



**BENZOHİDRAZİD TÜREVLERİ KULLANILARAK
HORSERADİSH PEROKSİDAZ (HRP) ENZİMİNİN
TEK BASAMAKTA SAFLAŞTIRILMASI**

Züleyha ALMAZ

Doktora Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Bilim Dalı

Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

2016

Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**BENZOHİDRAZİD TÜREVLERİ KULLANILARAK
HORSERADISH PEROKSİDAZ (HRP) ENZİMİNİN TEK
BASAMAKTA SAFLAŞTIRILMASI**

Züleyha ALMAZ

KİMYA ANABİLİM DALI
Biyokimya Bilim Dalı

ERZURUM
2016

Her Hakkı Saklıdır



**T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



TEZ ONAY FORMU

**BENZOİDRAZİD TÜREVLERİ KULLANILARAK HORSERADİSH
PEROKSİDAZ (HRP) ENZİMİNİN TEK BASAMAKTA SAFLAŞTIRILMASI**

Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR danışmanlığında, Züleyha ALMAZ tarafından hazırlanan bu çalışma .../.../2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı – Biyokimya Bilim Dalı’nda Doktora tezi olarak **oybirliği / oyçokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

İmza :

Üye : Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR

İmza :

Üye : Doç. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU

İmza :

Üye : Doç. Dr. Murat ÇANKAYA

İmza :

Üye : Doç. Dr. Veysel ÇOMAKLI

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 29/12/2016 tarih ve 50/30 nolu kararı ile onaylanmıştır.

**Prof. Dr. Cavit KAZAZ
Enstitü Müdürü**

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

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

ÖZET

Doktora Tezi

BENZOHİDRAZİD TÜREVLERİ KULLANILARAK HORSERADİSH PEROKSİDAZ (HRP) ENZİMİNİN TEK BASAMAKTA SAFLAŞTIRILMASI

Züleyha ALMAZ

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

Bu çalışmada Horseradish Peroksidaz (HRP) enziminin inhibitörleri olan 4-Amino benzohidrazid ve türevi moleküller kullanılarak bu enziminin tek basamakta saflaştırması hedeflendi. Literatürde bulunan Horseradish Peroksidaz (HRP) enziminin saflaştırma çalışmalarına katkı sağlamak amacıyla ilk defa 4-Amino benzohidrazid ve türevleri olan 4-Amino 2-bromo benzohidrazid, 4-Amino 3-kloro benzohidrazid, 4-Amino 2-kloro benzohidrazid moleküller ligand olarak kullanılıp, bu enziminin saflaştırılması çalışmasına uygulandı. Kullandığımız 4-Amino benzohidrazid türevi moleküllerin metilbenzoat formlarından hidrazin sentezleri yapılarak Horseradish Peroksidaz (HRP) enzimi üzerine inhibisyon etkileri incelendi ve dönüşümlü inhibisyon gösteren moleküller Sepharose-4B-L-Tirozin jel materyaline bağlanarak elde edilen afinite jelleri ile tek kademede Horseradish Peroksidaz (HRP) enziminin saflaştırılması gerçekleştirildi.

4-Amino benzohidrazid molekülü kullanıldığında Horseradish POD enzimi, %1,8 verimle 45,4 kat, 4-Amino 2-kloro benzohidrazid molekülü kullanıldığında Horseradish POD enzimi, %4,46 verimle 149 kat, 4-Amino 3-kloro benzohidrazid ile %4,7 verimle 102,3 kat, 4-Amino 2-bromo benzohidrazid ile %3,2 verimle 129 kat, saflaştırma yapıldı. Bu kolonlardan saflaştırılan enzimin molekül ağırlığı ve saflığı SDS-PAGE ile kontrol edildi. Horseradish Peroksidaz (HRP) enzimi için 44 kDa'da tek bant gözlemlendi. Tüm kolonların saflaştırma sonuçları karşılaştırıldı ve en iyi kolon olan Sepharose-4B-L-Tirozin-4-Amino-2-kloro benzohidrazid kolonu için kolon tutma kapasitesi, Horseradish Peroksidaz (HRP)enzimi için değişik pH, sıcaklık, iyonik şiddetlerde çalışıldı. Bu sonuçlara göre, 4-Amino 2-kloro benzohidrazid için 20°C'de pH 9,0'da 0,35 M iyonik şiddet konsantrasyonunda optimum bağlanma 2,99 mg/g jel olarak tespit edildi. Guaiakol substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik yapılan çalışma sonuçlarında Horseradish (*Armoracia rusticana*) POD enzimi için K_M değeri 4,34 mM ve V_{max} değeri 0,97 EÜ/mL.dk olarak tespit edildi.

2016, 91 sayfa

Anahtar Kelimeler: Horseradish Peroksidaz (HRP), Afinite kromatografisi, Saflaştırma, 4-Amino benzohidrazid ve türevleri

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

ONE STEP PURIFICATION OF HORSERADISH PEROXIDASE (HRP) ENZYME USING BENZOHYDRAZIDE DERIVATIVES

Züleyha ALMAZ

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

Advisor: Prof.Dr. Hasan ÖZDEMİR

In this thesis study, it was aimed to establish a purification procedure in one step for Horseradish Peroxidase (HRP) enzymes by using 4-Amino benzohydrazide and its derivative molecules which are the inhibitors of the HRP enzymes. In order to contribute to the purification studies in the literature of HRP enzyme, 4-Amino benzohydrazide and its derivatives which are 4-Amino 2-bromo benzohydrazide, 4-Amino 3-chloro benzohydrazide, and 4-Amino 2-chloro benzohydrazide molecules were used as ligands and first applied to the study of purification of HRP enzyme. The inhibition effects on the Horseradish Peroxidase (HRP) enzyme were investigated by hydrazine synthesis from the methyl benzoate forms of the 4-amino benzohydrazide derivative molecules we used and the purification of the single-stranded Horseradish Peroxidase (HRP) enzyme was performed by affinity gels obtained by binding molecules with alternating inhibition to Sepharose-4B-L-Tyrosine gel material.

Using a 4-Aminobenzohydrazide molecule, the Horseradish POD enzyme is purified with a yield of 1.8%, 45.4 fold, when the 4-amino 2-chloro benzohydrazide molecule is used the purification result is with a yield of 4.46%, 149 fold, with the 4-amino 3-chloro benzohydrazide the enzyme is purified with a yield of 4.7%, 102.3 fold, finally using a 4-amino 2-bromo benzohydrazide the enzyme purification is 129 fold with a yield of 3.2%. The molecular weight and enzyme purity of the enzymes purified from all the columns were controlled by SDS-PAGE. Single band at 44 kDa for the Horseradish peroxidase enzyme were observed. The purification results of all the columns were compared and the column holding capacity for Sepharose-4B-L-Tyrosine-4-amino-2-methoxy benzohydrazide showing the result of being the best column, for the Horseradish peroxidase enzymes were studied different pH, temperature and ionic strengths. According to these results, the optimum binding of Horseradish peroxidase enzyme for 4-amino 2-chloro benzohydrazide molecule was determined as 2.99 mg/g gel at 20°C, pH 9.0 and at 0.35 ionic intensity concentration. In the results of the studies aimed at finding the K_M and V_{max} values for the Guaiacol substrate, The K_M and the V_{max} values were found as 4.34 mM and 0.97 EU / mL.min respectively for the Horseradish (*Armoracia rusticana*) POD enzyme.

2016, 91 pages

Keywords: Horseradish Peroxidase (HRP), Affinity chromatography, Purification, 4-Amino benzohydrazide and derivatives

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışma Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR yönetiminde Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Değerli hocam Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR'e şükranlarımı sunarım.

Araştırma Görevlisi olarak görev yaptığım Muş Alparslan Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'ne, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünün bütün imkânlarını benden esirgemeyen Bölüm Başkanlığı'na, Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVOĞLU'na, Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN'e, Sayın Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR'e, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Sayın Doç. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU'na, Sayın Yrd. Doç. Dr. Halis ŞAKİROĞLU'na,

Eğitimim süresince desteklerini esirgemeyen aileme ve eşime teşekkürlerimi sunarım.

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

Züleyha ALMAZ

Aralık, 2016

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Horseradish (<i>Armoracia Rusticana</i>) Peroksidazı (HRP).....	10
1.2. Afinite Kromatografisi	20
2. KAYNAK ÖZETLERİ	22
2.1. Çalışmanın Amacı	25
3. MATERYAL ve YÖNTEMLER.....	27
3.1. Materyal.....	27
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler	27
3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar	27
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması	28
3.2. Yöntemler	31
3.2.1. Protein tayini	31
3.2.1.a. Kalitatif protein tayini	31
3.2.1.b. Bradford protein tayin yöntemi	32
3.2.2. Horseradish Peroksidaz aktivitesi tayini	33
3.3. Horseradish Bitkisinden Peroksidaz Enziminin Saflaştırılması Çalışmaları	34
3.3.1. Ligand seçimi	34
3.3.2. 4-Amino benzohidrazid türevlerinin sentezlenmesi.....	35
3.3.3. İnhibitör çalışmaları	36
3.3.3.a. 4-Amino benzohidrazid ve türevlerinin enzim aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesi	36
3.3.4. Sepharose-4B-L-tirozin afinite jelinin hazırlanması	36
3.3.4.a. CNBr ile aktifleştirilmiş sepharose-4B'ye tirozin takılması	37

3.3.4.b. 4-aminobenzohidrazid ve türevlerinin kenetlendirilmesi:	37
3.3.5. Afinite kolonlarının paketlenmesi	38
3.3.5.a. Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu	38
3.4. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrophorezi İle Enzim Saflığının Belirlenmesi	39
3.5. Horseradish bitkisinden saflaştırılan HRP Enzimi İçin Kinetik Çalışmalar	40
3.5.1. Optimum pH çalışmaları	40
3.5.2. Optimum sıcaklık çalışması	41
3.5.3. Stabil pH çalışmaları	41
3.5.4. K_M ve V_{max} değerlerinin bulunması	41
3.6. Afinite Kolonunun Horseradish Peroksidaz Enzimini Tutma Kapasitesinin Bulunması	42
3.6.1. Sıcaklığın kolon kapasitesine etkisi	42
3.6.2. pH'nın kolon kapasitesine etkisi	42
3.6.3. İyonik şiddetin kolon kapasitesine etkisi	43
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	44
4.1. Horseradish Peroksidaz Enzimi ile İlgili Yapılan Araştırma Bulguları	44
4.1.1. Kantitatif protein tayini için kullanılan standart grafik	44
4.2. Horseradish Bitkisinden POD Enziminin Saflaştırılması Sonuçları	45
4.2.1. Horseradish POD enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırma sonuçları	45
4.2.2. Horseradish POD enziminin 4-Amino Benzohidrazid Kolonu ile saflaştırma sonuçları	46
4.2.3. SDS-Poliakrilamid jel elektrophorezi sonuçları	46
4.2.4. Guaiakol substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik yapılan çalışma sonuçları	47
4.3. Kullanılan İnhibitörün K_i ve IC_{50} Değerlerinin Bulunmasına Yönelik Yapılan Çalışma Sonuçları	48
4.4. 4-Amino Benzohidrazid Türevlerinin Sentezlenmesi	51
4.5. Sentezlenen 4-Amino Benzohidrazid Türevlerinin K_i ve IC_{50} Değerlerinin Belirlenmesi	54

4.5.1. 4-Amino 2-kloro benzohidrazid inhibitörü için Horseradish (<i>Armoracia rusticana</i>) POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan kinetik çalışmalar	55
4.5.2. 4-Amino 3-kloro benzohidrazid inhibitörü için Horseradish (<i>Armoracia rusticana</i>) POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan kinetik çalışmalar	58
4.5.3. 4-Amino 2-bromo benzohidrazid inhibitörü için Horseradish (<i>Armoracia rusticana</i>) POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan kinetik çalışmalar	61
4.6. Horseradish Peroksidaz Enzimi Üzerine SDS-PAGE ve Kinetik Çalışma Sonuçları.....	65
4.6.1. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi sonuçları.....	65
4.6.2. 4-Amino 2-kloro benzohidrazid inhibitörü ile saflaştırılan HRP enzimi için guaiakol substratı ile bulunan kinetik parametreler	66
4.6.3. Guaiakol substratı için pH-aktivite grafiği	66
4.6.4. Guaiakol substratı için sıcaklık-aktivite grafiği	67
4.6.5. Stabil pH çalışması.....	67
4.7. Horseradish bitkisinden 4-Amino 2-kloro benzohidrazid Molekülü ile Hazırlanan Afinite Kolonunun HRP enzimi Tutma Kapasitesinin Belirlenmesi	68
4.7.1. Sıcaklığın kolon kapasitesine etkisi çalışma sonuçları.....	68
4.7.2. pH'nın kolon kapasitesine etkisi	69
4.7.3. İyonik şiddetin kolon kapasitesine etkisi.....	70
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	71
KAYNAKLAR	84
ÖZGEÇMİŞ	92

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ABTS	2,2' - azino-bis 3-etilbenzotiazolin-6-sulfonic asit
DMSO	Dimetil sülfoksit
E:C	Enzim kod numarası
HRP	Horseradish Peroksidaz (At turpu, yaban turpu, bayır turpu peroksidazı)
IC ₅₀	Enzimin aktivitesini yarıya indiren inhibitör konsantrasyonu
K _i	Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti
K _M	Maksimum hızın yarısına neden olan substrat derişimi
PABH	Para amino benzoikhidrazid (4-Amino benzohidrazid)
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
POD	Peroksidaz
SDS	Sodyum dodesilsülfat
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin
TLC	İnce tabaka kromatografisi
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidin
Tris	Trihidroksimetil aminometan
PEG	Polietilenglikol

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Farklı protein aileleri arasında filogenetik ilişkinin şematik gösterimi	3
Şekil 1.2. Peroksidazın katekol substratını kullanarak hidrojen peroksiti giderme mekanizması	4
Şekil 1.3. Guaiakol substratının peroksidaz enzimi tarafından guaiakolun renkli oksidasyon ürünlerine çevrilme mekanizması	5
Şekil 1.4. Guaiakol substratı varlığında peroksidaz enziminin reaksiyon katalizleme döngüsü	6
Şekil 1.5. HRP C'nin x ışını kristal yapısı	12
Şekil 1.6. İndirgeyici substrat olarak ferulat ile Horseradish Peroksidaz (HRP C)'nin katalitik döngüsü	16
Şekil 1.7. Afinite kromatografisinin genel prensibi	21
Şekil 3.1. Guaiakol substratının yükseltgenme denklemi	33
Şekil 3.2. Horseradish Peroksidaz (HRP) inhibitörü ve ligand olarak kullanılan moleküller	35
Şekil 3.3. 4-Amino benzohidrazid türevlerinin sentezlendiği genel reaksiyon şeması ..	35
Şekil 3.4. CNBr ile aktifleştirilmiş sepharose-4B'ye tirozin takılması reaksiyonu	37
Şekil 3.5. 4-Amino benzohidrazid ve türevi moleküllerin Sepharose-4B-L-Tirozin'e kenetlendirilmesi reaksiyonu	38
Şekil 4.1. Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayini için kullanılan standart grafik	44
Şekil 4.2. 4-Amino benzohidrazid kolonundan Bayır turpu POD (HRP) enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırma sırasında elüatların 280 nm'deki absorbanslarını ve 470 nm'deki aktivitelerini gösteren grafik	45
Şekil 4.3. 4-Amino benzohidrazid kolonundan saflaştırılan HRP enziminin SDS- PAGE fotoğrafı	47
Şekil 4.4. HRP enziminin guaiakol substratıyla elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği	48
Şekil 4.5. HRP enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 4-Amino benzohidrazid inhibitörü ile elde edilen % Aktivite-Konsantrasyon grafiği ..	49

Şekil 4.6. HRP enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 4-Amino benzohidrazid inhibitörü için edilen $1/V-1/[S]$ grafiği	51
Şekil 4.7. 4-Amino 2-kloro benzohidrazid molekülünün 400 MHz $^1\text{H-NMR}$ spektrumu	52
Şekil 4.8. 4-Amino 3-kloro benzohidrazid molekülünün 400 MHz $^1\text{H-NMR}$ spektrumu	53
Şekil 4.9. 4-Amino 2-bromo benzohidrazid molekülünün 400 MHz $^1\text{H-NMR}$ spektrumu	54
Şekil 4.10. HRP enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 4-Amino 2-kloro benzohidrazid ile elde edilen % Aktivite-Konsantrasyon grafiği	56
Şekil 4.11. HRP enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 4-Amino 2-kloro benzohidrazid inhibitörü için edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	57
Şekil 4.12. HRP enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 4-Amino 3-kloro benzohidrazid ile elde edilen % Aktivite-Konsantrasyon grafiği	58
Şekil 4.13. HRP enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 4-Amino 3-kloro benzohidrazid inhibitörü için edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	60
Şekil 4.14. HRP enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 4-Amino 2-bromo benzohidrazid ile elde edilen % Aktivite-Konsantrasyon grafiği	61
Şekil 4.15. HRP enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 4-Amino 2-bromo benzohidrazid inhibitörü için edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	63
Şekil 4.16. (1) 4-Amino 2-kloro benzohidrazid, (2) 4-Amino 3-kloro benzohidrazid, (3) 4-Amino 2-bromo benzohidrazid afinite kolonlarından saflaştırılan HRP enziminin SDS-PAGE fotoğrafı	65
Şekil 4.17. Horseradish POD enzimi için guaiakol substratıyla optimum pH için pH-aktivite grafiği	66
Şekil 4.18. Horseradish POD enzimi için guaiakol substratıyla elde edilen Sıcaklık-Aktivite grafiği	67
Şekil 4.19. Değişik pH'lardaki KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak HRP enzimi için elde edilen stabil pH grafiği	68
Şekil 4.20. Sepharose-4B-4-Amino 2-kloro benzohidrazid jelinin sıcaklık-kapasite grafiği	69

Şekil 4.21. Sepharose-4B-4-Amino 2-kloro benzohidrazid jelinin pH-kapasite grafiği	69
Şekil 4.22. Sepharose-4B-4-Amino 2-kloro benzohidrazid jelinin iyonik şiddet [M]-kapasite grafiği	70



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. 25°C’de HRP için Belirlenmiş Kinetik Karakteristikler	18
Çizelge 4.1. HRP enziminin 4-Amino benzohidrazid kolonundan saflaştırma basamakları sonuçları	46
Çizelge 4.2. Horseradish (<i>Armoracia rusticana</i>) POD enzimi için K_M ve V_{max} değerleri	48
Çizelge 4.3. 4-Amino benzohidrazid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen HRP enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan % Aktivite- Konsantrasyon deney prosedürü	49
Çizelge 4.4. HRP enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 4-Amino benzohidrazid inhibitörü için $1/V$, $1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü	50
Çizelge 4.5. HRP enzimi üzerine 4-Amino benzohidrazid inhibitörünün inhibisyon etkisi	51
Çizelge 4.6. 4-Amino benzohidrazid türevleri sentez sonuçları	52
Çizelge 4.7. 4-Amino 2-kloro benzohidrazid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen HRP enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan % Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü	55
Çizelge 4.8. HRP enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 4-Amino 2-kloro benzohidrazid inhibitörü için $1/V$, $1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü	56
Çizelge 4.9. HRP enzimini üzerine 4-Amino 2-kloro benzohidrazid inhibitörünün inhibisyon etkisi	57
Çizelge 4.10. 4-Amino 3-kloro benzohidrazid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen HRP enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan % Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü	58
Çizelge 4.11. HRP enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 4-Amino 3-kloro benzohidrazid inhibitörü için $1/V$, $1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü	59
Çizelge 4.12. HRP enzimi üzerine 4-Amino 3-kloro benzohidrazid inhibitörünün inhibisyon etkisi	60

Çizelge 4.13. 4-Amino 2-bromo benzohidrazid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen HRP enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan % Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü	61
Çizelge 4.14. HRP enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 4-Amino 2-bromo benzohidrazid inhibitörü için $1/V$, $1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü	62
Çizelge 4.15. HRP enzimini üzerine 4-Amino 2 bromo benzohidrazid inhibitörünün inhibisyon etkisi.....	63
Çizelge 4.16. HRP enzimi üzerine ligand moleküllerin toplu kinetik sonuçları	63
Çizelge 4.17. Afinite kolonlarından elde edilen HRP enzimi için hazırlanan saflaştırma tablosu	64

1. GİRİŞ

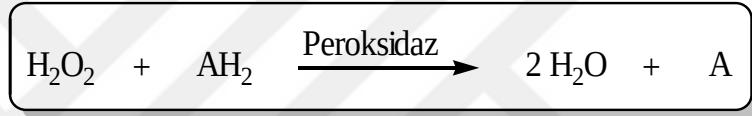
Canlılığın sürdürülebilmesi, biyolojik ortamda kimyasal reaksiyonların yüksek verimlilik ile gerçekleştirilmesi ve fonksiyonlar için gerekli enerjinin sağlanması ile mümkündür. Birçok canlıda enerjinin sağlanması egzergonik bir süreç gerektirir. Bu kimyasal süreç oldukça yavaş ilerlemektedir. Ancak insanda ve diğer birçok organizmada kimyasal enerji saniyeler içerisinde elde edilebilir. Bu farka sebep olan biyolojik katalizörlerdir. Biyolojik katalizörler enzim denilen özelleşmiş biyomoleküllerdir (Gürdöl ve Ademoğlu 2013). Bu biyomoleküller, kimyasal dönüşümleri sağlayan moleküler makinalardır. Enerjinin bir formdan diğer forma dönüşümünü sağlarlar. Enzimlerin en önemli özellikleri katalitik güçleri ve özgül olmalarıdır (Berg *et al.* 2014). Reaksiyonun hızını 10^5 - 10^{17} kat artırabilir ayrıca substratlarına çok benzeyen yapıları bile ayırt edebilirler (Nelson and Cox 2008).

Oksidoredüktaz enzim sınıfına dahil olan peroksidazların, yaşamın bütün formlarında bol miktarda ve her yerde bulunan enzimler olduğu bilinmektedir (Zamocky and Obinger 2010). Peroksidazlar (EC 1.11.1.7) prostetik grup olarak demir (III) protoporfirin IX (ferriprotoporfirin IX) içeren hem proteinlerdir. 30,000 ile 150,000 Da aralığında moleküler ağırlığa sahiplerdir. Çeşitli organik ve inorganik bileşenlerin oksidasyonunu ve H_2O_2 gibi peroksitlerin redüksiyonunu kataliz eden enzimlerdir (Hamid and Rehman 2009). Peroksidazlar hayvan, bitki ve mikroorganizma dokularındaki çeşitli redüktantlar ve H_2O_2 arasındaki oksidoredüksiyonu kataliz ederler (Hiraga and Sasaki 2001). Bu enzimler, bir grup oksidatif reaksiyonu kataliz etmek üzere elektron akseptörü olarak çeşitli peroksitleri (ROOH) kullanmaktadırlar (Passardi *et al.* 2007). Katalitik mekanizmaları ping-pong mekanizmasını içeren iki elektronun hidrojen peroksitten hem transferiyle başlar ve enzimin oksitlenmiş formu oluşur. Ardışık tek elektron azaltımları ile enzim doğal formuna döner veya indirgenmiş bölge enzimin ara oksitlenmiş formunu oluşturur (Dunford 1999). Glikozid yan zincirleri, polipeptit zinciri üzerindeki ikinci prostetik grubu oluşturur. Peroksidaz izoenzimleri çoğunun moleküler ağırlıklarının %15-17'si kadar karbohidrat içerirler (Van Huystee 1987). Hem grubu ve glikozidik grupların yanında kalsiyum (Ca^{2+}) iyonu da peroksidaz

salınımı ve polipeptit zincirinin yapısal devamlılığı için gereklidir (VanHuystee 1987; Fric 1976).

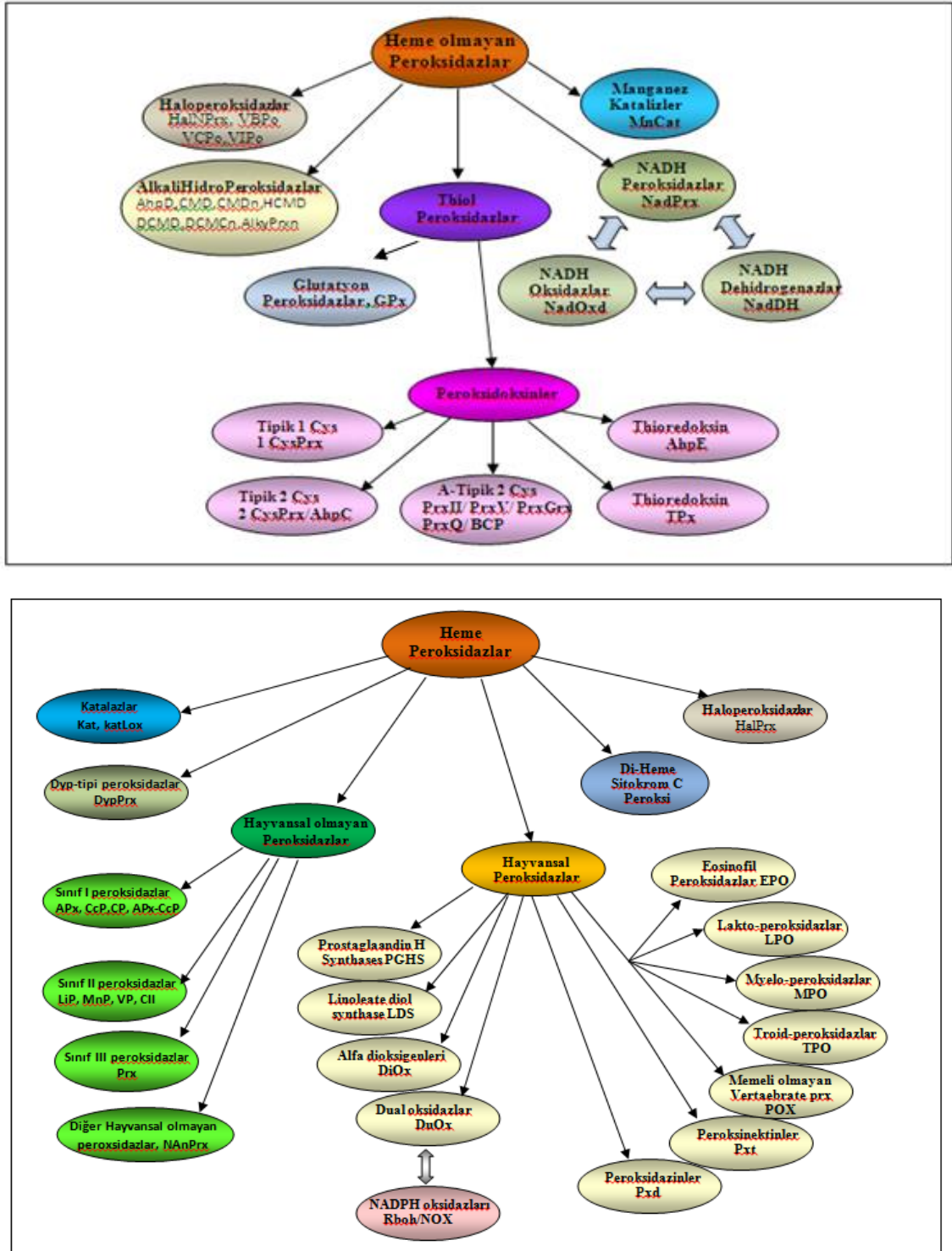
Peroksidazlar, aktivitelerinin kolay ölçülmesi ve yüksek sıcaklıklarda stabil kalabilmesinden dolayı enzimatik çalışmalarda ve protein yapı tayinlerinde model bir enzim olarak tercih edilme sebebi olmuştur (Hiraga *et al.* 2001).

Peroksidazlar tarafından kataliz edilen reaksiyonun genel formülü aşağıda verilmiştir (VanHuystee 1987).



Metabolizma sırasında oluşan, oksitleyici özelliği olan H_2O_2 'nin ortamdan hızlı bir şekilde uzaklaştırılması işlevi hücrede antioksidan özellik gösteren katalaz ve peroksidaz enzimleri tarafından gerçekleştirilir (Halliwell 1984). Hücre içindeki hidrojen peroksit miktarı peroksisomlarda katalazlar tarafından düzenlenirken, hücrenin diğer bölümlerinde ise peroksidaz enzimleri çeşitli aromatik bileşikler substrat olarak kullanır (Robert *et al.* 1993) ve H_2O_2 'yi etkisiz hale getirir (Scandalios *et al.* 1994).

Küçük ya da büyük gen aileleri tarafından kodlanmış peroksidazlar (EC 1.11.1.x), pek çok önemli fizyolojik ve gelişimsel süreçlere katılmaktadırlar (Passardi *et al.* 2007).



Şekil 1.1. Farklı protein aileleri arasında filogenetik ilişkinin şematik gösterimi

Hayvansal olmayan hem grubu peroksidazlar kendi içerisinde, dört yapısal sınıfa ayrılmaktadır:

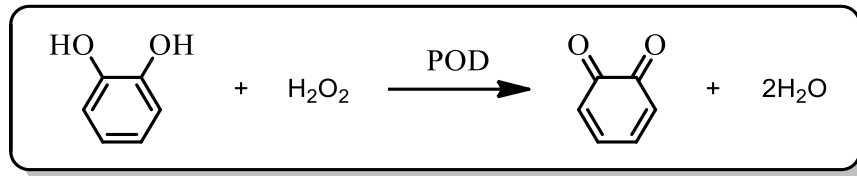
Sınıf I: Bakteri, yüksek bitki askorbat peroksidazları, sitokrom-c peroksidaz, L-askorbat peroksidaz ve maya peroksidazlarını içerir.

Sınıf II: Mantarlarda bulunan manganez peroksidaz ve lignin peroksidazdan oluşmaktadır.

Sınıf III: Klasik salgı bitki peroksidozlarından oluşur (Hiraga *et al.* 2001). Klasik salgı bitki peroksidazları (EC 1.11.1.7, Sınıf III Prx), elektron verici olarak hidrojen peroksit kullanarak, farklı alt substratların oksitlenmesini mümkün kılan hem gurubu ihtiva eden glikoproteinlerdir

Sınıf IV: Diğer hayvansal olmayan peroksidazlar (Passardi *et al.* 2007).

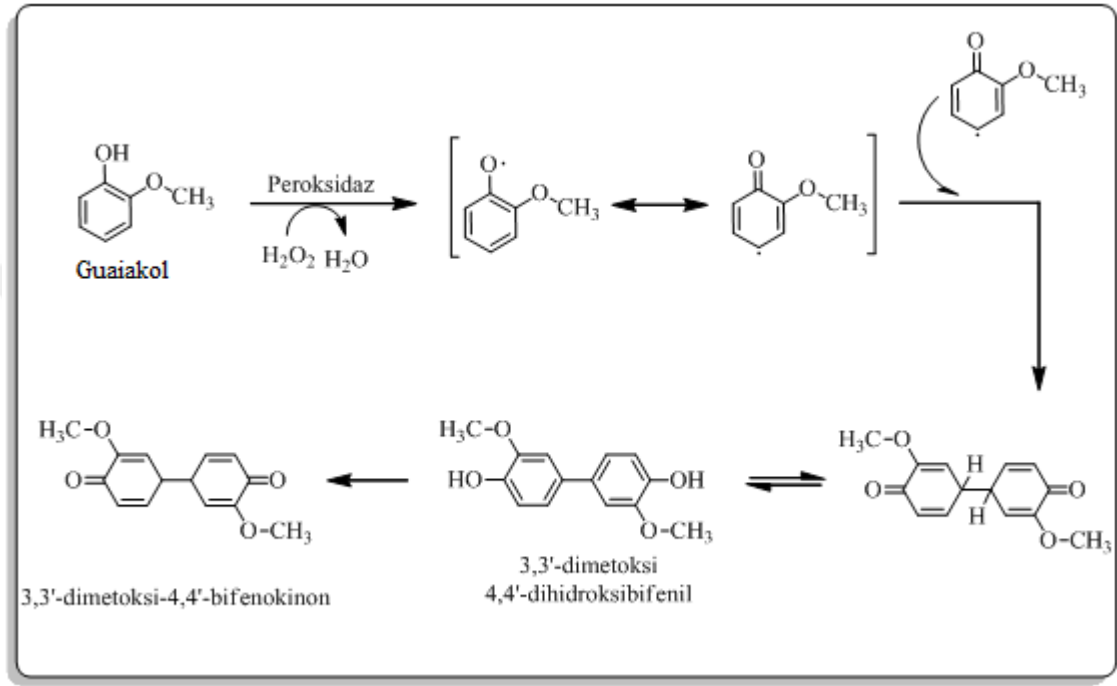
Bitki peroksidazları; klorogenik asit, katekol, pirogallol, katekin ve guaiakol gibi birtakım fenolik molekülün peroksit karşısında oksidasyonunu gerçekleştirir (Onsa *et al.* 2004). Aromatik moleküller peroksidazlar tarafından substrat olarak kullanılırken, metabolizmada meydana gelen hidrojen peroksiti suya indirgeyerek zararsız hale dönüştürürler (Robinson *et al.* 1987; Kampis *et al.* 1984). Bu reaksiyonlara katekolün oksidasyonunu örnek olarak verilebilir.



Şekil 1.2. Peroksidazın katekol substratını kullanarak hidrojen peroksiti giderme mekanizması

Peroksidazlar, ayrıca fenoller ve hidrokinonlar gibi birçok aromatik molekülün dehidrojenasyonunu da katalizler. Bu bileşikler pirogallol, toluidin, bazı azo boya türevleri, lökomalaşit yeşili, guaiakol, propiyonil promozin, 2-kresol, 4,4'-diaminodifenilen amin, benzidin, o-tolidin, di-oanisidin gibi maddelerdir (Pütter and Becker 1987; Van Huystee 1987).

