

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

**MEME KANSERLİ OLGULARDA PARAOKSONAZ  
(PON1) POLİMORFİZMİNİN BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**MUSTAFA OĞUZHAN KAYA**

**Balıkesir, Haziran 2009**

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

MEME KANSERLİ OLGULARDA PARAOKSONAZ (PON1)  
POLİMORFİZMİNİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MUSTAFA OĞUZHAN KAYA

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Oktay ARSLAN

Yard. Danışman: Doç. Dr. Selma SİNAN

Sınav Tarihi : 07.08.2009

Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Oktay ARSLAN (Danışman)

Doç. Dr. Mehmet DOĞAN

Doç. Dr. Feray KÖÇKAR

Balıkesir, Haziran 2009

## ÖZET

### **MEME KANSERLİ OLGULARDA PARAOKSONAZ (PON1) POLİMORFİZMİNİN BELİRLENMESİ**

**Mustafa Oğuzhan Kaya**

**Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı**

**(Yüksek Lisans Tezi / Tez Danışmanı: Prof. Dr. Oktay ARSLAN)**

**(İkinci Danışman: Doç. Dr. Selma SİNAN)**

**Balıkesir,2009**

Bu çalışmada, detoksifikasyon ve antioksidan aktivitelerine sahip insan serum Paraoksonaz 1 (PON1) enziminin meme kanserli olgularda aktivitelerinin türlemesi yapılarak kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır. Bazal PON1 aktivitesinde kontrol grubuna göre istatistiki bir azalma olduğu tespit edilmiştir. Kontrol grubundaki fenotip dağılımı AA %14, AB %37, BB %49 olarak tespit edilmiştir.

Ayrıca kanserli olgulardan elde edilen serum havuzundan PON1 enzimi, Sepharose 4B-L-Tirozin -9-Aminofenantren kimyasal yapısına sahip jel kullanılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzim SDS-Poliakrilamid jel elektroforezinde (Sodium Dodecyl Sulphate, PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) 43 kDa molekül ağırlığına sahip tek bir bant olarak elde edilmiştir. Enzimin kinetik sabitleri ( $K_M$  ve  $V_{MAX}$ .) Lineweaver-Burk yöntemi ile saptanmıştır.  $K_M$  ve  $V_{MAX}$ . değerleri sırasıyla 0,227 mM ve 62 U/ml.dak. olarak bulunmuştur.

**ANAHTAR KELİMELER:** Paraoksonaz (PON1), Polimorfizm, Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi, Meme kanseri, LDL oksidasyonu

## **ABSTRACT**

### **DETERMINATION OF PARAOXONASE (PON1) POLYMORPHISM ON BREAST CANCER CASES**

**Mustafa Oğuzhan KAYA**

**Balikesir University, Institute of Science, Department of Chemistry**

**(Msc. Thesis / Supervisor: Prof. Dr. Oktay ARSLAN)**

**Cosupervisor: Associated. Prof. Dr. Selma SİNAN**

**Balıkesir, 2009**

In the present study, the activities of human serum Paraoxonase 1 (PON1) enzyme, which has the activities of antioxidant and detoxification on breast cancer cases, were determined and compared to the control group. It was found that basal activity of PON1 statistically decreased compared to the control group. The phenotype distribution in the control group was determined as AA 14%, AB 37%, BB 49%.

In addition, the PON1 enzyme obtained from the serum pool in the cancer cases was purified by using the gel having the chemical structure of Sepharose 4B-L-Tirozin-9- aminophenanthrene. SDS- Polyacrylamide gel (Sodium Dodecyl Sulfate, Polyacrylamide Gel Electrophoresis) as a one single band of 43 kDa molecule weight. The kinetic constants of the enzyme ( $K_M$  and  $V_{MAX}$ ) were determined by Lineweaver-Burk method.  $K_M$  and  $V_{MAX}$  values are found as 0,227 mM and 62 U/ml. min. respectively.

**KEY WORDS:** Paraoxonase (PON1), Polymorphism, Hydrophobic Interaction, Chromatography, Breast cancer, LDL oxidation

## İÇİNDEKİLER

	<b><u>Sayfa</u></b>
<b>ÖZET, ANAHTAR SÖZCÜKLER</b>	ii
<b>ABSTRACT, KEYWORDS</b>	iii
<b>İÇİNDEKİLER</b>	iv
<b>SEMBOL LİSTESİ</b>	vii
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b>	viii
<b>ÇİZELGE LİSTESİ</b>	x
<b>ÖNSÖZ</b>	xi
<b>1.GİRİŞ</b>	1
1.1 Paraoksonaz Enzimi (PON) (EC. 3.1.8.1)	2
1.2 Adlandırılması	3
1.3 Paraoksonaz Gen Ailesi	4
1.3.1 PON1 Biyokimyasal Yapısı	5
1.3.2 Enzimin Katalitik Mekanizması	7
1.4 Katalizlediği Reaksiyonlar ve Substratları	8
1.4.1 PON1'in HDL'ye Bağlanması	12
1.4.2 PON1'in Sentezlenmesi ve Salgılanması	13
1.5 PON1 Polimorfizmi	13
1.6 Enzimin Saflaştırılması	17
1.7 Kanseri	18
1.7.1 Tanım	18
1.7.2 Kanserin Biyokimyası	19
1.8 Meme Kanseri	20

1.8.1	Kadınlarda meme kanseri	20
1.9	Meme Kanserinde Etkili Olduğu Düşünülen Enzimler	20
<b>2. MATERYAL VE YÖNTEMLER</b>		<b>24</b>
2.1	Materyaller	24
2.1.1	Kullanılan Kimyasal Maddeler	24
2.1.2	Kullanılan Alet ve Cihazlar	25
2.1.3	Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması	25
2.2	Yöntemler	27
2.2.1	Kan Serumunun Ayrılması	27
2.2.2	Enzim Aktivite Tayini	27
2.2.3	Q ve R Türünün Belirlenmesi	27
2.2.4	Enzimin Saflaştırılması	28
2.2.4.1	Amonyum Sülfat Çöktürme Aralığının Belirlenmesi	28
2.2.4.2	Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi İle Enzimin Saflaştırılması	29
2.2.4.2.1	Sepharose 4B'nin Aktifleştirilmesi	29
2.2.4.2.2	L-tirozinin Bağlanması	29
2.2.4.2.3	9-Aminofenantren Bileşiğinin Bağlanması	30
2.2.4.2.4	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDSPAGE) ile Enzim Saflığının Kontrolü	31
2.2.5	Optimum Şartlarda $K_M$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Bulunması	32
<b>3. BULGULAR</b>		<b>35</b>
3.1	Sağlıklı Ve Tümörlü Bireylerde Paraoksonaz Enzim Aktivitesinin Ve Fenotipinin Belirlenmesi	35
3.2	Enzimin Saflaştırılması	36
3.2.1	Amonyum Sülfat Çöktürmesi	36
3.2.2	Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile Enzimin Saflaştırılması	36
3.2.3	Serum Paraoksonaz Kanserli ve Kontrol Grubu için SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi	37
3.3	Kontrol Ve tümörlü Bireylerin Karşılaştırılması	38
3.3.1	Sağlıklı Bireylerde PON Aktiviteleri Ve Lipit Değerlerinin Karşılaştırılması	38
3.3.2	Tümörlü Bireylerde PON Aktiviteleri Ve Lipit Değerlerinin Karşılaştırılması	44

3.3.3	Optimum Şartlarda KM ve Vmax Değerlerinin Bulunması	53
<b>4.</b>	<b>SONUÇ VE TARTIŞMA</b>	<b>54</b>
<b>5.</b>	<b>KAYNAKLAR</b>	<b>59</b>

## SEMBOL LİSTESİ

<u>Simge</u>	<u>Adı</u>
PON1	Paraoksonaz 1 enzimi
SDS	Sodyum dodesil sülfat
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
HDL	High density lipoprotein
LDL	Low density lipoprotein
E	Enzim
S	Substrat
ES	Enzim-substrat kompleksi
P	Ürün



## ŞEKİL LİSTESİ

<b><u>Şekil No</u></b>	<b><u>Adı</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
Şekil 1.1	Paraoksanın kimyasal yapısı (O,O-dietil-O-p-nitrofenil fosfat)	3
Şekil 1.2	Paraoksonaz Enzim Mekanizması	4
Şekil 1.3	Paraoksonaz enziminin üç boyutlu görünümü. (a) $\beta$ -kırmalı tabakalar ve (b) hidrofobik bölgelerin (H1, H2, H3) $\beta$ -kırmalı tabakalara göre durumu	6
Şekil 1.4	Paraoksonazın katalitik mekanizması	7
Şekil 1.5	Lakton hidrolizi	9
Şekil 1.6	İnsektisitlerde yaygın kullanılan okson metabolitlerinin hidrolizi	11
Şekil 1.7	Sinir gazlarının hidrolizi	11
Şekil 1.8	Aromatik esterlerin hidrolizi	12
Şekil 1.9	PON1 enzimi gen polimorfizmleri	15
Şekil 2.1	Sepharose 4B' nin aktifleştirilmesi	29
Şekil 2.2	L-Tirozinin Bağlanması	30
Şekil 2.3	1-Naftilamin bileşiğinin bağlanması	31
Şekil 3.1	Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılan paraoksonaz enziminin SDS-polakrilamid jel elektroforez görüntüsü	37
Şekil 3.2	Kontrol grubunda paraoksonaz enzimi bazal aktivite ve kolesterol değerlerinin karşılaştırılmalı grafiği	40
Şekil 3.3	Kontrol grubunda paraoksonaz enzimi bazal aktivite ve tuzla uyarılmış paraoksonaz aktivitelerinin karşılaştırılmalı grafiği	40
Şekil 3.4	Kontrol grubunda paraoksonaz enzimi bazal aktivite ve trigliserit değerlerinin karşılaştırılmalı grafiği	41
Şekil 3.5	Kontrol grubunda paraoksonaz enzimi bazal aktivite ve HDL değerlerinin karşılaştırılmalı grafiği	41
Şekil 3.6	Kontrol grubunda paraoksonaz enzimi bazal aktivite ve LDL değerlerinin karşılaştırılmalı grafiği	42
Şekil 3.7	Kontrol Grubunda Paraoksonaz Enzimi Bazal Aktivite ve HDL Değerlerinin Sütun Grafiği	43
Şekil 3.8	Kanserli bireylerde paraoksonaz enzimi bazal aktivite ve HDL değerlerinin sütun grafiği	46
Şekil 3.9	Kanserli bireylerde paraoksonaz enzimi bazal aktivite ve tuzla uyarılmış aktivite değerlerinin karşılaştırılmalı grafiği	47
Şekil 3.10	Kanserli bireylerde paraoksonaz enzimi bazal aktivite ve kolesterol değerlerinin karşılaştırılmalı grafiği	47

Şekil 3.11	Kanserli bireylerde paraoksonaz enzimi bazal aktivite ve trigliserit değerlerinin karşılaştırılmalı grafiği	48
Şekil 3.12	Kanserli bireylerde paraoksonaz enzimi bazal aktivite ve LDL değerlerinin karşılaştırılmalı grafiği	48
Şekil 3.13	Kanserli bireylerde paraoksonaz enzimi tuzla uyarılmış aktivite ve LDL değerlerinin karşılaştırılmalı grafiği	49
Şekil 3.14	Kanserli bireylerde paraoksonaz enzimi bazal aktivite ve HDL değerlerinin karşılaştırılmalı grafiği	49
Şekil 3.15	Kanserli bireylerde paraoksonaz enzimi tuzla uyarılmış aktivite ve HDL değerlerinin karşılaştırılmalı grafiği	50
Şekil 3.16	Kontrol grubu ve kanserli bireylerde lipit değerlerinin karşılaştırılmalı grafiği	52
Şekil 3.17	Kontrol grubu ve kanserli bireylerde bazal aktivite, tuzla uyarılmış aktivite, HDL, LDL, kolesterol, ve trigliserit düzeylerinin ortalamalarını gösteren sütun grafiği	52
Şekil 3.18	PON1 192 Q/R (A/B) fenotiplerinin kontrol ve hasta gruplarındaki dağılımları	53
Şekil 3.19	Kontrol grubu için saflaştırılmış insan serum PON1 enziminin paraokson substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği	54
Şekil 3.20	Kanserli grup için saflaştırılmış insan serum PON1 enziminin paraokson substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği	54
Şekil 4.1	PON1 enziminin HDL yüzeyine bağlanma modeli	56

## ÇİZELGE LİSTESİ

<b><u>Çizelge No</u></b>	<b><u>Adı</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
Çizelge 3.1	Sağlıklı ve tümörlü bireylerin yaş aralığı ve sayı dağılımı	36
Çizelge 3.2	Sağlıklı bireylerin serum paraoksonaz enzim aktivitesi, lipit parametreleri ve diğer bilgilerinin karşılaştırılması	39
Çizelge 3.3	Kanserli bireylerin serum paraoksonaz enzim aktivitesi, lipit parametreleri ve diğer bilgilerinin karşılaştırılması	45
Çizelge 3.4	Kanserli ve kontrol grubu bireylerin ölçülen serum paraoksonaz enzim aktivitesi, lipit parametrelerinin istatistiksel değerlendirilmesi	51

## ÖNSÖZ

Yüksek Lisans Tez çalışmalarımın her safhasında her türlü desteğini gördüğüm, insanlara yaklaşımını ve bilimsel yönlerini kendime örnek aldığım çok kıymetli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Oktay ARSLAN'a öncelikle en derin minnet ve şükranlarımı arz ederim.

Yüksek Lisans Tez çalışmalarım esnasında değerli bilgi ve yorumları ile bizleri her daim yönlendiren çok kıymetli hocamlarım sayın Doç. Dr. Selma SİNAN'a ve Serap BEYAZTAŞ'a en derin saygılarımı sunarım.

Her zaman güzel bir aileye sahip olduğum için ne kadar şanslı olduğumu hissettiren ve hayatım boyunca attığım her adımda maddi ve manevi desteğini esirgemeyen sevgili annem Turunç KAYA'ya, babam Saim KAYA'ya, kardeşlerim Mihrap Yaşar KAYA ve Zeynep KAYA'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bursa Ali Osman Sönmez Onkoloji Hastanesi çalışanlarına, Hastane Müdürü Fikret MUTİ'ye, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Uzm. Dr. Erol AKSAZ, Mikail KAYA, Yeşim ÖZENÇ, İsa DEMİRTAŞ, Cemal IŞIKÇI, Yavuz KAYA, Serap MUTLU, M. Emin DİKEN'e, teşekkürü bir borç bilirim.

Son olarak bu tezi aileme ve amcalarım Naim ve İsa KAYA' nın anısına hediye etmek isterim.

**Balıkesir-2009**

**MUSTAFA OĞUZHAN KAYA**

Bu tezi 2008/31 nolu proje ile destekleyen Balıkesir Üniversite Rektörlüğü  
Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkür ederim.

## 1. GİRİŞ

Paraoksonaz (PON) karaciğerde sentezlenen, organik fosforlu bir insektisit olan parationun aktif metaboliti paraoksonu hidroliz etme yeteneğine sahip A-esterazlar grubundan bir serum esterazdır [1,2]. Enzim, paration dışında diizopropil florofosfat (DFP) gibi organik fosforlu insektisitlerle, yine aynı kimyasal gruptan olan sarin, tabun gibi sinir gazlarının; çeşitli karbamatların; fenilasetat, 4-nitrofenil asetat, 2-naftil asetat gibi birçok aromatik karboksilik asit esterlerinin hidrolizini de katalize etmektedir. PON1, HDL'ye bağlı, organofosfat ajanları (OP) ve LDL'nin oksidasyonu ile lipit peroksidlerin oluşumuna ve bakteri endotoksinlerine karşı koruyucu rol oynayan önemli bir enzimdir. LDL'nin oksidasyonu arteroskleroz sürecinin başlangıç evresini oluşturması, paraoksonaz (PON) enzimin antioksidan özelliğinin önemini ortaya koymaktadır [3,4].

Memeli türleri arasında geniş bir dağılıma sahip olan PON proteinleri, balıklarda, kuşlarda ve eklembacaklılar gibi omurgasızlarda mevcut değildir [5]. Memelilerde, en azından insanlarda ve farelerde, aynı kromozom üzerinde birbirine komşu üç ayrı PON geni (PON1, 2, 3) bulunmaktadır. Farelerde 6. kromozom üzerine yerleşen PON genlerinin, insanlarda 7. kromozomun uzun kolunda, q 21.3 ile q 21.1 bölgesinde lokalize oldukları bildirilmektedir [6]. Yapısal yönden büyük benzerlikler gösteren bu genlerden PON1'e yönelik çok yoğun çalışılmalar yapılmaktadır. PON1, fizyolojik substratlarının belirlenmesi ve arterosklerozis ile ilişkisinin ortaya konması nedeniyle, PON2 ve PON3'e göre nispeten daha iyi aydınlatılan genlerdir [4]. PON1 geni, Q/R 192 ve M/L 55 olmak üzere iki önemli polimorfizm göstermektedir. Bunlar içinde en yaygın Q/R 192 polimorfizmidir. Çünkü PON1 enzim aktivitesindeki bu polimorfizm substrat bağımlıdır ve farklı etnik kökenli popülasyonlara göre değişkenlik gösterdiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [7].

PON proteinlerinin amino asit sekansları arasında % 60 oranında benzerlik olduğu bildirilmektedir. Bununla beraber, PON proteinleri dokulardaki ekspresyonlarına ve dağılımlarına göre, birbirinden farklılaşmaktadırlar. PON1'e ait mRNA'nın karaciğerin yanı sıra böbrek, kalp, beyin, ince bağırsak ve akciğer dokularında da bulunduğu gösterilmiş ve PON1'in, bu dokuların hepsinde endotelial tabakada lokalize olduğu, immunohistokimyasal yöntemlerle tayin edilmiştir. Hemen hemen tüm dokularda görülen ve PON1 mRNA'ya göre, dokular arasında daha geniş bir dağılım gösteren PON2 geninin protein ürünleri henüz bilinmemektedir. Son yıllarda tavşan K<sub>C</sub>'i ve serumundan saflaştırılan ve bir laktonaz olduğu tanımlanan PON3 gen ürününün; en çok plazmada, HDL yapısında bulunduğu bildirilmektedir [8,9].

### **1.1 Paraoksonaz Enzimi (PON) (EC. 3.1.8.1)**

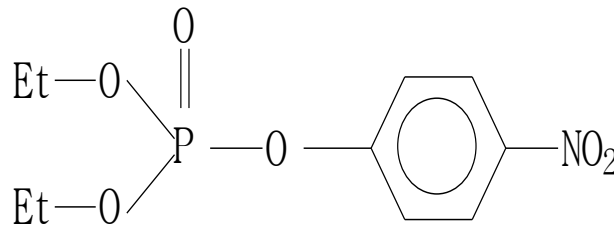
Paraoksonaz, Aldridge sınıflama sistemine göre A grubu arildialkilfosfataz sınıfı ester hidrolaz enzimidir. Önceleri organofosfat bileşiklerini hidroliz etme özelliği nedeni ile toksikoloji alanında çalışılmış, son yıllarda ise antioksidan etkileri nedeni ile kronik kalp hastalığı riskinden korunulabileceği düşünülerek güncellik kazanmıştır [10]. Paraoksonaz, ilk olarak 1953 yılında Aldridge W.N. tarafından p-nitrofenil asetat, propiyonat ve bütiratı hidroliz eden A-esteraz olarak teşhis edilmiştir. İnsan serumunda ilk kez 1961'de Uriel tarafından elektroforez sonrası HDL immunopresipitatlarında saptanmıştır [11]. Mackness ve arkadaşları ilk olarak HDL-ayırımı için santrifüj yöntemini geliştirdikten sonra, koyunlarda paraoksonaz aktivitesinin çoğunlukla Apo AI içeren partiküllerde HDL ile birlikte bulunduğunu ve insan serumunun ultra santrifüjlenmesi ile enzimin kanda HDL yapısında taşındığını ortaya koymuşlardır [12]. Saflaştırılmış sığır serum paraoksonazının lipidlerle ilişkili ve HDL ile aynı moleküler kütleye sahip olduğunu göstermişlerdir. Saflaştırma sırasında apo A-I'in paraoksonazdan ayırımının zor olması, ikisinin sıkı ilişkili olduğunu düşündürmüştü ve HDL kolesterol tayini sırasında lipoprotein fraksiyonunda aril-esteraz aktivitesine rastlamışlardır [11]. Enzim; paraokson, metil paraokson ve klormetil paraoksone yüksek derecede seçicilik gösterdiği için, paraoksonaz olarak adlandırılmıştır. Mackness ve arkadaşları, PON'un HDL üzerinde Apo A-I'e bağımlı olarak aktivite gösterdiğini ve 1991 yılında LDL

üzerindeki lipoperoksit birikimini azalttığını bulmuşlardır [12]. Aynı zamanda Macness ve arkadaşları farklı populasyonlarda (Fransız, Sudanlı vs) polimorfizm analizleri yapılarak, allelik formları belirlenmiş ve populasyon çalışmaları enzim aktivitesiyle HDL, Apo A-I, Apo A-II arasında istatistiksel ilişki gösterilmiştir [12]. İmmunoafinite kromatografi çalışmaları insan serum paraoksonazının gerçekte Apolipoprotein A-I ve Klusterin (apolipoprotein J) içeren HDL tipleri ile ilişkili olduğunu ve PON'un total HDL'nin çok küçük bir bölümünü oluşturduğunu göstermiştir [10,12].

Sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda, farklı kardiyovasküler hastalıklarda enzim aktiviteleri incelenmiş, lipoproteinler ve lipid peroksidasyonu arasındaki ilişki araştırılmış, enzimin aminoasit dizisi belirlenmiştir [13].

## 1.2 Adlandırılması

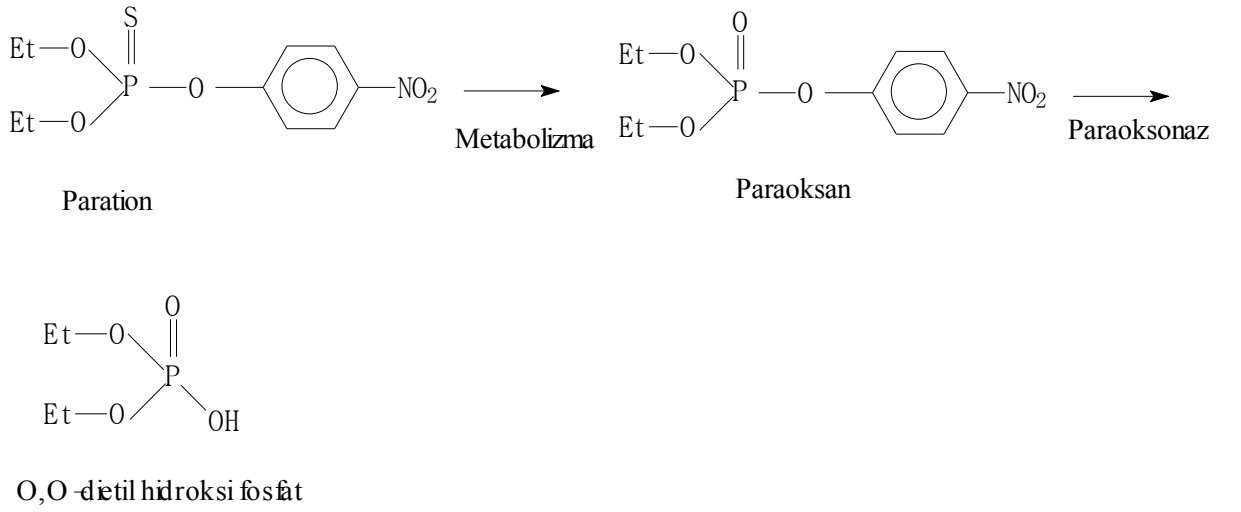
Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği'nin (IUBMB) enzim isimlendirmesinde paraoksonaz iki numaraya (EC 3.1.1.2 ve EC 3.1.8.1.) sahiptir. 1990'lı yıllardan sonra, paraoksonazın arilesterazdan farklı olarak yalnız fenolik esterleri değil, fosforik ve fosfinik asit esterlerini de hidroliz ettiği anlaşılmış ve EC 3.1.8.1 ile tanımlanmıştır [13]. Paraoksonaz enziminin, A grubu arildialkilfosfataz sınıfı bir ester hidrolaz enzimi olması nedeniyle sistematik adı arildialkilfosfatazdır. A esteraz grubunda yer alan paraoksonaz enzimi, aktivitesinin ölçümünde ilk olarak paraokson substratı kullanıldığı için paraoksonaz adını almıştır (Şekil 1.1) [14].



