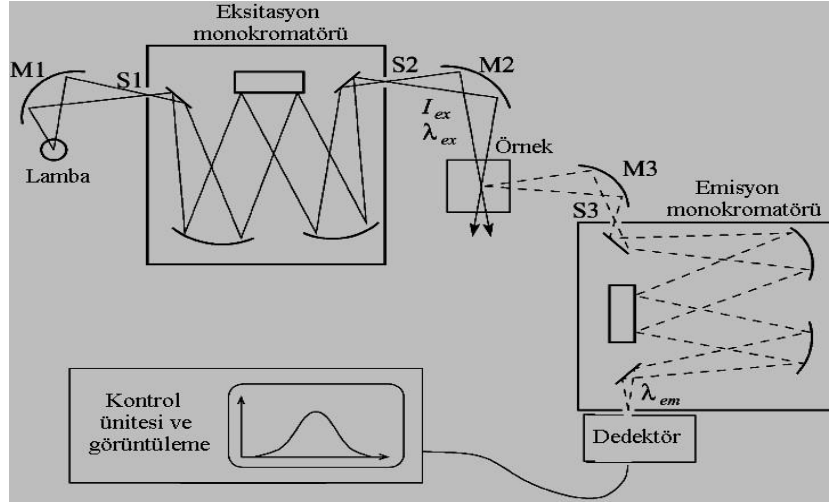
Floresans spektroskopisi, genellikle iki yöntem ile sınıflandırılmaktadır:

- (1) Kararlı hâl Floresans Spektroskopisi
- (2) Zaman Ayrımlı Floresans Spektroskopisi

Bu çalışmada biz; zaman ayrımlı floresans spektroskopisi yöntemini kullandık.

2.12.2.1 Kararlı Hâl Floresans Spektroskopisi

Kararlı hâl ölçümleri, sürekli bir aydınlatma ve gözlem ile gerçekleştirilen ölçümlerdir. Örnek, kesintisiz bir ışık demeti ile aydınlatılır ve yoğunluk veya emisyon spektrumu kaydedilir (Şekil 2.34) [3].



Şekil 2.34 Kararlı hal florimetresinin görünümü

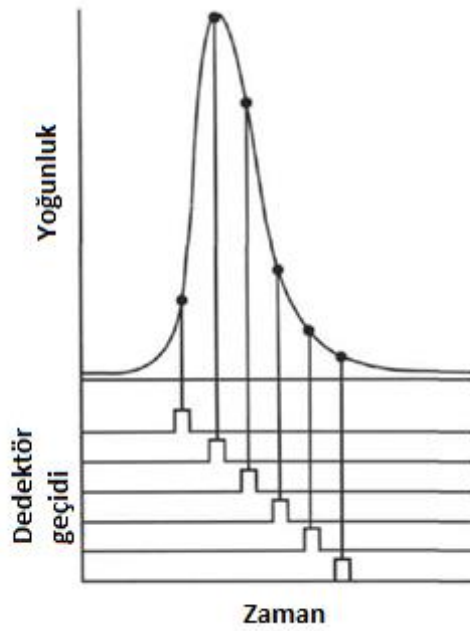
Lambanın emisyonu M1 ile gösterilen ayna tarafından toplanır ve uyarma kanalının monokromatörünün S1 ile gösterilen giriş açıklığına odaklanır. M2 aynası, monokromatör çıkışından (S2 açıklığından) ışığı toplar ve örnek üzerine odaklar. Örneğin emisyonu, M3 aynası tarafından toplanır ve saptama monokromatörünün S3 ile gösterilen açıklığına yönlendirilir. Işık yoğunluğu, bir fotoçoğaltıcı tüpü (PMT) ile ölçülür [3].

Emisyon spektrumu ölçümleri için λ_{em} sabit tutulur. Örnek konsantrasyonu sabittir, zamana bağlı olarak değişmez ve bu nedenle kararlı hâl olarak adlandırılan yöntem, uyarılmış hâldeki moleküllerin nanosaniye veya daha kısa zaman ölçeklerine girdiği anlamına gelir [2].

2.12.2.2 Zaman Ayrımlı Floresans Spektroskopisi

Zaman ayrımlı ölçümler nanometre veya daha küçük zaman ölçeklerinde yapılabilir, bu nedenle genellikle floresans spektroskopisinde kullanılır. Zaman ayrımlı floresans ölçümünde, stroboskopik atım örnekleme tekniği kullanılır, bu teknikte örnek bir atım ışık kaynağı ile uyarılır. Floresans emisyonunun yoğunluğu, her atım üzerinde çok kısa zamanlı bir pencerede ölçülür ve bilgisayarda kaydedilir. Her atımın ardından zaman penceresi hareket eder. Örnekler uygun zaman aralığında verilere alındığında, emisyon yoğunluğunun zamanla bozunmasına dair eğriler oluşturulabilir. "Strobe tekniği" adı, PMT fotoçoğaltıcısı, atım ışığı kaynağıyla senkronize olan bir voltaj atımıyla geçit

görevinde olduğu için ortaya çıkar. Atımlar PMT'yi aktif hâle getirir ve çok kısa bir süre boyunca emisyon yoğunluğunu ölçer (Şekil 2.35) [2], [44].



Şekil 2.35 Atım yöntemi ile ölçülen floresans ömür dağılımının şematik görünümü

Photon Technology International (PTI)'dan alınan Curtosey isimli cihaz [35]. Floresans ömür dağılımlarının değişimlerini elde etmek amacıyla üstel seri yöntemi kullanılır ve veriler, bu yöntemden elde edilen sonuçlara göre analiz edilir [4]

2.12.2.3 Üstel seriler yöntemi (ESM)

Floresans bozunması; sınırlı sayıda, ayırık ve her biri benzersiz bir floresans ömrüne (τ) sahip üstel terimlerden oluşan çok sayıda bozunumların (eşitlik 2.39) bir toplamı olarak tanımlanabilir. Her terim, farklı polaritelere sahip olan ve farklı serbestlik derecelerine sahip olarak çözücü molekülleri ile etkileşime giren, moleküldeki ayrı çevrelere bağlı olarak yerel emisyonların bozunumlarına karşılık gelmektedir.

$$F(t) = \sum_{i=1}^N a_i \exp(-t / \tau_i) \quad (2.39)$$

$F(t)$: floresans bozunma yoğunluğu

τ_i : floresans ömür dağılımı

α_i : "ön-üstel faktör" ve $\sum_i \alpha_i = 1,0$.

Proteinler gibi büyük ve karmaşık moleküllerin farklı bölümlerinde polarite çeşitliliği bulunduğundan dolayı, çoklu üstel bozunma analizi, floresans bozunmasını tanımlayan dağılım yaklaşımı modelini kullanarak, proteinlerin florofofor hâllerinin sürekli dağılımına dair floresans ömür dağılımı çeşitliliğini açıklamakta yetersiz kalmaktadır [45], [46].

Ömür dağılımı yaklaşımı modelinde, integraller eşitlik 2.40'da görüldüğü gibi üstel terimlerin üstel toplamalarını değiştirir ve terimlerin toplam bozunmaya kısmi katkılarını ifade eden ileri üstel faktörler, sürekli ömür dağılımı değişkenlerinin dağılım fonksiyonlarına dönüştürülür [$a(\tau)$]. Bunun, "floresans ömür dağılımı, dağınık yaklaşım modeli" olarak adlandırılmasına katkıda bulunan özel bir floresans ömür dağılımı, toplam bozunmaya kısmi bir katkıda bulunur [46, 47].

Toplam bozunmanın her bir τ değeri ile bileşenler, eşitlik 2.40 ile ifade edilir:

$$F(\tau, t) = \alpha(\tau) e^{-t/\tau} \quad (2.40)$$

Toplam bozunma: Her bir bireysel bozunmanın toplamıdır.

$$F(t) = \int_0^\infty a(\tau) \exp(-t/\tau) d\tau \quad (2.41)$$

Burada, $a(\tau)$: Sürekli ömür dağılımı değişkenlerinin dağılım fonksiyonlarıdır ve

$\int a(\tau) d\tau = 1,0$ şartını yerine getirmektedir.

"Cihaz (veya atım, darbe, lamba) Yanıtlama Fonksiyonu (IRF), $L(t)$ " olarak adlandırılan lamba atımının işlevi sınırlı bir genişliğe sahip olduğu için, deneysel floresans bozunma yoğunluğunu gerçekten saptırmaktadır. Dolayısıyla, gözlemlenen bozunum kıvrıktır ve fonksiyonu, eşitlik 2.42'de verilen kıvrılma integrali $I(t)$ olarak bilinir [48], [49].

$$I(t) = \int_0^t L(t) F(t-s) ds \quad (2.42)$$

$I(t)$: Floresans yoğunluğunun gözlemlenen bozunması

$L(t)$: Cihaz yanıt fonksiyonu

Üstel seri yöntemi; α_i ve τ_i düzgün dağılımlarını analiz etmek için belirli floresans ömür dağılımları (τ_i) ve değişken ön-üstel faktörleri (α_i) ve 200 terime kadar üstel serilerin bir

sonda işlevi olarak kullanılır. Ki-kare fonksiyonu 1'e yaklaşıncaya kadar (eşitlik 2.43) tekrarlayıcı yeniden birleştirme ile yalnızca arama fonksiyonunun a_i değerleri sürekli olarak tekrarlanır (uydurma prosedürü) [47], [50] .

$$C = \left(\frac{1}{n} \right) \sum_{k=1}^n \frac{(Y_{k_{\text{exp}}} - Y_{k_{\text{calc}}})^2}{\sigma_k^2} = \left(\frac{1}{n} \right) \sum_{k=1}^N \frac{\left(Y_{k_{\text{exp}}} - \sum_{i=1}^N D_{ki} a_i \right)^2}{\sigma_k^2} \approx 1,0 \quad (2.43)$$

Burada $Y_{k_{\text{exp}}}$: K. kanalda gözlemlenen floresans yoğunluğu

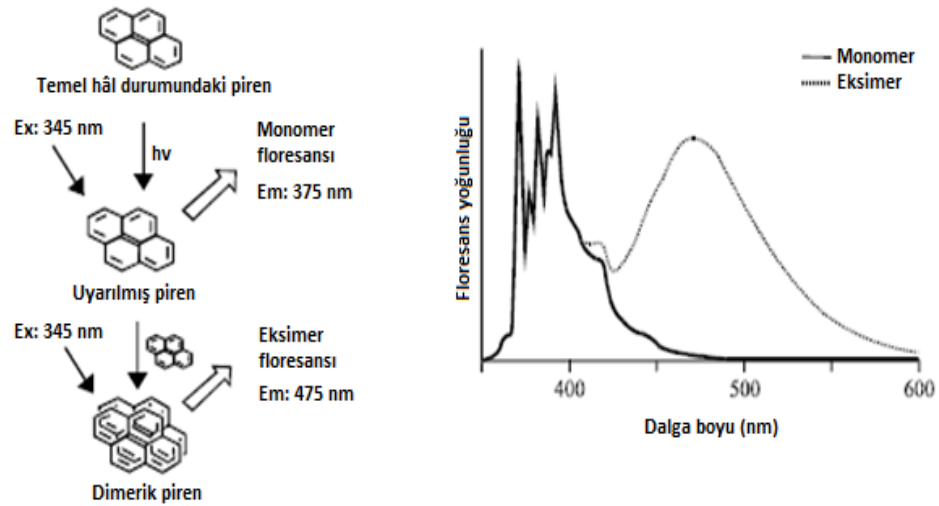
n : Kanalların sayısı, σ : K. Kanaldaki standart sapma

D_{ki} : Kıvrılma matrisi (eşitlik 2.44).

$$D_{ki} = \int_0^{t_k} L(t_k - t) \exp\left(\frac{-t}{\tau_i}\right) dt \quad (2.44)$$

2.13 Eksimer Yapıları

Eksimerler, yalnızca, bir molekülün uyarılmış hâlde ve diğer molekülün temel hâl durumunda olduğu, elektronik olarak uyarılmış dimerlerdir. Eksimerler genellikle iki atomludur ve ikisi de, piren gibi temel hâl durumunda ve bağlanmayacak gibi iki atomdan veya molekülden oluşur. Pirenin monomer emisyonu 370-390 nm aralığında görülürken, eksimer emisyonu 465-500 nm dalga boyu aralığında elde edilmektedir (Şekil 2.36) [51].



Şekil 2.36 Piren eksimeri oluşumu. Ex: Uyarma, Em: Emisyon [43]

Eksimer oluşumu iki şekilde gerçekleşmektedir. Birincisi, doğal bir bazik monomerin nötrleştirilmiş ortağı ile karşılaşması ile olurken ikincisi, radikal bir katyon ile buluşan radikal bir anyonun tepkimesi ile olmaktadır. Bir çözeltinin monomer ve eksimer floresansı, çarpışma hızına ve moleküller arasındaki mesafeye bağlıdır. Eksimer oluşturan gruplar arasındaki mesafe 0,3 nm veya daha azdır. Bu özellikleri kullanarak, proteolitik enzimler için eksimer floresans özellikli peptit substratları geliştirmek mümkündür [52], [53].

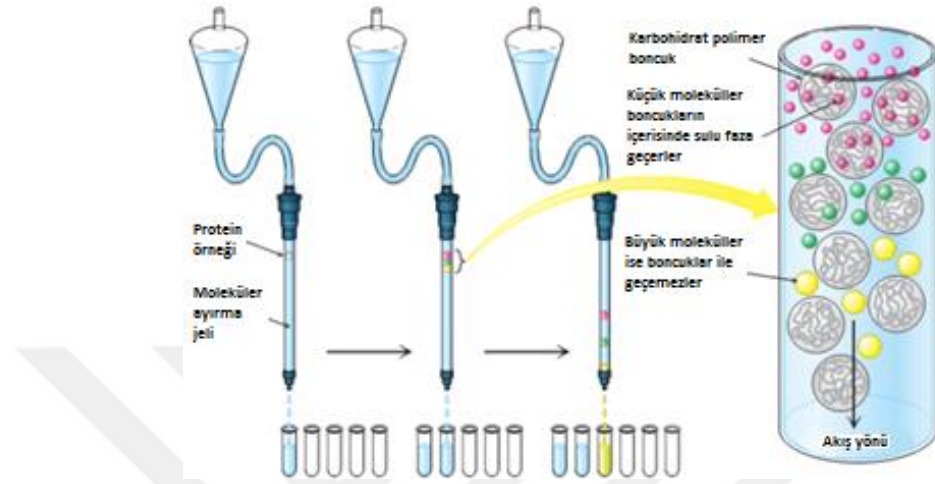
2.14 Jel Filtrasyon Kromatografisi

Biyopolimerlerin hidrodinamik hacmi ve molekül ağırlığına göre boyutlandırılması için kullanılan bir yöntem olan jel filtrelemenin evrimi, Porath ve Flodin'in boyut dışlama kromatografisi (SEC) yöntemlerini kullanarak çapraz bağlı dekstranlar için geliştirdikleri yöntemler 1959'da başladı ve böylece yeni bir yöntem, literatüre kazandırıldı. Bu yöntem peptidler, proteinler, DNA parçaları, enzimler ve benzeri biyokimyasal moleküllerin çalışmalarında kullanılır. Jel filtrasyon kromatografisi, ayırmanın, bir kolona paketlenmiş bir jel filtrasyon ortamı aracılığıyla moleküler boyutlarına ve biçimine göre ayırmaya dayandığı özel bir bölme kromatografisidir. Bazı istisnai durumlar haricinde genel olarak, örnek karışımdaki bileşenlerin ayrılması, molekül ağırlığı ile ilişkilidir. Bu gibi durumlarda jel filtrasyon, karakterize edilmemiş bir molekülün moleküler ağırlığını belirlemek için analitik bir yöntem olarak kullanılabilir [54].

2.14.1 Jel Filtrasyon Kromatografisi ile Protein Saflaştırma

Jel filtrasyon kromatografisi, herhangi bir bağlama gerçekleştirilmeyen bir yöntemdir (örnek bileşenlerinin hiçbir konsantrasyonunun değişmediği anlamına gelir). Boyut dışlama kromatografisinin temel ilkesi ise oldukça basittir: Jel parçacıkları ya da gözenekli matrisin bir kolonu, ayrılması gereken moleküller için uygun bir mobil faz ile denge halindedir. Sephadex, Sepharose ve Bio-gel; genellikle çapları 100 mm (0,1 mm) olan bu mobil fazın ticari preparatlarıdır. Büyük moleküller, gözeneklerden tamamen çıkartılır ve jel parçacıkları veya matrisi arasındaki boşluğu geçerek öncelikli olarak hareketli faza geçerler. Daha küçük moleküller, moleküler elek içerisinde ve dışındaki hareketli faz arasında dağılır ve daha sonra yavaş bir hızda kolondan geçer, böylece daha

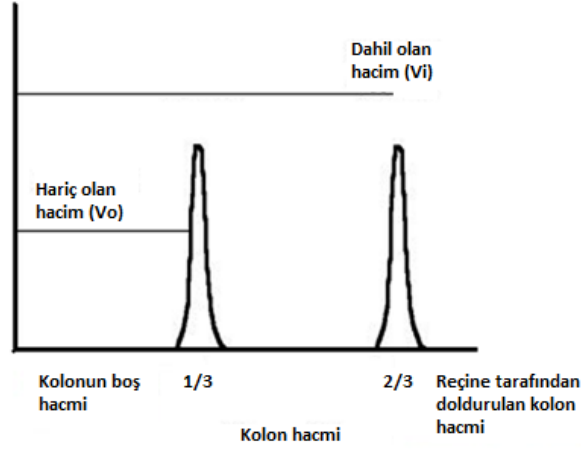
sonra hareketli fazda taşınarak atık suda görünecektir (Şekil 2.37). Yüklenen örnek hacmi, küçük tutulmalıdır. Hedef protein ile çıkarılacak kirlilikler arasındaki çözünürlük yüksekse, daha büyük örnek hacimleri bile uygun olabilir. Proteinin stabilitesini ve aktivitesini destekleyen bir tampon seçmek ise oldukça önemlidir [26].



