

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**FARKLI KAYNAKLARDA AMİNOPEPTİDAZLARIN
DAĞILIMININ İNCELENMESİ VE
SPESİFİKLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

Ehsan Moniri Toragay

Tez Danışmanı: Prof.Dr. Figen ZİHNİOĞLU

Biyokimya Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu:405.05.01

Sunuş Tarihi: 05 / 09 / 2013

**Bornova-İZMİR
2013**

Ehsan Moniri Toragay tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak sunulan “**Farklı Kaynaklarda Aminopeptidazların Dağılımının İncelenmesi ve Spesifikliklerinin Belirlenmesi**” başlıklı bu çalışma E. Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim yönetmeliği ile E. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 05 / 09 /2013 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/ oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri

İmza

Jüri Başkanı :

Üye :

Üye :

ÖZET**FARKLI KAYNAKLARDA AMİNOPEPTİDAZLARIN
DAĞILIMININ İNCELENMESİ VE SPESİFİKLİKLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Moniri Toragay, Ehsan

Yüksek Lisans Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı

Tez yöneticisi: Prof.Dr. Figen ZİHNİOĞLU

Eylül 2013, 44 sayfa

Aminopeptidazlar (amino açıl peptid hidrolaz EC: 3.4.11-) protein ve peptidlerin N-terminalindeki peptid bağlarının hidrolizini katalizleyen ekzopeptidazlardır. Aminopeptidaz aktivitelerinin belirlenmesi uygulamalı biyolojik bilimlerde büyük bir öneme sahiptir. Aminopeptidazlar gerek prokaryotlarda gerekse ökaryotik organizmalarda substrat spesifikleri ve yapısal özellikleri açısından geniş bir dağılım göstermektedir. Bu dağılım organizma ve subseleler düzeydeki fonksiyonlar ile ilişkilidir. Aminopeptidazlar N terminalindeki amino asite olan ilgilerine, inhibitörlere verdikleri yanıtlara ve subseleler kompartmanlardaki lokalizasyonlarına göre sınıflandırılırlar. Hücre içindeki anahtar patofizyolojik reaksiyonlarındaki rollerinden dolayı da gıda ve ilaç sanayinde önemli uygulamaları vardır. Aminopeptidazlar proteinlerin olgunlaşmasında, aktivasyonunda, biyoaktif peptidlerin degradasyonunda ve proteinlerin kararlılığının belirlenmesinde önemlidirler ve birçok biyolojik proseste (angiogenesis, hücre döngü düzenlenmesinde, üretimde, kan tansiyonunun kontrolü) görev alırlar. Ayrıca gıda sanayisinde (et, süt ürünlerinde, tahıl, vb) özellikle peynir yapımında peynirdeki acılığın giderilmesinde ve gıdada lezzet zenginleştirici özelliğe sahip olarak önemlidirler.

Bu tez projesi kapsamında aminopeptidaz kaynağı için alternatif olabilecek farklı kaynaklarda aminopeptidazların dağılımı, subseleler lokalizasyonu ve spesifiklerinin belirlenmesi hedeflendi.

Aminopeptidazların farklı tür ve dokulardaki dağılımının, subsellüler lokalizasyonunun belirlenebilmesi için çeşitli kaynaklardan (bitkisel ve hayvansal) enzim preparatları hazırlandı. Hazırlanan enzim preparatlarında aminopeptidazların (Prolilaminopeptidaz, Glutamilpeptidaz, , Lösil peptidaz) aktiviteleri kromojenik substratlar kullanılarak (H-Pro-pNA, H-Glu-pNA, H-Leu-pNA) belirlendi.

Anahtar Sözcükler: aminopeptidaz, ekzopeptidazlar, subsellüler, fraksiyonlama

ABSTRACT**DISTRIBUTION AND SPECIFICITY OF AMINOPEPTIDASES
FROM VARIOUS SOURCES**

Moniri Toragay, Ehsan

MSc in Biochemistry Department

Supervisor: Prof. Dr. Figen ZIHNIOGLU

September 2013, 44 pages

Aminopeptidases (amino acyl peptide hydrolase EC: 3.4.11-) are exopeptidases that catalyse the hydrolysis of peptide bonds at N-terminus of proteins and peptides. Determination of the aminopeptidase activity has a big importance in applied biological sciences. Aminopeptidases show a range variety in terms of substrate specificity and structural properties in prokaryotes as well as eukaryotes. This distribution is related with organism and subcellular functions. Aminopeptidases are classified based on their affinity to aminoacid at N-terminus, response to inhibitors and localization at subcellular compartments. Because of the key role at pathophysiological reactions in the cell, there are important applications in the food and pharmaceutical industries. Aminopeptidases are important at maturation and activationsof proteins, degradation of bioactive peptides and determination of protein stability. Aminopeptidases are involved in many biological process (angiogenesis, the regulation of cell cycle, production, blood pressure control). Also, they have importance in food industry (meat, dairy products, cereals, etc.) especially by removing bitterness in cheese at cheese production and having a feaure as a flavor enhancer.

Therefore the aim of this work is to investigate the distribution, subcellular localization and specificity of aminopeptidases.

In order to determine the distribution of aminopeptidases at different species and tissues, enzyme extracts were prepared from various sources (plant and animal). Aminopeptidase (Prolyl amino peptidase, Glutamyl peptidase, Leucyl

peptidase,) activities were estimated by using chromogenic substrates (H-Pro-pNA, H-Glu-pNA, H-Leu-pNA).

Key Words: Aminopeptidases, exopeptidases, subcellular fractionation

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresinde bilgisi deneyimle sürekli yanımda olan ve anlayışını benden esirgemeyen sayın hocam Prof.Dr. Figen ZİHNİOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Öğrenim hayatım boyunca beni maddi ve manevi olarak destekleyen sevgili babam Alireza MONİRİ ve annem Atreh Najafzadeh'ye, tecrübesiyle bana yol gösteren ve yardımlarıyla sürekli yanımda olan Dr.Ali ZEYTÜNLÜOĞLU ve Ebru KOCADAĞ' ve Yrd. Doç. Dr. Serap EVRAN'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	v
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Aminopeptidazlar	1
1.2. Aminopeptidazların Sınıflandırılması ve Terminolojisi.....	2
1.3. Aminopeptidaz Türleri ve İşlevleri.....	3
1.3.1. Memeli aminopeptidazları	3
1.3.2. Mikrobiyal aminopeptidazlar	5
1.3.3. Bitki aminopeptidazları.....	7
1.4. Katalitik Mekanizmalarına Göre Aminopeptidazlar	7
1.4.1. Metallo-aminopeptidazlar	7
1.4.2. Sistein ve serin aminopeptidazlar.....	9
1.5 Prolil, Lösil ve Glutamil Amino Peptidazların Bazı Özellikleri	11
1.6. Aminopeptidazların Endüstriyel Uygulamaları.....	13
1.6.1. İlaç endüstrisi	13
1.6.2. Bioteknoloji ve gıda endüstrisi uygulamaları	13
2. MATERYAL VE METOD	15
2.1. Materyal.....	15
2.2. Kobay (Guinea pig) Doku Ekstraktlarının Hazırlanması	15
2.3. Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması	15
2.4. Kobay Karaciğer Dokusu Subselluler Fraksiyonların Hazırlanması.....	17
2.5. Protein Tayini	17
2.6. Lösil, Glutamil ve Prolil Aminopeptidaz Aktivite Tayini	18
2.7. Lösil, Glutamil ve Prolil Aminopeptidaz Enzimlerinin Aktivitesi Üzerine Metal İyonlarının Etkisi	19

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	20
3.1. Lösil, Glutamil ve Prolil Aminopeptidaz Enzimlerinin Kobay Dokularında Dağılımı	20
3.2. Lösil, Glutamil ve Prolil Aminopeptidaz Enzimlerinin Bitkilerde Dağılımı	23
3.3. Lösil, Glutamil ve Prolil Aminopeptidaz Enzimlerinin Kobay Karaciğer Subsellüler Fraksiyonlarında Dağılımı.	25
3.4. Lösil, Glutamil ve Prolil Aminopeptidaz Enzimlerinin Aktivitesi Üzerine Metal İyonlarının Etkisi	26
3.4.1. Kobay Dokuları lösil aminopeptidaz enzim aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisi	27
3.4.2. Kobay dokuları glutamil aminopeptidaz enzim aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisi	32
3.4.3. Kobay dokuları prolil aminopeptidaz aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisi	33
4. GENEL DEĞERLENDİRME.....	35
KAYNAKLAR DİZİNİ	37
ÖZGEÇMİŞ	44

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Heksamerik <i>E.coli</i> lösil aminopeptidaz genel yapısı.....	9
1.2. Prolil aminopeptidaz monomeri	10
1.3. Lösil aminopeptidazın aktif merkezi	12

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Memeli aminopeptidazların türleri ve özellikleri.....	4
1.2. Mikrobiyal aminopeptidazların türleri ve özellikleri	6
3.1. Lösil, glutamil ve prolil aminopeptidaz enzimlerinin kobay dokularında dağılımı	21
3.2. Lösil, glutamil ve prolil aminopeptidaz enzimlerinin bitkilerde dağılımı	24
3.3. Lösil, glutamil ve prolil aminopeptidaz enzimlerinin kobay karaciğer subsellüler fraksiyonlarında dağılımı.....	26
3.4. Kobay dokuları lösil aminopeptidaz enzim aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisi	28
3.5. Kobay dokuları glutamil aminopeptidaz enzim aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisi.....	29
3.6. Kobay dokuları prolil aminopeptidaz enzim aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisi	30

1. GİRİŞ

Proteazlar uygun koşullarda proteinlerin peptid bağlarının hidrolizini katalizleyen enzimlerdir ve proteinaz, proteolitik enzim ya da peptidazlar olarak da adlandırılırlar. Tüm proteazlar pH, sıcaklık, iyon gereklilikleri, spesifik aktivite ve kararlılık yönünden karakteristik özelliklere sahiptirler ve bunlar hidrolizlenecek proteindeki amino asitlere bağlıdır. Bu parametreler bir proteazın uygulama alanını belirler. Proteazlar kaynaklarına (hayvan, bitki, mikroorganizma), katalitik aktivitelerine (endopeptidaz veya ekzopeptidaz), ve aktif merkezlerinin yapısına göre (serin, sistein, aspartil, metallo vb.) sınıflandırılmaktadırlar. Ekzopeptidazlar polipeptid zincirini amino ucundan veya karboksi ucundan hidrolizlerler ve buna göre sırasıyla aminopeptidazlar veya karboksipeptidazlar olarak adlandırılırlar.

Aminopeptidaz dağılımının çeşitli organizmalarda farklılaşması organizmada gerçekleşen biyolojik fonksiyonlar açısından önemlidir. Bu bağlamda patofizyolojik ve ticari birçok uygulamalarda önemli olan aminopeptidazlar ile son yıllarda yapılan çalışmalar yoğunlaşmıştır. Tezin amacı aminopeptidaz kaynağı için alternatif olabilecek farklı kaynaklarda aminopeptidazların dağılımı, subselüler lokalizasyonu ve spesifiklerinin belirlenmesi olarak hedeflendi.

1.1. Aminopeptidazlar

Aminopeptidazlar peptid bağlarını proteinlerin ve polipeptidlerin N-ucundan hidrolizlerler. Aminopeptidazlar üç alt sınıfta incelenebilir :1. İlk peptid bağlarını bir polipeptid zincirinde tek bir aminoasit artığından hidrolizleyen aminopeptidazlar; (aminoaçıl- ve iminoaçıl peptidazları [EC 3.4.11]), 2. Polipeptid zincirlerinden dipeptidleri ve tripeptidleri hidrolizleyenler (dipeptidil ve tripeptidil peptidazları [EC 3.4.14]), 3. Sadece dipeptidilleri veya tripeptidleri hidrolizleyenler(dipeptidazlar [EC 3.4.15] ve tripeptidazlar [EC 3.4.14.4]) Aminopeptidazlar bakteriler, mantarlar, bitkiler ve memelilerde yaygın olarak bulunmaktadır.(Barret ve ark., 2004). Bu enzimler, sitoplazma, lizozomlar ve membranlar gibi farklı organellerde ve ayrıca hücreler arası ortamda latent olarak

bulunurlar. Katalitik mekanizmaya göre çoğu aminopeptidazlar metallo-enzimlerdir, ancak sistein ve serin peptidazları da bu grupta bulunurlar. Bazı aminopeptidazlar monomerik yapıya sahipken, özellikle ökaryotik organizmalarda bulunanların çoğu multimerik yapıdadırlar. Bir çok aminopeptidazın üç boyutlu yapıları belirlenmiştir, bu da katalitik mekanizmanın ve işlevlerinin anlaşılmasına katkıda bulunmaktadır. Aminopeptidazlar çeşitli proteolitik yolların tamamlanmasında diğer peptidazlar ile uyum içinde çalışırlar. Böylelikle diyet proteinlerini ve vücut proteinlerini etkili bir şekilde parçalayabilirler ve bu sayede protein olgunlaşması, hormon seviyesinin düzenlemesi ve hücre döngüsü kontrolü gibi görevlerin yanı sıra beslenmede de rol oynarlar. Memelilerin bir çok enzimi sağlık ve hastalık koşullarında hücresel süreçlerde önemli işlevlere sahiptir ve bu nedenle ilaç endüstrisi için önemli bir hedeftir. Ayrıca bazı aminopeptidazlar biyoteknoloji ve tarım endüstrisi uygulamalarında büyük bir ilginin odağıdırlar (FitzGerald ve O’Cuinn, 2006).

