

**LİZİL OKSİDAZ ENZİMİ SAFLAŞTIRILMASI VE
BİYOTEKNOLOJİK UYGULAMALARI**

Ali RUSTAMBAYOV

Yüksek Lisans Tezi

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Bilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Özlem ÜNLÜER

Eskişehir

Eskişehir Teknik Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Ocak 2022

ÖZET

LİZİL OKSİDAZ ENZİMİ SAFLAŞTIRILMASI VE BİYOTEKNOLOJİK UYGULAMALARI

Ali RUSTAMBAYOV

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Bilim Dalı

Eskişehir Teknik Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Ocak 2022

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Özlem ÜNLÜER

Bu çalışmada, sığır aortundan lizil oksidaz (LOX) enzimi yeni bir kriyojel kolon geliştirilerek saflaştırılmıştır. Bu tez kapsamında ilk olarak metakriloil benzotriazol (Ma-Bt) temelli kompleksler sentezlenmiştir. Ardından, sentezlenen kompleksler 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) tabanlı kriyojel kolona tutturularak LOX enzimi saflaştırılması için yeni bir kromatografik ayırım kolonu geliştirmiştir. Sentezlenen komplekslerin karakterizasyonu Fourier Taramalı Infrared (FTIR) Spektroskopisi, Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Spektroskopisi, kriyojel kolonun karakterizasyonu ise FTIR, Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) analizi ve şişme testleriyle yapılmıştır.

Sığır aortundan elde edilen ham ekstraktan LOX enzimi, sentezlenen kriyojel kolonun Hızlı Protein Sıvı Kromatografisi (FPLC)'nde ayırım kolonu olarak kullanılmasıyla saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimin protein içeriği Bradford yöntemiyle tayin edildikten sonra, saflaştırılan enzimin aktivitesi ve optimum aktivite koşulları belirlenmiştir. Dairesel dikroizm (CD) spektroskopisiyle, saflaştırılan enzimin ikincil ve tersiyer yapısındaki değişim izlenmiş ve enzimin saflığı SDS-PAGE analiziyle belirlenmiştir. Yapılan çalışmada, LOX enziminin kromatografik olarak saflaştırılması için etkili ve kolay uygulanabilir bir kolon dolgu materyali geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntemle saflaştırılan LOX enziminin, laboratuvar koşullarında elastinin çapraz bağlanmasında etkili olduğu görülmüştür. Bu açıdan değerlendirildiğinde, LOX enziminin farklı biyoteknolojik uygulamalarda da kullanılabileceği öngörülmektedir.

Anahtar Sözcükler: Lizil Oksidaz enzimi, Kriyojel kolon, FPLC, Enzim saflaştırılması.

ABSTRACT

Lysyl oxidase enzyme purification and biotechnological applications

Ali RUSTAMBAYOV

Department of Advanced Technologies

Programme in Biotechnology

Eskişehir Technical University, Institute of Graduate Programs, January 2022.

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Özlem ÜNLÜER

In this study, lysyl oxidase (LOX) enzyme has purified from bovine aorta by developing a new cryogel column. In the thesis, firstly methacryloyl benzotriazole (Ma-Bt) based complexes have synthesized. Then, a new chromatographic separation column has developed for LOX enzyme purification by embedding the synthesized complexes to 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) based cryogel column. The synthesized complexes have characterized by Fourier Scanning Infrared (FTIR) Spectroscopy and Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy. The cryogel column has characterized by FTIR, Scanning Electron Microscope (SEM) analysis and swelling tests.

LOX enzyme has purified from the crude extract obtained from bovine aorta by using the synthesized cryogel as the separation column in Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC). Then, determination of the protein content of the purified enzyme by Bradford method, activity of the purified enzyme and the optimum enzyme activity conditions have investigated. Change in the secondary and tertiary structure and the purity of the purified enzyme have investigated by Circular Dichroism (CD) spectroscopy and SDS-PAGE analysis, respectively. In this study, an effective and easily applied column material has developed for the chromatographic purification of the LOX enzyme. It has been observed that the LOX enzyme purified by the developed method is effective in cross-linking of elastin under laboratory conditions. From this point of view, it is predicted that the LOX enzyme can be used in different biotechnological applications.

Keywords: Lysyl oxidase enzyme, Cryogel column, FPLC, Enzyme Purification.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca her konuda bilgi birikimini ve desteğini benden esirgemeyen, her zaman hoşgörü ve anlayışla yaklaşan ve beni her zaman destekleyen sevgili danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Özlem ÜNLÜER’e

Teorik ve deneysel çalışmalarım sırasında bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşarak beni yönlendiren, her zaman desteklerini hissettiğim değerli hocalarım Prof. Dr. Arzu ERSÖZ ve Prof. Dr. Rıdvan SAY’a

Yüksek lisans öğrenimim boyunca bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan hocalarım Prof. Dr. Filiz YILMAZ, Prof. Dr. Deniz HÜR, Doç. Dr. Rüstem KEÇİLİ, Doç. Dr. Recep Sulhi ÖZKÜTÜK’e

Deneysel çalışmalarımda yardım eden Araştırma Labrotuvanı-I’deki çalışma arkadaşlarım Banuay COŞKUN, Ayten ORAL’a

Labrotuvarda beraber çalışmaktan zevk aldığım ve desteklerini esirgemeyen yakın arkadaşım Emre ECE’ye

Yüksek lisans döneminde her daim yanımda olan ve beni destekleyen değerli arkadaşım Aslı ERKMEN’e

Bugüne dek hep arkamda olan maddi ve manevi olarak beni destekleyen benimle gurur duyan canım annem Şahnaz RUSTAMBAYOVA’ ya

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ali RUSTAMBAYOV

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Eskişehir Teknik Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Ali RUSTAMBAYOV

İÇİNDEKİLER

SAYFA

BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
DANIŞMAN ONAYI.....	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR	vi
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiv
GİRİŞ	1
1. TEORİK BİLGİ	3
1.1. Enzimler	3
1.1.1. Enzimlerin yapısı ve genel özellikleri	4
1.1.2. Enzimlerin adlandırılması ve sınıflandırılması	5
1.1.3. Enzimlerin spesifikliği ve etki mekanizması	8
1.1.4. Enzim aktivitesi	10
1.1.4.1. Enzim aktivite birimleri.....	10
1.1.5. Enzim aktivitesini etkileyen faktörler	11
1.1.6. İnhibitörler.....	15
1.1.7. Enzim kinetiği.....	16
1.1.8. Enzimlerin aktivite tayin yöntemleri.....	17
1.2. Lizil Oksidaz	19
1.3. Kriyojeller	21
1.4. Afinite Kromatografisi	22
1.5. Hızlı Protein Sıvı Kromatografisi (FPLC).....	23

1.6. Dairesel Dikroizm (CD) Spektroskopisi.....	25
2. MATERYAL VE METOD	27
2.1. Materyal.....	27
2.1.1. Kullanılan cihazlar	27
2.1.2. Kullanılan kimyasallar.....	27
2.2. Metod.....	28
2.2.1. Sığır aortundan LOX enzimi içeren ekstrakt hazırlanması.....	28
2.2.2. Kriyojel temelli ayırma kolonlarının hazırlanması.....	29
2.2.2.1. Metakriloilbenzotriazol (MaBt) fonksiyonel monomerinin sentezi.....	29
2.2.2.2. MaBt-Cu kriyojel kolon hazırlanması.....	31
2.2.3. Karakterizasyon çalışmaları	32
2.2.3.1. Şişme testi	32
2.2.3.2. FT-IR analizi	33
2.2.3.3. Yüzey morfolojisi.....	33
2.2.4. LOX Enzimi saflaştırılması	33
2.2.5. Enzimin protein içeriği ve aktivite tayini	34
2.2.5.1. Enzim aktivitesini etkileyen faktörler ve kinetik incelemeler	35
2.2.6. Saflaştırılan LOX enziminin yapısal karakterizasyonu.....	36
2.2.7. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) analizi.....	36
2.2.8. LOX enziminin biyoteknolojik uygulaması.....	36
3. BULGULAR.....	38
3.1. Metakriloilbenzotriazol (MaBt) fonksiyonel monomerinin ve MaBt-Cu kompleks monomerinin karakterizasyonu	38
3.2. MaBt-Cu-HEMA ve HEMA Kriyojellerinin Karakterizasyonu.....	41
3.3. LOX Enzimi örneklerinin protein içeriği ve aktivite tayini.....	44
3.3.1. Protein içeriği tayini.....	44
3.3.2. FPLC analizi.....	45

3.3.3. Enzim aktivitesini etkileyen faktörler ve kinetik incelemeler.....	46
3.4. Saflaştırılan LOX enziminin Yapısal Karakterizasyonu.....	48
3.5. SDS-PAGE analizi.....	49
3.6. LOX enziminin biyoteknolojik uygulaması.....	50
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	51
KAYNAKÇA.....	53
ÖZGEÇMİŞ	



TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 3.1. LOX enzimi saflaştırma tablosu	45
--	----



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. Enzimin yapısı	5
Şekil 1.2. Enzim substrat bağlanması ve ürün oluşumu	9
Şekil 1.3. Anahtar kilit modeli.....	10
Şekil 1.4. İndüklenmiş uyum modeli.....	10
Şekil 1.5. Enzim derişiminin reaksiyon hızına etkisi	11
Şekil 1.6. Substrat derişiminin reaksiyon hızına etkisi.....	12
Şekil 1.7. Substrat enzim ilişkisi	13
Şekil 1.8. pH'ın reaksiyon hızına etkisi.....	14
Şekil 1.9. Sıcaklığın reaksiyon hızına etkisi.....	14
Şekil 1.10. Michaelis-Menten grafiğı	17
Şekil 1.11. LOX protein yapısı.....	20
Şekil 1.12. LOX enziminin 3D kristal yapısı	21
Şekil 1.13. Kriyojel oluşumun şematik gösterimi.....	22
Şekil 1.14. FPLC sisteminin şematik görünümü.....	24
Şekil 2.1. Elde edilen ekstrakt	29
Şekil 2.2. MaBt sentezi şematik gösterimi	30
Şekil 2.3. MaBt-Cu (II) kompleksi.....	30
Şekil 2.4. Enzimin katalitik bazı olarak histidini gösteren lisil oksidazın katalitik döngüsü ve bakırın enzim katalizinde oynadığı olası rol.....	31
Şekil 2.5. MaBt-Cu-HEMA kryojel kolonu	32
Şekil 2.6. FPLC cihazı.....	34
Şekil 2.7. LOX tarafından katalize edilen reaksiyonun gösterimi.....	34
Şekil 3.1. MABt'ye ait ¹ H NMR spektrumu	39
Şekil 3.2. MABt'ye ait ¹³ C NMR spektrumu.....	40
Şekil 3.3. MABt ve MABt-Cu (II) kompleksine ait UV-Vis spektrumları	41
Şekil 3.4. MaBt-Cu-HEMA ve HEMA FT-IR spektrumu	42
Şekil 3.5. HEMA-MaBt-Cu ve HEMA SEM görüntüleri	43
Şekil 3.6. MaBt-Cu kriyojeli (a) şişmiş hali (b) kuru hali fotoğrafları.....	43
Şekil 3.7. Bradford yöntemine göre kalibrasyon grafiğı	44

Şekil 3.8.	FPLC ile LOX enziminin saflaştırılmasına ilişkin kromatogram	46
Şekil 3.9.	pH'ın LOX enzimi aktivitesine etkisi	47
Şekil 3.10.	Saflaştırılan LOX enzimi için substrat derişiminin reaksiyon hızına etkisi.....	47
Şekil 3.11.	Saflaştırılan LOX enzime ait CD spekturumu	48
Şekil 3.12.	Saflaştırılan LOX enziminin SDS-PAGE görüntüleri.....	49
Şekil 3.13.	Saflaştırılan LOX enziminin elastin çapraz bağlanmasındaki etkinliği.....	50



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Abs	: Absorbans
APS	: Amonyum persülfat
CD	: Dairesel dikroizm
DCM	: Diklorometan
EtOAc	: Etil Asetat
ELISA	: Enzim bağlı immunsorbent analiz
FPLC	: Hızlı protein sıvı kromatografisi
FT-IR	: Fourier Transform Infrared Spektroskopisi
HEMA	: 2- Hidroksi etilmetakrilat
HRP	: Horseradish (Yaban turbu) Peroksidaz
kDa	: Kilodalton
Km	: Michealis-Menten Sabiti
LOX	: Lizil Oksidaz
LTQ	: Lizil Tirosil Kinon
MaBt	: Metakriloil benzatriazol
MBA	: N,N' Metilenbisakrilamit
PAGE	: Poliakrilamid Jel Elektroforez
SDS	: Sodyum N-Dodesil Sülfat
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
SOCl ₂	: Tiyonil Klorür
TEMED	: N,N,N',N'-Tetraetil metilen diamin
U	Enzim Ünitesi
V _{max}	Maksimum reaksiyon hızı

GİRİŞ

Disiplinler arası bilim dalı olan biyoteknoloji; biyokimya, mikrobiyoloji, moleküler biyoloji, hücre biyolojisi genetik bilimleri yanı sıra mühendislik dalını bünyesinde toplayan oldukça geniş bir araştırma dalıdır. Biyoteknoloji, biyolojik materyallerden yararlanarak, doğada bulunmayan veya ihtiyacımız kadar bulunmayan ürünlerin üretilme süreçlerini de incelemektedir. Bu konuda öncelikle moleküler biyolojik tekniklerden yararlanır. Son yıllardaki biyoteknolojik çalışmalar incelendiğinde, insan sağlığına yönelik biyomoleküllerin sentezi, yapay organların geliştirilmesi, aşı üretimi ve insandaki genetik kusurların giderilmesi gibi çalışmaların hız kazandığı görülmektedir. Ayrıca, enzimoloji alanında, kanser gibi birçok hastalığın erken tanısına yönelik araştırmalar da mevcuttur [1. 2].

Enzimler, yaşamı geliştirmek ve sürdürmek için gerekli olan neredeyse tüm kimyasal reaksiyonların hız ve koordinasyonunu sağlayan biyokatalizörlerdir ve güçlü katalitik etkiye sahiptirler. Geleneksel kimyasal katalizörlere göre enzimlerin birçok avantajı bulunmaktadır. Sahip olduğu avantaja yüksek üretkenlik, katalitik etkinlik, özgüllük ve moleküllerin benzer kısmını ayırt etme yani bölgesel özgüllük örnek olarak verilebilir. Bu nedenle enzimler gıda, eczacılık, tekstil, kozmetik gibi birçok araştırma alanında ilgi kaynağı olmaktadır [3,4].

Lizil oksidaz (LOX) ve LOX benzeri ailenin üyeleri, hücre dışı matris proteinlerinde lisin türevli çapraz bağları katalize eden enzimlerdir. LOX'lar bakır ve lisil tirozil kinon (LTQ) içeren enzimlerdir. LOX enzimlerinin en genel görevi, elastik fibril oluşturmak ve elastik fibrillerin ekstraselüler matrikste birikimini sağlamak, ayrıca elde edilen elastik fibrillerin hem birbirleri hem de kollajenler ile çapraz bağlanmalarını katalizlemektir. Fakat LOX enzimlerinin farklı biyolojik fonksiyonları da vardır. LOX enziminin son zamanlarda kardiyovasküler sistemin gelişiminde çok önemli fonksiyonu olduğu teyit edilmiştir. Ayrıca LOX üzerine yapılmış son çalışmalarda solunum sisteminin gelişimi ve akciğerlerdeki ve derideki elastin ve kolajen liflerin bütünlüğü için gerekli bir enzim olduğu ortaya çıkmıştır. LOX aktivitesinde gerçekleşen bir azalmanın akciğer hastalıkları, diyafram hernileri, cilt deformasyonları ve vasküler kusurlar gibi birçok yaygın hastalığın gelişiminde kritik bir etkiye sahip olduğu düşünülmektedir [5]. Yani LOX aktivitesi, miyokardiyal fibroz, kronik karaciğer hastalığı ve hepatik fibroz, metastatik kanser gibi birçok hastalık ile ilişki içindedir. LOX, kanser konusunda

karmaşık rollere sahiptir. Lisil oksidaz propeptid (LOX-PP) alanının tümör baskılayıcı aktiviteye sahip olduğuna yönelik çalışmalar mevcuttur. Aynı zamanda yapılan çalışmalarda LOX enziminin meme kanserlerinin gelişimi ve metastatik ilerlemesi ile bağlantılı olduğuna yönelik bulgular vardır. Öte yandan, LOXL2'nin meme kanserinde biyobelirteç olarak hizmet edebileceğine yönelik çalışmalar da bulunmaktadır. Son alışmalar ışığında, hücrel yaşlanma ve kemotaksis gibi yeni roller de bu amin oksidaz ailesine atfedilmiştir. LOX enzimine artan ilgi basit ve etkili saflaştırma yöntemi ve hasas LOX'a özğü aktivite tayinin önemini artırmaktadır [6]. Tez kapsamında yapılan çalışmalar, farklı biyoteknolojik alanlarda LOX enziminin etkilerini keşfetmeye ışık tutacaktır. Buradan hareketle, LOX enziminin daha az maliyetle ve yüksek verimle saflaştırılması ve katalitik etkinliğinin incelenmesi hedeflenmiştir.

Yapılan çalışmada, sığer aortundan izole edilen ekstraktan LOX enziminin saflaştırılması için metakriloil benzotriazol (MaBt) temelli monomerler sentezlenmiş, MaBt-Cu ön organizasyon sonrası kriyojel kolona tutturularak kolon dolgu malzemesi geliştirilmiştir. Kriyojel kolonun Hızlı Protein Sıvı Kromatografisi (FPLC) cihazında ayırım kolonu olarak kullanılmasıyla tek aşamada enzimin saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Enzimin karakterizasyonu yapılarak, optimum aktivite koşulları belirlenmiştir. Laboratuvar ortamında saflaştırılan enzimin elastinin çapraz bağ oluşumunda etkinliği incelenmiştir.

1. TEORİK BİLGİ

1.1. Enzimler

Organizmada dokuların yenilenmesi, yıkıma uğraması, sindirim, hücre solunumu ve bunlar gibi birçok önemli fizyolojik olayların olması, devamı ve dolayısı ile de hayatın sürdürülebilmesi için bir sıra biyokimyasal reaksiyonların oluşması gereklidir. Enzimler, organizmada biyokimyasal reaksiyonların belirli aşamalardan geçerek hızlı bir şekilde gerçekleşmesini sağlayan biyolojik katalizörler olarak tanımlanmaktadır [7,8].

Tarihte uzun süre insanlar enzimler ve enzimlerin katalitik etkilerinin farkında olmaksızın birçok besinin üretiminde bilinçsizce enzimlerden faydalanmışlardır [8]. Enzim terimi ilk olarak 1878 yılında W. Kühne tarafından ferment yerine kullanılmıştır. Enzim terimi yunanca “maya” anlamına gelen bir kelimedenden türemiştir. Çünkü mayalanma veya diğer adıyla fermentasyon işlemi bir sıra enzimatik reaksiyon sonucunda gerçekleşmektedir. 1897’de Buchner tarafından ilk kez yaşayan bir hücreden aktif bir enzimin ayrılması işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem sonucu elde edilen maya ekstratını şekerin alkolle fermentasyonu için kullanmıştı. Ve böylece fermentasyonu gerçekleştiren enzimlerin canlı hücre yapısından ayrılması sonucunda hala işlev görebildiği ispatlanmıştır [9].

19. yüzyılın sonlarında ve 20. yüzyılın başlarında, birçok enzimin ekstraksiyonu, karakterizasyonu ve ticari olarak kullanılması başlanmıştır. Bu da katalitik aktivitenin protein molekülleri ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. 60 yıl boyunca tüm enzimlerin protein olduğu görüşü savunulmaktaydı ancak 1980’lerde ise bazı ribonükleik asit (RNA) moleküllerinin de katalitik etkiler gösterebildiği ortaya çıkmıştır [10].

Araştırmalar enzimlerin 5000’den fazla türde biyokimyasal reaksiyonu katalizlendiğini göstermektedir. Enzimler canlı hücrelerde sentezlenmekte ve aktivite göstermektedirler. Öte yandan enzimler “in vitro” çalışabilmeleri nedeniyle endüstriyel süreçlerde kullanılabilmektedirler. Enzimler de kimyasal katalizörlere benzer şekilde, aktivasyon enerjisini düşürerek reaksiyon hızını artırırlar. Böylece ürünler daha hızlı bir şekilde oluşmuş ve reaksiyonlar denge durumuna daha hızlı ulaşmış olur. Enzimlerin, kimyasal katalizörlerden pek çok üstünlükleri vardır. Örneğin, diğer katalizörler reaksiyon hızını 10^2 - 10^4 kadar arttırabilirken, biyolojik katalizörler, reaksiyon hızını yaklaşık 10^{20} ’ye kadar arttırır. Reaksiyonların ilerlemesi açısından bu özellik oldukça etkilidir. Enzimler spesifikliği oldukça yüksek maddelerdir. Enzimler ve reaksiyona

girdiklerinde etki ettikleri substratla oldukça benzer yapıdaki maddeleri ve hatta substratın stereoizomerlerini bile dönüşüme uğratmazlar. Enzimlerin spesifikliği sayesinde basit bir hücrede dahi aynı anda yüzlerce biyokimyasal reaksiyon gerçekleşmektedir [11,12].

