

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



**PARAOKSONAZ 1 ENZİMİNİN YENİ BİR HİDROFOBİK JEL  
İLE SAFLAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**EMRE YAVUZ**

**BALIKESİR, HAZİRAN - 2014**

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



**PARAOKSONAZ 1 ENZİMİNİN YENİ BİR HİDROFOBİK JEL  
İLE SAFLAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**EMRE YAVUZ**

**BALIKESİR, HAZİRAN - 2014**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

**Emre YAVUZ** tarafından hazırlanan “**PARAOKSONAZ 1 ENZİMİNİN YENİ BİR HİDROFOBİK JEL İLE SAFLAŞTIRILMASI**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 09.06.2014 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

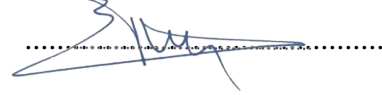
Danışman  
Doç. Dr. Nahit GENÇER



Üye  
Prof. Dr. Oktay ARSLAN



Üye  
Doç. Dr. Ekrem DÜNDAR



Jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş olan bu tez BAÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Cihan ÖZGÜR

.....

**Bu tez çalışması Balıkesir Üniversitesi tarafından 2013/30 nolu proje ile desteklenmiştir.**

## **ÖZET**

### **PARAOKSONAZ 1 ENZİMİNİN YENİ BİR HİDROFOBİK JEL İLE SAFLAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
EMRE YAVUZ**

**BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANABİLİM DALI  
(TEZ DANIŞMANI: DOÇ. DR. NAHİT GENCER)**

**BALIKESİR, HAZİRAN – 2014**

Fizyolojik substratı henüz belirlenmemiş olan Paraoksonaz 1 (PON1); arilesteraz, paraoksonaz ve laktonaz aktivitesine sahip bir ester hidrolazdır. Paraoksonaz 1 (PON1) enzimi detoksifikasyon ve antioksidan aktivitesi ile metabolizmada önemli bir fizyolojik fonksiyona sahiptir.

Bu çalışmada, insan paraoksonaz 1 (PON1) enzimi için amonyum sülfat çöktürmesi ve Sepharose-4B-L-tirozin-1-aminoantresen hidrofobik etkileşim kromatografisinden oluşan iki aşamalı yeni bir saflaştırma stratejisi geliştirilmiştir. Hidrofobik etkileşim kromatografisi jeli, CNBr ile aktive edilmiş Sepharose-4B'ye uzantı kolu olarak L-tirozin bağlandıktan sonra ligand olarak hidrofobik bir molekül olan 1-Aminoantresenin L-tirozine kenetlenmesi sonucu sentezlenmiştir.

Sentezlenen hidrofobik etkileşim jeli ile hidrofobik etkileşim kromatografisi ve amonyum sülfat çöktürmesi yöntemleri kullanılarak insan serumundan paraoksonaz 1 (PON1) enzimi saflaştırılmıştır. Saflaştırılan insan serum paraoksonazı SDS poliakrilamid jel elektroforezine uygulanarak yaklaşık 43 kDa molekül ağırlığına sahip tek bant elde edilmiştir. 674 kat saflaştırılan PON1 enzimi %16,17 verimle elde edildi.

**ANAHTAR KELİMELER:** Paraoksonaz (PON1), hidrofobik etkileşim kromatografisi, saflaştırma.

## **ABSTRACT**

### **PURIFICATION OF THE PARAOXONASE 1 ENZYME WITH A NEW HYDROPHOBIC GEL**

**MSC THESIS**

**EMRE YAVUZ**

**BALIKESIR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE**

**CHEMISTRY**

**(SUPERVISOR: ASSOC. PROF. DR: NAHİT GENCER)**

**BALIKESİR, JUNE 2014**

Physiological substrates that are not to be determined, yet, of paraoxonase (PON1), is an ester hydrolase, which has arylesterase, paraoxonase and lactonase activity. Paraoxonase (PON1) enzyme has an important physiological function in the metabolism with detoxification and antioxidant activity.

In this study, a new purification strategy for human PON1 enzyme was developed using two-step procedures, namely ammonium sulphate precipitation and sepharose-4B-L-tyrosine-1-aminoantrecene hydrophobic interaction chromatography. The gel was synthesized with Sepharose-4B-L-tyrosine and 1-aminoantrecene as hydrophobic ligand. Sepharose-4B was activated with CNBr and then L-tyrosine was added as extension arm.

Human serum paraoxonase was purified with ammonium sulfate precipitation and synthesized hydrophobic interaction chromatography. Purified human serum paraoxonase yielded a single band of 43 kDa on SDS-PAGE. PON1 enzyme was obtained with a yield 16,17% and the purification was 674 fold.

**KEYWORDS:** Paraoxonase (PON1), hydrophobic interaction chromatography purification.

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

|  |            |
|--|------------|
| <b>ÖZET</b> .....  | <b>i</b>   |
| <b>ABSTRACT</b> .....  | <b>ii</b>  |
| <b>İÇİNDEKİLER</b> .....   | <b>iii</b> |
| <b>ŞEKİL LİSTESİ</b> .....   | <b>iv</b>  |
| <b>TABLO LİSTESİ</b> .....   | <b>v</b>   |
| <b>SEMBOL LİSTESİ</b> .....  | <b>vi</b>  |
| <b>ÖNSÖZ</b> .....   | <b>vii</b> |
| <b>1. GİRİŞ</b> .....  | <b>1</b>   |
| 1.1 Paraoksonaz Enzimi .....   | 2          |
| 1.2 Adlandırılması .....   | 2          |
| 1.3 Paraoksonaz Gen Ailesi.....  | 3          |
| 1.3.1 PON1 Biyokimyasal Yapısı.....  | 4          |
| 1.3.2 PON1'in HDL'ye Bağlanması.....   | 5          |
| 1.3.3 PON1 Sentezlenmesi ve Salgılanması.....  | 6          |
| 1.3.4 PON1'in HDL ve LDL Oksidasyonunu Önlemesi.....   | 6          |
| 1.4 Enzimin Katalitik Mekanizması .....  | 7          |
| 1.5 Katalizlediği Reaksiyonlar ve Substratları .....   | 8          |
| 1.6 Enzimin Saflaştırılması .....  | 9          |
| <b>2. MATERYAL VE YÖNTEM</b> .....   | <b>11</b>  |
| 2.1 MATERYALLER .....  | 11         |
| 2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler .....   | 11         |
| 2.1.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar .....  | 11         |
| 2.1.3 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması.....   | 12         |
| 2.2 YÖNTEMLER .....  | 15         |
| 2.2.1 Kan serumunun ayrılması .....  | 15         |
| 2.2.2 Enzim Aktivite Tayini .....  | 15         |
| 2.2.3 Bradford Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini.....   | 15         |
| 2.2.4 Enzimin Saflaştırılması.....   | 16         |
| 2.2.4.1 Amonyum Sülfat Çöktürmesi .....  | 16         |
| 2.2.4.2 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile Enzimin Saflaştırılması.....                               | 16         |
| 2.2.5 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ile Enzim Saflığının Kontrolü ..... | 18         |
| <b>3. BULGULAR</b> .....   | <b>20</b>  |
| 3.1 Enzimin Saflaştırılması .....  | 20         |
| 3.1.1 Amonyum Sülfat Çöktürmesi .....  | 20         |
| 3.1.2 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile Enzimin Saflaştırılması .....                                | 20         |
| 3.1.3 Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri .....  | 21         |
| 3.2 Serum Paraoksonaz enziminin SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi.....                                   | 24         |
| <b>4. SONUÇ VE ÖNERİLER</b> .....  | <b>25</b>  |
| <b>5. KAYNAKLAR</b> .....  | <b>33</b>  |

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

|  |    |
|--|----|
| Şekil 1.1: Paraoksanın kimyasal yapısı .....   | 3  |
| Şekil 1.2: PON1'in üç boyutlu yapısı .....   | 5  |
| Şekil 1.3: PON1'in HDL'ye bağlanması .....   | 5  |
| Şekil 1.4: Paraoksonazın katalitik mekanizması .....   | 7  |
| Şekil 2.1: Sepharose 4B'nin aktiveştirilmesi .....   | 17 |
| Şekil 2.2: L-Tirozinin Bağlanması .....  | 17 |
| Şekil 2.3: 1-Aminoantresen bileşiğinin bağlanması .....  | 18 |
| Şekil 3.1: Hidrofobik etkileşim kolonundan PON1 enziminin elüsyon grafiği..  | 21 |
| Şekil 3.2: Bradford yöntemi ile protein miktarının tayin edilmesinde kullanılan standart grafik .....                          | 22 |
| Şekil 3.3: Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılan paraoksonaz enziminin SDS-polakrilamid jel elektroforezi..... | 24 |
| Şekil 4.1: PON1 enziminin HDL yüzeyine bağlanma modeli.....  | 25 |



## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

|   |    |
|---|----|
| <b>Tablo 2.1:</b> SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının miktarları. | 14 |
| <b>Tablo 3.1:</b> PON için saflaştırma tablosu.....                                   | 23 |
| <b>Tablo 4.1:</b> Literatürdeki Saflaştırma Metodları.....                            | 30 |
| <b>Tablo 4.2:</b> Sepharose-4B-L-tirozin-1-aminoantresen ve Diğer Jeller.....         | 31 |

## SEMBOL LİSTESİ

|                               |                                     |
|-------------------------------|-------------------------------------|
| <b>PON1:</b>                  | Paraoksonaz 1 enzimi                |
| <b>SDS:</b>                   | Sodyum dodesil sülfat               |
| <b>PAGE:</b>                  | Poliakrilamid jel elektroforezi     |
| <b>U:</b>                     | Enzim ünitesi                       |
| <b><math>\Delta A</math>:</b> | Absorbans farkı                     |
| <b>TEMED:</b>                 | N,N,N', N',-tetrametiletildiamin    |
| <b>HEK:</b>                   | Hidrofobik etkileşim kromatografisi |

## ÖNSÖZ

Tez çalışmam sırasında özgün düşünce ve fikirlerinden yararlandığım, yalnızca bilimsel anlamda değil insanlara yaklaşımıyla da kendime çok şey kattığına inandığım değerli danışman hocam Doç. Dr. Nahit GENCER'e en derin saygı ve şükranlarımı sunmayı bir borç bilirim.

Çalışmalarım boyunca her zaman yanımda olan, bilgisi ve tecrübesiyle bana daima yol gösteren, olumlu katkıları ile beni yönlendiren kıymetli hocam Prof. Dr. Oktay ARSLAN'a en derin saygılarımı sunarım.

Daima yanımda olan, sevgisini ve ilgisini her zaman üzerinde hissettiğim, bilgisi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren kıymetli hocam Prof. Dr. Selma SİNAN'a teşekkür eder, sevgilerimi sunarım.

Çalışmalarımın her aşamasında önerileri ile yol gösteren ve yardımını hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Dudu DEMİR'e teşekkür eder, saygı ve sevgilerimi sunarım.

