

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

**PROLİN- SPESİFİK ENDOPEPTİDAZLARIN
SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE
PROTEOLİTİK PROSESLERDE KULLANIM
POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ebru KOCADAĞ KOCAZORBAZ

Tez Danışmanı : Prof. Figen ZİHNİOĞLU

Biyokimya Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 405.05.01

Sunuş Tarihi :27.05.2015

Bornova-İZMİR

2015

Ebru KOCADAĞ KOCAZORBAZ tarafından doktora tezi olarak sunulan “Pro-
lin-Spesifik Endopeptidazların Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Proteolitik
Proseslerde Kullanım Potansiyelinin Araştırılması” başlıklı bu çalışma E.Ü. Li-
sansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim
ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirile-
rek savunmaya değer bulunmuş ve 27/05/2015 tarihinde yapılan tez savunma sı-
navında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Figen ZİHNİOĞLU

Raportör Üye : Prof. Dr. Seçil ÖNAL

Üye : Doç. Dr. Şenol ALPAT

Üye : Doç. Dr. Ayşe DİNÇER

Üye : Doç. Dr. Serap EVRAN

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi / Doktora Tezi olarak sunduğum “Prolin- Spesifik Endopeptidazların Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Proteolitik Proseslerde Kullanım Potansiyelinin Araştırılması” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

27 / 05 / 2015

Ebru KOCADAĞ KOCAZORBAZ

ÖZET

PROLİN- SPESİFİK ENDOPEPTİDAZLARIN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE PROTEOLİTİK PROSESLERDE KULLANIM POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI

KOCAZORBAZ , K, Ebru

Doktora Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Figen ZİHNİOĞLU

Mayıs 2015,190 sayfa

Prolil oligopeptidaz (POP, EC 3.4.21.26) prolin içeren küçük biyolojik peptidleri hidrolizleyen sitozolik bir serin proteazdır. Prolil oligopeptidaz ailesinin üyeleri, nörodejeneratif hastalıklar, peptid hormonları ve nöro peptidlerin yapımı ve yıkımı, öğrenme ve hafıza, DNA sentezi, hücre farklılaşması ve sinyal iletimi gibi bazı fizyolojik proseslerde önemli rol oynarlar. Bu nedenle teröpatik olarak potansiyel kullanımını açıklayabilmek için çeşitli kaynaklardan saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir.

Bu çalışmada *E.coli*'den eksprese edilen rekombinant *Myxococcus xanthus* Prolil oligopeptidaz metal-şelat affinite ve jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak 224 kat saflaştırıldı. Saflaştırılan enzimin molekül kütlesi 70 kDa (monomerik) ve izoelektrik noktası 6.3 olarak belirlendi. Optimum pH ve sıcaklık sırasıyla 7.5 ve 37°C olarak bulundu. Z-Pro-Prolinal ve PMSF gibi çeşitli serin proteaz inhibitörlerinin enzim aktivitesini inhibe ettiği görüldü. Ayrıca saflaştırılan enzimin substrat spesifikliği (sentetik/doğal) ve stabilitesi (termal, pH ve depo kararlılığı) araştırıldı.

Elde edilen sonuçlardan *Myxococcus xanthus*'dan saflaştırılan Prolil oligopeptidazın diğer kaynaklardan elde edilen prolil oligopeptidazlar ile benzerlik gösterdiği görülmektedir. Enzimin potansiyel kullanımı buğday glutenunun hidrolizi ile test edildi. Bu amaçla buğday gluteni, koşullar optimize edildikten sonra Prolil oligopeptidaz enzimi ile enzimatik hidrolize maruz bırakıldı. Açığa çıkan gluten hidrolizatının antioksidan antimikrobiyal, tripsin ve prolil oligopeptidaz inhibisyon aktiviteleri araştırıldı.

Keywords: Serin proteaz, Prolil oligopeptidaz, Bioaktif peptid, 2,4,6-trinitrobenzen sülfonik asit.

ABSTRACT

THE PURIFICATION, CHARACTERIZATION AND POTENTIAL BIOLOGICAL APPLICATIONS OF PROLINE SPECIFIC ENDOPEPTIDASES

KOCAZORBAZ , K, Ebru

PhD in Biochemistry

Supervisor: Prof. Dr. Figen ZİHNİOĞLU

May 2015, 190 pages

Prolyl oligopeptidase (POP, EC 3.4.21.26) is a cytosolic serine protease that hydrolyses proline containing small biological peptides. The members of prolyl oligopeptidase family play important roles in many physiological processes such as neurodegenerative diseases, maturation and degradation of peptide hormones and neuropeptides, learning and memory, DNA synthesis, cell differentiation and signal transduction. Thus the enzyme has been purified and characterized from various sources to elucidate the potential use as therapeutics.

In this study recombinant *Myxococcus xanthus* Prolyl oligopeptidase expressed in *E.coli* was purified 224 fold, using metal-chelate affinity and gel permeation chromatography. The purified enzyme exhibited a monomeric molecular weight of 70 kDa, and an isoelectric point of 6.3. The optimum pH and temperature was estimated as 7.5 and 37°C, respectively. Enzyme activity was inhibited by various serin protease inhibitors such as Z-Pro-Prolinal and PMSF. Furthermore the substrate specificity (synthetic/natural) and the stability (thermal, pH and storage stability) of the purified enzyme were also investigated.

The data showed that the *Myxococcus xanthus* Prolyl oligopeptidase is similar to Prolyl oligopeptidase isolated from other sources. The potential use of the enzyme was tested by the hydrolysis of the wheat gluten. For this purpose wheat gluten was subjected to enzymatic hydrolysis with Prolyl oligopeptidase, after optimizing the conditions. The resulting gluten hydrolysate were characterized by means of their antioxidant, antibacterial, trypsin inhibition and Prolyl oligopeptidase inhibition activities.

Keywords: Serine protease, Prolyl oligopeptidase, Bioactive peptides, 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid.

TEŞEKKÜR

Doktora tezi süresince yönlendirmesi, konu seçimine ve bilimsel vizyonuma katkıları ve deneysel çalışmalarda değerli birikimlerini benimle sabırla paylaşan ve desteğini her zaman hissettiğim Sayın Hocam Prof. Dr. Figen Zihnioğlu'na, laboratuvarında birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum kıymetli arkadaşım Esra MENFAATLİ'ye, sağlamış olduğu desteklerle çalışma sürecini kolaylaştıran kıymetli arkadaşım Doç. Dr. Serap Evran'a ve Arş.Gör. Dr. Funda KARTAL'a, tez projesini maddi olarak destekleyen E.Ü. Bilimsel Araştırma Fonu'na, maddi ve manevi olarak her zaman yanımda olan sevgili eşime, oğlum Yiğit KOCAZORBAZ'a ve aileme teşekkürü borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	VII
ABSTRACT	IX
TEŞEKKÜR	XI
ŞEKİLLER DİZİNİ	XX
ÇİZELGELER DİZİNİ	XXV
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XXVII
1.GİRİŞ	1
1.1 Proteazların Sınıflandırılması	1
1.2 Serin Proteazlar.....	2
1.3 Prolin Spesifik Peptidazlar	2
1.3.1 Prolin	2
1.3.2 Prolil oligopeptidaz ailesi	3
1.3.3 Prolil oligopeptidaz.....	3
1.3.4 Prolil oligopeptidaz yapısı	4
1.3.5 Aktif bölgenin yapısı	7
1.3.6 Gen yapısı	10
1.3.7 Prolil oligopeptidaz'ın kataliz mekanizması	12
1.3.8 Prolil oligopeptidaz'ın dağılımı ve lokalizasyonu	13
1.4 Prolil Oligopeptidaz Enziminin Fiziksel Özellikleri	15
1.4.1 Enzim aktivitesine pH'nın etkisi	15

İÇİNDEKİLER (Devam)

	<u>Sayfa</u>
1.4.2 Enzim aktivitesine sıcaklığın etkisi.....	15
1.4.3 Substrat spesifikliğı.....	19
1.5 POP Enziminin Kinetik Özellikleri.....	20
1.5.1 POP aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi.....	20
1.5.2 POP'un izoelektrik noktası	21
1.5.3 POP'un molekül kütlesi	21
1.6 Kararlılık Testleri.....	25
1.6.1 Termal kararlılık	25
1.6.2 pH kararlılığı	25
1.7 Prolil Oligopeptidaz Aktivitesi Üzerine Metal İyonlarının Etkisi	27
1.8 Serin Proteaz İnhibitörleri.....	30
1.8.1 Serin proteaz inhibitörlerinin sınıflandırılması	31
1.9 POP Aktivitesi Üzerine Çeşitli Kimyasal ve İnhibitörlerin Etkisi.....	35
1.10 Prolil Oligopeptidazın Fizyolojik Önemi.....	38
1.10.1 İnositol metabolizmasının regülasyonu	38
1.10.2 Mizaç bozuklukları (Bipolar Bozukluk)	39
1.10.3 Alzheimer hastalığı	40
1.10.4 Periferel hastalıklar	41

İÇİNDEKİLER (Devam)

	<u>Sayfa</u>
1.11 Prolil oligopeptidaz inhibitörleri	44
1.11.1 Sentetik inhibitörler	45
1.11.2 Doğal inhibitörler.....	47
1.11.3 Endojen inhibitörler	49
1.11.4 İlaç olarak Prolil oligopeptidaz inhibitörleri.....	49
1.12 Biyoaktif Peptidler.....	50
1.13 Protein Hidrolizi	54
1.13.1 Asidik hidroliz	54
1.13.2 Enzimatik hidroliz	55
1.14 Gluten	56
2. MATERYAL VE METOD	58
2.1 Materyal.....	58
2.2 Myxococcus xanthus Suşu'dan Prolil Oligopeptidaz Enziminin Üretimi ve Saflaştırılması için Gerekli Kimyasallar.....	59
2.2.1 Kullanılan bakteriler	59
2.2.2 Vektörler.....	60
2.2.2.1 pET 21a(+).	60
2.2.3 E.coli büyüme ortamları	61
2.2.4 Myxococcus xanthus büyüme ortamı	62
2.2.5 Tamponlar ve çözeltiler	62

İÇİNDEKİLER (Devam)Sayfa

2.3 Prolil Oligopeptidaz Enzimin Farklı Kaynaklarda Belirlenmesi	63
2.4 Myxococcus xanthus Suşu’ndan Prolil Oligopeptidaz Enziminin Üretimi ve Saflaştırılması.....	63
2.4.1 Sterilizasyon.....	63
2.4.2 E. coli hücrelerinin inkübasyon ve saklama koşulları.....	64
2.4.3 Myxococcus xanthus hücrelerinin inkübasyon ve saklama koşulları	64
2.4.4 Kimyasal kompetent E. coli hücrelerinin hazırlanması	65
2.4.5 E.coli’den plazmid DNA izolasyonu	65
2.4.6 Plazmid DNA izolasyonu.....	66
2.4.7 Genomik DNA izolasyonu.....	67
2.4.8 Agaroz Jel Elektroforezi	68
2.4.9 DNA’ya uygulanan enzimatik işlemler.....	71
2.4.10 DNA fragmentlerinin standart PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile çoğaltılması	75
2.4.11 Koloni PCR.....	76
2.5 E. coli’ de Rekombinant Protein Üretimi ve Saflaştırılması.....	78
2.5.1 Heterolog protein ekspresyonu ve Nikel-Şelat Afinite kromatografisi ile saflaştırılması	78
2.6 Protein Tayini.....	80
2.7 Prolil Oligopeptidaz’ın Aktivite Tayini	81
2.8 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)	82

İÇİNDEKİLER (Devam)Sayfa

2.9 Jel Filtrasyon Kromatografi İle Saflığının Kontrolü ve Molekül Kütlesinin Belirlenmesi.....	86
2.10 HPLC ile Prolil Oligopeptidaz Enziminin Saflığının Kontrolü.....	87
2.11 İki Yönlü Jel Elektrophorezi (2D-PAGE) ile İzoelektrik Noktanın Belirlenmesi.....	88
2.11.1 İzoelektrik odaklama (Fokuslama, IEF) 1.Yön	89
2.11.2 SDS-PAGE; 2. Yön	90
2.12 POP Enziminin Fiziksel ve Kimyasal Karakterizasyonu	93
2.12.1 Enzim aktivitesine pH'nın etkisi	93
2.12.2 Enzim aktivitesine sıcaklığın etkisi	93
2.12.3 Substrat spesifikliğı	93
2.13 Kararlılık Testleri.....	95
2.13.1 Termal kararlılık	95
2.13.2 pH kararlılığı.....	96
2.13.3 Depo kararlılığı.....	96
2.14 POP Enziminin Kinetik Özellikleri	96
2.14.1 POP aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi	96
2.15 POP Aktivitesi Üzerine Metal İyonlarının Etkisi	96
2.16 POP Aktivitesi Üzerine Çeşitli Kimyasal ve İnhibitörlerin Etkisi	97
2.16.1 IC50 değerlerinin belirlenmesi	97
2.17 Polil Oligopeptidaz Enzimi ile Protein Hidrolizi	98

İÇİNDEKİLER (Devam)Sayfa

2.17.1 POP enzimi ile gluten hidrolizinin optimizasyonu	98
2.18 POP ile Hazırlanan Hidrolizatların Biyolojik Etkinliklerin İncelenmesi.....	102
2.18.1 Gluten hidrolizatının antioksidan etkinliği	102
2.18.2 Gluten hidrolizatının antimikrobiyal etkinliği	103
2.18.3 Gluten hidrolizatının Tripsin ve Prolil oligopeptidaz enziminin aktivitesine etkisi.....	104
3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	107
3.1 Prolil Oligopeptidaz Enzimin Farklı Kaynaklarda Belirlenmesi	108
3.2 Myxococcus xanthus Suşu’ndan Prolil Oligopeptidaz Enziminin Üretimi ve Saflaştırılması.....	109
3.3 Jel Filtrasyon Kromatografisi ile Saflığının Kontrolü ve Molekül Kütlesinin Belirlenmesi.....	114
3.4 HPLC ile Prolil Oligopeptidaz Enziminin Saflığının Kontrolü	118
3.5 İki Yönlü Jel Elektforezi (2D-PAGE) ile İzoelektrik Noktanın Belirlenmesi	118
3.6 POP Enziminin Fiziksel ve Kimyasal Karakterizasyonu.....	119
3.6.1 Enzim aktivitesine pH’nın etkisi.....	119
3.6.2 Enzim aktivitesine sıcaklığın etkisi.....	120
3.6.3 Substrat spesifikliğı.....	121
3.7 Kararlılık Testleri.....	127
3.7.1 Termal kararlılık	128

İÇİNDEKİLER (Devam)

	<u>Sayfa</u>
3.7.2 pH kararlılığı.....	129
3.7.3 Depo kararlılığı.....	130
3.8 POP Enzimin Kinetik Özellikleri	131
3.8.1 POP aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi	131
3.9 POP Aktivitesi Üzerine Metal İyonlarının Etkisi	133
3.10 POP Aktivitesi Üzerine Çeşitli Kimyasal ve İnhibitörlerin Etkisi	136
3.11 Polil Oligopeptidaz Enzimi ile Protein Hidrolizi	139
3.11.1 POP enzimi ile gluten hidrolizinin optimizasyonu	140
3.11.2 Hidrolizatların RP-HPLC ile ayrılması	143
3.12 POP ile Hazırlanan Hidrolizatların Biyolojik Etkinliklerin İncelenmesi	144
3.12.1 Gluten hidrolizatının antioksidan etkinliği	145
3.12.2 Gluten hidrolizatının antimikrobiyal etkinliği	147
3.12.3 Gluten hidrolizatının Tripsin ve Prolil oligopeptidaz enziminin aktivitesine etkisi	149
4. GENEL DEĞERLENDİRME	152
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	155
ÖZGEÇMİŞ	190

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Prolinin kimyasal yapısı.....	2
1.2 Prolil oligopeptidaz'ın üç boyutlu yapısı.....	5
1.3 α/β Hidrolaz domainin yapısı	6
1.4 β -Propeller domainin yapısı	7
1.5 Prolil oligopeptidaz'ın aktif bölgesinin yapısı	8
1. 6 Katalitik triad'ın şematik görünümü.	9
1.7 Aktif bölgesine kovalent bağlı Z-Pro-prolinal	10
1.8 İnsan, fare, domuz, fare ve sıçan POP dizilerinin karşılaştırılması.	11
1.9 Serin proteazların kataliz mekanizası.	13
1.10 Prolin spesifliklerine göre peptidazlar	19
1.11 Enzim aktivitesi üzerine metal iyonunun etkisi (E: enzim, S: substrat)..	28
1.12 a.CMTI I: tripsin arasındaki etkileşim ile tripsin enziminin inhibisyonu b. CMTI I konveks bağlanma halkası	32
1.13 Serin proteaz inhibitörlerinden örnekler a.canonical (CMTI:tripsin), b.noncononical (ornithodorin:trombin), c.serpinler (α -1 antitripsin: tripsin).	33
1.14 Bazı serin proteaz inhibitörleri.....	35
1.15. İnositol döngüsü.....	39
1.16 POP ve KOAH arasındaki ilişki	42
1.17 POP spesifik sentetik inhibitörleri	47
1.18 POP doğal inhibitörleri	48

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.19 Glutenin, gliadin ve gluten yapısı.....	57
2.1 pET-21a(+) vektörü.	61
2.2 Agaroz jelden DNA ekstraksiyonu için jelden ilgili bantın alınması (örnek gösterimi).	71
2.3 Ligazın reaksiyon mekanizması	73
2.4 Ligasyon işlemi.(Gen fragmenti, T4 DNA ligaz varlığında plazmid vektörün halka yapısına katılır)	74
2.5 Koloni PCR işleminin şematik gösterimi.	77
2.6 Metal şelat afinite kromatografisi matriksi ve His-Trap kolonlar	79
2.7 Suc-Ala-Pro-pNA'nin POP ile hidroliz reaksiyonu	81
2.8 a. Akrilamid monomerlerinin polimerizasyonu, b. SDS-PAGE uygulaması.....	83
2.9 Jel filtrasyon kromatografisinin şematik gösterimi.	86
2.10 İki yönlü jel elektroforezi	89
2.11 Sağlıklı ve çölyak hastalıklı kişilerde protein sindirimi	99
2.12 TNBS yöntemi ile amino grupların belirlenmesi.....	101
2.13 DPPH radikal reaksiyonu	103
2.14 BAPNA'nın tripsin ile hidroliz reaksiyonu	104
3.1 Genomik DNA'nın agaroz jel görüntüsü.1.Kuyucukta marker 2.Kuyucukta Genomik DNA	110
3.2 Myxococcus xanthus için tasarlanan gene spesifik primer setinin farklı konsantrasyonları ile yapılan PCR ürünlerinin jel görüntüsü.....	110

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.3 Plazmid ve Genomik DNA'nın agaroz jel görüntüsü örneği 1. Kuyucukta Plazmid DNA 2.kuyucukta Fastruler middle range marker (5000bp, 2000bp, 850bp, 400bp, 100bp), 3.kuyucukta Genomik DNA fragmenti.....	111
3.4 Koloni PCR ile elde edilen fragmentlerin agaroz jel görüntüsü örneği. 1-7. Kuyucuk koloni PCR örnekleri, 8.Kuyucuk Fastruler middle range marker (5000bp,2000bp, 850bp, 400bp,100bp)	112
3.5 Nikel-Şelat Affinite kromatogramı	113
3.6 Nikel Şelat Affinite kromatografisi ile saflaştırılan enziminin SDS-PAGE jel (%12 poliakrilamid) görüntüsü. Protein standardı (1); kolona uygulanan homojenat (2); kolondan elde edilen elüat (3) ile gösterilmiştir	114
3.7 Jel filtrasyon kromatogramı	115
3.8 Molekül kütle standartlarının molekül kütle logaritmlarına karşılık Ve değerleri ile oluşturulan standart grafiği (Sığır serum albümin, 66 kDa; Peroksidaz, 40 kDa, Proteinaz K, 28 kDa ve Lizozim, 14 kDa).....	115
3.9 Jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılan POP enziminin SDS-PAGE görüntüsü. Protein standardı (2); kolondan elde edilen elüat (1) ile gösterilmiştir	116
3.10 Prolil oligopeptidaz enziminin RP-HPLC ile saflık kontrolü	118
3.11 POP enziminin 2D-PAGE görünütüsü.....	119
3.12 POP enzim aktivitesinin pH bağımlı değişimi.	120
3.13 POP enzim aktivitesinin sıcaklığa bağımlı değişimi.....	121

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.14 Substance P kromatogramı. Kolon: nukleosil RP-C18; Elusyon A: %0,1 TFA suda, B:%0,1 TFA asetonitrilde ; gradient:0-2 dk %5 B, 2-12 dk %60 B, 12-14 dk %5, 14-15 dk %5 B; akış hızı 1ml/dk; sıcaklık 45°C; UV: 210nm	123
3.15 Substance P'nin standart grafiği	123
3.16 Substance P'nin POP enzimi ile hidrolizi, A. Substance P'nin başlangıç kromatogramı (enzim, elüsyon A ve %10 TCA ile birlikte), B. Substance P'nin enzimle 30 dakika inkübasyon sonrasındaki kromatogramı. C. Substance P'nin enzimle 60 dakika inkübasyon sonrasındaki kromatogram.....	124
3.17 IGF-1 kromatogramı.....	125
3.18 IGF-1'in standart grafiği.....	125
3.19 IGF-1'nin POP enzimi ile hidrolizi, A. IGF-1'nin başlangıç kromatogramı (enzim, elüsyon A ve %10 TCA ile birlikte), B. IGF-1'nin enzimle 30 dakika inkübasyon sonrasındaki kromatogramı. C. IGF-1'nin enzimle 60 dakika inkübasyon sonrasındaki kromatogram.	126
3.20 Prolil oligopeptidaz enziminin termal kararlılığı.....	128
3.21 Prolil oligopeptidaz enziminin pH kararlılığı.	130
3.22 Prolil oligopeptidaz enziminin depo kararlılığı	131
3.23 POP enzim aktivitesi üzerine Suc-Ala-Pro-pNA konsantrasyonunun etkisi, b. POP Linewear-Burk diyagramı, c. POP Woolf Hofstee diyagramı	132
3.24 Bazı metal iyonlarının IC50 grafiği.....	135
3.25 Z-Pro-Prolinal'in yapısı	136
3.26 POP inhibitörlerinden Z-Pro-Prolinal ve PMSF'nin IC50 grafiği.....	138

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.27 Sıcaklık ile gerçekleştirilen protein denatürasyonu	140
3.28 Hidroliz derecesi ve E/S oranı arasındaki ilişki	141
3.29 Gluten ununun 8 saat hidroliz grafiği	142
3.30 Enzimin zamana bağlı etkinliğin belirlenmesi.....	142
3.31 Gluten proteinin POP enzimi ile hidrolizine ait kromatogramı; Gluten unu'nun başlangıç kromatogramı.....	143
3.32 Gluten proteinin POP enzimi ile hidrolizine ait kromatogramı; Gluten unu'nun enzimle 4 saat inkübasyon sonrasındaki kromatogramı.	144
3.33 DPPH grafiği.....	146
3.34 Mikrodilüsyon yönteminin mikropilaka görüntüsü	148
3.35 E.coli bakterisinin hidrolizat varlığında ve yokluğunda zamana bağlı A595 değerleri.....	149
3.36 Hidrolizatların POP ve Tripsin'in inhibisyon IC50 değerleri	150

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 POP'un farklı tür ve kaynaklardaki optimum pH değerleri	16
1.2 POP'un farklı tür ve kaynaklardaki optimum sıcaklık değerleri	18
1.3 Prolil oligopeptidaz enziminin hidrolizlediği peptidler	20
1.4 Farklı türlerdeki POP enziminin k_m değerleri.....	21
1.5 POP enziminin pI değerleri	22
1.6 Farklı kaynaklardan saflaştırılan POP enziminin SDS-PAGE, nondenatüre – PAGE ve jel filtrasyon ile belirlenen molekül kütleleri ve alt birim sayıları ..	23
1.7 Prolil oligopeptidaz'ın termal kararlılığı	26
1.8 Prolil oligopeptidaz'ın pH kararlılığı	27
1.9 POP aktivitesi üzerine çeşitli kimyasal ve inhibitörlerin etkisi	36
1.10 Biyoaktif peptidlerin sınıflandırılması.....	51
2.1 Jel ekstraksiyon kiti'nin bileşenleri	70
2.2 pET21-a ve PCR ürünlerinin ligasyon bileşenleri	74
2.3 DNA amplifikasyonu için kullanılan PCR koşulları	75
2.4 Koloni PCR için PCR karışımı	76
2.5 Koloni PCR için standart PCR koşulları	77
2.6 % 12 SDS-PAGE jel hazırlanmasında kullanılan çözeltiler.....	85
2.7 Çeşitli kimyasal ve inhibitörler.....	97
3.1 POP enziminin farklı kaynaklardaki aktiviteleri	109
3.2 Prolil oligopeptidaz enziminin saflaştırılması	117
3.3 POP enzimi ile sentetik substratların hidrolizi	122

ÇİZELGELER DİZİNİ (Devamı)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.4 POP enzimi ile doğal substratların hidrolizi	127
3.5 POP enzim aktivitesine metal iyonlarının etkisi	133
3.6 Bazı metal iyonlarının IC50 değerleri.....	136
3.7 POP enzim aktivitesine çeşitli kimyasal ve inhibitörlerin etkisi.....	137
3.8 Hidrolizatın IC50 değerleri	15

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
μM	Mikromolar
mM	Milimolar
μL	Mikrolitre
mL	Mililitre
L	Litre
mg	Miligram
gr	Gram
rpm	Dakikadaki dönüş
U	Unit
kDa	Kilodalton
Km	V _{max} 'ın yarısı hıza karşılık gelen substrat konsantrasyonu.
V _{max}	Doygun substrat konsantrasyonundaki reaksiyon hızı.
V _e	Elüsyon hacmi
IC ₅₀	Aktivitede %50 azalmaya neden olan inhibitör konsantrasyonu

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (Devam)

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
His(H)	Histidin
Asp(D)	Aspartik asit
Ser(S)	Serin
HPLC	Yüksek performans sıvı kromatografisi
RP-HPLC	Terz faz yüksek performans sıvı kromatografisi
POP	Prolil oligopeptidaz
pNA	Paranitroanilin
pI	İzoelektrik nokta
SDS	Sodyum dodesil sülfat
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PMSF	Fenilmetilsulfonyl florür
Tris	Hidroksimetilaminometan
TFA	Trifloroasetik asit
TNBS	Trinitrobenzen sulfonik asit
OPA	o-fitaldialdehit
TCA	Trikloroasetik asit
TEMED	Tetrametilendiamin

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (Devam)

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
APS	Amonyum per sülfat
DTT	Dithiyotreitol
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
IGF-1	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1
IPTG	İzopropil- β -D-tiyogalaktopiranozid
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
bp	Baz çifti
E.coli	Escherichia coli
M.x	Myxococcus xanthus
Suc	Suksinil
Z	Karbobenzoksi
MPLC	Orta basınçlı sıvı kromatografi

1.GİRİŞ

Prolil oligopeptidaz (POP; E.C.3.4.21.26) serin proteaz ailesine ait yaklaşık olarak 80 kDa molekül ağırlığında bir enzimdir (Venäläinen et al., 2004). POP ailesi; prolil oligopeptidaz, dipeptidil peptidaz IV (E.C.3.4.14.5), oligopeptidaz B (3.4.21.83) ve açilaminoaçil peptidaz (3.4.19.1) enzimlerini içerir. Bu enzim ailesi, katalitik triad bölgesinin düzeninden ve küçük peptid substratlarına olan spesifiklikleri bakımından klasik tripsin-subtilizin benzeri serin proteazlardan farklıdır. POP, 30 aminoasitten daha kısa peptidde yeralan prolinin karboksil ucundan hidrolizlemektedir. POP enziminin; tirotropin salıcı hormon, substance P, arjinin-vasopressin, nörotensin, anjiotensin gibi bazı biyoaktif peptidlerin hidrolizinde yer aldığı bilinmektedir (Garcia Horsman et al., 2007a; Männistö et al., 2007).

1.1 Proteazların Sınıflandırılması

Proteazlar; birçok biyolojik prosesin pozitif veya negatif efektörleri, protein degradasyonunun nonspesifik katalizörleri veya fizyolojik olayların kontrolünde son derece seçimli ajanlar olarak iş görürler (Page and Cera, 2008).

Proteazlar, tüm organizmalarda var olan toplam proteinin yaklaşık % 2'lik kısmını temsil ederler. Rawlings ve Barrett tarafından yapılan sınıflandırmaya göre proteazlar, ortak bir atadan geliş, üç boyutlu yapı arasındaki benzerlik, polipeptid zincirindeki katalitik rezidülerin dizilimi, katalitik rezidülerin çevresindeki primer dizilime göre hiyerarşik bir sınıflandırma sistemi içerisinde sınıflara (serin proteazlar, sistein proteazlar, aspartik proteazlar, metalloproteazlar) klanlara, familyalara ve alt familyalara ayrılmıştır (Rawlings and Barrets, 1993, 1999, 2007). Günümüze değin 66000'in üzerinde proteaz tanımlanmış olup; 50 klan ve 184 familya içerisinde sınıflandırılmıştır (Cunningham et al., 1997).

1.2 Serin Proteazlar

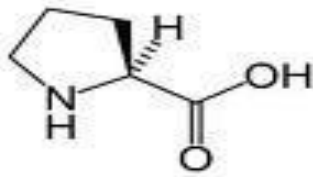
Serin proteazlar; peptidazların en büyük grubunu oluşturur. Tüm bilinen protezların üçte birinden fazlası serin proteazlardır. 2600 üzerinde serin proteaz 13 klan ve 40 familya içerisinde gruplandırılır. Serin proteazların SB ve SC klanları prokaryotlar, bitkiler, mantarlar ve arkealarda baskındır. İnsanda bilinen 699 proteazın, 178'i serin proteaz olup, bunların 138'i S1 proteaz familyasına aittir.

Serin proteazlar familya ismini; enzimin aktif bölgesinde yer alan ve açıl - enzim ara ürün oluşturmak üzere substrat peptidin karbonil kısmına nükleofilik atak yapan serin rezidüsünden alır. Hemen hemen tüm serin proteazların sahip olduğu aktivite nötral pH ile alkali pH aralığında sınırlıdır. Endoproteolitik veya ekzoproteolitik aktiviteye sahiptirler. İmmun cevap, kan koagülasyonu, fibrinolizis, apoptozis, üreme ve sindirim gibi birçok önemli fizyolojik sürece katılırlar (Page and Cera, 2008).

1.3 Prolin Spesifik Peptidazlar

1.3.1 Prolin

Prolin, doğal 20 amino asit arasında siklik yapıya sahip tek amino asittir. Prolinin yan zincirindeki üç karbon atomu bir halka oluşturur ve tekrar peptid bağına katılan azot atomuna bağlanır. Bu nedenle, diğer amino asitlerden farklı olarak primer amino grubu ($-NH_2$) içermez (Şekil 1.1).



Şekil 1.1 Prolinin kimyasal yapısı.

Prolinin 5 üyeli siklik yapısı α karbon-azot bağı etrafında rotasyonu önler ve bundan dolayı prolinin yapısı sadece birkaç konformasyona izin verir. Prolin peptid yapısına katıldığı durumda, doğal siklik yapısı nedeniyle hidrojen bağı yapamaz ve bu nedenle α -heliks yapısına uygun değildir. Prolinin bu karakteristiği, onun fizyolojik fonksiyonu için önemlidir (Yaron et al.,1993;

Cunningham et al., 1997; Berg et al., 2006). Polipeptid prekürsörlerinde prolin artıklarının varlığı, polipeptid zincirinin aminopeptidaz ve karboksipeptidaz tarafından proteolizine karşı koruyucudur. Bunun yanında, prolinin *cis-trans* izomerizasyonu proteinin fonksiyonunu değiştirebilir (Lu et al., 2007).

1.3.2 Prolil oligopeptidaz ailesi

Prolil oligopeptidazlar; serin peptidazların SC klanı içerisinde S9 familyası olarak adlandırılan en büyük ailesidir. Bu ailenin önemli 4 üyesi *prolil oligopeptidaz*, *dipeptidil peptidaz IV*, *açilaminoaçil peptidaz* ve *oligopeptidaz B*'dir. Bu 4 peptidazın aminoasit sekans homolojileri düşük, fakat benzer 3 boyutlu yapıyı paylaşırlar. Prolil oligopeptidaz ve oligopeptidaz B endopeptidazlardır ve sitozolde bulunurlar. Açilaminoaçil peptidaz ve dipeptidil peptidaz IV ekzopeptidazlardır. Açilaminoaçil peptidaz sitoplazmik omega peptidaz iken, dipeptidil peptidaz IV oligopeptidlerin amino ucundan dipeptidi yıkan membran bağlı bir enzimdir.

Klasik triad olarak adlandırılan serin, aspartik asit ve histidin'den oluşan yapı C-terminal bölgesinde bulunmaktadır. Prolil oligopeptidaz ailesindeki enzimlerin molekül kütlesi klasik serin proteazlardan (tripsin ve subtilisin gibi) çok daha büyüktür. Enzimlerin zimojen veya proenzim formları yoktur, aktif peptidazlar olarak sentezlenirler. Prolil oligopeptidaz ailesi üyelerinin en çok dikkate değer özellikleri seçimlilikleridir ki, yaklaşık 30 amino asit rezidüsünden daha fazla rezidü içermeyen oligopeptidler ile sınırlıdır (Polgar, 2002).

1.3.3 Prolil oligopeptidaz

Prolin spesifik endopeptidazlar (EC 3.4.21.26) ilk olarak insan uterusunun homojenatında oksitosini (Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-NH₂) karboksil ucundan hidrolizlediği (COO⁻) lösilglisinamid peptidinin salınmasıyla keşfedilmiştir. Bu peptidaz aktivitesi; peptid içinde yeralan prolin rezidülerin karboksil bölgelerinden hidrolizleyebilen enzim olarak tanımlandı ve daha sonra prolinden sonra kesen enzim olarak adlandırıldı. Beyinden yüksek saflıkta elde edilen bir enzim, peptidil prolilamino asit ve peptidil prolil-peptid bağı

hidrolizlediği için prolinden sonra kesen enzime benzer spesifiklikte özellik göstermektedir. Fakat imino grubu taşıyan prolin içeren substratlara karşı inaktif olduğu için daha sonra enzim terminolojisi tarafından prolil endopeptidaz olarak adlandırıldı. 1992 yılında enzimin özel karakteristiklerinden dolayı prolil oligopeptidaz olarak değiştirilmiştir (Polgar et al., 2002; Damian et al., 1997).

Prolil oligopeptidaz enzimi, memeli ve bakteriyel kaynaklar arasında geniş bir dağılım göstermektedir. Sadece mayalarda ve aktinomisetlerde prolil oligopeptidaz aktivitesi gözlenmemiştir (Venäläinen et al., 2004; Moriyama et al., 1988; Orłowski et al., 1979). Prolil oligopeptidaz enzimi membran bağlı formu tanımlanmış ve karakterize edilmiş olmasına rağmen çoğunlukla sitozolik olarak rapor edilmiştir (O'Leary and O'Connor, 1995; Tenorio-Laranga et al., 2008).

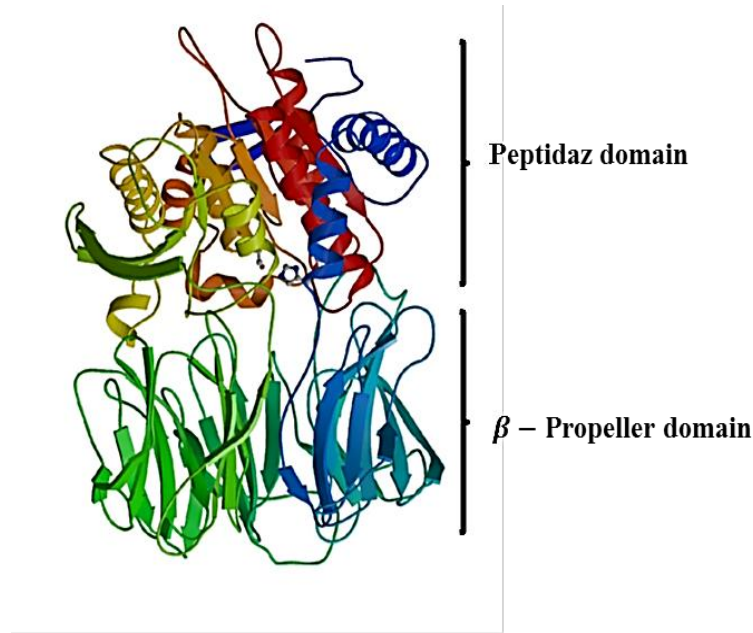
Prolil oligopeptidaz enzimi Kodia ve Walter tarafından 1976'da yaklaşık olarak 57 kDa molekül ağırlığında kuzu böbreğinden saflaştırılmıştır (Kodia and Walter, 1976). Ancak daha sonra yapılan çalışmalarda; molekül kütlesinin yaklaşık olarak 80 kDa ağırlığında olduğu belirlenmiştir. (Rawlings et al., 1991). İnsan Prolil oligopeptidaz enzimi 1994' de ilk kez insan lenfosit mRNA'sından sekanslandı. cDNA 2562 nükleotid uzunluğunda ve 710 amino asit uzunluğunda, ayrıca domuz beyninden elde edilen POP dizisi ile % 97 benzerlik gösterdiği bulunmuştur (Vanhoof, 1994).

1.3.4 Prolil oligopeptidaz yapısı

Prolil oligopeptidaz enzimi hakkında ilk yapısal bilgi domuz beyninin cDNA'sından elde edilmiştir (Rennex et al., 1991). Bu çalışmayla birlikte 710 rezidü dizisine sahip 80,751 Da molekül ağırlığına sahip tek bir protein zincirine sahip olduğu belirlenmiştir. Peptidaz domaini karboksil bölgesine lokalize olmuştur ve karakteristik α/β hidrolaz katlanmasını sergiler (Goosens et al, 1995). Aktif bölgede yeralan serin ve histidin domuz beyninden elde edilen enzimde ilk kez Ser⁵⁵⁴ (Rennex et al., 1991) ve His⁶⁸⁰ (Stone et al., 1991) olarak tanımlanmıştır. Katalitik rezidülerin düzeni, tripsin ve subtilizinin dizilerinin tersi şeklinde olmasına rağmen bazı lipaz dizilerine benzerlik göstermektedir. Lipazlar ve oligopeptidazların peptidaz domaini arasında yapısal ilişki göstermektedir.

Lipazların ve oligopeptidazların dizileri kıyaslandığında katalitik triadın üçüncü üyesi olarak Asp⁶⁴¹ tanımlanmıştır. Goosens ve arkadaşları tarafından prolil oligopeptidaz, dipeptidil peptidaz IV ve açilaminoasıl peptidazın sekonder yapısının tahmini ve sekans karşılaştırma çalışmalarıyla üçüncü üye olarak Asp⁶⁴¹ tanımlanmıştır.

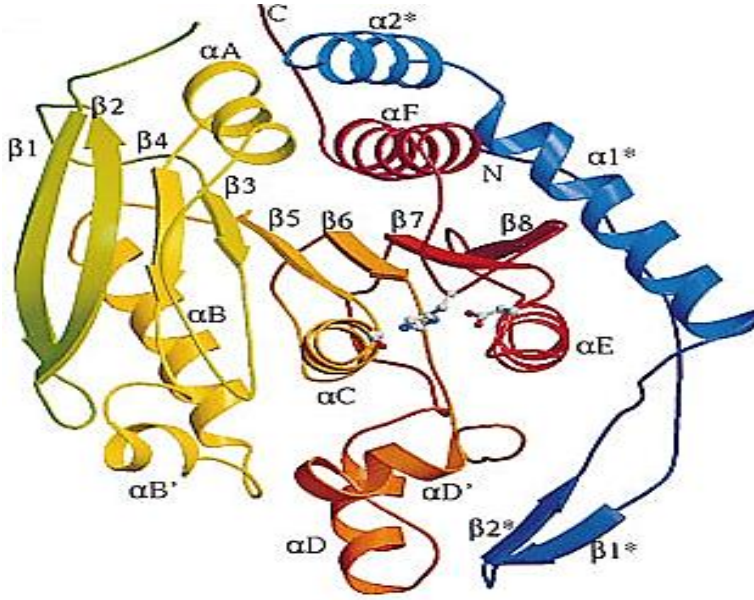
Domuz kasından elde edilen POP enziminin kristal yapısı; Fulop ve arkadaşları tarafından prolil oligopeptidaz enziminin inhibitörü olan Z-Pro-Prolinal ile oluşturduğu kompleksin X-ışınları kristallografisi yardımıyla 3 boyutlu yapısını açıklığa kavuşturmuş ve 1.4 Å rezolüsyonda belirlenmiştir (Rea et al, 2006). POP enzimi yaklaşık olarak 60 Å ağırlıklı ve 50 Å çapında silindirik şeklindedir. POP enzimi, bir peptidaz domaini ve 7 bıçaklı β -propeller domain içerir (Şekil 1.2).



Şekil 1.2 Prolil oligopeptidaz'ın üç boyutlu yapısı (Fulop et al., 1998).

Peptidaz veya katalitik domain 1-72 ve 428-710 rezidülerinden oluşur. Bu iki domain arasındaki rezidüler propeller domain içerir. N terminal kısmı iki kısa antiparalel β -tabaka ve iki uzun α -heliks içermektedir. Oldukça büyük olan C-terminal bölgesine de 23 hidrojen bağı, tuz köprüleri ve hidrofobik etkileşimler yoluyla bağlıdır (Şekil 1.3). Peptidaz domaini karakteristik α/β hidrolaz katlanmasını ve merkezi 8 zincirli beta tabakası içerir ve ikinci zincir hariç

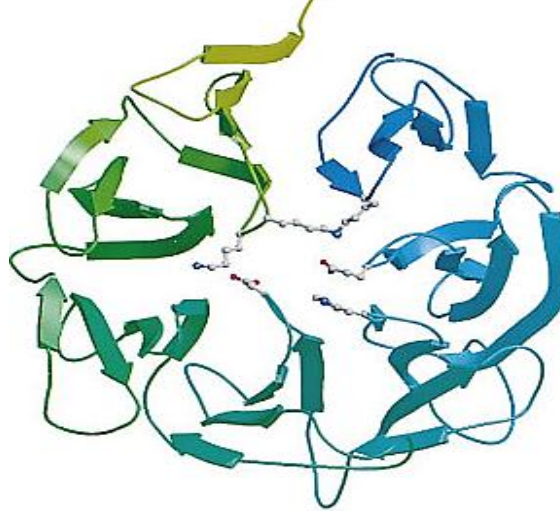
diğerleri paralel yönelmişlerdir (Fulop et al., 1998). Prolil oligopeptidaz enziminin hidrolaz domaini diğer serin proteazlara benzemektedir.



Şekil 1.3 α/β Hidrolaz domainin yapısı.

Prolil oligopeptidaz enziminin karakteristik yapısal elemanlarından biri olan β -propeller domaini, 73-427 rezidü içerir ve 4'ü antiparalel olan β -tabakanın yinelenmesi yedi kıvrımdan oluşur. β -tabakaları bükülmüştür ve merkezi oyuk çevresinde dairesel olarak düzenlenmişlerdir. Tipik olarak β -propeller domain halkanın her iki ucunda oluşan 4 antiparalel β -tabakanın dışında propeller domainin son bıçağının oluşumuyla kapalı halka oluşur (Gass et al., 2007). Bu kapalı halkaya açık çırçırt (open-velcro) topolojisi olarak adlandırılmıştır. Open-velcro topolojili benzersiz bir propeller domaine sahip hidrolaz domaini diğer serin proteazlara benzer. Open-velcro topolojisi merkez eksenini çevresinde 7 tane bıçağın dairesel düzenlenmesini içerir. 1. ve 7. bıçaklar birbirlerine bağlı değildirler (Şekil 1.4) (Kaushik et al., 2014). 4 bıçaklı β -propeller domainin yapısı, 1. ve 7. bıçaklar arasındaki disülfid bağları ile kararlıdır (Gass et al., 2007).

β -propeller, tuz köprüleri ve 27 tane hidrojen bağı ile birbirine bağlı iki ana polipeptid zincir yoluyla ve çoğunlukla hidrofobik etkileşimlerle protil oligopeptidazın katalitik domainine bağlı kalır (Szeltner et al., 2004).

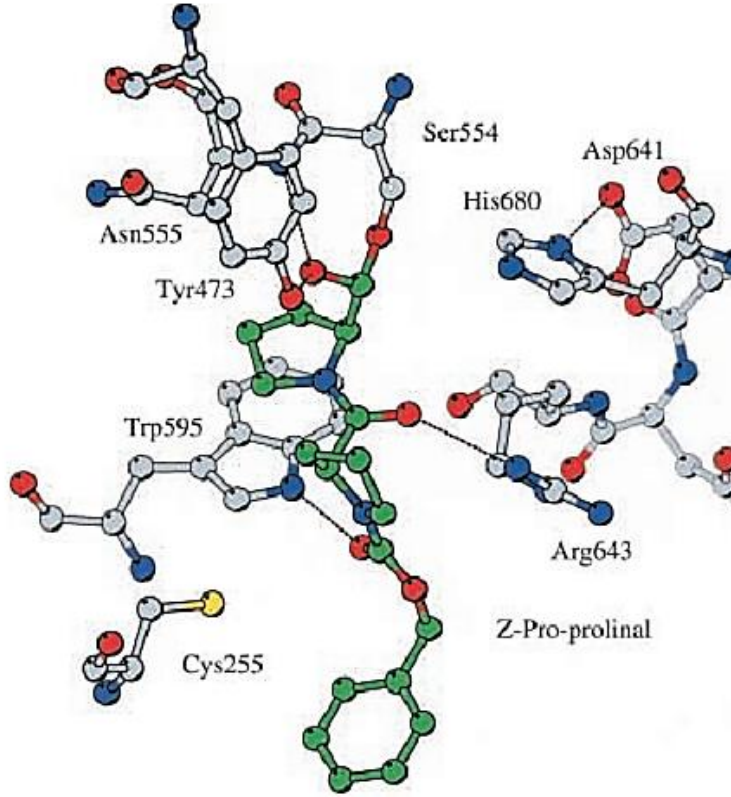


Şekil 1.4 β -Propeller domainin yapısı

1.3.5 Aktif bölgenin yapısı

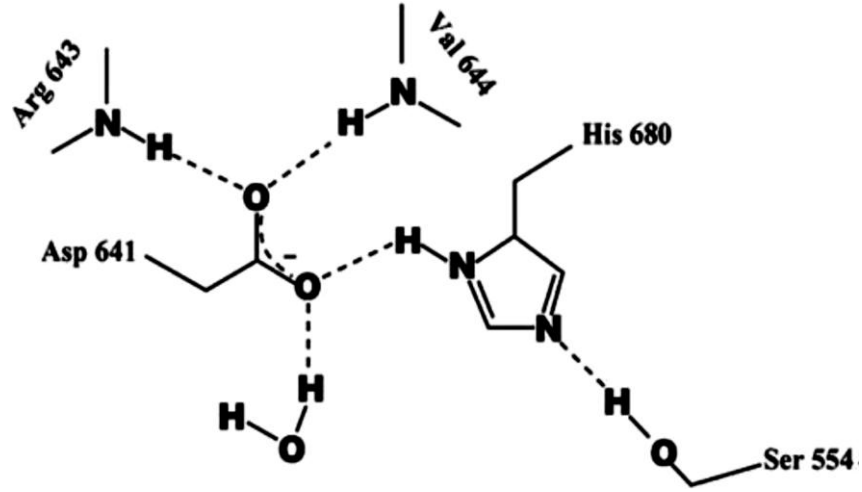
POP' un aktif bölgesi α/β hidrolaz domain ile 7 bıçaklı β -propeller domain arasındaki büyük bir oyuk içerisinde küçük bir cepte yer almaktadır. Katalitik domain tripsin kimotripsin gibi serin proteazlara benzerken β -propeller yapısı aktif bölge üzerinde sıkı bir silindir kapak şeklindedir (Tarragó et al., 2009). Peptidaz ve β -propeller domainlerin uyumlu hareketi, substrat enzimin aktif bölgesine girerken iki domainin ara yüzünde bir açıklığa neden olduğu gibi enzim fonksiyonu için de gereklidir. Ara yüzey açıklığının küçük boyutlarda olması aktif bölgeye girecek olan büyük peptid substratların girişini önlemektedir (Szeltner et al., 2004; Juhasz et al., 2005). Dolayısıyla propeller bıçakları kataliz sırasında bir geçit filtresi olarak görev yapar. Bu durum sadece küçük peptid substratlarının aktif bölgeye girişine izin verir (Tarragó et al., 2009). Bu yüzden POP substratlarının neden 30 amino asitten küçük olduğunu da açıklar (Rea et al., 2006). Aktif bölgede bulunan aminoasitler Ser, His, Asp, Arg, Asn, Tyr, Trp ve Cys'dir. Katalitik triad olarak kabul edilen Ser, Asp ve His'den oluşan 3'lü yapının katalitik bölgedeki dizilimleri; kimotripsin (His, Asp, Ser) ve subtilisin

ailelerinin (Asp, His, Ser) içinde bulunduğu klasik serin proteazlardan farklıdır (Kaszuba et al., 2012).



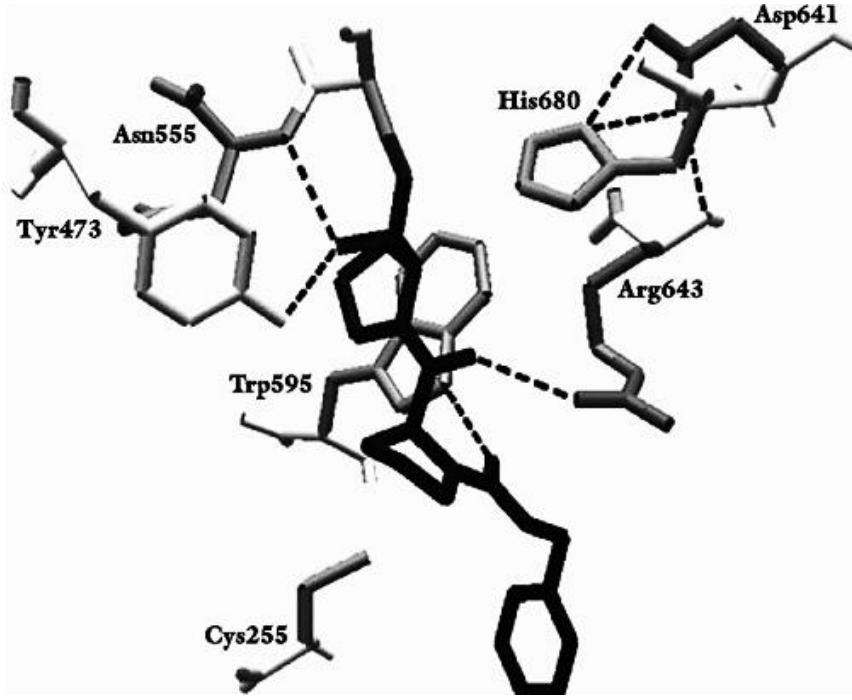
Şekil 1.5 Prolil oligopeptidaz'ın aktif bölgesinin yapısı (Fulop;1998).

Serin 554 heliks C ve 5. katlanma arasındaki çok keskin bir dönüşün uç noktasında yer alır. Böyle bir düzenlenme nükleofil dirsek olarak tanımlanır (Ollis et al., 1992). Sterik engelden kaçınmak için bazı küçük rezidüler katalitik serin çevresinde (Gly552, Gly553, Gly558 ve Gly 559) karşı karşıya gelir. Serin 554'ün ana zincir konformasyonu enerjetik olarak elverişsizdir. Serin'in (OH) hidroksil grubu bir taraftan His (680) diğer taraftan substrata maruz kalır. His 680, lop'un tam ortasında yer alır. Asp 641'in oksijen atomu His 680'in imidazol halkasının düzleminde yer alır. Bu durum hidrojen bağı oluşumu için ideal bir pozisyon sağlar (Şekil 1.6). Nükleer manyetik rezonans çalışmaları gösterir ki; Asp 641 ve His 680 arasındaki hidrojen bağı kimotripsin ve tripsinden daha zayıftır. Asp641'in karboksilatın diğer oksijen atomu iki ana zincirde yer alan NH-grupları (Arg643, Val644) ile koordine edilir. Katalitik triad'ın (üçlü'nün) üyelerinin geometrisi ve lokalizasyonu diğer α/β hidrolazlarınkine çok benzerdir.



Şekil 1.6 Katalitik triad'ın şematik görünümü (Szeltner et al., 2008).

Enzime peptidin ana zincirinin bağlanması prolil oligopeptidaz ve klasik serin peptidazlardan farklıdır. Tripsin ve subtilizinde substrat ana zincirinin NH grupları ile antiparallel β -tabakalar oluştururken ana zincir NH-grubu içermeyen prolin içeren substrat ile bu mümkün değildir. Klasik peptidazlarda yeralan S1-P1 hidrojen bağının yerine S2-P2 prolil oligopeptidazlarda hidrojen bağı önemlidir. Hidrojen bağı, Arg643'ün guanidin grubu ve P2 rezidü'nün karbonil oksijeni arasında oluşur. Hidrojen bağı oluşumu bir oktapeptid ve ürün tipi inhibitor olan Z-Pro-prolinal ile oluşan kompleks ile gerçekleşir (Şekil 1.7) (Polgar, 2002).



Şekil 1.7 Aktif bölgesine kovalent bağlı Z-Pro-prolinal (Szeltner, 2008).

1.3.6 Gen yapısı

POP geni; fare beyni (Ishino et al., 1998), domuz beyni (Rennex et al., 1991), sığır beyni (Yoshimoto et al., 1997), insan T hücreleri (Shirasawa et al., 1994), insan lenfositleri (Vanhoof et al., 1994), *Flavobacterium meningosepticum* (Yoshimoto et al., 1991; Chevallier et al., 1992), *Sphingomonas capsulata* (Kabashima et al., 1998) ve *Pyrococcus Furiosus* (Robinson et al., 1995) içeren birçok kaynaklardan klonlanmıştır.

POP-Pig	:	MLSFQYPDVYRDETAIQDYHGKVCDDPYAWLEDPDSEQTAKAFVEAQNKITVPFLEQCP	IRGLYKERMTELYDYPKYSCHF	:	80	
POP-Human	:	MLSFQYPDVYRDETAIQDYHGKVCDDPYAWLEDPDSEQTAKAFVEAQNKITVPFLEQCP	IRGLYKERMTELYDYPKYSCHF	:	80	
POP-Rat	:	MLSFQYPDVYRDETSVQDYHGKVCDDPYAWLEDPDSEQTAKAFVEAQNKITVPFLEQCP	IRGLYKERMTELYDYPKYSCHF	:	80	
POP-Mouse	:	MLSFQYPDVYRDETSVQDYHGKVCDDPYAWLEDPDSEQTAKAFVEAQNKITVPFLEQCP	IRGLYKERMTELYDYPKYSCHF	:	80	
POP-Pig	:	KKGKRYFFYNTGLQNRVLYVQDSLEGEARVFLDPN	ILSDDGTVALRGYAFSEDGEYFAYGLSASGSDWVTIKFMKVDG	:	160	
POP-Human	:	KKGKRYFFYNTGLQNRVLYVQDSLEGEARVFLDPN	ILSDDGTVALRGYAFSEDGEYFAYGLSASGSDWVTIKFMKVDG	:	160	
POP-Rat	:	KKGKRYFFYNTGLQNRVLYVQDSLEGEARVFLDPN	ILSDDGTVALRGYAFSEDGEYFAYGLSASGSDWVTIKFMKVDG	:	160	
POP-Mouse	:	KKGKRYFFYNTGLQNRVLYVQDSLEGEARVFLDPN	ILSDDGTVALRGYAFSEDGEYFAYGLSASGSDWVTIKFMKVDG	:	160	
POP-Pig	:	AKELPDVLERVKFSCMAWTHDGKGMFYNA	YPQDQKSDGTETSTNLHQKLYYHVLGTDQSEDI	LCAEFPDEPKWMGGAE	: 240	
POP-Human	:	AKELPDVLERVKFSCMAWTHDGKGMFYNA	YPQDQKSDGTETSTNLHQKLYYHVLGTDQSEDI	LCAEFPDEPKWMGGAE	: 240	
POP-Rat	:	AKELPDVLERVKFSCMAWTHDGKGMFYNS	YPQDQKSDGTETSTNLHQKLYYHVLGTDQSEDI	LCAEFPDEPKWMGGAE	: 240	
POP-Mouse	:	AKELPDVLERVKFSCMAWTHDGKGMFYNS	YPQDQKSDGTETSTNLHQKLYYHVLGTDQSEDI	LCAEFPDEPKWMGGAE	: 240	
POP-Pig	:	SDDGRYVLLSIREGCDPVNRLWYCDLQQESNG	ITGILKWKVLIDNFEGEYDYVTNEGTVTFKTNRHS	PNRYRLINIDFTD	: 320	
POP-Human	:	SDDGRYVLLSIREGCDPVNRLWYCDLQQESNG	ITGILKWKVLIDNFEGEYDYVTNEGTVTFKTNRHS	PNRYRLINIDFTD	: 320	
POP-Rat	:	SDDGRYVLLSIREGCDPVNRLWYCDLQQESNG	ITGILKWKVLIDNFEGEYDYVTNEGTVTFKTNRHS	PNRYRLINIDFTD	: 320	
POP-Mouse	:	SDDGRYVLLSIREGCDPVNRLWYCDLQQESNG	ITGILKWKVLIDNFEGEYDYVTNEGTVTFKTNRHS	PNRYRLINIDFTD	: 320	
POP-Pig	:	FEESKWKVLVPEHEKDVLEWVACVRSN	FLVLCYLHDKVKNILQLHDLTGALLKTFPLDVG	SVVGYSGQKKDTEIFYQFTS	: 400	
POP-Human	:	FEESKWKVLVPEHEKDVLEWVACVRSN	FLVLCYLHDKVKNILQLHDLTGALLKTFPLDVG	SVVGYSGQKKDTEIFYQFTS	: 400	
POP-Rat	:	FEESKWKVLVPEHEKDVLEWVACVRSN	FLVLCYLHDKVKNILQLHDLTGALLKTFPLDVG	SVVGYSGQKKDTEIFYQFTS	: 400	
POP-Mouse	:	FEESKWKVLVPEHEKDVLEWVACVRSN	FLVLCYLHDKVKNILQLHDLTGALLKTFPLDVG	SVVGYSGQKKDTEIFYQFTS	: 400	
POP-Pig	:	FLSPGIYHCDLTKEELEPRVFRVETVKGID	ASDYQTVQIFYP	SKDGT	KIPMFIVHKKGIKLDGSHPAFLYGYGGFNISI : 480	
POP-Human	:	FLSPGIYHCDLTKEELEPRVFRVETVKGID	ASDYQTVQIFYP	SKDGT	KIPMFIVHKKGIKLDGSHPAFLYGYGGFNISI : 480	
POP-Rat	:	FLSPGIYHCDLTKEELEPRVFRVETVKGID	ASDYQTVQIFYP	SKDGT	KIPMFIVHKKGIKLDGSHPAFLYGYGGFNISI : 480	
POP-Mouse	:	FLSPGIYHCDLTKEELEPRVFRVETVKGID	ASDYQTVQIFYP	SKDGT	KIPMFIVHKKGIKLDGSHPAFLYGYGGFNISI : 480	
POP-Pig	:	TPNYSVSRLLIFVRHMGGLAVANIRGGGEY	GETWHKGGILANKQNC	FDQCAAEYLIKEGYT	SPKRLTINGGSNGGLLV : 560	
POP-Human	:	TPNYSVSRLLIFVRHMGGLAVANIRGGGEY	GETWHKGGILANKQNC	FDQCAAEYLIKEGYT	SPKRLTINGGSNGGLLV : 560	
POP-Rat	:	TPNYSVSRLLIFVRHMGGLAVANIRGGGEY	GETWHKGGILANKQNC	FDQCAAEYLIKEGYT	SPKRLTINGGSNGGLLV : 560	
POP-Mouse	:	TPNYSVSRLLIFVRHMGGLAVANIRGGGEY	GETWHKGGILANKQNC	FDQCAAEYLIKEGYT	SPKRLTINGGSNGGLLV : 560	
POP-Pig	:	ATCANQRPDLFGCVIAQVGVM	DMLKFKHYTIGHAWTTDYG	CSDSKQHF	EWLKYSP	PLHNVLKPEADDIQYPSMLLLTADH : 640
POP-Human	:	AACANQRPDLFGCVIAQVGVM	DMLKFKHYTIGHAWTTDYG	CSDSKQHF	EWLKYSP	PLHNVLKPEADDIQYPSMLLLTADH : 640
POP-Rat	:	AACANQRPDLFGCVIAQVGVM	DMLKFKHYTIGHAWTTDYG	CSDSKQHF	EWLKYSP	PLHNVLKPEADDIQYPSMLLLTADH : 640
POP-Mouse	:	AACANQRPDLFGCVIAQVGVM	DMLKFKHYTIGHAWTTDYG	CSDSKQHF	EWLKYSP	PLHNVLKPEADDIQYPSMLLLTADH : 640
POP-Pig	:	DDRVVPLHSLKFIATLQYIVGRSR	RQSNPLLIHVDTKAGHGAGKPTAKVIE	EVSDMFAFIARCLNIDWIP	: 710	
POP-Human	:	DDRVVPLHSLKFIATLQYIVGRSR	RQSNPLLIHVDTKAGHGAGKPTAKVIE	EVSDMFAFIARCLNIDWIP	: 710	
POP-Rat	:	DDRVVPLHSLKFIATLQYIVGRSR	RQSNPLLIHVDTKAGHGAGKPTAKVIE	EVSDMFAFIARCLNIDWIP	: 710	
POP-Mouse	:	DDRVVPLHSLKFIATLQYIVGRSR	RQSNPLLIHVDTKAGHGAGKPTAKVIE	EVSDMFAFIARCLNIDWIP	: 710	

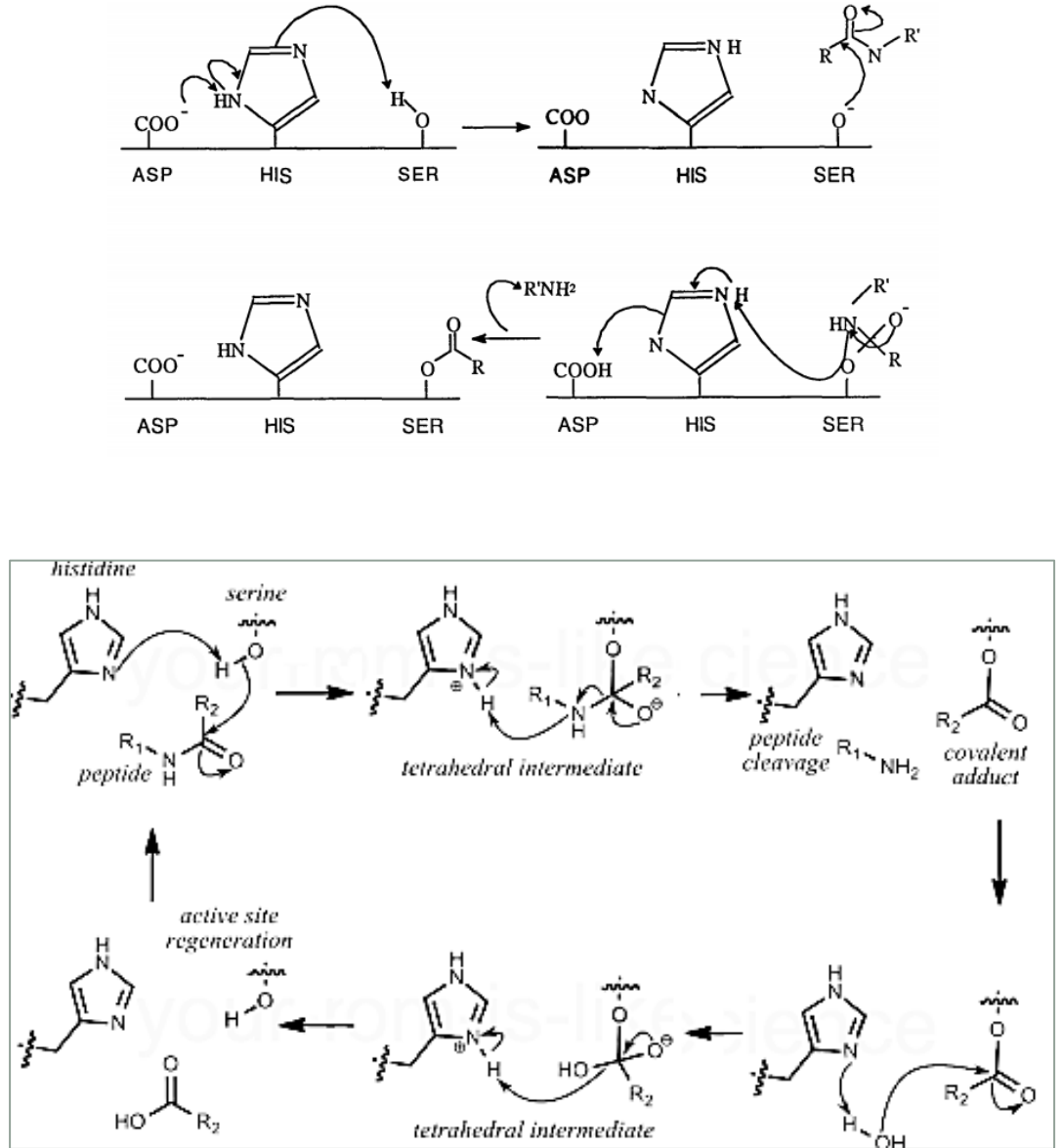
Şekil 1.8 İnsan, fare, domuz, fare ve sıçan POP dizilerinin karşılaştırılması.

