KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AZOL TÜREVİ MOLEKÜLLERİN PROTEAZ ENZİMLERİ ÜZERİNDEKİ İNHİBİSYON ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

SEVGİ NALBANTOĞLU

KOCAELİ 2012

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AZOL TÜREVİ MOLEKÜLLERİN PROTEAZ ENZİMLERİ ÜZERİNDEKİ İNHİBİSYON ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

SEVGİ NALBANTOĞLU

Yrd. Doç. Dr. Neslihan ŞAKİ
Danışman, Kocaeli Üniv. .....

Yrd. Doç. Dr. Yonca Avcı DUMAN
Jüri Üyesi, Kocaeli Üniv. .....

Yrd. Doç. Dr. Gülnur ARABACI
Jüri Üyesi, Sakarya Üniv. .....

Tezin Savunulduğu Tarih: 27.12.2012

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Çalışmamızın ilk kısmında azol türevi moleküllerin serin proteaz sınıfı enzimleri olan kimotripsin ve tripsin üzerindeki inhibisyon etkilerine bakılmıştır. İkinci aşamada ise bu moleküllerin antioksidan etkilerinin belirlenmesi için serbest radikal giderim aktivileri incelenmiştir. Gerçekleştirilen deneysel çalışmalar, laboratuvar çalışmaları ve yöntemler kısmında açıklanmıştır. Elde edilen sonuçlar ise bulgular kısmında yer almaktadır.

Tüm bu çalışmalarımı da içeren yüksek lisansım esnasında her fikrime değer veren, güler yüzünü, yakın ilgisini ve yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Neslihan Şaki'ye, çalışmalarımda bana yol gösteren Yrd. Doç. Dr. Gülnur Arabacı'ya teşekkürü borç bilirim. Bilime duyduğum heyecanı arttıran, desteğini ve sevgisini her zaman hissettiğim gelecekteki hayat arkadaşım Ömür Çuhadar'a teşekkür ederim. Ayrıca kimyaya uzun yıllarını ayırmış, laboratuvar çalışmalarımdaki kıymetli tavsiyelerinden ötürü birtanecik babam Osman Nalbantoğlu'na, çalışma azmimi sürekli taze tutan sevgili annem Melek Nalbantoğlu'na, sahip olduğum en değerli kişi, en samimi dost biricik kardeşim Serpil Nalbantoğlu'na, manevi desteğiyle her zaman yanımda olan canım ablam Selda Akdağ'a, hayal dünyalarıyla çalışma alanımı renklendiren yeğenlerim Efe, Elif'e ve tez arkadaşım Mustafa Akın'a teşekkür ederim.

Aralık – 2012 Sevgi Nalbantoğlu

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR i
İÇİNDEKİLER ii
ŞEKİLLER DİZİNİ iv
TABLOLAR DİZİNİ v
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ vi
ÖZET vii
ABSTRACT viii
GİRİŞ 1
1. GENEL BİLGİ 2
1.1. Enzimler 2
1.1.1. Enzimatik katalitik mekanizmaları 2
1.1.2. Enzimlerin yapısal özellikleri 4
1.1.3. Enzimlerin adlandırılması ve sınıflandırılması 4
1.1.4. Enzimlerin biyolojik işlevleri 6
1.1.6. Enzimlerin endüstriyel kullanımları 6
1.2. Proteolitik Enzimler 8
1.2.1.Tarihçesi 8
1.2.2. Proteazlar 10
1.2.3. Proteazların sınıflandırılması 10
1.3. Enzim Katalizi ve Kinetiği 21
1.3.1. Enzimatik bir reaksiyonun hızını etkileyen faktörler 23
1.3.2. Enzimlerin spesifikliği 27
1.3.3. Enzim inhibisyonu 27
1.4. Azoller 31
1.4.1. İmidazoller 33
1.4.2. Triazoller 36
1.4.3. Tiyoazoller 38
1.4.4. Azollerin enzim inhibisyonunda kullanımları 39
1.5. Antioksidan Maddeler 40
2. LABORATUVAR ÇALISMALARI VE YÖNTEMLER 42
2.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler 42
2.3. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler 42
2.4. Deneysel Yöntemler 43
2.4.1. α-kimotripsin ve tripsin aktivitelerinin tayini 43
2.4.2. α-kimotripsin enzimi için optimum pH ve sıcaklığın belirlenmesi 44
2.4.3. α-kimotripsin, üzerine bilinen inhibitörlerin etkisinin incelenmesi 44
2.4.4. Azol türevlerinin inhibisyon etkilerinin incelenmesi 45
2.4.5. İnhibisyon türlerinin belirlenmesi 46
2.4.6. DPPH serbest radikal giderim aktivitesi belirlenmesi 46
3. BULGULAR 48
3.1. Michealis-Menten ve Lineweaver Burk Grafiklerinin Çizilmesi 48
3.2. Bilinen İnhibitörlerin α-Kimotripsin Üzerine Etkisi 52
3.3. Azol Türevi Moleküllerin İnhibisyon Etkileri 53

3.4. Azol Moleküllerinin Antioksidan Etkilerinin İncelenmesi.....54
3.4.1. Azol moleküllerinin DPPH aktivitelerinin belirlenmesi 54
4. SONUÇ VE ÖNERİLER 55
KAYNAKLAR.....60
ÖZGEÇMİŞ.....67

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Eski Mısır Medeniyeti'nde şarap ve ekmek yapımı 8
Şekil 1.2. Proteazların hidrolizledikleri amid bağı 10
Şekil 1.3. Serin proteazların spesifisiteleri 17
Şekil 1.4. α-kimotripsin'in üç boyutlu yapısı 18
Şekil 1.5. Serin proteazların katalitik etki mekanizması 19
Şekil 1.6. Tripsinin konformasyonel yapısı 20
Şekil 1.7. Substrat miktarına bağlı reaksiyon grafiği 24
Şekil 1.8. Lineweaver Burk grafiği 25
Şekil 1.9. Yarışmalı inhibisyon mekanizması 28
Şekil 1.10. Yarışmalı İnhibisyon grafiği 28
Şekil 1.11. Yarışmasız inhibisyon mekanizması 29
Şekil 1.12. Yarışmasız inhibisyon grafiği 29
Şekil 1.13. Yarı yarışmalı inhibisyon mekanizması 30
Şekil 1.14. Yarı yarışmalı inhibisyon grafiği 30
Şekil 1.15. Karışık inhibisyon mekanizması 30
Şekil 1.16. Azollerin moleküler yapıları 33
Şekil 1.17. Ketokonazolün moleküler yapısı 33
Şekil 1.18. Klotrimazolün moleküler yapısı 34
Şekil 1.19. Mikonazolün moleküler yapısı 34
Şekil 1.20. Ekonazolün moleküler yapısı 35
Şekil 1.21. Bifonazolün moleküler yapısı 35
Şekil 1.22. Bütakonazolün moleküler yapısı 35
Şekil 1.23. Tiyokanozolün moleküler yapısı 36
Şekil 1.24. Flukonazolun moleküler yapısı 36
Şekil 1.25. İtrakonazolün moleküler yapısı 37
Şekil 1.26. Vorikonazolün moleküler yapısı 37
Şekil 1.27. Terkonazolün moleküler yapısı 38
Şekil 3.1. α- kimotripsin - BSA Michealis – Menten grafiği 49
Şekil 3.2. α- kimotripsin-BSA Lineweaver Burk grafiği 49
Şekil 3.3. α-kimotripsin – Hem Michealis – Menten grafiği 49
Şekil 3.4. α-kimotripsin-Hem Lineweaver Burk grafiği 50
Şekil 3.5. Tripsin – BSA Michealis – Menten grafiği 51
Şekil 3.6. Tripsin-BSA Lineweaver Burk Grafiği 51
Şekil 3.7. Trispin – hem Michealis – Menten grafiği 51
Şekil 3.8. Tripsin-hem. Lineweaver Burk grafiği 52
Şekil 3.9. Bazı organik çözücülerin inhibisyon etkisi 52
Şekil 3.10. Azol moleküllerinin DPPH serbest radikal giderim aktiviteleri 54

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1.1. Enzimlerin uluslararası sınıflandırılması..... 5
Tablo 1.2. Proteazların sınıflandırılması.....11
Tablo 1.3. Bazı enzimlerin dönüşüm sayıları.....22
Tablo 1.4. Azol içeren ilaçlar ve kategorileri.....32
Tablo 3.1. Değişen substratlara bağlı olarak α-kimotripsin aktivitesi…….....48
Tablo 3.2. Değişen substrat konsantrasyonlarına bağlı olarak tripsin aktivitesi 50
Tablo 3.3. Bilinen moleküllerin inhibisyon etkileri.....52
Tablo 3.4. Kimotripsinin inhibitör moleküller tarafından inhibisyon değerleri.....53
Tablo 3.5. Tripsinin inhibitör moleküller tarafından inhibisyon değerleri 53

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

$^{\circ}C$	:Celcius (sıcaklık birimi)
Dak	:Dakika
Gr	:Gram
L	:Litre
Mg	:Miligram
mL	:Mililitre
mM	:Milimolar
μL	:Mikrolitre

Kısaltmalar

DPPH	:2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
E	:Enzim
ES	:Enzim substrat kompleksi
ESI	:Enzim substrat inhibitör kompleksi
I	:İnhibitör
IC_{50}	:Enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
S	:Substrat
ATP	:Adenin trifosfat
ADP	:Adenin difosfat
DNA	:Deoksiribonükleik asit
RNA	:Ribonükleik asit

AZOL TÜREVİ MOLEKÜLLERİN PROTEAZ ENZİMLERİ ÜZERİNDEKİ İNHİBİSYON ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Bu çalışmada azol türevi moleküllerin proteaz enzimleri üzerine inhibisyon etkileri incelenmiş ve antioksidan etkileri araştırılmıştır. Kimotripsin ve tripsinin IC_{50} değerleri ve inhibitör tipleri belirlenmiştir. Azol moleküllerinin DPPH aktiviteleri ve folin içerikleri araştırılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda tolutriazol molekülünün en iyi derecede inhibisyona sebep olduğu görülmüştür. En iyi antioksidan etkiye ise 1,2-benzotiyoazol molekülünün sahip olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan Aktivite, Enzim, İnhibisyon, Proteaz.

INVESTIGATION OF INHIBITION EFFECT OF AZOLE BASED MOLECULES ON PROTEASE ENZYMES

ABSTRACT

In this work, the inhibition effects of azole derivative molecules on protease enzymes were investigated and the antioxidant effects of these molecules were studied. IC_{50} values and the inhibition types of chymotrypsin and trypsin were also determined in addition to the DPPH activities and folin contents of these molecules. As a result of this study, it was concluded that tolutriazole molecules cause the best inhibition while 1,2-benzothiazole molecule has the best antioxidant effect.

Keywords: Antioxidant Activity, Enzyme, Inhibition, Protease.

GİRİŞ

Enzimler biyolojik sistemlerdeki reaksiyonların yaşam ile uyumlu bir şekilde gerçekleşmesini sağlayan kimyasal ajanlardır. Biyolojik katalizörler olarak da tanımlanan enzimler kimyasal enerjinin depolandığı ve şeklinin değiştirildiği metabolik yollarda yüzlerce reaksiyon basamağını katalize etmektedirler.

Önemli metabolik işlevleri olan enzimler; ekmek, peynir, bebek gıdaları, alkollü içecekler, meyve suyu ve süt üretiminde, temizlik malzemelerinde, tıpta, kimyada ve biyoyakıt üretiminde kullanılmaktadır. Enzimlerin endüstrideki bu geniş kullanım alanı biyolojik savaşta kullanımlarına kadar ilerlemiştir.

Canlı sistemlerde metabolik olarak büyük öneme sahip olan enzimlerin inhibisyonu ise başlı başına bir kontrol mekanizmasıdır. Bir çok kimyasal madde çok düşük dozlarda uygulandığında bile spesifik bir enzimi inhibe edebilmekte ve enzimin aktivitesini düşürerek canlı metabolizmasını etkileyebilmektedirler [1].

Bütün canlı sistemlerde var olan, hücrenin gelişmesi ve değişmesi için gerekli olan proteazlar EC 3.4 sınıfı enzimlerdir. Proteazların enzim kataliz spesifiklikleri peptid bağları üzerinedir ve proteazlar bu peptid bağlarının hidrolizini gerçekleştirirler. Bu yüzden proteazların inhibisyonlarının da canlı sistemlerdeki önemi büyüktür.

Yapılan çalışmada Kocaeli Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Laboratuvarı'nda serin proteazlar üzerinde azol türevi moleküllerin inhibisyon etkileri araştırılmıştır. Aktivitenin en rahat gözlemlendiği ve denemelerde tekrarlanabilirliğin en fazla olduğu enzim-substrat ikilisi seçilerek enzim inhibisyonu çalışılmıştır. Son olarak da azol moleküllerinin antioksidan etkileri incelenmiştir.

1. GENEL BİLGİ

1.1. Enzimler

Enzimler, canlıların yaşamlarını sürdürebilmeleri için gerekli olan biyolojik katalizörlerdir [2].

Biyokimya tarihinin çoğu, enzim araştırmalarının tarihinden oluşmaktadır. Biyolojik kataliz, ilk olarak midenin salgılarıyla etin sindirimi üzerine yapılan çalışmalarda 1700'lerin sonunda keşfedilmiştir. Sonraki araştırmalar 1800'lerde tükürük ve çeşitli bitki özütleriyle nişastanın şekere dönüşümü çalışmalarıyla devam ettirilmiştir. 1850' lerde Louis Pasteur şekerin mayayla alkole fermentlenmesinin "fermentler" tarafından katalizlendiği sonucuna varmış, 1897'de Eduard Buchner yine maya özütlerinin şekeri alkole fermentlediğini, bunun da fermantasyonun hücreden uzaklaştırıldığında işlevine devam eden moleküller tarafından gerçekleştirildiğini keşfetmiştir. Frederic W. Kühne bu molekülleri enzimler olarak adlandırmış, böylece enzimlerin izolasyonu ve özelliklerinin araştırılmaya başlanması ile biyokimya biliminin yeni bir alanı, enzimlerin yapı ve fonksiyonlarını, kataliz mekanizmalarını ve enzimlerin katalizlediği her türlü metabolik ve biyokimyasal reaksiyonların neden ve nasıl gerçekleştiğini inceleyen "enzimoloji" ortaya çıkmıştır.

Enzimolojinin keşfedilmesi ile birlikte 1930'larda J.B.S Haldane "Enzimler" başlığı altında bilimsel bir eser yazmıştır. Haldane, enzimlerin moleküler yapıları henüz tam olarak anlaşılmamış olunmasına karşın enzim substrat arasındaki zayıf bağlı etkileşimlerin substratın değişmesiyle sonuçlandığını ve bu mekanizmanın bir tepkimenin katalizlenmesinde gerçekleşiyor olabileceği önerisinde bulunmuş ve enzimatik katalizin temelini oluşturmuştur.

1.1.1. Enzimatik katalitik mekanizmaları

Reaksiyonun aktivasyon enerjisini düşürerek tepkimeyi hızlandıran ve reaksiyondaki geçiş halinin kararlığını arttıran moleküller olan enzimlerin kataliz mekanizmaları beş alt başlıkta incelenebilir.

1.1.1.1. Asit-baz katalizi

Asit katalizinde reaksiyonun geçiş halinin serbest enerjisinin düşürülmesi proton vericisi olan Brønsted asidi'nden kısmi proton transferi ile gerçekleştirilir. Enzim katalizli reaksiyonlarda asit-baz katalizi birbirine eşlik etmektedir.

Enzim moleküllerinin aktif bölgelerinde yer alan aminoasit kalıntıları (Arg, Asp, Cys, Glu, His, Lys, Tyr) proton alıcısı veya proton sağlayıcısı olarak görev yapmaktadırlar.

1.1.1.2. Kovalent kataliz

Kovalent kataliz nükleofilik ve elektrofilik adımların her ikisini de içermektedir. Kataliz mekanizması katalizör ile substrat arasındaki nükleofilik reaksiyon ile başlayıp elektrofilik katalizörün elektronları reaksiyon merkezinden çekmesiyle devam etmekte, reaksiyonun birinci basamağa tekrar geri dönmesi ile de sonlanmaktadır.

1.1.1.3. Metal iyon katalizi

Enzimlerin üçte birlik kısmı katalitik aktivite gösterebilmeleri için metal iyonu varlığına ihtiyaç duymaktadırlar. Bunun yanı sıra metal iyonları katalitik prosese, substrata bağlanıp reaksiyon için substratın yeniden düzenlenmesi sağlayarak, yükseltgenme indirgenme reaksiyonlarında arabuluculuk görevi üstlenerek, elektrostatik kararlılığı veya negatif yüklerin kaymasını sağlayarak katılabilirler.

1.1.1.4. Elektrostatik kataliz

Elektrostatik katalizde substrat, enzim molekülünün aktif bölgesine bağlanmaktadır. Bu aktif cepte yerleşmiş olan yüklü gruplar substrat molekülü üzerindeki hidrofobik yan zincirler ile yeniden düzenlenmektedir.

1.1.1.5. Yakınlık ve düzenlenme etkisi

İntramoleküler reaksiyonlar intermoleküler reaksiyonlara göre daha kolay gerçekleşmektedirler.

Substrat ve enzim arasındaki katalitik reaksiyonda, ES kompleksinin oluştuğu kritik adımda da enzim ve substrat molekülleri birbirlerine çok yakındırlar. Bu sebeple reaksiyon intramoleküler reaksiyonlar da olduğu gibi hızlı bir biçimde gerçekleşir.

Düzenlenme etkisi ise, enzimin asıl substratının yokluğunda aktif merkezinin kendi substrat anoloğuna karşı yeniden düzenlenebilme yeteneğidir [3].

1.1.2. Enzimlerin yapısal özellikleri

Katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu hariç, bütün enzimler proteindirler. Enzimlerin katalitik aktiviteleri, doğal protein konformasyonlarına bağlıdır; bir enzim denatüre edilirse veya alt ünitelerine ayrıştırılırsa veya aminoasit komponentlerine yıkılırsa, katalitik aktivitesi genellikle kaybolur. Enzim proteinlerinin primer, sekonder, tersiyer ve kuarterner yapıları, katalitik aktiviteleri için esastır.

Bazı enzimler aktivite için protein yapıyı oluşturan aminoasit kalıntılarından başka kimyasal yan gruplara ihtiyaç duymazlar. Bazıları ise kofaktör diye adlandırılan ek kimyasal gruplara gereksinim duyarlar. Kofaktörler, ya Fe^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+} gibi inorganik iyonlar ya da koenzim denen organik veya metalloorganik kompleks moleküllerdir.

Kofaktörü ile birlikte tam, katalitik olarak aktif bir enzim, holoenzim olarak adlandırılır; holoenzimin bir protein kısmı bir de kofaktör kısmı vardır. Holoenzimin protein kısmına apoenzim veya apoprotein denmektedir.

Prostetik gruplar, holoenzimlerin kofaktör kısımlarına kovalent olarak bağlı olan gruplardır. Koenzimlerin enzim proteinine çok gevşek bir şekilde nonkovalent olarak bağlı olup enzim proteininden ayrılabilenlerine ise kosubstrat denmektedir.

1.1.3. Enzimlerin adlandırılması ve sınıflandırılması

Enzimlerin çoğu substratlarının adına veya aktivitelerini tanımlayan bir kelime veya sözcük grubuna “az” son eki eklenerek adlandırılmaktadır.

Bu adlandırma şekline ürenin hidrolizini katalize eden üreaz örnek olarak gösterilebilir. Bunun yanında, substratlarını veya aktivitelerini tanımlamayan genel bir tanıma uymayan enzim isimleri de (pepsin, tripsin) mevcuttur.

Karışık isimlendirmeler sebebiyle bazen aynı enzim için iki veya daha fazla ad kullanıldığı olmuştur, bazen de iki farklı enzim için aynı ad kullanılmıştır. Böyle problemler ve keşfedilen enzim sayısının sürekli ve hızlı artması sebebiyle uluslararası anlaşmalar vasıtasıyla, enzimlerin isimlendirilmesi ve sınıflandırılması için bir sistem oluşturulmuştur.

Enzimler salgılanma şekillerine göre hücre içi enzimler ve hücre dışı enzimler olmak üzere 2 ana sınıfa ayrılırlar. Hücre içi enzimler sitoplazmaya dağılmış olarak bulunan ribozomlarda sentezlenirler. Hücre dışı enzimler besiyeri ve hücre duvarının dışı ile bağlantı halinde olan enzimler olarak tanımlanırlar [4]. Enzimler Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) tarafından katalizledikleri reaksiyon tipleri temel alınarak altı ana sınıfa ayrılmışlardır [5]. Her sınıfın da katalizlenen reaksiyon tipine dayanan alt sınıfları vardır.