Şekil 2.37 Proteinin Jel Filtrasyon Kromatografisi ile saflaştırılması

Küçük hacimli proteinlerin karışımı, gözenekli boncuklarla dolu bir kolona uygulanır. Büyük proteinler boncukların iç hacmine giremediğinden, küçük proteinlerden daha çabuk sistemden çıkarlar [26].

Jel filtrasyon kolonunun ayırma profilinde iki uç mevcuttur. Jel filtrasyon boncuklarından tamamen çıkarılacak geniş bir kütle ve jel filtreleme boncuklarının gözeneklerinde tamamen birikecek küçük kütle bulunur. Sisteme verilen örneğin, bu iki aralık arasında çözünenler hariç tutulan ve kapatılan kısmı, söz konusu hacimler arasında akacaktır (Şekil 2.38) [55].



Şekil 2.38 Jel filtreleme kromatografisinde kullanılan sütunun ayırma profilindeki iki uç. Hariç olan hacim (V_0) yaklaşık olarak kolon hacminin üçte birine eşittir, dahil olan hacim ise yaklaşık olarak kolon hacminin üçte ikisine eşittir [55]

2.14.2 Jel Filtrasyon Kromatografisinin Mekanizması

Jel filtrasyon kromatografisi, sıvı moleküllerin iki sıvı faz arasında dağıldığı, jel gözeneklerindeki sıvı (i) ve jelin dışındaki sıvının (ii) bulunduğu bir sıvı-sıvı ayırma kromatografisi örneğidir. Jel filtrasyonu işlemi, Steril Hariç Tutma Mekanizması tarafından tanımlanır. Jel parçacıkları ise gözenek boyutları aralığında olduğu için, küçük moleküller çok sayıda gözenek içine girebilirken büyük moleküller içine girdiği gözenekler çok daha azdır. Dolayısıyla, toplam gözenek hacminin farklı fraksiyonlarına farklı ebattaki moleküller erişebilir. Bu nedenle, farklı boyutlara sahip moleküller bu iki sıvı faz arasındaki dağılım katsayısında farklılık gösterecektir (küçük moleküller gözeneklere daha fazla girebildikleri halde daha büyük moleküller gözeneklere daha az girebilirler) (Şekil 2.39) [55].

Çözücü ile şişirilmiş bir jel ile doldurulmuş bir kolonun toplam hacmi (V_t) şöyle yazılabilir:

$$V_t = V_g + V_i + V_0 \quad (2.45)$$

V_g : Jel katı matrisi tarafından doldurulan hacim

V_i : Gözeneklerde veya boşluklarda tutulan çözücünün hacmi

V_0 : Jel partiküllerinin dışında kalan serbest hacim

Karıştırma veya difüzyon gerçekleştiğinde, verilen türlerin difüzyon dengesi ve alıkonma hacmi (V_R), aşağıdaki eşitlik 2.46 ile yazılabilir:

$$V_R = V_{(int.)} + K_d V_{(int.)} \quad (2.46)$$

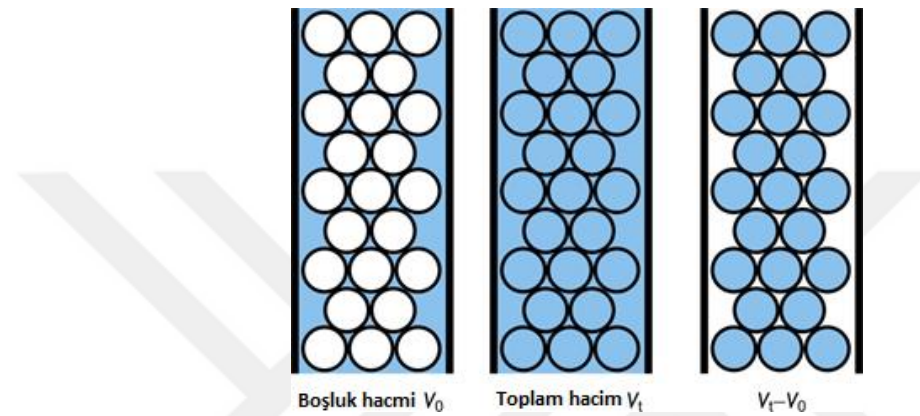
Dağılıma katsayısı (K_d) ise, eşitlik 2.47 ile hesaplanabilir:

$$K_d = V_{i(acc)} / V_{(total)} \quad (2.47)$$

$V_{i(acc)}$: Erişilebilen gözenek hacmi

$V_{(total)}$: Toplam gözenek hacmi

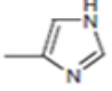
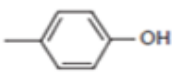
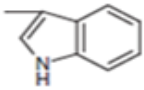
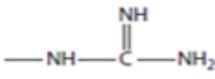
$V_{(int.)}$: Geçiş hacmi



Şekil 2.39 Bir jel filtrasyon kolonuna dair hacim açıklaması. $V_t - V_0$ eşitliği, matrisi oluşturan katı materyalin hacmini açıklar [56]

2.15 Reaktif Protein Grupları ve Modifiye Edici Ajanları

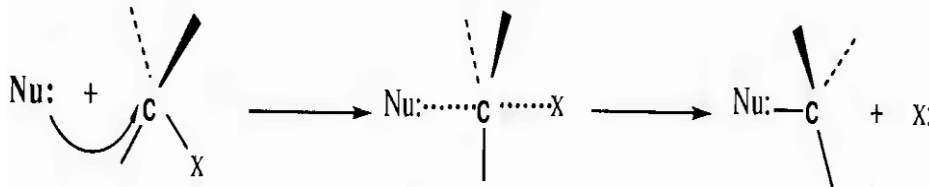
Proteinlerin kimyasal reaktivitesi, sırasıyla sahip oldukları amino asit yan zincirlerine ve ayrıca sırasıyla N- ve C- terminal uçlarının serbest amino ve karboksil gruplarına bağlıdır. Bununla birlikte, proteinlerin terminal uçlarındaki kalıntılar, kimyasal modifikasyon için pek fazla katkıda bulunmazlar; çünkü bunlar, proteindeki genel amino asit sayısı ile karşılaştırıldığında oldukça sınırlı sayıdadır [57]. 20 amino asitte hidrofobik kalıntıların alkil yan zincirleri, tüm modifikasyon amaçları için kimyasal olarak inertsdir. Çünkü serin ve treonin amino asitlerinin alifatik hidroksil grupları, su türevleri olarak düşünülebilir ve bu nedenle düşük reaktiviteye sahiptirler. Hidrofilik yan zincirlerin sadece sekiz tanesi kimyasal olarak aktiftir (Şekil 2.40) [58].

Amino Asit	Aktif Yan Zincir	Alkilleme ya da Arilleme	Açılleme	Oksidasyon	Diğer Reaksiyonlar
Sistein	-CH ₂ -SH	+	+	+	a,d,f,h
Lizin	-NH ₂	+	+	-	e,g
Metiyonin	-S-CH ₃	+	-	+	i
Histidin		+	+	+	a,c
Tirozin		+	+	+	a,b,c,d
Triptofan		+	-	+	h
Arjinin		-	-	-	g
Aspartik ve Glutamik Asit	-COOH	-	+	-	d,c

* Diğer reaksiyonlar ise şöyledir: iyotlaşma (a), nitratlaşma (b), diazotlaşma (c), esterleşme (d), amitleşme (e) ve civalı reaksiyonlar (f), dikarboniller (g), sülfenil halojenürler (h) ve siyanojen bromür (i).

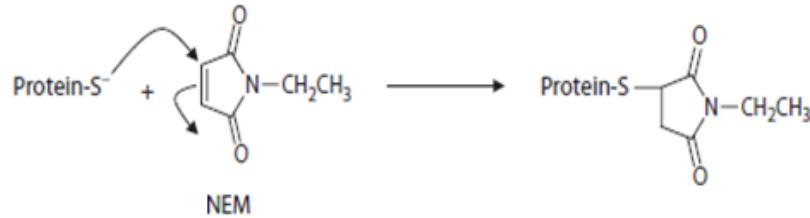
Şekil 2.40 Aktif yan zincirlerin kimyasal reaksiyonları [58]

Arjinin amino asitinin guanidinil grubu; sırasıyla aspartik ve glutamik asitlerin β- ve γ-karboksil grupları, sistein sülfidril grubu, histidin imidazolil grubu, lizin ε-amino grubu, metiyonin tiyoeter kısmı, triptofan grubu ve tirozin fenolik hidroksil grubu. En önemli reaksiyonlar ise alkilasyon ve açılasyondur. Alkilasyonda bir alkil grubu nükleofilik atoma aktarılırken, açılasyonda bir açil grubu bağlanır. Çoğu protein modifikasyonu; amino asitlerin yan zincirlerinde yer alan nükleofilik reaktif gruplar tarafından kolayca ayrılabilir bir grubun çıkarılmasını içeren nükleofilik atak reaksiyonları şeklindedir (Şekil 2.41). Böyle bir bimoleküler nükleofilik yer değiştirme reaksiyonu, yani S_N2 mekanizması, en azından iki faktöre bağlıdır: Ayrılan grubun özelliği ve saldıran grubun nükleofilikliği. Ayrılacak grup ne kadar kolay çıkarsa, reaksiyon o kadar hızlı gerçekleşecektir [59], [60].



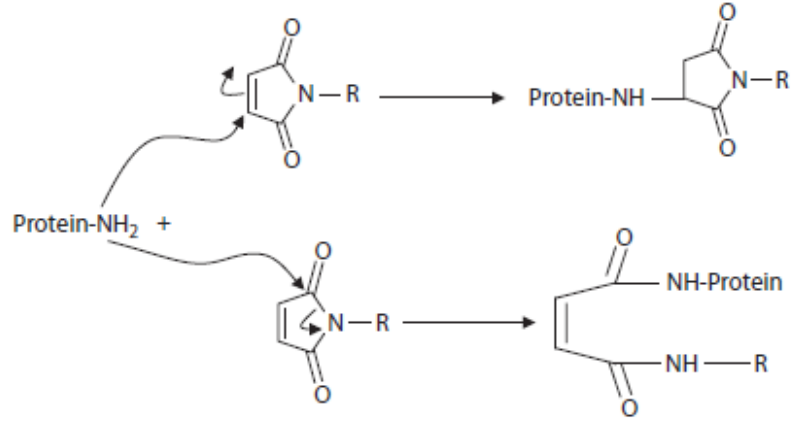
Şekil 2.41 Nükleofilik yer değiştirme reaksiyonu, S_N2 reaksiyon mekanizması

Nükleofil (Nu:) ayrılan gruba ve yer değiştiren bir elektron eksik olan merkez atoma saldırır (X:) [59]. Sülfidril grubu, aprotin içerisindeki reaktif fonksiyon grubudur (N-etilmaleimid, N-pirenilmaleimid vb.). Sülfidril grupları, amino gruplarına kıyasla çok daha hızlı tepki verirler (Şekil.2.42). Ortaya çıkan tiyoeter bağı ise oldukça karardır ve fizyolojik koşullar altında parçalanamaz [59].



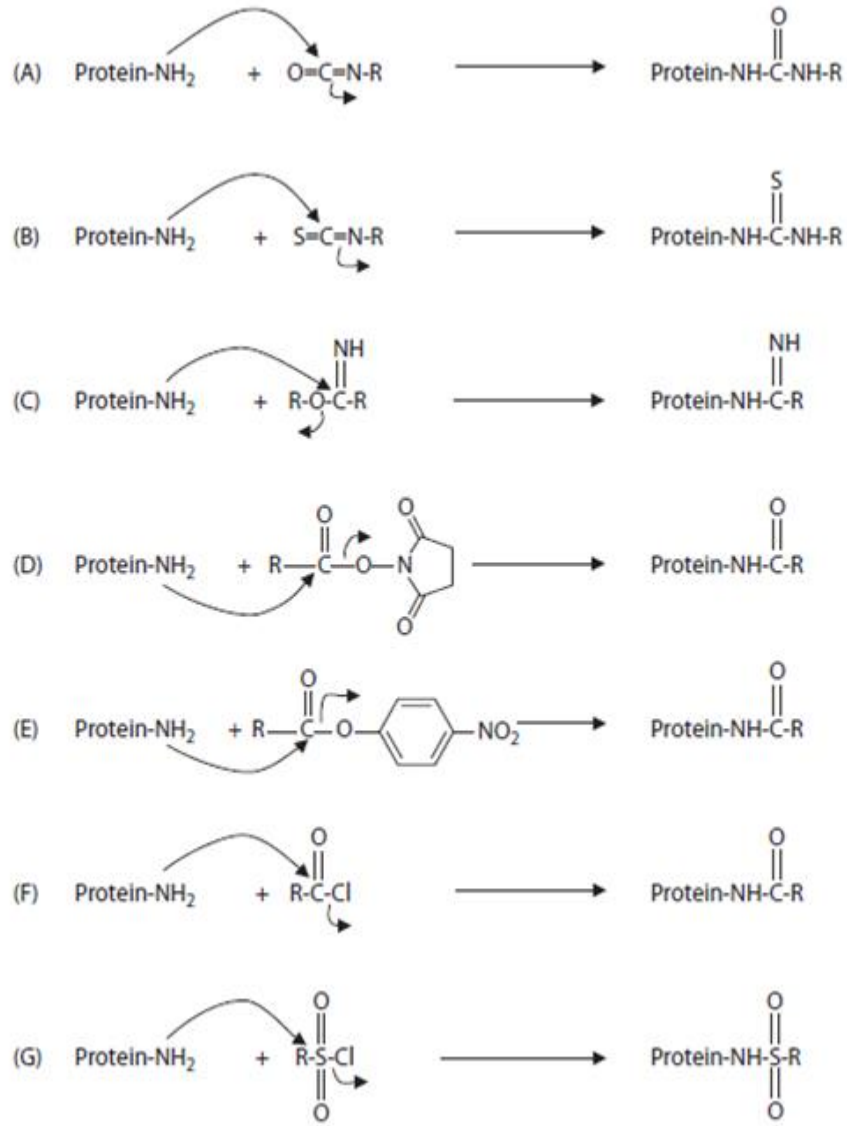
Şekil 2.42 N-etilmaleimidin (NEM) sülfidril grubu ile reaksiyonu [59]

Tiyol grupları içeren maleimidlerin kantitatif reaksiyonu, tiyol gruplarının spektrofotometrik kantitatif tayini için önemlidir. Örneğin; seyreltik bir çözeltide, pH 6'da N-etilmaleimidin 300 nm'deki absorpsiyonundaki azalma, tiyol gruplarının kantitatif tayini için kullanılabilir. Proteinlerin bulunduğu yerdeki amino grubunun fazla olması, o proteini en önemli kimyasal değişiklik hedefi yapar. Sülfidril gruplarına kıyasla amino grupları, yüksek pH'da α -haloasetil bileşikleriyle çok yavaş reaksiyona girer. O zaman dahi, reaksiyon hızı tiyolün yalnızca yüzde biri kadardır. Serbest sülfidril grubunun olmadığı veya tiyolün gömülü olduğu ve tepkimeye girmediği proteinlerde, amino gruplarının α -Haloasetil bileşikleriyle verdiği reaksiyonlar önem kazanmaktadır. Haloasetatlar gibi maleimid türevleri, alkali pH koşullarında sadece amino gruplarıyla reaksiyona girer. Amino gruplarının maleimidlerle reaksiyona girmesi için iki uygun yol vardır (Şekil 2.43). Birincisi, amin grubunun azotu, maleimid halkasının çift bağına saldırabilir veya ikinci olarak karbonil, karbon grubuna eklenir ve ardından halka açılmasıyla açillenebilir. Hangi yol seçilirse seçilsin, maleimidlerin aminlerle reaksiyonları, nötr seviyenin üstündeki pH değerlerinde oldukça önemlidir [60].



Şekil 2.43 N-maleimidlerin protein amino grupları ile reaksiyonları [60]

Açılme ajanlarında, ayrılan bir gruba, yer değiştiren karbonil karbonundaki nükleofil gruplar saldırır (Şekil 2.40). İzosiyanatlar ve izotiyosiyanatlar; proteinlerin amino, sülfhidril, imidazolil, tioksil ve karboksil grupları ile reaksiyona girer ancak sadece amino grupları ile stabil ürünler oluştururlar (Şekil 2.44, A ve B) [59].