Şekil 1.1 Paraoksanın kimyasal yapısı (O,O-dietil-O-p-nitrofenil fosfat)



Paraoksonaz enzimi geniş bir substrat özgüllüğü gösterirken, fizyolojik substratı tam olarak belirlenmemiştir. Ancak arilesteraz, organofosfataz ve laktonaz aktivitelerine sahip olduğu tespit edilmiştir. İnsan serum paraoksonaz enzimi, parationun metabolik ürünü olan paraoksanı kataliz etme yeteneğine sahiptir. Paraoksan organizmaya zararlı olup pestisit olarak kullanılmaktadır. Paraoksanın, paraoksonaz enzimi ile yıkımı sonucu paraoksana oranla göreceli olarak daha az zararlı p-nitro fenol ve dietil hidroksi fosfat bileşikleri oluşur (Şekil 1.2) [10].



Şekil 1.2 Paraoksonaz enzim mekanizması

### 1.3 Paraoksonaz Gen Ailesi

Paraoksonaz gen ailesi, insanlarda kromozom 7'nin uzun kolunda q21.3 ve q22.1 arasında bulunmaktadır [12,15]. İlk olarak memelilerde tanımlanan PON ve PON ile ilişkili genler, sonraları kümes hayvanları, zebra balığı ve omurgasızlardan *Caenorhabditis elegans*'ta bulunmuştur [11]. Paraoksonaz gen ailesi; PON1, PON2 ve PON3 olmak üzere bilinen üç üyeye sahiptir. Bu genler büyük yapısal benzerlikler göstermektedir ve ortak evrimsel öncüden gen dublikasyonlarının meydana gelmesiyle oluşur. Memeli türleri içerisinde PON1, PON2 ve PON3 aminoasit düzeyinde % 60, nükleotid düzeyinde % 70 benzerlik gösterir. Bununla

birlikte memeli türleri arasında bu üç genin her biri aminoasit düzeyinde % 79-90, nükleotid düzeyinde % 81-91 benzerlik göstermektedir. PON1, PON2 ve PON3 ile karşılaştırıldığında 4. ekzonda kodlanan 105 aminoasit içinde üç nükleotid rezidüsüyle ayrılır [12,16]. PON2 ve PON3, PON1 kadar aydınlatılamamıştır [4,13]. PON2 diğer üyelerden farklı olarak plazmada bulunmamaktadır. Ancak beyin, karaciğer, böbrek ve testis gibi pek çok dokuda sentezlenmektedir. PON3, tavşan HDL'si üzerinde lokalize olan laktonaz aktivitesi ile tanımlanabilmiştir [4,14]. PON3 enzimi de PON1'e benzer şekilde büyük çoğunlukta karaciğerden sentezlenir ve serumda HDL'ye bağlı olarak bulunur. Ayrıca PON3 daha düşük seviyelerde böbrekte sentezlenmektedir. PON3 geninin mRNA'sı ve proteinine insanlardan farklı olarak sıçanların makrofajlarında rastlanmıştır [17,18].

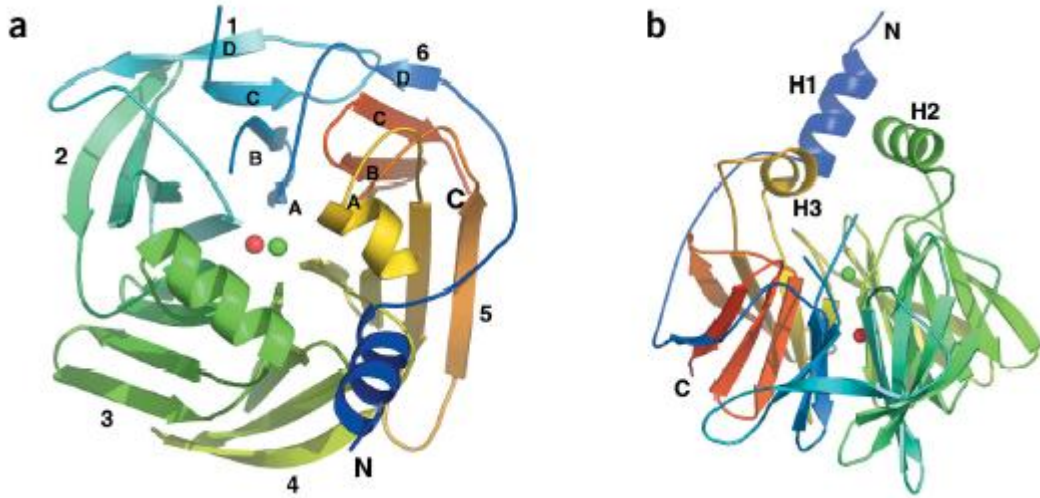
### 1.3.1 PON1'in Biyokimyasal Yapısı

PON1, 43-45 kDa molekül ağırlığına sahip 354 aminoasit içeren bir proteindir [16, 19]. Her molekül total ağırlığın %15.8'ini oluşturan üç karbonhidrat zinciri içermektedir. İzoelektrik noktası 5.1'dir. Aminoasit bileşimi yüksek lösin içeriği dışında bir özellik göstermez [16]. Yapısında yer alan 3 sistein (Cys) rezidüsünden 284'teki serbest iken 42 ve 352. sistein rezidüleri arasında disülfid bağı bulunur. *In situ* hibridizasyon çalışmaları ile PON1 geninin, 7. kromozomun uzun kolu üzerinde q21-q22' de bulunduğu gösterilmiştir [10,12].

PON1'in ince yapısı 4 adet zincirden oluşmuş 6 adet  $\beta$ -kırmalı yapıdan meydana gelmiştir (Şekil 1.3). Enzim 42. ve 353. sistein rezidüleri arasındaki disülfid köprüsü ile sonlanarak üç boyutlu yapısını kazanır [21]. N terminal ve C terminal uçlarının bu şekilde kovalent bağlanması  $\beta$ -kırmalı yapıyı enzimlerde nadir görülür.

Üç boyutlu yapıda;  $\beta$ -kırmalı tabakaların merkezinde  $7.4\text{\AA}$  aralıklı iki adet  $\text{Ca}^{+2}$  iyonu bulunmaktadır. Bunlardan bir tanesi yapısal özellikli olup yapıdan uzaklaştırılması dönüşümsüz denatürasyona neden olmaktadır [22]. Diğeri ise katalitik etkinlikte rol oynar. Bu kalsiyum iyonu  $2.2\text{-}2.5\text{\AA}$  uzaklıkta 5 adet

aminoasit rezidüsü (Asn224, Asn270, Asn168, Asp269 ve Glu53) ile etkileşim halindedir. Aynı kalsiyum iyonu bir su molekülü ve fosfat iyonunun oksijeni ile etkileşmektedir. PON1'in yapısı 6 adet  $\beta$ -kırmalı tabaka ile merkezdeki  $Ca^{+2}$  iyonları açısından diisopropilfluorofosfataz (DFPase) enzimi ile benzerlik göstermektedir [23]. Ancak, PON1 esterez, fosfotriesteraz ve laktonaz aktivitesi gösterirken, DFPase sadece fosfotriesterase aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. Bu iki enzimin aminoasit dizilerinde belirgin bir benzerlik yoktur [24]. PON1'in aktif bölgesinde diğer  $\beta$ -kırmalı yapılardan farklı olarak hidrofobik heliks (H2 ve H3) yapıları vardır (Şekil 1.3). Bu yapılar aynı zamanda sonlanma noktaları olup, aktif bölgenin korunması ve enzimin HDL'ye bağlanması gibi kritik rollere sahiptir. PON1 sentezlendiğinde monomerik yapı şeklindedir. Enzim, HDL'ye bağlanmadığı zaman oligomerizasyon gerçekleştiği belirlenmiştir. Bu olay *in vitro* deterjanlı ortamda H2 ve H3 heliksleri ile deterjan misellerine bağlanarak gerçekleşir [25].



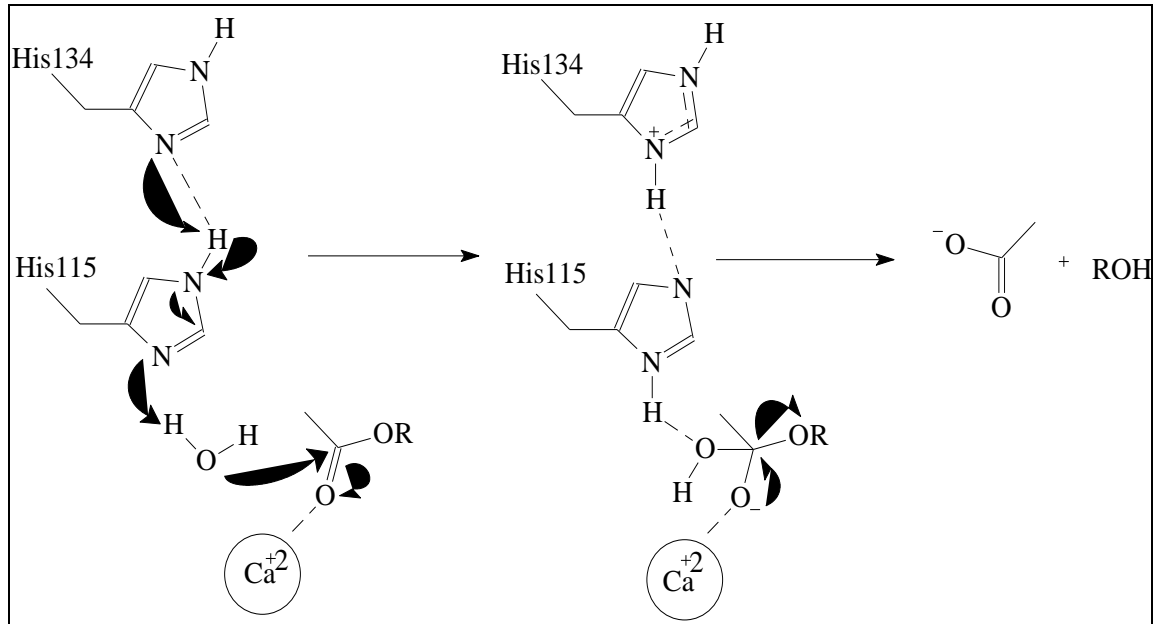
Şekil 1.3. Paraoksonaz enziminin üç boyutlu görünümü. (a)  $\beta$ -kırmalı tabakalar ve (b) hidrofobik bölgelerin (H1, H2, H3)  $\beta$ -kırmalı tabakalara göre durumu [18].

PON1 üzerinde 4 tane potansiyel N-glikozillenme bölgesi vardır. İki tanesi (Asn 227 ve Asn 270)  $\beta$ -kırmalı tabakaların merkezinde, diğer ikisi ise yüzeye bakan bölgede (Asn 253 ve Asn 324) yer almaktadır. PON1 memeli hücrelerinde ekspres edildikten sonra bu noktalardan glikozillendiği gözlenmiştir [25]. PON ailesinin

hidrolitik aktivitesi için, glikolizasyonun aktiviteyi önemli ölçüde etkilemediği saptanmıştır [26,27]. Ancak enzimin yapısında bulunan bu karbohidrat molekülleri spesifik olmayan hücre membranlarına bağlanmada veya kararlılığı ve çözünürlüğü arttırmada etkili olabileceği açıktır [28,29].

### 1.3.2 Enzimin Katalitik Mekanizması

Enzimin aktif bölgesinde bulunan His-His çifti, kalsiyum iyonu ve su molekülü, esteraz aktivitesinde önemli rollere sahiptir (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. Paraoksonazın katalitik mekanizması [35]

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. Oluşan yapıdaki  $\text{Ca}^{+2}$

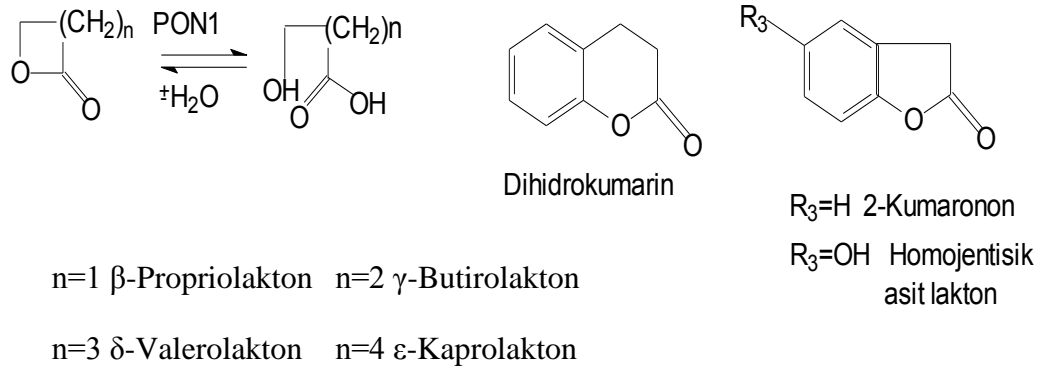
iyonu negatif yüklü oksijenden uzaklaşarak bağ tekrar fosfat veya karbonilin üzerine yıkılır ve ester bağı kopar.

PON1'in mekanizmasını açıklamak amacıyla, esteraz aktivitesi için 2-naftilasetat ve fosfotriesteraz aktivitesi için paraoksan substratları kullanılmıştır. Bu substratların optimum pH aralıkları saptanmış ve substratın yapısında bulunan yan zincirin katalizlenmeye direkt katılmadığı sonucu bulunmuştur [30].

#### **1.4 Katalizlediği Reaksiyonlar ve Substratları**

Paraoksonaz enzimi geniş bir substrat özgüllüğü gösterirken, fizyolojik substratı tam olarak belirlenmemiştir. Ancak arilesteraz, organofosfataz ve laktonaz aktivitelere sahip olduğu tespit edilmiştir. Söz konusu aktivitelerin tümünün tek bir aktif merkezde mi yoksa birden fazla aktif merkezde mi gerçekleştiği, substrat seçiciliğinin nasıl belirlendiği de henüz tespit edilmemiştir.

Son yıllarda PON1'in arterosklerozisin önlenmesinde ve ilaç metabolizmasında önemli rol oynadığı bilinmektedir [31, 32, 33]. PON1 özellikle LDL ve HDL lipitlerinin yükseltgenmesini önleyerek ve lipit peroksitlerini metabolize ederek arterosklerozise karşı koruyuculuğunu, sahip olduğu laktonaz aktivitesi ile göstermektedir [34, 35]. Söz konusu enzim 4 atomdan 7 atoma kadar değişen lakton halkası ihtiva eden en az 30 çeşit laktonu hidrolizleyebilmektedir. Alifatik lakton substratı olan  $\delta$ -valerolakton (6 halkalı lakton),  $\gamma$ -butirolakton (5 halkalı lakton) ve  $\epsilon$ -kaprolaktondan(7 halkalı lakton) daha hızlı hidrolizlenmektedir. PON1 enziminin aromatik laktonlar afinitesi, alifatik laktonlara oranla daha fazladır ve daha kolay hidrolizlenirler. Ancak ilgi çekicidir ki, pek çok ilacın etken maddesinde bulunan kumarin bileşiğinin lakton halkasında  $\alpha$  ve  $\beta$  çift bağı olmasına rağmen PON1 tarafından hidrolizlenememektedir, fakat dihidrokumarin hidrolizlenmektedir [36,37] (Şekil 1.5).



Şekil 1.5 Lakton hidrolizi [19]

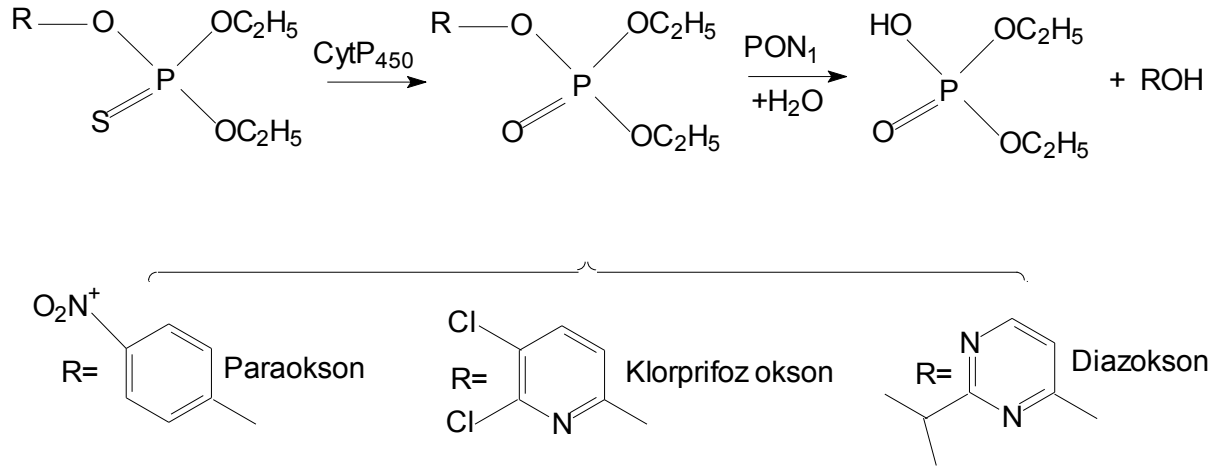
Önceleri PON1'in yapısının ve substratlarla olan ilişkisinin belirlenmesinde yapı-aktivite analizi üzerine çalışmalar yapılmıştır. Bu konuda ilk olarak, Augustinson ve Ekedahl aromatik halkalı veya çift bağlı aromatik esterlerin PON1 tarafından hidrolizlendiklerini bulmuştur. Bu reaksiyonda PON1'in substrat olarak kullanacağı esterin karbon-karbon çift bağının birbirine çok yakın olması gerektiği tespit edilmiştir [38]. Ayrıca, yapılan bir başka çalışmada, vinil asetat ve  $\Delta^2$ -siklopentil asetatın PON1 tarafından hidrolizlenmesi fakat etil asetat ve siklopentan asetatın PON1 tarafından hidrolizlenememesi bu öneriyi desteklemektedir [34]. Lakton halkasının oluşturduğu uzaysal yapı, bu yapıyı içeren bazı substratların enzimin aktif merkezine girmesini sağlayarak etkileşmelerine ve hidrolizlenmelerine izin verir. Bu etkileşim benzer şekilde içinde bulunan ester formları için mümkün değildir. Örneğin etil asetat PON1 ile hidrolizlenmezken, aynı sayıda atom ve ester yapısı gösteren  $\gamma$ -bütirolakton iyi hidrolizlenmektedir [34,39].

PON1 enziminin laktonaz aktivitesi için 284. rezidüde bulunan serbest sistein aminoasiti oldukça önemlidir. Bu serbest sistein rezidüsünün, söz konusu enzimin LDL'nin okside olmasını önlemede de rol alması; PON1'in sahip olduğu laktonaz aktivitesi aracılığıyla LDL ve HDL fosfolipitlerinin yükseltgenmeye karşı koruduğu düşünülmektedir [40,41]. Sorenson ve arkadaşları 284. pozisyonda bulunan serbest sistein rezidüsünün arilesteraz ve paraoksonaz aktivitesinde gerekli olmadığını göstermişlerdir [42]. Ancak aktif merkezdeki histidin rezidülerinin paraoksonaz ve

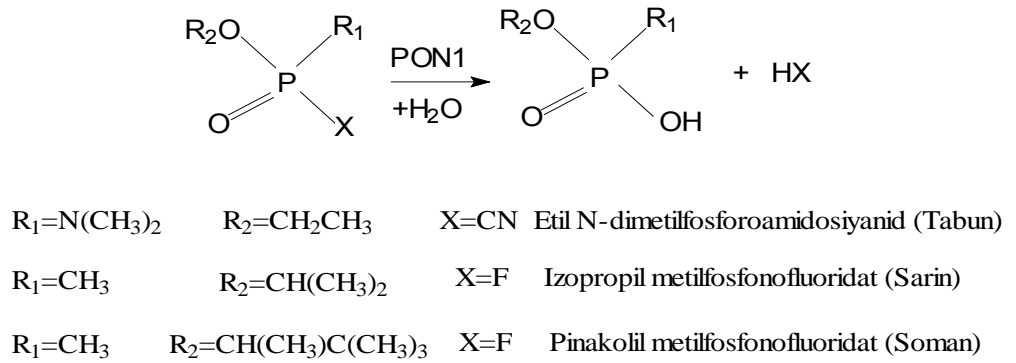
arilesteraz hidrolitik aktivitelerini göstermesinde çok gerekli olduğu gösterilmiştir [43].

PON1 bazı lakton ve karbonat esterlerini içeren ilaçları ve ilaç ön maddelerini de hidrolizleyebilmektedir. Örneğin, diüretik bir ilaç olan spironolakton ve 3-hidroksimetilglutaril-CoA redüktaz inhibitörleri olan mevastatin, lovastatin ve simvastatin bu enzim tarafından hidrolizlenir. Önceleri yapılan çalışmalarda bu hidroksimetil glutaril-CoA redüktaz inhibitörlerinin hidrolizlenmesi söz konusu enzimin statinaz aktivitesi olarak tanımlanmıştır [44,45]. Ayrıca PON1 glukokortikoid  $\delta$ -laktonların [46] sistemik metabolize edilmesinde ve ön ilaç maddesi olan karbonat ester yapısındaki prulifloksasinin aktivasyonunda rol oynamaktadır [47]. Bunun gibi PON1'in laktonaz aktivitesinden başlıca yönetici ajanların metabolize edilmesinde ve bunların istenmeyen yan etkilerinin azaltılmasında yararlanılmaktadır [46]. Laktonların isosterik formları olan laktamlar oksijen halkası yerine azot halkası ihtiva ederler. Laktamlar PON1'in substratını oluşturmazlarken enzimi inhibe ederler. *In vitro* çalışmalarda  $\delta$ -valerolaktam,  $\epsilon$ -kaprolaktam ve 2-hidroksikinolin gibi laktamlar PON1 enziminin güçlü inhibitörleridir [48].

İnsan serum PON1 enzimi ayrıca paration, diazinon ve klorpirifos gibi çok sayıda insektisit toksik okson metabolitlerini (Şekil 1.6) [49,50] ve soman, sarin ve tabun gibi organofosfat sinir ajanlarını hidrolizleyebilmektedir (Şekil 1.7) [51,52]. İnsan sağlığı açısından organofosfatlı bileşikler ise terörizm tehdidi kadar bir çevresel risk oluşturur [53]. PON1 enziminin çok yönlü bir araştırma konusu olmasının en önemli nedenlerinden biri budur.



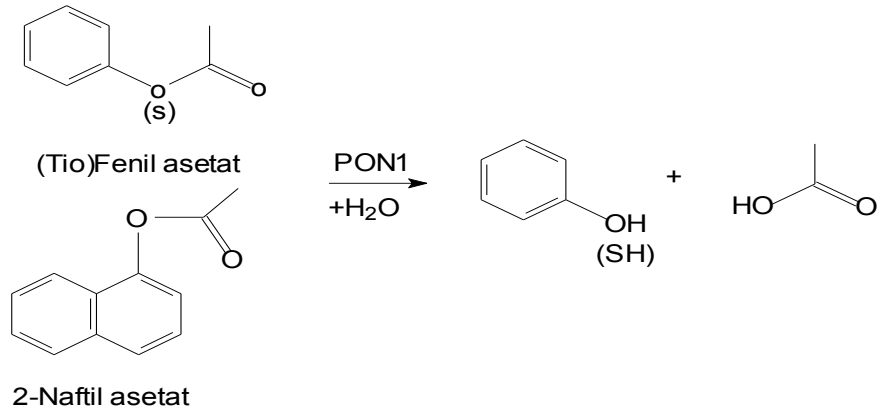
Şekil 1.6 İnektisitlerde yaygın kullanılan okson metabolitlerinin hidrolizi [39]



Şekil 1.7 Sinir gazlarının hidrolizi [39]

Bu aktivitelerinin yanında PON1 enzimi sınıflandırılmada yer aldığı A-esteraz grubunda bulunması ile fenilasetat gibi ester substratlarını da hidrolizleyebilmektedir. Ayrıca, tiofenil asetat ve 2-naftil asetat PON1'in aromatik ester substratları arasındadır (Şekil 1.8) [54,55,56].





