

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PARAOKSONAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILARAK
GRELİN HORMONUNA KARŞI KİNETİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Uğur AŞKIN

Tez Yöneticisi:
Prof. Dr. Fikret KARATAŞ

DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

ELAZIĞ, 2009

TC.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PARAOKSONAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILARAK
GRELİN HORMONUNA KARŞI KİNETİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Uğur AŞKIN

Doktora Tezi, Kimya Anabilim Dalı

Bu tez, 11.09.2009 tarihinde aşağıda belirtilen jüri tarafından oybirliği ile başarılı olarak değerlendirilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Fikret KARATAŞ

Üye: Prof. Dr. Necmi ÖZDEMİR

Üye: Prof. Dr. İhsan HALİFEOĞLU

Üye: Prof. Dr. İsmet YILMAZ

Üye: Prof. Dr. Sinan SAYDAM

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun..... /..... /..... tarih vesayılı kararıyla onaylanmıştır.

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmalarım suresince benden hiçbir zaman yardımlarını ve desteğini esirgemeyen hocam Sayın Prof. Dr. Fikret KARATAŞ'a teşekkür ederim.

Çalışmalarım suresince desteğini esirgemeyen, fikirlerinden ve tecrübelerinden yararlandığım İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalından hocam Sayın Prof. Dr. Yusuf TRKZ'e teşekkür ederim.

Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Bölümü laboratuarlarında bana çalışma fırsatı veren Sayın Doç. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ, Doktorantlar Nurettin ANAKOğLU ve Engin BERBER'e teşekkür ederim.

Bu çalışmada maddi desteğini esirgemeyen ve 1447 numaralı projeye destek olan FÜBAP'a teşekkür ederim.

Uğur AŞKIN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
İÇİNDEKİLER	I
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	IV
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	VI
SİMGELERİN LİSTESİ	VII
KISALTMALARIN LİSTESİ	VIII
ÖZET	X
ABSTRACT	XI
1. GİRİŞ	1
1.1. Enzimlerin Genel Özellikleri	1
1.2. Paraoksonaz Enzimi	3
1.2.1. Paraoksonaz Enziminin Yapısı ve Substratları	4
1.2.2. Paraoksonaz Enziminin Fonksiyonları	6
1.3. Grelın Hormonu	7
1.4. Protein Saflaştırma Yöntemleri	9
1.4.1. Homojenatın (Özütünün) Hazırlanması	10
1.4.2. Protein Çözeltilisinin Konsantre Edilmesi	12
1.4.3. İzolasyon ve Saflaştırma	14
1.4.3.1. Molekül Büyüklüğü Esasına Dayanarak Proteinlerin Ayrılması	14
1.4.3.2. Çözünürlük Farkına Göre Proteinlerin Saflaştırılması	15
1.4.3.3. Elektriksel Yük Esasına Dayanarak Proteinlerin Saflaştırılması	16
1.4.3.4. Seçimli Adsorbsiyon Esasına Dayanarak Proteinlerin Saflaştırılması	17
1.4.3.5. Afinite Kromatografisi	18
1.4.3.6. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi	18
1.5. Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi	19
1.6. Enzim Saflaştırmada Yapılacak Temel Analizler ve Aktivite Hesaplamaları	19
1.7. Araştırmanın Amacı	21
2. MATERYAL VE METOT	22
2.1. Materyal	22

2.1.1. Hayvan Materyali	22
2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	22
2.1.3. Kullanılan Alet ve Cihazlar	23
2.1.4. Kullanılan Çözeltiler	24
2.2. Metotlar	25
2.2.1. Sığır Karaciğer Dokusundan PON1 Enziminin Saflaştırılması	25
2.2.1.1. Karaciğer Örneğinin Homojenizasyonu (Özütleşmesi)	25
2.2.1.2. Homojenatın Ultrasantrifüj Edilmesi ve Çözülmesi	25
2.2.1.3. Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Diyaliz	26
2.2.1.4. DEAE-Sefaroz CL-6B İyon Değişim Kromatografisi	27
2.2.1.5. Sefadeks G-200 Jel Filtrasyonu Kromatografisi	28
2.2.2. Biüret Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini	28
2.2.3. PON1 Enziminin Aril Esteraz (ARE) Aktivite Tayini	30
2.2.4. SDS-PAGE (Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi) ile PON1 Enziminin Saflık Kontrolü ve Molekül Ağırlığının Tayini	31
2.2.5. Saflaştırılan PON1 Enziminin Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi	33
2.2.5.1. Değişen Fenilasetat Konsantrasyonlarının Enzim Aktivitesine Etkisi	33
2.2.5.2. Artan Enzim Miktarının Aktiviteye Etkisini İncelenmesi	33
2.2.5.3. Enzim Aktivitesinde Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi	34
2.2.5.4. Belirli Sıcaklıklarda İnkübasyon Süresine Bağlı Olarak Enzim Aktivitesindeki Değişimin Belirlenmesi	34
2.2.5.5. pH'nın Enzim Aktivitesine Etkisinin İncelenmesi	34
2.2.5.6. Saflaştırılan PON1 Enziminin Grelin Hormonu ile İlişkisi	35
3. BULGULAR	36
3.1. Saflaştırma Basamaklarında Ölçülen Protein Miktarları	36
3.2. PON1 Enziminin Saflaştırma Basamaklarında Ölçülen Aktivite Değerleri ...	37
3.2.1. Karaciğer Örneklerinin Homojenizasyonundan Elde Edilen Bulgular	39
3.2.2. Karaciğer Örneklerinin Ultrasantrifüjlenmesiyle Elde Edilen Bulgular	39
3.2.3. Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Diyaliz Sonrası Elde Edilen Bulgular	40
3.2.4. DEAE-Sefaroz İyon Değişim Kromatografisiyle Elde Edilen	

Bulgular	41
3.2.5. Sefadeks G-200 Jel Filtrasyonu Kromatografisiyle Elde Edilen	
Bulgular	42
3.3. SDS-PAGE (Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi) ile	
PON1 Enziminin Saflık Kontrolü ve Molekül Ağırlığının Tayininde	
Elde Edilen Bulgular	44
3.4. PON1 Enziminin Kinetik Özelliklerine Ait Bulgular	46
3.4.1. Değişen Fenilasetat Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesine Etkisi ..	46
3.4.2. Artan Enzim Miktarının Enzim Aktivitesine Etkisi	48
3.4.3. Enzim Aktivitesinde Optimum Sıcaklığın Belirlenmesine ait	
Bulgular	49
3.4.4. Belirli Sıcaklıklarda İnkübasyon Süresine Bağlı Olarak Enzim	
Aktivitesindeki Değişime ait Bulgular	50
3.4.5. pH'nın Enzim Aktivitesine Etkisinin İncelenmesine Ait Sonuçlar	51
3.4.6. Saflaştırılan PON1 Enzimi ile Grelin Hormonu Arasındaki Etkileşime	
Ait Bulgular	52
4. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	58
5. KAYNAKLAR	64
ÖZGEÇMİŞ	69

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 1.1. PON1 enziminin yapısı.....	5
Şekil 1.2. PON1 enziminin paraoksonu hidrolizi.....	6
Şekil 1.3. PON1 enziminin fenilasetatı hidrolizi.....	6
Şekil 1.4. İnsan, rat ve domuz grelinin yapısı.....	8
Şekil 1.5. Diyaliz tüpü (membranı).....	13
Şekil 3.1. Protein miktarı tayini için standart çalışma grafiği ve doğru denklemi.....	36
Şekil 3.2. 0,42 mM fenolün 255-282 nm arası ölçülen absorbans değerleri grafiği.....	38
Şekil 3.3. DEAE-Selüloz iyon değişim kromatografisi saflaştırma basamağından sonra (ilk çalışmaya ait) alınan numunelerin, sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS-PAGE) oluşturduğu elektroforegram.....	44
Şekil 3.4. Her bir saflaştırma basamağından sonra alınan numunelerin, sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS-PAGE) oluşturduğu elektroforegram.....	45
Şekil 3.5. Protein bandlarının molekül ağırlıklarının tespit edilmesinde kullanılan standard grafik.....	46
Şekil 3.6. Değişen fenilasetat konsantrasyonlarının enzim aktivitesine etkisini gösteren Michaelis-Menten grafiği.....	47
Şekil 3.7. Değişen fenilasetat konsantrasyonlarının enzim aktivitesine etkisini gösteren Lineweaver-Burk grafiği.....	48
Şekil 3.8. Artan enzim miktarının enzim aktivitesine etkisine ait grafik.....	49
Şekil 3.9. Enzim aktivitesinde optimum sıcaklığın belirlenmesine ait grafik.....	50
Şekil 3.10. PON1 enziminin 56 °C’ de bekleme süresine bağlı aktivite kaybı.....	51
Şekil 3.11. pH’nın enzim aktivitesine etkisi.....	52
Şekil 3.12. Akış hızı 1 ml/dak ve pH:4 olan hareketli faz 50 mM NaClO ₄ çözeltisi kullanıldığında, 215 nm’deki 80 pg/ml aktif standart grelin hormonunun çalışma kromatogramı	53

Şekil 3.13. Akış hızı 1 ml/dak ve pH:4 olan hareketli faz 50 mM NaClO ₄ çözeltisi kullanıldığında, 215 nm'deki 80 pg/ml aktif grelin hormonu ile PON1 enzimi (v/v 1:1) karışımının 37 °C'daki 20 dakika inkübasyonuna ait çalışma kromatogramı	54
Şekil 3.14. 200 pg/ml Grelın varlığında değışen fenilasetat konsantrasyonlarının enzim aktivitesine etkisini gösteren Michaelis-Menten grafiği.....	55
Şekil 3.15. 200 pg/ml Grelın varlığında değışen fenilasetat konsantrasyonlarının enzim aktivitesine etkisini gösteren Lineweaver-Burk grafiği.....	56

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

	Sayfa No
Çizelge 2.1. En yüksek spesifik aktiviteyi belirlemek için çözeltiye eklenmesi gereken katı amonyum sülfat miktarları.....	26
Çizelge 2.2. Protein tayini için hazırlanan standart çözeltilerin bileşimi.....	29
Çizelge 2.3. Protein tayini için kullanılan çözeltilerin bileşimi	29
Çizelge 2.4. Ayırma ve yükleme jelinin bileşimi	31
Çizelge 2.5. Standart olarak kullanılan proteinler ve molekül ağırlıkları.....	32
Çizelge 2.6. Değişik konsantrasyonlarda hazırlanan fenilasetatın çözeltideki miktarları.....	33
Çizelge 2.7. Artan enzim miktarının aktiviteye etkisinin incelenmesi	34
Çizelge 3.1. Standart çözeltilerin 540 nm'deki ölçülen absorbans değerleri	36
Çizelge 3.2. Saflaştırma basamaklarındaki protein miktarları	37
Çizelge 3.3. 0, 42 mM fenolün 255-282 nm arası ölçülen absorbans değerleri	38
Çizelge 3.4. % (NH ₄) ₂ SO ₄ derişimine bağılı olarak çökeltilinin sahip olduğı aktivite, protein miktarı ve spesifik aktivite değerleri.....	40
Çizelge 3.5. 280 nm'de okunan absorbanslar (protein konsantrasyonu) ve 271 nm'de ölçülen enzim aktiviteleri (3 ml).....	41
Çizelge 3.6. 280 nm'de okunan absorbanslar (protein konsantrasyonu) ve 271 nm'de ölçülen enzim aktiviteleri (1,5 ml).....	42
Çizelge 3.7. Saflaştırma basamakları sonuçları.....	43
Çizelge 3.8. Değişen fenilasetat konsantrasyonlarının enzim aktivitesine etkisine ait deney sonuçları	46
Çizelge 3.9. Artan enzim miktarının enzim aktivite etkisine ait bulgular.....	48
Çizelge 3.10. Enzim aktivitesinde optimum sıcaklığın belirlenmesine ait bulgular...	49
Çizelge 3.11. 56 °C' de enzim aktivitesinin inhibisyonuna ait deney sonuçları	50
Çizelge 3.12. pH'nın enzim aktivitesine etkisine ait sonuçlar	51
Çizelge 3.13. 200 pg/ml Grelin varlığında değişen fenilasetat konsantrasyonlarının enzim aktivitesine etkisine ait deney sonuçları	55
Çizelge 3.14. Substrat olarak Grelin hormonunun değişen konsantrasyonlarının enzim aktivitesine etkisine ait deney sonuçları	56

SİMGELERİN LİSTESİ

α	: Alfa
β	: Beta
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrad derece sıcaklığı
cm	: Santimetre
g	: devir/dakika
M	: Molarite
μg	: Mikrogram
μl	: Mikrolitre
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
nm	: Nanometre
rpm	: Devir/dakika
s	: Saniye
ε	: Ekstinksiyon katsayısı
kDa	: Kilo Dalton
λ	: Dalga Boyu
V	: Volt
v	: Hacim
w	: Ağırlık

KISALTMALARIN LİSTESİ

A.A.	: Aminoasit
Apo AI	: Apolipoprotein
Apo J	: Klusterin
APS	: Amonyum persülfat
ARE	: Arilesteraz
Atm	: Atmosfer
BSA	: Bovine serum albumin, Sığır serum albumini
Ca ⁺²	: Kalsiyum iyonu
Co ⁺²	: Kobalt iyonu
Cu ⁺²	: Bakır iyonu
CuSO ₄ .5H ₂ O	: Bakır(II)sülfat penta hidrat
CO ₂	: Karbondioksit
C-terminal	: Polipeptid zincirinin Karboksil uç kısmı
CM-Selüloz	: Karboksi metil selüloz
DEAE-Sefadeks	: Dietil Amino Etil-Sephadeks
DEAE-Selüloz	: Dietil Amino Etil-Selüloz
Dak.	: Dakika
EC	: Enzim Kod Numarası
EDTA	: Etilen Diamin Tetra asetik Asit
EÜ	: Enzim Ünitesi
FAD	: Flavın adenin dinükleotid
FÜBAP	: Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi
GH	: Büyüme hormonu
GHS	: Büyüme hormonu salgılatıcıları
GHS-R	: Büyüme hormonu salgılatıcı reseptör
GAH	: Grelın hormonu
Ghr	: Grelın hormonu
G-HH	: Grelın hormonu
Ghrl	: Grelın hormonu
h-GHS	: Grelın hormonu
aGAH	: Aktif Grelın hormonu
dGAH	: İnaktif grelin hormonu

HCl	: Hidroklorik asit
H ₂ O	: Su
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HDL	: Yüksek yoğunluklu lipoprotein
IGF-1	: İnsülin benzeri büyüme faktörü -1
IU	: Uluslararası Ünite
IUBMB	: Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği
KNaC ₄ H ₄ O ₆ .2H ₂ O	: Potasyum sodyum tartarat dihidrat
KCl	: Potasyum klorür
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
Mn ⁺²	: Mangan iyonu
Mg ⁺²	: Magnezyum iyonu
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik asit
NAD ⁺	: Nikotinamid adenin dinükleotid (Yükseltgenmiş)
NH ₃	: Amonyak
NADP ⁺	: Nikotinamid adenin dinükleotid Fosfat (Yükseltgenmiş)
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid Fosfat (İndirgenmiş)
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
N-terminal	: Polipeptid zincirinin Amino uç kısmı
NaCl	: Sodyum klorür
Na ₂ CO ₃	: Sodyum karbonat
(NH ₄) ₂ SO ₄	: Amonyum sülfat
NH ₄ Cl	: Amonyum Klorür
PON	: Paraoksonaz
PON1	: Paraoksonaz 1
PON2	: Paraoksonaz 2
PON3	: Paraoksonaz 3
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesilsülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi
TEMED	: N, N, N', N'-Tetrametil Etilendiamin
TRIS	: Trihidroksimetil aminometan
U	: Ünite
UV	: Ultraviyole

ÖZET

DOKTORA TEZİ

PARAOKSONAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILARAK GRELİN HORMONUNA KARŞI KİNETİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Uğur AŞKIN

Fırat Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

2009, Sayfa: 69 sayfa

Bu çalışmada, metabolizma için büyük öneme sahip olan Paraoksonaz 1 (E.C. 3.1.1.2. ve E.C. 3.1.8.1.) enzimi, sığır karaciğerinden saflaştırılmaya çalışılmıştır. Bu amaçla homojenizasyon, ultrasantrifüj, % amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-Sefaroz iyon değişim kromatografisi ve Sefadeks G-200 jel filtrasyonu kromatografisi sırasıyla uygulanmıştır. Bu işlemler sonucunda Paraoksonaz 1 enzimi 23,93 U/mg protein spesifik aktivite ile homojenata göre 26,30 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırılan Paraoksonaz 1 enziminin molekül ağırlığı SDS-PAGE ile 45,2 kDa olarak hesaplanmıştır. Paraoksonaz 1 enziminin pH:7,1 ve 37 °C'de optimum aktivite gösterdiği saptanmıştır. Substrat olarak fenil asetat kullanıldığında K_m değeri $0,074 \pm 0,002$ mM ve V_{max} değeri 36,42 U/mg olarak hesaplanmıştır. Paraoksonaz 1 enziminin aktif grelin hormonuna etki ettiği ve aktif grelin hormonunu 20 dakika sonunda % 61,20 oranında inaktif greline dönüştürdüğü bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler : Paraoksonaz 1, saflaştırma, sığır karaciğeri, grelin, HPLC

ABSTRACT

PhD Thesis

PURIFYING ENZYME PARAOXONASE AND INVESTIGATING ITS KINETIC AGAINST GHRELIN HORMONE

Uğur AŞKIN

Fırat University

Graduate School of Natural and Applied Sciences,

Department of Chemistry

2009, Page: 69 page

In this study, enzyme paraoxonase I (E.C. 3.1.1.2. and E.C. 3.1.8.1.) that has major importance for metabolism is tried to be purified from bovine liver. For this purpose homogenization, ultracentrifugation, fractionation with ammonium sulphate precipitation, DEAE-Sepharose ion exchanger chromatography and Sephadex G-200 gel filtration chromatography was applied respectively. In the end of this process Paraoxonase 1 enzyme 23,93 U/mg protein specific activity has been 26,30 fold purified than the homogenate. Molecule weight of Paraoxonase 1 enzyme is measured as 45.2 kDa by SDS-PAGE. Optimum activity of Paraoxonase 1 enzyme has been observed at pH:7.1 and 37 °C. Phenyl acetate used as substrat, K_m value was $0,074 \pm 0,002$ mM and V_{max} value was 36,42 U/mg. It is observed Paraoxonase 1 enzyme effects to ghrelin hormone and turns 61.20% of active ghrelin hormone to inactive ghrelin hormone in after 20 minutes.

Key Words: Paraoxonase I, purification, bovine liver, ghrelin, HPLC

1. GİRİŞ

1.1. Enzimlerin Genel Özellikleri

Enzimler, biyokimyasal olayları katalizleyerek organizmalardaki canlılığı sağlayan biyomoleküllerdir. Katalizledikleri reaksiyonlarda enzimler, reaksiyonun sonunda miktar ve yapı bakımından değişikliğe uğramazlar. Tam verimle ürün oluşumunu sağlarlar. Canlı organizma tarafından sentezlenen enzimler hem hücre içinde hem de hücre dışı koşullarda etkilidirler. Oldukça hızlı çalışan enzimlerin katalizlediği reaksiyonlar katalizlenmeyen reaksiyonlara göre 10^7 – 10^{14} kat daha hızlıdır. Enzimler, bu olağanüstü hız artışını, hücresel koşullara göre reaksiyonda daha düşük aktivasyon enerjisi gerektiren alternatif yollar oluşturarak gerçekleştirirler [1-6].

Katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu dışında enzimlerin hepsi protein yapısındadır. Proteinlerin en özel grubunu oluşturan enzimlerin katalizleme fonksiyonu ya da diğer bir ifadeyle aktivitesi protein yapısı ile ilgilidir. Proteinler, amino asitlerin peptid bağlarıyla bağlanması ile oluşur. Oluşan polipeptid zinciri, biyolojik aktive için gerekli olan üç boyutlu yapıyı dört basamakta kazanır. Primer, sekonder, tersiyer ve kuaterner yapı olarak adlandırılan basamaklarda peptid bağı dışında hidrojen bağları, disülfid bağları, iyonik bağlar ve elektrostatik etkileşimler, van der Waals kuvvetleri, non polar yan zincir etkileşimleri vardır [3, 4]. Primer yapıyı amino asitlerin sıralanışı ve varsa çapraz disülfid bağları yani protein zincirindeki amino asitler arasındaki bütün kovalent bağlanmaları kapsar. Sekonder yapıyı lineer dizilişte birbirine yakın amino asitler arasındaki sterik etkileşimler sonucu meydana gelir. Bu etkileşimlerin çoğunu hidrojen bağları oluşturur. Örneğin α -sarmal ve β -tabakalı yapı bu yapıya dahildir. Tersiyer yapı, lineer dizilişte birbirinden uzak noktalardaki amino asitler arasında meydana gelen sterik etkileşimlerle ortaya çıkar. Bir protein zincirindeki stabil katlanmalar sonucu, birbirine uzakta olan amino asit yapıları bir araya gelirler ve proteinin aktif bölgesini oluştururlar. Tersiyer yapıda belli bir düzenlilik ve periyodik şekil göze çarpmaz. Kuaterner yapı birden fazla polipeptid zincirine sahip proteinlerde rastlanır. Polipeptid alt birimleri, sekonder ve tersiyer yapıları meydana getiren sterik etkileşimler ile oluşan bağlar vasıtasıyla bir arada tutulur. Üç boyutlu yapısı bozulan proteinin aktifliği kaybolur ve denatüre olur. Ortam sıcaklığı (50–60 °C üstünde), kuvvetli asidik ve bazik ortamlar ($\text{pH} < 4$, $\text{pH} > 10$), alkol, aseton, sodyum dodesil sülfat (SDS), derişik üre, β -merkaptoetanol, guanidin HCl, gibi kimyasal maddeler, röntgen, ultraviyole ve infrared ışınları denatürasyona sebep olur. Protein

molekülleri aktivitelerinin belirli kimyasal ortamlarda, sınırlı pH'da ve sıcaklıkta sürdürmeleri nedeniyle saflaştırılmalarında denatürasyon şartları dikkate alınarak çalışılmalıdır [1-6].

Enzimler aktivitelerini protein yapısıyla sağladığı gibi, bazı durumlar da protein yapısında olmayan genellikle metal iyonlarından meydana gelmiş Ca^{+2} , Zn^{+2} , Mn^{+2} gibi kofaktörler ile ya da koenzim olarak adlandırılan organik moleküllerle (NAD^+ , FAD) sağlayabilmektedir. Enzimin protein kısmı olan apoenzim, kofaktör ya da koenzim ile birlikte aktif ise bu enzime, holoenzim denir. Holoenzimde koenzim ve kofaktör protein kısmına sıkıca bağlıysa diyaliz ile ayırmak mümkün değildir. Ayrılmayan ve protein yapısında olmayan bu kısımlara prostetik grup denir [5, 6].

Enzimler hakkında edindiğimiz bilgilerin temeli 1700'lerin sonlarında yapılan çalışmalara dayanır. Midenin salgıları ile etin sindirimi üzerine yapılan çalışmalar ilk çalışma olarak nitelendirilebilir. 1800'lerde J.J Berzellius tükürük ve buğdaygillerden elde edilen özütlerle nişastanın şekere dönüşümü çalışmalarını yürütmüştür. 1850'lerde Lowis Pasteur, fermantasyonun enzimler tarafından sağlandığını keşfetmiştir [3]. 1894 yılında Chittenden'in enzimler için öne sürdüğü bulgular ki; protein yapısında olan aktifliği protein yapısına bağlı substratları ile ara kompleksler oluşturarak işlev gören aktif katalizörler olduğu; günümüz bilgilerinin şekillenmesinde önemli bir yere sahiptir [4].

Enzimoloji alanında şüphesiz en önemli gelişme, 1926 yılında James B. SUMNER tarafından bir fasülye türünden üreaz enzimini saf halde elde edip kristallendirdikten sonra protein yapısında bir bileşik olduğunu ortaya koymasındır. Önceleri şüpheyile yaklaşılan bu sonuç, 1930-1936 yılları arasında J. Northrop'un pepsin, tripsin ve kimotripsin enzimlerini kristallendirmesi ve protein yapısında olduklarını kesin olarak ortaya koymasıyla doğrulanmıştır. Bununla beraber bugün enzim yapısında olmayan ve enzimin aktivite göstermesine yardımcı olan bazı grupların bulunduğu bilinmektedir. Keza bir RNA molekülünün de enzim aktivitesi gösterdiği saptanmıştır [4]. Bugüne kadar 2000 enzim tanımlanmış, birçoğu saf halde elde edilip kinetikleri incelenmiş ve 200'den fazlası da kristallendirilmiştir. Ancak yapılan genetik çalışmalar, daha tespit edilmemiş birçok enzimin varlığını göstermektedir [1-6].

Enzimler kullandıkları substratın veya katalizledikleri reaksiyon tiplerine göre adlandırılmakta ve sınıflandırılmaktadır. Enzimin etkilediği substratın sonuna "az" eki getirilerek adlandırılmaları birden fazla enzim ihtiva eden sistemler için sorun oluşturmaktadır. Bu nedenle günümüzde yapılan yeni sınıflandırmada enzimlere 4 numara verilmektedir. İlk numara enzimin yer aldığı grubun numarasıdır. İkinci numara etki ettiği kimyasal yapı ve fonksiyonel grubu belirtmektedir. Üçüncü numara ise akseptörü belirlemektedir. Dördüncü numara ise belli bir sınıfta enzimin aldığı sıra numarasıdır [1, 6].

Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) tarafından yapılan sınıflandırmaya göre enzimler 6 ana gruba ayrılmıştır. Her bir grup da kendi içinde 4 ile 13 arasında alt gruba sahiptir. Bu ana gruplar ve önemli özellikleri şunlardır:

1. Oksidoredüktazlar: İki substrat arasında redoks reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir. Bu sınıf enzimlerin substratları genellikle elektron ve hidrojen donörleridir. Dehidrogenazlar, oksidazlar bu grupta yer alan alt gruplardandır.

2. Transferazlar: Hidrojen dışında herhangi bir atom ya da atom grubunun, (metil, karboksil, amino, fosfat) bir molekülden diğer moleküle aktarılmasını katalizleyen enzimlerdir.

3. Hidrolazlar : Ester, eter, peptid, glikozid, asit anhidrit, C-C, C-halojenür veya P-N bağlarının bir H₂O molekülünün katılmasıyla hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Esterazlar, proteazlar bu grubun alt gruplarındandır.

4. Liyazlar : Hidrolizden farklı bir mekanizma ile substratlardan grupların uzaklaştırılıp, çift bağların oluşturulduğu reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir.

5. İzomerazlar : Geometrik, optik veya yapısal izomerlerin birbirine dönüştürülmesini katalizleyen enzimlerdir.

6. Ligazlar: Enerji kullanarak substrat moleküllerinin birbirine bağlanmasını katalizleyen enzimlerdir [1, 4, 6].

Bu sınıflandırma sistematğine göre enzimin sınıfı başta EC kısaltması ile birlikte dahil olduğu sınıfın numaraları belirtilir.

1. 2. Paraoksonaz Enzimi

Paraoksonaz enzimi, bir ester hidrolazdır. İki farklı ester hidrolazı aktivitesine sahiptir. Bunlardan biri arilesteraz diğeri de fosforik ve fosfinik asit esterlerini hidroliz aktivitesidir. Bu aktivitelerden dolayı iki numaraya (EC 3.1.1.2. ve EC 3.1.8.1.) sahiptir. Bu numaralandırmada;

- EC 3. Hidrolazları,
- EC 3.1. Ester bağları üzerine etki eden hidrolazları,
- EC 3.1.1. Karboksilik ester hidrolazları,
- EC 3.1.1.2. Arilesterazı,
- EC 3.1.8. Fosforik triester hidrolazları,
- EC 3.1.8.1. Arildialkil fosfatazı ifade etmektedir.

