

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**LÖKOSİT MİYELOPEROKSİDAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI, KİNETİK ÖZELLİKLERİ
İLE REAKTİF TÜRLERİN OLUŞUMUNDAKİ
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Bahram SARKARATI

**Biyokimya Programı
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA
2013**

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**LÖKOSİT MİYELOPEROKSİDAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI, KİNETİK ÖZELLİKLERİ
İLE REAKTİF TÜRLERİN OLUŞUMUNDAKİ
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Bahram SARKARATI

**Biyokimya Programı
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. N. Leyla AÇAN**

**İKİNCİ DANIŞMAN
Prof. Dr. Kamer KILINÇ**

**ANKARA
2013**

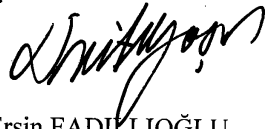
Anabilim Dalı **Biyokimya**
Program **Biyokimya**
Tez Başlığı **Lökosit Miyeloperoksidaz Enziminin
Saflaştırılması, Kinetik Özellikleri İle Reaktif
Türlerin Oluşumundaki Etkilerinin Araştırılması**
Öğrenci Adı-Soyadı **Bahram Sarkarati**
Savunma Sınav Tarihi **29.08.2013**

Bu çalışma jürimiz tarafından doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı **Pror. Dr. Nuriye Nuray Ulusu**
Hacettepe Üniversitesi
Tez Danışmanı **Prof. Dr. N. Leyla Açıan**
Hacettepe Üniversitesi
Üye **Prof. Dr. Gülberk Uçar**
Hacettepe Üniversitesi
Üye **Prof. Dr. Ediz Demirpençe**
TOBB Üniversitesi
Üye **Prof Dr. Derya Akaydın Aldemir**
Başkent Üniversitesi

ONAY

Bu Tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmenliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Ersin FADILLIOĞLU
Müdür

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimi boyunca tüm bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan ve eğitimimde her türlü özveri ve yardımını esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Kamer Kılınç'a teşekkürlerimi ve ömür boyu minnettarlığımı sunarım.

Doktora eğitimimde bilgileri ve deneyimlerini benimle paylaşan Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalının değerli öğretim üyelerine ve tüm mensuplarına özellikle tez danışmanlarım Prof. Dr. Ediz Demirpençe ve Prof. Dr. N.Leyla Açıan'a teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimi süresince sevgi, sabır ve anlayışla beni destekleyen eşim Sanaz'a, her türlü desteklerini esirgemeyen ve hep yanımda olan aileme teşekkür ve sevgilerimi sunarım.

Doktora eğitimi süresince sevgi, sabır ve anlayışla beni destekleyen eşim Sanaz'a, her türlü desteklerini esirgemeyen ve hep yanımda olan aileme teşekkür ve sevgilerimi sunarım.

ÖZET

Sarkarati B. Lökosit miyeloperoksidaz enziminin saflaştırılması, kinetik özellikleri ile reaktif türlerin oluşumundaki etkilerinin araştırılması. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Programı Doktora Tezi, Ankara 2013. Miyeloperoksidaz (MPO) enzimi, lökoferez ile elde edilen insan lökositlerinden saflaştırıldıktan sonra kinetik özellikleri belirlendi; MPO tarafından katalizlenen nitrit oksidasyonu ve tirozin nitrasyonu araştırıldı. Serum fizyolojik ile yıkanan lökositlerden MPO enzimi %1 (w/v) HETAB içeren fosfat tamponu içinde çözünürleştirildi. Çözünürleştirilmiş enzim fraksiyonu, Concanavalin A-Sepharose kromatografisi ve pH:8'de yapılan CM-Sephadex iyon-değiştirici kromatografisi ile % 70.3 verimle saflaştırıldı. Saflaştırılan enzim indirgen koşullardaki SDS-PAGE'de 57000 ve 13100 Dalton molekül ağırlığında iki protein bandı verdi. Enzimin spektral analizinde, saflaştırılan MPO'nun Reinheit Zahl (RZ) değeri 0.86 olarak bulundu. Bu veri enzimin en az % 99 oranında saf olduğunu gösterdi. Substrat olarak H₂O₂ ve tetrametilbenzidin kullanılarak saflaştırılan enzimin bu iki substratı için kinetik özellikleri belirlendi. MPO'nun H₂O₂ için K_m ve V_{max} değerleri 0.727mM ile 273±8 IU/mg protein; tetrametilbenzidin için ise sırası ile 0.111 mM ve 283.04±39 IU/mg protein olarak bulundu. MPO, fagozom-ıçi pH değerleri civarında (pH 4.5-6) ve H₂O₂ varlığında, nitriti substrat olarak kullanarak oksidasyonunu katalizlemektedir. Daha düşük pH'da nitritin oksidasyonu MPO'dan bağımsızdır. pH:7 civarında ise MPO nitrit oksidasyonuna (aktivasyonuna) etkisizdir. Nitritin oksidasyonu zamana bağlı olup, MPO tarafından kullanılan nitritin yaklaşık % 50'si nitrate çevrilmektedir. MPO, nitrit ve H₂O₂ varlığında, serbest tirozinlerin veya proteine bağlı tirozinlerin nitrasyonunu katalizleyebilir. Saflaştırılan MPO'nun fagozom içi pH aralıklarında (pH:5-6), etkili olarak tirozin nitrasyonunu katalizlediği; nitrasyon hızının sübstratları olan nitrit, H₂O₂ ve tirozin derişimlerine ayrı ayrı bağlı olduğu görüldü. MPO tarafından katalizlenen tirozin nitrasyonunun, iki önemli fizyolojik elektron verici antioksidan bileşik olan askorbik asit ile indirgenmiş glutatyon tarafından karışık-tip inhibisyon mekanizması ile inhibe edildiği bulundu.

Anahtar kelimeler: Miyeloperoksidaz, kinetik özellikleri, nitrit oksidasyonu, tirozin nitrasyonu.

ABSTRACT

Sarkarati B. Purification of human leukocyte myeloperoxidase, kinetic properties and its role on reactive species generation. Hacettepe University Institute of Health Sciences, Ph.D. Thesis in Biochemistry, Ankara, 2013.

Myeloperoxidase (MPO) has been purified from human leucocytes obtained by leukapheresis, and kinetic properties were determined, nitrite oxidation and tyrosine nitration catalyzed by the purified enzyme have been studied. MPO was solubilized and extracted from saline-washed leucocytes using phosphate buffer containing 1 % (w/v) HETAB. MPO from the extract was purified by chromatography on Concanavalin A-Sepharose, and CM-Sephadex ion-exchange chromatography at pH 8 with a yield of 70.3. Under reducing and denaturing conditions on polyacrylamide-gel electrophoresis (SDS-PAGE), purified enzyme gave rise to protein bands of M, 57000 and 15500 Dalton. Spectral analysis of the enzyme gave a Reinheit Zahl (RZ) values (A_{430}/A_{280}) of 86, indicating that the enzyme was pure at least 99 % pure. Kinetic properties of MPO were determined using hydrogen peroxide and tetramethylbenzidine as co-substrates. K_m and V_{max} values for H_2O_2 were 0.727mM and 273 ± 8 IU/mg protein; for tetramethylbenzidine were 0.111 mM and 283.04 ± 39 IU/mg protein, respectively. Myeloperoxidase was found to catalyze the oxidation of nitrite in the presence of H_2O_2 . The oxidation of nitrate was pH and time-dependent, and half of nitrite disappeared in the reaction medium was recovered as nitrate. MPO-catalyzed nitrite oxidation was observed between pH 4.5-6, and no spontaneous oxidation could be detected within this pH range. Above pH 6.5. Myeloperoxidase can utilize nitrite and hydrogen peroxide as substrates to catalyze tyrosine nitration. Both free tyrosine and tyrosine residues on proteins are subject to nitration. MPO was found to catalyze free tyrosine nitration around intra-phagosom pH (between pH 5-6). The extent of nitration was dependent on concentration of substrates (nitrite, hydrogen peroxide and tyrosine). Two physiological antioxidant compounds, reduced glutathione and ascorbic acid were found to inhibit MPO-catalyzed tyrosine nitration by a mixed-type inhibition mechanism.

Key words: Myeloperoxidase, kinetic properties, nitrite oxidation, tyrosine nitration.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	III
TEŞEKKÜRLER	IV
ÖZET	V
ABSTRACT	VI
İÇİNDEKİLER	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	X
ŞEKİLLER DİZİNİ	XII
TABLOLAR DİZİNİ	XIV
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Memeli Peroksidaz Ailesi	3
2.1.1. Eozinofil Peroksidaz	3
2.1.2. Laktoperoksidaz (Tükürük Peroksidazı)	4
2.1.3 Tiroid peroksidazı	4
2.1.4. Miyeloperoksidaz	4
2.2. MPO'nun Biyosentezi	5
2.2.1. Gen Ekspresyonu	5
2.2.2. Post Translasyonel Modifikasyonlar	6
2.2.3. MPO'nun Proteolitik Olgunlaşması Ve Hücre İçi Hareketi	8
2.3. MPO'nun Yapısal Özellikleri	9
2.3.1. Aktif Merkez Yapısı	9
2.3.2. MPO'nun Peroksidaz Aktivitesi	9
2.3.3. Hipokloröz Asitin Etkileri	11
2.3.4. MPO'nun Nitrit İle Tepkimesi	12
2.3.5. MPO'nun Tirozin İle Tepkimesi	12
2.4. Miyeloperoksidazın Biyolojik Fonksiyonu	13
2.4.1. MPO'nun Aktivasyonu ve Salınımı	13
2.4.2. MPO'nun Antimikrobik Rolü	14
2.4.3. MPO'nun Serum Proteinlerine Bağlanması	14

2.4.4. MPO ve Hastalıkların Patogenezi	15
2.4.5. Bir Biyobelirteç Olarak MPO	16
2.5. Proteinlerde Tirozin Nitrasyonu	17
2.5.1. Protein Tirozin Nitrasyonunu Etkileyen Faktörler	17
2.5.2. Protein Tirozin Nitrasyonunun Hüresel ve Hücre İçi Lokalizasyonu	18
2.5.3. Tirozin Nitrasyonunun Protein Fonksiyonuna Etkisi	18
2.5.4. Tirozin Nitrasyonunun Hastalıklarla Olan Bağlantısı	19
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	21
3.1. Gereçler	21
3.1.1. Kimyasallar	21
3.1.2. Cihazlar	21
3.2. Yöntemler	22
3.2.1. Lökosit Süspansiyonunun Hazırlanması	22
3.2.2. Lökositlerin Homojenizasyonu	22
3.2.3. Zarlardan Miyeloperoksidazın Çözünürleştirilmesi	23
3.2.4. Amonyum Sülfat Kesitlemesi	23
3.3. Kromatografik Yöntemler	23
3.3.1. Afinite Kromatografisi	23
3.3.2. İyon Değiştirici Kromatografi	24
3.3.3. Jel Filtrasyonu Kromatografisi	24
3.4. Analitik Yöntemler	24
3.4.1. Protein Tayini	24
3.4.2. Aktivite Tayini	25
3.4.3. Elektroforez	25
3.5. Kinetik Çalışma Yöntemleri	26
3.5.1. Miyeloperoksidaz Enziminin pH Optimumu Belirlenmesi	26
3.5.2. Myeloperoksidaz H ₂ O ₂ Ve TMB İçin Kinetik Özellikleri	26
3.5.3. Miyeloperoksidaz Bağımlı Nitrit Oksidasyonunun İncelenmesi	27
3.5.4. Total Nitrit (Nitrit + Nitrat) Tayini	27
3.5.5. MPO-Bağımlı Tirozin Nitrasyonu Çalışmaları	27
3.6. İstatistiksel Değerlendirmeler	28

4. BULGULAR	29
4.1. Miyeloperoksidaz Enziminin Saflaştırılması	29
4.1.1. Lökosit Süspansiyonunun Hazırlanması Ve Homojenizasyonu	29
4.1.2. Zarlardan Miyeloperoksidazın Çözünürleştirilmesi	29
4.1.3. Çözünürleştirilen Enzimin Amonuyum Sülfat Kesitlemesi	29
4.1.4. Concanavalin A (Con-A) Sepharose Afinite Kromatografisi	30
4.1.5. Jel Filtrasyonu Kromatografisi	34
4.1.6. CM-Sephadex Katyon Değiştirici Kromatografi	34
4.1.7. SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi	39
4.2. Kinetik Çalışmalar	41
4.2.1. Miyeloperoksidaz Enziminin pH Optimumu	41
4.2.2. Myeloperoksidaz Aktivitesinin H ₂ O ₂ Konsantrasyonuna Bağımlılığı	42
4.2.3. Myeloperoksidaz Aktivitesinin Tetrametilbenzidin Derişimi Bağımlılığı	44
4.2.4. Miyeloperoksidaz Bağımlı Nitrit Oksidasyonu	45
4.3. MPO-Bağımlı Tirozin Nitrasyonu Çalışmaları	48
4.3.1. Tirozin Nitrasyonuna pH'nın Etkisi	49
4.3.2. Zamana Bağlı Tirozin Nitrasyonu	50
4.3.3. Substrat Konsantrasyonlarının Tirozin Nitrasyonuna Etkisi	51
4.3.4. Miyeloperoksidazın Tirozin Nitrasyonu İçin Kinetik Sabitleri	53
4.3.5. Tirozin Nitrasyonuna Askorbik Asit Etkisi	53
4.3.6. Tirozin Nitrasyonuna Glutasyonun Etkisi	56
4.3.7. Kinetik Sabitlerinin Belirlenmesi	59
5. TARTIŞMA	60
KAYNAKLAR	68
EKLER	
EK 1. Etik Kurul Araştırma Projesi Değerlendirme Raporu	

SİMGELER ve KISALTMALAR

^{-}SCN	Tiyosiyanat
3-NT	3-Nitrotirozin
Alu	<i>Arthrobacter luteus</i>
APS	Amonyum persulfat
ARDS	Akut Respiratuar Yetmezlik Sendromu
CBB R-250	Commassie Brilliant Blue R-250
CLN	Kalneksin
CM-Sephadex	Carboksimetil Sephadex
CO_3^{-}	Karbonat radikali
ConA	Conkanavalin-A
CRT	Kalretikulin
EDTA	Etilendiamintetraasetik Asit
EPO	Eozinofil peroksidaz
FAD	Flavin adenin dinukleotid
Fpg	Formamidopirimidin glikozilaz
GCF	Dişeti Oluğu Sıvısı
GSH	Redukte glutatyon
GSSG	Okside glutatyon
H_2O_2	Hidrojen peroksit
HDL	Yüksek Dansiteli Lipoprotein
HEPES	Hidroksietil piperazin etan sulfonic asit
HETAB	Hekzadesiltrimetilamonyumbromid
HL-60	<i>Human Promyelocytic Leukemia Cells</i>
HOCL	Hipoklorik asit
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
IU	Uluslararası Ünite
kDa	KiloDalton
LDL	Düşük Dansiteli Lipoprotein
LPO	Laktoperoksidaz
MI	Miyokard enfarktüsü

MMP	Matriks metalloproteinaz
MPO	Miyeloperoksidaz
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat (Redükte Form)
NO [•]	Nitrik oksit
NO ₂ ⁻	Nitrit
NO ₃ ⁻	Nitrat
NO ₂ [•]	Nitrojen dioksit radikali
O ₂ ⁻	Süperoksit
OH [•]	Hidroksil radikali
ONOOH	Peroksinitrik asit
PAGE	Poliakrilamit Jel Elektroforezi
PISF	Peri-implant sulkus sıvısı
PLB-985	İnsan diploit miyeloid lösemi hücre hattı
PMN	Polimorfonükleer lökositler
PPAR γ	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptors-Gamma</i>
RXR	Retinoit X reseptörü
RZ	Reinheit Zahl
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SOD	Süperoksit dismutaz
TEMED	Tetrametiletildiamin
TMB	Tetrametilbenzidin
TPO	Tiroid peroksidaz

ŞEKİLLER

2.1	PPAR γ ve ER'nin MPO AluRRE bölgesine şematik bağlanma şekli ve AluRRE bölgesinin nükleotit dizisi	6
2.2	MPO'nun aktif merkezindeki yapısal elemanlar ve protoporfirin ile MPO arasındaki kovalan bağlar	8
2.3	Miyeloperoksidazın halojenasyon ile peroksidaz aktiviteleri ve hem demirinin oksidasyon siklusu.	10
4.1	Myeloperoksidaz enziminin Concanavalin A-Sepharose afinite kromatografisinde metilmannozid gradienti ile elüsyonu	32
4.2	Myeloperoksidaz enziminin Concanavalin A-Sepharose afinite kromatografisinde 0.6 M metilmannozid içeren tampon ile elüsyonu	33
4.3	Myeloperoksidaz enziminin Concanavalin A-Sepharose afinite kromatografisinden sonra, Sephacryl S-300 jel fitrasyonu kromatografisi	35
4.4	Jel filtrasyonundan sonra yapılan CM-Sephadex katyon değiştirici kromatografi	36
4.5	Afinite kromatografisini izleyen CM-Sephadex katyon değiştirici kromatografi (pH 6.1).	37
4.6	Afinite kromatografisini izleyen CM-Sephadex katyon değiştirici kromatografi (pH 8.0).	37
4.7	Saflaştırılan MPO enziminin absorpsiyon spektrumu	38
4.8	Saflaştırma basamakları sonucu elde edilen SDS-PAEG elektroforez görüntüleri	40
4.9	Molekül ağırlığı tayini için standart grafik. a: büyük altbirim, b: küçük altbirim.	40
4.10	İnsan miyeloperoksidaz enziminin pH optimumu	41
4.11	Sabit TMB konsantrasyonunda hidrojen peroksitin MPO aktivitesine etkisi	42
4.12	İnsan lökosit miyeloperoksidaz enziminin hidrojenperoksit için Michaelis-Menten grafiği	43
4.13	İnsan lökosit miyeloperoksidaz enziminin hidrojenperoksit için Lineweaver-Burk grafiği	43

4.14	İnsan lökosit miyeloperoksidaz enziminin değişken TMB konsantrasyonuna göre Michaelis-Menten grafiği	44
4.15	İnsan lökosit miyeloperoksidaz enziminin değişken TMB konsantrasyonuna göre Lineweaver-Burk grafiği	45
4.16	Farklı pH'larda MPO tarafından ve kendiliğinden oluşan nitrit oksidasyonu	46
4.17	Farklı pH'larda MPO'nun nitrit oksidasyon aktivitesi	47
4.18	Zamana bağlı nitrit oksidasyonu grafiği	48
4.19	MPO bağımlı tirozin nitrasyonuna pH'nın etkisi	49
4.20	Farklı MPO konsantrasyonlarında tirozin nitrasyonunun zamana bağımlılığı.	50
4.21	Tirozin nitrasyonuna H ₂ O ₂ konsantrasyonunun etkisi	51
4.22	Tirozin nitrasyonuna nitrit konsantrasyonunun etkisi	52
4.23	Tirozin nitrasyonuna tirozin konsantrasyonunun etkisi	52
4.24	Tirozin nitrasyonu aktivitesinin Lineweaver-Burk grafiği	53
4.25	Askorbik asit konsantrasyonunun tirozin nitrasyonuna etkisi	54
4.26	Askorbik asit inhibisyonunu IC ₅₀ grafiği	54
4.27	İnsan lökosit MPO enziminin sabit askorbik asit konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiği	55
4.28	MPO tirozin nitrasyonuna GSH etkisinin semilogaritmik grafiği	57
4.29	H ₂ O ₂ varlığında GSH'nin oksidasyonu	57
4.30	GSH inhibisyonunun Lineweaver-Burk grafiği ve 2. grafiklendirmeler	58

TABLOLAR

4.1	Farklı amonyum sülfat doygunluklarında MPO enziminin presipitasyonu	30
4.2	Miyeloperoksidaz enziminin Concanavalin A-Sepharose afinite kromatografisinde 0.6 M metilmannozid içeren tampon, ya da metilmannozid gradient ile elüsyonunun karşılaştırılması	33
4.3	Farklı yöntemlerden sonra MPO enziminin RZ değerleri	39
4.4	İnsan lökositlerinden Miyeloperoksidaz saflaştırma şeması	39

1.GİRİŞ

Miyeloperoksidaz (donör, hidrojen peroksit oksidoredüktaz, EC 1.11.1.7) memeli nötrofillerindeki başlıca antimikrobik sistem enzimlerinden biridir. Miyeloperoksidazın antimikrobik etkisi, hidrojen peroksit bağımlı olarak klorun ve tiyosiyanatın etkili antibakteriyel ajanlar olan hipokloröz asit ve hipotiyosiyanöz asite çevrilmesini katalizlemesinden kaynaklanır. Miyeloperoksidazın katalitik etkisi sırasında oluşan reaktif türler normal biyomoleküller ile de tepkimeye girdiklerinden, miyeloperoksidaz enzimi çeşitli enflamatuar hastalıklardaki hücre ve doku hasarına da katkıda bulunur (1-3).

Miyeloperoksidaz enzimi iki heterodimerden oluşan ve 140 kDa molekül ağırlığında tetramerik bir proteindir. Dimerlerin her biri 108 amino asit (hafif zincir) ve 466 amino asitten (ağır zincir) oluşan iki polipeptit, aktiviteden sorumlu bir hem grubu, en az 3 adet N-glikozilasyonu ve bir kalsiyum iyonu içerir. Heterodimerler birbirine zincirlerarası bir disülfid bağı ile bağlıdırlar (1,4).

Lökositlerin aktivasyonu, bu hücrelerde önemli biyokimyasal olayları başlatır. Antimikrobik etkileri için iki önemli biyokimyasal değişim NADPH oksidaz enziminin aktivasyonu ve indüklenebilen nitrik oksit sentazın (iNOS) indüksiyonudur. NADPH enzimi tarafından üretilerek fagozomun asidik ortamına bırakılan süperoksitler, kendiliğinden dismutasyon tepkimesi ile H_2O_2 oluştururlar. Oluşturulan H_2O_2 miyeloperoksidazın zorunlu bir substratı olup, enzimin hem-demirini oksitler. Hem-demiri oksitlenen enzim Bileşik-I olarak bilinir ve miyeloperoksidazın reaktif formunu oluşturur. Enzimin Bileşik-I formu, substratı olan bileşikleri (başta klor olmak üzere halojenler, tiyosiyanat ile nitrit gibi anyonlar ve çeşitli sentetik bileşikler) oksitler (5,6).

Diğer taraftan, iNOS indüksiyonu ile birlikte nitrik oksit sentezinde de önemli artış olur. Nitrik oksit, NADPH oksidaz tarafından sentezlenen süperoksit ile tepkimeye girerek peroksinitrit oluşturur veya oksijenle tepkimesi sonucu reaktif nitrojen türleri oluşturarak sonunda nitrit ve nitrate oksitlenir (7). Süperoksit ve nitrik oksit yapımının aktivasyonu ile başlayan zincirleme enzimatik (miyeloperoksidaz) ve non-enzimatik reaksiyonlar sonucunda oluşan reaktif türler, hedef olabilecek biyomoleküllerle tepkimelere girerler. Bu sırada gerçekleşen reaksiyonların bir grubu da biyomoleküllerin nitrasyonudur (8). Oksidatif ve nitrozatif stres koşullarında zar

lipidlerinin (9), nükleobazların (guanin) (10) ve amino asitlerin (tirozin ve triptofan) (11) nitrasyonu uğradıkları gösterilmiştir. Nitritin peroksidazlar tarafından reaktif nitrojen oksit türlerine çevirilmesi, nitritin antibakteriyel etkisinin de temelini oluşturur.

Normal koşullarda da bazal düzeyde reaktif oksijen ve nitrojen türleri oluştuklarından, yine bazal düzeyde tirozinlerin nitrasyonu gerçekleşir ve protein yaşlanması sürecinde proteinlerdeki nitrotirozin seviyesi artar (12). Proteinlerdeki nitrotirozin seviyesi geçmişe yönelik olarak nitrozatif stres hakkında bilgi verir. Çeşitli patolojik durumlarda reaktif nitrojen oksit türlerinin yapımındaki artışa bağlı olarak proteinlerdeki tirozin nitrasyonunda önemli artış meydana gelir (13). Tirozinlerin nitrasyonu ise proteinlerde yapı değişimine ve fonksiyon bozuklukları ile sonuçlanır. Çalışılan çok sayıdaki hastalıklarda protein nitrasyonunda artışlar gösterilmiştir ve örneğin kardiyovasküler hastalıklarda nitrotirozin diğer kardiyak belirteçlerle birlikte bir biyobelirteç (biomarker) olarak kabul edilmiştir. Genel olarak kişiideki nitrotirozin seviyesi geçmişe yönelik olarak oksidan/antioksidan dengenin önemli bir belirtecidir (14).

Tirozin amino asidi proteinlerin yapısında rol alan ve tirozin kinazlarla sinyal iletim yollarında rolü olan önemli bir amino asittir. Bu amino asidin MPO tarafından nitrit-bağımlı nitrasyonu, protein konformasyonu ve sinyal iletimi üzerinde etkilere sahip olacaktır. MPO tarafından katalizlenen tirozin nitrasyonunun koşullarının araştırılması, inflamatuvar hastalıklarda görülen doku hasarı mekanizmasının anlaşılmasına da katkıda bulunacaktır.

Bu tez kapsamında insan lökositlerinden miyeloperoksidaz enzimi saflaştırılarak kinetik özellikleri incelenmiştir. MPO tarafından nitrit oksidasyonunun incelenmesi nitrik oksitin oksidasyonunun son ürünlerinden olan nitritin, hidrojen peroksit varlığında aktivasyonu sodyum nitrit kullanılarak araştırılmıştır. Nitritin MPO tarafından aktivasyonu sırasında oluşan reaktif ara ürünlerden nitrojen dioksit radikalinin tirozin amino asiti ile reaksiyona girerek 3-nitrotirozin oluşturması beklenir. Nitrotirozin oluşumu spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir. Doğal antioksidan bileşikler glutatyon ve askorbik asitin MPO tarafından katalizlenen nitrit aktivasyonu ve tirozin nitrasyonu üzerinde etkileri araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Hidrojen peroksit bağımlı olarak çeşitli oksidasyon tepkimelerini katalizleyen ve aktiviteleri için prostetik grup olarak hem içeren peroksidaz enzimleri, iki üst aileye ayrılarak sınıflandırılırlar. İlk peroksidaz üst ailesi enzimler bitki, mantar ve bakterilerde bulunan peroksidazlardır. Bu enzimler üç sınıfa ayrılırlar ve aynı atasal gendeki gen duplikasyonundan kaynaklanırlar. Proteinlerin katlanmaları birbirine benzer ve üç boyutlu yapıları arasında çok az farklılıklar vardır.

Peroksidazların ikinci üst ailesi ise “memeli peroksidazları” diye adlandırılır. Bu gruptaki peroksidazlar mieloperoksidaz (MPO), eozinofil peroksidaz (EPO), laktoperoksidaz (LPO) ile tiroid peroksidazdır (TPO). Tükürük salgısında bulunan peroksidaz (TPO) ise LPO ile aynıdır. Bu peroksidazlar, primer ve tersiyer yapıları ile, prostetik grubun özellikleri nedeniyle birinci peroksidaz üst ailesinden farklıdırlar. Memeli peroksidazları olarak adlandırılmalarının nedeni, ilk olarak memeli dokularında tanımlanmalarıdır. Ancak daha sonra omurgasız hayvanlarda da benzer enzimlerin ve genlerinin varlığı gösterilmiştir (1,15). MPO, EPO ve LPO kromozom 17 üzerindeki birer gen tarafından kodlanırlar; intron ve ekzon yapıları benzerdir. TPO geni ise kromozom 2 üzerindedir. İtron ve ekzon yapısı diğer üç peroksidazinkilerden farklıdır. MPO, EPO ve LPO konakçının antimikrobik savunma sisteminde rol alan enzimler olup; H_2O_2 bağımlı olarak halidleri ve tiyosiyanatı toksik antimikrobik ajanlara çevirir. TPO ise tiroid bezindeki hormon sentezinde rol alır (1,16).

2.1. Memeli Peroksidaz Ailesi

2.1.1. Eozinofil Peroksidaz

EPO, eozinofil-spesifik granüllerde bulunan peroksidazdır., Granüllerdeki proteinlerin ağırlık cinsinden % 40'ını oluşturur. Yüksek NADPH oksidaz aktivitesi sayesinde eozinofiller, nötrofillerin 10 katı kadar H_2O_2 üretme yeteneğine sahiptir. EPO; H_2O_2 -bağımlı olarak klor, brom, nitrit ve tiyosiyanatı reaktif türlere çevirerek inflamasyon/enfeksiyon bulunan ortama bırakır (4). EPO 715 amino asitlik (80 kDa) bir öncül olarak sentezlenir. Bazık amino asitlerce zengin katyonik bir glikoproteindir. Proteoliz ve glikozilasyondan sonra 68.9 kDa molekül ağırlığına sahip ve iki altbirim içeren (57.9 ve 11.9 kDa) monomerleri oluşur. Aktif enzim iki

monomer içerir. Altbirim yapısı, primer yapısı (% 70 homoloji) ve molekül ağırlığı bakımından MPO'ya en fazla benzeyen peroksidazdır (2,15).

2.1.2. Laktoperoksidaz (Tükürük Peroksidazı)

Laktoperoksidaz enzimi süt, tükürük, ter, gözyaşı ve vajinal salgılar gibi ekzokrin salgılarda bulunan bir enzim olup, vücuda giren zararlı mikroorganizmalara karşı ilk kuşak savunma sistemini oluşturur (1). Bu salgılardaki peroksidazın 17. kromozom üzerindeki bir tek gen tarafından kodlandığı, tükürük peroksidazının klonlanması ve dizisinin aydınlatılması ile gösterilmiştir. Tükürükteki peroksidaz aktivitesi, özellikle diş eti cep sıvılarından salgılanan nötrofil kaynaklı miyeloperoksidaz ile, tükürük bezinden salgılanan tükürük peroksidazının bir karışımıdır. Tükürükteki bu peroksidazların ana fizyolojik substratı tiyosiyanat (SCN^-) olup, peroksidaz tarafından güçlü bir antimikrobik ajan olan hipotiyosiyanoz aside oksitlenir. Bu iki peroksidaz, anaerobik mikroorganizmalar tarafından üretilen hidrojen peroksiti de tepkime sırasında kullandıklarından, sitotoksik bir bileşik olan hidrojen peroksite karşı da korunma temin ederler. Yine katalizledikleri peroksidasyon tepkimeleri ile ağız yoluyla alınan çeşitli mutajenik ve karsinojenik bileşiklerin inaktivasyonunda da rol aldıkları kabul edilmektedir (17).

2.1.3. Tiroid Peroksidaz

Tiroid bezinde bulunan ve tiroid hormonlarının sentezi için H_2O_2 -bağımlı olarak iyotun aktivasyonundan sorumlu olan enzimdir. Polizomlarda sentezlendikten sonra endoplazmik retikulum ile Golgide translayon sonrası modifikasyona, esas olarak 4 adet asparajin yan zinciri üzerinde glikozilasyona uğrar. Folikül hücrelerinin apikal membranına transfer edilen peroksidazın hem içeren aktif merkezi folikül lümenine bakar. TPO 933 amino asitten oluşan (110 kDa) bir polipeptid olup, apikal membranı tek α -heliks ile geçer. Amino asit dizisi MPO ile % 42 homoloji gösterir (18).

2.1.4. Miyeloperoksidaz

Miyeloperoksidaz enzimi (MPO; donör H_2O_2 oksidoreduktaz, EC 1.11.1.7) polimorfonükleer lökositlerin antibakteriyel etkilerinde rol alan başlıca enzimlerden biridir. MPO, H_2O_2 bağımlı olarak başta klor iyonu olmak üzere diğer halojenlerin (F^- , Br^- , I^-) iyonlarını ve bazı inorganik bileşiklerin (tiyosiyanat, nitrit) reaktif

türlere oksidasyonunu katalizler. Bu reaktif türler MPO enziminin genel olarak toksik; özel olarak da antibakteriyel etkilerinin araçlarıdır.

Miyeloperoksidaz enzimi 146 kDa molekül ağırlığında, tetramerik yapıda bir glikoprotein ve hemoproteindir. Protoporfirin yapı içeren enzim yeşil renge sahiptir. Enzim nötrofil ve monositlerin primer granüllerinde bulunur. Nötrofil ve monositlerin kuru ağırlığının sırasıyla % 5 ve % 1-2'sini oluşturmaktadır. Bu hemoprotein lökositlerin azurofilik granüllerinde depo edilir ve çeşitli agonistlerle lökositlerin aktivasyonu sonucu hücre dışı alana ve fagolizozomal kompartmana salınır. Tipik olarak fagosit aktivasyonu ve MPO sekresyonuna, NADPH'nin oksidasyonu ile beraber süperoksit (O_2^-) ve hidrojen peroksitin (H_2O_2) oluşumunda artma şeklindeki bir oksidatif patlama (oxidative burst; respiratory burst) eşlik eder (19). MPO enziminin biyolojik önemi, bu enzim eksikliği olan kişilerde net olarak görülmektedir. MPO enzim eksikliği bulunan kişilerin nötrofilleri normal olarak fagositoz yapabilmektedir. Ancak fagosite edilen ajanı öldüremezler ve bu nedenle kronik bakteriyel enfeksiyonlara son derece yatkındırlar (20).

