



**HORSERADISH PEROKSİDAZ (HRP) ENZİMİ
ÜZERİNE BAZI BENZOHİDRAZİD
TÜREVLERİNİN ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Deniz EREL

**Yüksek Lisans Tezi
Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Bilim Dalı
Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR
2019**

Her hakkı saklıdır

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**HORSERADISH PEROKSİDAZ (HRP) ENZİMİ ÜZERİNE BAZI
BENZOHİDRAZİD TÜREVLERİNİN ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Deniz EREL

**KİMYA ANABİLİM DALI
Biyokimya Bilim Dalı**

**ERZURUM
2019**

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

“HORSERADISH PEROKSİDAZ ENZİMİ (HRP) ÜZERİNE BAZI
BENZOİDRAZİD TÜREVLERİNİN ETKİSİNİN İNCELENMESİ”

Prof. Dr Hasan ÖZDEMİR danışmanlığında, Deniz EREL tarafından hazırlanan bu çalışma 26/03/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı - Biyokimya Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

İmza :

Üye : Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

İmza :

Üye : Doç. Dr. Veysel ÇOMAKLI

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu'nun **04.04/2019** tarih ve **...15.../...20....** nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet KARAKAN
Enstitü Müdürü

Bu çalışma Tübitak 1001 projesi kapsamında desteklenmiştir.
Proje No:215Z386

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

HORSERADISH PEROKSİDAZ (HRP) ENZİMİ ÜZERİNE BAZI BENZOHİDRAZİD TÜREVLERİNİN ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Deniz EREL

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

Bu çalışmada, Horseradish peroksidaz enziminin inhibitörleri olan 3-Amino benzohidrazid ve 4-Amino benzohidrazid türevi moleküller kullanılarak tek basamakta saflaştırılması için etkili ve yeni afinite ligantlarının belirlenmesi hedeflendi. Bu amaçla, literatürde bulunan bitki peroksidaz POD saflaştırma çalışmalarına katkı sağlamak için 3-amino benzohidrazid ve türevleri olan 3-amino 5-metil benzohidrazid, 3-amino 5-metoksi benzohidrazid ve 4-amino benzohidrazid ve türevleri olan 4-amino 2-nitro benzohidrazid, 4 amino 3-nitro benzohidrazid molekülleri sentezlendi ve POD enziminin saflaştırılmasında kullanıldı. 3-Amino benzohidrazid türevi ve 4-amino benzohidrazid türevi moleküllerin metilbenzoat formlarından hidrazin sentezleri yapılarak Horseradish Peroksidaz (HRP) enzimi üzerine inhibisyon etkileri incelendi ve dönüşümlü inhibisyon gösteren moleküller Sepharose-4B-L-Tirozin jel materyaline bağlanarak elde edilen afinite jelleri tek kademedede Horseradish peroksidaz (HRP) enziminin saflaştırılması gerçekleştirildi. 3-Amino 5-metil benzohidrazid molekülü kullanılarak HRP enzimi ile %2,21 verimle 70,3 kat; 3-amino 5-metoksi benzohidrazid ile %2,39 verimle 135,43 kat; 4-amino 2-nitro benzohidrazid ile %6,5 verimle 151,7 kat, 4-amino 3-nitro benzohidrazid kullanılarak %1,2 verimle 60,3 kat saflaştırıldı. HRP enziminin molekül ağırlığı ve saflığı sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile kontrol edildi ve 43-47 kDa'da aralıklarında tek bant gözlemlendi. Tüm kolonların saflaştırma sonuçları karşılaştırıldı ve en iyi kolon materyali olan Sepharose-4B-L-Tirozin-4-amino-2-nitro benzohidrazid kolonu ile Sepharose-4B-L-Tirozin-3-amino-5-metoksi benzohidrazid için kolon tutma kapasitesi, HRP enzimi için değişik pH, sıcaklık, iyonik şiddetlerde çalışıldı. Horseradish POD enzimi 4-amino-2-nitro benzohidrazid kolonu için optimum şartlar: pH 7,5 sıcaklık 20°C ve iyonik şiddet 0,3 M konsantrasyonunda optimum bağlanma 2060 µg/g jel ve 3-amino-5-metoksi benzohidrazid kolonu için optimum şartlar: pH 7 sıcaklık 20°C ve iyonik şiddet 0,2 M aynı şartlar altında 2363,3 µg/g jel olarak tespit edildi.

2019, 67 sayfa

Anahtar Kelimeler: Horseradish Peroksidaz, afinite kromatografisi, saflaştırma, inhibisyon, kapasite

ABSTRACT

Master Thesis

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF SOME BENZOHAZIDE DERIVATIVES ON HORSERADISH PEROXIDASE (HRP) ENZYME

Deniz EREL

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry
Biochemistry Division

Supervisor: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

In the current study, it was aimed to determine the effective and novel affinity ligands using 3-amino benzohydrazide and 4-amino benzohydrazide derivative molecules, which are inhibitors of the enzyme, for purification of the enzyme in one step. For this aim, 3-amino benzohydrazide and its derivatives which are 3-amino 5-methyl benzohydrazide, 3-amino 5-methoxy benzohydrazide and 4-amino benzohydrazide and its derivatives which are 4-amino 2-nitro benzohydrazide and 4-amino 3-nitro benzohydrazide molecules were synthesized in order to contribute to the purification studies on plant peroxidase enzymes (POD) in the literature and used purification of POD enzyme. Hydrazine synthesis were done from the methyl benzoate forms of the 3-amino benzohydrazide and 4-amino benzohydrazide derivatives and investigated the inhibition effects on HRP enzyme. Molecules with reversible inhibition were bound to Sepharose-4B-L-Tyrosine gel material and HRP enzyme was purified in single step. Using 3-amino 5-methyl benzohydrazide molecule, HRP enzyme was purified with a yield of 2,21%, 70,3 fold, using 3-amino 5-methoxy benzohydrazide with a yield of 2.39%, 135.43 fold, using 4-amino 2-nitro benzohydrazide with a yield 6.5 fold 151,7 fold, using 4-amino 3-nitro benzohydrazide with a yield of 1.2%, 60.3 fold. HRP enzyme purity and molecular weight were controlled by sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and single band were observed at 43-47 kDa. The purification results of all the column material were compared and the column holding capacity was studied in different pH, temperature and ionic strengths for HRP enzyme using Sepharose-4B-L-Tyrosine-4-amino-2-nitro benzohydrazide and Sepharose-4B-L-Tyrosine-3-amino-5-methoxy benzohydrazide column, which are the best column materials. Optimum parameters for Horseradish POD enzyme were determined as 7.5 for pH, 20°C for temperature, 0.3 M for ionic intensity and 2060 µg/g gel for optimum binding for 4-amino 2-nitro benzohydrazide coloumn and optimum parameter for Horseradish POD enzyme were determined as 7 for pH, 20°C for temperature, 0.2 M for ionic intensity and 2363.3 µg/g gel for optimum binding for 3-amino 5-metoxy benzohydrazide coloumn.

2019, 67 pages

Keywords: Horseradish Peroxidase, affinity chromatography, purification, inhibition, capacity

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmanın deneysel kısmı Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR yönetiminde, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Yürütülen bu çalışma sürecinde verdiği geri bildirimlerle bana rehberlik eden, kişiliğiyle, babacanlığıyla ve akademik birikimiyle bana rol model olan değerli tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR'e en içten teşekkürlerimi ve saygılarımı sunmayı borç bilirim.

Ayrıca Kimya Bölümü Biyokimya Bilim Dalı öğretim üyelerinden değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVOĞLU'na ve Prof. Dr. Sayın İlhami GÜLÇİN'e, teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgilerini ve zamanını benden esirgemeyen Sayın Dr. Öğr. Üyesi Aykut ÖZTEKİN, Sayın Arş. Gör. Dr. Ramazan KALIN, Sayın Dr. Yeliz DEMİR, Sayın Dr. Hatice Esra DURAN, uzman Songül BAYRAK ve laboratuvar arkadaşlarım Serpil GERNİ ve Ziya DAĞALAN'a teşekkür ederim.

Hayatım boyunca aldığım kararlarda bana güvenen, desteğini esirgemeyen anneme, babama ve kardeşlerime, bu zorlu süreçte bana destek olan sevgili arkadaşlarım Nihal ŞİMŞEK ve Sebile SAĞLAM'a ayrıca bu yola baş koymama vesile olan sevgili arkadaşım Esra ERDEN'e sonsuz sevgilerimi sunarım.

Ayrıca tez çalışmamı 215Z386 nolu proje kapsamında destekleyen TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Deniz EREL

Mart, 2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Enzim Aktivitesi ve Miktar Tayini.....	1
1.2. Peroksidazlar (POD:H ₂ O ₂ -Oksidoredüktaz EC 1.11.1.7)	3
1.3. Horseradish (<i>Armoracia rusticana</i>) Peroksidazı (HRP)	6
1.4. Afinite Kromatografisi	8
2. KAYNAK ÖZETLERİ	12
2.1. Çalışmanın Amacı	13
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	15
3.1. Materyal.....	15
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	15
3.1.2. Kullanılan alet ve cihazlar	16
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması	16
3.1.3.a. Kolon materyali hazırlanmasında kullanılan çözeltiler	17
3.1.3.b. Homojenat hazırlanmasında kullanılan çözeltiler	17
3.1.3.c. Afinite kolonunda kullanılan çözeltiler	18
3.1.3.d. Enzim aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler:.....	18
3.1.3.e. Bradford yöntemiyle protein tayini için kullanılan çözelti.....	18
3.1.3.f. Lowry yöntemiyle protein tayini için kullanılan çözelti	19
3.1.3.g. Elektroforezde kullanılan çözeltiler	19
3.1.3.h. İnhibisyon çalışmalarında kullanılan moleküllerin stok konsantrasyonları	21
3.2. Yöntem	21
3.2.1. Protein tayini	21

3.2.1.a. Kalitatif protein tayini	21
3.2.1.b. Bradford yöntemi ile protein tayini	21
3.2.2. Horseradish Peroksidaz aktivitesi tayini	22
3.3. Horseradish (At turpu) Bitkisinden Peroksidaz Enziminin Saflaştırılması	
Çalışmaları	24
3.3.1. Ligand seçimi	24
3.3.2. Benzohidrazid türevlerinin sentezlenmesi.....	25
3.3.2.a. 4-Amino Benzohidrazid türevlerinin sentezlenmesi	25
3.3.2.b. 3-Amino Benzohidrazid türevlerinin sentezlenmesi	25
3.3.3. İnhibitör çalışmaları	26
3.3.3.a. 4-Amino benzohidrazid ve türevlerinin enzim aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesi	26
3.3.3.b. 3-Amino benzohidrazid ve türevlerinin enzim aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesi	27
3.3.4. Sepharose-4B-L-tirozin afinite jelinin hazırlanması	27
3.3.4.a. CNBr ile aktifleştirilmiş sepharose-4B'ye tirozin takılması	28
3.3.4.b. Aminobenzohidrazid ve türevlerinin kenetlenmesi	29
3.3.5. Afinite kolonlarının paketlenmesi	31
3.3.5.a. Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu.....	31
3.4. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi İle Enzim Saflığının Belirlenmesi	31
3.5. Afinite Kolonunun Peroksidaz Enzimini Tutma Kapasitesinin Bulunması	33
3.5.1. pH'nın kolon kapasitesine etkisi	33
3.5.2. Sıcaklığın kolon kapasitesine etkisi	34
3.5.3. İyonik şiddetin kolon kapasitesine etkisi.....	34
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	35
4.1. Horseradish Peroksidaz Enzimi ile İlgili Yapılan Araştırma Bulguları	35
4.1.1. Kantitatif protein tayini için kullanılan standart grafik	35
4.2. Horseradish Bitkisinden Peroksidaz Enzimi Saflaştırılması Sonuçları.....	36
4.2.1. Horseradish peroksidaz enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırma sonuçları	36
4.2.2. Horseradish peroksidaz enziminin Benzohidrazid türevlerinin saflaştırma sonuçları	37

4.2.2.a. 4-Amino benzahidrazid türevlerinin saflaştırılması	37
4.2.2.b. 3-Amino benzahidrazid türevlerinin saflaştırılması	38
4.2.3. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi sonuçları	39
4.3. Amino Benzohidrazid Türevlerinin Sentezlenmesi	40
4.4. Sentezlenen 4-Amino Benzohidrazid ve 3-Amino Benzohidrazid Türevlerinin Ki ve IC ₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi	43
4.4.1. 4-Amino 2-nitro benzohidrazid inhibitörü için Horseradish (<i>Armoracia rusticana</i>) POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan kinetik çalışmalar	43
4.4.2. 4-Amino 3-nitro benzohidrazid inhibitörü için Horseradish (<i>Armoracia rusticana</i>) POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan kinetik çalışmalar	46
4.4.3. 3-Amino 5-metil benzohidrazid inhibitörü için Horseradish (<i>Armoracia rusticana</i>) POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan kinetik çalışmalar	49
4.4.4. 3-Amino 5-metoksi benzohidrazid inhibitörü için Horseradish (<i>Armoracia rusticana</i>) POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan kinetik çalışmalar	52
4.5. 4-Amino 2-nitro benzohidrazid ve 3-Amino 5-metoksi Benzohidrazid Molekülleri ile Hazırlanan Afinite Kolonunun Horseradish Peroksidaz Enzimi Tutma Kapasitesinin Belirlenmesi	55
4.5.1. pH'nın kolon kapasitesine etkisi sonuçları	56
4.5.2. Sıcaklığın kolon kapasitesine etkisi sonuçları	57
4.5.3. İyonik şiddetin kolon kapasitesine etkisi sonuçları	58
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	59
KAYNAKLAR	65
ÖZGEÇMİŞ	68

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ABTS	2,2'- azino-bis 3-etilbenzotiazolin-6-sulfonic asit
DMSO	Dimetil sülfoksit
E.C.	Enzim kod numarası
E.Ü.	Enzim ünitesi
ES	Enzim-Substrat
HRP	Horseradish Peroxidase (At turpu peroksidazı)
K_i	Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti
K_M	Maksimum hızın yarısına neden olan substrat derişimi
PABH	Para amino benzoikhidrazid (4-amino benzohidrazid)
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PER	Amonyum persülfat
POD	Peroksidaz
SDS	Sodyum dodesilsülfat
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin
Tris	Trihidroksimetil aminometan
IC ₅₀	Enzimin aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Peroksidazın katekol substratını kullanarak hidrojen peroksiti giderme mekanizması	4
Şekil 1.2. Guaiakol substratının peroksidaz enzimi tarafından guaiakolun renkli oksidasyon ürünlerine çevrilme mekanizması	5
Şekil 1.3. Guaiakol substratı varlığında peroksidaz enziminin reaksiyon katalizleme döngüsü	5
Şekil 1.4. At Turpu (<i>Armoracia Rusticana</i>)	7
Şekil 1.5. HRP C'nin x ışını kristal yapısı	7
Şekil 1.6. Afinite kromatografisinin genel prensibi	9
Şekil 1.7. Küçük molekül kütlelerinde uzantı kolu.....	10
Şekil 1.8. Afinite kromatografisinin prosedürü.....	11
Şekil 3.1. Guaiakol substratının yükseltgenme mekanizması.....	22
Şekil 3.2. Horseradish Peroksidaz (HRP) inhibitörü ve ligand olarak kullanılan moleküller	24
Şekil 3.3. 4-Amino benzohidrazid türevlerinin sentezlendiği genel reaksiyon şeması.....	25
Şekil 3.4. 3-Amino benzohidrazid türevlerinin sentezlendiği genel reaksiyon şeması.....	26
Şekil 3.5. CNBr Sepharose 4B-L-Tirozin afinite jelinin hazırlanmasındaki reaksiyonların basamakları	29
Şekil 3.6. 4-Aminobenzohidrazitlerin Sepharose 4B kenetlenmesi modeli.....	30
Şekil 3.7. 3-Aminobenzohidrazitlerin Sepharose 4B kenetlenmesi modeli.....	30
Şekil 3.8. SDS-PAGE ile proteinlerin net yükünün maskelenmesi	33
Şekil 4.1. Proteinlerin kantitatif tayini için Bradford metoduyla kullanılan standart grafik	35
Şekil 4.2. 3-Amino 5-metoksi benzohidrazid kolonundan At turpu (HRP) enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırma sırasında elüatların 280 nm'deki absorbanlarını ve 470 nm'deki aktivitelerini gösteren grafik.....	36

Şekil 4.3. 4-Amino 2-nitro benzohidrazid kolonundan At turpu (HRP) enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırma sırasında elüatların 280 nm'deki absorbanlarını ve 470 nm'deki aktivitelerini gösteren grafik.....	37
Şekil 4.4. 4-Amino benzohidrazid afinite ligandlarından HRP enziminin SDS-PAGE fotoğrafı	39
Şekil 4.5. 3-Amino benzohidrazid afinite ligandlarından HRP enziminin SDS-PAGE fotoğrafı	40
Şekil 4.6. 4-Amino 2-nitro benzohidrazid molekülünün 400 MHz 1H-NMR spektrumu sonuçları.....	41
Şekil 4.7. 4-Amino 3-nitro benzohidrazid molekülünün 400 MHz 1H-NMR spektrumu sonuçları.....	41
Şekil 4.8. 3-Amino 5-metil benzohidrazid molekülünün 400 MHz 1H-NMR spektrumu sonuçları.....	42
Şekil 4.9. 3-Amino 5-metoksi benzohidrazid (2h) molekülünün 400 MHz 1H-NMR spektrumu sonuçları.....	42
Şekil 4.10. HRP enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 4-Amino 2-nitro benzohidrazid ile elde edilen % Aktivite-Konsantrasyon grafiği.....	44
Şekil 4.11. HRP enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 4-Amino 2-nitro benzohidrazid inhibitörü için edilen $1/V-1/[S]$ grafiği	45
Şekil 4.12. HRP enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 4-Amino 3-nitro benzohidrazid ile elde edilen % Aktivite-Konsantrasyon grafiği.....	46
Şekil 4.13. HRP enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 4-Amino 3-nitro benzohidrazid inhibitörü için edilen $1/V-1/[S]$ grafiği	48
Şekil 4.14. HRP enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino 5-metil benzohidrazid ile elde edilen % Aktivite-Konsantrasyon grafiği.....	49
Şekil 4.15. HRP enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino 5-metil benzohidrazid inhibitörü için edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	51
Şekil 4.16. HRP enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino 5-metoksi benzohidrazid ile elde edilen % Aktivite-Konsantrasyon grafiği	52

Şekil 4.17. HRP enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino 5- metoksi benzohidrazid inhibitörü için edilen $1/V-1/[S]$ grafiği	54
Şekil 4.18. 4-Amino 2-nitro benzohidrazid afinite jelinin horseradish POD enzimi için pH-kapasite grafiği	56
Şekil 4.19. 3-Amino 5-metoksi benzohidrazid afinite jelinin horseradish POD enzimi için pH-kapasite grafiği	56
Şekil 4.20. 4-Amino 2-nitro benzohidrazid afinite jelinin horseradish POD enzimi için sıcaklık-kapasite grafiği.....	57
Şekil 4.21. 3-Amino 5-metoksi benzohidrazid afinite jelinin horseradish POD enzimi için sıcaklık-kapasite grafiği.....	57
Şekil 4.22. 4-Amino 2-nitro benzohidrazid afinite jelinin horseradish POD enzimi için iyonik şiddet-kapasite grafiği	58
Şekil 4.23. 3-Amino 5-metoksi benzohidrazid afinite jelinin horseradish POD enzimi için iyonik şiddet-kapasite grafiği	58

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Çalışmalar sırasında faydalanılan alet ve cihazlar	16
Çizelge 3.2. Peroksidaz aktivitesinin belirlenmesindeki kuvvet içeriği	23
Çizelge 4.1. HRP enziminin 4-Amino benzohidrazid türevlerinin saflaştırma basamakları sonuçları	38
Çizelge 4.2. HRP enziminin 3-Amino benzohidrazid türevlerinin saflaştırma basamakları sonuçları	38
Çizelge 4.3. 4-Amino 2-nitro benzohidrazid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen HRP enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan % Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü	43
Çizelge 4.4. HRP enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 4-Amino 2-nitro benzohidrazid inhibitörü için $1/V$, $1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü	44
Çizelge 4.5. HRP enzimini üzerine 4-Amino 2-nitro benzohidrazid inhibitörünün inhibisyon etkisi	45
Çizelge 4.6. 4-Amino 3-nitro benzohidrazid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen HRP enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan % Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü	46
Çizelge 4.7. HRP enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 4-Amino 3-nitro benzohidrazid inhibitörü için $1/V$, $1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü	47
Çizelge 4.8. HRP enzimini üzerine 4-Amino 3-nitro benzohidrazid inhibitörünün inhibisyon etkisi	48
Çizelge 4.9. 3-Amino 5-metil benzohidrazid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen HRP enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan % Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü	49
Çizelge 4.10. HRP enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino 5-metil benzohidrazid inhibitörü için $1/V$, $1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü	50

Çizelge 4.11. HRP enzimini üzerine 4-Amino 3-nitro benzohidrazid inhibitörünün inhibisyon etkisi.....	51
Çizelge 4.12. 3-Amino 5-metoksi benzohidrazid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen HRP enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan % Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü	52
Çizelge 4.13. HRP enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino 5-metoksi benzohidrazid inhibitörü için $1/V$, $1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü.....	53
Çizelge 4.14. HRP enzimini üzerine 3-Amino 5-metoksi benzohidrazid inhibitörünün inhibisyon etkisi.....	54
Çizelge 4.15. HRP enzimi üzerine ligand moleküllerin toplu kinetik sonuçları.....	55

1. GİRİŞ

Enzimler kimyasal reaksiyonları katalize eden biyolojik katalizörler olup katalitik RNA molekülleri dışında protein yapısında olan organik bileşiklerdir. Oysa uzun yıllar, proteinlerin enzimler içine karışan kirlilikler olduğu düşünülmüş, ancak 1922 yılında, enzimin yapısını proteinlerin oluşturduğu saptanmıştır. 1926 yılında ise Sumner, ilk olarak üreaz isimli enzimi kristalize olarak elde etmiştir. Günümüzde, binlerce enzimin protein saflaştırma yöntemleri kullanılarak kristal halde elde edilebilmesi mümkün olmuş, bu sayede yapılarının protein olduğu belirlenmiştir (Burçak 2012). Canlıları oluşturan moleküller, biyomoleküller kinetik yönden kararlı oldukları için kendiliğinden kolayca reaksiyon vermezler. Enzimler olmasaydı, vücut sıcaklığında bu reaksiyonların birçoğu hemen hemen hiç meydana gelmezdi. Bir hücredeki tüm kimyasal olaylar enzimler aracılığıyla gerçekleştirilir. Biyomoleküllerin kararlılığı şu önemli sonucu sağlamaktadır; hücre içinde enzimi olmayan bir reaksiyon hemen hemen vuku bulmaz, kendiliğinden reaksiyonlar meydana gelmez. Bunun anlamı, enzimler protein yapısında olduğu ve DNA tarafından şifrelendiği için bir hücredeki tüm olaylar DNA seviyesinde düzenlenip, kontrol edilmektedir (Keha ve Küfrevioğlu 2012).

1.1. Enzim Aktivitesi ve Miktar Tayini

Enzim aktivitesi ve miktarının tayini, bir çözelti veya doku ekstraktı içindeki enzim miktarı, enzimin katalitik aktivitesinden bulunur. Bu iş için enzim hakkında bilinmesi gerekenler: (1) Katalizlenen reaksiyon denkleminin net stokiyometresi, (2) Enzim kofaktör veya metal iyonuna ihtiyacının olup olmadığı, (3) Substrat ve varsa kofaktörü için K_M değerleri, (4) Optimum pH'sı, (5) Enzimin kararlı ve aktivitesinin yüksek olduğu sıcaklık aralığı ve (6) Substratın kayboluş veya ürünün oluşum hızlarının tesbit edilebildiği basit bir analitik metod (Keha ve Küfrevioğlu 2012).

Enzim konsantrasyonu sistemde hızı sınırlayandır. Hız, enzim miktarıyla doğru orantılıdır ve çözeltideki enzim seviyesini direkt olarak verir. Bir çözelti içindeki enzim

aktivitesi 'enzim ünitesi' cinsinden verilir. 25°C'da ve optimal şartlarda 1 mikromol (10^{-6} mol) substratı bir dakikada ürüne dönüştüren enzim miktarına '1 enzim ünitesi' (EU veya U şeklinde gösterilir) denilmesi kabul edilmiştir. Ancak uluslararası ölçü sistemine göre zaman birimi saniye, madde miktarı birimi mol olduğundan bu sistemde enzim aktivite birimi kataldır. 1 katal enzim, belirli şartlar altında saniyede bir mol madde dönüşümüne sebep olur.

Spesifik aktivite (özgül aktivite) terimi de 1 mg protein başına enzim ünitesi (E.U / mg protein) olarak tarif edilir. Bu enzim saflığının bir ölçüsüdür, böylece enzimin saf halde elde edildiği anlaşılır (Keha ve Küfrevioğlu 2012).

Enzimatik bir tepkime hızının enzim inhibitörü adı verilen bazı maddeler tarafından azaltılması veya tamamen durdurulması olayına inhibisyon ve buna sebep olan bileşiklere de inhibitor denilir.

Inhibitor miktarı yeteri kadar yüksek olduğunda enzim aktivitesi tamamen durur. Diğer taraftan substrat konsantrasyonu arttırıldığında substrat enzimdeki aktif bölgeler için inhibitör ile daha etkin bir rekabete girer ve substratın ürünlere dönüşüm hızı artmış olur.

