

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**YENİ SENTEZLENMİŞ 1,2,4- MERKAPTO TRİAZOL BİLEŞİKLERİNİN
ÜREAZ AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN IN VITRO VE IN SILICO
OLARAK İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gamze ZEHİR KIRKBİR

**AĞUSTOS 2018
TRABZON**



KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

**YENİ SENTEZLENMİŞ 1,2,4- MERKAPTO TRİAZOL BİLEŞİKLERİNİN ÜREAZ
AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN IN VITRO VE IN SILICO
OLARAK İNCELENMESİ**

Gamze ZEHİR KIRKBİR

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
“YÜKSEK LİSANS (KİMYA)”
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 31 / 07 / 2018

Tezin Savunma Tarihi : 16 / 08 / 2018

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Yakup KOLCUOĞLU

Trabzon 2018

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Kimya Anabilim Dalında
Gamze ZEHİR KIRKBİR Tarafından Hazırlanan**

**YENİ SENTEZLENMİŞ 1,2,4-MERKAPTO TRİAZOL BİLEŞİKLERİNİN ÜREAZ
AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İN VİTRO VE İN SLİCO OLARAK İNCELENMESİ**

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 31 / 07 / 2018 gün ve 1764 sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak kabul edilmiştir.**

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK

Üye : Doç. Dr. Yakup KOLCUOĞLU

Üye : Doç. Dr. Özlem FAİZ



Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

“Yeni sentezlenmiş 1,2,4- merkapto triazol bileşiklerinin üreaz aktivitesi üzerine etkisinin *In vitro* ve *In silico* olarak incelenmesi’ adlı bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Bu çalışmada bana araştırma ve kendimi geliştirme olanağı sağlayan, tez konumun belirlenmesinde yardımcı olan, çalışmam süresince yakın ilgi ve önerileriyle bana yol gösterip beni yönlendiren danışmanım sayın Doç. Dr. Yakup KOLCUOĞLU’na teşekkür ederim.

Tez çalışmamda Moleküler Modelleme ve Docking çalışmalarını yapan saygıdeğer hocam Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK hocama teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisansım boyunca Biyokimya Lisansüstü Araştırma Laboratuvarında beraber çalışıp yardımlarını aldığım bütün hocalarıma özellikle de Dr. Kimyager Ümmühan ÇAKMAK’a ve diğer arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Yüksek lisans tez süresince beni anlayışla karşılayan, nazımı çeken canım eşim, arkadaşlarım ve dostlarıma teşekkür ederim.

Son olarak da hayatımda bir an bile maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen, varlıkları ile bana güç veren, zor günlerimde yanımda olan ve beni bu günlere getiren çok değerli ailem’e sonsuz teşekkürlerimi sunarım, iyiki varsınız.

Gamze ZEHİR KIRKBİR
Trabzon 2018

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Yeni Sentezlenmiş 1,2,4- Merkaptotriazol Bileşiklerinin Üreaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin *In vitro* ve *In silico* Olarak İncelenmesi” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Doç.Dr.Yakup KOLCUOĞLU’nun sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 16/08/2018

Gamze ZEHİR KIRKBİR

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	VII
SUMMARY	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	IX
TABLolar DİZİNİ.....	X
KISALTMALAR VE SEMBOLLER DİZİNİ	XI
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş	1
1.2. Üreaz Enzimi	2
1.2.1. Üreaz Enziminin Moleküler Yapısı ve Tepkime Mekanizması	3
1.2.2. Üreaz Enziminin Substratı Olarak Üre	5
1.2.3. Üreaz Aktivite Tayin Yöntemleri	5
1.2.4. Üreaz Enziminin Kullanım Alanları.....	7
1.3. Enzim İnhibisyonu	7
1.3.1. Enzim İnhibisyonunun Klinik Çalışmalarındaki Önemi	8
1.3.2. Üreaz Enziminin Klinik Önemi ve İnhibisyon Çalışmaları	9
1.3.3. Literatürde Üreazla İlgili Yapılan Bazı Çalışmalar	10
1.4. Çalışmanın Amacı ve Önemi	12
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	15
2.1. Kullanılan Kimyasal Madde ve Malzemeler	15
2.2. Kullanılan Cihazlar.....	15
2.3. Kullanılan Tampon ve Diğer Çözeltiler	16
2.3.1. Tampon Çözeltiler	16
2.3.2. Substrat ve Enzim Aktivitesi Tayin Çözeltileri	16
2.4. Aktivitenin Optimizasyonu ve İnhibisyon Çalışmaları	17
2.4.1. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	17

2.4.2. Enzim Aktivitesine pH'nın Etkisi.....	17
2.4.3. Enzim Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi	18
2.4.4. Enzim Konsantrasyonunun Aktivite Üzerine Etkisi.....	18
2.4.5. Substrat Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	18
2.4.6. Reaksiyon Süresinin Aktivite Üzerine Etkisi	18
2.4.7. Organik Moleküllerin Üreaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	19
2.4.8. Moleküler Modelleme Çalışması ve Docking Yöntemi	21
3. BULGULAR.....	23
3.1. Enzim Aktivitesinin Optimizasyonu.....	23
3.1.1. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'ın Etkisi	23
3.1.2. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	23
3.1.3. Enzim Aktivitesi Üzerine Protein Konsantrasyonunun Etkisi	24
3.1.4. Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi	25
3.1.5. Enzim Aktivitesi Üzerine Reaksiyon Süresinin Etkisi	26
3.2. Üreaz İnhibisyonu Çalışmaları	26
3.3. Moleküler Modelleme Çalışmaları	32
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	34
5. ÖNERİLER	38
6. KAYNAKLAR	39
ÖZGEÇMİŞ	

Yüksek Lisans Tezi

ÖZET

YENİ SENTEZLENMİŞ 1,2,4- MERKAPTO TRIAZOL BİLEŞİKLERİNİN ÜREAZ AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN IN VITRO VE IN SILICO OLARAK İNCELENMESİ

Gamze ZEHİR KIRKBİR

Karadeniz Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç.Dr. Yakup KOLCUOĞLU

2018, 44 Sayfa

Bu çalışmada, Merkapto-1,2,4- triazol bileşiklerinin klinik ve endüstriyel öneme sahip üreaz aktivitesini inhibe etme potansiyelleri incelenmiş ve elde edilen bulgulardan alternatif ilaç olarak kullanılabilirliği belirlenmeye çalışılmıştır. Enzim kaynağı olarak ticari Jack-Bean üreaz kullanılmıştır. Üreazın aktivite ve inhibisyon çalışmaları için optimum reaksiyon şartları tespit edilmiş ve kinetik çalışmalar yapılarak, organik moleküllerin inhibisyona sebep olduğu IC_{50} değerleri belirlenmiştir. Üreaz için inhibitör molekül varlığında inhibisyon türü, K_m , V_{maks} değerleri hesaplanarak belirlenmiş ve K_i değeri hesaplanmıştır. Çalışılan moleküller arasında G1 molekülünün en etkili inhibitör olduğu gözlenmiş, IC_{50} değeri $0,0109 \mu M$ olarak hesaplanmış ve inhibisyon türünde nonkompetitif olarak belirlenmiştir. Elde edilen grafiklerden yola çıkılarak K_i değeri $116,27 \mu M$ olarak hesaplanmıştır. Moleküler modelleme ve Docking çalışmaları için Autodock Vina 1.1.2 ve Discovery Studio 4.5 Client programları kullanılarak organik moleküllerle üreazın etkileşimleri ve bağlanma enerjileri incelenmiştir.

Moleküler modelleme çalışması sonuçlarına göre üreaz için G1 molekülü, bağlanma enerjisi en düşük olan dolayısıyla enzimle en güçlü etkileşim yapan molekül olarak belirlenmiştir. Elde edilen bulgulardan yola çıkıldığında, G1 molekülünün standart inhibitör olarak kullanılan tiyüreye kıyasla oldukça iyi bir inhibitör olduğu ve bu sebeple alternatif ilaç molekülü olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: 1,2,4- merkapto triazol, Üreaz, Enzim inhibisyonu, Moleküler modelleme

Master Thesis

SUMMARY

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF NEWLY SYNTHESIZED 1,2,4- MERKAPTO TRIAZOLE COMPOUNDS ON UREASE ACTIVITY AS IN VITRO AND IN SILICO

Gamze ZEHİR KIRKBİR

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Chemistry Graduate Program
Supervisor: Assoc. Dr. Yakup KOLCUOGLU
2018, 44 Pages

In this study, the inhibitory potentials of 1,2,4- merkapto triazole compounds with clinical and industrial importance on urease activity were investigated and from the acquired findings its attempted to determine usability as alternative drugs. The commercial Jack-Bean urease was used as the enzyme source. For optimum reaction conditions for activity and inhibition studies of urease enzyme were determined and kinetic studies were performed to determine the IC_{50} values of the inhibition which organic molecules cause. For the urease in the presence of inhibitor molecules, K_m - V_{maks} values were measured and specified and K_i values were calculated. Among the studied compounds, the most effective inhibitor of the G1 molecule was observed, the IC_{50} value for the G1 compound was estimated as 0.0109 μ M and the inhibition type was identified as noncompetitive. From the obtained graphs, the K_i value was calculated as 116.27 μ M. For molecular modeling and docking studies, urease interactions and binding energies with organic molecules were examined using Autodock Vina 1.1.2 and Discovery Studio 4.5 Client programs. According to the results of molecular modeling studies, G1 molecule for urease enzyme has the lowest binding energy therefore has the most strong interaction with the enzyme. Based on the findings in comparison to thiourea used as the standard inhibitor, G1 molecule is a quite decent inhibitor and for this reason, it is considered that might be an alternative drug molecule.

Key Words: Merkapto-1,2,4,-triazole, Urease, Enzyme inhibition, Molecular modelling

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Üreaz katalizli reaksiyon	2
Şekil 2. Üreaz katalizli reaksiyon mekanizması	4
Şekil 3. Üreaz enziminin üç boyutlu yapısı	5
Şekil 4. Nessler yöntemi reaksiyon mekanizması	6
Şekil 5. İndofenol oluşum mekanizması	6
Şekil 6. Çift enzim yöntemi reaksiyon mekanizması	7
Şekil 7. pH'ın enzim aktivitesi üzerine etkisi	23
Şekil 8. Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisi	24
Şekil 9. Enzim konsantrasyonunun aktivite üzerine etkisi	24
Şekil 10. Enzim substrat doygunluk grafiği	25
Şekil 11. Üreaz enzimi için Lineweaver-Burk grafiği	25
Şekil 12. Reaksiyon süresinin enzim aktivitesi üzerine etkisi	26
Şekil 13. G1 molekülünün üreaz aktivitesi üzerine etkisi	27
Şekil 14. G2 molekülünün üreaz aktivitesi üzerine etkisi	27
Şekil 15. G3 molekülünün üreaz aktivitesi üzerine etkisi	27
Şekil 16. G4 molekülünün üreaz aktivitesi üzerine etkisi	28
Şekil 17. G5 molekülünün üreaz aktivitesi üzerine etkisi	28
Şekil 18. G6 molekülünün üreaz aktivitesi üzerine etkisi	28
Şekil 19. G7 molekülünün üreaz aktivitesi üzerine etkisi	29
Şekil 20. G8 molekülünün üreaz aktivitesi üzerine etkisi	29
Şekil 21. G9 molekülünün üreaz aktivitesi üzerine etkisi	29
Şekil 22. G10 molekülünün üreaz aktivitesi üzerine etkisi	30
Şekil 23. G11 molekülünün üreaz aktivitesi üzerine etkisi	30
Şekil 24. Tiyoüre'nin üreaz aktivitesi üzerine etkisi	30
Şekil 25. G1 İnhibitör molekülünün Substrat doygunluk grafiği	31
Şekil 26. İnhibitör varlığında ve yokluğunda Lineweaver-Burk grafiği	31
Şekil 27. Üreaz enzimi ile G1 molekülünün etkileşimleri	33

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Kullanılan kimyasal madde ve malzemeler	15
Tablo 2. Çalışmada kullanılan cihazların listesi	15
Tablo 3. Çalışmada kullanılan inhibitör moleküller	19
Tablo 4. G1 bileşiği varlığında üreaz inhibisyon türünün belirlenmesi ve K_i değeri	32
Tablo 5. Üreaz varlığında çalışılan inhibitör moleküllerinin bağlanma enerjileri	32



KISALTMALAR VE SEMBOLLER DİZİNİ

DMSO: Dimetilsülfoksit

E.C : Enzim kod numarası

g : Gram

kcal : Kilokalori

K_i : Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti

K_m : Maksimum hızın yarısına neden olan substrat konsantrasyonu

M : Molar

mg : Miligram

mL : Mililitre

mM : Milimolar

μ L : Mikrolitre

μ M : Mikromolar

μ mol : Mikromol

N : Normalite

nm : Nanometre

NMR : Nükleer manyetik rezonans

rpm : Dakikadaki devir sayısı

S : Substrat

U : Ünite

V : Enzimatik reaksiyon hızı

V_{maks} : Maksimum hız

ΔG : Gibbs serbest enerjisi

IC_{50} : Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu

$^{\circ}C$: Celcius (sıcaklık birimi)

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Enzimler biyolojik katalizörler olup, katalizledikleri reaksiyonun aktivasyon enerjisini düşürerek reaksiyonun hızlandırılan polimerik yapılu bileşiklerdir (Cooper ve Hausman, 2006). Enzimler, midede etkin sindirilmesi ile ilgili çalışmalarla tanınmışlardır ve suda çözünebilirler. Nişastanın tükürük ile parçalanması ve James Sumner'in 1926 yılında ilk kez üreaz enzimini izole etmesi enzimler ile ilgili araştırmalara öncülük etmiştir (Balasubramnaian ve Ponnuraj, 2010).

Enzimler, mikroorganizma, hayvan ve bitkilerden elde edilirler. Enzim büyük bir kısmı, örneğin, selülozlar, amilazlar, proteazlar ve lipazlar gıda ve endüstri alanında büyük bir öneme sahiptir. Örneğin, invertaz enzimi gıda alanında reçel ve şekerleme üretiminde kullanılır (Kulshrestha, 2013).

Selüloz enziminin; domates, bakteri ve küf-maya gibi yerlerde bulunur. Selüloz enzimi, selülozun neden olduğu narenciye sularında bulanıklık gidermek için kullanılır ve ve biracılık sektöründe mayalama işleminde şekerlerin fermente edilebilmesinde kullanılır. Ayrıca yüksek lifli ekmeklerde, düşük ekmek hacmi ve ekmek içi dokusunun bozulması gibi sorunları gidermek için kullanılırlar (Yılmaz, 2015).

Laktaz enzimi, süt ürünlerinde laktoz miktarını ve gıda ürünlerinde tatlılığı azaltmak için kullanılır (URL-1, 2016).

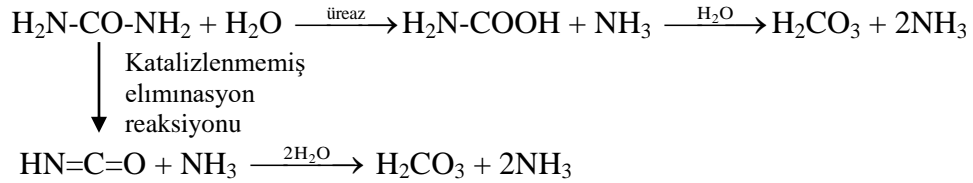
Endüstriyel boyutta önemli olan alfa-amilaz enzimi, nişastayı hidroliz etmek için ve gıda alanında maltoz, glukoz, ve diğer şeker şuruplarının üretimi için kullanılır. Amilazlar, unlu mamül üretimi, alkollü içki üretimi, bira üretimi, ve sirke fermantasyonunda kullanılırlar (Orhan, 2010).

Beta-glukanaz enzimi, üzüm şarabını berraklaştırmak, kahve üretiminde müsilağı (midede sindirilemeyen polisakkaritler) parçalamak ve kahve konsantresinin jelleşmesini önlemek amacıyla kullanılır (URL-2, 2015).

1.2. Üreaz Enzimi

Üreaz enzimi hidrolazlar sınıfından bir enzim olup, üreyi amonyak ve karbondioksit hidroliz eden nikel bağlı bir metalloenzimdir (Follmer vd., 2004). James B. Sumner 1926 yılında, birçok bilim adamının enzimleri kristalize etmenin imkansız olduğunu düşündüğü zamanlarda, Jackbean (*Canavalia ensiformis*) üreazını bir enzim olarak saflaştırmış ve kristalize etmiştir. Bu çalışma Sumner'a 1946'da kimya dalında Nobel ödülünü kazandırmıştır ve bu olay enzimoloji tarihinin önemli olaylarından biridir. Enzimin üç boyutlu yapısının analizi, X ışınları kristallografisi ile 1930'lu yıllarda bulunmasına rağmen, yapının aydınlatılması ancak bilgisayar teknolojisinin gelişmesiyle 1967 yılında mümkün olmuştur (Kara, 2006). Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği'nin 1961 yılında aldığı karar ve 1972 yılında yaptığı revizyonla enzimi Üre amidohidrolaz E.C. 3.5.1.5. olarak kodlamıştır.

Üreaz enzimi, ürenin amonyak ve karbondioksit parçalanmasını katalizler (Şekil 1). Bu tepkime katalizör olmadan gerçekleştiğinde üre hidrolizi yavaş gerçekleşir ve oluşan ürünler amonyak ve siyanürik asittir. Katalizörlü reaksiyonda ise oluşan ürünler amonyak ve karbonik asittir. Karbonik asitte kendiliğinden parçalanarak karbondioksit ve amonyağa dönüşür (Krajewska vd., 2001).



