

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNSAN LÖKOSİT MYELOPEROKSİDAZİNİN
SAFLAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

LEYLA BİLGE DEVECİOĞLU

DANIŞMAN
PROF.DR. NAİME CANORUÇ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR

2009

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNSAN LÖKOSİT MYELOPEROKSİDAZİNİN SAFLAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

LEYLA BİLGE DEVECİOĞLU

DANIŞMAN
PROF.DR. NAİME CANORUÇ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR

2009

Bu tez DÜBAP-07-02-03'nolu Projesi tarafından desteklenmiştir.

T.C
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

“İnsan Lökosit Myeloperoksidazının Saflaştırılması” isimli bu Yüksek Lisans tezi
..... tarihinde tarafımızdan değerlendirilerek başarılı bulunmuştur.

Tez Danışmanı : Prof.Dr.Naime CANORUÇ

Tezi Teslim Eden : Leyla Bilge DEVECİOĞLU

Jüri Üyesinin

	Ünvanı	Adı Soyadı	Üniversitesi-Fakültesi
Başkan	:		
Üye	:		
Üye	:		
Üye	:		
Üye	:		

Yukarıdaki imzalar tasdik olunur.

...../...../.....

Prof. Dr. Yusuf NERGİZ
Dicle Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda devam ettirdiğim yüksek lisans eğitimim boyunca göstermiş oldukları destek ve katkılarından dolayı tüm Anabilim Dalı öğretim üyeleri ve çalışanlarına,

Tezimin hazırlanmasında deneyimlerini ve yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım Sayın Prof.Dr.Naime Canoruç'a

Tezimin deney aşamalarında bana laboratuvarını açan, deneylerimin her aşamasında bana yardımlarını esirgemeyen Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof.Dr. Kamer Kılıncı'a ve Doktora Öğrencisi Behram Sarkarati'ye

Ayrıca bana gösterdikleri sevgi, anlayış ve desteklerinden dolayı sevgili annem ve babama teşekkürlerimi borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	2
GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	29
BULGULAR.....	33
TARTIŞMA.....	40
KAYNAKLAR.....	45
ÖZGEÇMİŞ.....	51

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekiller	Sayfa
Şekil 1. Enzimlerin Sınıflandırılması	10
Şekil 2. Jel Filtrasyon Kromatografisi	16
Şekil 3. Affinite Kromatografisi	17
Şekil 4. İyon Exchange Kromatografisi	18
Şekil 5. MPO'nun homodimer üç boyutlu yapısı	23
Şekil 6. MPO'nun kimyasal yapısı	24
Şekil 7. MPO'nun transkripsiyon öncesi şekli	25
Şekil 8. MPO için önerilen kinetik model	27
Şekil 9. MPO tarafından katalizlenen NO ₂ oksidasyonu	28
Şekil 10. İnsan lökositlerinden MPO'nun Con A Sefharose 4B affinite kromatografi profili	33
Şekil 11. İnsan lökositlerinden MPO'nun Sefhacryl S 300 HR jel filtrasyon kromatografisi profili	35
Şekil 12. İnsan lökositlerinden MPO'nun CM Sefhadex G 25 iyon değiştirici kromatografisi profili	36
Şekil 13. MPO'nun farklı saflaştırma basamaklarındaki örneklerin SDS-PAGE Elektroforezi	37
Şekil 14. MPO'nun H ₂ O ₂ aktivitesine göre Michaelis-Menten grafiği	38
Şekil 15. MPO'nun H ₂ O ₂ aktivitesine göre Lineweaver- Burk grafiği	39

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 1. İnsan lökositlerinden MPO enziminin saflaştırma şeması	34

SİMGELER VE KISALTMALAR

MPO	Myeloperoksidaz
LDH	Laktik dehidrogenaz
DEAE-selüloz	Dietil aminoetil selüloz
CM-selüloz	Karboksimetil selüloz
PMN	Polimorfonükleer
EDTA	Etilendiamintetraasetikasit
CETAB	Cetyltrimethyl ammonium bromide
TMB	Tetramethylbenzidine
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
BFB	Brom fenol blue
β -ME	β -Merkapto etanol
CBB	Coomassie brilliant blue

ÖZET

Myeloperoksidaz (MPO), (oksidoraductaz, EC 1.11.1.7) memeli nötrofillerinin granüllerinde yer alan bir enzim olup, fagosite edilmiş bakterilerin öldürülmesinde önemli rol oynamaktadır.

Buffy coattan ficoll gradiyenti ile, EDTA'lı antikoagülanlı kandan, sitratlı antikoagülanlı at kanından lökosit elde edilerek, buffy coattan CaCl_2 kullanarak lökositleri yıkamasıyla, native fare 32DcI3 hücrelerinden ve lökoferez sonrası lökositlerden myeloperoksidaz (MPO) enzimi izole edilmiştir.

Bu çalışmada insan myeloperoksidaz enzimini (MPO), lökosit solübilizasyonu, Con A Sepharose 4B affinite jel kromatografisi, amonyum sülfat çöktürmesi, Sephacryl S300 HR jel kromatografisi ve CM Sefhadex G 25 İyon Değiştirici kromatografi aşamaları ile saflaştırılmıştır. Bu yöntem ile H_2O_2 substratı kullanılarak insan myeloperoksidaz enzimi 71,45 kez saflaştırılmış ve spesifik aktivitesi 1192,574 u/mg protein olarak bulunmuştur. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi ile saflık derecesi kontrol edilmiş. Saflaştırılmış enzimin Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek 37 °C'de 50mM KPO_4 , %0,5 CETAB tamponunda (pH: 5,4) H_2O_2 substratı için K_m değeri 0,369 μmol ve V_m değeri 1,077 $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein olarak saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Myeloperoksidaz, Myeloperoksidaz saflaştırılması, saflaştırma, kinetik özellikleri

ABSTRACT

Myeloperoxidase (MPO), (transmitter H_2O_2 oxidoreductase, EC 1.11.1.7) is an enzyme found in mammalian neutrophil granules, play an important part in killing these bacteriums fagositated.

Myeloperoxidase (MPO), enzym has been isolated from leukophoresis preparations and native mouse 32Dc13 cells and using $CaCl_2$ from buffy coats by washing up leucocyte. Leucocyte has been obtained form horse blood containing anticoagulated with citrate, anticoagulated boold with EDTA and buffy coats on a ficoll density gradient.

At that study; human Myeloperoxidase (MPO) enzyme has been purified with rank of CM Sefhadex Ion Exchange, Sefhacryl S300 HR Gel filtration chromatography, Con A Sepharose 4B affinity gel chromatography and adjust to 80% ammonium sulfata by the addition of dry ammonium sulfata. In our study human myeloperoxidase had a specific activity of 1192,574 units per milligram protein when H_2O_2 used as a substrate with a purification fold of 71,45. The purity was controlled by using SDS-PAGE. The purified enzyme had a Km value of 0,369 μmol , which was calculated from Michaelis-Menten and Lineweaver-Burk plots, by using H_2O_2 as a substrate at the assay conditions of 37°C in 50 mM KPO_4 buffer (pH:5,4) containing 0,5% CETAB.

Key words: Myeloperoxidase, purification of Myeloperoxidase, purification, kinetic properties,

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Polimorfonükleer lökositler insanda önemli anti mikrobik ve anti bakteriyel savunma sisteminin elemanlarıdır. Bu hücreler içerdikleri hidrolitik ve peroksidatif etkili enzimlerin yanı sıra, aktivasyonlarından sonra bolca ürettikleri çeşitli reaktif nitrojen oksit ve reaktif oksijen türleri aracılığı ile sitotoksik etkiler gösterirler. Lökositlerin ürettiği reaktif türler hücrelerden dışarı salınabildiğinden, bu reaktif türler başta kardiyovasküler sistem olmak üzere konakçı hücreleri üzerinde de toksik etkiler gösterirler. Bu çalışmanın amacı, MPO enzimini insan lökositlerinden saflaştırmaktır.

Saflaştırılan bu enzimin vücut sıvılarında bulunan tiyosiyanat ile nitriti nasıl reaktif türlere çevirdiği ve bu reaktif türlerin, tirozin amino asidinin nitrasyonuna ne şekilde neden olduğunun araştırılmasına olanak sağlayacaktır.

Ayrıca Anabilim Dalımızda protein saflaştırma yöntemlerinin uygulamaları konusunda deneyim birikimine olanak sağlanması ve bu konuda bu çalışmanın basamak olacağı düşünülmektedir.

Sebebi ne olursa olsun bütün inflamatuvar hastalıklarda görülen zararlı etkilerden lökosit kaynaklı enzimler ve reaktif türler önemli derecede sorumludur. Bu reaktif türlerin etki mekanizmalarının aydınlatılması, inflamasyon sırasında konakçıda gözlenen zararlı etkilere karşı koruyucu tedbirlerin alınması yönündeki çalışmalara yol gösterici olacaktır.

Anabilim Dalımızda enzim ve proteinlerin saflaştırılması, saflaştırılan enzimlerin kinetik ve yapısal yönlerinin araştırılması ve enzimatik tepkimelerin etki mekanizmalarının araştırılması yönünde araştırmalar yapılmasının önü açılmış olacaktır. Bu çalışmayı takiben, benzer projelerle moleküler düzeydeki araştırmaların yapılması teşvik edilebilecektir.

Bu çalışmada myeloperoksidaz enzimi insan lökositlerinden, uygun deterjanlarla solubilize edildikten sonra, affinite kromatografi (Con A-Sepharose 4B), jel filtrasyonu (Sephacryl S-300) ve iyon değiştirici kromatografi (CM Sephadex G 25) yöntemleri kullanılarak hangi düzeyde saflaştırılacağı belirlenecektir. Elde edilen enzimin saflığı elektroforetik yöntemlerle kontrol edilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. LÖKOSİTLER

Lökositler vücudun savunma sisteminin hareketli birimleridir. Kısmen kemik iliğinde (granülositler, monositler ve az sayıda lenfosit) ve kısmen de lenfoid dokuda (lenfositler ve plazma hücreleri) oluşurlar. Oluştuktan sonra, kan ile kullanılacakları farklı vücut bölgelerine taşınırlar (1).

İnsan kanının mikrolitresinde, normalde 4000-11000 lökosit bulunur (2).

Stoplazmalarında granül içeren lökositlere granülositler, granül bulunmayan lökositlere agranülositler adı verilir. Granülositler iki tür granül içerir. Kullanılan boyanın nötral ya da asidik bileşenlerini bağlayan granüllere spesifik granüller adı verilir. Bazık boyalar ile mor renkte boyanma gösteren granüller ise azürafilik granüller olarak adlandırılır (3).

Granülositler enerjiyi tamamen glikoz metabolizmasından sağlarlar. Uyarılan PMN lökositlerin enerji depoları nispeten küçüktür ve enerjiye dayalı etkinliklerin sürekliliği için glikoz sağlanması gereklidir. Tüm önemli granülosit fonksiyonları enerjiye dayalı olaylardır (4).

Kanda normalde altı çeşit lökosit bulunur. Bunlar polimorfonükleer nötrofiller, polimorfonükleer eozinofiller, polimorfonükleer bazofiller, monositler, lenfositler ve seyrek olarak da plazma hücreleridir.

Granülositler ve monositler fagositoz ile vücudu korurlar. Lenfosit ve plazma hücrelerinin fonksiyonu ise immun sistem ile ilişkilidir. Granülositler ve monositler kemik iliğinde oluşur. Lenfositler esas olarak lenfoid dokularda, lenf bezleri, dalak, timus, tonsiller, vücudun çeşitli yerlerindeki lenfoid dokularda, özellikle kemik iliğinde ve barsak duvarı epiteli altında uzanan Peyer plaklarında üretilir. Kemik iliğinde oluşan lökositler, özellikle de granülositler, dolaşım sisteminde gerek duyuluncaya kadar, kemik iliğinde depolanırlar. Normalde tüm kanda dolaşımın üç katı kadar granülosit kemik iliğinde depolanır. Kemik iliğinden salındıktan sonra granülositlerin ömrü normal dolaşım kanında 4-8 saat, dokularda 4-5 gündür. Ciddi enfeksiyon durumlarında bu süre birkaç saate düşer çünkü granülositler hızla enfekte bölgeye gider, fonksiyonlarını yerine getirir ve kendi kendilerini haraplar (1).

2.1.1. NÖTROFİLLER

Dolaşımdaki nötrofillerin yarı ömrü ortalama 6 saattir. Dolayısıyla, dolaşımdaki normal düzeylerini sürdürebilmek için, her gün 100 milyardan fazla nötrofil üretilmesi gerekir. Nötrofillerin çoğu dokulara girer. Selektinler tarafından endotel yüzeyine çekilir ve yüzey boyunca yuvarlanır. Nötrofil yapışma bölgesine bağlanarak endotele yapışır. Endotel hücreleri arasından sızarak kapillerin hücre duvarını aşar ve dolaşımdan ayrılarak sindirim kanalına geçer ve vücudu terk eder (2).

Çapları 12-15 μm olup, çekirdekleri ince kromatin iplikler ile bağlanan 3-5 lob içerir. Tam olgunlaşmamış nötrofiller loblanma göstermeyip, çekirdekleri at nalı şeklindedir (3).

Lökositler endotel hücrelerinin bağlantı yerlerinden geçerek, dolaşımı terk ederler ve bağ dokusuna yerleşirler. Dokulara giren nötrofiller, olgun hücreler oldukları için derhal fagositoza başlayabilirler. Fagosite edilecek partiküle yaklaşıncaya nötrofil önce partiküle tutunur ve sonra sonra partikül etrafında her yöne doğru psödopotlar uzatır. Karşılıklı psödopotlar birbiri ile kaynaşır. Böylece içinde fagosite edilen partikül bulunan kapalı bir bölme yaratır. Ardından bu bölme sitoplazma içine doğru çöker ve hücre membranından ayrılarak sitoplazma içinde serbestçe yüzen fagositik vezikülü oluşturur. Lizozomlar ve diğer sitoplazmik granüller fagositik vezikül ile temasa geçer ve membranları vezikül membranı ile kaynaşarak, çeşitli sindirim enzimlerini ve bakterisidal ajanları vezikül içine boşaltır. Böylece fagositik vezikül sindirim vezikülü haline gelir ve fagosite edilen bakterinin sindirimi başlar (1).

Nötrofiller bakteriyi yuttuklarında oksijen tüketiminde ani bir artış görülür ve bu olay solunum patlaması olarak bilinir. Bu olay hızla oksijen tüketimi ve O_2^- , H_2O_2 , OH^- , OCl^- (hipoklorid anyonu) gibi tepkime veren türevlerin büyük miktarda üretilmesi ile kendini gösterir. Bu ürünlerin bazıları güçlü mikrop öldürücü ajanlardır. Solunum patlamasından sorumlu NADPH oksidaz oksijenin süperoksit anyonuna bir elektron indirgenmesini katalizler. İki molekül süperoksitten kendiliğinden hidrojen peroksit üretimi olur. Süperoksit dismutaz enziminin etkisiyle H_2O_2 oluşur. H_2O_2 myeloperoksidaz enzimi tarafında HOCl 'ye dönüşerek bakterileri öldürür (5).

Nötrofillerdeki glikojen, glikoliz ve heksoz monofosfat yolları ile yıkılarak glukoz oksidasyonu ile enerji elde edilir. Bu yıkımda sitrik asit

siklusu pek kullanılmaz, bu nedenle nötrofillerdeki mitokondrilerin sayısı azdır. Nötrofillerin anaerobik ortamlarda yaşamlarını sürdürmeleri, bu hücrelere oldukça, avantajlı bir durum sağlar. Çünkü, iltihaplı ve nekrotik dokularda olduğu gibi yetersiz oksijen içeren bölgelerde bakterilerin kolaylıkla öldürülmesi sağlanmış olur ve artıklar ortadan kaldırılabılır (3).

