

**T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ EĞİTİMİ ANABİLİM DALI**

**DİHİDROPİRİMİDİNAZİN BAZI
LEGUMINOSAE TÜRLERİNDEN İZOLASYONU
VE KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Olca SİNAN

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

112647

Balıkesir, Temmuz-2001

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ EĞİTİMİ ANABİLİM DALI

DİHİDROPİRİMİDİNAZIN BAZI
LEGUMINOSAE TÜRLERİNDEN İZOLASYONU
VE KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Olcay SİNAN

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Yusuf TURAN

Sınav Tarihi

06/07/2001

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Gülendarm TÜMEN

Doç. Dr. Oktay ARSLAN

Yrd. Doç. Dr. Yusuf TURAN

Balıkesir, Temmuz-2001

ÖZET

DİHİDROPRİMİDİNAZIN BAZI LEGUMINOSAE TÜRLERİNDEN İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU

Olca SİNAN

Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Eğitimi Anabilim Dalı

(Yüksek Lisans Tezi / Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Yusuf TURAN)

Balıkesir, 2001

Bu yüksek lisans tez çalışmasında *Pisum sativum* L. (Bezelye) ve *Albizzia julibrissin* Durazz.(Gülibrişim)'den dihidropirimidinaz (EC 3.5.2.2) izole ve karakterize edilmiştir. Bu amaçla belirtilen iki bitki için bir saflaştırma prosedürü tespit edilip uygulanmıştır. Öncelikle bu iki bitki laboratuvar ortamında yetiştirilerek enzimin ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Daha sonra da enzim ısıtma, amonyum sülfatla çöktürme ve jel filtrasyon kromatografisi ile kısmen saflaştırılmıştır.

Elde edilen dihidropirimidinazın optimum sıcaklık dereceleri dihidrourasil (DHU) için 60 °C, dihidrotimin (DHT) için 55 °C, pH dereceleri her iki substrat için 9.5 tespit edilmiştir. Dihidropirimidinazın stabilitesi hem ham ekstraktta, hem de amonyum sülfatla çöktürme ile elde edilen örneklerde belirlenmiştir. DHU ve DHT için K_M değerleri sırasıyla 0.33 mM ve 0.44 mM, V_{Max} değerleri de 0.23 nkatal/sn/ml ve 2.51 nkatal/sn/ml olarak hesaplanmıştır. Bazı metal iyonlarının bu enzime olan etkileri de araştırılmıştır. DHPazın aktivitesini, $AgNO_3$ % 94, $HgCl_2$ % 87, $FeSO_4$ % 80 ve $CoCl_2$ % 24 oranında azaltırken, $SnCl_2$ % 18, $MnSO_4$ % 14 oranında artırmıştır.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: Dihidropirimidinaz, *Pisum sativum*, *Albizzia julibrissin*, saflaştırma, inhibisyon.

ABSTRACT

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF DIHYDROPYRIMIDINASE FROM SOME LEGUMINOUS SPECIES

OlcaY SİNAN

Balıkesir University, Institute of Science, Department of Biology Education

(MSc.Thesis / Supervisor: Dr. Yusuf TURAN)

Balıkesir-Turkey, 2001

Dihydropyrimidinase was isolated and characterized from *Pisum sativum* L. and *Albizzia julibrissin* Durazz in this present investigation. A purification procedure was determined and applied for this purpose. Firstly, those two plant species were grown at laboratory then enzyme was isolated. Subsequently the enzyme was purified by using heat treatment, precipitation with ammonium sulphate and gel filtration chromatography technics.

The optimum temperatures of dihydropyrimidinase were 60 °C and 55 °C for dihydrouracil (DHU) and dihydrothymine (DHT) respectively. Optimum pH value of dihydropyrimidinase for two substrates was determined as 9,5. The stability of dihydropyrimidinase was determined both in crude enzymic extract and in the sample that obtained from ammonium sulphate precipitation. The effect of some metal ions on that enzyme was also examined. K_M values of the enzyme for DHU and DHT were 0.33 mM and 0.44 mM respectively. V_{Max} values were calculated as 0.23 nkatal/sn/ml and 2.51 nkatal/sn/ml for DHU and DHT respectively. The activity of dihydropyrimidinase was decreased by $AgNO_3$ (94 %), $HgCl_2$ (87 %), $FeSO_4$ (80 %) and $CoCl_2$ (24 %) but increased by $SnCl_2$ (18 %) and $MnSO_4$ (14 %).

KEY WORDS: Dihydropyrimidinase, *Pisum sativum*, *Albizzia julibrissin*, purification, inhibition

İÇİNDEKİLER

| | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| ÖZET, ANAHTAR SÖZCÜKLER | ii |
| ABSTRACT, KEY WORDS | iii |
| İÇİNDEKİLER | iv |
| SEMBOL LİSTESİ | vii |
| ŞEKİL LİSTESİ | viii |
| ÇİZELGE LİSTESİ | x |
| ÖNSÖZ | xi |
| 1.GİRİŞ | 1 |
| 1.1 Enzimler | 1 |
| 1.2 Enzimlerin Sınıflandırılması | 5 |
| 1.2.1 Oksidoredüktazlar | 6 |
| 1.2.2 Transferazlar | 7 |
| 1.2.3 Hidrolazlar | 7 |
| 1.2.4 Liyazlar | 7 |
| 1.2.5 İzomerazlar | 7 |
| 1.2.6 Ligazlar (Sentetazlar) | 7 |
| 1.3 V_{Max} , K_M Değerleri ve Önemi | 8 |
| 1.4 Enzim İnhibitörleri | 8 |
| 1.4.1 Dönüşümlü İnhibitörler | 9 |
| 1.4.1.1 Kompetitif (Yarışmalı) İnhibisyon | 9 |
| 1.4.1.2 Nonkompetitif (Yarışmasız) İnhibisyon | 9 |
| 1.4.1.3 Unkompetitif İnhibisyon | 9 |
| 1.4.2 Dönüşümsüz İnhibisyon | 10 |
| 1.5 Enzim Aktivitesinin İfade Edilmesi | 10 |

| | |
|---|----|
| 1.6 Enzimatik Aktivitenin Düzenlenmesi | 11 |
| 1.7 Enzim Saflaştırılmasındaki Önemli Metotlar | 11 |
| 1.7.1 Enzim Saflaştırma Stratejisi | 12 |
| 1.7.2 Kullanılan Saflaştırma İşlemlerinden Bazıları | 14 |
| 1.7.2.1.Enzim Kaynağından Enzimin Çıkarılması (Ekstraksiyon) | 14 |
| 1.7.2.2.Santrifüjleme | 14 |
| 1.7.2.3.Isıtma (Heat Treatment) | 15 |
| 1.7.2.4.Amonyum Sülfatla Çöktürme | 15 |
| 1.7.2.5.Diyaliz | 15 |
| 1.7.2.6.İzoelektrik Noktaya Göre Çöktürme | 15 |
| 1.7.2.7.Kolon Kromatografisi | 16 |
| 1.8 Pirimidinler | 16 |
| 1.8.1 Pirimidin Biyosentezi | 17 |
| 1.8.2 Pirimidin Katabolizması | 19 |
| 1.8.2.1 5'- Nükleotidaz | 19 |
| 1.8.2.2 Uridin Hidrolaz (Uridin Nükleosidaz) | 19 |
| 1.8.2.3 Dihidrourasil Dehidrogenaz (DHUDHaz) | 20 |
| 1.8.2.4 Dihidropirimidinaz (DHPaz) | 22 |
| 1.8.2.5 β -Ureidopropionaz (N-Karbamoil- β -Alanin Amidohidrolaz) | 24 |
| 1.8.3 Dihidropirimidinazın Özellikleri | 25 |
| | |
| 2 MATERYAL VE YÖNTEM | 28 |
| 2.1 Materyal | 28 |
| 2.1.1 Kimyasallar | 28 |
| 2.1.2 Çözeltilerin Hazırlanması | 28 |
| 2.1.2.1 Tris-HCl Tamponu | 28 |
| 2.1.2.2 Renk Belirteci | 28 |
| 2.1.3 Bitkiler | 29 |
| 2.1.4 Kullanılan Araç-Gereç | 33 |
| 2.2 Metot | 33 |
| 2.2.1 Ekstraksiyon | 33 |
| 2.2.2 Isıtma (Heat Treatment) | 33 |

| | |
|--|----|
| 2.2.3 Amonyum Sülfatla Çöktürme | 34 |
| 2.2.4 Kolon Kromatografisi (Jel Filtrasyon) | 34 |
| 2.2.5 Enzim Aktivite Tayini | 35 |
| 2.2.6 Protein Tayini | 37 |
| 2.2.7 V_{Max} ve K_M Değerlerinin Hesaplanması | 37 |
| 2.2.8 Güvenilirlik | 39 |
| 3. BULGULAR | 40 |
| 3.1 Enzim Ekstraksiyonu ve Aktivite Tayini | 40 |
| 3.2 Isıtma (Heat Treatment) | 40 |
| 3.3 Amonyum Sülfatla Çöktürme | 41 |
| 3.4 Jel Filtrasyon | 42 |
| 3.5 Optimum pH ve Sıcaklık | 44 |
| 3.6 V_{Max} ve K_M Değerleri | 45 |
| 3.7 Stabilite | 47 |
| 3.8 Metal İyonları | 50 |
| 4. TARTIŞMA VE SONUÇ | 52 |
| 5. KAYNAKLAR | 58 |

SEMBOL LİSTESİ

| Simge | Adı |
|------------------|--|
| DHU | Dihidrourasil |
| DHT | Dihidrotimin |
| DHPaz | Dihidropirimidinaz |
| NC β A | N-Karbamoil- β -alanin |
| NC β AIBA | N-Karbamoil- β -aminoizobütirik asit |
| EDTA | Etilendiaminotetraasetik asit |
| K _m | Michaelis sabiti |
| V _{max} | Maksimum hız |
| EC | Enzim kod numarası |
| ES | Enzim-Substrat kompleksi |
| EI | Enzim-İnhibitör kompleksi |
| ESI | Enzim-Substrat-İnhibitör kompleksi |
| kDa | Kilo Dalton |
| BSA | Bovine (Sığır) serum albümin |
| pI | İzoelektrik nokta |

ŞEKİL LİSTESİ

| Şekil Numarası | Adı | Sayfa |
|----------------|---|-------|
| Şekil 1.1 | Yapılarına göre enzimlerin sınıflandırılması | 6 |
| Şekil 1.2 | Üç temel pirimidin bileşiği | 17 |
| Şekil 1.3 | Pirimidin biyosentezi | 18 |
| Şekil 1.4 | Uridin monofosfatın 5'-Nükleotidaz katalizörlüğüyle hidrolizasyonu | 20 |
| Şekil 1.5 | Temel pirimidin bazlarının katabolik yolu | 20 |
| Şekil 1.6 | Uridinin uridin hidrolaz katalizörlüğüyle hidrolizasyonu | 21 |
| Şekil 1.7. | Pirimidinlerin dihidrourasil dehidrogenaz katalizörlüğüyle redüksiyonu | 23 |
| Şekil 1.8 | Dihidropirimidinlerin dihidropirimidinaz katalizörlüğüyle hidrolizasyonu | 24 |
| Şekil 1.9. | N-Karbamoil bileşiklerinin, β -ureidopropionaz katalizörlüğüyle hidrolizasyonu | 24 |
| Şekil 2.1 | Bradford (1976) metoduna göre proteinlerin kolorimetrik tayini için standart eğri | 30 |
| Şekil 2.2 | Prescott ve Jones (1969) tarafından geliştirilen, West ve arkadaşları (1982)'nce modifiye edilen yöntemle NC β A'nin kolorimetrik tayini için standart eğri | 31 |
| Şekil 2.3 | Prescott ve Jones (1969) tarafından geliştirilen, West ve arkadaşları (1982)'nce modifiye edilen yöntemle NC β AIBA'in kolorimetrik tayini için standart eğri | 32 |
| Şekil 2.4 | Lineweaver-Burk eğrisi | 39 |
| Şekil 3.1 | <i>Pisum sativum</i> 'dan izole edilen amonyum sülfatla çöktürülerek elde edilen dihidropirimidinazın DHU ve DHT | 44 |

| | | |
|-----------|---|----|
| | hidrolizasyonu için optimum pH isteği | |
| Şekil 3.2 | <i>Pisum sativum</i> 'dan amonyum sülfatla çöktürülerek elde edilen dihidropirimidinazın DHU ve DHT hidrolizasyonu için optimum sıcaklık isteği | 45 |
| Şekil 3.3 | <i>Pisum sativum</i> 'dan amonyum sülfatla çöktürülerek elde edilen dihidropirimidinazın DHU hidrolizasyonu için Lineweaver-Burk grafiği | 46 |
| Şekil 3.4 | <i>Pisum sativum</i> 'dan amonyum sülfatla çöktürülerek elde edilen dihidropirimidinazın DHU hidrolizasyonu için Lineweaver-Burk grafiği | 47 |
| Şekil 3.5 | <i>Pisum sativum</i> 'dan izole edilen ham ekstrakttaki dihidropirimidinaz aktivitesinin zamanla değişimi | 48 |
| Şekil 3.6 | <i>Albizzia julibrissin</i> 'den izole edilen ham ekstrakttaki dihidropirimidinaz aktivitesinin zamanla değişimi | 49 |
| Şekil 3.7 | <i>Pisum sativum</i> 'dan amonyum sülfatla çöktürülerek elde edilen dihidropirimidinaz aktivitesinin zamanla değişimi | 49 |
| Şekil 3.8 | <i>Albizzia julibrissin</i> 'den amonyum sülfatla çöktürülerek elde edilen dihidropirimidinaz aktivitesinin zamanla değişimi | 50 |

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge

| Numarası | Adı | Sayfa |
|-------------|--|-------|
| Çizelge 3.1 | <i>Pisum sativum</i> fidelerinden ekstre edilen dihidropirimidinazın farklı sıcaklıklardaki aktiviteleri | 41 |
| Çizelge 3.2 | <i>Pisum sativum</i> fidelerinden ekstre edilen dihidropirimidinazın amonyum sülfatla çöktürme aralığının belirlenmesi | 42 |
| Çizelge 3.3 | <i>Albizzia julibrissin</i> 'den ekstre edilen dihidropirimidinazın saflaştırma tablosu | 43 |
| Çizelge 3.4 | <i>Pisum sativum</i> 'dan ekstre edilen dihidropirimidinazın saflaştırma tablosu | 44 |
| Çizelge 3.5 | Bazı metal iyonlarının dihidropirimidinazın aktivitesine etkileri | 51 |

ÖNSÖZ

Çalışmalarımın her aşamasında fikirlerinden istifade ettiğim hocam Yrd. Doç. Dr. Yusuf TURAN'a teşekkürlerimi sunmayı borç bilirim.

Jel filtrasyon kromatografisinin yapılmasında ve tezimle ilgili diğer konulardaki önerilerinden dolayı sayın Doç. Dr. Oktay ARSLAN'a teşekkür ederim.

Bazı kimyasallar ve araç-gereç teminindeki yardımlarından dolayı başta Yrd. Doç. Dr. Canan Nakiboğlu olmak üzere, Necatibey Eğitim Fakültesi (NEF) Kimya Bölümü öğretim elemanları ve araştırma görevlilerine teşekkürlerimi sunarım.

Bana maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen aileme de minnettarım.

Balıkesir, 2001

Olçay SİNAN

1. GİRİŞ

1.1. Enzimler

Canlılarda, birbirlerinden çok farklı özelliklerde ve görevlerde yüzlerce değişik molekül bulunmaktadır. Sözü edilen moleküllerin her biri çok önemli işlevleri yerine getirirler. İşte bu biyomoleküllerin bir grubu da enzimlerdir.

Enzimler, canlılarda gerçekleşen biyokimyasal reaksiyonları hızlandıran ve reaksiyon sonucunda bozulmadan kalarak tekrar tekrar kullanılabilen protein tabiatındaki moleküllerdir. Biyokimyasal reaksiyonlar enzimler sayesinde milyarlarca kat daha hızlı bir şekilde gerçekleşmektedir. Canlılarda binlerce biyokimyasal reaksiyon olduğu ve bu reaksiyonların enzimler sayesinde milyarlarca kat daha hızlı gerçekleştirildiği düşünülürse, enzimlerin ne derece önemli biyomoleküller oldukları daha iyi anlaşılacaktır. Böylesine önemli olan bu moleküllerin izole edilmesi, incelenmesi ve katalizlenen reaksiyonların aydınlatılması çok önemli biyokimyasal çalışmalar olarak görülmektedir [1, 2].

Enzimlerle ilgili ilk çalışmalar 1760-1825 yılları arasında Berzellius tarafından yapılmıştır. Buğdaygillerden elde edilen enzim karışımının nişastayı sülfirik asitten daha hızlı parçaladığını göstermiştir. Pasteur, fermantasyonun enzimler tarafından gerçekleştirildiğini 1860 yılında ileri sürmüştü ve enzim için, organize olmuş "**ferment**" deyimini kullanmıştır. Kuhne biyolojik reaksiyon hızlarına etki eden maddeleri, diğer maddelerden ayırt etmek için, Yunanca "mayada bulunan" anlamına gelen "**enzim**" kelimesini 1879 yılında önermiştir. Chittenden tarafından 1894 yılında ileri sürülen 3 kavram enzimoloji tarihi için önemli bir dönüm noktası olmuştur. Chittenden, enzimlerin proteinden oluştuğunu, katalitik aktivitenin enzimin özel yapısına bağlı olduğunu, enzimlerin substrat ile ara kompleksler oluşturduklarını ileri sürmüştür.

Buchner 1897 yılında maya hücrelerinden bazı enzimleri ayırmayı başarak enzimoloji alanına yeni bir yön vermiştir [1, 2].

Henri ve Brown 1902 yılında enzim ve substrat ile enzim-substrat kompleksi arasında bir dengenin oluştuğunu önermesinden sonra, 1913 yılında Michaelis-Menten tarafından bu tanım daha da geliştirilerek bugün hala kullanılan, kendi adları ile anılan sabiti ve eşitliği ortaya çıkarmışlardır. İlk defa James B. Sumner tarafından 1926 yılında *Canavalia ensiformis* adındaki bir fasulye türünden “ürezaz enzimi” saf olarak elde edilmiştir. Bu yıldan itibaren bir çok enzim kristal halde saflaştırılarak tanımlanmıştır. Tanımlanan enzim sayısı 1930 yılında 80 civarında iken, bu sayı 1970'li yılların başında 1300'e, 1980'li yıllarda 2000'e ulaşmış ve günümüzde de 2500'den fazla enzimin tanımlanmış olduğu belirtilmektedir [1-5].

Enzimler yapı itibariyle büyük oranda proteinden oluşmaktadır. Bazı enzimler sadece proteinden oluşmakla birlikte bir çok enzim protein yapının yanında bir de yan grup adı verilen ve protein yapısında olmayan bir kısımdan oluşmaktadır. Bu kısım organik yapıda bir vitamin veya inorganik yapıda bir metal iyonu olabilmektedir. Bu şekilde olan enzimin protein kısmına apoenzim, tümüne de holoenzim ismi verilmektedir. Apoenzim substratın tanınmasını sağlarken, yan grup da reaksiyonun gerçekleşmesini sağlamaktadır. Bazı durumlarda da apoenzime çok sıkı bağlanan gruplar vardır ki, bunlara da prostetik grup adı verilmektedir [1-5]. Şekil 1.1'de yapılarına göre enzimlerin sınıflandırılması verilmiştir.

Proteinlerin yapıtaşlarını aminoasitler oluşturmaktadır. Normalde 20 çeşit aminoasit değişik sayı ve dizilişlerde bir araya gelerek farklı proteinleri oluşturmaktadır. Bilindiği gibi aminoasitler hem asit hem de baz özelliği göstermektedir. Düşük pH derecelerinde (+) yük, yüksek pH derecelerinde ise (-) yük taşırlar. Ancak bir pH derecesinde yüksüz olur ve bu noktada aminoasitler dipolar iyon şeklinde bulunmaktadır. İşte bu pH noktasına, izoelektrik nokta (pI) ismi verilmektedir. Bir proteinde yer alan aminoasitlerin tümünün yüklerinin toplamı o proteinin net yükünü vermektedir. Aminoasitler

izoelektrik noktalarında elektriksel alanda hiçbir kutba göç etmezler. Enzimler de protein yapısında oldukları için, her bir enzimin bir izoelektrik noktasının olduğunu söylemek mümkündür [1-5].

Enzimler, oldukça büyük farklılıklar gösterebilen substrat spesifitelerine sahiptirler. Bazı enzimler tek bir substrata etki ederken bazıları da birden fazla sayıda benzer substrata etki edebilmektedir. Örneğin D-amino asit oksidaz, sadece D konfigürasyonundaki amino asitlere etki ettiği halde, L konfigürasyonundakilere etki etmemektedir. Bunun yanında pepsin, midedeki bir çok proteine etki etmektedir [3]. Enzimlerin reaksiyona özel olduğunu söylemek daha doğru olmaktadır. Çoğunlukla substrata da özeldir ancak birçok enzimin genel itibariyle birbirlerine benzeyen birden fazla sayıda substratı vardır. İlgili olan enzim, substratın ürüne dönüşmesini katalize ederek, reaksiyonu hızlı bir şekilde gerçekleştirmektedir. Enzimle substrat arasında anahtar-kilit ilişkisine benzeyen bir ilişki bulunmaktadır. Önemli olan enzimin substratı tanıması ve söz konusu bu anahtar-kilit ilişkisinin kurulup reaksiyonun gerçekleştirilmesidir. Herhangi bir nedenle bu ilişki kurulamadığı zaman enzim reaksiyonu katalizleyememektedir [1-5].

