

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

**FOSFOLİPAZ A₂ ENZİMİNİN
AFİNİTE-ULTRAFİLTRASYON
İLE SAFLAŞTIRILMASI**

Mustafa TEKE

Biyokimya Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 405.05.01

Sunuş Tarihi : 23/08/2006

Tez Danışmanı : Prof.Dr.Azmi TELEFONCU

Bornova-İZMİR

Sayın Mustafa TEKE tarafından **DOKTORA TEZİ** olarak sunulan **“Fosfolipaz A₂ Enziminin Afinite-Ultrafiltrasyon İle Saflaştırılması”** başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve aday oy ile başarılı bulunmuştur. Bu nedenle Mustafa TEKE'nin sunduğu metnin doktora tezi olarak kabulüne oy ile karar verilmiştir.

. . 2006

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı	:
Raportör Üye	:
Üye	:
Üye	:
Üye	:

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/..../2006 gün ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Dr. Süleyman BORUZANLI
Enstitü Sekreteri

Prof.Dr. Emür HENDEN
Enstitü Müdürü

ÖZET**FOSFOLİPAZ A₂ ENZİMİNİN
AFİNİTE-ULTRAFİLTRASYON
İLE SAFLAŞTIRILMASI**

TEKE, Mustafa

Doktora Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Azmi TELEFONCU
Ağustos 2006,181 Sayfa

Fosfolipaz A₂'ler (PLA₂; EC 3.1.1.4) fosfogliseridlerin *sn-2* yağ asidi ester bağımlı hidrolizleyerek serbest yağ asitleri ve lizofosfolipitleri ayıran çeşitli enzim ailesidir. *sn-2* pozisyonundaki yağ asidi çoğunlukla araşidonik asittir (AA). Prostaglandinler, prostasiklinler ve tromboksanlar siklooksigenaz yoluyla, lökotrienler lipoksigenaz yoluyla AA'den sentezlenirler. PLA₂ hidroliz ürünü olan lizofosfolipit hücre sinyal iletiminde, fosfolipidin yeniden modellenmesinde ve membranın bozulmasında çok önemlidir. Bu rollere ek olarak PLA₂, son zamanlarda sistematik ve akut inflamator şartlardan kansere kadar değişen geniş bir patofizyolojik durumun içinde yer almakla tanınmaktadır. Gittikçe artan sayıdaki bir çok farmakolojik inhibitör fizyolojik koşullarda PLA₂'lerin rolünü tanımlamaya yardımcı olacaktır. Bu sebeple farklı kaynaklardan PLA₂'lerin saflaştırılması ve karakterizasyonu son derece önemlidir. Memeli PLA₂ enzimleri büyüklükleri, salgılanma kapasiteleri ve

kalsiyuma bağımlılıkları açısından sınıflandırılmak istenirse; düşük molekül kütleli Ca^{2+} -bağımlı salgılanan enzimler(sPLA₂), yüksek molekül kütleli Ca^{2+} -bağımlı sitozolik enzimler (cPLA₂) ve Ca^{2+} -bağımsız enzimler(iPLA₂) olarak sınıflandırılır. Memeli pankreası ve yılan zehirinde PLA₂'ler oldukça fazla miktarda bulunmaktadır ve bu nedenle saflaştırılmış ve kapsamlı olarak çalışılmıştır. Buna karşın, diğer hücre ve doku kaynaklarında da bulunan bu enzimler eser miktardadır ve iyi tanımlanmamıştır. Bu enzimler sığır bağırsağı, tavşan ve sıçan inflamator salgıları, sıçan ve insan plateletleri, sıçan dalağı, sıçan karaciğeri ve romatizmalı hastaların eklem sıvılarından saflaştırılmıştır.

Bu çalışmada, üç farklı afinite reçinesi tarafımızdan sentezlendi. %Verim ve saflaştırma katı açısından en iyi sonucu kitosan-glutaraldehid-substratla oluşturulan reçine verdi. Bu reçine, bir PLA₂ substratı olan fosfatidiletanolaminin kitosanla ilişkilendirilerek suda çözünür makromoleküler bir reçinenin geliştirilmesi esasında gerçekleştirilmiştir. Ultrafiltrasyon teknikleriyle birlikte makroligand, sığır pankreasından PLA₂'nin saflaştırılmasında kullanılmıştır. Reçineden bağılı PLA₂'nin elüsyonu için optimum koşullar incelendi. Ayrıca saf enzimin bazı karakteristik özellikleri ve kinetiği belirlendi. Reçinenin tekrar kullanılabilirliği de incelendi.

Anahtar kelimeler: Pankreatik FosfolipazA₂, PLA₂ saflaştırılması, afinite-ultrafiltrasyon

ABSTRACT

**PURIFICATION OF PHOSPHOLIPASE A₂ BY
AFFINITY-ULTRAFILTRATION**

TEKE, Mustafa

PhD in Biochemistry

Supervisor: Prof. Dr. Azmi TELEFONCU

August 2006, 181 pages

Phospholipases A₂ (PLA₂; EC 3.1.1.4) are a diverse family of enzymes that hydrolyze the *sn*-2 fatty acid ester bond of phosphoglycerides, liberating free fatty acids and lysophospholipids. The fatty acid at the *sn*-2 position is mainly arachidonic acid(AA). From AA prostaglandins, prostacyclins and thromboxanes are formed by the cyclooxygenase-dependent pathway and leukotrienes are synthesized by the lipoxygenase-dependent pathway. The other product of PLA₂ action, lysophospholipid, is very important in cell signaling, phospholipid remodeling, and membrane perturbation. In addition to its roles, phospholipase A₂ has recently been recognized to be involved in a wide number of pathophysiological situations, ranging from systematic and

VIII

acute inflammatory conditions to cancer. A growing number of pharmacologic inhibitors will help define the role of particular phospholipase A₂s in physiological conditions. Because of these facts the purification and characterization of phospholipase A₂ from different sources has a great importance. The mammalian PLA₂ enzymes, if subdivided on the basis of size, secretory capabilities and calcium requirements, fall broadly into three groups: low molecular weight Ca²⁺-dependent secreted enzymes(sPLA₂), high molecular weight Ca²⁺-dependent cytosolic enzymes(cPLA₂) and the Ca²⁺-independent enzymes(iPLA₂). PLA₂ from mammalian pancreas and snake venoms are abundant and consequently have purified and extensively studied. PLA₂ from other cell and tissue sources, in contrast, are trace enzymes and not well defined. Related enzymes have been purified from bovine intestine, rabbit and rat inflammatory exudate, rat and human platelets, rat spleen, rat liver, and from the joint fluid of patients with rheumatoids arthritis.

In this study, we have synthesized three different affinity resins. Chitosan-glutaraldehyde-substrate resin given the best result in terms of yield% and purification fold for PLA₂ purification. The resin, the development of a macromolecular water soluble resin based on chitosan bearing phosphatidylethanolamine, a PLA₂ substrate, was attempted. Together with ultrafiltration techniques, the macroligand was employed to purify PLA₂ from bovine pancreas. The optimum conditions for elution of bound PLA₂ from the resin were investigated. Furthermore, some characteristic properties of the purified enzyme and the kinetics were determined. Reusability of the resin was also investigated.

Keywords: Pancreatic PhospholipaseA₂, PLA₂ purification, affinity-ultrafiltration

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalıőmam boyunca değerli görüş ve deneyimlerinden yararlandığım sayın hocam Prof. Dr. Azmi TELEFONCU'ya, ayrıca Prof. Dr. Figen ZİHNİOğLU'na, Prof. Dr. Gül GÜNER'e, Prof. Dr. Güldal KIRKALI'ya, Doç. Dr. Seçil ÖNAL'a, tüm bölüm arkadaşlarıma ve beni her konuda daima destekleyen aileme ve eşim Ayőe TEKE'ye teşekkür eder, sevgi ve saygılarımı sunarım.

Bu alıőma Ege Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	V
ABSTRACT	VII
TEŞEKKÜR	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	XIX
ÇİZELGELER DİZİNİ	XXI
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XXII
1. GİRİŞ	1
2. FOSFOLİPAZLAR.....	2
3. FOSFOLİPAZ A ₂	3
3.1 Fosfolipaz A ₂ 'nin Katalitik Mekanizması.....	9
3.2 Fosfolipaz A ₂ Grupları İçin Sınıflama Kriterleri.....	10
3.3 Fosfolipaz A ₂ Grupları.....	12

İÇİNDEKİLER (devam)

3.3.1	Aktif Merkezinde Histidin İçeren PLA ₂ Grupları (sPLA ₂ 'ler).....	12
3.3.1.1	I, II, V ve X. Fosfolipaz A ₂ Grupları.....	13
3.3.1.2	Grup III Fosfolipaz A ₂	21
3.3.1.3	Grup IX Fosfolipaz A ₂	23
3.3.1.4	Grup XI Fosfolipaz A ₂ (bitki histidin PLA ₂ 'leri).....	23
3.3.2	Aktif Merkezinde Serin İçeren PLA ₂ Grupları.....	24
3.3.2.1	Grup IV Fosfolipaz A ₂ (cPLA ₂).....	24
3.3.2.2	Grup VI Fosfolipaz A ₂ (iPLA ₂).....	30
3.3.2.3	Grup VII Fosfolipaz A ₂ (PAF-asetilhidraz).....	33
3.3.2.4	Grup VIII Fosfolipaz A ₂ (PAF-AH1b).....	35
4.	PLA ₂ ENZİMLERİNİN BİYOKİMYASI.....	36
4.1	Biyokimyasal Sentezlerde PLA ₂	36
4.1.1	Araşidonik Asit Kaskadı ve Eikozanoidlerin Biyosentezi.....	36
4.1.2	Surfaktan Biyosentezi.....	38
4.1.3	Platelet Aktivasyon Faktörü(PAF) Biyosentezi.....	39
4.1.4	Membranın Yeniden Modellenmesi.....	40
4.1.5	Lipid Peroksidasyon Tahribatından Membranların Korunması.....	40
4.2	İnflamasyon Reaksiyonlarında PLA ₂	40
4.2.1	Genel Etkiler.....	40
4.2.2	Bakteriyel, Viral ve Protozoal Enfeksiyonlarda PLA ₂	41

İÇİNDEKİLER (devam)

4.2.3	İnflamator Hücrelerde PLA ₂	42
4.2.3.1	Polimorfonükleer Lökositler.....	42
4.2.3.2	Bazofiller.....	43
4.2.3.3	Lemfositler.....	43
4.2.3.4	Mast Hücreleri.....	44
4.2.3.5	Makrofajlar.....	44
4.2.3.6	Plateletler.....	45
4.2.4	İnflamasyonun Deneysel Yönleri.....	45
4.2.5	İnflamasyonun Klinik Yönleri.....	46
4.2.6	Çeşitli Organ Tahribatları(MOF).....	48
4.2.7	Kalp Hastalıklarında PLA ₂	49
4.2.8	Akciğer Hastalıklarında PLA ₂	51
4.2.9	Böbrek Hastalıklarında PLA ₂	53
4.2.10	Karaciğer Hastalıklarında PLA ₂	54
4.2.11	Pankreatik Hastalıklarda PLA ₂	55
4.2.11.1	Dış Salgı Pankreas.....	55
4.2.11.2	Endokrin Pankreas-İnsülin Salınımı.....	57
4.2.12	Bağırsak Hastalıklarında PLA ₂	58
4.2.13	Üreme Organları Hastalıklarında PLA ₂	59
4.2.13.1	Erkek Üreme Organları.....	59
4.2.13.2	Dişi Üreme Organları.....	60

İÇİNDEKİLER (devam)

4.2.14	Sinir Sistemi Hastalıklarında PLA ₂	61
4.2.15	Eklem Hastalıklarında PLA ₂	62
4.2.16	Cilt Hastalıklarında PLA ₂	65
4.2.17	Tümörlerde PLA ₂	65
4.3	PLA ₂ 'nin Regülasyonu ve Terapötik Hedef Olarak İnhibisyonu.....	66
4.3.1	HücreSEL Düzenleme.....	66
4.3.2	Eikozanoid Oluşumunun İnhibisyonu.....	68
4.3.3	PLA ₂ Aktivitesinin İnhibisyonu.....	70
4.3.4	Farmakolojik İnhibisyonda Kimyasal İnhibitörler.....	74
4.3.5	Antisense İnhibisyon.....	77
5.	ENZİM SAFLAŞTIRILMASI VE ÖNEMİ.....	78
6.	AFİNİTE-ULTRAFİLTRASYON TEKNİĞİ.....	80
6.1	Afinite Ultrafiltrasyonu için Çözünür Makroligandlar.....	85
6.2	Afinite Ultrafiltrasyonu için Çözünmez Makroligandlar.....	88
7.	MATERYAL METOD.....	93
7.1	Materyal.....	93
7.2	Fosfolipaz A ₂ Aktivitesi Tayini.....	93
7.3	Protein Tayini (Bradford Metodu).....	94
7.4	Fosfolipaz A ₂ 'nin Sığır Pankreasından İzolasyonu ve Kısmi Saflaştırılması.....	95
7.4.1	Homojenizasyon ve Santrifüj.....	96

İÇİNDEKİLER (devam)

7.5	Afinite-Ultrafiltrasyon.....	96
7.5.1	İnhibitör Sentezi.....	96
7.5.1.1	L-Serin-metilester.HCl (II) Sentezi.....	97
7.5.1.2	L-2-Oleilamino-serin-metilester (III) Sentezi.....	99
7.5.1.3	L-2-Oleilaminoserin-metilester-3-fosfatidilkolin (IV)Sentezi..	99
7.5.1.4	L-2-Oleilamino-serin-3-fosfatidilkolin (V) Sentezi.....	100
7.5.1.5	L-2-Oleilamino-serin-3-fosfatidilkolin(V)'in PLA ₂ Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi ve İnhibisyon Tipinin Belirlenmesi.....	100
7.5.2	Afinite Reçinelerinin Hazırlanması ve Fosfolipaz A ₂ Saflaştırılmasında Kullanılması.....	101
7.5.2.1	Kitosan-İnhibitör afinite reçinesinin hazırlanması(<i>Yöntem 1</i>).....	101
7.5.2.2	Kitosan-Glutaraldehid-Substrat afinite reçinesinin hazırlanması(<i>Yöntem 2</i>).....	103
7.5.2.3	Aljinat-HMDA-İnhibitör afinite reçinesinin hazırlanması(<i>Yöntem 3</i>).....	104
7.6	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ve Moleküler Kütle Tayini.....	106
7.6.1	Polimerizasyon protokolü.....	107
7.6.2	Örneklerin hazırlanması ve elektroforeze uygulanması.....	109
7.6.3	Protein bantlarının boyanması (Coomasie-Brilliant Blue).....	110
7.7	PLA ₂ 'nin Karakterizasyonu.....	110
7.7.1	PLA ₂ Aktivitesine Substrat Konsantrasyon Etkisinin İncelenmesi.....	110

İÇİNDEKİLER (devam)