Şekil 1. Üreaz katalizli reaksiyon (Krajewska, 2009).

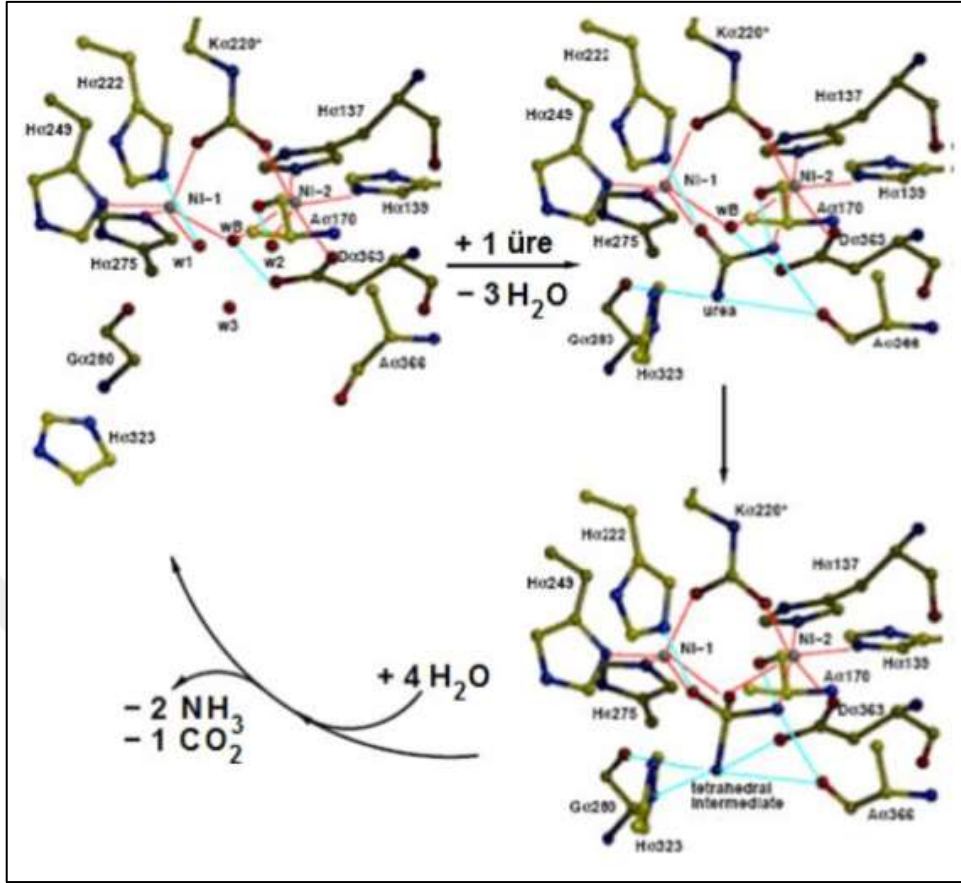
Üreaz enzimi bitkiler, bakteriler ve funguslarda bulunmaktadır (Sirko ve Brodzik, 2000). Bitkisel üreaz enzimleri azot metabolizmasında rol alarak, savunma proteini olarak görev yaparlar. Buna ilaveten bitkisel üreazlar, antifungal etkiye sahiptirler (Becker vd., 2007). Biyoteknolojik çalışmalarda da üreaz enzimi, kan ve üre tayininde biyosensör olarak, yapay böbrekte ürenin kandan uzaklaştırılmasında, gıda endüstrisinde üreyi meyve suyu ve alkollü yiyecek ve içeceklerden uzaklaştırma gibi çeşitli endüstriyel uygulamalara sahip olması açısından önemli bir yere sahiptir (Dindar vd., 2011; Ghasemi vd., 2004; Sujoy ve Aparna, 2013; Liu vd., 2012).

En yaygın üreaz içeren kaynaklar şunlardır;

1. *Klebsiella aerogenes*: Geviş getiren hayvanların sindirim sistemlerinde yaşayan ve içerdiği üreaz (KAU) sayesinde azot metabolizmasında önemli rol oynayan bir bakteridir (Stefano, 2000).
2. *Bacillus pasteurii*: Toprakta, pis sularla yaşar ve içerdiği üreaz (BPU) sayesinde bitkiler için toprağı azotça zenginleştirir (Stefano, 2000).
3. *Canavalia ensiformis* (Jack Bean): Bir fasulye türüdür ve bulunduğu bitkide topraktan azot emiliminin yeterli olmadığı durumlarda azot deposu olarak kullanılan argininin açığa çıkardığı üreyi içerdiği üreaz (JBU) sayesinde amonyağı çevirerek azot kaynağı olarak kullanılmasına yardım eder (Stefano, 2000).

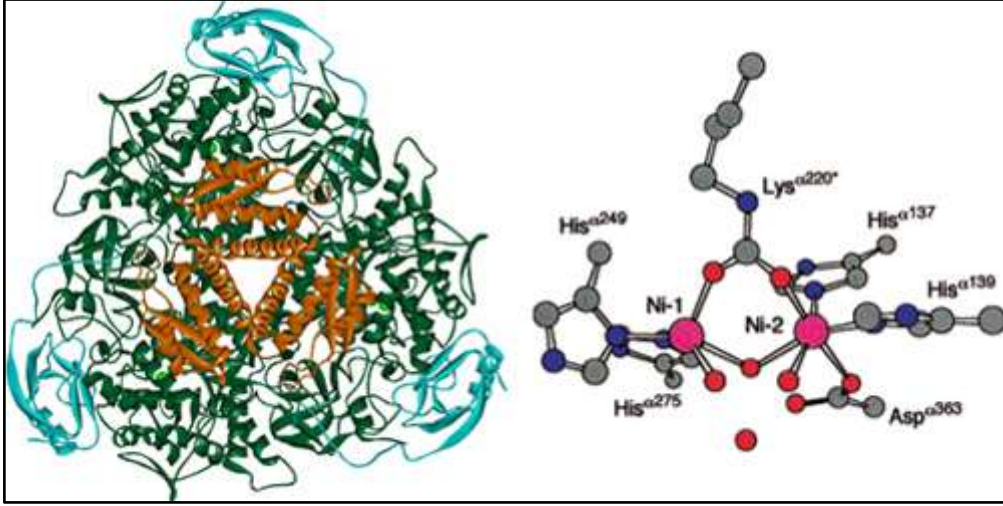
1.2.1. Üreaz Enziminin Moleküler Yapısı ve Tepkime Mekanizması

Canavalia ensiformis üreaz 1926 yılında Sumner tarafından saf enzim olarak elde edilmiş ve 50 yıl sonra, üreazın nikel içeren ilk enzim olduğu Dixon tarafından bildirilmiştir (Hefnawy vd., 2014). Enzimin aktif bölgesinde yer alan 2 nikel atomunun önemli rol oynadığı bildirilmiştir. Bu nikel atomlarından birincisi üreyi bağlayarak aktifleştirir, diğer nikel atomu ise su molekülüne nükleofilik olarak bağlanır (Ciurly vd., 1999; Dixon vd., 1980). Üreaz katiliz mekanizması olarak en yaygın kabul gören mekanizma Ciurly ve arkadaşları (1999) tarafından önerilen nikel iyonlarının dahil olduğu mekanizmadır. *K. aerogenes* ile yapılan bir araştırmada, aktif bölgedeki birinci nikel atomu karbonil oksijeni ile koordine olurken, ikincisi hidrolitik su ile etkileşir. Bunun sonucunda dört üre protonu enzimle hidrojen bağı oluşturur. Üç proton, oksijen atomlarına, dördüncü proton ise hidrojen akseptörü olarak sistein 319 birimine hidrojen bağı ile bağlanır. İkinci nikel atomunun OH tarafı üredeki karbonilin karbonuna saldırır ve tetrahedral dehidrate üre meydana gelir. Hidrate üre oluşumunda üre azotu, histidin 320 birimi ile etkileşir ve protonlanır. Bu 18 reaksiyon sonunda tetrahedral bir merkez meydana gelerek, amonyum iyonu ortamdan uzaklaşır ve bağı karbamat ise enzimden disosiyeye edilebilir hale gelir (Pearson vd., 1997), (Şekil 2).



Şekil 2. Üreaz katalizli reaksiyon mekanizması

Enzim α , β , γ olmak üzere üç alt birimden oluşan bir heteropolimerdir ve aktif merkezler α alt birimindedir. Üreaz enziminin üç boyutlu yapısı Şekil 3'de gösterilmektedir. Şekildeki yeşil, mavi ve turuncu kısımlar sırasıyla α , β , γ alt birimlerini göstermektedir (Krajewska, 2009).



Şekil 3. Üreaz enziminin üç boyutlu yapısı (Krajewska, 2009).

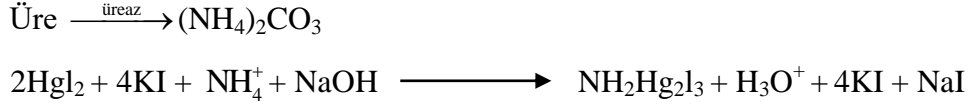
1.2.2. Üreaz Enziminin Substratı Olarak Üre

İnorganik bileşenlerden olan üre, Friedrich Wohler tarafından sentezlenmiştir ve karbonik asidin diamidi olan ilk organik bileşiktir. Formülü $\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{NH}_2$ 'dir. Üre böbrekler yoluyla idrar ile vücuttan uzaklaştırılır. Örneğin, insan idrarında günde yaklaşık 20 - 35 gr üre atılır. Üre, suda eriyebilme özelliğine sahip azotlu bir maddedir ve gübre olarak kullanılır. Üre, fizyolojik öneme sahip bir bileşiktir. Hücrede proteinlerin yıkılması sonucu oluşan amonyak, karaciğerde üre formuna dönüştürülür. Metabolizmada üre düzeyindeki artış böbrek fonksiyonlarındaki bir bozukluğun habercisidir. Bunun yansırı üre, aşırı su ve tuz alımında, kalp yetmezliğinde, fazla protein tüketiminde, bağırsak kanamalarında, yüksek ateş durumunda, yoğun stres anlarında ve kontrolsüz yapılan diyetlerde miktarı artmaktadır (Timothy vd., 2007). Üre, üreaz enziminin katalizli reaksiyonu ile NH_4^+ ve CO_2 'e parçalanır. Dünyada, üre en yaygın kullanılan azot gübresi olduğundan, enzimatik hidrolizi yoluyla üretilmesi tarımsal açıdan büyük öneme arz etmektedir (Follmer, 2008).

1.2.3. Üreaz Aktivite Tayin Yöntemleri

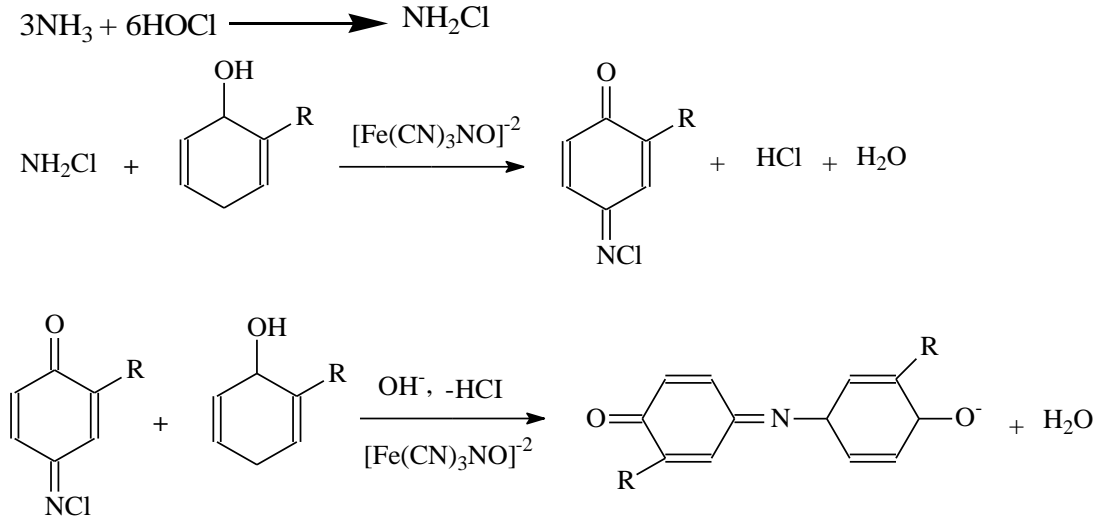
Nesslerizasyon: Bu yöntem 1856'da Julis Nessler tarafından uygulanmış olup günümüze kadar gelmiştir. Nessler reaktifi; sulu potasyum iyodür ve potasyum hidroksit içine civa iyodür'ün eklenmesiyle elde edilir ve çözeltilerdeki düşük miktarda amonyağın

tayini için kullanılan bir reaktiftir. Üreazın üre ile reaksiyonu sonucu oluşan amonyak nessler reaktifi ile sarı ile turuncu arasında renk oluşturur ve bu renk spektrofotometrik olarak 425 nm dalga boyunda tayin edilir (Sharma vd., 2009), (Şekil 4).



Şekil 4. Nessler yöntemi reaksiyon mekanizması

Berthelot Yöntemi: Berthelot reaktifi fenol ve hipoklorit'in alkali çözeltisidir. İlk kez öneren Marcellin Berthelot olduğu için bu isimle anılır. Amonyak tayini için kullanılır ve amonyak ile kolorimetrik tayine izin verecek şekilde mavi renk oluşturur. Ürenin hidroliz edilmesiyle oluşan amonyak, sodyum hipokloritli ortamda ve sodyum nitroprussid katalizörü eşliğinde fenol ile reaksiyona girerek mavi renkli indofenolü oluşturur ve rengin şiddeti üre miktarıyla doğru orantılı olarak değişir. Renk değişimi spektrofotometrik olarak ölçülür (Patton ve Crouch, 1977), (Şekil 5).

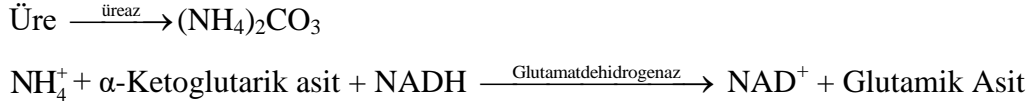


R=H or COO-

Şekil 5. İndofenol oluşum mekanizması

Çift Enzim Yöntemi: Hastalık teşhisi için yapılan tetkiklerde en çok kullanılan spektrofotometrik yöntem çift enzim yöntemidir. Bir enzimatik tayinde substrat veya ürün

ölçülebilir bir özelliğe sahip değilse ikinci bir enzim kullanılarak ölçülebilir bir büyüklük edilmeye çalışılır. Aşağıdaki tepkimelerde birinci enzim olan üreazın ürünü amonyak ve karbondioksit olup spektrofotometrik olarak ölçülemez. Takip eden ikinci enzimatik reaksiyonda glutamat dehidrogenaz enzimi NADH'ı koenzim olarak kullanır. Reaksiyon 340 nm'de takip edilerek tayin yapılır (Şekil 6).



Şekil 6. Çift enzim yöntemi reaksiyon mekanizması

1.2.4. Üreaz Enziminin Kullanım Alanları

Helicobacter pylori, mide ülserlerinden sorumlu bir bakteri türüdür ve üreaz üretir. *H. pylori*, çoğalması için mide pH'sını, 3,0'dan 7,0'a üreaz sayesinde dönüştürür. *H. pylori* için olan ticari kitler, nefeste üreaz varlığını gösterirler ve mide ülserinin tanısının konulmasında kullanılırlar (Marchetti vd., 1995).

Üreaz metabolik sıvılarda üre miktarının belirlenmesinde hastalık teşhis edici kitlerde kullanılmaktadır. Ayrıca, kan örneklerinin içerdiği üre miktarının belirlenmesinde, üreaz içeren biyosensörlerden yararlanılmaktadır (Dindar vd., 2011).

Atık sulardaki ürenin temizlenmesinde, atık sulardan ürenin uzaklaştırılması için uygulanan biyolojik arıtma sistemlerinde üreaz içeren makroorganizmalar kullanılır. Yiyecek endüstrisinde üreyi meyve suyu ve yiyeceklerden uzaklaştırmakta kullanılır. Gıda üretimlerinde herhangi bir nedenle oluşan üreyi uzaklaştırmak için üreaz kullanılır (Rajesh vd., 2005).

1.3. Enzim İnhibisyonu

Enzim inhibisyonu genel tanımı ile enzimatik bir reaksiyon hızının inhibitör adı verilen bazı maddeler tarafından azaltılması ya da tamamen durdurulması olayıdır. İlaç olarak kullanılan inhibitörler göz önüne, kanser ilaçları genellikle hücre bölünmesi için gerekli reaksiyonları katalizleyen enzimlerin inhibitörleridir. Aspirin, siklooksijenaz (COX) enzimi inhibitörüdür ve böylece ağrıyla ilgili süreçlerin reaksiyonlarını durdurur.

