

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

**BAZI BİTKİ GELİŞİM DÜZENLEYİCİ BİLEŞİKLERİN,
PARAOKSONAZ VE KARBONİK ANHİDRAZ İZOENZİMLER
ÜZERİNDE İNHİBİSYON ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SERAP BEYAZTAŞ

Balıkesir, Temmuz-2006

Bu alışma Balıkesir Üniversitesi Rektrlğ Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

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

BAZI BİTKİ GELİŞİM DÜZENLEYİCİ BİLEŞİKLERİN,
PARAOKSONAZ VE KARBONİK ANHİDRAZ İZOENZİMLER
ÜZERİNDE İNHİBİSYON ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SERAP BEYAZTAŞ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Oktay ARSLAN

Sınav Tarihi: 28/07/2006

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

Doç. Dr. Feray KÖÇKAR (BAÜ)

Yrd. Doç. Dr. Turgut KILIÇ (BAÜ)

Balıkesir, Temmuz-2006

ÖZET

BAZI BİTKİ GELİŞİM DÜZENLEYİCİ BİLEŞİKLERİN, PARAOKSONAZ VE KARBONİK ANHİDRAZ İZOENZİMLER ÜZERİNDE İNHİBİSYON ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Serap BEYAZTAŞ

Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,

Kimya Anabilim Dalı

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

Balıkesir, 2006

Bu çalışmada, bazı bitki gelişim düzenleyicilerinin (BGD), paraoksonaz (PON1) ve karbonik anhidraz izoenzimler (hCA-I ve hCA-II) üzerinde in vitro etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla kullanılan PON1, Sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin kimyasal yapısına sahip jel kullanılarak insan serumundan saflaştırılmıştır. Araştırmamızda kullanılan hCA-I ve hCA-II izoenzimleri ise Sepharose-4B-L-tirozin-p-aminobenzosülfonamit kimyasal yapısına sahip afinite kolonu kullanılarak insan eritrositlerinden saflaştırılmıştır. İzoenzimlerin saflığı, Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit Jel Elektrofrezisi ile (SDS-PAGE) kontrol edilmiştir.

BGD olarak tarımda yaygın olarak kullanılan, indol-3-asetik asit (IAA), indol-3- bütirik asit (IBA), gibberelik asit (GA_3) ve kinetin (Kn) adlı bileşikler seçilmiştir. Kn hariç araştırmamızda kullanılan BGD bileşiklerinin tamamı PON1 enzimini önemli ölçüde inhibe ettiği saptanmıştır (IC_{50} = 63,87- 89,48 μ M). IAA ve IBA bileşikleri, hCA-I ve hCA-II izoenzimlerini inhibe ederken (IC_{50} = 75,47- 78,13 μ M), GA_3 'in her iki enzimi aktive ettiği tespit edilmiştir. Ayrıca Kn, hCA-II izoenzimini aktive ederken hCA-I izoenzimini inhibe ettiği saptanmıştır (IC_{50} = 62,88 μ M).

ANAHTAR SÖZCÜKLER: İndol-3- asetik asit, indol-3-bütirik asit, gibberelik asit, kinetin, paraoksonaz, karbonik anhidraz, in vitro.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF INHIBITION EFFECTS OF SOME PLANT GROWTH REGULATORS ON PARAOXONASE AND CARBONIC ANHYDRASE ISOENZYME ACTIVITIES

Serap BEYAZTAŞ

Balikesir University, Institute of Science, Department of Chemistry

(MSc. Thesis/ Supervisor: Prof. Dr. Oktay ARSLAN)

Balikesir, Turkey,2006

In this study, the effect of some plant growth regulators (PGR) were investigated on paraoxonase (PON1) and hCAI and hCAII enzymes in vitro. For in vitro inhibition studies, firstly, paraoxonase (PON1) was purified from human serum using Sepharose-4B-L-tyrosine-1-naphthylamine hydrophobic gel. Secondly, human hCA-I and hCA-II from human erythrocyte were purified with Sepharose-4B-L-tyrosine-p-aminobenzosulfonamide affinity chromatography. The purity of isoenzymes were checked by SDS polyacrilamid gel electrophoresis.

Indole-3-acetic acid (IAA), indole-3-butyric acid (IBA), gibberellic acid (GA_3) and kinetin (Kn), which were widely used in agriculture, were chosen as plant growth regulators. From the inhibition studies, it was determined that apart from Kn, all plant growth regulators used in this study inhibit PON1 enzyme activity in significant level ($IC_{50}= 63,87- 89,48 \mu M$). hCA-I and hCA-II isoenzymes activity were inhibited by IAA and IBA ($IC_{50}= 75,47- 78,13 \mu M$). On the contatry, GA_3 activates both enzymes. In addition it was determined that Kn activates hCA-II but leads to inhibiton effect on hCA-I ($IC_{50}= 62,88 \mu M$).

KEY WORDS: Indole-3-acetic acid , indole-3-butyric acid , gibberellic acid, kinetin, paraoxonase, carbonic anhydrase, in vitro.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET, ANAHTAR SÖZCÜKLER	ii
ABSTRACT, KEY WORDS	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SEMBOL LİSTESİ	vii
ŞEKİL LİSTESİ	viii
ÇİZELGE LİSTESİ	x
ÖNSÖZ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Bitki Gelişim Düzenleyiciler	2
1.1.1. Oksinler	3
1.1.2. Sitonininler	4
1.1.3. Gibberellin Grubu	6
1.2. Paraoksonaz Enzimi	7
1.2.1. Katalizlediği Reaksiyonlar ve Substratları	9
1.2.2. Paraoksonaz Enziminin Hastalıklarla İlişkisi	11
1.3. Karbonik Anhidraz Enzimi	11
1.3.1. Fizyolojik Önemi	11
1.3.2. Karbonik Anhidraz İzoenzimleri	12
1.3.3. Karbonik Anhidraz Enziminin Hastalıklarla İlişkisi	13
1.3.4. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalizlediği Reaksiyonlar	14
1.3.5. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalitik Mekanizması	15
1.3.6. Karbonik Anhidraz Enziminin Aktivite Tayin Yöntemleri	18
1.3.6.1.CO ₂ -Hidrataz Aktivitesi	18

1.3.6.2. Esteraz Aktivitesi	19
1.3.7. Karbonik Anhidraz Enziminin Afinite Kromatografisi İle Saflaştırılması	19
2. MATERYAL VE YÖNTEMLER	21
2.1. Materyaller	21
2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	21
2.1.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar	21
2.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması	22
2.2. Yöntemler	27
2.2.1. Afinite Jelinin Hazırlanması	27
2.2.1.1. Sepharose 4B'nin Aktifleştirilmesi ve L-Tirozinin kolona eklenmesi	27
2.2.1.2. Sülfonamitin Kenetlenmesi	28
2.2.2. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile Paraoksonaz Enziminin Saflaştırılması	29
2.2.2.1. Sepharose 4B'nin aktifleştirilmesi	29
2.2.2.2. L-tirozinin Bağlanması	30
2.2.2.3. 1-Naftilamin Bileşiğinin Bağlanması	30
2.2.3. Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin (hCA-I ve hCA-II) Saflaştırılması	31
2.2.3.1. Kan Numunelerinin Alınması ve Hemolizatın Hazırlanması	31
2.2.3.2. Hemolizatın Afinite Kolonuna Tatbiki ve Enziminin Elüsyonu	32
2.2.3.3. Karbonik Anhidraz Aktivite Tayini (CO ₂ -Hidrat az Aktivitesi)	32
2.2.4. Paraoksonaz Enziminin Saflaştırılması	33
2.2.4.1. Amonyum sülfat Çöktürme Aralığının Belirlenmesi	33
2.2.4.2. Paraoksonaz Enziminin Aktivite Tayini	34
2.2.5. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) İle Enzim Saflığının Kontrolü	34

3. BULGULAR	36
3.1. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile PON1 Enzimin Saflaştırılması	36
3.2. Serum Paraoksonaz Enziminin SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi	37
3.3. Serum PON Enzim Aktivitesinin Tayini	37
3.4. BGD'lerin PON1 İzoenzimi Üzerine Etkileri	41
3.5. Afinite Kromatografisi İle hCA-I ve hCA-II İzoenzimlerin Saflaştırılması	43
3.6. hCA-I ve hCA-II Enzimlerinin SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi	45
3.7. BGD'lerin hCA-I ve hCA-II İzoenzimlerin Aktivite Tayini	45
3.8. BGD'lerin hCA-I ve hCA-II İzoenzimleri Üzerine Etkileri	51
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	54
5. KAYNAKLAR	61

SEMBOL LİSTESİ

Simge	Adı
BGD	Bitki gelişim düzenleyicisi
IAA	İndol-3-asetik asit
IBA	İndol-3-bütirik asit
A ₁ -A ₄ , A ₇ , A ₉ -A ₁₆ , A ₂₄ ve A ₂₅	Yüksek bitki gibberellin grupları
GA ₃ , GA ₄₊₇ GA ₃ GA ₃₂ GA ₄₅	Bitki tohumu gibberellin grupları
GA	Gibberellik asit serisi
ABA	Absisik asit
PON1	Paraoksonaz 1 izoenzimi
CA	Karbonik anhidraz enzimi
hCA-II	İnsan Karbonik anhidraz izoenzimi II
SDS	Sodyum dodesil sülfat
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
TEMED	N,N,N', N', -tetrametiletildiamin
Kn	Kinetin
hCA-I	İnsan Karbonik anhidraz izoenzimi I

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil Numarası	Adı	Sayfa
Şekil 1.1	İndol -3- asetik asitin molekül şekli	4
Şekil 1.2	İndol -3- bütirik asitin molekül şekli	4
Şekil 1.3	Kinetinin molekül şekli	5
Şekil 1.4	Giberelik asitin molekül şekli	7
Şekil 1.5	Paraoksonaz enziminin üç boyutlu görünümü	8
Şekil 1.6	İnsektisitlerde yaygın olarak kullanılan okson metabolitlerinin hidrolizi	9
Şekil 1.7	Sinir gazlarının hidrolizi	10
Şekil 1.8	Aromatik esterlerin hidrolizi	10
Şekil 1.9	Lakton hidrolizi	10
Şekil 1.10	CA Enziminin Aktif Bölgesi	16
Şekil 1.11	CA enziminin CO ₂ - hidratasyon reaksiyonunu katalizlediği mekanizma	17
Şekil 2.1	Sepharose 4B'nin aktifleştirilmesi	28
Şekil 2.2	L-tirozinin Bağlanması	28
Şekil 2.3	Sülfonamid Bileşiğinin Bağlanması	29
Şekil 2.4	1-Naftilamin Bileşiğinin Bağlanması	31
Şekil 3.1	Hidrofobik etkileşim kolonundan PON1 enziminin elüsyon grafiği	36
Şekil 3.2.	Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılan paraoksonaz enziminin SDS-PAGE görüntüsü.	37
Şekil 3.3.	Saflaştırılmış insan serum paraoksonaz enzimi üzerine IAA'nın % aktivite-[I] grafiği	41
Şekil 3.4.	Saflaştırılmış insan serum paraoksonaz enzimi üzerine GA ₃ 'nin % aktivite-[I] grafiği	42
Şekil 3.5.	Saflaştırılmış insan serum paraoksonaz enzimi üzerine Kn'nin % aktivite-[I] grafiği	42

Şekil 3.6.	Safılaştırılmış insan serum paraoksonaz enzimi üzerine IBA'nın % aktivite-[I] grafiği	43
Şekil 3.7.a	hCA-I enziminin elüsyon grafiği	44
Şekil 3.7.b	hCA-II enziminin elüsyon grafiği	44
Şekil 3.8.	Afinite kromatografisi ile safılaştırılan hCA-I ve hCA-II enzimlerinin SDS-PAGE görüntüleri.	45
Şekil 3.9.	Safılaştırılmış hCA-I ve hCA-II enzimleri üzerine IBA'nın % aktivite-[I] grafiği	51
Şekil 3.10.	Safılaştırılmış hCA-I ve hCA-II enzimleri üzerine Kn'nin % aktivite-[I] grafiği	52
Şekil 3.11.	Safılaştırılmış hCA-I ve hCA-II enzimleri üzerine IAA'nın % aktivite-[I] grafiği	52
Şekil 3.12	Safılaştırılmış hCA-I ve hCA-II enzimleri üzerine GA ₃ 'in % aktivite-[I] grafiği	53
Şekil 4.1.	PON1 enziminin HDL yüzeyine bağlanma modeli	55

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge Numarası	Adı	Sayfa
Çizelge 1.1	Karbonik anhidraz izoenzimleri	13
Çizelge 1.2	Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyonlar	15
Çizelge 2.1	SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının miktarları.	26
Çizelge 3.1	PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren IAA ve IBA'nın IC ₅₀ değerlerini bulunmasında kullanılan çözelti konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	39
Çizelge 3.2	PON1 enzimi üzerine aktivatör etkisi bulunan Kn'nin ve inhibisyon etkisi gösteren GA ₃ 'nin IC ₅₀ değerlerinin bulunmasında kullanılan çözelti konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	40
Çizelge 3.3	hCA-I ve hCA-II enzimleri üzerine inhibisyon etkisi gösteren IAA'nın IC ₅₀ değerlerini bulunmasında kullanılan çözelti konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	47
Çizelge 3.4	hCA-I ve hCA-II enzimleri üzerine inhibisyon etkisi gösteren IBA'nın IC ₅₀ değerlerini bulunmasında kullanılan çözelti konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	48
Çizelge 3.5	hCA-I enzimi üzerine inhibisyon etkisi ve hCA-II enzimi üzerine aktivatör etkisi gösteren Kn'nin IC ₅₀ değerlerini bulunmasında kullanılan çözelti konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	49
Çizelge 3.6	hCA-I ve hCA-II enzimi üzerine aktivatör etkisi gösteren GA ₃ 'nin çözelti konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	50
Çizelge 3.7	hCA-I, hCA-II ve PON1 enzimlerinin IC ₅₀ değerleri	53

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmanın deneysel kısmı, Balıkesir Üniversitesi Temel Bilimler Uygulama ve Araştırma Merkezi Biyoloji ve Kimya laboratuvarlarında, Balıkesir Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi öğretim üyesi ve dekanı Prof. Dr. Oktay ARSLAN yönetiminde gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmanın tamamlanmasında engin bilgilerinden faydalandığım, her türlü desteği ile yanımda olan, bilgi ve tecrübelerini kendime örnek aldığım çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Oktay ARSLAN' a en derin minnet ve saygılarımı arz ederim.

Çalışmalarında yardımlarını benden esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Feray KÖÇKAR' a en derin saygılarımı sunarım.

Çalışmalarında yardımlarını gördüğüm ve her konuda desteklerini esirgemeyen sayın hocalarım Semra IŞIK' a, Arş. Gör. Dr. Selma SİNAN' a, Arş. Gör. Nahit GENÇER' e ve Dr. Özen ÖZENSOY' a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Beni bugünlere getiren, her türlü maddi ve manevi desteklerini üzerimde hissettiğim sevgili aileme en içten sevgilerimi sunarım.

Balıkesir, 2006

Serap BEYAZTAŞ

1. GİRİŞ

Günümüz dünyasındaki aşırı nüfus artışı, hızlı kentleşme ve ileri teknoloji sonucu oluşan ve doğal kaynakları tehdit eden çevre kirlenmesi insanlığın en önemli sorunlarından birini oluşturmaktadır. İnsanoğlu açlık tehlikesi ile birlikte yetersiz ve dengesiz beslenme gibi çok önemli sorunlarla karşı karşıya kalmaktadır. Bu sorunların çözümünde şüphesiz ilk akla gelen, tarımsal üretimde yeterli miktarlarda kaliteli ürün elde etmek olmalıdır [1].

Bu amaçla çözüm olarak birçok yöntem uygulanmış olmasına rağmen bitki gelişim düzenleyici (BGD) bileşikler son yıllarda en çok uygulanan yöntemlerden birisi olduğu bilinmektedir.

Dünyada ve ülkemizde yaygın olarak kullanılan bitki gelişim düzenleyicilerin insan sağlığına etkileri konusunda birçok çalışmaya rastlanmış ancak, yapılan çalışmalar genellikle bitki gelişim düzenleyicilerin tarımda nasıl uygulanması gerektiği konusundadır [1]. Son yıllarda bu bileşiklerin bazı enzimler üzerindeki etkileri saptanmıştır. Ancak söz konusu bileşiklerin karbonik anhidraz ve paraoksonaz izoenzimleri üzerindeki etkisi konusunda herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bunun önemli bir eksiklik olduğunu düşünmekteyiz.

BGD bileşiklerinin üzerinde etkisini incelediğimiz ilk enzim paraoksonaz (PON); organofosfat sinir ajanlarını, aromatik karboksilik asit esterlerini ve insektisitleri hidroliz etme yeteneğinde antioksidan özelliğe sahip bir enzimdir. Detoksifikasyon özelliğini ortaya çıkaran bu aktivitenin çevresel faktörlerden kaynaklanan kansere karşı önemli olduğu bilinmektedir. Ayrıca söz konusu enzimin son yıllarda yapılan çalışmalar ile LDL'nin oksidasyonunu önlediği ortaya çıkarılmıştır. Antioksidan özelliği ile ateroskleroza karşı koruyucu görev üstlendiği bilinmektedir [2].

Araştırmamızda kullanılan ikinci enzim olan karbonik anhidraz (CA) (Karbonat hidrolizaz, E.C.4.2.1.1) CO₂'nin dönüşümlü hidrasyon ve dehidrasyon reaksiyonlarını katalizleyen çinko içeren bir enzimdir. CA, birçok farklı dokuda bulunur ve fizyolojik ve biyokimyasal süreçlerin çoğunda gereklidir [3-4]. Bu enzimler, çeşitli doku ve organlarda elektrolit salgılanması, fizyolojik pH kontrolü ve gaz dengesi, akciğer ve dokular arasındaki CO₂/HCO₃⁻ transportu, kemik erimesi,

kireçlenme, tümör oluşumu ve fotosentez gibi farklı süreçlerde anahtar rol oynarlar [5-6].

Araştırmamızda kullanılan BGD'lerden; oksinlerden indol-3-asetik asit (IAA), indol-3-bütirik asit (IBA), giberellinlerden giberellik asit (GA_3) ve sitokininlerden kinetin (Kn) ülkemizde sıklıkla ve maalesef çoğu bölgelerde kontrolsüz olarak kullanılmaktadır. Bu bileşikler bitkilerdeki olumsuzluklarının yanı sıra besin zinciri yolu ile insanlara kadar ulaşması kaçınılmazdır. Bu bileşiklerin yukarıda önemi anlatılan PON ve CA izoenzimleri üzerindeki etkilerin ortaya çıkarılmasının son derece önemli olduğunu düşünmekteyiz.

1.1. Bitki Gelişim Düzenleyiciler

Doğal olarak bitkilerde sentezlenen, büyüme ile buna bağlı diğer fizyolojik faaliyetleri kontrol eden ve meydana geldiği yerden bitkilerin diğer kısımlarına taşınıp oralarda da etkin olabilen, çok az miktarlarda dahi etkisini gösterebilen, organik maddelere "Hormon" adı verilir [7].

Bitki hormonları da kendi aralarında kimyasal yapılarına, bitkilerin büyüme ve gelişmesini etkileme durumuna göre dört farklı grupta toplanır.

- Büyüme teşvik eden hormonlar: Giberellinler, oksinler ve sitokininler.
- Büyüme kısıtlayan hormonlar : Absisik asit, jasmonik asit, etilen.
- Organ yapıcı hormonlar : Florigen ve rizokalin
- Yara hormonları (nekro hormonlar) : Travmatin.

Bitki hormonları yalnızca bol ürün eldesine karşı etkili olması istenmesine rağmen, bu hormonların büyük çoğunluğunun hem kontrol ettikleri bitkilere karşı, hem de insan ve diğer memelilerde, yan etki yapıp yapmayacağı bilinmemekle beraber sıkça kullanılmaktadır [1].

Bitki bünyesinde bulunan doğal bileşiklerin yanında bu bileşiklerin kimyasal yapılarına az veya çok benzeyen sentetik bileşiklerde yapılmış ve hormon etkilerinin olup olmadığı araştırılmıştır. Bunlardan birçoğunun bitkide doğal bulunanlardan çok daha aktif oldukları, yani çok daha az kullanıldıklarında benzer etkiler oluşturdukları

belirlenmiştir. Bitkide mevcut olmadığı halde çok düşük miktarlarda hormon etkisini gösteren bu maddelere **sentetik hormon** adı verilmektedir. Kavram kargaşasını önlemek amacıyla bitkide hormon etkili tüm maddelere **bitki büyüme düzenleyicisi** (BGD)denmektedir [8].

Hormonlar başlangıçta yalnız tohumların çimlenmesinde, meyve, fidan ve çeliklerin köklendirilmesinde kullanılmıştır. Daha sonra tohumdan hasada kadar geçen devrede verim artışı, ürün kalitesinin yükseltilmesi ve bitkilerin hastalık ve zararlılara karşı dayanıklılığın artırılması amacıyla ülkemizde ve tüm dünya ülkelerinde kullanılmaya başlanmıştır. Ancak dikkat edilmesi gereken husus diğer kimyasallarda olduğu gibi BGD'lerin de yazılı olan tavsiyeye uygun olarak kullanılması gerekmektedir [8].

1.1.1. Oksinler

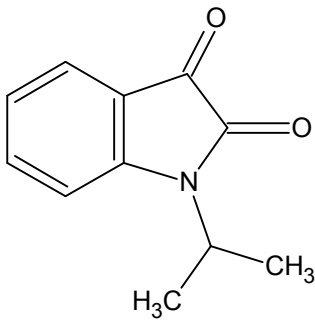
Bitkilerde büyüme ve gelişmeyi etkileyen en önemli gruptur. Asıl doğal oksinler, İndol-3-asetik asit (IAA) diğer iki doğal oksin ise 4- klorindol asetik asit ve fenilasetik asittir [9].