Şekil 2.44 Amino gruplarının açilleme reaksiyonları

Her bir reaksiyonda her bir harfin açıklaması şöyledir: (A) izosiyanat; (B) izotiyosiyanat; (C) imidoester; (D) N-hidroksisüksidinimidil ester; (E) p-nitrofenil ester; (F) açıl klorür ve (G) sülfonil klorür [60].

MATERYAL VE YÖNTEM**3.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar****3.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler**

Çizelge 3.1 Kullanılan kimyasal maddeler

Madde adı	Firma adı	Katalog No
Dimetil sulfoksid (DMSO)	Fluka	34943
Sığır serum albümin (BSA)	Fluka	05488
Sodyumdihidrojenfosfat dihidrat($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Fluka	71505
Sefadeks G-75	Sigma	17-005001
Sodyum klorür	Sigma	
Sodyum hidroksit(NaOH)	Fluka	71689
Tripsin	Fluka	93610
N(1Pirenil)maleimid(PM)	Fluka	82656
Metil alkol	Merck	106008
Etil alkol	Merck	818761
Kloroform	Merck	822265

3.1.2 Kullanılan Cihazlar

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

3.2 Çalışmanın Amacı, Kapsamı ve Uygulanan Yöntem

Proteolitik enzimler fizyolojik aktivitelerine ilaveten AIDS, SARS, kanser vb. birçok hastalıkta önemli rol oynamaktadır [7], [9]. Örneğin kanser hücreleri etkilerini göstermek için kendilerine çoğalma ve yayılma alanı açmak amacıyla çevre dokuları tahrip etmek için salgıladıkları proteazları kullanırlar. Farklı kanser hücrelerinin, birçok zararlı virüs ve bakterilerin ürettiği proteazların tespit edilmesi, günümüzdeki hastalıkların yayılmasını önlemede ve teşhisinde büyük öneme sahiptir. Bu konuda çeşitli proteaz türlerinin tanınması ve aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla mikroanaliz yöntemleri geliştirilmiştir [9].

Proteolitik enzimlerin endopeptidaz aktivitelerinin belirlenmesinde karşılaşılan en önemli sorunlar uygulanan yöntemlerin duyarlılığı ve substratın seçimidir [7]. Tarihsel olarak bakıldığında kazein ve hemoglobın, kolay ve ucuz bir şekilde temin edilebildikleri için proteolitik enzim çalışmalarında en çok kullanılan substratlar olarak bilinir [7]. Proteazların doğal substratları genellikle absorpsiyon veya emisyon spektroskopisinde uyarma sonucu özel sinyaller üretebilen bir yapıyı oluşturabilmek için organik bir maddeyle kompleks oluşturulur. Ayrıca bu süreç, proteolitik enzimin etki mekanizması ele alınarak sentezlenen sentetik peptid substratlara da uygulanabilir. Buradaki amaç;

sinyallerin göstereceği karakteristik değişimleri, enzim aktivitesine kalitatif ve kantitatif olarak yansıtabilmektedir [7], [9]. Antrasen, floresein, rodamin, piren vb. floresans özelliğe sahip birçok sayıda organik madde; yapılarında meydana gelen kimyasal değişikliklerle, proteinleri oluşturan L- α aminoasitlerin alkil yan zincirlerinde bulunan $-\text{COOH}$, $-\text{SH}$, $-\text{NH}_2$ gibi fonksiyonel gruplara kovalent bağlarla bağlanır. Bu kompleksler; enzim aktivitesinin gözlemlenmesi, proteinlerin çözelti ortamında meydana getirdiği yapısal değişikliklerinin incelenmesi, klinik tetkikler, membran geçirgenliği vb. amaçlar için sentezlenmektedir.

Enzimlerin katalitik aktivitesini arttırmak amacıyla polimerlerle yapılan konjugasyon günümüzde de hala detaylı bir çalışma sahasına sahip olan biyomakromoleküler kimyanın önemli bir araştırma konusudur [1], [59]. Çalışmamızda serin proteazlar sınıfına ait olan tripsin enziminin sığır serum albümin (BSA) üzerinde bulunan proteolitik aktivitelerini florometrik yöntemle belirlemek ve aktivitelerinin farklılığını gösterebilmek amacıyla N-1-pirenilmaleimid (PM) uygun reaksiyon koşullarında bağlanarak PM-BSA kompleksi sentezlendi. Bu bağlanma reaksiyonu hassas bir şekilde PM-BSA üzerine proteaz aktivitesini gözlemlememizi sağlayan eksimerleri oluşturacak biçimde gerçekleştirildi. Daha sonra jel filtrasyon işlemi yapıldı. Jel filtrasyon işleminin ardından soğutmalı santrifüjde ultrafiltrasyonla birden fazla saflaştırılan PM-BSA kompleksi üzerinde belli floresans ömür özellikleri gösteren eksimerlerin, proteoliz işlemi sonrasında hidrolizatlarda sergilediği yeni floresans ömürler proteazların özgün aktivitelerinin belirteci olarak değerlendirildi. N-1-pirenilmaleimid (PM) ; seçici olarak serbest $-\text{SH}$ gruplarının belirlenmesinde kullanılan nötral pH ortamında serbest sülfhidril ($-\text{SH}$) gruplarına bağlanır ve bu yüzden sistein amino asitlerinin kantitatif tayini için kullanılır [1], [44]. BSA; yapısında 35 sistein amino asidi bulundurur ve bu amino asitlerden 34 nolu sistein amino asidi (Cys34) hariç diğerleri 17 disülfid bağı ile sistinleri oluşturarak BSA yapısının stabilitesini arttırır [36]. Buna göre eksimer emisyonu oluşturmak için iki piren halka sisteminin BSA üzerinde uygun konfigürasyonlarda 0,3-0,5 nm'lik konumlarda karşılıklı pozisyonlarda durması gerektiğinden [38], [39], BSA yapısında Cys34 üzerindeki tek serbest $-\text{SH}$ grubunun PM ile modifikasyonu eksimer emisyonu üretmeye olanak tanımaz. Çalışmamızda eksimer emisyonunu elde etmek amacıyla PM'in bazik koşullarda (pH:9), hem serbest- NH_2 hem de serbest- $-\text{SH}$ gruplarına

bağlanabilme (Şekil 2.38, Şekil 2.39) özelliğinden [44] 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 [38], [39] amin grupları üzerindeki bu modifikasyonun gerçekleştiğini kanıtladı. Floresans ömür dağılımındaki değişiklikler serbest tripsin ve PAA-tripsin konjugatı aktiviteleri arasındaki farklılıkları belirlemek için kullanıldı. Literatürde; tez çalışmamızı özel ve eşsiz yapan serbest ve PAA konjugatlı tripsin arasındaki aktivite farklılığını açıklayan floresans ömür dağılımındaki değişikliklerle ilgili daha önce bir çalışma yapılmamış olunmasıdır.



DENEYSEL BÖLÜM

Biyomakromoleküllerin uygulama alanları ve özellikleri sentetik polimerleri bağlayarak geliştirilmiştir ve daha da genişletilmiştir. Enzim immobilizasyonu enzimlerin katalitik stabilitesini geliştirmek amacıyla yapılı ve nötr olan katalizörlerin uygulama alanlarını genişletebilir. Enzim immobilizasyonu için günümüzde sentetik organik polimerler, biyopolimerler, hidrojeller, inorganik destekler ve akıllı polimerler de dahil olmak üzere pek çok kimyasal madde kullanılır ve dolayısıyla bu maddeler sayesinde iyi bir enzim aktivitesi ve kararlı termostabilite özellik gözlemlenir [1]. Enzimlerin kovalent immobilizasyonu için kullanılabilen bir dizi fonksiyonel grup; amino, hidroksil, karboksil ve fenolik grupları içerir. Konjugasyonun fiziksel yapısı ve kimyasal bileşimi de immobilize edilen türlerin mikro koşullarını ve dolayısıyla biyolojik özelliklerini etkileyebilir [2]. Enzimlerin polimerlerle yapmış olduğu immobilizasyon ve konjugasyon çalışmaları; tıp alanında, temel bilimlerde ve birçok alanda da kolaylık sağlayabilir [3]. Bu çalışmada, PM-BSA kompleksinin floresan ömür dağılımları üzerinde zamana dayalı spektrofotometre kullanılarak, poliakrilik asit (PAA) ile tripsinin kovalent konjugatının aktivitesi incelendi. Çalışmamızın amacı serbest tripsin ve PAA-konjuge tripsin maddelerinin PM-BSA kompleksinin floresan ömür dağılımları üzerindeki proteolitik etkileri arasında belirgin farklılıklar olup olmadığını araştırmaktır. Bunu belirleyebilmek için; [61]'deki metoda göre sentezlenen PM-BSA'nın eksimer floresansın verilerini kullandık. Uyarılmış hal dimer kompleksleri, sadece uyarma süresince varlıklarını sürdürürler. Proteinlerin denatürasyon ve hidrolizlenmeleri ile ilgili detaylı bilgiler proteinlerin üç boyutlu yapısında meydana meydana gelen değişikliklerden kolaylıkla etkilenen eksimer emisyon değerleri kullanılarak elde edilebilir [51], [52], [53]. Uyarma kesildiğinde,

dimerler monomer formlarına parçalanarak uyarılmış dimerik hal kaybolur. Eksimer; aynı moleküllerin oluşturduğu uyarılmış hal dimerlerine, farklı moleküllerin oluşturmuş olduğu uyarılmış hal dimerlerine de eksimer denir [38], [43].

Çalışmamız aşağıda belirttiğimiz yolu izleyerek gerçekleştirilmiştir:

a- PM-BSA sentezi öncesinde, deneylerimizde kullandığımız PM ve BSA reaktiflerinin (floresans bozunma eğrileri, floresans spektrumları, floresans ömür dağılımları) floresans özellikleri "PTI Time Master C 71" markasına sahip zaman ayırmalı spektrofotometrede belirlendi.

b- PM-BSA kompleksi (pH: 9, +37 °C) uygun koşullar altında sentezlendi ve kompleksin floresans özellikleri belirlendi.

c- PM-BSA kompleksi jel filtrasyon kromatografisi ve ultrafiltrasyonla saflaştırıldı.

d- Saflaştırılma sırasında PM-BSA örneğinin PM/BSA mol oranı hesaplandı.

e- PAA ile tripsin enzimlerinin konjugasyonu sağlandı.

f- Saflaştırılan PM-BSA örneği, tripsin proteazlarının etkisine bırakıldı.

g- Proteoliz sonrası oluşturulan proteaz ürünü hidrolizatının floresans bozunma ve floresans spektrum eğrileri "PTI Time Master C 71" zamana bağımlı spektrofotometreden elde edildi ve bu eğrilere ait verilerden faydalanarak, cihaza bağlı bilgisayara kurulu olan ve cihaza bilgisayarla kumanda etmemizi sağlayan Felix32 programında yer alan ESM ile floresans ömür dağılımları belirlendi.

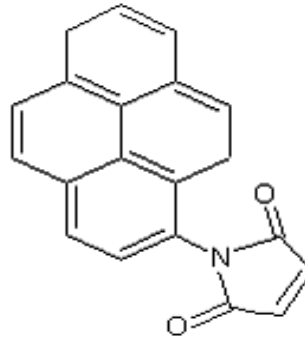
Serbest tripsin ve PAA ile konjuge edilen tripsinin aktiviteleri tarafından üretilen PM-BSA hidrolizatlarının ve PM-BSA'nın floresans ömür dağılımları karşılaştırıldı. Hidroliz öncesi ve sonrası elde edilen floresans ömür dağılımları karşılaştırdığında; aynı substrattan (PM-BSA) proteaz (tripsin) etkisi 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.

PM-BSA'nın hidrolizatından PAA-tripsin biyokonjugatı ile üretilen floresan ömür dağılımı; eş zamanlı olarak tripsin aktivitesinin önemli ölçüde azaldığını gösterdi. Bu sonuç, kovalent modifikasyonun bir sonucu olarak PAA'nın tripsinin aktif bölgesine bağlanmasından kaynaklanmış olabilir. Bununla birlikte, aktif bölgenin dış kısmına yakın bile olsa, PAA- tripsin konjugatı tarafından üretilen hidrolizat içerisindeki peptitlerin konumunun floresans ömür dağılımındaki değişikliklerle hassas bir şekilde izlenebileceği görülmüştür.

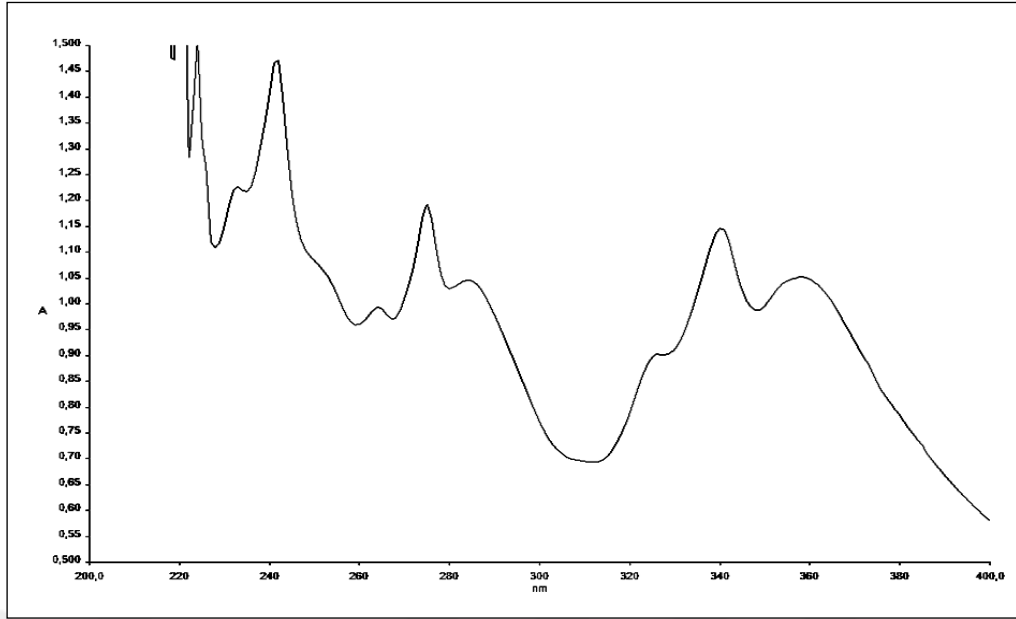
Yukarıda maddeler halinde sıraladığımız çalışmamızın aşamaları aşağıda detayları ile sunulmaktadır:

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

PM-BSA'yı sentezledikten sonra bağlanma oranlarını belirleyebilmek için; molekül yapısı Şekil 4.1'de gösterildiği gibi PM'in stok çözeltisinden "8 mg PM/mL DMSO", Tris-HCl tamponundan da (0,025 M, 0,1 M NaCl, 0,005 M CaCl₂, pH:8) alınarak hazırlanan 8×10^{-5} M çözeltisinin absorpsiyon spektrumu "Perkin Elmer Lambda 25 UV/Vis Spectrophotometer" cihazında Hellma 104-QS küvet kullanılarak alındı (Şekil 4.2).