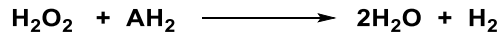
Enzim inhibisyonu dönüşümlü ve dönüşümsüz olmak üzere ikiye ayrılır. Dönüşümsüz inhibisyonda inhibitör enzime ya kovalent bağlanır ya da zor ayrılabilen bir kompleks oluşur. Dolayısıyla enzim tekrar aktivite göstermez. Dönüşümlü inhibisyonda ise enzim ile inhibitörün etkileşmesi bir denge reaksiyonu oluşturur. Bu inhibisyon tipi yarışmalı, yarışmasız veya yarı yarışmalı olabilir. Yarışmalı inhibisyonda (kompetit), inhibitör ile substratın yapıları benzerlik gösterir ve enzimin aynı aktif bölgesine bağlanırlar. İnhibitörün etkisi, substrat konsantrasyonu arttırıldıkça denge substrata doğru kaydığı için azalır. Bu sebepten yarışmalı inhibisyonda K_M değerinde artış gözlenir, enzimin V_{max} değeri değişmez. Bu tip inhibisyonda inhibitör enzimin aktif bölgesine bağlanmak için substrat ile yarışır. Enzimin aktif bölgesine inhibitör bağlanınca reaksiyon gerçekleşmez; inhibitör aktif bölgeyi işgal ederken substratın enzime bağlanmasını önler. Yarışmasız inhibisyon (nonkompetif) tipinde ise inhibitör ile substrat enzimin farklı

bölgelerine bağlanır, genelde inhibisyon etkisi substrat konsantrasyonundan bağımsızdır. Bu inhibisyonda V_{max} değeri inhibitör konsantrasyonu arttıkça azalır fakat K_M değeri değişmez. Yarı yarışmalı inhibisyonda inhibitör ES (Enzim-Substrat) kompleksine bağlanır. Bu inhibisyonda V_{max} ve K_M değerlerinde aynı anda bir azalma görülür. İnhibitör etkilerini yarışmalı veya yarışmasız olarak kesin sınırlarla birbirinden ayırmak mümkün değildir. Genel olarak karışık inhibisyon gözlenir (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

1.2. Peroksidazlar

Peroksidazlar (POD:H₂O₂-Oksidoredüktaz, E.C: 1.11.1.7) iki substrat arasındaki yükseltgenme-indirgenme reaksiyonlarını katalizleyen bir Oksidoredüktaz enzim grubudur. Bu enzimler bir substrattan diğerine H₂O atomu ya da elektron transferini sağlarlar. Birçoğu koenzim varlığında etki eder. Oksidaz, monooksijenaz, dioksijenaz, hidroksilaz, dehidrojenaz, redüktaz, katalaz, peroksidaz ve sitokramlar bu sınıfta yer alırlar (Burçak 2012).

POD, organik ve inorganik substratların oksidasyonunu H₂O₂ kullanarak katalizler. Ayrıca fenoller ve hidrokinonlar gibi birçok aromatik molekülün dehidrogenasyonunu da katalizler (Pütter and Becker 1987; Van Huystee 1987).



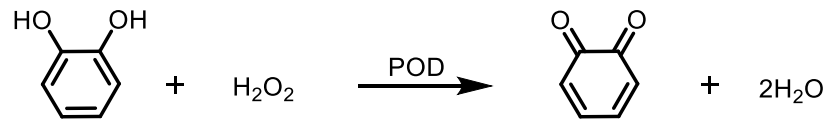
Peroksidazlar çok yaygın olarak prokaryotlarda, ökaryotlarda ve fotosentetik hücrelerde bulunan ve çok yaygın kullanım potansiyeline sahip enzimlerdir. Bu enzimler mayalarda, mantarlarda, yüksek bitkilerde, bakterilerde, turp türlerinde ve sütte bulunmakta olup spesifik aktivite, substrat ilgisi, kofaktörler, inhibitörlere hassasiyet ve optimum pH gibi biyokimyasal özellikleri farklı olan çok sayıda izoenzimleri mevcuttur (Fric 1976; Van Huystee 1987).

Peroksidazlar tarafından katalizlenen reaksiyonlarda H_2O_2 bazı antioksidan moleküller tarafından indirgenir (Doumonted and Rousset 1983). Bu görevi hücrelerdeki önemli antioksidan enzimler olan katalaz ile peroksidazlar yapar (Haliwell 1984; Robert *et al.* 1993).

Peroksidaz enziminin izoenzimleri, çeşitli alanlarda farklı amaçta kullanılmaktadır. Bu alanlar yapıştırıcı, otomobil parça üretimi, endüstriyel atık suların temizlenmesi gibi çeşitli alanlardır. Petrol, tekstil, ya da kömür işleme gibi sektörlerde kullanılan tehlikeli kimyasalların doğaya verilmeden önce, suda çözünebilen daha düşük molekül ağırlıklı bileşiklere dönüştürülmesinde peroksidaz izoenzimleri sıkça kullanılmaktadır. Tekstil sektöründe peroksidaz enziminin atık su arıtımındaki rolü geniş olmakla birlikte ağartma işleminde kullanılan hidrojen peroksitin ve boyama işleminde kullanılan büyük molekül ağırlıklı boyaların parçalanmasında kullanılır.

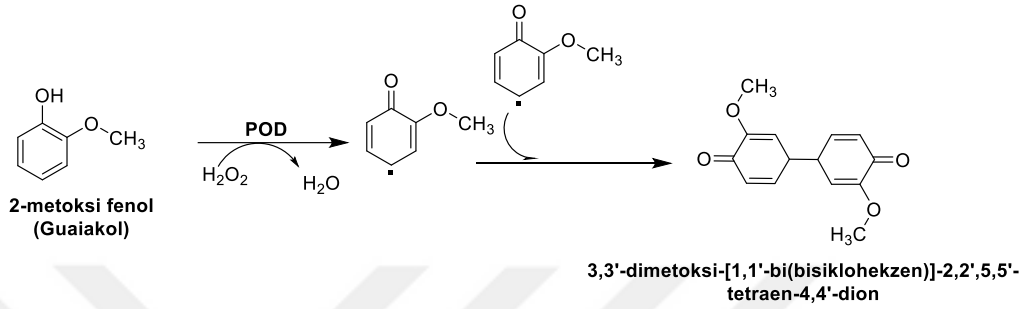
Peroksidazlar, üç yapısal sınıfa ayrılabilir. Sınıf I: Maya, bakteri peroksidazları ve yüksek bitki askorbat peroksidazlarını içerir. Sınıf II: Mantarlarda bulunan mangan peroksidazdan oluşmaktadır. Sınıf III ise klasik salgı bitki peroksidazlarından oluşur (Hiraga *et al.* 2001).

Bitkisel peroksidazlar (POD) pek çok proseste önemli rol oynamakla birlikte ve çoğu N-bağlı oligosakkarit bulunduran glikoproteinlerdir. Peroksidazlar bitkilerde birçok hücresel süreçte rol oynarlar. Bu süreçler içinde bitkilerin gelişimi, büyümenin hormonal düzenlenmesi, hücre duvarı metabolizması ve hücrelerin oksidasyon karşı savunmasında etkilidirler. Ayrıca ısıya karşı en dirençli enzimlerdir.



Şekil 1.1. Peroksidazın katekol substratını kullanarak hidrojen peroksiti giderme mekanizması

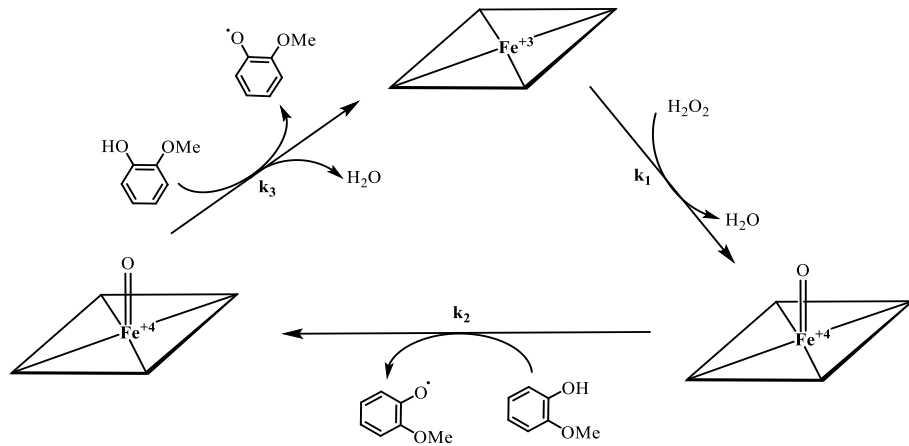
Biyolojik sistemlerde oluşan H_2O_2 oksitleyici özelliğe sahip olduğu için hızlı bir şekilde ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Bu görev hücre içerisinde antioksidan özellik gösteren katalaz ve peroksidaz enzimleri tarafından gerçekleştirilir (Halliwell 1984).



Şekil 1.2. Guaiakol substratının peroksidaz enzimi tarafından guaiakolun renkli oksidasyon ürünlerine çevrilme mekanizması

Guaiakolün substrat olarak kullanımı, ilk kez 1809'da biyomateryallerde yapılan renk reaksiyonuyla gerçekleşmiştir. At turpu'dan saflaştırılan peroksidaz enzim teriminin kullanılması bundan 100 yıl sonra gerçekleşmiştir (Van Huystee 1987).

Peroksidaz enziminin reaksiyon katalizleme mekanizması, hidrojen peroksitin indirgendiği ve guaiakol substratının yükseltlendiği reaksiyonlar üç basamakta gerçekleşir (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. Guaiakol substratı varlığında POD enziminin reaksiyon katalizleme döngüsü

Yukarıda belirtilen mekanizmanın ilk basamağında peroksidaz enzimi, Fe(+4) içeren porfirin katyon radikali olan bileşik I'ı oluşturmak için peroksitin bir ekivalentiyle reaksiyona girer. Bu bir redoks reaksiyonudur. Bu reaksiyonda H₂O₂ suya indirgenirken enzim ise yükseltgenmektedir. İkinci adımda bileşik I ortamdaki guaiakol substratından bir proton alarak Fe(+4) haline indirgenirken, substrat bir proton kaybederek radikal haline dönüşür. Bunun sonucunda oluşan bileşik II oksiferril bir merkeze sahip bir porfirindir. Son basamakta ise bileşik II ortamdaki substrattan tekrar bir proton alıp indirgenerek ilk durumuna geri döner. Ayrıca ortamda oluşan radikalik substratlar birbirleriyle etkileşerek polimer hale dönüşürler (Veitch 2004).

Peroksidazlar; enzimatik reaksiyonlar, enzim fonksiyonu ve protein yapı çalışmalarında tercih edilen bir enzimdir. Çünkü, aktivitelerinin kolay kromojenik metodlarla basitçe ölçülebilmesi ve yüksek sıcaklıklarda stabil kalabilme özelliklerinden kaynaklanmaktadır (Hiraga *et al.* 2001).

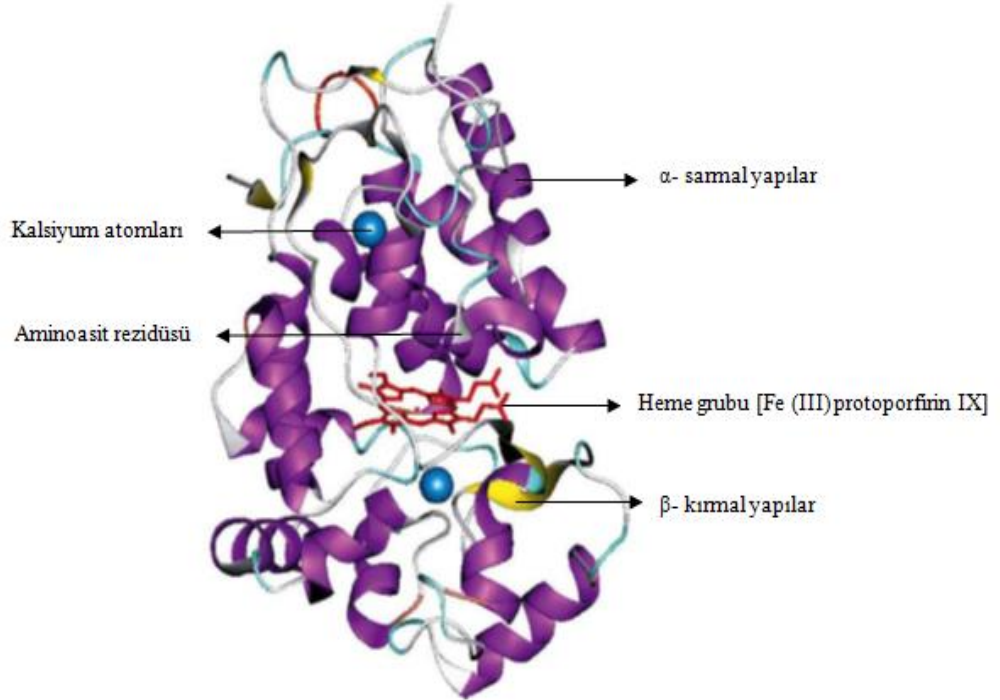
1.3. Horseradish (*Armoracia Rusticana*) Peroksidazı (HRP)

Horseradish (*Armoracia rusticana*), köklerinin besin değeri sebebi ile dünyanın ılıman bölgelerinde özellikle Avrupa ve Asya'nın bazı bölgelerinde ayrıca Kuzey Amerika'nın kuzey-ılıman bölgelerinde yetişen dayanıklı bir bitkidir.

Horseradish (bayır turpu, at turpu, yaban turpu); sarı kalın, etli kökü, baharatlı tadı ve antibiyotik yeteneği olan bir bitkidir (Sarika *et al.* 2015). Peroksidaz enzimi bu kökten elde edilmektedir (Veitch 2004).



Şekil 1.4. At Turpu (*Armoracia rusticana*)



Şekil 1.5. HRP C'nin x ışını kristal yapısı

X ışını ile HRP'nin kristal yapısı 1997 yılında bir grup çalışmacı tarafından ortaya koyulmuştur. Bu üç boyutlu yapıda α -sarmal ve β -kırmalı yapılar bulunmaktadır (Veitch 2004).

HRP protohemin bir haloenzim (apoenzim ve prostetik grup) dır. Peroksidaz katalizinde akseptör olarak H_2O_2 kullanır. 280 nm den başka 403 nm de de maksimum absorbans vermektedir (Leon *et al.* 2002; Franco Fagus *et al.* 2004).

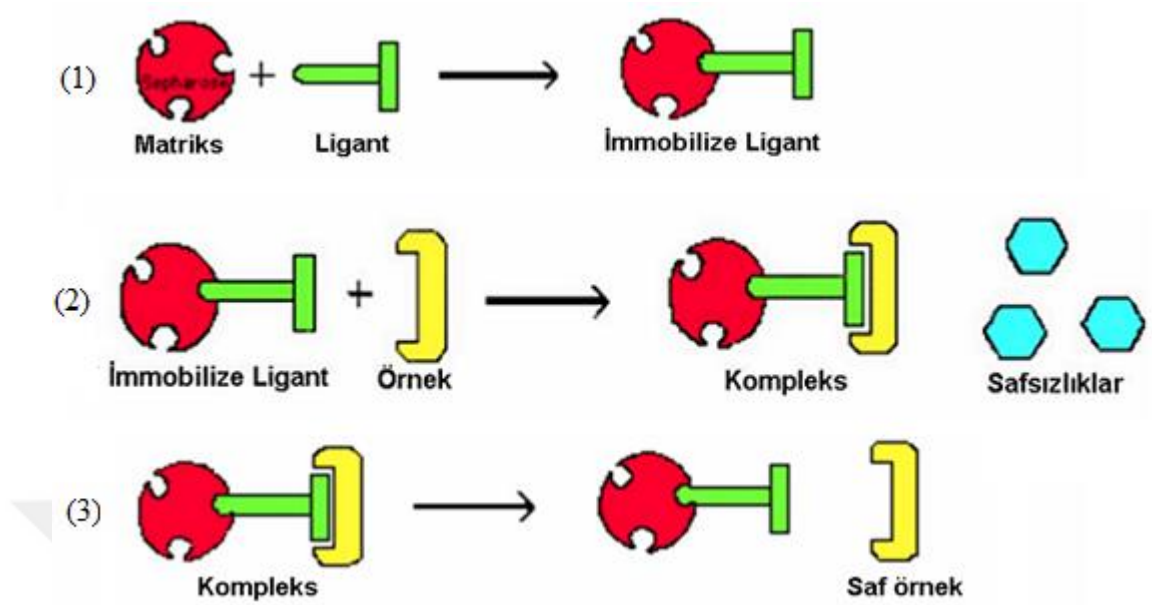
HRP üzerindeki ilginin sebebi biyomedikal uygulama alanında kullanılabilmesidir. Örneğin kanser tedavisinde kanserli hücreler HRP ile cDNA'ya transfekte edilir. HRP araştırmaları genellikle çeşitli ekspresyon sistemlerinde rekombinant üretim, enzimolojik karakterizasyonu ile ilgilidir.

Enzimin termal kararlılığı bazı faktörlerden etkilenmektedir. Bu faktörler arasında tampon şartları, disülfid köprüleri ve glikozilasyon gelmektedir. Bu süreç sırasında dikkat edilmesi gereken kritik kontrol noktaları maksimum sıcaklık limiti ve belirlenmiş pH aralığıdır. Bu faktörler süreç sırasında enzim stabilitesini sağlar (Barnard 2012).

1.4. Afinite Kromatografisi

Çok kompleks bir karışım içinde bulunan bazı proteinler afinite kromatografisi sayesinde tek basamakta oldukça saf halde elde edilirler. Afinite kromatografisi için polisakkarit yapısındaki agaroz taneciklerine kimyasal bir reaksiyon ile bir enzimin koenzimi bağlanır. Üzerine koenzim bağlanmış olan agaroz tanecikleri kolon dolgu maddesi olarak kullanılır. Protein karışımı bu kolona uygulandığı zaman yalnız ilgilendiğimiz enzim proteinleri koenzimin serbest ucuna spesifik olarak bağlanmaktadır. Bu bağlanma kovalent bir bağlanma değildir. Diğer proteinler koenzimin serbest ucuna bağlanma özelliğine sahip olmadıkları için kolondan ayrılırlar. Daha sonra serbest koenzim içeren çözelti kolona ilave edildiğinde, agaroz taneciklerine bağlı koenzime bağlanmış olan enzim molekülleri bu defa rekabetten dolayı çözelti ile birlikte gelen serbest koenzime bağlanarak kolondan çıkar. Böylece koenzime spesifik olarak enzim proteini diğer yüzlerce proteinden afinite kromatografisi ile tek basamakta saflaştırılmış olmaktadır.

Afinite kromatografisinin genel prensibi şu şekildedir;



Şekil 1.6. Afinite kromatografisinin genel prensibi

*((1)'de ligand matrikse kovalent bağlanır, (2)'de saflaştırılacak numune kolona adsorbe olup, safsızlıklar akar ve (3)'de numune elüe edilir)

Afinite kromatografisinde matriks olarak; Sephadex, Sepharose, Bio-gel gibi farklı jeller kullanılmaktadır. En çok kullanılan Sepharose bir agaroz jelidir. Afinite kromatografisinin gücü spesifik etkileşmelere bağlı olduğu için kullanılan jelin oldukça yüksek spesifik adsorbsiyona sahip olması gerekir. Sepharose jeli küresel ve rijit bir yapıda olduğundan bu şartı sağlayan en iyi jeldir. Ayrıca deterjanlar, yüksek ve düşük pH, ve disosiyatör maddeler gibi değişik şartlara göre dayanıklılık göstermektedir.

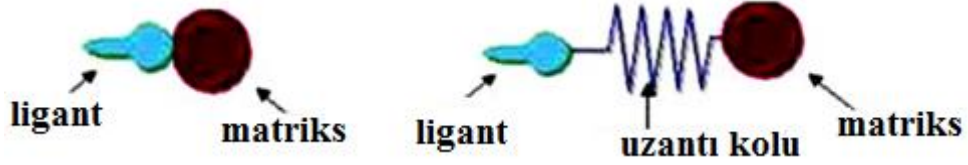
Afinite kromatografisi için seçilecek ligandın iki önemli özelliğe sahip olması gerekir. Bunlar;

- Ligand saflaştırılan madde için spesifik ve tersinir bağlama afinitesi göstermelidir.
- Ligandın bağlama afinitesine zarar vermeden matrikse tutunmasını sağlayan ve modifiye edilebilen grupları olmalıdır.

Afinite kromatografisinde kullanılacak olan ligand çeşitli fonksiyonel gruplara sahip ise ligandın matrikse bağlandığı bölge önemlidir. Bu bağlanma da ligandın saflaştırılacak

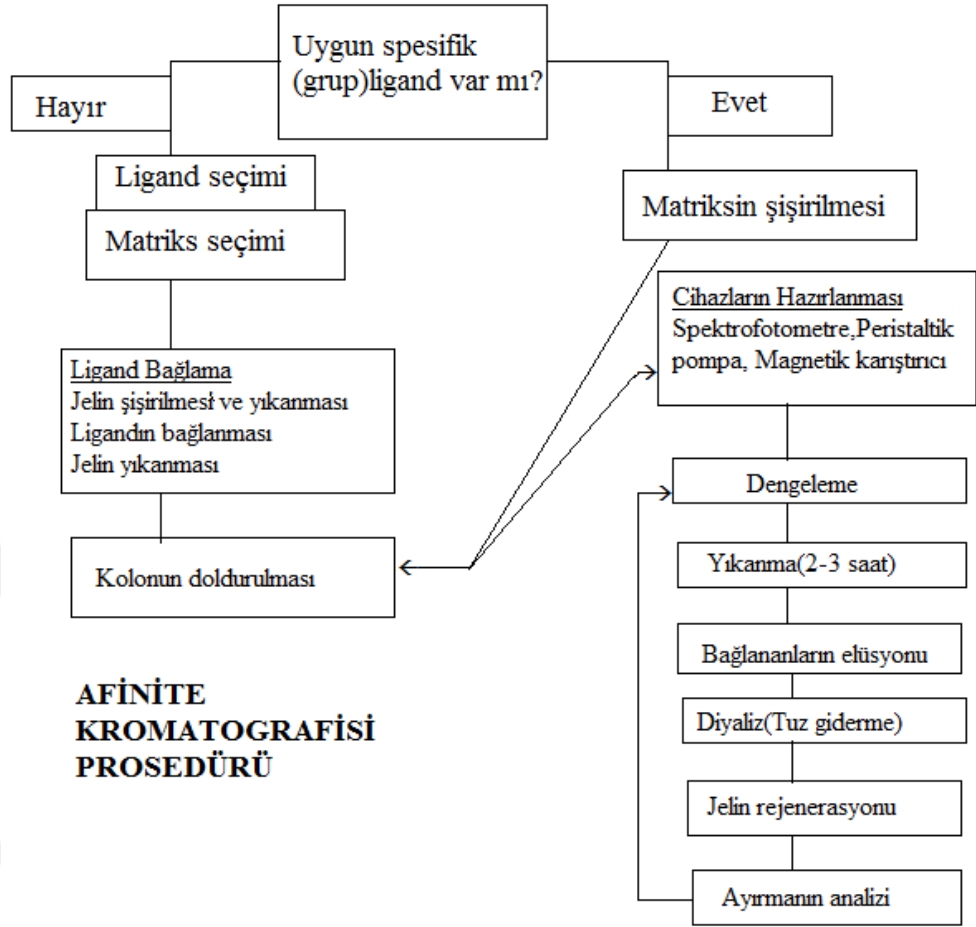
olan molekülle en düşük ihtimal ele alınarak spesifik etkileşme verecek grup ile matriks arasında yapılmalıdır (Cuatrecasas *et al.* 1968).

Küçük molekül kütleli ligantlar için;



Şekil 1.7. Küçük molekül kütlelerinde uzantı kolu

Enzimlerin aktif bölgesi genellikle molekülün içi kısımlarındadır. Bu yüzden küçük ligandların (enzim kofaktörleri gibi) doğrudan matrikse bağlanması sonucu hazırlanan adsorbanlarda, matriks ile liganda bağlanan maddeler arasında istenmeyen etkileşimler meydana gelebilir. Bu durumlar da istenmeyen bağlanmaları ortadan kaldırmak için ligand ile matriks arasına uzantı kolu adı verilen moleküller sokulur.



Şekil 1.8. Afinite kromatografisinin prosedürü

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bir indirgenme-yükseltgenme reaksiyonlarını katalizleyen peroksidaz enzimi; at turpu, karatup, incir, şalgam, baklagiller, patates, havuç, yeşil fasulye ve karnabahar gibi yüksek bitkilerde, mayalarda, mantarlarda, bakterilerde ve doğada var olmayan farklı sebzelerden sentezlenen brokolide bulunmaktadır. Memelilerdeki peroksidaz enzimleri ise sütte, karaciğerde, dalakta, uterusu, tükruk bezlerinde, mitokondride akciğer duvarlarında, sitoplazmada, mikrozom ile lizozomlarda lokalize olmuştur (Pütter and Becker 1987).

1960'larda peroksidaz enzimi farklı kaynaklardan farklı metotlarla saflaştırma çalışmaları yapılmaktadır. Afinite, iyon değişim, metal ve hidrofobik afinite kromatografisi kullanılan saflaştırma metodlarından birkaç tanesidir (Singh and Singh 2002).

Enzim saflaştırma ve karakterizasyon çalışmalarında şalgam, karatup ve diğer bitki çeşitleri üzerinde de çalışmalar mevcuttur. Türk karatupundan (*Raphanus sativus* L.) peroksidaz enzimi (Şişecioğlu *et al.* 2010), japon turpu (*Raphanus sativus* L.) köklerinden askorbat peroksidaz enzimi (Ohya *et al.* 1997) saflaştırılarak karakterize edilmiştir.

Aynı zamanda yapılan çalışmalar sonucunda at turpu (HRP) peroksidazının üç boyutlu yapısı aydınlatılmıştır. At turpu peroksidazı 37 kDa ağırlığında ve 308 amino asit rezidüsü içeren tek bir polipeptid zincirinden oluşur (Welinder 1976).