Enzim paraokson, metil paraokson ve klor metil paraoksone yüksek derecede seçicilik gösterdiği için paraoksonaz olarak adlandırılmıştır. Paraoksonazın diğeri isimleri; organofosfat hidrolaz, A-esteraz, organofosfat esteraz, paraokson esteraz, paraokson hidrolaz, organofosforöz hidrolaz, fosfotriesteraz, organofosforöz asit anhidraz, pirimifosmetilokson esterazdır [7].

1.2.1. Paraoksonaz Enziminin Yapısı ve Substratları

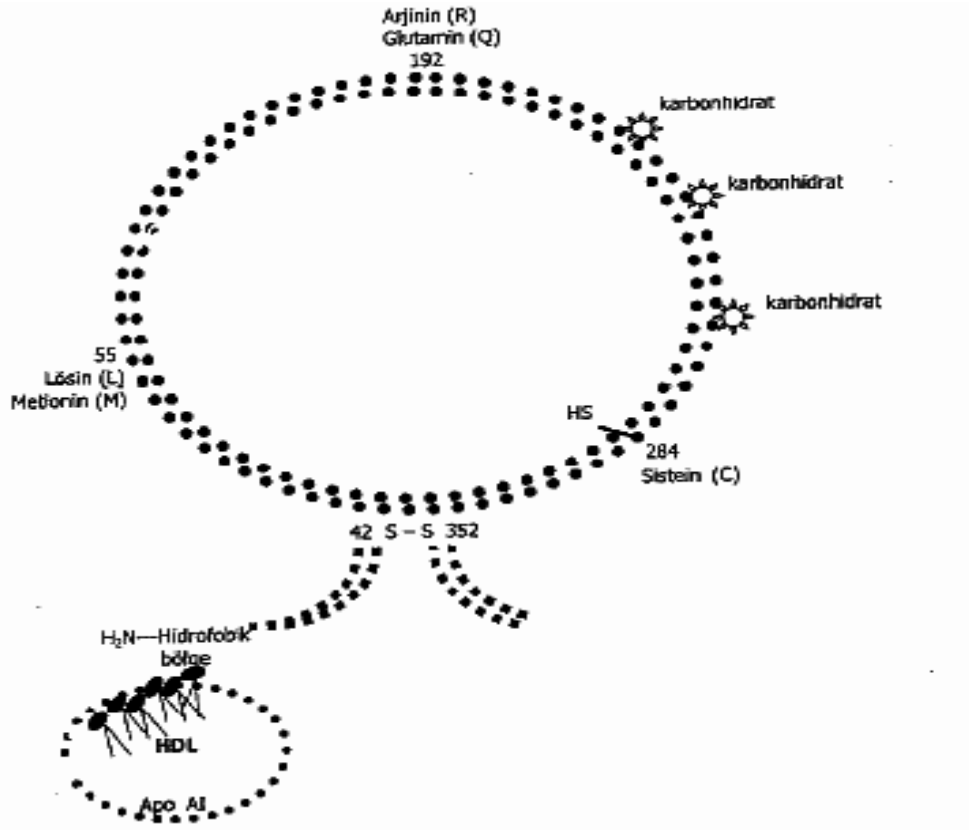
Paraoksonaz, ilk olarak 1953 yılında Aldridge W.N. tarafından p-nitrofenil asetat, propiyonat ve bütiratı hidroliz eden A-esteraz olarak teşhis edilmiştir. İnsan serumunda ilk kez 1961'de Uriel tarafından elektroforez sonrası HDL immunopresipitatlarında saptanmıştır. 1965 yılında, Boter tarafından paration ve paraokson hidrolizindeki stereospesifikliğı ile tanımlanmıştır. 1973 yılında bir grup Alman araştırmacı, ilk olarak insan serum paraoksonazı genetik olarak saptamışlardır. 1985 yılında Mackness, koyunlarda paraoksonaz enziminin Apolipoprotein AI (Apo AI) içeren partiküllerde HDL ile birlikte bulunduğunu ve insan kanında HDL yapısında taşındığını ortaya koymuşlardır. Sığır serumundan saflaştırılmış paraoksonazın lipidlerle ilişkili ve HDL ile aynı moleküler kütleye sahip olduğunu göstermişlerdir. Saflaştırma sırasında paraoksonazdan ayırımının zor olması, ikisinin sıkı ilişkili olduğunu düşündürmüş ve HDL-kolesterol tayini sırasında lipoprotein fraksiyonunda aril-esteraz aktivitesi gösterdiğini saptamışlardır. 1991 yılında da PON'un HDL üzerinde Apolipoprotein AI'e (Apo AI) bağımlı olarak aktivite gösterdiğini ve LDL üzerindeki lipoperoksit birikimini azalttığını bulmuşlardır. Sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda, farklı kardiyovasküler hastalıklarda enzim aktiviteleri incelenmiş, lipoproteinlerle ve lipid peroksidasyon arasındaki ilişkisi araştırılmış, enzimin aminoasit dizisi belirlenmiştir [7].

Memeli türlerinde geniş bir dağılıma sahip PON proteinleri, balıklarda, kuşlarda ve böcek gibi omurgasızlarda bulunmamaktadır [8]. Memelilerde, özellikle insanlarda ve farelerde üç ayrı PON geni (PON1, 2, 3) bulunmaktadır. PON kodlayan gen, insanlarda 7. kromozomun uzun kolu üzerinde q 21-22 bölgesinde, farelerde ise 6. kromozomdadır [9]. PON proteinlerinin aminoasit dizileri arasında % 60 oranında benzerlik vardır. PON proteinleri dokulardaki dağılımlarına göre de farklılık göstermektedir. PON1 ve PON3; memelilerin en fazla kan ve karaciğerinde olmak üzere hemen hemen tüm organ ve dokularında bulunmaktadır. Buna karşılık PON2; karaciğer, böbrek, kalp, beyin, testis dokularında özellikle endotel tabakasında bulunduğu ve aortik düz kas hücrelerinde de yer aldığı immünohistokimyasal yöntemle gösterilmiştir [10, 11]. PON1 ile yapılan çalışmaların PON2 ve PON3 göre fazlalığı PON1'in daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır [7].

PON1 karaciğerde sentezlenen, 43-45 kilo-dalton moleküler ağırlıklı, 354 aminoasit içeren glikoprotein yapıda, Ca^{+2} bağımlı bir esteraz enzimidir [10, 12]. Paraoksonaz enzim aktivitesinin Ca^{+2} 'a bağımlı olma özelliğı ile Co^{+2} , Mn^{+2} , Mg^{+2} kullanan diğer A esteraz tipi enzimlerden farklı olduğunu gösterir [7]. PON1'in genetik yapısı, insanlar, populasyonlar arasında ve çevre şartları regülasyonunda çok çeşitlilik gösterir. Serumda HDL'ye bağılı olarak bulunur. İzoelektrik noktası 5,1'dir. Molekül ağırlığının % 15,8'ini oluşturan üç karbonhidrat

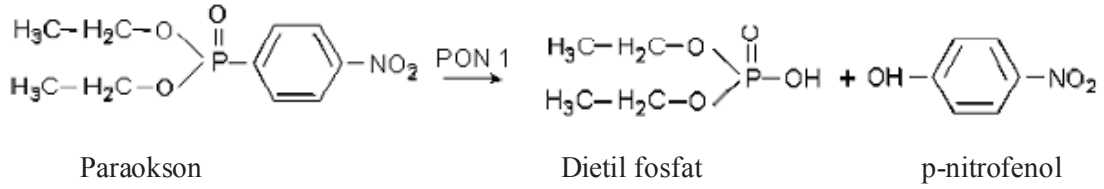
zinciri içerir. PON'un yapısındaki amino asitler içinde substrat tanınması ve bağlanması için gerekli olan serbest sisteinlerden 284'teki serbest iken, 42. ve 352. pozisyonundaki sisteinler arasında arasında 1 tane disülfid bağı vardır. Serbest sistein substrat tanınması ve bağlanması için gereklidir. PON1'in, hidrofobik N-terminal bölgesi aracılığıyla HDL lipidleriyle etkileşim için gereklidir. N-terminal hidrofobik bölge ile fosfolipidlere ve lipoproteinlere kolayca bağlanabilmektedir. PON1'i bağlayan HDL alt birimleri, Apolipoprotein AI (Apo AI) ve Apo J (klusterin) proteinlerini de içerdiğinden, Apo AI ve Apo J'nin bağlanmada rol oynayabileceği düşünülmektedir [13].

İnsan serum paraoksonaz enziminin iki genetik polimorfizmi bulunmaktadır. Bu iki polimorfizm 55. ve 192. pozisyonlardaki aminoasitlerin değişimi ile ortaya çıkar. 192. pozisyonundaki glutamin (Q aleli) arginin (R aleli) ile değişince birinci polimorfizm; 55. pozisyonundaki metionin (M aleli) lösin (L aleli) ile değişince ikinci polimorfizm oluşur. 192. pozisyonda glutamin varlığında PON1, A Tipi; 192. pozisyonda arginin varlığında ise, B Tipi şeklinde ifade edilir. Ancak son zamanlarda A Tipi Q izoenzimi B Tipi ise R izoenzimi, olarak ifade edilmektedir ve PON1'in hem Q hem de R izoenzimlerinin LDL' yi oksidasyona karşı koruma özelliğine sahip oldukları gösterilmiştir. Ancak Q izoenzimi paraoksone karşı düşük afiniteye sahip iken, R izoenzimi yüksek afiniteye sahiptir [14-17].

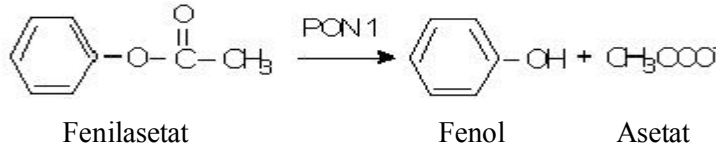


Şekil 1.1. PON1 enziminin yapısı [16]

Organofosfat bileşiklerinden parationun (parathion) aktif katabolik metaboliti olan paraokson (o,o-dietil-o-p-nitrofenil fosfat), enzime adına verdiği gibi, aktivite tayininde de en çok kullanılan substratlardan birisidir. Ayrıca aromatik karboksilli asit esterlerinden fenil asetat, enzimin arilesteraz aktivitesinin tayininde sıklıkla kullanılmaktadır. PON1'in hidrolitik aktivitesiyle açığa çıkan p-nitrofenol veya fenolün konsantrasyonu üzerinden, PON1 aktivitesi spektrofotometrik olarak tayin edilebilmektedir [18, 19].



Şekil 1.2. PON1 enziminin paraoksonu hidrolizi [20]



Şekil 1.3. PON1 enziminin fenilasetatı hidrolizi [20]

PON1 aktivite stabilizasyonu için Ca^{+2} iyonuna gereksinim duymaktadır. Kalsiyum, doğrudan katalitik reaksiyonlarda yer alarak ya da aktif bölgenin uygun konformasyonda tutulmasını sağlayarak etkisini göstermektedir. Ayrıca paraoksonun P=O bağına da polarize ederek fosforun nükleofilik saldırıya yatkınlığını sağlar, böylece dietil fosfatın aktif alandan ayrılmasını kolaylaştırır [7].

1.2.2. Paraoksonaz Enziminin Fonksiyonları

PON'nun en iyi bilinen koruyucu fonksiyonu, organofosfat nörotoksinleri, aromatik karboksilik asit esterlerini ve insektisidleri hidroliz etme yeteneğidir. Toksik organik molekülleri hidroliz etmesi, PON1'in tanımlanan ilk fizyolojik fonksiyonudur. İlk olarak organofosfat bileşiklerini hidroliz etme özelliği nedeniyle toksikoloji alanında üzerinde çalışılmıştır [12].

PON1'in belirlenen ikinci biyolojik fonksiyonu antiaterojenik aktiviteye sahip olmasıdır. Serum PON1 enzimi plazmada HDL ile birlikte bulunur ve plazma lipoproteinlerinin oksidasyonunu önlemede rolü olduğu düşünülmektedir. Peroksidasyona uğramış olan lipidler bu

enzim tarafından metabolize edildiğinden, lipid peroksidlerin hem HDL’de hem de LDL’de birikimi önlenir. HDL’nin LDL’yi oksidasyona karşı koruyucu etkisi ile yani antioksidan özelliğiyle A ve E vitaminlerinden daha etkilidir [21, 22].

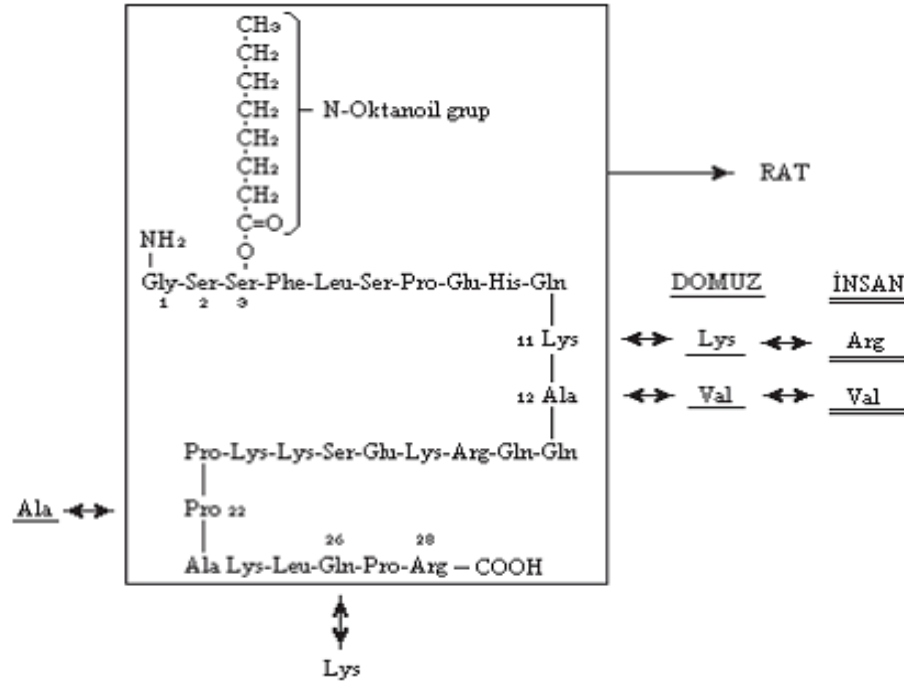
Serum PON1’in ateroskleroz sürecinin başlangıç evresinde LDL fosfolipidlerini oksidasyona karşı korumada önemli olduğu ilk olarak 1991 yılında Mackness tarafından yapılan çalışmada gösterilmiştir. Bu çalışmada, HDL’nin bakırla inkübe edilen LDL’de lipid peroksid oluşumunu % 90 oranında inhibe ettiğini; HDL’den saflaştırılan PON1’in tiyobarbitürik asit ile reaksiyona giren maddelerin düzeylerini ve lipoperoksid oluşumunu önlediğini göstermişlerdir [21]. PON1, lipid peroksidlerin yanı sıra hidrojen peroksid üzerine de etkilidir. Aterojenez sırasında arter duvarı hücrelerince üretilen majör toksik oksijen metaboliti olan hidrojen peroksid, oksidatif koşullarda daha potent ürünlere dönüşerek LDL oksidasyonuna neden olur. PON1’in okside LDL’deki kolesterol linoleat hidroperoksidlerini ve hidroksitleri indirgemesi nedeni ile peroksidaz benzeri aktivitesi olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, lipopolisakkarid inaktivasyonu yolu ile bakteriyel endotoksinlere karşı koruma sağlamaktadır [23].

PON2 hücre içi hidroperoksidlerin üretimini azaltmakta ve hücre aracılı LDL oksidasyonunu önleyerek antiaterojenik fonksiyon göstermektedir. PON2, PON1’den sonra tanımlanmıştır. PON2 daha az çalışılmış olmasına rağmen, endotel ve vasküler duvar hücrelerinde ekspresyonu ve bu hücrelerde antioksidan aktivite göstermesi nedeniyle büyük ilgi odağı olmuştur [24].

PON3 esas olarak karaciğerde sentez edilir ve serumda HDL ile birlikte bulunur. PON1’in aksine PON3’ün arilesteraz aktivitesi sınırlıdır ve PON aktivitesi yoktur [25]. Fakat hızla statin gibi laktonları hidroliz eder. Tavşan serumundaki PON3’ün bakırla indüklenen oksidasyondan LDL’yi korumada PON1’den daha etkin olduğu bildirilmiştir. PON1 mRNA ekspresyonu tavşanlarda akut faz yanıtı süresince baskılanmasına rağmen PON3 mRNA ekspresyonu değişmemektedir. Bu nedenle PON1 ve PON3 aterosklerozun önlenmesinde farklı roller oynuyor olabilir [26].

1.3. Grelin Hormonu

Grelin, gastrointestinal sistem tarafından üretilen, santral etki ile yeme davranışı ve vücut ağırlığı düzenlemesinde görev alan, 28 amino asitlik lipopeptid yapısal özelliğe sahip bir hormondur [27, 28].



Şekil 1.4. İnsan, rat ve domuz grelinin yapısı [29]

Grelın adı “grow” sözcüğünün kökü olan “ghre” ile salgılatma anlamına gelen “relın” kelimeleri bir araya getirilerek oluşturulmuş ve sonraları iştah hormonu anlamındaki “appetite hormone” şeklinde de adlandırılmıştır [27, 30]. Grelın hormonu için günümüze kadar farklı kısaltmalar kullanılmıştır Bunlar arasında “Ghr”, “G-HH” “Ghrl” ve “h-GHS” kısaltmaları gösterilebilir [31, 32].

İnsandaki grelin hormonunun N-terminal ucundaki 3. aa olan serine bağlı oktanil grubu 8 karbonlu bir yağ asidi içermektedir. Oktanil grubu, grelinin aktif olması için gereklidir. Grelın, bir yağ asidine göre aktivitesi değişen tek hormondur [27,28]. Bünyesinde yağ asidi içermeyen grelin ise desaçile grelinidir ve inaktiftir. Desaçile grelin döngüdeki toplam grelinin % 80-90’ını oluşturmaktadır. Aktif grelin, (aGAH) desaçile grelin (dGAH) şeklinde gösterilir. Grelinin yarı ömrü 15-20 dakikadır. Yarı ömrünün kısa olmasına muhtemelen plazma esterazı neden olmaktadır [33]. Çünkü grelin, kanda HDL’ye bağlanmaktadır. HDL’ye aynı zamanda bir kan esterazı olan paraoksonaz da bağlıdır. Paraoksonaz grelinin 3. aminoasidine bağlı olan oktanil grubundaki açıl bağlarını desaçilasyonla kırarak grelini inaktif forma getirdiği düşünülmektedir [34, 35].

Grelın ilk kez 1999 yılında Kojima tarafından farelerin mide fundusunda tanımlanmıştır. Grelinin mRNA’sı hemen hemen bütün dokularda tespit edilmiştir. Vücutta grelin üretimindeki iki hücresel alandan ilki oksintik bez; diğeri ise nöronal hücre gruplarının sinaptik ileti ile grelin salınımı yaptığı santral sinir sistemidir. Grelın midenin oksintik

mukozasında yer alan endokrin fonksiyonlara sahip X/A hücreleri tarafından üretilmesinin yanı sıra az miktarda bağırsak, böbrek, hipofiz bezi, plasenta, prostat, testis, beyin ve hipotalamus tarafından üretilip dolaşıma verilmektedir. Bu durum grelin hormonunun biyolojik aktiviteyi düzenlemede önemli bir rolü olduğunu gösterir [36, 37].

Grelın, *in vivo* ve *in vitro* olarak büyüme hormonu salgılatıcı GHS-R (büyüme hormonu salgılatıcı reseptör) için spesifik endojen bir ligand özelliğindedir [27]. Büyüme hormonu salgılatıcıları (GHS), büyüme hormonunu salgılamasını artırma özelliğine sahip reseptörler bulunan bileşiktir [38].

Grelın öncülü preprogrelin 117 amino asitten oluşur. Salınmadan önce sitoplazmada enzimatik bir işlemde geçer, üçüncü pozisyondeki serine n-oktanoil eklenmesi büyüme hormonu salgılatıcı etkinliği için gereklidir [39]. Grelın özellikle midede üretildikten sonra ön hipofiz ve hipotalamik bölgedeki reseptörlerine ulaşır GH (büyüme hormonu) salınışını uyarmakta, enerji dengesini ve besin alınımını düzenlemektedir [40]. İnsanlarda enerji alımı ve vücut ağırlığı hipotalamustaki merkezler tarafından kontrol edilmektedir [41]. Hipotalamik merkezler periferden gelen uyarılar doğrultusunda kontrol mekanizmalarını düzenlerler. Yağ dokusu kökenli leptin, beyine yağ dokuları konusunda bilgi götürerek besin alımını azaltır ve fazla yağ birikimini engeller [42]. Grelın ise açlık halinde kanda yüksek miktarda bulunup yemek sonrası miktarı azalmaktadır. Bu durum grelinin beyine besin alımını ve yağ dokusunu arttırıcı nitelikte bilgiler ilettiğini göstermektedir. Grelinin bu fonksiyonlarının büyüme hormonu üzerine olan etkisinden bağımsız olduğu düşünülmektedir [43].

Grelın yemek öncesi kanda ve tükürükte hızla yükselirken kolesistokinin hormonu yeme esnasında salgılanarak doyumluk hissi verir. Bu iki hormonun dengesi iştah için büyük bir önem taşımaktadır [29].

Grelinin büyüme hormonu ve insülin ile ilişkisi incelendiğinde sadece insülin benzer büyüme faktörü -1 (IGF-1) ile grelin arasında pozitif bir ilişki bulunmuştur. Buna karşın grelin ve insülin düzeyleri arasında bir ilişki bulunmamaktadır [44].

1.4. Protein Saflaştırma Yöntemleri

Proteinler gibi biyomoleküllerin bulundukları canlı organizmadan ayrılması ve saflaştırılması ilaç, gıda sanayi ve bununla ilgili diğer alanlarda yapılan araştırmalar için büyük bir önem taşımaktadır. Bununla birlikte saflaştırma aşamalarında karşılaşılan; denatürasyon ve aktivite kaybı gibi; sorunlar nedeniyle çalışmaların büyük bir titizlikle yürütülmesi gerekmektedir.

Protein yapısındaki enzimler gibi biyomoleküllerin çoğu saflaştırma aşamalarına dayanıksızdır. Bunun için saflaştırmanın her aşamasında stabilizasyonu sağlayan faktörlere

dikkat edilmelidir. Stabilizasyonu sağlayan faktörler; pH, oksidasyon derecesi, ağır metal konsantrasyonu, polarite, proteaz ve nükleazların konsantrasyonu, sıcaklık, süre ve elde edilecek ürünün ortamdaki son konsantrasyonudur. Örneğin homojenizasyon (özütleme) sırasında kontrol edilemeyen sıcaklık faktörü, ortamın pH'sının değişmesi, ya da çözücü olarak kullanılan deterjan gibi kimyasal maddeler biyomolekülün doğal yapısını bozabilmektedir. Ayrıca biyomolekülün, saflık derecesi, miktarı ve aktivitesi yüksek bir şekilde canlı organizmadan saflaştırılmasında seçilen yöntemlerin önemli bir rolü bulunmaktadır. Saflaştırmada uygulanan yöntemleri basamaklandırarak olursak ilk basamağı saflaştırılacak proteinin bulunduğu organizmadan homojenizasyon, ultrasantrifüj ve uygun çözücüler kullanılması gibi işlemlerle tampon çözeltilere alınması oluşturur. İkinci basamağı ise elde edilen ekstrenin diyaliz, çöktürme gibi işlemlerle konsantre edilmesidir. Üçüncü ve son basamağı da proteinin biyomoleküler özelliklerine göre kromatografi teknikleri uygulanarak saflaştırılmasıdır. Bu genel aşamalar birkaç defa ardı ardına uygulanarak proteinin istenilen düzeyde saflaştırılması sağlanabilir [4, 45, 46, 47, 48].

1.4.1. Homojenatın (Özütün) Hazırlanması

Homojenizasyon, saflaştırılacak proteini içeren belli bir doku ya da hücrelerin çeper ve zar yapılarının parçalanıp, yok edilmesi işlemidir. Homojenizasyon ile hücre içeriği tampon çözeltiye geçer. Oluşan bu süspansiyona homojenat adı verilir.

Homojenizasyon yöntemleri genel olarak ikiye ayrılır:

A- Fiziksel Yöntemler

- 1- Mekanik Yöntemler (Ezme, Homojenizatör kullanımı)
- 2 - Ultrasonikasyon (Titreşim ve yüksek ses dalgalarıyla homojenizasyon)
- 3 -Ozmotik şok (Yüksek ozmotik basınçlı bir ortamdan hipotonik bir ortama geçiş)
- 4 -Dondurma ve çözme

B- Kimyasal yöntemler

- 1- Çözücülerin kullanılması(iyonik olmayan deterjanlar kullanılması, sıvılaştırma)
- 2- Enzimlerin kullanılması

Kimyasal parçalama yöntemleri ısı, yüksek basınç, gürültü gibi olumsuz faktörlerin ortaya çıkmaması gibi nedenlerle fiziksel yöntemlere göre üstünlükler taşır.

Homojenizasyonda ve diğer saflaştırma aşamalarında pH ve sıcaklık faktörlerinin kontrolünde 0-4 °C sıcaklık aralığındaki tampon çözeltiler kullanılır. Protein moleküllerin büyüklükleri ile taşıdıkları yüklerin çeşidi ve miktarları ortamın pH'sına bağlı olarak değişmesi nedeniyle tampon çözeltilerde saflaştırma gerçekleştirilmelidir. Vücuttaki çoğu enzim pH 6-8 aralığında maksimum etkinlik göstermektedir. Bu sebeple ortamın pH'sı bu aralığa

tamponlanmalıdır. En çok kullanılan tamponlar; pH'sı 7-7,5 aralığındaki 20-50 mM fosfat ve pH'sı 7,5 olan 0,1M Tris-HCl tampon çözeltileridir. Saflaştırmada tampon yerine saf su kullanmak da mümkündür. Ancak saf su tüm proteinleri çözmez. Organel izolasyonunda süktroz, monnitol ve sorbitol gibi maddeler içeren izoozmatik tamponlarda kullanılır. Kullanılacak tamponun miktarı önemlidir. Fazla miktarda tampon eklenmesi konsantrasyonu düşürür. Genellikle homojenat ve tampon miktarı %10 (w/v) oranına göre belirlenir [46-48].

Özel bir materyalin kullanılma zorunluluğu yoksa genellikle sıçan, tavşan, sığır gibi hayvanlar tercih edilir. Bu hayvanların yumuşak doku ve kan gibi materyallerinde saflaştırma gerçekleştirilir. Homojenizasyon da karaciğer gibi yumuşak dokular, homojenizatör ile parçalanmadan önce uygun bir tamponda yıkanır. Daha sonra makasla kesilerek küçük parçalara ayrılır. Özellikle kesilmiş dokulardan bağ dokusu ve yağlar iyice temizlenir. Homojenizatörle uygun bir devirle ve 3 dakikalık bir süreyi geçmeyecek şekilde homojenizasyon gerçekleştirilir. Uzun süreli bir homojenizasyon da homojenat sıcaklığının artması ile proteinin aktifliği kaybolur. Bu durumda homojenat bulunan plastik kabın (dereceli silindir) içi buz dolu daha büyük bir cam ya da plastik kaba yerleştirilmesi ile homojenizasyon gerçekleştirilmelidir. Parçalanma sonunda elde edilen homojenattaki çözünmeyen materyalin filtrasyon ya da ultrasantrifüjleme ile uzaklaştırılmasından sonra elde edilen süpernatant (süzüntü) üzerinde diğer işlemler yapılır. Ayrıca gerek duyulursa süpernatantda ki yağ partikülleri cam yünü ile süzülebilir. Eğer mitokondri, kloroplast, ribozom ve mikrozom gibi organellerin proteinleri üzerinde çalışma yapılmak istenirse öncelikle bu organeller izole edilmelidir. 100.000 g gibi yüksek devirlerde ultrasantrifüjleme ile izolasyon sağlanabilir. Daha sonra ilgilenilen proteini membran yapısından söküp almak için iyonik olmayan deterjanlar kullanılır. Hemen hemen tüm proteinler SDS gibi iyonik deterjanlarla çözünür hale gelir. Ancak iyonik deterjanlar proteinleri geri dönüşümsüz şekilde denatüre ederler. Bu nedenle Triton X-100 gibi iyonik olmayan deterjanlar kullanılması gerekir. Yaklaşık 1 mg membran için en az 2 mg deterjan kullanılır. Bu miktarın 1 mg protein, 1 mg lipid için gereklidir. Çözünür hale getirmede kullanılan deterjanlar saflaştırma sırasında uzaklaştırılmalıdır. Daha sonrada çözünür hale gelmiş proteinleri saflaştırmak için diğer protein saflaştırma yöntemleri kullanılır ve istenilen protein saf halde elde edilebilir [4, 46, 47].