Tez çalışmalarım boyunca her zaman yanımda olan Yrd. Doç. Dr. Semra IŞIK'a, yardımını gördüğüm Serap BEYAZTAŞ'a çok teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmalarım boyunca her zaman yanımda olan, desteklerini her zaman hissettiğim Âdem ERGÜN, Çiğdem BİLEN, Mesut ACAR ve değerli grup arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Beni bugünlere kadar getiren en kıymetli varlığım aileme, her zaman desteklerini üzerinde hissettiğim ve daima yanımda oldukları için en içten sevgi ve şükranlarımı sunarım.

**Balıkesir, 2014**

**Emre YAVUZ**

# 1. GİRİŞ

Paraoksonaz 1 enzimi (EC 3.1.8.1, PON1) karaciğer tarafından sentezlenen, kalsiyuma bağımlı bir serum esterazdır. Serumda, yüksek yoğunluktaki lipoproteinlere bağlı olarak bulunur [1]. PON1 organofosfat ajanları (OP) ve sinir gazlarının hidrolizinde, LDL'nin oksidasyonu ile lipit peroksitlerin oluşumunda ve bakteri endotoksinlerine karşı koruyumada rol oynayan önemli bir enzimdir. LDL'nin oksidasyonu ve arteroskleroz sürecinin başlangıç evresini oluşturması, bu enzimin antioksidan özelliğinin önemini göstermektedir [2, 3].

Paraoksonazlar PON1, PON2 ve PON3 olmak üzere bilinen üç üyeye sahiptir. Çalışmalar daha çok PON1'e yönelik olarak yapılmaktadır. PON1, fizyolojik substratlarının belirlenmesi ve arterosklerozis ile ilişkisinin ortaya konması nedeniyle, PON2 ve PON3'e göre nispeten daha iyi aydınlatılmıştır [4].

Bu çalışmamızda, Sepharose-4B-L-tirozin-1-Aminoantresen hidrofobik etkileşim kromatografisi jeli kullanılarak insan serumundan Paraoksonaz 1 (PON1) enziminin saflaştırılması, saflaştırılan Paraoksonaz 1 (PON1) enziminin sodyum dodesil sülfat (SDS) jel elektroforezi ile yaklaşık molekül ağırlığının tespit edilmesi ve çalışma sonunda sentezlenen yeni jelden elde edilen verilerin mevcut diğer hidrofobik etkileşim kromatografisi jelleriyle karşılaştırılarak araştırılması amaçlanmıştır

Bunun için aşağıdaki çalışmalar planlanmıştır;

- Yeni bir hidrofobik jel sentezi
- Sentezlenen bu yeni jel ile insan serumundan hidrofobik etkileşim kromatografisi ile paraoksonaz 1 enziminin saflaştırılması
- SDS-PAGE elektroforezi ile saflığının kontrolü
- Yeni hidrofobik jelden elde edilen verilerin mevcut diğer hidrofobik jellerle mukayese edilmesi

## 1.1 Paraoksonaz Enzimleri

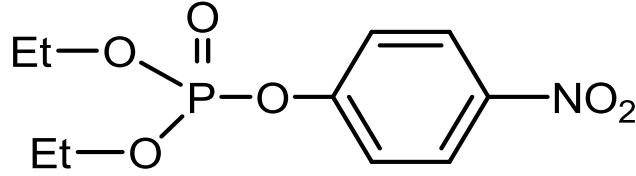
Paraoksonazlar (PON), Aldridge sınıflama sistemine göre A grubu arildialkilfosfataz sınıfı ester hidrolaz enzimleridir [5]. PON, ilk defa 1953 yılında Aldridge W.N. tarafından p-nitrofenil asetat, propiyonat ve bütirat'ı hidroliz eden A-esteraz olarak belirlenmiştir. İnsan serumunda ilk olarak 1961'de Uriel tarafından elektroforez sonrasında HDL immunopresipitatlarında bulunmuştur [6].

Mackness ve ark., ilk olarak HDL (High density Lipoprotein, Yüksek yoğunluklu Lipoprotein)-ayırımı için santrifüj yöntemini geliştirmişlerdir. Koyunlarda paraoksonaz aktivitesinin çoğunlukla apo AI içeren partiküllerde HDL ile beraber bulunduğunu ve insan serumunun ultra santrifüjlenmesi ile enzimin kanda HDL yapısında taşındığını belirlemişlerdir. [7]. Saflaştırılmış sığır serum paraoksonazının lipidlerle ilişkili ve HDL ile aynı moleküler kütleye sahip olduğunu bulmuşlardır. Saflaştırmada apo A-I'in paraoksonazdan ayırımının zor olmasından dolayı ikisinin sıkı ilişkili olduğunu düşündürmüştür ve HDL kolesterol tayini sırasında lipoprotein fraksiyonunda aril-esteraz aktivitesine rastlamışlardır [6]. Mackness ve ark., PON'un HDL üzerinde apo A-I'e bağımlı olarak aktivite gösterdiğini bulmuşlardır. 1991 yılında ise LDL üzerindeki lipoperoksit birikimini azalttığını bulmuşlardır. Aynı zamanda, farklı populasyonlarda polimorfizm analizleri yapılarak, allellik formları belirlemişler ve populasyon çalışmalarıyla enzim aktivitesinde HDL, apo A-I ve apo A-II arasında istatistiksel ilişki olduğunu göstermişlerdir [7]. Yapılan immunoafinite kromatografi çalışmaları insan serum paraoksonazının gerçekte apolipoprotein A-I ve apolipoprotein J içeren HDL tipleri ile ilişkili olduğunu ve PON1'in total HDL'nin çok küçük bir bölümünü oluşturduğunu göstermiştir [5, 7].

## 1.2 Paraoksonaz Enziminin Adlandırılması

Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği'nin (IUBMB) enzim isimlendirmesine göre paraoksonaz EC 3.1.1.2 ve EC 3.1.8.1. şeklinde iki numaraya sahiptir. 1990'lı yıllardan sonra, paraoksonazın arilesterazdan farklı olarak sadece fenolik esterleri değil, fosforik ve fosfinik asit esterlerini de hidroliz ettiği anlaşılmış ve enzim EC 3.1.8.1 ile tanımlanmıştır [8]. Paraoksonaz enziminin, A grubu

Arildialkilfosfataz sınıfı bir ester hidrolaz enzimi olmasından dolayı sistematik adı arildialkilfosfatazdır. A esteraz grubunda olan paraoksonaz enzimi, aktivitesinin ölçümünde ilk olarak paraokson substratı kullanıldığı için paraoksonaz adını almıştır [9].



**Şekil 1.1:** Paraoksonun kimyasal yapısı (O,O-dietil-O-p-nitrofenil fosfat)

Paraoksonaz enzimi geniş bir substrat özgüllüğü gösterirken, fizyolojik substratı tam olarak belirlenememiştir. Ancak arilesteraz, organofosfataz ve laktonaz aktivitelerine sahip olduğu bulunmuştur. İnsan serum paraoksonaz enzimi, parationun metabolik ürünü olan ve organizmaya zararlı olup pestisit olarak kullanılan paraoksanı kataliz etme yeteneğindedir. Paraoksanın, paraoksonaz enzimi ile yıkımı sonucu oluşan p-nitro fenol ve dietil hidroksi fosfat bileşikleri paraoksana oranla göreceli olarak daha az zararlıdır [5].

### 1.3 Paraoksonaz Gen Ailesi

Paraoksonaz gen ailesi, insanlarda kromozom 7'nin uzun kolunda q21.3 ve q22.1 arasında bulunmaktadır [4, 10]. İlk defa memelilerde tanımlanan PON ve PON ile ilişkili genler sonraları kümes hayvanları, zebra balığı ve omurgasızlardan *Caenorhabditis elegans*'ta bulunmuştur [11].

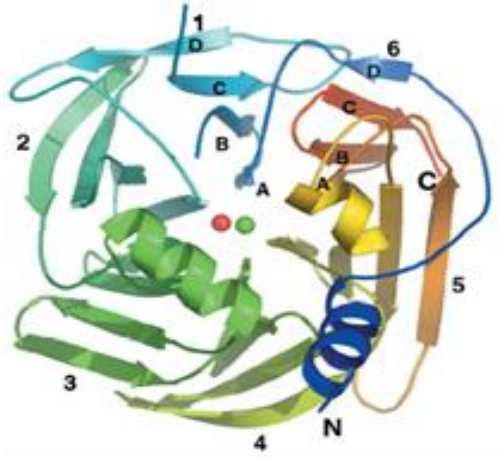
Paraoksonaz gen ailesi; PON1, PON2 ve PON3 olarak bilinen üç üyeye sahiptir. Bu genler yapısal olarak büyük benzerlikler göstermektedir. Memeli türleri içersinde PON1, PON2 ve PON3 aminoasit düzeyinde % 60, nükleotid düzeyinde % 70 benzerlik gösterir. Bununla birlikte memeli türleri arasında bu üç genin her biri aminoasit düzeyinde % 79-90, nükleotid düzeyinde % 81-91 benzerlik göstermektedir. PON1, PON2 ve PON3 ile karşılaştırma yapıldığında 4. ekzonda kodlanan 105 aminoasit içinde üç nükleotid rezidüsüyle ayrılır [4, 12].

PON2 ve PON3, PON1 kadar aydınlatılmamıştır [4, 13]. PON2 diğerlerinden farklı olarak plazmada bulunmamaktadır. 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 gibi 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 [13, 14].

### 1.3.1 PON1'in Biyokimyasal Yapısı

PON1, 43-45 kDa molekül ağırlığına sahip 354 aminoasit içeren bir proteindir [12, 15]. Her molekül total ağırlığın % 15.8'ini oluşturan üç karbonhidrat zinciri içermektedir. İzoelektrik noktası 5.1'dir [16]. PON1'in ince yapısı 4 tane zincirden oluşmuş 6 adet  $\beta$ -kırmalı yapıdan meydana gelmiştir (Şekil 1.2).

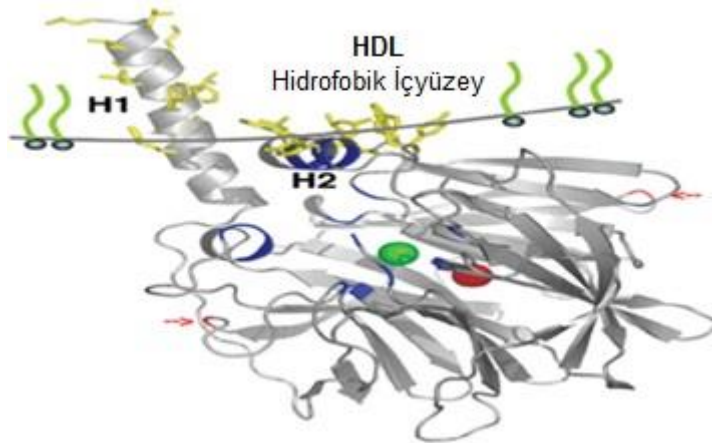
Üç boyutlu yapıda;  $\beta$ -kırmalı tabakaların merkezinde 7.4 Å aralıklı iki tane  $Ca^{+2}$  iyonu vardır.  $Ca^{+2}$  iyonlarından bir tanesi yapısal özellikli olup yapıdan uzaklaştırılması dönüşümsüz denatürasyona sebep olmaktadır [17]. Diğer  $Ca^{+2}$  iyonu katalitik etkinlikte rol oynamaktadır. Bu kalsiyum iyonu 2.2-2.5Å uzaklıkta 5 adet aminoasit (Asn224, Asn270, Asn168, Asp269 ve Glu53) ile etkileşim halindedir ve bir su molekülü ve fosfat iyonunun oksijeni ile etkileşmektedir [18]. PON1'in aktif bölgesinde diğer  $\beta$ -kırmalı yapılardan farklı olarak hidrofobik heliks ( $H_2$  ve  $H_3$ ) yapıları vardır (Şekil 1.2). Bu yapılar sonlanma noktaları olup, aktif bölgenin korunması ve enzimin HDL'ye bağlanması gibi kritik rollere sahiptir [19].