1.1.1. Enzimlerin yapısı ve genel özellikleri

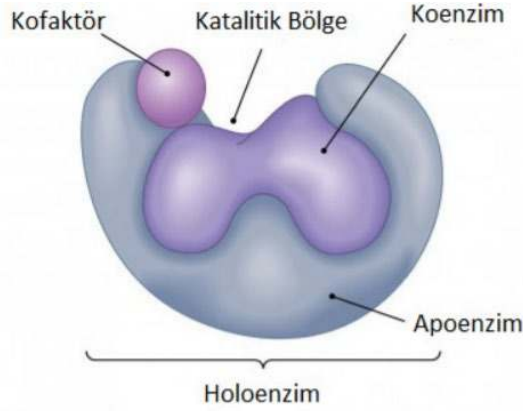
Biyolojik sistemde reaksiyon hızını artırmanın anahtarı enzimdir. Enzimler, bazı durumlarda reaksiyonları bir milyon kat kadar daha hızlandırabilmektedir [13].

Biyolojik sistemlerin tepkime katalizörleri olan enzimler, oldukça özellikli proteinlerdir. Sentetik ve inorganik katalizörlere nazaran enzimlerin olağanüstü bir katalitik gücü bulunmaktadır. Enzimlerin yüksek özgülüğü vardır. Kimyasal tepkimelerin hızı enzimlerin optimum pH ve sıcaklık koşullarında katalitik aktivite göstermesiyle artar. Katalizörler bir tepkimedeki, reaksiyon hızını arttıran ve reaksiyona girdiği gibi değişmeden çıkan maddelerdir. Bu özelliklerin hepsine çok az biyolojik olmayan katalizör sahiptir [14].

Vücutta gerçekleşen tüm reaksiyonlar, işlem tamamlandıktan sonra kendisi değişmeksizin reaksiyonların hızının artmasını sağlayan enzimler vasıtasıyla yürütülmektedir [15]. Yani enzimler her biyokimyasal süreçte merkez konumdadır [14].

Enzim reaktanları “substrat” olarak adlandırılır. “Substrat” enzimlerin etki ettikleri maddelere verilen addır. Enzimlerle reaksiyon veren substratlar enzime özgüdür [14]. Enzimler bütün metabolik olayları, enerji bakımından mümkün olabilen birçok reaksiyon içinde substratları kullanışlı yollara seçici olarak kanalize ederek yönlendirirler. Enzimle katalizlenmeyen reaksiyonlara göre katalizlenen reaksiyonların çoğu 10^3 ile 10^8 kat hızlıdır ve oldukça etkindirler ve saniyede 100 ila 1000 substrat molekülü ürüne dönüşebilmektedir. Enzimler aktive ürün oluşumunun hızına bağlı veya hücrenin ihtiyacını karşılayacak biçimde aktive veya inhibe edilebilir [15].

Enzimler genelde belirli maddeler arasındaki reaksiyonları katalize etmektedirler. Fakat bazen birbirine çok yakın özelliklerdeki maddelere de etki edebilirler. Enzimin etki yapacağı madde veya katalize edeceği reaksiyonun şekli, enzimin protein yapısı tarafından belirlenir [16] Şekil 1.1’de enzimin yapısı şematik olarak gösterilmektedir.



Şekil 1.1. *Enzimin yapısı* [12]

Katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu haricinde bütün enzimler proteindir. Enzimler, 12,000'den 1 milyona kadar değişen molekül ağırlıklarına sahiptirler. Enzimlerin bir kısmı amino asit kalıntıları dışında aktivite edici bir başka kimyasal gruba ihtiyaç duymazlar. Bunlara basit enzim denir. Ancak bileşik enzim denilen diğer enzimler kofaktör veya koenzime ihtiyaç duyarlar. Enzimin etkinlik göstermesi için gerekli olan bir veya daha fazla inorganik iyon kofaktör denilmektedir. Enzimi aktivite edici karmaşık organik moleküller veya metalloorganik moleküllere ise koenzim denilir. Enzimin kofaktör veya koenzimden ayrı olan protein kısmına apoenzim denir. Enzimlerin bir kısmı koenzimlerle birlikte bir veya birden fazla metal iyonuna da gereksinim duyar. Apoenzime kovalent bağlarla bağlanan koenzim ya da metal iyonlarına prostetik grup adı verilir. Kofaktör veya koenzim ile birlikte katalitik olarak tam aktif olan enzime ise holoenzim denir [14].

1.1.2. Enzimlerin adlandırılması ve sınıflandırılması

Enzimler sınıflandırılırken katalize ettikleri tepkimelere göre ayrılırlar. Enzimler etki ettikleri substratların adının sonuna 'az' eki ilave edilerek veya katalizledikleri tepkimeyi tanımlayan şekilde isimlendirilir. Ancak bazı proteolitik enzimler genellikle -in son ekine sahiptir (örn. Tripsin, kimotripsin, papain). Bununla birlikte, bazı enzim isimleri (örneğin, invertaz, diastaz, katalaz), substrat, ürün veya ilgili reaksiyon hakkında bilgi sağlar. Enzimlerin adlandırılmasındaki ortaya çıkan karmaşıklık ve tutarsızlık nedeniyle, Uluslararası Biyokimya Birliği, sorunu çözmek için Enzim Komisyonu'nu kurmuştur. İlk Enzim Komisyonu Raporu 1961'de yayınlanmış ve bu enzimlerin adlandırılmasına sistematik bir yaklaşım getirilmiştir. Komisyon katalize ettiği

reaksiyonu bağı olarak enzime bir sistematik isim belirlenmiştir. Ayrıca, enzimin net olarak ifadesi için, etki ettikleri reaksiyonlara göre yer aldıkları sınıfa göre bir numara verilmiştir. Bütün enzimlerin E.C. ile başlayan bir sistematik kod numarası bulunmaktadır ve bu kodda enzimler 4 rakamla ifade edilmektedir. Birinci rakam sınıfı, ikinci rakam alt sınıfı, üçüncü rakam: alt alt sınıfı ve dördüncü rakam ise adlandırılan asıl enzimin numarasını gösterir. Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) tarafından yapılmış bu sınıflandırma enzimleri 6 gruba ayırmaktadır [17]. Bu gruplar aşağıdaki şekilde açıklanabilir:

- I. Oksidoredüktazlar:** Oksidasyon ve redüksiyon tepkimelerini katalizleyen enzimlerdir. Oksidoredüktazlar, substratlar arasında elektron veya hidrojen transferini sağlayarak katalizleme işlemi gerçekleştirirler. Oksidoredüktazlara dehidrogenazlar, redüktazlar, oksidazlar, transhidrogenazlar, hidroksilazlar örnek verilebilir. Elektron kazandıran tepkimeleri etkileyen enzimler dehidrogenazlar sınıfına girer. Eğer tepkime sonucu elektron kaybı gerçekleşiyorsa bu tepkimeyi etkileyen enzimler ise oksidazlar sınıfına mensuptur. Substratı ancak bir redüktör vasıtasıyla indirgeyen enzimler ise redüktazlar olarak adlandırılır. Aldıkları EC kodu EC1 şeklinde başlar [18].
- II. Transferazlar:** Fonksiyonel bazı grupların transfer tepkimelerini katalizleyen enzimlerdir. Hidrojen haricinde bir atomun ya da metil, karboksil, glikozil, amino, fosfat grupları gibi bir atom grubunun bir molekülden başka moleküle transferini sağlarlar. Aspartat transaminaz, alanin transaminaz, dekarboksilazlar örnek olarak verilebilir. Dekarboksilazlar karboksilik asitlerden CO₂ çıkmasını sağlayan enzimlerdir [19]. En yaygın olan biyokatalizörlerden biri transferazlardır. Verici çoğu durumda transfer edilecek grubu taşıyan kofaktördür. Aldıkları EC kodu EC 2 ile başlar [20].
- III. Hidrolazlar:** Hidroliz reaksiyonunu katalize eden enzimlerdir. Hidroliz olayı substrata su eklenmesi ile olan parçalanmadır. Bu enzimler substratın parçalanacak olan bağına su ekleyerek substratın parçalanmasını yani hidrolizini sağlar. Örneğin esterazlar, ester bağlarını parçalayan enzimlerdir. Proteazlar ise peptit bağlarını yıkan enzimlerdir. Hidrolazlar günümüz endüstriyel süreçlerinde en önemli enzimlerdendir. Tahmini olarak tüm endüstriyel enzimlerin yaklaşık %80'inin bu enzim sınıfındandır. Çoğunlukla deterjan formülasyonlarında ve gıda

endüstrisinde proteinleri, karbonhidratları ve lipidleri parçalamak için kullanılır. Hidrolitik enzimler, her hidroliz reaksiyonu, belirli bir kimyasal grubun bir su molekülüne transferi olarak değerlendirilebileceği için transferazlar olarak da sınıflandırılabilir. Aldıkları EC kodu EC3 şeklinde başlar [21].

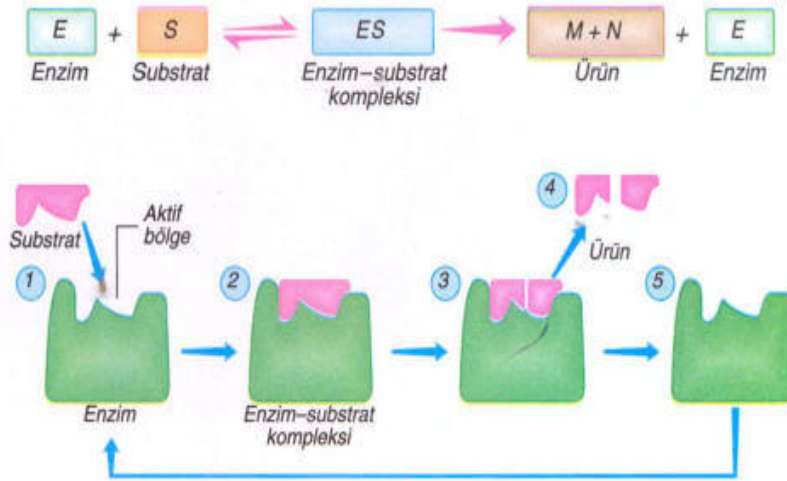
- IV. Liyazlar:** Çift bağların oluşmasını katalizlerler. Bu işlem, çift bağlara gruplarının ilavesi yoluyla veya grupların yer değiştirmesiyle gerçekleşir. Liyazlara, pürivat dekarboksilaz ve sitrat sentetaz örnek olarak verilebilir. Bu enzimler, moleküllerdeki C-C, C-O, C-N gibi bağların eliminasyon yoluyla yıkımını katalizlerler. Bu bağ bölünmesi, hidrolizden farklıdır. Genellikle daha ileri reaksiyonlara maruz kalabilecek çift bağlara sahip doymamış ürünler bırakırlar. Endüstriyel üretimde bu enzimler en yaygın olarak sentetik olarak kullanılmaktadır. EC kodu EC 4 ile başlamaktadır[22].
- V. İzomerazlar:** Moleküller arasındaki grup transferazı izomerik formları oluşturmak için katalizleyen enzimlerdir. Yani izomerazlar geometrik, optik veya yapısal izomerlerin birbirlerine dönüştürülmesini katalizler. Çok az sayıda enzimi temsil etse de bu enzimlerden biri günümüz endüstrisinde önemli bir rol oynar. Bu enzim, D-glukozun D-fruktoza dönüşümünü katalize eden glikoz izomeraz (EC 5.3.1.5) dır. Yüksek fruktozlu mısır şurubu üretiminde kullanılmaktadır. Genel olarak izomerazlar, tek bir molekül içindeki değişiklikleri katalize ederler. İzomerlerin türüne göre adlandırılırlar. Örneğin epimerazlar, rasemazlar, cis-trans-izomerazlar, tautomerler gibi. İzomeraz enzimlerinin EC kodu EC5 ile başlamaktadırlar [23]
- VI. Ligazlar:** Adenozintrifosfat (ATP)'nin uzaklaşmasıyla eşleşmiş kondensasyon tepkimeleriyle C-C, C-O, C-N bağlarının oluşmasını katalizleyen enzimlerdir. Yani ligazlar ATP veya diğer fosfatlardan faydalanarak, bunlarda bulunan difosfat bağının hidrolizini katalizleyerek iki molekülün arasında yeni bağlar oluşmasını sağlarlar. Oluşan bağlar genellikle yüksek enerjilidir. Örn: DNA ligaz. DNA ligazları olarak adlandırılan bu sınıftaki spesifik enzimler, DNA sentezinde C-O bağlarının oluşumunu katalize etmektedir. Bu reaksiyon iki DNA dizisinin tek bir diziye bağlanmasına izin verir. Bu nedenle, DNA ligazlar genetik mühendisliği ve genetik teşhiste önemli bir rol oynamaktadır. Ligazların EC kodu EC 6 şeklinde başlamaktadır [24,25].

1.1.3. Enzimlerin spesifikliği ve etki mekanizması

Enzimler, katalizledikleri reaksiyonlara ve ürüne dönüştürdükleri substratlara karşı son derece spesifiktirler. Spesifikklik yani özgülük, enzimlerin çoğunlukla sadece bir kimyasal reaksiyonu veya benzer olan reaksiyonları katalizlemesidir. Enzimlerin spesifikliği farklılıklar gösterebilmektedir. Bu nedenle enzimlere çeşitli spesifikklikler tanımlanmıştır

- I. **Mutlak spesifikklik:** Bir enzimin, sadece bir substratın yalnız tek bir reaksiyonunu katalize etmesi özelliğidir.
- II. **Grup spesifikliği:** Bir enzimin, benzer işlevsel gruplarda sınırlı sayıdaki substratın her birine etki etmesi özelliğidir.
- III. **Bağ spesifikliği:** Bir enzimin, yalnızca bazı bağ tiplerindeki substratlara **etki** etmesi özelliğidir. Örneğin proteinlerin peptid bağı, karbonhidratların glukozidik bağı gibi.
- IV. **Stereospesifikklik:** Bir enzimin sadece bir molekülün optik izomerlerine etki edebilmesidir. Örneğin, glukozun D- veya L- izomerleri gibi. Birçok enzim stereospesifik özellik taşımaktadır [26].

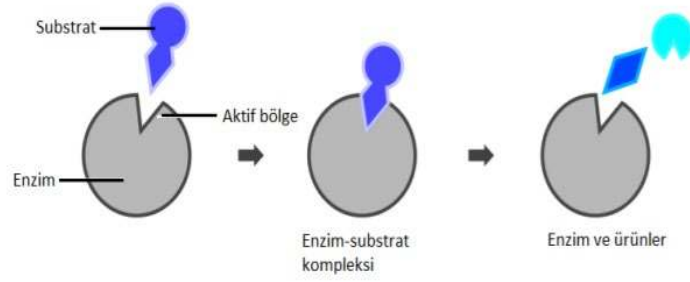
Enzim-substrat kompleksi gibi bir ara bileşimin oluşması enzimleri diğer katalizörlerden ayıran en önemli özelliğidir. Enzimler önce substrat ile birleşerek bir ara enzim-substrat (ES) kompleksi meydana getirmektedir (Şekil 1.2). Enzimin substrat ile birleşmesi sırasında substrat konformasyonel değişime uğrayarak yapısını bozar. Böylece reaktantların ürünlere dönüşmesi için aşmaları gereken enerji eşiği düşerken, reaksiyon da hızlanmış olur. Enzim katalizi sayesinde hızlı bir şekilde ürüne dönüşen substrattan sonra enzim-substrat kompleksi de enzim-ürün kompleksine dönüşür ve enzimin kompleksten ayrılmasıyla ürün serbestleşir. Serbest hale geçen enzim tekrar substrat ile aynı şekilde reaksiyona girerek devam eder. Enzimler, substratları ile cep biçimindeki bölgelerinde reaksiyona girerler. Bu bölgelere aktif bölge denilmektedir [27].



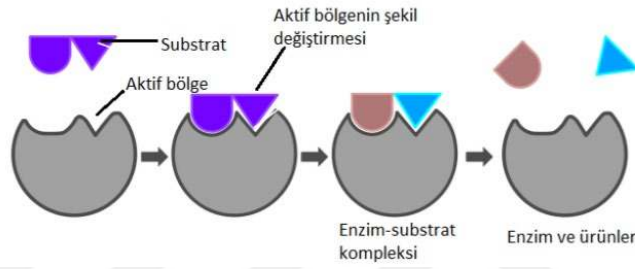
Şekil 1.2. Enzim substrat bağlanması ve ürün oluşumu [28]

Substratlar enzimlere göre oldukça küçük moleküllerdir. Bu nedenle ES enziminin oluşumunu sağlayan katalitik aktif bölge, enzimin oldukça dar bir bölgesini oluşturmaktadır. Aktif bölge veya aktif merkez olarak adlandırılan bu bölgede en az bir aminoasidin özel bir görevi vardır. Aktif bölgede aminoasitler dışında kofaktör ve koenzimler de yer alabilmektedir. Bu bölgede bulunan amino asitlerin bir kısmı substratın bu bölgeye bağlanmasını sağlarken bir kısmı da katalizi gerçekleştirir. Bazı enzimlerde ise alleosterik bölge denen bir bölüm vardır. Bu bölgede bulunan amino asitler konformasyonel değişime yol açıp enzim aktivitesini değiştirebilir [29].

Enzim ile substratın bağlanmasını inceleyen iki model vardır. Fisher modeli denilen anahtar kilit modelinde Şekil 1.3'te görüldüğü gibi enzim ile substrat arasında anahtar kilit uyumu söz konusudur. Aktif bölge ile substrat yapısının birbirini tamamlayıcı nitelikte olması gerekir. Diğer bir enzim-substrat bağlanma modeli olan Koshland modeli de denen indüklenmiş uyum modeli Şekil 1.4'te gösterilmiştir. Substrat moleküllerinin bağlanması ile enzimde uyarılan konformasyonel değişiklik sonucu aktif bölge katalize edilebilir hale gelmiş olur[30] .



Şekil 1.3. Anahtar Kilit modeli [12].



Şekil 1.4. İndüklenmiş uyum modeli [12].

1.1.4. Enzim aktivitesi

Bir enzimin aktivitesi, o enzim tarafından katalizlenen reaksiyonun hızının, optimum koşullarda ve belirli sürede enzimatik reaksiyon sonucu ürüne dönüştürülmüş olan substratın miktarına göre ya da oluşan ürüne göre ifadesidir. Enzim aktivitesi, enzimatik tepkimenin hızıyla ilişkilidir. Aktivitesi fazla olan enzimler, belirli bir sürede daha fazla oranda substrat molekülünü dönüştürme kabiliyetine sahiptirler. Enzimler, katalizledikleri reaksiyonların aktivasyon enerjisini düşürürler. Ve böylece tepkime hızını artırır. Aktivasyon enerjisi ya da eşik enerjisi kısaca kimyasal bir tepkimenin başlaması için zorunlu en düşük enerji miktarı olarak tanımlanmaktadır [31].

1.1.4.1. Enzim aktivite birimleri

Enzim birimleri, enzim aktivitesini ifade etmeye yarar. Enzim aktivitesi genellikle birim zaman başına dönüştürülen substrat mol sayısı olarak ifade edilir. Mevcut geçerli Uluslararası Birimler Sistemi (SI) sistemine göre, derişim mol cinsinden ifade edilir ve zaman birimi s'dir. Buna uygun olarak enzim birimi 1 katal (1 kat), 1 mol ürün/s oluşturan 1 mol substratı dönüştüren enzim miktarı olarak tanımlanır. Fakat, International Unit (IU), katal'den daha yaygın olarak kullanılmaktadır.

Enzim Ünitesi: Belirli şartlar (25° C’da) altında 1 dakikada 1 mikromol substratın dönüşümünü katalizleyen enzim miktarıdır.

Katal: Optimum şartlar altında 1 saniyede 1 mol substratı ürüne çeviren enzim miktarıdır.

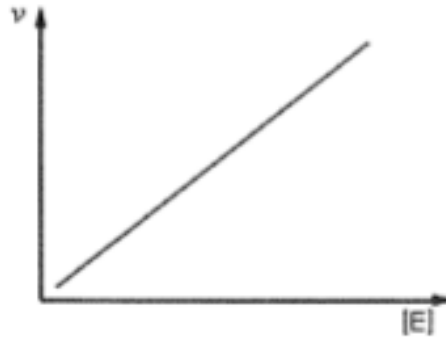
Katalitik Merkez Aktivitesi (Turnover Sayısı): (Molar Aktivite = Turnover Number) Yalnızca bir enzim molekülünün katalitik merkezinin 1 dakika içerisinde dönüştürmüş olduğu substrat molekülü sayısıdır. Yani turnover sayısı, enzim başına düşen, ürüne çevrilmiş substrat molekülü sayısıdır [32].

1.1.5. Enzim aktivitesini etkileyen faktörler

Enzim derişimi

Bir enzimin reaksiyon hızı ile enzimin derişimi arasında doğru orantı vardır. Enzim miktarına bağlı olarak reaksiyon hızı da artmaktadır. Enzim miktarı iki katına çıkarıldığında reaksiyon hızı da iki kata çıkmaktadır. Ancak ortamdaki substrat tükendiğinde ürüne dönüştürülecek herhangi bir madde olmadığından enzim derişimi ne kadar artarsa artsın reaksiyon sabit bir hızla devam eder. [32].

