

**T.C.**  
**HARRAN ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**İNSAN SERUMUNDA PARAOKSONAZ ENZİMİNİN**  
**SAFLAŞTIRILMASI VE AKTİVİTESİNİN**  
**ARAŞTIRILMASI**

**Halil BADEM**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**  
**Doç. Dr. Şahbettin SELEK**

**ŞANLIURFA**

**2013**

**T.C.**  
**HARRAN ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**İNSAN SERUMUNDA PARAOKSONAZ ENZİMİNİN**  
**SAFLAŞTIRILMASI VE AKTİVİTESİNİN**  
**ARAŞTIRILMASI**

**Halil BADEM**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**

**Doç. Dr. Şahbettin SELEK**

Bu tez, Harran Üniversitesi Araştırma Fonu Saymanlığı tarafından 12178 nolu proje numarası ile desteklenmiştir

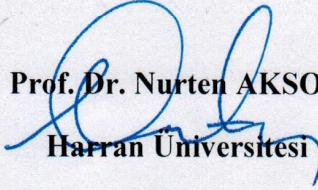
**ŞANLIURFA**

**2013**

HARRAN ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

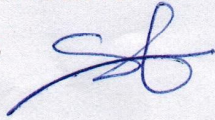
Halil BADEM'in hazırladığı "İnsan Serumunda Paraoksonaz Enziminin Saflaştırılması ve Aktivitesinin Araştırılması" konulu çalışma 21.08.2013 tarihinde jüri üyeleri tarafından değerlendirilerek Biyokimya Anabilim Dalında **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

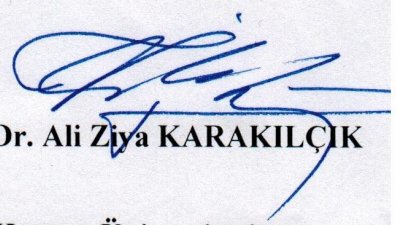
  
**Prof. Dr. Nurten AKSOY**  
Harran Üniversitesi  
**BAŞKAN**

**Doç. Dr. Şahbettin SELEK(Danışman)**

Harran Üniversitesi

ÜYE



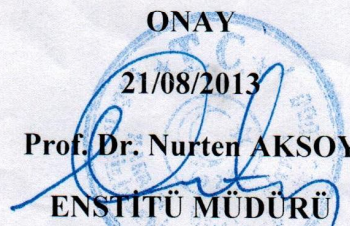
  
**Prof. Dr. Ali Ziya KARAKILÇIK**

Harran Üniversitesi

ÜYE

ONAY

21/08/2013

  
**Prof. Dr. Nurten AKSOY**  
ENSTİTÜ MÜDÜRÜ

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET .....	I
ABSTRACT .....	II
TEŞEKKÜR .....	III
KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ .....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	V
TABLolar DİZİNİ .....	VI
1. GİRİŞ .....	1
1.1. Paraoksonaz Enzimi (PON) (EC. 3.1.8.1).....	2
1.2..Tarihçe.....	3
2. Paraoksonaz Enziminin Genetik yapısı ve polimorfizimi.....	3
2.1. Yapı ve etki Mekanizması.....	6
2.2.PON1 Sentezlenmesi ve Salgılanması.....	8
3. PON1 ve Organofosfatlar Arasındaki İlişkisi.....	10
3.1. PON1 ve Ateroskleroz Arasındaki İlişkisi.....	11
3.2. PON1' in Ox-LDL ile Etkileşimi.....	12
3.3.Çeşitli Hastalıklarda PON1.....	14
4. Bakteriyel endotoksinlerin toksisitesine karşı koruma.....	15
5.MATERYAL ve YÖNTEM.....	17
5.1. Materyal.....	17
5.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler .....	17
5.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar.....	17
5.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması.....	18
5.1.4. Amonyum sülfat çökeltisinin çözünmesi ve diyaliz için kullanılan çözeltiler .....	18
5.1.5. Chibacron Blue Nonspesifik affinite kolonu için kullanılan tamponlar ...	19
5.1.6.Binding Buffer .....	19
5.1.7.Washing Buffer .....	20
5.1.8.Elüsyon Buffer .....	20
5.1.9. Protein miktar tayininde kullanılan tampon ve çözeltiler.....	20
5.1.10. SDS PAGE elektroforezinde kullanılan tampon ve çözeltiler.....	21
5.1.11.Yürütme Tamponu .....	22

5.1.12. 2X SDS PAGE Örnek Yükleme Tamponu .....	22
5.1.13. 1X SDS PAGE Örnek Yükleme Tamponu .....	23
5.1.14. Boyama Çözeltilisi.....	23
5.1.14. Jel Yıkama Çözeltilisi.....	23
5.2. METOD.....	24
5.2.1. Serum PON1 Enziminin Saflaştırılması.....	24
5.2.1.1. Serum Örneğinin Hazırlanması.....	24
5.2.1.2. Amonyum sülfat çöktürmesi.....	24
5.2.1.3. %35 Amonyum Sülfat Çöktürmesi .....	24
5.2.1.4. %70 Amonyum Sülfat Çöktürmesi.....	25
5.2.1.3. Jel filtrasyon kromatografisi.....	25
5.2.1.4. Birinci HiTrap AE İyon Değiştirici Kromatografi.....	26
5.2.1.5. Cibacron Blue Non-spesifik Afinite Kromatografisi .....	26
5.2.1.7. Protein miktar tayini.....	26
5.2.1.8. SDS PAGE elektroforezi.....	27
6. BULGULAR .....	30
6.1. Araştırma Bulguları.....	30
6.1.1. Protein Tayini için Kullanılan Standart Grafik.....	30
6.2. Serum PON1 Enziminin Saflaştırılma Sonuçları.....	31
6.2.1. Amonyum sülfat kesitlemesi.....	31
6.2.2. HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR Jel Filtrasyonu.....	32
6.2.3. HiTrap AE İyon Değiştirici Kromatografi.....	33
6.2.4. HiTrap Blue HP Non-spesifik Afinite Kromatografisi.....	34
6.2.5. Sodyum Dodesilsülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi ile Enzim Saflığının .....	37
7. TARTIŞMA.....	38
8. SONUÇ.....	39
9. KAYNAKLAR.....	40

# ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

## İNSAN SERUM PARAOKSONAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

Halil Badem

Harran Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Biyokimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Şahabettin SELEK  
Yıl: 2013, Sayfa:56

Paraoksonaz enzimi ilk olarak organofosfor zehirlenmesine karşı koruyucu bir bariyer olarak tanımlanmıştır. Bu enzim hakkında son yıllarda oldukça fazla sayıda araştırma yapılmış olup, sahip olduğu fonksiyonlar ve hastalıklardaki rolü hakkında büyük ilerleme kaydedilmiştir. Paraoksonaz 1 (PON1) enzimi, esteraz ve laktonaz aktivitesi gösteren yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) ilişkili bir enzimdir. Oksidatif strese karşı önemli bir antioksidan olarak görev yapan bu enzim, kanser ve kardiyovasküler hastalıklar başta olmak üzere birçok hastalığın patogeneziyle ilişkilendirilmektedir.

Paraoksanaz enziminin hastalık patogenezindeki fonksiyonlarını inceleyebilmek için saflaştırılması gerekmektedir. Bu çalışmada insan serum paraoksanaz-1 enzimi; amonyum sülfat çöktürmesi, jel filtrasyon kromatografisi, iyon değişim kromatografisi ve non-spesifik afinite kromatografisi yöntemleriyle saflaştırıldı. Çalışma sonucunda paraoksanaz enzimi; amonyum sülfat çöktürmesi, sephadex G-200 jel filtrasyon kromatografisi, DEAE-Sephadex A 50 anyon değişim kromatografisi ve afinite kromatografisi teknikleri ile %25 verimle 206 kat saflaştırıldı. Ayrıca spesifik aktivitesi 347,5 U/mg protein olarak tespit edildi. Saflaştırılan enzimin saflığı; SDS poliakrilamid jel elektroforezi uygulanarak yaklaşık 43 kDa molekül ağırlığına sahip tek bant elde edilmesi ile tespit edildi.

**Anahtar Kelimeler:** İnsan serum PON1, Saflaştırma

# **ABSTRACT**

**Master Thesis**

## **PURIFICATION OF HUMAN SERUM PARAOXONASE ENZYME AND INVESTIGATION OF ACTIVITY**

**Halil Badem**

**Harran University  
Health Sciences Institute  
Department of Biochemistry**

**Supervisor: Doç. Dr. Şahabettin SELEK  
Year: 2013, Page 56**

Paraoxonase enzyme has initially been identified as a protective barrier against organophosphorus poisoning. In the recent years, a wide range of investigations were conducted on this enzyme and the knowledge about its functions and the etiopathogenetic role in some diseases has been clarified in depth. PON1 is a high density lipoprotein-associated enzyme that have esterase and lactonase activities. PON, as an important antioxidant enzyme against oxidative stress, has been implicated in the pathogenesis of a number of disorders including cancer, cardiovascular and several other diseases.

Paraoxonase enzyme purification is required for function in the pathogenesis of the disease. For this purpose, our study; Paraoxanase purification was performed by ammonium sulphate precipitation, gel filtration chromatography, ion-exchange chromatography and non-specific affinity chromatography. In conclusion; Paraoxanase enzyme was purified 206 fold with a yield of 25 % using ammonium sulfate precipitation, DEAE-Sephadex anion exchange and Sephadex G-200 gel filtration chromatographies. Furthermore, human serum paraoxonase had a specific activity of 347,5 units per milligram protein found to be. The purity of purified human serum paraoxonase enzyme was checked, by yielded a single band of 43kDa on SDS-PAGE.

**Keywords:** Human serum PON1, Purification

## TEŞEKKÜR

Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda eğitimim süresince benden hiçbir konuda desteğini esirgemeyen, beni bu çalışmaya teşvik edip yönlendiren değerli danışman hocam Doç. Dr. Şahabettin SELEK'e teşekkür ederim. Eğitimim süresince her türlü desteklerini esirgemeyen, ilgi ve anlayış ile eğitimimde katkıları olan değerli hocam Prof. Dr. Nurten AKSOY'a teşekkür ederim. Biyokimya biliminde bana öncülük eden Prof. Dr. Abdurrahim KOÇYİĞİT'e teşekkür ederim. Bu tez ile ilgili desteğini esirgemeyen Dr. İsmail KOYUNCU'ya ve Ayrıca benimle tecrübe ve birikimini paylaşan, benden yardımlarını esirgemeyen Öğr. Gör. Abdullah TAŞKIN'a ve Hakim ÇELİK'e de teşekkür ederim. Her zaman maddi ve manevi destekleriyle yanımda olan değerli biyokimya lablatuvar çalışanlarına ayrıca teşekkür ederim. Bu tezin yapılmasında maddi destek veren Harran Üniversitesi Bilimsel Akademik Kurulu kurumuna teşekkür ederim. Bütün eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini esirgemeyen sevgili aileme teşekkür ederim.



## SİMGELELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

EDTA:	Etilendiamin tetra asetik asit
PAGE:	Poliakrilamid jel elektroforezi
PON1:	Paraoksonaz 1
SDS:	Sodyum dodesil sülfat
TEMED:	N,N,N',N'-tetrametilendiamin
Apo A-1:	Apolipoprotein A-1
Apo J:	Apolipoprotein J
HDL:	Yüksek yoğunluklu lipoprotein
LDL:	Düşük yoğunluklu lipoprotein
TRİS:	Trihidroksimetil amino metan
BSA:	Bovin serum albumin

## ŞEKİLLER DİZİNİ

No		Sayfa
1	Şekil 1.1. HDL partikülü ve Paraoksonaz enzimi	13
2	Şekil 1,2. İnsan serum paraoksonaz enziminin yapısı	14
3	Şekil 1.3. PON1 proteininin üç boyutlu yapısı	15
4	Şekil 2.1. Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayinin için kullanılan standart grafik	36
5	Şekil 2,2 İnsan serum PON1 enziminin jel filtrasyon kromatografisi yöntemi ile saflaştırılmasından elde edilen elüsyon grafiği	38
6	Şekil .2.3 Elüsyon grafiği İnsan serum PON1 enziminin HiTrap AE iyon değişim kolonundan	39
7	Şekil 2.4. İnsan serum PON1 enziminin HiTrap Blue HP kromatografisi yöntemi ile saflaştırılmasından elde edilen elüsyon grafiği	40
8	Şekil 3.1. Farklı saflaştırma basamaklarındaki örneklerin SDS-poliakrilamid jel	41
9	Şekil 3.2. Farklı saflaştırma basamaklarındaki örneklerin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi	42

## TABLÖLAR DİZİNİ

No		Sayfa
1	<b>Tablo:1:</b> Safılaştırma Basamakları	43

## 1. GİRİŞ

Paraoksonaz/Ariesteraz (PON1) enzimleri glikoprotein yapısında olup karaciğer tarafından sentez edilen, aromatik karboksilik asit esterlerini hidroliz eden, organik fosforlu bir insektisit olan parationun aktif metaboliti paraoksonu hidroliz etme yeteneğine sahip, HDL'ye sıkıca bağlı olan Ariesterazlar grubundan bir enzimdir [1]. PON1, HDL'ye bağlı, organofosfat ajanları (OP) ve sinir gazlarını hidrolizine, LDL'nin oksidasyonu ile lipid peroksitlerin oluşumuna ve bakteri endotoksinlerine karşı koruyucu rol oynayan önemli bir karaciğer enzimidir. Önceleri organofosfat bileşiklerini hidroliz etme özelliği nedeni ile toksikoloji alanında çalışılmış, son yıllarda ise antioksidan etkileri nedeni ile kronik kalp hastalığı riskinden korunulabileceği düşünülerek güncellik kazanmıştır. Ayrıca Paraoksonaz; arteroskleroz sürecinin başlangıç evresini oluşturan LDL'nin oksidasyonu ve dolayısıyla lipid peroksitlerinin birikimi sırasında HDL'nin bu enzimatik mekanizmalarla lipid peroksitlerini azaltması enzimin antioksidan özelliğinin önemini ortaya koymaktadır [2,3]. Arterosklerotik hastalıklara karşı vücuttaki savunma mekanizmalarından biri de paraoksonaz enzimidir (4)

Paraoksonaz enzimi HDL ile birlikte bulunur. HDL'nin arteroskleroz gelişimine karşı koruyucu olduğu uzun süredir bilinmektedir. Koruyucu etkinin mekanizmasında HDL'nin ters kolesterol taşıması, nitrik oksit gibi bazı damar genişletici moleküllerin sentezini artırması, inflamasyonu ve tromboz oluşumunu önleyici etki göstermesi, adezyon moleküllerinin sentezini azaltması, endotel tamirini uyarması ve LDL'deki oksidatif değişimleri önlemesi bulunmaktadır. Ancak bütün bu mekanizmalarda HDL'nin hangi bileşenlerinin rolü olduğu tartışmalıdır. Yakın zamanda PON1'in HDL'nin bir bileşeni olduğunun saptanması, bu tartışmalı mekanizmalara açıklık getirmek bakımından önem kazanmıştır. PON1'in bu mekanizmadaki işlevinin daha iyi incelenebilmesi için öncelikle serumdan saf halde elde edilmesi gerekmektedir (5)

PON1'in HDL ile oluşturduğu komplekste çok sayıda başka proteinin var olduğu bilinmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda PON1 için geniş bir substrat aralığının bildirilmesi enzimin yeterince saf olarak elde edilemediği izlenimi uyandırmaktadır. O nedenle, bu çalışmada PON1'in serumdan uygun saflaştırılma basamakları kullanılarak diğer HDL bileşenlerinden tamamen ayrıştırılması ve saf enzimin yapısal ve işlevsel özelliklerinin daha iyi tanımlanması hedeflenmiştir.

Karaciğerde sentezlenen PON1, HDL'ye bağlanarak dolaşıma salınmaktadır. Son dönemlerde yapılan çalışmalarda PON1'in dolaşımında HDL'nin bir bileşeni olduğu tespiti ile özellikle HDL'nin koroner arter hastalıklarındaki koruyucu rolünün açıklığa kavuşmaması nedeni ile önem kazanmıştır. Bu nedenle çalışmamızda PON1'in saflaştırma kaynağı olarak insan serumu seçildi

### **1.1. Paraoksonaz Enzimi (PON1) (EC. 3.1.8.1)**

Paraoksonaz, Aldridge sınıflama sistemine göre A grubu arildialkilfosfataz sınıfı ester hidrolaz enzimidir. Önceleri organofosfat bileşiklerini hidroliz etme özelliği nedeni ile toksikoloji alanında çalışılmış, son yıllarda ise antioksidan etkileri nedeni ile kronik kalp hastalığı riskinden korunulabileceği düşünülerek güncellik kazanmıştır [1].

Paraoksonaz, ilk olarak 1953 yılında Aldridge W.N. tarafından p-nitrofenil asetat, propiyonat ve bütirat'ı hidroliz eden A-esteraz olarak teshis edilmiştir. İnsan serumunda ilk kez 1961'de Uriel tarafından elektroforez sonrası HDL immunopresipitatlarında saptanmıştır [6]. Mackness ve ark., ilk olarak HDL-ayırımı için santrifüj yöntemini geliştirdikten sonra, koyunlarda paraoksonaz aktivitesinin çoğunlukla apo AI içeren partiküllerde HDL ile birlikte bulunduğunu ve insan serumunun ultra santrifüjlenmesi ile enzimin kanda HDL yapısında tasındığını ortaya koymuslardır [7].