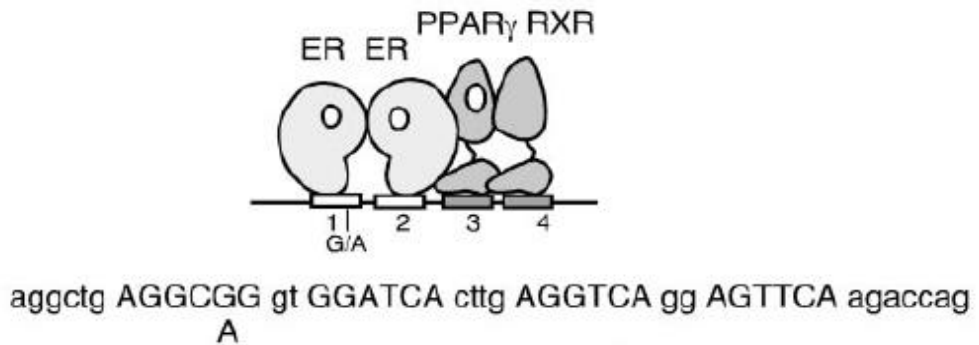
Polimorfonükleer lökositlerin aktivasyonunu izleyen NADPH oksidaz ve MPO kaynaklı reaktif/oksitleyici kimyasal türler, aynı zamanda konakçı için de çeşitli toksik etkilere sahiptirler. Örneğin bu reaktif türler, aralarında proteinler, lipidler, amino asitler ve DNA'nın da olduğu biyomoleküllerle tepkimeye girerek yapı ve fonksiyonlarında değişimlere neden olabilirler (19).

2.2. Miyeloperoksidazın Biosentezi

2.2.1. Gen Ekspresyonu

MPO 17. kromozomun uzun kolu üzerinde bulunan 14 kb'lık tek bir gen tarafından kodlanır. Bu genin ekspresyonu miyeloid hücrelerle sınırlıdır (21). Kemik iliğinde granülositlerin farklılaşması sırasında sadece promiyelosit ve promiyelomonositler tarafından MPO aktif olarak sentezlenir (22). MPO geninin ekspresyonu farklı transkripsiyon faktörleri tarafından ve farklılaşma basamaklarında kontrol edilir ve MPO sentezi miyeloid öncül miyelosit evresine geçtiğinde gen ekspresyonu durdurulur. MPO mRNA miktarı en fazla miyeloblast ve promiyelosit evrelerinde saptanmıştır (23). İnsan miyeloid öncül hücre hattı HL-60 veya PLB-985 hücrelerinde de forbol esterleri gibi farklılaşma ajanlarına maruz

kaldıklarında bir kaç saat içerisinde MPO geninin susması ve biyosentezinin durması gözlenmiştir (24). MPO promotör bölgesinde tesbit edilen Alu reseptör bağlanma bölgesi (AluRRE) peşpeşe dizilmiş 4 hegzamer hormon reseptör motifi (AGGTCA) içermektedir. Bu motifler 2-4-2 nukleotid aralıklarla tekrarlanmıştır. Değişik nükleer reseptörler tarafından tanınır. Bu reseptörlerden biri de Sp1 reseptörüdür. Sp1 reseptör bağlanma bölgesi taşıyan homozigot bireylerde Sp1 bağlanma bölgesi taşımayan bireylere göre 25 kat daha fazla MPO gen transkripsiyonu gözlenir. Heterozigot bireylerde ise orta derecede bir gen transkripsiyonu tesbit edilmiştir. Akut miyeloid lösemilerde vakaların çoğunluğu homozigot Sp1 bağlanma bölgesi taşır ve bu bireylerde MPO gen transkripsiyonu yüksektir. Bu da Sp1 reseptörünün MPO gen transkripsiyonunda etkili olduğunu göstermektedir (25). Çalışmalar, PPAR γ reseptörünün RXR ile dimer oluşturarak ilgili AluRRE bölgesinin 3. ve 4. dizinlerine bağlanıp MPO gen ekspresyonunu aktive ettiğini ve dimerik estrojen reseptörünün 1. ve 2. bölgeye bağlanarak PPAR γ -RXR dimerinin bağlanmasını engellemek suretiyle ekspresyonu inhibe ettiğini göstermiştir (Şekil 2.1) (26).



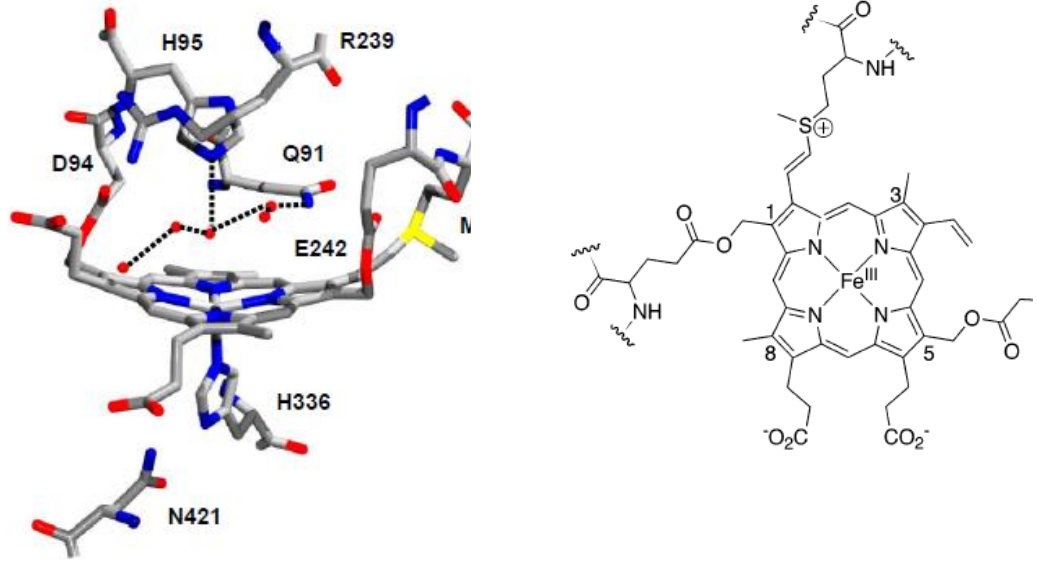
Şekil 2.1. PPAR γ ve ER'nin MPO AluRRE bölgesine şematik bağlanma şekli ve AluRRE bölgesinin nükleotit dizisi(26),

2.2.2. Post Translasyonel Modifikasyonlar

Sentezden sonraki protein modifikasyonunun ilk basamağında, 80 kDa translasyon ürününün glikozilasyonu ve sinyal peptidin kopmasıyla 90 kDa'luk apopro MPO oluşur (27). Bu ürün hem grubu içermez ve aktif değildir (28).

Diğer glikoproteinler gibi MPO da ribozomal sentez sonrası endoplazmik retikulumda bir seri proteolitik işleme tabi tutularak olgun MPO'nun okuşumu ve hedefe yönlendirilmesi sağlanır. Tüm N-bağlı (N-linked) glikoproteinlerde olduğu gibi MPO'da da karbohidrat yan zincirleri önce bir blok halinde proteine bağlanırlar. Her zincir 2 N-asetilglukozamin, 9 mannoz ve 2 glukoz içerir. Daha sonra endoplazmik retikulum glikozidaz ve mannozidaz aktivitesi sonucu terminal glukozlar ve en az bir mannoz koparılır ve 2 N-asetilglukozamim içeren bol mannozlu bir karbohidrat ilavesi kalır. Karbohidrat zincirleri 5 asparajin amino asidine bağlanır Bunlar Asn 139, 323, 355, 391 ve 483 aa'lerdir. Asn 139 propeptit üzerinde olup modifikasyon sonucu koptuğundan, olgun proteinde 4 glikozilasyon bölgesi vardır. Tüm glikozilasyonlar ağır zincir üzerinde yer alırlar. Glikozilasyonun fonksiyonu bilinmemekle birlikte, MPO glikozilasyonunu proteinin moleküler şaperonlar kalretikulin (CRT), kalneksin (CLN) ve Erp57 ile olan ilişkisinde rol oynadığı düşünülmektedir (29). Tüm glikoproteinler gibi MPO da doğru katlanma ve kalite kontrolün bir basamağı olarak sınırlı deglikozilasyon sonrası moleküler şaperonlarla etkileşime girer. ApoproMPO ER'da kaldığı sürede CRT ve CLN ile bağlantıda olduğu ve MPO'nun olgunlaşması için bu bağlanmanın gerekli olduğu gözlenmiştir (30).

90kDa proMPO'nun olgunlaşmasında sonraki basamak hem grubunun bağlanmasıdır. Bu bağlanma MPO'nun olgunlaşması sırasında doğru katlanması ve peroksidaz aktivitesinin kazanması için gereklidir. MPO'nun prostetik hem grubu Fe^{III} protoporfirin IX türevidir. Tüm memeli peroksidazlarında hem grubu glutamat 242'nin karboksil gurubu ve hem'in 1-metil altbirimi arasında ve diğeri aspartat 94'ün hidroksil grubu ve hem'in 5-metil gurubu arasında 2 ester bağıyla proteine bağlanırlar. MPO farklı olarak bir ilave bağ içerir, bu bağ met.243 ve 2-vinil altbiriminin β-karbon arasındaki bir sulfonyum bağıdır. Bu yeni bağ MPO'nun Soret bandını 412den 430'a kaydırır ve aynı zamanda MPO'ya fizyolojik pH da klorinasyon aktivitesi kazandırır. Bu 3 bağ oluşumunun otokatalitik bir proses olduğu düşünülmekte, ise de tam aydınlatılmamıştır (31,32). Sulfonyum bağı pozitif yükü sayesinde bir elektron çekici olarak görev yapar, ayrıca komşu amino asitle birlikte porfirin yapının düzlemsel yapısını bozar (33).



Şekil 2.2 MPO'nun aktif merkezindeki yapısal elemanlar(15)(solda) ve protoporfirin ile MPO arasındaki kovalan bağlar(32) (sağda).

2.2.3. Miyeloperoksidazın Proteolitik Olgunlaşması Ve Hücre İçi Hareketi

Enzimatik aktiviteye sahip proMPO 125 amino asit uzunluğunda propeptidin kopmasıyla kısa ömürlü 74 kDa'luk bir proteine dönüşür (34,35). Bu geçiş basamağı daha sonra 74 kDa'luk büyük α altbirimi ve 13.5 kDa'luk küçük β altbirimine ayrılır. Bu 2 alt birim hem gurubu aracılığıyla kovalan olarak birbirine bağlıdır. Daha sonra 2 $\alpha\beta$ protomeri bir araya gelerek 150 kDa ağırlığında dimer oluştururlar. Bu 2 monomer büyük altbirimlerdeki Cys319'lar arasındaki bir disülfid bağıyla birbirine bağlanırlar (36). Olgun dimer MPO primer granüllerde depolanır. Dimer oluşumunun fonksiyonel etkisi bilinmemektedir. MPO memeli peroksidazlarında tek dimer olan peroksidazdır. Endoplazmik retikulumdan trans Golgi şebekesine doğru yönlene MPO azurofilik granüllere gider veya hücre dışına salgılanır. Burada hücre içi granüllere gidecek olan MPO'lar, salınacak olan MPO'lardan ayrılmalıdır. Esas hedef nokta hücre içi organeller olduğundan hücre, proteinleri salınımdan kurtarmak zorundadır. MPO'nun lizozoma gönderilmesi iki farklı yolakla gerçekleştirilir. Birincisi doğrudan proteinin Golgiden geç-endozoma ve oradan lizozoma gitmesidir. İkinci yolak ise proteinin hücre zarı tarafından

yakalanması ve erken-endozomdan geç-endozoma ve oradan lizozoma geçmesidir (37).

2.3. Miyeloperoksidazın Yapısal Özellikleri

2.3.1. Aktif Merkezinin Yapısı

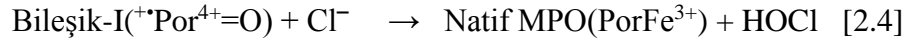
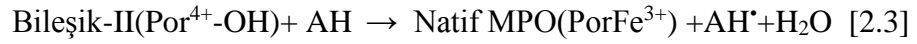
Dimerik MPO'nun her monomeri, hem grubuna bağlı bir demir ve bir kalsiyum içerir. Kalsiyum iyonunun bağlanma merkezi pentagonal bipiramid yapıdadır. Yapı tüm memeli peroksidazlarında iyi korunmuş benzer sekans içerir. İki uçta Ser174 ve Phe170 ve merkez düzlemde ise Asp96, Thr168, Asp172, bulunmaktadır. Bu amino asitlerden distal His95'e komşu olan Asp96 küçük polipeptid üzerinde bulunur; bu da kalsiyum iyonunun distal histidinin doğru yerleşmesinin yanı sıra iki zincirin bir arada tutulmasında etkili olduğunu gösterir. Kalsiyumun uzaklaştırılması proteinin çökmesine neden olur (38). Bu ise kalsiyum iyonunun üçüncü yapıyı düzenlediğini gösterir.

Natif MPO'da hem grubu beş bağ ihtiva eden Fe^{3+} içerir. Bu bağlardan dördü porfirinin pirol halkalarının azot atomuna, beşincisi ise proksimal histidinin (His336) ϵ azotuna bağlıdır. Bu histidinin δ azotu ise Asn421'in NH_2 gurubuna hidrojen bağı ile bağlıdır. Bu yapı ayrıca su molekülleriyle de hidrojen bağı aracılığıyla bağlanır. Bu yapı bir kompleks halinde MPO'nun peroksidaz aktivitesini sağlamaktadır (36,39). Distal histidin ve arjinin Bileşik-I ve Bileşik-II'nin oluşumunda ve stabilitesinde önemli rol oynamaktadır (40,41). Distal histidin H_2O_2 molekülünü deprotona ederek Fe-OOH kompleksinin oluşumunu ve onu takiben distal oksijene bir proton vererek O-O bağının kopmasını sağlar. Distal arjinin ferrik oksijen ile hidrojen bağı kurarak hem demirinin yüksek oksidasyon basamağının korunmasında ve H_2O_2 den kopan negatif yüklü OH^- oluşumunda etkin rol oynar (42,43).

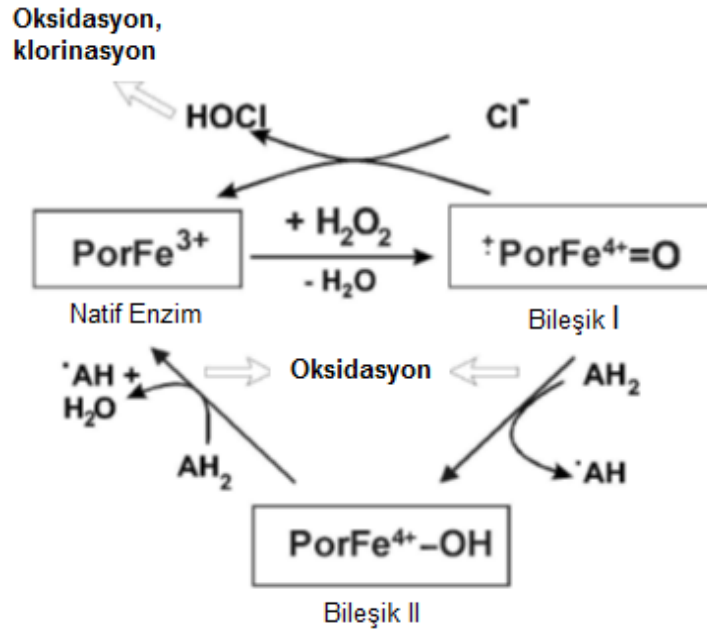
2.3.2. Miyeloperoksidazın Peroksidaz Aktivitesi

Peroksidazların farklı okside olabilen substratlara özgünlüğü farklı olsa da, bu substratların oksidasyonu için üç basamaklı redoks döngüsü izlenmektedir (41). İlk basamakta enzim bir molekül H_2O_2 ile iki elektronluk bir redoks tepkimesine girer. H_2O_2 suya indirgenirken enzim bileşik-1'e oksitlenir. Enzimin bu formu bir oksiferril merkezi ($Fe^{IV}=O$) ve porfirin üzerinde bir organik katyon radikali

içermektedir [Eşitlik-2.1]. Organik katyon radikali ikinci basamakta substratı oksitleyerek indirgenir ve bileşik-II oluşur [Eşitlik-2.2], bu yapı hala oksiferril merkez içermektedir. Son olarak bileşik-II ikinci substrat molekülünü oksitleyerek natif forma indirgenir [Eşitlik-2.3] (41,43). Bu basamak MPO tepkimesinde hız belirleyici basamaktır (40). Halid oksidasyonu tepkimesinde ise bileşik-1, halidleri 2 elektronlu tek bir tepkimeyle oksitler ve natif enzime dönüşür [Eşitlik-2.4] (41,44).



Miyeloperoksidaz fizyolojik koşullarda halojenasyon ve peroksidaz aktiviteleri olmak üzere başlıca iki tür aktiviteye sahiptir. Her iki aktivitesi de H_2O_2 bağımlıdır. Bu tepkimeler sırasında hem demirinin oksidasyonu seviyesindeki değişimler Şekil 2,3'de verilmiştir (45).



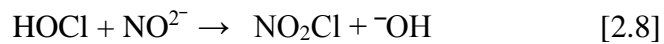
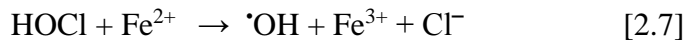
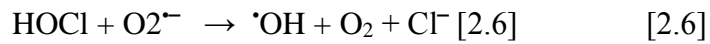
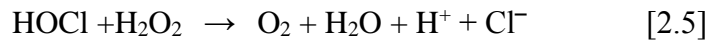
Şekil 2.3. Miyeloperoksidazın halojenasyon ile peroksidaz aktiviteleri ve hem demirinin oksidasyon siklusu.

MPO aktivitesi için gereken H_2O_2 farklı kaynaklardan sağlanmaktadır. Fagositoz sırasında NADPH oksidazın oluşturduğu süperoksit radikali asidik pH'da kendiliğinden, nötral ve bazik pH'larda süperoksit dizmutaz (SOD) aktivitesi ile H_2O_2 oluşturur. Vasküler NAD(P)H oksidaz da MPO için H_2O_2 kaynağı olabilir. Ksantin oksidaz, glukoz oksidaz ve amin oksidaz gibi bazı çözünen oksidazlar da H_2O_2 üretmektedirler (46). Laktik asit bakterileri de denilen bazı mikroorganizmalar metabolizmaları sonucu ortama H_2O_2 salarlar. Bu bakterilerden *streptococci*, *pneumococci*, ve *lactobacilli* cinsleri sayılabilir (47). Normal vajinal florası olan laktobasillus eksikliği sonucu azalan H_2O_2 vajinal *E.coli* ve bazı diğer anaerob bakteri enfeksiyonlarında artışa neden olmaktadır (48).

2.3.3. Hipokloröz Asitin Etkileri

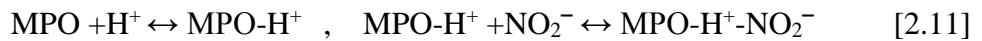
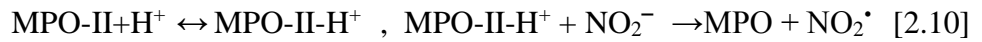
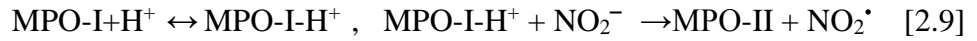
Miyeloperoksidaz tarafından üretilen hipokloröz asit, ayrıca bir katalizöre gerek duymadan proteinler ve diğer biyomoleküllerin klorinasyonuna neden olabilir. Hedef biyomoleküller arasında tirozin amino asidi ile, amino grubu içeren bileşikler sayılabilir. Aminlerle tepkimesi kloroaminleri oluşturur. Bu yapısal değişimler, hedef molekül veya organizmayı proteolize/hidrolize duyarlı kılar.

Hipokloröz asidin diğer önemli sitotoksik etkisi, çeşitli reaktif oksijen türlerinin oluşumuna neden olmasına dayanır. Özellikle fagozom ortamında bulunan H_2O_2 , süperoksit ve nitrit ile tepkimeye girdiğinde, bilinen en reaktif radikallerin oluşumuna neden olur. Bu radikallerin başlıcaları aşağıda verilmiştir. Bu nedenle inflamasyon bölgesindeki lökositlerin bulunduğu ortam, özellikle de fagozom ortamı oksidatif stresin ağır olarak hissedildiği ortamdır (45). Tepkimeler eşitlik 2.3-2.8'de verilmiştir.



2.3.4. Miyeloperoksidazın Nitrit ile Tepkimesi

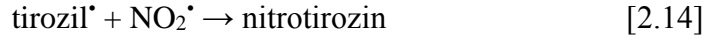
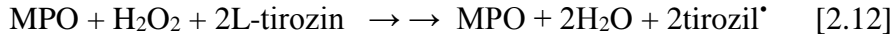
Miyeloperoksidazın hem demiri hidrojen peroksit ile tepkimeye girdiğinde, porfirin halkası üzerinde yüksek oksidasyon seviyesindeki oksoferril oluşur. Enzimin oksitleyici özelliği bu oksitleyici demir türevinden kaynaklanır. Oksoferril formundaki demir organik ve inorganik anyonları oksitleme yeteneğine sahiptir. Bu demir kloru hipokloröz aside oksitler (enzimin temel biyolojik substratı); ya da ortodiansidin veya tetrametilbenzidin gibi organik bileşikler oksitleyebilir. Oksidasyon ile gerçekleşen renk oluşumundan yararlanılarak MPO aktivitesi tayin edilebilir. Benzer şekilde MPO, nitriti kullanma (oksitleme) özelliğine sahiptir. MPO bağımlı nitrit oksidasyonu tek elektronlu, iki basamaklı oksidasyon şeklindedir. Nitrit, MPO-I ve MPO-II tarafından oksitlenerek nitrojen dioksit radikali oluşturur. Reaksiyonlar eşitlik 2.3 ve 2.4 'te görülmektedir. Nitrit MPO-I için daha iyi bir substrattır (49). Aynı zamanda natif MPO da nitrit ile tepkimeye girerek kompleks oluşturur (50). MPO asidik pH'da ve protone şekliyle nitrit ve diğer anyonik substratlarla tepkimeye girer. Distal histidin proton bağlayan alt birimdir (49). Tepkimeler eşitlik 2.9, 2.10, ve 2.11'de verilmiştir.



2.3.5. MPO'nun Tirozin İle Tepkimesi

MPO tarafından katalizlenen serbest veya proteine bağlı tirozin nitrazyonu için ilk ürün tirozil radikalidir. MPO bileşik-I ve bileşik-II tirozin amino asitini oksidasyona uğratarak tirozil radikali oluşturur (51). Oluşan tirozil radikalleri birleşerek ditirozin, tritirozin, pulkerozin ve izoditirozin oluşturabilirler (52). Ditirozin oluşumu serbest veya protein bağlı tirozinler arasında olabilir ki bu durumda proteinler arasında çapraz bağ oluşturur (51). İndüklenebilir nitrik oksit sentaz aktivitesi sonucu oluşan nitrik oksit ortamda daha stabil son ürün olan nitrite

veya süperoksit radikali ile tepkimeye girerek peroksinitrite dönüşür. Peroksinitrit kendiliğinden tirozil radikalini nitrasyona uğratarak nitrotirozin oluşturur. MPO ve H₂O₂ varlığında nitrit, nitrojen dioksit radikali oluşturur. Bu radikal tirozil radikali ile tepkimeye girerek farklı bir yoldan nitrotirozin oluşturur (53). MPO bağımlı nitrotirozin oluşumu kısaca eşitlik 2.12-2.14 da gösterilmiştir.



2.4. Miyeloperoksidazın Biyolojik Fonksiyonu

2.4.1. MPO'nun Aktivasyonu ve Salınımı

Polimorfonükleer lökositler (PMN) veya nötrofiller, periferel kandan inflamasyon bölgelerine yönelen ilk bağışıklık sistemi hücreleridir. Lökositlerin enfekte veya hasarlı bölgelere infiltrasyonu damarlar ve ilgili dokulardaki adezyon molekülleri, sitokinler ile hücreler arası matriks komponentleri tarafından kontrol edilmektedir (54,55). Lökositler tarafından salınan bazı özel proteinler ve metabolitler, patojenlere karşı korunmada, infiltrasyonda ve doku hasarında etkilidirler. Bu proteinlerin en önemlilerinden birisi de azurofilik granüllerde depolanan miyeloperoksidaz enzimidir (46). MPO'nun etkisi nötrofillerin toplandığı bölgeyle yakından bağlantılıdır. Nötrofillerin iltihaplı dokulara infiltrasyonu MPO aktivitesinin tayini ile gösterilir. Lökosit aktivasyonu sırasında MPO'nun önemli bir kısmı hücreler arası alana salınır. Bu serbest hücre dışı MPO değişik hedeflere bağlanarak onları etkilemektedir (56). Lökositlerin azurofilik granüllerinde MPO, diğer katyonik proteinler, negatif yüklü proteoglikanlar, özellikle kondroitin-4-sülfat ile birlikte izole edilmiştir (57,58). Granüllerin içinde pH'nın düşük olması (59), dinlenme fazında olan azurofilik granüllerinin komponentlerini inaktif durumda tutmaktadır. MPO ayrıca hidrojen peroksit yokluğu nedeniyle de inaktiftir. Fagositoz sonrasında azurofilik granüller içeriklerini oluşturan fagozoma salarlar. NADPH

oksidaz aktivasyonu ve fagozomlarda değişen iyon dengesinden sonra koşullar MPO ve diğer azurofilik moleküllerin aktivasyonu yönünde değişir (60). Yeni oluşan fagozomlarda ilk 3 dakikada pH 7.8-8.0'e yükselir, 10-15 dakika içinde 7'ye ve bir saat sonra da 6.0'ya düşmektedir (61,62).

2.4.2. MPO'nun Antimikrobik Rolü

İnsan lökositlerinde MPO-H₂O₂-halid sistemi bakteri, mantar, virus gibi patojenlerin ve tümör hücrelerinin inaktivasyonu ve öldürülmesinde görev alan bir savunma sistemidir (46,63,64). Bu antimikrobik sistemin başlıca fizyolojik substratları klor ile fagozom içinde üretilen hidrojen peroksittir. Sonuçları bakımından diğer önemli fizyolojik substrat, tiyosiyanat (-SCN) ile nitrittir. Bu substratların MPO tarafından reaktif türlere çevrilmesi için hidrojen peroksit gereklidir.

MPO tarafından oksitlenen klor, reaktif ve güçlü bir oksitleyici olan hipokloröz asite (HOCl) çevrilir. Hipokloröz asit, primer ve sekonder amino grubu içeren bileşiklerin klorinasyonuna ve kloroaminlerin oluşumuna neden olur. Hipokloröz asit fagozom koşullarında nitrit ile tepkimeye girerek nitril klorür, nitrojen dioksit radikali ve klor radikalinin oluşumuna da neden olabilir (Şekil2.3). Nötrofillerdeki degranülasyon sırasında çok sayıda hidrolitik enzim (elastaz, G-proteinaz-3, katepsin ve MMP-9, lizozim gibi) de fagozom içine veya dış ortama salınır. Bu enzimlerin etkileri için, hedef organizmanın yapısal moleküllerinin önceden MPO tarafından oluşturulan reaktif türlerle yapısal değişime uğratılmaları önemlidir. Bu nedenle MPO eksikliğinin görüldüğü kronik granülomatoz hastalarında fagozom oluşturulabilir, ancak fagosite edilen hücre öldürülemez (46).

MPO tarafından oksitlenen tiyosiyanat ve nitrit güçlü oksitleyici ve nitrasyon aracı reaktif türlere çevrilir. MPO tarafından oluşturulan tüm reaktif türler sadece hedef hücre için değil, fakat konakçı için de toksik etkilere sahiptir. Bu nedenle oksidatif ve nitrozatif stres sırasında üretilen reaktif türlerin etkileri sadece hedef moleküllerde değil, konakçının kendi molekülleri üzerinde de görülebilir.

2.4.3. MPO'nun Serum Proteinlerine Bağlanması

Aktivasyonlarından sonra nötrofillerden hücre dışına ve kana salınan MPO güçlü katyonik özelliği nedeniyle bazı asidik serum proteinleriyle etkileşime girer.

Bu etkileşimin hedef proteinin veya MPO'nun yapı ve aktivitesinde değişime neden olabilir. MPO ve serum albumini arasında oluşan kompleks MPO'nun ağır zincirindeki pozitif yüklü birimler aracılığı ile gerçekleşir (65). Örneğin MPO-H₂O₂ sistemi, albuminin 8 amino asidinde oksidasyon, brominasyon, nitrozilasyon ve nitrasyona sebep olmaktadır (66). Albumine bağlı MPO, endotel hücrelerin yüzeyinde bulunan albumin bağlayıcı proteinler aracılığı ile transsitozla dokular arası alana geçer ve fibronektin gibi proteinlerle etkileşime girer, proteine bağlı ve serbest tirozinleri nitrasyona uğratar (67-70). α_1 -Antitripsin, lökosit elastazını inhibe eder. Bu proteinde iki önemli metiyonin bulunur: Met-351 ve Met-358. Bu metiyoninlerin HOCl, HOBr veya MPO-H₂O₂-halid sistemi ile oksidasyonu, elastaz üzerindeki inhibitör etkisini kaldırmaktadır (71,72).

MPO HDL'nin en önemli apoproteini olan apolipoprotein A1'e bağlanarak tirozin nitrasyonu ve klorinasyonuna neden olur. Bu modifikasyonlar pasif HDL formu oluşumuna neden olur. Bu pasif HDL formu arterioskleroz oluşumunda rol almaktadır (73). Aynı şekilde MPO-LDL komplekslerinin oluşumu da rapor edilmiştir (74). MPO nitrik oksit miktarını azaltarak kan damarlarının esnekliğini azaltmaktadır (75). Bazı proteinler ise MPO'nun inaktivasyonunu sağlar, örneğin MPO'nun seruloplazmine bağlanması MPO'nun inhibisyonuna neden olmaktadır (76).

2.4.4. MPO ve Hastalıkların Patogenezi

Lökositlerin iltihaplı dokularda toplanması bu dokularda MPO'nun bulunmasını açıklamaktadır. MPO aktivitesi ateroskleroz plaklarında gösterilmiştir (77,78). Alzheimer (79) ve Parkinson (80) hastalarının beyin dokusunda, multipl skleroz lezyonlarında (36), romatoid artrit hastalarının sinovyal sıvısında (81), membran glomerulonefrit hastalarının glomerüllerinin bazal membranında (82,83) ve lökosit kaynaklı karaciğer hastalıklarında (84) MPO aktivitesi tespit edilmiştir. Yüksek serum MPO seviyesi kalp ve damar hastalıklarında risk faktörü olarak kabul edilir (85). Bu bulgular, MPO'nun çok sayıdaki hastalıkların patogenezi ile ilişkili olduğunu göstermektedir.

MPO'nun birikiminin yanı sıra, MPO bağımlı modifikasyonların da hastalıklarda arttığı gözlenmiştir. MPO bağımlı tirozin klorinasyonu aterosklerotik lezyonlarda tespit edilmiştir (86). MPO'nun ürettiği HOCl'nin sadece %2'si protein

tirozin klorinasyonunda etkili olduğu halde bu modifikasyon doku hasarında çok önemlidir (86,87). Ateroskleroz lezyonlarından izole edilen HDL ve LDL'lerde klorotirozin seviyelerinin arttığı tespit edilmiştir (88,89). Tiyosiyanatın MPO tarafından oksidasyonu, proteinlerde lizin aminoasitinin karbamilasyonuna neden olur. Bu tip modifikasyonlar da ateroskleroz lezyonlarında gösterilmiştir (90). Oksidatif ve nitratif stres koşullarında nitrit ve hidrojen peroksit miktarının yükselmesi protein nitrasyonunu artırır (68,73,91). Biyolojik nitrasyonun yaygın belirteçlerinden biri 3-nitrotirozindir ve inflamasyon bölgelerinde MPO bağımlı ve MPO'dan bağımsız mekanizmaların 3-nitrotirozin oluşumunda etkili olduğu düşünülmektedir (91). Tirozinin fenolik yapısının orto pozisyonuna bir nitro grubunun eklenmesi bağlı proteinde yüzey net negatif yükün artışına ve yapısal ve fonksiyonel değişikliklere neden olmaktadır (92).

Aktive olarak inflamasyon bölgesinde biriken nötrofillerde, NADPH oksidaz sistemi ile bol miktarda hidrojen peroksit üretilir. Bu hücrelerde aynı zamanda iNOS (indüklenebilir nitrik oksit sentaz) indüksiyonu da gerçekleştiğinden, NO yapımında da önemli artış olur. Zaten MPO ve iNOS proteinleri lökositlerde aynı azurofilik granüllerin içinde bulunurlar. Sitokinler ve bakterilerin lipopolisakaritleri iNOS ekspresyonunu artırırlar (93). Fagozom içi pH'da NO oksitlenerek nitrite çevrilir. Hem nitrit, hem de hidrojen peroksit konsantrasyonundaki artış, MPO tarafından katalizlenen nitrasyon tepkimeleri için gereken koşulları oluşturur (94).

MPO, nitrit ve hidrojen peroksitin bulunduğu koşullarda nükleotidlerden guaninin nitrasyonuna neden olarak 8-nitroguanin oluşturur. Bu tür DNA hasarı çok yaygın olmamasına rağmen, formamidopirimidin glikozilaz (Fpg) tarafından onarılmadığından ve depurinasyonu da yavaş olduğundan önemlidir (10).

2.4.5. Bir Biyobelirteç Olarak MPO

MPO kalp ve damar hastalıklarında biyobelirteç olarak kullanılmaktadır ve yüksek plazma MPO değerleri olan bireylerde kalp damar hastalıklarına yakalanma riskinin fazla olduğu gösterilmiştir (95). Sağlıklı yaşlı bireylerde yüksek sistemik MPO değerlerinin (>432 pmol/L) kalp yetmezliği riskini artırdığı görülmüştür. Göğüs ağrısı sonrası ölçülen MPO aktivitesi sonucu yüksek MPO aktivitesine sahip bireylerde 1-6 ay içinde kalp krizi (MI) riski, koroner baypas ihtiyacı ve hatta ölüm riskinin fazla olduğu gösterilmiştir (96).