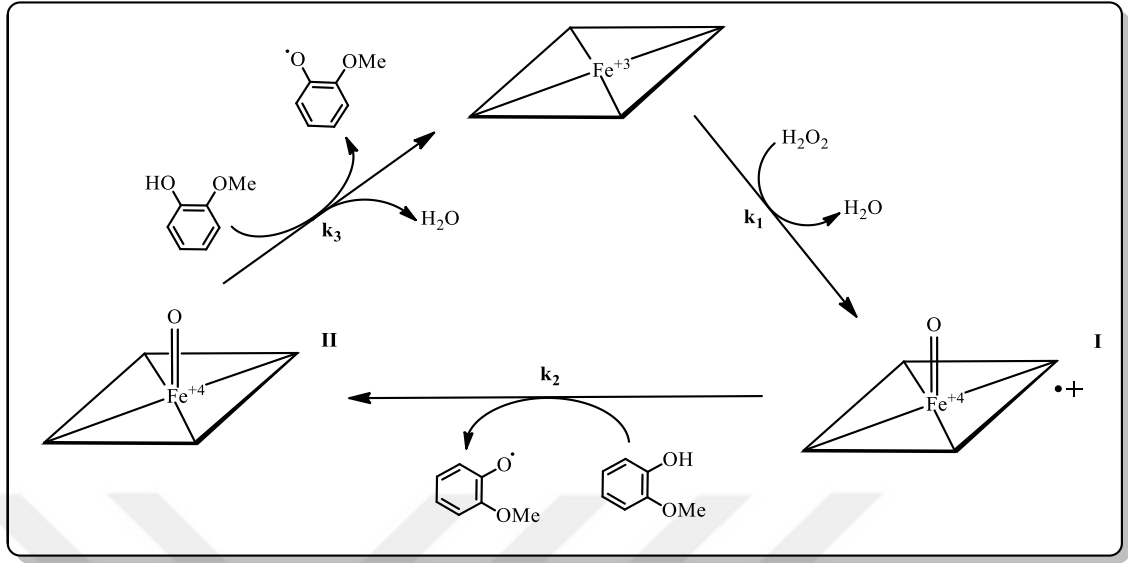
Peroksidazın bulunduğu şartlarda substrat olarak kullanılan guaiakolün yükseltgenme mekanizması yapılan çalışmalar sonucunda açığa kavuşturulmuş ve guaiakolün 3,3-dimetoksi-4,4 bifenokinona yükseltgendiği tespit edilmiştir (Doerge *et al.* 1997).



Şekil 1.3. Guaiakol substratının peroksidaz enzimi tarafından guaiakolün renkli oksidasyon ürünlerine çevrilme mekanizması

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

Peroksidaz enziminin reaksiyon katalizleme mekanizması, hidrojen peroksitin indirgendiği ve guaiakol substratının yükseltgendiği reaksiyonlar ile üç basamakta gerçekleşir (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. Guaiakol substratı varlığında peroksidaz enziminin reaksiyon katalizleme döngüsü

Yukarıda belirtilen mekanizmanın ilk basamağında peroksidaz enzimi, Fe(IV) içeren porfirin kation radikali olan bileşik I'ı oluşturmak için peroksitin bir ekivalentiyle reaksiyona girer. Bu bir redoks reaksiyonudur. Bu reaksiyonda H_2O_2 suya indirgenirken enzim ise yükseltgenmektedir. İkinci adımda bileşik I ortamdaki guaiakol substratından bir proton alarak Fe(IV) haline indirgenirken, substrat bir proton kaybederek radikal haline dönüşür. Bunun sonucunda oluşan bileşik II oksiferril bir merkeze sahip bir porfirindir. Son basamakta ise bileşik II ortamdaki substrattan tekrar bir proton alıp indirgenerek ilk durumuna geri döner. Ayrıca ortamda oluşan radikalik substratlar birbirleriyle etkileşerek polimer hale dönüşürler (Veitch 2004).

Peroksidazların önemli rol oynadığı hayvanlar, mikroorganizmalar ve bitkilerde peroksidaz aktivitesi tespit edilmiştir. Hidrojen peroksiti ya da diğer peroksitleri kullanarak çeşitli substratların oksidasyonunu katalize eder. Peroksidazlar hücre içi boşluklarda, plazmada, hücre içi cisimciğinde ve hücre duvarının içinde veya dışında bulunabilir. Hücre içinde bulunan enzim hücre duvarı bileşenlerine iyonik ya da kovalent olarak bağlanır (Belcarz *et al.* 2008). Peroksidazların substrat ilgisi, spesifik aktivite, kofaktörler, inhibitörlere hassasiyet ve optimum pH gibi biyokimyasal

özellikleri farklı olan çok sayıda izoenzimi vardır (Fric 1976). Bazı izozimler yapısal olarak ifade edilirken bazıları bitki yapısı ve gelişiminde önemli yer tutar. Bu enzimler bitki hücre bölmelerinde izoenzimlerin varlığı ile belirtilmiş çeşitli fonksiyonlara sahiptirler (Vitali *et al.* 1998).

Peroksidazlar, bitkilerin gelişimi ve strese karşı olan cevabı, bitkilerin büyümesindeki hormonal düzenlenme, hücre duvarı metabolizması, oksidasyon defansında hücrelerin cevabı gibi birçok hücresel süreçte rol oynamaktadır (Jouili 2011). Ayrıca, peroksidazlar biyotik ve abiyotik stresleri gösteren bir biyolojik belirteç olarak kabul edilmektedir. Bu enzimler çimlenmeden yaşlanmaya kadar birçok çok fizyolojik olayda rol oynar (Morohashi 2002). Fenolik bileşik oksidasyonu (Fry 2004), hücre uzaması (Liszkay *et al.* 2004), reaktif oksijen türleri ve reaktif azot türlerinin metabolizması (Almagro *et al.* 2009), fitohormon metabolizması (Cosio ve Dunand 2009), hücre duvarları bileşenlerinin çapraz bağlanması ve hücre duvarının sertliğinin kontrolü, suberin ve lignin oluşumunda görev alır (Passardi *et al.* 2007; Marjamaa *et al.* 2009). Ayrıca sebze ve meyvelerin yetiştirme dönemleri süresince indoleasetik asit miktarının ayarlanması, bitkilerde hücre duvar proteinlerinin bağlanması (Agostini *et al.* 1997), (Fry 1986), savunma mekanizmaları (Bartonek-Roxa *et al.* 1991) lignin biyosentezi (Duarte *et al.* 2000), hormonal faaliyet (Wakamatsu and Takahama 1993) ve oksidatif stres (Hiraga *et al.* 2001) gibi olaylarda etkilidirler. Ayrıca mikroanalitik uygulamalarda tercih edilir (Kwak *et al.* 1996). Bitkilerde, hasarlı veya enfekte dokular da fiziksel savunma mekanizmasına (Biles and Martyn 1993) katkıda bulunmaktadır. Peroksidazlar, klinik biyokimya ve enzim immünolojik testlerinde yaygın olarak kullanılır (Vamos-vizago 1981; Lin *et al.* 1996). Peroksidazların bazı yeni uygulamaları, örneğin endüstriyel atıklar ve gıda maddeleri gibi materyallerden peroksitlerin uzaklaştırılması, çeşitli aromatik kimyasalların sentezi, fenolik bileşenler içeren atık suların iyileştirilmesi gibi öneriler de içermektedir (Agostini *et al.* 2002).

Klasik salgı bitki peroksidazları (Sınıf III), hücre uzaması, hücre duvarı yapısı ve farklılaşması yanısıra değişik bitki patojenlerine karşı savunmada görev alan bitki salgı glikoproteinleridir (Zamocky and Obinger 2010).

Göl, nehir suyu gibi ham içme suyu kaynakları, toksik alifatik ve aromatik kirleticiler (fenol ve fenolik bileşenler) tarafından kontamine olabilir. Bunlar toksik olduğu için insan sağlığına potansiyel tehlike sunmaktadır ve bunların çoğunun kanserojen olduğu düşünülmektedir. Bu aromatiklerin konvansiyonel su arıtma tesislerinde biyoçözünürlüğü kolay değildir (Kim *et al.* 2006). Toprak, endüstriyel atıklar, çamur ve atıksulardan fenolik bileşenlerin uzaklaştırılması için çeşitli kimyasal, mikrobiyolojik ya da enzimatik yöntemler geliştirilmiştir. Ozon tedavisi gibi kimyasal yöntemler, çok pahalıdır ve bazı toksik kloro-organik bileşiklerin artmasına (klorin oksidasyonu) neden olabilir ki bu da fenolik bileşiklerin kendisinden daha tehlikelidir. İçme suyu mikrobiyolojik işleme karşı güvenli değildir. Çünkü hastalık üreten bakteri ve diğer mikropların vücuda girişine neden olabilir. Bu yüzden enzimatik metodlar, içme suyu kaynaklarındaki toksik aromatik bileşenleri uzaklaştırmak için yeni ve iyi bir opsiyon olmaktadır. Horseradish ve diğer bitki kaynaklarından peroksidazın izolasyonu mikrobiyal kaynak ürünlerinden daha ucuzdur. Bu nedenle bitki peroksidazları suların iyileştirilmesini de içeren çoğu ticari uygulamalar için kullanılmaktadır. (Lavery *et al.* 2010).

Bu bağlamda çoğu uygulamalar H_2O_2 varlığında fenolik kirleticilerin iyileştirilmesi yönündedir (Buchnan and Nicell 1997). HRP, boyaların renksizleştirilmesi ve sulu aromatik kirleticilerin iyileştirilmesi için de kullanılır. Horseradish Peroksidaz (HRP) enziminin benzidin ve naftilamin gibi anilin, hidroksikinolin ve arilamin kanserojenleri içeren kirleticilerin iyileştirilmesi için kullanımı çalışılmaktadır. Bayır turpu (*Armoracia rusticana*) peroksidazı (HRP) günümüzde diagnostikte büyük öneme sahip bir enzimdir. Örneğin mesane ve prostat kanseri riskini belirlemek için, 8-hidroksideoksiguanozin ve analogların üründe saptanması gibi tıpta birçok tanısal uygulamalarda kullanılmaktadır (Hamid and Rehman 2009). ELISA testlerinde, immunoblotting gibi tekniklerde işaretleyici olarak kullanılan bu enzim genellikle antikorlara, lektinlere ya da haptenlere bağlanmaktadır. Bayır turpu köklerinden elde edilen peroksidaz (HRP) tıbbi tanı testlerinde, yeni kimyasal maddelerin sentezinde, biyotemizleme gibi uygulamalarda sık olarak kullanılmaktadır. Farklı biyoteknolojik, biyomedikal ve diğer uygulamalar için kullanılan HRP, şimdilerde nükleik asitlerin ve proteinlerin radyoaktif olmayan

standardizasyonunun tespitine imkan sağlamıştır. HRP kullanımı nöroanatomi dahil tıbbi araştırmalarda, yaygın hale gelmiştir. HRP'nin en son nöronların terminal ucuna bağlandığı bulunmuştur (Sarika *et al.* 2015). Ayrıca H_2O_2 varlığında aromatik bileşiklerin (fenoller, bifenoller, anilinler) uzaklaştırılması ve azo boyalarının çöktürülmesinde etkili olduğu bilinmektedir. Enzim diam, nobenzidini (DAB) çözünmeyen bir bileşiğe dönüştürmektedir. Bu bileşik de kanser tanısına yardımcı olmaktadır. Avidin köprüleri ile HRP'nin immobilizasyonu kuvvetli etkinliğe sahip biyokatalizörler oluşturmaktadır. Ayrıca enzim histokimyasal boyamalarda ve biyosensörlerde de kullanılmaktadır. Dehidrojenasyon; aromatik bileşiklerin polimerizasyonları; heteroatom oksidasyonları ve epoksidasyon gibi oksidatif reaksiyonlarda HRP'den katalizör olarak yararlanılmaktadır. HRP aktivitesi; geniş bir pH ve sıcaklık aralığında olduğundan bu enzimin atık su sisteminde kullanılması uygundur (Leon *et al.* 2002; Franco Fagus *et al.* 2004).

Pratik analitik uygulamalarda da yaygın olarak kullanılan bir enzimdir. Örneğin süt ve süt ürünlerinde bulunan laktoz, spektrofotometre, biyosensör gibi sofistike araçlar gerektiren çeşitli analitik yöntemlerle tespit edilir. Laktoz tahmini için β -galaktosidaz, galaktoz oksidaz ve HRP'yi immobilize ederek basit ve ekonomik bir biostrip teknolojisi geliştirilmiştir Aynı zamanda fenolik ve aromatik amin bileşiklerini polimerize için kullanılmıştır ki yeni tip aromatik polimerler su ile karışabilen organik çözücüler içinde ve suda sentezlenmiştir (Hamid and Rehman 2009). Son zamanlarda HRP gübrelerin kokusunun giderilmesi için etkili bir alternatif olarak kanıtlanmıştır (Govere *et al.* 2007).

Organik sentezde HRP uygulamaları ağırlıklı olarak polimerizasyon reaksiyonları ile ilgilidir. Örneğin HRP, optik fiberlerin bir bileşeni olan poli metil metakrilat'ın katalizi oda sıcaklığında gerçekleştirilebilir. (Kalra and Gross 2000). HRP kitosan ve polivinil alkol fenolik türevleri kullanılarak, hidrojeller oluşturmak üzere kullanılmıştır (Sakai *et al.* 2014). Ayrıca stiren ve türevlerinden (örneğin ambalaj malzemesi olarak kullanılan) polistireni oluşturmak için polimerizasyon reaksiyonları HRP ile başarıyla gerçekleştirilmiştir (Krainer and Glieder 2015) .

HRP'nin ve indol asetik asitin veya türevlerinin kombinasyonu hale hazırda hedeflenmiş kanser terapilerinde kullanılmak için ajan olarak geliştirilmektedir. HRP C'nin en ilginç reaksiyonların biri bitki hormonu indol-3-asetik asit (IAA) ile oluşur. Çoğu peroksidaz katalizli reaksiyonların aksine, daha eski literatürlerde HRP C'nin aktivitesini tanımlamak için indol asetik asit oksidaz teriminin kullanımı, ilave hidrojen peroksit olmadan gerçekleşir. İndol-3-asetik asit ve HRP C'nin kombinasyon halinde kullanımı, Wardman ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarına göre, hedeflenen kanser tedavisi için yeni bir potansiyel sunabilmektedir. IAA'nın HRP C varlığında, insan tümör hücrelerini de kapsayan memeli hücrelerine karşı sitotoksik olduğu görülmektedir (Folkes and Wardman 2001). Doğal ürün sentezi veya biyotransformasyonda HRP C kullanımının örnekleri de literatürde mevcuttur (Veitch 2004). Enzim immünoanalizlerde (enzim-etiketli antikor) haberci olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (Hamid and Rehman 2009). Yeni elektrokimyasal biyosensör sistemlerinin geliştirilmesi yanında uygulamalı HRP üzerine güncel çalışmalar, atık sulardan fenolik kirleticileri çıkarmak ve sentetik boyaları indirgemek için biyoremediasyon sistemleriyle de alakalıdır (Krainer and Glieder 2015).

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

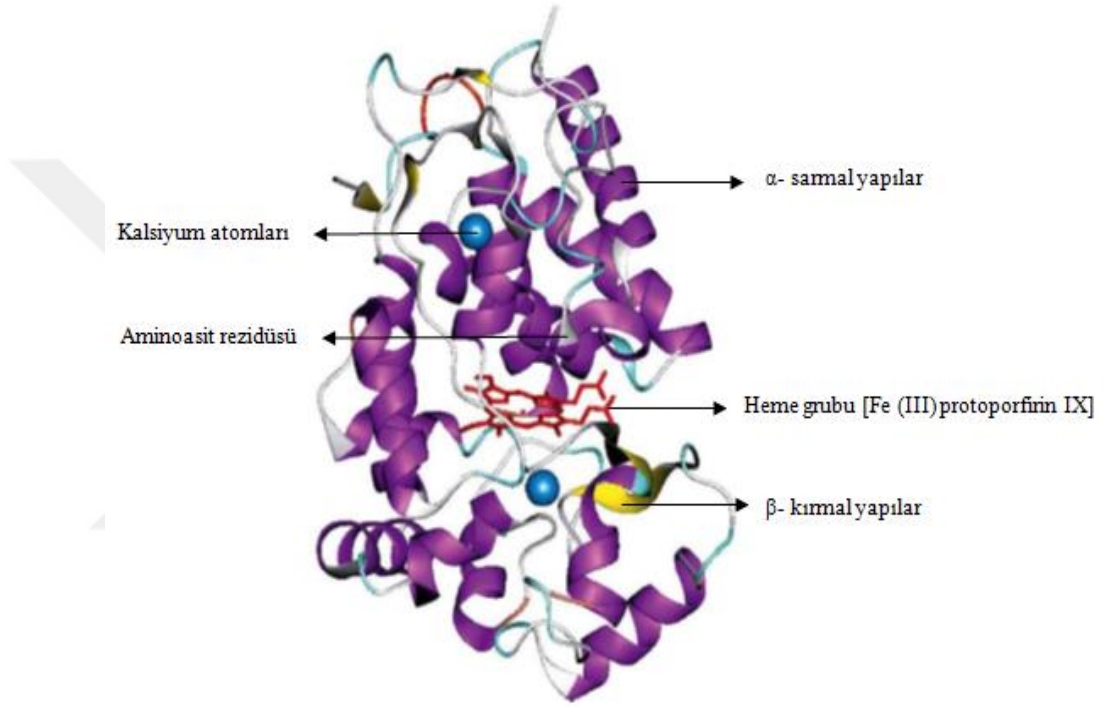
Horseradish (*Armoracia rusticana*), köklerinin besin değeri sebebi ile dünyanın ılıman bölgelerinde özellikle Avrupa ve Asya'nın bazı bölgelerinde ayrıca Kuzey Amerika'nın kuzey-ılıman bölgelerinde yetişen dayanıklı çok yıllık bir bitkidir ve uzun ömürlüdür. Bu bitki, önemli ölçüde ekonomik öneme sahip Cruciferae ailesinin bir üyesidir (Veitch and Smith 2000). Horseradish (bayır turpu, at turpu, yaban turpu); sarı kalın, etli kökü, baharatlı tadı ve antibiyotik ve antienflamatuar yeteneği olan bir bitkidir (Sarika *et al.* 2015). Yapraklar askorbik asit (vitamin C), kalsiyum, sodyum, magnezyum tohumlar ise katı yağ içermektedir. Ayrıca şeker, nişasta, sakızlı maddeler de bulundurmaktadır. Taze kök özü lizozim antibiyotik tesirli madde barındırmaktadır. *Armoracia rusticana* (bayır turbu)'nın antibiyotik özellik gösteren kökü de magnezyum, kalsiyum, sodyum, vitamin C içermektedir ve bu kökler tioglikozid ihtiva etmektedir. Hidroliz sonucu

eterik yağ allilizotiyosiyanat (hardal yağı gibi) ayrılmaktadır. Peroksidaz enzimi bu kökten elde edilmektedir (Veitch 2004).



Üzerinde uzun zamandır çalışılan HRP oksidoredüktazlar enzim grubu içinde sınıflandırılan bir heme proteindir. Bu sınıf içinde bulunmasının sebebi H_2O_2 gibi oksidize bir ajanın varlığı durumunda çok geniş yelpazede substratları okside etme yeteneğine sahip olmasıdır. Oksidoredüktaz enzim grubunda bulunan enzimlerden üzerinde en fazla çalışılmıştır. HRP ile katalize edilmiş substratlar askorbat, ferrosiyanit ve sitokrom c içerirler. Bu sınıftaki enzimler hem prokaryotik hemde okaryotik hücrelerde ifade edilirler (Barnard 2012). HRP heme içeren 44 kDa ağırlığında bir glikoproteindir ve 308 amino asit rezidüsü içeren tek bir polipeptid zincirinden oluşur (Welinder 1976). Buna ilave olarak 4 disülfid bağı aktif enzim yapısına destek olmaktadır. Molekölün karbohidrat rezidü içeriği saflaştırılan kaynağa bağlı olarak %18-22 arasındadır. Üç boyutlu yapıya göre katalitik olarak aktif olan izoenzim C iki metal merkez içerir. Bunlar iki kalsiyum atomu ve ferriprotoporfirin IX (hem grubu)

dur. Bu iki merkez enzimin yapısal ve fonksiyonel bütünlüğü için önemlidir. İki kalsiyum atomu hem bölgesine distal ve proksimal pozisyonlarda olacak şekilde yerleşmiştir (Haschke and Friedhoff 1978). Üç boyutlu yapıda α -sarmal ve β -kırmalı yapılar bulunmaktadır. Ancak α -sarmal yapının daha hakim olduğu görülmektedir. (Veitch 2004).



Şekil 1.5. HRP C'nin x ışını kristal yapısı

X ışını ile HRP'nin kristal yapısı 1997 yılında bir grup çalışmacı tarafından ortaya koyulmuştur. Enzim yapısının aminoasit sırtı ağırlıklı olarak alfa helikslerden oluşmuştur. Ayrıca buna beta kırmal bölgeleri eşlik etmektedir. HRP C toplamda 9 glukozilasyon bölgesine sahiptir ve asparagin bağlantısıyla protein yüzeyinde bu pozisyonların 8 inde gkukozlanır. Glikoproteinlerin stabilizasyonundaki N-bağlantılı glikanların rolü konusunda çelişkili sonuçlar veren çalışmalar yapılmıştır. HRP içinde bu grupların oynadığı rol enzimin kinetik stabilitesi ile alakalı olarak gösterilmiştir. Bu gruplar konjugelerin hazırlanmasında kullanılan bazı uygulamalarda büyük öneme sahiptir (Barnard 2012). HRP protohemin bir haloenzimdir. Peroksidaz katalizinde akseptör olarak H_2O_2 kullanır. Protohemin nedeniyle enzimin absorpsiyon spektrumu

280 nm den başka 403 nm de maksimum absorbands vermektedir. Çözeltilinin 403 nm deki absorbands değerinin 280 nm deki absorbands değerine oranı enzimin saflığını göstermektedir. (Leon *et al.* 2002; Franco Fagus *et al.* 2004).

Son yıllarda bu enzimin üç boyutlu yapısı, katalitik aralıkları, kataliz mekanizmaları ve belli aa kalıntılarının fonksiyonu gibi bu enzimle alakalı yeni bilgiler kullanışlı hale gelmiştir. HRP üzerindeki ilginin sebebi biyomedikal uygulama alanında geniş ölçekli olarak kullanılabilmesidir. Örneğin kanser tedavisinde kanserli hücreler HRP ile cDNA'ya transfekte edilir. IAA (bir HRP substratı) ilaç öncülü (prodrug) gibi davranır. Gen yönelimli enzim /prodrug tedavisinin bir parçası olarak belli kanser hücrelerinde apoptozisi indükleyerek oksidize edilir (Wardman 2002). Enzim bağlantılı analizlerde ise HRP ile oksidize edilen substratların büyük çoğunluğu emilir. Bu uygulamaya bir örnek antikor ile konjuge edilmiş HRP kolorimetrik bir sinyal üretir. Bunu seçilmiş renkli substratları oksidize ederek renkli, ölçülebilir metabolitler oluşturarak yapar. Renk reaksiyonu kullanıcının konjuge antikor tarafından yakalanmış hedef molekülün varlığını saptamasını sağlar. Fenolik bileşiklerin HRP ile oksidatif bağlantısı üç aşamalı döngüsel bir reaksiyondur (Barnard 2012).

Sınıf III salgı peroksidazlarının en iyi bilinen temsilcisi *Armoracia rusticana* yaban turpu peroksidazı (HRP)'dir. Sadece peroksidazlar arasında yaygın olarak bilinen köklerden elde edilen izoenzim C1 olarak değil, aynı zamanda 50 yıldır bilimsel ve patent literatüründe en yaygın sunulan bitki enzimleri arasında devam etmektedir (Zamocky and Obinger 2010). Farklı HRP izoenzimleri ilk olarak 1942 de rapor edilmiştir (Barnard 2012). Yaban turpu peroksidaz (HRP), 200'den fazla yıl önce bilimsel literatürde ilk olarak ortaya çıktı ve şimdiye kadar çok sayıda çalışmanın konusu olmuştur. HRP ye bilimin ilgisi, moleküler biyoloji alet kiti, moleküler tanının buluşuyla ve ilk HRP geninin yayınlanmasıyla 1980'lerin sonu 1990'ların başında oluşmuştur (Fujiyama *et al.* 1988). HRP araştırmaları genellikle kimya mühendisliğinde ve mutagenizde onların gelişmesi ve uygulamalarıyla, çeşitli ekspresyon sistemlerinde rekombinant üretim, enzimolojik karakterizasyonu ile ilgilidir. Şimdiye kadar, HRP araştırmalarının büyük çoğunluğu diğer doğal izoenzimlerinin

potansiyelini ihmal eden, bir izoenzim olan izoenzim C1A üzerinde durulmuştur. Yeni doğal HRP izoenzimleri keşfi nedeniyle (Näätäsaari *et al.* 2014), HRP ile ilgili çalışmalarda ek bir artış beklenmektedir (Krainer and Glieder 2015). Horseradish' te 1950'lerin başında izoenzimlerinin sayısı 5'e kadar uzanan birden fazla bileşen ile peroksidaz aktivitesi bulunmuştur (Jermyn 1952; Jermyn and Thomas 1954). Ayrıca bu peroksidaz bileşenlerinin nisbi miktarlarında mevsimsel değişimler ve farklı substratlara karşı reaktivliklerinde farklılıklar gözlemlenmiştir. Ortaya çıkan bileşenlerde vurgulanan şey, tek bir peroksidaz enziminin eserinden ziyade aslında farklı izoenzimlerin olduğudur (Jermyn and Thomas 1954). 1966 yılında Horseradish'ten yedi ayrı izoenzimin fiziksel özellikleri, izolasyon ve saflaştırma çalışması 'yaban turpu köklerden peroksidaz izoenzimleri' adlı bildiride yayınlanmıştır (Krainer and Glieder 2015). Bir asidik HRP izoenzimi ile temel bir enzim karşılaştırılarak kinetik ve substrat profil farklılıkları ortaya çıkarılmıştır (Marklund *et al.* 1974). 1977 yılında, izoelektrik odaklama ile Horseradish'ten üç ticari preparatın peroksidaz aktivitelerini ayırarak toplamda 42 HRP izoenzimi tespit edilmiştir (Hoyle 1977). 1980'lerin başında, B1-B3, C1 ve C2 diye beş izoenzim ayrıca E1-E6 izoenzimleri biyokimyasal olarak karakterize edilmiştir (Aibara *et al.* 1981, 1982). Asidik bir HRP izoenzim A2, H₂O₂ inaktivasyonuna karşı izoenzim C'den daha stabil olduğu bulunmuştur (Hiner *et al.* 2001a). Bununla birlikte izoenzim E'nin oksalasetat oksidasyonunda izoenzim A2 ve C'ye göre daha yüksek spesifik aktivite gösterdiği bulunmuştur (Kay *et al.* 1967). Ancak son zamanlarda kadar, HRP izoenzimlerinin altı nükleotit sekansı veri tabanlarında mevcuttur. 2014 yılında, salgı bitki peroksidazlarıyla enzimleri kodlayan toplam 28 dizi yayınlanmıştır. Çok sayıda peroksidaz izoenzimlerinin bitkilerde belirli fizyolojik roller oynadığı düşünülmektedir. Peroksidaz aktivitesi bir bitkinin tüm ömrü boyunca geniş bir reaksiyon çeşitliliği ile saptanabilmektedir. Ancak, HRP izoenzimlerinin ekspresyonunun düzenlenmesinde mevcut bilgi çok azdır. Son zamanlarda tanımlanan HRP izoenzim dizileri, dış uyaranlara tepki olarak ve farklı bitki dokularındaki izoenzimlerinin ekspresyonu üzerine gelecek çalışmaları kolaylaştıracaktır (Näätäsaari *et al.* 2014). Rekombinant teknoloji, yakın gelecekte yeni ve geliştirilmiş biyokatalizörlere imkan sağlayan HRP araçları içinde bu tür özellikleri

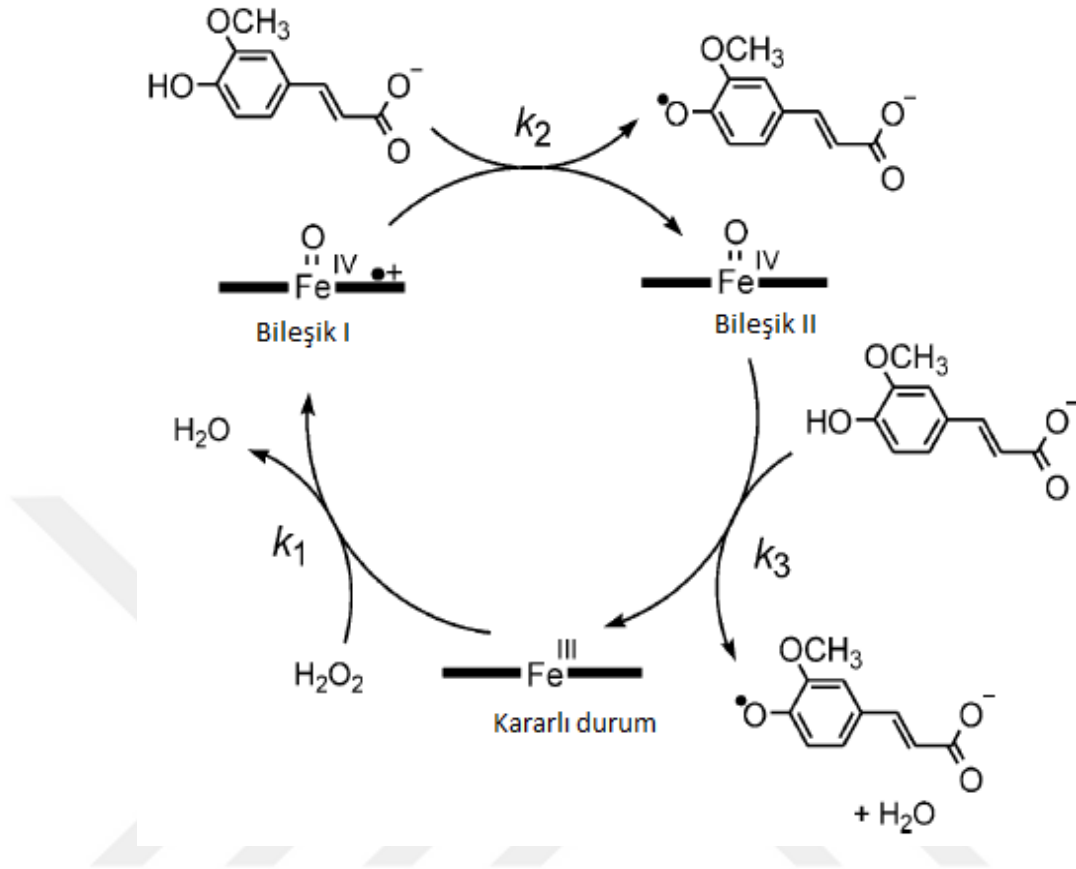
birleştirme ve kullanmaya olanak vermektedir. Şu anda genel veri tabanında mevcut 34 doğal HRP izoenzimi bulunmaktadır (Krainer and Glieder 2015).

Genel olarak Horseradish (yaban turpu) Peroksidaz terimi kullanıldığı halde bitkinin kökünün içerdiği farklı peroksidaz izoenzimleri içerisinde önemli olan üç izoenzim ise İzoenzim A (asidik), izoenzim C (nötral yada az bazik) ve kuvvetli bazik HRP'dir (Veitch 2004). Açıkçası, yaban turpu peroksidazı tek bir enzim değil daha çok bir enzim ya da izoenzim grubu olarak ifade edilir. En çok bulunan izoenzim C1 (HRP C), aynı zamanda çok geniş uygulama alanından dolayı yaban turpu peroksidazı ile ilgili çalışmaların çoğunda ve aynı zamanda çoğu uygulamalarında kullanılan izoenzimdir (Veitch and Smith, 2000). HRP C üzerine yapılan çalışmalar uygulamada daha çok kanser terapisi, immunodiagnostik, biyotransformasyon, enzim bağlantılı assaylar ve atık su arıtmalarına yoğunlaşmıştır (Barnard 2012).

HRP, H_2O_2 gibi bir oksidize edici ajanın varlığında geniş yelpazede substratları oksidize eder. Peroksidatif HRP katalizi yaklaşık üç ardışık reaksiyon ile tanımlanabilir. Reaksiyon HRP'nin H_2O_2 ile I bileşiği formuna indirgenmesiyle başlar. Bunu substratın enzimle oksidasyonu takip eder. HRP, HRP-I ve HRP-II, sırasıyla, stabil durumdaki enzim, birinci ara durum (bileşik I) ve ikinci geçiş durumunu (bileşik II) temsil etmektedir. AH_2 ve AH^* sırasıyla bir indirgenen substrat ve onun oksitlenmiş radikal türüdür (Krainer and Glieder 2015).



HRP'nin enzimatik aktivitesi, hem grubundaki demir atomunun siklik redüksiyon ve oksidasyonundan kaynaklanmaktadır (Fang ve Barcelona 2003)



Şekil 1.6. İndirgeyici substrat olarak ferulat ile Horseradish Peroksidaz (HRP C)'nin katalitik döngüsü

Hız sabitleri k_1 , k_2 ve k_3 sırasıyla bileşik I in oluşum hızı, bileşik I ve bileşik II nin indirgenme hız oranlarını göstermektedir.