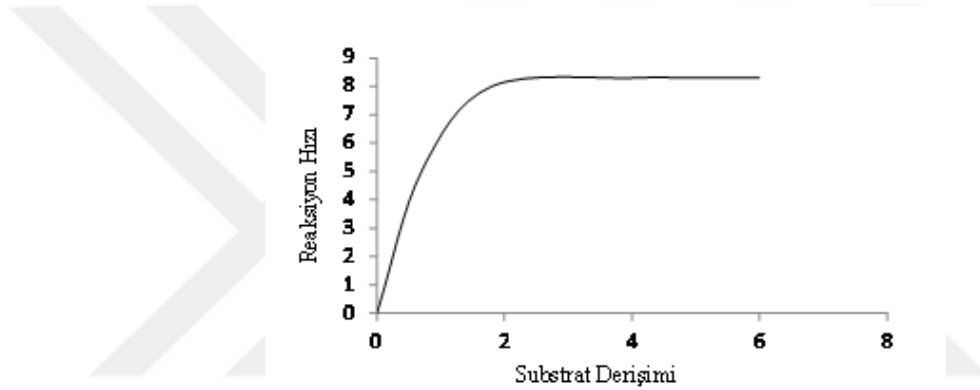
Şekil 1.5’te enzim miktarının (E) reaksiyon hızına (v) göre değişimini gösteren grafik verilmektedir. Bu grafikte doğrusal hareket gözlemlenmektedir. Grafikte de görüldüğü gibi enzim miktarının artışı ile doğru oranda reaksiyon hızında da bir artış görülmektedir.



Şekil 1.5. Enzim derişiminin reaksiyon hızına etkisi [16].

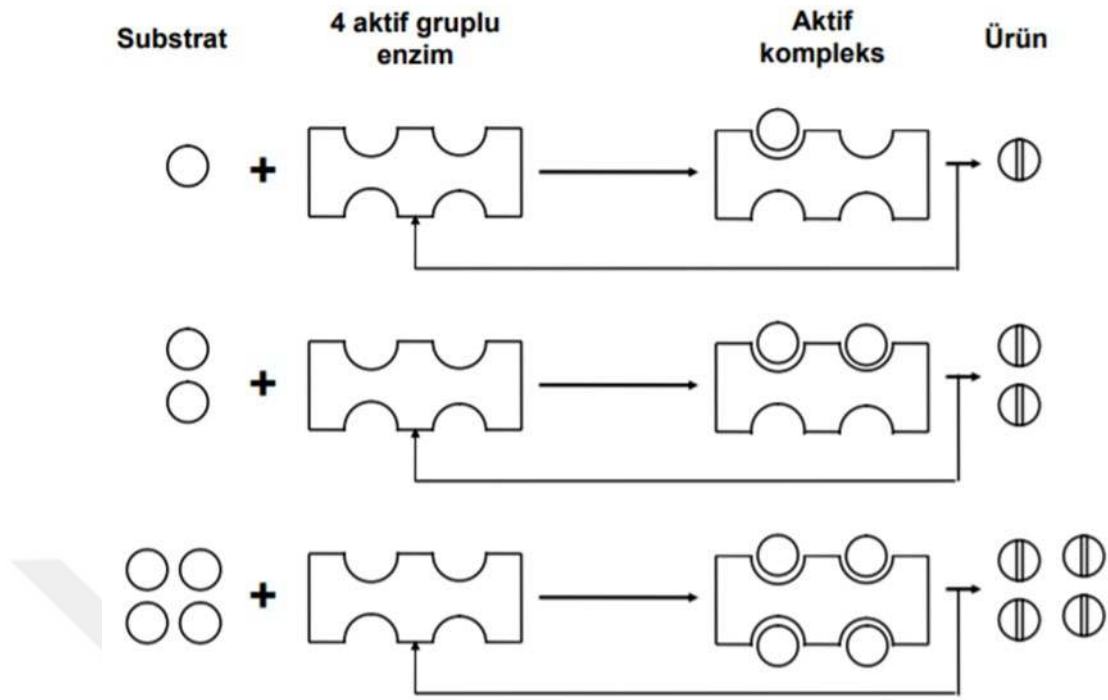
Substrat derişimi

Enzim miktarı sabit olduğu zaman, enzimatik reaksiyon hızı ile substrat derişimi arasında orantılı bir ilişki vardır. Substrat miktarının artışı ile doğru orantılı olarak reaksiyon hızı da belli bir süre artış gösterir. Fakat reaksiyon devam ettikçe belli bir süre sonra substrat miktarındaki artış reaksiyon hızını etkileyemeyecektir. Çünkü enzimin substratı aldığı aktif bölgesi substrat ile doymuş olacağından daha fazla substrata bağlanamayacaktır. Aktif bölge doyana kadar ulaşılmış son hız üzerinden aktivasyon gerçekleşmeye devam edecektir. Şekil 1.6.'da görüldüğü gibi belli bir noktaya kadar substrat derişimi arttıkça reaksiyon hızı da doğru orantıda artmaktadır. Fakat belli bir noktadan sonra substrat miktarındaki değişime rağmen reaksiyon hızı sabit kalmaktadır.



Şekil 1.6. *Substrat derişiminin reaksiyon hızına etkisi [21]*

Enzim ile substrat derişimi arasındaki ilişki Şekil 1.7'te gösterilmiştir. Enzim molekülleri, düşük substrat derişiminde substratla tam olarak birleşemediği için yüzeylerindeki aktif bölgelerinde boşluk kalır. Bu ise reaksiyon hızını düşürür. İkinci sırada enzim daha fazla substratla reaksiyona girdiği için reaksiyon hızında artış görülür. Sonuncuda ise artık aktif bölgesi doymuş bir enzim vardır. Bu doymuş durumda substrat miktarında gözlenecek artış ise reaksiyon hızındaki artışa yol açmaz. Reaksiyon hızı son durumda gittikçe yavaşlayıp belirli bir düzeyde sabit olarak kalır. Çünkü enzimin tam kapasitesine yani, katalitik görev sınırının en üst düzeyine ulaşılmıştır [33].

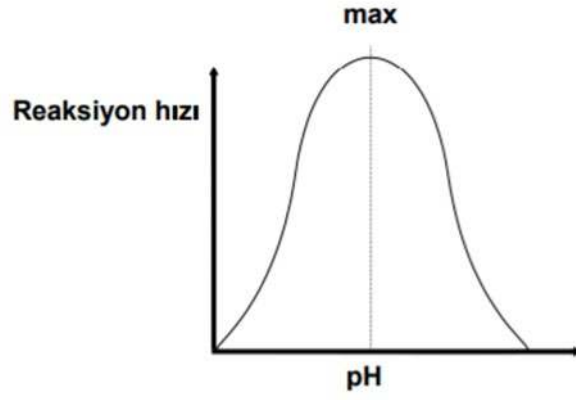


Şekil 1.7. Substrat-enzim ilişkisi [33].

pH

Genellikle enzimlerin en yüksek aktivite gösterdikleri belirli bir pH seviyesi vardır. Enzimler, protein yapısında olmalarından dolayı pH değişimlerine karşı oldukça hassas tepki vermektedirler. Çünkü enzimlerdeki amin ve karboksil grupları ortamdaki pH'ın derecesine bağlı olarak iyonlaşırlar. Bu durumda iyonik bağlar kırılmış olur. Yani yüksek ve düşük pH değerleri enzimde denatürasyona sebep olabilir. Böyle bir durumda enzim aktivitesi durur. Asit ve alkali ortam enzimin reaksiyon hızını etkilediği için enzim analizlerinde ortam pH'nın sabit kalmasını sağlayan tampon çözeltiler kullanılır [34].

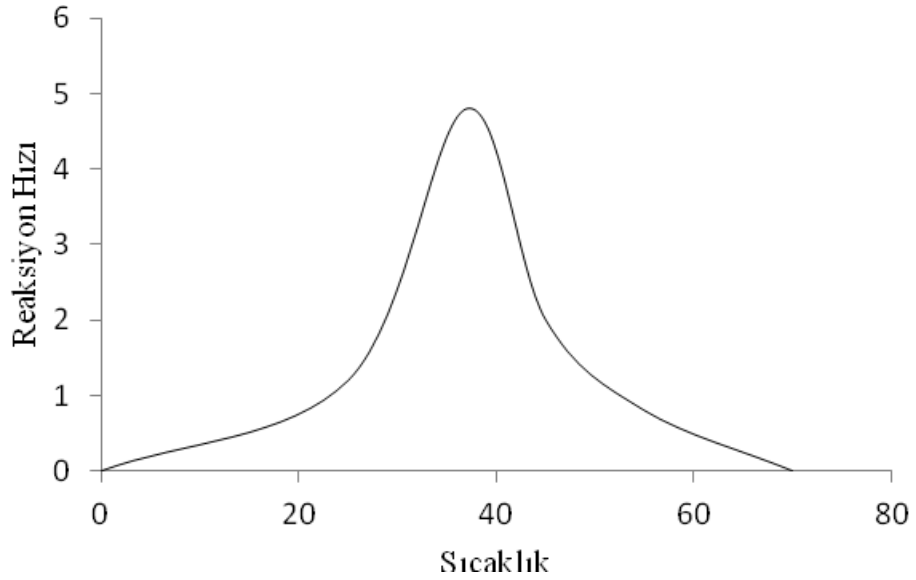
Şekil 1.8. de görüldüğü gibi enzim aktivitesi belirli pH derecelerinde saptanarak grafiğe işlendiğinde bir eğri oluşur. Grafikte oluşan eğrinin en tepe noktası enzimin en yüksek oranda aktivite göstermiş olduğu optimum pH değerini verir. Optimum pH değerine kadar reaksiyon hızında gözlenen yükseliş optimum pH değerine ulaştığında düşüşe geçer [34].



Şekil 1.8. pH'ın reaksiyon hızına etkisi [33]

Sıcaklık

Enzimatik reaksiyonlarda sıcaklık arttırıldığında reaksiyon hızı da artar. Fakat yüksek sıcaklık enzimi denatüre edebilir. Bu durumda da enzim aktivitesi bir süre sonra duracaktır. Enzimlerin maksimum aktivite gösterdikleri belirli bir sıcaklık seviyesi vardır. Bu sıcaklığa optimum sıcaklık denir. Enzim aktivitesi optimum sıcaklıkta olmalıdır. Şekil 1.9'da görüldüğü gibi sıcaklığın artışı ile birlikte reaksiyon hızında bir artış gözlemlenmektedir. Fakat optimum sıcaklık noktasından sonra reaksiyon hızında düşüş yaşanmaktadır.



Şekil 1.9. Sıcaklığın reaksiyon hızına etkisi [33]

Genellikle enzimler başlangıçta ısıнын her 10 °C artışında reaksiyon hızını iki katına çıkarır. Bu duruma sıcaklık koefisiyanı denir. Bazı enzimler ise 10 °C ‘lık sıcaklık artışında iki katından daha az bir reaksiyon hızı gösterirken bazıları ise 10 °C ‘lık sıcaklık artışında beş katını aşan reaksiyon hızına ulaşabilmektedir. Bitkisel enzimler, hayvansal enzimlerden daha yüksek bir optimum sıcaklıkta aktivite göstermektedirler. Yani ulaşılacak sonuç her enzimin optimal sıcaklık seviyesinin farklı olduğudur [35].

Zaman

Bir enzimin başlangıçta zamanla reaksiyon hızı artış göstermektedir. Fakat substratın tükenmesi, reaksiyonu önleyen maddelerin meydana gelmesi, oluşan ürünlerin kendi aralarında birleşip aksi yönde bir reaksiyona neden olmaları ve enzim aktivitesinin zamanla durması gibi faktörler sonucu reaksiyon hızında zamanla azalma görülür [35].

Allosterik etki

Multienzim sistemlerinde bazen gerektiğinden oldukça fazla miktarda son ürün oluştuğunda son ürün tarafından düzenleyici enzimler spesifik olarak inhibe edilir. Böylece düzenleyici enzim reaksiyonu yavaşlar ve sıralı enzimlerin hepside düşük hızda çalışırlar. Bu suretle hücrenin ihtiyaçları dengeye yolun son ürününün üretim hızı ile getirilmiş olur. Enzimin bu şekilde inhibe edilmesine allosterik feedback inhibisyonu denir. Allosterik feedback inhibisyonda, inhibisyonu gerçekleştirecek son ürün, genellikle reaksiyonun geri döndürülemez olan ilk aşamasında görevli allosterik enzime bağlanmak suretiyle inhibisyonu gerçekleştirir [35].

Hormonlar ve diğer biyokimyasal faktörlerin etkisi

Enzim aktivitesi hormonlar, amino asitler veya diğer maddeler tarafından da etkilenebilmektedirler. Örneğın glutamat dehidrojenaz (GDH) enzimine gevşek bağı 4 alt ünite dissosiyasyon olarak enzimin aktivitesini kaybetmesine neden olurlar. Enzimin yapısında gerçekleşen bu değişimin nedeni çeşitli östrojenik, androjenik ve bazı steroid gebelik hormonlarıdır. Aynı zamanda steroid hormonları, hücrelerin enzim sentez etmesini bile ayarlama kabiliyetine sahiptir [36,37].

1.1.6. İnhibitörler

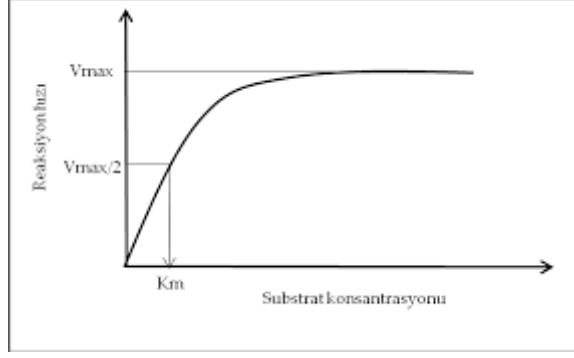
Enzim substrat ilişkisini bozarak reaksiyonların hızını azaltan ya da durduran maddelere inhibitör denir. Enzim inhibisyonu, reversible(tersinir) ve irreversible (tersinmez) olarak iki çeşite ayrılır. Kovalent bağlarla enzim inhibitöre bağlandığı zaman

geri kazanılamaz. Yani geri dönüşümsüz (tersinmez) inhibisyon gerçekleşmiş olur. Enzime kovalent bağları ile bağlanan inhibitörlere tersinmez inhibitör denir. Tersinir inhibitör ise enzimin tekrar serbest kalmasını sağlayan tersinir bağlarla bağlı inhibitörlerdir. Bu inhibitörler enzimlerde geri dönüşümlü inhibisyon meydana getirir. Tersinir inhibisyon üç alt başlığa sahiptir. Bunlar competitive (yarışmalı) inhibisyon, yarışmasız inhibisyon ve uncompetitive (yarıyarışmalı) inhibisyonudur. Yarışmalı inhibitörler türleri yapısal olarak substrata benzediği için substratla yarışarak enzimin aktif bölgesinde bağlanmaya çalışırlar. Eğer inhibitör enzimin aktif bölge dışında bir yerine bağlanarak substrat ile reaksiyona girmesini engelliyorsa yarıyarışmalı inhibisyon gerçekleşir. İnhibitörün enzim substrat kompleksine bağlanarak enzimin hızını azalttığı reaksiyonlara ise yarışmasız inhibisyon denir [38].

1.1.7. Enzim kinetiği

Enzim kinetiği, enzim tarafından katalizlenen tepkimenin hızını belirleyen faktörlerin incelenmesidir. Bir enzimin katalizlediği tepkimenin hızını substratın derişimi etkiler. V_0 başlangıç hızını, ilk hızı, ifade eder. Enzim derişimi, sabit tutulur ve substrat derişimine bağlı şekilde maksimum hıza ulaşılır. Bu maksimum hız noktasına V_{max} adı verilir. Maksimum hıza ulaşıldığında substrat derişimi artsa bile hızda bir değişim görülmeyecektir. Hız sabitleştiği zaman enzim aktivite tayini için ideal durum oluşmuş olur. V_0 , V_{max} değerine yaklaşırsa bile asla tam olarak bu değere ulaşamayacaktır [39].

Şekil 1.10'da Michaelis-Menten grafiğinden görüldüğü gibi V_0 noktasından V_{max} değerine kadar substrat derişiminin artışı ile reaksiyon hızı da arttırmaktadır. V_{max} değerine ulaşıldıktan sonra ise substrat derişiminde artış olsa bile enzimin reaksiyon hızının sabit kaldığı görülmektedir. Michaelis-Menten sabiti, maksimum hızın yarısına ulaşıldığındaki substrat derişimidir. Michaelis-Menten sabiti K_m ile ifade edilir [40].



Şekil 1.10. Michaelis-Menten grafiği.

Michaelis-Menten eşitliği:

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

Eşitlik (1.1)

K_m değeri enzimlerin kinetik ifadelerinde çok önemlidir. K_m enzimler için karakteristiktir. Tek substratlı enzimatik reaksiyonlarda bir K_m değeri bulunmaktadır. Fakat birden fazla substratlı enzimlerin birden fazla K_m değeri vardır. K_m substrat için enzim afinitesi ile ilgili fikir vermektedir. Enzim-substrat kompleksinde zayıf bağlanma yüksek K_m değerini verirken, enzim-substrat kompleksindeki kuvvetli bağlanma düşük K_m değeri ile ifade edilir. Enzim üzerine etki eden bir inhibitör varsa K_m etki tarzı hakkında bilgi vermektedir [41,42].

1.1.8. Enzimlerin aktivite tayin yöntemleri

Enzimler dokularda çok az miktarlarda bulunur. Bu nedenle enzim miktarının tayini birçok enzim için oldukça güçtür. Fakat enzimler kimyasal reaksiyona girdiklerinde ortaya çıkan ürünün miktar tayinini yapmak mümkündür. Elde edilmiş olan ürünün miktarı, enzimin derişimi ile doğru orantılı olacağı için enzim miktarı konusunda bilgi edinmeyi mümkün kılmaktadır. Ancak yeterli substrat, ısı ve pH gibi şartların hepsi yapılan deneylerde standart halde olmalıdır. Genellikle enzimlerin çoğunluğu henüz saflaştırılmış halde bulunmamaktadır. Bu nedenle enzim aktivite tayini miktar tayini için de önemlidir [43,44].

Enzim aktivite tayininde kullanılan yöntemler yedi başlık altında toplanır. Bunlar, Spektrofotometrik yöntem, Monometrik yöntem, Thunberg yöntemi, Elektrot yöntemi, Polimerik yöntem, Kromatografik yöntem, Kimyasal tayin yöntemidir.

I. Spektrofotometrik Yöntem: Spektrofotometrik yöntem oldukça kolay, basit ve hassas bir yöntemdir. Bu nedenle diğer yöntemlerden daha çok tercih edilmektedir. Enzim substratı, koenzim ya da ürün görünen ışık veya ultraviyole ışık altında çoğunlukla absorbans vermektedir. Bu yöntemle substratın kaybolması veya ürünün meydana gelişi gibi değişiklikler spektrofotometreden tayin edilir [44].

II. Monometrik Yöntem: Bu yöntem komponenti gaz olan enzimlerin aktivitesini ölçmekte kullanılmaktadır. Örneğin; oksidazlarda oksijen alınımı miktarına bakılarak ölçüm yapılırken, dekarboksilazlar için karbon dioksit salınımı ölçülür [44].

III. Thunberg Yöntemi: Dehidrogenaz enzimlerinin çoğunluğunda bu yöntem kullanılarak enzim aktivitesi tayini gerçekleştirilir. Bu yöntemde bir elektron alıcısı olan metilen mavisi kullanılır. Enzim aktivite tayini için reaksiyon ortamına belirli ölçüde metilen mavisi ilave edilir. Bu bileşik okside durumunda renkli iken redükte durumunda ise renksizdir. Metilen mavisi eklenmiş bileşikteki renk kaybuluncaya kadar ki zaman hesaplanır. Havanın oksijeninden korunabilmek için deney "Thunberg tüpü" denilen özel bir tüpte yapılır. Deneyin gerçekleştiği bu özel tüp yönteme adını vermiştir [44].

IV. Elektrot Yöntemi: Oluşan ürünlerin, cam elektrotlar vasıtasıyla ölçülmesine dayanan bir yöntemdir [44].

V. Polimerik Yöntem: Enzimin substratlarının pek çoğu optikçe aktiftir. Bu yöntem bir üründe optik aktivite değişmesi görüldüğünde kullanılmaktadır. Substrat optikçe aktif ve ürün de optikçe aktif olduğu durumlarda bu yöntem kullanılır. Yine substrat aktif ürün inaktif oluncada bu yöntem tercih edilir. Fakat hem ürün hem de substratın optikçe inaktif olduğu durumlarda bu yöntem kullanılamaz [44].

VI. Kromatografik Yöntem: Diğer yöntemlerle ölçmek mümkün olmadığı zaman bu yönteme başvurulur. Bu yöntemde belirli zaman aralıklarıyla enzim substrat karışımlarından örnekler alınmaktadır. Kromatografi kâğıdı ya da ince tabaka kromatografisiyle substrat ile ürün birbirinden ayırt edilir. Radyoaktif substratların kullanıldığı durumlarda ayırımdan sonra leke ya kağıt kromatografisindeki gibi kesilerek ya da ince tabaka kromatografisindeki gibi kazınarak sayım şişelerine koyulur. Sayaçta

radioaktivite miktarı sayılarak tayini yapılır. Bazı enzim aktivitelerinde meydana gelen lekenin büyüklüğünden yola çıkılarak da enzim faaliyeti hakkında bilgi elde edilir [44].