7.7.2	PLA ₂ Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi.....	110
7.7.3	PLA ₂ Aktivitesine pH Etkisi.....	111
7.7.4	PLA ₂ Aktivitesine CaCl ₂ Konsantrasyonu Etkisi.....	111
7.7.5	PLA ₂ Aktivitesine İyon Şiddetinin Etkisi.....	112
7.7.6	PLA ₂ 'nin Termal Stabilitesinin Belirlenmesi.....	112
7.7.7	Bazı Divalent Katyonların ve EDTA'nın PLA ₂ Enzim Aktivitesi Üzerine Aktivatör ve İnhibitör Etkilerinin İncelenmesi.....	113
7.8	Afinite Reçinesinin Tekrar Kullanılabilirliği.....	113
8.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	113
8.1	İnhibitörün Karakterizasyonu.....	113
8.2	L-2-Oleilamino-serin-3-fosfatidilkolin(V)'in PLA ₂ Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi ve İnhibisyon Tipinin Belirlenmesi.....	117
8.3	PLA ₂ 'nin Afinite-Ultrafiltrasyon İle Saflaştırılması.....	119
8.4	Enzimin Karakterizasyonu.....	124
8.4.1	PLA ₂ Aktivitesine Substrat Konsantrasyon Etkisinin İncelenmesi.....	124
8.4.2	PLA ₂ Aktivitesine Sıcaklık Etkisi.....	125
8.4.3	PLA ₂ Aktivitesine pH Etkisi.....	126
8.4.4	PLA ₂ Aktivitesine CaCl ₂ Konsantrasyonu Etkisi.....	127
8.4.5	PLA ₂ Aktivitesine İyon Şiddetinin Etkisi.....	128
8.4.6	PLA ₂ 'nin Termal Stabilitelerinin İncelenmesi.....	129

İÇİNDEKİLER (devam)

8.4.7	Bazı Divalent Katyonların ve EDTA'nın PLA ₂ Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi.....	131
8.5	Afinite Reçinesinin Tekrar Kullanılabilirliği.....	132
8.6	Fosfolipaz A ₂ (EC 3.1.1.4) Enziminin Sığır Pankreasından Saflaştırılmasının Genel Olarak Değerlendirilmesi.....	133
KAYNAKLAR DİZİNİ		138
ÖZGEÇMİŞ		177

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Fosfolipazların etki şekilleri.....	3
3.1 Substrat olarak fosfatidilkolinin 14kDa-PLA ₂ 'nin aktif merkezine bağlanma mekanizması.....	9
4.1 Memeli hücrelerinde araşidonik asit metabolizması.....	38
6.1 Afinite ultrafiltrasyonun temel prensibi.....	83
6.2 Tez çalışmasında kullanılan ultrafiltrasyon hücreleri.....	92
7.1 2-açilamino-alkilfosfolipid inhibitörünün 14kDa-PLA ₂ 'nin aktif merkezine bağlanma mekanizması.....	97
7.2 İnhibitörün sentezi adımları.....	98
7.3 Kitosan-İnhibitör affinite reçinesinin hazırlanması.....	102
7.4 Kitosan-Glutaraldehit-Substrat affinite reçinesinin hazırlanması.....	104
7.5 Aljinat-HMDA-İnhibitör affinite reçinesinin hazırlanması.....	105
8.1 L-Serin-metilester(II)'in IR spektrumu.....	114
8.2 L-2-Oleilamino-serin-metilester(III)'in IR spektrumu	115
8.3 L-2-Oleilamino-serin-metilester-3-fosfatidilkolin(IV)'in IR spektrumu.....	116
8.4 L-2-Oleilamino-serin-3-fosfatidilkolin(IV)'in IR spektrumu.....	116

ŞEKİLLER DİZİNİ(devam)

8.5 PLA ₂ aktivitesi üzerine L-2-Oleilamino-serin-3-fosfatidilkolin(V) etkisi.....	117
8.6 Sığır pankreası PLA ₂ 'sinin Lineweaver-Burk diagramına L-2- Oleilamino-serin-3-fosfatidilkolin(V) inhibitörünün etkisi.....	118
8.7 Sığır Pankreasından Saflaştırılan Fosfolipaz A ₂ enziminin SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi.....	123
8.8 SDS-PAGE Standart Grafiği.....	123
8.9 PLA ₂ aktivitesine substrat konsantrasyonunun etkisi.....	124
8.10 Sığır pankreatik PLA ₂ enziminin Lineweaver-Burk diyagramı.....	125
8.11 PLA ₂ aktivitesine sıcaklığın etkisi.....	126
8.12 PLA ₂ aktivitesine pH etkisi.....	127
8.13 PLA ₂ aktivitesine CaCl ₂ konsantrasyonunun etkisi.....	128
8.14 PLA ₂ aktivitesine iyon konsantrasyonunun etkisi.....	129
8.15 PLA ₂ 'nin termal stabilitesi.....	130
8.16 PLA ₂ 'nin termal stabilitesinin zamana bağımlı değişimi.....	130

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.1 Fosfolipaz A ₂ Grupları.....	5
3.2 Aktif Merkezinde Histidin İçeren PLA ₂ Grupları (sPLA ₂ 'ler).....	18
3.3 Aktif Merkezinde Serin İçeren PLA ₂ Grupları.....	27
4.1 NO _x , PLA ₂ -II, LTB ₄ ve PAF-AH'ın Septik Şoklu ve Şoksuz Hastalardaki Konsantrasyonları.....	48
8.1 Sığır Pankreası PLA ₂ 'sinin Kinetik Sabitleri.....	119
8.2 Kısmi Saflaştırma ve Affinite-Ultrafiltrasyon Sonrası (Yöntem1,2,3) Saflaştırma Sonuçları.....	119
8.3 Protein Miktarının Taşıyıcının Kapasitesine Etkisinin İncelenmesi.....	121
8.4 Bağlanma Süresinin İncelenmesi.....	121
8.5 5 mg Protein Miktarı İle Skala Büyütme(100mg/g kitosan) Saflaştırma Sonuçları.....	122
8.6 Bazı Divalent Katyonların ve EDTA'nın PLA ₂ Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	131
8.7 Reçinenin Tekrar Kullanılabilirliği.....	132

SİMGELER VE KISALTMALAR**Simgeler****Açıklama**

U	Unit aktivite birimi
K_m	Michaelis sabiti
V_{max}	Maksimum hız
[S]	Substrat konsantrasyonu
[I]	İnhibitör konsantrasyonu

Kısaltmalar**Açıklama**

PLA ₂	Fosfolipaz A ₂
PC	Fosfatidilkolin
PE	Fosfatidiletanolamin
PS	Fosfatidilserin
PI	Fosfatidilinozitol
AA	Araşidonik asit
OA	Oktadekanoik asit
BEL	Bromoenol lakton
LysoPL	Lizofosfolipit
PG	Prostaglandinler
LT	Lökotrienler
COX1, COX2	Siklooksigenaz 1 ve 2

SİMGELER VE KISALTMALAR(devam)

LOX	Lipoksigenaz
PAF	Platelet Aktivasyon Faktörü
PMN	Polimorfonükleer hücreler
TNF	Tümör nekroz faktör
IL-1	İnterlökin-1
NRDS	Bebeklerde solunum yolu rahatsızlığı
ARDS	Yetişkinlerde solunum yolu rahatsızlığı
NSAID	Non-steroidal anti-inflamator ilaç
ROS	Reaktif oksijen türleri
AATFMK	Araşidonil triflorometil keton
MAFP	Metil araşidonil florofosonat
BSA	Sığır serum albumini
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametilendiamin
EDC	1-etil-3(3-dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodimid
TEA	Trietanolamin
TMA	Trimetilamin
HMDA	Hekzametilendiamin
EDTA	Etilendiamintetraasetikasit
CBB	Coomasie Brilliant Blue
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi

1. GİRİŞ

Fosfolipaz A₂ (PLA₂; EC 3.1.1.4) fosfatidilkolin(PC), fosfatidiletanolamin(PE), fosfatidilserin(PS) ve fosfatidilinozitol(PI) gibi fosfolipidlerin spesifik olarak *sn*-2-açıl grubunun hidrolizini katalizler. PLA₂ reaksiyonunun hidroliz ürünleri serbest yağ asitleri ve lizofosfolipidlerdir. PLA₂'ler tarafından serbest hale getirilen araşidonik asit (AA; 5,8,11,14-eikozatetraenoik asit) ve oleik asit (OA;9-oktadekanoik asit) gibi yağ asitleri, enerji depoları olmaları açısından önemlidirler ancak bundan daha önemli olarak AA aynı zamanda ikincil mesajcı ve inflamasyon ile sinyal iletiminin kuvvetli mediyatörleri olan eikozanoidlerin prekürsörleri olarak görev yapmaktadır. PLA₂ hidrolizinin diğer önemli ürünü olan lizofosfolipid, hücre sinyallerinde, fosfolipidlerin yeniden oluşumunda ve membran perturbasyonunda önemlidir. Hücre sinyallerindeki rolüne ilaveten, PLA₂'nin yakın zamanda, sistemik ve akut inflamatuar durumlardan kansere kadar değişkenlik gösteren bir aralıkta çok sayıda patofizyolojik durumda rol aldığı belirlenmiştir.

PLA₂, mikroorganizmalar ve değişik hayvan kaynaklarından farklı tekniklerle izole edilerek saflaştırılmaktadır. Hücre sinyal ve fonksiyonları itibariyle farklı hastalıklara neden olabilen PLA₂'nin aktivasyonu üzerine terapötik ve patofizyolojik çalışmalar yapılmaktadır. Bu nedenle enzimoterapi gibi medikal uygulamalarda kullanılacak olan bu enzimin farklı kaynaklardan izole edilerek yüksek saflıkta elde edilmesi özellikle önemlidir.

Bu çalışmada, PLA₂ kaynak olarak sığır pankreasından biyokimyasal metodlar ve afinite ultrafiltrasyon yöntemi kullanılarak saflaştırılmıştır. Afinite ultrafiltrasyonda, saflaştırılan protein bir çözünür

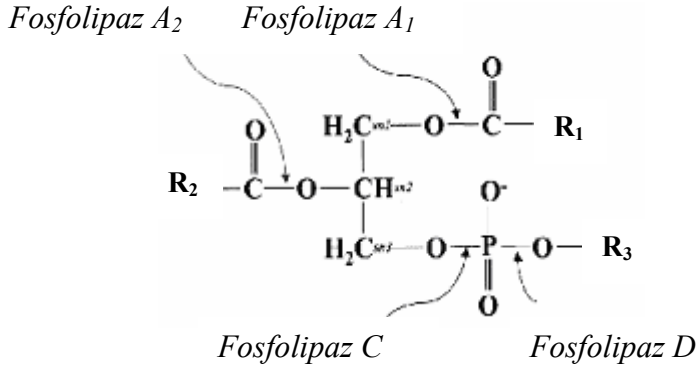
polimerden oluşan makroligand yada kovalent bağı hedef protein-spesifik afinite ligandı ve çözünmez mikropartikül ile kompleks oluşturur. Kompleks bir ultrafiltrasyon membranı ile tutulurken, istenmeyen proteinler membrandan geçer. Bu istenmeyen proteinler sistemden taşıyıcı sıvı yoluyla uzaklaştırılırlar. Sistem sonra hedef proteini mikroligand kompleksinden ayrıştırarak uzaklaştıran ajan ile desteklenir(yada sisteme bu ajan eklenir). Ardından, mikroligand kompleksi tutulurken, saflaştırılan protein membrandan geçer. Makroligand rejenerasyondan sonra tekrar kullanılabilir.

Bu tez çalışmasındaki saflaştırma yöntemi olarak kullanılan afinite ultrafiltrasyonun esası, ligand olarak substrat olan fosfatidiletanolamin veya tarafımızdan sentezlenen enzim inhibitörünün kullanıldığı alginat veya kitosan tabanlı ve koşullara bağılı olarak suda çözünür bir matrikse dayandırılmıştır. Enzimin molekül kütlesi ve saflık testi(SDS-PAGE) aynı zamanda enzim reaksiyonu ve kinetiğinin de optimum koşulları tespit edilmiştir.

2. FOSFOLİPAZLAR

Hücre membranının ana bileşeni fosfolipidlerdir. Gliserin iskeletinden türeyen bu moleküller Şekil 2.1’de de gösterildiği üzere *sn*-3 pozisyonunda fosfat içeren bir baş grup ve bu gruba bağılı fosfolipidin yapısına göre R₃ pozisyonunda serin, etanolamin, kolin veya inozitol grupları bağılıdır. *sn*-1 ve *sn*-2 pozisyonunda uzun zincirli yağ asitlerini taşırlar. *sn*-2 pozisyonunda genellikle doymamış yağ asitleri bulunur. Membran fosfolipidlerinin sürekliliği ve sayısı fosfolipazların aktivitesine bağılıdır. Bu enzimler öyle spesifiktirler ki, her enzim ailesi

fosfolipid iskeleti içinde aşağıdaki şekilde(Şekil 2.1) görüldüğü gibi spesifik bir bağın hidrolizini katalizler.



Şekil 2.1 Fosfolipazların etki şekilleri

Fosfolipaz B *sn*-1 ve *sn*-2 pozisyonundaki ester bağlarını parçalar ve her iki yağ asidini de hidrolizler. Fosfolipaz C'ler (toprak basillerinde ve fosfolipaz D'ler (bitkilerde) fosfodiester bağlarını hidroliz ederler ve fosfodiesterazlar olarak sınıflandırılırlar(Dennis, 1991; Simonsson *et al.*, 2000; Capper *et al.*, 2001). Fosfolipaz A₂'ler etki şekillerine göre karboksilik asit esterazdırlar, özellikle yılan ve arı zehirinde ayrıca pankreatik sıvılarda, insan ve hayvanların farklı dokularında bulunurlar(Kaiser, 1999; Six *et al.*, 2000; Dennis, 1997).

3. FOSFOLİPAZ A₂

Fosfolipid hidrolizleyen bir enzimin ilk olarak 1877'de tanımlanmasından bu yana, bu enzim çoğu araştırmacının ilgisini çekmiştir(Bokay, 1877/78). Şimdilerde Fosfolipaz A₂ olarak tanımlanmış olan enzim aktivitesi ilk olarak 1890'larda kobra zehiri kullanılarak fenomenolojik olarak ayrıntılı bir şekilde

çalışılmıştır(Stephens *et al.*,1898; Fairbairn, 1945). Benzer özellikler taşıyan ve salgılanan bir PLA₂ ise domuz pankreasında bol miktarlarda bulunmuştur. Daha sonradan gerçekleştirilen araştırmalarda, bu küçük ve salgılanmakta olan PLA₂'leri Ca²⁺'a bağımlı, yüksek disülfid bağı olan ve katalitik histidin ve aspartat barındıran kalıntılar olarak tanımlanmıştır (Davidson *et al.*, 1990). Yıllar boyunca venomlar ve çeşitli hayvanların pankreatik sıvılarında salgılanmakta olan daha fazla sayıda PLA₂'ler keşfedildi ve bu enzimler, disülfid bağ pozisyonları ve kendilerine has döngüleri ile genişlemeleri zemininde iki farklı grup altında toplandılar (Davidson *et al.*, 1990; Dufton *et al.*, 1983). Daha sonra, Grup II PLA₂, memelilere ait non-pankreatik PLA₂ bulundurmalarına göre genişletildi ve orijinal olarak sinoviyal sıvıdan izole edilmiş bir enzim olması nedeniyle bazıları tarafından sPLA₂ olarak tanımlandı(Kramer *et al.*, 1989; Seilhamer *et al.*, 1989) ve şimdilerde ise Grup IIA PLA₂ olarak kabul edilmektedir. Bunu müteakiben, arı venomundan elde edilen benzersiz PLA₂, Grup III PLA₂ olarak sınıflandırıldı (Davidson *et al.*, 1990). Son yıllarda ise bir katalitik histidinden faydalanan çok sayıda ilave PLA₂ formu keşfedilerek açık bir şekilde I, II ve III. PLA₂ gruplarıyla ilişkilendirildi ancak bu gruplara kolaylıkla uyum göstermedi; bu ise V, IX, X ve XI numaralı PLA₂ gruplarının oluşturulmasına yol açtı(Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2).