Tablo 1.1. Enzimlerin uluslararası sınıflandırılması [5]

No	Sınıf	Katalizlenen Tepkime Tipi
1	Oksidoredüktazlar	Elektronların transferi (hidrit iyonları ve H atomları ile)
2	Transferazlar	Grup-transfer tepkimeleri
3	Hidrolazlar	Hidroliz tepkimeleri (işlevsel grupların suya transferi)
4	Liyazlar	Grupların ilavesi ve grupların yer değiştirmesiyle çift bağların oluşması
5	İzomerazlar	İzomerik formları oluşturmak üzere moleküller içinde grupların transferi
6	Ligazlar	ATP'nin harcanmasıyla C-C, C-S, C-O ve C-N bağlarının oluşması

Sistematik adlandırma sisteminde, her enzime enzim komisyonu (EC) tarafından verilen dört rakamlı kod numarası ve katalizlediği reaksiyonu tanıtan sistematik bir ad verilmiştir.

1.1.4. Enzimlerin biyolojik işlevleri

Enzimlerin canlılardaki rolü çok büyüktür. Hareket esnasında ATP hidrolizinin katalizinde görev alarak kasların kasılmasını sağlayan miyozin [6], hücrede sinyal iletimindeki işlevleriyle kinaz ve fosforilazlar [7] enzimlerin insan metabolizmasındaki rollerine örnek olarak verilebilirler.

Nişasta, protein gibi bağırsaktan emilimlerinin mümkün olmadığı büyük moleküllerin bağırsaktan absorbsiyonlarının uygun hale getirilmesi için hidrolizlerini katalizleyen amilaz, proteaz benzeri enzimler [8] de yine insan metabolizmasındaki enzimlerdendir. Ateş böceklerinde ışık üretiminden sorumlu olan lüsiferazlar [9], otobur hayvanların bağırsaklarındaki mikroorganizmaların, selülozlu hücre duvarlarını sindirmeleri için ürettikleri selülaz, virüslerde ise, hücreleri enfekte etmede veya hücrelerinden virüslerin salınmasında iş gören entegraz, ters transkriptaz veya nöraminidazlar ise enzimlerin diğer canlılardaki görevlerine örnek olarak verilebilir.

Birçok enzim beraberce çalışarak metabolik ortak yollar meydana getirirler. Metabolik bir yolda, bir enzimin ürünü, bir diğeri tarafından substrat olarak kullanılır. Bazen birden çok enzim türü aynı tepkimeyi paralel olarak yürütebilir, böylece daha karmaşık düzenlemeler mümkün olur; bir enzim düşük seviyeli ve sabit bir etkinlik sağlarken, diğeri tetiklenebilen (indüklenebilen) yüksek seviyeli bir etkinlik sağlar [10].

Enzimlerin hastalıklardaki rolleri de oldukça büyüktür. Örnek olarak fenilalanin yıkımının ilk adımını katalizleyen fenilalanin hidroksilaz enziminin mutasyonunun, fenilanin ve ilişkili ürünlerin vücutta birikimine sebep olması ve tedavi edilmediğinde zekâ geriliğine sebep olması [11] ve DNA tamir enzimlerinin mutasyonları ile oluşan kanser sendromları verilebilir.

1.1.6. Enzimlerin endüstriyel kullanımları

Hücrelerde önemli metabolik görevlere sahip olan enzimler, çok çeşitli amaçlar için kullanılmak üzere günlük hayata da girmişlerdir.

Enzimler; ekmek, peynir, bebek gıdaları üretimi, alkollü içecekler, meyve suyu ve süt üretiminde, temizlik malzemelerinde ve tıpta teşhis ile tedavi sürecinde büyük miktarlarda kullanılmaktadırlar.

Ayrıca kimya, kâğıt, nişasta, biyoyakıt, kauçuk ve fotoğraf endüstrisinde, ziraatta, kontakt lens temizleyicilerinden, biyolojik savaşta kullanıma kadar çok geniş alanlarda da kullanılmaktadır.

Enzimlerin bu kadar fazla alanda kullanılabilir olmasının sebepleri; maliyet bakımından ucuz olması, çok farklı alanlarda kullanılabilme özelliğinde olmaları, alerjik ya da toksik etkiye sahip olmamaları [11] ve yüksek katalitik etkinlikleridir.

Enzimler sadece reaksiyonlara değil substratlara karşı da spesifite göstermektedir. Bu özellikleri ile istenilen tek bir son ürün oluşabildiğinden maliyetin düşmesi de sağlanabilmektedir.

Ayrıca çalışma şartlarının kimyasal katalizörlere kıyasla daha ılımlı olması enerji sarfiyatını ve dolayısıyla işletme maliyetini düşürmektedir.

Tüm bu özelliklerinden dolayı 1960'lardan bu yana enzimlerin endüstriyel kataliz olarak kullanımları artan bir ivmeyle yaygınlaşmaktadır [12,13].

Endüstriyel enzimlerin dünya piyasasındaki payı 1,6 milyar doları aşmaktadır [14, 15]. Endüstriyel enzimler arasında ise % 60'lık pazar payı ile en büyük grubu proteazlar oluşturmaktadır [16]. Bunu % 28 ile karbohidrazlar, % 2 ile lipazlar ve % 10 ile diğer enzim grupları izlemektedir.

Günümüzde proteazlar gibi birçok mikrobiyal enzim, önemli araştırma konusu haline gelmiş, dünyanın hemen her yerinde üretilmeye, sanayi ve endüstri alanında kullanılmaya başlanmıştır.

1.2. Proteolitik Enzimler

1.2.1.Tarihçesi

Enzimlerin günlük hayattaki kullanımlarına ilk olarak arkeolojik kaynaklarda ekmek ve şarabın yapımında rastlanmıştır.



Şekil 1.1. Eski Mısır Medeniyeti'nde şarap ve ekmek yapımı [17]

Proteinlerin enzimatik hidrolizlerinden çok eski çağlardan beri bilinçsiz olarak faydalanılmıştır. Kronolojik bir sırayla enzimlerin hayat içerisindeki rollerine bakılacak olursa; ilk olarak 1700'lerin sonlarına doğru etlerin yumuşatılmasında, gübre ve peynir yapımında proteazların basit olarak kullanılmasıyla karşılaşılmaktadır [18].

1783 yılında Spallanzani mide sıvısının proteinleri parçalama özelliğinde olduğunu saptamış [19, 20], Schwann ise 1836'da pepsinin de aynı özelliğe sahip olduğunu ortaya koyarak bu enzimi saflaştırmıştır. Süregelen yıllarda enzim saflaştırma denemelerine önem verilmiş ve mide sıvısından saflaştırılan enzime pepsin, pankreastan saflaştırılan enzime tripsin, bağırsak mukozasından elde edilen enzime ise erepsin denilmiştir [21].

Enzimlerin endüstride kullanımlarının başlangıcı ise 1800'lerde Jokichi Takamin'in mikrobiyal bir kaynaktan (aspergillus oryzae) enzim üretmesine dayanmaktadır [22]. Sonrasında Otto Röhm hayvansal kaynaklı enzimlerin üretilerek kullanılabileceğini pankreatik bir proteazı saflaştırıp deri endüstrisinde kullanarak ispatlamıştır [23] Otto Röhm ayrıca hidrolaz enzimlerini deterjan endüstrisinde ilk kez kullanan kişilerden biri olmuştur [24].

1930'lardan sonra enzimlerin moleküler yapıları üzerine yapılan çalışmalar ağırlık kazanmış, Bergman ve arkadaşları proteinlerin peptid bağlarının enzimlerle parçalandığını, J. Northrop ise pepsin, tripsin ve kimotripsin enzimlerini kristalize ederek enzimlerin protein yapısında olduklarını tespit etmiştir.

1938 yılında Northrop, Kunitz ve Herriott adlı araştırmacılar hazırladıkları 'Kristalize Enzimler' adlı yayında pepsinojen, pepsin inhibitörleri, karboksipeptidaz, ribonükleaz, heksokinaz, difteri antitoksini ve birkaç farklı çeşitte enzimin saflaştırılıp, kristalize edilmelerini açıklamışlardır [25]. Bu yayın, araştırmacılara 1946 Nobel Kimya Ödülü'nü kazandırmıştır.

Enzim saflaştırılması ve özelliklerinin belirlenmesi çalışmalarını enzimlerin spesifikliklerinin anlaşılması için yapılan araştırmalar izlemiş ve 1940'da farklı kaynaklı proteazlar (hayvansal ve bitkisel kaynaklı) saflaştırılarak her bir kaynaktan elde edilen enzimin belirli etkileri olduğu açıklanmıştır [26].

1950-1952 yıllarında ise, enzim kaynağı olarak çeşitli mikroorganizmalar da kullanılmıştır [27].

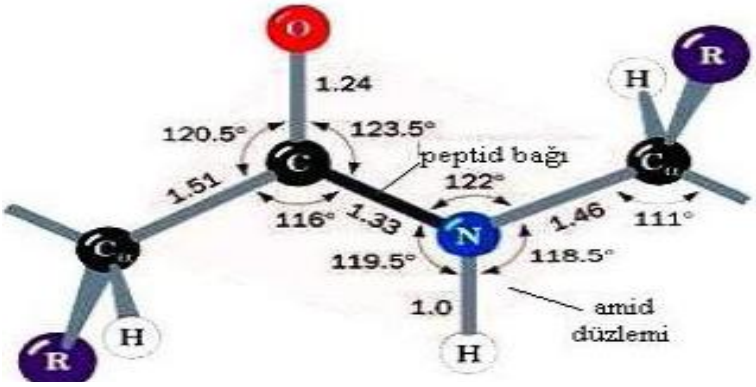
1950'li yıllarda dünya pazarında en gözde enzimler proteazlar ve amilazlar olurken 2. Dünya Savaşı'nı takip eden yıllarda ise fermantasyon teknolojisinde patlama yaşanmıştır.

Enzimlerin deterjan endüstrisine girmesinden sonra, Novo Nordisk firması da bakteriyel bir proteaz üreterek deterjan sanayinde kullanmıştır. Fakat enzim içeren bu deterjanların kullanılmasıyla birlikte alerjik reaksiyonlar ve akciğer kanserlerinde artış meydana gelmiştir. Bu problemi ortadan kaldırmak için yapılan araştırmaların sonucunda ise, enzimlerin granüler hale getirilmesinin sorunu çözeceği tespit edilmiştir. 1971 yılında Amerikan Doğa Bilimleri Akademisi, granüler yapılı enzim içeren deterjanların zararsız olduklarını açıklamıştır [24].

1965'lerde ise enzimler artık kristallendirilebildikleri için enzim yapılarının X-ışını kristalografisi ile çözülmesi mümkün hale gelmiştir. Kristalografinin enzim yapılarının aydınlatılmasındaki ilk kullanımı David Chilton Phillips ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiş ve lizozim enzimi için yapılan bu çalışma 1965' de yayımlanmıştır [28]. Enzimlerin üç boyutlu yapıları hakkında başlatılan araştırmalar günümüzde de halen devam etmektedir.

1.2.2. Proteazlar

Proteinlerin polipeptitleri içerisindeki amid bağlarının hidrolizinden sorumlu enzimler proteazlar veya proteinazlar olarak bilinirler. Proteazlar organizmada sentezlenen proteinlerin kompozisyonu, büyüklüğü, biçimi ve döngüsünün kontrolünde esansiyeldirler.



Şekil 1.2. Proteazların hidrolizledikleri amid bağı [62]

Proteazların gerçekleştirdikleri hidroliz reaksiyonunun mekanizması ise Şekil 1.3' de verilmiştir.

1.2.3. Proteazların sınıflandırılması

Proteazlar, enzimlerin Uluslararası Biyokimya Birliği (International Union of Biochemistry) tarafından yapılan sınıflandırılmasında hidrolazlar sınıfında (3. Sınıf) yer almaktadırlar.

Proteazlar kaynaklarına, aktif bölgedeki fonksiyonel gruplarına ve katalitik bölgedeki işlevlerine göre üç ana kriter temel alınarak sınıflandırılırlar.

Tablo 1.2. Proteazların sınıflandırılması [30]

Kaynağına Göre Proteazlar			
Bitkisel proteazlar			
Hayvansal proteazlar			
Mikrobiyal proteazlar			
Katalitik Bölgedeki İşlevlerine Göre Proteazlar			
Ekzopeptitazlar		Endopeptidazlar	Serin proteazlar
Aminopeptidazlar			Aspartik proteazlar
Karboksipeptidazlar	serin tipi		Sistein proteazlar
	sistein tipi		Metalo proteazlar
	metalo tipi		
Aktif Bölgedeki Fonksiyonel Gruplarına Göre Proteazlar			
Metallo proteazlar			
Aspartik proteazlar			
Sistein proteazlar			
Serin proteazlar			

1.2.3.1. Kaynağına göre proteazlar

Enzimler, ilk kez mayalardan elde edildikleri için eski yunanca'da “mayada bulunan” (in yeast) anlamına sahiplerse de, günümüzde yaşayan tüm hücrelerden; hayvanlardan, bitkilerden ve mikroorganizmalardan elde edilebilmektedirler [31]. Proteazlar da yaşayan tüm canlı organizmalar için gerekli olduklarından bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalardan elde edilebilmektedirler.

Bitkisel kaynaklı proteazlar, aktif merkezlerindeki sülfidril grupları bitkisel kaynaklı proteazların spesifik özellikleridir ve bitki kaynaklı proteazların aktivitelerinden bu sülfidril grupları sorumludur [31].

Bitkilerden elde edilen proteazların tümü, aynı gruba aittir ve bu proteazlar özellikle tropikal bitkilerden elde edilmektedir. Papaya (carica papaya), ananas (anana sativa), bazı Ficus türleri (f. carica, f. glabrata), enginar (cynera cardunculus) ve soya fasulyesi (soya hispidus)'den saflaştırılan proteazlar bitkilerden saflaştırılan proteazlara örnek olarak verilebilirler [33].

Papaya bitkisinden saflaştırılan bir enzim olan papain, vücutta karbohidratlar, yağlar ve diğer bileşikleri de etkileyerek tüm sindirim sistemini düzenleme yeteneğine sahiptir. Ananastan saflaştırılan bromelain enzimi ise sadece sindirim sistemini desteklemekle sınırlı kalmayıp sinüzit tedavisinde ve aşırı trombosit yapışkanlığını önlediği için doğal bir kan inceltici olarak ta kullanılabilmektedir [34].

Hayvansal kaynaklı proteazlar, hayvansal proteazların tarihçesi enzimolojinin başlangıcına dayanmaktadır. Henüz protein ve enzimlerin kimyasal yapıları keşfedilmemişken pankreas proteazlarının sindirici özelliğe sahip olduğu bilinmekteydi.

Bugün ise bilinen proteolitik enzimlerin başında pankreatik tripsin, kimotripsin, pepsin ve renin gelmektedir.

Hayvansal kaynaklardan elde edilen ilk enzim pepsindir. 1836'da Theodor Schwann tarafından keşfedilen pepsin gıda proteinlerini peptidlere parçalamak için çoğu omurgalının midesinde salgılanan asidik bir proteazdır [35].

Hayvansal kaynaklı proteazların en bilinenlerinden biri olan tripsin, bakteriyel ortamın hazırlanmasında ve bazı özel tıbbi uygulamalarda kullanılmaktadır. Tripsine göre daha pahalı bir enzim olan kimotripsin ise diagnostik ve analitik uygulamalarda kullanılmaktadır.

Renin ise her memelinin midesinde üretilen kompleks bir enzimdir. Anne sütünün sindiriminde görev alır ve bu özelliği sayesinde süt endüstrisinde süt kazeinin çöktürülmesinde ve lor üretiminde kullanılır [30].

Mikrobiyal kaynaklı proteazlar, bakteri, fungus ve virüs orijinli mikrobiyal proteaz kaynakları günümüzde en çok kullanılan proteaz kaynaklarıdır.

Mikroorganizmaların proteaz kaynağı olarak en fazla tercih edilmelerinin sebebi onların özelliklerini istenilen yönde hızlıca değiştirebilmeleri, ayrıca bitkisel ve hayvansal kaynaklara kıyasla çok daha saf ve kolay elde edilebilir olmalarındandır [36].

Fungus orijinli proteazları üreten mantarlar, bakterilerden daha geniş kapsamlı enzim üreticileridirler. Bu avantajlarının yanısıra çalışma aralıklarının sıcaklık ve pH spesifiklikleri, düşük reaksiyon hızlarına sahip olmaları ve düşük sıcaklık toleransları sebebiyle de diğer enzimlere göre daha fazla tercih edilmektedirler.

1.2.3.2. Katalitik bölgelerine göre proteazlar

Ekzopeptidazlar, polipeptid zincirlerinin uçlarında bulunan serbest amino (N) ya da karboksil (C) gruplarına atak yapan proteaz grupları olup, etki ettikleri protein zincirinin sonundaki grup serbest karboksil ise karboksipeptidazlar, serbest amino grubu ise aminopeptidazlar olarak adlandırılırlar [37].

Aminopeptidazlar, hidrolizledikleri aminoasit, dipeptit ya da tripeptide göre adlandırılmaktadırlar. Aminopeptidazlar da polipeptid zincirinin ucundaki serbest N terminaline atak yaptıklarından bu ismi almışlardır ve N-terminal metionini (Met) uzaklaştırdıkları bilinmektedir.

Karboksipeptidazlar, polipeptid zincirinin serbest bir C ucunda işlevsel hale gelmektedirler ve bu polipeptidin tek bir aminoasidini ya da bir dipeptidini ayırmaktadırlar. Enzimin aktif bölgesinde sahip olduğu aminoasit çeşitlerinin yapısına göre serin, metallo ve sistein karboksipeptidazlar olarak üç gruba ayrılırlar.

Farklı kaynaklardan elde edilen serin karboksipeptidazların substrat spesifiklikleri aynı olup optimum pH'ları, moleküler ağırlıkları ve inhibitörlerin enzime olan etkileri farklılık gösterirken, metallo karboksipeptidazlar aktiviteri için için Zn^{+2}'ya da Co^{+2} iyonuna ihtiyaç duyarlar, sistein karboksipeptidazlar ise aktif bölgelerinde sistein aminoasidi içerirler [30].

Serbest bir N ya da C terminal ucuna ihtiyaç duymamaları sebebiyle NC-IUBMB (Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği Adlandırma Komitesi) tarafından E.C 3.4.19 alt sınıfına yerleştirilmiş olan omegapeptidazlar ise amino veya karboksipeptidazların direkt etkide bulunamadıkları polipeptid bölgelerini hidroliz edebilmeleri ile egzopeptidazlardan, N ya da C terminal uçlara yakın bölgelerde hidroliz etme yeteneğine sahip olduklarından da endopeptidazlardan ayrılmaktadırlar. Omegapeptidazların farklı özelliklere sahip olanları da bulunmaktadır. Bunlar; ubikuitinil hidrolazlar, piroglutamil peptidazlar ve gama-glutamil hidrolazlardır [38].

Endopeptidazlar, polipeptid zincirlerinin iç bölgelerindeki peptid bağları üzerine etki etmektedirler. Serin, sistein, aspartik ve metalo proteazlar olmak üzere dört gruba ayrılmaktadırlar [39].

Serin proteazlar, aktif bölgelerinde serin içeren bu proteaz grubu substrat tercihinlerine göre üç alt sınıfa ayrılmaktadır. Pozitif yüklü aminoasitten sonraki peptid bağını hidrolizleyen tripsin benzeri serin proteazlar, ilk alt sınıfı oluştururlar. İkinci sınıfta büyük hidrofobik bir aminoasitten sonraki peptid bağını hidrolizleyen kimotripsin benzeri serin proteazlar yer alırken, son sınıf olan elastaz benzeri serin proteazlar ise, küçük hidrofobik aminoasitlerden sonraki peptid bağlarını hidrolizler [30].

Aspartik proteazlar, aktif merkezlerinde katalitik aktiviteleri için iki aspartik aside ihtiyaç duymaktadırlar ve asidik proteazlar olarak da bilinmektedirler. Bu gruptaki proteazlara örnek olarak pepsin, retropepsin, renin, katepsin D ve HIV-1 proteazları verilebilmektedir [40].

Sistein (tiyol) proteazlar, aktif merkezlerinde bir sistein rezidüsü bulundurmaktadırlar. Bu sistein grubu oksidasyona karşı duyarlıdır ve ağır metallerle reaksiyonlara girebilmektedir [41]. Bu proteazlar sadece HCN (hidrojen siyanür) ve sistein bulunması durumunda aktifleşmektedirler. Tiyol proteazlar tüm prokaryotik ve ökaryotik organizmalarda bulunmakla beraber, aktif merkezlerinin spesifitesine göre 4 gruba ayrılmaktadırlar. Bu grubun en iyi bilinenleri papain benzeri tiyol proteazlar [42] ve kaspazlardır. Diğer alt gruplar ise tripsin benzeri tiyol proteazlar, glutamik aside özel ve diğer tiplerdeki tiyol proteazlardır.