Enzimatik reaksiyonlar için çok önemli iki etken olan sıcaklık ve pH'nın, her enzim için belirli bir optimum derecesi vardır. Enzimler protein yapısında olduklarından ve yüksek sıcaklıklarda yapıları bozuldukları için aktivitelerini kaybetmektedirler. Sıcaklık düşürülse bile enzimin aktivitesi geri gelmemektedir. Düşük sıcaklık derecelerinde aktivite göstermez veya çok az aktivite göstermektedirler. Ancak sıcaklık artırılırsa eski aktivitelerini kazanabilmektedirler. Buradan hareket ederek, her enzimin en iyi aktivite gösterdiği bir optimum sıcaklık derecesinin olduğu söylenebilmektedir. Saklama koşulları açısından en uygun sıcaklık derecesi de genellikle 4°C olarak tercih edilmektedir. Ortamın pH'sının da yine bir optimum derecesi var olup, bu derecenin altında ve üzerinde enzim aktivitesinde azalma görülmektedir. Ancak bazı enzimlerin birden fazla sayıda optimum pH derecelerinin olduğu bildirilmektedir [1-5].

Enzimlerin en önemli özelliklerinden birisi de, başlamış olan reaksiyonu hızlandırmaları ve reaksiyon sonunda da değişmeden kalıp aynı reaksiyonu tekrar tekrar katalizlemeleridir. Canlılarda binlerce biyokimyasal reaksiyon olduğu ve her bir reaksiyon için ayrı bir enzimin gerekliliği düşünüldüğünde, aynı enzimin tekrar tekrar kullanılmasının canlı açısından çok önemli bir özellik olduğu görülmektedir. Enzimlerin etkinliği turnover sayısı (etkinlik değeri) adı verilen ve enzimin saniyede etki ettiği substrat sayısını anlatan bir ifade ile belirtilmektedir [1-5].

Enzimler çoğunlukla protein yapısındadır ve proteinler de DNA'dan gönderilen genetik şifrelere göre ribozomlarda sentezlenmektedir. Bu durum, bir gen-bir enzim ilişkisi ile açıklanmaktadır. DNA'nın belirli bir bölgesinde yer alan nükleotidler tarafından gönderilen şifreler sayesinde bir enzim sentezlenmektedir. Dolayısıyla da, her enzimden sorumlu olan bir genin olduğunu söylemek mümkündür. Genlerde meydana gelebilecek değişimler ilgili enzimi etkileyecektir [1-5].

Bazı enzimler, proenzim olarak bilinen inaktif proteinler şeklinde yapılmakta ve salgılanmaktadır. Bu inaktif protein birbirini izleyen bir dizi işlemten sonra aktif protein haline gelmekte ve olgun proteinin karakteristik aktivitesini gösterebildiği şekle dönüştürülmektedir. Proinsülin, pepsinojen, tripsinojen, kimotripsinojen gibi proteinler inaktiftir ve aktiveleştirildikleri zaman sırasıyla insülin, pepsin, tripsin ve kimotripsin haline dönüşerek asıl fonksiyonlarını yerine getirebilmektedirler. Bazı proteinlerin inaktif bazılarının ise aktif olarak salgılanmaları şöyle izah edilmektedir; Bazı proteinlere her zaman gereksinim duyulurken, bazılarında da ara sıra gereksinim duyulmaktadır. Mesela; insan kanındaki karbonik anhidraza her zaman ihtiyaç duyulurken, kanın pıhtılaşmasında görevli olan enzimler herhangi bir kanama olduğu zaman gereklidir. Tripsin enzimi de ince bağırsakta sindirimin olduğu zamanlar gereklidir. Bu durumun ikinci sebebi de aktif olan enzimin salgılandığı dokuya zarar verebildiği gösterilmektedir. Örneğin; pankreasta üretilen tripsinojen aktif değilken, ince bağırsaklara ulaştığı zaman aktif hale geçirilmektedir. Böylelikle de pankreasta olabilecek zedelenmelerin önüne geçildiği belirtilmektedir [3].

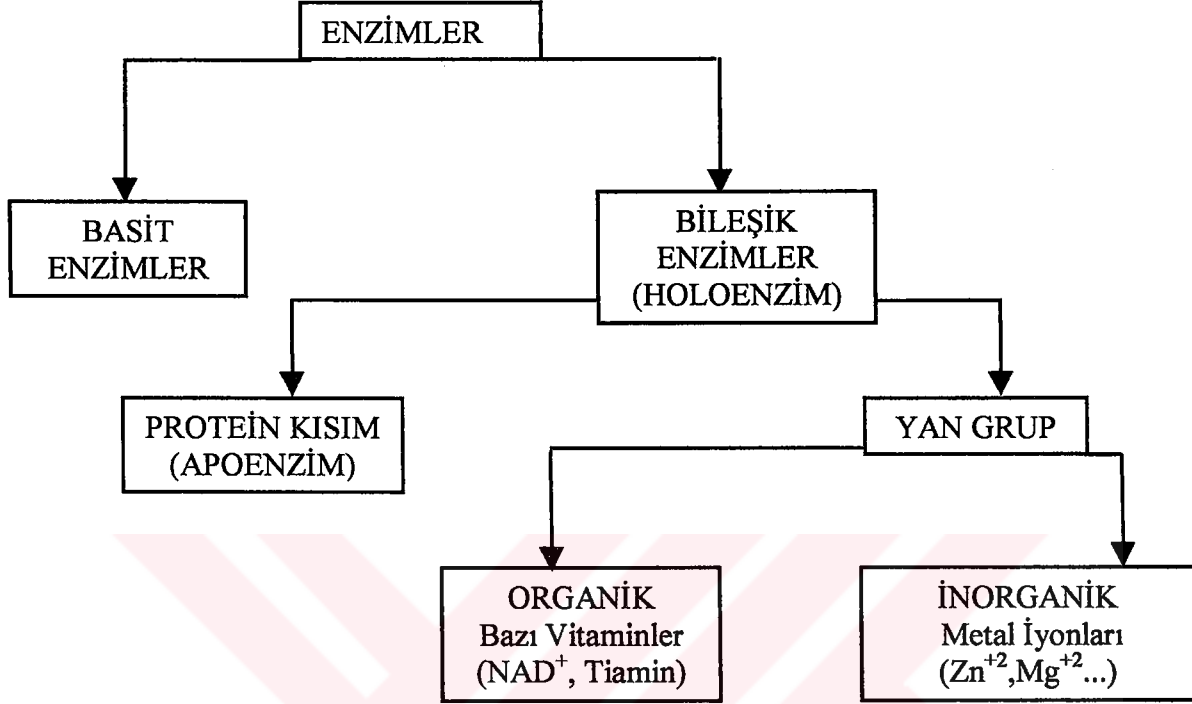
Enzimler, bir çok sahada kullanılabilir. Örneğin; kan plazmasında yer alan bazı enzimlerin aktivitelerinin ölçümü tıbbi bozuklukların tanısında önemli olmaktadır. Diagnostik enzimoloji, tıpta hastalıkların tanı ve kontrolünde yardımcı olarak kullanılan bir alandır. Mesela; kanser teşhisinde kullanılabilen bir yoldur. Bunun yanında enzimler hastalıkların tedavisinde de kullanılmaktadır [3]. Farmakoloji ve toksikolojinin temelinde enzimlere tesir etme yatmaktadır. Bunun da büyük oranda temelini enzim inhibisyonu oluşturmaktadır. Özellikle antibiyotikler, hastalık yapan mikroorganizmaların DNA veya RNA sentezinde yer alan enzimleri inhibe ederek çoğalmalarını engellemektedir. Bazı durumlarda hücre duvarı yapımının engellenmesi de söz konusudur [3]. Günlük hayatta bol olarak kullanılan deterjanların içerisinde belirli oranlarda enzimler yer almaktadır. Bu enzimler temizlenecek yüzeyde yer alan maddeye etki ederek onları parçalamaktadırlar [1-5].

1.2 Enzimlerin Sınıflandırılması

Enzimleri birkaç değişik şekilde sınıflandırmak mümkündür. Mesela, sadece proteinden meydana gelen enzimlere basit, proteinin yanında yan grup da içeren enzimlere bileşik enzim ismi verilmektedir. Hücre içinde görevli olan enzimlere endo-enzimler, hücre dışında etkili olan enzimlere de ekzo-enzimler denilmektedir. Bunların yanı sıra etki ettikleri substrata göre sınıflama da yapılmaktadır. Örneğin; proteine etki eden enzim için proteinaz, lipitlere etki eden için lipaz vs. isimleri verilebilmektedir [1-5].

Canlılardaki çeşitliliğin çok olmasından dolayı sistematik bir isimlendirme ve sınıflandırmanın yapılması gibi, çok sayıda olan enzimlerin de isimlendirilmesi ve sınıflandırılmasına ihtiyaç duyulmuştur. Bu nedenle uluslararası biyokimya birliği tarafından 1961 yılında enzimlerin sistematığının yapılmasına karar verilmiştir. Bu karara göre, enzimler alt grupları da olmak üzere 6 ana gruba ayrılmış ve ikili bir isimlendirme yoluna gidilmiştir. İlk isim substrat ismini, ikinci isim ise reaksiyon tipini belirler ve sonuna -az eki getirilir. Buradan yola çıkılarak her enzime sistematik bir enzim kodu (EC) verilmiştir. Enzim kodu, EC harflerinden sonra aralarına nokta konularak 4 tane

rakamın yan yana yazılması ile ifade edilmektedir. Söz konusu reaksiyonun doğasını aydınlatmak için, gerekli ise, ek bilgi parantez içerisinde verilebilmektedir. Örneğin; EC 3.5.2.2 daha sonra açıklanacak olan dihidropirimidinaz enzimi için verilen enzim kodudur [1-5].



Şekil 1.1. Yapılarına göre enzimlerin sınıflandırılması

Enzim sistematğine göre belirlenen 6 ana grup şunlardır:

1.2.1 Oksidoredüktazlar

Redoks tepkimelerinin katalizlenmesini sağlayan enzim grubudur. İki substrat arasında indirgenme ve yükseltgenme reaksiyonlarını gerçekleştirmektedirler. Dehidrogenazlar, oksidazlar, redüktazlar, transhidrogenazlar, hidroksilazlar bu grupta yer almaktadır. Örneğin; asetaldehit redüktaz, fenilalanin hidroksilaz, alkol dehidrogenaz, laktat dehidrogenaz bunlardan bazılarıdır.

1.2.2 Transferazlar

Hidrojen dışında bir atomun veya atom grubunun (metil, karboksil, amino, fosfat grupları) bir molekülden diğerine aktarılmasını sağlayan enzimlerdir. Dekarboksilazlar, kolin açıl transferaz, kreatin fosfokinaz örnek olarak verilebilmektedir.

1.2.3 Hidrolazlar

Bir molekül su katmak suretiyle veya su molekülü aracılığı ile moleküllerin yıkılmasını sağlayan enzimlerdir. Ester, peptid, C-C, P-N bağlarının hidrolizini katalizleyen enzim grubudur. Dihidropirimidinaz, lipaz, proteinaz, asetil kolin esteraz bu gruba örnek gösterilebilmektedir.

1.2.4 Liyazlar

Su molekülü çıkarmadan molekülleri yıkan enzimlerdir. Örneğin; C-C bağı aldolaz ve dekarboksilazla yıkılmaktadır. Substrattan grupların uzaklaştırılıp çift bağların oluşturulduğu reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir. Karbonik anhidraz ve aldolaz örnek verilebilmektedir.

1.2.5 İzomerazlar

Molekül içinde değişiklik yaparak onun uzayda dizilişini değiştiren enzimlerdir. Geometrik, optik veya yapısal izomerlerin birbirine dönüştürülmesini katalizleyen enzim grubudur. Trioz fosfat izomeraz, epimeraz, fosfoglukomutaz örnek olarak verilebilmektedir.

1.2.6 Ligazlar (Sentetazlar)

Enerji kullanılarak substratların birbirine bağlanmasını katalizleyen enzimlerdir. Glutamin sentetaz ve asetil Co-A sentetaz gibi enzimler bu gruptaki enzimlere örnek olarak verilebilmektedir [1-5].

1.3 V_{Max} , K_M Değerleri ve Önemi

V_{Max} değeri; ilgili enzimin, belirli substratla, belirli şartlar altında reaksiyona girdiğinde ulaşılabilecek en yüksek katalitik etki düzeyini anlatan bir ifadedir. K_M ise, Michaelis-Menten sabiti olarak bilinmekte ve $1/2 V_{Max}$ 'daki substrat konsantrasyonu olarak formülüne edilmektedir.

K_M değeri, bazı deneylerle yaklaşık olarak hesaplanabilmektedir. Enzim konsantrasyonu sabit tutularak değişik konsantrasyonlarda substrat uygulanarak reaksiyon hızları hesaplanmakta ve bu değerlerle bir grafik oluşturularak K_M değeri bulunabilmektedir. Her enzimin K_M değeri substrata, sıcaklığa ve pH'a göre değişiklik göstermektedir. Ancak enzim konsantrasyonu ile değişmemektedir.

K_M değeri, ilgili olan enzimin aktif bölgelerinin yarısının dolu olduğu substrat konsantrasyonunu ifade etmektedir. Bunun yanı sıra K_M değeri, enzimin substrata olan ilgisini ifade eden bir sabittir. Bu değer düşük olması enzimin belirtilen substrata daha çok ilgisi olduğunu göstermektedir. Bu yolla bir çok kimyasal reaksiyonun substratları ve ürünleri ortaya çıkarılabilmektedir. Enzimlerin karakterize edilmesinde bu değerler de hesap edilmelidir [1-5].

1.4 Enzim İnhibitörleri

Enzimin faaliyetlerini azaltan veya tamamen durduran maddelere **inhibitör**, bu olaya da **inhibisyon** ismi verilmektedir. Çoğunlukla da bu inhibisyon, küçük moleküller veya iyonlar tarafından gerçekleştirilmektedir.

Birçok ilacın ve zehirin etkisi belirli bir enzimin inhibisyonu yoluyla gerçekleştirilmektedir. Hem enzimlerin etki mekanizmasının aydınlatılması hem de tedavide kullanımları açısından, enzim inhibisyonu önemli görülmektedir.

Dört çeşit inhibisyondan bahsedilmektedir:

1.4.1 Dönüşümlü İnhibisyon

1.4.1.1 Kompetitif (Yarışmalı) İnhibisyon

Bu inhibisyon çeşidinde, enzimin substratına benzeyen inhibitör yarışmalı olarak enzimin aktif bölgesine bağlanmaktadır. Enzim-Substrat (E-S) kompleksinin oluşumu, dolayısıyla da ürün sentezi azalacağı için enzim aktivitesinde bir düşme olmaktadır. Ortama daha fazla substratın eklenmesi ile daha fazla E-S kompleksinin oluşması sağlanarak maksimum aktiviteye ulaşması mümkün olmaktadır. Böyle bir inhibisyonda V_{Max} değeri değişmezken K_M değeri artmaktadır [1-5]. (V_{Max} ve K_M için Bölüm 1.5'te açıklama yapılacaktır.)

1.4.1.2 Nonkompetitif (Yarışmasız) İnhibisyon

Nonkompetitif inhibisyonda hem substrat hem de inhibitör aynı anda enzime bağlanmaktadır. Burada EI, ES, ESI olmak üzere 3 değişik kompleks meydana gelmektedir. Bunlardan EI ve ESI kompleksleri inaktiftir ve bunlardan ürün oluşmamaktadır. Ancak ESI kompleksine inhibitör dönüşümlü olarak bağlandığından inhibitör yavaş bir şekilde bu kompleksten uzaklaşmaktadır. Geride kalan ES kompleksinden ürün oluşmaktadır. Bu inhibisyonda enzimatik aktivite düşer ve substrat konsantrasyonu artırılrsa bile maksimum aktiviteye ulaşamaz. V_{Max} değeri azalırken K_M değeri sabit kalmaktadır.

1.4.1.3 Unkompetitif İnhibisyon

Bu inhibisyon çeşidinde, inhibitör sadece ES kompleksine bağlanmaktadır. Burada substrat konsantrasyonunu artırmak, ES kompleksinin oluşumunu artıracığı için aktiviteyi artırmak yerine azaltacaktır. İnhibitör varlığında hem ürün oluşumu hem de ESI kompleksi oluşumu bir arada olacağı

için sürekli olarak ES kompleksi ve K_M değeri azalacaktır. Ürün oluşumunda azalma olduğu için V_{Max} değerinde de azalma görülecektir.

1.4.2 Dönüşümsüz İnhibisyon

Iodoasetamid, ağır metal iyonları (Ag^+ , Hg^{++}), oksitleyiciler gibi değişik maddeler enzime çok sıkı bağlanarak enzim aktivitesini tamamen durdurmaktadırlar. Bu inhibitörler söz konusu substrata benzerlik göstermedikleri için substrat konsantrasyonundaki artış inhibisyonu engelleyememektedir. Artık o enzim iş yapamaz hale gelmektedir. Bu tip inhibisyona neden olan madde, enzimin katalitik fonksiyon yapan grubu ile birleşerek onu iş yapamaz hale getirmek veya böyle bir grubun yapısını bozmak suretiyle etkili olmaktadır. Normal şartlarda enzimin katalitik etkiyi gösterebilmesi için aktif bölgenin fonksiyonel grubu, substratla ilişki kurup onu tanımalı ve reaksiyonu katalize etmelidir. Sinirlerde uyartıların iletilmesinde önemli etkisi olan asetil kolin esterazın, diizopropilfosforid tarafından inhibe edilmesi dönüşümsüz inhibisyona bir örnektir. Burada inhibitör enzime çok sıkı bir şekilde bağlanmakta ve ayrılma çok az olmakta veya hiç olmamaktadır [1-5].

1.5 Enzim Aktivitesinin İfade Edilmesi

Enzim aktivitesi değişik şekillerde ifade edilebilmektedir. Örneğin 1 mg enzim tarafından birim zamanda meydana getirilen absorbans değişikliği bir enzim birimi olarak ifade edilebilmektedir. Fakat dünya genelinde elde edilen sonuçları karşılaştırabilmek için daha standart bir birim ifadesi geliştirilmiştir. Bu, enzim ünitesi olarak ifade edilmektedir. Buna göre; **bir ünite enzim**, 1 dakikada 1 μ mol ürünün oluşumu veya substratın dönüşümünü katalizleyen enzim miktarıdır. Bir enzimin **spesifik aktivitesi** de 1 mg protein başına düşen enzim ünitesi olarak tanımlanmaktadır. Bu kullanımın yaygın olmasına karşılık, son zamanlarda katal ve nanokatal (nkatal) ifadeleri kullanılması da yaygınlaşmıştır. Bu birim Biyokimya Birliği, Enzim Alt Komisyonu tarafından önerilmiştir. Katal da; 1 saniyede 1 mol ürün oluşumunu veya substratın

dönüşümünü katalizleyen enzim miktarı olarak ifade edilmektedir. Buradan hareketle şu eşitlikler çıkarılabilmektedir [2, 6-9].

$$1 \text{ Katal} = 6 \times 10^7 \text{ Ünite}$$

$$1 \text{ Katal} = 10^9 \text{ nkatal}$$

$$1 \text{ Ünite} = 16,67 \text{ nkatal}$$

Enzim aktivite birimleri de U/ml/dak olarak ifade edilmektedir. Bu durumda spesifik aktivite de U/mg olarak ifade edilmektedir. Eğer nkatala çevrilirse nkatal/mg olarak tanımlanmaktadır.

1.6 Enzimatik Aktivitenin Düzenlenmesi

Enzimatik reaksiyonlar; ortam şartları (pH, Sıcaklık), başka enzimler ve allosteri ile düzenlenebilmektedir.

Herbir enzimin katalitik aktivitesini gösterdiği bir aktif bölgesi vardır. Ancak bunun yanı sıra, allosterik enzimlerde aktif bölgenin haricinde başka bir yer daha vardır. **Regülatör** yer olarak ifade edilen bu yere **modülatör** denilen bir madde bağlanabilmektedir. Eğer modülatör, enzimin aktivitesini artırırsa buna stimülatör, azaltırsa da inhibitör ismi verilmektedir. Modülatör, enzime bağlandığı zaman enzimin üç boyutlu yapısında konformasyonel bir değişime neden olmaktadır. Bu değişim de enzimin substrata olan ilgisini artırmakta veya azaltmaktadır. Bir dizi reaksiyon sonunda oluşan ürün de, başlangıçtaki enzimlerden birisinin modülatörü olabilmektedir. Ortamdaki ürün, bu serideki bir allosterik enzimin aktivitesini azaltarak veya çoğaltarak ürün oluşumunu bir diğer ifade ile metabolizmayı düzenlemektedir [1, 4, 5].

1.7 Enzim Saflaştırılmasındaki Önemli Metotlar

Enzimin saflaştırılması ve nitelendirilmesi diğer çalışmalar için bir ön basamak niteliği taşımaktadır. Belirli kriterlere göre saflaştırma stratejisi belirlenmektedir. Temel kriter; en düşük maliyetle, en yüksek saflık ve enzim

aktivitesi elde etmek olarak görülmektedir. Bunlara göre de diğer basamaklar düzenlenerek bir saflaştırma stratejisi oluşturulmaktadır [2, 6-9].

1.7.1 Enzim Saflaştırma Stratejisi

Öncelikle saflaştırılacak enzimin ne için gerekli olduğuna karar verilmelidir. Genel olarak laboratuvar çalışmaları veya sanayide kullanım için saflaştırma amaçlanmaktadır. Laboratuvar çalışmaları için az enzim ancak saflık derecesi mümkün olduğu kadar yüksek, sanayideki kullanım için ise çok ancak saflık derecesinin yüksekliği pek de fazla önemli olmayan enzim istenmektedir. Aktivite, yapı, yapı-işlev ilişkileri için % 80-90'luk saflık derecesi gerekmektedir. Hatta yapısal çalışmalar için bu oran % 95'den fazla olması iyi sonuçlar vermektedir. Aksi takdirde hatalı sonuçların normal sınırları geçmesi kaçınılmaz olmaktadır [2, 6-9].

