

Orijinal Araştırma Makalesi**Paraoksonaz-1 Enziminin Bazı Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi ve Ghrelin Hormonu ile İlişkisi**

Investigation of the Some Kinetic Features of Paraoxonase-1 Enzyme and Its Relationship with Ghreline Hormone

Uğur Aşkın¹, Fikret Karataş¹, Yusuf Türköz², Süleyman Aydın³

¹Fırat Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü, Elazığ

²Inönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya AD, Malatya

³Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya AD, Elazığ

Özet

Bu çalışmada, sığır karaciğerinden saflaştırılan ve metabolizma için büyük öneme sahip olan Paraoksonaz-1 (E.C. 3.1.1.2. ve E.C. 3.1.8.1.) enziminin bazı kinetik özellikleri ile ghrelin hormonu arasındaki ilişki araştırıldı. Paraoksonaz-1 enziminin pH:7.1 ve 37 °C'de optimum aktivite gösterdiği saptandı. Substrat olarak fenil asetat kullanıldığında K_m değeri 0.074 ± 0.002 mM ve V_{max} değeri 36.42 U/mg olarak hesaplandı. Paraoksonaz-1 enziminin aktif ghrelin hormonuna etki ettiği ve aktif ghrelin hormonunu 20 dakika sonunda % 9.5 oranında inaktif ghreline dönüştürdüğü tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Paraoksonaz-1, Kinetik özellikler, Ghrelin, HPLC.

Abstract

In this study, some of the kinetic features of paraoxonase-1 (E.C. 3.1.1.2. and E.C. 3.1.8.1.) that is purified from bovine liver and has major importance for metabolism and, the relationship between paraoxonase-1 and ghrelin hormone has been investigated. It is seen that paraoxonase-1 displays optimum activity at pH: 7. 1 and 37 °C. When phenyl acetate is used as a substrate, it is calculated that K_m value was 0.074 ± 0.002 mM and V_{max} value was 36.42 U/mg. It is determined that paraoxonase-1 interacts with the active ghrelin and converts it into the inactive ghreline at the end of 20 minutes. The converting rate was found as 9.5 %.

Key Words: Paraoxonase-I, Kinetic features, Ghrelin, HPLC.

Giriş

Biyokimyasal olayları katalizleyerek, organizmalardaki canlılığı sağlayan enzimlerin kinetik özelliklerinin belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Metabolizmada önemli işlevleri olan bu enzimlerden biri de Paraoksonaz-1 (PON1) enzimidir. PON1 enzimi, serumda HDL'ye bağlı olup antioksidan özelliği ile okside LDL yapısındaki lipid peroksitleri hidrolizleyip lipoprotein oksidasyonunu önlemektedir. HDL'ye aynı zamanda ghrelin hormonunda bağlanmaktadır. PON1 enziminin ghrelini inaktif forma getirdiği düşünülmektedir. Bu bilgilerin ışığında, bu çalışmada sığır karaciğerinden kısmen saflaştırılmış PON1 enziminin, ghrelin hormonu ile ilişkisi incelenmiş ve bazı kinetik özellikleri (K_m , V_{max} , optimum pH ve sıcaklık gibi) araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem**Paraoksonaz-1 (PON1) Enzimi**

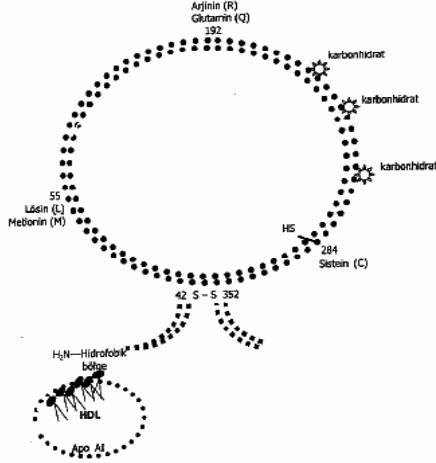
PON1 karaciğerde sentezlenen, 43-45 kilo-dalton moleküler ağırlıklı, 354 aminoasit içeren glikoprotein yapıda, Ca^{+2} bağımlı bir esteraz enzimidir (1,2). Paraoksonaz enzim aktivitesinin Ca^{+2} 'a bağımlı olma özelliği ile Co^{+2} , Mn^{+2} , Mg^{+2} kullanan diğer A esteraz tipi enzimlerden farklı olduğunu gösterir (3). PON1'in genetik yapısı, insanlar ve diğer populasyonlar arasında çok çeşitlilik gösterir.

Serumda HDL'ye bağlı olarak bulunur. İzoelektrik noktası 5,1'dir. Molekül ağırlığının % 15,8'ini oluşturan üç karbonhidrat zinciri içerir. PON1'in yapısındaki amino asitler içinde substrat tanınması ve bağlanması için gerekli olan serbest sisteinlerden 284'teki serbest iken, 42. ve 352. pozisyonundaki sisteinler arasında 1 tane disülfid bağı bulunur.

Serbest sistein substrat tanınması ve bağlanması için gereklidir. PON1'in, hidrofobik N-terminal bölgesi HDL lipidleriyle etkileşim için gereklidir. N-terminal hidrofobik bölge ile fosfolipidlere ve lipoproteinlere kolayca bağlanabilmektedir. PON1'i bağlayan HDL alt birimleri, Apolipoprotein AI (Apo AI) ve Apo J (klusterin) proteinlerini de içerdiğinden, Apo AI ve Apo J'nin bağlanmada rol oynayabileceği düşünülmektedir (4).