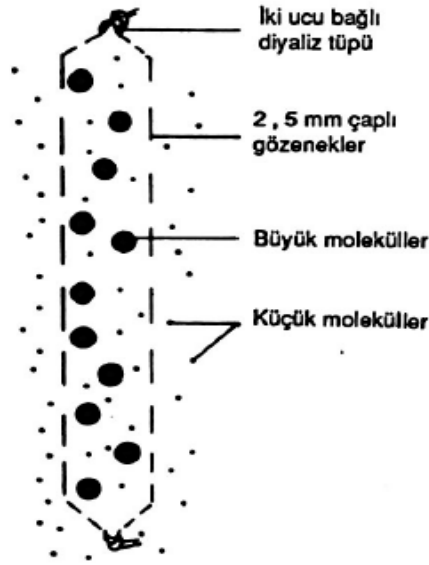
Parçalanma sırasında oluşan hidrolitik enzimler (proteolitik enzimler) proteinleri hedef almaktadır. Bu açıdan tampona proteolitik inhibitörlerin katılması önemlidir. PMSF (Fenil metil sülfonil florür) ve aprotin gibi maddeler proteazların inhibitörü olarak kullanılır. Bu maddeler kullanılmadan hemen önce hazırlanmalı ve doğrudan doğruya proteazın bulunduğu ortama katılmalıdır. Bu proteaz inhibitörlerin yanı sıra metallo-proteinaz enzimleri için EDTA çözeltisi kullanılabilir [46].

Çalışılan materyalin taze olması gerekir. Çünkü lizozomlardan çıkan proteazlar, konsantre haldeki protein havuzunda aktivite gösterirler. Bu durumda birkaç haftalık bir bekletme bile çok zararlıdır. Eğer dondurulmuş protein örneği ile çalışılacaksa saklama koşulu olarak, -25 °C altında hızla dondurmak gerekir. Çünkü -15 °C ve -25 °C arasındaki sıcaklıklarda pH'sı değişen çözeltiler donmadan kalabilir. Ayrıca çözünmenin hızlı olması gerekir [46-49].

1.4.2. Protein Çözeltisinin Konsantre Edilmesi

Protein içeren çözeltinin konsantre edilmesiyle hacim azalır, dolayısıyla küçük hacimlerde çalışmak saflaştırma işlemlerinde kolaylıklar sağlar. Örneğin, kromatografide protein örneğinin yükleme kolaylığı, kolon dolgu maddesine veya kabın iç yüzeyine çok özel olmayan bir şekilde adsorbsiyon nedeniyle ortaya çıkan protein kayıplarının azalması gibi yararlar sağlar. Konsantre işlemi, suyun ve diğer küçük moleküllerin uzaklaştırılması ile gerçekleştirilir. Bu amaç için genelde kuru matriks polimerinin kullanımı, diyaliz, ultrafiltrasyon, liyofilizasyon, çöktürme gibi yöntemler kullanılır [46-49]. Proteinler büyük moleküllerin girişine uygun olmayan porları bulunan kuru Sephadex G-25'in protein çözeltisine eklenmesiyle çözelti konsantre edilir [46].

Proteinleri daha küçük molekül ağırlığına sahip moleküllerden ayırmak için en çok kullanılan yöntemlerden biride diyalizdir. Doku özütü yahut doku ekstraktı $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ile çöktürüldükten sonra çözünür hale gelen protein çözeltileri gözenek büyüklüğü belli yarı geçirgen selefon zarlara konur. Bu selefon zarlar (diyaliz membranı) boru şeklindedir ve alt ucu düğümlenerek içine diyaliz edilecek örnek aktarılır. Daha sonra diyaliz membranı ya saf su ya da uygun bir tamponu içerisine bırakılır. Küçük moleküllerin bu tüp içindeki küçük porlardan geçip ortama girdikleri halde protein molekülleri bu porlardan geçemedikleri için selefon tüp içinde kalırlar. Bu sayede proteinler küçük moleküllerden ayrılabilir. Sistemin işleyişi membranla ayrılan iki faz arasındaki konsantrasyon farkına dayalı difüzyonla gerçekleşmektedir. Diyalizin etkili olabilmesi için magnetik bir karıştırıcı ile diyaliz tamponu alttan karıştırılır. Bu tamponlar 5-6 saat aralıklarla birkaç defa ya da 12 saat süre sonunda değiştirilerek kullanılır [1, 4, 46].



Şekil 1.5. Diyaliz tüpü (membranı) [50]

Ultrafiltrasyon da su ve daha küçük moleküller santrifüjleme veya yüksek basınç etkisiyle yarı geçirgen bir membrandan geçmeye zorlanırlar. Ultrafiltrasyon tüpünün dibine yarı geçirgen bir zar konulur. Üstten basınçlı azot gazı verilir. Bu basınç sayesinde yarı geçirgen zardan küçük moleküller ile birlikte sıvının bir kısmı aşağıya geçer. Fakat proteinler büyük moleküller olduklarından bu porlardan geçemez ve tüp içinde kalır. Bu sayede proteinler hem küçük moleküllerden ayırt edilir. Ayrıca bir miktar sıvı kaybedildiğinden protein daha konsantre elde edilir [46].

Liyofilizasyon (dondurarak vakumda kurutma) yönteminde dondurulmuş protein çözeltisi, liyofilizatörde yüksek vakum altında bırakılarak konsantre edilir. Bu işlemde çözeltideki tuzlar da konsantre olacağından daha önce tuzların uzaklaştırılması için diyaliz işlemine gerek duyulur [46, 47,49].

Tuzla çöktürme proteinlerin konsantre edilmesinde ve saflaştırılmasında kullanılan bir yöntemdir. Nötral tuzların miktarı proteinlerin çözünürlüğüne etkiler. Nötral tuzlar düşük konsantrasyonlarda protein moleküllerinin çözünürlüğünü artırır ki bu olaya “salting-in” adı verilir. $MgCl_2$ ve $(NH_4)_2SO_4$ gibi iki değerlikli iyonlu tuzlar, $NaCl$, NH_4Cl ve KCl gibi tek değerliklerden daha etkilidir. Nötral tuzların bu özelliği onların iyon şiddetine bağlıdır. Yeteri kadar yüksek tuz konsantrasyonunda bir protein bir çözeltide hemen kantitatif olarak çöktürülebilir. Yani yüksek tuz konsantrasyonunda proteinlerin çözünürlüğü azalır ve hatta çökerler ki bu olaya “salting-out” adı verilir. Yüksek tuz konsantrasyonunda hidrasyon suyu protein moleküllerinden uzaklaştırılır ve böylece çözünürlük azalır [1, 4, 46]. Çöktürme işlemlerinden sonra yapılacak diyalizle ortamdaki iyonların fazlalığından protein çözeltisi

temizlenmiş olur. Her bir protein farklı iyonik şiddette çökelme gösterdiği için, bu yolla proteinler birbirinden ayrılabilirler. Salting-out sırasında proteinler konformasyonlarını korurlar ve uygun bir ortamda tekrar çözelti fazına alınabilirler. Çöktürme işleminde genellikle etkinliği ve çözünürlüğü yüksek, pH'yı fazla etkilemeyen, çözeltide fazla ısınmaya yol açmayan, ucuz ve etkin bir tuz olan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ kullanılır. Bu nedenle yöntem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürmesi olarak da adlandırılmaktadır [4].

Aseton, etanol, metanol gibi organik çözücüler su çekici özellikleriyle proteinlerin çözünürlüğünü azaltıp çöktürürler. Protein çözeltilerinin konsantre edilmesindeki bu yöntem denatürasyona sebep olabileceğinden çöktürme koşullarına dikkat edilmesi gerekir. Özellikle bu çözücüler $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 'de bekletildikten sonra yine aynı sıcaklıkta protein çözeltisine yavaşça eklenmesine dikkat edilmelidir [47].

1.4.3. İzolasyon ve Saflaştırma

Saflaştırmada, proteinlerin fiziksel özelliklerine bağlı olarak ortamdaki diğer proteinlerden ya da yabancı maddelerden ayırt edilmesi amaçlanır. Bu fiziksel özellikler; molekül büyüklüğü, çözünürlük, elektriksel yük, adsorbsiyon davranışlarındaki farklılıklar, diğer moleküllere karşı biyolojik afinitedir [4, 46].

Saflaştırmada kullanılan yöntemlerin en yaygını kromatografi tekniğinin uygulandığı kolon kromatografisidir. Kolon kromatografisi, adsorbsiyon kökenli bir katı-sıvı kromatografi yöntemidir. Bu yöntemde ucu musluklu basit cam borular kullanılır. Kolonların doldurulmasında kullanılan dolgu maddesi sabit fazdır. Protein karışımının sabit fazda hareketini sağlayıcı çözücüler ve tamponlarda hareketli fazdır. Bu fazlar, yapılacak saflaştırma işlemine ve saflaştırılacak proteinin özelliklerine göre seçilir. Kolon kromatografisinin farklı temellere dayanan çeşitli tipleri vardır. Bunlardan iyon değişim kromatografisi, proteinlerin taşıdığı elektriksel yük ya da hidrofobik grupların farklılığı esasına dayanır. Afinite kromatografisi, protein ve dolgu maddesi arasındaki etkileşim temeline dayanır. Jel filtrasyonu ise molekül büyüklüğü farklılığı esasına dayanan bir kromatografik yöntemdir [1, 4, 46, 47, 51].

1.4.3.1. Molekül Büyüklüğü Esasına Dayanarak Proteinlerin Ayrılması

Proteinlerin en göze çarpan özelliği onların büyüklükleridir. Bu özellik, doğrultusunda saflaştırma yapıldığı gibi ekstrenin konsantre edilmesi de sağlanabilir. Bu esasa dayalı olarak ekstre konsantre edilmesi başlığı altında belirtilen diyaliz, ultrafiltrasyon yöntemleri dışında yoğunluk gradienti santrifügasyonu ve jel filtrasyon kromatografisi yöntemleri bulunmaktadır.

Diyaliz ve ultrafiltrasyon ile küçük moleküllerden ayırt edilmiş olan protein molekülleri

karışımı bu defa jel filtrasyonuna tabi tutulmaktadır. Jel filtrasyonu ile büyük ve küçük protein molekülleri birbirinden ayrılmaktadır. Saflaştırmada kullanılan kolonlar, polisakkarit türevi olan dekstran, sefadeks, bir poliakrilamid türevi olan bio-gel veya poli sakkarit yapısında olan agaroz ile doldurulur. Bu maddeler küçük inert tanecikler halinde bulunmaktadır. Kolon bu maddelerle doldurulduktan sonra uygun bir tamponla yıkanır ve kararlı hale getirilir. Daha sonra yine uygun bir tampon içinde bulunan protein çözeltisi kolonun üstünden yavaş yavaş ilave edilir. Yer çekimine göre aşağıya doğru hareket eden protein çözeltisi içinde bulunan küçük protein molekülleri kolon dolgu maddesinin küçük oyuklarına girerken büyük protein molekülleri ise bu oyuklara hiç girmeden kolonun altından ilk olarak çıkar. Ardından orta büyüklükteki ve en sonunda da en küçük boydaki protein molekülleri kolonun altından çıkar. Bu yöntemle protein molekülleri molekül ağırlığına göre kabaca ayrılmaktadır [4, 46, 47, 51, 52]. Çözünmüş haldeki proteinler, kuvvetli bir santrifüjleme alanında çökme eğilimine sahip oldukları için protein karışımları santrifüjleme ile ayrılabilirler. Bu metot, yalnız proteinlerin değil aynı zamanda diğer makromolekül, virüsler ve organellerin de ayrılması için sıkça kullanılmaktadır. Santrifüj tekniği ile protein fraksiyonlaması, gradient santrifüj, çökeltme gibi metotlar uygulanır. Gradient santrifüj için en çok değişik konsantrasyonlardaki sakkaroz çözeltileri kullanılmaktadır [1, 4, 46, 51].

1.4.3.2. Çözünürlük Farkına Göre Proteinlerin Saflaştırılması

Proteinlerin çözünürlüğü başlıca; pH, iyonik şiddet, çözücünün dielektrik özelliği ve sıcaklığa bağlıdır. Çözünürlük farkına göre; izoelektrik çökeltme, nötral tuzlarla çöktürme, çözücülerle fraksiyonlama ve sıcaklık etkisi yöntemleriyle proteinler saflaştırılmaktadır [1, 4].

İzoelektrik nokta, proteinlerin net yüklerinin sıfır olduğu pH değeridir. Bu kritik pH değerinin her iki yanında çözünürlük büyük ölçüde artarken bu noktada çözünürlüğün az olmasından yararlanılarak saflaştırma gerçekleştirilir [1, 4, 46].

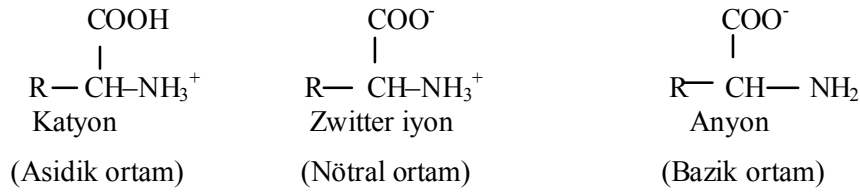
Suda çözünebilir nötral organik çözücülerin, özellikle etanol ve aseton ilavesi, çoğu globuler proteinlerin sudaki çözünürlüğünü çökeltme derecesine kadar azaltabilir. Bu etkinin kantitatif araştırmaları, sabit pH ve iyonik şiddetle, çözünürlüğün ortamın dielektrik sabitinin bir fonksiyonu olduğunu göstermiştir. Etanol sudan daha küçük bir dielektrik sabitine sahip olduğundan sulu protein çözeltisine etanolun ilavesiyle zıt yüklerin çekim kuvveti artar ve proteinler kümelenerek çökerler [1-6].

Protein karışımları her bir bileşen değişik etanol-su veya aseton-su karışımlarında farklı çözünürlüğü esasına dayanılarak ayrılabilir. Bu metodun bilinen sakıncası, bu gibi çözücülerin proteinleri yüksek sıcaklıklarda denatüre etmesidir. Bu nedenle daima çok düşük sıcaklıklarda çalışılmalıdır. Ayrıca proteinlerin çözünürlüğü 0-40 °C arasındaki sıcaklıkta artarken, 40-50°C

üzerinde ise azalır ve bir çoğu denatüre olur. Ancak bazı proteinler için oda sıcaklığı veya hücrelerin üreme sıcaklığı daha uygundur [1, 4, 46, 47].

1.4.3.3. Elektriksel Yük Esasına Dayanarak Proteinlerin Saflaştırılması

Proteinlerin elektriksel yüklerine göre ayrılması, polipeptid zincirlerinde bulunan iyonlaşabilir yan grupların sayı ve cinsi ile belirlenen asit-baz özelliklerine dayanmaktadır. Proteinler, amino asit bileşiminde ve dizilişinde farklılık gösterdiklerinden her protein özel bir asit-baz davranışına sahiptir. Proteinler yapılarında yer alan asidik ve bazik amino asitler nedeniyle amfoter özellik gösterirler. Proteinler sulu çözeltilerinde ortamın asitliğine ve bazlığına göre ya proton verecekler ya da proton alacaklardır. Asidik ortamlarda proteinler N-terminal ucundaki amino grubuna ekstra bir proton alarak pozitif bir yüke, bazik ortam koşullarında ise C-terminal ucundaki karboksil grubundan bir proton kaybederek negatif bir yüke sahip olurlar. Nötral ortamlarda net yükü sıfırdır. Bu durum aşağıdaki gibi gösterilebilir [4].



Dipolar veya zwitter (çift yüklü) iyon halinde bulunduğu pH'ya izoelektrik nokta denir. İzoelektronik ortamda toplam yük sıfır olduğundan elektriksel alanda hiçbir yöne hareket etmezler ve az çözünme özelliğine sahiptirler. İzoelektrik pH'nın üzerinde protein negatif olup elektrik alanında anoda doğru hareket ederken, altında ise pozitif yüklü olup katoda doğru hareket ederler [3, 4]. Proteinlerin bu karakteristik özelliklerinden saflaştırmada elektroforez ve iyon değişim kromatografi yöntemleri geliştirilmiştir [1].

Elektroforez molekül ağırlığının saptanmasında, miktar tayininde, saflık kontrolünde ve proteinlerin alt birimlerinin belirlenmesinde geniş çapta kullanılan bir yöntemdir. Elektroforezin diğer yöntemlerden farkı bir elektriksel alan oluşturulmasıdır. Protein çözeltisi bu elektriksel alanda farklı hızlarla bir elektrotan diğerine hareket ederek molekül ağırlıklarına ve taşıdıkları elektrik yüklerine göre birbirlerinden ayrılırlar. Daha sonra boyama yaparak protein bantları görünür hale gelmektedir. Elektroforezde asetat, selüloz, nişasta, agaroz gibi birçok jel kullanılmakla beraber en iyi ayrıştırma poliakrilamid jelinin kullanıldığı PAGE'de (poliakrilamid jel elektroforezi) gerçekleşmektedir. İzoelektrik odaklanmada duyarlı bir elektroforez tekniğidir. Bu teknik, proteinlerin net yüklerinin sıfır olduğu izoelektrik

noktalarının farkına dayanmaktadır. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS-PAGE) ise proteinlerin ilerleme hızları sadece elektriksel yükleri tarafından değil, aynı zamanda molekül ağırlıkları tarafından da belirlenmektedir. Denatüre edici özelliği daha önce belirtilen SDS'nin bir özelliğide moleküle negatif bir yük kazandırmaktadır. Ayrıca izoelektrik odaklanma ile SDS-PAGE tekniklerinin kombine biçimde uygulandığı iki boyutlu jel elektroforezide ayırma gücü çok yüksek bir tekniktir [4, 46, 47, 49, 52].

İyon değişim kromatografisi proteinleri asit- baz özelliğine göre ayıran bir yöntemdir. Bu yöntemin temelini, proteinin yüklü gruplar ile kolon dolgu maddesi olarak kullanılan katı matriks arasındaki elektrostatik etkileşimler oluşturmaktadır. Örneğin selüloz türevi olan dietilaminoetil selüloz (DEAE-Selüloz) nötr pH'da pozitif yüklü gruplar ihtiva eden anyon değiştirici bir maddedir. DEAE-Selüloz ile doldurulmuş kolondan protein çözeltisi geçirildiğinde nötr pH'da negatif yükü bulunan proteinler bu maddeye bağlanabilir. Aynı şekilde nötr pH'da negatif yüklü gruplar ihtiva eden ve katyon değiştirici özellikteki karboksimetil selüloz (CM-Selüloz) gibi bir madde bulunan kolondan protein çözeltisi geçirildiğinde, pozitif yükü bulunan proteinler CM-Selüloza bağlanarak karışımdan ayrılabilir. Bu yöntemde en çok kullanılan adsorbanlar selüloz, agaroz ve dekstranın karboksimetil ve dietilaminoetil türevleridir. Kolon dolgu maddeleri tampon çözeltiler kullanılarak kararlı hale getirilir. Bunu yaparken tampon maddelerle dolgu maddesi üzerindeki grupların aynı elektrik yüküne sahip olmasına dikkat edilir [46].

Proteinler ya kullanılan tampon çözeltisinin pH'sı ya da tuz konsantrasyonunu değiştirmek suretiyle kolondan ayrılırlar. Kolon içinde tutunmuş proteinlerin ayrılması için, kolon NaCl çözeltisi ile yıkanır. Tuz iyonları dolgu maddesinin yüzeyindeki yüklü gruplarla rekabet ederek ilgili proteinin kolondan ayrılmasını sağlar. Tuz konsantrasyonunun kademeli olarak arttırılması ile daha fazla yüke sahip proteinlerin de kolonu terk etmesi sağlanır. Böylece asidik ve bazik proteinler birbirinden ayrılmış olur. Bu metodun en önemli tarafı, iyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisini kombine edebilmesidir. Örneğin, DEAE-Sefadeks kullanılarak proteinleri yüklerine ve molekül büyüklüğüne göre ayırmak mümkündür [46- 52].

1.4.3.4. Seçimli Adsorbsiyon Esasına Dayanarak Proteinlerin Saflaştırılması

Proteinler, mangal kömürü gibi apolar materyaller veya alüminyum oksit gibi polar materyallere, molekül büyüklüklerine göre adsorbe olabilirler. Bu gibi adsorbsiyonlarda proteinleri bağlayan kuvvetlerin tam çeşidi bilinmemek ile birlikte, muhtemelen apolar adsorbsiyonlarda Van der Waals ve hidrofobik etkileşimler ve hidrojen bağları etkilidir.

Proteinlerin saflaştırılmasında adsorbsiyon esasına göre ayırmada en çok kullanılan adsorban madde, kristal kalsiyum fosfatın bir şekli olan hidroksiapatitin bünyesindeki Ca^{+2} iyonlarına bağlanır. Proteinler fosfat tamponuyla, hidroksiapatit kolonundan ayrılabilir [1, 4].

1.4.3.5. Afinite Kromatografisi

Afinite kromatografisinin temeli saflaştırılacak proteine, özel ve seçimli afinite gösteren bir biyolojik ligandın (substrat, koenzim, hormon, antikor ya da nükleik asit) kovalent olarak bağlanmasıdır. Özgün etkileşimi esas alan güçlü bir protein saflaştırma tekniğidir. Çok kompleks bir karışım içinde bulunan bazı proteinler afinite kromatografisi sayesinde tek basamakta oldukça saf halde elde edilirler. Örneğin bir enzim saflaştırılmasında o enzimin substratı veya yapısı substrata benzeyen bir inhibitör, kofaktör ligand olarak kullanılabilir. Bunun için ligand kolon matriksine bağlanmalıdır. Kromatografik ayırım sırasında liganda spesifik ve geri dönüşümlü bir bağlanma, hedef proteinin yüzeyindeki fonksiyonel bir bölge tarafından gerçekleştirilir. Böylece hedef protein özgün yapısını kaybetmeksizin saflaştırılmış olur [1, 4].

1.4.3.6. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi, bütün analitik ayırma teknikleri arasında en yaygın kullanılanıdır. HPLC yöntemi ile çok az miktardaki maddeler bile saflaştırılabilmektedir. HPLC'nin en önemli özelliği ayırma gücü, duyarlılığı ve geri kazanımı yüksek, hızlı bir yöntemdir. HPLC yönteminde hareketli faz 10-400 atm basınç altında kolondan 0,1-5 cm/s gibi yüksek bir hızla geçirilir. Buna bağlı olarak ta kısa sürede ayırma işlemi gerçekleşmiş olur. Bu yöntem saflaştırmanın yanı sıra protein çözeltilerinin tuzunu gidermek içinde kullanılır.

HPLC'de molekül dışlama, ters faz ve iyon değiştirme kromatografisi gibi kromatografik tekniklerden yararlanılır. Bu tekniklerden en yüksek verim molekül dışlama tekniği ile elde edilir. Buna karşılık ters faz kromatografisinde verim daha düşük olup proteinlerin özelliğine bağlı olarak değişmektedir. Ters faz kromatografisi ile ribozomal proteinler saflaştırılırken saflaştırılmayan diğer proteinler için iyon değişimi kromatografisi kullanılabilir. Karmaşık yapılu proteinlerden oluşan karışımlar bu üç tekniğin bir arada kullanılmasıyla saflaştırılabilir [46].

1.5. Protein Konsantrasyonunun Ölçülmesi

Saflaştırmanın her aşamasında ölçülen protein konsantrasyonu, saflaştırma aşamalarının saflaştırma için uygun olup olmadığını ve saflaştırmanın ne ölçüde gerçekleştiğini belirlemede önemlidir. Ayrıca saflaştırılan biyomolekölün saflaştırma oranının hesaplanırken protein konsantrasyonu belirlenmektedir.

Protein konsantrasyonun ölçülmesinde aşağıdaki yöntemler kullanılabilir:

- A_{280}/A_{260} (Warburg-Christian yöntemi)
- Biüret yöntemi
- Boya-bağlama (Bradford) yöntemi
- Lowry yöntemi

Genel olarak bu yöntemler protein çözeltisinin UV absorpsiyonunun ölçülmesi veya bir belirteç ile reaksiyonu sonucu oluşan renkli bir bileşiğin görünür alanda spektral olarak belirlenmesine dayanır [46].

1.6. Enzim Saflaştırmada Yapılacak Temel Analizler ve Aktivite Hesaplamaları

Biyolojik katalizör olarak görev yapan enzimlerin organizmadaki mevcut yerlerini, saflık düzeylerini, etki mekanizmalarını ve miktarlarını tespit etmede en önemli veri ölçülen aktivite değerleridir. Her enzime özgü karakteristik özellikler ve saflık düzeyi aktivite ölçümlerini şekillendirmektedir. Aktivite ölçümleri enzimin katalizör olarak görev yaptığı reaksiyonda tükenen substrata ya da ortamda oluşan ürüne bağlı olarak ölçülen reaksiyon hızı ile tespit edilir. Zamana bağlı olarak substratın derişiminde ki azalma ya da oluşan ürünün derişiminde ki artış reaksiyon hızını belirlemektedir. Reaksiyon, ortamdaki substrat tükeninceye kadar devam etmekte ve zamana bağlı olarak reaksiyon hızı azalmaktadır. Bu azalma ortama ilave edilen substrat ile enzim substrat doygunluğu sağlanarak giderilmektedir.

Enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçülürken dikkat edilmesi gereken hususlar vardır. Özellikle ölçümlerin yapılacağı zaman aralığının tespitinde elde edilen absorbans verilerinin zamana bağlı olarak grafiğe geçirilmesi ile oluşan eğrinin doğrusal olduğu zaman aralığı dikkate alınmalıdır. Spektrofotometrik ölçümlerde bu eğrilerin doğrusallıktan saptığı gözlenebilir. Bu duruma;

- Ham homojenatta aktivite ölçümü yapılırken, homojenattaki iri partiküllerin varlığı,
- Aktivite ölçümünün yapıldığı ortamın sıcaklık kontrolündeki sorunlar,
- Sağlıklı olmayan kör ölçümleri,
- Reaksiyon ortamındaki izoenzimlerin varlığı,

- Substratın başlangıç derişiminin yüksek olması (substrat inhibisyonu), neden olabilir. Bu sorunları çözmek için bir takım yöntemler uygulanabilir. Bu yöntemlerden biri iyonik olmayan deterjan kullanımıdır. Deterjanla homojenattaki iri partiküller çözünür hale getirilir. Ancak kullanılan deterjanın enzime etkisi denenmelidir. Sıcaklığın kontrolü ise çalışma çözeltisinin (tampon ve substrat karışımından oluşan çözelti) su banyosunda istenilen sıcaklıkta tutulması ile sağlanabilir. Sağlıklı bir kör ölçümü içinde kör olarak kullanılan çözeltideki safsızlıkların giderilmesi gerekir. Bu safsızlıklar ölçüm yapılan küvetlerin yüzeylerinde de bulunabileceğinden küvetlerin temiz olması gerekir. Özellikle ardı ardına yapılan ölçümlerde küvet yüzeyine bağlanan enzimler kirliliğe sebep olur. Bu durumda tek kullanımlık küvetler kullanılmalı ya da küvet ölçüm öncesi saf su ya da kör çözeltisi ile yıkanmalıdır. Kullanılan küvetler ölçüm yapılan dalga boyuna göre seçilmelidir. 300 nm dalga boyunun altındaki ölçümlerde kuartz küvetler kullanılmalıdır. Ayrıca ölçümlerde elde edilen absorbans veri aralığı 0,01-1,0 arasında olmasına dikkat edilmelidir [47].