Strateji belirlenirken netleştirilmesi gereken hususlardan birisi de enzim kaynağıdır. Yani enzimin hangi canlıdan elde edileceğine karar verilmelidir. Bunlar; bakteri, mantar, bitki, hayvan vs. olabilir. Hatta daha spesifik olarak canlının belirli bir kısmı da (fare karaciğeri, insan kanı, bezelye tohumu gibi) enzim kaynağı olarak belirlenebilmektedir [2, 6-9].

Çok önemli şartlardan birisi de maliyet ve zamandır. Bu tür çalışmalarda kullanılan araç-gereçler ve kimyasal maddeler genellikle çok pahalıdır. Bunların seçimi çok iyi planlanıp eldeki imkanlara göre yapılmalıdır. Kullanılabilecek alternatif yollar, araç-gereçler, kimyasal maddeler belirlenmelidir. Yapılacak çalışmaların çok uzun süreler alacağı hesap edilerek buna göre de gerekli tedbirler alınmalıdır. Bazı hatalar çok miktarda zaman kaybına neden olabilmektedir. Bu, aynı zamanda maliyetin de artması anlamına gelir ki, hataların en aza indirilmesi için gerekli tedbirlerin mutlaka alınması gerektiğini düşündürmektedir.

Hemen hemen her enzim diğerklerinden farklı özelliklerde olduğundan birbirlerinden değişik yöntemlerle saflaştırılmalarını gerektirmektedir. Temel mantık aynı olsa da ayrıntılarda farklı noktaların olabileceği göz önüne alınmalıdır. Bu nedenle de enzimle ilgili o zamana kadar yayınlanmış olan verilerin toplanıp ortaya konulması çok önemlidir. Bu verilere göre de saflaştırma basamakları ve onların sıraya konulması gerçekleştirilebilmektedir.

Dikkat edilmesi gereken en önemli hususlardan birisi de enzim aktivitesinin korunmasıdır. Ne yapılırsa yapılsın enzim aktivitesi azalacaktır. Ancak bu azalışı en aza indirecek şekilde gerekli önlemler alınmaya çalışılmalıdır. Eğer aktivite kaybolursa, yapılan çalışmaların hiçbir anlamı kalmaz. Enzimin özellikleri de göz önünde bulundurularak, aktivitenin korunması için gerekli şartlar optimum hale getirilmeye çalışılmalıdır. Bunlardan bazıları şöyle sıralanabilir:

- ◆ Enzim çoğunlukla 4 °C'de saklanmalıdır. Çok daha düşük sıcaklıklarda da saklanabilir ancak sıcaklığın artırılıp tekrar çok düşük derecelere getirilmesi enzimin çok daha çabuk bozulmasına neden olmaktadır. Bu nedenle optimum saklama derecesi 4 °C olarak tercih edilmektedir. Aksi takdirde sürekli olarak hızlı bir şekilde aktivite kaybı olacaktır.
- ◆ Her enzimin optimum bir pH derecesi vardır. pH değişimleri enzim aktivitesini önemli derecede etkilemektedir. Bu nedenle her enzim, uygun bir tampon içinde saklanmalıdır. Bu tampon, enzimin aktivitesini yitirmesine önemli derecede engel olacaktır.
- ◆ Kullanılan araç-gereç ve kimyasalların uygun nitelikleri taşıması gerekmektedir. Enzimin aktif bölgesi, doğası gereği çok reaktiftir ve bu nedenle inaktivasyona çok duyarlıdır. Özellikle, sülfidril grubu olan enzimlerde bu inaktivasyon kolaylıkla görülmektedir. Çünkü bu gruplar hücre parçalandıktan sonra çabucak okside olmaktadır. Enzimin bulunduğu ortama gelebilecek yabancı bir madde enzimin bozulmasına

neden olabilmektedir. Taşıma işlemlerine bile dikkat edilmelidir. Çalkalanmadan dolayı eğer enzimin bulunduğu ortamda hava kabarcıkları oluşursa, bu enzimin oksitlenip zarar görmesine neden olabilmektedir.

- ◆ Metal iyonları sülfidril gruplarını inaktive edebilmektedir. Bu nedenle tampona EDTA gibi kompleks oluşturucu maddeler ilave edilebilmektedir. Eğer enzimin metal iyonuna ihtiyacı varsa bu maddenin eklenmesine gerek yoktur [2,6-9].

1.7.2 Kullanılan Saflaştırma İşlemlerinden Bazıları

1.7.2.1 Enzim Kaynağından Enzimin Çıkarılması (Ekstraksiyon):

Bu işlem, her kaynak için farklı şekillerde yapılabilmektedir. Mesela; bakteri için sonikasyon kullanılırken, bitki için ezme yöntemi kullanılmaktadır. Burada amaç, mümkün olduğu kadar az aktivite kaybı ile en fazla enzimi izole edebilmektir.

1.7.2.2 Santrifüjle Çöktürme:

Saflaştırmanın değişik basamaklarında uygulanabilecek bir işlemdir. İstediğimiz veya istemediğimiz bir kısım maddelerin çöktürülmesinde faydalanılır. Herbir aşama için belirli bir hız ve süre tespit edilerek santrifüjleme gerçekleştirilir. Mesela enzim kaynağının homojenizasyonundan organellerin ve büyük partiküllerin uzaklaştırılması için kullanılabilir. İstenmeyen proteinlerin ısıtma ile denatüre edilmesinden sonra uzaklaştırılmasında santrifüjden yararlanır. Enzim aktivitesinin korunması için soğutmalı santrifüjler tercih edilmelidir.

1.7.2.3 Isıtma (Heat Treatment):

Enzimler protein yapısında olduklarından sıcaklığın artırılması ile üç boyutlu aktif yapıları bozulabilmektedir. Her enzimin dayanabildiği bir sıcaklık derecesi ve süresi vardır. Bu sıcaklık ve süre göz önünde bulundurularak, istenmeyen proteinlerin bir kısmını uzaklaştırmak mümkündür. Isıtma işleminden sonra santrifüjleme ile istenmeyen proteinler çökeltilerek uzaklaştırılıp diğer saflaştırma işlemlerine devam edilmektedir.

1.7.2.4 Amonyum Sülfatla Çöktürme

Nötral tuzlar proteinlerin çözünürlüğüne etki etmektedir. Düşük tuz konsantrasyonlarında proteinlerin çözünürlüğü artarken yüksek tuz konsantrasyonlarında proteinlerin çözünürlükleri azalmaktadır. Belirli doygunluk derecesine göre eklenen nötral tuz, değişik molekül ağırlığındaki proteinlerin çökmesine neden olmaktadır. Çöktürme işlemlerinde istenilen aralık belirlendiği zaman, bu aralığın dışında kalan proteinlerin uzaklaştırılması mümkündür. Dolayısıyla belirli bir oranda saflaştırma yapılmış olmaktadır. Bu yöntemde en çok kullanılan tuz amonyum sülfat olduğu için, bu yöntemde amonyum sülfatla çöktürme de denilmektedir. Amonyum sülfat, 2 değerlikli tuz olup daha etkili çöktürme yapması, maliyetinin ucuz olması ve çöktürme işlemleri sırasında sıcaklığı fazla artırmaması gibi özellikler sebebiyle daha çok tercih edilmektedir.

1.7.2.5 Diyaliz

İstenmeyen küçük maddelerin uzaklaştırılması için uygulanan bir işlemdir. Kullanılacak olan diyaliz tüpünün por çaplarının bilinmesi önemli olmaktadır. Bu porlardan geçebilen küçük maddeler difüzyonla diyaliz tüpünün dışına çıkmaktadırlar. Diyaliz tüpüne enzim örneği konulup iki ucu bağlandıktan sonra, tüp genellikle 4 °C'lik ortamda bir tampon içerisine konularak 15-20 saat süre ile gereğine göre birkaç defa tampon değiştirilerek bu

işlem gerçekleştirilmektedir. Bu süre zarfında manyetik karıştırıcı yardımıyla da tampon karıştırılırsa, daha etkili diyaliz işlemi gerçekleştirilmektedir. Amonyum sülfatla çöktürme işleminden sonra örnekteki tuzun uzaklaştırılması diyalizle gerçekleştirilebilmektedir. Ayrıca enzim çözeltisinin tamponunu değiştirmek için de diyalizden yararlanmak mümkündür.

1.7.2.6 İzoelektrik Noktaya Göre Çöktürme

Her enzimin bir izoelektrik noktası (pI) vardır. Enzimler izoelektrik noktalarında çökmektedirler. Saflaştırılacak enzimin izoelektrik noktası göz önünde bulundurularak, tampon çözeltinin pH'ı değiştirildiğinde, bir çok protein çökmektedir. Çöken bu proteinler santrifüjlenerek uzaklaştırılmaktadır. Bu işlemle yine bir çok istenmeyen protein uzaklaştırılabilmektedir. Burada dikkat edilmesi gereken en önemli nokta, pH değişimi aralığında saflaştırılmak istenen enzimin izoelektrik noktasının olmamasıdır.

1.7.2.7 Kolon Kromatografisi:

Saflaştırma işlemlerinde en çok kullanılan yöntemlerdendir. Bu amaçla değişik büyüklüklerdeki silindir şeklinde tüplerin içerisine konulan materyal durgun fazı oluşturmaktadır. Bu durgun fazdan, örnek hareketli faz olarak geçirilir ve istenilen enzimin diğerlerinden ayrılması sağlanır. Bu işlem saflaştırma basamaklarının son aşamalarında yapılmaktadır. Çünkü buraya kadar olan işlemlerle örneğin miktarı mümkün olduğu kadar azaltılmaya çalışılmaktadır. Kolona uygulanacak örneğin mümkün olduğu kadar az olması, kolonların maliyetinin de yüksekliği nedeniyle, önemli görülmektedir. İzoelektrik nokta, molekül büyüklüğü, elektriksel yük, afinite gibi değişik özelliklerden yararlanılarak hazırlanan kolonlardan örnek geçirildiği zaman, genellikle yüksek bir saflaştırma yüzdesi elde edilmektedir. Kolonun tipi, saflaştırılmak istenen enzimin niteliklerine göre değişiklikler gösterebilmektedir. Saflaştırma prosedüründe 1 tane kolon kullanıldığı gibi birkaç tane kolon kullanılıp daha yüksek saflık derecesine ulaşılabilmektedir [2, 6-9].

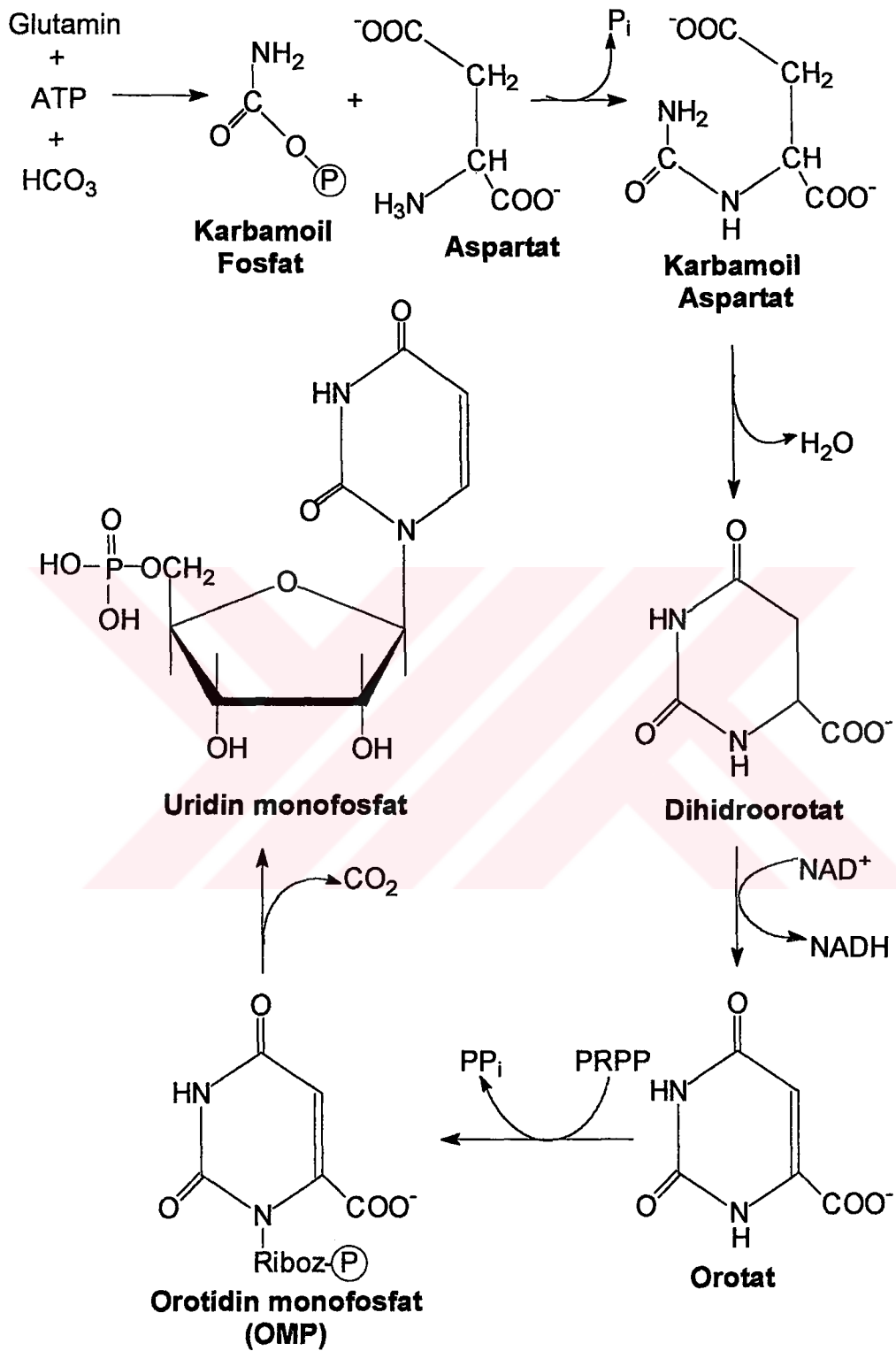
1.8 Pirimidinler

Nükleik asitler (DNA ve RNA) canlıların yönetici molekülleridir. Bunlar; azotlu organik bir baz, 5 karbonlu bir şeker ve bir de fosfat grubundan oluşan, **nükleotid** adı verilen birimlerden oluşmaktadır. Bu birimde yer alan azotlu organik bazlar, pürin ve pirimidin olmak üzere iki grupta incelenmektedir. Pirimidin grubu bazlar urasil, timin ve sitozindir.

Pirimidin ismi ilk kez 1885 yılında Pinner tarafından piridin ve amid isimlerinin birleştirilmesi suretiyle kullanılmıştır. İlk pirimidin bileşiği ise 1889 yılında Gabriel ve Colman tarafından 5-metil urasilden hazırlanmıştır. Bu molekül, dördü C ve ikisi N atomu olmak üzere toplam 6 üyeli bir halkalı bileşiktir. Pirimidinler genellikle suda çözünmektedirler. Pirimidinlerin yapılarında ikili konjuge bağlar olduğundan, 220-300 nm dalga boyları arasında UV ışığı absorblamaktadırlar. Bu özelliklerinden dolayı tanımlanmaları ve tayinleri kolaylıkla yapılabilmektedir. Şekil 1.2'de 3 temel pirimidin bileşiği verilmektedir [10-13].



Şekil 1.2 Üç temel pirimidin bileşiği



Şekil 1.3 Pirimidin biyosentezi

1.8.1 Pirimidin Biyosentezi

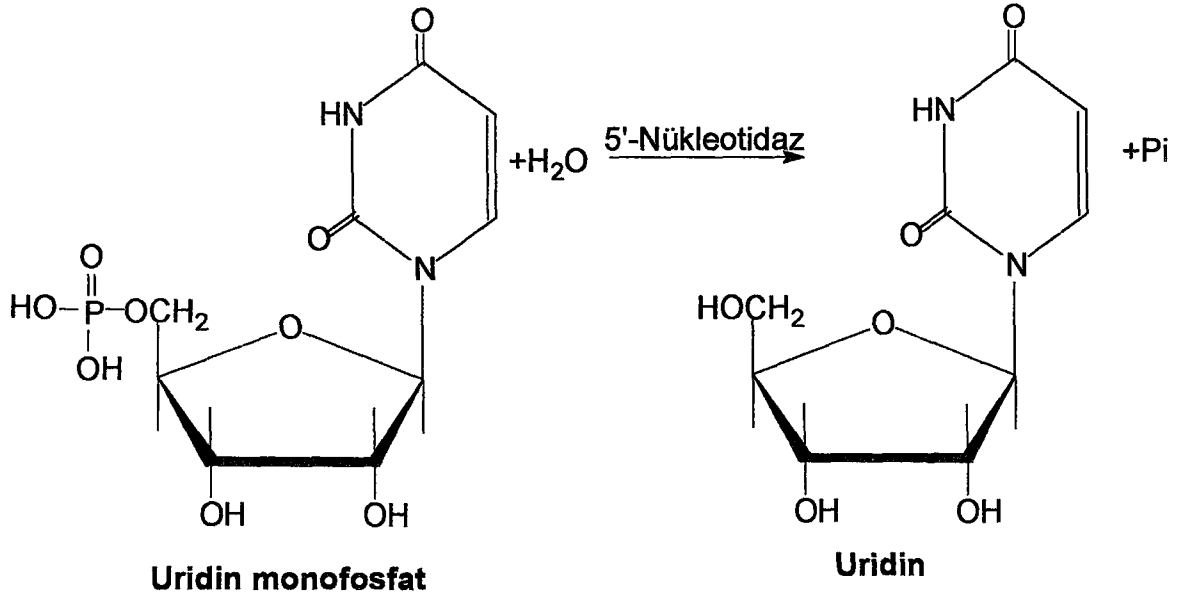
Pirimidinler, orotat yolu olarak da bilinen 6 enzimatik reaksiyonla sentezlenmektedir. Bu reaksiyonların, çalışılan tüm organizmalarda temel olarak benzerlik gösterdiği bulunmuştur. Reaksiyon basamakları aynı olmasına rağmen, enzimlerin farklı tip organizmalardaki hücre içi organizasyonları oldukça farklılıklar gösterebilmektedir.

Pirimidin biyosentezinin ilk enzimi olan karbamoil fosfat sentetaz, glutamin ve bikarbonattan karbamoil fosfat sentezini katalizlemektedir. Burada glutamin azot vericisi, ATP ise enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır. Karbamoil, aspartat transkarbamoilaz katalizörlüğü ile N-karbamoil aspartat oluşturmak üzere aspartata transfer edilmektedir. Üçüncü safhada, dihidroorotazın faaliyeti ile su uzaklaştırılmak suretiyle halka kapatılarak 6 üyeli dihidroorotat meydana gelmektedir. Dihidroorotat, dehidrogenizasyon ile orotat haline dönüşmektedir. Sonraki basamakta, bir riboz fosfat grubunun orotata transferi ile orotidin monofosfat meydana gelmektedir. Orotidin monofosfatın dekarboksilasyonu ile uridin monofosfat oluşmaktadır. Uridin monofosfattan da diğer pirimidinler sentezlenmektedir. Şekil 1.3'te bu reaksiyonların özeti verilmektedir [10-13].

1.8.2 Pirimidin Katabolizması

1.8.2.1 5'-Nükleotidaz

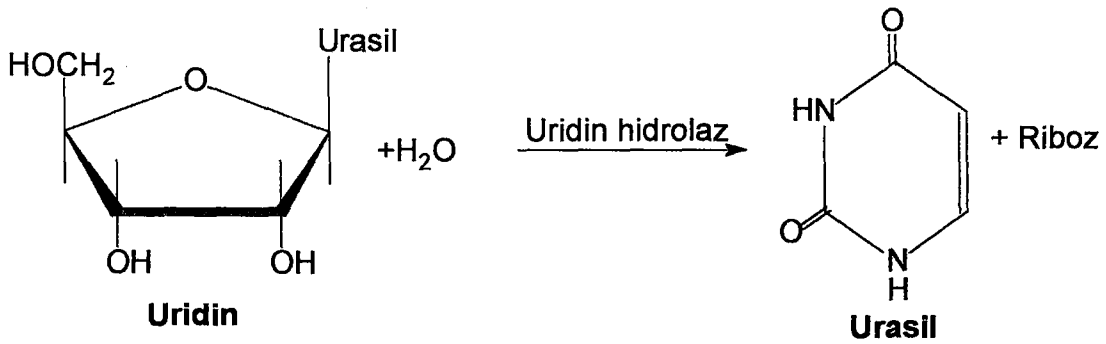
Bu enzim; nükleosit 5'-monofosfatın ilgili nükleosid ve inorganik fosfata parçalanma reaksiyonu katalizlemektedir. Şekil 1.4'te görüldüğü gibi uridin monofosfata su katılarak bir hidroliz reaksiyonu gerçekleşmekte ve sonuçta uridin ve inorganik fosfat meydana gelmektedir [10-13].