Saflaştırılmış sıgır serum paraoksonazının lipidlerle ilişkili ve HDL ile aynı moleküler kütleyle sahip olduğunu göstermişlerdir. Saflaştırma sırasında apo A-I'in paraoksonazdan ayırımının zor olması, ikisinin sıkı ilişkili olduğunu düşündürmü ve HDL kolesterol tayini sırasında lipoprotein fraksiyonunda aril-esteraz aktivitesine rastlamışlardır [6]. Enzim; paraokson, metil paraokson ve klormetil paraoksona yüksek derecede seçicilik gösterdiği için, paraoksonaz olarak adlandırılmıştır. Mackness ve ark., PON'un HDL üzerinde apo A-I'e bağımlı olarak aktivite gösterdiğini ve 1991 yılında LDL üzerindeki lipoperoksit birikimini azalttığını bulmuşlardır [7]. Aynı zamanda Macness ve ark., farklı populasyonlarda (Fransız, Sudanlı vs) polimorfizm analizleri yapılarak, allellik formları belirlenmiş ve populasyon çalışmaları enzim aktivitesiyle HDL, apo A-I, apo A-II arasında istatistiksel ilişki gösterilmiştir [7]. İmmunoafinite kromatografi çalışmaları insan serum paraoksonazının gerçekte apolipoprotein A-I ve klusterin (apolipoprotein J) içeren HDL tipleri ile ilişkili olduğunu ve PON'un total HDL'nin çok küçük bir bölümünü oluşturduğunu göstermiştir

[1,7].Sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda, farklı kardiyovasküler hastalıklarda enzim aktiviteleri incelenmiş, lipoproteinlerle ve lipid peroksidasyonu arasındaki ilişkisi araştırılmış, enzimin aminoasit dizisi belirlenmiştir [8].

## **1.2. Tarihçe**

Paraoksonaz, ilk olarak 1953 yılında Aldridge W.N. (9) tarafından p-nitrofenil asetat, propiyonat ve bütirat'ı hidroliz eden A-esteraz olarak teşhis edilmiştir. 1965 yılında, Ooms A.J. ve Boter HL tarafından (10), paratiyon ve paraokson hidrolizindeki stereospesifikliğı ile tanımlanmıştır. 1973 'te bir grup Alman araştırmacı, ilk olarak insan serum paraoksonazını genetik olarak saptamıştır (11). Paraokson, metil paraokson ve klormetil paraoksona yüksek derecede seçicilik gösterdiği için, paraoksonaz olarak adlandırılmıştır. 1985'lere kadar paraoksonazın nörotoksik olan organofosfatlar üzerine etkisi incelenmiş, saflaştırılması yapılmış ve detoksifikasyondaki rolü araştırılmıştır (12). 1985 yılında Mackness M.I. ve arkadaşları (13), ilk olarak HDL-ayırımı için santrifüj rotorunu geliştirirken, HDL-kolesterol ayırımı esnasında lipoprotein fraksiyonunda arilesteraz aktivitesine rastlamışlardır (13). Farklı popülasyonlarda (fransız, sudanlı vs) polimorfizm analizleri yapılmış ve allellik formları belirlenmiştir. 1987 yılında miyokart infarktüsü (MI) ile paraoksonaz arasındaki ilişki araştırılmış ve MI teşhisinde kullanılacak bir enzim olmadığı anlaşılmıştır (14). 1988 yılında Mackness ve arkadaşları (15), PON1' in HDL üzerinde apo A-I'e bağımlı olarak aktivite gösterdiğini ve 1991 yılında LDL üzerindeki lipoperoksit birikimini azalttığını bulmuşlardır. Sonraki yıllarda, farklı kardiyovasküler hastalıklarda enzim aktiviteleri incelenmiş, lipoproteinlerle ve lipid peroksidasyonu ile ilişkisi araştırılmış ve enzimin aminoasit dizisi belirlenmiştir.

## **2. Paraoksonaz Enziminin Genetik yapısı ve polimorfizimi**

Paraoksonaz ve arilesteraz her ne kadar iki ayrı enzim olarak algılanırsada, yapılan çalışmalar ve araştırmalar göstermiştir; İnsan serumunda tek gen ürünü enzim hem arilesteraz hem de paraoksonaz aktivitesine sahip olduğu işlenmiştir. Hatta bu enzimin laktonaz aktivitesine de sahip olduğunu gösteren yayınlarda mevcuttur (16). İnsanda 7. kromozomun uzun kolunda q-21.3 ve q-22.1 arasında tanımlanabilen paraoksonaz gen ailesinin PON1, PON2 ve PON3 şeklinde 3 üyesi bulunur. Gelişimsel açıdan bakıldığında, gen duplikasyonu sonucu oluşarak yapısal benzerlik gösteren genlerdir. PON1, PON2 ve

PON3 genlerinin memeliler arasında; nükleotid seviyesinde benzerlikleri %81-90 iken aminoasit seviyesindeki benzerlikleri %79-90 dır. PON1'de 106. kodonda (lizin) bulunurken, PON2 ve PON3'te lizin bulunmamaktadır. Yıllarca PON1 ile yapılan çalışmalarda, insan serum kapasitesi, ksenobiotikleri hidrolize etmesi ve aterosklerosis arasındaki ilişki araştırılmıştır. PON2 ve PON3, hakkında yapılan araştırmaların azlığı nedeniyle PON1 kadar iyi anlaşılammışlardır. PON1 ve PON3 genlerinin ürünü plazma da yer alırken, PON2'nin hücre içi yerleşimli olduğu söylenmektedir (17,18). Son yıllarda yapılan bazı araştırmalarda PON2 ve PON3 gen ailesinin PON1'in aktivitesine katkıda bulunduğunu ve PON2 ve PON3'ün KAH da en az PON1 kadar kıymetli olduğunu rapor etmişlerdir (19). Fakat bizler PON1 den bahsederken aslında PON1'in paraoksonaz ve arilesteraz aktivitesinden bahsedeceğiz. PON1 de 2 aminoasit polimorfizmi vardır. Bunlardan biri 55. pozisyonda metionin ile lösin (M/L) aminoasitlerinin yer değişmesiyle, diğeri 192. pozisyondaki arginin ve glutamin aminoasitlerinin yer değiştirmesinden [R/Q(bazı kaynaklarda Q yerine A genotip, R yerine B genotip kullanılmaktadır)] meydana gelir. PON1 promotor bölgesinde bu polimorfizmlerden başka bilinen beş tane daha polimorfizm bulunur. Populasyonlardaki polimorfik dağılım bireyler arasında farklılığa neden olur. Polimorfizm arilesteraz aktivitesini etkilemez, arilesteraz aktivitesi PON1 aktivitesindeki değişikliklerden bağımsız, esas olarak protein konsantrasyonunun göstergesi olarak kabul edilebilir. Yani Paraoksonaz; aktivite polimorfizmi göstermeyen arilesteraz aktivitesine de sahiptir (20). PON1'in 55. pozisyonda lösin (L genotip) yerine metionin (M genotip) gelmesinin aktivite üzerine etkisinin çok az olduğu belirtilmiştir (21). Ancak 192. pozisyondaki arjinin yerine glutamin gelmesi aktiviteyi en az 8 kat azaltmaktadır. Paraoksonaz enzim aktivitesindeki polimorfizm, PON1192R izoformu, paraoksonu PON1192Q formundan daha hızlı hidroliz ederken, PON1Q192 izoformu diazokson, somon'u daha hızlı hidroliz eder (22).

Paraoksonaz allozimlerin kantitatif ve kalitatif olarak farklı olduklarının keşfi ile fenotipleme metodları geliştirilmiştir. 1984'te La Du BN ve ark. dual substrat metodu diye adlandırdıkları bu metoda göre (23); İki izoenzimin tuz ve pH'ya farklı yanıtlarına göre iki fenotip tanımlamıştır. Tuza yanıt veren B allozim paraoksona karşı daha yüksek enzim aktivitesine sahiptir. Paraoksonaz aktivitesi 1M (Molarite) NaCl ile stimüle edildiğinde aktivesi artarken, arilesteraz aktivitesinde ise düşme olduğu tespit edilmiştir. Bu analizde trimodal dağılım izlenir. Geniş-düşük aktivite piki "düşük aktiviteli homozigotları-AA", küçük yüksek aktivite piki "heterozigotları-AB", en küçük aktivite piki ise "yüksek aktiviteli

homozigotları-BB" temsil eder. En yaygını homozigot-AA (QQ), ikincisi heterozigot-AB (QR), en az olanı homozigot-BB(RR)'dir. Paraoksonaz polimorfik dağılımı büyük interetnik değişkenlik gösterir. Karakaya ve ark. (24), bu tipte trimodal dağılımı Türk populasyonunda göstermiştir. Ancak bu trimodal dağılımı ilk olarak Mallinckrodt ve ark, tarafından sergilenmiştir (25).

Paraoksonaz için ilgili insan geni ayrıca HUMPONA olarak isimlendirilmektedir. Düşük paraoksonaz aktivitesi hiperkolestrol ve diyabetlilerin de içinde bulunduğu KAH hastalarında görülür. Çünkü bu gruplarda lipid peroksidasyon ürünleri, aterosklerozis'in gelişimini hızlandırır ve insan şilomikronlarında lipid oksidasyon ürünlerini artırır. Ayrıca PON1 aktivitesinin diyet alımıyla yakından ilişkili olduğu söylenmektedir. Diyette bulunan meyve, çay ve tereyağının PON1 aktivitesi artırdığını ve diyet içeriğindeki karbonhidrat, protein, MUFA, PUFA, E Vitamini, flavonoidler ve Qercetin ile korele olduğunu rapor eden çalışmalar mevcuttur (26) Yüksek seviyedeki PON1'den saflaştırılmış PON1192RR ve PON155LL'nin paraokson hidrolitik aktivitesi en yüksekken, PON1192QQ ve PON155MM de bu aktivite en düşüktür. R allelin kodladığı proteinin paraokson hidroliz aktivitesi Q allele göre sekiz kat yüksektir. Aktivitenin ara basamağı homozigotlardır (27). Substrat spesifitesinin benzer basamakları metil paraokson, klortion-okson gibi diğer oksonlarda ve armin'de gözlenebilir. Diğer yandan paraoksonaz alloenzimlerin oksidasyondan LDL'yi koruma kapasitesi paraokson hidrolitik aktivitesi ile tamamen terstir. Böylece, PON155MM /PON1192QQ alloenzim bulunan bireylerin HDL ve PON1 ile ilişkili olarak en büyük koruma kapasitesine sahip olmalarının yanında, bu alloenzimler diazoxon ve somon ve sarin gibi sinir gazlarını hidroliz etmede de aktif rol üstlenirler (28,29).

Türk populasyonunda oldukça düşük oranda görülen RR alleli; doğu populasyonlarından düşük Avrupa ırkına yakın değerler göstermiştir (30). Düşük aktivite görülen Q alleli Avrupa, Kanada ve Amerika'da yüksek, Avustralya, Aborjin, Zambiya ve Zimbabve'de düşüktür. Avrupa populasyonlarında izlenen %50 civarında düşük aktivite izoformu ve bimodalite Avrupa'dan uzaklaştıkça azalır. Afrika ve doğu ülkelerinde dağılım unimodaldir, bu ırklarda düşük aktiviteli genotip sıklığı az görülür.



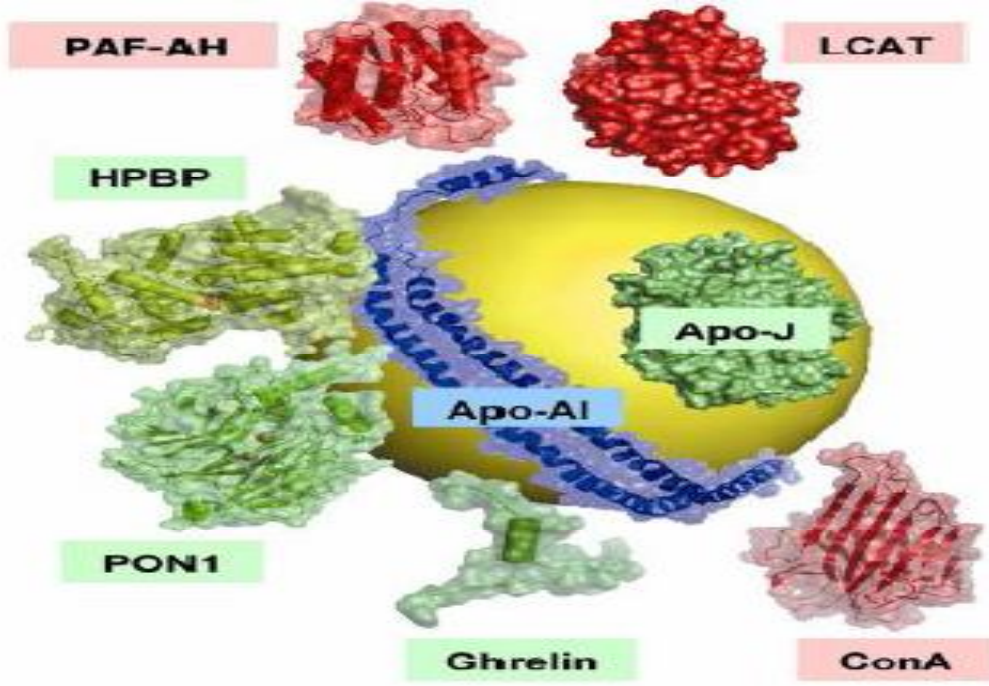
## 2.1. Yapı ve etki Mekanizması

Paraoksonaz (EC 3.1.8.1.) 43-45 kDa ağırlığında, 354 amino asit içeren ve glikoprotein yapısında olan, kalsiyum bağımlı bir esterazdır. Her molekül toplam ağırlığın % 15.8'ini oluşturan üç karbohidrat zinciri içerir. İzoelektrik noktası 5.1'dir. İnsan serum paraoksonazı; HDL'nin içerdiği apo A-1 ile yakın ilişkileri olan, lipid peroksidasyon ürünlerinin birikmesini azaltan diğer bir deyişle LDL'deki okside olmuş lipidleri hidroliz eden, antioksidan etki gösterdiği çeşitli kaynaklarda belirtilen, enzim aktivitesi kalsiyuma bağımlı karaciğerden sentezlenen esterazdır. Organofosfatların hidrolizini katalizler.

Karaciğer, böbrek, barsak ve serumda HDL' ye bağılı, yaygın olarak bulunur (22,31). PON1, paraokson gibi fosfonik ve fosfinik asit esterleri üzerine etki eder. Şelatör maddeler tarafından inhibe olur, aktivite için divalan katyonlara ihtiyaç duyar (32). İnsan serum paraoksonazı yaşa bağılı olarak azalma gösterir (33). Serum düzeyleri birçok nedene bağılı olarak değişebilir ve enzimatik aktivite bireyler arasında 10-40 kat değişkenlik gösterir (34). Serum enzim aktivitesi yenidoğan ve prematür infantlarda erişkin düzeylerinkinden daha düşüktür. Erişkin düzeylerine doğumdan bir yıl sonra ulaşılır. Fetüs'ün karaciğer ve dalağında enzim aktivitesi gösterilmiştir (35,36). Ayrıca akciğer, beyin, pankreas ve plasentada bulunduğu yolunda kanıtlar vardır. Hayvanlarda birçok dokuda özellikle karaciğer, böbrek, ince barsak ve plazmada bulunur. Serum PON1 düzeyleri diyet, akut faz reaktantları, gebelik ve apo A-1 metabolizmasını etkileyen bozukluklardan etkilenir (37).

Paraoksonaz'ın protein kısmında 354 amino asit içinde substrat tanınması ve bağlanması için gerekli olan serbest sisteinlerin yalnız üç tane sistein rezidüsü vardır. Yapısında bulunan üç sistein amino asidinden 284'teki serbest iken, diğer ikisi (Cys 42-352) arasında tek disülfid bağı bulunur. Sisteinler esteraz aktif merkezinin anahtar bileşeni olmasını sağlamıştır. Dolayısıyla enzim aktivitesi sülfhidril bileşikleri ile inhibe olur ve bu inhibisyon sistein ile geri döner. Bu da PON1'in antioksidan kapasitesinin serbest tiyol gruplarıyla orantılı olduğunu göstermektedir (38).

Aşağıdaki şekilde Paraoksonazın HDL ile etkileşim bölgelerini göstermektedir. Pozisyon 55 ve 192' de iki polimorfik bölge belirtilmiştir. Rezidü 42 ve 353 arasında sisteinlerin oluşturduğu disülfid bağı ve 284 pozisyonunda sistein vardır. Potansiyel karbohidrat zincirleri ve amino terminal ucunda hidrofobik baş gösterilmiştir (39).

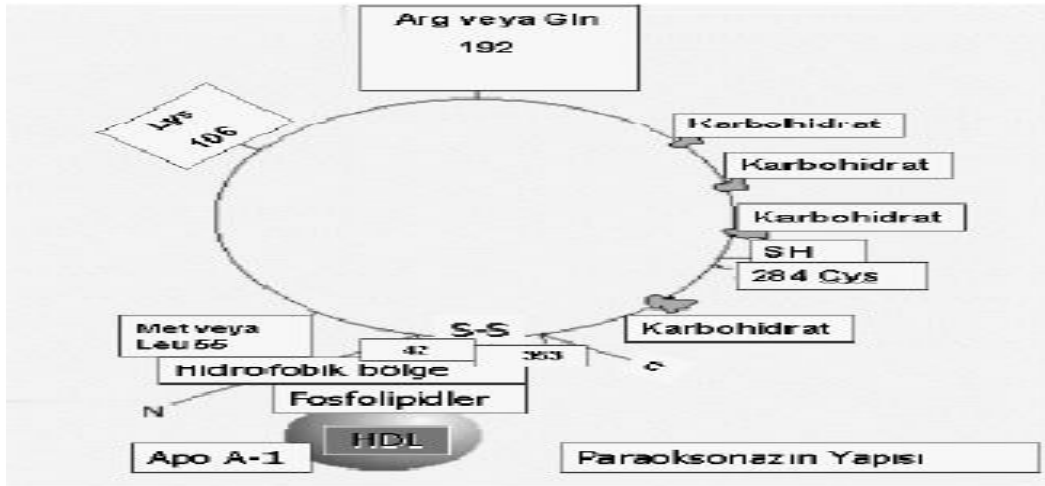


Şekil 1.1. HDL partikülü ve Paraoksonaz enzimi (103).