VII. Kimyasal Tayin Yöntemi: Reaksiyon başladıktan sonra enzim karışımından belirli aralıklarla örnekler alınır. Daha sonra ise substrat ve ürünün kimyasal yöntemler kullanılarak miktarı tayin edilir. ATP ve ADP'nin varlığında bazı kinaz ve sentetaz reaksiyonlarında bu yöntem ile enzim aktivitesi tayin edilir [44].

1.2. Lizil Oksidaz (LOX) Enzimi

LOX enziminin diğer adı protein-lizin-6-oksidadır. LOX enzimi, insanlarda LOX geni tarafından kodlanan bir enzimdir. Oksidoredüktazlar enzim sınıfına girmektedir. Lizil oksidaz, amin oksidazlar olarak bilinen bir enzim ailesine aittir. Bu enzim ailesi, aminlerin aldehitlere oksidasyonunu katalize eder. Bakır bağımlı bir amin oksidaz olan LOX enzimi, ekstraselüler matriks proteinlerinin, kollajenin ve elastinin çapraz bağlanmasını sağlamaktadır. Polimerik elastin ve kollajen liflerinin temel mekanik işlevleri elastikiyet veya uzayabilirlik vermek, dokuyu desteklemek ve hücreyi hücre dışı matrise sabitlemektir. LOX enziminin bağ dokusunun gelişimi ve onarımı için önemli bir rol oynadığı söylenebilir. LOX enzimi, fibrojenik hücreler tarafından salgılanır [45,46].

LOX bakır amin oksidazları, bağ dokusu matrislerinin biyogenezini için gerekli olan kritik bir post-translasyonel modifikasyonu katalize eder. Bu enzim, bu proteinlerdeki peptidil lizini peptidil a-aminoadipik-d-semialdehit (alisin) oksitleyerek elastin ve kollajenin moleküler birimleri arasında ve içinde kovalent çapraz bağlanmayı başlatır. Peptidil aldehit daha sonra fibriller kollajen ve elastinde bulunan kovalent çapraz bağları oluşturmak için komşu amino grupları veya peptidil aldehitlerle yoğunlaşabilir. Keşfedildiği zamandan beri 1980'lerin ortalarına kadar, bu enzim üzerindeki araştırmalar, kollajen ve elastin substratlarına yönelik özgüllüğüne, saflaştırılmasına, fiziksel-kimyasal özelliklerine, katalitik mekanizmasına ve fibrotik ve genetik hastalıklar spektrumunda ekspresyonunun değiştirilmesine yönelik olarak ilerlemiştir [45,46].

LOX enzim ailesinin üyeleri, sırasıyla LOX ve LOX benzeri LOXL-1, LOXL-2, LOXL-3 ve LOXL-4 olarak adlandırılan homolog 5 izoformdan oluşmaktadır. LOX izoenzimleri farklı fiziksel ve kimyasal özelliklerde aynı katalitik aktiviteye sahip farklı formlardır. Hücrelerde, LOX ilk olarak prolizil oksidaz adı verilen 50 kDa protein öncüsü olarak sentezlenir. Proteinin bu inaktif formu daha sonra golgi kompleksinde glikosile

edilir ve bir N-glikosile edilmiş proenzim oluşturur. Glikosilasyondan sonra, veziküller yoluyla hücre zarına taşınır, burada hücre dışı matrise (ECM) salgılanır. LOX'un ECM'de aktive olduğu düşünülmektedir. Aktif bir LOX 32 kDa molekül ağırlığına sahiptir. Aktivite açısından, lizil oksidazın çalışması için iki kofaktör gereklidir: bakır ve lizil tirozil kinon (LTQ) [47,48].

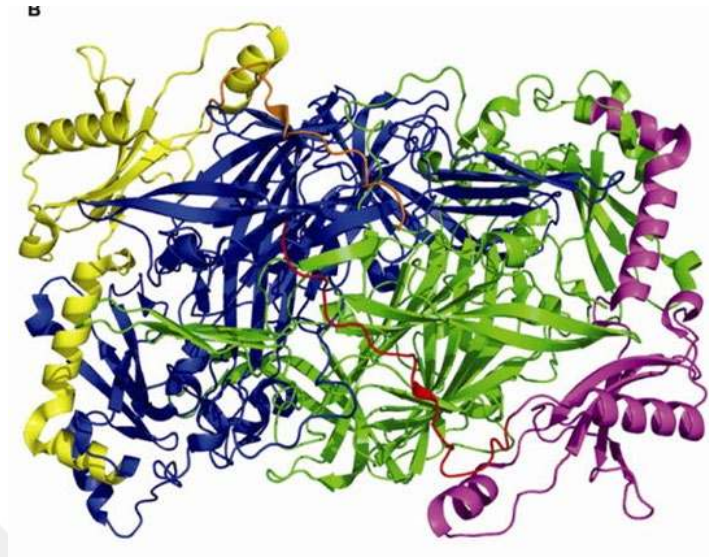
Şekil 1.11'de kırmızı renkli alan dört histidin içeren benzersiz bir bakır bağlama (Cu) alanıdır. Yeşil renkli alan ise tip I sitokin reseptörlerine benzer bir sitokin reseptörü benzeri (CRL) alanı gösterir. Öngörülen sinyal dizisi mor renkte gösterilmiştir. Sarı renkle gölgelenen BMP-1 bölünme bölgesi okla belirtilmiştir [49].



Şekil 1.11. LOX protein yapısı

LOX ailesi, bir bakır bağlama görevi gören histidin kalıntıları, bir lisil-tirozin-kinon (LTQ) kofaktörü ve sitokin reseptörü benzeri bir bölümü içeren oldukça korunmuş bir katalitik alanı paylaşır. Bunlar enzimatik aktivite için gereklidir. LOX yapısında 417 aminoasit içermektedir. Sarı renkte gösterilen sinyal dizisidir. Yeşil renkteki bölge BMP-1 bölgesidir. Bu bölge enzimatik aktivite için gerekli tüm elementleri içermektedir. yüksek oranda korunmaktadır [50].

Şekil 1.12'de LOX enziminin üç boyutlu yapısı görünmektedir. Kırmızı ve turuncu sinyal peptid alanını, sarı ve mor pro-peptidi, yeşil ve mavi ise C-terminal alanı göstermektedir [51].



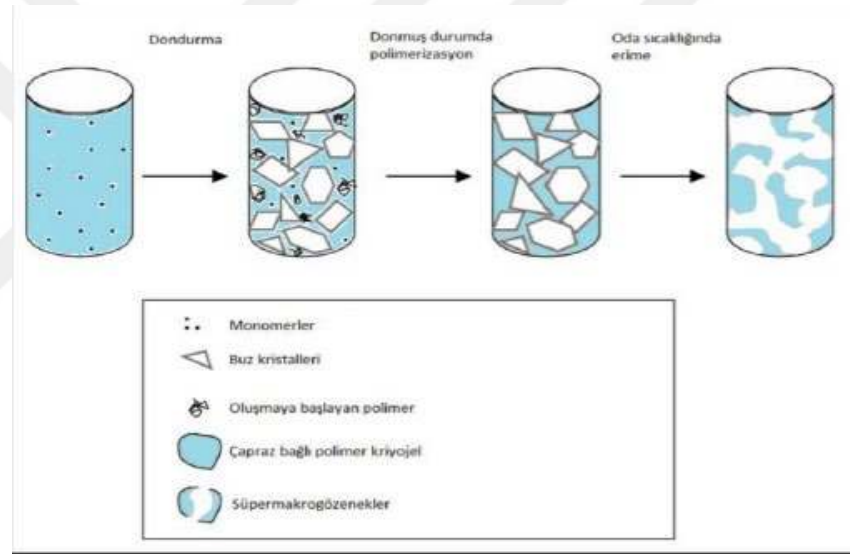
Şekil 1.12. LOX enziminin 3D Kristal yapısı[50]

1.3. Kriyojeller

Kriyojel kelimesi eski Yunancada “soğuk, buz” anlamına gelen κρυος(cryos) kelimesinden türetilmiştir. Çünkü kriyojeller genellikle uygun monomerik veya polimerik başlatıcıların uygun çözücülerdeki çözeltilerinin sıfırın altındaki sıcaklıklarda kriyojelasyonuyla geliştirilen süper makro gözenekli jel ağlarıdır. Kriyojellerin birbiri ile bağlantılı makro gözenekler ve süngerimsi morfoloji gibi özellikleri difüzyonun etkin bir şekilde gerçekleşmesine ve nano veya mikro partiküllerin kütle transferine katkıda bulunur. Yani gözenekli ve elastik yapıları sayesinde hareketli fazın kolondan geçmesi sırasında kolonda oluşacak geri basıncı elimine edebilirler. Bu nedenle kromatografik sistemlerde kolon malzemesi olarak kullanılmaktadırlar. Biyomoleküllerin bozunmadan ve denatüre olmadan, kromatografik tekniklerle verimli bir şekilde saflaştırılmasını kriyojellerin sahip olduğu bu avantaj sağlamaktadır [52-54]

Kriyojellerdeki gözenek yapısı, donma sıcaklığına, çözünen monomerlerin derişimine ve başlatıcı sistemin bileşimine bağlı olarak oluşmaktadır. Yani kriyojelleşme hızı ve çözgen kristalizasyon hızı uygun şekilde kontrol edildiği takdirde istenilen özelliklerde kriyojeller sentezlenebilmektedir. Şekil 1.13’te görüldüğü üzere, kriyojelasyon prosedürünün ilk aşamasında buz kristali oluşumları ile faz ayrımı, daha sonra çapraz bağlama ve polimerizasyon işlemi gerçekleşir. En son olarak birbirine bağlı gözenekli bir kriyojel ağı oluşturan buz kristallerinin erimesi ile kriyojelasyon

gerçekleşmiş olur. Kriyojeller, -10 ile -20 °C aralığındaki gibi düşük sıcaklıktaki sulu çözeltilerde hazırlanır. Reaksiyon karışımı donma işleminin sonunda donmuş olan monolitik buz kristalleri ve donmamış bölge olan donmayan sıvı mikrofaz olmak üzere iki bölüme ayrılmış olur. Donmayan sıvı mikrofazda kriyojelleşme gerçekleşir. Donmamış sıvı mikrofaz, başlangıç hacminin çok küçük bir kısmını oluşturmaktadır. Donma evresinde jel başlatıcılarının derişimi yoğun bir şekilde artar ve bu da jel oluşumunu tetikler. Mikrofazda gerçekleşen polimerleşme ile oluşan donmuş jel oda sıcaklığına getirilir. Donmuş kristaller gözenek oluşturuca ajan görevi görür ve eridiği yerde boşluklar, başka bir deyişle makro gözenekler bırakır. Kriyojelleşme tamamlanınca en son olarak gerçekleşen erime ile birlikte sürekli olarak makro gözenekli kanallara sahip bir sistem oluşmuş olur [53,54,56].



Şekil 1.13. Kriyogel oluşumunun şematik gösterimi[55]

1.4. Afinite Kromatografisi

Afinite kromatografisi moleküler tanımayaya dayalı bir yöntemdir. Proteinlerin biyolojik fonksiyonlarına göre ayrılmalarını sağlar. Afinite kromatografisi biyoafinite, immunoafinite, lektin afinitesi, boronat afinitesi, biyomimetik afinite ve immobilize metal afinitesi gibi çeşitli alt dallara ayrılmaktadır. Protein, enzim, karbonhidrat, vitamin gibi pek çok molekül bu yöntemler kullanılarak ayrılmaktadır. Afinite kromatografisinin diğer yöntemlere göre birtakım ayrıcalıkları vardır. Bunlar yüksek seçicilik özelliğine,

hızlı ve kolay kullanıma sahip olmasıdır. Fakat en büyük avantaj ise hedef proteinin ideal koşullar sağlandığı takdirde tek adımda saflaştırılabilmesidir [57,58].

Afinite kromatografisi, hedef biyomoleküllerin, uygun ligandalarla sipesifik ve geri dönüşümlü olarak bağlanmasıyla ayrılmasını sağlayan kromatografik bir yöntemdir. Ligandlar çözünmeyen bir destek materyali (matriks) üzerine immobilize edilerek hedef molekülü tamamlamak için gerekli bağlanma uçları içeren moleküldür. Hedef molekül ile ligand arasında biyolojik etkileşimler, elektrostatik veya hidrofobik etkileşimler, van der Waals veya hidrojen bağları aracılığıyla gerçekleşebilmektedir. Hedef molekülün elüsyonu için ya yarışmacı bir ligand kullanılır ya da mobil faz pH, iyonik kuvvet veya polaritesi birtakım değişimlere uğratarak değiştirilir. Bu aşamada, mobil faz elüsyon işlemi sırasında bileşiği denatüre etmemeli ve spesifik aktivitesinde veya işlevinde herhangi bir değişime yol açmamalıdır [57,58].

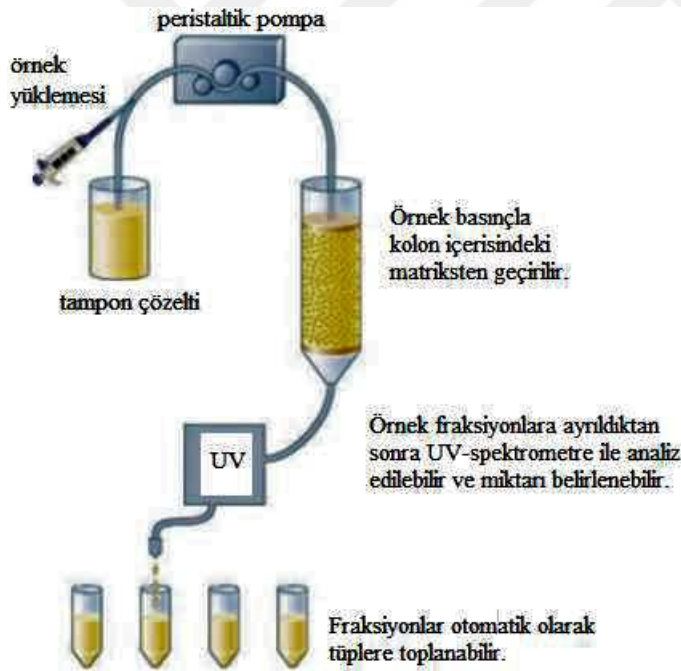
Saflaştırma işleminde analit içeren örnek, afinite kolonundan geçirilir. Burada kolondan geçirme işlemi, bileşik ile ligandın bağlanması için gerekli pH, iyonik kuvvet ve bileşime sahip uygulama tamponu ile gerçekleştirilir. Örnek kolondan geçerken bileşikler afinite ligandlara uygun bağlanma uçlarından bağlanırlar. Bağlanamayan bileşikler ise kolondan yıkama işlemi ile uzaklaştırılır. Uzaklaştırma işleminden sonra kolonda tutulan analitin elüsyonu gerçekleştirilir. Bu, analit ile ligand arasındaki bağlantının koparmayı sağlayan elüsyon tamponu denilen mobil fazın kolondan geçirilmesiyle yapılır. İşlemler sırasında hedef molekülün ve ligandın veya destek materyalinin yapısında herhangi bir geri döndürülemez denatürasyonun olmamasına özen gösterilmelidir. Diğer yandan, mobil fazdaki iyonik kuvvetin ve tuz derişiminin artışı iyonik etkileşimlerin bozulmasını neden olurken, hidrofobik etkileşimlerin oluşmasında teşvik edici bir rol oynamaktadır. Bu durumu önlemek için kaotropik tuzlar kullanılabilir [57,58].

1.5. Hızlı Protein Sıvı Kromatografisi (FPLC)

FPLC, proteinlerin ayrıştırılmasını, saflaştırılmasını, nicel olarak belirlenmesini ve nitelendirilmesini, peptid vb. ayrımlarının gerçekleştirilmesini sağlar. Proteinlerin tek bir adımda saflaştırılmasını sağlaması nedeni ile son zamanlarda yapılan biyokimyasal çalışmalarda oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu kromatografik yöntem orijinal olarak protein saflaştırma için geliştirilmiş olmasına rağmen, DNA (plazmitler, kısıtlama parçaları ve oligonükleotitler), nükleotit türevleri (örn. NAD, ATP), dahil olmak üzere

çok çeşitli diğer biyomoleküllerin saflaştırılmasında da kullanılmaktadır. Basit bir kromatografik ayırma dayanan bir sistemi vardır. Öncelikle uygun bir hareketli faz ile hazırlanan kolonun üzerinden saflaştırılmak istenen enzim veya protein geçirilir [59-61].

Şekil 1.14'te verilen şematik gösterim, FPLC cihazının çözücü kaplar, iki pompa, enjeksiyon ünitesi, kolon, dedektör, fraksiyon toplama ünitesi ve bir de veri kaydediciden (bilgisayar) oluştuğunu göstermektedir. Çözücü kaplarında kolonu şartlandırma çözeltisi ve kolonda tutunan analiti kolondan sökme amaçlı elüsyon çözeltisi bulunmaktadır. Pompalar, cihaza verilen komut doğrultusunda bu çözeltileri önce enjeksiyon ünitesinden, ardından cihaza yüklenen numuneyi de aldıktan sonra, belirli bir hızda kolondan geçirir. Kolonu terk eden türler sırayla dedektöre ulaşır. Buradan da belirli fraksiyonlarda örnek toplama ünitesindeki tüplerde toplanır. Dedektörden gelen sinyallere bağlı olarak oluşan piklerin kromatogram halinde görüntülenmesi ise bilgisayar sayesinde olur [59,60].



Şekil 1.14. FPLC sisteminin şematik gösterimi [59].

FPLC’de kullanılabilen ayırım mekanizmaları jel filtrasyon kromatografisi, iyon değişim kromatografisi, afinite kromatografisi yöntemidir [62].

1.6. Dairesel Dikroizm (CD) Spektroskopisi

CD spektroskopisi, moleküllerin dairesel spektrumlarını ölçen spektroskopik bir yöntemdir. Moleküllerin dairesel spektrumlarını belirli dalga boylarında ölçmektedir. Bu yöntem incelenen molekülden, sağ ve sol dairesel polarize ışığın geçerken uğradığı absorpsiyon farkına dayanır, eşit olmayan bu absorpsiyon dairesel dikroizm olarak tanımlanır. Dairesel dikroizm spektroskopisi, yapısal özelliğin belirlenmesinde kullanılan bir yöntemdir. Polarize ışığın etkileşim içine girdiği moleküller asimetric yapıdaki moleküllerdir. Bu moleküller polarize ışığın yönünü değiştiren optikçe aktif maddelerdir. CD spektroskopisi genellikle biyomoleküllere uygulanır [66,67].

$$\Delta A(\lambda) = A(\lambda)_{\text{sol yönlü polarize ışık}} - A(\lambda)_{\text{sağ yönlü polarize ışık}}$$

(λ = Dalga boyu)

Yukarıda verilen formülde A; polarize ışığın absorpsiyonunu, ΔA ise; polarize ışığın sola doğru olan absorpsiyonu ile polarize ışığın sağa doğru olan absorpsiyonu arasındaki farkını belirtmektedir.

CD spektroskopisinin, farklı birçok alanda, farklı uygulamalarda geniş bir kullanım alanı vardır. Fakat UV CD spektroskopisi en çok proteinlerin ikincil yapısının tayininde kullanılmaktadır. UV/Vis CD spektroskopisi moleküllerdeki yük transfer geçişlerinde, Vis CD spektroskopisi metal atomlarındaki d-d geçişleriyle geometrik ve elektronik yapının incelenmesinde, titreşimli CD spektroskopisi ise, küçük organik moleküllerin, proteinlerin ve DNA'ların yapısal analizlerini ortaya koymak gibi birçok amaçla kullanılmaktadır. Proteinler α -heliks yapısı ve nükleik asitlerin çift heliks yapıları nedeniyle CD spektrum sinyalleri vermektedir. Uzak UV bölgesinde, proteinlerin ikincil yapılarına ilişkin yapıdaki, α -heliks konformasyonu, beta katlanmaları veya beta tabakaları ya da diğer rastgele katlanmalar hakkında bilgi alınabilmektedir. Ayrıca CD spektroskopisi proteinlerdeki konformasyonel değişikliklerin ifadesinde büyük önem taşır. CD spektroskopisinde ölçümlerin sağladığı bilgiler ile proteinlerin ikincil yapılarının hakkındaki bilginin yanı sıra tersiyer yapılarındaki aromatik grupların da varlığını göstermiş olur. Örneğin, sıcaklık, denatüre edici ajanlar ya da bu ajanların derişimlerinin nedne olduğu proteinlerin ikincil yapılarındaki değişiklikleri incelemek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır [66].

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Materyal

Tez çalışmasındaki deneysel basamaklar aşağıdaki başlıklar altında toplanmıştır.

1. Sığır aortundan LOX enzimi içeren ekstrakt hazırlanması,
2. MaBt temelli monomer sentezi ve karakterizasyonu,
3. MaBt-Cu içeren kriyojel kolon sentezi ve karakterizasyonu,
4. LOX enzimi içeren ekstraktan FPLC ile LOX enziminin saflaştırılması,
5. Saflaştırılan enzimin karakterizasyonunun yapılması,
6. Saflaştırılan LOX enziminin aktivite tayini ve aktiviteyi etkileyen faktörlerin incelenmesi.
7. Saflaştırılan LOX enziminin biyoteknolojik uygulaması.