2.1.2 EOZİNOFİLLER

Eozinofiller lökositlerin %2 kadarını oluştururlar. Eozinofiller zayıf fagositlerdir. Paraziter enfeksiyonlu kişilerde çok miktarda üretilirler ve parazitli dokulara göçerler. Parazitlerin çoğu eozinofiller veya diğer fagositik hücreler tarafından fagosite edilemeyecek kadar büyük olmasına rağmen eozinofiller özel yüzey molekülleri yoluyla parazitlere tutunurlar ve birçoğunu öldüren maddeler salgırlar. Eozinofiller kendilerini parazitin genç formlarına bağlarlar ve onların çoğunu öldürürler. Bunu çeşitli yollarla yaparlar; modifiye lizozomlar olan granüllerden hidrolitik enzimleri salarak, oksijenin öldürücü olan yüksek derecede reaktif formlarını salarak ve granüllerinden büyük bazik protein olarak adlandırılan yüksek derecede larvasidal polipeptidi salarak yaparlar. Eozinofiller özellikle alerjik reaksiyonların olduğu dokularda toplanma eğilimindedir (1).

Eozinofillerin, nötrofillere oranla çok daha azdır ve lökositlerin sadece % 2-4'ünü oluştururlar. Çapları 12-15 µm ve nükleusları da genellikle 2 lobludur. Endoplazma retikulumu, golgi kompleksi iyi gelişmemiştir; mitokondrilerin sayısı da azdır. En belirgin özellikleri eozin ile boyanan ve sayıları 200 kadar olan, büyük uzun ve refraktil granüller içermeleridir. Granüllerin uzunluğu 0.5-1.5 µm, genişliği de 0.3-1 µm'dir (3).

Eozinofiller solunum, sindirim ve genitoüriner sistem gibi mukozal epitelial dokuya sahip organlarda daha yoğun şekilde bulunurlar. Kan eozinofil sayısı daima doku infiltrasyonunu göstermez. Çünkü eozinofiller dokulara geçerek kana oranla yüzlerce kat yoğunlukta dokularda bulunabilirler (6).

2.1.3. BAZOFİLLER

Kandaki lökositlerin % 1 'ini oluştururlar. Bu nedenle normal yayma preparatlarında bulunmaları oldukça güçtür. Bazofillerin çapı yaklaşık olarak 12-15 µm'dir (3).

Bazofiller kemik iliğinde üretilirler. Granüllerinde heparin bulundurlar (7).

Alerji reaksiyonlarının bazı tiplerinde önemli rol oynarlar, çünkü alerjik reaksiyona sebep olan antikor tip IgE mast hücreleri ve bazofillere özel tutunma eğilimindedir. Özgül antijen antikorla reaksiyona girdiğinde meydana gelen antijen-antikor bağlantısı mast hücresi veya bazofilde yırtılmaya neden olur ve büyük miktarda histamin, bradikinin, serotonin, heparin, anafaksinin yavaş tepkiyen maddesi ve birkaç lizozomal enzim salgınır. Bunlar alerjik görünümün bir kısmına neden olan lokal vasküler ve doku reaksiyonuna yol açarlar (1).

2.1.4. LENFOSİTLER

Lenfositler bağışıklık oluşturulmasındaki kilit elemanlardır. Doğumdan sonra bir kısım lenfosit kemik iliğinde üretilse de bunların çoğu lenf düğümleri, timus ve dalakta, kemik iliğinden daha önceden gelen öncül hücrelerden üretilir (2).

Lenfositler, lenf düğümleri ve diğer lenfoid dokulardan lenfatik drenaj ile sürekli olarak dolaşıma katılırlar. Birkaç saat sonra dokulara geçerler ve sonra tekrar lenfe girerek ya lenfoid dokuya ya da kana tekrar dönerler ve böylece lenfositlerin tüm vücudu dolaşımı olur. Lenfositlerin yaşam süreleri, vücudun bu gereksinimine göre haftalarca, aylarca ya da yıllarca olabilir (1).

Çapları 6-8 µm arasında olan lenfositler küçük boy lenfositleri oluştururlar. Dolaşım kanında az sayıda çapları orta boy ve 18 µm'ye ulaşabilen büyük boy lenfosit grupları da bulunmaktadır. Lenfositlerde görülen büyüklük farkları fonksiyonları ile ilişkilidir. Büyük boy lenfositler, spesifik antijenler ile uyarılmak suretiyle farklılaşmış hücreler olarak nitelendirilirler. Bu hücreler, etki gösteren T ve B lenfositlere farklılaşırlar (3).

Kandaki lenfositlerin yaklaşık % 80'i çok uzun ömürlü T lenfositleridir. Bu lenfositler birden fazla fonksiyona sahiptirler. T hücreleri diğer T hücreleri ya da B hücrelerini olumlu yönde (yardımcı T hücreleri) ya da olumsuz yönde (baskılayıcı T lenfositleri) kontrol ederler. T lenfositleri lenfokinler olarak bilinen bir dizi faktör salgırlarlar. Lenfokinler, makrofajların iltihaplı sahaya göçünde olduğu gibi bu hücrelerin çeşitli davranışlarını kontrol ederler. Bazı T-lenfositleri sitotoksik hücreler olarak isimlendirilirler. Sitotoksik hücreler,

tümör hücreleri, virüslerle infekte hücreler ve transplante edilmiş yabancı doku gibi dokulardaki hücreleri öldüren maddeler salgırlar. Dolaşım kanında T lenfositlerinde başka bir lenfosit grubu da B lenfositleri olup bunların oranı yaklaşık % 15 kadardır. B hücreleri dokularda uygun bir uyarı ile birkaç kez bölünerek plazma hücrelerine dönüşürler. Plazma hücreleri immünoglobulinleri sentezlerler. Spesifik immünoglobulinler (opsoninler) bakteriler ve diğer istilacı yapıların yüzeyini kaplayarak; bu yapıların makrofajlar tarafından fagositoza daha yatkın hale gelmelerini sağlarlar. Son olarak bu iki lenfosit türünden başka T veya B lenfosit yüzey antijenlerini içermeyen bir lenfosit türü daha bulunmaktadır. Bu lenfositler boş hücrelerdir. Bu hücreler muhtemelen kök hücreleri olabilirler ve dolaşım kanında yaklaşık % 5 oranında bulunurlar. B ve T lenfositlerinin her ikisi de immünolojik belleğe sahiptirler. Her lenfosit tek bir antijene cevap verecek şekilde şartlandırılmıştır. Herhangi bir lenfosit kendisine özgü antijen ile ilk kez karşılaştığında birkaç kez bölünme geçirir. Oluşan yeni lenfositlerin bir kısmı etkin lenfositlere dönüşür. Örneğin, bölünen B lenfosit ise aktif hücreler plazma hücreleri olup, antikor salgırlar. Diğer bazı hücreler ise o anda herhangi bir aktivite göstermez ve antijenin özelliğini bünyesinde saklar. Bu tür lenfositler bellek hücreleridir. Bellek hücreleri daha sonra aynı antijen ile karşılaştığında daha hızlı bir şekilde çoğalarak bu antijene karşı aşırı bir yanıt verirler (3).

2.1.4. MONOSİTLER

Monositler kemik iliğinden dolaşıma girerler. Dokulara girerek doku makrofajları haline alır. Dokulardaki ömürleri tam olarak bilinmemekte ise de, insanlarda kemik iliği nakillerinden elde edilen veriler, 3 ay canlı kaldıklarını göstermektedir. Bunlar dolaşıma geri dönmemektedir (2).

Monositlerin taşınma zamanı da kısadır, kapiller membranından dokulara geçmeden önce 10-20 saat kadar dolaşımda kalırlar. Dokularda şişerek genişlerler doku makrofajları haline gelmeye başlarlar ve bu formda fagositik fonksiyonlar sırasında yıkılmadıkları için aylarca hatta yıllarca yaşayabilirler. Bu doku makrofajları dokularda enfeksiyonlara karşı sürekli bir savunma sağlarlar (1).

Monosit hücrelerin çapı 12 μm -20 μm 'ye kadar değişmekte olup; lökositlerin en büyükleridir. Monositlerin nükleusları oval, at nalı veya böbrek biçiminde ve genellikle bir kenara itilmiş durumdadır (3).

2.2. ENZİMLER

2.2.1. ENZİMLERİN GENEL ÖZELLİKLERİ

Bir reaksiyonu hızlandıran, fakat kendisi reaksiyondan değişmeksizin çıkan maddeye katalizör denir. Enzimler ise canlı hücreler tarafından meydana getirilen, ancak etki yapabilmeleri için hücrenin varlığını gerektirmeyen, ısıya dayanıksız, protein yapısında organik bir katalizördür. Enzimler, oldukça özel yapı kazanmış ve genellikle büyük protein molekülleridir. Enzim proteinlerinin yapısı sadece enzimin biyolojik aktivitesi için değil, aynı zamanda metabolik olayların kontrolünü sağlamak için de gereklidir. Enzimler hücre metabolizmasını oluşturan binlerce kimyasal reaksiyonu yöneten moleküller oldukları için enzim reaksiyonları, yaşam yönünden en önemli reaksiyonlardır. Enzimler sadece belli maddeler üzerinde özel etki gösterirler (8).

2.2.2. ENZİMLERİN YAPISI

Enzimler protein yapısındadırlar. Enzimlerin etki ettikleri maddeler substrat veya reaktan adı verilir. Enzimler büyük, substratlar ise küçük moleküllerdir. Substratın enzime bağlandığı bölgeye aktif merkez veya katalitik bölge denir. Substratın dışındaki maddelerin bağlandığı yere allosterik bölge denir (9).

Bazı enzimler aktivite gösterebilmeleri için, protein yapısında olmayan, genellikle metal iyonlarından iyonlarından meydana gelmiş olan yan gruplarına kofaktör adı verilir. Enzimlerin aktivite göstermek için gereksinime duyduğu kompleks organik moleküllere koenzim adı verilir. Koenzimler spesifik atomların veya fonksiyonel grupların transfer edilmesinde rol oynamaktadır. Bazı durumlarda enzim aktivite gösterebilmek için hem kofaktöre hemde koenzime ihtiyaç duyabilir. Enzim yüzeyine sıkıca bağlanmış ve protein yapısında olmayan bu gruplara prostetik gruplar denir. Eğer enzim koenzimi veya kofaktörü ile birlikte ve katalitik bakımdan tamamen aktif durumda ise, enzimin bu haline holoenzim denir. Eğer koenzim ve kofaktörden ayrılarak enzim inaktif hale gelirse, enzimin diyalize edilemeyen ve sadece proteinden oluşan inaktif şekline apoenzim denir. Farklı dokularda aynı metabolik görevi gören ve aralarında küçük konformasyonel değişiklikler gösteren moleküllere izoenzim adı verilir (10).

2.2.3. ENZİMLERİN SUBSTRAT ÖZGÜLLÜĞÜ

Enzimler substratlarına karşı oldukça özgül davranmaktadırlar. Substrat molekülünün bir kısmının enzime bir anahtar-kilit hipotezi düşünülmektedir. Bazı enzimler oldukça spesifiktir ve yalnız bir tek tip molekülerin belirli bölgesine etki ederler. Bu tip enzimlere kesin özgülük gösteren enzimler denir. Bazı enzimlerde ise bu özgülük biraz daha gevşektir. Bu tip enzimlere kısmi özgülük gösteren enzimler denir (10)

2.2.4. ENZİMLERİN ADLANDIRILMASI

Her enzime iki isim verilmiştir. Birincisi günlük kullanım için olan kısa önerilen isimdir. İkincisi enzimin detaylı olarak tanımlanması gerektiğinde kullanılan daha kapsamlı olan sistematik ismidir. En sık kullanılan enzim isimlerinde reaksiyonun substratına veya yapılan işin tanımına -az eki eklenmiştir. Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) enzimlerin her birinin sayısız alt grup içeren altı ana sınıfa bölündüğü bir isimlendirme sistemi geliştirmiştir (11).

Örneğin; glukoz-6-fosfat dehidrojenaz enziminin sistematik adı Glukoz-6-fosfat NADPH: oksidoredüktaz sınıfı bir enzim olup bu sınıflandırmaya göre numarası şöyledir: (10)

E.C.1.1.1.49

E: Enzim

C: Klasifikasyonu

1. Sınıfı

1. Alt sınıfı ve etkilediği bağ (-CH₂- OH)

1. Akseptör (NAD veya NADP)

49. Enzimin sıra numarası

2.2.5. ENZİMLERİN SINIFLANDIRILMASI

Uluslararası sınıflandırmaya göre enzimler 6 sınıfa ayrılmıştır. (Şekil 1) (8)

1. Oksidoredüktazlar
2. Transferazlar
3. Hidrolazlar
4. Liyazlar
5. İzomerazlar
6. Ligazlar

Class	Reaction type	Important subclasses
1 Oxidoreductases	<p>○ = Reduction equivalent</p> <p>A_{red} + B_{ox} → A_{ox} + B_{red}</p>	Dehydrogenases Oxidases, peroxidases Reductases Monooxygenases, dioxygenases
2 Transferases	<p>A-B + C → A + B-C</p>	C ₁ -Transferases Glycosyltransferases Aminotransferases Phosphotransferases
3 Hydrolases	<p>A-B + H₂O → A-H + B-OH</p>	Esterases Glycosidases Peptidases Amidases
4 Lyases ("synthases")	<p>A + B → A-B</p>	C-C-Lyases C-O-Lyases C-N-Lyases C-S-Lyases
5 Isomerases	<p>A → Iso-A</p>	Epimerases <i>cis-trans</i> -Isomerases Intramolecular transferases
6 Ligases ("synthetases")	<p>A + B + XTP → A-B + XDP + P_i</p> <p>X = A, G, U, C</p>	C-C-Ligases C-O-Ligases C-N-Ligases C-S-Ligases

Şekil 1 : Enzimlerin Sınıflandırılması

2.2.5.1: OKSİDOREDÜKTAZLAR

Oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonlarını katalizleyen enzimler bu sınıftadır. Bu sınıf enzimlerin substratları genellikle elektron ve hidrojen donörleridir. Dehidrogenazlar bu gruptandır. Eğer oksijen elektron akseptörü olarak görev alıyorsa oksidazlar da bu sınıfa dahil edilmektedir. Laktatın pirüvata dönüştürülmesi örnek reaksiyon olarak verilmektedir. Oksidoredüktazlar sınıfında yer alan enzimlerin numaralanması aşağıdaki gibidir.

1.1. Donörün CH-OH grubuna etki ederler.

1.2. Donörün aldehid veya keton grubunu etkiler

- 1.3. Donörün CH-CH grubuna etki ederler.
- 1.4. Donörün CH-NH₂ grubuna etki ederler.
- 1.5. Donörün CH-NH grubuna etki ederler.
- 1.6. NADP⁺ H⁺ veya NADPH⁺H etki ederler.
- 1.7. Donör olarak diğer azotlu bileşiklere etki ederler.
- 1.8. Donörün sülfür grubuna etki ederler.
- 1.9. Donörün heme grubuna etki ederler.
- 1.10. Donör olarak difenol ve türevlerine etki ederler.
- 1.11. Akseptör olarak Hidrojenperoksida etki ederler
- 1.12. Donör olarak hidrojene etki ederler.
- 1.13. Moleküler oksijenin inkorporasyonu ile ilgili tek donöre etkilidirler.
- 1.14. Moleküler oksijenin yapıya girmesi ile bir çift donöre etkilidirler.
- 1.15. Süperoksit radikali gibi bir akseptöre etkilidir.
- 1.16. Metal iyonlarını oksitler.
- 1.17. CH₂ grubunu etkiler.

2.2.5.2. SINIF 2 TRANSFERAZLAR

Transferazlar fonksiyonel bir grubu, bir donörden bir akseptöre taşıyan enzimlerdir. Sistematik isim donör; akseptör grup transferaz şeklindedir. Örneğin; glutamat oksaloasetat aminotransferaz gibi burada glutamattan bir amino grubunun oksaloasetata taşındığı açıkça ifade edilmektedir.