Metalo endopeptidazlar katalitik mekanizmalarında çinko, kobalt veya diğer metal iyonlarını kullanmaktadırlar ve aktif merkezlerindeki fonksiyonel guplara göre sınıflandırılmaktadırlar.

En iyi bilinen metalo proteteazlar; serralysin, adamalysin gibi matriks metalloproteazlardır. Ayrıca hücre zarının yapısında bulunan ve yüzey membran proteinleri olan ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase) proteazlar da sık rastlanan metalo proteazlardandır [43]. Metalo proteazlar genellikle şelatlama özelliği olan moleküller ile inhibisyona uğramaktadırlar.

1.2.3.3. Aktif bölgedeki fonksiyonel gruplarına göre proteazlar

Metalloproteazlar, proteazların en eski sınıflarından biri olup bakteri, mantar ve yüksek organizmalarda bulunmaktadırlar. Bu grup içerisindeki enzimler aminoasit dizilimlerinde ve yapılarında büyük farklılıklara sahiptirler, fakat enzimatik aktiviteleri için genellikle çinko iyonuna ihtiyaç duymaktadırlar. Bu çinko iyonu, kobalt veya nikel gibi metal iyonları ile aktivite kaybı gözlenmeksizin yer değiştirebilmektedir [44].

Metalloproteazların on yedisi endopeptidaz, on ikisi ekzopeptidaz ve bir tanesi hem endo hem de ekzopeptidaz sınıfı içerisindedir.

Nötral, alkalen, Miksobakteri I ve Miksobakteri II olmak üzere dört gruba ayrılan metalloproteazların alkalen metalloproteaz sınıfı çok geniş bir spesifisite gösterirken nötral metalloproteazlar hidrofobik aminoasit kalıntılarına spesifisite göstermektedir. Miksobakteri I ayrılan bağın her iki tarafındaki küçük aminoasit kalıntılarına, miksobakteri II ise peptid bağının amino tarafındaki lizin kalıntılarına spesifiktir.

Metalloproteazların etki mekanizması diğer proteaz mekanizmalarından keskin farklılıklar gösterir. Bu enzimler aktivite gösterebilmek için iki değerlikli metal iyonlarının varlığına ihtiyaç duyarlar ve şelat yapıcı ajan ilavesi ya da diyaliz ile inaktive edilebilirler [45].

Aspartik proteazlar, katalitik aktiviteleri için aspartik asit rezidüsüne ihtiyaç duyarlar. Pepsin (A1), retropepsin (A2) ve pararetrovirüslerden (A3) elde edilen aspartil proteazlar olmak üzere üç grupturlar. Asidik pH'larda maksimum aktivite gösteren bu proteaz sınıfının izoelektrik noktası pH 3-4.5'tir.

Aspartil proteazların hidroliz mekanizması için genel asit baz mekanizması önerilebilmektedir. Bu asit baz mekanizması suyun doğrudan reaksiyona katıldığı bir hidroliz reaksiyonudur [45].

Sistein (sülfidril) proteazların ise aktiviteleri histidin ve sistein içeren katalitik triadla sağlanır. Bu sistein ve histidin rezidülerinin dizilişlerindeki farklılıklara göre sistein proteazlar, papain benzeri, tripsin benzeri, glutamik aside spesifik ve diğerleri olmak üzere dört gruba ayrılırlar.

Sistein proteazların hidroliz mekanizmaları ise genel asit-baz oluşumunu gerektiren iki yer değiştirme reaksiyonu şeklindedir. Bu sebeple serin proteazların etki mekanizmalarına çok benzerler [45].

Serin proteazlar, proteazların en sık rastlanan sınıfını oluşturmaktadırlar. Aktif merkezlerindeki zorunlu serin kalıntısı varlığı ile karakterize edilirler ve çoğu serin proteazın molekül ağırlığı 18 ile 35 kDa arasında değişmektedir.

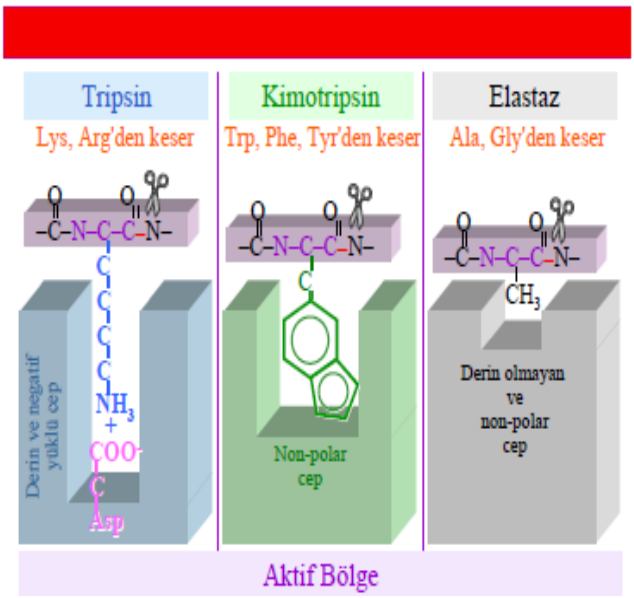
Serin proteazlar arkealar, bakteriler, ökaryotlar ve virüslerden izole edilebilirler ve dördü de evrimsel olarak aynı kökenli olan ekzopeptidaz, endopeptidaz, oligopeptidaz ve omegapeptidazlar sınıflarına ayrılmışlardır [47].

Serin proteazlar, yüksek pH'larda aktif olan serin alkelen proteazlar ve subtilizinler olarak farklı şekilde de gruplandırılabilirler.

Bakteri (arthrobacter, streptomyces ve flavobacterium spp.), maya, mantar ve küflerden üretilen ve serin proteazların en geniş alt sınıfı olan serin alkalen proteazlar yüksek pH'da aktiftirler. İzoelektrik noktaları ise pH 9 civarındadır. Serin alkalen proteazların moleküler ağırlıkları 15-30 kDa aralığındadır. Peptid bağlarını tirozin, fenilalanin ve lösinin karboksil ucundan hidrolize etmektedirler. Substrat spesifisiteleri kimotripsine kıyasla daha zor, fakat kendi içlerinde benzerdir.

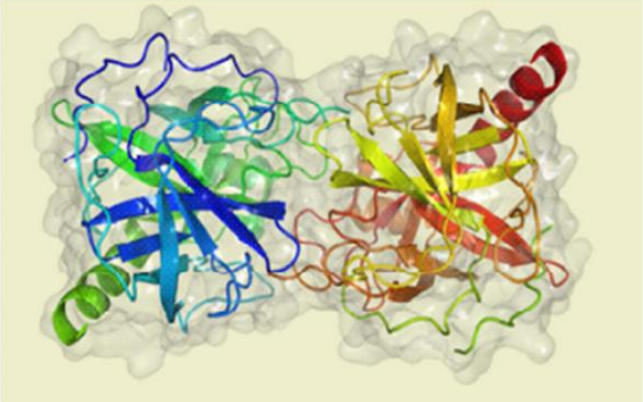
Subtilizinler, ikinci büyük serin proteaz sınıfıdırlar. Subtilizin Kalsberg ve subtilizin Novo ya da bakteriyel proteaz Nagaz (BPN) olarak iki farklı alt gruba ayrılmaktadır. Bu iki grubun molekül ağırlıkları 58 aminositlik bir farklılık hariç 2 7,5 kDa'dır. Her iki grubun da optimum sıcaklığı 60 °C, optimum pH'ları ise 10'dur. İki grup da geniş bir substrat spesifisine ve serin 221 Ser221), histidin 64 (His64) ve aspartik asit 32 (Asp32)'den oluşan aktif-bölge triadına sahiptirler [48].

Serin proteazlarda bu üç farklı aminoasit aktif bölgeye yakın bir cep oluştururlar. Substrat spesifitesini kuvvetli bir biçimde etkileyen aminoasit serin kalıntısıdır. Tripsinde bu cep nispeten daha derin olup stratejik olarak karboksilat yan zinciri cebin dibine yerleşmiştir. Tripsin bu cepte substratını lizin ve arginin yan zincirlerinden yüksek seçicilik ile yakalayarak adı geçen kalıntılardan sonra substratını hidrolizler. Kimotripsindeki cep ise daha geniş ve büyüktür. Enzim aromatik grup bulunduran substratlara karşı spesifisiteye sahiptir. Elastaz enzimi ise, valin ve treonin yan zincirleri tarafından oluşturulmuluş derine inmeyen sığ bir cebe sahiptir. Enzim spesifik olarak kısa, yüksüz ve C-terminal uçlardan substratını katalizler [47]. Serin proteazların spesifisiteleri Şekil 1.3'te gösterilmiştir [49].



Şekil 1.3. Serin proteazların spesifisiteleri [62]

Kimotripsin; 1968 yılında David Blow ve çalışma arkadaşları tarafından X-ray kristalografisi kullanılarak enzimin aktif bölge kalıntıları ve katalizden sorumlu aminoasitleri belirlenerek katalitik bölge mimarisi ilk olarak aydınlatılan serin proteaz sınıfı bir enzimdir ve [50] konformasyonel yapısı Şekil 1.8'de verilmiştir [51].

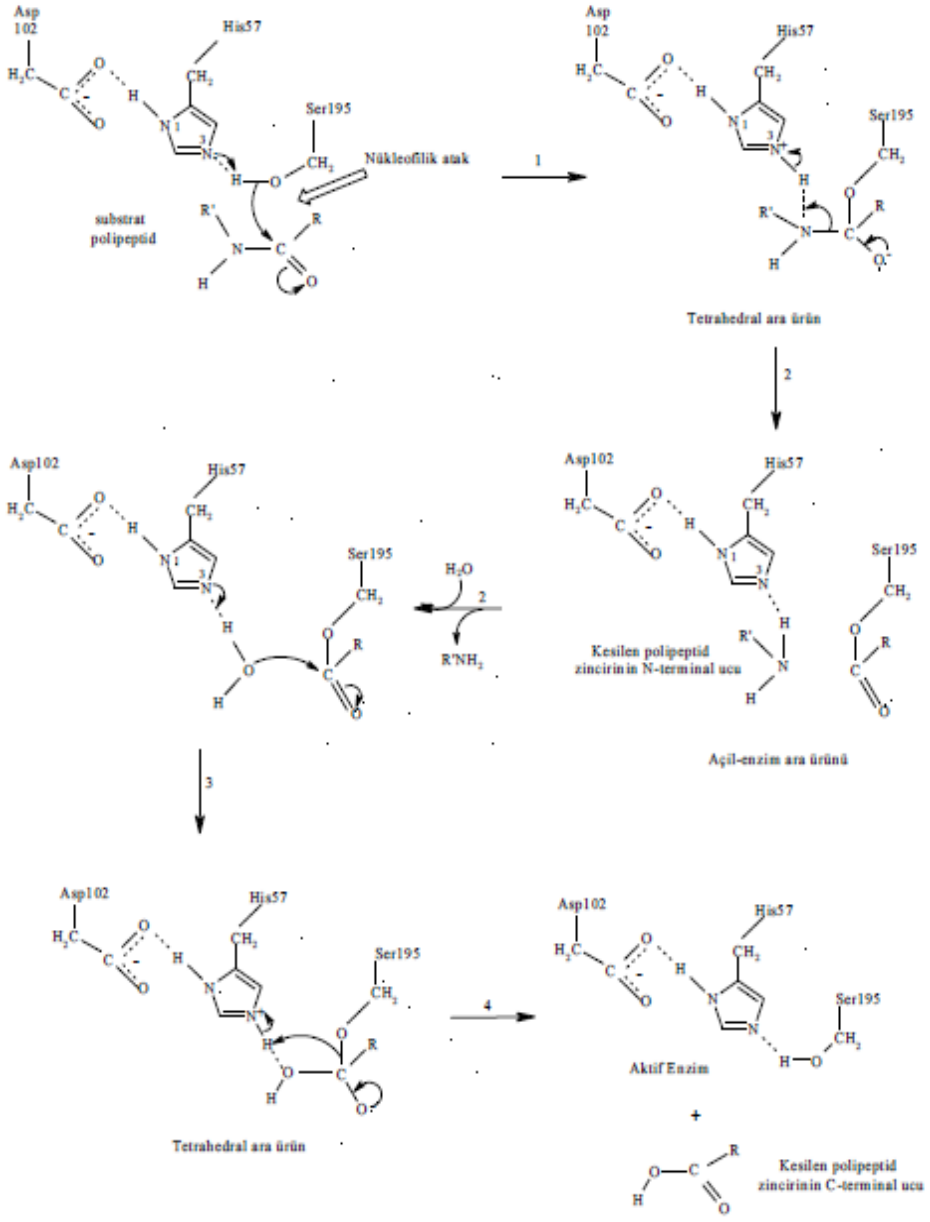


Şekil 1.4. α-kimotripsin'in üç boyutlu yapısı [51]

Bu enzim 241 aminoasit kalıntısı bulunduran bir endoproteaz olup peptid bağlarını fenilalanin, tirozin ve triptofan rezidülerinden sonraki karboksil gruplarından hidrolizlemektedir. Bu seçicilik substratın aromatik yan zinciri ile katalitik bölge arasındaki hidrofobik etkileşimler ve hidrofobik bağlanma cebinin katalitik bölgeye olan yakınlığı ile gerçekleştirilir [52].

Kimotripsin, (EC 3.4.21.1) molekül ağırlığı 23800 Da olup hayvansal pankreatik ekstraktlarında bulunan ve proteolizi gerçekleştiren bir sindirim enzimidir. Kimotripsinojen şeklinde pankreasta depolanır ve çok adımlı bir süreçle tripsin tarafından aktive edilir. Saf kimotripsin pahalı bir enzimdir ve yalnızca diagnostik ve analitik uygulamalarda kullanılır [45].

Kimotripsinin aktif bölge mimarisi Şekil 1.4'te, serin proteazlar için önerilen katalitik mekanizma ise Şekil 1.5'te gösterilmiştir.



Şekil 1.5. Serin proteazların katalitik etki mekanizması [53]

Şekil 1.5 açıklanacak olunursa tüm reaksiyon aşağıdaki gibi özetlenebilir;

Belirleyici basamak olan ilk aşamada kimotripsinin substrata bağlanmasından sonra Michaelis kompleksi de denilen enzim substrat kompleksi oluşur. Bu reaksiyon dizisi kovalent kataliz ve sonrasındaki asit baz katalizinden oluşur.

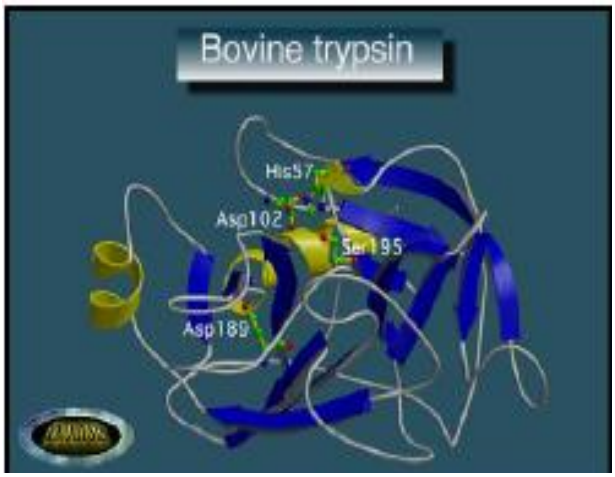
Kovelent katalizde tetrahedral ara kompleks, hidrolizlenecek peptid bağının karbonil karbonuna gerçekleşen nükleofilik atak sonucu oluşur.

Genel asit baz katalizinde ise Asp102'nin solvatize olmamış karboksilat iyonunun polarizasyon etkisi yardımı ile His57'nin imidazol halkası ayrılan protonu alır ve imidazolyum iyonu oluşur. Bu işlem sırasında Asp102'nin hidrojeni elektrostatik katalizle His57'ye bağlanır. Asp102 imidazolyum iyonundan proton aldığında yüksüz karboksilik asit grubundan çok karboksilat iyonunu oluşturmayı tercih etmektedir.

İkinci adımda bir önceki basamakta oluşan tetrahedral ara ürünün His57'nin N azotundan protonunun alınması ile birlikte genel asit baz kataliziyle açil-enzim ara ürüne bozunması gerçekleşir. Bu bozunma amin grubunun (R/NH_2, kesilen polipeptid zincirinin yeni N-terminal ucu) enzimden ayrılarak çözücüden gelen su molekülü ile yer değiştirmesi şeklinde gerçekleşir.

Son iki adımda ise açil-enzim ara ürünü hızlı bir şekilde deaçillenir ve karboksilat son ürününün (kesilen polipeptid zincirinin yeni C-terminal ucu) ayrılması ile reaksiyon sonlanır [53].

Tripsin, (EC 3.4.21.4) molekül ağırlığı 23300 Da olan, pankreastan salgılanan ve ince bağırsakta proteinleri parçalayıcı özelliğe sahip olan bir sindirim enzimidir. Tripsin'in üç boyutlu konformasyonel yapısı Şekil 1.10'da gösterilmiştir.



Şekil 1.6. Tripsinin konformasyonel yapısı [54]

Tripsin pH 8 ve 37 ºC'de optimum aktivite göstermektedir. İnaktif zimojen (tripsinojen) şeklinde pankreasta üretilen tripsinin bu inaktif hali ince bağırsağa salgılanır ve burada endopeptidazlar proteolitik parçalanmayla tripsinin aktivasyonunu başlatır daha sonra ise tripsin kendi kendini aktive eder. Bu aktivasyon mekanizması pankreasın kendi kendini sindirmesini önlemektedir.

Tripsinin enzimatik mekanizması da diğer serin proteazlara çok benzemektedir. Aktif bölgesinde sahip olduğu katalitik triadta bir serin nükleofil bulunduran tripsin kataliz mekanizmasını bu serinin çevresindeki diğer aminoasitlerin elektrostatik modifikasyonu ile başarır.

Peptid bağlarını lizin ve arjinin rezidülerinden sonraki karboksil gruplarından hidrolizleyen bir serin endopeptidaz olan tripsin, bakteriyel ortamın hazırlanmasında ve bazı özel tıbbi uygulamalarda kullanılır [55]. Enzimin oluşturduğu protein hidrolizatlarının acı tada sahip olmaları nedeni ile gıda endüstrisinde tripsin kullanım alanları sınırlıdır.

1.3. Enzim Katalizi ve Kinetiği

Yaşam için zorunlu olan yiyeceklerin sindirilmesi, sinir sinyallerinin gönderilmesi veya kasların kasılması gibi reaksiyonlar için gerekli reaksiyonlar, kataliz olmadan yararlı bir hızda meydana gelemezler. Bu yüzden canlı sistemler için reaksiyonların enzimatik katalizi esastır.

Biyolojik olarak uygun şartlar altında katalizlenmeyen reaksiyonlar, yavaş olmak eğilimindedirler. Bir enzim, belli bir reaksiyon için enerjetik olarak daha uygun spesifik bir ortam sağlayarak bu problemleri ortadan kaldırır.

Enzim üzerindeki aktif merkez diye adlandırılan ceplerde meydana gelen katalizde enzimin aktif merkezi ile substrat arasında gerçekleşen reaksiyon ise şu şekilde yazılabilmektedir.

$$E + S \rightarrow ES \rightarrow E + P \qquad (1.2)$$

Enzim (E) ile substrat (S) ın reaksiyonunda ilk temel kompleks ES (enzim substrat) ara ürünüdür. ES ara ürününden sonra ise enzim ve ürün (P) oluşur.

Kararlı bileşiklerin kararsız bileşiklere göre sahip oldukları serbest enerjileri çok daha düşüktür. Reaksiyon sırasında oluşan ES ara ürünü de oldukça kararsızdır. Enzimle substratın ES ara kompleksini oluşturması için ulaşması gereken enerji, aktivasyon enerjisi olarak bilinir.