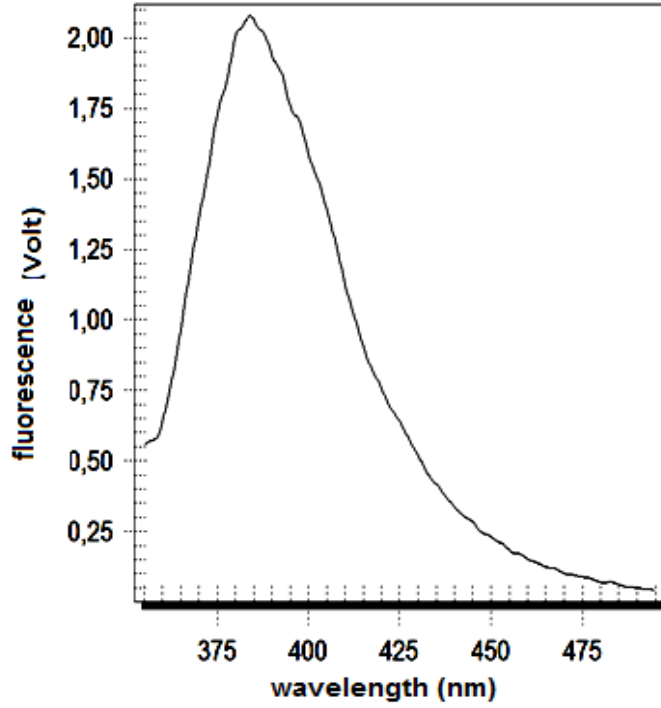
Şekil 4.1 N- (1-pirenil)maleimid (PM)



Şekil 4.2 Tris-HCl tamponunda (0,025 M, 0,1 M NaCl, 0,005 M 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

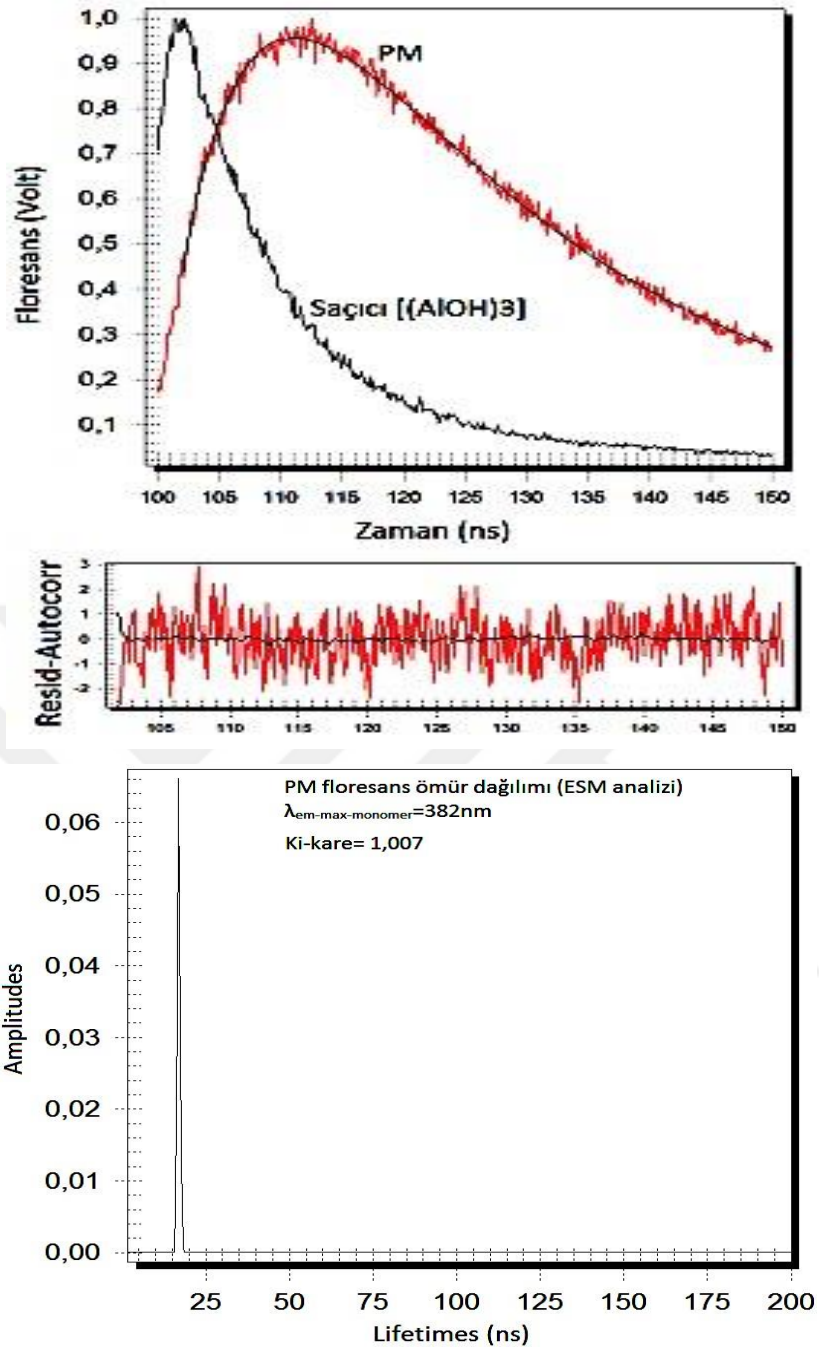
Şekil 4.2'de 280 nm'de PM'in absorbansının olduğu görülmektedir. Bu absorbans, PM-BSA'nın protein içeriğinden kaynaklı 280 nm'deki karakteristik absorbansı (Şekil 4.8) ile çakışır. PM-BSA kompleksi sentezlendikten sonra, PM/BSA mol oranı hesaplanırken PM'in PM-BSA absorbansına yaptığı katkı, düzeltme faktörü ($DF = A_{PM-280nm}/A_{PM-344nm} = 1,0291/1,0548 = 0,976$) kullanılarak giderilmiştir.

PM'nin zaman ayırmalı emisyon spektrumu da aynı şartlar altında alındı (Şekil 4.3).



Şekil 4.3 Tris-HCl tamponunda (pH:8) 0,025 M, 0,1 M NaCl, 0,005 M CaCl₂, 5x10⁻⁵ M PM'in zaman ayırmalı floresans spektrumu. (λ_{exc} : 337 nm; $\lambda_{emis-max-monomer}$: 382 nm; İntegrasyon süresi: 0,1 s; İlerleme sayısı: 0,25; Geciktirme süresi: 117 ns; Tekrarlama sayısı: 3

Şekil 4.3'ten de görüldüğü gibi PM'in karakteristik monomer emisyon piki 382 nm civarında bulunmuştur. 382 nm dalga boyundaki PM floresansının zamana dayalı bozulması Şekil 4.4'de verilmektedir.



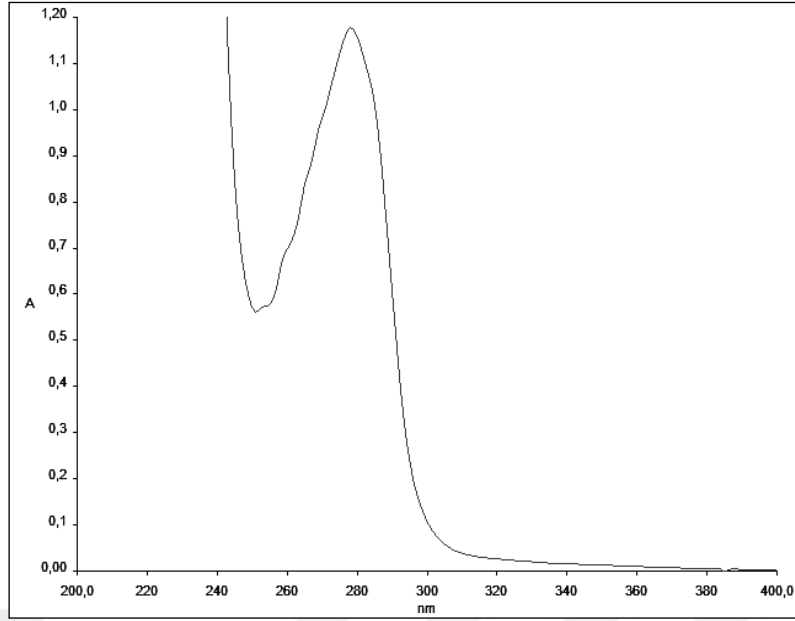
Şekil 4.4 Tris-HCl tamponunda (0,025 M, 0,1 M NaCl, 0,005 M CaCl₂, pH:8) 3×10^{-5} M PM floresans bozunma eğrisi, bozunma verilerinin eğriye uyarlanması ve floresans ömür dağılımı(ESM, Ki-kare:1,007). Saçıcı eğrisi, lamba pulslarının zamana göre azalma profilini vermektedir. λ_{exc} : 337 nm; $\lambda_{emis.max}$: 382 nm; İntegrasyon süresi: 0,1; Kanal sayısı: 400; Tekrarlama :3

PM floresans bozunma grafiğinden elde edilen verilere göre; “PTI Time Master C-71” markalı spektrofotometre cihazımızdaki Felix32 programında bulunan ESM analiz prosedürü uygulandı. Bu analize göre bozunma verilerine en uygun eğri ve bu eğrideki verilere göre floresans ömür dağılımı; ESM yöntemi için uygulanan Ki-kare analizi (Eşitlik 2.43) ile PM’in Kikare değerin 1,007 olduğunu ortaya çıkarmıştır. Şekil 4.4’te PM’in floresans ömür dağılımının 15-20 ns arasında olduğu gösterilmiştir.

4.2 BSA’nın Absorpsiyon ve Emisyon Özellikleri

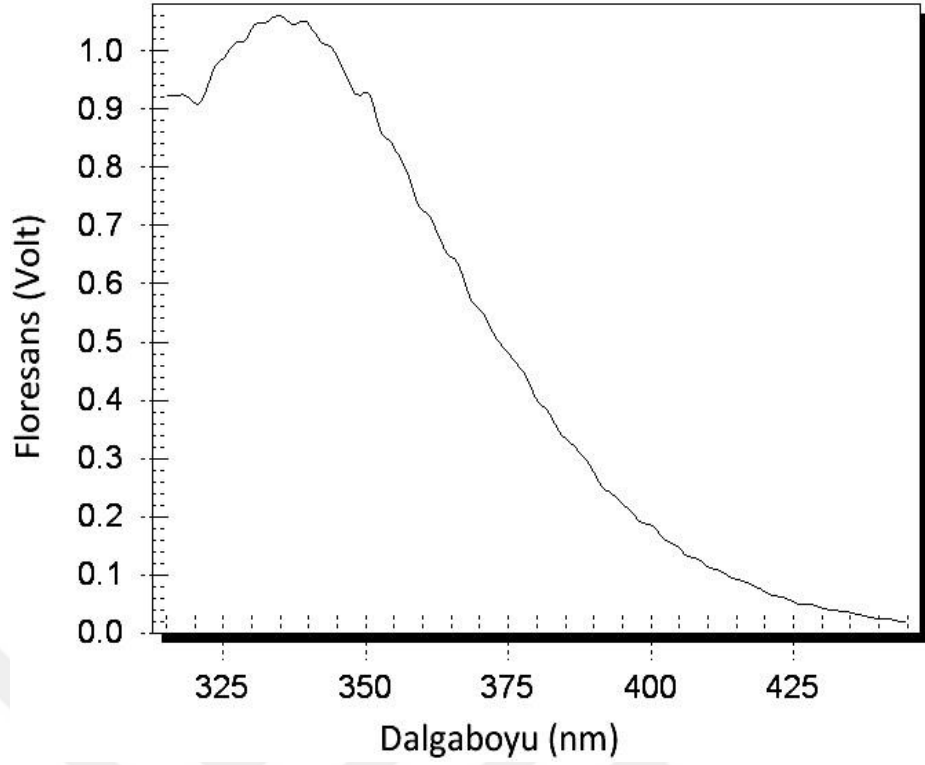
BSA’nın Tris-HCl (pH:8) tamponunda alınan absorpsiyon spektrumunda (Şekil 4.5) karşılaştığı gibi proteinlerin yapısında bulunan üç halkalı aminoasit (fenilalanin, triptofan, tirozin) vasıtasıyla UV bölgede 280 nm civarında maksimum pik verirler. Triptofanın absorpsiyon şiddeti, eşit konsantrasyonlarda ve belirli (optimum) şartlar altında tirozinle karşılaştırıldığında yaklaşık dört kat daha güçlüdür.

Triptofanın floresans özelliği diğer iki aminoaside göre daha baskındır. Triptofan içerikli proteinin floresansı, triptofanın bulunduğu konuma göre farklılığa sebep olur. Proteinin konformasyonunda meydana gelen değişiklikler, substratın bağlanması, alt birimler ile arasındaki ilişki ve proteinlerin yapısında bazı değişiklikler sonucunda meydana gelen denatürasyon triptofanın bulunduğu konumu etkileyen başlıca faktörlerdir.



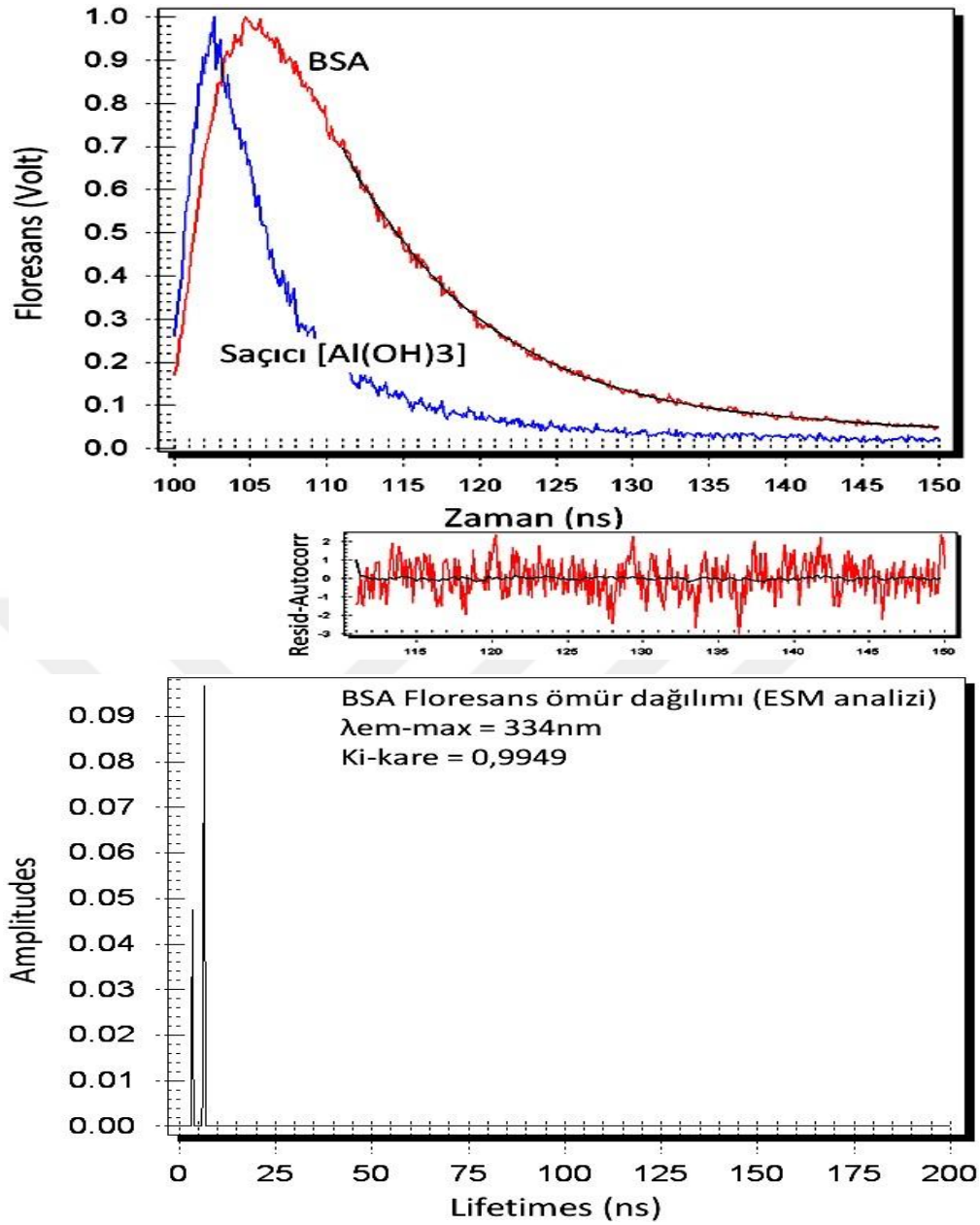
Şekil 4.5 Tris-HCl tamponunda 3×10^{-5} M BSA (pH:8, 0,025 M, 0,1M NaCl, 0,005 M CaCl_2) absorbands spektrumu

Şekil 4.6'da PM ile aynı koşullar altında hazırlanan BSA'nın floresans spektrumu gösterilmektedir. BSA'nın maksimum floresans emisyonu Tris-HCl tamponunda (pH:8, 0,025 M, 0,1 M NaCl, 0,005 M CaCl_2) zaman ayrımlı floresans spektrumu yaklaşık olarak 334 nm civarında gözlenmektedir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6 Tris-HCl tamponunda (pH:8, 0,025 M, 0,1 M NaCl, 0,005 M CaCl₂,) 8×10^{-5} M. BSA zaman ayırmalı floresans spektrumu $\lambda_{emis.max}$: 334 nm, λ_{exc} : 295 nm ; İntegrasyon süresi: 0,1; İlerleme sayısı:0,25; Geciktirme süresi : 117 ns; Tekrarlama sayısı : 3

Bu maksimum emisyon dalgaboyunda elde ettiğimiz floresans bozunma grafiği sayesinde, Felix 32 programının içermiş olduğu ESM analizi prosedürü kullanılarak bozunma verilerine en uygun eğri ve bu eğrinin verilerine göre BSA'nın floresans ömür dağılımı ESM analizi için uygulanan Ki-kare analizi (eşitlik 2.46) ile Ki-kare: 0,9949 değerine ulaşılarak elde edildi (Şekil 4.7). BSA'nın floresans ömrünün 4 ns ve 6 ns civarında iki pik şeklinde dağılım gösterdiği grafik Şekil 4.7'de verilmektedir.