Daha yeni çalışmalar, MPO'nun diş eti iltihaplarında da bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini göstermektedir. İmplant bölgesinden alınan diş eti oluğu sıvısı (GCF) ve peri-implant sulkus sıvısı (PISF) örneklerinde MPO aktivitesi sağlıklı bireylerden daha yüksek bulunmuştur. Bu veriler MPO'nun diş implantlarında bir enflamasyon ve uyum/uyumsuzluk belirteci olarak kullanılabileceğini göstermektedir (97). Diyabetik ve diş eti iltihabı hastalarının GCF örneklerinde yapılan MPO aktivite tayininde, tedavi sonrası MPO aktivitesinin azalması, MPO aktivitesi ölçümünün tedavinin başarılı olduğunu gösteren bir belirteç olabileceğini göstermektedir (98).

2.5. Proteinlerde Tirozin Nitrasyonu

Genel olarak tirozin nitrasyonu iki basamaklı bir tepkimedir. Bu basamaklardan biri tirozinin fenolik halkasının tek elektron oksidasyonu sonucu tirozil radikaline (Tyr[•]) dönüşmesidir. CO₃^{•-}, OH₂[•], NO₂[•] gibi oksitleyici radikaller veya MPO ve diğer hem merkezli peroksidaz enzimleri bu basamağı yürütmektedir. İkinci basamak nitrojen dioksit radikalinin (NO₂[•]) bir radikal-radikal tepkimesi sonucu tirozin radikaline eklenmesidir (14). Nitrojen dioksit radikali iki mekanizma ile oluşur: a) Süperoksit ile nitrik oksit arasındaki tepkimeyle oluşan peroksinitröz asitin (ONOOH), NO₂[•] ve OH[•] oluşturmak üzere homolitik kırılması ve b) Miyeloperoksidaz veya diğer hemoproteinler tarafından nitritin oksidasyonu ile. Miyeloperoksidaz, tirozil radikali ve NO₂[•] oluşturarak tirozin nitrasyonuna neden olabilir. MPO nadiren proteine bağlı tirozini doğrudan oksitler. Bunun yerine MPO tarafından oluşturulan serbest tirozil radikali proteine bağlı tirozini oksitleyerek kendisi indirgenir ve proteine bağlı tirozil radikali meydana gelir (51,99).

2.5.1. Protein Tirozin Nitrasyonunu Etkileyen Faktörler

Proteinlerde tirozin nitrasyonunun özel bir amino asit dizisine bağlı olduğu belirlenmemiştir. Ancak proteinin ikincil yapısı ve tirozinin mikro çevresinin nitrasyonda önemli olduğu düşünülmektedir. Nitrotirozinlerin çoğu proteinlerin kıvrılma bölgelerinde ve döngüyü sağlayan amino asitlere (prolin ve glisin) komşu bulunmuştur. Negatif yüklerin uzaklığı da etkilidir. Glutamata komşu tirozinler kolaylıkla nitrasyona uğrar. Sülfür içeren amino asitlerin tirozinin yakınında

bulunması tirozin nitrasyonunun olasılığını azaltmaktadır. Bu amino asitler oksidatif ve nitrozatif ajanları yakalıyarak nitrasyon olasılığını azaltırlar (100,101).

2.5.2. Protein Tirozin Nitrasyonunun Hücresel ve Hücre İçi Lokalizasyonu

Reaktif nitrojen ve oksijen türlerinin kısa ömürlü olmaları nedeniyle, hedef proteinler ve nitrasyon merkezlerinin bu radikallerin oluşma bölgelerine yakın olmaları gerekir. Çalışılan hastalıklarda, nitrasyona uğramış proteinler hasarlı bölgede ve özel hücre tiplerinde bulunur (101). Nitrasyona uğramış proteinler, özel hücrelerde bulunmalarına ilave olarak bu hücrelerin reaktif nitrojen türlerini üreten kompartmanlarında da bulunurlar (102). Nitrotirozin içeren proteinler immün-elektron mikroskopisi yöntemi ile esas olarak 5 hücresel kompartmanda tespit edilmiştir (103). Bu bölgeler: a) kemik iliği içerisindeki olgunlaşmamış nötrofil ve eozinofillerin peroksidaz içeren salgı granülleri; b) eritrositlerin sitozolu; c) kan damarlarının endotel hücreleri, fibroblastlar, ve düz kas hücrelerinin mütokondri ve endoplazmik retikulumu; d) kıkırdak kondrosit hücrelerinin endoplazmik retikulum zarının sitoplazmik yüzeyi; ve e) hepatositler ve gözyaşı bezlerinin salgı hücrelerinin peroksizomları olarak belirlenmiştir. Proteomik teknikleriyle yapılan çalışmalarda, iskelet ve kalp kasında ana nitrasyon merkezi mitokondri olarak tespit edilmiştir (104).

2.5.3. Tirozin Nitrasyonunun Protein Fonksiyonuna Etkisi

Tirozin nitrasyonunun protein üzerinde etkisi çok farklı olabilir. Bazı proteinlerde bu modifikasyon önemsiz olduğu halde, bazı proteinlerde fonksiyonun kaybolduğu ve bazı proteinlerde de aktivite artışı rapor edilmiştir. Solunum yetmezliği veya akut respiratuar yetmezlik sendromu (ARDS) hastalığında tirozin nitrasyonuna uğrayan serum proteinlerinden α 1-antikimotripsin ve transferrinin modifikasyona uğradığı ve natif formlarına göre her hangi bir aktivite değişikliği olmadığı rapor edilmiştir (105). Kronik allogreft nefropatide MnSOD tirozin nitrasyonu şeklinde modifikasyona uğramış olarak bulunur. Bu modifikasyon aktivite kaybına neden olmaktadır (106). Bazı proteinlerde ise aktivite artışı rapor edilmiştir. Sitokrom-c (107), Protein kinaz-C ϵ (108), ve fibrinojen (109) aktivite artışı rapor edilen proteinlerdir.

Proteine bağılı tirozin amino asitinin hidroksil grubunun pKa değeri 10-10.3 arasındadır. Tirozinin nitrasyonu sonucu pKa yaklaşık 3 pH birim inerek 7.2-7.5'e kadar düşer (110). Bu değişim proteinin yapı ve fonksiyonunu etkileyebilir. Bir çok sinyal iletim yolağı tirozinin hidroksil grubunun fosforilasyonu ile aktive olmaktadır. Tirozin nitrasyonu v-alb ve c-ser gibi bazı kinazların substratlarında fosforilasyonun hızını düşürmektedir (111). Lenfosit cdc2 kinaz substratlarında meydana gelen nitrasyonda aynı etkiyi gösterir (112).

Protein tirozinlerinde nitro grubunun bulunması immün cevap oluşmasına neden olabilir. Nitrotirozin içeren proteinlere karşı hazırlanmış monoklonal veya poliklonal antikorlar nitrotirozin ile ilgili çalışmalarda Western blot analizinde kullanılmaktadır (113). Travma sonrası akciğer hasarlarında 3-Nitrotirozine karşı immünglobulinler tesbit edilmiştir (114). Sitokrom-c Tyr-97'de meydana gelen nitrasyon lenfosit T cevabını tetiklemektedir (115). Antijen oluşumu sırasında oluşan nitro-proteinler CD4-T lenfositlere bağlı immün cevabı tetiklemektedir (116).

2.5.4. Tirozin Nitrasyonunun Hastalıklarla Olan Bağlantısı

Sağlıklı bireylerde bazal metabolizma koşullarında üretilen az miktarda oksijen ve nitrojen radikallerine bağlı olarak düşük düzeylerde serbest ve proteine bağlı 3-nitrotirozin (3-NT) bulunur. Hastalık durumunda nitrozatif ve oksidatif strese bağlı olarak 3-NT seviyesi yükselmektedir. Yüksek 3-NT enflamatuvar, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklarda tespit edilmiştir. İltihaplı kardiyovasküler hastalıklarda plazma proteinlerindeki her 100,000 tirozinden 1-10 tirozin, nitrotirozin şeklinde bulunur (10-100 µmol 3-NT/mol tirozin) (117). Dokularda ise bu oran 10 kat daha yüksektir (118). Normal koşullarda insan serum LDL'sinde tirozin nitrasyonu 9 µmol 3-NT/mol tirozin oranındadır. Ancak arteroskleroz plaklarından izole edilen LDL'lerde bu oran 840 µmol 3-NT/mol tirozin seviyelerindedir ki buda 90 kat artış olduğunu gösterir (119).

Araştırmalar plazma 3-NT seviyesi ve kardiyovasküler hastalıklar arasında yakın bağlantı olduğunu ve 3-NT seviyesinin yükselmesini bir risk faktörü belirtisi olarak göstermektedir. Statin ile tedavi edilen hastalarda statinin antioksidan özelliğine bağlı olarak 3-NT seviyesinde düşme görülür. Bu da 3-NT'nin nitrooksidatif stres için bir belirteç olduğunu gösterir (120). Astım hastalarının akciğerlerinden alınan sıvı örneklerinde 3-NT oranı 480 µmol 3-NT/mol tirozin

olarak bulunmuştur. Kontrol deneklerde bu oran bir mol tirozin için 16-65 μmol 'dür. Kalp damar hastalarında HDL'ye bağlı apolipoprotein A-1 incelendiğinde 3-NT ve 3-klorotirozinin aynı oranda yükseldiği gözlenmiştir (121). Tüm bu bilgilere rağmen nitrasyona uğramış protein toplam proteine göre küçük bir oran kapsadığından nitrasyonun kendi başına bir patolojik durum yaratabileceği veya tek başına bir biyobelirteç olabileceği tartışma konusudur (14).

3-GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

3.1.1. Kimyasallar

Miyeloperoksidaz enziminin saflaştırıldığı lökositler Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Kan Merkezi Aferez Ünitesinden temin edildi. Sephacryl S-300 HR[®], Concanavalin A-Sepharose 4B[®], CM-Sephadex[®] katyon değiştirici, metil- α -D-manno-piranozid, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin, N,N-dimetilformamid, hegzadesiltrimetilamonyumbromür (HETAB), L-tirozin, sodyum nitrit, hidrojen peroksit, sodyum hidroksit, kalsiyum klörür, magnezyum klörür, sodyum klörür, EDTA, Bradford ayırıcı, redükte glutatyon, sığır serum albumini fraksiyon V, nitrat redüktaz, amonyum persülfat (APS), tetrametiletildiamin (TEMED), Sigma-Aldrich Co. St. Louis MO ABD'den; sodyum fosfat (mono ve dibasik), sodyum asetat (mono ve dibasik), potasyum fosfat (mono ve dibasik), L-askorbik asit ICN Biomedicals, Inc. Aurora, Ohio, ABD'den; ve akrilamid, bisakrilamid, SDS, brom fenol mavisi, Bio-Rad laboratories, Richmond, CA, ABD'den temin edildi.

3.1.2. Cihazlar

Homojenizasyon Proscientific Inc. Pro 200 blender homojenizatör, NÜVE NF 800 R soğutmalı klinik santrifüj, Hanil supra 21K yüksek hızlı santrifüj kullanılarak yapıldı. Saflaştırma Amersham Bioscience LC kolonları, ISMATEC ecoline prostaltik pompa ve Farmacia Frac-100 Fraksiyon toplayıcı, Amicon 8050 basınçlı konsantratör kullanıldı. Kinetik ve spektrofotometrik ölçümler SHIMADZU UV-1700 spektrofotometrede yapıldı. Elektforez Bio-Rad mini protean 3 sistemi, Consort E865 elektforez güç kaynağı ve Major science kuru ısıtıcı kullanılarak yapıldı. Tüm deneyler için saf su Baranstead Infinity saf su sisteminden temin edildi. Değişik basamaklarda Hettich Micro 22 mikrosantrifüj, FINEPCR combi SV12 inkübatör, Mettler PJ300 tartı, Shang Ping FA 1104N hassas tartı, Labart SH-5 karıştırıcı ve Daigger vorteks kullanıldı. Tüm Pipetlemeler Gilson Pipetman mikropipet serisi ile yapıldı.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Lökosit Süspansiyonunun Hazırlanması

Aferez ünitesinden alınan lökosit süspansiyonu, üzerine kendi hacmi kadar 0.5 mM EDTA içeren 25 mM sodyum fosfat tamponunu (pH: 7.4) eklendi. Karışım yavaşça karıştırıldı ve 2500 rpm'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra supernatan atıldı. Bu işlem en az 2 kez tekrarlanarak aferez ünitesinde lökositlerle birlikte alınan plazma ve plazmada çözünür moleküller uzaklaştırıldı. Lökositlerden oluşan çökelti homojenizasyon işlemi için toplandı.

3.2.2. Lökositlerin Homojenizasyonu

Lökositlerden oluşan çökelti, kendi hacminin 3-4 katı hacimde ve 1mM MgCl₂, 3mM NaCl ve 0.5 mM EDTA içeren 10 mM sodyum fosfat tamponu (pH: 7) ile karıştırıldı ve mekanik homojenizatör ile bir dakika süreyle homojenize edildi. Homojenat, 15 dakika süre ile 20 000xg de santrifüj edildi. Supernatan atılarak zarsal fraksiyonları içeren çökelti saflaştırma çalışmalarında kullanılmak üzere toplandı.

3.2.3. Zarlardan Miyeloperoksidazın Çözünürleştirilmesi

Hücrelerin zarsal fraksiyonlarını içeren çökelti, hacminin 10 katı kadar 10 mM sodyum fosfat, 1mM MgCl₂, 3mM NaCl ve 0.5 mM EDTA içeren tamponda (pH: 7.0) süspanse edildi. Süspansiyon, manyetik karıştırıcı üzerinde yavaş hızla karıştırılarak, üzerine nihai konsantrasyonu %1 (w/v) olacak şekilde katı HETAB eklendi. Karışımın köpürmemesine özen gösterilerek sabit hızda 15 dakika karıştırıldı. Karışım 20 000xg'de 15 dakika santrifüj edilerek deterjan tarafından çözünürleştirilen MPO ve diğer proteinleri içeren süpernatant toplandı. Çöken zarsal fraksiyonda kalan MPO, aynı ekstraksiyon yöntemi tekrarlanarak çözünürleştirildi. Çökeltide MPO'nun kalıp kalmadığına bağlı olarak bu işlem 2-3 kez tekrarlandı. MPO aktivitesi içeren ekstraksiyonlar birleştirilerek daha sonraki saflaştırma çalışmalarında kullanıldı.

3.2.4. Amonyum Sülfat Kesitlemesi

Çökme Aralığının Belirlenmesi

Ektraksiyon ile elde edilen ve MPO içeren örnekten 5'er ml alındı ve her örneğin üzerine katı amonyum sülfat devamlı karıştırılmak suretiyle yavaş yavaş eklenerek örnekler %20, %30, %40, %50, %60, %70 ve %80 amonyum sülfat doygunluğuna getirildi. Bu örnekler bir gece 4°C'de bekletildikten sonra 10 dakika süre ile 20 000 xg'de santrifüj edildi, süpernatant ve çökeltilerdeki MPO aktivite tayin edildi. MPO enziminin % 30 amonyum sülfat doygunluğuna kadar çökmediği ve % 80 doygunluğunda ise çökeltinin hiç MPO aktivitesi içermediği görüldü.

Amonyum Sülfat Kesitlemesi:

Homojenizasyon işlemi sonucu elde edilen süpernatant %30 amonyum sülfat doygunluğuna getirildi ve bir gece 4°C'de bekletildi. Karışım 20 000 xg'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatantları toplandı. Bu süpernatantın üzerine gerekli miktarda katı amonyum sülfat eklenerek %70 doygunluğuna getirildi, 4°C'de bir gece bekletildikten sonra 10 dakika süre ile 20 000 xg'de santrifüj edildi ve çökelti toplandı. Çökelti 10 mM sodyum fosfat, 1mM MgCl₂, 3mM NaCl ve 0.5 mM EDTA içeren tamponda (pH:7.0) çözüldü ve 2 defa 2 litre hacimdeki aynı tampona karşı diyaliz edilerek tuzdan arındırıldı.

3.3. Kromatografik Yöntemler

3.3.1. Afinite kromatografisi

Miyeloperoksidazın saflaştırılmasında ilk kromatografi basamağı olarak Concanavalin-A Sepharose 4 B afinite kromatografisi kullanıldı. Jel materyali 2.6 x 6 cm boyutlarındaki kromatografi kolonuna aktarıldıktan sonra, 100 mM NaCl, 0.5mM EDTA ve % 0.1 HETAB içeren 50 mM fosfat tamponu (pH: 6.1) (Tampon A) ile dengeleninceye kadar yıkandı. Dengelenen kolona yaklaşık 100 ml diyalizat 1.5 ml/dakika hız ile uygulandı ve kolondan çıkan örnekler 10 ml'lik hacimler şeklinde toplandı. Diyalizatın uygulanması bittikten sonra, kolon aynı tampon (Tampon A) ile yıkamaya devam edildi. Kolondan protein çıkışı 280 nm'de izlenerek, protein çıkışı sıfıra ininceye kadar yıkama işlemi sürdürüldü. Miyeloperoksidazın kolondan elüsyonu 400 mM α -D mannopiranozid içeren

Tampon A ile; veya Tampon A içinde α -D mannopiranozid gradienti (0-800 mM) ile temin edildi. Kromatografi sırasında çıkan örneklerde MPO aktivitesi ölçüldü ve 280 nm'de protein tayini yapıldı. MPO aktivitesi içeren tüpler birleştirilerek toplam aktivite ve protein tayini yapıldıktan sonra izleyen saflaştırma çalışmasında kullanıldı.

3.3.2 İyon Değiştirici Kromatografi

Afinite kromatografisi sonrası enzim ultrafiltrasyonla konsantre edildikten sonra, 6 x 2.6 cm boyutlarındaki kolon içinde paketlenmiş CM Sephadex kolonuna uygulandı (akış hızı 1.2 ml/dak). Uygulamadan önce kolon materyali 1 mM MgCl₂, 0.5 mM EDTA içeren 25 mM fosfat tamponu (pH: 6.0) ile dengelendi ve yıkandı. Uygulamadan sonraki yıkama işlemine, kolondan hiç protein çıkmayınca kadar (280 nm'deki absorbans sıfıra düşünceye kadar) devam edildi. Enzim kolondan aynı tampon içindeki 0-800 mM sodyum klorür gradienti ile indirildi. Kolon çıktısının toplandığı tüplerde aktivite ve protein tayini yapıldı. MPO aktivitesi içeren tüpler birleştirilerek enzim ultrafiltrasyonla konsantre edildi.

3.3.3. Jel filtrasyonu kromatografisi

Afinite kromatografisi ya da iyon değiştirici kromatografisinden sonra konsantre edilen enzim örnekleri 100 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, ve % 0.1 HETAB içeren 25 mM asetat tamponu (pH. 4.7) ile dengelenmiş 2.6 x 30 cm (veya 2.6x70 cm) boyutlarında Sephacryl S-300 kolonuna uygulandı (uygulanan hacim 2 ml). Kolon aynı tamponla ve 0.6 ml/dak sabit akış hızı ile yıkandı. Kolon çıktısı 6 ml'lik fraksiyonlar şeklinde toplandı. Tüplerde aktivite ve protein tayini yapıldıktan sonra, MPO içeren tüpler birleştirildi ve ultrafiltrasyon ile konsantre edildi. Saflaştırılan enzim -30 °C'de donduruldu ve daha sonraki çalışmalarda kullanıldı.

3.4. Analitik Yöntemler

3.4.1. Protein Tayini

Enzimin saflaştırılması basamaklarında protein tayini, 280 nm'de absorbans ölçülerek yapıldı. Her basamaktan sonra ve saflaştırma tablosu oluşturulurken daha doğru protein tayini için Bradford mikro yöntemi kullanıldı (122). Deneyleerde 900 µl Bradford reaktifi ve 100 µl örnek karıştırıldı ve 5 dakika inkübasyondan sonra 650

nm'de 900 µl reaktif ve 100 µl sudan oluşan köre karşı absorbanslar ölçüldü ve standart eğrisi yardımıyla konsantrasyonlar tayin edildi.

3.4.2. Aktivite Tayini

Miyeloperoksidaz, peroksidaz-benzeri aktivitesi nedeniyle doğal substratlarının yanı sıra, çeşitli organik bileşikleri (taurin, O-dianisidin, tetrametilbenzidin gibi) substrat olarak kullanıp oksitleyen bir enzimdir. Bu çalışmada miyeloperoksidaz aktivitesi Demirpençe tarafından modifiye edilmiş Suzuki'nin substrat olarak etrametilbenzidin (TMB) kullanılan yöntemine göre tayin edildi. Enzim aktivitesi standart olarak son derişimleri 1.6 mM TMB, 1 mM H₂O₂ ve % 0.1 HETAB (hekzadesiltrimetilamonyum bromür) içeren ortamda ölçüldü (aktivite tayin ortamı). Enzim örneklerinin spektrofotometredeki kuvvetler içinde, 37°C'de 5 dakika süre ile son hacim 1 ml olacak şekilde aktivite ölçüm ortamında inkübasyonundan sonra, ortama H₂O₂ ilavesiyle tepkime başlatıldı ve tepkimenin ilk hızı kinetik tip spektrofotometrede yazdırılarak 655 nm'de 30 saniye süre ile izlendi. Aktivite ölçümü sırasında dakikadaki absorpsiyon değişimi (artışı) belirlendi.

Ünite tanımı: Yukarıda belirtilen aktivite ölçüm yöntemi kullanıldığında, 655 nm'de 1 dakikada 1 absorbans değişimi (artışı) sağlayan enzim miktarı 1 ünite MPO olarak tanımlandı (123,124).

3.4.3. Elektroferez

Enzim saflığının kontrolünde Laemmli tarafından önerilen SDS poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemi kullanıldı. MPO enziminin 15000 ve 45000 kDa'luk altbirimleri saptamak için 29/1 akrilamid-bisakrilamid karışımının % 12'lik jeli kullanıldı. Deneylerde 8 x 7.3 cm boyutlarında ve 0.75 mm kalınlığında jel içeren Bradford Mini-PROTEAN[®]3 elektroforez sistemi kullanıldı. Elektroforez yürütme ve örnek yükleme tamponları Laemmli yöntemi kullanarak hazırlandı. Deneyde 10 kuyucuklu tarak kullanıldı. Her kuyucuğa 30 mikrogram örnek yüklenecek şekilde dilüsyon yapıldı. 7.5 µl 4X örnek yükleme tamponu ve 22.5 µl örnek karıştırıldı. Karışım 95 derecede 4 dakika ısıtılarak proteinler denatüre edildi ve toplam 30 mikrolitre hacimde olacak şekilde her kuyucuğa yüklendi.

Elektroforezde standart proteinler olarak aprotinin (7000 Da), sitokrom-C (12000 Da), lizozim (17000 Da), karbonik anhidraz (29000 Da), aldolaz (46000 Da) ve albumin (66000Da) kullanıldı.

Elektroforez 80 Volt akım uygulanarak gerçekleştirildi. Bromfenol mavisi jel tabanına 3-5 mm kala elektroforez durduruldu ve Coommasie brilliant blue R-250 boyası ile boyandı. Boyamadan sonra jeller “destaining” çözeltilisine aktarıldı, proteine bağlanan dışındaki boyanın jelden uzaklaştırılması temin edildi.

3.5. Kinetik Çalışma Yöntemleri

3.5.1 Miyeloperoksidaz Enziminin pH Optimumu Belirlenmesi

Subtrat olarak hidrojen peroksit ve tetrametilbenzidin kullanılarak enzimin pH optimumu belirlendi. Bu amaçla, aktivite ölçümü için % 0.1 HETAB içeren 50 mM asetat tamponu (pH: 3.5-5.0 aralığı) ve fosfat tamponu (pH: 5.0-8.0 aralığı) kullanıldı. Tampon konsantrasyonları veya ortamın iyonik kuvveti enzim aktivitesini etkilemediğinden, aktivite ölçümü için sabit tampon konsantrasyonu (50 mM asetat veya fosfat tamponu) kullanıldı.

Son aktivite ortamı hacmi 1 ml olan ve substrat olarak 1 mM H₂O₂ ile 1.6 mM TMB içeren ortama, 1.1 ünite saf enzim eklenerek tepkime başlatıldı. 37° C’de 560 nm’de dakikadaki absorpsiyon değişimi tayin edildi. Bu aktivite ölçümü farklı pH’daki farklı tamponlar için de tekrarlandı; dakikadaki absorpsiyon değişimi üniteye çevrilerek pH’ya karşı grafiklendi.

3.5.2. Miyeloperoksidaz H₂O₂ ve TMB İçin Kinetik Özellikleri

Miyeloperoksidaz aktivitesinin H₂O₂ konsantrasyonuna bağımlılığını incelemek için, 0-2 mM H₂O₂ konsantrasyonu aralıklarında, yukarıda belirtilen aynı aktivite ölçüm koşullarında (sabit TMB konsantrasyonu: 1.6 mM; MPO: 1.1 U/test, 50 mM fosfat tamponu pH.5.4) enzim aktivitesi ölçüldü. Ölçülen aktivite değerlerinden yararlanılarak Michaelis-Menten grafiklemesi yapıldı ve çizilen Lineweaver-Burk grafiğinden yararlanılarak MPO enziminin hidrojen peroksit için V_{max} ve K_m değerleri belirlendi. Benzer şekilde sabit H₂O₂ konsantrasyonu (1 mM) ve değişken TMB konsantrasyonlarında MPO aktivitesi ölçüldükten sonra yine grafikleme yapılarak enzimin TMB için V_{max} ve K_m değerleri belirlendi.

3.5.3. Miyeloperoksidaz Bağımlı Nitrit Oksidasyonunun İncelenmesi

Miyeloperoksidaz bağımlı nitrit oksidasyonu çalışmasında, 80 µM nitrit (sodyum nitrit) kullanıldı. Nitritin oksidasyonu 1 mM H₂O₂ ve % 0.1 HETAB içeren 50 mM tampon içinde çalışıldı ve 2 ünite MPO ilavesi ile tepkime başlatıldı (tepkime ortamının son hacmi 1 ml). Tepkime başlatıldıktan 20 dakika sonra, 1 ml Griess reaktifi ile tepkime durduruldu ve oluşan rengin absorpsiyonu 540 nM'de ölçüldü. Griess reaktifi % 5 fosforik asit % 2'lik sulfonilamid (1.çözelti) ve %0.2'lik N-naftiletilediamin dihidroklorür (2.çözelti) olmak üzere 2 çözeltilerden oluşur. Çözeltiler deneyden hemen önce eşit oranda karıştırılarak taze olarak kullanıldı. Standart olarak sodyum nitrit kullanılarak deneylerdeki nitrit konsantrasyonları tayin edildi (125,126).

Nitrit oksidasyonu çalışmasında öncelikli olarak pH'nın MPO-bağımlı ve MPO-bağımsız nitrit oksidasyonuna etkisi araştırıldı. Bunun için pH 3.5-8.5 aralığındaki nitritin oksidasyonu MPO varlığında ve yokluğunda çalışıldı. İzleyen nitrit oksidasyonu çalışmaları, kendiliğinden oksidasyonun olmadığı pH'da yapıldı.

3.5.4. Total Nitrit (Nitrit + Nitrat) Tayini

MPO tarafından oksitlenmesi nedeniyle tüketilen nitritin nitrata çevrildiğini göstermek için, oluşan nitrat, nitrat redüktaz enzimi aracılığı ile nitrite indirgendikten sonra Griess yöntemi ile total nitrit (nitrit + nitrat) tayini yapıldı. Tepkime MPO eklenmesi ile başlatıldı. 25 dakika süre ile deney ortamından çekilen örnekler katalaz içeren tüplere pipetlenerek reaksiyon durduruldu. Son pipetlemeden sonra her tüpte oluşan nitrat tayini için nitrat redüktaz tepkimesinden yararlandı. Nitrat redüktaz aktivite ortamı 1mM NADPH, 1mM FAD, 0.4 U/ml *Aspergillus niger* kaynaklı nitrat redüktaz içeren 40mM HEPES pH 7.5 tamponu içermekteydi. Eşit miktarda örnek ve aktivite karışımı karıştırılarak 37°C 30 dakika inkübe edildi ve total nitrit tayini Griess yöntemi ile yapıldı.

3.5.5. MPO-Bağımlı Tirozin Nitrasyonu Çalışmaları

Miyeloperoksidaz enziminin tirozin nitrasyonuna etkisi çalışmalarında serbest tirozin amino asiti kullanıldı. MPO tarafından nitritin oksidasyonu ile oluşan reaktif nitrojen oksit türlerinin oluşturduğu 3-nitrotirozin spektrofotometrik olarak tayin edildi (7,127). Miyeloperoksidazın tirozin nitrasyonu aktivitesi, % 0.1 HETAB

içeren 50mM tampon içinde farklı nitrit, tirozin, pH ve antioksidanların varlığında çalışıldı. Tirozin nitrasyonu tepkimesi, ortamın pH'sı NaOH ile bazikleştirilerek durduruldu ve oluşan renk 430 nm'de tayin edildi. Miyeloperoksidazın nitrasyon aktivitesi, deney koşullarında 1 dakikada enzimin 1 mg'ı tarafından oluşturulan milimol nitrotirozin olarak kabul edildi. Nitrotirozinin bazik ortamda 430 nm'de molar absorptivitesinden ($4.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) kullanılarak birim zamanda enzimi tarafından oluşturulan nitrotirozin miktarı hesaplandı.

3.6. İstatistiksel Değerlendirmeler

Statistiksel analizlerde çoklu grupların karşılaştırılması tek yönlü ANOVA testi ile, 2'li grup t testi ile karşılaştırılacaktır.

4. BULGULAR

4.1. Miyeloperoksidaz Enziminin Saflaştırılması

4.1.1. Lökosit Süspansiyonunun Hazırlanması ve Homojenizasyonu

Lökosit süspansiyonu, iki kez kendi hacmi kadar 0.5 mM EDTA ve % 0.9 NaCl içeren 25 mM sodyum fosfat tamponu (pH: 7.4) ile yıkandıktan sonra, kendi hacminin 3-4 katı hacimde ve 1mM MgCl₂, 3 mM NaCl ve 0.5 mM EDTA içeren 10 mM sodyum fosfat tamponu (pH: 7) ile karıştırıldı ve mekanik homojenizatör ile bir dakika süreyle homojenize edildi. Homojenat 20000 xg'de 15 dakika santrifüj edilerek çözümler sitoplazmik fraksiyon atıldı, miyeloperoksidaz enzimini içeren zarsal fraksiyon (çökelti) toplandı. Bu işlem sırasında peroksidaz aktivitesine sahip olan diğer çözümler proteinler de uzaklaştırılmış oldu.

4.1.2. Zarlardan Miyeloperoksidazın Çözünürleştirilmesi

Miyeloperoksidaz enzimini içeren zarsal fraksiyon, hacminin 10 katı kadar 10 mM sodyum fosfat, 1 mM MgCl₂, 3 mM NaCl ve 0.5 mM EDTA içeren tamponda (pH: 7.0) süspansiyon edildi. Süspansiyon, manyetik karıştırıcı üzerinde yavaş hızla karıştırılarak, üzerine nihai konsantrasyonu %1 (w/v) olacak şekilde katı HETAB eklendi. Daha düşük konsantrasyondaki deterjanın enzimi yeterince çözünürleştiremediği ve bunun da çözünürleştirilmek istenen zarsal fraksiyonun büyüklüğünden kaynaklandığı görüldü. Karışım 20000 xg'de 15 dakika santrifüj edilerek deterjan tarafından çözünürleştirilen MPO ve diğer proteinleri içeren süpernatant toplandı. Çöken zarsal fraksiyonda kalan MPO, aynı ekstraksiyon yöntemi tekrarlanarak çözünürleştirildi. Çökeltide MPO'nun kalıp kalmadığına bağlı olarak bu işlem 2-3 kez tekrarlandı.

4.1.3. Çözünürleştirilen Enzimin Amonyum Sülfat Kesitlemesi

Deterjan ile çözünürleştirilen enzimin hangi amonyum sülfat doyumluğunda çöktüğünün belirlenmesi amacıyla, MPO içeren zar ekstraktları üzerine gerekli miktarda katı amonyum sülfat eklenerek örnekler %20, %30, %40, %50, %60, %70 ve %80 amonyum sülfat doyumluğuna getirildi (128). Bu örnekler bir gece 4°C'de bekletildikten sonra 10 dakika süre ile 20 000 xg'de santrifüj edildi, süpernatant ve çöktülerdeki MPO aktivitesi ve protein tayin edildi. MPO enziminin % 30

amonyum sülfat doygunluğuna kadar önemli oranda çökmediği ve % 80 doygunluğunda ise süpernatanın MPO aktivitesi içermediği; enzimin tamamının çöktüğü görüldü (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Farklı amonyum sülfat doygunluklarında MPO enziminin presipitasyonu.

Amonyum sülfat doygunluğu (%)	20	30	40	50	60	70	80
Çökeltiye geçen aktivite (U)	15	25	446	482	581	1250	1320
Süpernatanda kalan aktivite	1280	1298	775	640	615	7	5

Yukarıdaki bulgular (Tablo 4.1) doğrultusunda zarlardan ekstrakte edilen ve MPO içeren bir enzim örneğinde %30-%70 amonyum sülfat kesitlemesi yapıldı. Enzim örneği önce %30 amonyum sülfat doygunluğuna getirildi ve bir gece 4°C’de bekletildi. Karışım 20 000 xg’de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatın toplandı. Bu süpernatın üzerine %70 doygunluğuna gelecek şekilde katı amonyum sülfat eklendi. Karışım 4°C’de bir gece bekletildikten sonra 10 dakika süre ile 20 000 xg’de santrifüj edildi ve çökelti toplandı. Çökelti 10 mM sodyum fosfat, 1mM MgCl₂, 3 mM NaCl ve 0.5 mM EDTA içeren tamponda (pH: 7.0) çözüldü ve 2 defa 2 litre hacimdeki aynı tampona karşı diyaliz edilerek yüksek konsantrasyondaki tuzdan arındırıldı.