Oksinler bitkilerin büyüme gösteren uç kısımlarında (kök, tomurcuk, yaprak vs.) en yüksek konsantrasyona ulaşmaktadır. Oksinlerin uzamayı hızlandırması, hücre büyüme ve bölünmesini arttırmasının bir sonucudur. Hücre büyümesini arttırması oksinin hücrenin ozmotik sisteminde oluşturduğu bazı değişikliklerden kaynaklanmaktadır. Bu konudaki görüşlere göre oksin;

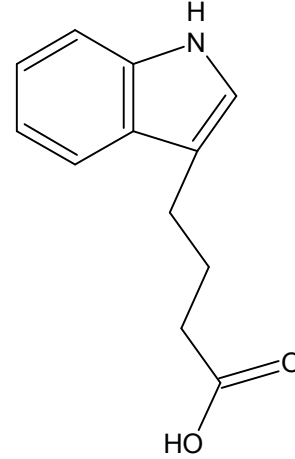
- Hücrede osmozunu arttırması,
- Hücrenin suya karşı geçirgenliğini yükseltmesi,
- Hücre çeperi basıncında düşmeye neden olması,
- Hücre çeperi sentezinde artış oluşturması,

- Hücre çeperi esnekliğini ve genişliğini artıran spesifik RNA ve protein yapısındaki enzimlerin sentezini artırması yollarıyla hücre büyümesinde etkili olmaktadır [10]

IAA (indol-3-asetik asit) (Şekil 1.1.) ,IBA (indol-3-bütirik asit) (Şekil 1.2.) bu grubun içinde yer almaktadır.



Şekil 1.1 İndol -3- asetik asitin molekül şekli



Şekil 1.2. İndol -3- bütirik asitin molekül şekli

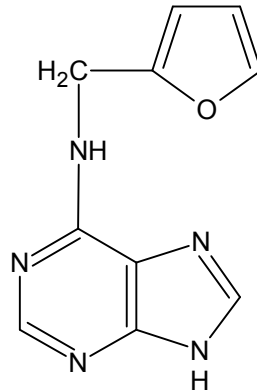
Genel adı Indole-3-bütirik asit olan IBA' nın en önemli kullanım alanı; bitki çeliklerinin köklendirilmesidir. Bu kimyasal ilk defa 1945 yılında Merck Co. tarafından geliştirilmiştir. Çeşitli yüzdeler halinde WP formülasyonları çeşitli firmalar tarafından günümüzde satılmaktadır.

1.1.2. Sitokininler

Hücre bölünmesini arttırarak, büyümenin düzenlenmesinde etkili olan maddeler sitokininlerdir. Yaklaşık bir düzine sitokinin vardır. Ancak bunların yapıları genellikle birbirine benzer. Bitkisel materyalden ilk izole edilen sitokinin

mısırdan elde edilen zeatindir. Bilinen sitokininlerin en yaygın olanları; Zeatin, Kinetin' dir (Şekil 1.3.) [9].

Kinetin bu gurubun en uzun zamandan beri bilinen temsilcisidir [10]. Yaklaşık 40 yıl önce izole edilmiştir [9]. Kinetinin bitkinin kendisi tarafından sentezlenen bir madde olmadığı kabul edilmektedir. Ancak etkisi doğal sitokininlere benzemektedir[10]. Sitokininler bitkilerde yaygın olarak bulunmaktadır. Tüm meristematik dokularda dal ve özellikle kök uçlarında sentezlenirler. Köklerin bitkilerde en önemli biosentez bölgeleri olduğu ve burada oluşturulan sitokininlerin yukarıya taşınıp, gelişen meyve ve tohumlarda biriktiği bilinmektedir. Sitokininlerin sentez merkezlerinden özellikle köklerden diğer bitkisel organlara taşınması bitki gelişmesi açısından önemlidir. Bunların ksilem kanallarıyla taşınmalarının transpasyondan önemli ölçüde etkilendiği, folem taşınmalarının ise oldukça az olduğu bildirilmektedir [10].



Şekil 1.3. Kinetinin molekül şekli

Sitokininlerin hücre bölünmesini hızlandırdığı, nükleik asitleri düzenlediği, uçlarda baskınlık ve dallanmayı teşvik ettiği, tomurcuklanma başlamasını uyardığı, tohumların filizlenme şansını artırdığı, besinlerin taşınmasına ve metabolizmaya etki ettiği çiçeklerin, meyvelerin ve yaprakların yaşlanmasını ve dökülmesini önlediği, köklenmenin başlamasını engellediği tespit edilmiştir [9].

Yukarıda kısmen söylendiği gibi sitokinlerin en önemli özelliklerinden birisi hücre bölünmesini arttırmalarıdır. Ayrıca IAA ve gibberellinlerle birlikte hücre büyümesini de etkiler. Bitki yapraklarında yaşlanmayı geciktirmesinin başlıca sebebi, proteinlerin ve klorofilin parçalanmasını azaltmasıdır. Öte yandan yaprakta nükleazların ve proteazların oluşumunu engelleyerek protein yıkımını önledikleri ve bu yolla yaşlanmayı geciktirdikleri sanılmaktadır [11].

1.1.3. Gibberellin Grubu

İlk defa Japonya'da *Gibberella fujikuroi* mantarlarından izole edilmişlerdir. Bu mantarın çeltikte aşırı boy uzamasına neden olmasıyla fark edilmiştir [10]. Bugün söz konusu mantarlardan ve yüksek bitkilerden elde edilebilmektedir. A₁-A₄, A₇, A₉-A₁₆, A₂₄ ve A₂₅ mantarlardan; A₁-A₉, A₁₃, A₁₇, A₂₃ ve A₂₆-A₂₉ ise yüksek bitkilerden izole edilmiştir. GA₃ ve GA₄₊₇ olgunlaşmamış elma çekirdeklerinden ve üzümünden, GA₃ partenokarpik elmadan, GA₁ ve GA₃ fındık çekirdeklerinden ve GA₃₂ kayısı ve şeftaliden elde edilmiştir. Ayrıca GA₄₅ *Pyrus cummunis* armutlarının çekirdeklerinde bulunmuştur. Bugün bilinen GA serileri 60'a varmaktadır. Bunların 50' den fazlası bitki tohumlarında bulunmuştur [11]. Ancak ticari amaçla en yaygın kullanılan GA₃'tür. Zira diğerlerinin izole edilmeleri zor ve masraflıdır. Bunun yanında gibberellinler çok sayıda genç yapraklardan, genç embriyolardan, meyvelerden ve köklerden elde edilebilirler [11].

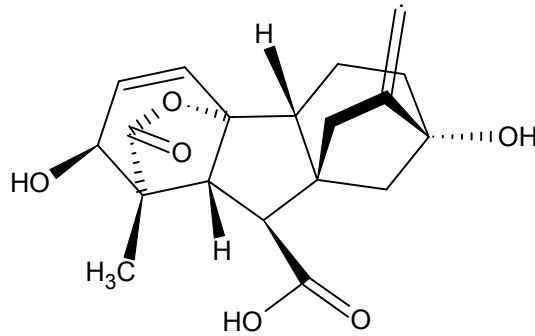
Gibberellinler de oksinler gibi hücre büyüme ve bölünmelerini artırarak boy uzamasını sağlarlar. Gibberellinlerce zengin bitkilerin boğum araları uzundur. Gibberellinler oksinlere göre ışığa daha az duyarlı olup, yüksek dozlardaki uygulamalarda daha az depresif etki gösterirler [10].

Bitkilerde çiçek açmanın gün uzunluğu ve sıcaklık gibi bazı dış faktörlere bağımlı olduğu bilindiği halde bu olayla ilgili bitkideki fizyolojik olaylar tam olarak çözülememiştir. Çiçeklenmenin büyüme düzenleyicilerin yardımı ile idare edilmesi ekonomik yönden önemlidir. Gibberellin uygulamaları zaman zaman çiçeklenme için gerekli uzun gün ya da vernalizasyonun yerini alabildiği ve çiçek oluşumunu artırdığı bilinmektedir.

Gibberellinler de oksinler gibi meyve gelişiminin ilk safhasında etkili olup tüm meyve ile değil, organ gelişimi ile daha iyi bir ilişki gösterirler. Gelişen meyveye asimilat depolama olaylarında oksinler yanında gibberellinlerinde iletim demetleri gelişimini arttırarak meyveye asimilat taşınımını arttırdığı sanılmaktadır [10].

Gibberellinlerin tohumların dinlenme veya uyku halini yani dormansiyi kırarak çimlenmeyi teşvik ettikleri bilinmektedir. Bitkisel organlardaki dormansinin sona ermesi gibberellin miktarındaki artış ile orantılı olmaktadır. Gibberellinlerin oksinler gibi partenokarpik meyve oluşumunu arttırdıkları hatta bazen daha etkin oldukları bilinmektedir [9].

Patates yumrusu gibi vejetatif depo organları oluşumunun Absisik asit (ABA)/GA oranı tarafından kontrol edildiği yüksek oranın yumru oluşumunu arttırıcı, düşük oranın ise kısıtlayıcı yönde etki yaptığı tespit edilmiştir. Bazı araştırmacılarda gibberellin uygulamasının yumru oluşumunu engellediğini, bunun sebebinin ise gibberellinlerin stolon sürgünlerinin boyuna uzamasını arttırması olduğunu söylemektedirler [10].



Şekil 1.4. Gibberelik asitin molekül şekli

1.2. Paraoksonaz Enzimi

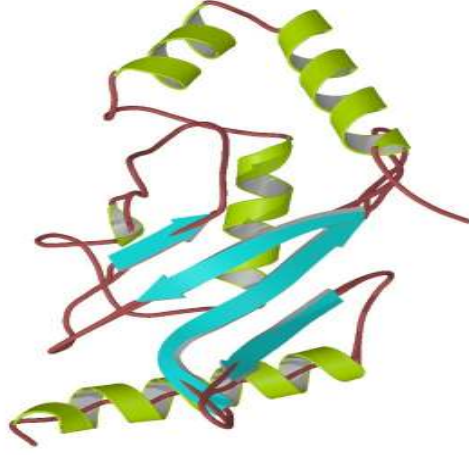
Paraoksonaz enzimi ilk olarak 1953 yılında Aldridge tarafından insan kan serumunda bulunmuştur [12-13]. Paraoksonaz enzimi; arildialkilfosataz ismi ve EC 3.1.8.1. kodu ile fosfo triester hidrolazlar veya organofosfat hidrolazlar grubunda yer almaktadır [14]. 1996 yılında, paraoksonaz aktivitesinden sorumlu genin bir

multigen ailesinin üyesi olduğu tespit edilmiş ve sırasıyla PON1, PON2 ve PON3 olarak isimlendirilmiştir [15]. Çalışmalar daha çok PON1 üzerine yoğunlaşmıştır. PON1'in karaciğerden sentezlendiği daha sonra serumda HDL'ye bağlı olarak bulunduğu tespit edilmiştir [16-17]. Ayrıca karaciğerde, endoplazmik retikulum membranlarının parçacıklarının uçları kapanarak oluşan mikrozomlarda da bulunmaktadır [18-19]. PON3 enzimi de PON1'e benzer şekilde büyük çoğunlukta karaciğerden sentezlenir ve serumda HDL'ye bağlı olarak bulunur. Ayrıca PON3 daha düşük seviyelerde böbrekte sentezlenmektedir ve PON3 geninin mRNA'sı ve proteinine insanlardan farklı olarak sıçanların makrofajlarında rastlanmıştır [20]. PON2 diğer üyelerden farklı olarak plazmada bulunmamaktadır. Ancak beyin, karaciğer, böbrek ve testis gibi pek çok dokuda sentezlenmektedir [21].

Paraoksonaz, aktivitesi ve kararlılığı için Ca^{+2} iyonuna ihtiyacı olan 43-45 kDa molekül ağırlığına sahip bir enzimdir. İzoelektrik noktası 5.1'dir [22-23].

Paraoksonaz, glikolize bir protein olarak saflaştırılmıştır [24-25]. Her molekül total ağırlığın %15,8'ini oluşturan üç karbohidrat zinciri içermektedir [25-26]. PON ailesinin hidrolitik aktivitesi için glikolizasyon önemli değildir [27-28]. Ancak enzimin yapısında bulunan bu karbohidrat molekülleri spesifik olmayan hücre membranlarına bağlanmada veya kararlılığı ve çözünürlüğü arttırmada etkili olabilir [29].

354 aminoasit içeren paraoksonazın yapısında yer alan üç sistein (Cys) rezidüsünden 284'teki serbest iken diğer ikisi arasında (Cys 42-352) tek disülfid bağı bulunur [13,30,31].



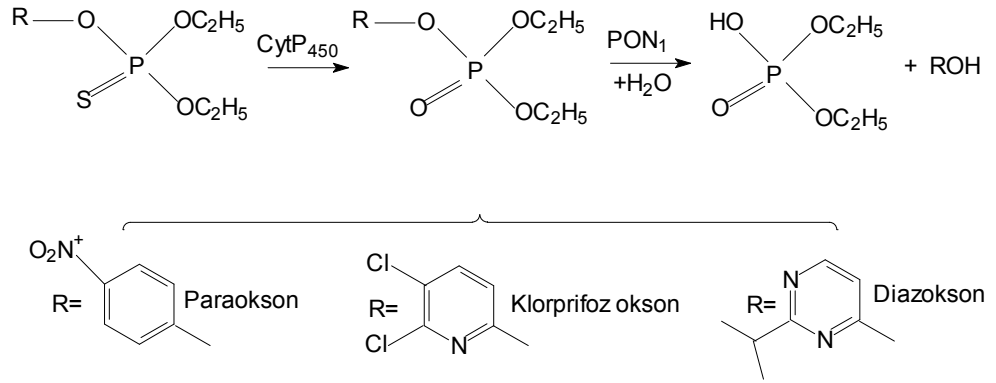
Şekil 1.5. Paraoksonaz enziminin üç boyutlu görünümü [32].

Paraoksonaz enzimi insanlarda karaciğerde sentezlenir. Enzim aktivitesi fetüs karaciğeri/dalağı ve erişkin karaciğerinde görülmüştür. Akciğer, beyin, pankreas ve plasentada bulunduğu yolunda kanıtlar varsa da henüz izole edilememiştir. Hayvanlarda özellikle karaciğer, böbrek, ince bağırsak ve plazmada bulunur [33].

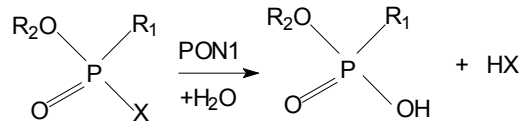
Bu enzimin en iyi bilinen koruyucu fonksiyonu; organofosfat sinir ajanlarını, aromatik karboksilik asit esterlerini ve insektisitleri hidroliz etme yeteneğinde antioksidan özelliğe sahip bir enzimdir. Paraoksonazın substratı olan paraoksonun asetilkolini yıkan kolinesterazların güçlü bir inhibitörü olması son derece önemlidir [33]. Ayrıca son yıllarda yapılan çalışmalar sonucu bu enzimin oksidatif veya peroksidatif aktivitesi ile LDL ve HDL oksidasyonunu önleyerek ateroskleroza karşı koruyucu görev üstlendiği saptanmıştır [34].

1.2.1. Katalizlediği Reaksiyonlar ve Substratları

İnsan serum paraoksonaz, paration, diazinon ve klorpiripos gibi çok sayıda insektisit toksik okson metabolitlerini [35] ve soman ve sarin gibi sinir maddelerini hidroliz edebilir [35-36]. Fenilasetat, tiofenil asetat ve 2-naftil asetat PON1'in aromatik ester substratları arasındadır [35]. Siklik karbonatlar gibi aromatik ve alifatik lakton türleri de PON1 tarafından hidroliz edilir, örneğin; homojenisik asit lakton, dihidro kumarin, γ -butirolakton ve homosistein tiolakton [37-38].

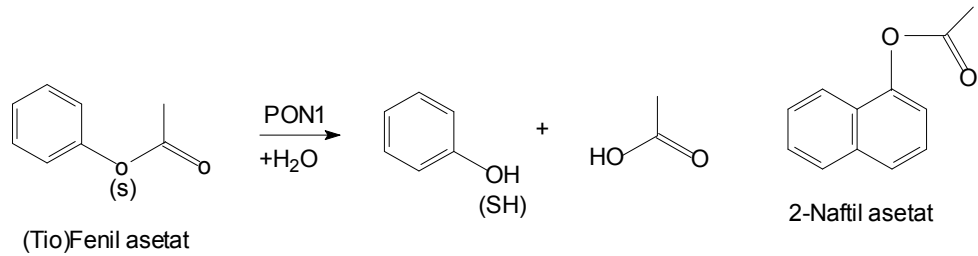


Şekil 1.6. İnektisitlerde yaygın olarak kullanılan okson metabolitlerinin hidrolizi [2]

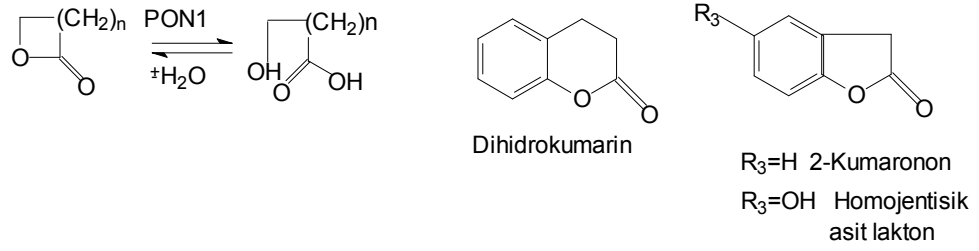


$\text{R}_1 = \text{N}(\text{CH}_3)_2$ $\text{R}_2 = \text{CH}_2\text{CH}_3$ $\text{X} = \text{CN}$ Etil N-dimetilfosforoamidosiyanid (Tabun)
 $\text{R}_1 = \text{CH}_3$ $\text{R}_2 = \text{CH}(\text{CH}_3)_2$ $\text{X} = \text{F}$ İzopropil metilfosfonofluoridat (Sarin)
 $\text{R}_1 = \text{CH}_3$ $\text{R}_2 = \text{CH}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{CH}_3)_3$ $\text{X} = \text{F}$ Pinakolil metilfosfonofluoridat (Soman)

Şekil 1.7. Sinir gazlarının hidrolizi [2]



Şekil 1.8. Aromatik esterlerin hidrolizi [2]



n=1 β -Propriolakton

n=2 γ -Butirolakton

n=3 δ -Valerolakton

n=4 ϵ -Kaprolakton

Şekil 1.9. Lakton hidrolizi [2]

1.2.2. Paraoksonaz Enziminin Hastalıklar ile İlişkisi

Paraoksonaz HDL'ye bağlı olup, kalp damar hastalıkları ile ilişkisinin yanı sıra, pek çok klinik yayınlarda gösterildiği gibi enzimin aktivitesinin diğer hastalıklarla da ilişkili olduğu tespit edilmiştir [39-40-41]. İnsülin bağımlı şeker hastalarında ve yüksek kolesterolü olan hastalarda da serum paraoksonaz aktivitesinde azalma gözlenmiştir [42]. Paraoksonaz aktivitesinin romatizmal kireçlenme ile bir ilişkisi tespit edilmiştir. Kireçlenme görülen romatizma hastalarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında serum paraoksonaz aktivitesinde önemli bir azalma olduğu belirlenmiştir [43]. Yüksek tansiyon ve tip 2 şeker hastaları yapılan başka bir çalışmada, kontrol grubunun paraoksonaz aktivitesi ile hasta grubun enzim aktivitesi arasında önemli bir farklılık gözlenmemiştir [44]. Tip 1 şeker hastalarında da kontrol grubu ile karşılaştırıldığında paraoksonaz enzim aktivitesinde önemli bir farklılık gözlenmemiştir. Ancak aynı çalışmada tip 1 şeker hastalarında HDL seviyesi kontrol grubundan oldukça yüksek bulunmuştur [45].

1.3. Karbonik Anhidraz Enzimi

1.3.1. Fizyolojik Önemi

Karbonik Anhidraz (CA) enzimi genel olarak metabolik CO₂ transportunu yanı sıra birçok dokuda H⁺ ve HCO³⁻ iyonlarının birikiminde de önemli rol oynamaktadır. Bu dokular arasında böbrek, gastrik mukoza ve göz lensi sayılabilir. Bu dokuların dışında histokimyasal yöntemlerle tükrük bezleri, kaslar, beyin, sinir miyelin kılıfı, pankreas, prostat ve endometrium dokularında da CA enzimine rastlanmış ve bunların bazıları saflaştırılarak biyokimyasal özellikleri incelenmiştir. Balıkların solungaç ve salgı organlarında, bazı böcek ve bakterilerde, kabuklu hayvanların kabuk yapımında ve alglerde ve enzimin değişik rolleri olduğu ayrıca ispatlanmıştır[46-47-48-49].

Yeşil bitkiler, fotosentetik hücre kloroplastları vasıtasıyla, gün ışığı varlığında fotosentez yapabilmek için atmosferden karbondioksit kullanılır. Gaz halindeki karbondioksit, bitkinin yapraklarında bikarbonat iyonları halinde taşınır. Hem kara hem de su bitkilerindeki CA enzimi, bikarbonat iyonlarının tekrar karbondioksit dönüşmesini sağlar [50].

CA enziminin, hidrataz aktivitesi ile son derece önemli bir fizyolojik fonksiyonu yerine getirdiği görülmektedir. Ayrıca bazı ester bağlarını parçalaması ve aldehitlerin hidratasyonunu da katalizlemesi, bu enzimin endüstriyel organik sentezlerde kullanımını gündeme getirmiştir. Bu nedenle, CA enziminin saflaştırılmasında daha etkili ve ekonomik yöntemlerin geliştirilmesi için çok yoğun çalışmalar yapılmaktadır [51].