2.1.1. Kullanılan cihazlar

Yapılan çalışmada, sentezlenen monomer ve polimerlerin karakterizasyonunda Perkin Elmer Spektrum 100 FT-IR Spektrofotometre, Bruker-UltraShield 500 MHz NMR cihazı, yüzey morfolojisinin belirlenmesinde Zeiss Ultra Plus Taramalı elektron mikroskobu kullanılmıştır. İzole edilen enzimin saflaştırılması çalışmalarında AKTA P-920 UPC-900 model FPLC cihazı, enzimin protein içeriği ve aktivitesini belirlemek için Biotech Synergy H1 ELISA mikrolaka okuyucu kullanılmıştır. Saflaştırılan enzimin konformasyonel değişimleri Applied Photophysics-Chirascan Plus model dairesel dikroizm (CD) spektrofotometresiyle, enzimin moleküler ağırlığı ve saflığı ise Thermo Scientific elektroforez ile belirlenmiştir. Ekstrakt hazırlama işlemlerinde, Sigma-3 18-KS santrifüj cihazı kullanılmıştır. Çalışma sırasında çözeltilerin hazırlanmasında Ohaus-Pioneer model hassas terazi, Thermo marka çalkalayıcı kullanılmıştır. Bu süreçte hazırlanan tampon ve çözeltilerin pH ölçümleri HANNA H1 PH/ORP cihazıyla yapılmıştır.

2.1.2. Kullanılan kimyasallar

Aktivite tayini çalışmalarında kullanılan Yabant Turpu Peroksidaz (HRP) ve enzim örneklerinin protein içeriğini belirlemek için kullanılan Sığır Serum Albumin (BSA) Sigmadan temin edilmiştir. Kolon sentezi ve Jel elektroforez deneylerinde kullanılan Sodyum Dodesilsülfat (SDS) Alfa-Aesardan, N,N' Metilenbisakrilamit (MBA) Sigma Aldrich'ten, 2-Hidroksi etil metakrilat (HEMA) Acrosstan, Tetraetilmetilendiamin

(TEMED) ve Amonyum persülfat (APS) Sigmadan tedarik edilmiştir. SDS-PAGE analizi sonrası boyama işleminin yapılmasında kullanılan Comassie Blue Appli Chem'den alınmıştır. Deneyler sırasında kullanılan Asetik asit, Sodyum hidroksit Haen firmasından, Metanol, Etanol, potasyum fosfat monobazik (KH_2PO_4), Potasyum fosfat dibazik (K_2HPO_4) Sigma'dan, Sodyum klörür Kimetsandan, alınmıştır. FT-IR analizi zamanı pelet yapımında kullanılan KBr, Merck firmasından tedarik edilmiştir. Enzim aktivitesinde substrat olarak TRIS (2-aminoetil)amin, $\text{C}_6\text{H}_{18}\text{N}_4$, LOX enziminin biyoteknolojik uygulaması çalışmalarında kullanılan elastin ve bakır (II) sülfat pentahidrat Sigma Aldrich firmasından alınmıştır. Kullanılan tüm kimyasallar tedarikçi firmaların önerdiği koşullarda labratuvar ortamında muhafaza edilmiştir. Deneyler sırasında kullanılan saf su Thermo Scientific firması tarafından üretilen saf su cihazı kullanılarak elde edilmiştir.

2.2. Metod

2.2.1. Sığır Aortundan LOX Enzimi İçeren Ekstrakt Hazırlanması

LOX enzimi içeren ekstraktın hazırlanması için, ilk olarak aort damarları temizlenmiştir. Daha sonra parçalayıcı kullanılarak çok küçük parçalara ayrılmıştır. Bir yandan da pH 7.7 tuz içeren fosfat tamponu hazırlanmıştır. Parçalanmış aort üzerine, gram başına 2.5 mL tampon çözeltisi eklenmiş ve 24 saat boyunca $+4^\circ\text{C}$ 'de bekletilmiştir.

LOX enziminin örnekten ekstaktının hazırlanması için üre gradiyenti yöntemi kullanılmıştır [63]. Bu yöntemle göre, 4M ve 2M üre içeren ayrı ayrı çözeltiler tampon çözeltiler kullanılarak hazırlanmıştır. 4M üre içeren tamponda aort örnekleri bekletildikten sonra süzölmüş ve tekrar üre çözeltisiyle etkileştirilmiştir. 7000G'de 20 dk boyunca santrifüj işlemi gerçekleştirildikten sonra, 2M üre içeren tampona aktarılmıştır. 2M üre içeren tampon çözeltide bekleyen örnekler daha sonra 20 dk boyunca 7000 G de bir daha santrifüj edilmiş ve elde edilen supernatan ile yapılacak olan saflaştırma işlemi için $+4^\circ\text{C}$ 'de saklanmıştır. Şekil 2.1'de elde edilen LOX enzimi içeren ekstrakt görölmektedir.



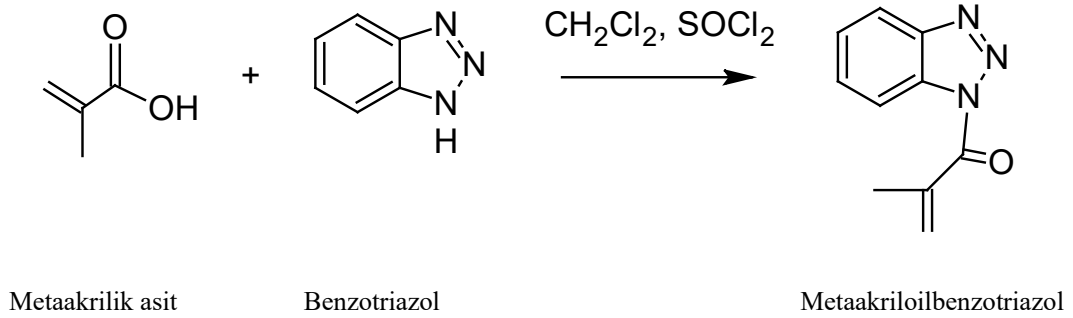
Şekil 2.1. *Elde edilen LOX ekstraktı*

2.2.2. Kriyojel temelli ayırma kolonlarının hazırlanması

LOX enziminin yukarıda bahsedilen prosedürler sonrası hazırlanan ekstrakttan tek basamakta saflaştırılması için, ilk aşamada enzimin etkileşeceği MaBt temelli monomerler sentezlenmiştir. Bu amaçla, MaBt fonksiyonel monomerinin sentezlenmesinden sonra, MaBt-Cu ön organizasyonu yapılmış ve kriyojel kolona tutturularak ayırım kolonu sentezlenmiştir

2.2.2.1. Metakriloilbenzotriazol (MaBt) fonksiyonel monomerinin ve MaBt-Cu kompleks monomerinin sentezi ve karakterizasyonu

Fonksiyonel monomer MaBt sentezi için ilk olarak 27.67 g benzotriazol (0.23 mmol, 4 eq) diklorometan (DCM) içerisinde çözülmüştür. Daha sonra üzerine 4.22 mL Tionil klorid (SOCl_2) (0.058 mmol, 1 eq) eklenmiştir Bu karışım 30 dk boyunca oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Daha sonra karışımın üzerine 4.93 mL (0.058 mmol, 1 eq) metakrilik asit ilave edilmiştir. Bu ilavenin arkasından azot atmosferi altında ve oda sıcaklığında tekrar 3 saat boyunca karıştırmaya devam edilmiştir. Reaksiyon sonucu oluşan çökelek süzülerek atılmıştır. Bu süzüntüde kalan ürün ise (MaBt) %20 Na_2CO_3 ile ekstrakte edilmiştir. Daha sonra organik faz DCM evaporatörde uçurulmuştur. Elde edilen monomer yüksek saflıkta olması için MaBt, EtOAc:Hekzan karışımı kullanarak kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Elde edilen ürün verimi %86 olarak hesaplanmıştır. MaBt sentezi şematik gösterimi Şekil 2.2’de verilmiştir.

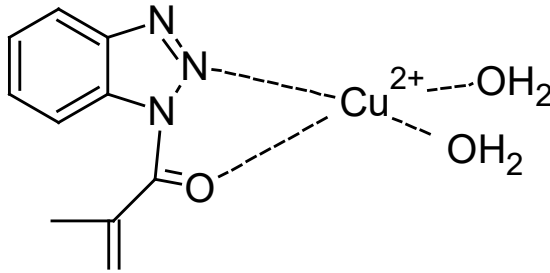


Şekil 2.2. MaBt sentezi şematik gösterimi

Sentezlenen MaBt monomerinin sentezi, Metakrilik asit ve benzotriazol reaksiyon ortamına diklorometan ve Tiyonil klorid ilave edilerek gerçekleştirilmiştir.

MaBt monomeri sentezinden sonra, ayırımı gerçekleştirecek olan fonksiyonel monomer olan MaBt-Cu kompleks monomeri sentezlenmiştir.

MaBt-Cu kompleksini sentezlemek amacıyla, ilk olarak 0.5039 g MaBt (2.7 mmol) 20 mL etanol içerisinde çözülmüştür. Daha sonra 0,6523 g $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (2.7 mmol) ile oda sıcaklığında 3 saat boyunca etkileştirilmiştir. Öncelikle etanol ortamdan uzaklaştırılarak katı MaBt-Cu(II) kompleksi (Şekil 2.3) elde edilmiştir. Bu kompleks önce etanol ve daha sonra deiyonize su ile yıkanmıştır. Bu işlemden sonra ise 50 °C’de 48 saat boyunca vakum etüvünde kurutulmuştur.



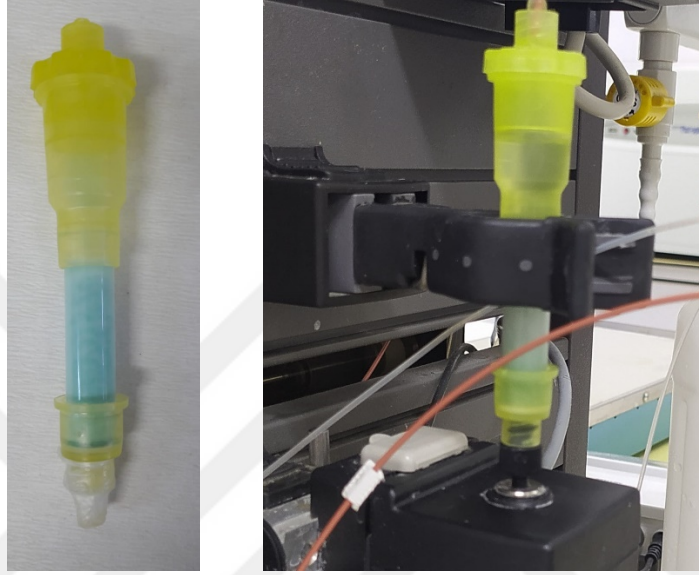
Şekil 2.3. MaBt-Cu(II) kompleksi

LOX enziminin aktif merkezinde korunmuş bölgede bulunan histidin kalıntıları bakır iyonlarını bağlama görevi yapmaktadır. Tasarlanan afinite temelli yöntemde ligand olarak MaBt-Cu kullanılmasının nedeni LOX’da bulunan histidin uçlarının MaBt-Cu monomerindeki Cu ile etkileşip ayırım gerçekleştirilmesini sağlamaktadır. Şekil 2.4’te bu

The diagram illustrates a proposed chemical mechanism for the formation of crosslinks from L-Tyrosine (L.TQ) and histidine. The cycle begins with L.TQ reacting with an RCH_2NH_2 group (from histidine) to form a Schiff base intermediate. This intermediate then reacts with H_2O to form a quinonoid structure. The quinonoid structure is then attacked by NH_3 to form a dihydroxyquinone intermediate. This intermediate is further modified by O_2 and $Cu(II)?$ to form a hydroperoxide intermediate. Finally, the hydroperoxide intermediate reacts with H_2O to form a crosslink, releasing $RCHO$ and H_2O_2 .

2.2.2.2. *MaBt-Cu(II) içeren kriyojel kolon hazırlanması*

Diğer yandan, sentezlenen MaBt-Cu-HEMA kriyojelinin yanında HEMA tabanlı boş kriyojel de hazırlanarak ayırım ve karakterizasyon işlemlerinde karşılaştırmalar yapılmıştır. HEMA kriyojeli hazırlanmasında, yukarıda anlatılan MaBt-Cu-HEMA kriyojeli sentez prosedürü uygulamış, ancak MaBt-Cu(II) kompleksi eklenmemiştir. HEMA kriyojeli, kullanılıncaya kadar +4 °C’de %0.02 NaN₃ içerisinde saklanmıştır.



Şekil 2.5. MaBt-Cu-HEMA kriyojel kolonu

2.2.3. Sentezlenen Kriyojellerin Karakterizasyon çalışmaları

MaBt-Cu-HEMA ve HEMA kriyojel kolonunun karakterizasyon çalışmalarında ilk önce kolonun su tutma kapasitesi belirlenmiştir. Belirleme amaçlı, kolon şişme testine tabi tutulmuştur. Daha sonra sırasıyla FT-IR analizi yapılmış ve yüzey morfolojisini belirlemek için SEM analizi yapılmıştır.

2.2.3.1. Şişme testi

Sentezlenen MaBt-Cu-HEMA ve HEMA kriyojel kolonunun su tutma kapasitesi aşağıdaki metod izlenerek belirlenmiştir.

İlk önce kriyojel kolonlar 24 saat boyunca oda sıcaklığında bekletilerek, oda koşullarında gözeneklerindeki suyun uzaklaşması sağlanmıştır. Daha sonra kuru polimer hassas terazide tartılmıştır (W_k). Ardından, kriyojeller 24 saat boyunca oda sıcaklığında saf su içinde bekletilmiş ve yeniden tartılmıştır (W_ş). Aşağıdaki formüle göre şişme kapasitesi hesaplanmıştır.

$$\text{Şişme derecesi: } SD = \frac{W_s - W_k}{W_k} \times 100 \quad \text{Eşitlik (2.1)}$$

Eşitlik 2.1’de, W_s şişmiş polimerin ağırlığını, W_k ise kuru polimer ağırlığını ifade etmektedir.

2.2.3.2. FT-IR analizi

Sentezlenen kriyojellerden kesit alınarak kurutulmuş ve FT-IR cihazının ATR kısmına yerleştirilerek FT-IR spektrumları elde edilmiştir.

2.2.3.3. Yüzey morfolojisi

Kolondan alınan 10 mm’lik kesit etüvde belli bir süre bekletilerek kurutulmuştur. Daha sonra SEM örneği hazırlama prosedürüne göre, 1 dakika boyunca 50 mA ~~44~~ akım uygulanarak altınla kaplanmıştır. Altınla kaplanmış örnekler SEM cihazına yerleştirilerek yüzey morfolojileri belirlenmiştir.

2.2.4. LOX Enzimi Saflaştırılması

Sığır aortundan ekstrakte edilen LOX enzimi, MABt-Cu-HEMA kriyojel kolonunun FPLC’de ayırım kolonu olarak kullanılmasıyla saflaştırılmıştır.

Bu amaçla, FPLC’ye takılan MaBt-Cu-HEMA kriyojel kolon 2M üre içeren pH 7.8 tampon çözeltiyle (A çözeltisi) dengelenmiştir. Dengelenen kolona ekstrakte edilen LOX enzimi içeren 100 µL örnek enjekte edilerek 0.7 mL akış hızında kromatografik ayırım gerçekleştirilmiştir. Bu sırada, kolonda LOX enzimi kriyojel kolonda tutunurken, ekstrakt çözeltisi içerisinde LOX enzimi dışındaki diğer türler analizin ilk dakikalarında kolondan ayrılmıştır. Kolonda tutunan LOX enzimini fraksiyon tüplerinde toplamak amacıyla 0.4 M NaCl (B çözeltisi) kolondan geçirilmiştir. Tüm bu analizler FPLC’de 280 nm’de izlenmiştir. Kromatografik analizde kullanılan FPLC cihazı Şekil 2.6’da gösterilmiştir. Fraksiyon tüplerinde toplanan saflaştırılmış LOX enzimi saflık testi, molekül ağırlığı tayini ve enzim aktivitesinin belirlenmesi amacıyla +4°C’de saklanmıştır.



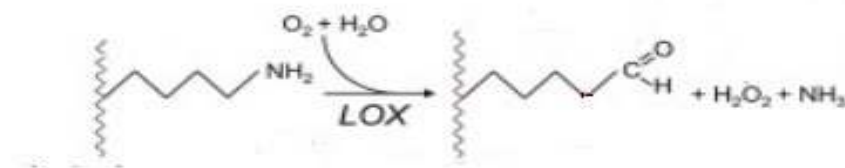
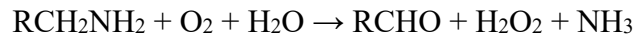
Şekil 2.6. FPLC cihazı

2.2.5. Enzimin protein içeriği ve aktivite tayini

Sığır aortundan izole edilen ekstraktın, saflaştırılan LOX enziminin protein içeriği Bradford yöntemi [65] kullanılarak belirlenmiştir. Bu amaçla, farklı derişimlerde BSA çözeltileri hazırlanarak her bir çözeltiliye Bradford reaktifi eklenmiş ve 595 nm’de UV absorbanslarına göre kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Hazırlanan kalibrasyon grafiğinden ($y=mx+k$) yola çıkarak absorbansı (y) bilinen ekstrakt ve LOX enzimi örneklerinin protein miktarları (x) belirlenmiştir.

LOX aktivitesi ise lizin kalıntısının enzimatik yıkımı sonucu açığa çıkan H_2O_2 ’nin kantitatif olarak tayin edilmesi ile gerçekleştirilmiştir. H_2O_2 , HRP enzimi varlığında mavi-yeşil renkli bileşiğe yükseltgenmektedir.

LOX enzimi, substratındaki birincil amini aşağıdaki reaksiyona göre bir aldehite dönüştürmektedir (Şekil 2.7)



Şekil 2.7. LOX tarafından katalize edilen reaksiyonun gösterimi

LOX tarafından katalize edilen reaksiyonun incelenmesi, H₂O₂ stokiyometrik olarak üretildiğini ve bu nedenle diğer birçok peroksit üreten enzim gibi LOX aktivitesini belirlemek için kullanılabileceğini göstermektedir. Tüm ölçümler spektrofotometrik olarak 420 nm dalgaboyunda yapılmıştır.

LOX, 2-aminoetil amin, içeren reaksiyon karışımı 30 dakika boyunca 37 °C de inkübe edilmiştir. Daha sonra reaksiyon karışımına HRP eklenmiş ve çalkalamalı karıştırıcıda 10 dakika bekletilmiştir. Ardından TMB eklenmiştir ve reaksiyon sonucu mavi-yeşil renkli ürünün oluşumu gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon %97'lik H₂SO₄ çözeltisi ile durdurulmuş ve 420 nm de UV absorbansı ölçülmüştür. Son olarak Eşitlik (2.2) yardımı ile LOX aktivitesi hesaplanmıştır. Bir enzim ünitesi, 37 °C sıcaklıkta, 1 dakikada, 1 µmol H₂O₂ üreten enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır.

$$\text{Enzim Ünitesi (U/mL)} = \frac{Vt \times \frac{dA}{dT} \times dF \times 1000}{E\lambda \times V_s \times d} \quad \text{Eşitlik (2.2)}$$

Burada:

Vt: Reaksiyonun toplam hacmi

dA/dT: Birim zamanda absorpsiyon değişimi

dF: Seyreltme faktörü

Eλ: Absorpsiyon katsayısı

Vs: Reaksiyondaki enzim hacmi

2.2.5.1. Enzim aktivitesini etkileyen faktörler ve kinetik incelemeler

Saflaştırılan enzimin aktivitesi, farklı pH (a) ve farklı substrat derişimlerinde (b) 2.2.5. de açıklanan yöntemle ölçülmüştür.

- a) pH'ın enzimatik reaksiyonun hızına olan etkisini incelemek için farklı pH'larda hazırlanan tampon çözeltiilerde LOX enzim aktivitesi tayin edilmiştir

- b) Sabit pH ve enzim derişiminde farklı substrat derişimlerine (1-5 mM) karşı enzim aktivitesi ölçülmüş ve substrat derişimine karşı reaksiyon hızı grafiğı elde edilmiştir.

Ardından substrat derişimine karşı reaksiyon hızı grafiğı kullanılarak, saflaştırılan LOX enziminin maksimum hızı (V_{max}) ve maksimum hızın yarsına denk gelen substrat derişimi (K_m) değerleri belirlenmiştir. K_m , Michaelis- Menten sabitidir ve enzimin substrata olan ilgisinin ölçüsünü belirtir.

2.2.6. Saflaştırılan LOX Enziminin Karakterizasyonu

CD Analizi

Saflaştırılan LOX enziminin protein yapısındaki değışim CD spektroskopisiyle belirlenmiştir. Bu amaçla, 100 mg mL⁻¹ derişiminde 75 µL LOX enzimi örneğinin 0.5 mm'lik CD küvetlerine uygulanarak, 180-350 nm dalgaboyu aralığında CD spektrumu alınmıştır.