Her saflaştırma aşamasından sonra saflaştırılacak enzim ile ilgili analizler saflaştırma işleminin verimini belirtir. Yapılacak temel analizleri iki kısımda toplayabiliriz. Bunlar enzim aktivitesinin ölçümü ve protein konsantrasyonunun ölçülmesidir. Protein konsantrasyonunun ölçümü Bölüm 1.5.'de belirtilen yöntemlerden duyarlılığı en yüksek olanı kullanılarak gerçekleştirilir. Enzim aktivitesinin spektrofotometrik ölçümlerinde ilk etap da kör çözelti spektrofotometreye yerleştirilerek absorbansın sıfırlanması sağlanır. Kör olarak tampon ve substrattan oluşan çözelti kullanılır. Daha sonra küvetteki kör çözeltinin üzerine enzim örneği ilave edilmesiyle küvet tekrar spektrofotometreye yerleştirilir. Spektrofotometrede zamana bağlı olarak değişen absorbanslar kaydedilir. Bu değerler doğrultusunda dakikadaki absorbans değişimi (dA/dt) hesaplanır. Hesaplanan bu değer saflaştırılan örnekteki enzim aktivitesi bulunur.

Enzim aktivitesinin çeşitli birimlerde ifade edilmesine karşın genelde enzimin toplam aktivitesi için ünite (U) birimi ve spesifik aktivitesi içinde Ünite/mg protein kullanılır. Bir ünite enzim aktivitesi, bir dakikada 1 µmol ürün oluşumu ya da 1 µmol substrat tükenmesini katalizleyen enzim miktarıdır. Bir ünite enzim (U) ya da uluslararası ünite (IU) şeklinde kısaltılır. Aşağıdaki formül kullanılarak da hesaplanır.

$$\text{Örnekteki Enzim ünitesi} = \frac{V_T \text{ (ml)} \times dA/dt \times 1000 \times \text{seyreltme faktörü}}{V_S \text{ (ml)} \times d \text{ (cm)} \times \epsilon_\lambda \text{ (cm}^2 \text{ /mol)}}$$

(Toplam aktivite U = µmol/dak)

dA/dt = Absorbansın dakikadaki değişimi

- V_T = Reaksiyon karışımının toplam hacmi
 V_S = Küvetteki saf enzim çözeltisi hacmi
 d = Küvetin ışık yolu (genellikle 1 cm)
 ϵ = Ekstinksiyon katsayısı

Formülün paydasında yer alan ekstinksiyon katsayısı absorpsiyon yapan maddenin derişimi ve absorbansı arasındaki sabit oranı ifade eder. $\epsilon = A / c \times d$ formülü ile hesaplanır. Formülün payında yer alan 1000 rakamı ise enzim ünitesini μmol olarak ifade etmek için gereklidir.

Bir mg protein başına düşen enzim ünitesi (U/mg protein) spesifik aktivite değeridir. Saflaştırma katsayısı her aşamada hesaplanan spesifik aktivitelerin birinci saflaştırma basamağındaki spesifik aktiviteye oranlanması ile bulunur [46].

1.7. Araştırmanın Amaçları

Bu araştırmada;

- Metabolizmada oldukça önemli olan PON1 enziminin sığır karaciğerinden düşük maliyetle, saflık ve aktivitesi yüksek bir şekilde saflaştırılması,
- Sığır karaciğerinden saflaştırılan PON1 enziminin kinetik özelliklerinin incelenmesi,
- PON1 enzimi ile grelin hormonu arasındaki ilişkinin araştırılması, amaçlanmıştır.

2. MATERİYAL ve METOT

2. 1. Materyal

2.1.1. Hayvan Materyali

Örnekler günlük yeni kesilmiş sığırların karaciğerinden temin edildi. Alınan karaciğer örnekleri tuz-buz karışımında korunarak laboratuara getirildi. Karaciğer örneği +4 °C'lik ortamda bağ dokusu, yağ dokusu ve kandan temizlendi. Keskin bir makas kullanılarak küçük parçalar haline getirilen karaciğer örneği ile saflaştırma basamaklarına geçildi.

2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan kimyasallar ve bu kimyasalların temin edildiği firmalar karşılarında belirtilmiştir.

- Trizma base (hidroksimetil amino metan), (Sigma)
- Triton X-100, (Merc)
- Potasyum fosfat, (Sigma)
- Etanol, (Sigma)
- Metanol, (Sigma)
- n-bütanol, (Carlo Erba)
- Protein standartları: BSA, Lizozim, Karbonikanhidraz, Fosforilaz B (Amresco)
- Kalsiyum klorür, (Sigma)
- DEAE Selüloz, (Fluka)
- DEAE Sefaroz, (Sigma)
- Coomassie brilliant blue G-250, (Fluka)
- o-Fosforik asit, (Merc)
- Asetik asit, (Merc)
- Aseton, (Merc)
- Amonyum persülfat, (appliChem)
- Sodyum dodesil sülfat, (Bio-Rad)

- TEMED, (appliChem)
- Akrilamid, (appliChem)
- Sükroz, (Merc)
- Hidroklorik asit, (Merc)
- Fenol, (Sigma)
- Fenilasetat, (Sigma)
- Bakır(II)sülfat penta hidrat, (Sigma)
- Sodyum hidroksit, (Sigma)
- Potasyum sodyum tartarat dihidrat, (Sigma)
- Aprotinin, (Sigma)
- Sodyum perklorat, (Merc)
- Glisin, (Merc)
- Diyaliz membranı. (Sigma)

2.1.3. Kullanılan Alet ve Cihazlar

- Homojenizatör : Bosch GGS27C
- Ultrasantrifüj : Beckman optima-L-70 K ultracentrifuge
- Su banyosu : Benmari memmert
- Spektrofotometre : Secomam S. 750
- pH metre : Jenway 3010 pH Meter
- Magnetik karıştırıcı : ARE Heating magnetic stirrer
- Hassas terazi : Chyo JL-189
- Karıştırıcı : NM 110 Vorteks
- Otomatik pipet : Eppendrof 50-1000 µl
- İnkübatör : ES 500
- Elektroforez tankı : UVP Vertical Electrophoresis Unit, Cambridge, UK
- HPLC : CE 1100 Series

- HPLC kolonu : SGE Walkosil 11 5Cl8 RS peptid kolonu
- Kromatografi kolonları : 1,4 x 30 cm ve 1,4 x 50 cm ebatlarındaki cam kolonlar

2.1.4. Kullanılan Çözeltiler

Saflaştırma basamaklarında kullanılan çözeltiler içinde en önemli yeri tampon çözeltiler oluşturmaktadır. Saflaştırma yöntemleri belirtilirken kolaylık sağlaması için bu tampon çözeltiler kullanım sırasına göre çeşitli harflerle adlandırılmıştır. Tampon çözeltilere verilen adlar ve içerikleri aşağıdaki gibidir:

A Tamponu : 5 mM Tris/HCl (pH:7,4), 0,25 M Sükroz,

B Tamponu : 5 mM Tris/HCl (pH:7,4),

C Tamponu : 20 mM Tris/HCl (pH:7,7), % 0,1 (v/v) Triton X-100,

D Tamponu : 20 mM Tris/HCl (pH:7,7), 2,5 mM CaCl₂, % 0,1 (v/v) Triton X-100, 50 mM NaCl ,

E Tamponu : 20 mM Tris/HCl (pH:7,7), 2,5 mM CaCl₂, % 0,1 (v/v) Triton X-100, 100 mM NaCl,

F Tamponu : 20 mM Tris/HCl (pH:7,7), 2,5 mM CaCl₂, % 0,1 (v/v) Triton X-100, 200 mM NaCl,

G Tamponu : 20 mM Tris/HCl (pH:7,7), 2,5 mM CaCl₂, % 0,1 (v/v) Triton X-100, 500 mM NaCl.

SDS-PAGE için gerekli çözeltiler;

Ayrırma jeli tamponu : 1,5 M Tris/HCl (pH: 8,8)

Yükleme jeli tamponu : 0,5 M Tris/HCl (pH: 6,8)

Sodyum dodesil sülfat çözeltisi : % 10 (w/v) SDS

Amonyum persülfat (APS) çözeltisi (polimerizasyon başlatıcı): % 10 (w/v) APS

Ayrırma jeli yüzey çözeltisi : %0,1 SDS, 0,375 M Tris/HCl (pH: 8,8)

Örnek uygulama tamponu : %4 SDS, %20 gliserol, %10 2-merkaptoetanol, 0,125 M Tris/HCl pH: 6,8

Tank tamponu : 0,025 M Tris/HCl (pH:8,3), 0,192 M glisin, %0,1 SDS,

Bromfenol mavisi çözeltisi : %0,1 (v/w) Bromfenol çözeltisi

ARE aktivitesi için kullanılan substrat çözeltisi ve tamponu: 50 mM Tris /HCl (pH: 8), 1 mM Fenilasetat, 1 mM CaCl₂

2.2. Metotlar

2.2.1. Sığır Karaciğeri Dokusundan PON1 Enziminin Saflaştırılması

2.2.1.1. Karaciğer Örneğinin Homojenizasyonu (Özütleşmesi)

Homojenatın hazırlanması, ultrasantrifüjlenmesi ve membran yapılarının çözülmesinde literatürde rat karaciğer dokusundan PON1 enziminin saflaştırılması kısmen değiştirilerek uygulandı [48]. Bölüm 2.1.1.'de belirtildiği gibi mezbahada yeni kesilmiş sığır karaciğer örneğinden 20 gram tartılarak 500 ml'lik plastik dereceli silindire konuldu. Bu kap içi buz dolu hacmi dereceli silindire göre daha büyük bir behere yerleştirildi. İki kap arasına buz konuldu. Bu sayede karaciğer doku örneği parçalanırken artabilecek sıcaklığın dokuya zarar vermesi önlenildi. Homojenizasyonda tampon çözelti olarak A tamponundan (5 mM Tris/HCl pH:7, 0,25 M sükröz) 80 ml kullanıldı. Bosch GGS27C (27000 devir/dak.) doku parçalayıcı ile yaklaşık 3 dakika boyunca kısa süreli ara verilerek gerçekleştirildi. Daha sonra karaciğer örneğinin bulunduğu dereceli silindire, karaciğer ağırlığı/tampon hacmi oranı % 10 olacak şekilde soğuk (+4 °C) A tamponundan 100 ml ilave edildi. Homojenat hazırlanırken, aprotinin proteaz inhibitöründen [aprotin, yapısında 1 flakan, 50 ml steril izotonik (% 0,9 NaCl) polivalan proteaz inhibe edici özelliğe sahip kallikrein, 70 mg polipeptid içerir] 50 µl homojenata ilave edildi.

2.2.1.2. Homojenatın Ultrasantrifüj Edilmesi ve Çözülmesi

Homojenat değişik devirlerde Beckman optima-L-70 K ultrasantrifüj ile üç defa ultrasantrifüj edildi. İlk olarak homojenattaki hücre içeriğini oluşturan çekirdek ve mitokondri 1600 rpm (460 g) devirde 10 dakika ultrasantrifüj edilerek çöktürüldü. Çökelti (pellet) üstündeki süzöntü (süpernatant) ayrı bir santrifüj tüpüne aktarılıp 8400 rpm (12500 g) devirde 10 dakika süre ile ikinci kez ultrasantrifüjlendi. İlk ultrasantrifüjlemede olduğu gibi süpernatant ayrıldı. Süpernatant üçüncü.kez 25000 rpm (105000 g) devirde 1 saat boyunca ultrasantrifüjlenerek tekrar pellet ve süpernatant ayrıldı. Çökelti, 20 ml B tamponuna alındı. Çökeltideki mikrozomal membranların çözülmesi için noniyonik deterjan olan Triton X-100'den % 0,75 (v/v) oranında, homojenata ilave edilerek vortekslendi. Bu çözelti +4 °C'da 30 dakika bekletildi. Tekrar 25000 rpm (105000 g) devirde 1 saat süre ile homojenat ultrasantrifüj edilerek süpernatant ayrıldı. Böylece saflaştırmanın ikinci aşaması da tamamlanmış oldu [48].

2.2.1.3. Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Diyaliz

Ultrasanrifüj saflaştırma basamağından elde edilen +4 °C'daki süpernatant uygun % amonyum sülfat çöktürmesi için 50 ml'lik behere konuldu. Amonyum sülfat ile enzim proteinini çöktürmede en yüksek spesifik aktiviteye sahip % doyumluk konsantrasyonu belirlendi. Bu amaç doğrultusunda çözeltideki son konsantrasyonu % 40-80 olacak şekilde amonyum sülfat ilave edilerek enzim örnekleri çöktürüldü. Çöktürme için süpernatantın bulunduğu beher buz dolu daha büyük bir kabın içine yerleştirildi. Magnetik bir karıştırıcı üzerine konulan bu behere daha önce havanda toz haline getirilen amonyum sülfat azar azar ilave edildi. Daha sonra çözelti 30 dakika magnetik karıştırıcı yardımıyla karıştırıldı. Proteinlerin çökmesi için çözelti 30 dakika 12500 rpm (52500 g) devirle santrifüjlendi. Çöken proteini çözmek için C tamponundan [20 mM Tris/HCl (pH:7,7), % 0,1 (v/v) Triton X-100] 10 ml kullanıldı. Protein karışımındaki amonyum sülfat diyaliz yapılarak bir sonraki saflaştırma basamağı olan DEAE-Sefaroz iyon değişim kromatografisine geçildi. Spesifik aktivitesi yüksek olan % amonyum sülfat miktarını belirlenmesinde aşağıdaki çizelge 2.1.'deki belirtilen amonyum sülfat miktarları kullanıldı [47, 53].

Çizelge 2.1. En yüksek spesifik aktiviteyi belirlemek için çözeltiye eklenmesi gereken katı amonyum sülfat miktarları [47]

Amonyum sülfatın % doygunluk konsantrasyonu	100 ml çözeltiye eklenecek amonyum sülfat miktarı (g)
40	22,90
50	29,50
55	33,11
60	36,60
70	44,20
80	52,30

Diyaliz işlemi Bölüm 1.4.2.'de belirtildiği gibi amonyum sülfat ile çöktürme sonrası protein çözeltisinde bulunan proteinden daha küçük iyonların diffüzyonla diyaliz membranından geçirilmesi esasına dayanmaktadır. Diyaliz öncesi membran yaklaşık 24 saat saf suda bekletildi. Diyaliz tamponu için amonyum sülfat çöktürmesi sonrası proteinlerin çözüldüğü C tamponu kullanıldı. Membranın uçlarından biri çift düğümle bağlandıktan sonra içinde hava boşluğu kalmayacak şekilde protein çözeltisi membrana aktarıldı. Membranın diğer ucu da çift düğümle bağlanıp membran gerginleştirildi. Magnetik karıştırıcı üzerindeki 200 ml diyaliz tamponu içeren behere konuldu. Diyaliz +4 °C'da 12 saat süreyle gerçekleştirildi. Diyaliz tamponu 4 saatte bir değiştirilerek diyaliz tamamlandı.

2.2.1.4. DEAE-Sefaroz CL-6B İyon Değişim Kromatografisi

İyon değişim kromatografisinde pH:7,7’de negatif yük kazanan PON1 enzim proteinini anyon değiştirici DEAE-Sefaroz CL-6B kullanılarak saflaştırılmıştır. İzolelektronik noktası pH: 5,1 olan PON1 enzimi bu değerin üstündeki bir pH’da negatif yüklenir [13]. Bölüm 1.4.3.3.’de belirtildiği gibi kolon dolgu matriksi DEAE-Sefaroz CL-6B amino grubu nedeniyle artı yüklüdür. Artı yüklü DEAE-Sefaroz CL-6B ile doldurulmuş ve pH:7,7 ile tamponlanmış kolondan protein çözeltisi geçirildiğinde eksi yük değerine göre proteinler dolgu matriksi ile etkileşerek kolonda tutulur. Bu sayede yük değerine göre bir saflaştırma gerçekleştirilir [48,54].

Saflaştırmada kolon olarak 1,4 cm iç çapında 30 cm boyunda cam boru kullanıldı. % 20’lik etil alkol süspansiyonundaki DEAE-Sefaroz CL-6B matriksi kullanılmadan önce etil alkolün uzaklaştırılması için C tamponuyla [20 mM Tris/HCl %0,1 (v/v) Triton X-100] yıkandı. Bunun için 100 ml DEAE-Sefaroz CL-6B süspansiyonu üzerine 100 ml C tamponu ilave edilip magnetik karıştırıcıyla 10 dakika karıştırıldı. Karıştırma işlemi tamamlanmasıyla beraber matriksin çökmesi sonrası süpernatant ayrıldı. Bu işlem 100 ml’lik C tamponuyla 3 defa tekrarlandı. Her işlem sonrası matriks tampon karışımının pH’sı ölçüldü. Üçüncü yıkamadan sonra gerekli yaklaşık pH:7,7 sağlandığından yıkama işlemi tamamlandı. Amonyum sülfat çöktürmesi sonrası diyaliz ile saflaştırılmış protein çözeltisi ve C tamponundaki DEAE-Sefaroz CL-6B magnetik karıştırıcıda 10 dakika karıştırılarak enzim proteinin matrikse bağlanması sağlandı. Daha sonra bu karışım kolona yavaşça ilave edildi. Kolonda hava kalmaması için kolon sürekli lastik bir çubuk ile dövüldü. Hazırlanan kolona HPLC’nin peristaltik pompası bağlandı. Kolondaki akış hızı 0,5 ml/dak. olarak ayarlandı. Yapılan bütün safhalar bu akış hızında gerçekleştirildi. Kolon matriksine bağlanmayan proteinlerin ayrılması için kolondan C tamponu geçirildi. Kolondan çıkan eluatlar 3 ml’lik tüplere toplandı. 51 ml C tamponun kolondan geçmesi sonrası kolonda tutulan protein örneklerinin ayrılması için tuz konsantrasyonu yükselen sırasıyla D tamponu [20 mM Tris/HCl (pH:7,7), 2,5 mM CaCl₂, % 0,1 (v/v) Triton X-100, 50 mM NaCl] ve E tamponu [20 mM Tris/HCl (pH:7,7), 2,5 mM CaCl₂, % 0,1 (v/v) Triton X-100, 100 mM NaCl], F tamponu [20 mM Tris/HCl (pH:7,7), 2,5 mM CaCl₂, % 0,1 (v/v) Triton X-100, 200 mM NaCl], G tamponu [20 mM Tris/HCl (pH:7,7), 2,5 mM CaCl₂, % 0,1 (v/v) Triton X-100, 500 mM NaCl], tamponlarından her birinden 30 ml kolondan geçirildi. Yine kolondan çıkan eluatlar üçer ml tüplere toplandı. Toplanan eluatlarda protein olup olmadığı kalitatif olarak Warburg-Christian yöntemi ile 280 nm’de okunan absorbanslar ile tespit edildi. Protein bulunan örneklerde PON1 enzim aktivitesi ölçülerek en yüksek spesifik aktiviteye sahip tüplerdeki örnekler sefadeks G-200 jel filtrasyonu kromatografisine uygulandı.

2.2.1.5. Sefadeks G-200 Jel Filtrasyonu Kromatografisi

DEAE-Sefaroz iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılan protein örnekleri jel filtrasyonu kromatografisine tabi tutuldu. Jel filtrasyonunda kolon dolgu maddesi olarak Sefadeks G-200 superfine matriksi kullanıldı. Molekül ağırlığı 5000-800000 kDa aralığındaki globuler materyalleri ayırmada kullanılan Sefadeks G-200, küresel yapılı ve belirli boyutlarda gözeneklere sahip inert parçacıklardan oluşmuştur. Bu özelliği ile doldurulduğu kolondan molekül büyüklüğüne göre bir ayrımı sağlar. Bu ayırmada büyük moleküller gözeneklere girmeyerek kolondan hızla ayrılırlar. Molekül küçüldükçe kolonda alıkonma süresinde artış olur ve bu sayede saflaştırma gerçekteştirilir [47,54].

Jel filtrasyonu kromatografisinde ilk olarak kolon hazırlanırken toz halindeki dolgu matriksinin şişmesi sağlandı. Bunun için 4 g Sefadeks G-200, 2 gün 100 ml C tamponunda [20 mM Tris/HCl (pH:7,7), % 0,1 (v/v) Triton X-100] bekletildi. Hazır hale gelen jel matriksi uzunluğu 50 cm, iç çapı 1,4 cm boyutlarındaki cam kolona yavaşça aktarıldı. Aktarımda, lastik bir hortumla kolona yavaşça vurularak kolonda hava kabarcığı oluşması önlendi. Kolon matriksle doldurulurken yaklaşık 2 cm boşluk bırakıldı. Bu boşluğa kolon dolgu maddesinin hava almaması için C tamponu konuldu. Cam kolona HPLC'nin pompası bağlanarak tampon çözeltinin kolondan geçmesi sağlandı. 0,2 ml/dak. akış hızı ile kolondan geçen C tamponu ile kolon stabil hale getirildi. Protein çözeltisi kolona uygulanırken daha önce kolon dolgu maddesinin üzerindeki hava ile teması engelleyen C tamponu pipet yardımıyla çıkarıldı. Bu boşluğa örnek yavaşça ilave edildi. Örnek kolon matriksine girdikten sonra üzerine tekrar C tamponu ilave edilip HPLC pompasına bağlandı. 0,2 ml/dak. akış hızıyla protein çözeltisi kolondan geçirildi. Eluatlar 1,5 ml'lik eppendorf tüplere toplandı. Toplanan eluatlarda protein olup olmadığı kalitatif olarak Warburg-Christian yöntemi ile 280 nm'de okunan absorbanslar ile tespit edildi. Protein bulunan örneklerde PON1 enzim aktivitesi ölçülerek en yüksek spesifik aktiviteye sahip protein örneği ayrıldı.

2.2.2. Biüret Yöntemi ile Kantitatif Protein Tayini

Saflaştırma basamaklarından elde edilen ekstraktlardaki protein miktarı tayinleri Biüret ve yöntemiyle belirlendi. Biüret yöntemi, proteinlerin peptit bağlarının alkali ortamda bakır iyonları ile meydana getirdikleri mor renkli kompleksin renk şiddetinin 540 nm'de ölçülmesi esasına dayanır [46].

Protein tayini için ilk etapda 1 ml'sinde 10 mg protein içeren BSA'dan (Bovine serum albumin) çeşitli konsantrasyonlarda standart çözeltiler ve biüret ayracı hazırlandı. Standart protein çözeltileri için 50 mg BSA'nın 5 ml saf suda çözülmesi ile hazırlanan stok çözelti kullanıldı.

Çizelge 2.2. Protein tayini için hazırlanan standart çözeltilerin bileşimi

Standart numarası	H ₂ O (ml)	Stok çözelti (ml)	Standart çözelti (ml)	Protein konsantrasyonu (mg/ml)
8	-	1,00	-	10,00
7	0,25	0,75	-	7,50
6	1,00	1,00	-	5,00
5	1,00	-	6. standarttan 1ml	2,50
4	1,00	-	5. standarttan 1ml	1,25
3	1,00	-	4. standarttan 1ml	0,63
2	1,00	-	3. standarttan 1ml	0,31
1	1,00	-	-	0,00

Biüret ayracının hazırlanması için; CuSO₄.5H₂O, KNaC₄H₄O₆.2H₂O, NaOH kimyasal maddeleri kullanıldı. 1,5 g CuSO₄.5H₂O'nun, 500 ml saf suda hazırlanan çözeltiye 6 g KNaC₄H₄O₆.2H₂O ilave edilerek çözüldü. Bu çözeltinin üzerine 300 ml %10'luk (ağırlık/hacim) oranda NaOH ilave edildi ve toplam hacim 1000 ml olacak şekilde saf su ile tamamlandı [46].

Protein tayini için kullanılan çözeltiler ve hacimleri çizelge 2.3.'de belirtilmiştir.

Çizelge 2.3. Protein tayini için kullanılan çözeltilerin bileşimi

Çözelti	Kör (ml)	Standart çözelti (ml)	Örnek (ml)
H ₂ O (ml)	0,50	-	-
Standart Çözelti (ml)	-	0,50	-
Örnek (ml)	-	-	0,50
Biüret Ayracı (ml)	2,00	2,00	2,00
Toplam Hacim (ml)	2,50	2,50	2,50

Standart çalışma grafiğinin çizimi için çizelge 2.2.'de belirtilen maddelerin çözeltileri tüplere konuldu. Tüpler vorteks ile karıştırıldıktan sonra 30 dakika oda sıcaklığında (25 °C) bekletildi. Daha sonra 540 nm dalga boyunda spektrofotometre çizelge 2.3.'de belirtilen kör çözeltisi ile sıfırlanarak standart çözeltilerin absorbansları ölçüldü. Ölçülen bu değerler ile standart çözeltilerdeki protein miktarları (mg/ml) grafiğe geçirilerek Şekil 3.1.'deki standart çalışma grafiği çizildi. Aynı işlemler saflaştırma basamaklarından elde edilen protein örnekleri içinde uygulandı. Ölçülen absorbans değerleri, standart çalışma grafiğinden elde edilen denklemde yerine yazılarak protein miktarları hesaplandı.

2.2.3. PON1 Enziminin Aril Esteraz (ARE) Aktivite Tayini

PON1 enziminin ARE aktivitesiyle fenilasetatın hidrolizi sonucu fenol ve asetik asit oluşur. Oluşan fenolün dakikadaki absorbans değişimi ölçülerek ARE aktivitesi tayin edilir [55]. Aktivite tayininde ve kinetik çalışmalarda Secomam S. 750 model spektrofotometre kullanıldı. Fenolün literatürde 270 nm’de maksimum absorbans verdiği belirtilmesine karşı ölçüm yapılan spektrofotometrede hangi dalga boyunda en yüksek absorbans ortalamasına sahip olduğu tespit edildi. Bu amaç doğrultusunda 255-282 nm aralığında kuartz küvet kullanılarak dalgaboyu (λ) taraması yapıldı.

Her saflaştırma basamağında saflaştırılan enzim örneklerinin aktivite tayininde Eckerson tarafından önerilen yöntem kullanıldı [55]. Bölüm 2.2.5.’de anlatılan kinetik çalışmalar doğrultusunda enzimin optimum aktivite gösterdiği koşullar dikkate alındı. Buna göre fenilasetatın hidrolizi sonucu oluşan fenolün, 30 s aralıklarla 2 dakikalık bir süre boyunca absorbansındaki değişimi, 271 nm dalga boyuna ayarlanmış spektrofotometrede ölçüldü. Ölçümler için 50 mM Tris/HCl pH:8 olan tampon içerisinde, 1 mM fenilasetat substratı ve 1 mM CaCl_2 aktivatörü bulunan çözelti hazırlandı. Spektrofotometrik ölçümler 1,5 ml ve 5 ml’lik kuartz küvetler kullanıldı. 1,5 ml kuartz küvetler ile yapılan ölçümde 1ml substrat çözeltisi, 5 ml’lik kuartz küvetler kullanıldığında 3 ml substrat çözeltisi kör olarak kullanıldı. Bir ml substrat için 17 μl enzim örneği 3 ml substrat için 50 μl enzim örneği ilave edilmesiyle reaksiyon ortamında oluşan fenolün absorbansındaki değişimi kaydedildi [55, 56, 57].