1.2. Aminopeptidazların Sınıflandırılması ve Terminolojisi

Aminopeptidazlar spesifik özelliklerine (geniş veya seçimli), katalitik mekanizmalarına (metalo-, sistein ve serin peptidazlar) ve moleküler yapılarına göre sınıflandırılırlar. Birçoğunun (aminoaçıl veya iminoaçıl) terminolojisi belirli bir N-ucu amino asitin özelliklerine veya gerekliliklerine göre belirlenir. Buna göre, en yüksek hidroliz oranı N-ucu metionil bağlarında gerçekleşiyor ise; metionil aminopeptidaz veya aminopeptidaz M olarak adlandırılır. Karışıklıktan kaçınmak için, subselüler lokalizasyonları da (membran, mikrozomal, sitosolik, vb.) benzer özellikleri olan aminopeptidazları adlandırmak için kullanılmaktadır. dipeptidil (DPP) ve tripeptidil peptidazlarının (TPP) ardından Romen rakamları getirilerek tanımlanan çeşitli türlerin arasındaki farkın ayırt edilmesi sağlanmıştır. Laktik asit bakterilerinde bulunan peptidazların terminolojisinde ‘Pep’ terimi, karşı gelen peptidaz gen diziliminin bilindiği durumlarda kullanılır ve bilinen diğer peptidazlar ile farklılıklarını ve benzerliklerini ifade eden bir büyük harfle gösterilir. (örn; Pep N, aminopeptidaz N’in benzerliği, Bununla birlikte, alternatif isimler ve kısaltmalar da literatürde mevcuttur. Yakın zamanda, MEROPS peptidaz veri tabanında peptidazların sınıflandırılması için familyalar ve klanlar halinde gösterilen hiyerarşik bir sistem uygulanmıştır. Bir familyanın üyeleri

homologlara ve homolog oldukları düşünölen familyalar ise klanlara göre gruplandırılmışlardır. Tek bir evrimsel kökü paylaşan peptidaz familyalarının oluşturduğu klanlar, üçüncöl yapılarındaki ve/veya katalitik-yapı aminoasit artıkları düzenlerindeki ve katalitik aminoasit artıkları genel dizilişlerindeki motiflerinin benzerlikleriyle kanıtlanmaktadır.

1.3. Aminopeptidaz Türleri ve İşlevleri

1.3.1. Memeli aminopeptidazları

Aminopeptidazlar memeli dokularında ilk keşfedilen proteazlardandır ve bir çoğu karakterize edilmiştir (Albiston ve ark., 2004). En iyi karakterize edilmiş memeli aminopeptidazları ve bunların kimyasal özellikleri Çizelge 1.1' de gösterilmiştir. Bunlar spesifikliklerine göre değişik gruplarda incelenebilirler:

- a) Geniş spesifikliğe sahip aminopeptidazlar (örn; Lösil aminopeptidazı, membran ve sitozol alanil aminopeptidazları);
- b) Öncelikleri temel aminoasit artıkları olan seçimli spesifik aminopeptidazlar; asidik aminoasit artıkları (glutamil ve aspartil aminopeptidazları), sistein (sistinil aminopeptidazı), metiyonin (metionil aminopeptidazı) veya prolin (prolil aminopeptidaz ve aminopeptidaz P)
- c) Di- ve tripeptidil salınımını gerçekleştiren dipeptidil peptidazları (DPP I, II, III ve IV) ve tripeptidil peptidazları (TPP I ve II) .

1.3.1.1. Geniş substrat spesifikliğine sahip memeli aminopeptidazları

Lösil aminopeptidazı (LAP) sitozol aminopeptidazı veya lösil aminopeptidazı olarak da adlandırılan bir enzimdir. Tanımlanan ilk sitozolik aminopeptidaz olma özelliğini taşır LAP öncelikle peptidlerin N-ucunda bulunan Lösil salınımını gerçekleştirir. Bunun yanı sıra Prolin için de etkin iken Arginin ya da Lizin için etkin değildir. Bu enzim homolog bir heksameridir ve 324-360 'kDa'lık bir moleköler kütleyle sahiptir.

Çizelge 1.1. Memeli aminopeptidazların türleri ve özellikleri

Enzyme	EC number	Catalytic type	Specificity	Family
Aminopeptidase (AP)			$X-\downarrow-Y-(Z)_n$	
Leucyl AP	3.4.11.1	Metallo	X = Leu	M17
Membrane alanyl AP	3.4.11.2	Metallo	X = Ala, Phe, Tyr, Leu	M1
Cytosol alanyl AP	3.4.11.14	Metallo	X = Ala	M1
Aminopeptidase B	3.4.11.6	Metallo	X = Arg, Lys	M1
Glutamyl AP	3.4.11.7	Metallo	X = Glu, Asp	M1
Cystinyl AP	3.4.11.3	Metallo	X = Cys	M1
Methionyl AP	3.4.11.18	Metallo	X = Met	M24A
Aminopeptidase P	3.4.11.9	Metallo	X and Y = Pro	M24B
Prolyl AP (PIP)	3.4.11.5	Serine	X = Pro	S33
Bleomycin hydrolase	3.4.22.40	Cysteine	X = Met, Leu, Ala Bleomycin peptide	C1B
Dipeptidyl peptidases (DPP)			$X-Y-\downarrow-(Z)_n$	
DPP I	3.4.14.1	Cysteine	$X \neq \text{Arg or Lys,}$ $Y \text{ or } Z \neq \text{Pro}$	C1
DPP II	3.4.14.2	Serine	Y = Ala or Pro	S28
DPP III	3.4.14.4	Metallo	X-Y = Arg-Arg	M49
DPP IV	3.4.14.5	Serine	Y = Pro	S9B
Tripeptidyl peptidases (TPP)			$X-Y-T-\downarrow-(Z)_n$	
TPP I	3.4.14. 9	Serine	Gly-Pro-T = hydrophobic	S53
TPP II	3.4.14.10	Serine	Ala-Ala-Phe T or Z $\neq$ Pro	S8

Alanil aminopeptidazı da membranda lokalize olmasına göre aminopeptidaz M ve/veya nötral amino asitlere spesifikliği nedeni ile aminopeptidaz N olarak da tanımlanır. Öncelikli olarak spesifik olduğu amino asit Alanin'dir, ancak Prolin dahil bir çok amino asit bu enzim tarafından hidrolizlenir. Uçta bulunan hidrofobik bir amino asitin ardından Prolin geldiğinde, X-Pro dipeptidi olarak salınabilirler. Birçok türde 280-300 kDa moleküler kütlesi olan ve glikozillenmiş bir homodimerdir. Memeli enzimi gastrik ve pankreatik proteaz hidrolizi sonrasında elde edilen peptidlerin sindiriminde rol oynarlar. Ayrıca böbrekte bulunan enkefalin ve nöropeptid "Substance P" gibi kanda oluşmuş peptidlerin deaktivasyonu açısından da önem taşırlar (2006, Albiston *ve ark.*, 2004).

1.3.1.2. Seçimli substrat spesifikliğine sahip memeli aminopeptidazları

Glutamil aminopeptidazı, aminopeptidaz A, anjiyotensinaz A ve aspartat aminopeptidazı olarak da bilinir. Bir peptidin N-ucundan Glutamik asit (ve daha az sıklıkta Aspartik asit) salınımını sağlar. Membrana bağlı bir enzimdir. Kan basıncının merkezi kontrolü üzerinde etki yaparak beyinde anjiyotensin III oluşturulmasında ve kan damarı oluşumunun düzenlenmesinde rol oynar (Fournie-Zaluski ve ark., 2004).

Metionil aminopeptidazı; peptidaz M olarak adlandırılır. Peptidlerin amino ucunu tercihen metionini ikincil artığı küçük ve yüksüz amino asitler olduğu zaman hidrolizler. Ökaryotlarda, mitokondride (tip I) ve sitoplazmada (tip II) olmak üzere iki çeşit metionil aminopeptidazı bulunur. Tip I peptidazı bakteriyal metionil aminopeptidazına, tip II ise archaee da bulunan enzime benzerlik gösterir. Memeli enzimleri protein sentezinin düzenlenmesinde ve normal gelişim, tümör gelişimi ve metastazda yeni kan damarlarının oluşturulması için gereken proteinin işlenmesinde rol oynarlar (Zhong ve ark., 2006).

1.3.2. Mikrobiyal aminopeptidazlar

Mikrobiyal aminopeptidazlar üzerine yapılan ilk çalışmalar 40 yıldan fazla bir zaman öncesine aittir ve o zamandan beri mikrobiyal kökene sahip bir çok aminopeptidaz karakterize edilmiştir (Sanz ve ark., 2002; Barret ve ark., 2004; Nampoothiri ve ark., 2005; Savijoki ve ark., 2006).. Günümüze kadar karakterize edilmiş mikrobiyal aktivitenin ana tipleri ve özellikleri Çizelge 1.2 'de verilmiştir. Bu enzimler spesifikliklerine göre memeli enzimlerinde açıklananlar ile benzer gruplarda incelenebilir:

- a) Geniş spesifiklik gösteren genel aminopeptidazlar (PepN, PepC, LAP ve PepS),
- b) Asidik amino asitler (PepA) ve metiyonin (MAP), D-amino asitler (DppA) veya prolin içeren peptid bağları (PepI ve PepP) gibi belirli amino asit artıklarını hidrolize eden seçimli spesifikliği olan aminopeptidazlar,
- c) Prolin içeren peptid bağlarını hidrolize eden dipeptidazlar,

- d) Sadece dipeptidleri veya tripeptidleri hidrolize eden geniş spesifikli dipeptidazlar (PepV ve Pep DA) ve tripeptidazlar (PepT); ve (v) N-ucu X-Pro için spesifik gösteren dipeptil peptidazları.

Çizelge 1.2. Mikrobiyal aminopeptidazların türleri ve özellikleri

Enzyme	EC number/ homologous	Catalytic type	Specificity	Family
Aminopeptidases (AP)			X- ↓-(Y)-(Z) _n	
PepN/ Lysyl aminopeptidase	Mammalian AP N	Metallo	X = Lys, Leu,	-
Bleomycin hydrolase GAL6/BLH1/YCP1	3.4.22.40	Cysteine	X = Arg, Tyr Bleomycin	C1B
PepC/aminopeptidase C	Bleomycin hydrolase	Cysteine	X = Lys, Glu, Ala, Met, Leu X or Y ≠ Pro	C1B
PepA/aminopeptidase A	-	Metallo	X = Glu, Asp, Ser	M42
PepS	-	Metallo	X = Arg, Trp	M29
CAP/PepA	3.4.11.10	Metallo	X = Leu, Met, Phe, Arg	M17
Leucine aminopeptidase				
Aminopeptidase Y/yscl	3.4.11.15	Metallo	X = Arg, Lys, Ala	M28
Aminopeptidase M/MAP	3.4.11.18	Metallo	X = Met	M24A
PepP/AminopeptidaseP	3.4.11.9	Metallo	Y = Pro	M24B
PepI/Proline iminopeptidase	3.4.11.5	Serine	X = Pro	S33
D-stereospecific aminopeptidase/DppA	-	Serine	X = D-Ala, D-Ser or D-Thr	S12
Dipeptidases			X-↓-Y	
PepV/peptidase V	-	Metallo	X = Lys, Leu, Met βAla-dipeptides	M20A
PepD/PepDA	-	Cystein	X = Lys, Met, Leu	C69
PepQ/prolidase	3.4.13.19	Metallo	Y = Pro	M24B
PepR/prolinase	-	Serine	X = Pro	-
Tripeptidases			X-↓-Y-Z	
PepT/Peptidase T	-	Metallo	Leu-Gly-Gly	-
Dipeptidyl-peptidases			X-Y-↓-(Z) _n	
PepX/X-Pro-dipeptidyl peptidase	3.4.14.11	Serine	Y = Pro	S15

Mikrobiyal aminopeptidazlar eksojen proteinlerden esansiyel amino asitlerin eldesinde ve bunların protein sentezi, metabolik enerji üretimi ve kofaktörlerin geri dönüşümünde kullanılmasında önemli bir rol oynarlar. Ayrıca protein dengelenmesinin, yeni sentezlenmiş proteinlerin işlenmesi ve yüksek kopya sayılı plazmidlerin stabilize edilmesi gibi daha özgün hücrel işlevlerin son aşamalarında da rol oynarlar.

1.3.3. Bitki aminopeptidazları

Aminopeptidaz bitkilerde de tanımlanmıştır. Bu enzimlerin çimlenme, protein olgunlaşması, eşeyli bölünme, çimlenmeden sonra kotilodonlardaki protein mobilizasyonu, protein dengelenmesi ve strese yanıt oluşturma gibi birçok önemli biyolojik proseste rol oynadıklarına bilinmektedir. Bitkilerde tanımlanan aminopeptidazlar da geniş ve seçimli substrat spesifikliğine sahip olmaları açısından diğer organizmadakilere benzer özellik gösterirler. Bunların içinde domatesteki (*Lycopersicon esculentum*) Lösil aminopeptidaz, geniş substrat spesifikliğı açısından en iyi karakterize edilmiş aminopeptidazlarından bir tanesidir. Bu gruptaki en iyi bilinen enzim LAPa-A, tercihen amino ucu Leu, Arg veya Met artıklarını içeren substratları hidrolize eden ve homo-heksamer yapıda yaralanma ile indüklenen bir metallo aminopeptidazdır (Tu et al., 2003). Aminopeptidaz N, ayrıca salatalıkta (*Cucumissativus L. suyo*) ve *Arabidopsis thaliana* da tanımlanmıştır. M1 familyası içinde sınıflandırılan N aminopeptidazlarına benzer bir spesifiklik ve dizi homolojisi olan bir metallo-enzimdir (Yamauchi ve ark., 2001). Seçimli spesifikliğı olan aminopeptidazlardan olan metiyonin aminopeptidazları da ayrıca *Arabidopsis thaliana* gibi çeşitli bitki türlerinde tanımlanmışlardır ve normal bitki gelişimi için gereklidirler (Ross ve ark., 2005). Aminopeptidaz P domateste tanımlanmıştır ve memeli aminopeptidazı P' yle % 40 dan fazla bir oranda benzerdir. Bradikinin'in amino ucundaki X-Pro bağlarını hidrolizler ve endopretolitik aktiviteye sahiptir (Hauser ve ark., 2001).