2.2.7. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) analizi

FPLC ile saflaştırılan LOX enziminin saflığını ve moleküler ağırlığını belirlemek için SDS-PAGE analizi yapılmıştır. Bu amaçla, 29:1 oranında akrilamid-bis monomerleri ile, APS , TEMED, pH 8.8 TRIS kullanılarak %10'luk ayırma ve %5'lik yükleme jeli hazırlanmıştır. Eşit miktarda örnek ve örnek yükleme boyası karıştırılıp kaynayan su içerisinde 5 dk boyunca denatüre edilmiştir. Karışımdan 20 µL alınarak kuyucuklara yüklenmiştir. Yükleme jelinde cihaza 16 A uygulanmış, daha sonra ayırma jelindeyken 32 A'e yükseltilmiştir. Yürütme bittikten sonra jel 2 saat boyunca fiksatif çözeltisinde daha sonra 24 saat boyunca boyama çözeltisinde bekletilmiştir. 24 saatin sonunda boya uzaklaştırılmış ve yıkama çözeltisi eklenmiştir. Yıkama işlemi jel tamamen renksizleşene kadar devam etmiştir. Son olarak belirginleşen bantların görüntüleri alınmıştır.

2.2.8. LOX Enziminin Biyoteknolojik Uygulaması

LOX enziminin peptidil lizini aminoadipik semialdehitlere oksitleyerek elastin öncülerinin kovalent çapraz bağlanmasını başlatan bakır bağımlı bir enzim olmasından yola çıkarak, saflaştırılan ve etkinliğı ifade edilen LOX enziminin laboratuvar koşullarında, elastinin çapraz bağlanmasındaki rolü incelenmiştir. Bu amaçla farklı

derişimlerdeki elastin çözeltileri (1.0, 5.0, 10 mg mL⁻¹) pH 8.8, 0.2M TRIS tamponunda hazırlanmıştır. Ayrıca enzimin hem bakır hem de o-kinon ile uyumlu bir karbonil kofaktörü içermesinden yola çıkarak, yine farklı derişimlerde CuSO₄.5H₂O (0.01-0.5 M) çözeltileri hazırlanmış ve elastin çözeltileriyle 5 mg mL⁻¹ derişimde pH 8.0 tamponunda hazırlanan LOX enzimi varlığında 37°C’de farklı sürelerde etkileştirilmiştir. LOX enzimi, elastin öncüsü, tropoelastin gibi çözünür ECM öncü moleküllerini çapraz bağlayan endojen enzimler grubundadır. Yapılan denemeler sonrasında, LOX enziminin elastin çapraz bağlanmasındaki optimum koşulları belirlenmiştir. Böylece, saflaştırılan LOX enziminin laboratuvar koşullarında, elastin çapraz bağlanmasındaki etkinliği de incelenmiştir.



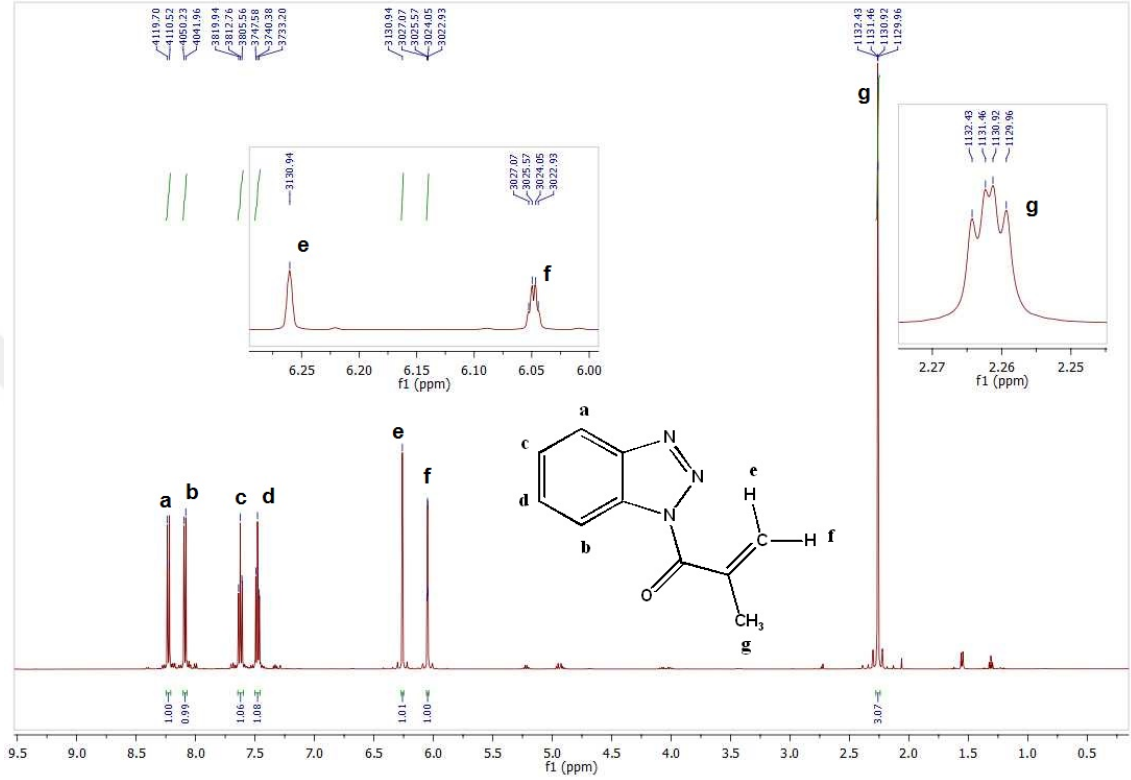
3. BULGULAR

3.1. Metakriloilbenzotriazol (MaBt) fonksiyonel monomerinin ve MaBt-Cu kompleks monomerinin karakterizasyonu

Sentezlenen MaBt monomeri ve MaBt-Cu (II) komplekslerinin karakterizasyonu NMR, UV-Vis ve FTIR spektrumlarıyla belirlenmiştir.

^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları için, fonksiyonel monomerler CDCl_3 içerisinde çözülmüştür. Kimyasal kaymalar (δ) ppm olarak CDCl_3 referans alınarak kaydedilmiştir. Şekil 3.1’de MaBt’ye ait ^1H NMR spektrumu molekül üzerindeki her bir proton sinyallerle eşleştirilerek gösterilmiştir. Spektrumdan da görüleceği gibi 8.23 ppm (a) ve 8.09 ppm’de (b) görülen dublet sinyaller, 7.62 ppm (c) ve 7.48 ppm’de (d) görülen triplet sinyaller N-açıl benzotriazollerden beklenen karakteristik sinyallerdir. Bunlar benzotriazol halkasının benzen halkasındaki protonların verdiği sinyallerdir. Spektrumda 6.26 ppm’de (e) kaydedilen yayvan sinyal metakriloil grubunun çift bağlı karbonuna bağlı metilen ($\text{C}=\text{CH}_2$) protonlarından birisidir. Yayvan bir sinyal olarak görülmesinin sebebi bu protonun komşu karbona bağlı metil ($-\text{CH}_3$, g) protonlarına üç boyutlu düzlemde uzak olduğundan yarılmaları net olarak kaydedilememiş olmasındandır. Öte yandan çift bağlı metilen ($\text{C}=\text{CH}_2$) protonlarından diğeri ise 6.05 ppm’de (f) net bir kuartet sinyal vermektedir. Bu protonun, üç boyutlu düzlemde komşu karbona bağlı metil ($-\text{CH}_3$, g) protonlarıyla dört bağ öteden etkileştiğini ve yakın olduğunu bu kuartet sinyal göstermektedir. Bu iki metilen (e, f) protonu aynı karbona (geminal) bağlı olmasına rağmen farklı sinyaller vermiştir. Bu da göstermektedir ki çift bağ dolayısıyla geometrinin sabitlendiği ve bu bağ etrafında dönmenin izinli olmaması nedeniyle her iki proton metakriloil grubunun metil ($-\text{CH}_3$) fonksiyonuyla farklı etkileşmiştir. Son sinyal ise 2.26 ppm’de (g) kaydedilen dubletin dubleti sinyaldir. Bu metakriloil fonksiyonunun metil ($-\text{CH}_3$) grubudur. Komşu karbona bağlı alken metilen protonlarının ($\text{C}=\text{CH}_2$) protonlarıyla dönme izninin yasaklı olması nedeniyle ayrı ayrı etkileştiğini dubletin-dubleti sinyali göstermektedir. Bu protonun sinyalindeki 0.97 Hz yarıma uzak olduğu (e) protonundan kaynaklanmaktadır. Son olarak bu protonun sinyalindeki 1.5 Hz yarıma ise üç boyutlu düzlemde yakın olduğu protondan (f) kaynaklanmaktadır.

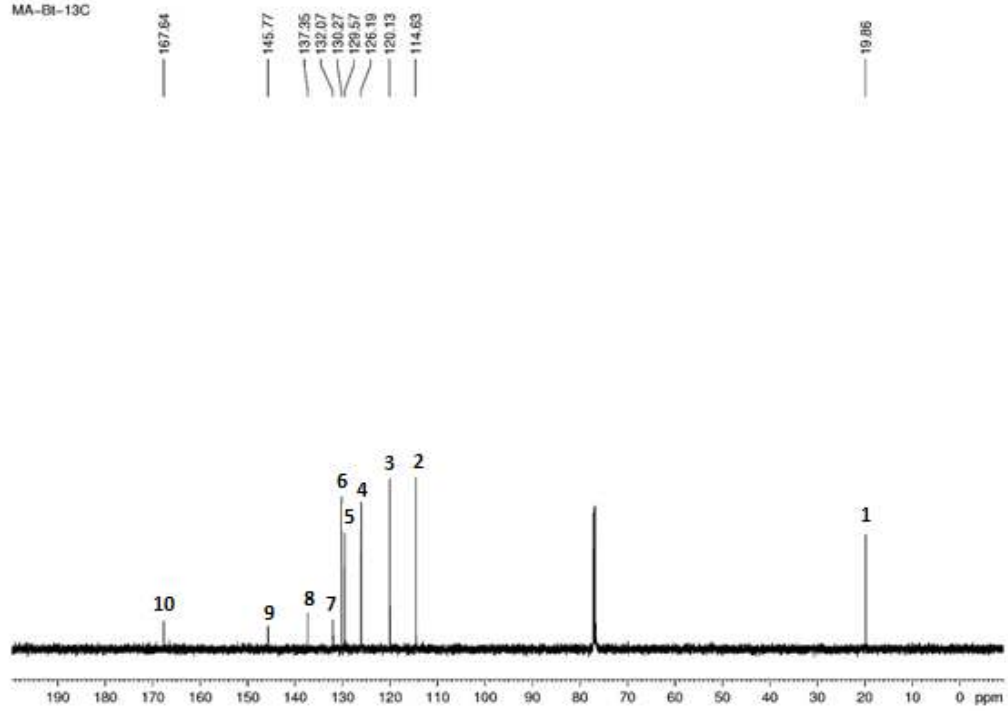
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , TMS) δ : 8.23 (d, J = 9.18 Hz, 1H, Ar-**H**), 8.09 (d, J = 8.27 Hz, 1H, Ar-**H**), 7.62 (t, J = 7.20 Hz, 1H, Ar-**H**), 7.48 (t, J = 7.2 Hz, 1H, Ar-**H**), 6.26 (yayvan sinyal, 1H, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 6.05 (q, J = 1.5 Hz, 1H, $-\text{C}=\text{CH}_2$), 2.26 (dd, J = 0.97 Hz, 1.5 Hz, 3H, $-\text{CH}_3$) ppm.



Şekil 3.1. MaBt'ye ait ^1H NMR spektrumu

MABt'ye ait ^{13}C NMR spektrumu Şekil 3.2'de verilmiştir. Spektrumda amit karbonil ($\text{C}=\text{O}$) grubuna ait 167.6 ppm'de sinyal görülmektedir. Benzotriazolün benzen halkasına ait sinyaller 145.7, 132, 130.2, 129.5, 126.1 ve 114.6 ppm'de görülen sinyallerdir. Öte yandan 137.2 ppm'de görülen sinyal metakrilol grubunun proton taşımayan alken karbonuna aittir. 120 ppm'de görülen sinyal ise metakrilol grubunun alken (CH_2) karbonuna aittir. Metakrilol grubundaki metil (CH_3) karbonuna ait sinyal ise 19.8 ppm'de görülen alifatik sinyaldir.

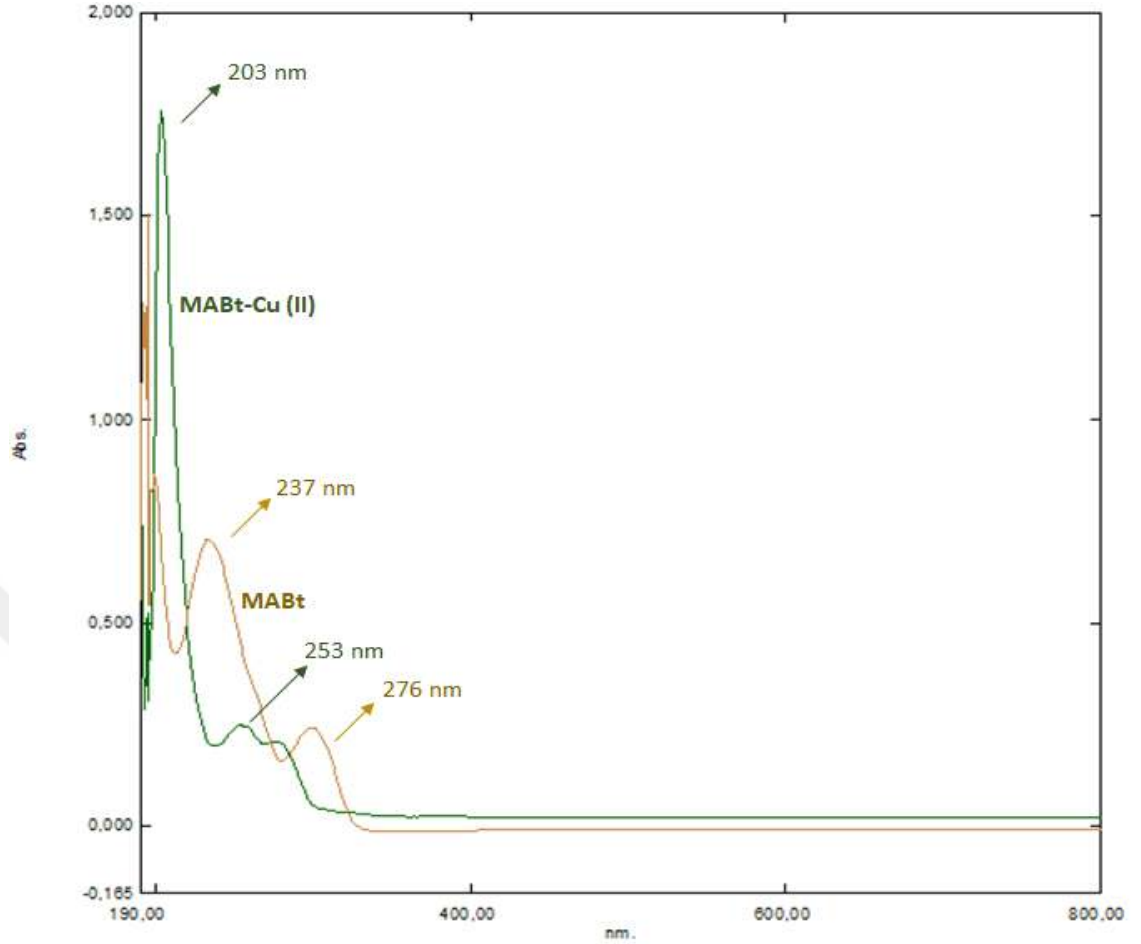
^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , TMS): 19.8 (1), 114.6 (2), 120.0 (3), 126.1 (4), 129.5 (5), 130.2 (6), 132.0 (7), 137.2 (8), 145.7 (9), 167.6 ppm (10).



Şekil 3.2. MaBt'ye ait ^{13}C NMR spektrumu

Sentezlenen fonksiyonel monomer MaBt ve MaBt-Cu (II) UV spektrumlarını elde edebilmek için 50 ppm MaBt ve MaBt-Cu (II) etanol içerisinde hazırlanmıştır. Spektrofotometrik ölçümler ise 200-800 nm dalga boyu aralığında gerçekleştirilmiştir.

Şekil 3.3'de MaBt ve MaBt-Cu (II) kompleksine ait UV-Vis spektrumları verilmiştir. Elde edilen spektrumlardaki farklılıklar MABt yapısı ile Cu (II)'nin etkileşimine işaret etmektedir.



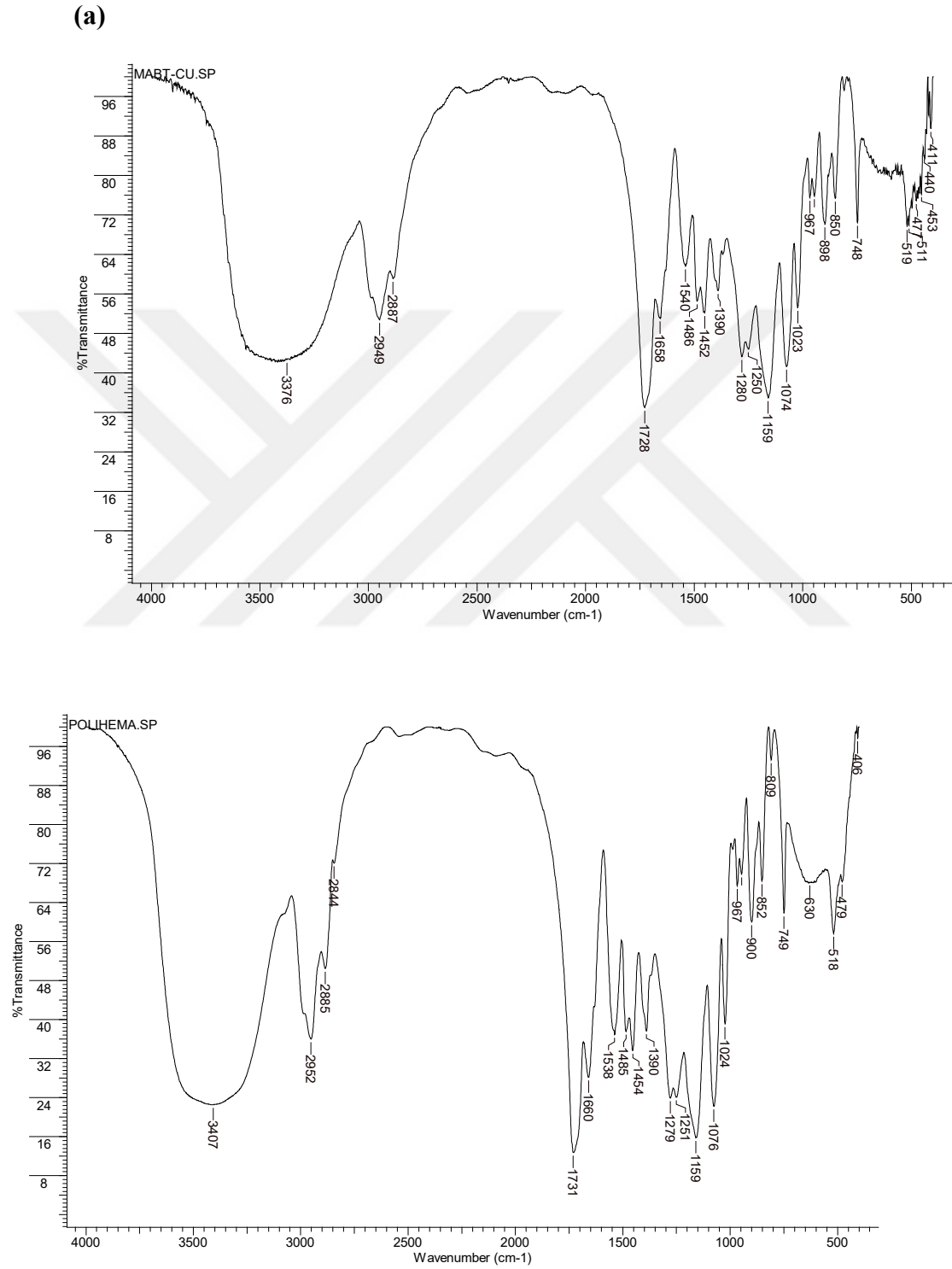
Şekil 3.3. MaBt ve MaBt-Cu (II) kompleksine ait UV-Vis spektrumları

3.2. MaBt-Cu-HEMA ve HEMA Kriyojellerinin Karakterizasyonu

Sentezlenen kriyojellerin FT-IR spektrumları Şekil 3.4'te verilmiştir. Buna göre, MaBt-Cu-HEMA kriyojeli için (Şekil 3.4.a.) 3376 cm^{-1} (-OH), 1540 cm^{-1} ve 1658 cm^{-1} (C=C), 1728 cm^{-1} (C=O), 1250 cm^{-1} ve 1280 cm^{-1} (C-N) frekanslarında MaBt-Cu kompleksine ait fonksiyonel gruplara ait pikler görülmektedir. HEMA kriyojeline ait pikler (Şekil 3.4.b.) ise 3407 cm^{-1} (-OH), 2952 cm^{-1} (C-H), 2885 cm^{-1} (=C-H), 1660 cm^{-1} ve 1538 cm^{-1} (C=C), 1731 cm^{-1} (C=O), 1159 cm^{-1} (C-O-C), frekanslarında görüntülenmiştir.