Enzim aktivitesini ölçmede, serum yada EDTA'sız plazma gereklidir. Çünkü yapısında kalsiyumun direk olarak katalitik reaksiyonda yer aldığı veya aktif alanın uygun konformasyonunu sağlayarak korunmasında rol oynadığı düşünülmektedir. E52 ve D53 aminoasitlerinin kalsiyumu ( $Ca^{+2}$ ) bağladığı, histidin ve triptofan başta olmak üzere en az yirmi aminoasit ile disülfid bağının arilesteraz ve paraoksonaz aktivitesi için temel olduğu ortaya konmuştur. Paraoksonaz/arilesteraz enzim aktivitelerinin  $Ca^{+2}$ 'a bağımlı olma özelliğiyle  $CO_2$ ,  $Mn_2$ ,  $Mg_2$  kullanan diğer A esteraz tipi enzimlerden ayrılır. Tavşan ve insan cDNA klonlarının nükleotid dizilimleri arasında %86, aminoasit dizilimleri arasında %85 benzerlik gösterilmiştir. İnsan ve tavşan serum paraoksonazı amino terminalinde hidrofobik sonlanma nedeniyle diğer lipoproteinlere ve lipid içeren partiküllere sıkı bağlanır.

Bu hidrofobik bölge ile HDL'deki fosfolipidlere bağlandığı ortaya konmuştur. Apolipoprotein A-1'in, paraoksonazın fosfolipidlere bağlanması ve stabilizasyonunda rol oynadığı düşünülmüştür. Özellikle HDL3 faksiyonunun fazla olduğu bireylerde ve Apo J içeriğinin yüksek olduğu HDL3'lerde paraoksonaz aktivitesinin daha fazla olduğu tespit edilmiştir (40,41). Dolaşımdaki PON1 ve HDL arasındaki ilişki, PON1 ekspresyonu ve biyolojik rolü, HDL ile ilişkili diğer proteinlerce etkilenebileceğini göstermiştir. Örneğin, PON1 ancak HDL tarafından sunulduktan sonra, endojen substratı ile etkileşebilir ve

biyolojik özelliklerini sergileyebilir. Bu nedenle, PON1 ve HDL arasındaki ilişkinin anlaşılması, katalitik komponentlerinin belirlenmesi açısından önemlidir (şekil 1). Diğer apoproteinler PON1 ve HDL ilişkisine katılabilir. PON1 ve Apo A-1 arasında ilişki noniyonik deterjanlar varlığında PON1 ve apoproteinler saflaştırılamamaktadır. Bu bulgulara ilaveten, enzimi Apo A-1' den ayırmak için noniyonik deterjanlar kullanmak gerekmektedir (22).



Şekil 1,2. İnsan serum paraoksonaz enziminin yapısı (102).

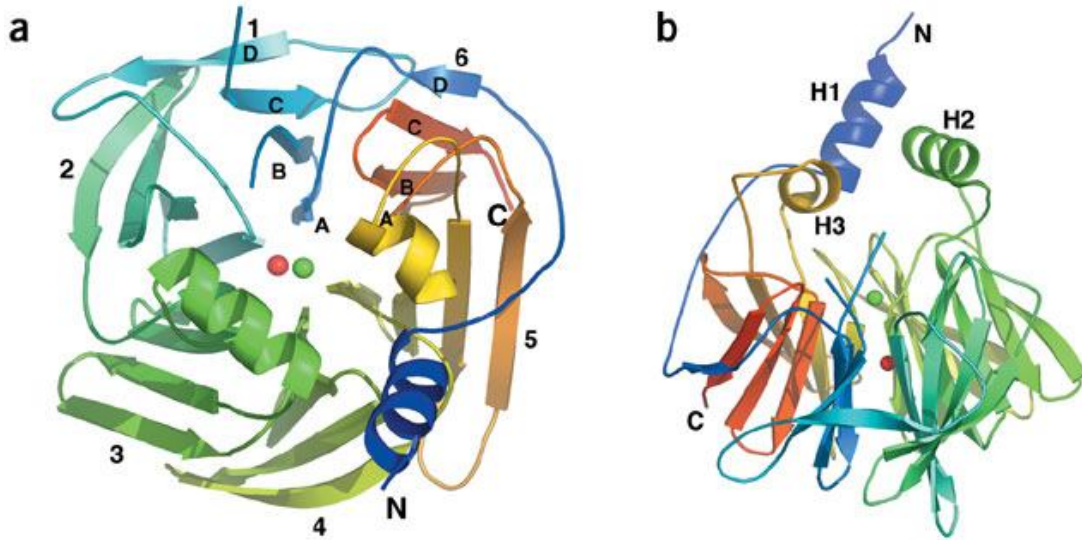
Aldridge organofosfat bileşenleri ile esterazların etkileşimine dayanan esteraz sınıflamasının bir metodunu ortaya koymuştur. B esterazlara organofosfatları inhibe ederken, A esterazlar ise organofosfatları hidrolize eder. A esterazlar arildialkilfosfataz (paraoksonaz) ve diisopropilflourofosfataz (DFPaze)'ları içerir. Organofosfatları hidrolize eden A esterazlar, karbamatlar ve aromatik karboksilik esterlerdir. B esterazlar ise karboksiesteraz ve kolinesterazları içerir. Organofosfatlar tarafından asetilkolinesterazın inhibisyonu, insektisitler olarak büyük ölçüde kullanılır ve sinir gazları olarak pazarlanır. A esterazlar organofosfatları kısmi olarak zararsız maddelere hidrolize eder ve onların zararlı etkilerine karşı korur (42).

## 2.2. PON1 Sentezlenmesi ve Salgılanması

PON1 sentezi karacigerde gerçekleştiğinden, serumdaki PON1 seviyesini belirleyen başlıca faktör karaciger fonksiyonlarıdır. Serumdaki PON1 seviyesi ve aktivitesi bireyler arasında çok degiskendir (43). Bunun nedeni enzim aktivitesini ve peptit konsantrasyonunu etkileyen PON1 geninin kodlanma ve promoter bölgesinde çok sayıda polimorfizm göstermesidir. PON1'in serumdaki aktivitesini ve konsantrasyonunu belirleyen promoter

aktivitesi üzerinde en önemli polimorfizm - 107 pozisyonundadır (44, 45). PON1 sentezinde önemli olan bir diğer faktör karaciğer hücrelerindeki kolesterol dengesidir. Ayrıca PON1'in karaciğerden sentezini herhangi bir hastalık durumu da etkilemektedir (46-47).

PON1 karaciğerden sentezlendikten sonra serumda HDL'ye veya karaciğerde mikrozomlara bağlanabilmesi için sentez sırasında N-terminal hidrofobik bölgesi olması gerekmektedir. N-terminal hidrofobik bölgesi bağlanmada belirleyici olduğu kadar salgılanma prosedüründe de önemli role sahiptir (48, 49). Yapılan çalışmalarda hamster ovaryum hücresi ve insan hepatosit hücresine transfekte edilen PON1'in, sentezlendikten sonra hücre zarının dış yüzeyine bağlandığı gösterilmiştir (50). PON1'in karaciğerde sentezlendikten sonra da önce mikrozomlara, daha sonra hücrenin dış yüzeyine bağlandığı düşünülmektedir [51, 52]. Hücre zarının dış yüzeyinden salınması ve HDL'ye bağlanması tesadüf değildir. Bu bağlanmada fosfolipit kompleksi önemli rol oynamaktadır. PON1'in hücreden salınması ve HDL'ye bağlanması için HDL'deki fosfolipit içeriği yeterli değildir [26, 50, 51].



Şekil 1.3. PON1 proteininin üç boyutlu yapısı. (a) 6'lı β pervane yapısının üstten görünümü. N, C terminali ve merkezde 2 kalsiyum iyonu (Ca1, yeşil; Ca2, kırmızı) (b) 6'lı β pervane yapısının yandan görünümü. H1, H2, H3 helixlerinin görünümü (104).

### 3. PON1 ve Organofosfatlar Arasındaki İlişki

Paraoksonaz için doğal ve fizyolojik substrat keşfedilememiştir. Bu nedenle katalitik aktivite daha önceden var olan bir enzimin evrim sürecindeki değişimi ile oluşmuştur. Organofosfatlı insektisitlerin çok yaygın olarak kullanılıyor olması, bu modifikasyonda rol oynamış olabilir. Paraoksonaz'ın endojen serum ve doku substratlarına karşı spesifitesi karakterize edilmiştir. Sentetik substratlar bu enzim aktivitesini görüntülemek için kullanılır. Kısmen saflaştırılmış PON1 enjekte edilen ratlar veya saflaştırılmış PON1 enjekte edilmiş fareler (53,54) belirli organofosfat bileşiklerine karşı rezistanslarını arttırmışlardır. Bu nedendirki; PON1'in en iyi bilinen koruyucu fonksiyonu organofosfat sinir ajanları, aromatik karboksilik asit esterleri ve insektisitleri hidrolize etme yeteneğidir. Paraoksan; asetilkolini yıkan kolinesterazların güçlü bir inhibitörüdür; Ardışık nöron overstimülasyonu ile sinaptik aralıkta asetilkolin birikimine neden olur (55).

Saf insan serum PON1 enziminin bazı organofosfat bileşiklerini hidroliz ettiği gösterilmesine rağmen, insan organofosfat metabolizması ile ilişkisi tam olarak açıklanamamıştır. Farklı populasyonlarda izlenen aktivite değişkenliği organofosfat hidroliz hızlarında farklılık ile birlikte olabilmekte ve bu insanlarda seçici toksisiteyi etkileyebilmektedir. Organofosfatlara karşı koruma sadece enzimin kan ve doku düzeylerine değil, partiküler izoenzimlere de bağlıdır. PON1192R izoformu, paraoksonu PON1192Q formundan daha hızlı hidroliz ederken, PON1192Q izoformunun diazokson, somon ve sarin'i in vitro koşullarda daha hızlı hidroliz ettiği gösterilmiştir. Bu nedenle PON1'in koruyucu rolü değerlendirilirken düzeyi, yanı sıra tipi de dikkate alınmalıdır (56,57,58).

Körfez savaşı sendromu olarak bilinen hastalık, Irak'a gönderilen Amerikan askerlerinde gözlenmiştir. Bazı askerlerde buna bağlı yorgunluk, kas güçsüzlüğü ve nörolojik hasarlar görülürken, bir diğer askerde sendrom belirtilerine rastlanmamıştır (59). PON1 enziminin, Irak tarafından kimyasal silah olarak kullanılmış olan sarin, diazokson gibi organofosfor bileşikleri detoksifiye ettiğinin anlaşılmasından sonra körfez savaşına katılmış olan askerlerde PON1 aktiviteleri araştırılmış ve körfez savaşı sendromu olan hastalarda PON1 aktivitesi oldukça düşük bulunmuştur (59).

Birçok sayıdaki organofosfat bileşikleri Karaciğerde önce mikrozomal enzimler tarafından metabolize edilirler. bu bileşikler serum Aesterazlar (PON1 v.s) tarafından hidroliz edilirler. organofosforları hidroliz etmesi aynı zamanda karaciğerde de olduğu düşünülür. Böylece hepatik yıkımdan kaçan okson, paration, somon, sarin v.b organofosfatlar kendi etki alanına girmeden önce (bu alanlarda asetilkolinesteraz'ı inhibe ederek nörotoksik etki gösterebilir) kanda serum PON1 enzimi ile hidroliz olur. Memelilere kıyasla kuşlarda serum PON1'in tam yokluğuna bağlı olarak organofosfat zehirlenmesine yatkınlık daha yüksektir (Bizim yayınlanmamış 43 bildircin ile olan bir çalışmamızda serum paraoksonazi ve arilesterazında herhangi bir aktiviteye rastlamadık). Benzer durum sürüngen ve balıkların zehirlenmeye yatkınlığını açıklar.

### **3.1. PON1 ve Ateroskleroz Arasındaki İlişki**

Paraoksonazın farelerde ateroskleroza karşı koruyuculuğu gösterilmiştir.Bu çalışmayı PON1' in okside olmuş lipidlerin metabolizmasındaki rolü (60) ve PON1I92R zoformunun koroner arter hastalığında risk faktörü olarak belirlenmesi (61) yönündeki çalışmalar desteklemiştir. Son yıllarda yapılmış olan çalışmalar, HDL' ye bağlı bir enzim olan PON1'in okside olmuş lipidlerin metabolizmasında ve aterosklerozdan korunmada önemli fizyolojik rolü olduğu yönündedir (60,62). Nitekim, yakın zamana ait çoğu çalışmalar, 1950'li yıllardan itibaren organofosfatlı insektisitlerin detoksikasyonu ile ilgilidir (63).

Paraoksonaz ve Apo A-1 arasındaki yakın ilişki, bu iki proteinin doğrudan bağlandığını düşündürür. İnsan ve tavşan serumlarından saflaştırılan PON1'in sekans analizleri PON1'in farklı bir özelliğini göstermiştir. Her iki türde de dolaşımda bulunan formu N-terminal hidroforbik sinyal sekansına sahiptir (53,54,64,65). Bu bulgular, PON1'in hidroforbik N-terminalinde sekansının HDL ile etkileşimini kolaylaştırdığı fikrini ortaya koymuştur. Bu sinyal peptid yapısında, büyük ve polar rezidüleri mevcutken, daha küçük rezidüleri de vardır ve sinyal peptidazlarla parçalanmalarına engel olur (65,66). Histidin ve glutamin rezidülerinin, pozisyon 20 ve pozisyon 21 'de sırasıyla alanin ile yer değiştirilmesi, in vitro normal ve salgılanan PON1, ekspresyonuna yol açar. Ekspresyon edilen protein, N-terminal hidroforbik sinyal sekansı bölünerek PON1' in lipoproteinlerle etkileşmesi için gerekli olup olmadığı araştırılmış ve PON1 ile HDL birleşmesi için N-terminal hidroforbik sinyal peptidin

yapıda gerekli olduğu saptanmıştır. Yine N-terminal hidrofobik peptit doğrudan fosfolipidlere, apolipoprotein noksanlığında bağlanır. PON1 ve HDL, HDL üzerindeki fosfolipidlere bağlanarak dolaşımında bulunabilir (67).

Serum paraoksonaz aktivitesi miyokard enfaktüslü (68), ailesel hiperkolesterolemili (67), diyabetik (124) hastalarda sağlıklılara göre daha düşük bulunmuştur. Her ne kadar PON1' in bazı organofosfat zehirlenmesine karşı koruyucu olduğu söylenirse de, fizyolojik rolü bilinmemektedir. Bunun yanısıra, PON1' in oksidatif hasara karşı koruyucu olduğu belirtilmektedir (69,70,71). PON1'in LDL oksidasyonuna karşı antioksidan HDL savunmasına katkıda bulunduğu belirtilmektedir. HDL-aracılıklı PON1 veya saflaştırılmış PON1'in LDL oksidasyonu prosesinde, başlangıç (konjüge dien oluşumu), yayılma (peroksit oluşumu) ve ayrışma (aldehit oluşumu) fazlarındaki etkisi araştırılmıştır. HDL'nin LDL oksidasyonu üzerine olan inhibitör etkisinin, metal iyon şelasyonu veya peroksidaz benzeri 43 aktiviteden kaynaklandığı söylenilmektedir. HDL-PON1, okside olmuş LDL'den ayrılan uzun zincirli okside olmuş fosfolipidleri hidroliz edebilir (68-70-71). Son olarak Apo E eksik olan farelerde hızlı ateroskleroz oluşumu ve oksidatif stres artışı belirgindir (73). Benzer şekilde, aterojenik diyet uygulanan farelerde diyet aracılıklaortik yağ kalıntılarına yatkındır (74). Bu koşullar altında, farede serum PON1 düzeyleri baskılanmıştır ve LDL oksidasyonuna karşı savunma yeteneğini kaybetmiştir. Kısmen okside olmuş LDL'nin bu farelere enjeksiyonu serum PON1 aktivitesini belirgin şekilde düşürmüştür (75).

### **3.2. PON1' in Ox-LDL ile Etkileşimi**

Yüksek dansiteli lipoprotein bağımlı PON1, LDL'yi oksidasyona karşı korur ve aynı zamanda PON1 makrofajlarıda oksidatif stres'den korur (76). PON1 inhibitörleri HDL ile birlikte eklendiğinde, LDL oksidasyonunun artırması hem PON1 inaktivasyonuna hem de HDL lipitlerinin total lipit peroksit oluşumuna katılmasına bağlıdır (77). İn vivo serum PON1 HDL'ye bağlı olduğu için başlıca görevi HDL'yi oksidatif stresin zararlı etkilerinden korumaktır. Bu nedenle, bir çok çalışma HDL bağımlı PON1'in yalnız LDL oksidasyonunu değil, aynı zamanda HDL oksidasyonunu da (geçiş metal iyonları ve serbest radikalleri aracılığıyla oksidasyon indüklendiğinde) engellemektedir . Bu etki PON1'in lipoprotein-kaynaklı peroksitlerini hidroliz edebilme özelliğine bağlıdır (78). Benzer ester bağı lipoprotein kaynaklı fosfolipid peroksitlerinde ve kolesteril ester peroksitlerinde bulunabilir.

Okside olmuş lipoproteinlerde benzer bir kimyasal yapı HDLbağımlı PON1 için fizyopatolojik substrat olabilir. Okside olmuş HDL'de bulunan peroksitlerin PON1 aracılığıyla hidrolizi, PON1'in daha önce oluşturulmuş olan okside lipoproteinler üzerine ve buna bağlı olarak aterojenik etkileri geri çeviren mekanizmalarda rol oynadığını düşündürür. Okside olmuş HDL' ler üzerine PON1 etki ettikten sonra, yağ asiti hidroperoksitlerinin birikimi azalmıştır. Nitekim bu ürünler hızla metabolize edilirken, PON1 esterase aktivitesi azalmamıştır (78).