- 2.1. Bir C grubu transfer ederler.
- 2.2. Aldehit veya Keton gruplarını transfer ederler.
- 2.3. Açıltransferazlar
- 2.4. Glikoziltransferazlar
- 2.5. Metil grubundan başka Alkil ve Aril gruplarını transfer ederler.
- 2.6. Azotlu grupları transfer ederler.
- 2.7. Fosfat ihtiva eden grupları transfer ederler.
- 2.8. Sülfür ihtiva eden grup transferi yapanlar

2.2.5.3. SINIF 3 HİDROLAZLAR

Hidrolazlar çeşitli bağların hidrolizini katalize etmektedirler. C-O, C-N, C-C ve Fosforik anhidrit bağını da içeren diğer bazı bağların hidrolitik

koparılmasını katalize eden enzimlerdir. Sistematik isimde daima hidrolaz kullanılmaktadır. Pratik isimlendirmede ise substratın önüne “az” eki getirilmektedir.

- 3.1. Ester bağına etki ederler.
- 3.2. Glikozil bileşiklerine etkilidirler.
- 3.3. Eter bağına etki ederler.
- 3.4. Peptid bağına etki ederler.
- 3.5. Peptid bağından başka diğer C-N bağına etki ederler.
- 3.6. Asit anhidritlerine etki ederler.
- 3.7. Karbon-Karbon (-C-C-) bağına etki ederler
- 3.8. Klor ile meydana gelmiş tuzlardaki bağa etkilidirler.
- 3.9. Fosfor-Azot bağına etkilidirler.
- 3.10. Kükürt-Azot bağına etkilidirler.
- 3.11. Karbon-Fosfor bağına etkilidirler.

2.2.5.4. SINIF 4 LİYAZLAR (SENTAZLAR)

Liyazlar adı verilen enzimler C-C, C-O ve C-N arasındaki bağları hidrolizden ve oksidasyondan farklı bir yolla kırarlar veya bu atomlar arasında bir çift bağ ilave ederler. Sistematik isim substrat-grup-liyaz şeklindedir. Pratik isim dekarboksilaz, aldolaz ve dehidrataz'dır.

Liyazlar sınıfında yer alan enzimlerin numaralanması aşağıdaki gibidir.

- 4.1. Karbon-Karbon (C-C) bağına etki ederler.
- 4.2. Karbon-Oksijen (C-O) bağına etki ederler.
- 4.3. Karbon-Azot (C-N) bağına etki ederler.
- 4.4. C-S liyazlar
- 4.5. C-Cl liyazlar
- 4.6. Fosforlu-Oksijen liyazlar

2.2.5.5. SINIF 5 İZOMERAZLAR

İzomerazlar bir molekül içindeki geometrik ve yapısal değişiklikleri katalize etmektedirler. Bu sınıfta yer alan enzimler yaptıkları izomerizme göre

rasemazlar, epimerazlar, cis-trans-izomerazlar, izomerazlar, tautomerazlar, mutazlar ve siklo-izomerazlar adını almaktadır.

- 5.1. Rasemazlar ve Epimerazlar
- 5.2. Cis, Trans izomerazlar
- 5.3. İntramoleküler oksidoredüktazlar
- 5.4. İntramoleküler transferazlar.
- 5.5. İntramoleküler liyazlar
- 5.6. Diğer izomerazlar

2.2.5.6. SINIF 6 LİGAZLAR (SENTETAZLAR)

Sentetazlar C-O, C-S, C-N ve C-C arasında bir bağ oluşmasını sağlayan enzimlerdir. Bu enzimler genellikle ATP'deki veya diğer trifosfatlardaki pirofosfatı hidroliz ederek iki molekülün birbirine bağlanmasını katalize ederler.

- 6.1. Karbon-Oksijen (C-O) arasında bağ yaparlar
- 6.2. Karbon-Kükürt (C-S) arasında bağ yaparlar
- 6.3. Karbon-Azot (C-N) arasında bağ yaparlar
- 6.4. Karbon-Karbon (C-C) arasında bağ yaparlar
- 6.5. Fosfat ester bağı yaparlar

2.3. PROTEİNLERİN SAFLAŞTIRILMASI

Doğadaki en önemli makromolekül gruplarından biride proteinlerdir. Hücre de pek çok işlev binlerce farklı protein tarafından yürütülür. Büyük çeşitliliğe ve farklı işlevlere sahip proteinler, temelde benzer yapıları olan bu moleküllerin, üstlendikleri önemli görevler nedeniyle yapılarının aydınlatılması, sentezlerinin işlevlerinin ve regülasyonlarının ortaya konulması çok büyük önem taşır.

Bir proteinin nasıl izole edileceğine, hangi yöntemle ve ne derecede saflaşaacağına veya analiz edileceğine karar vermeden önce, amaç, materyalin ve çalışılacak proteinin tipi ve miktarı, işlemlerin süresi ve maliyeti, eldeki olanaklar gibi ölçütler göz önünde bulundurulmalıdır.

Özel bir materyalin kullanılma zorunluluğu yoksa, proteinlerle ilgili çalışmalarda hayvansal obje olarak, genellikle şıçan, tavşan, inek ve domuz gibi hayvanlar tercih edilir. Kan ve plesanta gibi kolay ve bol elde edilebilen materyaller de insan proteinleri ile ilgili çalışmalar için uygun kaynaklardır (12).

2.3.1. PROTEİN EKSTRAKSİYONU

Protein ekstraksiyonunun ilk aşamasındaki işlem, çalışılacak proteinin hücrenin içinde mi, dışında mı olduğuna, içindeyse bulunduğu yere bağlı olarak değişir.

Çalışılacak molekül eksrasellüler ise kullanılacak yöntem basittir. Santrifüjleme veya filtrasyon tekniği ile elde edilir. Hücresiz üst sıvıda bulunur ve bu sıvı saflaştırma işlemlerinde kullanılır.

Saflaştırılacak protein membrana bağlı veya sitoplazmik ise, kullanılacak yöntem daha uzun ve karmaşıktır. Öncelikle hücre çeperi engeli aşılmalıdır. Bu aşamada proteinin yapısını en az etkileyecek yöntem kullanılmalıdır. İzole edilecek protein parçalanma sırasında açığa çıkan proteazların etkisinden korunmalıdır (12).

2.3.2. MEMBRAN PROTEİNLERİN EKSTRAKSİYONU

Hücrelerin içinde veya dışındaki sulu fazda çözünmeyen birçok protein vardır. Membranda yer alan bir proteinin izolasyonu söz konusu ise, araştırmacı gerek litatürde önerilen yöntemleri, gerekse elindeki olanakları göz önüne

olarak, ya önce proteinin bulunduğu organeli izole edip daha sonra protein ekstrasyonu yapar, ya da ektrasyonda materyalin tümünü kullanır. Daha sonra santrifüjlemeyle çöktürülen organeller tamponda süspanse edilir; tekrar santrifüjlenerek çözülmüş proteinler uzaklaştırılır.

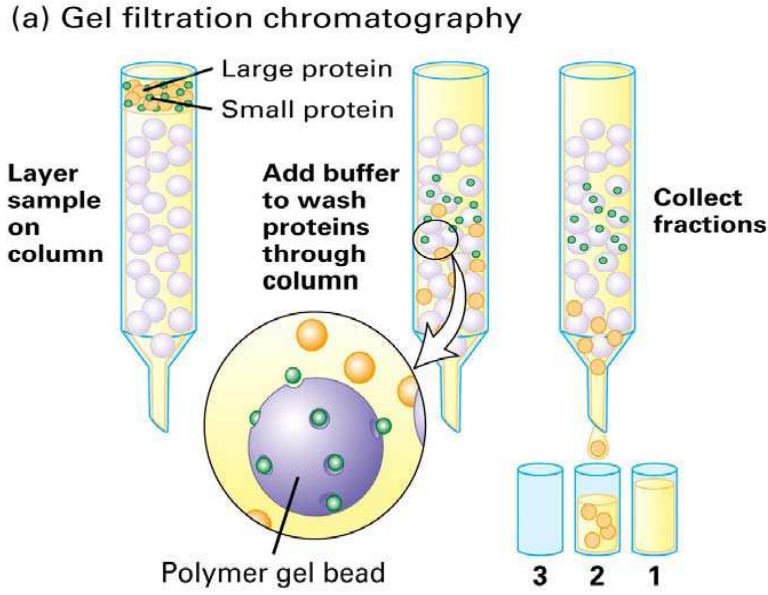
Membran yüzeyine zayıf bir şekilde bağlı (periferal) proteinler membranın tamamen çözünmesine gerek kalmadan, kısmen de olsa yapıdan ayrılabilirler.

Membranın içine gömülü (integral) proteinlerle çalışılırken daha dikkatli olunmalıdır. Bunların açığa çıkması için membranın tamamen çözünmesi gerekir. Proteini kümeleşmeden korumak için genellikle deterjan bulunmalıdır. Çünkü integral protein hidrofobik yüzeyi nedeniyle lipidlerle etkileşime girer ve bunun sonucunda da agregasyon gerçekleşebilir. Bu deterjanlar saflaştırma basamaklarında uzaklaştırılır (12).

2.3.3. KROMOTOGRAFİK YÖNTEMLER

2.3.3.2. JEL FİLTRASYONU

Bu metot, kolon kromatografi yöntemlerinde en yaygın olarak kullanılan yöntemdir. Homojenizattan makromoleküllerin ayrılması için kullanılan bir medottur. Bu metodun temeli, makromolekülleri molekül büyüklüklerindeki farklılıklara göre ayırmaktır. Jel genellikle dekstran, agaroz ve poliakrilamidden oluşmuştur. Kolon küresel yapılı belirli boyutta gözeneklere sahip inert jel parçacıklarından oluşmuştur. Farklı boyuttaki molekülden oluşan çözelti kolondan geçirildiğinde, büyük moleküller gözenekli taneciklerin aralarındaki boşluklardan geçerek kolonu hızla terk ederler. Gözenek boyutlarından küçük moleküller ise gözenekler arasında kalırlar. Molekül küçüldükçe kolonda alıkonma süresi artar (13). (Şekil 2)

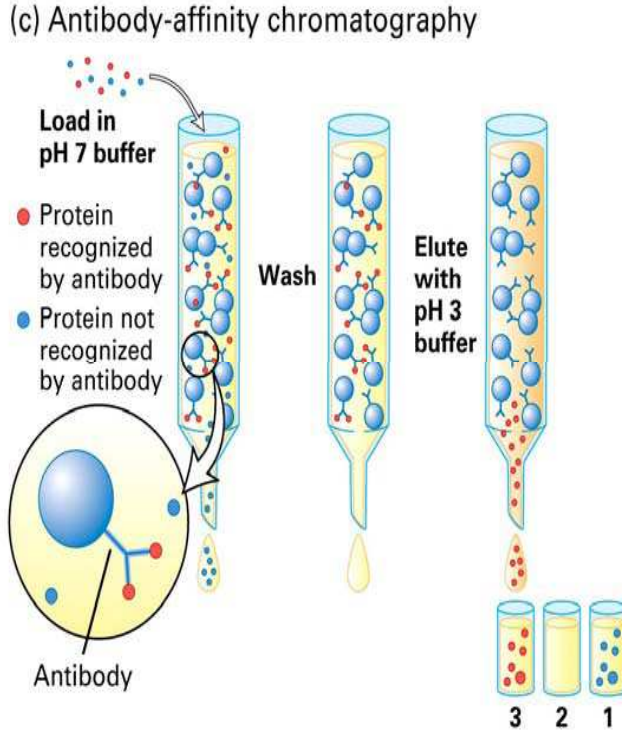


Şekil 2 : Jel Filtrasyon Kromatografisi

2.3.3.1. AFFİNİTE KROMOTOGRAFİSİ

Kolon dolgu maddesine kovalent olarak bağlanmış ve saflaştırılacak proteine özel ilgi göstererek seçinimli bir ayırım sağlayan, ligand adı verilen küçük moleküllerin kullanımlarıyla gerçekleştirilir.

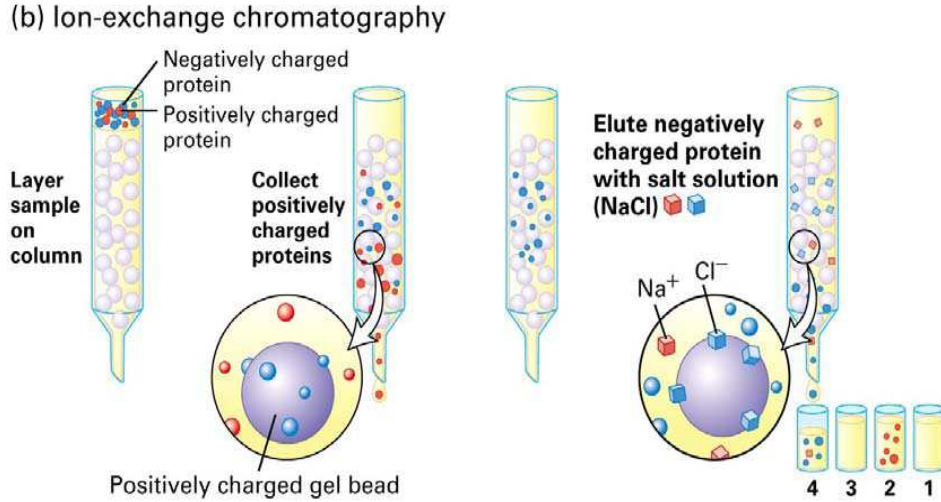
Membrana aktarılmış glikoproteinlerin saptanmasında çok farklı bir yöntem izlenir. Bu yöntemde glikoproteinlerin karbonhidratlarına seçinimli olarak şekilde bağlanan, bitki ve bakteri kaynaklı proteinlerden (lektinler) yararlanır. Örneğin; bitkisel bir lektin olan concanavalin A (Con A), α - D mannozil gruplarına ilgisi nedeniyle bu grupları içeren glikoproteinlerin saptanmasında geniş çapta kullanılırlar (Şekil 3) (12).



Şekil 3: Affinite kromotografisi

2.3.3.3. İYON DEĞİŞİM KROMOTOGRAFİSİ

İyon değişim kromotografisi kolondaki yüklü tanecikler, mobil fazdaki yüklü tanecikleri çekme prensibine dayanır. Matris ayrılacak proteinle ters yüke sahiptir ve proteinlerin kolona bağlanması iyonik bağlarla olur. Kolona bağlanan proteinler kullanılan tampon çözeltinin pH'sını ya da tuz konsantrasyonunu değiştirerek kolondan ayrılır. Bu tip kromatografi molekül ağırlıkları birbirine çok yakın olan molekülleri ayırmada kullanılır. İki tip iyon değiştirici kromatografi vardır. Bunlar anyon ve katyon değiştiriciler olarak isimlendirilir. İyon değişim kromotografisinde kullanılacak kolonun boyutları dolgu maddesinin protein bağlama kapasitesi ile ilgilidir. Genellikle çapı 1-2,5 cm olan kolonlar kullanılmalıdır. (Şekil 4)



Şekil 4: İyon Exchange kromotografisi

2.3.3.3.1.KATYON DEĞİŞTİRİCİLER

Negatif yüklü grupların kovalent olarak bağlı olduğu matrisleri vardır. Bunlar katyonik (pozitif yüklü) proteinleri adsorblarlar. Katyon değiştiricilerde ise negatif yüklü grup olarak; genelde sülfö ve karboksimetil grupları bulunur.

2.3.3.3.2. ANYON DEĞİŞTİRİCİLER

Pozitif yüklü grupların bağlı olduğu matrisleri vardır. Bunlar anyonik (negatif yüklü) proteinleri absorblarlar. Geniş çapta kullanılan anyon değiştiricilerdeki pozitif yüklü gruplar; aminoetil, trietilaminoetil ve dietilaminoetil gruplarıdır (14).