İnsan, inek ve domuz POP enzimi 710 amino asit içerir ve yaklaşık olarak 80 kDa molekül kütlesine sahiptir. Tam POP geni yaklaşık olarak 92 kilobaz büyüklüğünde ve 15 ekzon içerir. Enzimin katalitik domaini ekzon 1-3 ve ekzon 10-15 tarafından kodlanır ve propeller domain ekzon 3-10 tarafından kodlanır. Katalitik üçlü rezidülerinin ikisinin kodlama bölgeleri ekzon 15'e lokalize olur ve aktif bölgede yer alan serin rezidüleri ekzon 13'de kodlanmaktadır. Sadece insanlardaki POP geni 15 ekzon içerir ve kromozom 6q22'ye lokalize olmuştur. POP; memeliler arasında oldukça yüksek korunan bir enzimdir. İnsan, domuz ve fare POP geni arasındaki amino asit homolojisi %96'dır (İshino et al., 1998).

İnsan, fare, domuz ve sığır POP gen dizilerinin karşılaştırılması şekil 1.8’ de verilmiştir.

1.3.7 POP’un kataliz mekanizması

Enzim kataliz mekanizması; birkaç ara ürünün olduğu sıralı bir mekanizma biçimindedir. Peptidin yıkımı ping-pong katalizi şeklinde yani bir substratın bağlanması (peptid) ile bir ürünün (peptidin N terminali) salınması, diğer bir substratın bağlanması (su) ile diğer bir ürünün (peptidin C terminali) salınması şeklindedir. Substrat ile ilk olarak etkileşime giren katalik triad’ta yer alan serin rezidüsüdür. Serin rezidüsünün -OH grubu substratın peptid bağındaki karbonil karbonuna nükleofilik atak yapar. Histidin azotu üzerindeki bir çift elektron serin rezidüsünün -OH grubu üzerindeki hidrojen atomunu alır. Karbonil oksijenin çift bağından bir çift elektron oksijene taşınır ve tetrahedral ara ürün oluşur. Negatif yüklü tetrahedral ara ürün oksianyon boşluğunda hidrojen bağlarıyla kararlı halde tutulur. Tetrahedral ara ürün açıl-enzim ara ürüne parçalanır. Peptid bağı kırılır ve substratın N-terminal kısmı uzaklaştırılır. Kalan substrat enzim ile geçici olarak kovalent bağlı kalır. Bir su molekülü girer ve enzim-substrat ester bağına hücum eder. Suyun hidrojenlerinden birinin His’e geçişiyle tekrar tetrahedral ara ürün oluşur. Tetrahedral ara ürün substratı serbest bırakmak için parçalanır. Serin histidinden hidrojenini tekrar geri alır. Substratın C terminal kısmı aktif bölgenin dışına gönderilir ve enzim başlangıçtaki haline yeniden düzenlenir (Şekil 1.9) (Polgar, 2005; Ekici et al., 2008).



Şekil 1.9 Serin proteazların kataliz mekanizması (Horton, 2006).

1.3.8 POP'un dağılımı ve lokalizasyonu

Prolil oligopeptidaz enzimi bakteri, bitki, arkea ve insan gibi canlı türlerinde geniş bir dağılım gösterir (Rawlings et al., 2004). POP cDNA'sı hayvanları, bitkileri, protozoaları ve bakterileri içeren organizmaların geniş bir çeşitliliğinden sekanslanmıştır (Yoshimoto et al., 1988; Rennex et al., 1991; Yoshimoto et al., 1991; Chevallier et al., 1992; Shirasawa et al., 1994; Vanhoof et al., 1994; Robinson et al., 1995; Yoshimoto et al., 1997; Ishino et al., 1998; Kabashima et al., 1998). Mayalarda homolog gen bulunmamıştır. Memeli POP enzimi ile oldukça fazla çalışılmıştır. Ayrıca bakterilerde de POP enzimi ile ilgili çalışmalara odaklanılmıştır.

Memeli ve sıçanların dokularında POP enzim aktivitesi farklı organlarda geniş bir şekilde lokalize olmuştur (Kato et al., 1980; Daly et al., 1985; Fuse et al., 1990; Goossens et al., 1996; Agirregoitia et al., 2005) ve en yüksek aktivite beyinde saptanmıştır (Kato et al., 1980; Fuse et al., 1990; Irazusta et al., 2002; Agirregoitia et al., 2005). Karaciğer, kalp, böbrek, akciğer ve dalak'da 3 kat daha az aktivite gözlenmiştir (Yoshimoto et al., 1979; Taylor et al., 1980). Tavşan dokularındaki aktivite dağılımı sıçanlarınkine benzerlik göstermektedir (Orlowski et al., 1979).

İnsanlarda vücut sıvılarından (kan, sperm sıvısı, prostat sıvısı) ölçülen POP aktivitesi dokularda ölçülen aktiviteden daha düşük olduğu belirlenmiştir. Çoğalan hücrelerde artan aktivite sergilenirken fibroblastlarda maksimum olduğu gözlenmiştir. Epitel hücrelerde, renal korteks, testis, kalp ve akciğerlerde sırasıyla azalan bir aktivite gözlenmiştir. POP proteini ve POP'u kodlayan mRNA sıçanların ve farelerin vücudunda geniş bir dağılım göstermiştir (Bellemere et al., 2004; Myohanen et al., 2007; Myohanen et al., 2008a; Myohanen et al., 2008b), fakat Prep proteinin hücre tiplerinde farklı biçimde lokalize olmuştur. POP sitozolik bir enzimdir (Dresdner et al., 1982; Myohanen et al., 2008a). Ama POP'un membran bağlı formu endoplazmik retikulumun ve golgi aparatının membranında ve bir miktar plazma membranında bulunmuştur (O'Leary and O'Connor, 1995; Myohanen et al., 2008a; Tenorio-Laranga et al., 2008). Prolil oligopeptidaz enzimi sitozolik bir enzim olmasına rağmen ekstraselüler alanda da bulunan inaktif nöropeptid olarak bilinir. Prolil oligopeptidaz enziminin sekresyon sinyali yoktur ve transmembran bölgesi içermez. POP enzimi sitozolde bulunur ve sadece U-343 hücrelerin çözünmez fraksiyonunda iz miktarda enzim aktivitesi belirlenmiştir. Endojen POP; sıçan primer hücrelerinde ve araştırılan tüm insan hücre hatlarında perinükleer alanda oldukça fazla bulunmuştur. Birçok durumda lifsi, hücre iskeleti benzeri dağılımlar gözlenmiştir. POP, maya iki hibrit çalışmalarında tubulinin bağlanma partneri olarak ispatlanmıştır. POP'un benzer intraselüler dağılımı, insan beyninin bölümlerinde ve farenin nöronlarında gözlenmiştir. POP enziminin peptid sekresyonunu ve aksonal transportu içerdiği öne sürülmüştür (Myohanen et al., 2008a).

1.4 Prolil Oligopeptidaz Enziminin Fiziksel Özellikleri

1.4.1 Enzim aktivitesine pH'nın etkisi

Enzim aktivitesini etkileyen parametrelerden biri de pH'dır. pH'daki değişim enzim yapısında yer alan iyonik ve hidrojen bağlarının kırılmasına sebep olur. Bu durum enzimin üç boyutlu yapısını da değiştirir. Üç boyutlu yapının değişmesiyle substratın bağlanacağı aktif merkezin yapısında değişeceğinden enzim aktivitesi pH değişiminden etkilenir.

Serin proteazlar alkali proteaz olmaları nedeni ile genelde, alkali veya nötral pH'da optimum aktiviteye sahiptirler (Grzywnowicz and Labarzewski, 1994; Cunningham and O'Connor, 1997). Farklı tür ve kaynaklarda yapılan çalışmalarda enziminin optimum pH'sının asidik ve alkali bölgelerde olduğu belirtilmiştir (Çizelge 1.1).

1.4.2 Enzim aktivitesine sıcaklığın etkisi

Enzim katalizli reaksiyonun hız, sıcaklıktaki artışa paralel olarak artar. Sıcaklıktaki 10 °C'lik yükseliş birçok enzimin aktivitesinde % 50 ile % 100 oranında artışa sebep olmaktadır. Reaksiyon sıcaklığındaki 1-2 derece gibi küçük değişimlerin ise, aktiviteye yansması % 10-20 oranında değişim olarak gerçekleşmektedir. Ancak enzimler protein yapısında oldukları için belirli sıcaklığın üzerinde denatürasyona uğrayarak hızlı bir şekilde aktivitelerini kaybetmektedirler. Bu yüzden enzim çalışmalarında optimum sıcaklık olarak tanımlanan enzimin maksimum aktivite gösterdiği bir sıcaklık çalışma sıcaklığı olarak seçilir. Farklı tür ve kaynaklarda POP enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalarda enzimin optimum sıcaklığının 37 – 45 °C arasında değiştiği bulunmuştur (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.1 POP'un farklı tür ve kaynaklardaki optimum pH değerleri

POP enzim kaynağı	Substrat	Optimum pH	Referanslar
Bakteri (<i>A.niger</i>)	Suc-GPLGP-MCA	3,7	Kubota, 2005
Bakteri (<i>A.oryzae</i>)	Z-Gly-Pro-pNA	4,0	Kang, 2014
Sıçan (Deri)	Suc-Gly-Pro-MCA	5,8	Kusuhara et al., 1993
Sıçan (Karaciğer)	Suc-Gly-Pro-MCA	5,9	Yamakawa et al., 1986
Domuz (Kas)	Suc-Ala-Pro-Ala-NH-Mec Suc-Gly-Pro-NH-Mec	6,2	Moriyama et al., 1988
Domuz (Karaciğer) Bakteri (<i>T.denticola</i>)	Suc-Gly-Pro-MCA Z-Gly-Pro-pNA	6,5	Moriyama and Sasaki,1983 Mäkinen et al., 1994
İnsan (Plasenta)	Suc-Gly-Pro-MCA	6,7	Mizutani et al., 1984
İnsan (Beyin) Mantar(<i>L. cinerascens</i>)	Z-Gly-Pro-pNA Z-Gly-Pro-βNA	6,8	Kalwant and Porter ,1991 Yoshimoto et al., 1988
Sığır (Böbrek)	Z-Gly-Pro-2-NNap	6,9	Tsuru, 1988
Kuzu (Beyin) Bakteri (<i>F.meningosepticum</i>) Sığır (Kas) Bakteri(<i>Thermococcus</i> sp. NA1.) Ascidian <i>H. roretzi</i> sperm	Z-Gly-Pro-2-NNap Z-Gly-Pro-2-NNap Z-Gly-Pro-2-NNap Suc-Ala-Pro-pNA -	7,0	Yoshimoto et al., 1981 Yoshimoto et al., 1980 Tsuru. 1988 Lee et.al., 2007 Yokosawa et al., 1983
Sığır (karaciğer)	Z-Gly-Pro-2-NNap	7,1	Tsuru, 1988
Sığır (Testis)	Z-Gly-Pro-2-NNap	7,2	Tsuru, 1988
Havuç	Z-Gly-Pro-βNA	7,3	Yoshimoto et al., 1987a
Domuz (Karaciğer) Sığır (Pituitary)	Suc-triAla-pNA -	7,4	Moriyama and Sasaki, 1983 Knisatschek et al.,1979

Çizelge 1.1 (Devam) POP'un farklı tür ve kaynaklardaki optimum pH değerleri.

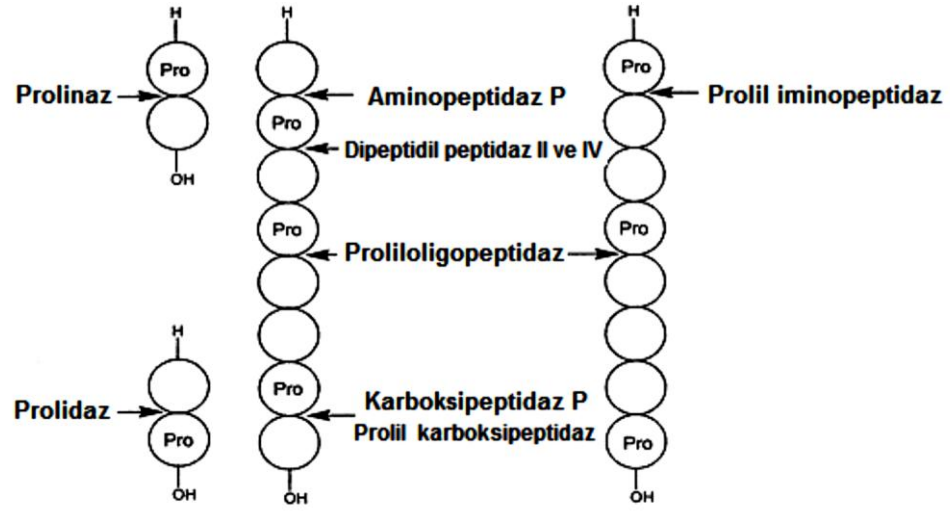
POP enzim kaynağı	Substrat	Optimum pH	Referanslar
Sığır (Beyin) Sığır(Lens) Bakteri(<i>P.furiosos</i>) Bakteri (<i>Xanthomonas sp</i>) Bakteri (<i>A. bispoms</i>) Kara sinek	Z-Gly-Pro-2-NNap Z-Gly-Pro-2-NNap Z-Gly-Pro-pNA Z-Gly-Pro-pNA Z-Gly-Pro-βNA Suc-Gly-Pro-MCA	7,5	Yoshimoto et al., 1983 Sharma et al., 1994 Harwood and Schreier, 2001 Szwajcer-Dey et al., 1992 Sattar et al., 1990 Ohtsuki et al.,1994
Siçan (Beyin) Ringa balık(Testis)	Z-Ala-Pro- βNA Suc-Gly-Pro-MCA	7,0-8,0	Andrews et al., 1982 Yoshida et al., 1999
Domuz (Böbrek)	Z-Gly-Pro-pNA	7,2-7,5	Hauzer et al., 1982
Kuzu (Böbrek)	Z-Gly-Pro-Leu-Gly	7,5-8,0	Koida et al., 1976
Bakteri (<i>A.hydrophilia</i>) Bakteri (<i>Pseudomonas sp</i>)	Z-Gly-Pro-2-NNap Z-Ala-Ala-Pro-pNA	8,0	Kanatani et al., 1993 Oyama et al., 1997
Domuz (Böbrek)	Z-Gly-Pro-βNA	7,8-8,0	Hauzer et al., 1982
Sığır (Serum)	Z-Gly-Pro-NH-Mec	8,0-8,5	Cunningham, 1998
Sığır (Serum)	Z-Gly-Pro-NH-Mec	8,0-8,5	Cunningham, 1998
Bakteri (<i>H. halobium S9</i>)	Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA	8,7	Capiralla et al., 2002
Süne	Z-Gly-Pro-pNA	8,0-10,0	Darkoh et al., 2010

Çizelge 1.2 POP'un farklı tür ve kaynaklardaki optimum sıcaklık değerleri.

POP enzim kaynağı	Substrat	Optimum °C	Referanslar
Süne	Z-Gly-Pro-pNA	20-35	Darkoh et al., 2010
Bakteri (<i>A. oryzae</i>)	Z-Gly-Pro-pNA	30	Kang, 2014
Bakteri (<i>A. hydrophilia</i>)	Z-Gly-Pro-2-NNap		Kanatani et al., 1993
Sazan (İskelet kası)	Suc-Gly-Pro-MCA	35	Wang et al., 2012
İnsan (Beyin)	Z-Gly-Pro-pNA	37	Kalwant and Porter, 1991
Mantar	Z-Gly-Pro-βNA		Yoshimoto et al., 1988
Domuz (Karaciğer)	Suc-Gly-Pro-MCA		Moriyama and Sasaki, 1983
Havuç	Z-Gly-Pro-βNA		Yoshimoto et al., 1987a
Sığır (Serum)	Z-Gly-Pro-NH-Mec		Cunningham and O'Connor, 1998
Mantar (<i>C. clastophylla</i>)	Z-Gly-Pro-pNA		Chen et al., 2012
Sığır (Beyin)	Z-Gly-Pro-2-NNap	40	Yoshimoto et al., 1983
Bakteri (<i>F. meningosepticum</i>)	Z-Gly-Pro-2-NNap		Yoshimoto et al., 1980
Bakteri (<i>H. halobium</i> S9)	Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA		Capiralla et al., 2002
Bakteri (<i>A. niger</i>)	Suc-GPLGP-MCA	42	Kubota, 2005
Bakteri (<i>S. capsulate</i>)	Z-Gly-Pro-pNA	43	Kabashima et al., 1998
Kuzu (Beyin)	Z-Gly-Pro-2-NNap	45	Yoshimoto et al., 1981
Bakteri (<i>Pseudomonas</i> sp)	Z-Ala-Ala-Pro-pNA		Oyama et al., 1997
Kuzu (Böbrek)	Z-Gly-Pro-Leu-Gly	47	Koida et al., 1976
Bakteri (<i>Thermococcus</i> sp. NA1.)	Suc-Ala-Pro-pNA	80	Lee et al., 2007
Bakteri (<i>P. furiosus</i>)	Z-Gly-Pro-pNA	85-90	Harwood and Schreier, 2001

1.4.3 Substrat spesifikliği

Birçok biyolojik aktif peptid yapısında prolin amino asidi içerir. Peptid yapısında prolin rezidüsünün varlığı, prolin amino asidinin sahip olduğu pirolidin halkası sayesinde peptidi birçok proteolitik enzimin hidrolizine karşı koruma sağlamaktadır. Ancak bazı prolin spesifik enzimler [prolidaz (3.4.11.9), prolinaz (3.4.13.8), prolin iminopeptidaz (3.4.11.5), aminopeptidaz P (3.4.11.9), dipeptidil peptidaz II (3.4.14.2), dipeptidil peptidaz IV (3.4.14.5), karboksipeptidaz P (3.4.17.16), prolil karboksipeptidaz (3.4.16.2), prolil oligopeptidaz (3.4.21.26)] peptid yapısındaki prolinin pirolidin halkasını tanıyarak peptidin spesifik hidrolizini gerçekleştirirler (Şekil 1.10).



Şekil 1.10 Prolin spesifikliklerine göre peptidazlar.

Prolil oligopeptidaz enzimi oksitosini prolil-lösil bağını hidrolizlemesi sonucu insan uterin enzimi olarak kayıtlara geçmiştir. O yıllardan beri de; farklı prolil oligopeptidaz enzimleri prolin aminoasidinin karboksil bölgesinden yaklaşık olarak 30 aminoasit uzunluğundaki oligopeptidleri hidrolizleyebildiği gözlenmiştir (Çizelge 1.3). Bazı durumlarda oligopeptidlerin alanin ucundan da hidrolizleyebildiği ancak prolin ucundakine göre etkisinin daha az olduğu gözlenmiştir (Bär et al., 2006). POP enzimi iki prolil arasındaki bağı ve amino ucunun ilk iki bağını hidrolizleyemez (Wilk et al., 1983). X-Pro-Y dizisinde X, bir

peptid veya korunmuş bir aminoasit ve Y ise bir amid, peptid, amino asit, aromatik amin veya bir alkol olabilmektedir (Wilson et al., 2011).

Çizelge 1.3 Prolil oligopeptidaz enziminin hidrolizlediği peptidler.

Peptid	A A	Dizi ve kesim noktası	Referans
Substance P	11	Arg-Pro-Lys- Pro-Gln -Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met	O'Leary et al., 1996
Oksitosin	9	Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Lys- Pro-Leu -Gly-NH ₂	Walter et al.1971
Nörotensin	13	Pyr-Leu-Tyr-Glu-Asn-Lys- Pro-Arg -Arg- Pro-Tyr -Ile-Leu	Camargo et al., 1984
Anjiotensin I	11	Asp-Arg-Arg-Val-Tyr-Ile-His- Pro-Phe -His-Leu	Moriyama et al., 1988
Anjiotensin II	8	Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His- Pro-Phe	Moriyama et al., 1988
Anjiotensin III	7	Arg-Val-Tyr-Ile-His- Pro-Phe	Moriyama et al., 1988
Bradikinin	9	Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser- Pro-Phe -Arg	Tate, 1981
TRH	3	pGlu- His-Pro -NH ₂	O'Leary et al., 1996
Vasopressin	8	Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys- Pro-Arg -Gly	Moriyama et al., 1988
Tuftsın	4	Thr-Lys- Pro-Arg	Tate,1981
LHRH	10	Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg- Pro-Gly -NH ₂	Wilk et al., 1979
Arg-vasopressin	9	Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys- Pro-Arg -Gly-NH ₂	Walter, 1976
Melanotropin	13	Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH ₂	Tate, 1981

1.5 POP Enziminin Kinetik Özellikleri

1.5.1 POP aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi

Prolil oligopeptidaz enzimin aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi kromojenik veya florojenik substratlar kullanılarak birçok türde incelenmiştir. Bu sentetik substratların varlığında farklı türler için belirlenen K_m değerleri Çizelge 1.4' de verilmiştir.

Çizelge1.4 Farklı türlerdeki POP enziminin K_m değerleri.

Tür	Substrat	K_m (mM)	Referanslar
Bakteri (<i>P.s furious</i>)	Z-Gly-Pro-pNA Z-Ala-Pro-pNA	0,16 0,0194	Wallén et al., 2003 Harris et al., 2001
İnsan (Beyin)	Z-Gly-Pro-pNA	0,9	Kalwant et al., 1991
Sıçan (Deri)	Suc-Gly-Pro-MCA	0.7	Masahiro et al.,1992
Bakteri (<i>A. oryzae</i>)	Z-Gly-Pro-pNA	0,26	Kang, 2014
Sığır (Beyin)	Z-Gly-Pro-MCA	0,06	Yoshimoto et al.1983
Sazan (İskelet kası)	Suc-Gly-Pro-MCA	0,083	Wang et al., 2012
Bakteri (<i>Thermococcus sp. NA1.</i>)	Suc-Ala-Pro-pNA	0,4	Lee et.al., 2007
Sığır (Testis)	Z-Gly-Pro-pNA	0,23	Tsuru, 1988
Sığır (Beyin)	Z-Gly-Pro-pNA	0,29	Tsuru, 1988
Sığır (Karaciğer)	Z-Gly-Pro-pNA	0,24	Tsuru, 1988
Sığır (Böbrek)	Z-Gly-Pro-pNA	0,18	Tsuru, 1988
Sığır (Kas)	Z-Gly-Pro-pNA	0,24	Tsuru, 1988
Bakteri(<i>T. denticola ATCC 35405</i>)	Z-Gly-Pro-pNA	$8,3 \times 10^{-4}$	Mäkinen et al., 1994

1.5.2 POP'un izoelektrik noktası

POP'un farklı kaynaklardan yapılan izoelektrik noktası tayinlerinde enzimin pI değerinin 4,5-9,6 aralığında olduğu bulunmuştur (Çizelge 1.5).

1.5.3 POP'un molekül kütlesi

Prolil oligopeptidaz enziminin molekül kütlesinin belirlenmesinde elektroforetik (SDS-PAGE, nondenatüre-PAGE) ve kromatografik (Jel Filtrasyon) yöntemler kullanılmıştır. Enzimin molekül kütlesinin kaynağa ve molekül kütlesinin belirlenmesinde kullanılan yöntemle göre farklılık gösterdiği yapılan çalışmalarda görülmektedir (Çizelge 1.6). Birkaç çalışmada enzimin trimer ve dimer olduğu birçok çalışmada ise monomer olduğu vurgulanmaktadır. SDS-PAGE sonrası, nondenatüre-PAGE veya jel filtrasyon uygulamalarıyla belirlenen molekül kütle değerleri birlikte değerlendirildiğinde enzimin çoğunlukla monomer olduğu görülmektedir.

Çizelge 1.5 POP enziminin pI değerleri.

POP enzim kaynağı	pI	Referanslar
Sıçan (Beyin)	4,5	Andrews et al., 1982
İnsan (Plasenta)	4,75	Mizutani et al., 1984
İnsan (Beyin)		Kalwant and Porter, 1991
İnsan (Kan)	4,7-4,8	Pratt et al., 1989
Havuç (<i>D. carota</i>)	4,8	Yoshimoto et al., 1987a
Sığır (Beyin)		Yoshimoto et al., 1983
İnsan lenfosit		Goossens et al., 1995
Sığır(Lens)		Sharma et al., 1994
Bakteri (<i>Agaricus bispoms</i>)		Sattar et al., 1990
Kuzu (Böbrek)		Koida et al., 1976
Kuzu (Beyin)	4,9	Yoshimoto et al., 1981
Domuz (Beyin)		Schönlein et al., 1990
Tavşan (Beyin)		Oliveira et al., 1976
Kuzu (Böbrek)		Yoshimoto et al., 1981
Domuz (Karaciğer)		Moriyama, et al.,1988
Ascidian <i>Halocynthia roretzi</i> sperm	5,0	Yokosawa et al., 1983
Mantar (<i>C. clastophylla</i>)	5,2	Chen et al., 2012
Mantar (<i>L.cinerascens</i>)		Yoshimoto et al., 1988
Bakteri (<i>A.hydrophilia</i>)	5,5	Kanatani et al., 1993
Sazan(İskelet kas)	6,0	Wang et al., 2012
Bakteri (<i>Xanthomonas sp</i>)	6,2	Szwajcer-Dey et al., 1992
Bakteri (<i>F.meningosepticum</i>)	9,6	Yoshimoto et al., 1980

Çizelge 1.6 Farklı kaynaklardan saflaştırılan POP enziminin SDS-PAGE, Nondenatüre –PAGE ve Jel filtrasyon ile belirlenen molekül kütleleri ve alt birim sayıları.

POP enzim kaynağı	Molekül kütlesi(kDa)				
	SDS-PAGE	Nondenatüre-PAGE	Jel Filtrasyon	Alt birim	Referans
İnsan (Beyin)	79,6	85.6	-	monomer	Koida et al., 1976
Sıçan (Deri)	70	-	-	monomer	Masahiro et al., 1992
Bakteri (<i>F.meningosepticum</i>)	74	-	-	monomer	Yoshimoto et al., 1980
Bakteri (<i>A. oryzae</i>)	60	-	-	monomer	Kang, 2014
Bakteri (<i>A.hydrophilia</i>)	76,4	-	-	monomer	Kanatani et al., 1993
Sığır (Beyin)	87	-	-	monomer	O'Leary et al., 1996
Sazan (İskelet kası)	82	-	-	monomer	Wang et al., 2012
Mantar (<i>L. cinerascens</i>)	76	-	76	monomer	Yoshimoto et al., 1988
Domuz (Karaciğer)	74	-	72	monomer	Moriyama and Sasaki, 1983
Havuç	75	-	75	monomer	Yoshimoto et al., 1987a
Sığır (Serum)	69,7	-	-	monomer	Cunningham and O'Connor, 1998
Mantar (<i>C. clastophylla</i>)	84-60-24	-	-	trimer	Chen et al., 2012
Bakteri (<i>H. halobium</i> S9)	71	-	45	monomer	Capiralla et al., 2002
Bakteri (<i>S.s capsulate</i>)	75	-	67	monomer	Kabashima et al., 1998
Kuzu (Beyin)	74	-	77	monomer	Yoshimoto et al., 1981
Kuzu (Böbrek)	74	-	-	monomer	Koida et al., 1976
Bakteri (<i>Pseudomonas sp. KU-22</i>)	76	-	76	monomer	Oyama et al., 1997
Bakteri (<i>Thermococcus sp. NA1.</i>)	70,38	-	-	monomer	Lee et.al., 2007
Bakteri (<i>Xanthomonas sp</i>)	75	-	74	monomer	Szwajcer-Dey et al., 1992
Ringa balık (Testis)	79	65	63	monomer	Yoshida et al., 1999
Sığır (Testis)	-	-	76	monomer	Tsuru, 1988

Çizelge 1.6 (Devam) Farklı kaynaklardan saflaştırılan POP enziminin SDS-PAGE, Nondenatüre –PAGE ve Jel filtrasyon ile belirlenen molekül kütleleri ve alt birim sayıları.

	Molekül kütlesi(kDa)				
POP enzim kaynağı	SDS-PAGE	Nondenatüre-PAGE	Jel Filtrasyon	Alt birim	Referans
Sığır (Karaciğer)	76	--	--	monomer	Tsuru, 1988
Sığır (Kas)	76	-	-	monomer	Tsuru, 1988
Sığır (Böbrek)	76	-	-	monomer	Tsuru, 1988
Domuz (Beyin)	70	-	-	monomer	Schönlein, 1990
Sığır (Lens)	72	72	-	monomer	Sharma et al., 1994
Fare (<i>Hepatic granulomas</i>)	79	-	-	monomer	Nozaki et al., 1992
Tavşan (Beyin)	66	-	-	monomer	Orlowski et al., 1979
Domuz (Kas)	72	-	-	monomer	Moriyama et al., 1988
Sığır (Serum)	81	-	-	monomer	Buckley, 2001
Kuzu(Böbrek)	57	-	115	dimer	Koida, 1976
Mantar (<i>A. bisporus</i>)	68	-	-	monomer	Sattar et al., 1990
Kara sinek	80	-	-	monomer	Ohtsuki et al.,1994
Sıçan (Karaciğer)	68	-	59	monomer	Yamakawa et al., 1985

1.6 Kararlılık Testleri

Kararlılık testleri, enzim aktivitesinin zamana bağlı olarak değişen çevre koşullarında (pH, sıcaklık, çözen gibi) ne ölçüde korunduğunun belirlenmesi amacıyla yapılmaktadır.

1.6.1 Termal kararlılık

Sıcaklık değişiklikleriyle kinetik molekül hareketlerindeki artışla beraber biyokimyasal reaksiyonların hızında da bir artış görülmektedir. Ancak bu artış protein yapısında olan enzimlerin belirli sıcaklıkların üzerinde önce tersiyer sonra sekonder yapısının bozularak enzimin denatürasyona uğraması sebebiyle reaksiyon hızında keskin bir düşüş olarak gözlenmektedir.

Termal kararlılık, enzimin değişen sıcaklık ve bu sıcaklıklarda gerçekleştirilen ön inkübasyon sonrasında, standart koşullarda ölçülen enzim aktivitesine göre en fazla aktivitesinin korunduğu sıcaklık olarak belirlenir. Farklı tür ve kaynaklardan POP enziminin termal kararlılığının belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalarda bulunan değerler Çizelge1,7’de verilmiştir.

1.6.2 pH kararlılığı

pH kararlılığı testi, enzimin değişen pH’lar ve bu pH’larda gerçekleştirilen ön inkübasyon sonrasında, standart koşullarda ölçülen enzim aktivitesine göre hangi pH veya pH aralığında enzimin en fazla aktivitesinin korunduğunun belirlenmesi amacıyla yapılır. Farklı tür ve kaynaklardan POP enziminin pH kararlılığının belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalarda bulunan değerler Çizelge 1.8 ’de verilmiştir. Literatür verilerine göre enzimin asidik pH’larda kararsız iken, alkali pH’larda daha kararlı olduğu görülmektedir.

Çizelge 1.7 Prolil oligopeptidaz'ın termal kararlılığı.

POP enzim kaynağı	Sıcaklık °C	İnkübasyon süresi	Aktivite kaybı (%)	Referans
Sığır (Testis)	48	30 dakika	-	Tsuru , 1988
Sığır (Beyin)	47,5	30 dakika	50	Tsuru , 1988
Sığır Karaciğer)	46	30 dakika	-	Tsuru, 1988
Sığır (Kas)	48	30 dakika	-	Tsuru, 1988
Sığır (Böbrek)	47	30 dakika	-	Tsuru , 1988
Bakteri(<i>A. oryzae</i>)	55	30 dakika	20	Kang, 2014
Sazan (İskelet kası)	45	30 dakika	50	Wang et al., 2012
Bakteri(<i>A. oryzae</i>)	52	60 dakika	20	Kang, 2014
İnsan (Serum)	37	20 dakika	69	Heinis et al., 2004
Bakteri (<i>P. furiosus</i>)	65	1440 dakika	60	Harwood et al., 1997
İnsan(Lenfosit)	37	20 dakika	Kararlı	Goossens et al., 1995
Bakteri(<i>Thermococcus sp. NA1.</i>)	80	1380 dakika	20	Lee et.al., 2007
Havuç	43	30 dakika	50	Yoshimoto et al., 1987a
Bakteri (<i>F.meningosepticum</i>)	42	30 dakika	50	Yoshimoto et al., 1980
Sığır (Lens)	50	30 dakika	50	Swanson et al., 1984
Bakteri (<i>Pseudomonas sp</i>)	45	30 dakika	20	Oyama et al., 1997
İnsan (Beyin)	37	4 dakika	40	Kalwant and Porter, 1991
İnsan (Tükürük)	37	60 dakika	60	Buckley, 2001

Çizelge 1.8 Prolil oligopeptidaz'ın pH kararlılığı.

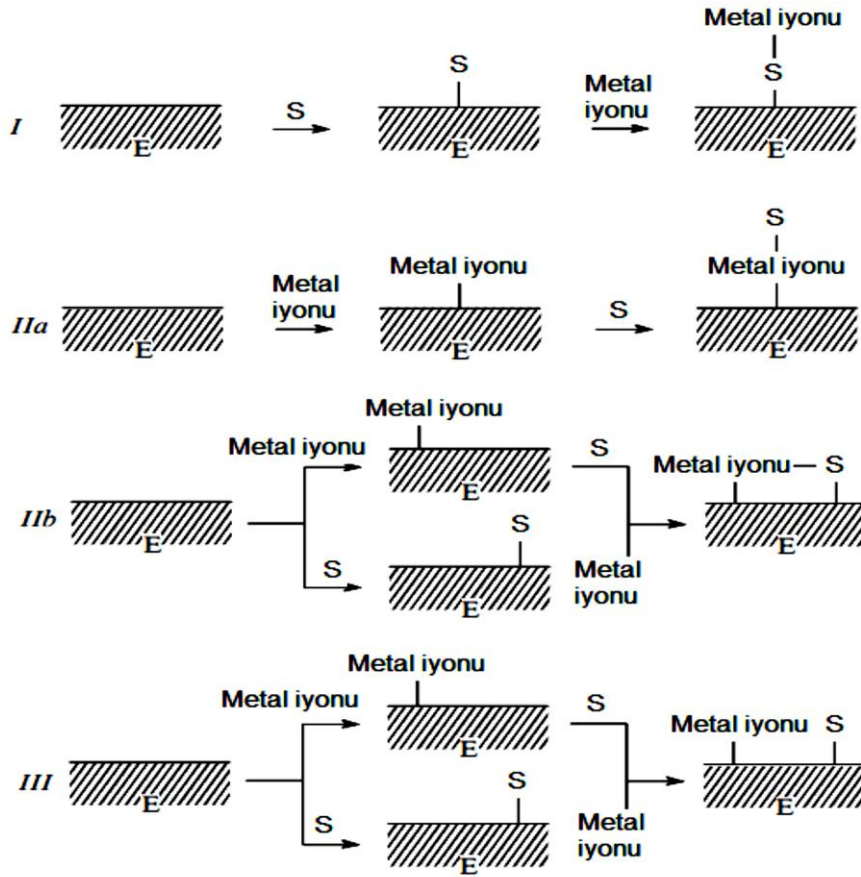
POP enzim kaynağı	pH Aralığı	Referans
Sığır (Testis)	5,0-9,0	Tsuru, 1988
Sığır (Beyin)	5,5-9,0	Tsuru, 1988
Sığır(Karaciğer)	5,5-9,5	Tsuru, 1988
Sığır (Kas)	5,5-9,0	Tsuru, 1988
Sığır (Böbrek)	5,5-9,0	Tsuru, 1988
Bakteri (<i>A. oryzae</i>)	3,0-5,0	Kang, 2014
Sazan(İskelet kası)	5,0-8,0	Wang et al., 2012
Bakteri (<i>Xanthomonas sp</i>)	6,0-8,5	Szwajcer-Dey et al., 1992
Sığır (Serum)	5,0-9,0	Cunnigham et al., 1996
Sıçan (Kas)	5,0-9,0	Daly et al., 1985
Domuz (Karaciğer)	6,0-7,0	Moriyama and Sasaki, 1983
Kuzu (Beyin)	5,5-9,0	Yoshimoto et al., 1981
Sığır (Balgam)	6,0-8,2	Knisatschek et al., 1979
Mantar (<i>Shahashimeji</i>)	5,75-7,4	Yoshimoto et al., 1988
Bakteri (<i>F. meningosepticum</i>)	5,0-9,0	Yoshimoto et al., 1980
<i>Agaricus bisporus</i>	5,0-9,0	Sattar et al., 1990
İnsan (Lenfosit)	6,0-9,0	Goossens et al., 1995
Bakteri (<i>H.halobium</i> S9)	Geniş pH aralığı	Capiralla et al., 2002
Bakteri (<i>Pseudomonas sp Ku-22</i>)	8,0-11,00	Oyama et al., 1997
Bakteri (<i>A. hydrophila</i>)	7,0-8,5	Kanatani et al., 1993
İnsan (Beyin)	5,5-9,5	Kalwant and Porter, 1991
Domuz (Kas)	6,0-üzeri	Moriyama et al., 1988
Kara sinek	7,0-8,5	Ohtsuki et al.,1994
Havuç	6,0-8,5	Yoshimoto et al., 1987a

1.7 POP Aktivitesi Üzerine Metal İyonlarının Etkisi

Metal iyonlarının enzimlerin katalitik mekanizmasına etkileri farklı şekillerde gerçekleşmektedir. Metalloenzimler; katalitik mekanizmasına kovalent olarak bağlanmış bir veya birkaç metal iyonunun varlığı ile karakterize edilirken,

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

Enzim ve metal iyonları arasındaki etkileşim 3 farklı şekilde gerçekleşir (Şekil 1.11). İlkinde metal iyonu direkt olarak enzime değil, substrata bağlanır (Şekil 1.11 I). İkincisinde metal iyonu direkt olarak enzim ile sonra substrat metal iyonuna bağlanır (Şekil 1.11 IIa) ya da metal iyonu veya substrat önce enzime bağlanır sonra birbirleri arasında köprü oluştururlar (Şekil 1.11 II b). Üçüncüsünde ise metal iyonu ve substrat enzimin farklı bölgelerine bağlanır (Şekil 1.11 III) (Medyanseva et al., 1998).



Şekil 1.11 Enzim aktivitesi üzerine metal iyonunun etkisi (E: enzim, S: substrat).

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

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

Kang ve arkadaşları (2014), 10 mM metal iyonu konsantrasyonunda Ca^{+2} , Mg^{+2} , Zn^{+2} metallerinin *A.oryzae* S1'den saflaştırdıkları POP enzim aktivitesini etkilemediğini, Al^{+3} ve Fe^{+2} metallerinin aktiviteyi yarıya düşürdüğünü, 1 mM Cu^{+2} metal iyonu konsantrasyonunda enzim aktivitesinin tamamına yakınını inhibe ettiği gözlemlemişlerdir. Kalwant ve arkadaşları (1991), 0,1 mM metal konsantrasyonunda Zn^{+2} metalinin insan beynindeki POP enzim aktivitesinin büyük bir kısmını inhibe ettiğini, fakat Ca^{+2} metal iyonunun 10 mM konsantrasyonunda inhibe ettiği belirlenmiştir. Yoshimoto ve arkadaşları (1987), 1 mM metal konsantrasyonunda Mn^{+2} , Ni^{+2} , Fe^{+2} metallerinin havuçtan saflaştırılan POP enzim aktivitesini çok az etkilediğini, aynı konsantrasyonlarda Hg^{+2} , Cu^{+2} ve Zn^{+2} ise tamamen inhibe ettiğini belirtmişlerdir. Yamakawa ve arkadaşları (1985), 5 mM Ca^{+2} ve Mg^{+2} metalinin sıçan karaciğerinden saflaştırılan POP enzim aktivitesinin arttığını, 1 mM Hg^{+2} metalinin ise enzimi tamamen inhibe ettiği belirlenmiştir. Yoshimoto ve arkadaşları (1981), 1 mM metal konsantrasyonunda Zn^{+2} ve Mg^{+2} metallerinin kuzu beynindeki POP aktivitesine hiçbir etkisi olmadığını, Co^{+2} iyonu aynı konsantrasyonlarında enzim aktivitesini arttığını, Hg^{+2} ve Cu^{+2} metallerinin ise enziminin tamamına yakın inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir. Koida ve arkadaşları (1976), 1 mM metal konsantrasyonlarında Zn^{+2} metalinin kuzu böbreğindeki POP enzimi aktiviteyi çok az düşürdüğü, Co^{+2} ve Mg^{+2} metallerinin ise enzim aktivitesini arttırırken, Hg^{+2} ve Cu^{+2} metallerinin ise enziminin tamamına yakın inhibe ettiğini belirlemişlerdir. Yoshimoto ve arkadaşları (1988), mantardan (shakashimeji) saflaştırdıkları enzim aktivitesini 1 mM metal iyonu konsantrasyonundaki Mn^{+2} iyonu çok az etkilerken, Zn^{+2} , Ni^{+2} , Cu^{+2} , Hg^{+2} ve Fe^{+2} metallerinin ise enzim

aktivitesinin büyük bir kısmını inhibe ettiğini gözlemlemişler. Kuwabara (1992), 0,2 mM metal konsantrasyonunda Cu^{+2} metalinin ıspanakdan (thylakoid) saflaştırılan POP enzim aktivitesini bir miktar etkilediği, 1 mM metal iyonu konsantrasyonunda Mg^{+2} , Ca^{+2} , Mn^{+2} metallerin enzime hiçbir etkisi olmazken, Zn^{+2} metal iyonun ise enzimi inhibe ettiği gözlemlemişler. Tsuru ve arkadaşları (1987), 1 mM metal iyonu konsantrasyonunda Hg^{+2} metalinin sığırın dokularından (testis, beyin, karaciğer, böbrek ve kas) saflaştırılan POP enziminin aktivitesini tamamen inhibe ettiğini, Zn^{+2} ve Co^{+2} metallerinin ise enzim aktivitesi üzerine hiçbir etkilerinin olmadığını, Ni^{+2} metalinin ise sadece testis, karaciğer, böbrek ve kas dokularındaki POP aktivitesinin % 50' sini, beyin dokusunda ise aktivitenin % 80'ini kaybettiğini belirtmişlerdir. Goossens ve arkadaşları (1995), 1 mM Mg^{+2} , Ca^{+2} , Mn^{+2} metallerinin insan lenfositindeki POP enzim aktivitesi üzerine hiçbir etkilerinin olmadığını, Cd^{+2} , Zn^{+2} ve Hg^{+2} metal iyonları ise enzimi tamamen inhibe ettiğini, Co^{+2} metalinin enzim aktivitesinin büyük bir kısmını inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir.

1.8 Serin Proteaz İnhibitörleri

Serin proteaz inhibitörleri, canlı sistemlerinde gerçekleşen metabolik olaylarda rol oynayan proteolitik enzim (endojen) aktivitelerinin kontrolü ve regülasyonunda, canlı sistemler dışında ise, böcek veya mikrobiyal kaynaklı proteolitik enzimlere (ekzojen) karşı koruyucu ajan olarak iş görürler. Serin proteaz inhibitörlerinin keşfine yönelik yapılan çalışmalarda bitkilerde [*Bauhinia variegata* var. *candida* (Di Ciero et al., 1998), *Ipomoea batatas* (Hou et al., 2002), *Cassia obtusifolia* (Liao et al., 2007), *Linum usitatissimum* (Lorenc-Kubis et al., 2001), *Sinapis alba* (Ruoppolo et al., 2000), *Benincasa hispida* (Atıwetın et al., 2006), *Derris trifoliata* (Bhattacharyya ve Baku, 2009), *Dichothrix utahensis* (Gunasekera et al., 2010), hayvanlarda [*Bufo andrewsi* (Zhao et al., 2005), *Vespa bicolor* (Yang et al., 2009), *Crassostrea virginica* (Xua et al., 2006), *Antheraea mylitta* (Rai et al., 2010), *Bombyx mori* (Shinohara et al., 1993), *Antheraea pernyi* (Egushi et al., 1982), *Schistocerca gregaria* (Hamdaoui et al., 1998), *Mytehimna unipuncta* (Cherqui et al., 2001)], ve mantarlarda [*Lentinus edodes* (Odani et al., 1999)] birçok serin proteaz inhibitörü bulunmuştur. Sayıları giderek artan serin

proteaz inhibitörlerinin daha doğru tanımlanabilmeleri için bir sınıflandırma sistemi geliştirilmiştir.

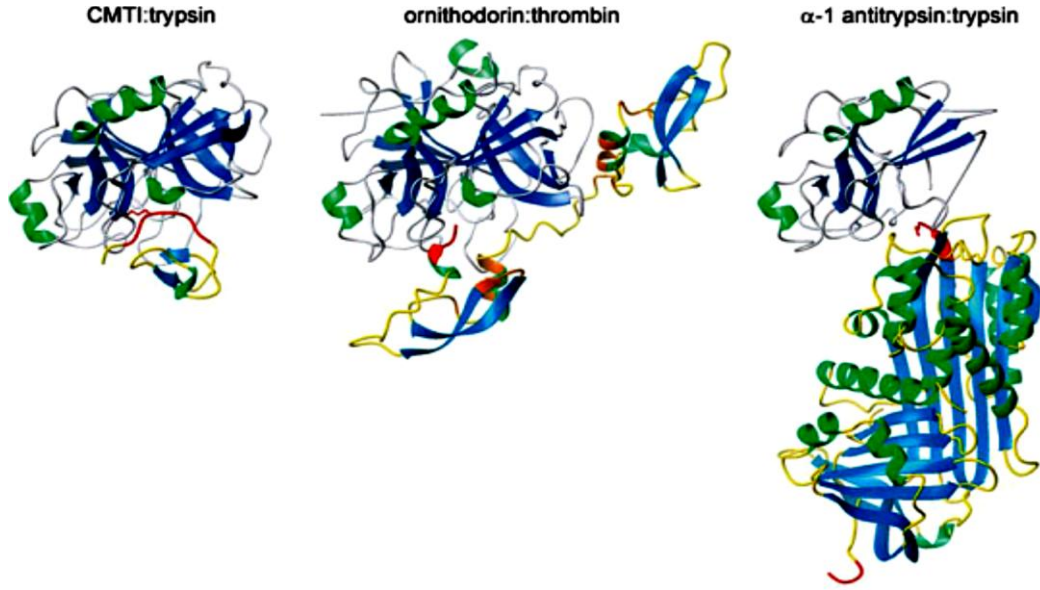
1.8.1 Serin proteaz inhibitörlerinin sınıflandırılması

Serin proteaz inhibitörleri, protein temelli veya küçük moleküllü inhibitörler (peptid temelli ve kimyasal bileşikler) olmak üzere iki ana grup altında toplanır.

1.8.1.1 Protein temelli inhibitörler

Protein temelli inhibitörler yapısal olarak α -heliks, β -tabaka, α/β ve disülfid bağlarınca zengin küçük proteinlerden oluşur. Canonical (standard mekanizma), non-cononical inhibitörler ve serpinler (serin proteaz inhibitörleri) olmak üzere 3 gruba ayrılır. Serin proteaz inhibitörlerinden örnekler Şekil 1.12 'de verilmiştir.

a. Cononical inhibitörler, 200'den daha az amino asit içeren küçük proteinler olup, memelilerden virüslere kadar birçok organizmadan izole edilerek tanımlanmışlardır. Özellikle bitki tohumları, kuş yumurtaları ve çeşitli vücut sıvılarında yüksek oranlarda bulunurlar. Enzim-substrat mimiği oluşturarak proteazın aktif bölgesini bloke ederler. İnhibisyon tipi kompetitif olup, ne inhibitörde ne de proteazda önemli konformasyonel değişiklere neden olmazlar. Enzim inhibisyonu, enzimin aktif bölgesi ile inhibitörün konveks bağlanma halkası arasındaki etkileşim sonrasında gerçekleşir (Krowarsch et al., 2003) (Şekil 1.13).

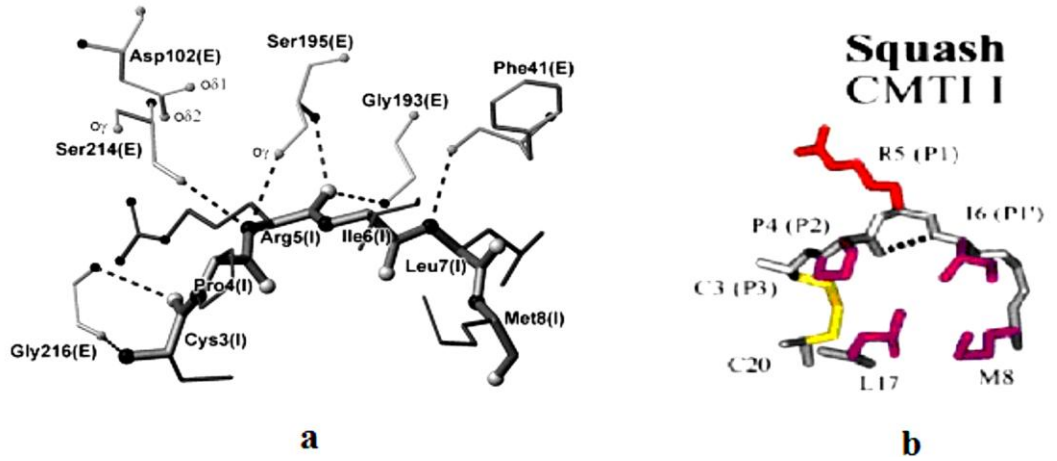


Şekil 1.12 Serin proteaz inhibitörlerinden örnekler: **a.**Canonical (CMTI:trypsin), **b.**noncanonical (ornithodorin:trombin), **c.**serpinler (α-1 antitripsin:trypsin). α-helix (yeşil), β-tabaka (mavi), ornithodorin'in sekonder bağlanma bölgesi (turuncu), CMTI, α-1 antitripsin'in yan zincirleri, ornithodorin'in N terminali ve bağlanma halkası (mavi) renklerle belirtilmiştir.

Cononical inhibitörler, disülfid bağı topografisi, reaktif bölgenin lokalizasyonu ve dizi homolojisine göre 18 familyaya ayrılır. Cononical inhibitörlere elastaz ve katepsin gibi proteinazların inhibisyonundan sorumlu 70 aminoasitten oluşan küçük monomerik bir protein Eglin C örnek verilebilir.

b. Non-cononical inhibitörler, serin proteazların aktif bölgesi dışında başka bir bölgeye non-kompetatif olarak bağlanır. N-terminal bölgeleri inhibisyonda görev alır. *Hirudo medicinalis*'den elde edilen hirudin, kanın pıhtılaşmasındaki son adım olan fibrinojenin fibrine dönüşümünü katalizleyen serin proteaz enzimi trombini inhibe eden non-cononical inhibitörlere örnek verilebilir.

c. Serpinler (serin proteaz inhibitörleri), 350-500 amino asit büyüklüğünde büyük proteinlerdir. Geri dönüşümsüz kovalent açıl-enzim kompleksini oluşturmak için hedef proteine cononical inhibitörler gibi substrat benzeri davranış sergileyerek bağlanır. Serpinlerin konformasyonal değişimle proteazların aktif bölgesine bağlanması sonucu aktif bölgenin yapısı da bozulur.



Şekil 1.13 a. CMTI I: triptsin arasındaki etkileşim ile triptsin enziminin inhibisyonu b. CMTI I konveks bağlanma halkası (Krowarsch et al., 2003).

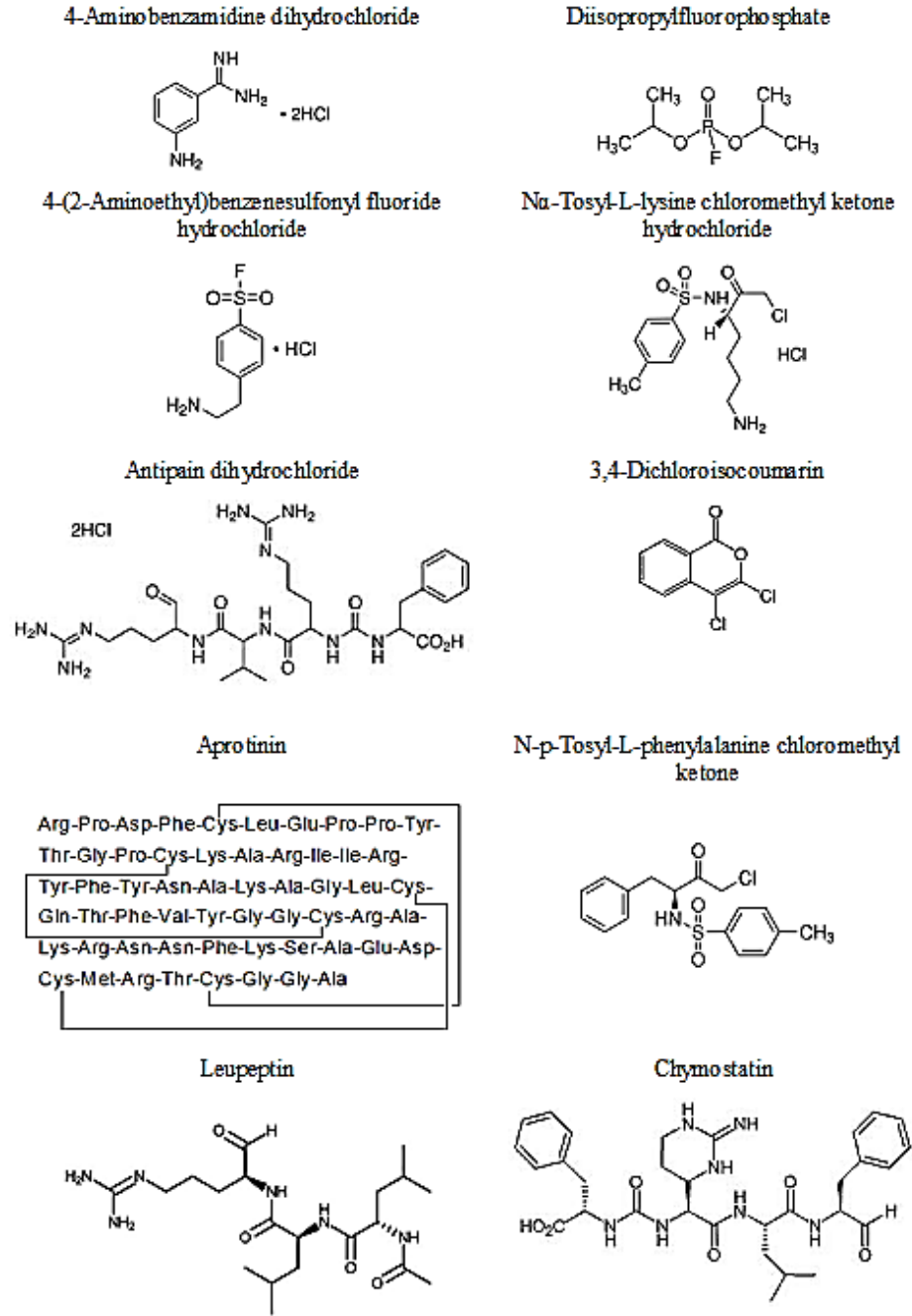
1.8.1.2. Küçük moleküllü inhibitörler

Küçük moleküllü inhibitörler (peptid temelli ve kimyasal bileşikler), alkilleme, açilleme, fosforilleme, sülfonilleme vb. farklı reaksiyon mekanizmaları üzerinden inhibisyon etkisi gösterirler (Bogyo and Wang, 2002). *Alkilleme reaksiyonunda*, klorometil ketonlar ve türevleri iş görür. Bunlar peptid temelli alkilleme inhibitörleridir. Enzimin aktif merkezinde yer alan serin rezidüsü tetrahedral ara ürünü oluşturmak için alkilleme inhibitörün (ketonun) karbonil karbonuna nükleofilik atak yapar. Bunun sonucunda da aktif bölgedeki histidin, klorometil ketonun fonksiyonel grubu tarafından alkillenir. *Açilleme reaksiyonlarında*, aza-peptidler, karbamatlar, peptidil açil hidroksamatlar, β -laktam ve analogları ve heterosiklik bileşikler iş görür. Açilleme reaksiyonu alkilleme reaksiyonlarına benzer. Enzimin aktif merkezindeki serin rezidüsü kovalent açıl-enzim ara ürününü oluşturmak için nükleofilik atak yapar. *Fosforilleme reaksiyonlarında*, peptid fosfonatlar, fosfonil florürler [DFP (diizopropilflorofosfat)] iş görür. *Sülfonilleme reaksiyonlarında*, sülfonil florür [PMSF (fenil metan sülfonil florür)] iş görür. Küçük moleküllü inhibitörlerden alkilleme, açilleme, fosforilleme, sülfonilleme reaksiyonlarına katılan inhibitörlerinin dışında enzimin tiyol ve hidroksil gruplarıyla tiyohemi asetal ve hemi asetal formunu oluşturarak serin peptidazların geri dönüşümlü doğal inhibisyonunu gerçekleştiren birçok aldehit (leupeptin, antipain, elastatinal, chymostatin) vardır. Ayrıca peptid temelli boronik asit inhibitörlerindeki bor

atomuyla enzimin aktif merkezinde yer alan Ser rezidüsü tetrahedral boranat türlerini oluşturmak için kovalent bağ yapar. Benzamidin ile inhibisyon, benzamidinin Vander Waals ve elektrostatik etkileşimle S1 cebi ile teması sonrasında gerçekleşir.

Serin proteaz ailesi katalitik triad açısından benzerlik göstermekle inhibitörler genellikle farklı aileler genel ve spesifik serin proteaz inhibitörlerinin varlığı bilinmektedir. Bu bağlamda serin proteazın tipine ve etkin olduğu biyolojik prosese göre spesifik inhibitörlerin kullanılması önemlidir.

Serin proteaz inhibitörlerine bazı örnekler Şekil 1.14 de verilmiştir.



Şekil 1.14 Bazı serin proteaz inhibitörleri.

1.9 POP Aktivitesi Üzerine Çeşitli Kimyasal ve İnhibitörlerin Etkisi

Günümüze değin yapılan çalışmalar incelendiğinde Prolil oligopeptidaz enzim aktivitesi üzerine çeşitli kimyasal ve inhibitörlerin etkisinin incelenmesinde serin, aspartik, sistein, metalloproteaz inhibitörleri, sülfidril grubunu bloklayan kimyasallar, indirgeyici ajanlar ve aminopeptidaz inhibitörlerinin kullanıldığı görülmektedir (Çizelge 1.9).

Çizelge 1.9 POP aktivitesi üzerine çeşitli kimyasal ve inhibitörlerin etkisi

Kimyasal ve İnhibitor	Konsantrasyon	Inhibisyon(%)	Enzim Kaynağı	Referans
Z-Pro-Prolinal	1	100	Bakteri (<i>Pseudomonas sp.KU-22</i>)	Oyama et al.,1997
	0,001	100	Mantar (<i>L.cinerascens</i>)	Yoshimoto et al., 1988
EDTA	1,0	21,3	Mantar (<i>L. cinerascens</i>)	Yoshimoto et al., 1988
	10	0	Kuzu (Beyin)	Yoshimoto et al., 1981
o-Phenanthroline	1,0	18	Mantar (<i>L. cinerascens</i>)	Yoshimoto et al.,1988
	1,10	14	Sıçan (Beyin)	Andrews et al.,1980
	10	0	Kuzu (Beyin)	Yoshimoto et al.,1981
DTT	1	0	İspanak	Kuwabara, 1992
	10	9	İnsan (Beyin)	Koida et al., 1976
β-Merkaptoetanol	5	19	Sığır (Beyin)	Dowling, 1998
	10	15	Sığır (Beyin)	Dowling, 1998
Iodoasetat	0,90	30	Sıçan (Beyin)	Andrews et al., 1980
	1,0	18	Mantar (<i>L. cinerascens</i>)	Yoshimoto et al.,1988
	5	40	İnsan (Beyin)	Koida et al., 1976
	10	49	İnsan (Beyin)	Koida et al., 1976
N-Etilmalemid	1,0	21	Mantar (<i>L. cinerascens</i>)	Yoshimoto et al., 1988
PCMB	0,01	99	Cluepa pallasi (Sperm)	Yoshida et al., 1999
	0,1	95	Kuzu (Beyin)	Yoshimoto et al., 1981
	1	19,1	Mantar (<i>L. cinerascens</i>)	Yoshimoto et al., 1988
		11,1	Bakteri (<i>Pseudomonas sp.KU-22</i>)	Oyama et al., 1997

Çizelge 1.9 (Devamı) POP aktivitesi üzerine çeşitli kimyasal ve inhibitörlerin etkisi.