Paraoksonaz ve arilesteraz yalnızca lipoprotein kaynaklı peroksitleri (kolesteril linoleat hidroperoksitleri) hidroliz etmekle kalmaz, bunun yanısıra hidrojen peroksiti ( $H_2O_2$ ) de hidroliz eder. PON1 spesifik lipid peroksitleri hidroliz eder veya peroksitler için hedef görevi görür.  $H_2O_2$ , arteriyel duvar hücreleri tarafından aterogenez esnasında üretilen başlıca reaktif oksijen türüdür (ROS) ve oksidatif stres altında LDL oksidasyonuna neden olan daha potent ROS'a dönüşür (79). HDL kaynaklı PON1'in  $H_2O_2$  (peroksitlerle beraber) hidroliz etmesi, aterosklerozda rol alan potent oksidanların eliminasyonunda önemlidir. Bu etki PON1'in peroksidaz benzeri aktivitesiyle ve HDL'nin antiaterojenik özelliklerine iştirak etmesiyle açıklanabilir (80).

Yüksek dansiteli lipoprotein kardiyo-protetif etkisi, aterojenik LDL oksidasyonunun inhibisyonu veya azaltılması ile yorumlanmaktadır (79,81,82). Bu inhibisyonu özellikle MCP-1'in endotel hücrelerinden stimüle ederek yaptığı ileri sürülmektedir (83). PON1, doymamış yağ asitlerinin hidroperoksi türevlerini elimine ederek, kısmen okside olmuş fosfolipidleri metabolize eder. (78). Bu nedenle, PON1 ile KAH arasındaki korelasyon, biyoaktif lipid moleküllerinin metabolizması ve okside olmuş LDL' ye bağlı hasara karşı koruyucu olması ile ilişkilidir (84). LDL, poliansatüre yağ asitlerinin oksidasyonu sonucu oluşan aldehit yapıdaki bileşikler, apolipoprotein B üzerindeki lizin rezidülerini modifiye edebilir. Buna bağlı olarak okside olmuş LDL, B/E reseptörünce tanınmaz, makrofaj yakalayıcı reseptör tarafından kontrolsüz uptake uğrar. Sonuç olarak, aterosklerotik lezyonların ilk basamakları olan köpük hücreleri ve yağ kalıntıları oluşur (79).



### 3.3.Çeşitli Hastalıklarda PON1

Hipergliseminin oksidatif stres ve ateroskleroza zemin hazırladığı düşünülürse, DM'li olgularda serum PON1'in rolü ortaya çıkar. PON1192RR ve PON155LL genotipleri IDDM'li (independent Diabetes mellitus) olgularda daha sık izlenmiştir. Ancak yapılan bir çalışmada DM, hiperkolestrolemi, böbrek yetmezliği gibi KAH ile ilişkisi olduğu bilinen hastalıklarda düşük serum PON1 aktivitesinin genotipten bağımsız olduğu çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir. Diyabetik retinopati ve hipertansiyon gelişen olgularda izlenen düşük serum PON1 aktivitesi, lipid peroksidasyonuna artmış yatkınlıktan kaynaklanmaktadır (85).

Lipid peroksidasyonu ve oksidatif hasar etkisi ile gelişen nöronal dejenerasyon izlenen Alzheimer hastalığının ateroskleroz ile ilişkisi bilindiğinden PON1 polimorfizmi ile ilişkisi incelenmiş ancak istatistiksel olarak anlamlı sonuç bulunamamıştır (86). Hepatit C enfeksiyonlu hasta grubunda yapılan bir çalışmada paraoksonaz aktivitesi düşük bulunmuş ve bunlarda PON1192RR polimorfizminin daha yüksek olduğu tespit edilmiş (87). Düşük doğum ağırlıklı yenidoğanlara yüksek miktarda C ve E vitamini verilmesiyle PON1'in polimorfizm de ve doğum ağırlığında değişiklikler saptanmıştır.(88).

Tavşan inflamasyon modelinde serum amiloid A ve seruloplazmin içeren akut faz HDL artışı ile apo AI, PON1, PAF' ta belirgin azalma gösterilmiş ve HDL'nin antiinflamatuvar/antioksidan durumdan proinflamatuvar/prooksidan duruma dönüşümü sorumlu tutulmuştur. Ateroskleroz riski bulunan üremik renal transplantlı olgularda düşük PON1/HDL ve PON1/apoAI oranları izlenerek bu olgularda HDL'nin antioksidan kapasitesinin azaldığı düşünülmüştür. Sporadik idiopatik Parkinson olgularında PON1 ile metabolize olan çevresel nörotoksinlerin yaşla birlikte nörodejenerasyondan sorumlu tutulabileceği ve B allelin Parkinson hastalığına genetik yatkınlık oluşturabileceği ileri sürülmüştür.(89). Hiperhomosisteinemi olan çocuklarda paraoksonaz ve arilesteraz enzim aktiviteleri düşük bulunmuş ve bunlarda metilasyon reaksiyonlarındaki bozukluğa bağlı olarak nörotransmitterlerin yapısının bozulabileceği bildirilmiştir (90). Lipid oksidasyonuna predispozan bir hastalık olduğu öne sürülen hipertroidili hastalarda paroksonaz aktivitesi düşük bulunmuştur (91). Antikardiolipin antikorları pozitif bulunan bir grup hastada mmLDL'ye karşı otoantikörlerin arttığı, PON1 aktivitesinin belirgin olarak düştüğü ve

arteriyel tromboz geliştirme riski yüksek olan R genotipinin de artma eğiliminde olduğu izlenmiştir (92). Sistemik amiloidozda düşük PON1 aktivitesi bildirilmiştir.

Plazma lipoprotein düzeylerinin normalden farklı olduğu balıkgözü sendromunda HDL kolesterol'ün plazma konsantrasyonunun %90 oranında, PON1 aktivitesinin ise %89 düzeyinde azaldığı gösterilmiştir. Diğer yandan bir başka lipoprotein metabolizma hastalığı olan Tangier hastalığında ise PON1 enzim aktivitesi tayin edilememiştir (93,94). Pilor stenozlu infantlar yüksek PON1 aktivitesine sahiptirler. Pilor stenozu operasyonla düzeltildikten bir hafta sonra enteral beslenmenin başladığı zamana kadar yükseklik devam eder (95). Van Lenten ve arkadaşları enflamasyonlu tavsan modellerinde akut faz olarak HDL, amiloid A ve seruloplazminin arttığını diğer taraftan apo A1 ve PON1'in ise dramatik olarak azaldığını göstermişlerdir (96). Bazı deneysel çalışmalarda serum PON1 aktivitesinde değişikliklere rastlanmıştır; yapılan bir çalışmada inflamatuvar cevabın bir parçası olarak düşünülmekte ve ilginç olarak PON1 aktivitesinin kronik olarak azalmasının, sadece ateroskleroza artırmakla kalmayıp, aynı zamanda akut inflamatuvar şartlara göre daha fazla vücutta kuvvetten düşmeye neden olduğu görülmüştür (97).

Sigara gibi çevresel faktörlerin PON1 aktivitesini ve konsantrasyonunu baskılayarak enzimin etkinliğini değiştirebilir. PON1'in paraoksanase aktivitesinin hormon replasman tedavileri ile arttığı gösterilmiştir (98). Paraoksonaz enzim aktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunduğu prostat kanserli bir çalışmada PON1 geninin 102. kodon'unda yeni bir polimorfizm bulunduğunu ve bu polimorfizm 102'de İzolösinin Valin ile yer değiştirmesiyle meydana geldiğini, bu polimorfizm'in prostat kanserinin nedenlerinden biri olabileceğini ileri sürülmektedir (99).

#### **4. Bakteriye endotoksinlerin toksisitesine karşı koruma**

Paraoksonazın buraya kadar ortaya konan fonksiyonlarının doğal fonksiyonları olmadığı düşünülür. Çünkü organofosfat bileşikleri doğada bulunmayan sentetik maddelerdir ve PON1'in bu maddeleri hidroliz etmesi çalışma sonucu bulunmuştur. Ox-LDL üzerine etkisinin organik fosfatlarla fosfolipidlerdeki bağların yapısal benzerliğinden kaynaklandığı düşünülürse PON1 enziminin gerçek substratının farklı olması gerektiği ortaya çıkar. İnsan serumunda HDL'de bulunan bir proteinin bakteriyel lipopolisakkaridi inaktive ederek endotoksemik semptomları önlediği yirmi yıl önce gösterilmiş ancak lipopolisakkarid

inaktivasyonunun immunolojik olmaktan çok enzimatik bir reaksiyon olduğu ve sorumlu enzimin PON1 olduğu yeni saptanmıştır (100). PON1, bakteriyel lipopolisakkaridi 'Lipid A' molekülündeki 4' fosfat üzerine fosfataz etkisi ile hidroliz eder. HDL'nin bir alt birimi olan tripanolitik faktör (TLF) "trypanosoma brucei brucei"e sitotoksiktir ve apo A-1, haptoglobülin ve PON1 ile ilişkili bir proteindir. Lizozomal pH'da PON1 peroksidaz aktivitesi gösterir. HDL'nin gram (-) bakteriyel enfeksiyon sırasında endotoksemi gelişimine karşı koruyucu olduğu bilinmektedir. Bazı bilinmeyen yollarla makrofaj hücre yüzeyindeki spesifik bağlayıcı protein (Cd14) ile lipoprotein polisakkaridin etkileşimini önler. Bu şekilde TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 gibi sitokin salınım kaskadının başlaması önlenir. PON1 tip ve düzeyinin bireylerin endotoksinlere karşı direnç ve duyarlılığında fark oluşturup oluşturmadığı sorusu henüz açıklığa kavuşturulamamıştır (101).

## 5.MATERYAL ve YÖNTEM

### 5.1. Materyal

#### 5.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Çalışmalarımızda kullanılan standart serum albümin, N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin (TEMED), diyaliz torbaları; sodyum hidroksit, trihidroksimetilaminometan (Tris), amonyum sülfat, sodyum klorür, sodyum asetat, hidroklorik asit, glisin, fosforik asit, gliserin, potasyum fosfat, potasyum bisfosfat, potasyum asetat, potasyum klorür, etanol, metanol, asetik asit, sodyum asetat, izopropanol E.Merck AG'den; akrilamid, N,N'-metilen bisakrilamid, coomassie brilliant blue G-250, brom timol mavisi, sodyum dodesil sülfat (SDS), , agar, 1-naftilamin, amonyum persülfat,  $\beta$ -merkaptoetanol; Sigma Chemical Comp.'den HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR, (GE Healthcare), HiTrap Blue HP (GE Healthcare), Cibacron Blue 3GA Agarose Type 3000-CL, saline suspension (Sigma), Sodium deoxycholate (Sigma), Econo-Column Chromatography Columns, (Biorad), Amonyum Sülfat (Sigma), HiTrap AE Ion Exchange Cartridge (Supelco) temin edilmiştir.

#### 5.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar

<u>Kullanılan cihazlar</u>	<u>Marka</u>
Santrifüj	Hettich Universal 30 RF
Derin dondurucu	Rewco
Dikey jel elektroforez sistemi	Biorad Mini- Protean® Tetra Cell Protein Elektroforezi
Fraksiyon kollektörü	Bio-Rad, Foxy 200
Isıtma tablası	Eppendorf thermomixer
Jel görüntüleme sistemi dansitometri	Biorad GS -800
PCR cihazı	Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler
Syringe filters	Corning
Ultra santrifüj	Beckman coulter, Optima LE- 80K
UV-Visible spektrofotometre	Cecil

### 5.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

### 5.1.4. Amonyum sülfat çökeltisinin çözünmesi ve diyaliz için kullanılan çözeltiler:

1. 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris/HCl PH:8: 0,294 gr CaCl<sub>2</sub> ve 3,152 gr Tris/HCl tartılıp 800 ml distile suda çözülüp 1000 ml tamamlandı.

2. (Diyaliz için) 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris/HCl pH:8: 0,294 gr CaCl<sub>2</sub> ve 3,152 gr Tris/HCl tartılıp 800ml distile suda çözülüp 1000ml tamamlandı.

3-Afinite kolonu için; yıkama tamponu olarak 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris/HCl pH:8 Hazırlanış: 800ml distile suda 0,1576 gr CaCl<sub>2</sub> ve 3,152 gr Tris/HCl tartılıp çözündü ve 1000 ml tamamladı. Bu tampondan 800ml alınarak 4M (233,76 gr NaCl tartılıp 800ml çözündü ve 1000ml tamamlandı ), 3M(175,32 gr NaCl tartılıp 800ml çözündü ve 1000ml tamamlandı), 2M (116,88gr NaCl tartılıp 800ml çözündü ve 1000ml tamamlandı) ve 1M(58,44 gr NaCl tartılıp 800ml çözündü ve 1000ml tamamlandı) NaCl hazırlandı. Elüsyon tamponu olarak 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris/HCl tamponu(0,14701 gr CaCl<sub>2</sub> ile 3,152 gr Tris/HCl tartılıp 800ml çözündü ve 1000ml tamamlandı.) içinde %0,1 sodyum deoksikolat ile hazırlandı.

4-İyon değişim kromatografisi için; 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris/HCl PH tamponu içinde 15mM, 400 mM NaCl (,14701 gr CaCl<sub>2</sub> ile 3,152 gr Tris/HCl tamponu içinde 0,8766 gr NaCl ve 23,376 gr NaCl )

### 5.1.5. Chibacron Blue Nonspesifik affinite kolonu için kullanılan tamponlar

Affinite kolonu ile saflaştırma işleminde kolonun hazırlanması, örneklerin yüklenmesi ve kolona bağlanan proteinlerin kolondan kopmasını sağlayan tamponlardır. Tüm tamponlar hazırlandıktan sonra, çözünmeyen maddelerin kolona zarar vermesini engellemek için 0.45 µl filtrelerden geçirildi.

#### **PBS (pH; 7,4)**

Madde	Konsantrasyon	Miktar
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	20 mM	1,429 g
NaCl	300 mM	8,766 g
deiyonize su		500 ml'ye tamamlandı.

Madde	Konsantrasyon	Miktar
Tris-HCl	20 mM	3.152gr
CaCl <sub>2</sub>	1 mM	0.14701gr
Triton-X100	% 0,1	1 ml
PBS		1L'ye tamamlandı

**5.1.6.Binding Buffer;** kolona örnek yüklemeyen önce kolon matriksinin, pH ve iyon durumunu dengeye getirir, kolon matriksinin maksimum oranda paraoksonaz enziminin bağlanmasını sağlarken, spesifik olmayan protein bağlanmasını da engeller. Ayrıca protein örneklerinin kolona yüklenmesinde taşıyıcı rol oynar.

#### **Binding /Equbilation buffer ( pH: 8,0)**

Tris-HCl	20mM	3.152gr
CaCl <sub>2</sub>	1 mM	0.14701gr
TritonX-100	%1	1 ml

**5.1.7.Washing Buffer;** İçerisindeki NaCl konsantrasyonu sayesinde kolona düşük iyonik güçte bağlanmış paraoksanaz haricindeki proteinlerin kolondan ayrılmasını sağlayarak, paraoksanazın yüksek saflıkta elde edilmesini sağlayan en önemli etmenlerden biridir. Bu kolon için sırasıyla 4M, 3M, 2M, 1M NaCl içeren washing buffer kullanıldı.

**Binding /Equbilation buffer ( pH: 8,0)**

Tris-HCl	20mM	3.152gr
CaCl <sub>2</sub>	1 mM	0.14701gr
TritonX-100	%1	10 ml
NaCl	4 M, 3M, 2M, 1 M	233,76gr-175,33gr-116,88gr-58,44gr

**Tablo 3.** Bin ml de hazırlanmış . Washing Buffer

**5.1.8.Elüsyon Buffer;** kolon matriksine bağlanan paraoksanazın kolondan ayrılmasını sağlar. Bu işlem elüsyon bufferın içerdiği Sodium Deoksikolat ile olmaktadır. Sodium Deoksikolat, kolona bağlı his gurupları ile yer değiştirerek kolona bağlanır, bu sayede his içeren proteinler kolondan ayrılır.

**Binding /Equbilation buffer ( pH: 8,0)**

Tris-HCl	20mM	3.152gr
CaCl <sub>2</sub>	1 mM	0.14701gr
TritonX-100	%1	10 ml
Sodium Deoxycholate	%0,1	1gr

**Tablo 4.** Bin ml de hazırlanmış. Binding /Equbilation buffer ( pH: 8,0)

**5.1.9. Protein miktar tayininde kullanılan tampon ve çözeltiler**

Protein miktar tayininde Bradford metodu kullanıldı. Bu metod için kullanılan çözeltiler aşağıda verilen tabloya göre hazırlandı.

### **Bradford ayıracı**

Coomassie Brilliant Blue G-250	0,1 g
% 95 'lik etanol	50 ml
% 95'lik Fosforik asit	100 ml
deiyonize su	1L'ye tamamlandı

0,1 g Coomassie Brilliant Blue G-250 50 ml % 95 'lik etanolde çözüldü. Bu çözelti üzerine %95 'lik 100 ml Fosforik asit ilave edildikten sonra deiyonize su ile 1 L'ye tamamlandı. 0,45 µm lik filtre ile filtre edildikten sonra ışık almayan bir şişeye konarak + 4 °C'de saklandı.

**Standart:** 1 mg/ml BSA (bovine serum albümin) içeren stok standart çözeltisi kullanılarak farklı miktarda stok içeren standartlar hazırlandı.

### **5.1.10. SDS PAGE elektroforezinde kullanılan tampon ve çözeltiler**

SDS PAGE elektroforezinde aşağıda verilen tampon ve çözeltiler kullanılmıştır.

**1-%30 Akrlamid / %0,08 Bis akrilamid;** SDS-PAGE jelinin ana bileşeni olup, polimerleşerek jeli meydana getirir. Bu maddeler kullanım konsantrasyonuna bağlı olarak farklı büyüklükteki proteinlerin birbirinden ayrılmasını sağlar.

Akrilamid	30 g
Bis akrilamid	0,8 g
Deiyonize saf su	100 ml'ye tamamlandı.
0.45 µm filtre ile süzülüp, + 4°C'de karanlıkta saklandı.	

**2-1,5 M Tris-HCl / SDS, pH=8,8;** Ayırma jelinin hazırlanmasında kullanılan tampondur. Kullanmadan önce içerisinde bulunan SDS'den dolayı kontrol edilmesi gerekir.

Tris baz	18,2 g
SDS	0,4 gr
Deiyonize saf su	100 ml'ye tamamlandı.