2.3.3.4.PROTEİNLERİN İYONİK ELÜSYON İLE KOLONDA AYRILMASI

Proteinlerin kolondan ayrılmasında en çok kullanılan elüsyon tekniği tuz gradiyentinin oluşturduğu iyonik elüsyondur. Genellikle KCl veya NaCl'den oluşan lineer bir gradiyent oluşturulur. Tuz iyonları proteinle yer değiştirerek onun tekrar matrise bağlanmasını engeller. Tuz konsantrasyonu artıka protein

bandı daralarak aşağıya doğru ilerler ve düzgün bir band olarak kolondan çıkar (12).

2.3.3.5. TUZLA ÇÖKTÜRME

Tuzla çöktürme (salting out) proteinlerin konsantre edilmesinde ve saflaştırmasında geniş çapta kullanılan bir yöntemdir. Ortama eklenecek nötral tuz, genellikle denatürasyona yol açmadan, proteinlerin agregasyonuna (bir araya gelmelerine) ve çözültiden ayrılarak çökmelerine yol açar. Proteinler farklı tuz konsantrasyonlarında çöktürülerek birbirlerinden ve çözültideki diğer moleküllerden ayrılabilirler. Çöktürme işleminde genellikle etkinliği ve çözünürlüğü yüksek, pH'yı fazla etkilemeyen, çözültide fazla ısınmaya yol açmayan, ucuz ve etkin bir tuz olan amonyum sülfat kullanılır. Bu nedenle bu yöntem amonyum sülfatlama çöktürmesi adıyla bilinmektedir (12).

2.3.3.6. SODYUM DODESİL SÜLFAT-POLİAKRİLAMİD JEL ELEKTROFOREZİ (SDS-PAGE)

Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezinde, polipeptidlerin ilerleme hızları, sadece iç elektriksel yükleri tarafından değil, aynı zamanda molekül ağırlıkları tarafından da belirlenmektedir. SDS, polipeptidlerin ana iskeletini çevreleyerek proteinleri denatüre eden bir deterjandır. Ayrıca moleküller negatif bir yükte kazandırmaktadır.

SDS-PAGE'nin en önemli yararı, polipeptidlerin molekül ağırlıklarının belirlenmesine olanak vermesidir. Molekül ağırlığı bilinmeyen protein örnek, molekül ağırlığı bilinen standart proteinlerle birlikte, aynı jel üzerinde yan yana ceplere uygulanır ve ayrı hatlarda elektroforetik olarak ayrılır. Boyama sırasında jelde gözlenen bantların karşılaştırılması ile proteinin molekül ağırlığı hakkında bir fikir edinilebilir (12).

2.3.3.6.1. BOYAMA İLE SAPTAMA

Elektroforetik ayırım sonunda jelde ayrılmış proteinlerin analizi için, gözle görünür hale getirilmesi gerekir. Bu amaçla başvurulan en temel yöntem boyamadır. Farklı boyama maddeleriyle reaksiyona giren proteinler, jel üzerinde renkli bantlar halinde belirirler. Böylece çalışılan protein örneğindeki

bantlar referans olarak kullanılan standart proteinlerin ortaya koyduğu bantlarla karşılaştırmalı olarak incelenir (12).

2.3.3.6.1.1. COOMASSİE BOYAMA

Coomassie parlak mavisi (brilliant blue) proteinleri rastgele bağlanan bir boyar maddedir. Bu boyamada jeldeki proteinler alkol (metanol veya izopropanol)/ asetik asit içeren fiksetifle çöktürölür. Jel üzerinde proteinlerin çöktüğü bölgeler boya ile mavi renge boyanır. Alt zemindeki fazla boya, yıkama (metanol+asetik asit+su) çözeltisi ile yok edildikten sonra jel asetik asitli suda saklanabilir (12).

2.5. MYELOPEROKSİDAZ:

65 yıl önce Agner, tüberküloz ampiyemli hastaların pürülan sıvısından peroksidaz aktivitesi olan, Fe içeren bir protein izole etmiş ve bu yeni proteini güçlü yeşil rengi nedeniyle verdoperoksidaz olarak adlandırmıştır. Daha sonraki çalışmalar doku ayrışmasını myeloid hücrelerle sınırlandırmışlar ve bu da proteinin myeloperoksidaz olarak yeniden adlandırılmasına neden olmuştur. Agner'in buluşunun 30 yıl sonrasında Klebanoff, MPO'nun oksijen bağımlı öldürücü fagosit aktivitesi olduğuna dair katkıda bulunmuş ve diğer bilim adamlarına bu proteinin doğal immüitedeki spesifik rolünü araştırması için önyak olmuştur. Daha sonra yapılan araştırmalar sonucunda MPO'nun antimikrobiyal aktivitesinin nötrofillerin fagolizozomlarında hipoklorik asit ve diğer toksik ajanları üreterek mikropları inhibe edici ve öldürücü etkiye sahip olduğu görülmüştür. MPO hedef moleküllerdeki posttranslasyonel modifikasyondaki etkilerini H_2O_2 'yi kullanarak gerçekleştirir. Fagozoma MPO salınımı ile eş zamanlı olarak fagositlerin NADPH bağımlı oksidazı MPO'nun HOCl oluşturması için gerekli olan H_2O_2 'i oluşturmak için aktive olur. Hayvan peroksidaz ailesinin diğer üyelerinin her birinde (tiroid peroksidaz, laktoperoksidaz ve eozinofil peroksidaz) farklı H_2O_2 kaynakları kullanarak aynı paradigmayı takip ederler (15).

MPO aracılı hasar intrafagozomal mikroplarla sınırlı değildir. HCOI ve deriveleri konak dokusunda aynı oranda hasarlar verir. MPO çeşitli inflamatuvar hastalıkların (örn; aterosklerozis, demyelinizan SSS hastalıkları ve bazı tümörler gibi) patogenezinde rol oynamaktadır (16). Örneğin; aterosklerotik lezyonlarda peroksidatif olarak aktive MPO tespit edilmiştir (17) ve MPO-katalizli lipoprotein oksidasyonunun kardiyovasküler hastalık gelişimine katkıda bulunmakta olduğu kanısına varılmıştır (18). Bazı epidemiyolojik çalışmalar savunmaktadır ki; aterosklerozun başlangıç ve progresyonuna katkıda bulunan MPO bağımlı biyokimyasal olaylarla uyumlu olarak MPO eksikliği olanlarda normal popülasyona oranla daha az kardiyovasküler hastalık görülmektedir (19). MPO'nun inflamatuvar hastalıklardaki rolünün ışığında; peroksidaz ailesi üyelerinin yapı ve fonksiyonları üzerine araştırmalar, çeşitli hastalıkların patofizyolojisinin anlaşılması, potansiyel tedavi ve korunma yöntemlerinin bulunması konusunda umut vaat etmektedir (15).

MPO ilk olarak insan polimorfonükleer lökositlerinde bulunmuştur ve toplam proteinin %5'ini oluşturur. PMN monositlerde ve makrofaj dokularında lokalizedir. MPO PMN ve monositlerin euzonofil granüllerinde depolanır. MPO sentezlemek için makrofajlar yeteneklerini kaybederler ve sonra ya MPO tek başına yada nötrofillerin endositozu ile hücre içerisine alınırlar. Hücrenin aktivasyonu yada degranülasyonu sırasında MPO ekstrasellüler alanın içine salınabileceği gibi fagositik vakuollere de salınabilir. MPO kemik iliğinde myeloid differasyonu sırasında öncül bir madde olarak salınır ve bu süreçte PMN'lerin dolaşıma salınmadan önce tamamlanır (20).

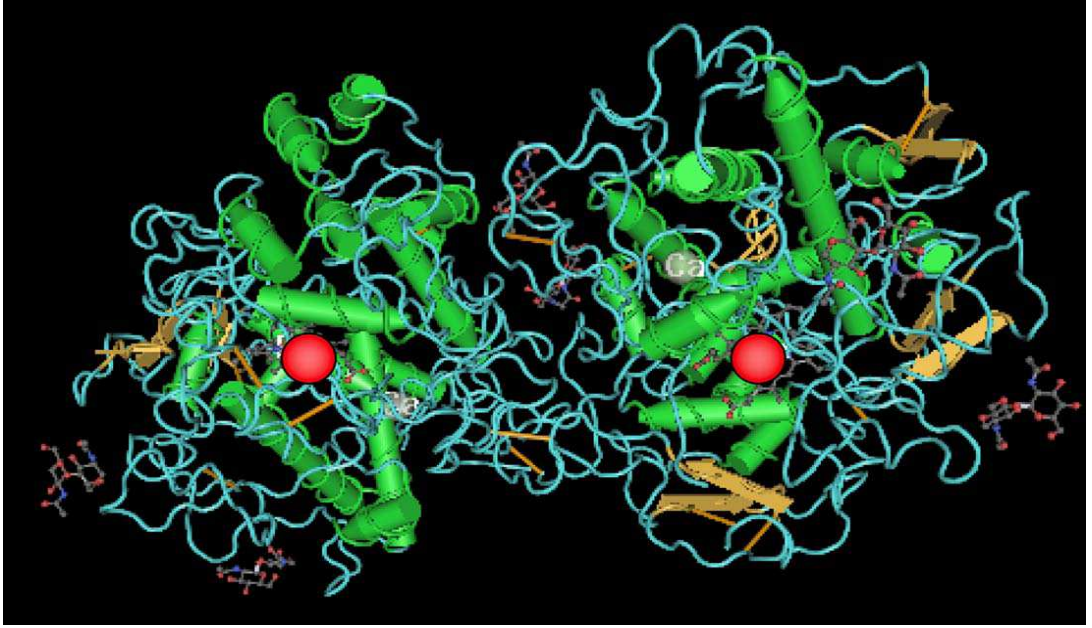
Yapılan randomize kontrolü bir çalışmada diş implantlarındaki inflamasyonla ilişkili olarak polimorfonükleer lökositlerdeki cevabın bir ölçütü olarak MPO düzeyleri çalışılmış; inflamasyon ve MPO düzeyinde arasında yakın bir ilişki olduğu gösterilmiştir (21).

Monositler kendi MPO'larının yavaş maturasyonu sırasında makrofajlara girerken kaybolurlar. Lökositlerin yanı sıra MPO karaciğer kuffer hücrelerinden de izole edilmiştir. Aynı zamanda da mikrogiallardan, granül içeren nöronlardan ve beyindeki hipokampusun pramidal nöronlardan da izole edilmiştir (20).

2.5.1. MYELOPEROKSİDAZ ENZİMİNİN YAPISI

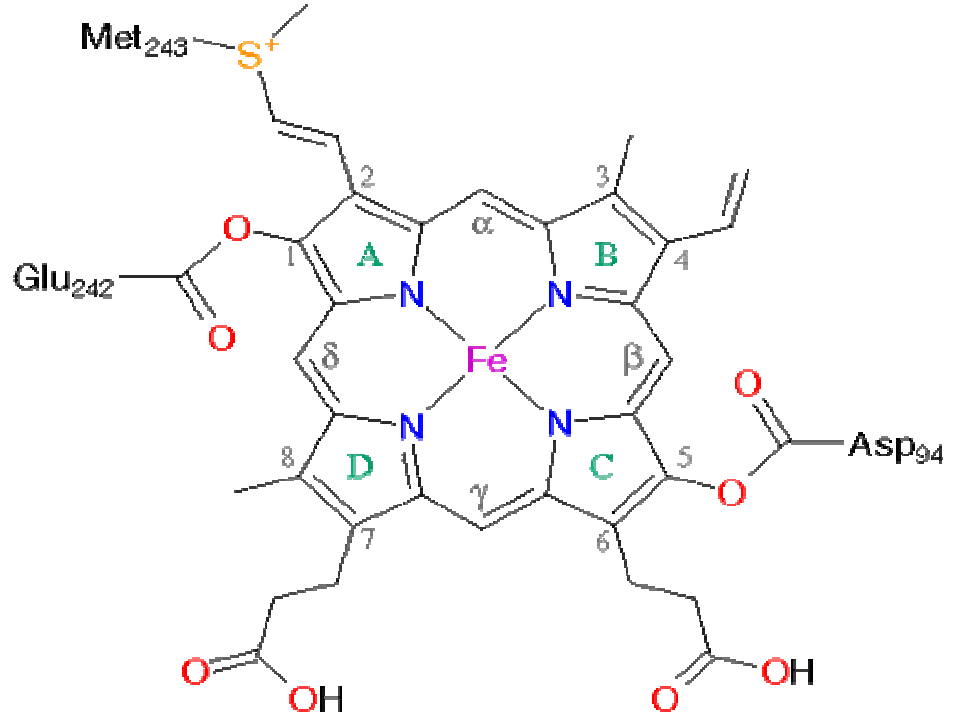
MPO enzimi 140kDa ağırlığında hem içeren homodimerdir. Her bir monomer ağır ve hafif subuniteden oluşur. Ağır olan 55-64 kDa ağırlığında ve 466 aminoasitten, hafif zincir ise 10-15 kDa ağırlığında ve 108 aminoasitten oluşmuştur. Kovalent bağlı hem kompleksinin birleşmesi olgunlaşmadan önce olur ve buda enzimatik aktiviteyi gösterir (20).

MPO'nun ikincil yapısında α -sarmal yapı baskındır. Herbir monomerin merkezinde 5 sarmal ve hem grubu bulunur (Şekil 5). Bu sarmalların dördü büyük polipeptitten türemektedir. Beşinci sarmal ise küçük polipeptitten meydana gelmektedir. Büyük polipeptit dört ayrı domain içinde katlanır ve ayrıca biri çekirdek merkezinde çevreler. Küçük molekül bu molekülün karboksi terminal bölgesine sarılır. Fe⁺³ iyonu taşıyan hem molekülü protoporfirin IX ' den türevlenmektedir (20).