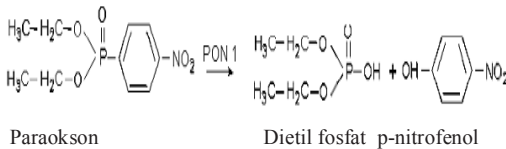
İnsan serum paraoksonaz enziminin iki genetik polimorfizmi bulunmaktadır. Bu iki polimorfizm 55. ve 192. pozisyonlardaki aminoasitlerin değişimi ile ortaya çıkar. Yüz doksan ikinci pozisyonundaki glutamin (Q aleli) arginin (R aleli) ile değişince birinci polimorfizm; 55. pozisyonundaki metionin (M aleli) lösin (L aleli) ile değişince ikinci polimorfizm oluşur. Yüz doksan ikinci pozisyonunda glutamin varlığında PON1 A Tipi; 192. pozisyonunda arginin varlığında ise, B Tipi

şeklinde ifade edilir. Ancak son zamanlarda A Tipi Q izoenzimi, B Tipi ise R izoenzimi, olarak ifade edilmektedir ve PON1'in hem Q hem de R izoenzimlerinin LDL'yi oksidasyona karşı koruma özelliğine sahip oldukları gösterilmiştir. Ancak Q izoenzimi paraoksone karşı düşük afiniteye sahip iken, R izoenzimi yüksek afiniteye sahiptir (5-8).



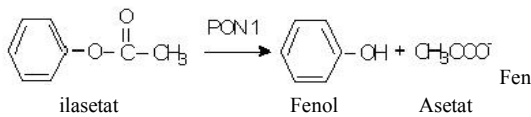
Şekil 1. PON1 enziminin yapısı (5).

Organofosfat bileşiklerinden parationun (parathion) aktif katabolik metaboliti olan paraokson (o,o-dietil-o-p-nitrofenil fosfat), enzime adına verdiği gibi, aktivite tayininde de en çok kullanılan substratlardan birisidir. Ayrıca aromatik karboksilli asit esterlerinden fenil asetat, enzimin arilesteraz aktivitesinin tayininde sıklıkla kullanılmaktadır. PON1'in hidrolitik aktivitesiyle açığa çıkan p-nitrofenol veya fenol konsantrasyonu spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile PON1 aktivitesi tayin edilebilmektedir (9, 10).



Şekil 2. PON1 enziminin paraoksonu hidrolizi (11).

PON1 aktivite stabilizasyonu için Ca^{+2} iyonuna gereksinim duymaktadır. Kalsiyum, doğrudan katalitik reaksiyonlarda yer alarak ya da aktif bölgenin uygun konformasyonda tutulmasını sağlayarak etkisini göstermektedir. Ayrıca paraoksonun P=O bağımlı da polarize ederek fosforun nükleofilik saldırıya yatkınlığını sağlar, böylece dietil fosfatın aktif alandan ayrılmasını kolaylaştırır (3).



Şekil 3. PON1 enziminin fenilasetatı hidrolizi (11)

PON1'in en iyi bilinen koruyucu fonksiyonu, organofosfat nörotoksinleri, aromatik karboksilik asit

esterlerini ve insektisitleri hidroliz etme yeteneğidir. Toksik organik molekülleri hidroliz etmesi, PON1'in tanımlanan ilk fizyolojik fonksiyonudur. Organofosfat bileşiklerini hidroliz etme özelliğinin ortaya çıkartılması sonrası PON1, toksikolojik çalışmalarda dikkate alınan önemli bir enzim haline gelmiştir (2).

PON1'in belirlenen ikinci biyolojik fonksiyonu antiaterojenik aktiviteye sahip olmasıdır. Serum PON1 enzimi plazma lipoproteinlerinin oksidasyonunu önlemede rolü olduğu düşünülmektedir. Lipidlerin peroksidasyonu sonrası farklı özellik ve yapıda lipid peroksidler meydana gelir. PON1, bu lipid peroksidleri yıkıma uğratabilmektedir. PON1'in HDL'nin yapısında bulunması nedeniyle HDL ve LDL'de lipid peroksid oluşumunu ve aynı zamanda birikimini de önler. PON1 içermesi nedeniyle HDL'nin LDL'yi oksidasyona karşı koruyucu etkisi, yani antioksidan etkisi, A ve E vitaminlerinden daha güçlüdür (12, 13).

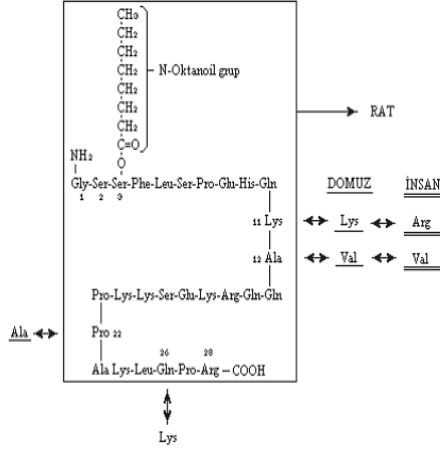
Mackness ve arkadaşlarının (12) çalışmasında, serum PON1'in ateroskleroz sürecinin başlangıç evresinde LDL fosfolipidlerini oksidasyona karşı korumada önemli olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada, HDL'nin bakırla inkübe edilen LDL'nin oksidasyonunu azaltarak lipid peroksid oluşumunu % 90 oranında inhibe ettiğini; HDL'den saflaştırılan PON1'in tiyobarbitürik asit ile reaksiyona giren maddelerin düzeylerini ve lipoperoksid oluşumunu önlediği ortaya konulmuştur. PON1, lipid peroksidlerin yanı sıra hidrojen peroksid üzerine de etkilidir. Aterojenez sırasında arter duvarı hücrelerince üretilen majör toksik oksijen metaboliti olan hidrojen peroksid, oksidatif koşullarda daha potent ürünlere dönüşerek LDL oksidasyonuna neden olur. PON1'in okside LDL'deki kolesterol linoleat hidroperoksidleri indirgemesi nedeni ile peroksidaz benzeri aktivitesi olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, lipopolisakkarid inaktivasyonu yolu ile bakteriyel endotoksinlere karşı koruma da sağlamaktadır (14).

Ghrelin Hormonu

Ghrelin, gastrointestinal sistem tarafından üretilen, merkezi sinir sistemini etkileyerek iştahın ve vücut ağırlığının düzenlenmesinde görev alan, 28 amino asitlik lipopeptid yapısal özelliğe sahip bir hormondur (15, 16).