Kanser tedavisi için hedeflenen rekombinant Horseradish Peroksidaz (HRP) çalışılmıştır (Bonifert *et al.* 2016). Diğer bir çalışmada rekombinant Horseradish Peroksidaz üretimi ve uygulamaları incelenmiştir (Grigorenko *et al.* 2015). Krainer ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada HRP'nin rekombinant üretimi ve biyoteknolojik uygulamaları araştırılmıştır (Krainer *et al.* 2015). Mutant rekombinant

Horseradish Peroksidaz (HRP) tarafından rafineri atık sudan fenolün uzaklaştırılması çalışması Asad ve arkadaşları tarafından yapılmıştır (Asad *et al.* 2014).

Horseradish kök yumruları genellikle peroksidaz üretimi için ticari bir kaynak olarak kullanılmaktadır (Yamada *et al.* 1987). Farklı POD enzim türlerinin varlığı, potansiyel endüstriyel proseslerin ve yeni analitik metotların oluşmasına yol açmaktadır (Gülçin and Yıldırım 2005).

Kalın *et al.* (2014), yapılan çalışmada şalgam ve karaturptan peroksidaz enzimini afinite kromatografi yöntemi kullanarak tek basamakta saflaştırılmıştır. Yeni sentezlenen 4-amino benzohidrazit kolonunda uzantı kolu olarak kullanılan L-tirozin amino asiti CNBr ile aktifleştirilmiş Sefaroz-4B'ye bağlanmıştır. Bu çalışmalarında karaturp ve şalgam bitkileri için enzimin saflaştırma kat sayıları sırayla 40,3 (%10,6 verim) kat ve 269,3 (%9 verim) kat bulunmuştur.

Literatürlerden özetle görüleceği gibi; bitki peroksidazlarının saflaştırma yöntemleri üzerine en az iki kromatografik yöntem yapılmış ve sadece tek bir bitki için spesifik kullanılmıştır. Yine bu çalışmalardan görüleceği gibi saflaştırma verimleri yüzde 02 – 70 arasında değişmektedir ve aromatik hidrazinlerin bitki POD saflaştırılmasında tek basamakta ve birkaç bitkide kullanılabilceği ise ilk kez grupça çalışmalarımızda gösterilmiştir.

2.1. Çalışmanın Amacı

Horseradish Peroksidaz (HRP) enzimi üzerine oldukça saflaştırma prosedürü bulunmaktadır. Daha önce yapılan ve literatürde bulunan çalışmalarda peroksidaz enzimin birçok inhibitörü bulunmakla birlikte afinite jeli de hazırlanarak enzim saflaştırma çalışmaları yapılmıştır. Bu tez kapsamında ise enzimin aktivitesi üzerine 3-Amino benzohidrazid ve türevleri olan 3-amino 5-metil benzohidrazid, 3-amino 5-metoksi benzohidrazid ve 4-amino benzohidrazid türevleri olan 4-amino 2-nitro benzohidrazid, 4-amino 3-nitro benzohidrazid moleküllerinin inhibisyon kinetikleri

alışıldı ve inhibisyon etkisi gösteren benzohidrazid türevlerinden afinite jeli hazırlandı. Bu afinite jellerinden peroksidaz enzimi at turpundan saflaştırıldı. Horseradish Peroksidaz (HRP) enziminin tek basamakta saflaştırılması, hem uygun maliyette hemde daha az zamanda ve yüksek verimde gerçekleşmesi ticari kullanımda ışık tutmuştur.

Bu tez çalışmasında;

3-Amino benzohidrazid ve 4-amino benzohidrazid afinite jeli kullanılarak at turpundan peroksidaz enzimi saflaştırıldı, saflaştırılan HRP enzimi üzerine sentezlediğimiz 3-amino benzohidrazid ve 4-amino benzohidrazid türevleri olan toplam dört molekl için inhibisyon çalışmaları yapıldı. Bu iki molekln IC_{50} , K_i değerleri ve inhibisyon tipleri belirlendi. Hazırlanan afinite jellerinden HRP saflaştırıldı ve en iyi kolonlar için pH, sıcaklık, iyonik şiddet parametresinde kolon tutma kapasite çalışması gerçekleştirildi.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B, sodyum dodesilsülfat (SDS), sodyum asetat, N,N,N,N'-tetrametil etilendiamin (TEMED), diyaliz torbası, 3-Amino benzohidrazid ve 4-Amino benzohidrazid, hidrojen peroksit, formaldehit, guaiakol, standart serum albumin, sodyum tiyosülfat, sodyum klorür, glutaraldehit, N,N'-metilen bisakrilamid, akrilamid, coomassie brilliant blue G-250, coomassie brilliant blue R-250, sodyum bikarbonat, folin-ciocalteu fenol, brom timol mavisi, gliserol, tirozin, trihidroksimetilaminometan (Tris), etanol, metanol, dikloro metan, sodyum karbonat, etil asetat, sodyum nitrit, %64 hidrazin monohidrat, Sigma Chemical Company'den; sodyum sülfat, sodyum perklorat, sodyum azotür, gümüş nitrat, hidroklorik asit, sülfirik asit, L-tirozin, fosforik asit, İzoproponal E. Merk AG'den; potasyum fosfat, sodyum hidroksit, triklor asetik asit (TCA) Riedel de Haen'den; β -merkaptolanol Fluka'dan; glisin ICN Biomedicals. inc.'den, 3-aminobenzohidrazid, 3-Amino 5-metil metilbenzoat, 3-Amino 5-metoksi metilbenzoat, 4-Amino 2-Nitro metilbenzoat, 4-Amino 3-Nitro metilbenzoat Fluorochem firmasından temin edildi.

3.1.2. Kullanılan alet ve cihazlar

Çizelge 3.1. Çalışmalar sırasında faydalanılan alet ve cihazlar

Spektrofotometre	: Shimadzu UV 1800
Karıştırıcı (Vorteks)	: Fisons whirli-mixer
Saf su cihazı	: Barnstead Easy Pure UV/UF
Karıştırıcı (Shaker)	: IKA KS 130 basic
Soğutmalı santrifüj	: Hermle Z 323 K(Germany)
Elektroforez tankı	: Bio rad (dikey)
Peristaltik pompa	: İsmatec
Hassas terazi	: Denver Instrument
pH metre	: Mettler Toledo Seven Compact
Otomatik pipet	: Eppendorf
Güç kaynağı	: 1-Bio Rad Power Pac 3000
Liyofilizatör	: Christ
NMR	: Bruker 400 MHz
Çalkalayıcı	: Midi Dual 14
Magnetik karıştırıcı	: WiseStir MSH-20A
Afinite kolonu	: Sigma
Rotary Evaporatör	: Heidolph
Ultraturaks	: Heidolph SilientCrusher M
Su banyosu	: Nüve
Kar makinesi	: Scotsman AF-20 (Authomatic ice machines)

3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

Biyokimyasal çalışmalarda kullanılan çözeltilerin kullanılış amaçları ve hazırlanış şekilleri aşağıdaki gibidir, ayrıca çözeltili hazırlamada kullanılan su ise saf sudur.

3.1.3.a. Kolon materyali hazırlanmasında kullanılan çözeltiler

1. CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye L-Tirozin kenetlendirilmesi reaksiyonunda: 0,1 M NaHCO₃ (pH:9,0) çözeltisi kullanıldı: 1,68 g (0,01 mol) NaHCO₃ 150 mL suda çözüldü, 1 M NaOH ile pH 9,0 oluncaya kadar titre edilerek toplam hacim destile su ile 200 mL'ye tamamlandı.
2. Kolon materyaline 3-amino benzohidrazid ve 4-amino benzahidrazid türevlerinin kenetlendirilmesi işleminde: 0,2 M NaHCO₃ (pH:9,5) çözeltisi, 5,04 g NaHCO₃ 250 mL suda çözüldü, 1 M NaOH ile pH 9,5 oluncaya kadar titre edilerek toplam hacim destile su ile 300 mL'ye tamamlandı.
3. Kolon materyalinde 3-amino benzohidrazid ve 4-amino benzahidrazid türevleri afinite jellerinin yıkanması işleminde: 10 mM NaH₂PO₄ pH 6,8 kullanıldı. 3 g NaH₂PO₄, 200 mL destile suda çözüldü. 1 M HCl ile pH 6,8'e kadar titre edilerek toplam hacim destile su ile 250 mL'ye tamamlandı.

Homojenat hazırlanmasında: 20 gr Horseradish turpu alınıp sıvı azotla havanda dövülerek toz haline getirildi. Daha sonra 50 mL fosfat tamponuna (pH 7.0 , 0,3 M) alındı. 13.000 rpm'de 4°C ve bir saat boyunca santrifüj yapıldı. Çökelek kısmı uzaklaştırıldı ve süpernant kısmı alınıp saklandı.

3.1.3.b. Homojenat hazırlanmasında kullanılan çözeltiler

HRP'den homojenat eldesinde: 0,3 M KH₂PO₄ (pH: 7,0) (Sıvı azotla birlikte bitki dokularının içine alındığı doku veya hücrenin çeper ve zar yapılarının parçalanması için gerekli tampon): 6,12 g KH₂PO₄, 130 mL destile suda çözüldü. 1N NaOH ile pH:7,0'e kadar titre edilerek toplam hacim destile su ile 150 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.c. Afinite kolonunda kullanılan çözeltiler

1. Afinite kolonun dengelenmesinde: 10 mM KH_2PO_4 (pH: 6,8) kullanıldı. 1,36 gr KH_2PO_4 , 950 mL suda çözüldü. 1M NaOH ile pH 6,8'e kadar titre edilerek toplam hacim suyla 1 L'ye tamamlandı.
2. Afinite kolonlarının yıkanmasında: 25 mM KH_2PO_4 (pH 6,8) tamponu kullanıldı. 1,36 g KH_2PO_4 350 mL suda çözüldü. 1M NaOH ile pH 6,8'e kadar titre edilerek toplam hacim destile suyla 400 mL'ye tamamlandı
3. Afinite kolonlarının POD enzimi elüe (enzim toplama) işleminde: 25 mM 1,36 g KH_2PO_4 (pH:6,8) tamponu ile 23,4 g NaCl 350 mL destile suda çözüldü. 1N NaOH ile pH:6,8'e kadar titre edilerek toplam hacim destile suyla 400 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.d. Enzim aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler:

1. POD enzimi aktivite ölçümünde: 0,1 M KH_2PO_4 (pH 6,0) tampon çözeltisi kullanıldı. 2,72 g KH_2PO_4 , 150 mL suda çözüldü. 1N NaOH ile pH 6,0'e kadar titre edilerek toplam hacim destile su ile 200 mL'ye tamamlandı.
2. Substrat çözeltisi: 45 mM Guaiakol çözeltisi kullanıldı. 996 μL pipet yardımı ile guaiakol alınarak son hacim destile su ile 200 mL'ye tamamlandı.
3. Substrat çözeltisi: 22,5 mM H_2O_2 çözeltisi kullanıldı. Yoğunluğu 1,11 g/mL olan %30'luk H_2O_2 'den 456 μL alınarak suyla 200 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.e. Bradford yöntemiyle protein tayini için kullanılan çözelti

Proteinlerin kantitatif tayininde Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi kullanıldı. 50 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 25 mL %95'lik etanol içerisinde çözüldü, bu çözeltiliye %95'lik 50 mL fosforik asit ilave edildi ve çözeltinin hacmi saf su ile son hacim 500 mL olacak şekilde ayarlandı. Hazırlanan çözelti karanlık ortamda muhafaza edildi.

3.1.3.f. Lowry yöntemiyle protein tayini için kullanılan çözelti

Bakır reaktifi; 0,05 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ve 0,1 g sodyum-potasyum tartarat tartıldı. 10 mL'de çözüldü. Aynı bir beherde 1 g sodyum karbonat ile 0,2 g NaOH eklenerek 50 mL de çözüldü sonra 1 mL saf su eklendi ve üzerine bakır reaktifinden 1 mL alınarak bu çözeltiliye eklendi. Tüplere protein çözeltilisinden 100 μL alınarak 1000 μL alkali bakır reaktifi katılır ve çözelti 10 dk inkübe edilir. Daha sonra 1000 μL Folin-Ciocalteu fenol reaktifi (1:1 oranında saf suyla seyreltilmiş) hızlıca katılır ve karıştırılır. Bu çözelti 30 dk inkübe edilir ve absorbansı 660 nm'de ölçülür. Bu çözelti günlük kullanımda hazırlanır.

3.1.3.g. Elektroforezde kullanılan çözeltiler

1. 1 M Tris-HCl tamponu (pH 8,8): 48,4 g Tris, 350 mL suda çözüldü. 1 M HCl ile pH 8,8'e ayarlanıp, toplam hacim suyla 400 mL'ye tamamlandı.
2. 1 M Tris-HCl tamponu (pH 6,8): 48,4g (0,2 mol) Tris, 350 mL suda çözüldü. 1 M HCl ile pH 6,8'e ayarlanıp, toplam hacim suyla 400 mL'ye tamamlandı.
3. %30 Akrilamid-%0,8 Bisakrilamid: 0,4 g bisakrilamid ile 15 g akrilamid, 34,6 mL su karıştırılarak çözüldü.
4. %10'luk amonyum persülfat çözeltisi: 1 g amonyum persülfat tartılarak saf su ile 10 mL'ye tamamlanır.
5. %10'luk SDS: 1 g SDS 9 mL suda çözülerek elde edildi.
6. Numune tamponu: 0,65 mL 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 1 mL %10'luk SDS ve 1 mL %100'lük gliserin, 1 mL 0,1'lik brom timol mavisi karıştırılarak, son hacim su ile 10 mL'ye tamamlanmasıyla hazırlandı. Bu tampona kullanmadan önce 1000 μL numune tamponunda 50 μL olacak şekilde β -merkaptoetanol ilave edildi. Bu tampon proteinin sıcak ortamda denatüre edilmesinde kullanıldı.
7. Yürütme tamponu: 3,02 g Tris ve 15,02 g glisin, 950 ml saf suda çözüldü. Bu çözelti üzerine 5 ml %10'luk SDS ilave edilerek ardından (pH 8,3)'e ayarlanıp toplam hacim saf suyla 1000 ml'ye tamamlandı. Bu tampon elektroforez cihazı için hazırlandı.
8. Jelde yürütülen proteinlerin sabitleştirilmesi için gereken çözelti: 50 mL izopropanol, 10 mL TCA ve 40 mL saf su karıştırılarak hazırlandı.

9. Ayırma Jelinin Hazırlanması: 5 mL(5000 μ L) 1 M Tris-HCl (pH:8,8), 4,4 mL %30'luk akrilamid - %0,8 bisakrilamid, 0,2 mL %10'luk SDS, 0,13 mL TEMED (N,N,N',N'-Tetrametil etilen diamin) ve 3,13 mL saf su ile küçük bir beherde karıştırıldı. Bu karışımın üzerine en son olarak donmayı sağlayan 0,07 mL %10'luk PER [amonyum persülfat, (NH₄)₂S₂O₈] eklendi.Ayırma jeli elektroforezde plakanın alt kısmında kalan jeldir.

10. Yığılma Jelinin Hazırlanması : 0,41 mL 1 M Tris-HCl pH:6,8, 0,44 mL %30'luk Akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 0,03 mL %10'lik SDS, 0,03 ml TEMED ve 2,45 mL saf su karıştırıldı. Bu karışımın üzerine en son olarak donmayı sağlayan 0,04 mL %10'luk PER eklendi.

Coomassie brillant blue boyasında kullanılan çözeltiler;

a. Jel yıkama çözeltisi (renksizleştirme): 10 mL asetik asit,50 mL metanol ve 40 mL destile suyun karıştırılmasıyla hazırlandı.

b. Jel boyama (renklendirme) çözeltisi: 0,66 g coomassie brillant blue R-250'nin 120 mL metanolde iyice çözünmesinin ardından üzerine 24 mL saf asetik asit ile 120 mL destile suyun ilavesiyle hazırlandı.

Gümüş boyamada kullanılan çözeltiler

1. Tespit çözeltisi: 70 mL saf su, 35 mL %96'lik etanol, 15 mL asetik asitin karıştırılmasıyla elde edildi.

2. Redüksiyon çözeltisi: 9,6 g sodyum asetat, 90 mL etanol ve 160 mL saf su karıştırılıp, pH 6,0'ya asetik asitle ayarlandıktan sonra 300 mg sodyum tiyosülfat, 6 mL glutaraldehit eklenip su ile 300 mL'ye tamamlandı.

3. Boyama çözeltisi: 100 mg gümüş nitrat, 100 mL saf su'da çözülüp üzerine 30 mL formaldehit eklenmesiyle hazırlandı.

4. Yıkama Çözeltisi 1: 7,5 g sodyum karbonat, 540 mL suda çözüldü ve üzerine 240 μ L formaldehit ilave edildi.Bu çözelti içerisinde marker ve bantlar görününceye kadar yavaş yavaş çalkalanır.

5. Yıkama çözeltisi 2: 2 mL gliserin ve 500 mL'lik %5'lik asetik asitten karıştırılarak saf su ile 250 mL'ye tamamlanır.Şayet jelin renginde kararma olursa rengin açılması için bu yıkama 2 çözeltisi kullanılır ve jelin zemin rengi açılıncaya kadar muamele edilir.Ardından saf su içerisinde bekletilir.

3.1.3.h. İnhibisyon çalışmalarında kullanılan moleküllerin stok konsantrasyonları

1. 3 mL 16,34 mM 3-amino-5-metil benzohidrazid
2. 2 mL 15,73 mM 3-amino-5-metoksi benzohidrazid
3. 3 mL 14,78 mM 4-amino-2-nitro benzohidrazid
4. 3 mL 15,63 mM 4-amino-3-nitro benzohidrazid

3.2. Yöntem

3.2.1. Protein tayini

3.2.1.a. Kalitatif protein tayini

Protein yapısında mevcut aromatik halkaya sahip aminoasitlerin 280 nm'deki UV ışınlarını absorplamaları esasına dayanan Segel (1968) metodu kullanılarak kromatografi işlemleri sonunda eşit hacimde toplanan bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı. Kromatografi sonucunda elüatlar kuvarz küvetlere konularak spektrofotometrede proteinin içinde bulunduğu tampon kör olarak kullanılarak absorbansları ölçüldü.

3.2.1.b. Bradford yöntemi ile protein tayini

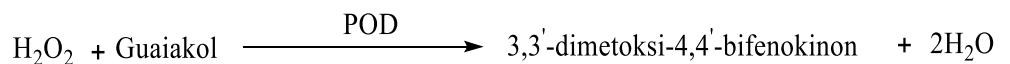
Afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltisi ve homojenattaki protein miktarları Bradford (1976) metoduna göre belirlendi. Bu yöntemde boya olarak Coomassie Brilliant Blue G-250'de negatif bir yük vardır ve bu negatif yük protein

üzerindeki pozitif yüke bağlanır. Bu boyanın kırmızı ($\lambda_{\max}=465$ nm) ve mavi ($\lambda_{\max}=595$ nm) formu mevcuttur. Proteinin bağlanması, kırmızı formun mavi forma dönüşümünü sağlar. Reaksiyon yüksek oranda tekrarlanabilir ve hızlı hareket eder, iki dakikada tamamlanır. Tayin işlemleri şu prosedüre göre gerçekleştirildi: 1 mL’inde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albumin çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 μ L konuldu. Saf su ile bütün tüplerin hacmi 0,1 mL’ye tamamlanarak ve 4,9 mL Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisi ilave edilerek vorteks ile karıştırıldı. 10 dakika inkübe edildikten sonra 595 nm’de 3 mL’lik küvetlerde köre karşı absorban değerleri okundu. Kör olarak, 0,1 mL enzim numunesinin içinde bulunduğu tampondan ve 4,9 mL Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisinden oluşan karışım kullanıldı. Elde edilen sonuçlardan absorban değerlerine karşılık gelen μ g protein değerleri standart grafik haline getirildi (Bradford and Williams 1976).

Saflaştırmanın her aşamasında ortamdaki protein miktarını belirlemek için enzim numuneleri 3 ayrı tüpe sırasıyla 100, 250 ve 500 μ L alınarak üzerlerine sırasıyla 4,9, 4,75, 4,5’er mL renklendirme reaktifi eklendi. Vorteks ile karıştırıldıktan sonra 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 595 nm’de absorban değerleri okundu. Bu işlem 3 defa tekrarlanarak 3 ayrı ölçümün aritmetik ortalaması alınıp standart grafikten protein miktarları belirlendi (Bradford and Williams 1976).

3.2.2. Horseradish Peroksidaz aktivitesi tayini

Peroksidaz enziminin aktivite ölçümü, Şişecioğlu ve arkadaşlarının uyguladığı prosedüre göre spektrofotometrik olarak belirlendi. Bu prosedür, H_2O_2 tarafından guaiakol kromojenik substratın yükseltgenmesi ve oluşan renkli bileşiğin meydana getirdiği absorban artışının 470 nm’de izlenmesi esasına dayanır (Şekil 3.1) (Şişecioğlu *et al.* 2010).



Şekil 3.1. Guaiakol substratının yükseltgenme mekanizması

Reaksiyon enzim çözeltisinin eklenmesiyle başlar ve 3 dakika süreyle her 1 dakikada bir olmak üzere oda sıcaklığında 470 nm’de absorbans artışı spektrofotometre ile 1 cm ışık yoluna sahip küvet kullanılarak izlenildi.

Horseradish Peroksidaz enziminin aktivitesini tayin etmek için aşağıdaki formül kullanıldı.

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c \quad c = A / \epsilon \cdot b \quad V = c \cdot D_f$$

A = Absorbans (3 dakika sonunda okunan absorbans)

b = Işığın geçtiği mesafe (1 cm)

c = Konsantrasyon ($\mu\text{mol/mL}$)

ϵ = Ekstinksiyon kat sayısı ($5000 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$)

D_f = Seyreltme katsayısı

Çizelge 3.2. Peroksidaz aktivitesinin belirlenmesindeki küvet içeriği

Kullanılan Çözeltiler	Kör (mL)	Numune (mL)
Aktivite Tamponu (0,1 M pH:6)	1,0	0,9
Guaiakol (45 mM)	1,0	1,0
Hidrojen peroksit (22,5 mM)	1,0	1,0
Enzim	-	0,1

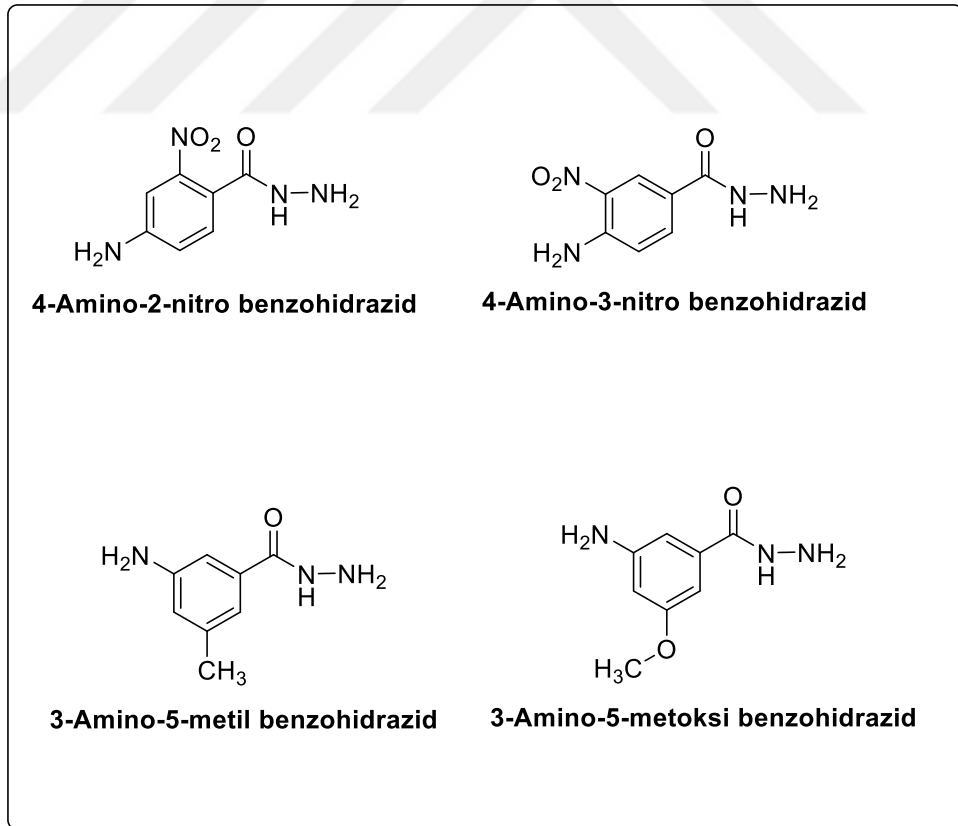
Enzim saflaştırılması işlemlerinde substrat olarak guaiakol kullanıldığından, saflaştırma basamaklarının enzim aktivite ölçümü sonuçları için; 1 enzim ünitesi "20°C’de 1 dakikada 1 μmol guaiakol’ün oksidasyonunu katalizleyen substratı ürüne dönüştüren enzim miktarı " olarak tanımlandı.

3.3. Horseradish Bitkisinden Peroksidaz Enziminin Saflaştırılması Çalışmaları

3.3.1. Ligand seçimi

Horseradish Peroksidaz enzimini saflaştırılması amacı ile 3-amino 5-metil metilbenzoat, 3-amino 5-metoksi metilbenzoat, 4-amino 2-nitro metilbenzoat, 4-amino 3-nitro metilbenzoat maddeleri satın alındı, bu 4 molekülün hidrazin formları tarafımızca sentezlenerek inhibisyon çalışmaları ve ligand olarak kullanılabilirliği incelendi (Şekil 3.2).