Şekil 5: MPO'nun homodimer üç boyutlu yapısı; kırmızı olan kısım hem kısmı, yeşil olan kısımlar α - heliks ve sarı olan kısım β - tabakalı yapısı

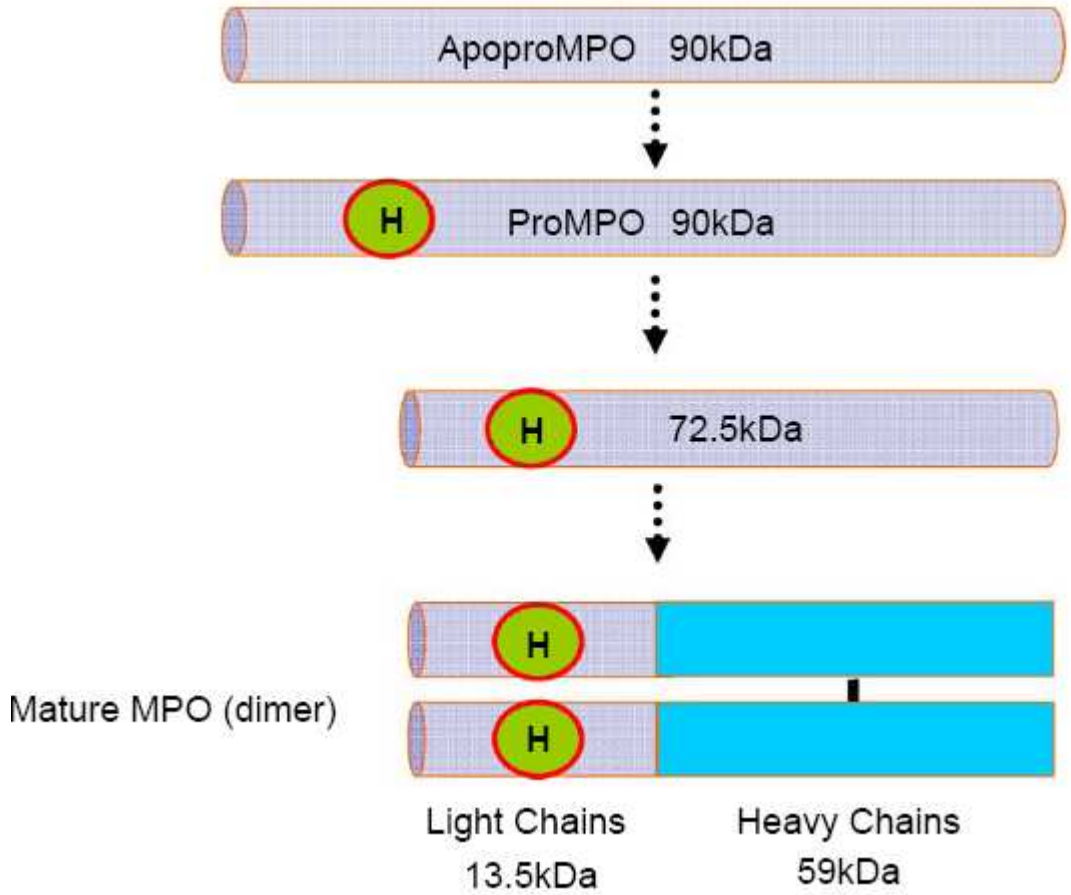
MPO 2,3 A⁰çözünürlüğünde kristal yapısı bilinen peroksidazdır. MPO'da 3 hem subunitesi vardır. Bunlarda kovalent bağlarla aminoasit yan zincirlerine bağlanmıştır. Modifiye metil gruplarının üzerindeki pirol halkaları A-C ile glutamat ve aspartat ile 2 ester bağı vardır. Pirol A halkası glutamata ve pirol C halkası ise aspartata ester bağı ile bağlanmıştır. Üçüncü bağ ise metiyonin kalıntılarının sülfonyum iyon bağlarıyla kükürt atomuna bağlanmasıyla oluşur. Sülfonyum iyon bağı pirol A halkasındaki vinil grubunu içerir (22). (Şekil 6)



Şekil 6: MPO'nun kimyasal yapısı

2.5.2. MPO EKSPRESYONU

MPO, ekspresyonu myeloid hücreler tarafından sınırlanan 17. kromozomun uzun koluna 14 kb uzaklıkta olan tek bir gen tarafından kodlanır (23). İnsan MPO'yu intrasellüler ortamda endoplazmik retikulumda üretilir. Üretilen MPO 90 kDa büyüklüğünde inaktif olan bir enzimdir ve apoproMPO olarak isimlendirilir. Peptid iskeletine hem'in eklenmesi ile enzimatik olarak aktif olan MPO'nun proMPO kısmı oluşur. proMPO'nun ayrılması ile olgun (mature) MPO oluşur (24). Olgun MPO 140 kDa ağırlığında hem içeren homodimerdir. Her bir monomer ağır ve hafif zincir subuniteden oluşur. Ağır olan zincir 55-64 kDa ağırlığında ve 466 aminoasitten, hafif olan zincir ise 10-15 kDa ağırlığında ve 108 aminoasitten oluşmuştur. Her bir zincir birbirlerine disülfid bağlarla bağlıdır (25). (Şekil 7)



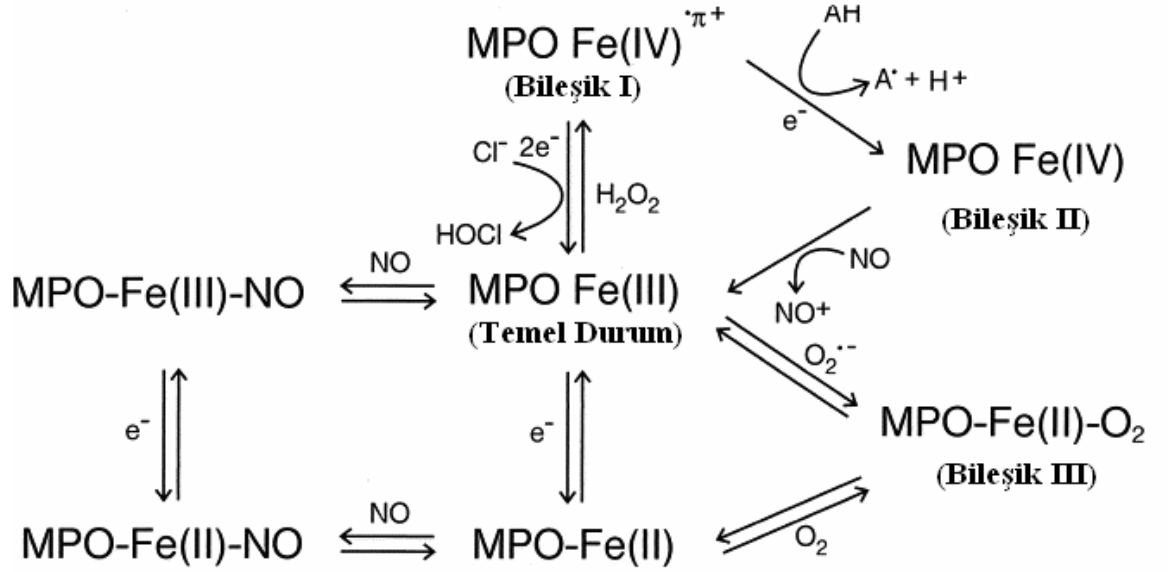
Şekil 7 : MPO'nun transkripsiyon öncesi şekli

Kemik iliğindeki granülosit diferansiyasyonu esnasında sadece promyelositler ve promyelomonositler aktif olarak MPO sentezlerler (26). Dokuda MPO gen ekspresyonunu ve diferansiyasyonunu çeşitli transkripsiyon faktörleri regüle etmekte ve diferansiyasyonun myelosit aşamasında giren myeloid progenitöründe MPO sentezini sonlandırmaktadır. Aynı koordinasyon in vitro olarak HL-60 veya PLB-985 hücreleri gibi insan myeloid prekürsör hücre serileri in vitro olarak kültüre edildiğinde kimyasal olarak granülositik seriye diferansiye olmaya teşvik edilirler.

Forbol esterleri veya transretinoik asit gibi diferansiyasyon ajanları saatler içerisinde MPO gen transkripsiyonunda duraklamaya ve MPO biosentezinin ani terminasyonuna neden olurlar. Kemik iliğindeki myeloid prekürsörleri dışında hiçbir non-malign hücrenin MPO protein sentezine dair yayınlanmış veri yoktur.

Promyelositlere ilave olarak monosit prekürsörlerde kemik iliğindeki matürasyon esnasında MPO sentezlerler. Normal ekspresyon myeloid gelişiminin bu aşamasında sınırlandırılmıştır. Dolaşımdaki monositler aktif MPO sentezi yapmazlar. Dokuda monositlerin makrofajlara diferansiyasyonuna MPO sentezinin down regülasyonu eşlik etmektedir. MPO'nun immünolojik olarak aterosklerotik plaklarda gösterilmesi gibi kanıtlar MPO'nun aterosklerotik hastalığın patogenezinde bulunduğuna işaret etmektedir (27,28).

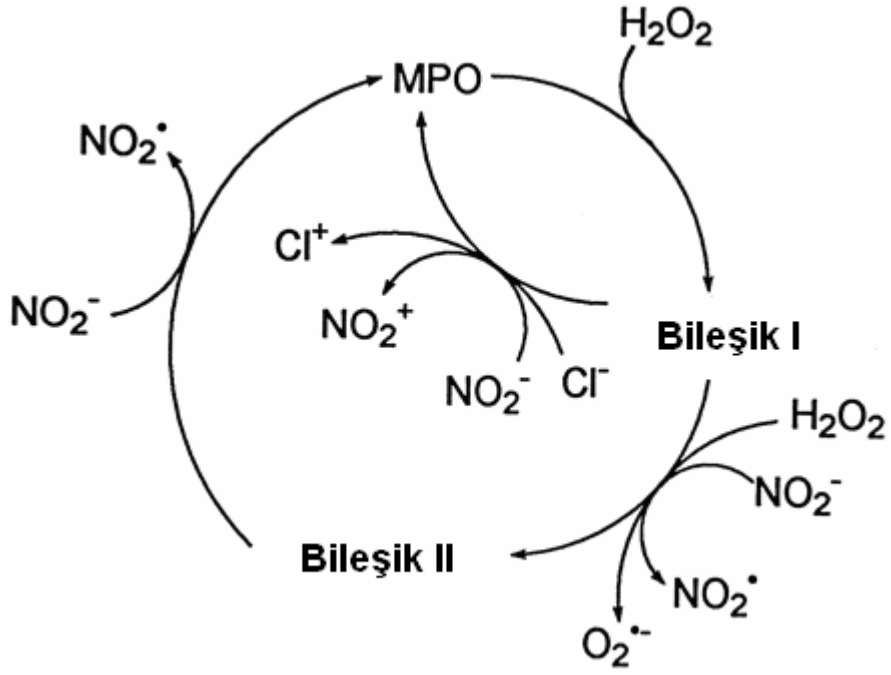
MPO için önerilen kinetik model şudur: Temel durumda MPO ferrik (Fe III) durumda bulunur. H_2O_2 eklenmesi durumunda MPO'nun hem grubu okside olarak reaktif ferril radikalini oluşturur. Bu ara bileşiğe "Bileşik I" denir. Cl^- , Br^- , I^- gibi halojenürlerin ve tiyosiyanat (SCN^-) gibi psödohalojenürlerin varlığında Bileşik I kolayca indirgenerek MPO-Fe III ve uygun gelen hipohalöz asidi (HOX) oluşturur. Halojenürlerin ve tiyosiyonatin normal plazma düzeylerinde klor tercih edilen bir substrattır ve hipokloröz asit HOCl oluşur (29). Ortamdaki indirgeyici substratlarla Cl^- konsantrasyonu arasındaki oran MPO'nun H_2O_2 'yi peroksidasyon veya klorinasyon döngülerinden hangisinde kullanacağını belirler. Zayıf peroksidaz substratları Bileşik I ile reaksiyona girerek Bileşik II'yi oluştururlar ve HOCl oluşumunu inhibe ederler (30). Halojenürler ve tiyosiyonata ek olarak MPO'nun nitrit (NO_2^-) tirozin, askorbat, ürat, katekolaminler, östrojenler ve serotonin gibi başka doğal substratları da bulunmaktadır (31). MPO-Fe III inaktif ferröz formu olan MPO-Fe II'ye indirgenebilir. MPO-Fe III, O_2^- ile ve MPO-Fe II, O_2 ile birleşerek Bileşik III denen bir ara ürün oluştururlar (MPO-Fe II - O_2). Spektrel çalışmalarla gösterildiği gibi Bileşik III'e H_2O_2 eklenmesi en son Bileşik II'yi oluşturur. Dolayısıyla Bileşik III dolaylı olarak tek elektron ile peroksidasyon işlemlerini başlatabilir. (Şekil 8)



Şekil 8: MPO için önerilen kinetik model. Podrez ve ark.(32)'den alınmıştır

Nötrofillerde $O_2^{\cdot-}$, MPO'nun klorinasyon aktivitesini ayarlar. Son yıllardaki çalışmalar NO 'nun da MPO aktivitesinin modüle edilmesinde rolü olduğunu göstermiştir. Kinetik çalışmalar, düşük NO seviyelerinde, MPO tarafından katalizlenen peroksidasyon oranının arttığını göstermiştir (33). MPO aktivitesinin düzenlenmesi karmaşıktır. Çünkü enzim değişken pH ve NO , H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$, O_2 derişimlerinin görüldüğü geniş bir çevrede etkisini gösterir.

Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, MPO'nun tirozin nitrasyonunu katalizlediği gösterilmiştir. Bu hem enzimi, protein ve peptidlerdeki tirozin kalıntılarını nitratlamaktadır. Apo-A1, nitrasyon ve klorinasyon için tercih edilen bir hedeftir. Daha ileri analizler MPO'nun Apo-A1'e bağlanarak Apo-A1 nitrasyonu için majör katalitik enzim olarak davrandığını açığa çıkarmıştır (34). Yapılan bir çalışmada MPO'nun nitrasyon işlemini iki farklı mekanizmayla gerçekleştirdiği öne sürülmüştür (35). Birincisi NO_2^- iyonunun, MPO bağlı olarak oksidasyonunu ve reaktif nitrojen türlerini oluşturmasını kapsar (Şekil 9) (31,36,37).



Şekil 9: MPO tarafından katalizlenen NO_2^- oksidasyonu. Van der Vliet ve ark. (31)'dan alınmıştır.

İkincisi ise NO_2 'nin, MPO tarafından oluşturulmuş HOCl tarafından sekonder olarak oksidasyonunu kapsar (36). Hem izole hem de insan nötrofillerinde yapılan çalışmalarda serbest ve protein bağlı tirozin kalıntılarının bu yollarla nitrotirozin (NO_2Tyr) haline getirildiği gösterilmiştir (31,36,37).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Bileşikler

Sodyum Fosfat (Na_2HPO_4), MgCl_2 , NaCl , EDTA (etilendiamintetraasetikasit), CETAB (Cetyltrimethyl ammonium bromide), Sodyum Asetat (CH_3COONa), CaCl_2 , MgCl_2 , Methyl- α -D manno-pyranoside, Amonyum Sülfat, H_2O_2 , TMB (3,3',5,5'- Tetramethylbenzidine), N,N,- Dimethylformamide, KPO_4 , TEMED, Akrilamid/Bisakrilamid, β -Merkaptoetanol, SDS, Metanol, Asetik Asit, Coomassie Brilliant Blue R250

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Deneylerde Shangping hassas terazi, Shimadzu UV-1700 Spektrofotometri, Consort C 830 pH metre, Manyetik Karıştırıcı, Supra21K Soğutmalı Süpersantrifüj, Ismatec peristaltik pompa, Spectra/Chrom CF-1 Fraksiyon kolektör, Amicon Konsantratör, Biorad Mini Protean II Elektroforez Sistemi kullanıldı.

3.2. Lökositlerden Myeloperoksidazının Saflaştırılması

Lökositlerin Solübilizasyonu

Dicle Üniversitesi Kan Bankasından alınan lökoferez sonrası ürün $+4^\circ\text{C}$ 'de $10950\times g$ 'de 5 dakika santrifüj edildi. Toplanan 15 ml lökosit peleti tampon A (10 mM Sodyum Fosfat, 1Mm MgCl_2 , 3Mm NaCl , 0,5 mM EDTA Ph:6.0) içerisinde %1 olarak çözülmüş CETAB tamponundan, 10 ml tampon eklenip lökositlerin çözünmesi sağlandı. 200 mg kuru CETAB eklenip homojenize edildi. $+4^\circ\text{C}$ 'de $10950\times g$ 'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant alındı. 650 nm'deki aktivite tayini ve 280 nm'deki protein tayini yapıldı. Protein derişimi taramaları, 280 nm'deki absorbans ölçümleri takibi ile yapıldı.

3.2.1. Con A Sepharose 4B Affinite Kromotografisi

Hacmi 25 ml olan Con A Sepharose 4B affinite jeli, $7\times 2,5$ cm boyutlarındaki kolona aktarıldı. Tampon B (100 mM Sodyum Asetat, 100 mM NaCl , 1mM CaCl_2 , 1mM MgCl_2 , 0,5 mM EDTA [pH: 6,3]) ile dengelendi.(Dengeleme; 125 ml tamponla jel yıkanarak dengelendi.)

Homojenize edilmiş olan 27 ml örnek kolona aktarıldı. Kolon tampon B ile 0,8 ml/dk akış hızı olacak şekilde yıkandı ve 4 ml'lik fraksiyonlar toplandı. Toplanan tüplerde protein tayini yapıldı. Kolona bağlı enzim, 0-0,7 M arası methyl- α -D manno-pyranoside gradiyenti ile, akış hızı 1 ml/dk olacak şekilde uygulandı. 5 ml fraksiyonlar toplandı. Toplanan fraksiyonlarda protein ve aktivite tayini yapıldı. Myeloperoksidaz aktivitesi olan tüpler bir sonraki basamakta kullanılmak üzere birleştirildi.