İnsandaki ghrelin hormonunun N-terminal ucundaki 3. aminoasit olan serine bağlı oktanil grubu 8 karbonlu bir yağ asidi içermektedir. Oktanil grubu, ghrelinin aktif olması için gereklidir. Ghrelin, 8 karbonlu bir yağ asitinin varlığına göre aktivitesi değişen tek hormondur (15, 16). İnsan, rat ve domuz ghrelinin yapısı Şekil 4.'de verilmiştir (17). Bütinesinde yağ asidi içermeyen ghrelin ise desaçile ghrelin'dir ve inaktiftir. Desaçile ghrelin, toplam ghrelinin % 80-90'ını oluşturmaktadır. Aktif ghrelin; aGAH, desaçile ghrelin ise dGAH şeklinde gösterilir. Ghrelinin yarı ömrü 15-20 dakikadır. Yarı ömrünün kısa olması, muhtemelen plazmada esteraz aktivitesinden kaynaklanmaktadır

(18). Çünkü ghrelin, kanda HDL'ye bağlanmaktadır. HDL'ye aynı zamanda bir kan esterazı olan paraoksonaz da bağlıdır. Paraoksonazın, ghrelinin 3. aminoasitine bağlı oktanil grubundaki açıl bağlarını desaçilasyonla kırarak ghrelini inaktif forma getirdiği düşünülmektedir (19, 20).



Şekil 4. İnsan, rat ve domuz ghrelinin yapısı (17).

Ghrelin ilk kez 1999 yılında Kojima tarafından farelerin mide fundusunda tanımlanmıştır. Ghrelinin mRNA'sı hemen hemen bütün dokularda tespit edilmiştir. Vücutta ghrelin üretimindeki iki hücresel alandan ilki oksintik bez; diğeri ise nöronal hücre gruplarının sinaptik ileti ile ghrelin salınımı artırdığı merkezi sinir sistemidir. Ghrelin, midenin oksintik mukozasında yer alan endokrin fonksiyonlara sahip X/A hücreleri tarafından üretilmesinin yanı sıra az miktarda bağırsak, böbrek, hipofiz bezi, plasenta, prostat, testis, beyin ve hipotalamus tarafından da üretilip dolaşıma verilmektedir. Ghrelinin vücut dokularında çok geniş bir dağılım göstermesi, ghrelinin biyolojik aktiviteyi düzenlemede önemli bir rolü olduğunu gösterir (21, 22).

Ghrelin, *in vivo* ve *in vitro* olarak büyüme hormonu salgılatıcı GHS-R (büyüme hormonu salgılatıcı reseptör) için spesifik endojen bir ligand özelliğindedir (15). Büyüme hormonu salgılatıcıları (GHS), büyüme hormonunu salgılamasını artırma özelliğine sahip reseptörler bulunan bileşikler (23).

Ghrelin öncülü preproghrelin 117 amino asitten oluşur. Salınmadan önce sitoplazmada enzimatik bir işlemde geçer, 3. pozisyonundaki serine n-oktanoil eklenmesi büyüme hormonu salgılatıcı etkinliği için gereklidir (24). Ghrelin özellikle midede üretildikten sonra ön hipofiz ve hipotalamik bölgedeki reseptörlerine ulaşır GH (büyüme hormonu) salınımını uyarmakta, enerji dengesini ve besin alımını düzenlemektedir (25). İnsanlarda enerji alımı ve vücut ağırlığı hipotalamustaki merkezler tarafından kontrol edilmektedir (26). Hipotalamik merkezler periferden gelen uyarıları doğrultusunda kontrol mekanizmalarını düzenlerler. Yağ dokusu kökenli leptin, beyine yağ dokuları konusunda bilgi götürerek besin alımını azaltır ve fazla yağ birikimini engeller (27). Ghrelin ise açlık halinde

kanda yüksek miktarda bulunup yemek sonrası miktarı azalmaktadır. Bu durum ghrelinin beyine besin alımını ve yağ dokusunu arttırıcı nitelikte bilgiler ilettiğini göstermektedir. Ghrelinin bu fonksiyonlarının büyüme hormonu üzerine olan etkisinden bağımsız olduğu düşünülmektedir (28).

Ghrelin, yemek öncesi kanda ve tükürkte hızla yükselirken kolesistokinin hormonu yeme esnasında salgılanarak doyumluk hissi verir. Bu iki hormonun dengesi iştah için büyük bir önem taşımaktadır (17).

Ghrelinin büyüme hormonu ve insülin ile ilişkisi incelendiğinde sadece insülin benzer büyüme faktörü-1 (IGF-1) ile ghrelin arasında pozitif bir ilişki bulunmuştur. Buna karşın ghrelin ve insülin düzeyleri arasında bir ilişki bulunmamaktadır (29).

PON1 Enziminin Bazı Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi

Kinetik çalışmalarda PON1 enziminin aktivitesi Eckerson tarafından önerilen tayin metodu ile belirlendi. PON1 enziminin arilesteraz (ARE) aktivitesi, fenilasetatı hidrolize ederek fenol ve asetik asit oluşturur. Oluşan fenolün dakikadaki absorbans değişimi ölçülerek ARE aktivitesi tayin edilir (30). Fenolün, 30 saniye aralıklarla 2 dakikalık bir süre boyunca absorbans değişimi, 270 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçüldü. Ölçümler için kör olarak, 50 mM Tris/HCl pH:7,1 olan tampon içerisinde, 1 mM fenilasetat substratı ve 1 mM CaCl₂ bulunan çözelti kullanıldı.

Bir ünite PON1 enziminin ARE aktivitesi, bir dakikada 1 µmol fenol oluşturur. Aktivite değeri U/ml cinsinden hesaplandı. Fenolün molar ekstinksiyon katsayısı 1310 M⁻¹.cm⁻¹ olarak alındı.

Değişen fenilasetat konsantrasyonlarının enzim aktivitesine etkisinin incelenmesi için (0,1-1) mM aralığında fenilasetat içeren 100 ml'lik 7 çözelti hazırlandı. Çözeltilerin hazırlanmasında 1 mM CaCl₂ içeren (pH:7,1) 50 mM Tris/HCl tamponu kullanıldı. 37 °C' de PON1 enziminin ARE aktivitesinin ölçülmesiyle elde edilen değerlere göre Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. PON1 enziminin 50 mM Tris/HCl ve pH:7,1 olan tamponda 37 °C' de fenilasetat substratı için K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı.

