

**T.C.**  
**BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**KİMYA ANABİLİM DALI**

**PARAOKSONAZ ENZİMİNİN GLUTARALDEHİT İLE**  
**İMMOBİLİZASYONU VE BAZI AĞIR METALLERE KARŞI**  
**AFİNİTESİNİN ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**ÇİĞDEM BİLEN**

**Balıkesir, Haziran-2009**

T.C.  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANABİLİM DALI

PARAOKSONAZ ENZİMİNİN GLUTARALDEHİT İLE  
İMMOBİLİZASYONU VE BAZI AĞIR METALLERE KARŞI  
AFİNİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÇİĞDEM BİLEN

Tez Danışmanı: Yard. Doç. Dr. Özen ÖZENSOY GÜLER

Sınav Tarihi: 17/08/2009 Pazartesi

Jüri Üyeleri: Prof. Dr. Oktay ARSLAN

Yard. Doç. Dr. Özen ÖZENSOY GÜLER

Doç. Dr. Feray KÖÇKAR

Balıkesir, Haziran-2009

## ÖZET

# PARAOKSONAZ ENZİMİNİN GLUTARALDEHİT İLE İMMOBİLİZASYONU VE BAZI AĞIR METALLERE KARŞI AFİNİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

## ÇİĞDEM BİLEN

Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı  
(Yüksek Lisans Tezi /Tez Danışmanı: Yard. Doç. Dr. Özen ÖZENSOY GÜLER)

Balıkesir, 2009

Bu çalışmada, ilk olarak sığır serum PON1 enzimini saflaştırmak amacıyla Sepharose 4B L-tirozin 1-naftilamin kimyasal yapısındaki hidrofobik etkileşim kromatografi jeli kullanılmış ve PON1 enzimi saflaştırılmıştır. SDS-PAGE ile serbest enzim için saflık kontrolü yapılmıştır.

İkinci aşamada, enzim farklı glutaraldehit yüzdelerinde immobilize edilmiş ve enzim aktivitesi en fazla % 7 glutaraldehit oranında immobilize edilen enzimde gözlenmiştir. Dolayısıyla deneysel çalışmamızın bundan sonraki aşamalarında, % 7 glutaraldehit oranında immobilize edilen enzim dikkate alınmıştır. Buradan immobilize ve serbest enzim için enzim ünitesi ve substrat konsantrasyon değerleri hesaplanarak Km ve Vmax değerleri elde edilmiş ve serbest enzimin katalitik etkinliğinin immobilize enzime göre daha fazla olduğu gözlenmiştir.

Son aşamada da  $Mn^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$  metallerinin (%7) immobilize ve serbest paraoksonaz enzimi üzerindeki inhibisyon etkileri çalışılmıştır.  $Cu^{+2}$  metalinin paraoksonaz enzim aktivitesi üzerindeki etkisine bakıldığında immobilize ve serbest enzimi inhibe ettiği gözlenirken,  $Mn^{+2}$  ve  $Co^{+2}$  metallerinin immobilize enzimi aktive ettiği, fakat serbest enzimi inhibe ettiği gözlenmiştir.

**ANAHTAR SÖZCÜKLER:** Paraoksonaz, enzim immobilizasyonu, glutaraldehit, enzim inhibisyonu.

## ABSTRACT

### IMMOBILIZATION WITH GLUTARALDEHYDE OF PARAOXONASE ENZYME AND INVESTIGATION OF SOME HEAVY METALS EFFECTS ONTO THE ENZYME AFFINITY

ÇİĞDEM BİLEN

Balikesir University , Institute of Science, Department of Chemistry

(M.Sc. Thesis / Supervisor: Yard. Doç. Dr. Özen ÖZENSOY GÜLER)

Balikesir, Turkey, 2009

In this research, paraoxonase 1 (PON1) was purified from serum blood by using sepharose 4B L-tirozin 1-naftylamin hydrofobic interaction chromatography gel and purification of the enzyme was controlled by sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis.

Paraoxonase enzyme was immobilized at different ratios of glutaraldehyde and the maximum activity was observed at the ratio of % 7 immobilized enzyme. So this immobilized enzyme was investigated for other steps of our experiment. And for immobilized and free enzyme, enzyme units and substrate concentrations were calculated. Km and Vmax plots were determined and catalytic efficiency of free enzyme was bigger than immobilized enzyme.

And finally, the effects of inhibition of Mn<sup>+2</sup>, Co<sup>+2</sup>, Cu<sup>+2</sup> metals onto the immobilized and free enzyme activity were studied. When the effect of Cu<sup>+2</sup> onto the immobilized and free enzyme were investigated, the inhibition of enzyme was observed. But on the other hand, the activation of immobilized enzyme was observed and inhibition of free enzyme was observed with Mn<sup>+2</sup> and Co<sup>+2</sup> metals.

**KEYWORDS:** Paraoxonase, enzyme immobilization, glutaraldehyde, enzyme inhibition.

<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b><u>Sayfa</u></b>
ÖZET, ANAHTAR SÖZCÜKLER	ii
ABSTRACT, KEY WORDS	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SEMBOL LİSTESİ	vii
ŞEKİL LİSTESİ	viii
ÇİZELGE LİSTESİ	x
ÖNSÖZ	xi
<b>1. GİRİŞ</b>	1
1.1 Enzimler	1
1.1.1 Enzim Tarihçesi	2
1.1.2 Enzimlerin Kimyasal Yapısı	2
1.1.3 Enzimlerin Avantajları ve Uygulama Alanları	3
1.2 Paraoksonaz Enzimi	3
1.2.1 Paraoksonaz Enziminin Adlandırılması ve Yapısı	3
1.2.2 Paraoksonaz Enziminin Tarihçesi	5
1.2.3 Paraoksonaz Enziminin Katalitik Mekanizması	5
1.2.4 Katalizlediği Reaksiyonlar ve Substratları	6
1.2.5 PON1'in HDL'ye Bağlanması	9
1.2.6 Enzimin Kullanım Alanları ve Hastalıklarla Olan İlişkisi	9
1.3 Enzim İmmobilizasyonu	10
1.3.1 İmmobilize Enzimlerin Sınıflandırılması ve Özellikleri	10
1.3.2 Taşıyıcıya Bağlı İmmobilize Enzimler	12

1.3.3 Çapraz Bağlı İmmobilize Enzimler	13
1.3.4 Tutuklanmış İmmobilize Enzimler	14
1.4 Enzim Kinetiği	15
1.4.1 Enzim Kinetiği ve Michaelis-Menten Eşitliği	15
1.5 Enzim İnhibisyonu	18
1.5.1 Enzim İnhibisyon Çeşitleri	18
<b>2. MATERYAL VE YÖNTEMLER</b>	<b>21</b>
<b>2.1 MATERYALLER</b>	<b>21</b>
2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler	21
2.1.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar	21
2.1.3 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması	22
<b>2.2 YÖNTEMLER</b>	<b>27</b>
2.2.1 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile Paraoksonaz	27
Enziminin Saflaştırılması	
2.2.1.1 Sepharose 4B'nin Aktifleştirilmesi	27
2.2.1.2 L-tirozinin Bağlanması	27
2.2.1.3 1-Naftilamin Bileşiğinin Bağlanması	28
2.2.2 Amonyum Sülfat Çöktürme Aralığının Belirlenmesi	29
2.2.3 Glutaraldehit ile İmmobilizasyon Basamağı	30
2.2.4 Paraoksonaz Enziminin Aktivite Tayini	31
2.2.5 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi	32
(SDS-PAGE) ile Enzim Saflığının Kontrolü	

2.2.6 İmmobilize Enzim için İnhibitörlü Ortamda $I_c$ Değerlerinin Bulunması	33
<b>3. BULGULAR</b>	34
3.1 Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile PON1 Enziminin Saflaştırılması	34
3.2 Enzim İmmobilizasyon Basamağı	35
3.2.1 Enzimin Glutaraldehit ile Farklı Yüzdelerde Karıştırılması	35
3.2.2 Glutaraldehit ile %7 Oranında Karıştırılarak İmmobilize Edilen Enzim için Aktivite Tayini	37
3.2.3 İmmobilize Enzim için $K_m$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Hesaplaması	38
3.2.4 Serbest Enzim için $K_m$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Hesaplaması	40
3.3 Enzim İnhibisyon Basamağı	43
3.3.1 Bazı Metal Bileşiklerinin Paraoksonaz Enzim Aktivitesi Üzerindeki İnhibisyon Etkilerinin İncelenmesi	43
3.3.1.1 Kobalt (II) Klorür ( $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ ) Bileşiğinin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	43
3.3.1.2 Mangan (II) Klorür ( $MnCl_2 \cdot 2H_2O$ ) Bileşiğinin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	47
3.3.1.3 Bakır (I) Klorür ( $CuCl$ ) Bileşiğinin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	51

3.4 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ile Enzim Saflığının Kontrolü	55
<b>4. TARTIŞMA VE SONUÇ</b>	57
<b>5. KAYNAKLAR</b>	62



## SEMBOL LİSTESİ

<i>Sembol</i>	<i>Adı</i>
PON	Paraoksonaz enzimi
HDL	Yüksek yoğunluklu lipoprotein
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
CHD	Koroner kalp hastalığı
EÜ	Enzim ünitesi
GA	Glutaraldehit
E.C.	Enzim kod numarası
ROS	Reaktif oksijen türü

## ŞEKİL LİSTESİ

### Şekil

Numarası	Adı	Sayfa
Şekil 1.1	Paraoksonaz enziminin üç boyutlu görünümü	4
Şekil 1.2	Paraoksonazın katalitik mekanizması	6
Şekil 1.3	Lakton hidrolizi	7
Şekil 1.4	İnsektisitlerde yaygın olarak kullanılan okson metabolitlerinin hidrolizi	7
Şekil 1.5	Sinir gazlarının hidrolizi	8
Şekil 1.6	Aromatik esterlerin hidrolizi	8
Şekil 1.7	İmmobilize enzimlerin sınıflandırılması	11
Şekil 1.8	Michaelis-Menten grafiği	17
Şekil 1.9	Linawear-Burk grafiği	18
Şekil 1.10	Kompetitif ve Unkompetitif İnhibisyon Çeşitleri	19
Şekil 1.11	Nonkompetitif İnhibisyon Çeşidi	19
Şekil 2.1	Sepharose 4B'nin aktifleştirilmesi	27
Şekil 2.2	L-Tirozinin bağlanması	28
Şekil 2.3	1-Naftilamin bileşiğinin bağlanması	29
Şekil 2.4	Glutaraldehit ile immobilizasyonun temel prensibi	30
Şekil 3.1	Hidrofobik etkileşim kolonundan PON1 enziminin elüsyon grafiği	35

Şekil 3.2	%7 Oranında GA ile immobilize edilmiş enzimin aktivite tayin grafiği	39
Şekil 3.3	Serbest enzim aktivite tayin grafiği	42
Şekil 3.4	(CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O)'lu ortamda immobilize enzim için aktivite tayin grafiği	45
Şekil 3.5	(CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O)'lu ortamda serbest enzim için aktivite tayin grafiği	47
Şekil 3.6	(MnCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O)'lu ortamda immobilize enzim için aktivite tayin grafiği	49
Şekil 3.7	(MnCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O)'lu ortamda serbest enzim için aktivite tayin grafiği	51
Şekil 3.8	(CuCl)'li ortamda immobilize enzim için inhibisyon tayin grafiği	53
Şekil 3.9	(CuCl)'li ortamda serbest enzim için inhibisyon tayin grafiği	55
Şekil 3.10	SDS-PAGE ile enzim saflığının kontrolü	56
Şekil 4.1	PON1 enziminin HDL yüzeyine bağlanma modeli	58

## ÇİZELGE LİSTESİ

<b>Çizelge</b>		
<b>Numarası</b>	<b>Adı</b>	<b>Sayfa</b>
Çizelge 1.1	Taşıyıcıya bağlı immobilize enzim çeşitleri	12
Çizelge 1.2	Çapraz bağlı immobilize enzim çeşitleri	13
Çizelge 1.3	Tutuklanmış immobilize enzim çeşitleri	14
Çizelge 1.4	Enzim immobilizasyon yöntemlerinin karşılaştırılması	15
Çizelge 1.5	Enzim İnhibisyon Çeşitleri	20
Çizelge 1.6	SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının miktarları	26
Çizelge 2.1	Serbest enzim, farklı yüzdelerdeki GA miktarları ve immobilize enzim aktiviteleri	36
Çizelge 2.2	% 7 oranında GA ile karıştırılarak immobilize edilen enzim için GA ve serbest enzim miktarları	37
Çizelge 2.3	İmmobilize enzim için aktivite tayin çizelgesi	37
Çizelge 2.4	% 7 oranında GA ile karıştırılarak immobilize edilen enzim için E.Ü. ve substrat konsantrasyon değerleri	38
Çizelge 2.5	Serbest enzim için aktivite tayin çizelgesi	40
Çizelge 2.6	Serbest enzim için E.Ü. ve substrat konsantrasyon değerleri	41
Çizelge 2.7	İmmobilize ve serbest enzim için katalitik etkinlik, $V_{max}$ ve $K_m$ değerlerinin karşılaştırılması	42
Çizelge 2.8	( $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ )'lu ortam için immobilize enzim aktivite çizelgesi	44
Çizelge 2.9	( $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ )'lu ortam için serbest enzim aktivite çizelgesi	46
Çizelge 2.10	( $MnCl_2 \cdot 2H_2O$ )'lu ortam için immobilize enzim aktivite çizelgesi	48
Çizelge 2.11	( $MnCl_2 \cdot 2H_2O$ )'lu ortam için serbest enzim aktivite çizelgesi	50
Çizelge 2.12	( $CuCl$ )'li ortam için immobilize enzim aktivite çizelgesi	52
Çizelge 2.13	( $CuCl$ )'li ortam için serbest enzim aktivite çizelgesi	54

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu deneysel çalışmamda ve çalışmanın tamamlanmasında en derin bilgilerinden faydalandığım ve her türlü desteği ile yanımda olan sayın danışman hocam Yard. Doç. Dr. Özen ÖZENSOY GÜLER'e ve çalışmalarında yardımlarını benden esirgemeyen ve her türlü imkanı sağlayan sayın hocam Prof. Dr. Oktay ARSLAN'a en derin saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarında yardımını gördüğüm ve çalışma esnasında da her konuda bana destek olan sayın hocam Arş. Gör. Serap BEYAZTAŞ'a, ayrıca, bilgilerinden faydalandığım ve her zaman yanımda olan sayın hocam Semra IŞIK'a ve okul hayatımda bana destek olan ve beni seven tüm arkadaşlarıma en içten sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisansın yanı sıra lisans döneminde de üzerimde emeği geçen tüm değerli hocalarıma da en derin saygı ve sevgilerimi sunarım.

Son olarak, her zaman yanımda olan ve her türlü maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen sevgili aileme en içten sevgilerimi sunarım.

**Balıkesir, 2009**

**Çiğdem BİLEN**

## **1. GİRİŞ:**

Bildiğimiz gibi, günümüzün hızla gelişen teknolojisi günlük yaşantıda olduğu kadar bilim dünyasında da kendini göstermektedir. Bu gelişime özellikle biyokimyasal alanda, enzimatik uygulamalarda rastlanmaktadır. Çünkü, enzimler biyokimyasal reaksiyonlarda biyolojik katalizör görevi gördüklerinden enzimlerin sıkça kullanımlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla enzim immobilizasyon yöntemleri geliştirilmiştir. Paraoksonaz enzimi ile yapılan bu çalışmada, enzim glutaraldehit kullanılarak immobilize edilmiştir.

Önceki çalışmalarda da glutaraldehit kullanılarak farklı enzim immobilizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Örneğin; 'Mantardan (*Agaricus bisporus*) Tirozinaz Enziminin İzole Edilmesi' yönteminde, kısmen saflaştırılan tirozinaz enzimi kitosan kürecikleri üzerine glutaraldehit kullanılarak immobilize edilmiştir [1]. Yapılan diğer bir çalışmada da, proteaz enzimi, glutaraldehit kullanılarak kovalent bağlanma ile immobilize edilmiştir [2].

### **1.1 Enzimler**

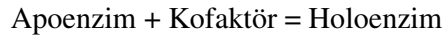
Enzimler, ilgili kimyasal reaksiyonları katalizleyen olağanüstü biyolojik sistemlerdir. En çarpıcı karakteristik özellikleri, katalitik güçlere sahip olmaları ve spesifik oluşlarıdır [3]. Enzimler kendilerine özgü, spesifik substratlarını tanıyarak, substratları üzerinden spesifik kimyasal reaksiyonları kısa zaman diliminde daha hızlı bir şekilde gerçekleştirirler [4].

### 1.1.1 Enzim Tarihçesi

Enzim moleküllerinin varoluşları bir yüzyılı aşkın bilinmektedir. Enzimlerle ilgili ilk çalışmalardan bir tanesi; 1835 yılında, İsveç asıllı kimyacı Jon Jakob Berzelius bazı kimyasal katalizörleri adlandırmıştır. İlk enzim ise saf halde Cornell Üniversitesi, James B. Sumner tarafından verimli bir başarıyla elde edilmiştir. Sumner, üreaz enzimini erkek tavşandan izole ve kristalize etmeyi başarmıştır. Bu çalışması Sumner'e 1947'de Nobel ödülünü kazandırmıştır [5,6,7].

### 1.1.2 Enzimlerin Kimyasal Yapısı

Çoğu enzimler, katalitik aktivitelerini harcamadan önce kofaktör gibi diğer bileşiklerin varlığına ihtiyaç duyarlar. Bu aktif kompleksin tamamı holoenzim olarak isimlendirilir. Örneğin, Apoenzim (protein kısmı)+Kofaktör (koenzim, prostetik grup, metal-iyon aktivatörü)



Holum'a göre;

- a) Koenzim (Protein kısmına serbest bağlı ve termostabil bir organik madde olabilir.)
- b) Prostetik Grup (Protein veya apoenzim kısmına sıkıca bağlı ve termostabil bir organik madde olabilir.)
- c) Metal-İyon Aktivatörü (K+, Fe++, Fe+++, Cu++, Co++, Zn++, Mn++, Mg++, Ca++, Mo+++....vb.) [5,6,7].