Bir çok zehir (tarım ilacı ve ağır metaller) enzimleri inhibe ettikleri için ölümcüldürler (Kuzucu, 2011; Keha ve Küfrevioğlu, 2010). Enzimlerin inhibisyonu dönüşümsüz ve dönüşümlü inhibisyon olarak başlıca iki grupta incelenir. Dönüşümsüz inhibisyon türünde enzimin bir ya da daha fazla fonksiyonel grubu etkilenir. İnhibitör molekülü, enzimin aktif bölgesine ya da aktif bölgeye yakın bir yere kovalent olarak bağlanır ve enzim-inhibitör kompleksini oluşturur. V_{maks} (enzimatik reaksiyonda ulaşılabilecek maksimum hız) azalır, K_m (enzimin substrata ilgisini gösteren sabit) değişmeden kalır. Dönüşümlü inhibisyon türünde enzim ile inhibitör molekülünün etkileşmesi, bir denge reaksiyonu şeklindedir ve inhibitör madde ortamdan uzaklaştırıldığında, enzim aktivitesini yeniden kazanır. Dönüşümlü inhibisyon üç grupta incelenir:

1. Yarışmalı (kompetitif) inhibisyon, inhibitör molekülü serbest enzime aktif bölgede bağlanır ve yapısal olarak substrata benzemesinden dolayı enzime bağlanma konusunda substratla yarışır. V_{maks} değeri değişmez, K_m değeri artar.
2. Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyon; inhibitör molekül, serbest enzime ya da enzim-substrat kompleksine bağlanabilir. Bir yarışma söz konusu değildir. V_{maks} değeri azalır, K_m değeri değişmez.
3. Yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyon, inhibitör molekülü sadece enzim-substrat kompleksine bağlanır. V_{maks} ve K_m değerleri azalır.

Bir inhibitör etkisinin ölçülmesi için kullanılan en yaygın iki değer IC_{50} ve K_i 'dir. IC_{50} değeri maksimum inhibisyonun yarısını sağlayan veya enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonudur ve bir seri deneysel yol ile belirlenmektedir. Elde edilen deneysel sonuçlar ile x ekseninde inhibitör konsantrasyonunun logaritması ve y ekseninde % Bağlı aktivite olacak şekilde grafik çizilir. IC_{50} değeri bulunur ve IC_{50} değerinin düşük olması etkili bir inhibisyon olduğunu gösterir (Copeland, 2005).

1.3.1. Enzim İnhibisyonunun Klinik Çalışmalardaki Önemi

Bir enzimin aktivitesini inhibe etmek, bir patojeni öldürebilir ya da bir metabolik dengesizliği düzeltebilir ve çoğu ilaç da aslında birer enzim inhibitörüdür. Bazı hastalıkların nedeni de, bir enzimin işlevini yerine getirmemesi olabilir ve bir hastalık enzim inhibisyonu üzerinden tedavi edilebilir. Asetilkolin esterazların organik fosfatlı olan formları ve MAO (Monoamin Oksidaz) inhibitörlerinin çoğu ilgili enzimleri tersinemez olarak inhibe ederler (Shi vd., 2010). Örneğin; sinir gazlarından diizopropil fosforidat,

asetil kolin isimli nörotransmittörü parçalayan asetilkolin esterazın tersinmez inhibitörüdür (Abdelhafez vd., 2013).

Hayat için enzimlerin ve aktivitelerinin son derece gerekli olmasının yanında enfekte edici organizmalardaki (virüsler, bakteriler) kritik enzimlerin seçimli inhibisyonu da bulaşıcı hastalıklara kemoterapik müdahalede son derece önemlidir. Seçimli enzim inhibisyonu stratejisi günümüzde modern eczacılıkta ilgi görmekte ve antiviral, antibiyotik ve antiparazitik ilaçların önemli bir kısmının etkinliklerini bu şekilde gösterdiği bilinmektedir. Buna ilave olarak regüle edilemeyen enzim aktivitesi hastalık haline öncülük edebilmektedir. Örneğin, bazı durumlarda enzimleri kodlayan genlerdeki mutasyonlar, enzimin hücre içerisinde aşırı derecede üretilmesine neden olabilmekte veya bazı nokta mutasyon durumlarında da enzimdeki yapısal değişmelerden dolayı enzimin katalitik etkinliği artabilmektedir. Bu her iki durum da anormal düzeylerde reaksiyon ürünlerinin oluşumuyla sonuçlanır ki bu da spesifik patolojilere neden olabilmektedir. Bu nedenle enzimler, patofizyolojideki ve hayat sürecindeki önemli rollerinden dolayı, ilaç terapilerinde ilgi çekici hedef olmuşlardır. Yapılan bazı araştırmalar sonucunda, klinik olarak kullanılan tüm ticari molekül ilaçların neredeyse %50'si, terapötik etkisini enzim inhibisyonu ile ortaya koyduğu belirlenmiştir (Hopkins ve Groom, 2002; Copeland, 2005).

1.3.2. Üreaz Enziminin Klinik Önemi ve İnhibisyon Çalışmaları

İnsan ve hayvan metabolizmasında hastalığa neden olan patojenlerin tedavisinde kullanılacak olan ilaçların geliştirilebilmesi için üreaz enziminin inhibitör çalışmaları oldukça önemlidir (Dinç, 2009).

Ürenin, üreaz tarafından parçalanması sonucu açığa çıkan amonyak mide asidini nötral pH'ya kaydırarak *Helicobacter pylori*'nin kolonizasyonuna yardımcı olur (Dunn vd., 1990). İnsan ve hayvanlarda ise üreaz idrar ve gastro intestinal yolların enfeksiyonlarında, idrar yolu taşlarının oluşumuna neden olan enfeksiyonlarda viral faktör olarak kendini göstermektedir (Burne ve Chen, 2000).

Üreaz enzimi, düşük pH'de bakteriye midede yaşama olanağı sağlayarak kansere yol açabilecek gastrit ve peptik ülser patojenezinde rol oynar (Mobley vd., 1995).

Ülser, mide veya duodenumun (onikiparmak barsağı) mide asidi ve sindirim sıvıları tarafından harabiyeti sonucunda meydana gelen doku kaybıdır (Covanci vd., 1999). Üreaz enzimi, üreyi karbondioksit ve amonyağa parçaladığında mide mukozasında bulunan

konağın direnç mekanizmalarını ortadan kaldırarak yani bazik bir ortam oluşturarak, mide ülserine neden olan *Helicobacter pylori* bakterisini, midenin asidik yapısından korur. Ancak bu bazik ortam negatif feed-back etkiyi ortadan kaldırarak, G hücrelerinden gastrin salınımını uyarır ve artan asit miktarı ile gastrit oluşumuna katkıda bulunur ya da direkt ve immünolojik yollar ile hasar oluşturur (Arı, 2006). *Helicobacter pylori* pek çok mikroorganizmanın barınmadığı mide ortamında yaşamını sürdürebilen bir bakteridir. Yalnızca gastrik tipte epitelyal hücrelere kolonize olurlar. Duedenal ülserlerde *Helicobacter pylori*'nin varlığı %100'e yakın oranla yüksek bulunmuştur (Kara, 2006). *Helicobacter pylori*'nin hastalık oluşturması üreaz inhibisyonu yoluyla kontrol edilebilir (Stingl ve Reuse, 2005). Önceki zamanlarda, yeni tedavi arayışında odağın sentetikten doğal ürünlere kayması, doğal ürünlerin çok az veya hiç toksik etki göstermemesi, iyi aktivite göstermesi ve yararlı olması avantajlarından dolayı doğal kaynaklardan yeni üreaz inhibitörleri için keşif başlatmıştır (Kreybig vd., 1968).

Matongo ve Nwodo (2014) yaptıkları çalışmaya göre; saflaştırılmış *Helicobacter pylori* üreazı inhibisyonunda kontrol grubu olarak Jack bean üreaz kullanılmış manuka balının polifenoller de dahil olmak üzere doğal kaynaklardan gelen biyoaktif moleküllerin *Helicobacter pylori* üreazına karşı inhibe edici aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Polifenoller arasında *Helicobacter pylori* üreazının tersinir inhibitörü olarak resveratrol gösterilmiştir. Bal, içerisinde dönüşümlü inhibitörleri daha fazla bulundururken, dönüşümsüz inhibitörleri dönüşümlü inhibitörlere göre daha az bulundurur. Sonuç olarak, bal ekstraktları balın coğrafi kökenine bağlı olarak *Helicobacter pylori* üreaz faaliyetlerini engellenmesi yönünde iyi bir potansiyele sahiptir.

1.3.3. Literatürde Üreazla İlgili Yapılan Bazı Çalışmalar

Üreaz aktivitesinin azaltılması yönündeki çalışmaların bir gereklilik olduğuna literatürde bildirilmektedir. Bu nedenle son yıllarda üreazın inhibisyonuna yönelik birçok küçük molekül kütleli organik molekül, bilgisayar programları yardımıyla dizayn edilmiş, sentezlenmiş, üreaz aktivitesi açısından inhibitör etkinlikleri değerlendirilmiş ve hatta patentleri alınmıştır (Amtul vd., 2004). Bu maksatla, Khan ve arkadaşları (2010) bazı yeni 1,2,4-triazol ve 1,3,4-tiyadiazol bileşiklerini sentezleyerek söz konusu bileşiklerini üreaz inhibisyonu açısından ele almışlardır. Ayrıca, Amtul ve arkadaşları (2004) üreaz enzimi için yarışmalı bazı yeni inhibitör moleküllerini tasarlamış, sentezlemiş ve enzimin

inhibisyonu açısından (enzim kinetiği çalışmalarıyla) sentezledikleri molekülleri irdelemiştir. Bunlara ek olarak fenilfosfosfodiamit (PPD), asetohidroksamik asit (AHA) borik asit ve florürün bakteri ve bitki üreazları inhibisyonu üzerine kinetik parametreleri hesaplanmış ve inhibisyon türlerinin, PPD, AHA ve borik asit için kompetitif, florür için ise unkompetitif olduğu rapor edilmiştir (Krajewska ve Zaborska, 2007). *Viola betonicifolia*'dan yeni bir bileşik olarak 3-metoksidalbergion elde edilmiş ve bu bileşiğin üreaz aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi incelenmiştir. Kinetik çalışmaları yapılarak üreaz enzimi üzerinde kompetitif inhibisyon yaptığı görülmüştür. Üreazın sebep olduğu hastalıklarla mücadelede kullanmak için ilaç yapımında kullanılabileceği düşünülmüştür (Muhammad vd., 2014). Oksovanadyum (IV) kompleksleri ile aroilhidrazin ligandları sentezlenmiş ve sırasıyla aktif bölgelerinde nikel içeren *C. ensiformis* (soya fasülyesi) ve *B. pasteurii* üreazları ile vanadyum (IV)-aroilhidrazin türevlerinin inhibisyon mekanizmaları oluşturulmuştur. Bütün bileşikler için kinetik parametreler hesaplanmıştır. *C. ensiformis* üreazı için -R grupları 4-nitrobenzoilhidrazin, izonikotinoilhidrazin, 2-klorürbenzoilhidrazin, 3-klorürbenzoilhidrazin, 4-klorürbenzoilhidrazin ve 2-metoksibenzoilhidrazin olan vanadyum (IV)-aroilhidrazin kompleksleri kompetitif inhibisyon gösterirken, benzoilhidrazin, 2-nitrobenzoilhidrazin, 3-nikotinoilhidrazin, 4-metoksibenzoilhidrazin komplekslerinin nonkompetitif inhibisyon gösterdikleri rapor edilmiştir. *B. pasteurii* üreazı için -R grupları sırasıyla; benzoilhidrazin, 3-klorürbenzoilhidrazin ve 2-metoksibenzoilhidrazin olan vanadyum (IV)-aroilhidrazin komplekslerinin kompetitif inhibisyon, fakat 4-metoksibenzoilhidrazin nonkompetitif inhibisyon ve 2-nitrobenzoilhidrazin, 3-nikotinoilhidrazin, 4-izonikotinoilhidrazin, 2-klorürbenzoilhidrazin, 4-klorürbenzoilhidrazin kompleks bileşiklerinin ise unkompetitif inhibisyona neden olduğu belirlenmiştir (Lodhi vd., 2015). Bir başka çalışmada ise, 1,2,4-triazolkarboksilik asit türevi olan ve Cu, Zn ve Fe metallerini içeren yeni bileşikler sentezlenmiş ve tek kristal X-ışını diferansiyel analizine göre karakterize edilmiştir.

Daha sonra *in vitro* ortamda bu moleküllerin (Jack Bean)soya fasülyesi üreazına karşı inhibitör aktiviteleri test edilmiştir. Sentezlenen bileşiklerden iki tanesinin Cu^{2+} kompleksleri, üreaz inhibitörü olarak literatüre geçmiş olan asetohidroksamik asitten daha iyi inhibitör aktivitesi göstermişken Zn^{2+} ve Fe^{2+} komplekslerinde inhibitör davranışı gözlenmemiştir. Enzim inhibisyon mekanizması için kinetik çalışmalar yürütülmüş olup bakır içeren komplekslerin karışık-kompetitif inhibitör mekanizması gösterdiği bulunmuştur (Xu vd., 2015).

1.4. Çalışmanın Amacı ve Önemi

Küçük organik moleküllerle sağlanan enzim inhibisyonu ve bu konuda yapılan araştırmalar, patojenik organizmaların neden olduğu bulaşıcı hastalıklara kemoterapik müdahalenin sağlanabilmesi amacıyla aşırı düzeylerde metabolit oluşumuyla sonuçlanan ve bu nedenle çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilebilen yüksek enzim etkinliğinin önlenmesi için klinik ve farmasötik anlamda önem arz etmektedir (Copeland, 2000; Copeland, 2005).

Biyolojik makromoleküller arasında enzimler, ilaç moleküllerinin hedefi olarak lider pozisyonda bulunmaktadır. Bu durum enzimlerin, bazı hastalık süreçlerinde etkinliklerinin gözlenmesinden kaynaklandığı gibi enzim katalizinin yapısal dinamikleri nedeniyle enzimlerin küçük molekül kütleli ilaç molekülleriyle inhibe olabilmelerinden kaynaklanmaktadır (Copeland, 2005).

Buna ilave olarak, ilaç olabilecek küçük organik moleküllerin hedefleri, yapısal olarak molekülle komplementer olan spesifik bağlanma cepleri/bölgeleri içermek zorundadır. Hatta ilaç molekülünün bağlanacağı bu bölge hedef molekülün biyolojik aktivitesi açısından kritik önemi olan bir bölge olmalıdır ve ilaçla söz konusu bölgenin etkileşimine bağlı olarak hedef molekülün biyolojik aktivitesi azalmalıdır. Bu nedenle de ilaç moleküllerinin etkileşeceği hedef moleküllerin başında enzimler gelmektedir ki enzimlerin üç boyutlu yapılarında sahip oldukları aktif bölgeleri ya da regülatör allosterik bağlanma bölgeleri (enzimin hacmine göre küçük hacimlidir ve biyolojik fonksiyon için kritik olan ve hidrojen bağı ya da diğer elektrostatik etkileşimleri yapabilecek spesifik olarak yönlendirilmiş atom ya da grupları içeren oldukça hidrofobik bağlanma cebi içerirler) bu iş için en uygun bağlanma bölgeleridir. Bu nedenle, günümüzde klinik olarak kullanılan ilaçların yaklaşık yarısının enzim inhibitörü olması hiç şaşırtıcı değildir. Bu da yakın gelecek için farmasötik araştırmaların ana odak noktasının spesifik enzim inhibisyonu olarak kalmasının hayati bir zorunluluk olacağını göstermektedir (Copeland, 2005). Bu nedenle yeni ilaç moleküllerinin belirlenebilmesi yukarıda bahsi geçen kriterleri yapısında bulunduran yeni küçük molekül kütleli organik bileşiğin sentezini ve bunların ilaç olarak etkinliklerinin incelenmesini zorunlu kılmaktadır.

Bugün birçok ilaç şirketi Ar-Ge laboratuvarlarında ve akademik düzeyde araştırma yapan laboratuvarlarda geniş bir bileşik kütüphanesi oluşturulmakta ve bu bileşiklerin enzim ile etkileşimleri *in vitro* olarak incelenmektedir. Yapılan çalışmalar neticesinde

görülmüştür ki ilaçların çoğu hedef enzimle dönüşümlü olarak etkileşmektedir. İnhibitör, serbest enzime bağlanabileceği gibi enzimsubstrat kompleksine veya her ikisine de bağlanabilir, ilaç etkileşiminin kantitatif büyüklüğünü ortaya koymanın en iyi yolu denge ayrışma sabitinin (K_i) ve bağlanmaya ait Gibbs serbest enerjisinin bilinmesidir (Copeland, 2005).

Bu çalışma kapsamında Yeni sentezlenmiş 1,2,4- merkaptotriazol bileşiklerinin klinik ve endüstriyel öneme sahip üreaz için inhibisyon potansiyellerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Enzimin ve organik moleküllerin üç boyutlu yapılarını ortaya koyan yöntemlerle birlikte bu organik moleküllerin bağlanma bölgelerine uygunluğunu tespit etmede kullanılan modelleme yöntemlerinin kombine kullanılması yeni ilaç moleküllerinin tasarlanması veya sentezlenmiş moleküllerinin ilaç potansiyellerinin ortaya konulması açısından son derece önemlidir. Bu teorik aşamalarla birlikte söz konusu organik moleküllerin hedef enzimlerin inhibisyonu üzerine etkisinin biyokimyasal açıdan incelenmesi bu tür çalışmaları arzu edilen sonuca ulaştırmaktadır. Böylelikle bazı yeni organik moleküller henüz ele alınmadığı boyutuyla incelenerek alternatif ilaç molekülleri olarak farmasötik kimya ve endüstrinin değişik alanlarında kullanılmak üzere biyoteknoloji pazarına sunulmasının yolu açılacaktır.