1.3.2. Karbonik Anhidraz İzoenzimleri

İnsanları da içine alan yüksek yapılı omurgalıların çok farklı doku ve hücrelerine yerleşmiş 14 farklı CA izoenzimi tespit edilmiş ve bağlı olduğu proteinlere göre belirlenmiştir. Bu dokuların çoğundan CA enzimi karakterize edilmiş ve fonksiyonları belirlenmeye çalışılmıştır. Bu yolla çeşitli doku ve

organlarda elektrolit salgılanması, CO₂ ve pH dengesinin sağlanması, akciğer ve dokular arasındaki CO₂ /HCO₃⁻ transportu gibi fizyolojik olaylarda rol almalarının yanı sıra patolojik ve fizyolojik işlem ve olaylarda da rol aldıkları açıklanmıştır [52-53].

Temel olarak bu izoenzimler, sitozolik formda (CA-I,CA-II,CA-VII) ve membrana bağlı (CA-IV,CA-XII,CA-XIV) olarak bulunmuştur. CA-VI bir salgı enzimi ve CA-V izoenziminin ise bir mitokondrial enzim olduğu tespit edilmiştir [46-49-54-55].

Eritrosit CA'sının en önemli fonksiyonu, doku kılcallarında metabolizma ürünü olan CO₂ , H₂CO₃ 'e akciğer pulmoner kapilerde ise H₂CO₃'in CO₂'e dönüşmesi reaksiyonunu katalizleyip, solunum olayında yer almasıdır. Böbrek tubullerinde ise aynı reaksiyonlarla Na⁺ ve H₂O geri Emilimini sağlamak için ya CO₂ tranferini ya da H⁺ iyonu birikimini sağlar. Bu dönüşüm reaksiyonları, omurgalıların kan ve hücreler arası sıvılardaki en önemli tampon sisteminin bikarbonat tampon sistemi olması nedeniyle çok önemlidir[50-55-57].

CA-III izoenzimi, iskelet kaslarında oluşan laktik asit/laklat dengesinde, pH değerini ayarlamak gibi çok önemli bir göreve sahiptir. CA-V izoenzimi bazı dokuların mitokondri matrikslerine yerleşmiş olarak bulunur. Karbamoilfosfat sentetaz-I ve piruvat karboksilaz enzimlerine sıralı olarak bikarbonat iyonu sağlanmasından dolayı, glukoneogenez ve ürogenozde rol oynadığı öngörülmektedir. Bu izoenzimin ayrıca lipogenaz olayında da etkili olduğu belirtilmiştir [58].

CA-VI izoenzimi tükürük bezlerinden salgılanan bir enzimdir. İnsan tükürüğünden izole edilmiş olup, tükürüğün pH dengesini sağladığı sanılmaktadır [59-60].

Çizelge 1.1 Karbonik anhidraz izoenzimleri [61]

İZOENZİM...	KATALİK AKTİVİTE...	BULUNDUĞU BÖLGE...
CA I	Düşük	Sitozol
CA II	Yüksek	Sitozol
CA III	Çok düşük	Sitozol
CA IV	Yüksek	Membrana bağlı
CA V	Orta-yüksek	Mitokondri
CA VI	Orta	Tükürükte gizli
CA VII	Yüksek	Sitozol
CA-RP VIII	Akatalitik	Muhtemelen sitozolik
CA IX	Yüksek	Membrana bağlı
CA-RP X	Akatalitik	Bilinmiyor
CA-RP XI	Akatalitik	Membrana bağlı
CA XII	Düşük	Membrana bağlı
CA XIII	Muhtemelen yüksek	Bilinmiyor
CA XIV	Düşük	Membrana bağlı

1.3.3. Karbonik Anhidraz Enziminin Hastalıklar ile İlişkisi

CA enzimi proton ve bikarbonat iyonlarını üretip, pH değerinin düzenlenmesinde ve vücudumuzun farklı bölgelerindeki akışkan dengesinin kurulmasında anahtar rol oynar. Midemiz asit salgılanmasında rol alırken, aynı enzim pankreatik alkalın özsuyu ve doğal tükürüğün üretilmesine yardımcı olur. Böbrek ve gözlerde üretilen bikarbonat iyonları ve protonların taşınması, bu bölgelerdeki hücrelerin su içeriğini etkiler. Bu yüzden karbonik anhidraz izoenzimleri kendi spesifik bölgelerinde farklı fonksiyonlar gösterir ve yoklukları ve inaktiflik durumları, midedeki asit üretiminin azalmasından böbreklerin kaybına kadar uzanan hastalık durumları oluşturabilir[48-51-56-62-62].

hCA-II izoenzimi ile ilgili olarak, CA-II eksikliği sendromu belirlenmiştir. Bunun da kemiklerin kireçlenmesi, böbrek taşı oluşumu ve beyinde kireçlenme ile ilgili olduğu gösterilmiştir. Bu da hCA-II izoenziminin kemik dokusu, böbrek ve beyin organları için ne derece önemli olduğunu ortaya koymaktadır [53-54-64-65].

Kanser, hücre değişiminin ve çoğalmasının kontrolden çıkması ile gelişen bir hastalıktır. Çoğu kanser hücre tipleri kitlelere neden olur ve buna tümör ismi verilir. CA-IX ve CA-XII izoenzimleri tümörlü hücrelerde aktivitelerini gösteren buna bağlı olarak da kanserlerle ilişkili olan izoenzimler olarak tesbit edilmişlerdir [66-67].

1.3.4. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalizlediği Reaksiyonlar

Karbonik anhidraz, CO₂ molekülünün hidrasyonunun yanı sıra, siyanatın karbamik asite ve siyanamide, aldehitin geminal diola hidrasyonu reaksiyonlarını da katalizlemektedir. Karboksilik asit, sülfonik asit ve fosforik asit esterlerinin hidrolizleri de enzim tarafından katalizlenmektedir. Ancak CA enziminin hidrataz aktivitesi dışında, aşağıdaki tablodan da görüldüğü üzere elektrofilik bir merkeze nükleofilik atakları içeren aldehit, piruvat ve alkil piruvatların hidrasyonu, pirüvik asit, sülfonik asit ve fosforik asit esterlerinin hidrolizi gibi reaksiyonları da katalizlediği bilinmektedir. Karbonik anhidrazın esteraz aktivitesini ortaya koyan bu özelliği ile, organizmada fizyolojik bir rolü olup olmadığı henüz bilinmemektedir [68-69-70].

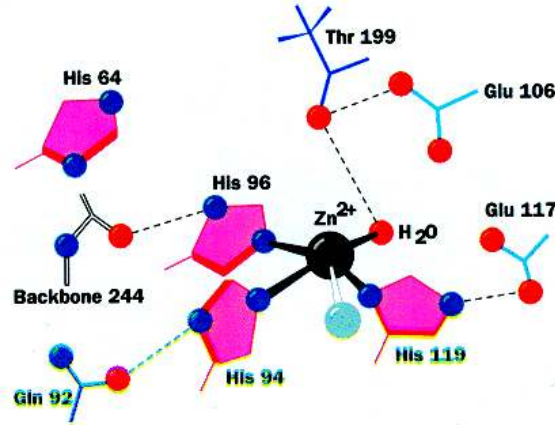
Çizelge 1.2 Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyonlar [61]

(1)	$O=C=O + H_2O \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$
(2)	$O=C=H_2O \rightleftharpoons H_2NCOOH$
(3)	$HN=C=NH + H_2O \rightleftharpoons H_2NCOOH_2$
(4)	$RCHO + H_2O \rightleftharpoons RCH(OH)_2$
(5)	$RCOOAr + H_2O \rightleftharpoons RCOOH + ArOH$
(6)	$RSO_3Ar + H_2O \rightleftharpoons RSO_3H + ArOH$
(7)	$ArOPO_3^{2-} + H_2O \rightleftharpoons HPO_3^{2-} + ArOH$
(8)	$ArF + H_2O \rightleftharpoons HF + ArOH$ (Ar=2,4 Dinitrofenil)
(9)	$PhCH_2OCOCl + H_2O \rightleftharpoons PhCH_2OH + CO_2 + HCl$
(10)	$RSO_2Cl + H_2O \rightleftharpoons RSO_3H + HCl$ (R=Metil, fenil)

1.3.5. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalitik Mekanizması

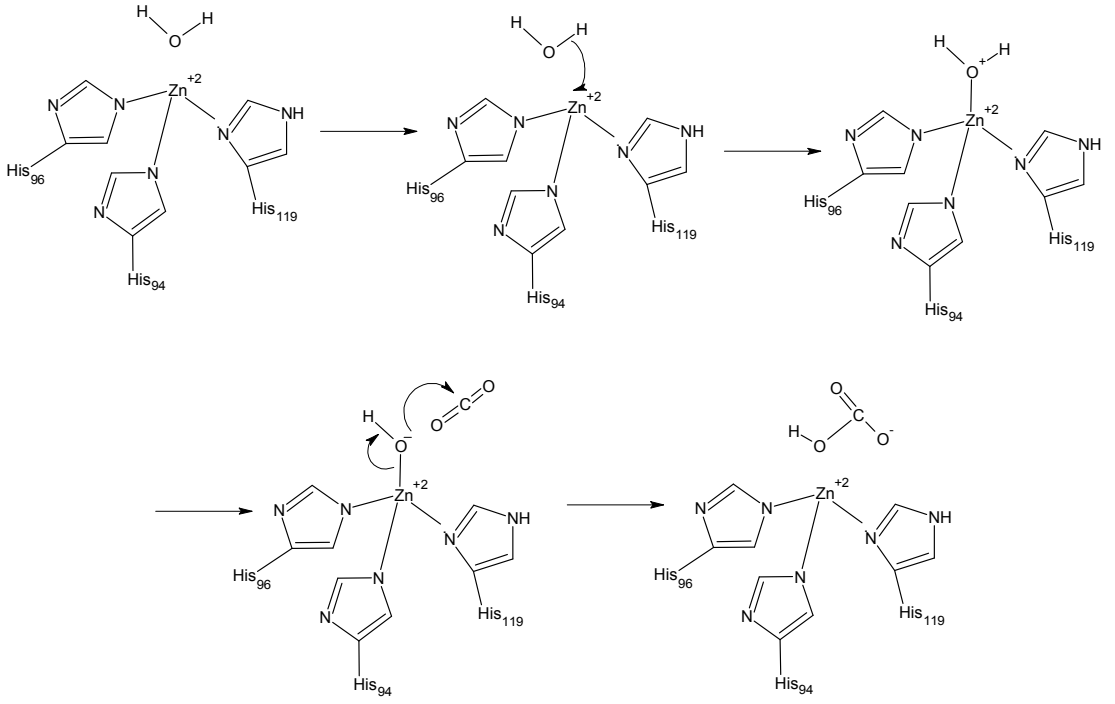
Yıllarca CA enziminin katalitik mekanizmasını aydınlatmayı amaçlayan çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre, CA enziminin metabolizmada son derece önemli görevleri olması, uygun şartlar altında aktivitesini kaybetmeden uzun süre saklanabilmesi ve çözelti ortamında kararlı olması gibi avantajlı özelliklere sahip olduğu anlaşılmıştır. Aktif bölgesinde Zn^{+2} iyonu ve ona bağlı bir hidroksil grubu ihtiva etmektedir. Aktif bölgenin yanındaki amino asitler, proton verici ve proton gradienti oluşturacak şekilde düzenlenmiştir.

CA enziminin reaksiyonları katalizinde Zn^{+2} iyonunun büyük önemi vardır. Yapılan X-Ray kristalografi sonuçları, metal iyonunun bir H_2O veya OH^- iyonu ve üç histidin rezidüsü (His-94, His-96, His-119) tarafından koordine edilen, aktif bölgedeki 15 \AA derinliğindeki bir yarığın tabanında olduğunu göstermektedir [71].



Şekil 1.10. CA Enziminin Aktif Bölgesi (Büyük küre Zn^{+2} iyonunu, etrafındaki küçük küreler de kristal yapıda immobilize olmuş su moleküllerini belirtmektedir.) [72]

Çinko bağlı H_2O , Glu-106 rezidüsünün karboksilat grubuna sırayla köprü oluşturan Thr -109 rezidüsünün hidroksil grubuyla, hidrojen bağı etkileşimleri sonucu tutunmaktadır. Bu etkileşimler, çinko bağlı su molekülünün nükleofilitesini arttırmakta ve molekül nükleofilik atak için uygun bir yerdeki CO_2 molekülüne doğru hareket etmektedir.[46-50]



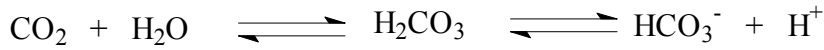
Şekil 1.11. CA enziminin CO₂- hidratasyon reaksiyonunu katalizlediği mekanizma [50]

Aktif bölgedeki Zn⁺² iyonuna, hidroksil grubunun bağlanmasıyla, enzimin aktif durumda bulunan bir formu meydana gelir. Enzimin aktif formu, güçlü nükleofilik yapısıyla CO₂ molekülüne saldırır. Bu reaksiyon sonucunda Zn⁺² iyonuna bağlı durumda bikarbonat iyonu oluşur. Daha sonra, HCO₃⁻ iyonu bir su molekülüyle yer değiştirir ve çözeltiliye geçer. Bunun sonucunda, Zn⁺² iyonuna su molekülü bağlanır ve bu da enzimin asit formuna dönüşmesini sağlar. (Şekil 1.11.) [70-73]

1.3.6. Karbonik Anhidraz Aktivitesi Tayin Yöntemleri

1.3.6.1. CO₂-Hidrataz Aktivitesi

CA enziminin hidrataz aktivitesi, enzimin CO₂ molekülünün hidrasyonundan, HCO₃⁻ iyonunun dehidratasyonundan ve bazı esterlerin hidrolizinden sorumlu olma özelliğinden yararlanılarak belirlenmektedir.



Yukarıdaki reaksiyonda da görüldüğü üzere, ortamda ilk olarak CO₂ gazı açığa çıkmakta veya harcamakta, diğer taraftan da H⁺ konsantrasyonu artmakta veya azalmaktadır. İlk durum kantitatif olarak mamomerik yöntemlerle tespit edilebilse de reaksiyon pH'sının değişken olması, CO₂'in suda sınırlı çözünmesi gibi nedenlerden dolayı bu yöntem geçerli olmamaktadır.

Ortamdaki H⁺ konsantrasyonunun artması veya azalması reaksiyon pH'ını etkileyeceğinden, enzim aktivitesi indikatörle belirlenebilir. Enzim saflaştırma basamaklarında aktivite ölçümleri ,genellikle Wilbur-Anderson yöntemi ile yapılır .Bu yönteme göre pH değerinin 8.2'den 6.3'e düşüşü için geçen süre brom-timol mavisi indikatörü yardımıyla bulunmakta ve enzimin birimi ,enzimsiz CO₂ hidrasyon süresi (t₀) ile enzimli reaksiyon süreleri (t_c)arasındaki farkın (t_c)'ye bölünmesiyle elde edilmektedir.Buna göre;

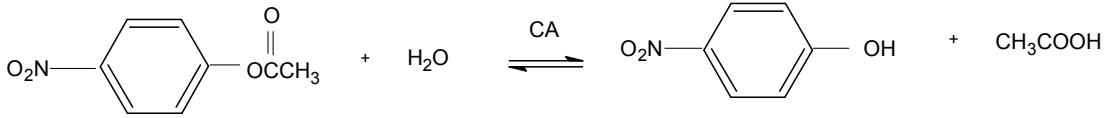
$$\text{Enzim Aktivitesi} = [(t_0) - (t_c)] / (t_c)$$

$$\text{Spesifik aktivite} = [10(t_0 - t_c) / (t_c)] / \text{mg Protein}$$

Formüllerinden hesaplanabilir[74].

1.3.6.2. Esteraz Aktivitesi

Kinetik çalışmalarda CA aktivitesi ölçümleri bu yöntemle belirlenmektedir. Bu yöntemde CA enzimi, substrat olarak kullanılan p-nitrofenil asetatı, p-nitrofenol ve p-nitrofenolata hidroliz eder ve bu da 348 nm dalga boyunda absorpsiyon göstermektedir. Reaksiyon denklemi aşağıdaki gibidir.



348 nm dalga boyu p-nitrofenol ve p-nitrofenolatın aynı absorbansı verdiği noktadır (izobestlik). Asidik özellik gösteren fenol grupları ortamın pH değerine göre- değişen oranda- fenolat ve H⁺ iyonlarına ayrışır. 348 nm dalga boyunda p-nitrofenol ne p-nitrofenolat iyonunun absorbansları aynı anda okunabildiği için, bu durum absorbans ölçümlerini etkilemez. P-nitrofenolün molar ekstraksiyon katsayısı, $\epsilon_{348} = 5,4 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ dir. Bu dalga boyunda p-nitrofenil asetatın molar ekstraksiyon katsayısı $\epsilon_{348} = 0,4 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ve çok az bir absorpsiyon vardır [50].

1.3.7. Karbonik Anhidraz Enziminin Afinite Kromatografisi İle Saflaştırılması

Karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması için en çok uygulanan yöntem afinite kromatografisidir. Bu yöntemle hedef protein kısa zamanda ve tek basamakta yüksek verimle saflaştırılarak elde edilmektedir [75]. CA enziminin afinite kromatografisi ilk defa 1972 yılında Falkbring ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu tekniğe yönelik çalışmalar 1974 yılında Whitney, 1975 yılında Wistrand ve arkadaşları, aynı yıl Osborne ve Tashian, 1976 yılında Chanpagnol ve aynı yılı takiben Johensen, 1977 yılında Khalifah ve arkadaşları, 1980 yılında Wistrand ve aynı yılda Keha'nın araştırmalarını takiben 1987 yılında Kaul ve Mattiasson, 1995 yılında Arslan ve arkadaşları, 2000 yılında ise Demir ve

arkadaşlarının araştırmaları ile devam etmiştir [51-70-75]. Chanpagnol dışında diğer araştırmacılar ligand olarak benzen sũlfonamid tũrevleri, Chanpagnol ise bir heteroaromatik sũlfonamid bileşiği olan asetozolamidi kullanmıştır. Bitki CA enzimi dışında ligand olarak benzen sũlfonamid tũrevleri kullanılmıştır. Bunu nedeni, bitki CA enziminin benzen sũlfonamidler tarafından çok az inhibe edilmesiyle açıklanmaktadır. Bu olayı uzantı koluna sahip afinite jellerinin yũksek bir kapasiteye sahip oldukları ile açıklanmaktadır. Ayrıca matrikse takılan uzantı kollarının farklılığı da kolon verimi ũzerindeki değişik sonuçları beraberinde getirmektedir [50].

2. MATERYAL ve YÖNTEMLER

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bu çalışma için kullanılan; Sepharose 4-B afinite jeli, sülfamid, L-trozin, p-nitro fenil asetat, diyaliz torbaları, akrilamid, N, N, N',N'- tetra metil etilendiamin(TEMED),N,N'- metilen bisakrilamid, β - merkaptoetanol, SDS, glisin, coomassie brillant blue G-250, coomassie brillant blue R-250, fenol red boyar maddesi ve brom-timol mavisini Sigma Chemical Comp.'den; sodyum hidroksit, sodyum karbonat , trihidroksi metil aminometan(Tris), sodyum sitrat dihidrat, sitrik asit, sodyum klorür, sodyum sülfat, sodyum perklorat, sodyum asetat, hidroklorik asit, asetik asit, sülfürik asit, fosforik asit, sodyum azotür, sodyum nitrat, sodyum tiyosiyanat ve sodyum siyanür Merck A.G'den; sodyum monohidrojen fosfat, sodyum dihidrojen fosfat, metanol, etanol, amonyum persülfat ve dekstrozu Riel de Haen A.G'den; karbondioksit gazı piyasadan sağlanmıştır.

2.1.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Bu çalışmada aşağıda isimlendirilen alet ve cihazlardan yararlanılmıştır.

Buz Makinesi	: Fiocetti Scotsman otomatik buz makinesi
Çalkalayıcı	: Biolab 1575-2B çalkalayıcı
Elektrofez Tankı	: Hofer, HSI
Etüv	: Elektromag
Kromatografi Kolonu	: Pharmacia
Kronometre	: Hanhard, Elektronisch Digital Stoppuhr
Magnetik Karıştırıcı-Isıtıcı	: ARE Magnetic, heating stirrer IKA Combimag RCO
Masa Santrifüjü	: Hettich Zentrifugen EBA 12 R
Otomatik Pipetler	: Eppendorf, Medisis
Peristaltik Pompa	: Pharmacia (Chromatograph Attd. S1211)
pH-metre	: Orion-model 920 A
Soğutmalı Santrifüj	: Sigma Laborzentrifügen 3K 15/10706 / 10707
UV-Spektrofotometresi	: CARY 1E, UV- Visible Spectrophotometer- VARIAN

Vorteks : Fisons Whirli Mixer

Hassas Terazi : Libror, AEG-220 (Shimadzu)

Jel Görüntüleme Sistemi : Gel Doc-H Imaging System (UVP)

2.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

Çalışmanın deneysel kısımlarında kullanılmak üzere aşağıda isimlendirilmiş çözeltiler hazırlanmıştır.

1. Sepharose 4B Jel Sentezinde Kullanılan Yıkama Tamponu :0.2 M NaHCO₃ (pH=8.8)

16.8 g (0.02 mol) NaHCO₃ 950 mL suda çözülür. 1M NaOH ile pH=8.8'e ayarlanarak toplam hacmi 1L'ye tamamlanır.

2. Sepharose 4-B Jel Sentezinde Kullanılan Saklama Tamponu; 0,1 M NaHCO₃(pH=10.0)

8.4 g (0.01) NaHCO₃ 950 mL distile suda çözülür. 1 M NaOH ile pH=10'a ayarlanarak toplam hacim 1L'ye tamamlanır.

3 .Afinite Jeli Dengeleme Tamponu; 25 mM Tris – HCL / 22 mM Na₂SO₄ (pH=8,7)

14,20 g (22 mmol) Na₂SO₄ ve 3,0275 g (25 mmol) tris 950mL destile suda çözülür . 1M HCL ile pH=8,7'ye ayarlanarak toplam hacim 1L'ye tamamlanır.