**Şekil 1.2:** PON1'in üç boyutlu yapısı [18]

### 1.3.2 PON1'in HDL'ye Bağlanması

HDL yaklaşık 10 nm çapında kompleks bir yapıdır. Bileşiminde öncelikle membran bileşenleri (fosfolipidler, kolesterol ve kolesterol esterleri), apolipoprotein A1 ve aromatik heliksler bulunur [20]. PON1 hidrofobik N terminal ucu ile sonlanır, H2 ve H1 hidrofobik heliksler bir araya gelerek potansiyel membrana bağlanma yüzeyi oluştururlar (Şekil 1.3). Heliks yapılar lizin, triptofan ve tirozin yan zincirleri ile oluşturdukları yapı karakteristiği sayesinde HDL ara yüzeyine girebilmektedir [21].



**Şekil 1.3:** PON1'in HDL'ye bağlanması [18]



### 1.3.3 PON1 Sentezlenmesi ve Salgılanması

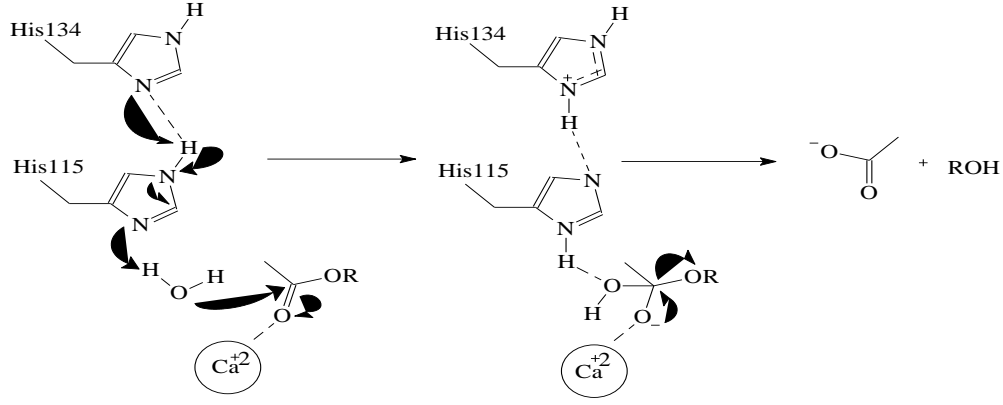
PON1 sentezi karaciğerde gerçekleştiği için serumdaki PON1 seviyesini belirleyen başlıca faktör karaciğer fonksiyonlarıdır. Serumdaki PON1 seviyesi ve aktivitesi bireyler arasında çok farklılık göstermektedir [22]. PON1 karaciğerden sentezlendikten sonra serumda HDL'ye veya karaciğerde mikrozoamlara bağlanabilmesi için sentez sırasında N-terminal hidrofobik bölgesi olması gerekmektedir. N-terminal hidrofobik bölgesi bağlanmada belirleyici olduğu kadar salgılanmada da önemli role sahiptir [23]. PON1'in karaciğerde sentezlendikten sonra, önce mikrozoamlara, daha sonra hücrenin dış yüzeyine bağlandığı düşünülmektedir [24, 25]. Hücre zarının dış yüzeyinden salınması ve HDL'ye bağlanması tesadüf değildir. Bu bağlanmada fosfolipit kompleksi önemli rol oynamaktadır. PON1'in hücreden salınması ve HDL'ye bağlanması için HDL'deki fosfolipit içeriği yeterli değildir [21, 24, 26].

### 1.3.4 PON1'in HDL ve LDL Oksidasyonunu Önlemesi

Oksidatif stres altında gerçekleşen lipit peroksidasyonu yalnızca LDL'de değil; HDL'de bulunan lipitlerde de meydana gelirken, PON1'in hem LDL'nin hem de HDL'nin oksidasyonunu önlediği bildirilmiştir [13,2]. PON1'in HDL ile birlikte antioksidan etkisinin bulunduğu ve HDL'nin inhibitör etkisinde, metal iyon selasyonu veya peroksidaz benzeri aktivite ile bağlantılı olabileceği tezi savunulmaktadır [27]. HDL'nin LDL oksidasyonu üzerine olan koruyucu etkisinin PON1 ile ilişkili olduğu ileri sürülmektedir. PON1'in  $Cu^{2+}$ 'nin harekete geçirdiği lipoprotein oksidasyonunu in vitro düzeyde inhibe ettiği ve PON1'in yarışmasız inhibitörlerinin serbest radikal oluşumunu ve  $Cu^{2+}$ 'nin harekete geçirdiği HDL oksidasyonunu artırdığı gösterilmiştir. Bunların yanında, PON1'in makrofaj kaynaklı kolesterol çıkışını arttırdığı tespit edilmiştir [27].

#### 1.4 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 [32]

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 sırada meydana gelen kompleks tetrahedral bir düzlem sonucu  $\text{Ca}^{2+}$  iyonu ile kararlı hale getirilir. 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 amacı ile, esteraz aktivitesi için 2-naftilasetat substratı ve fosfotriesteraz aktivitesi için ise paraoksan substratı kullanılmıştır. Bu substratların optimum pH aralıkları belirlenmiş ve substratın yapısında bulunan yan zincirin katalizlenmeye direkt katılmadığı sonucu bulunmuştur [28].

## 1.5 Katalizlediği Reaksiyonlar ve Substratları

Paraoksonaz enzimi geniş bir substrat özgüllüğü gösterirken, fizyolojik substratı tam olarak belirlenememiştir. Ancak arilesteraz, organofosfataz ve laktonaz aktivetelerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Söz konusu aktiviteğin 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 arterosiklozisin önlenmesinde ve ilaç metabolizmasında önemli rol oynadığı bilinmektedir [11, 29]. PON1 özellikle LDL ve HDL lipitlerinin yükseltgenmesini önleyerek ve lipit peroksidlerini metabolize ederek arterosklozise karşı koruyuculuğunu sahip olduğu laktonaz aktivitesi ile göstermektedir [30-32]. Söz konusu enzim 4 atomdan 7 atoma kadar değişen lakton halkası içeren en az 30 çeşit laktonu hidrolizleyebilmektedir. Alifatik lakton substratı olan  $\delta$ -valerolakton,  $\delta$ -butirolakton ve  $\epsilon$ -kaprolaktondan daha hızlı hidrolizlenmektedir. PON1 enziminin aromatik laktonlara afinitesi alifatik laktonlara oranla daha fazladır ve daha kolay hidrolizlerler. Ancak ilgi çekicidir ki, pek çok ilacın etken maddesinde bulunan kumarin bileşiğinin lakton halkasında  $\alpha$  ve  $\delta$  çift bağı olmasına rağmen PON1 tarafından hidrolizlenmemektedir, fakat dihidrokumarin hidrolizlenmektedir [33-36].

PON1'in yapısının ve substratlarla olan ilişkisinin belirlenmesinde yapı-aktivite analizi üzerine yapılan çalışmalarda ilk olarak Augustinson ve Ekedahl aromatik halkalı veya çift bağı aromatik esterlerin PON1 tarafından hidrolizlendiklerini bulmuştur. Bu reaksiyonda PON1'e substrat olan esterin karbon-karbon çift bağının birbirine çok yakın olması gerektiği tespit edilmiştir [37]. 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 [30]. Lakton halkasının oluşturduğu uzaysal yapı, bu yapıyı içeren bazı substratların enzimin aktif merkezine girmesini sağlayarak etkileşmelerine ve hidrolizlenmelerine izin verir. Bu etkileşim benzer şekildeki içte bulunan ester formları için mümkün değildir. Etil asetat PON1 ile hidrolizlenmezken, aynı sayıda atom ve ester yapısı gösteren butirolakton iyi hidrolizlenmesi buna iyi bir örnektir [9, 30].

PON1 enziminin laktonaz aktivitesi için 284. rezidüde bulunan serbest sistein aminoasiti oldukça önemlidir. Bu rezidünün, söz konusu enzimin LDL'nin okside olmasını önlemesinde de rol alması; PON1'in sahip olduğu laktonaz aktivitesi aracılığıyla LDL ve HDL fosfolipitlerinin yükseltgenmeye karşı koruduğu düşünülmektedir [38, 39]. Sorenson ve arkadaşları bu 284. pozisyonda bulunan serbest sistein rezidüsünün arilesteraz ve paraoksonaz aktivitesinde gerekli olmadığını göstermişlerdir [40]. Fakat, aktif merkezdeki histidin rezidülerinin paraoksonaz ve arilesteraz hidrolitik aktivitelerini göstermesinde çok gerekli olduğu gösterilmiştir. [41].

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 PON1 tarafından hidrolizlenir. Daha önce yapılan çalışmalarda bu hidroksimetil glutaril-CoA redüktaz inhibitörlerinin hidrolizlenmesi söz konusu enzimin statinaz aktivitesi olarak tanımlanmıştır [42, 43]. Ayrıca PON1 glukokortikoid  $\delta$ -laktonların [31] sistemik metabolize edilmesinde ve ön ilaç maddesi olan karbonat ester yapısındaki prulifloksasinin aktivasyonunda [44] rol oynamaktadır. Bunun gibi PON1'in laktonaz aktivitesinden başlıca yönetici ajanların metabolize edilmesinde ve bunların istenmeyen yan etkilerinin azaltılmasında yararlanılmaktadır [31].

İnsan serum PON1 enzimi ayrıca paration, diazinon ve klorpirifos gibi çok sayıda insektisit toksik okson metabolitlerini [45, 46] ve soman, sarin ve tabun gibi organofosfat sinir ajanlarını hidrolizleyebilmektedir [47-50]. 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 [40, 45, 41].

## **1.6 Enzimin Saflaştırılması**

Paraoksonaz enzimi karaciğerde, endoplazmik retikulum membranlarının parçacıklarının uçları kapanarak oluşan mikrozomlarda, serumda HDL'ye bağlı olarak bulunmaktadır [52]. İlk defa A-esterazları (diizopropil fosforidat hidrolaz)

Mazur tarafından tavşan böbreğinden yaklaşık 13 kat [53] ve daha sonra Mounter tarafından 65-100 kat saflaştırılmıştır [54]. Fakat, paraoksonaz ismi ile ilk saflaştırma işlemi koyun serumundan 330-385 kat etanol, pH ve iyonik çöktürme yöntemleri kullanılarak Main tarafından başarılmıştır [55]. Daha sonra Furlong ve arkadaşları tarafından insan ve tavşandan söz konusu enzim saflaştırılmış ve cDNA'sı karakterize edilmiştir [56].