Amonyum sülfat kesitlemesinden sonra, diyaliz edilerek tuzdan arındırılan enzim örneğinde protein ve aktivite tayini yapıldı. Kesitleme öncesi enzim örneği ile kıyaslandığında, amonyum sülfat kesitlemesinin spesifik aktivitede önemli bir artışa neden olmadığı ve daha sonraki saflaştırma basamaklarında bir avantaj sağlamadığı görüldüğünden, saflaştırma protokolünde amonyum sülfat kesitlemesinin uygulanmasından vazgeçildi.

4.1.4. Concanavalin A (ConA) Sepharose Afinite Kromatografisi

Concanavalin A (ConA) baklagillerde bulunan lektinlerden biri olup, yüksek afinite ile bazı karbohidrat ve glikoproteinlerdeki karbohidrat grubuna bağlanan bir proteindir. ConA esas olarak glikoprotein ve glikolipidlerdeki α -D-mannozil ve α -D-

glukoze gruplarına bağlanır. Bu özelliği nedeniyle ConA ticari öneme sahip ilk lektin olmuş ve ConA bağlanmış inert jeller (örneğin Sepharose) glikoproteinlerin saflaştırılmasında kullanılmıştır. α -D-mannoziil ve α -D-glukoze gruplarına olan afinitesi nedeniyle farklı glikoproteinler ConA'ya bağlanabildiklerinden, ConA bağlanmış jellerin kullanıldığı afinite kromatografileri aslında non-spesifik bir afinite kromatografisidir (129).

Concanavalin A afinite kromatografisi glikoproteinlerin kısmi saflaştırılmasında genellikle ilk basamak olarak kullanılmaktadır (130,131).

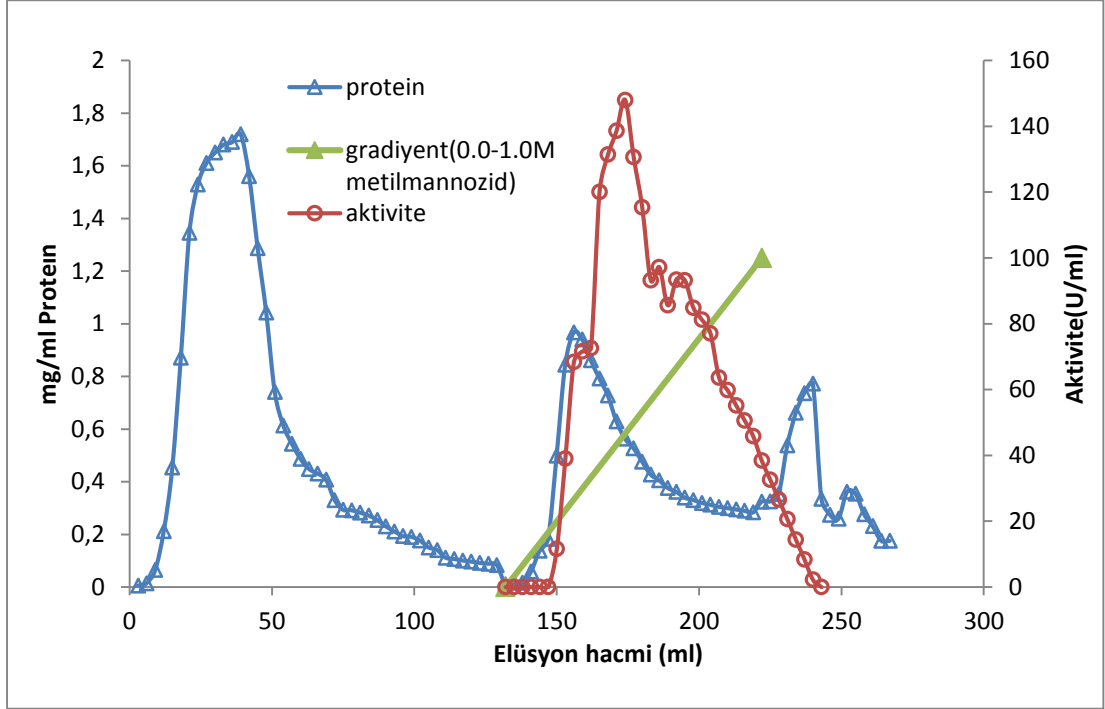
Afinite kromatografisi için, 30 ml Concanavalin A Sepharose 4B jeli, 2.6 x 6 cm boyutlarındaki kolona dolduruldu ve kolon 100 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 0.5 mM EDTA içeren 100mM Sodyum Asetat tamponu (pH 6.3) (Tampon A) ile yıkandı. Dengeleme işlemi için kolon, jel hacminin en az 10 katı tampon ile yıkandı ve kolondan çıkan tamponun pH'sı giriş tamponunun pH'sına eşitleninceye kadar tampon ile yıkamaya devam edildi. Kolondan tamponun akış hızı dengeleme, yükleme ve yüklemenden sonraki yıkamalar süresince sabit (0.6 ml/dakika) tutuldu.

HETAB ile zarlardan çözünürleştirilmiş enzim örneği (ya da amonyum sülfat kesitlemesi yapıldıysa, diyalizle tuzdan arındırılmış enzim örneği) aynı akış hızı ile (0.6 ml/dakika) kolona uygulandı. Kolon aynı tampon ile yıkandı; kolon çıktısı 3 ml'lik fraksiyonlar şeklinde toplandı. Tamponla yıkama işlemi, kolon çıktısının 280 nm'deki absorpsiyonu sıfıra yaklaşıncaya kadar devam edildi. Kolondan çıkan örneklerin MPO aktivitesi ile 280 nm'deki absorpsiyonları ölçüldü. Yıkamadan sonra enzimin kolondan elüsyonu basamağına geçildi.

Kolondan MPO enziminin elüsyonu metilmannoziid (Metil alfa-D mannopiranoziid) içeren Tampon A ile gerçekleştirildi. Kolondan enzim elüsyonu için 2 yöntem denendi.

Metilmannoziid Gradienti İle Elüsyon

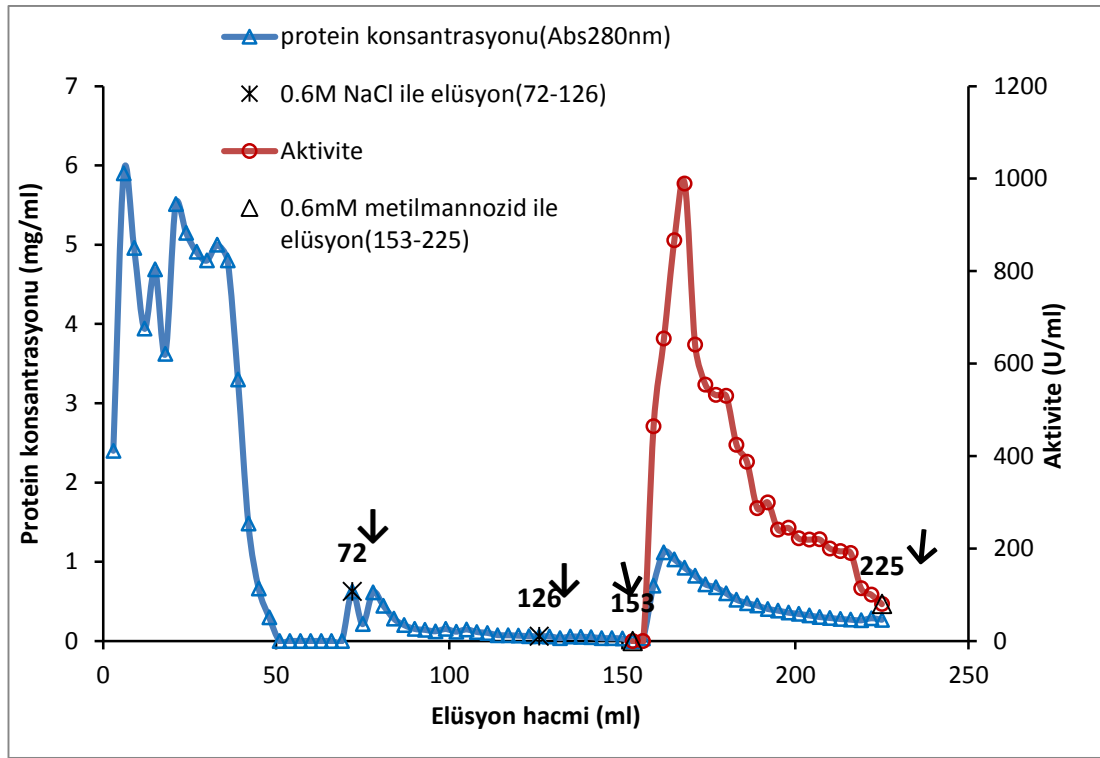
Kolon çıktısındaki protein sıfırlandıktan sonra, kolon 0-1.0 molar metilmannoziid gradientine bağlanarak enzimin kolondan elüsyonu sağlandı (Şekil 4.1). Kolona bağlanmadan diğer proteinlerle beraber inen ve peroksidaz aktivitesini de içeren fraksiyonlar atıldı. Metil mannoziid ile kolondan inen ve MPO aktivitesi içeren tüpler birleştirilerek toplandı.



Şekil 4.1. Miyeloperoksidaz enziminin Concanavalin A-Sepharose afinite kromatografisinde metilmannozid gradienti ile elüsyonu. Gradyentin tamamlanmasından sonra kolon 1 molar NaCl içeren tampon ile yıkanmıştır.

Sabit Metilmannozid Konsantrasyonu İle Elüsyon

Enzim örneği afinite kromatografisi için kolona yukarıda belirtilen koşullarda uygulandı. Kolon, Tampon A ile yıkanarak bağlanmayan proteinler kolondan uzaklaştırıldı. Kolona non-spesifik bağlanan proteinleri uzaklaştırmak amacıyla, 280 nm'deki absorpsiyon sıfıra düşünceye kadar, 0.6 molar NaCl içeren Tampon A ile yıkamaya devam edildi. Protein çıkışının sıfırlanmasından sonra, kolon 0.6 M metilmannozid içeren Tampon A ile yıkanarak (akış hızı: 0.6 ml/dak) enzimin kolondan elüsyonu sağlandı. Elüsyon çıktısı örneklerde (3'er ml'lik fraksiyonlar) aktivite ve protein tayini yapıldı. (şekil4.2).



Şekil 4.2. Miyeloperoksidaz enziminin Concanavalin A-Sepharose afinite kromatografisinde 0.6 M metilmannozid içeren tampon ile elüsyonu.

İki elüsyon yönteminin karşılaştırmalı sonuçları Tablo 4.2'de verilmiştir. Enzim kolondan gradient uygulanmaksızın 0.6 M metilmannozid ile elüe edildiğinde, verim ve spesifik aktivitesinin daha yüksek olduğu bulundu. Bu nedenle, diğer saflaştırma çalışmalarında enzimin elüsyonunda bu yöntem kullanıldı.

Tablo4.2. Miyeloperoksidaz enziminin Concanavalin A-Sepharose afinite kromatografisinde 0.6 M metilmannozid içeren tampon, ya da metilmannozid gradienti ile elüsyonunun karşılaştırılması.

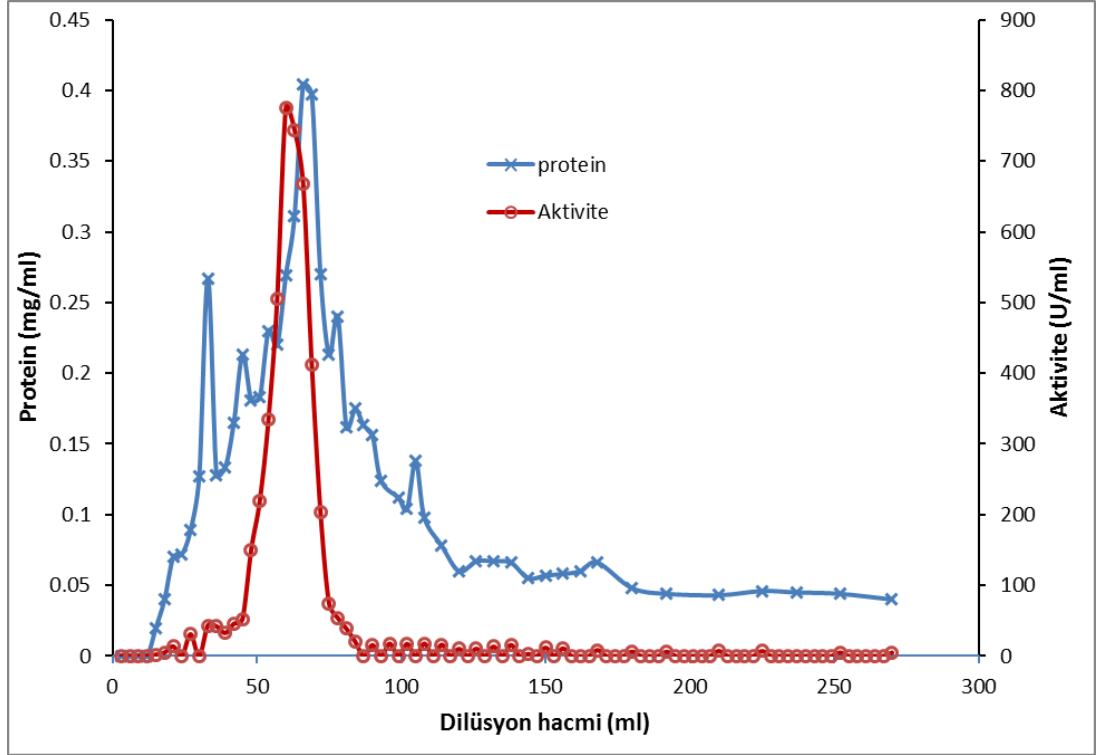
Elüsyon yöntemi	Kolona uygulanan (Ünite)	Saflaştırma oranı (kat)	Verim (%)
Tampon A içinde metilmannozid gradienti	111987	3.6	59.8
Tampon A içinde 0.6 M Metilmannozid	207900	9.7	80.0

4.1.5. Jel Filtrasyonu Kromatografisi

Afinite kromatografisinden elde edilen ve deriştirilen enzimin jel filtrasyonu kromatografisi Sephacryl S-300 HR jeli kullanılarak yapıldı. 2.6x70 cm boyutlarındaki kolon 100 mM NaCl, 0.5 mM EDTA ve % 0.1 HETAB içeren 25 mM sodyum asetat tamponu (pH:4.7) ile yıkanarak dengelendi. Kolon dengelendikten sonra afinite kromatografisinden elde edilen enzim örneği, Amicon® 8050 filtreli basınçlı deriştiricide (*cutoff* değeri 10 kDa olan membran filtreler kullanarak) son hacmi 5 ml olana kadar konsantre edildi ve Sephacryl S-300 HR kolonuna uygulandı.

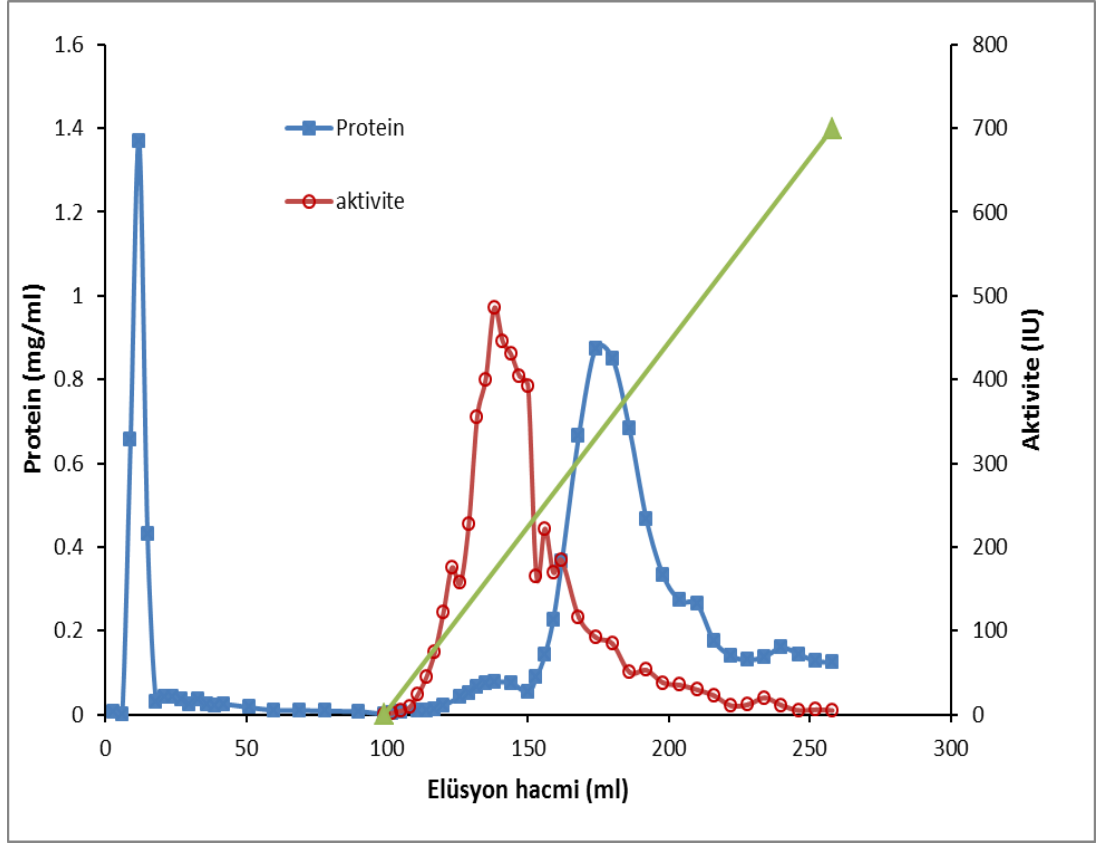
4.1.6. CM-Sephadex Katyon Değıştirici Kromatografi

Yukarıda verilen jel filtrasyonu basamağında elde edilen yüksek aktiviteli fraksiyonlar toplanıp birleştirildikten sonra katyon değıştirici kromatografisi uygulandı. CM-Sephadex katyon değıştirici jel 2.6 x 16 cm (toplam jel hacmi 85 ml) kolona dolduruldu ve 100mM NaCl, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 0.5mM EDTA ve %0.1 HETAB içeren 100 mM sodyum asetat tamponu (pH: 6.1) ile dengelendi. Dengeleme işleme kolondan en az kolon hacminin 3 katı tampon geçirerek, giriş ve çıkış pH'ları eşitlenene kadar devam edildi. Kolon dengelendikten sonra, önceki basamakta elde edilen materyal kolona yüklendi. Akış hızı 0.6 ml/dakika'ya ayarlandı ve her 5 dakikada bir fraksiyon toplandı. Protein miktarı 280 nm'de absorbans izlenerek takip edildi ve bu dalga boyundaki absorpsiyon sıfıra düşünceye kadar tamponla yıkamaya devam edildi. Bağlanmayan poteinlerin tamamen kolondan ayrıldığını gözledikten sonra kolona aynı hızda ve dengeleme tamponu içinde hazırlanan 0.0-0.7 molar arasındaki NaCl gradienti uygulandı. Elde edilen fraksiyonlarda aktivite ve protein tayini yapıldı (Şekil 4.4).



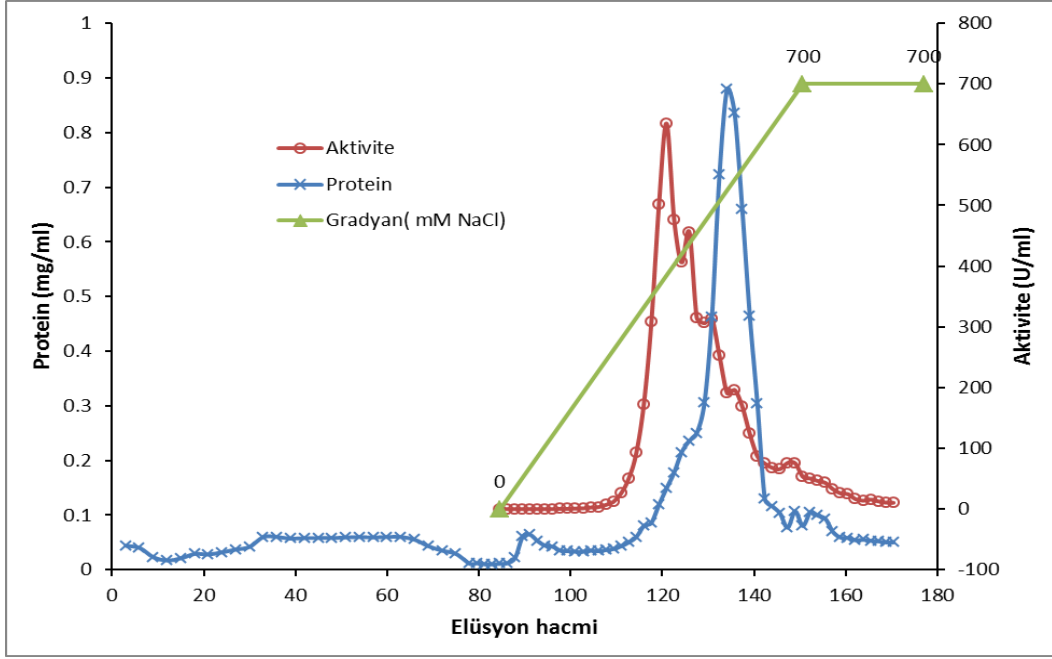
Şekil 4.3. Miyeloperoksidaz enziminin Concanavalin A-Sepharose afinite kromatografisinden sonra, Sephacryl S-300 jel fitrasyonu kromatografisi.

Jel fitrasyonu kromatografisi (Şekil 4.3) ile CM-Sephadex kation değiştirici (Şekil 4.4) kromatografisi sonuçları daha sonraki SDS-PAGE sonuçları ile birlikte değerlendirildiğinde, jel fitrasyonu basamağının MPO enziminin saflaşmasına önemli bir katkıda bulunmadığı görüldü. Aslında bu aşamada atılan proteinlerin kation değiştirici kromatografi sırasında uzaklaştırıldığı görüldüğünden, tekrarlanan diğer enzim saflaştırma çalışmalarında bu basamağın uygulanmasından vazgeçildi.

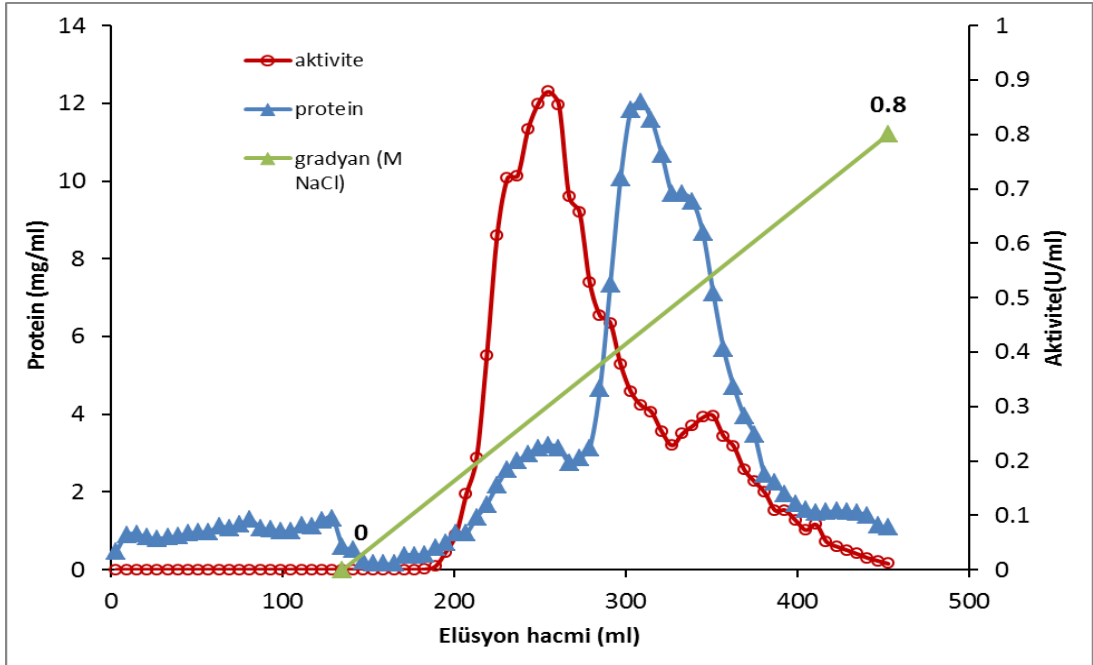


Şekil 4.4. Jel filtrasyonundan sonra yapılan CM-Sephadex katyon değıştirici kromatografisi.

Saflaştırma çalışmasında jel filtrasyonu basamağının çıkarılmasından sonra, Concanavalin A-Sepharose afinite kromatografisinde elde edilen enzim örneğii diyaliz edildikten sonra, iki farklı koşulda CM-Sephadex kolonuna uygulandı. MPO enziminin bazik bir protein olduğu göz önüne alınarak, kromatografi yukarıda katyon değıştirici kromatografide anlatıldığı gibi pH:6.1’de ve ilave olarak pH:8.0’de tekrarlandı (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6). Saflaştırılan enzimin absorpsiyon spektrumu Şekil 4.7’de verilmiştir.

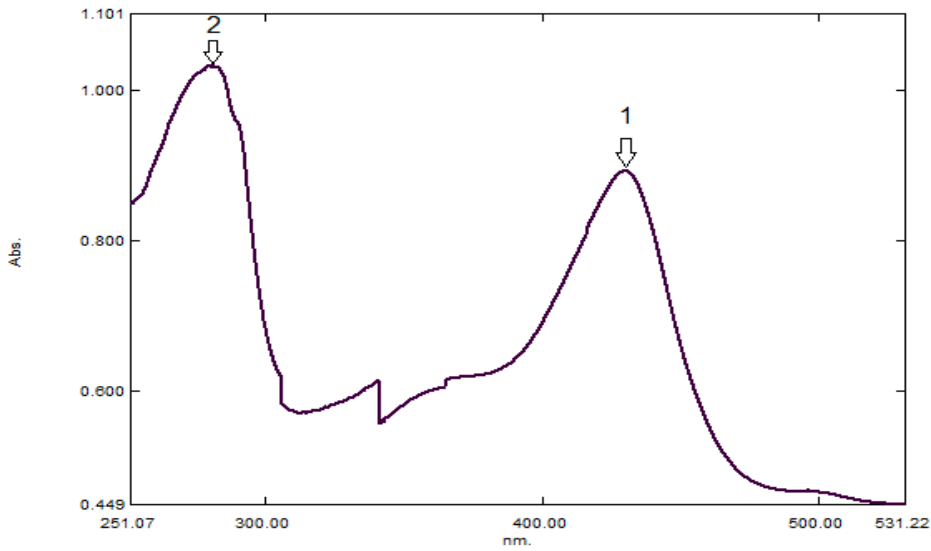


Şekil 4.5. Afinitite kromatografisini izleyen CM-Sephadex katyon değiştirici kromatografi (pH 6.1). Kolona bağlanmadan çıkan proteinler gösterilmemiştir.



Şekil 4.6. Afinitite kromatografisini izleyen CM-Sephadex katyon değiştirici kromatografi (pH 8.0). Kolona bağlanmadan çıkan proteinler gösterilmemiştir.

Miyeloperoksidaz enziminin saflık kriterlerinden biri *Reinheit Zahl*; *RZ* (A_{430}/A_{280}) değerleridir. Bu değer saf MPO için 0.82 ile 0.88 arası belirlenmiştir (132,133). % 99 saf olarak satılan ticari MPO'da ise RZ değeri 0.84 olarak verilmiştir (134). Saflaştırmada kullanılan yöntemler RZ değerleri yönünden karşılaştırıldığında, afinite kromatografisinden sonra ve iyon değiştiriciden önceki jel filtrasyon basamağının saflık oranına etkisi olmadığı gözlenmiştir. Katyon değiştirici için uygun pH 8.0 olarak tesbit edildi (Tablo4.3).



Şekil 4.7. Saflaştırılan MPO enziminin absorpsiyon spektrumu. 1: $A_{430} = 0.892$, 2: $A_{280} = 1.032$, $RZ = 0.864$ (spektrum Shimadzu UV probe 2.32 programı ile alınmıştır).

Miyeloperoksidaz HETAB ile çözünürleştirilerek sabit konsantrasyon metilmannozid elüsyonu ve PH:8 CM-Sephadex katyon değiştirici kromatografi basamakları kullanılarak 13 kez, % 70.3 verimle ve 110.7 IU/mg protein özgül aktivite ile insan lökositlerinden saflaştırıldı (Tablo 4.4).

Tablo 4.3. Farklı yöntemlerden sonra MPO enziminin RZ değerleri

Yöntem	RZ değeri
Afinite, Jel Filtrasyon, Katyon değiştirici sonrası (pH:6.1)	0.68
Afinite, Katyon değiştirici sonrası (pH:6.1)	0.64
Afinite, Katyon değiştirici sonrası (pH:8.0)	0.86

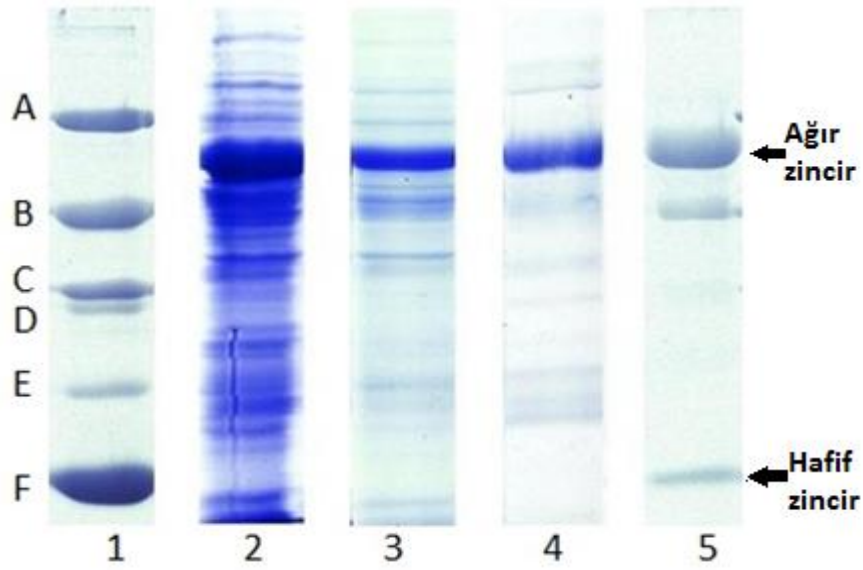
Tablo 4.4. İnsan lökositlerinden miyeloperoksidaz saflaştırma şeması

Saflaştırma basamağı	Hacim (ml)	Total Protein (mg)	Total Aktivite (IU)	Spesifik Aktivite (IU/mg)	Saflaştırma oranı	Verim (%)
Zarsal yapı homojenatı	135.0	11751.8	103950.0	8.8	1.0	100.0
Con-A afinite kromatografisi	94.0	1010.5	83190.0	82.3	9.7	80.0
CM cephadex	7.5	660.8	73125.0	110.7	13.0	70.3

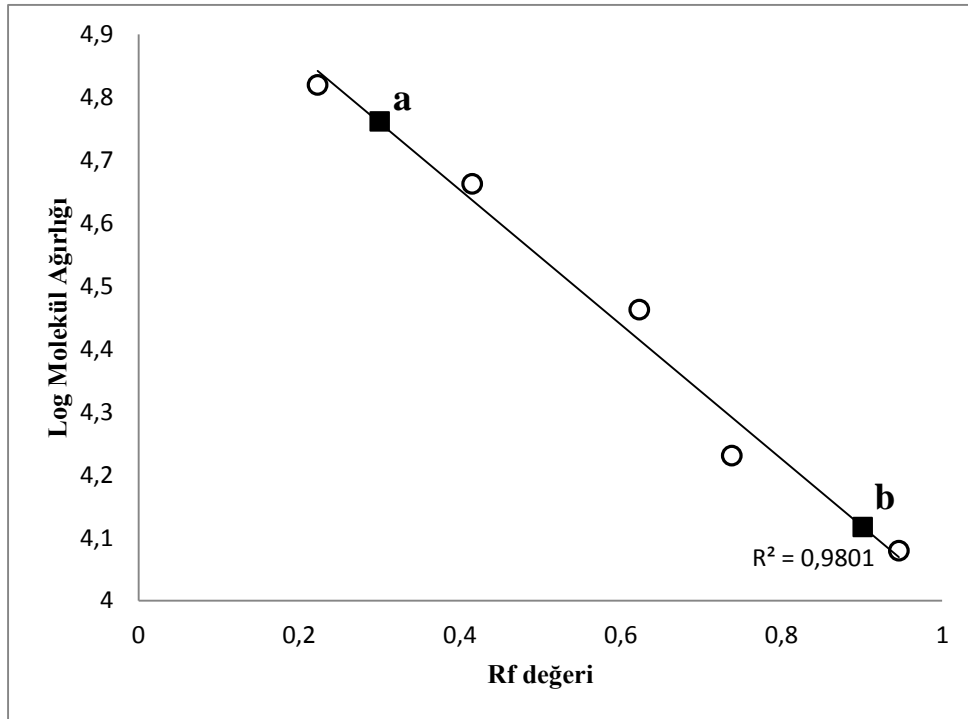
4.1.7. SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrez

Saflaştırma basamaklarında elde edilen örnekler SDS-PAGE yöntemi ile karşılaştırıldı. Elektrofrezde %4'lük yığma (stacking) ve %12'lik ayırma jeli kullanıldı. Kaynak olarak %30'luk 29/1 akrilamid/bisakrilamid oranına sahip ticari hazır çözelti kullanıldı. Elektrofrez 120 Voltta 2 saat yürütüldü ve jel CBB R-250 boyası ile boyandı. Elde edilen elektrofrez sonucu saflaştırılma basamaklarında artan saflık belirgindir (Şekil 4.8).