Optimal pH, 25 ^{o}C sıcaklık ve doyurucu substrat konsantrasyonunda bir tek enzim molekülü tarafından birim zamanda ürüne dönüştürülen substrat molekülü sayısına, enzime ait dönüşüm sayısı denir ve kısaca k_{cat} sembolü ile gösterilir. Bazı enzimlere ait dönüşüm sayıları şöyledir:

Tablo 1.3. Bazı enzimlerin dönüşüm sayıları [56]

ENZİM	SUBSTRAT	$k_{cat}(s^{-1})$
Katalaz	H_2O_2	40,000,000
Karbonik anhidraz	HCO_3	400,000
Asetilkolinesteraz	Asetilkolin	140,000
β-Laktomaz	Benzilpenisilin	2,000
Fumaraz	Fumarat	800
ATPaz	ATP	0,4

Enzim aktivitesi ise enzimin etkisiyle optimal koşullarda belirli sürede ürüne dönüştürülen substrat miktarı olarak tanımlanabilir. Enzim aktivitesi ölçümleri için tanımlanan birimler IU, katal, spesifik aktivite ve diğer özel bazı aktivite birimleridir.

En çok kullanılan enzim aktivitesi birimi, IU'dir. 1 IU enzim aktivitesi, optimal koşullarda, 1 dakikada 1 μmol substratı değiştiren enzim etkinliğidir. 1 IU, 1 saniyede 16,67 nmol substratın ürüne dönüştürülmesine karşılık gelmektedir.

Enzim aktivitesi birimlerinden katal ise optimal koşullarda, 1 saniyede 1 mol substratı değiştiren enzim etkinliğini ifade eder, bu da 6 x 10^7 IU enzim aktivitesine denktir. 1 katal = 6x10^7 IU, 1 nanokatal=10^{-9}katal=0,06 IU'dir.

Enzim aktivitesi, spesifik aktivite olarak da ifade edilir. Bir enzim için spesifik aktivite, 1 mg enzim proteini başına düşen enzim ünitesi (IU veya katal) sayısıdır.

Aktivite tayininde kullanılan enzim saflığının artması spesifik aktivitenin yükselmesine sebep olur. Bilinen bu aktivite birimlerinin yanı sıra 37 ^{o}C'de 8,6 pH' da, 100 mL serumda sodyum gliserofosfattan 1 saatte 1 mg fosfor oluşumunu katalize eden fosfataz enzimi aktivitesi olan Bodansky birimi ve 37 ^{o}C'de, 100 mL serumda fenilfosfattan 15 dakikada 1 mg fenol oluşumunu katalize eden fosfataz enzimi aktivitesi olan King-Armstrong birimi gibi çeşitli enzimler için varolan farklı aktivite birimleri de mevcuttur.

1.3.1. Enzimatik bir reaksiyonun hızını etkileyen faktörler

Enzimatik bir reaksiyonun hızını, enzim konsantrasyonu, substrat konsantrasyonu, pH, ısı veya sıcaklık, zaman, ışık ve diğer fiziksel faktörler, iyonların doğası ve konsantrasyonu, hormonlar ve diğer biyokimyasal faktörler, reaksiyon ürünleri gibi birçok faktör etkilemektedir.

1.3.1.1. Enzim konsantrasyonunun etkisi

Substrat miktarının daima yeterli olduğu bir ortamda optimal şartlarda enzimatik bir reaksiyonun ölçülen ilk hızı (V_o), enzim konsantrasyonu [E] ile doğru orantılıdır.

$$E + S \rightarrow ES \rightarrow E + P \qquad (1.3)$$

Yukarıda gösterilen enzim ile substrat etkileşiminee ait reaksiyon denge halindeyken tepkimenin ürün oluşumu için sahip olduğu hız, sola doğru sahip olduğu hıza eşittir.

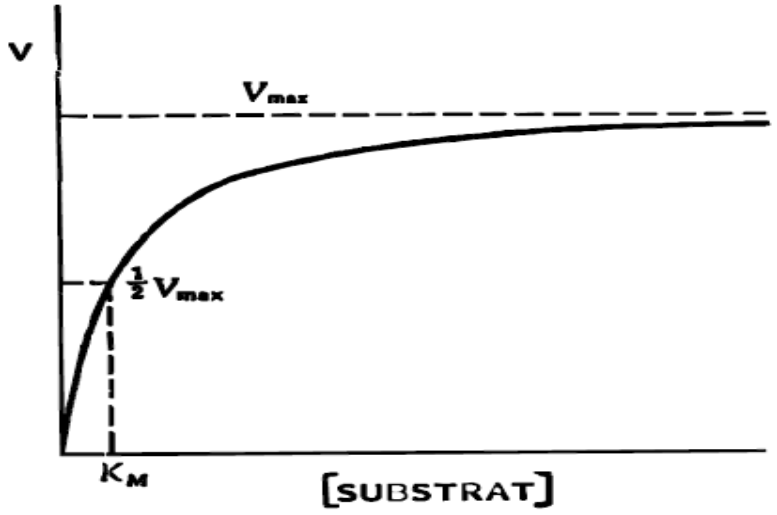
$$k_1 \cdot ([E] \cdot [S]) = k_2 \cdot ([E] \cdot [P]) \qquad (1.4)$$

Bu denklemden denge sabiti, $K_{denge} = k_1/k_2 = [P]/[S]$ olarak bulunur ve bu eşitlikten de denge halinde enzim konsantrasyonunun denge sabiti üzerine etkisinin olmadığı anlaşılır.

1.3.1.2. Substrat konsantrasyonunun etkisi

Enzim konsantrasyonunun ve diğer bütün şartların sabit olduğu bir ortamda başlangıçtaki tepkimenin hızı, substrat konsantrasyonunun artırılmasıyla doğrusal bir şekilde artarken, enzim substrat doygunluğuna ulaştıktan sonra ise reaksiyon hızı V_{max} düzeyinde sabit kalmaktadır.

Bir enzimatik reaksiyonda, V_{max}'a kıyasla belirlenmesi çok daha kolay olup yarı maksimal hızın gözlendiği nokta olan ½V_{max}'taki substrat konsantrasyonu "Michaelis-Menten sabiti" olarak adlandırılır ve K_m ile gösterilir. K_m enzim konsantrasyonundan bağımsız bir değerdir ve her bir reaksiyon için spesifiktir.



Şekil 1.7. Substrat miktarına bağlı reaksiyon grafiği [56]

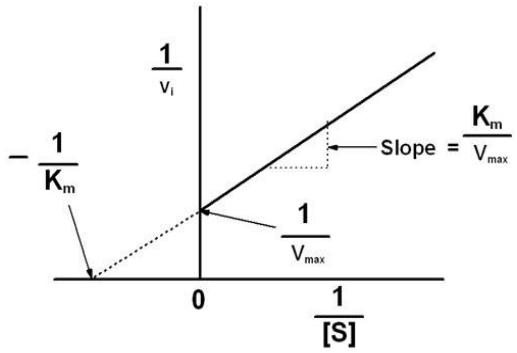
Enzimatik bir reaksiyonda V ile [S] arasındaki bağıntıdan faydalanılarak çizilen hiperbolik eğrinin matematiksel ifadesi Michaelis-Menten denklemi olarak adlandırılır.

$$V_0 = V_{max}\,[S] / K_m + [S] \qquad (1.5)$$

K_m (Michaelis-Menten sabiti), enzimin substratına karşı olan ilgisini göstermektedir. Bu tanıma göre K_m değeri küçük olan enzimler (K_m değeri 10^{-6} M ve daha düşük olan enzimler) substrata yüksek afinite gösteren enzimlerdir ve böyle enzimler düşük substrat konsantrasyonlarında doygunluğa ulaşarak maksimal hız sağlamaktadırlar.

Michaelis-Menten denkleminde eğri hiperbolik olduğu için karakteristik noktaların belirlenmesi zordur. V_{max} ve K_m'i deneysel olarak incelemeyi kolaylaştırmak amacıyla grafiği doğrusal olan Lineweaver-Burk denklemi'ne dönüştürmek mümkündür.

$$1/V_0 = K_m/V_{max}[S] + 1/ V_{max} \qquad (1.6)$$



Şekil 1. 8. Lineweaver Burk grafiği [56]

1.3.1.3. pH'ın etkisi

Ortamdaki H^+ iyonu konsantrasyonunun değişmesi enzimin aktif merkezinin iyonizasyonunun bozulmasına ve substrat molekülünün çözünürlüğünün de değişmesinden dolayı enzim-substrat etkileşiminin değişmesine yol açmaktadır. Ortamdaki pH farklanmaları ayrıca katalitik olarak aktif olan enzimin aminoasit zincirindeki iyonik karakterin değişmesine, enzimin denatüre olmasına ve katalitik aktivitesinin kaybolmasına sebep olmaktadır.

Her enzim maksimum aktivite gösterdiği optimum bir pH aralığına sahiptir. Optimum pH değerleri her enzim için spesifiktir ve reaksiyonlar optimum pH'lardaki tampon çözeltiler içerisinde gerçekleştirilmektedir.

1.3.1.4. Isı veya sıcaklığın etkisi

Genel olarak sıcaklıkta her 1 ^oC artış % 10 daha yüksek bir enzim aktivitesi sağlamaktadır. Enzimatik reaksiyonların hızlarındaki bu artış sıcaklık belirli bir sıcaklık değerine ulaşıncaya kadar devam eder, daha yüksek sıcaklıklarda enzim denatüre olacağından aktivite kaybolur ve reaksiyon hızı azalır.

Her enzimin sıcaklığa direnci farklıdır, 100 ^oC gibi oldukça yüksek sıcaklıklara bile birkaç dakika dayanabilen enzimlerin olduğu gibi 50-60 ^oC gibi sıcaklıklarda denatüre olan enzimler de mevcuttur. Enzimatik reaksiyonların hızlarının maksimum olduğu sıcaklık derecelerine o enzimlerin optimal sıcaklıkları denmektedir. Enzimlerin çoğunun optimal sıcaklıkları bulundukları hücre ortamlarının sıcaklıklarıdır (40-60 ^oC).

1.3.1.5. Zamanın etkisi

Bir enzim tarafından katalizlenen bir reaksiyonun hızı, reaksiyon ürünlerinin kendi aralarında birleşerek aksi yönde bir reaksiyon meydana getirmeleri, enzimin zamanla inaktive olması, reaksiyonu önleyen maddelerin oluşması ve substratın tükenmesi gibi sebeplerden ötürü zamanla azalmaktadır. Enzim analizleri genellikle reaksiyonun başlangıcında substratın % 10 kadarının kullanıldığı zaman aralığında gerçekleştirilmektedir.

1.3.1.6. Işığın etkisi

Işık enzimatik reaksiyonlara göre aktiviteyi artırabilir veya azaltabilir.

1.3.1.7. İyonların etkisi

Metal iyonlarının enzimatik katalizde oynadıkları rol, beş mekanizma ile özetlenebilir:

1) Metalloenzimlerdeki metal iyonları, sitokromlardaki demir iyonunun değer değiştirerek elektron transportunda rol oynaması gibi katalize doğrudan katılırlar.

2) Bir metal iyonu, Zn^{2+} iyonunun alkol dehidrojenazda aktif olan kuarterner yapıyı sürdürmede rol oynaması gibi ya da metalin enzime eklenmesi ile aktif halin inaktif hale çevrilmesi gibi enzimde biçimsel reaksiyonlarda görev alabilir.

3) Bazı enzimler ancak metal substrat kompleksine bağlanabilir yani birçok fosfat transferi reaksiyonlarında enzim için gerçek substratın Mg^{2+}-ATP^{-4} kompleksinin olması gibi enzim için esas olan substrat metal-substrat kompleksi (MS) olabilir.

4) Bir enzim, subsrata enzim-metal kompleksi (EM) oluşturduktan sonra bağlanabilir ve EMS kompleksi üzerinden ürün oluşturabilir.

5) Bir metal, ürünün tekrar substrata dönüşümünü engelleyerek reaksiyonu hızlandırabilmek için ürün ile kompleks yapabilir. Bu duruma trigliseridlerin lipaz ile parçalanmasında oluşan yağ asitlerinin Ca^{2+} iyonları ile çözünmeyen tuzlar halinde ortamdan uzaklaşmasıyla lipazın stimüle olması örnek olarak verilebilir.

Metaller, bu beş durumda etkili olabildikleri gibi reaksiyona giren türlerin doğasını değiştirerek tüm reaksiyonun denge sabitini de değiştirebilirler.

1.3.1.8. Hormonlar ve diğer biyokimyasal faktörlerin etkisi

Hormonlar, aminoasitler ve diğer biyokimyasal maddeler enzimlerin durumları üzerine etki göstererek reaksiyon hızını değiştirebilirler.

Örneğin, östrojenik, androjenik ve bazı steroid gebelik hormonlarının, glutamat dehidrojenaz enziminin dört alt ünitesini ayrışmaya uğratmasıyla enzimin aktivitesinin kaybolmasına sebep olmaları durumu, lösin, metiyonin, izolösin ve ADP tarafından geri çevrilebilir.

1.3.1.9. Reaksiyon ürünlerinin etkisi

Enzimatik reaksiyonun hızı, enzimatik reaksiyonların geri dönüşümlü olmalarından ötürü, reaksiyon ürünlerinin miktarının artmasıyla azalmaktadır. A ↔ B + C reaksiyonu, ancak ürünler ortamdan uzaklaştırılırlarsa hep soldan sağa doğru yürüyebilmektedir.

1.3.2. Enzimlerin spesifikliği

Enzimlerin kataliz ettikleri reaksiyonlara dair çeşitli özgüllükler tanımlanabilmektedir.

Bir enzimin tek bir substratın tek bir reaksiyonunu katalize ediyor olması mutlak spesifiklik, benzer fonksiyonel gruplara sahip olan substratlar ile reaksiyona giriyor olması ise grup spesifikliği olarak bilinmektedir. Ve enzimlerin çoğu bu spesifiklere sahiptirler. Ayrıca enzimin belirli bağ çeşitleri üzerinde etkili olması durumu bağ spesifikliği, sadece glukozun D veya L izomerleri gibi belli optik izomerlere etkili olması durumu stereospesifiklik olarak adlandırılmaktadır [56].

1.3.3. Enzim inhibisyonu

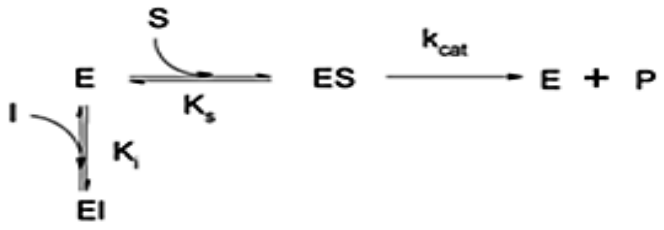
Enzimatik bir tepkimenin hızının inhibitör adı verilen maddeler tarafından azaltılması veya tamemen durdurulması durumuna enzim inhibisyonu denmektedir.

Enzim inhibitörleri ilaçlar veya kimyasal maddeler olabilmekte ve enzimlerin katalitik etkilerine engel olmaktadırlar. Bu engel yani inhibisyon tersinir ya da tersinmez olabilmektedir.

1.3.3.1. Tersinir enzim inhibisyonları

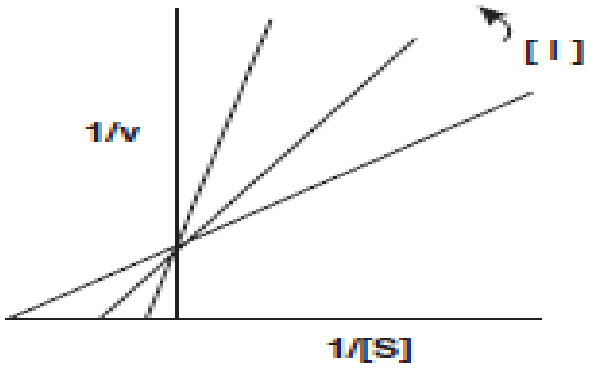
Yarışmalı enzim inhibisyonu; tersinir enzim inhibisyonunun çok karşılaşılan bir tipi olan yarışmalı inhibisyonda inhibitör substrata benzeyen bir yapıda olup aktif yeri için yarışmaktadır.

İnhibitör aktif bölgeye bağlandığında substratın enzime bağlanması mümkün olamamakta dolayısıyla reaksiyon gerçekleşememektedir.



Şekil 1. 9. Yarışmalı inhibisyon mekanizması [43]

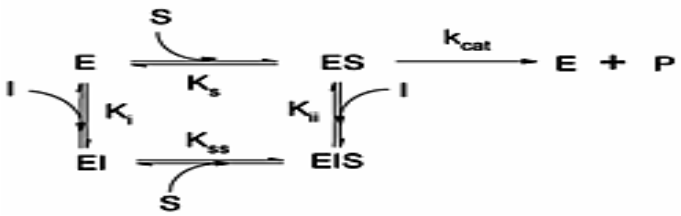
Yarışmalı enzim inhibisyonunda yarış substrat miktarının arttırılmasıyla substrat lehine çevrilebilir, çünkü yeterli substrat varlığında yarışmalı inhibitörün enzime bağlanma olasılığı çok azdır.



Şekil 1.10. Yarışmalı inhibisyon grafiği [43]

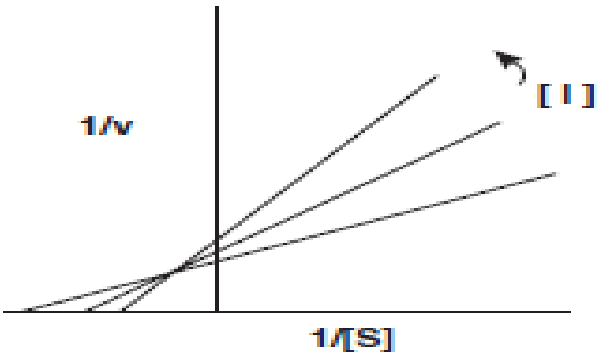
Bu yüzden de reaksiyon normal bir V_{max} değeri gösterir; fakat yarışmalı inhibitörün varlığında, yarı maksimal hızın gözlendiği noktadaki substrat konsantrasyonu olan K_m değeri artar.

Yarışmasız enzim inhibisyonunda, enzim üzerinde substratın bağlandığı aktif yerden ayrı bir yere tersinir olarak bağlanan yarışmasız inhibitör, enzime substrat bağlanmasını bloke etmemektedir.



Şekil 1.11. Yarışmasız inhibisyon mekanizması [43]

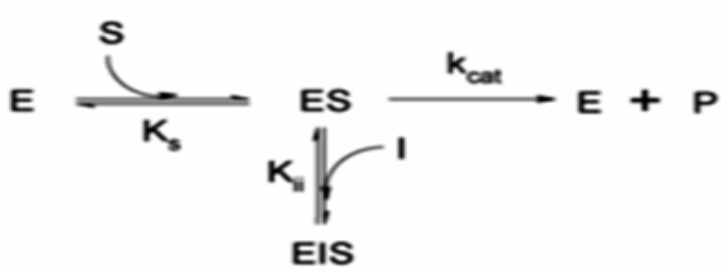
Yarışmasız inhibitör, kimyasal yapısı bakımından substrattan farklıdır. Enzimin aktif merkezinden farklı bir bölgeye geri dönüşümlü olarak bağlanarak enzimi inaktive eder ve ES konsantrasyonunu azaltır. Yarışmasız inhibisyon sonucu V_{max} azalır fakat K_m değeri değişmez.



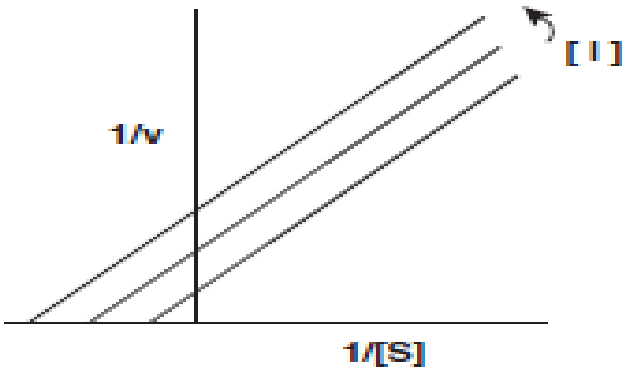
Şekil 1.12. Yarışmasız inhibisyon grafiği [43]

Yarı yarışmalı enzim inhibisyonunda, yarı yarışmalı inhibitör, yarışmasız inhibitör gibi, enzim üzerinde substratın bağlandığı aktif yerden ayrı bir yere tersinir olarak bağlanmaktadır.

Tek fark yarışmasız inhibitör serbest enzime veya ES kompleksine bağlanabildiği halde yarı yarışmalı inhibitör, yalnızca ES kompleksi oluştuktan sonra bağlanarak enzimi inaktive eder. Yarı yarışmalı inhibisyon sonucu hem V_{max} hem de K_m değeri azalır.