1.4. Katalitik Mekanizmalarına Göre Aminopeptidazlar

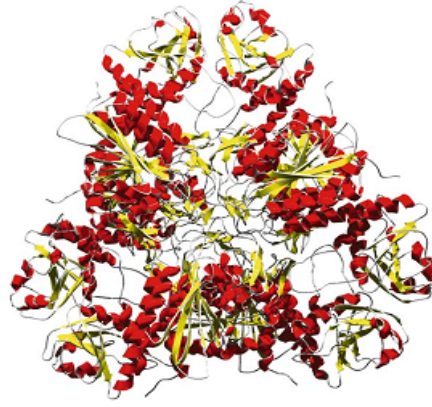
1.4.1. Metallo-aminopeptidazlar

Aminopeptidazların en geniş grubunu oluşturan metalo-aminopeptidazlar, divalent metal katyonu ile aktive edilen ve peptid bağına nükleofilik atak ile sulu ortamda gerçekleşen hidrolizlerdir (Barret ve ark., 2004). Bazı aminopeptidazlar kataliz için tek bir metal iyonuna gerek duyarlar (örn; Metiyonin amino peptidaz), bazıları da iki metal iyonuna (örn; Sığır lens Metiyonin aminopeptidazı; gerek duyarlar (Lowther ve Mattgeews, 2002). Aminopeptidazların bilinen metal ligandları His, Glu, Asp ve Lys aminoasit

artıklarıdır. Bu metal ligantlara ek olarak Glutamik asit, Lizin ve Arginin gibi en az bir ilave aminoasit artığı kataliz için gereklidir (Barret ve ark., 2004). Metalaminopeptidazlar arasındaki yapı ve metal merkezlerdeki farklılıklara rağmen benzer bir reaksiyon mekanizmasına sahiptirler. Substratın karbonil grubu aktif ölgeye bağlanarak metal bölge 1 ve korunmuş enzim artığı ile etkileşime girer. Substratın N-ucu da, ya metal bölge 2 ile ya da bir veya daha fazla enzim aminoasit artığı ile etkileşime girer Bağlanma ceplerindeki farklılıklar substrat spesifiklerindeki farklılıkların sebebidirler. Korunmuş amino asit zincirleri ve metal merkeze bitişik olan iskelet atomları etkileşimlere olanak tanırırlar(Lowther ve Mattgews, 2002).

Metalaminopeptidazlar; katlanmalarına, aktif bölge yapılarına ve içerdikleri metal iyonlarına göre altı alt klana (MA, MF, MG, MH, MN ve MQ) ayrılmışlardır. En iyi bilinen metalaminopeptidazlar MA klanında (alt klan MA(E)) bulunurlar. Bunlar tek bir katalitik iyonla sahip olan enzimlerdir. Alt klan MA(E), peptidaz familyası M1 içerisinde yer alır ve çinkoya-bağımlı peptidazdır. Bu grup bakteriyal lizil aminopeptidazı (PepN), memeli enzimleri; membran alanil aminopeptidazı (aminopeptidaz N) ve lökotrien A4 hidrolazı içermektedir, M1 familyasının peptidazları katalizinde korunmuş bir His-Glu-X-X-His (HEXXH) motifi vardır ve aktivite için çinko iyonu gereklidir. Katalitik çinko iyonu motifteki iki histidin ile bağlanır ve glutamik asit katalitik bir aminoasit olarak atki gösterir.

Klan MF ökaryotlarda(LAP) ve bakterilerde (PepA) içeren peptidaz familyası M17'den meydana gelir. Bu enzimler aktivite için kokatalitik metal iyonlara ihtiyaç duyarlar(Barret ve ark., 2004). Sığır lens LAP'ın üç-boyutlu yapısı aydınlatılarak proteinin bir homoheksamer olduğu, her bir monomerin N- ve C- terminal olmak üzere iki domaini olduğu ve bir metal merkezi içerdiği belirlenmiştir (Cappiello ve ark., 2006). İki domain de alfa ve beta yapılar içerirler ve alfa/beta/alfa olarak sıralanmıştır. Zn 1 ve Zn 2, iki metal iyon olarak, enzimin korunmuş amino asitlerinin yan grupları ile koordine edilirler. Zn 2 substratın N-ucunu bağlar; Zn 1' in ise substrat ve geçiş aşamaları için kritik bağlama ve stabilize etme işlevleri üstlendiği düşünülmektedir. *E.coli* enziminin (Şekil 1.1) üç-boyutlu yapısı da sığır lens Lözün aminopeptidazına benzer heksamerik yapıdadır, ancak aktif bölgesinde iki manganez iyonu içerir.



Şekil 1.1. Heksamerik *E.coli* lösil aminopeptidaz genel yapısı

Klan MG, M24 familyasının peptidazlarını içerir ve kendi içinde iki alt familyaya ayrılır: Metionil aminopeptidazları içeren M24A ve aminopeptidaz P ve prolidaz (X-Pro dipeptidaz veya PepQ) tipi peptidazları içeren M24B. Aktif merkezlerinde iki kobalt veya iki manganez iyonları vardır. Seçimli spesifiklikleri, bu enzimlerin genel protein parçalanmasından çok düzenleyici olarak rol oynadıklarını düşündürmektedir.

1.4.2. Sistein ve serin aminopeptidazlar

Sistein ve serin aminopeptidazların, yapılarında iyonik ko-faktörleri yoktur. Katalizde, son derece reaktif bir sistein veya serin aminoasit artığına gereksinim duyulur. İki durumda da, reaksiyon substratın peptid bağında bulunan karbonil grubunun karbonuna nükleofilik atak ile başlar. Sistein aminopeptidazda atak sülfidril grubunun kükürdü tarafından yapılırken, serin aminopeptidazda atak hidroksil grubundan oksijeni tarafından gerçekleşir (Gonzalez ve Robert-Baudouy, 1996). Bu tip enzimler metallo-aminopeptidazlar kadar bol bulunmazlar. Bleomisin hidrolazı ve PepC gibi geniş substrat spesifiklikleri olanlar ve prolin-spesifik peptidazlar (PepI veya prolil aminopeptidazı, PepX ve DPP IV) gibi seçimli spesifiklikleri olan peptidazları içerirler.

Sistein aminopeptidazları klan CA ve familya C1B' ye dâhil edilmişlerdir. Papain süperfamilyasının katalitik bölgesinin dizisine ve kataliz için önemli olan amino asit artıklarına (Gln, Cys, His, ve Asn/Asp) sahiptirler. *Lactococcus lactis* PepC'nin kristalografik modeli, alt ünitelerinin peptidlere erişimini engelleyen dar

bir kanal bırakan bir homohekzamer olduğunu ortaya koymuştur. C-ucu kolunun aktif bölgeye yansıtılması papaine göre büyük bir farklılık gösterir.

Serin aminopeptidazları tripsin ve subtilisin tarafından temsil edilen serin proteolitik enzim familyalarına ait değildirler. Peptid dizi analizleri, prolil aminopeptidaz (PIP), PepI, DPP IV ve PepX'in, Ser, His ve Asp' dan oluşan bir katalitik triad içerdiklerini ortaya çıkarmıştır (Engel ve ark., 2005). Çeşitli bakterilerin PIP larinin üç-boyutlu yapıları tanımlanmıştır. PIP proteini iki bitişik bölgenin içine katlanmıştır. Daha geniş olan bölge alfa/beta hidrolaz tabakasının genel topolojisine sahiptir ve iki sarmal ve bir tarafından 11 N-ucu aminoasit artığı ve diğer taraftan dört sarmal tarafından kesilen merkezi bir sekiz-katmanlı beta tabaka özelliği gösterir. Daha küçük olan bölge ise geniş olanın üzerinde konumlanmıştır ve altı sarmaldan (şekil 1.2) meydana gelir. Katalitik triad (Ser 113, His 296 ve Asp 268) iki domain arasındaki geniş oyukta konumlanmıştır.



şekil 1.2. Prolil aminopeptidaz monomeri

Laktokokal PepX in ve bir çok sayıda memeli DPP IV enzimlerinin kristal yapıları, DPP IV inhibitörlerinin terapötik potansiyelleri ve çeşitli düzenleme reaksiyonlarındaki oynadıkları anahtar rollerinin önemi sayesinde zlmştur (Engel ve ark., 2005). Memeli enzimi bir alfa/beta-hidrolaz olup normal proteolitik aktivite gösterebilmesi için oligomerizasyona gereksinim duymaktadır.

1.5 Prolil, Lösil ve Glutamil Amino Peptidazların Bazı Özellikleri

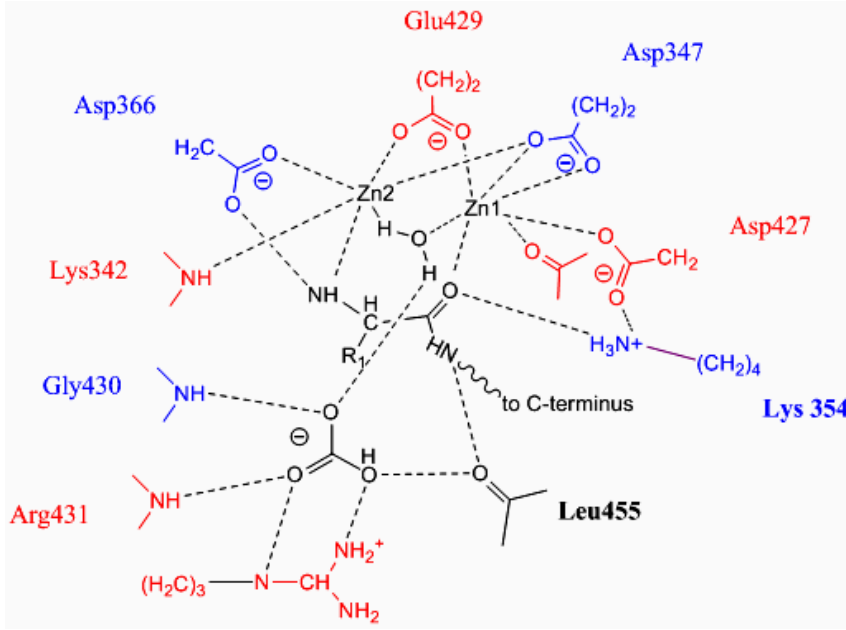
1.5.1. Prolil aminopeptidaz (PAP)

Prolin amino peptidazlar, prolil aminopeptidazı ve X-Pro aminopeptidazı olarak tanımlanırlar. Bir peptidden N-ucu prolinini salınmasını sağlarlar. Bu enzim ilk olarak *E. Coli*' de belirlenmiştir ve doğada yaygın şekilde bulunmaktadır. X-Pro aminopeptidazı da ayrıca aminopeptidaz P ve prolin aminopeptidazı olarak adlandırılır. Memeli enzimi membrana bağlı olarak ve sitozolde bulunur. Kardiyovasküler ve solunum sistemlerindeki biyoaktif peptidlerin işlenmesine ve kollajen ürünlerinin azaltılmasına katkıda bulunmaktadır (Cottrell ve ark., 2000).

Memeli peptidil peptidazları içinde, dipeptidil peptidazı IV (DPP IV) en iyi bilinendir. Sondan iki önceki aminoasit artığı Prolin olan ve sondan üç önceki aminoasit artığı Prolin (tercihen ama özellikle değil) veya hidrokisprolin olmayan polipeptidlerin amino ucundan dipeptidin salınmasını katalizler. Bu enzim hücre membranına bulunur ve bir çok hücre tipinde görülür. Molekül kütlesi yaklaşık 88 kDa' dır ve bir homodimerdir. DPP IV bir çok düzenlenme reaksiyonunda anahtar rol oynar, nöropeptidler, endomorfınler, peptid hormonları, glukajon-benzeri peptidler (GLP-1 ve GLP-2), gastrik inhibitory peptidler (GIP) ve parakrin kemokinleri gibi bir çok biyoaktif oligo peptidler üzerinde etki sahibidir ve bunların biyolojik aktivitelerinin modifikasyonuna veya deaktivasyonuna sebep olur (Augustyns ve ark., 2005).

1.5.2. Lösil aminopeptidaz (LAP)

Lösil aminopeptidazı (LAP; EC:3.4.11.1) sitozol aminopeptidazı veya lösin aminopeptidazı olarak da adlandırılan proteolitik bir enzimdir. Tanımlanan ilk sitozolik aminopeptidaz olma özelliğini taşır LAP öncelikle peptidlerin N-ucundaki Lösin salınımını gerçekleştirir. Bu enzim homolog bir hekzameridir. İnsan LAP' ı intraselüler proteazların peptid ürünlerinin ileri aşamada parçalanmasına katılır. Kodlama geninin ekspresyonu gamma interferon tarafından sağlanır. Lösin aminopeptidaz İnsan ve hayvan dokularında, bitkilerde ve mikroorganizmaların çoğunda bulunur.



Şekil 1.3. Lölil aminopeptidazın aktif merkezinin yapısı

LAP'ın klinik bakımından önemli olmayan bir çok izoenzimi vardır. LAP'ın hücre içi fonksiyonu henüz bilinmemekle beraber peptid bağlarının hidrolizini ya da lösinin bir peptitten diğerine transferini sağladığı düşünülmektedir. LAP L-konfigürasyondaki substratları daha hızlı hidroliz eder. *Örneğin*, L-lölil L-alanin stereozimeri L- lölil-D- alaninden 25 kez daha hızlı hidroliz ettiği bilinmektedir.

Bu enzimin fonksiyonu tam olarak bilinmemekle beraber, yapılan ilk çalışmalar serum LAP Aktivitesinin gebelik süresince arttığını göstermiştir. Bu yüksek enzim seviyesinin, doğumdan 6-8 hafta sonra normale döndüğü görülmüştür. Karaciğer hastalıklarının bir çoğunda serum LAP seviyesi yükselir. Siroz, hepatit, tıkanma sarılığı, pankreatit, pankreas kanserleri ve karaciğer metastazlarında, serum ve idrar LAP seviyesinin arttığı görülmüştür.

1.5.3. Glutamil Aminopeptidaz (GAP)

Glutamil aminopeptidazı;(EC 3.4.11.7) aminopeptidaz A, anjiyotensinaz A ve aspartat aminopeptidazı olarak adlandırılmaktadır. Bir peptidin N-terminalinde yer alan Glutamik asidin (ve daha az sıklıkta olarak Asp) bırakılmasını sağlar. Glutamil aminopeptidazının seçilmiş inhibitörleri, potansiyel anti-hipertansif ajan özelliği taşır ve arteriyel kan basıncının kontrolünde önemli bir rol oynar.