4.(Hemolizat Tatbikinden Sonra) Afinite Jeli Yıkama Tamponu; 25mM Tris-HCL / 22mM Na₂SO₄ (pH=8,7)

3,124 g (22 mmol) Na₂SO₄ ve 3,0275 g (25mmol) tris 950mL destile suda çözülür. 1 M HCl ile pH=8,7'ye ayarlanarak toplam hacim 1 L'ye tamamlanır.

5. hCA Elüsyon Tamponu ;

hCA-I izoenziminin elüsyonu için; 1 M NaCl / 22 mM Na₂HPO₄ (pH=6,3), 3,55 g (25 mmol) Na₂HPO₄ ve 29,25 g (0,5 mol) NaCl alınıp, pH 6,3'e getirildikten sonra toplam hacim 500 mL'ye destile su ile tamamlandı. hCA-II için ise 0.1 M

NaCH₃COO / 0.5 M NaClO₄ (pH 5.6), 15,31 g (0,075 mol) NaClO₄ ve 3,4 g (0,2 mol) NaCH₃COO, 200 mL destile su içinde çözüldü. 1 N HCl ile pH'sı 5,6'ya getirildikten sonra, toplam hacim destile su ile 250 mL'ye tamamlandı.

6. CO₂- Hidrataz Aktivite Tamponu; 0,15 M Na₂CO₃ / 0,10 M NaHCO₃ (pH = 10,0)

15,9 g (0,15 mol) Na₂CO₃ ve 8,4 g (0,1 mol) NaHCO₃ 1 L destile suda çözümlenerek çözelti hazırlanır.

7. CO₂- Hidrataz Aktivitesi Tamponu;

0,01256 g fenol-red ve 0,2184 g NaHCO₃ 1 L destile suda çözümlenerek hazırlanır.

8. CO₂-Hidrataz Aktivitesi CO₂ çözeltisi;

0 °C'de yarım saat süreyle destile su içerisinde CO₂ geçirilerek hazırlanır.

10. Hidrofobik jelin sentezinde kullanılan tamponlar

0.1 M NaHCO₃ tamponu (pH 10.0); 8.401 g (0.1 mol) NaHCO₃ 950 ml destile suda çözümlenerek, 1N NaOH ile pH'sı 10.0'a getirildi ve son hacim 1L'ye tamamlandı.

0.2 M NaHCO₃ tamponu (pH 8.8); 8.401 g (0.1 mol) NaHCO₃ 450 ml destile suda çözümlenerek, 1N NaOH ile pH'ı 8.8'e getirildi ve son hacim destile su ile 500 ml'ye tamamlandı.

0.01 M Na₂HPO₄ tamponu (pH 6.0); 1.42 g (0.01 mol) Na₂HPO₄ 950 ml destile suda çözümlenerek, 1N NaOH ile pH'sı 6.0'a getirildi ve son hacim destile su ile 1L'ye tamamlandı.

11. Hidrofobik jelin dengelenmesi için kullanılan tampon;

1 M (NH₄)₂SO₄ içeren, 0.1 M Na₂HPO₄ tamponu (pH 8.0); 14.2 g(0.1 mol) Na₂HPO₄ ve 132.14 g (1 mol) (NH₄)₂SO₄ 950 ml destile suda çözümlenerek, 1N HCl ile pH'sı 8.0'e getirildi ve son hacim destile su ile 1L'ye tamamlandı.

12. Hidrofobik jele bağlanmış PON1 enziminin elüsyonu için kullanılan çözelti;

1M (NH₄)₂SO₄ içeren, 0.1 M Na₂HPO₄ tamponu (pH 8.0) ve 0.1 M Na₂HPO₄ tamponu (pH 8.0) ile gradient mikser kullanılarak tuz gradienti oluşturuldu; 14.2 g (0.1 mol) Na₂HPO₄ ve 132.14 g (1 mol) (NH₄)₂SO₄ 950 ml destile suda çözülerek, 1N HCl ile pH'sı 8.0'e getirildi ve son hacim destile su ile 1L'ye tamamlandı. 14.2 g (0.1 mol) Na₂HPO₄ 950 ml destile suda çözülerek, 1N HCl ile pH'sı 8.0'e getirildi ve son hacim destile su ile 1L'ye tamamlandı.

13. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda oluşan çökeleğin alındığı tampon;

0.1 M Tris-Baz tamponu (pH 8.0); 1.211 g (0.01 mol) Tris-Baz 95 ml destile suda çözülerek, 1N HCl ile pH'ı 8.0'a getirildi ve son hacim destile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

14. Substrat çözeltisi:

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

15. Paraoksonaz aktivite ölçümünde kullanılan bazal aktivite tamponu;

2 mM CaCl₂ içeren 100 mM Tris-HCl, pH=8; 3,0285 g (25mmol) Tris, 200 ml destile suda çözüldü. 1 N HCl ile pH'ı 8.0'e getirildi. 0,0555 g (0,5 mmol) CaCl₂ katılarak son hacim 250 ml'ye tamamlandı.

16. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan numune tamponu;

0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	2.5 ml
% 10'luk SDS	4.0 ml
Gliserol	2.0 ml

β -merkptoetanol	1.0 ml
Bromfenol mavisi	0.01 g
Destile su	0.5 ml

17. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan tank tamponu;

Tris-HCl	3 g
Glisin	14.4 g
SDS	1.0 g

Destile su ile çözeltilinin son hacmi 1 L'ye tamamlanır

18. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan ayırma ve yığma jellerinin hazırlanışı;

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

19. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renklendirme çözeltisi;

0.66 g Coomassie brilliant blue G-250, 120 ml metanolde çözüldü. Bu çözeltiliye 24 ml saf asetik asit ve 120 ml destile su ilave edildi.

20. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renk açma çözeltisi;

% 7.5 asetik asit, % 5 metanol ve % 87.5 ml destile su içermektedir. Bu amaçla 75 ml asetik asit ve 50 ml metanol, 875 ml saf su ile karıştırıldı.

21. SDS-PAGE Elektroforezi:Numune Tamponu

0.5 M Tris-HCl (pH=6.8)	2,5 mL
%10'luk SDS	4.0 mL
Gliserol	2.0 mL
β -merkpto etanol	1.0 mL
Brom-timol mavisi	0.01 mL
Destile su	0.5 mL

Çizelge 2.1. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının miktarları.

	Ayırma Jeli	Yığıma Jeli
	%10	%3
<u>Akril amid/Bis</u>		
Akril amid 15 g	16.65 mL	2.6 mL
Bis 0,4 g		
Alınarak son hacim destile su ile 50 mL'ye tamamlanır.		
Destile su	20.1 mL	12.2 mL
<u>1.5 M tris-HCL (pH 8.8)</u>		
Tris-HCl 11.82 g	12.5 mL	—
Alınarak pH 8.8 oluncaya kadar 0.1 M NaOH ilave edilerek son hacim destile su ile 50 mL'ye tamamlanır.		
<u>0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)</u>		
Tris-HCl 3.94 g	—	5mL
Alınarak pH 6.8 oluncaya kadar 0.1 M NaOH ilave edilerek son hacim destile su ile 50 mL'ye tamamlanır.		
<u>% 10 'luk SDS</u>		
SDS 1g	0.5µL	200µL
Alınarak son hacim destile su ile 10 mL'ye tamamlanır.		
TEMED	25 µL	20µL
<u>%10'luk amonyum persulfat</u>		
Amonyum persulfat 1g	750µL	400µL
Alınarak son hacim destile su ile 10 mL'ye tamamlanır.		

2.2. YÖNTEMLER

2.2.1. Afinite Jelinin Hazırlanması

Afinite jeli, Sepharose 4B katı destek materyali üzerinde hazırlanmıştır. Sepharose 4B'nin serbest -OH grupları literatürde daha çok CNBr ile aktifleştirilmiştir. Bu çalışmada da aynı yöntem kullanılarak Sepharose 4B afinite jelinin CNBr ile aktifleştirilmesinden (Şekil 2.1.) sonra, tirozin kovalent olarak bağlandı (Şekil 2.2.) . Daha sonra sülfonamid diazolanarak L-tirozine kenetlendirildi. Burada afinite jelinin; uzantı kolunu L-tirozin, enzimi spesifikolarak bağlayan kısmını da sülfonilamid oluşturur. Sülfonilamid karbonik anhidraz enziminin spesifik bir inhibitörüdür. Afinite jelinin yapısına girerek CA enziminin yüksek oranda saflaştırılmasında başarı ile kullanılmıştır.

Afinite jeli aşağıda anlatılan prosedüre göre hazırlanmıştır.

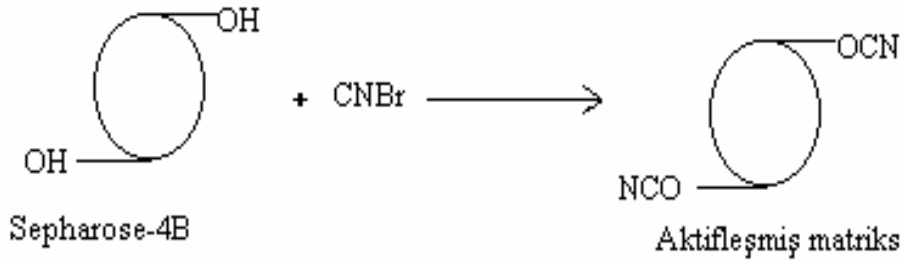
2.2.1.1. Sepharose 4B'nin Aktifleştirilmesi ve L-Tirozinin kolona eklenmesi :

20 mL kadar Sepharose 4B jeli destile su ile iyice yıkanarak dekante edildi. Eşit hacimdeki destile su ile birleştirilerek bir süspansiyon elde edildi. Karıştırılmakta olan süspansiyona 4 g toz haline getirilmiş CNBr katıldı. pH-metre kullanılarak süspansiyonun pH'sı 4 M NaOH ile hemen 11 değerine çıkarılarak reaksiyon bu pH değerinde sabit tutuldu. Reaksiyona pH değişmeyinceye kadar devam edildi (10-15 dakika). Çok miktarda buz süspansiyona katıldıve karışım bir buncher hunisine nakledildi. Daha sonra 250 mL soğuk 0,1 M NaHCO₃ tampon çözeltisi (pH=10) ile yıkandı ve bir behere aktarıldı. Aynı tamponun 20 mL'sinde 8 mg tirozin çözülmüş soğuk çözelti behere ilave edilerek yavaşça karıştırılan süspansiyonda, bağlanma derecesini öğrenmek için, her 15 dakika içinde jel bulunmayan 0,2 mL örnek alındı ve 1 M NaOH çözeltisi ile 20 mL'ye tamamlanarak 294 nm dalga boyunda absorbansı belirlendi. İşleme absorbans değerinde önemli bir değişme olmayıncaya kadar devam edildi. Bir süre (bağlanma süresi) yaklaşık 90 dakika sürdü. Bundan

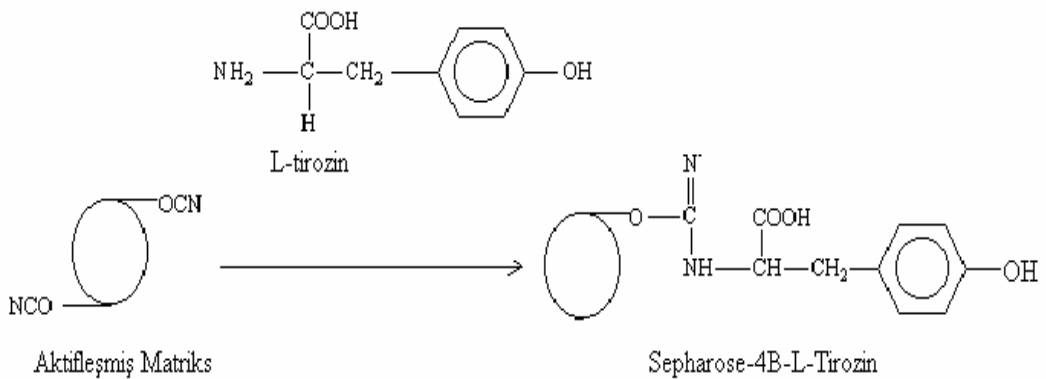
sonra süspansiyon, 4°C’de 16 saat süresince bekletildi. Bu sürecin sonunda jel, yıkama suyu 280 nm dalga boyunda absorbanans vermeyinceye kadar bol su ile yıkandı. Böylece reaksiyona girmeyen tirozin tamamen ortamdan uzaklaştırılmış oldu. Yıkama 100 mL 0,2 M NaHCO₃ tamponu (pH=8,8) ile tekrarlandı. Tirozin takılı jel aynı tamponun 40 mL’si içine alındı.

2.2.1.2. Sülfonamidin Kenetlenmesi

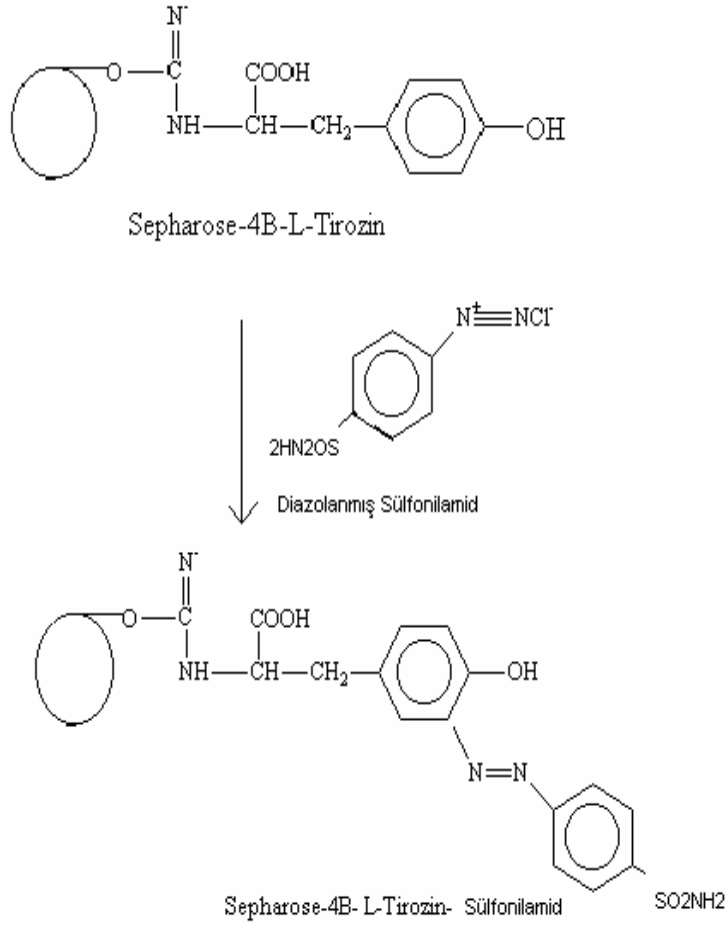
25 mg sülfonilamid, 0 °C civarında 10 mL 1 M HCl içerisinde çözüldü. 75 mg NaNO₂ ihtiva eden 0 °C’deki 5 mL çözelti, sülfonilamid çözeltisine damla damla katıldı. 10 dakika reaksiyondan sonra diazolanmış olarak bulunan sülfonilamid 40 mL Sepharose 4B-L-Tirozin süspansiyonuna ilave edildi. pH=9,5 değerine çıkarılarak sabit tutuldu ve 3 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Daha sonra 1 L destile su ve 200 mL 0,05 M Tris-SO₄ (pH=7,5) tamponu ile yıkandı ve aynı tampon içerisinde saklandı [50-76-77].



Şekil 2.1. Sepharose 4B’nin aktifleştirilmesi [2]



Şekil 2.2. L-tirozinin Bağlanması [2]



Şekil 2.3. Sulfonamid Bileşiğinin Bağlanması

2.2.2. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile Paraoksonaz Enziminin Saflaştırılması

2.2.2.1. Sepharose 4B'nin aktifleştirilmesi

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

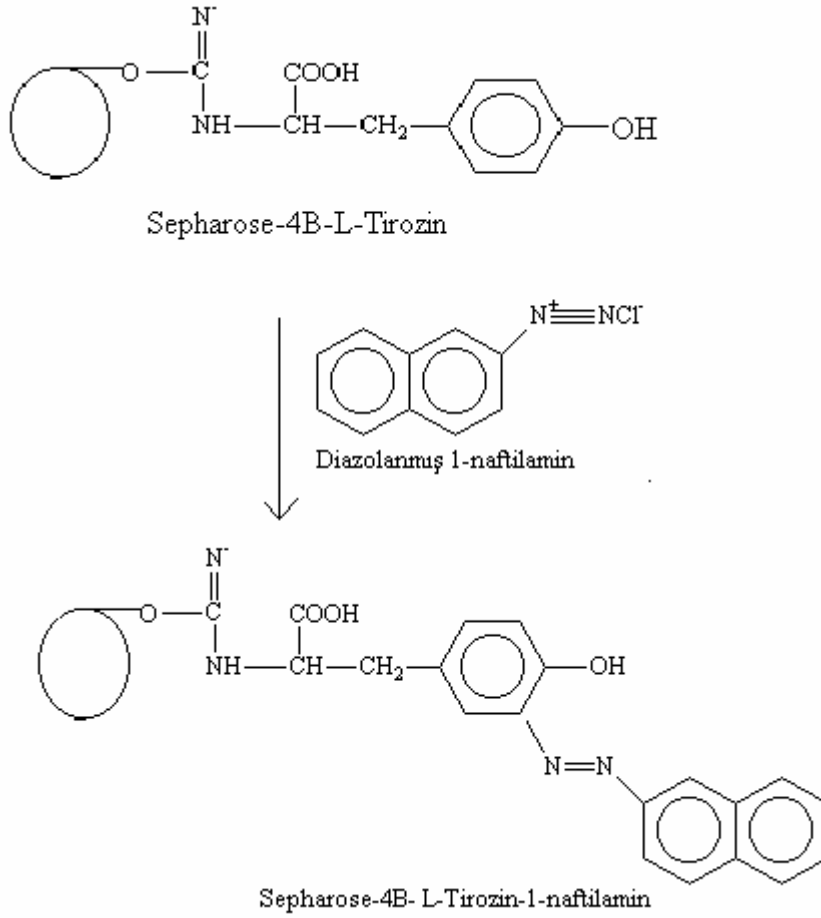
hemen 11'e çıkarıldı ve reaksiyon bu pH'da muhafaza edildi. Reaksiyona pH değışmeye kadar devam edildi. (10-15dk) Çok miktarda buz süspansiyona katıldı ve karışım bir buhner hunisine nakledildi. Daha sonra 250 mL soğuk 0.1 M NaHCO₃ tamponu (pH 10.00) ile yıkandı [2].

2. 2.2.2. L-tirozinin Bağlanması

CNBr ile aktifleştirilmiş matriks üzerine, 20mL'sinde 15mg tirozin içeren 0.1M NaHCO₃ tamponunun (pH 10.00) soğuk çözeltisi ilave edilerek 90 dk karıştırıldı. Bundan sonra süspansiyon 16 saat 4°C'de bekletildi. Bu sürenin bitiminde yıkama suyu 280 nm'de absorbans vermeyinceye kadar bol su ile yıkandı. Böylece reaksiyona girmeyen tirozin tamamen uzaklaştırılmış oldu. Yıkama 100 mL 0.2 M NaHCO₃ tamponu (pH: 8.8) ile tekrarlandı. Tirozinle modifiye sepharose-4B aynı tamponun 40mL'si içine alındı [2].

2.2.2.3. 1-Naftilamin Bileşğinin Bağlanması

25mg 1-naftilamin 0 °C civarında 10mL 1M HCl içerisinde çözüldü. 75mg NaNO₂ ihtiva eden 0 °C'deki 5mL çözelti, 1-Naftilamin çözeltisine damla damla katıldı. (1-Naftilamin çözeltisi hazırlanırken etanol ilave ettik ve ısıttık) 10 dk reaksiyondan sonra diazolanmış bulunan 1-Naftilamin, 40mL Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonuna ilave edildi. pH: 9.5'a çıkarılarak sabit tutuldu ve 3 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Daha sonra 1L saf su ve ardından 200mL 0.01M Na₂HPO₄ (pH: 6.0) tamponu ile yıkandı ve aynı tamponda muhafaza edildi [2].



Şekil 2.4. 1-Naftilamin Bileşiğinin Bağlanması [2]

2.2.3. Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin (hCA I ve hCA II) Saflaştırılması

2.2.3.1. Kan Numunelerinin Alınması ve Hemolizatın Hazırlanması

Deneyler için antikoagülanlı tüplere sağlıklı insanlardan yaklaşık 20 mL kan alınmış ve kanlar hemen çalışılmıştır.

İnsan kanı, eritrositlerin ayrılması amacıyla, 1,5 mL'lik ependorflara konuldu ve 10 dakika boyunca 5000 rpm'de santrifüj edildi. Serum ve eritrosit tabakaları ayrıldı. Altta kalan eritrositler % 0,9'luk NaCl çözeltisi ile 2 defa yıkandı üstte kalan kısımlar atıldı. Bu işlemler sonucunda yaklaşık 5 ml eritrosit elde edildi. Elde edilen eritrositler, kendi hacimlerinin 1,5 katı soğuk destile su ile karıştırıldı ve hemoliz olayının tamamlanması için 0 °C sıcaklıkta karıştırıldı. Elde edilen hemolizat, hücre

zarlarının ayrılması için 4 °C sıcaklıkta 15000 rpm'de santrifüj edildi. İşlem sonrasında tüplerdeki süpernatant alınarak dibe çökmüş olan hücre zarları atıldı. Hemolizatın pH değeri, afinite kolonuna tatbik edilebilmesi için, katı Tris ile 8,7 değerine ayarlandı.