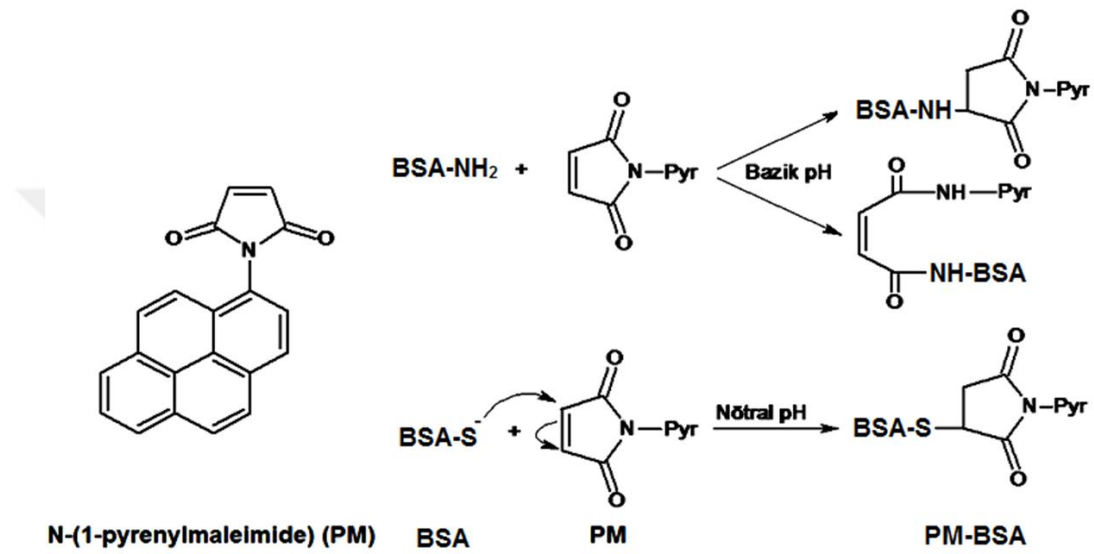


Şekil 4.7 Tris-HCl tamponunda (pH:8 ; 0,025 M, 0,1 M NaCl, 0,005 M CaCl₂) 8×10^{-5} M. BSA floresans bozunma eğrisi, bozunma verilerinin eğriye uyarlanması ve floresans ömür dağılımı (ESM, Ki-kare:0,9949). Soldaki saçıcı eğri, lamba pulslarının zamana göre değişimini verir. $\lambda_{emis.max}$: 334 nm ; λ_{exc} : 295 nm; İntegrasyon süresi : 0,1; Kanal sayısı: 400; Tekrarlama sayısı : 3

4.3 PM-BSA Kompleksinin Sentezi

Floresans karaktere sahip maddelerle proteinlerin modifikasyon reaksiyonlarında genellikle “1 mg Protein/mL” veya daha fazla protein miktarı kullanılır [14], [39], [46]. Çalışmamızda eksimer floresansını oluşturmak için BSA’nın serbest -NH₂ ve -SH

gruplarıyla yüksek oranda PM bağlanmasını sağlayacak olan fosfat tamponu içerisinde [38] (PBS; 0,01 M NaH₂PO₄, 0,15 M NaCl, pH:9) “**20 mg BSA/mL**” BSA stok çözeltisi hazırlandı. PM stok çözeltisi de dimetilsülfoksit (DMSO) içerisinde “**8 mg PM/mL DMSO**” konsantrasyonunda hazırlanarak +4°C’de uzun süreli kullanımlar için saklandı. PM ile BSA’nın konjugasyon (Şekil 4.8)reaksiyonu için, Eppendorf tüpü içerisinde toplam reaksiyon hacmi 1000 µL olacak şekilde aşağıdaki çözeltiler belirtilen hacimlerde birleştirildi;



Şekil 4.8 PM ile BSA’nın konjugasyon reaksiyonu mekanizması

I. 250 µL. BSA stok çözeltisi (20 mg.BSA/mL PBS)

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

II. 282 µL. PM stok çözeltisi (8 mg.PM/mL. DMSO), (MA_{PM} = 297,32)

PM mol oranı, BSA’nın 100 katı oranında belirlendi .BSA’nın yapısında tek serbest –SH içeren sistein-34 amino asidi ile birlikte 60 lizin amino asidinin serbest ε-NH₂ uçları mevcuttur.Ve burada iki madde arasındaki mol oranı farkında amaçlanan;bu serbest ε-NH₂ uçları ile yüksek oranda PM’i modifiye etmektir. Buna göre PM’den $n_{PM} = n_{BSA} \times 100 = 7,58 \times 10^{-8} \times 100 = 7,58 \times 10^{-6} \text{ mol}$ alabilmek için PM stok çözeltisinden kullanacağımız hacim;

$$V = \frac{7,58 \times 10^{-6} \times 1000 \mu l. (DMSO)}{\frac{8 \times 10^{-3} (g) PM}{297,32}} = 281,7107 \mu l \cong 282 \mu l. \text{ "Stok PM"} \quad (4.2)$$

III. 468 μ L Fosfat tampon çözeltisi (0,01 M NaH₂PO₄, 0,15 M NaCl, pH: 9)

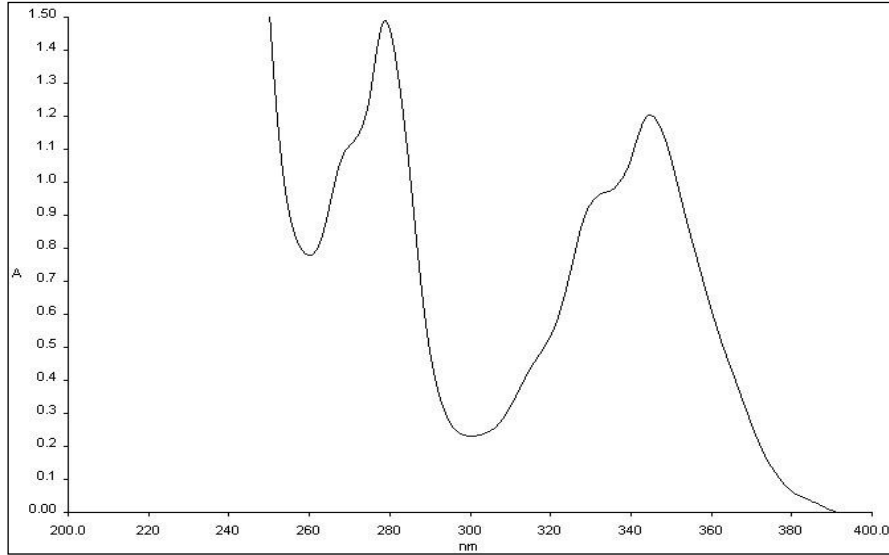
Hazırlanan reaksiyon karışımı 24 saat boyunca +37 °C’de çalkalamalı inkübatörde konjugasyon reaksiyonu için beklemeye bırakıldı.

4.4 PM-BSA’nın Saflaştırılması

Reaksiyon karışımından PM-BSA kompleksini ayırabilmek için; 1,5x20 cm boyutlarında Sephadex G-75 jeli ile dolu olan kromatografi kolonu kullanıldı. Hareketli faz olarak bidistile su kolondan geçirildi ve hazırlanan fraksiyonlar 2 mL’lik tüplerin içerisine alındı. "Perkin Elmer LAMBDA 25 UV / Vis" spektrofotometre cihazı kullanılarak 344 nm’de PM-BSA içeriğine sahip olduğu belirlenen fraksiyonlar "Vivaspin 6 (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Vivaproducts)" Santrifüj Konsantratöründe 6mL’lik hacimler halinde toplandı ve toplanan numuneler "SIGMA 3K30" soğutmalı santrifüj cihazı +4 °C’de 10000 rpm’de 2 saat süre ile santrifüjlenerek çözücü uzaklaştırıldı. Elde edilen saf PM-BSA örneği PAA-tripsin hidrolizi için uygun olan 6 mL Tris-HCl (0,025 M, 0,1 M NaCl, 0,005 M CaCl₂, pH:8) tamponunda çözülerek stok PM-BSA çözeltisi hazırlandı. [39]’daki yöntem uygulanarak yapılan mol oranı hesaplamaları sonucunda bir PM /BSA oranı 6 olarak hesaplandı.

4.5 PM-BSA Kompleksinde PM/BSA Mol Oranının Hesaplanması

Saflaştırma işlemleri sonucunda elde edilen PM-BSA stok çözeltisinden 1 mL alındı ve Tris-HCl(0.025 M, 0.1 M NaCl, 0,005 M CaCl₂, pH: 8) tamponunda 3 mL’ye kadar seyreltilti. Elde edilen çözeltinin absorbans değerleri; "Perkin Elmer LAMBDA 25 UV / Vis spektrofotometre cihazıyla A_{PM-BSA(280nm)}=0,64939 ve A_{344nm}=0,47672 olarak analiz edildi (Şekil 4.9).



Şekil 4.9 Tris-HCl tamponunda (pH:8 ,0,025 M, 0,1 M NaCl, 0,005 M CaCl₂,) PM-BSA kompleksi absorpsans 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 faydalanarak konsantrasyonun absorpsiyon cinsinden ifadesi;

$$C = \frac{A}{\epsilon \times b} \quad (4.3)$$

PM-BSA kompleksindeki PM ve BSA'nın konsantrasyonlarını oranlayacak olursak;

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

Eşitliğinde ışığın kuvvet içinde aldığı yol (b:1 cm) ve hacimler (V) aynı olduğundan bu ifade; eşitlik(4.5)' de olduğu gibi sadeleştirilebilir:

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

Şekil 4.2'de PM' in 280 nm'de absorpsiyon yaptığı gözlenmektedir. Böylece PM-BSA kompleksine ait 280 nm' de gözlemlediğimiz 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'daki eşitlikten BSA'ya ait absorpsiyonu çekecek olursak;

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

eşitliğini elde ederiz. PM-BSA kompleksindeki PM'in absorbans değerine olan katkısını belirlemek için, BSA absorpsiyonu değerinin, kompleks oluşumu ile değişmediğini kabul ederek saf PM'e ait absorbans değerlerinden faydalanabiliriz [62]. Şekil 4.2'de Tris-HCl tamponunda (pH:8) 8×10^{-5} M PM absorbans spektrumunda molekülün 280nm ve 344nm dalgalaboylarında verdikleri absorbans pik değerleri ; $A_{280}=1,0291$ ve $A_{344}=1,0548$ 'dir. Saf PM'e ait bu absorbans değerleri birbirine oranlandığımızda,

$$\frac{A_{PM(280nm)}}{A_{PM(344nm)}} = \frac{1,0291}{1,0548} = 0,9756351915 \cong 0,976 \quad (4.8)$$

sabiti elde edilir ve bu sabiti düzeltme faktörü (DF) olarak kullanıp eşitlik 4.8'den; eşitlik, 4.9'daki eşitlikteki gibi PM'in 280 nm'deki absorbansını 344 nm'deki gibi yazacak olursak;

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

ve böylece eşitlik 4.10'ü eşitlik 4.7'yi baz alarak tekrar yazarsak;

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

PM-BSA'daki saf BSA absorbans değerini ifade eden eşitlik 4.10 kullanılarak aşağıdaki gösterildiği gibi PM-BSA kompleksindeki PM ve BSA'nın mol oranlarını ifade eden eşitlik 4.11'i, eşitlik 4.5'i tekrar düzenleyerek yazdığımızda;

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

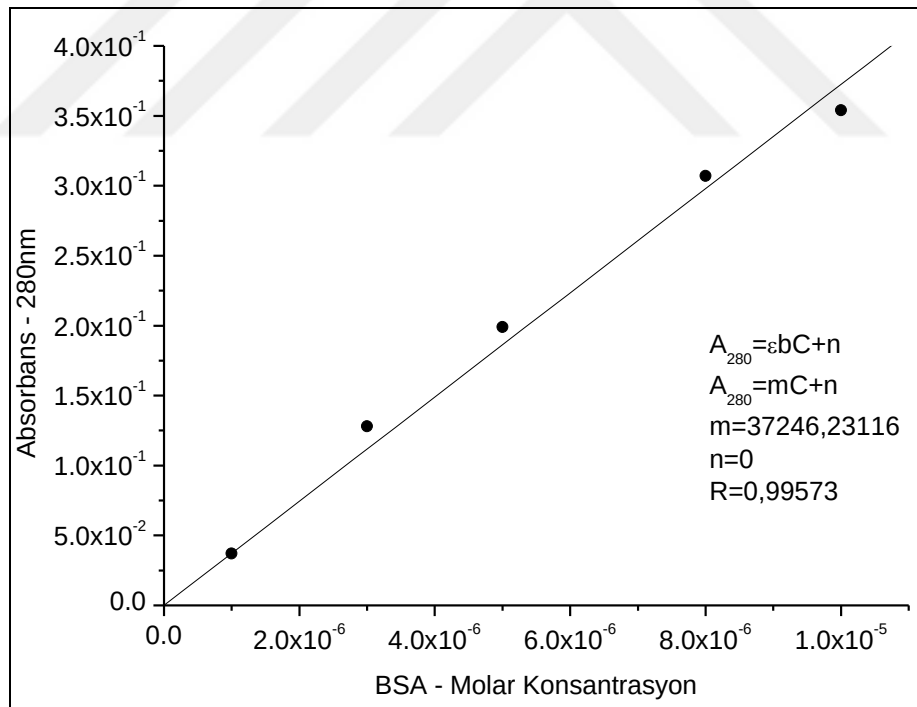
denkleme ulaşılır.

Bu basamaklardan sonra molar absorptiviteyi belirlememiz gerekir. Bu nedenle PM ve BSA için hazırladığımız standart absorpsiyon eğrilerinden faydalanıldı (Çizelge 4.1, Şekil 4.10 ve, Şekil 4.11).

Çizelge 4.1 Konsantrasyon değerlerine göre BSA'nın 280 nm'deki absorbens değerleri

$C_{BSA}(\text{Molar})$	A_{280}
$1,0 \times 10^{-6}$	0,037
$3,0 \times 10^{-6}$	0,128
$5,0 \times 10^{-6}$	0,199
$8,0 \times 10^{-6}$	0,307
$1,0 \times 10^{-5}$	0,354

BSA için Çizelge 4.1 konsantrasyonların absorbens değerleri "OriginPro7.0" programı kullanılarak grafik çizildi ve lineer regresyon uygulandı (Şekil 4.9). $R=0,99573$ sabitinin bu değere ulaşması sonucunda elde edilen eğrinin eğimi $m = 37246,23116$ bulundu. Bu eğim değeri BSA için molar absorptivite ($\epsilon_{BSA(280nm)}$) olarak alındı.



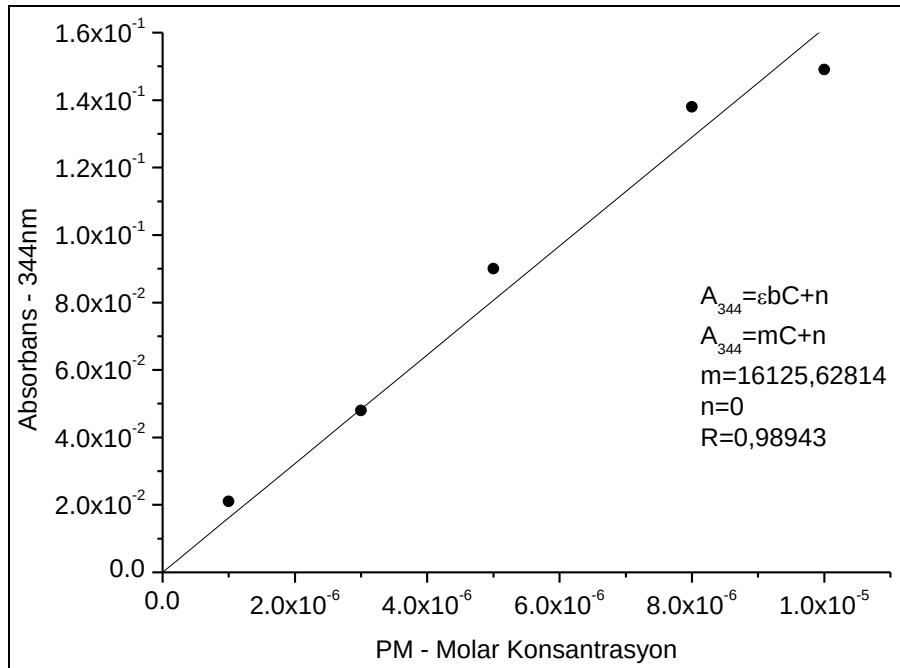
Şekil 4.10 Tris-HCl tamponunda (pH:8 0,025 M, 0,1 M NaCl, 0,005 M CaCl₂, pH:8) BSA standart absorbens eğrisi

PM'in molar absorptivitesini hesaplayabilmek için; Çizelge 4.2'deki konsantrasyonların absorbans değerleri "OriginPro7.0" programı kullanılarak grafik çizildi ve lineer regresyon uygulandı (Şekil 4.11).

Çizelge 4.2 PM'in konsantrasyon değerlerine göre 344 nm'deki 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

$R=0,98943$ sabitinin bu değere ulaşması sonucunda elde edilen eğrinin eğimi $m = 16125,62814$ bulundu. Bu eğim değeri BSA için molar absorptivite ($\epsilon_{PM(344nm)}$) olarak alındı.