Ferulik asitin indirgeyici substrat olarak kullanıldığı durumda kataliz döngüsünün bazı önemli özellikleri şekilde gösterilmiştir. İki tek-elektron indirgeme basamağında radikal türlerin oluşturulması reaksiyon ürünlerinin kompleks bir yapıya sahip olmasına yol açabilir ki bunlar arasında dimerler, trimerler ve ard arda çevrimlerde kendisinin indirgeyici substrat olarak davranabileceği yüksek oligomerlerde bulunur. Kataliz çevrimindeki ilk basamak H₂O₂ ve kararlı halde bulunan enzimdeki Fe(III) ile bileşik I i oluşturmak için yapacakları reaksiyon ki bu hal yüksek oksidasyon durumudur ve Fe (IV) oksoferil merkez ve porfirin tabanlı katyon radikali içerir. Yani bu basamağı saf peroksidazın (HRP), ferrihem prostatik grubunun H₂O₂ ile gerçekleşen 2 elektron oksidasyonu oluşturmaktadır. Geçiş durumunda (0 bileşiği) bileşik I oluşmadan gerçekleşir. Düşük sıcaklıklarda H₂O₂ ve HRP C arasında olan reaksiyonlarda gözlenmiştir ve Fe III hidroperoksi kompleksi olarak tanımlanmaktadır. Peroksidaz

bağlı bu komplekslerin moleküler dinamik simülasyonları gerçekleştirilmiştir. Formal terimlerle ifade edecek olursak I nolu bileşik kararlı durumun üzerinde iki oksitleyici eşdeğerleri mevcuttur. Birincisi tek-elektron indirgenmiş durum basamağı indirgeyici substratta yer almayı gerektirir. Bu durum bileşik II nin oluşmasına yol açar ki bu da Fe IV oksiferil türleridir ve kararlı durumun üzerinde tek oksitleyici eşdeğerlik içerir. Her iki bileşik te güçlü oksidantlardır. Tahmini redoks potansiyelleri +1 V'ye yakındır. İkinci tek-elektron indirgeme basamağı bileşik II yi enzimin kararlı durumuna çevirir. Fazla olan hidrojen peroksit ile kararlı hal enziminin reaksiyonu bileşik III ü verir. Bu sonuç başka yollar kullanılarak ta elde edilebilir (Dundorf 1999). Bu ara durum en iyi şekilde Fe (III)-süperoksit ve Fe (II)- dioksijen kompleksinin bir rezonans hibriti olarak tanımlanır (Veitch 2004).

İzoenzim C'nin değişik HRP substratları için katalitik sabiti (k_{cat}) michealis sabiti (K_M) tabloda gösterilmiştir. Datalar, incelenen substratlarda en yüksek k_{cat} değerine TMB'nin (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin) sahip olduğunu göstermiştir. ABTS [2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)], I bileşiğinin oluşumu sırasında HRP tarafından H_2O_2 ile oksidasyonu ile karşılaştırıldığında nispi olarak yüksek k_{cat} değerine sahip olduğu görülmüştür. Çeşitli substratların katalitik verimlilikleri k_{cat}/K_M değeri belirlenerek karşılaştırılmıştır. Bu datadan üzerine çalışılan substratlardan en verimlisinin TMB olduğu ortaya çıkmıştır. H_2O_2 ve guaiakol içeren reaksiyon döngüsü için bu oranı sınırlayan reaksiyon guaiakolün oksidasyonu olacaktır. HRP ile H_2O_2 nin oksidasyonu için yüksek K_M değeri ki bu değer TMB (8,5 kat daha yüksek) ve ABTS (8,4 kat daha yüksek) reaksiyonlarından daha yüksek olması, H_2O_2 için enzimle düşük affinite değeri gösterir (Barnard 2012).

Çizelge 1.1. 25°C’de HRP için Belirlenmiş Kinetik Karakteristikler

Substrate	k_{cat}	K_M	k_{cat}/K_M
Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) ¹	$3.48 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$	$3.7 \times 10^{-3} \text{ M}$	9.4×10^5
3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) ¹	$4 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$	$0.434 \times 10^{-3} \text{ M}$	9.2×10^6
2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolin -6-sulfonic asit (ABTS) ²	$226 \pm 14 \text{ s}^{-1}$	$(0.44 \pm 0.03) \times 10^{-3} \text{ M}$	5.1×10^5
Guaiakol (2-metoksifenol) ³	13.8 s^{-1}	$2.8 \times 10^{-3} \text{ M}$	4.9×10^{-3}

¹ [TMB]= 2.5 mM, [HRP]= $2.5 \times 10^{-11} \text{ M}$, [H₂O₂] = $1 \times 10^{-3} \text{ M}$.

² 0.1 M fosfat tamponu içinde reaksiyon, pH 6.0, [HRP]= $1 \times 10^{-10} \text{ M}$, [H₂O₂] = $7 \times 10^{-4} \text{ M}$.

³ 0.02 M potasyum fosfat içindeki reaksiyon, pH 7.0, [HRP]= 6 nM, [H₂O₂] = $2 \times 10^{-4} \text{ M}$.

HRP, pH 5.0- 10.0 değerleri arasında nötr pH da kararlıdır. Enzimin termal kararlılığı bazı faktörlerden etkilenmektedir. Bu faktörler arasında tampon şartları, Ca iyon bağ dayanıklılığı, disülfid köprüleri ve glikozilasyon gelmektedir. Yüksek konsantrasyonlardaki sodyum fosfat tamponu pH 7.0'nin enzimin termal dengesini indirgemekte olduğu gösterilmiştir. Termal ya da pH inaktivasyonu alfa heliksin ve üçüncül yapının hem bölgelerinin de stabilizasyonuna kaynaklık eder ve bu işlem geri dönüşümsüzdür. TMB ve luminolün kullanımının HRP'nin stabilitesini arttırdığı gözlenmektedir.

HRP inhibitörleri Cr₂O₇²⁻, Pb⁺², Co⁺², Cd⁺², Mn⁺², Cu⁺² ve Ni⁺² gibi divalent iyonlar içerirler. Diğer inhibitörler vanadat, sodyum azid, siyonit, florid, etilenetiöüre, hidroksilamin, sülfid, L-sistin, L-sistein, siyanür, p-amino benzoik asit ve karbon monoksit içerirler (Sariri *et al.* 2006). Bu küçük moleküllerin bir kısmı hem grubunun demir atomuna bağlanır bu da altı koordinatlı peroksidaz kompleks oluşumuna indirgenir veya katalitik aktivite göstermez ve bu şekilde dönüşümü sağlar. Bu ayrıca alkalın pH sında gözlenen hem grubu oluşumudur ki burada enzim oksidasyon-redüksiyon potansiyeline indirgenir.

Enzim stabilizasyonu aktivatörler ve inhibitörler HRP'nin saflaştırılması ve ekstraksiyonu düşünüldüğünde önemli faktörlerdir. Üretimde dolaylı veya direkt olarak

kullanılan kimyasal tiplerinde (ekipmanların temizlenmesi ve sanitasyonunda) enzim stabilizasyonu ve aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesi gerekmektedir. İz kontaminasyonu en büyük riskler arasında yer alır ve laboratuvar ölçekli üretim denemeleriyle birlikte ürünün kimyasal bileşiminin yorumlanması aktivite ve enzim verimi kayıplarının minimize edilmesiyle yapılır. Örneğin sodyum fosfat tamponunda HRP'nin azalmış termal stabilitesi bu tamponun işlemde çıkması sonucunu doğurur. Bu süreç sırasında dikkat edilmesi gereken kritik kontrol noktaları maksimum sıcaklık limiti ve belirlenmiş pH aralığıdır. Bu faktörler süreç sırasında enzim stabilitesini sağlar (Barnard 2012).

HRP nin mevcut saflaştırma prosedürlerinin çoğunun zaman alıcı ve pahalı olmasıyla birlikte bu saflaştırmalarda düşük saflaştırma katsayısı, spesifik aktivite ve verim görülmektedir. HRP nin kullanımının klinik ve endüstriyel uygulamalarla artmasıyla birlikte düşük maliyette, basit, hızlı saflaştırma metodlarına ihtiyaç duyulmaktadır (Lavery *et al.* 2010).

HRP ilk olarak 1958'de Seravac laboratuvarlarında (BBI enzim) ekstrakte edilip ve saflaştırılmıştır. Başlangıçtaki enzim pazarı daha çok biyokimyasal ve biyomedikal araştırmalar için üretilen enzimlerdir. Fakat immunodiagnostik test sistemlerinin bileşenlerinde kullanılan enzimler belirginleştikçe HRP kullanım pazarı da artmıştır. Yıllık bazda ulaşılan en yüksek üretim rakamı BBI şirketinin 2007 de ulaştığı 8 milyon ünite/ton dur. HRP nin ekstraksiyonu ve saflaştırılması çeşitli teknikler kullanılarak elde edilebilir. Buradaki önemli hususlar bu teknikleri kullanmaya karar verdiğimizde maliyeti dayanıklılığı ve kullanımdaki tutarlılığıdır. Sepharose bağlı Concanavalin A ve P-açilamidobenzoik asit içeren afinite kromatografi matriksleri geliştirilmiştir ve HRP' nin hızlı saflaştırılmasına kaynaklık etmiştir (Brattain *et al.* 1976). Bu reçinelerin kullanımı düşük verim nedeniyle geniş ölçekteki enzim üretiminde, matrikslerin maliyetinden dolayı düşük pH stabilitesi ve nispeten kısa ömür döngüsünden dolayı pratikte uygun değildir. BBI enzimlerinin saflaştırma prosesi iki adımda gerçekleşmektedir. Bu hidrofobik etkileşim kromatografisi ve iyon değişim kromatografisidir (Barnard 2012).

1.2. Afinite Kromatografisi

Afinite kromatografisi, hemen hemen bütün biyomoleküllerin biyolojik fonksiyonlarını veya özel kimyasal yapılarını esas alarak saflaştırma yapma imkanı tanır. Bu teknik diğer kromatografi tekniklerinden daha sonra geliştirilmesine rağmen, uygulama sahası çok hızlı gelişmiştir.

Bu teknikte saflaştırılması istenen molekül "matriks"adı verilen bir kolon maddesine kovalent olarak immobilize edilmiş bir komplementer bağlanma bileşiğine (ligand) spesifik ve tersinir bağlanır. Afinite kromatografisi bir tür adsorbsiyon kromatografisidir. Aktif materyalin geri kazanılması genelde çok yüksektir. Diğer tekniklerle çok basamaklı işlemler gerektiren, çok zaman alan hatta ayrılması mümkün olmayan birçok biyolojik materyaller, bu yöntemle bir tek basamakta elde edilebilir. Saflaştırma çoğu zaman birkaç bin kat olur. Afinite kromatografisinin konsantre edici etkisi de vardır; bundan dolayı büyük hacimlerle de çalışmak mümkündür (Wilchek *et al.* 1984). Ayırımların yüksek seçicilikleri, birbirini etkileyen moleküllerin tabii spesifitesinden kaynaklanır. Bu sebepten dolayı afinite kromatografisi şu amaçla kullanılabilir:

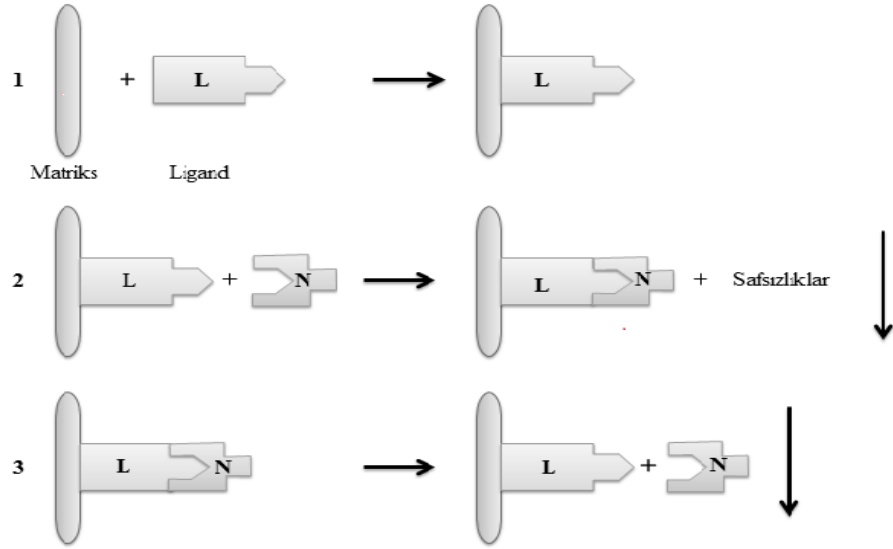
- a) Kompleks biyolojik karışımlardan maddeleri saflaştırmak için,
- b) Bazı maddelerin denatüre olmuş şekillerinden tabii şekillerini ayırmak için.
- c) Kirletici büyük miktarlardan küçük miktardaki biyolojik materyalleri ayırmak için.

Afinite kromatografisinde yapılacak iyi bir ayırım, biyospesifik ve matrikse kovalent bağlanabilecek bir ligand gerektirmektedir. Bununla birlikte şu iki husus önemlidir;

- a) İmmobilize edilen ligandın numune için spesifik bağlama afinitesi olması.
- b) Safsızlıklar aktıktan sonra, bağlı numunenin aktif bir şekilde seçimli desorpsiyonu için kullanılabilir bir yöntem bulunması önemlidir.

Afinite Kromatografisinin genel prensibi Şekil 1.7’de gösterilmektedir.

Afinite kromatografisinin genel prensibi:



Şekil 1.7. Afinite kromatografisinin genel prensibi

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

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Organizmalarda geniş bir yayılımı olan peroksidaz çeşitli kaynaklardan izole edilmektedir. Bitkilerde bulunan peroksidaz, ıspanak yaprakları, enginar yaprakları, lahanalar, marul, brokoli, domates tohumları, patates yumruları ve kültürlü yerfıstığı hücrelerinden saflaştırılmaktadır (Soda *et al.* 1991).

POD enziminin saflaştırıldığı bu çalışmalara örnek olarak karalahanadan (Gülçin and Yıldırım 2005), brokoliden (Tıpawan and Barrett 2005; Köksal and Gülçin 2008), ıspanak yapraklarından (Köksal 2011), bamyadan (Yemenicioglu *et al.* 1998), tütünden (Gazaryan and Lagrimini 1996), arpadan (Kristensen 1999), ısırgan otundan (Gülçin 2002), lahanadan (McLellan and Robinson 1987), yeşil bezelyeden (Halpin *et al.* 1989; Lee and Klein 1990), pamuktan (Triplett and Mellon 1992), tatlı patates yumrularından (Leon *et al.* 2002), brüksel lahanasından (McLellan and Robinson 1987), domatesten (Jen *et al.* 1980; Signoret and Crouzet 1982), havuçtan (Nair *et al.* 1996), portakaldan (Clemente 1998), kavundan (Rodriguez *et al.* 2000), hurma yapraklarından (Deepa and Arumughan 2002), çilekten (Civello *et al.* 1995), at turpundan (Lavery *et al.* 2010), mısırdan (Mika *et al.* 2008), çavdar yapraklarından (Murakami *et al.* 2007), zeytinden (Saraiva *et al.* 2007) ve papaya meyvesinden (Pandey *et al.* 2012) yapılan saflaştırma çalışmaları verilebilir.

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

Enzim saflaştırma ve karakterizasyon çalışmalarında karaturp, şalgam ve diğer bitki çeşitleri üzerinde de birçok çalışma mevcuttur. Bu anlamda Türk karaturpundan (*Raphanus sativus* L.) peroksidaz enzimi (Şişecioğlu *et al.* 2010), japon turpu (*Raphanus sativus* L.) köklerinden askorbat peroksidaz enzimi (Ohya *et al.* 1997)

saflaştırılarak karakterize edilmiştir. Karalahanadan (*Brassica oleracea*) POD enzimini üç kromatografik adımda 43805 (EÜ/mg) 33,5 kat %33 verimle (Gülçin 2005), karnabahardan (*Brassica oleracea* L.) POD enzimini üç kromatografik adımda 466987,9 (EÜ/mg) 19,33 kat %0,2 verimle (Köksal 2008). Kırmızı lahanada afinite kromatografisini kullanarak 120 kat %2.9 verimle (Somtürk *et al.* 2014). Yabani sinamekinden peroksidaz saflaştırmıştır (Vitali *et al.*1998). Marul mahsülünden elde ettiği peroksidaz enzimi, Sefadeks G 100 jel filtrasyonu, DEAE - iyon değişimi ve Triton X-114 içindeki faz ayrımı, sıcaklığın bir kombinasyonu yoluyla kısmen saflaştırılmıştır (Mdluli *et al.*2005). Kavun meyvesinden kısmen kavun peroksidazı anyon-değişim kromatografisi yoluyla kısmen saflaştırılmıştır (Rodriguez *et al.* 2000). Hurma yaprağı yağından elde edilen peroksidaz (POD) enzimi, amonyum sülfat çöktürmesi, anyon değişim kromatografisi ve moleküler dışlama kromatografisi yoluyla saflaştırılmıştır (Deepa *et al.* 2002).

Manu ve arkadaşı peroksidaz enzimini amonyum sülfat çöktürmesi, katyon değişimi, anyon değişimi ve jel filtrasyon kromatografisi yoluyla buğday kepeğinden saflaştırmıştır (Manu *et al.* 2009). Kırmızı tatlı biberden elde edilen peroksidaz (POD) enzimini, %30 ve %80 arasında amonyum sülfat fraksiyonu ve Triton X-114 ile ayrılan fazın bir kombinasyonunu kullanarak kısmen saflaştırılmıştır (Serrano *et al.* 2008). Pancarın genetik olarak değiştirilmiş kök kültürleri ile üretilmiş hücre içi peroksidazını (POD), iyon değişim kromatografisi ve amonyum sülfat ayırmsal damıtmasının birleşimi kullanılarak saflaştırmıştır (Rudrappa *et al.* 2007). Zeytinden elde ettikleri peroksidaz enzimi elektroforetik homojenlik için saflaştırılmıştır (Saraiva *et al.* 2007).

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

Literatürde Horseradish Peroksidaz (HRP) enzimi ile ilgili birçok çalışma mevcut olup, son yıllarda rekombinant HRP üretimi ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır.

Hedeflenmiş kanser tedavisi için rekombinant Horseradish Peroksidaz (HRP) varyantları çalışılmıştır (Bonifert *et al.* 2016). Diğer bir çalışmada rekombinant Horseradish Peroksidaz (HRP) üretimi ve uygulamaları incelenmiştir (Grigorenko *et al.* 2015). Krainer ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada HRP'nin rekombinant üretimi ve biyoteknolojik uygulamaları araştırılmıştır (Krainer *et al.* 2015). Mutant rekombinant Horseradish Peroksidaz (HRP) tarafından rafineri atık sudan fenolün uzaklaştırılması çalışması Asad ve arkadaşları tarafından yapılmıştır (Asad *et al.* 2014). Yine Asad ve arkadaşları tarafından 2013 yılında yapılan bir çalışmada rekombinant Horseradish Peroksidazın yeniden katlanma süreci ile ilgili araştırmaları mevcuttur (Asad *et al.* 2013). Doku mühendisliği uygulamaları için katalizli in situ oluşturulan hidrojellerde Horseradish Peroksidaz (HRP) incelenmiştir (Bae *et al.* 2015). Asidik yaban turpu peroksidaz aktivitesinin yaygın kullanılan boyaların genotoksitesini ortadan kaldırması çalışılmıştır (Janović *et al.* 2016). İmmobilize Horseradish Peroksidaz (HRP) tarafından fenollerin uzaklaştırılması incelenmiştir (Alemzadeh *et al.* 2009). Biyosensör merkezli yaban turpu peroksidaz ve grafin nanotrombosit başlıklı çalışma yapılmıştır (Luo *et al.* 2014). Horseradish Peroksidaz'a antikörlerin biyokonjugasyonu incelenmiştir (Hnasko 2015). Ürünün nanohidrofobik bir bileşeni tarafından Horseradish Peroksidazın inhibisyonu araştırılmıştır (Campbell *et al.* 2014).

Farklı konuk organizmalarda Horseradish Peroksidaz'ın üretimi ve saflaştırılması çalışmaları yapılmıştır.

Escherichia coli de tek bir adımda iyon değişim kromatografisiyle saflaştırılmıştır. Ucuz üretimi ve yüksek hücre yoğunluğunu artırmadaki kolaylık bu üretimdeki avantajıdır (Smith *et al.* 1990).

Memeli hücrelerinden HRP'nin saflaştırılması yine tek bir adımda afinite kromatografisi (Greco *et al.* 2000) ile olmuştur. Ancak bunun saflaştırılmasında virüs

uzaklaştırma adımı, üretimin maliyetli olması ve üretim işleminin zorluğu (Connell-Crowley *et al.* 2012), verimin düşük olması bu çalışmadaki dezavantajdır (Holland *et al.* 2010).

Mayada ise amonyum sülfat çöktürmesi, hidrofobik etkileşim kromatografisi, jel filtrasyon ve ayon değişim kromatografisi gibi aşamalarla Horseradish Peroksidazın ekspresyonu incelenmiştir (Morawski *et al.* 2000).

2.1. Çalışmanın Amacı

Horseradish Peroksidaz (HRP) enzimi üzerine pek çok saflaştırma prosedürü bulunmaktadır. Literatürde yapılan çalışmalarda bu enzimin birçok inhibitörü bulunmuş ve afinite jeli de hazırlanarak enzim saflaştırma çalışmaları yapılmıştır. Bu tez kapsamında ise enzimin aktivitesi üzerine ilk kez 4-Amino benzohidrazid ve türevleri olan 4-Amino 2-bromo benzohidrazid, 4-Amino 2-kloro benzohidrazid ve 4-Amino 3-kloro benzohidrazid moleküllerinin inhibisyon kinetikleri çalışıldı ve inhibisyon etkisi gösteren benzohidrazid türevlerinden afinite jeli hazırlandı. Hazırlanan afinite jellerinden peroksidaz enzimi bayır turpundan (Horseradish Peroksidaz) saflaştırıldı. Daha yüksek verimle bayır turpu peroksidaz enzimini saflaştırmak amacıyla bulunan benzohidrazid ve türevi moleküller bu enzimin saflaştırılmasında yeni bir yöntem olarak sunuldu. Bu çalışmanın, diğer bitki peroksidaz enzimlerinin saflaştırılmasında da etkili olabilecek kapasiteye sahip olduğu belirlendi. Horseradish Peroksidaz (HRP) enziminin tek basamakta saflaştırılması, bu saflaştırmanın da uygun maliyette ve daha az zamanda gerçekleşmesi, ticari bir kullanım potansiyeli sunmuş oldu.

Bu tez kapsamında;

- 1) 4-Amino benzohidrazid afinite jeli kullanılarak bayır turpundan Horseradish Peroksidaz (HRP) enzimi saflaştırıldı, daha sonra saflaştırılan HRP enzimi üzerine sentezlediğimiz 4-Amino benzohidrazid ve türevi olan üç molekül için inhibisyon çalışmaları yapıldı. Bu üç molekülün IC_{50} , K_i değerleri ve inhibisyon tipleri belirlendi.

İnhibisyon gösteren moleküllerin Sepharose-4B matriksi kullanılarak afinite jelleri hazırlandı.

2) Bayır turpu peroksidaz enzimi hazırlanan afinite jellerinden saflaştırıldı.

3) Afinite jelleri ile saflaştırılan HRP enziminin kinetik parametreleri; optimum pH, optimum sıcaklık, stabil pH, K_M ve V_{max} değerleri tespit edildi.

4) Saflaştırılmada kullanılma potansiyeli olan en iyi afinite kolonunun bağlanma kapasitesi üzerine sıcaklık, pH ve iyonik şiddet gibi parametreler hesaplandı.

3. MATERYAL ve YÖNTEMLER

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B, , Sodyum asetat, Sodyum dodesilsülfat (SDS), N,N,N,N'-tetrametil etilendiamin (TEMED), Diyaliz torbası, , 4-Amino benzohidrazid, Hidrojen peroksit, Formaldehit, Sodyum tiyosülfat, Guaiakol, Standart serum albumin, Sodyum klorür, Glutaraldehit, N,N'-metilen bisakrilamid, Akrilamid, Coomassie brillant blue G-250, Coomassie brillant blue R-250, Sodyum bikarbonat, Brom timol mavisi, Gliserol, Tirozin, Trihidroksimetilaminometan (Tris), Etanol, Metanol, Dikloro metan, Sodyum karbonat, Etil asetat, Sodyum Nitrit, %64 Hidrazin monohidrat, Sigma Chemical Company'den; Sodyum sülfat, Sodyum perklorat, Sodyum azotür, Gümüş nitrat, Hidroklorik asit, Sülfirik asit, L-Tirozin, Fosforik asit, İzoproponal E. Merk AG'den; Potasyum fosfat, Sodyum hidroksit, Triklor asetik asit (TCA) Riedel de Haen'den; β -merkaptotanol Fluka'dan; Glisin ICN Biomedicals. inc.'den, 4-aminobenzohidrazid, 4-Amino 2-kloro metilbenzoat, 4-Amino 3-kloro metilbenzoat, 4-Amino 2-bromo metilbenzoat Fluorochem firmasından temin edildi.

3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar

Çalışma süresince aşağıdaki alet ve cihazlar kullanıldı.

Spektrofotometre	: Shimadzu UV 1800
Saf su cihazı	: Barnstead Easy Pure UV/UF
Karıştırıcı (Shaker)	: IKA KS 130 basic
Soğutmalı santrifüj	: Hermle Z 323 K(Germany)
Elektroforez tankı	: Bio rad (dikey)
Peristaltik pompa	: İsmatec

Karıştırıcı (Vorteks)	: Fisons whirli-mixer
Hassas terazi	: Denver Instrument
pH metre	: Mettler Toledo Seven Compact
Otomatik pipet	: Eppendorf
Güç kaynağı	: 1-Bio Rad Power Pac 3000
NMR	: Bruker 400 MHz
Çalkalayıcı	: Midi Dual 14
Magnetik karıştırıcı	: WiseStir MSH-20A
Afinite kolonu	: Sigma
Su banyosu	: Nüve
Kar makinesi	: Scotsman AF-20 (Authomatic ice machines)
Buzdolapları	: Samsung
Derin dondurucu (-20°C'ye kadar)	: Samsung
Derin dondurucu (-85°C'ye kadar)	: Sanyo Ultra Lo
Rotary Evaporatör	: Heidolph
Ultraturaks	: Heidolph SilientCrusher M

3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

Biyokimyasal çalışmalarda kullanılan çözeltilerin kullanım yerleri ve hazırlanış şekilleri aşağıdaki gibidir. Çözelti hazırlamak amacıyla kullanılan su, saf sudur.

Kolon materyali sentezinde kullanılan çözeltiler:

1. CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye L-Tirozin kenetlendirme reaksiyonunda kullanılan tampon: 0,1 M NaHCO_3 (pH=9): 1.68 g (0,01 mol) NaHCO_3 150 mL suda çözüldü, 1 M NaOH ile pH=9 oluncaya kadar titre edildi ve toplam hacim suyla 250 mL'ye tamamlandı.
2. Sepharose-4B-L-Tirozin kolon materyaline 4-amino benzohidrazid ve türevi olan moleküllerin kenetlendirilmesi işleminde kullanılan tampon çözelti 0,2 M NaHCO_3

(pH=8,8): 0,84 g (0,005 mol) NaHCO_3 80 mL suda çözüldü, 1 M NaOH ile pH=8,8 oluncaya kadar titre edildi ve toplam hacim suyla 100 mL'ye tamamlandı.

3. Sepharose-4B-L-Tirozin-4-Amino benzohidrazid (türevleri) afinite jelinin yıkanması işleminde kullanılan tampon 10 mM NaH_2PO_4 (pH=6,8): 6 g (0,025 mol) NaH_2PO_4 , 400 mL destile suda çözüldü. 1 M HCl ile pH=6,8'e kadar titre edildi, toplam hacim suyla 500 mL'ye tamamlandı.

Afinite kolonunda kullanılan çözeltiler

1. CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B afinite kolonlarının dengelenmesinde kullanılan tampon: 10 mM NaH_2PO_4 (pH=6,8): 6 g ($1 \cdot 10^{-1}$ mol) NaH_2PO_4 , 450 mL suda çözüldü. 1 M HCl ile pH=6,8'e kadar titre edildi, sonra toplam hacim suyla 500 mL'ye tamamlandı.

2. CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B afinite kolonuna homojenatın tatbikinden sonra afinite kolonlarının yıkanmasında kullanılan tampon: 25 mM NaH_2PO_4 (pH= 6,8): 2,84 g ($1 \cdot 10^{-2}$ mol) Na_2HPO_4 750 mL suda çözüldü. 1 M HCl ile pH=6,8'e kadar titre edildi, toplam hacim 800 mL'ye tamamlandı.

3. HRP enziminin elüsyonunda kullanılan tampon: 1 M NaCl içeren 25 mM NaH_2PO_4 (pH=6,8): 23,4 g ($2 \cdot 10^{-1}$ mol) NaCl 300 mL suda çözüldü. 2,84 g ($1 \cdot 10^{-2}$ mol) Na_2HPO_4 çözeltiye ilave edilip çözünmesi sağlandı. 1 M HCl ile pH=6,8'e kadar titre edildi, toplam hacim suyla 400 mL'ye tamamlandı.

Homojenat hazırlanmasında kullanılan çözeltiler

Sıvı azot parçalamasından sonra bitki dokularının içine alındığı tampon (Horseradish bitkisinden homojenat elde edilmesinde kullanılan): 0,3 M KH_2PO_4 (pH: 7,0): 12,24 g KH_2PO_4 , 250 mL destile suda çözüldü. 1N NaOH ile pH:7,0'e kadar titre edildi ve toplam hacim destile suyla 300 mL'ye tamamlandı.

Aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler:

1. HRP enziminin aktivitesinin ölçümünde kullanılan tampon 0,1 M KH_2PO_4 (pH=6,0): 4,08 g KH_2PO_4 , 240 mL suda çözüldü. 1 N NaOH ile pH=6,0'e kadar titre edildi, daha sonra toplam hacim suyla 300 mL'ye tamamlandı.
2. HRP enziminin aktivitesinin ölçümünde kullanılan 45 mM Guaiakol substrat çözeltisi: 1,494 mL guaiakol alınarak son hacim 300 mL'ye tamamlandı.
3. 22,5 mM H_2O_2 substrat çözeltisi: Yoğunluğu 1,11 g/mL olan %30'luk H_2O_2 'den 684 μL alınarak suyla 300 mL'ye tamamlandı.

Bradford yöntemiyle protein tayini için kullanılan çözelti

Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi proteinlerin kantitatif tayininde kullanıldı. 300 mg Coomassie brilliant blue G-250, 150 mL %95'lik etanol içerisinde çözüldü, bu çözeltiye %95'lik 300 mL fosforik asit ilave edildi ve çözeltinin hacmi son hacim 3 L olacak şekilde ayarlandı. Hazırlanan bu çözelti karanlık ortamda muhafaza edildi.

Elektroforezde kullanılan çözeltiler:

1. 1 M (pH=8,8) Tris-HCl tamponu: 36,34 g (0,2 mol) Tris, 240 mL suda çözüldü. 1 M HCl ile pH=8,8'e ayarlanıp, son hacim 300 mL'ye tamamlandı.
2. 1 M (pH=6,8) Tris-HCl tamponu: 36,34 g (0,2 mol) Tris, 240 mL suda çözüldü. 1 M HCl ile pH=6,8'e ayarlanıp, son hacim 300 mL'ye tamamlandı.
3. Numune tamponu: 1,95 mL 1 M Tris-HCl (pH=6,8), 9 mL %10'luk SDS ve 3 mL %100'lük gliserin, 3 mL 0,1'lik brom timol mavisi karıştırılarak, son hacim saf su ile 30 mL'ye tamamlanmasıyla hazırlandı. Bu tampona kullanmadan önce 1000 μL numune tamponunda 50 μL olacak şekilde β -merkaptoetanol ilave edildi.
4. Yürütme tamponu: 4,5 g Tris ve 14,4 g glisin, 300 mL suda çözüldü. Daha sonra bunun üzerine 15 mL %10'lik SDS ilave edilerek toplam hacim saf suyla 1500 mL'ye tamamlandı.

5. Renklendirme çözeltisi: 1,32 g coomassie brilliant blue R-250'nin 240 mL metanolde çözünmesi ve bunun üzerine 48 mL saf asetik asit ile 240 mL destile suyun ilavesiyle hazırlandı.
6. Renksizleştirme çözeltisi: %7,5 asetik asit %5 metanol ve %87,5 destile suyun karıştırılmasıyla hazırlandı.

Gümüş boyamada kullanılan çözeltiler

1. Tespit çözeltisi: 180 mL su, 90 mL %96'lık etanol, 30 mL asetik asit'in karıştırılmasıyla elde edildi.
2. Redüksiyon çözeltisi: 14,4 g sodyum asetat, 135 mL etanol ve 240 mL saf su karıştırılıp, pH=6'ya asetik asitle ayarlandıktan sonra 450 mg sodyum tiyosülfat, 9 mL glutaraldehit eklenip su ile 450 mL'ye tamamlandı.
3. Boyama çözeltisi: 300 mg gümüş nitrat, 300 mL saf suda çözülüp üzerine 90 µl formaldehit eklenmesiyle hazırlandı.
4. Yıkama Çözeltisi 1: 11,25 g sodyum karbonat, 810 mL saf suda çözüldü ve üzerine 360 µl formaldehit ilave edildi.
5. Yıkama çözeltisi 2: 2 mL gliserin ve 500 mL'lik %5'lik asetik asitten karıştırılarak hazırlandı.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Protein tayini

3.2.1.a. Kalitatif protein tayini

Kalitatif protein tayini, kromatografi işlemleri sonunda eşit hacimde toplanmış olan bütün fraksiyonlara uygulandı. Bu metod protein yapısında bulunan aromatik halkaya sahip amino asitlerin (fenilalanin, tirozin ve triptofan) 280 nm'deki UV ışınlarını absorblamaları esasına dayanmaktadır (Segel 1968).