### **1.1.3 Enzimlerin Avantajları ve Uygulama Alanları**

Enzimlerin kullanımı, genel uygulamalarla elde edilemeyen birçok olumlu sonuç vermektedir. Enzimler, yüksek ürün kalitesi, üretimde düşük maliyet, az atık, fazla enerji tüketiminin engellenmesi, spesifiklik (sadece istenilen reaksiyonun gerçekleşmesi), kolay kontrol ve reaksiyonun ılıman koşullarda gerçekleşmesi ve reaksiyon hızının  $10^{16}$  kata kadar artması gibi pek çok avantajlara sahiptirler [8,9]. Bunun yanı sıra, nişastadan maltoz şuruplarının üretimi, süt ve süt ürünleriyle ilgili uygulamalar, endüstri (kağıt, deri, deterjan...vb.), meşrubat üretimi (düşük kalorili bira, katkısız meyve suyu...vb.), gıda sektörü (şekerleme), kontak lens üretimi, enerji ve tekstil uygulamaları, bilim ve biyoteknoloji gibi önemli uygulama alanlarına da sahiptirler [8].

## **1.2 Paraoksonaz Enzimi**

### **1.2.1 Paraoksonaz Enziminin Adlandırılması ve Yapısı**

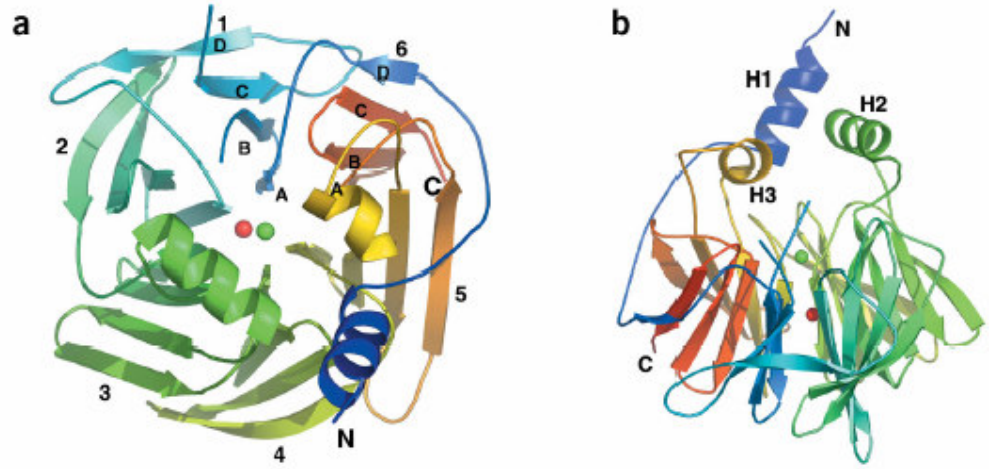
İnsan plazması, bütirikolin esteraz (EC 3.1.1.8), paraoksonaz (EC 3.1.8.1), asetilkolin esteraz (EC 3.1.1.7) ve albümin olmak üzere 4 esteraz içermektedir. Bütirikolin esteraz, paraoksonaz ve albümin ester hidrolizine önemli katkıda bulunmak amacıyla plazmada yeterince yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır [10].

Bir arilesteraz olarak da bilinen serum paraoksonaz 1 (PON1), bazı organofosfatlar ve çeşitli aromatik karboksilik asit esterlerin hidroliz reaksiyonlarını katalizleyen ve karaciğer tarafından sentezlenen bir kalsiyum ( $Ca^{+2}$ ) bağlı esterazdır. Gerçekleştirdiği reaksiyonlarında genellikle substratı olarak kullanılan paraoksondan türetildiği için paraoksonaz adını almıştır [11]. 43 kDa ağırlığındaki PON1, (arildialkilfosfataz, EC 3.1.8.1.) olarak da isimlendirilebilir [12,13].

Protein konsantrasyonuyla da bağlantılı olan PON1 enzim aktivitesini ölçmek amacıyla iki farklı substrat kullanılır: Paraoksonaz aktivitesi için paraokson ve



arilesteraz aktivitesi için aril esterlerin hidrolizi amacıyla fenil asetat substrat olarak kullanılır [12,14]. Son yıllarda PON1'in laktonaz aktivitesi üzerinde de çalışmalar yapılmış ve endojen bileşiklerinin lakton formları ile lakton içeren bazı ilaçların PON1 tarafından hidroliz edildiği gösterilmiştir [15]. İzoelektrik noktası 5.1 olan PON1'in yapısına bakıldığında 4 adet zincirden oluşmuş 6 adet  $\beta$ -kırmalı yapıdan meydana gelmiştir. Enzim 42. ve 353. sistein rezidüleri arasındaki disülfid köprüsü ile sonlanarak üç boyutlu yapısını kazanır [16]. N-terminal ve C-terminal uçlarının bu şekilde kovalent bağlanması  $\beta$ -kırmalı yapıli enzimlerde sık görülmemektedir (Şekil 1.1).



**Şekil 1.1.** Paraoksonaz enziminin üç boyutlu görünümü. (a)  $\beta$ -kırmalı tabakalar ve (b) hidrofobik bölgelerin (H1, H2, H3)  $\beta$ -kırmalı tabakalara göre durumu [17].

Üç boyutlu yapıda; iki adet  $\text{Ca}^{+2}$  iyonu,  $\beta$ -kırmalı tabakaların merkezinde 7,4 Å aralıklı olacak şekilde bulunmaktadır. İyonlardan bir tanesi yapısal kalsiyum olup yapıdan uzaklaştırılması dönüşümsüz denatürasyona neden olmaktadır [18]. Katalitik etkinlikte görev alan diğer  $\text{Ca}^{+2}$  iyonu ise; 2,2-2,5 Å uzaklıkta 5 adet

aminoasit (Asn224, Asn270, Asn168, Asp269 ve Glu53) ile etkileşim halindedir [19].

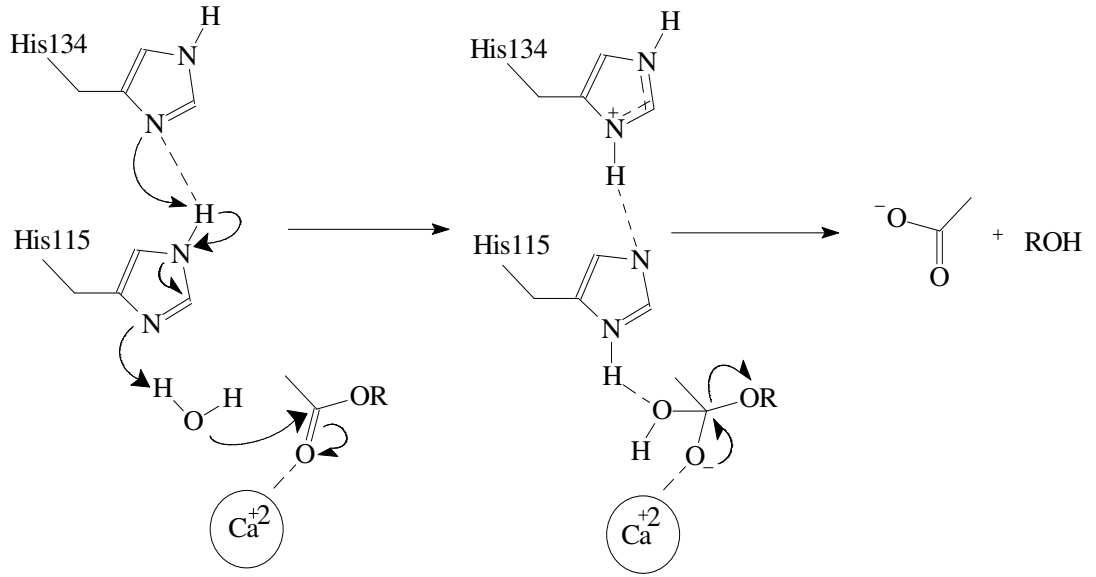
PON1 geninin yanı sıra PON2 ve PON3 gen ailesi de 7q21.3-q22.1 kromozomları üzerinde bağlantılı olup karaciğer de PON1 sentezi üzerinde kilit bir rol üstlenmiştir [20,21]. PON2 ve PON3'ün 105. pozisyonda lizin rezidüsü bulunmadığından paraoksonu hidroliz edemedikleri öne sürülmüştür. Ayrıca PON2 ve PON3 plazmada bulunmamaktadır [21].

### **1.2.2 Paraoksonaz Enziminin Tarihçesi**

Paraoksonaz enzimi ilk olarak 1953 yılında Aldridge tarafından insan kan serumunda bulunmuştur [22,23]. 1996 yılında, paraoksonaz aktivitesinden sorumlu genin bir multigen ailesinin üyesi olduğu tespit edilmiş ve sırasıyla PON1, PON2 ve PON3 olarak isimlendirilmiştir [24]. PON3 enzimi de PON1'e benzer şekilde büyük çoğunlukta karaciğerden sentezlenmekte ve serumda HDL'ye bağlı olarak bulunmaktadır[25]. PON2 diğer üyelerden farklı olarak plazmada bulunmamaktadır. Ancak beyin, karaciğer, böbrek ve testis gibi pek çok dokuda sentezlenmektedir [26].

### **1.2.3 Paraoksonaz Enziminin Katalitik Mekanizması**

Enzimin aktif bölgesinde bulunan His-His çifti,  $Ca^{+2}$  iyonu ve su molekülü, esteraz aktivitesinde önemli görevler üstlenmiştir (Şekil 1.2).

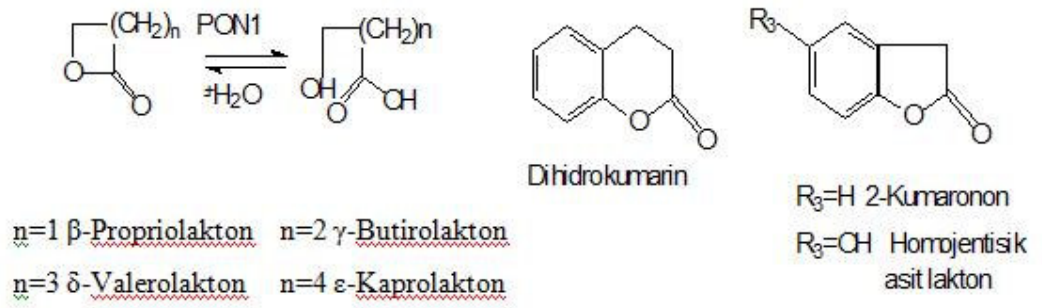


**Şekil 1.2.** Paraoksonazın katalitik mekanizması [17]

Katalitik etkinlik gösteren  $\text{Ca}^{+2}$  iyonu, substrattaki fosfat iyonunun negatif yüklü oksijenine 2,2 Å uzaklıktadır. Aktif bölgedeki His-His çifti, su molekülünün bir protonunu alarak bu molekülün nükleofilik gücünü artırır. Oluşan hidroksil iyonu karbonil veya fosfat esterine saldırır. Bu esnada meydana gelen kompleks tetrahedral bir düzlem sonucu  $\text{Ca}^{+2}$  iyonu ile kararlı kılınır [17]. Dolayısıyla, kalsiyum, enzimin hem aktivitesi hem de stabilitesi için gerekmektedir [21]. Oluşan yapıdaki  $\text{Ca}^{+2}$  iyonu negatif yüklü oksijenden uzaklaşarak bağ tekrar fosfat veya karbonilin üzerine yıkılır ve ester bağı kopar [17].

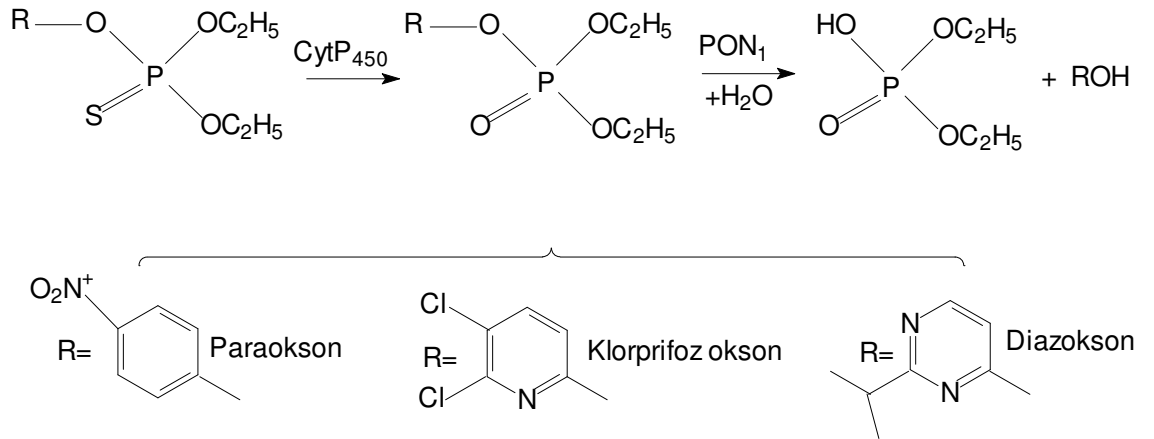
#### 1.2.4 Katalizlediği Reaksiyonlar ve Substratları

PON1 özellikle LDL ve HDL lipitlerinin yükseltgenmesini önleyerek ve lipit peroksidlerini metabolize ederek arterosklerozise karşı koruyuculuğunu, sahip olduğu laktonaz aktivitesine bağlı olarak göstermektedir [27,28]. Bu enzim üstelik homosistein tiyolakton, glikokortikoit gama-lakton vb. 30 farklı lakton molekülünü hidrolizleyebilme kapasitesine sahiptir [14].



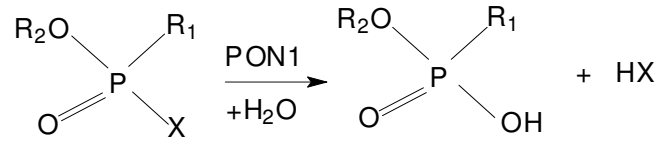
**Şekil 1.3.** Lakton hidrolizi [17]

İnsan serum PON1 enzimi ayrıca paration, diazinon ve klorpirifos gibi çok sayıda insektisit toksik okson metabolitlerini [29] (Şekil 1.4) ve soman, sarin ve tabun gibi organofosfat sinir ajanlarını hidrolizleyebilmektedir [30] (Şekil 1.5).



**Şekil 1.4.** İsektisitlerde yaygın olarak kullanılan okson metabolitlerinin hidrolizi

[17]



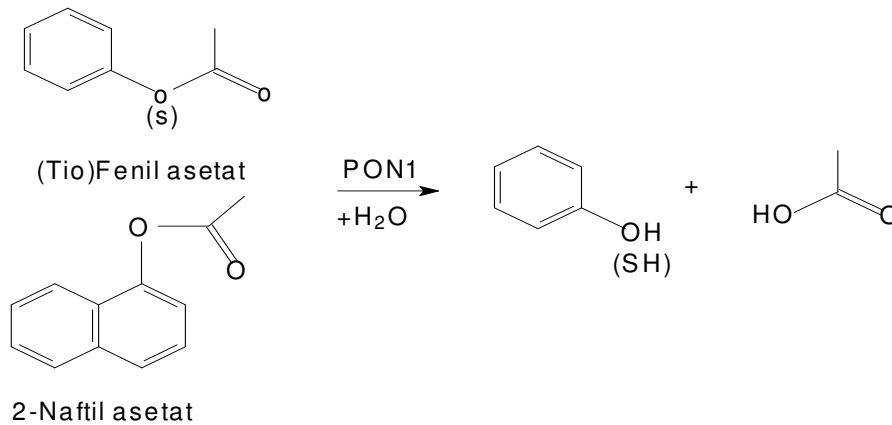
$\text{R}_1 = \text{N}(\text{CH}_3)_2$      $\text{R}_2 = \text{CH}_2\text{CH}_3$      $\text{X} = \text{CN}$     Etil N-dimetilfosforoamidosiyanid (Tabun)

$\text{R}_1 = \text{CH}_3$      $\text{R}_2 = \text{CH}(\text{CH}_3)_2$      $\text{X} = \text{F}$     Izopropil metilfosfonofluoridat (Sarin)

$\text{R}_1 = \text{CH}_3$      $\text{R}_2 = \text{CH}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{CH}_3)_3$      $\text{X} = \text{F}$     Pinakolil metilfosfonofluoridat (Soman)

**Şekil 1.5.** Sinir gazlarının hidrolizi [17]

Bu aktivitelerinin yanında fenilasetat gibi ester substratlarını da hidrolizleyebilmektedir [29] (Şekil 1.6).



**Şekil 1.6.** Aromatik esterlerin hidrolizi [17]

### 1.2.5 PON1'in HDL'ye Bağlanması

PON1 geni, fonksiyonel polimorfizm içeren , PON1 enziminin hem yüzey hem de substrat spesifikliğini etkileyen kod ve promotor bölgelere sahiptir [31]. Diğer memeli serumlarının yanı sıra insan ve sığır serumunda paraoksonaz enziminin N-terminal bölgesi, HDL' nin ApoA1 apolipoprotein kısmıyla da bağlantılıdır [13]. Dolayısıyla, paraoksonazın yapısında bulunan N-terminal hidrofobik sinyal peptidi, HDL ile etkileşim için gerekmektedir [21].

### 1.2.6 Enzimin Kullanım Alanları ve Hastalıklarla Olan İlişkisi

PON, lipit metabolizmasında;

- a) Aktif oksitlenmiş fosfolipitlerin hidrolizasyonu (fosfataz A<sub>2</sub>)
- b) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve lipit hidroperoksitlerinin yıkımı (peroksidaz aktivitesi)
- c) Endotel hücrelere bağlanmanın azaltılması
- d) HDL fonksiyonu ve bütünlüğünün korunmasından dolayı önemli görevler üstlenmektedir [11].

Paraoksonaz enzimi toksikolojide incelenmesine rağmen, HDL nin oksidatif özellikleri üzerindeki etkisine de son 10 yıldır çalışılmaktadır [13]. PON1, organofosfatların hidrolizi ile düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) oksidasyonunu ve lipoprotein peroksidasyonunu önleyerek bir antioksidan görevi görür. Bu fonksiyon, muhtemelen lipit peroksitlerinin hidrolizi ile bağlantılı olup insanlarda arterosklerozun önlenmesi açısından önemlidir [12,32,33]. Çünkü, LDL oksidasyonunun, arterosklerozun başlangıç ve gelişim evreleriyle ilgisi bulunmakta ve HDL (PON1), HDL nin büyük bir antiarterosklerotik bileşenini oluşturmaktadır [31].