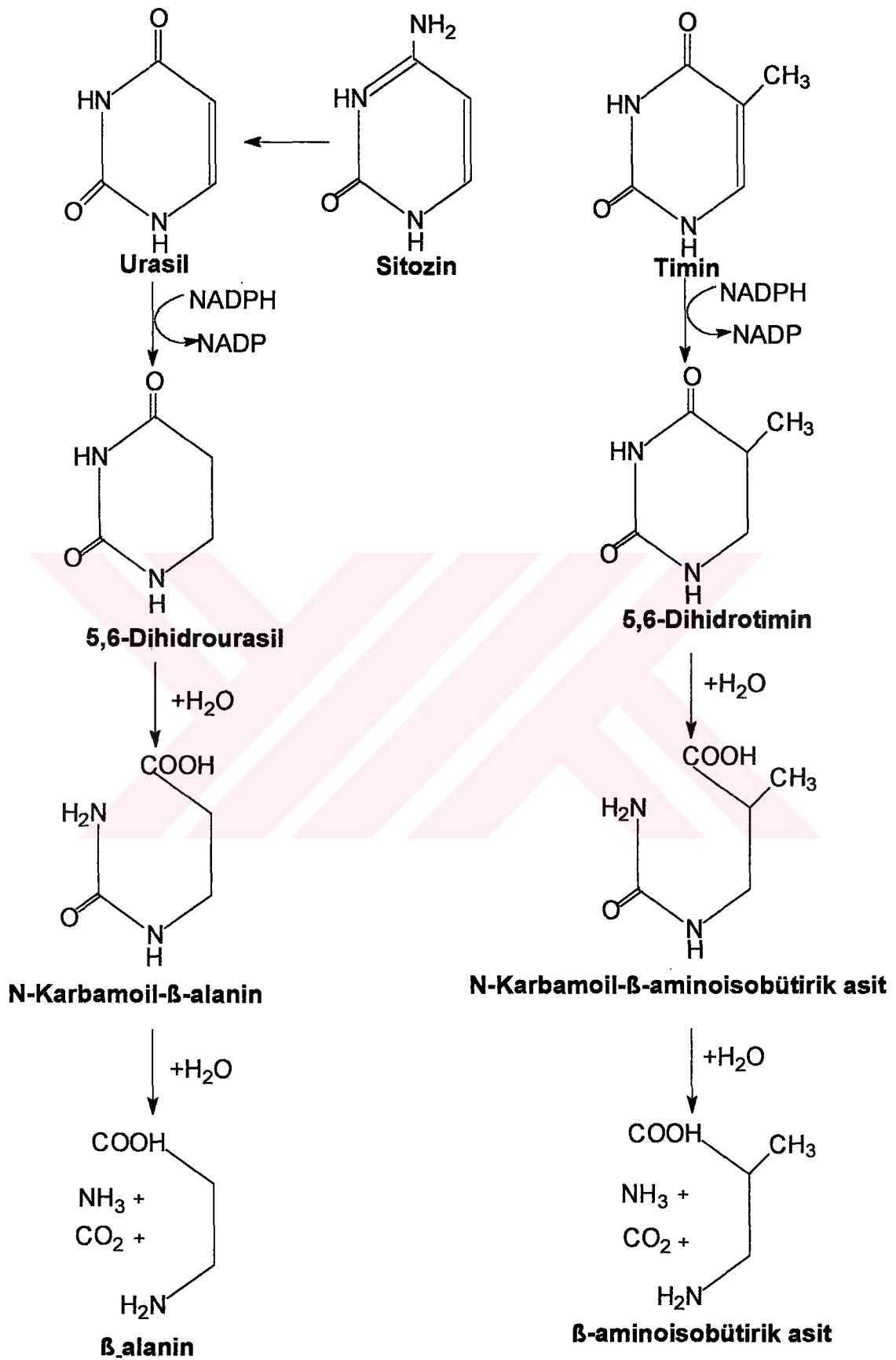
Şekil 1.4 Uridin monofosfatın 5'-Nükleotidaz katalizörlüğüyle hidrolizasyonu

1.8.2.2 Uridin Hidrolaz (Uridin Nükleosidaz)

Bir önceki reaksiyonda meydana gelen uridinden, uridin hidrolazın katalizörlüğü ile urasil ve riboz meydana getirilmektedir. Meydana gelen reaksiyon su katılarak parçalanma reaksiyonudur [10,13].

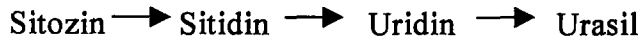


Şekil 1.5 Uridinin uridin hidrolaz katalizörlüğüyle hidrolizasyonu



Şekil 1.6 Temel pirimidin bazlarının katabolik yolu

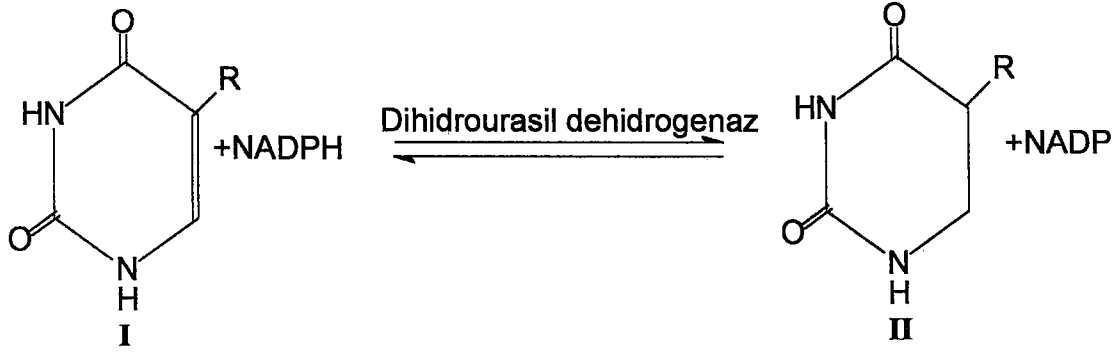
Çalışılan çoğu organizmada, pirimidin yıkımı indirgenme olarak yer almaktadır. Urasil ve timin için katabolizma reaksiyonları şekil 1.6'da gösterilmektedir. Urasil ve timinden NADH veya NADPH'ın reaksiyona katılmasıyla dihidrourasil ve dihidrotimin meydana gelmekte ve katabolik reaksiyonlar başlamaktadır. Bu reaksiyon dihidrourasil dehidrogenaz tarafından katalize edilmektedir. Sitozin ise deaminasyonla önce urasile dönüştürülerek yıkılmaktadır.



Dihidrourasil ve dihidrotimin sırasıyla N-karbamoil- β -alanin ve N-karbamoil- β -aminoizobütirik aside dihidropirimidinazın katalizörlüğü ile dönüştürülmektedir. Son enzim olan β -ureidopropionaz ile N-karbamoil- β -alanin β -alanine, N-karbamoil- β -aminoizobütirik asit ise β -aminoizobütirik aside bozunmaktadır [10-13].

1.8.2.3 Dihidrourasil Dehidrogenaz (DHUDHaz)

Üç basamaklı pirimidin halka katabolizmasındaki ilk enzim dihidrourasil dehidrogenaz (DHUDHaz)'dır. Bu enzim, urasil, 5-aminourasil ve timinin indirgenme reaksiyonunu katalizlemekte ve sonuçta 5. ve 6. karbon atomları arasında yer alan çift bağ NADPH tarafından sağlanan hidrojenler ile açılarak dihidropirimidin bileşikleri meydana gelmektedir. Bu reaksiyon şekil 1.7'de verilmektedir.



| | | |
|--------------------|------------------|--------------------------|
| R= H | I= Urasil | II= Dihidrourasil |
| R= CH ₃ | I= Timin | II= Dihidrotimin |
| R= NH ₂ | I= 5-Aminourasil | II= 5-Aminodihidrourasil |

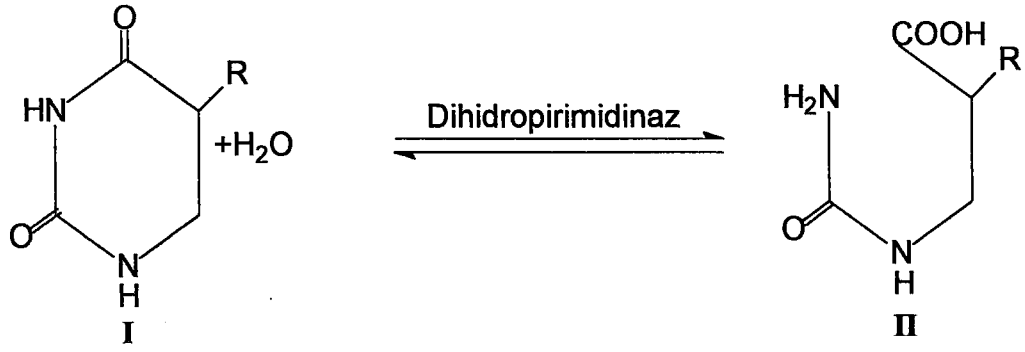
Şekil 1.7. Pirimidinlerin dihidrourasil dehidrogenaz katalizörlüğüyle redüksiyonu

Pirimidin katabolizmasında büyük oranda sınırlayıcı enzim (anahtar enzim) olarak DHUDHaz bilinmektedir (10). Ancak istisnai durumlar da vardır. Bu enzim, katabolik yolda kendinden sonraki diğer iki enzim kadar stabil değildir. EDTA ve merkaptoetanol ilavesinin stabiliteyi artırdığı belirtilmektedir [10, 14-20].

1.8.2.4 Dihidropirimidinaz (DHPaz)

Bu çalışmada karakterize edilmeye çalışılan dihidropirimidinaz (DHPaz), pirimidin katabolizmasında ikinci sırada yer almaktadır. Enzimle ilgili bu bölümde kısa bilgi verildikten sonra 1.8.3'te ayrıntılı açıklama yapılacaktır.

DHUDHaz'ın fonksiyonu ile meydana gelen dihidropirimidin bileşikleri, DHPaz'ın katalizörlüğüyle N-karbamoil bileşiklerine dönüştürülmektedirler. Bu safhada dihidropirimidinler hidrolize edilir ve 6 üyeli halka yapıları açılır (Şekil. 1.8) [10, 21-24].

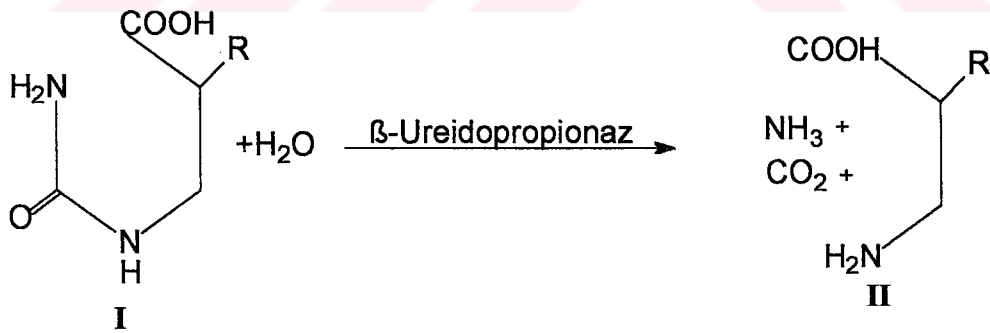


| | | |
|--------------------|-------------------------|--|
| R= H | I= Dihidrourasil | II= N-Karbamoil- β -alanin |
| R= CH ₃ | I= Dihidrotimin | II= N-Karbamoil- β -aminoizobütirik asit |
| R= NH ₂ | I= 5-Aminodihidrourasil | II= Albizzin |

Şekil 1.8. Dihidropirimidinlerin dihidropirimidinaz katalizörlüğüyle hidrolizasyonu

1.8.2.5 β -Ureidopropionaz (N-Karbamoil- β -Alanin Amidohidrolaz)

Pirimidin katabolizmasındaki son enzimdir. N-karbamoil bileşikleri bu enzimin katalizörlüğüyle β -amino asit, CO₂ ve NH₃'e hidrolize edilirler. Şekil 1.9'da bu enzimin katalize ettiği reaksiyon görülmektedir [10, 11, 15].



| | | |
|--------------------|---|-----------------------------------|
| R= H | I= N-Karbamoil- β -alanin | II= β -alanin |
| R= CH ₃ | I= N-Karbamoil- β -aminoizobütirik asit | II= β -aminoizobütirik asit |
| R= NH ₂ | I= Albizzin | II= 2,3-diamino propanoik asit |

Şekil 1.9. N-Karbamoil bileşiklerinin, β -ureidopropionaz katalizörlüğüyle hidrolizasyonu

1.8.3 Dihidropirimidinazın Özellikleri

Dihidropirimidinaz, pirimidin katabolizmasında değişik 5,6 dihidropirimidinlerin, ayrıca hidantoin ve suksinimidlerin de hidrolizini katalize eden enzimdir. Şekil 1.8'de gösterilen reaksiyonun katalizörlüğünü yapmaktadır [10, 21-24].

Bu zamana kadar dihidropirimidinazın saflaştırılması ve karakterizasyonu ile ilgili bazı çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmaların çoğu, bitkiler dışındaki organizmalarda özellikle de insan ve hayvan karaciğerlerinden izole edilen enzimle yapılmıştır. Bitkilerle bu amaçla en önemli çalışma Mazus ve Buchowicz (1968) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmanın dışında bitki dihidropirimidinazının saflaştırılması ve karakterize edilmesiyle ilgili başka çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak bunun yanında direkt olarak ham preparatın kullanıldığı çalışmalar mevcuttur [10, 26-27].

Dihidropirimidinaz, herbir alt ünitesinde sıkı bağlı bir Zn^{++} iyonu içeren 4 alt birimden oluşan bir metaloenzimdir. Saflaştırılmış enzimin çinko içeriği atomik absorpsiyon spektrofotometresi ile hesaplanmıştır. Molekül ağırlığı 215 kDa [28], 210 kDa [29], 217 kDa [30], 226 kDa [31], 280 kDa [27] gibi değişik ancak birbirine yakın değerlerde hesaplanmıştır. Herbir alt birimin molekül ağırlığı, 56,5 kDa [31], 54 kDa [28-30] olarak belirtilmiştir.

Dihidropirimidinaz, birbirine benzer bir çok substrata etki etmektedir. 5 bromodihidrourasil, 5-aminodihidrourasil, 5-florodihidrourasil, dihidrourasil, dihidrotimin, hidantoin gibi bir çok molekülün hidrolizinde aktiftir. Ancak bu bahsedilen maddelere karşı afinitesi değişik olmaktadır. Özellikle 5-bromodihidrourasil ve dihidrourasile çok daha fazla aktiftir. Bunun yanında glutarimid ve hidantoine karşı olan aktivitesi diğerlerininkinin ancak %5'i kadardır [28]. DHPaz, DHU ve DHT'e karşı daha aktiftir. Dihidrouridin ve dihidroorotata karşı bir aktivite göstermez. Dihidrourasile karşı dihidrotiminden daha fazla aktiftir [10, 27].

Dihidropirimidinazın oldukça stabil olduğu ve saflaştırılmış olan enzimin 4°C'de saklandığında, 6 ay sonra aktivitesinin ancak %50 kadarını kaybettiği bildirilmiştir. Çinko ilavesinin aktiviteyi geri getirmediği görülmüştür [31]. Saflaştırılıp konsantre edilmiş DHPaz 4°C'de birkaç ay önemli bir aktivite kaybetmeden kalabilmiştir [30]. Kullanılan tampon da stabiliteyi etkilemektedir. Ekstraksiyondan sonra enzimin 15 gün içerisinde aktivitesini hızlı kaybettiği daha sonraki dönemde aktivite kaybının yavaşladığı bildirilmiştir. Dietanolamino-asetat tamponunda (pH 10) 2 °C'de 20 günde aktivitesini % 65'e, 60 günde ise başlangıç aktivitesinin yarısına düştüğü rapor edilmiştir [27].

Dihidropirimidinaz yüksek sıcaklıklara belirli bir direnç göstermektedir. Dietanolamin-asetat tamponunda (pH 9.3) ham ekstraktın 70 °C'de 5 dakika ısıtılması enzim aktivitesini fazla değiştirmemektedir[27]. Saflaştırma işlemleri sırasında 55 °C'de 3 dakika [28], 58 °C'de 5 dakika [29], 62 °C'de 5 dakika [30] ısıtıldığı belirtilmektedir. Bunun yanında optimum sıcaklık derecesi olarak 70 °C verilmiştir [27]. Bunlara göre, enzimin ısıtmaya karşı önemli bir miktar dayanma gücünün olduğu söylenebilmektedir. Bu da saflaştırma işlemlerinde ısıtmadan yararlanılabileceğini göstermektedir.

Enzimin pH 8-10 arasında daha etkili olduğu görülmüştür. Değişik çalışmalarda optimum pH 9.5 [27] ve 8.8 [28] olarak verilmiştir

Metal iyonları ve diğer bir çok bileşik DHPaz'ın aktivitesine etki etmektedir. 0.1 mM Hg²⁺ ve Ag⁺ enzimin aktivitesini hemen hemen sıfıra indirmektedir. Bunun yanında 1 mM konsantrasyonda Mg²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺ de aktiviteyi az bir miktarda artırmaktadır [27]. 4-aminobenzen sülfonamid, 4- nitrobenzen sülfonamid ve 4- nitrobenzen türevleri %100'e varan oranlarda enzimi inhibe etmektedir [31].

Konsantrasyonları 1,2,4 mM olan 8-Hidroksiquinolin (8-HQSA), dipikolinik asit (DPA) ve o-fenantrolin (OP) ile 48 saat Tris-HCl tamponunda inkübe edildikleri zaman en azından 1 ve genellikle 3 katı kadar bir aktivite

kaybı olmaktadır. Bu maddeler DHPaz'ın kofaktörü olan Zn^{2+} atomlarının uzaklaşmasına ve bu da enzimin aktivitesini yitirmesine neden olmaktadır. Aynı şartlarda EDTA hiçbir aktivite kaybına neden olmamaktadır. Bunlarla inaktive olmuş enzim, Zn^{2+} veya Co^{2+} ile inkübe edilirse % 70 oranında tekrar aktivitesini kazandığı bildirilmiştir [31].

Dihidropirimidinaz sert tümörlerde normal dokulara oranla çok daha fazla bulunmaktadır. Karaciğerde dihidropirimidinaz, sitoplazmada lokalizedir. Rat karaciğerinde aktivitenin diğer organlardaki aktiviteden 10 kat daha fazla olduğu belirtilmektedir [19]. Tümör tedavisinde 5-nitrourasil, 5-florourasil, 5-bromourasil, 5-iyodourasil gibi pirimidin analogları kullanılmaktadır. Bu maddelerin sentezlenmesi pirimidin katabolizmasıyla gerçekleşmektedir. DHPaz da bu katabolik yolda yer alan enzimlerdendir. Kalıtsal pirimidinemi ve pirimidinurili hastalar, 5-florourasil ile tedavi edildikleri zaman nörolojik anormalliklerin geliştiği rapor edilmiştir [20, 25, 30, 32-34].

2 MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Materyal

2.1.1 Kimyasallar

Çalışmada kullanılan solventler Merck'ten alınmıştır. Kimyasallar Sigma Chemical Company Ltd'den sağlanmıştır. Sephadex G-200 Balıkesir Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Öğretim Üyesi Doç. Dr. Oktay Arslan'dan temin edilmiştir. Bazı kimyasallar ve cam malzemeler Balıkesir Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji-Kimya Bölümü Laboratuvarından bir kısmı da Balıkesir Üniversitesi Necatibey Eğitim Fakültesi (NEF) Kimya Bölümü Laboratuvarından sağlanmıştır.

2.1.2 Çözeltilerin Hazırlanması

2.1.2.1 Tris-HCl Tamponu

Ekstraksiyon ve diğer işlemlerde 0.1 M Tris-HCl tamponu (pH 9.5) kullanılmıştır.

Bu tamponu hazırlamak için, 12.1 g trisinhidroksimetilaminometan (Trizma Base) 950 ml saf suda çözülmüş ve çözeltinin pH'sı seyreltik HCl ile 9.5'e getirilmiştir. Çözeltinin hacmi saf su ile 1 litreye tamamlanmıştır.

2.1.2.2 Renk Belirteci

Dihidropirimidinazın aktivitesiyle dihidrourasil ve dihidrotiminden üretilen N-karbamoil- β -alanin (NC β A) ve N-karbamoil- β -aminoizobütirik asit (NC β AIBA)'in tayininde Prescott ve Jones (1969) tarafından geliştirilen, West ve arkadaşları (1982)'nce modifiye edilen yöntem kullanılmıştır. Prescott ve

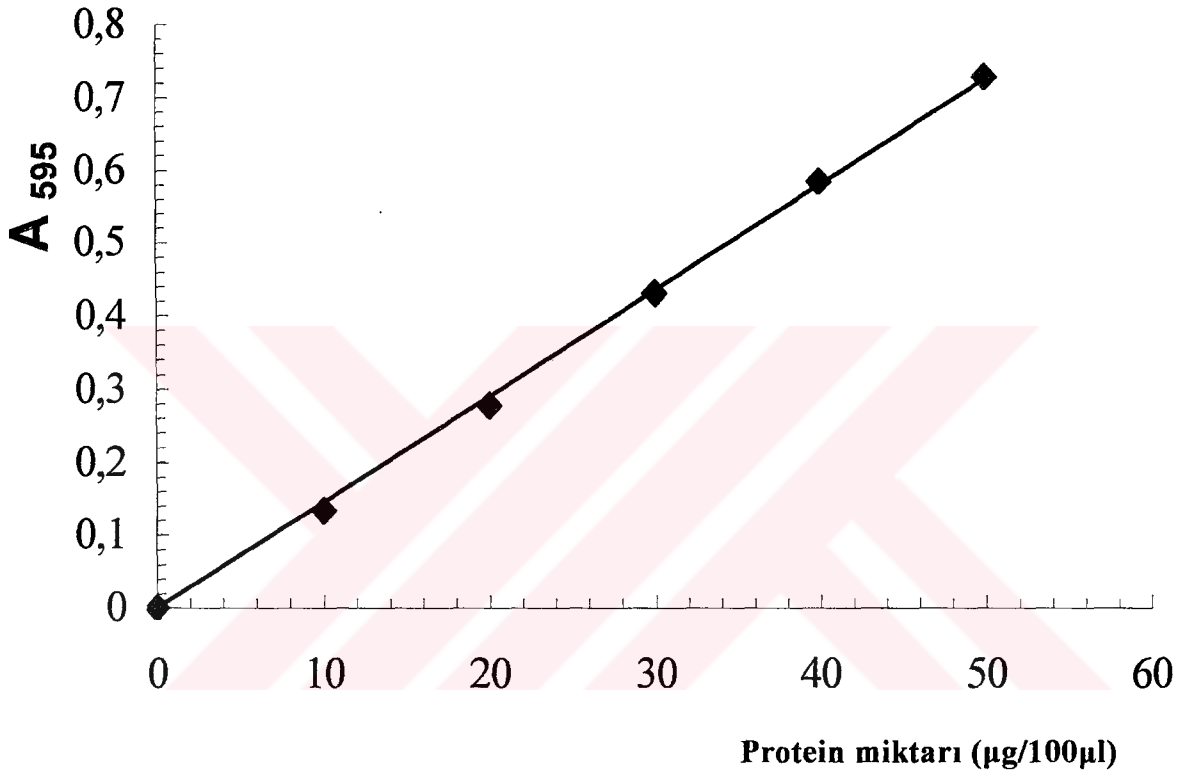
Jones (1969)'un metoduna göre, modifiye edilen bu yöntemin avantajı, renk oluşumunda substratın etkisinin minimal düzeye indirilmesidir. Kolorimetrik tayinde iki belirteç kullanılmıştır. Bunlar; antipirin/fosforik asit ve oksim belirteçleridir. Antipirin belirteci, 1g antipirinin, (1,5-dimetil-2-fenil-3-pirazolon) % 50 oranında % 85'lik orto fosforik asit içeren 200 ml'lik solüsyonda çözülmesiyle hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir. Oksim belirteci ise, 0.8 g diasetil monoksimin 100 ml % 5'lik asetik asitte çözülmesiyle hazırlanmıştır. Bu çözelti de alüminyum folyo ile kaplı bir cam kapta özellikle ışık almamasına dikkat edilerek 4 °C'de saklanmıştır. Hazırlanan bu iki renk belirteci, NCβA ve NCβAIBA tayinlerinden hemen önce 2:1 (Antipirin:Oksim) oranında karıştırılarak örneklerin bulunduğu herbir deney tüpüne 1 ml ilave edilmiştir [26-29].