1.6. Aminopeptidazların Endüstriyel Uygulamaları

1.6.1. İlaç endüstrisi

Aminopeptidazlar çok farklı biyolojik proseslerde önemli rol oynarlar. Bu bağlamda fizyolojik ve patofizyolojik süreçte gerek diyagnostik gerekse aktivitelerinin kontrolüne yönelik çalışmalara ağırlık verilmiştir (Brown, 2005). Özellikle birçok hastalıkta aktivitelerinin artışı nedeni ile spesifik aminopeptidazlar için inhibitörlerin tasarlanması ile yeni ilaç hedefleri ve bunların geliştirilmesi üzerine odaklanılmıştır. Glütamil aminopeptidazının seçimli inhibitörleri, anjiyotensin II' yi anjiyotensin III' e dönüştürerek arteriyel kan basıncının kontrolünü sağlamaktadır. Bu nedenle anti-hipertansif ajan olarak kullanımı gündeme gelmiştir (Cogolludo *ve ark.*, 2005; Inguibert *ve ark.*, 2005). Ayrıca bu enzimlerin anjiyogenez ve tümör gelişiminde oynadıkları rol sebebiyle Metiyonin aminopeptidazlarının inhibitörlerinin tasarımıda terapötik potansiyel olarak değerlendirilmektedir. Ateşli hastalıklar, kanser, lösemi, diyabetik nefropati, romatizmal eklem iltihabı gibi durumlarda alanil aminopeptidaz (aminopeptidaz N) inhibitörleri, bu hastalıkları kontrol etmek için ayrıca geliştirilmeye çalışılmaktadır. DPP IV ve diğer prolin-spesifik peptidazlar için önemli endokrin metabolizmalarında yer almaları nedeni ile potansiyel ilaç olarak üzerinde sıklıkla çalışılan konular arasındadır (Augustyns *ve ark.*, 2005). PepX (*Streptococcus gordonii*' nin yol açtığı enfeksiyona), stereospesifik DppA aminopeptidazı (peptidoglikan sentezi) ve metiyonil aminopeptidaz gibi diğer aminopeptidazların inhibisyonu da mikrobiyal enfeksiyonları kontrol etmek için potansiyel farmalojik hedefler oluştururlar.

1.6.2. Bioteknoloji ve gıda endüstrisi uygulamaları

Aminopeptidazların ve mikrobiyal kaynaklarının ana endüstriyel uygulamalarından biri de soya, et, süt, mısır gevreği, vb. gibi kaynaklardan besin değeri yüksek protein hidrolizatlarının eldesidir (Chevalet *ve ark.*, 2001; Scharf *ve ark.*, 2006). Gıda endüstrisinde kullanılan protein hidrolizatları, yiyecek ve içeceklerin dayanıklılıklarının güçlendirilmesi ve biyoaktif peptidlerin ve sağlık ürünlerinin üretilmesi gibi farklı amaçlar kullanılabilmektedirler (FitzGerald *ve O'Cuinn*, 2006). Aminopeptidazların bu endüstriyel işlemlerde kullanımının besin

değerinin yükseltilmesinin yanı sıra hidrofobik peptidlerin parçalanarak acılığın giderilmesi ve aromaya katkı yapılması amacı ile de kullanılmaktadır. Süt kazeinlerinde hidrofobik amino asit artıklarının yüksek oranda bulunması sebebiyle, bu stratejilerin peynir imalatına uygulanması gündeme gelmiştir. Prolin-spesifik peptidazların geniş spesifikteki aminopeptidazlar ile (örn.; LAP) birlikte kullanılması gıda endüstrisinde özellikle başarılı sonuçlar doğurmuştur (Raksakulthai ve Haard, 2003). Yiyeceklerdeki acılığı azaltmak için kullanılan bazı ticari mikrobiyal aminopeptidazlar laktik asit bakterisi, *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae* gibi türlerde bulunan LAP lardır (Nampoothiri ve ark., 2005). Laktik asit bakterisinin kullanımıyla gıda protein işlenmesinde ortaya çıkan spesifik peptidaz aktiviteleride süt ve mısır gevreği proteinlerinde bulunan toksik ve alerjenik epitopların seviyelerini azaltmak amacıyla araştırılmaktadır. Benzer bir yaklaşım antihipertansif, bağışıklık sistemi düzenleyici ve antimikrobiyal özellikler sahip biyoaktif peptidlerin üretilmesi için kullanılmıştır (Di Cagno ve ark., 2004). Yakın zamanda *Lactobacillus helveticus* R211 ve R38'un peptidazlarının, kazeinden-türemiş peptidler oluşturarak laboratuvar ortamında anjiyotensin dönüştürücü enzimi(ACE) inhibe ettikleri bulunmuştur (Leclerc ve ark., 2001; Seppo ve ark., 2003).

Bunun yanında, kozmetik amaçlı kullanımlar için kollajeni hidrolize edebilen peptidazların kombinasyonlarının uygulamaları da geliştirilmiştir (Shigeri ve ark., 2005). Ayrıca, ısıya dayanıklı yüksek aktiviteli aminopeptidazlar ile rekombinant proteinlerinin işlenmesi gibi biyoteknolojik uygulamalarda da alternatif kullanım olanakları sağladıkları rapor edilmiştir (Gilboa ve Ark., 2001).

2. MATERİYAL VE METOD

2.1. Materyal

Bu çalışmada kullanılan cihazlar ve yöntemlere ait bilgiler ilgili bölümlerde ayrıntılı olarak verildi. Tüm kimyasal maddeler ve çözümler analitik saflıktadır.

Aminopeptidaz dağılımının incelenmesi amacı ile kullanılan kobay organları Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsünden temin edildi. Çalışmada kullanılan bitkiler ise yerel marketlerden ve aktardan (Yelken Baharat-İzmir) sağlandı.

2.2. Kobay (Guinea pig) Doku Ekstraktlarının Hazırlanması

Kobaydan alınan 11 farklı dokunun (Böbrek, İncebağırsak, Kalınbağırsak, Pankreas, Mide, Dalak, Karaciğer, Testis, Timus, Beyin, Kalp) ekstraksiyonu sıvı azot varlığında (freeze- thaw) gerçekleştirildi.

Dokular 0,15 M NaCl (Riedel-Almanya) yıkandı, kurutma kâğıdı ile nemi alındı ve küçük parçalara ayrılarak tartıldı. Dokular sırayla havan içine alınarak sıvı azot varlığında öğütüldü. Ağırlığının 3.5 katı hacmi kadar 50mM Tris-HCL pH 7.4 tamponu eklendi, 1 saat 4 °C' de karıştırıldı ve 600 rpm, 4 °C' de 10 dakika santrifüjlendi (Hettich Universal 30 rh-almanya) . Süpernatant cam yününden süzöldükten sonra 10.000 rpm' de 30 dakika 4 °C' de santrifüjlendi. Elde edilen süpernatant aktivite ve protein tayinleri için porsiyonlanarak -20°C'de depolandı.

2.3. Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması

Farklı bitkilerde aminopeptidaz dağılımının incelenmesi amacı ile acıbadam, avokado, avokado kabuğu, bezelye, kivi, mısır, pazı, turp otu, ısırgan otu, ebegümeci ve karahindiba seçildi. Bitkilerin özellikleri dikkate alınarak farklı yöntemler ile ekstraktlar hazırlandı.



Acı bakla (*Lupinus albus*)



Avokado
(*Persea americana*)



Bezelye (*Pisum Sativum*)



Mısır (*Zea mays*)



Isırgan otu (*Urtica dioica*)



Pazı (*Beta vulgaris*)



Turp otu
(*Raphanus raphanistrum*)



Kivi (*Actinidia chinensis*)



Ebe gümece
(*Malva sylvestris*)



Karahindiba
(*Taraxacum officinale*)

Yaş bitkiler (avokado, avokado kabuğu, bezelye, kivi, mısır, pazı, turp otu, ısırgan otu, ebegümece ve karahindiba) tartılarak ağırlığının 3 katı hacminde 50mM Tris-HCL pH 7.4 tamponu ile blendırda(Arzum-Türkiye) homojenize edildi ve 600 rpm, 4⁰C'de 15 dakika santrifüjlendi(Hettich Universal 30 RH-Almanya). Süpernatant cam yününden süzülerek 10.000 rpm'de 30 dakika 4⁰C'de santrifüjlendi ve aktivite ve protein tayinleri için porsiyonlanarak -20⁰C'de depolandı.

Acıbakla ise öğütücüde (İKA M20-Almanya) öğütülerek un haline getirildi. Ağırlığının 3.5 katı hacmi kadar 50 mM Tris-HCL pH 7.4 tamponu eklendi, 1 saat 4⁰C' de karıştırıldı ve cam yününden süzülerek 10.000 rpm'de 30 dakika 4⁰C'de

santrifüjlendi. Elde edilen süpernatant aktivite ve protein tayinleri için porsiyonlanarak -20°C 'de depolandı.

2.4. Kobay Karaciğer Dokusu Subselluler Fraksiyonların Hazırlanması

Farklı dokularda aminopeptidaz ların hücre içi dağılımlarının fonksiyonlarına göre farklandığı bilinmektedir. Ancak bu çalışmada sadece kobay farklı organ dokularının ekstraksiyonu sonrasında amino peptidaz aktivitesi açısından en zengin organlardan biri olan karaciğer subsellüler lokalizasyonun incelenmesi için tercih edildi.

Bu amaçla karaciğer sıvı azotta öğütme işlemi yerine farklı şekilde işleme tabi tutuldu. tüm işlemler $+4^{\circ}\text{C}$ 'de gerçekleştirildi. Karaciğer dokusu üzerindeki kan 0,15 M NaCl(Riedel-Almanya) içeren 50 mM Tris-HCl (Sigma-Almanya-Riedel-Almanya) pH 7,4 tamponuyla yıkandı, kurutma kâğıdı ile dokunun nemi alındı ve küçük parçalara ayrılarak tartıldı. Ağırlığının 3 katı hacminde 0,25 M Sükroz (Riedel-Almanya), içeren 50mM Tris-HCl pH 7,4 ile blendırda(Arzum-Türkiye) homojenize edildi ve 600 rpm, 4°C 'de 15 dakika santrifüjlendi (Hettich Universal 30 RH-Almanya). Pellet (nuclei, hücre debris) ayrılarak süpernatant cam yününden süzüldü ve 10.000 rpm'de 30 dakika 4°C 'de santrifüjlendi. Pellet (lizozom, mitokondri) ayrılarak süpernatant içerisinde konsantrasyonu 8 mM olacak şekilde yavaşça CaCl_2 ilave edildi. 1 saat 4°C 'de karıştırma sonrasında 10.000 rpm de 1 saat santrifüjlendi. Pellet (mikrozom) ve süpernatant (sitozol) ayrıldı. Mikrozomal pellet 0,1% Triton-X-100 içeren 50mM Tris-HCL pH 7.4 tamponunda buz içinde 1 saat karıştırılarak çözünmesi sağlandı. Tüm aşamalarda elde edilen fraksiyonlar aktivite ve protein tayinleri yapılmaya değin -20°C 'de depolandı.

2.5. Protein Tayini

Tüm aşamalardaki protein tayinleri sığır serum albumin standart olarak kullanılarak Bradford (1976) yöntemine göre (milro plaka format) gerçekleştirildi. Boya bağlama temelli yöntemlerin en yaygını olan bu yöntem Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının asidik grupları ile proteinlerin bazik gruplarının(Lys, Arg) etkileşerek renk oluşturması esasına dayanmaktadır.

Standartlar : Sığır serum albumin(BSA)(Fluka-Almanya) ; 25 – 175 µg/ml

Bradford reaktifi : 40 mg Coomassie Blue G-250(Fluka-Almanya), 50 ml 95% etanolde(Sigma-Almanya) çözüldü. 55 ml [85% (w/v)] fosforik asit(Riedel-Almanya) yavaş yavaş ilave edildi ve distile su ile hacim 1 litreye tamamlandı.

- 10 µl her bir standart, bilinmeyen örnek ve distile su(kör) mikro plaka kuyucuklarına pipetlendi.
- 200 µl Bradford reaktifi ilave edildi.
- 10 dakika oda sıcaklığında bekleme sonrası 595 nm de absorbanslar okundu.
- Standartlar ile oluşturulan kalibrasyon eğri ve katsayılar yardımı ile seyrelme faktörleri de göz önüne alınarak protein konsantrasyonları hesaplandı.
- Ölçümler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

2.6. Lösil, Glutamil ve Prolil Aminopeptidaz Aktivite Tayini

Aminopeptidaz enzimlerinin aktivite tayini enzimin sentetik (kromogenik veya florogenik) substratları kullanılarak belirlenmektedir. Yöntem, enzimin sentetik substratlarından hidroliz reaksiyonu sonucu açığa çıkan p-nitroalanin'in 405 nm'de absorpsiyonunun mikropłaka okuyucu(Thermo-Multiskan FC-Finlandiya) ile spektrofotometrik ölçölmesi esasına dayanır.

Enzim aktivitesi (1 Ünite); optimum koşullarda dakikada 1 µmol p-nitroalanin açığa çıkartan enzim miktarı olarak ifade edildi.

Tüm çalışmalarda (farklı dokular, bitki ekstraktları ve subseölüler fraksiyon örnekleri) enzim aktivite tayinleri en az üç farklı seyrelme ve 2 tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

Tampon : 0.1 M Tris/HCl pH 7,4 (Sigma-Almanya/Riedel-Almanya)

Substrat : H-Pro-pNA(Prolin aminopeptidaz), H-Glu-pNA(Glutamil aminopeptidaz), H-Leu-pNA(Lösin aminopeptidaz); (Bachem-İsviçre); 2 mM (0.1 M Tris/HCl pH 7,4 tampon içinde hazırlandı)

Standart : p-nitroanilin (Merck-Almanya) (10-250 µM)

- 10 µl her bir standart, enzim preparatları (farklı seyrelmelerde) ve tampon (kör) mikro plaka kuyucuklarına pipetlendi.
- 140 µl tampon ve 50 µl substrat ilave edildi.
- 37⁰ C de 15 dakika mikropilaka okuyucu içinde inkübasyon sonrası 405 nm de absorbanslar okundu. Standartlar ile oluşturan kalibrasyon eğri ve katsayılar yardımı ile seyrelme faktörleri de göz önüne alınarak enzim aktiviteleri hesaplandı.