Kimyasal ve İnhibitor	Konsantrasyon	Inhibisyon(%)	Enzim Kaynağı	Referans
DFP	0,0067	93	Sıçan (Beyin)	Andrews et al.,1980
	0,267	99,9	Sıçan (Beyin)	Andrews et al.,1980
	0,01	69	Kuzu (Beyin)	Yoshimoto et al., 1981
	0,1	99	Kuzu (Beyin)	Yoshimoto et al., 1981
	1,0	93,3	Mantar (<i>L.cinereascens</i>)	Yoshimoto et al., 1988
	1,4x10 ⁻⁶	30	İnsan (Beyin)	Koida et al., 1976
	2,8x10 ⁻⁶	60	İnsan (Beyin)	Koida et al., 1976
E-64	0,1	0	Mantar (<i>L. cinereascens</i>)	Yoshimoto et al., 1988
PMSF	0,1	0	Kuzu (Beyin)	Yoshimoto et al., 1981
	0,45	34	Sıçan (Karaciğer)	Andrews et al.,1980
	1,0	17	Mantar (<i>L. cinereascens</i>)	Yoshimoto et al., 1988
	10	22	İnsan (Beyin)	Koida et al., 1976
	0,1	28	Mantar (<i>L. cinereascens</i>)	Yoshimoto et al., 1988
	1	0	İnsan (Beyin)	Koida et al., 1976
	10	0	İnsan (Beyin)	Koida et al., 1976

1.10 Prolil Oligopeptidazın Fizyolojik Önemi

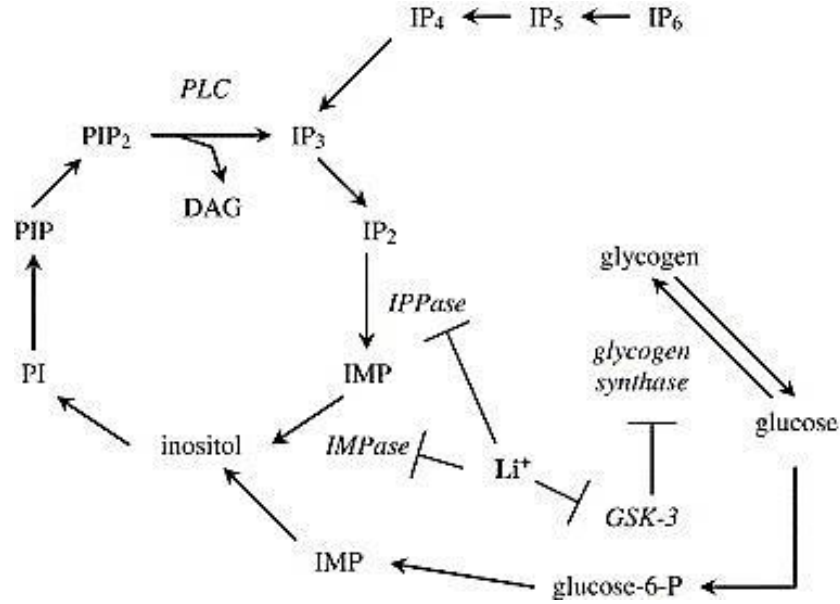
Birçok biyoaktif nöropeptidlere karşı *in vitro* spesifik aktivitesinin ve olası koşullar altında aktivitesindeki değişimler birtakım önemli fizyolojik fonksiyonları içeren hücre bölünmesi-farklılaşması, öğrenme-hafıza, sinyal iletimi ve psikiyatrik spekülasyonlara neden olur. Bu nedenle; POP'un asıl ilgisinin kesin bir şekilde anlaşılması halen büyük bir eksiklikler (Garcia-Horsman et al., 2007).

1.10.1 İnositol metabolizmasının regülasyonu

Nörotransmitter reseptör alt tiplerinin büyük bir çoğunluğunun uyarılması membran fosfolipidlerinin hidrolizini indükler. Reseptörlerin çeşitli agonistlere bağlanması G proteinini aktive eder ve fosfolipaz C uyarılır. Fosfolipaz C (PLC) enzimi tarafından fosfatidil inositol-bisfosfat (PIP₂) adlı fosfolipitin hidroliz ürünüdür. Hücre zarına bağlı olan bu enzim aynı reaksiyon ile inositol trifosfat (IP₃) üretir. İnositol trifosfat sitozola dağılmasına karşın, diaçilgliserol (DAG), hidrofobik olması nedeniyle plazma zarında kalır. IP₃ düz endoplazmik retikulumdan kalsiyum iyonlarının salınmasına neden olur. DAG ise protein kinaz C (PKC)'nin fizyolojik aktivatörüdür. Membranda DAG oluşumu, PKC'nin hücre zarından sitozola yer değiştirmesini (translokasyonunu) kolaylaştırır (Brandt et al., 2007).

Mutasyona uğramış sosyal amip *Dictyostelium discoideum*'da POP geni eksik olduğunun anlaşılması üzerine Prolil oligopeptidaz ile IP₃ arasındaki ilişki olabileceği ilk kez tahmin edildi (Williams et al., 1999). İkincil mesajcı IP₃'ün konsantrasyonu oluşan inositolün miktarına bağlıdır. Lityum uygulaması sırasında ise azalır ve azalan IP₃ düzeyiyle sonuçlanır. Azalan POP aktivitesi lityum uygulaması sırasında IP₃'ün miktarı artırır. Aynı etki POP inhibitörüne maruz kalmış wild-tip hücrelerinde gözlenmiştir. Azalan POP aktivitesi muhtemelen multiple inositol polifosfat polifosfataz'ın regülasyonu sayesinde fosfoinositlerin turnover'nı ve IP₃'ün hücresel konsantrasyonunda artırabilir. İnositol fosfatlar (IP₆, IP₅ ve IP₄) multiple inositol polifosfat polifosfataz enzimi tarafından katalizlenir (MIPP). POP, MIPP aktivitesini regüle eder ve azalan POP aktivitesi

üst düzey fosfatların yıkımını artmasına neden olur ve IP₃ düzeyi artar. IP₃ inositol monofosfat 1-fosfataz (IPP) ve inositol monofosfataz (IMPaz) tarafından inositole degrade olur. İnositol P1 sentaz, PI4 kinaz ve PI5 kinaz tarafından PIP₂ ye katılır. Lityum IPP ve IMPaz'ı inhibe eder (Şekil 1.15). Dolayısıyla inositol azalmasına ve inositol döngüsünün azalmasına neden olur (Schulz et.al., 2002; Williams and Harword, 2000; Harword et al., 2011).



Şekil 1.15 İnositol döngüsü.

1.10.2 Mizaç bozuklukları (Bipolar Bozukluk)

Çalışmaların birçoğunda çeşitli bipolar bozukluklarda inositol düzeylerinin değiştiği rapor edilmiştir. İnositol yolağında POP'un rolüne ek olarak depresyon patofizyolojisinde önemli rol oynarlar. 1995' de Maes ve arkadaşlarının manik depresyon ve şizofren hastalarında plazma POP aktivitesi artarken depresyon hastalarında plazma POP aktivitelerinin azaldığını rapor etmişlerdir. İlginçtir ki; antidepresan fluoxetine uygulanan depresyon hastalarında uygulanmayan hastalardan daha yüksek plazma POP aktivitesi gözlenmiştir. Manik depresif hastalarda valproate kullanımı ile plazma POP aktivitesi azalmıştır (Maes et al., 1995). Serum POP düzeylerindeki artış hem stres bağlantılı anksiyeti hemde post trömatik stres hastalığı ile bağlantılıdır (Maes et al., 1998, 1999). Yeme

bozukluğu ve anoreksiyalı hastalarda da POP aktivitesinin azaldığı gözlenmiştir (Maes et al., 2001).

Serum POP aktivitesinde Interferon- α uygulaması ile azalma kaydedilmiştir. IFN- α uygulama nöropsikiyatri yan etkileri ile bağlantılı ve değişen serum POP aktivitesi nöropsikozlarda önemli bir rol oynar (Van Gool et al., 2004).

1.10.3 Alzheimer hastalığı

Alzheimer hastalığı çok yaygın olarak karşılaşılan ve demansın en sık sebebi olan nörodejeneratif hastalıktır. 60 yaş üzerindeki kişilerin yaklaşık olarak % 4 'ünde bu hastalığın görüldüğü tahmin edilmektedir. Ancak henüz kesin fizyopatogenezi ortaya konmamıştır. Histopatolojik olarak senil amiloid plaklar (SD), Nörofibriler yumak (NFY) oluşumu, sinaps nöron kaybı ve beyinde belirgin bir atrofi mevcuttur. NFY'lerin temel bileşeni hiper fosforile "tau" proteinidir. AH patogenezi hiperaktif kinazlar ve/veya hipoaktif fosfotazlar, tau proteinin hiperfosforilasyonuna yol açarak mikrotübüllere bağlanma yeteneğini bozarlar. Bağlanmamış fosforilize tau çözölemeyen çift sarmallı filamanlara polimerize olur. Bunlar zaman içinde intranöronal NFY'ler haline gelir. NFY'ler hücre iskeletinin bütünlüğünü ve aksonal transportu bozarak hücre ölümüne neden olur. AH'deki ikinci temel nöropatolojik değişiklik, ana bileşeni amiloid β proteini ($A\beta$) olan, amiloid plaklardır. Amiloid β , diffüz plaklar halinde agrege olur ve bunlar yoğun nöritik plaklara dönüşür. Zararsız amiloid β içeren gevşek plakların nasıl β kıvrımlı zararlı yoğun plaklara dönüştüğü net bilinmemektedir (Saka ve ark., 2010).

POP aktivitesi Alzheimer ve β -amiloid plak oluşumu ile bağlantılıdır. Rossner ve arkadaşları yaşlıca yetişkin farelerin hipokampusünde POP ekspresyonunun arttığı gözlenirken beynin diğer bölgelerinde POP ekspresyonu gözlenmemiştir. Hipokampal POP aktivitesi transgenik yetişkin Tg2576 farelerin transgenik olmayanlarla karşılaştırıldığında arttığı gözlenmiştir. Rossner; POP'un inhibisyonu β -amiloid peptidlerin sekresyonunda önemli bir artış olduğu gözlenmiştir (Rossner et al., 2005).

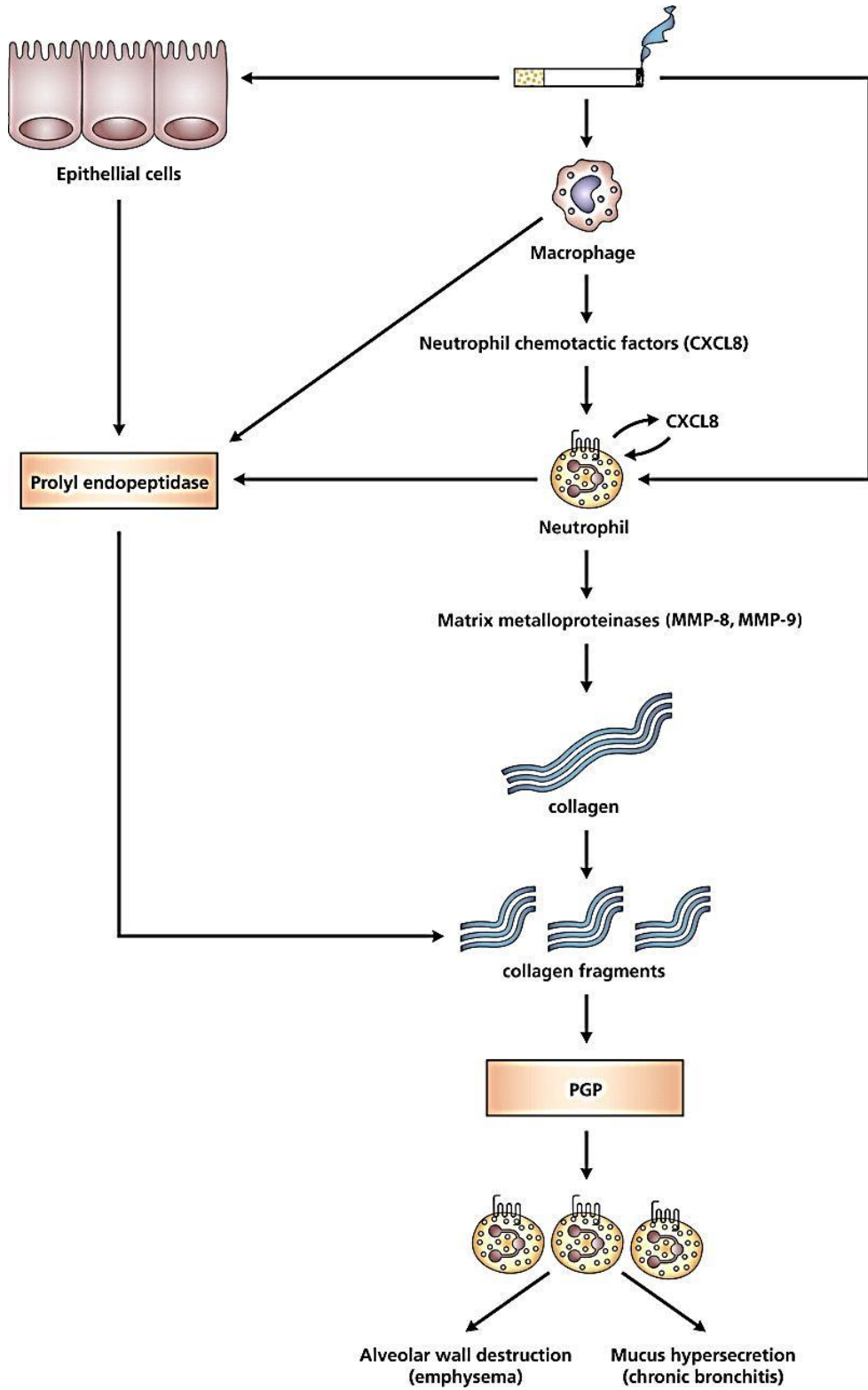
1.10.4 Periferik Hastalıklar

1.10.4.1 Kronik obstrüktif akciğer hastalığı

Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı (KOAH); tam olarak geri dönüşümlü olmayan, ilerleyici hava akımı kısıtlanması ile karakterize bir hastalıktır. KOAH'da kronik hava yolu obstrüksiyonu, küçük hava yollarında daralma ve parankimal yıkıma bağlı olarak gelişir. Kronik enflamasyon küçük hava yollarındaki yapısal değişikliklere neden olur. Bu enflamatuvar süreç ve parankimal yıkım, alveoler tutamalarda kayba ve akciğerlerin elastik geri dönüş basıncında azalmaya yola açar.

KOAH'da hem inflamasyonun ve oksidatif stresin etkisi ile hem de başta nötrofiller olmak üzere aktive olmuş inflamatuvar hücrelerden salgılanan proteolitik etkili enzimler nedeni ile proteaz aktivite artmıştır. Buna karşılık başta α -1antitripsin olmak üzere α -2 makroglobulin, SLPI, elatin ve doku matriks metalloproteaz inhibitörü (TIMP) gibi antiproteazların aktivitesinde azalma mevcuttur. Alveol duvarının temel proteini olan elastin başta nötrofil elastaz olmak üzere pek çok proteaz tarafından yıkıma uğratılır. Bu yıkım amfizem gelişiminden sorumlu tutulmaktadır (Başyigit et al., 2010).

Kronik nötrofilik inflamasyon kaskadı ile POP'un bağlantısının şematik olarak gösterimi Şekil 1.16'da verilmiştir. Aktive olan nötrofiller MMP8 ve MMP9 salınımını gerçekleştirir ve böylece 30 aminoasitten daha kısa fragmentler içeren kollojeni keserler. Bu fragmentler POP enzimi tarafından PGP'ye hidrolizlenir ve sonra bir nötrofil kemoatraksiyonu gibi davranırlar. Artan nötrofil akışın döngüsünü başlatır ve oksidant hasarını indükler böylece birçok proteolitik enzimlerin salınımını sağlar ve sonuç olarak kronik hava inflamasyonuna ve organ yetmezliğine neden olur (Gaggar et al., 2008).



Şekil 1.16 POP ve KOAH arasındaki ilişki (Braber et al., 2011).

1.10.4.2 Çölyak hastalığı

Prolil oligopeptidazın çölyak hastalığında yararlı etkilere sahip olduğu son yıllarda yapılan çalışmalarda ileri sürülmüştür. Çölyak hastalığı inflamatuvar bir rahatsızlıktır ve ince bağırsakta küçük ve parmak şeklindeki villus denilen yapıların bozulmasına sebep olur. Genetik bir geçmişe sahiptir ve arpa, buğday ve çavdar gibi gluten içeren gıdaların tüketilmesiyle ortaya çıkmaktadır. Bir grup araştırmacı α -gliadin'den birtakım immüjenik peptidler izole etmişler ve fırçası membran proteazları ve pankreatik proteazlara karşı dirençli olduğunu gözlemlemişler (Hauch et al., 2000; Shan et al., 2002). İmmüjenik peptidler proline zengindir ve buda enzim prosesine karşı dayanıklı olduğu açıklanabilir. A-gliadin, bakteriyel bir POP enzimine maruz kalarak hem *in vivo* hemde *in vitro* koşullarda detoksifiye edebilir ve çölyak hastaları için oral peptidaz destekleyici terapi olarak potansiyel bir strateji olarak ileri sürüldü. Glutamin-spesifik sistein proteaz'ı içeren iki enzim kokteyli *in vivo* ve *in vitro* koşullarda fareler üzerinde uygulanmıştır. Sonuç olarak glutence zengin katı gıdaların sindirimini hızlandırdığı ve bağırsak koşullarında pankreatik proteazlarla birlikte işlevlerini yerine getirirler. Bu kombinasyon çölyak hastalığının terapisi için oldukça güçlü yeni bir tedavi olarak sunulmaktadır ve son yıllarda faz 2 klinik uygulamalarında kullanılmaktadır (Gass et al., 2006; Siegel et al., 2006; Gass et al., 2007). Böylece POP enzimi diğer proteazlarla birlikte hareket edebilir ve gliadin peptidinin detoksifikasyonunda önemli bir rol oynar.

1.9.4.3 Kanser

Akciğer tümörleri, kötü huylu prostat ve sigmoid karsinomaların bir kısmında POP aktivitesinin arttığı gözlenmiştir. Ayrıca renal (böbrek) hücre karsinomasında, renal pelvisin ürotelyal karsinomasında, baş ve boyun hücre karsinomalarında da POP'un aktivitesinin arttığı gözlenmiştir (Larrinaga et al., 2010). POP henüz tanımlanmamış mekanizmasıyla hücre poliferasyonunda yer almaktadır ve POP inhibitörlerinin kötü huylu tümör hücrelerinin büyümesini baskıladığı gözlenmiştir.

Kanserin ilerlemesi tümör neovaskülarizasyonuna ve neoplastik hastalıklarda önemli olan proanjiojenik ajanlara bağlı olduğu için bir anjiojenik ajan olan Ac-SDKP ve POP'un seviyeleri kötü huylu kanserli dokularda yükseldiği ve kanserin patojenezisinde POP ve AcSDKP'in bir katkıda bulunduğu gösterilebilir (Liu et al., 2003; Liu et al., 2010).

POP, ekstraselüler nötrofil kemoatraktantın (PGP) salınımında önemli bir rol oynadığı gözlenmiştir. PGP aktiflenmiş nötrofilleri kendine çeker, böylece kanser progresyonunda önemli bir role sahip olduğu görülmüştür. Aktiflenmiş nötrofiller sırasıyla multiple proteinazları (MMP) salarlar ekstraselüler matriksin bileşenlerini (kollajen) degrade eder. MMP'ler; perisitler, düz kas hücreleri fibroblast, adipositler immun ve inflamatuvar hücreleri kan veya limpatik endotelyal hücreler ve kanser hücrelerini içeren kompleks tümör ekosistemin merkezi regülatörüdürler. MMP'ler tümör hücre invazyonu, anjiogenesis ve metastaz olarak sağlarlar. Tümör ekosisteminde aktiflenmiş PGP-MMPs yolağı kötü huylu tümörlerde gözlenen artan pop aktivitesi ile bağlantılı olabileceğidir. Buna ek olarak; POP inhibitörleri enazından *in vitro* koşullarda PGP oluşumunu engelleyebilir (Gaggar et al., 2008). Böylece POPun inhibisyonu PGP-MMP yolağını engellemesi ile kanser uygulamalarına yeni bir tıbbi yaklaşım sağlayabilir.

1.11 Prolil oligopeptidaz inhibitörleri

Prolil oligopeptidazın spesifik inhibitörleri tipik substrat analoglarıdır. Substrat benzeri tarzda enzimle etkileşime girerek enzim katalizini engeller. İnhibitörlerin etki şekli; P1 pozisyonunda prolin rezidusundan dolayı çok spesifiktirler ve enzimin fizyolojik rolünün tanımlanmasında bir rol oynar. Sonuç olarak, spesifik inhibitörlerin devam eden gelişimi *in vivo* koşullarda prolil oligopeptidaz enziminin aktivitesinde azalmalara neden olur ve kan-beyin bariyerini kolaylıkla geçebilir, beyin prolil oligopeptidaz enziminin uzun süren kalıcı inhibisyonunu gerçekleştirir.

1.11.1 Sentetik inhibitörler

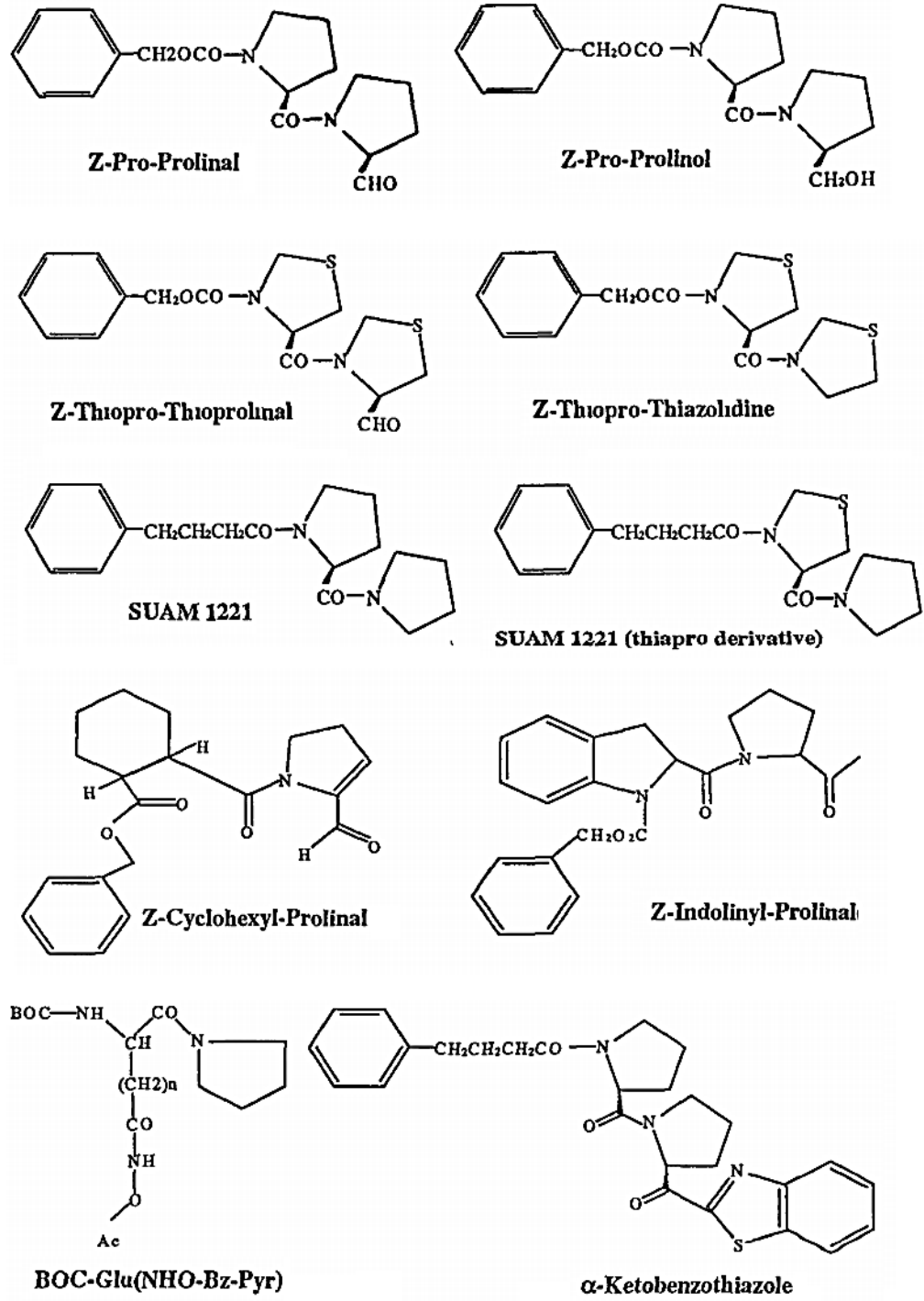
Peptid aldehydler birçok proteolitik enzimlerin güçlü inhibitörleri olarak bilinirler. Örneğin; N-bloklanmış arjininal sistein protea ve tripsinin güçlü bir inhibitörüdür. N-bloklanmış lizinal türevleri lizil endopeptidaz ve luepeptin için spesifiktir ve tripsini inhibe ettiği gözlenmiştir (Vinitsky et al., 1992). Prolil oligopeptidaz inhibitörleri dikarboksilik asit bis(prolyl-pyrrolidine) amid (Wallen et al., 2002a, 2003), açıl-prolil-pirorolidin (Wallen et al., 2002b), aminodikarboksilik asit pirorolidides (Demuth et al., 1993) ve peptidil asetalların (Augustyns et al., 1995) formunda sentezlenmiştir.

Prolil oligopeptidaz inhibitörlerin büyük bir kısmı prolin rezidülerini, peptid bağı ve amino asit yapısını taklit edecek şekilde dizayn edilmiştir. S1,S2 ve S3 pozisyonundaki enzime bağlanmak için spesifik yapılara gereksinim duyulur. İnhibitör yapının farklı kısımlarının değiştirilmesi veya küçük değişiklikler enzim inhibisyonunu önemli bir şekilde değiştirebilir. Örneğin, Venalainen ve arkadaşları, isophthalic acid bis (L-prolyl-pyrrolidine) inhibitörünün P1 pozisyonuna CHO, CH veya COCH₂OH eklenmesiyle artan bir Ki rapor edilmiştir (Venalainen et al., 2004). Modifikasyonlar, sıçan dokusundaki inhibisyonun süresini, asosiasyon oran sabitini ve bağlanma mekanizmasını etkiler.

Thiazolidine kısmı ile P1 pyrrolidin'in yer değiştirmesi bileşiğin inhibitör gücünü kaybetmemektedir. Ancak büyük heterosiklikler ile yer değiştirilmesi inhibisyonun kaybına sebep olur (Portevin et al; 1996). P1 pozisyonunda acylisoxazole ve acylisoxazoline grupları, memeli hücrelerine karşı çok düşük toksisiteli *T.cruzi* parazitik enzimine karşı spesifik inhibitör özelliği göstermektedir (Bal et al., 2003).

L-prolin, prolil oligopeptidaz inhibitörlerin P2 pozisyonunda olması tercih edilir. L-prolin rezidüsünün yer değiştirilmesi inhibitör potansiyelini azaltmadan çok zordur. Buna rağmen birkaç başarılı yer değiştirmeler L-thioprolin (Saito et al., 1991), bisiklik L-prolin analogu (Barelli et al., 1999) veya cyclopent-2-enecarbonyl (Jarho et al., 2004) gruplarının kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir.

P3 pozisyonundaki mevcut grup bileşik için verilen inhibisyon sabitini etkiler. Prolin oligopeptidaz enziminin substrat bağlı altbölgesi (S3) polar olmayan rezidülerle kaplıdır (Fulop et al., 1998) ve sonuç olarak lipofilik alifatik yapılar POP inhibitörlerin P3 pozisyonunda istenmektedir. S3 alt bölge dışındaki alan büyüktür, POP ve inhibitörler arasındaki etkileşimler zayıftır. Sonuç olarak; boşluk potansiyelini etkilemeksizin bir takım farklı inhibitör yapıları uyum sağlayabilir. ADME özelliklerinin optimizasyonu için modifikasyon bölgesi olarak kullanılabilir (Jarho et al., 2005). Sentetik inhibitörler Şekil 1.17’de verilmiştir.

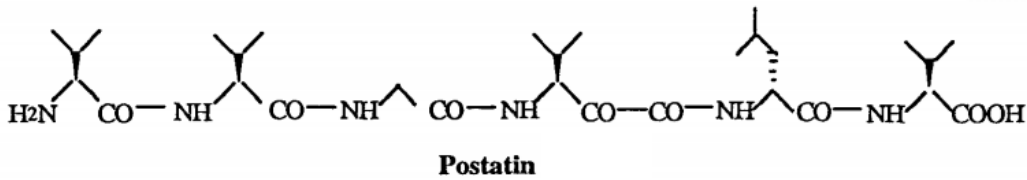
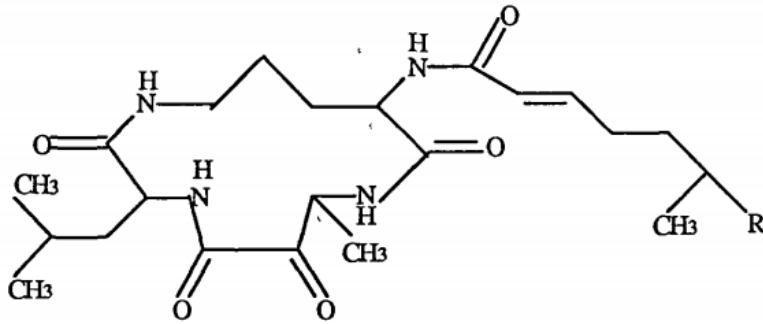
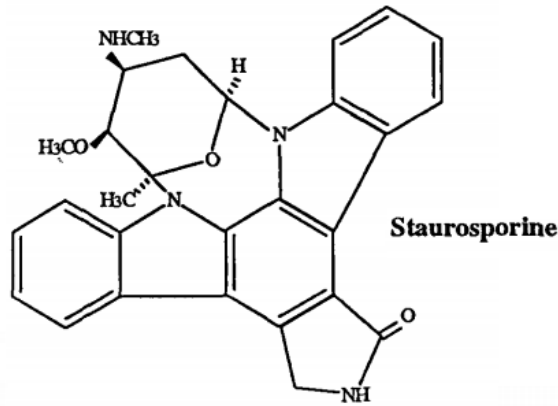


Şekil 1.17 POP spesifik sentetik inhibitörleri.

1.11.2 Doğal inhibitörler

Inhibitör bileşikleri, mantar *Polyozellus multiplex* (Song and Raskin, 2002) alp bitkisi *Rhodiola sachalinensis* (Fan et al., 2003), yeşil çay (Kim et al., 2001) ve çeşitli kırmızı ve beyaz şarap (Yanai et al., 2003) gibi farklı kaynaklardan izole

edilmiştir. *Streptomyces staurosporeus*'dan Staurosporin (Kimura et al., 1990), *Streptomyces viridochromogenes*'den Poststatin (Aoyagi et al., 1991), *Streptomyces eurythermu*'den Eurystatins A ve B (Toda et al., 1992), mantar *Moezia lindtneri* ve *Paecilomyces*'den Lipohexin (Chistner et al., 1997) ve *Microbispora*'nın miselyumundan (Kimura et al., 1997) propeptin gibi farklı kaynaklardan saflaştırılmıştır. Doğal inhibitörleri Şekil 1.18'de verilmiştir.



Şekil 1.18 POP doğal inhibitörler.

1.11.3 Endojen inhibitörler

Prolil oligopeptidaz keşfedildiğinden beri, doğal olarak meydana gelen inhibitörlerin bir çoğu, domuz pankreası (Yoshimoto et al., 1982), neonatal sıçan pankreatik hücre ekstaktı (Salers, 1994), sıçan beyni (Soeda et al., 1985) ve sığır beyni (Maruyama et al., 2002) içeren memeli dokulardan saflaştırılmıştır. Çeşitli dokulardan saflaştırılan inhibitörlerin molekül ağırlığı 6,5- 7,0 kDa civarındadır.

1.11.4 İlaç olarak Prolil oligopeptidaz inhibitörleri

Birtakım hastalıkların patofizyolojisinde PO'nun potansiyel rolünün bulunması potansiyel ilaçlar olarak PO inhibitörlerinin tanımlanması ve gelişmesinde çalışmaların büyük bir kısmına neden olmuştur. PO'nun ilk spesifik inhibitörü Z-ProProlinal olarak kayıtlara geçmiştir. Z-Pro-Prolinal'in modifiye formlarını içeren birtakım bileşikler (Z-Pyr-prolinal, Z-Val-prolinal ve Z-Gly-Pro-CH₂Cl sentezlenmiştir. Ayrıca ZTTA, Z-Pro-prolinal'benzer fakat prolin halkaların herbirinde sülfür atomu içerir (Shishido et al., 1996). PO spesifik inhibitörü Z-Pro-prolinal (bir geçiş durum analogu) aktif bölgeye ekli bir hemiasetal oluşturur (Kahyaoğlu et al., 1997).

Etrafında iki prolin reziduleri içeren bir yapıya sahip bir JTP - 4819(S) – 2 - [[(S) - 2(hidroxyacetyl) – 1 - pyrrolidiny]carbonyl] - N (phenylmethyl) – 1 - pyrrolidinecarboxamide), PO inhibitörü geliştirildi (Toide et al., 1995, 1997) ve zayıf bağlı kompetitif PO inhibitörü gibi davranırlar. S17092 ((2S,3aS,7aS)-1-[(R,R)-2-phenylcyclopropyl]carbonyl)-2-[(thiazolidin-3-yl)carbonyl]octahydro-1H-indole)) insan beyninden saflaştırılan PO için 0,3 nM'e kadar düşük Ki'li spesifikliğı oldukça güçlü bir inhibitördür (Barelli et al., 1999).

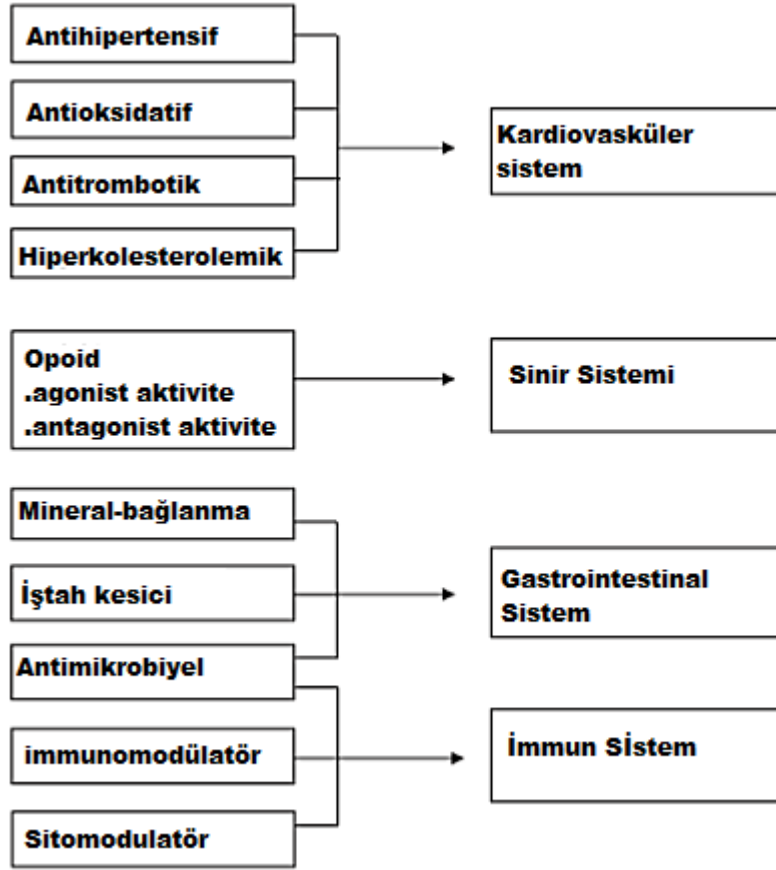
Çalışılan diğer spesifik inhibitörler; Z-321 (1-[3-(2-indanylacetyl)-L-thiopropyl]pyrrolidine) (Miura et al., 1997) ve ONO-1603 ((S)-1-[N-(4-chlorobenzyl)succinamoyl]pyrrolidine-2-carbaldehyde) (Katsube et al., 1999) dir. Bu inhibitörlerin büyük bir çoğunluğunun potansiyel terapötik yararlarına bakılan *in vivo* çalışmalara başlanmıştır.

1.12 Biyoaktif Peptidler

Biyoaktif peptidler vücut fonksiyonları veya koşullarında pozitif etkiye sahip ve sağlığı etkileyebilen spesifik protein fragmanları olarak tanımlanır. Ağız yoluyla alımlarda biyoaktif peptidler vücudun temel sistemlerini etkileyebilir. Özellikle kardiyovasküler, sindirim, immün ve sinir sistemleri üzerinde etkileri vardır. Biyoaktif peptidler kronik hastalık riskini azaltarak ya da doğal immün sistem korumasını arttırarak insan sağlığına katkı sağlar. Örneğin antimikrobiyal, antioksidatif, antitrombotik, antihipertensif ve immün sistem düzenleyici gibi etkileri vardır. Peptidlerin aktivitesi temel olarak peptidin amino asit kompozisyonuna ve dizisine bağlıdır. Aktif dizinin boyutu genellikle 2-20 aminoasit arasındadır.

Birçok peptid ham besin maddelerinin fizyolojik etkiye uğratılmasıyla ya da enzimatik hidroliz yoluyla in vivo veya in vitro koşullarda elde edilebilir. Son yıllarda besin proteinlerinin biyoaktif peptidlerce zengin olduğunun farkına varılmıştır. Kimi peptid temel protein dizisinde inaktiftir ve bu peptidler üç yolla aktifleştirilebilir: i) Fermantasyon yoluyla, ii) Sindirim enzimleriyle yapılan enzimatik hidroliz iii) mikroorganizmalardan elde edilen proteolitik enzimler yoluyla. Eğer biyoaktif peptidin yapısı biliniyorsa peptidler sentezlenebilir. Peptid sentezinin üç yöntemi vardır: i) Kimyasal sentez, ii) Rekombinant DNA teknolojisi, iii) Enzimatik sentez (Korhonen et al., 2006, 2003; Perez Espitia et al., 2012).

Biyoaktif peptidler hormon veya ilaç benzeri özelliğe sahiptirler ve bu yüzden bir çok fizyolojik fonksiyon (Çizelge 1.10) gösterirler (Şanlıdere et al., 2006).



Çizelge 1.10 Biyoaktif peptidlerin sınıflandırılması.

Antioksidanlar insan sağlığı üzerinde olumlu bir etkiye sahiptir. Vücudu reaktif oksijen türlerinin neden olduğu hasarlara karşı korurlar. Reaktif oksijen türleri lipit membranlarına, proteinlere ve DNA ya bağlanarak bunlara zarar verir. Kardiyovasküler rahatsızlıklar, diyabet, kanser ve alzheimer gibi hastalıklarda etkin rol oynarlar. Kimi bileşiklerin sağlık üzerindeki potansiyel negatif etkileri olduğu için sentetik antioksidan kullanımı sıkı denetim altındadır. Sağlık kaygıları ve kullanıcı tercihleri nedeniyle sentetik antioksidanların doğal olanlarıyla yer değiştirmesi son zamanlarda önem kazanmıştır. Çeşitli hidrolizatların antioksidan aktivitesi ispatlanmıştır. Örneğin, balık artıkları ve süten enzimatik hidroliz yoluyla elde edilen peptidlerde bu özellik gözlenir (Vercruysse et al., 2009).

Kemoterapötik ve antineoplastik ajanlar temel olarak kanser tedavisi için geliştirilmektedir. Kemoterapik ilaçların birçok yan etkisi vardır. İmmün, sinir ve sindirim sistemlerini olumsuz yönde etkileyebilecek toksisite içerir. Bazı doğal ürünler sentetik ilaçlardan daha az toksik etki gösterir bunların keşfedilip

tanımlanması onkoterapik ve immünofarmakolojik araştırmalar için önemli sonuçlar ortaya çıkarır. Bir dizi besin proteini hidrolizatlarında çeşitli antikanser peptidleri tanımlanmıştır örneğin bazı deniz canlılarından elde edilen hidrolizatların antikanser özellik taşıdığı belirlenmiştir. Bu hidrolizatlar saflaştırılmış ve meme, prostat ve akciğer kanseri hücre ölümünü uyardığı fakat canlı normal hücrelere etki etmediği gözlenmiştir. Antioksidan ve antikanser peptidler Tyr, Lys, Arg, Phe ve His bakımından zengindirler (Sun et al., 2014; Danquah et al., 2012).

Birçok katyonik antiviral peptidler 1980'lerden beri çeşitli kaynaklardan izole edilmektedir. Bu peptidler viral enfeksiyona karşı terapötik ilaç olarak güçlü bir potansiyel gösterirler (Mulder et al., 2013).

Opioid peptitler (ekzorfinler) rahatlatıcı etki sağlayan peptitlerdir. Bu peptitler sığır kazeini ve peynir suyu proteinin sindirimi ile açığa çıkarlar. Süt proteinlerinden elde edilen kazomorfinler ve ekzomorfinler opioid etki gösterirler. Ekzorfinler aynı zamanda buğday gluteninde de bulunurlar. Bağırsak epitelinde opioid reseptörlerini bağlama yeteneğine sahiptirler. Kazomorfinler de barsak fonksiyonlarını düzenleme etkilerine sahiptirler (Udenfriend and Meienhofer, 2014).

Bağışıklık sistemini düzenleyici peptitlerin lenfosit proliferasyonu, doğal öldürücü hücre aktivitesi (naturel killer cell activity), antikör sentezi ve sitokin regülasyonu gibi bağışıklık sistemi fonksiyonlarını güçlendirdiği belirtilmektedir. Dahası bu peptitlerin atopik bireylerde alerjik reaksiyonları azalttığı ve gastrointestinal sistemdeki mukozal bağışıklığı güçlendirdiği bildirilmiştir. Pirinç ve soya fasulyesi proteinlerinin tiriptik hidrolizatlarından elde edilmiş bağışıklık sistemini düzenleyici peptitlerin, süperoksit anyonlarını uyararak non-spesifik immün savunmasını tetikleyici etki gösterdiği belirtilmiştir. α ve β kazeinden elde edilmişlerdir (Sharma et al., 2011).

Mineral bağlayan peptitler kazeinin hidrolizi sonucu oluşurlar ve kazeinofosfopeptit olarak adlandırılırlar. KFP'ler kalsiyum ve fosfor minerallerinin biyoyararlılığının artmasını sağlamaktadır. KFPlerin bağırsaktaki

kalsiyum absorpsiyonuna etkileri üzerine sıçanlarla yapılan denemelerin sonuçları bu peptitlerin ince bağırsaktaki pasif kalsiyum transportunu arttırdığını işaret etmektedir. Çalışmalar, kalsiyum ve fosfat iyonlarının dış yüzeyinde stabilize olmasını sağlayan kazeinfosopeptitlerinin, dış minesindeki lezyonların tekrar mineralizasyonunu sağladığını da göstermiştir. KFP'lerin, mineralleri bağlayıp çözünürleştirdikleri için osteoporozun, dış çürüklerinin, aneminin ve hipertansiyonun önlenmesinde etkili olduğu bildirilmiştir. Bu peptitlerin dış çürüklerini önleyici etkisinin pek çok insan ve hayvan çalışmalarında kanıtlandığına ait bilgiler literatürde bulunmaktadır. KFP'lerin dış yüzeyinde tekrar kalsiyum birikimini teşvik ettiği ve κ -kazeinden elde edilen glikomakropeptidin ağız mukozasında plak oluşturan bakterilerin adhezyonunu ve gelişmesini engellediği belirtilmiştir (Zambrowicz, et al.,2013).

Sitomodülatör peptitler, sitokimyasal çalışmalarda görüldüğü gibi gıda kaynaklı biyoaktif peptitlerin farklı hücre tiplerinin canlılığını (proliferasyon, farklılaşma, apoptosis) düzenlerler. Bazı süt kaynaklı peptitlerin normal hücrelerde etkili değilken kanser hücrelerinde apoptosisi tetiklediği gösterilmiştir. Sitomodülatör ve immünomodülatör özelliklerin, gıda kaynaklı biyoaktif peptitlerin tümör gelişiminde koruyucu aktivitesini oluşturmada birlikte etkili oldukları bildirilmiştir (Sharma et al., 2011).

Antitrombotik peptitler kan trombosit agregasyonunu ve trombosit yüzey reseptörlerine fibrinojen bağlanmasını inhibe eden peptitlerdir ve glikomakropeptit sekansı ile şifrelenmiştir. Bu peptitler bebek mamalarıyla ya da anne sütüyle beslenen yeni doğmuş bebeklerin kan plazmasında tespit edilmiştir (Bernabucci et al., 2014).

İştah azaltıcı peptitler GMP ve KMP olarak bilinirler. Glikomakropeptitin (GMP) ve kazeinomakropeptitin (KMP) bağırsak fonksiyonlarını düzenleme etkisi üzerine yapılan çalışmalar, yaklaşık on yıllık bir geçmişe dayanmaktadır. KMP'in, gastrik salgıyı engellediği ve midenin hareketlerinin yavaşlamasını sağladığı belirtilmiştir. Ayrıca KMP tokluk hormonu olan kolesistokininin salgılanmasına neden olmaktadır. Bu hormon gıda alımını ve sindirimini düzenlemektedir. Sindirim sırasında midede bütün halde KMP'in varlığı

belirlenmiş, diğer taraftan yoğurt ve süt tüketimi sonrası yetişkin bireylerde kan dolaşımında GMP ve/veya KMP'nin varlığı saptanmıştır. Bu çalışmalara dayanarak iştah azaltma ve kilo kontrolü amacıyla, GMP içeren ticari ürünler tasarlanmış ve satışa sunulmuştur. Ancak bu tarz ürünlerin klinik etkilerinin aydınlatılması için daha fazla sayıda çalışmaya gereksinim duyulduğu da önemle vurgulanmıştır (Sharma et al., 2011).

1.13 Protein Hidrolizi

Protein molekülü içinde inaktif halde bulunan peptidler, gastrointestinal sindirimle, proteolitik kültür fermentasyonu ve proteolitik enzimlerle hidroliz yöntemleriyle serbest hale getirilmektedir. Özellikle soya, buğday arpa, balık proteinlerinden elde edilen peptidlerin besinsel özellikleri ve biyoaktif özellikleri yanında cilt kanseri, kolon kanseri, karaciğer tümörü gibi bazı kanser türlerine karşı koruyucu ve tedavi edici özellikleri bulunmaktadır (Aksay ve Özer, 2008)

Protein hidrolizi sırasında moleküler değişiklikler meydana geldiğinden dolayı, hidroliz ürünlerinin çözünürlük, viskozite, duyumsal özellikler, emülsiyon ve köpürme gibi fonksiyonel özelliklerinde farklılıklar olur (Panyam and Kilara, 1996; Nielsen, 1997; Caessens et al., 1999).

Proteinler, polipeptid zincirindeki peptid bağlarının su girişi ile yıkılması sonucu hidroliz olurlar. Proteinlerin hidrolizi, kaynatma, asit ve enzim etkisiyle olabilir. Asit hidrolizi ve enzim hidrolizi yaygın olarak kullanılmaktadır fakat bu yöntemlerin avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır.

1.13.1 Asidik hidroliz

Hidrolizleme en az hasarla tamamen hidrolize neden olmasından dolayı total amino asit analizlerinde çoğunlukla tercih edilir. Günümüzde en çok kullanılan hidrolitik reaktif 6 N HCl'dir.

Bütün protein veya polipeptidler amino asit analizine verilmeden önce, örnek aminoasitler arasındaki peptid bağlarının parçalanması için hidrolizlenmelidir. Asit hidrolizi metodunun bazı şartları kısmen veya tamamen

bazı amino asitleri parçalayabilmektedir. Bunun yanında bazı amino asitler de tamamen hidrolize olabilmek için farklı bazı şartlara gereksinim duyduklarından hidrolizlenmeleri zordur.

1.13.2 Enzimatik hidroliz

Proteinlerin enzimatik hidrolizi spesifik proteazlar kullanılarak gerçekleştirilir. Oluşan ürünün fonksiyonu üzerinden kontrol sağlanmaktadır (Kim et al., 2004). Clemente'ye göre hidroliz 40 - 60°C arasındaki sıcaklıkta, 6- 8 arasında değişen pH'da ve ılımlı koşullarda enzim tarafından gerçekleştirilen bir prosestir. Alkali ve asit hidroliz koşullarından farklı olarak, enzimatik reaksiyonlarda, ayrılan bileşiğin paralel yıkımına sahip değildir.

Hidroliz reaksiyonun tanımlanmasında bir takım parametrelere gereksinim vardır. Nilsen (2002) ve Apar ve Özbek (2008)'e göre en önemlisi enzim/substrat oranı, pH, sıcaklık, reaksiyon zamanı ve reaksiyon karışımındaki protein içeriğidir. Buna karşılık; enzimatik hidroliz reaksiyonunu çok kompleks yapan faktörleride kapsar. Bunlardan en dikkat çekicileri; proses koşulları (pH,sıcaklık ve iyonik şiddet), enzim inhibisyonu, peptid bağının eş zamanlı hidrolizi, ilk hidroliz adımından ürünlerin hidrolizi ve reaktiflerin çeşitliliğidir (Qi et al., 2006).

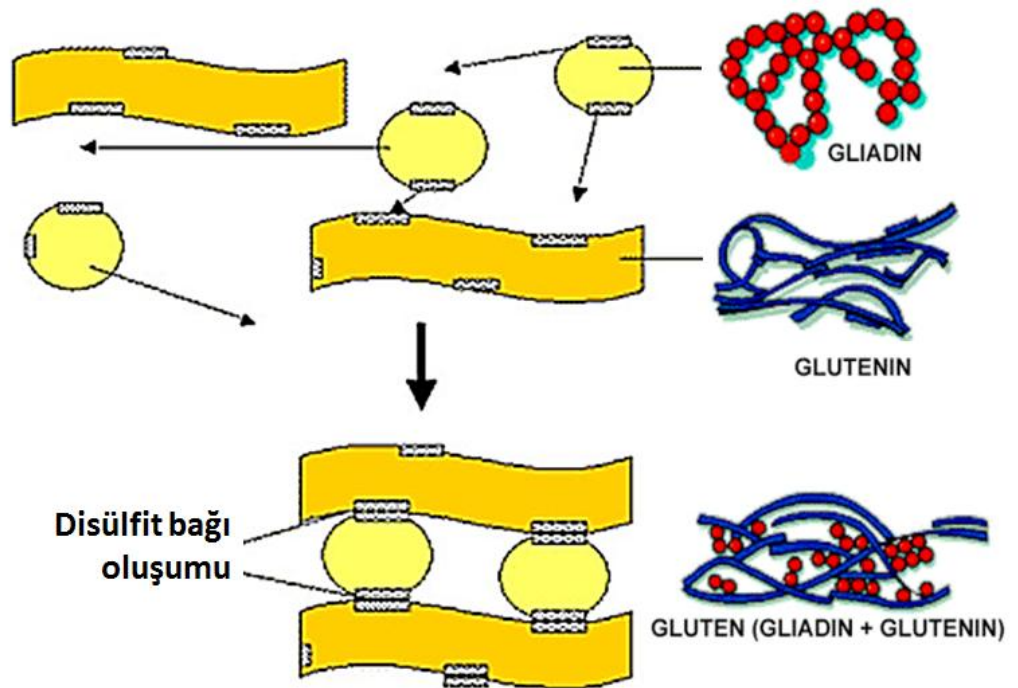
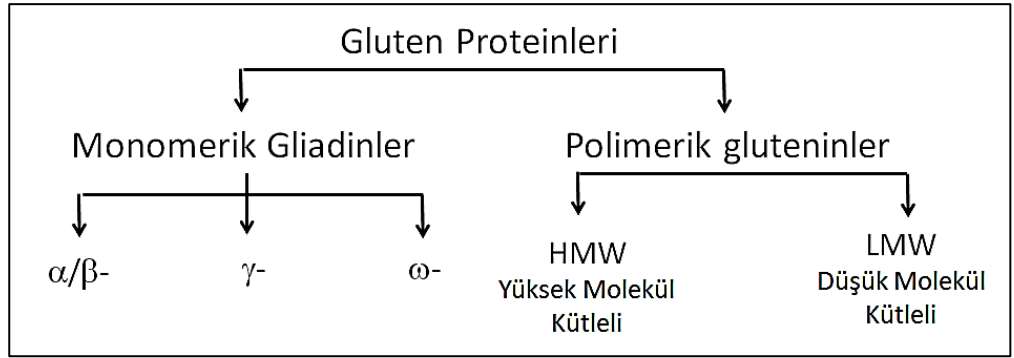
Protein hidrolizi endo-ekzopeptidazları kullanılarak gerçekleştirilir. Endopeptidazlar, iç kısımda yer alan peptid bağının hidrolizlenmesini sağlayarak proteinleri peptidlere ayırırlar. Ekzopeptidazlar, karboksi veya amino ucunda yeralan amino asitlerin hidrolizini gerçekleştirerek terminal peptid bağlarını hidrolizlerler (Clemente, 2000).

Proses sırasında zamanla hidroliz oranında düşüşler gözlenir. Gonzalez-Tello (1994) ye göre; bunun nedenleri, a) Hidrolizlenmeye eğimli peptid bağlarında azalma, b) Ürün tarafından enzim inhibisyonu ve c) Enzimin denatürasyonu olarak açıklanmaktadır.

1.14 Gluten

Gluten, hamur kalitesini iyileştirmek amacıyla katkı maddesi olarak kullanılabilmekte ya da yem endüstrisinde değerlendirilmektedir. Ancak, glutenin daha fonksiyonel değerlendirilmesini sağlamak amacıyla çeşitli teknikler geliştirilmesine yönelik çalışmalar artmaktadır. Enzimatik hidrolizin, glutenin daha verimli kullanımını sağlamak için iyi bir yaklaşım olduğu; glutenin bazı fonksiyonel özelliklerini (çözünürlük, emülsifikasyon, köpük oluşturma gibi) geliştirmede ya da hipoalerjenik bebek ürünlerinde kullanılacak hidrolize protein üretiminde kullanılabileceği ifade edilmektedir.

Buğday gluteni iki önemli proteine sahiptir (Junru et al., 2001). Buğday unu proteinlerinin % 80'inini oluştururlar. Proteinlerin her ikisinde buğday ununda aynı miktarda bulunurlar. Gluten prolin ve glutamince zengindir Glutenin ve gliadin yapılarını Şekil 1.19 'da verilmiştir.



Şekil 1.19 Glutenin, gliadin ve gluten yapısı

2. MATERYAL VE METOD

2.1 Materyal

Bu çalışmada yöntemlere ait bilgiler ilgili bölümlerde ayrıntılı olarak verilmiştir.

Kullanılan kimyasal maddeler p-nitroanilin (pNA), Sığır serum albümin (BSA), Tris, NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , MnCl_2 , CuCl_2 , KCl, BaCl_2 , NiCl_2 , HgCl_2 , CdSO_4 , MgCl_2 , NaCl, LiCl_2 , CaCl_2 (Sigma, Almanya), Substance P, IGF-1, Suc-Ala-Pro-pNA, Z-Gly-Pro-pNA, H-Gly-Pro-pNA, H-Ala-Pro-pNA, H-Arg-Pro-pNA, H-Val-Ala-pNA, H-Glu-Ala-pNA, H-Leu-pNA, H-Pro-pNA ve H-Glu-pNA (Bachem, İsviçre) , Trikoloro asetik asit (TCA) (Riedel, Almanya) , Trifloroasetik asit (TFA)(Fluka, Almanya), Asetonitril, Sodyum borat, Borik asit, NaCl, Etanol (Sigma, Almanya), Coomassie Brilliant Blue G-250 (Fluka, Almanya) SDS7 molecular Weight marker (Sigma-Aldrich, ABD), Pierce Unstained Molecular Weight Marker, Thermo Scientific, (Waltham, ABD), DNA-Polimeraz (GoTaq DNA-Polimeraz) PROMEGA'dan (Mannheim); Pwo DNA-Polimeraz ROCHE DIAGNOSTICS'den (Mannheim); restriksiyon endonükleazlar NEW ENGLAND BIOLABS'dan (Frankfurt A. M.), T4 DNALigaz MBI FERMENTAS'dan (St.-Leon-Rot) ve Tripsin Sigma-Aldrich'dan (Deisenhofen,Almanya) temin edilmiştir.

Laboratuvarda, ÄKTA prime protein saflaştırma sistemi (GE Healthcare, İsveç), Agaroz ve SDS-PAGE mini jel elektroforez sistemleri (Hoefer Pharmacia Biotech, ABD ve Bio-Rad, ABD), Vorteks (IKA MS 2, Almanya), pH-metre (Hana Instrument, ABD), ısıtıcı blok (Biosan, Türkiye), Soğutmalı-çalkalamalı inkübatörler (New Brunswick Scientific, Enfield, USA), thermal cyclers (Applied Biosystems, California, ABD), UV transilluminatör (UV star, Core Life Sciences, Laguna Niguel, ABD), Mikroplaka okuyucu (Thermo scientific, ABD), Ultrafree-20 Nanopore su sistemi (Millipore, Eschborn, Almanya), Hirayama Hiclave HG 50 otoklav (Lafayette, ABD), santrifüj 5810R, 5415D, 5415R (Eppendorf, Hamburg, Almanya), santrifüj mikro 200R (Hettich, Tuttlingen, Germany), Selecta tezgah üstü santrifüj (Barcelona, Soniks Vibra cell™ sonikatör (Newtown, USA), QuantiFluor® (Promega, Wisconsin, ABD),yüksek

performans sıvı kromatografisi-diodearray detektör HPLC-DAD (Agilent HP1100, Hewlett and Packard, ABD), Düşük basınçlı kromatografi sistemi (Biorad's Biologic LP, California, ABD) cihazları kullanıldı.

Çalışmada kullanılan kitler GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit, . PureLink™ Genomic DNA Mini Kit ve GeneJET™ Gel Extraction Kit Thermo Scientific firmasından (St.-Leon-Rot, ABD) temin edildi.

Prolil oligopeptidaz enzim kaynağı olarak bitkisel kaynaklar *Taraxacum officinale* (Karahinhiba yaprak ve sap), *Beta vulgaris* (Pazı yaprak ve sap), *Malva sylvestris* (Ebegümece yaprak ve sap), *Urtica dioica* (Isırganotu), *Qercus aucheri* (Pinar), *Euonymus japonica* (Taflan yaprak), *Raphanus raphanistrum* (Turp otu), hayvansal kaynaklar (Guinea pig; karaciğer, kalınbağırsak, incebağırsak, kalp, beyin, mide, böbrek, pankreas) ve mikroorganizma (*Myxococcus xanthus*) kullanılmıştır. Bu çalışmada kullanılan Prolil oligopeptidaz enzimi *Myxococcus xanthus* suşundan elde edilmiştir. Enzim kaynağı olarak kullanılan *Myxococcus xanthus* suşu DSMZ (Braunschweig, Almanya) firmasından temin edilmiştir.

2.2 *Myxococcus xanthus* Suşun'dan Prolil Oligopeptidaz Enziminin Üretimi ve Saflaştırılması için Gerekli Kimyasallar

2.2.1 Kullanılan bakteriler

Klonlama amacıyla kullanılan suşlar ve genetik özellikleri aşağıda verilmiştir.

E. coli Turbo

E. coli DH5α (New England Biolabs, Frankfurt am Main) hücrelerinin özellikleri şöyledir: *fhuA2Δ*(argF-lacZ)U169 *phoA glnV44 Φ80Δ* (*lacZ*)M15 *gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*. Hücreler faj dirençlidir.

E. coli Turbo (New England Biolabs, Frankfurt am Main) hücrelerinin genetik özellikleri şu şekildedir: F', *pro*^{A+B+}, *lacI*^q, *Δ*(*lacZ*)M15/*fhuA2*, *Δ*(*lac-proAB*), *glnV*, *gal* R(*zgb-210::Tn10*), Tet^s, *endA1*, *thi-1*, *Δ*(*hsdS-mcrB*)5. Bu

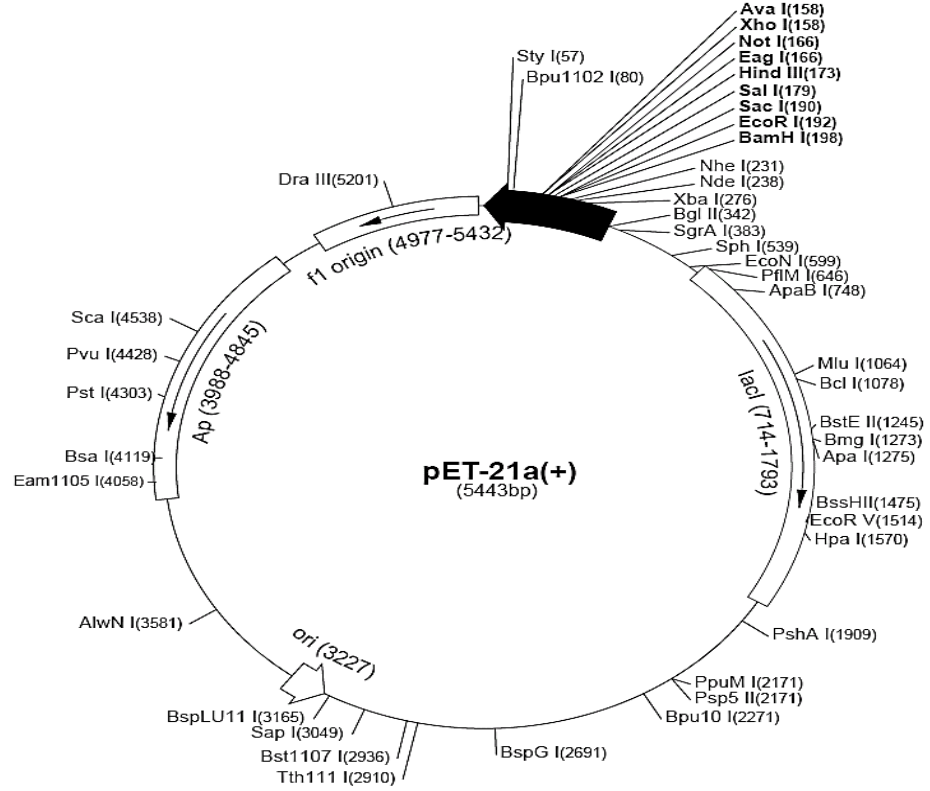
hücreler *E. coli* 5α hücreleri gibi T1-faj dirençlidir. Faj dirençliliği nedeniyle *E. coli* 5α hücreleri yavaş büyüme göstermektedir

2.2.2 Vektörler

2.2.2.1 pET 21a (+)

pET sisteminde (Novagen, Darmstadt), *E. coli* promotorlarına dayalı sistemlerden (*lac*, *tac*, *pL*) farklı olarak T7 promotoru bulunur ve hedef genin transkripsiyonu *E. coli* RNA polimeraz yerine T7 RNA polimeraz tarafından gerçekleştirilir. Bu suşlarda transkripsiyon izopropil-β-D-tiyogalaktopiranozid (IPTG) indüksiyonu sonucu gerçekleşir. Hedef genin transkripsiyonu vektördeki *lac* operatörü, *lacI* ve büyüme ortamına eklenen IPTG tarafından kontrol edilir (Studier et al., 1990).