Standart eğriler (Şekil 2.2 ve 2.3) NCβA ve NCβAIBA çözeltileri kullanılarak yapılmıştır. Bu çözeltiler için inkübasyon karışımında yer alan tampon kullanılmıştır.

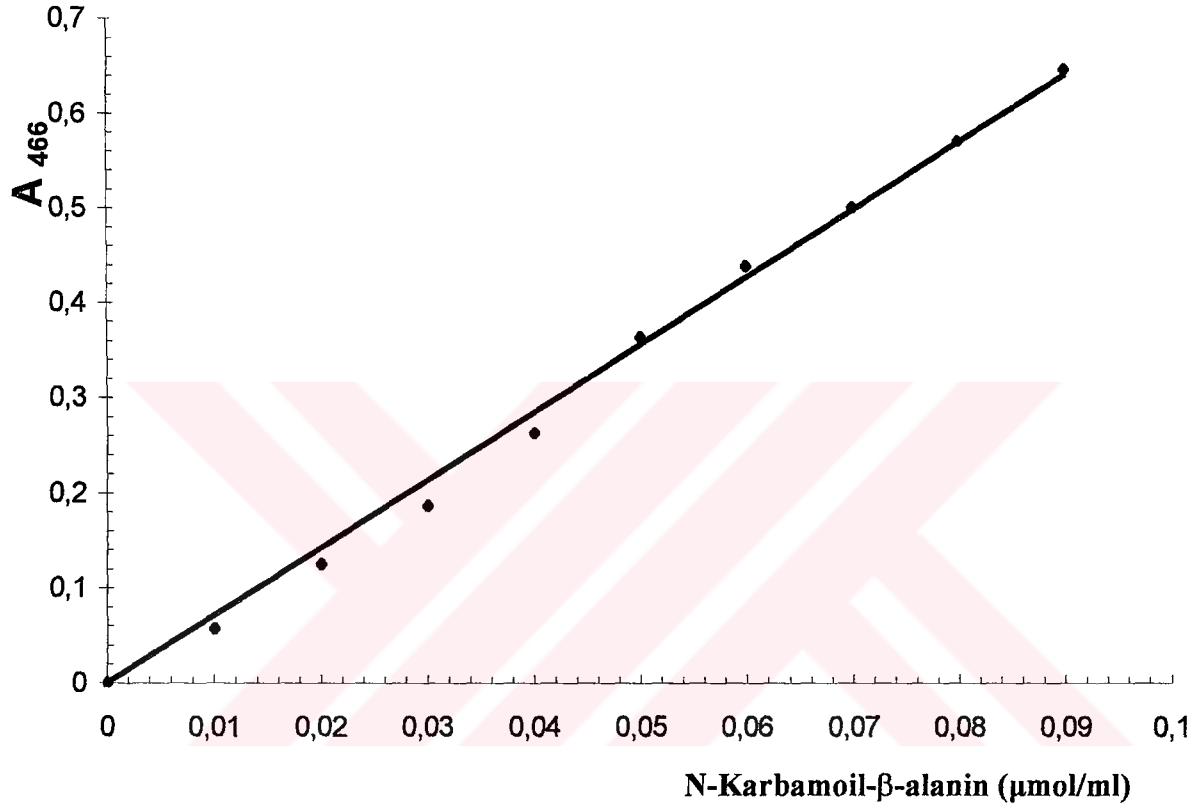
2.1.3 Bitkiler

Bu çalışmada *Pisum sativum* L. (Bezelye), ve *Albizzia julibrissin* Durazz. (Gülibrişim) kullanılmıştır. *Pisum sativum*, Balıkesir'de yerel bir tohum satıcısından alınmıştır. *Albizzia julibrissin* tohumları ise Balıkesir Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi bahçesindeki ağaçlardan toplanmıştır. Bitkilerin yetiştirilmesinde kullanılan kompost da yine yerel bir tohumcudan temin edilmiştir.

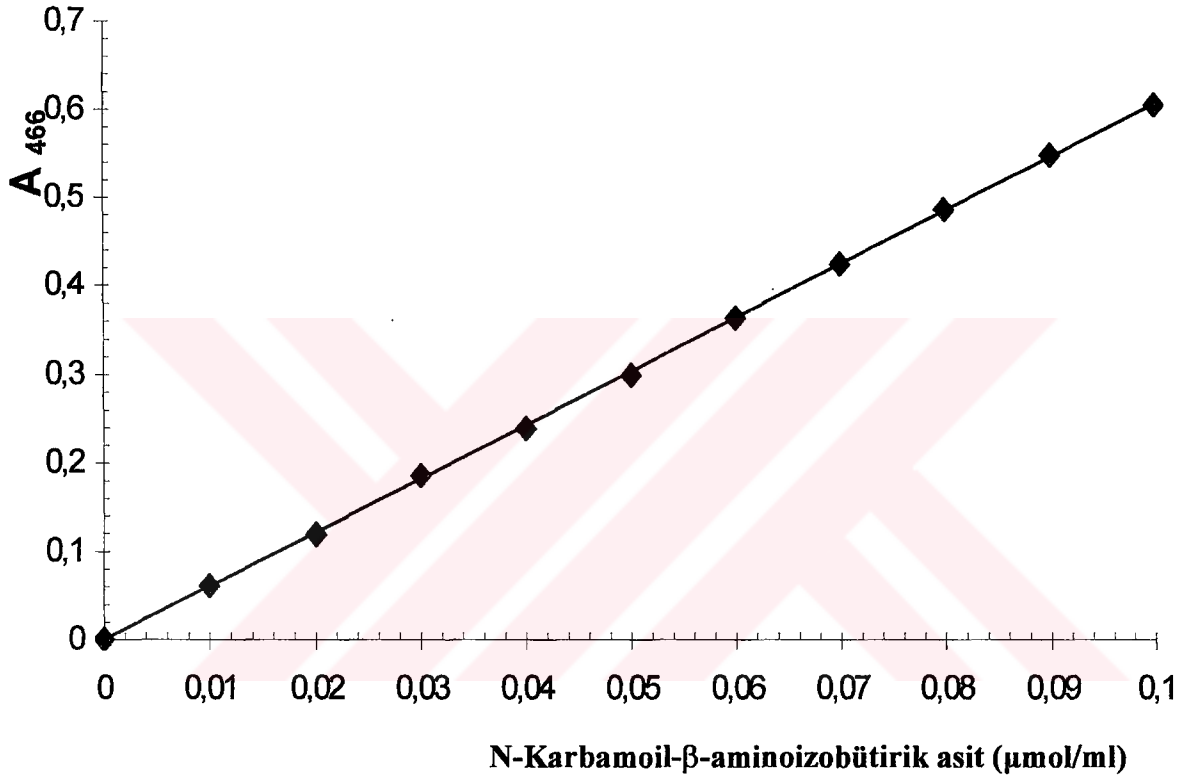
Tohumlar ekilmeden önce her zaman iyice yıkanmış ve karanlıkta, saf suda 15 saat kadar bekletilmiştir. *Albizzia julibrissin* tohumları, ıslatılmadan önce çentilmiştir. Suyu emmiş olan tohumlar 25 cm x 10 cm x 10 cm boyutlarındaki plastik saksılarda çimlendirilmiştir. Altlarında drenaj delikleri bulunan saksılar çeşme suyu ile her gün sulanmıştır. Fideler yaklaşık 25 °C'deki sıcaklıkta yetiştirilmiştir.



Şekil 2.1. Bradford (1976) metoduna göre proteinlerin kolorimetrik tayini için standart eğri



Şekil 2.2. Prescott ve Jones (1969) tarafından geliştirilen, West ve arkadaşları (1982)'nce modifiye edilen yöntemle NCβA'nin kolorimetrik tayini için standart eğri



Şekil 2.3. Prescott ve Jones (1969) tarafından geliştirilen, West ve arkadaşları (1982)'nce modifiye edilen yöntemle NCβAIBA'in kolorimetrik tayini için standart eğri

2.1.4 Kullanılan Araç-Gereç

Helios Scanning UV-VIS spektrofotometre

Hettich EBA 12 Santrifüj

Hettich EBA 12 R Santrifüj

Dijital Hassas Terazî

Otomatik Pipetler: HTL

Dijital pH metre

Sirkülatörlü Su Banyosu

Peristaltik Pompa

Vorteks- Mikser

Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı

2.2 Metot

2.2.1 Ekstraksiyon

Bölüm 2.1.3'te belirtildiği şekilde yetiştirilen fideler (10-15 günlük), önce çeşme suyu ile yıkanmış, saf su ile durulanıp yumuşak havlu kağıt ile zedelenmeden kurulandıktan sonra ekstraksiyonda kullanılmıştır. Bunun için, önceden soğutulmuş havan ve havaneli ile 4°C 'de 0.1 M Tris-HCl tamponu (pH 9.5) kullanılarak fideler homojenize edilmiştir. Ekstraksiyonda gram fide başına 2 ml tampon ilave edilmiştir. Homojenizat temiz iki katlı tülbentten süzülüp 12000 g'de 20 dakika santrifüj edildikten sonra, süpernatant enzimik çözeltide hazırlanan tampona karşı 4°C'de 12 saat diyaliz edilmiştir ve bu da ham enzim ekstraktı olarak kullanılmıştır [10, 26].

2.2.2 Isıtma (Heat Treatment)

Ham ekstrakt bir behere konulup ağzı kapatıldıktan sonra 60 °C'deki su banyosunda 10 dakika bekletilmiştir. Sonra ekstrakt 6000 g'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Çökelen kısım uzaklaştırılıp süpernatant alınmış ve sonraki saflaştırma işleminde kullanılmıştır. Belirtilen 60 °C ve 10 dakikalık ısıtma

süresi deneme-yanılma yoluyla tespit edilmiştir. Aktivite ve protein tayini için 5 ml süpernatant tampona karşı ham ekstraktta olduğu gibi 12 saat diyaliz edilmiştir. Isıtma işleminden sonra enzim aktivitesinde artış ve total protein miktarında bir azalma görülmüştür. Dolayısıyla da spesifik aktivitede de bir artış belirlenmiştir.

2.2.3 Amonyum Sülfatla Çöktürme

Amonyum sülfat; belirli doyunluk derecelerine göre belirli proteinlerin çökmesini sağlayan 2 değerlikli, çok kullanılan bir tuzdur. Burada yine deneme yanılma yoluyla % doyunluk derecesi 4°C'de belirlenmiştir. Amonyum sülfat miktarları 4 °C'deki değerlere göre alınmıştır. Manyetik karıştırıcı ile yavaş yavaş karıştırılan süpernatanta amonyum sülfat azar azar eklenmiş ve 20 dakika daha karıştırmaya devam edilmiştir. Solüsyon 6000 g'de 20 dakika santrifüj edilmiş ve çökelen kısım alınarak süpernatant uzaklaştırılmıştır. Pellet 2 ml tamponda çözülüp aynı tampona karşı 12 saat diyaliz edildikten sonra enzimatik ekstrakt olarak kullanılmıştır

2.2.4 Kolon Kromatografisi (Jel Filtrasyon)

Molekül büyüklüklerine göre ayırma işlemini gerçekleştirmede kullanılan jel filtrasyon kromatografisinin kolon materyalinde yer alan porlar değişik büyüklüklerde olmaktadır.

Çalışmamızda kolon materyali olarak 500 mg Sephadex G-200 kullanılmıştır. Bunun için kuru materyal tampon içerisinde iki gün şişmeye bırakılmıştır. Boyutları 1x30 cm olan kolonun alt kısmına bir miktar cam pamuğu yerleştirilmiş, 5-6 ml kadar tampon konulduktan sonra da çözelti halindeki jel kolona bir huni yardımıyla doldurulmuştur. Son durumda kolonun jel ile doldurulmuş boyutları 1x24 cm olmuştur.

Kolon öncesi işlemlerle (ekstraksiyon, ısıtma ve amonyum sülfatla çöktürme) elde edilen örnekten literatürde önerildiği şekilde (2) 700 µl kolona

uygulanmıştır. Örneğin kolona uygulanmasından önce jelin üst kısmında yer alan tamponun jel seviyesine kadar gelmesi beklenmiş, sonra enzim örneği kolona ilave edilmiş ve örnek tamamen jelin içerisine girinceye kadar üstten tampon ilave edilmemiştir. Jel ile enzim örneği aynı seviyeye geldiğinde yavaş yavaş tampon ilave edilmiştir. Bu arada elüsyonun akış hızını düzenlemek için bir peristaltik pompa kullanılmıştır. Akış hızı da yine literatürde önerildiği şekilde (2) 0,1 ml/dk. olarak ayarlanmıştır. Elüatlar 1,5 ml'lik santrifüj tüplerinde toplanmıştır. İşlemler kolonun sirkülatörlü su banyosuyla soğutulması sayesinde 4°C'de gerçekleştirilmiştir. Elüatlardaki protein varlığı spektrofotometre ile 280 nm'de kontrol edilmiştir. Protein tayini Bradford (1976)'un yöntemine göre yapılmıştır.

2.2.5 Enzim Aktivite Tayini

Enzim aktivitesi, oluşan ürünlere göre, kolorimetrik olarak tayin edilmiştir. Dihidropirimidinaz, dihidropirimidin bileşiklerini N-karbamoil bileşiklerine dönüştürmektedir. Belirli bir süre içerisinde, enzimin katalizörlüğü ile oluşturulan ürünün miktarına göre, enzimin aktivitesi belirlenmiştir. N-Karbamoil bileşikleri, bölüm 2.1.2.2'de açıklandığı şekilde belirlenmiştir. Bu metot Turan (1995) tarafından da modifiye edilerek kullanılmıştır. Yapılan değişikliğe göre, renk reaksiyon süresi 2 saat yerine 1 saat, sıcaklık da 60 °C yerine de 70 °C olarak alınmıştır. Turan (1995)'a göre, bu değişikliğin sebebi, substratın enzimatik aktivite olmadan da kısmen bozunmasıdır. Süre uzadıkça aktivite tayininin hassasiyeti azalmaktadır. Bu tez çalışmasında da sıcaklık ve süre tekrar denenmiş, sonuçta Turan (1995)'in sıcaklık derecesi uygun görülerek sadece renk reaksiyonu 1 saat yerine 1.5 saate uzatılmıştır.

Deneylerde öncelikle 37 °C'de 1 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Toplam 1 ml olan reaksiyon karışımında 3 mM 100 µl dihidropirimidin (dihidrourasil, dihidrotimin), 100 µl enzim ekstraktı ve 800 µl de tampon (Tris-HCl pH 9.5) yer almıştır. Kör, substrat hariç diğer tüm reaksiyon bileşenlerini içermiştir. İnkübasyon bir saat sonra bölüm 2.1.2.2'de belirtildiği gibi herbir tüpe 1 ml renk belirteci ilave edilerek durdurulmuş, reaksiyon

sonucunda meydana gelen N-karbamoil bileşiklerinin boyanması işlemi yapılmıştır. Renk reaksiyonu 70 °C'de 90 dakika gerçekleştirilmiş ve sonuçta N-karbamoil bileşiklerinin olduğu tüplerde sarı-turuncu renk meydana geldiği görülmüştür.

Renk oluşumu reaksiyonunda ışık da önemli bir etken olmuştur. Tüpler ne direkt güneş ışığına maruz bırakılmış ne de ışığın zayıf olduğu ortama, çalışmada verilerin güvenilirliğini artırmak amacıyla konulmuştur. Tüplere eşit miktarda ışık gelmesini sağlamak için 70 cm yükseklikten ışık verecek şekilde 9 watt floresan ampülü olan bir masa lambası kullanılmıştır. Bunun yanı sıra laboratuvarın lambaları da yakılmıştır. Tüm renk reaksiyonları için aynı şartların sağlanmasına özen gösterilmiştir. Renk reaksiyonunun sonunda tüpler su banyosundan alınarak soğuk suyun içerisine konulmuş, 1-2 dakika soğutma işleminden sonra 466 nm'de absorbans ölçülmüştür. Oluşan ürün miktarının tayini için kullanılmak üzere N-karbamoil-β-alanin ve N-karbamoil-β-aminoizobütirik asit bileşiklerinden hazırlanan çözeltilerle standart eğriler önceden çizilmiştir [Şekil 2.2 ve 2.3].

Aktivite tayininde dikkat edilmesi gereken önemli bir nokta da, substratın kendiliğinden bozunmasının hesaba katılması olmuştur. Yapılan denemelerde önemli miktarda substratın kendiliğinden bozunduğu görülmüştür. Bu nedenle de, enzim aktivitesi hesaplanırken, köre karşı toplam reaksiyon karışımından elde edilen absorbanstan, enzimin bulunmadığı tüplerdeki absorbans çıkarılmıştır [35-38].

Aktivite şu formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{Aktivite} = \frac{(\text{OD } 466/\text{Eğim}) \times \text{Reak.kar. hacmi (ml)} \times \text{Seyreltme}}{\text{Enzim ekstrakt hacmi (ml)} \times \text{Süre (dak.)}}$$

$$\text{Aktivite} = \text{Unite/ml/dak.}$$

$$\text{Aktivite} \times 16,67 = \text{nkatal/ml/sn}$$

$$\text{Spesifik Aktivite} = \text{Aktivite} / \text{Protein Miktarı (mg/ml)}$$

$$\text{Spesifik Aktivite} = \text{nkatal /mg protein olarak ifade edilmiştir.}$$

2.2.6 Protein Tayini

Enzimatik ekstraktın protein konsantrasyonu Bradford (1976) tarafından geliştirilen metot ile tayin edilmiştir. Bu kolorimetrik metot, komazi mavisi (Coomassie Brilliant Blue G-250)'nin proteine bağlanması esasına dayanmaktadır. Yöntemin en önemli avantajı 2 dakika gibi kısa bir sürede proteine bağlanarak boyama işleminin gerçekleşmesi ve 1 saate kadar da bu rengin değişmemesidir. Proteine bağlanmadan önce kırmızımsı renkli olan bu boya, proteinle etkileşimden sonra mavi renge dönüşmektedir ve bu durumda 595 nm'de maksimum absorbans vermektedir [39].

Belirteç 100 mg komazi mavisinin 50 ml etanol (% 95)'de çözülmesi ve buna 100 ml orto-fosforik asit (% 85 w/v)'in ilave edilip 1 lt'ye seyreltilmesi şeklinde hazırlanmıştır. Belirteçte bulunan kimyasalların son konsantrasyonları % 0.01 (w/v) komazi mavisi, % 4.7 etanol ve % 8.5 fosforik asittir.

Protein tayininde standart eğri hazırlamak için son hacmi 100 µl olacak şekilde 10-100 µg sığır serum albümini (BSA) içeren bir seri tüp kullanılmıştır. Herbir tüpe 5 ml komazi belirteci ilave edilmiş ve tüpün içeriği vorteks-mikser kullanılarak iyice karıştırılmıştır. 10 dakika sonra absorbans 595 nm'de, 100 µl ilgili tampon ve 5 ml belirteç bulunan köre karşı okunmuştur. Protein içeriği A_{595} 'e karşı işaretlenmiştir. Bilinmeyen örneklerin protein konsantrasyonu elde edilen standart eğri (Şekil 2.1) kullanılarak belirlenmiştir. Pratikte, çalışılan her enzim ekstraktı için ayrı standart eğri hazırlanmıştır.

2.2.7 V_{Max} ve K_M Değerlerinin Hesaplanması

Bu değerler Lineweaver-Burk grafiği çizilerek hesaplanmıştır. Bu grafik Micheales-Menten denklemi kullanılarak çizilmektedir.