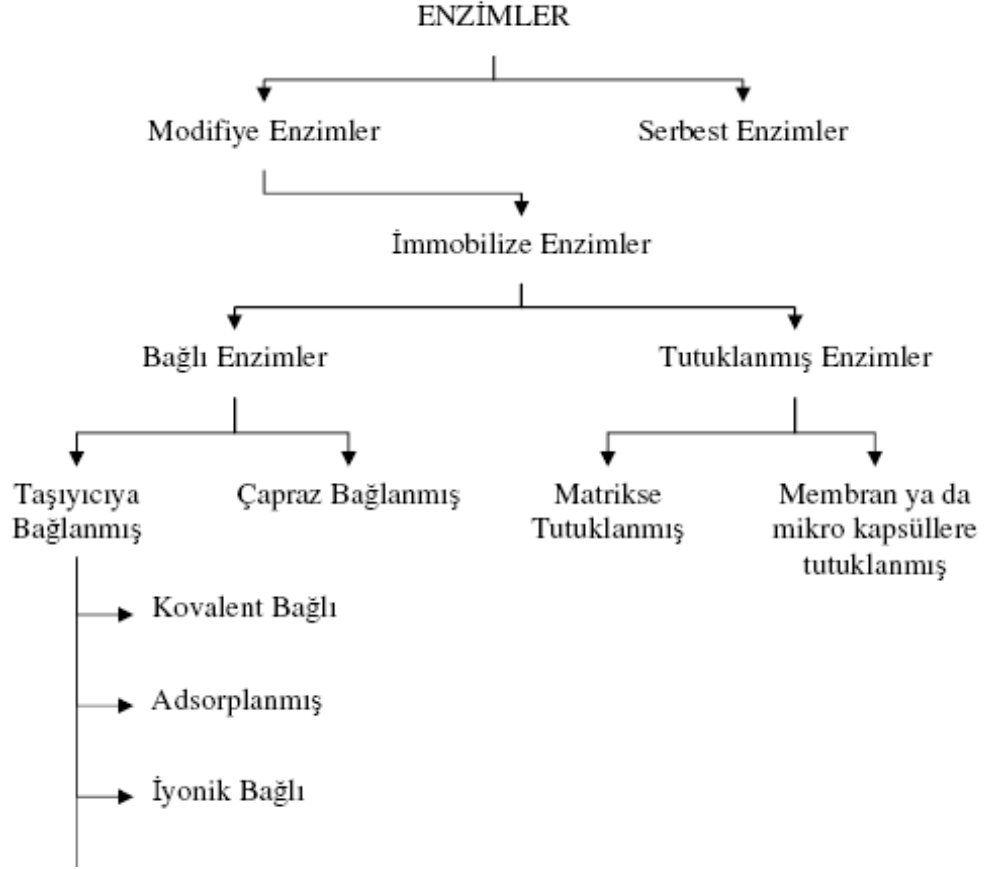
Verilen herhangi bir LDL konsantrasyonu için, HDL-kolesterol konsantrasyonu, dolayısıyla PON1 enzimi, KKH (koroner kalp hastalığı) ile oldukça bağlantılıdır [33]. Fakat; genetik çalışmaların meta-analizleri, PON1 polimorfizmi ile koroner kalp hastalığı KKH arasında benzer bir ilişki göstermemektedir. Buna rağmen, şimdiki çalışmalarda görülmektedir ki; PON1 enziminin aktivitesi veya konsantrasyonu, KKH ile çok yakından ilişkilidir. Dolayısıyla süregelen çalışmalarda ve genetik polimorfizm ile de karşılaştırıldığında, PON1 enzimi KKH için bağımsız bir risk faktörü oluşturmaktadır [31].

PON1 düzeyinin; sigara içenlerde, hiperkolesterolemide, ileri yaşta, obezitede, menopozda ve böbrek yetmezliklerinde azaldığı ortaya konulmuştur [32]. Yüksek oksidatif stres ve koroner kalp hastalığı ile bağlantılı olan kronik böbrek yetmezliği, PON1, katalaz ve süperoksit dizmutaz antioksidant enzimatik aktivitelerinin yetersizliğinden dolayı görülmektedir. Organofosfat bileşiklerinin çoğu nörotoksiktir. PON1 enzimi, organofosfat ve lipit peroksitlerini detoksifiye edebilme özelliği ile Alzheimer ve Parkinson gibi nörolojik hastalıkların saptanmasında anahtar element haline gelmiştir [14].

### **1.3 Enzim İmmobilizasyonu**

#### **1.3.1 İmmobilize Enzimlerin Sınıflandırılması ve Özellikleri**

İmmobilize enzim, hareketi bir yüzeyde veya belirli bir bölgede tamamen yada kısmen sınırlandırılan enzimdir [34]. İmmobilize enzim çeşitlerinin sınıflandırılması Şekil 1.7' de gösterilmiştir [35].



Şekil 1.7. İmmobilize enzimlerin sınıflandırılması [35]

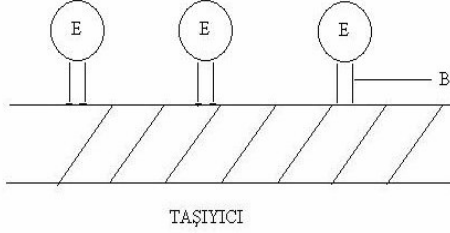
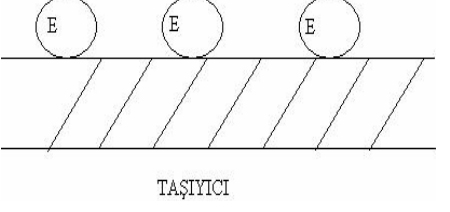
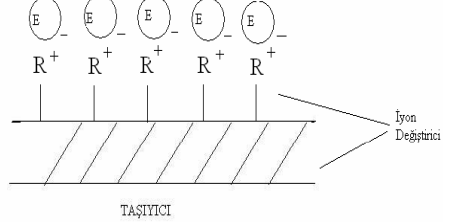
İmmobilize enzimlerin özellikleri: Çoklu yada tekrar tekrar kullanılabilirler, reaksiyon ortamından immobilize enzimin alınmasıyla reaksiyon kolayca durdurulabilir yada ilave edilmesiyle hızlandırılabilir, kolayca stabilize edilebilirler, ürün kirliliğine rastlanmaz, (özellikle ilaç ve gıda endüstrisi), enzimin üründen ayrılması daha kolaydır, multienzimli reaksiyon sistemleri geliştirilmiştir, dış etkilere karşı dayanıklıdır [34].



### 1.3.2 Taşıyıcıya Bağlı İmmobilize Enzimler

Taşıyıcıya bağlı immobilize enzim çeşitleri Çizelge 1.1' de gösterilmektedir.

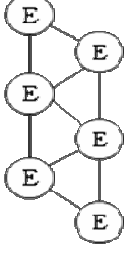
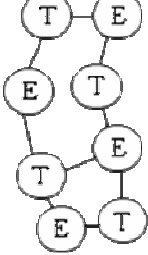
Çizelge 1.1. Taşıyıcıya bağlı immobilize enzim çeşitleri [35,36]

İmmobilizasyon Türü	Şematik Gösterimi	Özellikleri
<b>Kovalent Bağlama</b>		<p><b>Avantaj:</b> Enzim kaçıışı yok, sürekli sistemlere uygulanabilir, optimizasyon var.</p> <p><b>Dezavantaj:</b> Rejenerasyon yok, enzim denatürasyonu, yanlış bağlanma</p>
<b>Adsorptif Bağlama</b>		<p><b>Avantaj:</b> İşlem basit, denatürasyon riski yok. enzim saflaştırma olanağı var.</p> <p><b>Dezavantaj:</b> Enzim kaçıışı hızlı, ürün kirliliği mevcut optimizasyon zor</p>
<b>İyonik Bağlama</b>		<p><b>Avantaj:</b> Rejenerasyon mümkün, kolay işlem, enzim aktivitesi korunabilir.</p> <p><b>Dezavantaj:</b> Taşıyıcı ile enzim arası bağ zayıf, enzim kaçıışı hızlı, ürün kirliliği mevcut.</p>

### 1.3.3 Çapraz Bağlı İmmobilize Enzimler

Çapraz bağlı immobilize enzim çeşitleri Çizelge 1.2' de gösterildiği gibidir.

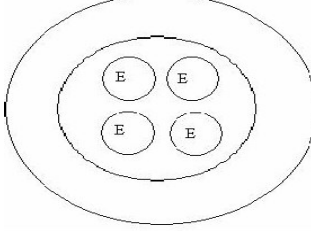
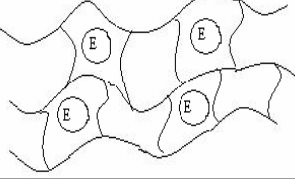
Çizelge 1.2. Çapraz bağlı immobilize enzim çeşitleri [37]

Enzim İmmobilizasyon Türü	Şematik Gösterimi	Özellikleri
Homo-çapraz Bağlama		<p><u>Avantaj:</u> Enzim çok güçlü bağlanır, adsorplanmış enzimler stabilize edilerek enzim kaçıışı önlenir.</p> <p><u>Dezavantaj:</u> Enzim hareketi sınırlı, hazırlanması zor, genl uygulanabilirliği düşük, rejenerasyon mümkün değil</p>
Ko-çapraz Bağlama		<p><u>Avantaj:</u> Homo-çapraz bağlama metoduna göre güvenilirlik, aktivite, kararlılık daha fazla.</p> <p><u>Dezavantaj:</u> Homo-çapraz bağlama metoduna göre maliyeti daha fazla.</p>

### 1.3.4 Tutuklanmış İmmobilize Enzimler

Tutuklama yöntemi ile immobilize edilmiş enzim çeşitleri Çizelge 1.3' de gösterildiği gibidir.

Çizelge 1.3. Tutuklanmış immobilize enzim çeşitleri [35,38,39]

Enzim İmmobilizasyon Türü	Şematik Gösterimi	Özellikleri
<b>Mikrokapsülleme</b>		Hücreler yarı geçirgen bir zardan oluşan mikrokapsüller içine tutulurlar. Sistemin temeli zarın seçiciliğine dayandığından gözenek çapından büyük olan moleküller zar dışına çıkamazlar. Bu yöntemden küçük molekül ağırlıklı ürün elde edilmesinde faydalanılır. Mikrokapsüller genellikle küreseldir.
<b>Polimer Matriste Tutuklama</b>		Bu yöntem, polimerizasyonun gerçekleştiği ortamda, çapraz bağlı taşıyıcılarla enzimin tutularak hapsedilmesi esasına dayanır. Böylelikle enzim kaçıışı mümkün değildir.

Enzim immobilizasyon yöntemlerini karşılaştıracak olursak;

**Çizelge 1.4.** Enzim immobilizasyon yöntemlerinin karşılaştırılması [36, 37]

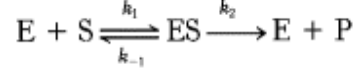
	<b>Kovalent Bağ</b>	<b>Adsorpsiyon</b>	<b>İyonik Bağ</b>	<b>Çapraz Bağ</b>	<b>Tutuklama</b>
<b>Hazırlama</b>	Zor	Kolay	Kolay	Zor	Zor
<b>Enzim Aktivitesi</b>	Yüksek	Düşük	Yüksek	Orta	Yüksek
<b>Bağ Gücü</b>	Kuvvetli	Zayıf	Orta	Kuvvetli	Kuvvetli
<b>Substrat Spesifikliği</b>	Değişebilir	Değişmez	Değişmez	Değişebilir	Değişmez
<b>Rejenerasyon</b>	Mümkün değil	Mümkün	Mümkün	Mümkün değil	Mümkün değil
<b>İmmobilizasyon Masrafı</b>	Yüksek	Düşük	Düşük	Orta	Düşük
<b>Genel Uygulanabilirlik</b>	Orta	Düşük	Orta	Düşük	Yüksek

## 1.4 Enzim Kinetiği

### 1.4.1 Enzim Kinetiği ve Michaelis-Menten Eşitliği

Enzim kinetiği, enzimler tarafından katalizlenen kimyasal reaksiyonların, reaksiyon hızlarını inceleyen bir çalışma alanıdır [40]. 1913 yılında Leonar Michaelis ve Menten, enzimlerin kinetik özelliklerini açıklamak için basit bir model

ileri sürmüşlerdir. Bu modele göre; birçok enzimin kinetik özellikleri en basit biçimde;



formülü ile ifade edilebilir. Bu formüle göre; ES kompleksi  $k_{-1}$  orantı katsayısı ile enzim ve substrata parçalanırken,  $k_2$  orantı katsayısı ile ürünü oluşturur. Enzim  $k_1$  orantı hızıyla substrata bağlanarak ES kompleksini oluşturur. Buradan;

$$[ES] \text{ oluşum hızı} = [ES] = k_1 \cdot [E] \cdot [S]$$

$$[ES] \text{ parçalanma hızı} = k_{-1} \cdot [ES] + k_2 \cdot [ES]$$

eşitlikleri elde edilir.

$$k_1[E][S] = (k_{-1} + k_2)[ES]$$

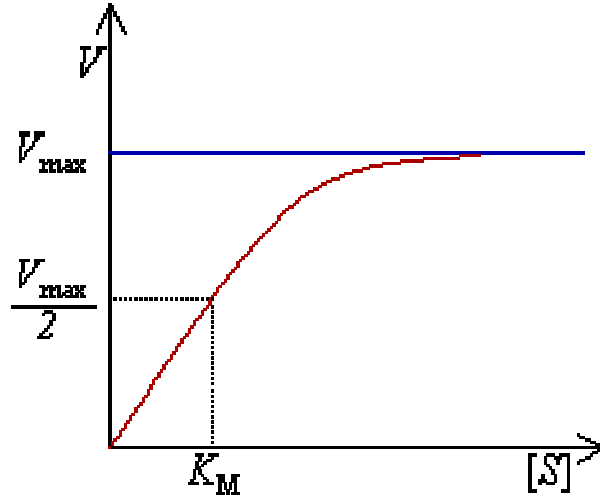
Maksimum hıza ulaşabilmek için ortamdaki toplam enzim konsantrasyonu bilinmelidir.

$$[E][S]/[ES] = (k_{-1} + k_2)/k_1$$

$K_m$ , karşılıklı enzim-substrat etkileşimini karakterize eden önemli bir birim olup enzim ve substrat konsantrasyonundan bağımsızdır. Buradan;

$$V_0 = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

Michaelis-Menten eşitliği elde edilir [3] (Şekil 1.8).



Şekil 1.8. Michaelis-Menten Grafiği [3]

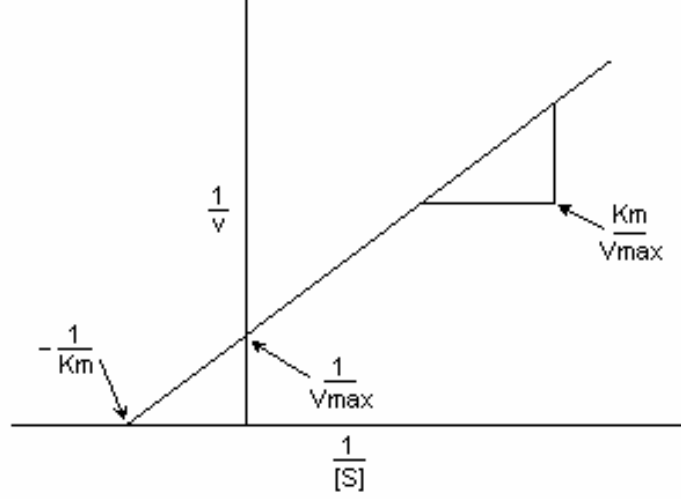
Sabit substrat konsantrasyonuna ulaşıldığı andaki enzim hızı ( $V_{max}$ ), maksimum hız olarak tanımlanır.  $K_m$  değeri ise; enzimin maksimum hızının yarısına ulaşılması için gerekli substrat konsantrasyonu olarak tanımlanır. Her enzime özgü karakteristik Michaelis-Menten sabiti ( $K_m$ ) vardır. Ayrıca  $K_m$  değeri, enzimin substrata karşı ilgisinin bir ölçüsüdür [40,41].

Michaelis-Menten denkleminin kullanıldığı bir hiperbolik eğride, ilgili enzime ait  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerlerini net olarak hesaplayabilmek için grafiği doğrusal olan Lineweaver-Burk denklemi önerilmiştir. Lineweaver-Burk denklemi, Michaelis-Menten denkleminin ters çevrilmesiyle elde edilir [4,42,43] (Şekil 1.9).

$$V_0 = V_{max} \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

↓

$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]}$$

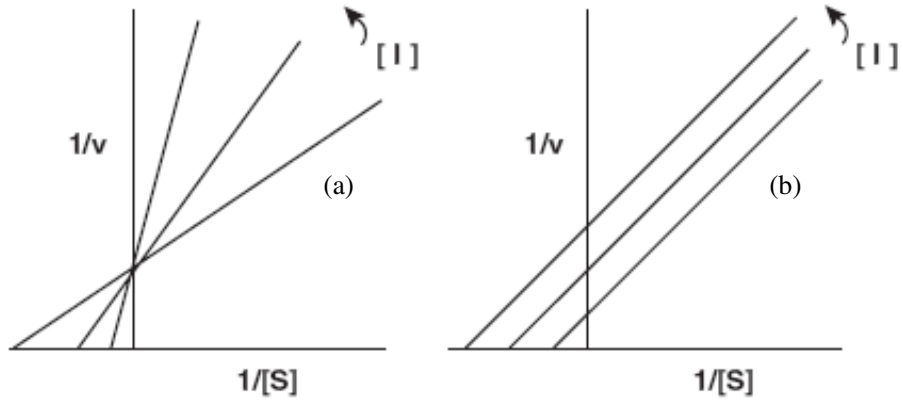


Şekil 1.9. Linawear-Burk Grafiği [4,44]

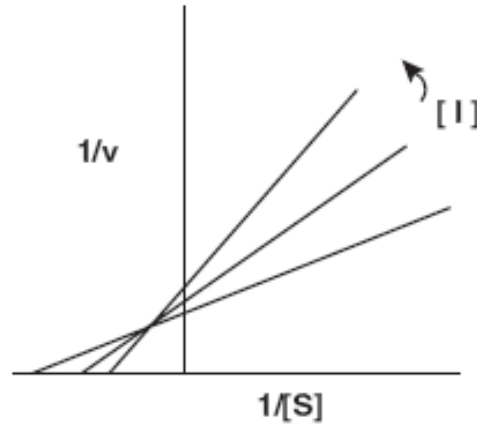
## 1.5 Enzim İnhibisyonu

### 1.5.1 Enzim İnhibisyon Çeşitleri

Enzim ihibisyon çeşitleri kompetitif, nonkompetitif ve unkompetitif inhibisyon olmak üzere üç gruba ayrılır. Enzim inhibisyon türlerine özgü grafikler Şekil 1.10 ve Şekil 1.11' de görüldüğü gibidir [4].