Şekil 1.8 Aromatik esterlerin hidrolizi [39]

#### 1.4.1 PON1'in HDL'ye Bağlanması

PON1 ve PON3 karaciğerde sentezlendikten sonra kana salınır, orada spesifik olarak HDL'ye bağlanır. HDL periferik hücrelerden kolesterolün taşınmasını sağlayan ve kendisine bağlı platelet aktive eden faktör, PON1, LCAT ve PON3 gibi enzimler ile LDL'nin yükseltgenmesini önler [56,57].

HDL yaklaşık 10 nm çapında kompleks bir yapıdır. Bileşiminde öncelikle membran bileşenleri (fosfolipidler, kolesterol ve kolesterol esterleri), apolipoprotein A1 ve aromatik heliksler yer alır [58]. HDL'ye bağlı olan enzimlerden ilk kez üç boyutlu yapısı aydınlatılan PON1 enzimidir [59,60]. PON1 hidrofobik N terminal ucuyla sonlanır, H<sub>2</sub> ve H<sub>1</sub> hidrofobik heliksler bir araya gelerek potansiyel membrana bağlanma yüzeyi oluşturular [61,62]. Heliks yapılar lizin, triptofan ve tirozin yan zincirleri ile oluşturdukları yapı karakteristiği ile HDL ara yüzeyine girebilmektedir [63].

#### 1.4.2 PON1'in Sentezlenmesi ve Salgılanması

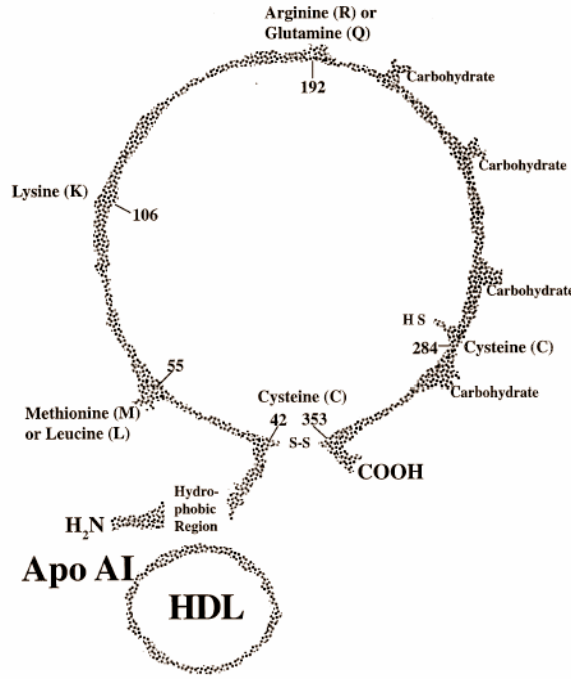
PON1 sentezi karaciğerde gerçekleştiğinden dolayı, serumdaki PON1 seviyesini belirleyen başlıca faktör karaciğer fonksiyonlarıdır. Serumdaki PON1 seviyesi ve aktivitesi bireyler arasında çok değişkendir [64]. Bunun nedeni enzim aktivitesini ve peptit konsantrasyonunu etkileyen PON1 geninin kodlanma ve promoter bölgesinde çok sayıda polimorfizm göstermesidir. PON1'in serumdaki aktivitesini ve konsantrasyonunu belirleyen promoter aktivitesi üzerinde en önemli polimorfizm -107 pozisyonundadır [65,66]. PON1 sentezinde önemli olan bir diğer faktör karaciğer hücrelerindeki kolesterol dengesidir. Ayrıca PON1'in karaciğerden sentezini herhangi bir hastalık durumu da etkilemektedir [67,68].

PON1 karaciğerden sentezlendikten sonra serumda HDL'ye veya karaciğerde mikrozomlara bağlanabilmesi için sentez sırasında N-terminal hidrofobik bölgesi olması gerekmektedir. N-terminal hidrofobik bölgesi bağlamada belirleyici olduğu kadar salgılanma prosedüründe de önemli role sahiptir [69,70]. Yapılan çalışmalarda hamster ovaryum hücresi ve insan hepatosit hücresine katılarak PON1 sentezlendikten sonra hücre zarının dış yüzeyine bağlandığı gösterilmiştir [71]. PON1 karaciğerde sentezlendikten sonra da önce mikrozomlara, daha sonra hücrenin dış yüzeyine bağlandığı düşünülmektedir [72,73]. Hücrenin zarının dış yüzeyinden salınması ve HDL'ye bağlanması tesadüf değildir, bu bağlanmada fosfolipit kompleksi önemli rol oynamaktadır ve LDL PON1'in hücreden salınmasına ve kendisine bağlanması için fosfolipit içeriği yeterli değildir [71,72].

#### 1.5 PON1 Polimorfizmi

Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda, bir kısmı PON1 geninin kodlanma bölgesinde, diğerleri intronlarda ve genin düzenleyici yani promoter bölgesinde olmak üzere 160'dan fazla polimorfizm tespit edilmiştir [74]. PON1 enzim

aktivitesindeki polimorfizm farklı etnik kökenli dağılımlara göre değişkenlik gösterir [75]. İlk olarak 1973'de Von Mallinckrodt ve arkadaşları tarafından enzimin genetik polimorfizm gösterdiği ve enzim aktivitelerinin trimodal dağılıma sahip olduğu gösterilmiştir [76]. Daha sonra 1976'da Playfer ve arkadaşları PON1'in insanlar arasında düşük, orta ve yüksek aktiviteye sahip polimorfik dağılım gösterdiğini daha detaylı bulgularla açıklamıştır [77,78]. Paraoksonaz aktivite polimorfizminin moleküler temeli, PON1'in kodlanma bölgesindeki kendiliğinden olan mutasyonlar sonucu iki aminoasitin yer değiştirmesi ile ilişkilidir. Bu mutasyonlarda birincisi kodlanma bölgesindeki 192. kodonda glutaminden (Q) arjinine (R) olan değişimdir [79]. Bu PON1 aktivitesindeki polimorfizm substrata bağımlıdır. Kodlanma bölgesindeki ikinci değişim 55. pozisyonda lösinden (L), metiyonine (M) olan değişimdir (Şekil 1.9). Bu mutasyonun PON1'in aktivitesi üzerinde etkisi çok az iken, serumdaki protein seviyesini etkilediği tespit edilmiştir [80,81]. PON1'in R allelinin kodlandığı proteinin paraoksan hidroliz aktivitesi Q allele göre sekiz kat daha yüksektir [82]. Ayrıca PON1 Q formu yükseltgenmiş HDL ve LDL'nin metabolize edilmesinde R formundan daha etkilidir [83]. Bu genetik polimorfizm serum protein konsantrasyonunu da etkiler. Homozigot R bireyler homozigot Q'ya göre daha yüksek enzim konsantrasyonuna sahiptir [84]. Farklı populasyonlardaki polimorfik dağılım bireyler arasında varyasyona neden olur [85]. PON1 allozimlerinin kalitatif ve kantitatif olarak farklı olduklarının keşfi ile fenotipleme metodları geliştirilmiştir. İlk olarak 1983'te Eckerson tarafından iki izoenzimin tuz ve pH'a farklı yanıtlarını temel alarak iki fenotip tanımlanmıştır [5]. Tuz (NaCl) varlığında homozigot R allozim (RR) paraoksana karşı daha yüksek enzim aktivitesine sahiptir.



Şekil 1.9 PON1 enzimi gen polimorfizmleri [1]

PON1'in kodlanma bölgesindeki PON1 M/L55 ve Q/R192 polimorfizmlerinden başka promoter bölgesinde de en az beş polimorfizm belirlenmiştir. Bu polimorfizmler -107/-108 (C/T), -126 (C/G), -160/-162 (A/G), -824/-832 (A/G) ve -907/-909 (C/G) bölgelerde bulunmaktadır. PON1 genindeki promoter polimorfizmlerinin, gen ekspresyonu ve enzimlerin serum düzeyleri üzerinde güçlü etkisinin olduğu bulunmuştur. Ayrıca promoter polimorfizmleri PON1 geninin 3' okunmayan bölgesi içerisinde de ortaya çıkarılmıştır, fakat bunların önemi henüz bilinmemektedir.

Paraoksonaz polimorfik dağılımı ırklar arasında oldukça değişim göstermektedir [85]. Türk populasyonunda RR allel oldukça düşük bir oranda bulunmuştur. Trimodal dağılım için QQ, QR ve RR allellerinin frekansı sırasıyla %48,6, %41,0 ve % 10,4 olarak tespit edilmiştir [86]. Düşük aktivite gösteren Q allel Avrupa, Kanada ve Amerika'da yüksek, Avustralya, Aborigin ve Zambiya'da düşüktür.

PON1'in kodlanma bölgesindeki diğ er bir polimorfizm 102. kodonda izolosinden valine olan değişimdir [87]. PON1'in promoter bölgesinde 5 tane polimorfizm tespit edilmiştir. Bunlardan plasma PON1 seviyesini etkileyen en önemli olanı C108T polimorfizmidir [80,81].

PON1 enziminin aktivitesi polimorfizme bağlı olarak oldukça değişim göstermektedir. Söz konusu enzimin organizmada fizyolojik fonksiyonu tam olarak açıklanamamasına rağmen, klinik yayınlarda PON1 enzim aktivitesi ile çeşitli hastalıklar arasında ilişkinin belirlenmesine yönelik pek çok çalışmaya rastlanmıştır [88,89]. Ayrıca yapılan çalışmalarda özellikle incelenen hastalıklar ile PON1 polimorfizmi arasında bir bağlantı olup olmadığı araştırılmıştır [90,91].

Öncelikle yapılan pek çok çalışmada kalp damar hastalıkları ile PON1 R/Q192 polimorfizmi arasında önemli bir ilişki olduğu gösterilmiştir [88,90,91]. Ancak başka çalışmada PON1'in Arjinin 192 polimorfizmi ile kalp damar hastalık riski ile ilişkili olmadığı gösterilmiştir [92]. Benzer şekilde PON1'in M/L55 polimorfizmi ile kalp damar hastalıkları oluşma riski arasında bir grup çalışmada bağlantı var iken [74,92], diğ er bir çalışma grubunda herhangi bir ilişki olmadığı gösterilmiştir [91,93]. Sonuç olarak, PON1 192. ve 55. polimorfizm genotipleri direkt enzim aktivitesini etkilemektedir. PON1 aktivitesi de geleneksel risk faktörleri dışında, kalp damar hastalıkları oluşma tehlikesini bize önceden haber vermektedir.

Yapılan bir çalışmada, PON1'in 192R ve 55M polimorfizmlerinin erkeklerde prostat kanseri riski ile istatistiksel olarak herhangi ilişkisi olmadığı gösterilmiştir [87]. Japon toplumunda tip 2 şeker hastalarında yapılan bir çalışmada, PON1 enziminin Q192R polimorfizmi ile hastalık arasında önemli bir bağlantı olmadığı tespit edilmiştir [94]. Paraoksonaz enziminin 192. kodonda Q alleli bulunduran kişilerde Parkinson hastalığı olma riskinin istatistiksel olarak ( $p<0,005$ ) yüksek olduğu tespit edilmiştir [95]. Alzheimer hastalarında yapılan bir çalışmada, PON1

geninin 192. polimorfizmi R allel görülme sıklığı kontrol grubuna göre oldukça düşük bulunmuştur [96].

## 1.6 Enzimin Saflaştırılması

Paraoksonaz enzimi karaciğerde, endoplazmik retikulum membranlarının parçacıklarının uçları kapanarak oluşan mikrozomlarda, serumda HDL'ye bağlı olarak bulunmaktadır [97]. Saflaştırma prosedürlerinde öncelikle söz konusu enzimin bağlı olarak bulunduğu yapılardan uzaklaştırılması gerekmektedir.

İlk olarak A-esterazları (diizopropil fosforidat hidrolaz) Mazur tarafından tavşan böbreğinden yaklaşık 13 kat [98] ve daha sonra Mounter tarafından 65-100 kat saflaştırılmıştır [99]. Ancak paraoksonaz ismi ile ilk saflaştırma koyun serumundan 330-385 kat etanol, pH ve iyonik çöktürme yöntemleri kullanılarak Main tarafından başarılmıştır [100]. Daha sonra Furlong ve arkadaşları tarafından insan ve tavşandan söz konusu enzim saflaştırılmış ve cDNA'sı karakterize edilmiştir [101].

Paraoksonaz enziminin saflaştırılması için, ulaşılmak istenen saflık derecesine ve enzimin serumda veya karaciğerde bulunuş durumuna göre değişen çok çeşitli metotlar tanımlanmıştır. Bu metotlardan sıklıkla uygulananları hidroksiapatit adsorbsiyonu, DEAE-Sepharose CL-6B iyon değiştirme kromatografisi, Cibacron Blue 3GA spesifik olmayan afinite kromatografisi, amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE anyon değiştirme kromatografisi, Concanavalin A-Sepharose afinite kromatografisi, mono Q HR 5/5 anyon değiştirme kromatografisi ve DEAE biojel kromatografisidir. Uygulanan metotların sırası enzim kaynağının serum veya karaciğer olmasına bağlı olarak değişebilir. Bazı durumlarda bir ya da diğer saflaştırma basamağı tekrar kullanılabilir. Örneğin; Gan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada insan serum paraoksonazının saflaştırma prosedürü için iki DEAE anyon değiştirme kromatografisi kullanılmıştır [102]. Furlong tavşan ve insan serumundan paraoksonaz enzimini Cibacron Blue 3GA-Agaroz, Sephadex G-75, DEAE Trisacril M ve tekrar Sephadex G-75 jel filtrasyon

kromatografi yöntemlerini kullanarak saflaştırmıştır [103]. Sıçan karaciğerinden paraoksonaz enzimi sırasıyla hidroksiapatit adsorbsiyonu, DEAE-Sepharose CL-6B iyon değiştirme, Cibacron Blue 3GA spesifik olmayan afinite Mono Q HR 5/5 anyon değiştirme kromatografisi ile saflaştırılmıştır [104]. Sıçan karaciğerinden PON3 enzimi de sırasıyla hidroksiapatit adsorbsiyonu, DEAE-Sepharose CL-6B iyon değiştirme, Cibacron Blue 3GA spesifik olmayan afinite, birinci DEAE anyon değiştirme, ikinci DEAE anyon değiştirme ve konkanavalin A-Sepharose afinite kromatografisi ile saflaştırılmıştır.

Paraoksonaz enzimi karaciğerde mikrozoamlara, serumda da HDL'ye bağlı olmasından dolayı homojen bir saflık elde etmek oldukça zordur [105,106]. Söz konusu enzimin saflaştırılması sırasında bağlı olduğu yapılardan uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu amaçla, karaciğerde enzimi mikrozoamlardan ayırmak için TritonX-100 kullanılırken [107] serumda HDL'den uzaklaştırılması için deterjan veya yüksek tuz konsantrasyonu kullanılması gerekmektedir [100,101].

## **1.7 KANSER**

### **1.7.1 Tanım**

Kanser önemi giderek artan bir sağlık ve yaşam sorunu durumundadır. Ölüm nedeni olarak, kalp ve damar hastalıklarının hemen ardından gelmektedir. Yurdumuzda en sık görülen kanserler erkeklerde akciğer, prostat, kalın barsak, rektum, mide ve pankreas; kadınlarda meme, akciğer, kalın barsak, rektum, serviks, over, mide ve pankreas kanserleri olarak sıralanabilir. Deri kanseri sıklığı her iki cinste de yüksek olmakla birlikte, deri kanserleri tedaviye iyi cevap verdiklerinden ölüm oranı çok düşüktür.

## 1.7.2 Kanserin Biyokimyası

Kanser, bazı etkilerle değişime uğramış hücrelerin, gerek yerel ve gerek uzak noktalarda kontrolsüz olarak çoğalıp büyümelerinin sonucu oluşan kötü huylu hastalıklar grubudur. Normalde hücreler belli bir kontrol altında, ihtiyaca göre bölünerek çoğalırlar. Hücreler bir taraftan programlı ölüm ya da "apoptoz" denen olay ile yok olurken, diğer taraftan da büyüme faktörlerinin etkisiyle çoğalır. Büyüme faktörleri normalde DNA'daki çeşitli genlerin etkisiyle oluşan proteinlerdir. Bu genler mutasyona uğrayarak hücrelerin aşırı büyümesine sebep olurlarsa, o zaman kanser oluşur ve bu genlere de "onkogen" denir. DNA hayatın merkezi maddesi olarak kabul edilebilir. DNA'da genler bulunmaktadır. Genler, anne veya babadan çocuğa siyah ya da sarı saç veya mavi göz gibi özelliklerin ya da talasemi (Akdeniz anemisi) gibi hastalıkların geçmesine sebep olan kalıtım birimleridir. Vücudumuza nasıl büyüyeceğini bildiren, hatta davranışlarımızı belirleyen biyolojik bir programlar dizinidir.

DNA, deoksiribonükleik asid dediğimiz hücre çekirdeği asidinin baş harflerinden oluşan bir kısaltmadır. DNA hücrelerde kromozom şeklinde bulunur.

İnsan vücudunda milyarlarca hücre vardır ve her hücredeki DNA o hücrenin kontrol merkezidir. İnsanda 23 çift kromozom vardır. Bunlar çekirdekte çiftler halinde bulunurlar. Yalnız son çifttekiler cinsiyet kromozomu olarak farklıdır; kadında XX ve erkekte XY olarak bulunur.

Kanser genleri ya da onkogenler 70'li yılların sonlarına doğru bulunmaya başlanmış ve günümüze kadar çok aktif araştırmaların konusunu oluşturarak, kanserin daha iyi anlaşılmasına, tanı ve tedavinin geliştirilmesine hizmet etmişlerdir.

Onkogenleri oluşturan mutasyonlar, karsinojen maddelerin, virüslerin ve X ışınlarının etkisiyle meydana gelir. Kanser bir organda oluştuktan sonra, uzak doku ve organlara da metastaz dediğimiz yerleşmeler yapar ve genel olarak hastalar metastazlar nedeniyle kaybedilir. Hızlı ilerleyen kanserlerde metastaz erken, daha



iyi gidişli kanserlerde ise metastaz geç oluşur. Metastaz oluşumu tesadüften çok, kanser hücrelerinin bazı organlara kolay yerleşmelerini sağlayan özelliklerine bağlıdır. Örneğin, kolon kanserleri karaciğere, prostat kanserleri kemiğe metastaz yapmayı tercih etmektedir. Burada, kanserli dokuda kan akımı, damar hücrelerinin aktivasyonu gibi faktörler rol oynamaktadır.

Onkogenlerin yanında anti-onkogenler de çok önemlidir. Onkogenler kansere sebep olurken, anti-onkogenler kanseri önleyen genlerdir. Anti-onkogenlere "tümörü baskılayan genler" de denir. Bunlar doğal hallerinde iken, yani mutasyona uğramamış hallerinde iken hücre bölünmesini ve çoğalmasını frenleyen, durduran genlerdir.

## **1.8 MEME KANSERİ**

### **1.8.1 Kadınlarda meme kanseri**

Kadın memesi, yağ, bağ doku ve çok sayıda küçük süt bezinden meydana gelir. Kadının bebeği varsa, emzirmenin gerçekleşebilmesi için süt kanalı adı verilen küçük tüplerden meme ucuna ilerler. Meme kanseri genellikle meme dokusunda bir kitle şeklinde ortaya çıkar, ancak memedeki kitlelerin çoğu kanserli değildir. Birleşik Krallıkta, meme kanseri kadınlar arasında en yaygın görülen kanser türüdür ve genellikle 50 yaş üstündeki kadınları etkiler. Ancak, kadınlarda her yaşta meme kanseri görülmesi mümkündür ve nadiren olmakla birlikte bu hastalık erkekleri de etkiler.

50-70 yaş arası tüm kadınların NHS Breast Screening Programme (NHS Göğüs Taraması Programı) kapsamında düzenli olarak meme kanseri taramasından geçmeleri gerekir.

### **1.9 Meme Kanseri Etkili Olduğu Düşünülen Enzimler ve Etkileri**

Stratus ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada meme kanserinde serum arginaz aktivitesinin sağlıklı kadınlardan 4 kat yüksek olduğunu saptamışlardır.

Kanserli dokunun arginaz enzimi ürettiğini veya enzim aktivitesini ileri derecede arttırdığını düşünmüşler ve buna bağlı olarak da dolaşıma arginaz enziminin sızması sonucu serum arginaz aktivitesinin artacağını söyleyemişlerdir. Çünkü arginaz, diğer enzimlerde de olduğu gibi kan dolaşımına çıkmaktadır [108].

Yılmaz ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalar sonucunda , antioksidan enzimlerin kanserli hücrelerdeki aktivite artışının tümör hücrelerinde enzim ekspresyonundaki artışa bağlı olabileceğini düşünmüşlerdir. Meme kanserli hastaların tümör dokularındaki arjinaz aktivitesinde görülen artışın, poliamin biyosentezine substrat olarak ornitini sağlaması nedeniyle kanser oluşumunda önemli bir role sahip olabileceğini öne sürmüşlerdir [109].

Meme kanserli hastalarda lipid peroksidasyonundaki artış oksidatif strese karşı koruyucu olarak artmış antioksidan savunma sistemi ile dengelenmiştir. Katalaz ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) primer enzimatik savunma sistemleridir [110]. Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) oksijen radikallerine karşı hücrel savunma mekanizmalarında yer alan önemli bir antioksidan enzimdir. G6PD laktasyon esnasında meme bezinde yağ asiti sentezlenmesi için gerekli bir kofaktör olan NADPH'ın üretiminde rol almaktadır [111].

Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), katalaz ve GSH-Px tarafından su ve moleküler oksijene dönüştürülerek metabolize edilmektedir [110]. Katalaz; kanser, diabet, katarakt, ateroskleroz, beslenme yetersizliği ve yaşlanmayı içine alan pek çok patolojik şartlarda ortaya çıkan oksidatif strese karşı savunmada antioksidan sistemin öncelikli bir enzimidir. Substrat olarak glutatyon kullanan GSH-Px ise serbest oksijen radikalleri, peroksitler ve kanserojenlere karşı savunmada önemli bir rol oynar. Ayrıca GSH-Px lipoksigenaz ve siklooksigenaz yollarını değiştirerek tümör oluşumunda anahtar bir rol oynar. Tümörlerde  $H_2O_2$  ve diğer hidroperoksitlere karşı enzim savunmasının ilk enzimi olan GSH-Px aktivitesinde önemli artış bildirilmiştir [112,113].

Piruvat kinaz; adenozin difosfatın substrat düzeyinde fosforilasyonunu katalize eden glikolizin anahtar regülatör bir enzimdir. Tümör hücrelerinde karbonhidrat metabolizmasında değişiklikler gözlenmiştir [114]. İyi huylu ve kötü huylu doku çoğalmasında piruvat kinaz aktivitesinin genellikle arttığı rapor edilmiştir. Bu da tümör hücrelerinin metabolizmasındaki enerji ve metabolitlerin sağlanması için glikolizin gerekliliğini açıklamaktadır [115].

Yılmaz ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalar sonucunda meme tümör hücrelerinde GSH-Px aktivitesinin normal doku ile karşılaştırıldığında belirgin olarak arttığını tespit etmişlerdir. GSH-Px aktivitesinin insan meme dokusunda 25 kat daha yüksek olduğunu bildirilmişler ve meme kanser hücrelerindeki yüksek GSH-Px aktivitesinin genomik DNA'nın artmış ekspresyonundan meydana geldiğini ileri sürmüşlerdir [116]. Bu nedenle meme tümör dokusunda GSH-Px aktivitesinin artması hücre çoğalmasının bir "belirteci" olabileceğini ön görmüşlerdir.