2.2.3.2. Hemolizatın Afinite Kolonuna Tatbiki ve Enziminin Elüsyonu

Hazırlanan afinite jeli 1.8 cm ×12 cm boyutundaki bir kolona paketlenerek 25 mM Tris-HCL /0.1 M Na₂ SO₄ (pH=7.0) tampon çözeltisi ile dengelendi. Hemolizat kolona tatbik edildikten sonra yıkama tamponu (25 mM Tris-HCL/22 mM Na₂ SO₄) (pH=7.0) ile yıkandı. Böylece CA enziminin büyük bir kısmı kolona tutunmuş ve istenmeyen safsızlıklar ortamdaki uzaklaştırılmıştır.

hCA-I ve hCA-II izoenzimleri direkt hemolizattan saflaştırılmıştır. Bu amaçla hCA-I izoenziminin elüsyonu için; 0,1 M NaCH₃COO / 0,5 M NaClO₄ (pH=5,6), 1 M NaCl / 22 mM Na₂HPO₄ (pH=6,3), hCA-II için ise 0.1 M NaCH₃COO / 0.5 M NaClO₄ (pH 5.6) elüsyon tamponları kullanılarak 5'er mL fraksiyonlar halinde tüplere alınmıştır. Elüsyon işlemi sırasında peristaltik pompanın akış hızı 20 mL /saat olarak ayarlanmıştır. Her bir eluat için,280 nm dalga boyunda kalitatif protein tayini ve CO₂.hidrataz aktivitesi tayini yapıldı [70].

2.2.3.3. Karbonik Anhidraz Aktivite Tayini (CO₂-Hidrataz Aktivitesi)

Karbonik anhidraz enziminin aktivite ölçümleri esnasında Maren ve arkadaşlarının geliştirmiş oldukları yöntem kullanıldı. Bu yöntem, CO₂'in hidrasyonu sonucu açığa çıkan H⁺ sebebiyle pH değerinin 10,0'dan 7,4'e düşmesi için geçen sürenin ölçülmesi prensibindedir. Burada indikatör olarak, pH=7,4'de renk değiştiren fenol kırmızısı kullanıldı. Tampon olarak da pH değeri 10,0 olan karbonat tamponundan yararlanıldı.

Deney prosedürü şu şekilde gerçekleştirildi; reaksiyon tüpüne önce 2 ml indikatör ve 1,5 ml doymuş CO₂ çözeltileri konuldu. Bu karışımın üzerine, saflaştırılan enzimden 0,1 ml ilave edildikten hemen sonra aynı anda 0,4 ml tampon katılarak kırmızı rengin sarıya dönmesi için geçen süre kronometre ile belirlendi (tc). Aynı işlemler, her numunenin çalışılmasından önce enzim çözeltisi yerine 0,1 ml

destile su konularak yapıldı (to). Bu yöntemeye göre, karbonik anhidraz (CA) aktivitesi için bir enzim ünitesi (EU), enzimsiz olarak meydana gelen CO₂ hidrasyonu süresini yarıya indiren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır. Buna göre;

$$EU = (t_o - t_c) / t_c$$

formülüne göre, enzim ünitesi hesaplandı.

2.2.4. Paraoksonaz Enziminin Saflaştırılması

2.2.4.1. Amonyum sülfat Çöktürme Aralığının Belirlenmesi

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

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

V : Serum hacmi

S₁ : 1'in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğu

S₂ : 1'in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğu

Paraoksonaz enzimini saflaştırmak için ilk önce %60 doygunluğa getirildi ve 20 dakika boyunca 4 °C'de 20 dakika boyunca 10000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant kısmı alındı ve çöken kısım atıldı. Süpernatant %80 doygunluğa getirildi 1 saat boyunca 10000 rpm'de 4 °C'de santrifüj edildi. Çöken kısım alındı [2]

2.2.4.2. Paraoksonaz Enziminin Aktivite Tayini

Paraoksonaz enziminin aktivitesi spektrofotometrik olarak tayin edildi. Aktivite ölçümü için 0.05 ml enzim çözeltisi (serum) alınıp daha önceden hazırlanmış olan 1ml tampon (100mM Tris-Base pH:8.00) + substrat (2 mM paraoxon) + koenzim (2 mM CaCl₂) çözeltisine çabuk bir şekilde eklendikte sonra 412 nm’de 1 dakikadaki 37 °C’de absorbansta meydana gelen değişme okundu. Bu şekilde paraoxonun p-nitrofenole enzimatik dönüşüm hızı tespit edildi. Aynı işlem enzim olmadan tekrarlanarak aradaki fark enzim aktivitesi olarak belirlendi. 1 ünite Paraoksonaz dakikada meydana gelen p-nitrofenolün mmol’ü olarak tayin edildi.

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

Paraoksonaz enzimi hidrofobik etkileşim kromatografisi ile hCA izoenzimleri afinite kromatografisi ile saflaştırılmasından sonra iki farklı akrilamid konsantrasyonunda; yığma jeli % 3, ayırma jeli % 10 konsantrasyonlarında olacak şekilde kesikli sodyum dodesil sülfat jel elektrofrez (SDS-PAGE) Laemelli [78] tarafından belirtilen yöntemle yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi [70].

Bu amaçla elektrofrez cam plakaları önce su, sonra etil alkol ile iyice temizlendi. Daha sonra plakalar arasına plastik aralık oluşturucusu yerleştirilerek iki cam plaka birbiri üzerine konuldu ve elektrofrezin dökme aparatına sabitlendi. Çizelge 2.1’de belirtildiği şekilde hazırlanan ayırma jeli plakalar arasına üstten 2-3 cm kalana kadar enjektörle döküldü. Jel içerisinde hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. Jel yüzeyinin düzgün olması için n-bütanol ile ince bir tabaka oluşturuldu. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra (1 gece) üst yüzeydeki n-bütanol döküldü. Daha sonra cam plakaların arasına tamamen doluncaya kadar polimerleşmiş ayırma jelinin üzerine yığma jeli ilave edildi. Jel kasetindeki yükleme jelinin üzerine tarak dikkatlice yerleştirilerek jelin polimerleşmesi beklendi (30 dakika). Yükleme jeli polimerleştikten sonra tarak kuyucukların arasının bozulmamasına dikkat

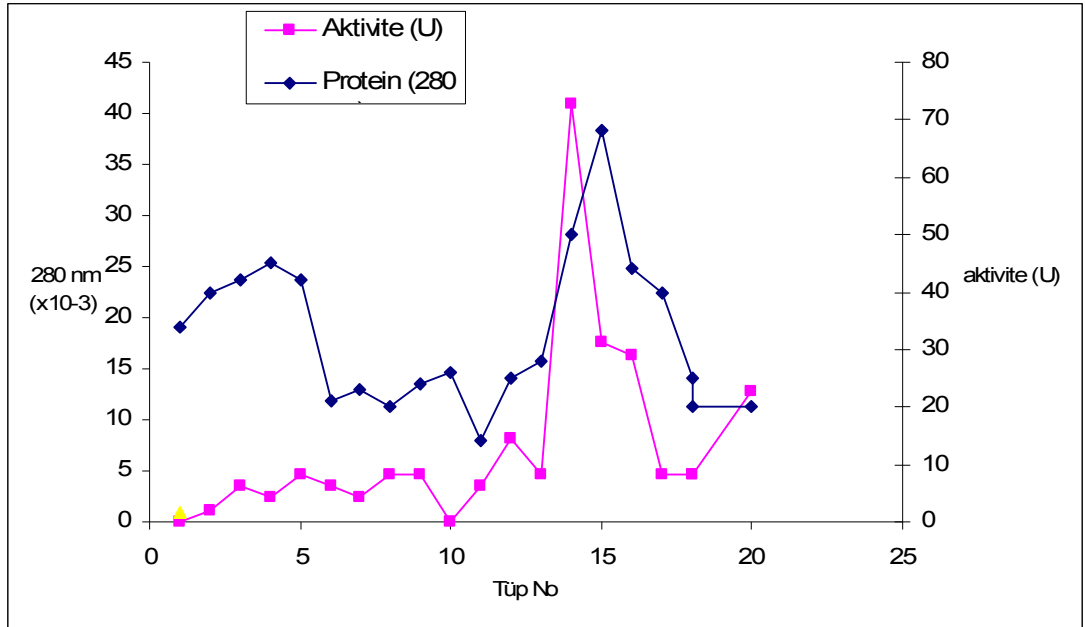
edilerek çıkarıldı. Kuyucuklar önce saf suyla sonra tank tamponuyla yıkandı. Polimerize jellerin bulunduğu kaset elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konuldu.

Hidrofobik etkileşim kromatografisi ve afinite kromatografisi sonucunda elde edilen fraksiyonlardan yüksek aktivite gösterenler birleştirildi. Elde edilen çözelti toplam hacim 100 µl olacak şekilde 1:1 oranında numune tamponuyla karıştırıldı. β-galaktosidaz (116.0kDa), sığır serum albumin (66,2.kDa), yumurta albumini (45.0 kDa), laktat dehidrogenaz (35,0 kDa), endonükleaz (25.0 kDa), β-laktoglobulin (18.4 kDa) ve Lizozim (14.4 kDa) içeren standart protein çözeltisi 1:1 oranında numune tamponuyla karıştırıldı. Jele yüklenecek numuneler 3 dakika 100 °C’de termoblokta bekletildi. Numuneler soğutulularak kuyucuklara yüklendi. Elektroforez güç kaynağına bağlanarak 80 volt’a ayarlandı. Proteinlerin jeldeki hareketini incelemeye yarayan numune tamponu içindeki boyaya ait bant ayırma jeline ulaştığında voltaj 150 volt’a yükseltildi. Yürütme işlemine proteinler, jelin altına 1cm kalana kadar devam edildi. Daha sonra akım kesilerek yürütme durduruldu. Cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı yığma jeli kesilip ayrıldıktan sonra protein bantlarını içeren ayırma jeli renklendirme çözeltisi içine konuldu ve 1.5-2 saat kadar çalkalayıcı üzerine bırakıldı. Daha sonra jel renklendirme çözeltisinden çıkartılarak renksizleştirme çözeltisine kondu. Belirli aralıklarla değiştirmek suretiyle jelin zemin rengi açılıp protein bantları belirginleşinceye kadar bu çözelti içinde çalkalandı. Jel renksizleştirme çözeltisinden çıkarıldıktan sonra jel görüntüleme sistemi (UVP) ile görüntü bilgisayara aktarıldı.

3. BULGULAR

3.1. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile PON1 Enziminin Saflaştırılması

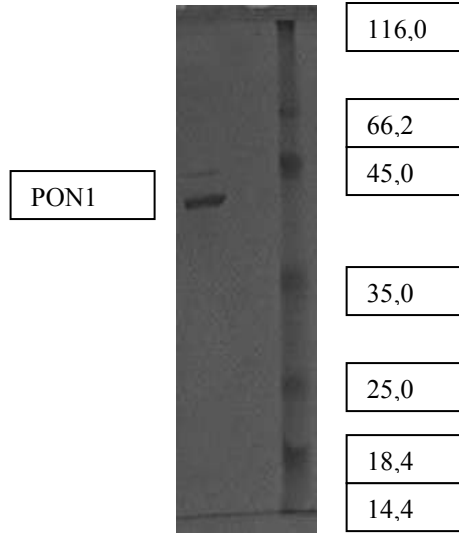
Hazırlanan hidrofobik etkileşim kolonu önce 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ içeren 0,1 M Tris-HCl pH=8,0 tamponu ile dengelendi. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen serum enzim çözeltisi 1 M amonyum sülfat doygunluğuna getirildikten sonra kolona tatbik edildi. Kolona 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ içeren 0,1 M Tris-HCl pH=8,0 tamponu ve 0,1 M Tris-HCl pH=8,0 tamponu ile oluşturulan yüksek tuz konsantrasyonuna doğru tuz gradienti uygulandı. Yıkama ve elüsyon çözeltisi 3 mL halinde tüplere toplandı. Yıkama ve elüsyon işlemi 280 nm'deki absorbans sıfır oluncaya kadar devam edildi. 0,1 M Tris-HCl pH=8,0 tamponu kör olarak kullanılarak her bir tüpte 280 nm'de kalitatif protein tayini ve 412 nm'de aktivite tayini yapıldı. Elde edilen değerlerin tüp numarasına karşı protein miktarı ve aktivite tayini grafiği çizildi (Şekil 3.1. ve 3.2.). Hidrofobik etkileşim kromatografisi sonunda enzim aktivitesine rastlanan tüpler birleştirildi [2]. Birleştirilen tüplerde PON enzimi üzerinde BGD'lerin inhibisyon etkilerine bakıldı.



Şekil 3.1. Hidrofobik etkileşim kolonundan PON1 enziminin elüsyon grafiği

3.2. Serum Paraoksonaz Enziminin SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezine

Hidrofobik etkileşim kolonundan saflaştırılan serum paraoksonaz enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla SDS poliakrilamid jel elektrofrezine serumdan saflaştırılan paraoksonaz enzim numunesi tatbik edildi. Protein bantları içeren jellerin görüntüleri jel görüntüleme sistemi ile bilgisayara aktarıldı (Şekil3.2.).



Şekil 3.2. Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılan paraoksonaz enziminin SDS-PAGE görüntüsü. Molekül ağırlık standartları β -galaktosidaz (116.0kDa), sığır serum albumin (66,2.kDa), yumurta albumini (45.0 kDa), laktat dehidrogenaz (35,0 kDa), endonükleaz (25.0 kDa), β -laktoglobulin (18.4 kDa) ve Lizozim (14.4 kDa)

3.3. Serum PON Enzim Aktivitesinin Tayini

BDG'lerin insan serum paraoksonaz enzim aktivitesine etkilerini belirlemek için Devlet Hastanesi'nden alınan kanlarla çalışıldı ve Hidrofobik etkileşim kromatografisiyle PON enzimi saflaştırıldıktan sonra 412 nm'de paraokson substratına karşı aktivite belirlendi. PON aktivitesi belirlenmesinde, küvette toplam hacim 1,05 mL'dir. Küvette bulunan paraokson substratının son konsantrasyonu [S]; 2 mM, 2 mM CaCl_2 ihtiva eden 100 mM tris-baz (pH=8,0) tamponu 1 mL ve enzim kaynağı olarak kullanılan serum hacmi 50 μL 'dir. Söz konusu hacimlerde 37 °C'de

belirlenen bir dakikadaki oluşan ürün (p-nitrofenol) nmol cinsinden konsantrasyonu enzim ünitesi olarak hesaplandı. Sonuçlar izelge 3.1. ve 3.2. de verilmiştir.

Çizelge3.1.PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren IAA ve IBA'nın IC₅₀ değerlerini bulunmasında kullanılan çözelti konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

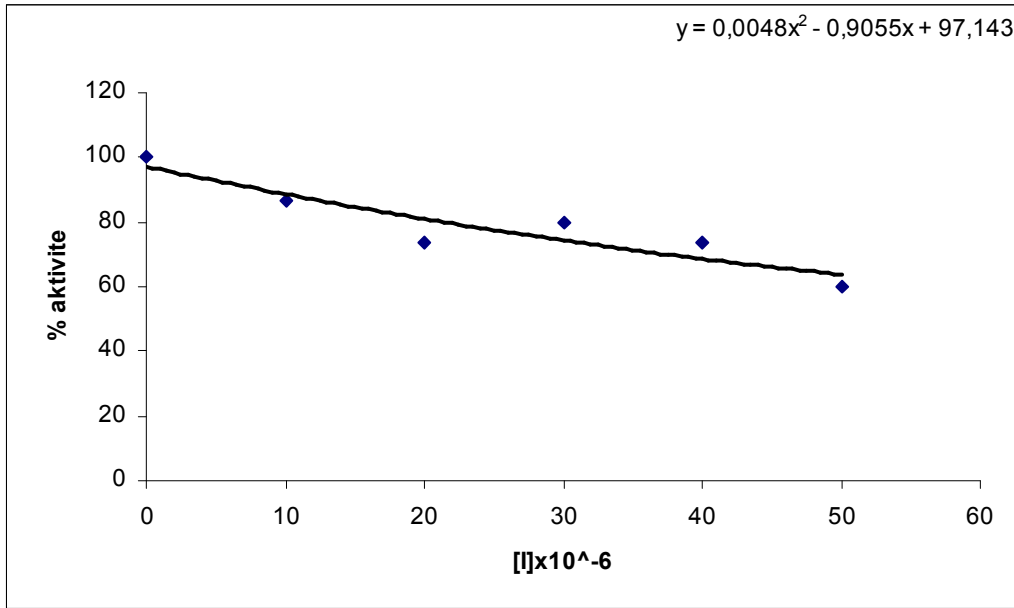
100 mM Tris Tamponu (µL)	BGD	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	BGD Çözeltisinin Hacmi (µL)	Küvetteki BGD'nin Konsantrasyonu (µM)	Aktivite (U/mL dak)	% Aktivite
900	IAA	50	100	-	-	35,09	100
890				10	9,52	30,41	86,66
880				20	19,05	25,73	73,32
870				30	28,57	28,07	79,99
860				40	38,09	25,73	73,32
850				50	47,62	21,05	59,99
900	IBA	50	100	-	-	23,98	100
890				10	9,52	22,22	92,66
880				20	19,05	22,22	92,66
870				30	28,57	21,05	87,78
860				40	38,09	22,22	92,66
850				50	47,62	17,54	87,78

Çizelge3.2 . PON1 enzimi üzerine aktivatör etkisi bulunan Kn'nin ve inhibisyon etkisi gösteren GA₃'nin IC₅₀ değerlerinin bulunmasında kullanılan çözelti konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

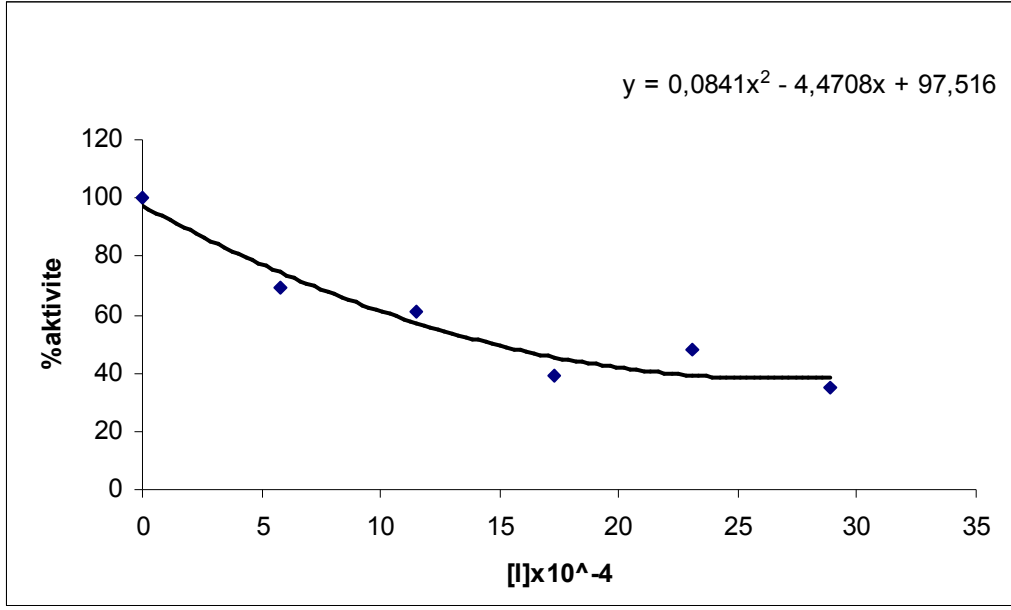
100 mM Tris Tamponu (µL)	BGD	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	BDG Çözeltisinin Hacmi (µL)	Küvetteki BGD'nin Konsantrasyonu (Kn µM) (GA ₃ x 10 ⁻⁴ M)	Aktivite (U/mL dak)	% Aktivite
900	Kn	50	100	-	-	36,84	100
890				10	9,52	36,84	100
880				20	19,05	38,07	103,33
870				30	28,57	35,61	96,66
860				40	38,09	41,75	113,33
850				50	47,62	41,75	113,33
900				GA ₃	50	100	-
890	10	5,49	18,71				69,55
880	20	10,99	16,37				60,85
870	30	16,48	10,53				39,14
860	40	21,98	12,86				47,81
850	50	27,48	9,37				34,83

3.4 BGD'lerin PON1 İzoenzimi Üzerine Etkileri

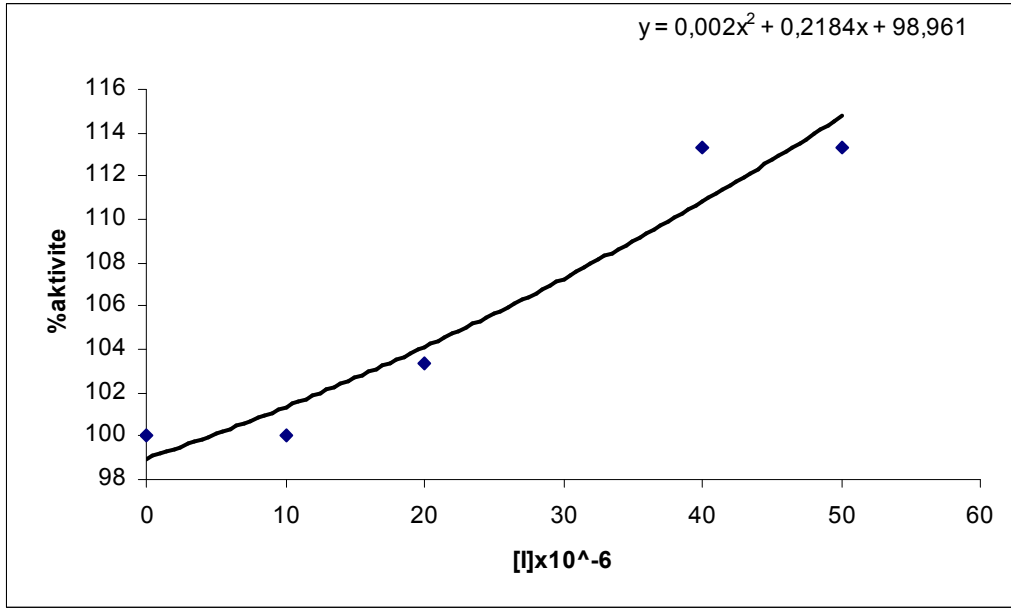
Çalışmamızda kullandığımız BDG'lerin IC₅₀ değerlerini bulmak için, optimum şartlarda paraokson substratının 2 mM sabit konsantrasyonunda çalışıldı. Substrat çözeltisi her ölçümde 0,1 mL paraokson alındı ve BGD çözeltilerinden ise değişik hacimlerde alınarak toplam 1,05 mL'lik bir reaksiyon hacmi oluşturuldu. Önce BGDsiz ortamda enzim aktivitesi bulundu. Bu değer %100 aktivite olarak kullanıldı. Daha sonra optimum pH ve sıcaklıkta 0,05 mL enzim çözeltisi alınıp daha önceden hazırlanmış olan 1 mL tampon+substrat+BGD çözeltisine eklendikten sonra 412 nm'de bir dakikada absorbansta meydana gelen değişme okundu. Elde edilen absorbans değerlerinden % aktivite hesaplandı. % Aktivite-[I] grafikleri çizildi (Şekil 3.3.-3.6.). Bu grafiklerden yararlanılarak her bir BGD için IC₅₀ değerleri hesaplandı (Çizelge 3.7.).