**Şekil 1.10.** (a) Kompetitif ve (b) Unkompetitif İnhibisyon Çeşitleri [4]



**Şekil 1.11.** Nonkompetitif İnhibisyon Çeşidi [4]

Kompetitif inhibisyonda, enzimin substratı ile yarış halinde olan kompetitif inhibitörler, enzimin aktif bölgesine bağlanırlar. Substrat konsantrasyonunun inhibitör konsantrasyonundan yüksek olduğu durumlarda aktif bölgeye substrat bağlanarak  $V_{max}$  hıza ulaşılabilir. Nonkompetitif inhibisyonda, inhibitörler substratla enzimin aynı aktif bölgesine bağlanmazlar. Yüksek substrat konsantrasyonunda da enzimin inhibisyonu engellenemez. Yarışmasız inhibitör, serbest enzime yada ES kompleksine bağlanarak reaksiyon hızını azaltır.



Unkompetitif inhibisyonda ise, inhibitör yapısı gereği sadece ES kompleksine bağlanabilir ve bunun sonucunda ürün oluşumu gözlenmez [4,45] (Çizelge 1.5).

**Çizelge 1.5.** Enzim İnhibisyon Çeşitleri [4]

<b>İnhibisyon Çeşidi</b>	<b>Şematik Gösterimi</b>	<b>Km, Vmax</b>
<b>Kompetitif İnhibisyon</b>	$E + S \rightleftharpoons ES \longrightarrow E + P$ $\begin{array}{c} \updownarrow \pm I \\ EI \end{array}$	Vmax değişmez Km artar
<b>Nonkompetitif İnhibisyon</b>	$E + S \rightleftharpoons ES \longrightarrow E + P$ $\begin{array}{c} \updownarrow \pm I \\ EI \end{array} \quad \begin{array}{c} \updownarrow \pm I \\ ESI \end{array}$	Vmax azalır Km değişmez
<b>Unkompetitif İnhibisyon</b>	$E + S \rightleftharpoons ES \longrightarrow E + P$ $\begin{array}{c} \updownarrow \pm I \\ ESI \end{array}$	Vmax azalır Km azalır

Bu deneyin amacı, hidrofobik etkileşim kromatografi yöntemi ile saflaştırılan sığır paraoksonaz enziminin glutaraldehit kullanılarak immobilize edilmesi ve bazı ağır metallerin enzim aktivitesi üzerindeki etkilerinin araştırılmasıdır. Çünkü, paraoksonaz enzimi toksikoloji ve sağlık alanlarında etkili olduğu kadar endüstriyel alanda da büyük öneme sahiptir.

## 2. MATERYAL VE YÖNTEMLER

### 2.1 MATERYALLER

#### 2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bu çalışmada, Sepharose-4B, 1-Naftilamin, L-tirozin, sodyum hidroksit, sodyum klorür, amonyum sülfat, hidroklorik asit, tris-baz, paraokson, aseton, kalsiyum klorür, tris-HCl ve sodyum dihidrojen fosfat vb. kimyasal maddeler Merck'den sağlanmıştır.

#### 2.1.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar

Bu çalışmada aşağıdaki alet ve cihazlardan yararlanılmıştır [46].

Buz makinesi	Fiocetti Scotsman otomatik buz makinesi
Çalkalayıcı	Biolab 1575-2B çalkalayıcı
Magnetik karıştırıcı ve ısıtıcı	ARE Magnetic, heating stirrer IKA Combimag RCO
Masa santrifüjü	Hettich Zentrifugen EBA 12R

pH metre	Orion-model 920 A
UV-Spektrofotometre	CARY 1E, UV-Visible Spectrophotometer- Varian
Soğutmalı Santrifüj	Sigma Laborzentrifügen 3K 15/10706/10707
Hassas Terazî	Libror, AEG-220 (Shimadzu)
Otomatik pipetler	Eppendorf, Medisis

### 2.1.3 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

Deneysel çalışma için kullanılan çözeltiler aşağıda belirtildiği gibi hazırlanmıştır [17,46].

#### 1. Hidrofobik jelin sentezinde kullanılan tamponlar:

- 0.1M NaHCO<sub>3</sub> tamponu (pH 10.0); 8,401g (0.1 mol) NaHCO<sub>3</sub> 950 mL distile suda çözülerek, 1N NaOH ile pH'sı 10,0'a getirildi ve son hacim 1 L'ye tamamlandı.
- 0.2 M NaHCO<sub>3</sub> tamponu (pH 8.8); 8,401 g (0.1 mol) NaHCO<sub>3</sub> 450 mL distile suda çözülerek, 1N NaOH ile pH'ı 8,8'e getirildi ve son hacim distile su ile 500 mL'ye tamamlandı.

- 0.01 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  tamponu (pH 6.0); 1,42 g (0,01 mol)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  950 mL distile suda çözülerek, 1N NaOH ile pH'sı 6.0'a getirildi ve son hacim distile su ile 1L'ye tamamlandı.

## **2. Hidrofobik jelin dengelenmesi için kullanılan tampon:**

- 1M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  içeren, 0.1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  tamponu (pH 8.0); 14,2g (0.1 mol)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ve 132,14 g (1 mol)  $\text{NH}_4(\text{SO})_2$  950 mL distile suda çözülerek, 1N HCl ile pH'sı 8,0'e getirildi ve son hacim distile su ile 1L'ye tamamlandı.

## **3. Hidrofobik jele bağlanmış PON1 enziminin dengelenmesi için kullanılan çözelti:**

- 1M  $\text{NH}_4(\text{SO})_2$  içeren, 0.1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  tamponu (pH 8,0) ve 0.1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  tamponu (pH 8,0) ile gradient mikser kullanılarak tuz gradienti oluşturuldu; 14,2g (0.1 mol)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ve 132,14 g (1 mol)  $\text{NH}_4(\text{SO})_2$  950 mL distile suda çözülerek, 1N HCl ile pH'sı 8.0'e getirildi ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

## **4. Hidrofobik jele bağlanmış PON1 enziminin elüsyonu için kullanılan çözelti:**

- 14,2 g (0.1 mol)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  950 mL distile suda çözülerek, 1 N HCl ile pH'sı 8,0'e getirildi ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

## **5. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda oluşan çökeleğin alındığı tampon:**

- 0,1 M Tris-Baz tamponu (pH 8,0); 1.211 g (0,01 mol) tris-Baz 95 mL distile suda çözülerek, 1N HCl ile pH'ı 8,0'a getirildi ve son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

#### 6. Substrat çözeltisi:

- 2 mM paraokson çözeltisi; 10,8 µl paraokson, 1 mL asetonda iyice çözüldükten sonra üzerine 1 mL bazal aktivite tamponu eklendi ve iyice karıştırıldıktan sonra kullanıldı.

#### 7. Paraoksonaz aktivite ölçümünde kullanılan bazal aktivite tamponu:

- 2 mM CaCl<sub>2</sub> içeren 100 mM tris-HCl, pH=8; 3,0285 g (25mmol) Tris, 200 mL distile suda çözüldü. 1 N HCl ile pH'ı 8,0'e getirildi. 0,0555 g (0,5 mmol) CaCl<sub>2</sub> katılarak son hacim 250 mL'ye tamamlandı.

#### 8. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan numune tamponu:

0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	2,5 mL
% 10'luk SDS	4,0 mL
Gliserol	2,0 mL
β-merkaptotanol	1,0 mL
Bromfenol mavisi	0,01 g
Distile su	0,5 mL

#### 9. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan tank tamponu:

Tris-HCl	3 g
Glisin	14,4 g
SDS	1,0 g

#### **10. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renklendirme çözeltisi:**

- 0,66 g Coomassie brilliant blue G-250, 120 mL metanolde çözüldü. Bu çözeltiye 24 mL saf asetik asit ve 120 mL distile su ilave edildi.

#### **11. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renk açma çözeltisi:**

- Hacimce % 7,5 asetik asit, % 5 metanol ve % 87,5 mL distile su içermektedir. Bu amaçla 75 mL asetik asit ve 50 mL metanol, 875 mL saf su ile karıştırıldı.

#### **12. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan ayırma ve yığma jellerinin hazırlanışı:**

- SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının hazırlanışı ve kullanılan miktarları Çizelge 1.6'da verilmektedir.

**Çizelge 1.6.** SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının miktarları [17,46].

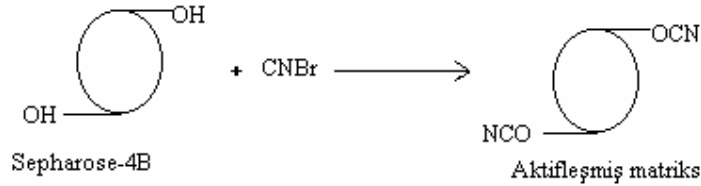
	Ayırma Jeli	Yığıma Jeli
	%10	%3
<p><b><u>Akril amid/Bis</u></b>  Akril amid            15 g  Bis                      0,4 g  Alınarak son hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlanır.</p>	8,325 mL	1,3 mL
<p><b><u>Distile su</u></b></p>	10,05 mL	6,1 mL
<p><b><u>1.5 M tris-HCL (pH 8.8)</u></b>  Tris-HCl            11.82  Alınarak pH 8.8 oluncaya kadar 0.1 M NaOH ilave edilerek son hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlanır.</p>	6,25 mL	–
<p><b><u>0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)</u></b>  Tris-HCl            3.94 g  Alınarak pH 6.8 oluncaya kadar 0.1 M NaOH ilave edilerek son hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlanır.</p>	–	2,5 mL
<p><b><u>% 10 'luk SDS</u></b>  SDS                    1g  Alınarak son hacim distile su ile 10 mL'ye tamamlanır.</p>	0,25 mL	100 µL
<p><b><u>TEMED</u></b></p>	13 µL	10 µL
<p><b><u>%10'luk amonyum persülfat</u></b>  Amonyum persülfat    1g  Alınarak son hacim distile su ile 10 mL'ye tamamlanır.</p>	400 µL	200 µL

## 2.2 YÖNTEMLER

### 2.2.1 Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile paraoksonaz enziminin saflaştırılması

#### 2.2.1.1 Sepharose 4B'nin aktifleştirilmesi

10 mL Sepharose-4B jeli, saf su ile iyice yıkanarak dekante edildi. Eşit hacimde distile su ile birleştirildi. Karıştırılmakta olan jel süspansiyonuna 4 g CNBr'in hepsi birden katıldı. pH metre kullanılarak süspansiyonun pH'sı 4 M NaOH ile hemen 11'e çıkarıldı ve reaksiyon bu pH'da muhafaza edildi. Reaksiyona pH değişmeye kadar devam edildi. (10-15 dakika) Çok miktarda buz süspansiyona katıldı ve karışım bir buhner hunisine nakledildi. Daha sonra 250 mL soğutulmuş 0,1 M Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub> tamponu (pH 10,00) ile yıkandı (Şekil 2.1).



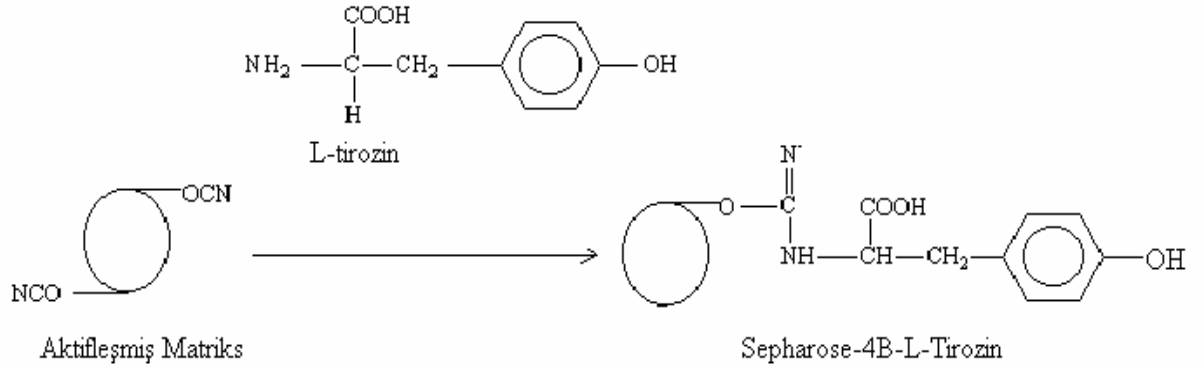
Şekil 2.1. Sepharose 4B'nin aktifleştirilmesi

#### 2.2.1.2 L-tirozinin Bağlanması

CNBr ile aktifleştirilmiş matriks üzerine, 20 mL'sinde 15 mg tirozin içeren 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> tamponunun (pH 10,00) soğuk çözeltisi ilave edilerek 90 dk



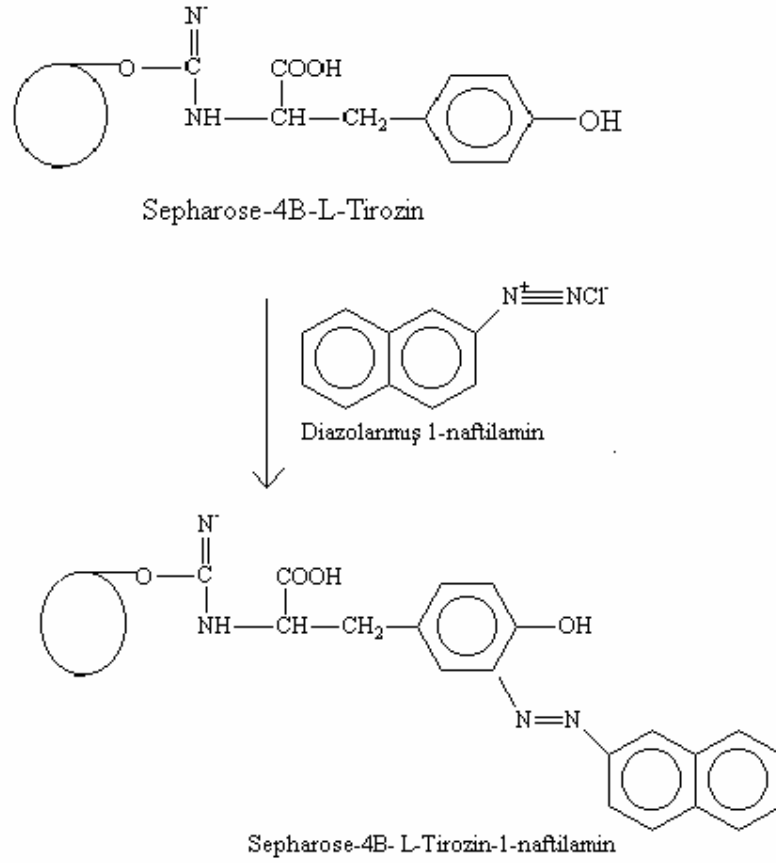
karıştırıldı. Bundan sonra süspansiyon 16 saat 4°C’de bekletildi. Bu sürenin bitiminde yıkama suyu 280 nm’de absorbands vermeyinceye kadar bol su ile yıkandı. Böylece reaksiyona girmeyen tirozin tamamen uzaklaştırılmış oldu. Yıkama 100 mL 0,2 M NaHCO<sub>3</sub> tamponu (pH: 8,8) ile tekrarlandı. Tirozinle modifiye sepharose-4B aynı tamponun 40 mL’si içine alındı (Şekil 2.2).



**Şekil 2.2.** L-Tirozinin Bağlanması

### 2.2.1.3 1-Naftilamin Bileşiğinin Bağlanması

25 mg 1-naftilamin 0 °C civarında 10 mL 1M HCl içerisinde çözüldü. 75 mg NaNO<sub>2</sub> ihtiva eden 0 °C’deki 5 mL çözelti, 1-naftilamin çözeltisine damla damla katıldı. (1-Naftilamin çözeltisi hazırlanırken etanol ilave edilerek ısıtıldı) 10 dakika reaksiyondan sonra diazolanmış bulunan 1-Naftilamin, 40 mL Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonuna ilave edildi. pH: 9,5’a çıkarılarak sabit tutuldu ve 3 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Daha sonra 1 L saf su ve ardından 200 mL 0,01M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH: 6,0) tamponu ile yıkandı ve aynı tamponda muhafaza edildi [17,46] (Şekil 2.3).



**Şekil 2.3.** 1-Naftilamin bileşiğinin bağlanması [17,46]

### 2.2.2 Amonyum Sülfat Çöktürme Aralığının Belirlenmesi

Amonyum sülfat, belirli doygunluk derecelerine göre belirli proteinlerin çökelmesini sağlayan 2 değerlikli, çok kullanılan bir tuzdur. Öncelikle, kullanılacak uygun amonyum sülfat konsantrasyonu aşağıda verilen formülle tespit edildi:

$$g(NH_4)_2SO_4 = \frac{1.77xVx(S_2 - S_1)}{3.54 - S_2}$$

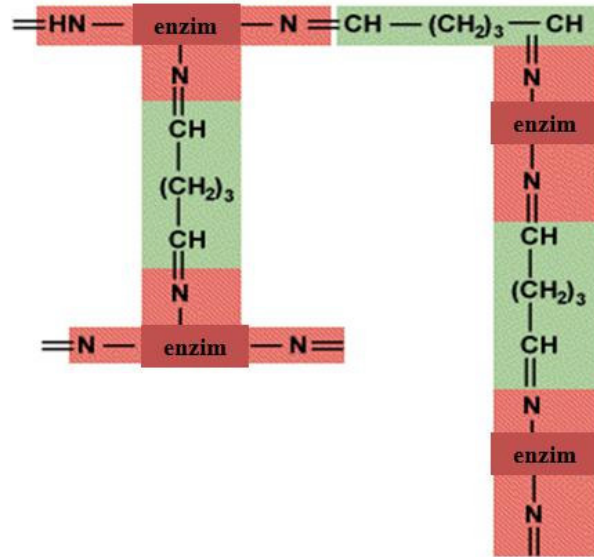
V : Serum hacmi

S<sub>1</sub> : 1'in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğu

S<sub>2</sub> : 1'in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğu

Paraoksonaz enzimini saflaştırmak amacıyla sığır serumu 5000 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüj edildikten sonra amonyum sülfat ile % 60 doygunluğa getirildi ve 15000 rpm'de 4°C'de 30 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı alınıp çöken kısım atıldı. Daha sonra ayrılan süpernatant kısmı amonyum sülfat ile % 80 doygunluğa getirildi ve 15000 rpm'de 4°C'de 30 dakika santrifüj edildikten sonra çöken kısım alınıp süpernatant kısmı atıldı [17,46].