Yüksek  $H_2O_2$  konsantrasyonlarında katalaz, GSH-Px enziminden daha etkilidir. Katalaz enzimi prostat ve meme kanser dokularında belirgin olarak yüksektir. Bu artış tümör hücrelerindeki enzim ekspresyonundaki artmaya bağlı olabilir [117]. Kanserlerde eritrosit süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz aktivitelerinde düşüş bildirilmiştir. Bu antioksidan enzimler lipid peroksidasyonuna aracılık eden  $O_2^{\cdot -}$  ve  $H_2O_2$ 'ye karşı eritrositleri korur [118]. Kumaraguruparan ve arkadaşları, meme kanserli hastalarda eritrosit lipid peroksidasyondaki artış ile SOD ve katalaz aktivitesindeki düşüş arasında bir ilişkinin olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca meme tümörlerinde piruvat kinaz ve G6PD aktiviteleri yüksek bulunmuştur. Kötü huylu meme kanser dokusu daha yüksek piruvat kinaz aktivitesi gösterirken, normal meme dokusu daha düşük enzim aktivitesi göstermiştir.

Kanserli dokulardaki G6PD ve piruvat kinaz aktivitelerinin normal dokulardakinden farklı olması, kısmen değişmiş bir gen ekspresyonu ile açıklanmıştır [114].

Meme tümör dokusunda arjinaz aktivitesi yüksek bulunmuştur. Bu sonuç arjinaz aktivitelerinin meme kanseri vakalarında arttığını ileri süren çalışmalarla tutarlıdır [119,117,120,121].

Meme kanserli hastaların tümör dokusu arjinaz aktivitelerinde sağlıklı dokulardakine göre önemli bir artış olduğu ve bu artışın poliamin biyosentezini hızlandırması nedeni ile kanser gelişiminde önemli bir rol oynayabileceği gösterilmiştir. Ayrıca, katalaz, GSH-Px, G6PD, piruvat kinaz ve arjinaz enzimlerinin meme kanserinde “belirteç” olarak görev yapabileceği söylenebilir.

## **2 MATERYAL VE YÖNTEMLER**

### **2.1 MATERYALLER**

#### **2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler**

Deneysel çalışmalarda kullanılan, Sepharose-4B, 9-aminofenantren, L-tirozin, standart serum albumin, trihidroksimetil aminometan (Tris-Base), paraoksan, Tris-HCl, Sigma'dan, sodyum hidroksit, amonyum sülfat, glisin, fosforik asit, asetik asit, etil alkol, hidroklorik asit, sodyum dihidrojen fosfat, amonyum persülfat, sodyum bikarbonat, sodyum fosfat, potasyum fosfat, kalsiyum klorür Merc'den temin edilmiştir. Ayrıca deneysel çalışmalarda kullanılan vakumlu tüpler (Aysel, ClotActivator & Gel (ZS) 16x100mm, 8,5 ml) AYSET A.ř. 'den karşılanmıştır.

Araştırmada kullanılan Paraoksonaz enzimini saflaştırma amaçlı insan kanı T.C. Sağlık Bakanlığı Ali Osman Sönmez Onkoloji Hastanesi'nden temin edilmiştir.

### 2.1.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar

Bu çalışmada aşağıdaki alet ve cihazlardan yararlanılmıştır.

Soğutmalı santrifüj	Sigma 3K15
Soğutmalı Ultrasantrifüj	Hettich EBA 12R
Multi Santrifüj (Falkon santrifüjü)	Thermo IEC
pH metre	Hanna pH 211 Microprocessor
UV-Spektrofotometre (Plaka okuyuculu)	Biotek Power Wave XS
Manyetik karıştırıcı	Torrey Pines Scientific
Terazi	Sartorius BL 210S
Otomatik pipetler	Hi-Tech ve Finipipette
Kromatogafi Kolonu	Sigma (1 cm çap ve 20 cm uzunluk)
Derin Dondurucu (-80 °C)	CFC Free
Vorteks	Fisons Whirli Mixer
Gadient Mikser	Atta Magnetik Karıştırıcı ve Gadient Tüp
Otoklav	Hirayama HV 85
Buz makinesi	Fiocchetti AF 10
Su Banyosu	Elektro-mag

### 2.1.3 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

#### Hidrofobik jelin sentezinde kullanılan tamponlar

**0.1 M 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, 1 N NaOH ile pH'ı 8,8'e getirildi ve son hacim distile su ile 500 mL'ye tamamlandı.

**0.01 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu (pH 6.0);** 1,42 g (0,01 mol) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 950 mL distile suda çözülerek, 1 N NaOH ile pH'sı 6.0'a getirildi ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

**Hidrofobik jelin dengelenmesi için kullanılan tampon:** *1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içeren, 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu (pH 8.0);* 14,2g (0.1 mol) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve 132,14 g (1 mol) NH<sub>4</sub>(SO)<sub>2</sub> 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.

**Hidrofobik jele bağlanmış PON1 enziminin elüsyonu için kullanılan çözelti:** *1M NH<sub>4</sub>(SO)<sub>2</sub> içeren, 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu (pH 8,0) ve 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu (pH 8,0) ile gradient mikser kullanılarak tuz gradienti oluşturuldu;* 14,2g (0.1 mol) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve 132,14 g (1 mol) NH<sub>4</sub>(SO)<sub>2</sub> 950 mL distile suda çözülerek, 1N HCl ile pH'sı 8.0'e getirildi ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı. 14,2 g (0.1 mol) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 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.

**Amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda oluşan çökeleğin alındığı tampon:** *0,1 M Tris-Base 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.

**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.

**Paraoksonaz aktivite ölçümünde kullanılan bazal aktivite tamponu:** *2 mM CaCl<sub>2</sub> içeren 100 mM tris-HCl, pH=8;* 3,0285 g (25 mmol) 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.

## **2.2 YÖNTEMLER**

### **2.2.1 Kan Serumunun Ayrılması**

Kan numuneleri, kuru santrifüj tüpüne alındıktan sonra 5000 rpm'de, +4°C'de ve 10 dakika santrifüj edilerek serumlarının ayrılması sağlanmıştır. Ayrılan serum aktivite ölçümüne kadar -70°C'de bekletilmiştir. Daha sonra enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.

### **2.2.2 Enzim Aktivite Tayini**

Paraoksonaz enziminin aktivitesi spektrofotometrik olarak tayin edildi. Aktivite ölçümü için 0,05 mL enzim çözeltisi (serum) alınıp daha önceden hazırlanmış olan 1 mL tampon (100 mM tris-baz pH:8,00) + substrat (2 mM paraoxon) + koenzim (2 mM CaCl<sub>2</sub>) çözeltisine hızlı bir şekilde eklendikten sonra 412 nm'de 37 °C'de 1 dakikada absorbansta meydana gelen değişim okundu. Bu şekilde paraoxonun p-nitrofenole enzimatik dönüşüm hızı tespit edildi. Aynı işlem enzim olmadan tekrarlanarak aradaki fark enzim aktivitesi olarak belirlendi. 1 ünite paraoksonaz dakikada meydana gelen p-nitrofenolün nmol'ü olarak tayin edildi.

### **2.2.3 Q ve R Türünün Belirlenmesi**

Aktivite ölçümü için 0.05 ml serum örneği alınıp daha önceden hazırlanmış olan 1 ml tampon (100mM Tris-Base pH:10.5) ve substrat (1 mM paraokson) çözeltisine hızlı bir şekilde eklendikten sonra, 412 nm'de 37 °C'de 1 dakikadaki absorbansta meydana gelen bazal aktivite değeri okundu. Aynı solüsyonlara koenzim (1 M NaCl) ilave edilerek de tuzla uyarılma (salt stimulate) aktivite değeri ölçüldü. Bu şekilde paraoksanın p-nitrofenole enzimatik dönüşüm hızı tespit edildi. Aynı işlem enzim olmadan tekrarlanarak aradaki fark enzim aktivitesi olarak belirlendi. 1 Ünite paraoksonaz, dakikada meydana gelen p-nitrofenolün µmol'u



olarak tayin edildi. Paraoksonaz enzimi bazal ve tuz aktiviteleri ölçümünden sonra aşağıda verilen formül kullanılarak fenotip belirlenmesi yapıldı.

$$\frac{1\text{M NaCl varlığında paraoksonaz aktivitesi} - \text{Bazal paraoksonaz aktivitesi}}{\text{Bazal paraoksonaz aktivitesi}} \times 100$$

Paraoksonun yüksek aktiviteli enzim ile hidrolizi, 1 M NaCl ile stimüle edildiğinde düşük aktiviteli form inhibe olur. Bu analizde trimodal dağılım izlenir. %60 'a kadar homozigot Q (A), % 60 ile % 200 arası QR (AB) ve % 200 üzeri homozigot R (B) bireyleri temsil eder.

## 2.2.4 Enzimin Saflaştırılması

### 2.2.4.1 Amonyum Sülfat Çöktürme Aralığının Belirlenmesi

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

$$g_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4} = \frac{1.77 \times V \times (S_2 - S_1)}{3.54 - S_2}$$

V : Serum hacmi

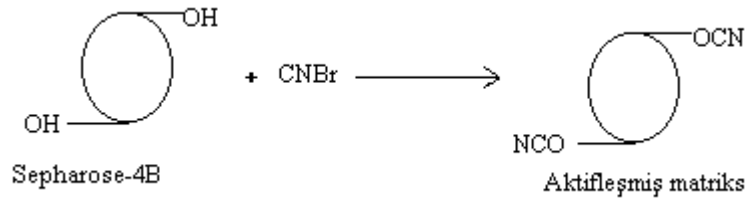
S<sub>1</sub> : 1'in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğu

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

## 2.2.4.2 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi İle Enzimin Saflaştırılması

### 2.2.4.2.1 Sepharose 4B'nin Aktifleştirilmesi

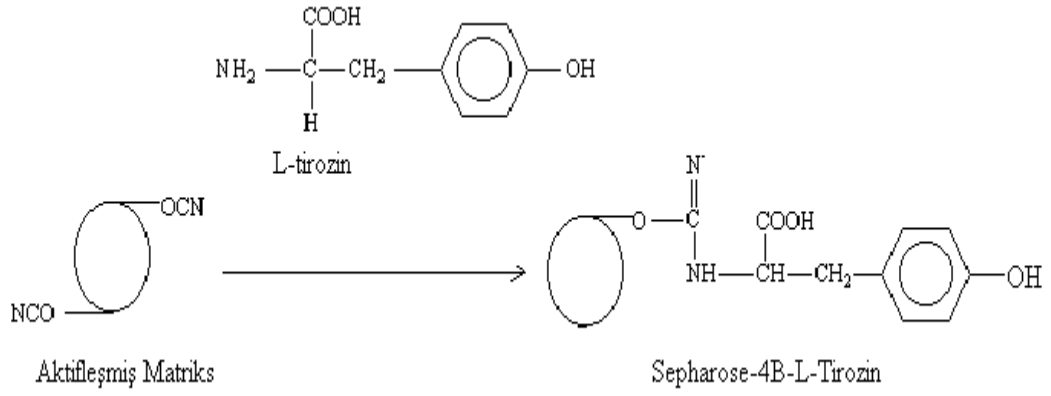
10 mL Sepharose-4B jeli, saf su ile iyice yıkanarak dekante edildi. Eşit hacimde distile su ile birleştirildi. Karıştırılmakta olan jel süspansiyonuna 4 g CNBr'in hepsi birden katıldı. pH metre kullanılarak süspansiyonun pH'sı 4 M NaOH ile hemen 11'e çıkarıldı ve reaksiyon bu pH'da muhafaza edildi. Reaksiyona pH değişmeyene 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

### 2.2.4.2.2 L-tirozinin Bağlanması

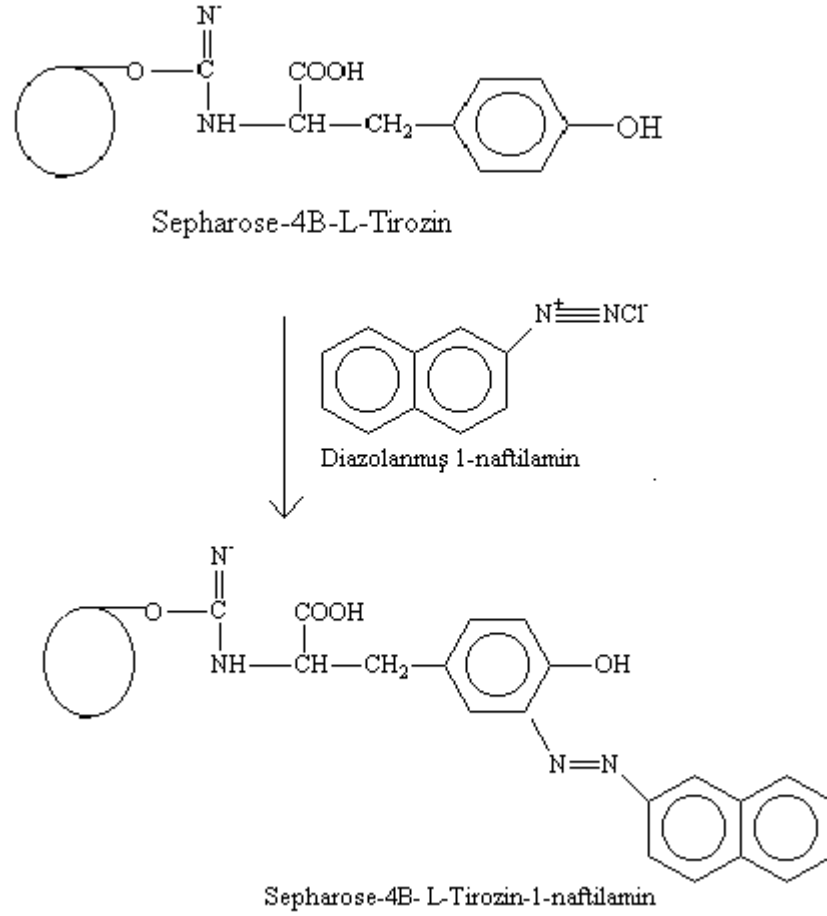
CNBr ile aktifleştirilmiş matriks üzerine, 20 mL'sinde 15 mg tirozin içeren 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> tamponunun (pH 10,00) soğuk çözeltisi ilave edilerek 90 dk karıştırıldı. Bundan sonra süspansiyon 16 saat 4°C'de bekletildi. Bu sürenin bitiminde yıkama suyu 280 nm'de absorbans vermeyinceye kadar bol 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

#### 2.2.4.2.3 9-Aminofenantren Bileşiminin Bağlanması

25 mg 9-aminofenantren C<sup>0</sup> civarında 10 mL THF içerisinde çözüldü. 75 mg NaNO<sub>2</sub> ihtiva eden C<sup>0</sup>'deki 5 mL 1 M HCl içinde hazırlanan çözelti, 9-aminofenantren çözeltisine damla damla katıldı. 10 dakika reaksiyondan sonra diazolanmış bulunan 9-aminofenantren, 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 (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 1-Naftilamin bileşiğinin bağlanması

#### 2.2.4.2.4 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDSPAGE) ile Enzim Saflığının Kontrolü

Paraoksonaz enziminin hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılmasından sonra iki farklı akrilamid konsantrasyonunda; yığıma jeli % 3, ayırma jeli % 10 olacak şekilde kesikli sodyum dodesil sülfat jel elektrofrez (SDSPAGE) yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi. Bu amaçla elektrofrez cam plakaları önce su, sonra etil alkol ile iyice temizlendi. Daha sonra plakalar arasına plastik aralık oluşturucusu yerleştirilerek iki cam plaka birbiri üzerine konuldu ve elektrofrezin dökme aparatına sabitlendi. Ayırma jeli plakalar arasına üstten 2-3 cm kalana kadar enjektörle döküldü. Jel içerisinde hava kabarcığı

kalmamasına dikkat edildi. Jel yüzeyinin düzgün olması için n-bütanol ile ince bir tabaka oluşturuldu. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra (1 gece) üst yüzeydeki n-bütanol döküldü. Daha sonra cam plakaların arasına tamamen doluncaya kadar polimerleşmiş ayırma jelinin üzerine yığılma jeli ilave edildi. Jel kasetindeki yükleme jelinin üzerine tarak dikkatlice yerleştirilerek jelin polimerleşmesi beklendi (30 dakika). Yükleme jeli polimerleştikten sonra tarak kuyucukların arasının bozulmamasına dikkat edilerek jellerin bulunduğu kaset elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konuldu. Hidrofobik etkileşim kromatografisi sonucunda elde edilen fraksiyonlardan yüksek aktivite gösterenler birleştirildi. Elde edilen çözelti toplam hacim 100 µL olacak şekilde 1:1 oranında numune tamponuyla karıştırıldı. β-galaktosidaz (116.0 kDa), sığır serum albumin (66,2 kDa), yumurta albumini (45,0 kDa), laktat *dehidrogenaz* (35.0 kDa), β-laktoglobulin (25.0 kDa) ve lizozim (19.5 kDa) içeren standart protein çözeltisi 1:1 oranında numune tamponuyla karıştırıldı. Jele yüklenecek numuneler 3 dakika 100 °C'de termoblok da bekletildi. Numuneler soğutularak kuyucuklara yüklendi. Elektroforez güç kaynağına bağlanarak 80 volt'a ayarlandı. Proteinlerin jeldeki hareketini incelemeye yarayan numune tamponu içindeki boyaya ait bant ayırma jeline ulaştığında voltaj 120 volt'a yükseltildi. Yürütme işlemine proteinler, jelin altına 1 cm kalana kadar devam edildi. Daha sonra akım kesilerek yürütme durduruldu. Cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı yığılma 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 renksizleştirme çözeltisine kondu. Belirli aralıklarla değiştirmek suretiyle jelin zemin rengi açılıp protein bantları belirginleşinceye kadar bu çözelti içinde çalkalandı. Jel renksizleştirme çözeltisinden çıkarıldıktan sonra jel görüntüleme sistemi (UVP) ile görüntü bilgisayara aktarıldı.

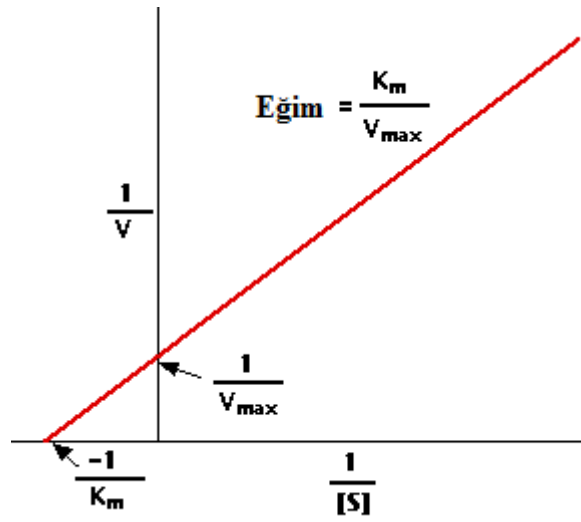
### 2.2.5 Optimum Şartlarda $K_M$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Bulunması

$K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin tespit edilmesi amacıyla optimum şartlarda paraokson substratının beş farklı konsantrasyonunda enzim aktivitesi ölçümü yapıldı. Her ölçüm iki defa tekrarlanarak, bulunan değerlerin ortalaması alındı.

1/V ve 1/[S] değerleri bulunarak Lineweaver-Burk grafiği çizildi.  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri grafiğin denklemlerinden yararlanılarak bulundu.

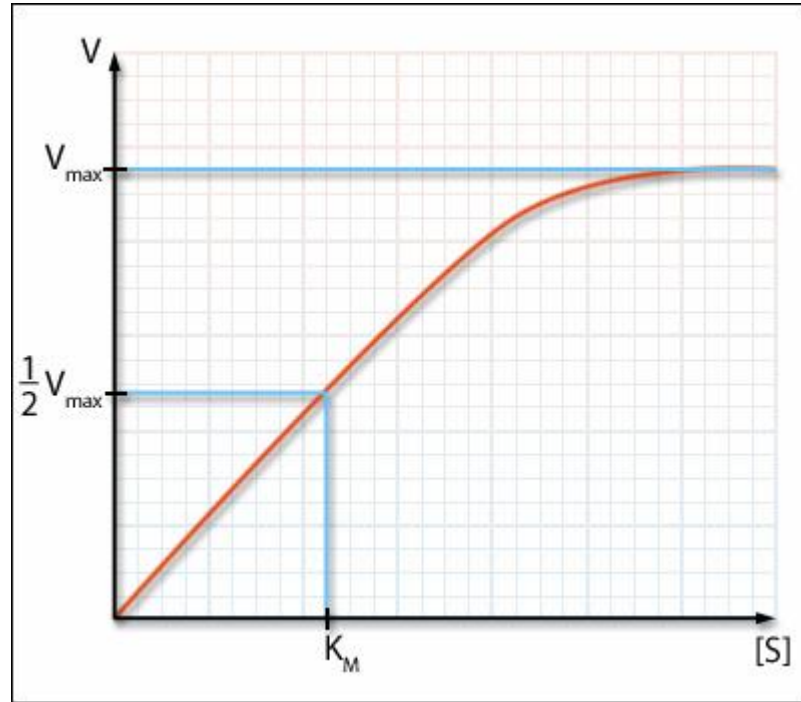


Lineweaver-Burk Grafiği ve denklemi



$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Michaelis-Menten grafiği ve denklemi



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

### **3 BULGULAR**

Bu bölümde enzimin kontrol grubu ve kanserli hastalardaki aktivitesi, fenotiplerinin belirlenmesi, kolesterol değerleri, HDL, LDL ve TG (Trigliserit) değerleri verilmiştir.

#### **3.1 Sağlıklı Ve Tümörlü Bireylerde Paraoksonaz Enzim Aktivitesinin Ve Fenotipinin Belirlenmesi**

Çalışmamızda Lipit değerleri belirli 35 sağlıklı bireye ait kan örnekleri gönüllülerden ve 32 meme kanserli bireylere ait kan örnekleri Bursa Ali Osman Sönmez Onkoloji Hastanesi'nden temin edildi. Çalışmada kullanılan sağlıklı bireylerin yaş ve diğer bilgileri Çizelge 3.2.'de, tümörlü bireylerin yaş ve diğer bilgileri Çizelge 3.3.'de gösterildi.

PON1 serumda HDL'ye bağlı olarak bulunan bir enzim olduğundan dolayı enzim aktivitesi ve lipit değerleriyle arasında korelasyonu belirlemek amacıyla çalışmada kullanılan kolesterol, trigliserit, HDL ve LDL değerleri Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2' de verilmiştir. Serum paraoksonaz enzim aktivitesindeki değişimler ve fenotipleri belirlemek için kan serumu ayrıldı.

Aktivite ölçümü için 0.05 ml enzim örnek çözeltisi (serum) daha önceden hazırlanmış olan 1 ml tampon (100mM Tris-Base pH:8,00) ve substrat (1mM paraokson) çözeltisine hızla bir şekilde eklendikte sonra 412 nm'de 37°C'de 1 dakikadaki absorbansta meydana gelen bazal aktivite değeri okundu. Aynı solüsyonlara koenzim (1M NaCl) ilave edilerek de tuzla uyarılmış aktivite değeri ölçüldü. Bu şekilde paraoksanın p-nitrofenole enzimatik dönüşüm hızı tespit edildi. Aynı işlem enzim olmadan tekrarlanarak aradaki fark enzim aktivitesi olarak belirlendi. 1 Ünite paraoksonaz dakikada meydana gelen p-nitrofenolün  $\mu\text{mol}'u$  olarak tayin edildi.



Paraoksonaz enzimi bazal ve tuzlu aktiviteleri ölçümünden sonra bölüm 2.2.3. de açıklandığı üzere fenotip belirlemesi yapıldı.

Paraoksonun yüksek aktiviteli enzim ile hidrolizi 1M NaCl ile stimüle edildiğinde düşük aktiviteli form inhibe olur. Bu analizde trimodal dağılım izlenir. %60'a kadar homozigot Q (veya A), %60 ile %200 arası QR (AB) ve %200 üzeri homozigot R (veya B) bireyleri temsil eder.