Şekil 4.11 Tris-HCl tamponunda (pH:8 0,025 M, 0,1 M NaCl, 0,005 M CaCl₂, pH:8) PM standart absorbans eğrisi

Standart eğrilerden hesaplanan PM ve BSA'nın molar absorbans değerleri eşitlik 4.11'de yerine yazıldığında eşitlik 4.12 elde edilir;

$$\frac{C_{PM}}{C_{BSA}} = \frac{n_{PM}}{n_{BSA}} = \frac{\frac{A_{PM(344nm)}}{16125,62814}}{\frac{A_{PM-BSA(280nm)} - 0,976 \times A_{PM(344)}}{37246,23116}} \quad (4.12)$$

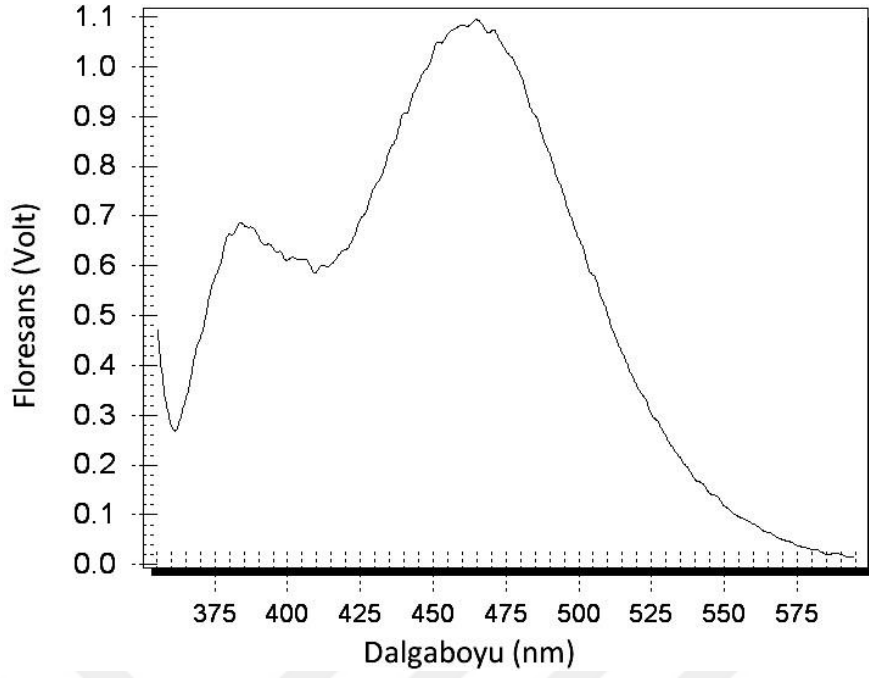
Eşitlik 4.12'de; saflaştırma sonrasında hazırladığımız PM-BSA çözeltisinin 280 nm ve 344 nm'deki absorbans değerleri yerine yazıldığında, PM-BSA kompleksinde “ n_{PM}/n_{BSA} ” mol oranı 6 olarak bulunmuştur (Eşitlik 4.13).

$$\frac{C_{PM}}{C_{BSA}} = \frac{\frac{0,47672}{16125,62814}}{\frac{0,64939 - 0,976 \times 0,47672}{37246,23116}} = \frac{2,95628794 \times 10^{-5}}{4,943084824 \times 10^{-6}} = 5,980653874 \cong 6 \quad (4.13)$$

4.6 PM-BSA kompleksinin Floresans Özellikleri

Fosfat tamponu sadece bağlanma reaksiyonu olarak kullanıldı çünkü proteazları inhibe etme özelliği gözlemlendiğinden dolayı PM-BSA'nın proteazlarla reaksiyonu sırasında Tris-HCl tamponu kullanılmıştır [12].

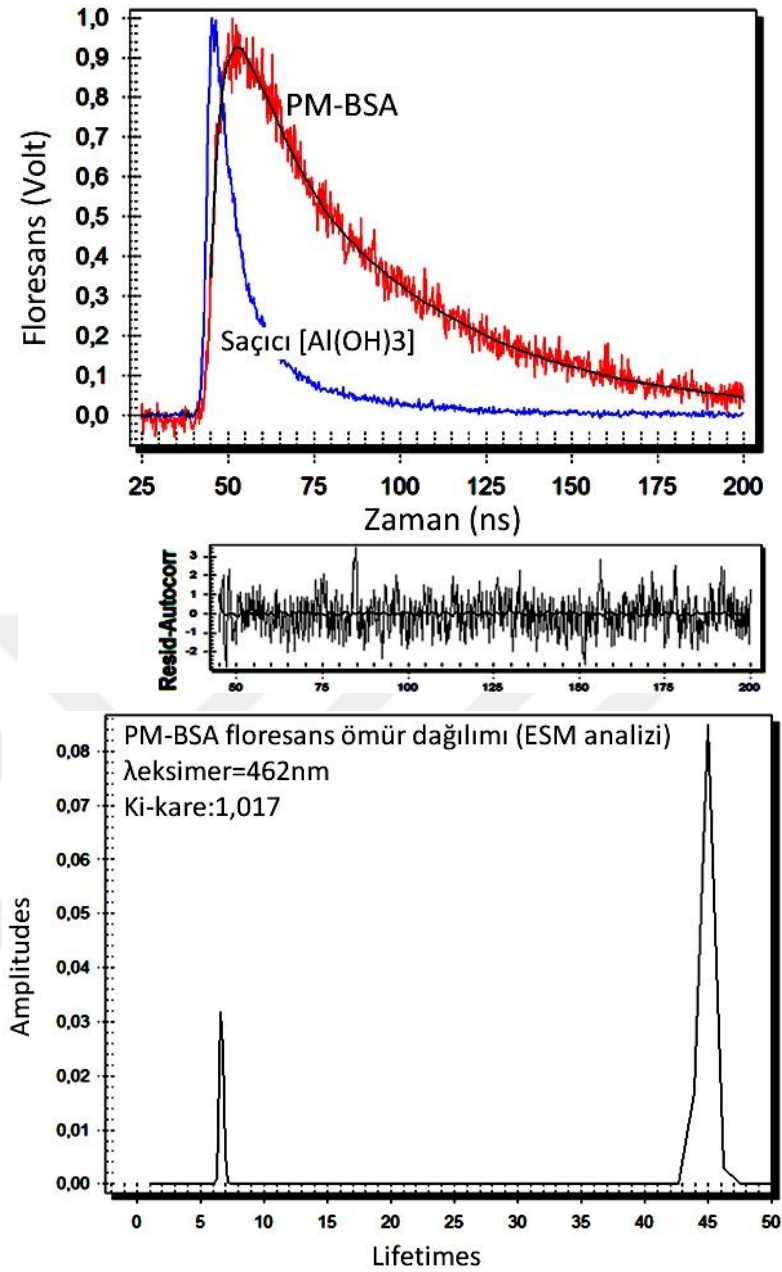
PM-BSA'nın tripsin proteazlarıyla reaksiyonundan önce, bu proteazın maksimum aktivite gösterdiği şartlarda (pH:8) PM-BSA kompleksi çözeltisinin zaman ayrımlı floresans spektrumu (Şekil 4.12), floresans bozunma grafiği ve floresans ömür dağılımı (Şekil 4.13) elde edildi.



Şekil 4.12 Tris-HCl tamponunda (0,025 M, 0,1 M NaCl, 0,005 M CaCl₂, pH:8) PM-BSA çözeltisinin zaman ayırmalı floresans spektrumu. λ_{exc} : 337 nm; $\lambda_{emis.max}$: 384 nm(monomer); $\lambda_{emis.max}$: 462 nm.(eksimer); İntegrasyon Süresi (Int. time): 0,1; İlerleme sayısı: 0,25; Geciktirme süresi: 60 ns; Tekrarlama sayısı: 3

Şekil 4.12’de PM-BSA molekülünün floresans spektrumunda, PM moleküllerinin BSA üzerinde 0,3 nm veya daha yakın mesafelerde konumlandırıldığıнын belirtisi olarak 464 nm civarında yeni ve yaygın bir pik olarak ortaya çıkan piren eksimer emisyonunu gözlemledik [51], [52], [53]. Nötral pH’da yalnızca sülfhidril gruplarına bağlanan maleimidin buna ilaveten bazik pH değerlerinde serbest amin gruplarına da bağlandığı bu spektrumla kanıtlanmıştır.

Tripsinin etkisiyle oluşan eksimer emisyonunun floresans ömür dağılımında (Şekil 4.12) meydana gelen değişiklikler tripsin proteazın aktivitesine özgünlük kazandırmıştır.



Şekil 4.13 Tris-HCl tamponunda (0,025 M, 0,1 M 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} : 337 nm; $\lambda_{\text{eksimer.max}}$: 462 nm; integrasyon süresi : 0,1; Kanal sayısı : 700; Tekrarlama: 3

464 nm'de PM-BSA kompleksinin eksimer emisyonunun floresans bozunma eğrisi ve bu eğriye ait verilerin ESM analizinde kullanılmasıyla elde edilen floresans ömür dağılım sonuçları Şekil 4.13'de verilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre kısa ömürlü eksimerlerin yaklaşık 7-9 ns arasında dağılıma uğradığı, daha uzun ömürlü eksimerlerde ise bu dağılımın 44-46 ns'ler arasında ortaya çıktığı gözlemlenmiştir.

PM-BSA kompleksinin floresans ömür dağılımını, PM ve BSA moleküllerinin floresans ömür dağılımları (Şekil 4.4, Şekil 4.7) ile karşılaştırdığımızda; bu kompleksin yapısında nisbeten daha hidrofobik bölgelerde konumlanmış olan eksimerlerden kaynaklanan uzun ömürlü floresans emisyonu gösteren sistemler (44-46 ns aralığında) PM-BSA'ya özgüdür.

Bu çalışmada; PM-BSA'nın serbest tripsin ve PAA-tripsin konjugatı ile hidrolizinden elde edilen dağılımların önemli derecede farklılık gösterdiği belirlendi.

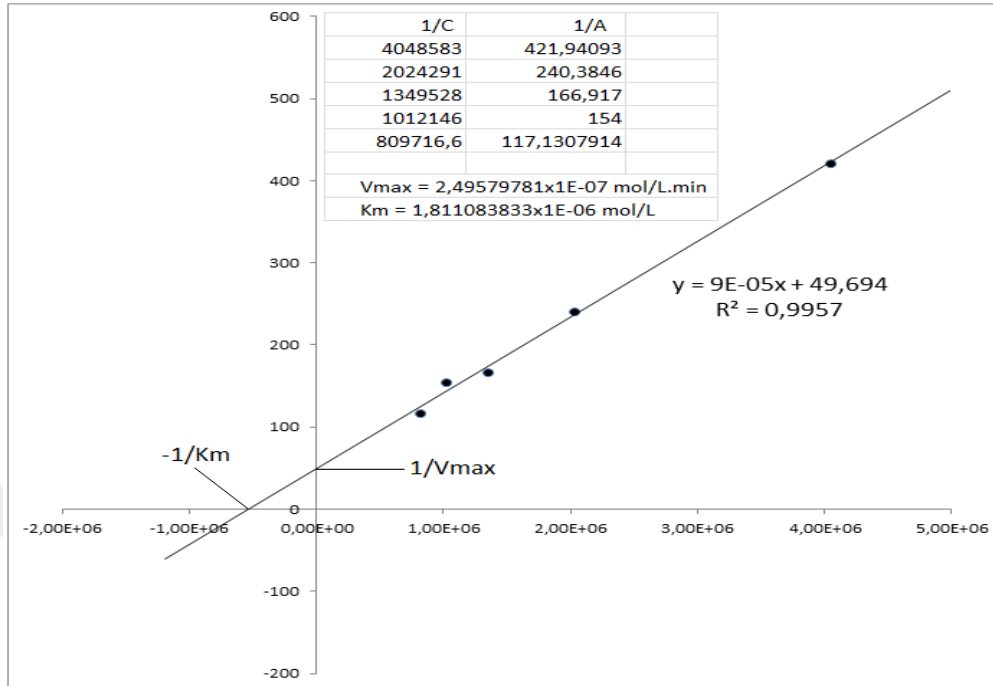
4.7 PAA–tripsin konjugatının sentezi

PAA-tripsin biyokonjugatında PAA/tripsin oranı 1:1'dir [11]. Bu amaçla $2,7615 \times 10^{-3}$ M PAA stok çözeltisinden 1 mL ($d=0,789$ g/mL; %35; $M_w=100000$) alındı ve Tris-HCl tamponuyla (pH:5; $2,7615 \times 10^{-4}$ M PAA) 10 mL'ye seyreltildi. 0,5523 gram 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid (EDC, $MW = 191,7$) çözeltiye eklendikten hemen sonra PAA'yı aktive etmek için karışım 2 saatliğine manyetik karıştırıcıda inkübasyona bırakıldı. Bu işlemten sonra aktive edilen PAA içerisine 0,0012 M tripsin çözeltisinden 1 mL ilave edildi ve PAA-tripsin konjugatını sentezlemek amacıyla 12 saat boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında UV-VIS spektrofotometrede 280 nm'de ölçülen $A_{280nm}(PAA-tripsin)=2,5842$ absorbans değeri ve $\epsilon=37246,23116$ molar absorptivite değeri kullanılarak biyokonjugat konsantrasyonu $M_{PAA-trypsin}=6,93815 \times 10^{-5}$ M olarak hesaplandı. PM-BSA kompleksinin floresans ömür üzerinde PAA-tripsin konjugatının proteolitik etkisi zaman ayrımlı spektrofotometre aracılığıyla tespit edildi.

4.8 PM-BSA Kompleksi Üzerinde PAA-tripsin Etkisinin UV-VIS Spektrofotometre İle İncelenmesi

PM-BSA stoğundan ($4,94 \times 10^{-6}$ M, pH = 8, Tris-HCl) alınan 100, 200, 300, 400, 500 μ L'lik numuneler, Tris-HCl tamponu (pH: 8) ile 2 mL'ye kadar seyreltildi ve böylece $2,47 \times 10^{-7}$, $4,94 \times 10^{-7}$, $7,41 \times 10^{-7}$, $9,88 \times 10^{-7}$, $1,235 \times 10^{-6}$ molar farklı konsantrasyonlarda PM-BSA hazırlandı. Her çözeltiye 36 μ L $6,93815 \times 10^{-5}$ M PAA-tripsin ($1,235 \times 10^{-6}$ M, 2mL) eklenerek UV-VIS spektrofotometrede 344 nm'de 30 saniyelik aralıklarla 5 dakika

boyunca alınan absorbans değerleri arasındaki farkların ortalaması kullanılarak Lineweaver-Burk grafiği excel programında çizildi (Şekil 4.14).



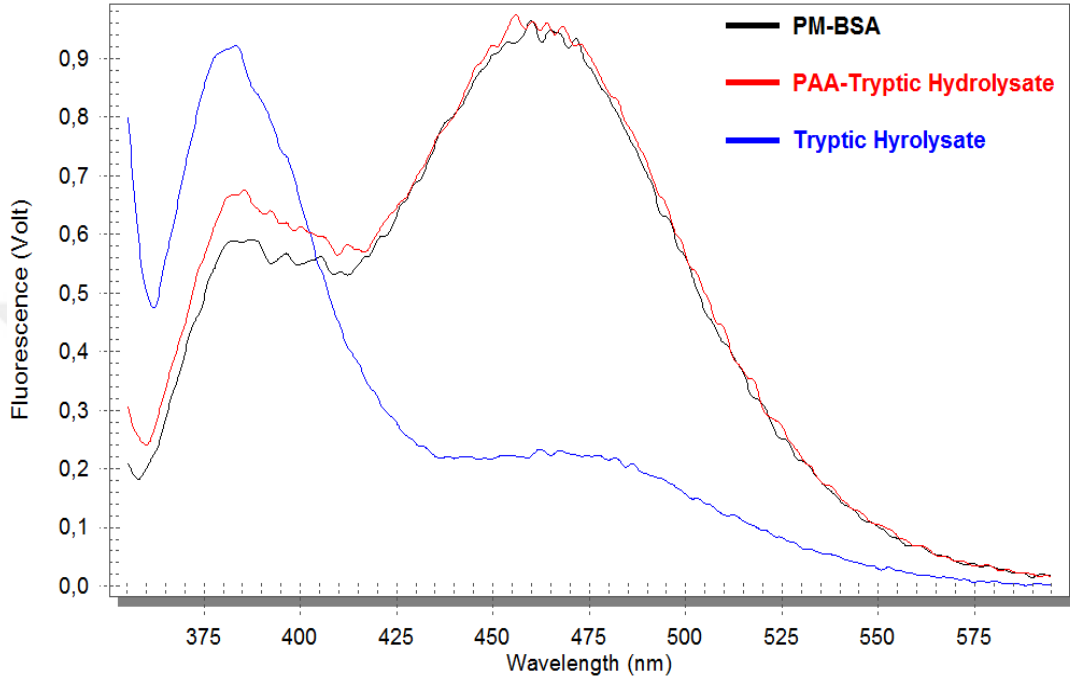
Şekil 4.14 PAA-tripsin konjugatı ile PM-BSA kompleksinin hidrolizlenmesinden elde edilen Lineweaver-Burk grafiği

Grafik denklemi ($y = 9E-05x + 49,694$; $R^2 = 0,9957$) kullanarak, Vmax ve Km değerleri hesaplandı. Vmax = $2,1 \times 10^{-4}$ M ve Km = $1,77326 \times 10^{-7}$ M olarak bulundu. Bu sonuçlar, Km ve Vmax değerlerinde büyük bir düşüş olduğunu göstermektedir [59]. Buna göre, tripsinin PAA'ya kovalent modifikasyon ile konjugasyonu; muhtemelen aktif bölgenin PAA ile örtülmesi sonucu önemli bir aktivite kaybına neden olmuştur.