Deney inkübasyon sıcaklığının enzim aktivitesine etkisi incelendi. Bu amaç doğrultusunda 25°C, 30°C, 35°C, 37°C, 40°C sıcaklıklarda 30 dakikalık inkübasyon sağlandıktan sonra reaksiyon durdurulup aktivite ölçümleri yapıldı.

Isının (56 °C ve 65 °C) enzim aktivitesi üzerine olan etkisi incelendi. 0,3 ml enzim örneklerinin konulduğu eppendorf tüpler ilk olarak 56 °C ve daha sonra 65 °C'lik su banyosunda 75 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası PON1 enzim örneği buz

banyosunda soğutulduktan sonra kalan enzim aktivite ölçüldü.

pH'nın enzim aktivitesi üzerine etkisinin incelenmesi için değişik pH'larda tampon çözeltileri hazırlandı. Bunlar pH: 6,5-8,5 aralığında Tris/HCl tamponları ve pH: 9-11 aralığında glisin/NaOH tamponları kullanılarak enzim aktivitesi ölçüldü.

PON1 Enziminin Ghrelin Hormonu ile İlişkisi

Ghrelin hormonunun hem aktif hem de inaktif şekli, SGE Walkosil 11 5C18 RS 21 peptid kolonunda, 215 nm dalga boyu, hareketli fazı 50 mM NaClO₄ pH: 4 olan çözelti ve akış hızı 1,0 ml/dak. koşullarında tayin edilebilir. Aktif ghrelin hormonunun bu kolondaki alıkonma süresi 16 dakika iken, inaktif ghrelin hormonunun alıkonma süresi 5,9 dakikadır (31).

Bu çalışmada PON1 enziminin ghrelin hormonuna etkisi incelendi. İlk olarak ghrelin hormonu standardı (1600 pg/ml), 50 mM Tris/HCl 1 mM CaCl₂, pH:7,1 tamponu ile 20 kat seyreltildi. HPLC'ye SGE Walkosil 11 5C18 RS 21 peptid kolonu bağlandı. HPLC'deki UV dedektöründeki dalga boyu 215 nm olarak ayarlandı. 1,0 ml/dak. akış hızı ile hareketli faz olan 50 mM NaClO₄ pH: 4 olan çözelti kolondan 1 saat boyunca geçirildi. Stabil hale gelen kolona 80 pg/ml derişimli aktif ghrelin hormonundan 20 µl enjekte edildi. Kolondaki alıkonma süresi ve pik alanları incelendi. Sonraki aşamada 100 µL hacimdeki PON1 enzimi ve ghrelin hormonu karışımı (v/v 1:1) 37 °C sıcaklıktaki su banyosunda inkübasyona bırakıldı. Ghrelin hormonunun yarı ömrünün 15-20 dakika olması nedeniyle inkübasyon süresi 20 dakika ile sınırlandırıldı. Inkübasyon sonrası karışımdan 20 µL alınarak kolona enjekte edildi, inaktif ghrelinin oluşup oluşmadığı ve aktif ghrelin hormonu ait pik alanında ne tür değişimler olduğu incelendi. Ayrıca ghrelin hormonu substrat olarak kullanılarak 2 dakika süreyle 215 nm dalga boyunda spektrofotometre ile PON1 enzim aktivitesi ölçüldü. Konsantrasyonları farklı aktif ghrelin hormonunun 1 mM CaCl₂ içeren 50 mM Tris/HCl (pH:7,1) tamponunda çözeltileri hazırlandı. Enzim aktivitelerine bağlı reaksiyon hızları ölçüldü.

Ghrelin hormonunun PON1 enzim aktivitesi üzerine inhibitör etkisi araştırıldı. Yedi farklı fenilasetat konsantrasyonunda reaksiyon ortamına 200 pg/ml aktif ghrelin hormonu eklenerek PON1'in ARE aktivitesine ait reaksiyon hızı ölçüldü. Elde edilen değerlere göre Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek ghrelin varlığında PON1 enziminin 50 mM Tris/HCl ve pH: 7,1 olan tamponda 37 °C' de K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı.

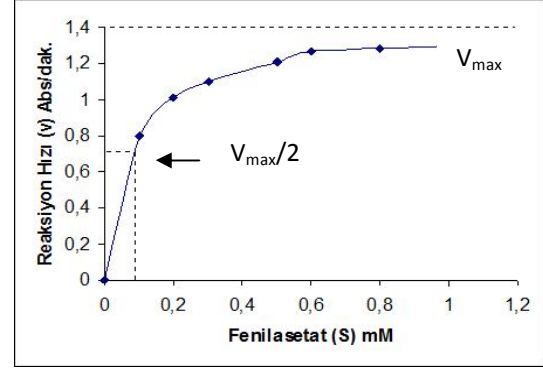
Sonuçlar

PON1 Enziminin Kinetik Özelliklerinin Saptanması

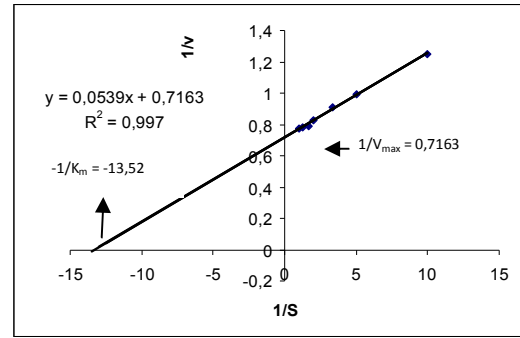
Bu bulgular ile çizilen Michaelis-Menten grafiği Şekil 5.'de, Lineweaver-Burk grafiği Şekil 6.'da gösterilmiştir.

Tablo 1. Farklı fenilasetat konsantrasyonlarının PON1 enzim aktivitesine etkisi.

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



Şekil 5. Farklı fenilasetat konsantrasyonlarının PON1 enzim aktivitesine etkisi: Michaelis-Menten grafiği.