Çizelge 3.1 Sağlıklı ve tümörlü bireylerin yaş aralığı ve sayı dağılımı

	Kişi Sayısı	Yaş Aralığı
Kontrol	30	21-67
Kanserli	33	28-82

### 3.2 Enzimin Saflaştırılması

#### 3.2.1 Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Amonyum sülfat, belirli doygunluk derecelerine göre belirli proteinlerin çökmesini sağlayan 2 değerlikli, çok kullanılan bir tuzdur. Bu amaçla %60-80 amonyum sülfat çöktürmesi aşağıda verilen formülle tespit yapıldı:

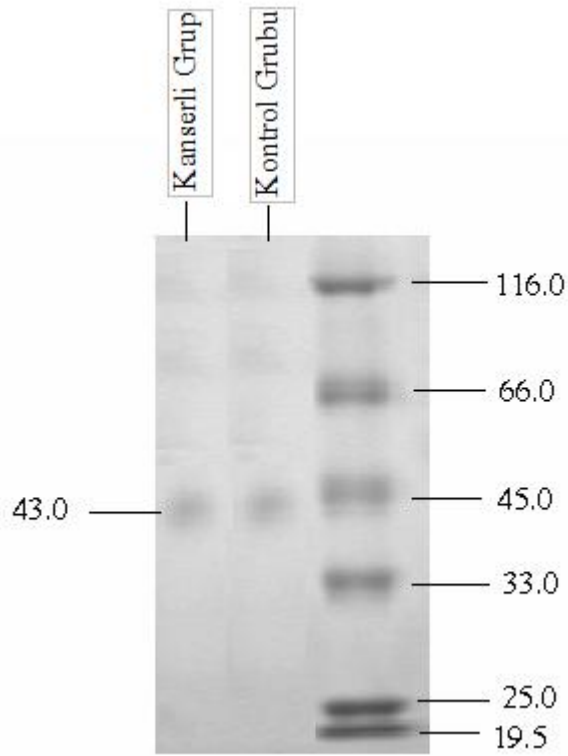
#### 3.2.2 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile Enzimin Saflaştırılması

Hidrofobik etkileşim kolonu önce 1M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  içeren 0,1 M Tris-HCl pH:8,0 tamponu ile dengelendi. Kolonun dengeleme işlemi bittikten sonra, jel üzerindeki tampon çözeltisi jel seviyesine kadar indirildi. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen serum enzim çözeltisi 1 M amonyum sülfat doygunluğuna getirildikten 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. Altan gelen yıkama ve elüsyon çözeltisi 1,5 mL halinde tüplere toplandı.

Yıkama ve elüsyon işlemi 280 nm'deki absorbans sıfır oluncaya kadar devam edildi. 0,1 M Tris-HCl pH:8,0 tamponu kör olarak kullanılarak her bir tüpte 280 nm'de kalitatif protein tayini ve 412 nm'de aktivite tayini yapıldı.

### 3.2.3 Serum Paraoksonaz Kanserli ve Kontrol Grubunun SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Hidrofobik etkileşim kolonundan saflaştırılan serum paraoksonaz enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla SDS poliakrilamid jel elektroforezine serumdan saflaştırılan paraoksonaz enzim numunesi tatbik edildi. Protein bantlarını içeren jellerin görüntüleri jel görüntüleme sistemi ile bilgisayara aktarıldı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılan paraoksonaz enziminin SDS-polakrilamid jel elektroforez görüntüsü

### **3.3 Kontrol Ve Tümörlü Bireylerin Karşılaştırılması**

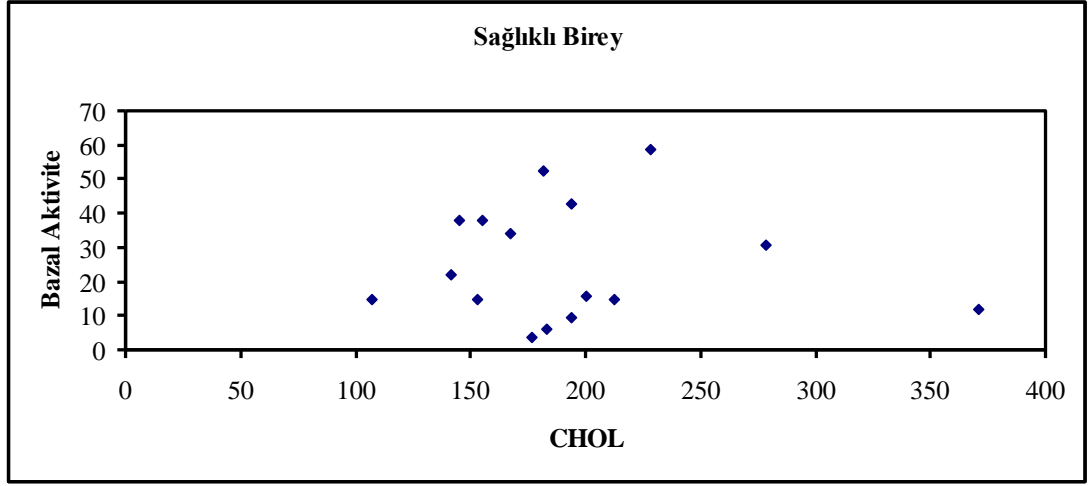
#### **3.3.1 Sağlıklı Bireylerde PON Aktiviteleri Ve Lipit Değerlerinin Karşılaştırılması**

Önemli bir hastalık tanısı konmamış yaş aralığı 21-67 arasında bulunan 30 kadın çalışmamıza dahil edilmiştir. Her bir bireye ait yaş verileri ile ilgili kişilere ait lipit değerleri, kolesterol, HDL, LDL (mg/dl) değerleri ve bazal paraoksonaz aktivitesi, tuzla uyarılmış paraoksonaz aktiviteleri de Çizelge 3.2’de görülmektedir. Bazal aktiviteleri ve tuzla uyarılmış paraoksonaz aktivitelerinden yararlanarak fenotip tayini de yukarı da belirtildiği gibi yapılmıştır.

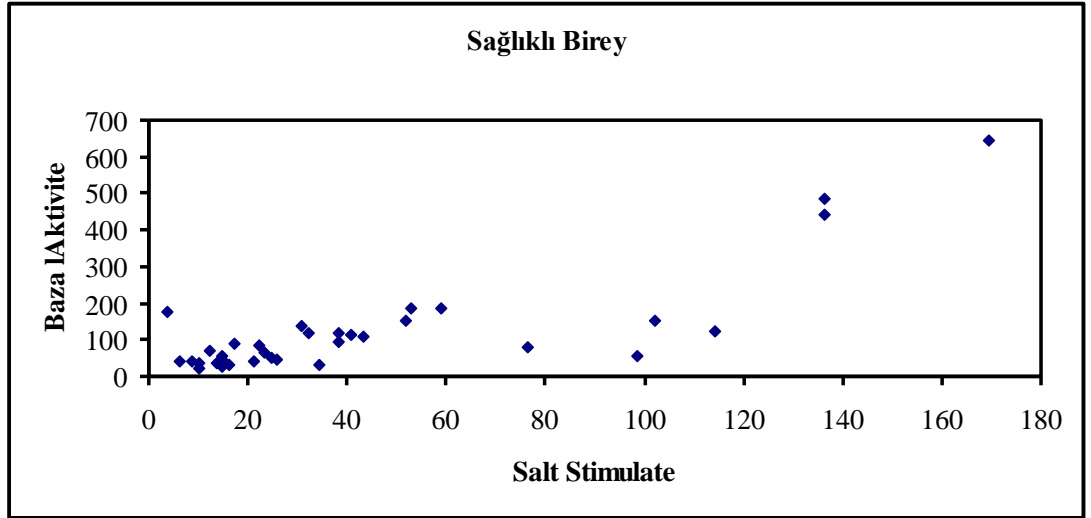
Buna göre kontrol grubunu kendi içinde değerlendirdiğimizde, kontrol grubunda bazal aktivite genellikle 0-50 U aralığında olmakla birlikte 50 ve üzeri U değerleri de tespit edilmiştir. Kolesterol değerleri 150-250 mg/dl (Şekil 3.2), tuzla uyarılmış aktivite genellikle 40-200 U olmakla birlikte daha düşük değerler ve daha yüksek değerlere de rastlanmıştır (Şekil 3.3). Ayrıca trigliserit (TG) 50-150 mg/dl (Şekil 3.4), HDL 30-70 mg/dl (Şekil 3.5), LDL 50-200 mg/dl (Şekil 3.6) arasında yoğunlaştığı görülmektedir.

Çizelge 3.2. Sağlıklı bireylerin serum paraoksonaz enzim aktivitesi, lipit parametreleri ve diğer bilgilerinin karşılaştırılması

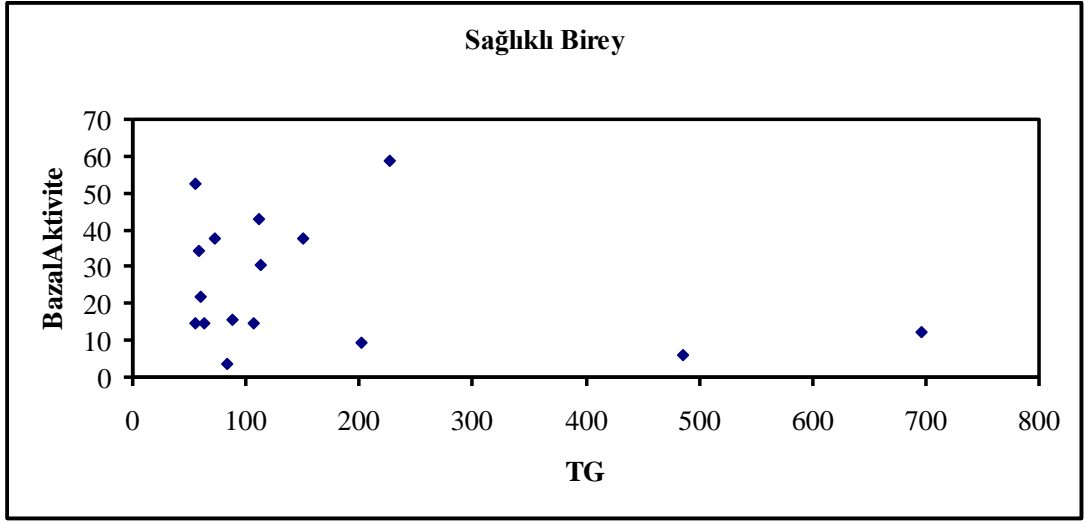
	Cinsi- yet	Yaş	CHOL (mg/dl)	TG (mg/dl)	HDL (mg/dl)	LDL (mg/dl)	Bazal Aktivite (U)	Tuzla Uyarılmış Aktivite (U)	Fenotip
1	K	37			73,45		20,88	44,21	AB
2	K	67			61,23		55,25	57,72	AA
3	K	34	152,71	62,22	64,62	75,64	14,74	58,95	BB
4	K	29	176,53	81,96	62,31	97,82	3,68	180,53	BB
5	K	31			57,81		23,33	70,00	AB
6	K	28	107,09	54,56	45,09	51,1	14,74	50,35	BB
7	K	29	193,38	111,48	66,93	104,15	42,98	112,98	AB
8	K	29					13,51	39,30	AB
9	K	58					51,58	152,28	AB
10	K	43	228,18	226,11	35,45	147,5	58,95	186,67	BB
11	K	49	199,78	87,15	46,45	135,9	15,96	35,61	AB
12	K	55					31,93	121,58	BB
13	K	37	181,28	54,63	50,56	119,79	52,81	187,89	BB
14	K	46					40,53	116,67	AB
15	K	61					25,79	47,89	AB
16	K	34					14,74	33,16	AB
17	K	31	167,37	58,42	52,92	102,78	34,39	36,39	AA
18	K	23					17,13	89,65	BB
19	K	37	154,56	150,37	43,49	81,01	38,07	97,02	AB
20	K	27	144,9	71,45	80,34	50,25	38,07	120,35	BB
21	K	52	278,42	111,76	66,67	189,38	30,70	138,77	BB
22	K	54	211,86	105,28	50,67	140,13	14,74	30,70	AB
23	K	33					8,60	45,44	BB
24	K	39	370,42	695,05	35,85	195,55	12,28	72,46	BB
25	K	47	193,62	201,83	28,73	124,53	9,82	24,56	AB
26	K	35					24,56	54,03	AB
27	K	24	141,55	59,7	74,35	55,25	22,10	88,42	BB
28	K	41	182,52	484,29	35,34	50,32	6,14	41,75	BB
29	K	27					9,82	39,30	BB
30	K	23					76,14	81,05	AA
31	K	21					136,32	445,79	BB
32	K	24					101,93	155,96	AA
33	K	25					169,47	648,42	BB
34	K	22					114,21	124,03	AA
35	K	32					136,32	487,54	BB



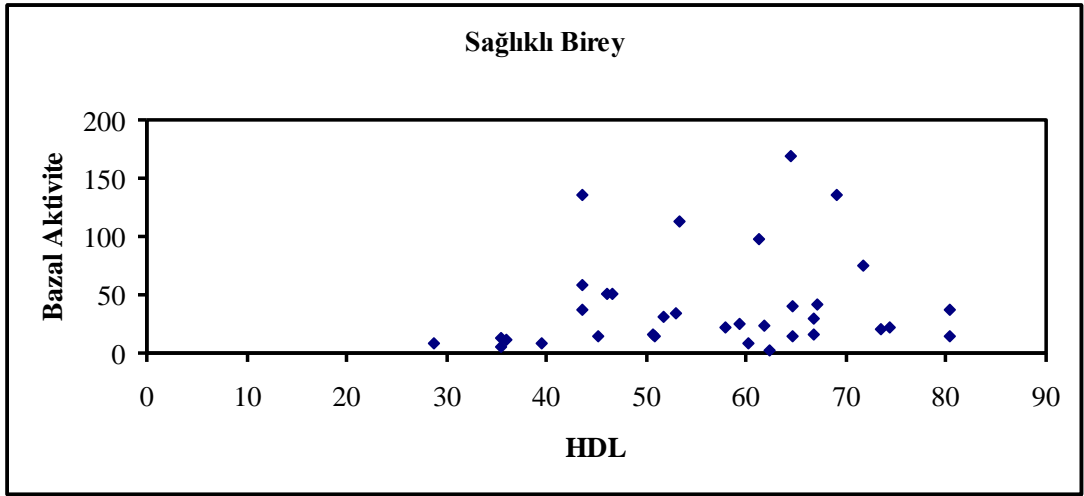
Şekil 3.2 Kontrol grubunda paraoksonaz enziminin bazal aktivite ve kolesterol değerlerinin karşılaştırılmalı grafiği



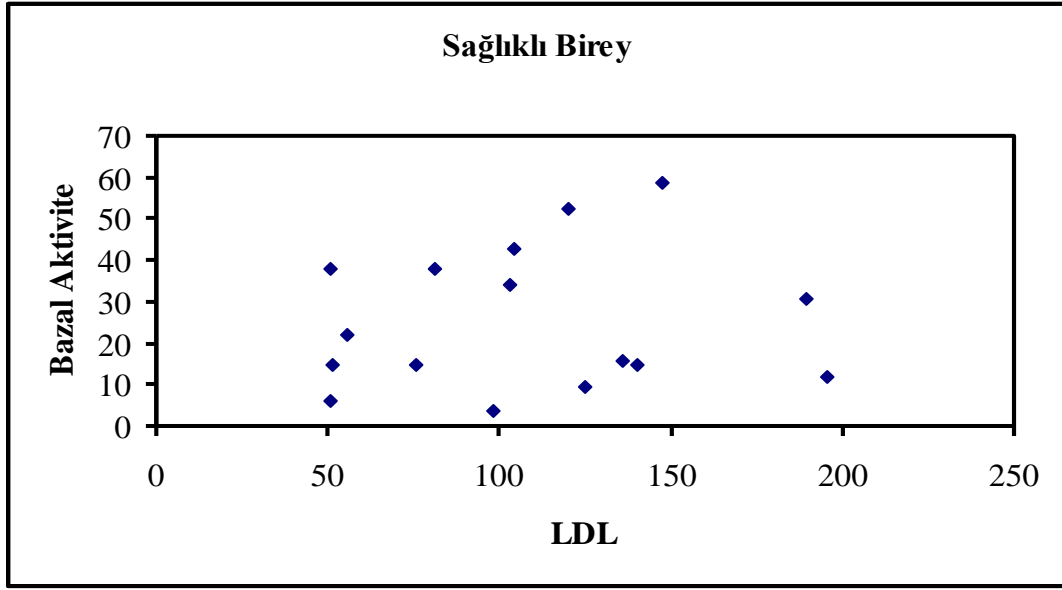
Şekil 3.3 Kontrol grubunda paraoksonaz enziminin bazal aktivite ve tuzla uyarılmış paraoksonaz aktivitelerinin karşılaştırılmalı grafiği



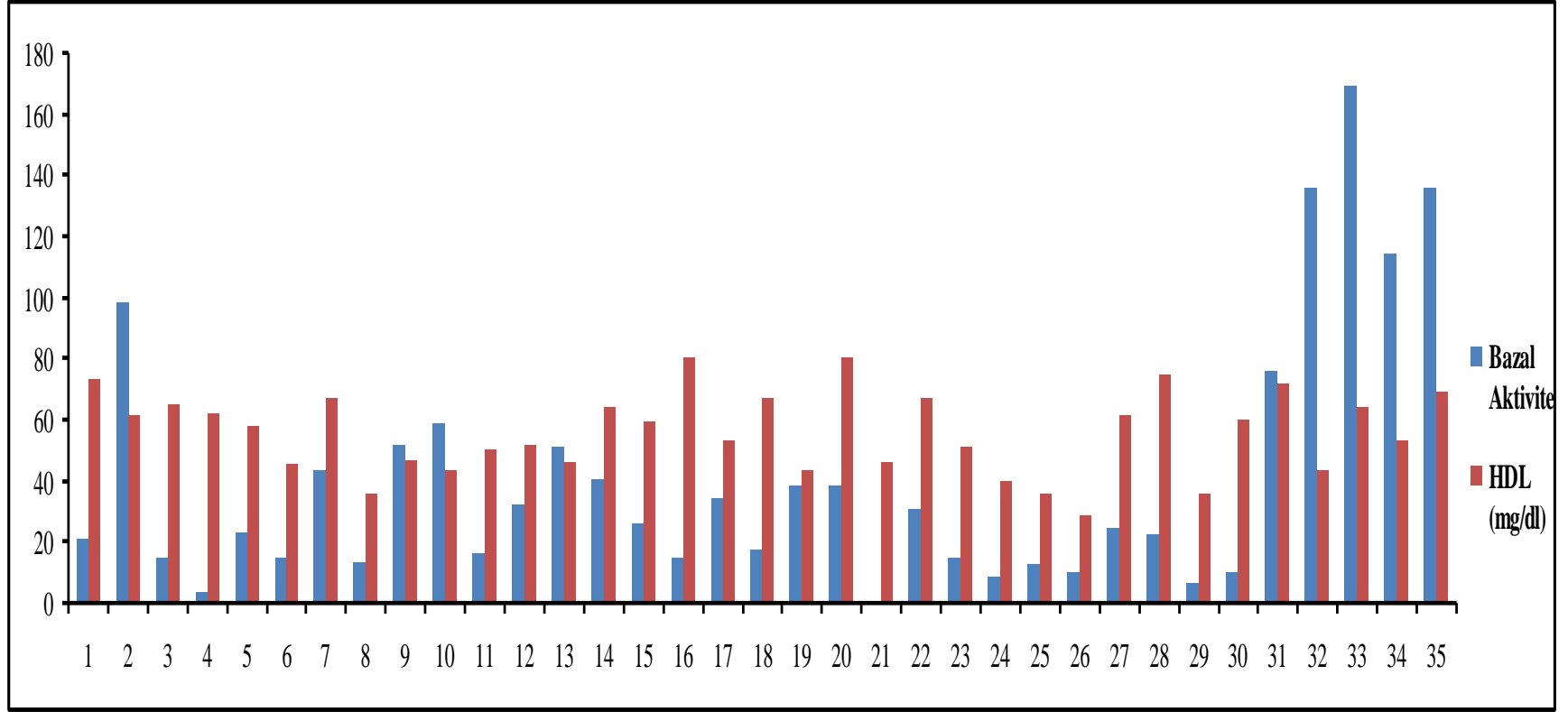
Şekil 3.4 Kontrol grubunda paraoksonaz enziminin bazal aktivite ve trigliserit değerlerinin karşılaştırılmalı grafiği



Şekil 3.5 Kontrol grubunda paraoksonaz enziminin bazal aktivite ve HDL değerlerinin karşılaştırılmalı grafiği



Şekil 3.6 Kontrol grubunda paraoksonaz enziminin bazal aktivite ve LDL değerlerinin karşılaştırılmalı grafiği



Şekil 3.7 Kontrol grubunda paraoksonaz enziminin bazal aktivite ve HDL değerlerinin sütun grafiği



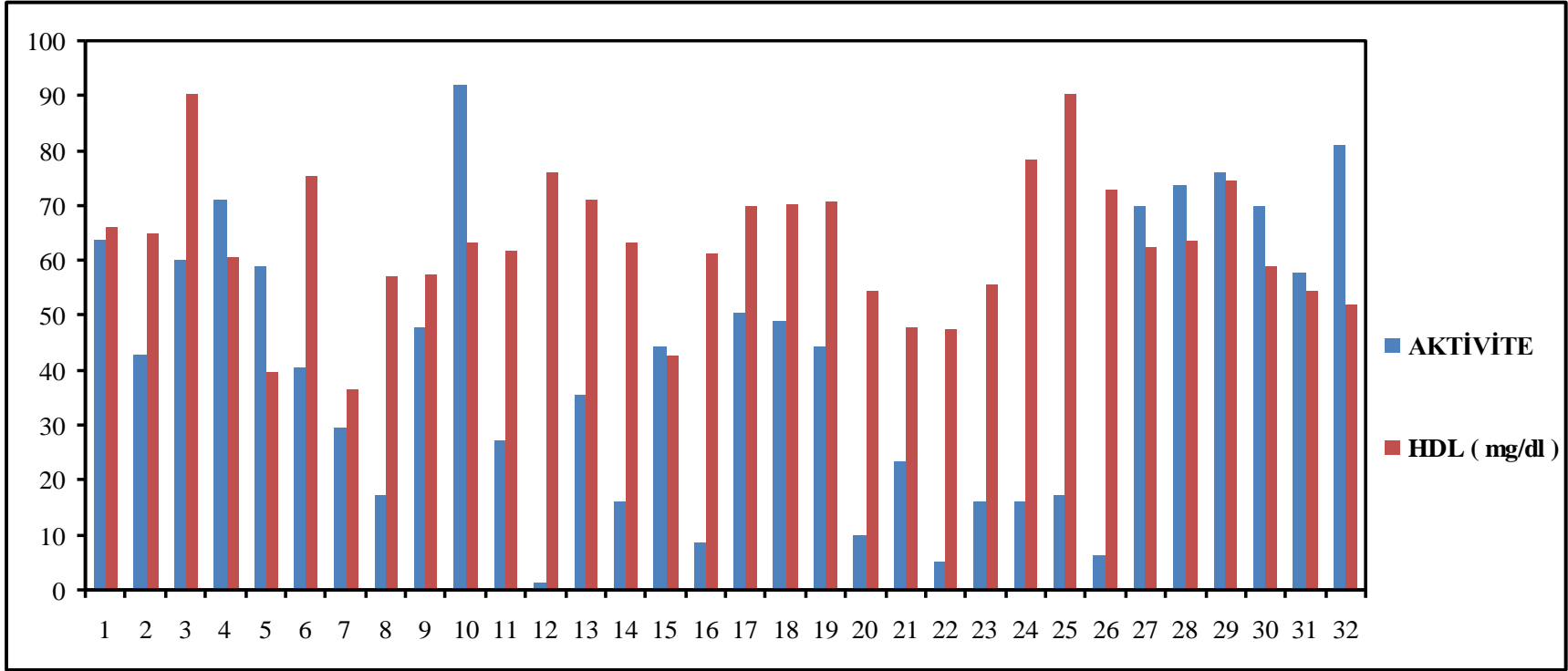
### **3.3.2 Tümörlü Bireylerde PON Aktiviteleri Ve Lipit Değerlerinin Karşılaştırılması**

Bursa Ali Osman Sönmez Onkoloji Hastanesi'nden meme kanseri tespit edilmiş, yaşları 28-82 arasında değişen 33 kadın hasta çalışmamızda PON 192 polimorfizmi belirlemek amacıyla çalışmamıza dahil edilmiştir. Bu 33 hastanın her biri tedavilerinin farklı evrelerindeydi.