Klonlama bölgesinde (MCS) *XhoI* (158), *EagI* (166), *NotI* (166), *HindIII* (173), *SalI* (179), *SacI* (190), *EcoRI* (192), *BamHI* (198) restriksiyon enzim kesim bölgeleri yer almaktadır. Klonlama bölgesinin 3' bölgesinde altı histidin kodonu bulunmaktadır. C-terminalde altı histidin artığı ((His)₆-tag) içerecek şekilde ifade edilen protein, Nikel-Şelat Afinite kromatografisinden yararlanılarak saflaştırılır. pET21a(+) vektörü beta-laktamaz kodlayan ampisilin dirençlilik geni (*bla*) içermektedir ve vektörü taşıyan hücreler bu şekilde seçilir.



Şekil 2.1 pET-21a(+) vektörü.

2.2.3 *E.coli* Büyüme Ortamları

Hazırlanan büyüme ortamlarının sterilizasyonu otoklavda (121 °C, 2 bar, 20 dakika) gerçekleştirildi. Seçici katı ortamların hazırlanması için ortamların sıcaklığı yaklaşık 60 °C'ye getirildi ve 1000X stok konsantrasyonda hazırlanmış ve steril filtreden geçirilmiş antibiyotik çözeltisi eklendi. Kullanılan büyüme ortamları ve içerikleri (Sambrook *et al.*, 1989) aşağıda verilmiştir.

Luria-Bertani-(LB)

Bakteri hücrelerinin büyütülmesinde, rekombinant *E.coli* suşlarının büyütülmesinde ve kültüründe en yaygın olarak kullanılan ve zengin besi ortamı olarak bilinen Luria-Bertani (LB) besi ortamı kullanıldı. Luria-Bertani besi ortamının içeriği ; % 0.5 (w/v) Maya ekstraktı, % 1.0 (w/v) NaCl, % 1.0 (w/v) Tripton'dan oluşmaktadır.

LB-Agar

LB-Agar ortamı; LB besi ortamına %1.5 (w/v) Bacto-Agar eklenerek hazırlandı.

Mueller-Hinton Agar (Merck) (MHA)

Sığır eti ekstraktı 2,0 g/L; Kazein asit hidrolizatı 17,5 g/L; Nişasta 1,5 g/L; Agar-agar 13,0 g/L.

Muller Hilton Broth (Merck) (MHB)

Et ekstraktı 2,0 g/L; Kazein asit hidrolizatı 17,5 g/L; Nişasta 1,5 g/L

2.2.4 *Myxococcus xanthus* büyüme ortamı

Myxococcus xanthus suşunun büyütülmesinde kullanılan ve zengin besiyeri olan casitone (CTT) besi ortamı kullanıldı. Casitone besi ortamının içeriği; % 1 (w/v) Casitone, % 1 (v/v) 1 M Tris-HCl (pH 8,8), %1 (w/v) 0,8 M MgSO₄, %0,1 (v/v) 1 M Potasyum-Fosfat (pH 7,4) 'dan oluşmaktadır.

2.2.5 Tamponlar ve Çözeltiler

Çözeltilerin hazırlanmasında ultra saf su kullanıldı. İlgili antibiyotik çözeltileri aşağıda belirtilen konsantrasyonlarda hazırlandı. Steril filtreden geçirildikten sonra -20°C'de saklandı.

Ampisilin stok çözeltisi (1000x)

150 mg/mL ampisilin (Na-tuzu) sulu çözeltisi hazırlandı ve steril filtreden geçirilerek strelize edildi ve stok çözelti küçük hacimlerde -20°C'de saklandı.

Kloramfenikol stok çözeltisi (1000x)

50 mg/mL sulu çözeltisi hazırlandı ve steril filtreden geçirilerek sterilize edildi ve stok çözelti küçük hacimlerde -20°C'de saklandı.

1 M CaCl₂

Sulu çözeltisi hazırlandı, steril filtreden geçirildi ve oda sıcaklığında saklandı.

1 M MgCl₂

Sulu çözeltisi hazırlandı, steril filtreden geçirildi ve oda sıcaklığında saklandı

1 M MgSO₄

Sulu çözeltisi hazırlandı, steril filtreden geçirildi ve oda sıcaklığında saklandı.

İzopropil-β-D-tiyogalaktopiranozid stok çözeltisi

0,5 M IPTG sulu çözeltisi hazırlandı, steril filtreden geçirildi ve -20 °C’de saklandı.

2.3 Prolil Oligopeptidaz Enzimin Farklı Kaynaklarda Belirlenmesi

Prolil oligopeptidaz enziminin saflaştırılacağı uygun kaynağın seçilmesi için farklı bitkisel ve hayvansal dokularda ekstraksiyon sonrası enzim aktiviteleri incelendi. Bu amaçla; seçilen bitkisel kaynaklar; *Taraxacum officinale* (Karahinhiba yaprak ve sap), *Beta vulgaris* (Pazı yaprak ve sap), *Malva sylvestris* (Ebegümece yaprak ve sap), *Urtica dioica* (Isırganotu), *Qercus aucheri* (Pinar), *Euonymus japonica* (Taflan yaprak), *Raphanus raphanistrum* (Turp otu) ve hayvansal kaynaklar; Guinea pig karaciğer, kalın bağırsak, ince bağırsak, kalp, beyin, mide, böbrek, pankreas, dalak 0,1 M Tris-HCl pH 7,4 tamponunda homojenize edilerek 10000 g, 30 dakika. +4 °C’de santrifüjlendi. Süpernatantlar aktivite ve protein (Bradford, 1976) tayinleri için -20 °C depolandı.

2.4 *Myxococcus xanthus* Suşu’ndan Prolil Oligopeptidaz Enziminin Üretimi ve Saflaştırılması

2.4.1 Sterilizasyon

Isıya dayanıklı çözeltiler ve büyüme ortamları kullanılmadan önce otoklavlandı (20 dakika, 121 °C ve 2 bar). Pipet uçları otoklavlandıktan sonra 50

°C’de kurutuldu. Sıcaklığa dayanıklı olmayan çözeltiler stok çözelti olarak hazırlandı ve 0.2 µm membran filtreden geçirildi.

2.4.2 *E. coli* hücrelerinin inkübasyon ve saklama koşulları

E. coli hücreleri protein ekspresyonu için sıcaklığın değiştirildiği koşullar dışında 37 °C’de sıvı LB besi ortamında inkübe edildi. Karıştırma hızı 140 rpm (1L kültür için) ve 220 RPM (5, 50 ve 250 mL kültür için) olarak belirlendi. Plazmid taşıyan hücreler için büyüme ortamına ilgili antibiyotikler (150 µg/mL ampicillin ve 50 µg/mL kloramfenikol) eklendi. Hücre süspansiyonu ilgili antibiyotiği içeren katı agar (LB-Agar) petrilere yayıldı, gece boyunca 37 °C’de inkübe edildi. Tek düşen koloniler belirlendi. Kısa süreli depolama için petrilere veya hücre süspansiyonları 4 °C’de buzdolabında bekletildi. Uzun süreli depolama için hücreler gliserin stoklarında ve -80 °C’de saklandı. Gliserin stoğu elde edilmesi amacıyla sıvı kültürden steril tüpe alınan örnek 1:1 oranında % 87 gliserin ile karıştırıldı.

2.4.3 *Myxococcus xanthus* hücrelerinin inkübasyon ve saklama koşulları

Myxococcus xanthus Genomik DNA’sı DSMZ (Braunschweig, Almanya) firmasından temin edildi. *Myxococcus xanthus* (DSM16526) kasiton ortamında (CTT ortamı) 30 °C ‘de 225 rpm’de 6 gün inkübe edildi. Kısa süreli depolama için petrilere veya hücre süspansiyonları 4 °C’de buzdolabında bekletildi. Uzun süreli depolama için hücreler gliserin stoğu şeklinde saklandı. Bu amaçla sıvı kültürden steril tüpe alınan örnek 1:1 (v/v) oranında gliserol (% 87, w/v) ile karıştırıldı. Ortamın hazırlanışı aşağıda verilmiştir.

2.4.4 Kimyasal kompetent *E. coli* hücrelerinin hazırlanması

Bakterilerin çoğu yabancı DNA moleküllerini büyüme ortamından hücre içine alabilir. Ancak bu yolla alınan DNA hücre tarafından parçalanır. Eğer DNA molekülü bir plazmid ise ve plazmidin replikasyon orijini konakçı tarafından tanınıyorsa, plazmid parçalanmaz ve hücrede çoğalabilir. Laboratuvar koşullarında sadece birkaç bakteri türü (*Bacillus* ve *Streptococcus*) için transformasyon kolayca gerçekleşir. Bu bakteriler DNA bağlanması ve hücre içine

alınması için özel mekanizmalara sahiptir. *E.coli* ve diğer birçok bakteri türünün ise normal şartlarda hücre içine alabileceği DNA miktarı sınırlıdır. Transformasyon etkinliğinin artırılması için fiziksel ve/veya kimyasal işlemlere maruz kalmış hücreler kompetent olarak isimlendirilmektedir. Kimyasal kompetent hücre hazırlanmasında kullanılan CaCl_2 'ün, DNA'nın negatif yükünü maskeleyiği ve hücre duvarında porların açılmasını sağladığı düşünülmektedir. Bu işlem sırasında DNA'nın hücreye girişini sağlayan 42 °C'de gerçekleştirilen ısı şokudur (Brown, 2006).

Kimyasal kompetent hücrelerin hazırlanması için kullanılan metot Hanahan protokolünü temel almaktadır (Hanahan; 1983, 1985). Bu metotun transformasyon etkinliğinin CaCl_2 protokolünden daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Kompetent hücreye DNA transformasyonu, öncelikle hücre membranının zayıflatılması ve ardından uygulanan ısı şoku ile DNA'nın hücre içine girişinin sağlanması esasına dayanır. Ekipmana ihtiyaç duyulmaması ve iyi transformasyon verimine sahip olması yöntemin başlıca avantajlarıdır (Cohen et al., 1972).

Kimyasal kompetent hücrelerin hazırlanması amacı ile uygulanan protokol; öncelikle 50 mL LB besi ortamına ($\text{OD}_{600} = 0,1$) inokule edilen hücreler OD_{600} 0,6'ya ulaşıncaya kadar 37 °C ve 220 rpm'de inkübe edildi. 1 mL hücre kültürü +4 °C'de 4000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi. (Bu adım istenilen hücre yoğunluğuna ulaşmak için 4 kere tekrarlandı). 1 mL soğuk ($\text{MgCl}_2 + \text{CaCl}_2$) çözeltisi ile süspanse edildi. +4°C'de 4000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Çöken hücreler 0,1 M 100 μL soğuk CaCl_2 de süspanse edildi. % 50'lik gliserol eklendi. Her iki eklemede oldukça yavaş bir şekilde pipetle karıştırma yapılarak süspansiyon homojen olması sağlandı. Karıştırma bittikten sonra, önceden buzlukta tutularak soğutulmuş olan boş ve steril ependorf tüplerinin her birine 0,2 mL kültür aktarıldı. Aktarma işlemi bittikten sonra tüpler 5 dk kuru buzda bekletildi. Sürenin sonunda tüpler -80° C' de depolandı.

2.4.5 *E. coli*'den plazmid DNA izolasyonu

Hücrelerden plazmid DNA izolasyonu alkali liziz prensibine dayanmaktadır (Legouill et al., 1994). Hücre liziz tamponu NaOH ve SDS içerir. NaOH, hücre

duvarının parçalanmasında yardımcıdır. Ancak en önemli işlevi genomik DNA'nın ve plazmid DNA'nın denatürasyonunu sağlamaktır. SDS protein denatürasyonuna neden olarak proteinlerin uzaklaştırılmasını sağlar. Amonyum asetat eklenmesiyle tek iplikli DNA'nın renatürasyonu gerçekleştirilir. Bu, plazmid DNA ve genomik DNA'nın birbirinden ayrılmasını sağlayan seçici adımdır. Genomik DNA'nın renatürasyonu, küçük dairesel plazmid DNA ile karşılaştırıldığında daha zordur. Liziz aşamasında çok hızlı karıştırma veya vorteksleme genomik DNA'nın kolayca renatüre olabilen küçük ipliklere parçalanmasına neden olur ve plazmid DNA örneğinin saflığını etkiler. Çift iplikli DNA suda kolayca çözünebilirken, tek iplikli genomik DNA, SDS ve denatüre proteinler hidrofobik etkileşimler yoluyla bir araya gelir. Oluşan bu beyaz çökelek santrifüj ile kolayca uzaklaştırılabilir.

2.4.6 Plazmid DNA izolasyonu

E.coli'den plazmid DNA izolasyonu için Fermentas GeneJET™ Plazmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, St.-Leon-Rot, ABD) kullanıldı. Gece boyu inkübe edilen 5 mL hücre süspansiyonu 8000 rpm'de 2 dakika santrifüjlendi. İzolasyon işlemi, kitte verilen protokole uygun olarak aşağıda verilen adımlarla gerçekleştirildi. İzolasyon işleminin son basamağındaki plazmid DNA elüsyonunda elüsyon tamponu yerine 50 µL steril H₂O kullanıldı. Plazmid DNA - 20 °C'de saklandı.

- LB ortamında büyüyen 1000 µL hücre kültürü 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine alındı.
- Üzerine 250 µL liziz tamponu eklendi ve 4-6 defa alt-üst edilerek karıştırıldı.
- Ardından karışıma 350 µL soğuk nötralizasyon tamponu eklendi.
- Tüp 13000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi.
- Hücre debris pelletini süspanse etmeden süpernatant GeneJET™-Spin kolona alındı. Kolon toplama tüpüne yerleştirildi ve 1 dakika maksimum hızda (13000 rpm) santrifüjlendi.
- Toplama tüpünde biriken sıvı atılarak kolon tekrar yerleştirildi

- Kolona 500 µL yıkama tamponu eklenerek 60 saniye 2 kez santrifüjlendi
- Kolon yeni bir santrifüj tüpüne aktarılarak üzerine 50 µL ultra saf su ilave edildi ve 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- 2 dakika santrifüjlenerek plazmid DNA elüsyonu gerçekleştirildi.

İzole edilen plazmidler % 1 (w/v) 'lik agaroz jele yüklendi. Thermo EC 300 XL cihazında 100 V'da maksimum A'de 80 dakika boyunca yürütüldü. UV görüntüleme cihazı ile görüntüledi.

2.4.7 Genomik DNA izolasyonu

Myxococcus xanthus DSMZ firmasından temin edildi. *Myxococcus xanthus* suşunun genomik DNA'sının elde edilmesi için Fermentas GeneJET™ genomik DNA ekstraksiyonu kiti kullanıldı. Suş, ilgili protokol'e uygun olarak açıldıktan sonra 30 °C'de, Kasiton ortamında (CTT) 6 gün boyunca inkübe edildi ve genomik DNA kitte verilen protokole uygun olarak izole edildi.

- CTT ortamında büyüyen 1000 µL hücre kültürü 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine alındı.
- Hücre kültürü 8000 rpm' de 5 dakika 2 kez santrifüj edildi.
- Hücre pelleti 180 µL PureLink Genomic digestion tamponuyla süspanse edildi. Hücreleri parçalamak için 20 µL proteinaz K eklendi.
- Süspansiyon 55°C de 120 dakika inkübe edildi
- Lizata 20 µL RNaz A eklendi ve 2 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- Üzerine önce 200 µL Genomik parçalama/bağlama tamponu ve sonra 200 µL % 96-100 (v/v) etanol eklendi.
- Lizat, PureLink spin kolona alındı. Kolon toplama tüpüne yerleştirildi ve 1 dak. 11200 rpm'de santrifüjlendi.
- Toplama tüpünde biriken sıvı atıldı ve kolon tekrar yerleştirildi.
- Kolona 500 µL yıkama tamponu-1 eklenerek 1 dakika santrifüjlendi.

- Kolona 500 µL yıkama tamponu-2 eklenerek 1 dakika santrifüjlendi
- Kolon yeni bir santrifüj tüpüne aktarılarak üzerine 50 µL steril su ilave edildi ve 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- 1 dakika 11000 rpm'de santrifüjlenerek genomik DNA elüsyonu gerçekleştirildi.
- İzole edilen örnekler jel elektroforezi ve PCR çalışmalarında kullanılmak üzere -20 °C'de depolandı.

2.4.8 Agaroz Jel Elektroforezi

DNA moleküllerinin ayrıştırılmasında, tanımlanmasında ve saflaştırılmasında yaygın olarak kullanılan metodoljiler poliakrilamid (PAGE) ve agaroz jel elektroforezleridir (Sambrook et al., 1989). Bu metodların ilkesi; yapısındaki fosfat grubu nedeniyle negatif yüke sahip olan DNA moleküllerinin elektriksel alanda pozitif elektroda doğru hareket etmesidir. Bu işlemde jel porları nedeni ile küçük DNA molekülleri daha hızlı hareket ederler. DNA'nın jelde görünür hale gelebilmesi etidyum bromür (EtBr)'ün interkalasyon özelliği ile DNA'ya bağlanarak 300-360 nm'de ışığı absorbe etmesi sonucu flüoresan etki göstermesi ile gerçekleşmektedir. Bu etki DNA konsantrasyonuna bağlı olarak kuvvetli veya zayıf olabilir.

Agaroz jel elektroforezi için gerekli olan kimyasallar aşağıda verilmiştir.

Agaroz (% 1)

Aksi belirtilmediği takdirde % 1 agaroz 0,5 x TBE tamponunda ısıtılarak çözeltisi elde edildi ve agaroz jel elektroforezi deneylerinde kullanılmak üzere uygun jel tanklarına döküldü.

Etidyum bromür stok çözeltisi

10 mg/ml stok Etidyum bromür (EtBr) hazırlandı, stok çözelti oda sıcaklığında saklandı.

0,5xTBE

44,5 mM borik asit, 0,5 mM EDTA, 44,5 mM Tris (pH 8,15) sulu çözeltisi hazırlandı.

DNA marker

Agaroz jel elektroforezinde standart olarak Thermo Scientific (Waltham, USA) Thermo Scientific FastRuler Middle Range DNA Ladder ve Smart Ladder (EUROGENTEC, Köln) kullanıldı. Smart Ladder ve FastRuler Middle Range DNA Ladder polinükleotid büyüklükleri bp 10000, 8000, 6000, 5000, 4000,3000, 2500, 2000, 1500,1000, 800, 600, 400, 200 standardı 5000, 2000, 850, 400, 100 olarak verilmiştir.

Deneyimizde DNA moleküllerinin görüntülenmesinde aksi belirtilmediği takdirde; agaroz (% 1, w/v), 25 mL 0,5 TBE (Tris-Borat-EDTA) tamponunda kaynatılarak çözüldü. 50-60 °C'ye soğutulmasının ardından 10 mg/mL stok EtdBr çözeltisinden 2,5 µL eklendi. Jel ünitesine yayılan agarozun katılaşması beklendi ve üzerine 0,5xTBE tamponu eklendi. DNA örnekleri 10xDNA yükleme tamponu ile karıştırıldı ve jele uygulandı. Elektroforez 60 volt. saat uygulandı. DNA fragmentleri UV ışıktaki Bio-Rad UV Transilluminator 2000 görüntüleme cihazı yardımıyla belirlendi.

2.4.8.1 DNA fragmentlerinin agaroz jelden ekstraksiyonu

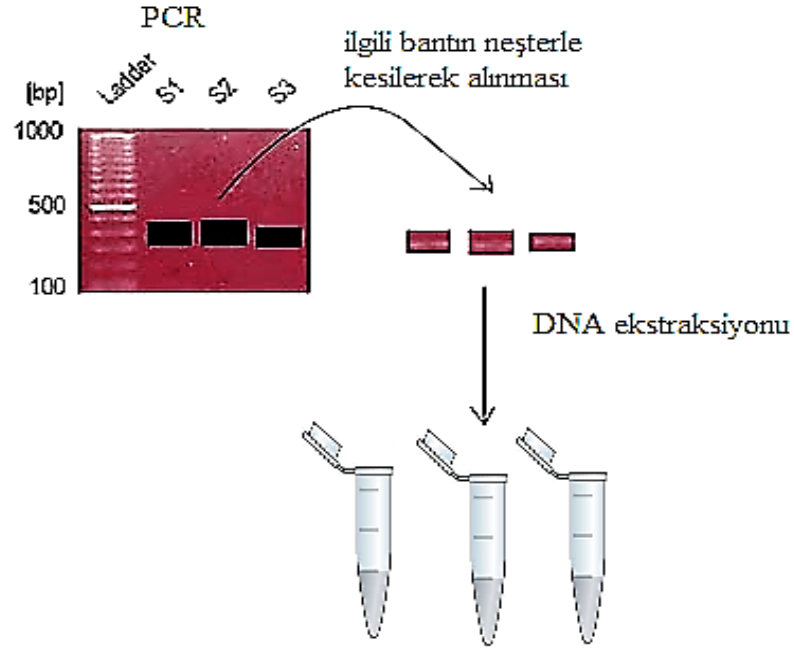
UV ışık altında görüntülenen DNA fragmentleri temiz bir neşter kullanılarak jelden kesildi ve ependorf tüpe alındı. DNA ekstraksiyonunda Fermentas agaroz jel DNA ekstraksiyon kiti (Fermentas, GeneJET™ Gel Extraction Kit) kullanıldı. Jel ekstraksiyon kitinin bileşenleri aşağıda Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Jelden ekstraksiyon işlemi, Fermentas agaroz jel DNA ekstraksiyon kitinin aşağıda verilen protokolüne göre yapılmıştır.

Çizelge 2.1 Jel ekstraksiyon kiti'nin bileşenleri.

GeneJET jel ekstraksiyon kiti
Bağlanma tamponu
Yıkama tamponu (Konsantre)
Elüsyon tamponu (10mM Tris-HCl, pH 8.5)
GeneJET purifikasyon kolonu

- DNA bantını içeren bölge jelden kesilerek bir ependorf tüpe alındı.
- Üzerine 300 µL agaroz çözündürme tamponu eklendi.
- Karışıma silika süspansiyonundan 10 µL eklendi
- Karışım 60 °C' de her 2-3 dakikada bir vortekslenerek toplam 10 dak. inkübe edildi.
- Karışım maksimum hızda (13000 rpm) 30 saniye santrifüjlendi ve süpernatant atıldı.
- Pellet üzerine 500 µL nükleik asit bağlama tamponu eklendi. Bir önceki basamakta olduğu gibi santrifüjlendi ve süpernatant atıldı.
- Pellet 2 defa 500 µL yıkama tamponu (etanol içeren) ile yıkandı, santrifüjlendi ve süpernatant atıldı.
- Sıvı kısım uzaklaştırıldı ve ısıtıcılı blokta 55 °C'de 15 dak. süresince bekletildi.
- DNA elüsyonu için 50 µL ultra saf su tüpe eklendi. Bir dak. oda ısısında bekletildi. Son olarak, maksimum hızda (13000 rpm) 30 saniye santrifüjlendi ve DNA'yı içeren üst faz yeni bir tüpe alındı.
- Jelden ekstrakte edilen DNA'lar -20 °C'de depolandı.



Şekil 2.2 Agaroz jelden DNA ekstraksiyonu için jelden ilgili bantın alınması (örnek gösterim).

2.4.9 DNA'ya uygulanan enzimatik işlemler

2.4.9.1 Çift iplikli DNA'nın restriksiyon endonükleazlar ile kesimi

Restriksiyon enzimleri (RE) ilk kez Bertani ve Weigle tarafından, bakteriyofaj ile infekte edilen *E.coli* bakterisinde yapılan çalışmalarda gözlenmiştir (Bertani and Weigle, 1953). Bu enzimler çift sarmallı DNA moleküllerini özgün nükleotid tanıma dizilerinden kesen endonükleazlardır. Bu enzimler etki özellikleri bakımından Tip I, Tip II ve Tip III olarak sınıflandırılırlar, ancak substrat DNA'larına özgün olmaları nedeniyle gen mühendisliğinde yalnızca Tip II enzimleri kullanılmaktadır.

Çift iplikli DNA'nın spesifik olarak kesimi için palindromik dizileri tanıyan restriksiyon endonükleaz tip II enzimleri kullanıldı. (Sambrook et al., 1989). Restriksiyon enzimleri deoksiriboz ile fosfat grupları arasındaki fosfodiester bağlarına etki etmektedir ve bu nedenle kesim sonucu 5'-fosfat ve 3'-hidroksil uçları oluşmaktadır. Color Opti Taq EURX (Przyrodnikow, Polonya) restriksiyon endonükleazlar New England Biolabs (Frankfurt, Almanya), T4-DNA ligaz Thermo Scientific (Waltham, ABD) firmalarından temin edildi

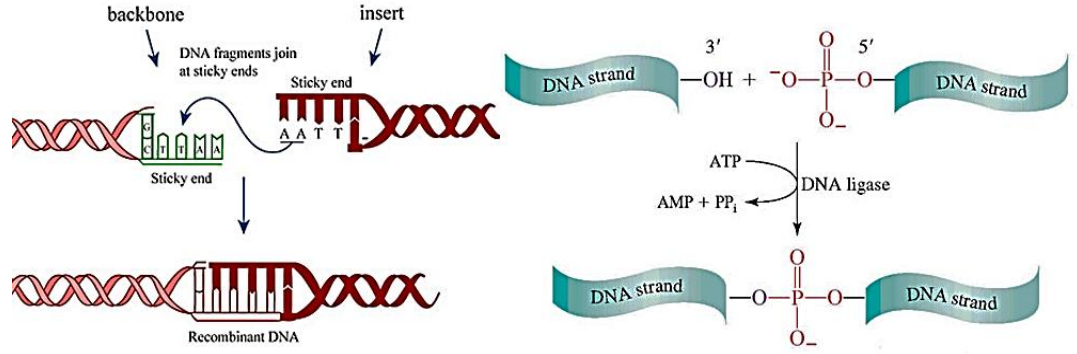
Toplam reaksiyon hacmi 30 μL olacak şekilde en fazla 1 μg DNA örneği veya 2 μg vektör, ilgili restriksiyon enzimleri (*Hind* III ve *Nde*I) ile (20 U) gece boyunca 37 $^{\circ}\text{C}$ 'de muamele edildi. *Hind* III ve *Nde*I restriksiyon enzimleri birlikte kullanıldığı için üretici firma tarafından önerilen tampon kullanıldı. Kullanılan restriksiyon enzimlerinin toplam hacmi, reaksiyon hacminin % 10' unu aşmayacak şekilde hesaplandı. Bu şekilde restriksiyon enzimlerinin depolanması için kullanılan gliserolün aktiviteyi etkilemesi engellendi. Restriksiyon enzimleri ile muamele edilen örnekler agaroz jel elektroforezine uygulandı. UV ışık altında görüntülenen fragmentler ligasyonda kullanılmak üzere agaroz jelden ekstrakte edildi.

2.4.9.2 Kimyasal kompetent *E. coli* hücrelerine transformasyon

Derin dondurucuda (-80 $^{\circ}\text{C}$) saklanan kompetent *E. coli* hücreleri buzda 5 dakika inkübe edilerek ligasyon ürünleri tüplere eklendi ve buzda 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tüpler sırasıyla; 45 saniye 42 $^{\circ}\text{C}$ 'de ve 5 dakika buzda inkübe edildi. Üzerlerine 800 μL LB ortamı eklendi ve 37 $^{\circ}\text{C}$ 'de 1 saat karıştırılarak inkübe edildi. Örnekler daha sonra 4000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi ve besi ortamının bir kısmı uzaklaştırıldı. 100 μL hücre süspansiyonu, LB agar ve 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ampisilin içeren petrilere ekim yapıldı. 37 $^{\circ}\text{C}$ 'de gece boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrası koloniler öncelikle LB agar + ampisilin+ kloramfenikol içeren petrilere çoğaltıldı. Ligasyon işleminin gerçekleştiği koloni PCR uygulamaları ile kontrol edildi.

2.4.9.3 Ligasyon

Ligasyon, rekombinant geni taşıyan DNA parçaları ile vektör DNA arasındaki fosfodiester bağlarının yeniden oluşturulması reaksiyonudur. Bu reaksiyonda ligaz sınıfı enzimler görev yapar (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 Ligazın reaksiyon mekanizması.

Ligasyon sürecinde karşılaşılabilecek sorunlardan biri, vektörün insert DNA'ya bağlanması yerine kendi uçlarının birleşip halka şeklini kazanmasıdır. Bunu engellemek için yapılan uygulamalardan biri, vektörün 5' uçlarındaki fosfat gruplarının yok edilerek fosfodiester bağ oluşumunu önlemektir. Aynı enzimle kesilmiş DNA parçaları ve doğrusal konuma getirilmiş taşıyıcı DNA molekülleri bir araya getirildiğinde, birbirlerini tamamlayıcı özellikteki (yapışkan) uçları taşımalarından dolayı baz eşleşmeleri yoluyla moleküller bağlanma sağlanır. Sonrasında ligaz enzimi nükleotitler arasında fosfodiester bağları kurarak açık uçları kapatır. Bu yöntem rekombinant DNA elde etmek için kullanılan en basit ve etkili yoldur.

Ligasyon için restriksiyon enzimleri ile muamele edilmiş DNA fragmenti ve vektör kullanıldı. Reaksiyon 20 µL hacimde gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımına 1U T4-DNA-Ligaz (Thermo Scientific, St.-Leon-Rot, USA) ve uygun tampon eklendi. Termal döngü'de gece boyu 16°C'de inkübe edildi. Ligasyon örnekleri inkübasyonun ardından +4 °C'de depolandı. Ligasyon karışımının 5 µL'si kompetent *E. coli* hücrelerine transforme edildi. Jelden saflaştırılan PCR ürünleri ile pET21a(+) vektörünün ligasyon reaksiyonu bileşenleri Çizelge 2.2'de verildi.

2.4.10 DNA fragmentlerinin standart PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile çoğaltılması

PCR, hedef bir DNA molekülünün *in vitro* koşullarda enzimatik olarak amplifikasyonu esasına dayanır (Mullis and Faloona, 1987). DNA'nın denatürasyonu, primerlerin bağlanması ve enzimatik DNA sentezi (uzama) adımlarının tekrarlanmasıyla DNA fragmentleri üssel olarak çoğaltılır. DNA molekülü denatüre edildikten sonra, primerler tek iplikli DNA molekülleri üzerinden kendilerine tamamlayıcı olan bölgelere bağlanırlar. DNA polimeraz enzimi, uygun tampon ve dört çeşit deoksiriboz nükleozid trifosfat (dNTP) varlığında, primerin 3' hidroksil ucundan başlayarak zincirin uzamasını sağlar.

PCR 50 µL hacimde, termal cycler'da (kapak sıcaklığı 110 °C) gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımı her bir dNTP'den 0,2 mM, 12,5 nmol son konsantrasyonda ileri ve geri yönde primerler, 1.25 U Dream Taq Polimeraz, 0,5 µg kalıp DNA ve 5 mM MgCl₂ içeren reaksiyon tamponu kullanılarak hazırlandı. Amplifikasyon için uygulanan reaksiyon koşulları Çizelge 2.3'de verilmiştir.

Tasarlanan primerlerin bağlanma sıcaklığını belirlemek amacıyla 55-68 °C arasında gradient PCR kuruldu.

Çizelge 2.3 DNA amplifikasyonu için kullanılan PCR koşulları.

PCR Basamağı	Sıcaklık-Süre
Başlangıç Denatürasyonu (Initial Denaturation)	94 °C-3 dak
Denatürasyon (Denaturation)	95 °C-45 sn
Primer bağlanması (Annealing)	55-68°C-45 sn
Uzama (Extention)	72 °C- 2 dak
Son uzama (Final Extention)	72 °C- 10 dak

PCR’da denatürasyon-uzama basamakları 35 döngü olarak uygulandı.

Hedef DNA fragmanlarının amplifikasyonu amacıyla PCR deneylerinde kullanılmak üzere tasarlanan primerler Alpha DNA (Montreal) firmasından temin edildi. Tasarlanan primer aşağıda verilmiştir.

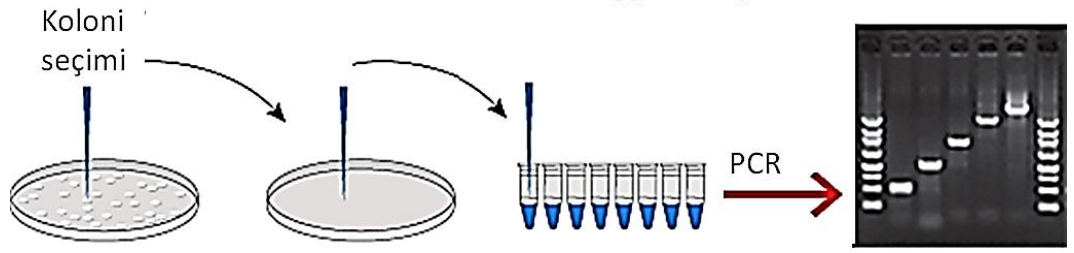
Primer Adı	Primer Dizisi
<i>NdeI</i>	5’GGGAATTCCATATGTCCTACCCGGCGACC3’
<i>HindIII</i>	5’GGGAATTCCATATGTCCTACCCGGCGACC3’

2.4.11 Koloni PCR

Koloni PCR işleminin uygulama amacı klonlanan DNA fragmentini alan vektörleri taşıyan hücrelerin taranmasıdır. Bu amaca yönelik olarak transformasyon işleminden sonra seçici antibiyotik içeren LB-petrilere hücre ekimi gerçekleştirildi. Gece boyu 37°C sıcaklıkta büyütülen hücrelerden tek düşen kolonilerden steril kürdanlar ile PCR tüplerine sürüntü alındı. Her bir PCR tüpüne aşağıda içeriği belirtilen PCR karışımından 10 µL eklendi. PCR karışımı çizelge 2.4, programı ise Çizelge 2.5’deki gibi uygulandı.

Çizelge 2.4 Koloni PCR için PCR karışımı.

PCR Bileşeni	Hacim (µl)
5× Green GoTaq® tamponu	10
0,5 U GoTaq® DNA polimeraz	1
dNTP karışımı (0,2 mM)	1
5’primerler (1 µM)	1
3’primerler (1 µM)	1
d. H ₂ O	36
Toplam	50



Şekil 2.5 Koloni PCR işleminin şematik gösterimi.

Çizelge 2.5 Koloni PCR için standart PCR koşulları.

PCR Basamağı	Sıcaklık-Süre
Başlangıç Denatürasyonu (Initial Denaturation)	95°C-5 dak
Denatürasyon (Denaturation)	95°C-45 sn
Primer bağlanması (Annealing)	55°C-45 sn
Uzama (Extention)	72°C-45 sn
Son uzama (Final Extention)	72 °C-5 dak
	4°C, ∞.

İkinci denatürasyon, primer bağlanması ve uzama adımları 30 kez tekrarlandı. Agaroz jelde PCR ürünlerinin büyüklüğü karşılaştırıldı ve bu şekilde klonlanan geni içeren vektörleri taşıyan koloniler belirlendi. PCR sonucunda hedef geni almamış vektörlerden yaklaşık 300 bp büyüklüğünde fragman oluşmaktadır. Hedef geni almış vektörler ise klonlanan genin büyüklüğüne göre fragmanlar vermektedir.

2.5 *E. coli*' de Rekombinant Protein Üretimi ve Saflaştırılması

2.5.1 Heterolog protein ekspresyonu ve Nikel-Şelat Afinite kromatografisi ile saflaştırılması

2.5.1.1 Proteinlerin küçük ölçekte ekspresyonu

Optimum ekspresyon koşullarının belirlenmesi için test ekspresyonları gerçekleştirildi. Proteinlerin küçük ölçekteki ekspresyonu için ilgili antibiyotiği içeren 50 mL LB ortamı 250 mL cam erlene alındı. Büyüme ortamına, OD₆₀₀ 0.1 olacak şekilde tek koloniden oluşturulmuş taze kültür inokule edildi ve 37 °C, 200 rpm'de inkübe edildi. OD₆₀₀ 0,4 - 0,6'ya ulaştığında değişen konsantrasyonlarda İzopropil-β-D-tiyogalaktopiranozid (IPTG) eklendi. Ekspresyon için inkübe edilen hücreler santrifüjlendi (4000 rpm, 10 dak, +4 °C) ve hücre pelleti 10 mL 50 mM fosfat tamponunda (pH 7,5) süspanse edildi. Hücre süspansiyonu buz üzerine alınarak sonikasyon (% 40 güç; 2 sn sonikasyon – 2 sn bekletme toplam 1 dakika.) uygulandı. Homojenattan alınan 100 µL örnek santrifüjlenerek (13000 rpm, 10 dk, +4°C) süpernatant ve pellet ayrıldı. Pellet 100 µL 0,1 M fosfat tamponunda (pH 7,5) tekrar süspanse edildi. Süpernatant ve pellet SDS-PAGE'e uygulandı. SDS PAGE sonuçlarına göre hangi ekspresyon koşulunda hedef proteininin daha fazla üretildiği tespit edildi.

IPTG ile indüklenen ve indüklenmeyen hücrelerin protein ekspresyonları karşılaştırıldı.

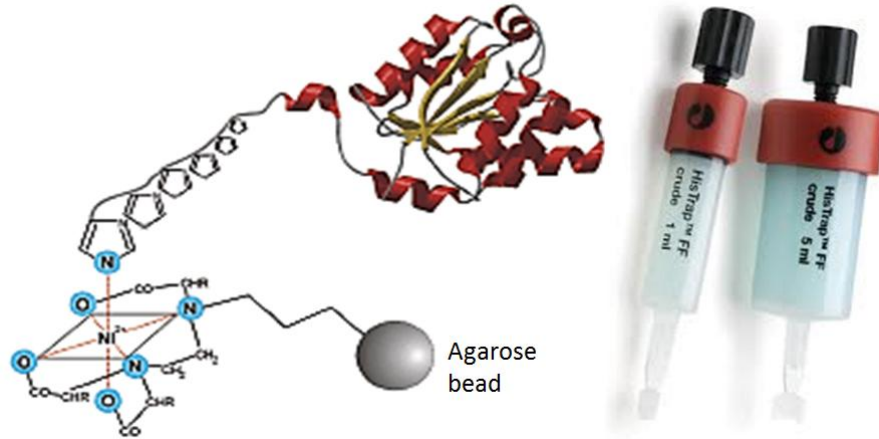
2.5.1.2 Poteinlerin büyük ölçekte ekspresyonu

Proteinlerin büyük ölçekte ekspresyonu için ilgili antibiyotiği içeren 1 L LB ortamı 3 L cam erlene alındı. Büyüme ortamına, OD₆₀₀ 0.1 olacak şekilde tek koloniden oluşturulmuş taze kültür inokule edildi ve 37 °C, 200 rpm'de inkübe edildi. Test ekspresyonunda belirlenen konsantrasyonda IPTG, OD₆₀₀ 0.4 - 0.6'ya ulaştığında ortama eklendi. Erlenler IPTG ilavesinden önce yaklaşık 30 dak. bekletildi. Ekspresyon için gece boyu 20 – 25 °C sıcaklıkta inkübe edilen hücreler santrifüjlendi (4000 rpm, 30 dak, +4 °C). 1 g hücre pelleti başına 5 ml, 50 mM fosfat tamponu (pH 7.4 – 8.0), 500 mM NaCl ve 5 mM imidazol içeren tampon

ilave edilerek süspanse edildi. Hücre süspanasyonu buz üzerine alındı ve sonikasyon (% 40 güç; 5 sn sonikasyon – 10 sn bekletme toplam 5 dakika) uygulandı. Homojenat santrifüjlendi (13000 rpm, 30 dak, +4 °C) ve süpernatant afinite kolonuna uygulandı.

2.5.1.3 Metal Şelat Afinite Kromatografisi

Rekombinant proteinlerin saflaştırılmasında immobilize metal şelat afinite kromatografisi (IMAC) oldukça sık kullanılan bir yöntemdir (Porath et al., 1975). Bu amaca yönelik olarak saflaştırılmak istenilen proteine bir afinite kuyruğu eklenmesi ile kromatografik işlem için uygun bir hale getirilir. En yaygın kullanılan afinite kuyruklarından biri polihistidin kuyruğudur. IMAC yöntemi bir matrikse immobilize olan bir geçiş metali ile spesifik amino asit zincir arasındaki etkileşime dayanmaktadır. İmmobilize metaliyon matriksle en güçlü etkileşim gösteren amino asit histidindir. Histidin amino asidindeki imidazol halkası elektron donörü grup olarak immobilize geçiş metali ile koordinasyon bağları oluşturur (Terpe, 2003; Walls, 2011).



Şekil 2.6 Metal şelat afinite kromatografisi matriksi ve His-Trap kolonlar.

Sistem	: ÄKTA prime (GE Healthcare, İsveç)
Kolon	: HisTrap™ FF 5mL (GE Healthcare, İsveç),
Mobil Faz A	: 50 mM Fosfat tamponu, pH 7,8, 500 mM NaCl, 10 mM imidazol
B	: 50 mM Fosfat tamponu, pH 7,8, 500 mM NaCl, 250 mM imidazol

Akış hızı	: 2,5 mL/dakika
Dedeksiyon	: 280nm
Uygulama	: Gradient elusyon
0 - 20 dakika	% 100 A tamponu
20 - 40 dakika	% 50 B tamponu
40 - 60 dakika	% 75 B tamponu
60 – 80 dakika	% 100 B tamponu
80 - 100 dakika	% 100 A tamponu

Saflaştırma sonrası proteinlerin deriştirilmesi amacıyla Amicon® santrifüj tüpüne (Amicon Ultra 15; NMWC: 10 kDa) alınan örnekler santrifüjlendi (4000 rpm, +4°C) Deriştirilen protein örneğine, 100 mM Tris-HCl pH 7,4 tamponu eklendi ve tampon değişimi sağlandı.

2.6 Protein Tayini

Tüm aşamalaradaki protein tayinleri; sığır serum albuminin standart olarak kullanıldığı, Bradford (1976) yöntemine göre (mikroplaka format) gerçekleştirildi. Boya bağlama temelli yöntemler arasında en yaygın olarak kullanılan bu yöntem, Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının asidik grupları ile proteinlerin bazık gruplarının (Lys, Arg) etkileşerek renk oluşturması esasına dayanmaktadır.

Standartlar : 25 – 175 µg/mL Sığır serum albumin (Fluka, Almanya)

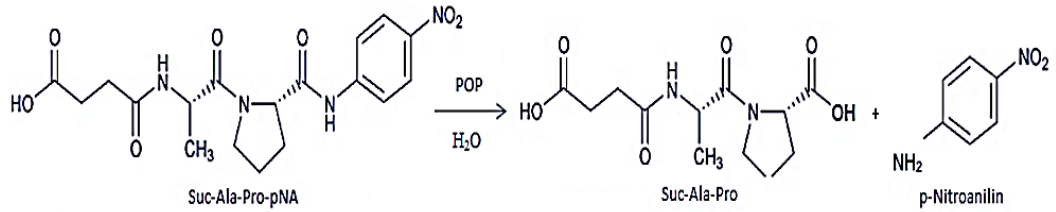
Bradford reaktifi : 40 mg Coomassie Blue G-250 (Fluka, Almanya), 50 mL 95 % (v/v) Etanol (Sigma, Almanya), 55 mL 85 % (v/v) Fosforik asit (Riedel, Almanya), dH₂O ile 1 litreye tamamlandı.

- 10 µL her bir standart, analizlenecek örnek farklı seyreltmelerde ve distile su (kör) mikro plaka kuyucuklarına pipetlendi.
- 200 µL Bradford reaktifi ilave edildi.
- 10 dak. oda sıcaklığında bekleme sonrası 595 nm’de absorpsanlar okundu.

- Standartlar ile oluşturulan kalibrasyon eğri ve katsayılar yardımı ile seyrelme faktörleri de göz önüne alınarak protein konsantrasyonları hesaplandı.
- Tüm ölçümler üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

2.7 Prolil Oligopeptidaz'ın Aktivite Tayini

POP aktivitesi, enzimin sentetik (kromojenik veya florojenik) substratları kullanılarak belirlenmektedir. Yöntem, enzimin sentetik substratından Suc-Ala-Pro-pNA (Bachem, İsviçre)'nin hidroliz reaksiyonu sonucu açığa çıkan p-nitroanilin'in, 405 nm'de absorpsiyonunun mikropilaka okuyucu (Thermo Multiskan FC, Finlandiya) ile spektrofotometrik ölçülmesi esasına dayanır (Şekil 2.7). Enzim aktivitesi (Ünite); Optimum koşullarda (0,1 M Tris-HCl pH 7,4, 37 °C), dakikada 1 µmol p-nitroanilin açığa çıkartan enzim miktarı olarak ifade edildi.



Şekil 2.7 Suc-Ala-Pro-pNA'nin POP ile hidroliz reaksiyonu

Tüm çalışmalarda POP enzim aktivite tayinleri iki tekrarlı olarak aşağıdaki prosedüre göre gerçekleştirildi.

Tampon : 0,1 M Tris pH 7,4 (Sigma, Almanya)

Substrat : 2 mM Suc-Ala-Pro-pNA (Bachem, İsviçre)

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

- 100 µL her bir standart, enzim preparatı (farklı seyrelmelerde) ve tampon (kör) mikro plaka kuyucuklarına pipetlendi.
- 100 µL substrat ilave edildi (toplam hacim 200 µL).
- 37 °C'de 5 dakika mikropilaka okuyucu içinde inkübasyon sonrası 405 nm'de absorbanslar okundu.

- Standartlar ile oluşturulan kalibrasyon eğri ve katsayılar yardımı ile seyrelme faktörleri de göz önüne alınarak enzim aktiviteleri hesaplandı.

2.8 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) protein saflaştırma prosedürlerinde elde edilen proteinin saflığının kontrolü ve molekül kütlesinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Yöntemin temel prensibi ayırmak istenilen proteinin molekül kütlesine bağlı olarak, bir monomer (akrilamid) ve bir çapraz bağlayıcının (N'-N'-metilen bis akrilamid) farklı yüzdeleriyle hazırlanan jellerde ve SDS varlığında yüklerinin maskelenmesi sonrasında proteinlerin elektriksel bir alanda ayrımını gerçekleştirmektir (Şekil 2.8).

SDS-PAGE prosedürü; Laemmli metoduna göre gerçekleştirildi (Laemmli; 1970). SDS-PAGE için mini jel sistemi kullanıldı (Biorad, ABD). SDS-PAGE’de kullanılan stok çözeltilerin uygulaması ve jelin boyanma prosedürü aşağıda açıklandı.

SDS-PAGE’de Kullanılan Çözeltiler:

Akrilamid/N'-N'-metilen bisakrilamid (A/B):

29,2 g akrilamid (Sigma, Almanya), 0,8 g N'-N'-metilen bisakrilamid (Sigma, Almanya)/ 100 mL’ye dH₂O ile tamamlandı, filter edildi ve amber şişede 4 °C’de saklandı.

Ayırma Jel Tamponu, (1,5 M Tris-HCl pH:8,8):

18,15 g Tris/100 mL dH₂O.

Düzenleyici Jel Tamponu , (0,5 M Tris-HCl pH: 6,8):

6,0 g Tris/100 mL dH₂O.

%10 (w/v) SDS:

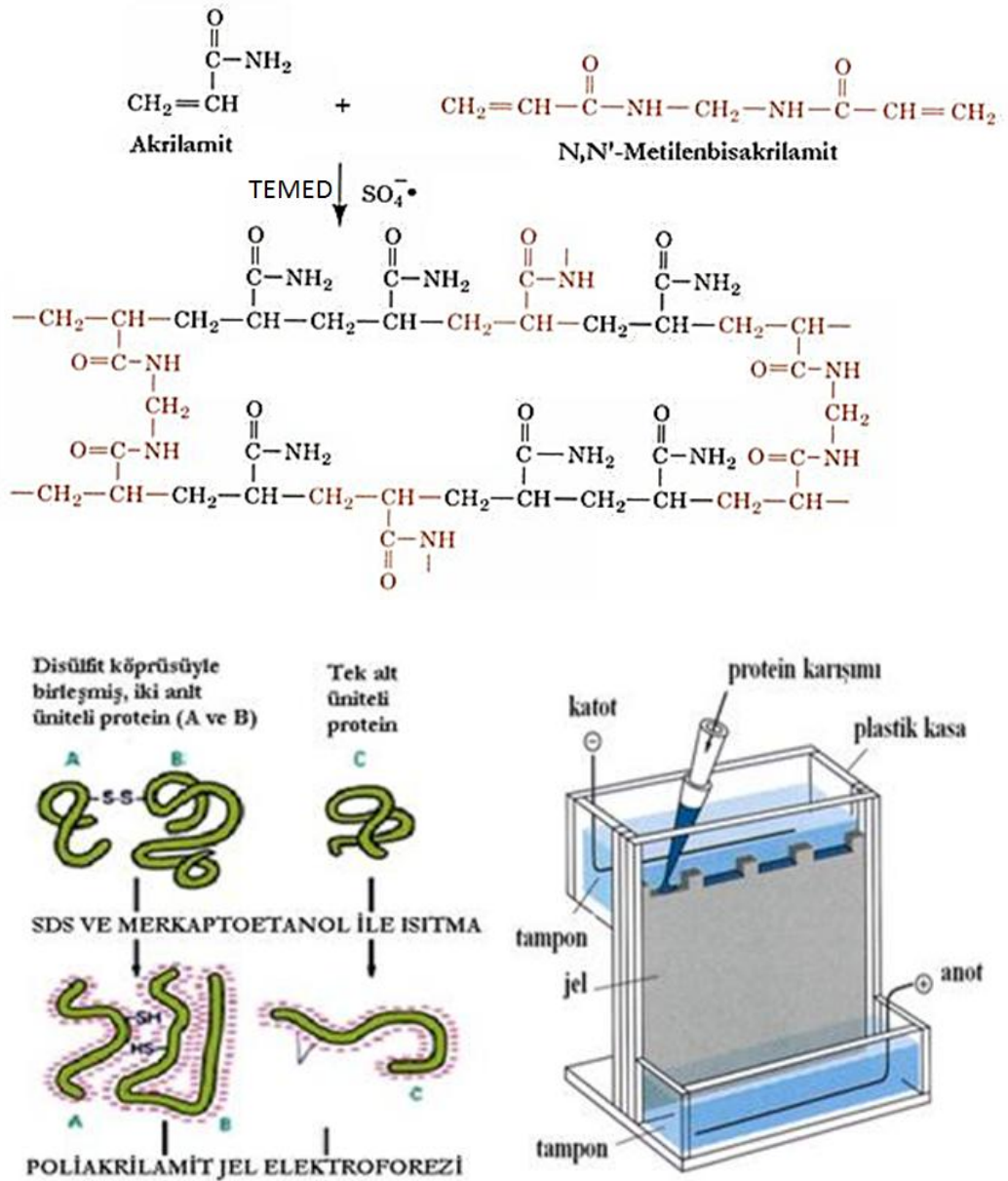
5 g SDS (Sigma-Almanya) / 50 mL dH₂O.

%10 (w/v) Amonyum per sülfat (APS):

100 mg APS (Aldrich, Almanya)/ 1 mL dH₂O (taze olarak hazırlandı).

TEMED (N,N,N',N' Tetramethylethylenediamine) :

TEMED (Sigma, Almanya) stok çözelti (6,63 M) olarak kullanıldı.



Şekil 2.8 a. Akrilamid monomerlerinin polimerizasyonu, **b.** SDS-PAGE uygulaması.

Örnek tamponu :

3,55 mL dH₂O, 1,25 mL 0,5 M Tris-HCl pH: 6,8, 2,5 mL gliserol (Sigma, Almanya), 2,0 mL % 10 SDS, 0,2 mL % 0,5 (w/v) bromfenol mavisi (Sigma, Almanya) karıştırılarak hazırlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

Yürütme Tamponu (10X) (pH: 8.3):

7,58 g Tris, 36 g Glisin ve 2,5 g SDS/ 250 mL dH₂O 4 °C’de saklandı.

Coomassie Brilliant Blue R250 çözeltisi:

% 0,05 (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250 (Fluka-Almanya), % 10 (v/v) Asetik asit (Riedel, Almanya), % 50 (v/v) Metanol (Sigma, Almanya) çözüldükten sonra oda sıcaklığında saklandı.

Destain çözeltisi :

% 40 (v/v) Metanol, % 10 (v/v) Asetik asit

Protein standartı

Protein standardının (Pierce Unstained Molecular Weight Marker, Thermo Scientific, (Waltham, USA) içeriğinde β -galaktozidaz (116 kDa), albumin (66,2 kDa), ovalbumin (45.0 kDa), laktat dehidrogenaz (35.0 kDa), Reaz Bsp98I (25.0 kDa), beta-laktoglobulin (18.4 kDa) ve lizozim (14.4 kDa). Kullanılan diğer protein standardı (SDS7 molecular Weight marker, Sigma-Aldrich, USA) içeriğinde sığır albümin (66 kDa), yumurta albümin (45 kDa), gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenez, tavşan kası (36 kDa), karbonik anhidraz (29 kDa), Tripsinojen (24 kDa), Tripsin inhibitörü (20 kDa) , α -laktaalbumin (14 kDa) bulunmaktadır.

Ayırma ve Düzenleyici Jelin Hazırlanması

SDS-PAGE uygulamaları için; farklı yüzdelerde ayırma ve düzenleyici jellerin hazırlanmasında aşağıdaki Çizelge 2.6’da verilen değerler kullanıldı.

Çizelge 2.6 % 12 SDS-PAGE jel hazırlanmasında kullanılan çözeltiler.

	Ayırma Jeli (% 12)	Düzenleyici Jel (% 4)
Distile su	3,4	6,1
A/B (ml)	4	1,3
Jel Tamponu(ml)	2,5	2,5
%10 SDS (ml)	0,1	0,1
Vakum altında degas işlemi		
%10 APS(µl)	50	50
TEMED (µl)	5	5

Protein Örneklerinin Hazırlanması ve Elektroforeze Uygulanması

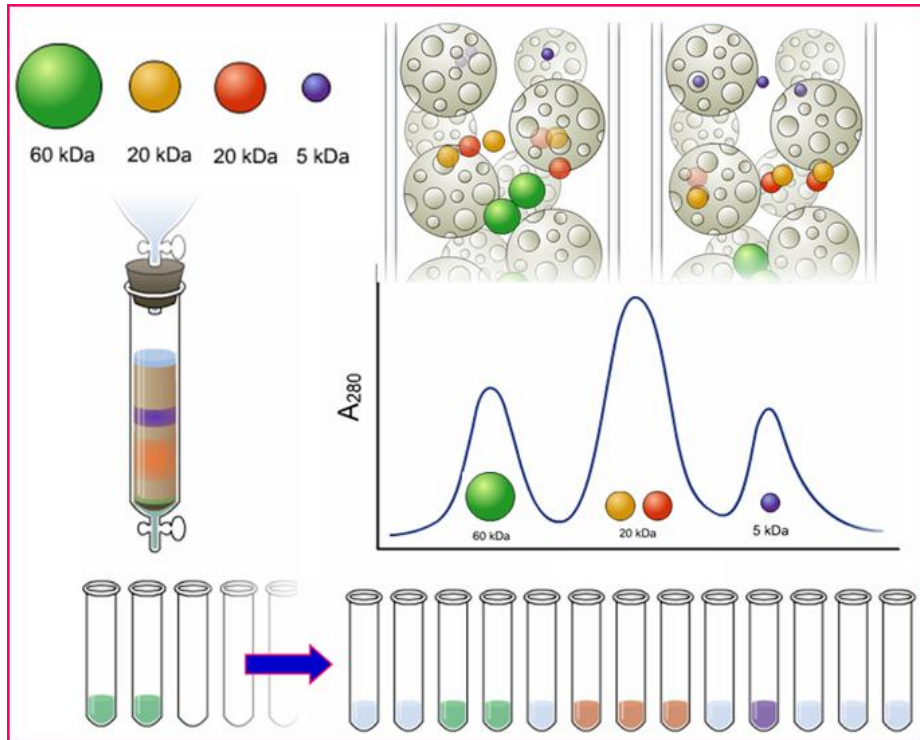
Örnek tamponunun 950 µL'sine SDS-PAGE uygulaması öncesi 50 µL β-merkaptoetanol eklendi. Herbir saflaştırma adımı sonrası elde edilen örneklerin; eşit protein değerlerinde jel kuyucuklarına yüklenebilmesi için, örnekler örnek tamponu ile uygun oranlarda karıştırıldı. Örnekler 95 °C'de 5 dak. inkübe edildikten sonra jel kuyucuklarına 20 µL olarak uygulandı. Sistem güç kaynağına bağlanarak akım düzenleyici jel boyunca 80 Volt, ayırma jelinde ise 100 Volt akım uygulandı. Yürütme işlemi boyanın jelin alt kısmına yaklaşık 0,5 cm'lik mesafesi kaldığında sonlandırıldı.

Coomassie Brilliant Blue ile Jelin Boyaması

Coomassie Brilliant Blue R250; jel elektroforezi ile elektroforetik ayrımı yapılan proteinlerin jeldeki konumunun belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan bir boyadır. Boyanın duyarlılığı 100 ng'dır. Metanol ve asetik asit içerisinde asidik şartlarda hazırlanan boyanın, jeldeki proteinlerin pozitif yükleri ile etkileşime girmesi sonucunda proteinler mavi renk ile boyandı. Boyanın fazlası destain çözeltisi kullanılarak uzaklaştırıldı. Boyanmış jellerin görüntüleri jel görüntüleme sistemi (Vilber Lourmat, Fransa) ile alındı ve Infinity-Capt Version 2.18 software kullanılarak molekül kütleleri hesaplandı.

2.9 Jel Filtrasyon Kromatografisi ile Saflığının Kontrolü ve Molekül Kütlesinin Belirlenmesi

Jel filtrasyon kromatografisi; proteinlerin saflaştırılmasında, molekül kütlesinin belirlenmesinde ve küçük molekül kütleli safsızlıkların uzaklaştırılmasında kullanılan bir tekniktir. Farklı gözenek yapısına sahip destek (stasyoner faz) materyalinin yapısı ayırımın etkinliğini belirleyen temel unsurdur. Kolon dolgu materyalinin dengelenmesi sırasında jel partiküllerinin gözenekleri içersine hareketli faz girer. Örnek uygulandığında Brownian hareketiyle proteinler jel partiküllerinin gözeneklerinden içeri ve dışarıya doğru difüzlenir. Çok büyük partiküller jel partiküllerinin gözeneklerinden geçemedikleri için jel partikülleri arasındaki boşlukta hızla ilerleyerek kolonu terkederler. Küçük moleküller jel partikülleri gözeneklerinden girerek oyalandıkları için kolonu daha geç terk ederler. Böylelikle farklı molekül büyüklüğüne sahip proteinlerin ayırımı gerçekleştirilmiş olur (Şekil 2.9). Jel filtrasyon kromatografisinde kullanılan kolon dolgu materyalinin yapısı çapraz bağlı dextran (Sephadex), dextranpoliakrilamid (Sephacryl HR), agaroz (Sephacrose, Biogel A, Ultrogel) poliakrilamid (Biogel P), agaroz-poliakrilamid (Ultrogel AcA) tabanlıdır.



Şekil 2.9 Jel filtrasyon kromatografisinin şematik gösterimi.

POP enziminin molekül kütlesinin belirlenmesi amacı ile MPLC sistemi kullanıldı. Kolon destek materyali olarak Ultrogel AcA 44 (10-130 kDa; Serva, Almanya) kullanıldı. Ultrogel AcA 44, iki kolon hacmi kapasitesine sahip bir vakumlu erlen içerisine alındı. Jel hacminin yaklaşık %40'ına tekabül eden hacimde 150 mM NaCl içeren 10 mM Tris-HCl pH 7,4 tamponuyla süspanse edildi. Nazikçe karıştırarak vakum altında çözülmüş gazlar uzaklaştırıldı. Süspansiyon halinde kolona dolduruldu. Akış hızı 1 mL/dakika olarak ayarlandı. Molekül kütlesi bilinen standartlar ve örnek uygulanarak elüsyon hacimleri (V_e) belirlendi. Standartların V_e değerleri ve molekül kütlelerinin logaritmasıyla oluşturulan grafikten örneğin doğal koşullardaki molekül kütlesi hesaplandı.

MPLC Koşulları

Sistem : Biorad (Biorad's Biologic LP, California, ABD)

Kolon destek materyali : Ultrogel AcA 44 (10 - 130 kDa; Serva, Almanya)
1,8x30cm

Mobil Faz : 150 mM NaCl içeren 10 mM Tris-HCl pH 7,4

Akış hızı : 1,0 mL / dakika

Dedeksiyon : 280 nm

Uygulama : İzokratik

2.10 HPLC ile Prolil Oligopeptidaz Enziminin Saflığının Kontrolü

Yüksek performans sıvı kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) en yaygın olarak kullanılan analitik tekniklerden bir tanesidir. Kromatografik prosesler stasyonere ve hareketli fazlar arasında kütle transferini kapsayan ayırma teknikleri olarak tanımlanırlar. HPLC'nin diğer klasik tekniklere göre kıyaslaması yapıldığında; küçük boyutlu paslanmaz çelik kolonların kullanılması, partikül boyutları çok küçük (3,5- 10 μ m) matrikslerin kullanılması, yüksek iç basınç ve kontrollü akış hızı sağlanabilmesi, örnek gereksinimlerinin az olması, sürekli akış dedektörleri ile küçük miktarların tayinine olanak sağlaması, otomasyona müsait olması hızlı, analiz imkanı ve yüksek ayırma gücüne sahip olmaları nedeniyle çok yönlü uygulamalara daha açık olduğu görülmektedir.