SDS-PAGE'de standart olarak kullanılan proteinlerin moleköl ağırlıklarının logaritmaları, bu proteinlerin elektrofrezdeki Rf değerlerine karşı grafiklenerek standart grafik elde edildi ve MPO'nun alt birimlerinin Rf değerleri kullanılarak standart grafikten moleköl ağırlıkları bulundu. Büyük alt birim 57500, küçük altbirim ise 13100 moleköl ağırlığında tanımlandı (Şekil 4.9).



Şekil 4.8. Saflaştırma basamakları sonucu elde edilen SDS-PAGE elektroforez görüntüleri 1: Standartlar (A= 66kDa, B= 46kDa, C=29 kDa, D=24 kDa, E=17 kDa, F=12 kDa,), 2: lökosit homojenatı, 3: sitoplazmik fraksiyonu ayrılmış lökosit homojenatı, 4: Concanavalin A-Sepharose 4B sonrası, ve 5: CM- Sephadex kromatografisinden elde edilen fraksiyon

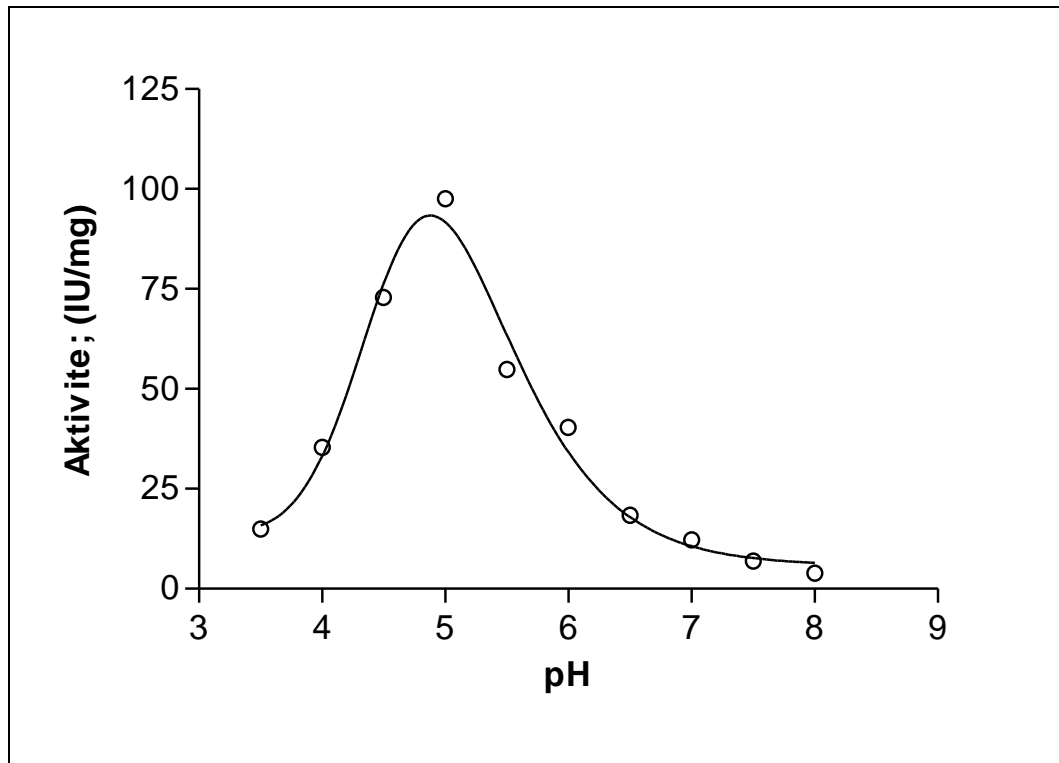


Şekil 4.9. Molekül ağırlığı tayini için standart grafik. a: büyük altbirim, b: küçük altbirim.

4.2. Kinetik Çalışmalar

4.2.1. Miyeloperoksidaz Enziminin pH Optimumu

Enzimin pH optimumu tayininde aktivite ölçümünde 1 mM H₂O₂, 1.6 mM TMB, % 0.1 HETAB içeren 50 mM asetat tamponu (pH: 3.5-5 aralığı) veya fosfat tamponu (pH: 5-8 aralığı) kullanıldı. Son aktivite ortamı hacmi 1 ml olan ve substrat olarak 1 mM H₂O₂ ile 1.6 mM TMB içeren ortama, 1.1 ünite saf enzim eklenerek, 37° C'de 560 nm'de dakikadaki absorpsiyon değişimi tayin edildi. Bu aktivite ölçümü farklı pH'daki farklı tamponlar içinde tekrarlandı; dakikadaki absorpsiyon değişimi üniteye çevrilerek pH'ya karşı grafiklendi (Şekil 4.10). Enzimin pH optimumu 5.0 olarak bulundu. Ancak MPO ile ilgili çalışmalarda aktivite ölçümü pH 5.4'de gerçekleştirildi. Bu tercihin nedeni, fagozom içi pH'ya daha yakın olması ve literatürde aktivite ölçümleri ile kinetik çalışmaların pH 5.4'de yapılmış olmasıdır.

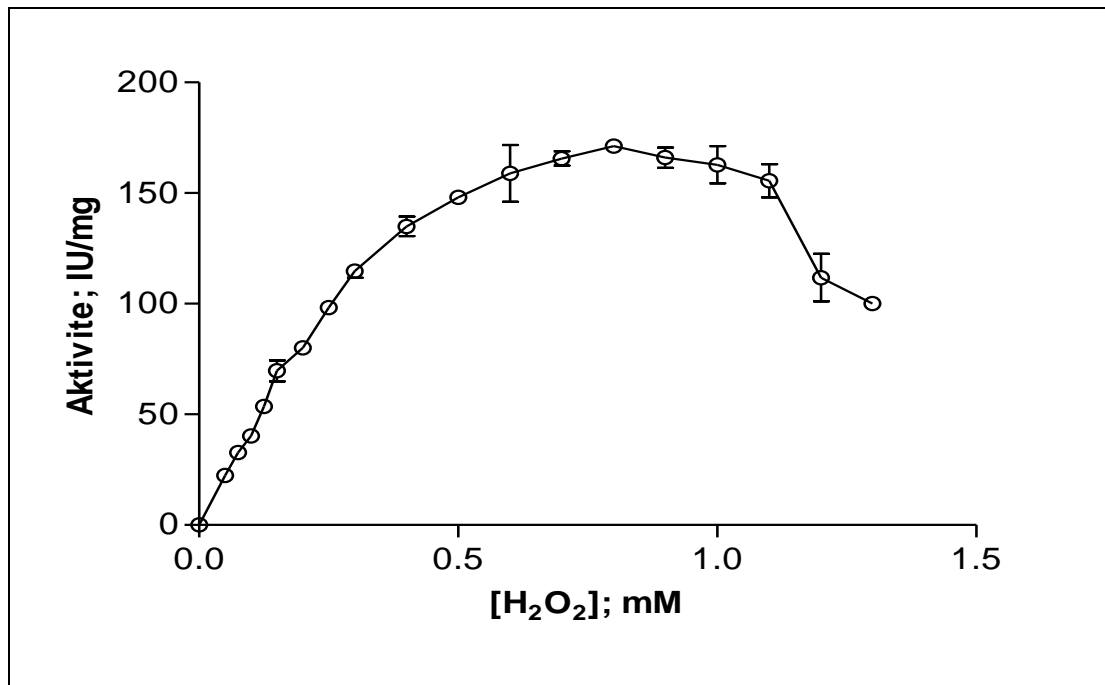


Şekil 4.10. İnsan miyeloperoksidaz enziminin pH optimumu

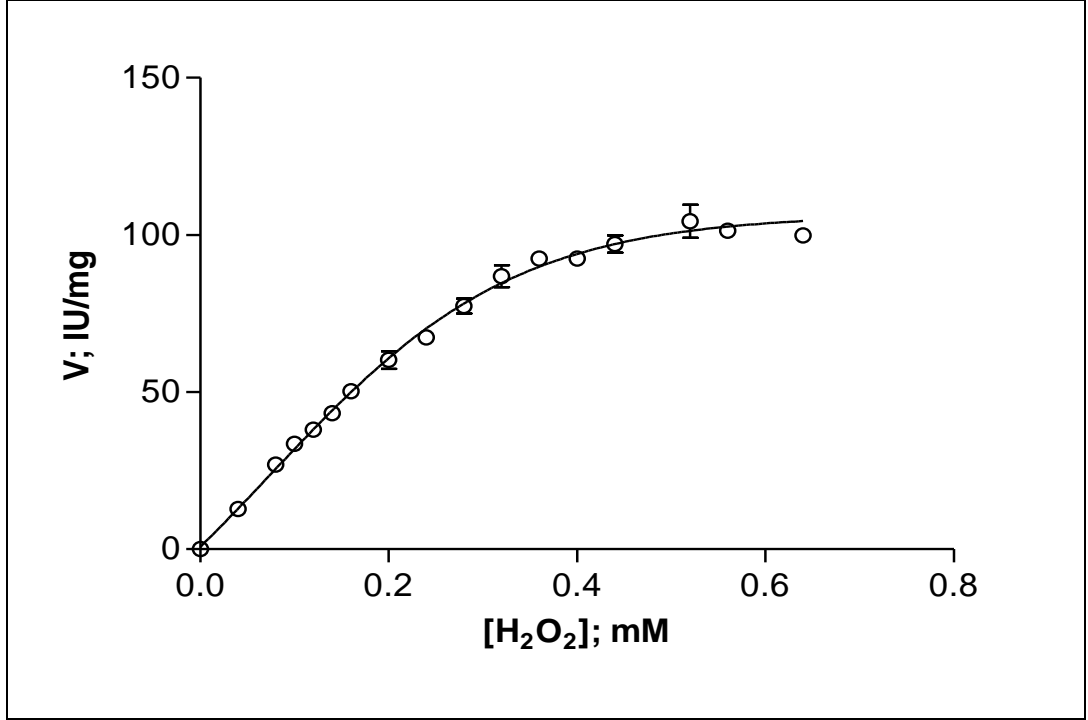
4.2.2. Miyeloperoksidaz Aktivitesinin H_2O_2 Konsantrasyonuna Bağımlılığı

Enzimin optimum pH değeri belirlenmesinden sonra, kinetik özellikleri bu pH'da çalışıldı (% 0.1 HETAB içeren 50 mM fosfat tamponunda). Diğer peroksidaz enzimleri gibi miyeloperoksidaz da H_2O_2 -bağımlı olarak organik ve inorganik bileşiklerin oksidasyonunu katalizler. MPO aktivitesinin H_2O_2 konsantrasyonuna bağımlılığını incelemek için, 0-2 mM H_2O_2 konsantrasyonu aralıklarında, aynı aktivite ölçüm koşullarında (sabit TMB konsantrasyonu: 1.6 mM; MPO: 1.1 U/test) enzim aktivitesi ölçüldü (Şekil 4.11).

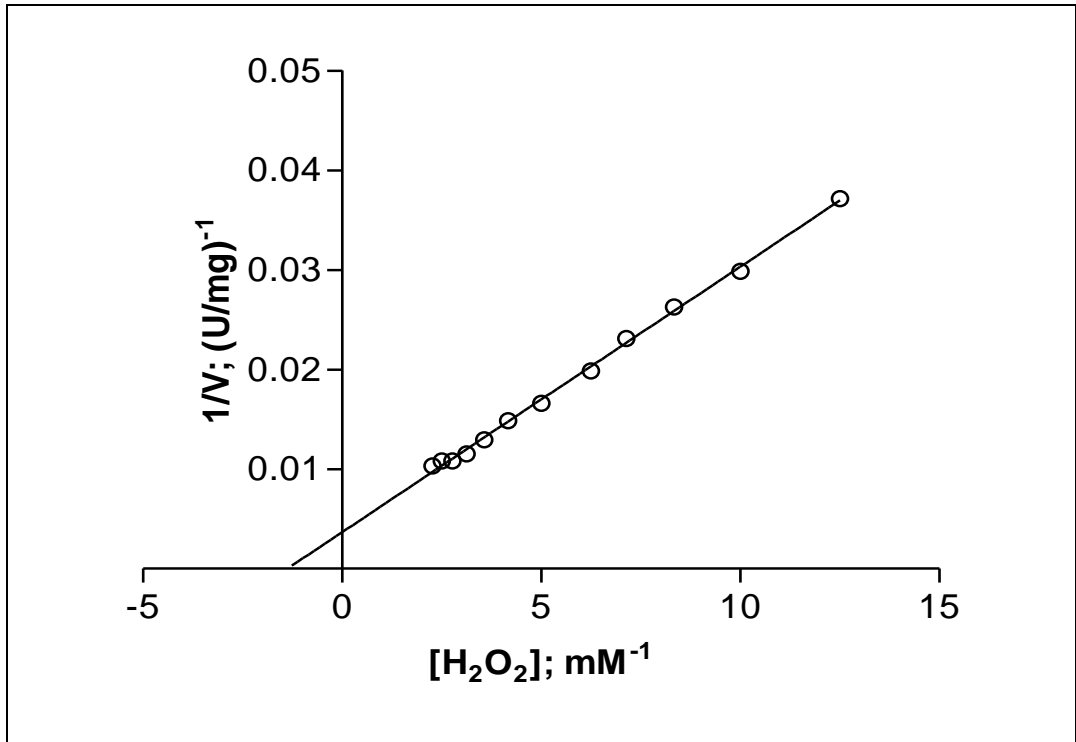
Sabit TMB konsantrasyonunda MPO aktivitesi H_2O_2 konsantrasyonuna bağlı olarak artmakta ve 0.7-1.1 mM derişiminde maksimuma ulaşmaktadır. Daha yüksek konsantrasyondaki H_2O_2 ise enzimi inhibe etmeye başlamaktadır. Enzimin kinetik özellikleri 0-1 mM H_2O_2 derişimi aralıklarında Michaelis-Menten kinetiğine uymaktadır. Bu nedenle enzimin H_2O_2 için kinetik özelliklerini belirlemek için, daha düşük substrat konsantrasyonu aralıklarında (0-0.7 mM) enzim aktivitesinin H_2O_2 derişimine bağımlılığı daha ayrıntılı olarak çalışıldı (Şekil 4.12).



Şekil 4.11. Sabit TMB konsantrasyonunda (1.6 mM) hidrojen peroksitin MPO aktivitesine etkisi (değerler 3 çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir).



Şekil 4.12. İnsan lökosit miyeloperoksidaz enziminin hidrojen peroksit için Michaelis-Menten grafiği.

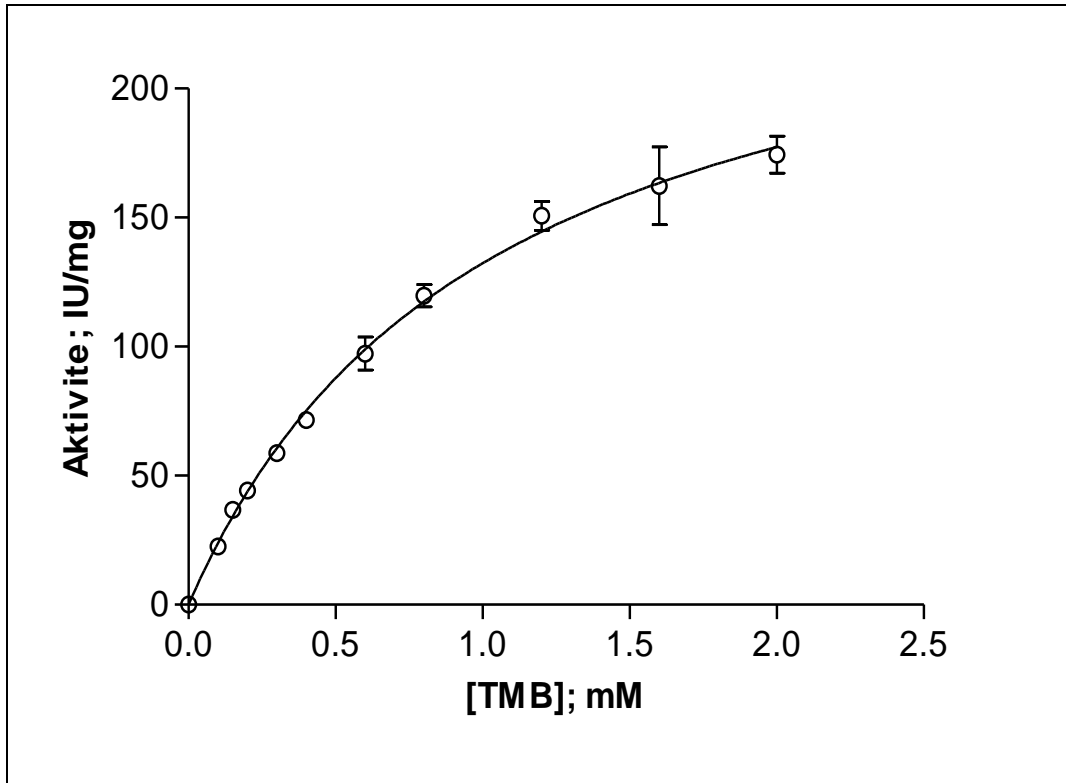


Şekil 4.13. İnsan lökosit miyeloperoksidaz enziminin hidrojen peroksit için Lineweaver-Burk grafiği. ($V_{\max} = 283.04 \pm 39$ IU/mg; $K_m = 0.111$ mM)

Şekil 4.11'deki $1/V$ değerlerinin $1/[S]$ değerlerine karşı çizilmesi ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği Şekil 4.13'de görülmektedir. Bu grafikten yararlanılarak MPO enziminin hidrojen peroksit için V_{max} değeri 273 ± 8 IU/mg protein ve K_m değeri 0.727 mM olarak tayin edildi.

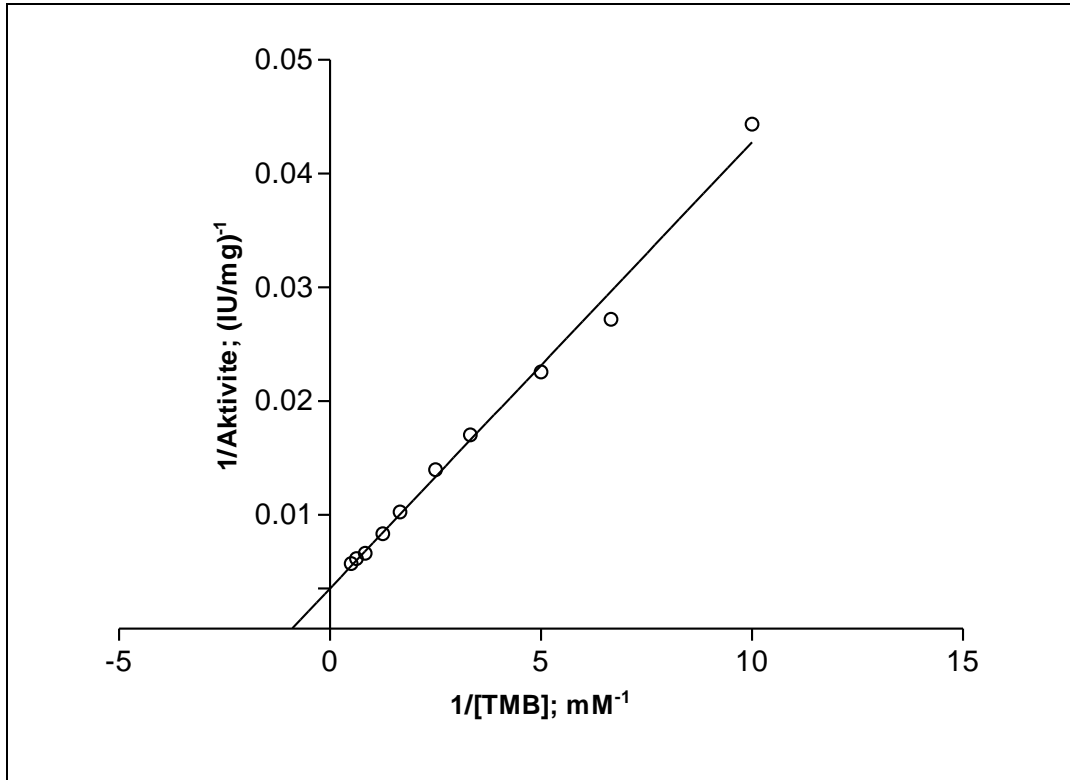
4.2.3. Miyeloperoksidaz Aktivitesinin Tetrametilbenzidin Derişimine Bağımlılığı

Miyeloperoksidaz enziminin oksitlediği substratı olan tetrametilbenzidin için kinetik özellikleri yine % 1 HETAB içeren 50 mM fosfat tamponu içinde (pH: 5.4) çalışıldı. Bunun için sabit (1 mM) H_2O_2 konsantrasyonunda aktivitenin oksitlenen substrat olan TMB konsantrasyonuna bağımlılığı çalışıldı. Son aktivite ortamı hacmi yine 1 ml idi ve tepkime 1.1 ünite saf enzim eklenerek başlatıldı. Tepkimenin hızı $37^\circ C$ 'de 560 nm'deki dakikadaki absorpsiyon değişimi tayin edildi. Dakikadaki absorpsiyon değişimi üniteye çevrilerek artan TMB derişimine karşı grafiklendi (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. İnsan lökosit miyeloperoksidaz enziminin değişken TMB konsantrasyonuna göre Michaelis-Menten grafiği.

Şekil 4.13'deki $1/V$ değerlerinin $1/[S]$ değerlerine karşı çizilmesi ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği Şekil 4.15'te görülmektedir. Bu grafikten yararlanılarak MPO enziminin tetrametilbenzidin için K_m değeri 0.111 mM ve V_{max} değeri 283.04 ± 39 IU/mg protein olarak bulundu.

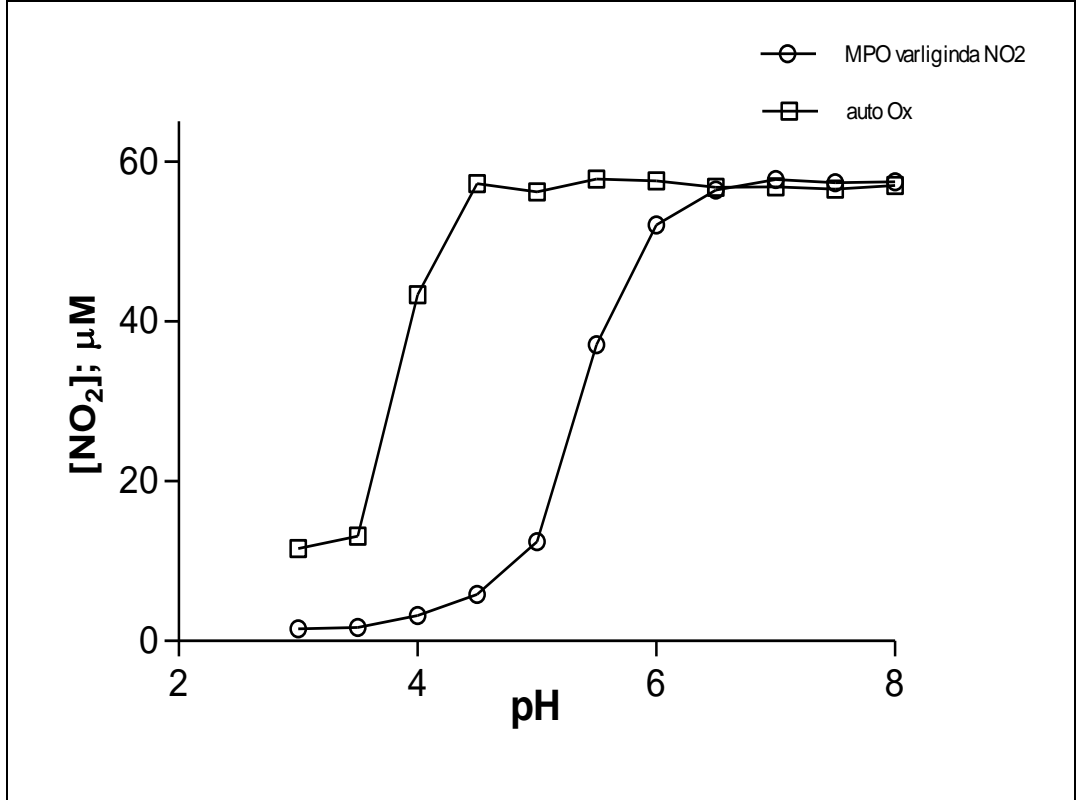


Şelil 4.15. İnsan lökosit miyeloperoksidaz enziminin değişken TMB derişimine göre Lineweaver-Burk grafiği. ($V_{max}=273 \pm 8$ IU/mg; $K_m=0.727$ mM)

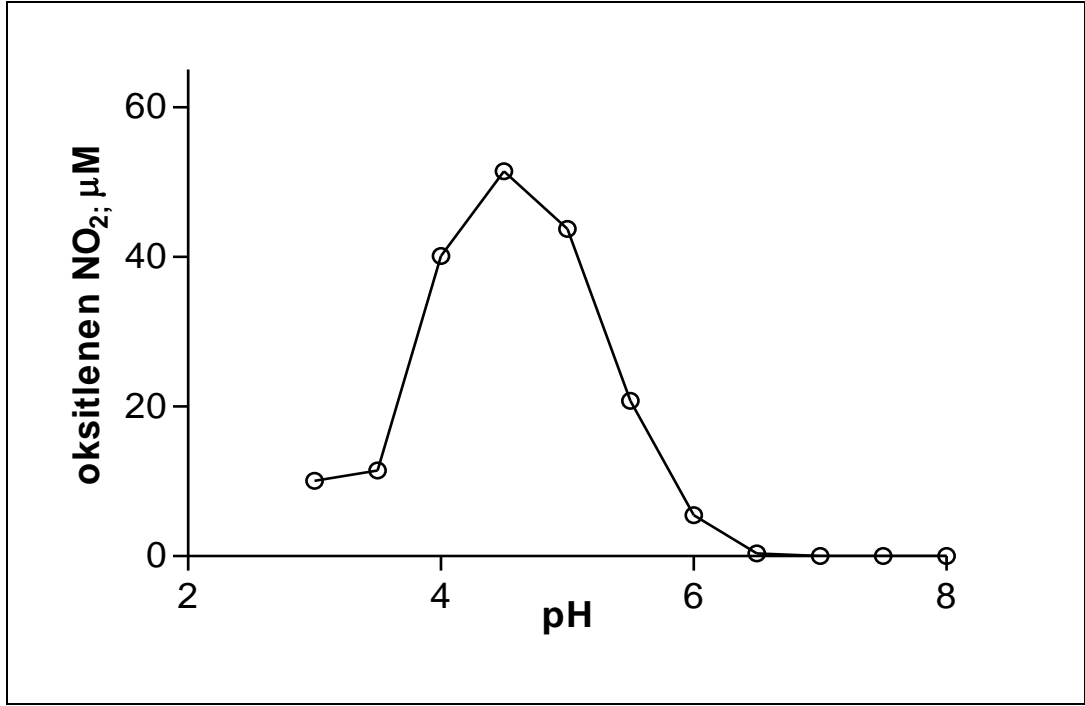
4.2.4. Miyeloperoksidaz Bağımlı Nitrit Oksidasyonu

Miyeloperoksidaz bağımlı nitrit oksidasyonu deneylerinde sodyum nitrit substrat olarak kullanıldı. Aktivite ortamı için $80 \mu\text{M NaNO}_2$, 2 ünite MPO, 1mM H_2O_2 , ve %0.1 HETAB içeren 50 mM potasyum fosfat (pH:5-8. aralığında) ve sodyum asetat tamponları (pH:3.5-5 aralığında) kullanıldı. Asidik ortamda ve hidrojen peroksit varlığında nitrit okasitlenebildiğinden, MPO-bağımlı nitrit oksidasyonunun pH- bağımlılığı araştırıldı. Nitrit oksidasyonu ortamda kalan nitrit miktarı tayin edilerek izlendi. pH 3-8 aralığındaki kendiliğinden oksidasyon ve MPO

tarafından katalizlenen oksidasyon Şekil 4.16'da verilmiştir. Her iki oksidasyon arasındaki farktan oluşan ve MPO-tarafından katalizlenen nitrit oksidasyonu ise şekil 4.17'de görülmektedir. Şekil 4.17'ye göre MPO tarafından katalizlenen nitrit oksidasyonunun optimum pH'sı 4.5'dir. Bu pH fizyolojik koşullar için oldukça düşüktür.



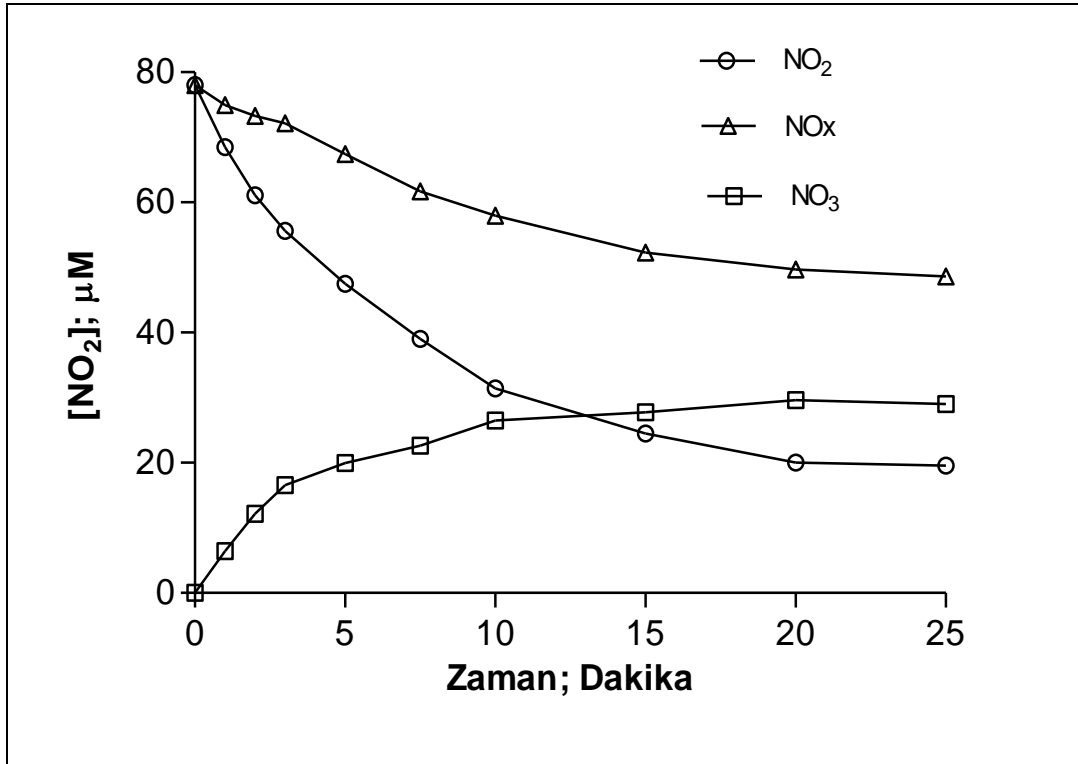
Şekil 4.16. Farklı pH'larda MPO tarafından ve kendiliğinden oluşan nitrit oksidasyonu



Şekil 4.17. Farklı pH'larda MPO'nun nitrit oksidasyon aktivitesi. Optimum pH 4.5 olarak belirlendi.

MPO tarafından katalizlenen nitrit oksidasyonunun zamana bağımlılığı Şekil 4.18'de görülmektedir. Zamana bağlı olarak ortamdaki nitrit azalmakla beraber, çalışılan koşullarda ve sürede nitritin tamamı tüketilmemektedir. Bu çalışmada tepkime H_2O_2 ile başlatıldıktan sonra şekilde verilen zaman aralıklarında ortamdaki çekilen örneklerin tepkimesi katalaz ile durduruldu. Örneklerin bir serisinde nitrit tayini, diğer serisinde ise nitrat redüktaz yöntemi ile total nitrit tayini yapıldı. Total nitrit ile nitrit arasındaki fark, MPO tarafından nitrata oksitlenen nitrit miktarını verir.

Şekil 4.18'de görüldüğü gibi, tepkime ortamında kaybolan nitritin yaklaşık % 40'ı nitrata oksitlenmektedir. Tüketilen diğer nitrit daha önce bildirildiği gibi nitril ve nitrojen dioksit ve diğer reaktif nitrojen oksit türlerine çevirilmektedir (49).