### 2.2.3 Glutaraldehit ile İmmobilizasyon Basamağı



Şekil 2.4. Glutaraldehit ile immobilizasyonun temel prensibi [36, 37]

Glutaraldehit ile immobilizasyonun temel prensibi; serbest enzim molekülleri ile glutaraldehit homo çapraz bağlayıcı reaktifi kullanılarak çapraz bağlı enzim agregasyonları oluşturulur (Şekil 2.4). Glutaraldehit reaktantının önemi, her iki ucunun da reaktif olmasıdır. Böylelikle birçok enzim molekülünün bir arada bulunmasıyla çözünür yapı çözünmez özellik kazanarak enzim molekülleri güçlü bağlanır. Glutaraldehit ile çapraz bağlı agregasyon immobilizasyonu, çapraz bağlı immobilizasyon çeşidinin bir alt kümesi olarak düşünülebilir. Bu yöntemin avantajı, glutaraldehit dışında herhangi bir taşıyıcıya gerek duyulmadığından uygulaması diğer immobilizasyon çeşitlerine göre daha basittir. Ayrıca uygulaması kolay olduğu için zamandan tasarruf edilir, maliyeti de düşüktür.

%25'lik 0,265g/ml yoğunluğundaki glutaraldehit (GA), saf enzime farklı yüzdelerde ilave edildi. Glutaraldehit/ serbest enzim karışımı, 25°C oda sıcaklığında, 65-70 rpm çalkalama hızında bir gün inkübasyona bırakılarak enzim agregasyonları oluşturuldu. Serbest enzim renksiz iken immobilize enzimin renginde kahverengi bir değişim gözlemlendi. Bir gün sonrasında immobilize enzim (5000 rpm, 4°C, 5 dakika) santrifüj edilerek katı ve sıvı faz ayrıldı. Paraoksonaz enzimi, çöken katı kısımda kaldığından, katı faz minimum hacimde 2 mM CaCl<sub>2</sub> içeren Tris-HCl tamponu (100mM, pH:8) ile yıkama işlemine tabi tutulduktan sonra enzim aktivitesi hem serbest hem de immobilize enzim için spektrofotometrede ölçülerek karşılaştırma yapıldı.

#### **2.2.4 Paraoksonaz Enziminin Aktivite Tayini**

Paraoksonaz enziminin aktivitesi spektrofotometrik olarak tayin edildi. Aktivite ölçümü için sırasıyla, 850µl Tris-HCl tamponu (100mM, pH:8) + 100µl substrat çözeltisi (2mM paraokson + 2mM koenzim CaCl<sub>2</sub>) + 100 µl enzim çözeltisi karıştırılıp 412 nm ve 37°C'de 1 dakikada absorbansta meydana gelen değişim okundu. Böylelikle paraoksonun p-nitrofenole enzimatik dönüşüm hızı tespit edildi.

Spektrofotometrede belirtilen absorbans farklarından yola çıkılarak aşağıdaki formüle göre enzim ünitesi hesaplandı [17,46]:

$$E\ddot{U} = \frac{[ \text{Reaksiyon Hacmi (ml)} \times dA/dT \times 1000 ]}{[ C_{412} \times \text{Enzim Hacmi (ml)} \times d \text{ (cm)} ]}$$

d = 1cm, ışık yolu

### **2.2.5. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) ile Enzim Saflığının Kontrolü**

Paraoksonaz enziminin hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılmasından sonra iki farklı akrilamid konsantrasyonunda; yağma jeli % 3, ayırma jeli % 10 olacak şekilde (SDS-PAGE) Laemelli [17,46] tarafından belirtilen yöntemle yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi.

Bu amaçla elektrofrez cam plakaları saf su ile iyice temizlendikten sonra plakalar arasına plastik yerleştirilerek iki cam plaka birbiri üzerine konuldu ve elektrofrezin dökme aparatına sabitlendi. Çizelge 1.6'da belirtildiği şekilde hazırlanan ayırma jeli plakalar arasına üstten 2-3 cm kalana kadar pipet yardımıyla döküldü. Jel içerisinde hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi ve jel yüzeyinin düzgün olması için saf su ile ince bir tabaka oluşturuldu. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra polimerleşmiş ayırma jelinin üzerine yağma jeli ilave edildi. Jel kasetindeki yükleme jelinin üzerine tarak dikkatlice yerleştirilerek jelin polimerleşmesi beklendi (30 dakika). Yükleme jeli polimerleştikten sonra tarak kuyucukların arasından dikkatlice çıkarıldı. Polimerize jellerin bulunduğu kaset elektrofrez tankına yerleştirilerek elektrofrez tankının alt ve üst kısmına yürütme taponu ilave edildi.

Hidrofobik etkileşim kromatografisi sonucu yüksek aktivite gösteren ependorf tüplerindeki örnekler birleştirildi ve elde edilen çözelti ve diğer immobilizasyon örnekleri toplam hacim 100 µl olacak şekilde 1:1 oranında numune tamponuyla karıştırıldı. Jele yüklenecek numuneler 3 dakika 100 °C'de ısıtılarak bekletildi ve daha sonra soğutulularak kuyucuklara yüklendi. Elektroforez güç kaynağına bağlanarak 85 volt'a ayarlandı. Proteinlerin jeldeki hareketini incelemeye yarayan numune tamponu içindeki boyaya ait bant ayırma jeline ulaştığında voltaj 200 volt'a yükseltildi. Yürütme işlemine örnekler, jelin altına 1cm kalana kadar devam edildi. Yığma jeli kesilip ayrıldıktan sonra protein bantlarını içeren ayırma jeli renklendirme çözeltisi içine konuldu ve 1,5-2 saat kadar çalkalayıcı üzerine bırakıldı. Daha sonra jel, renklendirme çözeltisinden çıkartılarak rengin açılması için renksizleştirme çözeltisine konuldu ve elde edilen görüntü bilgisayara aktarıldı.

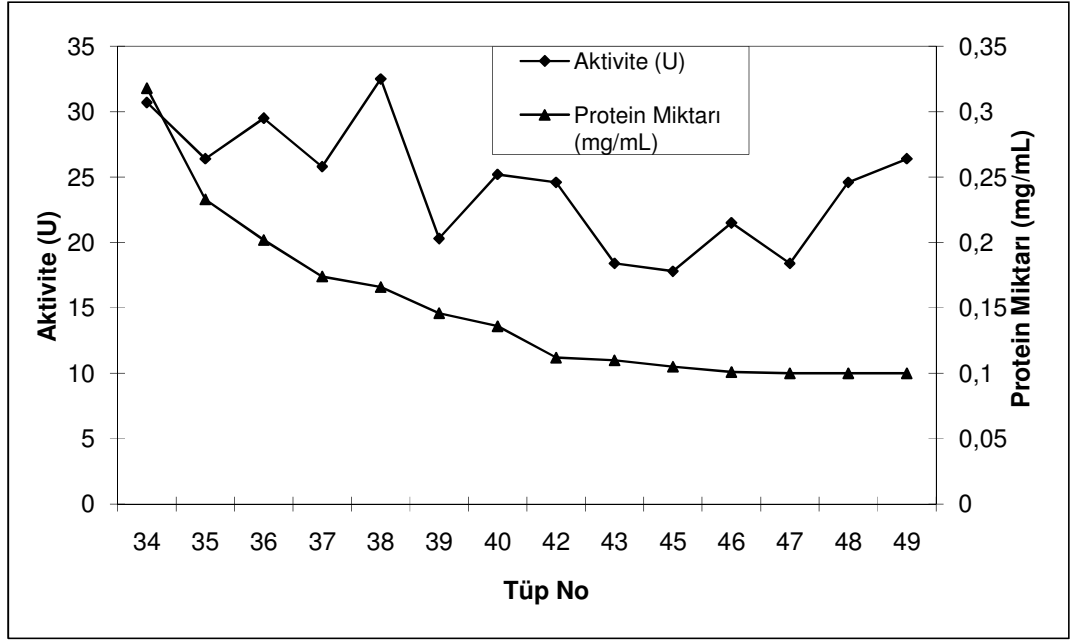
#### **2.2.6. İmmobilize Enzim için İnhibitörlü Ortamda IC<sub>50</sub> Değerlerinin Bulunması**

Farklı inhibitörlerin IC<sub>50</sub> değerlerinin hesaplanabilmesi amacıyla, immobilize enzim için sırasıyla Çizelge 2.8, 2.10 ve 2.12' de belirtilen farklı inhibitör konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbans değerleri 412 nm'de okundu. İmmobilize enzim için denenen inhibitörlere ait konsantrasyon değerleri sırasıyla Çizelge 2.9, 2.11 ve 2.13' de de gösterilmiştir. Elde edilen absorbans değerlerinden enzim ünitesine göre % aktivite hesaplandı. % Aktivite – [I] grafikleri çizilerek ilgili inhibitör için IC<sub>50</sub> değerleri hesaplandı.

### 3. BULGULAR

#### 3.1 Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile PON1 Enzimin Saflaştırılması

Metod bölümünde belirtildiği gibi hazırlanan hidrofobik etkileşim kolonu önce 1M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  içeren 0,1 M Tris-HCl pH:8,0 tamponu ile dengelendi. % 60; 28,89 g amonyum sülfat ile birinci çöktürme (15000 rpm, 4°C, 30 dakika) ve % 80; 10,08 g amonyum sülfat ile ikinci çöktürme yapılarak elde edilen serum çözeltisi 0,1 M Tris-Baz pH:8,0 çökelek tamponu ile 4 ml minimum hacimde seyreltikten sonra kolona tatbik edildi. Kolona 1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  içeren 0,1 M Tris-HCl pH:8,0 tamponu ve 0,1 M Tris-HCl pH:8,0 tamponu ile oluşturulan yüksek tuz konsantrasyonundan düşük tuz konsantrasyonuna doğru tuz gradienti uygulandı. Yıkama ve elüsyon çözeltileri 1,5 ml hacmindeki ependorf tüplerde toplandı. Daha sonra her bir tüp için 280 nm'de kalitatif protein tayini ve 412 nm'de aktivite tayini yapıldı [17]. Enzim aktivitesi enzim ünitesi (mol/dakika) cinsinden hesaplanarak elde edilen değerlerin tüp numarasına karşı aktivite ve protein miktarı grafiği çizildi (Şekil 3.1). Hidrofobik etkileşim kromatografisi sonunda enzim aktivitesine rastlanan tüpler birleştirildi.



**Şekil 3.1.** Hidrofobik etkileşim kolonundan PON1 enziminin elüsyon grafiği

### 3.2 Enzim İmmobilizasyon Basamağı

#### 3.2.1 Enzimin Glutaraldehit ile Farklı Yüzdelerde Karıştırılması

%25'lik 0,265g/ml yoğunluğundaki glutaraldehit, farklı yüzdelerde (% 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ve 10) saf enzime ilave edilerek enzim immobilize edildi ve enzim aktivitesi en fazla % 7 oranında glutaraldehit ilave edilen enzimde görüldü (Çizelge 2.1). Saf enzim çözeltisi, aktivitenin yüksek çıktığı 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 42, 43, 45, 46, 47, 48 ve 49. ependorf tüplerdeki enzim örnekleri karıştırılarak elde edildi.



**Çizelge 2.1.** Serbest enzim, farklı yüzdelerdeki GA miktarları ve immobilize enzim aktiviteleri

<b>Glutaraldehit / Saf Enzim</b>	<b>Glutaraldehit</b>	<b>Glutaraldehit</b>	<b>Serbest Enzim</b>	<b>Absorbans Farkı (Katı Faz)</b>	<b>İmmobilize Enzim Aktivitesi</b>
<b>% Yüzde Oran</b>	<b>Kütle (g)</b>	<b>Hacim (µl)</b>	<b>Kütle (g)</b>	<b> A<sub>2</sub> - A<sub>1</sub> </b>	<b>EÜ (mol/dk.)</b>
1	0,0100	9,430	1,0091	0,071	43,59
2	0,0199	18,773	0,9996	0,003	1,84
3	0,0300	28,301	1,0118	0,044	27,02
4	0,0405	37,735	1,0128	0,021	12,89
5	0,0508	47,92	1,0175	0,004	2,45
6	0,0617	58,21	1,0294	0,018	11,05
7	0,0727	68,58	1,0393	0,078	47,89
8	0,0828	78,11	1,0353	0,002	1,23
9	0,0937	88,39	1,0413	0,012	7,37
10	0,1038	97,92	1,0388	0,030	18,42

Yukarıdaki çizelgede de görüldüğü gibi; immobilize enzim aktivitesi en fazla, glutaraldehit ile % 7 oranında karıştırıldığında gözlenmiştir. Dolayısıyla sonraki deneysel basamaklarda % 7 (GA / saf enzim) oranı dikkate alınarak immobilize enzim aktivitesi hesaplanmıştır.

### 3.2.2 Glutaraldehit ile % 7 Oranında Karıştırılarak İmmobilize Edilen Enzim için Aktivite Tayini

İmmobilize paraoksonaz enzimi için en yüksek aktivite % 7 oranında glutaraldehit ilavesiyle gözleendiğinden, yüksek aktivite gözlenen on dört ependorf tübündeki enzim çözeltileri karıştırılarak, tamamı % 7 oranında immobilize edildi (Çizelge 2.2) ve bu immobilize enzim için 412 nm’de aktivite tayini yapıldı (Çizelge 2.3).

**Çizelge 2.2.** % 7 oranında GA ile karıştırılarak immobilize edilen enzim için GA ve serbest enzim miktarları

Glutaraldehit / Serbest Enzim	Glutaraldehit	Glutaraldehit	Serbest Enzim
% Yüzde Oran	Kütle (g)	Hacim (µl)	Kütle (g)
7	1,2465	1176	17,8066

**Çizelge 2.3.** İmmobilize enzim için aktivite tayin çizelgesi

pH:8 Bazal Aktivite Tamponu (µl)	Substrat (paraokson) (µl)	İmmobilize Enzim (µl)	Absorbans Farkı $ A_2 - A_1 $
850	100	100	0,011
550	400	100	0,022
450	500	100	0,035
350	600	100	0,047

**Çizelge 2.4.** % 7 oranında GA ile karıştırılarak immobilize edilen enzim için EÜ ve substrat konsantrasyon değerleri

<b>Absorbans Farkı  A<sub>2</sub> - A<sub>1</sub> </b>	<b>Enzim Ünitesi(mol/dk.) (EÜ)</b>	<b>1 / EÜ</b>	<b>Substrat Konsantrasyonu [S] (Mx10<sup>-3</sup>)</b>	<b>1 / [S]</b>
0,011	6,7543	0,1480	0,190	5263,1
0,022	13,5087	0,0740	0,762	1312,3
0,035	21,4912	0,0465	0,952	1050,4
0,047	28,8596	0,0346	1,143	874,9

İmmobilize enzim aktivitelerine ilişkin enzim ünite değerleri, paraoksonaz enzim aktivite tayininde belirtilen formüle göre hesaplanmıştır. Substrat konsantrasyonu ise;  $M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$  formülüne göre hesaplanmıştır. Reaksiyonun toplam hacmi 1050µl {850µl Tris-HCl tamponu (100mM, pH:8) + 100µl substrat çözeltisi (2mM paraokson + 2mM koenzim CaCl<sub>2</sub>) + 100 µl enzim çözeltisi} olup farklı substrat hacimleri ve konsantrasyonları da Çizelge 2.4' de verilmektedir.

### **3.2.3 İmmobilize Enzim için Km ve Vmax Değerlerinin Hesaplanması**

İmmobilize için bulgular 3.2.2'de hesapladığımız enzim ünitesi ve substrat konsantrasyonlarından yola çıkılarak Km ve Vmax değerleri hesaplandı.

Linawear-Burk metoduna göre, doğrunun x eksenini ( $-1/K_m$ ) ve y eksenini ( $1/V_{max}$ ) kestiği noktalardan yola çıkılarak  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri hesaplanır (Şekil 3.2).

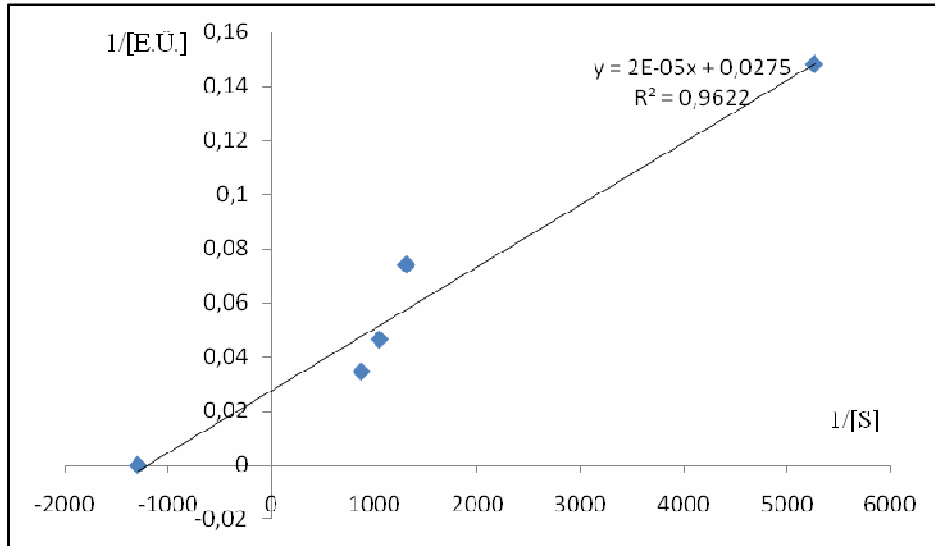
İmmobilize enzim için;

$$y=0 \text{ ise; } -[1/K_m]=-1290$$

$$K_m= 0,775 \times 10^{-3}$$

$$x=0 \text{ ise; } [1/V_{max.}]=0,0258$$

$$V_{max.}=38,76 \text{ e.ü.}$$



**Şekil 3.2.** % 7 oranında GA ile immobilize edilmiş enzim için aktivite tayin grafiği

### 3.2.4 Serbest Enzim için Km ve Vmax Değerlerinin Hesaplanması

Serbest enzime ait Km ve Vmax değerlerinin hesaplanabilmesi için gerekli olan enzim ünitesi ve substrat konsantrasyon değerleri Çizelge 2.6' da belirtilmektedir.