Bir ünite PON1 enziminin ARE aktivitesi, bir dakikada 1 μmol fenol oluşturur. Aktivite değeri U/ml cinsinden aşağıdaki formül doğrultusunda hesaplandı. Fenolün molar ekstinksiyon katsayısı $1310 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ olarak alındı [55].

$$\begin{aligned} \text{Örnekteki Enzim aktivitesi} &= \frac{V_T(\text{ml}) \times dA/dt \times 10^6}{V_E(\text{ml}) \times d(\text{cm}) \times \epsilon (\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}) \times 10^3} \\ (\text{Toplam aktivite U/ml} = \mu\text{mol/dak.ml}) \end{aligned}$$

dA / dt = Absorbansın dakikadaki değişimi

V_T = Reaksiyon karışımının toplam hacmi

V_E = Küvetteki saf enzim çözeltisi hacmi

d = Küvetin ışık yolu (1 cm)

ϵ = $1310 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (Molar ekstinksiyon katsayısı)

10^6 = 1 Molü 1 mikromole dönüştürme sabiti

10^3 = 1 Litreyi 1 mililitreye dönüştürme sabiti

Bu veriler doğrultusunda formül tekrar düzenlenerek aşağıdaki bağıntı oluşturulmuştur.

$$\text{PON1 Enzim aktivitesi} = \frac{V_T \times dA/dt \times 10^3}{V_E \times 1310}$$

(U/ml = $\mu\text{mol/dak.ml}$)

2.2.4. SDS-PAGE (Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi) ile PON1 Enziminin Saflık Kontrolü ve Molekül Ağırlığının Tayini

SDS- PAGE Laemmli tarafından tanımlanan teknikle uygulandı [58]. SDS- PAGE için gerekli çözeltiler ve jel aparatı Bölüm 2.1.4’de belirtildiği gibi hazırlandı. Jel aparatı hazırlanırken iki cam levha arasına bir miktar su dökülerek sızdırma kontrolü yapıldı. Çizelge 2.4.’de içeriği belirtilen ayırma jelinden 25 ml hazırlandı. Ayırma jeli pipet yardımı ile cam ve alüminyum plakaların arasına hava kabarcığı kalmayacak şekilde, üstten 3 cm kalıncaya kadar jel kasetine dolduruldu.

Çizelge 2.4. Ayırma ve yükleme jelinin bileşimi

Karışımında kullanılan maddeler	Ayırma Jeli (% 10) 25 ml	Yükleme Jeli (% 5) 10 ml
Distile su (ml)	9,89 ml	6,80 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	6,30 ml	—
1,0 M Tris-HCl (pH 6,8)	—	1,25 ml
% 10 SDS	0,25 ml	0,10 ml
% 30 Akrilamid	8,30 ml	1,70 ml
% 10 Amonyum persülfat	0,25 ml	0,10 ml
TEMED	0,01 ml	0,05 ml

Jelin yüzeyini düzgünleştirmek için, 0,3 ml’lik saf su ile doyurulmuş n-bütanol çözeltisi, jel kasetine döküldü. Bu şekilde düzgün bir polimerizasyon yüzeyi sağlanmış oldu. İki dakika içinde n-bütanol jel iç yüzeyine geçti ve çok keskin bir jel fazı oluştu. İki saat polimerizasyonun tamamlanması için bekledikten sonra üst yüzeydeki bütanol kurutma kağıdı ile uzaklaştırıldı. % 5’lik yükleme jelinin hazırlanmasına geçildi. Yükleme jeli çizelge 2.4.’de belirtilen miktarlara göre hazırlanıp pipet yardımıyla jel kasetine aktarıldı. Bu işlemler gerçekleştirilirken hava kabarcığı olmamasına dikkat edildi. Tarak yerleştirilmesi sonrası yarım saat polimerizasyon için beklenildi. Polimerizasyon sonrası taraklar çıkarılıp örneklerin uygulanacağı kuyucuklar ucuna iğne takılmış sıringa ile düzenlenerek tank tamponuyla yıkandı. SDS-PAGE yapılacak örneklerin hazırlanışına başlandı. İlk olarak örneklerden ve çizelge 2.5.’de belirtilen standart proteinlerden 10 μl alınıp üzerine 10 μl örnek uygulama tamponu ilave

edildi. Örnek uygulama tamponundaki SDS proteinlerin denatürasyonunu ve negatif yüklenmesini sağlamaktadır. Bu karışım kapakları iğne ile delinmiş eppendorf tüplerde karıştırılıp, 3 dakika kaynatıldı. Oda sıcaklığına kadar soğuması sağlandı. Üzerlerine 10 µl % 0,1 bromfenol mavisini damlatıldı. Örnekler kuyucuklara yüklendikten sonra güç kaynağı 80 V'ta çalıştırıldı. Elektroforez sık sık kontrol edilerek üst havuzdaki tampon azaldığında alttaki havuzdan takviye edildi. Bromfenol mavisinden kaynaklanan mavi bant, jelin altına 0,5 cm kalıncaya kadar yürüdükten sonra güç kaynağı kapatıldı. Levha elektroforez cihazından alındı ve levhalardan biri dikkatli bir şekilde jelin üzerinden kaldırıldı. Jel boyamasında % 10 (v/v) etanol, % 5 (v/v) asetik asit ve 0,0045 gram Coomassie brilliant blue G-250 içeren 300 ml'lik çözelti hazırlandı. Oda ısısında 4 saat boyunca boyamaya bırakıldı. Jel boyandıktan sonra boya yıkama için bileşiminde % 50 metanol, % 10 asetik asit, % 40 saf su bulunan çözelti hazırlandı. Bu çözeltide 30 dakika bekletilmek üzere üç defa yıkandı. Jellerdeki fazla boyanın alınması için de bileşiminde % 5 metanol, % 7 asetik asit ve % 88 saf su bulunan çözelti hazırlandı. Bu çözeltide 2 saat aralıklarla bekletilerek yıkama işlemi tamamlandı [46].

Çizelge 2.5. Standart olarak kullanılan proteinler ve molekül ağırlıkları

Proteinler	Molekül Ağırlığı (kDa)
Lizozim	23
Karbonikanhidraz	29
Sığır Albumini (BSA)	67
Fosforilaz B	97,4

SDS-PAGE elektroforegramı'nda PON1 enziminin molekül ağırlığının hesaplanması için jele uygulanan standart proteinler ve brom fenol mavisini'nin elektroforez sonunda, uygulama noktasından itibaren göç ettiği mesafeler ölçüldü. Brom fenol mavisini için ölçülen değerin rölatif göç mesafesi 1 olarak alındı ve standart proteinlerin göç mesafeleri brom fenol mavisinin göç mesafesiyle oranlanarak her bir standart protein için bir rölatif göç mesafe değeri bulundu. Daha sonra standart proteinlerin molekül ağırlıkları ile rölatif göç mesafeleri bir grafiğe yerleştirildi. Çizilen standart grafikten doğru denklemi bulundu. Elektroforegramda molekül ağırlığı bilinmeyen protein bantlarının rölatif göç değerleri denklemde yerine konularak molekül ağırlığı hesaplandı.

2.2.5. Safılaştırılan PON1 Enziminin Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi

2.2.5.1. Değişen Fenilasetat Konsantrasyonlarının Enzim Aktivitesine Etkisi

Enzim aktivitesinin ölçülmesi için yapılan deneyde bütün faktörler sabit tutulup yalnız fenilasetat konsantrasyonu değiştirildi. Bunun için çizelge 2.6.'da verilen değerlere göre hazırlanan farklı fenilasetat konsantrasyonlarının enzim aktivitesine etkisi incelendi. Fenilasetatın çeşitli konsantrasyonlardaki çözeltilerini hazırlamak için (pH:7,1) 50 mM Tris/HCl tamponunda 1 mM CaCl_2 aktivatörü kullanıldı. 0,1 mM-1 mM aralığı fenilasetat konsantrasyonlarını içeren 100 ml'lik 7 çözelti hazırlandı. Bölüm 2.2.3.'de belirtildiği şekilde 37 °C'de enzim aktiviteleri ölçüldü. Elde edilen değerlere göre Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. PON1 enzimin 50 mM Tris/HCl ve pH:7,1 olan tamponda 37 °C' de fenilasetat substratı için K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı.

Çizelge 2.6. Değişik konsantrasyonlarda hazırlanan fenilasetatın çözeltideki miktarları

Tüp Numarası	Fenilasetat (S) mM	Fenilasetatın Çözeltideki Hacmi (µl)	Toplam Çözelti Hacmi (ml)
1(kör)	-	-	100,00
2	0,10	1,28	100,00
3	0,20	2,60	100,00
4	0,30	3,86	100,00
5	0,50	6,40	100,00
6	0,60	7,74	100,00
7	0,80	10,30	100,00
8	1,00	12,80	100,00

Çizelge 2.6.'da belirtilen miktarların yanı sıra çözelti hazırlanırken (yukarıdaki paragrafta belirtildiği üzere) çözeltideki konsantrasyonu 1mM olacak şekilde 0,01 g CaCl_2 , 50 mM Tris/HCl tamponu için 0,6057 g Tris ve pH ayarlamasında 0,1 M HCl asit kullanılmıştır. Çözeltilerin son hacmi 100 ml olacak şekilde tampon ilave edilmiştir.

2.2.5.2. Artan Enzim Miktarının Aktiviteye Etkisinin İncelenmesi

Bu çalışmada artan enzim miktarının aktiviteye etkisinin incelenmesi amaçlandı. Deneydeki diğer faktörler sabit tutularak yalnız ilave edilen enzim miktarının değiştiği 5 çözelti hazırlandı. Bu çözeltiler hazırlanırken kullanılan enzim ve tampon (pH 7,1; 50 mM Tris/HCl) miktarı çizelge 2.7.'de gösterilmiştir. Bölüm 2.2.3.'de belirtildiği şekilde 37 °C'de enzim aktiviteleri ölçüldü.

Çizelge 2.7. Artan enzim miktarının aktiviteye etkisinin incelenmesi

Tüp Numarası	Enzim (ml)	Tampon (ml)	Toplam Hacim (ml)
(kör)	-	1,00	1,00
1	0,05	0,95	1,00
2	0,10	0,90	1,00
3	0,15	0,85	1,00
4	0,20	0,80	1,00
5	0,25	0,75	1,00

2.2.5.3. Enzim Aktivitesinde Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi

Bu kısımda deney esnasındaki inkübasyon sıcaklığının enzim aktivitesine etkisi incelendi. Bu amaç doğrultusunda ile tampon ve substrat çözeltisi (pH 7,1 ; 50 mM Tris/HCl, 1 mM CaCl₂, 1mM fenilasetat) 25°C, 30°C, 35°C, 37°C, 40°C sıcaklıklarda 30 dakikalık inkübasyonu sağlandıktan sonra reaksiyon durdurulup Bölüm 2.2.3.'de belirtilen metot uygulanarak enzim aktiviteleri ölçüldü.

2.2.5.4. Belirli Sıcaklıklarda İnkübasyon Süresine Bağlı Olarak Enzim Aktivitesindeki Değişimin İncelenmesi

Sıcaklığın enzim aktivitesine etkisi 56 °C ve 65 °C sıcaklıklarda incelendi. 0,3 ml enzim örneklerinin konulduğu eppendorf tüpler ilk olarak 56 °C ve daha sonra 65 °C'lik su banyosunda 75 dakika inkübasyona bırakıldı. Beşer dakika aralıklarla eppendorf tüplerden alınan 17 µl PON1 enzim örneği buz banyosunda soğutulduktan sonra kalan enzim aktiviteleri Bölüm 2.2.3.'de belirtilen metot uygulanarak ölçüldü.

2.2.5.5. pH'nın Enzim Aktivitesine Etkisinin İncelenmesi

pH'nın enzim aktivitesi üzerine etkisinin incelenmesi için değişik pH'larda tampon çözeltileri hazırlandı. Bunlar pH: 6,5-8,5 aralığında Tris/HCl tamponları ve pH: 9-11 aralığında glisin/NaOH tamponlarıdır [48]. Bölüm 2.2.3.'de belirtilen metot uygulanarak pH'ları farklı çalışma çözeltileri ile enzim aktiviteleri ölçüldü.

2.2.5.6. Saflaştırılan PON1 Enziminin Grelin Hormonu ile İlişkisi

Grelin hormonunun hem aktif hem de inaktif şekli, SGE Walkosil 11 5C18 RS 21 peptid kolonunda, 215 nm dalga boyu, hareketli fazı 50 mM NaClO₄ pH: 4 olan çözelti ve akış hızı 1,0 ml/dak. koşullarında tayin edilebilir. Aktif grelin hormonunun bu kolondaki alıkonma süresi 16 dakika iken, inaktif grelin hormonunun alıkonma süresi 5,9 dakikadır [59].

Bu çalışmada PON1 enziminin grelin hormonuna etkisi incelendi. İlk olarak grelin hormonu standartı (1600 pg/ml) 20 kat, 50 mM Tris/HCl 1 mM CaCl₂, pH:7,7 tamponunda seyreltilti. HPLC'ye SGE Walkosil 11 5C18 RS 21 peptid kolonu bağlandı. HPLC'deki UV dedektöründeki dalga boyu 215 nm olarak ayarlandı. 1,0 ml/dak. akış hızı ile hareketli faz olan 50 mM NaClO₄ pH: 4 olan çözelti kolondan 1 saat boyunca geçirildi. Stabil hale gelen kolona 80 pg/ml derişimli aktif grelin hormonundan 20 µl enjekte edildi. Kolondaki alıkonma süresi ve pik alanları incelendi. Sonraki aşamada 100µl'lik PON1 enzimi ve grelin hormonu karışımı (v/v 1:1) 37 °C sıcaklıktaki su banyosunda inkübasyona bırakıldı. Grelin hormonunun yarı ömrünün 15-20 dakika olması nedeniyle inkübasyon süresi 20 dakika ile sınırlandırıldı. İnkübasyon sonrası karışımdan 20 µl kolona enjekte edilip inaktif grelinin oluşup oluşmadığı ve aktif grelin hormonu ait pik alanında ne tür değişimler olduğu incelendi. Ayrıca PON1 enziminin substrat olarak grelin hormonuna etkisini spektrofotometrik yöntemle belirlemek için reaksiyon hızı, 215 nm dalga boyunda 30 s aralıklarla 2 dakika ölçüldü. Konsantrasyonları farklı aktif grelin hormonunun 1 mM CaCl₂ içeren 50 mM Tris/HCl (pH:7,7) tamponunda çözeltileri hazırlandı. Bölüm 2.2.3.'de belirlenen metot uygulanarak enzim aktivitelerine bağlı reaksiyon hızları ölçüldü.

Bu çalışmaların yanı sıra grelin hormonunun PON1 enzime etkisi de araştırıldı. Bölüm 2.2.5.1.'de beltilen koşullara ek olarak 200 pg/ml aktif grelin hormonu ilaveli 7 farklı fenilasetat konsantrasyonunda PON1 enziminin ARE aktivitesine ait reaksiyon hızları ölçüldü. Elde edilen değerlere göre Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek grelin varlığında PON1 enzimin 50 mM Tris/HCl ve pH: 7,1 olan tamponda 37 °C' de K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı.

3.BULGULAR

3.1. Saflaştırma Basamaklarında Ölçülen Protein Miktarları

Protein miktarları, çizelge 3.1.'deki standart olarak kullanılan BSA proteini konsantrasyonlarının 540 nm'deki ölçülen absorbanlarına göre hesaplandı. Bu hesaplamada;

Örnek Absorbansı

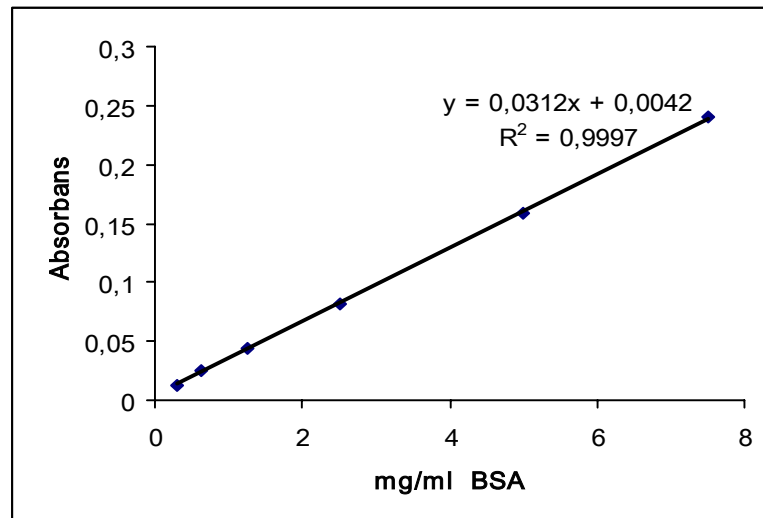
$$\text{Protein (mg/ml)} = \frac{\text{Standart Absorbansı}}{\text{Standart Konsantrasyonu}} \times \text{Standart Konsantrasyonu}$$

Standart Absorbansı

formülüne göre bulunan protein konsantrasyonlarının her standart protein konsantrasyonuna göre farklı çıkmasını önlemek için çizelge 3.1.'deki veriler ile şekil 3.1'deki standart çalışma grafiği çizildi. Bu standart çalışma grafiğinden oluşturulan doğru denklemi ile protein konsantrasyonu hesaplandı.

Çizelge 3.1. Standart çözeltilerin 540 nm'deki ölçülen absorban değerleri

Standart numarası	540 nm'deki Ölçülen Absorbanlar (A ₅₄₀)	Protein konsantrasyonu (mg/ml)
8	0,310	10,000
7	0,241	7,500
6	0,158	5,000
5	0,082	2,500
4	0,044	1,250
3	0,025	0,625
2	0,013	0,313
1	0,000	0,000



Şekil 3.1. Protein miktarı tayini için standart çalışma grafiği ve doğru denklemi

Saflaştırılmış enzim çözeltilerindeki protein konsantrasyonları, 540 nm’de okunan absorpsiyonlarının şekil 3.1.’de elde edilen “ $y = 0,0312x + 0,0042$ ” doğru denkleminde “y” yerine konularak “x” değerleri (protein konsantrasyonu) hesaplandı. Hesaplanan bu değerler çizelge 3.2.’de belirtilmiştir.

Çizelge 3. 2. Saflaştırma basamaklarındaki protein miktarları

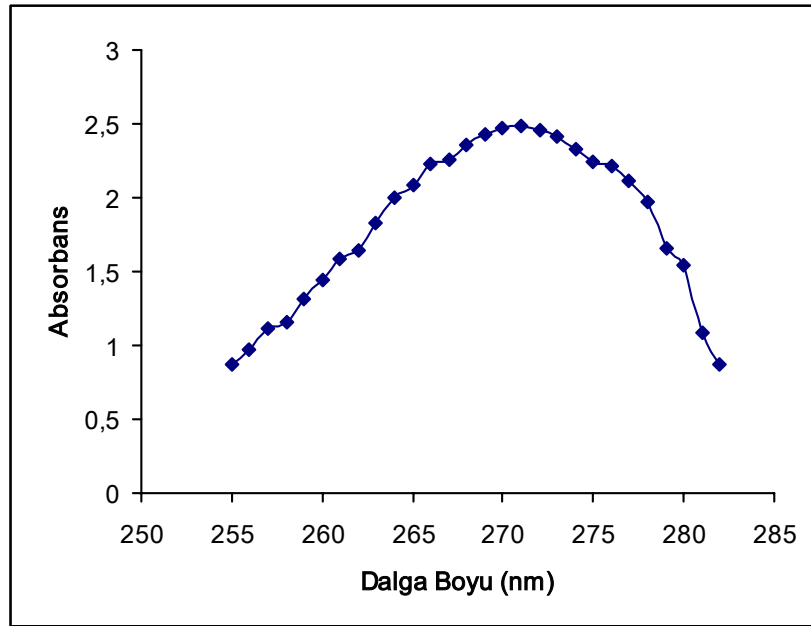
Saflaştırma Basamakları	Absorbans A_{540}	Protein Konsantrasyonu mg/ml	Toplam Hacim (ml)	Toplam protein (mg)
1. Karaciğer örneklerinin homojenizasyonu	2,46	78,71	100,00	7871,00
2. Homojenatın ultrasantrifüjlenmesi ve membranların çözülmesi	0,89	28,39	18,60	528,05
3. % 55 doygunlukta Amonyum Sülfat çöktürmesi ve diyaliz	0,60	19,10	10,50	200,55
4. DEAE -Sefaroz İyon Değişim Kromatografisi	0,33	10,44	9,00	93,96
5. Sefadeks G-200 Filtrasyon Kromatografisi	0,06	1,79	1,50	2,69

3.2. PON1 Enziminin Saflaştırma Basamaklarında Ölçülen Aktivite Değerleri

PON1 enziminin aril esteraz aktivitesi Enzim aktivitesiyle ilgili ölçümlerin standardının oluşturulması için ilk olarak fenil asetatın hidrolizi sonucu oluşan fenolün maksimum absorpsiyon yaptığı dalga boyunun literatür doğrultusunda ölçüm yaptığımız Secomam S. 750 spektrofotometresinde tespit edildi [55]. Buna göre 0,42 mM fenolün saf sudaki çözeltisinin 255-282 nm arası dalga boylarındaki ölçülen absorpsiyon değerleri çizelge 3.3.’de gösterilmiştir. Çizelge 3.3.’deki veriler kullanılarak şekil 3.2. çizilmiştir. Buna bağlı olarak da enzim aktivitesiyle ilgili ölçümler 270-271 nm’de yapılmıştır.

Çizelge 3.3. 0,42 mM fenolün 255-282 nm arası ölçülen absorbans değerleri

Dalga (nm)	Boyu	Absorbans	Dalga (nm)	Boyu	Absorbans
255		0,878	269		2,423
256		0,966	270		2,476
257		1,110	271		2,480
258		1,163	272		2,460
259		1,314	273		2,412
260		1,447	274		2,324
261		1,585	275		2,240
262		1,649	276		2,212
263		1,831	277		2,111
264		2,002	278		1,970
265		2,092	279		1,661
266		2,228	280		1,539
267		2,262	281		1,089
268		2,359	282		0,875



Şekil 3.2. 0,42 mM fenolün 255-282 nm arası ölçülen absorbans değerleri grafiği

3.2.1. Karaciğer Örneklerinin Homojenizasyonundan Elde Edilen Bulgular

Homojenizasyon sonrası protein çözeltisindeki PON1 enziminin ARE aktivitesi Bölüm 2.2.3.'de belirtildiği gibi ölçüldü. Ham homojenattaki enzim aktivitesinin ortalama dakikadaki absorbans değişimi $dA/dt = 1,53$ olarak ölçülmüştür. Bu ortalama değerler enzim aktivitesinin lineer olarak değiştiği ilk 1. dakikada ölçülen absorbans değerleridir. Enzim aktivitesinin U/ml biriminden değeri Bölüm 2.2.3.'de belirtilen formül yardımıyla hesaplanmıştır.

$V_T = 3,05$ ml (3 ml substrat ve tampon karışımı ile 0,05 ml enzim örneği toplamı)

$V_E = 0,05$ ml (küvetteki enzim örneği)

Bu değerler aşağıdaki formülde yerine konuldu.

$$\text{PON1 Enzim Aktivitesi} = \frac{V_T \times dA/dt \times 10^3}{V_E \times 1310} = dA/dt \times 46,57$$

(U/ml = $\mu\text{mol/dak.ml}$)

Saflaştırma basamaklarındaki enzim aktivitesi, formülden elde edilen 46,57 faktörü ile dA/dt 'nin çarpılmasıyla hesaplanmıştır. Elde edilen 46,57 faktör ile absorbansın dakikadaki değişimi 1,53 değeri çarpıldığında PON1 Enzim aktivitesi 71,25 U/ml olarak bulunmuştur. Çizelge 3.2.'deki verilere göre protein miktarı 78,71 mg/ml olan homojenatın spesifik aktivitesi, enzim aktivitesinin U/ml biriminden değerinin ml'deki protein miktarına bölünmesiyle hesaplanmıştır. Buna göre;

$$\text{Homojenat için spesifik aktivite} = \frac{\text{U/ml}}{\text{mg protein/ml}} = \frac{71,25 \text{ U/ml}}{78,71 \text{ mg/ml}} = 0,91 \text{ U/mg'dır.}$$

(U/mg)

3.2.2. Karaciğer Örneklerinin Ultrasantrifüjlenmesiyle Elde Edilen Bulgular

Homojenatların ultrasantrifüjlenmesiyle elde edilen protein çözeltisindeki enzim aktivitesinin ortalama dakikadaki absorbans değişimi $dA/dt = 1,44$ olarak ölçülmüştür. Bölüm 3.2.1'de belirtilen formüldeki 46,57 faktörü ile $dA/dt=1,44$ çarpıldığında enzim aktivitesi 67,06 U/ml olarak hesaplanmıştır. Çizelge 3.2.'de belirtildiği gibi protein miktarı 28,39 mg/ml'dir.

Buna göre;

$$\text{Ultrasantrifüjleme için spesifik aktivite} = \frac{67,06 \text{ U/ml}}{28,39 \text{ mg/ml}} = 2,39 \text{ U/mg}$$

(U/mg)

$$\text{Saflaştırma Katsayısı} = \frac{\text{Ultrasantrifüjleme sonrası spesifik aktivite}}{\text{Ham homojenat için spesifik aktivite}}$$

$$\text{Saflaştırma Katsayısı} = \frac{2,39 \text{ U/mg}}{0,91 \text{ U/mg}} = 2,63 \text{ 'dür.}$$

3.2.3. Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Diyaliz Sonrası Elde Edilen Bulgular

Ultrasantrifüj sonrası elde edilen protein çözeltisi Bölüm 2.2.1.3.'de belirtildiği gibi en yüksek spesifik aktiviteye sahip % (NH₄)₂SO₄ doygunluğu için çöktürme işlemleri yapıldı. Çöktürme sonucu % (NH₄)₂SO₄ derişimine bağı olarak çöktürmenin sahip olduğu mg protein/ml ve spesifik aktivite değerleri çizelge 3.4. 'de verilmiştir.

Çizelge 3.4. % (NH₄)₂SO₄ derişimine bağı olarak çöktürmenin sahip olduğu aktivite, protein miktarı ve spesifik aktivite değerleri

% (NH ₄) ₂ SO ₄	Çöktürü (mg protein/ml)	Çöktürü aktivite (U/ml)	Spesifik Aktivite (U/mg protein)
40	17,11	47,22	2,76
50	18,45	52,59	2,85
55	19,10	56,99	2,98
60	19,87	58,80	2,96
70	21,85	60,09	2,75
80	22,46	59,07	2,63

En yüksek spesifik aktiviteye sahip %55 doygunluğunda (NH₄)₂SO₄ ile çöktürme ve diyaliz sonrası protein çözeltisindeki enzim aktivitesinin ortalama dakikadaki absorbans değışimi dA/dt = 1,17 olarak ölçülmüştür. Bölüm 3.2.1'de belirtilen formüldeki 46,57 faktörü ile dA/dt=1,17 çarpıldığında enzim aktivitesi U/ml biriminden değeri 54,49 U/ml olarak hesaplanmıştır. Çizelge 3.2.'de belirtildiği gibi protein miktarı 19,10 mg/ml'dir.