Paraoksonaz enziminin saflaştırılması için, ulaşılmak istenen saflık derecesine bağlı olarak 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 [16]. 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 [57].

Paraoksonaz enzimi, karaciğerde mikrozoamlara ve serumda da HDL'ye bağlı olduğu için homojen bir saflık elde etmek oldukça zordur [58]. Enzimin saflaştırılması sırasında bağlı olduğu yapılardan uzaklaştırılması gerekmektedir. Karaciğerde enzimi mikrozoamlardan ayırmak için TritonX-100 kullanılırken [59] serumda HDL'den uzaklaştırılması için deterjan veya yüksek tuz konsantrasyonu kullanılması gerekmektedir [57].

## 2. MATERYAL VE YÖNTEM

### 2.1 MATERYALLER

#### 2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneysel çalışmalarda kullanılan, Sepharose-4B, 1-aminoantresen, L-tirozin, standart serum albumin, N,N,N,N'tetrametiletildiamin (TEMED), trihidroksimetil aminometan (Tris-Base), paraoksan, Tris-HCl Sigma Chemical'den; sodyum hidroksit, amonyum sülfat, glisin, fosforik asit, asetik asit, etil alkol, hidroklorik asit, sodyum dihidrojen fosfat,  $\beta$ -merkaptotanol, sodyum dodesil sülfat, akrilamid, N,N-metilen bis-akrilamid, amonyum persülfat, bromofenol mavisi, gliserol, Coomassie brilliant blue G-250, sodyum bikarbonat, sodyum fosfat, potasyum fosfat ve kalsiyum klorür Merk'den sağlanmıştır.

#### 2.1.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar

Bu çalışmada aşağıdaki alet ve cihazlardan yararlanılmıştır.

| <u>Cihaz</u>         | <u>Marka-Model</u>                       |
|----------------------|--|
| Soğutmalı santrifüj  | Sigma 3K15                               |
| pH metre             | Hana pH 211 Microprocessor               |
| UV-Spektrofotometre  | Biotek Power Wave XS                     |
| Manyetik karıştırıcı | Torrey Pines Scientific                  |
| Terazi               | Sartorius BL 210S                        |
| Otomatik pipetler    | Hi-Tech ve Finipipette                   |
| Elektroforez Sistemi | BIORAD                                   |
| Kromatografi Kolonu  | Sigma (1,5x10 cm )                       |
| Vorteks              | Fisons Whirli Mixer                      |
| Gadient Mikser       | Atta Magnetik Karıştırıcı ve Gadient Tüp |

Buz makinesi

Fiocchetti AF 10

Jel Görüntüleme Sistemi

Gel Doc-H Imaging System (UVP)

### 2.1.3 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

**Hidrofobik jelin dengelenmesi için kullanılan tampon:** *1M (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>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 950 mL distile suda çözülerek, 1N HCl ile pH'sı 8,0'e getirildi ve son hacim distile su ile 1L'ye tamamlandı.*

**Hidrofobik jele bağlanmış PON1 enziminin elüsyonu için kullanılan çözelti:** *1M (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) 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>)<sub>2</sub>SO<sub>4</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.*

**Proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti:** 100 mg Coomassie brilliant blue G-250, 50 mL etanol de çözüldü. Bu çözeltiye 100 mL %95'lik fosforik asit ilave edildi. Çözeltinin son hacmi distile su ile 1L'ye tamamlandı.

**Amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda oluşan çökeleğin alındığı tampon:** *0,1 M Tris-Baz tamponu (pH 8,0); 1.211 g (0,01 mol) tris-Baz 95 mL distile suda çözülerek, 1N HCl ile pH'ı 8,0'a getirildi ve son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.*

**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 (25mmol) Tris, 200 mL distile suda çözüldü. 1 N HCl ile pH'ı 8,0'e getirildi. 0,0555 g (0,5 mmol) CaCl<sub>2</sub> katılarak son hacim 250 mL'ye tamamlandı.*

**SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan numune tamponu;**

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

**SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan tank tamponu;**

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

**SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan ayırma ve yığma jellerinin hazırlanışı;**

SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının hazırlanışı ve kullanılan miktarları Çizelge 2.1'de verilmektedir.

**SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renklendirme çözeltisi;** 0,66 g Coomassie brilliant blue G-250, 120 mL metanolde çözüldü. Bu çözeltiye 24 mL saf asetik asit ve 120 mL distile su ilave edildi.

**SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renk açma çözeltisi;** Hacimce %7,5 asetik asit, %5 metanol ve %87,5 mL distile su içermektedir. Bu amaçla 75 mL asetik asit ve 50 mL metanol, 875 mL saf su ile karıştırıldı.



**Tablo 2.1:** SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının miktarları

|  | <b>Ayırma Jeli</b> | <b>Yığıma Jeli</b> |
|--|--------------------|--------------------|
|  | <b>%10</b>         | <b>%3</b>          |
| <b><u>Akril amid/Bis</u></b><br>Akril amid 15 g<br>Bis 0,4 g<br>Alınarak son hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlanır.   | 16,65 mL           | 2,6 mL             |
| Distile su   | 20,1 mL            | 12,2 mL            |
| <b><u>1.5 M tris-HCL (pH 8.8)</u></b><br>Tris-HCl 11.82<br>Alınarak pH 8.8 oluncaya kadar 0.1 M NaOH ilave edilerek son hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlanır.  | 12,5 mL            | –                  |
| <b><u>0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)</u></b><br>Tris-HCl 3.94 g<br>Alınarak pH 6.8 oluncaya kadar 0.1 M NaOH ilave edilerek son hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlanır. | –                  | 5 mL               |
| <b><u>% 10 'luk SDS</u></b><br>SDS 1g<br>Alınarak son hacim distile su ile 10 mL'ye tamamlanır.  | 0,5 µL             | 200 µL             |
| <b>TEMED</b>   | 25 µL              | 20 µL              |
| <b><u>%10'luk amonyum persülfat</u></b><br>Amonyum persülfat 1g<br>Alınarak son hacim distile su ile 10 mL'ye tamamlanır.  | 750 µL             | 400 µL             |

## **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 aynı gün deneysel çalışmalarda 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 1mL tampon (100 mM tris-baz pH:8,00) + substrat (1 mM paraoksan) + koenzim (2 mM CaCl<sub>2</sub>) çözeltisine çabuk bir şekilde eklendikte sonra 412 nm'de 37 °C'de 1 dakikadaki absorbansta meydana gelen değişme okundu. 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'ü olarak tayin edildi [16].

### **2.2.3 Bradford Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini**

Amonyum sülfat çöktürmesi sırasında elde edilen çözeltilerdeki protein miktar tayinleri bu yöntemle belirlendi. Bu yöntem, proteinlerin fosforik asitli ortamda, Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi ile kompleks oluşturması, oluşan kompleksin 595 nm'de maksimum absorbans göstermesi esasına dayanır [60].

Protein tayini işleminde şu yol izlendi: 1 mL'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albümin çözeltisinden tüplere 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µl alındı. 100mM Tris-HCl tamponu (pH:8,00) ile tüm tüplerin hacimleri 0.1mL'ye tamamlandı. 5mL Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi her bir tüpe ilave edildi. Tüpler vorteks ile karıştırılarak 10 dakika sonra 595 nm'de 3 mL'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak 0,1 mL'lik 100 mM

Tris-HCl (pH:8,00) tamponu olan 1. tüp kullanıldı. Okunan absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri ile standart grafik hazırlandı (Şekil 3.2).

Enzim örneklerinden 0,1'er mL 2 ayrı tüpe alınarak üzerlerine 5'er mL Coomassie reaktifi ilave edildi. Vortekste karıştırıldıktan 10 dakika sonra 595 nm'de absorbansları ölçüldü. İki ölçümün ortalama absorbansına karşılık gelen protein miktarı standart grafik yardımıyla hesaplandı.

## **2.2.4 Enzimin Saflaştırılması**

### **2.2.4.1 Amonyum Sülfat Çöktürmesi**

Amonyum sülfat, belirli doygunluk derecelerine göre belirli proteinlerin çökmesini sağlayan 2 değerlikli, çok kullanılan bir tuzdur. Bu amaçla literatürden bakılarak %60-80 amonyum sülfat çöktürmesi [61] aşağıda verilen formülle belirlendi;

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

V : Serum hacmi

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

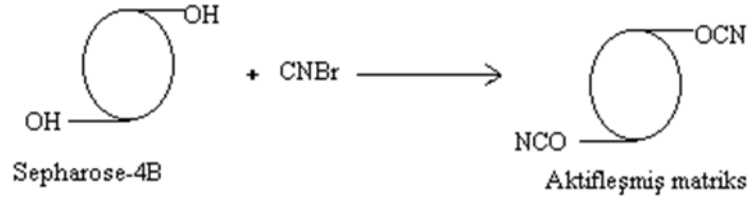
S<sub>2</sub> : 1'in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğu

### **2.2.4.2 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile Enzimin Saflaştırılması**

#### **2.2.4.2.1 Sepharose 4B'nin Aktifleştirilmesi**

10 mL Sepharose-4B jeli, saf su ile iyice yıkanarak dekante edildi. Üzerine eşit hacimde distile su eklendi. Karıştırılmakta olan jel süspansiyonuna 4 g CNBr'in hepsi birden katıldı. pH metre kullanılarak süspansiyonun pH'sı 4 M NaOH ile

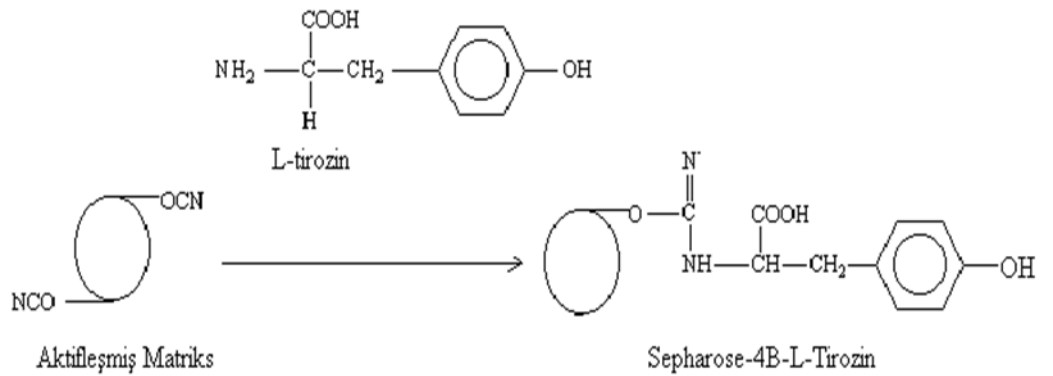
hemen 11'e çıkarıldı ve reaksiyon bu pH'da muhafaza edildi. Reaksiyona pH değişmeyene kadar devam edildi. (10-15 dakika) Çok miktarda buz süspansiyona katıldı ve karışım bir buhner hunisine nakledildi. Daha sonra 250 mL soğutulmuş 0,1 M Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub> tamponu (pH 10,00) ile yıkandı (Şekil 2.1).