2.7. Lösil, Glutamil ve Prolil Aminopeptidaz Enzimlerinin Aktivitesi Üzerine Metal İyonlarının Etkisi

Metal iyonlarının Kobay doku lösin, glutamil ve prolil aminopeptidaz enzim aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesinde, çeşitli metal iyonlarının [MnCl₂, (Fluka-Almanya), CuCl₂, NiCl₂, (Merck-Almanya), MgCl₂, (SigmaAldrich-Almanya)] 5,0 ve 10,0 mM konsantrasyonları ile hazırlanmış olan doku preparatları 37°C’de 15 dakika ön inkübasyona tabii tutuldu. Metal iyonunun varlığı ve yokluğundaki enzim aktivitesi standart koşullarda (Bölüm 2.6) ölçüldü. Ölçümler en az 2 tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

3.1. Lösil, Glutamil ve Prolil Aminopeptidaz Enzimlerinin Kobay Dokularında Dağılımı

Aminopeptidazlar ile ilgili günümüze değin yapılan çalışmalarda çok farklı izoformların farklı kaynaklarda belirlenerek bunların substrat spesikliklerine ve seçimli olmalarına göre dağılım gösterdikleri bulunmuştur. Bu çalışmaların çoğunda genellikle insan aminopeptidazların dağılımları incelenmiş olup diğer organizmalar ile ilgili dağılım çalışmaları ise histokimyasal çalışmalar ile sınırlıdır. Bunun yanı sıra direkt doku spesifik saflaştırma ve karakterizasyon hedefli ve hastalık gibi değışen koşullarda aminopeptidaz aktivite değışimlerinin araştırılarak klinik önemlerini vurgulayan çalışmalarda mevcuttur. Ancak günümüze değin kobay dokularında ve bu çalışmada taranan bitkiler ile ilgili bir çalışmaya literatürde rastlanamamıştır.

Bu bağlamda bu çalışmada öncelikle 11 farklı kobay dokusunda Lösil aminopeptidaz (LAP), Glutamil aminopeptidaz (GAP) ve Prolil aminopeptidaz (PAP) enzimlerinin aktivite dağılımlarına bakıldı (Çizelgede 3.1).

Çizelge 3.1 incelendiğinde taranan tüm dokularda Lösil aminopeptidaz (LAP) aktivitesinin genelde glutamil ve prolil aminopeptidazlara kıyasla daha yüksek olduğu ve 11 farklı doku arasından da en iyi aktivitenin böbrek ($38,23 \pm 6.58$ U), incebağırsak ($33,51 \pm 0.13$ U) ve karaciğer ($27,51 \pm 6.75$ U) de olduğu gözlemlendi. Ancak spesifik aktivite olarak değerlendirildiğinde ise protein değerinin düşük olması nedeni ile en etkin dokunun pankreas olduğu ($15,3 \pm 1.30$) ve Timusta da önemli ölçüde yüksek olduğu gözlemlendi. Prolil aminopeptidaz (PAP) aktiviteleri ise taranan tüm dokularda saptanmasına rağmen en fazla aktivite böbrekte ($26,4 \pm 1.59$ U) belirlendi. Ancak spesifik aktivite açısından değerlendirildiğinde pankreas ve dalakta PAP'ın daha etkin olduğu belirlendi. Glutamil aminopeptidaz sonuçları değerlendirildiğinde ise literatürde verilen diğer bir çok organizmadakine benzer olarak kobayda da böbrek ($22,0 \pm 2.80$ U) ve karaciğer'in ($27,57 \pm 6.75$ U) en fazla aktiviteye sahip olduğu görüldü.

Çizelge 3.1. Lösil, glutamil ve prolil aminopeptidaz enzimlerinin kobay dokularında dağılımı

		Lösil aminopeptidaz (LAP)		Prolil aminopeptidaz (PAP)		Glutamil aminopeptidaz (GAP)	
Doku	Protein (mg/ml)	Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (U/mg)
Beyin	3,47 ± 0.06	10,9 ± 1.53	3,13 ± 0.45	7,25 ± 1.75	2,09 ± 0.72	3,45 ± 0.85	0,99 ± 0.33
Böbrek	17,3 ± 0.22	38,2 ± 6.58	2,20 ± 0.35	26,4 ± 1.59	1,52 ± 0.04	22,0 ± 2.80	1,27 ± 0.05
Pankreas	0.62 ± 0.01	9,50 ± 0.20	15,3 ± 1.30	5,85 ± 1.85	9,43 ± 4.5	3,68 ± 0.13	5,93 ± 1.01
Kalp	4,40 ± 0.21	12,4 ± 1.70	2,81 ± 0.40	11,3 ± 2.45	2,57 ± 0.63	9,0 ± 1.20	2,00 ± 0.30
Kalınbarsak	3.74 ± 0.06	16,2 ± 2.72	4,32 ± 0.73	5,92 ± 1.19	1,59 ± 0.75	2,55 ± 0.55	0,68 ± 0.20
İncebarsak	6,59 ± 0.18	33,5 ± 1.13	5,08 ± 0.10	5,25 ± 1.53	0,79 ± 0.17	12,54 ± 2.36	1,90 ± 0.27
Dalak	3,34 ± 0.21	23,4 ± 2.30	7,00 ± 0.69	14,14 ± 2.61	4,23 ± 1.17	13,25 ± 0.65	3,96 ± 0.30
Testis	8,18 ± 0.25	17,1 ± 1.03	2,15 ± 0.37	10,07 ± 0.63	1,23 ± 0.05	2,70 ± 0.40	0,33 ± 0.03
Timus	1,25 ± 0.11	12,5 ± 3.06	10,0 ± 2.42	4,58 ± 0.53	3,66 ± 0.3	7,97 ± 0.47	6,37 ± 1.50
Karaciğer	12,3 ± 0.23	27,5 ± 1.75	2.24 ± 0.04	11,02 ± 0.92	0,89 ± 0.37	27,57 ± 6.75	2,24 ± 0.14
Mide	4,50 ± 0.27	14,7 ± 1.09	3.26 ± 0.25	1,03 ± 0.15	0,22 ± 0.05	3,28 ± 0.08	0,72 ± 0.02

Genel olarak tüm dokularda her üç formun da var olması ancak değer olarak birbirinden farklı sonuçlar göstermesi bu enzimlerinin dokulardaki dağılımlarının farklı olması olarak değerlendirildi. Özellikle LAP'ın tüm dokularda diğerlerine göre daha yüksek aktivite değerlerine sahip olmasının nedeninin ise geniş substrat spesifikliğine bağlı olduğu düşünüldü.

Literatürde aminopeptidazların kobay dokularında dağılımı ile ilgili bir çalışmaya rastlanmadığından elde edilen verilerin kıyaslaması yapılamamakla birlikte farklı kaynaklarda bu enzimlere ait veriler aşağıda özetlenmiştir.

Osamo ve Ark. (2004) Lösil aminopeptidaz enziminin insan endotel hücrelerinde lokalize olduğunu belirlemişlerdir. Wu ve Ark. (2008), Kızıldeniz çipura (*Pagrus major*), iskelet kası ve böbreğinde ve İleana ve Ark. (1992), ise insan lökositinde PAP enziminin aktivitesinin yüksek olduğu gözlemişlerdir.

Kenji ve Ark. (2003) tavuk etinden glutamil aminopeptidaz enzimini saflaştırmışlar ve karakterize etmişlerdir. Maria Dolores ve arkadaşları (2001), fare beyin frontal korteksinde, Abdelouahab ve arkadaşları (1979), domuz bağırsağında ve Maria Jesus ve arkadaşları (2001), sıçan astrositlerinde aspartil ve glutamil amino peptidaz enziminin karakterizasyonu ve indüklenebilirliği üzerine çalışmalar yapmışlardır.

Diğer yandan İleana ve arkadaşları (1992), tarafından insan lökositinden Prolil amino peptidaz enzimi elde edilmiş ve karakterize edilmiştir.

Literatür verilerinden de açıkça görülebileceği gibi kaynağa göre hemen hemen her dokuda aminopeptidazların bulunduğu ancak koşullardaki farklanmaya göre seviyelerinin değiştiği görülmüştür. Bu nedenle bu tez kapsamında yapılan çalışmaların ileri aşamada genişletilerek gerek daha farklı substratların kullanılması gerekse değişen koşullarda enzim seviyelerinin incelenmesi gerekliliği açıktır.

3.2. Lösil, Glutamil ve Prolil Aminopeptidaz Enzimlerinin Bitkilerde Dağılımı

Bitkiler birçok proteaz ve peptidaz için önemli kaynaklardır. Bu bağlamda aminopeptidazların bazı bitkilerde tanımlanması, saflaştırılması ve karakterizasyonuna yönelik çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmada seçilen bitkilerde çalışılmış diğer proteazlar ile ilgili çalışmalar olmakla birlikte aminopeptidazlar ile ilgili veriler literatürde yoktur. Aminopeptidaz dağılımının bazı bitkilerde incelenmesi amacı ile acıbakla, avokado, avokado kabuğu, bezelye, kivi, mısır, pazı, turp otu, ısırgan otu, ebegümeci ve karahindiba seçildi. Hazırlanan bitki ekstraktlarında protein tayini ve lösil aminopeptidaz(LAP), glutamil aminopeptidaz (GAP) ve prolil aminopeptidaz (PAP) aktiviteleri ölçüldü ( izelge 3.2).

Sonuc lar değerlendirildiğinde, protein konsantrasyonlarının genelde düşük olmasına rağmen her üç enzim de tüm bitkilerde aktivite gösterdiği belirlendi ve spesifik aktiviteler doğal daha yüksek bulundu. LAP, aktiviteleri en fazla avokado ve ısırgan otunda bulunmasına rağmen diğer bitkilerde birbirine benzer aktiviteler gözlendi. Glutamil aminopeptidazın ise sırasıyla ısırgan otu, mısır ve acıbaklada en etkin olduğu diğer bitkilerde birbirine yakın aktivitelere sahip olduğu gözlendi. Prolil aminopeptidaz enzimi ise çalışılan tüm bitkiler ve enzimler arasında en yüksek aktivite değeri olarak acıbaklada saptandı. Bu sonuc  bir uygulama alanı da acılığın giderilmesi olan prolil aminopeptidazın etkinliği açısından anlamlı olarak değerlendirildi. Bu bağlamda prolil aminopeptidaz için acıbaklanın, glutamil amino peptidaz için mısırın ve lösil aminopeptidaz için avokadonun iyi bir kaynak olabileceği düşünüldü. Ancak çalışılan bitkilerde her üç enzim için bulunan aktiviteler birbirine yakın olduğundan gerçek değerlendirmenin spesifik aktiviteler cinsinden yapılması gerekmektedir.

Peptidazların bitkilerin çimlenme vb. farklanan evrelerinde ve stres koşullarında ekspresyonlarının arttığı bilinmektedir. Bu bağlamda gerek dağılım ve lokalizasyon gerekse fonksiyonel açıdan iyi bir değerlendirme yapabilmek için aminopeptidaz enzimlerinin bitkinin tohum, kök, gövde, yaprak, meyve vb. dokularında dağılımlarının ve değişen koşullarda ekspresyonel bazda incelenmesi gerekliliği açıktır.

Çizelge 3.2. Lösil, glutamil ve prolil aminopeptidaz enzimlerinin bitkilerde dağılımı

Bitkiler	Protein (mg/ml)	Lösil aminopeptidaz		Glutamil aminopeptidaz		Prolil aminopeptidaz	
		Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (U/mg)
<i>Acıbakla (Lupinus albus)</i>	4,30±0.35	7,9 ±1,0	1.84±0.24	10,6 ±0,5	2.45±0.14	29,01 ±1,5	6.74±0.39
<i>Avokado (Persea americana)</i>	0,91±0.14	16,4 ±0,8	18.2±0.80	6,6 ±1,0	7.25±0.75	8,4 ±0,5	9.2±0.45
Avokado kabuğu (<i>Persea americana</i>)	0,30±0.04	3,1 ±0,5	10.3±0.70	8,5 ±0,7	28.3±2.40	9,5 ±0,5	31.7±1.13
Bezelye (<i>Pisum sativum</i>)	1,23±0.23	8,5 ±0,5	6.91±0.70	7,2 ± 0,5	5.85±0.60	11,4 ±1,8	9.27±0.55
Kivi (<i>Actinidia chinensis</i>)	0,33±0.10	7,9 ±1,0	23.9±1.57	5,6 ±1,5	16.9±1.54	7,7 ±0,8	23.3±0.89
Mısır (<i>Zea mays</i>)	1,09±0.35	8,5 ±1,0	7.8±1.26	16,2 ±2,0	14.9±0.89	10,4 ±1,0	9.54±0.59
Pazı (<i>Beta vulgaris</i>)	0,28±0.19	6,0±0,5	21.4±0.81	7,87±0,5	28.1±1.79	7,8±0,5	27.9±1.4
Turp otu (<i>Raphanus raphanistrum</i>)	0,95±0.25	9,6±0,8	10.1±0.53	9,0±0,7	9.47±0.68	10,0±1,0	10.52±0.49
Isırgan otu (<i>Urtica dioica</i>)	1,73±0.16	11,0±1,0	6.36±0.70	12,6±1,0	7.28±0.85	14,0±0,5	8.09±0.76
Ebegümeçi (<i>Malva sylvestris</i>)	0,51±0.17	5,5±0,5	10.8±0.81	8,3±1,5	16.3±1.20	7,2±1,0	14.1±0.94
Karahindiba (<i>Taraxacum officinale</i>)	0,18±0.08	2,7±0,6	15.0±0.64	5,9±0,5	32.8±1.43	4,8±0,2	26.7±1.45

Bitkilerde yapılan lösil aminopeptidaz ile ilgili bazı çalışmalar incelendiğinde Ogiwara ve Ark. (2004) arpada (*Hordeum vulgare* L), Yong ve Ark. (2000), domates yaprağında (*Solanum lycopersicum*), Vujcic ve Ark. (2010), patatesde (*Solanum tuberosum*) ve Premarathne ve Ark. (2010), kivi meyvesinde (*Actinidia chinensis*) LAP enziminin karakteristik özelliklerini inceledikleri görülmektedir.