Buna göre;

$$\begin{aligned} \text{\%55 (NH}_4\text{)}_2\text{SO}_4 \text{ doygunluğunda çöktürme ve } &= \frac{54,49 \text{ U/ml}}{19,10 \text{ mg/ml}} = 2,85 \text{ U/mg} \\ \text{diyaliz sonrası spesifik aktivite (U/mg)} & \end{aligned}$$

$$\text{Saflaştırma Katsayısı} = \frac{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \text{ çöktürmesi ve diyaliz sonrası spesifik aktivite}}{\text{Ham homojenat için spesifik aktivite}}$$

$$\text{Saflaştırma Katsayısı} = \frac{2,85 \text{ U/mg}}{0,91 \text{ U/mg}} = 3,13' \text{ dür.}$$

3.2.4. DEAE-Sefaroz İyon Değişim Kromatografisiyle Elde Edilen Bulgular

Diyaliz sonrası protein çözeltisi Bölüm 2.2.1.4.'de belirtildiği gibi iyon değişim kromatografisine uygulandı. Kolondan sırasıyla 30'ar ml C, D, E, F, G tamponları geçmesiyle üçer ml tüplerde toplandı. Protein bulunan tüpler, Warburg-Christian yöntemi ile kalitatif olarak 280 nm dalga boyunda okunan absorbanlar ile tespit edildi. Protein bulunan tüplerde enzim aktivitesi ölçüldü. Toplam 50 tüp için 280 nm'okunan absorbanlar ve 271 nm'de ölçülen enzim aktiviteleri çizelge 3.5. 'de verilmiştir.

Çizelge 3.5. 280 nm'de okunan absorbanlar (protein konsantrasyonu) ve 271 nm'de ölçülen enzim aktiviteleri (3 ml)

Tüp numarası	C tamponu		D tamponu		E tamponu		F tamponu		G Tamponu	
	A ₂₈₀	A ₂₇₁	A ₂₈₀	A ₂₇₁	A ₂₈₀	A ₂₇₁	A ₂₈₀	A ₂₇₁	A ₂₈₀	A ₂₇₁
1	0,514	-	-	-	-	-	-	-	0,258	-
2	0,498	-	-	-	-	-	-	-	0,633	-
3	0,378	-	-	-	0,291	-	0,035	-	1,402	0,842
4	0,325	-	-	-	0,768	-	0,145	-	2,068	1,057
5	0,274	-	-	-	0,345	-	0,365	1,050	2,003	1,048
6	0,210	-	-	-	0,030	-	0,572	1,053	1,450	-
7	0,115	-	-	-	-	-	0,620	1,047	0,852	-
8	0,068	0,010	-	-	-	-	0,580	0,975	0,321	-
9	0,050	-	-	-	-	-	0,494	0,765	0,152	-
10	0,035	-	-	-	-	-	0,389	-	0,024	-

Çizelge 3.5.'de görüldüğü gibi kolondan F tamponunun geçmesi sırasında spesifik aktivitesi diğer tüplere göre daha yüksek olan 5, 6 ve 7. tüplerdeki eluatlar toplandı. Toplanan bu örneklerdeki enzim aktivitesinin ortalama dakikadaki absorban değişimi $dA/dt = 1,05$ olarak ölçülmüştür. Bölüm 3.2.1'de belirtilen formüldeki 46,57 faktörü ile $dA/dt=1,05$ çarpıldığında enzim aktivitesi U/ml biriminden değeri 48,90 U/ml olarak hesaplanmıştır. Çizelge 3.2.'de belirtildiği gibi protein miktarı 10,44 mg/ml'dir.

Buna göre,

$$\text{DEAE-Sefaroz İyon değişim kromatografisi sonrası spesifik aktivite (U/mg)} = \frac{48,90 \text{ U/ml}}{10,44 \text{ mg/ml}} = 4,68 \text{ U/mg}$$

$$\text{Saflaştırma Katsayısı} = \frac{\text{İyon değişim kromatografisi sonrası spesifik aktivite}}{\text{Ham homojenat için spesifik aktivite}}$$
$$\text{Saflaştırma Katsayısı} = \frac{4,68 \text{ U/mg}}{0,91 \text{ U/mg}} = 5,14' \text{dür.}$$

3.2.5. Sefadeks G-200 Jel Filtrasyonu Kromatografisiyle Elde Edilen Bulgular

DEAE-Sefaroz iyon değişim kromatografisi sonrası protein çözeltisi Bölüm 2.2.1.5.'de belirtildiği gibi Sefadeks G-200 jel filtrasyonu kromatografisine uygulandı. Kolondan C tamponu geçerken eluatlar 1,5 ml'lik eppendorf tüplere toplandı. Protein bulunan tüpler, Warburg-Christian yöntemi ile kalitatif olarak 280 nm dalga boyunda okunan absorbanslar ile tespit edildi. Protein bulunan tüplerde enzim aktivitesi ölçüldü. Toplam 25 tüp için 280 nm'okunan absorbanslar ve 271 nm'de ölçülen enzim aktiviteleri çizelge 3.6.'de verilmiştir.

Çizelge 3.6. 280 nm'de okunan absorbanslar (protein konsantrasyonu) ve 271 nm'de ölçülen enzim aktiviteleri (1,5 ml)

Tüp numarası	C tamponu	
	A ₂₈₀	A ₂₇₁
(1-12) arası	-	-
13	0,021	0,033
14	0,025	0,045
15	0,069	0,127
16	0,223	0,425
17	0,335	0,918
18	0,304	0,808
19	0,174	0,326
20	0,066	0,108
(21-25) arası	-	-

Çizelge 3.6.'da görüldüğü gibi kolondan C tamponunun geçmesi sırasında spesifik aktivitesi diğer tüplere göre daha yüksek olan 17. tüpdeki eluatta enzim aktivitesinin ortalama dakikadaki absorbans değişimi $dA/dt = 0,92$ olarak ölçülmüştür. Bölüm 3.2.1'de belirtilen formüldeki 46,57 faktörü ile $dA/dt = 0,92$ çarpıldığında enzim aktivitesi U/ml biriminden değeri

42,84 U/ml olarak hesaplanmıştır. Çizelge 3.2.'de belirtildiği gibi protein miktarı 1,79 mg/ml'dir. Buna göre,

$$\text{Sefadeks G-200 Jel filtrasyonu kromatografisi sonrası spesifik aktivite (U/mg)} = \frac{42,84 \text{ U/ml}}{1,79 \text{ mg/ml}} = 23,93 \text{ U/mg}$$

$$\text{Saflaştırma Katsayısı} = \frac{\text{Jel filtrasyonu kromatografisi sonrası spesifik aktivite}}{\text{Ham homojenat için spesifik aktivite}}$$

$$\text{Saflaştırma Katsayısı} = \frac{23,93 \text{ U/mg}}{0,91 \text{ U/mg}} = 26,30 \text{ 'dur.}$$

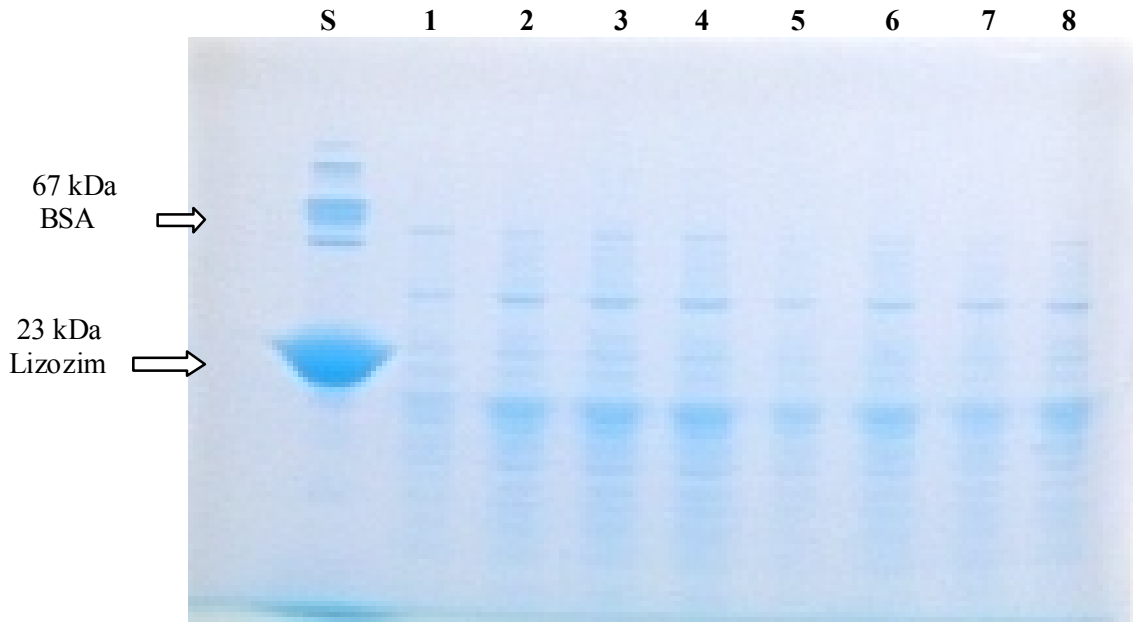
Bu sonuçlar doğrultusunda ham homojenattan başlayarak sefadeks G-200 jel filtrasyonu kromatografisine kadar olan saflaştırma basamaklarında hesaplanan parametreler ve saflaştırma katsayısı çizelge 3.7. 'de verilmiştir.

Çizelge 3.7. Saflaştırma basamakları sonuçları

Saflaştırma Basamakları	Toplam Hacim (ml)	Protein miktarı (mg/ml)	Toplam protein (mg)	Aktivite (U/ml)	Aktivite (U)	Spesifik aktivite (U/mg)	Saflaştırma oranı
1- Karaciğer örneklerinin homojenizasyonu	100,00	78,71	7871,00	71,25	7125,00	0,91	1,00
2. Homojenatın ultrasantrifüjlenmesi ve membranların çözülmesi	18,60	28,39	528,05	67,06	1247,32	2,39	2,63
3. % 55 doygunlukta Amonyum Sülfat çöktürmesi ve diyaliz	10,50	19,10	200,55	54,49	572,15	2,85	3,13
4. DEAE-Sefaroz İyon Değişim Kromatografisi	9,00	10,44	93,96	48,90	440,10	4,68	5,14
5. Sefadeks G-200 Jel Filtrasyon Kromatografisi	1,50	1,79	2,69	42,84	64,26	23,93	26,30

3.3. SDS-PAGE (Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi) ile PON1 Enziminin Saflık Kontrolü ve Molekül Ağırlığının Tayininde Elde Edilen Bulgular

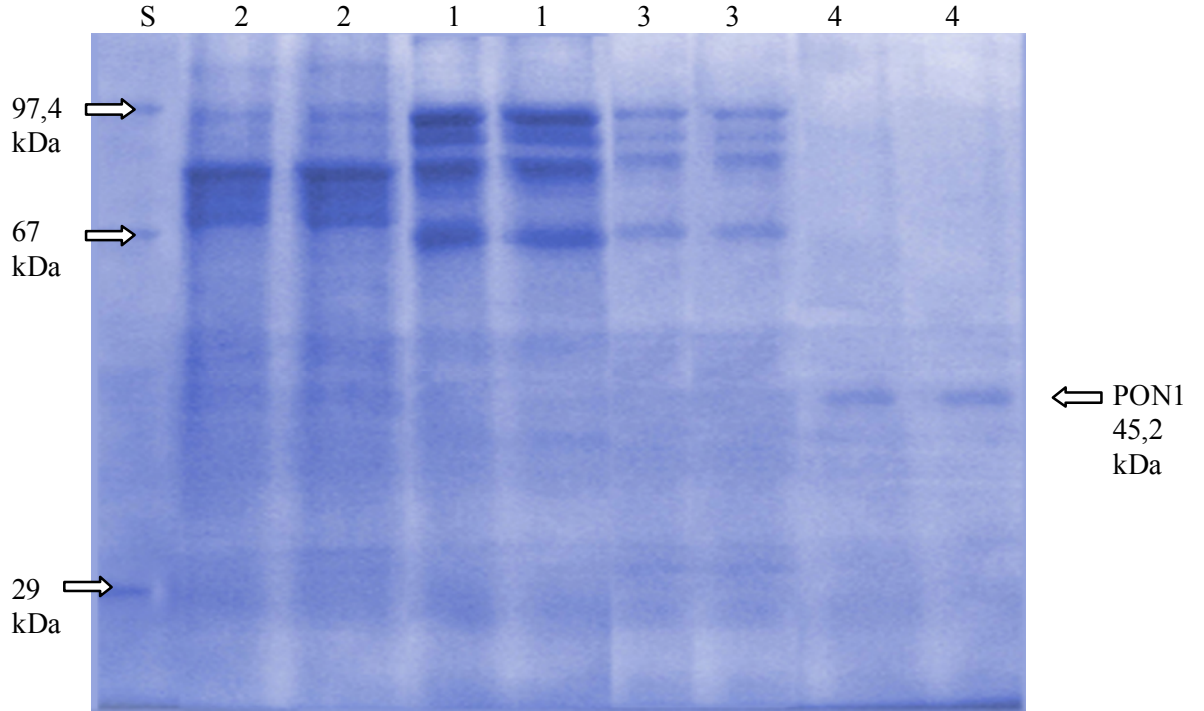
PON1 enziminin saflaştırılması çalışmalarında iki farklı metot sonrası saflaştırılan enzimin SDS-PAGE yöntemiyle saflık kontrolü ve molekül ağırlığı tayini yapıldı. İlk çalışmada izlenen metodlar sırasıyla; homojenizasyon, homojenatın silika jel kolonuna uygulanması ve çözülmesi, % 35-70 doygunlukta $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürmesi ve DEAE-Selüloz iyon değişim kromatografisi metodlarıdır. Son çalışmada izlenen metodlar ise sırasıyla homojenizasyon, ultrasantrifüj ve membranların çözülmesi, % 55 doygunlukta $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürmesi ve diyaliz, DEAE-Sefaroz iyon değişim kromatografisi ve Sefadeks G-200 Jel filtrasyonu kromatografisi metodlarıdır. İlk çalışmaya ait SDS-PAGE elektroforegramı şekil 3.3.'de ve son çalışmaya ait SDS-PAGE elektroforegramı şekil 3.4.'de gösterilmiştir. Ayrıca şekil 3.5.'de protein bandlarının molekül ağırlıklarının tespit edilmesinde kullanılan standard grafik yer almaktadır.



Şekil.3.3. DEAE-Selüloz iyon değişim kromatografisi saflaştırma basamağından sonra (ilk çalışmaya ait) alınan numunelerin, sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS-PAGE) oluşturduğu elektroforegram

Standart (S) : Protein standartı (67 kDa BSA, 23 kDa Lizozim proteinleri),

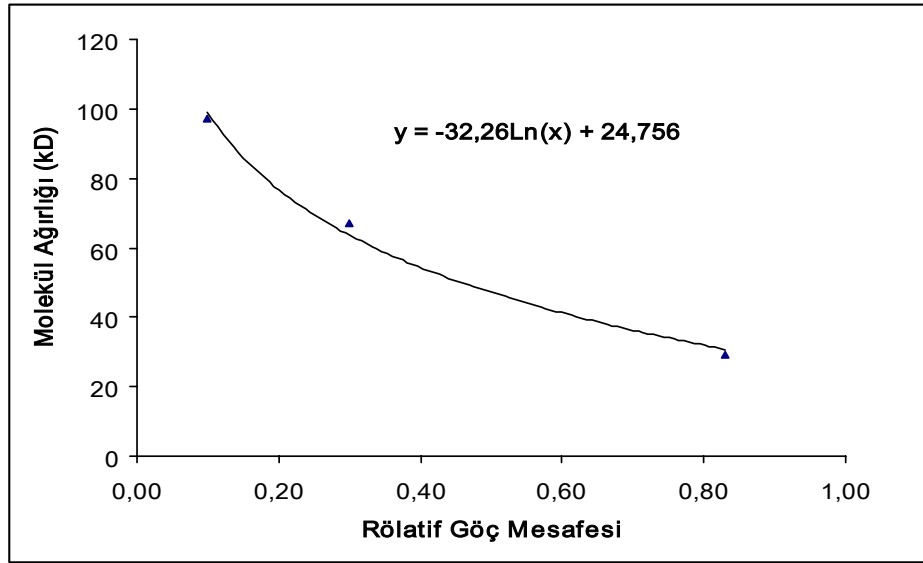
(1-8) numaraları : DEAE-Selüloz iyon değişim kromatografisi sonrası alınan numuneler



Şekil 3.4. Her bir saflaştırma basamağından sonra alınan numunelerin, sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS-PAGE) oluşturduğu elektroforegram

- S:** Standart proteinler (Fosforilaz B 97,4 kDa, BSA 67 kDa ve Karbonik anhidraz 29 kDa),
1: Ultrasantrifüj sonrası süpernatant,
2: % 55 amonyum sülfat çöktürmesi sonrası,
3: DEAE-Sefaroz iyon değişim kromatografisi sonrası,
4: Sefadeks G-200 jel filtrasyon kromatografisi sonrası, elde edilen protein bandlarıdır.

Proteinlerin molekül ağırlığının logaritması ile rölatif göç mesafesi arasında doğrusal bir ilişki vardır [47]. Bu nedenle standart proteinlerin molekül ağırlıklarının logaritması ile rölatif göç mesafelerini gösteren standart grafik çizilmiştir. Bu grafik şekil 3.5.'de verilmiştir. Molekül ağırlığı bilinmeyen protein bandlarının rölatif göç değerleri bulundu ve " $y = -32,26 \ln(x) + 24,756$ " formülünde " x " yerine konarak molekül ağırlığı hesaplandı. Şekil 3.4.'deki elektroforegramda PON1 enziminin protein bandının rölatif göç değeri 0,53 olarak hesaplandı. 0,53 değeri yukarıdaki formülde " x " yerine konulduğunda, PON1 enziminin protein bandının molekül ağırlığı 45,2 kDa olarak hesaplandı.



Şekil 3.5. Protein bandlarının molekül ağırlıklarının tespit edilmesinde çizilen standart grafik

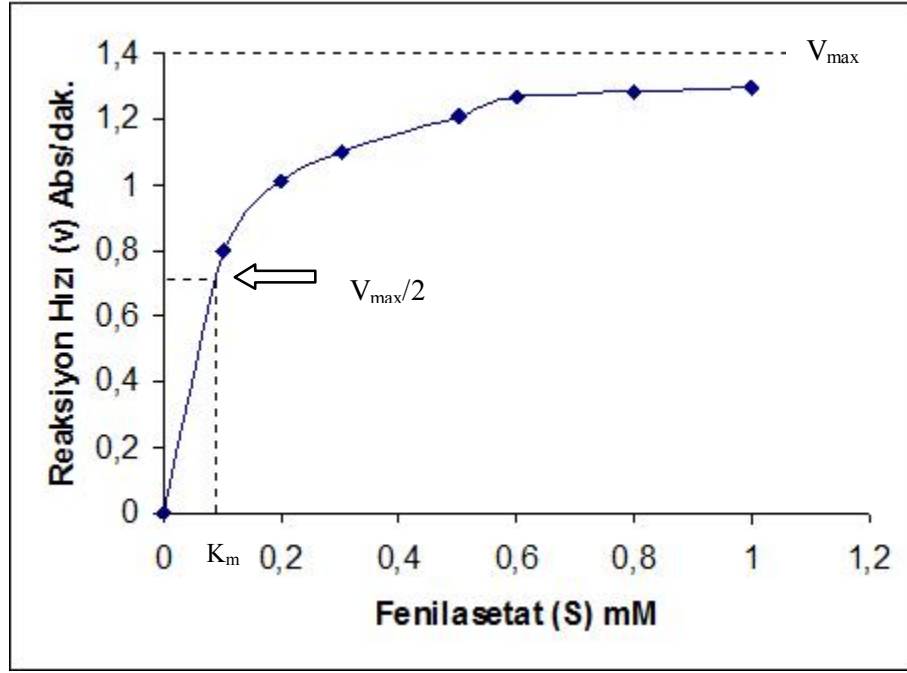
3.4. PON1 Enziminin Kinetik Özelliklerine Ait Bulgular

3.4.1. Değişen fenilasetat Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Bölüm 2.2.5.1’de belirtildiği gibi 7 farklı fenilasetat konsantrasyonu ile çizelge 2.3.’deki miktarlara göre enzim aktivitesi tayin edildi. Elde edilen bulgular çizelge 3.8.’de verilmiştir. Bu sonuçlara göre çizilen Michaelis-Menten grafiği şekil 3.6.’da ve Lineweaver-Burk grafiğide şekil 3.7.’de verilmiştir.

Çizelge 3.8. Değişen fenilasetat konsantrasyonlarının enzim aktivitesine etkisine ait deney sonuçları

Tüp No	Fenilasetat (S) mM	1/S mM ⁻¹	Reaksiyon Hızı (V) Abs./dak.	1/V (dak./Abs.)
1	0,10	10,00	0,80	1,25
2	0,20	5,00	1,01	0,99
3	0,30	3,33	1,10	0,91
4	0,50	2,00	1,21	0,83
5	0,60	1,66	1,27	0,79
6	0,80	1,25	1,28	0,78
7	1,00	1,00	1,30	0,77



Şekil 3.6. Değişen fenilasetat konsantrasyonlarının enzim aktivitesine etkisini gösteren Michaelis-Menten grafiği

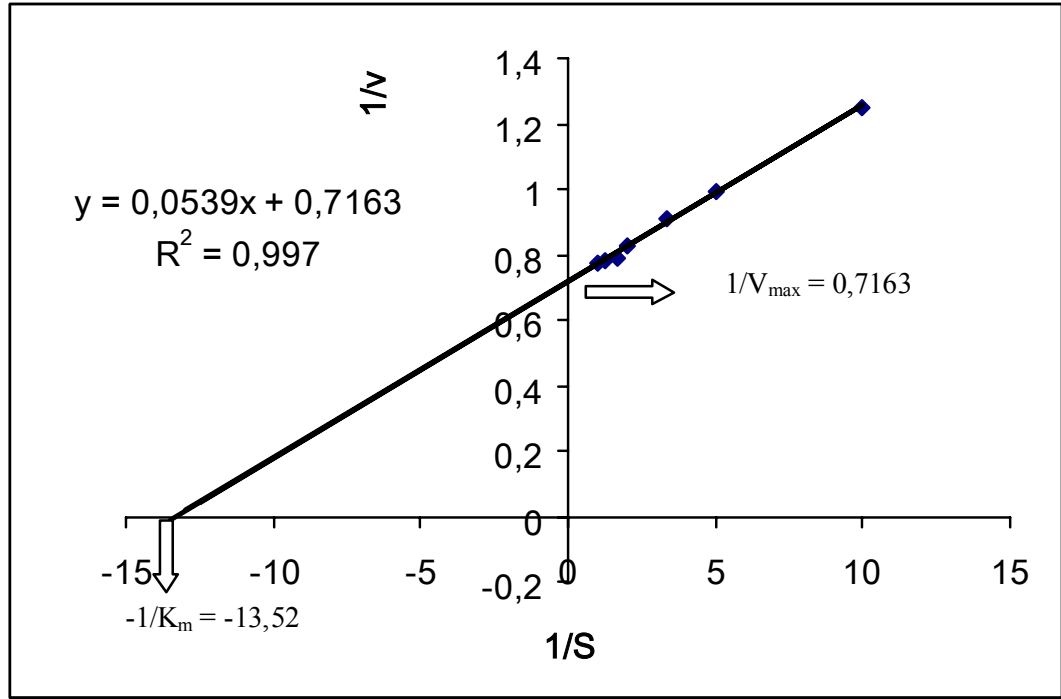
Şekil 3.6.'daki hiperbolik eğrinin denklemi Michaelis-Menten eşitliğidir [1,4]. Bu eşitlik ;

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

formülü ile ifade edilir. Hiperbolik eğrinin denklemini doğru denklemine dönüştürmek için Lineweaver-Burk eşitliğinden yararlanıldı. Bu eşitlik;

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

formülü ile ifade edilir [1,4]. 1/V'ye karşılık 1/S değerlerini gösteren şekil 3.7.'deki Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Lineweaver-Burk grafiğinde kullanılan 1/V ve 1/S değerleri için çizelge 3.8.'den yararlanıldı. Bu grafikteki doğrunun yatay eksenini kestiği nokta $-1/K_m$ ve dikey kestiği nokta $1/V_{\max}$ 'dır [1,4].



Şekil 3.7. Değişen fenilasetat konsantrasyonlarının enzim aktivitesine etkisini gösteren Lineweaver -Burk grafiği

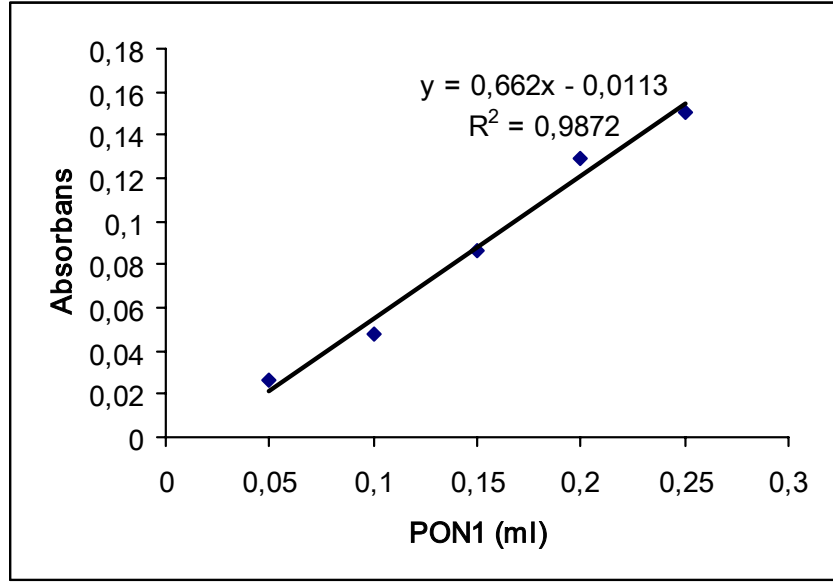
Şekil 3.7.'deki Lineweaver-Burk grafiğinden elde edilen $-1/K_m$: -13,52 ve $1/V_{\max}$: 0,7163 değerlerine göre fenilasetat substratı için PON1 enziminin 37 °C'de ve 50 mM Tris/HCl tamponu pH:7,1'de K_m değeri $0,074 \pm 0,002$ mM ve $V_{\max}$ değeri 1,40 Abs./dak. (65,20 U/ml ve 36,42 U/mg) olarak hesaplandı.

3.4.2. Artan Enzim Miktarının Enzim Aktivitesine Etkisi

Bölüm 2.2.5.2.'de belirtildiği gibi çalışılarak çizelge 3.9' da gösterilen bulgular elde edildi. Bu bulgulara göre çizilen grafik şekil 3.8'de verilmiştir.

Çizelge 3.9. Enzim aktivitesinde optimum sıcaklığın belirlenmesine ait bulgular

Tüp No	Çözeltideki Enzim (ml)	Absorbans ortalaması dA/dt (1 dakikalık)
1	0,050	0,026
2	0,100	0,048
3	0,150	0,086
4	0,200	0,129
5	0,250	0,151



Şekil 3.8. Artan enzim miktarının enzim aktivitesine etkisine ait grafik

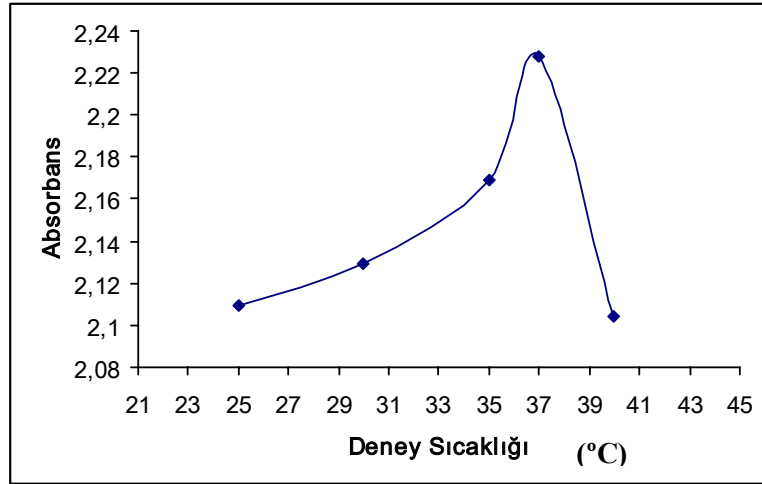
PON1 enzimi miktarının artması şekil 3.8.’deki grafikte görüldüğü gibi aktiviteyi artırmaktadır.