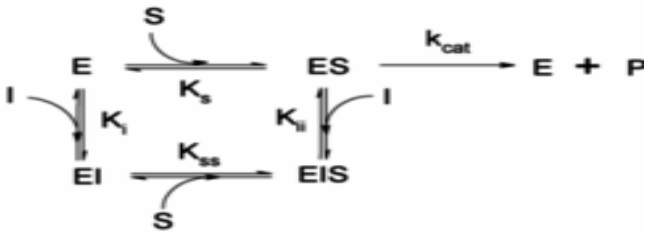


Şekil 1.13. Yarı yarışmalı inhibisyon mekanizması [43]



Şekil 1.14. Yarı yarışmalı inhibisyon grafiği [43]

Karışık inhibisyon türü yarı yarışmalı olana benzemektedir fakat enzim substrat inhibitör kompleksinde de kısmî enzim aktivitesi bulunmaktadır.



Şekil 1. 15. Karışık inhibisyon mekanizması [43]

1.3.3.2. Tersinmez enzim inhibisyonları

Tersinmez bir inhibitörün enzim üzerinde bulunan ve aktivite için esas olan bir fonksiyonel grubu yıkması veya onunla tersinmez olarak birleşmesiyle meydana gelen bu inhibisyon tipinde inhibitörler çoğunlukla enzimle kovalent bağlar meydana getirir.

Suisid inhibitörler, geri dönüşümsüz inhibitörlerin çok özel bir sınıfıdırlar ve enzimi inaktive etmek için normal enzim reaksiyon mekanizmasını kullandıklarından mekanizmaya dayanan inaktivatörler diye de adlandırılırlar.

Çoğu canlıda inhibitörler geri besleme mekanizmasının parçası olarak etkirler. Eğer bir enzim bir bileşikten çok fazla miktarda üretirse bu bileşik, kendisini üreten metabolik yolun başında yer alan diğer bir enzime inhibitör bir molekül olarak etki edebilir.

Ürün miktarı yeterli seviyede olunca bu bileşik oluşumu için gerekli olan substratın üretimini azaltır veya durdurur. Bu bir negatif geri besleme şeklidir.

Bu tür düzenlemeye tâbi olan enzimler genelde multimerikdir (çok altbirimlidir) ve düzenleyici bileşikler için allosterik bağlanma konumlarına sahiptirler. Ayrıca Substrat/hız eğrileri hiperbolik değil sigmoidaldır (s-şekillidir).

1.4. Azoller

Azoller 1960'lı yıllarda bulunmuş tamamen sentetik ajanlardır. Beş üyeli azol halkasında 2 ya da 3 azot bulunmasına göre imidazoller veya triazoller olarak sınıflandırılmaktadırlar [57].

Daha geniş bir sınıflandırma ile azoller daha fazla alt gruplara ayrılabilmektedirler. Bu alt sınıfların bulundukları ilaçlar ve etki mekanizmaları ise aşağıdaki gibidir.

Tablo 1.4. Azol içeren ilaçlar ve kategorileri [58, 59]

Azoller	İlaçlar	Kategori
İsoksazoller	Sikloserinler	Antibakteriyel
	Sulfisoaksazoller	Antimikrobiyal
Tiyoazoller	Tiyobendazoller	Anthelmintik
	Tiyoamizler	Vitamin B_1
İmidazoller	Klotrimazoller	Antifungal
	Ketokonazoller	Antifugal
	Pilokarpinler	Kolinarsiya
Pirzoller	Betazoller	Histamin serbest ilaç
Tiyadiazoller	Asetazolamidler	Karbonik-n-hidraz inhibitörü
Triazoller	Flukonazoller	Antifungal
	İtrakonazoller	Antifungal

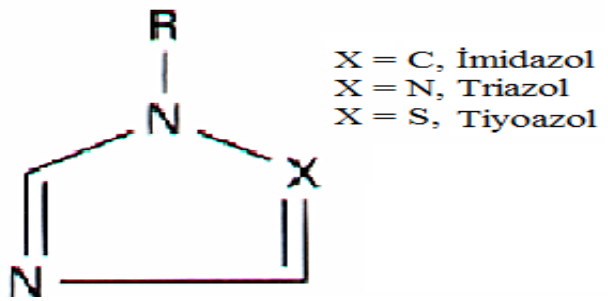
Azoller en sık kullanılan antifungal ilaçlardır. Bu ilaçlar, mantar hücre membranındaki ergosterol sentezini inhibe ederek etki göstermektedirler. Azollerin ergosterol biyosentezi üzerindeki etkileri C-14 demetilasyon basamağı üzerinedir. Bu basamaktaki oksidatif reaksiyon, sitokrom P450 enzimi olan 14 α-sterol demetilaz (lanosterol demetilaz) tarafından katalizlenir.

Azol türevlerinin bir azotu molekülün demir atomuna bağlanır ve lanosterol demetilasyonu için gereken oksijenin aktivasyonunu önler [60]. Buna ek olarak azollerdeki ikinci azot ise lanosterol demetilazın apoproteini ile direkt ilişkiye girer.

Azol türevleri P450 enziminin inhibisyonu ile ergosterol tükenmesini ve lanosterol ile diğer 14 metilli sterollerin birikmesine yol açar. Bu durum da ergosterolün bir membran bileşeni olarak fonksiyonunun bozulmasına ve membranın hasara daha duyarlı hale gelmesine yol açar [61-63].

Ergosterol bozulması ergosterolün hormon benzeri fonksiyonlarını da bozarak hücre büyümesini ve proliferasyonunu etkiler [61, 63]. Azoller $P450_{DM}$ inhibisyonu ile fungus hücrelerini fagositozda oluşan oksidatif metabolitlere daha duyarlı hale getirir [64].

Azollerin en önemli iki sınıfı imidazol ve triazollerdir. Yan etkileri diğer antifungal ajanlara göre daha azdır, fakat fazla kullanımları direnç oluşumuna yol açmıştır. Birçok tür bütün azollere çapraz-dirençlidir. Bu durum araştırmacıları azol grubu antifungal ilaçlarda yenilik arayışına yönlendirmiştir [65].

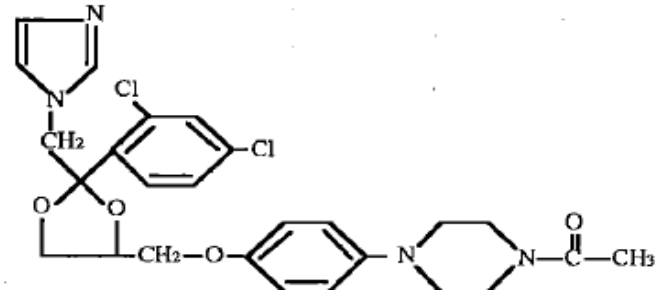


Şekil 1.16. Azollerin moleküler yapıları[65]

1.4.1. İmidazoller

İmidazol ($C_3H_4N_2$) organik bir bileşiktir. Aromatik bir diazol olan imidazoller sahip oldukları halka sistemi nedeniyle biyolojik bloklamada görevlidirler. Bu bileşikler ayrıca birçok ilaç içeren antifungal ilaç ve nitroimidazol moleküllerinde olduğu gibi baz ve zayıf bir asit olarak hizmet verebilirler [66].

1.4.1.1.Ketokonazol

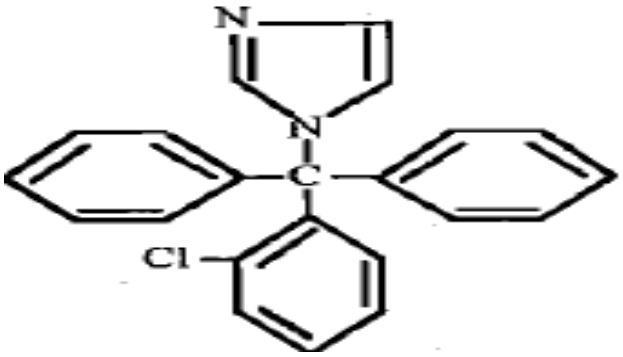


Şekil 1.17. Ketokonazolün moleküler yapısı [67]

Ketokonazol 1977'de geliştirilen ve azol türevleri içerisinde altın standart olarak bilinen en başarılı ve yaygın kullanılan imidazol türevidir [67, 68].

Gonadal ve adrenal streoid hormonlarının (özellikle testosteron) sentezini engelleyen bu azol grubu iyi bir etki olarak LDH'ı düşürür. Sonuçta hücre membran geçirgenliği artar. Aynı zamanda sistemik mikozların tedavisinde kullanılan bir antifungal olan ketokonazoller çeşitli enzimleri de inhibe ederler [65].

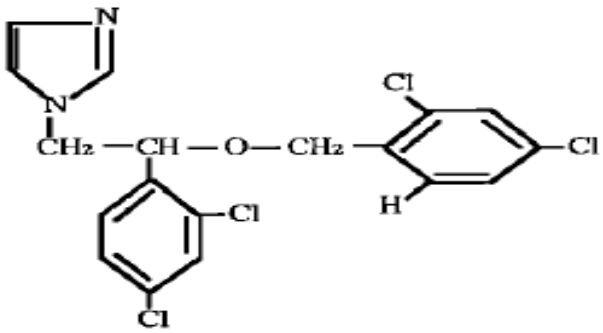
1.4.1.2. Klotrimazol



Şekil 1.18. Klotrimazolün moleküler yapısı [65]

1969'da sentezlenen ve geliştrilen ilk imidazol antifungal ilaçlardandır. Ama sentezi 1972 yılına kadar bildirilmemiştir. Dermotofitler, patojen mayalar ve flamanlı ve dimorfik mantarlar kadar Gram(+) bakterilere de etki etmektedir.

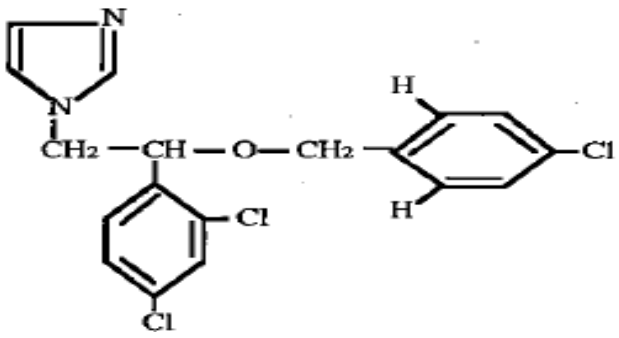
1.4.1.3.Mikonazol



Şekil 1.19. Mikonazolün moleküler yapısı [65]

Oldukça düşük toksisitesi nedeniyle sistemik mantar enfeksiyonlarında kullanılabilen ilk imidazoldür.

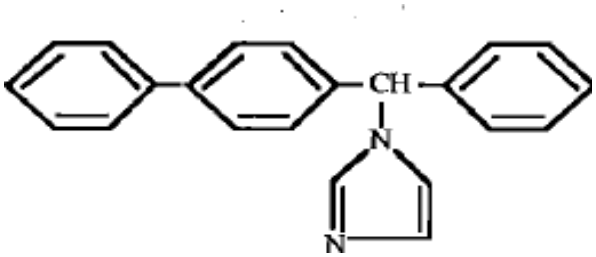
1.4.1.4. Ekonazol



Şekil 1.20. Ekonazolün moleküler yapısı [65]

Ekonazoller mikonazole benzemektedirler. Topik tedavide dermatofitozlar, yüzeysel mikozlar olarak kullanılırlar. Serum proteinlerine kuvvetle bağlandığından sistemik tedavi için uygun değildirler.

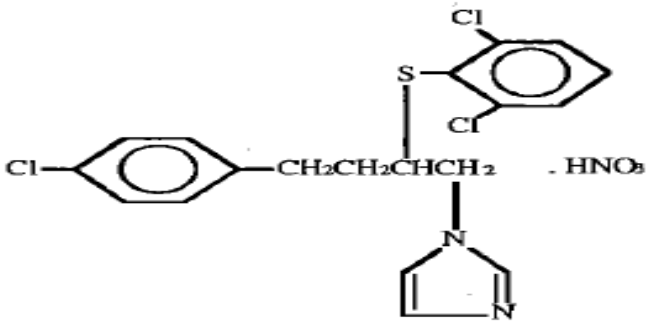
1.4.1.5. Bifonazol



Şekil 1.21. Bifonazolün moleküler yapısı [65]

Halojensiz bir imidazol olan bifonazollipofildir ve suda az çözünür. Yarı ömrü 19-32 saattir. Topik kullanılır ve birçok maya ve mantarda etkilidir.

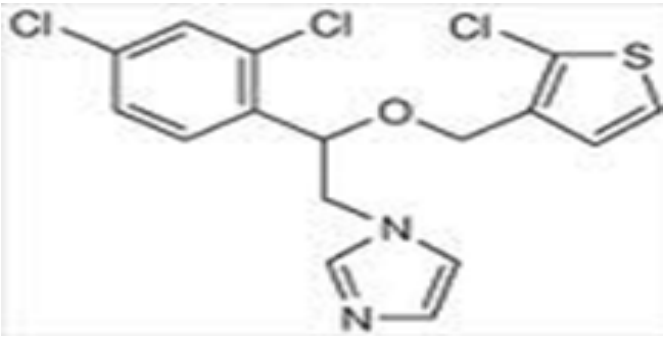
1.4.1.6. Bütakonazol



Şekil 1.22. Bütakonazolün moleküler yapısı [65]

Geniş spektrumlu patojen mayalar üzerine etkili bir imidazol türevidir.

1.4.1.7. Tiyokanozol



Şekil 1. 23. Tiyokanozolün moleküler yapısı [65]

Yapılan klinik araştırmalarda çoğu imidazolden daha etkili olduğu tespit edilen bir imidazol türevidir.

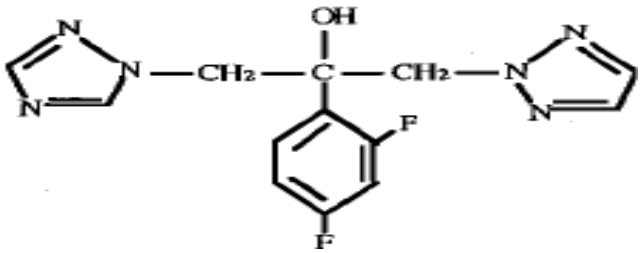
Candida türlerine karşı mikonazollerden 4 kat aktif, aspergillus türlerine karşı ise mikonazole benzer aktivitede olduğu bilinmektedir.

1.4.2. Triazoller

Triazoller, fungustatik etkili olup, yukarıda da bahsedildiği gibi etkilerini sitokrom P450 bağımlı bir enzim olan lanosterol demetilaz (14-a-sterol demetilaz) enzimini inhibe ederek gösterirler ve ergosterol sentezini engellerler.

Çoğu azolün etki spektrumları aynıdır fakat triazoller daha yavaş metabolize olmalarından ve özellikle imidazollere göre insan sterol sentezine daha az etki ettiklerinden ötürü daha çok tercih edilirler ve geliştirilmekte olan çoğu azol triazollerdendir [61].

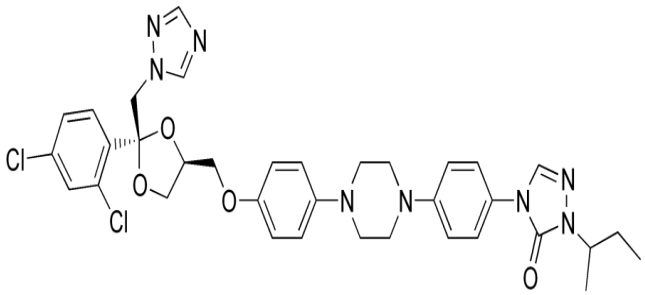
1.4.2.1. Flukonazol



Şekil 1.24. Flukonazolun moleküler yapısı [70]

Lipofilik yapıdaki biyoyararlanımı bozuk olan ketokonazol ve itrakonazole göre nispeten daha küçük, suda eriyebilen bir moleküldür ve hızla yüksek oranda absorbe olur. Suda iyi çözünür ve beyin omurilik sıvısına geçerler. Son yıllarda özellikle flukonazolün tedavi aşamasında çok sık kullanılması maya mantarlarında flukonazole karşı bir direncin oluşmasına neden olmuştur [70].

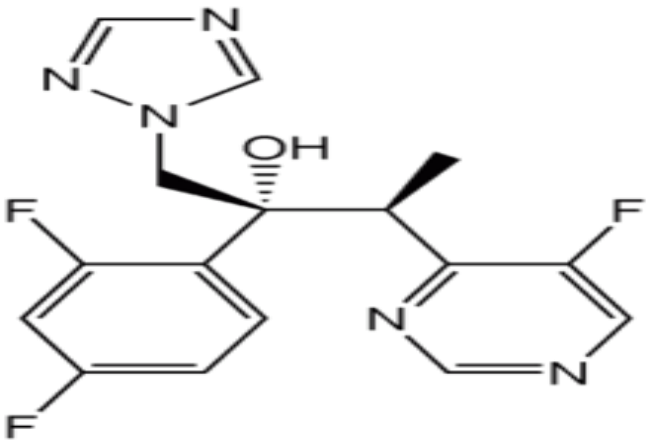
1.4.2.2. İtrakonazol



Şekil 1.25. İtrakonazolün moleküler yapısı [71]

Diğer azollere kıyasa daha yeni bir azoldür. Ketakozol gibi CYP3A4 ve 2C9 enzimlerini inhibe eder. Farmakokinetik özellikleri flukonazole benzer. Oral formunun biyoyararlanımı yaklaşık %55'tir [65].

1.4.2.3. Vorikonazol



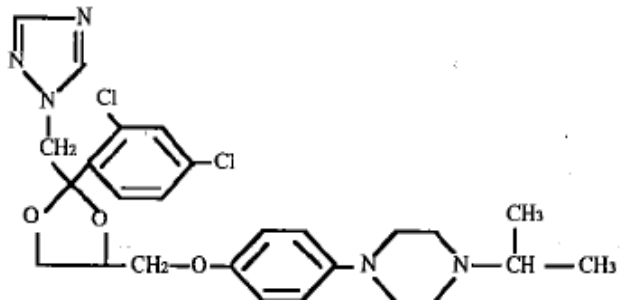
Şekil 1.26. Vorikonazolün moleküler yapısı [72]

Klinik uygulamalara yeni girmiştir karaciğerde metabolize olsa da P450 sistemi üzerine etkisi azdır [65].

1.4.2.4. Posakonazol

İkinci kuşak azollerden olup itrakonazolün hidroksile edilmiş şeklidir. candida türleri, c. neoformans, aspergillus türleri ve rhizopus türleri bazı endemik mantarlara etkilidir. Oral süspansiyon ve tablet formu vardır. Klinik çalışmalar halen devam etmektedir [65].

1.4.2.5. Terkonazol



Şekil 1.27. Terkonazolün moleküler yapısı [65]

Bu grubun klinik olarak iş gören ilk üyesidir. Geniş bir spektruma sahiptir.

1.4.3. Tiyoazoller

Tiyoazoller azol halkalarında bir S atomu içeren heterosikilik bileşiklerdir. Biyolojik aktivitelerinden ve çeşitli hastalıkların tedavisindeki rollerinden ötürü tiyoazoller benzer heterosiklik yapılar içerisinde oldukça önemli bir sınıfıtır.

Doğal olarak var olan bir tiyoazol halkası olan vitamin B (tiyamin) tiyoazollerin canlı metabolizmadaki örneklerindendir. Tiyamin suda çözünebilen bir vitamindir ve metabolizmada karbohidratlardan enerji elde edilmesinde yardımcı olmaktadırlar. Ayrıca sinir sisteminin normal fonksiyonlarına da, bir nörotransmitter olan asetilkolinlerin sentezinde görev alarak yardımcı olurlar [73].

Tiyoazoller suda, alkolde ve eterde çözülebilirler. Genellikle ilaçların, fungusitlerin ve boyaların üretiminde kullanılmaktadırlar. Birçok biyolojik olarak aktif molekül içerisinde bulunabilirler. Örneğin, sülfotiyoazoller; antimikrobiyal ilaçlarda, ritonovirler; antiretroviral ilaçlarda ve abosoller ve tiyoazofurinlar de antinoplastik ilaçlarda bulunmaktadırlar [74].

Tetrahidrotiyoazoller penisilinin iskeletinde, aminotiyoazoller ise estrojen reseptörlerinin ligantları olarak bulunurlar. Piyroazoller ise herbisitler, fungusitler ve analjezik aktiviteleri gibi sahip oldukları tedavi özellikleri ile geniş kullanım alanlarına sahiptirler [75].

Tiyoazoller antitüberkülar, antifungal, analjesik ve antikanser özellikleriyle bilinmektedirler. Ayrıca hipertansiyon, alerji, bakteriyel enfeksiyonlarda, proteaz inhibisyonunda ve bakteriyel DNA giraz B enziminin inhibisyonunda kullanılmaktadırlar [73].