Bütün bu hususlar dikkate alındığında çalışmadaki temel amaçlar aşağıdaki şekilde sıralanabilir:

1. Ticari olarak satın alınan üreazın biyokimyasal karakterizasyonu yapılarak optimum çalışma şartlarının (pH, sıcaklık, enzim konsantrasyonu, substrat konsantrasyonu) tespit edilmesi ve enzime ait kinetik büyüklüklerin (V_{maks} , K_m) belirlenmesi,
2. Bu şartlar altında incelenen organik moleküllerin reaksiyon karışımındaki varlığı, deneysel kinetik çalışmalar tekrarlanarak organik moleküllerin herhangi bir inhibisyona sebep olup olmadığının belirlenmesi ve eğer bir inhibisyon söz konusu ise incelenen moleküller için IC_{50} ve K_i değerlerinin belirlenmesi,
3. İnhibisyona uğrayan üreaz enziminin en etkili inhibitör molekülü mevcudiyetinde ne tür bir inhibisyona uğradığının belirlenmesi,
4. Çalışmada kullanılan organik moleküllerin, moleküler modelleme çalışmalarıyla, üreaz enzimine ne derece bağlanabileceğinin, enerji hesaplamalarıyla ortaya konulması ve böylece deneysel çalışmalarla teorik çalışmaların birlikte değerlendirilmesi,

5. Efektif derecede inhibisyona neden olan organik moleküllerin alternatif ilaç molekülleri olarak farmasötik kimya ve endüstrinin değişik alanlarında kullanılmak üzere biyoteknoloji pazarına kazandırılması.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Kullanılan Kimyasal Madde ve Malzemeler

Çalışmada kullanılan kimyasal madde ve malzemeler Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. Kullanılan kimyasal madde ve malzemeler

Kimyasal Madde/Malzemeler	Marka
Üreaz (Jack Bean)	Sigma
Üre	Sigma
Tiyoüre	Sigma
Etanol	Sigma-Aldrich, Merck
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Sigma, Merck
Glisin	Sigma, AppliChem
Sodyum hidroksit (NaOH)	Merck, Sigma
Di-potasyum hidrojen fosfat	Applichem, Sigma
Potasyum di-hidrojen fosfat	Applichem, Sigma
Fenol	Sigma,Merck
Sodyum nitroprussid	Sigma
Sodyum hipoklorit çözeltisi	Sigma

2.2. Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazların listesi Tablo 2’te verilmiştir.

Tablo 2. Çalışmada kullanılan cihazların listesi

Cihaz İsmi	Marka
Saf Su Cihazı	Sartorius
Spektrofotometre	Perkin Elmer
pH Metre	Thermo Scientific
Hava Banyolu Çalkalayıcı	InoLab
Su Banyosu	IKA
Vorteks	Memmert
Otoklav Cihazı	Thermolyne,InoLab
Terazi	Tomy
Buz Makinesi	Ohaus
Buzdolabı	Hoshizaki
Magnetik Karıştırıcı	Profilo,Arcelik
Otomatik Pipetler	IKA
Cam malzemeler	Socorex
Derin Dondurucu	Isolab
	Regal

2.3. Kullanılan Tampon ve Diğer Çözeltiler

2.3.1. Tampon Çözeltiler

- 50 mM Asetat Tamponu (pH 5,0): 0,6804 g NaAc.3H₂O uygun hacimde saf suda çözüldü. 1 M HCl ile pH 5,0'a ayarlandı ve hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- 50 mM Asetat Tamponu (pH 6,0): 0,6409 g KH₂PO₄ ve 0,0505 g K₂HPO₄ uygun hacimde saf suda çözüldü. 1 M NaOH ile pH 6,0'a ayarlandı ve hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- 50 mM Fosfat Tamponu (pH 6,5): 0,14 g KH₂PO₄ ve 0,57 g K₂HPO₄ uygun hacimde saf suda çözüldü. 1 M NaOH ile pH'sı 6,5'a ayarlandı ve hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- 50 mM Fosfat Tamponu (pH 7,0): 0,4180 g KH₂PO₄ ve 0,3300 g K₂HPO₄ uygun hacimde saf suda çözüldü. 1 M NaOH ile pH'sı 7,0'a ayarlandı ve hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- 50 mM Fosfat Tamponu (pH 7,5): 0,45 g KH₂PO₄ ve 0,29 g K₂HPO₄ uygun hacimde saf suda çözüldü. 1 M NaOH ile pH'sı 7,5'a ayarlandı ve hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- 50 mM Glisin-NaOH Tamponu (pH 8,0): 0,187g glisin uygun hacimde saf suda çözüldü. 1 M NaOH ile pH 8,0'a ayarlandı ve hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- 50 mM Glisin-NaOH Tamponu (pH 9,0): 0,3799g glisin uygun hacimde saf suda çözüldü. 1 M NaOH ile pH 9,0'a ayarlandı ve hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

2.3.2. Substrat ve Enzim Aktivitesi Tayin Çözeltileri

- Fenol Reaktifi: 1 g fenol ve 50 mg sodyum nitroprusside saf suyla hacim 100 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan fenol reaktifi şişesi alüminyum folyo ile sarılarak, taze kullanılmak üzere buzdolabında saklandı.
- Alkali Reaktifi: 0,5 g NaOH ve 840µL (%5'lik) saf su ile hacim 100 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan fenol reaktifi şişesi alüminyum folyo ile sarılarak, taze kullanılmak üzere buzdolabında saklandı.

- Üre Çözeltisi: 0,067 g üre tartılarak 50 mM pH 7,5 fosfat tamponunda ısıtılarak çözüldü ve hacmi 10 mL'ye tamamlandı.
- Üreaz Çözeltisi: 9 mg üreaz tartılarak, 1 mL 50 mM pH 7,5 fosfat tamponunda çözüldü.
- Tiyüre Çözeltisi: 0,15 g tiyüre tartılarak, 50 mM pH 7,5 fosfat tamponunda çözüldü ve hacmi 10 mL'ye tamamlandı.
- İnhibitör Çözeltisi: Deneyde kullanılacak 11 tane inhibitör molekül konsantrasyonları 10^{-3} M olacak şekilde etanol içinde çözümlenerek hazırlandı ve gerekli seyreltme işlemleri yapılarak inhibisyon çalışmalarında kullanıldı.

2.4. Aktivitenin Optimizasyonu ve İnhibisyon Çalışmaları

2.4.1. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Üreaz aktivitesi, Weatherburn-Berthelot yöntemi kullanılarak, açığa çıkan amonyak miktarının belirlenmesiyle tayin edildi (Weatherburn, 1967; Fawcett vd,1960). 40 µL üreaz çözeltisi üzerine 4 µL üre çözeltisi ve 1 µL tampon çözeltisi ilave edilerek reaksiyon karışımı hava banyolu çalkalayıcıda 35 °C'de 120 rpm'de 20 dakika inkübe edildi. Daha sonra bu karışıma 750 µL fenol reaktifi eklendi ve hızlıca vorteks yapıldı. Üzerine 750 µL alkali reaktifi ilave edilerek hemen vortekslendi. Karışım hava banyolu çalkalayıcıda 35 °C'de 120 rpm'de 20 dakika inkübe edildikten sonra karışım spektrofotometrede 625 nm'de köre karşı absorbans okundu. Açığa çıkan amonyak miktarı önceden hazırlanmış olan kalibrasyon grafiği yardımıyla belirlendi. Bir ünite enzim aktivitesi reaksiyonda 1 dakikada açığa çıkan 1 µmol amonyak miktarı olarak hesaplandı. (Amtul vd., 2004; Weatherburn, 1967).

2.4.2. Enzim Aktivitesine pH'nın Etkisi

Üreaz enziminin optimum pH değerinin belirlenebilmesi amacıyla farklı pH değerlerinde tamponlar kullanılarak aktivite tayinleri yapıldı. Çalışmada 50 mM asetat tamponu pH 5,0-6,0, 50 mM fosfat tamponu pH 6,0- 7,0 ve 50 mM Glisin-NaOH tamponu

pH 8,0-9,0 değerlerinde hazırlanan tamponlar kullanıldı.Elde edilen sonuçlarla pH'ya karşı % Bağıl Aktivite grafikleri çizildi ve optimum pH değeri bulundu.

2.4.3. Enzim Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi

Üreaz enziminin optimum sıcaklık değerinin belirlenebilmesi için tampon ve substrat çözeltisi karışımları, belirlenen optimum pH değerinde ve 20-55°C sıcaklık aralığında 15 dakika inkübe edilerek enzim aktivite tayinleri yapıldı. Elde edilen sonuçlar kullanılarak sıcaklık değerlerine karşı % Bağıl Aktivite grafikleri çizildi ve optimum sıcaklık değeri bulundu.

2.4.4. Enzim Konsantrasyonunun Aktivite Üzerine Etkisi

Üreaz enziminin, karakterizasyon ve inhibisyon çalışmalarında reaksiyon ortamında bulunması gereken miktarını belirlemek için, sabit substrat konsantrasyonunda optimum sıcaklık ve optimum pH değerlerinde nihai enzim konsantrasyonu 0,05-8 mg/mL aralığında olacak şekilde bir seri aktivite tayini yapıldı. Elde edilen enzim aktiviteleri ($U(\mu\text{mol/dk})$) enzim konsantrasyonlarına karşı grafiği geçirildi.

2.4.5. Substrat Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Substrat konsantrasyonunun enzim aktivitesini nasıl etkilediğini belirlemek için, optimum enzim konsantrasyonu, optimum sıcaklık ve optimum pH'da, nihai substrat konsantrasyonları 0,0625-8 mM aralığında olacak şekilde bir seri aktivite tayini yapıldı. Elde edilen sonuçlara göre hız değerleri hesaplandı ve Lineweaver-Burk grafiği çizilerek K_m ve V_{maks} değerleri belirlendi (Lineweaver-Burk, 1934).

2.4.6. Reaksiyon Süresinin Aktivite Üzerine Etkisi

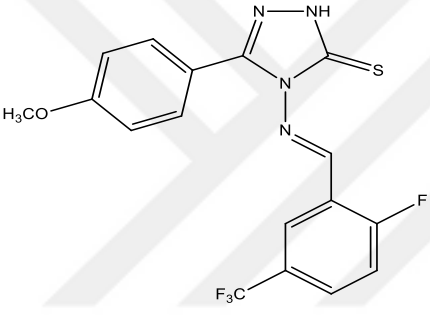
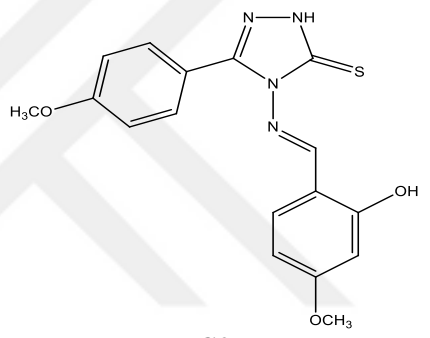
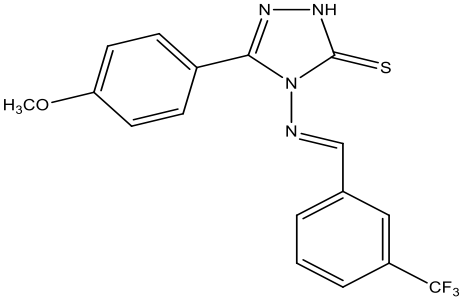
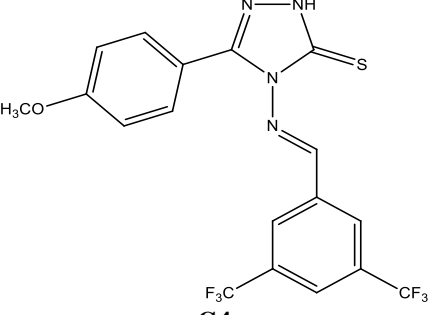
Üreaz enziminin optimum reaksiyon süresinin belirlenebilmesi için önceden belirlenmiş olan optimum enzim, substrat, pH ve sıcaklık değerlerinde 5-35 dakika

aralığında bir seri aktivite tayini yapıldı. Elde edilen sonuçlar kullanılarak reaksiyon süresine karşı % Bağıl Aktivite grafikleri çizildi ve optimum reaksiyon süresi bulundu.

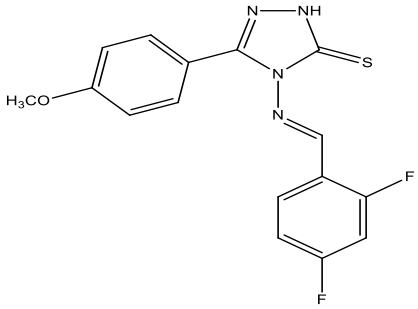
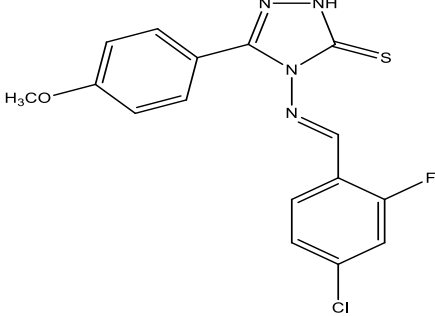
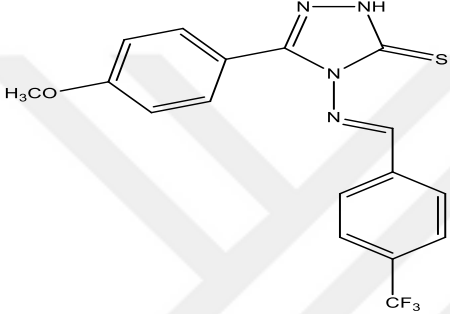
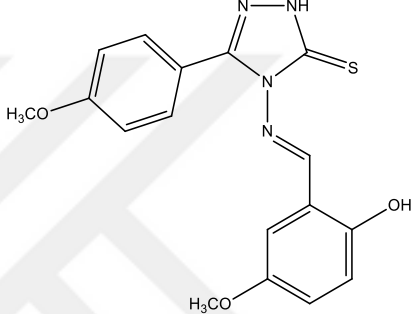
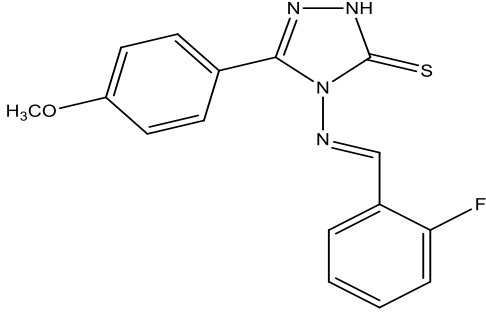
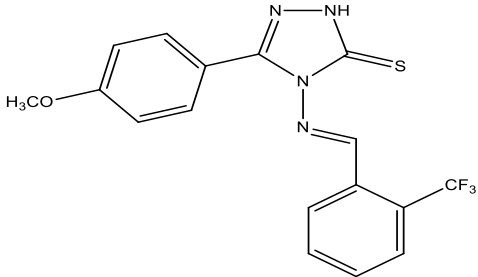
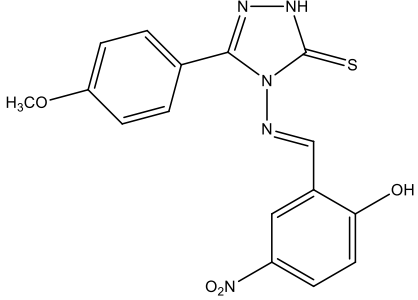
2.4.7. Organik Moleküllerin Üreaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Üreaz enzimi için yapılan çalışmalarda belirtildiği şekilde aktivitenin optimizasyonu sağlandı ve Tablo 3'te verilen organik inhibitör moleküllerin üreaz enzimini inhibe etme potansiyelleri incelendi.

Tablo 3. Çalışmada kullanılan inhibitör moleküller

 <p style="text-align: center;">G1</p>	 <p style="text-align: center;">G2</p>
<p style="text-align: center;">5-(4-metoksifenil)-4-[(2-floro-5-triflorometilbenziliden)amino]-4H-1,2,4-triazol-3-tion</p>	<p style="text-align: center;">5-(4-metoksifenil)-4-[(2-hidroksi-4-metoksibenziliden)amino]-4H-1,2,4-triazol-3-tion</p>
 <p style="text-align: center;">G3</p>	 <p style="text-align: center;">G4</p>
<p style="text-align: center;">5-(4-metoksifenil)-4-[(3-triflorometilbenziliden)amino]-4H-1,2,4-triazol-3-tion</p>	<p style="text-align: center;">5-(4-metoksifenil)-4-[(3,5-di-triflorometilbenziliden)amino]-4H-1,2,4-triazol-3-tion</p>

Tablo 3'ün devamı

 <p style="text-align: center;">G5</p>	 <p style="text-align: center;">G6</p>
<p style="text-align: center;">5-(4-metoksifenil)-4-[(2,4-diflorobenziliden)amino]-4H-1,2,4-triazol-3-tion</p>	<p style="text-align: center;">5-(4-metoksifenil)-4-[(2-floro-4-klorobenziliden)amino]-4H-1,2,4-triazol-3-tion</p>
 <p style="text-align: center;">G7</p>	 <p style="text-align: center;">G8</p>
<p style="text-align: center;">5-(4-metoksifenil)-4-[(4-triflorometilbenziliden)amino]-4H-1,2,4-triazol-3-tion</p>	<p style="text-align: center;">5-(4-metoksifenil)-4-[(2-hidroksi-5-metoksibenziliden)amino]-4H-1,2,4-triazol-3-tion</p>
 <p style="text-align: center;">G9</p>	 <p style="text-align: center;">G10</p>
<p style="text-align: center;">5-(4-metoksifenil)-4-[(2-florobenziliden)amino]-4H-1,2,4-triazol-3-tion</p>	<p style="text-align: center;">5-(4-metoksifenil)-4-[(2-triflorometilbenziliden)amino]-4H-1,2,4-triazol-3-tion</p>
 <p style="text-align: center;">G11</p>	
<p style="text-align: center;">5-(4-metoksifenil)-4-[(2-hidroksi-5-nitrobenziliden)amino]-4H-1,2,4-triazol-3-tion</p>	

Organik moleküllerin organik çözücülerdeki çözünürlükleri, hangi çözücünün kullanılacağı, çözücü ve inhibitör organik molekülün enzim aktivitesine etkisi çalışma için belirlendi. Organik moleküllerin enzim aktivitesine etkisini belirlemek için Tablo 3'te verilen organik moleküller G1: 0- 2,22 μM , G2-G11 0-22,2 μM nihai konsantrasyon aralığında uygun çözücüde (etanol) hazırlanan çözeltilerinden 1 μL reaksiyon karışımına eklenerek inhibitör molekülünün 40 μL üreaz enzim çözeltisi ile ön inkübasyonu sağlandı (Amtul vd., 2002; Zaborska vd., 2015). Daha sonra 4 μL ürenin ortama konulması ile bir seri aktivite tayini gerçekleştirildi.. Elde edilen sonuçlarla her bir organik molekül için inhibitör konsantrasyonuna karşı % Bağlı Aktivite grafiği çizildi ve aktivitenin %50 olduğu inhibitör konsantrasyonu IC_{50} değeri olarak belirlendi (Copeland, 2005).