Şekil 6. Farklı fenilasetat konsantrasyonlarının PON1 enzim aktivitesine etkisi: Lineweaver -Burk grafiği.

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

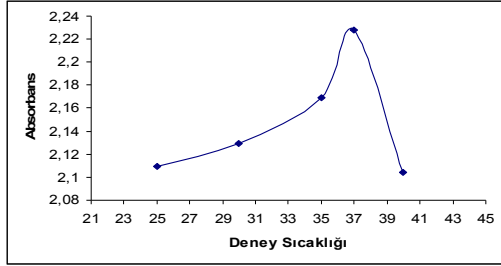
Tablo 2. Deneysel sıcaklığının PON1 enzim aktivitesine etkisi ve optimum sıcaklığın belirlenmesi.

Deneysel Sıcaklığı (°C)	Absoransların Ortalaması
25	2,109
30	2,129
35	2,169
37	2,228
40	2,104

PON1 enzimi aktivitesi 35-37 °C sıcaklık aralığında artmakta ve 37 °C'de en yüksek değere ulaşmaktadır. Inkübasyon süresine bağlı olarak PON1 enzimi 56 °C ve 65 °C'lerde 0, 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 dakika

bekletilerek aktivite tayini yapıldı. 56 °C'de yapılan deneyin sonuçları Tablo 3'de ve bu sonuçlara göre çizilen grafik Şekil 8.'de gösterilmiştir.

PON1 enziminin 56 °C'de inkübasyona bırakılarak belirli sürelerde aktivitesi ölçüldüğünde 75. dakikaya kadar % 42,65 ile aktifliğini koruduğu ve 56 °C sıcaklığa oldukça dayanıklı bir enzim olduğu görülmüştür. 65 °C'de yapılan deneyde ise enzimin 5. dakikadan itibaren aktivitesini tamamen kaybederek inaktif hale geçtiği tespit edilmiştir.



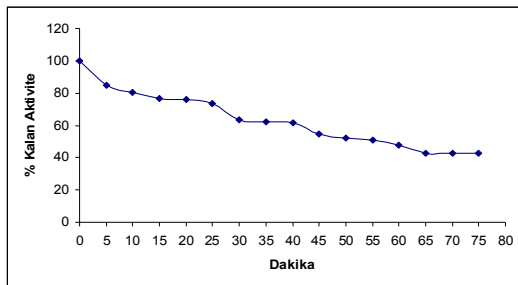
Şekil 7. PON1 enzim için optimum sıcaklığın belirlenmesi.

pH'nın PON1 enzim aktivitesine etkisinin incelenmesinde farklı pH'larda tampon çözeltiler hazırlandı ve bu pH'larda PON1 enziminin aktivitesi tayin edildi.

Tablo 3. 56 °C sıcaklığın PON1 aktivitesine etkisi.

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

Enzim aktivite ölçüsü olarak, 1 dakikalık absorbans değişim değerleri verilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 4 ve Şekil 9.'da gösterilmiştir.



Şekil 8. PON1 enziminin 56 °C'deki inkübasyon süresine bağlı aktivite kaybı.

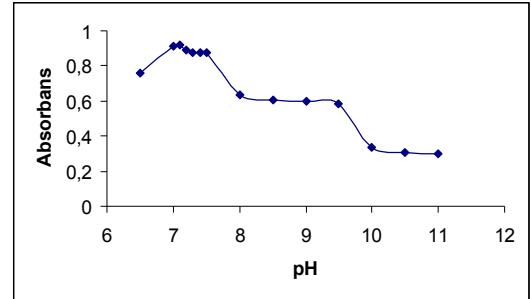
PON1 enziminin Şekil 9.'daki grafikte görüldüğü gibi, 7-7,5 pH aralığında aktivitesinin yüksek olduğu ve bu aralıkta en yüksek aktiviteyi (optimal pH) pH:7,1'de gösterdiği tespit edilmiştir.

Tablo 4. pH'nın enzim aktivitesine etkisi.

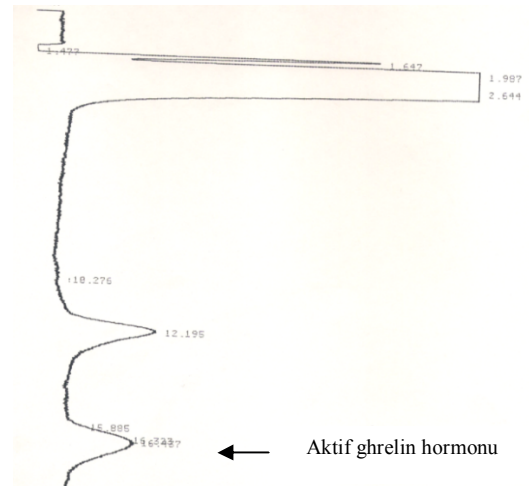
pH	Ortalama Absorbans (Abs/1dk)
6,5	0,758
7,0	0,910
7,1	0,918
7,2	0,894
7,3	0,878
7,4	0,876
7,5	0,875
8,0	0,632
8,5	0,604
9,0	0,598
9,5	0,587
10,0	0,339
10,5	0,308
11,0	0,301

PON1 Enziminin Ghrelin Hormonu ile İlişkinine Ait Bulgular

Akış hızı 1 ml/dak ve pH:4 olan hareketli faz 50 mM NaClO₄ çözeltisinde 215 nm dalga boyu koşullarında 80 pg/ml aktif standart ghrelin hormonuna ait çalışma kromatogramı Şekil 10.'da verilmiştir.



Şekil 9. pH'nın enzim aktivitesine etkisi.



Şekil 10. 80 pg/ml standart aktif ghrelin hormonunun kromatogramı.

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

Akış hızı 1 ml/dk ve pH:4 olan hareketli faz 50 mM NaClO₄ çözeltisinde 215 nm dalga boyu koşullarında 80 pg/ml aktif standart ghrelin hormonu ile PON1 enzim (1:1 v/v) karışımının 37 °C'de 20 dakika süreyle inkübasyonu sonrası elde edilen çalışma kromatogramı Şekil 11.'de verilmiştir.