Sentezlenen bu moleküller HRP'nin afinite kromatografisi ile saflaştırılmasında en uygun diazonyum tuzu oluşturabilecek ligand yapısına sahiptir.

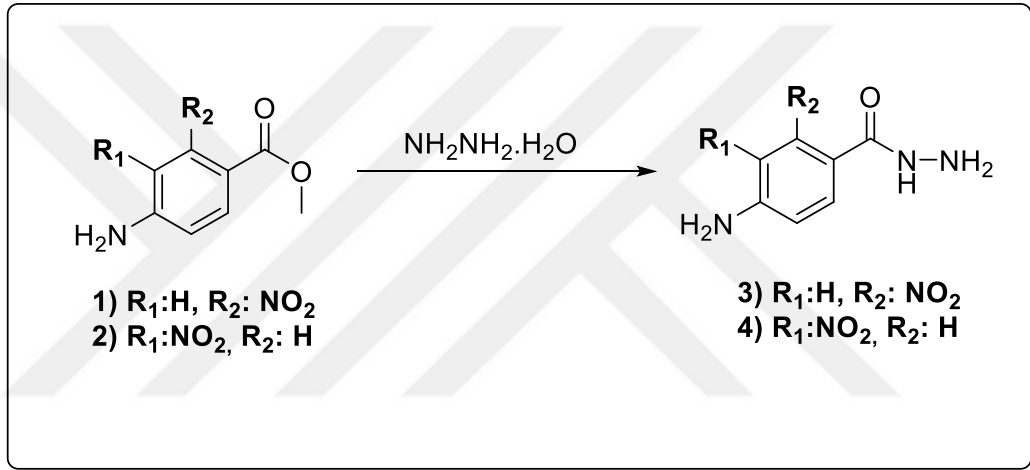


Şekil 3.2. Horseradish Peroksidaz (HRP) inhibitörü ve ligand olarak kullanılan moleküller

3.3.2. Benzohidrazid türevlerinin sentezlenmesi

3.3.2.a. 4-Amino Benzohidrazid türevlerinin sentezlenmesi

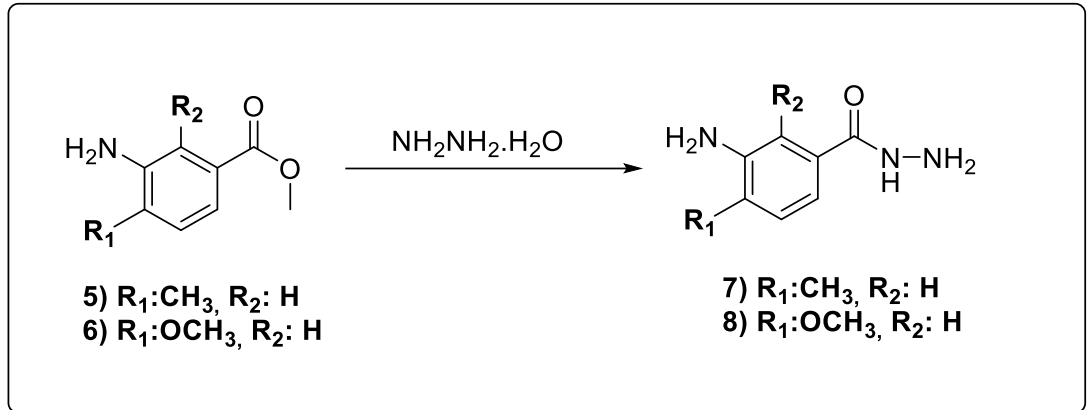
4-amino 2-nitro benzohidrazid, 4-amino 3-nitro benzohidrazid bileşikleri ticari olarak temin edilmemesinden ötürü bu bileşikler, metil esterleri çıkış bileşiği olarak kullanılıp, hidrazin sentezleri yapıldı.



Şekil 3.3. 4-Amino benzohidrazid türevlerinin sentezlendiği genel reaksiyon şeması

3.3.2.b. 3-Amino Benzohidrazid türevlerinin sentezlenmesi

3-amino 5-metil benzohidrazid, 3-amino 5-metoksi benzohidrazid bileşikleri ticari olarak sağlanılamadığından ötürü bu bileşikler, metil esterleri çıkış bileşiği olarak kullanılıp, hidrazin sentezleri yapıldı.



Şekil 3.4. 3-Amino benzohidrazid türevlerinin sentezlendiği genel reaksiyon şeması

3-Amino benzohidrazid türevlerinin ve 4-Amino benzohidrazid türevlerinin sentezleri (Hiroshi *et al.* 2012) yönteminde belirtildiği şekilde yapılmıştır. Bu kapsamda 4-Amino metil benzoatlar (1, 2) (3 mmol) ve (9-12 mmol) ve 3-Amino metil benzoatlar (5, 6) (3 mmol) ve (9-12 mmol) %64'lük hidrazin hidrat çözeltisi 30 mL metil alkol içerisinde çözüldü ve reaksiyon tamamlanincaya kadar geri soğutucu altında ısıtılarak çözücü uzaklaştırıldı. Katı partiküller etanolde çözülerek kristallenmeye bırakıldı ve oluşan beyaz kristaller süzgeç kağıdı yardımıyla ayrıldı. Bu işlem iki kez tekrarlandı. Böylece 4-Amino benzohidrazid türevi olan 2 molekül (3, 4) ve 3-Amino benzohidrazid türevi olan 2 molekül (7, 8) sentezlenmiş oldu. Karakterizasyonları $\text{H}^1\text{-NMR}$ yöntemiyle doğrulandı.

3.3.3. İnhibitör çalışmaları

3.3.3.a. 4-Amino benzohidrazid ve türevlerinin enzim aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesi

Literatürde daha önce sentezlenen Sepharose-4B-L-tirozin-4-Amino benzohidrazid afinite jeli ile saflaştırılan HRP enzimi üzerine planlanan, 4-aminobenzohidrazid ve sentezlediğimiz 4-Amino 2-nitro benzohidrazid (3), 4-Amino 3-nitro benzohidrazid (4) inhibitörlerinin inhibisyon kinetiklerinin incelenmesi amacı ile sabit substrat (guaiakol) konsantrasyonunda ve 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda her bir inhibitör için aktivite

değerleri hesaplandı. İnhibitör ihtiva etmeyen ortamda yapılan aktivite ölçümü kontrol olarak aktivite %100 olarak kabul edildi. Her bir deney üç kez tekrar edildi. İnhibisyon etkisi gösteren 4-Amino benzohidrazid ve türevlerinin IC₅₀ (enzim aktivitesinde %50 azalmaya neden olan inhibitör konsantrasyonu) değerleri % Aktivite-[İnhibitör] grafiğinden bulundu. Daha sonra 5 farklı substrat konsantrasyonuna ve 3 farklı inhibitör konsantrasyonuna denk gelen inhibisyon değerlerinden faydalanılarak Linewaver–Burk grafikleri çizildi ve K_i değerleri hesaplandı.

3.3.3.b. 3-Amino benzohidrazid ve türevlerinin enzim aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesi

Literatürde daha önce sentezlenen Sepharose-4B-L-tirozin-3-Amino benzohidrazid afinite jeli ile saflaştırılan HRP enzimi üzerine çalışılması planlanan, 3-aminobenzohidrazid ve sentezlediğimiz 3-Amino 5-metil benzohidrazid (7), 3-Amino 5-metoksi benzohidrazid (8) inhibitörlerinin inhibisyon kinetiklerinin incelenmesi amacı ile sabit substrat (guaiakol) konsantrasyonunda ve 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda her bir inhibitör için aktivite değerleri hesaplandı. İnhibitör bulunmayan ortamda yapılan aktivite ölçümü kontrol olarak aktivite %100 olarak kabul edildi. Bu deneyde üç kez tekrar edildi. İnhibisyon etkisi gösteren 4-Amino benzohidrazid ve türevlerinin IC₅₀ (enzim aktivitesinde %50 azalmaya neden olan inhibitör konsantrasyonu) değerleri % Aktivite-[İnhibitör] grafiğinden bulundu. Daha sonra 5 farklı substrat konsantrasyonuna ve 3 farklı inhibitör konsantrasyonuna denk gelen inhibisyon değerlerinden faydalanılarak Linewaver–Burk grafikleri çizildi ve K_i değerleri tespit edildi.

3.3.4. Sepharose-4B-L-tirozin afinite jelinin hazırlanması

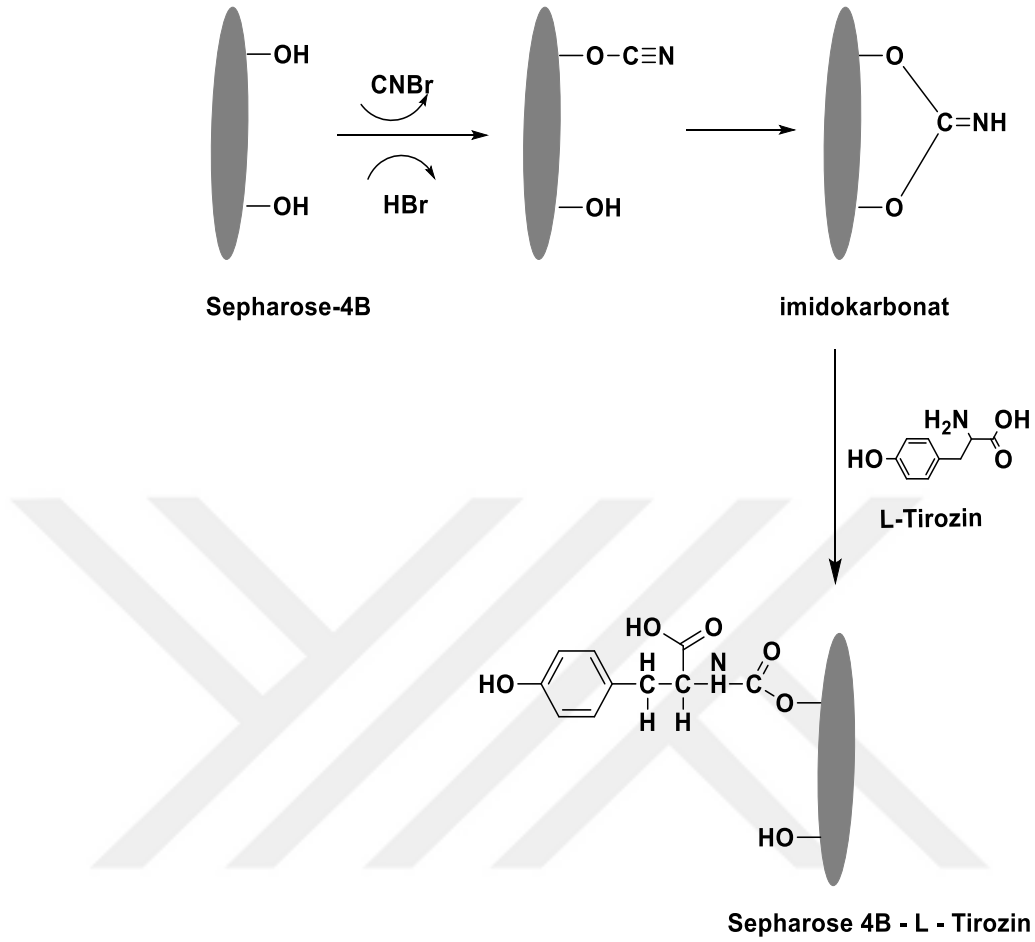
CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B matriksi kullanıldı. Bu kolon materyaline L-tirozin uzantı kolu kovalent olarak bağlandı. Daha sonra Sepharose 4-B-L-Tirozin jel materyaline, ligand olarak 4-Amino benzohidrazid, 4-Amino 2-nitro benzohidrazid, 4-Amino 3-nitro benzohidrazid ve 3-Amino benzohidrazid, 3-Amino 5-metil benzohidrazid, 3-Amino 5-metoksi benzohidrazid önceden diazollanarak tirozine

kenetlenirildi. Burada tirozin afinite jelinin uzantı kolunu, ligandlar ise enzimi spesifik olarak bağlayan kısmını oluşturmaktadır (Atasever *et al.* 2013).

Afinite jelleri aşağıdaki prosedüre göre hazırlandı:

3.3.4.a. CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye Tirozin takılması

CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B, 250 mL soğuk su ile yıkanarak 0,1 M NaHCO₃ tamponu (pH 9,0) ile bir behere aktarıldı. Kullanılan tamponun 50 mL'sinde 80 mg tirozin çözüldü ve aynı çözelti Sepharose 4-B ile bir behere aktarılarak reaksiyon başlatıldı. 4°C'de 2 saat süreyle manyetik karıştırıcıda karıştırıldı ve 16 saat boyunca 4°C'de bekletildi. Bu süre bitiminde jel yıkama suyu ile 280 nm'de absorbans vermeyinceye kadar bol su ile yıkandı, böylece reaksiyona girmeyen tirozin tamamen uzaklaştırılmış oldu. Yıkama işlemi 200 mL 0,2 M NaHCO₃ tamponu ile (pH 9,5) tekrarlandı ve tirozin takılı olan jel, aynı tamponun 40 mL'si içine alındı. Reaksiyon mekanizması Şekil 3.4'te verilmiştir.

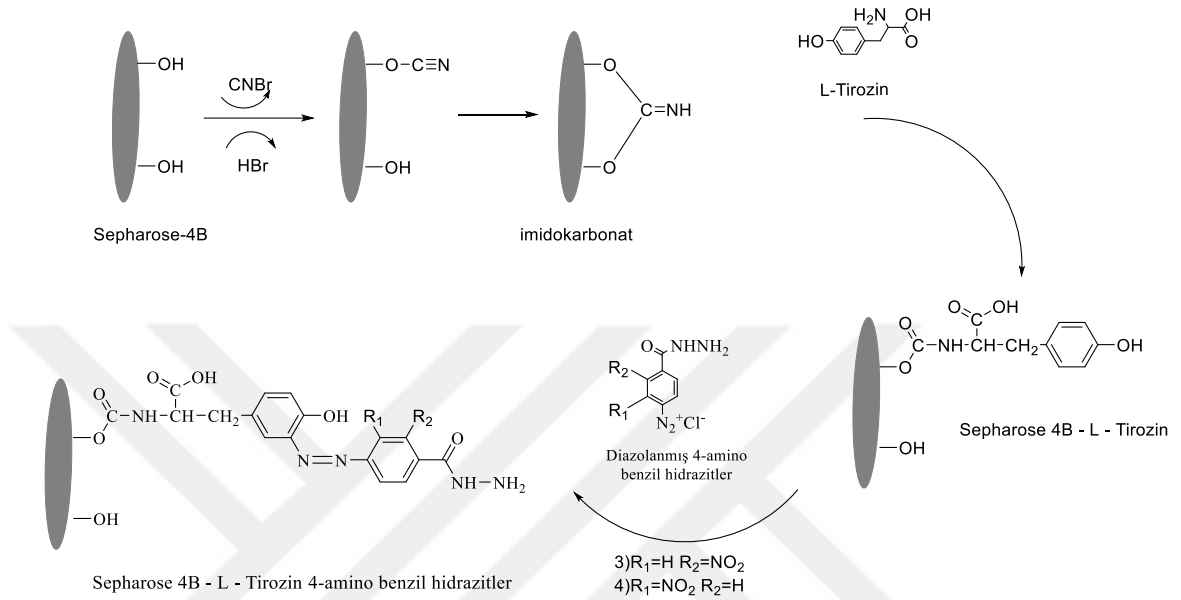


Şekil 3.5. CNBr Sepharose 4B-L-Tirozin afinite jelinin hazırlanmasındaki reaksiyonların basamakları

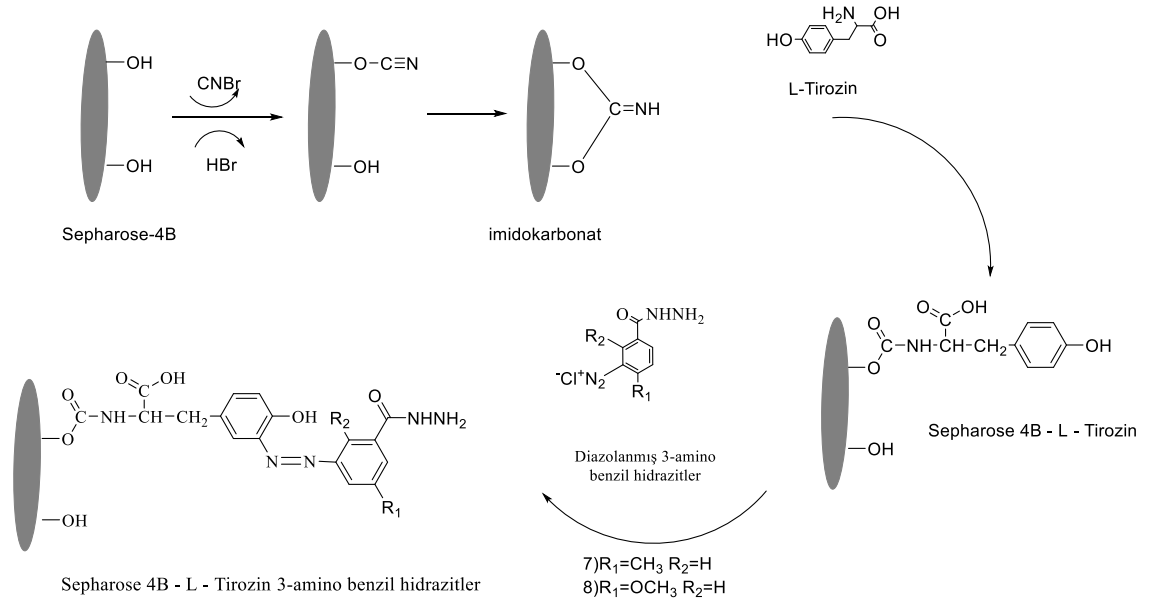
3.3.4.b. Aminobenzohidrazid ve türevlerinin kenetlendirilmesi

Her bir inhibitörden (3-Amino benzohidrazid ve (türevi olan 2 molekülün her birinden ve 4-Amino benzohidrazid ve (türevi olan 2 molekülün her birinden) 15 mg alınarak 0°C civarında 7,8 mL, 1 M HCl içinde çözüldü ve içerisinde 65 mg NaNO₂ bulunan 0°C'deki 5 mL çözelti, her bir inhibitör çözelti içerisine damla damla katıldı. 10 dakikalık reaksiyondan sonra diazolanmış olarak bulunan sülfanilamid türevleri ayrı ayrı her bir 40 mL Sepharose-4B-L-Tirozin süspansiyonuna ilave edildi. 1 M NaOH ile pH 9,5'a çıkarılarak sabit tutuldu ve 3 saat süreyle oda sıcaklığında yavaşça karıştırıldı. Daha sonra 1 L saf su ve 200 mL dengeleme tamponuyla (pH 6,8) yıkandıktan sonra

üzerine bir miktar daha aynı tampondan konularak saklandı ve Şekil 3.5’de gösterildi. (Whitney 1974; Kalın 2014).



Şekil 3.6. 4-Aminobenzohidrazitlerin Sepharose 4B kenetlenmesi modeli



Şekil 3.7. 3-Aminobenzohidrazitlerin Sepharose 4B kenetlenmesi modeli

3.3.5. Afinite kolonlarının paketlenmesi

Hazırlanmış olan jeller dengeleme tamponu (KH_2PO_4 , pH 6,8) içine alınarak jel süspanse edildi ve su trombu yardımı ile vakumla havası alındı. Jel, 1×10 cm'lik kapalı sistemden oluşan afinite kolonuna paketlenildi. Jel çöktükten sonra akış hızını kolaylaştıran peristaltik pompa yardımıyla dengeleme tamponu kullanılarak yıkandı. Kolonun dengelenmiş olup olmadığına bakmak için eluat tamponu kullanılarak cam kuantz ile spektrofotometre cihazında 280 nm 'e absorbanslarının eşitlenmesine bakıldı.

3.3.5.a. Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu

Hazırlanan HRP bitkisinin homojenatı 10 mM fosfat (pH 6,8) tamponu ile en az 2 saat boyunca dengelenmiş olan kolonlara yüklendi ve kolonlar 500 mL 25 mM fosfat (pH 6,8) çözeltisi ile yıkandı (Yıkama süresi en az 2-3 saat). Böylece Horseradish Peroksidaz (HRP) enzimleri kolona tutunmuş ve diğer safsızlıklarda uzaklaştırılmış oldu. Sonra 1 M $\text{NaCl}/25 \text{ mM}$ Na_2HPO_4 (pH 6,8) tamponu tatbik edilerek peroksidaz enzimi elüe edildi. Elüatlar $1,5$ 'er mL halinde 20 eppendorf tüpte ayrı ayrı toplandı Her bir elüatın 280 nm 'deki absorbans değeri köre karşı ölçüldü. Peristaltik pompa yardımıyla kolonun akış hızı 20 mL/saat 'e ayarlandı.

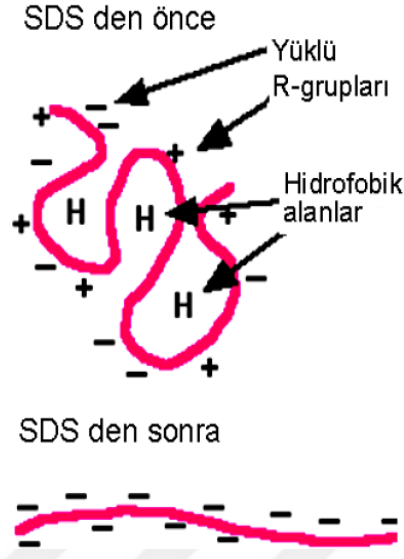
3.4. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrez İle Enzim Saflığının Belirlenmesi

POD enzimi hazırlanan afinite kolonundan saflaştırıldıktan ve diyaliz (fosfat tamponu, pH 7.0) edildikten sonra %3-8 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektrofrez (SDS-PAGE) ile enzimlerin saflık derecesi ve moleköl ağırlığı kontrol edildi. Standart olarak moleköl ağırlığı belli olan proteinler kullanıldı (Laemmli 1970).

Bu işlem için elektrofrez plakaları önce su ardından leke izini önlemek için alkol ile iyice yıkandı. Her iki kenarında aralık oluşturucu bir plaka ile düz bir plaka üst üste getirilerek kısıkaçlarla tutturuldu. Sabitleşen plakalar, içerisinde sızdırmayı önleyen sünger ihtiva eden jel hazırlama kabinine konuldu. Ayırma ve yığma jelleri hazırlandı.

Hazırlanan ayırma jeli plakalar arasına üst kesimde 0,5 cm kalıncaya kadar ince uçlu pipet yardımıyla döküldü. Hava almamasına dikkat edilerek bir süre jelin donması için beklendi. Üzerindeki köpük oluşumunu engellemek için ayırma jeli tabakalar arasına dökülür dökülmez 1 μ L izopropil alkol ilave edildi sonrasında bu sıvı, üzerinde kalmayacak şekilde döküldü ve jelin katılaşmasının ardından yığılma jeli hazırlandı. Ayrıca proteinler ayırma jelinden yukarıya kadar (yığılma jeline kadar) gelip orada yüksüzleşirler. Ve yığılma jeli donma esnasında ayırma jeline göre daha seyreltiktir. Yığılma jeli cam plakanın üst seviyesine kadar eklendi. Üzerine dikkatlice tarak yerleştirildikten sonra jelin kuruması için beklendi diğer bir yandan numunelerin her birinde 20 μ g protein olacak şekilde hazırlandı. Toplam hacim 100 μ g olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu ile 3 dakika boyunca sıcak su banyosunda denatüre edildi. Daha sonra numunelerin soğutulmasının ardından tarak yardımıyla oluşan istenilen boşluklara 30 μ L enzim ile 4 μ L marker çok ince uçlu pipet yardımıyla eklenerek plakalar elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konuldu ve tank kapağı kapatılarak alt tarafından (+) kablo (anot), üstten (-) kablo (katot) denk gelecek şekilde yerleştirildi. Önce 90 voltta yarım saat yürütüldü. Daha sonra akım 120 volta çıkartılarak 1 saat 20 dakika oda sıcaklığında yürütülmesi sağlandı. Akım kesilerek, cam plakalar arasındaki jel dikkatli bir şekilde çıkarıldı. Bu yürütme tamponu tekrar kullanılmak üzere saklandı.

Elektroforez bitince cam plaklardan çıkartılan jel tespit çözeltilisiyle muamele edilip 30 dakika boyunca karıştırıcı ile karıştırıldı. Ardından bu sıvı alındı, redüksiyon çözeltilisiyle bir 30 dakika daha karıştırıcı cihazında bekletildi. 5 dakika saf su ya da musluk su ile muamele edilerek jel üç defa iyice yıkandı. Jellerin yırtılmamasına dikkat edilerek karıştırıcının hızı ayarlandı. Gümüş nitrattan 0,1 g alınarak (miktarına dikkat edildi) 20 dakika gümüş nitrat çözeltilisiyle karıştırıcının üstünde boyandı. Bu boya kısa bir süre önce hazırlanıp karanlıkta bekletildi. Boyama sonrası karıştırıcıdan alınan afinite jeli ardından gümüşün akması için 3 kere saf su ile yıkandı. Bantlar görülünce jel karıştırıcının üstünde 7,5 g sodyum karbonat, 540 mL suda çözüldü ve üzerine 240 μ L formaldehit ilave edildi (Temel 2006).