**Çizelge 2.5.** Serbest enzim için aktivite tayin çizelgesi

<b>pH:8 Bazal Aktivite Tamponu (µl)</b>	<b>Substrat (paraokson) (µl)</b>	<b>Serbest Enzim (µl)</b>	<b>Absorbans Farkı <math> A_2 - A_1 </math></b>
850	100	100	0,024
800	150	100	0,030
600	350	100	0,039
400	550	100	0,047
300	650	100	0,053

**Çizelge 2.6.** Serbest enzim için EÜ ve substrat konsantrasyon değerleri

<b>Absorbans</b> <b>Farkı <math>A_2 - A_1</math></b>	<b>Enzim</b> <b>Ünitesi(mol/dk.)</b> <b>(EÜ)</b>	<b>1 / EÜ</b>	<b>Substrat</b> <b>Konsantrasyonu</b> <b>[S] (<math>M \times 10^{-3}</math>)</b>	<b>1 / [S]</b>
0,024	14,7368	0,0678	0,1904	5252,1
0,030	18,4210	0,0543	0,2857	3500,2
0,039	23,9473	0,0418	0,6666	1500,1
0,047	28,8596	0,0346	1,1047	905,2
0,053	32,5438	0,0307	1,238	807,7

Linawear-Burk metoduna göre, doğrunun x eksenini ( $-1/K_m$ ) ve y eksenini ( $1/V_{max}$ ) kestiği noktalardan yola çıkılarak  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri hesaplanır (Şekil 3.3).

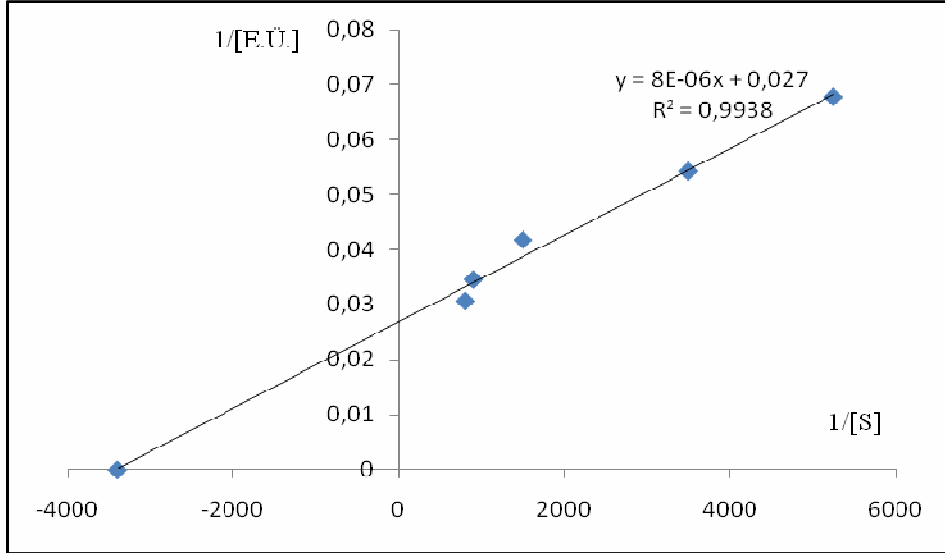
Serbest enzim için;

$$y=0 \text{ ise; } -[1/K_m]=-3400$$

$$x=0 \text{ ise; } [1/V_{max.}]=0,0272$$

$$K_m= 0,294 \times 10^{-3}$$

$$V_{max.}=36,76 \text{ e.ü.}$$



Şekil 3.3. Serbest enzim için aktivite tayin grafiği

Çizelge 2.7. İmmobilize ve serbest enzim için katalitik etkinlik, Vmax ve Km değerlerinin karşılaştırılması

	Vmax (EÜ)	Km (10 <sup>-3</sup> M)	Vmax/Km (10 <sup>3</sup> EÜ/M)
<b>Serbest Enzim</b>	36,76	0,294	125
<b>İmmobilize Enzim</b>	38,76	0,775	50

Hesaplanan Km ve Vmax değerlerine göre immobilize ve serbest enzim için (Vmax/Km) katalitik etkinlikler Çizelge 2.7' de karşılaştırılmış ve immobilize

enzimin substrata olan ilgisi serbest enzime göre daha fazla olmasına rağmen katalitik etkinlik serbest paraoksonazda daha fazladır.

### **3.3 Enzim İnhibisyon Basamağı**

#### **3.3.1 Bazı Metal Bileşiklerinin Paraoksonaz Enzim Aktivitesi Üzerindeki İnhibisyon Etkilerinin İncelenmesi**

##### **3.3.1.1 Kobalt (II) Klorür ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) Bileşiminin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi**

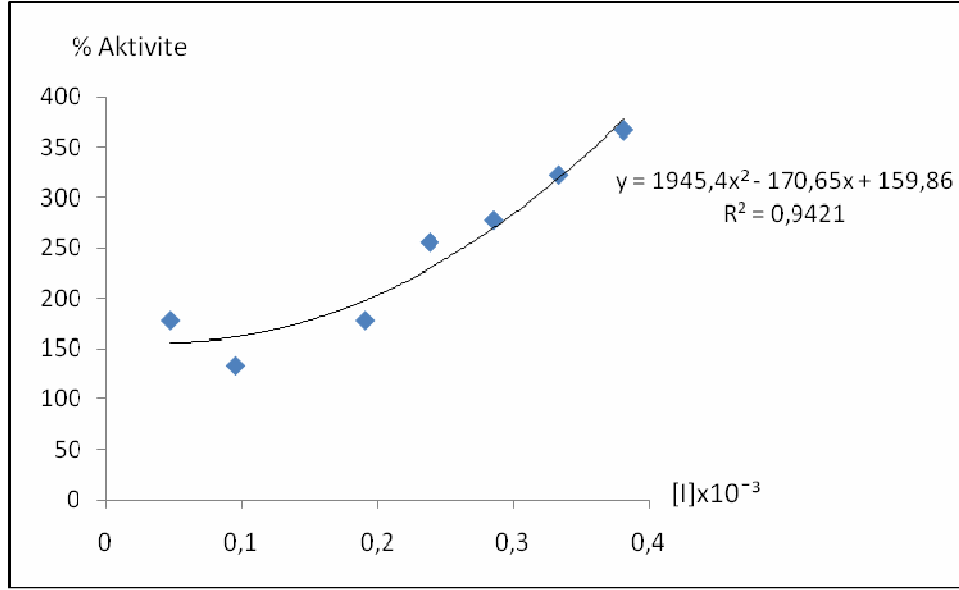
Paraoksonaz enzim aktivite (412 nm) tayin metodunda olduğu gibi önce bazal aktivite tamponu pH:8, sonra substrat çözeltisi (paraokson) küvete pipetler yardımıyla ilave edildi ve enzim çözeltisinden önce inhibitör çözeltisi ilave edilerek son durumda enzim aktivitesinde meydana gelen değişme gözlemlendi. İmmobilize enzim için aktivite tayin çizelgesi (Çizelge 2.8) ve aktivite grafiği aşığıdaki gibidir (Şekil 3.4 ).



**Çizelge 2.8.** (CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O)'lu ortam için immobilize enzim için aktivite çizelgesi

pH:8 Bazal Aktivite Tamponu (µl)	Substrat (paraokson) (µl)	İnhibitör Çözelti (µl)	İmmobilize Enzim (µl)	Absorbans Farkı  A <sub>2</sub> - A <sub>1</sub>	[Inh.] (10 <sup>-3</sup> M)	Aktivite (EÜ)	% Aktivite
850	100	---	100	0,009	---	5,526	---
800	100	50	100	0,016	0,04762	9,824	177,77
750	100	100	100	0,012	0,09524	7,368	133,33
650	100	200	100	0,016	0,19048	9,824	177,77
600	100	250	100	0,023	0,23810	14,123	255,55
550	100	300	100	0,025	0,28570	15,351	277,77
500	100	350	100	0,029	0,33333	17,807	322,22
450	100	400	100	0,033	0,38095	20,263	366,66

MA (CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O) = 237,93 g/mol; [CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O] = 1.10<sup>-3</sup> M değerlerinden yola çıkılarak 0,0059 g CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O tartılarak 25 ml inhibitör çözeltisi hazırlandı. Farklı inhibitör çözelti konsantrasyonları  $M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$  formülüne göre yukarıdaki çizelgede belirtilen hacimler kullanılarak hesaplandı. (V<sub>son</sub> = 1,05 ml) Aşağıdaki grafiğe göre; CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O bileşiğinin immobilize enzimi aktive ettiği görülmektedir (Şekil 3.4).



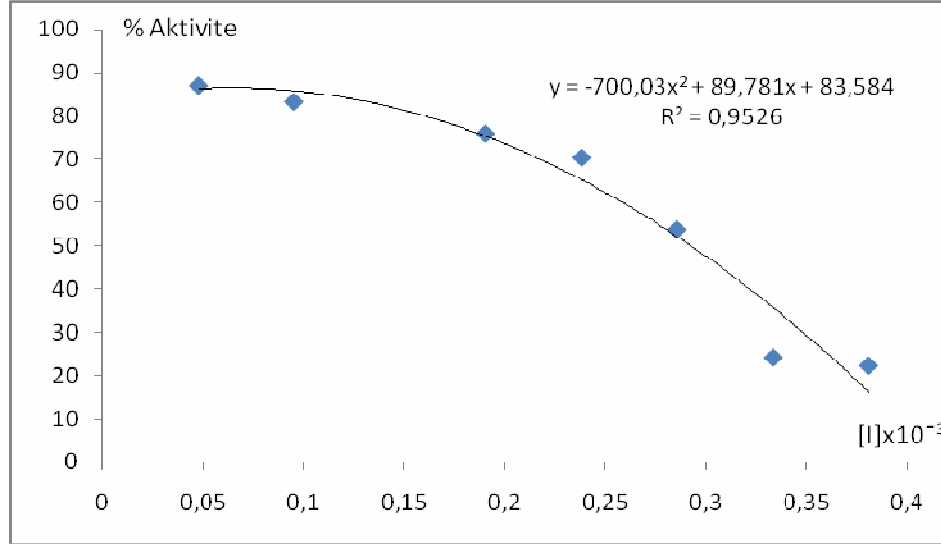
**Şekil 3.4.** (CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O)'lu ortamda immobilize enzim için aktivite tayin grafiği

CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O'lu ortamda serbest enzim için hesaplanan aktivite değerleri ve farklı inhibitör konsantrasyonları Çizelge 2.9' da gösterilmektedir ve aktivite grafiği Şekil 3.5' de görüldüğü gibidir.

**Çizelge 2.9.** (CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O)'lu ortam için serbest enzim için aktivite çizelgesi

pH:8 Bazal Aktivite Tamponu (µl)	Substrat (paraokson) (µl)	İnhibitör Çözelti (µl)	İmmobilize Enzim (µl)	Absorbans Farkı  A <sub>2</sub> - A <sub>1</sub>	[Inh.] (10 <sup>-3</sup> M)	Aktivite (EÜ)	% Aktivite
850	100	---	100	0,054	---	33,158	---
800	100	50	100	0,047	0,04762	28,859	87,04
750	100	100	100	0,045	0,09524	27,631	83,33
650	100	200	100	0,041	0,19048	25,175	75,92
600	100	250	100	0,038	0,23810	23,333	70,37
550	100	300	100	0,029	0,28570	17,807	53,7
500	100	350	100	0,013	0,33333	7,982	24,07
450	100	400	100	0,012	0,38095	7,368	22,22

CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O'lu ortamda serbest enzim için Çizelge 2.9' da belirtilen inhibitör konsantrasyonları ve aktivite değerlerinden yola çıkılarak % Aktivite / [I] grafiği çizildi (Şekil 3.5).



**Şekil 3.5.** (CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O)'lu ortamda serbest enzim için aktivite tayin grafiği

Enzim inhibisyon grafiklerinde belirli bir aktivite değerine bağlı olarak inhibitör konsantrasyonu (IC<sub>50</sub>) hesaplanır. IC<sub>50</sub> değeri, polinom denkleminde % aktivite yerine 50 yazılarak bulunabilir. Çünkü; IC<sub>50</sub> değeri, % aktivitenin yarısına geldiği andaki inhibitör konsantrasyonudur. Şekil 3.4 ve Şekil 3.5' i karşılaştırdığımızda CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O ağır metalinin immobilize enzimi aktive ederken serbest enzimi inhibe ettiği gözlenmiştir. Buradan serbest enzim için CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O'lu ortamda IC<sub>50</sub> değerleri, 0,292x10<sup>-3</sup>M ve -0,164x10<sup>-3</sup>M olarak hesaplanmıştır.

### 3.3.1.2 Mangan (II) Klorür (MnCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O) Bileşiğinin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

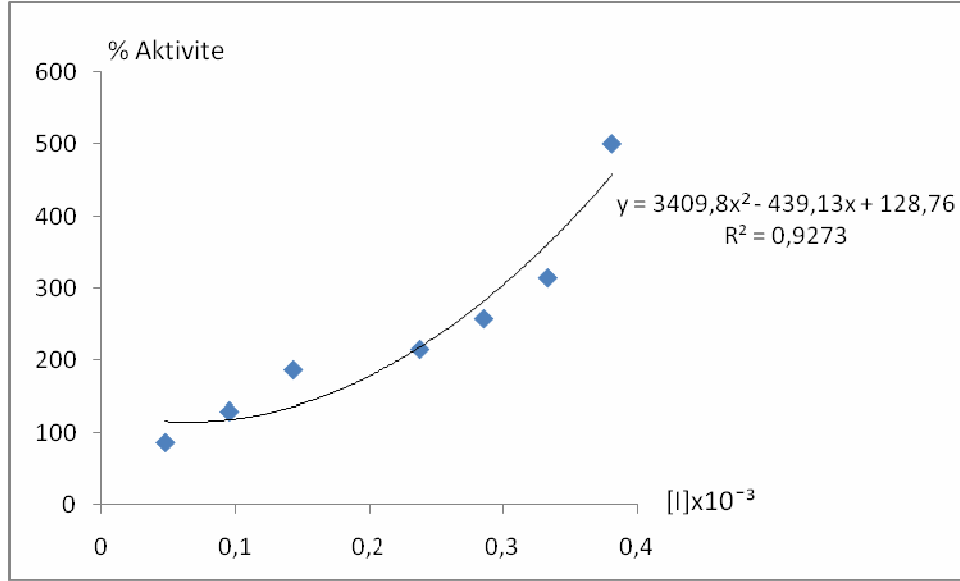
Paraoksonaz enzim aktivitesi için reaksiyon ortamına enzim çözeltisinden önce inhibitör çözeltisi ilave edilerek son durumda enzim aktivitesinde meydana

gelen değişme gözlemlendi. İmmobilize enzim için aktivite tayin çizelgesi (Çizelge 2.10) ve aktivite grafiği aşağıdaki gibidir (Şekil 3.6).

**Çizelge 2.10.** (MnCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O)'lu ortam için immobilize enzim aktivite çizelgesi

pH:8 Bazal Aktivite Tamponu (µl)	Substrat (paraokson) (µl)	İnhibitör Çözelti (µl)	İmmobilize Enzim (µl)	Absorbans Farkı  A <sub>2</sub> - A <sub>1</sub>	[Inh.] (10 <sup>-3</sup> M)	Aktivite (EÜ)	% Aktivite
850	100	---	100	0,007	---	4,298	---
800	100	50	100	0,006	0,04762	3,684	85,71
750	100	100	100	0,009	0,09524	5,526	128,57
700	100	150	100	0,013	0,14286	7,982	185,71
600	100	250	100	0,015	0,23810	9,21	214,28
550	100	300	100	0,018	0,28570	11,052	257,14
500	100	350	100	0,022	0,33333	13,508	314,28
450	100	400	100	0,035	0,38095	21,491	500,00

MA (MnCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O) = 161,87 g/mol; [MnCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O] = 1.10<sup>-3</sup> M değerlerinden yola çıkılarak 0,0040 g MnCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O tartılarak 25 ml inhibitör çözeltisi hazırlandı. Farklı inhibitör çözelti konsantrasyonları M<sub>1</sub> . V<sub>1</sub> = M<sub>2</sub> . V<sub>2</sub> formülüne göre yukarıdaki çizelgede belirtilen hacimler kullanılarak hesaplandı. (V<sub>son</sub> = 1,05 ml) Aşağıdaki grafiğe göre; MnCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O bileşiğinin immobilize enzimi aktive ettiği görülmektedir (Şekil 3.6).



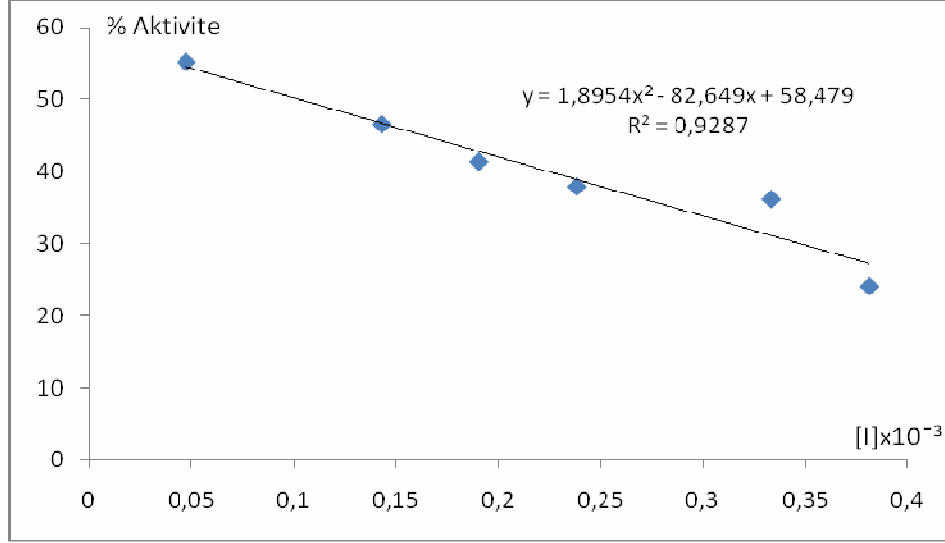
**Şekil 3.6.** (MnCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O)'lu ortamda immobilize enzim için aktivite tayin grafiği

MnCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O'lu ortamda serbest enzim için hesaplanan aktivite değerleri ve farklı inhibitör konsantrasyonları Çizelge 2.11' de gösterilmektedir ve aktivite grafiği Şekil 3.7' de görüldüğü gibidir.