Çizelge 3.1 Fosfolipaz A₂ grupları

Grup	Kaynak	Lokalizasyon	Boyut (kDa)	Ca ²⁺	Disülfid bağ sayısı	Moleküler özellikleri	
I	A	Kobra, Asya yılanı	Salgılanan	13-15	mM	7	His-Asp çifti
	B	Domuz/insan pankreası	Salgılanan	13-15	mM	7	His-Asp çifti
II	A	Çıngıraklı yılan,engerek, insan eklem sıvısı/plateletler	Salgılanan	13-15	mM	7	His-Asp çifti, karboksil
	B	Gaboon engerek	Salgılanan	13-15	mM	6	His-Asp çifti, karboksil
	C	Sıçan/fare testis	Salgılanan	15	mM	8	His-Asp çifti, karboksil
III		Arı,kertenkele	Salgılanan	16-18	mM	5	His-Asp çifti
IV	A	Raw 264.7/sıçan böbreği, insan U937/plateles	Sitozolik	85	<μM		Ser-228,Arg-200, Asp-549,Ser-505
	B	İnsan beyni	Sitozolik	100	<μM		N-terminal ,Ser-228
	C	İnsan kalbi/kas	Sitozolik	65	-		Ser-228, Ser-505/Ser-727
V		İnsan/sıçan/fare kalbi/akciğer P388D1 makrofajlar	Salgılanan	14	mM	6	His-Asp,
VI		P388D1 makrofajlar,CHO hücreleri	Sitozolik	80-85	-		GXSXG, ankirin birimleri, 340kDa kmlpx
VII	A	İnsan plazması	Salgılanan	45	-		GXSXG, Ser-273, Asp-296, His-351
	B	Sığır beyni	Sitozolik	42	-		
VIII		Sığır beyni	Sitozolik	29	-		Ser-47
IX		Deniz Salyangozu	Salgılanan	14	mM	6	His-Asp
X		İnsan lökositleri	Salgılanan	14	mM	7	His-Asp
XI	A	Yeşil pirinç filizi (PLA-I)		12.4	mM	6	
	B	Yeşil pirinç filizi (PLA-II)		12.9	mM	6	

1991 yılında, PLA₂'lerin küçük, katalitik bir histidin barındıracak şekilde salgılanan enzimler olarak sınıflandırılması, başlangıçta nötrofillerde ve trombositlerde sitozolik PLA₂ aktivitesinin tanımlanması ve dizi halinde klonlanması nedeniyle demode hale geldi (Alonso, 1986; Kramer *et al.*, 1989; Clark *et al.*, 1991). Elde edilen dizi ise tamamen bağlantısız olan 85kDa'luk, katalitik bir serin barındıran ve disülfid bağı olmayan bir PLA₂ ortaya çıkardı (Sharp *et al.*, 1991). Hücre sitozolünden elde edilmesinden dolayı cPLA₂ olarak adlandırılan PLA₂'nin klonlanmasından bu yana Grup IV PLA₂ (şimdilerde Grup IVA PLA₂) olarak sınıflandırılmıştır. Daha sonra, görece daha ilgisiz olan PLA₂ grupları keşfedildi ve sınıflandırıldı, ve bunlar arasında toplam sayıyı 11'e ulaştıracak şekilde VI, VII ve VIII grupları da vardı (Çizelge 3.1). Genom biliminin ortaya çıkmasıyla PLA₂ alt gruplarının sayısında bir artış olmuştur ve bu artış, gelecekte daha da fazla PLA₂ grubu ortaya çıkacağına işaret edecek şekilde yeni PLA₂'lerin tanımlanmasına sebep olmuştur. Bu bilgilerin ışığında dizi verilerinden faydalanmak yerine biyolojik özellikler üzerine odaklanırsa, PLA₂ sınıflandırması üç ana tip olacak şekilde basitleştirilebilir: Bunlar milimolar düzeyde Ca²⁺'a ihtiyaç duyan ~14kDa civarında küçük molekül kütleli salgılanan PLA₂'ler(sPLA₂), yüksek molekül kütleli(~80-85kDa) Ca²⁺'a ihtiyaç duyan(cPLA₂) ve Ca²⁺'a ihtiyaç duymayan(iPLA₂) intraselüler enzimler olarak sınıflandırılmıştır(Dennis, 1994; Waite, 1990).

sPLA₂'ler memelilerden salgılanırlar ve primer yapıya göre genellikle iki grup altında sınıflandırılırlar: Grup I(PLA₂-I) pankreatik sindirim enzimi(pankreatik PLA₂) ve GrupII(PLA₂-II) vücut sıvılarında, hücrelerde ve nonpankreatik sıvılarda bulunmaktadır(nonpankreatik PLA₂). PLA₂-I domuz, öküz, koyun ve at pankreasından saf formda izole edilmiştir(De Hass *et al.*, 1968; Dutilh *et al.*, 1975; Evenberg *et al.*, 1977). İnsan pankreatik fosfolipazı ilk saflaştırma çalışması, otopsi

materyali kullanılarak yapılmış ve daha sonra enzim, insan pankreatik sıvıdan saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir(Grataroli *et al.*, 1982). At, köpek, sıçan, sığır, insan ve domuz pankreasından pankreatik PLA₂'lerin bütün aa dizileri bilinmektedir(Ohara *et al.*, 1986; Fleer *et al.*, 1978; De Haas *et al.*, 1970). İnsan, domuz, öküz ve at pankreatik PLA₂'lerin N-terminal bölgesindeki ilk 32 artığın aminoasid dizisi işaretli bir homolog ile ortaya çıkarılmıştır(Ono *et al.*, 1984). PLA₂, 7 disülfid köprü bağı ile bağlanmış 125 aa artığından oluşmuş bir polipeptittir(Dufton *et al.*, 1983). İnsan PLA₂-I'in yaklaşık molekül kütlesi 14kDa civarındadır. Enzim sıcaklığa karşı dayanıklıdır ve optimum pH 8.5'da milimolar düzeyde Ca²⁺ iyonları ile aktive olmaktadır(Eskola *et al.*, 1983). İnsan sPLA₂ bazik bir proteindir, diğer PLA₂'lerin yüksek derecede korunmuş aminoasid artıkları ve dizi karakterinin çoğunu içermektedir(Kramer *et al.*, 1990). PLA₂-II(nonpankreatik) PLA₂-I'in tersine, 11. ve 77. pozisyonlarda sistein artıklarından yoksundur. PLA₂-I ve PLA₂-II arasındaki yapısal farklılıklara rağmen aktif merkezleri ve hidrofobik bölgeleri benzerdir. Bu durum sığır pankreası ve insan sinovial sıvı PLA₂'nin X-ray yapı analiziyle doğrulanmıştır. Bu sonuç aktif merkezin fonksiyonel anlamda önemli artıkları ve üç boyutlu yapısının hemen hemen aynı olduğunu göstermiştir(Wery *et al.*, 1991). PLA₂-II aktivitesi Ca²⁺ bağımlıdır ve bazik optimum pH'a sahiptir. Son zamanlarda enzimatik olarak aktif insan PLA₂-II'nin kimyasal sentezi tanımlanmıştır(Hackeng *et al.*, 1997). sPLA₂'lerin tümü düşük moleküler kütleli enzimlerdir (yaklaşık 14kDa) ve yapılarındaki 5-8 disülfid bağları nedeniyle çok katı bir tersiyer yapı sergilerler(Çizelge 3.1). Bu durum söz konusu enzimlere hem proteolize karşı bir dayanıklılık, hem de denatürasyona karşı direnç sağlamakta ve bahsedilen bu özellikler ise buldukları yer olan ekstraselüler sıvılarda aktivitelerini korumaktadır. sPLA₂'ler *in vitro* olarak önemli düzeyde yağ asidi selektivitesi sergilemezler, ancak milimolar Ca²⁺ açısından gereksinim ortaya

koyarlar. Memeli hücrelerinde beş farklı sPLA₂ mevcuttur ve bunlar arasında I, IIA, IIC, V ve X. gruplara ait olanlar vardır(Dennis, 1994; Tischfield, 1997).

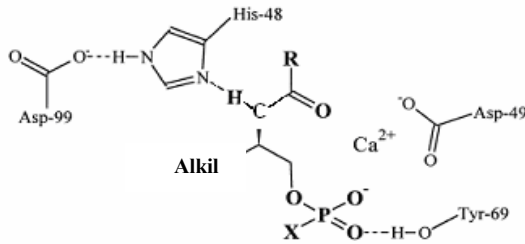
cPLA₂ ya da Grup IV PLA₂, yüksek moleküler kütleli (85 kDa) bir enzimdir ve uygulamada çalışılmış olan hemen hemen tüm hücre türlerinin sitozolik fraksiyonlarında bulunmuştur. Bu enzim, reseptörle aktive edilen sinyal kaskadlarında yerinin olduğunu düşündüren özellikler sergilemektedir. Bu enzim, mitojenle aktive olan protein kinaz kaskadının kinazları tarafından fosforillenmektedir ve bu da enzime ait spesifik aktivitede orta seviyede artışa sebep olmaktadır. Bunun da ötesinde protein dahilinde bulunan kalsiyum-lipid bağlayıcı (CaLB ya da C-2) bölgesi aracılığıyla intraselüler Ca²⁺ artışına yanıt olarak membranlarda translokasyon yapabilmektedir. Sonuç olarak, cPLA₂, AA taşımakta olan fosfolipidler için bir tercih gibi davranmaktadır(Dennis, 1994; Leslie, 1997). cPLA₂'nin, enzimin fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfat ile kuvvetli bir etkileşim sergilediğini düşündürecek şekilde plekstrin benzeriymiş gibi davrandığı yakın zamanda gösterilmiştir. Bu etkileşim ise enzim aktivasyonuna yardımcı olabilmektedir(Mosior *et al.*, 1998).

iPLA₂'ler, PLA₂ ailesinin en yeni tanımlanmış olan üyeleridir. Her ne kadar çoğu doku ve hücre homojenatı için çok sayıda Ca²⁺ bağımlı PLA₂ aktivitesi bildirilmişse de, bunlardan sadece birisi ayrıntılı olarak incelenmiştir(Ackermann *et al.*, 1995). Bu iPLA₂, Grup VI enzimidir. sPLA₂ ve cPLA₂'lerle farklı bazı özellikleri paylaşır. sPLA₂'ler gibi cPLA₂'ler de AA içeren fosfolipidler için belirgin hiçbir substrat spesifikliğı göstermezler ve post-translasyonel kovalent farklılaşmalar için hedef olmadıklarına dair bir görüntü sergilemektedirler. iPLA₂, katalitik mekanizmanın intraselüler yerleşimini, boyunu ve belki de elemanlarını cPLA₂ ile paylaşır(Balsinde *et al.*, 1997). Ca²⁺ eksikliğine

ilaveten iPLA₂'nin kendine has bir özelliği ise, molekülün N-terminali olan yarısında 8 ankirin motif barındırmasıdır(Tang *et al.*, 1997; Balboa *et al.*, 1997).

3.1 Fosfolipaz A₂'nin Katalitik Mekanizması

Mekanizmalara dair çok sayıdaki laboratuvar çalışmasında, sPLA₂'lerle katalizin serin esterazların açıl-enzim formasyonunda yer almadıklarını ortaya koymuştur(Dennis, 1994). Bunun yerine sPLA₂'ler, daha sonra karbonil grubuna saldıran, H₂O bağı polarize eden bir Asp'in yardımcı olduğu atıl bir His kalıntısını kullanır. Tetrahedral olan geçiş aşamasındaki ara ürünün stabilize edilmesi için Ca²⁺ döngüsüne bağlı olan Ca²⁺ iyonuna gerek duyulur(Dennis, 1994). Bu nedenle, PLA₂'lerin bu sınıfı için Ca²⁺ iyonu katalizde oldukça aktif bir role sahiptir. sPLA₂'ler için düşünülen mekanizma Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1 Substrat olarak fosfatidilkolinin 14kDa-PLA₂'nin aktif merkezine bağlanma mekanizması. (Kısaltmalar;R: yağ asidi, X:O-CH₂-CH₂-N⁺(CH₃)₃)

Buna karşın, Grup IV cPLA₂'ye ait katalitik mekanizma Ca²⁺'dan bağımsızdır. Yukarıda da belirtildiği gibi, kendisine ait substratın yerleşik olduğu membranla etkileşime girebilmek için cPLA₂ Ca²⁺'a ihtiyaç duyar(Dennis, 1994; Leslie, 1997). cPLA₂'nin bir açıl-enzim ara ürünü üzerinden serin hidroksilaz işlevine sahip olduğu görülmektedir. Her ne kadar katalitik mekanizması tam olarak açıklanabilmiş değilse de, cPLA₂, klasik Ser/His/Asp üçlüsünde His için

mevcut rollerinden birinin demonstre edilememesinden dolayı yeni bir serin hidroksilaz sınıfı olarak tanımlanmıştır(Pickard *et al.*, 1996).

cPLA₂ ile benzer şekilde, iPLA₂ de, diğer lipazlarda da yaygın olarak görüldüğü şekilde, GX SXG'nin sonlanış bölümünün ortasında yer alan aktif haldeki bir Ser artığı ile birlikte, bir serin hidroksilaz işlevine sahip gibi görünmektedir(Balsinde *et al.*, 1997; Balboa *et al.*, 1997). Son dönemde elde edilen kanıtlara bakılırsa, bu enzim, bir açıl-enzim ara ürünü üzerinden işlev görmektedir(Lio *et al.*, 1998). Kataliz için önemli olan diğer iPLA₂ kalıntıları ise henüz tanımlanabilmiş değildir.

3.2 Fosfolipaz A₂ Grupları İçin Sınıflama Kriterleri

Çeşitli PLA₂ enzimleri, I'den XI'e kadar gruplara sınıflandırılmıştır (Çizelge 3.1)(Balsinde *et al.*, 1999). Herhangi bir grup ya da alt gruba dahil edilme kriterleri, yeni gruplar tanımlandıkça değişiklik göstermiştir (Dufton *et al.*, 1983; Dennis, 1994). Ancak grup çeşitliliği ve boyutlarındaki artışlarla birlikte, aşağıda da tarif edilmiş olan mantıklı sınıflandırma şablonuyla kodlanan kriterlere gerçekten büyük ihtiyaç doğmuştur. Bir enzimin PLA₂ grubuna atanması için gerekli olan **ilk kriter**; fosfolipid substratın *sn*-2 ester bağının hidrolizini katalizlemesi, bu hidroliz reaksiyonu için katalizör görevi taşımasıdır. Doğal olarak meydana gelen substratlar arasında trombosit aktive edici faktör, kısa yağ asidi zinciri ile oksidize fosfolipidler ve uzun yağ asidi zincirli fosfolipidler yer alır ve bunlarda *sn*-2 açıl zincirleri 2 (asetil) ile 20 (araşidonat) arasında değişen ve hatta daha da fazla sayıda olabilecek kadar karbon taşırlar. Asıl aktivitenin PLA₂ aktivitesi olması gerektiğinden, PLA₂ üst ailesinin üyeleri, aralarında PLA_b, lizofosfolipaz A₁/A₂, açıl transferaz veya transaçilaz aktivitenin de yer aldığı diğer etkinliklere sahip de olabilirler (Six *et al.*, 2000).

Bir enzimin PLA₂ grubuna dahil edilmesi için gerekli olan **ikinci önemli kriter** ise, tüm amino asit dizisinin bilinme zorunluluğudur. Ayrıca, gelecekte PLA₂ üst ailesine olacak yeni katılımlar, DNA ya da aktivite bazlı araştırmalarla keşfedilmiş olmalarından bağımsız bir şekilde, belirsiz bir sistem dahilindeki spesifik bir aktiviteyle dizilimin ilişkilendirilebilmesi/orantılanabilmesi için klonlanabilmeli, eksprese edilmeli ve saflaştırılabilmelidir (Six *et al.*, 2000).