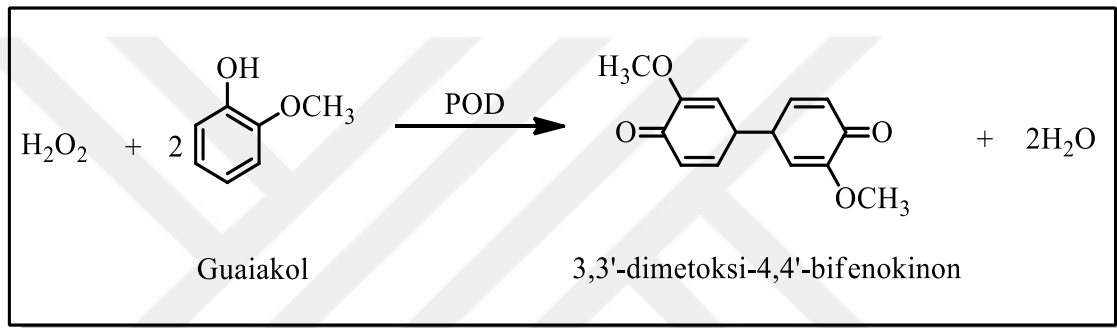
Kromatografik işlemler sonucunda elde edilen elüatlar kuvartz küvetlere konuldu ve proteinin içinde bulunduğu tamponun köre karşı absorbansları spektrofotometrede ölçüldü.

3.2.1.b. Bradford protein tayin yöntemi

Homojenattaki ve afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltisindeki protein miktarları Bradford metoduna göre belirlendi. Negatif yüke sahip olan ve protein üzerindeki pozitif yüke bağlanan Coomassie Brilliant Blue G-250 bu yöntemde boya olarak kullanıldı. Bu boyanın kırmızı ($\lambda_{\text{max}}=465$ nm) ve mavi ($\lambda_{\text{max}}=595$ nm) formu mevcuttur. Proteinin bağlanması, kırmızı formun mavi forma dönüşümünü sağlar. Bu yöntemin bozucu faktörlere karşı hassasiyeti oldukça azdır (1-100 μg arası). Tayin işlemleri şu prosedüre göre gerçekleştirildi: 1 mL'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albumin çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 μL konuldu. Saf su ile bütün tüplerin hacmi 0,1 mL'ye tamamlandı ve 4,9 mL Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisi ilave edilerek vorteks ile karıştırıldı. 10 dakika inkübe edildikten sonra 595 nm'de 3 mL'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak protein numunesinin içinde bulunmadığı tampondan, ölçüm için ise 0,1 mL protein çözeltisi ve 4,9 mL Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltilerinden oluşan karışımlar kullanıldı. Elde edilen sonuçlardan absorbans değerlerine karşılık gelen μg protein değerleri standart grafik haline getirildi. Saflaştırmanın her aşamasında ortamdaki protein miktarını belirlemek için enzim numuneleri üç ayrı tüpe 100, 250 ve 500 μL alınarak üzerlerine sırasıyla 4,9, 4,75, 4,5'er mL renklendirme reaktifi eklendi. Vorteks ile karıştırıldıktan sonra 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 595 nm'de absorbans değerleri okundu. Bu işlem üç defa tekrarlanarak üç ayrı ölçümün aritmetik ortalaması alınıp standart grafikten protein miktarları belirlendi. (Bradford and Williams 1976).

3.2.2. Horseradish Peroksidaz aktivitesi tayini

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



Şekil 3.1. Guaiakol substratının yükseltgenme denklemi

Reaksiyon enzim çözeltisinin ilavesiyle başlatıldı ve 3 dakika süresince oda sıcaklığında 470 nm’de absorbans artışı spektrofotometrede 1 cm ışık yoluna sahip küvet kullanılarak ölçüldü.

Horseradish Peroksidaz enziminin aktivitesini tayin etmek için aşağıdaki formül kullanıldı.

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

A = Absorbans (3 dakika sonunda okunan absorbans)

b = Işığın geçtiği mesafe (1 cm)

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

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

D_f = Seyreltme katsayısı

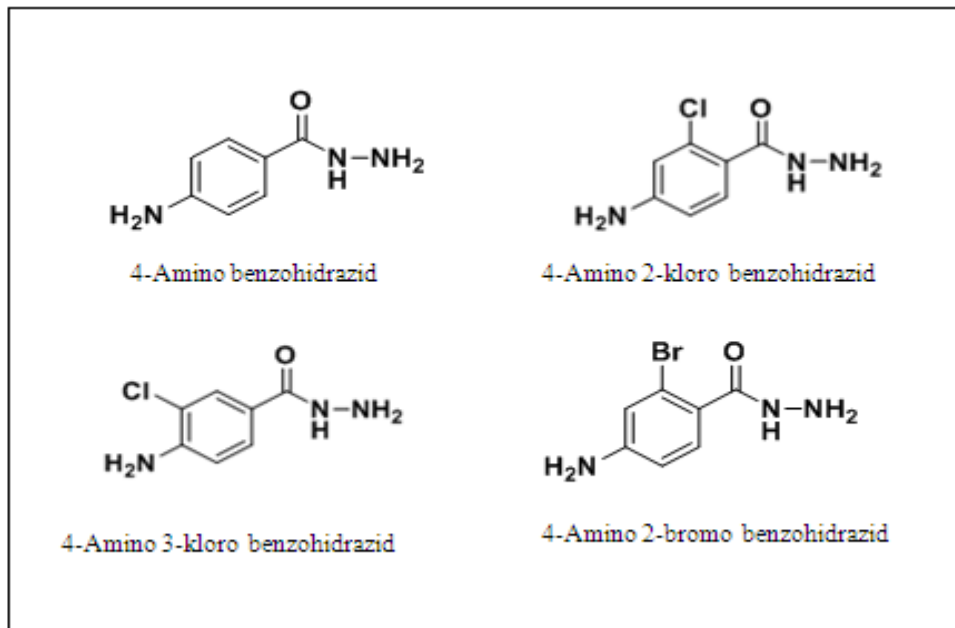
$V = \text{Reaksiyon hızı } (\mu\text{mol} \times \text{dak.} / \text{mL})$

Substrat olarak guaiakolün kullanıldığı enzim saflaştırma işlemlerinde saflaştırma basamaklarının enzim aktivite ölçümü sonuçları için; 1 enzim ünitesi 20°C’de 1 dakikada 1 μmol guaiakol’ün oksidasyonunu katalizleyen enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

3.3. Horseradish Bitkisinden Peroksidaz Enziminin Saflaştırılması Çalışmaları

3.3.1. Ligand seçimi

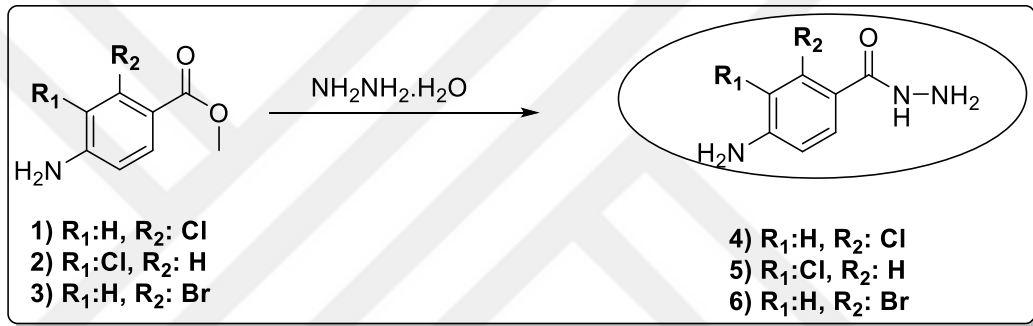
Horseradish Peroksidaz (HRP) enzimi saflaştırmak amacı ile 4-Amino benzohidrazid satın alındı. Ayrıca 4-Amino 2-kloro metilbenzoat, 4-Amino 3-kloro metilbenzoat, 4-Amino 2-bromo metilbenzoat maddeleri de satın alındı ve bu üç molekülün hidrazin formları tarafımızca sentezlendi. Bu moleküllerin ligand olarak kullanılabilirliği incelendi. İnhibisyon çalışmaları yapıldı. Sentezlenen bu moleküller diazonyum tuzu oluşturabilecek yapıda olduklarından dolayı HRP’nin afinite kromatografisi ile saflaştırılmasında önem arz etmektedir.



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

3.3.2. 4-Amino benzohidrazid türevlerinin sentezlenmesi

Ticari olarak satın alamadığımız 4-Amino 2-kloro benzohidrazid, 4-Amino 3-kloro benzohidrazid, 4-Amino 2-bromo benzohidrazid bileşiklerinden, metil esterleri çıkış bileşiği olarak kullanılıp, hidrazin sentezleri yapıldı.



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

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

3.3.3. İnhibitör çalışmaları

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

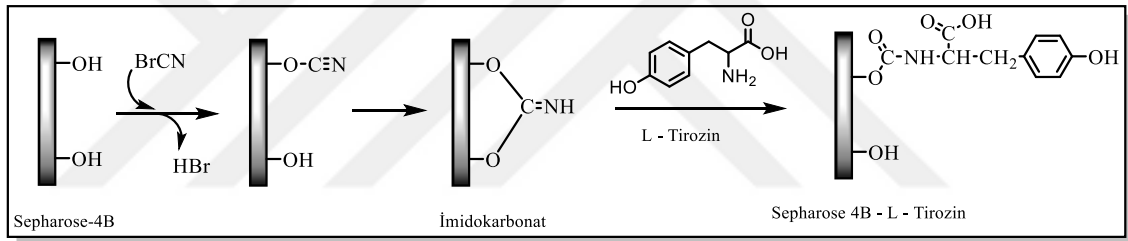
Literatürde önceden sentezlenen Sepharose-4B-L-tirozin-4-Amino benzohidrazid afinite jeli ile saflaştırılan HRP enzimi üzerine çalışılması planlanan, 4-aminobenzohidrazid ve sentezlediğimiz 4-Amino 2-kloro benzohidrazid (**4**), 4-Amino 3-kloro benzohidrazid (**5**), 4-Amino 2-bromo benzohidrazid (**6**) inhibitörlerinin inhibisyon kinetiklerinin incelenmesi amacı ile sabit substrat (guaiakol) konsantrasyonunda ve 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda her bir inhibitör için aktivite değerleri hesaplandı. İnhibitör ihtiva etmeyen ortamda yapılan aktivite ölçümü kontrol olarak kabul edilerek aktivite %100 olarak kabul edildi. Her bir deney üç kez tekrar edildi. İnhibisyon etkisi gösteren 4-Amino benzohidrazid ve türevlerinin IC_{50} (enzim aktivitesinde %50 azalmaya neden olan inhibitör konsantrasyonu) değerleri % Aktivite-[İnhibitör] grafiğinden bulundu. Daha sonra 5 farklı substrat konsantrasyonuna ve 3 farklı inhibitör konsantrasyonuna denk gelen inhibisyon değerlerinden faydalanılarak Linewaver–Burk grafikleri çizildi ve K_i değerleri tespit edildi.

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

CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B kullanılarak afinite jeli hazırlandı. L-tirozin uzantı kolu bu kolon materyaline kovalent olarak bağlandı. Sepharose 4-B-L-Tirozin jel materyaline, ligand olarak 4-Amino benzohidrazid, 4-Amino 2-kloro benzohidrazid, 4-Amino 3-kloro benzohidrazid, 4-Amino 2-bromo benzohidrazid diazollanarak tirozin'deki benzen halkasının 3 pozisyonuna kenetlendirildi. Hazırlanan afinite jelinde Sepharose 4-B; matriksi, tirozin; afinite jelinin uzantı kolunu, inhibitörler ise enzimin spesifik olarak bağlayan kısmını oluşturmaktadır. Afinite jeli aşağıdaki prosedüre göre hazırlandı:

3.3.4.a. CNBr ile aktifleştirilmiş sepharose-4B'ye tirozin takılması

CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B, 300 mL soğuk su ile yıkanarak 0,1 M NaHCO₃ tamponu (pH=10) ile bir behere aktarıldı. Kullandığımız aynı tamponun 50 mL'sinde 70 mg tirozin çözülerek çözelti Sepharose 4-B ile aynı behere aktarıldı ve reaksiyon başlatıldı. 4°C'de 2 saat süreyle manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. 16 saat boyunca 4°C'de bekletildi. Bu sürenin bitiminde yıkama suyu 280 nm'de absorbanı vermeyinceye kadar bol su ile jel yıkandı, böylece reaksiyona girmeyen tirozin tamamen uzaklaştırılmış oldu. Yıkama işlemi 300 mL 0,2 M NaHCO₃ (pH=8,8) tamponu ile tekrarlandı. Tirozin takılı jel, aynı tamponun 40 mL'si içine alındı. Reaksiyon mekanizması Şekil 3.4'te verilmiştir.

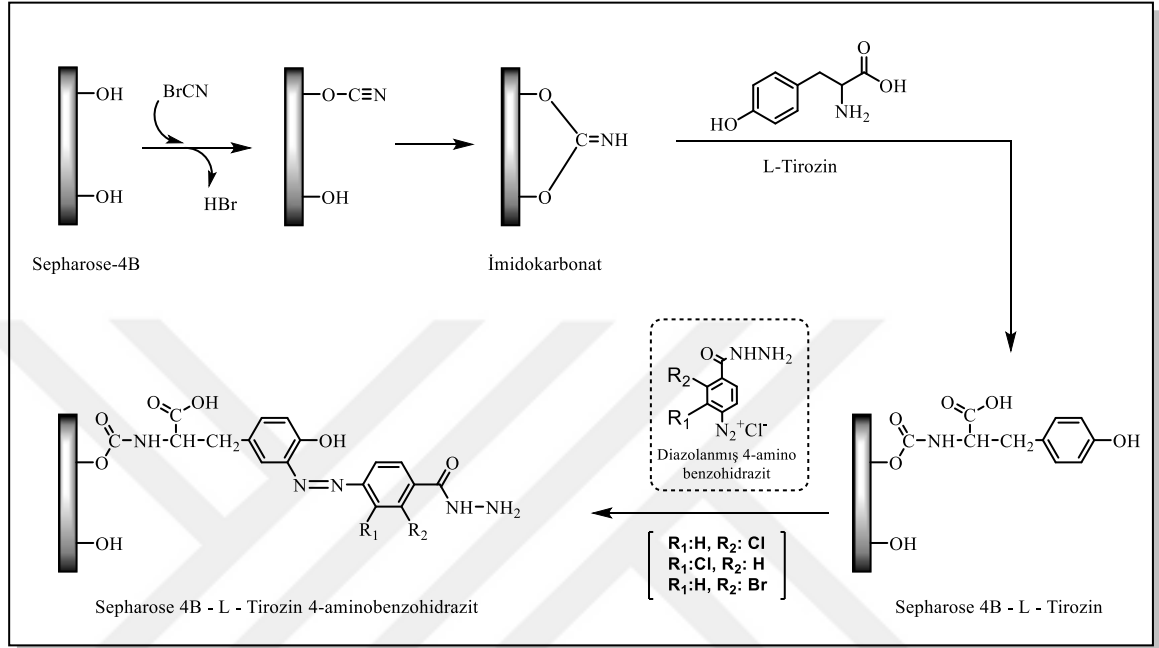


Şekil 3.4. CNBr ile aktifleştirilmiş sepharose-4B'ye tirozin takılması reaksiyonu

3.3.4.b. 4-aminobenzohidrazid ve türevlerinin kenetlendirilmesi

4-Amino benzohidrazid ve (türevi olan 3 molekülün her birinden) 100'er µmol alınarak 0°C civarında 10 mL, 1 M HCl içinde çözüldü ve içerisinde 20 mg NaNO₂ bulunan 0°C'deki 5 mL çözelti, inhibitör çözeltisine damla damla reaksiyon çözeltisine eklendi. 10 dakikalık reaksiyondan sonra diazolanmış bulunan inhibitörler 40 mL Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonuna ilave edildi. 1 M NaOH ile pH=9,5'a çıkarılarak ve sabit tutularak 3 saat süreyle oda sıcaklığında yavaşça karıştırıldı. Daha sonra 1 L saf su ve 100 mL, 10 mM KH₂PO₄ (pH=6,8) tamponuyla yıkandı, sonra da üzerine bir miktar daha aynı tampondan konularak saklandı (Whitney 1974).

Hazırlanan 4-Amino benzohidrazid (türevi) afinite jelleri için reaksiyon mekanizmaları Şekil 3.5'te gösterildi.



Şekil 3.5. 4-Amino benzohidrazid ve türevi moleküllerin Sepharose-4B-L-Tirozin'e kenetlendirilmesi reaksiyonu

3.3.5. Afinite kolonlarının paketlenmesi

pH=6,8 olan KH₂PO₄ dengeleme tamponu içine hazırlanmış olan jeller alınarak süspanse edildi. Su trombu kullanılarak vakum ile sistemin havası alındı. 1x10 cm'lik kapalı sistemden oluşan soğutmalı kolona, süspanse edilen jel paketlendi. Jel çöktükten sonra dengeleme tamponu kullanılarak peristaltik pompa yardımıyla yıkandı. Kolonun dengelenmiş olup olmadığını anlamak için eluat ile tamponun 280 nm'de absorbanslarının eşitlenmiş olmasına bakıldı.

3.3.5.a. Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu

Horseradish bitkisinin homojenatları 10 mM fosfat (pH=6,8) tamponu ile dengelenmiş olan kolonlara tatbik edildi. Kolonlar 500 mL 25 mM fosfat (pH=6,8) çözeltisi ile

yıkandı. Böylece Horseradish Peroksidaz (HRP) enzimi kolona tutunmuş oldu ve bu şekilde diğer safsızlıklar uzaklaştırılmış oldu. Sonra 1 M NaCl/25 mM Na₂HPO₄ (pH=6,8) tamponu tatbik edilerek Horseradish Peroksidaz (HRP) enzimi elüe edildi. Elüatlar 1,5'er mL halinde tüplere alındı ve 280 nm'deki absorbanslarına bakıldı. Peristaltik pompa vasıtasıyla kolonun akış hızı 20 mL/saat'e ayarlandı. Elüatlar 1,5'er mL halinde tüplere alındı. Her bir elüatın 280 nm'deki absorbans değeri köre karşı ölçüldü. Toplanmış olan elüatlardan absorbans gösteren tüplerde 595 nm'de Bradford protein tayini ve 470 nm'de Horseradish Peroksidaz (HRP) aktivite tayini yapıldı. Aktivitesi yüksek olan elüatların SDS-PAGE ile saflıkları kontrol edildi.

3.4. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofözezi İle Enzim Saflığının Belirlenmesi

HRP enzimi her bir afinite kolonundan saflaştırıldıktan sonra diyaliz edildi. Daha sonra %3-8 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektrofözezi (SDS-PAGE) ile saflaştırılan enzimin saflık derecesi ve molekül ağırlığı kontrol edildi. Standart olarak ise molekül ağırlığı belirlenmiş olan proteinler kullanıldı (Laemmli 1970).

Bunun için elektroförez plakaları önce su sonra alkol ile yıkandı. Her iki kenarında aralık oluşturuu bir plaka ile düz bir plaka üst üste getirilerek kısıkaçlarla tutturuldu. Sabitleştirilen plakalar, içerisinde sızdırmayı önleyen sünger ihtiva eden jel hazırlama kabinine konuldu. Ayırma ve yığma jelleri hazırlandı.

Ayırma jeli şöyle hazırlandı: 15 mL 1 M Tris-HCl (pH: 8,8), 13,2 mL %30 akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 0,6 mL %10 SDS, 0,39 mL %5'lik TEMED (N,N,N',N'-tetrametil etilen diamin) ve 9,39 mL saf su karıştırıldı. Bu karışımın üzerine son olarak 0,6 mL %10'luk amonyum persülfat (NH₄)₂S₂O₈ (PER) ilave edildi.

Yığma jeli şöyle hazırlandı: 1,23 mL 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 1,2 mL %30 akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 0,09 mL %10'luk SDS, 0,09 mL %5'lik TEMED ve 7,35 mL saf su alınarak karıştırıldı. Son olarak yine %10'luk PER'den 0,3 mL ilave edildi.

Hazırlanan ayırma jeli plakalar arasına üst kesimde 0,5 cm kalıncaya kadar enjektörle döküldü. Hava almamasına dikkat edildi. Jelin donması için bir süre beklendi. Ayırma jelinin katılaştığından emin olunduktan sonra yığma jeli hazırlandı. Yığma jeli tarağın üst seviyesine kadar ilave edildi. Üzerine tarak yerleştirildikten sonra jelin kurumması için beklendi ve sonra tarak dikkatlice çıkarılarak plakalar elektroforez tankına konuldu. Oluşan boşluklar işaretlenerek jelin üstü önce saf su, sonra da yürütme tamponu ile yıkandı. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu eklendi. Numuneler her birinde 10 µg protein olacak şekilde hazırlandı. Toplam hacim 100 µg olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu katıldı. 3 dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi. Daha sonra numuneler soğutulurak, elektroforeze çok ince bir enjektör yardımıyla uygulandı. Tank kapağı kapatılarak alt tarafından (+) kablo (anot), üstten (-) kablo (katot) yerleştirildi. Önce 90 voltta yarım saat bekletildi. Daha sonra akım 130 volta çıkarılarak 1,5 saat oda sıcaklığında yürütüldü. Akım kesilerek, cam plakalar arasındaki jel dikkatli bir şekilde çıkarıldı.

Elektroforez bitince cam plaklardan çıkartılan jel 30 dakika karıştırıcıda tespit çözeltisiyle muamele edildi. Daha sonra 30 dakikada redüksiyon çözeltisiyle karıştırıcıda bekletildi ve bu süre sonunda jel 3 defa saf su ile iyice yıkandı. Daha sonra 20 dakika gümüş nitrat çözeltisiyle karıştırıcının üstünde boyandı. Bu boya kısa bir süre önce hazırlanıp karanlıkta bekletildi. Banyo çözeltisiyle kısa ve çabukça yıkayıp siyahlaşan sıvı döküldü. Bantlar görülünce jel karıştırıcının üstünde 1 mL gliserin ve 250 mL %5'lik asetik asitten oluşan çözeltiyle iyice yıkandı (Temel 2006).

3.5. Horseradish bitkisinden saflaştırılan HRP Enzimi İçin Kinetik Çalışmalar

3.5.1. Optimum pH çalışmaları

Optimum pH çalışmaları, enzimin substrata doyduğu noktalarda pH=5,0-8,0 aralığında fosfat tamponu çözeltilerinde enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak belirlendi. Sonuçlar grafik ve tablo halinde verildi.

3.5.2. Optimum sıcaklık çalışması

Optimum sıcaklığı belirlemek amacıyla Horseradish bitkisinden saflaştırılan HRP enzimi için 5-85°C'de sıcaklık aralığında ve optimum pH da doygun substrat konsantrasyonlarında yapıldı. Bu işlem için -20 ile 100°C'ye ayarlanabilen su banyosu kullanıldı. İstenilen sıcaklığa getirilen aktivite ölçüm ortamına en son olarak enzim çözeltisi pipetlenip spektrofotometrede aktivite ölçümleri yapıldı. Sonuçlar grafik ve tablo halinde verildi.

3.5.3. Stabil pH çalışmaları

Enzimin stabil olduğu pH'yı tespit etmek için pH'ları 5,0 ile 8,0 arasında olan 10 mM KH_2PO_4 tamponları kullanıldı. Belirtilen pH'lardaki tampon çözeltilerinin 1 mL'sine 1 mL enzim çözeltisi karıştırılarak +4°C'de muhafaza edildi. 5 gün boyunca 12 saat arayla yapılan aktivite ölçümünde enzimin stabil olduğu pH belirlendi. Sonuçlar grafik ve tablo halinde verildi.

3.5.4. K_M ve V_{max} değerlerinin bulunması

K_M ve V_{max} değerlerinin tespit edilmesi amacıyla; Guaiakol kullanılarak optimum pH değerinde ve optimum sıcaklıkta 5 farklı substrat konsantrasyonunda aktivite değerleri ölçüldü. Bu amaçla guaiakolün stok çözeltisinden sırasıyla 0,5-1,5 mL arasında alındı. Her bir guaiakol konsantrasyonunun uygulandığı deney için, enzim aktivitesinin ölçüldüğü tampon çözeltisiyle toplam hacim 2,8 mL'ye tamamlandı. Daha sonra her bir tüpe 0,1 mL enzim çözeltisi ve son olarak 0,1 mL H_2O_2 katılarak, spektrofotometrede 470 nm'de absorbans değerleri ölçüldü. Her ölçüm 3 defa tekrarlandı. $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri bulunarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Grafiklerin çizimlerinde en küçük kareler regresyon doğru denklemi kullanıldı. K_M ve V_{max} değerleri grafik ve doğru denklemleri yardımıyla hesaplanarak grafik ve tabloda gösterildi (Lineweaver and Burk 1934).

3.6. Afinite Kolonunun Horseradish Peroksidaz Enzimini Tutma Kapasitesinin Bulunması

Hazırlanan jelin tutma kapasitesi bulunurken pH, sıcaklık ve iyonik şiddet etkileri incelendi. Kolonun kapasite tayin işleminde uygulanan prosedüre göre: Hazırlanan jelden 1 mL alındı. Dengeleme tamponuyla dengelenmiş 1x10 cm'lik bir kolona konuldu ve daha önceden Horseradish Peroksidaz (HRP) enzimi ile doyuruldu. Enzimin fazlası yıkama tamponu ile yıkandıktan sonra bağlanmış olan Horseradish Peroksidaz (HRP) enzimi uygun elüsyon tamponuyla elüe edilerek protein miktarı belirlendi. Aynı zamanda jel kurutularak tartıldı ve mg protein/gram-jel cinsinden Horseradish Peroksidaz (HRP) enziminin tutma kapasitesi belirlendi.

3.6.1. Sıcaklığın kolon kapasitesine etkisi

Horseradish Peroksidaz (HRP) enziminin saflaştırılmasında hazırlanan kolonda sıcaklığın kolon kapasitesine etkisini tespit etmek amacı ile pH:6,8'da 5, 10, 15, 20 ve 25°C'de farklı sıcaklıklarda tutma kapasitesi belirlendi ve (mg protein /g jel) başına grafik edildi.

3.6.2. pH'nın kolon kapasitesine etkisi

Horseradish Peroksidaz (HRP) enziminin saflaştırılmasında hazırlanan kolonda pH'nın bağlanmayı nasıl etkilediğini tespit etmek amacı ile farklı pH'larda (pH'sı 6,8 ile 10 arasında) değişen tamponlar kullanıldı ve en uygun pH için sonuçlar (mg protein /g jel başına) grafik edildi.

3.6.3. İyonik şiddetin kolon kapasitesine etkisi

Horseradish Peroksidaz (HRP) enzimi için optimum pH ve en uygun bağlanma sıcaklığında deney yapıldı ve bu deneyde iyonik şiddet 0,2 ile 0,5 arasında değiştirilerek, sonuçlar (mg protein /g jel) başına grafikte gösterildi.

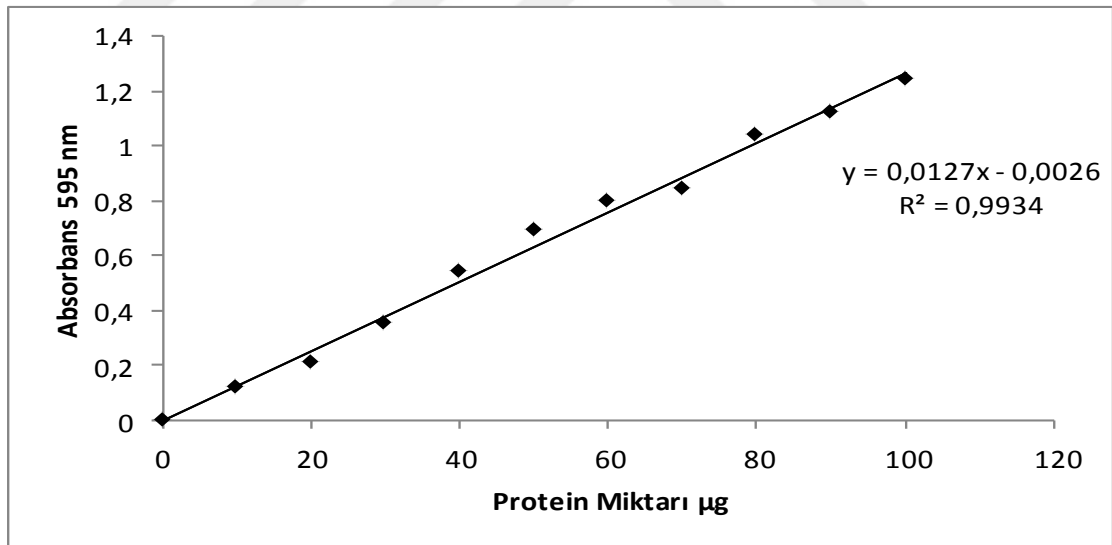


4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Horseradish Peroksidaz Enzimi ile İlgili Yapılan Araştırma Bulguları

4.1.1. Kantitatif protein tayini için kullanılan standart grafik

Bayır turpu bitkisinden hazırlanan homejenatlar ve afinite kolonlarından saflaştırılan Horseradish POD enzim çözeltilerindeki kantitatif protein miktarı Bradford yöntemiyle tayin edildi. Bu amaçla önce standart grafik hazırlandı. Bayır turpu bitkisinin homejenatları ve afinite kromatoğrafisi ile elde edilen enzim çözeltilerindeki kantitatif protein miktarı bu standart grafikten faydalanılarak bulundu. Standart çözeltilerin μg proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 4.1’de gösterildi.



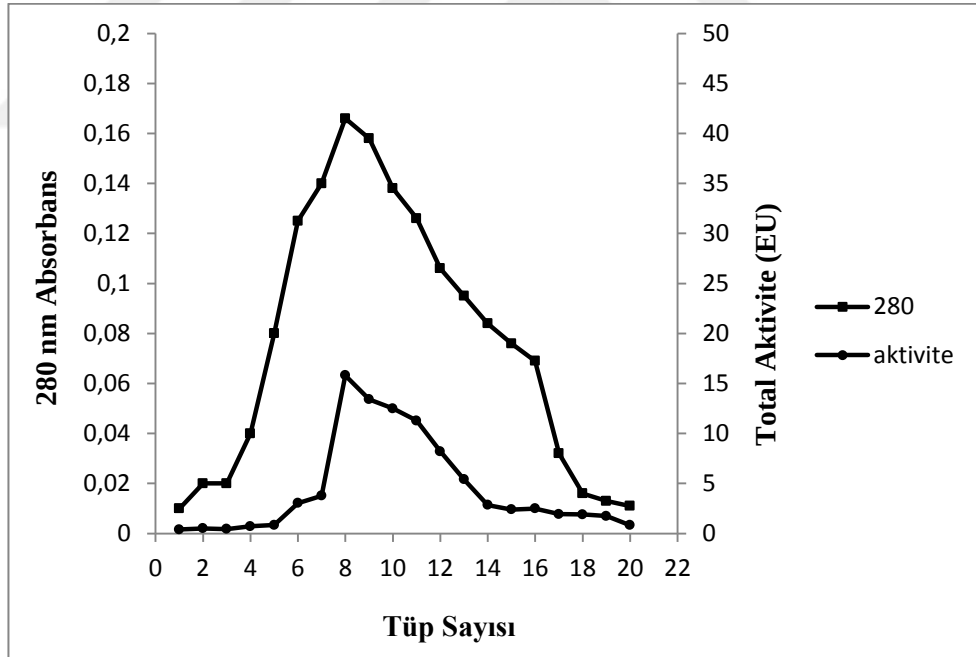
Şekil 4.1. Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayini için kullanılan standart grafik

*Protein miktarı (BSA: Bovine Serum Albumini)

4.2. Horseradish Bitkisinden POD Enziminin Saflaştırılması Sonuçları

4.2.1. Horseradish POD enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırma sonuçları

Bayır turpu bitkisinden hazırlanan homojenatlardan 5'er mL Bölüm 3.3.4'de anlatıldığı şekilde hazırlanan dengelenmiş olan kolona pipet vasıtasıyla tatbik edildi. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra elüsyon çözeltisi ile elüsyon yapıldı. Elüatlar kolon akış hızı 35 mL/saat'e ayarlanarak 1,5'er mL halinde tüplere alındı. Her bir elüatın 280 nm'de absorbans değerleri ölçüldü. 280 nm'de ölçülen absorbans değerlerinin tüp sayısına karşı grafikleri Şekil 4.2'de verildi. Absorbans gösteren tüplerin 470 nm'de aktivitelerine bakıldı. 470 nm'de tüp sayısına karşı aktivite grafikleri doygun substrat konsantrasyonunda hesaplanarak Şekil 4.2'de gösterildi.