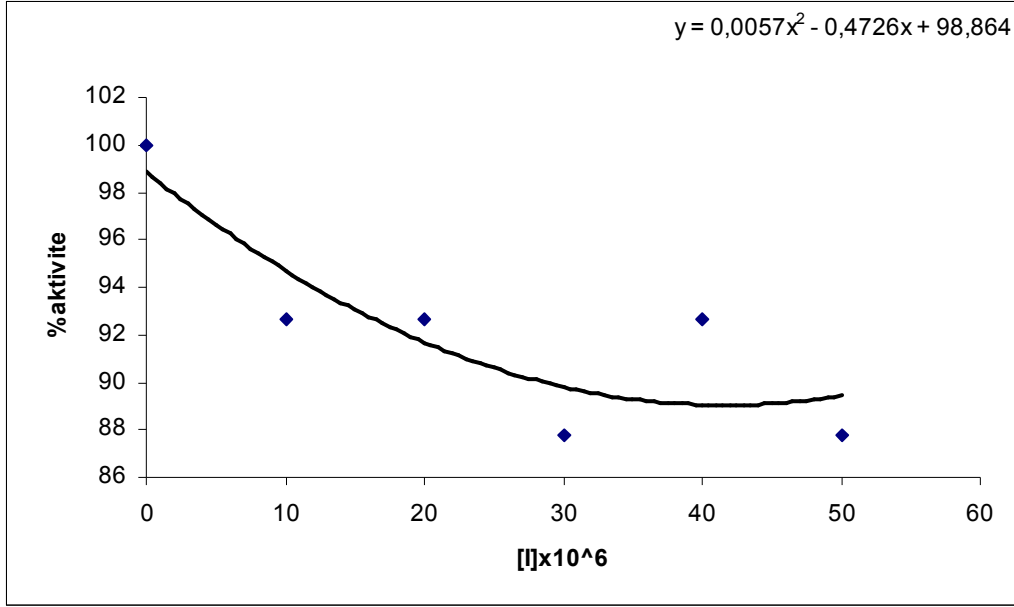
Şekil 3.3. Saflaştırılmış insan serum paraoksonaz enzimi üzerine IAA'nın % aktivite-[I] grafiği



Şekil 3.4. Saflaştırılmış insan serum paraoksonaz enzimi üzerine GA₃'nin % aktivite-[I] grafiği



Şekil 3.5. Saflaştırılmış insan serum paraoksonaz enzimi üzerine Kn'nin % aktivite-[I] grafiği

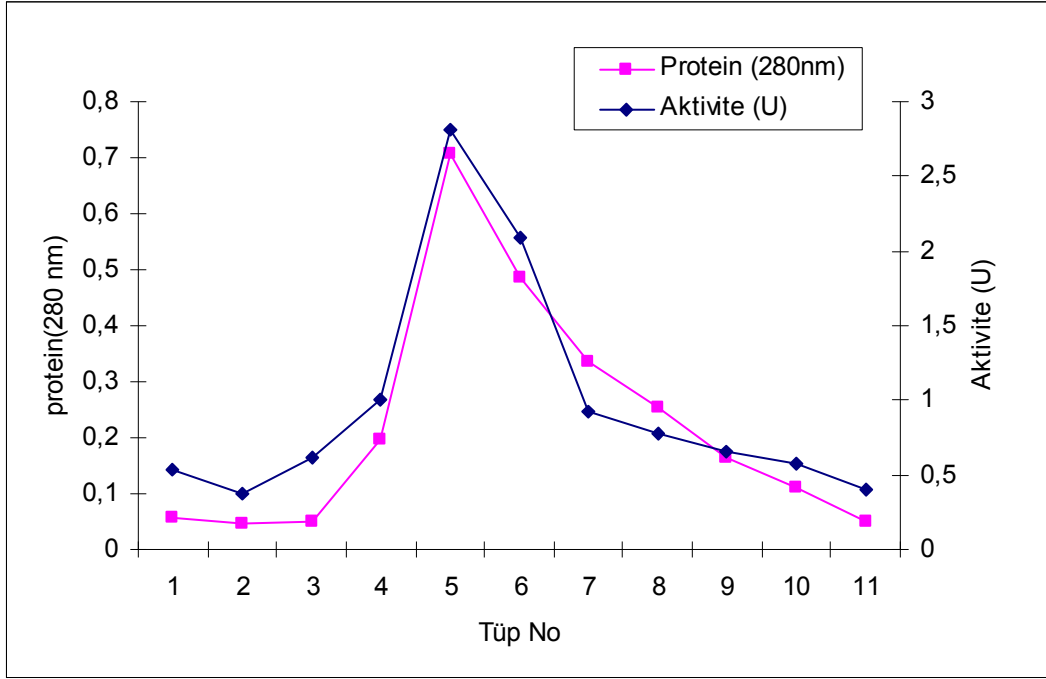


Şekil 3.6. Saflaştırılmış insan serum paraoksonaz enzimi üzerine IBA'nın % aktivite-[I] grafiği

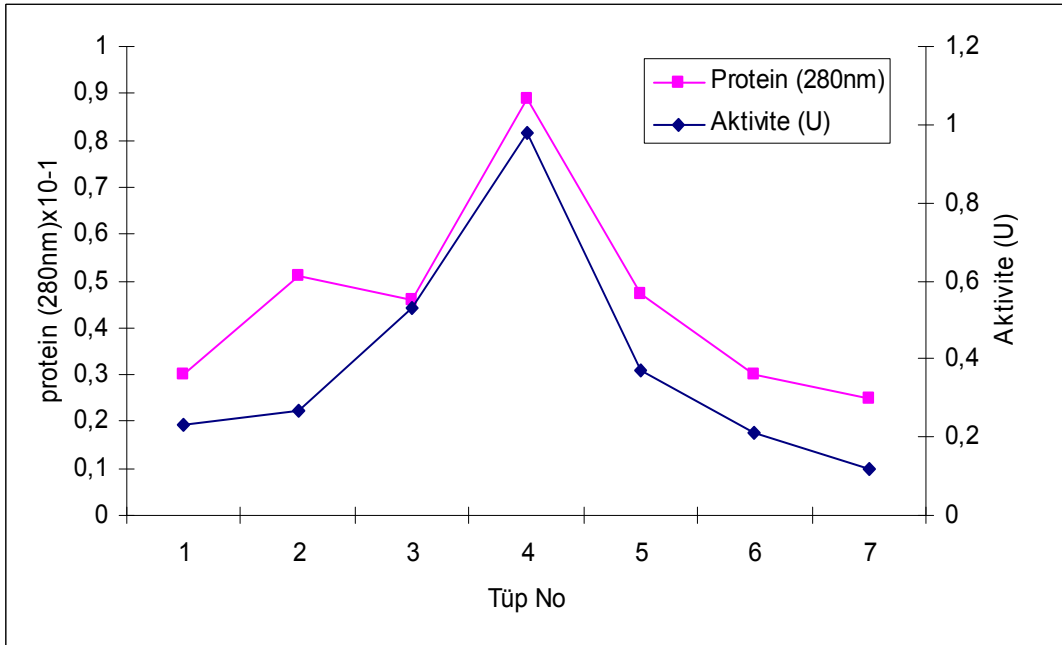
3.5. Afinite Kromatografisi İle hCA-I ve hCA-II İzoenzimlerin Saflaştırılması

hCA-I izoenziminin elüsyonu için; 0,1 M NaCH₃COO / 0,5 M NaClO₄ (pH=5,6), 1 M NaCl / 22 mM Na₂HPO₄ (pH=6,3), hCA-II için ise 0,1 M NaCH₃COO / 0,5 M NaClO₄ (pH 5.6) elüsyon tamponları kullanılarak 5'er mL fraksiyonlar halinde tüplere alınmıştır. Elüsyon işlemi sırasında peristaltik pompanın akış hızı 20mL /saat olarak ayarlanmıştır.

Yıkama ve elüsyon işlemi 280 nm'deki absorbans sıfır oluncaya kadar devam edildi. Elde edilen değerlerin tüp numarasına karşı protein miktarı (Şekil 3.8. ve 3.9.)belirlendi. 280 nm'de en yüksek absorbans ve aktivite gösteren tüpler birleştirildi (Şekil 3.7.a ve 3.7.b). Birleştirilen tüplerde hCA-I ve hCA-II enzimleri üzerinde BGD'lerin inhibisyon etkilerine CO₂-hidrataz aktivitesi ile bakıldı.



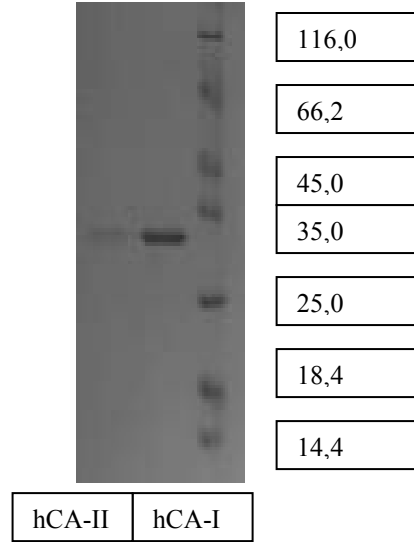
Şekil 3.7.a hCA-I enziminin elüsyon grafiği



Şekil 3.7.b hCA-II enziminin elüsyon grafiği

3.6. hCA-I ve hCA-II İzoenzimlerinin SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Afinite kromatografisi ile saflaştırılan hCA-I ve hCA-II enzimlerinin saflığını kontrol etmek amacıyla SDS poliakrilamid jel elektroforezine hCA-I ve hCA-II enzimleri numuneleri tatbik edildi. Protein bantları içeren jellerin görüntüleri jel görüntüleme sistemi ile bilgisayara aktarıldı (Şekil 3.8.).



Şekil 3.8. Afinite kromatografisi ile saflaştırılan hCA-I ve hCA-II enzimlerinin SDS-PAGE görüntüleri. Molekül ağırlık standartları β -galaktosidaz (116.0kDa), sığır serum albumin (66,2.kDa), yumurta albumini (45.0 kDa), laktat dehidrogenaz (35,0 kDa), endonükleaz (25.0 kDa), β -laktoglobulin (18.4 kDa) ve Lizozim (14.4 kDa)

3.7. hCA-I ve hCA-II İzoenzimlerin Aktivite Tayini

BDG'lerin hCA-I ve hCA-II enzim aktivitelere etkilerini belirlemek için Devlet Hastanesi'nden alınan kanlarla çalışıldı ve afinite kromatografisi ile hCA-I ve hCA-II enzimleri saflaştırıldıktan sonra CO₂-hidrataz aktivitesi ile aktivite belirlendi. hCA-I ve hCA-II enzimleri aktivitesi belirlenmesinde, tüpte toplam hacim 4 mL'dir. Ortamdaki H⁺ konsantrasyonunun artması veya azalması reaksiyon pH'ını etkileyeceğinden, enzim aktivitesi indikatörle belirlenebilir..Bu yöntemde göre pH değerinin 8.2'den 6.3'e düşüşü için geçen süre brom-timol mavisi indikatörü yardımıyla bulunmakta ve enzimin birimi ,enzimsiz CO₂ hidrasyon süresi (t₀) ile

enzimli reaksiyon süreleri (t_c) arasındaki farkın (t_c)'ye bölünmesiyle elde edilmektedir. Sonuçlar çizelge 3.3 ve 3.6 da verilmiştir.

Çizelge3.3. hCA-I ve hCA-II enzimleri üzerine inhibisyon etkisi gösteren IAA'nın IC₅₀ değerlerini bulunmasında kullanılan çözelti konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

pH=10 Tamponu (μ L)	Enzim (μ L)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μ L)	Fenol Red Çözeltisi (μ L)	Saf Su (μ L)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (μ L)	BDG Çözeltisinin Hacmi (μ L)	Küvetteki BGD'nin Konsantrasyonu (μ M)	Aktivite [(t ₀) (t _c)]/(t _c)	% Aktivite
400	hCA-I	100	2000	300	1200	-	-	0,92	100
				250		50	12,5	0,86	93,48
				200		100	25,0	0,82	89,13
				150		150	37,5	0,69	75
				100		200	50,0	0,65	70,65
				50		250	62,5	0,63	68,48
				-		300	75,0	0,58	63,04
400	hCA-II	100	2000	300	1200	-	-	0,64	100
				250		50	12,5	0,56	87,5
				200		100	25,0	0,53	82,81
				150		150	37,5	0,49	76,56
				100		200	50,0	0,44	68,75
				50		250	62,5	0,34	53,12
				-		300	75,0	0,27	42,19

Çizelge3.4. hCA-I ve hCA-II enzimleri üzerine inhibisyon etkisi gösteren IBA'nın IC₅₀ değerlerini bulunmasında kullanılan çözelti konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

pH=10 Tamponu (µL)	Enzim (µL)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	Fenol Red Çözeltisi (µL)	Saf Su (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	BDG Çözeltisinin Hacmi (µL)	Küvetteki BGD'nin Konsantrasyonu (µM)	Aktivite [(t ₀ (t _c)]/(t _c)	% Aktivite
400	hCA-I	100	2000	300	1200	-	-	1,78	100
				250		50	12,5	1,31	73,60
				200		100	25,0	1,19	66,85
				150		150	37,5	1,06	59,55
				100		200	50,0	0,84	47,19
				50		250	62,5	0,75	42,13
				-		300	75,0	0,60	33,71
400	hCA-II	100	2000	300	1200	-	-	0,86	100
				250		50	12,5	0,78	90,70
				200		100	25,0	0,72	83,72
				150		150	37,5	0,54	62,79
				100		200	50,0	0,52	60,46
				50		250	62,5	0,50	58,14
				-		300	75,0	0,46	53,49

Çizelge3.5. hCA-I enzimi üzerine inhibisyon etkisi ve hCA-II enzimi üzerine aktivatör etkisi gösteren Kn'nin IC₅₀ değerlerini bulunmasında kullanılan çözelti konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

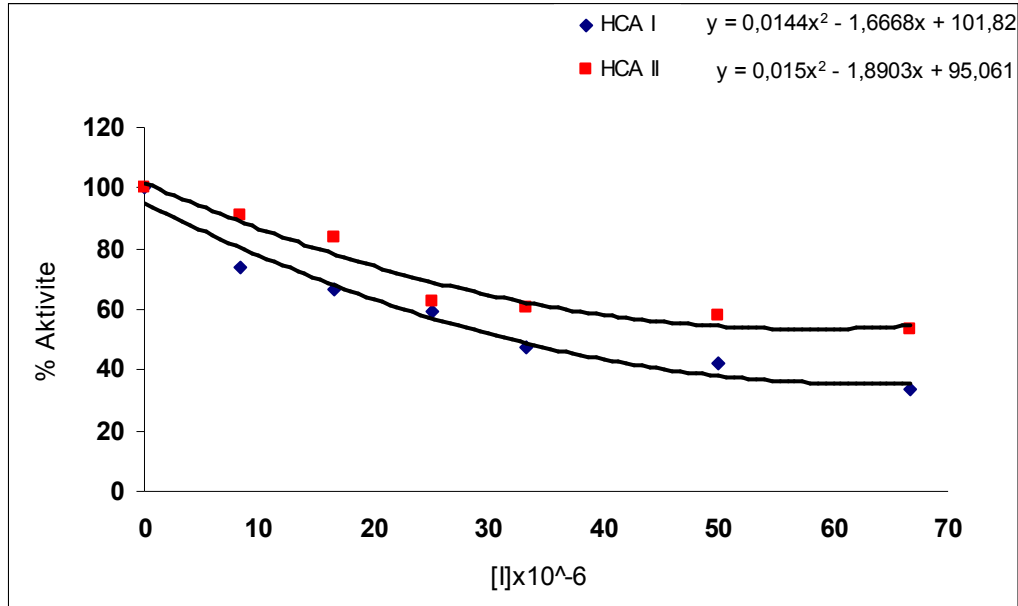
pH=10 Tamponu	Enzim (µL)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	Fenol Red Çözeltisi (µL)	Saf Su (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	BDG Çözeltisinin Hacmi (µL)	Küvetteki BGD'nin Konsantrasyonu (µM)	Aktivite [(t _o) (t _c)]/(t _c)	% Aktivite
400	hCA-I	100	2000	300	1200	-	-	2,69	100
				275		25	6,25	2,33	86,62
				250		50	12,5	2,18	81,04
				225		75	18,75	1,99	73,98
				200		100	25	1,84	68,40
				150		150	37,5	1,77	65,80
				100		200	50	1,62	60,22
400	hCA-II	100	2000	300	1200	-	-	0,26	100
				250		50	12,5	0,35	60,46
				200		100	25,0	0,34	79,07
				150		150	37,5	0,53	123,25
				100		200	50,0	0,60	139,53
				50		250	62,5	0,81	188,37
				-		300	75,0	0,97	225,58

Çizelge3.6. hCA-I ve hCA-II enzimi üzerine aktivatör etkisi gösteren GA₃'nin çözelti konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

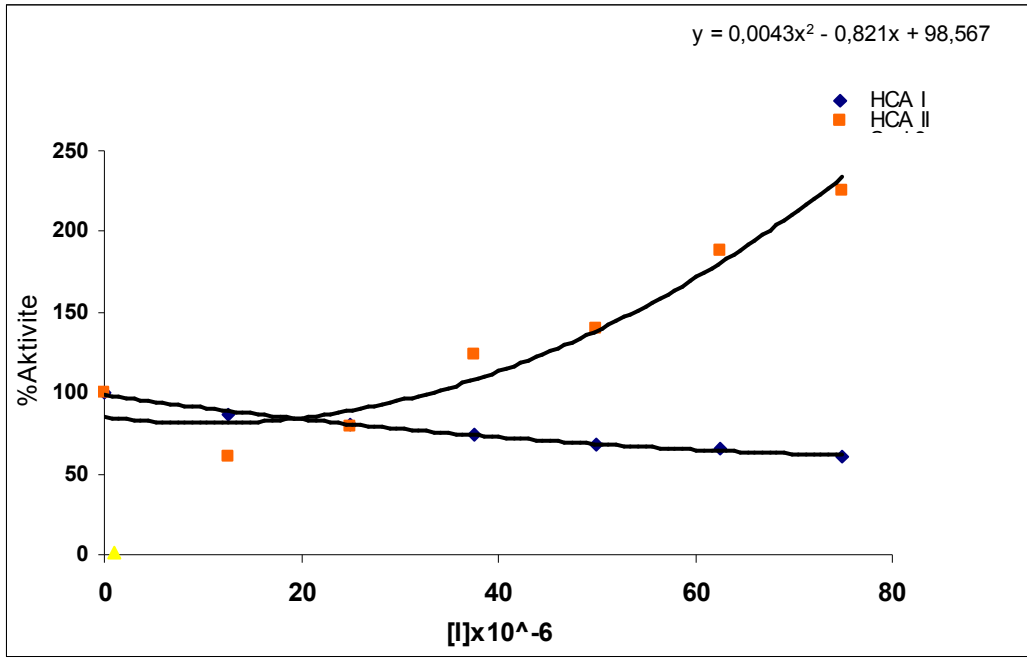
pH=10 Tamponu	Enzim (µL)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	Fenol Red Çözeltisi (µL)	Saf Su (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	BDG Çözeltisinin Hacmi (µL)	Küvetteki BGD'nin Konsantrasyonu (x10 ⁻⁴ M)	Aktivite [(t _o (t _c)]/(t _c)	% Aktivite
400	hCA-I	100	2000	300	1200	-	-	1,01	100
				200		100	14,4	1,24	122,77
				170		130	18,75	1,36	134,65
				150		150	21,16	1,44	142,57
				130		170	24,57	1,90	188,12
				100		200	28,85	2,08	205,94
400	hCA-II	100	2000	300	1200	-	-	0,445	100
				200		100	14,4	0,603	135,51
				170		130	18,75	0,66	148,31
				150		150	21,16	1,077	242,02
				130		170	24,57	1,153	259,10
				100		200	28,85	1,28	287,64