Sınıflama için **üçüncü temel kriter** ise, her bir PLA₂ Grubunun, homolog olduğu tanımlanmış olan dizileri barındıran tüm enzimleri içerme zorunluluğudur. Spesifik olarak, herhangi bir tür dahilinde birden fazla homolog PLA₂ geni mevcutsa, her bir PLA₂ geni, Grup IVA ve IVB ile IVC örneklerinde olduğu gibi bir alt gruba atanmalıdır. Ayrıca, Grup IIC PLA₂'de de görüldüğü gibi sadece belirli türler dahilinde paraloglar da görülebilir (Tischfield *et al.*, 1996). Farklı türlerden kaynaklanan homologlar (ya da ortologlar), bu türden atamaların mümkün olduğu durumlarda aynı alt gruba dahil edilmelidirler ve buna örnek ise zebra balığı ile insan Grup IVA PLA₂'sidir. Diğer yandan, bazı zamanlarda homolog enzimleri belirli bir alt gruba sınıflamak zor olabilir. Buna güzel bir örnek ise, Grup IV PLA₂ için homolog olan ancak hali hazırda Grup IV PLA₂ alt gruplarına sınıflandırılmamış olan, çeşitli mantarlara ait fosfolipaz B (PLB) olmaktadır. PLB'lerin tam olarak sınıflandırılması, biyokimyasal özellikleri olduğu kadar PLB'lerin daha fazla miktarda diziliminin, PLB'lerin mevcut alt gruplardan birine veya Grup IV PLA₂'ya sınıflandırılmalarına izin vermesi ya da yeni bir alt grubun tanımlanmasını sağlaması gereklidir. Sınıflandırma için gerekli olan **dördüncü kriter**, aynı PLA₂ geninin aktif birleşik varyantlarının ayrı proteinler olmasını ancak aynı alt grubun parçası olmasını dikkate almaktadır. Birleşik olan her bir varyant, aktivitesi bir kez onaylandığında, iki aktif varyantı bulunan ve burada Grup IVA-1

PLA₂ ve Grup IVA-2 PLA₂ olarak ayrılmış bulunan Grup IVA PLA₂ örneğinde olduğu gibi numaralanmalıdır (Ma *et al.*, 1999; Winstead *et al.*, 2000). Grup IVA PLA₂ örneğinde, onaylanmış inaktif iki birleşik varyant, PLA₂ enzimi olarak kabul edilmemekte ancak Grup VIA ankyrin-1 ve Grup VIA ankyrin-2 şeklinde grup nomenklaturünü hala kullanmaktadır (Winstead *et al.*, 2000) . PLA₂ grupları yukarıda belirtilen kriterlerin ışığında aşağıda ayrıntılı bir şekilde incelenmiştir.

3.3 Fosfolipaz A₂ Grupları

3.3.1 Aktif Merkezinde Histidin İçeren PLA₂ Grupları (sPLA₂'ler)

Genel Benzerlikler

Oldukça büyük sayılarda olup Grup I, II, V ve X'e denk düşen ve yılan venomları ile memeli salgılarında bulunup yakın bağlantılı olan PLA₂'lerin benzerlikleri dikkat çekmektedir , buna müteakiben, her bir alt grup için spesifik farklılıklar ve önemli özellikler mevcuttur. Bunlardan sonra da Grup III, IX ve XI PLA₂'lerin özellikleri ele alınacaktır(Çizelge 3.2). I, II, V ve X. Grup PLA₂'ler yakın bir şekilde bağlantılıdır ve fosfolipidlerin *sn*-2 ester bağının ayrılması için ortak bir mekanizmayı paylaşırlar. Hidroliz, aktif histidine hidrojen bağı ile bağlı olan bir su molekülünün aktivasyonu ve oriyantasyonu üzerinden gerçekleşir ve bu ise, katalitik histidin taşımakta olan tüm PLA₂'lerin 7-9 arası pH'a bağlı oluşunu gerektirmektedir. Bir katalitik histidinden faydalanan söz konusu bu PLA₂'ler; I, II, III, V, IX, X ve XI. gruplarına denk düşer ve uyumluluk açısından histidin PLA₂'leri olarak adlandırılırlar. Bunun da ötesinde, katalitik histidin için yerleşik olan komşu, korunmuş bir aspartattır ve His/Asp çiftini oluşturmaktadır. Bu

Asp, PLA₂ reaksiyonunun negatif yüklü geçişini stabilize eden pozitif yüklü okso-anyon deliğini oluşturan ve kritik öneme sahip olan Ca²⁺ için bir ligand olmaktadır. Bu durum, Histidin PLA₂'lerinin mM Ca²⁺ bağımlılığının kaynağı olmaktadır. Sonuç olarak, aralarında tirozinler ve Ca²⁺ bağlayıcı halkadaki glisinler ve katalitik histidini aktive edip oriyente eden ikinci bir aspartat kalıntısı da dahil olmak üzere Grup I, II, V ve X için aktif bölgelerin hidrojen bağlarına katılım gösteren çok sayıda korunmuş kalıntılar mevcuttur (Dennis, 1994; Scott *et al.*, 1991; Arni *et al.*, 1996; Six *et al.*, 2000).

I, II, V ve X. PLA₂ Grupları, kolayca açıklanabilen dizilim benzerliği ve hatta büyük yapısal benzerlikleri nedeniyle evrimsel olarak bağlantılı olmaktadır. Yüksek oranda korunmuş olan aktif bölge kalıntılarının dışında, her bir grup üyesinde, mutlak olarak korunmuş olan 6 adet disülfid bağ linkleyici kalıntı, 27-131, 29-45, 44-109, 51-102, 61-95, 85-100 ve ikiye kadar ilave kendine tekil disülfid bağı vardır. Buna ilaveten, tüm bu enzimlerin, aktif protein salgılanma sürecinde ayrılmakta olan sinyal dizileri vardır. Bu durumun tek istisnası, aktif enzimin üretilmesi için propeptidin tripsin tarafından ayrılması gereken GIBPLA₂ olmaktadır (Davidson *et al.*, 1990; Valentin *et al.*, 1999).

3.3.1.1 I, II, V ve X. Fosfolipaz A₂ Grupları

GIAPLA₂

Yukarıda da tanımlandığı gibi, kobra venom PLA₂'si, karakterize edilmiş olan ilk örnektir ve 6 korunmuş disülfidi ile ilave bir yedinci disülfid taşımaktadır ve bu, Grup I enzimlere has olup 11 ve 77. kalıntıları birleştirmektedir (Davidson *et al.*, 1990). Buna ilaveten, GIAPLA₂'ler, elapid halka (elapid loop) olarak adlandırılan ve ikinci büyük α -heliksini

β -kanadına bağlayan karakteristik bir yüzey halkasına sahiptir. Tüm histidin PLA_2 'leri gibi $GIAPLA_2$ 'ler de fosfolipid substratlarına ulaşabilmek için bağ kurabilmek adına yüzeyinin agrege olmasına gereksinim duyar. $GIAPLA_2$ 'lerin bazılarındaki kısmi kinetik özellik, fosfatidiletanolamin (PE) hidrolizinin ara yüzde PC varlığıyla artış gösterdiği fosfatidilkolin (PC) aktivasyonu ile tanımlanmaktadır. İyi karakterize olmuş substrat bağlayıcı bölgeye ilaveten, Hindistan kobralarından elde edilen $GIAPLA_2$ 'lerde daha yeni, iki ayrılabilir PC aktivasyon bölgesi ve yüzler arası aktivasyon adreslenmiştir ve bu da $GIAPLA_2$ -fosfolipid etkileşimlerinin anlaşılabilmesinde büyük artış sağlamıştır(Lefkowitz *et al.*, 1999; Gelb *et al.*, 2000).

GIBPLA₂

Tanımlanan ilk venom dışı PLA_2 , ineklerin pankreatik salgılarından elde edilmişti ve sonrasında, aralarında insanların da bulunduğu pek çok türü de elde edilebilmiştir. $GIBPLA_2$ 'nin, 11 ve 77. kalıntılar arasındaki yedinci disülfid bağın haricinde kendine has elapid halkanın 5 amino asit genişlemesi vardır ve buna pankreatik halka denir(Davidson *et al.*, 1990). Pankreatik sıvılara fazlaca salgılanmasıyla uyumlu bir şekilde, $GIBPLA_2$, diğer doku ve hücrelerdeki görece daha az düzeyde alışlagelmiş olan rollerine ilaveten diyetle alınan fosfolipidlerin sindirilmesinde de açık bir role sahiptir(Arita *et al.*, 1991; Snitko *et al.*, 1999).

GIIAPLA₂

Başlangıçta engerek ve çingiraklı yılanlara ait venomlardan elde edilen yaklaşık 14 kDa ve yaklaşık 120 aminoasitlik matür proteinlerden karakterize edilen GIIAPLA₂, bütün dizilim benzerliği ve spesifik disülfid bağı ile halka konumlanması zemininde memelilere ait non-pankreatik PLA₂'leri de kapsar hale gelmiştir(Dufton *et al.*, 1983). GIIAPLA₂ korunmuş olan 6 disülfide ilave olarak 50 ve 138 arasında yedinci bir taneye ve Grup X PLA₂'larda olduğu gibi tüm GIIAPLA₂'lerde de bulunan C-terminali uzantılı Cys-138'e sahiptir. Alakalı bulunan çeşitli histidin PLA₂'lerin filogenetik analizi, tüm memeli Grup II ve V enzimleri arasındaki çok daha büyük boşluğa karşın hem memeli hem de venom enzimlerinin GIIAPLA₂ kapsamında bulunduğu mevcut sınıflandırma sisteminde büyük belirsizlikler olduğunu ortaya çıkarmıştır(Davidson *et al.*, 1990).

GIIAPLA₂'nin memelilerde eikozanoid üretiminde de sorumluluk sahibi olduğu düşünülmüş, ancak bu durum, söz konusu çalışmaların çoğunun IIC, D, E, F ya da Grup V PLA₂'leri GIIAPLA₂'lerden ayıramaması nedeniyle oldukça karmaşık hale gelmiştir. Farelerdeki bilinmekte olan histidin PLA₂ homologlarına dair bir dizi sıralaması ve filogenetik ağaç, yakın döneme ait bir makalede gösterilmiştir ve bu makale, Grup II PLA₂'nin alt grupları arasındaki ilişkileri demonstre etmektedir(Valentin *et al.*, 1999). Fare GIIAPLA₂'sinin ekspresyonu oldukça sınırlıdır ve insan GIIAPLA₂'sinin hemen hemen her yerde salgılanıyor olmasına karşılık farede büyük oranda sindirim sisteminde (barsaklarda) ve bir miktar prostatta salgılanmakta ve başka yerde tespit edilebilmiş değildir(Valentin *et al.*, 1999; Cupillard *et al.*, 1997). Fare ve insan tür varyantları için çekirdek dizilim özdeşlikleri arasındaki farklılıklar (% 67-89) olduğu kadar fare ve insandaki GIIAPLA₂

homologları arasındaki bu değişken ekspresyon şablonlarında da türe has verilerin genellenmesi sorun haline gelebilir. İnsan GIAPLA₂'sinin bakteriyel membranlar gibi anyonik fosfolipid içerikli arayüzlere sıkı bir şekilde bağlandığı ve nötral membranlara karşı ya çok az aktivite gösterdiği ya da hiç aktivite göstermediği bilinmektedir(Kramer *et al.*, 1989; Kinkaid *et al.*, 1995). Son yıllarda, insan GIAPLA₂'si, anyonik membranlara olan afinitesi nedeniyle antibakteriyel aktivite gibi konak savunma yanıtlarından sorumlu tutulmuştur (Weinrauch *et al.*, 1996).

GIIBPLA₂

Grup IIBPLA₂'leri, GIPLA₂'lerin anomalili bir alt grubudur, memelilerde bulunmaz, ancak iki ayrı engerek türü olan *Bitis gobonica* ve *Bitis nasicornis*'de görüldüğü bildirilmiştir(Botes *et al.*, 1974). GIIBPLA₂'ler, diğer türlü 61-95 disülfid bağını gerektirmeleri dışında venom GIAPLA₂'leri ile benzerlik gösterirler (Davidson *et al.*, 1990). Literatürde mevcut olan ve bunların gerçek olmadığını söyleyen bir iddiaya karşın söz konusu bu GIIBPLA₂'lere ilave herhangi bir homologue olmayan yüzlerce venom PLA₂'si tanımlanmıştır(Siddiqi *et al.*, 1991). Belirgin halde olan bu tutarsızlık ise muhtemelen, GIIPLA₂'lerin başlangıç diziliminde keşfedilmiş olan iki GIIPLA₂'nin peptid dizilimine dair hatalardan kaynaklanmaktadır(Kuchler *et al.*, 1989). Buna alternatif olarak, neredeyse evrensel olduğu keşfedilen 61-95 disülfid bağını yerinden koparan mutasyonlar, evrimsel istisnaları ortaya koymaktadır. Hangi yolla olursa olsun, mevcut sınıflandırmada GIIBPLA₂'lerin bulunması, söz konusu bu alt gruba, garanti edilenden daha fazla önem yüklemekte ve karışıklığa yol açmaktadır(Six *et al.*, 2000).

GIICPLA₂

GIICPLA₂ kemirgenlerden klonlanmış olan ve yaklaşık 15kDa kütleli ve 130 aminoasit barındırdığı görülen matür bir proteindir. GIICPLA₂'nin, GIPLA₂'lara özgü olan 7 bağa ilave olup genişlemiş bir halkadaki 87 ve 93 arasında kurulan bağ ile birlikte 8 disülfid bağ içermektedir. GIICPLA₂ kemirgenlerde eksprese edilmektedir ancak insanlarda bir ekzondaki kısımlardan birinin eksikliği, bunun yalancı gen olduğuna işaret etmektedir. mRNA, kemirgenlerin testislerinde, özellikle mayoz bölünme geçiren hücrelerde yüksek oranda eksprese edildiği gibi beyin ve pankreas'ta da eksprese edilmektedir. Rekombinant kemirgen GIICPLA₂'si, insan 293s hücrelerinden salgılanmaktadır ve PC ve PE'den daha fazla miktarda fosfatidilinozitol (PI) üzerinde etkinliğe sahiptir ancak bunların tümü hidrolize edilmektedir (Valentin *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 1994).

Çizelge 3.2 Aktif Merkezinde Histidin İçeren PLA₂ Grupları (sPLA₂'ler)

Grup	Kaynak	Lokalizasyon	Boyut (kDa)	Ca ²⁺	Disülfid bağ sayısı	İlk bulunan kaynağı	
I	A	Kobra, Asya yılanı	Salgılanan	13-15	mM	7	Kobra
	B	Memeli pankreası	Salgılanan	13-15	mM	7	İnsan
II	A	Çıngıraklı yılan, engerek zehiri, insan eklem sıvısı/plateletler	Salgılanan	13-15	mM	7	İnsan
	B	Gaboon engerek zehiri	Salgılanan	13-15	mM	6	Engerek
	C	Sıçan/fare testis	Salgılanan	15	mM	8	Fare
	D	İnsan/fare pankreası/dalak	Salgılanan	14-15	mM	7	İnsan
	E	İnsan/fare/beyin/kalp/uterus	Salgılanan	14-15	mM	7	İnsan
	F	Fare testisi/embryo	Salgılanan	16-17	mM	7	Fare
III	Arı/kertenkele/akrep/insan	Salgılanan	15-18	mM	5	Bal arısı	
V	Memeli kalbi/akciğer/makrofaj	Salgılanan	14	mM	6	İnsan	
IX	Deniz Salyangozu	Salgılanan	14	mM	6	Salyangoz	
X	İnsan dalak/timus/lökositler	Salgılanan	14	mM	8	İnsan	
XI	A	Yeşil pirinç filizi (PLA-I)		12.4	mM	6	
	B	Yeşil pirinç filizi (PLA-II)		12.9	mM	6	

GIIDPLA₂

İlk kez 1999 yılında klonlanan GIIDPLA₂ dizisi, fareye ait eksprese edilmiş dizi zincirinde (EST, expressed sequence tag) tanımlandı ve bunu insan ve fare cDNA'larından klonlanması izledi. GIIDPLA₂ dizisi 125 aminoasitlidir ve yaklaşık 14kDa kütlelidir. Bahsettiğimiz mRNA, insan ve farede en yüksek oranda pankreas ve dalakta tespit edilirken timus ve kalın barsakta da daha düşük oranlarda görülebilmektedir. COS ve CHO hücrelerinden sekrete edilen rekombinan fare ve insan GIIDPLA₂'lerinin fosfatidilgliserol (PG), PE ve PC vezikülleri karşısında aktif oldukları ve bu üçü için benzer aktif bölgelere afinite gösterdiği ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca önemli bir ayırt ettirici özellik ise, GIIDPLA₂ karşısında GIAPLA₂ için kısmi bir 1-oksamaylindoline türevinin inhibisyonunda 1000 kattan fazla bir spesifite görülmesidir (Ishizaki *et al.*, 1999; Valentin *et al.*, 1999).