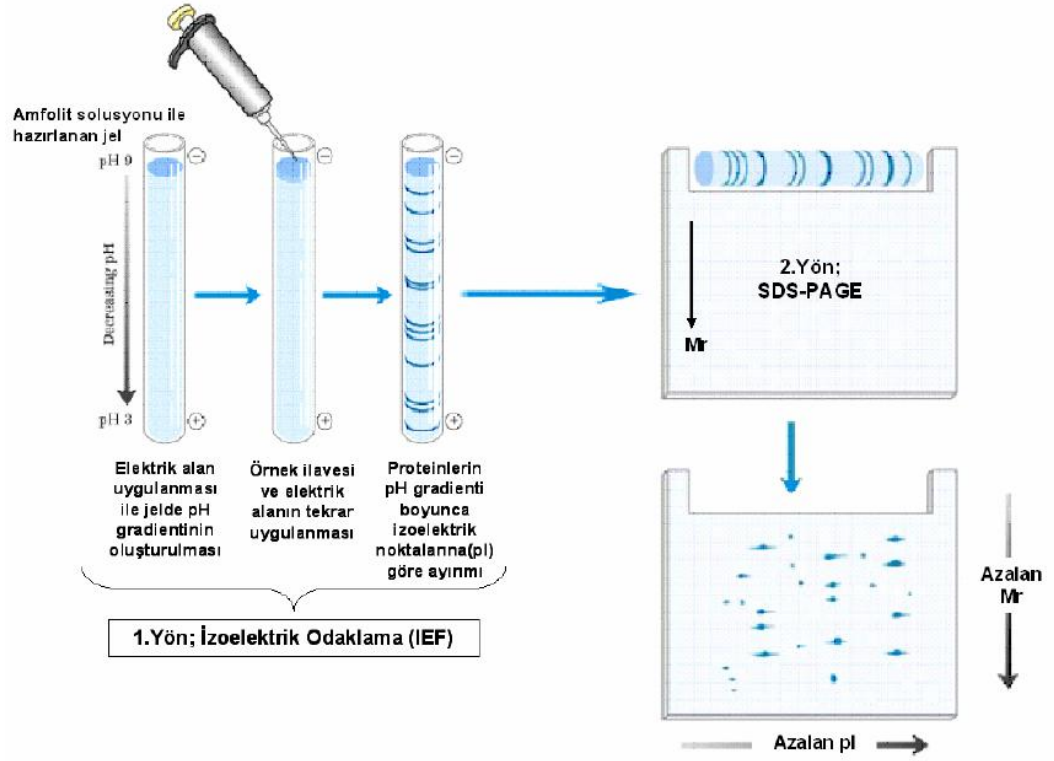
Prolil oligopeptidaz enziminin saflığının kontrolü için HPLC sistemi kullanıldı. Prolil oligopeptidaz enziminin HPLC analiz koşulları aşağıda verilmiştir.

HPLC Koşulları

Sistem	: Agilent 1100 (Almanya)
Kolon	: Thermo BioBasic SEC-60 300x7.8 5 μ L (37°C)
Mobil Faz	: 150 mM NaCl içeren 10 mM Tris-HCl pH 7,4
Akış hızı	: 1,0 mL / dakika
Dedeksiyon	: DAD 215 nm/254 nm/ 280nm
Uygulama	: İzokratik

2.11 İki Yönlü Jel Elektroforezi (2D-PAGE) ile İzoelektrik Noktanın Belirlenmesi

İki yönlü jel elektroforezi, kompleks protein karışımlarının ayrılması ve karakterizasyonunda kullanılan en önemli tekniklerden bir tanesidir. İlk olarak 1970 yılında Kenrick ve Margolis, daha sonra ise O'Farrell ve arkadaşları (1975) tarafından uygulamaya sunulmuş olup 20 yılı aşkın bir süreden beri geliştirilmiştir (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. İki yönlü jel elektroforezi.

İki yönlü jel elektroforezi (2D-PAGE) prensibte iki iyi ayırma tekniğinin kombinasyonudur. Birinci yönde izoelektrik odaklama (IEF; yüke bağımlı ayırma; pH gradienti) ve ikinci yönde ise Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE; moleküler kütleye bağımlı ayırma) dır.

2.11.1 İzoelektrik odaklama (Fokuslama, IEF); 1.Yön

İzoelektrik odaklama (IEF); izoelektrik noktalarına (pI) göre proteinlerin ayırımında kullanılan elektroforetik bir tekniktir. Proteinler bulundukları çevrenin pH'sına ve amino asit kompozisyonlarına bağlı olarak, pI değerlerinin altındaki pH'da pozitif, pI değerlerinin üstündeki pH'da negatif veya pI değerine eşit olduğu durumda sıfır net yüke sahiptirler. Bu özellikleri sayesinde proteinler IEF tekniğinde oluşturulan pH gradienti ile birbirlerinden ayrılabilirler. pH gradient ile proteinlerin elektriksel bir alanda ayırımının temel prensibi bir proteinin net yükünün sıfır olduğu gradientteki pozisyonuna taşınımıdır (göçüdür). Bir protein pozitif yüklü ise katoda doğru, negatif yüklü ise anodo doğru göç ederek net yüklerinin sıfır olduğu pH gradientindeki yerlerine ulaşacaklardır.

2.11.2 SDS-PAGE; 2. Yön

SDS-PAGE; 2. yönde horizoantal veya vertikal sistemler kullanılabilir. Horizontal sistemler genelde hazır jellerde, vertikal slab jeller ise aynı anda birçok jelin uygulanmasında tercih edilmektedir. Vertikal gradient slab jel sisteminde modifiye Laemmli-sistemi kullanılmaktadır. En önemli modifikasyon slab jelin kullanılmamasıdır. IEF sonrası elde edilen jel, ayırma jeli üzerine yerleştirilir.

Rekombinant olarak saflaştırılan POP enzimi izoelektrik noktası iki yönlü jel elektroforezi (2D-PAGE) kullanılarak belirlendi. 2D-PAGE tekniğinde jelin hazırlığı, jelde örneklerin yürütülme koşulları ve elektrogramdaki dedeksiyonları aşağıda açıklanan şekilde gerçekleştirildi.

Izoelektrik odaklama da kullanılan çözeltiler (1.Yön)

Örnek tamponu:

0,1 g DTT,
100 µL TritonX-100,
5,4 g Üre,
500 µL Amfolit (3-10),
6 mL dH₂O karıştırılarak hazırlandı ve -80°C 'de saklandı.

Yürütme tamponları

1) Üst tampon (Katot) (20 mM NaOH):

0,4 g NaOH (Riedel, Almanya) / 500 ml dH₂O. Çözelti degas yapıldı. 4 °C'de saklandı.

2) Alt tampon (Anot) (10 mM H₃PO₄):

1,8 mL % 85 H₃PO₄ / 2,6 L dH₂O. Çözelti degas yapıldı. 4 °C'de saklandı.

IEF Tüp Jel Monomer Solusyonunun Hazırlanması

- 11 g üre (Sigma, Almanya)
- 3 mL akrilamid/bis akrilamid
- 0,2 mL amfolit 5-7 (Fluka, Almanya)

- 0,8 mL amfolit 3-10 (Servalyt, Almanya)
- 1mL deterjan çözeltisi [100 µL TritonX-100 (Sigma, Almanya), 100 µL Nonidet P40 ve 800 µL d.dH₂O] eklendi.
- Karışım dH₂O ile 20 mL'ye tamamlandı ve degas yapıldı.
- 40 µL % 10 (w/v) APS ve 20 µl TEMED eklendi ve tüplerde polimerizasyon gerçekleştirildi.

Yürütme koşulu:

- 2 saat 2000 Volt
- 2 saat 500 Volt
- 16 saat 800 Volt

Dengeleme tamponu:

- 12,1 g Tris
- 35 ml d.H₂O
- 1 M H₃PO₄ ile pH 6.8'e ayarlandı.
- 100 mL dH₂O

Transfer çözeltisi:

- 160 g Gliserol
- 12 g SDS
- 40 mg Bromophenol Blue
- 50 mL Dengeleme tampon
- 400 mL d.H₂O

IEF'dan sonra jeller tüplerden çıkarılarak 15 dakika dengeleme çözeltisi ile muamele edildi ve -80 °C de depolandı. SDS-PAGE öncesi jeller oda sıcaklığına getirilerek % 12'lik akrilamid jel'e uygulandı.

2.Yön jelinin solüsyonlarının hazırlanması

% 12 jel monomerinin hazırlanması

- 33,5 mL d.H₂O
- 25 mL 1,5 M Tris-HCl pH 8.8

- 1 mL % 10 (w/v) SDS
- 40 mL akrilamid/bis akrilamid (%30 T)
- Karışım dH₂O ile 100 mL'ye tamamlandı ve degas yapıldı.
- 500 µL % 10 (w/v) APS ve 500 µl TEMED eklenmesinin ardından jel tanka döküldü.

Yürütme tamponu (10X) (pH: 8.3):

7,58 g Tris, 36 g Glisin ve 2,5 g SDS/ 250 mL dH₂O 4 °C'de saklandı.

Yürütme koşulu:

- 24 saat 48 mA

Gümüş Boyama İle Jelin Boyanması

Poliakrilamid jellerde gümüş boyama ile dedeksiyon; en duyarlı; spesifik ve radyoaktif olmayan boyama metodudur. İlk olarak 1979 yılında merril ve arkadaşlarınca tanımlanmıştır. Gümüş, proteinlerdeki sülfidril ve karboksil gruplarına bağlanarak boyama yapar. Gümüş boyama (5-10 ng), Coomassie Brilliant Blue (100 ng) boyasına göre 100 kat daha duyarlı bir boyadır. Gümüş boyama prosedürü aşağıda verildiği şekilde gerçekleştirildi.

Jelin Boyanması:

- % 50 Etanol, % 1 Asetik asit ve % 40 dH₂O (24 saat)
- % 30 Etanol, 0,5 M CH₃COONa, % 0,5 Glutaraldehit (% 25), % 0,2 Na₂S₂O₃ (2 saat)
- dH₂O ile yıkama (3 kez 20 dakika)
- % 0,1 (w/v) AgNO₃, % 0,01 (v/v) Formaldehit (30 dk)
- dH₂O ile yıkama (30 saniye)
- % 2,5 (w/v) NaCO₃, % 0,05 Na₂S₂O₃, % 0,01 (v/v) Formaldehit (zemin koyulaşmaya kadar)
- % 5 Asetik asit (15 dakika)

Boyanmış jellerin görüntüleri jel görüntüleme sistemi (Vilber Lourmat, Fransa) ile alındı ve BIO-2D (Infinity-Capt Version 2.18) software programı ile izoelektrik noktası belirlendi.

2.12 POP Enziminin Fiziksel ve Kimyasal Karakterizasyonu

2.12.1 Enzim aktivitesine pH'nın etkisi

Optimum pH'nın belirlenmesinde, Fosfat (pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5); Tris (pH 7,5; 8,0; 8,5; 9,0) ve Sodyum- borat (9,0; 10,0) tamponları kullanıldı. Enzim aktivitesi (% Bağıl Aktivite) ile pH arasında çizilen grafikten enzimin optimum pH değeri belirlendi. Her bir pH değeri için ölçümler üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

2.12.2 Enzim aktivitesine sıcaklığın etkisi

Optimum sıcaklığın belirlenmesinde enzim aktivitesi; standart koşullar (2 mM Suc-Ala-Pro-pNA, pH 7.4 100 mM Tris-HCl tamponu) ve değişen sıcaklıklarda (4, 20, 30, 37, 40, 45, 50, 60, 70, 80 °C) ölçüldü. Enzim aktivitesi (% Bağıl Aktivite) ile sıcaklık arasında çizilen grafikten enzimin optimum sıcaklık değeri belirlendi. Herbir sıcaklık değeri için ölçümler üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

2.12.3 Substrat spesifikliğı

POP enziminin substrat spesifikliğinin belirlenmesinde sentetik ve doğal substratlarla enzim aktivitesinin ölçümü gerçekleştirildi. Enzimin sentetik ve doğal substratları için hidroliz etkinliğı belirlendi. Ölçümler üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

2.12.3.1 Prolil oligopeptidaz'ın sentetik substratları ile aktivite tayini

Rekombinant olarak üretilen *Myxococcus xanthus* Prolil oligopeptidaz enzim preparatında ayrıca Leu-pNA, Pro-pNA, Glu-pNA, Glu-Ala-pNA, H-Ala-Pro-pNA, H-Arg-Pro-pNA, H-Val-Ala-pNA, H-Gly-Pro-pNA, Suc-Ala-Pro-pNA, Z-Gly-Pro-pNA, Suc-Gly-Pro-pNA POP enzim aktivite tayini gerçekleştirildi. Tüm substratlar Bachem, İsviçre firmasından temin edildi.

pNA (para-nitroanilin) içermeyen substratlar için Prolil oligopeptidaz enzim aktivitesi HPLC ile analizlendi.

Sentetik substratlar ile enzim aktiviteleri, standart koşullarda (1 mM substrat, pH 7,4 100 mM Tris-HCl tamponu) bölüm 2.7’de anlatılan şekilde ölçüldü ve aktiviteleri hesaplandı. Ölçümler iki tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

2.12.3.2 HPLC ile Prolil oligopeptidaz’ın doğal substratları ile aktivite tayini

Rekombinant olarak üretilen *Myxococcus xanthus* prolil oligopeptidaz enzim preparatında doğal substratlardan IGF-1 (H-Gly-Pro-Glu-OH) ve Substance P (H-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂) kullanılarak RP-HPLC analizi ile aktivite tayini gerçekleştirildi. Doğal substratlardan Substance P ve IGF-1’nin, rekombinant olarak üretilip saflaştırılan POP enzimi tarafından hidrolizlenmesinde; 50 µL substrat (1 mM); 100 µL enzim (0,5 mg/mL) ve 350 µL 100 mM Tris-HCl pH 7,4 tamponunu içeren ortamda 37°C’de 15 dakika inkübe edildi. Enzimatik reaksiyon 5 µL % 10 (w/v) TCA (Riedel, Almanya) eklenerek durduruldu. 13000 g’de 5 dakika santrifüj sonrası üst fazlar ayrıldı ve her bir substratın hidroliz öncesi ve sonrası RP-HPLC analiz koşulları aşağıda verilmiştir.

Her bir substratın farklı konsantrasyon aralıklarında hazırlanan çözeltileri RP-HPLC’ye uygulandı ve analiz sonuçlarından standart kalibrasyon eğrileri oluşturuldu. Substratların başlangıç ve enzim ile 30 ve 60 dakika inkübasyonları sonrası gerçekleştirilen HPLC uygulamalarından elde edilen kromatogramlardan standart kalibrasyon eğrileri kullanılarak enzim aktiviteleri hesaplandı. Enzimin Substance P ve IGF-1 için hidroliz etkinliği belirlendi. Ölçümler iki tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

Substance P’nin RP-HPLC Koşulları:

Sistem	: Agilent 1100 (Almanya)
Kolon	: Nucleosil RP-C18 (Supelco, Almanya) (250mm x 4.6 mm, 5 µM, 100 Å)

Mobil Faz A : % 0,1 (v/v) TFA (Fluka-Almanya)
B : % 0,1 TFA içeren asetonitril (Sigma-Almanya)
Akış hızı : 1 mL/dakika
Dedeksiyon : DAD 210 nm/280 nm/254 nm
Uygulama : Gradient elusyon
0-2 dakika % 5 B tamponu
2-12 dakika % 60 B tamponu
12-14 dakika % 5 B tamponu
14-15 dakika % 5 B tamponu

IGF-1'in RP-HPLC Koşulları:

Sistem : Agilent 1100 (Almanya)
Kolon : Nucleosil RP-C18 (Supelco, Almanya)
(250mm x 4.6 mm, 5 µM, 100 Å)
Mobil Faz A : % 0,1 (v/v) TFA (Fluka-Almanya)
B : % 0,1 TFA içeren asetonitril (Sigma-Almanya)
Akış hızı : 1 mL/dakika
Dedeksiyon : DAD 210 nm/280nm/254nm
Uygulama : Gradient elusyon
0-2 dakika % 5 B tamponu
2-5 dakika % 10 B tamponu
5-7 dakika % 20 B tamponu
7-10 dakika % 5 B tamponu

2.13 Kararlılık Testleri

2.13.1 Termal kararlılık

Prolil oligopeptidaz enziminin termal kararlılığı, farklı sıcaklıklarda (4, 20, 37, 45, 50, 55 °C), 30 dakika ön inkübasyon yapılan enzimin, standart koşullarda

(2 mM Suc-Ala-Pro-pNA, pH 7.4 100 mM Tris-HCl tamponu) aktivitesinin ölçülmesiyle belirlendi. Ölçümler üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

2.13.2 pH kararlılığı

Prolil oligopeptidaz enzimin pH kararlılığının belirlenmesinde pH aralığı 3,0-10,0 arasında değişen tamponlarda, 30 dakika ön inkübasyon sonrası, standart koşullarda (2 mM Suc-Ala-Pro-pNA, pH 7,4 100 mM Tris-HCl tamponu) enzim aktivitesi ölçüldü. Ölçümler üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

2.13.3 Depo kararlılığı

Saflaştırılan POP enziminin depo kararlılığının belirlenmesinde 4 °C’de depolanan enzimden belirli zaman aralıklarında (haftada bir), örnek alınarak standart koşullarda (2 mM Suc-Ala-Pro-pNA, pH 7,4 100 mM Tris-HCl tamponu) enzim aktivitesi ölçüldü. Ölçümler üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

2.14 POP Enziminin Kinetik Özellikleri

2.14.1 POP aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi

POP enziminin kinetik parametreleri Suc-Ala-Pro-pNA sentetik substratı kullanılarak belirlendi. Doygunluk substrat konsantrasyonu, K_m , V_{max} ve K_{kat} değerlerinin belirlenmesi için Suc-Ala-Pro-pNA’nın 0,05 - 2 mM konsantrasyon aralığı kullanıldı. Standart koşullarda (37 °C’de 5 dakika) enzimin aktivitesi ölçüldü. Her bir substrat konsantrasyonu üç tekrarlı olarak çalışıldı. Sonuçlar GraphPrism 6 programı kullanılarak değerlendirildi. Substrat konsantrasyonu ve aktivite arasında çizilen grafikten doyumluk substrat konsantrasyonu, Lineweaver-Burk ve Woolf Hofstee diyagramından K_m , V_{max} ve K_{kat} değerleri hesaplandı.

2.15 POP Aktivitesi Üzerine Metal İyonlarının Etkisi

Metal iyonlarının POP enzim aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesinde çeşitli metal iyonlarının [$HgCl_2$, $MnCl_2$, $BaCl_2$, $CaCl_2$ (Fluka, Almanya), $ZnCl_2$, $CuCl_2$, $NiCl_2$, $CoCl_2$, KCl (Merck, Almanya), $MgCl_2$, $LiCl$ (Sigma Aldrich,

Almanya), CdSO_4 (Carloerba, İtalya), NaCl (Riedel, Almanya)] farklı konsantrasyonları ile saflaştırılmış olan POP enzimi 37 °C’de 15 dakika ön inkübasyona tabi tutuldu. Metal iyonun varlığı ve yokluğundaki enzim aktivitesi standart koşullarda (2 mM Suc-Ala-Pro-pNA, pH 7,4 100 mM Tris-HCl) ölçüldü. Ölçümler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

2.16 POP Aktivitesi Üzerine Çeşitli Kimyasal ve İnhibitörlerin Etkisi

Çeşitli kimyasal ve inhibitörlerin (Serin Proteaz inhibitörleri, metalloproteaz inhibitörleri, indirgeyici ajanlar, peptid inhibitörleri) POP enzim aktivitesi üzerine etkilerinin belirlenmesi amacıyla, inhibitörlerin değişen konsantrasyonları ile POP enzimi 37 °C’de 15 dakika ön inkübasyona tabii tutuldu (Çizelge 2.7). İnhibitör varlığı ve yokluğundaki enzim aktivitesi standart koşullarda (2 mM Suc-Ala-Pro-pNA, pH 7,4 100 mM Tris-HCl) ölçüldü ve hesaplandı. Ölçümler üç tekrarlı gerçekleştirildi.

Çizelge 2.7 Çeşitli kimyasal ve inhibitörler.

Serin Proteaz İnhibitörleri	PMSF Z-Pro-Prolinal (Z-PP) pABA (para-aminobenzoate)
Metalloproteaz İnhibitörleri	1-10 Fenatrolin EDTA
İndirgeyici Ajanlar	β -merkaptoetanol DTT

2.16.1 IC_{50} değerlerinin belirlenmesi

Prolil oligopeptidaz enziminin metaller, çeşitli kimyasal ve inhibitörlerin ve prolil oligopeptidaz enzim ile glutenin hidrolizlenmesi sonucu oluşan hidrolizat ile inhibisyonu sonrası inhibisyon etkinliği yüksek olarak gözlenen örneklerde, IC_{50} değerleri belirlendi. Farklı konsantrasyonundaki CuCl_2 , NiCl_2 ve BaCl_2 metal iyonlarının, Z-Pro-Prolinal (Z-PP) ve PMSF gibi serin proteaz inhibitörlerinin ve gluten hidrolizatın üç tekrarlı olarak enzim aktiviteleri ölçüldü. Kontrol

(inhibitörsüz) enzim aktivitesiyle, farklı konsantrasyondaki örneklerin inhibitör aktivitelerinin kıyaslanmasıyla CuCl_2 , NiCl_2 ve BaCl_2 metal iyonlarının, Z-PP ve PMSF gibi serin proteaz inhibitörlerinin enzim inhibisyon yüzdeleri hesaplandı. Oluşturulan % inhibisyon eğrileri ve lineer regresyon formülasyonları ile IC_{50} değerleri; enzim aktivitesinin % 50'sini inhibe eden inhibitör konsantrasyonu olarak hesaplandı.

2.17 Polil Oligopeptidaz Enzimi ile Protein Hidrolizi

Proteinlerin enzimatik hidrolizi spesifik proteazlar kullanılarak gerçekleştirilir. Hidroliz reaksiyonun tanımlanmasında bir takım parametrelere ihtiyaç duyulur. Bu parametrelerin en önemlisi enzim/substrat oranı, pH, sıcaklık, reaksiyon zamanı ve reaksiyon karışımındaki protein içeriğidir. Buna karşılık; enzimatik hidroliz reaksiyonunu çok kompleks yapan faktörleride kapsar. Bunlardan en dikkat çekicileri; proses koşulları (pH, sıcaklık ve iyonik şiddet), enzim inhibisyonu, peptid bağının eş zamanlı hidrolizi, ilk hidroliz adımından ürünlerin hidrolizi ve reaktiflerin çeşitliliğidir.

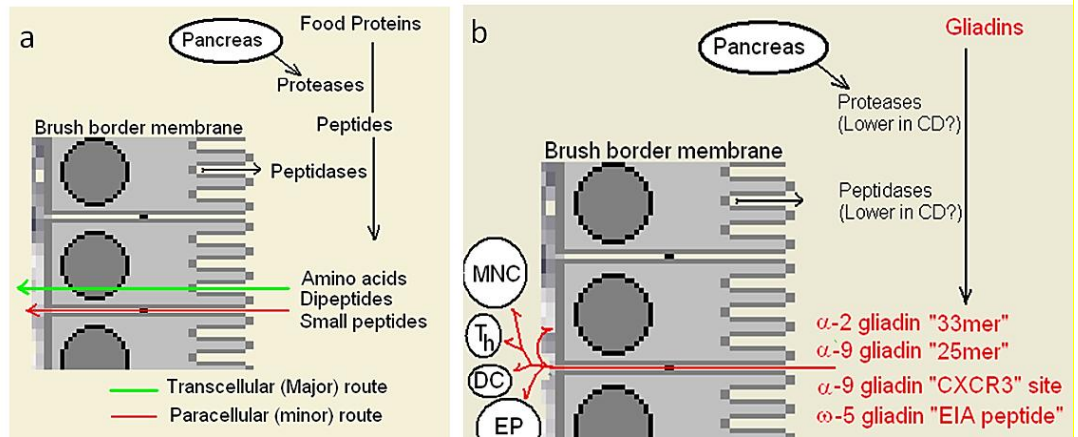
Bu çalışma kapsamında rekombinant olarak ürettiğimiz prolil oligopeptidaz enzimi ile gluten preparatının enzimatik hidroliz potansiyelinin araştırılması amacıyla öncelikle hidroliz koşulları optimize edildi.

2.17.1 POP enzimi ile gluten hidrolizinin optimizasyonu

Serin proteaz sınıfına ait prolil oligopeptidaz enzimi prolin amino asidinden sonra kesen bir endopeptidazdır. Prolil oligopeptidaz enziminin sağlık ve gıda sektöründe uygulama alanine sahiptir. Sağlık alanındaki en önemli uygulamalarda biri çölyak hastalığına yönelik yeni tedavilerin geliştirilmesidir.

Gluten özellikle buğday gibi tahıllarda bulunan bir protein grubudur. Gluten protein kompleksi, gliadin ve glutenin içermektedir. Çölyak hastalığı; bitkisel protein olan glutenin neden olduğu genetik bir hastalıktır. Genel olarak, barsak lümenine gelen proteinler gastrik pepsin ve pankreatik proteazlar tarafından sindirilir ve sonra fırça kenar enzimleri ile tripeptid, dipeptid ve amino asitlere

çevrilerek intestinal epitelden geçerler. Ancak, immün baskın gliadin peptidlerinde yüksek miktarda bulunan prolin rezidüleri bunları sindirim proteazlarına dirençli hale getirirler (Şekil 2.10) Bu nedenle, bir başka strateji de, bu peptidlerin lamina propriaya ulaşmasını engellemek için, çeşitli mikroorganizmalarda eksprese olan ve immün baskın prolin bölgelerini ayırabilen prolil endopeptidazların kullanılmasıdır (Cengiz et al., 2011). Bu amaç ile çalışmanın son aşamasında rekombinant olarak üretilip saflaştırdığımız Prolil oligopeptidaz enziminin gluten proteinini hidrolizleyebilme potansiyeli araştırıldı.



Şekil 2.11 Sağlıklı ve çölyak hastalıklı kişilerde protein sindirimi.

Ticari olarak M. A.R.K gıda tarafından temin edilen gluten unu (3 g) önce 100 mL 0,1 M pH 7,4 tamponu ile 37 °C’de 22 saat 200 rpmde süspanse edildi. Elde edilen preparat enzimatik çalışmalarda kullanılmak üzere -20 °C’ ye kaldırıldı. Hidroliz öncesi hidroliz etkinliğini arttırmak için bir 95°C de 15 dakika kaynatma yapılarak protein denatürasyonu sağlandı.

Hidroliz reaksiyonlarında substrat olarak gluten unu kullanılmıştır. Hidroliz reaksiyonları; sıcaklık, pH ve karıştırıcı hızı kontrol modülleri ile kombine edilmiş bir cam erlen içerisinde gerçekleştirilmiştir. Hidroliz reaksiyonları için hazırlanan substrat çözeltilerinin reaktör sisteminde; pH, sıcaklık ve karıştırıcı hızı ayarları yapıldıktan ve sistem stabil hale geldikten sonra, enzim ilavesi ile reaksiyon başlatılmıştır.

Rekombinant olarak saflaştırılan POP enzimi, öncelikle enzim hidrolizasyonu için (0,1 M pH 7,5 Fosfat-Tris-HCl) tamponları, E/S(0,3, 0,6, 0,9, 1,2 U) ve farklı sürelerle (1-8 saat) gerçekleştirilerek üretim koşulları optimize edilmiştir. Çalışmada kullanılacak gluten proteini 2 farklı şekilde hazırlandı. 1. yöntemde gluten protein herhangi bir ön muamele işlemine tabi tutulmazken; 2. yöntemde gluten proteinini 100 °C 15 dakika denatürasyonu sağlandı. Hidroliz reaksiyonun süresine bağlı olarak üretilen peptid oluşumunu TNBS yöntemiyle belirlenmiştir. Elde edilen verilerin karşılaştırılması ile kullanılabilirliği en uygun hidroliz metodu belirlenmiştir.

E/S hidroliz süreleri toplam hacim 1mL olacak inkübasyon koşullarında gerçekleştirildi.

Optimize edilen koşullarda 100 mL gluten süspansiyonuna 1 mL *Prolil oligopeptidaz* (0,6 U) enzimi eklendi ve 37 °C’de 8 saat inkübasyona bırakıldı. Bu koşullar altında reaksiyon gerçekleştirilirken belirli zaman aralıklarında alınan numuneler 90°C sıcaklığındaki bir su banyosunda 15 dakika bekletilerek enzimin inaktif hale gelmesi sağlandı. Hidrolizasyon reaksiyonun sonucu TNBS metodu ile belirlendi.

2.17.1.1 Hidroliz derecesinin belirlenmesi

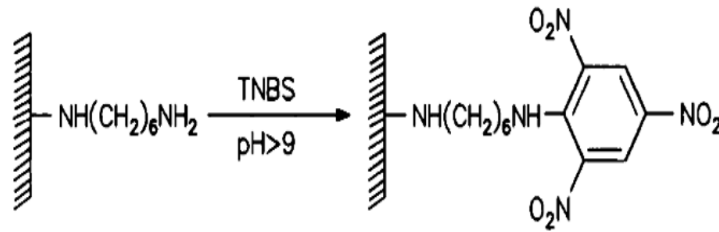
Protein hidrolizi sırasında reaksiyonun gözlenmesinde hidroliz derecesi anahtar parametredir. Hidroliz derecesi hidrolizlenen peptid bağlarının yüzdesi olarak tanımlanırlar. Protein hidroliz sırasında hidroliz derecesinin belirlenmesi için birtakım metodlar literatürlerde tanımlanmıştır. Bu metodlar pH-stat, osmometri, çözünür azot içeriği ve trinitro-benzen-sulfonik asit (TNBS) ve OPA’dır.

$$DH = h/htot * 100\%$$

Htot, bir proteindeki peptid bağlarının toplam sayısı, h; hidrolizlenen peptid bağlarının sayısı olarak ifade edilir. Htot; kullanılan örneğin amino asit kompozisyonuna bağlıdır (Nielsen et al., 2001).

2.17.1.2 TNBS (2,4,6-trinitrobenzen sülfonik asit) yöntemi

Proteinlerdeki ve diğer moleküllerdeki amino gruplarının ölçümü ve belirlenmesinde farklı metodlar (TNBS, OPA vb.) kullanılmaktadır. TNBS çözünmez matriks üzerindeki amino gruplarının tayininde kullanılan hızlı hassas spektrofotometrik bir yöntemdir (Şekil 2.12). Hidroliz sonucu oluşan serbest amino grup sayısı Nissen tarafından kullanılan TNBS yönteminin modifiye edilerek Mikro TNBS yöntemi şeklinde uygulanmasıyla belirlendi (Adler-Nissen, 1979). Mikro TNBS yönteminin prosedürü aşağıda ayrıntılı olarak verildi.



Şekil 2.12 TNBS yöntemi ile amino grupların belirlenmesi.

Amino grubu tayininde kullanılan çözeltiler

0,1 M pH 9,1 Borat Tamponu: 0,618 g borik asit/ 100 mL dH₂O

0,1 M Na₂HPO₄: 1,779 g Na₂HPO₄ (Riedel, Almanya) / 100 mL dH₂O.

0,2 M NaH₂PO₄: 2,398 g NaH₂PO₄ (Riedel, Almanya) / 100 mL dH₂O.

0,2 M Na₂SO₄: 1,42 g Na₂SO₄ (Riedel, Almanya) / 50 mL NaH₂PO₄.

TNBS Reaktifi (% 0,05 Pikrilsülfonik asit çözeltisi):

25 µL % 5 pikrilsülfonik asit / 2,5 mL 0,1 M Na₂HPO₄

Standartlar : 1-10 mM Tirozin

- 25 µL her bir standart ve örnek (farklı seyrelmelerde) üzerine 475 µL Borat tamponu eklendi. Karışımın 50 µL'si mikropilaya kuyucuklarına pipetlendi.
- 20 µL TNBS reaktifi eklenerek karıştırıldı ve 37 °C'de 20 dakika mikropilaya okuyucu içinde inkübe edildi.

- 200 µL 0,2 M Na₂SO₄ ilave edildi ve karıştırılarak 405 nm’de absorpsiyon okundu.
- Standartlar ile oluşturulan kalibrasyon eğri ve katsayılar yardımı ile seyrelme faktörleri de göz önüne alınarak taşıyıcı üzerindeki amino grup konsantrasyonu hesaplandı.

2.17.1.3 Hidrolizatların RP-HPLC ile ayrılması

Reaksiyon ürünleri kantitatif olarak RP-HPLC ile analiz edilerek bulunmuştur. Örneklerin RP-HPLC analiz koşulları aşağıda verilmiştir.

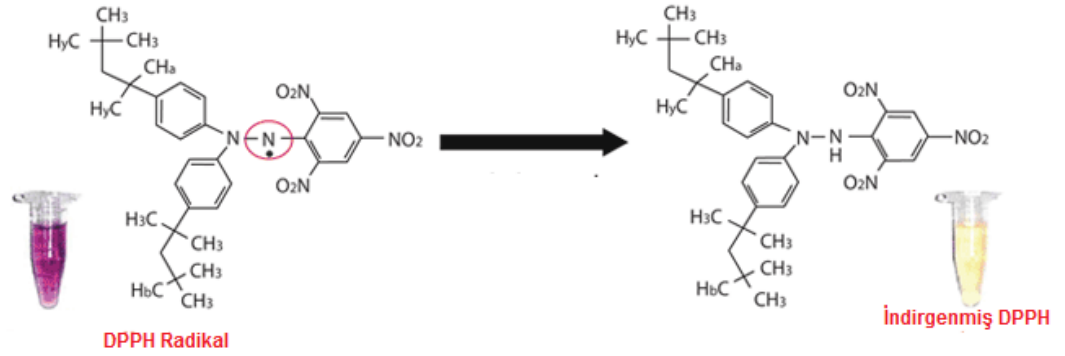
Sistem	: Agilent 1100 (Almanya)
Kolon	: Nucleosil RP-C18 (supelco, Almanya) (250mm x 4.6 mm, 5 µM, 100 Å)
Mobil Faz A	: %0,1 (v/v) TFA (Fluka-Almanya)
B	: %0,1 TFA içeren asetonyitril (Sigma-Almanya)
Akış hızı	: 0,9 mL/dakika
Dedeksiyon	: DAD 210 nm/280 nm/254 nm
Uygulama	: Gradient elusyon 0-20 dakika %5 B tamponu 20-25 dakika %40 B tamponu 25-30 dakika %50 B tamponu 30-35 dakika %5 B tamponu

2.18 POP ile Hazırlanan Hidrolizatların Biyolojik Etkinliklerin İncelenmesi

2.18.1 Gluten hidrolizatının antioksidan etkinliği

Serbest radikal yakalama etkinliği deneyi 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikali kullanılarak Blois’in metoduna göre çalışıldı (Blois, 1958). Metod hidrolizatın bir proton veya elektron verebilme yeteneğinin, mor renkli DPPH çözeltisinin rengini açması esasına dayanır. Reaksiyon karışımının

absorbansının düşmesi yüksek serbest radikal giderme aktivitesinin göstergesidir (Şekil 2.13)



Şekil 2.13 DPPH radikal reaksiyonu.

Farklı konsantrasyonlardaki hidrolizatlardan (1-4 nmol) 1'er mL alınarak, 4 mL 0,1 mM DPPH (etanolde) çözeltisi ilave edildi. Vortekslendikten sonra oda koşullarında karanlıkta 30 dakika bekletildi ve 517 nm'de absorbansları okundu.

$$\text{DPPH radikal giderme etkisi (\%)} = [(A_0 - A_1)/A_0] \times 100,$$

A_0 ; Kontrol'ün absorbansı

A_1 ; Hidrolizat'ın absorbansı

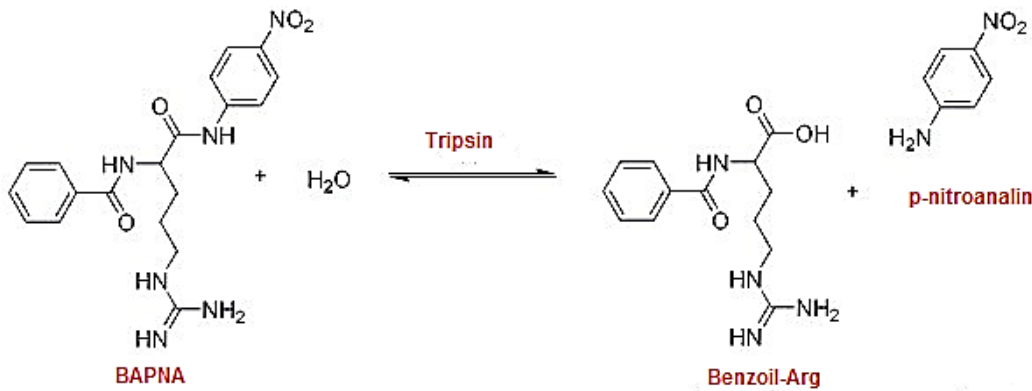
2.18.2 Gluten hidrolizatının antimikrobiyal etkinliği

Çalışmada kullanılan mikroorganizma kültürleri Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim dalı kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. Araştırmada, Gram negaif *Escherichia coli* ATCC11230 ve Gram pozitif *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P kullanılmıştır. Çözeltilerin minimum inhibe edici konsantrasyonları (MIC) 96 kuyucuklu mikrolakalar kullanılarak ve broth mikrodilüsyon tekniği ile belirlenmiştir. Hidrolizatın antibakteriyel etkisinin belirlenmesinden önce örneklerin mikroorganizma içeriği test edilmiştir. Örneklerde bir öze dolusu Muller Hinton agara çizgi ekimi yapılmış ve 37 °C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda MHA petrilinde herhangi bir bakteriyel üreme görülememiştir. Mikroorganizmalar Muller Hinton Broth (MHB) içinde 37°C' de

18–20 saat inkübe edilerek aktivasyonları sağlanmıştır (Holetz et al., 2002; Lkhagvajav et al., 2011). Hidrolizatların 40 µg/mL - 0.019 µg/mL aralığında seyreltmeleri hazırlanmıştır. Çift kuvvet MHB içinde 1/100'lük seyreltmeleri hazırlanan test mikroorganizmalarının 25 µL' si paralelli olarak kuyucuklara aktarılmış ve bu kuyucukların üzerine ise son hacim 50 µL olacak biçimde bileşiklerin hazırlanan seri seyreltmelerinden 25 µL eklenmiştir. 24 saatlik inkübasyondan sonra kuyucukların üzerine % 0,5'lik TTC (Trifenil tetrazolium klorid) çözeltisinden 50 µlt ilave edilerek 2 saat daha inkübe edilmiştir. Süre sonunda TTC'nin indirgenmesi ile oluşan kırmızı renkli formazan bileşiği üremenin indikatörü olarak kabul edilmiş ve MIC değerinin belirlenmesinde kullanılmıştır (Navarro et al., 1996; Lkhagvajav et al., 2011). MIC değeri üremenin görülmediği en düşük madde konsantrasyonu olarak ifade edilmemiştir. Çıplak gözle belirlenebilen en düşük antibiyotik konsantrasyonu MİK olarak kabul edilmiştir.

2.18.3 Gluten hidrolizatının Tripsin ve Prolil oligopeptidaz enziminin aktivitesine etkisi

Tripsin aktivitesi, sentetik bir substrat olan N-benzoil-L-arginin-p-nitroanalid (BAPNA) kullanılarak tayin edildi. Prosedürün temeli, reaksiyon sonucu açığa çıkan p-nitroanilin 405 nm'de spektrofotometrik ölçümüne dayanır (Hosseininaveh et al; 2009) (Şekil 2.14).



Şekil 2.14 BAPNA'nın tripsin ile hidroliz reaksiyonu.

Hidrolizat ile tripsin enziminin inhibisyonu enzim aktivite tayinleri üç tekrarlı olarak aşağıdaki prosedüre göre gerçekleştirildi:

- 10 µL tripsin (1mg/mL) ve değişen konsantrasyonlarda hidrolizat mikropilaya kuyucuklarına pipetlendi
- 30 dakika 37°C’de ön inkübasyona bırakıldı.
- Son hacim 80 µL olacak şekilde fosfat tamponu eklendi ve 10 µL substrat (1 mM BAPNA) ilave edildi.(Toplam hacim 100 µL)
- Tripsin için 37 °C’de 10 dakika sonrası mikropilaya okuyucu ile 405 nm’de absorpsanlar okundu.
- İnhibitörsüz koşullarda enzim aktivite ölçümleri kıyaslama amacı ile hidrolizat içermeyen deney seti ile çalışıldı.
- Hidrolizat ve tampon içeren körler hazırlandı.
- Daha önce standartlar ile oluşturulan kalibrasyon eğri ve katsayılar yardımı ile hidrolizat ve normal deney körü girişimlerini de göz önüne alınarak enzim aktiviteleri hesaplandı. IC₅₀ değerleri bölüm 2.16.1 ‘de anlatıldığı şekilde hesaplandı.

Glutenin prolil oligopeptidaz enzimi ile hidrolizi sonucu oluşan hidrolizatlatda Prolil oligopeptidaz enziminin inhibisyonu; optimum koşullarda enzim aktivitesinin ölçülmesiyle gerçekleştirildi.

Hidrolizat ile POP enziminin inhibisyonu enzim aktivite tayinleri üç tekrarlı olarak aşağıdaki prosedüre göre gerçekleştirildi:

- 10 µL POP enzimi ve değişen konsantrasyonlarda hidrolizat mikropilaya kuyucuklarına pipetlendi.
- 30 dakika 37 °C’de ön inkübasyona bırakıldı.
- Son hacim 100 µL olacak şekilde (uygun) tampon eklendi ve 100 µL substrat ilave edildi.(Toplam hacim 200 µL)
- 37 °C’de 5 dakika inkübasyon sonrası mikropilaya okuyucu ile 405 nm’de absorpsanlar okundu.
- İnhibitörsüz koşullarda enzim aktivite ölçümleri kıyaslama amacı ile her deney seti ve enzim için bölüm 2.7’de anlatıldığı gibi tekrarlı çalışıldı.
- Hidrolizat ve tampon içeren körler hazırlandı.
- Daha önce standartlar ile oluşturulan kalibrasyon eğri ve katsayılar yardımı ile hidrolizat ve normal deney körü girişimlerini de göz önüne

alınarak enzim aktiviteleri hesaplandı. IC_{50} değerleri bölüm 2.16.1 'de anlatıldığı şekilde hesaplandı.

3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Prolil oligopeptidaz enzimi (POP; EC 3.4.21.26); serin peptidaz enzim sınıfının prolil oligopeptidaz ailesine ait bir endopeptidazdır. Prolil oligopeptidaz enzimi özellikle 30 amino asite kadar uzunluktaki kısa peptidlerin prolin amino asidinin karboksil kısmından hidrolizler.

Birçok önemli metabolik olayda rol oynayan enzimin metabolizmadaki bilinmeyen etki mekanizmalarının ortaya çıkarılması, bazı hastalıkların teşhis ve tedavilerinde yeni uygulamaların keşfinde araştırmacılara ışık tutacaktır. Özellikle gluten intoleransı gibi önemli hastalıklardaki rolünün keşfi ile potansiyel farmasötik ajanların geliştirilmesi gündeme gelmiştir. Gluten intoleransı açısından bakıldığında, immün baskın gliadin peptidlerinde yüksek miktarda bulunan prolin rezidüleri bunları sindirim proteazlarına dirençli hale getirirler. Bu bağlamda bu peptidlerin çeşitli mikroorganizmalarda eksprese olan ve immün baskın prolin bölgelerini ayırabilen prolil endopeptidazların kullanılmasını gerektirmektedir (Cengiz et al., 2010).

Çölyak hastalığının sadece tek tedavi yöntemi glutensiz bir diyetdir. Bu diyet hem çok pahalı hem de gıda hazırlığı sırasında çapraz kontaminasyon olmaktadır. Böylelikle yetersiz gıda etiketlenmesi çölyak hastaların yaşam kalitesini ve sağlığını olumsuz etkilemektedir. Sonuç olarak; çölyak hastalığının tedavisi için alternatif uygulamalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu bağlamda diyet ile alınan glutenin gliadin fragmentlerinin prolil oligopeptidaz enzimi ile enzimatik hidrolizi gündeme gelmiştir. Genel anlamda POP'un biyolojik önemi göz önüne alındığında enzimin yapısı ve katalitik özelliklerinin bilinmesi gerekmektedir. Bu amaçla gerekli tüm yapı analizleri ve mekanistik çalışmalar için enzimin saflaştırılması gerekliliği açıktır.

Walter (1971) tarafından POP enziminin keşfinden sonra, araştırmacılar tarafından birçok türde (sıçan, fare, domuz, insan, sığır, tavşan, kuzu, balık, karasinek, havuç, mantar ve bakteri türleri) farklı doku, organ ve vücut sıvılarında enzimin varlığı tanımlanmış, çeşitli protokoller kullanılarak saflaştırılması ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Öncelikle protein hidrolizatlarının hazırlanmasında POP enziminin kullanım potansiyelinin araştırılması amacıyla en uygun enzim kaynağının belirlenmesi için farklı kaynaklar (bitkisel ve hayvansal) tarandı. Ancak amaca yönelik yeterli aktivite içeren uygun bir kaynak bulunmadığından enzimin rekombinant olarak üretim ve saflaştırılması gerçekleştirildi.

Sonuç olarak; bu tez çalışmasında, rekombinant olarak *E. coli* 'de üretilen *Myxococcus xanthus* prolil oligopeptidaz enziminin Nikel-Şelat Affinite ve jel filtrasyon kromatografileri kullanılarak saflaştırılması gerçekleştirildi. Saflaştırılan enzimin karakterizasyonunda optimum pH ve sıcaklık, izoelektrik nokta, moleküler kütle, substrat spesifikliği, kinetik parametreler, metal iyonlarının etkisi, çeşitli kimyasal ve inhibitörlerin etkisi, pH, termal ve depo kararlılıkları belirlendi. Rekombinant olarak elde edilen prolil oligopeptidaz'ın gluten ununun hidrolizinde kullanılabilirliği ile ilgili çalışmalar yapıldı. POP ile hazırlanan hidrolizatların biyolojik etkinlik potansiyelleri araştırıldı.

3.1 Prolil Oligopeptidaz Enzimin Farklı Kaynaklarda Belirlenmesi

Prolil oligopeptidaz enziminin saflaştırılması için en uygun kaynağın belirlenmesinde seçilen bitkisel ve hayvansal dokular bölüm 2.3'de anlatıldığı gibi homojenize edildi. Santrifüj sonrası elde edilen preparatlarda enzim aktivite ve protein tayinleri yapılarak spesifik aktiviteleri hesaplandı (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1'de görüldüğü gibi seçilen 10 bitkisel kaynakta hiçbir aktivite bulunamazken guinea pig'in farklı dokularında değişen oranlarda aktivite bulunmuştur. Spesifik aktiviteler kıyaslandığında enzim için sırasıyla pankreas, kalp ve karaciğerin daha etkin olduğu görülmektedir. Ancak test edilen tüm kaynaklarda biyolojik prosesde kullanıma yönelik uygun miktarda enzim aktivitesi görülmediği düşünülerek enziminin *E. coli*'de rekombinant olarak üretilmesine karar verildi.

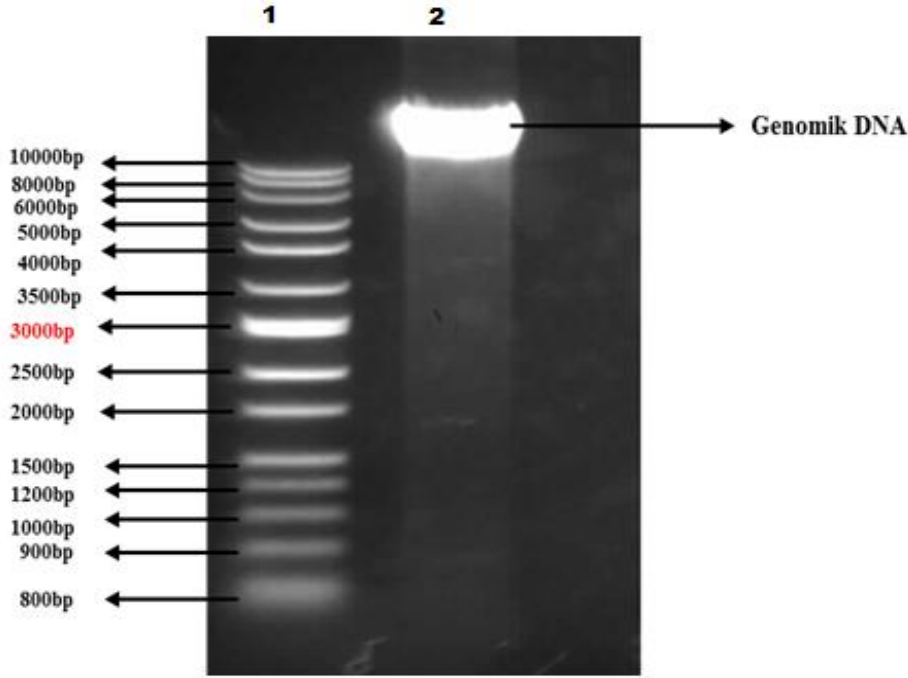
Çizelge 3.1 POP enziminin farklı kaynaklardaki aktiviteleri

Kaynak	Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (U/mg)
Guinea pig (Karaciğer)	11,7 x10 ⁻³	4,9x10 ⁻³
Guinea pig (Kalınbağırsak)	1,5 x10 ⁻³	2,2x10 ⁻³
Guinea pig (İncebağırsak)	1,6 x10 ⁻³	2,1x10 ⁻³
Guinea pig (Kalp)	5,4 x10 ⁻³	5,9x10 ⁻³
Guinea pig (Beyin)	2,2 x10 ⁻³	3,1x10 ⁻³
Guinea pig (Mide)	1,8 x10 ⁻³	2,3x10 ⁻³
Guinea pig (Böbrek)	6,7 x10 ⁻³	3,1x10 ⁻³
Guinea pig (Pankreas)	1,1 x10 ⁻³	9,2x10 ⁻³
Guinea pig (Dalak)	10,2 x10 ⁻³	0,9 x10 ⁻³
<i>Taraxacum officinale</i> (Karahinhiba)	-	-
<i>Qercus aucheri</i> (Pinar)	-	-
<i>Beta vulgaris</i> (Pazı)	-	-
<i>Malva sylvestris</i> (Ebegümece)	-	-
<i>Urtica dioica</i> (Isırgan otu)	-	-
<i>Beta vulgaris</i> (Pazı sap)	-	-
<i>Euonymus japonica</i> (Taflan)	-	-
<i>Taraxacum officinale</i> (Karahinhiba sap)	-	-
<i>Malva sylvestris</i> (Ebegümece sap)	-	-
<i>Raphanus raphanistrum</i> (Turp otu)	-	-

3.2 *Myxococcus xanthus* Suşu'dan Prolil Oligopeptidaz Enziminin Üretimi ve Saflaştırılması

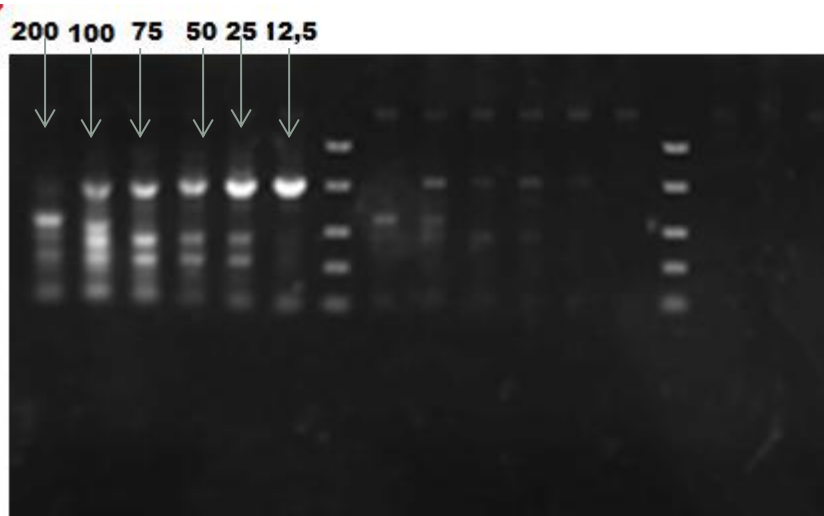
Prolil oligopeptidaz enzimini *E. coli*'de rekombinant olarak üretmek, saflaştırmak ve POP aktivitesini ölçmek üzere *Myxococcus xanthus* suşu seçildi. Bu suşu seçmemizdeki neden çalışılan diğer mikroorganizmalara göre POP enzimini kodlayan genin daha kısa olmasıdır. Uzun fragment klonlamayı zorlaştıracığı ve *E. coli*'de büyük proteinlerin üretiminde yaşanan zorluklardan dolayı tercih edildi.

Myxococcus xanthus suşuna ait genomik DNA elde edildi (Şekil 3.1). Uygun primerler ile POP enzimini kodlayan gen fragmenti PCR ile çoğaltıldı (Şekil 3.2). Agaroz jel elektroforezi ile POP geninin amplifikasyonun gerçekleştirip gerçekleştirilmediği kontrol edildi. Agaroz jelden DNA fragmentlerinin ekstraksiyonu yapıldı.



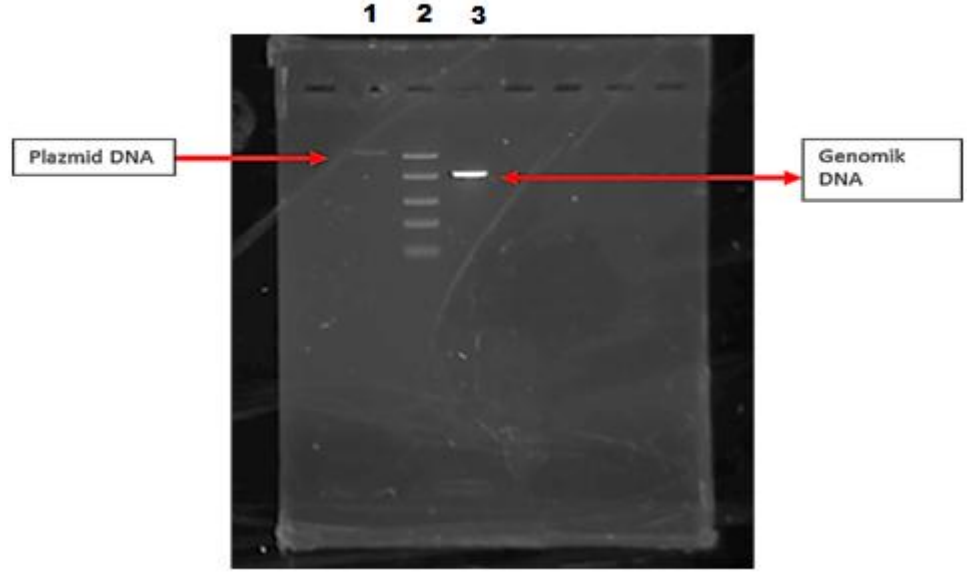
Şekil 3.1 Genomik DNA'nın agaroz jel görüntüsü.1.Kuyucuk; marker (Smart DNA Ladder 10000bp-200bp), 2.Kuyucuk; Genomik DNA .

PCR koşullarının optimizasyonu için ilk olarak 100 nmol kullanılan primerin konsantrasyonu yüksek geldiği için dimerler oluştuğu gözlemlendi. PCR koşullarının optimizasyonu için primerin değişen konsantrasyonlarında reaksiyon gerçekleştirildi ve elde edilen PCR sonuçlarından en iyi primer konsantrasyonunun 12.5 nmol olduğu belirlendi.



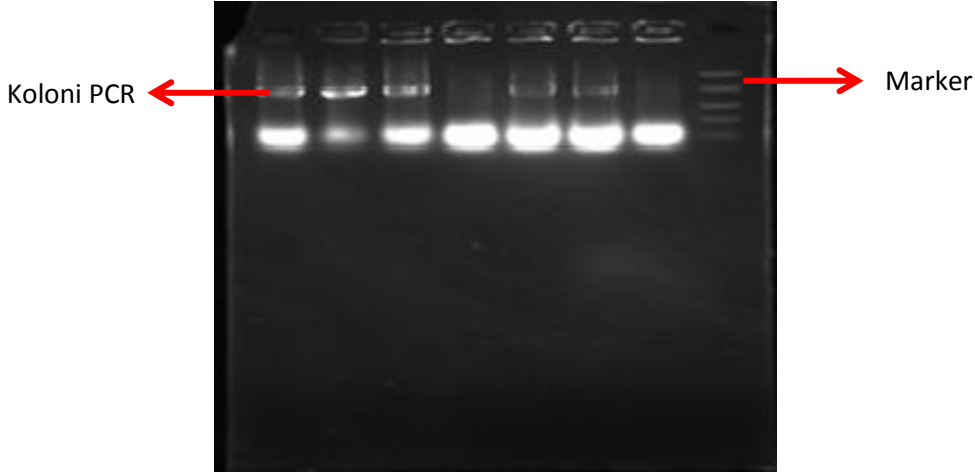
Şekil 3.2 *Myxococcus xanthus* için tasarlanan gene spesifik primer setinin farklı konsantrasyonları ile yapılan PCR ürünlerinin jel görüntüsü.

Jelden ekstraksiyonu yapılan DNA fragmenti ve pET21a vektörü *Hind*III ve *Nde*I restriksiyon enzimleriyle kesildi. Kesilen vektör ve fragmentler agaroz jel elektroforezine uygulandı. Fragmentler agaroz jelden ekstrakte edildi. Gen fragmenti ve vektör ligasyon reaksiyonu ile birleştirildi (Rekombinant plazmid DNA molekülünün oluşumu) (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 Plazmid ve Genomik DNA'nın agaroz jel görüntüsü örneği 1. Kuyucuk; Plazmid DNA 2.kuyucuk; Fastruler middle range marker (5000bp, 2000bp, 850bp, 400bp, 100bp), 3.kuyucuk; Genomik DNA fragmenti.

Restriksiyon enzimler ile kesilmiş POP fragmenti ve pET21a (+) vektörü arasında ligasyon reaksiyonu gerçekleştirildi ve ligasyon karışımı *E.coli* DH5α hücrelerine transforme edildi. Hücreler 37 °C de 1 saatlik inkübasyonun ardından ilgili antibiyotiği içeren petrilere yayıldı. Antibiyotik dirençliliğine sahip (rekombinant plazmid DNA'yı başarıyla alan) koloniler koloni PCR ile yalancı pozitifliğe karşı test edildi (Şekil 3.4).



Şekil 3.4 Koloni PCR ile elde edilen fragmentlerin agaroz jel görüntüsü örneği. 1-7. Kuyucuk koloni PCR örnekleri, 8.Kuyucuk Fastruler middle range marker (5000bp,2000bp, 850bp, 400bp,100bp).

pET21a/POP vektörünü taşıyan ve koloni PCR ile tespit edilen *E.coli* hücrelerinden plazmid DNA izole edildi ve test ekspresyonu yapılmak üzere *E.coli* DH5 α hücrelerine transforme edildi. 0.3 mM IPTG ile indüklenen ve indüklenmeyen DH5 α hücrelerinin 28 °C’de gece boyu inkübasyonlarının ardından POP test ekspresyonu düzeylerinin belirlenmesi için SDS-PAGE (% 12 w/v akrilamid) uygulandı.

SDS-PAGE sonrası elde edilen sonuçlara göre; IPTG konsantrasyonunun 0,5 mM’dan 0,3 mM’a değiştirilmesi ve sıcaklığın 28°C’ye düşürülmesinin süpernatanttaki POP miktarını arttırdığı belirlendi. Bu nedenle büyük ölçekli ekspresyon *E.coli* DH5 α hücrelerinde 0,3 mM IPTG varlığında ve 28°C gece boyu inkübasyonu gerçekleştirildi.

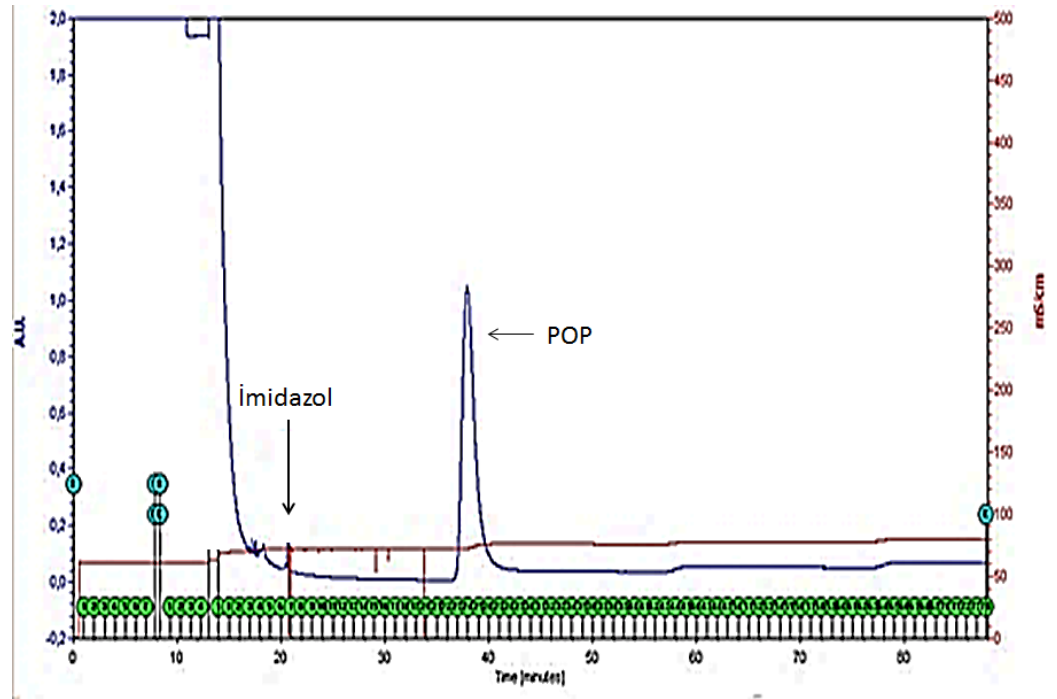
N-terminalinde His-tag içeren POP enzimi HisTrapFF kolon kullanılarak (5 mL; GE Healthcare, Uppsala, Sweden) Nikel-Şelat Afinite kromatografisi ile saflaştırıldı.