0.45 µm filtre ile süzülüp + 4°C’de saklandı.

**3- 0,5M Tris-HCl/ SDS, pH=6,8;** Yığma jelinin hazırlanmasında kullanılır.

Tris baz 6,05 g

SDS 0,4 gr

Deiyonize saf su 100 ml’ye tamamlandı.

0.45 µm filtre ile süzülüp +4°C’de saklandı.

**4- %10 APS:** TEMED’le beraber serbest radikal molekülleri oluşturarak polimerleşmenin meydana gelmesini sağlar.

Amonyum persülfat 0,1 g

Deiyonize su 1 ml çözülür

Çalışma öncesinde taze olarak hazırlandı.

**5.1.11.Yürütme Tamponu, pH=8,3 (5X):** Örnekleri jele yüklendikten sonra, tank içerisinde uygun iyonik bir ortam oluşturup, protein moleküllerinin elektrik akımıyla hareket etmesini sağlar.

Tris base 15.1 g

Glycine 72.0 g

SDS 5.0 g

Deiyonize su ile 1L’ye tamamlandı.

pH ayarlanmaz. Çalışma yapılacağı zaman su ile 1X olarak dilüe edilir.

**5.1.12. 2X SDS PAGE Örnek Yükleme Tamponu;** İçerisindeki β-mercaptoetanol protein molekülündeki disülfid bağlarının kopmasını, SDS ise protein molekülünün negatif yükle kaplanmasını sağlayarak denatüre olmasını sağlar. Gliserol ve Bromo fenol ise örneklerin jele kolayca yüklenmesini ve jelde hareketinin görüntülenmesini sağlar.

0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	2.5 ml
Glycerol (100%)	2.0 ml
$\beta$ -mercaptoethanol	0.4 ml
Bromophenol Blue	0.02 g
SDS	0.4 g
Deiyonize su ile	10 ml'ye tamamlandı.
Küçük tüplere konulup, kullanıncaya kadar -20 °C'de saklandı.	

**5.1.13. 1X SDS PAGE Örnek Yükleme Tamponu;** 2X SDS-PAGE tamponu deiyonize su ile 1:1 oranında dilüe edilerek hazırlandı.

**5.1.14. Boyama Çözeltisi;** elektrik akımıyla jelde farklı seviyede yürüyen protein moleküllerinin görüntülenmesini sağlar. Bu işlem çözelti içerisindeki Comassie Brilliant Blue G-250 boyasının protein molekülleriyle bağlanması sonucu oluşur.

Coomassie Brilliant Blue G-250	0,1 g
Metanol	50 ml
Asetik asit	10 ml
Deiyonize su	100 ml'ye tamamlandı.
+ 4°C'de karanlıkta saklandı.	

**5.1.14.Jel Yıkama Çözeltisi;** Jel yıkama çözeltisi jel boyanması sırasında, protein molekülü haricindeki jelde bulunan boyanın uzaklaştırılmasını ve protein bandlarının jelde ayırt edilmesini sağlar

Metanol	50 ml
Asetik asit	10 ml
Deiyonize su	100 ml'ye tamamlandı.
+ 4°C'de saklandı.	

## **5.2. METOD**

### **5.2.1. Serum PON1 Enziminin Saflaştırılması**

Paraoksanaz Enzim saflaştırılması için Bayrak., 2008 metodu modifiye edilerek kullanıldı.

#### **5.2.1.1. Serum Örneğinin Hazırlanması**

Sağlıklı gönüllü kişilerden antekübital ven yoluyla alınan antikuagülan içermeyen tam kan +4 °C'de 4000 rpm' de 5 dk santrifüj edilerek serumu ayrıldı. Elde edilen serumda PON1'in paraoksanaz, arilesteraz aktivitesi otoanalizörde ölçüldü ve Bradford metoduyla protein tayini yapıldı.

#### **5.2.1.2. Amonyum sülfat çöktürmesi**

Proteinler çok değerli elektrolitler oldukları için iyonlara benzer şekilde hareket ederler. Yüksek tuz konsantrasyonlarında, protein moleküllerini çevreleyen ve çözünür halde tutan su molekülleri, amonyum sülfat tuzundaki iyonlar tarafından çekilir ve proteinler çöker (salting-out). Gerçekleştirilen amonyum sülfat çöktürmesi deneyleri proteinlerin bu özellikleri esasına dayanmaktadır. Serum PON1 enziminin amonyum sülfat çöktürme aralığı Bayrak., 2008 yaptığı gibi %35-70 arasında gerçekleştirildi (bayrak., 2008 kaynak no:24-25). Çöktürme için kullanılan katı amonyum sülfat yavaş yavaş katılarak manyetik karıştırıcı üzerinde bar ile iyice çözünmesi sağlandı.

#### **5.2.1.3. %35 Amonyum Sülfat Çöktürmesi**

Elde edilen 20 ml serumu %35 amonyum sülfat doygunluğuna getirmek için 3,9 gr. amonyum sülfat kullanıldı. Soğukta 30 dakika manyetik karıştırıcı ile yavaşça karıştırılarak eklenen amonyum sülfatın çözünmesi sağlandı ve 60 dakika bekletildi. Daha sonra +4 °C'de 30.000 xg'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatanın hacmi ölçüldü, protein ve aktivite tayini yapılarak ikinci amonyum sülfat çöktürmesine geçildi.

#### **5.2.1.4. %70 Amonyum Sülfat Çöktürmesi**

%35 amonyum sülfat çöktürmesinden elde edilen 22 ml süpernatana 4,7 gr amonyum sülfat eklenerek %70 amonyum sülfat doygunluğuna getirildi. Bir saat bekletildikten sonra +4 °C'de 30000xg'de 15 dakika. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatana atıldı. Enzim içeren aktif çökelti 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris/HCl tamponunda pH 8 çözüldü. Son hacmi 6 ml olan bu örnek bir gece boyunca, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris/HCl tamponuna karşı gece boyunca diyaliz edildi. Diyaliz sonrası elde edilen 28 ml örnek liyofilizatör kullanılarak kurutulduktan sonra 6 ml 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris/HCl tamponunda pH 8 tamponu ile çözüldü. Konsantre edilen örnekte protein ve aktivite tayini yapıldı.

#### **5.2.1.3. Jel filtrasyon kromatografisi**

Karışımındaki moleküllerin molekül büyüklüklerinde göre ayrılması esasına dayanan kromatografi tekniğidir, Çalışmada HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR, (GE Healthcare) jel filtrasyon kolonu kullanıldı. Kolon kullanımı şu şekilde gerçekleştirildi.

1. Saflaştırma işlemi oda ısısında yapıldı.
2. Kolon fraksiyon kollektörüne bağlandıktan sonra akış hızı 10 ml/saat olacak şekilde ayarlandı.
3. Kolon içerisindeki etanolü uzaklaştırmak için kolondan 100 ml saf su geçirildi.
4. Kolonu dengelemek için kolona Binding /Equibilation buffer (1 mM CaCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris/HCl) buffer yüklendi. Kolondan akan fraksiyonunun absorbans ve pH'sı buffer ile aynı oluncaya kadar bu işleme devam edildi.
5. Protein örneğinin pH ortamını dengelemek için; 5 ml protein örneği, 0.45 µl filtrelerden geçirildikten sonra kolona yüklendikten sonra, Aynı tampon kolondan geçirildi.. Kolondan akan bindig tamponu 2 ml 'lik fraksiyonlar halinde toplandı. jel filtrasyonu sonunda toplanan tüplerde aktivite ve protein tayini yapıldı. Protein derişimi taramaları, 280 nm'deki absorbans ölçümleri takibi ile yapıldı.
6. Son fraksiyonda protein kalmayınca kadar bu işleme devam edildi. Fraksiyonlar toplandıktan sonra kolonun, başka bir saflştırma işleminde kullanılması için rejenere işlemi yapıldı.

#### **5.2.1.4. Birinci HiTrap AE İyon Değiştirici Kromatografi**

Sephacryl 200HR jel filtrasyonu basamağından elde edilen paraoksonaz aktivitesi içeren tüpler birleştirilerek, tampon A ile dengelenen HiTrap AE Ion Exchange Cartridge (Supelco.) kolonuna yüklendi. Kolondan 20 ml A tamponu geçirilerek yıkandıktan sonra, sonra jele bağlanmış enzim, akış hızı 20 ml/saat olacak şekilde tampon A içinde hazırlanmış 0- 0,4 M lineer NaCl gradienti ile elue edildi.

#### **5.2.1.5. Cibacron Blue Non-spesifik Afinite Kromatografisi**

HiTrap AE Ion Exchange kolonundan elde edilen paraoksonaz aktivitesi içeren tüpler birleştirilerek, tampon A ile dengelenen HiTrap Blue HP (GE Healthcare) kolonuna yüklendi. Daha sonra kolon 90 ml/saat akış hızında sırası ile 4M, 3M, 2M ve 1M NaCl içeren tampon A ile, daha sonra ise iyonik gücü azaltmak için sadece tampon A ile yıkandı. Kolona bağlı enzim %0,1 sodyum deoksikolat içeren tampon A ile elue edildi. Paraoksonaz aktivitesi içeren fraksiyonlar bir sonraki basamakta kullanılmak üzere birleştirildi.

#### **5.2.1.7. Protein miktar tayini**

Bradford metoduyla protein miktarı ölçüldü. Bu metod 0,1-200 g protein lme hassasiyetine sahiptir.

1. 1 mg/ml BSA (bovine serum albümin) içeren stok standart zltisi kullanılarak farklı miktarda stok içeren standartlar hazırlandı.
2. 20 l örnek ya da standart üzerine 980 l Bradford ayırıcı eklendikten sonra vortekslendi.
3. Oda ısısında 10 dk inkübe edildi.
4. Spektrofotometerede 595 nm okundu.

### 5.2.1.8. SDS PAGE elektroforezi

Proteinlerin denatüre edilerek büyüklüklerine göre ayrılması SDS PAGE yöntemi ile yapılır. Bu yöntem ile proteinler dimer, tetramer ya da moleküler kompleks oluştursalar bile denatüre formlarında monomer yapıları gözlenir. Yöntem ile oluşturulan jel proteinlerin büyüklük hesaplamasında ve Western Blot'da kullanılabilir.

SDS PAGE jeli iki farklı özellikteki jelden oluşur. Bunlardan ilki ayırma jelidir ve proteinlerin asıl olarak ayrımının yapıldığı jeldir. Sahip olduğu por çapı dar olan bu jel genellikle % 8-12 oranında hazırlanır. Diğer jel ise yığıma jelidir. Bu jel daha geniş por büyüklüğüne sahiptir. SDS'nin proteinleri tam olarak kaplaması ve aynı hizada ayırma jeline yönlendirmesi amacı ile kullanılır. Genellikle % 4-12 oranında hazırlanır.

#### **SDS PAGE işleminin adımları aşağıda verilmiştir.**

1. Elektroforez camları kullanılmadan önce su ve alkol ile yıkanarak iyice temizlenir, sonra camlar arasında 0,75 mm olacak şekilde sistem oluşturulur. Öncelikle jelin hazırlanacağı jel dökme aparatı kurularak su ile test edilir. Sızdırma yapmıyorsa jel hazırlanmaya başlanır.
2. Ayırma jeli hazırlanır, jeli hazırlarken en son aşamada TEMED ve APS eklendikten sonra camlara dökülür.
3. Ayırma jeli döküldükten sonra polimerleşmenin sağlanması ve jelin üst kısmının düz bir şekil alması için 0,5 ml izopropanol ayırma jelinin üzerine hafifçe eklenir 30-60 dk arasında oda ısısında jel polimerleştikten sonra, jel üzerindeki izopropanol kurutma kâğıdıyla uzaklaştırıldıktan sonra su ile yıkanır, kurutma kâğıdıyla su uzaklaştırılır.
4. Yığıma jeli, ayırma jelinin üzerine döküldükten sonra taraklar yerleştirilir. 30-45 dk arasında polimerleşme sağlanır.

5. Jel hazırlandıktan sonra; Protein örneği 1:1 oranında 2X SDS örnek tamponu ile karıştırıldıktan sonra örnekler buz üzerinde tutuldu, sonra 5 dk 95 °C'de inkübe edildi (SDS oda ısısında eklendiğinde protein örnekleri proteazlar tarafından parçalanır, bunu önlemek için buz üzerinde tutulur, proteazları inhibe etmek için kaynatılır). Kaynama işleminden sonra örnekler oda ısısında soğutuldu.
6. 10,000 rpm 'de 2 dk santrifüj edildikten sonra jele yüklenir hale getirildi.
7. Taraklar jelden dikkatlice çıkarıldıktan sonra kuyular 1X SDS elektroforez tamponu ile yıkanarak polimerleşmeyen monomerler uzaklaştırıldı.Çünkü kuyularda polimerleşme olabileceğinden dolayı kuyulara örnek yükleme işlemi aksar.
8. Jeller tanka yerleştirildikten sonra iç kısım 1X SDS elektroforez tamponu ile dolduruldu.
9. Örnekler kuyulara aynı miktar ve yoğunlukta eklenir yoksa yan kuyucuklara yayılma olabilir. Kuyucuklara fazla yüklendiğinde bandlarda bozulma gözlenir. Bu yüzden kuyucuklara 20 µl den fazla örnek yüklenmedi.
10. Protein büyüklüklerinin belirlenmesi için belirteç olarak, Pageruler Prestained markerı (Thermo) kullanıldı.
11. Jeller önce 100 V yürütüldü, bromofenol ayırma jeline geldiğinde akım 120 V çıkarıldı. Bu işlem 2 saat sürdü. Çalışma ortamının ısı 10-20 °C arasında olmalı ve 5 °C'den düşük olmamalıdır. Ortamın aşırı ısınması bandların eğri olmasına neden olmaktadır.
12. Yürütme işlemi bittikten sonra iç kısımdaki tamponu alttaki tampon ile karıştırmadan döküldü. Dış kısımdaki tampon bir kaç kez daha kullanılabilir.
13. Camlar açılıp jel çıkarıldıktan sonra bir köşesi işaretlenir sonrasında boyama işlemine geçildi.

**14.** Jel boyama çözeltilisinde bir gece boyunca bırakıldı. Sonrasında fazla boyanın giderilmesi için jel yıkama çözeltilisine konuldu. Bandlar belirginleşip fazla boya giderildikten sonra jel görüntüledi.

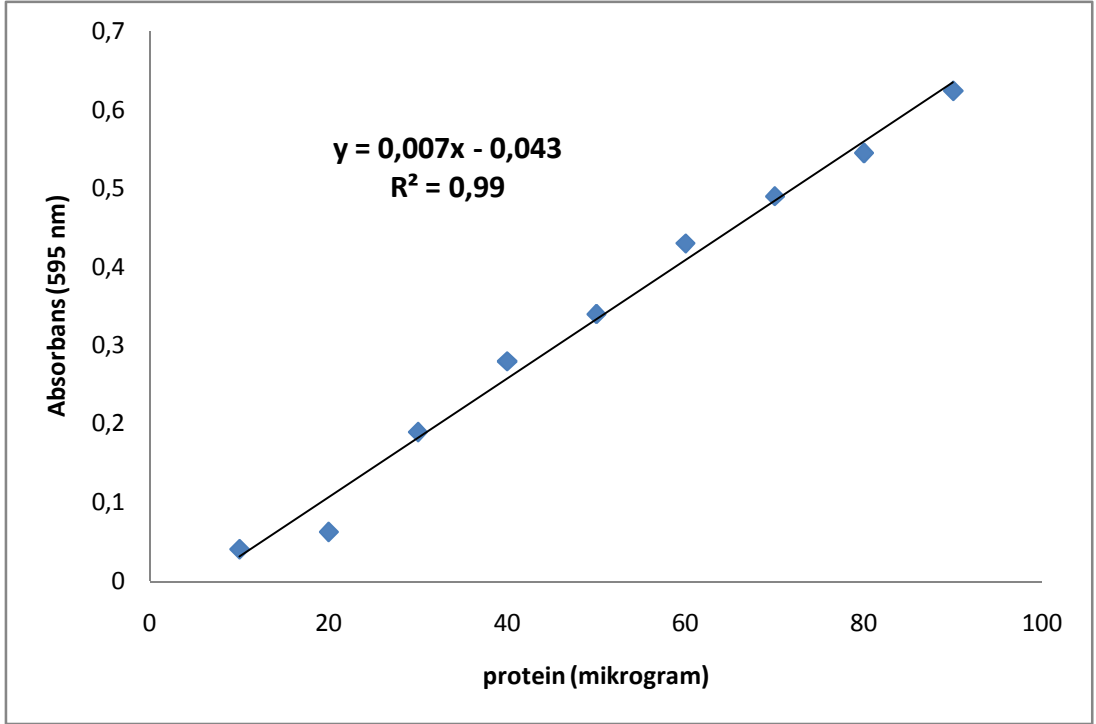


## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

### 4.1. Araştırma Bulguları

#### 4.1.1. Protein Tayini için Kullanılan Standart Grafik

Elde ettiğimiz enzim çözeltilerindeki kantitatif protein tayini Bradford yöntemiyle belirlendi. Bu amaçla önce standart grafik hazırlandı. Elde edilen enzim çözeltilerindeki protein tayinleri Bradford yöntemiyle yapıldıktan sonra bu standart grafikten faydalanılarak protein miktarları hesaplandı (Şekil 4.1).