GIIEPLA₂

İlk kez 1999 yılında klonlanan GIIEPLA₂ dizisi, fare EST'sinde gerçekleştirilen aramalarda tanımlandı. Klonlamanın ardından matür proteinin 127 amino asit içerdiği ve yaklaşık 14.5 kDa olduğu, histidin PLA₂'si katalitik kalıntıları barındırdığı ve Grup II üyeleri için tipik olan 7 disülfid bağına taşıdığı görüldü. İnsan GIIEPLA₂'si ise daha sonra klonlandı ve matür enzimlerde yaklaşık %89 yakın uyum olacak şekilde fare GIIEPLA₂'si ile benzerlik taşıdığı gösterildi. Rekombinant saf insan GIIEPLA₂'si PG substratını tercih etmekte ancak PE'yi ve daha düşük bir ölçüde PC'yi de GIAPLA₂ ile benzer eğilimlerle hidrolize edebilmekteydi. Sonuçta, endotoksinle zorlanma durumunda GIIEPLA₂

ekspresyon seviyesinin, GIIAPLA₂ bulunmayan bir çok fare dokusunda artış gösterdiği görülmüştür. Endotoksinle zorlanmış fare akciğerinden elde edilen in-situ hibridizasyon, alveoler makrofajlarda yoğun boyanma olduğunu gösterdi ve bu da in vivo enflamatuar yanıtta GIIEPLA₂'nin rolüne işaret etmekteydi (Valentin *et al.*, 1999; Cupillard *et al.*, 1997).

GIIFPLA₂

En yakın dönemde keşfedilmiş histidin PLA₂'si olan GIIFPLA₂, klonlama sonrasında fare EST veritabanında gerçekleştirilen bir aramada tanımlanmıştır. GIIFPLA₂ dizisi, matür proteinin, herhangi bir fonksiyonu olmayan ve 30 aminoasitten oluşan bir C-terminali uzantısından dolayı 148 aminoasitten oluştuğunu göstermiştir. 4.2 kb'lık mRNA erişkin testisinde ve embriyoda eksprese edilmektedir. Bir insan homoloğu henüz bulunmuş değildir ancak diğer Grup II ve V PLA₂'ler gibi GIIFPLA₂'nin de 4 numaralı fare kromozomunda olmasından dolayı, 1p34-36 no'lu sentenik kromozomda insan homoloğunun var olması beklenebilir (Valentin *et al.*, 1999).

GVPLA₂

İnsan GVPLA₂'si ilk olarak 1994'te keşfedilmiş ve klonlanarak yaklaşık 14 kDa olup I, II, V ve X PLA₂'lerin disülfid bağlarından yalnızca 6 tanesini barındırırken I veya II. PLA₂ gruplarının hiçbir disülfid bağı veya kendine özgü halkasını barındırmadığı görülmüştür. Bu nedenle söz konusu bu benzersiz PLA₂, hali hazırda mevcut olan alt gruplardan herhangi birine kolaylıkla atanamamakta ve Grup V PLA₂ olarak ayrı bir şekilde sınıflandırılmaktadır. GVPLA₂'nin sıçanlarda ve insan kalbinde yüksek oranda eksprese edildiği ancak özellikle insan ve fare dokularında enflamatuar uyaranlara yanıt olarak daha yaygın bir

şekilde eksprese edildiği gösterilmiştir (Valentin *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 1994). *In vitro* ortamda eksprese edildiğinde GVPLA₂, PE ve PC veziküllerine karşı, GIPLA₂ ile zıt olacak şekilde önemli bir aktivite göstermektedir (Chen *et al.*, 1994). GVPLA₂'nin ayrıca inflamasyon ve *in vivo* sinyal iletimi konularında da rolü olduğu ve kendi sinyal partnerleri olan GIVAPLA₂ ve siklooksijenaza olan yakınlığıyla birlikte intraselüler olarak dahi tanımlanmıştır (Murakami *et al.*, 1999; Bingham *et al.*, 1999).

GXPLA₂

1997 yılında, insan EST veritabanlarında yapılan araştırmalarda, yeni ve başka bir PLA₂ geni tanımlandı. Dizilim, 123 amino asitten oluşan ve Grup I, II ve V PLA₂'lere özdeş dizilim kimliği bulunan (27-35%) ve korunmuş 6 adet disülfidi olup histidin ve aspartatlardan oluşan aktif bölgeye sahip matür bir proteini göstermektedir. Ancak, söz konusu bu yeni PLA₂'lerin mevcut sistemle sınıflandırılmasının güç olduğunu kanıtladı, çünkü sırasıyla Grup I ve Grup II PLA₂'lerde bulunan hem 11-77 disülfidi hem de 50-137 disülfidini (sırasıyla Grup I ve II) içermekteydi ve bu nedenle Grup X PLA₂ olarak adlandırılmaktaydı. İnsan GXPLA₂ mRNA ekspresyonu dalak, timus, ve kandaki lökositlerde tespit edildi (Cupillard *et al.*, 1997). GXPLA₂'nin insan monositik THP-1 hücrelerinden, eksojen olarak eklendiğinde inflamasyon ya da sinyal iletiminde rol oynayan AA, OA ve prostaglandin E₂'nin salınımını indüklemektedir (Hanasaki *et al.*, 1999).

3.3.1.2 Grup III Fosfolipaz A₂

Grup III PLA₂'ler mesafeli bir şekilde I, II, V ve X grupları ile ilgilidir. 1970'lerde, ilk karakterize edilen Grup III üyeleri, bal arısı venomundan tanımlanmıştı. GIIPLA₂'nin I ve II. Grup PLA₂'lerle çok

sayıda benzer biyokimyasal özellikleri vardır ve bunlar, dizi benzerliklerine yorulabilir. I, II ve III. Gruplar arasında benzer ölçüler ve korunmuş olan 3 disülfid bağının varlığı nedeniyle GIIPLA₂ aynı zamanda, diğer histidin PLA₂'leri için tanımlanmış olan aynı hidrolaz mekanizmasını destekleyen, aktif bölgede yerleşimli bir homolog His/Asp çifti gösterir(Davidson *et al.*, 1990; Scott *et al.*, 1991; Kuchler *et al.*, 1989). Bu durum, Grup III enzimler için optimum 8.0 pH seviyesiyle uyumlu ve tutarlı olmaktadır. GIIPLA₂ homologları günümüzde bal arılarına ilave olarak sürüngenler, denizanaları ve akreplerdeki venomlarda da tanımlanmaktadır(Valentin *et al.*, 2000; Zamudio *et al.*, 1997).

Akrep venomundan elde edilen ve imperatoksin I (IpTxI) olarak bilinen bir GIIPLA₂ homologu, ryanodin'in Ca²⁺ salınım kanallarına bağlanmasını inhibe etme yeteneğine sahip olmasıyla tanımlanmıştır. Venomdan arıtılmış proteinin indirgenmesi, 12 ve 3 kDa'lık iki proteinin ortaya çıkmasına neden olur. 12 kDa'lık olan bant, diğer venom GIIPLA₂'leriyle önemli derecede benzerliğe sahiptir. Gen klonlandığında, iki polipeptidin aynı gen tarafından, açık bir şekilde matür proteinden çıkarılan bir pentapeptid ile birlikte kodlandığı görülmüştür. IpTxI, muhtemelen ryanodin bağlanma inhibisyonu sağlaması nedeniyle Ca²⁺ye dayalı bir PLA₂ aktivitesine sahiptir, p-bromofenasil bromid ile inhibisyonu ve benzer şekilde ryanodine bağlanma inhibisyonu ise fosfolipid hidroliz ürünleri tarafından indüklenmektedir(Zamudio *et al.*, 1997).

GIIPLA₂ için bir insan homologu da klonlanmış ve karakterize edilmiştir. İnsan GIIPLA₂'si COS hücrelerinde eksprese edildiğinde, PLA₂ aktivitesi, kültür ortamında birikim göstermektedir. Kısmen saflaştırılmış insan GIIPLA₂'sinin ise PG veziküllerini PC

veziküllerinden daha iyi hidrolize ettiği bulunmuştur. pH ve Ca^{2+} bağımlılıkları ise diğer histidin GIIIPLA₂'lerininkilerle uyumlu olmaktadır (Valentin *et al.*, 2000).

3.3.1.3 Grup IX Fosfolipaz A₂

GIXPLA₂, *Conus magus* olarak bilinen deniz salyangozunun venomundan saflaştırılmış, dizilimi bulunmuş ve karakterize edilmiştir. 14 kDa'luk bu protein, yine aynı gen tarafından kodlanan disülfidlerle bağlanmış olan iki polipeptidten oluşmaktadır. Diğer histidin PLA₂'leri ile olan yegane dizilim benzerliği, var olduğu düşünülen aktif bölge His/Asp çifti ve aktif bölge His'e hidrojen bağıyla bağlanan ikinci bir Asp'dir. Ayrıca, geriye kalan 9 sistein kendine has olsa da 3 adet korunmuş yakın sistein mevcuttur. Açık bir şekilde var olan dizilim farklılıkları ve % 50 aktivite için daha düşük (20µM) Ca^{2+} gereksinimi duyuluyor olması, bunu ayrı bir PLA₂ grubu haline getirmekte ve bilinen adıyla Grup IX üyesi sınıfına sokmaktadır (McIntosh *et al.*, 1995).

3.3.1.4 Grup XI Fosfolipaz A₂ (bitki histidin PLA₂'leri)

Yakın döneme ait raporlar, pirinç, karaağaç, karanfil ve *Arabidopsis* gibi bitkilerde de histidin PLA₂'leri mevcudiyetini göstermiştir (Stahl *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1999). Ayrıca, pirinç genomu, birbirleri ile % 31 oranında özdeş olan en az iki farklı histidin PLA₂'sinin varlığını göstermektedir. I, II, III, V ve X. PLA₂ gruplarından çeşitli örneklerle gerçekleştirilen karşılaştırmalar, bitki PLA₂'lerinin Ca^{2+} bağlama bölgesinde iki glisin ile birlikte korunmuş olan iki tirozin varlığını, aktif bölgedeki His ve Asp'i ayrıca tanımlanabilir haldeki 5 sisteinin varlığını ortaya koymuştur. Bilinen Histidin PLA₂'leriyle dizi özdeşliğinin oldukça düşük olması (büyük boşluklar veya eklemelerin

yokluğu, < % 25) ve kendine has 7 adet sisteinin varlığı, bitki PLA₂'lerini bilinen Histidin PLA₂'lerinden ayırmaktadır. Bitki PLA₂ aktivitesi, üzerinde uzlaşmış bir şekilde, tek ve çift işaretli dipalmitoyl-PC kullanarak ve radyolojik olarak işaretli olan palmitik asidin sadece ortalama 100µmol/dk/mg düzeyinde PC'nin *sn-2* pozisyonundan salınmıyor olmasını koruyarak demonstre edilmiştir(Stahl *et al.*, 1999). Bir PLA₂ enzimi olarak sınıflandırılabilmek için gerekli olan tüm kriterleri karşıladığından ve diğer tüm gruplarla düşük seviyeli bir dizi benzerliği gösterdiğinden, bu iki Histidin PLA₂'si günümüzde Grup XIA ve XIB PLA₂'leri olarak tanımlanmakta ve sırasıyla keşfedenlerin pirinçteki PLA₂ I ve PLA₂ II tasarımlarına uyum göstermektedir(Six *et al.*, 2000).

3.3.2 Aktif Merkezinde Serin İçeren PLA₂ Grupları

3.3.2.1 Grup IV Fosfolipaz A₂ (cPLA₂)

GIVAPLA₂

1986 yılına kadar bilinmekte olan yegane PLA₂ enzimleri, Bölüm 3.3.1'de tanımlamış olduğumuz 13-18 kDa'luk katalitik bir histidinden faydalanan PLA₂ Gruplarına denk düşmekteydiler. 1986 yılında, sitozolik PLA₂ aktivitesinin başlangıç tanımlamaları ve karakterizasyonu, insan nötrofilleri ve trombositleri zemininde rapor edilmiştir(Alonso *et al.*, 1986; Kramer *et al.*, 1986). 1991 yılında ise sitozolik PLA₂ dizilimi çözüldüğünde söz konusu bu enzim cPLA₂ olarak anıldı ve günümüzde, ilk ciddi PLA₂ olan Grup IVA PLA₂ olarak bilinmektedir(Sharp *et al.*, 1991). GIVAPLA₂, C2 bölgesi ve α/β hidrolaz PLA₂'si olmak üzere iki bölgeden oluşan, 85 kDa'luk bir proteindir. Yıllar boyu gerçekleştirilmiş olan çalışmalar, GIVAPLA₂'nin Ser-228 ve Asp-549'dan oluşan yeni bir katalitik çiftten faydalanmakta olduğunu ortaya çıkarmıştır(Desen *et al.*,

1999). GIVAPLA₂, substrat fosfolipidlerinin *sn*-2 pozisyonundaki AA için bir spesifite göstermiştir. Söz konusu bu AA bir kez serbestleştirildiğinde, lökotrienler ve prostaglandinler gibi inflamatuvar ve sinyal iletim yolları için kuvvetli araçlar olan eikozanoidlere dönüştürülebilir. GIVAPLA₂ ile devre dışı bırakılan fareler, GIVAPLA₂'nin AA salınımı ve beyin travması sonrasında ortaya çıkan enflamatuvar yanıtta merkezi rolünü teyit etmiş ve GIVAPLA₂'nin eikozanoid salınımının tüm safhalarındaki temel rolünü onaylamıştır(Underwood *et al.*, 1998; Fugishima *et al.*, 1999).

GIVAPLA₂'nin *in vivo* etkileri için moleküler zemin de ayrıntılarıyla incelenmiştir. GIVAPLA₂'nin C2 bölümü, büyük bir C2 bölgesi ailesinin en iyi çalışılan üyelerinden biridir ve fosfolipid membranları olduğu gibi iki kalsiyum iyonunun bağlanmasında spesifik özellikler sergilemektedir. GIVAPLA₂'nin sitozolden perinükleer membran bölgesine, Ca²⁺'un hücre içi konsantrasyonlarını artıran uyarılara karşı yanıt olarak taşınmasından C2 bölgesinin sorumlu olma olasılığı vardır. Perinükleer yerleşime dair ilginç bir mekanizma, C2 bölgesinin aynı zamanda perinükleer bölgede de yerleşim gösteren hücre yapısal proteini olan vimentin ile Ca²⁺ bağımlı spesifik ilişkisini de kapsamaktadır(Gijon *et al.*, 1999; Nakatani *et al.*, 2000).