Rekombinant olarak üretilen proteinlerin saflaştırılmasında genel olarak Metal-Şelat Afinite kromatografisi kullanılmaktadır. Bunun nedeni C-terminalindeki 6-His tag kuyruğu ile metalin kompleks oluşturmasıdır. Metal şelat affinite kromatografisinde matriks olarak Sefaroz 6’ya kovalent bağlı

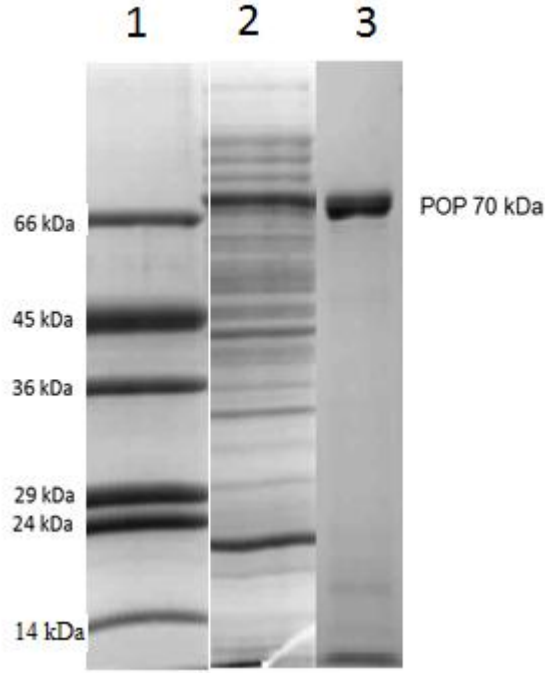
iminodioasetik asit kullanılmaktadır. İminodio asetik asit metal iyonunu şelatlar ve bu şekilde metal iyonu immobilize edilir. Protein moleküllerinin yüzeyindeki elektronca zengin amino asitler metal iyonu ile etkileşir ve proteinler immobilize metal iyonuna olan affinitelerine göre ayrılırlar. N- veya C- terminalinde His-tag bulunan rekombinant proteinler kolona uygulandığında metal iyonu ile etkileşim sonucu kolona spesifik olarak bağlanırlar.

POP enziminin saflaştırılması sırasında uygulanan imidazol gradienti sonucu farklı fraksiyonlar elde edildi. Her bir fraksiyonun 280 nm'deki absorbans değeri izlendi. Protein içeriği yüksek olan fraksiyonlar toplandı Aktivite, protein tayini ve saflık kontrolü için SDS-PAGE yapıldı.

Rekombinant olarak *Myxococcus xanthus* suşundan üretilen POP enziminin Nikel-Şelat Afinite kromatografisi ile elde edilen kromatogram görüntüsü Şekil 3.5'de verilmiştir. SDS-PAGE ile rölatif molekül kütlesi yaklaşık 70 kDa olarak belirlenen majör tek band şeklinde gözlemlendi (Şekil 3.6). Infinity –Capture version 2.18 software kullanılarak molekül kütleleri hesaplandı.



Şekil 3.5 Nikel-Şelat Affinite kromatogramı.

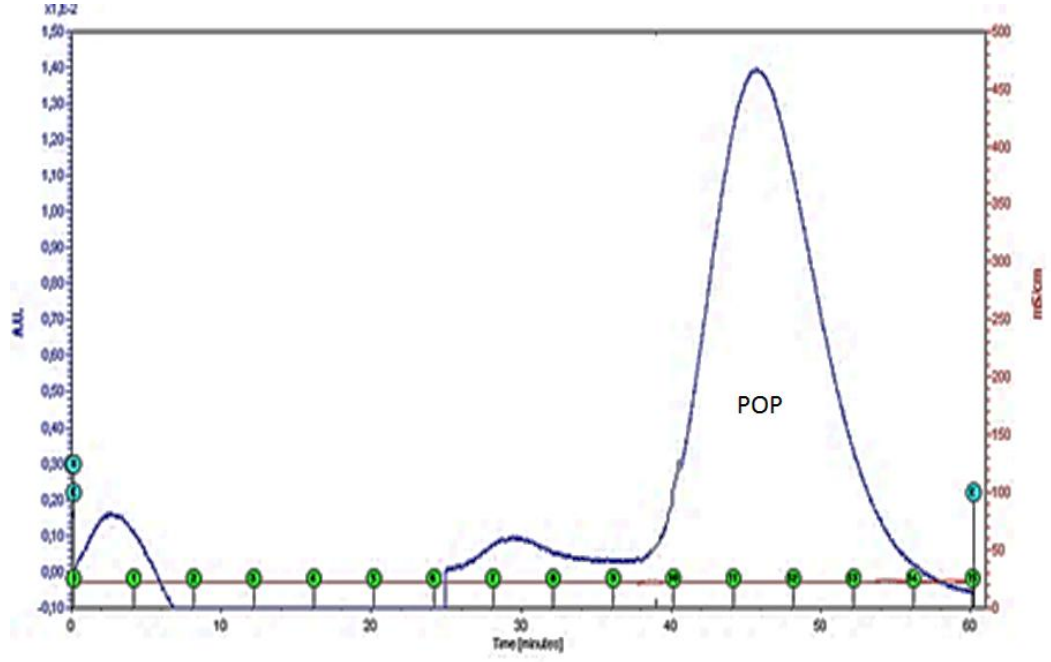


Şekil 3.6 Nikel Şelat Afinite kromatografisi ile saflaştırılan enziminin SDS-PAGE jel (%12 poliakrilamid) görüntüsü. [Protein standardı (1); kolona uygulanan homojenat (2); kolondan elde edilen elüat (3) ile gösterilmiştir]

Şekil 3.6 dan da görüldüğü gibi majör saf enzimin yanısıra çok net olmasa da az oranda minör proteinlerinde olduğu gözlemlendi. Her ne kadar uygulamaya girişim yapabilecek bir sorun olduğu düşünülme de gerek enzimin daha ileri düzeyde saflaştırılması gerekse SDS-PAGE’de belirlenen molekül kütlesinin doğrulanması ve stökiyometrik değerlendirilmesi için jel filtrasyon kromatografisi uygulandı.

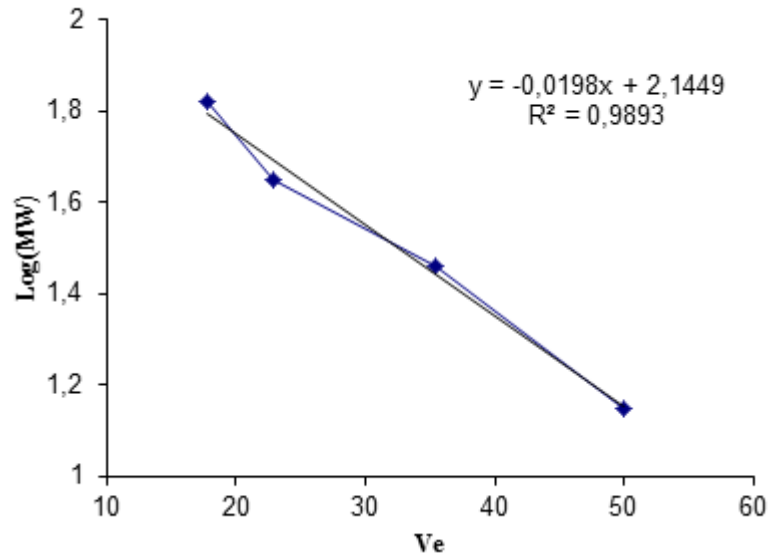
3.3 Jel Filtrasyon Kromatografisi İle Saflığının Kontrolü ve Molekül Kütlesinin Belirlenmesi

İleri aşamada Prolil oligopeptidaz enziminin jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılması, saflığının kontrol edilmesi ve molekül kütlesinin test edilmesi (Şekil 3.7). Orta basınç sıvı kromatografi (MPLC) sisteminde gerçekleştirildi. Jel filtrasyon sonrası elde edilen kromatogram görüntüsü Şekil 3.7’de verilmiştir.



Şekil 3.7 Jel filtrasyon kromatogramı.

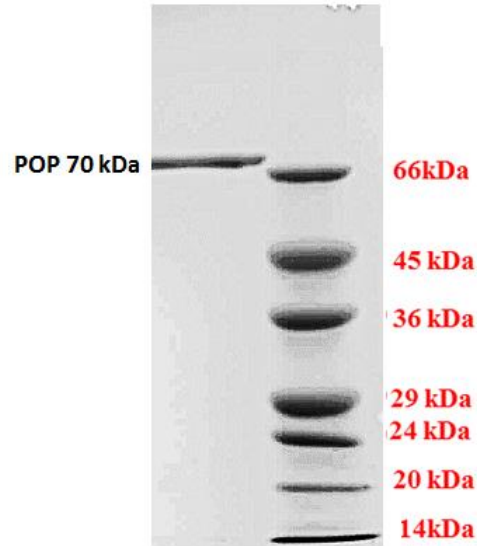
Molekül kütlesi bilenen protein standartları aynı koşullarda jel filtrasyon sistemine uygulanarak standartların molekül kütlelerinin logaritmalarına karşı alıkonma hacimleri ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi kullanılarak POP enziminin molekül kütlesi 70 kDa olarak belirlendi (Şekil 3.8).



Şekil 3.8 Molekül kütle standartlarının molekül kütle logaritmalarına karşılık V_e değerleri ile oluşturulan standart grafiği (Sığır serum albümin, 66kDa; Peroksidaz, 40kDa, Proteinaz K, 28kDa ve Lizozim, 14 kDa).

Literatürde farklı organizmalardan, *Myxococcus xanthus* suşundan ve diğer mikroorganizmalardan rekombinant olarak üretilen ve saflaştırılan Prolil oligopeptidaz enziminin SDS-PAGE, jel filtrasyon ve non-denatüre page uygulamaları sonrası yapısının; çoğunlukla monomer, birkaç çalışmada dimer, yine bir çalışmada da trimer olduğu ifade edilmektedir (Wang et al., 2012; Chen et al., 2012; Lee et.al., 2007). Molekül kütlelerinin ise farklı türlerde 57 ile 81 kDa arasında değişen bir büyüklüğe sahip olduğu belirtilmektedir (Bkz. Çizelge 1.6).

Tarafımızdan metal affinite ve jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılan Prolil oligopeptidaz enziminin SDS-PAGE ile molekül kütlelerinin yaklaşık olarak 70 kDa olması literatür verileri ile uyum sağlamaktadır (Şekil 3.9) (Capiralla et al., 2002; Lee et al., 2007; Masahiro et al., 1992).



Şekil 3.9 Jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılan POP enziminin SDS-PAGE görüntüsü.

Protein standardı (2); kolondan elde edilen elüat (1) ile gösterilmiştir.

Jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılan POP enziminin bağıl molekül kütlesi yaklaşık 42,6 kDa olarak bulundu. Bu sonucun enzimin SDS-PAGE ile belirlenen molekül kütlelerinden farklı olması ve özellikle jel filtrasyon kromatografisi ile belirlenen molekül kütlelerinin daha küçük bir değerde olması enzimin monomer olduğunu güçlendirmektedir. Birçok literatür verilerinde prolil oligopeptidaz enzimin monomer yapıda olduğu belirtilmiştir (Goossens et al., 1995; Buckley, 2001; Fulop et al., 1998; Harwood et al., 1997; Juhász et al., 2005; Kubota et al., 2005; Li et al., 2000).

Ancak iki farklı teknik kullanılarak elde edilen sonuçlardan gerçek molekül kütlelerinin hangisi olduğunun belirlenmesi için ileri düzeyde çalışmalara ihtiyaç duyulduğu açıktır. Bununla birlikte; Prolil oligopeptidaz enzimin DNA dizisi göz önüne alındığında bağlı molekül kütlelerinin yaklaşık 71 kDa olduğu tahmin edilmektedir. Bu veri tarafımızdan saflaştırılan Prolil oligopeptidaz enziminin SDS-PAGE ile belirlenen bağlı molekül kütlesi ile uyum içindedir. Fakat jel filtrasyon kromatografisi ile bağlı molekül kütlelerinin yaklaşık olarak 42,6 kDa olarak bulunması ile 27,4 kDa'luk bir fark görülmektedir. Benzer sonuçlar literatürde de görülmektedir. (Capiralla et al., 2002; Kabashima et al., 1998). Buna getirilen açıklama ise enzimin jel matriksi ile etkileşime girmesi sonucu kromatografik koşullardaki farklılık olarak düşünülebileceği gibi beklenen molekül kütlelerinden daha küçük bir molekül kütlelerinin elde edilmesi prolil oligopeptidaz enzimin yapısal özelliğinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Myxococcus xanthus suşundan prolil oligopeptidaz enziminin saflaştırılması kısaca özetlenecek olursa; ilk olarak enzimin *Myxococcus xanthus* suşundan rekombinant olarak eldilmesi. Ni-Şelat Afinite kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografi adımları ile ileri düzeyde saflaştırılması gerçekleştirildi. Tüm saflaştırma adımları sonrasında enzim % 11 verimle 1066 kat saflaştırıldı (Çizelge 3.2)

Çizelge 3.2 Prolil oligopeptidaz enziminin saflaştırılması

	Total aktivite (U)	Total Protein (mg)	Spesifik Aktivite* (U/mg)	Saflaştırma katsayısı	Verim# (%)
Homojenat*	56	263,7	0,21	1	100
Ni⁺² şelat afinite kromatografisi	25	16	1,56	7,5	45
Jel filtrasyon	6,1	0,27	224	1066	11

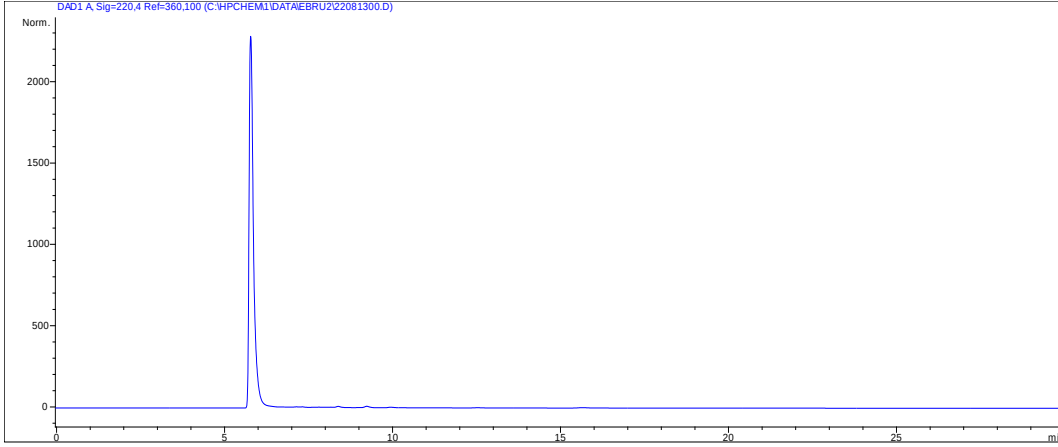
*1 mg enzim tarafından dakikada dönüşüme uğratılan substratın µmol miktarıdır

× Homojenat 4L LB büyüme ortamı

Verim aktivite cinsinden hesaplanmıştır

3.4 HPLC ile Prolil Oligopeptidaz Enziminin Saflığının Kontrolü

Prolil oligopeptidaz enziminin saflığının diğer yöntemlerin yanısıra kontrolü için HPLC analizi yapıldı. Elde edilen kromotagrama bakıldığında enzimin saf olduğu gözlemlendi (Şekil 3.10).

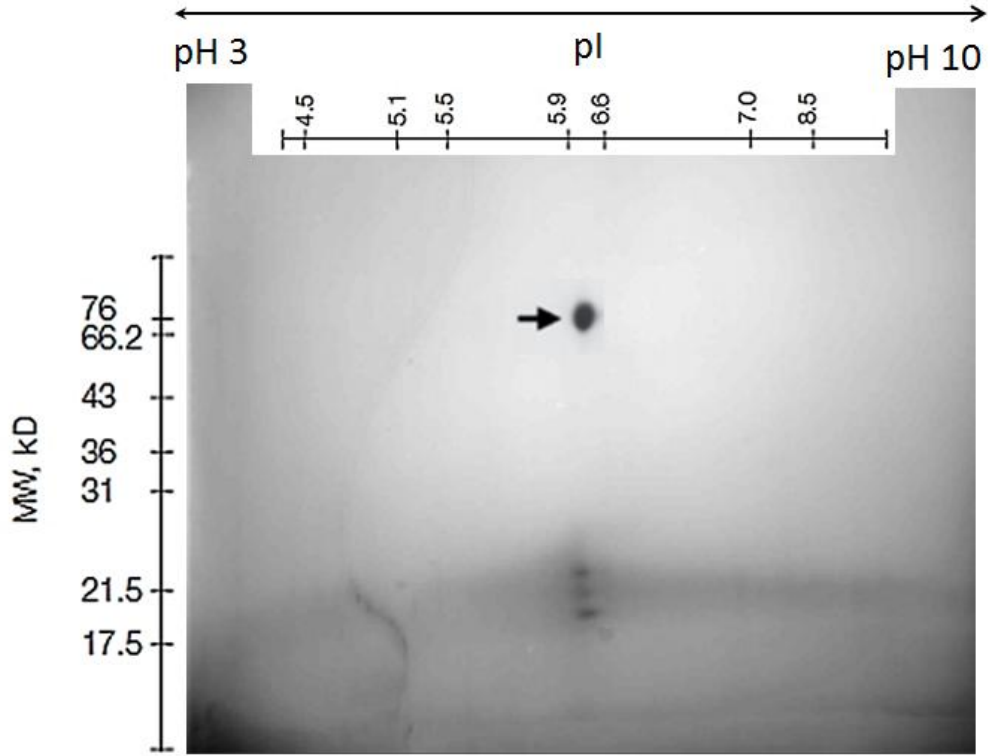


Şekil 3.10 Prolil oligopeptidaz enziminin RP-HPLC ile saflık kontrolü [Kolon: Thermo BioBasic SEC-60 Elusyon A: distile su, B:150 mM NaCl içeren 10 mM Tris-HCl pH 7,4; izokratik:0-37 dk %100 B; akış hızı 1ml/dk; sıcaklık 37°C; UV: 280nm].

3.5 İki Yönlü Jel Elektroforezi (2D-PAGE) ile İzoelektrik Noktanın Belirlenmesi

Prolil oligopeptidaz enziminin izoelektrik noktası bölüm 2.11’de anlatıldığı gibi belirlendi. İki yönlü jel elektroforezi ile (Şekil 3.11) *Myxococcus xanthus* suşundan rekombinant olarak saflaştırılan enzimin izoelektrik noktası $6,3 \pm 0,2$ olarak hesaplandı.

Prolil oligopeptidaz enziminin farklı kaynak ve türlerde bulunan pI değerleri Çizelge 1.5’de özetlenmiştir. Buna göre; hayvansal dokularda genellikle izoelektrik noktanın 4,5- 5,0 aralığında değiştiği ancak bakterilerde ise 5,5-6,2 aralığında olduğu görülmektedir.



Şekil 3.11 POP enziminin 2D-PAGE görüntüsü.

Myxococcus xanthus suşundan saflaştırılıp üretilen POP enziminin bulunan rölatif pI değeri özellikle bakteriyel kaynaklardan elde edilen kaynaklarda bulunan değerler ile uyum göstermektedir (Szwajcer-Dey et al., 1992).

3.6 POP Enziminin Fiziksel ve Kimyasal Karakterizasyonu

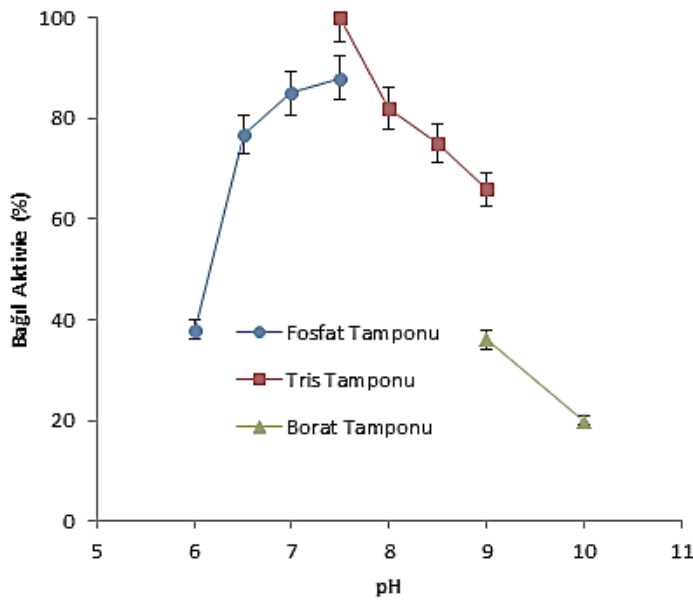
3.6.1 Enzim aktivitesine pH'nın etkisi

pH; enzimin katalitik aktivitesini etkileyen en önemli çevresel faktörlerden biridir. Enzimin bulunduğu ortamın pH'sı; protein yapısındaki enzimin yükünü, dissosiasyon durumunu ve aktif merkezini etkilemektedir. Bu nedenle enzim ile yapılacak çalışmalarda, enzim için en iyi çalışma koşulların belirlenmesinde enzim-pH ilişkisinin tam olarak ortaya konması gerekmektedir.

POP enziminin optimum pH'sı bölüm 2.12.1'de anlatıldığı gibi belirlendi. *Myxococcus xanthus* suşundan elde edilen POP enziminin aktiviteleri en yüksek pH 7,0-8,5 aralığında gözlenirken optimum pH'sı 7,5 olarak belirlendi (Şekil 3.12).

Farklı tür ve kaynaklardan saflaştırılan enzimin optimum pH'sının 3,7-10 arasında değiştiği Çizelge 1.1'de görülmektedir. Harwood and Schreier (2001), tarafından bakteri (*P.furiosos*)'den saflaştırılan POP enziminin optimum pH'sı, *Myxococcus xanthus*'dan elde edilen pH değeri ile benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Enzimin pH 7,0-9,0 aralığında yüksek aktivite sergilemesi ve optimum pH'sının 7,5 olması Grzywnowicz ve Labarzewski (1994)'in serin proteazlar için “alkali ve nötral pH'larda optimum aktiviteye sahiptirler” ifadesini doğrular niteliktedir.



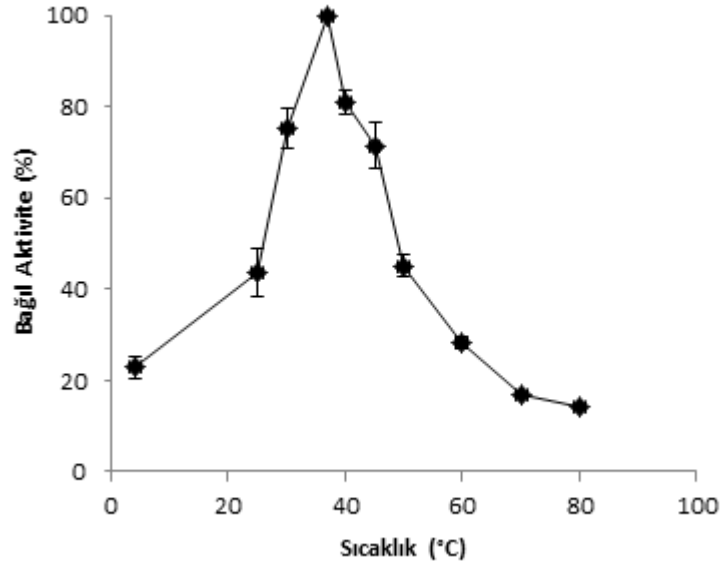
Şekil 3.12 POP enzim aktivitesinin pH bağımlı değişimi

3.6.2 Enzim aktivitesine sıcaklığın etkisi

Sıcaklık; enzim katalizli reaksiyonları etkileyen önemli çevresel faktörlerden biridir. Sıcaklığın etkisi enzim kaynağına göre farklılaşmakla birlikte sıcaklıktaki artışlar belli derecelere kadar enzim aktivitesini etkilemezken, bu derecelerin üzerindeki sıcaklıklar enzim aktivitesinde hızlı düşüslere neden olmaktadır.

Prolil oligopeptidaz enzimine sıcaklığın etkisi 2.12.2'de anlatıldığı gibi belirlendi. *Myxococcus xanthus* suşundan elde edilen POP enziminin optimum sıcaklığı 37 °C olarak bulundu. 45 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda, sıcaklıklardaki

artışla paralel olarak enzim aktivitesinde düşüşler gözlemlendi (Şekil 3.13). Bu sonuçların literatür verileri ile uyumlu olduğu gözlemlenmiştir (Bkz, Çizelge 1.2).



Şekil 3.13 POP enzim aktivitesinin sıcaklığa bağımlı değişimi.

3.6.3 Substrat spesifikliğı

Prolil oligopeptidaz enziminin substrat spesifikliğı sentetik substratları bölüm 2.12.3.1’de ve doğal substratları kullanılarak bölüm 2.12.3.2’de anlatıldığı gibi belirlendi.

POP enziminin sentetik (Suc-Ala-Pro-pNA, Z-Gly-Pro-pNA, H-Gly-Pro-pNA, H-Ala-Pro-pNA, H-Arg-Pro-pNA, H-Val-Ala-pNA, H-Glu-Ala-pNA, H-Leu-pNA, H-Pro-pNA ve H-Glu-pNA) kullanılarak ölçülen enzim aktiviteleri tüm substratlar için Çizelge 3.3’de verilmiştir. Enzimin farklı substratlar varlığında aktiviteleri incelendiğinde *Myxococcus xanthus* suşundan saflaştırılan POP enziminin genel olarak dipeptid yapısında prolin içeren substratları hidrolizleyemediğı, sadece protein yapısında prolin içeren substratları hidrolizlediğı görülmektedir. Bu sonuç ise POP enziminin prolin arkasından kesen bir endopeptidaz olduğunu doğrulamaktadır. Peptid’inin içinde yer alan Y- Pro-X bağıını hidrolizlemekte olup X, prolin dışında herhangi bir amino asit olabilmektedir. N-terminalin de prolin amino asidi yer aldığı takdirde hidroliz

gerçekleşmez. Y, korunan bir amino asit artığı veya bir peptid olması gerekmektedir. Prolil oligopeptidaz enzimi Ala-X bağına da hidrolizleyebilir ancak etkinliği 100-1000 kat daha düşüktür. X, asidik ve bazik amino asitlere kıyasla hidrofobik amino asitleri daha etkin hidrolizyebilmektedir (Ishino et al., 1998).

Ayrıca prolil oligopeptidaz'ın P1 pozisyonunda peptidin iç kısmında yer alan prolin dışındaki alanin, serin, α -aminobutril, hidroksiprolin, ve sistein gibi amino asitleri de spesifik olarak hidrolizledikleri bilinmektedir. Ancak peptid de yer alan amino aside göre hidroliz etkinliği Pro>Ala-Cys>Ser (Van Elzen and Lambeir, 2011; Vlieghe et al., 2010) şeklinde gerçekleşmektedir. P3 pozisyonunda hidrofobik ve bazik amino asitler olduğunda POP enziminin yüksek hidroliz etkinliği yapılan çalışmalarda gözlenmiştir (Gorao et al., 2007).

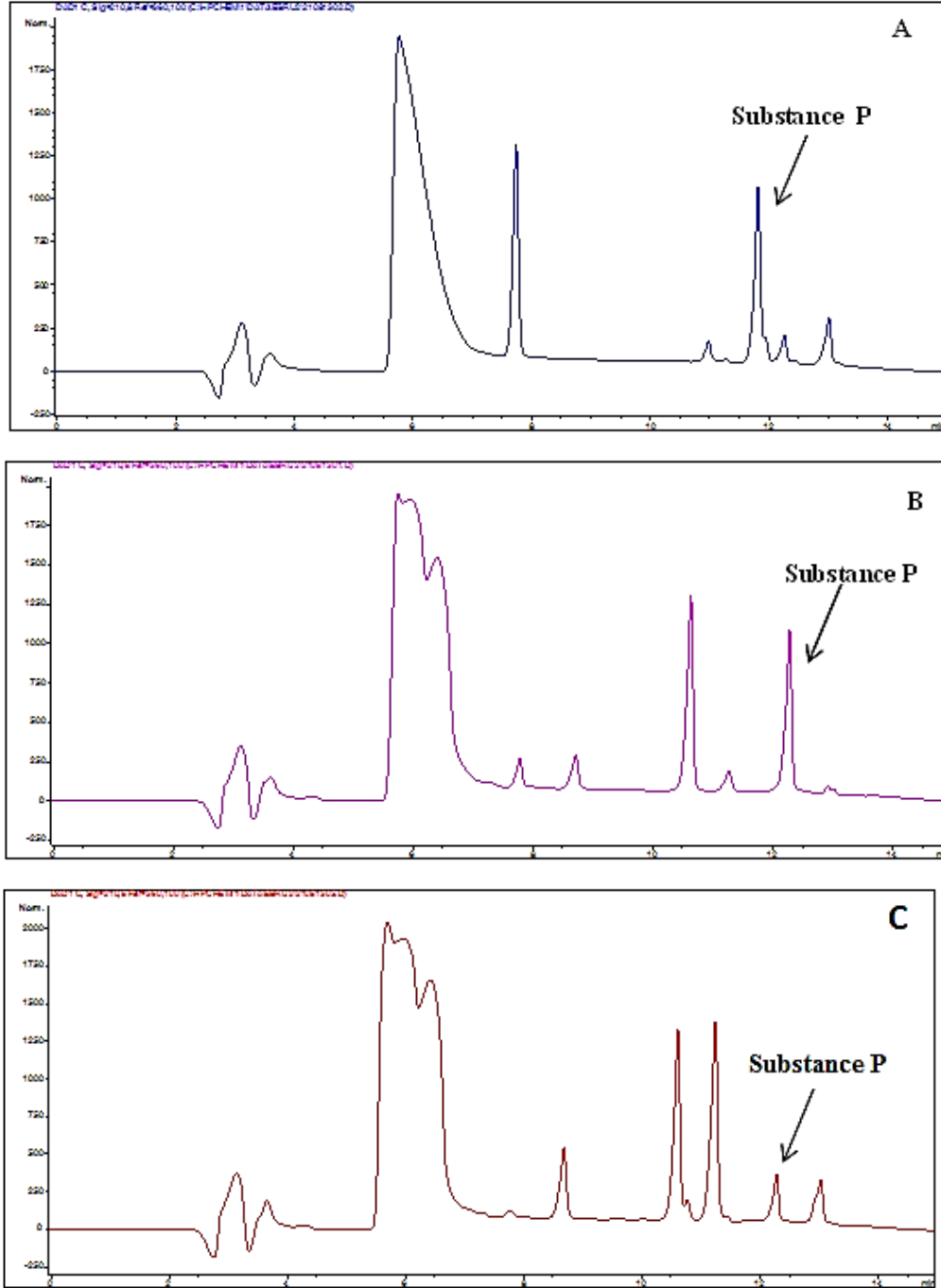
Bu çalışmada kullanılan sentetik substratlar da Y'nin hidrofobik olan N-benziloksikarbonil (Z) grubunu izleyen amino aside bağlı prolin'in yer aldığı peptidler'in enzim tarafından daha etkin hidrolizlendiği görüldü. Ayrıca doğal substratlar olan IGF-1 ve Substance P'nin hidrolizlenmesinde peptidin amino ucunun korunmuş bir grup içermesinin de önemli olduğunu göstermektedir (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3 POP enzimi ile sentetik substratların hidrolizi.

Sentetik Substrat Adı	Aktivite (U/mg)*	Süre (Dakika)
Suc-Ala-Pro-pNa	1,43	5
Z-Gly-Pro-pNa	1,56	5
Suc-Gly-Pro-pNa	0,52	5
H-Ala-Pro-pNa	-	5
H-Arg-Pro-pNa	-	10
H-Val-Ala-pNa	-	10
H-Gly-Pro-pNa	-	10
H-Leu-pNa	-	15
H-Pro-pNa	-	15
H-Glu-pNa	-	15
H-Glu-Ala-pNa	-	15

* 1mg enzim tarafından dakikada dönüşüme uğratan substratın μ mol miktarıdır

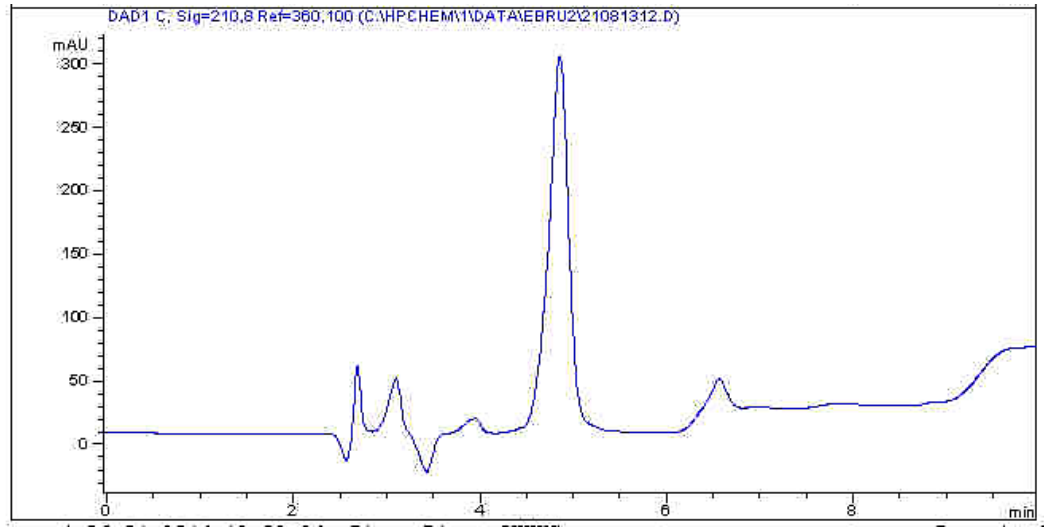
Substance P'nin *Myxococcus xanthus* dan rekombinanat olarak saflaştırılan enzimle 30 ve 60 dakika inkübasyon sonrasında, enzim tarafından hidrolizlendiği gözlemlendi (Substance P'nin HPLC'de alıkonma zamanı $11,84 \pm 0,027$ dk olarak bulundu).



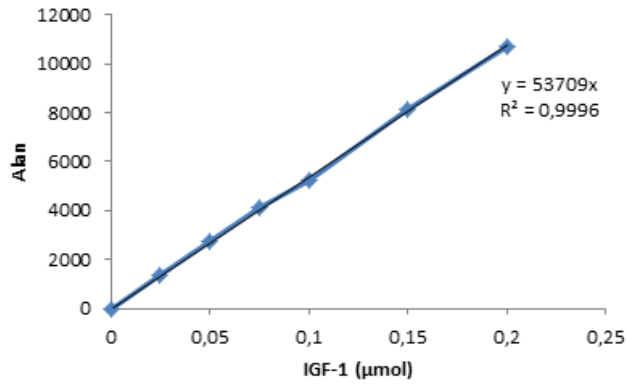
Şekil 3.16 Substance P'nin POP enzimi ile hidrolizi, A. Substance P'nin başlangıç kromatogramı (enzim, elüsyon A ve %10 TCA ile birlikte), B. Substance P'nin enzimle 30 dakika inkübasyon sonrasındaki kromatogramı. C. Substance P'nin enzimle 60 dakika inkübasyon sonrasındaki kromatogramı, Kolon: nucleosil RP-C18; Elusyon A: %0,1 TFA suda, B: %0,1 TFA asetonitrilde ; gradient: 0-2 dk %5 B, 2-12 dk %60 B, 12-14 dk %5, 14-15 dk %5 B; akış hızı 1ml/dk; sıcaklık 45°C; UV: 210nm

Substance P'nin Prolil oligopeptidaz enzimi ile hidroliz aktivitesinin belirlenmesinde sıfıncı an (a) 30. dak. (b) ve 60. dak (c) sonrası elde edilen kromatogramlarda zamana bağı olarak hidroliz etkinliğinin arttığı görölmektedir. Bu bağlamda enzim spesifik aktivitesinin Substance P varlığında değerlendirilmesinde inkübasyon süresi 60 dakika alınarak gerekli hesaplamalar yapıldı (Çizelge 3.4).

$$IGF-1, y=53709x$$

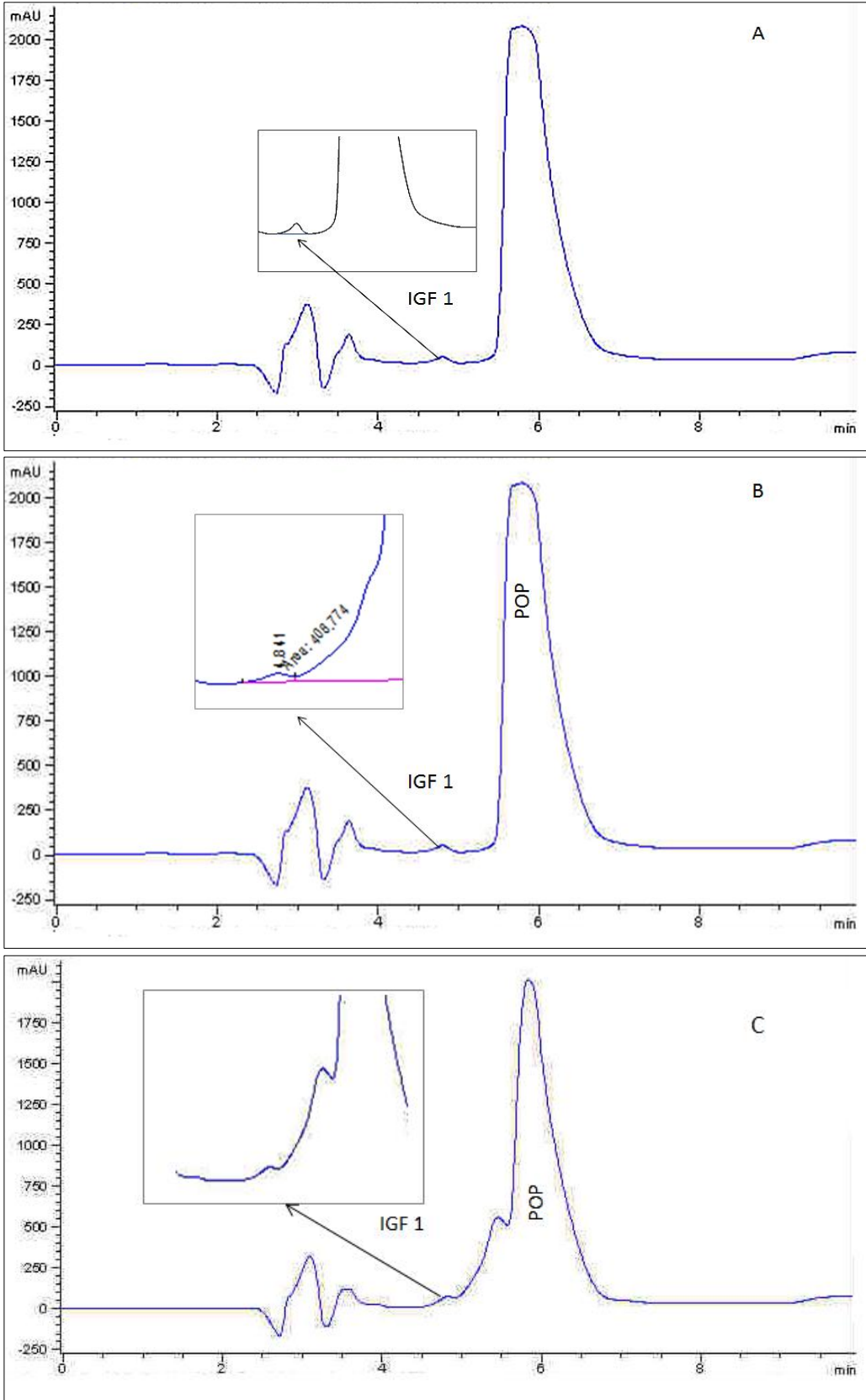


Şekil 3.17 IGF-1 kromatogramı. [Kolon: nucleosil RP-C18; Elusyon A: %0,1 TFA suda, B:%0,1 TFA asetonitrilde ; gardient:0-2 dk%5 B, 2-12 dk %60 B, 12-14 dk %5, 14-15 dk %5 B; akış hızı 1ml/dk; sıcaklık 45°C; UV: 210nm].



Şekil 3.18 IGF-1'in standart grafiği.

IGF-1'nin *Myxococcus xanthus*'dan rekombinant olarak saflaştırılan enzim ile 30 ve 60 dakika inkübasyon sonrasında, IGF-1'nin hidrolizlendiği gözlemlendi (Şekil 3.19). IGF-1'nin HPLC'de alıkonma zamanı $4,87 \pm 0,03$ dk olarak bulundu.



Şekil 3.19 IGF-1'nin POP enzimi ile hidrolizi, A. IGF-1'nin başlangıç kromatogramı (enzim, elüsyon A ve %10 TCA ile birlikte), B. IGF-1'nin enzimle 30 dakika inkübasyon sonrasındaki kromatogramı. C. IGF-1'nin enzimle 60 dakika inkübasyon sonrasındaki kromatogram, Kolon: Nucleosil RP-C18; Elüsyon A: %0,1 TFA suda, B: %0,1 TFA asetonitrilde ; gradient: 0-2 dk %5 B, 2-5 dk %10 B, 5-7 dk %20, 7-10 dk %5 B; akış hızı 1ml/dk; sıcaklık 45°C; UV: 210nm.

Çizelge 3.4 POP enzimi ile doğal substratların hidrolizi.

Peptid Adı	Dizi	Aktivite (U/mg) *	Süre (Dakika)
IGF-1	H-Gly-Pro-Glu-OH	$0,34 \times 10^{-4}$	60
Substance P	H-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met	$0,23 \times 10^{-3}$	60

* 1mg enzim tarafından dakikada dönüşüme uğratılan substratın μ mol miktarıdır .

Literatürler’de farklı kaynaklardan saflaştırılan prolil oligopeptidaz enzimi substrat spesifiklikleri yönünden karşılaştırıldığında enzimin hidroliz etkinliğinin substratların N-terminalinde hidrofobik grup içermesinin hidrofilik bir gruba göre daha fazla olduğu görülmektedir. P2 pozisyonundaki amino asidin prolin veya alanin olması durumunda, enzimin bu substratları kolaylıkla hidrolizleyebildiği ancak prolin içeren substratlara karşı olan hidroliz etkinliğinin alanin içeren substratlara göre daha yüksek olduğu belirtilmektedir (Osorio et al., 2012). Literatürdeki bu sonuçlar rekombinant olarak saflaştırdığımız POP enzim ile elde edilen sonuçlara benzerlik göstermektedir.

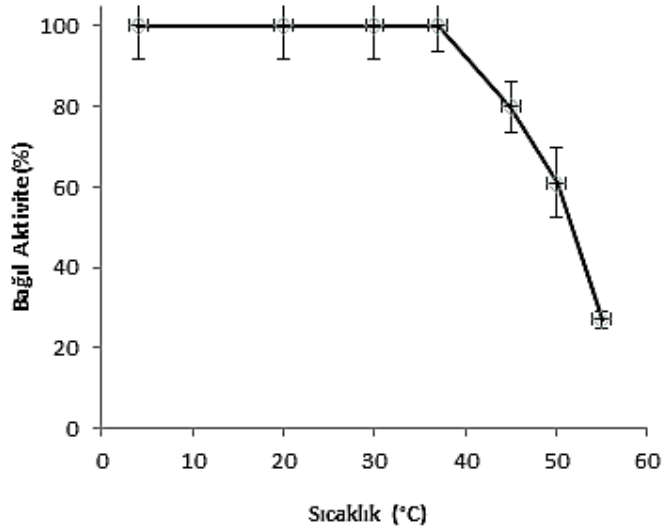
3.7 Kararlılık Testleri

Enzim preparatlarının kararlılığı belirli çalışma koşullarında enzim aktivitesinin zamana bağımlı olarak korunmasıdır. Enzimlerin kararlılığı denince genellikle proteinin konformasyonel kararlılığından söz edilir. Enzimin termal, pH ve depo kararlılıkları büyük ölçüde konformasyonel kararlılığı ile belirlenir ve denatürasyon sonucu da inaktivasyon gerçekleşir. Bir enzimin kararlılığı sıcaklık, pH, iyon şiddeti, tampon türü, substratın varlığı ve yokluğu, enzim konsantrasyonu, inkübasyon zamanı, aktivatör yada inhibitörlerin varlığı ve yokluğuna bağlı olarak değişim gösteren önemli bir parametredir. Çünkü enzimler oldukça karmaşık yapılı proteinlerdir. Enzimin üç boyutlu yapısına etki edecek bir faktör, enzim aktivitesini de etkiler (Telefoncu, 1997).

3.7.1 Termal kararlılık

Enzimlerin termal kararlılığını etkileyen faktörlerden biri sıcaklık değeri ise inkübasyon süresidir. Sıcaklık artışıyla birlikte protein yapısındaki değişiklikler ile enzimlerin aktivitelerinde düşüşler meydana gelmektedir.

POP enziminin termal kararlılığı bölüm 2.13.1’de anlatıldığı gibi belirlendi. *Myxococcus xanthus* suşundan elde edilen Prolil oligopeptidaz enziminin 30 dakika farklı sıcaklıklarda ön inkübasyonundan sonra optimum koşullarda aktiviteleri belirlendi. Termal kararlılığının 4-37 °C aralığında oldukça iyi olduğu, 50 °C’de aktivitesinin % 50’ sini, 55 °C’de ise % 74 ‘ini kaybettiği gözlemlendi.



Şekil 3.20 Prolil oligopeptidaz enziminin termal kararlılığı.

Literatür verilerine bakıldığında farklı kaynaklardan saflaştırılan enzimin termal kararlılık değerleri aralarında çok az farklılıklar göstermektedir (Bkz, Çizelge 1.7). Rekombinant olarak saflaştırılan enzimin termal kararlılığı da bulunan bu değerlerle uyumluluk göstermektedir.

Enzimlerin kararlılığına etki eden en önemli parametrelerden biri sıcaklıktır. Genelde enzimler düşük sıcaklıkta daha kararlı iken yüksek sıcaklıkta hızlı bir şekilde denatüre olurlar. Yüksek sıcaklıkta kararlı kalabilen enzimlerin çeşitli proseslerde kullanım potansiyelinin artması söz konusudur (Telefoncu, 1997). Bu

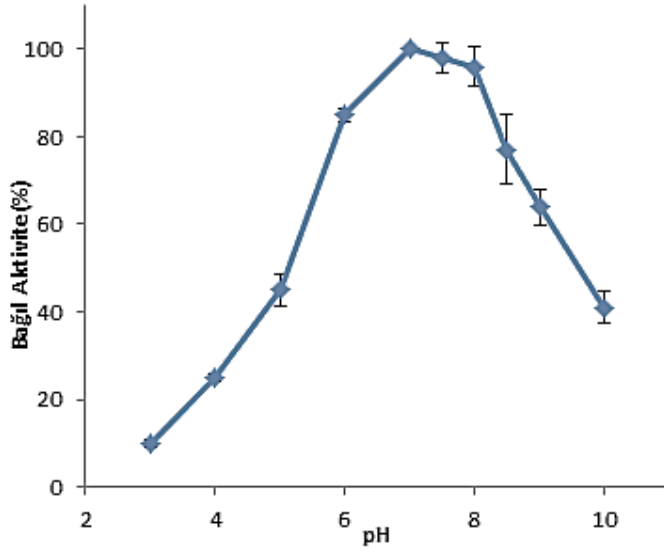
çalışmada saflaştırılan prolil oligopeptidaz enziminin termal kararlılığının 37 °C de % 100 iken 50 °C’de ise % 50’sini kaybettiği görülmektedir. Tez kapsamında temel olarak üretilen enzimin protein hidrolizatlarının hazırlamasında da kullanım potansiyelinin araştırılması hedeflenmiştir. Bu bağlamda termal kararlılık açısından sorun yaşanmayacağı görülmekle birlikte ileri aşamada zamana bağlı hidroliz etkinliğinin hesaplanmasında sıcaklık kriteri tekrar irdelenecektir.

3.7.2 pH kararlılığı

Bir enzimin pH kararlılığı; enzimin bulunduğu ortamdaki tamponun türüne pH’sına ve inkübasyon süresine bağlıdır.

Enzimler protein yapıda olduklarından kararlılıklarına etki eden her faktör proteinin üç boyutlu yapılarını etkileyebilmektedir. Bir enzimin pH kararlılığında inkübasyon koşulları sıcaklık, inkübasyon süresi, iyon şiddeti substrat konsantrasyonu vb. gibi birçok faktör önemlidir. Ortam pH’sının farklanması ile proteinin yapısında yer alan yüklü amino asitlerin proton alıp-vermeleri ile toplam yük durumları değişmektedir. Bu bağlamda; üç boyutlu yapının oluşumunda etkin olan parametrelerden özellikle iyonik etkileşimlerdeki değişimler ile konformasyonun farklanması nedeni ile fonksiyonda da değişim söz konusudur. Çoğu enzim aşırı asidik ve bazik koşullarda denatürasyona uğrar iken daha ılımlı pH değişimlerinde etkinliklerinin belirli oranlarda kaybetmeleri söz konusudur (Telefoncu, 1997).

POP enziminin pH kararlılığı bölüm 2.13.2’de anlatıldığı gibi belirlendi. *Myxococcus xanthus* suşundan elde edilen prolil oligopeptidaz enziminin 30 dakika farklı pH’larda ön inkübasyonundan sonra optimum koşullarda aktiviteleri belirlendi.



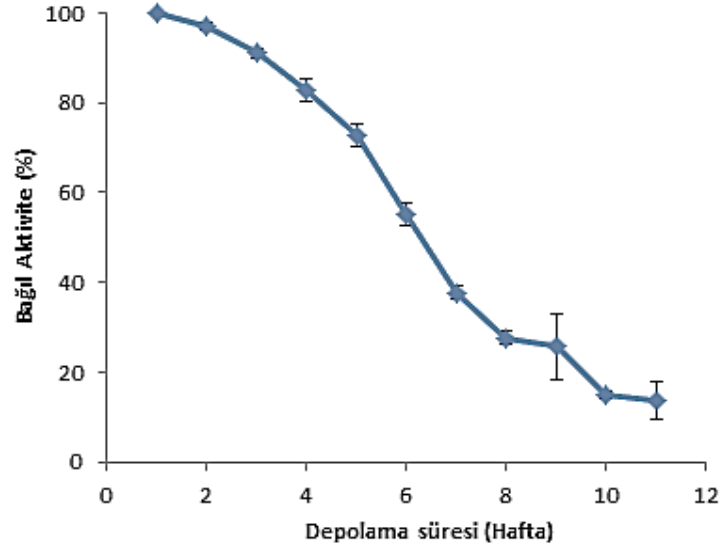
Şekil 3.21 Prolil oligopeptidaz enziminin pH kararlılığı.

pH kararlılığını pH 6,0-8,5 aralığında iyi korunurken, bu pH'ların üstündeki ve altındaki değerlerde aktivitesinde düşüşler gözlemlendi (Şekil 3.21). Literatür verilerine göre farklı kaynaklardan saflaştırılan enzimin pH kararlılığı çizelge 1.8'de gösterilmiş olup, enzimin çoğunlukla pH 5,0'in altında ve birkaç literatür dışında pH 10,0'un üzerinde kararsız olduğu belirtilmektedir. Dolayısıyla rekombinant olarak saflaştırılan enzimin pH kararlılığı literatürde bulunan değerlerle uyumluluk göstermektedir

3.7.3 Depo kararlılığı

Bir enzimin depo kararlılığını birden fazla faktör belirleyebilir. Bunlardan depolama sıcaklığı, depolamada kullanılan kabın yapısı ve depolama ortamına eklenen koruyucu maddelerin türü gibi faktörler enzim kararlılığındaki çevresel faktörleri oluştururken, enzimin depolama formu, depolama şekli ve kullanım şekli gibi araştırmacı tarafından belirlenen dolayısıyla kullanıcıya bağlı olarak değişen diğer faktörleri oluşturur.

POP enziminin depo kararlılığı bölüm 2.13.3'de anlatıldığı gibi belirlendi. Enzim 4 °C'deki sıcaklık da 100 mM Tris-HCl pH 7,4 tamponu içerisinde bekletildi ve enzim aktiviteleri ölçüldü (Şekil 3.22).



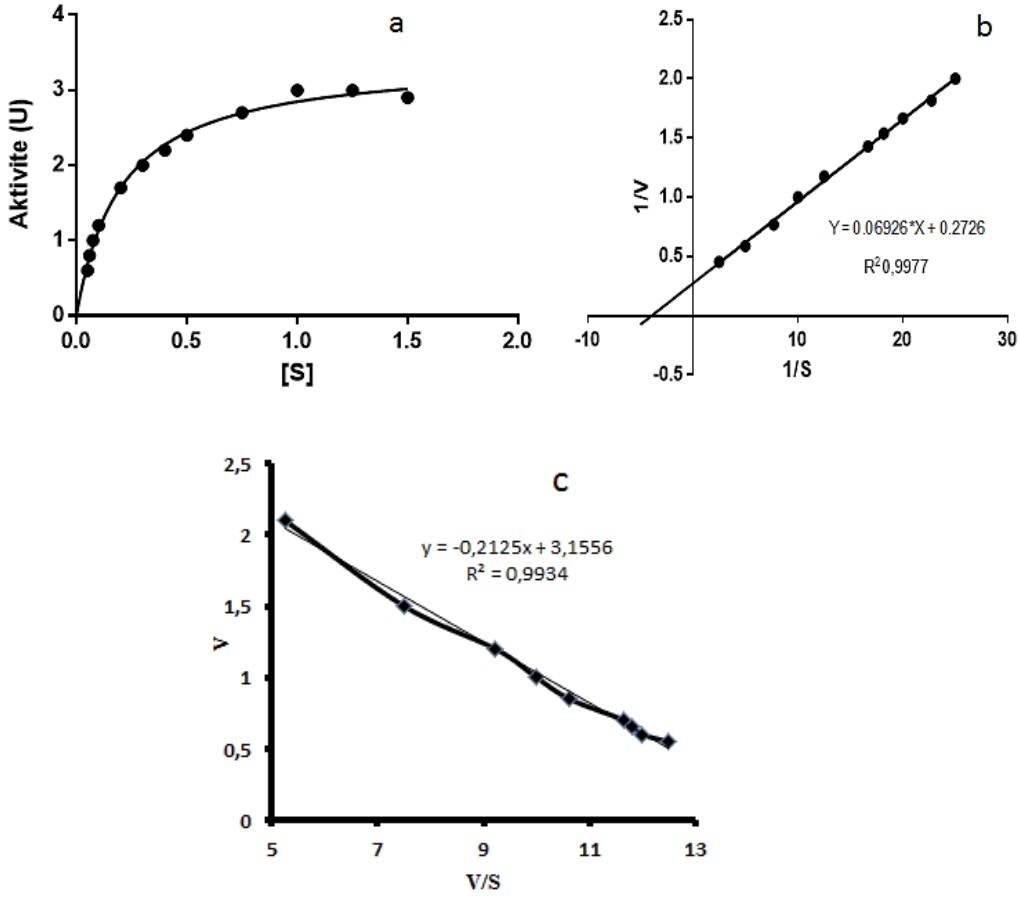
Şekil 3.22 Prolil oligopeptidaz enziminin + 4 °C’de depo kararlılığı

Genel olarak rekombinant olarak üretilen enzimler’de depo kararlılığının çok iyi olmadığı bilinmektedir. Bu çalışmada; görüldüğü gibi enzim 4 °C’de 6. haftada aktivitesinin % 50’sini kaybederken 11 haftalık süreçte % 95’ini kaybettiği görüldü. Bu durumun hedefimiz olan protein hidrolizatlarının hazırlanması prosesinde bir sorun yaratmayacağı şeklinde yorumlandı. Literatür verilerinde rekombinant olarak üretilen saflaştırılan prolil oligopeptidaz enzimi için herhangi bir depo kararlılık sonucuna rastlanmadı.

3.8 POP Enzimin Kinetik Özellikleri

3.8.1 POP aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi

POP enzim aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi bölüm 2.14.1’de anlatıldığı gibi Suc-Ala-Pro-pNA substratı kullanılarak belirlendi. *Myxococcus xanthus* suşundan elde edilen POP enzimi için doygunluk substrat konsantrasyonu, K_m , V_{max} ve k_{kat} GraphPad Prism 6 programı kullanılarak sırasıyla 0.20 ± 0.014 mM, 3.42 ± 0.07 $\mu\text{mol/dk}$ ve 244 (dak^{-1}) olarak bulundu (Şekil 3.23).



Şekil 3.23 a. POP enzim aktivitesi üzerine Suc-Ala-Pro-pNA konsantrasyonunun etkisi
b. POP Lineweaver-Burk diyagramı
c. POP Woolf Hofstee diyagramı

K_m ; bir enzimatik reaksiyonda, reaksiyon hızının maksimum hızın yarısına ulaştığı andaki substrat konsantrasyonunu; V_{max} doymuş substrat konsantrasyonundaki reaksiyon hızını ifade eder. K_m değeri aynı zamanda enzimin substrata olan ilgisinin bir göstergesidir. K_m değeri ne kadar düşükse enzimin substrata olan ilgisi yüksek, K_m değeri ne kadar yüksekse enzimin substrata olan ilgisi o kadar düşüktür.

Prolil oligopeptidaz enzim aktivitesi üzerine substrat konsantrasyon'unun etkisi kromojenik veya florojenik substratlar kullanılarak birçok türde incelenmiştir. Literatürler verilerinde farklı sentetik substratları kullanılarak farklı türlerde yapılan çalışmalarda bulunan k_m değerlerine bakıldığında Z-Gly-Pro-pNA substratına enzimin ilgisinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Ancak daha önce de belirtildiği gibi Z-Gly-Pro-pNA'nın çözünürlük probleminden dolayı çalışmalarda Suc-Ala-Pro-pNA kullanılmıştır. Rekombinant olarak

saflaştırdığımız enzimün Suc-Ala-Pro-pNA kullanarak bulunan K_m değeri ile literatürdeki değerlerin uyumlu olduğu görölmektedir.

3.9 POP Aktivitesi Üzerine Metal İyonlarının Etkisi

POP enzim aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisi divalent ve monovalent iyonları (Hg^{+2} , Zn^{+2} , Mg^{+2} , Cu^{+2} , Cd^{+2} , Mn^{+2} , Ni^{+2} , Ba^{+2} , Ca^{+2} , Co^{+2} , Na^+ , K^+ , Li^+) kullanılarak gerçekleştirildi. Farklı metal iyonu konsantrasyonlarının enzim aktivitesine etkisi bölüm 2.15’de anlatılan şekilde belirlendi.

Çizelge 3.5 POP enzim aktivitesine metal iyonlarının etkisi.

Metal İyonu	Konsantrasyon (mM)	Kalan Aktivite (U/mg)	KalanAktivite (%)
Kontrol	-	1,13	100
$MnCl_2$	1,0	0,98	87
	2,5	0,96	85
	5,0	0,82	72
	7,5	0,80	71
	10	0,80	71
$CuCl_2$	1,0	0,64	57
	2,5	0,61	54
	5,0	0,47	42
	7,5	0,28	25
	10	0,16	14
KCl	1,0	0,71	63
	2,5	0,62	55
	5,0	0,61	54
	7,5	0,61	54
	10	0,60	53
$BaCl_2$	1,0	1,02	90
	2,5	0,91	81
	5,0	0,81	71
	7,5	0,70	62
	10	0,54	48

^a Enzim aktivitesinin %50’sini inhibe eden metal iyonlarının konsantrasyonu

Çizelge 3.5 (Devam) POP enzim aktivitesine metal iyonlarının etkisi.

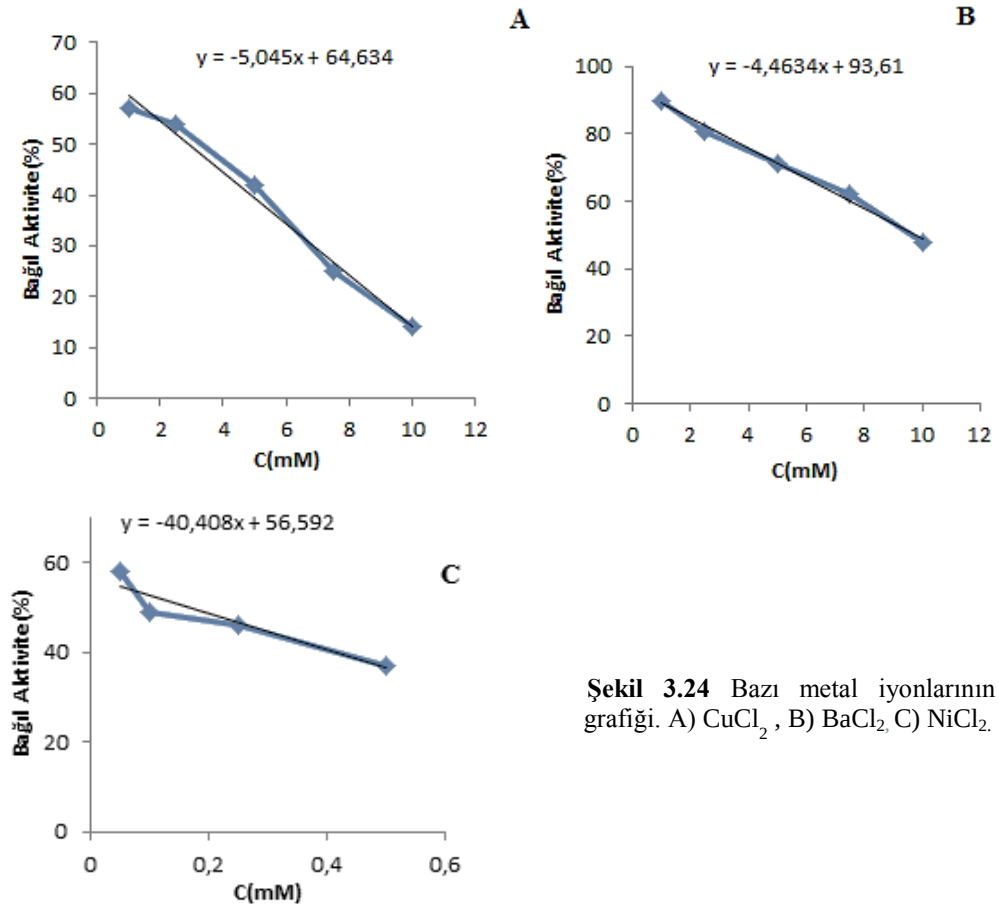
Metal İyonu	Konsantrasyon (mM)	Kalan Aktivite (U/mg)	KalanAktivite (%)
NiCl ₂	0,05	0,65	58
	0,1	0,55	49
	0,25	0,52	46
	0,5	0,41	37
	1	0,36	32
HgCl ₂	0,05	-	0
	0,1	-	0
	0,25	-	0
	0,5	-	0
	1	-	0
CdSO ₄	0,05	-	0
	0,1	-	0
	0,25	-	0
	0,5	-	0
	1	-	0
MgCl ₂	1,0	0,98	87
	2,5	0,94	84
	5,0	0,90	80
	7,5	0,81	72
	10	0,78	69
NaCl	1,0	1,17	104
	2,5	1,25	111
	5,0	1,26	112
	7,5	1,29	115
	10	1,33	118
LiCl ₂	1,0	1,08	96
	2,5	0,98	87
	5,0	0,97	86
	7,5	0,97	86
	10	0,96	85
CaCl ₂	1,0	1,17	104
	2,5	1,19	105
	5,0	1,24	110
	7,5	1,27	112
	10	1,38	122

Na⁺ ve Ca⁺²'un 1-10 mM konsantrasyonlarında enzim aktivitesinin rölatif olarak etki etmediği ve az da olsa enzim etkinliğini arttırdığı rakamsal olarak

görülse de belirgin bir artış olmadığı düşünüldü. Hg^{+2} ve Cd^{+2} metallerinin güçlü inhibitör etkisi gösterdikleri ve bu etkiyi de bir serin proteaz olan Prolil oligopeptidaz enzimin aktif merkezinde yer alan histidin amino asidinin imidazol halkasına bağlanarak gerçekleştirdikleri düşünüldü (Kaushik et al., 2014).