**Şekil 2.1:** Sepharose 4B'nin aktifleştirilmesi

#### 2.2.4.2.2 L-tirozinin Bağlanması

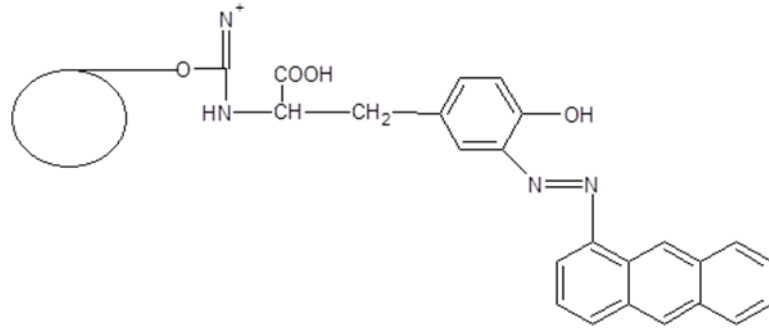
CNBr ile aktifleştirilmiş matriks üzerine, 20 mL'sinde 15 mg tirozin içeren 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> tamponunun (pH 10,00) soğuk çözeltisi ilave edilerek 90 dk karıştırıldı. Bundan sonra süspansiyon 16 saat 40C'de bekletildi. Bu sürenin bitiminde yıkama suyu 280 nm'de absorbans vermeyinceye kadar bol 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 1-Aminoantresen Bileşiminin Bağlanması

25 mg 1-Aminoantresen 0 °C civarında 10 mL THF içerisinde çözüldü. 75 mg NaNO<sub>2</sub> ihtiva eden 0 °C'deki 5 mL 1 M HCl içinde hazırlanan çözelti, 1-Aminoantresen çözeltisine damla damla katıldı. 10 dakika reaksiyondan sonra diazolanmış bulunan 1-Aminoantresen, 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). Bu süre sonunda renksiz olan çıkış maddelerinden koyu kahve renkli bir jel elde edildi. Diazolama reaksiyonları sonucu boyar maddeler elde edilir. Reaksiyon sonucu koyu kahve renk oluşması diazolanmanın gerçekleştiğini gösterir.



Şekil 2.3: 1-Aminoantresen bileşiminin bağlanması

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

Paraoksonaz enziminin hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılmasından sonra iki farklı akrilamid konsantrasyonunda; yığılma jeli % 3, ayırma jeli % 10 olacak şekilde kesikli sodyum dodesil sülfat jel elektrofrez (SDS-PAGE) Laemmli [62] tarafından belirtilen yöntemle 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 elektroforezin dökme aparatına sabitlendi. Çizelge 2.1’de belirtildiği şekilde hazırlanan 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 yığma 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 çıkarıldı. Kuyucuklar önce saf suyla sonra tank tamponuyla yıkandı. Polimerize 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 (66.2.0 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 soğutulularak 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 1cm kalana kadar devam edildi. Daha sonra akım kesilerek yürütme durduruldu. Cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı yığma jeli kesilip ayrıldıktan sonra protein bantlarını içeren ayırma jeli renklendirme çözeltisi içine konuldu ve 1,5-2 saat kadar çalkalayıcı üzerine bırakıldı. Daha sonra jel renklendirme çözeltisinden çıkartılarak 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.

### 3. BULGULAR

#### 3.1 Enzimin Saflaştırılması

##### 3.1.1 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 [65] aşağıda verilen formülle tespit yapıldı:

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

V : Serum hacmi

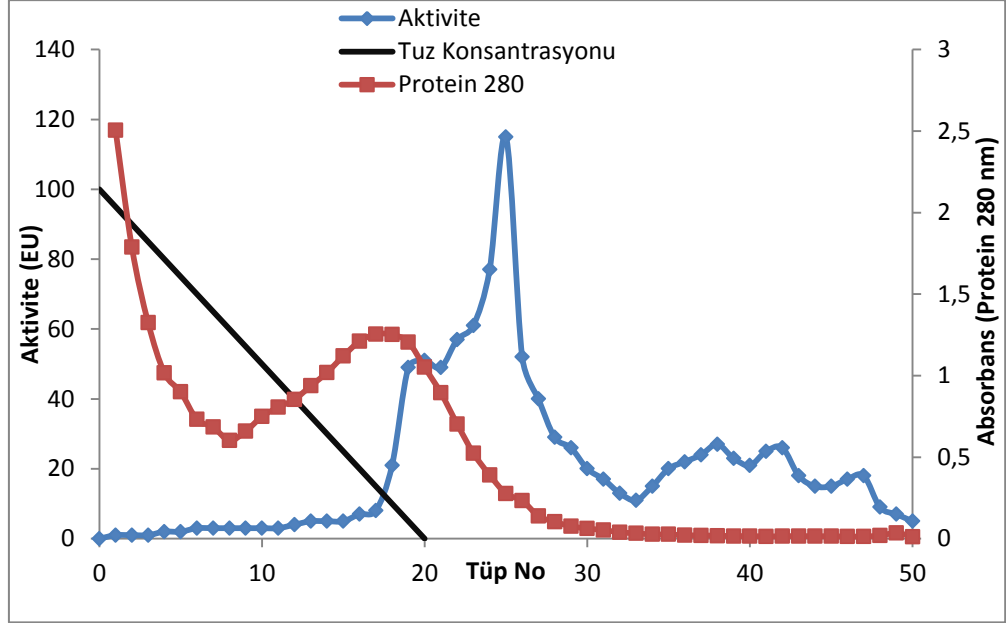
S<sub>1</sub> : 1'in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğu

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

##### 3.1.2 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile Enzimin Saflaştırılması

Bölüm 2.2.4.2'de belirtildiği şekilde hazırlanan hidrofobik etkileşim kolonu önce 1M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içeren 0,1 M Tris-HCl pH 8 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 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içeren 0,1 M Tris-HCl pH 8 tamponu ve 0,1 M Tris-HCl pH 8 tamponu ile oluşturulan yüksek tuz konsantrasyonundan düşük tuz konsantrasyonuna doğru tuz gradienti uygulandı. Alttan 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 tamponu kör olarak kullanılarak her bir tüpte 280 nm'de kalitatif protein tayini ve 412 nm'de aktivite tayini yapıldı. Elde

edilen değerlerin tp numarasına karşı aktivite ve protein miktarı grafiği çizildi (şekil 3.1).



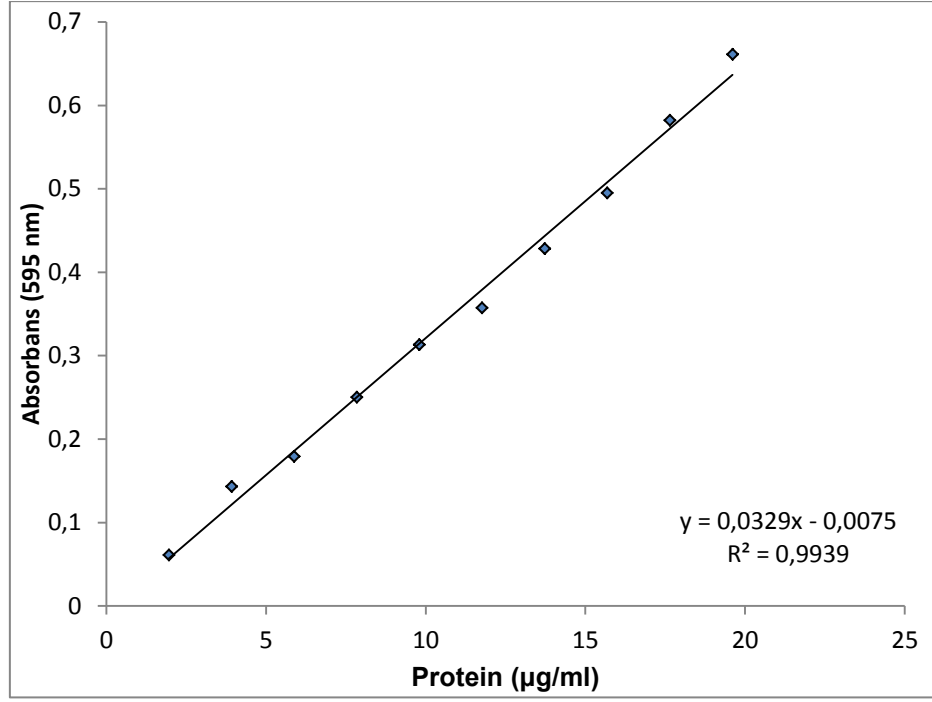
**şekil 3.1:** Hidrofobik etkileşim kolonundan PON1 enziminin elsyon grafiği (kolondaki jel ykseklęi 5 cm ve çap 1 cm)

### 3.1.3 Kantitatif Protein Tayini için Hazırlanan Standart Eğri

Hidrofobik etkileşim kromatografisi sonunda enzim aktivitesine rastlanan tpler birleştirildi. Kolona tatbik edilen numune ve birleştirilen elat czlteleri için Bradford metoduyla kantitatif protein tayini yapıldı. Daha sonra aktivite tayinleri yapılarak spesifik aktiviteler ve saflaştırma oranları tespit edildi. Sonuçlar şekil 3.1'de verildi.

Serumdan elde edilen enzim czltisi ve saflaştırma basamakları sonundaki enzim czltilerinin protein miktarları bu standart grafiğe gre belirlendi. Standart czltideki mg proteine karşılık gelen absorbans değerleri şekil 3.2'de gsterilmiştir.





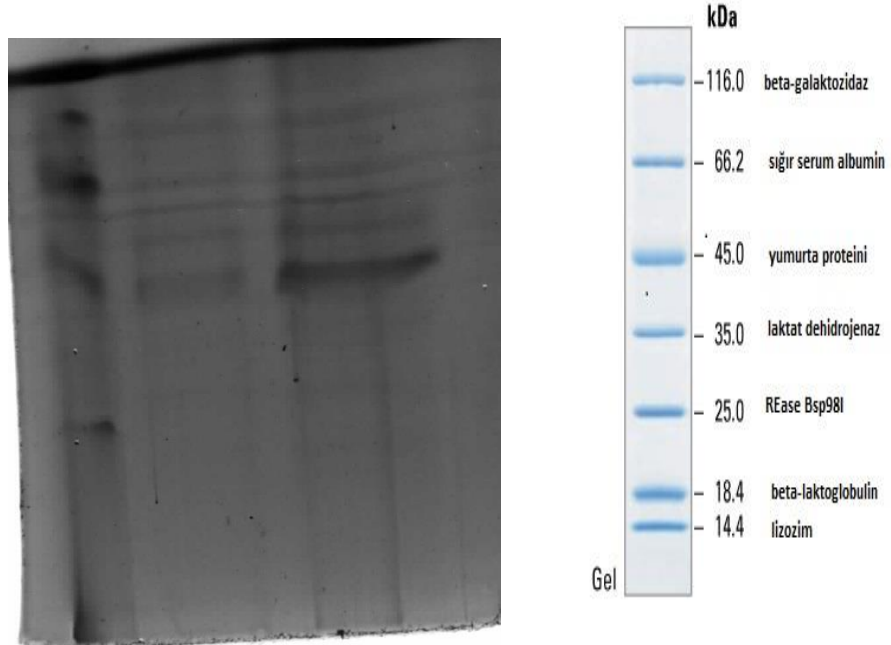
Şekil 3.2: Bradford yöntemi ile protein miktarının tayin edilmesinde kullanılan standart grafik