**Çizelge 2.11.** (MnCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O)'lu ortam için serbest enzim aktivite çizelgesi

<b>pH:8 Bazal Aktivite Tamponu (µl)</b>	<b>Substrat (paraokson) (µl)</b>	<b>İnhibitör Çözelti (µl)</b>	<b>İmmobilize Enzim (µl)</b>	<b>Absorbans Farkı  A<sub>2</sub> - A<sub>1</sub> </b>	<b>[Inh.] (10<sup>-3</sup> M)</b>	<b>Aktivite (EÜ)</b>	<b>% Aktivite</b>
850	100	---	100	0,058	---	35,61	---
800	100	50	100	0,032	0,04762	19,65	55,17
700	100	150	100	0,027	0,14286	16,58	46,55
650	100	200	100	0,024	0,19048	14,74	41,38
600	100	250	100	0,022	0,23810	13,51	37,93
500	100	350	100	0,021	0,33333	12,89	36,21
450	100	400	100	0,014	0,38095	8,596	24,14

MnCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O'lu ortamda serbest enzim için Çizelge 2.11' de belirtilen inhibitör konsantrasyonları ve aktivite değerlerinden yola çıkılarak % Aktivite / [I] grafiği çizildi (Şekil 3.7).



**Şekil 3.7.** (MnCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O)'lu ortamda serbest enzim için aktivite tayin grafiği

Şekil 3.6 ve Şekil 3.7' i karşılaştırdığımızda MnCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O ağır metalinin immobilize enzimi aktive ederken serbest enzimi inhibe ettiği gözlenmiştir. Buradan serbest enzim için MnCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O'lu ortamda IC<sub>50</sub> değerleri, 0,103x10<sup>-3</sup>M ve 0,435x10<sup>-1</sup>M olarak hesaplanmıştır.

### 3.3.1.3 Bakır (I) Klorür (CuCl) Bileşiğinin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

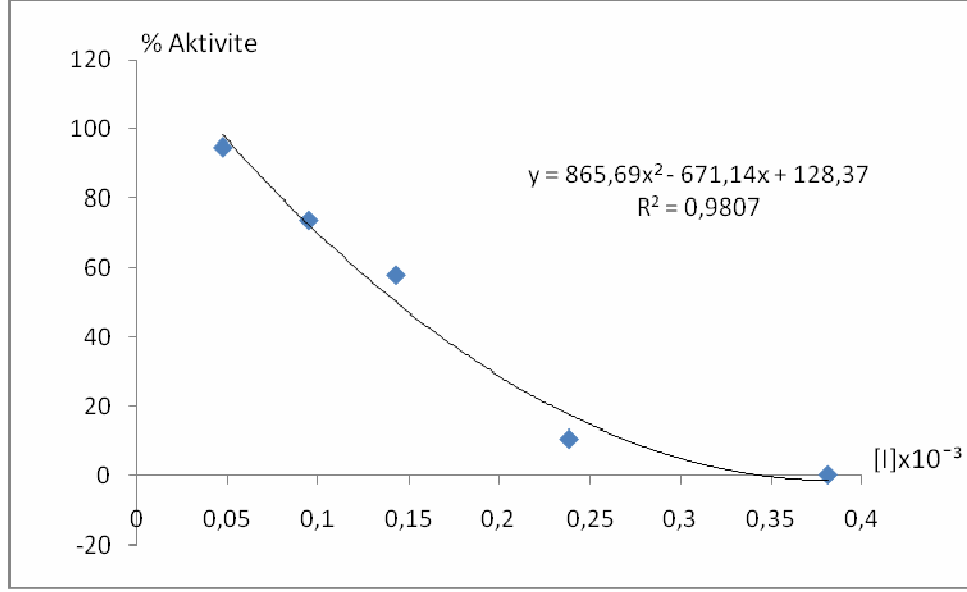
Paraoksonaz enzim aktivitesi için reaksiyon ortamına enzim çözeltisinden önce inhibitör çözeltisi ilave edilerek son durumda enzim aktivitesinde meydana gelen değişme gözlemlendi. Enzim aktivite tayin çizelgesi (Çizelge 2.12) ve aktivite grafiği aşağıdaki gibidir (Şekil 3.8).



**Çizelge 2.12.** (CuCl)<sup>2+</sup>li ortam için immobilize enzim aktivite çizelgesi

<b>pH:8 Bazal Aktivite Tamponu (µl)</b>	<b>Substrat (paraokson) (µl)</b>	<b>İnhibitör Çözelti (µl)</b>	<b>İmmobilize Enzim (µl)</b>	<b>Absorbans Farkı  A<sub>2</sub> - A<sub>1</sub> </b>	<b>[Inh.] (10<sup>-3</sup> M)</b>	<b>Aktivite (EÜ)</b>	<b>% Aktivite</b>
850	100	---	100	0,019	---	11,666	---
800	100	50	100	0,018	0,04762	11,052	94,73
750	100	100	100	0,014	0,09524	8,596	73,68
700	100	150	100	0,011	0,14286	6,754	57,89
600	100	250	100	0,002	0,23810	1,228	10,52
450	100	400	100	0	0,38095	0	0

MA (CuCl) = 98,99 g/mol; [CuCl] = 1.10<sup>-3</sup> M değerlerinden yola çıkılarak 0,0025 g CuCl tartılarak 25 ml inhibitör çözeltisi hazırlandı. Farklı inhibitör çözelti konsantrasyonları  $M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$  formülüne göre yukarıdaki çizelgede belirtilen hacimler kullanılarak hesaplandı. (V<sub>son</sub> = 1,05 ml) Aşağıdaki grafiğe göre; CuCl bileşiğinin enzimi inhibe ettiği görülmektedir (Şekil 3.8).



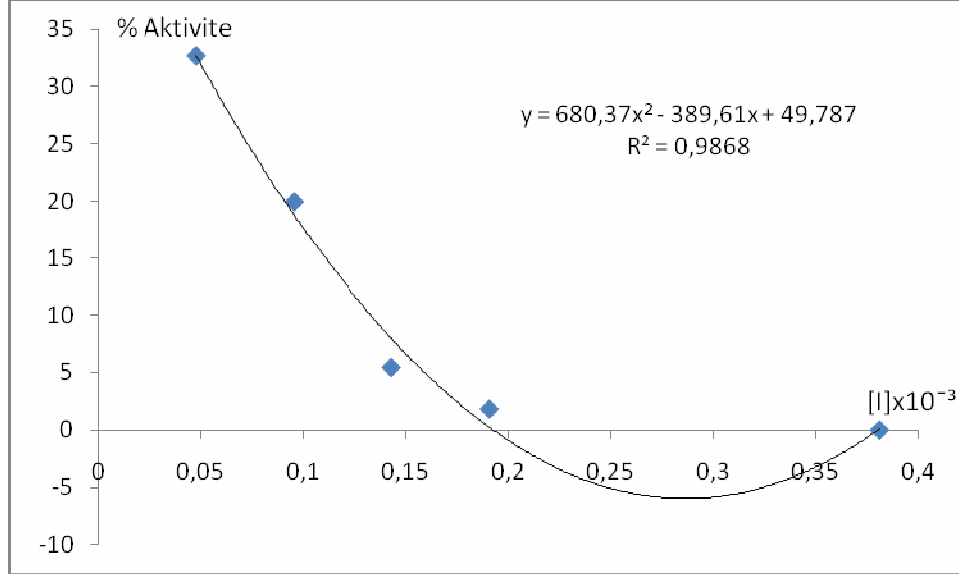
**Şekil 3.8.** (CuCl<sub>2</sub>)'li ortamda immobilize enzim için inhibisyon tayin grafiği

Şekil 3.8' de görüldüğü gibi  $0,143 \times 10^{-3} \text{M}$  ve  $0,632 \times 10^{-3} \text{M}$  olmak üzere iki farklı IC<sub>50</sub> değeri bulunmuştur. CuCl<sub>2</sub> li ortamda serbest enzim için hesaplanan aktivite değerleri ve farklı inhibitör konsantrasyonları ise Çizelge 2.13' de gösterilmektedir ve aktivite grafiği Şekil 3.9' da görüldüğü gibidir.

**Çizelge 2.13.** (CuCl)<sup>2+</sup>’li ortamda serbest enzim için aktivite çizelgesi

<b>pH:8 Bazal Aktivite Tamponu (µl)</b>	<b>Substrat (paraokson) (µl)</b>	<b>İnhibitör Çözelti (µl)</b>	<b>İmmobilize Enzim (µl)</b>	<b>Absorbans Farkı  A<sub>2</sub> - A<sub>1</sub> </b>	<b>[Inh.] (10<sup>-3</sup> M)</b>	<b>Aktivite (EÜ)</b>	<b>% Aktivite</b>
850	100	---	100	0,055	---	33,77	---
800	100	50	100	0,018	0,04762	11,05	32,73
750	100	100	100	0,011	0,09524	6,75	20
700	100	150	100	0,003	0,14286	1,84	5,45
650	100	200	100	0,001	0,19048	0,61	1,82
450	100	400	100	0	0,38095	0	0

CuCl<sup>2+</sup>’li ortamda serbest enzim için Çizelge 2.13’ de belirtilen inhibitör konsantrasyonları ve aktivite değerlerinden yola çıkılarak % Aktivite / [I] grafiği çizildi (Şekil 3.9).

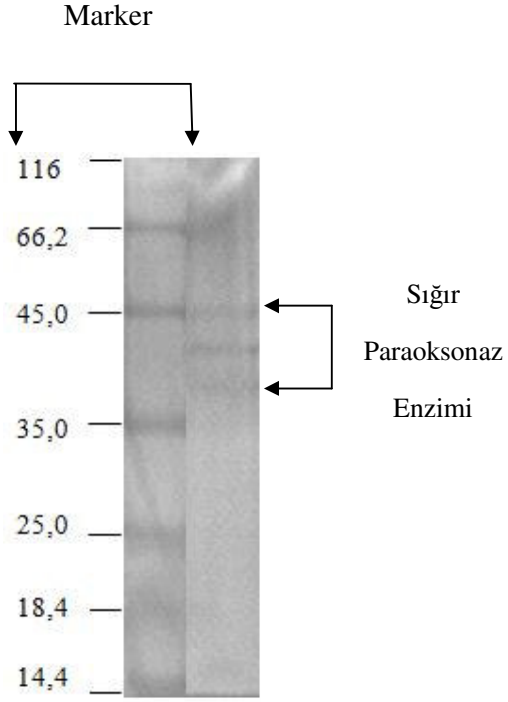


**Şekil 3.9.** (CuCl) li ortamda serbest enzim için inhibisyon tayin grafiği

Şekil 3.8 ve Şekil 3.9' u karşılaştırdığımızda CuCl ağır metalinin immobilize enzimi inhibe ederken serbest enzimi de inhibe ettiği gözlenmiştir. Buradan serbest enzim için CuCl' li ortamda  $IC_{50}$  değerleri,  $-5,07 \times 10^{-7} M$  ve  $0,573 \times 10^{-3} M$  olarak hesaplanmıştır. CuCl ağır metalinin serbest enzimi daha fazla inhibe ettiği görülmektedir.

### **3.4 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) ile Enzim Saflığının Kontrolü**

Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez yöntemi ile enzim saflık kontrolü yapıldı. Marker olarak Fermentas kullanıldı.



**Şekil 3.10.** SDS-PAGE ile enzim saflığının kontrolü

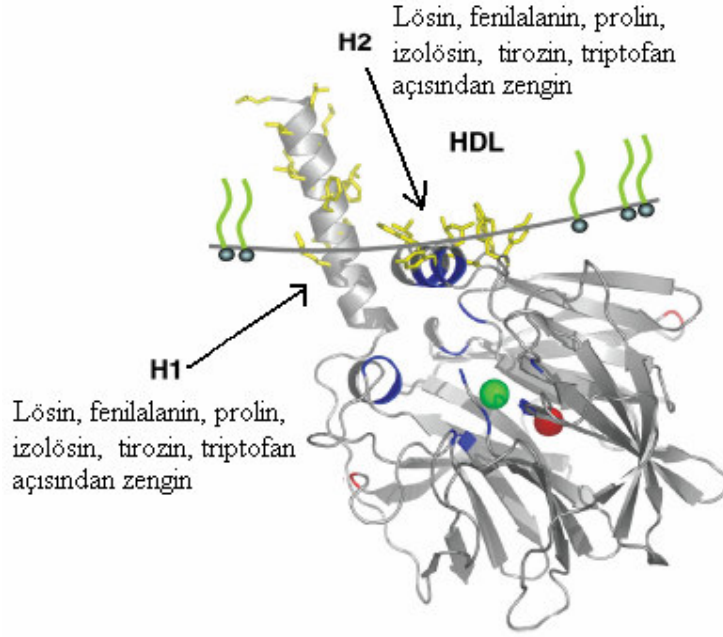
Sığır paraoksonaz enzimi için 35-45 kDa aralıklarında bant oluştuğu gözlenmektedir (Şekil 3.10). Oluşan bantlardan bir tanesi bu aralıktaki gözlenen diğer iki banda göre daha belirgindir. Fakat bu çalışmada enzim hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırıldığından birden fazla bant gözlenmesi muhtemeldir. PON1'in minimum molekül ağırlığını Gan ve arkadaşları 43 kDa olarak belirlemişlerdir. Enzimin yapısında, toplam molekül ağırlığının %15,8'i kadar karbohidrat molekülü bulunmaktadır. Bu molekülün, enzimin çözünürlüğünü ve kararlılığını arttırmada ve zar yapısına bağlanmada görevi olduğu düşünülmektedir. Karbohidrat içermeyen PON1 enziminin molekül ağırlığı ise 37 kDa'dur. Enzim, serumda HDL'ye bağlı olduğu bölgelerin yakınında bulunan proteinler (ApoA1) ile bir arada saflaştırıldığında da molekül ağırlığının 47-54 kDa olduğu rapor edilmiştir [17].

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu deneysel çalışmada, PON1 enzimi sığır serumundan, sepharose 4BL-tirozin 1-naftilamin kimyasal yapısındaki hidrofobik etkileşim kromatografi jeli kullanılarak saflaştırılmış ve enzim immobilize edilmiştir. Paraoksonaz enziminin tercih edilmesinin sebebi, enzimin hidrofobik karakterinin yanı sıra, detoksifikasyon ve antioksidan özelliğe sahip olmasıdır. Fakat bu özelliklerinin yanı sıra paraoksonaz, hidrojen peroksiti ( $H_2O_2$ ) hidroliz edebilme yeteneğine de sahiptir. Hidrojen peroksit, arteriyel duvar hücreleri tarafından aterogenez esnasında üretilen başlıca reaktif oksijen türüdür (ROS) ve oksidatif stres altında LDL oksidasyonuna neden olan reaktif oksijen türüne dönüşür. HDL kaynaklı PON'un  $H_2O_2$ 'i (peroksitlerle beraber) hidroliz etmesi, arterosklerozda rol alan potent oksidanların eliminasyonunda önemlidir [47,48]. Dolayısıyla, paraoksonazın, okside LDL'deki kolesterol linoleat hidroperoksitleri ve hidroksitleri indirgemesi nedeni ile peroksidaz benzeri aktivitesi de olduğu bildirilmiştir [49].

Sığır serum paraoksonazın yanı sıra, PON1 enzimi, sıçan ve tavşanların karaciğer ve serumlarından da saflaştırılmıştır. Fakat, enzimin serum ve karaciğerden saflaştırma basamaklarında kısmen farklılık bulunmaktadır [50,51,52].

Enzimin yapısına bakıldığında ise, N-terminal bölgesindeki H1 ve H2 heliks, hidrofobik yapılar, enzimin HDL'ye bağlanmasını sağlamaktadır [53,54] (Şekil 4.1). Enzimin N-terminal bölgesi; lösin, fenil alanin, prolin, isolösin, tirozin, triptofan ve valin gibi aminoasitleri ihtiva eden 7-18 residüler arası H1 hidrofobik uç ve 185-202 residüler arası da H2 hidrofobik ucundan oluşturmaktadır. Dolayısıyla PON1 enziminin hidrofobik yüzeyi ile HDL arasında triptofan, tirozin ve lizin aminoasitlerince zengin aromatik ve kısmen hidrofilik bölgeler bulunmaktadır [53,55].



**Şekil. 4.1.** PON1 enziminin HDL yüzeyine bağlanma modeli [53]

Paraoksonaz enziminin saflaştırılmasında kullanılan hidrofobik etkileşim kromatografisinin temel prensibi, yüksek tuz konsantrasyonunda saflaştırılacak biyomolekülde bulunan hidrofobik yüzey ile apolar ligand arasındaki hidrofobik etkileşimdir. Bu etkileşimin gerekçesi artan entropi ile açıklanmaktadır. Bu teknikte ligand ve matriks yapısının son derece önemli olduğu bildirilmektedir [56]. Düşük hidrofobik karakterli ligandlar kullanıldığında saflaştırılacak molekülün kolanda etkileşimini sağlamak amacıyla yüksek tuz konsantrasyonuna ihtiyaç vardır. Bu durumda proteinlerin kendi aralarında hidrofobik etkileşim riski doğabilir ki yüksek hidrofobik karakterli ligand tercih edildiğinde ise saflaştırılacak molekül ile ligand arasındaki etkileşim artacağı için elüsyon sırasında problemler ortaya çıkabilir [56]. Genellikle ticari olarak bulunan hidrofobik etkileşim kromatografi jellerinde hidrofobik uç olarak düz zincirli alkil ligandları ve aril ligandları gibi moleküller tercih edilmektedir [57]. İsopropil, butil, oktil ve fenil bileşikleri en çok tercih edilen ligandlardır. Düz zincirli alkil ligandları saf hidrofobik karaktere sahip iken, aril

ligandlarında hem hidrofobik hem de aromatik etkileşimler gözlenir. Bu amaçla deneysel çalışmamızda ligand olarak 1-naftilamin bileşiği kullanılmıştır. PON1 enziminin H1 ve H2 bölgelerinde fenil alanin, tirozin, triptofan gibi aromatik rezidülerin bulunmasıyla L-tirozin ligandı söz konusu bölgelerle hem hidrofobik hem de aromatik etkileşim yapacağından dolayı bu ligand immobilizasyon için uygundur.

Çalışmamızda PON1 enzimini sığır serumundan saflaştırmak için hidrofobik etkileşim kromatografisi uygulanmadan önce bu kromatografi prosedürüne uygun ön saflaştırma işlemi olarak %60-80 aralığında amonyum sülfat çöktürmesi yapılmıştır. Yaygın olarak kullanılan tuzlar  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NaBr}$ ,  $\text{NaSCN}$  olmasına rağmen amonyum sülfat en çok tercih edilendir [58,59]. Serum proteinlerinin organik çözücüler ile çöktürülmesi yöntemi amonyum sülfat çöktürme yönteminden daha avantajlı olduğu söylenmektedir [60]. Fakat hidrofobik etkileşim kromatografisi için amonyum sülfat çöktürmesi daha uygun bir metoddur.