3.4.3. Enzim Aktivitesinde Optimum Sıcaklığın Belirlenmesine Ait Bulgular

Bölüm 2.2.5.3.’de anlatıldığı şekilde çalışılacak değişik deney sıcaklıklarının enzim aktivitesine etkisi incelendi. Bu çalışmaya ait bulgular çizelge 3.10’da ve bu bulgulara göre çizilen grafik şekil 3.9.’da verilmiştir.

Çizelge 3.10. Enzim aktivitesinde optimum sıcaklığın belirlenmesine ait bulgular

Deney Sıcaklığı (°C)	Absorbansların ortalaması
25	2,109
30	2,129
35	2,169
37	2,228
40	2,104



Şekil 3.9. Enzim aktivitesinde optimum sıcaklığın belirlenmesine ait grafik

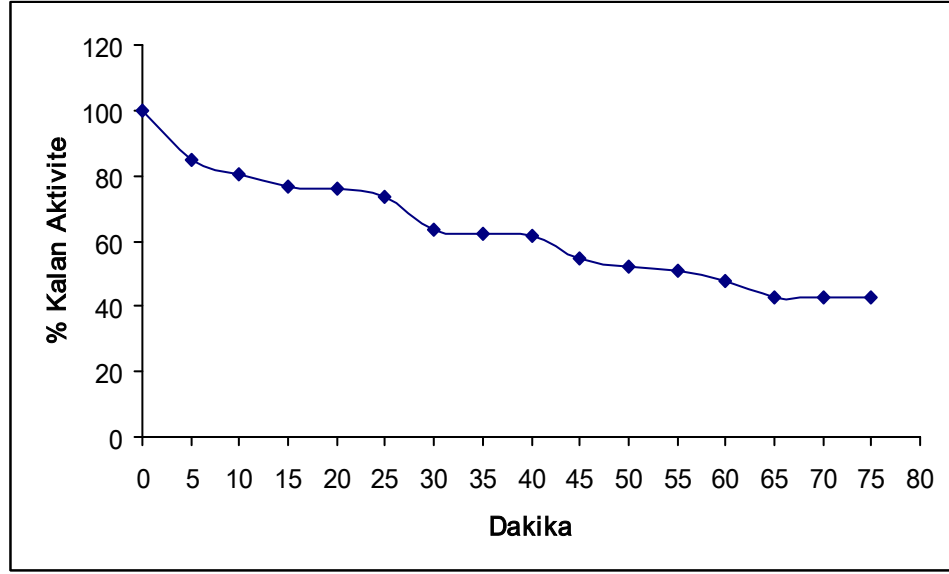
PON1 enzimi aktivitesi şekil 3.9.’daki grafikte görüldüğü gibi 35-37 °C sıcaklık aralığında artmakta ve 37 °C’de en yüksek değere ulaşmaktadır.

3.4.4. Belirli Sıcaklıklarda İnkübasyon Süresine Bağlı Olarak Enzim Aktivitesindeki Değişime Ait Bulgular

Bölüm 2.2.5.4.’de belirtildiği gibi 56 °C ve 65 °C’lerde 0, 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 dakika bekletilerek aktivite tayini yapıldı. 56 °C’de yapılan deneyin sonuçları çizelge 3.11’de ve bu sonuçlara göre çizilen grafik şekil 3.10’da verilmiştir. 65 °C’de yapılan deneyde ise enzimin 5. dakikadan itibaren aktivitesini tamamen kaybederek inaktif hale geçtiği tespit edilmiştir.

Çizelge 3.11. 56 °C’de enzim aktivitesinin inhibisyonuna ait deney sonuçları

56 °C’deki İnkübasyon Süresi (dak.)	Absorbans ortalaması dA/dt (1 dak.)	% Kalan Aktivite	% İnhibisyon
0	0,415	100	-
5	0,353	85,06	14,94
10	0,334	80,48	19,52
15	0,318	76,63	23,37
20	0,316	76,14	23,86
25	0,304	73,25	26,75
30	0,263	63,37	36,63
35	0,259	62,41	37,59
40	0,256	61,69	38,31
45	0,228	54,94	45,06
50	0,216	52,05	47,95
55	0,212	51,08	48,92
60	0,197	47,47	52,53
65	0,177	42,65	57,35
70	0,177	42,65	57,35
75	0,177	42,65	57,35



Şekil 3.10. PON1 enziminin 56 °C'deki inkübasyon süresine bağlı aktivite kaybı

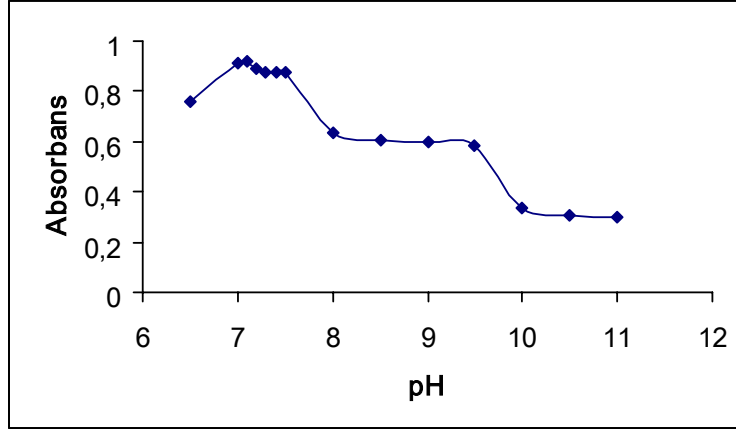
PON1 enziminin 56 °C'de inkübasyona bırakılarak belirli sürelerde aktivitesi ölçüldüğünde 75. dakikaya kadar % 42,65 ile aktifliğini koruduğu ve sıcaklığa oldukça dayanıklı bir enzim olduğu görülmüştür.

3.4.5. pH'nın Enzim Aktivitesine Etkisinin İncelenmesine Ait Bulgular

Bölüm 2.2.5.5.'de belirtildiği gibi farklı pH'larda tampon çözeltiler hazırlanarak PON1 enziminin aktivitesi tayin edildi. Tayin edilen değerler 2 dakika sonundaki absorbans değerleridir. Elde edilen sonuçlar çizelge 3.12'de ve çizilen grafik şekil 3.11.'de verilmiştir.

Çizelge 3.12. pH'nın enzim aktivitesine etkisine ait sonuçlar

pH	Absorbans ortalaması dA/dt (1 dakikalık)
6,5	0,758
7,0	0,910
7,1	0,918
7,2	0,894
7,3	0,878
7,4	0,876
7,5	0,875
8,0	0,632
8,5	0,604
9,0	0,598
9,5	0,587
10,0	0,339
10,5	0,308
11,0	0,301

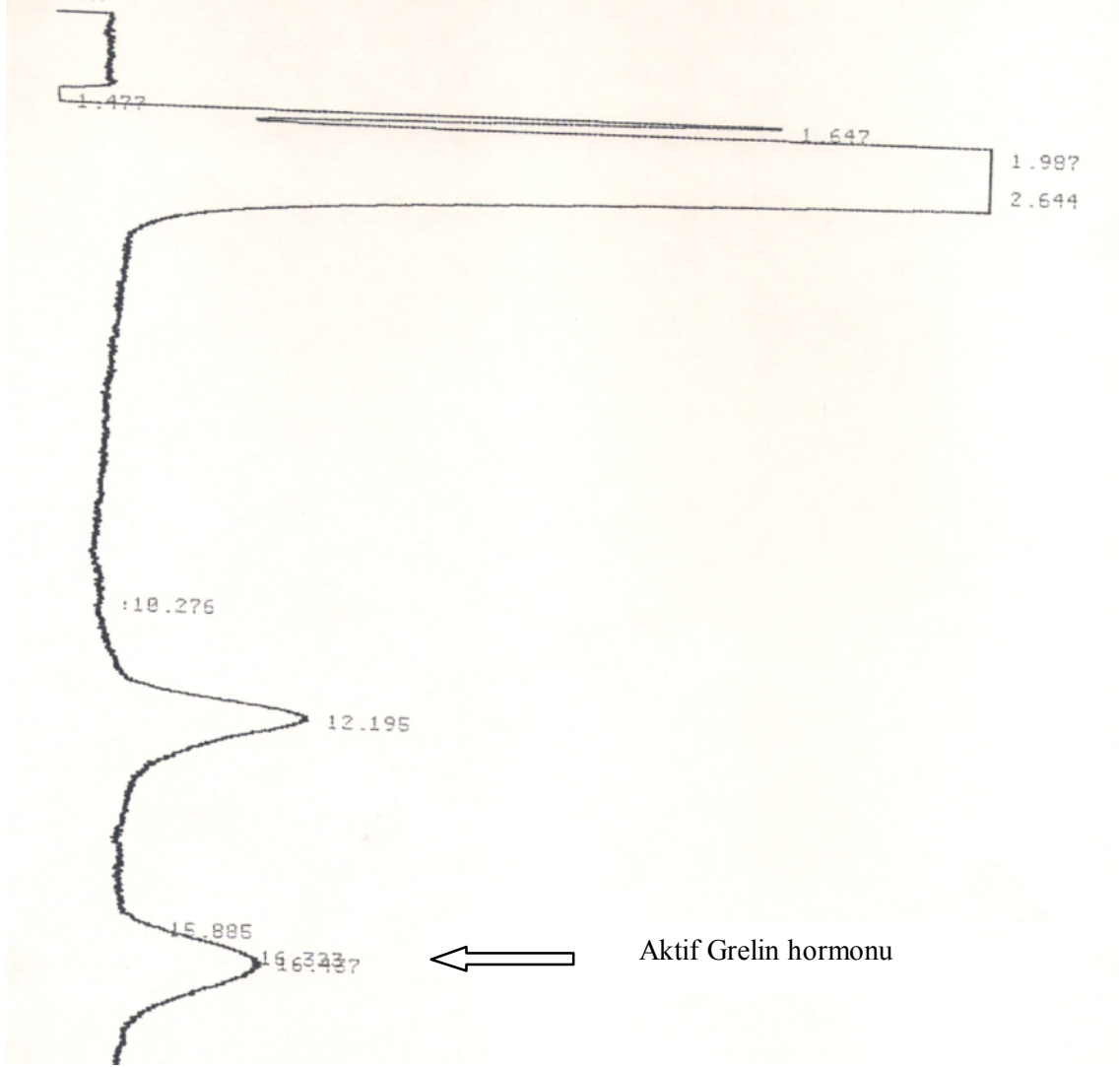


Şekil 3.11. pH'nın enzim aktivitesine etkisi

PON1 enziminin şekil 3.11.'deki grafikte görüldüğü gibi 7-7,5 pH aralığında aktivitesinin yüksek olduğu ve bu aralıkta en yüksek aktiviteyi pH:7,1'de gösterdiği tespit edilmiştir.

3.4.6. Saflaştırılan PON1 Enzimi ile Grelin Hormonu Arasındaki Etkileşime Ait Bulgular

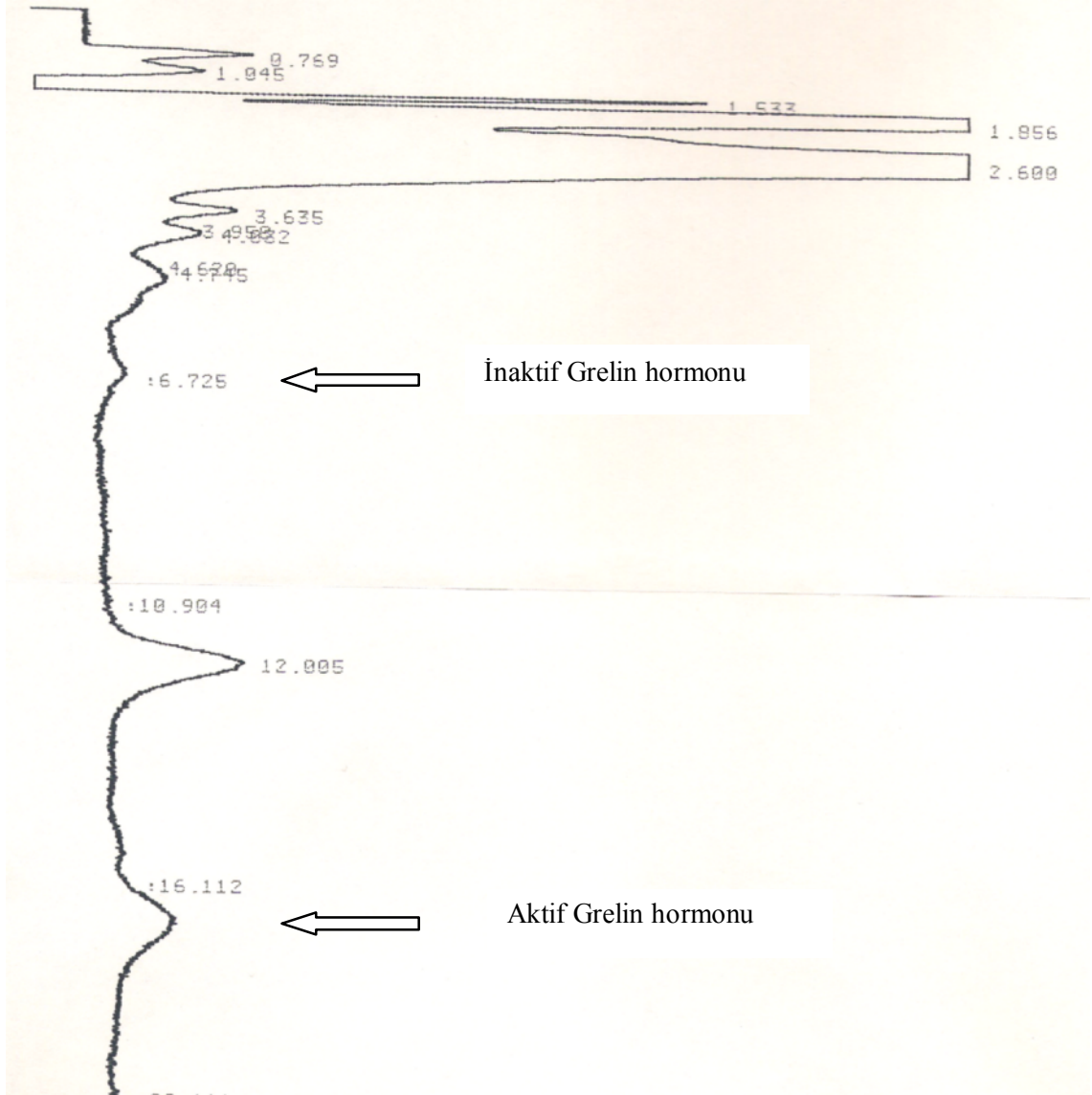
Bölüm 2.2.5.6.'da belirtildiği gibi akış hızı 1 ml/dak ve pH:4 olan hareketli faz 50 mM NaClO₄ çözeltisinde 215 nm dalga boyu koşullarında 80 pg/ml aktif standart grelin hormonuna ait çalışma kromatogramı şekil 3.12.'de verilmiştir.



Şekil 3.12. Akış hızı 1 ml/dak ve pH:4 olan hareketli faz 50 mM NaClO₄ çözeltisi kullanıldığında, 215 nm'deki 80 pg/ml standart aktif grelin hormonunun çalışma kromatogramı

Şekil 3.12.'de 80 pg/ml standart aktif grelin hormonuna ait çalışma kromatogramında 16,3 dakikada pik veren aktif grelin hormonunun pik alanı değeri 122288 olarak tespit edildi.

Bölüm 2.2.5.6.'da belirtildiği gibi akış hızı 1 ml/dak ve pH:4 olan hareketli faz 50 mM NaClO₄ çözeltisinde 215 nm dalga boyu koşullarında 80 pg/ml aktif standart grelin hormonu ile PON1 enzimi (1:1 v/v) karışımının 37 °C'daki 20 dakika inkübasyonuna ait çalışma kromatogramı şekil 3.13.'de verilmiştir.



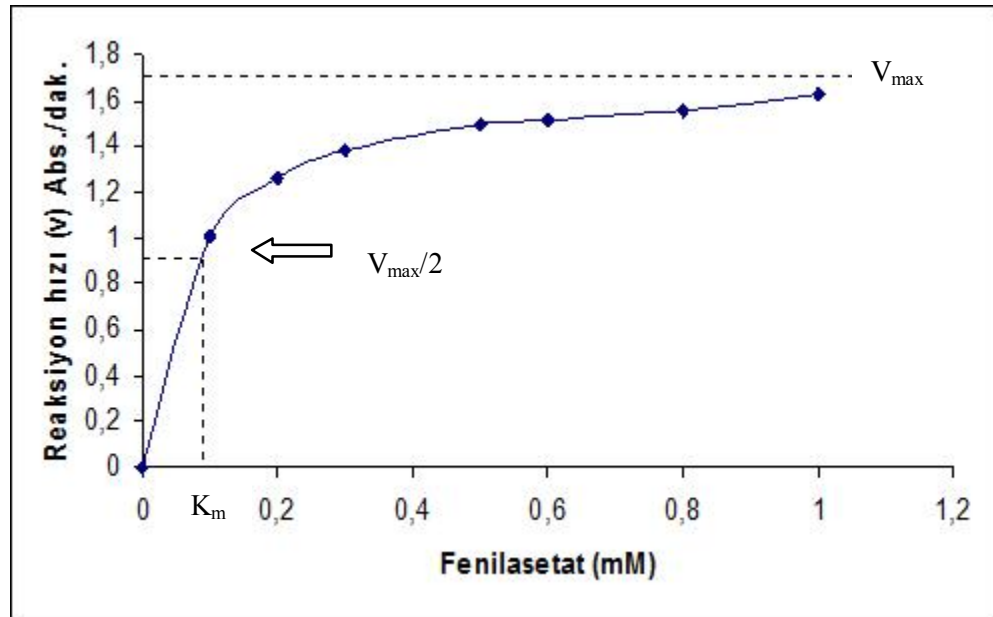
Şekil 3.13. Akış hızı 1 ml/dak ve pH:4 olan hareketli faz 50 mM NaClO₄ çözeltisi kullanıldığında, 215 nm'deki 80 pg / ml aktif ghrelin hormonu ile PON1 enzimi (v/v 1:1) karışımının 37 °C'da 20 dakika inkübasyonuna ait çalışma kromatogramı

Şekil 3.13'deki kromatogramda 16,3 dakikada pik veren aktif ghrelin hormonun pik alanı 55412 ve 6,5 dakikada pik veren inaktif ghrelin hormonunun pik alanı 3508 olarak tespit edildi. Aktif ghrelin hormonunun PON1 enzimi ile (v/v 1:1) oranında karışımı ghrelini % 50 oranında seyreltmesiyle şekil 3.12.'deki aktif ghrelinin pik alanı 122288'in yarısı 61144 değerinde olması gerekirken pik alanı değeri 55412'dir. Bu durum şekil 3.12. ve şekil 3.13. kromatogramlarındaki aktif ghrelinin 5732 değerindeki pik alanı farkının şekil 3.13. kromatogramındaki inaktif ghrelinin 3508 değerindeki pik alanına dönüştüğünü göstermektedir. Aktif ghrelin hormonunun inaktif forma dönüşüm yüzdesi pik alan değerlerine göre hesaplandığında % 61,20 oranında dönüşüm olmuştur.

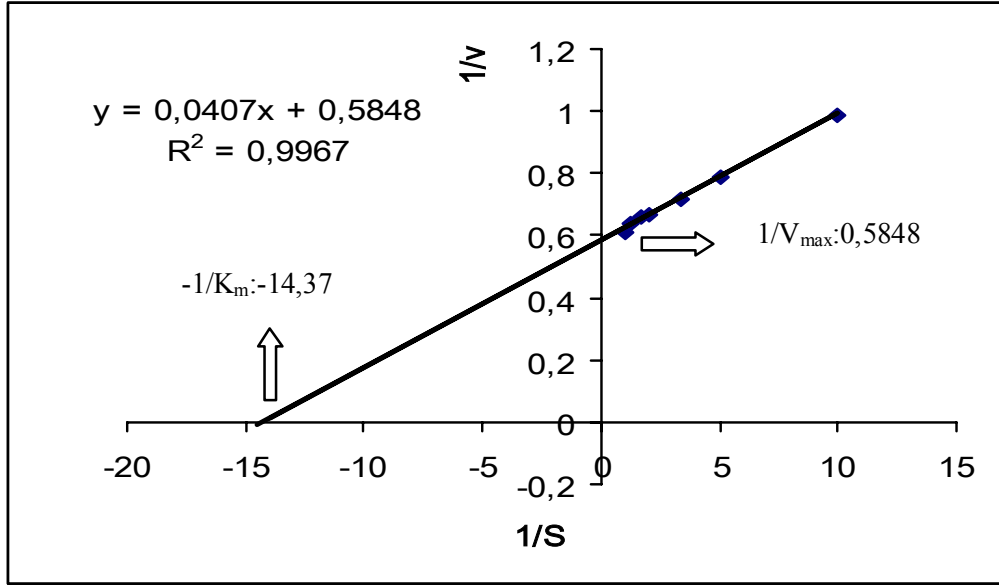
Grelin hormonu varlığında PON1 enziminin ARE aktivitesine etkisine ait bulgular çizelge 3.13.'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre çizilen Michaelis-Menten grafiği şekil 3.12.'dedir. Lineweaver–Burk grafiği ise şekil 3.13.'de verilmiştir.

Çizelge 3.13. 200 pg/ml Grelin varlığında değişen fenilasetat konsantrasyonlarının enzim aktivitesine etkisine ait deney sonuçları

Tüp No	Fenilasetat (S) mM	1/S mM ⁻¹	Reaksiyon Hızı (v)	1/v
1	0,10	10,00	1,01	0,99
2	0,20	5,00	1,26	0,79
3	0,30	3,33	1,38	0,72
4	0,50	2,00	1,49	0,67
5	0,60	1,66	1,52	0,66
6	0,80	1,25	1,56	0,64
7	1,00	1,00	1,63	0,61



Şekil 3.14. 200 pg/ml Grelin varlığında değişen fenilasetat konsantrasyonlarının enzim aktivitesine etkisini gösteren Michaelis-Menten grafiği



Şekil 3.15. 200 pg/ml Grelin varlığında değişen fenilasetat konsantrasyonlarının enzim aktivitesine etkisini gösteren Lineweaver-Burk grafiği

Şekil 3.15.'deki Lineweaver-Burk grafiğinden elde edilen $-1/K_m:-14,37$ ve $1/V_{max}:0,5848$ değerlerine göre 200 pg/ml grelin hormonu varlığında PON1 enziminin fenilasetat substratı için 37 °C'de ve 50 mM Tris/HCl tamponu pH:7,1'de bulunan K_m değeri $0,070 \pm 0,002$ mM ve V_{max} değeri 1,71 Abs./dak. (79,63 U/ml ve 44,48 U/mg) olarak hesaplandı.

Bölüm 2.2.5.6.'da belirtildiği gibi substrat olarak değişik konsantrasyonlarda grelin hormonuna PON1 enziminin etkisine ait reaksiyon hızının 215 nm dalga boyunda ölçülen değerleri çizelge 3.14.'de verilmiştir.

Çizelge 3.14. Substrat olarak grelin hormonunun değişen konsantrasyonlarının enzim aktivitesine etkisine ait deney sonuçları

Tüp No	Grelin (0,5 ml)	Tampon (0,5 ml)	PON1 (µl)	Reaksiyon Hızı (v)
1	20 pg/ml	0,50	17	0,70
2	40 pg/ml	0,50	17	0,52
3	80 pg/ml	0,50	17	0,22
4	160 pg/ml	0,50	17	0,18
5	320 pg/ml	0,50	17	0,12
6	400 pg/ml	0,50	17	0,08

Çizelge 3.14.'deki verilere göre PON1 enziminin substrat olarak grelin hormonuna etkisinin Michalies-Menten grafiğine uymadığını göstermektedir. Substrat olarak aktif grelin hormonunun konsantrasyonu artmasına karşın enzimatik reaksiyonun hızı azalmaktadır.

4. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Biyokimyasal olayları katalizleyerek, organizmalardaki canlılığı sağlayan enzimlerin saflaştırılması ve kinetik özelliklerinin belirlenmesi büyük bir önem taşımaktadır. Bu önem çerçevesinde değişik dokulardan ve serumdan spesifik aktivitesi yüksek enzim elde etmek en önemli amaçtır. Saflaştırılacak enzimin özellikleri göz önünde bulundurularak saflaştırma basamaklarının uygulanabilirliği kolay ve maliyeti düşük olmasına özen gösterilmelidir.

Bu çalışmada, sığır karaciğerinden PON1 enzimi saflaştırılmaya çalışılmıştır. Saflaştırılan enzimin saflık kontrolü ve molekül ağırlığı tayin edilmiş, kinetik özellikleri, (K_m , V_{max} , optimum pH ve sıcaklık gibi) ve grelin hormonu ile ilişkisi incelenmiştir.

PON1 enziminin çeşitli hayvanların karaciğer dokularından ve serumundan saflaştırılmasında ilk olarak ne tür metotların kullanıldığı tespit edilmiştir. Literatürde sığır karaciğerinden PON1 enziminin saflaştırılmasına ait sınırlı bilgiler olsa da karaciğerinin enzim bakımından zengin olması saflaştırılacak kaynağın belirlenmesinde en önemli etken olmuştur. Bunun yanı sıra PON1 enziminin saflaştırılması ile ilgili çalışmalar incelendiğinde karaciğer dokusu dışında çoğunlukla serum örneklerinin kullanıldığı da görülmüştür. Bu durum serumdaki parametrelerin karaciğere göre daha az olması ile açıklanabilir.

PON1 enziminin sığır karaciğerinden saflaştırılmasında sırasıyla; karaciğer örneklerinin homojenizasyonu, ultrasantrifüj, %55 doygunlukta amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz, DEAE-Sefaroz CL-6B iyon değişim kromatografisi ve son basamak olarak da Sefadeks G-200 jel filtrasyonu kromatografisi yöntemleri kullanılmıştır. Saflaştırma basamaklarından homojenizasyon ve ultrasantrifüj çalışmaları literatürde rat karaciğerinden PON1 enzimi saflaştırma çalışmalarında izlenen yöntem dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir [48]. Enzim saflaştırma yöntemleri arasında amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz en yaygın olarak kullanılanlardır. Bu basamakta enzimin en yüksek spesifik aktiviteyi % 55 doygunluğundaki amonyum sülfat çöktürmesi sonrası gösterdiği bulunmuş ve bu doğrultuda saflaştırma basamaklarına devam edilmiştir. DEAE-Sefaroz CL-6B iyon değişim ve Sefadeks G-200 jel filtrasyonu kromatografileride, insan serumundan PON1 enziminin saflaştırılma çalışmalarında izlenen yöntemler dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir [48, 53].

Saflaştırma işlemleri ve kinetik çalışmalarda enzim aktivitesi Eckerson tarafından önerilen tayin metodu ile ölçülmüştür [55]. Kalitatif protein tayinleri Warburg-Christian yöntemiyle, kantitatif tayinler ise biüret yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Protein miktarları şekil 3.1.'deki standart çalışma grafiğinden hesaplanan doğru denklemiyle hesaplanmıştır.

PON1 enziminin saflaştırma çalışmasında karaciğer örneğinin homojenizasyonu sonucu spesifik aktivite değeri 0,91 U/mg protein ve membranların çözülmesi sonrası yapılan

ultrasantrifüj sonucu spesifik aktivite 2,39 U/mg protein olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre 2,63 kat saflaştırma gerçekleşmiştir. Literatürde rat karaciğerinden yapılan çalışmada homojenizasyon ve ultrasantrifüj basamakları sonrası 8,5 kat saflaştırma gerçekleşmiş [48]. Saflaştırma katsayılarındaki bu farklılığa karaciğer kaynağının değişik olması ve laboratuvar koşulları neden olabilir.