**Tablo 3.1:** PON için saflaştırma tablosu

| <b>Saflaştırma Basamağı</b>                | <b>Hacim (ml)</b> | <b>Aktivite (U/ml)</b> | <b>Toplam Aktivite (U/ml)</b> | <b>Protein Miktarı (mg/ml)</b> | <b>Toplam Protein (mg)</b> | <b>Spesifik Aktivite (U/mg)</b> | <b>% Verim</b> | <b>Saflaştırma Derecesi</b> |
|--|-------------------|------------------------|-------------------------------|--------------------------------|----------------------------|---------------------------------|----------------|-----------------------------|
| <b>Serum</b>                               | 32                | 28,24                  | 903,68                        | 33,71                          | 1078,72                    | 0,84                            | 100            | -                           |
| <b>Amonyum Sülfat Çöktürmesi</b>           | 11                | 43,60                  | 479,60                        | 35,24                          | 387,64                     | 1,24                            | 53,07          | 1,48                        |
| <b>Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi</b> | 2                 | 73,07                  | 146,14                        | 0,129                          | 0,258                      | 566,43                          | 16,17          | 674                         |

### 3.2 Serum Paraoksonaz enziminin SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi

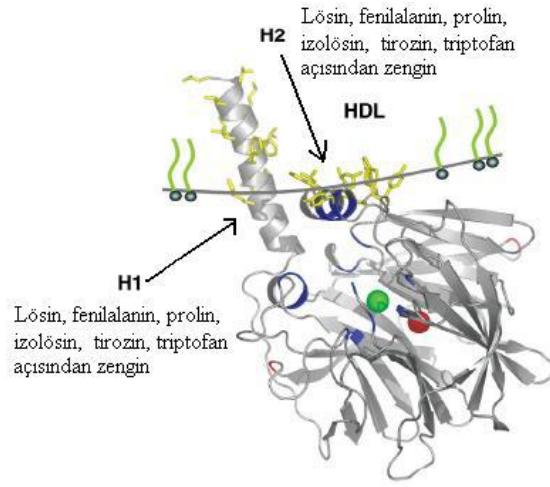
Hidrofobik etkileşim kolonundan saflaştırılan serum paraoksonaz enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla bölüm 2.2.5’de anlatıldığı şekilde hazırlanan SDS poliakrilamid jel elektroforezine serumdan saflaştırılan paraoksonaz enzim numunesi tatbik edildi. Protein bantları içeren jellerin görüntüleri jel görüntüleme sistemi ile bilgisayara aktarıldı (Şekil 3.3).



**Şekil 3.3:** Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılan paraoksonaz enziminin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi. Molekül ağırlık standartları; ( $\beta$ -galaktosidaz (116.0 kDa), sığır serum albumin (66.2 kDa), yumurta albumini (45.0 kDa), laktat dehidrojenaz (35.0 kDa), REase Bsp981 (25.0kDa), beta-laktoglobulin (25.0kDa) ve lizozim (14.4kDa), saf PON1 (43.0 kDa).

#### 4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, detoksifikasyon ve antioksidan aktivitesi ile metabolizmada önemli fizyolojik fonksiyona sahip Paraoksonaz 1 (PON1) enziminin hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılması için yeni bir jel sentezlenmiştir. Sepharose-4B-Ltirozin-1-aminoantresen kimyasal yapısına sahip bu jel kullanılarak insan serumundan PON1 saflaştırılıp elektroforetik özellikleri incelenmiş ve yeni jelden elde edilen veriler diğer jellerle kıyaslanmıştır.



**Şekil 4.1:** PON1 enziminin HDL yüzeyine bağlanma modeli [18].

Paraoksonaz 1 (PON1) enziminin hidrofobik karakteri bu tekniğin seçilmesinde en önemli nedeni oluşturmuştur. Söz konusu enzim, N terminal bölgesinde bulunan H1 ve H2 heliks yapısı olarak isimlendirilen hidrofobik yapılar ile HDL'ye bağlanmaktadır (Şekil 4.1) [18,65]. N-terminal bölgesini lösin, fenil alanin, prolin, izolössin, 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 [61,65].

Bu kromatografinin temel prensibi, yüksek tuz derişiminde saflaştırılacak biyomolekülde bulunan hidrofobik yüzey ile apolar ligand arasındaki hidrofobik etkileşimdir. Bu etkileşimin gerekçesi artan entropi ile açıklanmaktadır. Bu

teknikte ligand ve matriks yapısının son derece önemli olduğu rapor edilmiştir. Kullanılacak ligantın hidrofobik karakteri kritik bir öneme sahiptir. Düşük hidrofobik karaktere sahip ligandlar kullanıldığı zaman ayrılacak moleküllerin kolonda etkileşimini sağlayabilmek için yüksek tuz konsantrasyonu uygulama zorunluluğu vardır. Bu durumda proteinlerin kendi aralarında hidrofobik etkileşim riski daha fazladır. Yüksek hidrofobik karaktere sahip ligand tercih edildiği durumda ise saflaştırılacak molekül ile ligand arasındaki etkileşim artacağı için elüsyon sırasında problemler ortaya çıkabilir [62]. Genellikle ticari olarak bulunan hidrofobik etkileşim kromatografi jellerinde hidrofobik uç olarak düz zincirli alkil ligandları ve aril ligandları gibi moleküller kullanılmaktadır [63]. Bunlardan isopropil, butil, oktil ve fenil bileşikler en çok tercih edilen ligandlardır. En popüler hidrofobik etkileşim jelinin fenil-sepharose olduğu literatürde görülmektedir [62]. Düz zincirli alkil ligandları saf hidrofobik karakter gösterirken, aril ligandlarında hem hidrofobik hem de aromatik etkileşimler gözlenir. Bu amaçla çalışmamızda ligand olarak 1-aminoantresen bileşiği tercih edilmiştir.

Hidrofobik etkileşim kromatografisinde kullanılan tuzun tipi ve derişimi de oldukça önemlidir. Bu kromatografide yaygın olarak kullanılan tuzlar  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NaBr}$  ve  $\text{NaSCN}$  olmasına rağmen  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  en çok tercih edilendir [64].

PON1 insan serumundan saflaştırmak için hidrofobik etkileşim kromatografisi uygulanmadan önce bu kromatografi prosedürüne uygun ön saflaştırma yöntemi olarak amonyum sülfat çöktürmesi yapılmıştır. Amonyum sülfat çöktürme aralığı %60-80 olarak literatürdeki gibi gerçekleştirilmiştir [65].

Hidrofobik etkileşim kromatografisinde kullanılan jel, ardışık üç basamakta sentezlenmiştir. Önce matriks olarak seçilen Sepharose-4B, CNBr ile aktifleştirilmiştir ve buna uzantı kolu olarak L-tirozin bağlanmıştır. Daha sonra, diazolanmış 1-aminoantresen bileşiği eklenmiştir. Sepharose-4B'nin matriks olarak seçilmesinin başlıca sebebi çok iyi akış özelliğine sahip olması ve ayrıca serbest -OH grupları taşıdığından, CNBr ile çok kısa bir süre içerisinde aktifleştirilebilmesidir. Bu amaçla literatürde karbodiimid bileşiklerinin de kullanıldığı çalışmalar bulunmaktadır [67]. Karbodiimid ile aktifleştirilmiş matrikse primer amin grubunun bağlanır ve amid bağı oluşur. Bu bağ kromatografi

işlemlerinde dayanıklıdır, fakat aktifleştirilme sırasında jel, pH 4,5’da 24 saat süre ile karıştırılması işlemi kromatografi sırasında jelin akış özelliklerini olumsuz yönde etkilemektedir [67]. Başka bir matriks aktifleştirme işleminde epoksi bileşikleri kullanılmıştır [68]. Kromatografi işlemlerinde gayet dayanıklı olan bu yapılar, 16 saat aktifleştirme ve 16 saat ligand bağlama süresi olmak üzere toplam 32 saatte gerçekleşmektedir. Uzun süre alan bu karıştırma işlemleri, polisakkarit partiküllerinin fiziksel yapısının deformasyonuna sebep olabilir. Sonuç olarak, hazırlanacak hidrofobik jelin akış özellikleri olumsuz yönde etkilenecektir.

Çalışmamızda kullanılan CNBr ile aktifleştirme işlemi yaklaşık 5 dakika kadar kısa bir sürede gerçekleştirilmektedir. Böylece jelin fiziksel yapısındaki deformasyon sakıncaları ortadan kaldırılmıştır. Yeni hidrofobik jel, paraoksonaz enziminin saflaştırma aşamalarının sayısını azaltmak ve yüksek bir saflaştırma katsayısıyla enzimi saflaştırmak için sentezlenmiştir.

Araştırmamızda matriks olarak seçilen Sepharose-4B’ye hidrofobik ligand olan 1-aminoantresen L-tirozin bileşiği aracılığı ile immobilize edilmiştir. Burada L-tirozin uzantı kolu olarak da görev yapmaktadır ve ligandın matrikse bağlanmasında da son derece uygun bir adaptör moleküldür.

Düz zincirli alkil ligandları saf hidrofobik karakter gösterirlerken, aril ligandlarında hem hidrofobik hem de aromatik etkileşimler gözlenir. Bu amaçla çalışmamızda ligand olarak 1-aminoantresen bileşiği kullanılmıştır. PON1 enziminin H1 ve H2 bölgelerinde fenil alanin, tirozin, triptofan gibi aromatik aminoasitlerin bulunması seçilen ligandın söz konusu bölgelerle hem hidrofobik hem de aromatik etkileşim yapacağı göz önüne alınarak, oldukça uygun bileşik olduğu kanaatini uyandırmaktadır.

PON1 enziminin hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılması ilk olarak Sinan ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada hidrofobik karaktere sahip Sepharose-4B-L-tirozin-2-naftilamin jeli kullanılmıştır ve enzim 227 kat saflaştırılmıştır [65]. Yapılan bir diğer çalışmada Sepharose-4B-L-tirozin-2-naftilamin jeli modifiye edilerek geliştirilirken, saflaştırma işlemi sırasında, ek olarak uygulanan iki basamak sonucunda enzim 302 kat saflaştırılmıştır [69]. Basit kromatografik yöntemler kullanılan bir başka çalışmada iyon değişim ve jel filtrasyon kromatografisi kullanılırken enzim yaklaşık 225 kat saflaştırılmıştır [70].

M. Şentürk ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ise TritonX-100 ile muamele edilen serum, basit kromatografik yöntemlerin uygulanmasından sonra Sepharose-4B-anilin-2-naftilamin jeli ile saflaştırma uygulanmış ve işlem sonunda enzim 394,3 kat saflaştırılmıştır [71]. Gençer ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada ise ligand olarak hidrofobik karakteri 2-naftilamin'den daha büyük olan 9-aminofenantren bileşiği kullanılmıştır ve PON1 enzimi 526 kat saflaştırılmıştır [72]. Bu çalışma sonucu insan serumundan PON1 enzimi sentezlenen jel ile 674 kat saflaştırılmış, amaçlanan yüksek saflaştırma derecesine ulaşılmıştır.