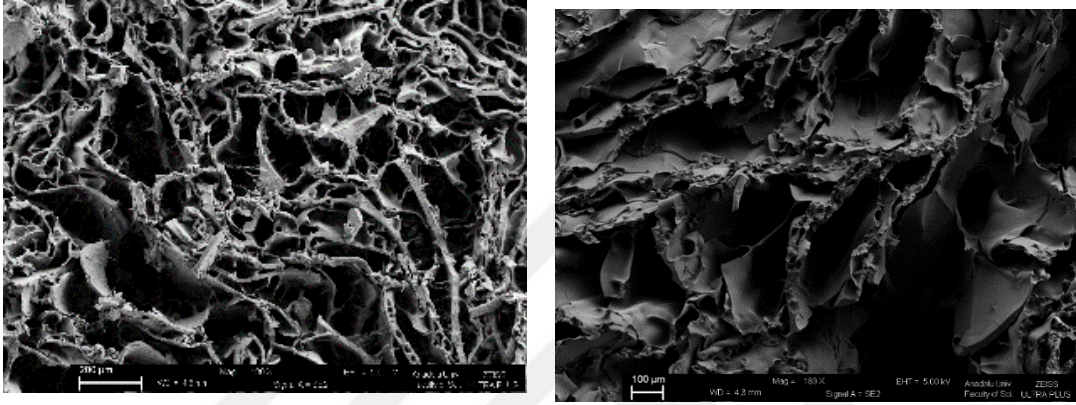
Pikler değerlendirildiğinde, kriyojeller arasındaki en büyük farklılık 1250 cm^{-1} ve 1280 cm^{-1} (C-N) piklerinin MaBt-Cu içermeyen saf HEMA'da bulunmamasıdır. 453 cm^{-1} ve 477 cm^{-1} (Cu-N) ait bakır bağlama pikleri görülmektedir. MaBt-Cu-HEMA

kriyojelinde bu piklerin olması sentezin başarıyla gerçekleştiğini ve MaBt-Cu kompleksinin kriyojel içinde bulunduğunu kanıtlamaktadır.



Şekil 3.4. (a) MaBt-Cu-HEMA (b)HEMA kriyojeli FT-IR spektrumu

MaBt-Cu-HEMA ve HEMA kriyojel kolonunun yüzey morfolojisi SEM analizi ile belirlenmiştir. Şekil 3.5 a’da HEMA’nın, Şekil 3.5 b’de ise MaBt-Cu-HEMA kriyojelinin SEM görüntüsü görülmektedir. Buna göre, sentezlenen kriyojellerin birbirine bağlantılı oldukça geniş gözeneklere sahip olduğu görülmektedir. Kriyojellerin önemli karakteristik özelliklerinden olan bu birbirine bağlı geniş gözenek yapısı MaBt-Cu-HEMA yapısında da kendini gösterdiğinden, kriyojel sentezinin başarıyla gerçekleştirildiği anlaşılmaktadır.



Şekil 3.5. (a) HEMA (b) MaBt-Cu-HEMA kriyojeli SEM görüntüsü

MaBt-Cu-HEMA kriyojeli hidrofilik özellikte bir polimerdir. Polimerik yapıda olması nedeniyle yüksek molekül ağırlığına, hidrofilik özelliğinden dolayı yapısına su alarak şişme özelliği göstermektedir. Şekil 3.6.a’ da MaBt-Cu-HEMA kriyojelinin şişmiş hali, Şekil 3.6.b’de ise MaBt-Cu-HEMA kriyojelinin kuru hali görülmektedir.



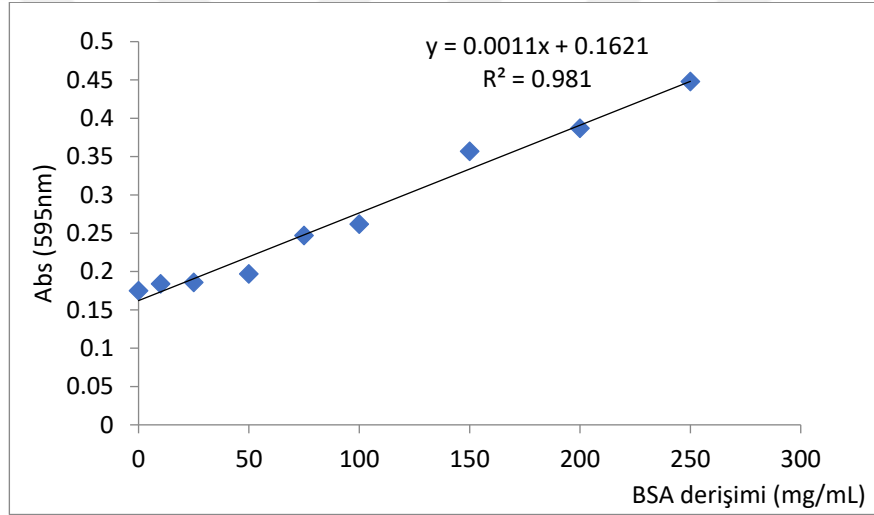
Şekil 3.6. MaBt-Cu-HEMA kriyojeli (a) şişmiş hali (b) kuru hali fotoğrafları

Eşitlik 2.1'e göre yapılan hesaplamalar sonucunda MaBt-Cu-HEMA kriyojel kolonun su tutma kapasitesi %680 olarak ve HEMA kriyojelin su tutma kapasitesi ise %672 olarak bulunmuştur. Bu iki veri karşılaştırıldığında, HEMA kriyojeline MaBt-Cu(II)'nin eklenmesiyle elde edilen MaBt-Cu-HEMA kriyojelin hidrofilikliğin kompleksin de hidrofilik özelliği olmasından dolayı arttığı görülmektedir.

3.3. LOX Enzimi örneklerinin protein içeriği ve aktivite tayini

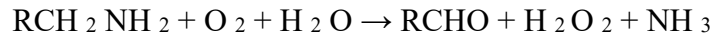
3.3.1. Protein içeriği tayini

Sığır aortundan saflaştırılan LOX enzimi örneklerinin protein miktarları Bradford yöntemi ile belirlenmiştir. Farklı derişimlerdeki BSA çözeltilerinin Bradford reaktifiyle etkileştirilerek 595 nm'de absorbaans ölçümlerine göre oluşturulan standart grafiği Şekil 3.7'de verilmiştir.



Şekil 3.7. Bradford yöntemine göre kalibrasyon grafiği

Buna göre toplam protein içeriği, LOX enzim aktivitesi literatürdeki Palamakumbura ve Trackman'ın çalışması [64] temel alınarak ve metotta biraz farklılıklar yapılarak daha kolay uygulanabilir bir şekilde gerçekleştirilmiştir.



Buna göre, TRİS(2-aminoetil)aminin substrat olarak kullanılmasıyla saflaştırılan LOX enzimi varlığında (1mg mL⁻¹) 37°C'de, pH 7 tamponunda 30 dakika inkübasyon gerçekleştirilmiş ve reaksiyon sonrası açığa çıkan H₂O₂ miktarı spektrometrik olarak tayin edilerek zaman içinde azalan substrat derişimine göre enzim aktivitesi tayin edilmiştir. Enzimatik reaksiyon sonrası açığa çıkan H₂O₂ miktarı HRP ile tayin edilmiştir.

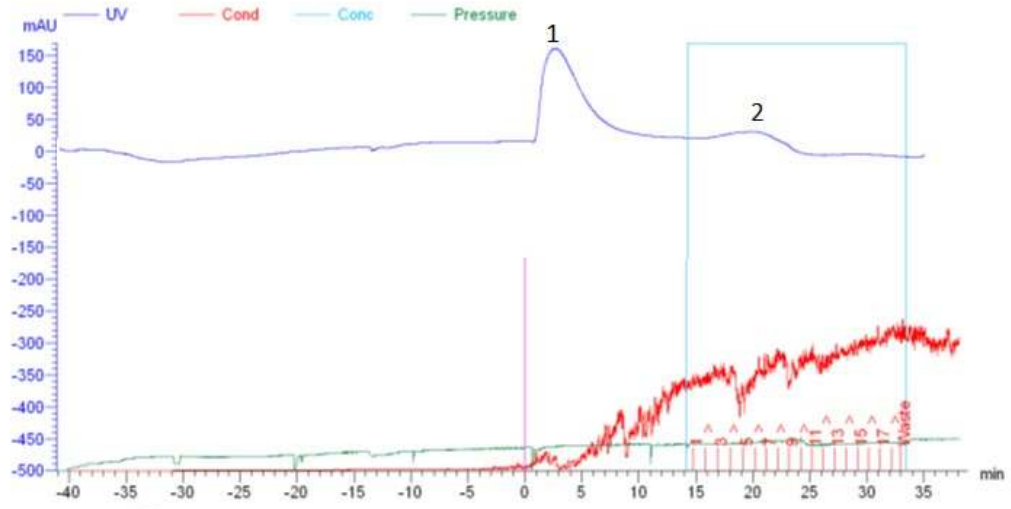
Bu amaçla reaksiyon ürünleri ortamına HRP eklenerek çalkalamalı inkübatörde 10 dakika bekletilmiş ve ardından TMB eklenmiştir. Bekleme süresinden sonra, reaksiyon %97'lik H_2SO_4 çözeltisi ile durdurulmuş ve 420 nm dalga boyunda mikroparka okuyucuda Abs değerlerinin elde edilmesiyle, enzim aktivitesi belirlenmiştir. Elde edilen verilere göre LOX enziminin saflaştırmasına ilişkin değerler Tablo 3.1'de verilmiştir. Buna göre, LOX enziminin %75.6 verimle saflaştırıldığı bulunmuştur.

Tablo 3.1. LOX enzimine ait saflaştırma tablosu

Numune	Toplam Protein Derişimi ($mg\ mL^{-1}$)	Toplam Aktivite ($\mu moldk^{-1}mL^{-1}$)	Spesifik Aktivite ($\mu moldk^{-1}mg^{-1}$)	Saflaştırma katsayısı	Verim (%)
Ham ekstrakt	3.42	28,49	8,32	1	100
MaBt-Cu-HEMA saflaştırılması	0.9	21.53	23.92	2.8	75.6

3.3.2. FPLC analizi

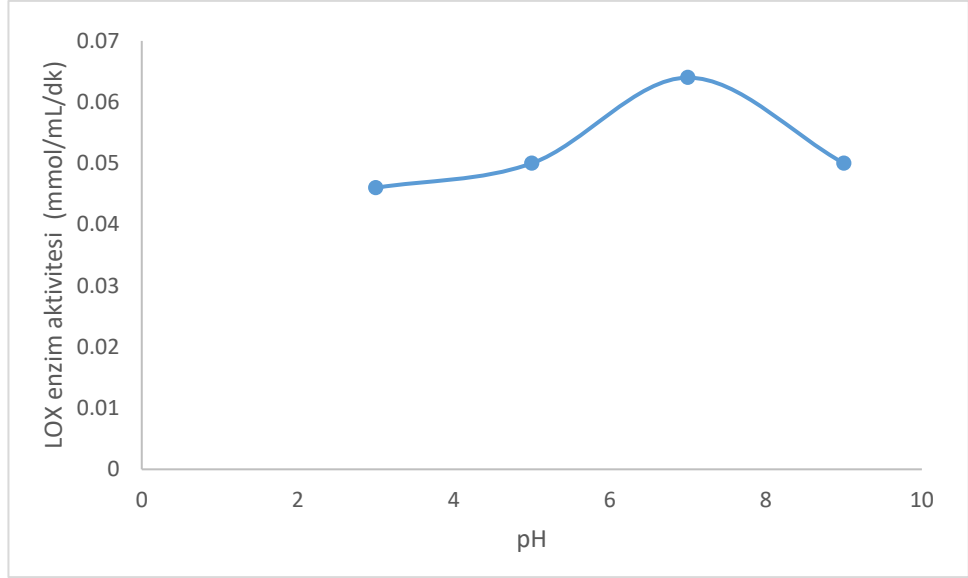
Sığır aortundan elde edilen ekstrakt içinde bulunan LOX enzimi, afinite kromatografisi ile FPLC cihazı kullanılarak saflaştırılmıştır. Ekstrakt, uygun filtrasyon işlemlerinden sonra 100 μL hacimde FPLC kolonuna enjekte edilmiştir. FPLC kriyojel kolondaki saflaştırma, LOX enziminin aktif bölgesindeki histidin aminoasitlerinden Ma-Bt-Cu kompleks monomerindeki bakır bölgesinden bağlanarak kriyojel kolonda tutunması ve ardından histidin-Cu etkileşiminin tuz çözeltisiyle kırılarak kolondan LOX enziminin alınması ve fraksiyon tüplerinde toplanması işlemlerine dayanmaktadır. Şekil 3.8'deki kromatogramda alıkonma süresi 5 dakika olan ilk pik, ekstrakt içindeki LOX enzimi dışındaki kriyojel kolona tutunamadan kolonu terk eden türleri ifade etmektedir. 15.dakikadan itibaren hareketli fazın değiştirilmesiyle, kolondan NaCl çözeltisi geçirilmesiyle, kolona tutunmuş LOX enzimi ayrılmıştır ve alıkonma süresi 20. dakika olan ikinci pik LOX enzimini ifade etmektedir. Bu pik boyunca fraksiyonlar, fraksiyon toplama ünitesinde toplanmış ve kolondan alınan LOX enzimi ileri karakterizasyon testleri için $+4^{\circ}C$ 'de saklanmıştır.



Şekil 3.8. FPLC ile LOX enzimi saflaştırılmasına ilişkin kromatogram.

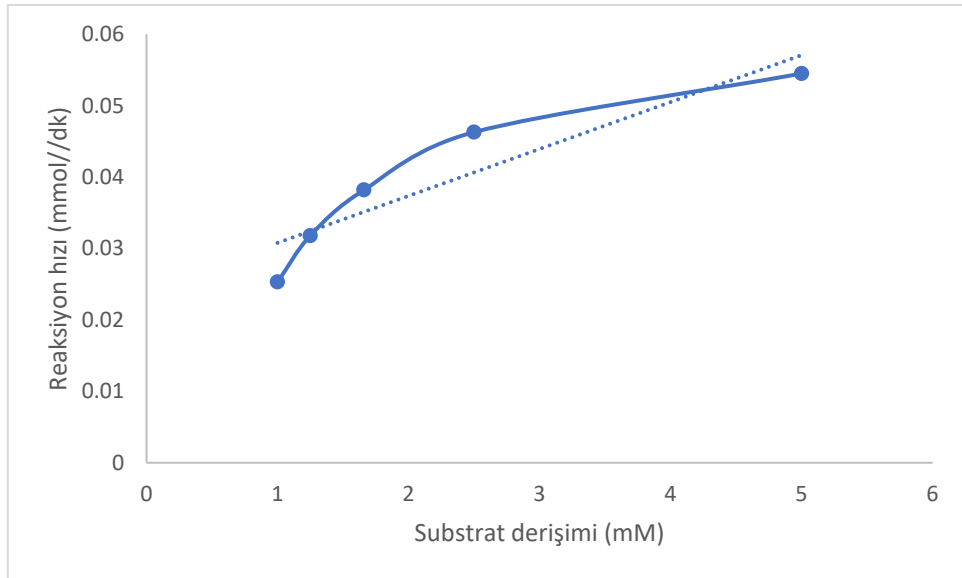
3.3.3. Enzim aktivitesini etkileyen faktörler ve kinetik incelemeler

Saflaştırılan LOX enziminin aktivitesi farklı pH değerlerinde (pH 3-9) tampon çözeltiler hazırlanarak incelenmiştir. Bir enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH, enzim için optimum pH değerini vermektedir. Her bir pH değerinde incelenen enzim aktivitesi sonrası elde edilen değerlerin grafiğe geçirilmesiyle LOX enzimi için optimum pH değeri pH 7 olarak bulunmuştur (Şekil 3.9). Literatürle karşılaştırıldığında Mure vd.nin çalışmalarında [68], LOX enzimi için optimum pH 7, Kagan vd.nin çalışmalarında [69] ise LOX enzimi için optimum pH aralığı 7.8-8.3 olarak belirlenmiştir. Dolayısıyla elde edilen sonuç literatürle uyumluluk göstermektedir.



Şekil 3.9 pH'ın LOX enzimi aktivitesine etkisi

Substrat derişiminin, LOX enzim aktivitesine etkisinin belirlenmesi amacıyla, farklı substrat derişimlerinde (1mM-5mM), 1 mg mL⁻¹ LOX enzimi pH 7.0 tamponunda etkileştirilerek Şekil 3.10'daki enzimatik huza karşı substrat derişimi değişiminin etkisi grafiği elde edilmiştir.



Şekil 3.10 Saflaştırılan LOX enzimi için Substrat derişiminin reaksiyon hızına etkisi

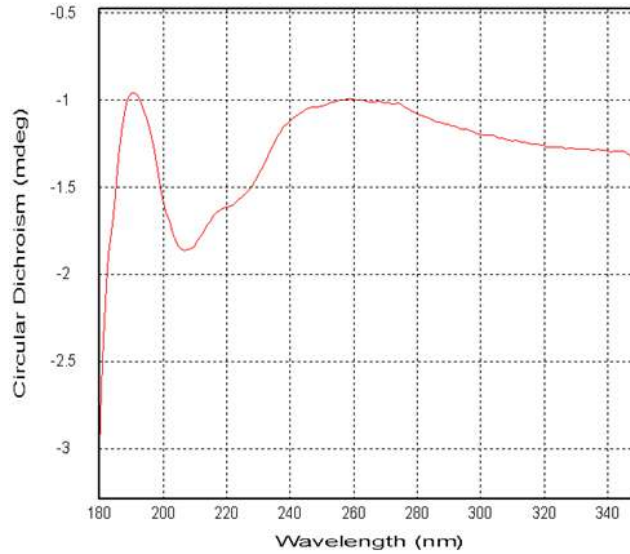
Şekil 3.10'da verilen Michaelis-Menten grafiği değerlendirildiğinde, saflaştırılan LOX enzimi için enzimin bağlayabileceği maksimum miktarda substratı bağladığındaki

maksimum reaksiyon hızı (V_{mak}) $5,45 \times 10^{-2}$ mM/dk, K_m değeri ise 0,833 mM olarak bulunmuştur. Literatürde Tracman vd. [70] tarafından yapılan çalışmada, substrat olarak 1.5-diaminopentan kullanıldığında enzim için K_m değeri 0,5 mM olarak bulunmuştur. Palamakumbura vd. ise [64], akciğerden saflaştırdıkları ve florimetrik yöntemle tayin ettikleri LOX enzimi için K_m değerini 0,3 mM olarak bulmuşlardır. Saflaştırılan LOX enzimi için bulunan bu değerler literatürle uyumluluk göstermektedir.

3.4. Saflaştırılan LOX enziminin Yapısal Karakterizasyonu

CD Analizi

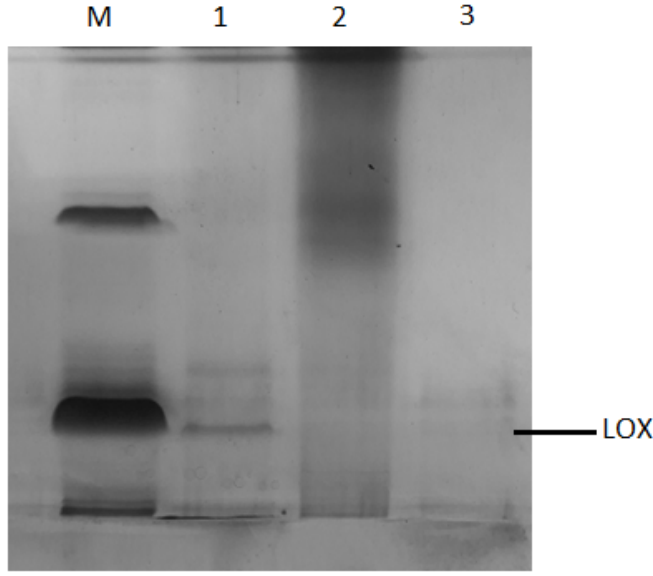
Saflaştırılan LOX enziminin analiz boyunca ikinci veya üçüncül yapılarındaki değişiklik CD spektroskopisi ile izlenmiştir. Şekil 3.11'deki CD spektrumu değerlendirildiğinde, 180-210 nm ve 210-220 nm gelen pikler sırasıyla, saflaştırılan enzimin yapısındaki α -helix ve beta katlanmalarını göstermektedir. 240-300 nm aralığındaki pikler ise rastgele katlanmaları göstermektedir. Buradan hareketle, LOX enziminin yapısında ikincil yapıların korunduğu ve enzim yapısında herhangi bir bozunma olmadığı görülmektedir. Enzim aktivite sonuçları da bu veriyi desteklemektedir.



Şekil 3.11 Saflaştırılan LOX enzimine ait CD spekturumu

3.5. SDS-PAGE analizi

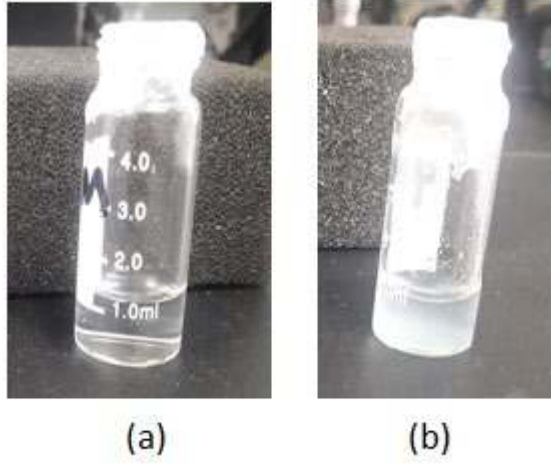
Saflaştırılan LOX enziminin saflığı ve moleköl ağırlığı SDS-PAGE analiziyle belirlenmiştir. Şekil 3.11'deki SDS-PAGE görüntüsünde M: Marker. 1: 2M Üre içeren tampondaki ekstrakt, 2: 4M Üre içeren ekstrakt, 3: FPLC kolonundan alınan LOX enzimini ifade etmektedir. Burada 3. Bant değerlendirildiğinde yaklaşık 32 kDa moleköl ağırlığında olduğu gözlenmektedir. Ayrıca ekstraktta gelen diğér proteinlere ait bantlarında uzaklaşmış olması LOX enziminin saf halde izole edildiğini göstermektedir.