Şekil 3.8. SDS-PAGE ile proteinlerin net yükünün maskelenmesi

3.5. Afinite Kolonunun Peroksidaz Enzimini Tutma Kapasitesinin Bulunması

Afinite jellerinin tutma kapasitesi bulunurken pH, sıcaklık ve iyonik şiddet etkileri incelendi. Kolonun kapasite belirleme işlemi şu prosedüre göre gerçekleştirildi:

Hazırlanan jelden 1 ml alınarak dengeleme tamponuyla 1x10 cm'lik bir kolona alındı ve daha önceden peroksidaz enzimi ile doyuruldu. Enzimin fazlası yıkama tamponu ile yıkandıktan sonra bağlanmış olan peroksidaz enzimleri uygun elüsyon tamponuyla elüe edilerek Lowry yöntemi ile protein miktarı belirlendi. Aynı zamanda jel kurutularak tartıldı, kurutulan jeller 0,02 gr ile 0,05 gr arasında bulundu. En son işlemde ise bulunan değerlerin en yükseği alınarak 2 g'lık olan her ayrı kolon için sıcaklık, iyonik şiddet, pH için ortalamaları alındı ve mg protein/gram-jel cinsinden peroksidaz enziminin tutma kapasitesi belirlendi.

3.5.1. pH'nın kolon kapasitesine etkisi

Horseradish bitkisinden saflaştırılan HRP enziminin saflaştırılması için hazırlanan kolonda pH'nın bağlanmayı nasıl etkilediğini belirlemek amacı ile farklı pH'larda

(pH'sı 5.5, 6.0, 6.8, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 ve 9.0 arasında) tamponlar kullanıldı. En uygun pH için sonuçlar mg protein /g jel başına grafik edildi.

3.5.2. Sıcaklığın kolon kapasitesine etkisi

Horseradish bitkisinden saflaştırılan HRP enziminin saflaştırılması için hazırlanan kolonda, sıcaklığın kolon kapasitesine etkisini belirlemek amacı ile fosfat tamponu pH 6,8'de, 5, 10, 15, 20 ve 25°C'de farklı sıcaklıklarda tutma kapasitesi belirlendi ve mg protein /g jel başına grafik edildi.

3.5.3. İyonik şiddetin kolon kapasitesine etkisi

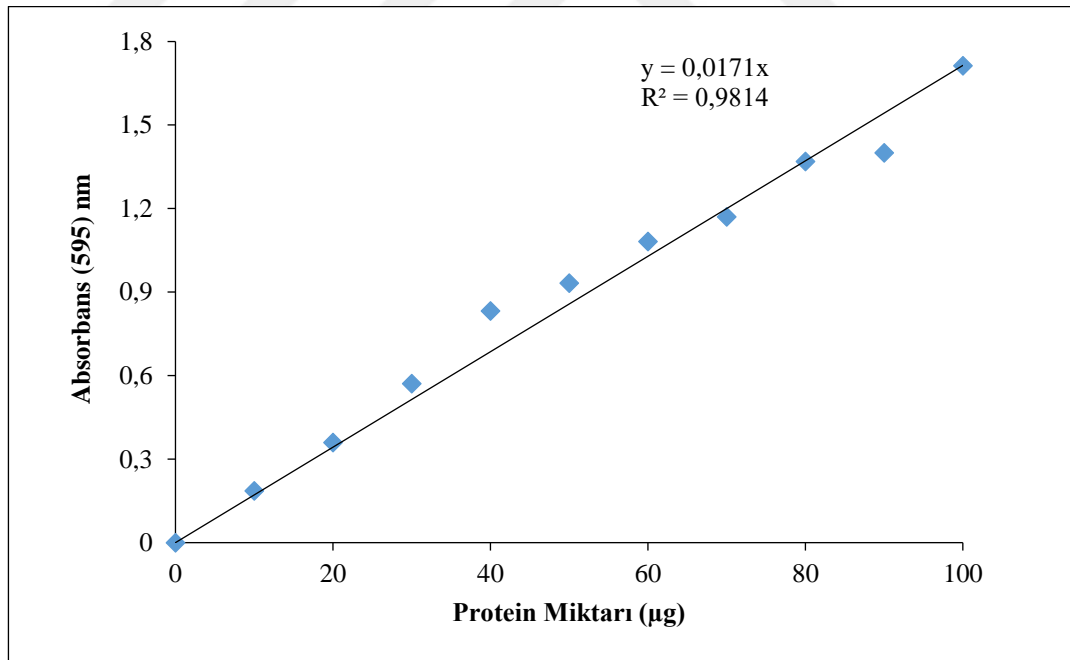
Horseradish bitkisinden saflaştırılan HRP enziminin saflaştırılması için hazırlanan kolonda, optimum pH ve en uygun bağlanma sıcaklığında deney yapıldı. Bu deneyde iyonik şiddet 0,2 ile 0,5 arasında değiştirilerek sonuçlar mg protein /g jel başına grafikte gösterildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Horseradish Peroksidaz Enzimi ile İlgili Yapılan Araştırma Bulguları

4.1.1. Kantitatif protein tayini için kullanılan standart grafik

At turpu bitkisinden elde edilen homojenatlar ve afinite kolonlarından saflaştırılan peroksidaz enzim çözeltilerindeki kantitatif protein miktarı Bradford yöntemiyle belirlendi ve standart grafik hazırlandı. At turpu bitkisinin homojenatları ve afinite kolonu ile hazırlanan enzim çözeltilerindeki kantitatif protein miktarı bu standart grafikten faydalanılarak bulundu. Standart çözeltilerin μg protein başına denk gelen absorban değerleri Şekil 4.1’de gösterildi.



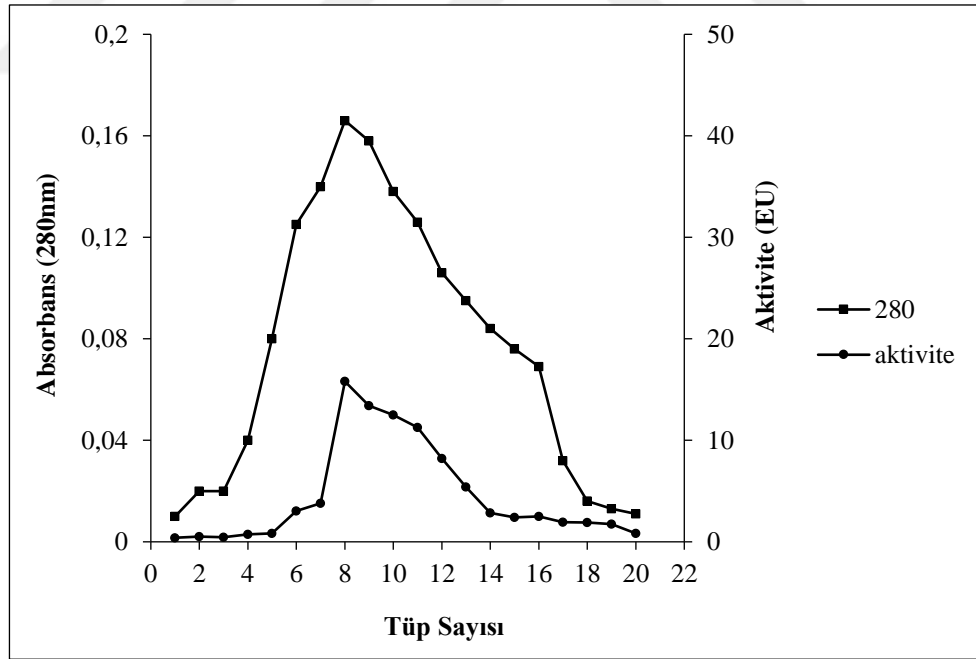
Şekil 4.1. Proteinlerin kantitatif tayini için Bradford metoduyla kullanılan standart grafik

*Protein miktarı (BSA: Bovine Serum Albumini)

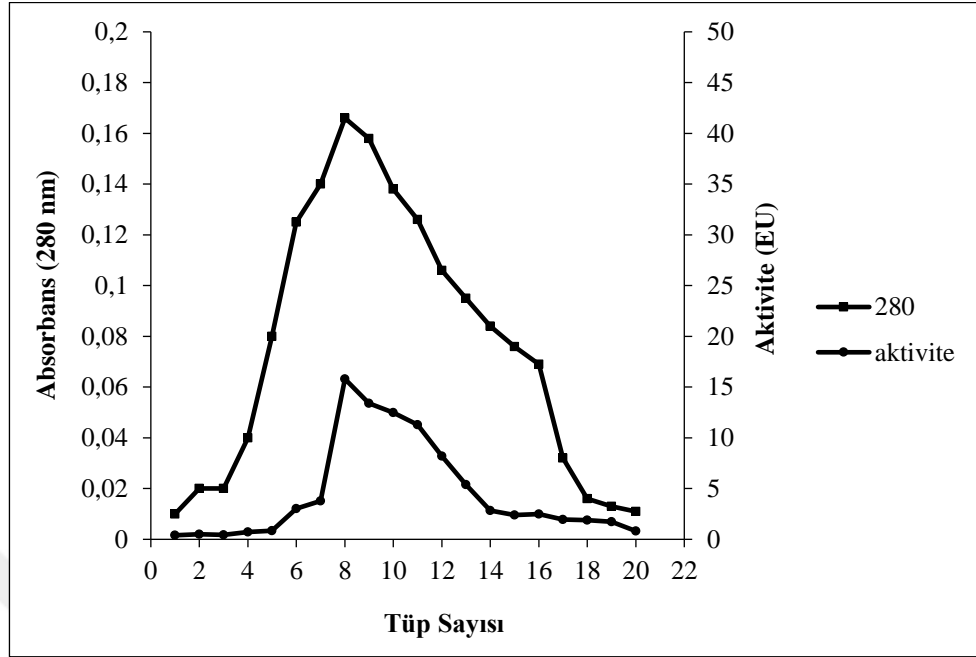
4.2. Horseradish Bitkisinden Peroksidaz Enzimi Saflaştırılması Sonuçları

4.2.1. Horseradish peroksidaz enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırma sonuçları

At turpu bitkisinden hazırlanan homojenatlardan 5'er mL Bölüm 3.3.4'de anlatıldığı gibi hazırlanan dengelenmiş olan kolona pipet aracılığıyla tatbik edildi. Yıkama işlemi tamamlanmasının ardından elüsyon çözeltisi ile elüe edildi. Peristaltik pompa kullanılarak kolon akış hızı 35 mL/saat'e ayarlandı, 1,5'er mL halinde tüplere alındı. Alınan her bir elüatın 280 nm'de absorbanans değerleri ölçüldü. Ölçülen absorbanans değerlerinin tüp sayısına karşı grafikleri Şekil 4.2'de verildi. 470 nm'de absorbanans gösteren tüplerin aktivitelerine bakıldı. Tüp sayısına karşı aktivite grafikleri doygun substrat konsantrasyonunda hesaplanarak Şekil 4.2 ve 4.3'de gösterildi.



Şekil 4.2. 3-Amino 5-metoksi benzohidrazid kolonundan At turpu (HRP) enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırma sırasında elüatların 280 nm'deki absorbananslarını ve 470 nm'deki aktivitelerini gösteren grafik



Şekil 4.3. 4-Amino 2-nitro benzohidrazid kolonundan At turpu (HRP) enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırma sırasında elüatların 280 nm'deki absorpsanlarını ve 470 nm'deki aktivite gösteren grafik

4.2.2. Horseradish peroksidaz enziminin Benzohidrazid türevlerinin saflaştırma sonuçları

4.2.2.a. 4-Amino benzahidrazid türevlerinin saflaştırılması

Ligand olarak 4-Amino benzohidrazid türevleri olan 4-Amino 2-nitro benzahidrazid ve 4-Amino 3-nitro benzahidrazid molekülünün bulunduğu kolonlardan, at turpu (Horseradish) bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin saflaştırılması kademesinde aktivite tayini (470 nm) ve Bradford metoduyla (595 nm) kantitatif protein tayini yapıldı. Horseradish POD enziminin 4-Amino 2-nitro benzahidrazid ile 4-Amino 3-nitro benzahidrazid kolonlarının saflaştırma sonuçları Çizelge 4.1'de gösterildi.

Çizelge 4.1. HRP enziminin 4-Amino benzohidrazid türevlerinin saflaştırma basamakları sonuçları

HRP		Toplam Hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Protein Miktarı (mg/mL)	Total Aktivite (EU)	Total Protein Miktarı (mg)	S. Aktivite (EU/mg)	Yüzde Verim	S. Katsayısı
4-Amino 2-Nitro Benzohidrazid	Homojenat	6	228,3	1,27	1369,8	7,6	179,7	100	1
	Sepharose 4B Afinitite Jeli	3	30	0,0011	90	0,0033	27272,7	6,5	151,7
4-Amino 3-Nitro Benzohidrazid	Homojenat	6	269,5	1,27	1617	7,6	212,2	100	1
	Sepharose 4B Afinitite Jeli	1,5	12,8	0,001	19,2	0,0015	12800	1,2	60,3

4.2.2.b. 3-Amino benzahidrazid türevlerinin saflaştırılması

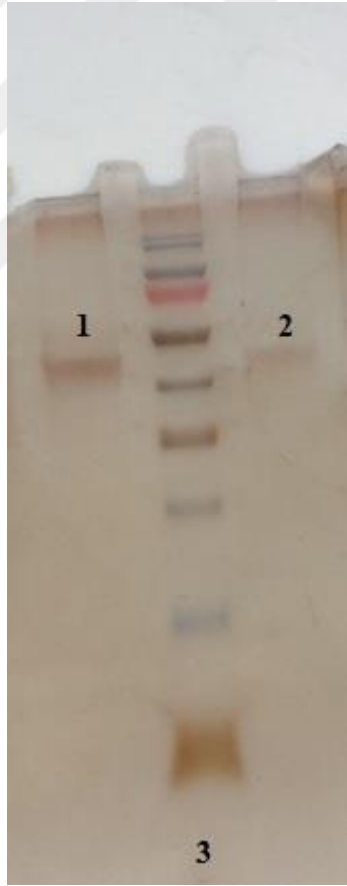
Ligand olarak 3-Amino benzohidrazid türevleri olan 3-Amino 5-metil benzahidrazid ve 3-Amino 5-metoksi benzahidrazid molekülünün bulunduğu kolonlardan, at turpu (Horseradish) bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin saflaştırılması kademesinde aktivite tayini (470 nm) ve Bradford metoduyla (595 nm) kantitatif protein tayini yapıldı. Horseradish POD enziminin 3-Amino 5-metil benzahidrazid ile 3-Amino 5-metoksi benzahidrazid kolonlarının saflaştırma sonuçları Çizelge 4.2’de gösterildi.

Çizelge 4.2. HRP enziminin 3-Amino benzohidrazid türevlerinin saflaştırma basamakları sonuçları

HRP		Toplam Hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Protein Miktarı (mg/mL)	Total Aktivite (EU)	Total Protein Miktarı (mg)	S. Aktivite (EU/mg)	Yüzde Verim	S. Katsayısı
3-Amino 5-Metil Benzohidrazid	Homojenat	6	226,6	1,27	1359,6	7,62	178,4	100	1
	Sepharose 4B Afinitite Jeli	1,5	20,08	0,0016	30,12	0,0024	12550	2,21	70,3
3-Amino 5-Metoksi Benzohidrazid	Homojenat	6	218,4	1,27	1310,4	7,62	171,96	100	1
	Sepharose 4B Afinitite jeli	1,5	20,96	0,0009	31,44	0,00135	23288,8	2,39	135,43

4.2.3. Sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) sonuçları

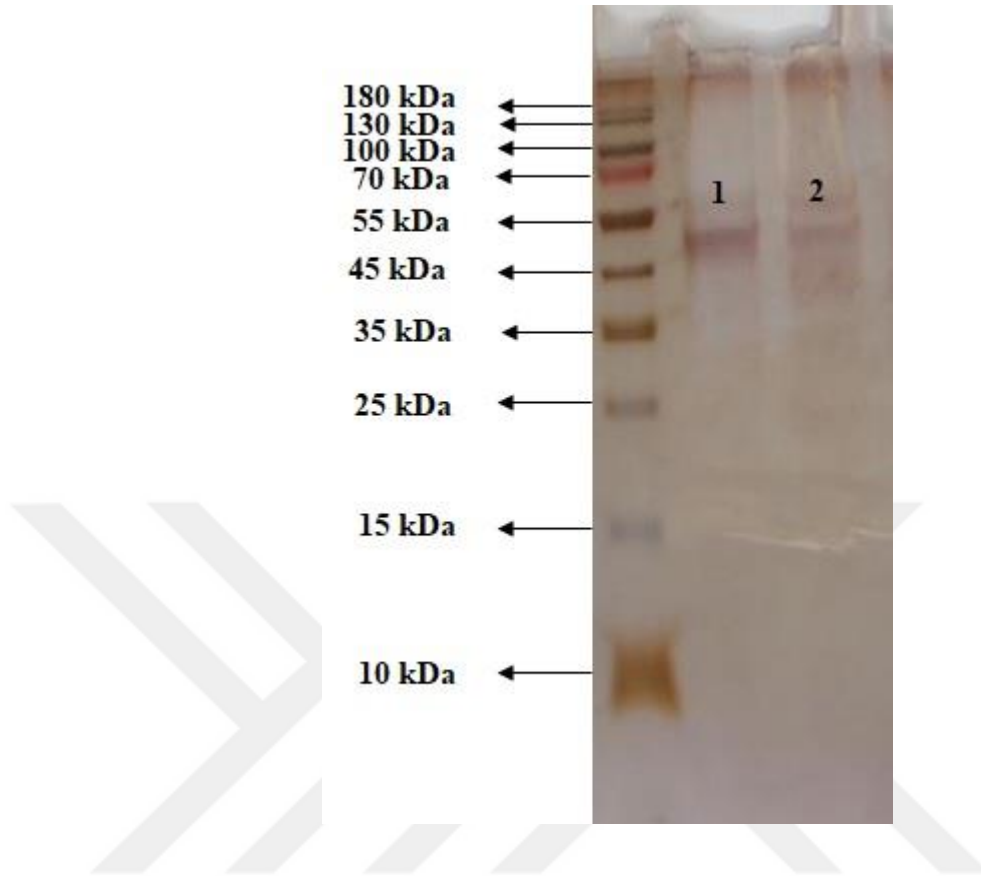
Sentezlediğimiz molekülleri kullanarak hazırladığımız Sepharose 4-B-L-Tirozin-4-Amino benzohidrazid ve 3-Amino benzahidrazid türevlerinin afinite kolonu ile at turpundan saflaştırılan (HRP) enziminin hem saflığını kontrol etmek hem de molekül kütlesini belirlemek amacıyla SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı. Bunun için hazırlanan kesikli SDS-poliakrilamid jel elektroforez kuyularına saflaştırılan peroksidaz enzimi ve standart proteinler uygulandı ve yürütüldü. Ardından elde edilen bantların fotoğrafı çekildi.



Şekil 4.4. 4-Amino benzohidrazid afinite ligandlarından HRP enziminin SDS- PAGE fotoğrafı

(1) 4-Amino 2-Nitro benzahidrazid, (2) 4-Amino 3-Nitro benzahidrazid

*1. ve 2. kuyu afinite kolonundan elde edilen POD; 3.kuyu: standart proteinler (180kDa, 130kDa, 100kDa, 70kDa, 55kDa, 45kDa, 35kDa, 25kDa, 15kDa, 10kDa)



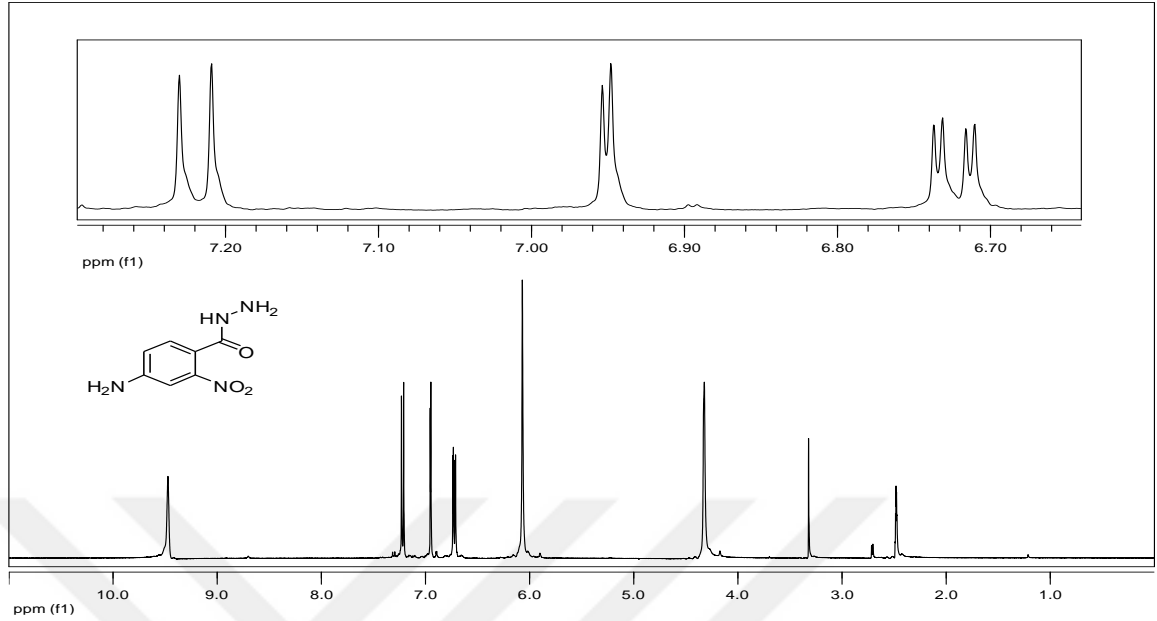
Şekil 4.5. 3-Amino benzohidrazid afinite ligandlarından HRP enziminin SDS-PAGE fotoğrafı

(1) 3-Amino 5-Metil benzahidrazid, (2) 3-Amino 5-Metoksi benzahidrazid

4.3. Amino Benzohidrazid Türevlerinin Sentezlenmesi

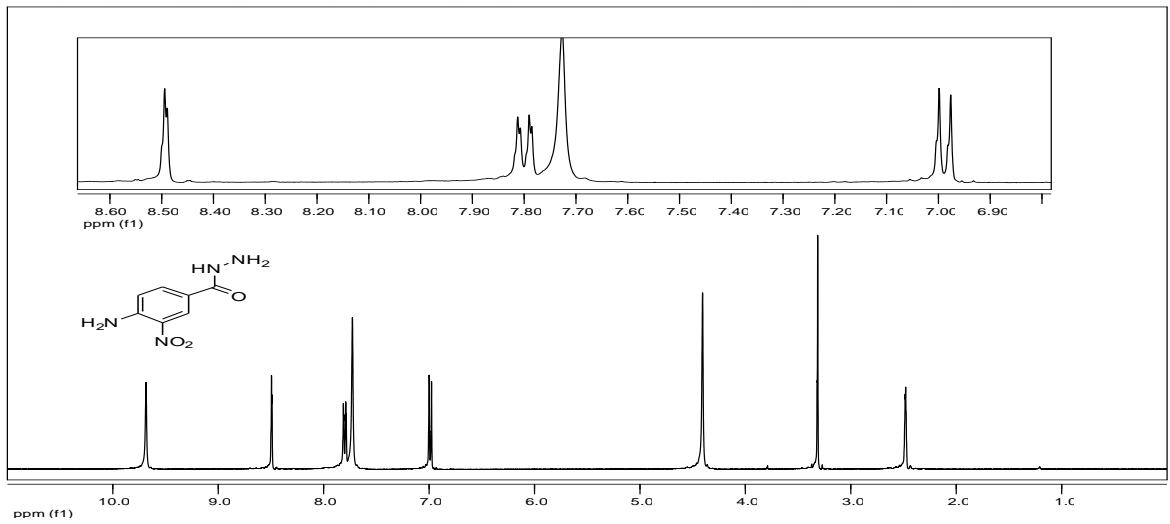
Tez kapsamında çalışması planlanan 4-Amino 2-nitro benzohidrazid, 4-Amino 3-nitro benzohidrazid, 3-Amino 5-metil benzohidrazid ve 3-Amino 5-metoksi benzohidrazid molekülleri ticari olarak temin edilemediğinden dolayı bu bileşiklerin metil esterleri kullanılarak bölüm 3.3.2’de anlatıldığı gibi hidrazin sentezleri yapıldı. Daha sonra $^1\text{H-NMR}$ ’la moleküllerin karakterizasyonu ile doğrulandı.

Satın aldığımız 4-Amino 2-nitro metilbenzoat, 4-Amino 3-nitro metilbenzoat, 3-Amino 5-metil metilbenzoat ve 3-Amino 5-metoksi çıkış molekülleri olarak kullanılıp bunların hidrazin formları sentezlendi. Sentezlenen moleküllerin $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz) spektrumları Şekil 4.6, 4.7, 4.8 ve 4.9’da gösterildi.



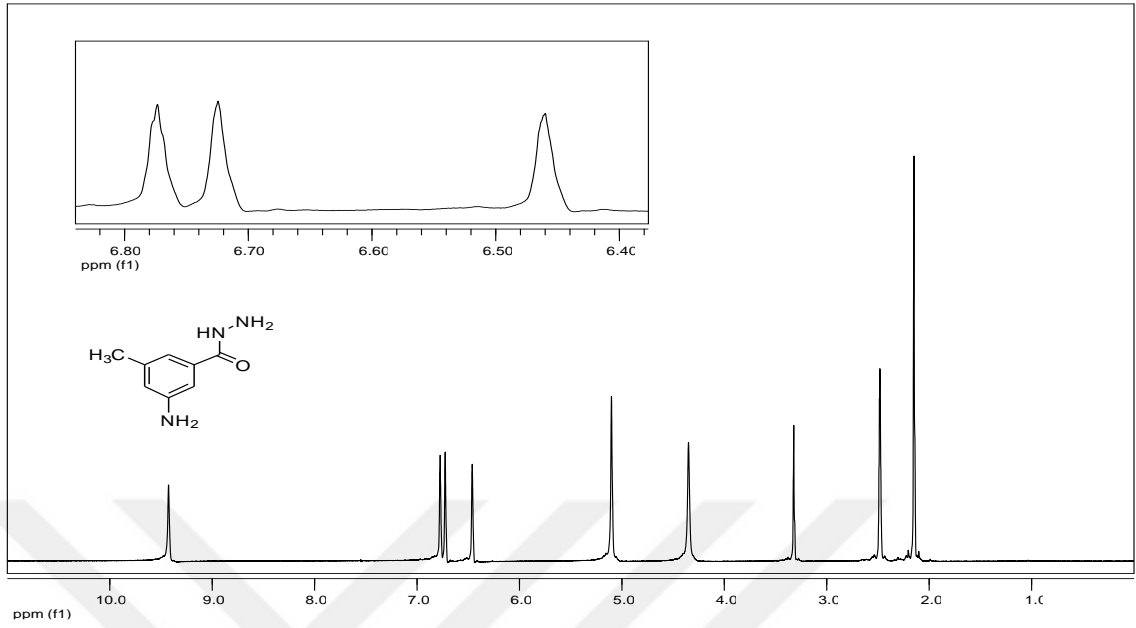
Şekil 4.6. 4-Amino 2-nitro benzohidrazid molekülünün 400 MHz ¹H-NMR spektrumu sonuçları

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆, ppm) □ 9.47 (bs, 1H), 7.22 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.95 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 6.72 (dd, J = 8.4, 2.2 Hz, 1H), 6.07 (bs, 2H), 4.32 (bs, 2H).