Şekil 4.2. 4-Amino benzohidrazid kolonundan Bayır turpu POD (HRP) enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırma sırasında elüatların 280 nm'deki absorbanslarını ve 470 nm'deki aktivitelerini gösteren grafik

4.2.2. Horseradish POD enziminin 4-Amino Benzohidrazid Kolonu ile saflaştırma sonuçları

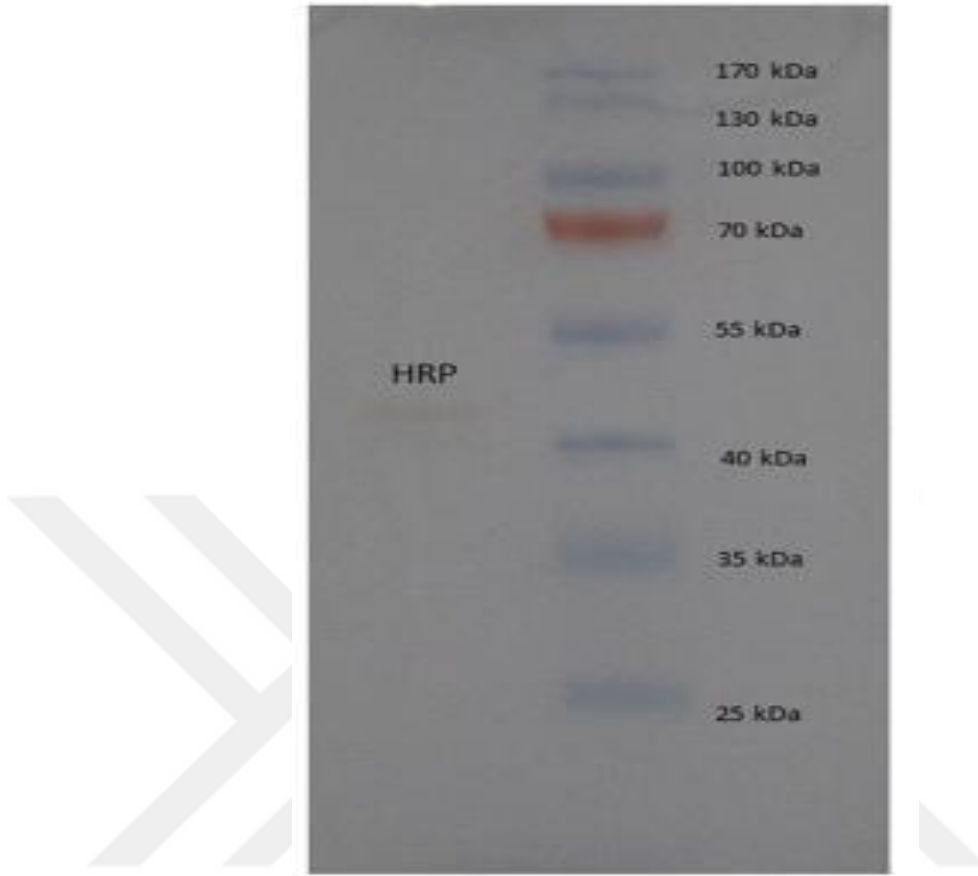
Ligand olarak 4-Amino benzohidrazid molekülünün kullanıldığı kolondan, bayır turpu (Horseradish) bitkisinden elde edilen peroksidaz enziminin saflaştırılması kademesinde 470 nm de aktivite tayini ve Bradford metoduyla kantitatif protein tayini yapıldı. Horseradish POD enziminin 4-Amino benzohidrazid kolonu ile saflaştırma sonuçları Çizelge 4.1’de gösterildi.

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

Horseradish Peroksidaz (HRP)		Toplam Hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Protein Miktarı (mg/mL)	Total Aktivite (EU)	Total Protein Miktarı (mg)	Spesifik Aktivite (EU/mg)	Yüzde Verim	S. Katsayısı
4-Amino benzohidrazid	Homojenat	5,00	160	0,89	800	4,45	179,7	100	1
	Sepharose 4B Afinité	1,50	9,8	0,0012	14,7	0,0018	8166,6	1,8	45,4

4.2.3. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi sonuçları

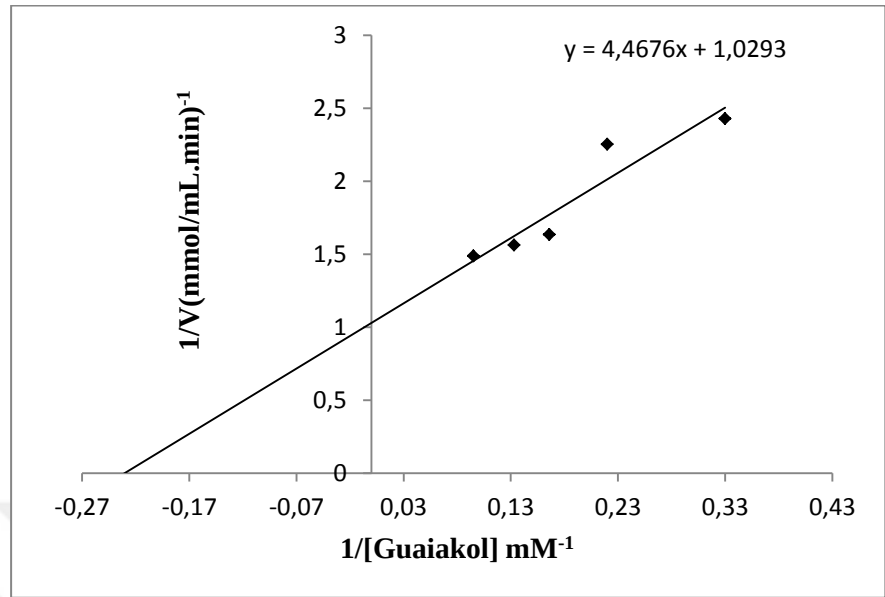
Kromatografik işlemler sonucu 4-Amino benzohidrazid afinite kolonu kullanılarak bayır turpundan saflaştırılan peroksidaz (HRP) enziminin saflığını kontrol etmek ve molekül kütlelerini tespit etmek amacıyla SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı. Bunun için hazırlanan kesikli SDS-PAGE elektroforez kuyularına sırayla saflaştırılan Horseradish POD’lar ve standart proteinler uygulandı ve yürütüldü. Daha sonra elde edilen bantların fotoğrafı çekildi.



Şekil 4.3. 4-Amino benzohidrazid kolonundan saflaştırılan HRP enziminin SDS- PAGE fotoğrafı

4.2.4. Guaiakol substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik yapılan çalışma sonuçları

Guaiakol substratı için Horseradish bitkisinden saflaştırılan POD enziminin K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi çalışmaları yapıldı. HRP için en az 5 farklı guaiakol konsantrasyonu kullanılarak optimum şartlarda aktivite ölçüldü. $1/[Guaiakol]-1/V$ Lineweaver-Burk grafiği çizildi ve bu grafikten K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2 ve Şekil 4.4’de görülmektedir. Bu çalışmalar sonucunda guaiakol için K_M değeri 4,34 mM bulunurken V_{max} değeri ise 0,97 EU/mL.dk olarak tespit edildi.



Şekil 4.4. HRP enziminin guaiakol substratıyla elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği

Çizelge 4.2. Horseradish (*Armoracia rusticana*) POD enzimi için K_M ve V_{max} değerleri

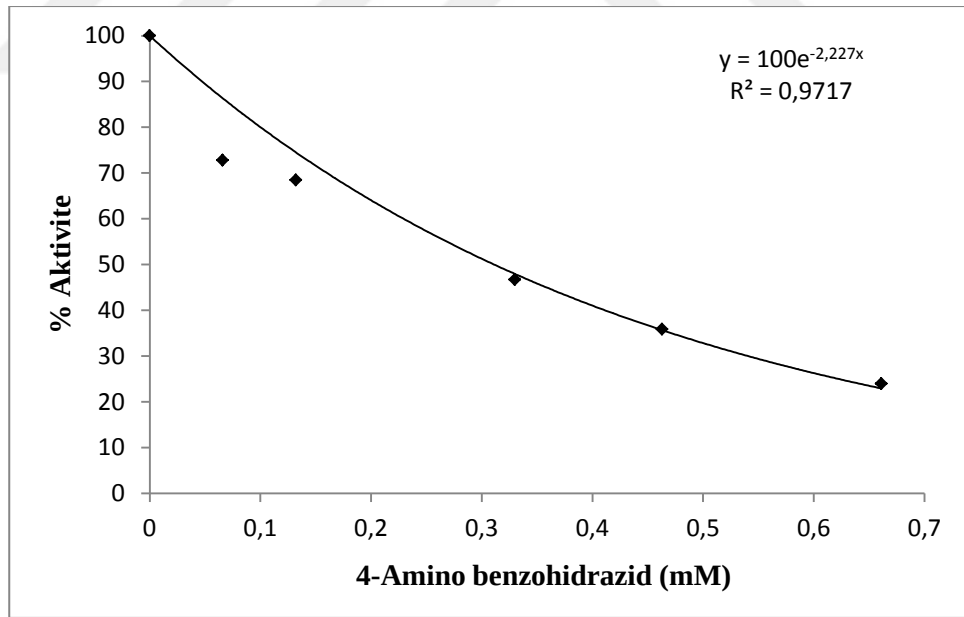
Kinetik Çalışmalar	
K_M	4,34 mM
V_{max}	0,97 EU/mL.dk

4.3. Kullanılan İnhibitörün K_i ve IC_{50} Değerlerinin Bulunmasına Yönelik Yapılan Çalışma Sonuçları

Bu çalışmada 4-Amino benzohidrazid molekülünün Horseradish POD enzimi üzerine inhibisyon etkisi incelendi. Sabit substrat konsantrasyonunda (45mM guaiakol) ve 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda her bir inhibitör için aktivite değerleri hesaplandı. 3 farklı inhibitör konsantrasyonu ve 5 farklı substrat konsantrasyonundan ise K_i değeri belirlendi. K_i ve IC_{50} deney prosedürü gösterildi. % Aktivite-Konsantrasyon grafiği çizilerek IC_{50} değeri bulundu ve Lineawear-Burk grafiğinden K_i değeri tespit edildi.

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

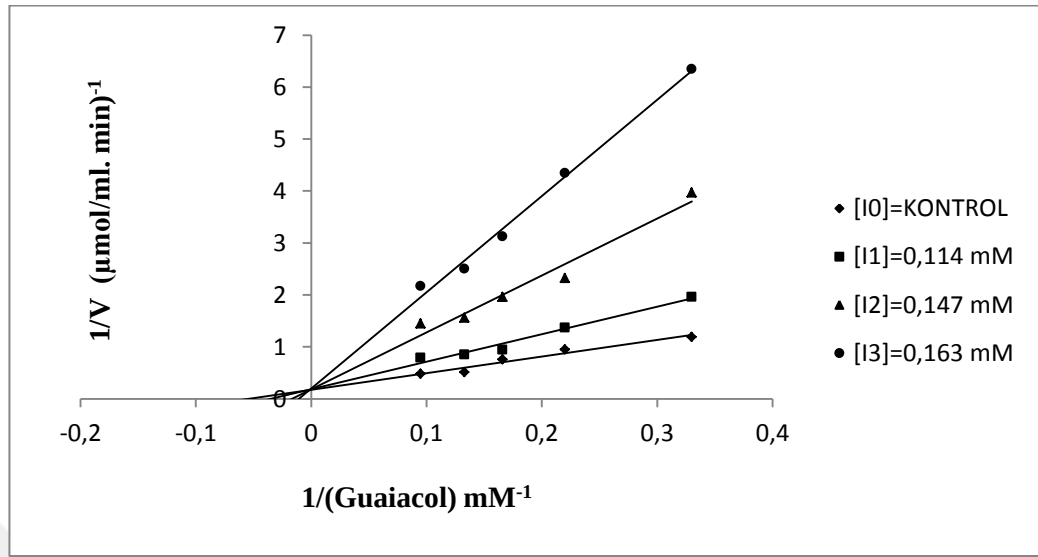
Kör Tüpü						Numune Tüpü							
	Guaiakol (mL)	Fosfat Tamp(mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	Su (mL)	Guaiakol(mL)	Fosfat Tamp(mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	POD(mL)	Su (mL)	[I] mM	% Aktivite
4-Amino benzohidrazid	0,5	1,0	1,0	0,01	0,490	0,5	1,0	1,0	0,01	0,05	0,440	0,066	72,82
	0,5	1,0	1,0	0,02	0,480	0,5	1,0	1,0	0,02	0,05	0,430	0,132	68,47
	0,5	1,0	1,0	0,05	0,450	0,5	1,0	1,0	0,05	0,05	0,400	0,330	46,73
	0,5	1,0	1,0	0,07	0,430	0,5	1,0	1,0	0,07	0,05	0,380	0,463	35,86
	0,5	1,0	1,0	0,10	0,400	0,5	1,0	1,0	0,10	0,05	0,350	0,661	23,95



Şekil 4.5. HRP enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 4-Amino benzohidrazid inhibitörü ile elde edilen % Aktivite-Konsantrasyon grafiği

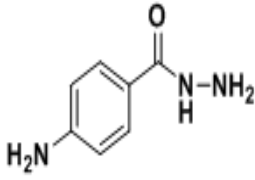
Çizelge 4.4. HRP enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 4-Amino benzohidrazid inhibitörü için $1/V$, $1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü

Kör Tüpü						Numune Tüpü						$1/V$ ($\mu\text{mol}/$ $\text{mL} \cdot \text{min})^{-1}$	$1/S$ mM^{-1}
	Guaiakol (mL)	Fosfat Tamp(mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	Su (mL)	Guaiakol (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	Su (mL)	POD (mL)		
[I] ₀	0,2	1,0	1,0	-	0,800	0,2	1,0	1,0	-	0,780	0,02	1,180	0,330
	0,3	1,0	1,0	-	0,700	0,3	1,0	1,0	-	0,680	0,02	0,952	0,220
	0,4	1,0	1,0	-	0,600	0,4	1,0	1,0	-	0,580	0,02	0,757	0,166
	0,5	1,0	1,0	-	0,500	0,5	1,0	1,0	-	0,480	0,02	0,515	0,133
	0,6	1,0	1,0	-	0,400	0,6	1,0	1,0	-	0,380	0,02	0,480	0,095
[I] ₁	0,2	1,0	1,0	0,01	0,79	0,2	1,0	1,0	0,01	0,770	0,02	1,960	0,330
	0,3	1,0	1,0	0,01	0,690	0,3	1,0	1,0	0,01	0,670	0,02	1,369	0,220
	0,4	1,0	1,0	0,01	0,590	0,4	1,0	1,0	0,01	0,570	0,02	0,943	0,166
	0,5	1,0	1,0	0,01	0,490	0,5	1,0	1,0	0,01	0,470	0,02	0,854	0,133
	0,6	1,0	1,0	0,01	0,390	0,6	1,0	1,0	0,01	0,370	0,02	0,787	0,095
[I] ₂	0,2	1,0	1,0	0,05	0,660	0,2	1,0	1,0	0,05	0,730	0,02	3,970	0,330
	0,3	1,0	1,0	0,05	0,560	0,3	1,0	1,0	0,05	0,630	0,02	2,325	0,220
	0,4	1,0	1,0	0,05	0,460	0,4	1,0	1,0	0,05	0,530	0,02	1,960	0,166
	0,5	1,0	1,0	0,05	0,360	0,5	1,0	1,0	0,05	0,430	0,02	1,562	0,133
	0,6	1,0	1,0	0,05	0,260	0,6	1,0	1,0	0,05	0,330	0,02	1,449	0,095
[I] ₃	0,2	1,0	1,0	0,1	0,700	0,2	1,0	1,0	0,1	0,680	0,02	6,350	0,330
	0,3	1,0	1,0	0,1	0,600	0,3	1,0	1,0	0,1	0,580	0,02	4,347	0,220
	0,4	1,0	1,0	0,1	0,500	0,4	1,0	1,0	0,1	0,480	0,02	3,125	0,166
	0,5	1,0	1,0	0,1	0,400	0,5	1,0	1,0	0,1	0,380	0,02	2,500	0,133
	0,6	1,0	1,0	0,1	0,300	0,6	1,0	1,0	0,1	0,280	0,02	2,173	0,095



Şekil 4.6. HRP enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 4-Amino benzohidrazid inhibitörü için edilen $1/V-1/[S]$ grafiği

Çizelge 4.5. HRP enzimi üzerine 4-Amino benzohidrazid inhibitörünün inhibisyon etkisi

 4-Amino benzohidrazid	HRP	IC ₅₀ (μM)	Ortalama K _i (μM)	İnhibisyon tipi
		311	141±23,3	Yarışmalı

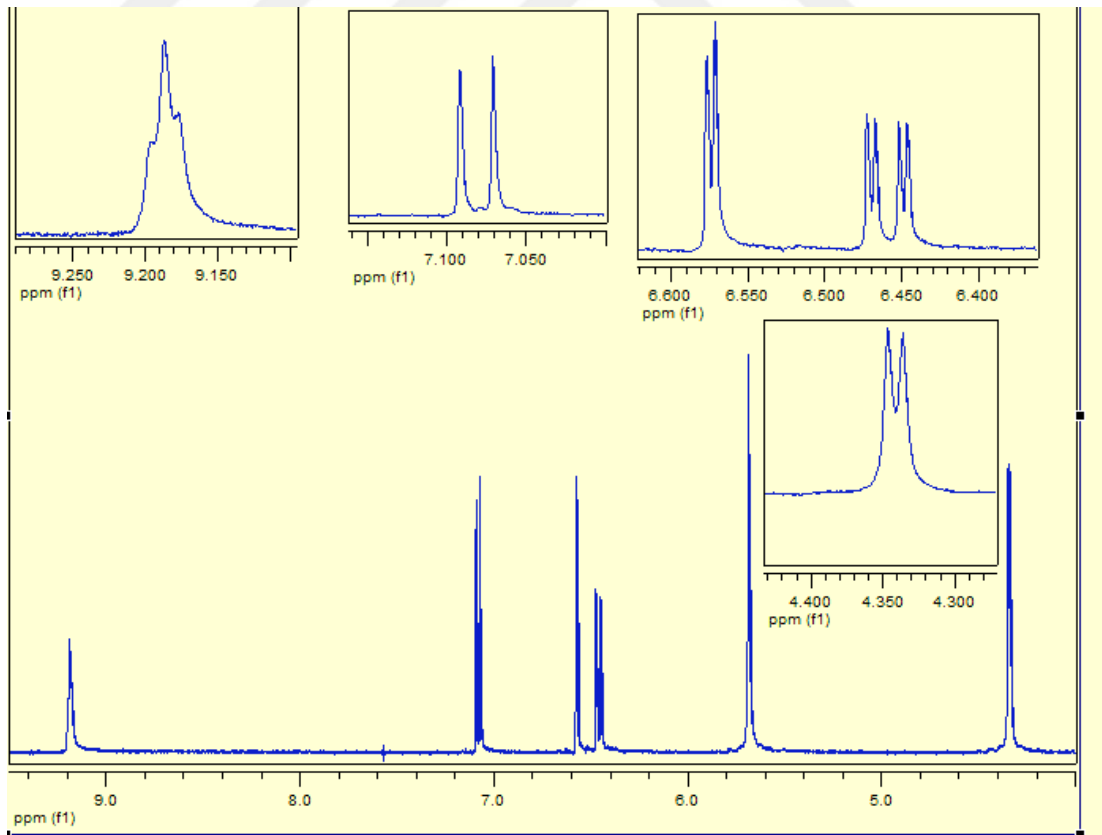
4.4. 4-Amino Benzohidrazid Türevlerinin Sentezlenmesi

4-Amino 2-kloro benzohidrazid, 4-Amino 3-kloro benzohidrazid, 4-Amino 2-bromo benzohidrazid molekülleri ticari olarak temin edilemediğinden dolayı bu bileşiklerin metil esterleri kullanılarak bölüm 3.3.2’de anlatıldığı gibi hidrazin sentezleri yapıldı. ¹H-NMR’la moleküllerin karakterizasyonu doğrulandı.

Çizelge 4.6. 4-Amino benzohidrazid türevleri sentez sonuçları

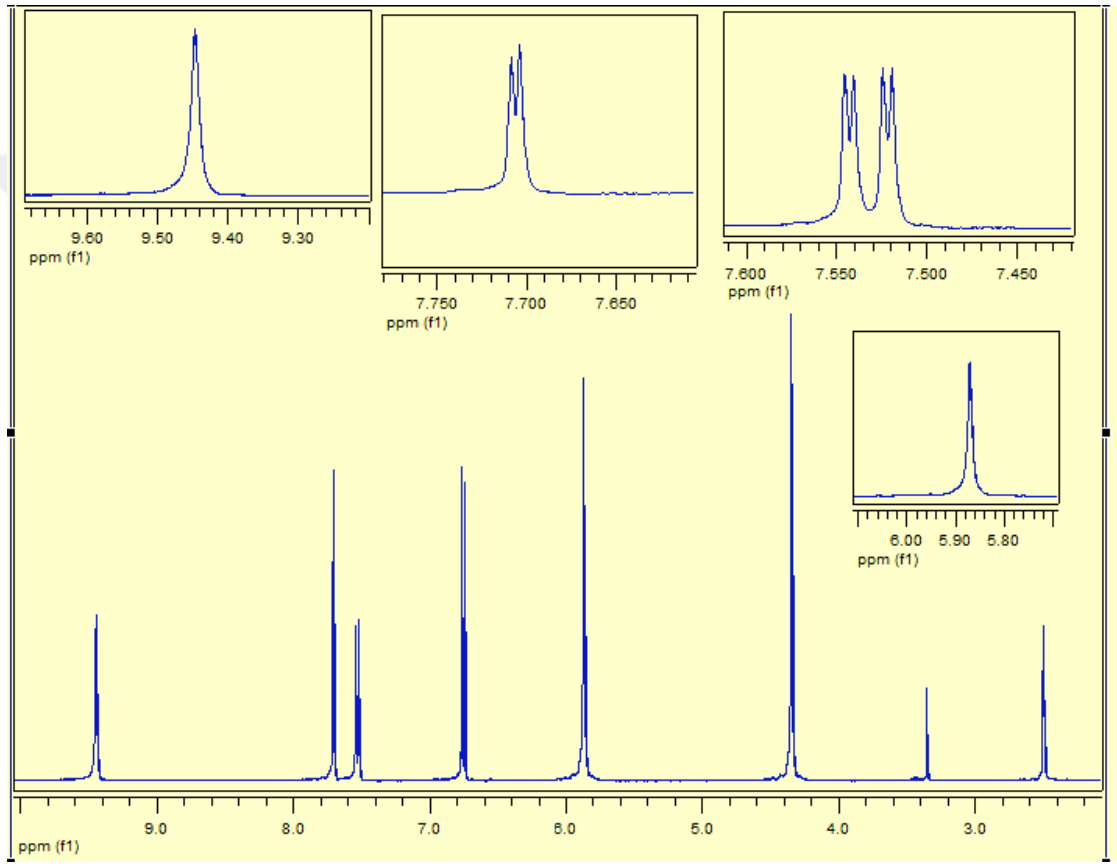
Reaktant 1	Reaktant 2	R ₁ /R ₂ mmol	Ürün	Süre	% Verim
4-Amino 2- kloro metil benzoat (1)	Hidrazin monohidrat	3/12	4-Amino 2-kloro benzohidrazid (4)	21 saat	55
4-Amino 3- kloro metil benzoat (2)	Hidrazin monohidrat	3/12	4-Amino 3-kloro benzohidrazid (5)	24 saat	42
4-Amino 2-bromo metil benzoat (3)	Hidrazin monohidrat	3/9	4-Amino 2-bromo benzohidrazid (6)	13 saat	60

Satın aldığımız 4-Amino 2-kloro metilbenzoat, 4-Amino 3-kloro metilbenzoat, 4-Amino 2-bromo metilbenzoat çıkış molekülleri olarak kullanılıp bunların hidrazin formları sentezlendi. Sonuçlar Çizelge 4.6’da ve sentezlenen moleküllerin ¹H-NMR (400 MHz) spektrumları Şekil 4.7, 4.8 ve 4.9’da gösterildi.

**Şekil 4.7.** 4-Amino 2-kloro benzohidrazid molekülünün 400 MHz ¹H-NMR spektrumu

4-Amino 2-kloro benzohidrazid molekü için NMR sonuçları:

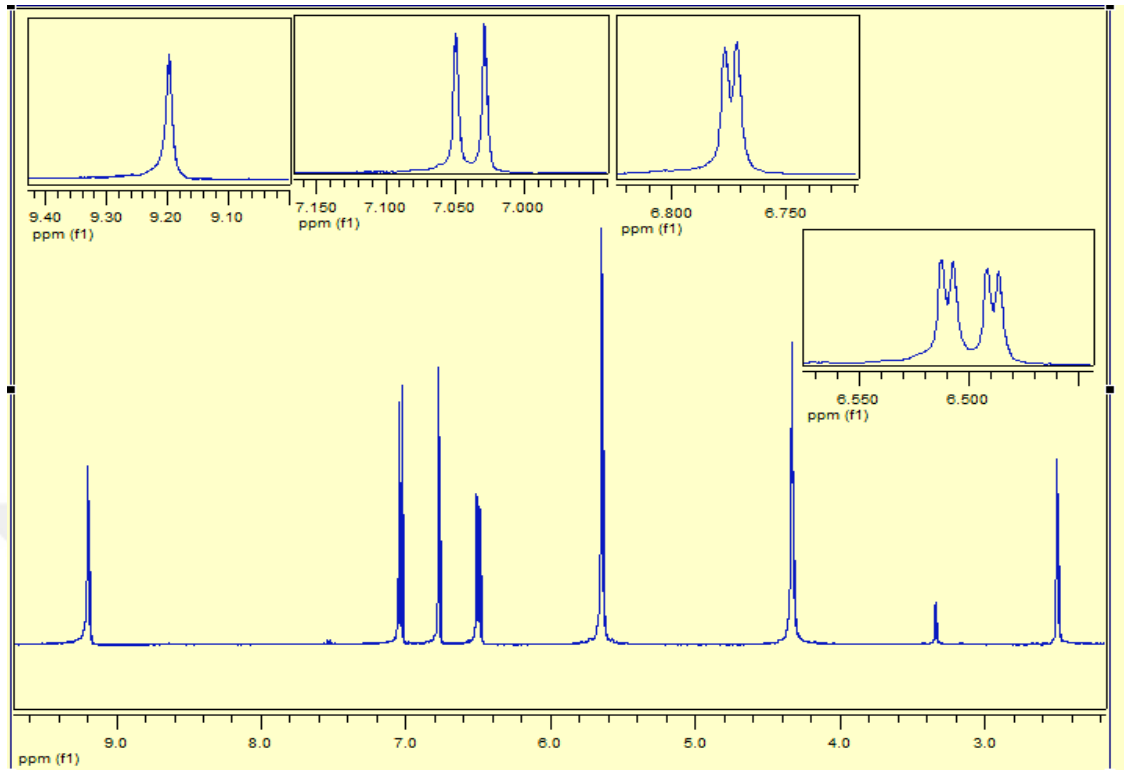
^1H -NMR (400 MHz, DMSO-d_6): 9.19 (t, $J=4$ Hz, 1H, -NH-N-); 7.08 (d, $J_{65}=8.4$ Hz, 1H, $\text{H}_{6\text{aril}}$); 6.57 (d, $J_{53}=2.4$ Hz, 1H, $\text{H}_{3\text{aril}}$); 6.46 (dd, $J_{65}=8.4$ Hz, $J_{53}=2.4$ Hz, 1H, $\text{H}_{5\text{aril}}$); 5.69 (s, 2H, Ar- NH_2); 4.34 (d, $J=4$ Hz, 2H, -N- NH_2)



Şekil 4.8. 4-Amino 3-kloro benzohidrazid molekülünün 400 MHz ^1H -NMR spektrumu

4-Amino 3-kloro benzohidrazid molekü için NMR sonuçları:

^1H -NMR (400 MHz, DMSO-d_6): 9.45 (s, 1H, -NH-N-); 7.71 (d, $J_{62}=2$ Hz, 1H, $\text{H}_{2\text{aril}}$); 7.53 (dd, $J_{65}=8$ Hz, $J_{62}=2$ Hz, 1H, $\text{H}_{6\text{aril}}$); 6.75 (d, $J_{65}=8$ Hz, 1H, $\text{H}_{5\text{aril}}$); 5.87 (s, 2H, Ar- NH_2); 4.35 (s, 2H, -N- NH_2)



Şekil 4.9. 4-Amino 2-bromo benzohidrazid molekülünün 400 MHz ^1H -NMR spektrumu

4-Amino 2-bromo benzohidrazid molekü için NMR sonuçları:

^1H -NMR (400 MHz, DMSO-d_6): 9.20 (s, 1H, -NH-N-); 7.04 (d, $J_{65}=8$ Hz, 1H, $\text{H}_{6\text{aril}}$); 6.77 (d, $J_{53}=2$ Hz, 1H, $\text{H}_{3\text{aril}}$); 6.50 (dd, $J_{65}=8$ Hz, $J_{53}=2$ Hz, 1H, $\text{H}_{5\text{aril}}$); 5.65 (s, 2H, Ar-NH₂); 4.33 (s, 2H, -N-NH₂)

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

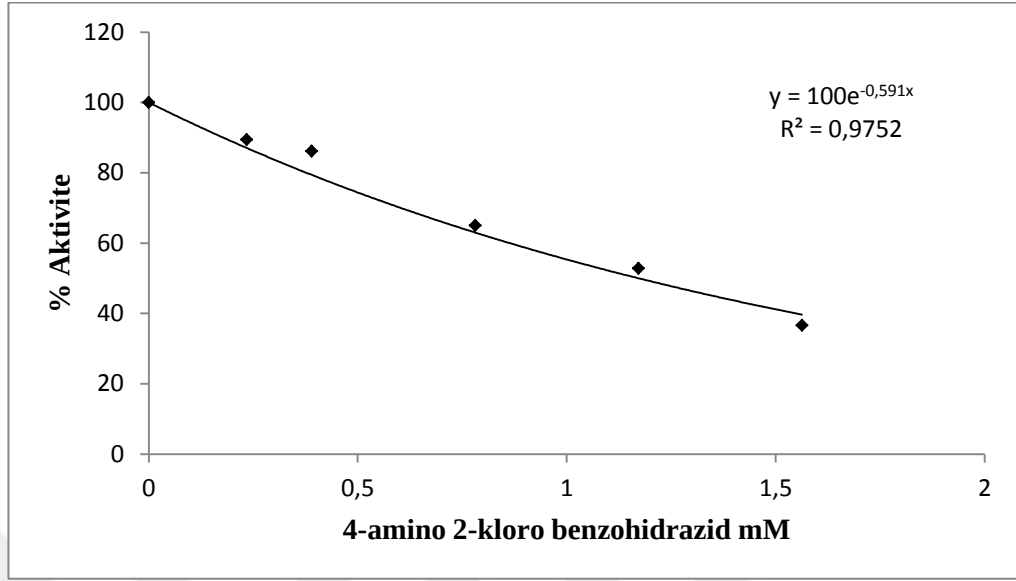
Bu çalışmada sentezlenen 4-Amino 2-kloro benzohidrazid, 4-Amino 3-kloro benzohidrazid ve 4-Amino 2-bromo benzohidrazid moleküllerinin Horseradish POD enzimi üzerine inhibisyon etkileri incelendi. Guaiakol substratı doygunluğun altında alındı. Böylece reaksiyon hızı guaiakole bağlı olarak bulundu. Bu amaçla, sabit substrat konsantrasyonunda (45mM guaiakol) ve 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda her bir inhibitör için aktivite değerleri hesaplandı. 3 farklı inhibitör konsantrasyonu ve 5 farklı

substrat konsantrasyonundan ise K_i değerleri belirlendi. K_i ve IC_{50} deney prosedürleri gösterildi. % Aktivite-Konsantrasyon grafikleri çizilerek IC_{50} değerleri bulundu ve Lineawear-Burk grafiklerinden K_i değerleri tespit edildi.