4.9 PM-BSA Kompleksi Üzerine PAA-Tripsin Konjugat Etkisinin Zaman Ayrımlı Floresans Tekniği İle İncelenmesi

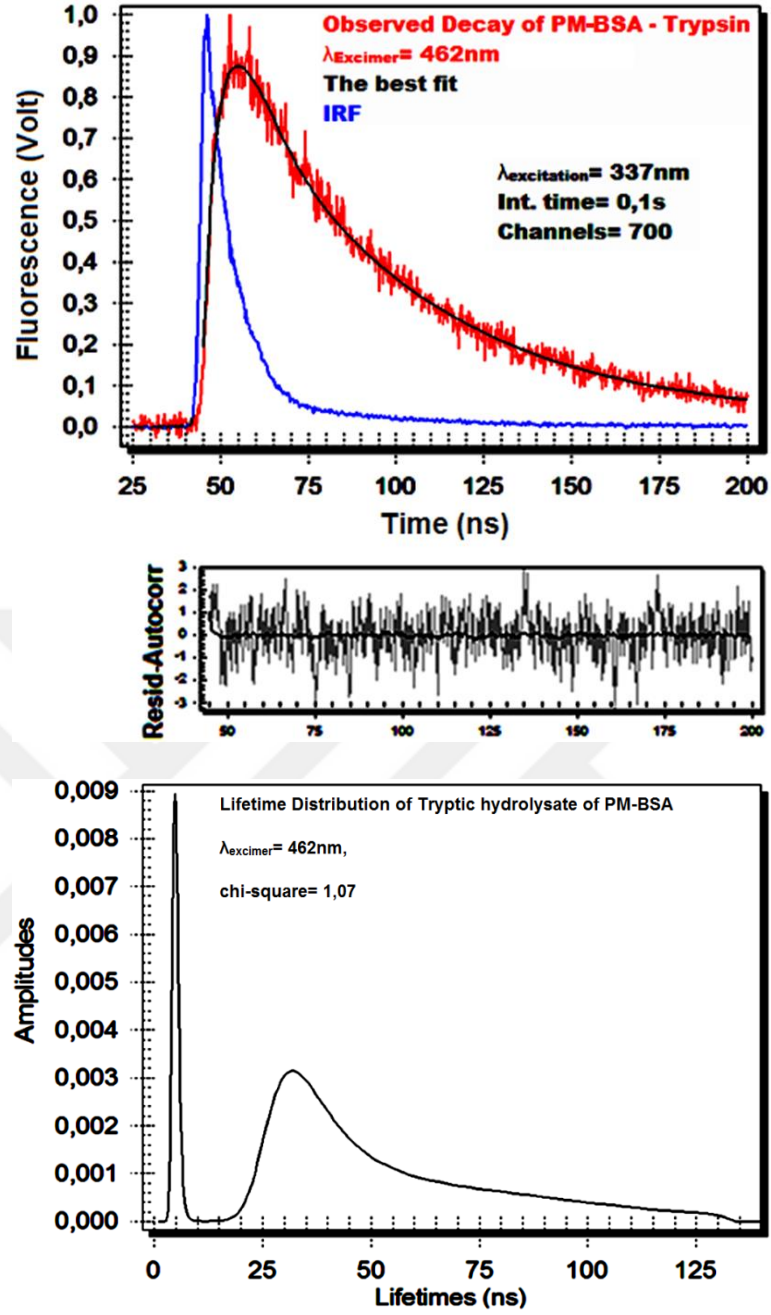
Şekil 4.15 'deki absorpsiyon değerleri ($A_{PM-BSA(280nm)} = 0,64939$; $A_{PM(344nm)} = 0,47672$) ve BSA'nın standart absorpsiyon eğrisinden elde edilen (Şekil 4.9) molar absorptivite değeri eşitlik 4.12'de kullanılarak PM-BSA stok çözeltisinin (pH=8, TrisHCl) konsantrasyonu; $4,94 \times 10^{-6}$ M olarak hesaplandı. PM-BSA (pH=8, Tris-HCl) stok çözeltisinden 500 μ L alındı ve Tris-HCl (pH: 8) ($M_{PM-BSA(0,5)} = 1,235 \times 10^{-6}$ M) tampon çözeltisiyle 2 mL'ye seyreltildi. Bu çözelti içerisine PM-BSA kompleksinin PAA-tripsin ile tam hidrolizi için, ($n_{PM-BSA}/n_{PAA-tripsin}$)=1 mol oranında olacak şekilde PAA-tripsin konjugatı

çözeltisinden ($M_{\text{PAA-trypsin}} = 6,93815 \times 10^{-5} \text{ M}$) 36 μL eklendi ve 30 °C'de 24 saat boyunca su banyosunda inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonrası PAA-tripsin konjugatının aktivitesiyle PM-BSA'nın floresans spektrumu ve floresans ömür dağılımındaki değişimler elde edildi ve serbest tripsin etkisi altında floresans spektrumu ve floresans ömür dağılımında gözlenen değişimlerle karşılaştırıldı [61].



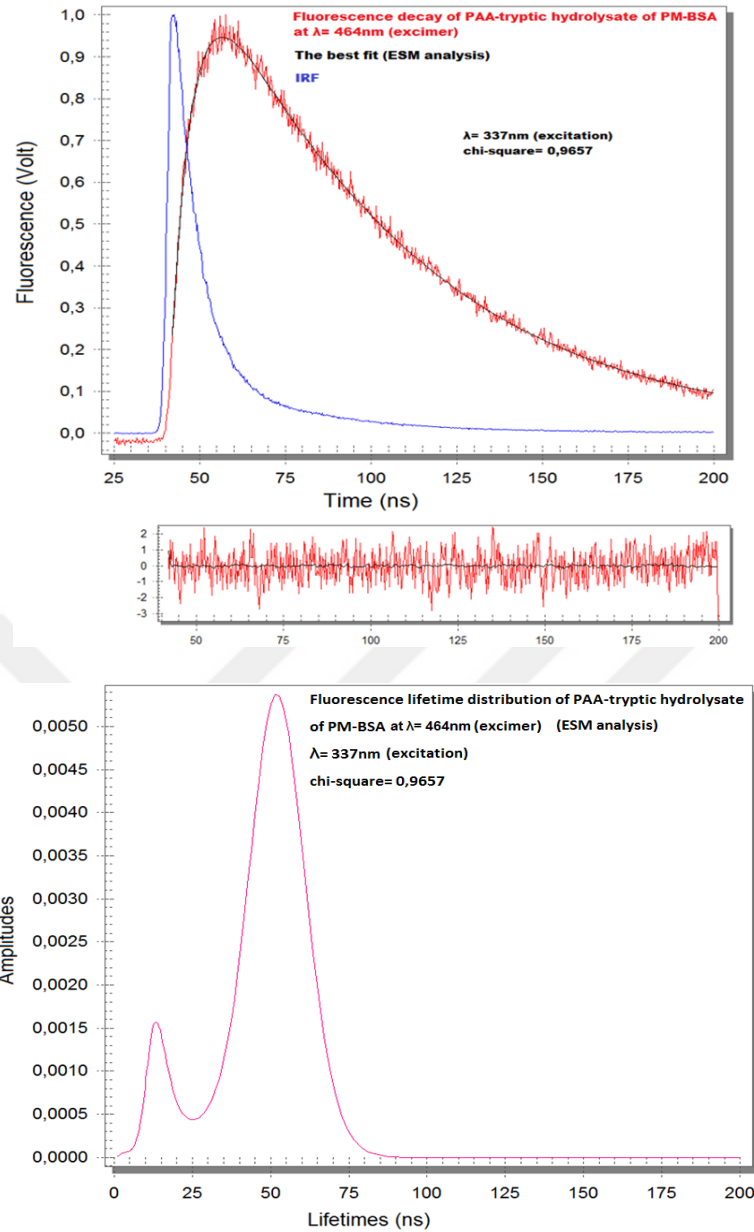
Şekil 4.15 Tris-HCl (0,025 M, 0,1 M NaCl, 0,005 M CaCl_2 , pH: 8) tamponunda serbest tripsin ve PAA-tripsin konjugatıyla PM-BSA çözeltisiyle muamele öncesi ve sonrasında alınan zaman ayrımlı floresans spektrumları 2 mL. λ_{exc} : 337 nm ; $\lambda_{\text{emis.max}}$: 384 nm (monomer); $\lambda_{\text{emis.max}}$: 464 nm (eksimer)

PM-BSA kompleksinin tripsin etkisi öncesi ve tripsin etkisi sonrası floresans spektrumlarındaki değişimler karşılaştırıldığında (Şekil 4.16); 464 nm'de maksimum eksimer emisyonunun büyük miktarda azaldığı ve 384 nm'deki monomer emisyonunun arttığı görülmektedir. Buna göre, eksimer emisyonunu oluşturmaya uygun mesafelerde birbirlerine karşılıklı konumlanmış düzlemsel piren halka çiftlerinin önemli bir kısmının, serbest tripsinin hidrolitik etkisinden dolayı pozisyonlarının bozulduğu anlaşılmaktadır. PM-BSA'nın PAA-tripsin ile hidrolizi sonrasında, 384 nm'de maksimum verdiği monomer emisyonundaki küçük bir artış haricinde herhangi bir önemli değişim gözlemlenmemiştir. Buna göre PAA ile konjugasyon sonucu tripsin aktivitesinde önemli derecede kayıp oluşmuş ve inhibisyon meydana gelmiştir.



Şekil 4.16 Tris-HCl tamponunda (0,025 M, 0,1 M NaCl, 0,005 M CaCl₂, pH:8) serbest tripsin etkisinde PM-BSA'dan elde edilen hidrolizata ait floresans bozunma eğrisi, bozunma verilerinin eğriye uyarlanması ve floresans ömür dağılımı (ESM, Ki-kare: 1,07). Soldaki saçıcı eğri, lamba pulslarının zamana göre değişimini vermektedir. $\lambda_{\text{exc}} = 337\text{ nm}$; $\lambda_{\text{eksimer.max}} = 462\text{ nm}$; İntegrasyon süresi : 0,1; Kanal sayısı : 700; Tekrarlama:3

Şekil 4.17; serbest tripsin etkisinde PM-BSA'dan elde edilen hidrolizata ait floresans ömür dağılımını vermektedir. Ve PAA-tripsin konjugatı ile PM-BSA'nın hidrolizi sonucunda oluşan floresans ömür dağılımı gösterilmektedir.



Şekil 4.17 Tris-HCl tamponunda (0,025 M, 0,1 M NaCl, 0,005 M CaCl_2 , pH:8) PAA-tripsin konjugatı etkisinde PM-BSA'dan elde edilen hidrolizata ait floresans bozunma eğrisi, bozunma verilerinin eğriye uyarlanması ve floresans ömür dağılımı (ESM, Ki-kare: 0,9657). Soldaki saçıcı eğri, lamba pulslarının zamana göre değişimini vermektedir. λ_{exc} : 337 nm; $\lambda_{\text{eksimer.max}}$: 464 nm; İntegrasyon süresi : 0,1; Kanal sayısı : 700; Tekrarlama:3

PM-BSA'nın serbest tripsin hidrolizi sonrası, hidrolizden etkilenmemiş eksimerlerin çözücüye maruziyetlerinin artması nedeniyle, beklendiği gibi floresans ömür dağılımının daha kısa ömürlü emisyonlara kaydığı görülmektedir. Serbest tripsin ile hidrolizin aksine, PM-BSA'nın PAA-tripsin konjugatı ile hidrolizi sonrası daha uzun ömür dağılımına sahip emisyonların oluşumu gözlemlenmektedir. Bu sonuçlar; PAA-tripsin biyokonjugatı bünyesinde yer alan tripsinin hidrolitik karakterinin değiştiğini, tamamlanmamış

hidrolizden dolayı ortaya çıkan peptidlerin daha apolar karakterde olduğunu ve eksimerlerin bu peptidlerin oluşturduğu apolar ortamla çevrelendiklerini, bu nedenle çözücü molekülleri ile daha az etkileşime girdiğini göstermektedir ki; tüm bu değerlendirmeler konjugat yapısında bulunan tripsinin aktivitesinin azaldığına işaret etmektedir.

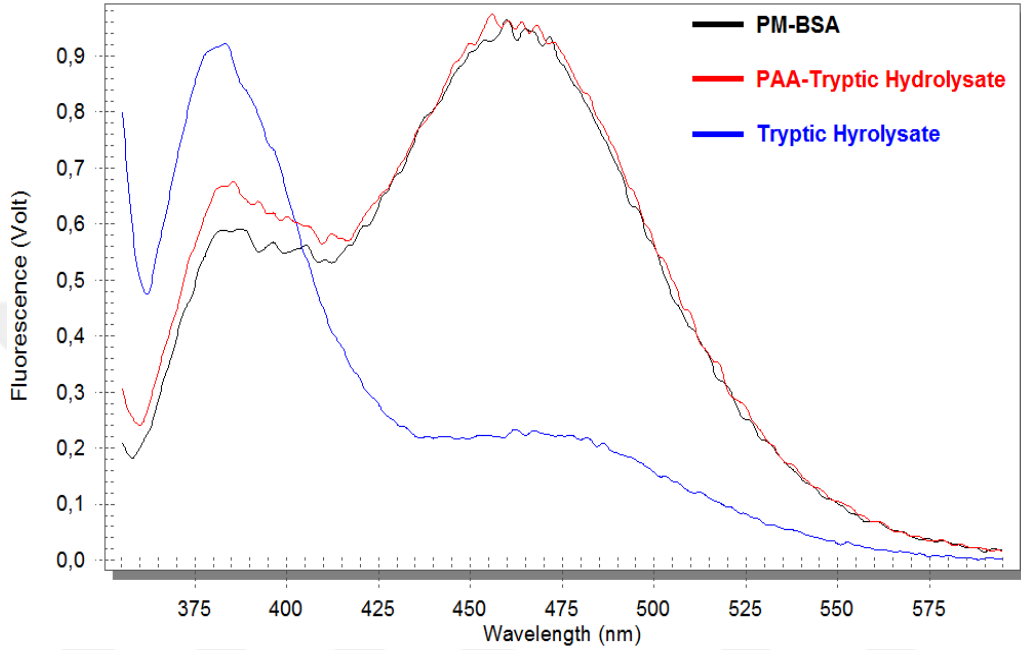


SONUÇ VE ÖNERİLER

Proteazların hidrolitik etkilerinin spesifikliği, belli bir proteinden ürettikleri hidrolizatlara ait peptidlerin yapısında yer alan amino asitlerin; sayılarının, türlerinin, dizilişlerinin gösterdiği çeşitlilik nedeniyle bu peptidlerin konformasyonlarını, şekillerini, boyutlarını, elektriksel yüklerini, polaritelerini ve tüm bu parametrelere bağlı olarak peptidlerin yapısında yer alan floresan moleküllerin kazandığı yeni kimyasal çevre koşullarını proteaz aktivitesine özgün kılar. Proteaz aktivitesine bağlı olarak floroforların kazandığı yeni kimyasal çevre koşulları, floresans ömür dağılımlarında, proteaz aktivitesine özgün değişimler meydana getirir. Proteazın kararlılığını arttırmak için sentezlenen polimer-proteaz konjugatında aktivitenin korunması en önemli konudur. Serbest tripsinin etkisindeki PM-BSA'nın floresans ömür dağılımında meydana gelen değişiklikler [61]'de gösterilmiştir.

Bu çalışmada zamana bağımlı spektrofotometre kullanılarak PM-BSA'nın floresans ömür dağılımları üzerine poliakrilik asit (PAA) ile tripsinin kovalent bağlı konjugatının modifiye edici özelliğini inceledik. Serbest tripsin ve PAA-tripsin konjugatı ile oluşturulan PM-BSA'nın iki proteolitik hidrolizatından elde edilen floresans spektrumları (Şekil 5.1) ve floresans ömür dağılımları (Şekil 5.2) arasındaki farklılıklar karşılaştırıldığında; tripsinin aktivitesinde konjugasyon ile önemli derecede azalmanın olduğu gözlenmiştir. Serbest tripsin etkisinde PM-BSA kompleksinden elde edilen hidrolizatın floresans spektrumuna bakıldığında; 384 nm'de monomer emisyonunun önemli derecede artmış olduğu gözlemlenirken, 464 nm'de maksimum veren eksimer emisyonunun önemli derecede azaldığı fakat tükenmediği görülmektedir. Bu durum eksimeri oluşturan piren

halka düzlemlerinin önemli bir kısmının birbirlerine bakışık konumlarının bozulmasıyla açıklanabilir. PAA-tripsin konjugatı ile PM-BSA'dan üretilen hidrolizata ait spektrumda; 384 nm'de monomer emisyonunda küçük bir artış dışında önemli bir değişiklik görülmemektedir ve bu da; hidrolizin çok düşük miktarda gerçekleştiğini ve dolayısıyla önemli derecede aktivite azalması olduğunu açıklamaktadır.