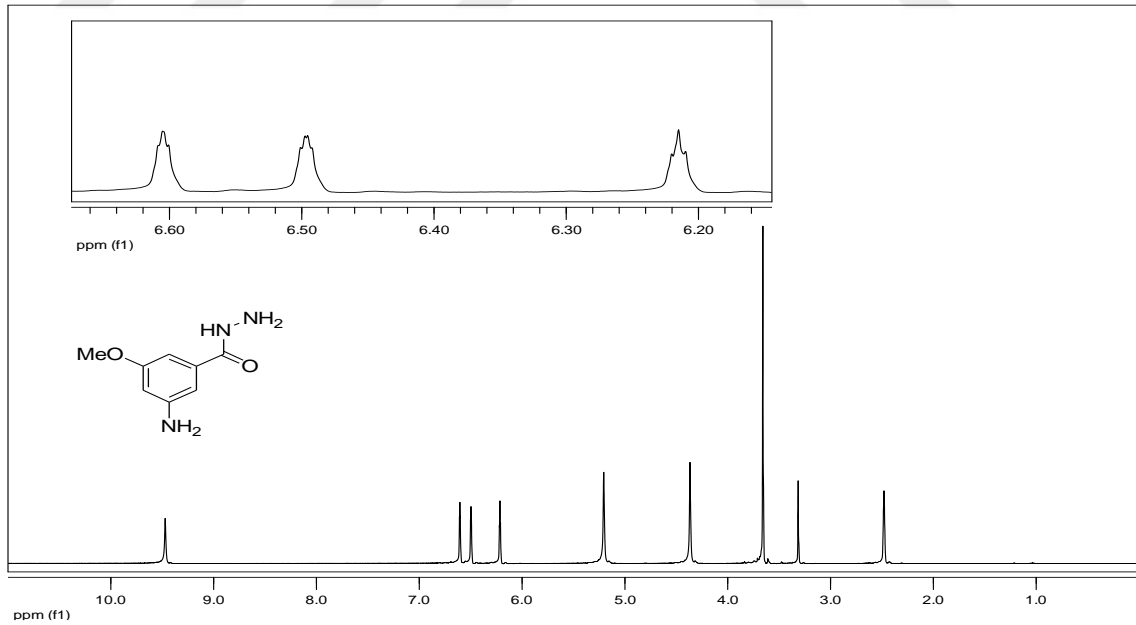
Şekil 4.7. 4-Amino 3-nitro benzohidrazid molekülünün 400 MHz ¹H-NMR spektrumu sonuçları

¹H-NMR (400 MHz, DMSO):) δ ppm 9.68 (bs, 1H) 8.49 (s, 1H), 7.80 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 7.73 (bs, 2H), 6.99 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 4.41 (bs, 2H)



Şekil 4.8. 3-Amino 5-metil benzohidrazid molekülünün 400 MHz $^1\text{H-NMR}$ spektrumu sonuçları

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6 , ppm) ppm 9.43 (bs, 1H), 6.77 (s, 1H), 6.72 (s, 1H), 6.46 (s, 1H), 5.10 (bs, 2H), 4.35 (bs, 2H), 2.15 (s, 3H).



Şekil 4.9. 3-Amino 5-metoksi benzohidrazid (2h) molekülünün 400 MHz $^1\text{H-NMR}$ spektrumu sonuçları

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6 , ppm) ppm 9.47 (bs, 1H), 6.61 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.22 (s, 1H), 5.21 (bs, 2H), 4.37 (bs, 2H), 3.66 (s, 3H).

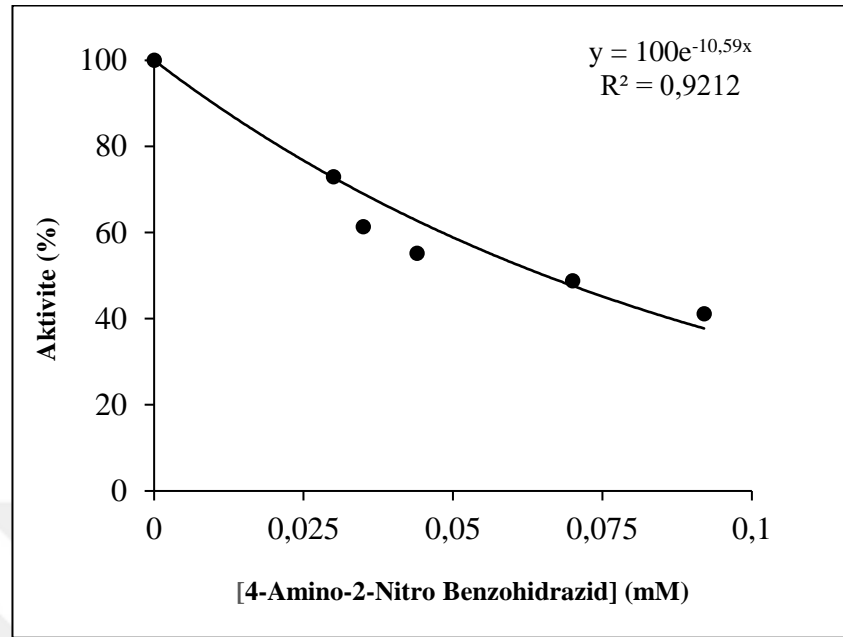
4.4. Sentezlenen 4-Amino Benzohidrazid ve 3-Amino Benzohidrazid Türevlerinin K_i ve IC_{50} Değerlerinin Belirlenmesi

Bu tez kapsamında ki çalışmada 4-Amino benzohidrazid ve 3-Amino benzohidrazid moleküllerinden saflaştırılan Horseradish POD enzimi üzerine 4-Amino benzohidrazid ve 3-Amino benzohidrazid türevlerinin inhibisyon etkisi incelendi. Guaiakol substratı doyumluğun altında alındı ve böylece reaksiyon hızı guaiakole bağlı olduğu anlaşıldı. Sabit substrat konsantrasyonunda (45 mM guaiakol) ve 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda her bir inhibitör için aktivite değerleri hesaplandı. 3 farklı inhibitör konsantrasyonu ve 5 farklı substrat konsantrasyonundan ise K_i değeri belirlendi. K_i ve IC_{50} deney prosedürü gösterildi. % Aktivite-Konsantrasyon grafiği çizilerek IC_{50} değeri bulundu ve Lineawear-Burk grafiğinden K_i değeri tespit edildi. POD enzimi için ayrı ayrı çizilen IC_{50} ve K_i grafiklerinden yararlanılarak moleküllerin IC_{50} ve K_i değerleri ve inhibisyon tipleri belirlendi.

4.4.1. 4-Amino 2-nitro benzohidrazid inhibitörü için Horseradish (*Armoracia rusticana*) POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan kinetik çalışmalar

Çizelge 4.3. 4-Amino 2-nitro benzohidrazid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen HRP enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan % Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

Kör Tüpü(mL)						Numune Tüpü(mL)							
inhibitör	Guaiakol	Fosfat Tamponu	H ₂ O ₂	İnhibitör	Su	Guaiakol	Fosfat Tamponu	H ₂ O ₂	İnhibitör	POD	Su	[I] mM	%Aktivite
4-amino 2-nitro benzohidrazid	0,5	1,0	1,0	0,07	0,430	0,5	1,0	1,0	0,07	0,01	0,420	0,03	72,96
	0,5	1,0	1,0	0,08	0,420	0,5	1,0	1,0	0,08	0,01	0,410	0,035	61,35
	0,5	1,0	1,0	0,10	0,400	0,5	1,0	1,0	0,10	0,01	0,390	0,044	55,17
	0,5	1,0	1,0	0,16	0,340	0,5	1,0	1,0	0,16	0,01	0,330	0,07	48,82
	0,5	1,0	1,0	0,21	0,290	0,5	1,0	1,0	0,21	0,01	0,280	0,092	41,17



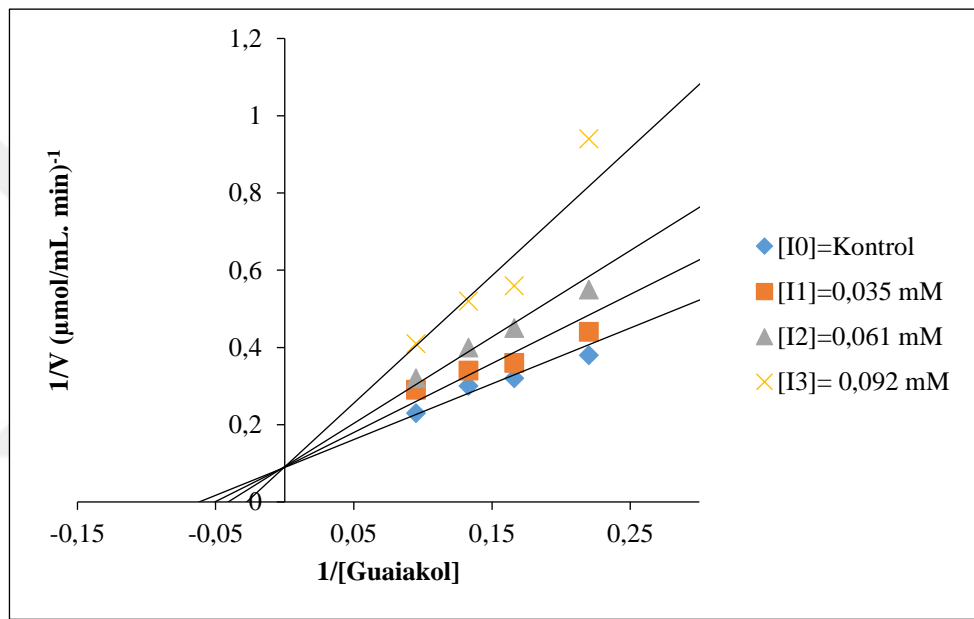
Şekil 4.10. HRP enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 4-Amino 2-nitro benzohidrazid ile elde edilen % Aktivite-[İnhibitör] grafiği

Çizelge 4.4. HRP enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 4-Amino 2-nitro benzohidrazid inhibitörü için $1/V$, $1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü

İnhibitör no	Kör Tüpü (mL)					Numune Tüpü (mL)						$1/V$ ($\mu\text{mol}/\text{mL} \cdot \text{min})^{-1}$	$1/S$ mM^{-1}
	Guaiakol	Fosfat Tamponu	H_2O_2	İnhibitör	Su	Guaiakol	Fosfat Tamponu	H_2O_2	İnhibitör	Su	POD		
[I] ₀	0,2	1,0	1,0	-	0,8	0,2	1,0	1,0	-	0,790	0,010	0,58	0,33
	0,3	1,0	1,0	-	0,7	0,3	1,0	1,0	-	0,690	0,010	0,38	0,22
	0,4	1,0	1,0	-	0,6	0,4	1,0	1,0	-	0,590	0,010	0,32	0,16
	0,5	1,0	1,0	-	0,5	0,5	1,0	1,0	-	0,490	0,010	0,3	0,13
	0,6	1,0	1,0	-	0,4	0,6	1,0	1,0	-	0,390	0,010	0,23	0,09
[I] ₁	0,2	1,0	1,0	0,080	0,720	0,2	1,0	1,0	0,080	0,710	0,010	0,71	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,080	0,620	0,3	1,0	1,0	0,080	0,610	0,010	0,44	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,080	0,520	0,4	1,0	1,0	0,080	0,510	0,010	0,36	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,080	0,420	0,5	1,0	1,0	0,080	0,410	0,010	0,34	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,080	0,320	0,6	1,0	1,0	0,080	0,310	0,010	0,29	0,09
[I] ₂	0,2	1,0	1,0	0,140	0,660	0,2	1,0	1,0	0,140	0,650	0,010	0,85	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,140	0,560	0,3	1,0	1,0	0,140	0,550	0,010	0,55	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,140	0,460	0,4	1,0	1,0	0,140	0,450	0,010	0,45	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,140	0,360	0,5	1,0	1,0	0,140	0,350	0,010	0,4	0,13

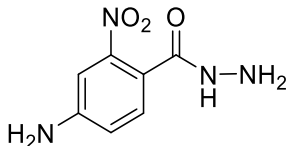
Çizelge 4.4. (devam)

	0,6	1,0	1,0	0,140	0,260	0,6	1,0	1,0	0,140	0,250	0,010	0,32	0,09
[I] ₃	0,2	1,0	1,0	0,210	0,590	0,2	1,0	1,0	0,210	0,580	0,010	1,14	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,210	0,490	0,3	1,0	1,0	0,210	0,480	0,010	0,94	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,210	0,390	0,4	1,0	1,0	0,210	0,380	0,010	0,56	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,210	0,290	0,5	1,0	1,0	0,210	0,280	0,010	0,52	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,210	0,190	0,6	1,0	1,0	0,210	0,180	0,010	0,41	0,09



Şekil 4.11. HRP enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 4-Amino 2-nitro benzohidrazid inhibitörü için edilen 1/V-1/[S] grafiği

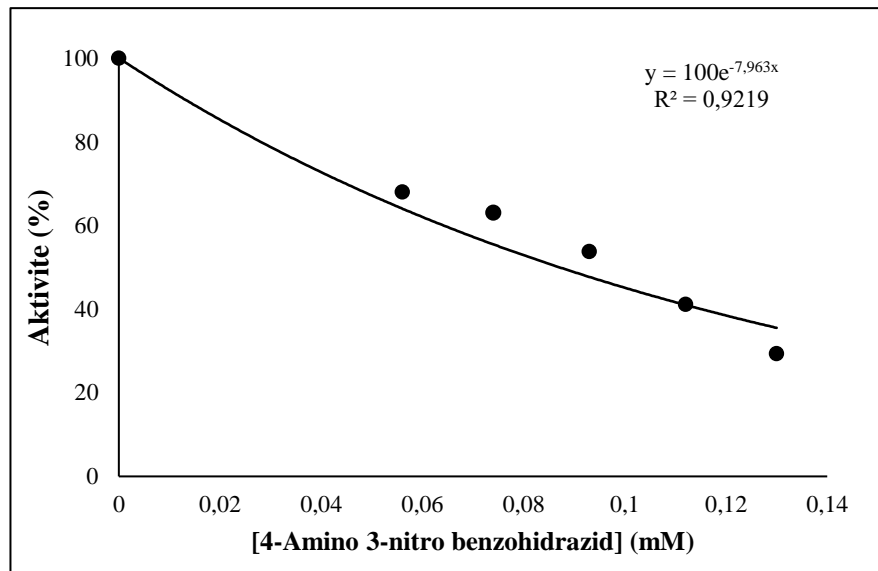
Çizelge 4.5. HRP enzimini üzerine 4-Amino 2-nitro benzohidrazid inhibitörünün inhibisyon etkisi

 4-amino-2-nitro benzohidrazid	HRP	IC ₅₀	Ortalama K _i	İnhibisyon
		(mM)	(mM)	tipi
		0,065	0,116±0,043	Yarışmalı

4.4.2. 4-Amino 3-nitro benzohidrazid inhibitörü için Horseradish (*Armoracia rusticana*) POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan kinetik çalışmalar

Çizelge 4.6. 4-Amino 3-nitro benzohidrazid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen HRP enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan % Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

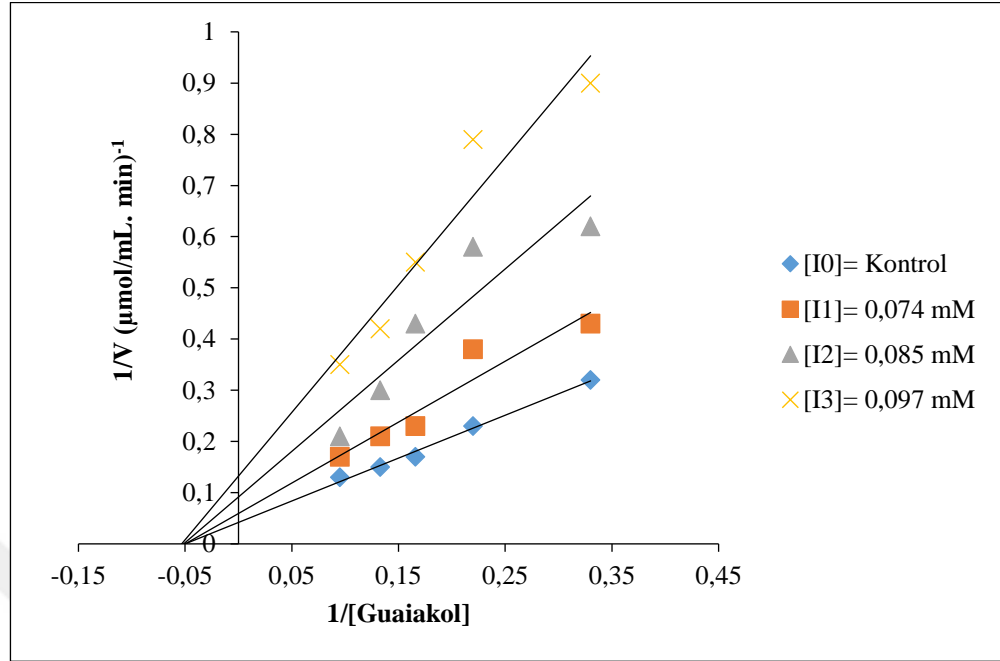
İnhibitör	Kör Tüpü(mL)					Numune Tüpü(mL)						[I] mM	% Aktivite
	Guaiakol	Fosfat Tamponu	H ₂ O ₂	İnhibitör	Su	Guaiakol	Fosfat Tamponu	H ₂ O ₂	İnhibitör	POD	Su		
4-Amino 3-nitro benzohidrazid	0,5	1,0	1,0	0,150	0,350	0,5	1,0	1,0	0,050	0,01	0,340	0,056	68,06
	0,5	1,0	1,0	0,200	0,300	0,5	1,0	1,0	0,100	0,01	0,290	0,074	63,02
	0,5	1,0	1,0	0,250	0,250	0,5	1,0	1,0	0,125	0,01	0,240	0,093	53,78
	0,5	1,0	1,0	0,300	0,200	0,5	1,0	1,0	0,150	0,01	0,190	0,112	41,17
	0,5	1,0	1,0	0,350	0,150	0,5	1,0	1,0	0,200	0,01	0,140	0,13	29,41



Şekil 4.12. HRP enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 4-Amino 3-nitro benzohidrazid ile elde edilen % Aktivite-[İnhibitör] grafiği

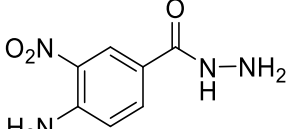
Çizelge 4.7. HRP enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 4-Amino 3-nitro benzohidrazid inhibitörü için $1/V$, $1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü

İnhibitör no	Kör Tüpü (mL)					Numune Tüpü (mL)						$1/V$ ($\mu\text{mol}/\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$)	$1/S$ mM^{-1}
	Guaiakol	Fosfat Tamponu	H_2O_2	İnhibitör	Su	Guaiakol	Fosfat Tamponu	H_2O_2	İnhibitör	Su	POD		
[I] ₀	0,2	1,0	1,0	-	0,8	0,2	1,0	1,0	-	0,790	0,010	0,32	0,33
	0,3	1,0	1,0	-	0,7	0,3	1,0	1,0	-	0,690	0,010	0,23	0,22
	0,4	1,0	1,0	-	0,6	0,4	1,0	1,0	-	0,590	0,010	0,17	0,16
	0,5	1,0	1,0	-	0,5	0,5	1,0	1,0	-	0,490	0,010	0,15	0,13
	0,6	1,0	1,0	-	0,4	0,6	1,0	1,0	-	0,390	0,010	0,13	0,09
[I] ₁	0,2	1,0	1,0	0,200	0,600	0,2	1,0	1,0	0,200	0,590	0,010	0,43	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,200	0,500	0,3	1,0	1,0	0,200	0,490	0,010	0,38	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,200	0,400	0,4	1,0	1,0	0,200	0,390	0,010	0,23	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,200	0,300	0,5	1,0	1,0	0,200	0,290	0,010	0,21	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,200	0,200	0,6	1,0	1,0	0,200	0,190	0,010	0,17	0,09
[I] ₂	0,2	1,0	1,0	0,230	0,570	0,2	1,0	1,0	0,230	0,560	0,010	0,62	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,230	0,470	0,3	1,0	1,0	0,230	0,460	0,010	0,58	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,230	0,370	0,4	1,0	1,0	0,230	0,360	0,010	0,43	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,230	0,270	0,5	1,0	1,0	0,230	0,260	0,010	0,3	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,230	0,170	0,6	1,0	1,0	0,230	0,160	0,010	0,21	0,09
[I] ₃	0,2	1,0	1,0	0,260	0,540	0,2	1,0	1,0	0,260	0,530	0,010	0,9	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,260	0,440	0,3	1,0	1,0	0,260	0,430	0,010	0,79	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,260	0,340	0,4	1,0	1,0	0,260	0,330	0,010	0,55	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,260	0,240	0,5	1,0	1,0	0,260	0,230	0,010	0,42	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,260	0,140	0,6	1,0	1,0	0,260	0,130	0,010	0,35	0,09



Şekil 4.13. HRP enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 4-Amino 3-nitro benzohidrazid inhibitörü için edilen $1/V-1/[S]$ grafiği

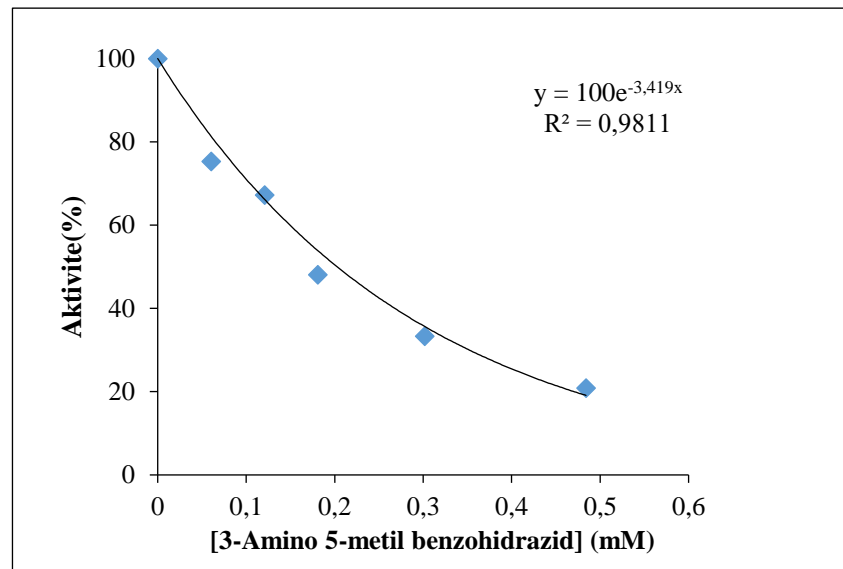
Çizelge 4.8. HRP enzimini üzerine 4-Amino 3-nitro benzohidrazid inhibitörünün inhibisyon etkisi

 4-amino-3-nitro benzohidrazid		IC₅₀ (mM)	Ortalama K_i (mM)	İnhibisyon tipi
			0,087	0,099±0,0694

4.4.3. 3-Amino 5-metil benzohidrazid inhibitörü için Horseradish (*Armoracia rusticana*) POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan kinetik çalışmalar

Çizelge 4.9. 3-Amino 5-metil benzohidrazid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen HRP enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan % Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