4.5.1. 4-Amino 2-kloro benzohidrazid inhibitörü için Horseradish (*Armoracia rusticana*) POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan kinetik çalışmalar

Çizelge 4.7. 4-Amino 2-kloro benzohidrazid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen HRP enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan % Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

Kör Tüpü						Numune Tüpü							
İnhibitör	Guaiakol (mL)	Fosfat Tamp(mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	Su (mL)	Guaiakol (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	İnhibitör (mL)	POD(mL)	Su (mL)	[I] mM	% Aktivite
4-Amino 2-kloro benzohidrazid	0,5	1,0	1,0	0,030	0,470	0,5	1,0	1,0	0,030	0,01	0,460	0,234	89,43
	0,5	1,0	1,0	0,050	0,450	0,5	1,0	1,0	0,050	0,01	0,460	0,390	86,17
	0,5	1,0	1,0	0,100	0,400	0,5	1,0	1,0	0,100	0,01	0,390	0,781	65,04
	0,5	1,0	1,0	0,150	0,350	0,5	1,0	1,0	0,150	0,01	0,340	1,172	52,84
	0,5	1,0	1,0	0,200	0,300	0,5	1,0	1,0	0,200	0,01	0,290	1,563	36,58



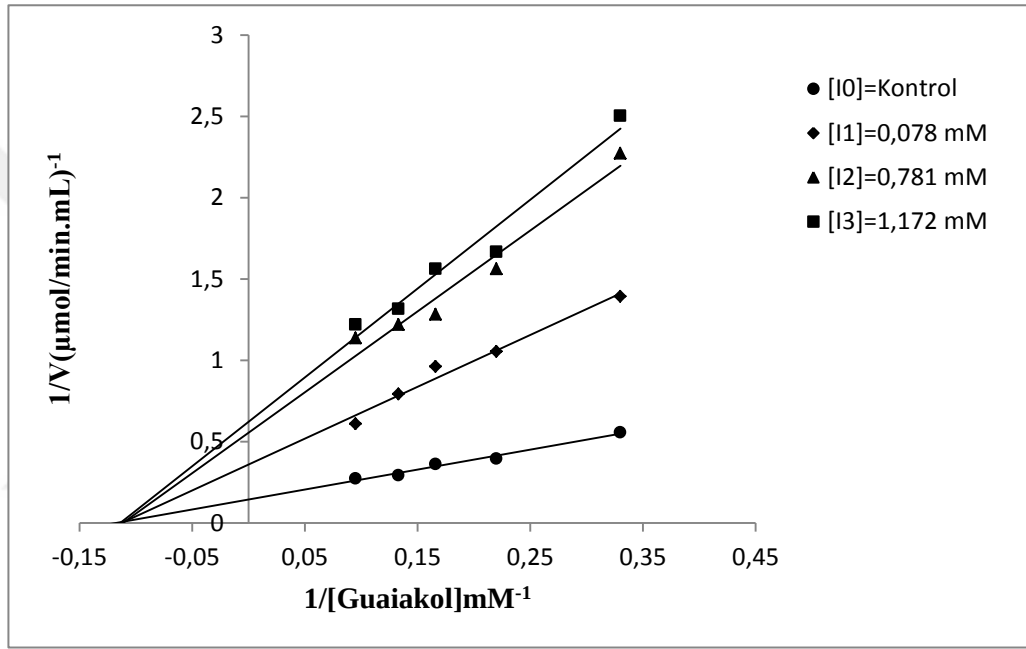
Şekil 4.10. HRP enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 4-Amino 2-kloro benzohidrazid ile elde edilen % Aktivite-Konsantrasyon grafiği

Çizelge 4.8. HRP enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 4-Amino 2-kloro benzohidrazid inhibitörü için $1/V$, $1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü

Kör Tüpü						Numune Tüpü							
Inhibitör no	Guaiaakol (mL)	Fosfat Tamp(mL)	H ₂ O ₂ (mL)	Inhibitör (mL)	Su (mL)	Guaiaakol (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	Inhibi-tör (mL)	Su (mL)	POD (mL)	1/V (µmol/ mL. min) ⁻¹	1/S mM ⁻¹
[I] ₀	0,2	1,0	1,0	-	0,8	0,2	1,0	1,0	-	0,79	0,01	0,557	0,330
	0,3	1,0	1,0	-	0,7	0,3	1,0	1,0	-	0,69	0,01	0,394	0,220
	0,4	1,0	1,0	-	0,6	0,4	1,0	1,0	-	0,59	0,01	0,362	0,166
	0,5	1,0	1,0	-	0,5	0,5	1,0	1,0	-	0,49	0,01	0,292	0,133
	0,6	1,0	1,0	-	0,4	0,6	1,0	1,0	-	0,39	0,01	0,272	0,095
[I] ₁	0,2	1,0	1,0	0,010	0,79	0,2	1,0	1,0	0,01	0,78	0,01	1,392	0,330
	0,3	1,0	1,0	0,010	0,69	0,3	1,0	1,0	0,01	0,68	0,01	1,053	0,220
	0,4	1,0	1,0	0,010	0,59	0,4	1,0	1,0	0,01	0,58	0,01	0,961	0,166
	0,5	1,0	1,0	0,010	0,49	0,5	1,0	1,0	0,01	0,48	0,01	0,793	0,133
	0,6	1,0	1,0	0,010	0,39	0,6	1,0	1,0	0,01	0,38	0,01	0,609	0,095
[I] ₂	0,2	1,0	1,0	0,1	0,7	0,2	1,0	1,0	0,1	0,69	0,01	2,272	0,330
	0,3	1,0	1,0	0,1	0,6	0,3	1,0	1,0	0,1	0,59	0,01	1,562	0,220
	0,4	1,0	1,0	0,1	0,5	0,4	1,0	1,0	0,1	0,49	0,01	1,282	0,166
	0,5	1,0	1,0	0,1	0,4	0,5	1,0	1,0	0,1	0,39	0,01	1,219	0,133
	0,6	1,0	1,0	0,1	0,3	0,6	1,0	1,0	0,1	0,29	0,01	1,136	0,095

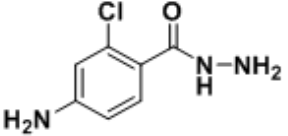
Çizelge 4.8. (devam)

[I] ₃	0,2	1,0	1,0	0,15	0,65	0,2	1,0	1,0	0,15	0,64	0,01	2,503	0,330
	0,3	1,0	1,0	0,15	0,55	0,3	1,0	1,0	0,15	0,54	0,01	1,666	0,220
	0,4	1,0	1,0	0,15	0,45	0,4	1,0	1,0	0,15	0,44	0,01	1,562	0,166
	0,5	1,0	1,0	0,15	0,35	0,5	1,0	1,0	0,15	0,34	0,01	1,315	0,133
	0,6	1,0	1,0	0,15	0,25	0,6	1,0	1,0	0,15	0,24	0,01	1,219	0,095



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

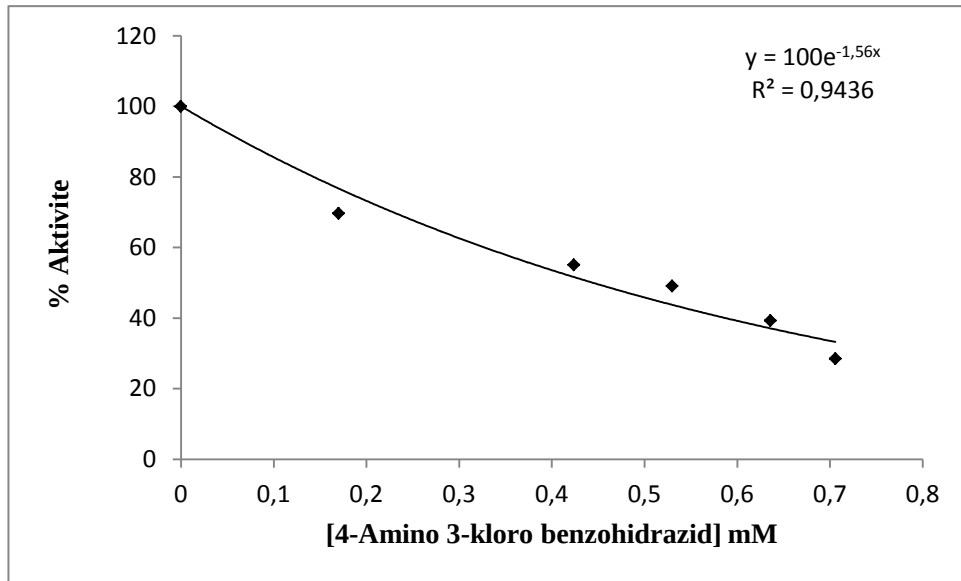
Çizelge 4.9. HRP enzimini üzerine 4-Amino 2-kloro benzohidrazid inhibitörünün inhibisyon etkisi

 4-Amino 2- kloro benzohidrazid	HRP	IC ₅₀ (μM)	Ortalama K _i (μM)	İnhibisyon tipi
		1138	260±99,1	Yarışmasız

4.5.2. 4-Amino 3-kloro benzohidrazid inhibitörü için Horseradish (*Armoracia rusticana*) POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan kinetik çalışmalar

Çizelge 4.10. 4-Amino 3-kloro benzohidrazid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen HRP enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan % Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

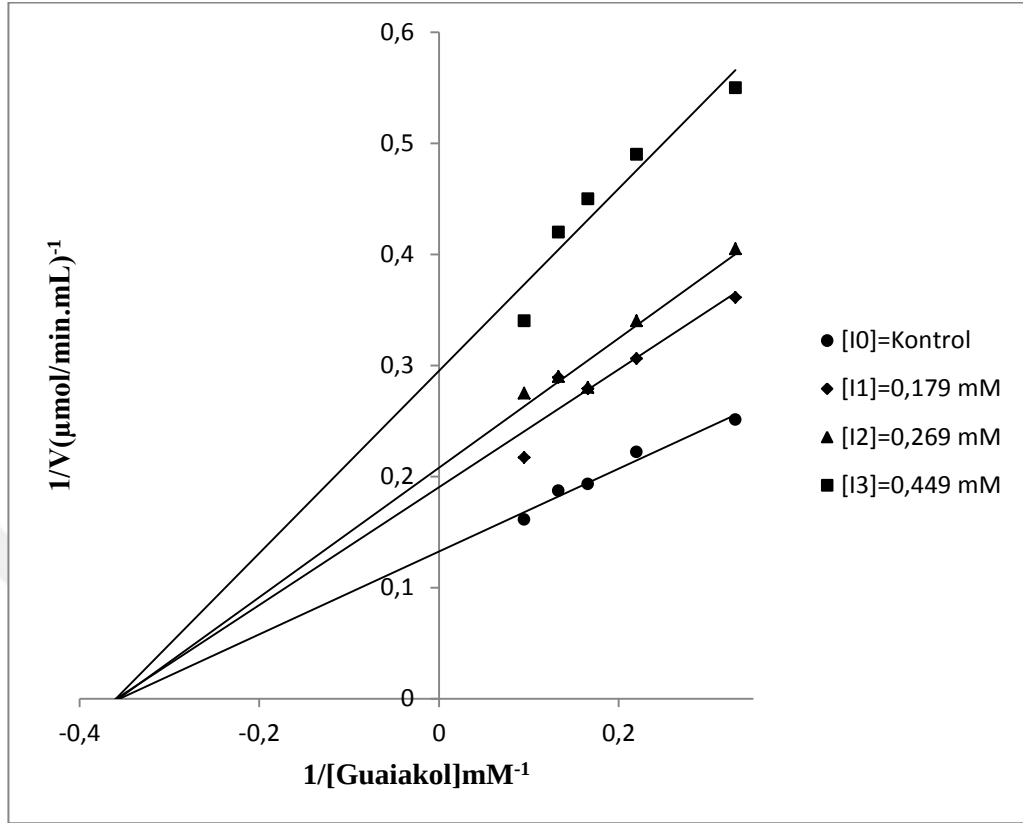
Kör Tüpü						Numune Tüpü							
Inhibitör	Guaiakol (mL)	Fosfat Tamp(mL)	H ₂ O ₂ (mL)	Inhibitör (mL)	Su (mL)	Guaico(mL)	Fosfat Tamp(mL)	H ₂ O ₂ (mL)	Inhibitör (mL)	POD(mL)	Su (mL)	[I] mM	% Aktivite
4-Amino 3 kloro benzohidrazid	0,5	1,0	1,0	0,05	0,45	0,5	1,0	1,0	0,05	0,01	0,44	0,17	69,66
	0,5	1,0	1,0	0,12	0,38	0,5	1,0	1,0	0,12	0,01	0,37	0,424	55,05
	0,5	1,0	1,0	0,15	0,35	0,5	1,0	1,0	0,15	0,01	0,34	0,530	49,06
	0,5	1,0	1,0	0,18	0,32	0,5	1,0	1,0	0,18	0,01	0,31	0,636	39,32
	0,5	1,0	1,0	0,2	0,3	0,5	1,0	1,0	0,2	0,01	0,29	0,706	28,46



Şekil 4.12. HRP enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 4-Amino 3-kloro benzohidrazid ile elde edilen % Aktivite-Konsantrasyon grafiği

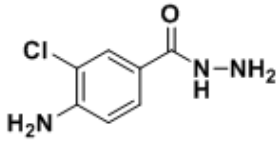
Çizelge 4.11. HRP enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 4-Amino 3-kloro benzohidrazid inhibitörü için $1/V$, $1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü

Kör Tüpü						Numune Tüpü							
Inhibitör no	Guaiakol (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	Inhibitör (mL)	Su (mL)	Guaiakol (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	Inhibi-tör (mL)	Su (mL)	POD (mL)	1/V (μmol/ mL. min) ⁻¹	1/S mM ⁻¹
[I] ₀	0,2	1,0	1,0	-	0,80	0,2	1,0	1,0	-	0,790	0,01	0,251	0,330
	0,3	1,0	1,0	-	0,70	0,3	1,0	1,0	-	0,690	0,01	0,222	0,220
	0,4	1,0	1,0	-	0,60	0,4	1,0	1,0	-	0,590	0,01	0,193	0,166
	0,5	1,0	1,0	-	0,50	0,5	1,0	1,0	-	0,490	0,01	0,187	0,133
	0,6	1,0	1,0	-	0,40	0,6	1,0	1,0	-	0,390	0,01	0,161	0,095
[I] ₁	0,2	1,0	1,0	0,05	0,75	0,2	1,0	1,0	0,05	0,740	0,01	0,361	0,330
	0,3	1,0	1,0	0,05	0,65	0,3	1,0	1,0	0,05	0,640	0,01	0,306	0,220
	0,4	1,0	1,0	0,05	0,55	0,4	1,0	1,0	0,05	0,540	0,01	0,279	0,166
	0,5	1,0	1,0	0,05	0,45	0,5	1,0	1,0	0,05	0,440	0,01	0,289	0,133
	0,6	1,0	1,0	0,05	0,35	0,6	1,0	1,0	0,05	0,340	0,01	0,217	0,095
[I] ₂	0,2	1,0	1,0	0,075	0,725	0,2	1,0	1,0	0,075	0,715	0,01	0,405	0,330
	0,3	1,0	1,0	0,075	0,625	0,3	1,0	1,0	0,075	0,615	0,01	0,340	0,220
	0,4	1,0	1,0	0,075	0,525	0,4	1,0	1,0	0,075	0,515	0,01	0,280	0,166
	0,5	1,0	1,0	0,075	0,425	0,5	1,0	1,0	0,075	0,415	0,01	0,290	0,133
	0,6	1,0	1,0	0,075	0,325	0,6	1,0	1,0	0,075	0,315	0,01	0,275	0,095
[I] ₃	0,2	1,0	1,0	0,125	0,675	0,2	1,0	1,0	0,125	0,665	0,01	0,550	0,330
	0,3	1,0	1,0	0,125	0,575	0,3	1,0	1,0	0,125	0,565	0,01	0,490	0,220
	0,4	1,0	1,0	0,125	0,475	0,4	1,0	1,0	0,125	0,465	0,01	0,450	0,166
	0,5	1,0	1,0	0,125	0,375	0,5	1,0	1,0	0,125	0,365	0,01	0,420	0,133
	0,6	1,0	1,0	0,125	0,275	0,6	1,0	1,0	0,125	0,265	0,01	0,340	0,095



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

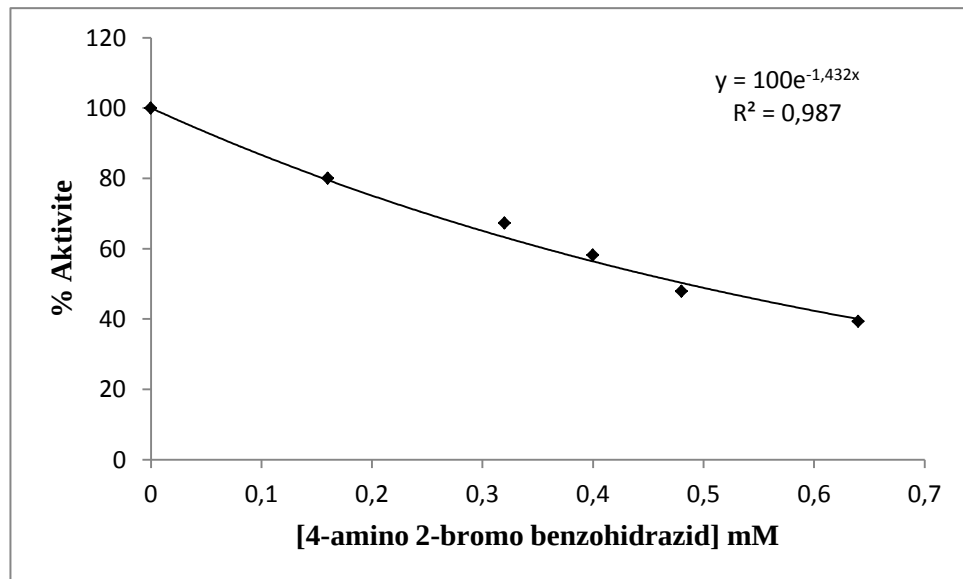
Çizelge 4.12. HRP enzimi üzerine 4-Amino 3-kloro benzohidrazid inhibitörünün inhibisyon etkisi

 4-Amino 3-kloro benzohidrazid	HRP	IC_{50} (μM)	Ortalama K_i (μM)	İnhibisyon tipi
		444	$408 \pm 55,5$	Yarışmasız

4.5.3. 4-Amino 2-bromo benzohidrazid inhibitörü için Horseradish (*Armoracia rusticana*) POD enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan kinetik çalışmalar

Çizelge 4.13. 4-Amino 2-bromo benzohidrazid inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen HRP enzimi üzerine guaiakol substratıyla yapılan % Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

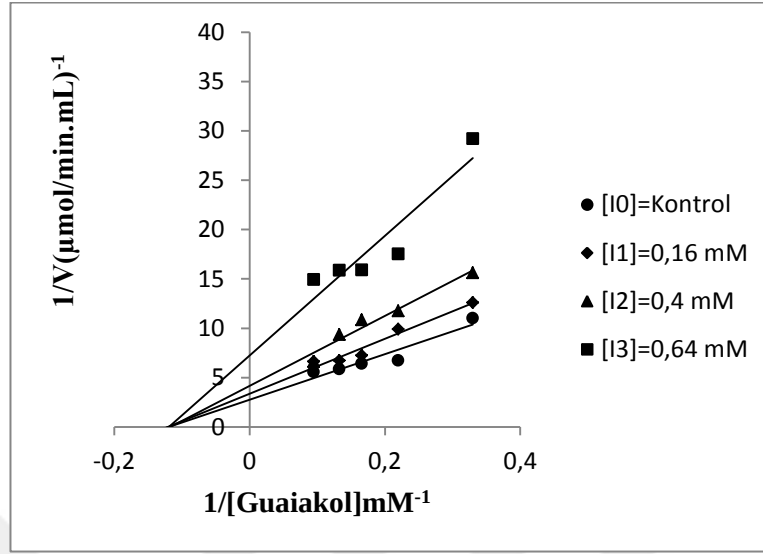
Kör Tüpü						Numune Tüpü						[I] mM	% Aktivite
Inhibitör	Guaiakol (mL)	Fosfat Tamp(mL)	H ₂ O ₂ (mL)	Inhibitör (mL)	Su (mL)	Guaico(mL)	Fosfat Tamp(mL)	H ₂ O ₂ (mL)	Inhibitör (mL)	POD(mL)	Su (mL)		
4-Amino 2 bromo benzohidrazid	0,5	1,0	1,0	0,050	0,450	0,5	1,0	1,0	0,050	0,01	0,440	0,16	80,00
	0,5	1,0	1,0	0,100	0,400	0,5	1,0	1,0	0,100	0,01	0,390	0,32	62,27
	0,5	1,0	1,0	0,125	0,375	0,5	1,0	1,0	0,125	0,01	0,365	0,40	58,18
	0,5	1,0	1,0	0,150	0,350	0,5	1,0	1,0	0,150	0,01	0,340	0,48	47,87
	0,5	1,0	1,0	0,200	0,300	0,5	1,0	1,0	0,200	0,01	0,290	0,64	39,39



Şekil 4.14. HRP enzimi için guaiakol substratına bağlı olarak 4-Amino 2-bromo benzohidrazid ile elde edilen % Aktivite-Konsantrasyon grafiği

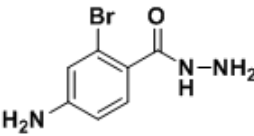
Çizelge 4.14. HRP enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 4-Amino 2-bromo benzohidrazid inhibitörü için $1/V$, $1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü

Kör Tüpü						Numune Tüpü							
Inhibitör no	Guaiakol (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	Inhibitör (mL)	Su (mL)	Guaiakol (mL)	Fosfat Tamp (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	Inhibi-tör (mL)	Su (mL)	POD (mL)	$1/V$ ($\mu\text{mol}/\text{mL} \cdot \text{min})^{-1}$	$1/S$ mM^{-1}
[I] ₀	0,2	1,0	1,0	-	0,8	0,2	1,0	1,0	-	0,790	0,01	10,99	0,330
	0,3	1,0	1,0	-	0,7	0,3	1,0	1,0	-	0,690	0,01	6,71	0,220
	0,4	1,0	1,0	-	0,6	0,4	1,0	1,0	-	0,590	0,01	6,41	0,166
	0,5	1,0	1,0	-	0,5	0,5	1,0	1,0	-	0,490	0,01	5,84	0,133
	0,6	1,0	1,0	-	0,4	0,6	1,0	1,0	-	0,390	0,01	5,55	0,095
[I] ₁	0,2	1,0	1,0	0,05	0,75	0,2	1,0	1,0	0,05	0,740	0,01	12,59	0,330
	0,3	1,0	1,0	0,05	0,65	0,3	1,0	1,0	0,05	0,640	0,01	9,90	0,220
	0,4	1,0	1,0	0,05	0,55	0,4	1,0	1,0	0,05	0,540	0,01	7,24	0,166
	0,5	1,0	1,0	0,05	0,45	0,5	1,0	1,0	0,05	0,440	0,01	6,71	0,133
	0,6	1,0	1,0	0,05	0,35	0,6	1,0	1,0	0,05	0,340	0,01	6,62	0,095
[I] ₂	0,2	1,0	1,0	0,125	0,675	0,2	1,0	1,0	0,125	0,665	0,01	15,61	0,330
	0,3	1,0	1,0	0,125	0,575	0,3	1,0	1,0	0,125	0,565	0,01	11,76	0,220
	0,4	1,0	1,0	0,125	0,475	0,4	1,0	1,0	0,125	0,465	0,01	10,86	0,166
	0,5	1,0	1,0	0,125	0,375	0,5	1,0	1,0	0,125	0,365	0,01	9,34	0,133
	0,6	1,0	1,0	0,125	0,275	0,6	1,0	1,0	0,125	0,265	0,01	6,62	0,095
[I] ₃	0,2	1,0	1,0	0,2	0,6	0,2	1,0	1,0	0,2	0,590	0,01	29,19	0,330
	0,3	1,0	1,0	0,2	0,5	0,3	1,0	1,0	0,2	0,490	0,01	17,54	0,220
	0,4	1,0	1,0	0,2	0,4	0,4	1,0	1,0	0,2	0,390	0,01	15,89	0,166
	0,5	1,0	1,0	0,2	0,3	0,5	1,0	1,0	0,2	0,290	0,01	15,87	0,133
	0,6	1,0	1,0	0,2	0,2	0,6	1,0	1,0	0,2	0,190	0,01	14,92	0,095



Şekil 4.15. HRP enzimi üzerine guaiakol substratına bağlı olarak 4-Amino 2-bromo benzohidrazid inhibitörü için edilen $1/V-1/[S]$ grafiği

Çizelge 4.15. HRP enzimini üzerine 4-Amino 2 bromo benzohidrazid inhibitörünün inhibisyon etkisi

 4-Amino 2- bromo benzohidrazid	HRP	IC ₅₀ (μM)	Ortalama K _i (μM)	İnhibisyon tipi
		483	628±209	Yarışmasız

Çizelge 4.16. HRP enzimi üzerine ligand moleküllerin toplu kinetik sonuçları

LİGAND MOLEKÜLLER	IC ₅₀ (μM)	K _i (μM)	İnhibisyon Tipi
4-Amino benzohidrazid	311	141±23,3	Yarışmalı
4-Amino 2-kloro benzohidrazid	1138	260±99,1	Yarışmasız
4-Amino 3-kloro benzohidrazid	444	408±55,5	Yarışmasız
4-Amino 2-bromo benzohidrazid	483	628±209	Yarışmasız

Horseradish POD Enzimlerinin 4-Amino benzohidrazid Türevleriyle Saflaştırılması Sonuçları

Horseradish POD enzimleri üzerine 4-Amino 2-kloro benzohidrazid, 4-Amino 3-kloro benzohidrazid, 4-Amino 2-bromo benzohidrazid moleküllerinin inhibisyon etkileri incelendikten sonra bu moleküllerin ligand olarak kullanıldığı Sepharose 4-B-L-Tirozin-4-Amino 2-kloro benzohidrazid, Sepharose 4-B-L-Tirozin-4-Amino 3-kloro benzohidrazid, Sepharose 4-B-L-Tirozin-4-Amino 2-bromo benzohidrazid kolonlarının sentezi bölüm 3.3.4.b’de anlatıldığı gibi yapıldı. Hazırlanan kolonlardan Horseradish bitkisinden peroksidaz enziminin saflaştırılma kademelerinde 470 nm de aktivite tayini yapıldı. Tüm kolonlardan saflaştırılan HRP enziminin saflaştırma sonuçları Çizelge 4.17’de gösterildi.

Çizelge 4.17. Afinite kolonlarından elde edilen HRP enzimi için hazırlanan saflaştırma tablosu

Horseradish Peroksidaz (HRP)		Toplam Hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Protein Miktarı (mg/mL)	Total Aktivite (EU)	Total Protein Miktarı (mg)	Spesifik Aktivite (EU/mg)	Yüzde Verim	S. Katsayısı
4-Amino 2-kloro benzohidrazid	Homojenat	5,00	94	1,2	470	6	78,3	100	1
	Sepharose 4B Afinite	1,50	14	0,0012	21	0,0018	11666	4,46	149
4-Amino 2-bromo benzohidrazid	Homojenat	5,00	94	1,2	470	6	78,3	100	1,00
	Sepharose 4B Afinite	1,50	10,1	0,0010	15,15	0,0015	10100	3,2	129
4-Amino 3-kloro benzohidrazid	Homojenat	5,00	94	1,2	470	6	78,3	100	1,00
	Sepharose 4B Afinite	1,50	15	0,0019	22,5	0,0028	8035	4,7	102,3

4.6. Horseradish Peroksidaz Enzimi Üzerine SDS-PAGE ve Kinetik Çalışma Sonuçları

4.6.1. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi sonuçları

Sentezlediğimiz molekülleri kullanarak hazırladığımız Sepharose 4-B-L-Tirozin-(**4**, **5**, **6**) afinite jellerinden saflaştırdığımız HRP enziminin saflığını ve molekül ağırlıklarını belirlemek için SDS-PAGE yapıldı. Jellerin boyanmasında gümüş boyama metodu daha hassas olduğu için tercih edildi. Saflaştırılan enzimlerin SDS-PAGE fotoğrafları Şekil 4.16'da gösterildi.



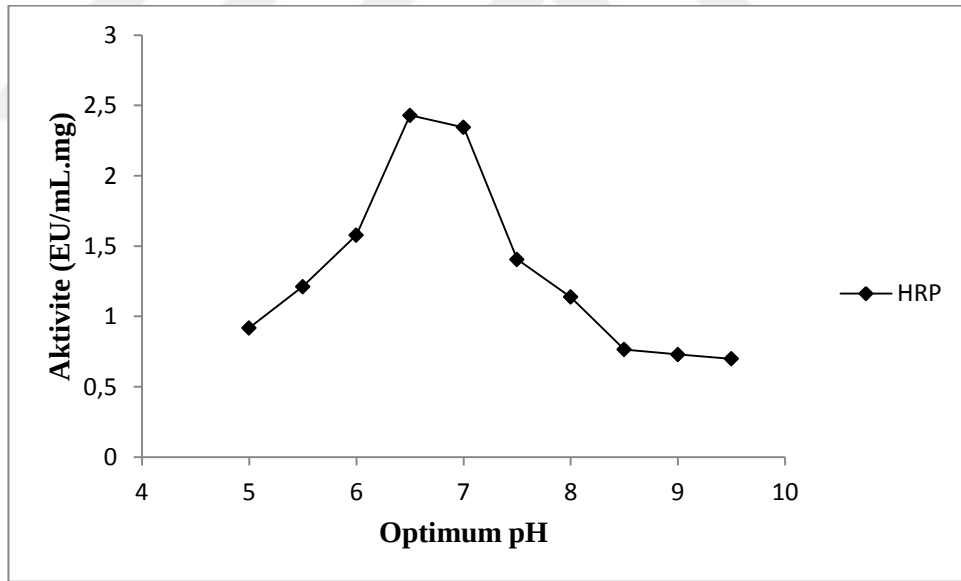
Şekil 4.16. (1) 4-Amino 2-kloro benzohidrazid, (2) 4-Amino 3-kloro benzohidrazid, (3) 4-Amino 2-bromo benzohidrazid afinite kolonlarından saflaştırılan HRP enziminin SDS-PAGE fotoğrafı

4.6.2. 4-Amino 2-kloro benzohidrazid inhibitörü ile saflaştırılan HRP enzimi için guaiakol substratı ile bulunan kinetik parametreler

Optimum pH, optimum sıcaklık, stabil pH değerlerini belirlemek amacıyla Bölüm 3.5'te anlatıldığı şekilde aktivite ölçümleri yapıldı. Horseradish bitkisinden elde edilen sonuçlar Şekil 4.17; 4.18 ve 4.19'da gösterildi.

4.6.3. Guaiakol substratı için pH-aktivite grafiği

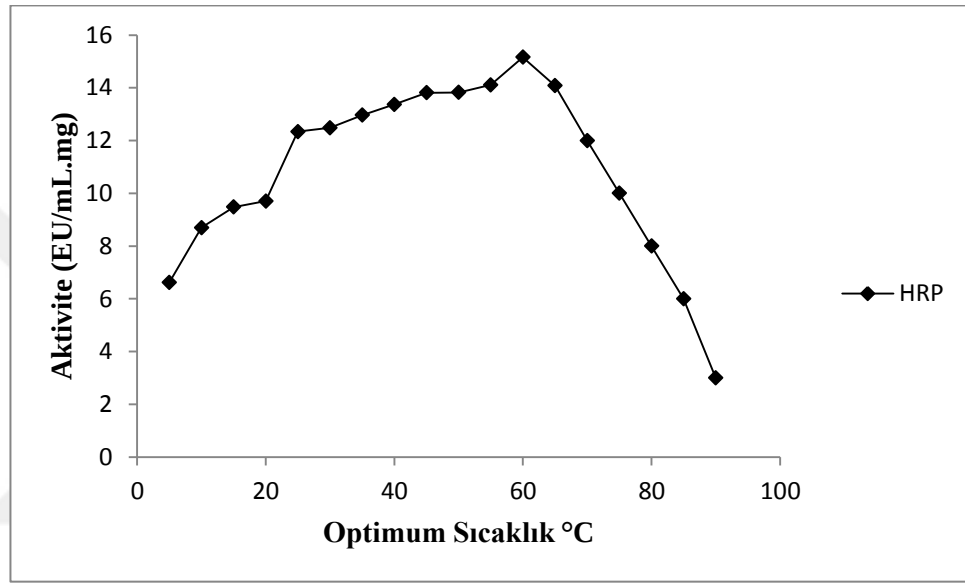
Optimum pH değerlerini belirlemek amacıyla Bölüm 3.5.1'de anlatıldığı şekilde pH:5-8 aralığında aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen aktivite değerlerine karşılık gelen pH değerleri Şekil 4.17'de verildi.



Şekil 4.17. Horseradish POD enzimi için guaiakol substratıyla optimum pH için pH-aktivite grafiği

4.6.4. Guaiakol substratı için sıcaklık-aktivite grafiği

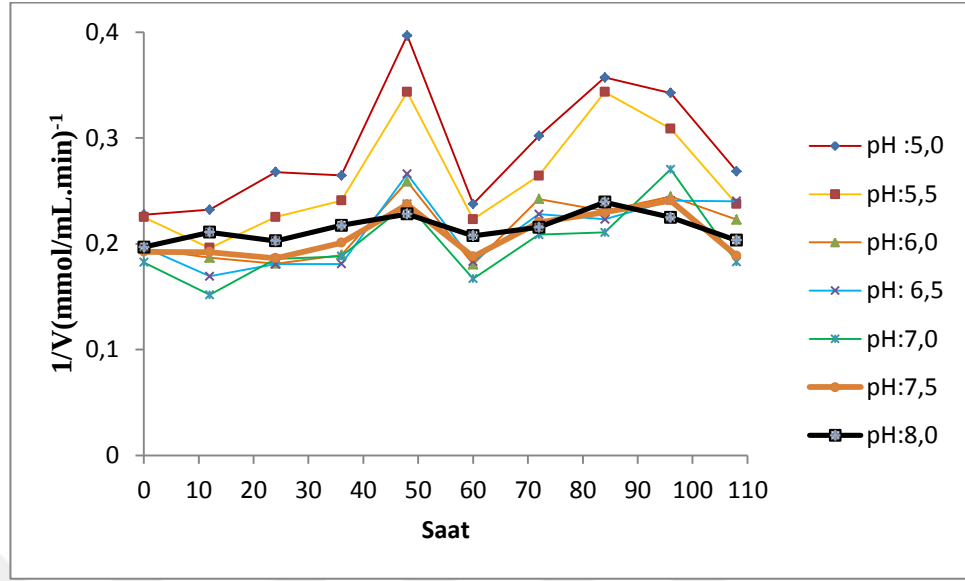
Optimum sıcaklık değerlerini belirlemek amacıyla B3l3m 3.5.2’de anlatıldığı şekilde 5-90°C sıcaklık aralığında aktivite 3l33mleri yapıldı. Elde edilen aktivite değerlerine karşılık gelen sıcaklık grafiği şekil 4.18’de verildi.



şekil 4.18. Horseradish POD enzimi i3in guaiakol substratıyla elde edilen Sıcaklık-Aktivite grafiği

4.6.5. Stabil pH 3alışması

Stabil pH değerlerini belirlemek amacıyla B3l3m 3.5.3’de anlatıldığı şekilde pH:5,0-8,0 aralığında her 12 saatte bir 7 g3n boyunca aktivite 3l33mleri yapıldı. Elde edilen aktivite değerlerine karşılık gelen pH değerleri şekil 4.19’da verildi.