Daha sonra çalışılan moleküller içinde IC_{50} değeri hesaplanabilen bileşik için üreazın inhibisyon mekanizması ve türü incelendi. Bunun için inhibitör yokluğunda ve inhibitör bileşiğinin farklı konsantrasyonlarında (0,088-2,22 μM) aktivite tayini yapılarak substrat doygunluk grafiği çizildi. Bu grafikten yola çıkarak Michealis-Menten ve Lineweaver-Burk ve grafiği çizildi. İnhibitör varlığında ve inhibitör yokluğunda K_m ve V_{maks} değerleri belirlendi. Bu değerler incelenerek inhibisyon mekanizması ve türü tespit edildi. Daha sonra matematiksel olarak da K_i değeri hesaplandı.

2.4.8. Moleküler Modelleme Çalışması ve Docking Yöntemi

Organik inhibitör moleküllerinin enzime bağlanma özelliklerini araştırmak amacıyla moleküler modelleme-docking çalışmaları yapıldı. Bu çalışmada organik moleküllerin enzimin aktif bölgesi ve aktif bölgesi dışındaki bağlanma enerjileri belirlendi ve sonrasında inhibisyon çalışmaları ile docking çalışmaları sonuçlarının uyumluluğu değerlendirildi. Docking çalışmalarına hazırlık olması amacıyla öncelikle Tablo 3'te verilen organik inhibitör molekülleri Spartan 16 programı kullanılarak optimize edildi. Optimizasyon metodu olarak moleküler mekanik ile konformasyonel dağılım, yarı deneysel/PM6 denge geometrisi ve fonksiyonel kütle/M06-2X/6-31G** kullanıldı ve bileşiklerin en uygun konformasyonları belirlendi. Bileşiklerin docking işleminin gerçekleştirileceği hedef reseptör olarak seçilen enzimin kristal şekli bulunup çeşitli kodlarla Protein Veri Bankası (PDB) web sitesinden PDB formatında (Jack Bean üreaz için 4G7E) temin edildi. Enzim Autodock Tools-1.5.6 programı kullanılarak saflaştırıldı ve daha sonra AutoDock Vina 1.1.2 (Trott vd., 2010) ve Discovery Studio 4.5 Client programı kullanılarak organik

bileşiklerin aktif bölgesi ve aktif bölgesi dışındaki ligand-protein etkileşimleri incelendi. Organik inhibitör moleküllerin bağlanma enerjileri hesaplandı ve bu etkileşimler doğrultusunda organik moleküllerin enzimlere bağlanma enerjileri belirlendi ve inhibisyon potansiyelleri teorik olarak ortaya konuldu.

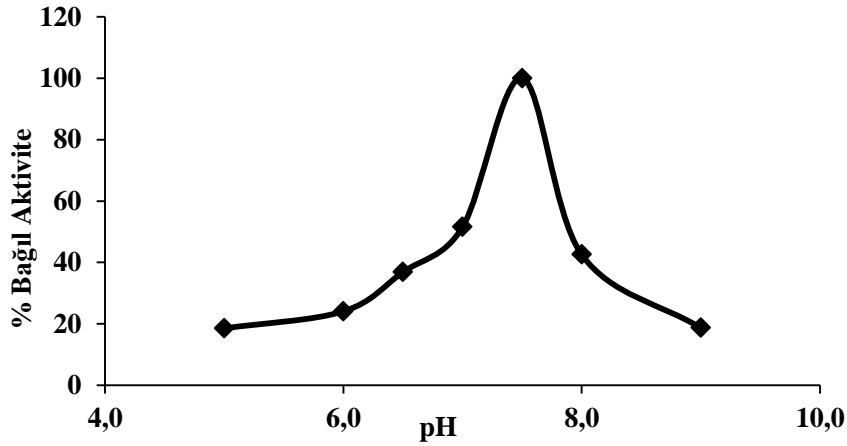


3. BULGULAR

3.1. Enzim Aktivitesinin Optimizasyonu

3.1.1. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'ın Etkisi

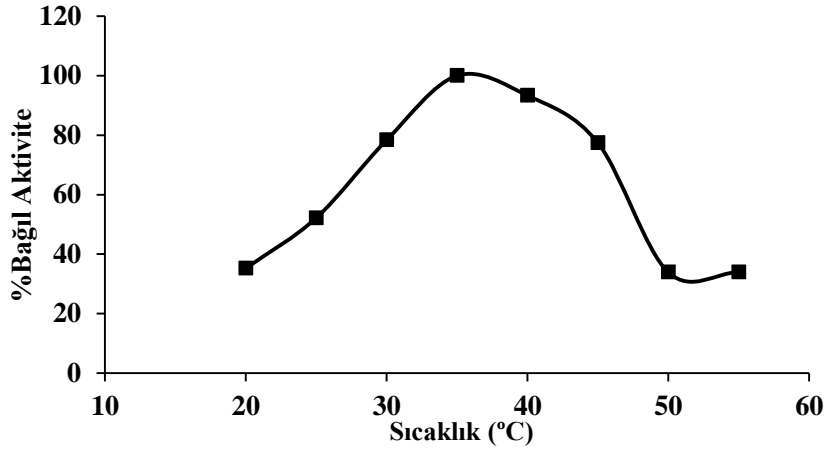
Enzim aktivitesi üzerine pH etkisini belirlemek amacıyla, önceden belirlenmiş olan optimum şartlar varlığında pH 5,0-9,0 aralığındaki tamponlar kullanılarak aktivite tayini yapıldı. pH değerlerine karşı aktivite değerleri grafiği çizildi. Üreaz enziminin en yüksek aktiviteyi pH 7,5 'da 50 mM fosfat tamponunda gösterdiği görüldü (Şekil 7).



Şekil 7. pH'ın enzim aktivitesi üzerine etkisi

3.1.2. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

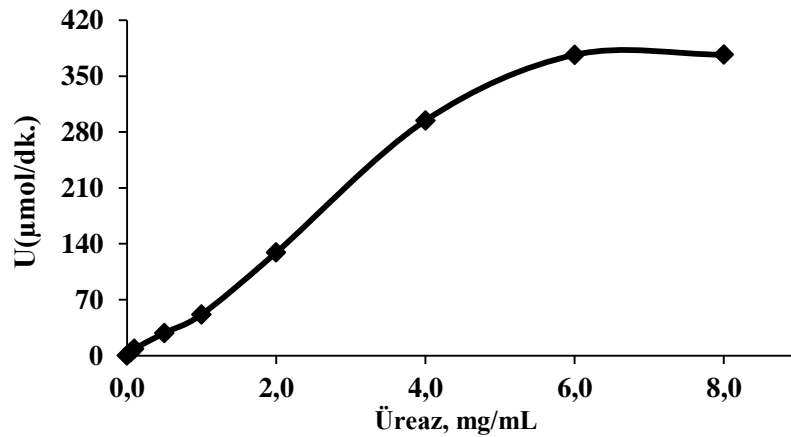
Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini incelemek amacıyla 20-55 °C aralığındaki sıcaklık değerlerinde aktivite tayinleri yapıldı. Elde edilen veriler aktivite değerleri sıcaklık değerlerine karşı grafiğe geçirildi . Bu grafikten yola çıkarak, üreaz enzimi için optimum sıcaklık 35 °C olarak belirlendi (Şekil 8).



Şekil 8. Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisi

3.1.3. Enzim Aktivitesi Üzerine Protein Konsantrasyonunun Etkisi

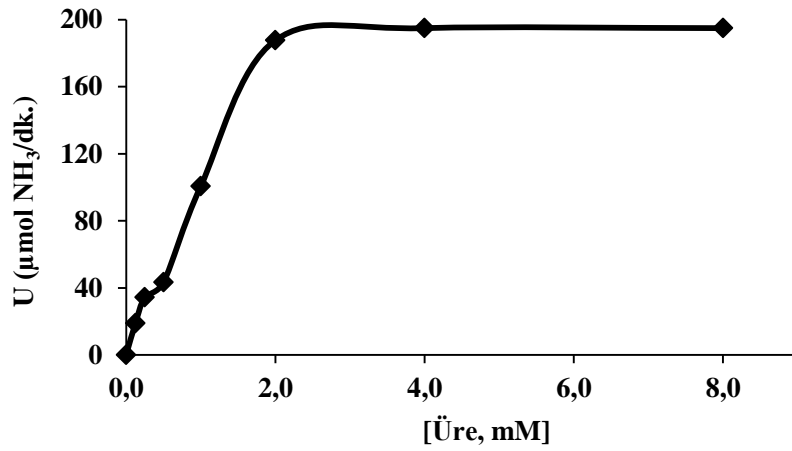
Enzim konsantrasyonunun aktivite üzerine etkisini incelemek amacıyla reaksiyon karışımında 0,05-8 mg/mL arasındaki değerlerde nihai protein konsantrasyonuna sahip olacak şekilde enzim çözeltileri kullanılarak aktivite tayinleri yapıldı. Enzim konsantrasyonuna karşı aktivite değerleri grafiğe geçirildiğinde, optimum enzim konsantrasyonunun 6 mg/mL olduğu belirlendi (Şekil 9).



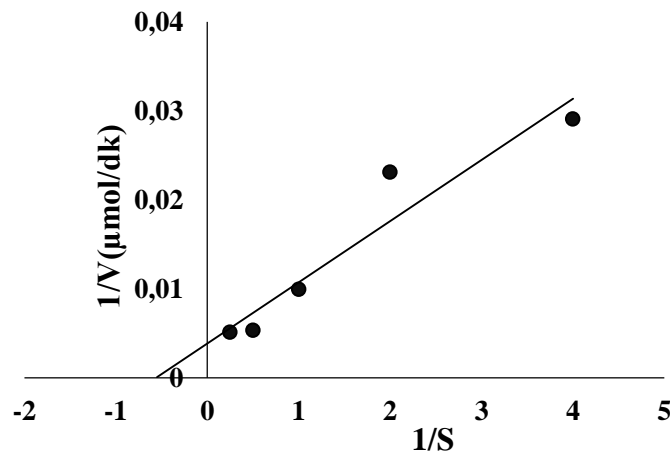
Şekil 9. Enzim konsantrasyonunun aktivite üzerine etkisi

3.1.4. Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

Substrat konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisini incelemek amacıyla reaksiyon karışımında 0,0625-8 mM arasındaki değerlerde nihai substrat konsantrasyonuna sahip olacak şekilde aktivite tayinleri yapıldı. Substrat konsantrasyonuna karşı aktivite değerleri grafiğe geçirildiğinde, optimum substrat konsantrasyonunun 2 mM olduğu belirlendi. Elde edilen veriler kullanılarak Lineweaver-Burk grafiği çizildi ve bu grafikten K_m ve V_{maks} değerleri sırasıyla, 1,76 mM ve 256 $\mu\text{mol/dk.}$ olarak hesaplandı (Şekil 10-11).



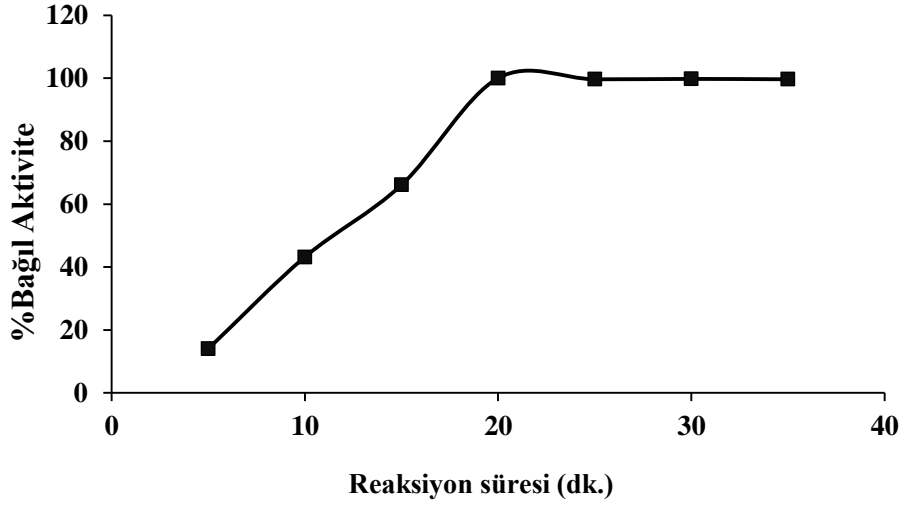
Şekil 10. Enzim substrat doygunluk grafiği



Şekil 11. Üreaz enzimi için Lineweaver-Burk grafiği

3.1.5. Enzim Aktivitesi Üzerine Reaksiyon Süresinin Etkisi

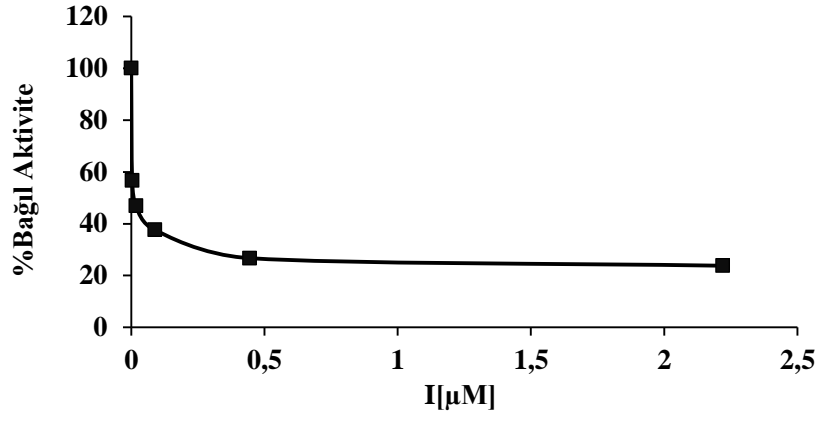
Üreaz aktivitesi için optimum reaksiyon süresini belirlemek için 5-35 dk. aralığında daha önceden belirlenmiş olan optimum değerler kullanılarak aktivite tayini yapıldı. Elde edilen sonuçlardan yola çıkılarak aktivite sıcaklık grafiği çizildi. Üreaz enzimi en yüksek aktiviteyi 20. dakika'da gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 12).



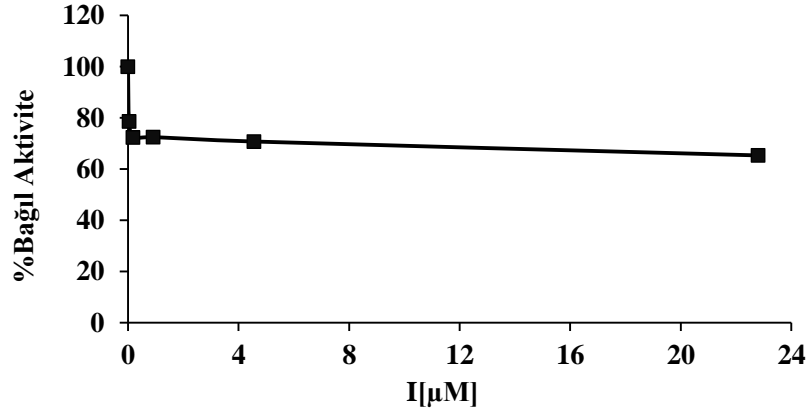
Şekil 12. Reaksiyon süresinin enzim aktivitesi üzerine etkisi

3.2. Üreaz İnhibisyonu Çalışmaları

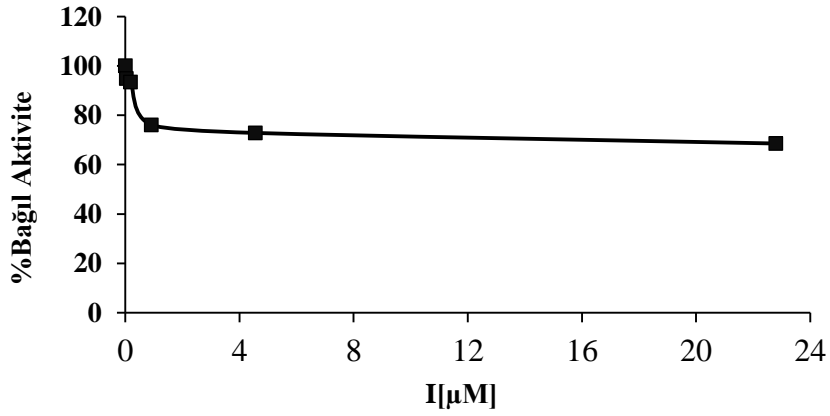
Üreaz inhibisyonu çalışmaları için G1-G11 molekülleri ve referans inhibitör molekül olarak da tiyoüre kullanıldı. İnhibisyon çalışmaları 2.4.7'te anlatıldığı gibi ve 1,76 mM (K_m) üre substratı varlığında yapıldı. Elde edilen sonuçlarla her bir organik molekül için inhibitör konsantrasyonuna karşı % Bağlı Aktivite grafiği çizildi ve bağlı aktivitenin %50 azaldığı inhibitör konsantrasyonu IC_{50} değeri olarak belirlendi. Şekil 13'de görüldüğü üzere sadece G1 bileşiği varlığında %50'nin altında aktivite gözlenebildiği için IC_{50} değeri yalnızca bu bileşik için hesaplanabildi ve G1 bileşiği için IC_{50} değeri 0,0109 μ M olarak bulundu.