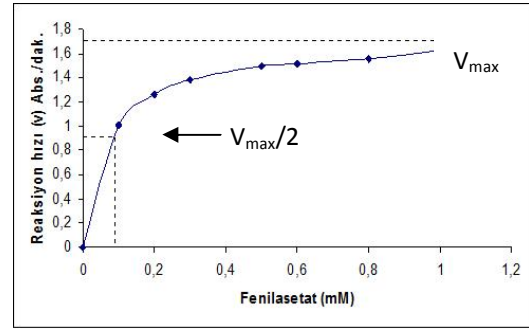
Şekil 11. 80 pg / ml aktif ghrelin hormonu ile PON1 enzimi (v/v 1:1) karışımının 37 °C'de 20 dakika inkübasyonu sonrası elde edilen kromatogram.

Şekil 11.'deki kromatogramda 16,3 dakikada pik veren aktif ghrelin hormonun pik alanı 55412 ve 6,5 dakikada pik veren inaktif ghrelin hormonunun pik alanı 3508 olarak tespit edildi. Aktif ghrelin hormonunun PON1 enzimi ile (v/v 1:1) oranında karışımı sonrası ghrelin % 50 oranında seyreltilmiş oldu, seyreltilmemiş aktif ghrelinin Şekil 10.'daki pik alanı 122288 olarak bulunmuştu, seyreltme sonrası pik alanının 61144 olması beklendi, ancak ghrelin için Şekil 11.'deki pik alanı 55412 olarak hesaplandı. Bu durum, aktif ghrelinin bir kısmının PON1 enzimi tarafından inaktif ghreline dönüştüğünü göstermektedir. Aktif ghrelin hormonunun inaktif forma dönüşüm yüzdesi pik alan değerlerine göre hesaplandığında, % 9,5 oranında dönüşüm olduğunu göstermektedir.

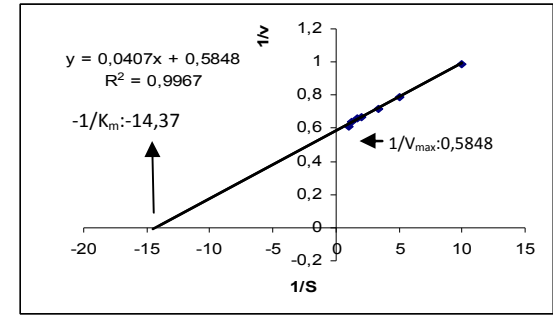
Tablo 5. Farklı fenilasetat konsantrasyonlarında 200 pg/ml Ghrelinin PON1 enzim aktivitesine etkisi.

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

Ghrelin hormonu varlığında PON1 enziminin ARE aktivitesine etkisine ait bulgular Tablo 5.'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre çizilen Michaelis-Menten grafiği Şekil 12.'de ve Lineweaver-Burk grafiği ise Şekil 13.'de verilmiştir.



Şekil 12. Farklı fenilasetat konsantrasyonlarında 200 pg/ml Ghrelinin PON1 enzim aktivitesine etkisi: Michaelis-Menten grafiği.



Şekil 13. Farklı fenilasetat konsantrasyonlarında 200 pg/ml Ghrelinin PON1 enzim aktivitesine etkisi: Lineweaver-Burk grafiği.

37 °C'de, pH: 7.1, 50 mM Tris/HCl tamponu ile farklı fenilasetat konsantrasyonuna karşılık, ortama 200 pg/ml ghrelin hormonu ilave edilmesi sonrası ölçülen reaksiyon hızları Lineweaver-Burk grafiğine yerleştirildiğinde; PON1 enzimi için hesaplanan $-1/K_m$: -14,37 ve $1/V_{max}$: 0,5848 olarak hesaplandı. Değişen substrat konsantrasyonuna karşılık gelen reaksiyon hızlarının Michaelis-Menten grafiğine dönüştürülmesi sonrası hesaplanan K_m değeri $0,070 \pm 0,002$ mM ve V_{max} değeri 1,71 Abs./dak. (79,63 U/ml ve 44,48 U/mg) olarak bulunmuştur.

Tartışma

PON1 enziminin bazı kinetik özellikleri incelenirken ilk olarak konsantrasyonları farklı fenilasetat substratının enzim aktivitesine etkisi araştırıldı. PON1 enzimin Michaelis-Menten kinetiğine uygunluğu Şekil 5.'de verilen grafik verilerinden tespit edildi. Şekil 6.'daki Lineweaver-Burk grafiğine göre $-1/K_m$: -13,52 $1/V_{max}$: 0,7163 değerleri bulundu. Fenilasetat substratı için PON1 enziminin 37 °C'de ve 50 mM Tris/HCl tamponu pH:7,1'de yapılan aktivite ölçümlerine göre çizilen Michaelis-Menten grafiğinde ise K_m değeri $0,074 \pm 0,002$ mM ve V_{max} değeri 1,40 Abs./dak. (65,20 U/ml ve 36,42 U/mg) olarak hesaplandı. Bu bulgular

literatürle uyumludur, çünkü literatürde genellikle paraoksan ve fenilasetat substratlarına karşı PON1 enziminin K_m değerinin 0,78-4,16 mM aralığında, V_{max} değerinin 15,175 U/ml civarında olduğu rapor edilmiştir [32, 33]. Bu değerlere göre sığır karaciğerinden saflaştırılan PON1 enziminin K_m değerinin daha düşük ve V_{max} değerinin yüksek olduğu görülmektedir. Bu durum, sığır karaciğer PON1 enziminin, insan ve rat kaynaklı PON1 enzime göre çok daha düşük substrat konsantrasyonlarında bile antioksidan aktivite gösterebildiğini, toksik bileşikler detoksifiye edebildiğini ortaya koymaktadır.