3.8. BGD'lerin hCA-I ve hCA-II İzoenzimleri Üzerine Etkileri

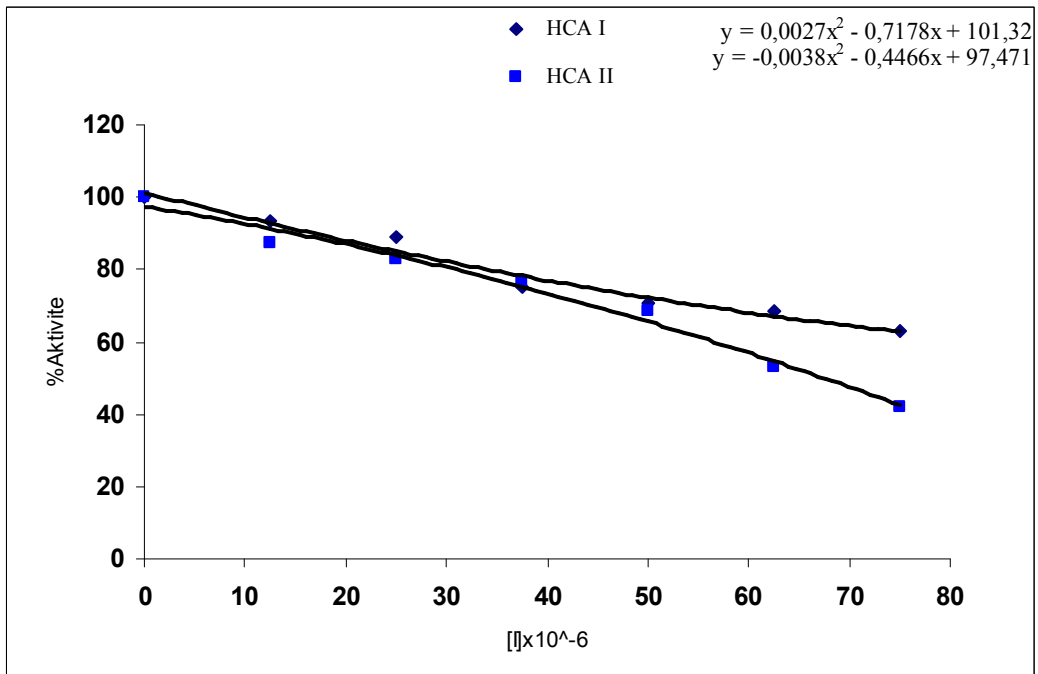
Çalışmamızda kullandığımız BDG'lerin IC_{50} değerlerini bulmak için, BDG çözeltilerinden değişik hacimlerde alınarak toplam 4 mL'lik bir reaksiyon hacmi oluşturuldu. Önce BGDsiz ortamda enzim aktivitesi bulundu. Bu değer %100 aktivite olarak kullanıldı. Daha sonra optimum pH ve sıcaklıkta 0,1 mL enzim çözeltisi alınıp daha önceden hazırlanmış olan 2,9 mL tampon+substrat+BGD çözeltisine eklendikten sonra Bu yöntemle göre pH değerinin 8.2'den 6.3'e düşüşü için geçen süre brom-timol mavisi indikatörü yardımıyla bulunmakta ve enzimin birimi, enzimsiz CO_2 hidrasyon süresi (t_0) ile enzimli reaksiyon süreleri (t_c) arasındaki farkın (t_c)'ye bölünmesiyle elde edilmektedir. Elde edilen veriler ile % aktivite hesaplandı. % Aktivite-[I] grafikleri çizildi (şekil 3.9.-3.12.). Bu grafiklerden yararlanılarak her bir BGD için IC_{50} değerleri hesaplandı (Çizelge 3.1)



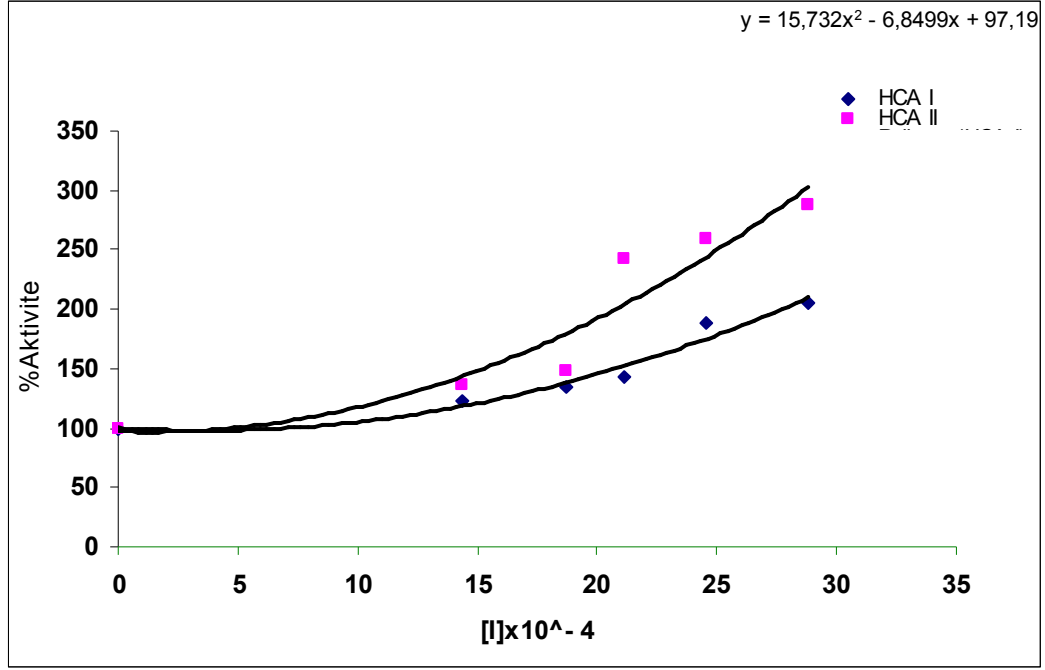
Şekil 3.9. Saflaştırılmış hCA-I ve hCA-II enzimleri üzerine IBA'nın % aktivite-[I] grafiği



Şekil 3.10. Saflaştırılmış hCA-I ve hCA-II enzimleri üzerine Kn'nin % aktivite-[I] grafiği



Şekil 3.11. Saflaştırılmış hCA-I ve hCA-II enzimleri üzerine IAA'nın % aktivite-[I] grafiği



Şekil 3.12. Saflaştırılmış hCA-I ve hCA-II enzimleri üzerine GA₃'in % aktivite-[I] grafiği

Çizelge 3.7. hCA-I, hCA-II ve PON1 enzimlerinin IC₅₀ değerleri

Enzim	IC ₅₀ (μM)				
	BGD	IAA	IBA	GA ₃	Kn
hCA-I		78,135	54,480	----	62,887
hCA-II		75,470	38,046	----	----
PON1		63,868	89,484	8422,6	----

4. TARTIŞMA SONUÇ

Bu çalışmada bazı BDG'lerin PON ve CA izoenzimleri üzerinde etkileri incelenmiştir. Bu amaçla BDG olarak; IAA, IBA, GA₃ ve Kn bileşikleri kullanılmıştır. Bu bileşiklerin seçilmesinin en önemli nedeni ülkemizde ve dünyada çok ve bazı bölgelerde kontrolsüz bir şekilde kullanılması sonucu, besin zinciri yolu ile insanlara kadar ulaşabilmesidir.

Araştırmamızda enzim olarak PON enzimini seçilmesinin nedeni, bu enzimin detoksifikasyon ve antioksidan özelliğine sahip olmasıdır. Gelişmiş ülkelerde en önemli ölüm sebeplerinin kanser ve kalp krizi olduğu düşünüldüğünden bu enzimin aktivitesinin önemi daha iyi anlaşılmaktadır.

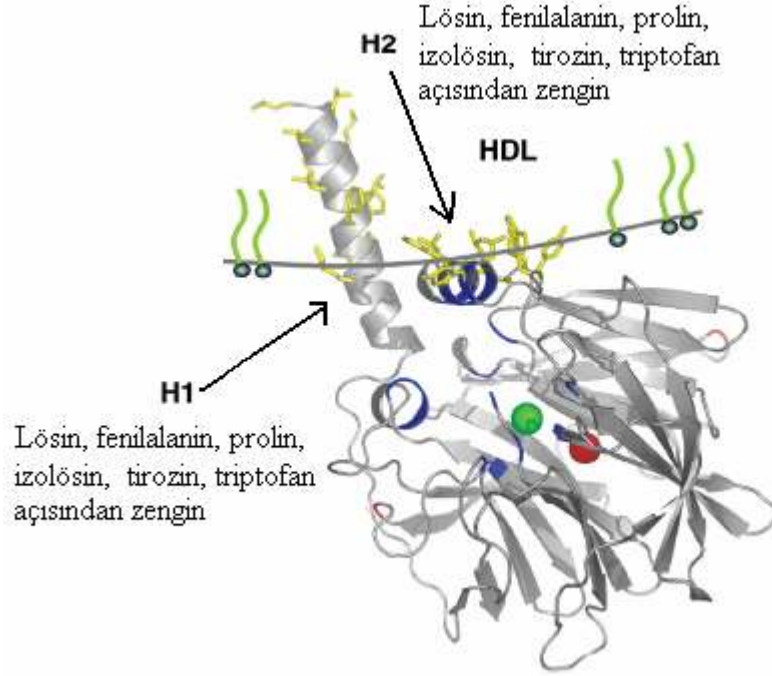
Çalışmamızda kullanılan diğer enzim ise CA'dır. Karbonik Anhidraz (CA) enzimi genel olarak metabolik CO₂ transportunu sıra birçok dokuda H⁺ ve HCO³⁻ iyonlarının birikiminde de önemli rol oynamaktadır. Bu dokular arasında böbrek, gastrik mukoza ve göz lensi sayılabilir. Bu dokuların dışında histokimyasal yöntemlerle tükrük bezleri, kaslar, beyin, sinir miyelin kılıfı, pankreas, prostat ve endometrium dokularında da CA enzimine rastlanmıştır [46-47-48-49].

Bu çalışmada, detoksifikasyon ve antioksidan aktivitesi ile metabolizmada önemli fizyolojik fonksiyona sahip PON enzimi hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Bu amaçla Sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin kimyasal yapısına sahip jel tarafımızdan sentezlenerek kullanılmıştır [2].

PON1 enziminin hidrofobik karakteri bu tekniğin seçilmesinde en önemli sebeplerden birisi olmuştur. Söz konusu enzim, N terminal bölgesinde bulunan H1 ve H2 heliks yapısı olarak isimlendirilen hidrofobik yapılar ile HDL'ye bağlanmaktadır (Şekil 4.1) [79-80].

N-terminal bölgesini lösin, fenil alanin, prolin, isolösin, tirozin, triptofan ve valin gibi aminoasitleri ihtiva eden 7-18 residüler arası H1 hidrofobik ucu, 185-202 residüler arası da H2 hidrofobik ucu oluşturmaktadır. Ayrıca PON1'in hidrofobik

yüzeyi ile HDL arasında triptofan, tirozin ve lizin aminoasitlerince zengin aromatik ve kısmen hidrofilik bölge bulunmaktadır [79-81].



Şekil. 4.1. PON1 enziminin HDL yüzeyine bağlanma modeli [32]

Bu kromatografinin temel prensibi, yüksek tuz konsantrasyonunda saflaştırılacak biyomolekülde bulunan hidrofobik yüzey ile apolar ligand arasındaki hidrofobik etkileşimdir. Bu etkileşimin gereğesi artan entropi ile açıklanmaktadır. Bu teknikte ligand ve matriks yapısının son derece önemli olduğu bildirilmektedir [82]. Kullanılacak ligandın hidrofobik karakteri kritik bir öneme sahiptir. Düşük hidrofobik karaktere sahip ligandlar kullanıldığı zaman ayrılacak moleküllerin kolanda etkileşimini sağlayabilmek için yüksek tuz konsantrasyonu uygulama zorunluluğu vardır. Bu durumda proteinlerin kendi aralarında hidrofobik etkileşim riski daha fazladır. Yüksek hidrofobik karaktere sahip ligand tercih edildiği durumda ise saflaştırılacak molekül ile ligand arasındaki etkileşim artacağı için elüsyon sırasında problemler ortaya çıkabilir [82]. Genellikle ticari olarak bulunan hidrofobik etkileşim kromatografi jellerinde hidrofobik uç olarak düz zincirli alkil ligandları ve aril ligandları gibi moleküller kullanılmaktadır [83]. Bunlardan isopropil, butil, oktil ve fenil bileşikleri en çok tercih edilen ligandlardır. En popüler

hidrofobik etkileşim jelinin fenil-sepharose olduğu literatürde görülmektedir [84]. Düz zincirli alkil ligandları saf hidrofobik karakter gösterirken, aril ligandlarında hem hidrofobik hem de aromatik etkileşimler gözlenir. Bu amaçla çalışmamızda ligand olarak 1-naftilamin bileşiği kullanılmıştır. PON1 enziminin H1 ve H2 bölgelerinde fenil alanin, tirozin, triptofan gibi aromatik rezidülerin bulunması tarafımızdan seçilen ligandın ve immobilizasyon için kullanılan L-tirozinin söz konusu bölgelerle hem hidrofobik hem de aromatik etkileşim yapacağı göz önüne alınarak, oldukça uygun bileşik olduğu kanaatindeyiz [2].

Bu yöntemle insan serumundan PON1 enzimi 227 kat saflaştırılmıştır. Furlong ve arkadaşları 4 basamaktan oluşan agarose blue, sephadex G-200, DEAE Trisakril M ve Sephadex G-75 yöntemlerini kullanarak tarafımızdan gözlenen saflaştırma katsayısından daha düşük bir değer (62,1) elde etmişlerdir [13].

Ancak bir başka çalışmada sadece üç basamaktan oluşan blue agaroz, DEAE I ve DEAE II yöntemlerini kullanarak yaklaşık 600 kat saflaştırma derecesine ulaşmışlardır. Bu çalışmada ayrıca üç basamakta PON1 enziminin Q ve R polimorfik formları ayrı ayrı saflaştırılmıştır [23].

Araştırmamızda saflaştırılan enzim için SDS-PAGE uygulanmıştır. Molekül ağırlığı yaklaşık 43 kDa olarak tahmin edilen PON1 enzimi tek bant olarak SDS-PAGE jelinde gözlenmiştir. Bu değer literatürle uygunluk göstermektedir. PON1'in minimum molekül ağırlığını Gan ve arkadaşları 43kDa olarak belirlemişlerdir [23]. Çünkü enzimin yapısında, toplam molekül ağırlığının %15.8'i kadar karbohidrat molekülü bulunmaktadır. Molekül ağırlığı taşıdığı karbohidrat zincirinin varlığına bağlı olarak değişmektedir [85]. İhtiva ettiği bu karbohidrat zinciri enzimin hidrolizleme reaksiyonu için gerekli değildir. Söz konusu molekülün PON1'in çözünürlüğünü ve kararlılığını arttırmada ve zar yapısına bağlanmada görevi olduğu düşünülmektedir [27-28]. Karbonhidrat içermeyen PON1 enziminin molekül ağırlığı 37 kDa'dur [42]. Ayrıca PON1 serumda HDL'ye bağlı olduğu bölgelerin yakınında bulunan proteinler (Apo A1) ile bir arada da saflaştırılabilmektedir. Bu durumda molekül ağırlığı 47-54kDa olduğu rapor edilmiştir [86]. PON1 enziminin molekül ağırlığı türden türe değişmemekte ve insan PON1 enziminin molekül ağırlığı ile

tavşan, sıçan ve koyunun PON1 enziminin molekül ağırlığı benzerlik göstermektedir [15-85].

Araştırmamızda kullanılan diğer enzim olan karbonik anhidraz insan eritrositlerinden afinite kromatografisi yöntemi ile saflaştırılmıştır. Bu amaçla tarafımızdan Sepharose-4B-L-tirozin-p-aminobenzosülfonamid kimyasal yapısına sahip jel sentezlenmiştir.

Afinite jeli, Sepharose 4B katı destek materyali üzerinde hazırlanmıştır. Sepharose 4B'nin serbest -OH grupları literatürde daha çok CNBr ile aktifleştirilmiştir. Bu çalışmada da aynı yöntem kullanılarak Sepharose 4B afinite jelinin CNBr ile aktifleştirilmesinden sonra, tirozin kovalent olarak bağlandı. Daha sonra sülfonamid diazolanarak L-tirozine kenetlendirildi. Burada afinite jelinin; uzantı kolunu L-tirozin, enzimi spesifik olarak bağlayan kısmını da sülfonilamid oluşturur. Sülfonilamid karbonik anhidraz enziminin spesifik bir inhibitörüdür. Afinite jelinin yapısına girerek CA enziminin yüksek oranda saflaştırılmasında başarı ile kullanılmıştır [49]. Söz konusu jel kullanılarak hCA-I ve hCA-II izoenzimleri direkt hemolizattan saflaştırılmıştır. Bu amaçla hCA-I izoenziminin elüsyonu için; 1 M NaCl / 22 mM Na₂HPO₄ (pH=6,3), hCA-II için ise 0.1 M NaCH₃COO / 0.5 M NaClO₄ (pH 5.6) elüsyon tamponları kullanılmıştır. Enzimlerin saflığı SDS-PAGE uygulanarak kontrol edilmiştir [70].

hCA-I ve hCA-II izoenzimleri için tek bantlar elde edilmiştir. Yaklaşık molekül ağırlıkları 30 kDa ağırlığında bulunmuştur. Bu değerlerin literatürle uyum halinde olduğu tespit edilmiştir [50].

Paraoksonaz enziminin aktivitesi Gan ve arkadaşlarının uyguladığı yöntem kullanılarak belirlenmiştir [38]. Bu amaçla literatürde Gil ve arkadaşlarının uyguladığı yöntem de bilinmektedir. Her iki yöntem, paraoksonun hidrolizi ile açığa çıkan 4-nitrofenolün 37 °C'de, 412 nm'de absorbans ölçümüne dayanmaktadır, 1 ünite paraoksonaz, dakikada meydana gelen 4-nitrofenolün nmol'ü olarak tayin edilmektedir [2].

Karbonik anhidrazın aktivite tayini, CO₂-Hidrataz adı verilen, Maren ve arkadaşlarının modifiye ettikleri Wilbur-Anderson yöntemi kullanılarak yapılmıştır

[87]. Bu yöntemle, CO₂ molekülünün su ile reaksiyona girmesi sonucu meydana gelen H₂CO₃ molekülünün H⁺ ve HCO₃⁻ iyonlarına ayrışarak, ortamın pH'ını değiştirme süresi ölçülmektedir [74].

Araştırmamızda kullanılan bileşiklerden; IAA ve IBA, PON enzimini önemli ölçüde inhibe ettiği saptanmıştır. Bu bileşiklerin IC₅₀ değerleri sırası ile 63,86 ve 89,48 µM olarak tespit edilmiştir. Bu değerlerin birbirine yakın olması son derece dikkat çekicidir. Ancak en güçlü inhibitörün IAA olduğu IC₅₀ değerlerinden kolaylıkla anlaşılmaktadır. GA₃ ise 8400,23 µM, IC₅₀ değeri ile diğerlerine göre daha zayıf bir inhibitör olduğu tespit edilmiştir.

IAA, enzimler üzerinde inhibitör olarak en çok çalışılan bileşiklerden birisidir. Bu bileşiğin süperoksit dismutaz, katalaz, ve glutatyon peroksidaz enzimi üzerinde etkileri incelenmiştir. 1 mM bileşiğin bu enzimlerle 24 saat inkübasyonu sonucu aktivitelerini belirli ölçüde arttırdığı saptanmıştır [88-89]. Bu bileşik ayrıca bazı insan serum enzimleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Aspartat aminotransferaz, amilaz, kreatin fosfokinaz, laktat dehidrogenazı belirli ölçüde inhibe ettiği bulunmuştur [90]. Diğer yandan Çelik ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise aynı bileşiğin, laktat dehidrogenaz, kreatin fosfokinaz enzimlerini önemli ölçüde inhibe ettiği saptanmıştır [91].

Araştırmamızda kullanılan Kn ise paraoksonaz enzimi üzerinde kullanılan konsantrasyon aralığında (9,52-47,62 µM) aktivatör olarak davrandığı saptanmıştır. Benzer etki literatürde, süperoksit dismutaz, katalaz, ve glutatyon peroksidaz enzimi üzerinde de görülmüştür [88-89].

Araştırmamızda aynı BGD'ler afinite kromatografisi ile saflaştırılmış hCA-I ve hCA-II izoenzimleri üzerinde inhibisyon etkileri araştırılmıştır. hCA-I enzimi, IBA, Kn ve IAA tarafından farklı düzeylerde inhibe edilmiştir. IBA, Kn ve IAA'ın IC₅₀ değerleri sırası ile 54,48, 62,88 ve 78,13 µM olarak bulunmuştur. Kullanılan bileşikler arasında IBA en güçlü inhibitör olarak davranırken, GA₃ ise aktivatör olarak fonksiyon görmüştür.

Araştırmamızın önemli bulgularından birisi de GA₃, paraoksonaz enzimini önemli ölçüde inhibe ettiği halde hCA-I enziminin bir aktivatörü olmasıdır. Bu durum enzimlerin üç boyutlu yapısının ve özellikle aktif bölgelerinin konformasyon farklılığından kaynaklanmaktadır. Bu bileşiklerden IAA ve Kn, aspartat aminotransferaz, fosfo fruktokinaz, laktat dehidrogenaz enzimlerini de önemli ölçüde inhibe ettiği literatürden anlaşılmaktadır [90]. Diğer yandan IAA, aspartat tranamilaz, kreatin fosfokinaz enzimlerini inhibe ettiği de literatürden anlaşılmaktadır [92].

Araştırmamızda kullanılan hCA-II enzimi eritrositlerde ve özellikle gözde bulunarak önemli fizyolojik fonksiyonu göstermektedir. hCA-II, göz içi sıvısının oluşmasında ve dolayısı ile göz tansiyonunun kontrolünde kritik bir enzimdir [51]. Bu enzim üzerinde BGD'lerden IBA ve IAA güçlü bir şekilde inhibitör etkisi göstermiştir. IC₅₀ değerleri sırası ile 38,05 ve 75,47 µM'dır. Bileşiklerin IC₅₀ değerleri ilaç olarak kullanılan sülfonamidlere yakın olması son derece dikkat çekicidir [50]. Glaucoma hastalığı, yüksek göz içi basıncıyla ortaya çıkarak, dönüşümsüz körlüğe sebep olmaktadır. Göz içi basıncının kontrolünde çok önemli rolü olan karbonik anhidrazın inhibisyonu ile glaucomalı hastaların göz içi basıncı düşürülmektedir [50]. Araştırmamızda GA₃ ve Kn bu enzimin aktivitesini çalışılan konsantrasyon aralığında arttırdığı tarafımızdan tespit edilmiştir. Bu durumun özellikle glokom hastaları açısından ciddi sonuçlar doğurabilecek niteliktedir [50].