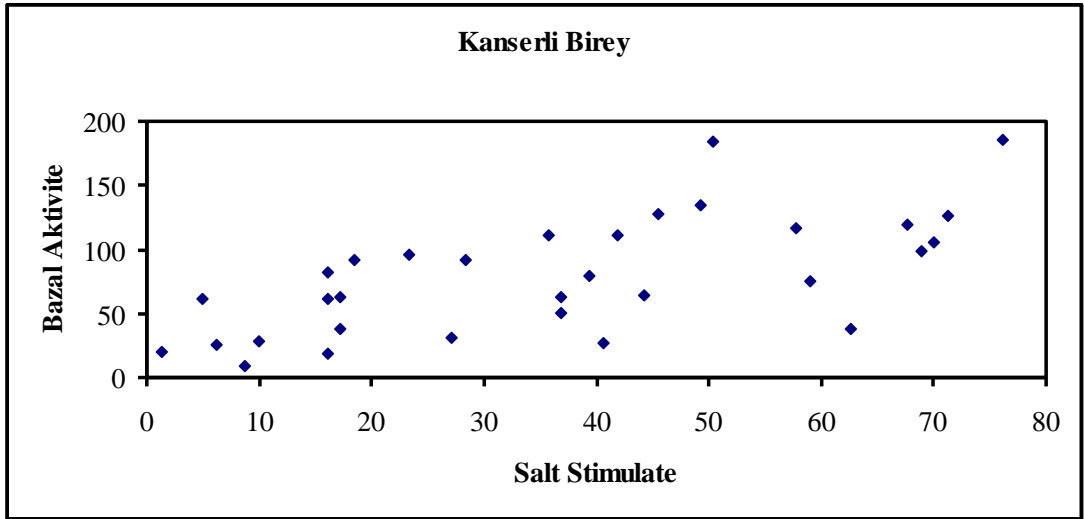
Hastalar kendi içinde değerlendirildiğinde, bazal aktivite 15-70 U, kolesterol değerleri 115-240 mg/dl, trigliserit düzeyi 50-235 mg/dl, tuzla uyarılmış aktivite değerleri 25-190 U, HDL düzeyi 30-90 mg/dl, LDL düzeyi 30-160 mg/dl arasında değiştiği görülmektedir.

Çizelge 3.3 Kanserli bireylerin serum paraoksonaz enzim aktivitesi, lipit parametreleri ve diğer bilgilerinin karşılaştırılması

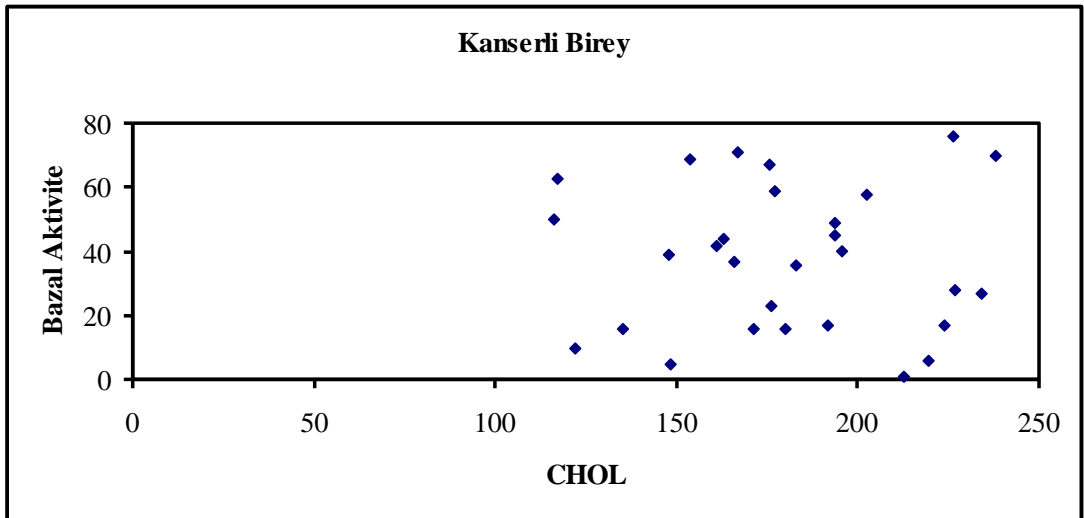
	Cinsi- yet	Yaş	CHOL (mg/dl)	TG (mg/dl)	HDL (mg/dl)	LDL (mg/dl)	Bazal Aktivite (U)	Tuzla Uyarılmış Aktivite (U)	Fenotip
1	K	28	116,89	51,18	66,07	40,57	37,63	38,07017	AA
2	K	58	165,55	49,52	65,12	90,53	36,84	63,85964	AB
3	K	82	161,06	128,16	90,25	45,17	41,75	111,75437	AB
4	K	51	153,53	97,92	60,61	73,34	68,77	99,47367	AA
5	K	41	176,94	163,56	39,53	104,68	58,95	76,14034	AA
6	K	69	195,36	54,86	75,4	108,96	26,53	28,24561	AA
7	K	43	226,56	277,25	36,5	134	28,25	92,10525	BB
8	K	63	223,78	118,46	57,28	142,8	17,19	63,85964	BB
9	K	46	193,36	180,78	57,5	99,68	45,44	128,94735	AB
10	K	46					18,42	92,10525	BB
11	K	72	234,05	227,83	61,78	126,7	27,02	31,92982	AA
12	K	32	212,49	85,71	76,14	119,2	1,23	20,87719	BB
13	K	50	182,63	129,33	71,26	85,5	35,61	111,75437	BB
14	K	59	179,61	159,59	63,27	84,42	15,96	19,64912	AA
15	K	49	162,97	122,31	42,71	95,79	44,21	65,08771	AA
16	K	33					8,60	9,82456	AA
17	K	42	116,12	68,95	70,03	32,28	50,35	184,2105	BB
18	K	51	193,53	72,42	70,12	108,93	49,12	135,0877	AB
19	K	53					36,84	50,35087	AA
20	K	53	121,95	166,9	54,5	34,07	9,82	29,47368	AB
21	K	75	175,93	126,31	47,82	102,84	23,33	97,01753	BB
22	K	42	148,36	113,59	47,39	78,25	4,91	61,4035	BB
23	K	50	135,18	127,2	55,6	54,14	15,96	82,28069	BB
24	K	72	170,91	48,82	78,37	82,76	15,96	62,63157	BB
25	K	52	191,28	85,93	90,31	83,79	17,19	39,29824	AB
26	K	66	219,12	217,5	72,98	102,65	6,14	25,78947	BB
27	K	63	237,59	189,81	62,47	137,15	70,00	105,61402	AA
28	K	56	202,25	111,1	63,54	116,48	57,72	117,89472	AB
29	K	60	226,33	163,96	74,59	118,95	76,14	186,66664	AB
30	K	38	175,62	91,71	58,78	98,5	67,54	120,35086	AB
31	K	79	147,86	98,59	54,4	72,12	39,30	79,82455	AB
32	K	51	166,62	78,76	58,07	92,81	71,23	126,49121	AB



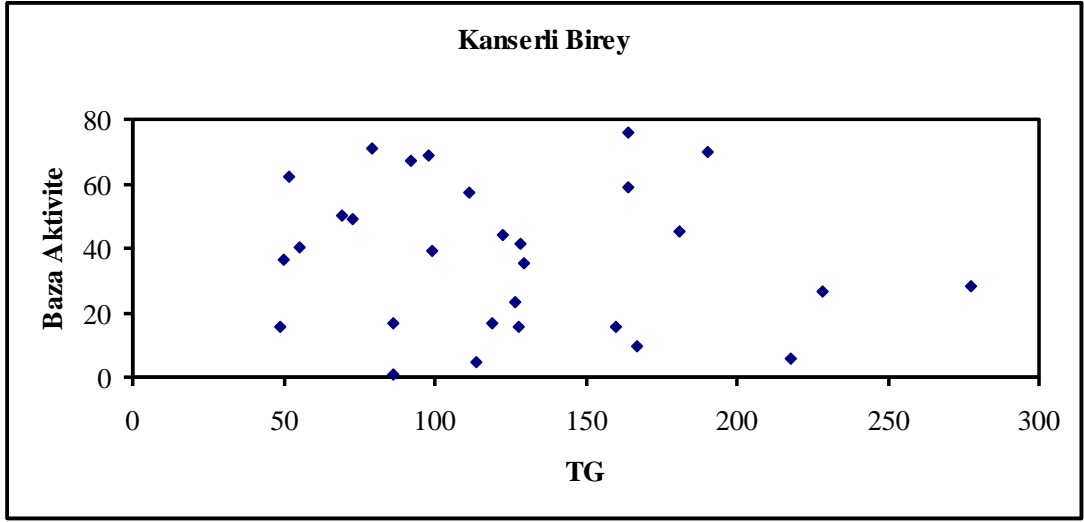
Şekil 3.8 Kanserli bireylerde paraoksonaz enziminin bazal aktivite ve HDL değerlerinin sütun grafiği



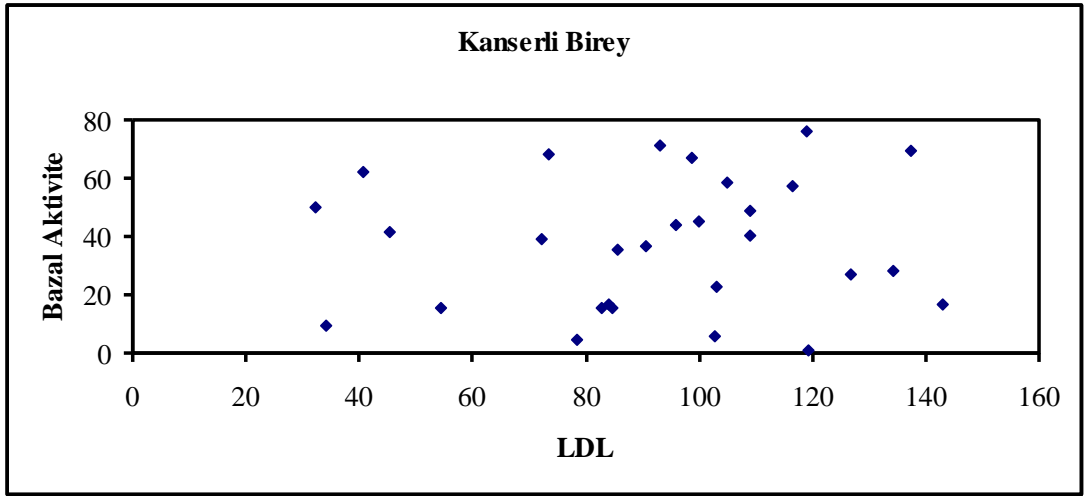
Şekil 3.9 Kanserli bireylerde paraoksonaz enziminin bazal aktivite ve tuzla uyarılmış aktivite değerlerinin karşılaştırılmalı grafiği



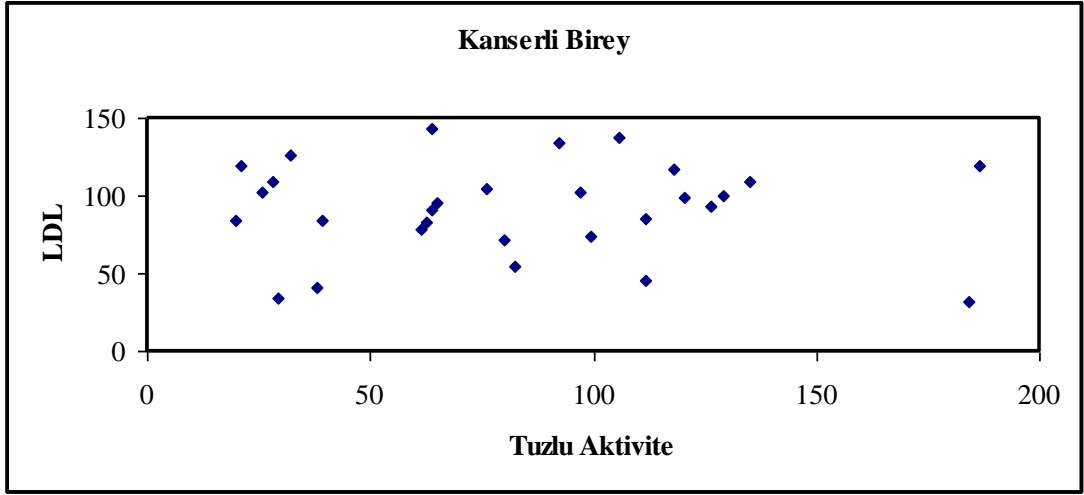
Şekil 3.10 Kanserli bireylerde paraoksonaz enziminin bazal aktivite ve kolesterol değerlerinin karşılaştırılmalı grafiği



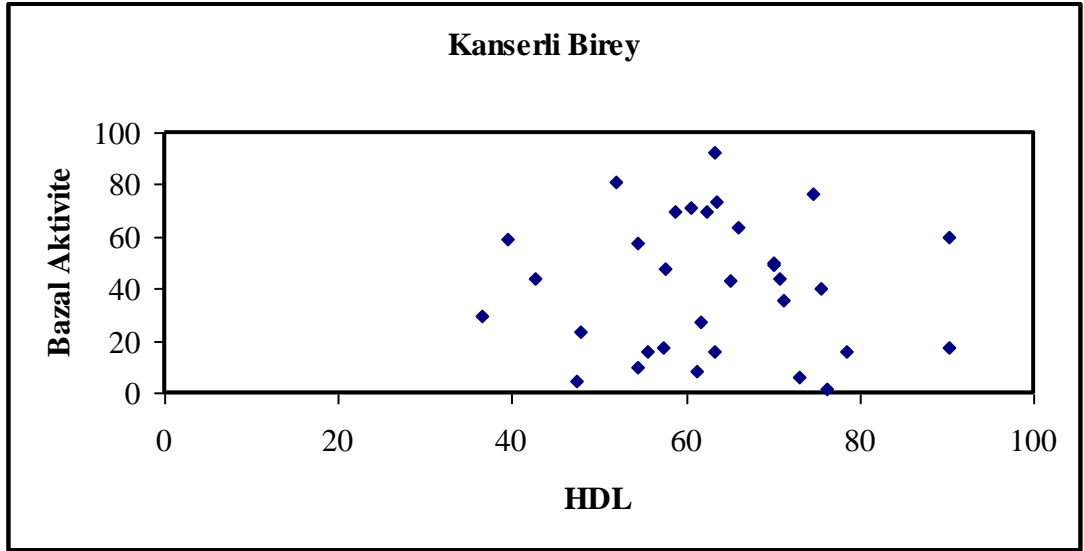
Şekil 3.11 Kanserli bireylerde paraoksonaz enziminin bazal aktivite ve trigliserit değerlerinin karşılaştırılmalı grafiği



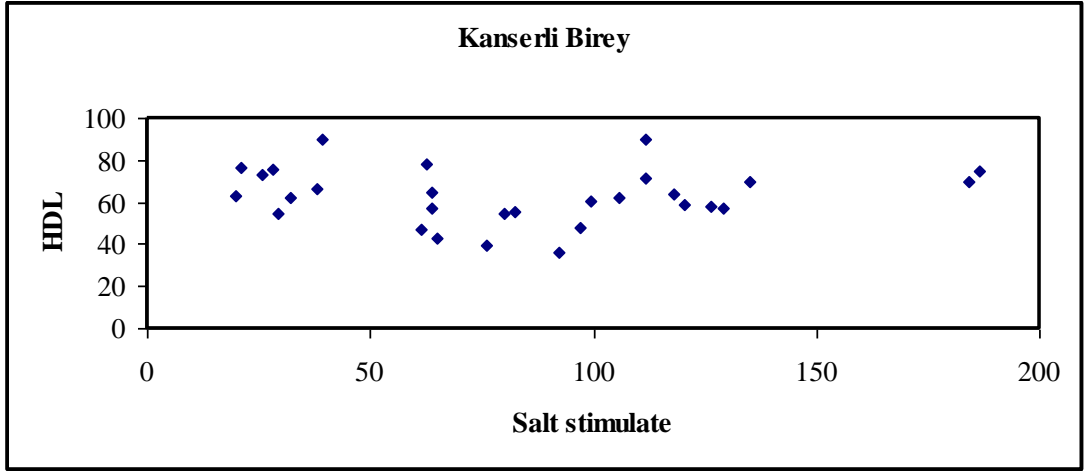
Şekil 3.12 Kanserli bireylerde paraoksonaz enziminin bazal aktivite ve LDL değerlerinin karşılaştırılmalı grafiği



Şekil 3.13 Kanserli bireylerde paraoksonaz enziminin tuzla uyarılmış aktivite ve LDL değerlerinin karşılaştırılmalı grafiği



Şekil 3.14 Kanserli bireylerde paraoksonaz enziminin bazal aktivite ve HDL değerlerinin karşılaştırılmalı grafiği

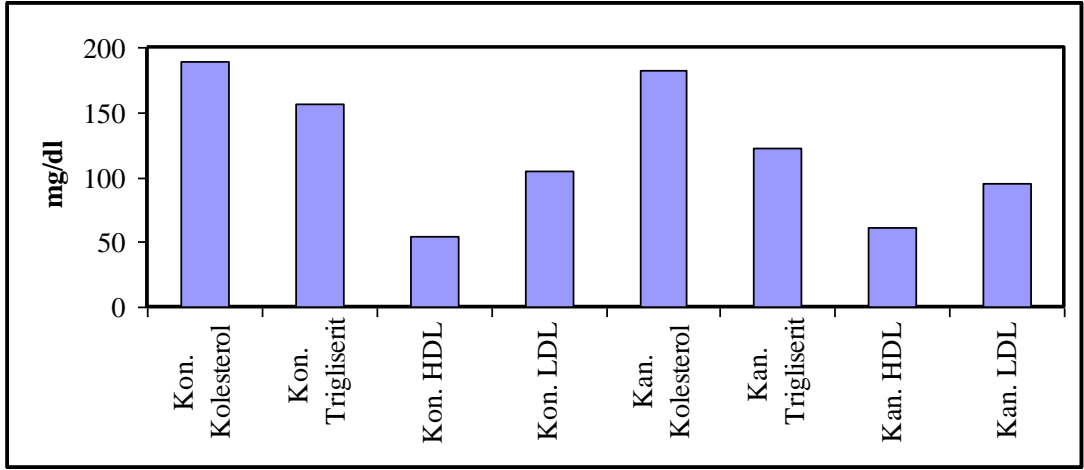


Şekil 3.15 Kanserli bireylerde paraoksonaz enziminin tuzla uyarılmış aktivite ve HDL değerlerinin karşılaştırılmalı grafiği

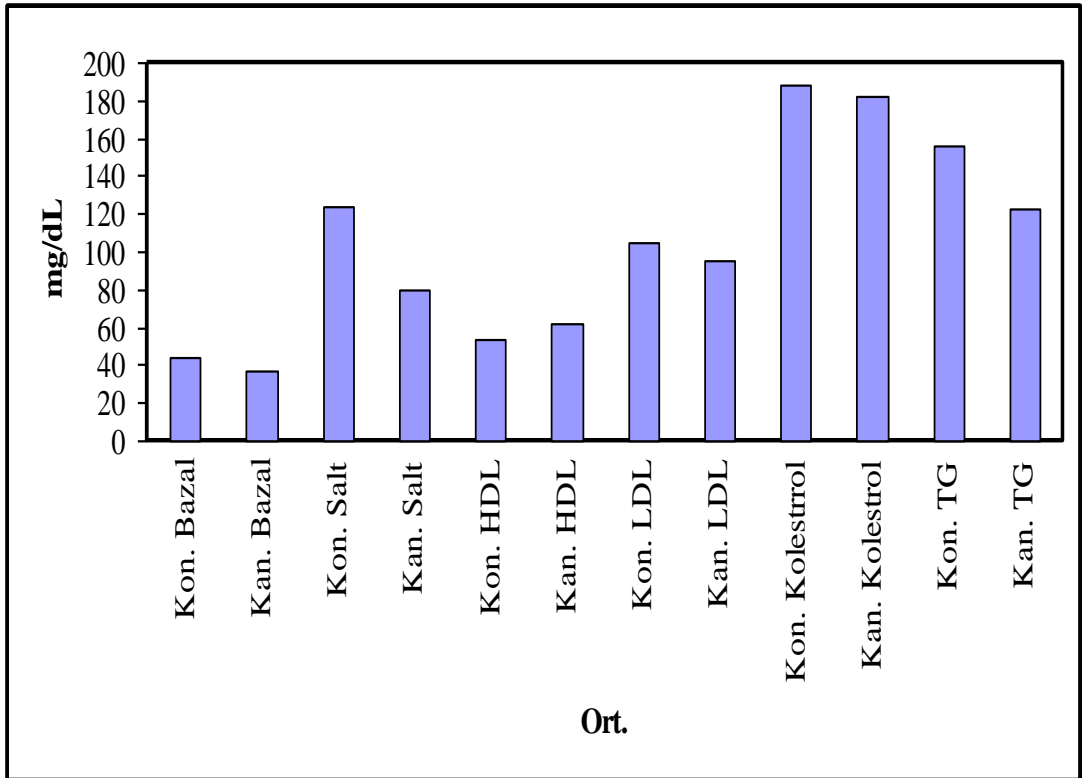
Çizelge 3.4 Kanserli ve kontrol grubu bireylerin ölçülen serum paraoksonaz enzim aktivitesi ve lipit parametrelerinin istatistiksel değerlendirilmesi

		Ortalama	Min.	Max.	P değeri (Kon. X Kan.)
<b>K O N T R O L</b>	<b>Bazal PON Aktivite</b>	43,579	0,00	169,00	
	<b>Tuzla Uyarılmış PON Aktivite</b>	123,298	0,00	648,00	
	<b>Kolesterol</b>	188,546	107,00	370,00	
	<b>Trigliserit</b>	156,221	39,00	695,00	
	<b>HDL</b>	53,902	28,00	80,00	
	<b>LDL</b>	105,208	50,00	195,00	
	<b>K A N S E R L İ</b>	<b>Bazal PON Aktivite</b>	36,343	0,00	76,00
<b>Tuzla Uyarılmış PON Aktivite</b>		79,94	0,00	186,00	0,919
<b>Kolesterol</b>		182,101	116,00	237,00	0,000
<b>Trigliserit</b>		122,931	48,00	277,00	0,000
<b>HDL</b>		61,636	32,00	90,00	0,496
<b>LDL</b>		95,804	32,00	158,00	0,017

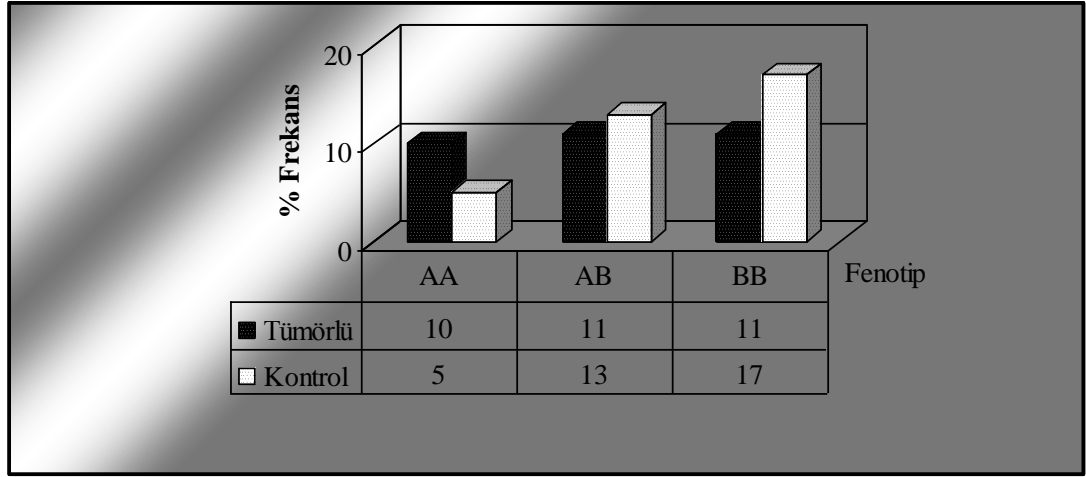




Şekil 3.16 Kontrol grubu ve kanserli bireylerde lipit değerlerinin karşılaştırılmalı grafiği