Kinetik çalışmalarda PON1'in optimum sıcaklık ve pH dereceleri, enzimin ısıya karşı dayanıklılığı ve ghrelin hormonu ile PON1 enzimi arasındaki ilişki araştırılmıştır. PON1 enziminin aktivite artışı 35-37 °C aralığında gözlenmiş, ancak PON1 için optimal sıcaklık derecesinin 37 °C olduğu tespit edilmiştir. PON1 enziminin aktivite artışı pH 7,0-7,5 aralığında gözlenirken, optimal aktivitenin pH: 7,1'de meydana geldiği ortaya konulmuştur. Bu bulgular ve değişik kaynaklardan elde edilen PON1 üzerinde yapılan araştırma sonuçları ile karşılaştırıldığında, genel olarak enzimler için optimum pH ve sıcaklık değerlerinin birbirine çok yakın olduğu görülmüştür (32-34). PON1 enziminin 56 °C ve 65 °C sıcaklıklarda inkübasyonu sonrası aktivite ve denatürasyon düzeyleri ölçüldüğünde, 56 °C'de 65-75 dakikalık inkübasyon sonrası enzim aktivitesinin % 42,65'i korurken, 65 °C'de inkübasyonun 5. dakikasından sonra aktivitenin tamamen kaybedildiği görüldü. Literatürde, rat karaciğerinden saflaştırılan PON1 enziminin 52,5 ve 55 °C'de 15 ve 60 dakikalık inkübasyon süresince hızlı bir denatürasyonun meydana geldiği rapor edilmiştir (34). Bizim sonuçlarımız, sığır karaciğerinden saflaştırılan PON1 enziminin ısıya karşı, rat karaciğerinden saflaştırılan PON1'e göre çok daha dayanıklı olduğunu göstermektedir.

Bizim yaptığımız kinetik çalışmalar, PON1 enziminin ghrelin hormonunu substrat olarak kullanabildiğini ve aktif ghrelinin bir kısmını inaktif ghreline dönüştürebildiği ortaya koymuştur. Ghrelinin yarı ömrü 15-20 dakikadır. Bu hormonun yarı ömrünün kısa olmasının nedeni, muhtemelen plazma PON1'nin esteraz aktivitesinden kaynaklandığı belirtilmiştir. Bunu destekleyen en önemli veri, kanda ghrelinin ve PON1 enziminin HDL'ye bağlı olmasıdır. PON1'in, ghrelinin 3. aminoasitine bağlı olan oktanil grubundaki açıl bağlarını desaçilasyonla kırarak ghrelini inaktif forma getirdiği rapor edilmiştir (19, 20).

Bu çalışmada, PON1 enziminin ghrelin hormonuna etkisini araştırmak için HPLC kullanılmıştır. Şekil 10.'da 215 nm dalga boyunda aktif ghrelin hormonu için elde edilen kromatogram ve Şekil 11.'de ise ghrelin hormonunun PON1 enzimi ile inkübasyonu sonrası elde edilen kromatogram sonuçları karşılaştırıldı. Şekil 10.'da 80 pg/ml standart aktif ghrelin hormonuna ait kromatogramda aktif ghrelin

hormonunun 16,3. dakikada pik verdiği ve pik alanının 122288 olduğu, Şekil 11.'deki kromatogramda ise aktif ghrelin hormonunun yine 16,3 dakikada pik verdiği ve pik alanının 55412 olduğu; inaktif ghrelin hormonunun 6,5 dakikada pik verdiği ve pik alanının 3508 olduğu tespit edildi. Aktif ghrelin hormonunun PON1 enzimi ile v/v1:1 oranında karıştırılması sonrası ghrelin % 50 oranında seyreltilmiş oldu, bu durumda 16,3. dakikadaki pik alanının, 122288'in yarısı, yani 61144 olması beklenirdi. Ancak aktif ghrelin için hesaplanan pik alan değerinin 55412 olduğu tespit edildi. Bu bulgular, aktif ghrelin için 5732'lik bir pik alan azalmasının meydana geldiğini göstermektedir. Aktif ghrelin için pik alanındaki bu azalma, PON1 etkisiyle aktif ghrelinin bir kısmının inaktif ghreline dönüşmesinden kaynaklanmaktadır. Çünkü, kromatogramın 6,5'inci dakikasında, normalde bulunmayan ancak ghrelinin PON1'le muamelesinden sonra ortaya çıkan bir pik bulunmaktadır. Aktif ghrelin hormonunun inaktif forma dönüşüm yüzdesinin, pik alan değerlerine göre hesaplandığında, % 9,5 olduğu bulunmuştur.

Ghrelin hormonunun PON1 enziminin ARE aktivitesine etkisi araştırıldı. Farklı konsantrasyonlardaki fenilasetata karşılık ortama 200 pg/ml sabit konsantrasyonda ghrelin ilavesinin PON1'in arilesteraz aktivitesi üzerine etkisi incelendi. Elde edilen veriler Tablo 5'de özetlenmiş ve bu verilere göre çizilen Michaelis-Menten grafiği Şekil 12.'de verilmiştir. Bu grafikten PON1'in K_m 'i 0,070 ± 0,002 mM ve V_{max} 'ı 1,71 Abs./dak. (79,63 U/ml ve 44,48 U/mg) olarak hesaplandı. Bu sonuçlar, ortama ghrelin ilavesinin PON1'in fenilasetata olan afinitesini (K_m) ve hızını (V_{max}) önemli derecede artırdığını, yani enzim aktivitesi üzerine aktivatör olarak etki gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Sonuç olarak; sığır karaciğerinden kısmen saflaştırılarak kinetik özellikleri incelenen PON1 enziminin fenilasetata karşı K_m , V_{max} , optimal sıcaklık ve pH değerlerinin sırasıyla 0.074 mM, 1.40 Abs./dak. (65.20 U/ml ve 36.42 U/mg), 37 °C, 7.1 olduğu tespit edilmiştir. Bu araştırmanın en önemli bilimsel sonucu olan, PON1'in; açıl-ghrelini (aktif form) substrat olarak kullanabildiğini ve aktif ghrelinin %9,5'lük kısmını deaçile-ghreline (inaktif form) dönüştürebildiği ilk defa ortaya konularak literatüre kazandırılmıştır.

Teşekkür

Bu çalışma Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (FÜBAP) birimi tarafından desteklenmiştir (no: 1447). Bu destekten dolayı teşekkürlerimizi bildiririz.