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

Bu Micheales-Menten denkleminin her iki tarafı da ters çevrilirse aşağıdaki Lineweaver-Burk denklemi elde edilmektedir.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Bu denklem, $y = ax+b$ şeklinde bir doğru denklemi gibi düşünülmektedir ve;

$$y = 1 / V$$

$$a = K_M / V_{Max}$$

$$x = 1 / [S]$$

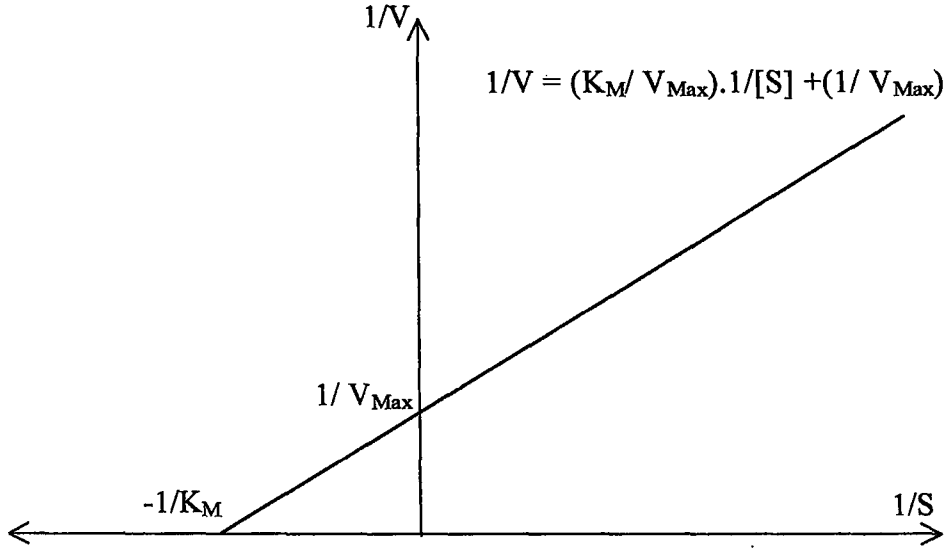
$$b = 1 / V_{Max}$$

olmaktadır. Bu grafik çizildiği zaman yukarıda belirtilen değerler hesaplanabilmektedir.

Grafiğin çizilmesi de, değişik konsantrasyonlarda hazırlanan substratın bozunması ile meydana gelen reaksiyon hızlarının belirlenerek grafiğe aktarılması şeklinde yapılmaktadır. Substrat konsantrasyonunun tersi x eksenine, reaksiyon hızının tersi de y eksenine yazılarak bir grafik oluşturulmakta ve elde edilen bu grafiğin denklemi çıkarılarak V_{Max} ve K_M değerleri hesaplanmaktadır [Şekil 2.4].

Dihidropirimidinaz için V_{Max} ve K_M değerlerinin hesaplanmasında uygun tamponda toplam 1 ml hacimli sırasıyla 1, 1.5, 2, 3 ve 4 mM substrat olacak şekilde reaksiyon karışımları hazırlanmış, herbir reaksiyon karışımına aynı enzim örneğinden 100 µl ilave edilerek reaksiyonlar başlatılmış ve bölüm 2.2.5'de belirtildiği gibi reaksiyon hızları belirlenmiştir. Bu arada herbir substrat konsantrasyonu için, substratın kendiliğinden bozunması da kontrol tüpleri hazırlanarak dikkate alınmış ve aradaki fark alınarak enzim aktivitesi belirlenmiştir. $1/[S]$ x eksenine, $1/V$ de y eksenine yazılarak grafik oluşturulmuştur. Bu grafiğin denkleminde yararlanılarak V_{Max} ve K_M değerleri hesap edilmiştir. DHU ve DHT için dihidropirimidinazın, V_{Max} ve K_M değerlerinin hesaplanmasında kullanılmak üzere çizilen grafikler Şekil 3.3 ve

Şekil 3.4'de görülmektedir. Şekil 2.4'de bir Lineweaver-Burk grafiği ve ilgili denklemi verilmiştir [2-5, 40].



Şekil 2.4 Lineweaver-Burk eğrisi

2.2.8 Güvenilirlik

Bütün deneylerin aynı koşullarda yapılmasına özen gösterilmiştir. Her bir aşamada enzim aktivitesi ve protein tayini 4 ölçümün ortalaması alınarak yapılmıştır. Şüpheli durumlarda aksaklıklar araştırılarak deneyler tekrar edilmiş ve daha doğru sonuçlar elde edilmeye çalışılmıştır. Tüm çalışmalarda saf su kullanılmıştır. Substratların kendiliğinden bozunması göz önünde bulundurularak, sürekli olarak taze hazırlanmış substrat çözeltileri kullanılmış ve hazırlanan çözeltiler $4^{\circ}C$ 'de muhafaza edilmiştir. Enzimin denatürasyonunu minimum düzeye indirmek için her zaman buzdolabında $4^{\circ}C$ 'de tutulmuştur. Işıktan etkilenen diasetilmonoksim belirteci hazırlandıktan sonra devamlı olarak alüminyum folyo ile kaplı bir kap içerisinde $4^{\circ}C$ 'de saklanmıştır. Yaklaşık olarak 1 ayı dolduran belirteçler atılarak yenileri hazırlanmıştır. Kullanılan cam malzemelerin temizliğine de azami derecede önem gösterilmiştir.

3 BULGULAR

3.1 Enzim Ekstraksiyonu ve Aktivite Tayini

Çalışmamızda kullanılan bitkilerden dihidropirimidinaz bölüm 2.2.1'de izah edildiği şekilde ekstre edilmiş, diyalizden sonra bölüm 2.2.5'de anlatıldığı yönteme göre de aktivite tayini yapılmıştır. *Pisum sativum* ve *Albizzia julibrissin*'den elde edilen ham ekstraktaki enzimatik aktivite sırasıyla 0.215 ve 0.025 nkatal/mg protein olarak belirlenmiştir [Çizelge 3.3 ve 3.4].

3.2 Isıtma (Heat Treatment)

Proteinlerin, farklı sıcaklıklarda değişik sürelerde denatüre oldukları bilinmektedir. Bu özellikten kısmi saflaştırmada yararlanılmaktadır. Önemli olan, istenilen proteinin ve aktivitesinin kaybedilmemesidir.

Çalışmamızda bu işlemin temel iki kriteri olan uygun sıcaklık ve süre, deneme-yanılma yoluyla tespit edilmiştir. Ham ekstrakt örnekleri sırasıyla 50, 55, 60 ve 65 °C'de 10'ar dakika ısıtmadan sonra enzim aktivitesi belirlenmiştir. Aktivite tayininden önce, ısıtılan ekstrakt örnekleri 12000 g'de 10 dakika santrifüj edilip, süpernatant 12 saat uygun tampona karşı bölüm 2.2.1'de belirtildiği şekilde diyaliz edilmiştir. Diyalizden sonra protein miktarı ve enzimatik aktivite tayinleri yapılarak en uygun sıcaklık ve süre sırasıyla 60 °C ve 10 dakika olarak tespit edilmiştir [Çizelge 3.1].

Çizelge 3.1. *Pisum sativum* fidelerinden ekstre edilen dihidropirimidinazın farklı sıcaklıklardaki aktiviteleri

| Ham Ekstrakt | Protein (mg/ml) | Aktivite (nkatal/ml/sn) | Spesifik Aktivite (nkatal/mg) |
|----------------------|------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|
| Isıtılmamış | 1.21 | 0.23 | 0.19 |
| 50 °C 10 dak. | 1.09 | 0.31 | 0.28 |
| 55 °C 10 dak. | 0.89 | 0.31 | 0.35 |
| 60 °C 10 dak. | 0.76 | 0.33 | 0.43 |
| 65 °C 10 dak. | 0.74 | 0.27 | 0.37 |

3.3 Amonyum Sülfatla Çöktürme

Saflaştırma basamakları içerisinde en önemli basamaklardan birisi de amonyum sülfatla çöktürme (Salting Out) işlemidir. Uygun miktarlarda amonyum sülfat ekstrakta ilave edildiğinde, belirli proteinlerin çöktürülmesi sağlanmaktadır.

Çalışmamızda çöktürme aralığı deneme-yanılma yoluyla tespit edilmiştir. Bu amaçla herbir işlem sonunda enzimatik aktivite tayini yapılarak istenilen çöktürme aralığı elde edilmiştir. Buna göre DHPaz için % 35-55 aralığının en uygun olduğu görülmüştür [Çizelge 3.2].

Çizelge 3.2 *Pisum sativum* fidelerinden ekstre edilen dihidropirimidinazın amonyum sülfatla çöktürme aralığının belirlenmesi

| Çöktürme Aralığı (%) | Spesifik Aktivite (nkatal/ml/sn) |
|----------------------|----------------------------------|
| 0-25 | 0.11 |
| 0-30 | 0.12 |
| 25-50 | 1.49 |
| 30-60 | 1.20 |
| 50-75 | 0.6 |
| 60-80 | 0.1 |
| 75-100 | 0.05 |
| 25-35 | 0.06 |
| 35-45 | 0.42 |
| 45-55 | 0.47 |
| 55-65 | 0.06 |
| 35-55 | 1.72 |

3.4 Jel Filtrasyon

Jel filtrasyon kromatografisi Bölüm 2.2.4'te anlatıldığı şekilde Sephadex G-200'den hazırlanan kolona amonyum sülfatla çöktürülerek elde edilen enzim örneği yüklenerek gerçekleştirilmiştir. Eluatlar 1.5 ml'lik santrifüj tüplerinde toplanıp, tüplerdeki protein varlığı spektrofotometre ile 280 nm'de tespit edildikten sonra herbir tüpte bulunan eluat için dihidropirimidinaz aktivitesi de belirlenmiştir. Bu arada protein tayini de Bölüm 2.2.6'da belirtildiği gibi Bradford (1976) yöntemine göre yapılmıştır. Çizelge 3.3 ve Çizelge 3.4'de görüldüğü gibi jel filtrasyon kromatografisi ile de enzim belirli oranda saflaştırılmıştır.

Çizelge 3.3 *Albizzia julibrissin*'den izole edilen dihidropirimidinazın saflaştırma tablosu

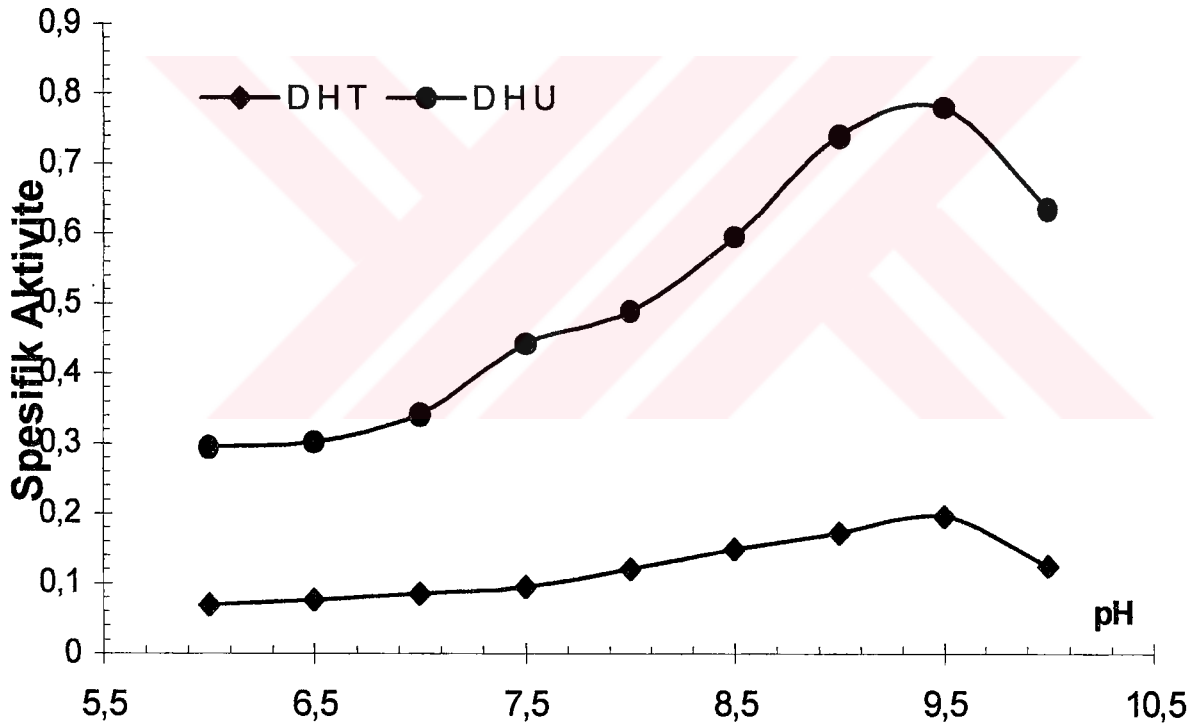
| Saflaştırma Basamağı | Aktivite nkatal/ml/sn | Protein (mg/ml) | Spesifik Aktivite nkatal/mg | Saflaştırma Derecesi |
|--|-----------------------|-----------------|-----------------------------|----------------------|
| Ham Ekstrakt | 0.064 | 2.35 | 0.025 | 1 |
| Isıtma(Heat Treatment) (60 °C 10 dk.) | 0.078 | 1.33 | 0.059 | 2 |
| Amonyum Sülfatla Çöktürme (%35-55) | 1.29 | 4.89 | 0.264 | 10 |
| Jel Filtrasyon Kromatografisi | 0.167 | 0.177 | 0.944 | 35 |

Çizelge 3.4 *Pisum sativum*'dan izole edilen dihidropirimidinazın saflaştırma tablosu

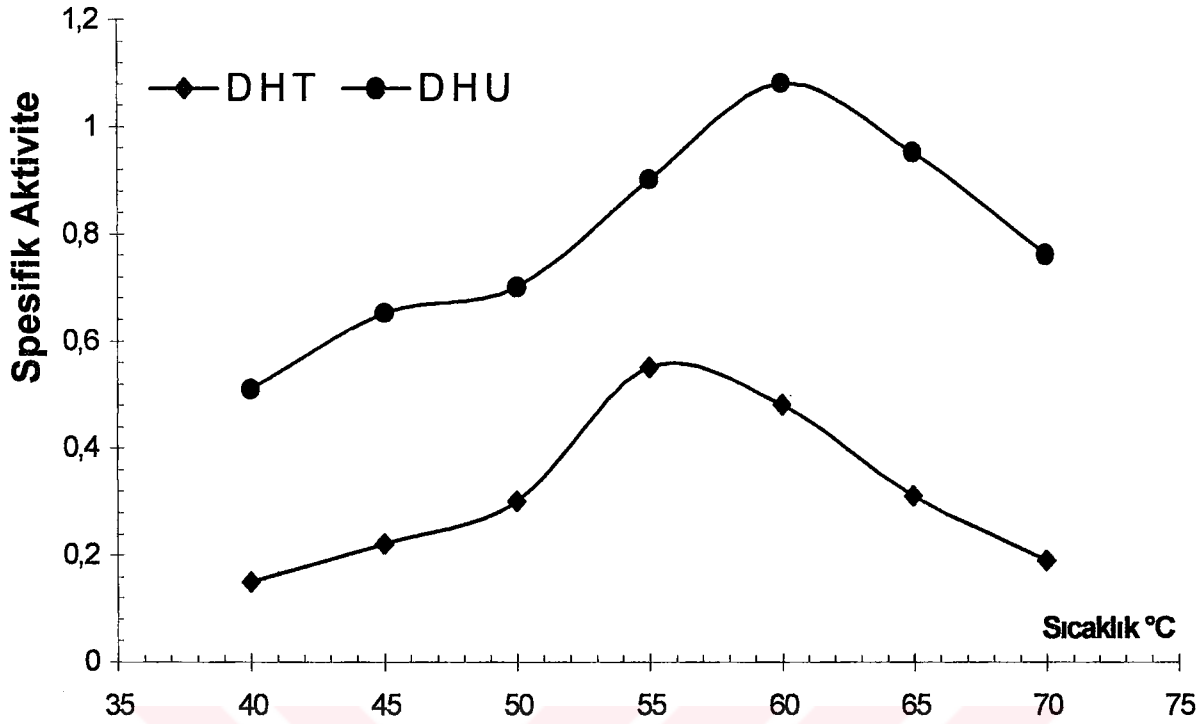
| Saflaştırma Basamağı | Aktivite nkatal/ml/sn | Protein (mg/ml) | Spesifik Aktivite nkatal/mg | Saflaştırma Derecesi |
|---|-----------------------|-----------------|-----------------------------|----------------------|
| Ham Ekstrakt | 0.26 | 1.3 | 0.215 | 1 |
| Isıtma (Heat Treatment) (60 °C 10 dk.) | 0.35 | 1.07 | 0.327 | 2 |
| Amonyum Sülfatla Çöktürme (%35-55) | 3.12 | 1.96 | 1.59 | 8 |
| Jel Filtrasyon Kromatografisi | 0.32 | 0.042 | 7.62 | 38 |

3.5 Optimum pH ve Sıcaklık

Her enzim için olduğu gibi dihidropirimidinazın da optimum pH ve sıcaklık dereceleri bulunmaktadır. Mevcut çalışmada her iki substrat (dihidrourasil ve dihidrotimin) varlığında ayrı ayrı optimum pH değerleri ve sıcaklık dereceleri tespit edilmiştir. Buna göre optimum pH 9.5, optimum sıcaklık ise bir saatlik inkübasyonda dihidrourasil ve dihidrotimin için sırasıyla 60 °C ve 55 °C olarak belirlenmiştir [Şekil 3.1 ve 3.2].



Şekil 3.1 *Pisum sativum*'dan amonyum sülfatla çöktürülerek elde edilen dihidropirimidinazın DHU ve DHT hidrolizasyonu için optimum pH isteği



Şekil 3.2 *Pisum sativum*'dan amonyum sülfatla çöktürülerek elde edilen dihidropirimidinazın DHU ve DHT hidrolizasyonu için optimum sıcaklık isteği

3.6 V_{Max} ve K_M Değerleri

Dihidrourasil ve dihidrotimin için V_{Max} ve K_M değerlerini hesaplamak amacıyla değişik konsantrasyonlardaki substratlar 2.2.5'de belirtildiği şekilde herbir reaksiyon karışımına ilave edilmiş ve aynı bölümde belirtildiği gibi enzim aktivitesi tayin edilmiştir. Elde edilen değerlerle Lineweaver-Burk grafiği çizilmiş ve grafik denkleminde de V_{Max} ve K_M değerleri hesaplanmıştır. Şekil 3.3 ve Şekil 3.4'de görüldüğü gibi enzimin maksimum hızı dihidrourasil için 2.51 nkatal/ml/sn, dihidrotimin için 0.23 nkatal/ml/sn, K_M değerleri de sırasıyla 0.33 mM ve 0.44 mM olarak belirlenmiştir. Buradan da enzimin dihidrourasil ile olan afinitesinin daha yüksek ve maksimum hızının da fazla olduğu görülmektedir.