3.2.2. %80 Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Con A Sepharose 4B Affinite Kromotografisinden elde ettiğimiz myeloperoksidaz aktivitesi olan 145 ml örnek %80'lik amonyum sülfat doygunluğuna getirildi. +4 °C'de gece boyu (over night) bekletildi. Örnekler +4 °C'de 25650xg'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Enzim içeren aktif çökelti, tampon A (10 mM Sodyum Fosfat, 1Mm MgCl₂, 3Mm NaCl, 0,5 mM EDTA [Ph:6.0]) 'da çözündü. Total aktivite ve protein tayini yapıldı.

3.2.3. Sephacryl S 300 HR Jel Filtrasyonu

%80 Amonyum Sülfat kesitlemesi yapılan 8,5 ml örnek, tampon C (25mM Sodyum Asetat, 100mM NaCl, 0,5 mM EDTA [pH:4,7]) ile dengelenmiş (dengeleme 800 ml tampon geçirilerek yapıldı), hacmi 160 ml olan Sephacryl S300 HR kolonuna (50x2,5 cm boyutlarında) aktarıldı. Akış hızı 0,6ml/dk olarak ayarlandı. 5ml'lik fraksiyonlar toplandı. Jel filtrasyonu sonunda elue edilen fraksiyonlarda aktivite ve protein tayini yapıldı. Protein derişimleri, 280 nm' deki absorbans ölçümleri takibi yapıldı. Myeloperoksidaz aktivitesi olan tüpler bir sonraki basamakta kullanılmak üzere birleştirildi.

3.2.4. CM Sefhadex G 25 İyon Değişirici Kromatografi

Sephacryl S 300 HR Jel Filtrasyonu basamağında myeloperoksidaz aktivitesi içeren tüpler birleştirilerek elde edilen 83 ml örnek, tampon D (25mM Sodyum Fosfat, 0,25 mM EDTA, 1Mm MgCl₂ [pH:6,0]) ile dengelenen (125 ml tampon geçirilerek dengeleme yapıldı) ve 25 ml hacimli olan CM Sefhadex G 25 İyon Değişirici (7x2,5 cm boyutlarındaki) kolona aktarıldı. Kolon tampon D, ile 1,3 ml/dk akış hızıyla yıkandı. Toplanan

fraksiyonlarda protein tayini yapıldı. Kolona bağlı enzim 0-0,7M NaCl gradiyenti uygulanarak, akış hızı 1,2 ml/dk olacak şekilde elue edildi. Toplanan fraksiyonlarda protein ve aktivite tayini yapıldı.

3.2.5. Protein Ölçümü

Kromotografi çalışmalarında elde edilen fraksiyonlarda, protein tayini, 280 nm'deki absorbansları ölçülerek yapıldı. Protein konsantrasyonları BCA (bicinchoninic acid) Protein Assay Kit (Sigma, ABD) kullanılarak ölçüldü. Protein standartı olarak sığır serum albümin kullanıldı. 562 nm'deki absorbansları tayin edildi (38).

3.2.6. Myeloperoksidaz Aktivitesinin Ölçümü

Myeloperoksidaz aktivitesi Suzuki ve arkadaşlarının (39) değiştirilmiş yöntemine (40) göre tayin edildi. Aktivite ölçüm ortamı, son hacmi 1 mililitre olacak şekilde, %0.5 HETAB içeren 50 mM fosfat tamponu (pH:5.4), 1.6 mM sentetik substrat tetrametil benzidin (TMB), 2 mM H₂O₂ ve aktivite ölçülecek örnek içermektedir. Tepkime H₂O₂ eklenmesi ile başlatıldı ve 650 nm'de dakikadaki absorpsiyon artışı spektrofotometrik olarak tayin edildi. Bu deney koşullarında dakikadaki bir absorpsiyon değişimi sağlayan enzim miktarı bir enzim ünitesi olarak alındı.

3.2.7. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS- PAGE) İle Myeloperoksidaz Enziminin Safliğinin Kontrolü

Myeloperoksidaz enzimi saflaştırıldıktan sonra, sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektrofrezisi (SDS-PAGE) Laemmli (41) tarafından belirtilen yöntemle yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi. Ayırma jelinin yüzdesi %10, yığma jelinin yüzdesi %5 olarak tutuldu. Örnekler jele yüklenmeden önce 5 dakika 100 °C'de ısıtılarak proteinler denatüre edildi. Örnekler ayırma jeline girene kadar 60 V, girdikten sonra da 100 V uygulandı. Yürütme işlemi oda ısısında 1 saat sürdü. Daha sonra akım kesilerek yürütme işlemi durduruldu. Cam plaklar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldıktan sonra yığma jeli kesilerek uzaklaştırıldı. Protein bantlarını içeren ayırma jeli Coomassie Brilliant Blue-R250 boyasıyla (CBB, %0,1) yaklaşık 5 saat boyandı.

Boya ıkarma işlemi (destaining), %25 metanol ve %10'luk asetik asit karışımıyla yapıldı. Bu özelti belirli aralıklarla değiştirilmek suretiyle jelin zemin rengi açılıp protein bantları belirginleşinceye kadar bu çözelti içerisinde çalkalandı. Jel renk açıcı çözeltiden çıkartılarak görüntülendi.

4. BULGULAR

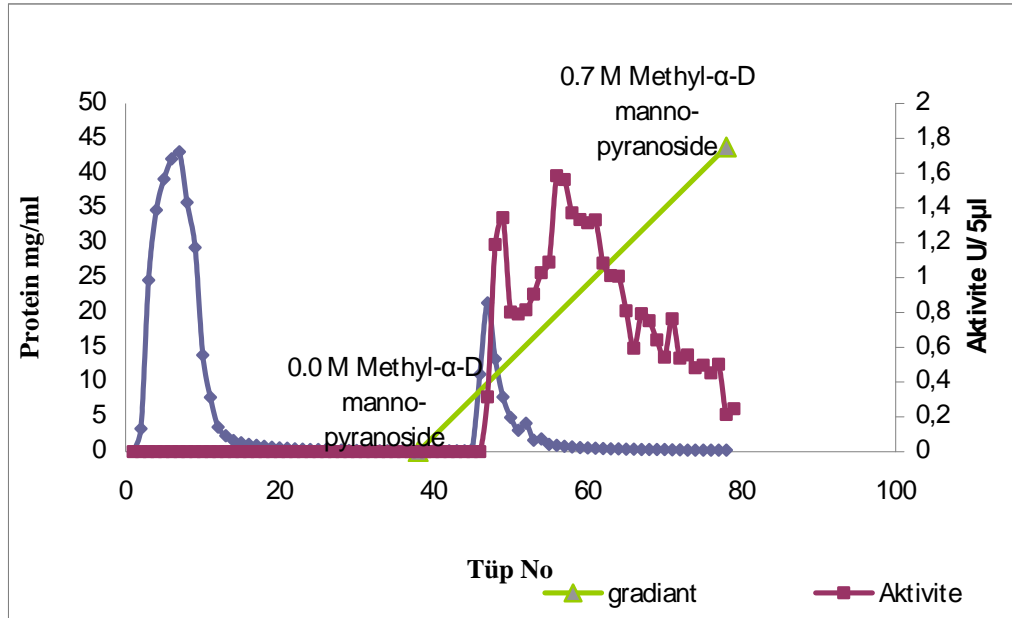
4.1. Lökositlerden Myeloperoksidaz Saflaştırılması

Myeloperoksidaz enzimi, solübilize edilmiş lökositlerden Con A Sepharose 4B, affinite kromatografisi, %80 Amonyum Sülfat Çöktürmesi, Sephacryl S 300 HR Jel Filtrasyonu ve CM Sefhadex G 25 İyon Değiştirici Kromatografi basamakları kullanılarak saflaştırıldı.

4.1.1. Con A Sepharose 4B Affinite Kromatografisi

Con A Sepharose 4B Affinite Kromatografisinde 0,27 M methyl- α -D manno-pyranoside derişiminde zirve oluşturan myeloperoksidaz aktivitesine sahip fraksiyonlar bir sonraki basamakta kullanılmak üzere birleştirildi. (Şekil 10)

Bu basamaktaki saflaştırma, başlangıç basamağına göre myeloperoksidaz aktivitesi 21,30 kez saflaştırıldı.(Tablo 1)



Şekil 10: İnsan lökositlerinden myeloperoksidaz enziminin Con A Sepharose 4B Affinite Kromatografisi profili

Tablo 1: İnsan lökositlerinden Myeloperoksidaz enziminin saflaştırma şeması

Saflaştırma Basamağı	Hacim (ml)	Total Protein(mg)	Total Aktivite(IU)	Spesifik Aktivite(IU/mg)	Fold	Verim
Lökosit	27	1566	26136	16,69	1	100
Con-A Sefharose 4B	145	89,9	31950	355,48	21,3	122,24
Amonyum Sülfat Çöktürmesi	8,5	64,26	28560	444,4	26,6	109,27
Sephacryl S-300-HR	83	25,979	20135	775,08	46,4	77,03
CM Cephadex G 25	96	10,368	12364,6	1192,574	71,45	47,3

4.1.2. %80 Amonyum Sülfat Çöktürmesi

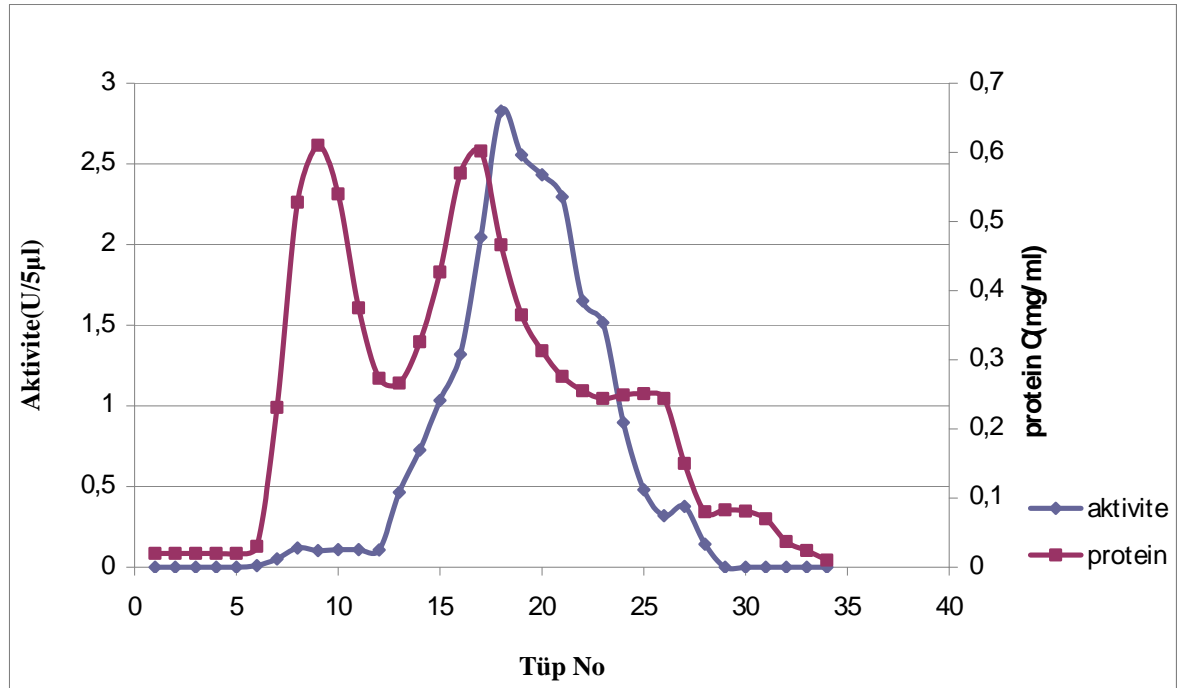
Con A Sepharose 4B Affinite Kromotografisinden elde ettiğimiz myeloperoksidaz aktivitesi olan örnek %80'lik amonyum sülfat doygunluğuna getirildi.

Bu basamaktaki saflaştırma, başlangıç basamağına göre myeloperoksidaz aktivitesi 26,60 kez saflaştırıldı. (Tablo 1)

4.1.3. Sephacryl S 300 HR Jel Filtrasyonu

Sephacryl S 300 HR Jel Filtrasyonu sonunda toplanan tüplerde aktivite ve protein tayini yapıldı (Şekil 11). Myeloperoksidaz aktivitesi olan tüpler bir sonraki basamakta kullanılmak üzere birleştirildi.

Bu basamaktaki saflaştırma, başlangıç basamağına göre myeloperoksidaz aktivitesi 46,44 kez saflaştırıldı (Tablo 1).

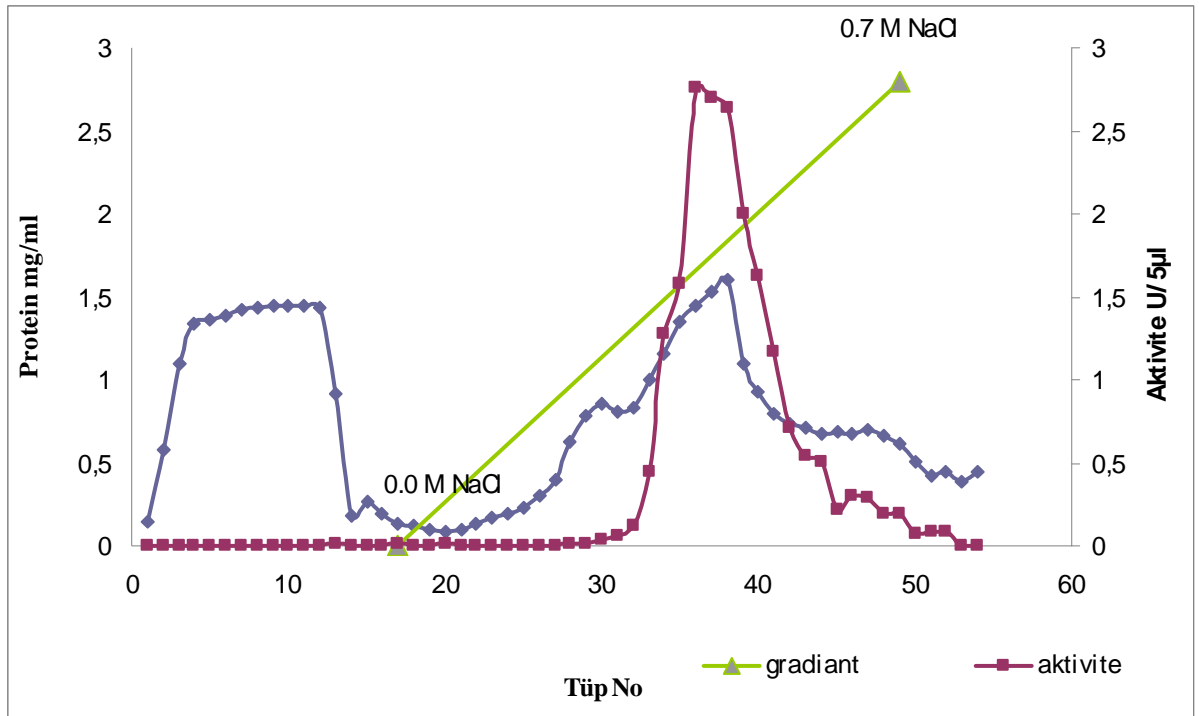


Şekil 11: İnsan lökositlerinden myeloperoksidaz enziminin Sephacryl S 300 HR Jel Filtrasyon Kromatografisi profili

4.1.4. CM Sefhadex G 25 İyon Değişirici Kromatografi

CM Sefhadex G 25 İyon Değişirici Kromatografi basamğında 0,416 M NaCl derişiminde zirve oluşturan myeloperoksidaz aktivitesine sahip fraksiyonlar bir sonraki basamakta kullanılmak üzere birleştirildi. Toplanan tüplerde protein ve aktivite tayini yapıldı.(Şekil 12)

Bu basamaktaki saflaştırma, başlangıç basamağına göre myeloperoksidaz aktivitesi 71,45 kez saflaştırıldı.(Tablo1)

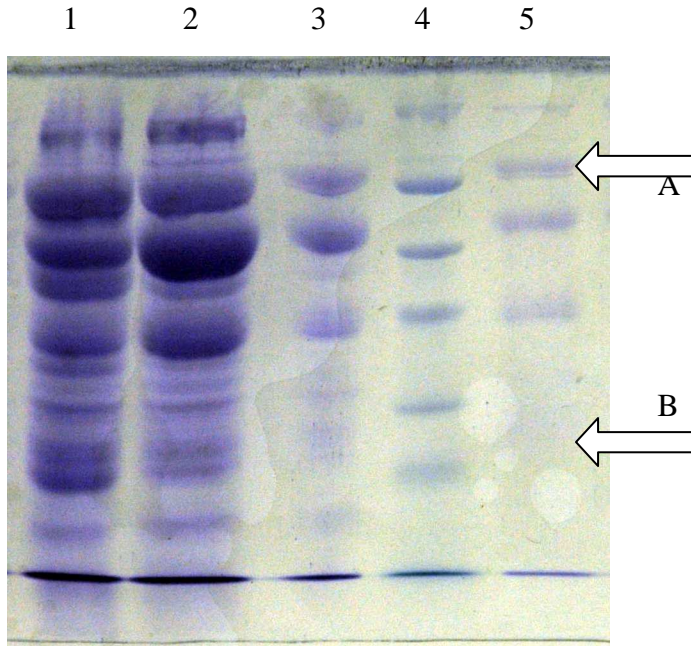


Şekil 12: İnsan lökositlerinden myeloperoksidaz enziminin CM Sefhadex G 25 İyon Değişirici Kromatografisi profili

4.1.5. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS- PAGE) İle Myeloperoksidaz Enziminin Saflığının Kontrolü

Elde edilen enzim örneği, moleköl ağırlığının saptanması ve saflık kontrolü için SDS-PAGE elektrofrezine uygulandı. Elektrofretik işlemler için, Laemmli'den modifiye edilen yöntem esas alındı (41). Elektrofretik ayırım Miniprotean II-Biorad sistemi kullanılarak oda ısısında yapıldı.