Şekil 3.12 Saflaştırılan LOX-un SDS-Page görüntüleri.

3.6. LOX Enziminin Biyoteknolojik Uygulaması

Saflaştırılan LOX enziminin biyoteknolojik açıdan etkinliği çalışmasında, laboratuvar koşullarında, elastinin çapraz bağlanmasındaki enzim aktifliği incelenmiştir. Şekil 3.13.a'da elastin çözeltisi, Şekil 3.13.b'de ise, pH 7.0 tamponunda hazırlanan LOX enzimiyle 37°C'de LOX enzimiyle CuSO₄.5H₂O çözeltisi varlığında oksijen atmosferinde etkileştirildikten sonra çapraz bağlanmış elastin görülmektedir. Yapılan denemeler sonucuda, 0.4M CuSO₄.5H₂O çözeltisinin kullanılması ve reaksiyon ortamından oksijen gazı geçirilmesiyle 37°C'de 20 saat reaksiyon sonrasında çapraz bağlanma gerçekleşmiştir. Dolayısıyla, saflaştırılan LOX enziminin elastin çapraz bağlanmasında da etkin olduğu belirlenmiştir.



Şekil 3.13 Saflaştırılan LOX enziminin elastin çapraz bağlamadaki etkinliği

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada LOX enziminin saflaştırılmasına yönelik kriyojel tabanlı afinite kolonu geliştirilmiş ve bu kolonun enzimin saflaştırılmasındaki etkinliği incelenmiştir. Afinite kolonu için ligand seçiminde, enzimin kofaktörü olan bakır iyonlarıyla etkileşimden yola çıkılmıştır.

Çalışmanın ilk aşamasında sığır aortundan LOX enzimi içeren ekstraktın izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın ikinci aşamasında MaBt fonksiyonel monomerleri sentezlenmiş ve MaBt-Cu ön organizasyon işlemi yapılmıştır. Sentezlenen MaBt-Cu kompleksi çapraz bağlayıcı MBA varlığında HEMA monomeri ile sıfırın altındaki sıcaklık değerinde polimerleştirilmesiyle kriyojel afinite kolonu hazırlanmıştır. Kriyojel kolonlar poröz yapıya sahip olduklarından, kromatografik sistemlerde düşük basınçlarda çalışmaya izin vermektedir. Bu da enzimin bozunmadan saflaştırılmasını sağlamaktadır. Bu çalışmada kriyojel kolon olarak sentezlenen MaBt-Cu-HEMA'ya LOX yapısındaki histidin uçlarından Cu ile bağlanmanın sağlanması hedeflenmiş, böylece tek basamakta saflaştırmanın gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. MaBt-Cu-HEMA kriyojel kolonunun SEM görüntüleri incelendiğinde, kriyojellerin önemli karakteristik özelliklerinden olan birbirine bağlı geniş gözenek yapısı MaBt-Cu-HEMA yapısında da kendini göstermiştir. Böylece kriyojel sentezinin başarıyla gerçekleştirildiği görülmektedir. Kolonun FT-IR analizi ise MaBt-Cu monomerinin karakteristik piklerini göstermektedir. Çalışmanın diğer aşamasında LOX enzimi FPLC cihazıyla kromatografik yöntemle saflaştırılmıştır. Hem ekstraktın hem de saflaştırma sonucu elde edilen saf enzimin protein içeriği Bradford yöntemine göre belirlenmiştir. Saflaştırma sonrası 0.9 mg mL^{-1} derişimde LOX enzimi elde edilmiştir. Enzimin spesifik aktivitesi $23,92 \text{ } \mu\text{mol dk}^{-1}\text{mg}^{-1}$ olarak hesaplanmış ve enzimin 75.6 % verimle saflaştırıldığı görülmüştür. SDS-PAGE analizi sonrası elde edilen bant enzimin başarılı bir şekilde saflaştırıldığını ifade etmektedir. Enzimin moleköl ağırlığı yaklaşık olarak 32 kDa olarak belirlenmiştir.

Çalışmanın bir sonraki aşamasında enzim aktivitesini etkileyen faktörler incelenmiş, enzime ait V_{max} ve K_m değerleri bulunmuştur. LOX enzimi maksimum aktiviteyi pH 7'de göstermiştir. Bu aşamada elde edilen verilerin literatürde çeşitli LOX enzimi saflaştırma çalışmalarında elde edilen verilere yakın olduğu görülmüştür.

Çalışmada LOX enzimi afinite temelli bir yaklaşımla FPLC cihazı kullanılarak saflaştırılmıştır. LOX enziminin saflaştırılmasına yönelik dizayn edilen kriyojel kolon ve bu kolonla tek basamakta saflaştırmanın yapılması açısından çalışma yenilik içermektedir. Dizayn edilen kriyojel kolon hem LOX enzimi için spesifik ayırım sağlayacak monomeri içermesi hem de ayırım sırasında kolondaki geri basıncı elimine edecek süngerimsi yapıda ve hareketli fazın geçişini kolaylaştıracak makroporlara sahip olması açısından oldukça avantajlıdır. Ayrıca, saflaştırılan enzimin kolondan çıkışında cihaza entegre FPLC cihazının fraksiyon ünitesinde hemen toplanmasıyla enzimin saflaştırma basamağında aktivasyon kaybı önlenmiştir.

LOX enziminin aktivite çalışmaları genellikle kadaverinin (1,5 diaminopentan) substrat olarak kullanıldığı reaksiyonlar üzerinden yapılmıştır. Bu çalışmada, literatürden farklı bir substrat, TRIS-2-aminoetilamin, kullanılarak enzimatik aktivite incelenmiştir. LOX enziminin yapısında amin bulunduran bir substratı aldehite dönüştürmesi ve reaksiyon sonrası açığa H_2O_2 çıkması gerçekleşmiştir. Bu açıdan değerlendirildiğinde, literatürden farklı bir substratla LOX enziminin katalitik aktivitesinin incelenmesi de yeniliktir.

Çalışmanın son aşamasında saflaştırılan LOX enziminin biyoteknolojik açıdan etkinliği laboratuvar koşullarında, elastinin çapraz bağlanmasındaki enzim aktifliği incelenmiştir. Yapılan denemeler sonucunda, 0.4 M $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ çözeltisinin kullanılması ve reaksiyon ortamından oksijen gazı geçirilmesiyle 37°C’de 20 saat reaksiyon sonrasında çapraz bağlanma gerçekleşmiştir. Dolayısıyla, saflaştırılan LOX enziminin elastin çapraz bağlanmasında etkin olduğu belirlenmiştir.

Tüm bu veriler göz önüne alındığında, LOX enzimi saflaştırılması ve aktivitesinin tayini için kolay ve tekrar tekrar uygulanabilir bir kromatografik materyal geliştirilmiştir. LOX enziminin bu metotla saflaştırılarak, farklı biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilir nitelikte olduğu görülmektedir.

KAYNAKÇA

- [1] Gül, Ü. D. (2014). Sağlık alanında biyoteknolojik uygulamalar: Kırmızı biyoteknoloji. *Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 1(1), 66-70.
- [2] Thieman, W, J.& Michael A. P. (2013). *Biyoteknolojiye Giriş*, (Çev. Ed. Mücella Tekeoğlu), Ankara: Palme Yayıncılık.
- [3] Öztürk, B. (2002). Lipaz enzimi: Yapısal özellikleri ve uygulama alanları. *Gıda Mühendisliği Dergisi*, 12, 20-23.
- [4] Kotzia, G. A., Platis, D., Axarli, I. A., Chronopoulou, E. G., Karamitros, C., & Labrou, N. E. (2012). Biocatalysis, enzyme engineering and biotechnology. *Food Biochemistry and Food Processing*, 125-166.
- [5] Maki, J. M., Sormunen, R., Lippo, S., Kaarteenaho-Wiik, R., Soininen, R., & Myllyharju, J. (2005). Lysyl oxidase is essential for normal development and function of the respiratory system and for the integrity of elastic and collagen fibers in various tissues. *The American journal of pathology*, 167(4), 927-936.
- [6] Gudkova, O. O., LatyShko, N. V., Zaitseva, O. V., & Shandrenko, S. G. (2018). Purification Procedure and assay for the activity of lysyl oxidase. *Ukrainian Biochemical Journal*, 90(5), 98-105.
- [7] Atasağungil, M. (1965). *Enzimler*, Ankara: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, No: 8.
- [8] Bingöl, G. (1977). *Vitaminler ve enzimler*. Ankara: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları Ders Kitabı Serisi, No: 46.
- [9] Topal, Ş. (1985). Enzimler, mikrobiyolojik yolla enzim üre-timi ve bu teknolojiye rennin'nin yeri. *Gıda*, 10, (1), 25-37.
- [10] Robinson, P. K. (2015) “Enzymes: principles and biotechnological applications,” *Essays in Biochemistry*, 59, 1–41.

- [11] Kocabaş, D.S. (2021). Gıda endüstrisinde enzimlerin rolü ve ilgili yasal düzenlemeler (Ed. Ögel, Z.B), *Gıda Biyoteknolojisi*. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2021. p.29-38.
- [12] Biçen Ünlüer, Özlem (2018). Karbondioksit tutucu ve dönüştürücü biyomimik nano enzim sistemlerinin geliştirilmesi ve uygulamaları. *Doktora Tezi*, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- [13] Arya, A.& Kumar, A. (2019). *Understanding Enzymes: An Introductory Text*, New Delhi: Drawing Pin Publishing.
- [14] Nelson, D., & Cox, M. M. (2013). *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri*, (Çev.Ed. Y. M. Elçi), Ankara: Palme Yayınevi.
- [15] Ferrier D.R. (2019), *Lippincott Biyokimya: Görsel Anlatımlı Çalışma Kitabı* (Çev. E. Ulukaya). İzmir: Nobel Tıp Kitabevi.
- [16] Ası, T. (1999) *Tablolarla Biyokimya Cilt 2*. Ankara, 1999.
<http://veterinary.ankara.edu.tr/~fidanci>
(Erişim tarihi: 30 Kasım.2021).
- [17] Gürdöl, F. (Ed.) (2015) *Tıbbi Biyokimya*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi
- [18] Hui, Y. H., Nollet, L. M. L., Paliyath, G. & Simpson, B.K. (2006). *Food Biochemistry and Food Processing*. Iowa: Blackwell Publishing.
- [19] Boyce, S. & Tipton, K. F. (2001) "Enzyme Classification and Nomenclature," *Encyclopedia of Life Sciences*, doi: 10.1038/npg.els.0000710.
- [20] Liese, A, Seelbach, K., Wandrey, C., Hoh, C. & Villela Filho, M. (2008) *Industrial Biotransformations*. Jülich: Wiley-VCH.
- [21] Korkmaz, H., Tınkılıç, N., Özen, T., Güder, A. (2018) *Biyokimya-I ders notları*. Samsun: Ondokuz Mayıs Üniversitesi Yayınları.
- [22] Young, D. S. (1977). Classification of enzymes and current status of enzyme nomenclature and units. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 7(2), 93-98.

- [23] Cuesta, S. M., Rahman, S. A., & Thornton, J. M. (2016). Exploring the chemistry and evolution of the isomerases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(7), 1796-1801.
- [24] Bayındırlı, A. (2010). Introduction to enzymes. *Enzymes in Fruit and Vegetable Processing: Chemistry and Engineering Applications*, 1-18.
- [25] Lehman, I. R. (1974). DNA ligase: structure, mechanism, and function. *Science*, 186(4166), 790–797.
- [26] Altınışik, D. M. (2007) *Organik kimya ve Biyokimya uygulamaları*. Aydın: Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları.
- [27] Demircan Yardibi, H. & Aktaran Bala, D. *Temel Biyokimya ve Fizyoloji bilgisi*.
http://auzefkitap.istanbul.edu.tr/kitap/laborantveveterinersaglik_ao/tbfizyoloji.pdf
(Erişim tarihi: 21.12.2021)
- [28] <https://www.nkfu.com/enzimlerin-ozellikleri-maddeler-halinde> (Erişim tarihi: 23 Aralık 2021).
- [29] Benkovic, S. J., & Hammes-Schiffer, S. (2003). A perspective on enzyme catalysis. *Science*, 301(5637), 1196-1202.
- [30] Koshland Jr, D. E. (1995). The key–lock theory and the induced fit theory. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 33(23-24), 2375-2378.
- [31] Tucker, G. A. (1995). Fundamentals of enzyme activity. *In Enzymes in Food Processing*. 1-25.
- [32] Bisswanger, H. (2014). Enzyme assays. *Perspectives in Science*, 1(1–6).41–55. doi: 10.1016/j.pisc.2014.02.005.
- [33] T. Ası, (1999). *Tablolarla Biyokimya*, Ankara.
http://80.251.40.59/veterinary.ankara.edu.tr/fidanci/Ders_Notlari/Tablolarla_Biyokimya/TB-Enzimler.pdf
(Erişim tarihi: 23.12.2021).

- [34] Scanlon, M. G., Henrich, A. W., & Whitaker, J. R. (2018). Factors affecting enzyme activity in food processing. *In Proteins in Food Processing*. pp. 337-365.
- [35] M. Altınışık. “Enzimler”.
<http://www.mustafaaltinisik.org.uk/89-1-09.pdf>, 1999.
(Erişim tarihi: 24 Aralık 2021).
- [36] Warren, J. C., Carr, D. O., & Grisolia, S. (1964). Effect of cofactors, oestrogens and magnesium ions on the activity and stability of human glutamate dehydrogenase. *Biochemical Journal*, 93(2), 409-419.
- [37] Black, H. E. (1988). The effects of steroids upon the gastrointestinal tract. *Toxicologic pathology*, 16(2), 213-222.
- [38] Vitolo, M. (2020). Brief review on enzyme activity. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 9(2), 60-76.
- [39] Xie, X. S. (2013). *Enzyme Kinetics, Past and Present. Science*, 342(6165), 1457–1459.
- [40] Michaelis, L., & Menten, M. L. (1913). Die kinetik der invertinwirkung. *Biochem. z*, 49(333-369), 352.
- [41] Lineweaver, H., & Burk, D. (1934). The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American chemical society*, 56(3), 658-666.
- [42] Canela, E. I., Navarro, G., Beltrán, J. L., & Franco, R. (2019). The meaning of the Michaelis-Menten constant: K_m describes a steady-state. *bioRxiv*, 608232.
- [43] Tipton, K. F. (2002). Principles of enzyme assay and kinetic studies. *Enzyme assays: a practical approach*, 257, 1-47.
- [44] Özata, A. & Türe, C. *Enzimler ve Enzim Aktivitelerinin Gösterilmesi*. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi, pp. 25–34.
<https://docplayer.biz.tr/9462190-Enzimler-ve-enzim-aktivitelerinin-gosterilmesi.html> (Erişim tarihi:30.11.2021)
- [45] Smith-Mungo, L. I., & Kagan, H. M. (1998). Lysyl oxidase: properties, regulation and multiple functions in biology. *Matrix biology*, 16(7), 387-398.

- [46] Akagawa, M., & Suyama, K. (2001). Characterization of a model compound for the lysine tyrosylquinone cofactor of lysyl oxidase. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 281(1), 193-199.
- [47] Kagan, H.M. & Li, W. (2003). Lysyl oxidase: Properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell. *Journal of Cellular Biochemistry*, 88 (4), 660–672.
- [48] Borel, A. *et al.* (2001). Lysyl oxidase-like protein from bovine aorta: Isolation and maturation to an active form by bone morphogenetic protein-1. *Journal of Biological Chemistry*, 276(52), 48944–48949.
- [49] Fong, S.F.T., Fong, K.S.K., Csiszar, K., February (2009). LOX (lysyl oxidase). Atlas Genet. Cytogenet. Oncol. Haematol]
http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_LOX.html
(Erişim tarihi: 15.12.2021)
- [50] Mayorca-Guiliani, A. & Erler, J.T. (2013). The potential for targeting extracellular LOX proteins in human malignancy. *OncoTargets and Therapy*, 6, 1729–1735.
- [51] Sethi, A., Wordinger, R. J., & Clark, A. F. (2012). Focus on molecules: lysyl oxidase. *Experimental Eye Research*, 104, 97.
- [52] Mikhalovsky, S. V., Savina, I. N., Dainiak, M., Ivanov, A. E., & Galaev, I. Y. (2011). 5.03-Biomaterials/Cryogels. *Comprehensive Biotechnology*, 11-22.
- [53] Dainiak, M. B., Galaev, I. Y., Kumar, A., Plieva, F. M., & Mattiasson, B. (2007). Chromatography of living cells using supermacroporous hydrogels, cryogels. *Cell Separation*, 106, 101-127.
- [54] Nayak, A. K., & Das, B. (2018). Introduction to polymeric gels. *In Polymeric Gels*, 3-27. Woodhead Publishing. doi: 10.1016/b978-0-08-102179-8.00001-6.
- [55] Perver, D. (2014). Phema-Jelatin Kriyojel Kemik Doku İskelelerinin Sentezi, Karakterizasyonu ve Biyolojik Aktivite Kazandırılması. *Yüksek lisans tezi*, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara

- [56] Lozinsky, V. I., Plieva, F. M., Galaev, I. Y., & Mattiasson, B. (2001). The potential of polymeric cryogels in bioseparation. *Bioseparation*, 10(4), 163-188.
- [57] Konak, Ü. İ., Turhan, İ., & Certel, M. (2014). Proteinlerin Kromatografik Yöntemlerle Saflaştırılması. *Akademik Gıda*, 12(2), 79-87.
- [58] Goding, J. W. (1996). Affinity chromatography. *Monoclonal antibodies: principles and practice*, 3rd edn. Academic, London, 327-351.
- [59] Madadlou, A., O'Sullivan, S., & Sheehan, D. (2011). Fast protein liquid chromatography. *In Protein Chromatography*, 439-447. Humana Press.
- [60] Prajapati H., Desai C., Narkhede S. (2021) A Brief Review on Fast Protein Liquid Chromatography- FPLC. *Journal Pharmaceutical Science and Bioscientific Research (JPSBR)*. 10(4),235-237.
- [61] Sheehan, D. (2013). *Physical biochemistry: principles and applications*. Oxford: John Wiley & Sons.
- [62] Sheehan, D. (n.d.). Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) Methods. *Protein Purification Protocols*, 269–276.
- [63] Kagan, H. M., Sullivan, K. A., Olsson III, T. A., & Cronlund, A. L. (1979). Purification and properties of four species of lysyl oxidase from bovine aorta. *Biochemical Journal*, 177(1), 203-2
- [64] Palamakumbura, A. H., & Trackman, P. C. (2002). A fluorometric assay for detection of lysyl oxidase enzyme activity in biological samples. *Analytical biochemistry*, 300(2), 245-251.
- [65] Masaru, S., & Mitsutaka, Y. (1984). A new enzymatic serum creatinine measurement based on an endogenous creatine-eliminating system. *Clinica chimica acta*, 143(2), 147-155.
- [66] Siligardi, G., & Hussain, R. (2017). Circular Dichroism, Applications. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, U. K. Academic Press, 293–298.

- [67] Solomons, T. W., Graham, Fryhle, Craig B., Snyder, Scott A. (2014). *Organic Chemistry*. Singapore: John Wiley & Sons.
- [68] Mure, M., Wang, S. X., & Klinman, J. P. (2003). Synthesis and characterization of model compounds of the lysine tyrosyl quinone cofactor of lysyl oxidase. *Journal of the American Chemical Society*, 125(20), 6113-6125.
- [69] Kagan, H. M., & Sullivan, K. A. (1982). Lysyl oxidase: Preparation and role in elastin biosynthesis. In *Methods in enzymology* (Vol. 82, pp. 637-650). Academic Press.
- [70] Trackman, P. C., Zoski, C. G., & Kagan, H. M. (1981). Development of a peroxidase-coupled fluorometric assay for lysyl oxidase. *Analytical Biochemistry*, 113(2), 336-342.

ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı : Ali Rustambayov

Yabancı Dil : Türkçe,Rusca,İngilizce

Eğitim ve Mesleki Geçmişi:

2016, Lisans, Bakü Devlet Üniversitesi, Biyoloji.

2022, Yüksek Lisans, Eskişehir Teknik Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, İleri Teknolojiler Anabilim Dalı, Biyoteknoloji.

Projeler:

1. Heteroleptik Çok Fonksiyonlu İridyum (III) Komplekslerinin Sentezi, Karakterizasyonu, Organik Işık Yayan Diyot (OLED) ve Biyo Görüntüleme Malzemesi Olarak Kullanılabilirliklerinin İncelenmesi, Tübitak -1001, Proje Görevi: **Bursiyer.** 01/05/2018-01/05/2021. Proje No: 217Z049
2. PECOT.CNC polimeri kullanılarak 3 boyutlu (3B) basıma uygun bir hidrojel geliştirilmesi, BAP, Proje Görevi: **Bursiyer.** 31/12/2020/31/12/2021. Proje No:20ADP110