Şekil 4.18. Zamana bağlı nitrit oksidasyonu grafiği

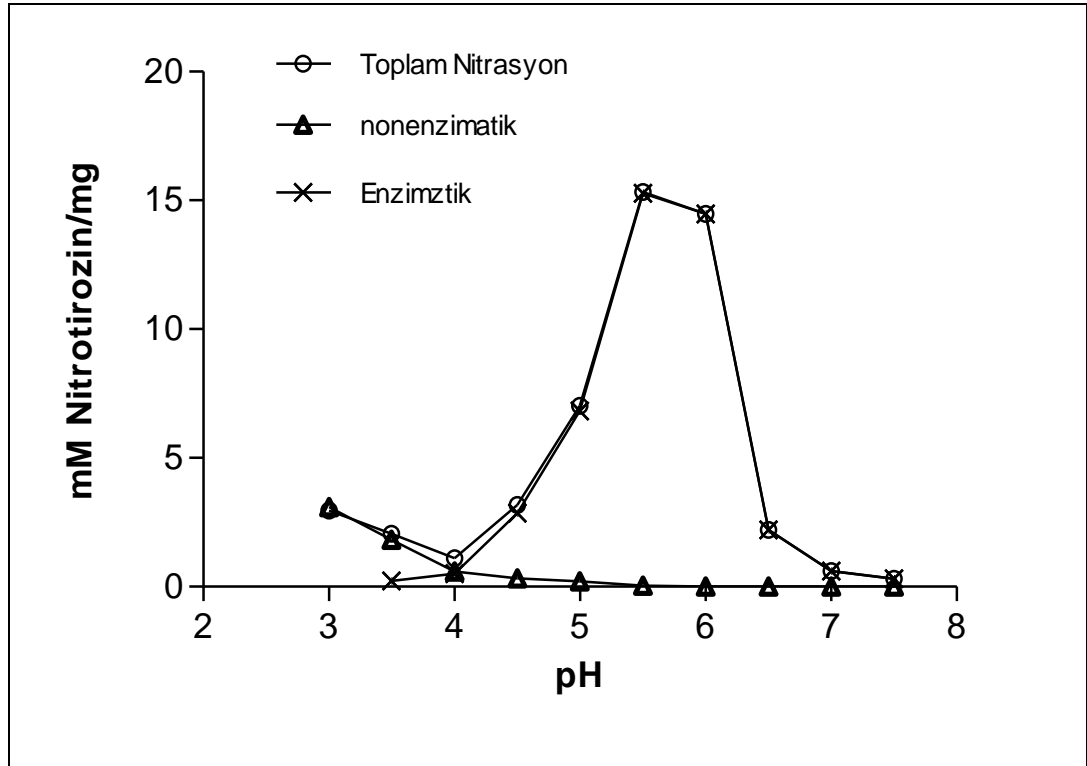
4.3. MPO-Bağımlı Tirozin Nitrasyonu Çalışmaları

Miyeloperoksidaz enziminin tirozin nitrasyonuna etkisi çalışmalarında serbest tirozin amino asiti kullanıldı. MPO tarafından nitritin oksidasyonu ile oluşan reaktif nitrojen oksit türlerinin oluşturduğu 3-nitrotirozin spektrofotometrik olarak tayin edildi (7,127). Miyeloperoksidazın tirozin nitrasyonu aktivitesi, % 0.1 HETAB içeren 50 mM tampon içinde farklı nitrit ve tirozin derişimlerinde, pH değerlerinde ve antioksidanların varlığında çalışıldı. Tirozin nitrasyonu tepkimesi, ortamın pH'sı NaOH ile bazikleştirilerek durduruldu ve oluşan renk 430 nm'de tayin edildi. Miyeloperoksidazın nitrasyon aktivitesi, deney koşullarında 1 dakikada enzimin 1 mg'ı tarafından oluşturulan milimol nitrotirozin olarak kabul edildi. Nitrotirozinin bazik ortamda 430 nm'de molar absorptivitesinden ($4.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) kullanılarak birim zamanda enzim tarafından oluşturulan nitrotirozin miktarı hesaplandı.

$$\text{Aktivite} = \text{Absorbans}_{430} / (4.2 \times \text{inkübasyon zamanı}) \quad [4.1.]$$

4.3.1. Tirozin Nitrasyonuna pH'nın Etkisi

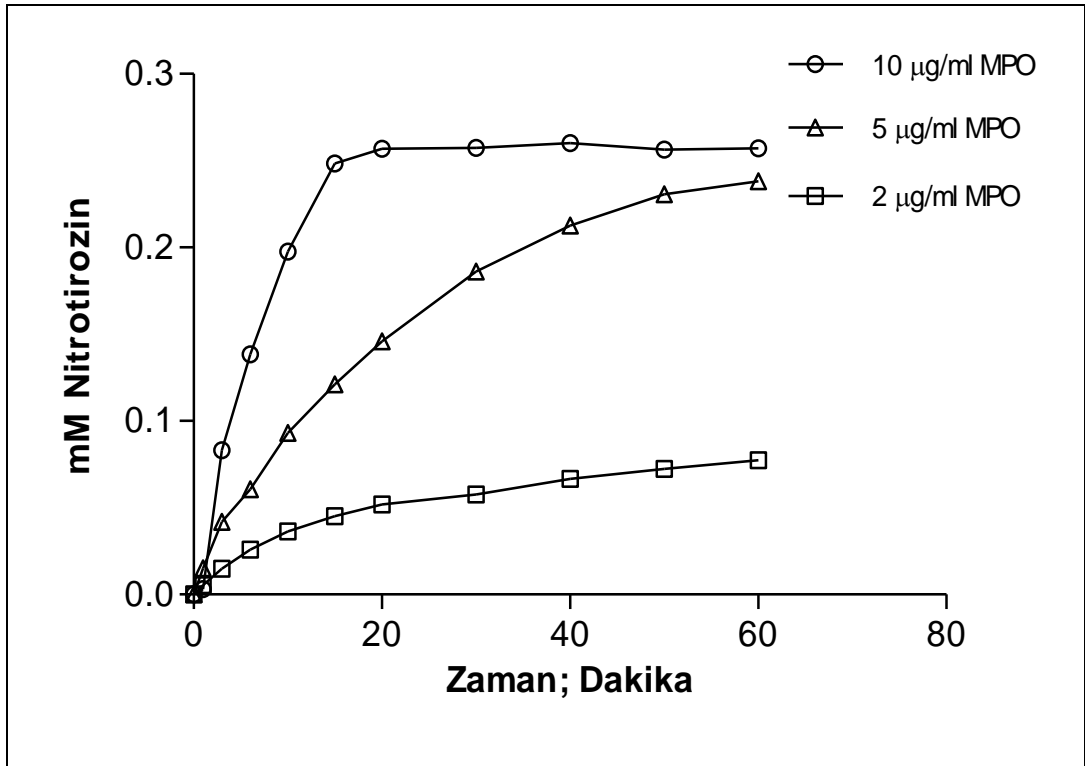
MPO tarafından katalizlenen tirozin nitrasyonunun pH optimumunu tayini için %1 HETAB içeren 50mM sodyum asetat (pH 3-5) ve potasyum fosfat (pH 5-8) tamponları kullanıldı. Deneylerde 1mM NO₂, 1mM L-tirozin, 1mM H₂O₂, ile 10 µg saf MPO, son hacim 1 ml olacak şekilde hazırlandı ve tepkime H₂O₂ eklenmesi ile başlatıldı. 20 dakikalık inkübasyondan sonra nitrasyon tepkimesi son konsantrasyonu 0.1 mM olacak şekilde NaOH ilavesi ile durduruldu. Oluşan sarı renkteki nitrotirozinin absorpsiyonu 430 nm'de ölçüldü. Nitrotirozinin 430 nm'de molar absorptivitesinden ($4.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) yararlanılarak konsantrasyonu tayin edildi. MPO tarafından katalizlenen tirozin nitrasyonuna pH'nın etkisi Şekil 4.19'da verilmiştir. Nitrasyonun pH optimumu 5.5 olarak bulundu.



Şekil 4.19. MPO bağımlı tirozin nitrasyonuna pH'nın etkisi. Maksimum enzimatik aktivite pH:5.5'de görüldü.

4.3.2. Zamana Bağlı Tirozin Nitasyonu

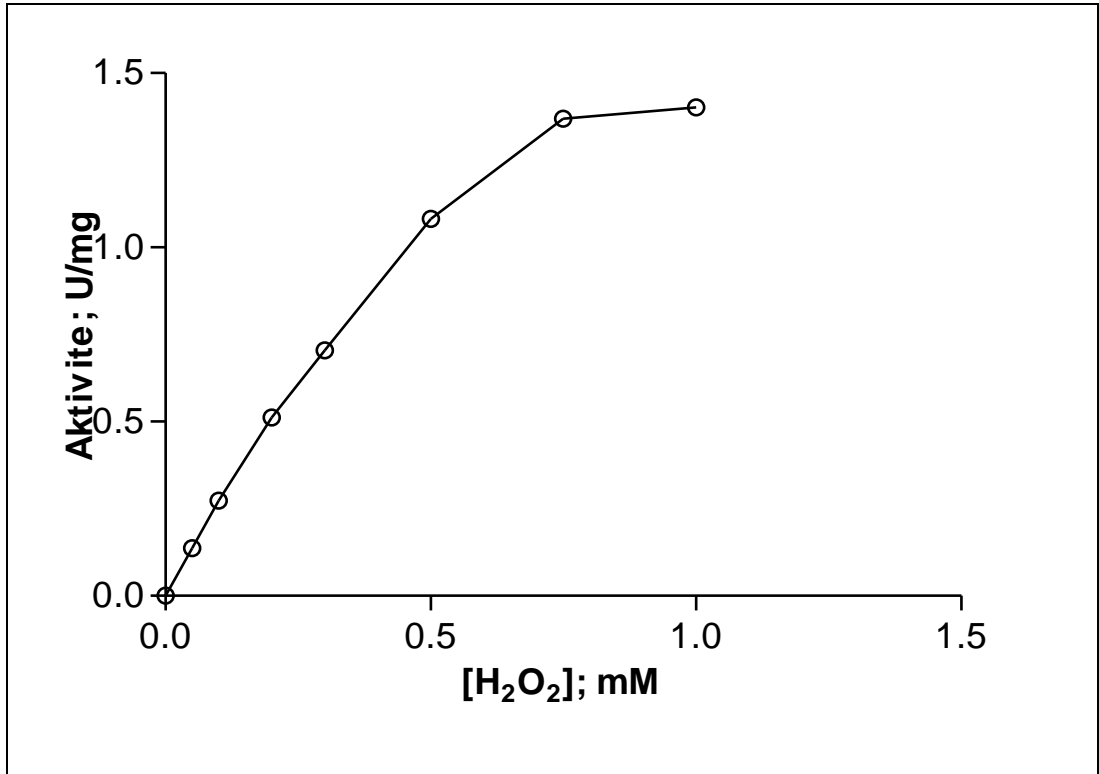
MPO tarafından katalizlenen tirozin nitasyonu düzeyi zaman bağı olarak pH 5.4'de çalışıldı. 1mM NO₂, 1mM L-tirozin, 1mM H₂O₂, ve %1 HETAB, 50mM potasyum fosfat ile 2, 5 veya 10 ünite MPO içeren karışımdaki tepkime H₂O₂ ilavesi ile başlatıldıktan sonra, 60 dakika süresince değişik zaman aralıkları ile ortamdan birer ml örnek çekilerek NaOH ile tepkime durduruldu ve nitrotirozin tayini yapıldı. 10 ünite enzim kullanılan seride nitrotirozin oluşumu 20 dakika içinde maksimum seviyeye ulaşmakla beraber, daha düşük enzim kullanılan serilerde tirozin nitasyonu 60 dakika süresince devam etmektedir (Şekil 4.20).



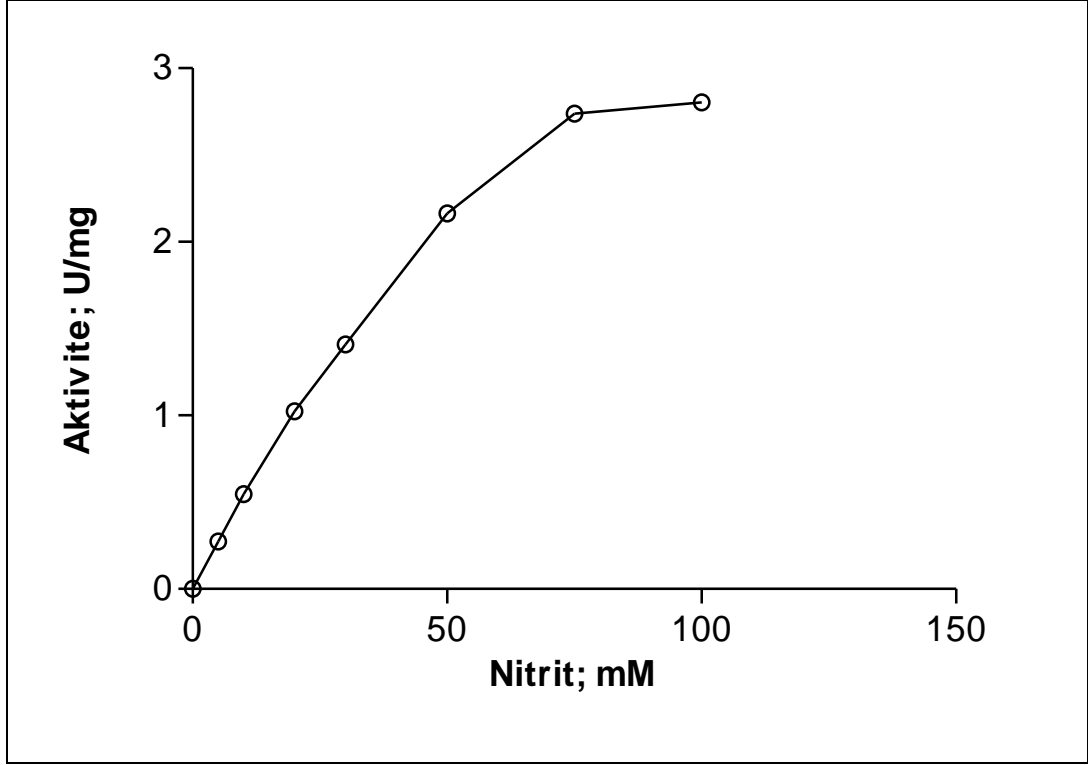
Şekil 4.20. Farklı MPO konsantrasyonlarında tirozin nitasyonunun zamana bağımlılığı.

4.3.3.Substrat Konsantrasyonlarının Tirozin Nitrasyonuna Etkisi

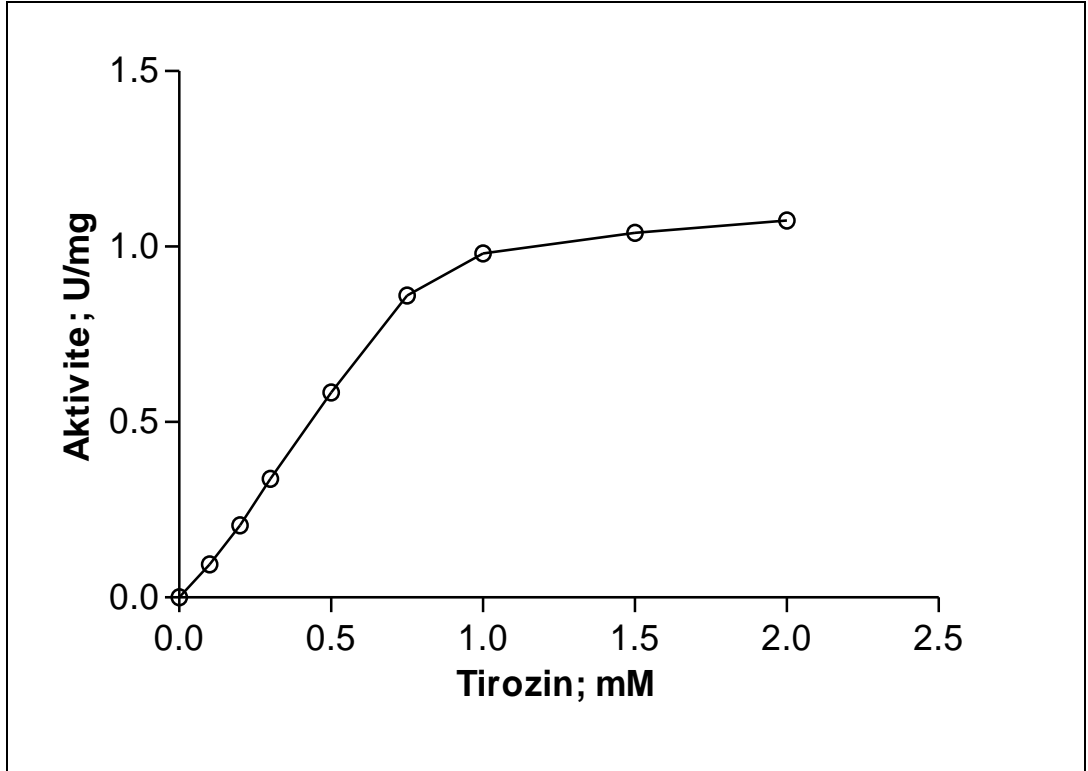
Miyeloperoksidaz tarafından katalizlenen tirozin nitrasyonuna her üç substratın (H_2O_2 , nitrit ve L-tirozin) etkisi araştırıldı. Çalışmalar % 0.1 HETAB içeren 50mM potasyum fosfat tamponu (pH 5.4) içinde yapıldı. Aksi belirtilmedikçe 1mM NO_2 , 1mM H_2O_2 , 1mM tirozin sabit substrat konsantrasyonları kullanıldı. Konsantrasyon etkisi araştırılacak olan substratın farklı konsantrasyonu kullanılırken, diğerlerinin sabit tutuldu. Her üç substratın etkisi araştırılırken, inkübasyon ortamından çekilen birer ml örnekteki tepkime NaOH ile durdurularak nitrotirozin ölçümü yapıldı. Çalışılan her üç substratın tirozin nitrasyonuna etkileri Şekil 2.21, Şekil 4.22 ve Şekil 4.23'te verilmiştir.



Şekil 4.21. Tirozin nitrasyonuna H_2O_2 konsantrasyonunun etkisi



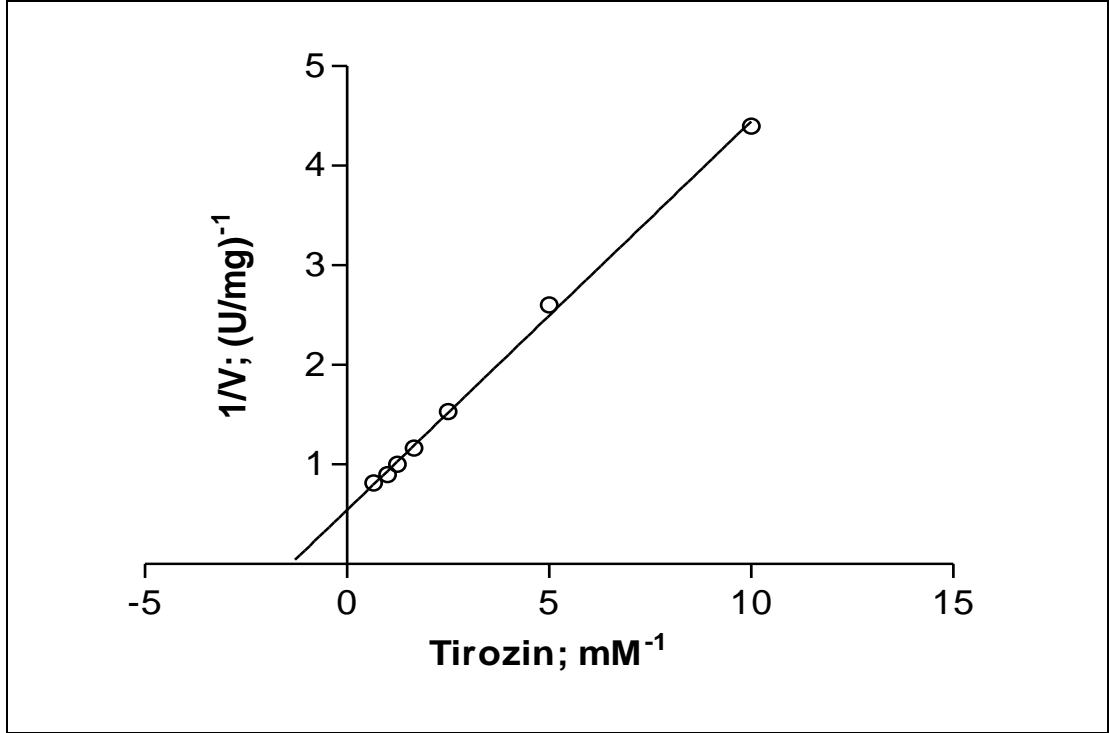
Şekil 4.22. Tirozin nitrasyonuna nitrit konsantrasyonunun etkisi



Şekil 4.23. Tirozin nitrasyonuna tirozin konsantrasyonunun etkisi

4.3.4. Miyeloperoksidazın Tirozin Nitasyonu için Kinetik Sabitleri

MPO enziminin tirozin nitasyonu aktivitesinin kinetik sabitlerini belirlemek için diğler substrat konsantrasyonları sabit tutularak (1 mM nitrit, 1 mM H₂O₂) farklı L-tirozin konsantrasyonlarında nitrotirozin oluşumu tayin edildi. Şekil 4.22'deki verilerden yararlanılarak Linweaver-Burk grafiğı çizildi ve tirozin için V_{max} değeri 1.845 µmol/mg protein ve K_m değeri 0.72 mM olarak hesaplandı (Şekil 4.24.).

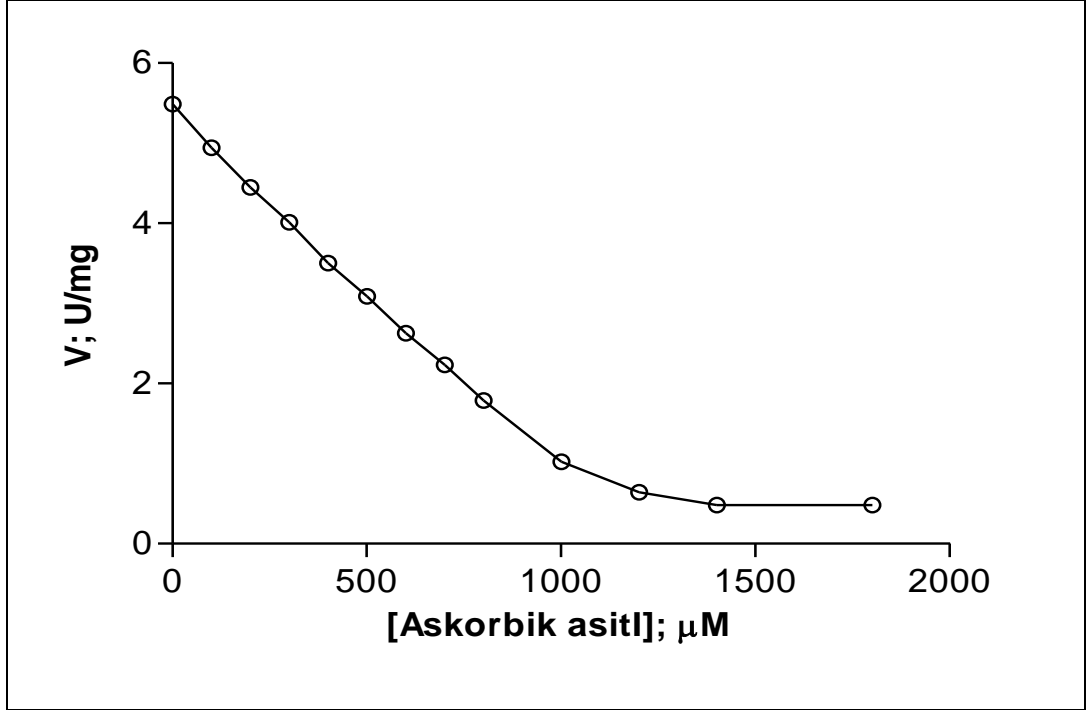


Şekil 4.24. Tirozin nitasyonu aktivitesinin Lineweaver-Burk grafiğı

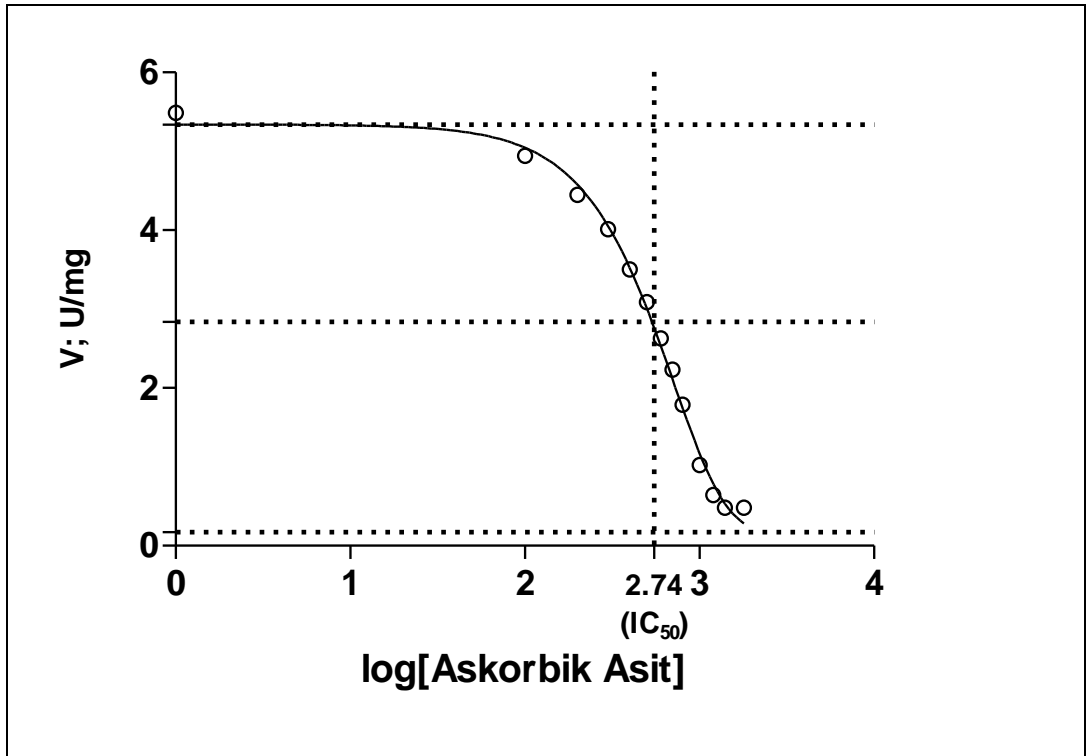
4.3.5. Tirozin Nitasyonuna Askorbik Asit Etkisi

Miyeloperoksidaz enziminin tirozin nitasyonu aktivitesi üzerine askorbik asitin etkisini incelemek için aktivite ortamına (%0.1 HETAB içeren 50mM potasyum fosfat tamponu içerisinde 1 mM NO₂, 1 mM H₂O₂, 1 mM tirozin ve 100 µg saf enzim) son konsantrasyonları 0 µM ile 1800 µM arası olacak şekilde L-askorbat eklenerek aktivite tayini yapıldı. L-Askorbat 10mM suda çözelti şeklinde hazırlandı ve 30 dakika içerisinde taze olarak kullanıldı. Artan inhibitör derişimine karşın hızın azalarak bir limit değere ulaştığı görüldü (Şekil 4.25). İnhibitorkonsantrasyonunun logaritmasına karşı hız grafiğinden inhibitörün yarı

maksimum inhibisyon konsantrasyonu (IC_{50} değeri) $533.9 \pm 35 \mu M$ olarak hesaplandı (Şekil 4.26.)

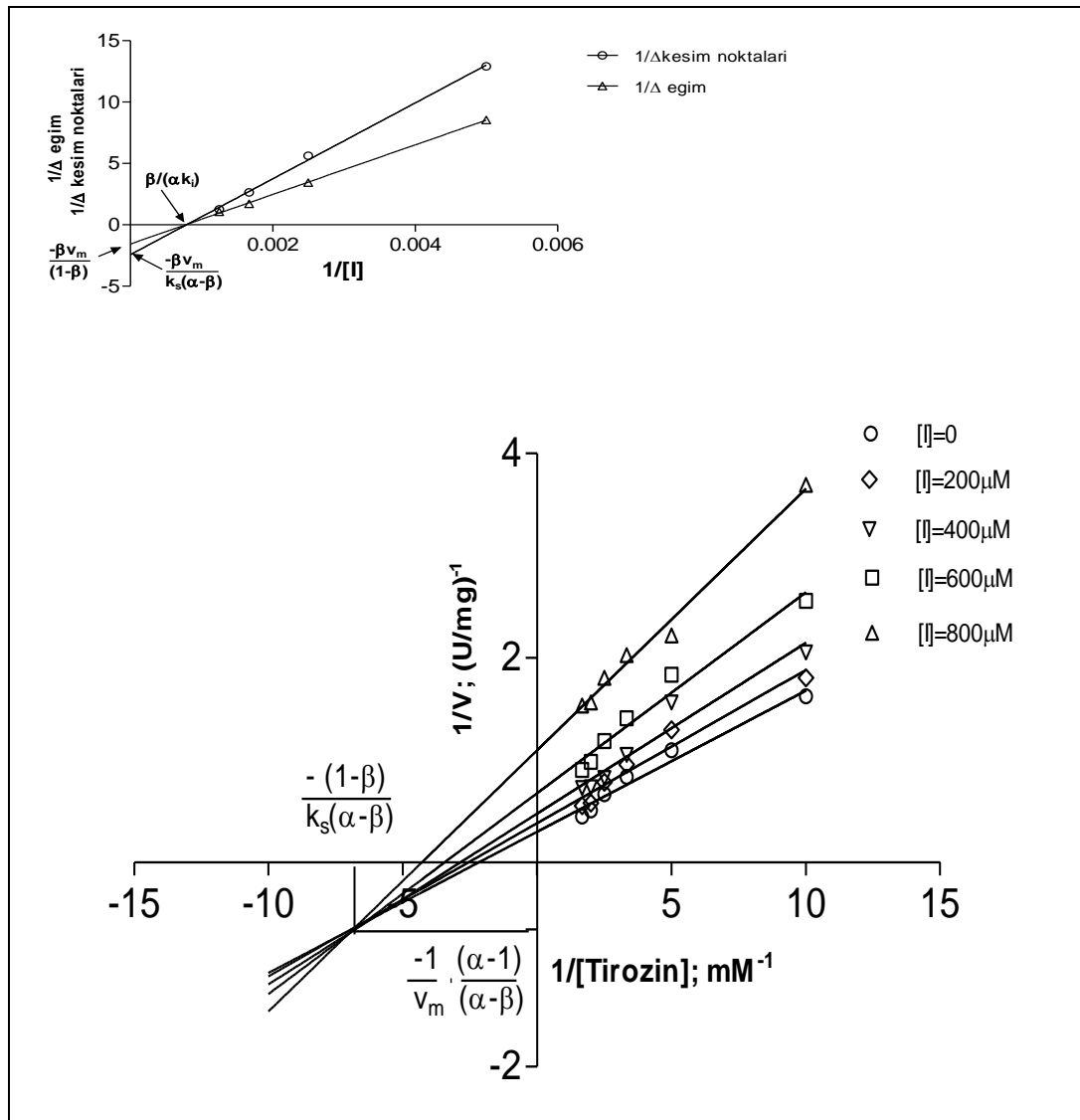


Şekil 4.25. Askorbik asit konsantrasyonunun tirozin nitrasyonuna etkisi



Şekil 4.26. Askorbik asit inhibisyonunun IC_{50} grafiği

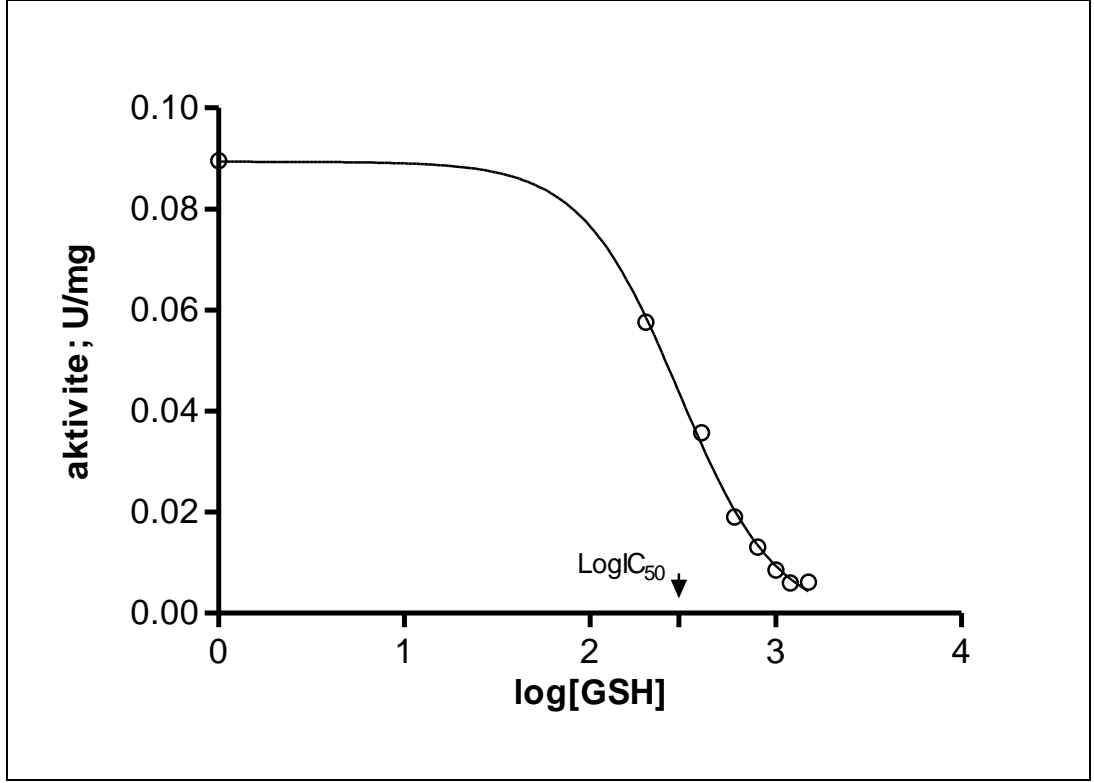
MPO'nun askorbik asit varlığında kinetik davranışını belirlemek için 0, 400, 600 ve 800 μM askorbik asit içeren ortamlarda MPO'nun aktivite tayini yapıldı ve Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Artan inhibitor konsantrasyonuna karşı azalan V_{max} ve artan K_m değerleri ve grafiğin biçimi dikkate alınarak inhibisyon tipi kısmi non kompetitif inhibisyon olarak belirlendi (Şekil 4.27.).