1.4.4. Azollerin enzim inhibisyonunda kullanımları

Triazollerin inhibisyon etkilerinin araştırılmasına antifungal etkileri öncülük etmiştir. Triazoller sitokrom P450 enzimi olan C14 α sterol demetilaz'ın inhibisyonuna neden olmaktadırlar [76]. Tasarlanan ilk triazollerden ketakazol ve itrakazollerin t. cruzi enfeksiyonuna karşı etkili oldukları görülmüştür [77]. Süregelen çalışmalarda daha etkili triazoller de bulunmuş posakonazolün de içinde bulunduğu bu triazoller lanosterol sentezinde oksido skualen siklaz enzimi üzerinde inhibitör olarak kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir [78].

Triazoller sadece C14 α sterol demetilaz üzerinde inhibisyon etkisine sahip değillerdir. Glisin transporter 1 ve 2 enzimleri üzerinde inhisbisyona neden olan (4H-1,2,4-triazol-4-yl) isoquinolin [79], siklooksigenaz enzimini inhibe eden (aril-1,2,3-triazol-1)-metansülfonilfenil [80] ve karbonik anhidraz inhibisyonuna sebep olan 1,2,4-triazol-tiyoller [81] triazollerin etkili olduğu diğer enzimlere örnek olarak verilebilir.

Triazollerin çeşitli proteazlar üzerine de inhibisyon etkileri araştırılmıştır. Metiyonil aminopeptidazlar üzerine 1,2,4 – triazol türevlerinin [82]; metiyonin aminopeptidaz üzerine 1,4 – benzodioksan içeren 1,2,4 – triazollerinin [83]; kaspaz üzerinde 1,2,3-triazollerin [84]; serin proteazlar üzerinde tetrasiklik triazollerin [85] ve triazol içeren sülfamidlerin [86] inhibisyon etkileri incelenmiştir.

1.5. Antioksidan Maddeler

Vücudun, ürettiği serbest radikallere (oksidanlara) karşı savunma mekanizması anlamında bir enzim sistemi vardır. Bu enzimlerin etkinliğini artıran maddelere antioksidan denir. Antioksidanlar vücut hücreleri tarafından üretildiği gibi, gıdalarla da alınabilen bir grup kimyasal maddedir. Çaydaki polifenoller, soya ve turunçgillerdeki flavonoidler, kakaodaki siyanidin kanserden koruyucu etkisi olan ve antioksidan etkili maddelere örnektir.

Organik bileşiklerin yapısında değişikliklere neden olan atmosferik oksijen, gıdaların raf ömrünün azalmasına neden olmaktadır. Oksidatif bozunmayı önlemek veya geciktirmek için gıda maddelerini bu bozunmadan korumak amacıyla antioksidan maddeler kullanılmaktadır.

Antioksidanlar gıdalarda; onları dengelemek, oksitlenmeyi kontrol ederek ürün kalitesini artırmak, tatsızlık gelişimini engellemek ve önemli ölçüde terapik ajan olarak potansiyellerini ortaya çıkarmak için kullanılırlar. Gıdaların oksidasyonu sonucu, istenmeyen kahverengi renk, kötü koku, kötü tat (acılık), duyusal kalitede ve vitamin miktarında azalmalar gibi sorunlar oluşur [87].

İnsan metabolizmasında vücudun oksijen kullanımındaki normal işlemleri sırasında bazı etmenlerin teşviki ile aktif oksijen formları oluşmaktadır. Oluşan aktif oksijen formları engellenmediğinde DNA, protein, karbonhidrat ve lipitlerde yapısal bozulmalara yol açmaktadır. Antioksidan maddeler, aktif oksijen oluşumunu engelleyerek ya da oluşan aktif oksijenleri tutarak, oksidasyonun teşvik etmiş olduğu zararları hücresel bazda engellemekte ve dejeneratif hastalıkların oluşumunu durdurmaktadır.

Azol türevi çoğu molekülün de antioksidan etkilerinin varlığı bilinmektedir. Özellikle tiyoazollerin serbest radikal giderim aktiviteleri üzerine olan araştırmalar diğer azol türevlerine göre çok daha popülerdir.

Litaratüre örnek verilecek olunursa 2011'de V. Jaishree ve arkadaşları tiyoazol türevi moleküller sentezlemiş ve potansiyel antioksidan etkileri üzerinde durmuşlarıdır [88].

Firas A. Hassan ise 2012'de bir seri yeni tiyoazol türevi sentezlemiş ve sentezlediği moleküller içerisindeki (z)-4-(3-metoksifenil)-N-(4-nitrobenzil) tiyoazol-2-amin ve N-[4-(3-metoksifenil) tiyoazol-2-il]-4-nitrobenzamid moleküllerinin DPPH, nitrik oksit ve lipit peroksit üzerinde iyi derecede serbest radikal giderim güçlerine sahip olduklarını belirlemiştir [89].

2. LABORATUVAR ÇALIŞMALARI VE YÖNTEMLER

2.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

α-kimotripsin, Tripsin, Bovin Serum Albumin, Hemoglobin, Sodyum Hidroksit, ve Sodyumazid Sigma Aldrich'ten, Trikloro Asetik Asit,Trisma Base, Dimetil Sülfoksit, Dimetil Fenil Anilin, Asetonitril, β-merkaptoetanol, Metanol, DPPH, Hidroklorik Asit ise Merck'ten satın alınmıştır.

2.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

UV-Visible Spektrofotometre (Optizen Pop)

pH Metre (CG 840 Schott)

Magnetik Karıştırıcı (Vortex-Genine)

Santrifüj (Nuve)

Otomatik Pipet (Eppendorf)

Elektrikli Terazi (Sartorius)

Su Banyosu(Nuve)

2.3. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler

Çalışma boyunca aşağıdaki çözeltiler kullanıldı.

0,1 M pH 8 Tris-HCl tamponu:1,42 gr Triss base tartılıp yaklaşık 200 ml distile suda çözüldü, sonrasında ise seyreltik HCl ile pH 8'e ayarlanıp hacim 250 ml'ye tamamlandı.

% 1 lik BSA: 0,25 gr BSA tartılıp pH 8 Tris-HCl tamponunda çözülerek hacim 25 ml'ye tamamlandı.

5 mg/ml lik Hemoglobin: 0,125 gr hemoglobin tartılıp pH 8 Tris-HCl tamponunda çözülerek hacim 25 ml'ye tamamlandı.

% 0,125'lik Tripsin: %0.25 stok tripsinden 10 ml alınıp 10 ml pH 8 Tris-HCl tamponu eklenerek hazırladı.

1 mg/ml'lik α-kimotripsin: 0,01 gr enzim tartılıp pH 8 Tris-HCl tamponunda çözülerek hacim 10 ml'ye tamamlandı.

% 5'lik TCA: 5 g TCA tartılıp bir miktar distile suda çözülerek hacmi 100 ml'ye tamamlandı.

Sodyumazid çözeltisi: Molekül ağırlığı 65,01 g/mol olan sodyum azid'ten 0,32 gr tartılarak bir miktar distile suda çözüldü ve hacmi 10 ml'ye tamamlanarak 0,5 M'lık stok çözeltisi hazırlanmış olundu.

β-merkaptoetanol çözeltisi: 14,3 M'lık β-merkaptoetanolden 350 µl alınarak hacmi distile su ile 10 ml'ye tamamlandı. 0,5 M'lık stok hazırlanmış olundu.

Azol molekülleri: Her molekülden 0,03'er gr tartılıp hacimleri 10'ar ml'ye tamamlanarak 3 mg/ml'lik stoklar hazırlandı. İnhibitörlerin tamamen çözünmesi için yaklaşık 10 dk. 60 $^{\circ}$C'de ısıtıldı ve soğutularak denemede kullanıldı.

DPPH çözeltisi: 0,1 mM konsantrasyonu için 4 mg DPPH 100 ml etanolde çözülerek hazırlandı.

2.4. Deneysel Yöntemler

2.4.1 α-kimotripsin ve tripsin aktivitelerinin tayini

Çalışmada öncelikle enzimlere ait substrat konsantrasyonları belirlendi ve Lineweaver Burk grafikleri çizilerek K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı.

2.4.1.1. Deneyin yapılışı

Michealis–Menten eğrisinin hazırlanmasında kullanılacak olan enzimin doygunluk gösterdiği substrat konsantrasyonun belirlenmesi için yapılan çalışmada aşağıdaki gibi gerçekleştirildi.

Kimotripsin (1 mg/ml) ve tripsinin (% 12,5'lik) pH 8Tris-HCl tamponunda artan konsantrasyonlarda 10 mg/ml'lik stok BSA (0,4-1,2-2-2,8-3,6-4,4-5,2 mg/ml) ve 5 mg/ml'lik hemoglobin (0,2- 0,6-1-1,4-1,8-2,4-2,8 mg/ml) substratları ile 40 °C'de 20 dak inkübasyonları gerçekleştirildi. Reaksiyon % 5'lik TCA ile sonlandırıldı. Sonrasında 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilen her bir numunenin filtre edilerek 280 nm'de tampona karşı absorbans ölçümleri alındı.

2.4.1.2. Hesaplama

Lineweaver Burk grafiklerinin eğim denklemlerinden faydalanılarak V_{max} ve K_m değerleri aşağıdaki formül ile hesaplandı.

$$1/V_0 = K_m/ V_{max}[S] + 1/V_{max} \quad (2.1)$$

2.4.2. α-kimotripsin enzimi için optimum pH ve sıcaklığın belirlenmesi

α- kimotripsin enziminin optimum pH'sını belirlemek amacıyla pH'ı 2 – 3 – 4 – 5 olan asetat, pH'sı 5,5 - 6,0 - 6,5 - 7,0 - 7,5 ve 8,0 olan potasyum fosfat ve 7,5 - 8,0 - 8,5 - 9,0 – 9,5 - 10 olan Tris-HCl tamponları hazırlandı. Uygun substrat çözeltisi ile her bir tamponda ayrı ayrı enzim aktivitesi belirlendi.

α- kimotripsin enziminin optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla 20°C ile 120°C arasında denemeler gerçekleştirildi. 20'şer °C aralıklarla aktivite ölçümü yapıldı.

2.4.3. α-kimotripsin, üzerine bilinen inhibitörlerin etkisinin incelenmesi

β-merkaptoetanol ve sodyumazid maddeleri ve DMSO, asetonitril ve DMF çözücülerinin enzim üzerinde inhibisyon etkileri incelenerek; spektrofotometrik ölçümde kullanılacak körün içeriği, kontrol numunesinin inhibitörlü numunelerle nasıl karşılaştırılacağı gibi yöntemle ilgili tespitler için fikir edinildi.

2.4.3.1. Deneyin yapılışı

Deneme sabit enzim konsantrasyonunda (0,2 mg/ml)ve sabit substrat varlığında (4 mg/ml) artan inhibitör konsantrasyonları ile gerçekleştirildi.

2.4.3.2. Hesaplama

Stok çözeltilerden numunelere eklenecek miktarların ve bu inhibitör çözeltilerin numune içerisindeki konsantrasyonlarının stok çözeltiler baz alınarak hesaplandı.

2.4.4. Azole türevlerinin inhibisyon etkilerinin incelenmesi

İnhibisyonu incelenecek olan maddelerin öncelikle stok çözeltileri hazırlandı. Sonrasında ise deneme aşağıdaki gibi gerçekleştirildi.

2.4.4.1. Deneyin yapılışı

İnhibisyon denemeleri sabit enzim konsantrasyonunda (0,2 mg/ml) ve sabit substrat varlığında (4 mg/ml) 3 mg/ml stok inhibitörlerin artan konsantrasyonları (0-0,02-0,04-0,08-0,16-2 mg/ml) ile gerçekleştirildi.

Aynı deneme her bir numune için ayrı olarak hazırlanacak körler için de uygulandı. Kör çözeltilerinin substrat yerine tampon çözelti eklenerek hazırlanmalarıydı.

Yine tüm körler her bir numune için ayrı olarak hazırlandı ve onlara substrat eklenmedi. Körlere substrat miktarı kadar (1000 µl) tampon çözelti eklendi.

2.4.4.2. Hesaplama

İnhibitörlerin numune içindeki konsantrasyonları stok konsantrasyonları baz alınarak her bir örnek için ayrı ayrı hesaplandı.

2.4.4.3. IC_{50} değerlerinin tespiti

Bu deneme sonucu elde edilen absorbanslardan, artan inhibitör konsantrasyonuna karşı % aktivitenin düşüşüne ait inhibisyon grafiği çizilip IC_{50} değerleri tespit edildi. Hesaplanan IC_{50} değerlerinden yola çıkılarak üç farklı inhibitör konsantrasyonu belirlenerek çalışmanın ikinci kısmı olan inhibitör türünün belirlenmesi için gerçekleştirilecek olan denemeye geçildi.

2.4.5. İnhibisyon türlerinin belirlenmesi

IC_{50} konsantrasyonlarının belirlenmesinden sonra %50 inhibisyonu sağlayan, konsantrasyonda, % 50 inhibisyonu sağlayan konsantrasyonun altında ve üstünde tespit edilen 3 inhibitör konsantrasyonu belirlendi. Sonrasında inhibitör konsantrasyonları her üç deneme için sabit tutularak artan substrat konsantrasyonlarında Michealis-Menten eğrileri çizilerek K_m farklanmaları gözlemlendi, Lineweaver Burk grafiği ile inhibisyon türleri belirlendi.

2.4.5.1. Deneyin yapılışı

Denemelerde 3 set inhibitörlü 1 set ise inhibitörsüz kontrol amaçlı çalışıldı. Kontrol denemesi olarak enzimin inhibitör varlığı olmaksızın aktivitesinin belirlendiği deneyi tekrar edildi.

İnhibitörlü denemelerde ise enzime inhibitör ile muamale edildi. Her bir inhibitör konsantrasyonu için üç deneme gerçekleştirildi.

Denemelerin tümünde enzim, substrat, inhibitör ve tampon miktarları aşağıdaki şemalara göre eklendi. Denemenin diğer aşamaları olan inkübasyon koşulları, santrifüj, filtrasyon ve UV ölçümleri ise aşağıdaki şemalarda da gösterildiği gibi daha önceki inhibisyon denemeleriyle aynı olarak gerçekleştirildi.

Tüm bu denemeler sonucunda üç triazol türevinin de enzim inhibisyonları belirlenmiş olundu.

2.4.6. DPPH serbest radikal giderim aktivitesi belirlenmesi

2.4.6.1. Deneyin yapılışı

Azol türevi moleküllerin serbest radikal giderim aktiviteleri DPPH serbest radikali kullanılarak belirlendi. Standart olarak metanol kullanıldı.

Azol moleküllerinin etanol içerisindeki 3 mg/ml'lik stok çöeltilerinden 0,2- 0,8- 1,6 ve 2 mg/ml'lik konsantrasyonlarında hazırlanan örneklerine 0,1 mM'lık DPPH çözeltisinden 2700 µl'si ile muamele edildi. Örnekler oda sıcaklığında karanlıkta 60 dakika inkübasyon edildikten sonra her bir numunenin 517 nm'de absorbans ölçümleri alındı.

2.4.6.2. Hesaplama

Serbest radikal giderim aktivitesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı. $A_{kontrol}$, kontrol çözeltisinin 517 nm'deki absorbans değeri, $A_{örnek}$ ise örnek çözeltilerinin 517 nm'deki absorbans değerleriydi.

$$\%\text{inhibisyon} = A_{kontrol} - A_{örnek} / A_{kontrol} \times 100 \quad (2.2)$$

3. BULGULAR

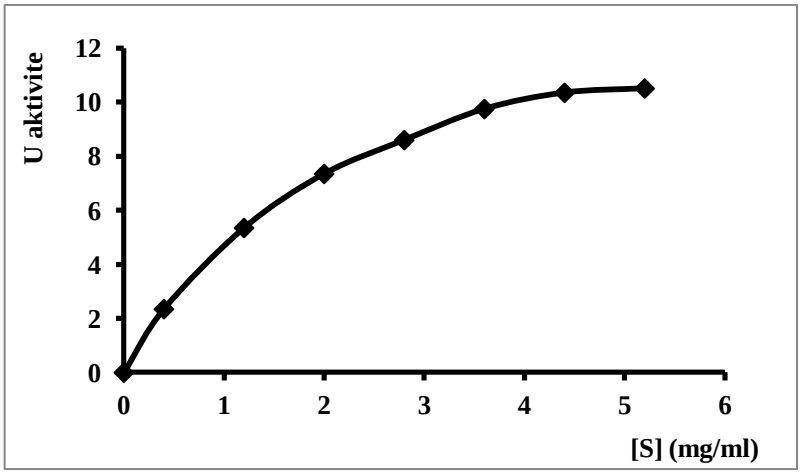
3.1. Michealis-Menten ve Lineweaver Burk Grafiklerinin Çizilmesi

Belirli miktar enzim (0,5 ml) ile 10 mg/ml'lik BSA stok çözeltisinden 0,4 – 1,2 – 2 – 2,8 – 3,6 – 4 mg/ml konsantrasyon aralığında, 5 mg/ml hemoglobin stok çözeltilerinden ise 0,2 – 0,6 – 1 – 1,4 – 1,8 – 2,4 mg/ml konsantrasyon aralığında numuneler hazırlanarak Michaelis-Menten grafiği çizilmiştir.

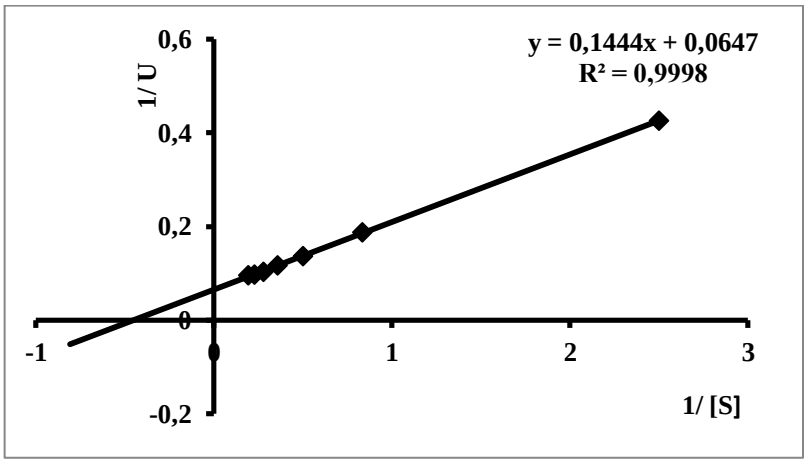
Bu grafikten yararlanarak α-kimotripsin (1 mg/ml), tripsin (%12,5'lik) için K_m ve V_{max} değerleri belirlenmiştir. Bu çalışmaya ait grafikler aşağıda görülmektedir.