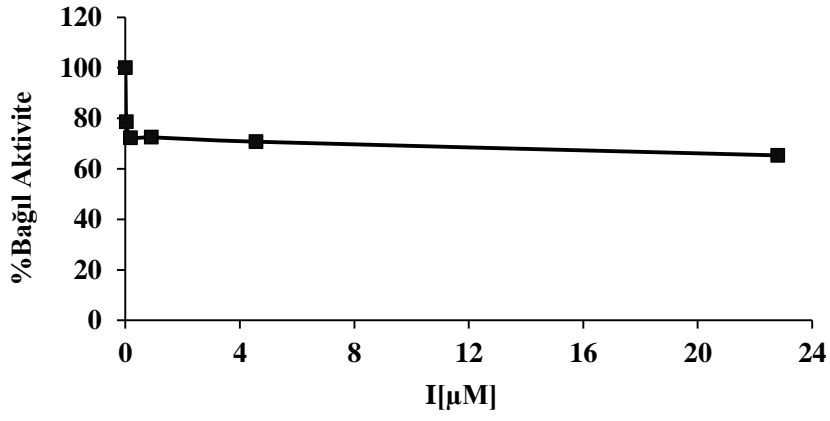
Şekil 13. G1 molekülünün üreaz aktivitesi üzerine etkisi



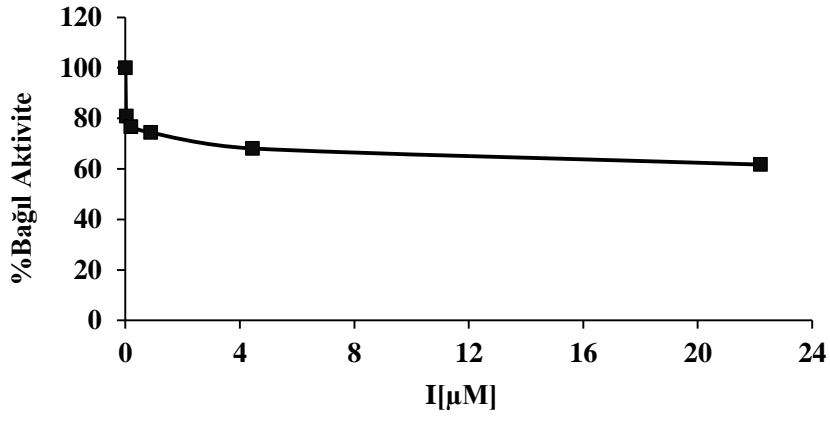
Şekil 14. G2 molekülünün üreaz aktivitesi üzerine etkisi



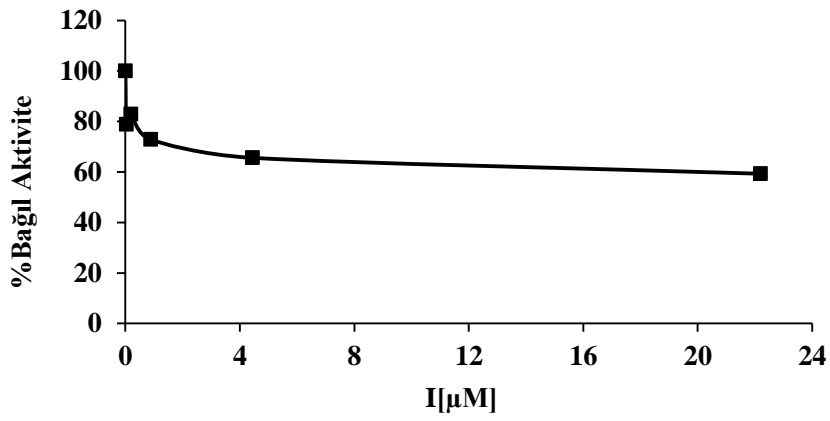
Şekil 15. G3 molekülünün üreaz aktivitesi üzerine etkisi



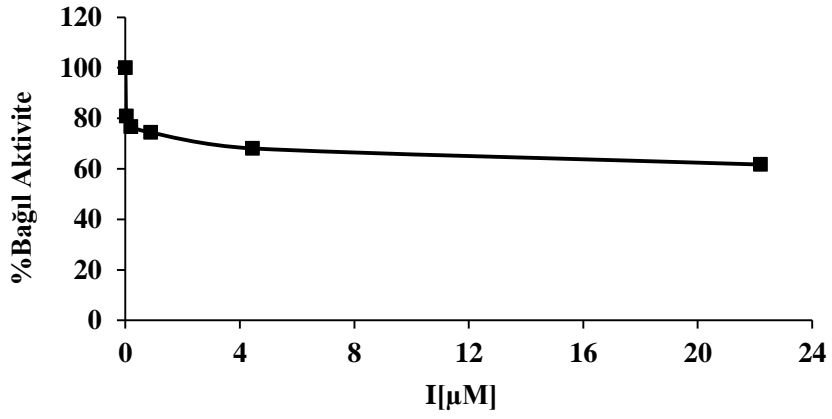
Şekil 16. G4 molekülünün üreaz aktivitesi üzerine etkisi



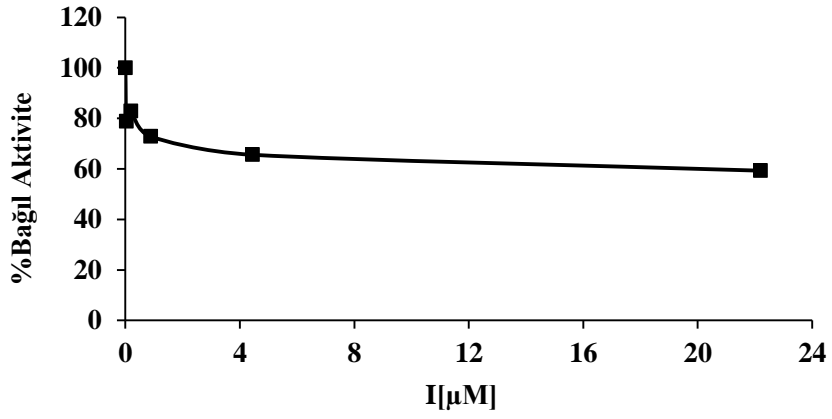
Şekil 17. G5 molekülünün üreaz aktivitesi üzerine etkisi



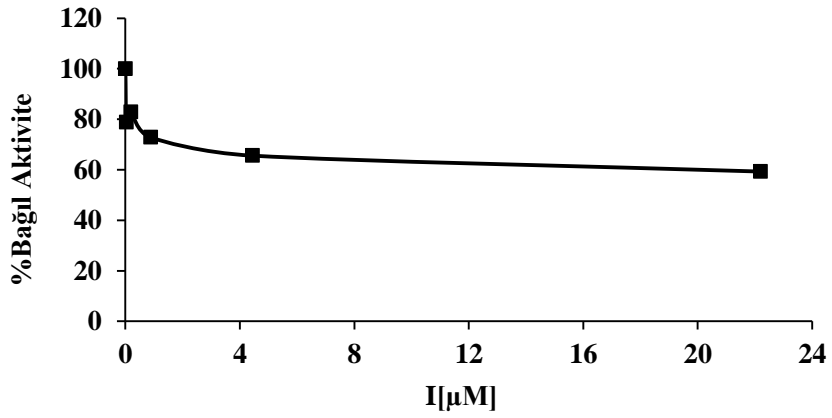
Şekil 18. G6 molekülünün üreaz aktivitesi üzerine etkisi



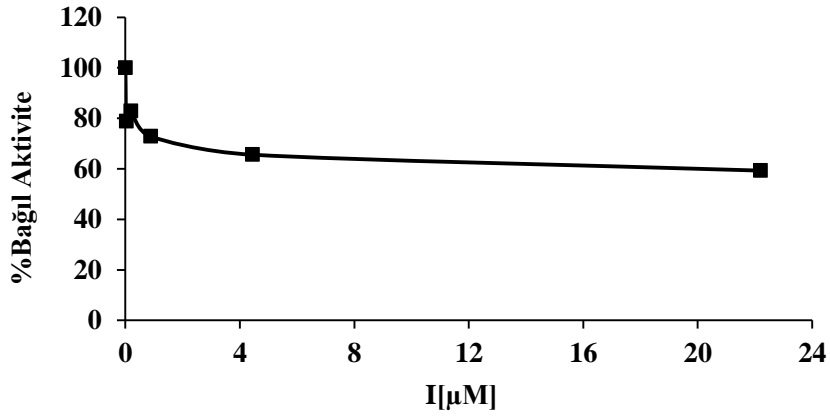
Şekil 19. G7 molekülünün üreaz aktivitesi üzerine etkisi



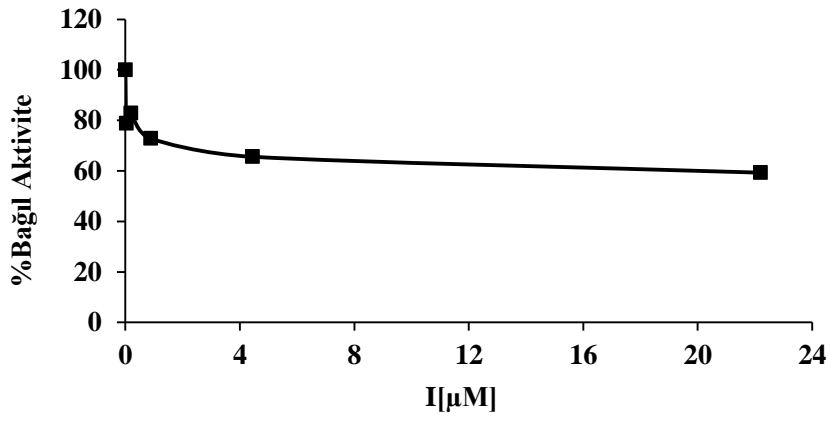
Şekil 20. G8 molekülünün üreaz aktivitesi üzerine etkisi



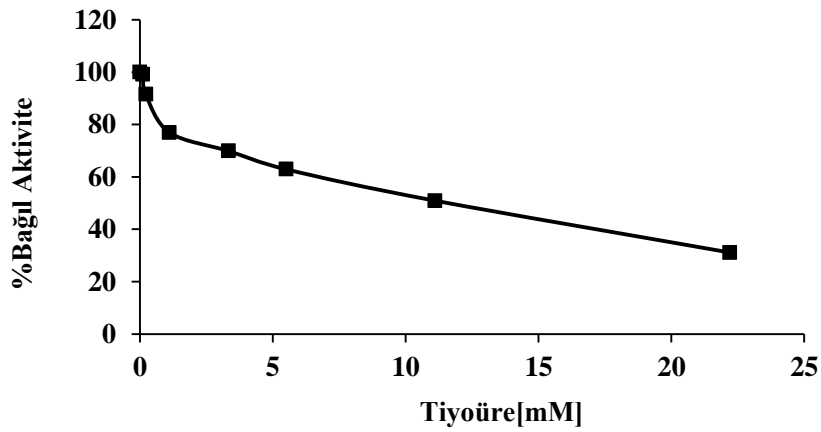
Şekil 21. G9 molekülünün üreaz aktivitesi üzerine etkisi



Şekil 22. G10 molekülünün üreaz aktivitesi üzerine etkisi



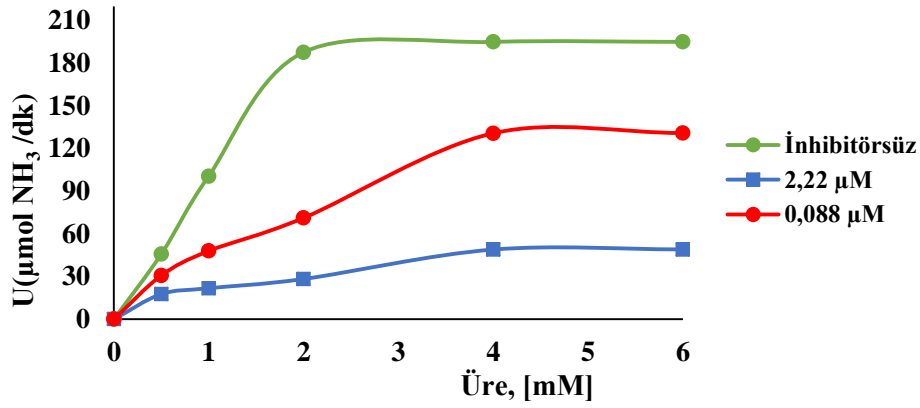
Şekil 23. G11 molekülünün üreaz aktivitesi üzerine etkisi



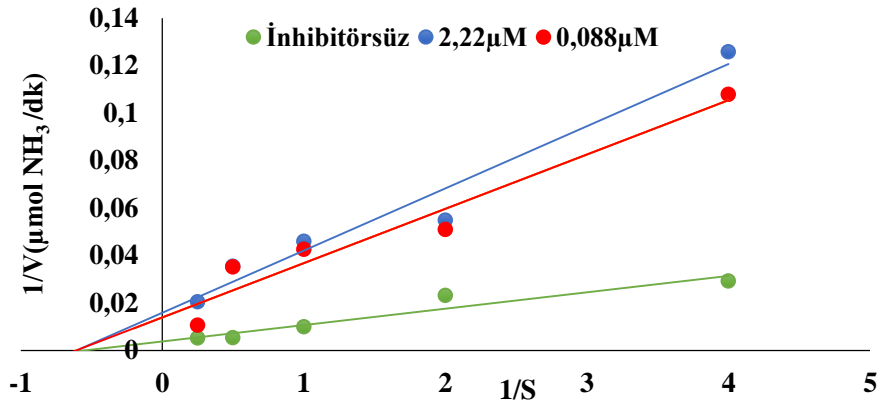
Şekil 24. Tiyoüre'nin üreaz aktivitesi üzerine etkisi

Üreaz inhibisyon türünün belirlenebilmesi amacıyla, G10molekülünün yokluğunda ve bu molekülün iki farklı konsantrasyonunda (0,088 μ M ve 2,22 μ M) bir seri aktivite tayini

yapılarak substrat doygunluk (Michealis-Menten ve Lineweaver-Burk) grafiği çizilerek inhibitör varlığında ve yokluğunda K_m ve V_{maks} değerleri belirlendi (Şekil 25-26, Tablo 4). Buna göre G1 bileşiiği varlığında üreaz Nonkompetitif olarak inhibe olmuşken K_i değeride yaklaşık 116,27 μM olarak hesaplandı.