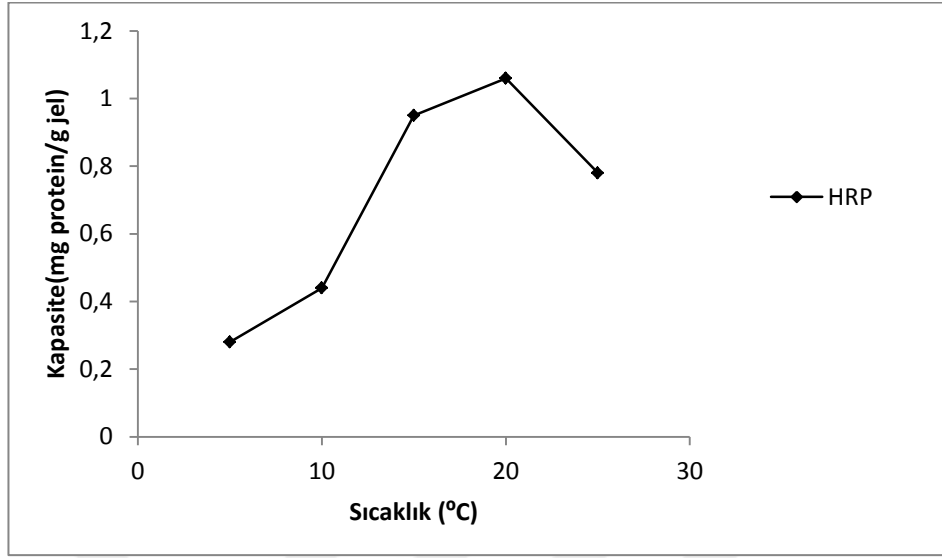
Şekil 4.19. Değişik pH'lardaki KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak HRP enzimi için elde edilen stabil pH grafiği

4.7. Horseradish bitkisinden 4-Amino 2-kloro benzohidrazid Molekülü ile Hazırlanan Afinite Kolonunun HRP enzimi Tutma Kapasitesinin Belirlenmesi

Hazırlanan jelin tutma kapasitesi bulunurken sıcaklık, pH ve iyonik şiddet etkileri incelendi. Deney prosedürü bölüm 3.6'da anlatıldığı şekilde uygulandı.

4.7.1. Sıcaklığın kolon kapasitesine etkisi çalışma sonuçları

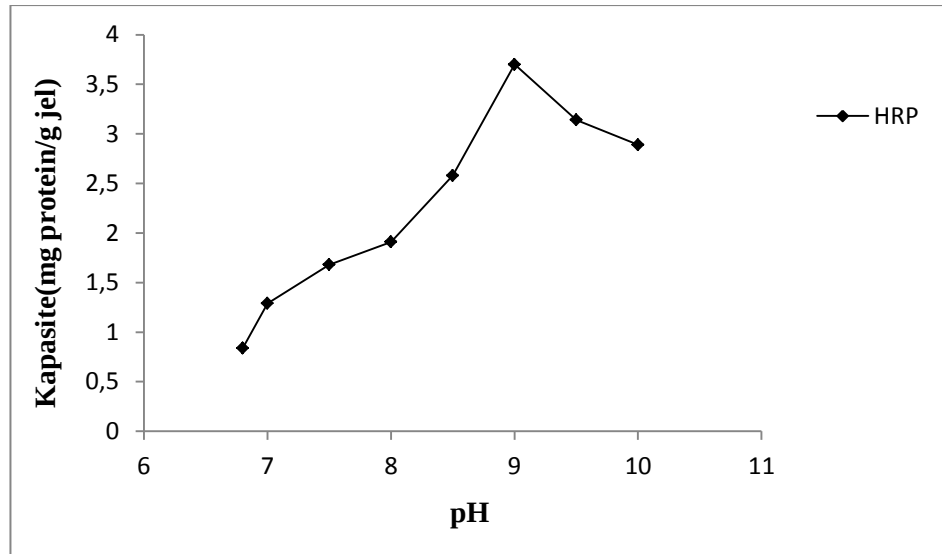
pH:6,8'de Horseradish POD farklı sıcaklıklarda 5, 10, 15, 20 ve 25°C sıcaklıklarda tutma kapasitesi belirlenerek (mg protein/g jel) sonuçlar Şekil 4.20'de verildi.



Şekil 4.20. Sepharose-4B-4-Amino 2-kloro benzohidrazid jelinin sıcaklık-kapasite grafiği

4.7.2. pH'nın kolon kapasitesine etkisi

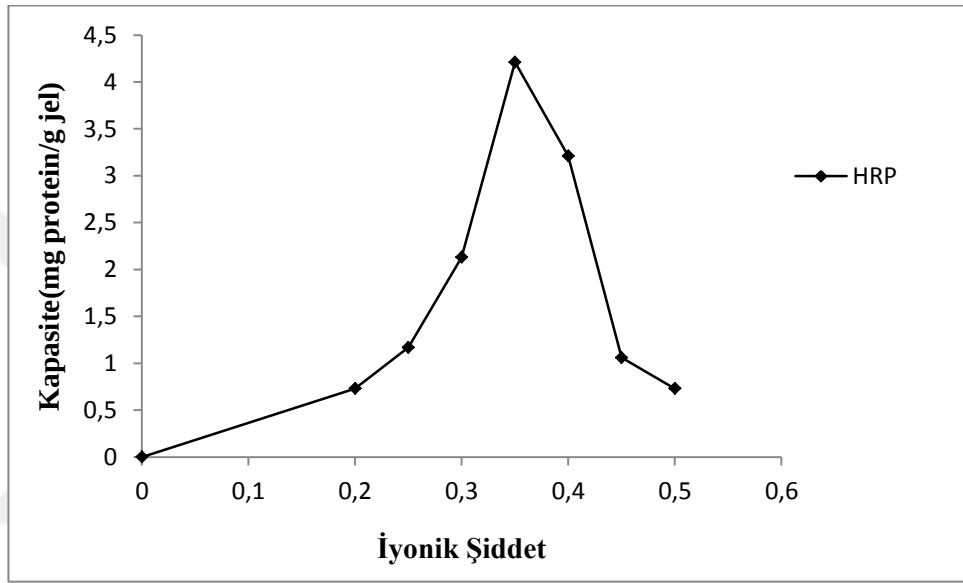
Bu bölümdeki deneyler pH'sı 6,8 ile 9,5 arasında değişen tamponlar kullanılarak yapıldı ve sonuçlar (mg protein /g jel başına) belirlenerek Şekil 4.21'de verildi.



Şekil 4.21. Sepharose-4B-4-Amino 2-kloro benzohidrazid jelinin pH-kapasite grafiği

4.7.3. İyonik şiddetin kolon kapasitesine etkisi

HRP enzimi için optimum pH ve en uygun bağlanma sıcaklığında deney yapıldı bu deneyde iyonik şiddet 0,2 ile 0,5 M arasında değiştirilip, sonuçlar mg protein/g jel başına grafik Şekil 4.22’de verildi.



Şekil 4.22. Sepharose-4B-4-Amino 2-kloro benzohidrazid jelinin iyonik şiddet [M]-kapasite grafiği

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Horseradish Peroksidaz (HRP, E,C 1.11.1.7) enzimi tıbbi tanı kitlerinde kullanılmaktadır. Ayrıca boyaların giderilmesinde biyolojik ve fiziksel yöntemlerin uygulanmasına yönelik araştırma çalışmaları yapılmaktadır. Gıda, tekstil, deri, boya, kozmetik ve kağıt sanayilerinde boyalar önemli kirleticilerdir. Zehirli atıklar olarak değerlendirilen boyaların giderilmesi çevre çalışmaları yönünden önemlidir. Azo boyalarının ve bifenoller, fenoller, anilinler gibi aromatik bileşiklerin giderilmesinde HRP'nin etkili olduğu bilinmektedir (Önder *et al.* 2009). Organik bileşiklerin biyotransformasyonu, organik sentezleri ve H_2O_2 algılanması için biyosensörlerin oluşumu için de sıklıkla kullanılmaktadır. H_2O_2 güçlü bir oksitleyici maddedir; eğer birikmesine izin verilirse toksik olabilir. Bu nedenle, peroksidazlar normal ve stres koşulları altında hücrelerde aşırı H_2O_2 uzaklaştırmada önemli bir rol oynar (Sarika *et al.* 2015).

Bunların yanı sıra ticari önemi olan enzimler olmaları ve uygulama alanlarının yaygın olması nedeniyle Horseradish Peroksidaz (HRP) enzimlerinin saf olarak elde edilmesinin amaçlandığı saflaştırma çalışmalarının sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Bitkisel kaynaklı peroksidaz enzimlerinin saflaştırılmasında litratürde farklı kromatografik metotların kullanıldığı çalışmalar yapılmıştır ve bu çalışmalar halen devam etmektedir. Bu peroksidaz enzimlerinin afinite kromatografisi tekniği ile tek basamakta saflaştırılması birçok araştırmacının hedefidir.

Horseradish Peroksidazın yüksek saflıkta elde edilmesi için 1954'e kadar iki mevcut metot vardır. Bunlardan birinde 1942'de elektroforez aparatı kullanılmıştır. Diğerinde 1951'de pek çok adımda gerçekleştirilen bir saflaştırma yapılmıştır. 1954'te ise daha basit bir metot geliştirilmiş ve elektroforez kullanmadan ayırma prosedürlerinin sayısını azaltarak saflaştırma gerçekleştirilmiştir. Yöntem etanol ve kloroform karışımıyla çökelme olmasıyla ham ekstraktan inaktif materyallerin uzaklaştırılması esasına dayanmaktadır. Bu işlemin ardından, yüksek ölçüde saflaştırılmış peroksidaz preparasyonu, amonyum sülfat ve etanolla kısmi çöktürmelerle elde edilmiştir. Elde

edilen ürün, kararlı bir kuru preparasyonudur ki bu, amonyum sülfat çözeltisinden kristalleştirilebilir. Bu çalışmada hemin içeriği kullanılarak tarif edilen yöntem ile elde edilen nihai kuru preparatların yaklaşık %90 bir saflığa sahip olduğu tespit edilmiştir (Kenten and Mann 1954).

Sepharose bağlı Concanavalin-A (lektin) üzerine afinite kromatografisiyle HRP nin saflaştırması adlı araştırmada %73 verim ve 2.45 saflaştırma katsayısına ulaşılmıştır. Saf horseradish peroksidazın karakterizasyonu, 403 nm'de hem absorbands hem de protein içeriği bakımından artmış bir enzimatik aktivite göstermiştir (Brattain *et al.* 1976).

Armoracia rusticana kökünden elde edilen yaban turpu peroksidazın kısmi davranışları üzerine sistem pH'sı, sodyum klorür konsantrasyonu ve poli (etilenglikol) (PEG) molekül ağırlığının etkisi, poli (etilenglikol)/sodyum fosfat sistemlerinde araştırılmıştır. PEG molekül ağırlığı önemli ölçüde enzim katsayısını etkilerken pH'ın 5.5'den 8.0'a değişiminin ise çok az etkisi olduğu belirlenmiştir. Bir pH 7.0 PEG/fosfat sistemine sodyum klorür eklenmesi, toplam yaban turpu kökü proteinlerinde önemli bir değişiklik olmadan peroksidaz katsayısını 13.5 kat arttırdığı görülmüştür. Ayrıca, bu koşullar, saflaştırma faktörü 4.8 olan ve enzimin %90'ından fazlasını ihtiva eden berrak üst faz ile seçilen sulu iki-fazlı bir sistemle *A. rusticana* köklerinin doğrudan homojenizasyonu sağlanmaktadır (Miranda *et al.* 1995).

Yaban turpu peroksidaz (HRP), diyaliz edilmiş sulu ekstraktan iki aşamalı ters-misellerle Horseradish köklerinden saflaştırılmıştır. İzooktan içinde çözülen anyonik sürfaktan AOT [Aerosol OT (sodyum bis [2-etilhekzil] sülfosüksinat)], ters misel fazı üretmek için kullanılmıştır. İlk ekstraksiyonda kontamine proteinlerin büyük bir kısmının çıkarılması için dar pH aralığında çözülmüş HRP kullanılmıştır. İkinci ekstraksiyon fazında HRP, sulu ve organik fazlar arasında 10 hacim oranında çözülmüş, konsantre edilmiştir ve bu işlemler sonucunda spesifik aktivite 86 guaiakol U/ mg⁻¹, saflaştırma faktörü 80 ve %46 verim bulunmuştur. SDS-PAGE sonucunda HRP, 43.8 kDa'a karşılık gelen iki üst üste binen bant göstermiştir. İzoelektrik fokuslama (IEF)

jelleri üzerindeki görüntü analizinde %80 saf HRP olduğu gözlemlenmiştir. Direkt ters misel ekstraksiyonu ham ekstraktan yapıldığı zaman, arayüzeyde çökelti oluşturarak yüksek HRP kayıplarının olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Regalado *et al.* 1996).

Armoracia rusticana (HRP) kökleri ve *Glycine max* (soya) tohum kabuklarından afinite ve sıcaklığa bağlı mikroküre ihtiva eden sulu iki fazlı sistemlerle peroksidaz saflaştırması incelenmiştir. *Armoracia rusticana* köklerinden peroksidaz için iki aşamalı saflaştırma işlemi uygulanmıştır. Bir polietilen glikol/fosfat sulu iki fazlı sisteme Concanavalin A afinite mikroküreleri eklenerek geliştirilmiştir ve verim %60 olarak tespit edilmiştir (Miranda *et al.* 1998).

Armoracia rusticana kökü ekstrelerinden yaban turbu peroksidazı (HRP) ters akım kromatografisi saflaştırması (CCC), polimer fosfat sulu iki-fazlı sistemler (ATPS) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu fraksiyonda yüklenen toplam aktivitenin %45'i ve 6 gibi bir saflaştırma faktörü hesabıyla HRP nin geri kazanımı sağlanmıştır (Magri *et al.* 2003).

Concanavalin A (Con A) merseze makro-gözenekli selüloz membranları üzerine immobilize edilmiştir ve membran afinite kromatografisi için bir ligand olarak kullanılmıştır. 2,4,6-trikloro-1,3,5-triazin, glutaraldehit veya diazotizasyon içeren üç aktivasyon ve immobilizasyon metotları kullanılmış ve karşılaştırılmıştır. Hazırlanan afinite membranlar ticari bir peroksidaz ve Horseradish Peroksidaz (HRP) ayrılması ve saflaştırılması için kullanılmıştır. Ayırma ve saflaştırma, substrat olarak 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) kullanılıp peroksidaz aktivitesi belirlenerek izlenmiştir. Horseradish'te, %24,5 lik bir geri kazanım ve 142 kat saflaştırma elde edilmiştir; ticari bir numunenin saflaştırılmasında ise %71 lik geri kazanım ve 2,3 katlık bir zenginleşmeye ulaşılmıştır (Guo and Ruckenstein 2003).

Yaban turpu peroksidazı köklerinden hızlı ve yüksek verimli saflaştırma için yüksek yoğunluklu Concanavalin A hazırlanması ve kullanımı araştırılmıştır. İki aşamadan

oluşan bu saflaştırmada amonyum sülfat çöktürmesi ve afinite kromatografisi kullanılarak %73 verimle 14 kat saflaştırma gerçekleştirilmiştir (Fraguas *et al.* 2004).

Yaban turpu peroksidazının geri dönüşümsüz termal denatürasyon kinetiği çalışılmıştır. Horseradish köklerinden izole edilen yaban turpu peroksidaz (HRP), amonyum sülfat, iyon değişimi ve jel filtrasyonu kombinasyonu ile saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimin spesifik aktivitesi, ham özütten 14.92 kat daha yüksektir ve %20'den daha az verim gözlenmiştir. Saflaştırılmış HRP daha sonra kinetik ve termodinamik karakterizasyonu için kullanılmıştır. Bu yaban turpu peroksidazın oldukça termostabil ve endüstriyel uygulamalar için kullanılabilir olduğu kanısına varılmıştır (Bhatti *et al.* 2007).

Yine Horseradish köklerinden Fenil Sepharose CL-4B üzerinde ultrasonikasyon, amonyum sülfat çöktürmesi ve hidrofobik etkileşim kromatografisiyle üç adımda peroksidaz saflaştırması çalışması yapılmış, bu çalışma sonucunda 772 EÜ/mg spesifik aktivite ile % 71,3 verim ve 291 saflaştırma katsayısına ulaşılmıştır. (Lavery *et al.* 2010).

Concanavalin A agaroz afinite kromatografisi kullanılarak Horseradish köklerinden peroksidaz saflaştırılmıştır. 4-aminoantipirin-fenol çözeltisi; enzim aktivitesini, enzim aktivitesi üzerine inhibitör, pH, sıcaklık etkisini değerlendirmek için substrat olarak kullanılmıştır. Saflaştırılmış enzim (HRP), 14.45×10^{-4} M substrat konsantrasyonu ve 38×10^{-2} µg enzim konsantrasyonunda etkili bir aktivite göstermiştir. Sırasıyla optimum pH ve optimum sıcaklık değerlerinin, 6.0 ve 40°C olduğu saptanmıştır. Saflaştırılmış HRP doğal PAGE üzerinde 40 kDa bir molekül ağırlığına sahip tek bir band olarak gözlemlenmiştir (Sarika *et al.* 2015).

Bazı tiol tipi inhibitörler tarafından HRP' nin inhibisyonu çalışmaları yapılmıştır. Yaban turpu peroksidazı ile 4-Amino antipirin oksidasyonunun glutatyon ve sistein tarafından inhibisyonu karşılaştırılmıştır. Substrat olarak 4-Amino antipirin kullanılarak herbir inhibitörün varlığında enzimin biyolojik aktivitesi ölçülmüştür. Glutatyon ile peroksidazın inhibisyon kinetiği araştırılmıştır ve L-sistein inhibisyonu ile

karşılaştırılmıştır. Bu redükte glutatyonun peroksidaz aktivitesi üzerinde L-sisteinden daha güçlü bir inhibitör olduğu bulunmuştur. Kinetik çalışmalar her iki durumda da yarışmasız ve karışık inhibisyon tipi olduğunu göstermiştir. Bazı tiyol bileşikleriyle peroksidaz inhibisyonu mekanizması incelenmiş olmasına rağmen, bu çalışmada substrat olarak 4-Amino antipirin kullanılarak L-sistein ve glutatyon gibi diğer kükürt bileşikleriyle tarafından HRP nin inhibisyon mekanizması tespit edilmiştir. Bu substrat, HRP inhibisyonunun kinetiği üzerine çalışan araştırmacılar tarafından az ilgi görmektedir. Glutatyonun indirgenmiş formu düşünüldüğünde, virüs yaşam döngüsünün son safhasında insan bağışıklık eksikliği virüsü'nün (HIV) kopyalanmasını inhibe eder ve AIDS tedavisinde diğer anti-viral ilaçların kombinasyonunda kullanılabilir (Sariri *et al.* 2006a).

Yaban turpu peroksidazın 4-Amino antipirin oksidasyonunun merkaptasetik asit ve merkaptetanol tarafından inhibisyonu karşılaştırılmıştır. Merkaptetanol ve merkaptasetik asit için IC_{50} belirlenmiştir ve bu kinetik çalışmalar için kullanılmıştır. Enzim aktivitesi, substrat olarak 4-Amino antipirin ile inhibitörlerin varlığında ölçülmüştür. Merkaptetanolün peroksidaz aktivitesi üzerinde merkaptasetik asitten daha güçlü bir inhibitörü olduğu bulunmuştur. Kinetik çalışmalarda, her iki durumda da karışık tipte yarışmasız inhibisyon gösterdiği görülmüştür. Bu tip inhibitörlerin AIDS'in tedavisinde diğer anti-viral ilaçlar ile kombinasyon halinde kullanılabilir olduğu tespit edilmiştir (Sariri *et al.* 2006b).

Bitki hücreleri H_2O_2 salınmasıyla patojen saldırısına karşılık vermektedir. Bu savunma reaksiyonunun memelilerde fagositik lökositlerin NADPH oksidazına benzer bir NAD(P)H oksidaz tarafından mı yoksa bir hücre dışı peroksidaz tarafından mı katalizlendiği tartışma konusudur. Bitki hücreleri tarafından üretilen H_2O_2 memeli NADPH oksidazının güçlü bir inhibitörü olan, Diphenyleneiodonium (DPI) tarafından inhibe edilebilir. Diphenyleneiodonium (DPI), bir memeli tip enzimin bitki hücreleri tarafından H_2O_2 üretiminden sorumlu olduğu görüşü için önemli avantajlar sağlamaktadır. Bu çalışmada DPI'nin Horseradish Peroksidaz (HRP) tarafından NADH bağımlı H_2O_2 üretimini inhibe ettiği gösterilmektedir. Bitkilerde varsayılan NADPH

oksidaz aktivitesinin inhibisyonu için daha önce kullanılanla aynı konsantrasyon aralığındaki Horseradish Peroksidaz (HRP) kullanılmıştır. Sonuç olarak, bu çalışmada DPI'nın, peroksidazın katalitik aktivitesinin H_2O_2 üretiminin etkili bir inhibitörü olduğu gösterilmektedir. Oysaki guaiakol diaminobenzidin gibi aromatik substratların H_2O_2 aracılı oksidasyon ile belirlenen klasik peroksidaz aktivitesi etkilenmemiştir. Bu durumda, bu inhibitör, bitki hücrelerinin oksidatif patlamasının enzimatik mekanizmasında peroksidazın ve memeli tipi NAD(P)H oksidazın ayrıştırılması için bir araç olarak uygun olmadığı saptanmıştır. Bu da DPI'nın inhibitör etkisinin geciktirilmesinde açıklamaya olanak sağlamıştır (Frahry and Schopfer 1998).

Hidrazidler, peroksidaz inhibitörleri olarak bilinen bileşiklerdir. Çeşitli hidrazin ve hidrazin türevleri, iproniazid (sakinleştirici), mebanazine, izokarboksazid, fenelzin (monoamin oksidaz inhibitörleri), hidralazin (tansiyon düşürücü) ve PHZ (fenilhidrazin; polisitemi kontrolü), izoniazid [INH (izonikotinik hidrazit) tüberküloz antibiyotik] terapötik olarak kullanılmıştır. Ancak bu bileşiklerin pek çoğu uzun süreli kullanımda karaciğer hasarı, baz-çifti mutasyonları, hemolizise yol açan yan etkilere yol açtığından ilaç olarak kullanılmamaktadır. Hidrazinler ve hidrazid inhibitörleri metabolik olarak aktive edilir. Enzimatik aktivasyon sonrasında, metabolik olarak aktive edilen inhibitörler farklı bir biyomoleküle ya da aynı enzime ya yeniden bağlanabilir ya da aktif bölgesinden serbest bırakılır, dolayısıyla inaktivasyona yol açar. Özgüllük hem bağlanma afinitesi hem de aktif inhibitörün reaktivitesine göre değişir. HRP C, PHZ tarafından etkili bir şekilde inaktive edilir fakat PHZ süperoksit üretimi için pH 7'de oto-oksidasyona maruz kaldığından, terapötik bir madde olarak uygun değildir. Bunun aksine, INH'nin oto-oksidasyonu pH 7'de daha düşük bir hızda gerçekleşir. Mycobacterium tuberculosis / katalaz (katG) peroksidaz ile aktivasyondan sonra aktive INH bir inhibitörünün oluşturulması için, enoil redüktazın kofaktörü ile reaksiyona girer. Alerjik ve otoimmün sendromlar içeren ciddi yan etkilerine rağmen, INH hala tüberküloz tedavisi için dünya çapında birincil ilaçtır. INH için görülen yan etkiler, ilaç olarak metabolik olarak aktif hidrazitlerin kullanılması ile ortaya çıkan problemlerin görünmesine olanak sağlamaktadır (Aitken *et al.* 2003).

Peroksidaz üzerine yapılan en son saflaştırma tekniğinde peroksidazın afinite tekniği ile tek basamakta saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Ligand olarak 4-Amino benzohidrazid kullanılıp şalgam ve karaturptan peroksidaz enzimi tek basamakta saflaştırılmıştır. Karaturp (*Raphanus sativus* L.) için 947,5 EÜ/mg spesifik aktivite ile 40.3 kat saflaştırma katsayısı ve %10,6 verime ulaşılrken, şalgam (*Brassica rapa* L.) da bu değerler 9626,67 EÜ/mg spesifik aktivite, 269.3 kat saflaştırma katsayısı ve %9 verimdir (Kalin *et al.* 2014). Ayrıca yine afinite kromatografisi tekniğiyle PABH [(Para amino benzoikhidrazid (4-Amino benzohidrazid)] ligand olarak kullanılarak POD enzimi kırmızı lahanadan 120 kat %2.9 verimle saflaştırılmıştır (Somtürk *et al.* 2014).

Bu tez çalışmasında ise saflaştırma çalışmalarını daha ileri götürme ve verimi artırmaya katkı sağlamak amacı ile; daha önce grubumuzca yapılan 4-Amino benzohidrazidin ligand olarak kullanıldığı karaturp ve şalgam bitkilerinden POD enziminin saflaştırılması çalışması esas alınarak (Kalin *et al.* 2014), bayır turpu bitkisini aynı liganda ve bu ligandin türevlerine uygulayıp tek basamakta yüksek saflıkta HRP enzimi elde etmek amaçlandı.

Horseradish POD enziminin, 4-Amino benzohidrazid ve türevi molekülleri (4, 5, 6) ligand olarak afinite kromatografisinde kullanarak, yüksek saflıkta ve verimde elde edilmesi hedefiyle Şekil 3.2’de verilen türevler (4, 5, 6) ticari olarak temin edilemediğinden dolayı moleküllerin metil benzoat türevleri (1, 2, 3) satın alınarak hidrazin sentezleri tarafımızca yapıldı ve sonuçlar Çizelge 4.6’da gösterildi. 4-Amino benzohidrazid ve sentezi yapılan türevlerinin ilk olarak inhibisyon kinetikleri incelendi ve dönüşümlü inhibisyon gösteren moleküllerin afinite jellerinin sentezi yapıldı. Saflaştırma tabloları hazırlandı ve elde edilen sonuçlar tartışıldı.

Çalışmamızın tüm basamaklarında kantitatif protein tayinleri Bradford metodu kullanılarak yapıldı. Saflaştırılan enzim çözeltisi ve hemolizattaki protein miktarları bu yöntemle belirlendi. Proteine coomassie brillant blue G-250’nin bağlanması esasına dayanan bu yöntemde, oluşan kompleks 595 nm’de maksimum absorbans göstermektedir. Proteine boyanın bağlanması çok hızlı olmaktadır. Protein–boya

kompleksi çözeltilerde uzun süre kalır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır (Bradford and Williams 1976).

Horseradish Peroksidaz (HRP) enziminin aktivite ölçümü, Şişecioğlu ve arkadaşlarının uyguladığı prosedüre göre spektrofotometrik olarak belirlendi. CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B matriks, L-tirozin ise uzantı kolu olarak kullanıldı. Her bir inhibitörden 90 µmol madde alınarak Sepharose-4B-L-tirozin jelleri hazırlandı. Homojenatlar hazırlanan kolonlara tatbik edildi, A_{470} yüksek olan eluatlar birleştirildi ve protein tayini yapıldı.

Horseradish POD enziminin, ilk olarak 4-Amino benzohidrazid molekülünün ligand olarak kullanıldığı saflaştırmada %1,8 verim ve 45,4 saflaştırma katsayısı elde edildi. Saflaştırma tablosu Çizelge 4.1'de verildi. Saflaştırılan HRP enziminin saflığını ve molekül ağırlığını belirlemek için SDS-PAGE yapıldı. Şekil 4.3'te 4-Amino benzohidrazid kolonundan saflaştırılan HRP enzimi için SDS-PAGE fotoğrafı gösterildi ve aynı enzim için molekül ağırlığı literatürde belirtildiği gibi 44 kDa olarak bulundu.

Horseradish bitkisinden saflaştırılan HRP enziminin guaiakol substratına olan ilgisini tespit etmek amacıyla bu enzim için en az beş farklı guaiakol konsantrasyonunda enzim aktivite değerleri belirlendi. Elde edilen $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri yardımıyla Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı. HRP enzimi için K_M değeri 4,34 mM bulunurken V_{max} değeri ise 0,97 EU/mL.dk olarak tespit edildi. Saflaştırılan HRP enzimi üzerine bu molekülün inhibisyon kinetiği detaylı olarak incelendi. Bu çalışmada küvetteki inhibitör konsantrasyonları Çizelge 4.3'te verildi. Guaiakol substratına bağlı olarak inhibisyon etkisini incelemek amacıyla, doygun olmayan guaiakol reaksiyon ortamına farklı konsantrasyonlarda inhibitör ilave edilerek aktivite değerleri hesaplandı. Elde edilen bu değerlerle % Aktivite-Konsantrasyon grafiği çizilerek IC_{50} değeri bulundu. 4-Amino benzohidrazid kolonundan saflaştırılan HRP enzimi için bu grafik Şekil 4.5'te verildi. 4-Amino benzohidrazid molekülü Horseradish POD enzimi için IC_{50} değeri 311 µM olarak hesaplandı. Bu molekülün IC_{50} değerinin sonuçlarına bakıldığında HRP enzimi inhibitörü olabileceği ortaya konuldu.

İnhibisyon tipini belirlemek amacı ile K_i değerinin hesaplanması çalışmaları yapıldı. Horseradish POD enzimi için 5 farklı guaiakol substrat konsantrasyonunda ve 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapıldı inhibitör konsantrasyonu Çizelge 4.4'te gösterildi. 4-Amino benzohidrazid için Lineweaver-Burk grafiği çizilerek inhibisyon tipi ve K_i değeri bulundu (Lineweaver *et al.* 1934). Horseradish POD enzimi üzerine denenen inhibitörün K_i grafiği Şekil 4.6'da gösterildi.

4-Amino benzohidrazid için Horseradish POD enzimi K_i değerinin 141 μM olduğu grafikten yararlanılarak hesaplandı. Böylece saflaştırmada ligand olarak kullanılacak molekülün detaylı kinetik parametreleri ve inhibisyon tipi ilk kez tespit edilmiş oldu.

Saflaştırılan HRP enzimi üzerine sentezlenen 4-Amino 2-kloro benzohidrazid (4), 4-Amino 3-kloro benzohidrazid (5), 4-Amino 2-bromo benzohidrazid (6) moleküllerinin inhibisyon kinetikleri detaylı olarak incelendi. Bu çalışmalarda küvetteki inhibitör konsantrasyonları Çizelge 4.7, 4.10 ve 4.13'te gösterildi. Guaiakol substratına bağlı olarak inhibisyon etkisini incelemek amacıyla, doygun olmayan guaiakol reaksiyon ortamına farklı konsantrasyonlarda inhibitör ilave edilerek aktivite değerleri hesaplandı. Elde edilen bu değerlerle % Aktivite-Konsantrasyon grafikleri çizilerek IC_{50} değerleri bulundu. HRP enzimi için bu grafikler Şekil 4.10, 4.12 ve 4.14'te gösterildi.

HRP enzimi için sırasıyla IC_{50} değerleri 4-Amino 2-kloro benzohidrazid (4), 4-Amino 3-kloro benzohidrazid (5), 4-Amino 2-bromo benzohidrazid (6) için; 1138 μM , 444 μM , 483 μM olarak hesaplandı. Tüm moleküllerin IC_{50} değerlerinin sonuçlarına bakıldığında HRP enzimi inhibitörü olabileceği ortaya konuldu.

İnhibisyon tiplerini belirlemek amacı ile K_i değerlerinin hesaplanması çalışmaları yapıldı. HRP enzimi için 5 farklı guaiakol substrat konsantrasyonunda ve 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapıldı inhibitör konsantrasyonları Çizelge 4.8, 4.11 ve 4.14'te gösterildi. 4-Amino 2-kloro benzohidrazid (4), 4-Amino 3-kloro benzohidrazid (5), 4-Amino 2-bromo benzohidrazid (6) için Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek inhibisyon çeşitleri ve K_i değerleri bulundu (Lineweaver *et al.* 1934).

HRP enzimi üzerine denenen inhibitörlerin K_i grafikleri Şekil 4.11, 4.13, 4.15'te gösterildi. HRP enzimi K_i değerleri 4-Amino 2-kloro benzohidrazid (4) için 260 μ M, 4-Amino 3-kloro benzohidrazid (5) için 408 μ M ve 4-Amino 2-bromo benzohidrazid (6) için 628 μ M olduğu grafiklerden yararlanılarak hesaplandı. Böylece saflaştırmada ligand olarak kullanılacak moleküllerin detaylı kinetik parametreleri ve inhibisyon tipleri ilk kez tespit edilmiş oldu. Çalışılan 4-Amino benzohidrazid türevi moleküllerin (4, 5, 6) HRP enziminin yeni inhibitörleri olarak belirlendi ve inhibisyon etkisi gösteren bu moleküllerin her biri için afinite jelleri sentezlendi.

CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B matriks, L-tirozin ise uzantı kolu olarak kullanıldı. Her bir inhibitörden 90 μ mol madde alınarak Sepharose-4B-L-tirozin-(4, 5, 6) jelleri hazırlandı. Homojenatlar hazırlanan kolonlara tatbik edildi, A_{470} yüksek olan eluatlar birleştirildi ve protein tayini yapıldı.

HRP enzimi saflaştırma tablosu Çizelge 4.17'de gösterildi. HRP enzimini saflaştırmak için 4-Amino 2-kloro benzohidrazid (4) molekülü ligand olarak kullanıldığında sırasıyla %4,46 verimle 149 kat, 4-Amino 3-kloro benzohidrazid (5) ile %4,7 verimle 102,3 kat, 4-Amino 2-bromo benzohidrazid (6) ile %3,2 verimle 129 kat saflaştırma yapıldı.

4-Amino benzohidrazid molekülü halkasının 2 ve 3 pozisyonlarına klor ve brom bağlandığında, elde edilen bu moleküllerin enzime olan afinitesinin arttığı saptandı. Özellikle 4-Amino 2-kloro benzohidrazid (4) molekülü ile yapılan saflaştırma çalışmalarında HRP enziminde %4,46 verime ve 149 kat saflaştırma katsayısına ulaşılmıştır. Afinite tekniği kullanılarak HRP enzimini saflaştırmada 4-Amino 2-kloro benzohidrazid molekülünün ligand olarak kullanılabileceğinin oldukça önemli olduğu belirlendi ve bu çalışma ilk defa tarafımızdan gerçekleştirildi.