SDS- Poliakrilamid jel elektroforezinde,%5'lık yığıma jeli (stacking jel) ve %10'luk ayırma (separator) hazırlandı. Yığıma jeli tamponu olarak 0,5 M Tris/HCl, pH:6,8; ayırma jeli içinde 1,5 M Tris/HCl tamponu pH:8,8 kullanıldı. Örnekler jele yüklemeye önce 5 dakika 100 °C'de ısıtılarak proteinler denatüre edildi. Örnekler ayırma jeline girene kadar 60 V, girdikten sonra 100 V uygulandı. Uygulama süresi ve akım denemek suretiyle optimize edildi. Yürütme işlemi oda sıcaklığında 1 saat sürdü. Daha sonra akım kesilerek yürütme işlemi durduruldu. Cam plaklar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldıktan sonra yığıma jeli kesilerek uzaklaştırıldı. Protein bantlarını içeren ayırma jeli Coomassie Brilliant Blue-R250 boyasıyla (CBB, %0,1) yaklaşık 5 saat boyandı. Daha sonra jel renklendirme çözeltisinden çıkarılarak, renk açıcı çözeltiye (%25 metanol, %10 glasiyel asetik asit karışımı) konuldu. Bu çözelti belirli aralıklarla değiştirilmek suretiyle jelin zemin rengi açılıp protein bantları belirginleşinceye kadar çalkalandı. Jel renk açıcı çözeltiden çıkarıldıktan sonra görüntü bilgisayara aktarıldı. (Şekil 13)

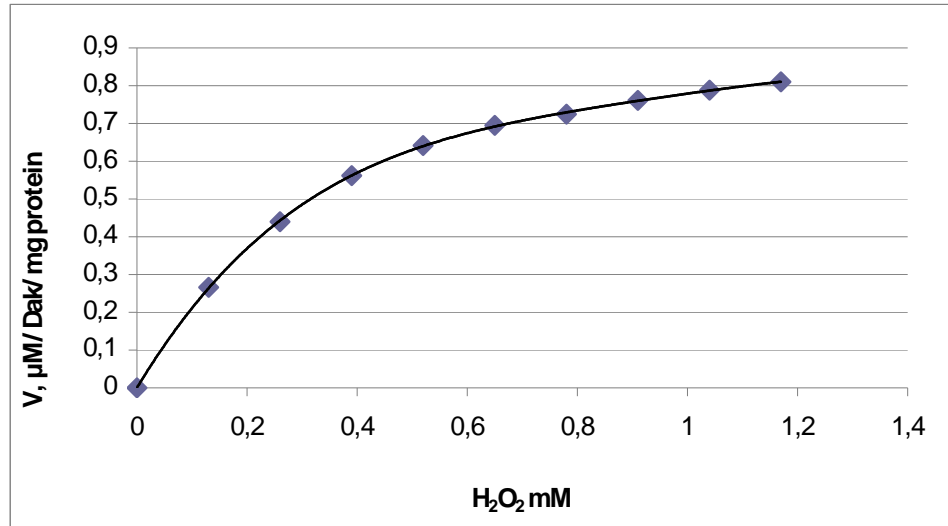


Şekil 13: Myeloperosidaz enziminin farklı saflaştırma basamaklarındaki örneklerin SDS-PAGE elektroforezi 1. Con A Affinite Sonrası, 2. Sefhakril S 300 HR sonrası, 3. CM Sefhadex sonrası, 4. Marker (molekül ağırlığı standardı) (yukarıdan aşağıya doğru 80kDa, 58kDa, 46kDa, 25kDa, 17kDa, 5 kDa) 5.A; Ağır Zincir (64-55 kDa) B; Hafif Zincir (10-15 kDa)

4.2. Kinetik Çalışmalar

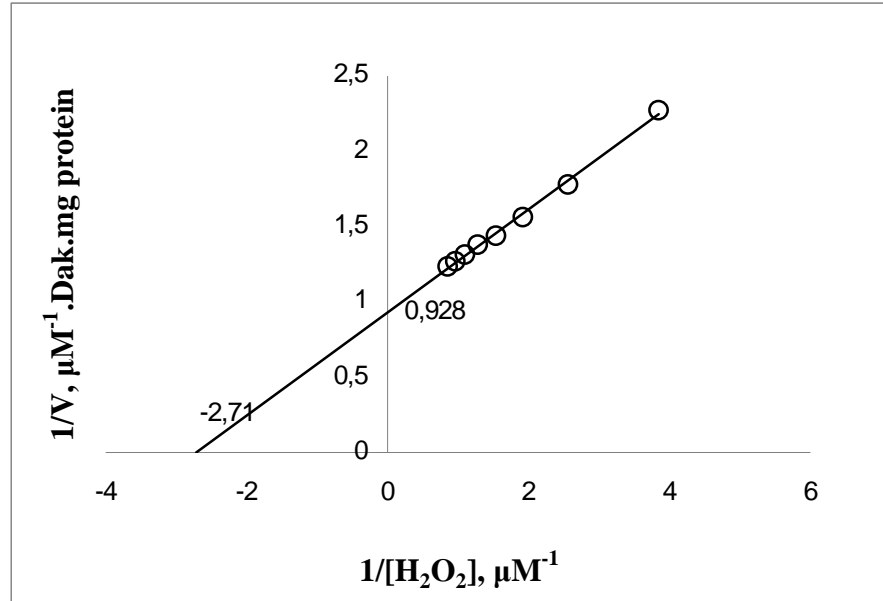
4.2.1. Myeloperoksidaz Aktivitesinin Özelliklerinin Saptanması

H_2O_2 'nin substrat olarak kullanıldığı kinetik çalışmalarda, ilk hızlar $37^\circ C$ 'de, $50mM KPO_4$, %0,5 CETAB tamponunda (pH: 5,4) ölçüldü. Tepkime ortamına yukarıdaki karışımın eklenmesinden sonra sabit miktarlarda enzim eklendi. Tepkime son derişimi 0-1,2 mM arasında olacak şekilde H_2O_2 ilave edilerek başlatıldı. Tepkime ortamının son hacmi 1 ml idi. Ölçülen absorbans değişimi değerlerinden yararlanarak her substrat derişimine karşılık gelen ilk hızlar hesaplandı. İlk hız (v) değerlerinin H_2O_2 derişimine karşı grafiklenmesi Michaelis-Menten grafiğı çizildi. (Şekil 14)



Şekil 14: İnsan Lökosit Myeloperoksidaz enziminin H_2O_2 aktivitesine göre Michaelis-Menten grafiğı

Enzimin kinetik sabitleri, $1/v$ değerlerine karşı $1/[S]$ değerlerinin grafiklenmesi ile elde edilen Lineweaver-Burk doğrusundan yararlanarak saptandı. Lineweaver-Burk doğrusunun $1/v$ eksenini kesim noktasından enzimin maksimum hızı (V_m), $1,077 \mu\text{mol/dk/mg}$ protein; $1/[S]$ eksenini kestiği noktadan K_m değeri $,0,369 \mu\text{mol}$ olarak saptandı. (Şekil 15)



Şekil 15: İnsan Lökosit Myeloperoksidaz enziminin H_2O_2 aktivitesine göre Lineweaver-Burk grafiği

5. TARTIŞMA

Çeşitli hastalıklarda değişik öneme sahip MPO, bu hastalıkların patogenezinin aydınlatılmasına farklı ölçülerde katkıda bulunur. Bu nedenle MPO'nun saf olarak elde edilmesi ve incelenmesi oldukça önemli hale gelmektedir.

MPO bazı balık türlerinin nötrofillerinde de mevcut olan bir enzimdir. Bunun omurgalılarda da benzer olduğu belirlenmiştir. Yapılan bir çalışmada, turbot (kalkan balığının) böbrek hücrelerinden MPO izole edilmiştir. Burada affinite kromatografisi (Concavalin A Sepharose) kullanılmış, izole edilen molekülün ağırlığı (150 ve 75 kDa) SDS-PAGE ile belirlenmiş ve peroksidaz aktivitesi belirlenmiştir. Filogenetik sınıflandırmada memeli MPO ile balık MPO'sunun %55-57 oranında benzediği görülmüştür (42).

Foucher P. ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada insan polimorfonükleer lökositleri, buffy coattan ficoll dansite gradiyentini takip eden dekstran sedimantasyonu ile izole edilmiş, sedimantasyon sonrasında eritrositler hipotonik solüsyon ile uzaklaştırılmış, sonifikasyon ve CETAB kullanılarak solibilize edilmiştir. Nükleus ve membran fragmentleri ultrasantrifüj ile uzaklaştırılmıştır. MPO Concavalin A Sepharose jele bağlanmış ve α -metil- D mannopranozoid ile elue edilerek, toplanan fraksiyonlar sodyum asetat tamponuna karşı diyalize tabi tutulmuştur. Sefhadex G 100 jel kromatografisi ile MPO pürifiye edilmiş ve elektroforez ile MPO bantları (15, 39, 58 kDa) gözlenmiştir. Bu çalışmada saflaştırılan MPO enziminin akciğer hastalıklarındaki ilişkisi incelenmiştir (43).

Daugherty A. ve arkadaşlarının çalışmalarında, MPO enzimi EDTA'lı antikoagülanlı kandan elde edilmiş, Lectin affinite kromatografisi (Concavalin A Sepharose) ile tutulmuş ve 0,5 M α -metil- D mannopranozoid ile elue edilmiştir. Toplanan fraksiyonlarda protein konsantrasyonları belirlenerek, SDS-PAGE yapılarak MPO'nun molekül ağırlığı saptanmıştır (44).

Bir başka çalışmada lökositler %5 CETAB çözeltisinde lizis edilmiş ve %50-65 amonyum sülfatlamaya tabi tutularak sature edilmiştir. 50mM Tris pH:7,0 ve %0,5 CETAB tamponunda çözülerek, Sefhadex G 150 iyon değiştirici kromatografi yapılmış ve toplanan fraksiyonları 0,4 M dithiothreitol'le inkübe edilmiştir. 1M iodacetamide ekleyip santrifüj edilerek 280nm'de protein konsantrasyonları belirlenmiştir. SDS-PAGE ile native MPO

ve hem-MPO'nun molekül ağırlıkları belirlenmiştir. Bu yöntemle %89-93 oranında saflaştırma sağlanmıştır (45).

Apostolopoulos J. ve arkadaşları çalışmalarında fare native MPO'su farklılaşmış 32DcI3 hücrelerinden Merrill'in modifiye etmiş olduğu protokolden, Xiao ve Hope ve ark.'inin protokollarından yararlanarak hücreler izole edilmiştir. Toplanan hücreler santrifüj sonrası 6,7 mM Sodyumfosfat (pH:6), 1mM MgCl₂, 3 mM NaCl ile yıkanmış ve 100mM sodyum asetat (pH:6,3) 100 mM NaCl ye karşı diyalize tabi tutulmuştur. Concavalin A Sepharose'a +4 C'de overnight bırakılmıştır. Kolana tutulan örnek, 750 mM α -metil-D mannopranozoid ile elue edilmiştir. Toplanan fraksiyonlarda aktivite ve protein tayini yapılmış, SDS-PAGE ile MPO'nun ağır (59 kDa) ve hafif (13,5 kDa) zincirleri belirlenmiştir. MPO'nun otoimmün hastalıklarla olan ilişkisi incelenmiştir (46).

Hope R. ve arkadaşları pürfiye edilmiş hücre peletlerini 6,7 mM Sodyum Fosfat (pH:6), 1mM MgCl₂, 3mM NaCl, 0,5 PMSF içerisinde çözülmüş ve solibilize olan lökositleri 100mM Sodyum Asetat (pH:6,3), 100mM NaCl'ye karşı diyaliz edilmiştir. Diyaliz sonrası 5 ml Concavalin A Sepharose'da bir gece bekletilmiştir. Kolona aktarılan materyal α -metil-D mannopranozoid ile elue edilmiştir. Toplanan fraksiyonlar %85'lik amonyum sülfatlamaya tabi tutulmuştur. Superose 6 and Superose 12 kolonundan toplanan fraksiyonlar %70'lik amonyum sülfatlamaya tabi tutularak, suya karşı diyaliz edilmiştir. SDS-PAGE %4-20 arası gradiyent yapılarak MPO'nun ağır ve hafif zincirleri belirlenmiştir (47).

Bir başka çalışmada 0,5 M CaCl₂ kullanılarak yıkanmış lökositler Concavalin A Sepharose, Fenil Sefharose ve jel filtrasyon kromatografisi yapılarak MPO saflaştırılmıştır. Son enzimin saflığı spektral ve jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir. Poliakrilamid jel elektroforezinde MPO 57, 39 ve 15,5 kDa bantları vermiş oysa eozinofil peroksidaz bantları 50 ve 15,5 kDa bantlarını vermiştir. Bu çalışmada enzimin azalmış ve doğal özellikleri belirlenmiştir (48).

Bir diğer çalışmada atlardan alınan sitratlı kandaki PMN'lerden MPO saflaştırılmıştır. Daha fazla hücre proteini elde etmek için PMN'ler ekstrakte edilmiş ve %55'lik amonyum sülfatlamaya tabi tutulmuştur. Hiload S Sepharose HP iyon değiştirici kolona yüklenen enzim 0,2-0,5 M'lık NaCl

gradiyenti ile elue edilmiştir. Toplanan fraksiyonlar Sefhakril S-200 jel filtrasyona tabi tutulmuş ve jel filtrasyon sonrası toplanan fraksiyonlar SDS-PAGE jel elektroforezinde insan MPO'sundan farklı olarak 3 bant ortaya çıkmıştır (49).