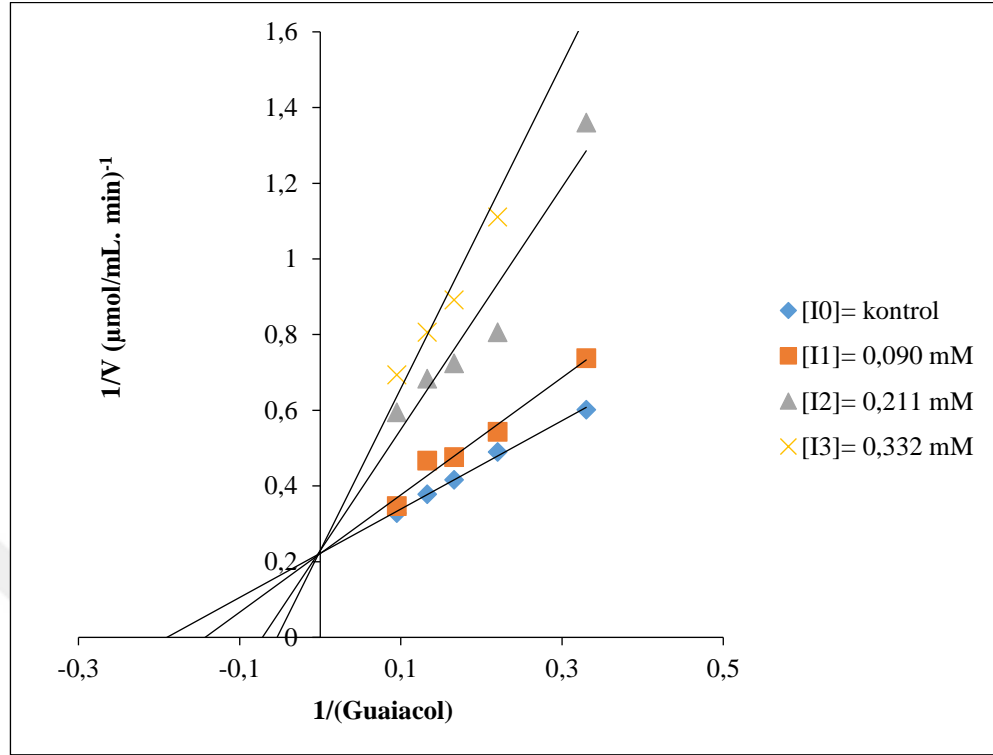
İnhibitör	Kör Tüpü(mL)					Numune Tüpü(mL)						[I] mM	% Aktivite
	Guaiakol	Fosfat Tamponu	H ₂ O ₂	İnhibitör	Su	Guaiakol	Fosfat Tamponu	H ₂ O ₂	İnhibitör	POD	Su		
3-Amino 5-metil benzohidrazid	0,5	1,0	1,0	0,010	0,490	0,5	1,0	1,0	0,010	0,01	0,480	0,0605	75,3
	0,5	1,0	1,0	0,020	0,480	0,5	1,0	1,0	0,020	0,01	0,470	0,121	67,2
	0,5	1,0	1,0	0,030	0,470	0,5	1,0	1,0	0,030	0,01	0,460	0,181	48,1
	0,5	1,0	1,0	0,050	0,450	0,5	1,0	1,0	0,050	0,01	0,440	0,302	33,3
	0,5	1,0	1,0	0,080	0,420	0,5	1,0	1,0	0,080	0,01	0,410	0,484	20,9



Şekil 4.14. HRP enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino 5-metil benzohidrazid ile elde edilen % Aktivite-[İnhibitör] grafiği

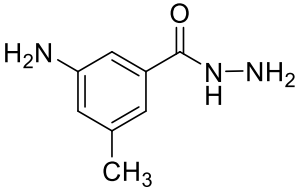
Çizelge 4.10. HRP enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino 5-metil benzohidrazid inhibitörü için $1/V$, $1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü

İnhibitör no	Kör Tüpü (mL)					Numune Tüpü (mL)						$1/V$ ($\mu\text{mol}/\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$)	$1/S$ mM^{-1}
	Guaiakol	Fosfat Tamponu	H_2O_2	İnhibitör	Su	Guaiakol	Fosfat Tamponu	H_2O_2	İnhibitör	Su	POD		
[I] ₀	0,2	1,0	1,0	-	0,8	0,2	1,0	1,0	-	0,790	0,010	0,602	0,33
	0,3	1,0	1,0	-	0,7	0,3	1,0	1,0	-	0,690	0,010	0,49	0,22
	0,4	1,0	1,0	-	0,6	0,4	1,0	1,0	-	0,590	0,010	0,416	0,16
	0,5	1,0	1,0	-	0,5	0,5	1,0	1,0	-	0,490	0,010	0,378	0,13
	0,6	1,0	1,0	-	0,4	0,6	1,0	1,0	-	0,390	0,010	0,328	0,09
[I] ₁	0,2	1,0	1,0	0,015	0,785	0,2	1,0	1,0	0,015	0,775	0,010	0,738	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,015	0,685	0,3	1,0	1,0	0,015	0,675	0,010	0,543	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,015	0,585	0,4	1,0	1,0	0,015	0,575	0,010	0,476	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,015	0,485	0,5	1,0	1,0	0,015	0,475	0,010	0,467	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,015	0,385	0,6	1,0	1,0	0,015	0,375	0,010	0,347	0,09
[I] ₂	0,2	1,0	1,0	0,035	0,765	0,2	1,0	1,0	0,035	0,755	0,010	1,36	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,035	0,665	0,3	1,0	1,0	0,035	0,655	0,010	0,806	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,035	0,565	0,4	1,0	1,0	0,035	0,555	0,010	0,724	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,035	0,465	0,5	1,0	1,0	0,035	0,455	0,010	0,684	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,035	0,365	0,6	1,0	1,0	0,035	0,355	0,010	0,595	0,09
[I] ₃	0,2	1,0	1,0	0,055	0,745	0,2	1,0	1,0	0,055	0,735	0,010	1,69	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,055	0,645	0,3	1,0	1,0	0,055	0,635	0,010	1,111	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,055	0,545	0,4	1,0	1,0	0,055	0,535	0,010	0,892	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,055	0,445	0,5	1,0	1,0	0,055	0,435	0,010	0,806	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,055	0,345	0,6	1,0	1,0	0,055	0,335	0,010	0,694	0,09



Şekil 4.15. HRP enzimi üzerine guaiacol substratına bağlı olarak 3-Amino 5-metil benzohidrazid inhibitörü için edilen $1/V-1/[S]$ grafiği

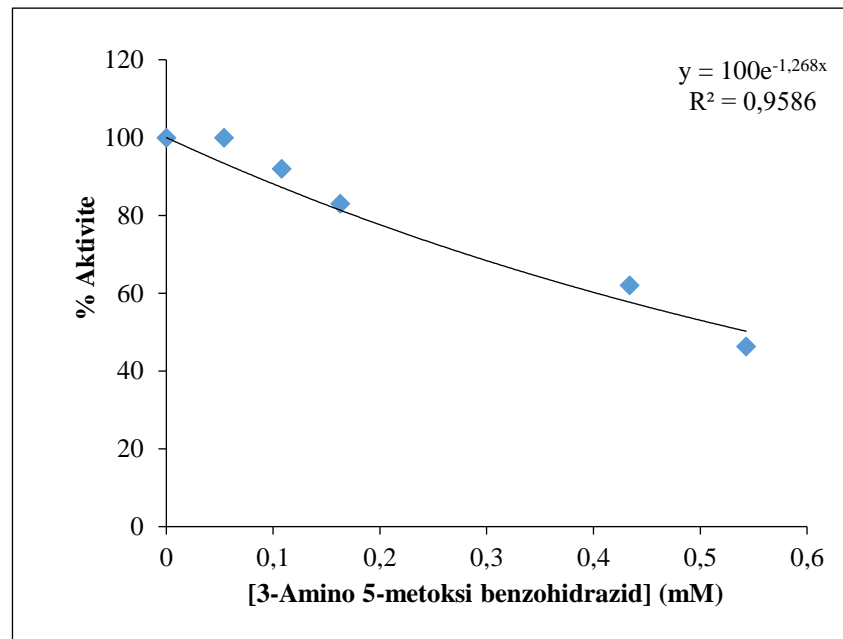
Çizelge 4.11. HRP enzimini üzerine 4-Amino 3-nitro benzohidrazid inhibitörünün inhibisyon etkisi

 3-amino-5-metil benzohidrazid	HRP	IC ₅₀	Ortalama K _i	İnhibisyon
		(mM)	(mM)	tipi
		0,202	0,173±0,0805	Yarışmalı

4.4.4. 3-Amino 5-metoksi benzohidrazid inhibitörü için Horseradish (*Armoracia rusticana*) POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan kinetik çalışmalar

Çizelge 4.12. 3-Amino 5-metoksi benzohidrazid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen HRP enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan % Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

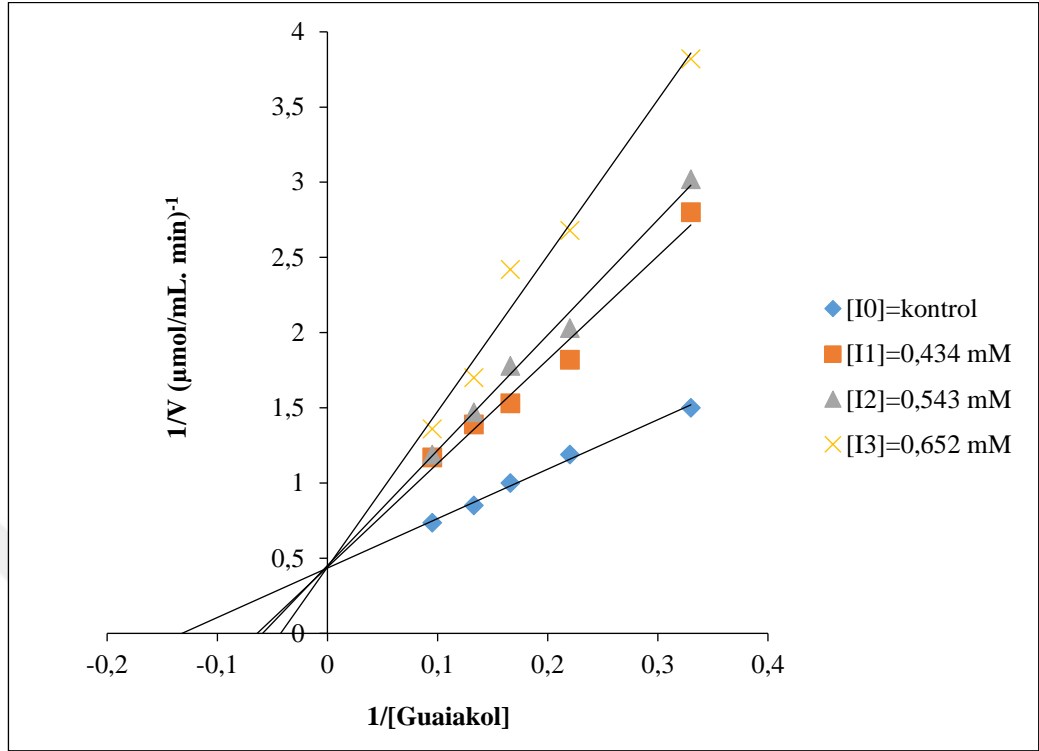
Kör Tüpü						Numune Tüpü						[I] mM	% Aktivite
Inhibitör	Guaiakol (mL)	Fosfat Tamp(mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	Su (mL)	Guaiaco(mL)	Fosfat Tamp(mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	POD(mL)	Su (mL)		
3-Amino 5-metoksi benzohidrazid	0,5	1,0	1,0	0,010	0,490	0,5	1,0	1,0	0,010	0,01	0,480	0,054	100
	0,5	1,0	1,0	0,020	0,480	0,5	1,0	1,0	0,020	0,01	0,470	0,108	92
	0,5	1,0	1,0	0,030	0,470	0,5	1,0	1,0	0,030	0,01	0,460	0,163	83
	0,5	1,0	1,0	0,080	0,420	0,5	1,0	1,0	0,080	0,01	0,410	0,434	62
	0,5	1,0	1,0	0,100	0,400	0,5	1,0	1,0	0,100	0,01	0,390	0,543	46,3



Şekil 4.16. HRP enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino 5-metoksi benzohidrazid ile elde edilen % Aktivite-[İnhibitör] grafiği

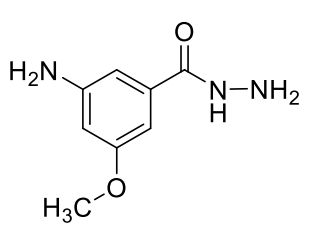
Çizelge 4.13. HRP enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino 5-metoksi benzohidrazid inhibitörü için $1/V$, $1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü

İnhibitör no	Kör Tüpü (mL)					Numune Tüpü (mL)						$1/V$ ($\mu\text{mol}/\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$)	$1/S$ mM^{-1}
	Guaiakol	Fosfat Tamponu	H_2O_2	İnhibitör	Su	Guaiakol	Fosfat Tamponu	H_2O_2	İnhibitör	Su	POD		
[I] ₀	0,2	1,0	1,0	-	0,8	0,2	1,0	1,0	-	0,785	0,010	1,5	0,33
	0,3	1,0	1,0	-	0,7	0,3	1,0	1,0	-	0,685	0,010	1,19	0,22
	0,4	1,0	1,0	-	0,6	0,4	1,0	1,0	-	0,585	0,010	1	0,16
	0,5	1,0	1,0	-	0,5	0,5	1,0	1,0	-	0,485	0,010	0,85	0,13
	0,6	1,0	1,0	-	0,4	0,6	1,0	1,0	-	0,385	0,010	0,736	0,09
[I] ₁	0,2	1,0	1,0	0,080	0,720	0,2	1,0	1,0	0,080	0,710	0,010	2,8	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,080	0,620	0,3	1,0	1,0	0,080	0,610	0,010	1,82	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,080	0,520	0,4	1,0	1,0	0,080	0,510	0,010	1,53	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,080	0,420	0,5	1,0	1,0	0,080	0,410	0,010	1,39	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,080	0,320	0,6	1,0	1,0	0,080	0,310	0,010	1,17	0,09
[I] ₂	0,2	1,0	1,0	0,100	0,700	0,2	1,0	1,0	0,100	0,690	0,010	3,02	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,100	0,600	0,3	1,0	1,0	0,100	0,590	0,010	2,03	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,100	0,500	0,4	1,0	1,0	0,100	0,490	0,010	1,78	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,100	0,400	0,5	1,0	1,0	0,100	0,390	0,010	1,47	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,100	0,300	0,6	1,0	1,0	0,100	0,290	0,010	1,19	0,09
[I] ₃	0,2	1,0	1,0	0,120	0,680	0,2	1,0	1,0	0,120	0,670	0,010	3,82	0,33
	0,3	1,0	1,0	0,120	0,580	0,3	1,0	1,0	0,120	0,570	0,010	2,68	0,22
	0,4	1,0	1,0	0,120	0,480	0,4	1,0	1,0	0,120	0,470	0,010	2,42	0,16
	0,5	1,0	1,0	0,120	0,380	0,5	1,0	1,0	0,120	0,370	0,010	1,7	0,13
	0,6	1,0	1,0	0,120	0,280	0,6	1,0	1,0	0,120	0,270	0,010	1,36	0,09



Şekil 4.17. HRP enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 3-Amino 5-metoksi benzohidrazid inhibitörü için edilen $1/V-1/[S]$ grafiği

Çizelge 4.14. HRP enzimini üzerine 3-Amino 5-metoksi benzohidrazid inhibitörünün inhibisyon etkisi

 3-amino-5-metoksi benzohidrazid	HRP	IC ₅₀ (mM)	Ortalama K _i (mM)	İnhibisyon tipi
		0,546	0,374±0,063	Yarışmalı

Çizelge 4.15. HRP enzimi üzerine ligand moleküllerin toplu kinetik sonuçları

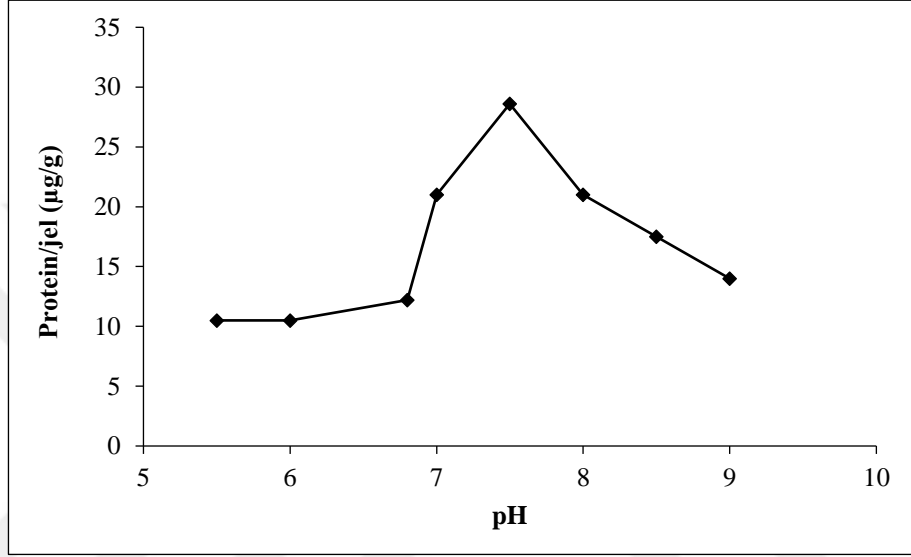
LİGAND MOLEKÜLLER	IC₅₀ (mM)	K_i (mM)	İnhibisyon Tipi
4-Amino 2-nitro benzohidrazid	0,065	0,116±0,043	Yarışmalı
4-Amino 3-nitro benzohidrazid	0,087	0,099±0,0694	Yarışmasız
3-Amino 5-metil benzohidrazid	0,202	0,173±0,0805	Yarışmalı
3-Amino 5-metoksi benzohidrazid	0,546	0,374±0,063	Yarışmalı

4.5. 4-Amino 2-nitro benzohidrazid ve 3-Amino 5-metoksi Benzohidrazid Molekülleri ile Hazırlanan Afinite Kolonunun Horseradish Peroksidaz Enzimi Tutma Kapasitesinin Belirlenmesi

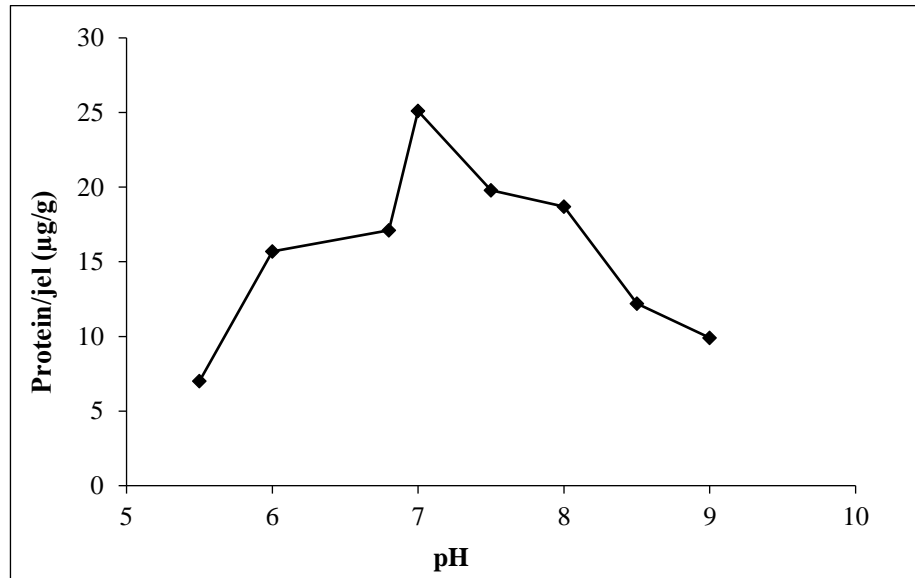
Saflaştırma katsayısına göre en iyi kolon materyali olan Sepharose-4B-L-Tirozin-4-amino-2-nitro benzohidrazid ile Sepharose-4B-L-Tirozin-3-amino-5-metoksi benzohidrazid kolonları için kolon tutma kapasitesi, horseradish POD enzimi için değişik pH, sıcaklık, iyonik şiddetlerde incelendi. Horseradish POD enzimi 4-amino-2-nitro benzohidrazid kolonu için optimum şartlar: pH 7,5 sıcaklık 20°C ve iyonik şiddet 0,3 M konsantrasyonunda optimum bağlanma 2060 µg/g jel ve 3-amino-5-metoksi benzohidrazid kolonu için optimum şartlar: pH 7 sıcaklık 20°C ve iyonik şiddet 0,2 M aynı şartlar altında 2363,3 µg/g jel olarak tespit edildi. Deney prosedürü bölüm 3.5'te anlatıldığı şekilde uygulandı.

4.5.1. pH'nın kolon kapasitesine etkisi sonuçları

Horseradish POD enzimleri için farklı pH'larda 5,5 ile 9 arasında değişen kolon tutma kapasiteleri belirlendi, sonuçlar (protein/jel $\mu\text{g/g}$) olarak Şekil 4.18 ve 4.19'da verildi.



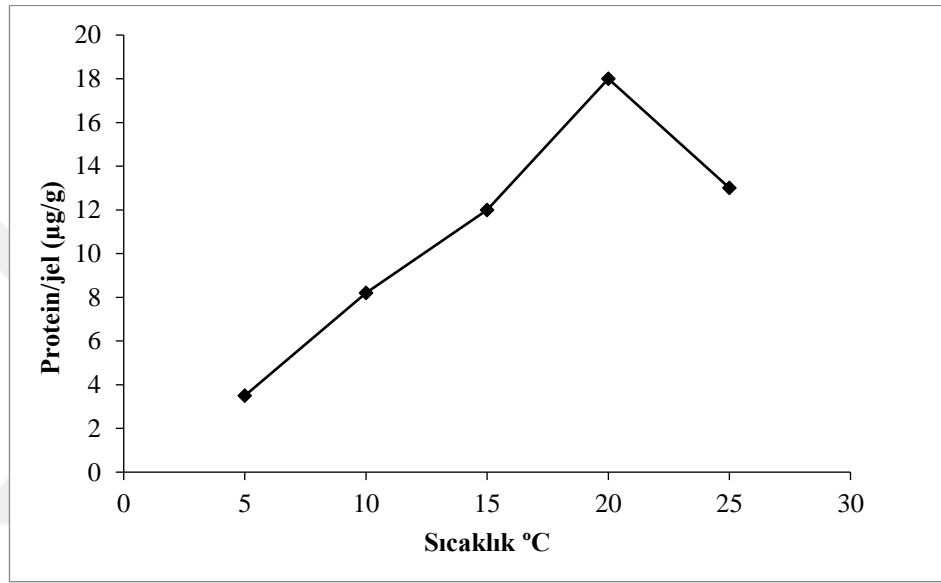
Şekil 4.18. 4-Amino 2-nitro benzohidrazid afinite jelinin horseradish POD enzimi için pH-kapasite grafiği



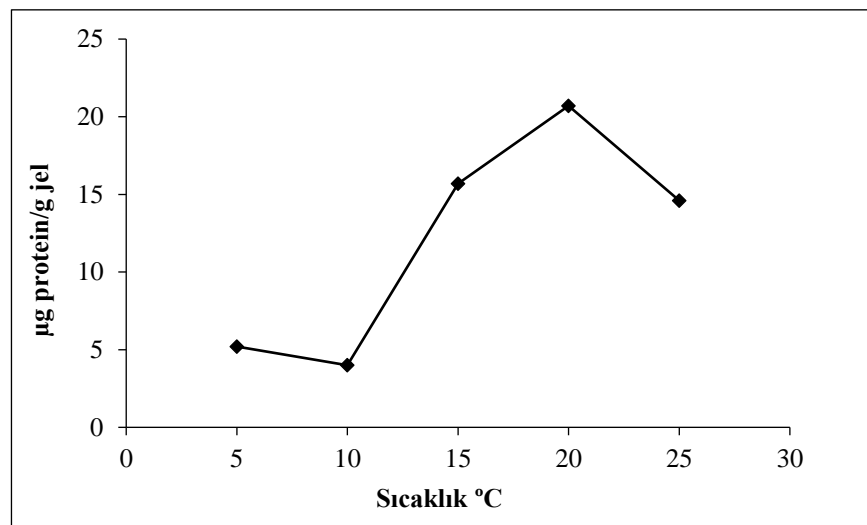
Şekil 4.19. 3-Amino 5-metoksi benzohidrazid afinite jelinin horseradish POD enzimi için pH-kapasite grafiği

4.5.2. Sıcaklığın kolon kapasitesine etkisi sonuçları

Horseradish POD enzimleri için farklı sıcaklıklarda 5, 10, 15, 20, 25°C sıcaklıklarda (pH 6,8) sıcak su banyosu veya buz kullanılarak kolon tutma kapasiteleri belirlendi, sonuçlar (protein/jel $\mu\text{g/g}$) olarak Şekil 4.20 ve 4.21’de verildi.



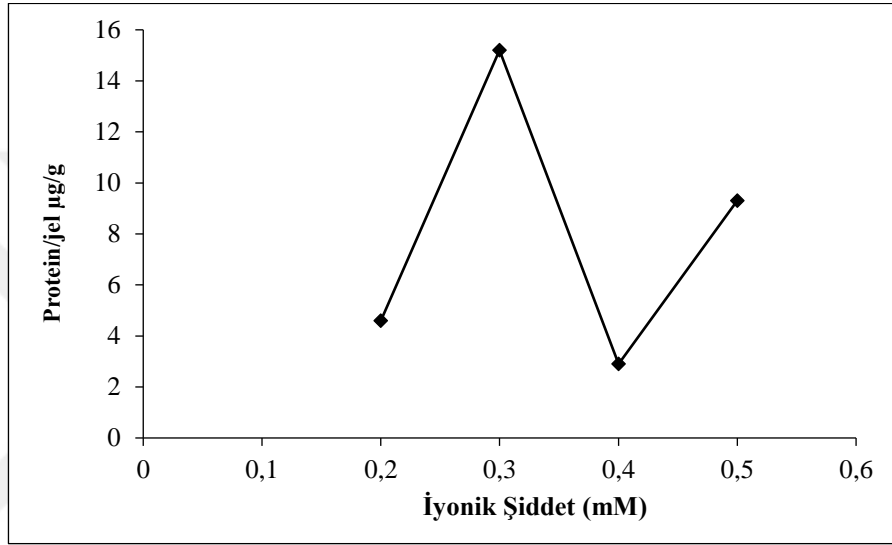
Şekil 4.20. 4-Amino 2-nitro benzohidrazid afinite jelinin horseradish POD enzimi için sıcaklık-kapasite grafiği



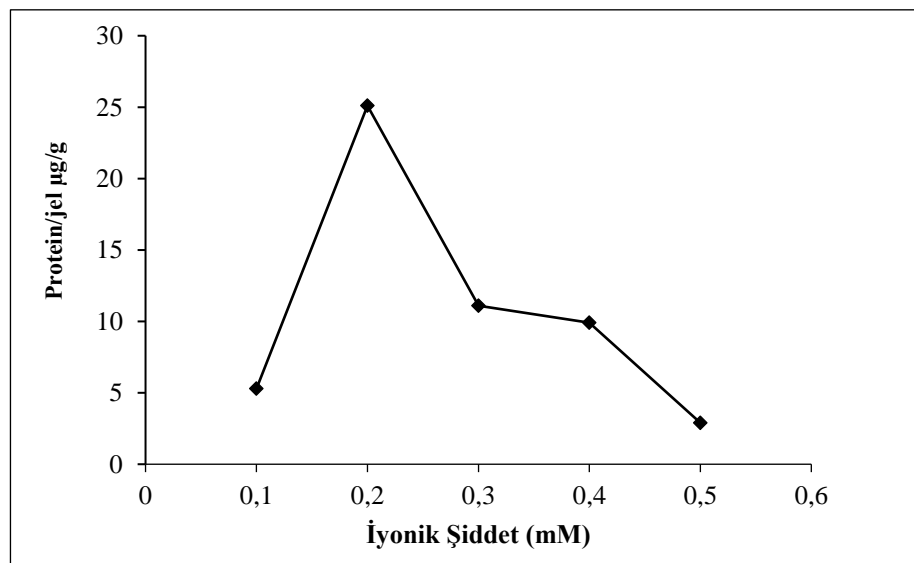
Şekil 4.21. 3-Amino 5-metoksi benzohidrazid afinite jelinin horseradish POD enzimi için sıcaklık-kapasite grafiği

4.5.3. İyonik şiddetin kolon kapasitesine etkisi sonuçları

Horseradish POD enzimleri için farklı iyonik şiddette 0,2 ,0,3 0,4 ve 0,5 M arası (pH 6,8, sıcaklık sbt.) tuz konsantrasyonunda kolon tutma kapasiteleri belirlendi, sonuçlar (protein/jel $\mu\text{g/g}$) olarak Şekil 4.22 ve 4.23'de verildi.