Şekil 25. G1 İnhibitör molekölünün Substrat doygunluk grafiği



Şekil 26. İnhibitör varlığında ve yokluğunda Lineweaver-Burk grafiği

Tablo 4. G1 bileşiği varlığında üreaz inhibisyon türünün belirlenmesi ve K_i değeri

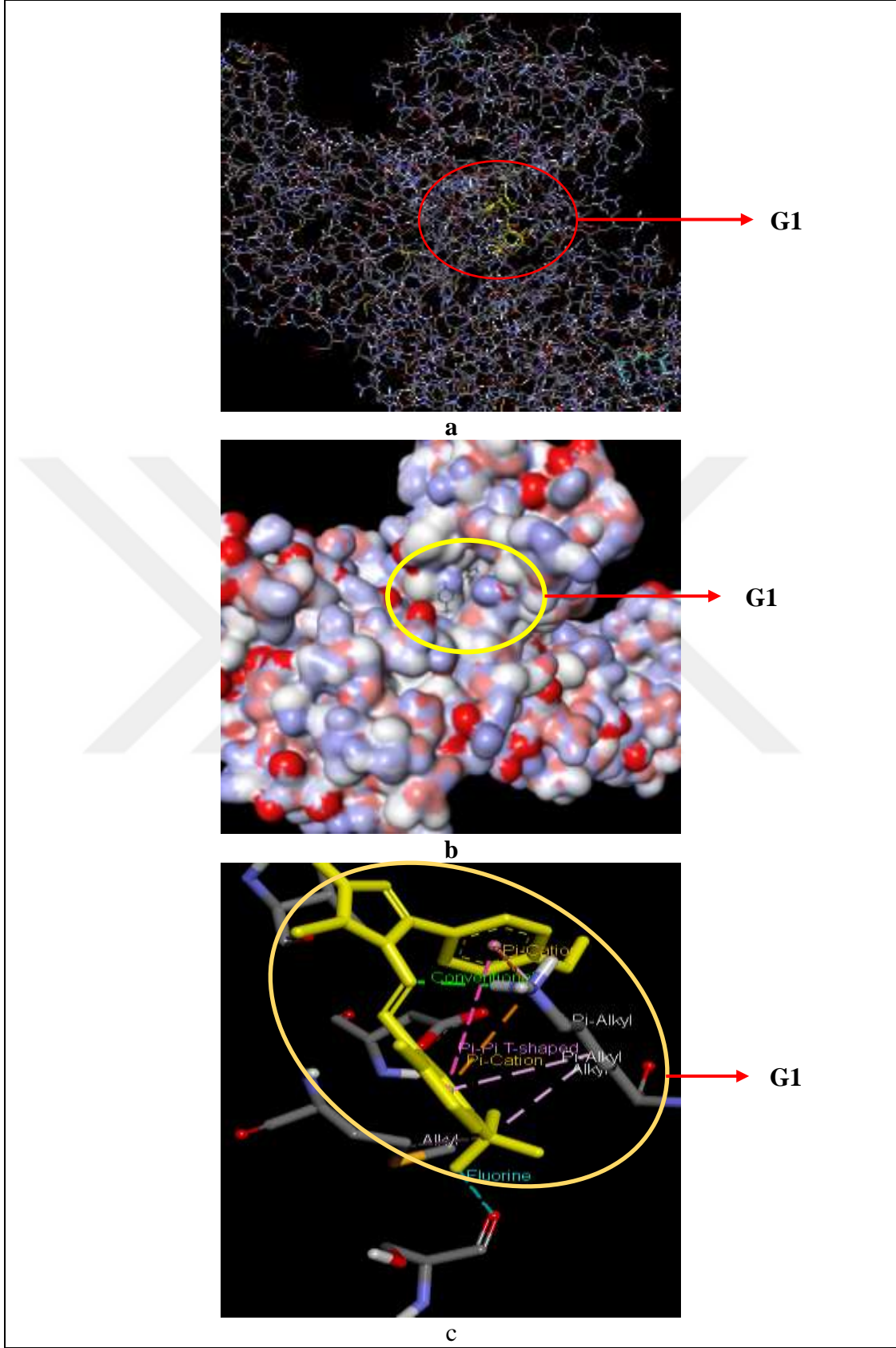
İnhibitör (G1, μ M)	K_m (mM)	V_{maks} (μ mol/dk.)	İnhibisyon Türü	K_i (μ M)
İnhibitörsüz	1,76	256,4	Nonkompetitif	116,27
0,0888	1,76	71,94		
2,22	1,76	62,89		

3.3. Moleküler Modelleme Çalışmaları

Moleküler modelleme çalışmaları için IC_{50} değeri tespit edilebildiği G1 molekülü ve diğer inhibitör molekülleri için üreaz enziminin aktif bölgeye bağlanma özellikleri, 2.5'te anlatıldığı gibi docking çalışmaları incelendi. Üreaz ile etkileştirilmek üzere her bir molekül için uygun konformasyonlar (gaz fazında en düşük enerjili) seçilerek üreaz için PDB'den sağlanan enzim kristal yapısı ile aktif bölgede etkileştirildi ve inhibitör moleküllerin enzimin aktif bölgesine bağlanma enerjileri belirlendi. Hangi molekül durumunda etkileşimin daha güçlü olduğu dolayısıyla güçlü bir aktif bölge inhibisyonuna neden olacağı teorik olarak ortaya konuldu (Tablo 5).

Tablo 5. Üreaz varlığında çalışılan inhibitör moleküllerinin bağlanma enerjileri

Molekül	ΔG Bağlanma Enerjisi (kcal/mol)
G1	-8.5
G2	-7.7
G3	-8.3
G4	-8.4
G5	-7.5
G6	-7.5
G7	-8.1
G8	-7.4
G9	-7.3
G10	-7.7
G11	-7.5



Şekil 27. Üreaz enzimi ile G1 molekülünün etkileşimleri (a)-(b)-(c)

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Enzimler, ilaç olarak tasarlan moleküllerin öncelikli hedefleridirler. Tedavi amaçlı olarak kullanılan ilaçların yaklaşık olarak yarısının enzim inhibitörü olduğu görülmektedir. Bu da yıllar içinde farmasötik bilimlerde yapılan araştırmaların önemli noktasının spesifik enzim inhibisyonu olarak kalmasının hayati bir zorunluluk olacağını göstermektedir (Copeland, 2005). Ayrıca klinik amaçlı kullanılacak olan yeni ilaç moleküllerinin belirlenebilmesi için birçok küçük molekül kütleli yeni organik bileşiğin sentezi yapılmalıdır ve bunların ilaç olarak kullanılıp kullanılmayacağını irdelenmesini zorunludur (Özdemir ve Karakurt, 2016).

Birçok ilaç firmasının Ar-Ge laboratuvarlarında ve akademik düzeyde inceleme yapan laboratuvarlarda geniş bir organik molekül kütüphanesi oluşturulmakta ve bu moleküllerin enzim inhibitör etkileşimleri *in vitro* olarak incelenmektedir (Copeland, 2005). İlaç olarak kullanılan birçok organik molekülün yapısında özellikle, oksadiazol, triazol ve tiyadiazol gibi beş üyeli heterosiklik halka bulunmaktadır. Bu halkalı yapıların çeşitli izomerlere sahip oldukları bilinmektedir. Bununla birlikte, izomerler arasında biyolojik olarak en etkin olan izomerler 1,2,4-triazol, 1,3,4-tiyadiazol ve 1,3,4-oksadiazol türevleridir. Bu yapıdaki beş üyeli heterosiklik halka içeren moleküller, başta antikanser olmak üzere antibakteriyal, antifungal anti-HIV, antiviral, antidepresan, antiinflamatuvar, antitüberküloz, diüretik, analjezik gibi çok geniş biyolojik aktivite spektrumuna sahiptirler (Küçükgül vd., 2004; Modzelewska vd., 1999; Gülerman vd., 1997; Bekircan vd., 2005; Kahveci vd., 2005; Demirbas vd., 2002; Demirbas vd., 2005; Bekircan vd., 2006; Herbrecht 2004; Crance vd., 2003; Gori vd., 2005).

Triazol halkalı organik bileşiklerin genel olarak farmakolojik özelliğe sahip olduğu bilindiği özellikle 1,2,4-triazol-3-*tion* ve türevi bileşiklerin klinik öneme sahip bazı enzimlerin inhibisyonuna neden olduğu literatürde yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (Amtul vd., 2004; Serwar vd., 2009; Bele, 2011; Bektas vd., 2013).

Bazı 1,2,4 triazollerin Schiff ve Mannich türevlerinin kolay bir şekilde sentezlenebilmeleri ve birçok uygulamalarda kullanılabilmesi bu organik bileşiklerin son yıllarda biyoloji ve kimya alanında büyük ilgi çekmelerine neden olmuştur (Haijian vd., 1998; Karthikeyan vd., 2006).

İnhibisyon çalışmalarına başlamadan önce ticari olarak satın alınan üreaz enziminin aktiviteleri literatüre uygun olarak belirlendi ve bölüm 3.1.'de ifade edildiği şekliyle enzim optimizasyonu gerçekleştirildi. Yapılan optimizasyon çalışmalarıyla üreazın çalışma sıcaklığı ve pH'ı belirlendi ve ayrıca inhibisyon çalışmalarında reaksiyon karışımında kullanılacak olan enzim ve substrat miktarı tespit edildi. Üreaz için denenen her bir inhibitör molekülüne ait IC_{50} değerini belirlemek üzere yapılan aktivite çalışmalarında inhibitör konsantrasyonları % Bağıl aktiviteye karşı grafiğe geçirildi. Bu nedenle öncelikle inhibitör molekülünün olmadığı şartlarda K_m değeri belirlendi (Şekil 10) ve inhibisyon çalışmalarındaki reaksiyon karışımları K_m değeri hesaplandı (Copeland, 2005).

Daha sonra IC_{50} değeri belirlenebilen inhibitör molekülü varlığında inhibisyonun türü ve K_i değerleri tespit edilmesi amaçlandı. Bu çalışma için bir dizi substrat ve inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümleri yapıldı. Substrat konsantrasyonu olarak 0,0625-8 K_m , inhibitör konsantrasyonu olarak ise Şekil 25'de gösterilen inhibitör konsantrasyonu-% Bağıl aktivite grafiğinde %22-56 inhibisyona neden olan inhibitör konsantrasyon aralığı kullanıldı (Copeland, 2005).

Çalışmada kullanılan organik bileşiklerin çözünürlükleri ve çözücünün inhibisyon üzerine etkisi, inhibitör molekülün hangi konsantrasyona kadar çalışmalarda kullanılabileceğinin belirlenmesinde etkili olmuştur. Yapılan bu değerlendirmeler sonucunda inhibisyon çalışmaları için organik moleküllerin etanol veya DMSO-etanol karışımları hazırlandı. İnhibitör çözeltilerinin reaksiyon karışımına ilave edilmesiyle organik çözücünün reaksiyon karışımındaki son konsantrasyonu %1'i geçmeyecek şekilde ayarlandı. Literatürde yapılan bazı çalışmalarda enzimler organik çözücüler varlığında inhibe olabildiği bildirilmektedir (Copeland, 2005). Yaptığımız bu çalışmada üreaz enziminin de DMSO varlığında inhibe olduğu görülmüştür. Bu nedenle yapılan inhibisyon çalışmalarındaki kontrol karışımlarında çözücünün inhibisyon etkisi de dikkate alındı.

Bu tespitler ışığında üreaz inhibisyonu çalışmaları için Tablo 3'te verilen G1-G11 organik bileşikleri kullanıldı ve substrat olarak üre varlığında (1,76 mM K_m) inhibisyon çalışmaları yapıldı. Organik moleküllerin reaksiyon karışımlarındaki nihai konsantrasyon aralığı G1: 0-2,22 μ M, G2-G11: 0-22,2 μ M, olacak şekilde aktivite çalışmaları gerçekleştirildi. Buna göre sadece G1 bileşiği varlığında 0,0109 μ M olarak IC_{50} değeri belirlenebilmişken diğer inhibitör moleküllerinin çalışılan konsantrasyon aralığının üzerine çıktığında reaksiyon ortamında çökme olduğu için IC_{50} değeri belirlenememiştir. Çalışmada referans inhibitör molekül olarak tiyoüre kullanılmış ve IC_{50} değeri 11 mM

olarak belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar neticesinde, çalışmada kullanılan G1 molekülünün tiyoyüreye kıyasla daha iyi bir üreaz inhibitörü olduğu söylenebilir.

Khan vd. (2010) 4,5-disubstitue-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tion türevleri ile yapmış olduğu bazı üreaz inhibisyon çalışmalarında 18 farklı organik molekül için IC_{50} değerleri hesaplamış en yüksek ve en düşük IC_{50} değerlerini sırasıyla 483,6 μM ve 45,6 μM olarak bildirmişlerdir. Bir başka çalışmada Akhtar ve arkadaşları (2014) 2-arilamino-5-ariloksilalkil-1,3,4-oksadiazol ve türevi olan 21 sentez bileşiğinde en yüksek ve en düşük IC_{50} değerlerini sırasıyla 57,2 μM ve 6,03 μM olarak bulmuşlardır. Serwar vd. (2009) tarafından sentezlenen 5-aril-4-(1-fenilpropil)2H-1,2,4-triazol-3(4H)-tion türevi 9 bileşik ile yapılan inhibisyon çalışmalarında IC_{50} değerleri 7,8-117 μM arasında değiştiği gözlenmiştir. Başka bir çalışmada ise 5-amino-1-siklopropil-7-[(3R,5S)3,5-dimethylpiperazin-1-il]-6,8-difloro-4-oksokinolin-3 karboksilik asitin 3 türevi ile üreaz enzim inhibisyonu yapılmış ve bu inhibisyon için IC_{50} değerleri 393-421 μM arasında değiştiği bildirilmiştir (Arayne vd., 2014).

Hanif ve arkadaşlarının 2012 yılında yaptığı bir çalışmada 4-Amino-5-aril-3H-1,2,4-triazol-3-tion türevi bazı bileşikler için üreaz inhibisyon çalışması yapılmış ve en düşük IC_{50} değerine sahip bileşiğin 0,85 μM olduğu görülmüştür (Hanif vd., 2012). 2016 yılında yapılan bir üreaz inhibisyonu çalışmasında ise Saeed ve arkadaşları N- (1- (5- mercapto- 4- ((substitute benziliden)amino)- 4H- 1,2,4- triazol- 3- il)- 2- feniletıl) benzamid türevi organik bileşikler sentezlemiş ve bunları üreaz inhibisyonu etkisi üzerine incelemişlerdir. Yapılan çalışmalar sonucunda en düşük IC_{50} değerine sahip molekülün olduğunu ve IC_{50} değerinin 0.00866 μM gibi çok düşük bir konsantrasyona sahip olduğunu bildirmişlerdir (Saeed vd., 2016).

Buna göre yaptığımız üreaz inhibisyonu çalışmasında G1 bileşiğinin inhibisyon potansiyeli, IC_{50} değeri yukarıda belirtilen literatür çalışmalarına göre daha iyi sonuç göstermiştir.

Üreaz inhibisyonu türünü belirlemek üzere 0,0625-8 mM üre konsantrasyonunda ve 0,0888–2,22 μM inhibitör konsantrasyonlarında G1 bileşiği için aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Her iki inhibitör konsantrasyonun da $1/[S]-1/V$ grafikleri çizildi. İnhibisyon mekanizması, diğer inhibitör molekülleri varlığında etkili bir inhibisyon gözlenemediği için sadece G1 bileşiği için mekanizma aydınlatılmaya çalışıldı. İnhibitör yokluğunda yapılan aktivite tayinleri sonucunda K_m ve V_{maks} değerleri sırasıyla 1,76 mM ve 256.4 $\mu\text{mol/dk}$. olarak belirlendi. G1 bileşiğinin 0,0888 ve 2,22 μM konsantrasyonları

varlığında belirlenen K_m değeri değişmezken V_{maks} değerleri sırasıyla 71,94 $\mu\text{mol/dk.}$ ve 62,89 $\mu\text{mol/dk}$ olarak azaldığı görüldü (Tablo 4). Bu durum, inhibitör konsantrasyonu değişimiyle K_m değerinin sabit kaldığı, V_{maks} değerinin azaldığı nonkompetitif inhibisyona işaret etmekte ve G1 bileşiğinin böyle bir inhibisyon mekanizmasıyla üreazı inhibe ettiğini göstermektedir (Tablo 4). Buna göre, G1 bileşiğinin enzimin aktif bölgesi dışında bir bölgede serbest enzime veya enzim-substrat kompleksine zayıf bir etkileşimle ve dönüşümlü olarak bağlanmasıyla inhibisyona neden olduğu söylenebilir.

Üreaz için yapılan moleküler docking çalışmalarında inhibitör moleküllerinin enzime aktif bölgesine bağlanma enerjileri hesaplandı. Buna göre en düşük bağlanma enerjisine sahip olan molekülün enzime en güçlü etkileşim yapan ve dolayısıyla aktif bölgede inhibisyona neden olan en potansiyel molekül olduğu belirlendi (Şekil 27). Buna göre, üreaz aktif bölgesinde en potansiyel inhibisyonu G1 molekülünün sağladığı yapılan teorik hesaplamalarla ortaya konulmuş oldu (Tablo 5). Bu sonuçtan anlaşılacağı üzere üreaz için deneysel olarak potansiyel bulunan inhibitör molekülü, teorik olarak potansiyel bulunanla örtüşmektedir. İnhibisyon türünün belirlendiği deneysel çalışmalardan elde edilen sonuçlardan kolayca anlaşılacağı gibi söz konusu üreaz nonkompetitif olarak inhibe olmuştur. Bu durumda çalışılan molekül varlığında gözlenen inhibisyon türünde üreaz için inhibitör molekülü aktif bölge dışında bir bölgede veya enzim-substrat kompleksine bağlandığı söylenebilir. Yapılan deneysel kinetik mekanizma ve moleküler docking analizlerinden sonra, tasarlanan bileşiğin üreaz enzimine karşı kimyasal ilaç tasarımında güçlü inhibitörler olarak kullanılabilceği görülmektedir.

5. ÖNERİLER

Sonuç olarak bakıldığında, yapılan çalışmalar kapsamında elde edilen bulgulardan varılan sonuçlar değerlendirildiğinde, aşağıda belirtilmiş olan önerilerin daha ileri düzeyde gerçekleştirilebilecek çalışmalarda dikkate alınabileceği söylenebilir.