Tablo 3.1. Değişen substratlara bağlı olarak α-kimotripsin aktivitesi

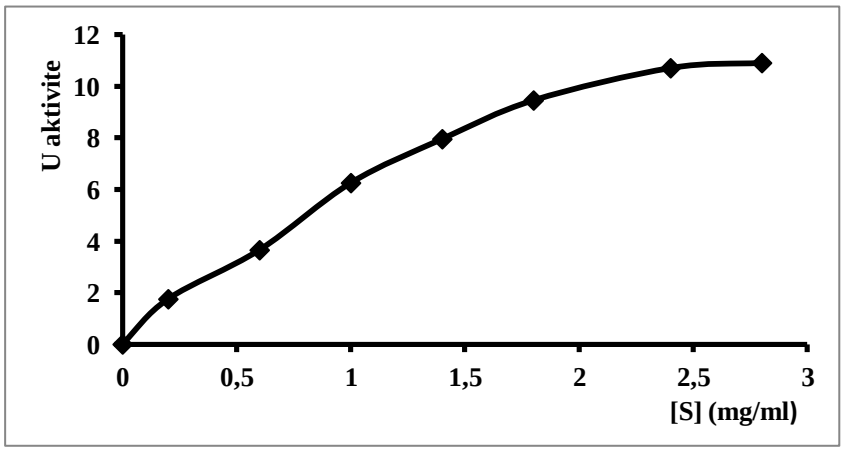
[S] mg/ml BSA	Aktivite [U]	[S] mg/ml Hemoglobin	Aktivite [U]
0,4	2,35	0,2	1,75
1,2	5,35	0,6	3,65
2	7,35	1	6,25
2,8	8,6	1,4	7,95
3,6	9,75	1,8	9,45
4,4	10,35	2,4	10,7
5,2	10,51	2,8	10,9



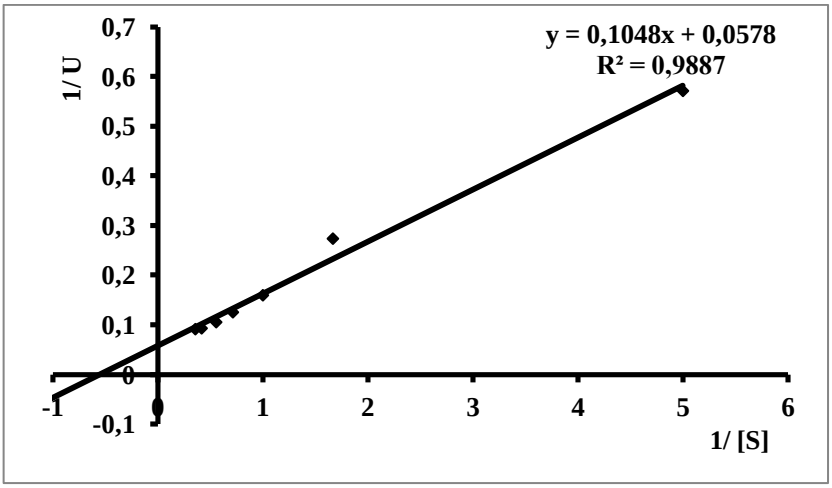
Şekil 3. 1. α- kimotripsin - BSA Michealis–Menten grafiği



Şekil 3.2. α- kimotripsin-BSA Lineweaver Burk grafiği



Şekil 3.3. α-kimotripsin – Hem Michealis – Menten grafiği



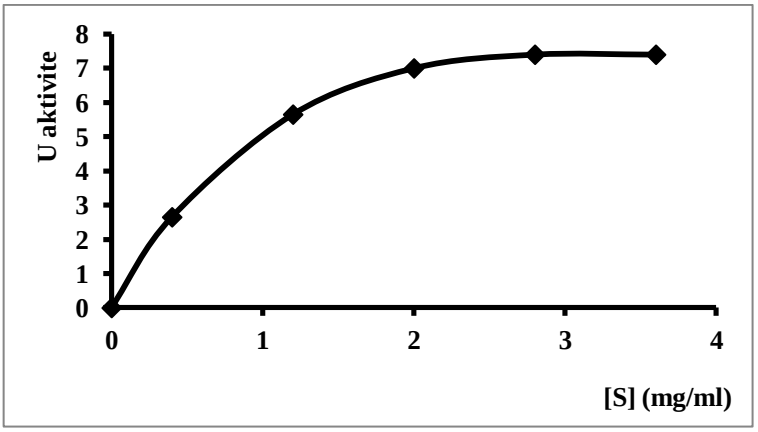
Şekil 3.4. α-kimotripsin-Hem Lineweaver Burk grafiği

Denemeler sonucunda kimotripsin enziminin BSA ile aktivite denemesi sonucunda V_{max} 15,85 U K_m ise 2,3 mg/ml olarak hesaplanmıştır.

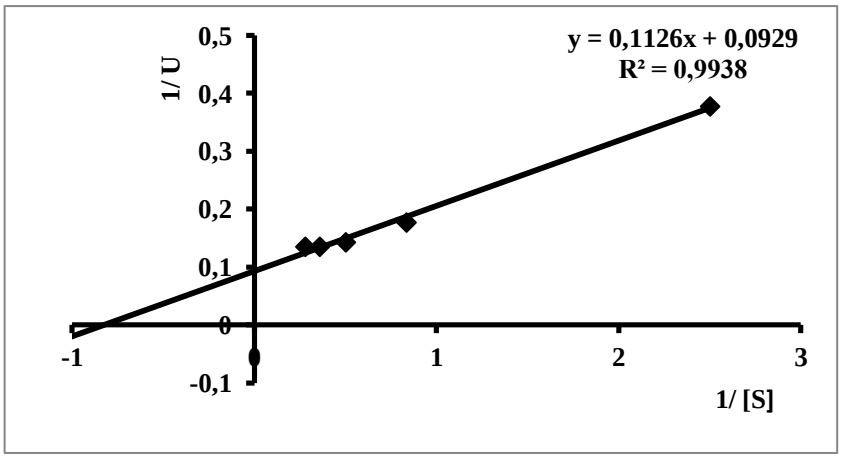
Substrat olarak hemoglobin kullanıldığında ise V_{max} 17,30 U K_m 1,81 mg/ml olarak hesaplanmıştır.

Tablo 3.2. Değişen substrat konsantrasyonlarına bağlı olarak tripsin aktivitesi

[S] mg/ml BSA	Aktivite[U]	[S] mg/ml Hemoglobin	Aktivite[U]
0,4	2,65	0,2	1,3
1,2	5,65	0,6	4,35
2	7	1	6,35
2,8	7,4	1,4	6,8
3,6	7,4	1,8	8,15
		2,4	10

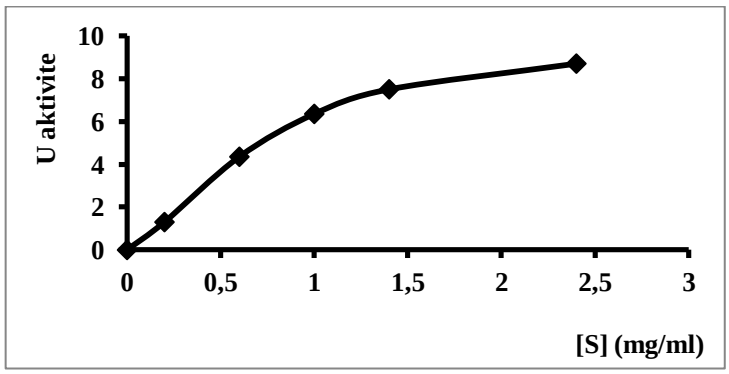


Şekil 3.5. Tripsin – BSA Michealis – Menten grafiği

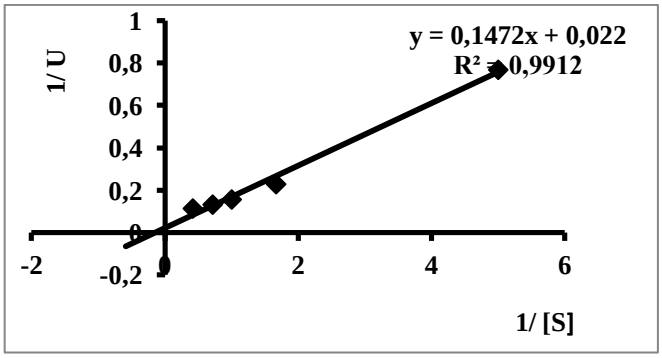


Şekil 3.6. Tripsin-BSA Lineweaver Burk Grafiği

Tripsin BSA aktivite tayini sonucunda V_{max} 10,76 U, K_m ise 1,21 mg/ml olarak belirlenmiştir. Çizilen Michealis - Menten ve Lineweaver Burk grafikleri sonucunda tripsin enziminin BSA ile doygunluğa ulaştığı substrat konsantrasyonu belirlenmiştir.



Şekil 3.7.Trispin – hem Michealis – Menten grafiği



Şekil 3.8.Tripsin-hem. Lineweaver Burk grafiği

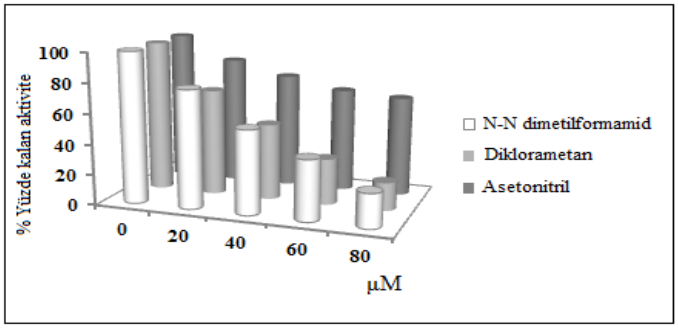
Tripsin hemoglobin denemesinde ise V_{max} 18,58 U, K_m ise 2,26 mg/ml olarak hesaplanmıştır.

3.2. Bilinen İnhibitörlerin α-Kimotripsin Üzerine Etkisi

0,32 - 0,64 - 1,28 – 1,6 mg/ml konsantrasyon aralığında β-merkaptoetanol, EDTA ve sodyumazid' in enzim üzerindeki inhibisyon etkileri Tablo 3.3'teki gibidir.

Tablo 3.3. Bilinen moleküllerin inhibisyon etkileri

	IC 50 Değerleri (mg/ml)
Sodyum Azid	0,95 mg/ml
EDTA	0,36 mg/ml
Merkaptoetanol	0,06 mg/ml



Şekil 3.9. Bazı organik çözücülerin inhibisyon etkisi

20 – 40 – 60 – 80 µM'lık konsantrasyonlardaki organik çözücülerin enzim üzerindeki inhibisyon etkileri grafikteki gibidir.

Bu iki deneme sonrasında çalışmaya doğruluğu tespit edilen yöntem ile devam edilmiştir. Bölüm 3.3'de azolmoleküllerinin IC_{50} değerlerine ve inhibitör türlerine ait grafikler bulunmaktadır.

3.3. Azol Türevi Moleküllerin İnhibisyon Etkileri

Tablo 3.4. Kimotripsinin inhibitör moleküller tarafından inhibisyon değerleri

			Yüzde Kalan Aktivite					
Kimotripsin	IC 50 Değerleri (mg/ml)	İnhibitör Tipleri	İnhibitör Konsantrasyonu (mg/ml)					
			0	0,02	0,04	0,08	0,16	2
1-2, Benzotiyoazol	0,13 mg/ml	Y. yar. inh.	100	80	78,6	72,5	45,7	26,3
Tolutriazol	0,02 mg/ml	Y. yar. inh.	100	36,5	19,4	17,8	8,94	6,1
3-amino-1,2,4-triazol	0,11 mg/ml	Yarışmasız inh.	100	90,2	88,4	66,9	42,4	41,4

Tablo 3.5. Tripsinin inhibitör moleküller tarafından inhibisyon değerleri

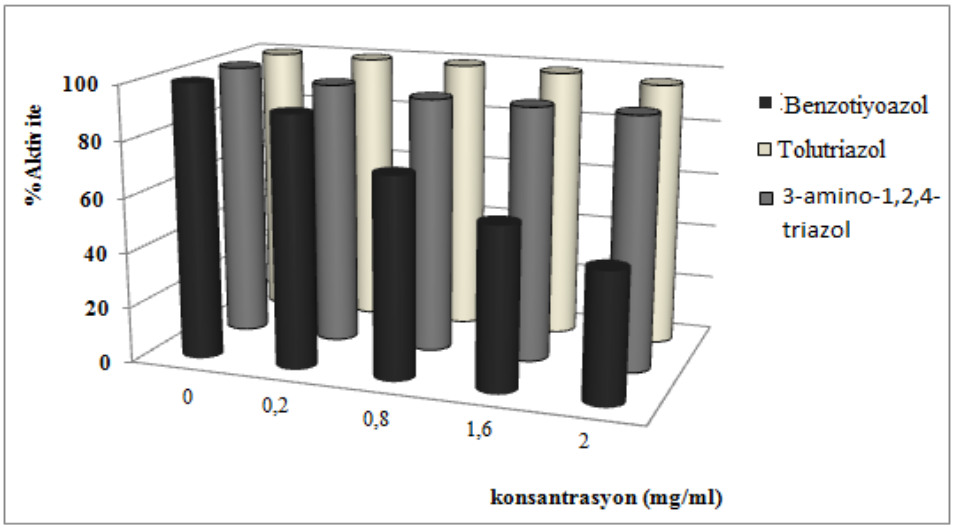
			Yüzde Kalan İnhibisyon					
Tripsin	IC 50 Değerleri (mg/ml)	İnhibitör Tipleri	İnhibitör Konsantrasyonu (mg/ml)					
			0	0,02	0,04	0,08	0,16	2
1-2, Benzotiyoazol	0,09 mg/ml	Yarışmasız inhibisyon	0	86,2	68,1	51,6	35,3	0,02
Tolutriazol	0,04 mg/ml	Yarışmasız inhibisyon	0	67,7	44,2	17,1	3,6	2,3
3-amino-1,2,4-triazol	0,084 mg/ml	Yarışmasız inhibisyon	0	85	71,1	54,5	40,3	5,6

Tablolarda görüldüğü gibi azol türevi moleküller inhibisyonu bilinen birçok moleküle kıyasla çok daha iyi inhibisyon derecelerine sahiplerdir. 3-amino-1,2,4-triazol her iki enzim üzerinde de nonkompetetif inhibisyona neden olurken 1-2, benzotiyoazol ve tolutriazol moleküllerinin kimotripsin üzerinde unkompetetif tripsin enzimi üzerinde ise nonkompetetif bir inhibisyon sağladıkları görülmüştür. En iyi inhibisyon etkisi her iki enzim üzerinde de en iyi IC_{50} değerine sahip olan tolutriazol molekülü tarafından sağlanmıştır.

3.4. Azol Moleküllerinin Antioksidan Etkilerinin İncelenmesi

3.4.1. Azol moleküllerinin DPPH aktivitelerinin belirlenmesi

Azol moleküllerinin serbest radikal giderim aktiviteleri Şekil 3.6'daki gibidir. En iyi inhibisyonu 1,2-benzotiyoazol molekülü sağlamıştır. Diğer iki moleküle kıyasla 1,2-benzotiyoazolün çok daha iyi bir inhibisyona sebep olması azol halkasındaki S varlığından ötürüdür.



Şekil 3.10. Azol moleküllerinin DPPH serbest radikal giderim aktiviteleri

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Proteazlar proteinlerin peptid bağlarını hidroliz eden enzimlerdir. Proteazlar çeşitli peptid zincirlerini hidroliz etme spesifikliklerine göre farklılık gösterirler. Her proteaz, özel bir peptid zincirini parçalamaktadır.

Bu enzim insan vücudunda doğuştan bu yana vardır ve canlı sistemlerde her aşamada görev almaktadırlar. Proteazların bağırsaktan emilimlerinin mümkün olmadığı büyük moleküllerin hidrolizlerini katalizlemeden sorumlu olmaları ne kadar mühimse [8], homoeastaz için de doğru çalışmalarının gerekli olması o kadar mühimdir.

Proteazların hastalıklardaki rolleri de büyüktür. Örneğin, canlı tarafından üretilen proteazın bir hıv proteinini kendi orijinal proteazı ile tam aynı yerden kesebilmesi sebebiyle proteazlar hıv'in canlı hücre içerisinde yaygınlaşmasını kolaylaştırmaktadır. Bu yüzden proteazların aktivitelerini korumak kadar onları inhibe edebilmek de oldukça önemlidir.

Proteazlar endüstride de büyük öneme sahiptirler. Laktik asit bakterileri süt ve süt endüstrisinde, hipoalerjenik bebek mayalarının üretiminde, meyve suları ve alkolsüz içkileri kuvvetlendirmede kullanılırlar. Doku ve lif proteinlerini hidrolizleme güçleri ile etin yumuşatılmasında yine proteazlardan faydalanılmaktadır [90].

Deterjan sektöründe deterjana yıkama sıcaklığından bağımsız olarak kirleri çıkarabilme yeteneği kazandırmalarından ötürü proteazlar tercih edilmektedirler [91].

Temizleme sektörünün çok farklı bir alanı olan lenslerde, proteazlar lenslerin düşük sıcaklıklarda temizlenmesini sağlamaktadırlar [90, 92].

Derinin üretiminde ve tekstil alanında hidroliz yetenekleri sebebiyle kullanılmaktadırlar [92, 93].

İlaç sanayinde geniş bir uygulama alanına sahip olan proteazlar vücuttaki çeşitli ihtiyaçları karşılamak ya da eksik enzim ihtiyacını gidermek için kullanılmaktadırlar. Özellikle sindirim sistemini destekleyici ilaçlarda proteazlar kullanılmaktadır [92].

Cilt bakımı, diş sağlığı, saç bakımında kullanılan kozmetik ürünlerde enzimlerin kullanım alanı her geçen gün artmaktadır [92].

Proteazlar D,L-amino asitlerin sentezlenmesi ve çözündürülmesinde de kullanılmaktadırlar. Hem insanlar hem de evcil hayvanlar için ek besin olarak giderek artan bir öneme sahip olan aminoasitlerden sadece L-amino asitler canlı organizmalar tarafından sindirilebildiği için, kimyasal sentezler sonucu elde edilen rasemik karışımın ticari kullanımdan önce izomerlerine ayrılması gerekmektedir. Ve çeşitli rasemik karışımların çözünmesinde de proteazlar başarıyla kullanılmışlardır [91].

Bizim çalışmamızda ise serin proteaz olan α-kimotripsin ve tripsin aktivitesi üzerine çalışılmış ve öncelikle bu aktivite üzerine çeşitli kimyasalların etkisi incelenmiştir.

Denemede satın alınan α-kimotripsin ve tripsin enzimlerinin aktivitelerini ölçmek için BSA ve hemoglobinin hidrolizi metotu kullanılmıştır. Bu metota göre 500 µl enzim çözeltisine 1 ml substrat çözeltileri eklenerek 40 ^{o}C de 20 dak. bekletilmiştir. Bu süre içerisinde proteaz enzimi sayesinde peptit bağları parçalanmıştır. Daha sonra reaksiyonu durdurmak için 3 ml % 5' lik TCA eklenerek 20 dak. bekletilmiş, karışım 5000 rpm'de 10 dak. santrifüjlenmiş ve süpernatant filtre edilmiştir. Böylece parçalanmayan protein ortamdan uzaklaştırılmış olunmuştur [94].

Spektrofotometrik ölçümde çözünür proteinlerin vereceği absorbans değerleri dikkate alınmıştır. Kör olarak örnekler ile aynı miktarda enzim içeren fakat substrat içermeyen numuneler hazırlanmıştır. Kör çözelti substrat miktarı kadar ekstra tampon içermektedir. Enzim için proteolitik aktivite U aktivite şeklinde hesaplanmıştır.

Araştırmada optimum sıcaklık, optimum pH belirlenmesinde, bazı kimyasalların ve triazol moleküllerinin etkilerin incelenmesinde de bu aktivite tayin yönteminden yararlanılmıştır.

Her iki enzimin her iki substrata karşı K_m ve V_{max} değerlerinin hesaplanması Michealis – Menten grafiğinden faydalanılmıştır. Sabit enzim konsantrasyonuna karşı artan substrat konsantrasyonlarına ait denemenin aktivite sonuçlarıyla çizilen Michealis – Menten grafiğinde enzim doygunluğu görülmüş ve sonrasında Lineweaver –Burk grafiği çizilerek K_m ve V_{max} değerleri hesaplanmıştır.

Lineweaver Burk grafiklerine göre α- kimotripsin – BSA çifti için K_m 15,85 mg/ml, V_{max} 2,3 U hesaplanmıştır. α-kimotripsin- hemoglobin çifti için ise K_m 17,30 mg/ml, V_{max} 1,80 U olarak belirlenmiştir. Tripsin- BSA denemesi sonucunda K_m 10,76 mg/ml, V_{max} 1,21 U ve tripsin – hemoglobin denemesi sonucunda K_m 18,58 mg/ml, V_{max} 2,26 U bulunmuştur.

Aktivite ölçümlerinin sonrasında α-kimotripsinin optimum sıcaklığının belirlenmesi için yapılacak olan denemelere geçilmiş ve enzimin optimal çalıştığı sıcaklık 40 $^{\circ}$C olarak tespit edilmiştir. Literatürde α-kimotripsin enzimi için belirtilen optimum sıcaklık da yine 40 $^{\circ}$C'dir.

Enzimin optimum pH' ı ise 0,1 M pH 8 Tris-HCl tamponu olarak tespit edilmiştir.

Sonrasında enzim aktivitesinin üzerine 0,5 M' lık stoklardan seyreltilen β-merkaptoetanol ve sodyumazidin etkisi incelenmiştir. Bulgular kısmında da görüldüğü gibi her iki kimyasal da enzimi inhibe etmişler fakat inhibisyon etkileri kıyaslanacak olunursa IC_{50} değeri 0,4 mg/ml olan β-merkaptoetanol IC_{50} değeri 0,75 mg/ml olan sondyumazid'e göre daha iyi bir inhibisyon göstermiştir. Yine bu deneme için de α-kimotripsinin BSA hidrolizi metotu kullanılmıştır.

Yine α-kimotripsin inhibisyonu için DMF, diklorametan ve asetonitril kullanılmıştır. Bunun için de proteolitik aktivite enzimin parçaladığı substrat miktarının tespiti metotuyla ölçülmüş ve her üç organik çözücünün de enzimi inhibe ettiği fakat en az inhibisyonu gösteren asetonitrilin belirlenen konsantrasyon aralıklarında enzim aktivitesini yarıya düşürecek kadar inhibisyon yeteneğinin olmadığı belirlenmiştir. DMF in IC_{50} değeri 49 μM, diklorametanın ise 43,44 μM olarak hesaplanmıştır.