Kalsiyumun C2 bölgesi üzerinden gerçekleştirdiği düzenleyici rolün ötesinde, GIVAPLA₂, Ser-505'in *in vitro* olarak fosforilasyonundan sonra 3 kata kadar fazla aktive edilmektedir. Ser-505'de mitojenle aktive edilen protein kinaz ailesinin üyeleri aracılığıyla *in vivo* olarak gerçekleşen fosforilasyon, hücre aktivasyonuna yanıt olarak GIVAPLA₂'nin aktive olmasından sorumlu tutulmaktadır(Gijon *et al.*, 1999).

Son olarak, GIVAPLA₂'nin fosfatidilinozitol 4,5-bifosfat (PIP₂) için yüksek bir afinite ve spesifite gösterdiği gösterilmiştir. Arayüzle gerçekleşen PIP₂ aracılıklı etkileşim aynı zamanda GIVAPLA₂'de aktivite artışına neden olmaktadır. Çok sayıda fosfoinozitol-protein etkileşiminde aracılık bir plekstrin benzeri bölge üzerinden gerçekleştiğinden, GIVAPLA₂'de bu türden bir bölgenin açık bir şekilde bulunmayışı oldukça şaşırtıcıdır. Bu aktivasyon, PIP₂ seviyesindeki eş zamanlı artış ile birlikte meydana gelir. Bunun da ötesinde, aktive hücrelerde, fosfatidilinozitol 4,5-fosfattan PIP₂ sentezinin inhibe edilmesi, AA salınımında bir azalmayla orantılı olmaktadır. Sonuç olarak, dinlenme safhasındaki hücrelerde PIP₂ seviyelerindeki doğrudan eklenme veya üretiminin uyarılması şeklinde gerçekleşecek herhangi bir artış, artmış AA salınımıyla sonuçlanacak şekilde GIVAPLA₂'yi aktive etmeye yetmektedir (Mosior *et al.*, 1998; Balsinde *et al.*, 2000).

Çizelge 3.3 Aktif Merkezinde Serin İçeren PLA₂ Grupları

Grup	Kaynak	Alternatif isim	Boyut (kDa)	Ca ²⁺	Disülfit bağ sayısı	
IV	A	İnsan U937 hücreleri/platelet/Sıçan böbreği	cPLA ₂	85	<μM; membran translokasyonu	-
	B	İnsan pankreası/karaciğer kalp/beyin	cPLA ₂	114	<μM; membran translokasyonu	-
	C	İnsan kalbi/iskelet kası	cPLA ₂	61	-	-
VI	A-1	P388D1 makrofajlar,CHO	iPLA ₂	84-84	-	-
	A-2	İnsan B-lenmfositler,testis	iPLA ₂	88-90	-	-
	B	İnsan kalbi/iskelet kası	iPLA ₂	88	-	-
VII	A	İnsan/fare/domuz/sığır plazma	PAF-AH	45	-	-
	B	İnsan/sığır/karaciğer/böbrek	PAF-AH(II)	40	-	-
VIII	A	İnsan beyni	PAF-AH	26	-	-
	B	İnsan beyni	PAF-AH	26	-	-

GIVBPLA₂

EST veritabanlarındaki araştırmalar, insan genomundaki yeni GIVBPLA₂ paraloglarının ortaya çıkmasını sağlamıştır. Bir insan EST'si kullanarak, 1012 amino asitlik bir matür proteini tümüyle tanımlayacak şekilde GIVBPLA₂ ile % 30 özdeşlikle GIVBPLA₂ klonlanabilmiştir. mRNA, her yerde bulunabilecek kadar çok eksprese ediliyorsa da pankreas, karaciğer, kalp ve beyinde daha yüksek seviyelerde görülmektedir. GIVBPLA₂ enzimi, 114 kDa ağırlıktadır ve kendine özgü 242 kalıntılı amino terminal uzantısı ile C2 bölgesi sonrasında yine kendine özgü 120'lik bir bölümün ilavesinden meydana gelir. GIVBPLA₂, GIVAPLA₂ ile aynı şekilde kalsiyum bağımlı gibi görünmektedir ve katalitik artıklar olan Ser-228 ve Asp-549 yakınında GIVAPLA₂ ile yüksek oranda benzerlik göstermektedir, ancak GIVAPLA₂'de fosforillendiği gösterilmiş olan 4 serin'in herhangi birisine sahip değildir. Benzer aktif bölge kalıntılarının, bölge tarafından yönetilen mutagenез için kritik öneme sahip olduğu gösterilmiştir. Grup IVA PLA₂, *in vivo* ortamda açık bir şekilde PLA₂ olarak işlev grmekteyserde, *in vitro* ortamda lysoPLA₁/A₂ sahibi olduğu ve transaılaz aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir. İlginç bir şekilde, normalin üstünde GIVBPLA₂ eksprese eden hücrelerden elde edilen lizatlar, yüksek PLA₁ aktivitesine sahip olduğu ve PLA₂ aktivitesi yerine lysoPLA₂ aktivitesi sergilediği görülmektedir, ancak tanımlayıcı kararlara ulaşabilmek için daha ayrıntılı çalışmalara gerek duyulmaktadır(Pickard *et al.*, 1999; Song *et al.*, 1999).

GIVCPLA₂

GIVCPLA₂, GIVAPLA₂ ile % 30'dan daha az benzerlik gösteren ve 541 aminoasitten oluşan 61 kDa'luk bir proteindir. Eksprese edilen mRNA, kalp ve iskelet kasında en yüksek oranda bulunmaktadır. GIVBPLA₂ için olduğu gibi, aktif bölge kalıntıları, yüksek benzerlik gösteren alanlar dahilinde tanımlanmıştır ve bölge tarafından yönetilen mutagenezi kullanan aktivite için kritik bir öneme sahiptir. Küçük boyutları ile uyumlu bir şekilde, GIVCPLA₂'de C2 bölgesi eksiktir ve hiç Ca²⁺ bağımlılığı yoktur. Ayrıca GIVCPLA₂'nin GIVAPLA₂'ye (24 kat) kıyasla çok daha düşük bir AA spesifitesine (3.5 kat) sahip olduğu gösterilmiştir(Pickard *et al.*, 1999; Underwood *et al.*, 1998).

Fungal GIVPLA₂ homologları

GIVAPLA₂ dizisi, *Peniillium notatum*'dan kalan ve fosfolipaz B (PLB) şeklindeki bir lipaz dahilinde Ser-228 barındırır ve bunun aktif bölge Serin'i olduğu gösterilmiştir. Maya PLB'leri için var olan ilave sıralamalar, GIVCPLA₂ için kritik olan kalıntıların üçünün (Ser, Asp, Arg) PLB ile aynı hizada olduğunu göstermiştir(Pickard *et al.*, 1996). PLB'ler, tanımlamak gerekirse, fosfolipid substratlardaki her iki açıl zinciri de hidrolize edebilirler, bu ise GIVCPLA₂ için de bildirilmiş olan bir fenomendir ve dizi benzerliği ile birlikte biyokimyasal benzerliği de desteklemektedir. En iyi çalışılmış olan PLB, *P. Notatum*'dan kaynaklanmaktadır ve bilinen bir açilhidrolaz olarak 1960'lardan beri üzerinde çalışmalar yürütülmektedir(Dawson *et al.*, 1967). *P. Notatum* dizisi sıralandığında, PLB'ler için bilinen bir özellik olarak sayıca çok miktarda asparajin bağımlı karbonhidrat barındırdığı görülmüştür(Fujii *et al.*, 1994).

3.3.2.2 Grup VI Fosfolipaz A₂ (iPLA₂)

Kalsiyum bağımlılığı olmayan ve klonlanıp karakterize edilmiş olan ilk PLA₂'ye, kalsiyumdan bağımsız olması nedeniyle iPLA₂ denmiştir ve şimdilerde GVIA-1 PLA₂ olarak anılmaktadır. GVIAPLA₂ ilk olarak P388D₁ makrofajlarından izole edilip karakterize edilmiştir. GVIA-1 PLA₂ ise ilk olarak CHO, P388D ve insan lenfoma cDNA'larından klonlanmış ve yaklaşık 750 aminoasitten oluşan ve 85kDa ağırlığında yeni bir moleküldür ve 8 adet ankyrin tekrarı barındırır. Bunun da ötesinde, GVIA-1 PLA₂ ayrıca bir lipaz konsensus dizisi barındırır (Gly-X-Ser⁴⁶⁵-X-GLY) ve bu dizi, mutagenезle gösterildiği üzere aktif serin'i içerir. Ayrıca, serin modifiye edici inhibitör olan bromoenol lakton (BEL) kadar serin içeren Grup IVA PLA₂ inhibitörleri de GVIA-1 PLA₂'yi inhibe etmekte ve bu da serin'in nükleofil rolünü teyit etmektedir. Henüz daha fazla aktif bölge kalıntısı tanımlanmamış olduğundan, ve kısaltılmış bir proteinin eksikliği nedeniyle N-terminali 405 kalıntılarının hiçbir aktivitesi mevcut değildir. GVIA-1 PLA₂ ise radyasyon inaktivasyon çalışmaları ile aktif olarak gösterilmiştir. Buna ilaveten, saflaştırılmış bir Grup VIA PLA₂'nin başlangıçta ATP tarafından aktive edildiği gösterilmiş, ancak daha yakın bir zamanda ATP'nin aktivasyonun ortaya çıkmasına sebep olabilecek bir koruyucu olarak rol oynadığı gösterilmiştir (Ackermann *et al.*, 1994; Balboa *et al.*, 1997; Ackermann *et al.*, 1995; Lio *et al.*, 1998).

Hamster, insan ve fare GVIA-1 PLA₂'lerinin ilk klonlamalarından sonra, insan GVIAPLA₂ geninin çok sayıda birleşik varyantı olduğu keşfedilmiştir. Daha uzun (88kDA) birleşik olup sekizinci ankirin tekrarına 54 aminoasit eklenmiş olan varyantın aktivite sahibi olduğu gösterilmiş ve buna göre GVIA-2 PLA₂ olarak adlandırılmıştır. İnaktif olan diğer iki birleşik varyant ise aynı zamanda tanımlanmış, ve ilk 7

ankyrin'in değişken terminallerle devam ettiği gösterilmiştir. İlk inaktif birleşik varyant olan GVIA Ankyrin-1'in eş zamanlı transfekte edildiğinde GVIA-2 PLA₂ aktivitesini azalttığı gösterilmiştir ve bu da hetero-oligomerlerin oluşabileceği ve inaktif birleşik varyantlar tarafından inhibe edilebileceğine işaret etmektedir(Larsson *et al.*, 1995).

İlk tanımlanmış olan insan GVIA-1 PLA₂'si daha yakın bir zamanda pankreatik ada hücrelerinde de tanımlanmıştır. Rekombinant ekspresyon ise fare ve hamster kaynaklı GVIA-1 PLA₂ için ve insan kaynaklı GVIA-2 PLA₂ için çok benzer bir aktivite olduğunu onaylamıştır. İnsan GVIA-1 PLA₂ ve GVIA-2 PLA₂'si de, GVIA-1 PLA₂'nin etkinliği ATP'den bağımsızken GVIA-2 PLA₂'nin ATP tarafından geliştirilebilen bir etkinliğe sahip olması nedeniyle özdeş değillerdir. Bunun ötesindeki sonuçlar ise, belki 54 amino asitlik dizinin eklenmiş olmasından dolayı, GVIA-2 PLA₂'nin in vivo ortamda membrana bağlı olduğunu göstermiştir. Bu varyantların her birisi için dokuya bağımlı ekspresyon şablonları, diğer varyantlar için olduğu gibi tanımlanmış ancak karakterize edilmemiş ve ayrı bir incelemede daha ayrıntılı olarak ele alınmıştır(Winstead *et al.*, 2000).

GVIAPLA₂'nin BEL tarafından inhibisyonu ve spesifik antisens oligonükleotid bazlı inhibisyon zemininde fikir birliğine varılmış olan kanıtlar, çeşitli sistemlerde, GVIAPLA₂'nin fosfolipid yeniden modellenmesinde ve lizofosfolipid üretimi sayesinde homeostazda anahtar bir rol oynamakta olduğunu demonstre etmiştir. GVIAPLA₂'nin fosfolipid yeniden modellenmesi ve homeostazda oynadığı açık role ilaveten, çeşitli diğer raporları sinyal iletimi ile diğer fizyolojik süreçlerde de GVIAPLA₂'nin yer aldığını vurgulamaktadır ve bunların her biri, farklı yerlerde özetlenecektir. Çoklu birleşik varyantların varlığı

ve aktif GVIAPLA₂'nin oligometrik doğası, GVIAPLA₂ için karmaşık roller ileri sürmektedir(Winstead *et al.*, 2000).

GVIBPLA₂

Çok yakın bir dönemde, yeni bir kalsiyumdan bağımsız PLA₂, insan genom projesinden türev alan öncü bir dizi zemininde tanımlanmıştır ve EST'lerin ileri düzeyde araştırılması, tam dizilimin kalp ve iskelet kası cDNA'sından ve bağımsız olarak insan lenfosit cDNA'sından klonlanmasına izin vermiştir. Bu dizilim, korunmuş olan 437 aminoasitlik çekirdek üzerinden GVIA-1 PLA₂ ile yaklaşık % 25'lik bir özdeşlik göstermektedir. 3.4kb civarında bir mRNA, kalp, plasenta, böbrek, karaciğer, beyin ve iskelet kasında tespit edilmiştir. Söz konusu bu yeni PLA₂ ise aralarında plazmenil-PC'nin de bulunduğu *sn-2* pozisyonundaki çeşitli yağ asitleri ile birlikte PC'i hidrolize edebilmekteydi ve bu da PLA₂-spesifik bir aktiviteye işaret etmekteydi. Aktivite ayrıca irreversibl serin hidrolaz inhibitörü olan BEL tarafından, 3 dakikalık enkübasyonda 3µM gibi bir IC₅₀ değeri ile inhibe edilmekteydi. *Caenorhabditis elegans*'da ise 546 aminoasitlik olup GVIBPLA₂ ile % 47 özdeşliğe sahip bir GVIBPLA₂ ortoloğu tanımlanmıştır(Mancuso *et al.*, 2000; Tanaka *et al.*, 2000). Mevcut dizilim benzerliği ve GVIAPLA₂ ile olan biyokimyasal benzerlik doğrultusunda, insan gen ürünü (ya da ürünleri) ve tür homologları, GVIBPLA₂'ler olarak sınıflandırılmıştır.

Diğer GVIPLA₂ homologları

Veritabanı taramaları, memeli Grup VI PLA₂'leri ile alakalı olan farklı tür proteinlerini açığa çıkarır. Çalışılmış en iyi örnek ise patates ve diğer bitkilerden elde edilen patatin isimli PLA₂'dir. Patates patatini

(yaklaşık 40 kDa), PC substratı için PLA₁ aktivitesinden daha fazla PLA₂ aktivitesine sahiptir ancak ikinci lysoPLA₁/A₂ reaksiyonunun rolü henüz araştırılmış değildir. Ca²⁺ yokluğunda da aktif olsa da Ca²⁺ varlığında patatin'in aktivitesi 3 kat artmaktadır, patatin bağımlı bir aktivite artışı gösterir ancak bunun önemi henüz net değildir(Senda *et al.*, 1996). Bir diğer patatin homoloğu (patatesle % 48 özdeşlikte) ise salatalıktan klonlanmış ve karakterize edilmiştir. Hiç genel lipaz aktivitesine sahip olmadığı ve PLA₂ aktivitesinin PC substrat üzerinde PLA₁ aktivitesine kıyasla en az 15 kat fazla olduğu görülmüştür(May *et al.*, 1998). Yakın dönemde GVIBPLA₂'nin keşfedilmesiyle birlikte, eğer herhangi birine aitse patatin'in hangi GVIBPLA₂ alt grubuna ait olduğunu belirlemek zordur. Her iki patatin de GVIBPLA₂ lipaz konsensus sekansına sahiptir (Gly-Thr-Ser-Thr-Gly) ancak lipaz bölgesinin tamamı hem salatalık patatini hem de Grup VIA ve VIB PLA₂'lerinde korunmuştur, bu nedenle açık ve net bir alt grup ataması, daha ileri düzey dizilim ve enzimoloji verilerini gerektirmektedir(Six *et al.*, 2000).