Şekil 2.1. Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayinin için kullanılan standart grafik

#### **4.1. Serum PON1 Enziminin Saflastırılma Sonuçları**

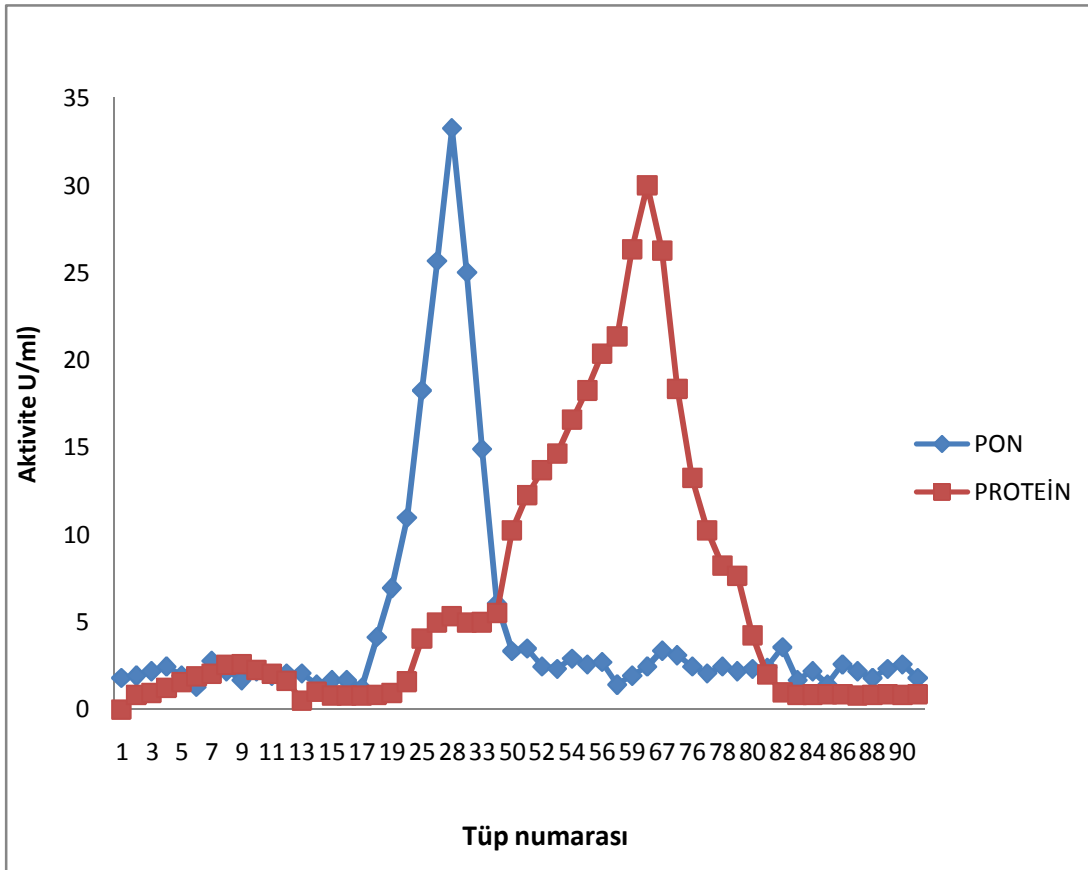
Paraoksonaz enzimi insan serumundan %35-%70 amonyum sülfat kesitlemesi, HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR jel filtrasyonu, Cibacron Blue 3GA non-spesifik afinite kromatografisi ve HiTrap AE Ion Exchange iyon değiştirici kromatografisi basamaklarını içeren yöntemle saflaştırıldı.

##### **4.1.1. Amonyum sülfat kesitlemesi**

Antikoagulan madde içermeyen tüplere alınan toplam kan örneğinden alınan 20 ml serum örneği %35-%70 aralığında amonyum sülfat çöktürmesine tabi tutuldu (Bayrak., 2008 kaynak No:24-25 ). Öncelikle serum örneği % 35 amonyum sülfat yoğunluğuna getirilerek çökeltideki proteinler atıldı. Bu işlem sonrasında elde edilen süpernatant % 70 amonyum sülfat yoğunluğuna getirildi. Çöken proteinler, 1 mM CaCl<sub>2</sub> içeren 20 mM Tris/HCl (pH 8) tamponunda çözüldü ve 1 mM CaCl<sub>2</sub> içeren 20 mM Tris/HCl (pH 8) tamponuna karşı bir gece boyunca diyaliz edildi. Diyaliz sonrası elde edilen örnek bir gece boyunca liyofilizatör ile kurutulduktan sonra 1 mM CaCl<sub>2</sub> içeren 20 mM Tris/HCl (pH 8) dilüe edildi. %35-70 arası amonyum sülfat kesitlemesi basamağı ile PON1, paraoksonaz aktivitesine göre 1,25 kez saflaştırıldı.

#### 4.1.2. HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR Jel Filtrasyonu

Diyalizden sonra liyofilizatör ile konsantre hale getirilen 5 ml'lik %35-70 amonyum sülfat kesitlemesi örneği 1 mM CaCl<sub>2</sub> içeren 20 mM Tris/HCl tamponu (pH 8) ile dengelenmiş HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR akış hızı 10 ml/saat olacak şekilde uygulandı ve 2'şer ml'lik fraksiyonlar toplandı.

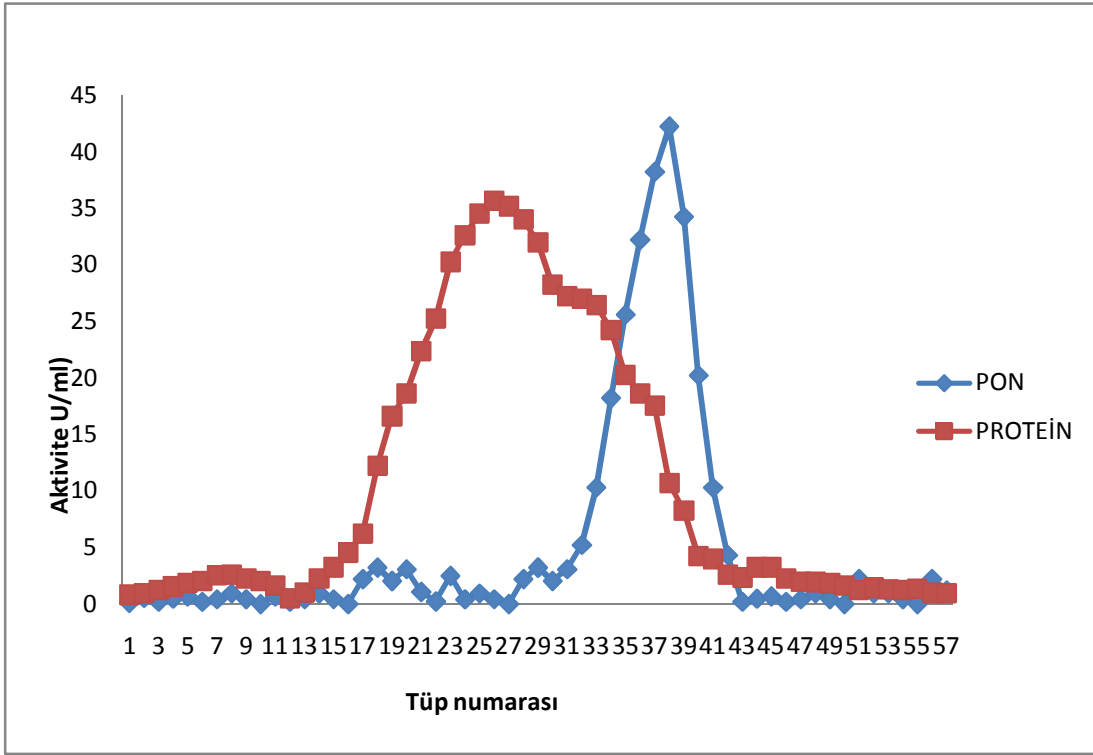


Şekil 2.2. İnsan serum PON1 enziminin jel filtrasyon kromatografisi yöntemi ile saflaştırılmasından elde edilen elüsyon grafiği

Paraoksonaz aktivitesinin saptandığı tüpler birleştirildi ve elde edilen eluat HiTrap AE iyon değiştirici kolonuna uygulandı. Bu basamaktaki saflaşma, başlangıç basamağına göre, paraoksonaz aktivitesi için 16, arilesteraz aktivitesi için 22 kez olarak saptandı (Tablo :1).

### 4.1.3. HiTrap AE İyon Değişirici Kromatografi

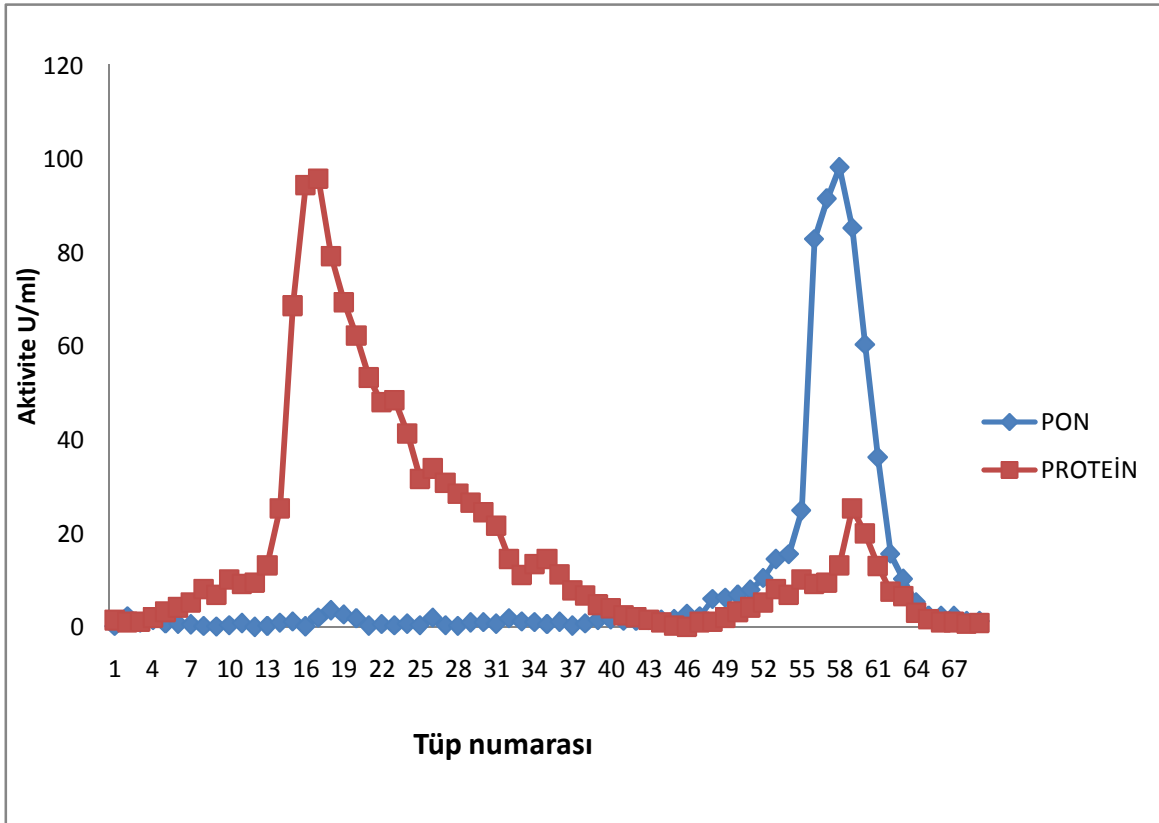
HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR jel filtrasyonu basamağında elde edilen paraoksonaz aktivitesi içeren fraksiyonlar 1 mM CaCl<sub>2</sub> içeren 20 mM Tris/HCl dengelenmiş iyon değiştirici kolonuna yüklendi. Akış hızı 20 ml/saat olacak şekilde 1 mM CaCl<sub>2</sub> içeren 20 mM Tris/HCl tamponu ile yıkama işleminden sonra, jele bağlı enzim aynı tamponda 0-0,4 M arasındaki lineer NaCl gradienti ile elue edildi. Kromatografide 2 ml'lik fraksiyonlar toplanarak, bir sonraki basamakta kullanılmak üzere birleştirildi. Bu basamakta başlangıca göre paraoksonaz enzimi 44 kez saflaştırıldı.



Şekil 2.3. İnsan serum PON1 enziminin HiTrap AE iyon değisim kolonundan elüsyon grafiği

#### 4.1.4. HiTrap Blue HP Non-spesifik Afinite Kromatografisi

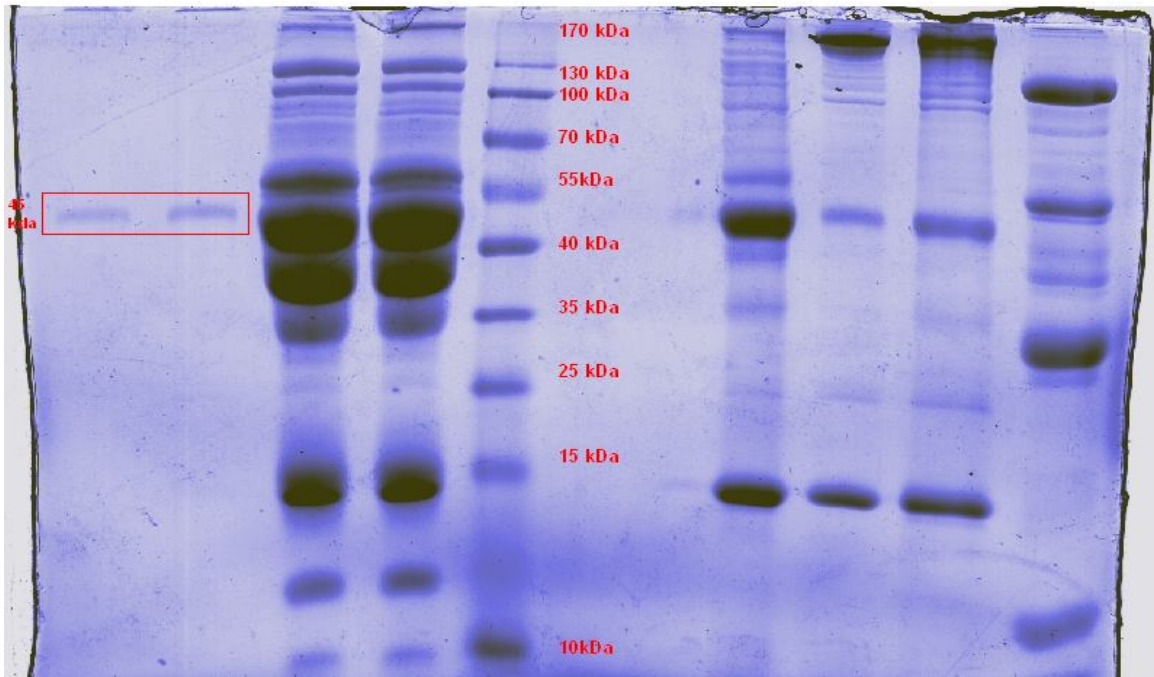
HiTrap AE İyon Değiştirici kolonundan elde edilen ve paraoksonaz aktivitesi içeren tüpler birleştirilerek, 1 mM CaCl<sub>2</sub> içeren 20 mM Tris/HCl tamponu ile dengelenen HiTrap Blue HP non-spesifik afinite kolonuna yüklendi. Daha sonra 4 M NaCl içeren 1 mM CaCl<sub>2</sub> içeren 20 mM Tris/HCl tamponu kolondan geçirildi. Daha sonra akış hızı 60 ml/saat olacak şekilde HiTrap Blue HP kolonu önce sırası ile 4M, 3M, 2M ve 1M NaCl içeren 1 mM CaCl<sub>2</sub> içeren 20 mM Tris/HCl tampon ile, daha sonra ise iyonik gücü azaltmak için sadece 1 mM CaCl<sub>2</sub> içeren 20 mM Tris/HCl tampon ile yıkandı. Paraoksonaz aktivitesi, %0,1 sodyum deoksikolat içeren 1 mM CaCl<sub>2</sub> içeren 20 mM Tris/HCl tamponu ile elue edildi. Kromatografide 2 ml'lik fraksiyonlar toplandı. PON1 aktivitesi içeren fraksiyonlar bir sonraki basamakta kullanılmak üzere birleştirildi. Bu basamakta saflaşma, başlangıç basamağına göre paraoksonaz aktivitesi için 70, arilesteraz aktivitesi için ise 100 kez olarak bulundu (Tablo 1).



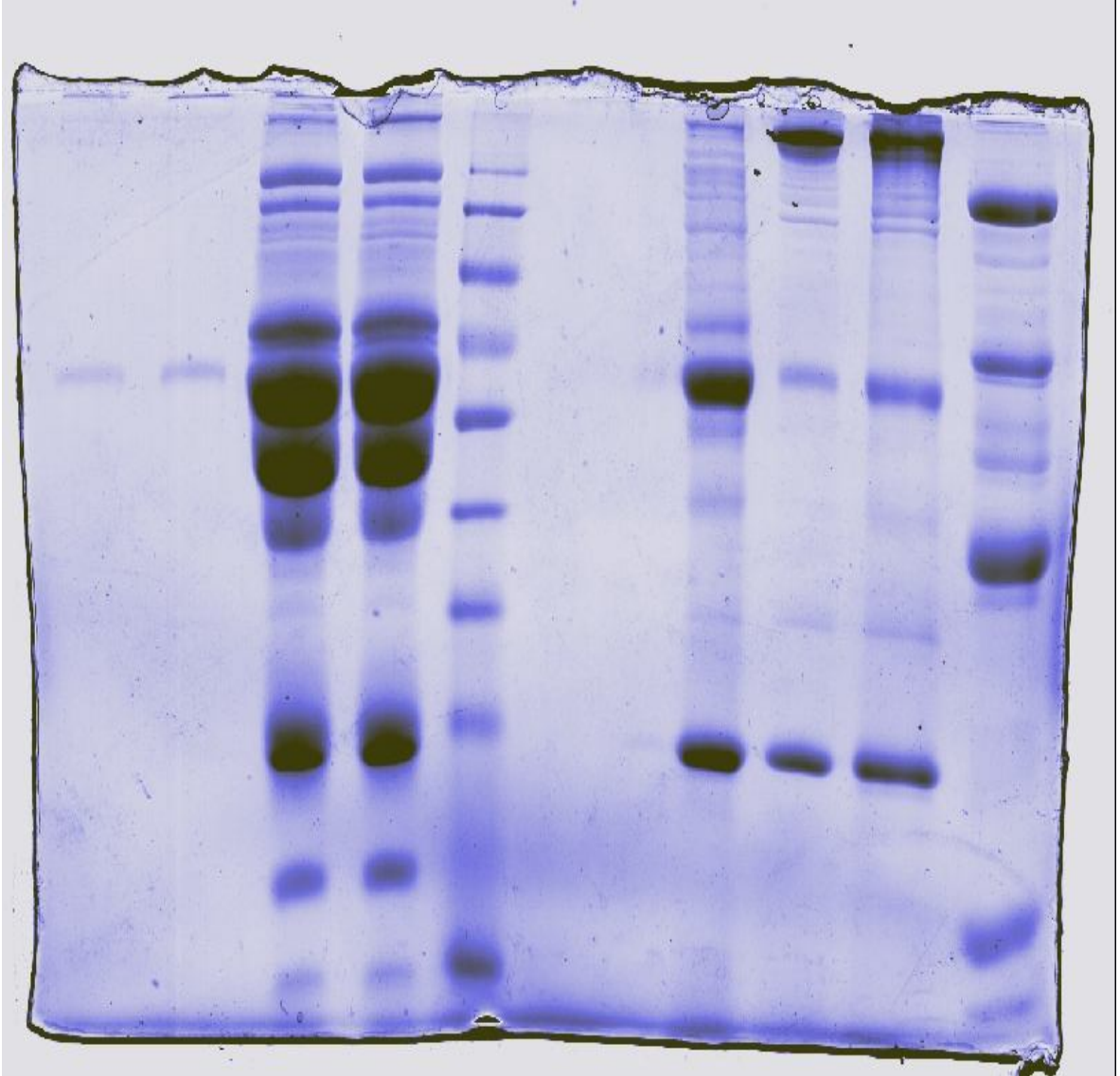
şekil 2.4. İnsan serum PON1 enziminin HiTrap Blue HP kromatografisi yöntemi ile saflaştırılmasından elde edilen elüsyon grafiği

#### 4.1.5. Sodyum Dodesilsülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofözezi ile Enzim Saflığınn Kontrolü

İnsan serumundan elde edilen paraoksonaz enzimi numunelerinin, amonyum sülfat çökeleği, jel filtrasyon, iyon değişim, ve afinite kromatografisinden elde edilen elüatlardaki enzimlerin saflığını kontrol etmek için SDS-PAGE yöntemi kullanıldı. Bu amaçla elektroförez sistemi kurularak enzim numuneleri sırayla kuyulara uygulandı ve yürütüldü. Elde edilen bantları gösteren fotoğraf Şekil 3.1 de gösterildi.