Çalışmanın asıl kısmında azol moleküllerinin proteaz üzerindeki inhibisyon etkileri ve DPPH aktiviteleri denemeleri yer almaktadır. Litaratüre bakıldığında, azollerin çeşitli proteazlar üzerine inhibisyon etkileri araştırıldığı görülmektedir.

Christian Oefner 2003'de metiyonil aminopeptidazlar üzerine azol türevlerinin inhibisyonu üzerine çalışmışlardır. Çalışmaları sonucu ise 1,2,4–tiyoazol türevlerinin sahip olduğu iki azotun enzimin aktif bölgesindeki divalent iki kobalt iyonu ile etkileşime girerek inhibisyona yol açtıklarını bulmuşlardır [82]. Benzer şekilde 2011'de Ya-Ping Hou ve arkadaşları kanser tedavisinde azol türevlerini kullanmışlar ve 1,4–benzodioksan içeren 1,2,4–azollerinin metiyonin aminopeptidaz inhibisyonunu sağlayarak antitümör ajanları olarak kullanılabileceklerini göstermişledir [83].

N. K. Terrett 2007'de proteazlar üzerinde azollerin inhibisyon etkilerini incelemiş ve başarılı sonuçlar elde etmiştir [95]. Debendra K. Mohapatra ve arkadaşları da 2009'da serin proteazlar üzerinde tetrasiklik triazollerin inhibisyonunu tespit etmişlerdir [85].

Yang Jiang, Trond Vidar Hansenisatin 2011'de; 1,2,3-triazollerin sistein proteazlar sınıfına dahil kaspaz üzerinde yarışmalı bir inhibisyona sebep olduklarını tespit etmişlerdir [84].

Yine 2011'de Rogelio Siles ve çalışma arkadaşları azol içeren sülfamidlerin serin proteazlar üzerindeki inhibisyon etkilerini araştırmışlardır [86].

Bizim çalışmamızda ise hazır olarak temin edilen, inhibisyonları ve inhisyonlarının önemi bilinen triazol moleküllerinden henüz serin proteazlar üzerinde inhibitör olarak hiç denenmemiş üç molekülün inhibisyonu denemeleri gerçekleştirilmiştir. Sonrasında ise azol moleküllerinin DPPH aktiviteleri ve folin içerikleri belirlenmiştir.

Sonuç olarak:

1. Enzim aktivitesi denemelerinde V_{max} ve K_m değerleri her enzim- substrat çifti için hesaplanmıştır.

2. α-kimotripsinin optimum pH'ı 8, optimal aktivite gösterdiği sıcaklık ise 40 $^{\circ}$C bulunmuştur.

3. Her iki enzim üzerinde bazı kimyasalların etkisi incelenmiş asetonitril haricinde tüm kimyasalların enzimin aktivitesini yarıya düşürebileceği görülmüştür.

4.Tolitriazol, benzotiyoazol ve 3-amino-1,2,4-triazol enzim üzerindeki inhibisyonları denenmiş ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. En iyi inhibitörün ise tolitriazol olduğu belirlenmiştir.

5. Üç azol molekülünün DPPH aktiviteleri incelenmiş ve litaratüre de uygun olarak da 1-2, benzotiyoazol molekülünün en iyi derecede serbest radikal giderim aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir.

Çalışma sonunda elde edilen başarılı sonuçlar bu azol moleküllerinin diğer proteaz tipleri içinde inhibisyon etkisine sahip olabileceği fikrini kazandırmıştır. Ayrıca DPPH aktiviteleri bakımdan da oldukça başarılı çalışmalar gerçekleştirebilineceği görülmüştür. Canlı sistemlerde her aşamada etkili olan proteazların hastalıklardaki rollerinin de büyük olduğu bilindiğinden çalışma bu yeni moleküllerin farklı tip proteazların inhibisyonları çalışmalarına da öncülük edecektir. Ayrıca bu üç yeni molekülün sadece proteazlar üzerinde değil diğer enzimler üzerindeki inhibisyon etkilerinin ve antioksidan aktivitelerinin de belirlenmesi süregelen çalışma planlarımızın içerisindedir.

KAYNAKLAR

[1] Hochster R. M., Kates M., Quastel J. H., *Metabolic Inhibitors*, 1st ed., Academic Press, New York, 1965.

[2] Yıldız U., İmmobilize glukomilaz ile maltodekstrinden glukoz üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, 2000, 98298.

[3] Öner N. K., Zorunlu alkalifilik bacillus marmariensis gmbe 72 soyundan izole edilen alkalen proteaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu, Doktora Tezi, Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsi, Kocaeli, 2009, 259381.

[4] John F. K., Enzyme Technology, Editors: Rehm. H. J., Reed G., *Biotechnology*, 2nd ed., VCH Press, New York, 37-62, 1987.

[5] Whitford D., *Proteins:structure and function*, 1st ed., John Wiley& Sons Ltd, USA, 2005.

[6] Berg J. S., Powell B. C., Cheney R. E., Amillennial myosin census, *Molecular Biology of the Cell*., 2001, **14**, 780–794.

[7] Hunter T., Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling, *Cell.*, 1995, **80**, 225–236.

[8] Mackie R. I., White B. A., Recent advances in rumen microbial ecology and metabolism: potential impact on nutrient output, *Journal of Dairy Science*, 2010, **73**, 2971–2995.

[9] Meighen E. A., Molecular biology of bacterial bioluminescence, *Microbil Reviews*, 1991, **55**, 123–142.

[10] http://tr.wikipedia.org/wiki/Enzim (Ziyaret Tarihi: Şubat 2008)

[11] Wiseman A., The application of enzymes in industry, Editor: Wiseman A., *Hanbook of Enzyme Biotecnology*, 2nd ed., New York, 274 – 373. 1987.

[12] Aehle W., *Enzymes in Industry Production and Applications*, 2nd ed.,Wiley-VCH, New York, 2004.

[13] Krajewska B., Applicaiton of chitin and chitosan based materials for enzyme immobilization, *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, **35**, 126-139.

[14] Ottrup H. S. T., The importance of Bacillus species in the production of industrial enzymes, Editor: Berkley R., *Applications and systems of Bacillus and Relatives*, 2nd ed., Blackwell Science, Massachusetts, 206-208, 2002.

[15] Kasavi C., Kovalent bağlanma ve fiziksel adsorbsiyon metodları ile proteaz enziminin immobilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2006, 223313.

[16] Genckal H., Tarı C., Alkaline protease production from Bacillus sp. isolated from natural habitat, *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, **39**, 703-710.

[17] http://www.touregypt.net (Ziyaret Tarihi: 2009)

[18] D'reaumur R., Observations sur la digestion des oiseauxé, *Histoire de l'academie royale des sciences*, 2006, **461**, 1752-1753.

[19] Aunstrup K., Industrial production of proteolytic enzymes, Editors: Spencer B, *Industrial Aspects of Biochemistry*, 1st ed., American Elsevier, New York, 23-46, 1974.

[20] Hoffman-Ostenhof O., *Enzymologie*, 1st ed., Springer, Wien, 1954.

[21] Keay L., Moseley M. H., Anderson R. G, O'Connor R.J., Production and isolation of microbial proteases, Editors: Wingard B. L., *Enzyme Engineering Biotechnology and Bioengineering Symposium*, 1st ed., Interscience Publishers, New York, 63-92, 1972.

[22] Takamine J., Preparing and making taka-koji, *U.S.Patent*, 1894, 525-820.

[23] Rohm O., Preparation of hides fort he manufacture of leather, *U.S. Patent*, 1908, 886-411.

[24] Uhlig H., *Industrial Enzymes and Their Applications*, 2nd ed., John Wiley & Sons, USA, 1998.

[25] Neurath H., Proteolytic enzymes: past and future, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999, **96**, 10962-10963.

[26] Balk M., Bazı Bacillusların ekstraselüler proteazlarının özellikleri ve üretim koşullarının optimizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1991, 16585.

[27] James E. B., David F. O., *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2nd ed., McGraw Hill Book Company, USA, 1986.

[28] Blake C. C., Koenig D. F., Maig G. A., Sarma V. R., Structure of hen egg-white lysozyme: A three-dimensional fourier synthesis at 2 angstrom resolution, *Nature*, 1965, **32**, 757–761.

[29] Bugg T., An introduction to enzyme and coenzyme chemistry, *Blackwell Science*, 1996, **45**, 657-689.

[30] Rao M. B., Tanksale A. M., Ghatge M. S., Deshpande V. V., Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998, **62**, 597-635.

[31] Polaina J., Maccabe A. P., *Industrial Enzymes: Structure, Function And Application*, 1st ed., Springer, Netherlands, 2007.

[32] Uhlig H., *Industrial Enzymes and Their Applications*, 1st ed., John Wiley &Sons, USA, 1998.

[33] Ward O. P, Proteolytic Enzymes, Editors: Moo-Young M., *Comprehensive Biotechnology*, 1st ed., Pergamon Press, Great Britain, 789-818, 1985.

[34] http://en.wikipedia.org/wiki/Bromelain (Ziyaret Tarihi: Kasım 2006)

[35] http://en.wikipedia.org/wiki/Pepsin (Ziyaret Tarihi: Kasım 2006)

[36] Kiran E. O., Comlekcioglu U., Dostbil N., Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları, *Journal of Science and Engineering*, 2006, **9**, 12-19.

[37] Sevinç N., Türkiye topraklarından elde edilen Bacillus SP. suşlarından proteaz üretimi, kısmi saflaştırılması ve karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa, 2010, 259668.

[38] http://merops.sanger.ac.uk/about/about_9.htlm (Ziyaret Tarihi: Ocak 2005)

[39] Tanksale M. A., Molecular aspects of a fungal alkaline protease, Doktora Tezi, University of Pune, National Chemical Laboratory, Pune, 2001.

[40] Szecsi P. C., Koch B., Seminal pepsinogen C is not identical with, but is very similar to gastric pepsinogen, *FEBS Letters*, 1992, **101**, 238-239.

[41] Kenny A. J., Nomenclature and Classes of Peptidases, In Proteolytic Enzymes Tools and Targets, Editors: Sterchi E. E., Stöcker W., *Proteolytic enzymes - Tools and Targets*, 1st ed., Springer-Verlag, Berlin, 1-8, 1999.

[42] Gençkal H., Studies on Alkaline Protease Production from Bacillus sp., Yüksek Lisans Tezi , İzmir İleri Teknoloji Enstitüsü, İzmir, 2004, 152037.

[43] Edwards D. R., Handsley M. M., Pennington C. J., Metalloproteinases, *Molecular Aspects of Medicine*, 2008, **2**, 258-289.

[44] Metzler D. E., *Biochemistry: the chemical reactions of living cells*, 2nd ed., Harcourt Academic Press, San Diego, 2001.

[45] Rao M. B., Tanksale A. M., Ghatge M. S., Deshpande V. V., Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998, **62**, 597-635.

[46] http://www.richmond.edu/~bell2/protease_biochem.march05.ppt (Ziyaret tarihi: 15 Kasım 2006).

[47] Walsh G., *Proteins Biochemistry and Biotechnology*, 2nd ed., John Wiley&Sons, USA, 2002.

[48] Anwar A., Saleemuddin M., Alkaline proteases: A review, *Bioresource Technology*, 1998, **64**, 175-183.

[49] http://www.sb.fsu.edu/~chapman/Classes/Bch5505/Content/proteases (Ziyaret Tarihi: Ocak 2008)

[50] Dodson G., Wlodawer A., Catalytic triads and their relatives, *Trends İn Biochemical Sciences*, 1998, **23**, 347-352.

[51] http://chemical-quantumimages.com/chymotrypsin.html (Ziyaret Tarihi: 21 Ekim 2008).

[52] Bugg T., An Introduction to enzyme and coenzyme chemistry, *Blackwell Science*, 1996, **19**, 657-689.

[53] Voet D., Voet J. G., *Biochemistry*, 3rd ed., John Wiley & Sons, USA, 2004.

[54] http://delphi.phys.univtours.fr/Prolysis/Images/tyrpsine.jpeg (Ziyaret tarihi: 15 Kasım 2006).

[55] http://en.wikipedia.org/wiki/Trypsin (Ziyaret tarihi: 15 Kasım 2006).

[56] http://www.mustafaaltinisik.org.uk/geribildirimler.html (Ziyaret Tarihi: Ocak 2009)

[57] Georgopapadakou N. H., Antifungals: mechanism of action and resistance, established and novel drugs, *Current Opinion in Microbiology*, 1998, **1**, 547-548.

[58] Joule J. A., Mills K., *Heterocyclic Chemistry*, 3rd ed., Blackwell Science, Cambridge, 1995.

[59] Delgando Z. N., Remers A. W., *Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry*, 10nd ed., Zipincott Raven Publishers, Philadelphia, 1998.

[60] Joseph-Horne T., Hollomon D. W., Molecular mechanism of azole resistance in fungi, *Microbiology Letters*,1997, **149**, 141-142.

[61] Bennet J. E., Antimicrobial agents-antifungal agents, Editors: Hardman J. G., Limbird L. E., Molinoff P. B., Ruddon R. W., Gilman A. G., *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 2nd ed., The McGraw-Hill Companies, New York, 1175, 1996.

[62] Georgopapadakou N. H., Dix B. A., Smith S. A., Freudenburger J., Funke P. T., Effect of antifungal agents on lipid biosynthesis and membrane integrity in candida albicans, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1987, **31**, 46-47.

[63] Georgopapadakou N. H., Walsh T. J., Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1996, **40**, 279-283.

[64] Shimokawa O., Nakayama H., Increased sensitivity of candida albicans cells accumulating 14α-methyylated sterols to active oxygen: possible relevance to in vivo efficacies of azole antifungal agents, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1992, **36**, 1926-1927.

[65] Dalgıç N., İnce E., Sistemik etkili antifungal ilaçlar, *Klinik Pediatri*, 2005, **4**, 90-98.

[66] http://en.wikipedia.org/wiki/Imidazole (Ziyaret Tarihi: Ağustos 2012)

[67] Heeres J., Backx L. J. J., Mostmans J. H., Antimyotic imidazoles, synthesis and antifungal activity of ketoconazole: A new potent orally active broadspectrum antifungal agent, *Journal of Medicinal Chem*istry, 1979, **22**, 1003.

[68] Thienpont D., Nueten J. V., Niemegeers C. J. E., Marsboom R., Biological and toxicogical propertied econazole, a broad-spectrum antimycotic, *Arnzneimittel-Forschung Drug Research*, 1975, **25**, 224-226.

[69] Rawn D., *Biochemistry*, 2nd ed., Biological Supply Company, Caroline, 1989.

[70] Henderson J. T., *Recent trends in the in the discovery, development and evaluation of antifungal agents*,1st ed., J. R. Prous Publishers, Barcelona, 1987.

[71] http://en.wikipedia.org/wiki/File:Itraconazoles_structures.png (Ziyaret Tarihi: Ağustos 2012)

[72] http://sl.wikipedia.org/wiki/Vorikonazol (Ziyaret Tarihi: Ağustos 2012)

[73] Siddiqui N. M., Arshad F., Ahsan W., Alam M. S., Thiazoles: a valuable insight into the recent advances and biological activities, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, 2009, **1**, 136-143.

[74] Santhosh P., Vedula R. R., A facile one-pot synthesis of thiazoles and thiazolyl-pyrazole derivatives via multicomponent approach, *Organic Communications*, 2012, **5**, 143-149.

[75] Narsaiah A. V., Ghogare R. S., Biradar D. O., Glycerin as alternative solvent for the synthesis of thiazoles, *Organic Communications*, 2011, **4**, 75-81.

[76] Maya J. D., Cassels B. K., Patricio I., Ferreira J., Faúndez M., Galanti N., Ferreira A., Morello A., Mode of action of natural and synthetic drugs against trypanosoma cruzi and their interaction with the mammalian host, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2007, **146**, 601-620.

[77] Apt W., Arribada A., Zulantay I., Sanchez G., Vargas S. L., Rodriguez J., Itraconazole or allopurinol in the treatment of chronic american trypanosomiasis: the regression and prevention of electrocardiographic abnormalities during 9 years of follow-up, *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 2003, **97**, 23–29.

[78] Urbina J. A., Concepción J. L., Caldera A., Payares G., Sanoja C., Otomo T., Hiyoshi H., In vitro and in vivo activities of E5700 and ER-119884, two novel orally active squalene synthase inhibitors, against trypanosoma cruzi, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2004, **48**, 2379–2387.

[79] Sugane T., Tobe T., Hamaguchi W., Shimada I., Maeno K., Miyata J., Suzuki T., Kimizuka T., Morita T., Sakamoto S., Tsukamoto S., Synthesis and biological evaluation of (4H-1,2,4-triazol-4-yl)isoquinoline derivatives as selective glycine transporter 1 inhibitors, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2011, **5**, 1-8.

[80].Wuest F., Tang X., Kniess T., Pietzsch J., Suresh M., Synthesis and cyclooxygenase inhibition of various (aryl-1,2,3-triazole-1-yl)-methanesulfonylphenyl derivatives, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2009, **17**, 1146–1151.

[81] Almajan G. l., Innocenti A., Puccetti L., Manole G., Barbuceanu S., Saramet I., Scozzafava A., Supuran T. C., Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of the cytosolic and tumor-associated carbonic anhydrase isozymes I, II, and IX with a series of 1,3,4-thiadiazole- and 1,2,4-triazole-thiols, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2005, **15**, 2347–2352.

[82] Oefner C., Douangamath A., Darcy A., Mareque S., Sweeney A., Padilla J., Schulz S. P. H., Thormann M., Wadman S., Dale G. E., The 1.15 A crystal structure of the staphylococcus aureus methionyl-aminopeptidase and complexes with triazole based inhibitors, *Journal of Molecular Biology*, 2003, **332**, 13–21.

[83] Hou Y., Sun J., Pang Z. L. P., Li D., Yan L., Zhang H., Zheng E., Zhao J., Zhu H., Synthesis and antitumor activity of 1,2,4-triazoles having 1,4-benzodioxant fragment as a novel class of potent methionine aminopeptidase type II inhibitors, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2011, **19**, 5948–5954.

[84] Jiang Y., Hansen T. V., Isatin 1,2,3-triazoles as potent inhibitors against caspase-3, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2011, **21**, 1626–1629.

[85] Mohapatra D. K., Maity P. K., Shabab M., Khan M. I., Click chemistry based rapid one-pot synthesis and evaluation for protease inhibition of new tetracyclic triazole fused benzodiazepine derivatives, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2009, **19**, 5241–5245.

[86] Siles R., Kawasaki Y., Ross P., Freire E., Synthesis and biochemical evaluation of triazole/tetrazole-containing sulfonamides against thrombin and related serine proteases, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2011, **21**, 5305–5309.

[87] Gökalp N., Doğal Antioksidanlar, Tezsiz Yüksek Lisans Dönem Projesi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2006.

[88] Jaishree V., Ramdas N., Sachin J., Ramesh B., In vitro antioxidant properties of new thiazole derivatives, *Journal of Saudi Chemical Society*, 2012, **16**, 371–376.

[89] Hassan F. A., Synthesis, characterization, anti-inflammatory and antioxidant activities of some new thiazole derivatives, *International Journal of Applied Science and Technology*, 2012, **2**, 180-187.

[90] Öztürk M. H., Partial purification and characterization of alkaline proteases from isolated bacillus strains, Yüksek Lisans Tezi, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2005, 166336.

[91] Özçömlekçi E., Proteaz enziminin glutaraldehit kullanarak kovalent bağlanma ile immobilizasyonunda optimum şartların belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İ.T.Ü., İstanbul, 2006, 223313.

[92] Gerze A., Proteaz enziminin bacillus subtilis megatherium ve bacillus polymxa bakteri türlerinden kısmi saflastırılması ve özelliklerinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İ.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2003, 142684.

[93] Anwar A., Saleemuddin M., Alkaline Protease: A review, *Biosource Technology*, 1997, **64**, 175-183.

[94] Fadıloğlu S., Immobilization and characterization of ficin, *Nahrung/Food*, 2001, **45**, 143-146.

[95] Terrett N. K., Combinatorial chemistry, *An Online Journal*, 2007, **9**, 31-35.

ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında Kocaeli'de doğdu. İlköğretimi ve liseyi Kocaeli'de okudu. 2006 yılında İzmit Anadolu Lisesi'nden mezun oldu. Aynı yıl Ege Üniversitesi Fen-Fakültesi Biyokimya Bölümü'nü kazandı. 2010 yılında bu bölümden mezun oldu. Mezun olduğu yıl Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde Kimya anabilim dalında biyokimya üzerine yüksek lisans programına başladı ve 2012 yılında yüksek lisansını bitirdi.