Sinan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada PON1 enzimi %72,54 verimle 227 kat saflaştırılmış, basit kromatografik yöntemler kullanılan çalışma ile karşılaştırıldığında elde edilen saflaştırma katsayısının yaklaşık aynı olduğu fakat verim %39,8 ile Sinan ve arkadaşlarının çalışmasına göre daha düşüktür. Sinan ve ark. kullandığı yöntemin bir diğer avantajı saflaştırmanın 3 adımda yapılmasıdır. Daha kısa yoldan ve daha yüksek verimle aynı saflaştırma katsayısına ulaşılması Sinan ve ark. kullandığı yöntemin daha iyi olduğu kanaatini uyandırmaktadır.

M. Şentürk ve ark. tarafından, Sinan ve arkadaşlarının sentezlediği HEK jelini modifiye ederek yaptıkları bir çalışmada PON1 enzimi %37,74 verimle 394 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırma katsayısının artırılması için Sinan ve arkadaşlarının izlediği yoldan farklı olarak Amonyum Sülfat çöktürmesi öncesi Triton-X ile muamele edilen serum üçüncü basamakta jel filtrasyon kromatografisinden geçirilmiştir. Son basamakta uzantı kolu anilin olarak modifiye edilen ve ligandı 2-Naftilamin olan HEK jeli ile saflaştırılmıştır. M. Şentürk ve ark. tarafından ilk iki saflaştırma metodlarından oluşturulan bu yöntemde yaşanan verim düşmesine rağmen saflaştırma katsayısı yaklaşık iki kat artarak 394 olmuştur.

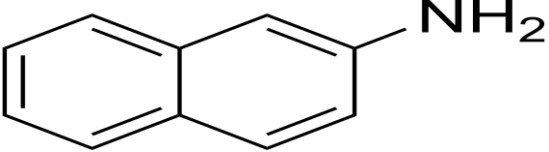
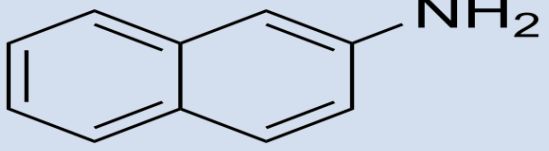
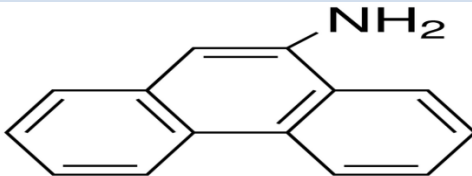
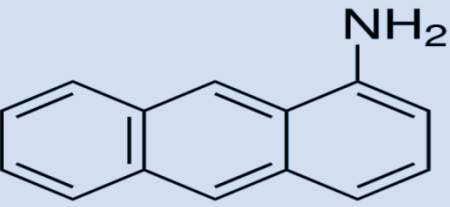
Gençer ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, Sinan ve ark. bulduğu yöntem izlenirken HEK jelinde ligant olarak 9-aminofenantren kullanılmış, 2-naftilamine göre yapısında fazladan 1 aromatik halka bulunduran ligandın PON1 enzimini daha iyi saflaştıracağı düşünülmüştür. Nitekim PON1 enziminin H1 ve H2 bölgelerinde fenil alanin, tirozin, triptofan gibi aromatik aminoasitlerin bulunması, 9-aminoantresenin söz konusu bölgelerle hem hidrofobik hem de aromatik olarak daha fazla etkileşimde bulunacağı kanaatini uyandırmaktadır. Gençer ve ark. yaptıkları

çalışmada %14,74 verimle PON1 enzimini 526 kat saflaştırmış, elde ettikleri düşük verime rağmen hedefledikleri yüksek saflaştırma katsayısına ulaşmışlardır.

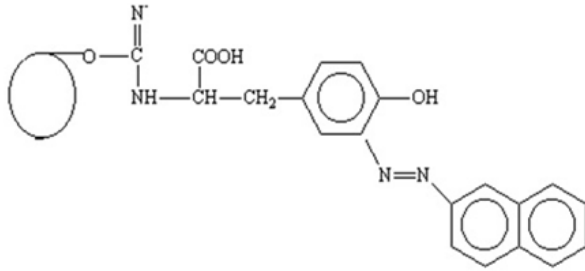
Araştırmamızda Gençler ve ark. ile benzer şekilde Sinan ve ark. bulduğu metod izlenirken HEK jelinde ligant olarak 1-aminoantresen kullanılmıştır. 9-aminofenantren gibi 1-aminoantresen de 2-naftilaminle kıyaslandığında fazladan 1 aromatik halka bulunurken 9-aminofenantren'e göre düz yapıda olması, bizde PON1 ile hem hidrofobik hem de aromatik olarak daha fazla etkileşimde bulunabileceği kanaatini uyandırmıştır. Nitekim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuç %16,17 verim ve 674 saflaştırma katsayısı olarak gerçekleşmiş, sentezlenen Sepharose-4B-L-Tirozin-1-Aminoantresen HEK jeli PON1'i en yüksek saflaştırma katsayısıyla saflaştıran jel olarak literature gireceği kanaatindeyiz.



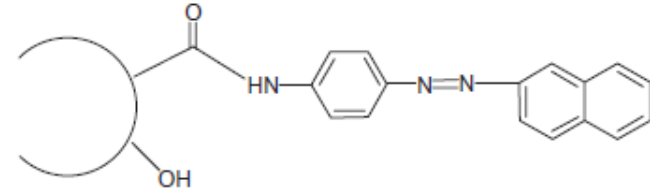
**Tablo 4.1:** Literatürdeki Saflaştırma Metodları

| Saflaştırma Basamakları  | Ligant   | Verim (%) | Saflaştırma Katsayısı | Referans   |
|--|--|-----------|-----------------------|------------|
| - Triton-X içeren serum<br>-Amonyum Sülfat<br>-İyon değişim Kromatog.<br>-Jel filtrasyon Kromatog. | Yok  | 39.8      | 225                   | [70]       |
| -Serum<br>-Amonyum Sülfat<br>-Hidrofbik Et. Kromatog.  |    | 72.54     | 227                   | [65]       |
| - Triton-X içeren serum<br>-Amonyum Sülfat<br>-İyon değişim Kromatog.<br>-Hidrofbik Et. Kromatog.  |    | 37.74     | 394                   | [71]       |
| -Serum<br>-Amonyum Sülfat<br>-Hidrofbik Et. Kromatog.  |   | 14,74     | 526                   | [72]       |
| -Serum<br>-Amonyum Sülfat<br>-Hidrofbik Et. Kromatog.  |  | 16.17     | 674                   | Bu çalışma |

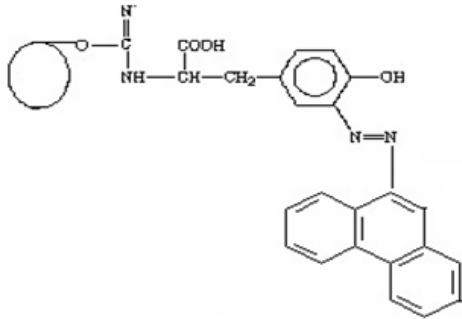
**Tablo 4.2:** Sepharose-4B-L-tirozin-1-aminoantresen ve Diğer Jeller



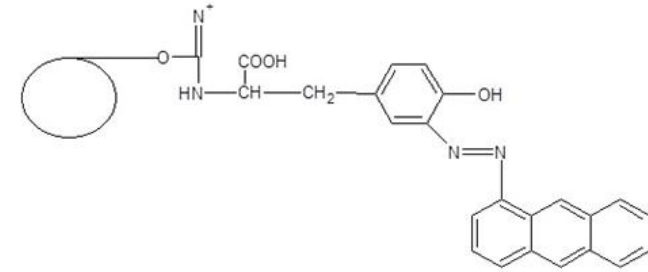
Sepharose-4B-L-Tirozin-2-Naftilamin [65]



Sepharose-4B-Anilin-2-Naftilamin [71]



Sepharose-4B-L-Tirozin-9-Aminofenantren [72]



Sepharose-4B-L-Tirozin-1-Aminoantresen [Bu Çalışma]

Çalışmamızda saflaştırılan enzim için SDS-PAGE uygulanmıştır. Molekül ağırlığı yaklaşık 43 kDa olarak tahmin edilen PON1 tek bant olarak SDS-PAGE jeline gözlenmiştir. Bu değer literatüre uygunluk göstermektedir. PON1'in minimum molekül ağırlığı Gan ve arkadaşları tarafından 43 kDa olarak belirlenmiştir [16].

Sonuç olarak yapılan çalışmalarda aşağıdaki bulgular elde edilmiştir;

- ✓ İnsan serum PON1 enzimini saflaştırmak için Sepharose 4B-L-tirozin-1-aminoantresen kimyasal yapısına sahip yeni bir hidrofobik etkileşim kromatografisi jeli sentezlenmiştir.
- ✓ Sepharose 4B-L-tirozin-1-aminoantresen yapısına sahip hidrofobik jel kullanılarak insan serumundan PON1 enzimi 674 kat gibi yüksek bir oranda saflaştırılarak bilenen diğer hidrofobik jellerden daha yüksek oranda saflaştırma verimi elde edilmiştir.
- ✓ Amonyum sülfat çöktürmesi ve hidrofobik etkileşim kromatografisi yöntemi ile saflaştırılan PON1 enziminin SDS-PAGE elektroforezinde yaklaşık 43 kDa molekül ağırlığında tek bant elde edilmiştir.

## 5. KAYNAKLAR

- [1] Aldridge, W. N., "An Enzyme Hydrolysing Diethyl *p*-Nitrophenyl Phosphate (E600) and Its Identity with The A-Esterase of Mammalian Sera", *Biochem J.*, 53, 117-124, (1953).
- [2] Durrington, P. N., Mackness, B. and Mackness M. I., "Paraoxonase and Atherosclerosis". *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 21, 473-480, (2001).
- [3] Ng, C. J., Shih, D. M., Hama, S. Y., Villa, N., Navab, M. and Reddy, S. T., "The Paraoxonase Gene Family and Atherosclerosis", *Free Radical Biology & Medicine*, 38, 153-163, ( 2005).
- [4] Mackness, M. I., B. M., Mackness, B. and Durrington, P. N., "Paraoxonase and coronary heart disease". *Atherosclerosis Supplements*, 3, 49-55, (2002).
- [5] Azarsız, E. and Sözmen, E. Y., "Paraoksonaz ve Klinik Önemi", *Türk Biyokimya Dergisi*, 25 (3), 109-119, (2000).
- [6] Uriel, A., "Characterization of cholinesterase and other carboxylic esterases after electrophoresis and immunoelectrophoresis on agar. I. Application to the study of esterases of normal human serum". *Am Insit Pasteur*, 104-119, (1961).
- [7] Mackness, M. I., Mackness, B., Durrington, P. N., Connelly, P. W. and Hegele, R. A., "Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins". *Current Opinion in Lipidology*, 7, 69-76, (1996).
- [8] Erdem, M.S.T.İ. "ST Elevasyonlu Miyokard İnfarktüsü (Stemi) Hastalarda İnsan Paraoxonase Geni Met-Leu/55 Polimorfizmi." Dr. Siyami Ersek Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Merkezi, İstanbul, (2004).
- [9] Mackness B., D.P.N., Mackness M.I, "Human Serum Paraoxonase", *Gene Pharmacy*, 31(3) , 329-36, (1998).