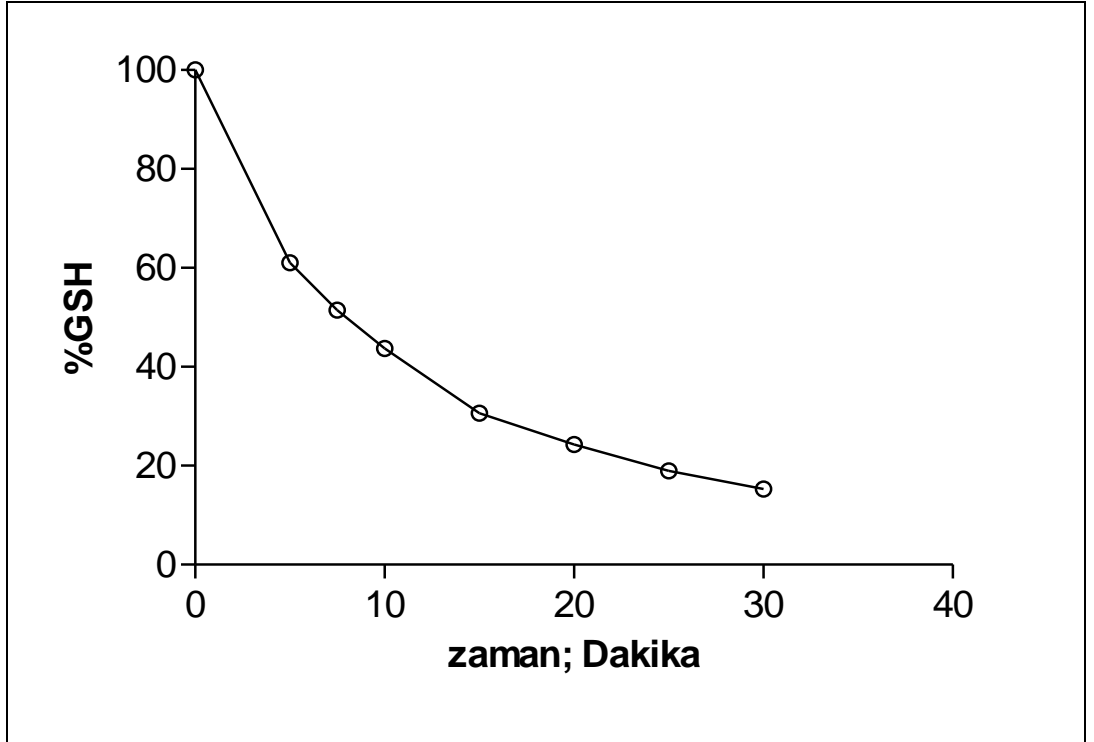
Şekil4.27. İnsan lökosit MPO enziminin sabit askorbik asit konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiği

4.3.6. Tirozin Nitrasyonuna Glutatyonun Etkisi

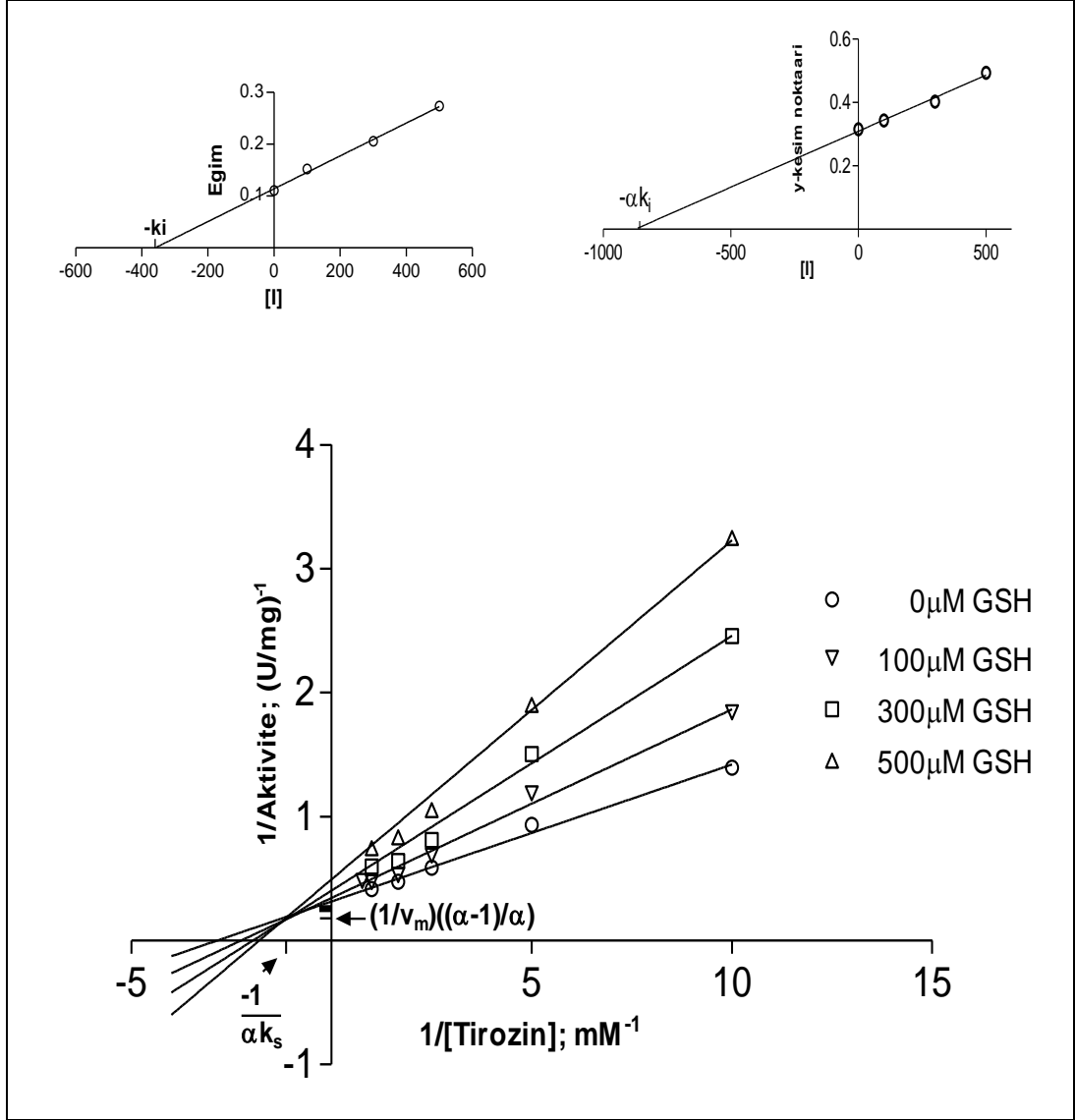
İndirgenmiş glutatyonun (GSH) tirozin nitrasyonuna etkisini incelemek için aktivite ortamına son konsantrasyonları 0, 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200 ve 1500 μM olacak şekilde (GSH) eklenerek 20 dakika süreyle aktivite bakıldı. Aktivite tayini için 2, 5, 10, 15 ve 20. dakikalarda reaksiyon 100 ml 1M NaOH eklenerek durduruldu ve 430 nm'de absorbans ölçümü ile oluşan nitrotirozin miktarı tayin edildi. GSH konsantrasyonunun logaritmasına karşı aktivite grafiği çizilerek IC_{50} değeri 300.4 μM GSH olarak belirlendi (Şekil4.28.). Enzimsiz ortamlarda yapılan analizlerde kendiliğinden nitrotirozin oluşmadığı ancak sadece GSH ve H_2O_2 içeren ortamda zamana bağlı GSH oksidasyonu gözlemlendi (Şekil 4.29.). GSH doğrudan enzime bağlanmadığı halde ortamda inhibitor-substrat kompleksi oluşturarak enzim-substrat kompleksinin oluşumunu engeller ve inhibitör şekilde etki gösterir (şekil 4.29.). Glutatyonun miyeloperoksidaz inhibisyonunun kinetik davranışını belirlemek için 0, 100, 300 ve 500 μM GSH içeren ortamlarda değişen substrata karşı aktivite tayini yapıldı. Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek kinetik model belirlendi (Şekil 4.30.). Maksimum hızın inhibitor konsantrasyonuyla ters orantılı olarak değişmesi ve görünür K_m değerinin inhibitörlü ortamlarda artması inhibisyon tipinin karışık tip inhibisyon olarak açıklamaktadır. GSH, H_2O_2 ile tepkimeye girerek GSSH ve su oluşturur ve bu tepkime sonucu ortamdaki H_2O_2 konsantrasyonu azalır. Bu sıralı Bi-Bi sistemdeki azalan ikinci substrat kinetiğine benzerlik gösterir. Grafik ve hesaplamalar inhibisyonun lineer karışık tip inhibisyon olduğunu göstermektedir ancak bu tip inhibisyonun tersine artan inhibitör konsantrasyonlarında Δ -eğim Bi-Bi sisteme benzer bir şekilde artış göstermiştir. SI kompleksinin ürün oluşturma ihtimali olmadığından sonsuz inhibitor konsantrasyonu tam inhibisyon sağlar.



Şekil 4.28.MPO tirozin nitrasyonuna GSH etkisinin semilogaritmik grafiği



Şekil 4.29. H₂O₂ varlığında GSH'nın oksidasyonu



Şekil 4.30. GSH inhibisyonunun Lineweaver-Burk grafiği (altta) ve 2. grafiklendirmeler: üst sol eğim/[I] ve üst sağ y-kesim noktaları/[I].

4.3.7. Kinetik Sabitlerinin Belirlenmesi

Askorbik asit inhibisyonunda kinetik sabitleri belirlemek için Lineweaver-Burk grafiğinin $1/\Delta$ eğim ve $1/\Delta$ kesim noktaları $1/[I]$ 'ye karşı grafiklendi ve α , β ve K_i değerleri hesaplandı (Şekil 4.23. iç grafik). Bu grafiklerden elde edilen değerlere göre $\alpha=0.248$, $\beta=0.317$ ve $K_i=1638$ mM nitrit olarak elde edildi. Veriler ayrıca GraphPad Prism programında değerlendirildi. Program kullanılarak veriler kısmi karışık tip inhibisyon olarak analiz edildi. Analiz sonucu $\alpha=0.253$ ve $K_i=1515$ mM nitrit olarak elde edildi ve $\beta=0.299$ olarak hesaplandı.

GSH inhibisyonu için Lineweaver-Burk grafiğinin eğim ve kesim noktaları inhibitör konsantrasyonuna karşı grafiklendirildi. Eğim / $[I]$ ve kesim noktaları / $[I]$ grafiklerinden (Şekil 4.26. üst grafikler) $\alpha=2.38$ ve $K_i=360$ μ M GSH olarak hesaplandı.

5. TARTIŞMA

Enzimolojide miyeloperoksidazın geçmişi 1940'lı yıllara kadar uzanır. Bu yıllarda, tüberküloz hastalarının pürülan sıvılarında bulunan yeşil renkli bir proteinin demir içerdiği ve peroksidaz aktivitesine sahip olduğu görülmüş ve protein "verdoperoksidaz" olarak adlandırılmıştır. Daha sonra miyeloperoksidaz olarak adlandırılan bu proteinin, fonksiyonu için hidrojen peroksit ve klor bağımlı bir protein olduğu, nötrofillerin antimikrobik aktivitesinde hayati bir fonksiyona sahip olduğu 1968 yılında Klebanoff tarafından gösterilmiştir. Bu çalışmada miyeloperoksidazın antibakteriyel etkisinin ortama eklenen hidrojen peroksit tarafından arttırıldığı, etkinin katalaz tarafından tamamen önlendiği, dolayısıyla miyeloperoksidaz aktivitesi için endojen H₂O₂ yapımının gerekli olduğu bildirilmiştir. İzleyen yıllardaki araştırmalarda, MPO etkisi için fagositik hücrelerin kendi hidrojen peroksitlerini NADPH oksidaz tepkimesi ile kendilerinin ürettiği, H₂O₂ kullanılarak klorun hipokloröz asit gibi etkili bir antimikrobik bileşiğe oksitlendiği gösterilmiştir (135).

Mikroorganizmalar, mantar ve tümör hücrelerine karşı, vücudun başlıca savunma/korunma mekanizmalarından birini oluşturan enzimlerden biri olan miyeloperoksidaz enziminin yapısal ve kinetik özellikleri ile normal ve patolojik durumlardaki biyolojik fonksiyonlarını/etkilerini belirlemeye yönelik çalışmalar Klebanoff'un ilk bulgularından bu yana devam etmektedir. Bir proteinin yapı ve fonksiyonunun araştırılması için gerekli ön aşamalardan biri de söz konusu proteini biyolojik bir kaynaktan saflaştırmaktır.

Literatürde 1982'den günümüze kadar lökositlerden MPO'nun saflaştırılmasının bildirildiği 5 çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda saflaştırma işlemlerinde MPO HETAB veya kalsiyum klorür kullanılarak ekstrakte edilmiş; amonyum sülfat kesitlemesi, jel filtrasyonu kromatografileri (Sephadex G75, Sephadex G150, Ultrogel AcA 44, Superdex 200), iyon değiştirici kromatografiler (karboksimetil selüloz, CM Sepharose CL-6B), afinite kromatografisi (ConA Sepharose), hidrofobik etkileşim kromatografisi (Phenyl Sepharose) gibi yöntemler kullanılmıştır. Saflaştırma işlemlerinden sonra saflık kontrolleri SDS-PAGE ile yapılmış ve altbirimlerin molekül ağırlıkları belirlenmiştir (71,132,135-137).

Protein saflaştırılmasında, ilgilenilen proteince zengin bir kaynak seçmek önemli bir avantajdır. Miyeloperoksidazın ise en bol bulunduğu hücreler ise başta nötrofiller olmak üzere lökositlerdir. Bu nedenle insan miyeloperoksidazını saflaştırılması için lökoferez ile hastalardan toplanmış lökositler kullanıldı. Santrifüj tüplerine aktarılan lökosit süspansiyonu santrifüj edilerek hücreler toplandı ve bu hücreler mekanik homojenizatör kullanılarak patlatıldı; izleyen santrifügasyonla çözünür fraksiyonlar atıldı ve zarsal fraksiyonlarda bulunan MPO, deterjan (HETAB) aracılığı ile çözünürleştirildi. Çözünürleştirme ile süpernatana geçen MPO saflaştırılma işlemlerinde kullanıldı.

Saflaştırma çalışmasında çözünür enzimi daha konsantre etmek ve amonyum sülfat kullanımının saflaştırma için bir avantaj sağlayıp sağlamadığını araştırmak amacıyla amonyum sülfat kesitlemesi yapıldı. Aktivitenin tamamının %30-%70 amonyum sülfat kesitlemesi ile toplanabileceği görüldü. Ancak kesitleme öncesi enzim örneği ile kıyaslandığında, amonyum sülfat kesitlemesinin spesifik aktivitede önemli bir artışa neden olmadığı ve daha sonraki saflaştırma basamaklarında bir avantaj sağlamadığı görüldüğünden, saflaştırma protokolünde amonyum sülfat kesitlemesinin uygulanmasından vazgeçildi.

Bir lektin olan Concanavalin A (ConA), inert bir jele kovalent bağlandıktan sonra, glikoprotein yapıya sahip proteinlerin saflaştırılmasında kullanılmaktadır. Farklı glikoprotein farklı glikokonjugat yapı (farklı dizimli karbohidrat) içerdiğinden, ConA bağlanmış jeller, örneğin ConA-Sepharose bir non-spesifik afinite jelidir. Miyeloperoksidaz enzimi de bir glikoprotein olduğundan ConA-bağlı jellere tutunabilmektedir ve bu özelliği nedeniyle saflaştırılmasında ConA-Sepharose kromatografileri uygulanmıştır. İlk kez Merril tarafından ConA Sepharose MPO saflaştırılması amacıyla kullanılmış ve enzimin jelden α -metil-D-mannozid ile elüe edilmiştir (135).

Çalışmamızda MPO saflaştırılmasında ilk basamak olarak ConA-Sepharose 4B kromatografisi uygulandı. Bu jele sadece glikoprotein yapısındaki proteinler bağlandığından, glikoprotein yapısına sahip olmayan, fakat MPO-benzeri peroksidaz aktivitesine sahip proteinlerin jele bağlanmadan kolondan çıktığı görüldü. Bu fraksiyonda istenmeyen proteinlerin önemli oranda uzaklaştırıldığı görüldü. Afinite jelinden MPO elüsyonu metil mannozid ile sağlandı. MPO aktivitesi kolondan

gradient uygulanmaksızın, 0.6 M metilmannozid ile elüe edildiğinde, verim ve spesifik aktivitesinin daha yüksek olduğu görüldüğünden, saflaştırma çalışmalarında enzimin elüsyonunda bu yöntemle elüsyon tercih edildi (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2). Peroksidaz aktivitesi esas alındığında, bu basamaktaki verimin % 80 olduğu görüldü. Ancak kolona bağlanmadan inen peroksidaz aktivitesi, total aktivitenin % 20'si civarında idi. Saflaştırmada kullanılması gerekmeyen bu fraksiyondaki peroksidaz aktivitesi ile birlikte değerlendirildiğinde, ConA Sepharose basamağındaki verimin aslında çok daha yüksek olduğu söylenebilir.

ConA Sepharose kromatografisinden sonra, daha ileri saflaştırma için Sephacryl S300 jel filtrasyonu ve pH 6'da CM-Sephadex iyon değiştirici kromatografisi yöntemleri kullanıldı. Sephacryl S300 jel filtrasyonu yöntemi, ister iyon değiştiriciden önce, ister iyon değiştiriciden sonra uygulansın, saflaştırmaya katkıda bulunmadığından, saflaştırma yönteminden çıkarıldı. pH 6'da yapılan CM-Sephadex iyon değiştirici kromatografisi sonrasında ise, yapılan SDS-PAGE analizinde MPO'nun küçük altbiriminin kaybedildiği ve bazı safsızlıklar içerdiği görüldü. Bunun üzerine, literatürdeki çalışmaların aksine, CM-Sephadex iyon değiştirici kromatografisi hafif alkali koşullarda (pH 8'de) yapıldı. MPO'nun bazik bir protein olması bu uygulamaya olanak sağlar. Alkali pH'da yapılan CM-Sephadex iyon değiştirici kromatografisinde tuz gradienti ile indirilen proteinin daha saf olduğu ve küçük altbirimi de içerdiği görüldü (Şekil 4.4 ve Şekil 4.5).

İyon değiştirici kromatografiden sonra elde edilen enzim konsantre edildikten sonra, saflık kontrolü için SDS-PAGE analizi yapıldı ve absorpsiyon spektrumu alındı. Absorpsiyon spektrumu analizinde *Reinheit Zahl; RZ* (A_{430}/A_{280}) değeri 0.86 olarak bulundu (Şekil 4.7). Literatürde MPO enziminin saflık kriteri olarak bu değer 0.72 olması gerektiği savunulmaktadır (71,132,135-137). Saflaştırılan enzim, SDS-PAGE'de 57500 ve 13100 Dalton molekül ağırlığında olan ve MPO'nun büyük ve küçük altbirimlerine karşılık gelen iki protein bandı verdi. Ancak elektroforezde, 47000 Dalton molekül ağırlığına karşılık gelen üçüncü bir protein bandı daha gözlemlendi. RZ değeri MPO'nun saflığının önemli bir kanıtı olduğundan, bu beklenmeyen protein bandının deglikozilasyona uğramış MPO olduğu savunulabilir (Şekil 4.8).

Sonuç olarak; insan lökositlerinden MPO enzimi afinite kromatografisi ve hafif bazik koşullarda CM Sephadex kromatografisini içeren iki basamakta % 70.3 verimle saflaştırıldı. Saflaştırılan enzimin pH optimumu belirlendi. Substratlarından H₂O₂ ve tetrametil benzidin için kinetik özellikleri tesbit edildi ve MPO tarafından katalizlenen nitrit oksidasyonu ve tirozin nitrasyonu çalışıldı.

MPO enziminin pH optimumu, iki farklı tampon sistemi kullanılarak geniş bir pH aralığında aktivitesi ölçülerek araştırıldı. Çalışmada kullanılan substratlar göz önüne alındığında, pH 3.5 altında ve pH 6.5 üzerinde ölçülebilir çok az aktiviteye sahiptir ve optimum pH'sı 5.0 olarak tayin edildi. Ancak tetrametilbenzidin substrat olarak kullanıldığı çalışmalarda aktivite ölçümlerinin pH 5.4'de yapıldığı bildirildiğinden, bu çalışmada da aktivite ölçümleri için bu pH tercih edilmiştir.

Miyeloperoksidazın biyolojik fonksiyonları, kataliz mekanizması, etkileri ve patolojik durumlarda değişimi ile ilgili çok sayıda araştırma yapılmış olmasına rağmen; kinetik özelliklerinin araştırıldığı çalışmalar bulunmamaktadır. İstisna olarak Demirpençe ve arkadaşlarının doku homojenatını kullanarak MPO'nun H₂O₂ ve tetmetilbenzidin için kinetik özelliklerini araştırdıkları çalışmada, K_m değerleri sırası ile 0.6 mM ve 0.2 mM olarak bildirilmiştir (124). Bu çalışmada MPO enziminin H₂O₂ için V_{max} değeri 273 ± 8 IU/mg protein ve K_m değeri 0.727 mM olarak; tetrametilbenzidin için ise K_m değeri 0.111 mM ve V_{max} değeri 283.04 ± 39 IU/mg protein olarak tayin edildi.

Özelde MPO, genelde diğer peroksidaz enzimleri ve hemoproteinler, H₂O₂ ile tepkimeye girdikleri zaman, hem grubunun demiri ferrik (Fe³⁺) formundan, daha yüksek oksidasyon formu olan perferril demire (Fe^{IV+}) oksitlenir. Bu oksidasyondan sonra hem demiri oksoferril kompleksi (Fe^{IV}=O) şeklindedir. Oksoferril reaktif bir tür olup, ortamdaki çeşitli organik ve inorganik bileşiklerle tepkimeye girer. Girdiği tepkimenin fizyolojik olarak önemli olup olmadığı, tepkimeye girdiği bileşiğin fizyolojik ortamdaki varlığı ve konsantrasyonuna bağlıdır (41,46).

MPO'nun halojenasyon (klorinasyon) tepkimesinde başlıca substratı klor iken; peroksidasyon (oksidasyon) tepkimesi ile oksitlediği çok sayıda substratı vardır. Fizyolojik koşullarda, özellikle de inflamasyon bölgesi ile fagozom içinde önemli substratı nitrittir. Diyet ile alınan ve sistemik dolaşıma geçebilen nitrit bir tarafa bırakılırsa, vücuttaki nitritin ana kaynağı nitrik oksittir (49,138). Bilindiği gibi

aktive edilerek travma/enfeksiyon bölgesine göç eden lökositlerde oksijen tüketiminde patlama (respiratory burst) görülür. Bu sırada oksijen ve glukoz tüketimindeki artışın nedeni, NADPH oksidaz sistemi ile süperoksit ve neticede H_2O_2 üretmektir. Lökosit aktivasyonu sırasında hücrelerde gerçekleşen çok sayıdaki değişimlerden biri de iNOS indüksiyonudur. Diğer nitrik oksit sentaz izozimlerinin (eNOS ile nNOS) aksine, iNOS aktivitesi kontrol edilemez ve ortamda arjinin amino asiti mevcut olduğu sürece, yüksek konsantrasyonda NO sentezlemeye devam eder. Nitrik oksit oksihemoglobin ile tepkimeye girdiğinde nitrate oksitlenir ve nitrat vücutta NO oksidasyonunun başlıca son ürünüdür. NO'nun diğer bir son ürünü de, aerobik ortamda kendiliğinden oksidasyon tepkimeleri ile oluşan nitrittir. Nitrat'ın aksine, nitrit MPO ve benzeri peroksidazlar tarafından kullanılabilen bir bileşiktir. Aktive edilen lökositlerin hem H_2O_2 , hem de nitriti aynı anda yüksek konsantrasyonda üretmeleri nedeniyle, nitritin MPO tarafından H_2O_2 bağımlı olarak oksidasyonu fizyolojik etkileri bakımından önemlidir.

Nitritin MPO tarafından oksidasyonu, inkübasyon ortamına eklenen nitrit konsantrasyonundaki azalma izlenerek tayin edilebilir. Nitritin oksidasyonu ile oluşan ilk ürün nitrojen dioksit radikalidir. Bu reaktif ortamdaki diğer molekülleri oksitleyebilir veya katılma (nitrasyon gibi) tepkimelerine girebilir (49).

Hidrojen peroksit varlığında ve asidik koşullarda nitrit stabil olmayıp hızla önce peroksinitröz aside, ardından nitrate oksitlenir. Bu durum göz önüne alınarak, MPO varlığında ve yokluğunda nitrit oksidasyonu (ortamdan nitrit kaybı) pH bağımlı olarak çalışıldı. Bu çalışmada pH 8 ile 3.5 arasında ortamdaki nitritin stabil olduğu, ancak pH 3.5'un altında, pH düştükçe nitritin kendiliğinden oksidasyonunun hızlandığı bulundu. MPO tarafından katalizlenen nitrit oksidasyonu ise pH 6.5 civarında başlamakta ve kendiliğinden oksidasyonun başladığı pH'da tamamlanmaktadır (Şekil 4.15). MPO tarafından katalizlenen nitrit oksidasyonunun optimum pH'sı 4.5 olmakla beraber (Şekil 4.16), nitrit oksidasyonu kinetiği pH 5.4'de çalışıldı.

Nitritin MPO tarafından oksidasyonu zamana bağlı olarak ilerlemekte, fakat ortamdaki nitritin tamamı tüketilmemektedir. Bunun nedenlerinden biri, zamana bağlı olarak H_2O_2 konsantrasyonunun azalması ve ortamda sabit H_2O_2 konsantrasyonunun temin edilememesidir. Çalışılan koşullarda, ortamdaki nitritin %

75'i MPO tarafından tüketilmektedir. Yine bu koşullarda oksitlenen nitritin 1/3'ünün nitrata çevirildiği görüldü (Şekil 4.17). Teorik olarak, ortamda MPO tarafından oksitlenen nitritin peroksinitrit ve nitrojen dioksit radikalleri ara ürünleri aracılığıyla nitrata çevrilmesi beklenir. Muhtemelen nitritin oksidasyonu ile başlayan radikalik tepkimeler sırasında, bazı reaktif türler son ürün olarak nitrata çevrilirken, reaktif türlerin bir kısmı tekrar nitrite çevrilmektedir ve bu nedenle nitrit konsantrasyonu sifıra kadar düşmemektedir.

Aktive edilen lökositler NADPH oksidaz, iNOS ve miyeloperoksidaz enzimleri aracılığı ile radikalik zincir tepkimelerini başlatırlar. Oluşan ilk reaktif türler, fagozom ortamında hatta lökositlerin mikro çevrelerinde bilinen bütün reaktif oksijen ve nitrojen oksit radikallerinin yapımına olanak sağlarlar. Lökositler tarafından oluşturulan reaktif türlerin ve salınan hidrolitik etkili enzimin primer hedefi sadece patojenler değildir. Reaktif türlerin seçici etkileri olmadığından, bu reaktif türler enflamasyon veya travma bölgesindeki konakçının normal biyomolekülleri ile de tepkimeye girebilirler. Bu nedenle enflamasyonun şiddetine de bağlı olmak üzere konakçının biyomolekülleri de hasar görür. Bu hasarlara örnek olarak amino asit ve nükleobazların nitrasyonu, oksidasyonu, DNA baz modifikasyonları, lipid peroksidasyonunda artış, antioksidanların tüketimi örnek verilebilir. Bu değişimlerin izlenmesi, örneğin kişiden alınabilen biyolojik örneklerde yukarıda belirtilen parametrelerin tayini, oksidatif ve nitrozatif stres konusunda bilgi verir (11,49-51,53,100,102).

Literatürde bildirilen çeşitli araştırmalarda çeşitli hemoproteinlerin (hemoglobin, miyoglobin, laktoperoksidaz, tükürük peroksidazı, miyeloperoksidaz) tirozin amino asitinin oksidasyonuna, ditirozin oluşumuna ve nitrit varlığında ise tirozin nitrasyonuna neden oldukları gösterilmiştir.

Bir kaos ortamı olan fagozom içinde ve aktive olan lökositlerin biriktiği ortamda, gözlenen tepkimelerden biri de nitrasyon tepkimesidir. Proteinlerdeki tirozin amino asitinin yan zinciri ile nükleobazlardan guanin nitrasyona uğradıkları bilinen moleküllerdir. Hücre sel koşullarda nitrasyon ajanı olarak bilinen başlıca reaktif türler peroksinitrit (ONOOH), nitril klorür (NO₂Cl), nitrojen dioksit radikali (NO₂•) ile nitronyum iyonudur (NO₂⁺). Bu reaktif türler lökositler tarafından oluşturulabilmektedir. Nitrasyon tepkimelerinde hız kısıtlayıcı basamaklar bu

radikaller ile tirozil radikalinin oluşumudur. Bu radikaller tirozil radikali ile radikal-radikal tepkimesi sonucu nitrasyonu gerçekleştirirler.

Bu çalışmada, saflaştırılan MPO tarafından tirozinin nitrasyonu koşulları araştırılmıştır. Tirozin nitrasyonunun pH bağımlılığı incelendiğinde, nitrit oksidasyonu ve tirozin nitrasyonu arasında tam bir paralellik görüldü. MPO bağımlı nitrit oksidasyonunun görüldüğü pH aralığında (pH:4-6.5) tirozin nitrasyonu da etkili olarak gerçekleşmektedir (Şekil 4.16 ve 4.18). Ancak nitrasyon için optimum pH daha yüksek olup 6.5'dir.

MPO tarafından serbest tirozin amino asitinin nitrasyonu hızı, ortamın H_2O_2 , nitrit ve tirozin konsantrasyonuna bağımlıdır ve nitrasyon derecesi zamana bağlı olarak ilerler (Şekil 4.19-4.22). MPO enziminin tirozin nitrasyonu aktivitesinin kinetik sabitlerini belirlemek için diğer substrat konsantrasyonları sabit tutularak (1 mM nitrit, 1 mM H_2O_2) farklı L-tirozin konsantrasyonlarında nitrotirozin oluşumu incelendiğinde, enzimin tirozin amino asiti için V_{max} değeri 1.845 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein ve K_m değeri 0.72 mM olarak hesaplandı (Şekil 4.23.).

Tirozin nitrasyonu, radikal özelliğindeki kimyasal türler arasında gerçekleşen bir tepkimedir. Bu özellik nedeniyle radikalleri indirgeyici ya da radikallere afinitesi yüksek olan bileşiklerin çalıştığımız sistemde tirozin nitrasyonunu inhibe etmeleri beklenir. İndirgenmiş glutatyon ve askorbik asit radikallere elektron transfer afinitesi yüksek olan iki hücrel antioksidandır.

Çalışmamızda, tirozin nitrasyonunun çalışıldığı ortama eklenen askorbik asitin, doz bağımlı olarak nitrotirozin oluşumunu inhibe ettiği görüldü (Şekil 4.23). İnhibitor olarak kullanılan askorbik asit konsantrasyonunun logaritmasına karşı nitrasyon hızı grafiğinde, inhibitörün yarı maksimum inhibisyon konsantrasyonu (IC_{50} değeri) 533.9 \pm 35 μM olarak belirlendi (Şekil 4.24). Nitrotirozin oluşumunun askorbat tarafından inhibisyonunun tipini belirlemek amacıyla farklı askorbik asit derişimlerinde yapılan kinetik çalışmada, artan inhibitör konsantrasyonuna karşı azalan V_{max} ve artan K_m değerleri ve grafiğin biçimi dikkate alınarak inhibisyon tipi kısmi non kompetitif inhibisyon olarak belirlendi (Şekil 4.25).

Tirozin nitrasyonuna glutatyonun etkisi de, askorbik asite benzer şekilde çalışıldı. Glutatyon ile kıyaslandığında, GSH tirozin nitrasyonunu daha düşük konsantrasyonda % 50 oranında inhibe etmektedir (IC_{50} değeri 300.4 μM). Tirozin

nitrasyonunun çalışıldığı ortamda, glutatyonun da zamana bağlı olarak azaldığı görüldü (Şekil 4.26, 4.27). Kinetik çalışmaların grafiği ve yapılan hesaplamalar GSH inhibisyonunun lineer karışık tip inhibisyon olduğunu göstermektedir. Karışık tip inhibisyon, nitrasyonun hem askorbik asit, hem de GSH tarafından inhibisyonunda beklenen bir sonuç olmalıdır. Çünkü her iki antioksidan molekül sadece MPO'nun aktif merkezindeki oksoferril kompleksini değil; ayrıca tepkime sırasında oluşan tirozil radikali ve nitrojen dioksit radikali ile tepkimeye gireceklerdir. Bu nedenle inhibisyon tipinin klasik kompetitif veya nonkompetitif/unkompetitif inhibisyon tiplerinden birine uyması beklenemez.

MPO bağımlı tirozin nitrasyonu oksidatif ve nitrozatif stres durumlarında artmaktadır. Serbest tirozin amino asitinin nitrasyonu ve nitrasyonu etkileyen bazı faktörler bu tezde incelenmiş ve etkileri araştırılmıştır. Bu etkenlerin proteinlerde ve lipoproteinlerde tirozin nitrasyonu ile DNA'daki guanin nitrasyonunu nasıl etkilediğinin ve nitrasyonun bu makromoleküllerin fonksiyonunu nasıl etkilediğinin araştırılması çalışmanın devamı olarak planlanmaktadır. Özellikle lipoproteinlerde tirozin nitrasyonu ve monosit MPO'sunun bu olayda ve aterosklerotik plakların oluşumundaki rolünün incelenmesi öncelikli konudur.