Şekil 3.1. Farklı saflaştırma basamaklarındaki örneklerin SDS-poliakrilamid jel Elektrofözezi



Şekil 3.2. Farklı saflaştırma basamaklarındaki örneklerin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi

<b>Saflaştırma Basamakları</b>	<b>Aktivite (IU/ml)</b>	<b>T.Hacim (ml)</b>	<b>Protein (mg/ml)</b>	<b>T.Protein (mg/ml)</b>	<b>T.Aktivite (IU/ml)</b>	<b>Spesifik Aktivite (IU/ml)</b>	<b>Verim (%)</b>	<b>Saflaştırma Katsayısı</b>
<b>Serum</b>	115,2	20	68,3	1366	2304	1,7	100	1
<b>Amonyum sülfat çöktürmesi (%35-70)</b>	415,5	5	172	860	2077,5	2,4	90,2	1,4
<b>Sephacryl S-200 HR jel filtrasyon kromatografisi</b>	35	42	1,05	44,1	1470	33,3	63,8	19,8
<b>HiTrap AE İyon Değiştirici Kromatografisi</b>	40,25	18	0,38	6,84	724,5	105,9	31,4	62,8
<b>HiTrap Blue HP Afinite Kromatografisi</b>	29,54	20	0,085	1,7	590,8	347,5	25,6	206,0

Tablo.1 : Saflaştırma Basamakları



## 7. TARTISMA ve SONUÇ

Serum paraoksonaz enzimi (PON1), organofosfatların hidrolizini katalizleyen kalsiyuma bağımlı bir esterazdır. Karaciger böbrek, bağırsak gibi çeşitli dokularda ve ayrıca HDL bağımlı olarak serumda bulunur. PON1'un doğal fizyolojik substratları tamamen bilinmemekle birlikte enzim aktivitesini izleyebilmek amacıyla sentetik substratlar kullanılmaktadır. PON1 aktivitesinin miyokard enfarktüsü, ailesel hiper kolesterolemi ve diabetusmetillus hastalarında sağlıklı hastalara nazaran azaldığı tesbit edilmistir. PON'un organofosfat toksisitesini azalttığı önerilmekle birlikte fizyolojik rolü hala bilinmemektedir (105,111).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, PON1 ezimlerinin fizyolojik önemini aydınlatmaya yönelik çalışmaların önümüzdeki yıllarda artarak devam edeceğinin sinyalini vermektedir. Hayvan model çalışmalarından bellidir ki PON1'in bilinen aktiviteleri gerçekten fizyolojik öneme sahiptir. Spesifik organofosfatların PON1 tarafından hidrolizi fizyolojik olarak çok önemlidir. Bir A-oksonaz ailesi üyesi olan paraoksonaz, asetil kolin esteraz inhibitörlerini kolin esterazlara bağlanmadan önce parçalarlar ve busebeple insanları düşük dozlardaki organofosfat pestisitlerin zararlarından korur. Bugün dünya çapında her yıl 220.000 insanın bu tür maruz kalmalardan dolayı hayatını kaybettiği tahmin edilmektedir. Pestisitlerin kullanıldığı çevrelerdeki insanlar daha yüksek risk altındadırlar. Ayrıca lipid metabolizmasındaki rolü ne olursa olsun düşük PON1 seviyeleri vasküler hastalıklar için önemli bir risk faktörüdür (106,107,108,109,110,111).

Yaptığımız bu çalışmada insan serumda amonyum sülfat çöktürmesi yapılarak PON1 enziminin farklı kromatografik metotlar denenerek saflastırılması ve aktivitesinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmada enzimin saflastırılması işlemi Bayrak., 2008 metodu modifiye edilerek kullanıldı. Serum numuneleri için %35-%70 amonyum sülfat çöktürmesinde elde edilen numuneler için jel filtrasyon ve Birinci HiTrap AE İyon Değiştirici Kromatografi ve Cibacron Blue Non-spesifik Afinite Kromatografisi ve İkinci HiTrap AE İyon Değiştirici Kromatografisitekniklerinin kullanılmasıdır. Bütün saflastırma işlemleri sırasında sıcaklık +40C'de tutulması gerektiğinden işlemler soğuk ortamda gerçekleştirilmiştir. Böylece sıcaklığın sebep olacağı enzim aktivitesindeki kaybın önüne geçilmiştir.

Amonyum sülfat çöktürmesi uzun zamandan beri birçok bilim insanı tarafından kullanılan kısmi saflaştırma metodudur.%35-%70 amonyum sülfat çöktürmesinde sonra elde edilen enzim çözeltisi diyaliz edildi. Böylece enzim çözeltisinden iyonlar uzaklaştırıldı ve jel filtrasyon kolona tatbik edilerek enzimin kolona tutunması kolaylaştırılmış oldu.

Enzimlerin aktivitesini etkileyen birçok faktörler vardır. Bu faktörler en önemlisi pH, sıcaklık bundan dolayı enzim saflaştırma çalışmalarında ortam sıcaklığı önem arz etmektedir. Bu faktörler dışında diğer faktörler arasında substrat konsantrasyonu, enzim konsantrasyonu, allosterik etkiler, iyonik siddet, hormonlar ve bazen amino asitler, inhibitör veya aktivatörlerin varlığı sayılabilir.

Pon1 enzimini saflaştırmak için kullandığımız yöntemde önce enzim çözeltisi HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR içeren jel filtrasyon kolona tatbik edilerek Kolon fraksiyon kollektörüne bağlandıktan sonra akış hızı 10 ml/saat olacak şekilde ayarlandı. Bu basamakta elde edilen paraoksonaz aktivitesi içeren tüpler birleştirilerek HiTrap AE Ion Exchange Cartridge(Supelco.) kolonuna yüklendi. HiTrap AE Ion Exchange kolonundan elde edilen paraoksonaz aktivitesi içeren tüpler birleştirilerek HiTrap Blue HP (GE Healthcare) kolonuna yüklendi. HiTrap Blue HP Afinite kolonundan elde edilen paraoksonaz aktivitesi içeren fraksiyonlar birleştirilerek, HDL'ye bağlı PON1 enzimini solübilize etmek amacıyla son konsantrasyonu %0,1 olacak şekilde Triton X-100 ilave edildi. Daha sonra %0,1 Triton X-100 içeren tampon A ile dengelenmiş HiTrap AE Ion Exchange kolonuna aktarıldı. . Elüsyondan sonra çıkan fraksiyonlarda aktivite ve protein tayini yapıldı. Enzimlerin saflığını kontrol etmek için sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jelelektroforezi (SDS-PAGE) yapılmıştır. Jelde tek bandın gözlenmesi ile insan serumundan elde edilen PON1 enzimlerinin saf oldukları ispatlanmıştır (Şekil 3.1.)

### **Sonuç olarak bu tez kapsamında;**

1. Her iki yöntemle de enzim saf halde elde edilmiş ve saflaştırma basamaklarından elde edilen sonuçların literatürle uyumlu olduğu tespit edilmiştir.

2. Çalışma sonucunda insan serum PON1 enzimi % 25,6 verimle 206,0 kat saflaştırılabilmiştir. Enzimin saflığı elektroforezle kontrol edilerek tek bant gözlenmiştir.

## 9.KAYNAKLAR

1. E. Azarsız, E.Y.S., "Paraoksonaz ve Klinik Önemi". Türk Biyokimya Dergisi,. 25 (3) ,(2000),109-119
2. P.N. Durrington, B.M., M.I. Mackness, "Paraoxonase and Atherosclerosis". Arterioscler Thromb Vasc Biol., 21, ( 2001), 473-480
3. Carey J. Ng, D.M.S., Susan Y. Hama, Natividad Villa, Mohamad Navab, Srinivasa T. Reddy, "The Paraoxonase Gene Family and Atherosclerosis". Free Radical Biology & Medicine,, 38, ( 2005), 153– 163
- 4- Gençer Nahit paraoksonaz Q ve R izoenzimlerin saflaştırılması ve bazı çevre kirleticilere karşı afinitesinin araştırılması balık kesir üniversitesi fen bilimleri enstitüsü kimya anabilim dalı doktora tezi 2008
5. Bayrak Ahmet. insan serum paraoksonaz enziminin saflaştırılarak kinetik özellikleri, endojen substratları ve antioksidan özelliklerinin araştırılması. hacettepe üniversitesi sağlık bilimleri enstitüsü, biyokimya programı. doktora tezi. 2009
6. E. Azarsız, E.Y.S., "Paraoksonaz ve Klinik Önemi". Türk Biyokimya Dergisi,. 25 (3) ,(2000),109-119 6 Uriel, A., "Characterisation des cholinesterases et d'autres esterases carboxylique apres electrophorese et immunoelectrophorese en gelose, I; applications a l'etude des esterases du serum humain normal". Am Insit Pasteur, (1961),101-104
7. Michael I.Mackness , B., Paul N.Durrington, Philip W.Connelly and Robert A.Hegele, "Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins". Current Opinion in Lipidology, 7, (1996), 69-76
8. Erdem, M.S.T.\_. "ST Elevasyonlu Miyokard enfarktüsü (Stemi) Hastalarda insan Paraoxonase Geni Met-Leu/55 Polimorfizmi." Dr. Siyami Ersek Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Merkezi, İstanbul, (2004)
9. Aldridge W N. An enzyme hydrolyzing diethyl p-nitro phenyl phosphate (E600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera. Biochem J 1953; 53:117-124
10. Ooms A J, Boter H L. Sterospecificity of hydrolytic enzymes in their reaction with optically active organophosphorus compounds. The reaction of cholinesterases and paraoxonase with S-alkyl p-nitrophenyl methyl phosphono thiolates. Biochem Pharmacol 1965; 12:1839-1845

11. Geldmacher-von Mallinckrodt M., Petenyi M., Flugel M., Burgis H, Dietzel B, Metzner H., Nirschl H., Renner O. Genetically determined polymorphism of human serum paraoxonase (EC 3.1.1.2). *Humangenetik*. 1973; 17:331-335
12. Brophy V H., Jampsa RL, Clendenning J B., McKinstry L A, Jarvik G P, Furlong CE. Effects of 5' regulatory-region polymorphisms on paraoxonase gene (PONI) expression. *Am J Hum Genet*. 2001; 68:1428-1436
13. Mackness MI, Hallam SD, Peard T, Warner S, Walker CH. The separation of sheep and human serum "A"-esterase activity into the lipoprotein fraction by ultracentrifugation. *Comp Biochem Physiol B*. 1985; 82:675-677
14. Szabo F, Rona K, Czinner A, Gachalyi B, Kaldor A: Is paraoxon hydrolytic activity in serum predictive of myocardial infarction? *Clin Chem* 1987; 33:742-743
15. Mackness MI, Walker CH.: Multiple forms of sheep serum A-esterase activity associated with the high-density lipoprotein. *Biochem J* 1988; 250:539-545
16. suchocka Z, swatowska J, pachecka J, suchocka P; RP-HPLC determination of Paraoxonase activity in human blood serum; *J of pharmaceutical and biomedical analysis* 2006; 42:113-119
17. Lipincott W. Paraoxonase a cardioprotective enzyme: continuing issues, *Curr Opin Lipidol* 2004; 15:261-267
18. Shamir R, Hartman C, Karry R, Pavlotzky E, Eliakim R, Lachter J, Suissa A, Aviram M; Paraoxonases 1, 2 and 3 are expressed in human and Mouse gastrointestinal tract and in Caco-2 cell line: selective secretion of PON1 and PON2; *Free Radical biology* 2005; 39:336-344
19. Yang X, Gao Y, Zhou J, Zhen Y, Yang Y, Wang J, Song L, Liu Y, Xu H, Chen Z, Hui R; Plasma homocysteine thiolactone adducts associated with risk of coronary heart disease; *C Chimica acta* 2006; 364: 230-234
20. Gülcü F, Gürsu F; The standardization of paraoxonase and arylesterase Activity Measurements; *Turkish J Biochem* 2003; 28:45-49
21. Mackness M, Durrington P, Mackness B. Paraoxonase 1 activity, concentration and genotype in cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 2004; 15:399-404.
22. Aviram M, Davies J. A, Paraoxonase 1 and atherosclerosis: Is the gene or the protein more important? *Free Radical Biology* 2004; 37:1317-1323-Aviram, M., Rosenblat M., Bisgair

C.L., 1998. Paraoxonase inhibits high density lipoprotein (HDL) oxidation and preserves its functions: a possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest*, 101, 2215-57.

23. La Du BN, Eckerson HW. The polymorphic paraoxonase/arylesterase isozymes of human serum. *Fed Proc* 1984; 43:2338-2341

24. Karakaya A., Suzen S., Sardas, S, Karakaya AE, Vural N. Analysis of the serum paraoxonase/arylesterase polymorphism in a Turkish population. *Pharmacogenetics* 1991; 1:58-61

25. Mallinckrodt M, Geldmacher V, Hommel G, Dumbach J. On the genetics of the human serum paraoxonase. *Hum Genet* 1979; 50:313-326

26. Kleemola P, Freese R, Jauhiainen M, Pahlman R, Altfhan G, Mutanen M; Dietary determinants of serum paraoxonase activity in healthy humans. *Atherosclerosis* 2002; 160:425-432

27. Ombres D, Pannitteri G, Montali A, Candeloro A, Seccareccia F, Campagna F, Cantini R, Campa P P, Ricci G, Arca M. The Gln-Arg192 Polymorphism of Human Paraoxonase Gene Is Not Associated With Coronary Artery Disease in Italian Patients. *Atheroscler Throm Vasc Biol*. 1998; 18:1611-1616

28. Garin MCB, James RW, Dussoix P, Blanchè H, Passa P, Froguel P, Ruiz J. Paraoxonase polymorphism Met-Leu 54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme: a possible link between the paraoxonase gene and increased risk of cardiovascular disease in diabetes. *J Clin Invest* 1997; 99:62-64.