Bunlarla ilgili hesaplamalar şöyledir;

DHU için elde edilen denklem: $y = 0.1264x + 0.387$

$$1/V = (K_M / V_{Max}) \times 1/[S] + (1 / V_{Max})$$

$$V_{Max} = 2.51 \text{ nkatal/ml/sn}$$

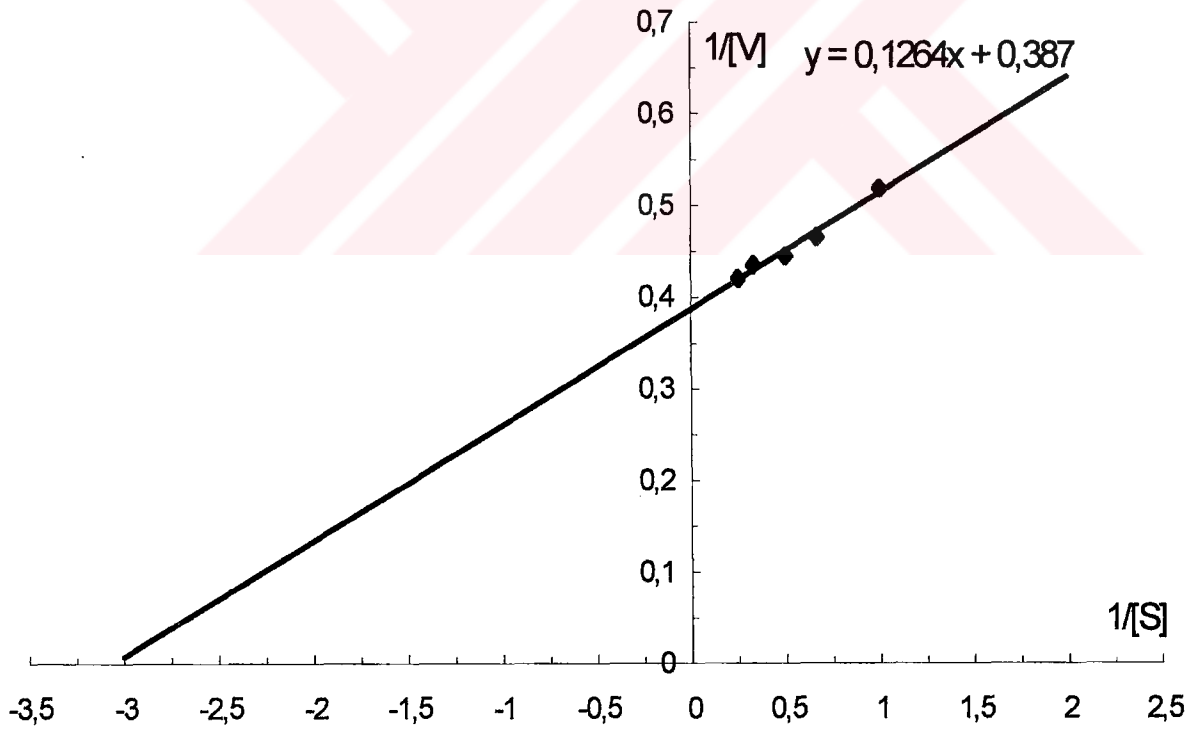
$$K_M = 0.33 \text{ mM}$$

DHT için elde edilen denklem $y = 1.926x + 4.4035$

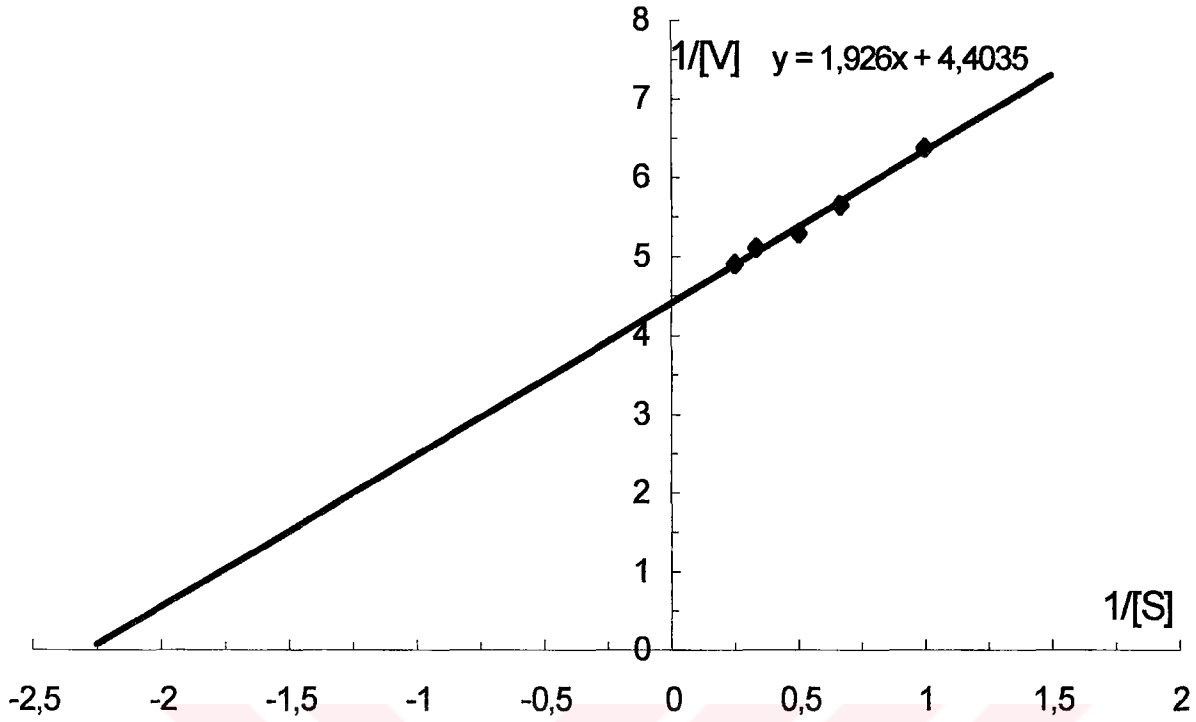
$$1/V = (K_M / V_{Max}) \times 1/[S] + (1 / V_{Max})$$

$$V_{Max} = 0.23 \text{ nkatal/ml/sn}$$

$$K_M = 0.44 \text{ mM}$$



Şekil 3.3 *Pisum sativum*'dan amonyum sülfatla çöktürülerek elde edilen dihidropirimidinazın DHU hidrolizasyonu için Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 3.4 *Pisum sativum*'dan amonyum sülfatla çöktürülerek elde edilen dihidropirimidinazın DHT hidrolizasyonu için Lineweaver-Burk grafiği

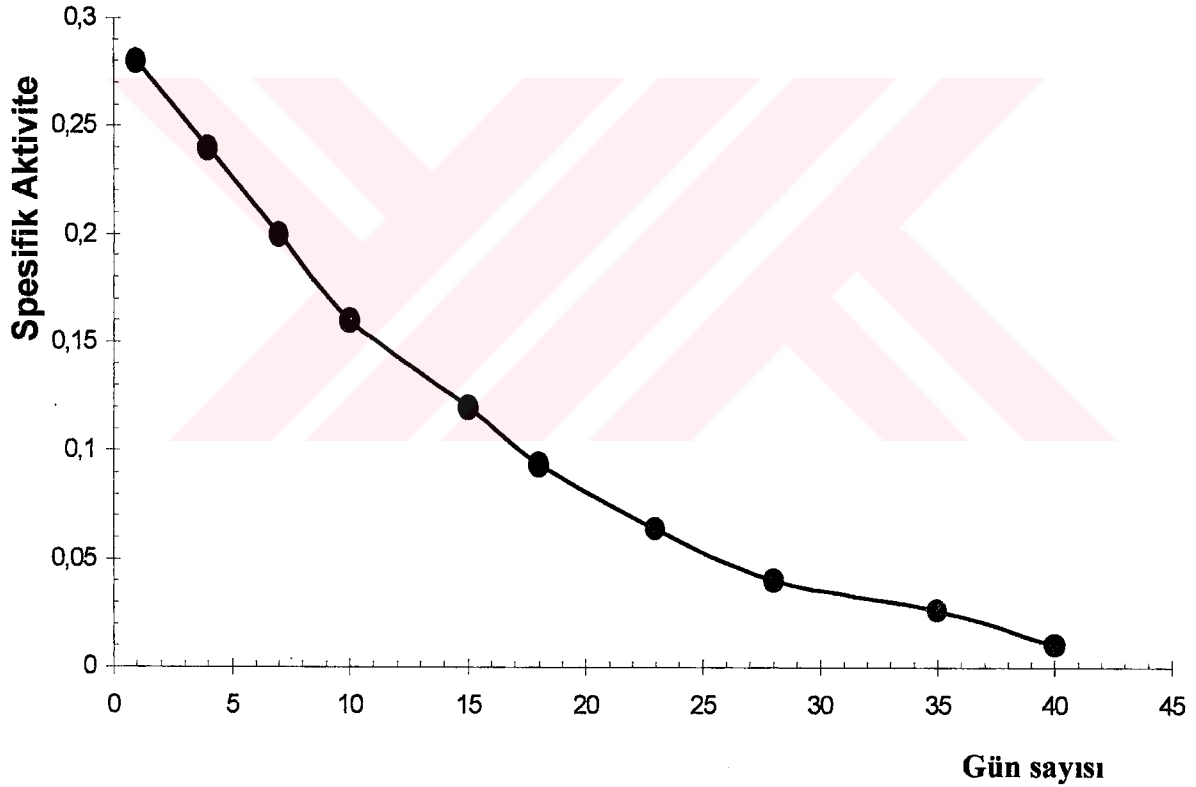
3.7 Stabilite

Dihidropirimidinazın oldukça stabil bir enzim olduğu bildirilmiştir [26-31]. Çalışmalarımızda da *Pisum sativum* ve *Albizzia julibrissin*'den elde edilen hem ham ekstraktta, hem de saflaştırma aşamalarında enzimin stabilitesi kontrol edilmiştir. Enzim saflaştırıldıkça stabilitesinin de arttığı açık bir şekilde görülmektedir [Şekil 3.5, 3.6, 3.7 ve 3.8]. Ham ekstraktta DHPaz, kısa bir sürede aktivitesini kaybetmesine rağmen amonyum sülfatla çöktürülerek elde edilen örnekte enzim uzun süre aktivite göstermiştir.

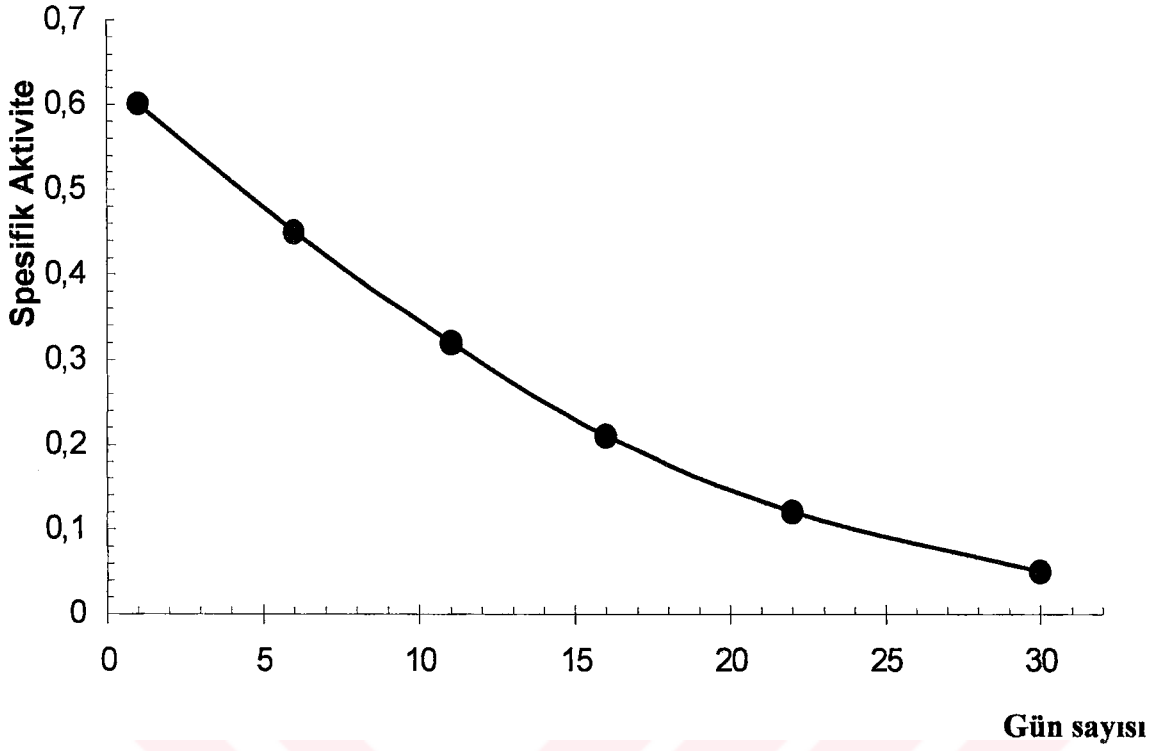
Şekil 3.5'de görüldüğü gibi *Pisum sativum* bitkisinin ham ekstraktında dihidropirimidinaz aktivitesi 15 günde % 50 azalmış, 40 günün sonunda da aktivitesinin tamamını kaybetmiştir. Örnekler sürekli Tris-HCl (pH 9.5) tamponunda 4°C'de saklanmıştır. Aynı şartlar altında amonyum sülfatla çöktürme sonucunda elde edilen enzim örneği daha uzun süre aktivitesini korumuştur. Bu aşamada enzim aktivitesinin % 50'si 25 günde kaybolmuş, 75

gün sonunda da başlangıçtaki aktivitesinin %6'sını tespit edilmiştir [Şekil 3.5 ve Şekil 3.6].

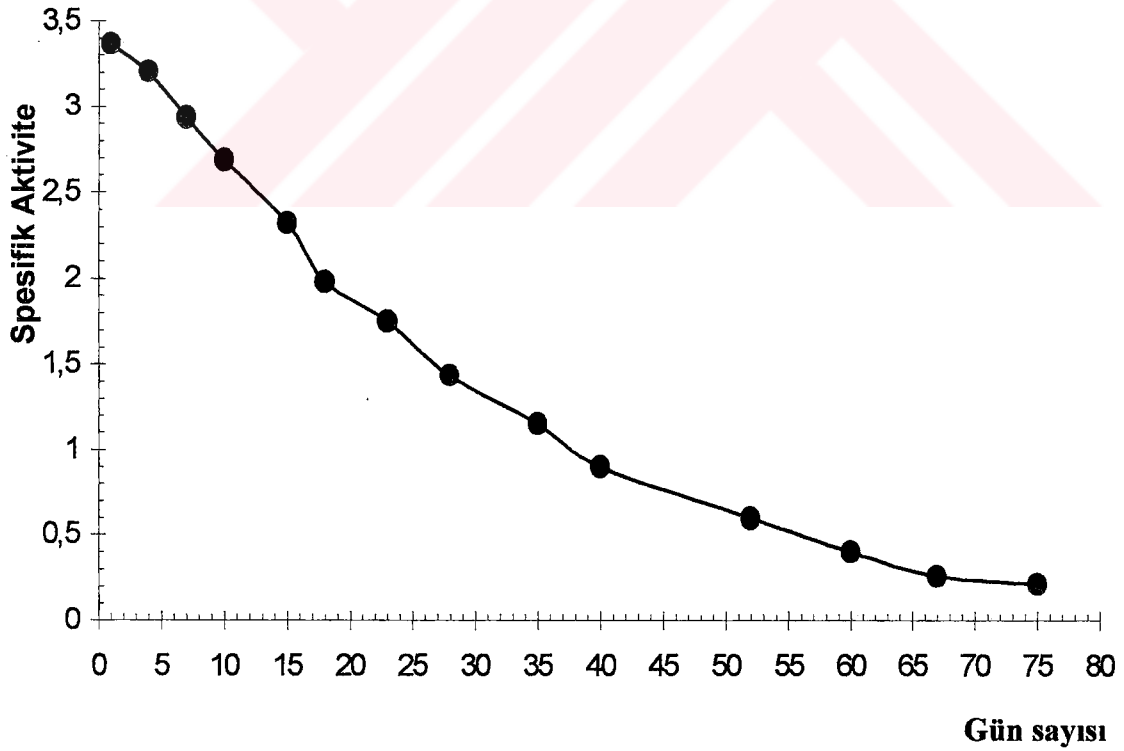
Albizzia julibrissin fidelerinden elde edilen dihidropirimidinazın stabilitesinin daha düşük olduğu görülmüştür. Ham ekstrakttaki dihidropirimidinaz 13 günde aktivitesinin % 50'sini kaybetmiş, 30 gün sonra ise hemen hemen hiç aktivite görülmemiştir. Amonyum sülfatla çöktürme sonucunda elde edilen dihidropirimidinazın 18 gün sonra aktivitesinin % 50'sini kaybettiği ve 40 gün sonunda ise aktivitesinin % 25'ini koruyabildiği tespit edilmiştir [Şekil 3.7 ve Şekil 3.8].



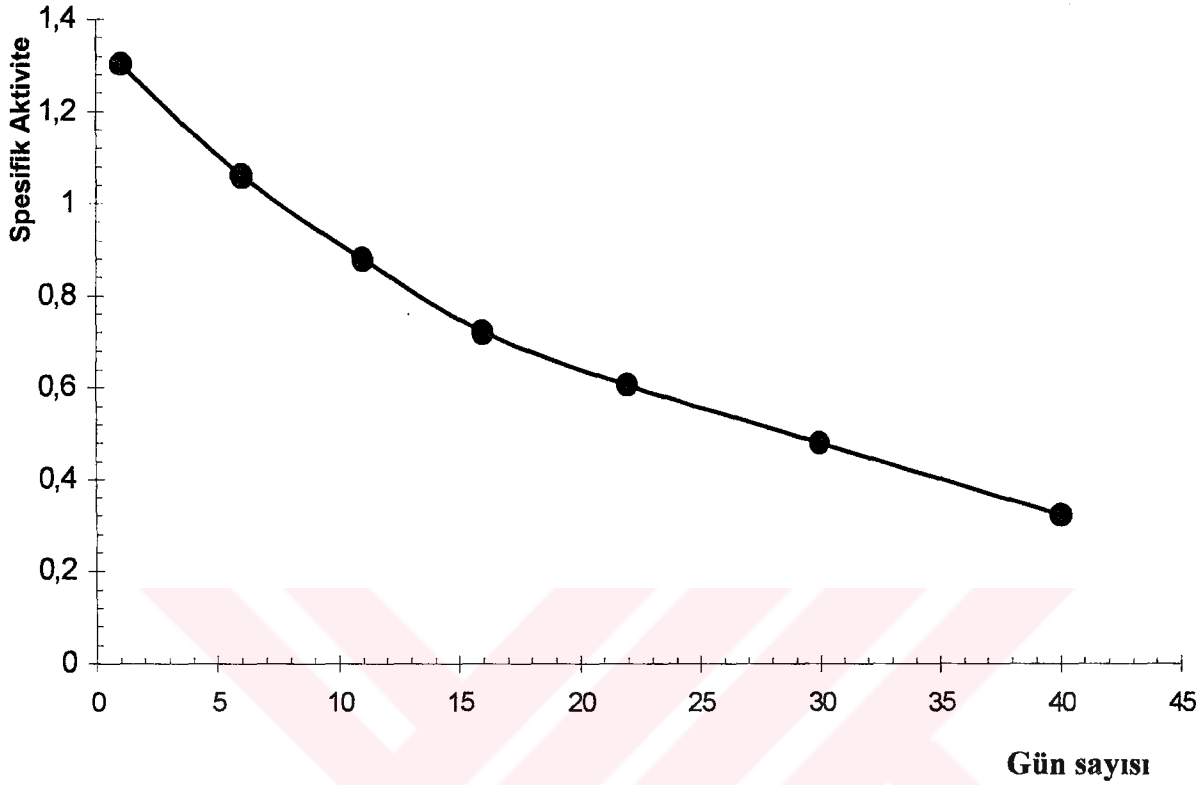
Şekil 3.5 *Pisum sativum*'dan izole edilen ham ekstrakttaki dihidropirimidinaz aktivitesinin zamanla değişimi



Şekil 3.6 *Albizzia julibrissin*'den izole edilen ham ekstrakttaki dihidropirimidinaz aktivitesinin zamanla değişimi



Şekil 3.7 *Pisum sativum* 'dan amonyum sülfatla çöktürülerek elde edilen dihidropirimidinaz aktivitesinin zamanla değişimi



Şekil 3.8 *Albizzia julibrissin* 'den amonyum sülfatla çöktürülerek elde edilen dihidropirimidinaz aktivitesinin zamanla değişimi

3.8 Metal İyonları

Çalışmamızda metal iyonlarının dihidropirimidinaz aktivitelerine etkileri incelenmiştir. Bu amaçla, değişik metal iyonları toplam hacimde 1 mM konsantrasyonda olacak şekilde bölüm 2.2.5'te belirtilen reaksiyon karışımına ilave edilmiştir. İnkübasyon sonunda en fazla inhibisyona AgNO_3 'ün (% 94), sonra sırasıyla HgCl_2 (% 87), FeSO_4 (% 80) ve CoCl_2 (% 24)'nin sebep olduğu görülmüştür. SnCl_2 % 18, MnSO_4 % 14 oranında aktivite artışına sebep olurken, PbNO_3 , ZnCl_2 ve NiCl_2 'nin enzim aktivitesine fazla etki etmedikleri görülmüştür [Çizelge 3.4].

Çizelge 3.5 Bazı metal iyonlarının dihidropirimidinazın aktivitesine etkileri

| METAL | MOLARİTE (mM) | AKTİVİTE (%) |
|-------------------|------------------|-----------------|
| KONTROL | -- | 100 |
| CoCl ₂ | 1 | 76 |
| AgNO ₃ | 1 | 6 |
| HgCl ₂ | 1 | 13 |
| CuSO ₄ | 1 | 93 |
| FeSO ₄ | 1 | 20 |
| SnCl ₂ | 1 | 118 |
| MgCl ₂ | 1 | 109 |
| MnSO ₄ | 1 | 114 |
| PbNO ₃ | 1 | 103 |
| ZnCl ₂ | 1 | 107 |
| NiCl ₂ | 1 | 105 |

4 TARTIŞMA VE SONUÇ

Pirimidin katabolik yolunda substratların hangi oranda katabolize edileceğini düzenleme bakımından kilit rolü oynadığı belirtilen dihidrourasil dehidrogenaz [13-17]'dan sonra, dihidropirimidinlerin hidrolizasyonunu dihidropirimidinaz katalizlemektedir [10,18,24]. Bu enzimin karakterize edilmesiyle ilgili bakterilerde, yüksek hayvanlarda ve insanda çok sayıda çalışma yapılmış olmasına rağmen [11, 25, 28-31], bitkilerde en detaylı Mazus ve Buchowicz (1968)'in karakterize etme çalışması görülmektedir. Literatüre göre, dihidropirimidinaz aktivitesi şimdiye kadar saflaştırılmadan sadece bitki ham ekstraktlarında tayin edilmiştir [41-43]. Ancak enzim aktivitesini ham ekstraktta etkileyebilecek çok sayıda faktörün bulunabileceği dikkate alındığında, aktivite tayinlerinin daha hassas yapılabilmesi için enzimin kısmen de olsa saflaştırılmasının önemi anlaşılmaktadır. Özellikle bazı leguminosae türlerinde kimyasal detoksifikasyonun gerçekleşmesinde önemli rol oynadığı ileri sürülen [44] dihidropirimidinaz, *Pisum sativum* ve *Albizzia julibrissin*'den ayrı ayrı izole edilip saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir.

Hemen hemen her enzimin aktivite tayini için farklı metotlar geliştirildiği gibi, bu zamana kadar da dihidropirimidinazın aktivitesini belirlemek amacıyla birkaç değişik yöntem kullanılmıştır [24, 32]. Karbamoil bileşiklerinin kolorimetrik tayini ile ilgili bir metot Prescott ve Jones (1969) tarafından geliştirilmiş, daha sonra da aynı metot West ve arkadaşları (1982) tarafından modifiye edilmiştir. Ancak bu metot dihidropirimidinazın aktivite tayini amacıyla ilk kez Turan (1995) tarafından değişiklikler yapılarak kullanılmıştır. Bu metodun dihidropirimidinaz katalizörlüğüyle meydana gelen karbamoil bileşiklerinin tayininde de en hassas, tekrarlanabilir, kullanımı kolay ve doğrusal standart eğriler verebilen bir metot olduğu, Turan (1995) tarafından bildirilmiştir. Çalışmamızda da dihidropirimidinazın aktivitesi, dihidrourasil ve dihidrotiminin hidrolizasyonu ile meydana gelen N-karbamoil bileşiklerinin

kolorimetrik tayin metodu ile belirlenmiştir. Turan (1995) tarafından kullanılan bu metot, bölüm 2.2.5'te belirtildiği gibi çalışmamızda hassasiyetin daha da artırılması için, denemeler sonucu bazı değişiklikler yapılarak kullanılmıştır. Ayrıca ham ekstrakttaki dihidropirimidinazın aktivite tayini yapıldığında, diyaliz öncesi ve sonrası enzim aktiviteleri arasında önemli farkların olduğu görülmüştür. Aktivite tayininde köre de ham enzim ekstraktı ilave edildiğinden (Bölüm 2.2.5), diyaliz edilmemiş ham ekstraktta bulunabileceği düşünülen karbamoil bileşiklerinin köre oluşturduğu renk, aktivitenin belirlenmesinde hassasiyeti azaltmıştır. Bu nedenle, ham ekstrakttaki aktivite tayini, hassasiyetin artırılması için diyalizden sonra yapılmıştır (Bölüm 2.2.1).