Sepharose-4B-L-tirozin-1-Naftilamin yapıları jel kullanılarak saflaştırılan sığır serum paraoksonaz enziminin  $K_M$  ve  $V_{max}$  kinetik sabitleri, PON1 enzim aktivite tayin metoduna göre paraokson substratı kullanılarak belirlenmiştir. Lineweaver-Burk grafiklerinden elde edilen  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri serbest enzim için sırasıyla  $0,294 \times 10^{-3}$  ve 36,76 EÜ, immobilize enzim için ise bu değerler sırasıyla  $0,775 \times 10^{-3}$  ve 38,76 EÜ olarak bulunmuştur. Immobilize ve serbest enzim için hesaplanan  $V_{max}$  değerleri farklı olmasına rağmen birbiri ile benzerlik göstermektedir. Fakat immobilize ve serbest enzim için elde edilen  $K_M$  değerleri karşılaştırıldığında,  $K_M$  değerinin serbest enzimde daha düşük olduğu görülmektedir.  $K_M$  değeri, enzimin substrata karşı ilgisinin bir ölçüsü idi. Bu değer ne kadar düşük ise enzimin substrata bağlanma ilgisi de o derece fazla demektir. Bu durumda PON1 enzimi, bizim (% 25) glutaraldehit ile uyguladığımız immobilizasyon metoduyla immobilize olmasına rağmen serbest enzimin substrata olan ilgisinin immobilize enzime göre daha fazla olduğu görülmektedir. Ayrıca, ( $V_{max}/K_M$ ) katalitik etkinlik immobilize ve serbest



enzim için hesaplanmış ve bu değerler sırasıyla 50 EÜ/M ve 125 EÜ/M olarak hesaplanmıştır (Çizelge 2.7).

Ayrıca bu araştırmamızda, paraoksonaz enzimi endüstriyel alanda da büyük öneme sahip olduğundan,  $Mg^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$  metallerinin, hem serbest hem de immobilize enzim üzerindeki inhibisyon etkileri çalışılmıştır. Yapılan diğer çalışmalarda EDTA, baryum, lantan, bakır ve p-hidroksiciva benzoat bileşiğinin kompetitif inhibisyona neden olduğu ve çinkonun ise nonkompetitif bir inhibisyon gösterdiği bildirilmektedir [61]. Çalışmamızda  $Cu^{+2}$  metalinin paraoksonaz enzim aktivitesi üzerindeki etkisine bakıldığında sırasıyla immobilize (Şekil 3.8) ve serbest enzimi (Şekil 3.9) inhibe ettiği görülmektedir ve aktivite ölçümü sırasında inhibitör, ortama enzim çözeltisinden önce ilave edilmiştir.  $Cu^{+2}$  metali, inhibisyon etkisini serbest enzimde daha çok göstermektedir. Ancak inhibitörü enzim çözeltisinden sonra ortama ilave ettiğimizde enzim aktivitesinde herhangi bir değişim gözlenmemiştir ve inhibitör konsantrasyonunun artırılmasıyla aktivite en son sifıra kadar düşmüştür. Dolayısıyla,  $Cu^{+2}$  metalinden kaynaklanan inhibisyon çeşidinin kompetitif inhibisyon olduğu düşünülebilir. Ayrıca karbon sayısı değişen çeşitli alifatik alkollerin, kobalt, nikel ve kadmiyum gibi metallerin insan serum PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir [62,63]. Fakat bizim sığır serumundan saflaştırdığımız PON1 enziminde  $Co^{+2}$  ve  $Mn^{+2}$  metalleri immobilize enzimi aktive ederken (Şekil 3.4 ve Şekil 3.6), serbest enzimi inhibe ettikleri gözlenmiştir (Şekil 3.5 ve Şekil 3.7).

Sonuç olarak yapılan çalışmalarda aşağıdaki bulgular elde edilmiştir.

- Sığır serum PON1 enzimini saflaştırmak amacıyla Sepharose 4BL-tirozin 1-naftilamin kimyasal yapısındaki hidrofobik etkileşim kromatografi jeli kullanılmış ve PON1 enzimi saflaştırılarak SDS-PAGE ile saflık kontrolü yapılmıştır.

- Enzim farklı glutaraldehit oranlarında (% 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ve 10) immobilize edilmiş ve immobilize enzim aktivitesi en fazla % 7 glutaraldehit oranında immobilize edilen enzimde gözlenmiştir (Çizelge 2.1).
- % 7 glutaraldehit oranında immobilize edilen enzim için enzim ünitesi ve substrat konsantrasyon değerleri hesaplanarak buradan katalitik etkinlik, Km ve Vmax değerleri elde edilmiştir. Aynı işlemler serbest enzim için de denenmiş ve katalitik etkinliğin serbest enzimde daha fazla olduğu gözlenmiştir.
- Sonuç olarak; Mn<sup>+2</sup>, Co<sup>+2</sup>, Cu<sup>+2</sup> metallerinin (%7) immobilize ve serbest paraoksonaz enzimi üzerindeki inhibisyon etkileri çalışılmıştır. Çalışmamızda Cu<sup>+2</sup> metalinin immobilize (Şekil 3.8) paraoksonaz enzimini ve serbest enzimi (Şekil 3.9) inhibe ettiği görülürken, Co<sup>+2</sup> ve Mn<sup>+2</sup> metallerinin immobilize enzimi aktive ettiği (Şekil 3.4 ve Şekil 3.6) ve serbest enzimi de inhibe ettiği (Şekil 3.5 ve Şekil 3.7) gözlenmiştir.

## KAYNAKLAR

- [1] <http://www.fbe.gazi.edu.tr>
- [2] <http://tez.yok.gov.tr>
- [3] Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., 'Biochemistry, Fifth Edition, Chapter 8', *W. H. Freeman and Company*.
- [4] Gilbert, H.F., 'Basic Concepts in a Student's Survival Guide Biochemistry', Second Edition, Ph.D. Professor of Biochemistry Baylor College of Medicine Houston, Texas.
- [5] Bennett, T. P., Frieden, E., 'Modern Topics in Biochemistry', (1969) 43-45, Macmillan, London.
- [6] Wiley, N.Y., Holum, J., 'Elements of General and Biological Chemistry', (1968) 377.
- [7] Simon and Schuster, N.Y., Pfeiffer, J., 'Enzymes, the Physics and Chemistry of Life', (1954) 171-173.
- [8] 'Enzymes, a Primer on Use and Benefits Today and Tomorrow', Enzyme Technical Association, 1800 Massachusetts Avenue, N.W. Second Floor Washington, DC 20036.
- [9] Guss, M., 'Biochemistry for Pharmacy, Lecture 9, Proteins & Enzymes', [M.Guss@mmb.usyd.edu.au](mailto:M.Guss@mmb.usyd.edu.au), 9351-4302.
- [10] Sedlacek, M., Manoharan, I., Boopathy, R., Duysen, E.G., Masson, P., Lockridge, O., 'Butyrylcholinesterase, paraoxonase, and albumin esterase, but not carboxylesterase, are present in human plasma', *Biochemical Pharmacology*, (2005) 70, 1673–1684.

- [11] Akçay, Y.D., Sagin, F.G., Şendağ, F., Öztekin, K., Sozmen, E.Y., 'Effects of estrogen-only therapy on LDL oxidation in women with hysterectomy: Does paraoxonase genotype play a role?', *Maturitas*, (2006) 53, 325–332.
- [12] Miyamoto, T.<sup>1</sup>, Takahashi, Y.<sup>1</sup>, Oohashi, T.<sup>1</sup>, Sato, K.<sup>2</sup>, Oikawa, S.<sup>3</sup>, 'Bovine Paraoxanase 1 Activities in Serum and Distribution in Lipoproteins', *J. Vet. Med. Sci.*, (2005) 67(3), 243-248.
- [13] Turk, R., Juretic, D., Geres, D., Turk, N., Rekić, B., Simeon-Rudolf, V., Svetina, A., 'Serum paraoxonase activity and lipid parameters in the early postpartum period of dairy cows', *Research in Veterinary Science*, (2004) 76, 57–61.
- [14] Tomás, M., Latorre, G., Sentí, M., Marrugata, J., 'The Antioxidant Function of High Density Lipoproteins: A New Paradigm in Atherosclerosis', *Rev. Esp. Cardiol*, (2004) 57(6), 557-69.
- [15] Bilecke, S., Draganov, D., Counsell, R., et al. 'Human serum paraoxonase (PON1) isozymes Q and R hydrolyze lactones and cyclic carbonate esters', *Drug Metab. Dispos.*, (2000) 28, 1335-1342.
- [16] Draganov, D.I. and La Du, B.N., 'Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review', *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, (2004) **369**, 78.
- [17] Arslan, O., Sinan, S., 'İnsan Serum Paraoksonaz Enziminin Yeni Bir Yöntemle Safalaştırılması ve Bazı Antibiyotiklerin Enzim Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması', Balıkesir, Nisan-2005.
- [18] Mackness, M.I., 'Commentary. 'A' esterases, Enzymes looking for a role?', *Biochem. Pharmacol*, (1989) **38**, 385.
- [19] Mackness, M.I., 'Possible medical significance of human serum 'A' esterases', In: Reiner, E., Aldridge, W.N., Hoskin, F.C.G., 'Enzymes hydrolyzing organophosphorus compounds', Ellis Horwood, Chichester, (1989) 202-213.

- [20] Ikeda, Y., Suehiro, T., Arii, K., Kumon, Y., Hashimoto, K., 'High glucose induces transactivation of the human paraoxonase 1 gene in hepatocytes', *Metabolism Clinical and Experimental*, (2008) **57**, 1725–1732.
- [21] Ekmekçi, Ö.B., Donma, O., Ekmekçi, H., 'Paraoksonaz\*', *Cerrahpaşa J. Med.*, (2004) **35**(2), 78-82.
- [22] 'Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry, Enzyme Nomenclature', Recommendation 1984 Suppl. 2, correction and additions, *European Journal of Biochemistry*, (1989) 489-533.
- [23] Mackness, M.I., Thompson, H.M., Hardy, A.R., Walker, C.H., 'Distinction between A-esterase and arylesterase', *Biochemistry Journal*, (1987) **245**, 293-296.
- [24] Main, A.R., 'The role of A-esterase in the acute toxicity of paraoxon, TEPP and parathion', *Can. J. Biochem. Physiol.*, (1956) **34**, 197.
- [25] Rodrigo, L., Gil, F., Hernandez, A.F. and Pla, A., 'Identification of two rat liver proteins with paraoxonase activity: biochemical evidence for the identity of paraoxonase and arylesterase', *Chem. Biol. Interact.*, (1999) **263**, 119-120.
- [26] Bastos, C., Rossini, A., Alves, M.V., Ceccarelli, P.S., Lima, J.A.F. and Bastos, J.C., 'Paraoxonase activity in sera from *Piaractus mesopotamicus* holmberg (Characidae) and *Hypostomus punctatus* valenciennes (Siluridae)', *Revta bras. Zool.*, (1998) **15**(3), 665.
- [27] Klimov, A.N., Gurevich, V.S., Nikiforova, A.A., Shatilina, L.V., Kuzmin, A.A., Plavinsky, S.L. and Teryukova, N.P., 'Antioxidative activity of high-density lipoproteins in vivo', *Atherosclerosis*, (1993) **100**, 13.
- [28] Rosenblat, M., Draganov, D., Watson, C.E., Bisgaier, C.L., La Du, B.N. and Aviram, M., 'Mouse macrophage paraoxonase 2 activity is increased whereas cellular paraoxonase 3 activity is decreased under oxidative stress', *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.*, (2003) **23**, 468.

- [29] Mackness, M.I., Mackness, B., Durrington, P.N., Connelly, P.W. and Hegele, R.A., 'Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins', *Curr. Opin. Lipidol.*, (1996) **7**, 69.
- [30] Humbert, R., Adler, D.A., Distche, C.M., Hassett, C., Omiecinski, C.J. and Furlong, C.E., 'The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism', *Nature Genetics*, (1993) **3**, 73.
- [31] Mackness, M.I., Mackness, B., 'Paraoxonase 1 and Atherosclerosis: Is The Gene or The Protein More Important?', *Free Radical Biology & Medicine*, (2004) **37**(9), 1317–1323.
- [32] Özkan, Y., Koca, S.S., Gürsu, F., Sonkaya, E., Poyrazoğlu, O.K., Dönder, E., 'Hiperlipidemik Hastalarda Atorvastatin Tedavisinin Serum Paraoksonaz-1 Düzeyine Etkisi', *Fırat Tıp Dergisi*, (2004) **9**(4), 123-126.
- [33] Mackness, M.I., Mackness, B., Durrington, P.N., 'Paraoxonase and coronary heart disease Atherosclerosis Supplements, University Department of Medicine, Manchester Royal Infirmary', Oxford Road, Manchester M13 9WL, UK, (2002) **3**, 49- 55.
- [34] Kim, S-W., 'Development of Enzyme Immobilization Technique', Bioprocess engineering Laboratory, Department of Chemical and Biological Engineering, Korea University.
- [35] Özçömlekçi, E., 'Proteaz Enziminin Glutaraldehit Kullanılarak Kovalent Bağlanma ile İmmobilizasyonunda Optimum Şartların Belirlenmesi', İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Kimya Müh., Haziran 2006.
- [36] <http://fbe.deu.edu.tr>
- [37] <http://biol.paisley.ac.uk>, <http://blackwell-synergy.com>
- [38] Chang, T.M.S., Mosbach, K., 'Microencapsulation of enzymes and biologicals Methods Methods in Enzymology', *Academic Press, New York*, (1976) 201–218.
- [39] Cremonesi, P., Angiuro, L.D., 'Kinetic and Thermal Characteristics of Enzyme-Graft Copolymers', *Biotechnology and Bioengineering*, (1983) **25** (3), 735-744.

- [40] <http://wikipedia.com>
- [41] [www.cardiff.ac.uk/biosi/staffinfo/kille/dentals/dental4](http://www.cardiff.ac.uk/biosi/staffinfo/kille/dentals/dental4)
- [42] [www.mustafaaltinisik.org.uk/89-1-09.pdf](http://www.mustafaaltinisik.org.uk/89-1-09.pdf)
- [43] <http://curvefit.com>
- [44] [www.ChemistryDaily.com](http://www.ChemistryDaily.com), 2005
- [45] 'Enzyme Kinetics, Biochemistry', ( 2003) 8(1), 11-14.
- [46] Arslan, O., Beyaztaş, S., 'Bazı Bitki Gelişim Düzenleyici Bileşiklerin, Paraoksonaz ve Karbonik Anhidraz İzoenzimler Üzerinde İnhibisyon Etkilerinin İncelenmesi', Balıkesir, Temmuz-2006.
- [47] Erden, İ., Yeşilçimen, K., 'ST Elevasyonu Miyokard İnfarktüsülü (STEMİ) Hastalarda İnsan Paraoksonase Geni Met-Leu/55 Polimorfizmi' (2004).
- [48] Parthasarathy, S., Morales, A.J., Murphy, A.A.. 'Antioxidant: a new role for RU-486 and related compounds', *J. Clin Invest*, (1994) 94, 1990–5.
- [49] Shih, D.M., Xia, Y.-R., Wang, Y.-P., 'Combined serum paraoxonase knockout/apolipoprotein E knockout mice exhibit increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis', *J. Biol Chem*, (2000) 275, 17527–17535.
- [50] Rodrigo, L., Gil, F., Hernández, A.F., Marina, A., Vázquez, J. and Pla, A., "Purification and characterization of paraoxon hydrolase from rat liver", *Biochem. J.*, (1997) **321**, 595.
- [51] Pond, AL., Chambers, HW., Coyne, CP., Chambers, JE., Purification of two rat hepatic proteins with A-esteraseactivity toward chlorpyrifos-oxon and paraoxon, *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*, (1998), **286(3)**, 1404-1411.
- [52] Draganov, DI., Stetson, PL., Watson, CE., Billecke, SS., La Du BN., "Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation", *J. Biol. Chem.* (2000) **275**, 33435-33442.
- [53] Harel, M., Aharoni, A., Gaidukov, L., Brumshtein, B., Khersonsky, O., Meged, R., Dvir, H., Ravelli, R.B.G., McCarthy, A., Toker, L., Silman, I., Sussman, J.L. and Dan S. Tawfik, 'Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes', *Nature Struct. Mol. Biol.*, (2004) **11**, 412.

- [54] Sorenson, RC., Aviram, M., Bisgaier, CL., Billecke, S., La Du BN., 'Properties of the retained N-terminal hydrophobic leader sequence in human serum paraoxonase/arylesterase', *Chem. Biol. Interact.*, (1999) **119-120**, 243-249.
- [55] Killian, J.A., Von Heijne, G., 'How proteins adapt to a membrane-water interface', *Trends Biochem. Sci.*, (2000) **25**, 429-434.
- [56] Robyt, JF., White, BJ., 'Biochemical Techniques Theory and Practice', *Waveland Pres*, (1990) 98.
- [57] <http://www.chromatography.amershambiosciences.com>
- [58] Aguiar, J.A.K. and Michelacci, Y.M. "Preparation and purification of *Flavobacterium heparinum* chondroitinases AC and B by hydrophobic interaction chromatography". *Braz J Med Biol Res*, May (1999), **32(5)** 545-550.
- [59] Kminkova, M. and Jiri Kucera, J. "Single-Step Separation Of Lactate Dehydrogenase Using Thiophilic Chromatography", *Czechoslovak Chemical Communications*, (1998) **63(6)**, 851-856.
- [60] Mounter, L.A., Floyd, C.S. and Chanutin, A., 'Dialkylfluorophosphatase of Kidney I. Purification And Properties', *J. Biol. Chem*, (1953) **204**, 221-232.
- [61] Pellin, MC., Moretto, A., Lotti, M., Vilanova, E., 'Distribution and biochemical properties of rat paraoxonase activity', *Neurotoxicol Teratol*, (1990) **12**, 611-614.
- [62] Debord, J., Dantoine, T., Bollinger, JC., Abraham, MH., Verneuil, B., Merle, L. 'Inhibition of aryesterase by aliphatic alcohols', *Chemico-Biological Interactions*, (1998) **113**, 105-115.
- [63] Debord, J., Bollinger, JC., Lous, M., Dantoine, T., 'Inhibition of human serum arylesterase by metal chlorides', *Journal of Inorganic Biochemistry*, (2003) **94**, 1-4.