3.3.2.3 Grup VII Fosfolipaz A₂ (PAF-asetilhidraz)

GVIIAPLA₂ (plazma PAF-asetilhidrolazı)

GVIIAPLA₂, iyi çalışılmış ve incelenmiş olan bir plazma trombosit aktive edici faktör asetilhidrazıdır (pPAF-AH). Trombosit aktive edici faktör (PAF), *sn*-1 zincirinin bir eter bağlantısı ile linklendiği ve *sn*-2 pozisyonunun asetil grubu taşıdığı bir fosfatidilkolin şeklidir. PAF'ın çok sayıda fizyolojik etkisi vardır ve bunlar arasında, *sn*-2 asetil grubunun lyso-PAF oluşturmak üzere hidrolizi nedeniyle ortadan kaldırılabilen kuvvetli proinflamatuvar etkiler de yer alır(Derewenda *et al.*, 1999; Peplow, 1999).

PAF-hidrolaz aktivitesi açısından en iyi olduğu bilinen GVIIAPLA₂, aynı zamanda *sn*-1 zincirinin uzunluğu ya da doğasından bağımsız bir şekilde PC veya PE'nin *sn*-2 pozisyonundan, uzunluğu 9 karbona kadar olan kısa zincirli okside yağ asitlerini de hidrolize edebilmektedir. GVIIAPLA₂'nin çoğu hayvanların kan dolaşımında mevcut olduğu ve insanlarda ise düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) ve yüksek yoğunluklu lipoprotein'in apolipoprotein B100'ü (apoB100) ile ilişkili olduğu bulunmuştur(Stafforini *et al.*, 1987; Stafforini *et al.*, 1999). LDL üzerinde okside fosfolipidlerin varlığı, ateroskleroz gibi patolojik durumlarla ilişkilidir ve bu nedenle, okside lipidin okside açıl zincirini ayırabilen GVIIAPLA₂ lokalizasyonu, koruyucu bir rolle işlev gösterebilir(McIntry *et al.*, 1999). Fare için olmasa da özellikle insanda, GVIIAPLA₂'nin apoB100 ile ilişki içindedir ve farklılık, kritik kalıntılar olan Trp-115 ve Leu-116 düzeyinde mevcut olmaktadır (Stafforini *et al.*, 1999). GVIIAPLA₂' ile ApoB100 arasındaki etkileşimler açık olsa da, söz konusu etkileşimin fizyolojik önemi henüz netleşmiş değildir. Yakın dönemde GVIIAPLA₂'nin yüzeyler arası bir enzim olmadığı gösterilmiştir ve bu, substratına bir membran gibi fosfolipid agregat üzerinden erişmediği anlamına gelmektedir ancak sadece PAF veya oksidatif olarak kısaltılmış fosfolipidlere solüsyonlardan fosfolipid monomerler şeklinde erişim gösterir(Min *et al.*, 1999).

GVIIIBPLA₂

GVIIIBPLA₂, ilk olarak sığır beyninden bir PAF-AH II olarak saflaştırılan ve karakterize edilen intraselüler bir enzimdir(Ho *et al.*, 1997). GVIIIBPLA₂, GVIIAPLA₂ ile lipaz konsensus motifi olarak Gly-X-Ser-X-Gly barındırması ve yaklaşık 40 kDa'luk 392 amino asit barındıran bir monomer olması sayesinde önemli ölçüde dizilim benzerliği (% 41) göstermektedir. GVIIAPLA₂ ile hemen hemen aynı

yolla GVIIBPLA₂ de sadece asetil içeren değil glutaril (terminal karboksilik asidi bulunan 5 karbonlu) kadar uzun olanları da içeren *sn-2* açıl zincirlerini hidrolize edebilmektedir(Hattori *et al.*, 1996).

GVIIBPLA₂, en yüksek oranlarda karaciğer ve böbrekte ve daha az oranda ise kalan diğer vücut dokularında eksprese edilmektedir(Hattori *et al.*, 1996). Daha ileri düzey analizler, GVIIBPLA₂'nin Met-Gly-X-X-X-Ser sonuç dizisi ile N-terminalinden myristoylate olduğunu göstermektedir. Sitozolda bulunmasına karşın GVIIBPLA₂ kısmen nükleer zarf bitişiğinde endoplazmik retikulumda yerleşimlidir ve bu durum bünyesindeki myristoylasyon sayesinde kolaylaştırılmaktadır. Oksidatif stres ajanlarının ilave edilmesiyle GVIIBPLA₂ kısa bir süre zarfında membrana geçmektedir ve daha uzun dönemde ise antioksidanlara bir yanıt olarak sitozole yerleşmektedir. Bunun da ötesinde, sadece aktif GVIIBPLA₂'yi normalin üstünde eksprese eden hücreler, oksidatif stresörlerin indüklediği apoptoza karşı daha dirençlidir(Matsuzawa *et al.*, 1997). Bu ise, GVIIAPLA₂'nin plazmada oksidasyona karşı koruyucu bir rol oynarken GVIIBPLA₂'nin karaciğer ve böbrekteki hücreleri oksidatif hasardan koruduğu anlamına gelmektedir(Six *et al.*, 2000).

3.3.2.4 Grup VIII Fosfolipaz A₂ (PAF-AH1b)

GVIIIAPLA₂ ve GVIIBPLA₂

Grup VIIIA ve VIIIB PLA₂ enzimleri, heterotrimerik PAF-AH1b'nin aktif alt birimleri olarak beyinde intraselüler olarak eksprese edilmektedir(Ho *et al.*, 1997). 26 kDa'luk GVIIIAPLA₂ ve GVIIBPLA₂ yaklaşık % 62 oranında özdeşliğe sahiptir ve heterotrimerik PAF-AH1b içinde iki alt ünite olarak bulunmaktadır. Heterotrimer ise

GVIIIPLA₂'lere ilaveten 45kDa'luk bir düzenleyici alt ünite ile birlikte olacak şekilde homodimer ve heterodimerlerden oluşmaktadır. Bu bahsettiklerimiz açık bir şekilde farklı genler olduklarından burada GVIIIAPLA₂ ve GVIIIBPLA₂ olarak adlandırılmaktadırlar. Tarihsel olarak baktığımızda, katalitik olan iki alt birim 29 ve 30 kDa'luk alt birimler olarak ifade edilmekteyken, daha sonra β - ve γ - alt birimleri olarak tanımlanmış, en sonunda ise PAF-AH1b'nin α_1 ve α_2 alt birimleri olarak kabul edilmiştir. Klonlanmış olan ilk katalitik alt birim GVIIIAPLA₂ (α_1 alt birimi) olmuş ve sığır beyninden klonlanmıştır. Hem GVIIIAPLA₂ hem de GVIIIBPLA₂ için yaklaşık 230 amino asitlik diziler, Gly-X-Ser-X-Val şeklindeki psödo lipaz konsensus motifi dahilinde bir "Serin" içermektedir, ki bu serin artık nükleofilik serin olarak kabul edilmektedir(Hattori *et al.*, 1995).

GVIIIPLA₂ enzimleri, PAF için aşırı miktarda substrat spesifitesi gösterirler ve propiyonil-PAF için % 5'in altındaki PAF aktivitesine karşı GVIIIPLA₂'da bu değer yaklaşık % 50 olmaktadır(Hattori *et al.*, 1996).

4. PLA₂ ENZİMLERİNİN BİYOKİMYASI

4.1 Biyokimyasal Sentezlerde PLA₂

4.1.1 Araşidonik Asit Kaskadı ve Eikozanoidlerin Biyosentezi

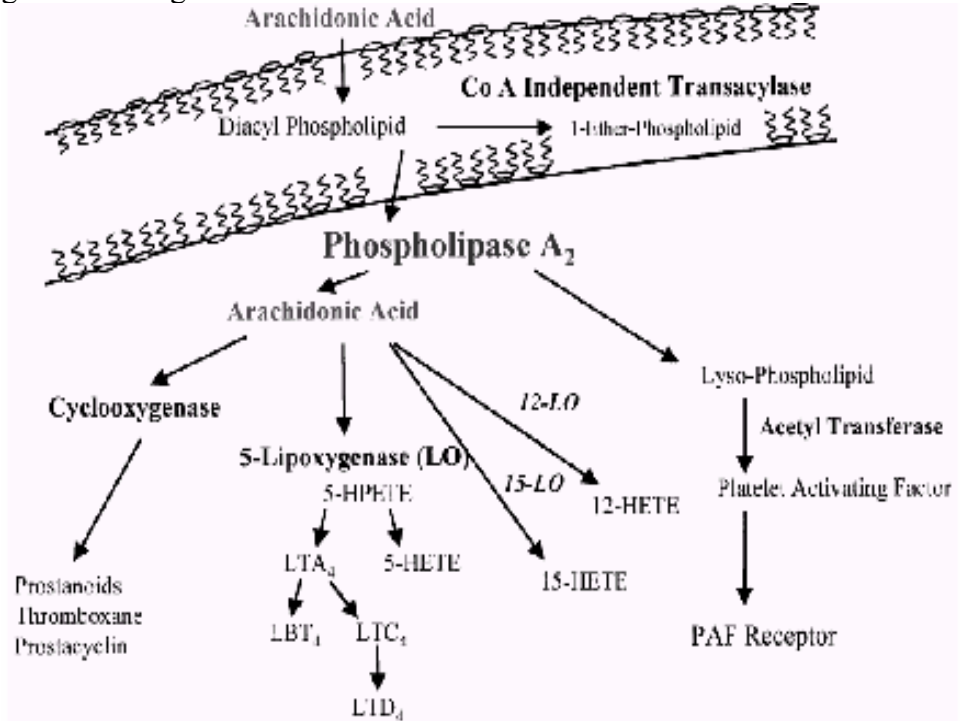
Membran fosfolipitlerinin PLA₂ ile hidrolizi sonucu açığa çıkan lizofosfolipitler(LysoPL) ve yağ asitleri özellikle araşidonik asit(AA), farklı patolojik durumların medyatörlüğünü yapar.

LysoPL'ler beyaz kan hücrelerini aktive eder ve endotel hücrelerin monotabakasına doğru onların geçirgenliğini artırır. Özellikle

lizofosfatidilserin mast hücrelerinde histamin sekresyonunu artırır. LysoPL gastrik ülser, büyüme faktörleri(özellikle lyso-fosfatidik asid) gibi doku tahribatını ve kanser hücrelerinin proliferasyonunu, tümör metastazını indükleyebilir. LysoPL'ler aynı zamanda inflamasyon proseslerinin güçlü bir medyatörü olan platelet aktivasyon faktörünün de prekürsörüdür(Yedgar *et al.*, 2000).

Araşidonik asit (AA;5,8,11,14-eikozatetraenoik asit) metabolizması, 25 yıldan fazla bir süredir farmakoloji, fizyoloji ve biyokimya için aktif bir şekilde araştırma konusu olmaktadır. AA metabolitlerinin çok sayıda fizyolojik rolü olduğuna dair yaygın inanışlara rağmen, AA oluşumuna dair ayrıntılar hali hazırda tam anlamıyla açığa kavuşmuş değildir. Bir serbest yağ asidi olarak AA için hücre içi seviyeler düşüktür ve bu nedenle oluşumu, genellikle AA metabolitlerinin sentezini kısıtlamaktadır. AA, çeşitli lipazların deaçile edici etkisi ile potansiyel olarak serbestleştirilebilecekleri yer olan membran fosfolipidlerinin *sn-2* bölgesinde bulunurlar. AA, özellikle prostaglandinler(PGs) ve lökotrienler(LTs) gibi eikozanoidlerin üretilmesi için siklooksigenaz(COX1, COX2) ve lipoksigenaz(LOX) yoluyla metabolize edilir (Şekil 4.1). Eikozanoidler, enflamatuar reaksiyonlarla ilişkili olan çeşitli semptom ve bulgulara aracılık etme yeteneklerini sağlayan oldukça geniş bir biyolojik aktivite yelpazesindeki davranışları sergilerler(Balsinde *et al.*, 1999). AA'in *sn-2* bölgesinden PLA₂ aracılığıyla ayrılması, hücrelerdeki deaçilasyon için bir anahtar basamaktır, ancak AA'in potansiyel olarak diğer bazı ileti yolları tarafından da üretilebildiğinin belirtilmesi gerekmektedir. Bunlar arasında; mono- ya da digliserol lipaz üzerinden AA üretecek şekilde parçalanabilen diasilgliserolu oluşturan fosfolipaz C, ve fosfatidik asit fosfolipaz tarafından diasilgliserole metabolize edilebilen fosfolipaz D üreten fosfatidik asit yer almaktadır. Görece daha az düzeyde yaygın

olarak bilinen bir gerçek de, lizofosfolipidlerin reaçilasyonunda faydalanımı inhibe edildiğinde AA seviyelerinin hücrelerde artış gösterebileceğidir.



Şekil 4.1 Memeli hücrelerinde araşidonic asit metabolizması(Capper *et al.*, 2001)

4.1.2 Sürfaktan Biyosentezi

Alveolar iç kaplama hücrelerinin tip II pneumositler tarafından majör salgılanan ürünü surfaktandır. Tip II pneumositlerle salgılanır. PLA₂ akciğer surfaktanlarının ana aktif bileşiği doymamış fosfatidilkolinin(DPPC) anahtar enzimidir. DPPC iki mekanizma üzerinden de gerçekleşebilir. (1)Deaçilasyon-reaçilasyon prosesi (2)Deaçilasyon-transaçilasyon reaksiyonu(Robertson *et al.*, 1984).

4.1.3 Platelet Aktivasyon Faktörü(PAF) Biyosentezi

Özellikle fagositik sınıf hücreler stimülasyonla platelet aktivasyon faktörü (PAF, 1-O-alkil-2-asetil-glisero-3-fosfokolin) üretir. Sentez yeniden modellenme yolu yada de novo sentezi ile gerçekleşir. Yeniden modellenme PLA₂ aktivasyonu ile başlar. Bir sonraki adım lizo-PAF'ın spesifik bir açıl-CoA:lizo-PAF asetiltransferazla katalizli bir reaksiyonuyla asetatin eklenerek PAF'a dönüşümüdür. De novo sentezi 1-O-alkil-2-asetil-sn-glisero-3-fosfokolinin bir CDP-kolinle PAF'a dönüşümünü gerektirmektedir. PAF'ın nötrofil, eisonofil, monosit, makrofaj, platelet ve endotel hücreler gibi değişik hücre tipleri tarafından üretildiği bilinmektedir. PAF'ın fizyolojik ve patolojik davranışları PAF asetilhidrolaz tarafından modüle edilmektedir. Plazma PAF asetilhidrolaz bir PLA₂'dir(Prescott *et al.*, 1990; Sturk *et al.*, 1989; Tjoelker *et al.*, 1995).

PAF düşük tansiyon, akciğerle ilgili yüksek tansiyon, bronş daralması, akciğerde ödem ve damar geçirgenliğini artırmaktadır, travmatik ve septik şokun gelişmesinde major işaret olarak görülmektedir(Humphrey *et al.*, 1982; Vadas *et al.*, 1984). PLA₂ ve PAF-aseteterin artan düzeyleri septik şoklu ve multiple travmalı hastaların sirkülasyonunda bulunmakta ve yetişkin solunum sistemi sendromundaki oran yüksek PLA₂ düzeylerinde gerçekleşmektedir. PLA₂ ve PAF-aseteter düzeylerinin herikiside hastalığın şiddeti ile korelasyon halindedir ki PLA₂ ve/veya PAF-aseteter septik ve travmatik şokun belirleyicisi olarak kullanılabilir(Sörensen *et al.*, 1994).