Bizim bu çalışmada kan bankasından alınan lökoferez sonrası ürün santrifüj edilerek lökosit peletleri elde edildi. Lökosit peletleri CETAB ile lizis edildi. Con A Sepharose 4B affinite jel kolonuna aktarıldı. Kolona bağlanan enzim 0-0,7 M arası methyl- α -D manno-pyranoside gradiyenti ile elue edildi. Elue edilen fraksiyonlar %80 amonyum sülfatlama yapıldı. Amonyum sülfatlama sonrası örnek Sephacryl S300 HR kolonuna aktarılarak toplanan fraksiyonlar CM Sefhadex G 25 İyon Değiştirici kolona aktarıldı. Kolona bağlanan enzim 0-0,7 M NaCl gradiyenti ile elue edildi. Eluent SDS-PAGE yapılarak saflığı belirlendi. Biz bu çalışmada MPO enzimini başlangıç basamağına göre 71,45 kez saflaştırdık.

Myeloperoksidaz enziminin saflaştırılması için ulaşılmak istenen saflık derecesi enzimin bulunduğu materyale göre değişiklik göstermektedir. Saflaştırma yöntemlerden sıklıkla uygulananları Con A Sepharose affinite kromatografisi, kolona bağlı enzimi elue etmek için methyl- α -D manno-pyranoside ve Sephacryl jel kromatografileridir.

Biz bu çalışmamızda Foucher P.ve ark. buffy coattan ficoll gradiyenti ile (43), Daugherty A. ve ark. EDTA'lı antikuagülanli kanda (44), Apostolopoulos J. ve ark. kullandığı native fare 32DcI3 hücrelerinden (46), Mathy-Hartert M. ve ark. sitratlı antikuagülanlı at kanından (49), L.Olsen R. ve ark. buffy coattan CaCl₂ kullanarak lökositleri yıkamasıyla (48) lökosit elde etmek yerine lökosit sayısı daha fazla olması nedeniyle lökoferez sonrası lökositleri kullandık. Andrewa P. C. ve ark (45) da bizim gibi lökoferez sonrası lökositleri kullanmışlar.

Foucher P.ve ark. (43), L.Olsen R. ve ark. (48), Mathy-Hartert M. ve ark (49), Hope R. ve ark. (47), Apostolopoulos J. ve ark (46), Andrewa P. C. ve ark (45) nın kullandığı CETAB ile lizis yöntemini bizde çalışmamızda kullandık.

Affinite kromatografisi (Concanavalin A Sepharose) metodunu, Foucher P. ve ark. (43), Apostolopoulos J. ve ark. (46), Daugherty A. ve ark. (44), Castro R. ve ark. (42), L.Olsen R. ve ark. (48) ve Hope R. ve ark. (47)

kullandığı gibi bizde kullandık. Concanavalin A Sepharose'un bağlama kapasitesi yüksek olduğu için bu jel seçildi. Kolona bağlanan enzimi elue etmek için ise Foucher P. ve ark. (43) kullandığı methyl- α -D manno-pyranoside kullanarak elue ettik. Burada methyl- α -D manno-pyranoside'ın affinite kolonuna bağlanma affinitesi yüksek olduğu için kullanıldı. Bu basamaktaki saflaştırma, başlangıç basamağına göre myeloperoksidaz aktivitesi 21,30 kez saflaştırıldı.

Bizim bu çalışmamızda Hope R. ve arkadaşlarının kullandığı (47) amonyum sülfat ile çöktürme yöntemini uygulayarak, başlangıç basamağına göre myeloperoksidaz aktivitesi 26,60 kez saflaştırıldı.

Jel kromatografi yöntemi olarak Daugherty A. ve ark. (44), Castro R. ve ark. (42), Mathy-Hartert M. ve ark. (49), L.Olsen R. ve ark. (48) ve Hope R. ve ark. (47) kullandığı yöntemi biz çalışmamızda kullandık. Burada jel olarak Sephacryl S300 HR jelini kullandık. Sephacryl S300 HR jeli 1-400 kDa ağırlığındaki proteinleri geçirebildiği için ve bizim enzimimizin boyutları 140 kDa olduğu için seçildi. Bu basamaktaki saflaştırma, başlangıç basamağına göre myeloperoksidaz aktivitesi 46,44 kez saflaştırıldı.

Biz bu çalışmamızda Foucherve P. ark. (43), Andrewa P. C ve ark. (45), Mathy-Hartert M. ve ark. (49) kullanıldığı İyon Exchange kromatografisi yöntemini kullandık. Biz CM Sefhadex G 25 İyon Değiştirici jel kullandık. Kolona bağlı enzim 0-0,7M NaCl gradiyenti ile elue edildi. Bu basamaktaki saflaştırma, başlangıç basamağına göre myeloperoksidaz aktivitesi 71,45 kez saflaştırıldı.

Saflaştırdığımız bu enzim vücut sıvılarında bulunan tiyosiyanat ile nitriti nasıl reaktif türlere çevirdiği ve bu reaktif türlerin, tirozin amino asidinin nitrasyonuna ne şekilde neden olduğunun araştırılmasına olanak sağlayacaktır.

Sonuç olarak; insan myeloperoksidaz enzimini (MPO), lökosit solübilizasyonu, Con A Sepharose 4B affinite jel kromatografisi, amonyum sülfat çöktürmesi, Sephacryl S300 HR jel kromatografisi ve CM Sefhadex G 25 İyon Değiştirici kromatografi aşamaları kullanılarak saflaştırılmıştır.

Bu yöntem ile H₂O₂ substratı kullanılarak insan myeloperoksidaz enzimi 71,45 kez saflaştırılmış ve spesifik aktivitesi 1192,574 u/mg protein olarak bulunmuştur.

Sodyum Dodesil Sulfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi ile saflık derecesi kontrol edilmiş. Saflaştırılmış enzimin Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek 37 °C'de 50mM KPO₄ , %0,5 CETAB tamponunda (pH: 5,4) H₂O₂ substratı için Km değeri 0,369 µmol, Vm 1,077 µmol/dk/mg protein olarak saptanmıştır.

KAYNAKLAR

1. Guyton C.A., Hall E.J., Textbook of Medical Physiology (Tıbbi Fizyoloji) Çavuşoğlu H., 9. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 1996
2. Ganong F.W., Tıbbi Fizyoloji, Türk Fizyolojik Bilimler Derneği, 20. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2002
3. Junqueira L.C., Carneiro J., Kelley R.O., Temel Histoloji, Aytekin Y., 8.Baskı, İstanbul, Barış Kitabevi
4. Çelikbaş A., Diyabet Seyrinde Gelişen Enfeksiyonlarda İmmunopatogenez, Klimik Dergisi, 18, 17-20, 2005
5. Murray K.R., Granner K.D., Mayes A.P., Rodwell W.V., Harper Biyokimya, Dikmen N., Özgünen T., 25. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2004
6. http://www.thd.org.tr/doc/kurs_pdf/lokositoz.pdf 11.06.2009
7. Hoffbrand V.A., Pettit E.J., Clinical Haematology, Barcelona, Spain, 1994, Sandoz Pharma, 26
8. Sözbilir Bayşu N., Bayşu N., Enzimler, Biyokimya, 1.Baskı, Ankara, Öncü Basım Evi, 2008, 284-326
9. Ersoy İ., Türkiye Klinikleri Biyokimya Ders Notları, Ankara, 2003, Türkiye Klinikleri, syf:5,
10. Gözükara E.M., Enzimler, Biyokimya, 4. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2001, 572-677
11. Champe C.P., Harvey A.R., Biyokimya, Tokullugil A., Dirican M., Ulukaya E., 2. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 1997

12. Temizkan G., Arda N., Proteinlerin İzolasyonu, Analizi ve Saflaştırılması, Arda N., Ertan H., Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, 3. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2008, 161-274
13. Biswanger H., Enzyme Kinetics, Weinheim, 2002, Wiley-Vch Verlag GmbH, 172
14. McMaster C.M., HPLC A Practical User's Guide, Second Ed., New Jersey., 2007, John Wiley & Sons, Inc., 96-98
15. Hansson M., Olsson I., Nauseef W.M., Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. Arch Biochem Biophys. Jan 15;445(2):214-24.2006, Epub 2005 Aug 31
16. Nauseef W.M., Contributions of myeloperoxidase to proinflammatory events: more than an antimicrobial system. Int J Hematol. Aug;74(2):125-33,2001
17. Podrez E.A., Abu-Soud H.M., Hazen S.L., Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis. Free Radic Biol Med. Jun 15;28(12):1717-25,2000.
18. Hazell L.J., Arnold L., Flowers D., Waeg G., Malle E., Stocker R. Presence of hypochloritemodified proteins in human atherosclerotic lesions. J Clin Invest. Mar 15;97(6):1535-44,1996.
19. Kutter D., Devaquet P., Vanderstocken G., Paulus J.M., Marchal V., Gothot A., Consequences of total and subtotal myeloperoxidase deficiency: risk or benefit? Acta Haematol.; 104(1):10-5. 2000
20. Lau D., Baldus S., Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. Pharmacology and Therapeutics ; 111: 16-26, 2006.

21. Güncü G.N., Tözüm T.F., Güncü M.B., Yamalık N., Tümer C., Karabulut E., Kılınç K., Myeloperoxidase as a measure of polymorphonuclear leukocyte response in inflammatory status around immediately and delayed loaded dental implants: a randomized controlled clinical trial. *Clin. Implant Dent. Relat. Res.* Mar 10, 1: 30-9, 2008
22. Kooter I.M., Moguilevsky N., Bollens A., Van Der Veen L.A., Otto C., Dekker H.L., Wever R. The Sulfonium Ion Linkage in Myeloperoxidase. *The Journal of Biological Chemistry* ; 274 : 26794-26802,1999
23. Malle E. , Furtmüller P.G. , Sattler W. And Obinger C. Myeloperoxidase: A Target for New Drug Development? *British Journal of Pharmacology* ; 152: 838- 854,2007.
24. Siraki G.A., Bonini G.M., Jiang J., Ehrenshaft M., Mason P.R., Aminoglutethimide-induced protein free radical formation on myeloperoxidase: a potential mechanism of agranulocytosis, *Chem Res Toxicol.* July;20(7):1038-1045, 2007.
25. Nauseef, W.M., Insights into myeloperoxidase biosynthesis from its inherited deficiency. *J. Mol. Med.* 76, 661,1998
26. Gullberg U, Bengtsson N, Bulow E, Garwicz D, Lindmark A, Olsson I. Processing and targeting of granule proteins in human neutrophils. *J Immunol Methods.* Dec 17;232 (1- 2):201-210,1999
27. Daugherty A, Dunn JL, Rateri DL, Heinecke JW. Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest.* Jul;94(1):437-44, 1994
28. Hazen S.L., Heinecke J.W., 3-Chlorotyrosine, a specific marker of myeloperoxidase-catalyzed oxidation, is markedly elevated in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic intima. *J Clin Invest.* May 1;99(9):2075-81,1997.

29. Weiss S.J., Klein R, Slivka A, WeiXu M Chlorination of Taurine by Human Neutrophils. Evidence for hypochlorous acid generation. *Clin Invest.*; 70: 598–607,1982
30. Kettle A.J., Winterbourn C.C., Mechanism of inhibition of myeloperoxidase by anti-inflammatory drugs. *Biochem Pharmacol.*; 41: 1485-92,1991
31. Van der Vliet A, Eiserich J.P., Halliwell B, Cross C.E., Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite. *J Biol Chem.*; 272: 7617-7625,1997.
32. Podrez E.A., Abu-Soud H.M., Hazen S.L. Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis. *Free Radic Biol Med.*;12:1717-1725, 2000
33. Abu-Soud H.M., Hazen S.L., Nitric oxide modulates the catalytic activity of myeloperoxidase. *J Biol Chem.*; 275: 5425-5430,2000.
34. Zheng L, Nukuna B, Brennan M.L., Hazen S.L.,: Apolipoprotein A-I is a selective target for myeloperoxidase-catalyzed oxidation and functional impairment in subjects with cardiovascular disease. *J Clin Invest.* 114: 529-541,2004
35. Van Dalen CJ, Winterbourn CC, Senthilmohan R, Kettle AJ. Nitrite as a Substrate and Inhibitor of Myeloperoxidase. *J Biol Chem.*: 275; 11638-11644, 2000.
36. Van Dalen C.J., Winterbourn C.C., Senthilmohan R., Kettle A.J.. Nitrite as a Substrate and Inhibitor of Myeloperoxidase. *J Biol Chem.*: 275; 11638-11644, 2000.

37. Hazen S.L., Zhang R., Shen Z., Wu W., Podrez E.A., MacPherson J.C., Schmitt D., Mitra S.M., Mukhopadhyay C., Chen Y., Cohen P.A., Hoff F., Abu-Soud H.M.. Formation of nitric oxide-derived oxidants by myeloperoxidase in monocytes. *Circ Res*; 85: 950-958, 1999.
38. Smith P., Krohn R., Hermanson G., Mallia A., Gartner F., Provenzano M., ve diğerleri, Measurement of protein using bicichoninic acid. *Anal Biochem.* 150, 76-85, 1985
39. Suzuki, K., Ota, H., Sasagawa, S., Sakatani, T., Fujikura, T. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leucocytes. *Anal. Biochem.* 127:346-350, 1982
40. Demirpençe, E., Köksoy, C., Kuzu, A., Kılınç, K.A spectrophotometric assay for tissue-associated myeloperoxidase activity and its application to intestinal ischemia-reperfusion. *Turk. J. Med. Sci.* 27:197-200, 1997
41. Laemmil, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature (London)* 227, 680-685, 1970.
42. Castro R., Piazzon C.M., Noya M., Leiro M. J., Lamas J. Isolation and Molecular Cloning of a Fish Myeloperoxidase. *Molecular Immunology*; 45, 428-437, 2008
43. Foucher P., Heeringa P., Petersen H., Huitema G., Brouwer E., Tervaert J., Prop J., Camus P., Weening J., and Kallenberg M. Antimyeloperoxidase-associated Lung Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* Vol.190 987- 994, 1999.
44. Daugherty A., Dunn L., Rateri D. and Heinecke J. Myeloperoxidase, a Catalyst for Lipoprotein Oxidation, is Expressed in Human Atherosclerotic Lesions. *The American Society for Clinical Investigation*, 94, 437-444, 1994

45. Andrewa P.C., Krinsky N. The Reductive Cleavage of Myeloperoxidase in Half, Producing Enzymically Active Hemi-myeloperoxidase. *The Journal of Biological Chemistry.*; 256, 4211-4218, 1981.
46. Apostolopoulos J., Ooi J., Odobasic D., Holdworth S., Kitching R. The Isolation and Purification of Biologically Active Recombinant and Native Autoantigens for The Study of Autoimmune Disease. *Journal of Immunological Methods.*;308, 167-178, 2006
47. Hope R., Resmen E., Lewis C., Heuvelman D., Walker C., Jennings M. and Connolly T., Large-Scale Purification of Myeloperoxidase from HL60 Promyelocytic Cells: Characterization and Comparison to Human Neutrophil Myeloperoxidase. *Protein Expression and Purification*; 18, 269-276, 2000.
48. Olsen L Ragnar, Little C. Purification and Some Properties of Myeloperoxidase and Eosinophil Peroxidase from Human Blood. *Biochem. J.* 209, 781-787, 1983
49. Mathy-Hartert M., Bourgeois E., Grülke S., Deby-Dupont G., Caudron I., Deby C., Lamy M. and Serteyn D. Purification of Myeloperoxidase from Equine Polymorphonuclear Leucocytes. *Can J Vet Res*; 62: 127-132, 1998.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Leyla Bilge DEVECİOĞLU

Doğum Yeri: Şanlıurfa

D. Tarihi : 22.11.1981

Eğitim : Dicle Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü
(2003)

Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya
Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Başlangıç 2006-2007 öğretim yılı