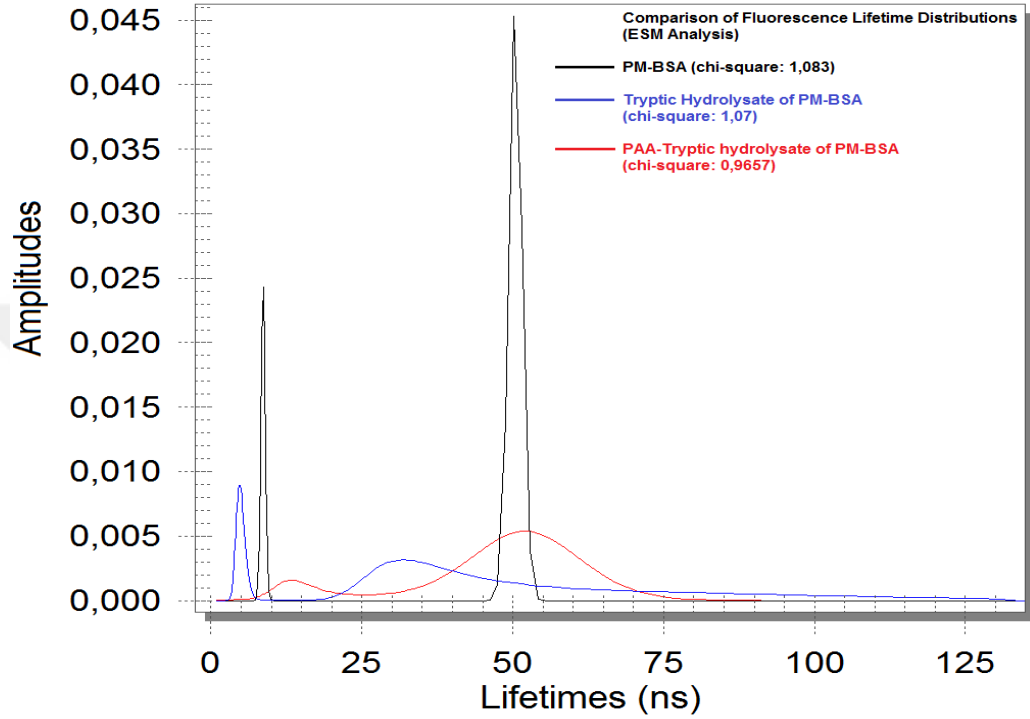


Şekil 5.1 Tris-HCl (0.025 M, 0,1 M NaCl, 0.005 M CaCl₂, pH: 8) tamponunda serbest tripsin ve PAA-tripsin konjugatıyla PM-BSA çözeltisiyle muamele öncesi ve sonrasında alınan zaman ayrımlı floresans spektrumları 2mL . λ_{exc} : 337 nm ; $\lambda_{emis.max}$: 384 nm (monomer); $\lambda_{emis.max}$: 464 nm (eksimer)

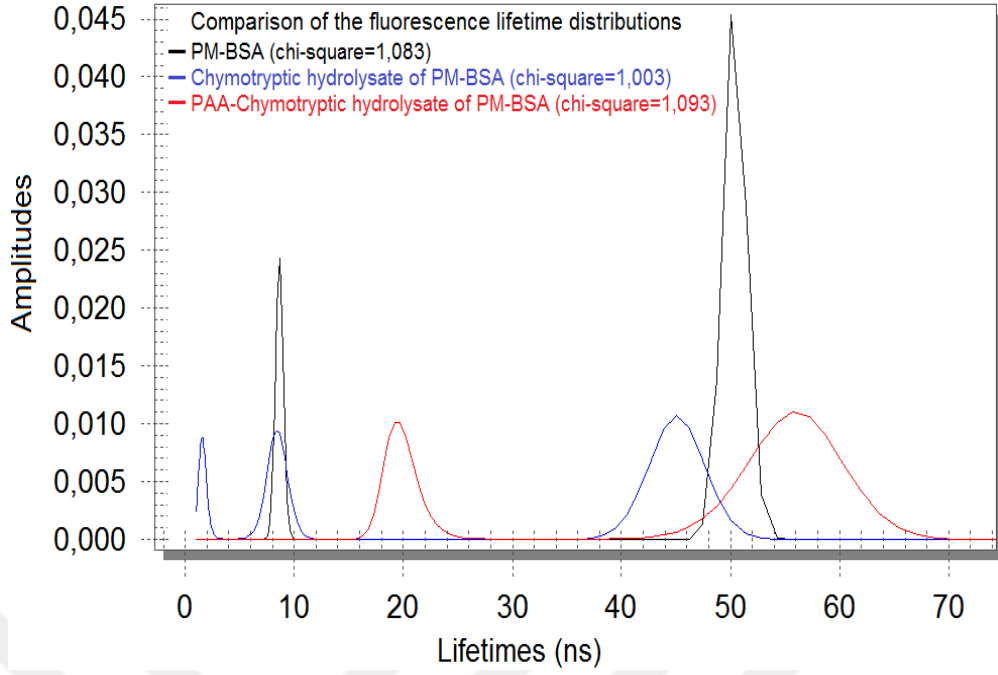
Bu sonuçlar UV-VIS ölçümlerinden elde edilen verilerin de doğruluğunu desteklemektedir. Serbest tripsin ve PAA-tripsin konjugatı etkisinde elde edilen floresans ömür dağılımları arasındaki farklılıklar (Şekil 5.2, Şekil 5.3)'de karşılaştırılarak verilmiştir. Serbest tripsin ile PM-BSA kompleksinden elde edilen hidrolizatın floresans ömür dağılımının, tam hidrolizle ortaya çıkan peptid parçaları üzerindeki eksimerlerin çözücüye maruziyetinin artması sonucu, beklendiği gibi daha kısa ömürlü emisyonlara kaydığı görülmektedir.

PAA-tripsin konjugatı ile PM-BSA'dan üretilen hidrolizata ait floresans ömür dağılımı; sınırlı hidroliz ürünü olan ve de bundan dolayı nisbeten daha apolar karakterli olan peptidlerin, kendileri de apolar olan ve de eksimerleri oluşturan piren çiftlerinin etrafında çözücüye karşı daha korunumlu kimyasal çevre oluşturmaları sonucu uzun

ömürlü emisyonlara kaymıştır. [61]'de aynı substrat (PM-BSA) üzerinde serbest tripsin ve kimotripsinin proteolitik etkinliklerinin farklılığı floresans ömür dağılımları kullanılarak ortaya konmuştu. Bu çalışmada ve [62]'deki çalışmada ise PAA ile kovalent konjugasyon sonucu beliren düşük proteolitik aktivitelerin dahi floresans ömür dağılım analizi ile ortaya çıkarılabileceği tesbit edildi.



Şekil 5.2 PM-BSA'nın ve serbest tripsin ve PAA-tripsin konjugatından üretilen hidrolizatlarının floresans ömür dağılımlarının karşılaştırılması, λ uyarılma = 337 nm, λ max. monomer = 384 nm, λ max. eksimer = 464 nm, integrasyon süresi = 0,1 s



Şekil 5.3 PM-BSA'nın ve serbest kimotripsin ve PAA-kimotripsin konjugatından üretilen hidrolizatlarının floresans ömür dağılımlarının karşılaştırılması, $\lambda_{uyarılma} = 337 \text{ nm}$, $\lambda_{max. monomer} = 384 \text{ nm}$, $\lambda_{max. eksimer} = 464 \text{ nm}$, integrasyon süresi = 0,1 s [62]

Aynı zamanda floresans ömür dağılım analizi ile iki farklı proteazın aynı substrat üzerinde düşük aktivitelerinin de birbirinden ayırt edilebileceği belirlendi (Şekil 5.2, Şekil 5.3). Bu sonuçlar floresans ömür dağılımı analizinin proteolitik enzimlerin aktivitelerinin birbirinden ayrıştırılmasında son derece duyarlı olduğunu kanıtlamaktadır.

Floresans ömür dağılımlarından elde edilen bu veriler proteazların kararlılığını geliştirmek amacıyla yapılacak olan biyokonjugasyon araştırmalarında aktivite kaybına uğramamak için polimerin doğru seçilmesinde, konjugasyon reaksiyonunun metodunun doğru belirlenmesinde büyük öneme sahiptir.

Bu veriler floresans ömür dağılımı analizinin; proteaz ilgili hastalıklarda (kanser, AIDS, SARS vb.) özgün proteaz aktivitesinin teşhisinde, tarım-hayvancılık, ziraat, mandıra, gıda, tıp ve ilaç sanayiinde AR-GE çalışmalarında proteolitik süreçlerle ilgili yeni tayin yöntemlerinin keşfinde kullanılabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

-
- [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. (2008). Principles and applications of fluorescence spectroscopy. John Wiley & Sons.
 - [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] Narain, R. (Ed.). (2014). Chemistry of Bioconjugates: Synthesis, Characterization and Biomedical Applications. John Wiley & Sons.
- [17] Jung, B., & Theato, P. (2012). Chemical strategies for the synthesis of protein–polymer conjugates. In Bio-synthetic polymer conjugates (pp. 37-70). Springer Berlin Heidelberg.
- [18] Hermanson, G. T. (2013). Bioconjugate techniques. Academic press.
- [19] Troop, B. (2011). Molecular Biology, Fourth edition, Jones & Bartlett Publishers.
- [20] 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.
- [21] Copeland, R.A. (2000). Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis, second edition, John Wiley & Sons, Inc. Publication, New York.
- [22] Bahçeci, Z. (2002), "Moleküler Biyoloji" Öğrenci Kitabevi Yayınları, Kırşehir.
- [23] <https://courses.lumenlearning.com/bio1/chapter/reading-protein-structure/20> Haziran 2017.
- [24] Leiros HK, Brandsdal BO, Andersen OA, Os V, Leiros I, Helland R, Otlewski J, Willassen NP, Smalås AO, (April 2004). Trypsin specificity as elucidated by LIE calculations, X-ray structures, and association constant measurements. Protein Sci. 13 (4): 1056–70.
- [25] Palmer, T., (1991). Understanding Enzymes, third edition, Ellis Horwood limited, Chichester, England.
- [26] Dr. Kristala L. Jones Prather. (2004). MIT Department of Chemical Engineering Lecture -1 - Course Overview, Enzyme Classification System.
- [27] Gençkal, H. 2004. Studies On Alkaline Protease Production from *Bacillus* sp. isolated from natural habitats.
- [28] Sevinç N., (2010). Türkiye Topraklarından İzole Edilen *Bacillus* Sularından Proteaz Üretimi, Kısmi Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa.
- [29] Rao , M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., Deshpande, V.V. (1998). Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 67(3): 597-635.

- [30] Garrett, R. H. and Grisham, C. M. 2010. Biochemistry. Brooks/Cole Cengage Learning, 500-532, USA.
- [31] Kim, N. S., Yu, H. Y., Chung, N. D., Shin, Y. J., Kwon, T. H., & Yang, S. Y. (2011). Production of functional recombinant bovine trypsin in transgenic rice cell suspension cultures. *Protein Expression and Purification*, 76, 121–126.
- [32] Balti, R., Barika, A., Bougatef, A., Ktari, N., & Nasri, M. (2009). A heat-stable trypsin from the hepatopancreas of the cuttlefish (*Sepia officinalis*) : Purification and characterisation. *Food Chemistry*, 113, 146–154.
- [33] Forbes, R. T., Barry, B. W., & Elkordy, A. A. (2007). Preparation and characterisation of spray - dried and crystallised trypsin: FT-Raman study to detect protein denaturation after thermal stress. *European journal of pharmaceutical sciences*, 30, 315-323.
- [34] Hehemann, J. H., Redecke, L., Murugaiyan, J., Bergen, M. V., Betzel, C., & Saborowski, R. (2008). Autoproteolytic stability of a trypsin from marine crab *Cancer pagurus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 370, 566-571.
- [35] Katona, G., Berglund, G. I., Hajdu, J., Graf, L., & Szillagyi, L. (2002). Crystal Structure Reveals Basis for the Inhibitor Resistance of Human Brain Trypsin. *J. Mol. Biol.*, 315, 1209-1218.
- [36] Kishimura, H., & Hayashi, K. (2002). Isolation and characteristics of trypsin from pyloric ceca of the starfish *Asterina pectinifera*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 132, 485-490.
- [37] Bisswanger, H., (2008). *Enzyme Kinetics, Principles and Methods*, second edition, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- [38] Leskovac, V., (2004). *Comprehensive Enzyme Kinetics*, Kluwer Academic Publishers, New York.
- [39] Bergmeyer, H.U., (1974). *Methods of Enzymatic Analysis*. 4. New York: Academic Press. pp. 2066-72.
- [40] Gore, Michael G., (2000). *Spectrophotometry and Spectrofluorimetry: A Practical Approach*. Oxford University Press.
- [41] Tkachenko, N.V. (2006). *Optical Spectroscopy, Methods and Instrumentations*, Elsevier Science, Netherlands.
- [42] <http://media.vwr.com/interactive/publications/VWRbioMarke2013/Magazine/files/assets/basic-html/index.html> 7/ 17 Mart 2017.
- [43] Davidson AG., (2002). Ultraviolet-visible absorption spectrophotometry. In Beckett AH, Stenlake JB, Fourth Edition , *Practical Pharmaceutical chemistry*. CBS Publishers and distributors, New Delhi, 275-278.
- [44] Jon H. Hardesty, PhD and Bassam Attili, PhD., (2010). *Spectrophotometry and the Beer-Lambert Law: An Important Analytical Technique in Chemistry*.
- [45] http://www.columbia.edu/cu/chemistry/ugrad/hssp/EXP_5.html 18 Mayis 2017.

- [46] Hofmann, A, (2010). Spectroscopic techniques: I spectrophotometric techniques.
- [47] <http://depts.washington.edu/cmdt.tr/modules/oled/lightemittingelectrochemicalprocesses.html> 16 Temmuz 2017.
- [48] Sharma, A., Schulman, S.G. (1999). Introduction to Fluorescence Spectroscopy, John Wiley & Sons, Inc., New York.
- [49] Pekcan, O. (1993). ESM Method and Laplace Transform of Klafter-Blumen Equation for DET Analysis in Polymer Blend Like Materials. In MATERIALS RESEARCH SOCIETY SYMPOSIUM PROCEEDINGS (Vol. 290, pp. 221-221). Materials Research Society.
- [50] Pekcan, Ö., (1993). "Lifetime Distribution Study on Evolution of Dimensionality in Blend-Like Polymer Films", Chem. Phys., 177: 619-628.
- [51] Siemiarz, 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.
- [52] D.R. James, W.R. Ware, Chem. Phys. Lett. 126 (1986) 7-11.
- [53] D.R. James, A. Siemiarz, W.R. Ware, Rev. Sci. Instrum. 63 (1992) 1710-1716.
- [54] Pekcan, Ö. (1996). "Fluorescence Lifetime Distributions: Applications to High and Low Viscosity Media in Polymer Blend-Like Particles", Eur. Polym. J., 32: 117-124
- [55] Mahara A., R. Iwase, T. Sakamoto, K. Yamana, T. Yamaoka and A. Murakami, (2002). Bispyrene-Conjugated 2-O-Methyloligonucleotide as a highly specific RNA-recognition probe. Angewandte Chem., 114: 3800-3802.
- [56] Birks, J.B. (1975). "Excimers", Rep. Prog. Phys., 38: 903-974.
- [57] Panda, D., Bhattacharyya, B., (1992). "Excimer Fluorescence of Pyrene-maleimide-labeled Tubulin", Eur. J. Biochem., 204: 783-787.
- [58] C. Heath.,(2007), Biotechnol. Progr. 23, 46-51.
- [59] Gottfried Samuel Current Topics In Insect Endocrinology And Nutrition
- [60] Means, G. E. and Feeney, R. E. ,(1971). Chemical Modification of Proteins, Holden Day, San Francisco, CA.
- [61] Özyiğit, İ. E., Karakuş, E., & Pekcan, Ö. (2016). The modifier effects of chymotrypsin and trypsin enzymes on fluorescence lifetime distribution of "N-(1-pyrenyl) maleimide-bovine serum albumin" complex. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 154, 8-12.
- [62] Amer S., (2017). Fluorometric investigation of the effect of chmotrypsin-poly(acrylic acid)Bioconjugate on N-(1-pyrenl)maleimide-bovine serum albümin complex, Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Ümmügülsüm POLAT
Doğum Tarihi ve Yeri : 02.02.1990 / Avcılar-İSTANBUL
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : ummugulsumplt@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Biyokimya	Yıldız Teknik Üniversitesi	2017
Lisans	Kimya	Balıkesir Üniversitesi	2013
Lise	Fen	Süleyman Nazif Anadolu Lisesi	2007

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2017- Halen	Yıldız Teknik Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

YAYINLARI

Bildiri

1. Polat Ü., Özyiğit, İ.E., Karakuş E., Fluorescence Lifetime Distribution Changes of “N-(1-Pyrenyl)Maleimide (PM)–Bovine Serum Albumin (BSA); PM-BSA” Complex By The Proteolytic Effects of Free and Polyacrylic Acid (PAA)-Conjugated Trypsin, International Conference On Advances in Science and Arts, İstanbul, Türkiye, 29-31 Mart 2017.
2. Amer S., Polat Ü., Özyiğit İ.E., Karakuş E., Effects of PAA-Chymotrypsin Conjugate on Fluorescence Lifetime Distributions of PM-BSA Complex, International Conference On Advances in Science and Arts, İstanbul, Türkiye, 29-31 Mart 2017.
3. Polat Ü., Özyiğit, İ.E., Karakuş E., Tripsin Ve Kimotripsin’in Poliakrilik Asit Konjugatlarının PM-BSA Kompleksi Floresans Ömür Dağılımı Üzerine Etkileri, 8. Ulusal Kimya Öğrenci Kongresi, İstanbul, Türkiye, 16-18 Mayıs 2017.