Saflaştırılan HRP enziminin saflığının kontrolü için ve molekül ağırlıklarının tespiti için bölüm 3.4'de anlatıldığı şekilde SDS-PAGE yapıldı. Yapılan SDS-PAGE sonucunda Horseradish'ten izole edilen HRP enziminin saf olduğu belirlendi ve ağırlığı literatürde belirtildiği gibi 44 kDa olarak bulundu.

4-Amino 2-kloro benzohidrazid kolonundan saflaştırılan HRP enzimi için kinetik parametreleri tespit etmek amacı ile aşağıdaki sonuçlar bulunmuştur.

Optimum pH çalışmasında guaiakol substratı için pH 5,0-8,0 aralığında enzimin gösterdiği aktiviterler spektrofotometrik olarak 470 nm’de ölçüldü. Aktivite-pH grafiği şekil 4.17’de gösterildi. Bu grafikden çıkarılan sonuçlara göre Horseradish bitkisinden elde edilen HRP enzimi için optimum pH’nın 6,5 olduğu bulundu.

Kolondan saflaştırılan HRP enzimin optimum sıcaklık değerlerini tespit etmek amacıyla, guaiakol substratı için sıcaklık 5-80°C aralığında enzimin gösterdiği aktiviterler spektrofotometrik olarak 470 nm’de ölçüldü. Aktivite-sıcaklık grafiği şekil 4.18’de gösterildi. Bu grafikden çıkarılan sonuçlara göre Horseradish bitkisinden elde edilen HRP enzimi için optimum sıcaklığın 60°C olduğu bulundu.

HRP enziminin stabil olduğu pH bulunurken de pH’sı 5,0-8,0 aralığında olan 10 mM’lık fosfat tamponları kullanıldı. Bu tamponlarda hazırladığımız enzim stoğunun her 12 saatte bir 96 saat boyunca aktiviterleri ölçülerek enzimin stabil olduğu pH’nın pH 8,0 olduğu tespit edildi. Stabil pH grafiği şekil 4.19’da gösterildi.

Hazırlanan 4-Amino 2-kloro benzohidrazid kolonu için HRP enzimini tutma kapasitesi çalışmaları yapıldı.

Enzimin kolona tutma kapasitesi bulunurken sıcaklık, pH ve iyonik şiddet parametreleri incelendi ve protein/gram-jel cinsinden HRP enziminin tutma kapasitesi belirlendi. Kapasite tayin işleminde hazırlanan jelden 1 mL alınarak dengeleme tamponuyla dengelenmiş 1x10 cm'lik bir kolona alındı ve daha önceden afinite ile elde edilen HRP enzimi ile doyuruldu. Enzimin fazlası yıkama tamponu ile yıkandıktan sonra bağlanmış olan HRP enzimi uygun elüsyon tamponuyla elüe edilerek protein miktarı bulundu jel kurutulup tartılarak mg protein/gram-jel cinsinden HRP enziminin tutma kapasitesi belirlendi (Aslan *et al.* 1996).

HRP enziminin saflaştırılmasında 4-Amino 2-kloro benzohidrazid ile hazırlanan kolondan sıcaklığın kolon kapasitesine etkisini belirlemek amacı ile pH 6,8 da 5, 10, 15, 20 ve 25°C farklı sıcaklıklarda tutma kapasitesi belirlenerek (mg protein /g jel başına) grafik edildi. Şekil 4.20'den görüldüğü gibi 20°C'de jel bağlanma kapasitesi maksimumdur.

HRP enzimi için kolonda pH'nın bağlanmayı nasıl etkilediğini belirlemek amacı ile farklı pH'larda (pH 6,8 ile 10 arasında) tamponlar kullanılarak en iyi pH için sonuçlar (mg protein/gram-jel başına) Şekil 4.21'de grafik edildi. Buradan 4-Amino 2-kloro benzohidrazid için pH:9,0 civarında maksimum bağlanma olduğu tespit edildi.

Kolonların bağlanma kapasitelerini etkileyen iyonik şiddetin etkisini belirlemek amacı ile enzimin optimum pH ve en uygun bağlanma sıcaklığında denemeler yapıldı ve bu iyonik şiddet 0,2 M ile 0,5 M arasında değiştirilerek, sonuçlar grafikte gösterildi. Şekil 4.22'de görüldüğü gibi 0,35 M iyonik şiddet konsantrasyonunda bağlanmanın maksimum olduğu tespit edildi. Kolon tutma kapasitesi sonuçlarına göre, 4-Amino 2-kloro benzohidrazid için 20°C'de pH 9,0'da 0,35 M iyonik şiddet konsantrasyonunda optimum bağlanma 2,99 mg/g jel olarak tespit edildi.

Sonuç Olarak;

4-Amino benzohidrazid maddesi hazır olarak satın alındı, 4-Amino 2-kloro benzohidrazid (4), 4-Amino 3-kloro benzohidrazid (5), 4-Amino 2-bromo benzohidrazid (6) moleküllerinin sentezi yapıldı ve Horseradish POD enzimleri üzerine inhibisyon etkileri incelendi. Çalışılan dört molekülün enzimin yeni, dönüşümlü ve etkili inhibitör olduğu tespit edildi ve afinite kolonunda ligand olarak kullanılma potansiyelleri ortaya konuldu.

Bu moleküller kullanılarak afinite jelleri hazırlandı, Horseradish POD enzimleri tek basamakta saflaştırıldı. Horseradish POD enzimlerinin saflaştırılmasında; 4-Amino 2-kloro benzohidrazid molekülünün çalıştığımız moleküller içerisinde en etkili ligand olduğu belirlendi. Saflaştırmada elde edilen verimlerin ve saflaştırma katsayılarının, literatürde olan çalışmalardan çok daha kısa sürede ve tek kademede daha yüksek olduğu görüldü. Bu çalışmada ligand olarak kullandığımız 4-Amino 2-kloro benzohidrazid molekülünün ucuz maliyette ve yüksek verimde Horseradish POD enzimlerini saflaştırdığı ve diğer bitki peroksidazlarını da saflaştırmada kullanılma potansiyelinin olduğu literatüre kazandırıldı.

KAYNAKLAR

- Agostini, E., Hernandez-Ruiz, J., Arnao, M.B., Milrand, S.R., Tigier, H.A., Acosta, M., 2002. A peroxidase isoenzyme secreted by turnip (*Brassica napus*) hairy-root culture inactivation by hydrogen peroxide and application in diagnostic kits. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 35, 1–7.
- Agostini, E., Medina, M.I., Milrad de Forchetti, S.R., Tigier, H., 1997. Properties of two anionic peroxidase isoenzymes from turnip (*Brassica napus* L.) roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 596-598.
- Aibara, S., Kobayashi, T., Morita, Y., 1981. Isolation and properties of basic isoenzymes of Horseradish peroxidase. *J. Biochem.*, 90, 489–496.
- Aibara, S., Yamashita, H., Mori, E., Kato, M., Morita, Y., 1982. Isolation and characterization of five neutral isoenzymes of Horseradish peroxidase. *J. Biochem.*, 92, 531–539.
- Aitken, S.M., Ouellet, M., Percival, M.D., English, A.M., 2003. Mechanism of Horseradish peroxidase inactivation by benzhydrazide: a critical evaluation of arylhydrazides as peroxidase inhibitors, *Biochem. J.*, 375, 613–621
- Alemzadeh, I., Nejati, S., 2009. Phenols removal by immobilized Horseradish peroxidase. *Journal of Hazardous Materials*, 166(2), 1082-1086.
- Almagro, L., Gómez Ros, L.V., Belchi-Navarro Bru, S.R., Ros Barceló, A., Pedreño, M.A., 2009. Class III peroxidases in plant defence reactions. *J. Exp. Bot.*, 60, 377-390.
- Arslan, O., Nalbantoglu, B., Demir, N., Ozdemir, H. and Kufrevioglu, O. I., 1996. A new method for the purification of carbonic anhydrase isozymes by affinity chromatography. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 26, 163–166.
- Asad, S., Dabirmanesh, B., Ghaemi, N., Etezad, S.M., Khajeh, K., 2013. Studies on the refolding process of recombinant Horseradish peroxidase. *Mol. Biotechnol.*, 54(2), 484-492.
- Asad, S., Dabirmanesh, B., Khajeh, K., 2014. Phenol removal from refinery wastewater by mutant recombinant Horseradish peroxidase. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 61(2), 226-229.
- Bae, J.W., Choi, J.H., Lee, Y., Park, K.D., 2015. Horseradish peroxidase-catalysed in situ-forming hydrogels for tissue-engineering applications. *J. Tissue. Eng. Regen. Med.*, 9(11), 1225-1232
- Barnard, A., 2012. The Optimization of the Extraction and Purification of Horseradish Peroxidase from Horseradish Roots. MS Thesis, University of Stellenbosch, Stellenbosch, 7599, South Africa.
- Bartonek-Roxa, E., Ericksson, H., Mattiasson, B., 1991. The cDNA sequence of a neutral Horseradish peroxidase. *Biochimica et biophysica acta*, 1080, 245–250.
- Belcarz, A., Ginalska, G., Kowalewska, B., Kulesza, P., 2008. Spring cabbage peroxidases – Potential tool in biocatalysis and bioelectrocatalysis. *Phytochemistry*, 69, 627–636.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L. and Stryer, L., 2014. *Biyokimya*. Palme Yayıncılık, 241-247 s, Ankara.

- Bhatti, H.N., Akbar, M.N., Zia, M.A., 2007. Kinetics of irreversible thermal denaturation of Horseradish peroxidase. *J. Chem. Soc. Pak.*, 29, 99–102.
- Biles, C.L., Martyn, R.D., 1993. Peroxidase, polyphenol oxidase and shikimate dehydrogenase isozymes in relation to the tissue type, maturity and pathogen induction of watermelon seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, 31, 499–506.
- Bonifert, G., Folkes, L., Gmeiner, C., Dachs, G., Spadiut, O., 2016. Recombinant Horseradish peroxidase variants for targeted cancer treatment. *Cancer Med.*, 5(6), 1194–1203.
- Bradford, M.M., Williams W.L., 1976. New, rapid, sensitive method for protein determination. *Federation Proceedings*, 35, 274–274
- Brattain, M.G., Marks, M.E., Pretlow, T.G., 1976. Purification of Horseradish-peroxidase by affinity chromatography on sepharose-bound concanavalin-A. *Anal. Biochem.*, 72 (1-2), 346–352.
- Buchanan, I.D., and Nicell, J.A., 1997. Model development for Horseradish peroxidase catalyzed removal of aqueous of phenol. *Biotechnology and Bioengineering*, 54, 251–261.
- Campbell, K.L., Lopresti, M., Lukas, W., 2014. Inhibition of Horseradish Peroxidase (HRP) by a nonhydrophobic component of urine: A caution for immunoassays. *Open Clinical Chemistry Journal*, 7(1), 1–7.
- Civello, P. M., Martinez, G. A., Chaves, A. R., Anon, M. C. 1995. Peroxidase from strawberry fruit (*Fragaria ananassa-Duch*)s partial-purification and determination of some properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2596–2601.
- Clemente, E., 1998. Purification and thermostability of isoperoxidase from oranges. *Phytochemistry*, 49, 29–36.
- Connell-Crowley, L., Nguyen, T., Bach, J., 2012. Cation exchange chromatography provides effective retrovirus clearance for antibody purification processes. *Biotechnol. Bioeng.* 2012; 109, 157–165.
- Cosio, C., Dunand, C., 2009. Specific functions of individual class III peroxidase genes. *J. Exp. Bot.*, 60, 391–408.
- Deepa, S. S., Arumughan C., 2002. Purification and characterization of soluble peroxidase from oil palm (*Elaeis guineensis Jacq.*) leaf. *Phytochemistry*, 61, 503–511.
- Doerge, D.R., Divi, R.L., Churchwell, M.I., 1997. Identification of the colored guaiacol oxidation product produced by peroxidases. *Analytical Biochemistry*, 250, 10–17.
- Duarte-Vazquez, M.A., Garcia-Almendarez, B., Regalado, C., Whitaker, J.R., 2000. Purification and partial characterization of three turnip (*Brassica napus* L. var *esculenta* D.C.) peroxidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1574–1579.
- Dunford, H. B., 1999. Heme Peroxidases. Wiley, 1–57 p, 299–304 p, New York, USA.
- Florian, WK. and Glieder, A., 2015. An updated view on Horseradish peroxidases: recombinant production and biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 99, 1611–1625.

- Folkes, L.K., Wardman, P., 2001. Oxidative activation of indole-3- acetic acids to cytotoxic species-a potential new role for plant auxins in cancer therapy. *Biochem. Pharmacol.*, 61, 129–136.
- Fraguas, L.F., Batista-Viera, F., Carlsson, J., 2004. Preparation of high-density Concanavalin A adsorbent and its use for rapid, high-yield purification of peroxidase from Horseradish roots. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 803, 237–241.
- Frahry, G., Schopfer, P., 1998. Inhibition of O₂-Reducing Activity of Horseradish Peroxidase by Diphenyleneiodonium, *Phytochemistry*, 48,223-227
- Franco Fraguas, L., Batista-Viera F., Carlsson J., 2004. Preparation of high-density Concanavalin A adsorbent and its use for rapid high-yield purification of peroxidase from Horseradish roots. *J.Chromatogr. B.*, 803, 237-241.
- Fric, F., 1976. Oxidative Enzymes. *Encyclopedia of Plant Physiology*. 4-17 p, New York, USA.
- Fry, S.C., 1986. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 37, 165-186.
- Fry, S.C., 2004. Oxidative coupling of tyrosine and ferulic acid residues: intra- and extra-protoplasmic occurrence, predominance of trimers and larger products, and possible role in inter-polymeric cross-linking. *Phytochem. Rev.*, 3, 97-111.
- Fujiyama, K., Takemura, H., Shibayama, S., Kobayashi, K., Choi, J.K., Shinmyo, A., Takano, M., Yamada, Y., Okada, H., 1988. Structure of the Horseradish peroxidase isozyme C genes. *Eur J Biochem.*, 173, 681–687.
- Gazaryan, I.G., Lagrimini, L.M., 1996. Purification and unusual kinetic properties of a tobacco anionic peroxidase. *Phytochemistry*, 41, 1029–1034.
- Govere, E.M., Tonegawa, M., Bruns, M.A., Wheeler, E.F., Kephart, K.B., Voigt, J.W., 2007. Using minced Horseradish roots and peroxidase for the deodorization of swine manure: A pilot scale study. *Bioresourse Technology*, 98, 1191–1198.
- Greco, O., Folkes, L.K., Wardman, P., Tozer, G.M., Dachs, G.U., 2000. Development of a novel enzyme/prodrug combination for gene therapy of cancer. Horseradish peroxidase/indole-3-acetic acid. *Cancer Gene Ther.* 7,1414–1420.
- Grigorenko, V.G., Andreeva, I.P., Rubtsova, M.Y., Egorov, A.M., 2015. Recombinant Horseradish peroxidase: production and analytical applications. *Biochemistry (Mosc.)*, 80(4), 408-416.
- Guo, W., Ruckenstein, E., 2003. Separation and purification of Horseradish peroxidase by membrane affinity chromatography. *J. Memb. Sci.*, 211,101–111.
- Gülçin, İ., 2005. The antioxidant and radical scavenging activities of black pepper (*Piper nigrum*) seeds. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 56, 491-499.
- Gülçin, İ. and Yıldırım, A., 2005. Purification and chracterization of peroxidase from *Brasica oleracea* var. *Acephala*. *Asian Journal of Chemistry*, 17 (4).
- Gülçin, İ., 2002. Isırgan otunun (*Urtica dioica*) antioksidan aktivitesinin belirlenmesi, oksidatif enzimlerinin karakterizasyonu ve bazı *in vivo* etkilerinin incelenmesi. Doktora tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi, Ezurum.
- Gürdöl, F. ve Ademoğlu, E., 2013. Biyokimya. Nobel Tıp Kitabevleri, 2. Baskı, 347 s, İstanbul.
- Halliwell, B., 1984. Oxygen radicals: A commonsense look at their nature and medical importance. *Medical Biology*, 62, 71-77.

- Halpin, B., Pressey, R., Jen, J., Mondy, N., 1989. Purification and characterization of peroxidase isoenzymes from green peas (*Pisum sativum*). *Journal Food Science*, 54, 644.
- Hamid, M. and Rehman, K., 2009. Potential applications of peroxidases. *Food Chemistry*, 115, 1177-1186.
- Haschke, R.H., Friedhoff, J.M., 1978. Calcium-related properties of Horseradish peroxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 80, 1039-1042.
- Hiner, A.N.P., Hernández-Ruiz, J., Rodríguez-López, J.N., Arnao, M.B., Varón, R., García-Cánovas, F., Acosta, M., 2001a. The inactivation of Horseradish peroxidase isoenzyme A2 by hydrogen peroxide: an example of partial resistance due to the formation of a stable enzyme intermediate. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 6, 504-516.
- Hiraga S., Sasaki K., Ito H., Ohashi Y., Matsui H., 2001. A large family of class III plant peroxidases, *Plant Cell Physiol.* 42, 462-468.
- Hiroshi, Y., Masahito, K., Tomomi, N., Kumi, M., Takashi, K., Hideaki, I., Takehiko, Y., Takeshi, F., 2012. Development Of A Fluorescent Chelating Ligand For Scandium Ion Having A Schiff Base Moiety. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular And Biomolecular Spectroscopy*, 90-72-77.
- Hnasko, R.M., 2015. Bioconjugation of Antibodies to Horseradish Peroxidase (HRP). *Methods in Molecular Biology*, 1318, 43-50.
- Holland, T., Sack, M., Rademacher, T., 2010. Optimal nitrogen supply as a key to increased and sustained production of a monoclonal full-size antibody in BY-2 suspension culture. *Biotechnol. Bioeng.*, 107, 278-289.
- Hoyle, M.C., 1977. High resolution of peroxidase-indoleacetic acid oxidase isoenzymes from Horseradish by isoelectric focusing. *Plant Physiol*, 60, 787-793.
- Janović, B.S., Collins, A.R., Vujčić, Z.M., Vujčić, M.T., 2016. Acidic Horseradish peroxidase activity abolishes genotoxicity of common dyes. *J. Hazard. Mater.*, 321, 576-585.
- Jen, J.J., Seo, A., Flurkey, W.H., 1980. Tomato peroxidases purification via hydrophobic chromatography. *Journal Food Science*, 45, 60-63.
- Jermyn, M.A., 1952. Horseradish peroxidase. *Nature*, 169, 488-489.
- Jermyn, M.A., Thomas, R., 1954. Multiple components in Horseradish peroxidase. *Biochem. J.*, 56, 631-639.
- Jiasong, F., Barcelona, M.J., 2003. Coupled oxidation of aromatic hydrocarbons by Horseradish peroxidase and hydrogen peroxide. *Chemosphere*, 50 105-109.
- Jouili, H., Bouazizi, H., Ferjani, E., 2011. Plant peroxidases: biomarkers of metallic stress. *Acta Physiol Plant*, 33, 2075-2082.
- Kalin R., Atasever A., Ozdemir H. 2014. Single-step purification of peroxidase by 4-aminobenzohydrazide from turkish blackradish and turnip roots. *Food Chemistry* 335-340
- Kalra, B., Gross, R.A., 2000. Horseradish peroxidase mediated free radical polymerization of methyl methacrylate. *Biomacromolecules*, 1, 501-505.
- Kampis, A., Bartuczakovacs, O., Hoschke, A., Aosvgyazo, V., 1984. Changes in peroxidases activity of broccoli during processing and frozen storage. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 17, 293-295.
- Kay, E., Shannon, L.M., Lew, J.Y., 1967. Peroxidase isozymes from Horseradish roots. II. Catalytic properties. *J. Biol. Chem.*, 242, 2470-2473.

- Kim, E.Y., Choi, Y.J., Chae, H.J., Chu, K.H., 2006. Removal of aqueous pentachlorophenol by Horseradish peroxidase in the presence of surfactants. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 11, 462–465.
- Köksal, E., 2011. Peroxidase from leaves of spinach (*Spinacia oleracea*) partial purification and some biochemical properties. *International Journal of Pharmacology*, 7 (1), 135-139.
- Köksal, E., Gülçin, İ., 2008. Purification and characterization of peroxidase from cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) buds, *Protein & Peptide Letters*, 15, 320-326.
- Krainer, F.W., Glieder, A., 2015. An updated view on Horseradish peroxidases: recombinant production and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 99(4), 1611-1625.
- Kristensen, B.K., Bloch, H., Rasmussen, S.K., 1999. Barley coleoptile peroxidases. Purification, molecular cloning, and induction by pathogens. *Plant Physiology*, 120, 501
- Kwak, S.S., Kim, S.K., Park, I.H., Liu, J.R. 1996. Enhancement of peroxidase activity by stress-related chemicals in sweet potato. *Phytochemistry*, 43, 565-568.
- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the heat of bacteriophage T4. *Nature (London)*, 227, 680-683.
- Lavery, C.B., Macinnis, M.C., Macdonald, M.J., Williams, J.B., Spencer, C.A., Burke, A.A., Irwin, D.J.G., D’Cunha, G.B., 2010. Purification of peroxidase from Horseradish (*Armoracia rusticana*) roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 8471-8476.
- Lee, H.C., Klein, B.P., 1990. Classification of green pea peroxidases by preparative isoelectric focusing. *Journal Food Biochemistry*, 14, 137–152.
- Leon, J.C., Alpeeva, I.S., Chubar, T.A., Galaev, I. Yu., Csoregi, E., Sakharov, I. Yu., 2002. Purification and substrate specificity of peroxidase from sweet potato tubers. *Plant Science*, 163, 1011–1019.
- Lin, Z.F., Chen, L.H., Zhang, W.Q., 1996. Peroxidase from *I. Cairica* (L) SW Isolation, purification and some properties. *Process of Biochemistry*, 5, 443–448.
- Lineweaver, H. and Burk, D., 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American Chemical Society*, 56, 658-666.
- Liszkay, A., Van Der Zalm, E., Schopfer, P., 2004. Production of reactive oxygen intermediates (O₂, H₂O₂, and OH) by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth. *Plant Physiol.*, 136, 3114-3123.
- Manu, B.T., Prasada Rao, U.J.S., 2009. Calcium modulated activity enhancement and thermal stability study of a cationic peroxidase purified from wheat bran. *Food Chemistry*, 114, 66–71.
- Marjamaa, K., Kukkola, E.M., Fagerstedt, K.V., 2009. The role of xylem class III peroxidases in lignifications. *J. Exp. Bot.*, 60, 367-376.
- Marklund, S., Ohlsson, P.I., Opara, A., Paul, K.G., 1974. The substrate profiles of the acidic and slightly basic Horseradish peroxidases. *Biochim, Biophys. Acta*, 350, 304–313.
- McLellan, K.M., Robinson, D.S., 1987. Purification and heat stability of Brussels sprout peroxidase isoenzymes. *Food Chemistry*, 23, 305–319.

- Mdluli, K.M., 2005. Partial purification and characterisation of polyphenol oxidase and peroxidase from marula fruit (*Sclerocarya birrea subsp. Caffra*). Food Chemistry, 92, 311–323.
- Morawski, B., Lin, Z.L., Bandara, G., Arnold, F.H., 2000. Expression of Horseradish peroxidase (HRP) in *Scerevisiae* and *P-pastoris*. Abstr. Pap. Am. Chem. Soc., 219, 165–165.
- Morohashi, Y., 2002. Peroxidase activity develops in the micropylar endosperm of tomato seeds prior to radical protrusion. Journal of Experimental Botany, 53 (374), 1643-1650.
- Murakami, S., Takahara, H., Shiraiwa, M., 2007. Purification and characterization of three neutral extracellular isoperoxidases from rye leaves. Phytochemistry, 68, 777–78.
- Näätäsaari, L., Krainer, F.W., Schubert, M., Glieder, A., Thallinger, G.G., 2014. Peroxidase gene discovery from the Horseradish transcriptome. BMC Genomics, 15, 227.
- Nair, A. R., Showalter, A. M., 1996. Purification and characterization of a woundinducible cell wall cationic peroxidase from carrot roots. Biochemistry biophys. Research Communucation, 226, 254
- Nelson, D. L., Lehninger, A. L. and Cox, M. M., 2013. Lehninger Principles of Biochemistry. Palme Yayıncılık, 5. Baskıdan çeviri, 185 s, Ankara.
- Ohya, T., Morimura, Y., Saji, h., Mihara, T., Ikawa, T., 1997. Purification and characterization of ascorbate peroxidase in roots of Japanese radish. Plant Science, 125, 137-145.
- Onsa, G.H., Saari, N., Selamat, J., Bakar, J., 2004. Purification and characterization of membrane bound peroxidases from Metroxylon sagu. Food Chemistry, 85, 365–376.
- Önder, R.S., Çelebi, M., Altıkatoğlu, M., Kuzu, H., 2009. He effect of Horseradish peroxidase (HRP)-dextran conjugate on naphtol blue black. Journal of Engineering and Natural Sciences, 27, 18-25
- Pandey, V.P., Singh, S., Singh, R., Dwivedi, U.N., 2012. Purification and characterization of peroxidase from papaya (*Carica papaya*) fruit. Appl Biochem Biotechnol., 167, 367-376.
- Passardi, F., Theiler, G., Zamocky, M., Cosio, C., Rouhier, N., Teixeira, F., Margis-Pinheiro, M., Ioannidis, V., Penel, C., Falquet, L., Dunand, C., 2007. PeroxiBase: the peroxidase database. Phytochemistry, 68, 1605-1611.
- Pütter, J., and Becker, R., 1987. Methods of Enzymatic Analysis: Peroxidases. Bergmeyer, third edition, VCH, 286 p, New York, USA.
- Robert, K.M., Petter, A.M., Darly, K.G., and Victor, W.R., 1993. Harper'in Biyokimyası. Barış Kitabevi, 141, İstanbul.
- Robinson, F.E., Maxwell, S.R.J., Thorpe, G.H.G., 1987. An investigation of the antioxidant activity of black tea using enhanced chemiluminescence. Free Radical Research, 26, 291–302.
- Rodriguez L, J. N., Espin, J. C., Amor, F. del, Tudela, J., Martinez, V., Cerda, A., Garcia-Canovas,F., 2000. Purification and kinetic characterization of an anionic peroxidase from melon (*Cucumis melo* L.) cultivated under different salinity conditions. Journal Agricultural Food Chemistry, 48, 1537–1541.

- Rudrappa, T., Lakshmanan, V., Kaunain, R., Singara, N. M., Neelwarne, B., 2007. Purification and characterization of an intracellular peroxidase from genetically transformed roots of red beet (*Beta vulgaris* L.). *Food Chemistry*, 105, 1312–1320.
- Sakai, S., Khanmohammadi, M., Khoshfetrat, A.B., Taya, M., 2014. Horseradish peroxidase-catalyzed formation of hydrogels from chitosan and poly(vinyl alcohol) derivatives both possessing phenolic hydroxyl groups. *Carbohydr Polym.*, 111, :404–409.
- Saraiva, J.A., Nunes, C.S., Coimbra, M.A., 2007. Purification and characterization of olive (*Olea europaea* L.) peroxidase – Evidence for the occurrence of a pectin binding peroxidase. *Food Chemistry*, 101, 1571–1579.
- Sarika, D., Ashwin Kumar, P.S.S., Arshad, S., Sukumaran, M. K., 2015. Purification and evaluation of Horseradish peroxidase activity. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, 4 (7), 367–375
- Sariri, R., Jafarian, V., Hassan Sajedi, R., Khajeh, Kh., 2006b. Inhibition of Horseradish peroxidase by thiol type inhibitors: Mercaptoethanol and mercaptoacetic acid, *Journal of Molecular Liquids* 128, 175–177.
- Sariri, R., Sajedi, R.H., Jafarian, V., 2006. Inhibition of Horseradish peroxidase activity by thiol type inhibitors. *Journal of Molecular Liquids*, 123, 20–23.
- Sariri, R., Sajedi, R.H., Jafarian, V., 2006a. Inhibition of Horseradish peroxidase activity by thiol type inhibitors, *Journal of Molecular Liquids* 123, 20 – 23.
- Scandalios J.G., 1994. Regulation and Properties of Plant Catalyses, ,Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants, CRC Press, pp. 275–316, Boca Raton, FL
- Segel, I.H., 1968. Biochemical Calculations. John Wiley and Sons, Inc., 403, New York.
- Serrano-Martínez, A., Fortea, M. I., Del Amor, F. M., Nuñez-Delgado, E., 2008. Kinetic characterisation and thermal inactivation study of partially purified red pepper (*Capsicum annum* L.) peroxidase. *Food Chemistry*, 107, 193–199.
- Signoret, A., Crouzet, J., 1982. Tomato peroxidase: purification by affinity chromatography. *Agricultural and Biological Chemistry*, 46, 459.
- Singh, W. N., Singh, J., 2002. Purification of turnip peroxidase and its kinetic properties. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 32, 39–49.
- Smith, A.T., Santama, N., Dacey, S., 1990. Expression of a synthetic gene for Horseradish peroxidase-C in *Escherichia-coli* and folding and activation of the recombinant enzyme with Ca-2+ and heme. *J.Biol. Chem.* 265, 13335–13343.
- Soda, I., Hasegawa, T., Suzuki, T., Ogura, N., 1991. Purification and some properties of peroxidase from kiwi fruit. *Agric. Biol. Chem.*, 55(6), 1677–1678.
- Somtürk, B., Kalın, R., Özdemir, N., 2014. Purification of peroxidase from red cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra*) by affinity chromatography, *Appl Biochem Biotechnol.*, 173,1815–28.
- Spadiut O., Rossetti L., Dietzsch C., Herwig C., 2012. Purification of a recombinant plant peroxidase produced in *Pichia pastoris* by a simple 2-step strategy. *Protein Expr. Purif.*, 86, 89–97.
- Şişecioğlu, M., Gülçin, İ., Çankaya, M., Atasever, A., Şehitoğlu, M.H., Kaya, H.B., Özdemir, H., 2010. Purification and characterization of peroxidase from Turkish

- black radish (*Raphanus sativus* L.). Journal of Medicinal Plants Research, 4 (12), 1187-1196.
- Temel, D., 2006. Doğal ve sentetik biomateryallerde, osteogenic (rhBMP-7) ve angiogenic (bFGF) büyüme faktörleri ile insan osteoblast hücrelerinin gelişiminin incelenmesi. Yüksek lisans tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çukurova Üniversitesi, Adana.
- Tıpawan, T. Barrett M., 2005. Purification and partial characterization of broccoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*) peroxidases. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 3206–3214
- Triplett, B. A., Mellon, J. E., 1992. Purification and characterization of anionic peroxidases from cotton (*Gossypium hirsutum*). Plant Science, 81, 147-154.
- Vamos-Vigyazo, L., 1981. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. CRC Critical Review of Food Science and Nutrition, 15 (1), 49–127.
- Van Huystee, R.B., 1987. Some molecular aspects of plant peroxidase biosynthetic studies. Ann. Rev. Plant. Physiol, 38, 205-219.
- Veitch, N. C., 2004. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. Phytochemistry, 65, 249-259.
- Veitch, N.C., Smith, A.T., 2001. Horseradish peroxidase. Adv. Inorg. Chem., 51, 107–162.
- Vitali, A., Botta, B., Delle Monache, G., Zappitelli, S., 1998. Purification and partial characterization of a peroxidase from plant cell cultures of *Cassia didymobotrya* and biotransformation studies. Biochem. J., 331, 513-519.
- Wakamatsu, K., Takahama, U. 1993. Changes in peroxidase activity and in peroxidase isozymes in carrot callus. Physiologia Plantarum, 88, 167–171.
- Wardman, P., 2002. Indole-3-acetic acids and Horseradish peroxidase: a new prodrug/enzyme combination for targeted cancer therapy. Curr. Pharm. Des., 8(15), 1363-1374.
- Welinder, K.G., 1976. Covalent structure of the glycoprotein Horseradish peroxidase. FEBS Lett., 72, 19–23.
- Whitney, P.L., 1974. Affinity chromatography of carbonic anhydrase. *Analytical Biochemistry*, 57, 467-476.
- Wilchek, M., Miron, T. and Kohn, J. 1984. Affinity chromatography. Methods in enzymology, 104, 3-55.
- Xi, L., Zhipeng, Q., Qijin, W., Hao, S., Nianjun, Y., 2014. Graphene nanoplatelets and Horseradish peroxidase based biosensor. Phys. Status Solidi A, 211(12), 2795–2800
- Yamada, Y., Kobayashi, S., Watanabe, K., Hayashi, U., Yajima, Y., Inoue, H., 1987. Production of Horseradish peroxidase by plant cell culture. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 38, 31–39.
- Yemenicioglu, A., Özkan, M., Cemeroglu, B., 1998. Partial purification and thermal characterization of peroxidase from okra (*Hibiscus esculentum*). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46, 4158–4163.
- Zamocky, M. and Obinger, C., 2010. Molecular Phylogeny of Heme Peroxidases. Springer Verlag, 20-48 p, Berlin, Heidelberg.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Kemaliye’de doğdu. İlk ve orta öğrenimini Malatya’da tamamladı. 2003 yılında girdiği Fırat Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden 2007 yılında mezun oldu. 2007 yılında başladığı Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimini 2009 yılında tamamladı. 2009 yılı başlarında Muş Alparslan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı. 2011 yılında Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Bilim Dalı’nda doktora eğitimine başladı.