Mn^{+2} ve Li^{+} iyonları 1-10 mM konsantrasyonlarda enzim aktivitesinin çok az bir düşüşün ardından değişmediği gözlemlendi. Cu^{+2} , Ba^{+2} ve Ni^{+2} iyonlarının ise rekombinant prolil oligopeptidaz enzimine inhibisyon etkisi gösterdiği ve bu etkinin konsantrasyona bağımlı olarak arttığı görüldü.

Bölüm 1.6'da çeşitli metal iyonlarının prolil oligopeptidaz enzimi üzerine olan etkileriyle ilgili literatür bilgileri özetlenmiştir. Tüm bulunan sonuçların literatür'de yapılan çalışmalarla uyum içinde olduğu görülmektedir. İleri aşamada konsantrasyona bağımlı inhibisyon etkisi gösteren Cu^{+2} , Ba^{+2} ve Ni^{+2} iyonları için IC_{50} değerlerinin belirlenmesi bölüm 2.16'da anlatıldığı gibi gerçekleştirildi (Şekil 3.24). Spesifik aktivitesi kontrol'e göre en düşük olan metallerin IC_{50} değerleri Çizelge 3.6'da verildi.



Şekil 3.24 Bazı metal iyonlarının IC_{50} grafiği. A) CuCl_2 , B) BaCl_2 , C) NiCl_2 .

Çizelge 3.6 Bazı metal iyonlarının IC₅₀ değerleri.

Metal iyonu	IC ₅₀ ^a (mM)	Linear regresyon ^b (% inhibisyon)
NiCl ₂	0,16	y=-40,408x+56,592
BaCl ₂	10	y=-4,4634+93,61
CuCl ₂	3	y=-5,045+64,634

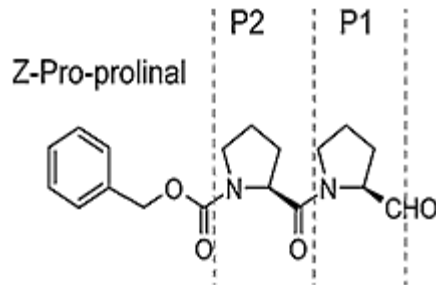
^a Enzim aktivitesinin %50'sini inhibe eden metal iyonu konsantrasyonu

^b x; IC₅₀, y; aktivite cinsinden %50 değeri

3.10 POP Aktivitesi Üzerine Çeşitli Kimyasal ve İnhibitörlerin Etkisi

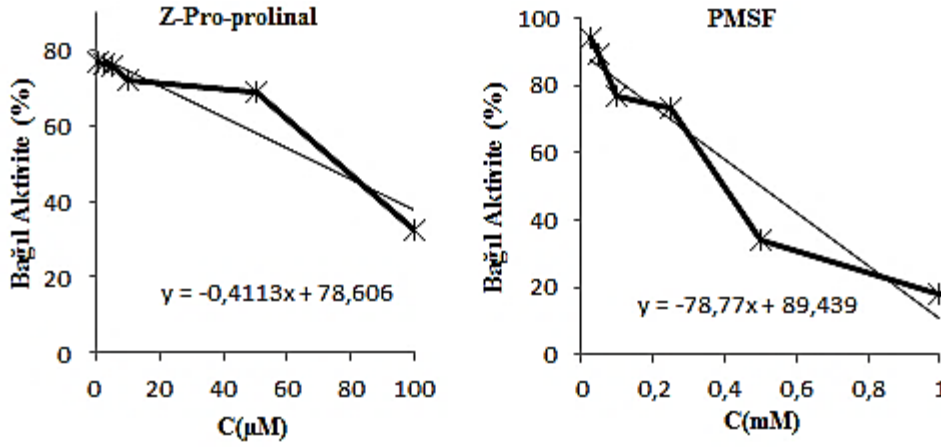
Prolil oligopeptidaz enzim aktivitesi üzerine çeşitli kimyasal ve inhibitörlerin etkisi bölüm 2.16'da anlatılan şekilde belirlendi (Çizelge 3.7). Elde edilen sonuçlar Çizelge 1.9 da özetlenen literatür verileri ile kıyaslandı.

Prolil oligopeptidaz inhibitörü olarak bilinen Z-Pro-Prolinal'in çok düşük konsantrasyonlarda (10 µM) rekombinant olarak elde edilen prolil oligopeptidaz enzim aktivitesinin % 77'sini inhibe ettiğini bulundu ve IC₅₀ değeri 70 µM olarak hesaplandı. Z-Pro-Prolinal inhibisyon etkisi, inhibitörün P1 fonksiyonel bölgesi bağlanma için çok önemlidir. Z-Pro-Prolinal aldehid grubu aktif bölgede yer alan Ser(554) amino asidine bağlanarak kovalent hemiasetal bağ oluşturur. Bu bağ çok uzun zaman skalasında tersinirdir (Kaszuba et al., 2012). Literatürlerde yer alan çalışmalarda da Z-Pro-Prolinal'in düşük konsantrasyonlarda dahi spesifik olarak enzimin inhibisyonunda rapor edilmiştir.

**Şekil 3.25** Z-Pro-Prolinal'in yapısı.

Çizelge 3.7 POP enzim aktivitesine çeşitli kimyasal ve inhibitörlerin etkisi.

İnhibitörler	Konsantrasyon (mM)	Aktivite (U/mg)	Aktivite (%100)
Kontrol	-	5,23	100
Serin Proteaz İnhibitörleri			
ZPP (Z-proprolinal)	0,0010	4,03	77
	0,0025	3,98	76
	0,005	3,98	76
	0,010	3,76	72
	0,050	3,60	69
	0,100	1,67	32
	0,500	1,57	30
PMSF (phenyl-methylsulfonyl flüoride)	0,025	4,91	94
	0,050	4,65	89
	0,100	4,02	77
	0,250	3,82	73
	0,500	1,78	34
	1,000	0,94	18
pABA (para- aminobenzoate)	1,0	5,23	100
	2,5	5,17	99
	5,0	5,02	96
	7,5	4,71	90
	10	4,44	85
Metalloproteaz İnhibitörleri			
1-10 Fenatrolin	1,0	5,12	98
	2,5	4,76	91
	5,0	4,49	86
	7,5	4,49	86
	10	4,49	86
EDTA	1,0	4,91	94
	2,5	4,39	84
	5,0	4,29	82
	7,5	4,03	77
	10	3,92	75
İndirgeyici Ajanlar			
β -merkaptotanol	1,0	5,12	98
	2,5	4,60	88
	5,0	4,60	88
	7,5	4,29	82
	10	4,18	80
DTT	5,0	4,50	86
	7,5	4,03	77
	10	3,45	66



Şekil 3.26 POP inhibitörlerinden Z-Pro-Prolinal ve PMSF'nin IC₅₀ grafiği

Serin proteaz inhibitörü olarak bilinen ve katalitik triad'taki serin amino asidi üzerinden inhibisyon etkisi gösteren PMSF'nin; 0,38 mM konsantrasyonunda POP enzim aktivitesinin % 50'sini inhibe etmesi ile, saflaştırılan enzimin bir serin proteaz olduğu doğrulandı. Literatürde rapor edilen çalışmalarda da PMSF'nin 1mM konsantrasyonunda enzim aktivitesinin % 20'sini kaybettiği görülmektedir.

p-Aminobenzamidin (pABA) tripsin benzeri serin proteazların (trombin, plasmin, kallikrein, urokinaz, enterokinaz vb.) kompetitif inhibitörü olarak bilinmektedirler. pABA ve tripsin benzeri serin proteazların L-Arginil fonksiyonel grubundaki yapısal ve fonksiyonel benzerlik nedeni ile enzimin negatif yüklü S1 cebi ile etkileşime girerek enzimi inhibe ettiği bilinmektedir (Venturini et al; 1997). POP enzim substratlarının tripsin benzeri serin proteazlardan farklı olmasından dolayı pABA'nın enzim üzerine 1-7,5 mM konsantrasyon aralığında hiçbir etkisi olmadığı, konsantrasyon 10 mM'a çıkarıldığında enzim aktivitesinde % 15'lik bir düşüş gözlemlendi.

Proteazların sınıflandırılmasında özellikle metalloproteaz enzimlerine inhibe ettiği bilinen EDTA ve 1-10 fenatrolinin enzim aktivitesini inhibe etmediği gözlenmiştir. Bu ise enzimin metalloproteaz olmadığına bir göstergesidir. Yapılan diğer çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiş olup EDTA ile ilgili birkaç çalışmada 10 mM konsantrasyonunda % 70 inhibisyon gösterdiği bulunmuştur (Kang et al., 2014).

Prolil oligopeptidaz enzim aktivitesine indirgeyici ajanlardan β -merkaptoetanol'un 1 mM konsantrasyonunda hiçbir inhibisyon etkisi gözlenmezken, farklı konsantrasyonlarında (2,5-10 mM) inhibisyon etkinliği % 12-20 arasında değişmektedir. DTT'nin 1-2,5 mM konsantrasyonunda hiçbir inhibisyon etkisi gözlenmezken, daha yüksek konsantrasyonlarında (5,0-10 mM) inhibisyon etkinliği % 14-24 arasında değişmektedir. β -merkaptoetanol'un farklı konsantrasyonları için farklı inhibisyon değerleri gözlenmekle birlikte inhibisyon etkinliği % 15-19 arasında değişmektedir. Prolil oligopeptidazların yapısında yer alan Cys 255 yan zincir S1 ve S3 bağlanma bölgelerine yakın olması nedeni ile tiyol grubu içeren indirgen ajanlar ile enzimin inhibisyonunun azda olsa gerçekleştiği düşünülmüştür. *F. meningsepticum*'den elde edilen prolil oligopeptidaz enziminin indirgeyici ajanlar tarafından inhibe edilmediği rapor edilmiştir. Bunun nedenin ise; sistein 255'in treonin ile yer değiştirmesi olarak açıklanmıştır (Polgár, 2002). Yapılan diğer bazı çalışmalarda POP enzimine homolog olan bazı enzimlerde sistein amino asitleri aktif merkezden uzakda yer almaları ve N-terminal domaine lokalize olmaları nedeni ile sistein'in tiyol grubunun merkaptanlar ile bağlanması ile enzimin inhibe olmadığı gösterilmiştir (Fulop et al., 1998; Goossens et al., 1995).

Sonuç olarak; literatürde rapor edilen çeşitli kimyasal ve inhibitörlerin POP aktivitesi üzerine etkisi ile rekombinant olarak elde edilen POP enzimi için bulunan değerlerle kıyaslandığında çoğunlukla benzer sonuçlar elde edilmiştir.

3.11 Polil Oligopeptidaz Enzimi ile Protein Hidrolizi

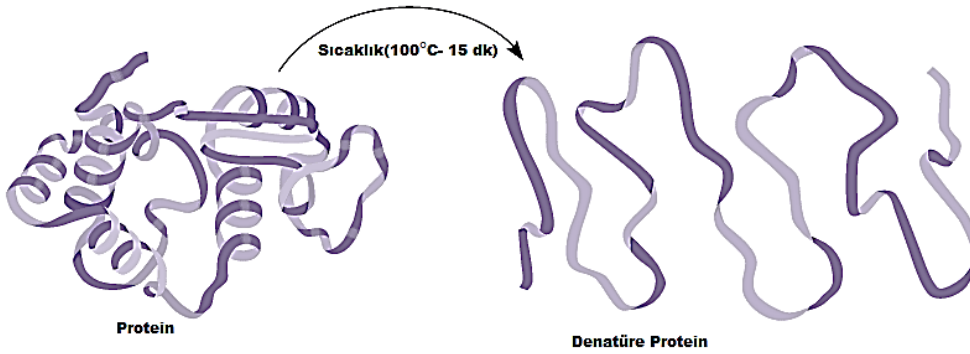
Myxocoocus xanthus suşundan üretilen, saflaştırılan ve karakterize edilen POP enziminin biyolojik proseslerde kullanım potansiyelinin araştırılması amacı ile öncelikle prolil oligopeptidaz varlığında gluten kullanılarak protein hidrolizatları hazırlandı. Prolil oligopeptidaz, peptidi prolin sonrası kesen bir serin endopeptidazdır ve genellikle 30 amino asite kadar büyüklükteki peptidleri hidrolizleyebilmektedirler (Myöhänen et al., 2009). POP'un fizyolojik önemi ve özellikle çölyak hastalarının gluten intoleransı düşünüldüğünde, gluten hidrolizinin sağlık ve gıda sektörü açısından önemli bir konu olduğu açıktır. Bu nedenle POP enzimi ile protein hidrolizatlarının hazırlanması ve bunların

biyolojik etkinliklerinin belirlenmesi amacıyla bu çalışmada gluten model substrat olarak kullanıldı.

Gluten unu ile hazırlanan preparatın enzimatik hidroliz sonrası açığa çıkan serbest amino grupları TNBS yöntemi ile belirlendi.

3.11.1 POP enzimi ile glüten hidrolizinin optimizasyonu

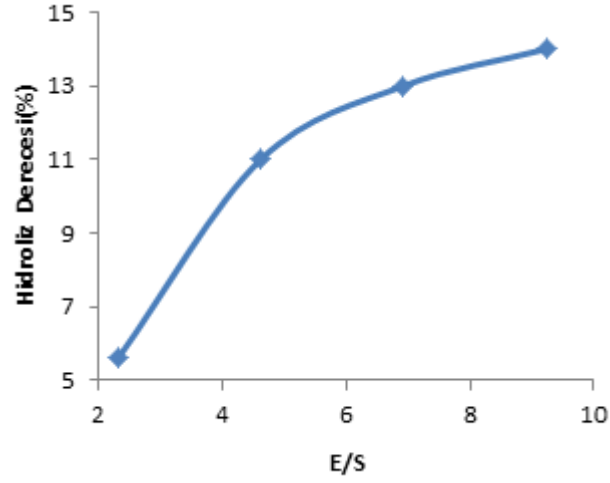
Saf gluten unu'nun prolil oligopeptidaz enzimi tarafından hidroliz etkinliğinin belirlenmesi ve iyileştirilmesi amacı ile öncelikle farklı E/S oranları ve hidroliz zamanı denenerek optimizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Daha öncede belirtildiği gibi POP enzimi ancak 30 amino asite kadar büyüklükteki peptidleri etkin parçalayabildiğinden hızlı ve etkili protein hidrolizinin gerçekleştirilebilmesi için bölüm 2.17.1'da açıklandığı gibi ilk olarak gluten çözeltisinin (% 3 w/v) hidroliz öncesi yıkım etkinliğini artırmak için ön işlem ile protein denatürasyonu gerçekleştirildi (Şekil 3.27).



Şekil 3.27 Sıcaklık ile gerçekleştirilen protein denatürasyonu.

Gluten'in POP ile hidrolizi enzimin optimum çalışma koşullarında gerçekleştirildi. Bölüm 2.17.1'da görüldüğü gibi enzim en iyi aktiviteyi 0,1 M Tris-HCl pH 7,4 tamponunda göstermektedir. Ancak hidroliz derecesinin belirlenmesinde TNBS reaktifi Tris tamponundaki amino gruplarıyla reaksiyona girerek girişime neden olmaktadır. Bu sebeple hidroliz deneyleri 0,1 M sodyum-fosfat pH 7,4 tamponu ile gerçekleştirildi.

Hidroliz etkinliğinin incelenmesinde E/S oranının belirlenmesi optimize edilmesi gereken en önemli parametredir. Farklı E/S oranlarına karşı hidroliz etkinliği Şekil 3.28’de verildi.

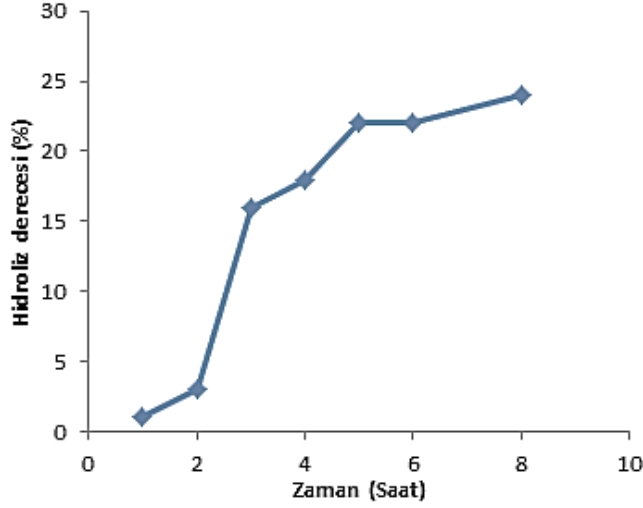


Şekil 3.28 Hidroliz derecesi ve E/S oranı arasındaki ilişki.

Şekil 3.28’den görüldüğü gibi genel anlamda E/S oranı 4.6 U/mg gluten oranına kadar lineer bir artış gözlenmektedir. Ancak bu oran arttırıldığında hidroliz derecesinin yavaşladığı görülmektedir. Bu bağlamda, hidroliz işlemi sırasında artan substrat konsantrasyonu ile enzimin ürün inhibisyonunu arttırdığı kanısına varılmıştır. Bu nedenle, POP ile gluten hidrolizatların hazırlanmasında % 11 hidroliz derecesi ile en uygun E/S oranı 4,6 U/mg gluten olarak belirlendi.

Yüksek E/S oranı açığa çıkan fazla amino grubu ile doğru orantılı olup, yüksek enzim konsantrasyonlarında substrat hidrolizi daha etkindir. Genelde E/S oranındaki artış ile hidroliz derecesi belli bir seviyeye kadar artar iken ilave edilen enzim miktarına bağlı olarak belli bir noktada doygunluğa ulaşılmaktadır (Liaset et al., 2002).

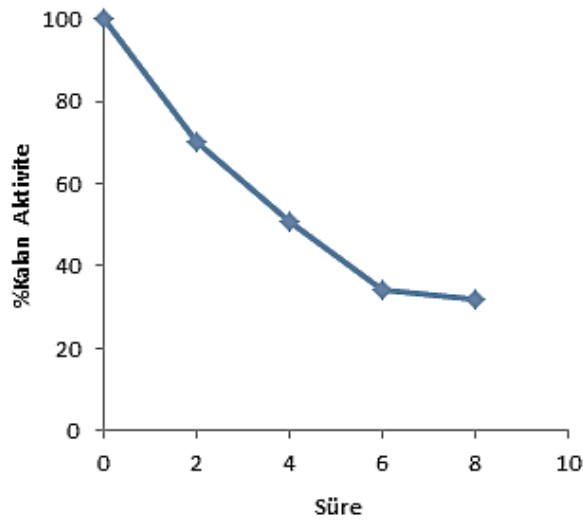
Gluten’in enzimatik hidroliz için uygun inkübasyon süresinin belirlenmesi amacı ile öncelikle 8 saat boyunca farklı zaman aralıklarında örnek alınarak hidroliz dereceleri belirlendi (Şekil 3.29).



Şekil 3.29 Glutenunun 8 saatlik hidroliz grafiği.

Şekil 3.29’de görüldüğü gibi hidroliz derecesi 5. saat sonunda % 22’ye ulaşmışken 8. saat sonunda anlamlı bir farklanma gözlenmemiştir. Genelde glutenunu gibi doğal substratlarda çalışıldığında hidroliz derecesi zamana bağlı olarak arttığı bilinmektedir. Literatür verileri incelendiğinde bu sürelerin enzimin stabilitesine bağlı olarak değiştiği görülmektedir (Jeewanthi et al., 2014).

Bu nedenle, 4 saat sonrasında hidroliz etkinliğinin enzimin kararlılığına bağlı olup olmadığını test etmek amacı ile rekombinant POP enziminin 37 °C ‘de optimum koşullar altında inkübasyon süreleri arttırılarak POP enzim aktivitesi incelendi (Şekil 3.30).



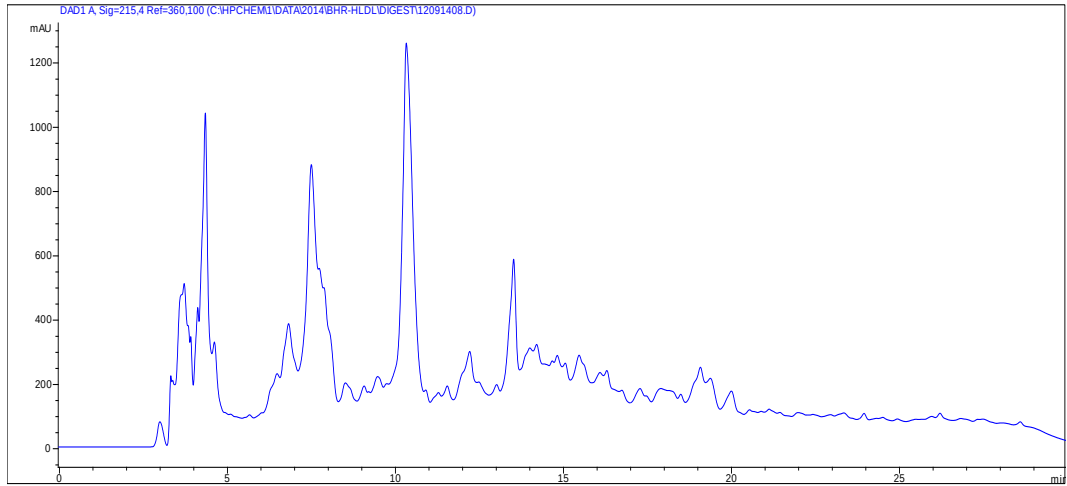
Şekil 3.30 Enzimin zamana bağlı etkinliğin belirlenmesi.

Elde edilen sonuçlara bakıldığında 6. saatin sonunda enzim aktivitesinin % 66'sını kaybettiği gözlemlendi. Bu nedenle; hidroliz koşulları için 4 saatlik inkübasyon süresi tercih edildi.

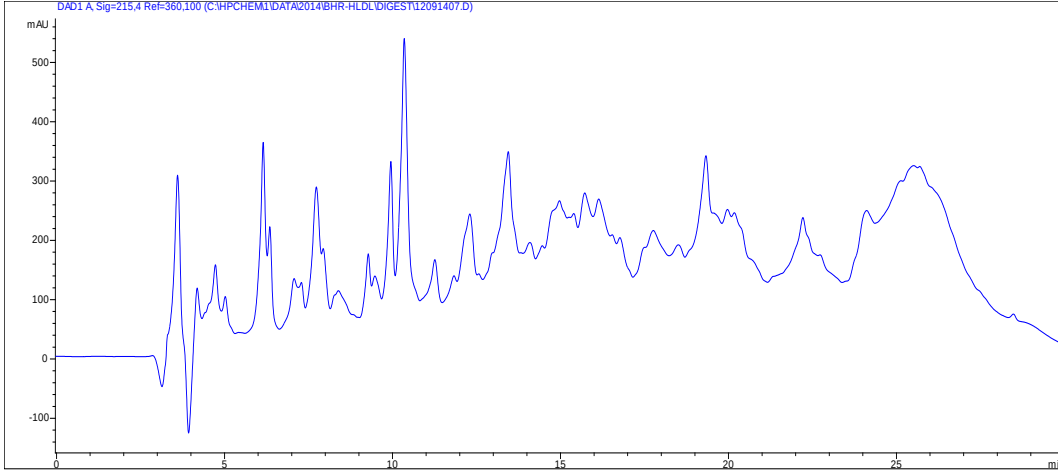
3.11.2 Hidrolizatların RP-HPLC ile ayrılması

Rekombinant olarak üretilip, saflaştırılan POP enzimi ile gluten unundan hazırlanan protein hidrolizatlarındaki peptidlerin ayrılmasında RP-HPLC kullanıldı. Bu amaçla öncelikle hidrolizatlardaki peptid miktarlarının düşük olması nedeni ile azot gazı altında konsantre edildi. Kuru preparatlar HPLC'de hidroliz sonrası oluşan peptid kompleksliğinin ve biyolojik aktivitelerin belirlenmesi için uygun ortamlarda çözülerek hazırlandı.

Gluten'in hidroliz öncesi ve sonrası kromatogramları sırasıyla şekil 3.31 - 3.32 verildi.



Şekil 3.31 Gluten proteinin POP enzimi ile hidrolizine ait kromatogramı; Gluten unu'nun başlangıç kromatogramı (enzim ve elüsyon A), Kolon: nucleosil RP-C18; Elusyon A: %0,1 TFA suda, B:%0,1 TFA asetonitrilde ; gradient:0-20 dk%5 B, 20-25 dk %40 B, 25-30 dk %50, 30-35 dk %5 B; akış hızı 0,9 mL/dk; sıcaklık 45°C; UV: 210nm



Şekil 3.32 Gluten proteinin POP enzimi ile hidrolizine ait kromatogramı; Gluten unu'nun enzimle 4 saat inkübasyon sonrasındaki kromatogramı. Kolon: nucleosil RP-C18; Elusyon A: %0,1 TFA suda, B:%0,1 TFA asetonyitrilde ; gradient:0-20 dk%5 B, 20-25 dk %40 B, 25-30 dk %50, 30-35 dk %5 B; akış hızı 0,9 mL/dk; sıcaklık 45°C; UV: 210nm

Glütenin hidroliz öncesi ve sonrası kromatogramları kıyaslandığında üretilip, saflaştırılan POP enzimi ile elde edilen hidrolizatın peptid çeşitliliği açıkça görülmektedir. Bu tez çalışması kapsamında sadece elde edilen hidrolizatların biyolojik aktiviteleri hedeflenmiştir. Ancak ileri aşamada hidrolizatta ki peptidlerin ilgili biyolojik aktiviteye göre saflaştırılmaları, karakterizasyonları ve yapı analizi sonrası kullanılabilme potansiyellerinin araştırılması gerektiği açıktır.

3.12 POP ile Hazırlanan Hidrolizatların Biyolojik Etkinliklerin İncelenmesi

Bilindiği gibi biyoaktif peptidler birçok biyolojik prosede önemli rol oynamaktadırlar. Son yıllarda biyoaktif peptid üretimine olan ilgi gerek gıda sektörü gerekse medikal anlamda ilgi artmıştır. Bu bağlamda, fizyolojik aktiviteye sahip biyoaktif peptidlerin antimikrobiyal, antitümör, antioksidan, antihipertansif vb. gibi özelliklerinin bilimsel olarak ortaya konması ile bunların gelecekte eldesi, izolasyonu ve biyolojik etkinliklerinin çalışılması gerek inovasyon gerekse tepki mekanizmalarına göre daha etkin peptidlerin yapılarının bilinmesi açısından son derece önemlidir. Biyoaktif peptidler *endojen* ve *ekzojen* olmalarına göre elde edilişleri farklıdır. Ekzojen peptidler genelede protein içeren kaynakların

in vitro sistemde çeşitli proteazlar ile hidrolizi sonucu elde edilmektedir. Bu proteazlardan en yaygın olarak kullanılanları tripsin, nötraz, alkalaz ve papain vb. gibi enzimlerdir. Substrat spesifiklikleri açısından farklı olan bu enzimlerin yanında prolin amino asidinden sonra kesen prolil oligopeptidaz enziminin kullanılması bu çalışmada esas olarak tercih edildi.

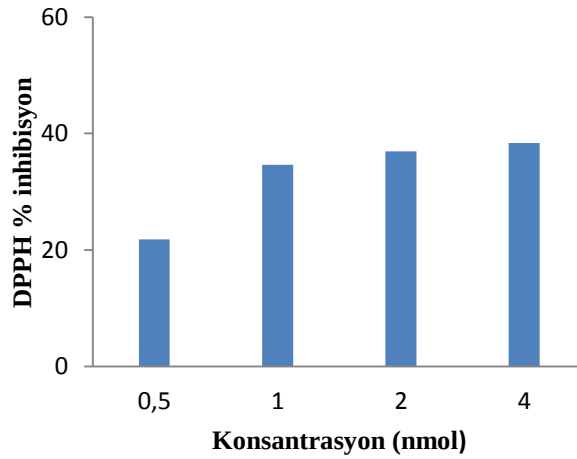
3.12.1 Gluten hidrolizatının antioksidan etkinliği

Otooksidasyon gıda bileşenleri ile oksijen arasında kendiliğinden meydana gelen ve çoğunlukla gıdalarda kalite kaybına yol açan tepkimelerdir. İnsan fizyolojisi açısından ele alındığında, oksidasyon tepkimelerinin pek çok kronik ve dejeneratif hastalığın sebebi olduğu bilinmektedir. Gerek gıda sektöründe ürünlerin raf ömrünün iyileştirilmesi gerekse de fizyolojik sistemlerde oksidatif stres'den korunma amacı ile etkin olabilecek antioksidan bileşenlerinin farklı kaynaklarda çalışılması önemlidir. Bitkisel gıdalar doğal antioksidan madde olarak tanımlanan bileşenlerce zengin gıda grupları olarak gösterilmiştir. Son zamanlarda, biyoaktif peptitlerde antioksidan etkilerinden dolayı dikkati çekmektedir. Pek çok bitki ve hayvan kaynaklı protein hidrolizatlarının antioksidan aktivite gösterdiği bilinmektedir (Akıllıoğlu ve ark, 2010; Damar ve ark., 2011). Bu çalışmada, POP enzimi ile hazırlanan gluten hidrolizatının antioksidan etkisinin varlığı araştırıldı.

Proteinlerin antioksidan aktivitesi yapılarındaki aminoasitlerden ve proteaz'ın kullanıldığı enzimatik hidroliz ile elde edilen biyoaktif peptitlerden (2-100 aminoasit grubu) kaynaklanmaktadır. Proteinlerin sahip oldukları antioksidan aktiviteleri, yapıtaşları olan aminoasitlerden kaynaklanmaktadır. Örneğin; tirozin, fenilalanin, triptofan ve sisteinin antioksidan aktiviteleri serbest radikaller için proton donörü olmalarına, lizin, arjinin gibi bazik aminoasitlerle, aspartik asit, glutamik asit gibi asidik aminoasitlerin antioksidan aktiviteleri ise metal iyonları ile şelat oluşturmalarına bağlanmaktadır. Ancak, proteinlerin yapısında bu aminoasitlerin bulunmasının antioksidan aktiviteyi belirleyen tek faktör olmadığı; sekans içindeki doğru sıralanmanın da antioksidan aktivite açısından önemli ve etkili olduğu belirtilmektedir.

Peptit ve proteinlerin gıda sistemlerinde antioksidan olarak kullanımının; besin değerlerinde, emülgatör ve antimikrobiyal aktivitede, köpük ve jel oluşumunda, koku, viskozite ya da film oluşumunda artış gibi ek avantajlar sunduğu aktarılmaktadır. Ayrıca, antioksidan peptitlerin düşük molekül kütlesi, kolay emilebilmeleri ve yüksek aktiviteleri açısından ilgi çekmektedir.

Enzimatik hidroliz sonucu elde edilen hidrolizatlar için serbest radikal süpürme veya yakalama aktivitesi antioksidan kapasite testleri içinde en yaygın olanıdır. Bu amaçla çok çeşitli radikaller kullanılmasına rağmen en yaygın olanı DPPH'dir. Her bir hidrolizatın antioksidan yüzdesi; kontrol ile hidrolizatın ölçülen antioksidan aktivitesinin kıyaslanması ile belirlendi (Şekil 3.33).



Şekil 3.33 DPPH antioksidan grafiği.

Rekombinant olarak elde edilen Prolil oligopeptidaz enzimi ile hazırlanan gluten hidrolizatının (0,5 - 4 nmol peptid karışımı) antioksidan etkinliği incelendiğinde 0,5 nmol değerinde % 21' lik bir inhibisyon gösterirken 1, 2 ve 4 nmol de '% 35 - % 39 aralığında değişmektedir. Bu ise, enzimin antioksidan özelliğinin düşük ve konsantrasyona bağlı bir artış göstermediğini ifade etmektedir. Bunun sebebi ise oluşan peptidlerin antioksidan kapasitesi peptidin amino asit dizisi ve uzaysal konfigürasyonundan etkilenmesi olduğu düşünüldü. Ayrıca antioksidan peptidler genellikle 3-16 amino asit içerirler. Antioksidan peptidlerin esansiyel amino asitleri histidin ve tirozindir. Bu ikisi güçlü antioksidantlardır. Benzer özellikler metiyonin, lizin, arjinin, fenilalanin ve

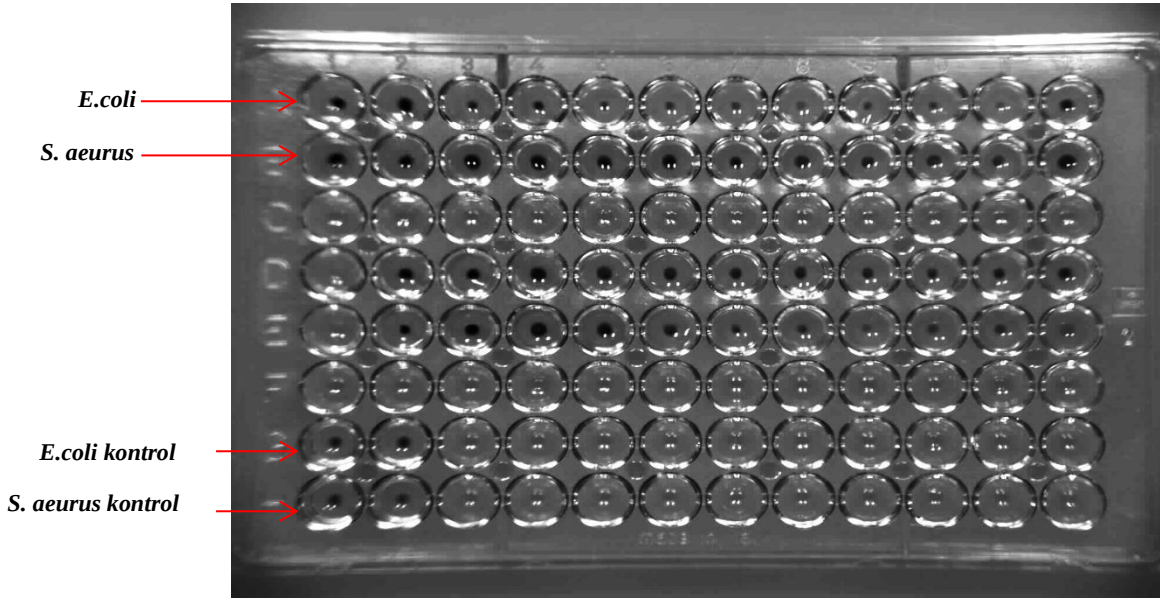
triptofan amino asitlerinde de mevcuttur (Pena-ramos and Xiong, 2001). Bundan dolayı da hidrolizatın içeriğinde bu amino asitlerin oranlarının daha az olduğu düşünülerek serbest radikal giderme etkisinin düşük olduğu şeklinde açıklanabilir.

3.12.2 Gluten hidrolizatının antimikrobiyal etkinliği

Bitkiler ve yumuşakçalar gibi omurgasız pek çok canlı mikroorganizmalar ile dolu bir evren ile mücadele edebilmek için gelişimsel olarak korunmuş çok çeşitli ve oldukça etkili antimikrobiyal peptidler (AMP) üretirler. Bu proteinler tipik olarak iki ya da daha çok pozitif yüklü arginin, lizin kalıntılarını veya asidik ortamlarda, histidin ve büyük çoğunlukla (genellikle % 50) hidrofobik kalıntıları içerir. Bu proteinlerin antimikrobiyal aktivitelerinin mikroorganizmalara bağlanma ve zarlarında gözenekler oluşturarak mikroorganizmaların büyümesini engellediği düşünülmektedir (Aksoy, 2013).

İlk antimikrobiyal peptid, bir güve türü olan *Hyalophora cecropia*'dan izole edilmiş ve sekropinler olarak tanımlanmıştır. Sekropinler'in keşfinden sonra 100'den fazla antimikrobiyal aktiviteye sahip peptidler elde edilmiştir. Bu peptidlerin yapısal farklılıkları göz önünde tutularak dört ana gruba ayrılmıştır: 1) Sekropinler, yaklaşık 4 kDa ağırlığında, gram-pozitif ve gram-negatif bakteriler üzerinde etkili lineer heliks şeklinde peptidlerdir, 2) Defensinler, yaklaşık 4 kDa ağırlığında anti-gram-pozitif peptidlerdir. Bu peptidler 6 sistein ve moleküller arasında 3 disülfid köprüsü bulunduran β -tabaka yapısındadır, 3) Prolin ve arjinince zengin küçük peptidlerdir. Özellikle gram-negatif bakterilere etkilidir. Apidaesinler, abaesinler bu grupta yer alan peptidlerdir. 4) Diğer antimikrobiyal peptidler 8-27 kDa ağırlığında, çoğunluğu glisince zengin, disülfid köprülerine sahip peptidleri içermektedir. Bu peptidlerin çoğu gram-negatif bakterilere etkilidir. Attasinler, sarkotoksin, dipterinler, koleopterinler bu gruba örnektir (Yiğit, 2003).

Gluten hidrolizatının antibakteriyel etkinliği nitel ve nicel olarak sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. Testin yapıldığı nitel mikrolaka görüntüsü Şekil 3.34'de gösterilmiştir.

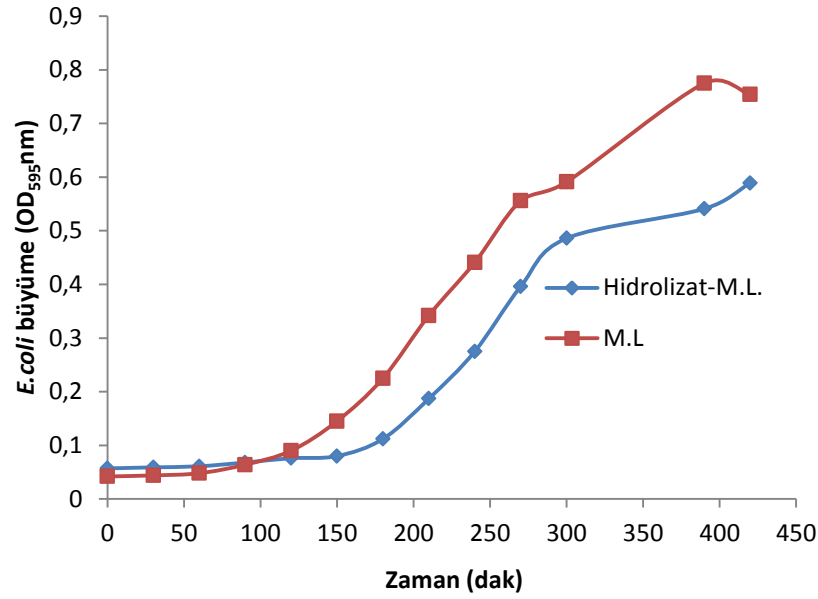


Şekil 3.34 Mikrodilüsyon yönteminin mikrolaka görüntüsü.

* 40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - 0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ sol üst köşeden başlayıp sağa doğru sayılarak numaralamaya devam edildiğinde, ilk 12 kuyucukta test edilecek hidrolizatın seri seyreltmesi yapılmış, enalttaki kuyucuklar kontrol (sadece mikroorganizma ve Muller Hilton ortamı) içerir.

Şekil 3.34 incelendiğinde prolil oligopeptidaz enziminin hücresel büyümesi üzerine etkisi olduğu görüldü. Ancak bu etkinliğin derecesi hakkında yeterli sonuca ulaşamadığından aynı şekilde hazırlanan sıvı mikrodilüsyon örneklerindeki mikroorganizmalar'ın 595 nm'de absorbans'ta zamana bağlı değişimleri de mikrolaka okuyucu ile takip edilerek kantitatif olarak inhibisyonun olup olmadığı belirlendi (Şekil 3.35). Bu deneylerde kantitatif olmayan sıvı mikrodilüsyon yöntemine benzer şekilde *E. coli* (gram negatif) ve *S. aureus* (gram pozitif) bakteriler kullanıldı. Şekil 3.35'de görüldüğü gibi gram negatif bir bakteri olan *E. coli* (gram negatif)'de zamana bağımlı olarak antibakteriyel etki irdelendi.

Elde edilen bulgulara göre gluten hidrolizat'ın test *E.coli*'ye karşı 40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ konsantrasyonda antibakteriyel etki gösterdiği ve 7 saat sonunda üremeyi % 22 oranında engellediği belirlendi.



Şekil 3.35 *E.coli* bakterisinin hidrolizat varlığında ve yokluğunda zamana bağımlı A_{595} değerleri. ■ -40µg/µL hidrolizat varlığında A_{595} değişimi ve ▲ -hidrolizat içermeyen besiyerinde (Muller Hilton) A_{595} değişimi

Çalışmada yüksek oranda bir antimikrobiyal aktivite gözlenmemesine karşın hücresel büyüme üzerine bir inhibisyon olduğu açıktır. Prolil oligopeptidaz enzimi prolinden sonra kesen bir enzimdir. Bu bağlamda, gluten'den elde edilen protein hidrolizatında prolince zengin ve C-terminali prolin olan peptidlerin olduğu düşünüldüğünde çoğunlukla gram negatif bakterilere karşın etkin olması beklenmektedir (Yiğit, 2003). *E.coli* gram negatif olması nedeniyle antibakteriyel etki göstermesi beklenen bir durumdur. Bunun yanı sıra hidrolizatlardaki aktiviteden sorumlu etken peptidlerin yapıları belli değildir. İnhibisyonda etkin olabilecek bileşenlerin saflaştırılması, sonrası bakteriyel aktivitelerinin *in vitro* ve *in vivo* sistemler denenmesi gerekmektedir.

3.12.3 Gluten hidrolizatının Tripsin ve Prolil oligopeptidaz enziminin aktivitesine etkisi

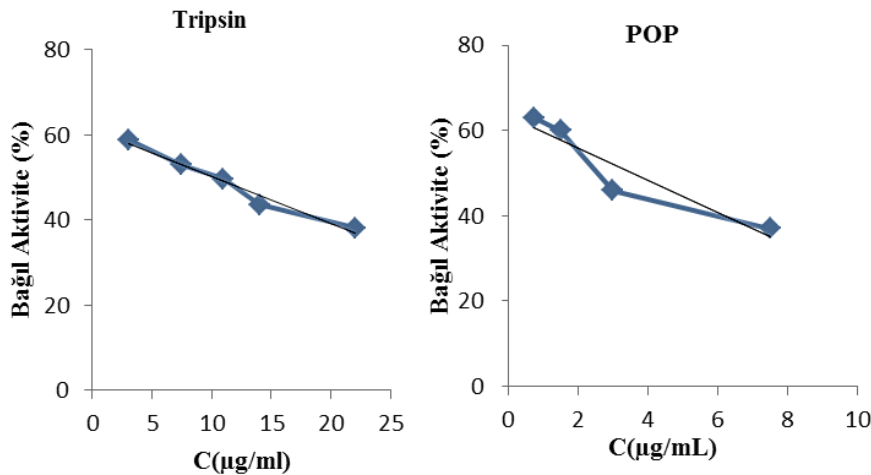
Dünya sağlık örgütüne göre, yaklaşık 450 milyon kişi nörolojik veya ruhsal hastalıkla mücadele etmektedir. Dünyada en çok ölüme neden olan on hastalıktan beşi ruhsal kaynaklıdır. Sosyal, biyolojik ve nörolojik bilimler, ruhsal ölümlerin ve hastalıkların gelişiminde koruyucu ve risk faktörlerini ayrıntılı şekilde anlamaya odaklanmışlardır. Bazı enzimlerin özellikle Prolil oligopeptidaz enziminin değişen aktivitesi, anksiyete, depresyon ve Alzheimer hastalığı gibi

bazı ruhsal hastalıkların tedavisinde ve önlenmesinde ilişkilidir. POP enziminin inhibitörleri mental hastalıklarının tedavisinde ve önlenmesinde potansiyel kullanıma sahiptir (Lafarga et al., 2015).

Tripsin en iyi bir şekilde karakterize edilmiş serin proteaz ailesinin bir üyesidir. Bu proteazlar sadece gıda hidrolizi, kan koagülasyonu, fibrinolizis ve kan basıncın düzenlenmesi gibi bazı fizyolojik prosesler de değil aynı zamanda kanser, inflamasyon, ateroskleroz gibi önemli patolojik proseslerin çoğunda önemli rol oynamaktadırlar. Tripsinin biyolojik önemi ve onun etkileşimi gelecekte kanser tedavilerinin gelişimini için araştırma konusu olacağı düşünülmektedir. Aynı zamanda, tripsin ve tripsin benzeri serin proteazlar beyinde nöral gelişim, nörodejenerasyon ve nörorejenerasyon gibi fizyolojik olaylarda çok önemli rol oynamaktadırlar.

Bu yaklaşımla son yıllarda araştırmacılar POP, Tripsin, DPPIV gibi serin proteaz inhibitörü olabilecek bileşenlerin belirlenmesi ve kullanım potansiyellerinin araştırılmasına yoğunlaşmışlardır.

Prolil oligopeptidaz enzimi ile hazırlanan gluten hidrolizatının POP ve tripsin aktivitesi üzerine etkisinin araştırılması bölüm 2.18.3’de anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. Gluten hidrolizatının POP ve tripsin enzim aktivitesini inhibe ettiği artan konsantrasyonlarında inhibisyonun lineer olduğu gözlemlendi (Şekil 3.36). POP ve tripsin inhibisyonu için IC_{50} değerleri hesaplandı (Çizelge 3.8).



Şekil 3.36 Hidrolizatların Tripsin ve POP'un inhibisyon IC_{50} değerleri

Çizelge 3.8 Hidrolizatın IC₅₀ değerleri.

Enzim	IC ₅₀ ^a (µg/mL)	Linear regresyon ^b (% inhibisyon)
Tripsin	10,3	y=-1,1082x+61,392
POP	3,58	y=-3,7855+63,557

^a Enzim aktivitesinin %50'sini inhibe eden hidrolizatın konsantrasyonu

^b x; IC₅₀, y; aktivite cinsinden %50 değeri

IC₅₀ değerleri tripsin enzimi için 10,3 µg/mL, POP enzimi için 3,58 µg/mL olarak bulundu. Sonuçlar elde edilen gluten hidrolizatının her iki enzimi de inhibe ettiğini ancak Prolil oligopeptidaz üzerine daha etkin olduğunu göstermektedir. Her iki enzimin de serin proteaz olmasına rağmen katalik triad'da yer alan fonksiyonel amino asitlerin dizilim farklılıkları olması bunun gerekçesi olarak düşünüldü.

4. GENEL DEĞERLENDİRME

Prolil oligopeptidaz enzimi; birçok fizyolojik prosesin regülasyonunda önemli rol oynayan serin peptidaz sınıfı bir proteindir. Multifonksiyonel karakteristiğe sahip olan enzim birçok kaynaktan farklı teknik ve yöntemler kullanılarak saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir.

Bu çalışmada; prolil oligopeptidaz enzimin rekombinant olarak saflaştırılması, karakterizasyonu ve biyolojik proseslerde kullanım potansiyelinin araştırılması hedeflendi.

Prolil oligopeptidaz enziminin biyolojik proseslerde kullanılması amacı ile bitkisel ve hayvansal dokularda yapılan taramalarda yeterli aktivite elde edilemedi. Bu nedenle, Prolil oligopeptidaz enziminin rekombinant olarak üretilip, saflaştırılmasına karar verildi. Rekombinant olarak üretilen enzim homojenattan Nikel-Şelat ve jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak % 11 verim ile 1066 kat saflaştırıldı.

Nikel Şelat afinite kromatografisi sonrası elde edilen enzim preparatı SDS-PAGE jel elektroforezinde rölatif molekül kütlesi yaklaşık olarak 70 kDa olan tek band ve minör bazı bantlar görüldü. Bu minör bantların uygulamaya girişim yapabilecek bir sorun olduğu düşünülme de gerek enzimin daha ileri düzeyde saflaştırılması gerekse SDS-PAGE’de belirlenen molekül kütlesinin doğrulanması ve stökiyometrik değerlendirilmesi için jel filtrasyon kromatografisi uygulandı. Enzim jel filtrasyon sonrasında elde edilen fraksiyonun SDS-PAGE’de tek band olarak gözlemlendi ve SDS-PAGE, jel elektroforezi ve jel filtrasyon sonuçları birlikte değerlendirildiğinde enzimin bir monomer olduğu belirlendi.

Prolil oligopeptidaz enziminin saflığının diğer yöntemlerin yanısıra kontrolü için HPLC analizi yapıldı. Elde edilen kromatogram sonucundan enzimin saf bir şekilde elde edildiği kanısına varıldı.

Saflaştırılan enzimin optimum pH’sı 7,5; optimum sıcaklığı 37 °C; izoelektrik noktası $6,3 \pm 0,2$ aralığında; k_m , V_{max} ve k_{kat} sırasıyla 0.20 ± 0.014 mM, 3.42 ± 0.07 $\mu\text{mol/dk}$ ve 244 (dak^{-1}) olarak bulundu.

Enzimin termal kararlılığının 4-37 °C aralığında oldukça iyi olduğu, 50 °C’de aktivitesinin % 50’ sini, 55 °C’de ise % 74 ‘ini kaybettiği; pH 6,0-8,5 aralığında enzim aktivitesinin iyi korunduğu ve 4 °C’de 6. haftada aktivitesinin % 50’sini kaybettiği görüldü.

Mn⁺² ve Li⁺ iyonları 1-10 mM konsantrasyonlarda enzim aktivitesi üzerine az bir etkisi olduğu, Hg⁺² ve Cd⁺² metallerinin ise güçlü bir inhibitör etkisi gösterdiği belirlendi. Cu⁺², Ba⁺² ve Ni⁺² iyonlarının ise konsantrasyona bağımlı lineer inhibisyon gösterdiği ve IC₅₀ değerleri sırasıyla 3,10 ve 0,16 mM olarak hesaplandı.

POP enziminin spesifik inhibitörü olduğu bilinen Z-Pro-Prolinal’in çok düşük konsantrasyonlarında (10 µM) rekombinant olarak elde edilen prolil oligopeptidaz enzim aktivitesinin % 77’inin inhibe etmekte olup ve IC₅₀ değeri 70 µM olarak hesaplandı. Diğer yandan genel bir serin proteaz inhibitörü olarak bilinen PMSF ve pABA inhibisyon etkinliği açısından değerlendirildi ve pABA’nın yüksek konsantrasyonlarında dahi (10 mM) enzim aktivitesinin % 15 ini inhibe ettiği gözlemlendi. PMSF ise konsantrasyona bağımlı lineer inhibisyon gösterdi ve IC₅₀ değeri 0,38 mM olarak bulundu.

Metalloproteaz inhibitörlerinden EDTA ve 1-10 fenatrolin’in enzim aktivitesini inhibe etmediği belirlendi.

İndirgeyici ajanlardan DTT’nin 1-2,5 mM konsantrasyonunda hiçbir inhibisyon etkisi gözlenmezken, daha yüksek konsantrasyonlarında (5,0-10 mM) inhibisyon etkinliği % 14-24 arasında değiştiği, β-merkaptetanol’ün farklı konsantrasyonları için farklı inhibisyon değerleri gözlenmekle birlikte inhibisyon etkinliği % 15-19 arasında değişmediği gözlemlendi.

Prolil oligopeptidaz’ın sentetik (Suc-Ala-Pro-pNA, Z-Gly-Pro-pNA, H-Gly-Pro-pNA, H-Ala-Pro-pNA, H-Arg-Pro-pNA, H-Val-Ala-pNA, H-Glu-Ala-pNA, H-Leu-pNA, H-Pro-pNA ve H-Glu-pNA) ve doğal substratlarındaki (IGF-1 ve Substance P) peptidin yapısında prolin içeren substratları daha hızlı hidrolizleyebildiği, alanin içeren substratları ise daha yavaş hidrolizlediği ve ayrıca dipeptidleri hidrolizleyemediği bulundu.

POP enziminin biyolojik proseslerde kullanım potansiyelinin araştırılmasına yönelik çalışmalarda gluten hidrolizatlarının hazırlandı. Bu amaçla yapılan optimizasyon çalışmalarında en iyi hidroliz derecesi % 22 olarak E/S oranı 4,6 U/mg gluten, 37°C’de 4 saat inkübasyon koşullarında elde edildi.

Rekombinant olarak üretilip, saflaştırılan POP enzimi ile gluten unundan hazırlanan protein hidrolizatlarındaki peptidlerin ayrılmasında RP-HPLC kullanıldı. Glutenin hidroliz öncesi ve sonrası kromatogramları kıyaslandığında üretilip, saflaştırılan POP enzimi ile elde edilen hidrolizatın peptid çeşitliliği açısından zengin olduğu görüldü.

POP enzimi ile hazırlanan gluten hidrolizatlarından serin proteaz ailesinden olan POP ve Tripsin enziminin inhibisyonuna yönelik bir çalışma yapıldı. IC₅₀ değerleri tripsin enzimi için 10,3 µg/mL, POP enzimi için 3,58 µg/mL olarak bulundu.

Rekombinant olarak elde edilen Prolil oligopeptidaz enzimi ile hazırlanan gluten hidrolizatının (1 – 4 nmol peptid karışımı) antioksidan etkinliği incelendiğinde 1 nmol değerinde % 21’ lik bir inhibisyon gösterirken 2, 3 ve 4 nmol de % 35 - % 39 aralığında değiştiği görüldü.

POP enziminin hidrolizi sonucu elde edilen hidrolizatın antibakteriyel etkinliğini sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile *E. coli* ve *S. aureus* mikroorganizmalarının 595 nm’de absorbansta zamana bağlı değişimleri incelendi. *E. coli*’ye karşı 40 µg/µL konsantrasyonda mikrobiyal üremeyi % 22 oranında engellediği belirlendi.