Javier ve Ark. (2008) domates yaprağında (*Lycopersicon esculentum*) ve Armia ve Ark. (2000), Hint keneviri tohumunda (*cannabis sativa*) glutamil aminopeptidaz enzimi üzerine çalışmalar yapmışlardır.

Bu çalışmada da etkinliği incelenen prolil amino peptidaz özellikle gıda ve potansiyel medikal uygulamaları nedeni ile farklı organizmalarda sıklıkla çalışılmıştır. Bitkilerde ise Stephen ve Ark. (1983), tarafından buğdayda (*Triticum aestivum* L.), Morinova ve Ark. (2008) lahanada (*Brassica oleracea*) ve Kuzuki ve Ark. (2004), mantarda (*Lentinus edodes*) prolil amino peptidazların saflaştırılması ve karakterizasyonuna yönelik çalışmalar yapmışlardır.

3.3. Lösil, Glutamil ve Prolil Aminopeptidaz Enzimlerinin Kobay Karaciğer Subsellüler Fraksiyonlarında Dağılımı.

Aminopeptidazların hücre içi lokalizasyonlarının belirlenmesi amacı ile yapılan histokimyasal çalışmalar olmakla birlikte enzim aktivite seviyelerindeki farklılıkları inceleyen çalışmalar sınırlıdır. Bu nedenle bu çalışmada kobay dokularından en iyi aktiviteye sahip olan dokulardan biri olan karaciğer dokusunda subsellüler fraksiyonlar hazırlandı ve aktiviteler farklı fraksiyonlarda ölçüldü. LAP, GAP ve PAP enzimlerinin karaciğer subsellüler fraksiyonlarında dağılımı Çizelge 3.3 de verildi.

Çizelge 3.3 den de görüldüğü gibi LAP ve GAP için en yüksek aktivite lizozomal preparatta gözlenirken prolil aminopeptidaz tüm fraksiyonlarda benzer aktivitelere sahiptir. Bunun yanı sıra mikrozomal preparatta da sitozole kıyasla her LAP, GAP ve PAP için kayda değer aktiviteler belirlenmiştir.

Çizelge 3.3. Lösil, glutamil ve prolil aminopeptidaz enzimlerinin kobay karaciğer subsellüler fraksiyonlarında dağılımı

		Lösil aminopeptidaz		Glutamil aminopeptidaz		Prolil aminopeptidaz	
Fraksiyon	Protein (mg/ml)	Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (U/mg)
Lizozom/ mitokondri	24,2±2,4	123,1±7,5	5,0±1.5	102,4±5,8	4,2±1.1	71,6±10,7	3.0±1.8
Sitozol	30,4±2,3	67,3±4,8	2,2±0.96	58,8±3,9	1,9±0.7	75,6±6,6	2,5±1,3
Mikrozom	29,8±3,5	88,6±6,4	2,9±1.0	78,5±8,0	2,6±1,5	85,2±7,6	2,9±1,4

Lizozomlar hücre içinde yaşlanmış, yıpranmış yada işlevlerini yitirmiş organellerin sindiriminden sorumludurlar ve çok etkili hidrolitik enzimler içerirler ve bu nedenle aminopeptidazların lizozomal preparatta daha etkin olması beklenen bir sonuç olara değerlendirilebilir. Ayrıca lizozomal preparattaki mitokondri çok farklı önemli metabolik olaylarda etkin olan bir organeldir ve bu nedenle matriks ve iç membranın protein ve proteaz enzimlerinin oranı diğer membranlara göre daha yüksektir.

Günümüze değin farklı kaynaklarda aminopeptidazlar ile ilgili yapılan bir çok çalışmada Lizozom/mitokondri preparatı hazırlandığı ve bu preparattan saflaştırma ve karakterizasyon çalışmalarının gerçekleştirildiği görülmektedir. Kobay karaciğerinin sübsellüler fraksiyonlarında aminopeptidazların lokalizasyonları ile ilgili bir çalışmaya literatürde yer verilmemesine rağmen elde edilen sonuçların farklı türlerde elde edilen veriler ile uyum içinde olduğu düşünüldü.

3.4. Lösil, Glutamil ve Prolil Aminopeptidaz Enzimlerinin Aktivitesi Üzerine Metal İyonlarının Etkisi

Metal iyonlarının enzimlerin katalitik mekanizmasına etkisi çeşitlidir. Bazı enzimler (metalloenzimler), katalitik mekanizmasına kovalent olarak bağlanmış bir veya birkaç metal iyonlarının varlığıyla karakterize edilirken, bazı

enzimler(metal bağımlı veya metalle aktive edilen enzimler) ise, metal iyonuna doğrudan bağlanmaz, ancak metal iyonunun varlığı katalitik aktiviteye katkı sağlar. Bazı enzimler (metal bağımsız enzimler) için ise, katalitik aktivite için metal iyonunun varlığı zorunlu değildir, bununla birlikte varlığı enzim aktivitesini etkiler.

Metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisinde, metal iyonunun konsantrasyonu ve yük durumu da önemlidir. Konsantrasyon artışı çoğunlukla aktiviteyi olumsuz yönde etkilerken, metal iyonunun monovalent veya divalent oluşu da enzim aktivitesinde farklı etkilere(aktivatör veya inhibitör) neden olmaktadır. Divalent iyonların genellikle monovalent iyonlara göre enzim üzerinde daha fazla etkin olduğu görülmektedir.

LAP, GAP ve PAP enzimlerinin aktivitesi üzerine metal iyonunun etkisi kobay dokularında divalent metal iyonları (Mg^{+2} , Mn^{+2} , Ni^{+2} , Cu^{+2}) kullanılarak gerçekleştirildi. Farklı metal iyonu konsantrasyonlarının enzim aktivitesine etkisi bölüm 2.7’de anlatılan şekilde belirlendi (Çizelge 3.4, 3.5, 3.6).

3.4.1. Kobay Dokuları lösil aminopeptidaz enzim aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisi

Metal iyonlarının farklı kobay dokularındaki lösil amino peptidaz aktivitesi üzerine etkisi Çizelge 3.4 de verildi.

Sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde Mg^{+2} , Mn^{+2} , Ni^{+2} , Cu^{+2} metallerinin böbrek LAP aktivitesi üzerine inhibitör etkisi gösterdiği görülmektedir. Mg^{+2} , Mn^{+2} , Ni^{+2} iyonları diğer dokularda aktiviteyi arttırırken, Cu^{+2} nin ise tüm dokularda inhibisyon etkisi gösterdiği belirlendi. Aktivite artışlarının iyon konsantrasyonundaki artış ile doğrusal olmadığı görüldü. Bu konuda kesin bir yargıya varabilmek ancak 5 mM’lık iyon konsantrasyonundan düşük miktarlarda yapılacak çalışma sonuçlarının değerlendirilmesi ile mümkün olabilecektir. Dokular arasında en belirgin aktivite artışının Mn^{+2} iyonları varlığında beyin, karaciğer ve testiste olduğu ve Ni^{+2} iyonları varlığında ise beyin, mide ve testiste olduğu görülmektedir. Karaciğer dokusunda ise 5 mM nikel konsantrasyonunda aktivite artışı yüksek iken 10 mM da inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir.

Çizelge 3.4. Kobay dokuları lösin aminopeptidaz enzim aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisi

			Mg^{+2}		Mn^{+2}		Ni^{+2}		Cu^{+2}	
Doku	Kontrol (U/mg)	Konsantrasyon (mM)	Sp.Aktivite (U/mg)	Aktivite (%)	Sp.Aktivite (U/mg)	Aktivite (%)	Sp.Aktivite (U/mg)	Aktivite (%)	Sp.Aktivite (U/mg)	Aktivite (%)
Böbrek	46,3±2,0	5	21,0±0,7	45	19,0±0,5	41	38,0±1,5	82	13,0±2,0	28
		10	19,7±1,5	42	17,0±0,1	36	38,0±1,0	82	11,0±1,0	23
İncebağırsak	23,2±1,0	5	27,6±2,0	119	36,0±2,0	155	29,8±0,6	128	22,2±0,6	95
		10	28,7±1,0	124	41,0±1,2	177	43,8±0,7	189	18,1±2,0	78
Dalak	32,3±2,0	5	38,9±1,0	120	50,2±0,5	158	49,0±1,5	151	28,0±2,0	75
		10	40,2±1,0	124	54,5±1,0	170	52,0±1,0	170	24,2±1,5	74
Beyin	6,5±1,0	5	10,7±0,5	165	16,7±2,0	257	13,7±0,5	211	6,1±0,2	94
		10	12,3±1,0	186	21,5±1,5	330	19,6±1,0	301	4,6±0,5	71
Kalınbağırsak	20,0±0,6	5	22,8±0,3	114	30,0±1,0	150	30,9±1,0	155	16,0±1,5	80
		10	25,0±1,0	125	27,0±0,4	135	33,0±2,5	165	11,0±0,2	55
Kalp	20,8±1,0	5	21,0±1,0	100	24,0±2,0	115	27,0±2,0	130	15,8±0,5	75
		10	25,0±2,5	120	25,0±1,5	122	31,0±2,5	150	14,2±0,6	70
Karaciğer	11,7±0,5	5	16,5±1,0	137	29,0±1,0	247	30,0±1,0	247	10,0±0,5	83
		10	19,6±0,4	167	33,0±1,0	282	9,4±0,5	80	4,8±1,0	41
Mide	15,5±1,0	5	19,0±0,1	122	22,0±1,0	141	41,0±1,0	264	8,8±0,6	56
		10	27,0±0,5	147	31,0±1,5	200	41,7±1,0	269	8,0±0,5	51
Pankreas	80,0±4,0	5	87,0±1,0	109	96,6±4,8	120	123,0±2,0	153	69,1±1,8	86
		10	119,0±0,5	148	116,6±2,6	145	125,0±1,5	156	44,0±3,0	55
Testis	8,0±0,5	5	10,5±1,0	128	14,0±1,0	175	23,0±0,8	286	5,5±0,5	67
		10	12,2±0,5	152	20,6±0,5	257	18,2±0,6	227	3,5±0,5	47

Çizelge 3.5. Kobay dokuları glutamil aminopeptidaz enzim aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisi

			Mg^{+2}		Mn^{+2}		Ni^{+2}		Cu^{+2}	
Doku	Kontrol (U/mg)	Konsantrasyon (mM)	Sp.Aktivite (U/mg)	Aktivite (%)	Sp.Aktivite (U/mg)	Aktivite (%)	Sp.Aktivite (U/mg)	Aktivite (%)	Sp.Aktivite (U/mg)	Aktivite (%)
Böbrek	8,2±0,1	5	13,6±0,8	165	18,0±0,3	219	30,0±0,4	365	4,5±0,5	54
		10	15,6±0,1	190	17,0±0,3	207	32,0±1,6	390	4,3±0,5	52
İncebağırsak	8,2±0,2	5	10,4±0,8	127	10,8±0,6	131	11,5±1,0	140	6,3±1,5	76
		10	11,2±0,6	136	10,8±0,2	132	14,6±1,0	178	3,6±0,8	43
Dalak	18,0±0,3	5	21,0±0,2	116	17,9±2,0	99	22,6±1,6	125	16,5±0,1	92
		10	21,6±0,3	120	31,8±1,1	176	28,2±1,0	156	8,9±2,3	50
Beyin	3,3±0,5	5	3,2±1,0	96	4,2±2,0	127	5,2±0,5	157	2,5±0,2	75
		10	5,0±1,0	150	7,3±1,0	212	9,7±1,0	293	1,5±0,3	45
Kalınbağırsak	3,0±0,2	5	7,0±0,2	233	4,5±2,0	150	7,3±1,0	245	2,2±0,1	73
		10	7,5±0,1	250	6,0±1,5	200	6,5±2,0	216	1,5±0,2	50
Kalp	9,7±0,5	5	10,5±0,5	108	12,0±0,2	123	17,8±1,0	183	8,3±1,0	85
		10	10,7±1,0	110	12,8±0,5	131	18,5±1,5	190	8,0±0,5	82
Karaciğer	13,0±2,0	5	18,0±1,0	138	36,0±1,0	276	43,0±2,0	330	12,2±1,0	92
		10	20,0±1,0	154	31,0±2,0	238	31,0±1,0	238	8,5±1,0	65
Mide	3,5±0,5	5	4,0±0,1	114	5,5±1,0	157	11,0±0,2	314	3,0±0,2	85
		10	7,0±0,1	200	10,0±2,0	285	9,0±0,5	257	2,5±0,1	71
Pankreas	13,3±0,1	5	15,8±1,0	118	14,0±1,5	105	16,6±0,0	124	14,1±0,1	106
		10	15,8±1,0	118	17,5±0,5	131	18,3±0,1	137	7,6±0,1	57
Testis	0,85±0,5	5	1,3±0,5	158	1,0±1,0	117	3,0±1,0	341	0,6±0,1	75
		10	2,2±1,0	258	1,4±0,6	165	3,5±0,5	411	0,5±0,1	60

Çizelge 3.6. Kobay dokuları prolin aminopeptidaz enzim aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisi

			Mg⁺²		Mn⁺²		Ni⁺²		Cu⁺²	
Doku	Kontrol (U/mg)	Konsantrasyon (mM)	Sp.Aktivite (U/mg)	Aktivite (%)	Sp.Aktivite (U/mg)	Aktivite (%)	Sp.Aktivite (U/mg)	Aktivite (%)	Sp.Aktivite (U/mg)	Aktivite (%)
Böbrek	8,4±0,7	5	14,0±1,8	166	23,0±0,3	273	25,5±0,5	303	5,7±1,2	67
		10	18,4±1,8	219	27,4±2.0	326	28±0,4	333	4,6±1.0	54
İncebağırsak	1,9±0,2	5	2,9±0,2	136	3,5±0,4	184	2,4±0,5	126	1,9±0,2	100
		10	2,8±0,1	147	3,1±0,5	163	3,0±0,1	157	1,6±0,1	84
Dalak	15,6±0,4	5	20,3±0,5	130	23,4±0,4	150	22,3±1.0	142	11,3±1,5	72
		10	30,0±1.0	190	28,3±1,5	181	30,0±2,3	172	5,8±1.0	37
Beyin	3,4±1.0	5	5,0±0,6	144	4,5±1.0	132	5,2±0,2	152	3,5±1.0	102
		10	5,5±0,2	161	8,1±0,5	238	10,5±0,1	307	1,5±0,8	44
Kalınbağırsak	4.0±0,3	5	5,0±0,1	125	6,0±0,2	150	10,0±0,1	250	4,0±0,2	100
		10	7,5±0,8	187	8,0±0,4	200	13,0±0,1	325	2,7±0,1	67
Kalp	20.0±0,1	5	23,0±0,2	115	30,6±0,8	153	35,8±1,2	180	19,5±0,1	97
		10	23,6±1.0	118	34,0±0,1	170	47,5±0,1	237	19,0±0,1	95
Karaciğer	5.0±0,5	5	7,0±0,5	140	11,4±1,2	228	10,0±0,2	200	5,1±1.0	102
		10	7,7±0,5	154	13,4±0,5	268	5,5±0,5	170	4,0±2.0	80
Mide	2,3±1.0	5	3,0±0,8	130	3,4±0,5	147	6,5±1,5	283	1,7±0,3	73
		10	3,6±0,2	156	5,6±0,2	243	4,0±2.0	173	1,0±0,1	43
Pankreas	30.0±0,4	5	35,3±0,4	117	37,0±0,2	123	45,0±4.0	150	22,0±0,5	73
		10	39,5±0,8	131	51,0±4.0	170	56,0±3.0	186	10,0±1,2	36
Testis	4,4±0,1	5	6,5±0,2	147	5,5±0,5	125	6,0±3.0	136	3,0±0,7	68
		10	7,0±0,2	160	7,2±0,5	163	11,6±1.0	253	2,5±0,1	56

Sonuç olarak Cu^{+2} iyonları tüm dokularda inhibisyon etkisi gösterirken diğer iyonlar böbrek haricinde tüm dokularda kısmen veya yüksek aktivite artışına neden olmuştur.

Araştırmacılar tarafından farklı kaynaklardan lölil aminopeptidaz enzimi üzerine çeşitli metal iyonlarının etkisi incelenmiştir. Bulunan bazı sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

Morty ve Ark. (2002) Mn^{+2} , Mg^{+2} , Co^{+2} , Ni^{+2} metallerinin patojenik bir bakteride ve Lei Dong, (2005) *Helicobacter pylori* de Mg^{+2} , Mn^{+2} ve Ni^{+2} iyonlarının enzim aktivitesini arttırdığını gözlemlemişlerdir.

Natasa ve arkadaşları, Mg^{+2} ve Mn^{+2} iyonlarının 5 mM konsantrasyonunda *morimus funereas* böceğindeki LAP enzimin aktivitesini arttırdığını belirlemişlerdir (Natasa ve Ark. 2008)

Hatta ve arkadaşları, kenede (*Haemaphysalis longicornis*) yapmış oldukları bir çalışmada 10 mM Cu^{+2} iyonlarının LAP enzimin üzerine inhibisyon etkisi gösterdiğini, 10 mM Ni^{+2} iyonlarının ise aktiviteyi arttırdığını gözlemişlerdir.

Nampoothiri ve arkadaşları mantar (*Aspergillus sp.*) dan elde ettikleri LAP üzerine Mg^{+2} , Mn^{+2} ve Cu^{+2} iyonlarının etkisini incelemişlerdir. 2mM metal konsantrasyonunda Mg^{+2} ve Mn^{+2} iyonlarının aktiviteyi çok az düşürdüğünü ancak bakırın ise kuvvetli inhibisyon etkisi olduğunu göstermişlerdir (Nampoothiri ve Ark. 2005).

Sonuç olarak kobay dokuları lölil aminopeptidaz enzimi üzerine metal iyonlarının etkisi değerlendirildiğinde literatür verilerine benzer sonuçlar elde edilmiştir. Literatürde genelde aminopeptidaz inhibisyonunda etkili metal olan Cu^{+2} kobay daki dokularda da enzimi için de inhibisyon etkisi göstermiştir. Yine literatürde aktivatör etkisi gösteren metaller (Mg^{+2} , Mn^{+2} ve Ni^{+2}) beyin dokusu hariç diğer dokularda LAP enzimi için de aktivatör görevi görmüştür. Ancak kaynağa, lokalizasyona ve dolayısı ile fonksiyona göre enzimlerin iyonlar ile etkileşimleri sonucunda aktivitedeki değişimler söz konusu olabileceği gibi ilgili amino peptidazın reaksiyon mekanizmasındaki metal iyonunun rolünde aydınlatılması gerekliliği açıktır.

3.4.2. Kobay dokuları glutamil aminopeptidaz enzim aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisi

Metal iyonlarının farklı kobay dokularındaki glutamil amino peptidaz aktivitesi üzerine etkisi Çizelge 3.5 de verildi.

Sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde tüm dokularda Mg^{+2} , Mn^{+2} , Ni^{+2} metallerinin glutamil aminopeptidaz aktivitesini arttırdığı görülürken Cu^{+2} iyonlarının inhibitör etkisi gösterdiği görülmektedir. Lösil aminopeptidazdan farklı olarak glutamil aminopeptidaz aktivitelerindeki artışın veya inhibisyonun genelde iyon konsantrasyonuna bağlı olduğu görüldü.. Glutamil amino peptidaz aktivasyonunda ise hemen hemen tüm dokularda Ni^{+2} iyonlarının en etkili olduğu gözlemlendi.. Dokular arasında ise en belirgin aktivite artışının 10 mM Ni^{+2} konsantrasyonunda testis ve böbrek dokusunda, en belirgin inhibisyonun da böbrek, ince bağırsak ve beyin dokularında olduğu görülmektedir.

Araştırmacılar tarafından farklı kaynaklardan glutamil aminopeptidaz enzimi üzerine çeşitli metal iyonlarının etkisi incelenmiştir. Bulunan bazı sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

Sarah Sarıd ve arkadaşları, 1 mM metal konsantrasyonlarında Mg^{+2} iyonlarının insan lenfositlerindeki GAP enzim aktivitesine hiç bir etkisi olmazken, Mn^{+2} metallerinin enzim aktivitesini çok az arttırdığını ve Cu^{+2} metallerinin ise aktivitenin % 50'sini inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir (Sarıd ve Ark.(1992).

Takashi Kuda ve arkadaşları Cu^{+2} metalinin 1 mM konsantrasyonda bakteri (*S. Suis*) GAP enziminin aktivitesini % 70'ini azaldığını belirtmişlerdir (Takashi Kuda ve Ark, 2005).

Hama ve Ark.(1982), 0,1 mM Zn^{+2} ve 0,1 mM Cu^{+2} metalleri ve 1 mM Mn^{+2} iyonlarının insan böbreğindeki GAP enzim aktivitesi üzerine hiç bir etkilerinin olmadığını belirtmişlerdir.

Kenji ve Ark. (2001), ise 1 mM metal konsantrasyonunda Mg^{+2} ve Ni^{+2} metallerinin tavuk eti GAP enzim aktivitesini arttırdıkları gözlemlemiştir.

Sonuç olarak kobay dokuları glutamil aminopeptidaz enzimi üzerine metal iyonlarının etkisinde literatür verilerine benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Literatürde enzim inhibisyonu üzerine etkili olan Cu^{+2} iyonları kobay glutamil aminopeptidaz enzimi için de inhibisyon etkisi göstermesi temel benzerliktir. Ancak diğer metaller için farklı organizmalarda aktiviteyi etkilemediği veya az oranda arttırdığı veya azalttığına ilişkin sonuçlara yer verilmiştir. Bunun yanı sıra bu çalışmada glutamil aminopeptidaz enzim aktivitesinin nikel iyonları varlığında belirgin bir şekilde artması GAP enzimi için nikel iyon varlığının aktivite için son derece önemli olduğunu göstermektedir. Bu nedenle ilgili amino peptidazın aktivasyonunda nikel iyonunun etki mekanizmasının aydınlatılması gerekliliği açıktır.

3.4.3. Kobay dokuları prolil aminopeptidaz aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisi

Metal iyonlarının farklı kobay dokularındaki prolil amino peptidaz aktivitesi üzerine etkisi Çizelge 3.6 de verildi.

Sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde tüm dokularda Mg^{+2} , Mn^{+2} , Nimetallerinin prolil aminopeptidaz aktivitesini arttırdığı görülmektedir. Cu^{+2} iyonları ise lösil ve glutamil aminopeptidaza benzer şekilde inhibitor etkisi göstermekle birlikte inhibisyonun 5 mM konsantrasyonda diğer iki enzim kadar etkin olmadığı 10 mM konsantrasyonda daha etkin olduğu belirlendi. Özellikle ince bağırsak, beyin, kalın bağırsak ve karaciğer dokularında 5 mM Cu^{+2} varlığında aktivite hiç değişmezken 10 mM konsantrasyonda yaklaşık 20-40% aktivite kaybı olduğu gözlemlendi. Ayrıca aktiviteleredeki artış veya inhibisyonun genelde iyon konsantrasyonuna bağlı olduğu görülmektedir. Prolil aminopeptidaz aktivasyonunda hemen hemen tüm dokularda Ni^{+2} iyonları başta olmak üzere Mg^{+2} ve Mn^{+2} iyonlarının etkili olduğu gözlemlendi.

Araştırmacılar tarafından farklı kaynaklardan glutamil aminopeptidaz enzimi üzerine çeşitli metal iyonlarının etkisi incelenmiştir. Bulunan bazı sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

Yukihiro Yamamata ve Ark.(2011), 1 mM konsantrasyonunda Mg^{+2} , Cu^{+2} metallerinin bakteri (*Stereptomayces sp.*) PAP enzim aktivitesine etkisini incelemişlerdir ve 1 mM Mg^{+2} konsantrasyonunda enzimin aktivitesinin arttığını, 1 mM Cu^{+2} konsantrasyonunda ise aktivitenin değişmediğini belirtmişlerdir.

Marinava ve Ark. (2008), 1mM ve 5 mM konsantrasyonlarda Mn^{+2} , Ni^{+2} ve Cu^{+2} iyonlarının *Aspergillus oryzae* rekombinant PAP enzimi üzerine etkilerini incelemişlerdir. Mn^{+2} ve Ni^{+2} iyonlarının aktiviteyi arttırdığını ve Cu^{+2} nin ise inhibisyon etkisi gösterdiğini belirtmişlerdir.

Ninomiya ve arkadaşları kayısı tohumlarından prolil aminopeptidazı saflaştırarak karakterize etmişler ve 0,1 mM ve 1 mM konsantrasyonunda Mg^{+2} ve Ni^{+2} ve Cu^{+2} metallerinin etkisini incelemişlerdir. Mg^{+2} ve Ni^{+2} iyonlarının aktiviteyi az arttırdığını ve Cu^{+2} nin ise POP aktivitesine hiç etkisi olmadığını belirtmişlerdir

Sonuç olarak kobay dokuları prolil aminopeptidaz enzimi üzerine metal iyonlarının etkisinde literatür verilerine benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışmada prolil aminopeptidazın lösil ve glutamil aminopeptidaza kıyasla daha yüksek bakır konsantrasyonlarda inhibisyon etkisi gösterdiği diğer iyonların ise aktiviteyi olumlu yönde etkilediği belirlendi. İleri aşamada amino peptidazınların kaynağa, lokalizasyona ve türe göre saf enzim preparatlarında iyon etkilerinin araştırılması etki mekanizmasının tanımlanması açısından önemli olacaktır.

4. GENEL DEĞERLENDİRME

Bu çalışmada farklı kaynaklarda aminopeptidazların dağılımının incelenmesi amacı ile doku ve bitki ekstraktları hazırlandı ve aktiviteleri ölçüldü. Çalışma kapsamında incelenen lösil aminopeptidaz, glutamil aminopeptidaz ve prolil amino peptidaz enzimlerinin araştırılan tüm kobay ve bitki dokularında varlığı belirlendi ancak kaynağa göre enzim seviyelerinde farklılıklar olduğu gözlemlendi.

Kobay dokularında Lösil aminopeptidaz (LAP) aktivitesinin genelde diğerlerine kıyasla daha yüksek olduğu ve 11 farklı doku arasından da en iyi aktivitenin böbrek, incebağırsak ve karaciğer de olduğu gözlemlendi. Prolil aminopeptidaz (PAP) ise en fazla böbrekte, glutamil aminopeptidaz (GAP) ise böbrek ve karaciğerde en fazla aktiviteye sahip olduğu görüldü.

Bu çalışmada incelenen bitkilerde her üç enzim için tüm bitkilerde birbirine benzer aktivite değerleri belirlendi. En dikkat çekici ve en belirgin aktivite farkı acıbadamda prolil aminopeptidaz enziminde bulundu.

Aminopeptidazların sübcellüler fraksiyonlarında dağılımının incelenmesi amacı ile kobay karaciğer lizozom/mitokondri, sitozol ve mikrozomal preparatları hazırlandı. LAP ve GAP için en yüksek aktivite lizozomal preparatta gözlenirken prolil aminopeptidaz tüm fraksiyonlarda benzer aktivitelere sahip olduğu belirlendi.

Aminopeptidaz aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisi tüm dokularda 5 mM ve 10 mM konsantrasyonlarında hazırlanan Mg^{+2} , Mn^{+2} , Ni^{+2} ve Cu^{+2} divalent iyonları ile değerlendirildi. Genel anlamda Cu^{+2} iyonlarının LAP, GAP ve PAP aktivitelerine inhibisyon etkisi gösterdiği, ancak prolil aminopeptidaz için ise bu etkinin bazı dokularda yüksek iyon konsantrasyonlarında olduğu belirlendi. Diğer yandan Mg^{+2} , Mn^{+2} , ve Ni^{+2} iyonlarının genelde tüm enzimleri aktive ettiği, glutamil aminopeptidazı ise LAP ve PAP'a kıyasla daha yüksek oranda etkilediği belirlendi.