Şekil 4.22. 4-Amino 2-nitro benzohidrazid afinite jelinin horseradish POD enzimi için iyonik şiddet-kapasite grafiği



Şekil 4.23. 3-Amino 5-metoksi benzohidrazid afinite jelinin horseradish POD enzimi için iyonik şiddet-kapasite grafiği

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Horseradish Peroksidaz enzimi tıbbi tanı kitlerinde kullanılmakla birlikte ayrıca boyaların giderilmesine yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Tekstil, gıda, deri, kozmetik ve kağıt sanayilerinde boyalar kirleticilerin başlıcalarıdır. Zehirli atık olarak bilinen boyaların giderilmesi için HRP bitkisi çevre çalışmaları bakımından önemlidir. Azo boyalarının ve bifenoller, fenoller, anilinler gibi aromatik bileşiklerin giderilmesinde etkili olduğu bilinmektedir (Önder *et al.* 2009). Ayrıca ticari öneme sahip enzimlerin olmaları, H₂O₂ uzaklaştırmada önemli bir rol oynaması, biyosensörlerin oluşumunda ve uygulama alanlarının yaygın olması nedeniyle Horseradish Peroksidaz (HRP) enzimlerinin saf olarak elde edilmesinin amaçlandığı saflaştırma çalışmaları devam etmekte olup gün geçtikçe de artmaktadır.

Bitkisel peroksidaz enzimlerinin saflaştırılmasında kromatografik metotların kullanıldığı pek çok çalışmalar vardır ve hızlı bir şekilde devam etmektedir. Kullanılan yöntemler arasında amonyum sülfat çöktürmesi, metal ve hidrofobik afinite, ultrafiltrasyon, diyaliz, jel filtrasyon kromatografisi (geçirgenlik/moleküler elek kromatografisi, proteinlerin boyutlarına göre ayrılması) ve iyon değişim kromatografisi (proteinlerin yüklerine göre ayrılması) gibi kromatografik yöntemler bulunmaktadır. Afinite kromatografi tekniği proteinlerin diğer bir moleküle spesifik bağlanmaları ve ayrılması ile yüksek spesifiklik ve az saflaştırma adımı tekniğiyle günümüzde tercih edilmektedir.

Enzimlerin afinite kromatografisi tekniği ile çok kompleks bir karışım içinde bulunan bazı proteinlerde de tek basamakta ve yüksek saflıkta saflaştırılması birçok araştırmacının temel amaçlarından biri olmaktadır. Afinite kromatografisi ayrılma mekanizmasına göre adsorbsiyon kromatografisidir ve istenen molekül, matriks adı verilen bir kolon dolgu maddesi polisakkarit yapısındaki agaroz tanecikleri gibi kimyasal bir reaksiyon ile bir enzimin koenzimi bağlanır. Üzerine koenzim bağlanmış olan agaroz tanecikleri kolon dolgu maddesi olarak kullanılır. Başarılı bir ayırım yapabilmek için öncelikle matrikse bağlanabilecek bir ligand olmalıdır. Ligand olarak

inhibitörler, antikolar, metaller, kofaktörler kullanılmaktadır. Ligandın numune içindeki moleküle spesifik olarak ilgisi olmalı ve safsızlıklar uzaklaştırıldıktan sonra, uygun bir metod ile ayrılması gerekir.

At turpu köklerinden hızlı ve yüksek verimli POD saflaştırması için yüksek yoğunluklu Concanavalin A hazırlanması araştırılmıştır. Bu saflaştırma iki aşamadan oluşmakta olup amonyum sülfat çöktürmesi ve afinite kromatografisi kullanılarak %73 verimle 14 kat saflaştırma gerçekleşmiştir (Fraguas *et al.* 2004). Horseradish köklerinden elde edilen at turpu peroksidazı amonyum sülfat, iyon değişimi ve jel filtrasyonu kromatografisi (geçirgenlik/moleküler elek kromatografisi) ile saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimin spesifik aktivitesi, ham özütten 14.92 kat daha yüksektir ve %20'den daha az verim gözlenmiştir. Saflaştırılmış HRP daha sonra kinetik ve termodinamik karakterizasyonu için kullanılmıştır. Bu at turpu peroksidazın endüstriyel uygulamalar için kullanılabilir olduğuna varılmıştır (Bhatti *et al.* 2007).

Bu tez çalışmasında ise saflaştırma çalışmalarını daha ileri götürme ve verimi artırmaya katkı sağlamak amacı ile daha önce grubumuzca yapılan 4-Amino benzohidrazidin ligand olarak kullanıldığı karaturp ve şalgam bitkilerinden POD enziminin saflaştırılması çalışması esas alınarak (Kalın *et al.* 2014). *Armoracia rusticana* bitkisinden POD enziminin saflaştırılması için afinite jeli hazırlandı. 3-aminobenzohidrazid ve 4-aminobenzohidrazidlerin ligant olarak afinite kolonundan saflaştırılan enzimlerin protein tayini, SDS-PAGE metoduyla molekül kütlesi ve kinetik özellikleri belirlendi.

Horseradish POD enziminin, 3-Amino benzohidrazid ve 4-Amino benzohidrazid türevi molekülleri (3, 4, 7 ve 8) ligand olarak afinite kromatografisinde kullanarak, yüksek saflıkta ve verimde elde edilmesi amacıyla Şekil 3.2'de verilen türevler ticari olarak temin edilemediğinden moleküllerin metil benzoat türevleri (1, 2, 5 ve 6) satın alınarak hidrazin sentezleri tarafımızca yapıldı. Farklı sterik ve elektronik özellik taşıyan aminobenzohidrazid türevleri hazırlandı ve bitki peroksidaz enziminin saflaştırılmasında en etkin ligand saptandı. 3-Amino benzohidrazid ve 4-Amino

benzohidrazid sentezi yapılan türevlerinin ilk olarak inhibisyon kinetikleri incelendi ve dönüşümlü inhibisyon gösteren moleküllerden ilgili diazonyum tuzu sefaroze-4B'ye kenetlenerek afinite kromatografisi dolgu maddesi hazırlandı. At turpu bitkisinden yüksek saflaştırma katsayısı ve verimde POD enziminin saflaştırılması ile saflaştırma tabloları hazırlanıp elde edilen sonuçlar tartışıldı.

Amino benzohidrazid türevlerinin sentezi yapıldı ve karakterizasyonları 400 MHz ¹H-NMR ile doğrulandı. Spektrogramlar, Şekil 4.6, 4.7, 4.8 ve 4.9'da gösterildi ve saflaştırılan horseradish peroksidaz enzimi üzerine inhibisyon çalışmaları yapıldı. NMR spektrogramlarından görüldüğü gibi tüm sentezler sorunsuz bir şekilde tamamlandı.

Çalışmalarımızda en çok kullanılan protein tayin yöntemlerinden Bradford metodu kullanılarak hemolizattaki protein miktarları ve saflaştırılan enzim çözeltisi bu metod ile belirlendi. Proteine coomassie brilliant blue G-250'nin bağlanması esasına dayanan bu yöntem oldukça hassas olmakla birlikte proteinlerin asidik ve bazik gruplarıyla etkileşerek renk oluşturması esasına dayanır. Bu boya kuvvetli bir asitte çözüldüğü zaman protolanmadan ötürü kırmızı-kahverengi arası renge dönüşür, (+) yüklü bir proteine bağlandığında ise renk maviye dönüşür ve oluşan kompleks 595 nm'de maksimum absorban göstermektedir. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır (Bradford 1976).

Kolon kapasitesi basamağındaki çalışmamızda lowry metodu ile protein tayin yöntemi kullanıldı. Kolondan elüe edilen enzim çözeltisinin protein miktarı bu yöntem ile belirlendi. Bu yöntemde iki farklı reaksiyon meydana gelir, birincisi Biüret reaksiyonudur. Cu^{+2} iyonları peptid azotlarına bağlanır ve Cu^{+1} iyonunu indirir. İkinci reaksiyonda ise indirgenmiş Cu^{+1} iyonları varlığındaki alkali koşullarda, Folin-Ciocalteu reaktifi proteinlerdeki fenolik amino asitlerle tepkime göstererek renk oluşturur. Oluşan rengin şiddeti protein yoğunluğu ile doğru orantılıdır ve 660 nm'de maksimum absorban verir.

Safılaştırılan POD enzim üzerine 4-amino 2-nitro benzohidrazid, 4-amino 3-nitro benzohidrazid, 3-amino 5-metil benzohidrazid ve 3-amino 5-metoksi benzohidrazid moleküllerinin inhibisyon kinetikleri detaylı olarak incelendi. Bu çalışmalarda küvetteki inhibitör konsantrasyonları Çizelge 4.3, 4.6, 4.9 ve 4.12'de gösterildi. Guaiakol substratına bağılı olduğu bilinerek inhibisyon etkisini incelemek için doygun olmayan guaiakol reaksiyon ortamına farklı konsantrasyonlarda inhibitör ilave edilerek aktivite değerleri hesaplandı. Elde edilen bu değerlerle %Aktivite-Konsantrasyon grafikleri çizilerek IC₅₀ değerleri bulundu. Horseradish POD enzimi için bu grafikler Şekil 4.10, 4.12, 4.14 ve 4.16'da gösterildi.

Horseradish POD enzimi için sırasıyla IC₅₀ değerleri 4-amino 2-nitro benzohidrazid için; 0,065 mM, 4-amino 3-nitro benzohidrazid için; 0,087 mM, 3-amino 5-metil benzohidrazid için; 0,202 mM ve 3-amino 5-metoksi benzohidrazid için; 0,546 mM olarak hesaplandı. Tüm moleküllerin IC₅₀ değerlerinin sonuçlarına bakıldığında POD enzimi inhibitörü olabileceği anlaşıldı.

İnhibisyon tiplerini belirlemek ve K_i değerlerinin hesaplanması için çalışmalar yapıldı. Horseradish POD enzimi için 5 farklı guaiakol substrat konsantrasyonunda ve 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapılarak inhibitör konsantrasyonları Çizelge 4.4, 4.7, 4.10 ve 4.13'de belirtildi. 4-amino 2-nitro benzohidrazid, 4-amino 3-nitro benzohidrazid, 3-amino 5-metil benzohidrazid ve 3-amino 5-metoksi benzohidrazid için Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek inhibisyon çeşitleri ve K_i değerleri bulundu (Lineweaver *et al.* 1934).

Horseradish POD enzimi üzerine denenen inhibitörlerin K_i grafikleri Şekil 4.11, 4.13, 4.15, ve 4.17'de gösterildi. Horseradish POD enzimi K_i değerleri sırasıyla 4-amino 2-nitro benzohidrazid için 0,116 mM, 4-amino 3-nitro benzohidrazid için 0,099 mM, 3-amino 5-metil benzohidrazid için 0,173 mM ve 3-amino 5-metoksi benzohidrazid için 0,374 mM olarak K_i grafiklerinden yararlanılarak hesaplandı. Böylece safılaştırmada ligand olarak kullanılacak moleküllerin kinetik parametreleri ve inhibisyon tipleri ilk kez tespit edilmiş oldu. Çalışılan 3-amino benzohidrazid ve 4-amino benzohidrazid

türevi moleküllerin horseradish POD enziminin inhibitörleri olarak belirlendi ve inhibisyon etkisi gösteren bu moleküllerin her biri için afinite jelleri sentezlendi.

İnhibisyon çalışmalarını yapabilmek için bölüm 3.3.4.b da belirtildiği gibi 4-amino benzohidrazid ve 3-amino benzohidrazid molekülü tirozine kenetlendirilerek afinite jeli hazırlandı. *Armoracia rusticana* bitkisinden peroksidaz enzimi Sepharose-4B-L-Tirozin-4-amino-2-nitro benzohidrazid afinite jelinden tek basamakta sırasıyla %6,5 verimle 151,7 kat, Sepharose-4B-L-tirozin-4-amino-3-nitro benzohidrazid %1,2 verimle 60,3 kat, Sepharose-4B-L-tirozin-3-amino-5-metil benzohidrazid %2,21 verimle 70,3 kat, Sepharose-4B-L-tirozin-3-amino-5-metoksi benzohidrazid %2,39 verimle 135,43 kat saflaştırıldı. Enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak 470 nm'de ölçüldü.

Armoracia rusticana POD enzimlerini kolon tutma kapasitesi bulunurken pH, sıcaklık, ve iyonik şiddet parametreleri incelendi ve protein/gram-jel cinsinden at turpu (HRP) POD enzimlerini tutma kapasitesi belirlendi. Kapasite tayin işlemlerinde en yüksek verim ve saflaştırma katsayısına ulaşılan kolon olan 4-amino benzohidrazid türevlerinden olan 4-amino 2-nitro benzohidrazid jelinden ve 3-amino benzohidrazid türevlerinden olan 3-amino 5-metoksi benzohidrazid kolonlarından 1 mL alınarak dengeleme tamponuyla dengelenmiş 1x10 cm'lik bir kolona yüklendi ve daha önceden afinite ile elde edilen at turpu POD enzimleri ile doyuruldu. Enzimin fazlası yıkama tamponu ile yıkandıktan sonra bağlanmış olan POD enzimleri uygun elüsyon tamponuyla elüe edilerek protein miktarı bulundu. Jel kurutulup tartılarak protein/jel ($\mu\text{g/g}$) cinsinden POD enzimlerini tutma kapasitesi belirlendi (Arslan *et al.* 1996).En iyi kolon materyali olan Sepharose-4B-L-Tirozin-4-amino-2-nitro benzohidrazid ve Sepharose-4B-L-Tirozin-3-amino-5-metoksi benzohidrazid kolonu için kolon tutma kapasitesi, horseradish POD enzimi için değişik pH, sıcaklık, iyonik şiddetlerde çalışıldı. Horseradish POD enzimi 4-amino-2-nitro benzohidrazid kolonu için optimum şartlar: pH 7,5 sıcaklık 20°C ve iyonik şiddet 0,3 M konsantrasyonunda optimum bağlanma 2060 $\mu\text{g/g}$ jel ve 3-amino-5-metoksi benzohidrazid kolonu için optimum şartlar: pH 7 sıcaklık 20°C ve iyonik şiddet 0,2 M aynı şartlar altında 2363,3 $\mu\text{g/g}$ jel olarak tespit edildi (Şekil 4.18, 4.19, 4.20, 4.21, 4.22 ve Şekil 4.23).

Enzimin saflığı ve moleköl ağırlığının kontrolü için SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı ve moleköl ağırlığı 43-47 kDa aralıklarında tek bant olarak gözlendi (Şekil 4.4 ve Şekil 4.5).

Sonuç Olarak;

4-Amino 2-nitro benzohidrazid (3), 4-amino 3-nitro benzohidrazid (4), 3-amino 5-metil benzohidrazid (7), 3-amino 5-metoksi benzohidrazid (8) moleküllerinin sentezi yapıldı. HRP enzimleri üzerine inhibisyon etkileri incelendi ve molekölün enzimin yeni, dönüşümlü ve etkili inhibitör olduğu tespit edilerek afinite kolonunda ligand olarak kullanılma potansiyelleri ortaya konuldu. HRP enzimi üzerine sentezlenen 4 moleköl için aminobenzohidrazid moleküllerinin inhibisyonlarına bakıldı. K_i , IC_{50} ve inhibisyon tipleri tespit edildi. Tüm moleküllerin dönüşümlü inhibitör olduğu bulundu. Dönüşümlü inhibisyon gösteren her benzohidrazid molekölü için Sefaroz-4B-L-tirozin destek materyaline amino benzohidrazinler bağlanarak afinite jelleri sentezlendi.

Saflaştırılma sonuçlarına göre kullanılma potansiyeli en yüksek olan afinite kolonlarından 4-amino benzohidrazid ve 3-amino benzohidrazid türevlerinden 4-amino 2-nitro benzohidrazid ile 3-amino 5-metoksi benzohidrazid enzimi bağlama kapasiteleri üzerine sıcaklık, pH ve iyonik şiddet parametreleri bulundu.

Bu çalışmada ligand olarak kullandığımız 4-amino 2-nitro benzohidrazid ile 3-amino 5-metoksi molekölünün ucuz maliyette ve yüksek verimde HRP enzimlerini saflaştırdığı ve diğer bitki peroksidazlarını da saflaştırmada kullanılma potansiyelinin olduğu literatüre kazandırıldı.

KAYNAKLAR

- Arslan, O., Nalbantoglu, B., Demir, N., Ozdemir, H. and Kufrevioglu, O. I., 1996. A new method for the purification of carbonic anhydrase isozymes by affinity chromatography. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 26, 163–166.
- Asad, S., Dabirmanesh, B., Khajeh, K., 2014. ‘Phenol removal from refinery wastewater by mutant recombinant Horseradish peroxidase’, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 61(2), 226-229.
- Atasever, A., Ozdemir, H., Gülcin, I., Küfrevioglu, O.I., 2013. ‘One-step purification of lactoperoxidase from bovine milk by affinity chromatography’, *Food Chemistry*, 136 864–870.
- Barnard, A., 2012. The Optimization of the Extraction and Purification of Horseradish Peroxidase from Horseradish Roots. MS Thesis, University of Stellenbosch, Stellenbosch, 7599, South Africa.
- Bhatti, H.N., Akbar, M.N., Zia, M.A., 2007. Kinetics of irreversible thermal denaturation of Horseradish peroxidase. *J. Chem. Soc. Pak.*, 29, 99–102.
- Bonifert, G., Folkes, L., Gmeiner, C., Dachs, G., Spadiut, O., 2016. ‘Recombinant Horseradish peroxidase variants for targeted cancer treatment’, *Cancer Med.*, 5(6), 1194-1203
- Bradford, M.M. 1976. ‘A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding’, 72, (1–2), 248-254.
- Bradford. M.M. and Williams W.L., 1976. ‘New, rapid, sensitive method for protein determination’, *Federation Proceedings*, 35, 274-274.
- Burçak, G., 2012. *Biyokimya Cilt 1*. İstanbul Üniversitesi Yayınları, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları, 123-157 İstanbul Üniversitesi, 590 s, İstanbul.
- Cuatrecasas, P., Fuchs, S., Anfinsen, C.B., 1968. The effect of a competitive inhibitor on the acetylation of tyrosyl and lysyl residues of staphylococcal nuclease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Enzymology*, 159, 417-419.
- Doumonted, C., Rousset B. 1983. ‘Identification, purification and characterization of a non-home lactoperoxidase in bovine milk’, *The Journal of Biological Chemistry*, 258, 14166.
- Fraguas, L.F., Batista-Viera, F., Carlsson, J., 2004. Preparation of high-density Concanavalin A adsorbent and its use for rapid, high-yield purification of peroxidase from Horseradish roots. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 803, 237–241.
- Franco Fraguas, L., Batista-Viera F., Carlsson J., 2004. Preparation of high-density Concanavalin A adsorbent and its use for rapid high-yield purification of peroxidase from Horseradish roots. *J. Chromatogr. B.*, 803, 237-241.
- Fric, F., 1976. Oxidative Enzymes. *Encyclopedia of Plant Physiology*. 4-17 p, New York, USA.
- Grigorenko, V.G., Andreeva, I.P., Rubtsova, M.Y., Egorov, A.M., 2015. ‘Recombinant Horseradish peroxidase: production and analytical applications’, *Biochemistry (Mosc.)*, 80, 408-416.

- Gülçin, İ. and Yıldırım, A., 2005. "Purification and characterization of peroxidase from *Brassica oleracea* var", *Acephala, Asian Journal of Chemistry*, 17- 4.
- Halliwell, B., 1984. "Oxygen radicals: A commonsense look at their nature and medical importance", *Medical Biology*, 62, 71-77.
- Hiraga S., Sasaki K., Ito H., Ohashi Y., Matsui H., 2001. A large family of class III plant peroxidases, *Plant Cell Physiol.* 42, 462-468.
- Hiroshi, Y., Masahito, K., Tomomi, N., Kumi, M., Takashi, K., Hideaki, I., Takehiko, Y. and Takeshi, F., 2012. Development Of A Fluorescent Chelating Ligand For Scandium İon Having A Schiff Base Moiety. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular And Biomolecular Spectroscopy*, 90-72-77.
- Kalın, R., Atasever, A., Özdemir, H., 2014. Single-step purification of peroxidase by 4-aminobenzohydrazide from Turkish blackradish and Turnip roots. *Food Chemistry* 150: 335-340.
- Keha, E. ve Küvrevioğlu. Ö.İ., 2009. *Biyokimya. Aktif yayınları*, 97-125, Erzurum.
- Keha, E. ve Küvrevioğlu. Ö.İ., 2012. *Biyokimya. Aktif yayınları*, 89-138, Erzurum.
- Krainer, F.W., Glieder, A., 2015. "An updated view on Horseradish peroxidases: recombinant production and biotechnological applications", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 99-4, 1611-1625.
- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the heat of bacteriophage T4. *Nature (London)*, 227, 680-683.
- Leon, J.C, Alpeeva, I.S., Chubar, T.A., Galaev, I. Yu., Csoregi, E., Sakharov, I. Yu., 2002. Purification and substrate specificity of peroxidase from sweet potato tubers. *Plant Science*, 163, 1011-1019.
- Lineweaver, H. and Burk, D., 1934. "The determination of enzyme dissociation constants", *J. Am. Chem. Soc*, 57, 685 .
- Ohya, T., Morimura, Y., Saji, h., Mihara, T., Ikawa, T., 1997. Purification and characterization of ascorbate peroxidase in roots of Japanese radish. *Plant Science*, 125, 137-145.
- Önder, R.S., Çelebi, M., Altıkatoğlu, M., Kuzu, H., 2009. He effect of Horseradish peroxidase (HRP)-dextran conjugate on naphtol blue black. *Journal of Engineering and Natural Sciences*, 27, 18-25
- Pütter, J., Becker, R., 1987. *Methods of Enzymatic Analysis Peroxidases*. Bergmeyer, Third Edition, VCH. 286, New York.
- Robert. K.M., Petter, A.M., Darly, K.G., and Victor, W.R., 1993. *Harper'ın Biyokimyası. Barış Kitabevi*, 141, İstanbul.
- Sarika, D., Ashwin Kumar, P.S.S., Arshad, S., Sukumaran, M. K., 2015. Purification and evaluation of Horseradish peroxidase activity. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, 4 (7), 367-375
- Singh, W. N., Singh, J., 2002. Purification of turnip peroxidase and its kinetic poperties. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 32, 39-49.
- Şişecioğlu, M., Gülçin, İ., Çankaya, M., Atasever, A., Şehitoğlu, M.H., Kaya, H.B., Özdemir, H., 2010. Purification and characterization of peroxidase from Turkish black radish (*Raphanus sativus* L.). *Journal of Medicinal Plants Research*, 4 (12), 1187-1196.
- Temel, D., 2006. Doğal ve sentetik biomateryallerde, osteogenic (rhBMP-7) ve angiogenic (bFGF) büyüme faktörleri ile insan osteoblast hücrelerinin

- gelişiminin incelenmesi. Yüksek lisans tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çukurova Üniversitesi, Adana.
- Van Huystee, R.B., 1987. Some molecular aspects of plant peroxidase biosynthetic studies. *Ann. Rev. Plant. Physiol*, 38, 205-219.
- Veitch, N. C., 2004. 'Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme', *Phytochemistry*, 65, 249-259.
- Welinder, K.G., 1976. Covalent structure of the glycoprotein Horseradishperoxidase. *FEBS Lett.*, 72, 19-23.
- Whitney, P.L., 1974. Affinity chromatography of carbonic anhydrase. *Analytical Biochemistry*, 57, 467-476.
- Yamada, Y., Kobayashi, S., Watanabe, K., Hayashi, U., Yajima, Y., Inoue, H., 1987. 'Production of Horseradish peroxidase by plant cell culture', *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 38, 31-39.



ÖZGEÇMİŞ

1992 yılında Bayburt'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Trabzon'da tamamladı. 2010 yılında kazandığı Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünden 2015 yılında mezun oldu. 2016 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı ve aynı yıl Erzurum Atatürk Anadolu Lisesi Destekleme ve Yetiştirme kurslarında kimya öğretmenliği yaptı.