Sonuç olarak bu çalışmada *Myxococcus xanthus* suşundan üretilip saflaştırılan POP enziminin karakterizasyonu gerçekleştirilmiş olup biyoaktif peptid eldesinde kullanım potansiyelinin araştırılması gerçekleştirildi. Elde edilen enzim preparatının farklı biyolojik aktiviteye sahip peptidlerin eldesinde kullanılabileceği belirlendi. İleri aşamada elde edilen hidrolizatlardan peptidlerin biyolojik aktiviteye bağlı olarak saflaştırılması ve yapı analizleri sonrası gerek medikal gerekse gıda sektörü açısından temel oluşturacağı, varolan literatüre katkı sağlayarak ileri düzeydeki çalışmalara ışık tutacağı açıktır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Adler-Nissen, J.**, 1979, Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27(6), 1256-1262 pp.
- Agirregoitia, N., Laiz-Carrión, R., Varona, A., del Río, M. M., Mancera, J. M., and Irazusta, J.**, 2005, Distribution of peptidase activity in teleost and rat tissues, *Journal of Comparative Physiology B*, 175(6), 433-444 pp.
- Akılhoğlu, H. G., and Yalçın, E.**, 2010, Tahıl protein hidrolizatlarının antioksidan aktiviteleri, 35 (3), 227-233 pp.
- Aksoy, B.**, 2013, Derinin doğal bağışıklık sistemi, *Archives of the Turkish Dermatology and Venerology/Turkderm*. 47(1):2-11 pp.
- Andrews, P. C., Minth, C. D., and Dixon, J. E.**, 1982, Immunochemical characterization of a proline endopeptidase from rat brain. Its relationship to proline endopeptidase from other tissues and from other species, *Journal of Biological Chemistry*, 257(10), 5861-5865 pp.
- Aoyagi, T., Nagai, M., Ogawa, K., Kojima, F., Okada, M., Ikeda, T., Hamada, M., and Takeuchi, T.**, 1991, Poststatin, a new inhibitor of prolyl endopeptidase, produced by *Streptomyces viridochromogenes* MH534-30F3. I. Taxonomy, production, isolation, physico-chemical properties and biological activities, *The Journal of Antibiotics*, 44(9), 949-955 pp.
- Atiwetin, P., Harada, S., and Kamei, K.**, 2006, Serine proteinase inhibitor from wax gourd (*Benincasa hispida* [Thunb] Cogn.) seeds, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 70(3):743-5 pp.
- Augustyns, K., Borloo, M., Belyaev, A., Rajan, P., Goossens, F., Hendriks, D., Scharpé, S., and Haemers, A.**, 1995, Synthesis of peptidyl acetals as inhibitors of prolyl endopeptidase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 5(12), 1265-1270 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Bal, G., Van der Veken, P., Antonov, D., Lambeir, A. M., Grellier, P., Croft, S. L., Augustyns, K., and Haemers, A.,** 2003, Prolylisoxazoles: potent inhibitors of prolyl oligopeptidase with antitrypanosomal activity, *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 13(17), 2875-2878 pp.
- Bär, J. W., Rahfeld, J. U., Schulz, I., Gans, K., Ruiz-Carrillo, D., Manhart, S., Rosch, F., and Demuth, H. U.,** 2006, Prolyl endopeptidase cleaves the apoptosis rescue peptide humanin and exhibits an unknown post-cysteine cleavage specificity, In *Dipeptidyl Aminopeptidases*, 103-108 pp.
- Barelli, H., Petit, A., Hirsch, E., Wilk, S., De Nanteuil, G., Morain, P., and Checler, F.,** 1999, S 17092-1, a highly potent, specific and cell permeant inhibitor of human proline endopeptidase, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 257(3), 657-661 pp.
- Basyigit, I., Sahin, M., Sahin, D., Yildiz, F., Boyaci, H., Sirvanci, S., and Ercan, F.,** 2010, Anti-inflammatory effects of montelukast on smoke-induced lung injury in rats, *Multidisciplinary Respiratory Medicine*, 5(2), 92 pp.
- Başığit, İ.,** 2010, Koah Patogenezi ve Fizyopatolojisi, *Türk Toraks Cerrahisi Bülteni*, 1 (2), 114-118 pp.
- Bellemere, G., Vaudry, H., Mounien, L., Boutelet, I., Jegou, S.,** 2004, Localization of the mRNA encoding prolyl endopeptidase in the rat brain and pituitary, *J Comp Neurol*. 471,128–143 pp.
- Berg, D. T., Gerlitz, B., Shang, J., Smith, T., Santa, P., Richardson, M. A., Kurz, K. D., Grinnel, B. W., Mace, K., and Jones, B. E.,** 2003, Engineering the proteolytic specificity of activated protein C improves its pharmacological properties, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(8), 4423-4428 pp.
- Bernabucci, U., and Nardone, A.,** 2014, milk proteins: source of bioactive peptides to human health, *Atti*, 4-7 pp.
- Bertani, G., and Weigle, J. J.,** 1953, Host controlled variation in bacterial viruses, *Journal of Bacteriology*, 65(2), 113-121 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Bhattacharyya, A., and Babu, C. R.,** 2009, Purification and biochemical characterization of a serine proteinase inhibitor from *Derris trifoliata* Lour. seeds: insight into structural and antimalarial features, *Phytochemistry*, 70(6), 703-12 pp.
- Blois, M. S.,** 1958, Antioxidant determinations by the use of stable free radical, *Nature*, 1199-1200 pp.
- Bogyo, M., and Wang, E. W.,** 2002, Proteasome inhibitors: complex tools for a complex enzyme, In *The Proteasome—Ubiquitin Protein Degradation Pathway*, 185-208 pp.
- Braber, S., Koelink, P. J., Henricks, P. A., Jackson, P. L., Nijkamp, F. P., Garssen, J., Kraneveld, D. A., Blalock, J. E., and Folkerts, G.,** 2011, Cigarette smoke-induced lung emphysema in mice is associated with prolyl endopeptidase, an enzyme involved in collagen breakdown, *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 300(2), 255-265 pp.
- Bradford, M. M.,** 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248-254 pp.
- Brandt, I., Scharpé, S., and Lambeir, A. M.,** 2007, Suggested functions for prolyl oligopeptidase: a puzzling paradox, *Clinica Chimica Acta*, 377(1), 50-61 pp.
- Brown, T. A.,** 2006, *Gene cloning and DNA analysis an introduction*, Wiley-Blackwell, 408 p
- Buckley, S. J.,** 2001, *The purification and characterisation of prolyl oligopeptidase from human saliva and dipeptidyl peptidase IV from bovine serum*, Doctoral dissertation, Dublin City University.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Caessens, P. W., Visser, S., Gruppen, H., and Voragen, A. G.,** 1999, β -Lactoglobulin hydrolysis. 1. Peptide composition and functional properties of hydrolysates obtained by the action of plasmin, Trypsin, and *Staphylococcus aureus* V8 Protease, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(8), 2973-2979 pp.
- Camargo, A. C. M., Almeida, M. L. C., and Emson, P. C.,** 1984, Involvement of Endo-Oligopeptidases A and B in the Degradation of Neurotensin by Rabbit Brain, *Journal of Neurochemistry*, 42(6), 1758-1761 pp.
- Capiralla, H., Hiroi, T., Hirokawa, T., and Maeda, S.,** 2002, Purification and characterization of a hydrophobic amino acid—specific endopeptidase from *Halobacterium halobium* S9 with potential application in debittering of protein hydrolysates, *Process Biochemistry*, 38(4), 571-579 pp.
- Carr, P. D., and Ollis, D. L.,** 2009, α/β Hydrolase fold: an update, *Protein and Peptide Letters*, 16(10), 1137-1148 pp.
- Cengiz, C.,** 2010, Çölyak Hastalığında Yeni Terapötik Yaklaşımlar, *Güncel Gastroenteroloji*, 14(4), 198-201 pp.
- Chen, J. T., Chao, M. L., Wen, C. Y., and Chu, W. S.,** 2012, Screening, purification, and characterization of an extracellular prolyl oligopeptidase from *Coprinopsis clastophylla*, *Journal of Microbiology*, 50(4), 652-659 pp.
- Cherqui, A., Cruz, N., and Simões, N.,** 2001, Purification and characterization of two serine protease inhibitors from the hemolymph of *Mythimna unipuncta*, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31(8):761-9 pp.
- Chevalier, S., Goeltz, P., Thibault, P., Banville, D., and Gagnon, J.,** 1992, Characterization of prolyl oligopeptidase from *Flavobacterium meningosepticum*, *J. Biol. Chem*, 267, 8192-8199 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Christner, C., Zerlin, M., Gräfe, U., Heinze, S., Küllertz, G., and Fischer, G.,** 1997, Lipohexin, a new inhibitor of prolyl endopeptidase from *Moeszia lindtneri* (HKI-0054) and *Paecilomyces sp.*(HKI-0055; HKI-0096). II. Inhibitory activities and specificity. *The Journal of Antibiotics*, 50(5), 384-389 pp.
- Clemente, A.,** 2000, Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition, *Trends in Food Science & Technology*, 11(7), 254-262 pp.
- Cohen, S. N., Chang, A. C., and Hsu, L.,** 1972, Nonchromosomal Antibiotic Resistance in Bacteria: genetic transformation of *E. coli* by R-factor DNA”, *Proc. Natl. Acad. Sci, USA* , 69, 2110-2114 pp.
- Cunningham, D. F.,** 1996, A study of two proline specific peptidases from bovine serum, Doctoral dissertation, Dublin City University.
- Cunningham, D. F., and O'Connor, B.,** 1998, A study of prolyl endopeptidase in bovine serum and its relevance to the tissue enzyme. *The International Journal of Biochemistry and CellBiology*, 30(1), 99-114 pp.
- Cunningham, D. F., and O'Connor, B.,** 1997, Proline specific peptidases, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1343(2), 160-186.
- Daly, D. J., Maskrey, P., and Pennington, R. J.,** 1985, Characterization of proline endopeptidase from skeletal muscle, *International Journal of Biochemistry*, 17(4), 521-524 pp.
- Damar, A. G. İ., and Karadeniz, F.,** 2012, Biyoaktif peptitlerin ve proteinlerin antioksidan aktiviteleri ve fonksiyonel gıdalarda kullanılabilme potansiyelleri, *Dünya Gıda*, 6, 70-75 pp.
- Danquah, M., and Agyei, D.,** 2012, Pharmaceutical applications of bioactive peptides, *OA Biotechnology [E]*, 1, 1-7 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Darkoh, C., El-Bouhssini, M., Baum, M., and Clack, B.,** 2010, Characterization of a prolyl endoprotease from *Eurygaster integriceps* Puton (Sunn pest) infested wheat, *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 74(3), 163-178 pp.
- Davey, J., and Lord, M.,** 2003, Gel electrophoresis of proteins, *Essential Cell Biology (Cell Structure)*, 1, 197-268 pp.
- Demuth, H. U., Schlenzig, D., Schierhom, A., Grosche, G., Chapot-Chartier, M. P., and Gripon J. C.,** 1993, Design of (omega-N-(O-acyl)hydroxy amid) aminodicarboxylic acid pyrrolidides as potent inhibitors of proline-specific peptidases. *FEBS Lett.*, 320, 23-27 pp.
- Di Ciero, L., Oliva, M. L., Torquato, R., Köhler, P., Weder, J. K., Novello, J. C., Sampaio, C. A. M., Oliveira, B., and Marangoni, S.,** 1998, The complete amino acid sequence of a trypsin inhibitor from *Bauhinia variegata* var. *candida* seeds, *Journal of Protein Chemistry*, 17(8), 827-834 pp.
- Dowling, O.,** 1998, The purification and characterisation of a prolyl oligopeptidase from the cytosolic fraction of bovine whole brain, *Doctoral dissertation*, Dublin City University.
- Dresdner, K., Barker, L. A., Orlowski, M., Wilk, S.,** 1982, Subcellular distribution of prolyl endopeptidase and cation-sensitive neutral endopeptidase in rabbit brain. *J Neurochem.* 38, 1151–1154 pp.
- Eguchi, M., Haneda, I., and Iwamoto, A.,** 1982, Properties of protease inhibitors from the haemolymph of silkworms, *Bombyx mori*, *Antheraea pernyi* and *Philosamia cynthia ricini*, *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B*, 71(4), 569-76 pp.
- Ekici, Ö. D., Paetzel, M., and Dalbey, R. E.,** 2008, Unconventional serine proteases: variations on the catalytic Ser/His/Asp triad configuration, *Protein Science*, 17(12), 2023-2037 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Fan, W., Tezuka, Y., Komatsu, K., Namba, T., and Kadota, S.,** 1999, Prolyl endopeptidase inhibitors from the underground part of *Rhodiola sacra* SH Fu, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 22(2), 157-161 pp.
- Fulop, V., Bocskei, Z., and Polgar, L.,** 1998, Prolyl oligopeptidase: an unusual β -propeller domain regulates proteolysis, *Cell*, 94, 161-170 pp.
- Fulop, V., Szeltner, Z., Polgar, L.,** 2000 Catalysis of serin oligopeptidases is controlled by a gating filter mechanism, *EMBO Reports*, 3(1) 227-281 pp.
- Fuse, Y. O. Z. E. N., Polk, D. H., Lam, R. W., Reviczky, A. L., and Fisher, D. A.,** 1990, Distribution and ontogeny of thyrotropin-releasing hormone degrading enzymes in rats, *Am J Physiol*, 259(6), 787-791 pp.
- Gaggar, A., Jackson, P. L., Noerager, B. D., O'Reilly, P. J., McQuaid, D. B., Rowe, S. M., Clancy, J. P., and Blalock, J. E.,** 2008, A novel proteolytic cascade generates an extracellular matrix-derived chemoattractant in chronic neutrophilic inflammation, *The Journal of Immunology*, 180(8), 5662-5669 pp.
- Garcia-Horsman, J. A., Männistö, P. T., and Venäläinen, J. I.,** 2007, On the role of prolyl oligopeptidase in health and disease, *Neuropeptides*, 41(1), 1-24 pp.
- Gass, J., and Khosla, C.,** 2007, Prolyl endopeptidases, *Cellular and molecular life sciences*, 64(3), 345-355 pp.
- Gass, J., Bethune, M. T., Siegel, M., Spencer, A., and Khosla, C.,** 2007, Combination enzyme therapy for gastric digestion of dietary gluten in patients with celiac sprue, *Gastroenterology*, 133(2), 472-480 pp.
- Gass, J., Vora, H., Bethune, M. T., Gray, G. M., and Khosla, C.,** 2006, Effect of barley endoprotease EP-B2 on gluten digestion in the intact rat, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 318(3), 1178-1186 pp.
- González-Tello, P., Camacho, F., Jurado, E., Paez, M.P., and Guadix, E.M.,** 1994, Enzymatic hydrolysis of whey proteins: I. Kinetic models, *Biotechnology and Bioengineering*, 44(4), 523-528 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Goossens, F., Meester, I., Vanhoof, G., and Scharpé, S.,** 1996, Distribution of prolyl oligopeptidase in human peripheral tissues and body fluids, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 34(1), 17-22 pp.
- Goossens, F., Meester, I., Vanhoof, G., Hendriks, D., Vriend, G., and Scharpé, S.,** 1995, The Purification, characterization and analysis of primary and secondary-structure of prolyl oligopeptidase from human lymphocytes, *European Journal of Biochemistry*, 233(2), 432-441 pp.
- Gorrão, S. S., Hemerly, J. P., Lima, A. R., Melo, R. L., Szeltner, Z., Polgár, L., Juliano, M. A., and Juliano, L.,** 2007, Fluorescence resonance energy transfer (FRET) peptides and cycloretro-inverso peptides derived from bradykinin as substrates and inhibitors of prolyl oligopeptidase, *Peptides*, 28(11), 2146-2154 pp.
- Grzywnowicz, K., and Lobarzewski, J.,** 1994, A Purification Method for Specific Serine Proteases Using One-Step Affinity Chromatography, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 60, 153-60 pp.
- Gunasekera, S. P., Miller, M. W., Kwan, J. C., Luesch, H., and Paul, V. J.,** 2010, Molassamide, a depsipeptide serine protease inhibitor from the marine cyanobacterium *Dichothrix utahensis*, *Journal of Natural Products* 73(3), 459-62 pp.
- Hamdaoui, A., Wataleb, S., Devreese, B., Chiou, S.J., Vanden Broeck, J., VanBeeumen, J., De Loof, A., and Schoofs, L.,** 1998, Purification and characterization of a group of five novel peptide serine protease inhibitors from ovaries of the desert locust, *Schistocerca gregaria*, *FEBS Letters*, 1998 Jan 23; 422(1): 74-8 pp.
- Hanahan, D.,** 1983, Studies on Transformation of *E. coli* with Plasmids, *Journal of Molecular Biology*, Amsterdam, 166: 557-580 pp.
- Hanahan, D.,** 1985, Techniques for Transformation of *E. coli* DNA Cloning: a practical approach, Oxford University Press, United Kingdom.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Harris, M. N., Madura, J. D., Ming, L. J., and Harwood, V. J.,** 2001, Kinetic and mechanistic studies of prolyl oligopeptidase from the hyperthermophile *Pyrococcus furiosus*, *Journal of Biological Chemistry*, 276(22), 19310-19317 pp.
- Harwood, A. J.,** 2011, Prolyl oligopeptidase, inositol phosphate signalling and lithium sensitivity, *CNS and Neurological Disorders Drug Targets*, 10(3), 333 pp.
- Harwood, V. J., and Schreier, H. J.,** 2000, Prolyl oligopeptidase from *Pyrococcus furiosus*, *Methods in Enzymology*, 330, 445-454 pp.
- Harwood, V. J., Denson, J. D., Robinson-Bidle, K. A., and Schreier, H. J.,** 1997, Overexpression and characterization of a prolyl endopeptidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*, *Journal of Bacteriology*, 179(11), 3613-3618 pp.
- Hausch, F., Shan, L., Santiago, N. A., Gray, G. M., and Khosla, C.,** 2002, Intestinal digestive resistance of immunodominant gliadin peptides, *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 283(4), 996-1003 pp.
- Hauzer, K., Servítová, L., Barth, T., and Jošt, K.,** 1982, Post-proline endopeptidase. Partial purification and characterization of the enzyme from pig kidneys, *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 47(4), 1139-1148 pp.
- Heinis, C., Alessi, P., and Neri, D.,** 2004, Engineering a thermostable human prolyl endopeptidase for antibody-directed enzyme prodrug therapy, *Biochemistry*, 43(20), 6293-6303 pp.
- Holetz, F. B., Pessini, G. L., Sanches, N. R., Garcia Cortez, D. A., Nakamura, C. V., and Dias Filho, B. P.,** 2002, Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 97(7), 1027-1031pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Horton, H. R., Moran, L. A., Scrimgeour, K. G., Perry, M. D., and Rawn, J. D.,** 2006, Mechanism of Enzymes, Principles of Biochemistry, Pearson Education, Chapter 6: 158-91 pp.
- Hosseininaveh, V., Bandani, A., and Hosseininaveh, F.,** 2009, Digestive proteolytic activity in the Sunn pest, *Eurygaster integriceps*, Journal of Insect Science, 9(1), 70 pp.
- Hou, W. C., Huang, D. J., and Lin Y. H.,** 2002, An aspartic type protease degradestrypsin inhibitors, the major root storage proteins of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam cv. Tainong 57), Botanical Bulletin of Academia Sinica, 43(4):271-276 pp.
- Irazusta, J., Larrinaga, G., González-Maeso, J., Gil, J., Meana, J. J., and Casis, L.,** 2002, Distribution of prolyl endopeptidase activities in rat and human brain, Neurochemistry International, 40(4), 337-345 pp.
- Ishino, T., Ohtsuki, S., Homma, K., Natori, S.,** 1998, cDNA cloning of mouse prolyl endopeptidase and its involvement in DNA synthesis by Swiss 3T3 cells, J. Biochem, 123:540–545 pp.
- Jarho, E. M., Venäläinen, J. I., Huuskonen, J., Christiaans, J. A., Garcia-Horsman, J. A., Forsberg, M. M., Jarvinen, T., Gynther, J., Mannistö, P. T., and Wallén, E. A.,** 2004, A cyclopent-2-enecarbonyl group mimics proline at the P2 position of prolyl oligopeptidase inhibitors, Journal of Medicinal Chemistry, 47(23), 5605-5607 pp.
- Jarho, E. M., Wallén, E. A., Christiaans, J. A., Forsberg, M. M., Venäläinen, J. I., Männistö, P. T., Gynther, J., and Poso, A.,** 2005, Dicarboxylic acid azacycle l-prolyl-pyrrolidine amides as prolyl oligopeptidase inhibitors and three-dimensional quantitative structure-activity relationship of the enzyme-inhibitor interactions, Journal of Medicinal Chemistry, 48(15), 4772-4782 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Jeewanthi, C. R. K., Paik, H. D., Kim, M. H., Lee, N. K., Kim, S. Y., and Yoon, C. Y.,** 2014, Characteristics of whey protein hydrolysates from cheese whey, favors on various food applications, Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly, 20(4), 503-509 pp.
- Juhász, T., Szeltner, Z., Fülöp, V., and Polgár, L.,** 2005, Unclosed β -propellers display stable structures: Implications for substrate access to the active site of prolyl oligopeptidase, Journal of Molecular Biology, 346(3), 907-917 pp.
- Junru, Q.,** 2003, Study on the limited enzymatic hydrolysis of wheat gluten [J], Science and Technology of Food Industry, 9, 027 pp.
- Kabashima, T., Fujii, M., Meng, Y., Ito, K., and Yoshimoto, T.,** 1998, Prolyl Endopeptidase from *Sphingomonas capsulata*: Isolation and characterization of the enzyme and nucleotide sequence of the gene, Archives of Biochemistry and Biophysics, 358(1), 141-148 pp.
- Kahyaoglu, A., Haghjoo, K., Kraicsovits, F., Jordan, F., and Polgar, L.,** 1997, Benzyloxycarbonylprolylprolinal, a transition-state analogue for prolyl oligopeptidase, forms a tetrahedral adduct with catalytic serine, not a reactive cysteine, Biochem. J, 322, 839-843 pp.
- Kalwant, S., and Porter, A. G.,** 1991, Purification and characterization of human brain prolyl endopeptidase, Biochemistry Journal, 276, 237-244 pp.
- Kanatani, A., Yoshimoto, T., Kitazono, A., Kokubo, T., and Tsaru, D.,** 1993, Prolyl endopeptidase from *Aeromonas hydrophila*: cloning, sequencing, and expression of the enzyme gene, and characterization of the expressed enzyme, Journal of Biochemistry, 113(6), 790-796 pp.
- Kang, C., Yu, X. W., and Xu, Y.,** 2014, Purification and characterization of a prolyl endopeptidase isolated from *Aspergillus oryzae*, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 41(1), 49-55 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Kaszuba, K., Róg, T., Danne, R., Canning, P., Fülöp, V., Juhász, T., Szeltner, Z., St Pierre, J. F., Garcia-Horsman, A., Mannisto, P. T., Karttunen, M., Hakkanen, J., and Bunker, A.,** 2012, Molecular dynamics, crystallography and mutagenesis studies on the substrate gating mechanism of prolyl oligopeptidase, *Biochimie*, 94(6), 1398-1411 pp.
- Kaszuba, K., Róg, T., Danne, R., Konserve, P., Fülöp, V., Juhász, T., Szeltner, Z., St.Pierre, F. J., Garcia-Horsman, A., Mannistö P.T., Karttunen, I., Hokkanen, J., and Bunker, A.,** 2012, Molecular dynamics, crystallography and mutagenesis studies on the substrate gating mechanism of prolyl oligopeptidase, *Biochimie*, 94(6), 1398-1411 pp.
- Kato, T., Okada, M., and Nagatsu, T.,** 1980, Distribution of post-proline cleaving enzyme in human brain and the peripheral tissues, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 32(3), 117-121 pp.
- Katsube, N., Sunaga, K., Aishita, H., Chuang, D. M., and Ishitani, R.,** 1999, ONO-1603, a potential antidementia drug, delays age-induced apoptosis and suppresses overexpression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in cultured central nervous system neurons, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 288(1), 6-13 pp.
- Kaushik, S., Etchebest, C., and Sowdhamini, R.,** 2014, Decoding the structural events in substrate-gating mechanism of eukaryotic prolyl oligopeptidase using normal mode analysis and molecular dynamics simulations, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 82(7), 1428-1443 pp
- Kim, J. H., Kim, S. I., and Song, K. S.,** 2001, Prolyl endopeptidase inhibitors from green tea, *Archives of Pharmacal Research*, 24(4), 292-296 pp.
- Kimura, K. I., Kanou, F., Takahashi, H., Esumi, Y., Uramoto, M., and Yoshihama, M.,** 1997, Propeptin, a new inhibitor of prolyl endopeptidase produced by *Microbispora*. I. Fermentation, isolation and biological properties, *The Journal of Antibiotics*, 50(5), 373-378 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Kimura, K. I., Kawaguchi, N., Yoshihama, M., and Kawanishi, G.,** 1990, Staurosporine, a prolyl endopeptidase inhibitor, *Agricultural and Biological Chemistry*, 54(11), 3021-3022 pp.
- Kınık, Ö., and Gürsoy, O.,** 2011, Süt proteinleri kaynaklı biyoaktif peptitler, *Pamukkale University Journal of Engineering Sciences*, 8(2).
- Knisatschek, H., and Bauer, K.,** 1979, Characterization of " thyroliberin-deamidating enzyme" as a post-proline-cleaving enzyme. Partial purification and enzyme-chemical analysis of the enzyme from anterior pituitary tissue, *Journal of Biological Chemistry*, 254(21), 10936-10943 pp.
- Koç Z.E., Aladağ, M.O., Uysal, A.,** 2013, Synthesis of novel dopamine derived multidirectional ligands from cyanuric chloride structural and antimicrobial studies, *EXCLI Journal*, 12, 396-403 pp.
- Koida, M. A. S. A. O., and Walter, R. O. D. E. R. I. C. H.,** 1976, Post-proline cleaving enzyme. Purification of this endopeptidase by affinity chromatography, *Journal of Biological Chemistry*, 251(23), 7593-7599 pp.
- Korhonen, H., and Pihlanto, A.,** 2003, Food-derived bioactive peptides-opportunities for designing future foods, *Current Pharmaceutical Design*, 9(16), 1297-1308 pp.
- Korhonen, H., and Pihlanto, A.,** 2006, Bioactive peptides: production and functionality, *International Dairy Journal*, 16(9), 945-960 pp.
- Krowarsch, D., Cierpicki, T., Jelen, F., and Otlewski, J.,** 2003, Canonical protein inhibitors of serine proteases, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60(11), 2427-44 pp.
- Kubota, K., Tanokura, M., and Takahashi, K.,** 2005, Purification and characterization of a novel prolyl endopeptidase from *Aspergillus niger*, *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 81(10), 447-453 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Kusuhara, M., Hachisuka, H., Nakano, S., and Sasai, Y.,** 1993, Purification and characterization of prolyl endopeptidase from rat skin, *Journal of Dermatological Science*, 6(2), 138-145 pp.
- Laemmli, U. K.,** 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227(5259): 680-685 pp.
- Lafarga, T., O'Connor, P., and Hayes, M.,** 2015, In silico methods to identify meat-derived prolyl endopeptidase inhibitors, *Food Chemistry*, 175, 337-343 pp.
- Larrinaga, G., Begoña, S., Itxaro, P., Blanco, L., Maria, L. C., Pinto, F. M., Gil, J., and José, I. L.,** 2010, Cannabinoid CB1 receptor is downregulated in clear cell renal cell carcinoma, *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 58(12), 1129-1134 pp.
- Larrinaga, G., Perez, I., Blanco, L., López, J. I., Andrés, L., Etxezarraga, C., Santaolalla, F., Zabala, A., Varona, A., and Irazusta, J.,** 2010, Increased prolyl endopeptidase activity in human neoplasia, *Regulatory Peptides*, 163(1), 102-106 pp.
- Lee, H. S., Kim, Y. J., Cho, Y., Kim, S. J., Lee, J. H., and Kang, S. G.,** 2007, Characterization of prolyl oligopeptidase from hyperthermophilic archaeon *Thermococcus* sp. NA1, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 103(3), 221-228 pp.
- Legouill, C., Parent, J. L., Rolapleszczynski, M., and Stankova, J.,** 1994, Analysis of Recombinant Plasmids by a Modified Alkaline Lysis Method, *Analytical Biochemistry*, Amsterdam, 219 (1):164 pp.
- Liao, H., Ren, W., Kang, Z., Jiang, J. H., Zhao, X. J., and Du, L. F.,** 2007, A trypsin inhibitor from *Cassia obtusifolia* seeds: isolation, characterization and activity against *Pieris rapae*, *Biotechnology Letters*, 29(4):653-658 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Liaset, B., Nortvedt, R., Lied, E., and Espe, M.,** 2002, Studies on the nitrogen recovery in enzymic hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) frames by Protamex™ protease, *Process Biochemistry*, 37(11), 1263-1269 pp.
- Liu, J. M., Garcia-Alvarez, M. C., Bignon, J., Kusinski, M., Kuzdak, K., Riches, A., and Wdzieczak-Bakala, J.,** 2010, Overexpression of the natural tetrapeptide acetyl-N-ser-asp-lys-pro derived from thymosin β 4 in neoplastic diseases, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1194(1), 53-59 pp.
- Liu, J. M., Lawrence, F., Kovacevic, M., Bignon, J., Papadimitriou, E., Lallemand, J. Y., Katsoris, P., Potier, P., Fromes, Y., and Wdzieczak-Bakala, J.,** 2003, The tetrapeptide AcSDKP, an inhibitor of primitive hematopoietic cell proliferation, induces angiogenesis in vitro and in vivo, *Blood*, 101(8), 3014-3020 pp.
- Lkhagvajav, N., Yaşa, I., Çelik, E., Koizhaiganova, M., Sarı, Ö.,** 2011, Antimicrobial activity of colloidal silver nanoparticles prepared by sol-gel method, *Digest Journal Of Nanomaterials And Biostructures*, 6(1), 149-154 pp.
- Lorenc-Kubis, I., Kowalska, J., Pochron, B., Zuzlo, A., and Wilusz, T.,** 2001, Isolation and amino acid sequence of a serine proteinase inhibitor from common flax (*Linum usitatissimum*) seeds, *Chembiochem*, 2(1), 45-51 pp.
- Lu, K. P., Finn, G., Lee, T. H., and Nicholson, L. K.,** 2007, Prolyl cis-trans isomerization as a molecular timer, *Nature Chemical Biology*, 3(10), 619-629 pp.
- Maes, M., Goossens, F., Lin, A. H., De Meester, I., Van Gastel, A., and Scharpé, S.,** 1998, Effects of psychological stress on serum prolyl endopeptidase and dipeptidyl peptidase IV activity in humans: higher serum prolyl endopeptidase activity is related to stress-induced anxiety, *Psychoneuroendocrinology*, 23(5), 485-495 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Maes, M., Goossens, F., Scharpé, S., Calabrese, J., Desnyder, R., and Meltzer, H. Y.,** 1995, Alterations in plasma prolyl endopeptidase activity in depression, mania, and schizophrenia: effects of antidepressants, mood stabilizers, and antipsychotic drugs, *Psychiatry Research*, 58(3), 217-225 pp.
- Maes, M., Lin, A. H., Bonaccorso, S., Goossens, F., Van Gastel, A., Pioli, R., Delmeire, L., and Scharpé, S.,** 1999, Higher serum prolyl endopeptidase activity in patients with post-traumatic stress disorder, *Journal of Affective Disorders*, 53(1), 27-34 pp.
- Maes, M., Lin, A., Bonaccorso, S., Vandoolaeghe, E., Song, C., Goossens, F., De Meester, I., Degroote, J., Neels, H., Scharpe, S., Janca, A.,** 1999, Lower activity of serum peptidases in abstinent alcohol-dependent patients, *Alcohol*, 17(1), 1-6 pp.
- Maes, M., Monteleone, P., Bencivenga, R., Goossens, F., Maj, M., Van West, D., Maes, M., Monteleone, P., Bencivenga, R., Goossens, F., Maj, M., Bosmans, E., and Scharpe, S.,** 2001, Lower serum activity of prolyl endopeptidase in anorexia and bulimia nervosa, *Psychoneuroendocrinology*, 26(1), 17-26 pp.
- Mäkinen, P. L., Mäkinen, K. K., and Syed, S. A.,** 1994, An endo-acting proline-specific oligopeptidase from *Treponema denticola* ATCC 35405: evidence of hydrolysis of human bioactive peptides, *Infection and Immunity*, 62(11), 4938-4947 pp.
- Männistö, P. T., Venäläinen, J., Jalkanen, A., and García-Horsman, J. A.,** 2007, Prolyl oligopeptidase: a potential target for the treatment of cognitive disorders, *Drug News Perspect*, 20(5), 293-305 pp.
- Maruyama, S., and Ohmori, T.,** 2002, Isolation and characterization of prolyl endopeptidase-inhibiting peptides from bovine brain, In *Peptide Science—Present and Future*, 637-638 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Medyantseva, E. P., Vertlib, M. G., and Budnikov, G. K.,** 1998, Metal ions as enzyme effectors, Russian Chemical Reviews, 67(3):225-32 pp.
- Miura, N., Shibata, S., and Watanabe, S.,** 1997, Z-321, a prolyl endopeptidase inhibitor, augments the potentiation of synaptic transmission in rat hippocampal slices, Behavioural Brain Research, 83(1), 213-216 pp.
- Mizutani, S., Sumi, S., Suzuki, O., Narita, O., and Tomoda, Y.,** 1984, Post-proline endopeptidase in human placenta, Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology, 786(1), 113-117 pp.
- Moriyama, A., and Sasaki, M.,** 1983, Porcine liver succinyltrialanine p-nitroanilide hydrolytic enzyme. Its purification and characterization as a post-proline cleaving enzyme, Journal of Biochemistry, 94(5), 1387-1397 pp.
- Moriyama, A., Nakanishi, M., Sasaki, M.,** 1988 Porcine muscle prolyl endopeptidase and its endogenous substrates, J Biochem, 104:112-117 pp.
- Mulder, K. C., Lima, L. A., Miranda, V. J., Dias, S. C., and Franco, O. L.,** 2013, Current scenario of peptide-based drugs: the key roles of cationic antitumor and antiviral peptides, Frontiers in Microbiology, 4.
- Mullis, K. B., and Faloona, F. A.,** 1987, Specific synthesis of DNA *in vitro* via apolymerase catalyzed chain reaction, Methods in Enzymology, 155: 335-50 pp.
- Myöhänen, T. T., Venalainen, J. I., Garcia-Horsman, J. A., Piltonen, M., Mannisto, P. T.,** 2008b, Distribution of prolyl oligopeptidase in the mouse whole-body sections and peripheral tissues, Histochem Cell Biology, 130:993–1003 pp.
- Myöhänen, T. T., Venalainen, J. I., Garcia-Horsman, J. A., Piltonen, M., Mannisto, P. T.,** 2008a, Cellular and subcellular distribution of brain prolyl oligopeptidase and its association with specific neuronal neurotransmitters, J Comp Neurol, 507:1694–1708 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Myöhänen, T.T., Venäläinen J.I., Tupala, E., Garcia-Horsman, J.A., Miettinen, R., Männistö P.T.,** 2007, Distribution of immunoreactive prolyl oligopeptidase in human and rat brain, *NeurochemRes.* 32:1365–1374 pp.
- Naomi, Y., Shinji S., Hiroshi, S., and Atsuo, N.,** 1986, Purification and characterization of proline endopeptidase from rat liver, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 34(1), 256-263 pp.
- Navarro, V., Villareal, M. L., Rajas, G., Lozoya, X.,** 1996, Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases, *J. Ethnopharmacol.* 53, 143–147 pp.
- Nielsen, P. M.,** 1997, Functionality of protein hydrolysates, *Food Science and Technology*, 443-472 pp.
- Nielsen, P. M., Petersen, D., and Dambmann, C.,** 2001, Improved method for determining food protein degree of hydrolysis, *Journal of Food Science*, 66(5), 642-646 pp.
- Nozaki, Y., Sato, N., Iida, T., Hara, K., Fukuyama, K., and Epstein, W. L.,** 1992, Prolyl endopeptidase purified from granulomatous inflammation in mice, *Journal of Cellular Biochemistry*, 49(3), 296-303 pp.
- O’Leary, R. M., O’Connor, B.,** 1995, Identification and localisation of a synaptosomal membrane prolyl endopeptidase from bovine brain, *Eur J Biochem.* 227:277–283 pp.
- Odani, S., Tominaga, K., Kondou, S., Hori, H., Koide, T., Hara, S., Isemura, M., and Tsunasawa, S.,** 1999, The inhibitory properties and primary structure of a novel serine proteinase inhibitor from the fruiting body of the basidiomycete, *Lentinus edodes*, *European Journal of Biochemistry*, 262(3), 915-23 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Ohtsuki, S., Homma, K. I., Kurata, S., Komano, H., and Natori, S.,** 1994, A prolyl endopeptidase of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly): its purification and suggestion for its participation in the differentiation of the imaginal discs, *Journal of Biochemistry*, 115(3), 449-453 pp.
- O'Leary, R. M., Gallagher, S. P., and O'Connor, B.,** 1996, Purification and characterization of a novel membrane-bound form of prolyl endopeptidase from bovine brain, *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 28(4), 441-449 pp.
- Oliveira, E. B., Martins, A. R., and de Camargo, A.,** 1976, Rabbit brain thiol-activated endopeptidase. Hydrolysis of bradykinin and kininogen, *General Pharmacology, The Vascular System*, 7(2), 159-161 pp.
- Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S. M., Harel, M., Remington, S. J., Silman, I., Schrag, J., Sussman, J. L., Verschueren, K. H. G., and Goldman, A.,** 1992, The α/β hydrolase fold, *Protein Engineering*, 5(3), 197-211 pp.
- Orlowski, M., Wilk, E., Pearce, S., and Wilk, S.,** 1979, Purification and properties of a prolyl endopeptidase from rabbit brain, *Journal of Neurochemistry*, 33(2), 461-469 pp.
- Osorio, C., Wen, N., Gemini, R., Zemetra, R., Von Wettstein, D., and Rustgi, S.,** 2012, Targeted modification of wheat grain protein to reduce the content of celiac causing epitopes, *Functional & Integrative Genomics*, 12(3), 417-438.
- Otağ, F. B., and Hayta, M.,** 2013, Gıdalarda Biyoaktif Peptit Oluşumu ve Aktivitesi Üzerine Isıl İşlem Ve Fermantasyonun Etkileri, *Gıda Dergisi*, 38(5).
- Oyama, H., Aoki, H., Amano, M., Mizuki, E., Yoshimoto, T., Tsuru, D., and Murao, S.,** 1997, Purification and characterization of a prolyl endopeptidase from *Pseudomonas sp. KU-22*, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84(6), 538-542 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Page, M. J., and Di Cera, E.,** 2008, Serine peptidases: classification, structure and function, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(7-8), 1220-1236 pp.
- Panyam, D., and Kilara, A.,** 1996, Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification, *Trends in Food Science and Technology*, 7(4), 120-125 pp.
- Pata, C., Akyüz, Ü., Erzin, Y., and Mercan, A.,** 2010, Double-balloon enteroscopy: the diagnosis and management of small bowel diseases, *The Turkish Journal of Gastroenterology: The Official Journal of Turkish Society of Gastroenterology*, 21(4), 353-359 pp.
- Pena-Ramos, E. A., and Xiong, Y. L.,** 2001, Antioxidative activity of whey protein hydrolysates in a liposomal system, *Journal of Dairy Science*, 84(12), 2577-2583 pp.
- Perez Espitia, P. J., de Fátima Ferreira Soares, N., dos Reis Coimbra, J. S., de Andrade, N. J., Souza Cruz, R., Medeiros, A., and Antonio, E.,** 2012, Bioactive peptides: synthesis, properties, and applications in the packaging and preservation of food, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(2), 187-204 pp.
- Pirisi-Hauck, N. C., Foss, H. D., Baier, J., and Kurunczi, S.,** 2000, Simultaneous occurrence of autoimmune enteropathy and recurrent deep venous thrombosis, *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 30(3), 324-329 pp.
- Polgar, L.,** 2002, The prolyl oligopeptidase family, *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 59(2), 349-362 pp.
- Polgar, L.,** 1995, Effects of ionic strength on the catalysis and stability of prolyl oligopeptidase, *Biochem. J*, 312, 267-271 pp.
- Polgar, L.,** 2005, The catalytic triad of serine peptidases, *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 62(19-20), 2161-2172 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., and Belfrage, G.,** 1975, Metal chelateaffinity chromatography, a new approach to protein fractionation, *Nature*,258: 598–599 pp.
- Portevin, B., Benoist, A., Rémond, G., Hervé, Y., Vincent, M., Lepagnol, J., and De Nanteuil, G.,** 1996, New prolyl endopeptidase inhibitors: in vitro and in vivo activities of azabicyclo [2.2. 2] octane, azabicyclo [2.2. 1] heptane, and perhydroindole derivatives, *Journal of Medicinal Chemistry*, 39(12), 2379-2391 pp.
- Pratt, G., Hough, R., and Rechsteiner, M.,** 1989, Proteolysis in heat-stressed HeLa cells.Stabilization of ubiquitin correlates with the loss of proline endopeptidase, *J. Biol. Chem.* 264, (21), 12526-12532 pp.
- Qi, B., Chen, X., and Wan, Y.,** 2010, Pretreatment of wheat straw by nonionic surfactant-assisted dilute acid for enhancing enzymatic hydrolysis and ethanol production, *Bioresource Technology*, 101(13), 4875-4883 pp.
- Rai, S., Aggarwal, K.K., Mitra, B., Das, T.K., and Babu, C.R.,** 2010,Purification, characterization and immunolocalization of a novel protease inhibitor from hemolymph of tasar silkworm, *Antheraea mylitta*, *Peptides*,31(3):474-81 pp.
- Rawlings, N. D., and Barrett, A. J.,** 1993, Evolutionary families of peptidases, *Biochem. J*, 290, 205-218 pp.
- Rawlings, N. D., and Barrett, A. J.,** 1999, MEROPS: the peptidase database, *Nucleic Acids Research*, 27(1), 325-331 pp.
- Rawlings, N. D., Polgar, L., and Barrett, A. J.,** 1991, A new family of serine-type peptidases related to prolyl oligopeptidase, *Biochemical Journal*, 279, 907 pp.
- Rawlings, N. D., Tolle, D. P., and Barrett, A. J.,** 2004, MEROPS: the peptidase database, *Nucleic Acids Research*, 32(1), 160-164 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Rea, D., and Fülöp, V.,** 2006, Structure-function properties of prolyl oligopeptidase family enzymes, *Cell Biochemistry and Biophysics*, 44(3), 349-365 pp.
- Rea, D., Fülöp, P.,** 2006, Structure-Function Properties of Prolyl Oligopeptidase Family Enzymes, *Cell Biochemistry and Biophysics*, 44, 349-365 pp.
- Rennex, D., Hemmings, B.A., Hofsteenge, J., and Stone, S.R.,** 1991, cDNA Cloning of Porcine Brain Prolyl Endopeptidase and Identification of the Active-Site Seryl Residue, *Biochemistry* 30, 2195-2203 pp.
- Robinson, K. A., Bartley, D. A., Robb, F. T., and Schreier, H. J.,** 1995, A gene from the hyperthermophile *Pyrococcus furiosus* whose deduced product is homologous to members of the prolyl oligopeptidase family of proteases, *Gene*, 152(1), 103-106.
- Robner, S., Schulz, I., Zeitschel, U., Schliebs, R., Bigl, V., and Demuth, H. U.,** 2005, Brain prolyl endopeptidase expression in aging, APP transgenic mice and Alzheimer's disease, *Neurochemical Research*, 30(6-7), 695-702 pp.
- Rossner, S., Schulz, I., Zeitschel, U., Schliebs, R., Bigl, V., and Demuth, H. U.,** 2005, Brain prolyl endopeptidase expression in aging, APP transgenic mice and Alzheimer's disease, *Neurochemical Research*, 30(6-7), 695-702 pp.
- Ruoppolo, M., Amoresano, A., Pucci, P., Pascarella, S., Polticelli, F., Trovato, M., Menegatti, E., and Ascenzi, P.,** 2000, Characterization of five new lowmolecular-mass trypsin inhibitors from white mustard (*Sinapis alba* L.) seed, *European Journal of Biochemistry*, 267(21):6486-92 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Saito, M., Hashimoto, M., Kawaguchi, N., Shibata, H., Fukami, H., Tanaka, T., and Higuchi, N.,** 1991, Synthesis and inhibitory activity of acyl-peptidyl-pyrrolidine derivatives toward post-proline cleaving enzyme; a study of subsite specificity, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 5(1), 51-75 pp.
- Saka, B., Kaya, O., Ozturk, G. B., Erten, N., and Karan, M. A.,** 2010, Malnutrition in the elderly and its relationship with other geriatric syndromes, *Clinical Nutrition*, 29(6), 745-748 pp.
- Saka, E.,**2010, Pathophysiology of alzheimer's disease: experimental and genetic findings, *Turkish Journal of Geriatrics*, 13,21-26 pp.
- Salers, P.,** 1994, Evidence for the presence of prolyl oligopeptidase and its endogenous inhibitor in neonatal rat pancreatic β -cells, *Regulatory Peptides*, 50(3), 235-245 pp.
- Sambrook, J., Fritsch, E. E., and Maniatis, T.,**1989, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, New York:Cold Spring Harbour.
- Şanlıdere, H., and Öner, Z.,** 2006, Süt Ürünlerinde Bulunan Biyoaktif Peptitler ve Fonksiyonları, *Gıda Dergisi*, 31(6).
- Sattar, A. A., Yamamoto, N., Yoshimoto, T., and Tsuru, D.,** 1990, Purification and characterization of an extracellular prolyl endopeptidase from *Agaricus bispoms*, *Journal of Biochemistry*, 107(2), 256-263 pp.
- Schönlein, C., Heins, J., and Barth, A.,** 1990, Purification and characterization of prolyl endopeptidase from pig brain, *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*,371(2), 1159-1164 pp.
- Schulz, I., Gerhartz, B., Neubauer, A., Holloschi, A., Heiser, U., Hafner, M., and Demuth, H. U.,** 2002, Modulation of inositol 1, 4, 5-triphosphate concentration by prolyl endopeptidase inhibition, *European Journal of Biochemistry*, 269(23), 5813-5820 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Shan, L., Molberg, Ø., Parrot, I., Hausch, F., Filiz, F., Gray, G. M., Sollid, L. M., and Khosla, C.,** 2002, Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue, *Science*, 297(5590), 2275-2279 pp.
- Sharma, K. K., and Ortwerth, B. J.,** 1994, Purification and characterization of prolyl oligopeptidase from bovine lens, *Experimental Eye Research*, 59(1), 107-116 pp.
- Sharma, S., Singh, R., and Rana, S.,** 2011, Bioactive peptides: a review, *Int J Bioautomation*, 15(4), 223-250 pp.
- Shinohara, T., Aso, Y., Shirai, K., Fujii, H., and Funatsu, G.,** 1993, Purification of chymotrypsin inhibitors from larval hemolymph of the silkworm, *Bombyxmori*, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 57(7):1067-71 pp.
- Shirasawa, Y., Osawa, T., and Hirashima, A.,** 1994, Molecular cloning and characterization of prolyl endopeptidase from human T cells, *Journal of Biochemistry*, 115(4), 724-729 pp.
- Shishido, Y., Furushiro, M., Tanabe, S., Nishiyama, S., Hashimoto, S., Ohno, M., Yamamoto, T., and Watanabe, S.,** 1996, ZTTA, a postproline cleaving enzyme inhibitor, improves cerebral ischemia-induced deficits in a three-panel runway task in rats, *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 55(3), 333-338 pp.
- Siegel, M., Bethune, M. T., Gass, J., Ehren, J., Xia, J., Johannsen, A., Stuge, B. T., Gray, M. G., Lee, P. P., and Khosla, C.,** 2006, Rational design of combination enzyme therapy for celiac sprue, *Chemistry & Biology*, 13(6), 649-658 pp.
- Soeda, S.,** 1985, An Inhibitor of proline endopeptidase: purification from rat brain and characterization, *chemical and pharmaceutical Bulletin*, 33(6), 2445-2451 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Song, K. S., and Raskin, I.,** 2002, A Prolyl endopeptidase-inhibiting benzofuran dimer from *polyozellus multiflex*, *Journal of Natural Products*, 65(1), 76-78 pp.
- Stone, S. R., Rennex, D., Wikstrom, P., Shaw, E., and Hofsteenge, J.,** 1991, Inactivation of prolyl endopeptidase by a peptidylchloromethane. Kinetics of inactivation and identification of sites of modification, *Biochem. J.*, 276, 837-840 pp.
- Sun, H. X., Chen, L. Q., Zhang, J., and Chen, F. Y.,** 2014, Anti-tumor and immunomodulatory activity of peptide fraction from the larvae of *Musca domestica*, *Journal of Ethnopharmacology*, 153(3), 831-839 pp.
- Swanson, A. A., Davis, R. M., and McDonald, J. K.,** 1984, The identification of prolyl endopeptidase in bovine lenses: a preliminary report, *Current Eye Research*, 3(4), 659-661 pp.
- Szeltner, Z., Rea, D., Juhász, T., Renner, V., Fülöp, V., and Polgár, L.,** 2004, Concerted structural changes in the peptidase and the propeller domains of prolyl oligopeptidase are required for substrate binding, *Journal of Molecular Biology*, 340(3), 627-637 pp.
- Szwajcer-Dey, E. S. T. E. R. A., Rasmussen, J. O. H. N., Meldal, M. O. R. T. E. N., and Breddam, K. L. A. U. S.,** 1992, Proline-specific endopeptidases from microbial sources: isolation of an enzyme from a *Xanthomonas* sp, *Journal of Bacteriology*, 174(8), 2454-2459 pp.
- Tarragó, T., Martín-Benito, J., Sabidó, E., Claasen, B., Madurga, S., Gairí, M., Valpuesta, J. M., and Ankara E.,** 2009, A new side opening on prolyl oligopeptidase revealed by electron microscopy, *FEBS letters*, 583(20), 3344-3348.
- Tate, S. S.,** 1981, Purification and Properties of a Bovine Brain Thyrotropin-Releasing-Factor Deamidase, *European Journal of Biochemistry*, 118(1), 17-23 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Taylor, W. L., Andrews, P. C., Henrikson, C. K., and Dixon, J. E.,** 1980, New fluorogenic substrates for a rat brain proline endopeptidase, *Analytical Biochemistry*, 105(1), 58-64 pp.
- Telefoncu, A.,** 1997, İmmobilize enzimler, enzimoloji (yaz okulu), editor: A. Telefoncu, 193s..
- Tenorio-Laranga, J., Venalainen, J. I., Mannisto, P. T., Garcia-Horsman, J.A.,** 2008. Characterization of membrane-bound prolyl endopeptidase from brain, *FEBS J*, 275:4415–4427 pp.
- Terpe, K.,** 2003, Overview of tag protein fusions from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems, *Applied Microbiology and Biotechnology*, USA, 60: 523–533 pp.
- Toda, S., Obi, Y., Numata, K. I., Hamagishi, Y., Tomita, K., Komiyama, N., Kotake, C., Furumai, T., and Oki, T.,** 1992, Eurystatins A and B, new prolyl endopeptidase inhibitors. I. Taxonomy, production, isolation and biological activities, *The Journal of Antibiotics*, 45(10), 1573-1579 pp.
- Toide, K., Okamiya, K., Iwamoto, Y., and Kato, T.,** 1995, Effect of a Novel Prolyl Endopeptidase Inhibitor, JTP-4819, on prolyl endopeptidase Activity and Substance p and Arginine Vasopressin-Like Immunoreactivity in the Brains of Aged Rats, *Journal of Neurochemistry*, 65(1), 234-240 pp.
- Toide, K., Shinoda, M., Fujiwara, T., and Iwamoto, Y.,** 1997, Effect of a novel prolyl endopeptidase inhibitor, JTP-4819, on spatial memory and central cholinergic neurons in aged rats, *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 56(3), 427-434 pp.
- Tsuru, D.,** 1988, Prolyl endopeptidase from bovine testis: purification, characterization and comparison with the enzymes from other tissues, *chemical and pharmaceutical Bulletin*, 36(4), 1456-1462 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Udenfriend, S., and Meienhofer, J., (Eds.),** 2014, Opioid Peptides: Biology, Chemistry, and Genetics: The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology (Vol. 6). Elsevier.1-391 pp.
- Van Elzen, R., and Lambeir, A. M.,** 2011, Structure and function relationship in prolyl oligopeptidase, CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders), 10(3), 297-305 pp.
- Van Gool, A. R., Van Ojik, H. H., Kruit, W. H. J., Mulder, P. G. H., Fekkes, D., Bannink, M., Scharpe, S., Stoter, G., Eggermont, A.M., Maes, M., and Verkerk, R.,** 2004, Serum activity of prolyl endopeptidase, but not of dipeptidyl peptidase IV, is decreased by immunotherapy with IFN- α in high-risk melanoma patients, Journal of Interferon and Cytokine Research, 24(7), 411-415 pp.
- Vanhoof, G., Goossens, F., Hendriks, L., De Meester, I., Hendriks, D., Vriend, G., Van Broeckhoven, C., and Scharpe, S.,** 1994, Cloning and sequence analysis of the gene encoding human lymphocyte prolyl endopeptidase, Gene, 149(2), 363-366 pp.
- Venäläinen, J. I., Juvonen, R. O., and Männistö, P. T.,** 2004, Evolutionary relationships of the prolyl oligopeptidase family enzymes, European Journal of Biochemistry, 271(13), 2705-2715 pp.
- Venäläinen, J. I., Juvonen, R. O., Forsberg, M. M., Garcia-Horsman, A., Poso, A., Wallen, E. A., Gynther, J., and Männistö, P. T.,** 2002, Substrate-dependent, non-hyperbolic kinetics of pig brain prolyl oligopeptidase and its tight binding inhibition by JTP-4819, Biochemical Pharmacology, 64(3), 463-471 pp.
- Venäläinen, J. I., Juvonen, R. O., Männistö, P. T.,** 2004, Evolutionary relationships of the prolyl oligopeptidase family enzymes, Eur J Biochem 271:2705-2715 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Venäläinen, J., Wallen, E., Mannistö, P., Juvonen, R., Garcia-Horsman, J., Christiaans, J., Jarho, E. M., and Gynther, J.,** 2004, Slow-binding inhibitors of prolyl oligopeptidase with different functional groups at the P1 site, *Biochem. J.*, 382, 1003-1008 pp.
- Venturini, G., Menegatti, E., and Ascenzi, P.,** 1997 Competitive Inhibition of nitric oxide synthase byp-Aminobenzamidine, a serine proteinase inhibitor, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 232(1), 88-90 pp.
- Vercruysse, L., Smagghe, G., Beckers, T., and Van Camp, J.,** 2009, Antioxidative and ACE inhibitory activities in enzymatic hydrolysates of the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*, *Food Chemistry*, 114(1), 38-43 pp.
- Vinitsky, A., Michaud, C., Powers, J. C., and Orlowski, M.,** 1992, Inhibition of the chymotrypsin-like activity of the pituitary multicatalytic proteinase complex, *Biochemistry*, 31(39), 9421-9428 pp.
- Vlieghe, P., Lisowski, V., Martinez, J., and Khrestchatisky, M.,** 2010, Synthetic therapeutic peptides: science and market, *Drug discovery today*, 15(1), 40-56 pp.
- Wallén, E. A., Christiaans, J. A., Forsberg, M. M., Venäläinen, J. I., Männistö, P. T., and Gynther, J.,** 2002a, Dicarboxylic acid bis (L-prolyl-pyrrolidine) amides as prolyl oligopeptidase inhibitors, *Journal of Medicinal Chemistry*, 45(20), 4581-4584 pp.
- Wallén, E. A., Christiaans, J. A., Jarho, E. M., Forsberg, M. M., Venäläinen, J. I., Männistö, P. T., and Gynther, J.,** 2003, New prolyl oligopeptidase inhibitors developed from dicarboxylic acid bis (l-prolyl-pyrrolidine) amides, *Journal of Medicinal Chemistry*, 46(21), 4543-4551 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Wallén, E. A., Christiaans, J. A., Saario, S. M., Forsberg, M. M., Venäläinen, J. I., Paso, H. M., Mannistö, P. T., and Gynther, J.,** 2002b, 4-Phenylbutanoyl-2 (S)-acylpyrrolidines and 4-phenylbutanoyl-L-prolyl-2 (S)-acylpyrrolidines as prolyl oligopeptidase inhibitors, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 10(7), 2199-2206 pp.
- Walls, D., Loughran, S. T., Madadlou, A., O'Sullivan, S., and Sheehan, D.,** 2011, Protein chromatography, Totowa: Humana Press, New York City, 311-312 pp .
- Walter, R.,** 1976, Partial purification and characterization of post-proline cleaving enzyme:: Enzymatic inactivation of neurohypophyseal hormones by kidney preparations of various species, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 422(1), 138-158 pp.
- Walter, R., Shlank, H., Glass, J. D., Schwartz, I. L., and Kerenyi, T. D.,** 1971, Leucylglycinamide released from oxytocin by human uterine enzyme, *Science*, 173(3999), 827-829 pp.
- Wang, M. X., Zhong, C., Cai, Q. F., Liu, G. M., Zhang, L., Hara, K., Su, W.J., and Cao, M. J.,** 2012, Study on a prolyl endopeptidase from the skeletal muscle of common carp (*Cyprinus carpio*), *Process Biochemistry*, 47(12), 2211-2218 pp.
- Wilk, S., and Orlowski, M.,** 1983, Inhibition of Rabbit Brain Prolyl Endopeptidase by N-Benzylloxycarbonyl-Prolyl-Prolinal, a Transition State Aldehyde Inhibitor, *Journal of Neurochemistry*, 41(1), 69-75 pp.
- Wilk, S., Benuck, M., Orlowski, M., and Marks, N.,** 1979, Degradation of luteinizing hormone—Releasing hormone (LHRH) by brain prolyl endopeptidase with release of des-glycinamide LHRH and glycineamide, *Neuroscience Letters*, 14(2), 275-279 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Williams, R. S. B., Eames, M., Ryves, W. J., Viggars, J., and Harwood, A. J.,** 1999, Loss of a prolyl oligopeptidase confers resistance to lithium by elevation of inositol (1, 4, 5) trisphosphate, *The EMBO journal*, 18(10), 2734-2745 pp.
- Williams, R. S., and Harwood, A. J.,** 2000, Lithium therapy and signal transduction, *Trends in Pharmacological Sciences*, 21(2), 61-64 pp.
- Wilson, J., Hayes, M., and Carney, B.,** 2011, Angiotensin-I-converting enzyme and prolyl endopeptidase inhibitory peptides from natural sources with a focus on marine processing by-products, *Food Chemistry*, 129(2), 235-244 pp.
- Xue, Q.G., Waldrop, G.L., Schey, K.L., Itoh, N., Ogawa, M., Cooper, R.K., Losso, J.N., and La Peyre, J.F.,** 2006, A novel slow-tight binding serine protease inhibitor from eastern oyster (*Crassostrea virginica*) plasma inhibits perkinsin, the major extracellular protease of the oyster protozoan parasite *Perkinsus marinus*, *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology*, 145(1):16-26 pp.
- Yanai, T., Suzuki, Y., and Sato, M.,** 2003, Prolyl endopeptidase inhibitory peptides in wine, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 67(2), 380-382 pp.
- Yang, X., Wang, Y., Lu, Z., Zhai, L., Jiang, J., Liu, J., and Yu, H.,** 2009, A novel serine protease inhibitor from the venom of *Vespa bicolor* Fabricius, *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology*, 153(1):116-20 pp.
- Yaron, A., Naider, F., and Scharpe, S.,** 1993, Proline-dependent structural and biological properties of peptides and proteins, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 28(1), 31-81 pp.
- Yiğit, N.,** 2003, Örümcek zehirlerinin antimikrobiyal aktivitesi. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 1(3), 1-9 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Yokosawa, H., Miyata, M., Sawada, H., and Ishii, S. I.,** 1983, Isolation and characterization of a post-proline cleaving enzyme and its inhibitor from sperm of the ascidian, *Halocynthia roretzi*, Journal of Biochemistry, 94(4), 1067-1076 pp.
- Yoshida, K., Inaba, K., Ohtake, H., and Morisawa, M.,** 1999, Purification and characterization of prolyl endopeptidase from the Pacific herring, *Clupea pallasii*, and its role in the activation of sperm motility, Development, Growth and Differentiation, 41(2), 217-225 pp.
- Yoshimoto, T. ., Tsukumo, K., Takatsuka, N., and Tsuru, D.,** 1982, An inhibitor for post-prolinecleaving endopeptidase, Distribution and partial purification from porcine pancreas, Journal of Pharmacobio-Dynamics, 9, 734-740 pp.
- Yoshimoto, T., Abdus Sattar, A. K. M., Hirose, W., and Tsuru, D.,** 1987, Studies on prolyl endopeptidase from carrot (*Daucus carot*): purification and enzymatic properties, Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology, 916(1), 29-37 pp.
- Yoshimoto, T., Nishimura, T., Taizo, K. I. T. A., and Tsuru, D.,** 1983, Post-proline cleaving enzyme (prolyl endopeptidase) from bovine brain, Journal of Biochemistry, 94(4), 1179-1190 pp.
- Yoshimoto, T., Ogita, K., Walter, R., Koida, M., and Tsuru, D.,** 1979, Post-proline cleaving enzyme: synthesis of a new fluorogenic substrate and distribution of the endopeptidase in rat tissues and body fluids of man, Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology, 569(2), 184-192 pp.
- Yoshimoto, T., Sattar, A. A., Hirose, W., and Tsuru, D.,** 1988, Studies on prolyl endopeptidase from shakashimeji (*Lyophyllum cinerascens*): purification and enzymatic properties, Journal of Biochemistry, 104(4), 622-627 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Yoshimoto, T., Simmons, W. H., Taizo, K. I. T. A., and Tsuru, D.,** 1981, Post-proline cleaving enzyme from lamb brain, *Journal of Biochemistry*, *90*(2), 325-334 pp.
- Yoshimoto, T., Walter, R., and Tsuru, D.,** 1980, Proline-specific endopeptidase from *Flavobacterium*. Purification and properties, *Journal of Biological Chemistry*, *255*(10), 4786-4792 pp.
- Zambrowicz, A., Timmer, M., Polanowski, A., Lubec, G., and Trziszka, T.,** 2013, Manufacturing of peptides exhibiting biological activity, *Amino acids*, *44*(2), 315-320 pp.
- Zhao, Y., Jin, Y., Wei, S.S., Lee, W.H., and Zhang, Y.,** 2005, Purification and characterization of an irreversible serine protease inhibitor from skin secretions of *Bufo andrewsi*, *Toxicon*, *46*(6):635-40 pp.

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyadı : Ebru KOCADAĞ KOCAZORBAZ
Doğum Tarihi : 27.08.1981
Doğum Yeri : Bornova-İZMİR
Medeni Hali : Evli
Uyruğu : T.C
E-mail : kocadage@hotmail.com
Yabancı Dili : İngilizce

1. EĞİTİM DURUMU

Okul	Derece	Yıl
Süleyman Demirel Üniversitesi	B.Sc. (Biyoloji)	2003
Ege Üniversitesi	M.Sc. (Biyokimya)	2009
Ege Üniversitesi	Ph D.(Biyokimya)	2015

2. AKADEMİK DENEYİM

GÖREV TARİHİ	ÜNVAN	ÜNİVERSİTE	BÖLÜM
2005-	Araş.Gör.	Ege Üniversitesi	Biyokimya

3. Uluslararası bilimsel toplantılarda yayınlanmış bildiriler

- **Kocadağ, E.**, Sarıkaya, D., Telefoncu, A., Topçu, Z., 'Effects of Nick Formation on DNA Substrates via uv-irradiation The Kinetic Parameters of Mamamlian DNA Topoisomerase ', 31th FEBS Congress, Molecules in Health- Disease ,24-29 June 2006, Istanbul -TURKEY - (poster bildirisi)
- **Kocazorbaz, K. E.**, Zencir, S., Odacı, D., Timur, S., Telefoncu, A., 'Lipoxygenase Based Biosensor For Caffeic Acid Determination' 7th Workshop on Biosensors and Bioanalytical Mikro-techniques in Environmental and Clinical Analysis - 10-14 september 2006, Kuşadası, IZMİR-TURKEY
- **Ebru K. Kocazorbaz,** Serap EVRAN, 'DIRECTED MOLECULAR EVOLUTION OF ENZYMES 'International Enzyme Engineering Symposium, IEES'08, 01-05 October 2008, Kuşadası, Türkiye
- **Ebru K. Kocazorbaz,** F.Zihnioğlu, Bazı Medikal Gıdaların Sulu Ekstraktları ile Protein Glikasyonunun İnhibisyonu, XXII. Ulusal Biyokimya Kongresi, 27-30 Ekim 2010

- **Ebru K. Kocazorbaz**, Azmi TELEFONCU, Afif BERDELİ, The relationship Between mRNA Expression and MEFV Gene Mutations in Patients with Familial Mediterranean Fever, “The International Congress on Bioinformatics and Biomics” 18-22 May, 2011. Kuşadası, TURKEY
- H. Kübra Kani, **Ebru K. Kocazorbaz**, “General Approach to Bioactive Peptide Production” 19-22 Ekim 2014, Kuşadası, TURKEY.

4. Ulusal bilimsel toplantılarda yayınlanmış bildirileri

- Kamer H., **Kocazorbaz K.E.**, Zeytunluoğlu A., Zihnioğlu F., Bazı Bitki Ekstraktların Glutasyon-S-Transferaz Aktivitesi Üzerine Etkisi ve Polifenol İçeriği ile İlişkisinin İncelenmesi. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi 3-7 Eylül 2012. EGE Üniversitesi, İZMİR
- Çelik D., Akşit E., Zeytunluoğlu A., **Kocazorbaz K.E.**, Zihnioğlu F., Bazı Bitkilerin α -Glukosidaz ve α -Amilaz İnhibisyon Etkinliklerinin Belirlenmesi. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi 3-7 Eylül 2012. EGE Üniversitesi, İZMİR
- **Ebru K. Kocazorbaz**, Figen ZİHNİOĞLU, *Cyclamen mirabile*'den Konkovalin A Afinité Kromatografisi ile Lektin Saflaştırılması., Kromatografi 2013, 19-22 Haziran BURSA
- **Kocazorbaz, Ebru**, Abas, Burçin İrem, Zihnioğlu Figen, Bazı Bileşiklerin Deglikasyon ve Metal-Şelatlama Etkinliklerinin Belirlenmesi. XXV. Ulusal Biyokimya Kongresi, 3-6 Eylül 2013, İzmir. Türkiye
- **Kocazorbaz, Ebru**, Yaşar Ayşegül, Zihnioğlu Figen, Biyoaktif Peptidlerin Ekstraksiyonunda Kullanılan Yöntemlerin Kıyaslanması. XXV. Ulusal Biyokimya Kongresi, 3-6 Eylül 2013, İzmir. Türkiye

5. Sonuçlandırılmış araştırma projeleri:

- Ailesel Akdeniz Ateşli Hastalarda MEFV Gen Mutasyonlarının mRNA Ekspresyonu ile İlişkisi (Ege Üniv BAP Projesi)
- Prolin- Spesifik Endopeptidazların Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Proteolitik Proseslerde Kullanım Potansiyelinin Araştırılması (Ege Üniv BAP Projesi 2010 FEN 004)

6. Devam Eden Araştırma Projeleri

- Çeşitli Kaynaklarda Peptid Temelli Deglikasyon Ajanlarının Araştırılması ve İzolasyonu (Tübitak 1002, 2015=)

7. DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

- Real Time qPCR çalıştayı, ODTÜ Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü ,22-24 Aralık, ANKARA ,2006 - 2006
- Apoptozis, Hastalıklarla ilişkisi ve Güncel Belirleme Yöntemleri,Teaching Workshop on Apotozis, DEÜ, Sağlık Bilimleri Enstitüsü,7-8 Aralık, İzmir ,2006
- Temel Moleküler Biyolojik Yöntemler Kursu 14-16 Şubat,Ege Üniversitesi,Eczacılık Fakültesi,Türk Biyokimya Derneği İZMİR,2007
- Kanser Biyokimyası Sempozyumu, Ege Üniversitesi Bilim-Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (EBİLTEM), 02.03.2007
- Proteomik'e Giriş: 2D Elektroforez teknikleri ve Kütle Spektrometrisi uygulamalı Eğitim Kursu,Marmara Üniversitesi,mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü,24-27 Nisan, 2007,İSTANBUL,2007
- The workshop on Recent Advances in Applications of Bioinformatics and Biomics,Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü,12-14 Temmuz,İzmir,2010 - 2010
- “PROTEOMİK: Temel Bilgiler ve Uygulama Örnekleri” semineri, Dokuz Eylül Üniversitesi, İZMİR, 2011.
- UHPLC-kromatografiye giriş, HPLC , Kolonlar ve ileri Uygulama Teknikleri semineri, EGE Üniversitesi, Fen Fak. Kimya Böl. İzmir,2012.
- Optimization Techniques for Western Blot, Immunoprecipitation, and Immunohistochemistry. Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir,2012
- Discrimination Between self and nonself by the complement system. Türk Biyokimya Derneği. İzmir,2012
- Hastalıkta ve Sağlıkta Hücre İçi Protein Kalite Kontrolü ve yıkım Yolakları. Türk Biyokimya Derneği.İzmir,2013
- 1.uygulamalı Lisansüstü Kromatografi Yaz Okulu., Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi,Çanakkale 2013 ÇANAKKALE
- 7.Ulusal Afinite Teknikleri Kongresi. Ege Üniversitesi, 13-15 Eylül 2013.İzmir/Çeşme

- Proteom Analiz Teknikleri Uygulamalı Eğitimi, TÜBİTAK Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, 01-05 Ekim 2012.

8. Üyesi olduğu bilimsel kuruluşlar

- Türk Biyokimya Derneği