Enzimin her iki bitkiden de ekstraksiyonunda Tris-HCl tamponu (pH 9.5) kullanılmıştır. Bu tamponun 25°C'deki pKa değeri 8.06 olup [45], dihidropirimidinazın optimum pH'sı olan 9.5 değerinin, ekstraksiyon sırasında ve sonraki aşamalarda, korunması için uygun bulunmuştur. Ekstraksiyon işlemleri literatüre göre değişik çalışmalarda sonikasyon ve blender ile yapılmış olmasına rağmen [2,11, 28-31], çalışmamızda bölüm 2.2.1'de belirtildiği gibi havan ve havaneli kullanılarak, enzimin denatüre olma riskini azaltma bakımından yavaş bir şekilde yapılmıştır. Ekstraksiyon ve diğer basamakların tümü, maksimum enzim aktivitesi elde edilebilmesi için 4°C'de yapılmıştır.

Bakteri ve hayvansal organizmalardan dihidropirimidinazın saflaştırılmasında uygulanıp [11, 28-31] bitkilerden izolasyonda daha önce denenmeyen bazı yöntemler, bu çalışmada kullanılmıştır. Bunlardan, bölüm 2.2.2'de belirtildiği şekilde ısıtma ile total protein miktarı azalarak enzimin spesifik aktivitesinin arttığı görülmüştür. Ayrıca ısıtma sonucunda, literatürde rastlanmadığı halde, enzimin aktivitesinin de arttığı belirlenmiştir [Çizelge 3.2].

Enzimleri nötral tuzlarla çöktürme, saflaştırma aşamalarından birisi olarak, sıklıkla kullanılmaktadır. Bu işlemde, yüksek tuz konsantrasyonunda hidratasyon suyunun protein molekülünden uzaklaştırıldığı ve böylece çözünürlüğün azalarak çökelmenin gerçekleştiği belirtilmektedir [1]. Değişik organizmalardaki dihidropirimidinaz için farklı çökelme aralıkları rapor

edilmiştir [25-31]. Çalışmamızda da amonyum sülfat kullanılarak dihidropirimidinazın maksimum çökelme aralığı belirlenmiştir [Çizelge 3.2]. Buna göre her iki bitkiden de % 35-55 aralığında çöktürülen dihidropirimidinaz aktivitesinin maksimum düzeyde olduğu görülmüştür. Bu aralıkta çökeltmeyen proteinler uzaklaştırılarak enzim kısmen saflaştırılmış ve konsantre edilmiştir. Bu işlemin gerçekleştirilmesi, bir sonraki aşama olan jel filtrasyon kromatografisinde daha yüksek verim alınabilmesi bakımından, önemli görülmektedir [2].

Saflaştırılma işlemlerinde en yüksek saflaştırma derecesinin kolon kromatografisi ile elde edildiği bilinmektedir. Bu çalışmada da molekül büyüklüğüne göre ayırma yapmak amacıyla jel filtrasyon kromatografisi uygulanmış ve diğer basamaklara oranla daha fazla saflaştırma derecesi elde edilmiştir [Çizelge 3.3 ve Çizelge 3.4]. Mazus ve Buchowicz (1968)'e göre Sephadex G-100 ile hazırlanan jel kullanılarak 13 kat saflaştırma elde edilebilmesine rağmen, çalışmamızda *Pisum sativum*'dan elde edilen enzim 30 kat saflaştırılmıştır. Ayrıca *Albizzia julibrissin*'deki saflaştırma da 25 kat olarak gerçekleştirilmiştir. Buradan da kullandığımız yöntemin ayırmada daha da etkili olduğu görülmüştür.

Dihidropirimidinazın stabilitesinin yüksek olduğu şimdiye kadar yapılan çalışmalarda belirtilmiştir [25-31]. Mazus ve Buchowicz (1968), dietanolamino-asetat tamponunda (pH 10) ham ekstraktta enzimin 2°C'de 60 günde aktivitesinin % 50'sini koruduğunu belirtmiştir. Brooks (1983) ise sığırcı karaciğerinden izole edilen enzimin yine benzer şekilde 60 günde % 50 oranında aktivitesini kaybettiğini rapor etmiştir. Diğer çalışmalarda da bu verilere yakın sonuçların elde edildiği görülmektedir [28-30]. Çalışmamızda ise iki bitki türü için hem ham ekstraktta hem de amonyum sülfatla çöktürülerek elde edilen örneklerde stabilite kontrol edilmiştir. Buna göre *Pisum sativum*'dan izole edilen ham ekstraktta dihidropirimidinaz Tris-HCl tamponunda (pH 9.5) 4°C'de 15 günde, *Albizzia julibrissin*'deki ise 13 günde aktivitesinin % 50'sini kaybetmiştir. Aynı örneklerdeki dihidropirimidinaz *Pisum sativum*'da 40 gün, *Albizzia julibrissin*'de ise 30 günde aktivitesinin tamamını kaybetmiştir.

Amonyum sülfatla çöktürülmüş örneklerdeki dihidropirimidinazın ise daha stabil olduğu görülmüştür. *Pisum sativum*'dan izole edilen amonyum sülfatla çöktürülmüş dihidropirimidinazın 25 günde, *Albizzia julibrissin*'dekinin ise 18 günde aktivitesinin % 50'sini kaybettiği belirlenmiştir [Şekil 3.5, 3.6, 3.7 ve Şekil 3.8]. Enzimlerin saflaştırılması ve nitelendirilmesi ile ilgili olarak yapılan bir çok çalışmada [25-31] belirtildiği gibi, enzimlerin saflaştırıldıkça stabilitelelerinin artması özelliğinin, çalışmamızda elde edilen bu verilerle de desteklendiği görülmektedir.

Her enzim için olduğu gibi dihidropirimidinaz için de önemli kinetik değerler olan V_{Max} ve K_M değerleri de hesaplanmış ve sonuçların daha önceki çalışmalarda elde edilen verilere uygunluk gösterdiği görülmüştür. Mazus ve Buchowicz (1968)'e göre K_M değerleri, DHU için 5.6 mM, DHT için 5.9 mM olarak hesaplanmıştır. Kikugava (1994)'ya göre K_M değeri, DHU için 0.019 mM, DHT için 0.026 mM olarak belirlenmiştir. Kautz (1989) ise K_M değerini, DHU için 0.025 mM, DHT için 0.085 mM olarak tespit etmiştir. Diğer çalışmalarda da bu değerlere yakın sonuçlar elde edilmiştir [29, 31, 32]. Buna göre, genel olarak DHU için elde edilen K_M değerlerinin DHT için elde edilen K_M değerlerinden daha düşük olduğu görülmektedir. Bu da, dihidropirimidinazın, DHU'e olan afinitesinin DHT'e göre daha yüksek olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda da benzer sonuçlar elde edilmiştir. DHU için K_M değeri 0,33 mM, DHT için ise 0,44 mM olarak hesaplanmıştır. V_{Max} değerleri de DHU için 2,51 nkatal/ml/sn ve DHT için 0,23 nkatal/ml/sn olarak belirlenmiştir. Ancak dihidropirimidinazın sadece DHU ve DHT için spesifik olmadıkları, ayrıca 5-aminourasil, 5-iyodourasil 5-florourasil ve hidantoin gibi bir çok substratı da hidrolize ettiği bildirilmiştir [28-31, 42, 43, 46, 47].

Ayrıca *Pisum sativum*'dan izole edilen enzimin *Albizzia julibrissin*'den elde edilene göre çok daha aktif olduğu tespit edilmiştir [Çizelge 3.3 ve Çizelge 3.4]. Bu durum Turan (1995) tarafından *Albizzia julibrissin* için dihidrourasil yerine 5-aminodihidrourasilin öncelikli substratı olduğu şeklinde bildirilmiştir. Bu bitkide 5-aminodihidrourasilin dihidropirimidinaz tarafından hidrolize edilmesiyle, albizzin denilen non-protein aminoasit açığa çıkmakta ve bitkinin

farklı kısımlarında depolanmaktadır. Bu şekilde de yüksek konsantrasyonlarda bitkiler için toksik olabileceği belirtilen urasilin, toksik olmayan moleküllere dönüştürülerek detoksifikasyon mekanizmasının işlediği rapor edilmiştir [44]. Buna göre çalışmamızda elde edilen veriler Turan [42, 43]'ın bulgularıyla uyumluluk göstermektedir.

DHPazın her iki substrat (DHU ve DHT) için optimum pH değerleri de tespit edilmiş ve her ikisi için de optimum pH değerinin 9.5 olduğu görülmüştür. Daha önce yapılan çalışmalarda da bu optimum pH değeri veya buna yakın sonuçların elde edildiği bildirilmiştir [22-31]. Bu sonuçlara göre dihidropirimidinazın bazik ortamda daha etkili bir enzim olduğunu söylemek mümkün olmaktadır. Mazus ve Buchowicz (1968)'e göre de optimum pH 9.5 olarak belirlenmiştir.

Bu çalışmada dihidropirimidinazın optimum sıcaklık değeri de her iki substrat (DHU, DHT) için tespit edilmiştir. Bir saatlik inkübasyonda optimum sıcaklık değeri DHU için 60 °C, DHT için ise 55 °C olarak belirlenmiştir. Mazus-Buchowicz (1968)'e göre de optimum sıcaklık değeri DHU ve DHT için 70 °C'dir. Bu sonuçlara göre de dihidropirimidinazın yüksek sıcaklıklara dayanıklı olduğu görülmektedir.

Enzimlerin nitelendirilmesinde enzim aktivitesine etki eden maddelerin tespit edilmesinin de önemli olduğu bilinmektedir. Bununla ilgili olarak da 1 mM konsantrasyonda bazı metal iyonlarının dihidropirimidinazı nasıl etkilediği incelenmiştir. Hemen hemen her enzimi inhibe ettiği gibi dihidropirimidinazı da $AgNO_3$ ve $HgCl_2$ 'nin önemli oranda inhibe ettiği gözlenmiştir. Dihidropirimidinaz ile ilgili Mazus ve Buchowicz (1968) ve diğer bir çok çalışmada yer almayan $FeSO_4$ 'ün dihidropirimidinaz aktivitesini önemli derecede azalttığı görülmüştür. Mazus ve Buchowicz (1968) $CuSO_4$ 'ün DHPaz aktivitesini az miktarda artırdığını belirtmiştir. Ancak mevcut çalışmada yapılan deneylerle $CuSO_4$ 'ün az miktarda DHPazı inhibe ettiği görülmüştür. Aynı şekilde $CoCl_2$ 'nin DHPazı Mazus ve Buchowicz (1968)'e göre artırdığı belirtilirken, bu çalışmada % 25 oranında inhibe ettiği belirlenmiştir. Burada

ilginç sonuçlardan birisi de enzimleri büyük oranda inhibe ettikleri belirtilen $PbNO_3$, DHPazı inhibe etmemiş hatta az bir miktarda (%1) aktiviteyi artırmıştır. $SnCl_2$, $MgCl_2$, $MnSO_4$, $ZnCl_2$, $PbNO_3$ ve $NiCl_2$ DHPazın aktivitesini bir miktar artırırken, bu metal iyonlarının içerisinde en çok aktiviteyi arttıranın $SnCl_2$ olduğu tespit edilmiştir [Çizelge 3.4].



5. KAYNAKLAR

- [1] Keha, E.E., Küfreviođlu, Ö.İ., Biyokimya, Şafak Yayınevi, Erzurum, 1997
- [2] Erarslan, A., Kazan, D., Enzimlerin Saflaştırılması ve Nitelendirilmesinde Temel Yöntemler II. Uygulamalı Eğitim Kursu, TUBİTAK-MAM, Gebze, Kasım-1999
- [3] Murray, K. R. , Mayes, P.A., Granner, D.K., Rodwell, V.W., Çevirenler, Menteş, G., Ersöz, Biltan, Harper'ın Biyokimyası, Barış Kitabevi, İstanbul, 1993
- [4] Bingöl, G., Biyokimya, Hacettepe TAŞ Kitapçılık Ltd. Şti., Ankara, 4. Baskı 1987
- [5] Gözükara, E.M., Biyokimya, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara, 1989
- [6] Segel, I.H., Enzyme Kinetics, John Wiley & Sons, Inc., New -York, (1975)
- [7] Segel, I.H., Biochemical Calculations, John Wiley & Sons, Inc., New -York, (1968)
- [8] Tipton, K.F., Dixon, H.B.F. "Effects of pH on Enzymes, in Enzyme Kinetics and Mechanism Part A" (D.L. Purich Ed.), Methods in Enzymology, Academic Press, Inc., New York 63 (1979) 183-234
- [9] Tipton, K.F., Dixon, H.B.F. "Effects of pH on Enzymes in Contemporary Enzyme Kinetics and Mechanism" (D.L. Purich Ed.), *Academic Press, Inc.* New-York (1983)

- [10] Y, Turan, "Pyrimidine Primary and Secondary Metabolism in Plants", A thesis presented for the Degree of Doctor of Philosophy in the University of Wales Swansea, Department of Biochemistry School of Biological Science University of Wales Swansea, November, 1995
- [11] West, P. T. "Reductive catabolism of uracil and thymine by *Burkholderia cepacia*" *Arch Microbiol*, 168 (1997) 237-239
- [12] Matthews, M.M., Traut, T.W. "Regulation of N-Carbamoyl β -alanine amidohydrolase the terminal enzyme in pyrimidine catabolism by ligand-induced change in polymerization" *J.B.C.*, 262 (1987) 7232-7237
- [13] Smith, A.E., Yamada, E. W. "Dihydrouracil dehydrogenase of rat liver. Separation of hydrogenase and dehydrogenase activity" *J. Biol. Chem.*, 246 (1971) 3610-3617
- [14] DeAbreu, R., Bakkereu, J.A.M., Braakhekke, J., Gabreels, F.J. M., Haas, J.M., Sengers, R.C.A. "Dihydrothymine dehydrogenase deficiency in family leading to elevated levels of uracil and thymine" *Pediatric Res.*, 19 (1985) 752
- [15] Hallock, R. O., Yamada, E.W. "Pyrimidine reducing enzymes of rat liver" *Can J. Biochem.*, 54 (1976) 178-184
- [16] Queener, S. F., Morris, H.P., Weber, G. "Dihydrouracil dehydrogenase activity in normal, differentiating and regenerating liver and hepatomas" *Cancer Res.*, 31 (1971) 1004-1009
- [17] Tintemann, H., Wasternack, C., Benndorf, R., Reinbothe, H., "The rate-limiting step uracil degradation in tomato cell suspension cultures and *Euglena gracilis* in vivo studies" *Comp. Biochem. Physiol.*, 82B (1985) 787-793

- [18] Tintemann, H., Wasternack, C., Helbing, D., Glund, K., Hause, B. "Pyrimidine Degradation in Tomato Cell Suspension Cultures and in *Euglena gracilis*-Localization of Enzymes" *Comp. Biochem. Physiol.*, 3 (1987) 943-948
- [19] Wasternack, C. "Compartmentation of uracil in *Euglena gracilis*" *Molec. Cell. Biol.*, 3 (1983a) 613-622
- [20] Fink, R.M., Mc Gaughey, C., Cline, R.E., Fink, K. "Metabolism of intermediate pyrimidine reduction products in vitro" *J. Biol. Chem.*, 218 (1956) 1-7
- [21] Morin, A. "Use of D-hydantoinase extracted from legumes to produce N-carbamyl D-amino acids" *Enzyme Microb. Technol.*, 15 (1993) 208-214
- [22] Morin, A., Leblanc, D., Lingnau, A., LaPointe, G., "Cyclic Amide Amidohydrolase Activities in *Pisum Sativum* Hulls" *Bioresource Technology*, 61 (1997) 91-97
- [23] Morin, A., Poitras, E., Moresoli, C., Brion, F. "Extraction Of Cyclic Amide Amidohydrolase From Green Hulls Of *Pisum Sativum* And Its Use As Biocatalyst For N-Carbamyl Amino Acids" *Bioresource Technology*, 53 (1995) 31-37
- [24] Dudley, K.H., Roberts, S.B. "Dihydropyrimidinase Stereochemistry of the Metabolism of Some 5-Alkylhydantoins" *Drug Metabolism and Disposition*, 6 (1977) 133-139
- [25] Maguire, J., Dudley, K.H. "Partial purification and characterization of dihydropyrimidinase from calf and rat liver" *Drug Metab. Dispos.*, 6 (1978) 601-605
- [26] Mazus, B. and Buchowicz, J., "Dihydropyrimidinase Activity in Pea Plants" *Acta Biochimica Polonica* 13 (1966) 267-273

- [27] Mazus, B. and Buchowicz, J. "Dihydropyrimidinase Of Pea Plants Purification And Properties" *Acta Biochimica Polonica*, 15 (1968) 327-337
- [28] Kikugava, M., Kaneko, M., Fujimoto-Sakata, S., Maeda, M., Kawasaki, K., Takagi, T., Tamaki, N., "Purification, characterization and inhibition of dihydropyrimidinase from rat liver" *Eur. J. Biochem.*, 219 (1994) 393-399
- [29] Jahnke, K., Podschun, B., Schnackerz, K.D., Kautz, J., Cook, P.F. "Acid-Base Catalytic Mechanism of Dihydropyrimidinase from pH Studies" *Biochemistry*, 32 (1993) 5160-5166
- [30] Kautz, J., Schnackerz, K.D. " Purification and properties of 5,6-Dihydropyrimidine amidohydrolase from calf liver" *Eur. J. Biochem.*, 181 (1989) 431-435
- [31] Brooks, P.K., Jones, E.A., Kim, B., Sander, E.G. "Bovine Liver Dihydropyrimidine Amidohydrolase: Purification, Properties and Characterization as a Zinc Metalloenzyme" *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 226 (1983) 469-483
- [32] Naguib, N.M.F., El Kouni, M.H., Cha, S. "Enzymes Uracil Catabolism in Normal and Neoplastic Human Tissues" *Cancer Research*, 45 (1985) 5405-5412
- [33] Traut, T.W., Loechel, S. "Pyrimidine catabolism: individual characterization of three sequential enzymes with a new assay" *Biochemistry*, 23 (1984) 2533-2539
- [34] Wasternack, C. "Degradation of pyrimidines-enzymes, localization and role in metabolism" *Biochem. Physiol. Pflanzen*, 173 (1978) 467-499
- [35] Prescott, M. L., Jones, M. E. "Modified Methods for the Determination of Carbamyl Aspartate" *Analytical Biochemistry*, 32 (1969) 408-419

- [36] West, P.T., Shanley, S.S., O'Donovan, G.A., "Improved Colorimetric Procedure for Quantitating N-Carbamoyl- β -alanine with Minimum Dihydrouracil Interference" *Analytical Biochemistry*, 122 (1982) 345-347
- [37] Grisolia, S., Wallach, D. P., "Enzymic interconversion of dihydrouracil and β -ureidopropionic acid" *Biochim. Biophys. Acta*, 18 (1955) 449
- [38] Sanno, Y., Holzer, M., Schimke, R.T."Studies of a mutation affecting pyrimidine degradation in inbred mice" *J. Biol. Chem.*, 245 (1970) 5668-5676
- [39] Bradford, M. M., "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding" *Analytical Biochemistry*, 72 (1976) 248-253
- [40] Wasternack C. " Degradation of pyrimidines in *Euglena gracilis*-I. Studies with intact cells" *Plant Sci. Letts*, 4 (1975) 353-360
- [41] Magiure, J.H., Dudley, K.H. " Dihydropyrimidinase Metabolism of Some Cyclic Imides of Different Ring Size" *Drug Metabolism and Disposition*, 6 (1977) 140-145
- [42] Brown, E.G., Turan, Y. "Pyrimidine Metabolism And Secondary Product Formation, Biogenesis Of Albizzine, 4-Hydroxyhomoarginine And 2,3-Diaminopropionic Acid" *Phytochemistry*, 40 (1995) 763-771
- [43] Brown, E.G., Turan, Y. "Formation Of Albizzine And 2,3-Diaminopropionic Acid From Uracil In *Albizzia* Seedlings" *Phytochemistry*, 41 (1996) 1491-1495
- [44] Turan, Y., Konuk, M., "The effect of uracil on germination and growth of some leguminous plants" *Tr. J. of Botany*, 23 (1999) 241-245
- [45] Stall, V.S., Blanchard, J.S. "Buffers: Principles and Practice" *Methods in Enzymology*, 182 (1990) 24-38

[46]] Maguire, J., Dudley, K.H "Colorimetric Hydroxylamine-Iron (III) Methods for Studies of the Enzymatic Hydrolyses of Cyclic Imides and of Amic Acids" *Analytical Chemistry*, 49 (1977) 292-297

[47] Kim, B.D., Keenen, S., Bodnar, J.K., Sanders, E.G. " Role of Enzymatically Catalyzed 5-Iodo-5,6-dihydrouracil Ring Hydrolysis on the Dehalogenation of 5-Iodouracil" *The Journal of Biological Chemistry*, 251 (1976) 6909-6914