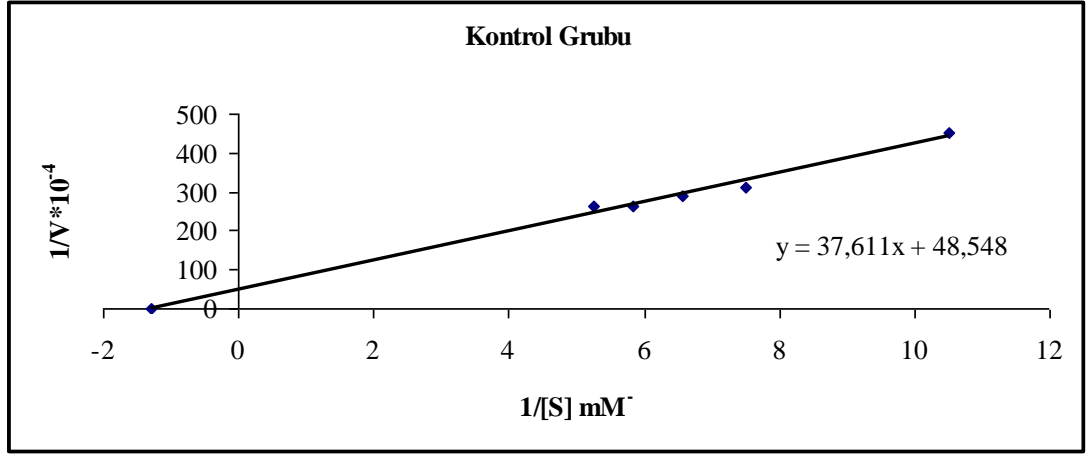
Şekil 3.17 Kontrol grubu ve kanserli bireylerde bazal aktivite, tuzla uyarılmış aktivite, HDL, LDL, kolesterol, ve trigliserit düzeylerinin ortalamalarını gösteren sütun grafiği



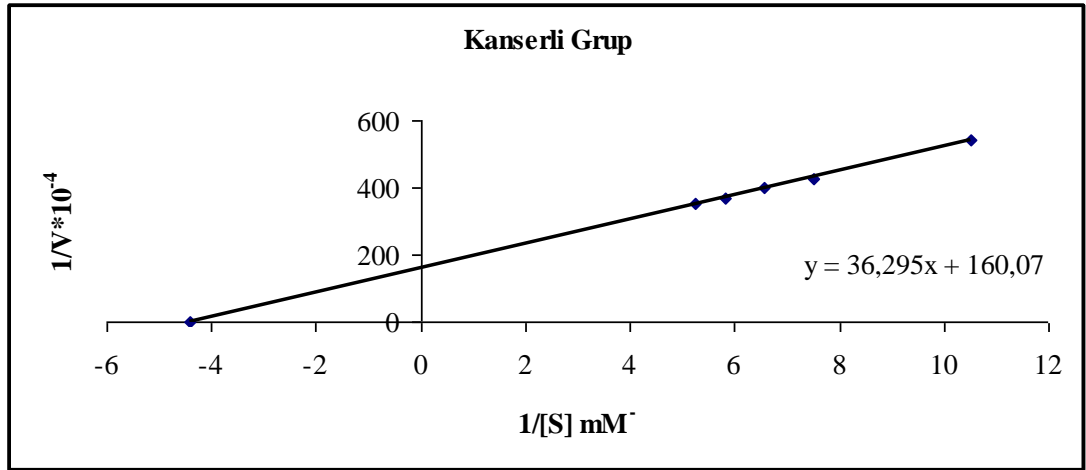
Şekil 3.18 PON1 192 Q/R (A/B) fenotiplerinin kontrol ve hasta gruplarındaki dağılımları

### 3.3.3 Optimum Şartlarda $K_M$ ve $V_{Max}$ Değerlerinin Bulunması

$K_M$  ve  $V_{Max}$  değerlerinin bulunması amacıyla, optimum şartlarda paraokson substratının değişen konsantrasyonlarında kanserli grup ve sağlıklı kontrol grubu için enzim aktivitesi ölçümleri yapıldı. Her ölçüm iki defa yapılarak bulunan değerlerin ortalaması alındı. 412 nm'de ölçülen aktivite değerleri reaksiyon hızı (U/ml.dakika) olarak alındı.  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri bulunarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi (Şekil 3.19 ve Şekil 3.20). Grafikten yararlanarak kanserli grup için  $K_M$  değeri 0.227 mM ve  $V_{Max}$  değeri 62 U/ml.dakika olarak bulunurken sağlıklı kontrol grubu için  $K_M$  değeri 0,775 mM  $V_{Max}$  değeri 206 U/ml dakika tespit edildi.



Şekil 3.19 Kontrol grubu için saflaştırılmış insan serum PON1 enziminin paraokson substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 3.20 Kanserli grup için saflaştırılmış insan serum PON1 enziminin paraokson substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği

#### 4. TARTISMA VE SONUÇ

Araştırmamızın birinci bölümünde PON1 enziminin meme kanserli olgularda polimorfizmi araştırılarak, kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır.

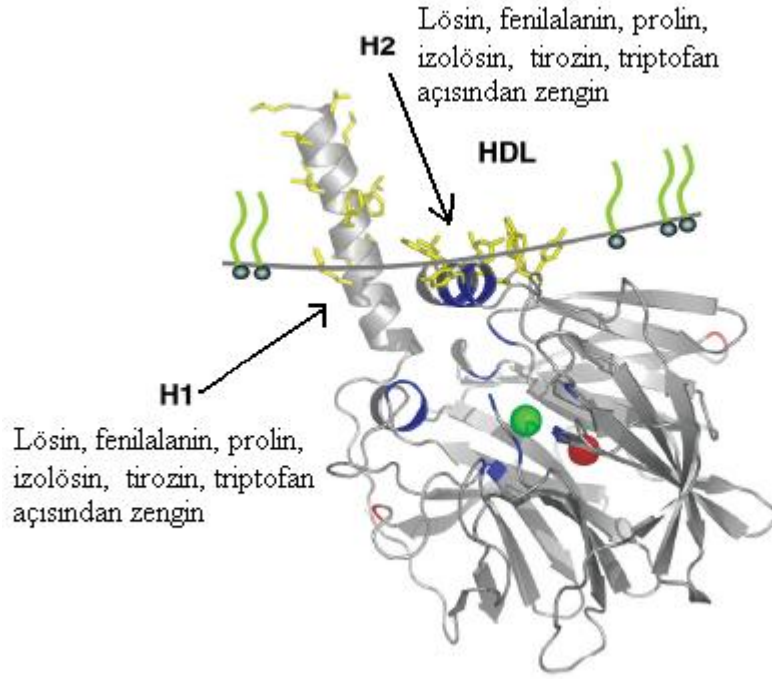
PON1 enziminin aktivitesi polimorfizme bağlı olarak oldukça değişim göstermektedir. Söz konusu enzimin organizmada fizyolojik fonksiyonu tam olarak açıklanamamasına rağmen, klinik yayınlarda PON enzim aktivitesi ile çeşitli hastalıklar arasında ilişkinin belirlenmesine yönelik pek çok çalışmaya rastlanmıştır. Ayrıca yapılan çalışmalarda özellikle incelenen hastalıklar ile PON1 polimorfizmi arasında bir bağlantı olup olmadığı araştırılmıştır. Paraoksonaz gen polimorfizmi ile meme kanseri riski arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmaların çoğunda birbiriyle çelişen sonuçlar elde edilmiştir. Ko ve arkadaşları, Tayvan'da Çinliler arasında yaptıkları çalışmadan insan paraoksonaz geninin Gln-Arg 191 polimorfizmiyle KAH (Koroner kalp hastalığı) arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişkiye rastlanmamıştır [133]. Japon popülasyonunda yapılan çalışmalarda; Suehiro ve arkadaşları [134], 134 MI veya angina pectoris hastalarında PON1 192 Gln/Arg genotipi, Sanghera ve arkadaşları [135], Asyalı Hintliler ve Çinliler arasında PON1 Met/Leu polimorfizmi ile KAH arasındaki ilişkiyi inceledikleri çalışmalarda anlamlı ilişkiye rastlanmamıştır. Yavuz ve arkadaşlarının hipertiroidli kişilerde yaptığı çalışmada kontrol grubuna göre hipertiroidli kişilerde PON enzim aktivitesinin düştüğü gözlenmiştir [136]. Tip1 diyabetik grupta yapılan bir çalışmada ise endotel fonksiyonu ve PON aktivitesi arasında pozitif korelasyon olduğu belirlenmiştir [137]. Marchesani ve arkadaşlarının Finlandiya popülasyonunda 835 sağlıklı ve 1569 kanserli bireylerin kan ve serumlarını kullanarak prostat kanseri üzerine yaptıkları bir çalışmada, PON1 I-102-V allelinde RR fenotipinin 6 kat daha fazla olduğu ve bu sonucun prostat kanseri riskini arttırdığı tespit edilmiştir. [138].

Araştırmamızda 28-82 yaş aralığında 33 meme kanseri hastası ve 21-67 yaş arası 30 sağlıklı kişiden alınan kan ve serumlarından PON1 enziminin polimorfizmi

incelenmiştir. Deney grubumuzda AA fenotipi %31, AB %34,5 ve BB %34,5'dir. Kontrol grubumuzda ise değerler sırasıyla %14, %37, %49 bulunmuştur. Sonuçlardan anlaşılacağı gibi deney grubumuzda PON1 AA alleli daha yüksekken, BB alleli kontrol grubuna göre çok daha düşük olduğu görülmektedir (Şekil 3.18). Meme kanseri olgularında aktivitesi düşük AA allelinin yüksek olması çalışmamızın en çarpıcı sonuçlarından. Nitekim PON1 aktivitesinin düşük olması kanser riskini artırdığı literatürde belirtilmiştir [133,134,135,136,137,138].

Araştırmamızın ikinci bölümünde kanserli olgulardan elde edilen PON1 enzimini saflaştırarak, kinetik sabitleri belirlenip kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Enzimin saflaştırılmasında hidrofobik etkileşim kromatografisi uygulanmıştır.

PON1 enziminin hidrofobik karakteri bu tekniğin seçilmesinde en önemli sebeplerden birisi olmuştur. Söz konusu enzim, N terminal bölgesinde bulunan H1 ve H2 heliks yapısı olarak isimlendirilen hidrofobik yapılar ile HDL'ye bağlanmaktadır (Şekil 4.1) [33,55]. N-terminal bölgesini lösin, fenil alanin, prolin, isolösin, tirozin, triptofan ve valin gibi aminoasitleri ihtiva eden 7-18 residüler arası H1 hidrofobik ucu, 185-202 residüler arası da H2 hidrofobik ucu oluşturmaktadır. Ayrıca PON1'in hidrofobik yüzeyi ile HDL arasında triptofan, tirozin ve lizin aminoasitlerince zengin aromatik ve kısmen hidrofilik bölge bulunmaktadır [42,51].



Şekil. 4.1 PON1 enziminin HDL yüzeyine bağlanma modeli [42]

Araştırmamızda matriks olarak seçilen Sepharose-4B'ye hidrofobik ligand (9-aminofenantren) L-tirozin bileşiği aracılığı ile immobilize edilmiştir. Burada L-tirozin uzantı kolu olarak da görev yapmaktadır. Uzantı kolunun hidrofobik etkileşim kromatografisindeki önemi afinite kromatografisinde olduğu gibi [139] açıkça belirtilmemesine rağmen, hidrofobik etkileşimde de L-tirozin bileşiğinin önemli olduğu kanaatindeyiz. Ayrıca ligantın matrikse bağlanmasında da son derece uygun bir adaptör molekül olduğu L-tirozinin bir başka kullanım sebebidir.

Bu kromatografinin temel prensibi, yüksek tuz konsantrasyonunda saflaştırılacak biyomolekülde bulunan hidrofobik yüzey ile apolar ligand arasındaki hidrofobik etkileşimdir. Bu etkileşimin gerekçesi artan entropi ile açıklanmaktadır. Kullanılacak ligandın hidrofobik karakteri kritik bir öneme sahiptir. Düşük hidrofobik karaktere sahip ligandlar kullanıldığı zaman ayrılacak moleküllerin kolanda etkileşimini sağlayabilmek için yüksek tuz konsantrasyonu uygulama zorunluluğu vardır. Bu durumda proteinlerin kendi aralarında hidrofobik etkileşim riski daha fazladır. Yüksek hidrofobik karaktere sahip ligandın tercih edildiği durumda ise saflaştırılacak molekül ile ligand arasındaki etkileşim artacağı için

elüsyon sırasında problemler ortaya çıkabilir. Genellikle ticari olarak bulunan hidrofobik etkileşim kromatografi jellerinde hidrofobik uç olarak düz zincirli alkil ligandları ve aril ligandları gibi moleküller kullanılmaktadır. Bunlardan isopropil, butil, oktil ve fenil bileşikleri en çok tercih edilen ligandlardır. En popüler hidrofobik etkileşim jelinin fenil-sepharose olduğu literatürde görülmektedir [139]. Düz zincirli alkil ligandları saf hidrofobik karakter gösterirken, aril ligandlarında hem hidrofobik hem de aromatik etkileşimler gözlenir. Bu amaçla çalışmamızda ligand olarak 9-aminofenantren bileşiği kullanılmıştır. PON1 enziminin H1 ve H2 bölgelerinde fenil alanin, tirozin, triptofan gibi aromatik rezidülerin bulunması tarafımızdan seçilen ligandın söz konusu bölgelerle hem hidrofobik hem de aromatik etkileşim yapacağı göz önüne alınarak, oldukça uygun bileşik olduğu kanaatindeyiz. Ayrıca yapılan bir çalışmada hidrofobik karektere sahip Sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin bileşiği kullanılmış ve 227 kat saflaştırma elde edilmiştir [140]. Bu çalışmada ligand olarak kullanılan 1-naftilamin bileşiğinin hidrofobik karekteri bizim çalışmamızda kullandığımız 9-aminofenantren bileşiğinden daha zayıftır. Bu sebeple bizim saflaştırma oranımız daha fazla bulunmuştur.

Hidrofobik etkileşim kromatografisinde kullanılan tuzun tipi ve konsantrasyonu da oldukça önemlidir. Bu kromatografide 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.

Araştırmamızda saflaştırılan enzim için SDS-PAGE uygulanmıştır. Molekül ağırlığı yaklaşık 43 kDa olarak tahmin edilen enzimimiz, kanserli ve kontrol grubu için ayrı ayrı tek bant olarak SDS-PAGE jelinde gözlenmiştir. Bu değer literatürle uygunluk göstermektedir. PON1'in minimum molekül ağırlığını Gan ve arkadaşları 43 kDa olarak belirlemişlerdir [20]. Çünkü enzimin yapısında, toplam molekül ağırlığının %15.8'i kadar karbohidrat molekülü bulunmaktadır. Molekül ağırlığı taşıdığı karbohidrat zincirinin varlığına bağlı olarak değişmektedir [103]. İhtiva ettiği bu karbohidrat zinciri enzimin hidrolizleme reaksiyonu için gerekli değildir. Söz konusu molekülün PON1'in çözünürlüğünü ve kararlılığını arttırmada ve zar yapısına bağlanmada görevi olduğu düşünülmektedir [26]. Karbonhidrat içermeyen PON1 enziminin molekül ağırlığı 37 kDa'dur [103]. Ayrıca PON1 serumda HDL'ye

bağlı olduğu b6lgelerin yakınında bulunan proteinler (Apo A1) ile bir arada da saflaştırılabilir. Bu durumda molek6l ağırlığı 47-54 kDa olduğu rapor edilmiştir [106]. PON1 enziminin molek6l ağırlığı t6rden t6re değişmemekte ve insan PON1 enziminin molek6l ağırlığı ile tavsan, sıçan ve koyunun PON1 enziminin molek6l ağırlığı benzerlik g6stermektedir [103].

Sepharose-4B-L-tirozin-9-aminofenantren yapılı jel kullanılarak saflaştırılan insan serum paraoksonaz enziminin kanserli ve kontrol grubu için kinetik sabitleri ( $K_M$  ve  $V_{Max}$ ) optimum pH ve sıcaklıkta paraokson substratı kullanılarak belirlenmiştir. Lineweaver-Burk grafiklerinden elde edilen  $K_M$  ve  $V_{Max}$  değerleri sırasıyla kanserli grup için 0.227 mM ve 62 U/mL.dak., kontrol grubu için ise 0.775 mM ve 206 U/mL.dak. olarak bulunmuştur.



## 5. KAYNAKLAR

- [1] Juretic, D, Tadijanovic, M, Rekić, B, Simean-Rudolf, V, Reiner, E, Baricic, M. (2001) Serum paraoxonase activities in hemodialyzed uremic patients: cohort study. *Clin Sci.* 42, 146-150.
- [2] Li, W.F, Costa, L.G, Furlong, C.E. (1993) Serum paraoxonase status: a major factor in determining resistance to organophosphates. *J Toxicol and Environ Health.* 40, 337-346.
- [3] P.N. Durrington, B.M., M.I. Mackness, "Paraoxonase and Atherosclerosis". *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 21, ( 2001), 473-480
- [4] Carey J. Ng, D.M.S., Susan Y. Hama, Natividad Villa, Mohamad Navab, Srinivasa T. Reddy, "The Paraoxonase Gene Family and Atherosclerosis". *Free Radical Biology & Medicine.*, 38, ( 2005), 153– 163
- [5] Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 473-480.
- [6] Hegele RA. Paraoxonase genes and disease. *Ann Med* 1999; 31: 217-224
- [7] M. Ferit Gürsu, M.Ö., Funda Gülcü, "Koroner Kalp Hastaları ile Etiyolojik Risk Faktörlerini Taşıyan Bireylerde Paraoksonaz Aktiviteleri ve Fenotiplerinin Araştırılması". *F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi*, 17(4) (2003) 237-244.
- [8] Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, LaDu BN. The human serum paraoxonase/aryesterase gene (PON 1) is one member of a multigene family. *Genomics* 1996; 33:498-507
- [9] Draganov DI, Stetson PL, Wateon 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
- [10] E. Azarsız, E.Y.S., "Paraoksonaz ve Klinik Önemi". *Türk Biyokimya Dergisi.*, 25 (3) , (2000), 109-119
- [11] Uriel, A., "Characterisation des cholinesterases et d'autres esterases carboxylique apres electrophorese et immunoelectrophorese en gelose, I; applications a l'etude des esterases du serum humain normal". *Am Insit Pasteur*, (1961), 101-104

- [12] Michael I. Mackness, B., Paul N. Durrington, Philip W. Connelly and Robert A. Hegele, "Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins". *Current Opinion in Lipidology*, 7, (1996), 69-76
- [13] Erdem, M.S.T. "ST Elevasyonlu Miyokard infarktüsülü (Stemi) Hastalarda insan Paraoxonase Geni Met-Leu/55 Polimorfizmi." Dr. Siyami Ersek Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Merkezi, İstanbul, (2004)
- [14] Mackness B., D.P.N., Mackness M.I, "Human Serum Paraoxonase". *Gene Pharmacy*, 31(3), (1998), 329-36
- [15] Kirsty S. Robertson, Emma Hawe, 1, George J. Miller, Philippa J. Talmud, Steve E. Humphries, "Human Paraoxonase Gene Cluster Polymorphisms As Predictors of Coronary Heart Disease Risk in The Prospective Northwick Park Heart Study II". *Biochimica et Biophysica Acta*, 1639, (2003), 203– 212
- [16] Liang, H.-L.L.D.-P.L.C.-C., "Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress, and diseases." *J Mol Med*, 81, (2003), 766–779
- [17] Bert N. La Du, M.A., Scott Billecke, Mohamad Navab, Sergio Primo-Parmo, Robert C. Sorenson, Theodore J. Standiford, "On The Physiological Role(s) of The Paraoxonases". *Chemico-Biological Interactions*, (1999), 379–388
- [18] Michal Harel, A.A., Leonid Gaidukov, Boris Brumshtein, Olga Kherksonsky, Ran Meged, Hay Dvir, Raimond B G Ravelli, Andrew McCarthy, Lilly Toker, Israel Silman, Joel L Susman, Dan S Tawfik, "Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and antiatherosclerotic enzymes". *Nature Structural & Molecular Biology*, (2004), 412-419
- [19] Bharti Mackness, P.N.D., Michael I. Mackness, "The Paraoxonase Gene Family and Coronary Heart Disease". *Current Opinion in Lipidology*, 13, (2002), 357-362
- [20] Gan, K.N., Smolen A., Eckerson HW., La Du BN., "Purification of Human Serum Paraoksonase/Arylesterase, Evidence for One Esterase Catalyzing Both Activities". *Drug Metab. Dispos.*, 19 (1), (1991), 100-6
- [21] Jawad, Z., Paoli, M., "Noval Sequences Propel Familiar Folds". *Structure*, 10, (2002), 447-454
- [22] Kuo C.L. & La Du, B.N., Calcium binding by human and rabbit serum paraoxonases. Structural stability and enzymatic activity. *Drug Metab. Dispos.*, 26, (1998), 653-60
- [23] Scharff, E.I., Koepke, J., Fritzch, G., Lucke, C. & Ruterjans, H., "Crystal structure of diisopropylfluorophosphatase from *Loligo vulgaris*".