Yüksek lisans olarak sunulan bu çalışmada elde edilen bulgular aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

- İnsan serumundan PON1 enzimi, Sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin kimyasal yapısına sahip jel kullanılarak saflaştırılmış ve SDS-PAGE'te tek bant elde edilmiştir.
- İnsan eritrositlerinden hCA-I ve hCA-II izoenzimleri, Sepharose-4B-L-tirozin-p-aminobenzensülfonamid kimyasal yapısına sahip afinite jeli ile saflaştırılmış ve saflığı SDS-PAGE ile kontrol edilmiştir.

- Araştırmamızda kullanılan IAA, GA₃, IBA paraoksonaz enzimini inhibe ederken, Kn bileşiği çalışılan konsantrasyon aralığında aktivite ettiği saptanmıştır.
- IBA, Kn ve IAA hCA-I izoenzimini inhibe ederken GA₃ bileşiğinin aktive ettiği saptanmıştır.
- Gz içi sıvısının oluşumunda görev yapan hCA-II izoenziminin [50], GA₃ ve Kn bileşikleri tarafından çalışılan konsantrasyon aralığında (Kn için; 12,5-75,0 μM GA₃ için; 1,44-2,88 mM) arttırdığı saptanmıştır. Bu durumun glokoma hastaları için son derece ciddi sonuçlar doğuracağı açıktır.
- Son olarak araştırmamızda kullanılan bileşiklerden GA₃, paraoksonaz enziminin inhibitörü iken karbonik anhidraz izoenzimlerinin (hCA-I ve hCA-II) aktivatörü olarak davranmıştır.

5. KAYNAKLAR

[1] Tülüce, Y., “Bazı Bitki Büyüme Düzenleyicilerin Subakut ve Subkronik Uygulamalarının Ratların Eritrosit ve Çeşitli Dokularındaki Antioksidan Enzim Aktiviteleri, Glutatyon ve Lipid Peroksidasyon Seviyeleri üzerine Etkileri”, *Doktora Tezi*, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Van, (2005)

[2] Sinan, S., “İnsan Serum Paraoksonaz Enziminin Yeni Bir Yöntemle Saflaştırılması Ve Bazı Antibiyotiklerin Enzim Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması” *Doktora Tezi*, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı

[3] Henry, R.P., “Multiple roles of carbonic anhydrase in cellular transport and metabolism”, *Annu. Rev. Physiol.* (1996) 58,523.

[4] Maren, T.H., “Carbonic anhydrase:chemistry, physiology and inhibition”, *Physiol. Rev.* (1967) 47,595.

[5] Jabusch, J.R., Deutsch, H.F., *Arch. Biochem. Biophys.* (1985) 238, 170.

[6] Sugrue, M.F., “The preclinical pharmacology of dorzolamide hydrochloride, a topical carbonic anhydrase inhibitor”, *J. Ocular pharmacol. Ther.* (1996) 12, 363.

[7] Vardar, Y., “Bitki Fizyolojisi Dersleri II” EÜ, Fen Fakültesi Kitapları Serisi No: 69, Bornova, İzmir. (1983)

[8] http://www.kkgm.gov.tr/Birimler/ilac_alet/bgd/hormon.htm

© 2001 TARIM VE KOYİŞLERİ BAKANLIĞI, Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü

[9] Westwood, M.N., “Hormones and Growth Regulators”, *Temperate Zone Pomology : Physiology and Culture. Timber Press, Inc.*(1993)

- [10] Seçer ., M., Doğal Büyüme Düzenleyicilerin (Bitkisel Hormonların) Bitkilerdeki Fizyolojik Etkileri ve Bu Alanda Yapılan Araştırmalar, (1989) 109.
- [11] Güleryüz., M. Ziraatında Bytc ve Engelleyici Maddelerin Kullanılması ve nemi, . Atatürk Üniversitesi Yayınları, (1982)
- [12] Aldridge, W.N., “Serum esterases I: two types of esterases (A and B) hydrolysing p- nitrophenyl acetate propionate and butyrate and a method their determination”, *Biochem J.*, (1953a) 53, 110.
- [13] Aldridge, W.N., “Serum esterases II: an enzyme hydrolyzing diethyl p-nitrophenyl phosphate (E600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera”, *Biochem. J.*, (1953b) 53,117.
- [14] Mackness, M.I., Thompson, H.M., Hardy, A.R., Walker, C.H., “Distinction between A-esterase and arylesterase. *Biochemistry Journal* (1987) 245, 293-296.
- [15] Primo-Parmo, S.L., Sorenson, R.S., Teiber, J. and La Du, B.N., “The human serum paraoxonase/arylesterase gen (PON1) is one member of a multigene family”, *Genomics*, (1996) 33, 498.
- [16] Mackness, M.I., “Commentary. ‘A’ esterases, Enzymes looking for a role?”, *Biochem Pharmacol*, (1989a) 38, 385.
- [17] Hassett, C., Richter, R.J., Humbert, R., Chapline, C., Crabb, J.W., Omiecinski, C.J. and Furlong, C.E., “Characterization of cDNA clones encoding rabbit and human serum paraoxonase: the mature protein retains its signal sequence”, *Biochemistry*, (1991) 30, 10141.
- [18] La Du, B.N., “Structural and functional diversity of paraoxonases”, *Nat. Med.*, (1996) 2, 1186.

- [19] Klimov, A.N., Gurevich, V.S., Nikiforova, A.A., Shatilina, L.V., Kuzmin, A.A., Plavinsky, S.L. and Teryukova, N.P., "Antioxidative activity of high-density lipoproteins in vivo", *Atherosclerosis*, (1993) 100, 13
- [20] Rosenblat, M., Draganov, D., Watson, C.E., Bisgaier, C.L., La Du, B.N. and Aviram, M., "Mouse macrophage paraoxonase 2 activity is increased whereas cellular paraoxonase 3 activity is decreased under oxidative stress", *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.*, (2003) 23,468.
- [21] Mochizuki, H., Scherer, S.W., Xi, T., Nickle, D.C., Majer, M., Huizenga, J.J., Tsui, L.C. and Prochazka, M., "Human PON2 gene at 7q21.3: cloning, multiple mRNA forms, and missense polymorphisms in the coding sequence", *Gene*, (1998) 213, 149.
- [22] Eckerson, H.W., Wyte, C.M. and La Du, B.N., "The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism", *Am. J. Hum. Genet.*, (1983) 35, 1126.
- [23] Gan, K.N., Smolen, A., Eckerson, H.W., La Du, B.N., "Purification of human serum paraoxonase/arylesterase", *Drug Metab. Dispos.*, (1991) 19, 100.
- [24] Eckerson, H.W., Romson, J., Wyte, C., La Du, B.N., "The human serum paraoxonase polymorphism: identification of phenotypes by their response to salts", *Am. J. Hum. Genet.* (1983) 35(2),214.
- [25] Gan, K.N., Smolen, A., Eckerson, H.W., La Du, B.N., "Purification of human serum paraoxonase / arylesterase. Evidence for one esterase catalyzing both activities", *Drug Metab. Dispos.* (1991) 19(1), 100.
- [26] Holuoet, P., Perez, G., Zhao, Z., Brouwers, E., Bernar, H., Collen, D., "Malondialdehyde modified low density lipoproteins in patients with atherosclerotic disease", *J. Clin. Invest.* (1995) 95,2611.

- [27] Aharoni, A., "Directed evolution of mammalian paraoxonases PON1 and PON3 for bacterial expression and catalytic specialization", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (2004) 101, 482.
- [28] Josse, D., "Identification of residues essential for human paraoxonase (PON1) arylesterase/organophosphatase activities", *Biochemistry*, (1999) 38, 2816.
- [29] Jonas, A., "Lecithin cholesterol acyltransferase", *Biochim. Biophys. Acta*, (2000) 1529, 245.
- [30] Augustinsson, K.B., Homologous enzymes and biochemical evolution, (eds) In: Van Thoai N., Roche J., Gordon and Breach, New York, (1968), 299.
- [31] Mackness, M.I., Mackness, B., Durrington, P.N., Connely, P.W., Hegele, R.A., "Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins", *Cur. Opin. Lipid* (1996) 7, 69.
- [32] Harel, M., Aharoni, A., Gaidukov, L., Brumshtein, B., Khersonsky, O., Meged, R., Dvir, H., Ravelli, R.B.G., McCarthy, A., Toker, L., Silman, I., Sussman, J.L. and Dan S. Tawfik, "Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes", *Nature Struct. Mol. Biol.* (2004) 11, 412.
- [33] Mackness, M.I., Arrol, S., Durrington, P.N., "Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low density lipoprotein", *FEBS lett.* (1991) 286 (1-2), 15.
- [34] La Du B.N., Human serum paraoxonase / arylesterase, In pharmacogenetics of drug metabolism, Edited by Kalow, W., New York: Pergamon Press, (1992), 51.
- [35] Broomfield, C.A., Ford, K.W., Hydrolyses of nerve gases by plasma enzymes, Proceedings of the 3rd International Meeting on Cholinesterases, La Grande-Motte, (1991), 161.

- [36] Davies, H.C., Richter, R.J., Keifer, M., Broomfield, C.A., Sowalla, J., Furter, C.I., "The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman, sarin", *Nation. Genet.* (1996) 14,334.
- [37] Jakubowski, H., "Calcium-dependent human serum homocysteine thiolactone hydrolase. A protective mechanism against protein N-homocysteinylation" *J. Biol. Chem.* (2000) 275,3957.
- [38] Kitchen, B.J., Masters, C.J. and Winzor, D.J., "Effects of lipid removal on the molecular size and kinetic properties of bovine plasma arylesterase", *Biochem J*, (1973) 135, 93.
- [39] Hegele, R.A., "Paraoxonase genes and disease", *Ann. Med.*, (1999) 31, 217.
- [40] Heinecke, J.W. and Lusic, A.J., "Paraoxonase-gene polymorphisms associated with coronary heart disease: support for the oxidative damage hypothesis?", (Letter) *Am. J. Hum. Genet.*, (1998) 62, 20.
- [41] Brophy, V.H., Jarvik, G.P., Furlong, C.E., PON1 polymorphisms. In: Costa LG, Furlong CE (eds) *Paraoxonase (PON1) in health and disease*. Kluwer, Norwell, (2002) 53.
- [42] Mackness, M.I., Harty, D., Bhatnagar, D., Winocour, P.H., Arrol, S., Ishola, M. and Durrington, P.N., "Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolaemia and insulin-dependent diabetes mellitus", *Atherosclerosis.*, (1991) 86, 193.
- [43] Tanimoto, N., Kumon, Y., Suehiro, T., Ohkubo, S., Ikeda, Y., Nishiya, K. and Hashimoto, K., "Serum paraoxonase activity decreases in rheumatoid arthritis", *Life Sciences*, (2003) 72, 2877.

- [44] Ayub, A., Mackness, M.I., Arrol, S., Mackness, B., Patel, J. and Durrington, P.N., “Serum Paraoxonase After Myocardial Infarction”, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, (1999) 19, 330.
- [45] Sozmen, B., Delen, Y., Girgin, F.K. and Sozmen, E.Y., “Catalase and paraoxonase in hypertensive type 2 diabetes mellitus: correlation with glycemic control”, *Clin. Biochem.*, (1999) 32 (6), 423.
- [46] Supuran, C. T., and Scozzafava, A., “Carbonic Anhydrase Inhibitors” ,*Curr.Med.Chem.*, 1, (2001),61.
- [47] Wistrand, P. J., “The Importance of Carbonic Anhydrase B and C for the Unloading of CO₂ by the Human Erythrocyte”, *Acta Physiol. Scand.*, (1981), 343.
- [48] Holmes, R., S., “Purification, Molecular Properties and Ontogeny of Carbonic Anhydrase Isozymes Evidence for A, B and C Isozymes in Avian and Mammalian Tissues”, *Eur. J. Biochem.*, (1977), 78, 511.
- [49] Chegwidan, W. R., Dodgson, S. J., and Spencer, I. M., “In the Carbonic Anhydrase New Horizons”, *Birkhauser Verlag, Basel*, (2000), 343.
- [50] Arslan, O. , “Glaucoma Tedavisinde Kullanılmaya Aday Karbonik Anhidraz İnhibitörlarinin Sentezi ve İnhibisyon Etkilerinin Araştırılması”, *Doktora Tezi*, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Erzurum, (1994)
- [51] Arslan, O., Nalbantoğlu, B., Demir, N., Özdemir, and H., Kührevioğlu, İ. Ö., “A New Method for the Purification of Carbonic Anhydrase Isozymes by Affinity Chromatography”, *Turk J. Med Sci.*, 26, (1995), 163.
- [52] Hewett-Emmett, D., “In the Carbonic Anhydrase New Horizons”, *Birkhauser Verlag, Basel*, (2000), 29.

[53] Winum, J., Y., Innocenti, A., Nasr, Montero, J., L., Scozzafava, A., Vulloa, D., and Supuran, C., T., “Carbonic Anhydrase Inhibitors: Synthesis and Inhibition of Cytosolic/tumor-associated Carbonic Anhydrase Isozymes I, II, IX, V and XII with N-hydroxysulfonamides a New Zinc-Binding Function In the Design Inhibitors” *Elsevier Science*, (2005), 15, 2353.

[54] Winum, J., Y., Innocenti, A., Montero, J., L., Scozzafava, A., Vulloa, D., Gagnard, V., and Supuran, C., T., “Carbonic Anhydrase Inhibitors. Interaction of Isozymes I, II, IV, V and IX with Organic Phosphates and Phosphonates” *Elsevier Science*, (2005), 15, 1683.

[55] Deutsch, H. F., “Carbonic Anhydrase”, *Int. J. Biochem.*, (1987) 19,100.

[56] Geers, C., and Gros., G., “Carbon Dioxide Transport and Carbonic Anhydrase in Blood and Muscle”, *Physiological Reviews*, (2000), 80, 681.

[57] Keha, E. E., Küfrevioğlu, Ö. İ., “Biyokimya”, *Derya Kitabevi*, Trabzon, (1993), 34.

[58] Hazen, S. A., Waheed, A., Sly, W. S., La Nave, K. F., and Lynch, C. J., “Differentiation-Dependent Expression of CA and the Role of Carbonic Anhydrase Isozymes in Pyruvate Carboxylation in Adipocytes”, *FASEB J.*, 10, (1996), 481.

[59] Lakkis, M.M. , Berghem, N.C.N. , and Tashian ,R.E. , “Expression of Carbonic Anhydrase of Mouse VII in E.Coli and Demonstration of its CO₂ Hydratase Activity” , *Biochem .Biophys .Res . Commun .* , 226, (1996) , 268 .

[60] Mastrolorenzo A . ,Zuccati , G. , Massi ,D. , Gabrielli, M . G . , Casini , A. , Scossafava , A. , Supuran C. T. ,”Immunohistochemical study of carbonic anhydrase isozymes in human skin” *European Journal of Dermatology*, 13, (2003), 440-444.

[61] Bayram, T., “Köpek Eritrositlerinden Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılan Karbonik Anhidraz Enziminin Sülfonamidlerle İnhibisyon Kinetiğinin İncelenmesi”, *Yüksek Lisans Tezi*, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı

[62] Sugrue, M.. F., “The Preclinical Pharmacology of Dorzolamide hydrochloride, a Topical Carbonic Anhydrase Inhibitor”, *J. Ocular Pharmacol. Ther.*, 12, (1996), 363.

[63] Tripp, B .C . , Smith, K. , and Ferry , J .G. ,”Carbonic Anhydrase: New Insights for an Ancient Enzyme” , *The Journal of the Biological Chemistry* , 52 , (2001), 48615.

[64] Maren , T. H ., Conroy C.W. , Wynns,G. C. ,and Godman ,D. R. ,”Renal and Cerebrospinal Fluid Formation Pharmacology of a High Molecular Weight Carbonic Anhydrase Inhibitor “ , *J. Of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 280,(1997), 98.

[65] Svastova, E. , Hulikova, A. , Casini A. , Rafajova ,M. ,Scozzafava , A. , and Supuran , C. , T. , “Hypoxia Activates the Capacity of Tumor-Associated Carbonic Anhydrase IX to Acidify Extracellular pH” , *FEBS*,(2004),577,439.

[66] Türeci, Ö., Şahin, U., Vollmar, E. *et al.* “Human Carbonic anhydrase XII: cDNA Cloning, Expression and Chromosomal Localization of a Carbonic Anhydrase Gene that is Overexpressed in Some Renal Cell Cancers” *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, (1998), 95, 7608.

- [67] Fiore, A., De Simone, G., Menchise, V., Pedone, C., Antel, J., Wurl, M., Casini A., Scozzafava, A., and Supuran, C. T., "Carbonic Anhydrase Inhibitors. Zonisamide is an effective Inhibitor of the Cytosolic Isozyme II and Mitochondrial Isozyme V Solution and X-Ray Crystallographic Studies", *Elsevier Science*, (2005) 15, 2315.
- [68] Kaiser, E. T., and Lo, K. W., "The Carbonic Anhydrase Catalysed Hydrolysis of 2-Hydroxy-5-Nitrotoluen Sulfonic Sulfate", *J. Am. Chem. Society.*, 1, (1969), 4912.
- [69] Jabusch, J. R., and Deutsch, H. F., "Localization of the Lycines Actlated in Ubiquitin Reacted with p-Nitrophenyl Acetat", *Arch. Biochem. Bioophys.*, 238, (1989), 170
- [70] Özensoy, Ö., "Eritrositlerden Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin Saflaştırılması İçin Yeni Bir Afinite Jelinin Sentezi ve Uygulanması " *Yüksek Lisans Tezi*, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı
- [71] Fiore, A., De Simone, G., Menchise, V., Pedone, C., Antel, J., Wurl, M., Casini A., Scozzafava, A., and Supuran, C. T., "Carbonic Anhydrase Inhibitors. X-Ray Crystal Structure of a Benzenesulfonamide strong CA II and CA IX Inhibitor Bearing a Pentaurorophenylaminothioureido Tail in Complex with Isozyme II", *Elsevier Science*, (2005),15, 1937.
- [72] Voet's Biochemistry, 1990, John Wiley & Sons, Inc.
- [73] Stams, T., Chen, Y., Bariack-Sjodin, P. A., Hurt J. D., Liao, J., May, J. A., Dean, T., Laipis, P., Christianson, D. W., *Protein Sci.* 7, (1998), 556
- [74] Wilbur, K. M., and Anderson, N. G., "Electrometric and Colrimetric Determination of Carbonic Anhydrase", *J. Biol. Chem.*, 176, (1948), 147

- [75] Cuatrecasas, P., "Protein Purification by Affinity Chromatography, Derivatizations of Agarose and Polyacrylamide Beads ", *J. Biol. Chem.*, 245, (1970), 3059.
- [76] Khn, J., Wilchek, M., "A Colorimetric Method for Monitoring Activation of Sepharose by Cyanogen Bromide", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (1978) 7,14.
- [77] Axen, R., Ernback, S., "Chemical Fixation of Enzymes Halide Activated Polysaccharide Carriers", *Eur. J. Biochem.* (1971), 18,351.
- [78] Blatter-Garin, M.C., Kalix, B., De Pre, S. and James, R.W., "Aspirin use is associated with higher serum concentrations of the antioxidant enzyme, paraoxonase-1", *Diabetologia*, (2003) 46, 593.
- [79] Harel, M., Aharoni, A., Gaidukov, L., Brumshtein, B., Khersonsky, O., Meged, R., Dvir, H., Ravelli, R.B.G., McCarthy, A., Toker, L., Silman, I., Sussman, J.L. and Dan S. Tawfik, "Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes", *Nature Struct. Mol. Biol.* (2004) 11, 412.
- [80] Sorenson, R.C., Bisgaier, C.L., Aviram, M., Hsu, C., Billecke, S. and La Du, B.N., "Human serum paraoxonase/arylesterase's retained hydrophobic N-terminal leader sequence associates with high density lipoproteins by binding phospholipids: apolipoprotein A-1 stabilizes activity", *Atheroscler Thromb Vasc Biol.* (1999) 19, 2214.
- [81] Killian, J.A., Von Heijne, G., (2000), How proteins adapt to a membrane-water interface. *Trends Biochem. Sci.* 25, 429.
- [82] Robyt, JF., White, BJ., "Biochemical Techniques Theory and Practice", (1990), Waveland Pres, Inc.,98.

[83] <http://www.chromatography.amershambiosciences.com>

[84] Jakoby, B., Wilchek, M., Coupling reaction of ligands and general methodology of affinity chromatography, in *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York, (1974).

[85] Furlong, C.E., Richter, R.J., Chapline, C. and Crabb, J.W., "Purification of Rabbit and Human Serum Paraoxonase", *Biochemistry*, (1991) 30, 10133.

[86] Zimmerman, J.K., Grothusen, J.R., Bryson, P.K., Brown, T.M., Partial purification and characterization of paraoxonase from rabbit serum. In "Enzymes Hydrolyzing Organophosphorus Compounds", Ellis Horwood Ltd., Chichester, UK, (1989), 128.

[87] Yu, BP, "Cellular defences against damage from reactive oxygen species", *Physiological Rev.* (1994) 74, 139.

[88] M. P. De Melo, T. M. de Lima, T. C. Pithon-Curi, " The Mechanism of Indole Asetic acid Cytotoxicity " *Toxicol. Lett.* 14,148 (1-2) (2004),103.

[89] J. A. John, C. D. Blogg, F.J. Murray, B. A. Schwetz, P.J. Gehring, " teratogenic Effecet of the Plant hormone Indole-3-acetic acid in Mice and Rats", *Teratology* 19 (3) (1979), 321.

[90] Celik, I., Kara M., " The Effects of Plant Growth Regulators on Activity of Eight Serum Enzymes in Vitro", *J. Environ. Sci. Health A* 32 (1997), 1755.

[91] Celik I., Tuluce Y., "Effect of Indoleacetic acid and Kinetin on Lipid Peroxidation and Antioxidant Defense in Various Tissues of Rats ", *Pesticide Biochemistry and Physiology* 84 (2006) ,49.

[92] Celik I., Tuluce Y.,Turker M.,“ Antioxidant and Immune Potential Marker Enzymes Assessment in the Various Tissues of Rat Exposed to Indoleacetic Acid and Kinetin: A Drinking water Study”, *Pesticide Biochemistry and Physiology* (2006)