29. Agachan B, Ergen H A, Karaali Z E, Isbir T, PON1 55 and 192 Polymorphism and Its Effects to Oxidant-Antioxidant System in Turkish Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Physiol Res* 2005; 54:287-293

30. Karakaya A, Ibis S, Kural T, Kose SK, Karakaya A.E, Serum paraoxonase activity and phenotype distribution in Turkish subjects with coronary heart disease and its relationship to serum lipids and lipoproteins. *Chem Biol Interact* 1999; 118:193-200

31. Watson AD, Berliner J A, Rama S Y, La Du B N, Faull K F, Fogelman AM, Navab M: Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest* 1995; 96:2882-2891

32. Aviram M., Billecke S, Sorenson R, Bisgaier C, Nelton R, Rosenblat M., Eroglu J, Hsu C, Dunlop C, La Du B. Paraoxonase active site required for protection against LDL

oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities: selective action of human paraoxonase allozymes Q and R. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 13: 1617-1624

33. Seres I, Paragy G, Deschene E, Fulop Jr T, Khalil A. Study of factors influencing the decreased HDL associated PON1 activity with aging. *Experimental gerontoloji* 2004; 39:59-66

34. Fere N, Camps J, Fernandez-Balart J, Arija V, Murphy M.M, Ceruello S, Biarnes E, Vilella E, Tous M, Joven J. Regulation of serum paraoxonase activity by genetic Nutritional and lifestyle factors in the general population. *Clin Chemistry* 2003; 49:1491-1497

35. Ozols J. Isolation and complete covalent structure of liver microsomal paraoxonase. *Biochem J* 1999; 338:265-272

36. Vlachos G D, Bartzeliotou A, Schulpis K H, Partsinevelos G A, Lazaropoulou C, Papadima C, Papastamataki M, Antsaklis A, Papassotiriou I. Maternal- neonatal serum paraoxonase-1 activity in relation to the mode of delivery. *Clin Biochemistry* 2006

37. Costa L, Vitalone A, Cole T B, Furlong C E. Modulation paraoxonase (PON1) activity. *Biochemical Pharmacology* 2004

38. Jaouad L, Guise C.D, Berrougui H, Clouiter M, Isabellea M, Fulop T, Payette H, Khalil A. Age- Related decrease in HDL's antioxidant activity is due to an alteration in the PON1's free sulfhydryl groups. *Atherosclerosis* 2006; 185:191-200

39 La Du B N, Aviram M., Billecke S, Navab M., Primo-Parmo S., Sorenson RC, Standiford TJ, On the physiological roles of the paraoxonases. *Chem Biol Interact.* 1999; 120:379-388

40. Rosenblat M, Karry R, Aviram M. PON1 is a more potent antioxidant and stimulant of macrophage cholesterol efflux when present in HDL than in lipoprotein-deficient serum: Relevance to diabetes. *Atherosclerosis* 2006; 187:174-79

41. Thomas-Moya E, Gianotti M, Liadino I, Proenza A.M Effects of caloric restriction and gender on rat Paraoxonase 1 activity. *J N Biochemistry* 2006; 17:197-203

42. Yeung D T, Josse D, Nicholson J D, Khanal A, McAndrew C W, Bahnson B J, Lenz D E, Cerasoli D.M. Structure/function analyses of serum paraoxonase mutants designed from a DFPase-like homolog model. *Biochimica and biophysica Acta.* 2004 1702:67-71

43. Blatter Garin, M.-C., Abbot, C., Messmer, S., Mackness, M. I., Durrington, P., Pometta, D., James, R. W., "Quantification of Human Serum Paraoxonase by Enzyme Linked

\_mmunoassay: Population Differences in Protein Concentrations". *Biochem. J.*, 304, (1994), 549–554

44. Leviev, I., James, R. W., "Promoter Polymorphisms of the Human Paraoxonase PON1 Gene and Serum Paraoxonase Activities and Concentrations". *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 20, (2000), 516-521

45. Deakin, S., Leviev, I., Brulhart Meynet, M. C., James, R. W., "Paraoxonase-1 Promoter Haplotypes and Serum Paraoxonase: A Predominant Role in vivo for Polymorphic Position -107 Implicating The Transcription Factor Sp1". *Biochem. J.*, (2003), 377.

46. Feingold, K.R., Memon, R. A., Moser, A. H., Grunfeld, C., "Paraoxonase Activity in The Serum and Hepatic mRNA Levels Decrease During The Acute Phase Response". *Atherosclerosis*, 139, (1998), 307-315

47. Van Lenten, B.J., Wagner, A. C., Nayak, D. P., Hama, S, Navab, M., Fogelman, A. M., "High-density lipoprotein loses its anti-inflammatory properties during acute influenza A infection". *Circulation*, 103(2001), 2283-88

48. Cabana, V.G., Reardon, C. A., Feng, N., Neath, S., Lukens, J., Getz, G. S., "Serum Paraoxonase: Effect of The Apolipoprotein Composition of HDL and The Acute Phase Response". *J. Lipid Res.*, 44, (2003), 780-792

49. Martoglio, B.D., B., "Signal sequences: more than just greasy peptides". *Trends Cell Biol.*, 8, (1998), 41041–4104537.

50. Hassett, C., Richter, R. J., Humbert, R., Chapline, C., Crabb, J. J., Omiecinski, C. J., Furlong, C., "Characterisation of cDNA Clones Encoding Rabbit and Human Serum Paraoxonase: The Mature Protein Retains Its Signal Sequence". *Biochemistry*, 30, (1991), 10141– 10149

51. Deakin, S., Leviev, I., Gomaschi, M., Calabresi, L., Franceschini, G., James, R. W., "Enzymatically Active Paraoxonase- 1 Is Located at The External Membrane of Producing Cells and Released by A High Affinity, Saturable, Desorption Mechanism". *J. Biol. Chem.*, 277, (2002), 4301– 4308

52. Sorenson, R.C.B., C. L.; Aviram, M.; Hsu, C.; Billecke, S.; La Du, B. N., "Human serum paraoxonase/arylesterase's retained hydrophobic N-terminal leader sequence associates with HDLs by binding phospholipids: apolipoprotein A-I stabilizes activity". *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 19, (1999), 2214– 2225

53. Furlong CE, Richter RJ, Chapline C, Crabb J W. Purification of rabbit and human serum paraoxonase. *Biochemistry* 1991; 30:10133-10140
54. Furlong C E, Li W F, Brophy VH, Jarvik G P, Richter R J, Shih D M, Lusic A L, Costa L G: The PON1 gene and detoxication. *Neurotoxicology* 2000; 21:581-587
55. Furlong CE, Richter RJ., Seidel S L, Motulsky AG. Role of genetic polymorphism of human plasma paraoxonase/arylesterase in hydrolysis of the insecticide metabolites chlorpyrifos oxon and paraoxon. *Am J Hum Genet* 1998; 43:230-238
56. Aviram M, Hardak E, Vaya J, Mahmood S, Milo S, Hoffmann A, Billicke S, Draganov D, Rosenblat M. Human serum paraoxonase (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions: PON1 esterase and peroxidase-like activities. *Circulation* 2000; 101:2510–2517
57. Akgür S A, Öztürk P, Solak I, Moral A R, Ege B. Human serum paraoxonase activity in acute organophosphorus insecticide poisoning. *Forensic science international*.2003; 133:136-140
58. Sözmen E Y, Mackness B, Sözmen B, Durlington P, Girgin F.K, Aslan L, Mackness M. Effect of organophosphate intoxication on human serum paraoxonase. *Human and Experimental toxicology* 2002; 21:247-252
59. Furlong CE.: PON1 status and neurologic symptom complexes in Gulf War veterans. *Genome Res* 2000; 10:153-155
60. Watson AD, Berliner J A, Rama S Y, La Du B N, Faull K F, Fogelman AM, Navab M: Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest* 1995; 96:2882-2891
61. Leviev L, Righetti A, James RW. Paraoxonase promoter polymorphism T(107) C and relative paraoxonase deficiency as determinants of risk of coronary artery disease. *J Mol Med* 2001; 79:457-463
62. Jialal I, Devaraj S. Low density lipoprotein oxidation antioxidants and atherosclerosis. A clinical biochemistry perspective. *Clin Chem* 1996; 42:498-506
63. Geldmacher-von Mallinckrodt M., Petenyi M., Flugel M., Burgis H, Dietzel B, Metzner H., Nirschl H., Renner O. Genetically determined polymorphism of human serum paraoxonase (EC 3.1.1.2). *Humangenetik*. 1973; 17:331-335



64. Adkins S, Gan KN, Mody M, La Du B N. Molecular basis for the polymorphic forms of human serum paraoxonase / arylesterase: glutamine or arginine at position 191 for the respective A or B allozymes. *Am J Hum Genet* 1993; 52:598-608
65. Hassett C, Richter R J, Humbert R, Chapline C, Crabb L W., Omiecinski C L, Furlong CE. Characterization of cDNA clones encoding rabbit and human serum paraoxonase: the mature protein retains its signal sequence. *Biochemistry* 1991; 30:10141-10149
66. Furlong CE, Richter RJ, Chapline C, Crabb J W. Purification of rabbit and human serum paraoxonase. *Biochemistry* 1991; 30:10133-10140
67. Aviram M., Billecke S, Sorenson R, Bisgaier C, Nelton R, Rosenblat M., Eroglu J, Hsu C, Dunlop C, La Du B. Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities: selective action of human paraoxonase allozymes Q and R. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 13: 1617-1624
68. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo-Parmo S L, La Du B N. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions: a possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest* 1998; 101:1581-1590
69. Serrato M, Marian AJ. A variant of human paraoxonase/arylesterase (HUMPONA) gene is a risk factor for coronary artery disease. *J Clin Invest* 1995; 96:3005-3008
70. Zama T, Murata M, Matsubara Y, Kawano K, Aoki N, Yoshino H, Watanabe G, Ishikawa K, Ikeda YA. 192Arg variant of the human paraoxonase (HUMPONA) gene polymorphism is associated with an increased risk for coronary artery disease in the Japanese. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:3565-3569
71. Hegele R A, Connelly P W, Scherer S W, Hanley A J, Harris S R, Tsui L C, Zinman B. Paraoxonase 2 gene (PON2) G148 variant associated with elevated fasting plasma glucose in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:3373-3377
72. Chen LY, Mehta P, Mehta JL. Oxidized LDL decreases L-arginin uptake and nitric oxide synthase protein expression in human platelets: relevance of the effect of oxidized LDL on platelet function. *Circulation* 1996; 93:1740-1746
73. Zech R, Rockseisen M., Kluge K, Dewald K, Armstrong V W, Chemnitz I M. Lipoproteins and hydrolysis of organophosphorus compounds. *Chem Biol Interact* 1993; 87:85-94

74. Li H, Reddick R L, Maeda N. Lack of apoA-I is not associated with increased susceptibility to atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb* 1993; 13:1814-1821
75. Plump AS, Azrolan N, Odaka H, Wu L, Jiang X, Tall A, Eisenberg S, Breslow J L. Apo A-1 knockout mice: characterization of HDL metabolism in homozygotes and identification of a post-RNA mechanism of apo A-I upregulation in heterozygotes. *J Lipid Res* 1997; 38:1033-1047
76. Rozenberg O, Rosenblat M, Coleman R, Shih D.M, Aviram M. Free radical biology 2003; 34:774-784
77. Mackness M I, Arrol S, Abbott C, Durrington P N. Protection of low density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase. *Atherosclerosis* 1993; 104:129-135
78. Watson AD, Berliner J A, Rama S Y, La Du B N, Faull K F, Fogelman AM, Navab M: Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest* 1995; 96:2882-2891
79. Aviram M., Billecke S, Sorenson R, Bisgaier C, Nelton R, Rosenblat M., Eroglu J, Hsu C, Dunlop C, La Du B. Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities: selective action of human paraoxonase allozymes Q and R. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 13: 1617-1624
80. La Du B N, Aviram M., Billecke S, Navab M., Primo-Paromo S., Sorenson RC, Standiford TJ, On the physiological roles of the paraoxonases. *Chem Biol Interact.* 1999; 120:379-388
81. Mackness M I, Arrol S, Abbott C, Durrington P N. Protection of low density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase. *Atherosclerosis* 1993; 104:129-135
82. Mackness MI, Hallam SD, Peard T, Warner S, Walker CH. The separation of sheep and human serum "A"-esterase activity into the lipoprotein fraction by ultracentrifugation. *Comp Biochem Physiol B.* 1985; 82:675-677
83. Nguyen S D, Sok D E. Preferable stimulation of PON1 arylesterase activity by phosphatidylcholines with unsaturated acyl chains or oxidised acyl chains at sn-2 position. *Biochimica et Biophysica acta* 2006; 1758:499-508

84. Brophy V H., Jampsa RL, Clendenning J B., McKinstry L A, Jarvik G P, Furlong CE. Effects of 5' regulatory-region polymorphisms on paraoxonase gene (PON1) expression. *Am J Hum Genet.* 2001; 68:1428-1436
85. James R, Leviev I, Ruiz J, Passa P, Fuegel P, Gavin MCB. Promoter polymorphism T(- 107)C of the paraoxonase PON1 gene is a risk factor for coronary heart disease in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 2000; 29:390–39
86. Paragh G, Balla P, Katona E, Seres I, Egerhazi A, Degrell I, Serum paraoxonase activity changes in patients with Alzheimer's disease and vascular dementia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2002; 252:63-67
87. Ferre N, Marsilach J, Camps J, Rull A, Coll B, Tous M, Joven J. Genetic association of paraoxonase-1 polymorphisms and chronic hepatitis C virus infection. *Clinica chimica acta.* 2005; 18:112-118
88. Min J, Park H, Park B, Kim YJ, Park J, Lee H, Ha E, Park E A, Hong Y C. Paraoxonase gene polymorphism and vitamin levels during pregnancy: relationship with maternal oxidative stress and neonatal birth weights. *Reproductive toxicology* 2006; 147:363-367
89. Clarimon J, Eerola J, Hellstrom O, Tienari PJ, Singleton A, Paraoxonase 1 (PON1) gene polymorphisms and Parkinson's disease in a Finnish population. *Neurosci Lett* 2004; 367:168-170
90. Paşca S.P, Nemeş B, Vlase L, Gaygi C.E, Dronca E, Miu A.C, Dronca M,. High levels of homocysteine and low serum paraoxonase 1 arylesterase activity in children with autism. *Life sciences* 2006; 78:2244-2248
91. Raiszadeh F, Solati M, Etemadi A, Azizi F. Serum paraoxonase activity before and after treatment of thyrotoxicosis. *Clin Endocr* 2004; 60:75–80
92. Delgado Alves J, Ames PR, Donohue S, Stanyer L, Nourooz-Zadeh J, Ravirajan C, Isenberg DA, Nourouz-Zadeh J. Antibodies to high density lipoprotein and  $\beta$ -2 glycoprotein-I are inversely correlated with paraoxonase activity in systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 2003; 48:284
93. Mackness MI, Mackness B, Arrol S, Wood G, Bhatnagar D, Durrington PN. Presence of paraoxonase in human interstitial fluid. *FEBS Letters* 1997; 416:377-380.
94. Griffith MK, Virella GT, Stevenson HC, Lopes-Virella MF. Low density lipoprotein metabolism by human macrophages activated with low density lipoprotein immune complexes. A possible mechanism of foam cell formation. *J Exp Med* 1988; 168:1041-1059

95. Szafran Z, Nowak J, Szafran H, Janik A. Esterolytic activity of blood serum in infants with hypertrophic pyloric stenosis. *J Clin Chem Clin Biochem* 1997; 17:321-324
96. Van Lenten BJ, Hama SY, de Beer FC, Staffonini DM, McIntyre TM, Prescott SM, La Du BN, Fogelman AM, Navab M. Anti-inflammatory HDL becomes proinflammatory during the acute phase response. *J Clin Invest* 1995; 96:2758-2767
97. Berliner JA, Navab M, Fogelman AM. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation* 1995; 91:2488–2496
98. Costa L, Vitalone A, Cole T B, Furlong C E. Modulation paraoxonase (PON1) activity. *Biochemical Pharmacology* 2004
99. Marchesani M, Hakkarainen A, Tuomainen T P, Kaikkonen J, Pukkala E, Uimari P, Seppalo E, Matikainen M, Kallioniemi O P, Schleutker J, Lehtimaki T, Salonen J T. New paraoxonase 1 polymorphism I102V and the risk of prostate cancer in finnish Men *J Natl Cancer Inst* 2003; 95:812-818
100. La Du B N, Aviram M., Billecke S, Navab M., Primo-Parmo S., Sorenson RC, Standiford TJ, On the physiological roles of the paraoxonases. *Chem Biol Interact.* 1999; 120:379-388
101. Furlong CE, Richter RJ., Seidel S L, Motulsky AG. Role of genetic polymorphism of human plasma paraoxonase/arylesterase in hydrolysis of the insecticide metabolites chlorpryfos oxon and paraoxon. *Am J Hum Genet* 1998; 43:230-238
102. M., Rosenblat M., 2004. Paraoxonase 1,2, and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. *Free Radic Biol Med.* 37, 1304-1316.- insan serum paraoksonaz enziminin saflaştirılması ve bazı ilaçların enzim aktivitesi üzerine etkilerinin araştırılması m. mustafa işgör 2009 erzurum
103. F., Chabriere E., Andrieu J.P., Dublet B., Massona P., Rochua D., 2006. Tandem purification of two HDL-associated partner proteins in human plasma, paraoxonase (PON1) and phosphate binding protein (HPBP) using hydroxyapatite chromatography. *Journal of Chromatography B*, 836, 15–21. insan serum paraoksonaz enziminin saflaştirılması ve bazı ilaçların enzim aktivitesi üzerine etkilerinin araştırılması m. mustafa işgör 2009 erzurum
104. Josse, D., Xie, W., Renault, F., Rochu, D., Schopfer, LM., Masson, P. Ve diğerleri. (1999). Identification of residues essential for human paraoxonase (PON1) arylesterase/organophosphatase activities. *Biochemistry*, 38(9), 2816-25.- insan serum

paraoksonaz enziminin saflaştırılarak kinetik özellikleri, endojen substratları ve antioksidan özelliklerinin araştırılması. ahmet bayrak ankara 2008

105.M.,Rosenblat M., Bisgair C.L., 1998. Paraoxonase inhibits high density lipoprotein(HDL) oxidation and preserves its functions: a possible peroxidation role for paraoxonase. *J Clin Invest*, 101, 2215–57.-

106. James, R.W.,Deakin S.P., 2004. The importance of high-density lipoproteins for paraoxonase-1 secretion, stability, and activity. *Free Radic. Biol. Med.*, 37,1986–1994.-

107.Jarvik, G.P.,Rozek, L.S., Brophy, V.H., Hatsukami, T.S., Richter, R.J., Schellenberg,G.D. Furlong, C.E., 2000. Paraoxonase (PON1) phenotype is a better predictor of vascular disease than is PON1192 or PON155 genotype. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* 20: 2441–2447.

108.Jarvik, G.P.,Hatsukami, T.S., Carlson, C., Richter, R.J., Jampsa, R., Brophy, V.H. et al., 2003. Paraoxonase activity, but not haplotype utilizing the linkage disequilibrium structure, predicts vascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23: 1465–1471.

109.Mackness, M.I, Boullier A.,Hennuyer N., 2000. Paraoxonase activity is reduced by a pro-atherosclerotic diet in rabbits. *Biochem Biophys Res Commun*, 269, 232–6.Mackness, B.,Durrington P.N., Mackness M.I., 2004. Human serum paraoxonase. *Gen Pharmacol*, 39, 56-66.

110.Mackness, B.,Davies, G.K., Turkie, W., Lee, E., Roberts, D.H., Hill, E., Roberts, C.,Durrington, P.N., Mackness, M.I., 2001. Paraoxonase status in coronary heart disease. Activity and concentration more important than genotype *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21: 1451–1457.

111.insan serumundan paraoksonaz 1 enziminin saflaştırılması, bazı metal iyonları ve antibiyotiklerin enzim aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesi-deniz ekinci-sükrü beydemir-2009