*Structure*, 9, (2001), 493-502

- [24] Fokine, A.e.a., "Direct Phasing at Low Resolution of A Protein Copurified With Human Paraoxonase (PON1)". *Acta Crystallogr. D.*, 59, (2003), 2083-87
- [25] Josse, D.e.a., "Oligometric States of The Detergent-Solubilized Human Serum Paraoxonase (PON1)". *J. Biol. Chem.*, 277, (2002), 33386-97
- [26] Ahoroni, A.e.a., "Directed Evolution of Mammalian Paraoxonases PON1 and PON3 for Bacterial Expression and Catalytic Specialization". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, (2004), 482-487
- [27] Josse, D.e.a., "Identification of Residues Essential For Human Paraoxonases (PON1) Arylesterase/Organophosphatase Activities". *Biochemistry*, 38, (1999), 2816-25
- [28] Jonas, A., "Lecithin cholestrol Acyltransferase". *Biochim. Biophys. Acta*, 1529, (2000), 245-256
- [29] Sinan, M.S.T.S., "İnsan Serum Paraoksonaz Enziminin (PON1) Expressiyonu, Saflastırılması ve Bazı İlaçların Enzim Üzerine Etkilerinin Araştırılması." Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, (2005)
- [30] 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
- [31] Draganov, D.I. and La Du, B.N., "Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review", *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, (2004) 369, 78
- [32] Lusis, A.J., "Atherosclerosis", *Nature*, (2000) 407, 233
- [33] Mackness, B., Davies, G.K., Turkei, W., Lee, E., Roberts, D.H., Hill, E., Roberts, C., Durrington, P.N. and Mackness, M.I., "Paraoxonase Status in Coronary Heart Disease", *Arteroscler Thromb. Vasc. Biol.* (2001) 21, 1451
- [34] Billecke, S., Draganov, D., Councell, R., Stetson, P., Watson, C., Hsu, C. and La Du, B.N., "Human serum paraoxonase (PON1) isozymes Q and R hydrolyse lactones and cyclic carbonate esters", *Drug Metab. Dispos.*, (2000) 28(11), 1335
- [35] Teiber, J.F., Draganov, D.I., La Du, B.N., "Lactonase and Lactonizing of Human Serum Paraoxonase (PON1) and Rabbit Serum PON3", *Biochemical Pharmacology*, (2003) 66, 887

- [36] Billecke, S., Draganov, D. and Rosenblat, M., "Human serum paraoxonases (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions: PON1 esterase and peroxidase-like activities", *Circulation*, (2000) 101, 2510
- [37] Garrett, E.R., Lippold, B.C. and Mielck, J.B., "Kinetics and mechanisms of lactonization of coumarinic acids and hydrolysis of coumarins I", *J. Pharm. Sci.*, (1971) 60, 396
- [38] Augustinsson, K.B., Homologous enzymes and biochemical evolution, (eds) In: Van Thoai N., Roche J., Gordon and Breach, New York, (1968), 299-311
- [39] Draganov, D.I. and La Du, B.N., "Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review", *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, (2004) 369, 78
- [40] Aviram, M., Billecke, S., Sorenson, R., Bisgaier, C., Newton, R., Rosenblat, M., Erogul, J., Hsu, C., Dunlop, C. and La Du, B.N., "Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities. Selective action of human paraoxonase allozymes Q and R", *Arterioscler. Thromb Vasc. Biol.*, (1998) 18, 1617
- [41] Aviram, M., Rosenblat, M., Bisgaier, C.L., Newton, R.S., Primo-Parmo, L.S. and La Du, B.N., "Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase", *J. Clin. Invest.*, (1998) **101(81)**, 1581
- [42] Sorenson, R.C., Primo-Parmo, S.L., Kuo, C.L., Adkins, S., Lockridge, O. and La Du, B.N., "Reconsideration of the catalytic center and mechanism of mammalian paraoxonase/arylesterase", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1995) 92, 7187
- [43] Doorn, J.A., Sorenson, R.C., Billecke, S.S., Hsu, C. and La Du, B.N., "Evidence that several conserved histidine residues are required for hydrolytic activity of human paraoxonase/arylesterase", *Chemico-Biological Interaction*, (1999) 119-120, 235
- [44] Vickers, S., Duncan, C.A., Chen, I-W., Rosegay, A. and Duggan, D.E., "Metabolic disposition studies of simvastatin, a cholesterol-lowering prodrug", *Drug Metab Dispos* (1990) 18, 138
- [45] Tang, B.K. and Kalow, W., "Variable activation of lovastatin by hydrolytic enzymes in human plasma and liver", *Eur. J. Clin. Pharmacol.* (1995) 47, 449
- [46] Biggadike, K., Angell, R.M., Burgess, C.M., Farrel, R.M., Hancock, A.P., Harker, A.J., Irving, W.R., Ioannou, C., Procopiu, P.A., Shaw, R.E.,

- Solanke, Y.E., Singh, O.M., Snowden, M.A., Stubbs, R.J., Walton, S. and Weston, H.E., "Selective plasma hydrolysis of glucocorticoid gamma-lactones and cyclic carbonates by the enzyme paraoxonase: an ideal plasma inactivation mechanism", *J. Med. Chem.*, (2000) 43, 19
- [47] Tougou, K., Nakamura, A., Watanabe, S., Okuyama, Y. and Morino, A., "Paraoxonase Has a Major Role in the Hydrolysis of Prulifloxacin (NM441), a Prodrug of a New Antibacterial Agent", *Drug Metab. Dispos.*, (1998) 26, (4), 355
- [48] Billecke, S., Draganov, D., Councell, R., Stetson, P., Watson, C., Hsu, C. and La Du, B.N., "Human serum paraoxonase (PON1) isozymes Q and R hydrolyse lactones and cyclic carbonate esters", *Drug Metab. Dispos.*, (2000) 28(11), 1335
- [49] La Du, B.N., Human serum paraoxonase/arylesterase, In *Pharmacogenetics of Drug Metabolism*, ed. Kalow, W., Pergamon Pres, New York, (1992), p.51
- [50] Costa, L.G., Li, W.F., Richter, R.J., "PON1 and organophosphate toxicity", pp. (2002) 165–83
- [51] Broomfield, C.A. and Ford, K.W., "Hydrolysis of nerve gasses by plasma enzymes", *Proceedings of the 3rd International Meeting on Cholinesterases, La Grande-Motte, France*, (1991), 167
- [52] Baillie, T.A., Moldeus, P., Mason, R.P. Younes, M., *Enzymes Interacting with Organophosphorus Compounds*, Elsevier Scientific Publishers Ireland Ltd, Shannon, (1993).
- [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.* 11, 412 (2004).
- [54] Eckerson, H.W., Wyte, C.M. and La Du, B.N., "The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism", *Am. J. Hum. Genet.*, (1983) 35
- [55] Sorenson, R.C., Primo-Parmo, S.L., Kuo, C.L., Adkins, S., Lockridge, O. and La Du, B.N., "Reconsideration of the catalytic center and mechanism of mammalian paraoxonase/arylesterase", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1995) 92, 7187
- [56] La Du, B. N., Human serum paraoxonase/arylesterase, In *Pharmacogenetics of Drug Metabolism*, ed. Kalow, W., Pergamon Pres, New York, (1992), p.51
- [57] Lund-Katz, S., Liu, L.J., Thuahnai, S.T. and Philips, M.C., "High density lipoprotein structure", *Front. Biosci.*, (2003) 8, D1044

- [58] Borhani, D.W., Rogers, D.P., Engler, J.A. and Brouillette, C.G., “Crystal structure of truncated human apolipoprotein A-1 suggests a lipid-bound conformation”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1997) 94, 12291
- [59] Blatter, M.C., James, R.W., Messmer, S., Barja, F. and Pometta, D., “Identification of a distinct human high-density lipoprotein subspecies defined by a lipoprotein-associated protein, K-45: identity of K-45 with paraoxonase”, *Eur. J. Biochem.*, (1993) 211, 871
- [60] Kelso, G.J., Stuart, W.D., Richter, R.J., Furlong, C.E., Jordan-Starck, T.C. and Harmony, J.A.K., “Apolipoprotein J is associated with paraoxonase in human plasma”, *Biochemistry*, (1994) 33, 832
- [61] Deakin, S., Leviev, I., Gomaraschi, M., Calabresi, L., Franceschini, G. and James, R.W., “Enzymatically active paraoxonase-1 is located at the external membrane of producing cells and released by a high affinity, saturable, desorption mechanism”, *J. Biol. Chem.*, (2002) 277, 4301
- [62] Killian, J.A., Von Heijne, G., (2000), How proteins adapt to a membrane-water interface. *Trends Biochem. Sci.* 25, 429-434
- [63] James, R. W., Blatter Garin, M. C., Calabresi, L. et al. (1998) Modulated serum activities and concentrations of paraoxonase in high density lipoprotein deficiency states. *Atherosclerosis* 139, 77–82
- [64] Blatter, G, M.C., Abbott, C., Messmer, S., Mackness, M., Durrington, P.N., Pometta, D. and James, R.W., “Quantification of human serum paraoxonase by enzyme-linked immunoassay: population differences in protein concentrations”, *Biochem. J.*, (1994) 304, 549
- [65] Leviev, I., Negro, F. and James, R.W., “Two alleles of the human paraoxonase gene produce different amounts of mRNA: an explanation for differences in serum concentrations of paraoxonase associated with the (Leu-Met54) polymorphism”, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, (1997) 17, 3935
- [66] Deakin, S., Leviev, I., Guernier, S. and James, R.W., “Simvastatin modulates expression of the PON1 gene and increases serum paraoxonase: a role for sterol regulatory element-binding protein-2”, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, (2003) 23, 2083
- [67] Feingold, K-R., Memon, R-A., Moser, A-H. and Grunfeld, C., “Paraoxonase activity in the serum and hepatic mRNA levels decrease during the acute phase response”, *Atherosclerosis*, (1998) 139, 307
- [68] Cabana, VG., Reardon, C.A, Feng, N., Neath, S.X., Lukens, J.R. and Getz, G.S., “Serum paraoxonase: effect of the apoproteins of HDL and the acute phase response”, *J. of Lipid Research*, (2003) 44(4), 780

- [69] Martoglio, B. and Dobberstein, B., "Signal sequences - more than just greasy peptides", *Trends Cell Biol.*, (1998) 8, 410
- [70] Hassett, C., Richter, R.J., Humbert, R., Chapline, C., Crabb, J.W., Omiecinski, C.J. and Furlong, C.E., "Characterization of cDNA clones encoding rabbit and human serum paraoxonase: the mature protein retains its signal sequence", *Biochemistry*, (1991) 30, 10141
- [71] Deakin, S., Leviev, I., Nicaud, V., Brulhart Meynet, M. C., Tiret, L. and James, R. W. (2002) Paraoxonase-1 L55M polymorphism is associated with an abnormal oral glucose tolerance test and differentiates high risk coronary disease families. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 1268–1273
- [72] Sorenson, R.C., Bisgaier, C.L., Aviram, M., Hsu, C., Billecke, S. and La Du, B.N., "Human serum paraoxonase/arylesterase's retained hydrophobic N-terminal leader sequence associates with high density lipoproteins by binding phospholipids: apolipoprotein A-1 stabilizes activity", *Atheroscler Thromb Vasc Biol*, (1999) 19, 2214
- [73] Oda, M.N., Bielicki, J.K., Berger, T. and Forte, T.M., "Cysteine substitutions in apolipoprotein a-I primary structure modulate paraoxonase activity", *Biochem*, (2001) 40, 1710
- [74] Costa, L.G., Cole, T.B., Jarvik, G.P. and Furlong, E.F., "Functional Genomics of the Paraoxonase (PON1) Polymorphisms: Effects on Pesticide Sensitivity, Cardiovascular Disease, and Drug Metabolism", *Annu. Rev. Med.*, (2003) 54, 371
- [75] Costa, L.G. and Furlong, C.E., *Paraoxonase (PON1) in Health and Disease: Basic and Clinical Aspects*. Norwell, MA: Kluwer Acad. (2002)
- [76] Geldmacher-von Mallinckrodt, M., Lindorf, H.H., Petenyi, M., Flugel, M., Fischer, T. and Hiller, T., "Genetically determined polymorphism of human serum paraoxonase (E.C.3.1.1.2)", *Humangenetic*, (1973) 17(4), 331
- [77] Geldmacher-von Mallinckrodt, M. and Diepgen, T.L., "The human paraoxonase-polymorphism and specificity", *Toxicol. Environment. Chem.*, (1988) 18, 79
- [78] Playfer, J.R., Eze, L.C., Bullen, M.F. and Evans, D.A., "Genetic polymorphism and interethnic variability of plasma paraoxonase activity", *J. Med. Genet.*, (1976) 13, 337
- [79] Humbert, R., Adler, D.A., Disteché, C.M., Hassett, C., Omiecinski, C.J. and Furlong, C.E., "The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism", *Nature Genet.*, (1993) 3, 73
- [80] Brophy, V.H., Hastings, M.D., Clendenning, J.B., Richter, R.J., Jarvik,

- G.P. and Furlong, C.E., "Polymorphisms in the human paraoxonase (PON1) promoter", *Pharmacogenetics*, (2001a) 11, 77
- [81] Brophy, V.H., Jampsa, R.L., Clendenning, J.B., McKinstry, L.A., Jarvik, G.P. and Furlong, C.E., "Effects of 5' regulatory-region polymorphisms on paraoxonase-gene (PON1) expression", *Am. J. Hum. Genet.*, (2001) 68, 1428
- [82] Davies, H.G., Richter, R.J., Keifer, M., Broomfield, C.A., Sowalla, J. and Furlong, C.E., "The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin", *Nature Genet.*, (1996) 4, 334
- [83] Aviram, M., Hardak, E., Vaya, J., Mahmood, S., Milo, S., Hoffman, A., Billecke, S., Draganov, D. and Rosenblat, M., "Human serum paraoxonases (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions: PON1 esterase and peroxidase-like activities", *Circulation*, (2000) 101, 2510
- [84] Mackness, M.I., Mackness, B., Durrington, P.N., Connely, P.W., Hegele, R.A., "Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins", *Cur. Opin. Lipid.*, (1996) 7, 69
- [85] Azarsız, E. and Sözmen, E.Y., "Paraoksonaz ve Klinik Önemi", *Türk Biyokimya Dergisi*, (2000) 25, (3) 109
- [86] Aynacıoğlu, A.S. and Kepekçi, Y., "The human paraoxonase Gln-Arg 192 (Q/R) polymorphism in Turkish patients with coronary artery disease", *International Journal of Cardiology*, (2000) 74, 33
- [87] Marchesani, M., Hakkarainen, A., Tuomainen, T.P., Kaikkonen, J., Pukkala, E., Uimari, P., Seppala, E., Matikainen, M., Kallioniemi, O.P., Schleutker, J., Lehtimäki, T. and Salonen, J.T., "New paraoxonase 1 polymorphism I102V and the risk of prostate cancer in Finnish men", *J. Natl. Cancer Inst.*, (2003) 4, 95(11), 812
- [88] Mackness, B., Durrington, P.N., Mackness, M.I., PON1 and other diseases, In: Costa LG, Furlong CE (eds) *Paraoxonase (PON1) in health and disease*. Kluwer, Norwell, (2002) pp 185–195
- [89] Dantoine, T.F., Drouet, M., Debord, J., Merle, L., Cogne, M. and Charmes, J.P., "Paraoxonase 1 192/55 gene polymorphisms in Alzheimer's disease", *Ann. NY. Acad. Sci.*, (2002) 977, 239
- [90] Osei-Hyiaman, D., Hou, L., Mengbai, F., Zhiyin, R., Zhiming, Z. and Kano, K., "Coronary artery disease risk in Chinese type 2 diabetics: is there a role for paraoxonase 1 gene (Q192R) polymorphism?", *Eur. J. Endocrinol.*, (2001) 144, 639
- [91] Malin, R., Knuuti, J., Janatuinen, T., Laaksonen, R., Vesalainen, R.,



- Nuutila, P., Jokela, H., Laakso, J., Jaakkola, O., Solakivi, T. and Lehtimäki, T., "Paraoxonase gene polymorphisms and coronary reactivity in young healthy men", *J. Mol. Med.*, (2001) 79, 449
- [92] Hegele, R.A., "Paraoxonase genes and disease", *Ann. Med.*, (1999) 31, 217
- [93] Yamada, M., Sodeyama, N., Itoh, Y., Suematsu, N., Otomo, E., Matsushita, M. and Mizusawa, H., "No association of paraoxonase genotype or atherosclerosis with cerebral amyloid angiopathy", *Stroke*, (2002) 33, 896
- [94] Ikeda, T., Obayashi, H., Hasegawa, G., Nakamura, N., Yoshikawa, T., Imamura, Y., Koizumi, K., Kinoshita, S., "Paraoxonase gene polymorphisms and plasma oxidized low-density lipoprotein level as possible risk factors for exudative age-related macular degeneration", *Am. J. Ophthalmol.*, (2001) 132, 191
- [95] Kondo, I. and Yamamoto, M., "Genetic polymorphism of paraoxonase 1 (PON1) and susceptibility to Parkinson's disease", *Brain Res.*, 8(1998) 06, 271
- [96] Scacchi, R., Gambina, G., Martini, M.C., Broggio, E., Vilardo, T. and Corbo, R.M., "Different pattern of association of paraoxonase Gln192-->Arg polymorphism with sporadic late-onset Alzheimer's disease and coronary artery disease", *Neurosci. Lett.*, (2003) 13; 339(1)
- [97] 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
- [98] Mazur, A., An Enzyme In Animal Tissues Capable of Hydrolyzing The Phosphorus-Fluorine Bond of Alkyl Fluorophosphates *J. Biol. Chem.* 164 (1946) 271-289
- [99] Mounter, L.A., Floyd, C.S. and Chanutin, A., Dialkylfluorophosphatase of Kidney I. Purification And Properties, *J. Biol. Chem.* (1953) 204 221-232
- [100] Main, A. R. (1956) *Can. J. Biochem. Physiol.* 34, 197-216
- [101] Furlong, C.E., Costa, L.G., Hassett, C., Richter, R.J., Sundstrom, J.A., Adler, D.A., Disteché, C.M., Omiecinski, C.J., Chapline, C., Crabb, J.W. and Humbert, R., "Human and rabbit paraoxonase: purification, cloning, sequencing, mapping and role of polymorphism in organophosphate detoxification", *Chem. Biol. Interact.*, (1993) 87, 35
- [102] Gan, K.N., Smolen, A., Eckerson, H.W., La Du, B.N., "Purification of human serum paraoxonase/arylesterase", *Drug Metab. Dispos.*, (1991) 19, 100

- [103] Furlong, C.E., Richter, R.J., Chapline, C. and Crabb, J.W., "Purification of Rabbit and Human Serum Paraoxonase", *Biochemistry*, (1991) 30, 10133
- [104] 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
- [105] Kitchen, B.J., Masters, C.J. and Winzor, D.J., "Effects of lipid removal on the molecular size and kinetic properties of bovine plasma arylesterase", *Biochem J*, (1973) 135, 93
- [106] Zimmerman, J.K., Grothusen, J.R., Bryson, P.K., Brown, T.M., Partial purification and characterization of paraoxonase from rabbit serum. In "Enzymes Hydrolyzing Organophosphorus Compounds", Ellis Horwood Ltd., Chichester, UK, (1989) 128-1428
- [107] Gil, F., Pla, A., Gonzalvo, M.C., Hernández, A.F. and Villanueva, E., "Partial purification of paraoxonase from rat liver", *Chem. Biol. Interact.*, (1993) 87, 69
- [108] Meram İ. , Ahi S., Tarakçıoğlu M. : Serum Arginase Activity in Cancer : Van Tıp Dergisi, Cilt: 7, Sayı: 1, Ocak/ 2000
- [109] Yılmaz S. Temizer Ozan S. : Turkish Journal of Biochemistry - Turk J Biochem] 2003; 28 (4); 252-256
- [110] Portakal O, Ozkaya O, Inal ME, Bozan M, Sayek I. (2000) Coenzyme Q10 concentrations and antioxidant status in tissues of breast cancer patients. *Clin Biochem.* 33, 279-284
- [111] Lerner EH, Rutherford CL. (1978) Application of a microchemical technique to the elucidation of enzyme activity profiles within single human mammary tumors. *Cancer.* 41, 1863-1870
- [112] Kumaraguruparan R, Subapriya R, Viswanathan Nagini S. (2002) Antioxidant profile in the circulation of patients with fibroadenoma and adenocarcinoma of the breast. *Clin Biochem.* 35, 275-279
- [113] Serin E, Yılmaz E, Yılmaz S, Ünsaldı E, Durmuş AS. (1998) İskemi-reperfizyon hasarında serbest oksijen radikalleri. *Artroplastik Artroskopik Cerrahi.* 9, 36-39
- [114] Oude Weernink PA, Rijksen G, Staal GE. (1991) Phosphorylation of pyruvate kinase and glycolytic metabolism in three human glioma cell lines. *Tumour Biol.* 12, 339-352
- [115] Van Erp HE, Van Unnik JA, Rijksen G, Smits JG, Staal GE. (1991) Cellular expression of K-type pyruvate kinase in normal and neoplastic human tissues. *Cancer.* 68, 2595-2601

- [116] Doroshow JH. (1995) Glutathione peroxidase and oxidative stress. *Toxicol Lett.* 44, 45-51
- [117] Halliwell B. (1991) Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry and role in human disease. *Am J Med.* 91, 14-21
- [118] Kumaraguruparan R, Subapriya R, Viswanathan Nagini S. (2002) Tissue lipid peroxidation and antioxidant status in patients with adenocarcinoma of the breast. *Clin Chim Acta.* 325, 165-170
- [119] Gökmen S, Yörük Y, Yorulmaz F, Gülen Ş. (1999) Arjinase and ornithine, as markers in human non-small cell lung carcinoma. *Cancer Biochem Biophys.* 17, 125-131
- [120] Straus B, Cepelak I, Festa G. (1992) Arjinase, a new marker of mammary carcinoma. *Clin Chim Acta.* 210, 5-12
- [121] Poremska Z, Luboinski G, Chrzanowska A, Mielczarek M, Magnuska J, Baranczyk-Kuzma A. (2003) Arjinase in patient with breast cancer. *Clin Chim Acta.* 328, 105-111
- [122] Keha, E.E., Karbonik anhidraz enziminin saflastırılması için geliştirilmiş bir afinite kromatografisi metodu, Doçentlik Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Erzurum.
- [123] Michael I. Mackness, B.M., Paul N. Durrington, "Paraoxonase and coronary heart disease". *Atherosclerosis Supplements.* 3, (2000), 49-55
- [124] Michael Aviram, E.H., Jacob Vaya, Saeed Mahmood, Simcha Milo, Aaron Hoffman, Scott Billicke, Dragomir Draganov, Mira Rosenblat, "Human Serum Paraoxonases (PON1) Q and R Selectively Decrease Lipid Peroxides in Human Coronary and Carotid Atherosclerotic Lesions". *Circulation*, 101, (2000), 2510-2517
- [125] L. Gaidukov, M. Rosenblat, M. Aviram, and D.S. Tawfik. "The 192R/Q polymorphs of serum paraoxonase PON1 differ in HDL Binding, lipolactonase stimulation, and cholesterol efflux". *Journal of Lipid Research.* (2006) 47, 2492
- [126] B. Lin, M. Sedlacek, I. Manohanran, R. Boopathy, E.G. Duysen, P. Masson, O. Lockridge, *Biochem. Pharmacol.* 70 (2005) 1673.
- [127] O. Khersonsky, D.S. Tawfik. Structure-Reactivity Studies of Serum Paraoxonase PON1 Suggest that Its Native Activity Is Lactonase *Biochemistry* 44 (2005) 6371
- [128] Mueller RF, Hornung S, Furlong CE, Anderson J, Giblett ER, Motulsky

- AG. Plasma paraoxonase polymorphism: a new enzyme assay, population, family biochemical and linkage studies. *Am J Hum Genet* (1983); 35:393–408.
- [129] Eckerson, H.W., Wyte, C.M. and La Du, B.N., “The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism”, *Am. J. Hum. Genet.*, (1983) 35, 1126.
- [130] Debord, J., Dantoine, T., Bollinger, J.C., Abraham, M.H., Verneuil, B., Merle, L. “Inhibition of arylesterase by aliphatic alcohols”, *Chemico-Biological Interactions* (1998), 113, 105-115.
- [131] Pellin, M.C., Moretto, A., Lotti, M., Vilanova, E., Distribution and biochemical properties of rat paraoxonase activity *Neurotoxicol Teratol* (1990) 12, 611-614.
- [132] Wistrand, P.J., Lindahl, S. and Wahlstrand, T., “Human renal carbonic anhydrase. Purification and properties”, *Eur J. Biochem.*, (1975) 57, 189.
- [133] Ko YL, K.Y., Wang SM, Hsu LA, Chang CJ, Chu PH, Cheng NJ, Chen WJ, Chiang CW, Lee YS, “The Gln-Arg 191 polymorphism of the human paraoxonase gene is not associated with the risk of coronary artery disease among Chinese inTaiwan.” *Atherosclerosis*, 141(2), (1998), 259-64
- [134] Suehiro T, I.Y., Ohsaki F., Arie K, Kumon Y, Hashimoto K, “Relationships between polymorphism of the human serum paraoxonase gene and insulin sensitivity in Japanese patients with type 2 diabetes. “*Diabetes Res Clin Pract.*, 60(2), (2003), 79-85
- [135] Sanghera DK, S.N., Kamboh MI, “The codon 55 polymorphism in the paraoxonase 1 gene is not associated with the risk of coronary heart disease in Asian Indians and Chinese.” *Atherosclerosis* 136(2), (1998), 217-23
- [136] Dilek Yavuz, Y.I.A., Meral Yüksel, Hasan Aydın, Oğuzhan Deyneli, Sema Akalın, “S002-Hipertiroidide Serum Paraoksonaz aktivitesi azalmaktadır.” *Turkish Journal of Endocrinology and metabolism* 7(1), (2003)
- [137] Dilek Yavuz, O.D., Meral Yüksel, Ahmet Toprak, Hasan Aydın, Sema Akalın, “P022-Tip 1 Diyabetik hastalarda serum paraoksonaz aktivitesinin Endotel Fonksiyonu ile ilişkisi.” *Turkish Journal of Endocrinology and metabolism* 7(1), (2003)
- [138] Marja Marchesani, A.H., Tomi-Pekka Tuomainen, Jari Kaikkonen, Eero Pukkala, Pekka Uimari, Eija Seppala, Mika Matikainen, Olli-P., Kallioniemi, Johanna Schleutker, Terho Lehtimäki, Jukka T.Salonen, “New Paraoxonase 1 Polymorphism I-102-V and the risk of Prostate cancer in Finnish Men”. *Journal of the national Cancer Institute*, 95(11),

(2003), 812-818

- [139] Jakoby, B., Wilchek, M., Coupling reaction of ligands and general methodology of affinity chromatography, in *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York, (1974).
- [140] Selma Sinan, Feray Kockar, Oktay Arslan." Novel purification strategy for human PON1 and inhibition of the activity by cephalosporin and aminoglikozide derived antibiotics. *Biochimie*, Volume 88, Issue 5, May (2006), Pages 565-574