KAYNAKLAR

1. Obinger, C. (2006) Chemistry and biology of human peroxidases. *Arch Biochem Biophys*, 445 (2), 197-198.
2. Wang, J.G., Mahmud, S.A., Thompson, J.A., Geng, J.G., Key, N.S., Slungaard, A. (2006) The principal eosinophil peroxidase product, HOCl, is a uniquely potent phagocyte oxidant inducer of endothelial cell tissue factor activity: a potential mechanism for thrombosis in eosinophilic inflammatory states. *Blood*, 107 (2), 558-565.
3. Johannes Everse, M.B.G., Kathleen E. Everse,. (1991). Peroxidases in Chemistry and Biology (c. 1): CRC Press.
4. Olsen R. L., L., C.. (1984) Studies on the subunits of human myeloperoxidase. *Biochem. J.*, 222, 701-709.
5. Carreras, M.C., Pargament, G. A., Catz, S. D., Poderoso, J. J., Boveris, A. (1994) Kinetics of nitric oxide and hydrogen peroxide production and formation of peroxynitrite during the respiratory burst of human neutrophils. *FEBS Lett.*, 341, 65-68.
6. Edwards, S.W., Swan, T.F. (1986) Regulation of superoxide generation by myeloperoxidase during the respiratory burst of human neutrophils. *Biochem. J.*, 237, 601-604.
7. Kılınç, K., Kılınç, A. (2003). *Nitrik Oksit*. Ankara, Türkiye: Palme Yayıncılık.
8. Jason P. Eiserich, Milena Hristova, Carroll E. Cross, A. Daniel Jones, Bruce A. Freeman, Barry Halliwell ve diğerleri. (1998) Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *NATURE*, 391, 393-397.
9. Jamshad Khan, K. Richard BIUCM, Michael Jacobs. (1997) 3-Nitrotyrosine in human serum albumin and low density lipoproteins. *Biochem Soc. T.*, 25, 394S.
10. Jingsheng Tuo, Li Liu, Henrik E. Poulsen, Allan Weimann, Ove Svendsen, Steffen Loft. (2000) Importance of guanine nitration and hydroxylation in DNA in vitro and in vivo. *Free Radical Bio. Med.*, 29 (2), 147-155.
11. Ischiropoulos, H. (2003) Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration. *Biochem. Biophys. Res. Co.*, 305, 776-783.
12. Viner, R.I., Ferrington, D.A., Williams, T.D., Bigelow, D.J., Schoneich, C. (1999) Protein modification during biological aging: selective tyrosine nitration of the SERCA2a isoform of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in skeletal muscle. *Biochem J*, 340 (Pt 3), 657-669.
13. Greenacre, S.A., Ischiropoulos, H. (2001) Tyrosine nitration: localisation, quantification, consequences for protein function and signal transduction. *Free Radic. Res.*, 34, 541-581.
14. José M. Souza, Gonzalo Peluffo, Rafael Radi. (2008) Protein tyrosine nitration—Functional alteration or just a biomarker? *Free Radical Bio. Med.*, 45, 357-366.
15. Furtmuller, P.G., Zederbauer, M., Jantschko, W., Helm, J., Bogner, M., Jakopitsch, C. ve diğerleri. (2006) Active site structure and catalytic mechanisms of human peroxidases. *Arch Biochem Biophys*, 445 (2), 199-213.

16. Ueda, T., Sakamaki, K., Kuroki, T., Yano, I., Nagata, S. (1997) Molecular cloning and characterization of the chromosomal gene for human lactoperoxidase. *Eur J Biochem*, 243 (1-2), 32-41.
17. Ihalin, R., Loimaranta, V., Tenonuo, J. (2006) Origin, structure, and biological activities of peroxidases in human saliva. *Arch Biochem Biophys*, 445 (2), 261-268.
18. Ruf, J., Carayon, P. (2006) Structural and functional aspects of thyroid peroxidase. *Arch Biochem Biophys*, 445 (2), 269-277.
19. Davies, M.J. (2011) Myeloperoxidase-derived oxidation: mechanisms of biological damage and its prevention. *J Clin Biochem Nutr*, 48 (1), 8-19.
20. Nauseef, W.M. (1988) Myeloperoxidase deficiency. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2 (1), 135-158.
21. Johnson, K.R., Nauseef, W.M., Care, A., Wheelock, M.J., Shane, S., Hudson, S. ve diğeri. (1987) Characterization of cDNA clones for human myeloperoxidase: predicted amino acid sequence and evidence for multiple mRNA species. *Nucleic Acids Res*, 15 (5), 2013-2028.
22. Gullberg, U., Bengtsson, N., Bulow, E., Garwicz, D., Lindmark, A., Olsson, I. (1999) Processing and targeting of granule proteins in human neutrophils. *J Immunol Methods*, 232 (1-2), 201-210.
23. Cowland, J.B., Borregaard, N. (1999) The individual regulation of granule protein mRNA levels during neutrophil maturation explains the heterogeneity of neutrophil granules. *J Leukoc Biol*, 66 (6), 989-995.
24. Yang, J.J., Pendergraft, W.F., Alcorta, D.A., Nachman, P.H., Hogan, S.L., Thomas, R.P. ve diğeri. (2004) Circumvention of normal constraints on granule protein gene expression in peripheral blood neutrophils and monocytes of patients with antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*, 15 (8), 2103-2114.
25. Piedrafita, F.J., Molander, R.B., Vansant, G., Orlova, E.A., Pfahl, M., Reynolds, W.F. (1996) An Alu element in the myeloperoxidase promoter contains a composite SP1-thyroid hormone-retinoic acid response element. *J Biol Chem*, 271 (24), 14412-14420.
26. Kumar, A.P., Piedrafita, F.J., Reynolds, W.F. (2004) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands regulate myeloperoxidase expression in macrophages by an estrogen-dependent mechanism involving the -463GA promoter polymorphism. *J Biol Chem*, 279 (9), 8300-8315.
27. Yamada, M. (1982) Myeloperoxidase precursors in human myeloid leukemia HL-60 cells. *J Biol Chem*, 257 (11), 5980-5982.
28. Hansson, M., Olsson, I., Nauseef, W.M. (2006) Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. *Arch Biochem Biophys*, 445 (2), 214-224.
29. Helenius, A., Trombetta, E.S., Hebert, D.N., Simons, J.F. (1997) Calnexin, calreticulin and the folding of glycoproteins. *Trends Cell Biol.*, 7 (5), 193-200.
30. Nauseef, W.M., Mc Cormick, S.J., Goedken, M. (1998) Coordinated participation of calreticulin and calnexin in the biosynthesis of myeloperoxidase. *J Biol Chem*, 273 (12), 7107-7111.
31. DePillis, G.D., Ozaki, S., Kuo, J.M., Maltby, D.A., Ortiz de Montellano, P.R. (1997) Autocatalytic processing of heme by lactoperoxidase produces the native protein-bound prosthetic group. *J Biol Chem*, 272 (14), 8857-8860.

32. Colas, C., Ortiz de Montellano, P.R. (2003) Autocatalytic radical reactions in physiological prosthetic heme modification. *Chem Rev*, 103 (6), 2305-2332.
33. Bolscher, B.G., Plat, H., Wever, R. (1984) Some properties of human eosinophil peroxidase, a comparison with other peroxidases. *Biochim Biophys Acta*, 784 (2-3), 177-186.
34. Koeffler, H.P., Ranyard, J., Pertcheck, M. (1985) Myeloperoxidase: its structure and expression during myeloid differentiation. *Blood*, 65 (2), 484-491.
35. Akin, D.T., Kinkade, J.M., Jr. (1986) Processing of a newly identified intermediate of human myeloperoxidase in isolated granules occurs at neutral pH. *J Biol Chem*, 261 (18), 8370-8375.
36. Fiedler, T.J., Davey, C.A., Fenna, R.E. (2000) X-ray crystal structure and characterization of halide-binding sites of human myeloperoxidase at 1.8 Å resolution. *J Biol Chem*, 275 (16), 11964-11971.
37. Ihrke, G., Kytala, A., Russell, M.R., Rous, B.A., Luzio, J.P. (2004) Differential use of two AP-3-mediated pathways by lysosomal membrane proteins. *Traffic*, 5 (12), 946-962.
38. Booth, K.S., Kimura, S., Lee, H.C., Ikeda-Saito, M., Caughey, W.S. (1989) Bovine myeloperoxidase and lactoperoxidase each contain a high affinity site for calcium. *Biochem Biophys Res Commun*, 160 (2), 897-902.
39. Martina Zederbauer, Paul G. Furtmüller, Silvia Brogioni, Christa Jakopitsch, Giulietta Smulevich, Christian Obinger. (2007) Heme to protein linkages in mammalian peroxidases: impact on spectroscopic, redox and catalytic properties. *Nat. Prod. Rep.*, 24, 571-584.
40. Dunford, H.B. (1999). Heme Peroxidases (1 bs.): John Wiley.
41. Smith, A.T., Veitch, N.C. (1998) Substrate binding and catalysis in heme peroxidases. *Curr Opin Chem Biol*, 2 (2), 269-278.
42. Poulos, T.L., Kraut, J. (1980) The stereochemistry of peroxidase catalysis. *J Biol Chem*, 255 (17), 8199-8205.
43. Battistuzzi, G., Bellei, M., Bortolotti, C.A., Sola, M. (2010) Redox properties of heme peroxidases. *Arch Biochem Biophys*, 500 (1), 21-36.
44. Furtmuller, P.G., Burner, U., Obinger, C. (1998) Reaction of myeloperoxidase compound I with chloride, bromide, iodide, and thiocyanate. *Biochemistry*, 37 (51), 17923-17930.
45. J. Arnhold. (2004) Properties, Functions, and Secretion of Human Myeloperoxidase. *Biochemistry (Moscow)*, 69 (1), 4-9.
46. Klebanoff, S.J. (2005) Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol*, 77 (5), 598-625.
47. Whittenbury, R. (1964) Hydrogen Peroxide Formation and Catalase Activity in the Lactic Acid Bacteria. *J Gen Microbiol*, 35, 13-26.
48. Gupta, K., Stapleton, A.E., Hooton, T.M., Roberts, P.L., Fennell, C.L., Stamm, W.E. (1998) Inverse association of H₂O₂-producing lactobacilli and vaginal *Escherichia coli* colonization in women with recurrent urinary tract infections. *J Infect Dis*, 178 (2), 446-450.
49. Burner, U., Furtmuller, P.G., Kettle, A.J., Koppenol, W.H., Obinger, C. (2000) Mechanism of reaction of myeloperoxidase with nitrite. *Journal of Biological Chemistry*, 275 (27), 20597-20601.

50. Cooper, C.E., Odell, E. (1992) Interaction of human myeloperoxidase with nitrite. *FEBS Lett*, 314 (1), 58-60.
51. Heinecke, J.W., Li, W., Francis, G.A., Goldstein, J.A. (1993) Tyrosyl radical generated by myeloperoxidase catalyzes the oxidative cross-linking of proteins. *J Clin Invest*, 91 (6), 2866-2872.
52. Jacob, J.S., Cistola, D.P., Hsu, F.F., Muzaffar, S., Mueller, D.M., Hazen, S.L. ve diğeri. (1996) Human phagocytes employ the myeloperoxidase-hydrogen peroxide system to synthesize dityrosine, trityrosine, pulcherosine, and isodityrosine by a tyrosyl radical-dependent pathway. *J Biol Chem*, 271 (33), 19950-19956.
53. Hataishi, R., Kobayashi, H., Takahashi, Y., Hirano, S., Zapol, W.M., Jones, R.C. (2002) Myeloperoxidase-associated tyrosine nitration after intratracheal administration of lipopolysaccharide in rats. *Anesthesiology*, 97 (4), 887-895.
54. Muller, W.A. (2002) Leukocyte-Endothelial Cell Interactions in the Inflammatory Response. *Lab Invest* 82, 521-533.
55. Taylor, K.R., Gallo, R.L. (2006) Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. *FASEB J.* , 20 (1), 9-22.
56. Arnhold, J., Flemmig, J. (2010) Human myeloperoxidase in innate and acquired immunity. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 500, 92-106.
57. Murata, K. (1974) Acidic glycosaminoglycans in human platelets and leukocytes: the isolation and enzymatic characterization of chondroitin 4-sulfate. *Clin Chim Acta.* , 57 (2), 115-124.
58. Kolset, S.O., Gallagher, J.T. (1990 Dec 11) Proteoglycans in haemopoietic cells. *Biochim Biophys Acta.*, 1032 ((2-3)), 191-211.
59. B., S., MS., K. (1982 Nov 22) Internal pH of human neutrophil lysosomes. *FEBS Lett.* , 149 (1), 113-116.
60. Segal, A.W. (2005) How neutrophils kill microbes. *Annu. Rev. Immunol.*, 23, 197-223.
61. Segal, A.W., Geisow, M., Garcia, R., Harper, A., Miller, R. (1981 Apr 2) The respiratory burst of phagocytic cells is associated with a rise in vacuolar pH. *Nature*, 290 (5805), 406-409.
62. Cech, P., Lehrer, R. (1984) Phagolysosomal pH of human neutrophils. *Blood*, 63 (1), 88-95.
63. Yamamoto, K., Miyoshi-Koshio, T., Utsuki, Y., Mizuno, S., Suzuki, K. (1991) Virucidal activity and viral protein modification by myeloperoxidase: a candidate for defense factor of human polymorphonuclear leukocytes against influenza virus infection. *J Infect Dis.* , 164 (1), 8-14.
64. Aratani, Y., Koyama, H., Nyui, S., Suzuki, K., Kura, F., Maeda, N. (1999) Severe impairment in early host defense against *Candida albicans* in mice deficient in myeloperoxidase. *Infect Immun.* , 67 (4), 1828-1836.
65. Tiruppathi, C., Naqvi, T., Wu, Y., Vogel, S.M., Minshall, R.D., Malik, A.B. (2004) Albumin mediates the transcytosis of myeloperoxidase by means of caveolae in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* , 101 (20), 7699-7704.
66. Salavej, P., Spalteholz, H., Arnhold, J. (2006) Modification of amino acid residues in human serum albumin by myeloperoxidase. *Free Radic Biol Med.* , 40 (3), 516-525.

67. Baldus, S., Eiserich, J.P., Mani, A., Castro, L., Figueroa, M., Chumley, P. ve diğeri. (2001) Endothelial transcytosis of myeloperoxidase confers specificity to vascular ECM proteins as targets of tyrosine nitration. *J Clin Invest.* , 108 (12), 1759-1770.
68. Baldus, S., Eiserich, J.P., Brennan, M.L., Jackson, R.M., Alexander, C.B., Freeman, B.A. (2002) Spatial mapping of pulmonary and vascular nitrotyrosine reveals the pivotal role of myeloperoxidase as a catalyst for tyrosine nitration in inflammatory diseases. *Free Radic Biol Med.*, 33 (7), 1010.
69. Cuzzocrea, S., Costantino, G., Mazzon, E., Caputi, A.P. (1999) Protective effect of N-acetylcysteine on multiple organ failure induced by zymosan in the rat. *Crit Care Med.* , 27 (8), 1524-1532.
70. A. Van Der Vliet, V. M. Nguyen, M. K. Shigenaga, J. P. Eiserich, G. P. Marelich, C. E. Cross. (2000) Myeloperoxidase and protein oxidation in cystic fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000 Sep;279(3):L537-46., 279 (3), L537-546.
71. Matheson, N.R., Wong, P.S., Travis, J. (1981) Isolation and properties of human neutrophil myeloperoxidase. *Biochemistry*, 20 (2), 325-330.
72. Bouriche, H., Salavei, P., Lessig, J., Arnhold, J. (2007) Differential effects of flavonols on inactivation of alpha1-antitrypsin induced by hypohalous acids and the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-halide system. *Arch Biochem Biophys*, 459 (1), 137-142.
73. Zheng, L., Nukuna, B., Brennan, M.L., Sun, M., Goormastic, M., Settle, M. ve diğeri. (2004) Apolipoprotein A-I is a selective target for myeloperoxidase-catalyzed oxidation and functional impairment in subjects with cardiovascular disease. *J Clin Invest*, 114 (4), 529-541.
74. Carr, A.C., Myzak, M.C., Stocker, R., McCall, M.R., Frei, B. (2000) Myeloperoxidase binds to low-density lipoprotein: potential implications for atherosclerosis. *FEBS Lett*, 487 (2), 176-180.
75. Eiserich, J.P., Baldus, S., Brennan, M.L., Ma, W., Zhang, C., Tousson, A. ve diğeri. (2002) Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular NO oxidase. *Science*, 296 (5577), 2391-2394.
76. Govorova, N., Sharonov, B.P., Lyzlova, S.N. (1989) [Erythrocyte oxidative damage by myeloperoxidase. The protective action of serum proteins]. *Biull Eksp Biol Med*, 107 (4), 428-430.
77. Malle, E., Marsche, G., Panzenboeck, U., Sattler, W. (2006) Myeloperoxidase-mediated oxidation of high-density lipoproteins: fingerprints of newly recognized potential proatherogenic lipoproteins. *Arch Biochem Biophys*, 445 (2), 245-255.
78. Daugherty, A. , Dunn, J. L. , Rateri, D. L., Heinecke, J.W. (1994) Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest*, 94 (1), 437-444.
79. Green, P.S., Mendez, A.J., Jacob, J.S., Crowley, J.R., Growdon, W., Hyman, B.T. ve diğeri. (2004) Neuronal expression of myeloperoxidase is increased in Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 90 (3), 724-733.
80. Choi, D.K., Pennathur, S., Perier, C., Tieu, K., Teismann, P., Wu, D.C. ve diğeri. (2005) Ablation of the inflammatory enzyme myeloperoxidase

- mitigates features of Parkinson's disease in mice. *J Neurosci*, 25 (28), 6594-6600.
81. Schiller, J., Arnhold, J., Sonntag, K., Arnold, K. (1996) NMR studies on human, pathologically changed synovial fluids: role of hypochlorous acid. *Magn Reson Med*, 35 (6), 848-853.
 82. Malle, E., Woenckhaus, C., Waeg, G., Esterbauer, H., Grone, E.F., Grone, H.J. (1997) Immunological evidence for hypochlorite-modified proteins in human kidney. *Am J Pathol*, 150 (2), 603-615.
 83. Malle, E., Buch, T., Grone, H.J. (2003) Myeloperoxidase in kidney disease. *Kidney Int*, 64 (6), 1956-1967.
 84. Hanumegowda, U.M., Copple, B.L., Shibuya, M., Malle, E., Ganey, P.E., Roth, R.A. (2003) Basement membrane and matrix metalloproteinases in monocrotaline-induced liver injury. *Toxicol Sci*, 76 (1), 237-246.
 85. Zhang, R., Brennan, M.L., Fu, X., Aviles, R.J., Pearce, G.L., Penn, M.S. ve diğeri. (2001) Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease. *JAMA*, 286 (17), 2136-2142.
 86. Kettle, A.J. (1996) Neutrophils convert tyrosyl residues in albumin to chlorotyrosine. *FEBS Lett*, 379 (1), 103-106.
 87. Pattison, D.I., Davies, M.J. (2001) Absolute rate constants for the reaction of hypochlorous acid with protein side chains and peptide bonds. *Chem Res Toxicol*, 14 (10), 1453-1464.
 88. Bergt, C., Pennathur, S., Fu, X., Byun, J., O'Brien, K., McDonald, T.O. ve diğeri. (2004) The myeloperoxidase product hypochlorous acid oxidizes HDL in the human artery wall and impairs ABCA1-dependent cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (35), 13032-13037.
 89. Malle, E., Waeg, G., Schreiber, R., Grone, E.F., Sattler, W., Grone, H.J. (2000) Immunohistochemical evidence for the myeloperoxidase/H₂O₂/halide system in human atherosclerotic lesions: colocalization of myeloperoxidase and hypochlorite-modified proteins. *Eur J Biochem*, 267 (14), 4495-4503.
 90. Wang, Z., Nicholls, S.J., Rodriguez, E.R., Kummu, O., Horkko, S., Barnard, J. ve diğeri. (2007) Protein carbamylation links inflammation, smoking, uremia and atherogenesis. *Nat Med*, 13 (10), 1176-1184.
 91. Ischiropoulos, H., Beckman, J.S. (2003) Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect, or association? *J Clin Invest*, 111 (2), 163-169.
 92. Schopfer, F.J., Baker, P.R., Freeman, B.A. (2003) NO-dependent protein nitration: a cell signaling event or an oxidative inflammatory response? *Trends Biochem Sci*, 28 (12), 646-654.
 93. Evans, T.J., Buttery, L.D., Carpenter, A., Springall, D.R., Polak, J.M., Cohen, J. (1996) Cytokine-treated human neutrophils contain inducible nitric oxide synthase that produces nitration of ingested bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93 (18), 9553-9558.
 94. Kumar, A.P., Ryan, C., Cordy, V., Reynolds, W.F. (2005) Inducible nitric oxide synthase expression is inhibited by myeloperoxidase. *Nitric Oxide*, 13 (1), 42-53.
 95. Roger K. Schindhelm, Leonard P. van der Zwan, Tom Teerlink, Peter G. Scheffer. (2009) Myeloperoxidase: A Useful Biomarker for Cardiovascular Disease Risk Stratification? *Clin. Chem.*, 55 (8), 1462-1470.

96. Marie - Luise Brennan, Marc S. Penn, Frederick Van Lente, Vijay Nambi, Mehdi H. Shishehbor, Ronnier J. Aviles ve diğerleri. (2003) Prognostic Value of Myeloperoxidase in Patients with Chest Pain. *n engl j med*, 349 (17).
97. Güliz N. Güncü, Tolga F. Tözüm, M. Barış Güncü, Nermin Yamalik, Celal Tümer, Erdem Karabulut ve diğerleri. (2008) Myeloperoxidase as a Measure of Polymorphonuclear Leukocyte Response in Inflammatory Status Around Immediately and Delayed Loaded Dental Implants: A Randomized Controlled Clinical Trial. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 10 (1), 30-39.
98. Daniela Gonçalves, Fernanda Oliveira Bello Correa, Najeh Maissar Khalil, Olga Maria Mascarenhas de Faria Oliveira, Silvana Regina Perez Orrico. (2008) The effect of non-surgical periodontal therapy on peroxidase activity in diabetic patients: a case-control pilot study. *J Clin Periodontol*, 35, 799-806.
99. Heinecke, J.W. (2002) Tyrosyl radical production by myeloperoxidase: a phagocyte pathway for lipid peroxidation and dityrosine cross-linking of proteins. *Toxicology*, 177 (1), 11-22.
100. Souza, J.M., Daikhin, E., Yudkoff, M., Raman, C.S., Ischiropoulos, H. (1999) Factors determining the selectivity of protein tyrosine nitration. *Arch. Biochem. Biophys.*, 371 (2), 169-178.
101. Ischiropoulos, H. (2003) Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration. *Biochem. Biophys. Res. Co.*, 305 (3), 776-783.
102. Nicolas Abello, Huib A. M. Kerstjens, Dirkje S. Postma, Rainer Bischoff. (2009) Protein Tyrosine Nitration: Selectivity, Physicochemical and Biological Consequences, Denitration, and Proteomics Methods for the Identification of Tyrosine-Nitrated Proteins. *J. Proteome Res.*, 8 (7), 3222-3238.
103. Heijnen, H.F., van Donselaar, E., Slot, J.W., Fries, D.M., Blachard-Fillion, B., Hodara, R. ve diğerleri. (2006) Subcellular localization of tyrosine-nitrated proteins is dictated by reactive oxygen species generating enzymes and by proximity to nitric oxide synthase. *Free Radic Biol Med.*, 40 (11), 1903-1913.
104. Radi, R., Cassina, A., Hodara, R., Quijano, C., Castro, L. (2002) Peroxy nitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.*, 22 (11), 1451-1464.
105. Beckman, J.S., Ischiropoulos, H., Zhu, L., van der Woerd, M., Smith, C., Chen, J. ve diğerleri. (1992) Kinetics of superoxide dismutase- and iron-catalyzed nitration of phenolics by peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.*, 292 (2), 438-445.
106. MacMillan-Crow, L.A., Crow, J.P., Kerby, J.D., Beckman, J. S., Thompson, J.A. (1996) Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 93 (21), 11853-11858.
107. Cassina, A.M., Hodara, R., Souza, J.M., Thomson, L., Castro, L., Ischiropoulos, H. ve diğerleri. (2000) Cytochrome c nitration by peroxynitrite. *J. Biol. Chem.*, 275 (28), 21409-21415.
108. Balafanova, Z., Bolli, R., Zhang, J., Zheng, Y., Pass, J.M., Bhatnagar, A. ve diğerleri. (2002) Nitric oxide (NO) induces nitration of protein kinase Cepsilon (PKCepsilon), facilitating PKCepsilon translocation via enhanced PKCepsilon-RACK2 interactions: a novel mechanism of no-triggered activation of PKCepsilon. *J. Biol. Chem.*, 277 (17), 15021-15027.

109. Vadseth, C., Souza, J.M., Thomson, L., Seagraves, A., Nagaswami, C., Scheiner, T. ve diğerleri. (2004) Pro-thrombotic state induced by posttranslational modification of fibrinogen by reactive nitrogen species. *J. Biol. Chem.*, 279 (10), 8820-8826.
110. Creighton, T.E. (1993). *Proteins: Structures and Molecular Properties*. New York: W.H. Freeman and Company, .
111. Gow, A.J., Duran, D., Malcolm, S., Ischiropoulos, H. (1996) Effects of peroxynitrite induced protein modifications on tyrosine phosphorylation and degradation. *FEBS Lett.* , 385 (1), 63-66.
112. Kong, S.K., Yim, M.B., Stadtman, E.R., Chock, P.B. (1996) Peroxynitrite disables the tyrosine phosphorylation regulatory mechanism: Lymphocyte-specific tyrosine kinase fails to phosphorylate nitrated cdc2(6-20)NH₂ peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* , 93 (8), 3377-3382.
113. Ye, Y.Z., Strong, M., Huang, Z.Q., Beckman, J.S. (1996) Antibodies that recognize nitrotyrosine. *Methods Enzymol.* , 269, 201-209.
114. Thomson, L., Christie, J., Vadseth, C., Lanken, P.N., Fu, X., Hazen, S.L. ve diğerleri. (2007) Identification of immunoglobulins that recognize 3-nitrotyrosine in patients with acute lung injury after major trauma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* , 36 (2), 152-152.
115. Birnboim, H.C., Lemay, A.M., Lam, D.K., Goldstein, R., Webb, J.R. (2003) Cutting edge: MHC class II-restricted peptides containing the inflammation-associated marker 3-nitrotyrosine evade central tolerance and elicit a robust cell-mediated immune response. *J. Immunol.* , 171 (2), 528-532.
116. Herzog, J., Maekawa, Y., Cirrito, T.P., Illian, B.S., Unanue, E.R. (2005) Activated antigenpresenting cells select and present chemically modified peptides recognized by unique CD4 T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* , 102 (22), 7928-7933.
117. Shishehbor, M.H., Aviles, R.J., Brennan, M.L., Fu, X., Goormastic, M., Pearce, G.L. ve diğerleri. (2003) Association of nitrotyrosine levels with cardiovascular disease and modulation by statin therapy. *JAMA* 289 (13), 1675-1680.
118. Brennan, M.L., Wu, W., Fu, X., Shen, Z., Song, W., Frost, H. ve diğerleri. (2002) A tale of two controversies: defining both the role of peroxidases in nitrotyrosine formation in vivo using eosinophil peroxidase and myeloperoxidase-deficient mice, and the nature of peroxidase-generated reactive nitrogen species. *J. Biol. Chem.*, 277 (20), 17415-17427.
119. Leeuwenburgh, C., Hardy, M.M., Hazen, S.L., Wagner, P., Oh-ishi, S., Steinbrecher, U.P. ve diğerleri. (1997) Reactive nitrogen intermediates promote low density lipoprotein oxidation in human atherosclerotic intima. *J. Biol. Chem.*, 272 (3), 1433-1436.
120. Shishehbor, M.H., Aviles, R.J., Brennan, M.L., Fu, X., Goormastic, M., Pearce, G.L. ve diğerleri. (2003) Association of nitrotyrosine levels with cardiovascular disease and modulation by statin therapy. *JAMA*, 289 (13), 1675-1680.
121. Zheng, L., Nukuna, B., Brennan, M.L., Sun, M., Goormastic, M., Settle, M. ve diğerleri. (2004) Apolipoprotein A-I is a selective target for myeloperoxidase-catalyzed oxidation and functional impairment in subjects with cardiovascular disease. *J. Clin. Invest.* , 114 (4), 529-541.

122. Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254.
123. Suzuki, K., Ota, H., Sasagawa, S., Sakatani, T., Fujikura, T. (1983) Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Anal Biochem*, 132 (2), 345-352.
124. Demirpençe, E., Köksoy, C., Kuzu, A., Kılınç, K. (1997) A spectrophotometric assay for tissue-associated myeloperoxidase activity and its application to intestinal ischemia-reperfusion. *Turk. J. Med. Sci.*, 27 197-200.
125. Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R. (1982) Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*, 126 (1), 131-138.
126. Wishnok, J.S., Glogowski, J.A., Tannenbaum, S.R. (1996) Quantitation of nitrate, nitrite, and nitrosating agents. *Methods Enzymol*, 268, 130-141.
127. Crow, J.P., Ischiropoulos, H. (1996) Detection and quantitation of nitrotyrosine residues in proteins: in vivo marker of peroxynitrite. *Methods Enzymol*, 269, 185-194.
128. Arda Alden Green, W.L.H. (1955) Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents. *Methods in Enzymology*, 1, 67-90.
129. Goldstein, I. J., Liener, I. E., Sharon, N. (1986). *The Lectins Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine* (1 bs.). UK: Academic Press Inc.(London) Ltd.
130. Romero, P.A., Sleno, B., Herscovics, A. (1994) Glycoprotein biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Partial purification of the alpha-1,6-mannosyltransferase that initiates outer chain synthesis. *Glycobiology*, 4 (2), 135-140.
131. Takahashi, S., Pollack, J., Seifter, S. (1974) Purification of gamma-glutamyltransferase of rat kidney by affinity chromatography using concanavalin A conjugated with sepharose 4B. *Biochim Biophys Acta*, 371 (1), 71-75.
132. Svensson, B.E., Domeij, K., Lindvall, S., Rydell, G. (1987) Peroxidase and peroxidase-oxidase activities of isolated human myeloperoxidases. *Biochem J*, 242 (3), 673-680.
133. Hope, H.R., Remsen, E.E., Lewis, C., Jr., Heuvelman, D.M., Walker, M.C., Jennings, M. ve diğerleri. (2000) Large-scale purification of myeloperoxidase from HL60 promyelocytic cells: characterization and comparison to human neutrophil myeloperoxidase. *Protein Expr Purif*, 18 (3), 269-276.
134. products, p.n. (2012). General Product Information, Ağ Sitesi : <http://www.myeloperoxidase.com/MPO/framedef.html>
135. Klebanoff, S.J. (1968) Myeloperoxidase -halide -hydrogen peroxide antibacterial system. *J Bacteriol*, 95 (6), 2131-2138.
136. Pember, S.O., Fuhrer-Krusi, S.M., Barnes, K.C., Kinkade, J.M.J. (1982) Isolation of three native forms of myeloperoxidase from human polymorphonuclear leukocytes. *FEBS Lett.*, 140 (1), 103-108.
137. Olsen, R.L., Little, C. (1983) Purification and some properties of myeloperoxidase and eosinophil peroxidase from human blood. *Biochem. J.*, 209 (3), 781-787.

138. Merrill, D.P. (1980) Purification of human myeloperoxidase by Concanavalin A-Sepharose affinity chromatography. *Prep Biochem*, 10 (2), 133-150.

EK-1 Etik Kurul Araştırma Projesi Değerlendirme Raporu



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

06100 Sıhhiye-Ankara
 Telefon: 0 (312) 305 1082 - Faks: 0 (312) 310 0580
 E-posta: goetik@hacettepe.edu.tr

03 Ocak 2013

Sayı: B.30.2.HAC.0.05.07.00 /13

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 12 ARALIK 2012 ÇARŞAMBA
Toplantı No : 2012/12
Proje No : LUT 12/143 (Değerlendirme Tarihi 28.11.2012)
Karar No : LUT 12/143 - 33

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, öğretim üyelerinden Prof. Dr. Kamer Kılınc'ın sorumlu araştırmacı olduğu Dr. Tülay Karaağaç ile birlikte çalışacakları Bahram Sarkarati'nin tezi olan LUT 12/143 kayıt numaralı ve "**Miyeloperoksidaz Enziminin Saflaştırılması ve Miyeloperoksidaz Tarafından Katalizlenen Tirozin Nitrasyonunun İncelenmesi**" başlıklı proje önerisi Kurulumuzda değerlendirilmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

- | | | | |
|---|--|--|--|
| 1. Prof. Dr. Nurten Akarsu (Başkan) | | 9 Prof. Dr. Songül Vaizoğlu (Üye) | |
| 2. Prof. Dr. Nüket Örnek Buken (Üye) | | 10. Prof. Dr. Melahat Görduysus (Üye) | |
| İZİNLİ | | | |
| 3. Prof. Dr. Hakan S. Orer (Üye) | | 11. Doç. Dr. R. Köksal Özgül (Üye) | |
| 4. Prof. Dr. Seyda F. Müftüoğlu (Üye) | | 12. Prof. Dr. Cansın Saçkesen (Üye) | |
| 5. Prof. Dr. Cenk Sökmensüer (Üye) | | 13 Doç. Dr. Ayşe Lale Doğan (Üye) | |
| 6. Prof. Dr. Kafiye Eroğlu (Üye) | | 14. Doç. Dr. S. Kutay Demirkan (Üye) | |
| İZİNLİ | | | |
| 7. Prof. Dr. Volga Bayrakçı Tunay (Üye) | | 15. Yrd. Doç. Dr. H. Hüsrev Turnagöl (Üye) | |
| GÖREVLİ | | | |
| 8. Prof. Dr. Yılmaz Selim Erdal (Üye) | | 16. Av. Meltem Onurlu (Üye) | |