Ultrasantrifüj sonrası protein çözeltisi farklı % doyunlukta 40, 50, 55, 60, 70, 80 amonyum sülfatla çöktürülmüştür. En yüksek spesifik aktiviteye sahip çökelti derişiminin % 55 doyunlukta amonyum sülfat olduğu tespit edilmiştir. Çöktürme ve diyaliz sonrası spesifik aktivite 2,85 U/mg protein bulunmuştur. Bu değeri enzimin 3,13 kat saflaştırıldığını göstermektedir. Bu sonuç literatürde insan serumundan PON1 enzimini saflaştırmaları çalışmalarındaki amonyum sülfat çöktürmesi ile paralellik göstermektedir. Bu çalışmalarda %60-80 doyunlukta amonyum sülfat kullanılarak ve 1,18 kat saflaştırma gerçekleştiği görülmektedir [54]. Çalışmamızdaki ultrasantrifüj sonrası elde edilen saflaştırma katsayısı ile literatürü karşılaştırdığımızda saflaştırmanın çok az gerçekleştiği görülmektedir. Bu duruma saflaştırma sırasında ortamdaki yüksek tuz konsantrasyonu neden olabilir. Saflaştırmada amonyum sülfat çöktürmesi sonrası ortamdaki yüksek tuz konsantrasyonu diyaliz yapılarak uzaklaştırılmıştır. Amonyum sülfat çöktürmesi ve sonrasında uygulanan diyaliz yerine ultrafiltrasyon yöntemi kullanılması aktivite kaybını daha alt seviyeye çekebilir. Literatürde protein çözeltilerinin konsantre edilmesinde ultrafiltrasyon uygulandığı ve daha yüksek aktiviteli saflaştırma yapıldığı görülmektedir [48, 54].

Amonyum sülfat çöktürmesi ve sonrasında uygulanan diyaliz işlemlerinde saflaştırılan ve konsantre edilen protein çözeltisi DEAE-Sefaroz iyon değışim kromatografisine uygulanmıştır. Literatüre göre iyon değışim kromatografisinde kolonu dengeleyen tamponlarda 1-2,5 mM CaCl₂ ve 20 mM NaCl tuzlarının bulunması kolonun stabilizasyonunda problemler oluşturmuştur [48, 53]. Kolon dolgu maddesi DEAE-Sefaroz % 20 etil alkol süspansiyonunda korunmaktadır. Bu dolgu maddesi kolona doldurulması sonrası ortamda bulunan etil alkolün uzaklaştırılması için kolondan tuz içeren tamponlar geçirildiğinde kolonun pH stabilizasyonu sağlanamamıştır. Etil alkol kolondan uzaklaştırılırken kolonun pH'sı olması gereken 7,7 değerinden düşerek asidik değerlere ulaşmıştır. Bu duruma ortamdaki tuzların çözülmesi sonucu oluşan anyonların DEAE'deki artı yüklü amino grubuna bağlanması ve ortamda artan H⁺ iyonu konsantrasyonu neden olabilir. Bu nedenle kolonun stabilizasyonunda tuz içermeyen tampon çözelti kullanılmıştır. Ayrıca Bölüm 2.2.1.4.'de belirtildiği gibi kolon dolgu maddesi tamponla üç defa yıkanmış ve uygun pH sağlanması ile enzim proteini bağlı DEAE-Sefaroz dolgu maddesi kolona doldurulmuştur. Kolon dolgu maddesi DEAE-Sefaroz matriksine bağlı enzim proteininin kolondan ayrılması için literatürlerde genel olarak 0-700 mM aralığında NaCl tuzu

kullanıldığı görülmektedir [48, 53, 54]. Ayrıca literatürlerde iyon değişim kromatografisinde tuz konsantrasyonunun lineer bir şekilde artırıldığı bir sistemle proteinler kolondan ayrılıp saflaştırıldığı belirtilmektedir. Saflaştırmada kolondan geçen 0-500 mM aralığındaki NaCl konsantrasyonu manuel yolla değiştirilerek kromatografi gerçekleştirilmiştir. Bu durum tuz konsantrasyonunu lineer bir şekilde artmasını sağlamayabilir. DEAE-Sefaroz ile yaptığımız iyon değişim kromatografisi sonucunda spesifik aktivite 4,68 U/mg protein bulunmuştur. Bu sonuç literatürlere göre düşüktür [48, 53]. Daha önce belirttiğimiz gibi laboratuvar koşullarında kromatografi gerçekleştirilirken tuz konsantrasyonunun lineer bir şekilde arttığı sistemin olmaması, spesifik aktivitesi düşük bir seviyede enzim proteinin saflaştırılmasına neden olabilir.

Bu çalışmada son saflaştırma basamağı olarak Sefadeks G-200 jel filtrasyonu kromatografisi yapılmıştır. Sefadeks G-200 jel filtrasyonu kromatografisi sonucu saflaştırılan PON1 enziminin spesifik aktivitesi 23,93 U/mg protein bulunmuştur. Bu sonuç literatür ile paralellik göstermektedir [53]. Saflaştırma çalışmalarımızda en yüksek spesifik aktivite bu aşamada gerçekleşmiştir. Enzim proteini 26,30 kat saflaştırılmıştır. SDS-PAGE yapılan molekül ağırlığı tayininde saflaştırılan enzimin molekül ağırlığı 45,2 kDa olarak bulunmuştur.

PON1 enzimi saflaştırma basamakları sonucunda 26,30 kat saflaştırılmasını ve uygulanan yöntemleri literatürdeki saflaştırma sonuçları ve yöntemleriyle genel bir şekilde değerlendirdiğimizde karşımıza şu sonuçlar çıkmaktadır. Literatürde PON1 enzimi rat karaciğerinden sırasıyla homojenizasyon, ultrasantrifüj, hidroksiapatit adsorbsiyonu, DEAE-Sefaroz iyon değişim kromatografisi, Cibacron Blue 3GA kromatografisi ve Mono Q HR 5/5 anyon değişim kromatografilerini uygulanarak 415,3 kat saflaştırma gerçekleştirilmiş [48]. İnsan serumunda yapılan bir saflaştırmada sırasıyla ultrasantrifüj, % 60-80 amonyum sülfat çöktürmesi ve sefaroz 4B-L-tirozin-1-naftilamin afinite kromatografisi sonucu 227 kat saflaştırma gerçekleştirilmiş [53]. İnsan serumunda yapılan başka bir saflaştırmada da sırasıyla ultrasantrifüj, DEAE-Sefadeks A-50 kromatografisi ve Sefadeks G 200 jel filtrasyonu kromatografileri uygulanarak 607 kat saflaştırma gerçekleştirilmiş [54]. Bu genel sonuçlara göre saflaştırma oranımızın düşük olduğu görülmektedir. Saflaştırma oranının daha yüksek olması için saflaştırmada hidrofobik adsorbsiyona dayalı afinite kromatografileri uygulanabilir. Bu tür etkileşimler ve özel bir afinite içeren kolonlarda yapılan saflaştırmada tek basamakla kısa bir sürede yüksek spesifik aktiviteye sahip enzim elde edilebilir. Bu doğrultuda FÜBAP'ın 1447 numaralı projesi desteğinde, afinite kromatografisi için istenilen Cibacron Blue 3GA maddesinin üretimden kaldırılması nedeniyle bu madde alınamamış ve bu nedenle saflaştırma oranı düşük bir saflaştırma gerçekleşmiştir.

Saflaştırma işlemlerinin tamamlanmasından sonra PON1 enziminin fizikokimyasal ve kinetik özellikleri araştırılmıştır. Saflaştırdığımız enzimin kinetik özellikleri incelenirken önce

değişik substrat konsantrasyonlarının enzim aktivitesine etkisi araştırılmıştır. Değişik konsantrasyonlarda fenilasetat substratı ile yaptığımız çalışmada enzimin Michaelis-Menten kinetiğine uygunluğu şekil 3.6.'da gösterilen grafikte tespit edilmiştir. Fenil asetat ile 37 °C'de ve 50 mM Tris/HCl pH:7,1 olan tampon çözeltide bulunan K_m değeri $0,074 \pm 0,002$ mM ve V_{max} değeri 1,40 absorbans/dakika (65,20 U/ml, 36,42 U/mg) olarak hesaplanmıştır. Literatürde genellikle paraoksan ve fenilasetat substratlarına karşı PON1 enziminin K_m ve V_{max} değerlerinin rapor edildiği görülmektedir. Yapılan çalışmalarda K_m değerinin üst ve alt sınırını genel olarak belirten literatürler incelendiğinde insan serumunda fenilasetat hidrolizine bağlı K_m değerini $0,78 \pm 0,08$ mM-4,16 mM aralığında V_{max} değerleri 15,175 U/ml civarında olduğu görülmektedir [53, 54]. Bu değerlere göre sığır karaciğerinden saflaştırılan PON1 enziminin K_m değerinin daha düşük ve V_{max} değerinin yüksek olması düşük substrat konsantrasyonlarında bile enzim aktivitesinin insan ve rat kaynaklı enzime göre daha yüksek olduğunu göstermektedir.

Kinetik çalışmalarda optimum sıcaklık ve pH değerleri, enzimin ısıya karşı dayanıklılığı artan enzim miktarının enzim aktivitesine etkisi ve grelin hormonu ile PON1 enzimi arasındaki ilişki araştırılmıştır. PON1 enzimi için optimum sıcaklık 35-37 °C aralığında ve en yüksek aktivite 37 °C'de gerçekleşmektedir. Optimum pH aralığı 7,0-7,5 ve en yüksek aktivite pH:7,1'dedir. Artan enzim miktarı ile enzim aktivitesinin lineer bir şekilde arttığı görülmektedir. Yapılan çalışma ve literatürler karşılaştırıldığında genel olarak enzimler için optimum pH ve sıcaklık koşulları birbirine yakın değerlere sahiptir [48, 53, 54]. PON1 enziminin 56°C ve 65°C yüksek sıcaklıklardaki inkübasyonu sonrası aktiviteleri ölçüldüğünde 56°C'de 65-75. dak. süre boyunca % 42,65'lik bir aktiviteyi korurken 65°C'de 5 dakikadan sonra aktiviteyi kaybettiği görülmüştür. Literatürde rat karaciğerinden saflaştırılan PON1 enziminin 52,5 ve 55°C'de 15 ve 60 dak. aralığında hızlı bir inhibisyonunun olduğunu rapor edilmiş [48]. Bu durum farklılığı özellikle sığır karaciğerinden saflaştırılan PON1 enziminin ısıya karşı daha dayanıklı olması ile açıklanabilir.

Kinetik çalışmalarında PON1 enziminin grelin hormonuna önemli bir etkisi olduğu saptanmıştır. Literatürde grelinin yarı ömrü 15-20 dakika olduğunu yarı ömrünün kısa olmasına muhtemelen plazma esterazı PON1'in neden olduğunu rapor edilmektedir [33- 35]. Bunun için en önemli veri olarak hem grelinin hemde PON1 enziminin kanda HDL'ye bağlı olması gösterilmiş ve PON1'in grelinin 3. aminoasidine bağlı olan oktanil grubundaki açıl bağlarını desaçilasyonla kırarak grelini inaktif forma getirdiği rapor edilmektedir [33- 35]. Bu çalışmada grelin hormonuna PON1 enziminin etkisini aydınlatmak için HPLC kullanılmıştır. Şekil 3.12.'de 215 nm dalga boyunda standart aktif grelin hormonunun çalışma kromatogramı ve Şekil.3.13.'de PON1 enzimi ile inkübasyona bırakılan aktif grelin hormonun kromatogramları karşılaştırılmıştır. Şekil 3.12.'de 80 pg/ml standart aktif grelin hormonuna ait çalışma

kromatogramında aktif grelin hormonunun 16,3 dakikada pik alanı 122288, Şekil 3.13'deki aktif grelin hormonun 16,3 dakikada pik alanı 55412 ve inaktif grelin hormonunun 6,5 dakikada pik alanı 3508 olarak tespit edilmiştir. Aktif grelin hormonunun PON1 enzimi ile (v/v 1:1) oranında karışımı grelini % 50 oranında seyreltmesiyle pik alanı 1122288'in yarısı 61144 değerinde olması gerekirken pik alanı değeri 55412 olarak tespit edilmiştir. Bu durum şekil 3.12. ve şekil 3.13. kromatogramlarındaki aktif grelinin 5732 değerindeki pik alanı farkının şekil 3.13. kromatogramındaki inaktif grelinin 3508 değerindeki pik alanına dönüştüğünü göstermektedir. Aktif grelin hormonunun inaktif forma dönüşüm yüzdesi pik alan değerlerine göre hesaplandığında % 61,20 oranında dönüşüm gerçekleştiği bulunmuştur.

PON1 enziminin 200 pg/ml grelin hormonu varlığında ARE aktivitesi için 37 °C, 50 mM Tris/HCl tamponunda ve pH:7,1'de bulunan K_m : $0,070 \pm 0,002$ mM ve V_{max} : 1,71 Abs./dak. (79,63 U/ml ve 44,48 U/mg) olarak bulunmuştur. PON1 enziminin ARE aktivitesi sonucu hesaplanan K_m değeri $0,074 \pm 0,002$ mM'dan daha düşük bir K_m değeri bulunması grelin hormonun bir aktivatör olarak PON1 enziminin ARE aktivitesini artırdığını göstermektedir. Bu sonucu V_{max} değerindeki artış da desteklemektedir.

Çizelge 3.14.'deki verilere göre spektrofotometrik yöntemle 215 nm dalga boyunda ölçülen reaksiyon hızları PON1 enziminin substrat olarak grelin hormonuna etkisinin Michaelis-Menten grafiğine uymadığını göstermektedir. Substrat olarak aktif grelin hormonunun konsantrasyonu artmasına karşın enzimatik reaksiyonun hızı azalmaktadır. Bu durum reaksiyon hızının ölçüldüğü zaman aralığından ya da ortamdaki grelin hormonunun artan konsantrasyonunun hormon enzim etkileşimini azaltmasından kaynaklanabilir. Grelinin yarı ömrünün 15-20 dak. olması nedeniyle ortalama 20 dakika süre sonunda reaksiyon hızının ölçülmesi daha uygun olabilir.

Sonuç olarak PON1 enzimi; sığır karaciğerinden sırasıyla homojenizasyon, ultrasantrifüj, amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-Sefaroz iyon değişim kromatografisi ve Sefadeks G-200 jel filtrasyonu kromatografi yöntemleriyle 23,93 U/ml spesifik aktiviteyle homojenata göre 26,30 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimin SDS-PAGE ile molekül ağırlığı 45,2 kDa olarak belirlenmiştir. Saflaştırılan enzimin kinetik özellikleri araştırılmış; optimum sıcaklığı 37 °C ve optimum pH:7,1 bulunmuştur. Enzimin 56°C inkübasyona bırakılarak belirli sürelerde aktivitesi ölçüldüğünde 75. dakikaya kadar % 42,65 ile aktifliğini koruduğu ve sıcaklığa oldukça dayanıklı bir enzim olduğu görülmüştür. PON1 enziminin ARE aktivitesi çalışılmış K_m değeri $0,074 \pm 0,002$ mM ve V_{max} değeri 1,40 absorbans/dakika (65,20 U/ml, 36,42 U/mg) olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre enzimin oldukça aktif olduğu sonucuna varılmıştır. Bugüne kadar ilk defa yapılan bir çalışma ile PON1 enziminin grelin üzerine etkisi araştırılmıştır. PON1 enziminin aktif grelini 20 dakika sonunda % 61,20 oranında

inaktif greline dönüştürdüğü saptanmıştır. Çalışmamızda grelinin PON1 enziminin ARE aktivitesi etkisi araştırılmış ve bir aktivatör olarak grelinin PON1 enziminin ARE aktivitesini artırdığı görülmüştür. PON1 enziminin substrat olarak grelin hormonuna etkisi incelenmiş ve elde edilen değerlerin Michaelis-Menten grafiğine uymadığı bulunmuştur. Genel olarak çalışmamızda elde edilen sonuçlar ile istenilen amaca ulaşılmaya çalışılmıştır. Bu doğrultuda kazanılan bilgi ve tecrübenin ileri ki çalışmalarda farklı yöntemlerin kullanılmasına ve geliştirilmesine hizmet edeceği düşüncesini taşımaktayız.

5. KAYNAKLAR

1. Keha, E., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2004, Biyokimya. Aktif Yayınevi, Erzurum, 637s.
2. Konukoğlu, D., 2000, Tus'a Hazırlık Biyokimya. Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 435s.
3. Nelson D.L., Cox, M.M., 2005, Lehninger Biyokimyanın İlkeleri (Editör: Kılıç N.) Palme Yayıncılık, Ankara, 1152s.
4. Gözükar, E. M., 1997 , Biyokimya 1-2 cilt. Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 1225s.
5. Emerk K., Onat T., 1996 , Temel Biyokimya . Saray Medikal Yayıncılık, İzmir, 932s.
6. www.genetikbilimi.com/genbilim/enzimler
7. Erden İ., 2004, ST Elevasyonlu Miyokard İnfarktüsü (stemi) hastalarda insan paraoksonase geni met-leu/55 polimorfizmi, Uzmanlık Tezi, Dr. Siyami Ersek Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Merkezi, 70s.
8. Durrington PN, Mackness B, Mackness MI, 2001, Paraoksonase and atherosclerosis. Arterioscler, Thromb Vasc Biol, 21, 473-480.
9. Hegele R.A., 1999, Paraoksonase genes and disease, Ann Med , 31, 217-224
10. Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du B.N., 1996, The human serum paraoksonase/aterosklerozun arylsterase gene (PON1) is one member of a multigene family, Genomics , 33, 498-509.
11. Draganov D.I., Stetson P.L., Wateon Ce, Billecke S.S., La Du B.N., 2000, Rabbit serum paraoksonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation, J. Biol. Chem., 275, 33435-33442
12. Mackness, M.I., Mackness, B., Durrington, P.N., Connelly, P.W., Hegele, R.A., 1996, Paraoksonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins, Curr Opin Lipidol, 7, 69-76.
13. Deakin, S.P., James, R.W., 2004, Genetic and environmental modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoksonase-1, Clin Sci, 107, 435-447.
14. Heijmans, B.T., Westendorp, R.G.J., Lagaay, A.M., Knook, D.L., Kluft, C., Slagboom, P.E., 2000, Common paraoksonase gene variants, mortality risk and fatal cardiovascular events in elderly subjects, Atherosclerosis, 149, 91-97
15. Hasselwander, O., McMaster, D., Fogarty, A.D., Maxwell, A.P., Nicholls, D.P., Young, J.S., 1998, Serum paraoksonase and platelet-activating factor acetylhydrolase in chronic renal failure, Clin. Chem., 44, 179-182.

16. La Du B.N., Aviram, M., Billecke, S., Navab, M., 1999, On the physical role(s) of the paraoxonases, *Chem. Biol. Inter*, 119-120, 379-388.
17. Kelso, G.J., Stuart, W.D., Richter, R.J., Furlong, C.E., Jordon, T.J., Harmony, J.A.K., 1994, Apolipoprotein J is associated with paraoxonase in human plasma, *Biochemistry*, 33, 832-839.
18. Eckerson, H.W., Romson, J., Wyte, C., La Du B.N., 1983, The Human serum paraoxonase polymorphism: Identification of phenotypes by their response to salts, *Am J Hum Genet*, 35, 214-227.
19. Gan, N., Smolen, A., Eckerson, W., La Du BN., 1991, Purification of human serum paraoxonase/arylesterase. Evidence for one esterase catalyzing both activities, *Drug Metab Dispos*, 19, 100-106.
20. Öztürk, H., 2008, Diabetes mellitus'da paraoksonaz aktivitesi ve AOPP düzeyleri, *Tıbbi Biyokimya Uzmanlık Tezi, Sağlık Bakanlığı Haseki ve Araştırma Hastanesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya Bölümü*, 59 s.
21. Mackness, M.I., Arrol, S., Durrington, P.N., 1991, Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low density lipoprotein, *FEBS Lett*, 286, 152-154
22. Rousselot, D.B., Therond, P., Beaudeux, J.L., Peynet, J., Legrand, A., Delatre, J., 1999, High density lipoproteins and the oxidative hypothesis of atherosclerosis, *Clin. Chem. Lab. Med.*, 37, 939-949.
23. Aviram, M., Rosenblat, M., Bisgaier, C.L., Newton, R.S., Primo, P., Parao, S.L., La Du B.N., 1998, Paraoxonase inhibits high density lipoprotein oxidation and preserves its functions, *J.Clin.Invest.*, 101, 1581-1590.
24. Martinelli, N., Girelli, D., Oliveri, O. et al., 2004, Interaction between smoking and PON-2 Ser311Cys polymorphism as a determinant of the risk of myocardial infarction, *Eur. J. Clin. Invest*, 34, 14-20.
25. Reddy, S.T., Wadleigh, D.J., Grijalva, V., et al., 2001, Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids, *Arterioscler Thromb Vasc. Biol.*, 21, 542-547
26. Hong-Liang, L., De-Pei, L., Chihj-Chuan, L., 2003, Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress and diseases. *J. Mol. Med.*, 81, 766-779
27. Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H., Kangawa, K., 1999, Ghrelin is a growth hormone-releasing acylated peptide from stomach, *Nature*, 402, 656-659.
28. Aydın, S., Özkan, Y., Caylak, E., 2006 Ghrelin and its biochemical functions, *Türkiye Klinikleri, J. Med. Sci.*, 26, 272-283.

29. Aydin, S., 2007, Ghrelin Hormonunun Keşfi: Araştırmaları ve Klinik Uygulamaları, Türk Biyokimya Dergisi, 32, 76-89
30. Wren, AM., Seal, L.J., Cohen, M.A., Brynes, A.E., Frost, G.S., Murphy, K.G., Dhillo, W.S., Ghatei, M.A., Bloom, S.R., 2001, Appetite and increases food intake in humans, J. Clin. Endocrinol Metab., 86, 12, 5992.
31. Groschl, M., Uhr, M., Kraus, T., 2004, Evaluation of the comparability of commercial ghrelin assays, Clin. Chem., 50, 2, 457-458.
32. Aydin, S., 2006, Proposal for the abbreviation of ghrelin the appetite hormone, Horm. Res., 66, 4, 206.
33. Ariyasu, H., Takaya, K., Tagami, T., Ogawa, Y., Hosoda, K., Akamizu, T. et al., 2001, Stomach is a major source of circulating ghrelin and feeding state determines plasma ghrelin-like immuno reactivity levels in humans, Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism., 86, 4753-4758.
34. Kaiya, H., Darras, V.M., Kangawa, K., 2007, Ghrelin in Birds: Its structure, distribution and function, The Journal of Poultry Science., 44, 1, 18.
35. Kaiya, H., Kojima, M., Hosoda, H., Riley, L.G., Hirano, T., Grau, E.G., Kangawa, K., 2003, Identification of tilapia ghrelin and its effects on growth hormone and prolactin release in the tilapia, Oreochromis mossambicus, Comp Biochem Physiol B Biochem Mol. Biol., 135, 3, 421-429.
36. Korbonits, M., Kojima, M., Kangawa, K., Grossman, A.B., 2001, Presence of ghrelin in normal and adenomatous human pituitary, Endocrine, 14, 101-104.
37. Gualillo, O., Caminos, J., Blanco, M., et al., 2001, Ghrelin, a novel placental-derived hormone, Endocrinology, 142, 788-794.
38. Korbonits, M., Bustin, S.A., Kojima, M., 2001, The expression of the growth hormone secretagogue receptor ligand ghrelin in normal and abnormal human pituitary and other neuroendocrine tumors, J. Clin. Endocrinol Metab., 86, 881-887.
39. Casanueva, F.F., Dieguez, C., 2002, Ghrelin; The link connecting growth with metabolism and energy homeostasis, Reviews in Endocrine Disorders, 3, 325-338.
40. De Ambrogi, M., Volpe, S., Tamanini, C., 2003, Ghrelin: central and peripheral effects of a novel peptide hormone, Med. Sci. Monit., 9, 217-224.
41. Schwartz, M.W., Woods, S.C., Porte, D., et al., 2000, Central nervous system control of food intake, Nature, 404, 661-671.
42. Janeckova, R., 2001, The role of leptin in human physiology and pathophysiology, Physiol Res., 50, 443-459.

43. Tschöp, M., Smiley, D., Heiman, M.L., 2000, Ghrelin induces adiposity in rodents, *Nature*, 407, 908-913.
44. Soriano-Guillen, L., Barrios, V., Chowen, J., et al., 2004, Ghrelin levels from fetal life through early adulthood: relationship with endocrine and metabolic and anthropometric measures, *J. Pediatr.*, 144, 30-35.
45. Eienthal, R., and M.J.Danson., 1993, *Enzyme assays*, Oxford University Press, Oxford, 1, 335.
46. Temizkan, G., Arda, N., 1999, *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*. Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 234s.
47. Eraslan, A., Kazan, D., Denizci, A., Öztürk, D.C., Karahan, N., 2003, *Enzim Saflaştırılmasında Temel Yöntemler*, VI. Uygulamalı Eğitim Kursu, TÜBİTAK, Kocaeli, 161s.
48. Rodrigo, L., Gil, F., Hernandez, A. F., Marina, A., Vazquez, J., Pla A., 1997, purification and characterization of paraoxon hydrolase from rat liver, *Great Britain Biochem J.*, 321, 595- 601.
49. E.L.V. Harris, S. Angal, 1989, *Protein Purification Methods-A Practical Approach*. IRL Pres., Oxford, 252s.
50. www.mu.edu.tr/departments/biyoloji/MUbiyoweb/molbio/konu3.ppt
51. tip.erciyes.edu.tr/Dersnotlari/temeltip/Biyokimya
52. Beynon, R.J., and Bond, J.S., 1989, *Proteolytic enzymes*, Oxford University Press, Oxford, 15-25.
53. Sinan S., Koçkar F., Arslan O., 2006, Novel purification strategy for human PON1 and inhibition of the activity by cephalosporin and aminoglikozide derived antibiotics, *Biochimie*. 88, 565-574.
54. Golmanesh L., Mehrani H., Tabie M., 2008, Simple procedures for purification and stabilization of human serum paraoxonase-1, *J. Biochem. Biophys. Methods* 70, 1037-1042.
55. Eckerson, H. Wyte, C. And La Du, B., 1983, The Human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism, *Am J Hum Genet* 35, 1126-1138.
56. Atalay, S., 2007, Koroner Arter Hastalarında HDL Alt Grupları ile Paraoksonaz Enzim Aktivitesi Dağılımları, Uzmanlık Tezi, Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya Bölümü, 84s.
57. Gülcü, F., Gürsu, M.F., 2003, Paraoksonaz ve aril estaraz aktivite ölçümlerinin standardizasyonu, *Türk Biyokimya Dergisi*, 28,2, 45-49.
58. Laemmli, D.K., 1970, Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of bacteriophage T₄, *Nature*, 227, 680-683.

59. Karataş F., Aydın S., Geçkil H., 2006, Ghrelin hormonunun HPLC ile belirlenmesi, 21. Ulusal Kimya Kongresi, Malatya.

ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Çemişgezek'te doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Çemişgezek'te tamamladım. 1994 yılında kazandığım İnönü Üniversitesi Eğitim Fakültesi Kimya Öğretmenliği Bölümünden 1998'de mezun oldum. Aynı yıl Çemişgezek İstiklal İlköğretim Okuluna Fen Bilgisi öğretmeni olarak atandım. 1999 yılında Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim dalında yüksek lisansa başladım. Ağustos 2001'de yüksek lisansımı tamamladım. Eylül 2001'de ise Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim dalında doktora programı kazandım. 2002'den 2007 yılına kadar Çemişgezek Ertuğrul Gazi Lisesinde çalıştım. 2007 yılından itibaren de Elazığ Ahmet Kabaklı Anadolu Öğretmen Lisesinde Kimya öğretmeni olarak görev yapmaktayım.

Uğur AŞKIN