Kaynaklar

1. Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du BN. The human serum paraoxonase/aterosklerozun arysterase gene (PON1) is one member of a multigene family. Genomics 1996; 33: 498-509.

2. Mackness MI, Mackness B, Durrington PN, Connelly PW, Hegele RA. Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 1996; 7: 69-76.
3. Erden İ. ST Elevasyonlu Miyokard İnfarktüsü (stemi) Hastalarda İnsan Paraoksonase Geni *met-leu/55* polimorfizmi. Uzmanlık Tezi, 2004.
4. Deakin SP, James RW. Genetic and environmental modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase-1. *Clin Sci* 2004; 107: 435-47.
5. La Du BN, Aviram M, Billecke S, Navab M. On the physical role(s) of the paraoxonases. *Chem Biol Inter* 1999; 120: 379-88.
6. Heijmans BT, Westendorp RGJ, Lagaay AM, Knook DL, Klufft C, Slagboom PE. Common paraoxonase gene variants, mortality risk and fatal cardiovascular events in elderly subjects. *Atherosclerosis* 2000; 149: 91-7.
7. Hasselwander O, McMaster D, Fogarty AD, Maxwell AP, Nicholls DP, Young JS. Serum paraoxonase and platelet-activating factor acetylhydrolase in chronic renal failure. *Clin Chem* 1998; 44: 179-182.
8. Kelso GJ, Stuart WD, Richter RJ, Furlong CE, Jordon TJ, Harmony JAK. Apolipoprotein J is associated with paraoxonase in human plasma. *Biochemistry* 1994; 33: 832-9.
9. Eckerson HW, Romson J, Wyte C, La Du BN. The human serum paraoxonase-1 polymorphism: identification of phenotypes by their response to salts. *Am J Hum Genet* 1983; 35: 214-27.
10. Gan N, Smolen A, Eckerson W, La Du BN. Purification of human serum paraoxonase/arylesterase. Evidence for one esterase catalyzing both activities. *Drug Metab Dispos* 1991; 19: 100-6.
11. Öztürk H. Diabetes mellitus'da paraoksonaz aktivitesi ve AOPP düzeyleri. Tıbbi Biyokimya Uzmanlık Tezi. 2008.
12. Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low density lipoprotein. *FEBS Lett* 1991; 286: 152-4.
13. Rousselot DB, Therond P, Beaudeau JL, Peynet J, Legrand A, Delatre J. High density lipoproteins and the oxidative hypothesis of atherosclerosis. *Clin Chem Lab Med* 1999; 37: 939-49.
14. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo Parmo SL, La Du BN. Paraoxonase inhibits high density lipoprotein oxidation and preserves its functions. *J Clin Invest* 1998; 101: 1581-90.
15. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999; 402: 656-9.
16. Aydın S, Özkan Y, Caylak E. Ghrelin and its biochemical functions. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2006; 26: 272-83.
17. Aydın S. Ghrelin Hormonunun Keşfi: Araştırmaları ve Klinik Uygulamaları. *Türk Biyokimya Dergisi* 2007; 32: 76-89.
18. Ariyasu H, Takaya K, Tagami T, et al. Stomach is a major source of circulating ghrelin and feeding state determines plasma ghrelin-like immuno reactivity levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 4753-8.
19. Kaiya H, Darras VM, Kangawa K. Ghrelin in birds: Its structure, distribution and function. *J Poul Sci* 2007; 44: 1-18.
20. Beaumont NJ, Skinner VO, Tan TM, et al. Ghrelin can bind to a species of high density lipoprotein associated with paraoxonase. *J Biol Chem* 2003; 278: 8877-80.
21. Korbonits M, Kojima M, Kangawa K, Grossman AB. Presence of ghrelin in normal and adenomatous human pituitary. *Endocrine* 2001; 14: 101-4.
22. Gualillo O, Caminos J, Blanco M, et al. Ghrelin, a novel placental-derived hormone. *Endocrinology* 2001; 142: 788-94.
23. Korbonits M, Bustin SA, Kojima M. The expression of the growth hormone secretagogue receptor ligand ghrelin in normal and abnormal human pituitary and other neuroendocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 881-7.
24. Casanueva FF, Dieguez C. Ghrelin; the link connecting growth with metabolism and energy homeostasis. *Rev Endocrine Dis* 2002; 3: 325-38.
25. De Ambrogi M, Volpe S, Tamanini C. Ghrelin: central and peripheral effects of a novel peptidyl hormone. *Med Sci Monit* 2003; 9: 217-24.
26. Schwartz MW, Woods SC, Porte D, et al. Central nervous system control of food intake. *Nature* 2000; 404: 661-71.
27. Janeckova R. The role of leptin in human physiology and pathophysiology. *Physiol Res* 2001; 50: 443-59.
28. Tschöp M, Smiley D, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 2001; 407: 908-13.
29. Soriano-Guillen L, Barrios V, Chowen J, et al. Ghrelin levels from fetal life through early adulthood: relationship with endocrine and metabolic and anthropometric measures. *J Pediatr* 2004; 144: 30-5.
30. Eckerson H, Wyte C, La Du B. The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. *Am J Hum Genet* 1983; 35: 1126-38.
31. Karataş F, Aydın S, Geçkil H. Ghrelin hormonunun HPLC ile belirlenmesi. 21. Ulusal Kimya Kongresi, 2006, Malatya.
32. Sinan S, Koçkar F, Arslan O. Novel purification strategy for human PON1 and inhibition of the activity by cephalosporin and aminoglikozide derived antibiotics. *Biochimie* 2006; 88: 565-74.
33. Golmanesh L, Mehrani H, Tabie M. Simple procedures for purification and stabilization of human serum paraoxonase-1. *J Biochem Biophys Methods* 2008; 70: 1037-42.
34. Rodrigo L, Gil F, Hernandez AF, Marina A, Vazquez J, Pla A. Purification and characterization of paraoxon hydrolase from rat liver. *Great Britain Biochem J* 1997; 321: 595-601.

İletişim Yazarı

Dr. Uğur Aşkın

Fırat Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi

Kimya Bölümü, Elazığ.

e-posta: askinugur@hotmail.com