1. Üreaz enziminin üre'nin hidrolitik ayrışmasını sağlayan mekanizmasında suyun gerekli olduğu dikkate alınarak enzim ve inhibitör molekülünün su varlığında teorik etkileşimi incelenebilir.
2. Organik moleküllerin suda çözünebilir formları (tuzları) sentezlenebilir ve deneysel çalışmalarda organik moleküllerin çözünürlük problemlerinden kaynaklanan olumsuzluklar bertaraf edilebilir.
3. Enzimin aktif bölge ve bağlanma bölgesi topolojileri detaylı bir şekilde ele alınarak inhibitör üzerindeki hangi grupların protein yapısındaki hangi aminoasit yan zinciri ile etkileştiği belirlenebilir ve böylece enzim aktivitesi için kritik aminoasitler belirlenerek aktivite ve inhibisyon için uygun mekanizmalar önerilebilir.
4. Bu tür çalışmalar deneysel inhibisyon çalışmalarıyla desteklenerek yapısal olarak optimize edilmiş daha efektif inhibitör moleküllerinin tasarlanması ve sentezlenmesinin yolu açılabilir.
5. Elde edilen bulgulardan yola çıkılarak daha efektif inhibitör moleküllerinin tasarlanması ve sentezlenmesi gerçekleştirilebilir.
6. Elde edilen verilerin *in vitro* hücre kültürü çalışmaları ile desteklenmesi durumunda inhibitörlerin klinik kullanımlarının gündeme gelebileceği de öngörülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Abdelhafez, O.M., Amin, K.M., Ali, H.I., Abdalla, M.M. ve Batran, R.Z. 2013. Monoamine oxidase A and B inhibiting effect and molecular modeling of some synthesized coumarin derivatives, Neurochemistry International, 62, 198-209.
- Akhtar, T., Khan, M.A., Iqbal, J., Jones, P.G. ve Hameed, S.A., 2014. Facile One-Pot Synthesis of 2-Arylamino-5-Aryloxylalkyl-1,3,4-Oxadiazoles and Their Urease Inhibition Studies, Chemical Biology Drug Design, 84, 92-98.
- Amtul, Z., Atta-ur-Rahman, Siddiqui, R.A. ve Choudhary, M.I., 2002. Chemistry and Mechanism of Urease Inhibition, Current Medicinal Chemistry, 9, 1323-1348.
- Amtul, Z., Rasheed, M. ve Choudhary, M.I., 2004. Kinetics of novel competitive inhibitors urease enzymes by a focused library of oxadiazoles/thiadiazoles and triazoles, Biochemical and Biophysical Research Communications, 319, 1053-1063.
- Arayne, M.S., Sultan, N., Gul, S. ve Khan, A., 2014. Novel derivatives of 5-amino-1-cyclopropyl-7-[(3R,5S)3,5-dimethylpiperazine-1-yl]-6,8-difluoro-4-oxo-quinoline-3-carboxylic acid: their synthesis, antimicrobial, antifungal, and urease inhibitory studies, Medicinal Chemistry Research, 23, 1248-1256.
- Arı, A., 2006. Histolojik olarak mide kanseri ile Helicobacter pylori arasındaki ilişki, Uzmanlık Tezi, T.C. Sağlık Bakanlığı İstanbul Eğitim Hastanesi II. Genel Cerrahi Kliniği, İstanbul.
- Balasubramanian A., Ponnuraj K., 2010. Crystal Structure of the First Plant Urease from Jack Bean: 83 Years of Journey from Its First Crystal to Molecular Structure, J. Mol. Biol., 400, 274–283.
- Becker–Ritt A.B., Martinelli A.H., Mitidieri S., Feder V., Wasserman G.E., MH. Vainstein M.H., Oliveira J.T., Fiuza L.M., Pasqualli G. ve Carlini C.R., 2007. Antifungal activity of plant and bacterial ureases, Toxicon., 50, 7, 971-983.
- Bekircan, O. ve Gümrükçüoğlu, N., 2005. Synthesis of some 3,5-diphenyl-4H-1,2,4-triazole derivatives as antitumor agents, Indian Journal of Chemistry, 44B, 21072113.
- Bekircan, O., Kahveci, B. ve Küçük, M., 2006. Synthesis and Anticancer Evaluation of Some New Unsymmetrical 3,5-Diaryl-4H-1,2,4-Triazole Derivatives, Turkish Journal of Chemistry, 30, 29-40.
- Bekircan, O., Mentşe, E., Ülker, S. ve Kucuk, C. 2014. Synthesis of Some New 1,2,4-Triazole Derivatives Starting from 3-(4-Chlorophenyl)-5-(4-methoxybenzyl)-4H-1,2,4-triazol with Anti-Lipase and Anti-Urease Activities, Archiv der Pharmazie Chemistry in Life Sciences, 347, 387-397.

- Bektas, H., Ceylan, S., Demirbas, N., Karaoglu, S.A. ve Sökmen, B.B., 2013. Antimicrobial and antiurease activities of newly synthesized morpholine derivatives containing an azole nucleus, Medicinal Chemistry Research, 22, 3629-3639.
- Bele, D. ve Singhvi, İ., 2011. A review on 1,2,4-triazole, Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research, 1, 88-100.
- Burne, R. A. and Chen, Y.M., 2000. Bacterial ureases in infectious diseases, Microbes and Infection, 2, 533-542.
- Ciurli S., Benini S., Rypniewski W.R., Wilson K.S., Miletta S. ve Mangani S., 1999. Structural properties of the nickel ions in urease: novel insights into the catalytic and inhibition mechanisms, Coordination Chemistry Reviews, 190-192, 331–355.
- Cooper G. ve Hausman E., 2006. Hücre Moleküler Yaklaşım, İzmir Tıp Kitabevi, İzmir.
- Copeland, R.A., 2000. Enzymes: a practical Introduction to structure, mechanism, and data analysis, New York.
- Copeland, R.A., 2005. Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery, New Jersey.
- Crance, J.M., Scaramozzino, N., Jouan, A. ve Garin, D., 2003. Interferon, ribavirin, 6azauridine and glycyrrhizin: antiviral compounds active against pathogenic flaviviruses, Antiviral Research, 58, 73-79.
- Demirbas, N., Demirbas, A. ve Karaoglu, S.A., 2005. Synthesis and biological activities of new 1,2,4-triazol-3-one derivatives, Russian Journal of Bioorganic Chemistry, 31, 387-397.
- Demirbas, N., Ugurluoglu, R. ve Demirbas, A., 2002. Synthesis of 3-alkyl(aryl)-4alkylidenamino-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazol-5-ones and 3-alkyl-4-alkylamino-4,5dihydro-1H-1,2,4-triazol-5-ones as antitumor agents, Bioorganic Medicinal Chemistry, 10, 3717-3723.
- Dindar B., Karakuş E. ve Abasıyanık F., 2011. New urea biosensor based on urease enzyme obtained from Helicobacter pylori, Appl Biochem Biotechnol., 165, 5-6.
- Diñç, Y., 2009. Üreaz Enziminin Bazı Tıbbi Bitkiler Tarafından İnhibisyonu, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Dixon N.E., Riddles P.W., Gazzola C., Blakeley R.L. ve Zerner B., 1980. Jack bean urease (EC 3.5.1.5). V. On the mechanism of action of urease on urea, formamide, acetamide, N-methylurea, and related compounds, Canadian Journal of Biochemistry, 58, 12, 1335-1344.
- Dunn, B.E., Campbell, G.P., Perez-Perez, G.L. and Blaser, M.J., 1990. Purification and characterization of urease from Helicobacter pylori, The Journal of Biological Chemistry, 265, 9464-9469.

- Dunn, B.E., Campbell, G.P., Perez-Perez, G.L. and Blaser, M.J., 1990. Purification and characterization of urease from *Helicobacter pylori*, The Journal of Biological Chemistry, 265, 9464-9469.
- Fawcett, J.K., Scott, J.E. and Clin Path.J., 1960. A rapid and precise method for the determination of urea, National Center For Biotechnology Information, 13, 156-159.
- Follmer C., Real-Guerra R., Wasserman G., Olivera-Severo D. ve Carlini C., 2004. Jackbean, Soybean and *Bacillus pasteurii* ureases biological effects unrelated to ureolytic activity, European Journal of Biochemistry, 271, 1357-1363.
- Follmer C., 2008. Insights into the role and structure of plant ureases, Phytochemistry, 69, 18-28.
- Ghasemi M., Bakhtiari M., Fallahpour M., Noohi H., Moazami N. ve Amidi Z., 2004. Screening of urease production by *Aspergillus niger* strain, Iranian Biomedical Journal, 8, 1, 47-50.
- Gori, S., Morelli, N., Bellini, G., Bonanni, E., Manca, L., Orlandi, G., Iudice, A. ve Murri, L., 2005. Rizatriptan does not change cerebral blood flow velocity during migraine attacks, Brain Research Bulletin, 65, 297-300.
- Gülerman, N., Rollas, S., Kiraz, M., Ekinçi, A.C. ve Vidin, A., 1997. Evaluation of antimycobacterial and anticonvulsant activities of new 1-(4-fluorobenzoyl)-4-substitutedthiosemicarbazide and 5-(4-fluorophenyl)-4-substituted-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazole-3- thione derivatives, Farmaco, 52, 691-695.
- Haijian, S., Zhongyi, W. ve Haoxina, S., 1998. Study on the intramolecular Mannich reaction of 4-amino-3-aryl-2,3-dihydrogen-5-mercapto-1,2,4-triazoles, Synthetic Communications, 28, 3973-3982.
- Hanif, M., Saleem, M., Hussain, M., Rama, N., Zaib, S., Aslan, M., Jones, P. ve Iqbal, J., 2012. Synthesis, Urease inhibition, antioxidant and antibacterial studies of some 4-amino-5-aryl-3H-1,2,4-triazole-3-thiones and their 3,6-disubstituted 1,2,4-triazolo[3,4-b]1,3,4-thiadiazole derivatives, Journal of the Brazilian Chemical Society, 23, 854-860.
- Hefnawy M., Sakran M., Ismail A. ve Aboelfetoh E.F., 2014. Extraction, purification, kinetic and thermodynamic properties of urease from germinating *Pisum Sativum* L. seeds, BMC Biochemistry, 15, 15.
- Herbrecht, R., 2004. Posaconazole: a potent, extended-spectrum triazole anti-fungal for the treatment of serious fungal infections, International Journal of Clinical Practice, 58, 612-624.
- Hopkins, A.L. ve Groom, C.R., 2002. The druggable genome, Nature Reviews Drug Discovery, 1, 727-730.

- Kara, F. 2006. Üreazın alginat-kitosan polielektrolit ve poli(akrilat-ko-akrilik asit)/karragenan interpolimer komplekslerine immobilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara, Fen Bilimleri Enstitüsü, 10-28.
- Karthikeyan, M.S., Prasad, D.J., Poojary, B., Subrahmanya Bhat, K., Holla, B.S. ve Kumari, N.S., 2006. Synthesis and biological activity of Schiff and Mannich bases bearing 2,4-dichloro-5-fluorophenyl moiety, Bioorganic Medicinal Chemistry, 14, 7482.
- Keha, E. ve Küfrevioğlu, Ö.İ., 2010. Biyokimya, Aktif yayınevi, Erzurum.
- Krajewska, B., Zaborska, W. ve Leszko, M., 2001. Inhibition of chitosan- immobilized urease by slow-binding inhibitors, Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic, 14, 101-109.
- Krajewska, B. ve Zaborska, W., 2007. Jack bean urease: The effect of active-site binding inhibitors on the reactivity of enzyme thiol groups, Bioorganic Chemistry, 35, 355-365.
- Krajewska, B., 2009. Ureasases I. functional, catalytic and kinetic properties: review, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 59, 9-21.
- Khan, A., Ali, S. ve Choudhary, M.İ., 2010. Synthesis, antioxidant activities and urease inhibition of some new 1,2,4-triazole and 1,3,4-thiadiazole derivatives, European Journal of Medicinal Chemistry, 45, 5200-5207.
- Kulshrestha, S., Tyagi, P., Sindhi, V. ve Yadavilli, K., 2013. Invertase And Its Applications – A Brief Review, Journal of Pharmacy Research, 7, 9, 792-797.
- Kuzucu, M., 2011. Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimleri Üzerine Bazı İlaçların in vitro Etkilerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Erzincan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzincan, 93s.
- Küçükgülzel, İ., Küçükgülzel, Ş.G., Rollas, S., Ötük-Saniş, G., Özdemir, O., Bayrak, İ., Altuğ, T. ve Stables, J.P., 2004. Synthesis of some 3-(arylalkylthio)-4-alkyl/aryl-5(4-aminophenyl)-4H-1,2,4-triazole derivatives and their anticonvulsant activity, II Farmoca, 59, 893-901.
- Lineweaver, H. ve Burk, D., 1934. The determination of enzyme dissociation constant, Journal of American Chemical Society, 56, 658-661.
- Liu J., Xu Y. ve Zhao GA., 2012. Optimization production of acid urease by *Enterobacter* sp. in an approach to reduce urea in Chinese rice wine, Bioprocess Biosyst Eng, 35, 4, 651-7.
- Lodhi, M.A., Ashiq, U., Jamal, R.A. ve Khan, M.K., 2015. Study of Vanadium Complexes as Novel Inhibitors of *Bacillus Pasteurii* and *Canavalia Ensiformis* Urease Enzyme, Journal of the Chemical Society of Pakistan, 37, 549-558.

- Marchetti, M., Arico, B., Burrone, D., Figura, N., Rappuoli, R. ve Ghira, P., 1995. Development of a mouse model of *Helicobacter pylori*, *Science*, 267, 1655-1658.
- Mobley, H.L., Island, M.D. ve Hausinger, R.P., 1995. Molecular biology of microbial ureases, *Microbiol Reviews*, 59, 451-480.
- Modzelewska, B. ve Kalabun, J., 1999. Synthesis and biological action of 5-oxo-1,2,4-triazine derivatives, *Pharmazie*, 54, 503.
- Muhammad, N., Saeed, M., Khan, A., Adhikari, A., Wadood, A., Khan, K.M. ve De Feo, V., 2014. A New Urease İnhibitor from *Viola betonicifolia*, *Molecules*, 19.
- Orhan, N., 2012. *Hypocrea Jecorina* QM9414'den Pullulanazın Saflaştırılması, Doktora Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Özdemir, Z. ve Karabulut, A., 2016. İlaç Metabolizması ve Farmasötik Kimyada Önemi, İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 5, 2, 35-46.
- Pearson M.A., Michel L.O., Hausinger R.P. ve Karplus P.A., 1997. Structures of Cys319 variants and acetohydroxamate-inhibited *Klebsiella aerogenes* urease, *Biochemistry*, 36, 26, 8164-72.
- Patton C., Crouch S., 1977. Spectrophotometric and kinetics investigation of the Berthelot reaction for the determination of ammonia, *Analytic Chemistry*, 49, 3, 464-469.
- Rajesh, Bisht, V., Takashima, B. ve Kaneto, K., 2005. An amperometric urea biosensor onto an electrochemically prepared copolymer poly (N-3-aminopropyl pyrrole-copolyrrole) film, *Biomaterials*, 26, 3683-3690.
- Serwar, M., Akhtar, T., Hameed, S. ve Khan, K.M., 2009. Synthesis, urease inhibition and antimicrobial activities of some chiral 5-aryl-4-(1-phenylpropyl)-2H-1,2,4-triazole-3(4H)-thiones, *Arkivoc*, 7, 210-221.
- Sharma M., Kumar V., Kumar J. ve Pundir C., 2009. Preparation of reusable enzyme strips using alkylamine and arylamine glass beads affixed on plastic strips for urea determination, *Indian Journal of Chemical Technology*, 16, 357-360.
- Shi, L., Yang, Y., Li, Z., Zhu, Z., Liu, C. ve Zhu, H. 2010. Design of novel nicotinamides as potent and selective monoamine oxidase a inhibitors, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18: 1659-1664.
- Sirko A. ve Brodzik R., 2000. Plant ureases: Roles and regulation, *Acta Biochimica polonica*, 47,1189-1197.
- Sujoy B. ve Aparna A., 2013. Enzymology, Immobilization and Applications of Urease Enzyme, *International Research Journal of Biological Science*, 2, 6, 51-56.

- Stefano, B., 2000. Structure and function relationship of urease and cytochrome c-553 from *Bacillus Pasteurii*, A thesis the degree of doctor of philosophy, Doktora Tezi, York Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İngiltere.
- Timothy W. M. ve Hostetter T.H., 2007. Uremia, The New England Journal of Medicine, 357, 1316-1325.
- Trott, O. ve Olson, A.J., 2010. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading, Journal of Computational Chemistry, 30, 455-61.
- URL-1, <https://prezi.com/qxgt9xtvavxy/laktaz-enzimi-ve-laktozsuz-sut-uretimi/>, 20 Aralık 2016.
- URL-2, http://content.lms.sabis.sakarya.edu.tr/Uploads/79251/33122/g%C4%B1da_biyoteknolojisi_6._hafta.pdf, 5 Kasım 2015.
- Weathernburn, M.W., 1967. Phenol-Hypochlorite reaction for determination of ammonia, Analytical Chemistry, 39, 971-974.
- Weber, M., Jones, M.J. and Ulrich, J., 2008. Optimisation of isolation and purification of the jack bean enzyme urease by extraction and subsequent crystallization, Food and Bioproducts Processing, 86, 43-52.
- Xu, Y.P., Chen, Y.H., Chen, Z.J., Qin, J., Qian, S.S. ve Zhu, H.L., 2015. Synthesis, Crystal Structures, Molecular Docking, and Urease Inhibitory Activities of Transition-Metal Complexes with a 1,2,4-Triazolecarboxylic Acid Derived Ligand, European Journal of Inorganic Chemistry, 2076-2084.
- Yılmaz, Y., 2015. Termofilik *Myceliophythora Hinnulea*'dan Selülaz Enzimi Üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Andalou Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Zaborska, W., Kot, M. ve Superata, K., 2015. Inhibition of Jack Bean Urease by 1,4benzoquinone and 2,5-dimethyl-1,4-benzoquinone. Evaluation of the Inhibition Mechanism, Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 17, 247-253.

ÖZGEÇMİŞ

1991 yılında Fethiye’de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Fethiye’de tamamladı. 2009-2010 yılları arasında, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Kimya Bölümü’nde lisans öğrenimine başladı ve 2015 yılında bu bölümden mezun oldu. 2015 yılında Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda yüksek lisans programına başladı. Yabancı dili İngilizce’dir.