- [10] Robertson, K. S., Emma, H. I., George, J. M., Philippa, J. T., Steve, E. H., "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, 203-212, (2003).
- [11] Draganov, B.N.L.D., "Pharmacogenetics of Paraoxonases: A Brief Review". *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 369, 78–88, (2004).
- [12] Liang, H.-L.L.D.-P.L.C.-C., "Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress, and diseases." *J. Mol. Med.*, 81, 766-779, (2003).
- [13] 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*, 379-388, (1999).
- [14] Harel, M. A., Leonid Gaidukov, Brumshtein, B., Kherksonsky, O., Meged, R., Dvir, H., Ravelli, R. B. G., McCarthy, A., Toker, L., Silman, I., Susman, J. L., Tawfik, D. S., "Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes". *Nature Structural & Molecular Biology*, 412-419, (2004).
- [15] Mackness, B. and Michael I., "The Paraoxonase Gene Family and Coronary Heart Disease", *Current Opinion in Lipidology*, 13, 357-362, (2002).
- [16] 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), 100-6, (1991).
- [17] Kuo C.L. & La Du, B.N., "Calcium binding by human and rabbit serum paraoxonases. Structural stability and enzymatic activity", *Drug Metab. Dispos.*, 26, 653-60, (1998).
- [18] Scharff, E.I., Koepke, J., Fritzch, G., Lucke, C. and Ruterjans, H., "Crystal structure of diisopropylfluorophosphatase from *Loligo vulgaris*", *Structure*, 9, 493-502, (2001).
- [19] Josse, D.e.a., "Oligometric States of The Detergent-Solubilized Human Serum Paraoxonase (PON1)", *J. Biol. Chem.*, 277, 33386-97, (2002).

- [20] Borhani, D.W., Rogers, "Crystal Structure Oftruncated Human Apolipoprotein A-I Suggests A Lipid Bound Conformation", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 12291-96, (1997).
- [21] Sinan,S., Doktora Tezi, "İnsan Serum Paraoksonaz Enziminin (PON1) Expressiyonu, Saflaştırılması ve Bazı İlaçların Enzim Üzerine Etkilerinin Araştırılması" Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, (2005).
- [22] Blatter Garin, M. C., Abbot, C., Messmer, S., Mackness, M. I., Durrington, P., Pometta, D., James, R. W., "Quantification of Human Serum Paraoxonase by Enzyme Linked Immunoassay: Population Differences in Protein Concentrations". *Biochem. J.*, 304, 549–554, (1994).
- [23] Hassett, C., Richter, R. J., Humbert, R., Chapline, C., Crabb, J. J., Omiecinski, C. J., Furlong, C., "Characterisation of cDNA Clones Encoding Rabbit and Human Serum Paraoxonase: The Mature Protein Retains Its Signal Sequence", *Biochemistry*, 30, 10141– 10149, (1991).
- [24] Sorenson, R.C.B., C. L., Aviram, M., Hsu, C., Billecke, S., La Du, B. N., "Human serum paraoxonase/arylesterase's retained hydrophobic N-terminal leader sequence associates with HDLs by binding phospholipids: apolipoprotein A-I stabilizes activity", *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 19, 2214– 2225, (1999).
- [25] Oda, M.N.B., J. K.; Berger, T.; Forte, T. M., "Cysteine substitutions in apolipoprotein A-I primary structure modulate paraoxonase activity". *Biochemistry*, 40, 1710– 1718, (2001).
- [26] Deakin, S., Leviev, I., Gomaraschi, M., Calabresi, L., Franceschini, G., 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.*, 277, 4301– 4308, (2002).
- [27] Hahn, M., Subbih, M. T., "Significant association of lipid peroxidation products with high density lipoproteins", *Biochem Mol Biol Int*, 33, 699-704, (1994).

- [28] 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).
- [29] Lusis, A.J., "Atherosclerosis", *Nature*, (2000) 407, 233., 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", *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* 21, 1451, (2001).
- [30] Billecke, S., Draganov, D., Cuncell, 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.*, 28 (11), 1335, (2000).
- [31] Biggadike, K., Angell, R.M., Burgess, C.M., Farrell, R.M., Hancock, A.P., Harker, A.J., Irving, W.R., Ioannou, C., Panayiotis, A., Procopiou, P.A., Shaw, R.E., Solanke, Y.E., Singh, O.M.P., Snowden, M.A., Stubbs, R.J., Walton, S. and Weston, H.E., "Selective plasma hydrolysis of glucocorticoid lactones and cyclic carbonates by the enzyme paraoxonase: An ideal plasma inactivation mechanism", *J. Med. Chem.* 43, 19, (2000).
- [32] Teiber, J.F., Draganov, D.I., La Du, B.N., "Lactonase and Lactonizing of Human Serum Paraoxonase (PON1) and Rabbit Serum PON3", *Biochemical Pharmacology*, 66, 887, (2003).
- [33] 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*, 101, 2510, (2000).
- [34] Jakubowski, H., "Calcium-dependent human serum homocysteine thiolactone hydrolase. A protective mechanism against protein N-homocysteinylation", *J. Biol. Chem.*, 275, 3957, (2000).

- [35] Kearny, A.S, Crawford, L.F., Mehta, S.C. and Radebaugh, G.W., "The interconversion kinetics, equilibrium, and solubilities of the lactone and hydroxyacid forms of the HMG-CoA reductase inhibitor, CI-981", *Pharm. Res.*, 10, 1461, (1993).
- [36] 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.*, 60, 396, (1971).
- [37] Augustinsson, K.B., Homologous enzymes and biochemical evolution, (eds) In: Van Thoai N., Roche J., Gordon and Breach, New York, (1968), 299-311.
- [38] 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.*, 18, 1617, (1998).
- [39] 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.*, 101(81), 1581, (1998).
- [40] 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*, 92, 7187, (1995).
- [41] 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*, 119-120, 235, (1999).
- [42] 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* 18, 138, (1990).



- [43] Tang, B.K. and Kalow, W., "Variable activation of lovastatin by hydrolytic enzymes in human plasma and liver", *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 47, 449, (1995).
- [44] 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.*, 26, (4), 355, (1998).
- [45] La Du, B.N., "Human serum paraoxonase/arylesterase, In Pharmacogenetics of Drug Metabolism", ed. Kalow, W., Pergamon Pres, New York, p.51, (1992).
- [46] Costa, L.G., Li, W.F., Richter, R.J., "PON1 and organophosphate toxicity", 165–83, (2002).
- [47] 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*, 167, (1991).
- [48] 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 Genetics*, 14, 334, (1996).
- [49] Reiner, E., Aldridge, W.N., Hoskin, F.C.G., "Enzymes Hydrolyzing Organophosphorus Compounds", John Wiley & Sons, New York, (1989).
- [50] Baillie, T.A., Moldeus, P., Mason, R.P. Younes, M., "Enzymes Interacting with Organophosphorus Compounds", *Elsevier Scientific Publishers Ireland Ltd*, Shannon, (1993).
- [51] Eckerson, H.W., Wyte, C.M. and La Du, B.N., "The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism", *Am. J. Hum. Genet.*, 35, 1126, (1983).
- [52] 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*, 100, 13, (1993).

- [53] Mazur, A., "An Enzyme In Animal Tissues Capable of Hydrolyzing The Phosphorus-Fluorine Bond of Alkyl Fluorophosphates" *J. Biol. Chem.* 164, 271-289, (1946).
- [54] Mounter, L.A., Floyd, C.S. and Chanutin, A., "Dialkylfluorophosphatase of Kidney I. Purification And Properties", *J. Biol. Chem.* 204, 221-232, (1953).
- [55] Main, A. R., *Can. J. Biochem. Physiol.* 34, 197-216, (1956).
- [56] 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.*, 87, 35, (1993).
- [57] Furlong, C.E., Richter, R.J., Chapline, C. and Crabb, J.W., "Purification of Rabbit and Human Serum Paraoxonase", *Biochemistry*, 30, 10133, (1991).
- [58] 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*, 135, 93, (1973).
- [59] Gil, F., Pla, A., Gonzalvo, M.C., Hernández, A.F. and Villanueva, E., "Partial purification of paraoxonase from rat liver", *Chem. Biol. Interact.*, 87, 69, (1993).
- [60] Bradford M., "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal. Biochem.*, 72, 248-251, (1976).
- [61] Jakoby, B., Wilchek, M., "Coupling reaction of ligands and general methodology of affinity chromatography", *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York, (1974).
- [62] Robyt, J.F., White, B.J., "Biochemical Techniques Theory and Practice", Waveland Press, Inc. p:98, (1990).

- [63] Aguiar, J.A.K. and Michelacci, Y.M., "Preparation and purification of Flavobacterium heparinum chondroitinases AC and B by hydrophobic interaction chromatography", *Braz J Med Biol Res*, 32(5) 545-550, (1999).
- [64] Gan, K.N., Smolen A., Eckerson H.W., La Du B.N., "Purification of Human Serum Paraoksonase/Arylesterase, Evidence for One Esterase Catalyzing Both Activities", *Drug Metab. Dispos.*, 19 (1), 100-6 116, (1991).
- [65] Sinan, S., Kockar, F. and Arslan, O., "Novel purification strategy for human PON1 and inhibition of the activity by cephalosporin and aminoglikozide derived antibiotics", *Biochimie*, 88, 565-574, (2006).
- [66] Laemmli, D. K., "Cleavage of Structural Proteins During in Assembly of the Head of Bacteriophage T<sub>4</sub>". *Nature*, London, 227, 680, (1970).
- [67] Keha, E., "Karbonik anhidraz enziminin saflastırılması için geliştirilmiş bir afinite kromatografisi metodu" Doçentlik Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Erzurum, (1981).
- [68] Wistrand, P. J., Lindahl, S. and Wahlstrand, T., "Human renal carbonic anhydrase. Purification and properties", *Eur J. Biochem.*, 57, 189, (1975).
- [69] Ekinci, D., Şentürk, M., Beydemir, Ş., Küfrevioğlu, Ö. İ., "Supuran, C., T., "An Alternative Purification Method for Human Serum Paraoxonase 1 and its Interactions with Sulfonamides" *Chem. Biol. Drug Des*, 76, 552–558, (2010).
- [70] Ekinci, D., Beydemir, Ş., Ateş, O., "In Vitro Effects of Dexamethasone on Human Serum Paraoxonase-I (PON1) Activity" *Hacettepe J. Biol. & Chem.*, 37 (3), 197-205, (2009).
- [71] Ekinci, D., Beydemir, Ş., Şentürk, M., Alici, H. A., "Paraoxonase-1, an organophosphate detoxifier and cardioprotective enzyme, is inhibited by anesthetics: An in vitro and in vivo insight" *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 101, 206–211, (2011).
- [72] Gençer, N., Colak, U., "Immobilization of paraoxonase onto chitosan and its characterization" *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 40, 290-295, (2012).