Tüm veriler, literatür bilgileri ve önemli biyolojik proseslerdeki fonksiyonları düşünüldüğünde amino peptidazların yaygın olarak bulunması

sürpriz bir sonuç değildir. Ancak amino peptidazların çeşitliliği, organizmaya göre değişen karakteristik özellikleri, substrat spesifiklikleri ve hastalık gibi farklı koşullarda ekspresyonel veya aktivite seviyelerindeki değişiklikler nedeni ile konuya ilişkin daha detaylı araştırma gerekliliği vardır. Bu bağlamda bu enzimlerin organ, substrat vb. spesifik fomlarının belirlenmesi, saflaştırılması ve karakterizasyonları ile potansiyel spesifik terapötik ajanların bulunması veya biyoteknolojik uygulamalar açısından önemli olacaktır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abdelouahab, B. and Suzanne, M.**, 1979, Purification and characterization of an aminopeptidase A from Hog Intestinal Brush-Border membrane, *Eur.j. biochem.*107, 381-388.
- Albiston, A.L., Ye, S. and Chai, S.Y.**, 2004, Membrane bound members of the M1 family: more than aminopeptidases. *Protein Pept. Lett.* 11, 491–500.
- Armia, K., Uchicoba, T., Shimoda, M., Yonezawa, H. and Kaneda,M.**, 2000, Purification and some properties of an aminopeptidase from the seeds of cannabis sativa, *Biosci.Biotechnol.Biochem.*64,1055-1057.
- Augustyns, K., Van der Veken, P., Senten, K. and Haemers, A.**, 2005, The therapeutic potential of inhibitors of dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) and related proline-specific dipeptidyl aminopeptidases. *Curr. Med. Chem.* 12, 971–98.
- Barret, A.J., Rawlings, N.D. and Woessner (eds)**, 2004, Handbook of proteolytic enzymes. Elsevier Academic Press. Oxford, UK.
- Bodineau, L., Frugiere, A. and Marc, Y.**, 2008, Aminopeptidase A inhibitors as centrally acting antihypertensive agents, *Heart Fail Rev.* 13:311-319.
- Bradford, M.M.**, 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brown, N.J.**, 2005, Biological markers and diagnostic test for angiotensin converting enzyme inhibitor and vasopeptidase inhibitor-associated angioedema. Patent Application US6887679.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Cappiello, M., Alterio, V., Amodeo, P., Del Corso, A., Scaloni, A., Pedone, C., Moschini, R., De Donatis, G.M., De Simone, G. and Mura, U., 2006,** Metal ion substitution in the catalytic site greatly affects the binding of sulfhydryl-containing compounds to leucyl aminopeptidase. *Biochem.* 45, 3226–3234.
- Chevalet, L., Souppe, J., Deleseleuc, J., Brunet, J. and Warmardam.M.J., 2001,** *Aspergillus ninger* aminopeptidase compositions for making bread doughs and cheese. US6271013.
- Cogolludo, A., Perez-Vizcaino, F. and Tamargo, J., 2005,** New insights in the pharmacological therapy of arterial hypertension . *curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 14,423-427.
- Cottrell, G.S., Hooper, N.M. and Turner, A.J., 2000,** Cloning, expression, and characterization of human cytosolic aminopeptidase P: a single manganese(II)-dependent enzyme. *Biochemistry* 39, 15121–15128.
- Di Cango, R., D Angelis, M., Auricchio, S., Grico., L., Clarke,C. and De Vincenzi. M., 2004,** Sourdough bread made from wheat and nontoxic flours and started with selected lactobacilli is tolerated in celiac sprue patients, *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1088-1096.
- Engel, C.K., Pirard, B., Schimanski, S., Kirsch, R., Habermann, J., Klingler, O., Schlotte, V., Weithmann, K.U. and Wendt K.U., 2005,** Structural basis for the highly selective inhibition of MMP-13. *Chem. Biol.* 12, 181–189.
- FitzGerald, R.J. and O’Cuinn, G., 2006,** Enzymatic debittering of food protein hydrolysates. *Biotechnol. Adv.* 24, 234–237.
- Fourine-Zaloski,M,C.Fassot,C., Valentin,B.,Djordjievic,D and Corrol, P., 2004,** Brain renin-aniotensin-system blockade by systemically active aminopeptidase A inhibitors: a potential treatment of solt- dependent hypertension-*Proc.Natl. Acad.Sci. USA.*101, 7775-7780.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gilboa, R., Spungin-Bialik, A., Wohlfahrt, G., Schomburg, D., Blumberg, S. and Shoham, G.,** 2001, Interactions of *Streptomyces griseus* aminopeptidase with amino acid reaction products and their implications toward a catalytic mechanism. *Proteins* 44, 490–504.
- Gonzales, T. and Rober-Baudouy,J.,** 1996, Bacterial aminopeptidase: properties and function, *FEMS Microbiol.* 18,319-344.
- Hama, L., Tsujimoto,M, Cheung, H.S. and Cashman, D.W.,** 1982, A sloluble aspartate aminopeptidase from human kidney, *Biochim.Biophys.Acta.*242,190-193.
- Hatta, T, Kazama, K., Miyoshi, T., Umemiya, R. and Liao, M.,** 2006, Identification and characterization of a leucine aminopeptidase from the hard tich *Haemaphysalis longicornis*, *Lnt.J.Parasitol.*36,1123-1132,
- Hauser, F., Strassner,j. and Schaller,A.** 2001, Cloning, expression, and characterization of tomato (*clycopersicon esculentum*) aminopeptidase, *p.j. Biol. Chem.* 276, 31732-31733.
- Inguimbert, N., Corie, P., Dhothel.H., Bonnard, E., Liorens-Cortes, C. and Mota.N.,** 2005, Synthesis and invitro activities of new non-peptidic APA inhibitors, *J. Pept. Res.* 65, 175-188.
- Ileana, R. and ArieH', y.,** 1992, Aminopeptidase P from Human leukooytes, *Department of membrane Research and Biophisics*, 210, 93-100.
- Javier, N.,V. and Sang, Y.,P.,** 2008, Targeting and localization of wound-inducible Leucine aminopeptidase A in tomato leaves. *Planta.*227, 341-351.
- Johnson, K.S. and Felton, G.W.,** 2000, Digestive proteinase activity in corn earworm (*Helicoverpa zea*) after molting and in response to lowered redox potential. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 44, 151-161.
- Kazuyuki, H., Keitaro, T., Akira, K. and Shunzo,I.,** 2004, Purfication and characterization of a novel prolyl aminopeptidase from Maitak (*Grifola frondosa*), *Biosci.Biotechnal.Biyochem.*, 68(6), 1395-1396.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kenji, M., Takato, A. and Tadasu, Y.,** 2003, Purification and characterization of a novel glutamyl aminopeptidase from chicken meat, meat science. 64, 163-164.
- Lie Dong, Nicheng, Ming-Wei. and jungfeag Zhang,** 2005, The leucyl aminopeptidase from *Helicobacter pylori* is an allosteric enzyme, Microbiology. 151,2017-2023.
- Lowther, W.T. and Matthews, B.W.,** 2002, Metallo aminopeptidase: structural surrounding. Chem. Rev.102.4581-4608.
- Maria D., M., Mariya Jesus, R. and Manuel. R.,** 2001, Ethanol modifies differently aspartyl- and glutamyl- aminopeptidase activities in mouse frontal cortex synaptosomes, Brain Reserarch Bullerin, vol 57, No.2, pp. 195-203.
- Maria Jesus, R., Isabel, P. and Garbine,A.,** 2001, Oleat, linoleate and cholesterol differently modify aspartal- and glutamil- aminopeptidase activities in primary cultures of rat astrocytes, comparative Biochemistry and phisiyology part C. 128, 113-118.
- Marinava, K.M, Frukawa.L, Suzaki, S., Yamagata.,Y., Koide, Y., Ishida,H.,** 2008, Charactrization of recombinant prolyl aminopeptidase from *Aspergillus oryzae*, Appl.Microbiol.109,156-165.
- Morinova,M., Dolashki,A., Altenberend.F., Stevanovic,S. and Voelter,W.,** 2008, Charactrization of an aminopeptidase and a proline iminopeptidase from cabbage leaves, Naturforsch.C63,105-112.
- Nampoothiri, K.M., Nagy, V., Kovacs, K. and Szakacs, G.,** 2005, L-leucine aminopeptidase production by filamentous *Aspergillus* fungi. Let. Appl. Microbiol.41, 498-504.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Natasa, B., Jelisaveta, I., Vera, N. and Thomas, L.,** 2008, Purification and properties of major midgut leucyl aminopeptidase of *Morimus funereus* (Coleoptera, Cerambycidae) larvae, Comparative Biochemistry and physiology. part B. 149, 454-462.
- Ninomiya, K., Kawatani, K., Tanaka, S. and Makisumi, S.,** 1982, Purification and properties of a proline iminopeptidase from apricot seeds, J. Biochem. 92, 413-421.
- Ogiwara N., Toyoki, A. and Masashi, S.,** 2004, Leucine aminopeptidase from etiolated barley seedlings: characterization and partial purification of isoforms, plant Science. 168, 597-581.
- Osamo, N., Hiroki, M., Tohru, Y. and Tetsuya, A.,** 2004, Transcriptional regulation of angiogenesis-related puromycin-insensitive leucyl-specific aminopeptidase in endothelial cells, Archives of Biochemistry and Biophysics 424, 63-71.
- Premarathne, A.A. and Leung, D.W.,** 2010, Characterization of activity of a potential food-grade leucine aminopeptidase from kiwifruit, Enzyme Res. 51, 7283.
- Raksakulthai, R. and Haard, N.F.,** 2003, Exopeptidases and their application to reduce bitterness in food: a review. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 43, 401-446.
- Roy E, Morty and Jennifer Morehead,** 2002, Cloning and characterization of a leucyl aminopeptidase from the pathogenic leishmania species, Vol. 277, No. 29. Issue of July 19, 26050-26065.
- Ross, S., Giglione, E., Pierre, M., Espagen, C. and Meinel, T.,** 2005. Functional and development impact of cytosolic protein N-terminal methionine excision in Arabidopsis. Plant physiology. 137, 623-637.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sanz, Y. and Toldra, F.**, 2002, Purification and characterization of an arginin aminopeptidase from *lactobacillus sakei*. Appl. Environ. Microbiol. 68, 1980-1987.
- Sarah Sarid, Henrik, S., Mester.T., Van Sande,S.**, 1992. Aminopeptidase P and dipeptidyl peptidase IV activity in human leucocytes and in stimulated lymphocytes, Vol.192, 87-96.
- Savijoki, K., Ingmer, H. and Varmanen, P.**, 2006, Proteolytic systems of lactic bacteria, Appl. Microbiol. Biotechnol. April21.
- Scarf, U., Stolz, P., Huscroft, S.C., and Schmidt-Hahn,K.**, 2006, Use of aminopeptidase in dough, doughs and bread improvers comprising aminopeptidase. Patent Application. WO2006009447.
- Seppo, L., Jauhiainen,T., Pousa.T. and Korpela, R.**, 2003. A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure- lowering effect in hypertensive subjects. Am. J. Nutr. 77, 326-330.
- Shigeri, Y., Tsujimoto, Y., Yutaka, M., and Kunihiro, W.**, 2005, Method for producing degraded material of collagen. Patent Application. JP 20025245285.
- Stephen, P. and Michael, J.**, 1983, Purification and characterization of an iminopeptidase from the primary leaf of wheat (*Triticum aestivum.L*), Plant physiol. 739, 1048-1054.
- Takashi Kudo, Mikio Shuji. and Hiruyuki, A.**, 2005, Purification and characterization of aminopeptidase A from the swine pathogen streptococcus suis, journal of Bacteriology.187,780-786.
- Tu, C., Park. S-Y, and Walling,L.L.**, 2003, Isolation and characterization of the neutral leucine aminopeptidase (LAPN) of tomato Plant physiol.132, 243-255.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Vujcic, Z., Lonkar,N., Dojnov,B., Milovanovic. A. and Bozic. N.,** 2010, Charactrizetion of leucine aminopeptidase from solanum tuberosum tuber, Food.chem.121,418-423.
- Wu Gp, Cao, Mj, Chen, Y., Liu Bx. and Su, Wj.,** 2008, Leucine aminopeptidase from red sea bream (Pagrus major) skeletal muscle: Purfication, charactrization, cellular location, and tissue distribution. Food chem.56, 9653-9660.
- Yamauchi, Y., Ejiri, Y. and Tanaka,K.,**2001, Purfication of an aminopeptidase preferentially relasing N-terminal alanine from cucmber leaves and its identification as a plant aminopeptidase, N.Biyosci. Biofechnol.Biochem.65,2802-2805.
- Yong-Qiana, G. and Linda, L.,** 2000, Specificity of the wound-induced leucine aminopeptidase (LAP-A) of tomato, Eur.J.Biochem.267, 1178-1187.
- Yukihiro Yamamata., Uraji, M., Yesuji,Y., Lwabuchi, M., Hatanaka, T. and Arima, J.,** 2011, Effect of salt on the activity of Streptomayces prolyl aminopeptidase, Acta.1774,1446-1469.
- Zong. H, and Bowen, J.P,** 2006, Antiangiogenesis drug design: multiple pathways tragenting tumor vasculature. Curr. Med. Chem. 13, 849-862.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ehsan Moniri Toragay

Doğum Tarihi : 04 / 09 /1980

Doğum Yeri : Miyandoab

Uyruğu : İran

E- mail : eng_ehsan2009@yahoo.com

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Kurumu

2000 - 2004 Maragha Üniversitesi B.Sc. (Beslenme Anabilim Dalı)

2013 – (-) Ege Üniversitesi, İzmir M. Sc.(Biyokimya)