4.1.4 Membranın Yeniden Modellenmesi

Transaçilasyonlar membran modellenmesinde önemli rol oynamaktadır. Fosfolipazlar transaçilazlar olarak bile transaçilasyon sistemlerinde görev yapabilir. Kardiolipin hemen hemen bütün moleküler türler içinde linoleilin varlığı ile diğer fosfolipidlerden ayrılmaktadır. Kardiolipinin linoleil içeriği özellikle mitokondrial PLA₂ içeren bir deaçilasyon-reaçilasyonla zenginleştirilmektedir(Kramer *et al.*, 1984; Schlame *et al.*, 1990).

4.1.5 Lipid Peroksidasyon Tahribatından Membranların Korunması

PLA₂ fosfolipid membranlarında tercihli olarak perokside olmuş yağ asidi esterlerini hidrolizler ve böylece PLA₂ fosfolipid peroksidasyonunun detoksifikasyonunda temel olarak görülmektedir. Serbest yağ asidi hidroperoksidlerinin ayrılması glutasyon varlığında glutasyon peroksidaz tarafından azaltılmaktadır. Lizofosfolipitler membran yapısının tamirini tamamlamak için tahminen uzun zincirli bir açıl-CoA ile tekrar açillenmektedir(Van Kuijk *et al.*, 1987).

4.2 İnflamasyon Reaksiyonlarında PLA₂

4.2.1 Genel Etkiler

İnflamasyonunun en kabul edilebilir mekanistik açıklaması kimyasal teoridir. Bu teoriye göre aktive olmuş, tahrip olmuş yada ölmüş hücrelerden ayrılan medyatörler inflamasyonun işaretlerini ve semptomlarını göstermek için cevap olmaktadır. PLA₂ aktivasyonu inflamasyonun efektör yolunda esas adımdır. Doku tahribatına direk yol

açan inflamasyon medyatörlerinin çoğu iyi bilinmektedir. AA, toksik oksijen radikalleri ve PAF metabolitleri polimorfonükleer hücreler(PMN), bazofiller, lenfositler ve mast hücreleri gibi farklı inflamator hücrelerinde PLA₂ ile üretilmektedir. İnflamasyonun en yakın bölgesindeki medyatörler mikrobiyal enfeksiyonun varlığına işaretler. Bu sinyaller interlökinler, tümör nekroz faktör(TNF) ve PLA₂'dir. Özellikle bakteriyel, viral ve protozoan enfeksiyonlar da PLA₂'nin rolünden kaynaklanmaktadır. AA ve metabolitlerinin artan düzeyi ile inflamator prosesinin birlikteliği hayvan modelleriyle ve erkeklerde açık olarak belirlenmiştir(Kaiser, 1999).

İnflamasyonun patogeneğinde salgılanan PLA₂'nin önemi deney hayvanlarının deri, deri altı hava kesesi, akciğer, karın zarı boşluğu ve eklem bölgelerine enjeksiyonu ile gösterilmiştir. Safılaştırılmış sıçan platelet PLA₂'si eklem iltihabında inflamasyonlu pençelerde ödemi şiddetlendirmektedir(Cirino *et al.*, 1994; Edelson *et al.*, 1991; Vadas *et al.*, 1989; Murakami *et al.*, 1990).

4.2.2 Bakteriyel, Viral ve Protozoal Enfeksiyonlarda PLA₂

Endotoksinler ve diğer mikrobiyal ürünler, stokinler ve diğer inflamator medyatörlerin sentezini indükler ve septik sendroma cevap oluşturur. Farklı inflamasyon hücrelerinden sirkülasyona PLA₂'nin aktivasyonu ve salgılanması bu durumda önemli rol oynar. TNF ve interlökin-1(IL-1) endotoksimia ile alakalı klinik gelişmelerle ilişkilendirilmiştir. Bu durum septik şokun görünmesiyle TNF ve IL-1'in takip eden oluşumuyla desteklenmiştir. Serumda PLA₂'nin artan aktivitesi yada kütle konsantrasyonu invaziv bir bakteriyel enfeksiyonu göstermektedir(Kaiser, 1999). PLA₂ bakteriyel saldırıya karşı atakçı savunma mekanizmalarında merkezi rol oynar. PLA₂ fagositoz ve

nötrofil fonksiyonların modifikasyonu ile gerçekleşir ki bunlar kemotaksi ve süperoksit ve lizozomal enzimlerin ayrılması ile ilgilidir. Dolaşımdaki PLA₂ bu savunma aktivitelerini yansıtmaktadır(Hoffmann *et al.*, 1989). PLA₂ artan protein geçirgenliği bakterisidal etkiyle lökositler tarafından bakterinin ölümüne de karışmaktadır(Elsbach *et al.*, 1988).

Virüslü enfeksiyon hücre erimesini indükleyebilmekte ve bu durum içerden erime ve dışardan erime olmak üzere iki tipte sınıflandırılmıştır. İlk başta konakçı hücrelerde bazı virüslerin replikasyonu sırasında ve daha sonra ekstraselüler virüs ve hücre membranı arasında etkileşimin en yakın basamağında yer alır. Kızamık virüsü ile enfekte olmuş insan amniotik membrandan kültürlenmiş hücreler virüs replikasyonunun son adımlarında içerden geniş erime göstermektedir. Bu olaya enfekte hücrenin sitozolünde lizozomlardan PLA₂'nin ayrılması eşlik eder ve lizofosfatidilkolin oluşumu hızlanır(Suzuki *et al.*, 1982). Serumda PLA₂-II düzeylerinin belirlenmesi viral enfeksiyonun türü ile ilgili önemli bilgi vermektedir.Dolaşımdaki PLA₂-II'nin artan konsantrasyonları sıtmalı hastaların kanında bulunmuştur ki bu protozoal enfeksiyon belirtisidir(Vadas *et al.*, 1992).

4.2.3 İnflamator Hücrelerde PLA₂

4.2.3.1 Polimorfonükleer Lökositler

İnflamator cevabın oluşmasında PMN lökositlerin önemli bir fonksiyonu PAF ve eikozanoidler gibi biyoaktif lipid medyatörlerin üretilmesidir. İnsan PMN'de bu inflamasyon medyatörlerinin oluşmasının ilk adımı selüler PL'lerin PLA₂ katalizli hidrolizini gerektirmektedir(Walsh *et al.*, 1983). PMN'lerin granüllerinde saklanan çözünür bir PLA₂, fagositik, antijenik yada kemotaktik stimülasyona

cevap olarak ekstraselüler boşluğa bırakılır(Victor *et al.*, 1981). Tavşan ve insan PMN lökositlerde PLA₂, PL'lerin hidroliziyle bu hücrelerin bakterisidal aktivitesine katılmaktadır. PLA₂ aktivitesi insan ve tavşan nötrofillerinin her ikisinde de gösterilmiştir(Forst *et al.*, 1986) .

PLA₂-II, inflamasyonun bazı sitokin medyatörlerinin ayrılmasını artırarak PMN lökositlerde araşidonat metabolizmasının artmasında rol oynar(Murakami *et al.*, 1993). Bununla beraber beyaz hücrelerde PLA₂'nin önemi beyaz hücre sayısı ile inflamasyon sırasında PLA₂ aktivitesiyle korelasyon halinde olmadığı gibi bir soru getirmektedir ve PMN lökositler inflamator akışkan PLA₂'nin minor ek kaynağı olabilmektedir. Ancak eklem romatizması olan hastaların sinovial sıvılarında araşidonik asit ayrılması ve beyaz hücre(akyuvar) sayısı arasında da pozitif bir korelasyon belirlenmiştir(Loeser *et al.*, 1990).

4.2.3.2 Bazofiller

Sıçan basofilik leukemia(lösemi) hücrelerinde IgE reseptörlerinin köprü olması histamin sekresyonuna birliktelik eden biyokimyasal olayların birçoğuyla sonuçlanır. Bunlar arasında göze çarpan, PLA₂ aktivasyonu ile hücrel fosfolipidlerden AA ayrılmasıdır. Proses, Ca²⁺-bağımsız ve Ca²⁺-bağımlı olarak ayrılabilir(Garcia-Gil *et al.*, 1986).

4.2.3.3 Lenfositler

T-lenfositlerinde PLA₂ aktivitesi, sıçan timus ve geçirgen T hücrelerinden AA'in ayrılmasıyla indirekt yolla görülmüştür. Lenfositlerin PLA₂ davranışı interferon- γ indüksiyonu için daha yardımcı

bir sinyal sağlamaktadır. AA interferon- γ üretimi için IL-2 sinyalinin medyatörlüğünde rol oynamaktadır(Goppelt-Struebe *et al.*, 1986).

4.2.3.4 Mast Hücreleri

Eikozanoidler ve PAF gibi lipid medyatörlerin üretimi hücresele PLA₂'nin aktivasyonu ile indüklenir. Kültür mast hücrelerinde en azından üç PLA₂ kaydedilmiştir. Bunlardan ilki Ca²⁺-bağımlı 14 kDa PLA₂, ikincisi 85 kDa sitozolik enzim ve üçüncüsü Ca²⁺-bağımlı PS için yüksek substrat spesifikliğine sahip PLA₂'dir. PLA₂ mast hücrelerinden histamin ayrılmasının medyatörü olarak belirlenmiştir(Chi *et al.*, 1982). Ancak fare mast hücreleri üzerinden son yapılan araştırmalar PLA₂'nin lipid medyatörlerinin üretilmesi için istenen araşidonik asidin ayrılmasında temel olmadığı belirtilmektedir. PLA₂ aktivasyonu salgılama mekanizması sırasında membran-füzyon olaylarının bir sonucu olmadığı tahmin edilmektedir(Churcher *et al.*, 1990).

4.2.3.5 Makrofajlar

Makrofajlar inflamasyon cevabının değişik fazlarında ki yetenekleri ile iyi karakterize edilmiş biyoaktif medyatörlerin salgılanmasında önemli rol oynadığı belirtilmektedir(Scott *et al.*, 1984). Makrofajlar tarafından üretilen potansiyel medyatörlerin bir sınıfı PAF ve eikozanoid lipid metabolitlerdir. En ayrıntılı karakterize edilmiş PLA₂, makrofaj benzeri hücreden P388D1'den membrana bağlı Ca²⁺-bağımlı PLA₂'dir. Bu enzim saflaştırılmış, kinetik olarak karakterize edilmiş ve PLA₂ inhibitörleriyle değerlendirilmiştir. Kemik iliğinden türevlendirilmiş makrofajlar pH 9'da PLA₂ üretirler, PC ve PE'yi hidrolizler(Kröner *et al.*, 1981).

4.2.3.6 Plateletler

Kan pulcukları trombin, kollogen, epinefrin yada karagenan gibi eksternal stimülasyona yönelik en çok cevap oluşturan hücrelerden biridir. Plateletlerde iki farklı PLA₂ mevcuttur: ilki, plazma içinde salgılanan mM Ca⁺²'a ihtiyaç duyan 14 kDa'luk PLA₂'dir. İkincisi, mikromolar Ca⁺²'a ihtiyaç duyan 85 kDa'luk PLA₂'dir(Kramer *et al.*, 1993) . Salgılanan 14 kDa PLA₂ sıçan plateletlerinden stimülasyondan sonra ayrılmış, saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir(Hayakawa *et al.*, 1988).

4.2.4 İnflamasyonun Deneysel Yönleri

İnflamasyon prosesi ve PLA₂ arasındaki ilişkinin ilk delili, deney hayvanlarında hiperemia indüklü maddelerin ayrılmasının gözlemlenmesinden meydana gelmektedir. Damar aktif madde daha sonra PLA₂ olarak tanımlanmıştır. Bu bilgi daha sonra *Crotalus atrox* zehirinden saf PLA₂'nin deri içine ve eklem içine enjeksiyonuyla hiperemiaya sebep olmasıyla desteklenmiştir(Vadas *et al.*, 1986). Şüphesiz hem PLA₂-I hem de PLA₂-II'nin etkisi ödem, kızarma ve selüler büzülme gibi inflamasyon reaksiyonlarını indüklediği görülmüştür. IL-I ve TNF kültürde hedef hücrelerden PLA₂'nin sentezini ve ekstraselüler salgılanmasını artırmaktadır. PLA₂'nin salgılanmasıyla sitokin stimülasyonuna cevap oluşturan hücreler sıçan calvarial osteoblastlar, sıçan renal mesajcı hücreler, insan articular chonrocytler, sıçan vascular düz kas hücreleri ve hepatoma hücrelerini de içermektedir(Weichman *et al.*, 1989).

Sıçan zimozan indüklü akciğer inflamasyonu yakın gelişme döneminde inflamasyon sızmasında kritik rol oynayan PAF'ın bulunduğu deneysel inflamasyonun iyi karakterize edilmiş diğer bir bölümüdür. PLA₂-II'nin yüksek düzeyleri zimozan ile indüklü sıçanlarda pleural ve lökositlerin her ikisinde belirlenmiştir. Bu deneysel sonuçlar PLA₂-II'nin bu modelde eikozanoidlerin üretimine neden olan inflamasyonun ilerlemesinde önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir(Hara *et al.*, 1993).

Erkeklerde PLA₂ aktivitesinde gözeçarpan bir artış *E.coli*'den endotoksinlerle toplardamara geçmesinden sonraki üç haftada kaydedilmiştir. Maksimum aktivite saldırıdan 24 saat sonra bulundu ve daha sonraki 48 saat belirgindi. Endotoksinlerle saldırıya uğratılmış bazı insan gönüllüler klinik semptomların başlangıcında aynı zamana rastlayan serum PLA₂ aktivitesindeki artışla takip eden serum geçişi TNF artışı göstermektedir. Bu veriler TNF ve PLA₂'nin ortaya çıkışı kaskadın bir parçasını oluşturur ki PAF ve eikozanoidler gibi aktif biyolojik medyatörlerin artması da verebilir. Erkeklerde rekombinant insan TNF'nin intravenöz infüzyonu PLA₂'nin yüksek düzeylerinin intravasküler ayrılmasını indükler(Pruzanski *et al.*, 1992).

4.2.5 İnflamasyonun Klinik Yönleri

PLA₂'nin lokal ve dolaşımdaki düzeyi enfeksiyonlar, inflamasyon hastalıkları ve doku tahribatları sırasında yükselmektedir. PLA₂'nin dolaşımdaki düzeyinin sözü geçen düzensizliklerin sürekliliği, büyüklüğü ve şiddetiyle korelasyon halinde olduğu söylenmektedir. Septik şoklu 6 hastada yapılan çalışmada serum PLA₂ aktivitesinin etkili olarak yükseldiği bulunmuştur. Sirkülasyonda ki enzim aktivitesi, yıkım sırasında ve derecesiyle korelasyon halindedir. Bütün hastalarda serum

PLA₂'nin enzimatik aktivite ve immünoaktivite arasında açık bir uyum olduğu bulunmuştur. Kandaki PLA₂ kütle konsantrasyonundaki artışlar PLA₂-II'nin intravasküler ayrılma nedeniyle olduğu düşünülmektedir. Aktivasyon yada inhibisyon proteinlerinin varlığı için hiçbir delil elde edilmemiştir(Vadas *et al.*, 1992). Beklenen bir çalışmada sepsis, nonsepsis bakteriyel ve viral enfeksiyonlu 46 hastanın serumunda PLA₂-II ve CRP konsantrasyonları belirlenmiştir. Sepsisli ve kan kültür negatif bakteriyel enfeksiyonlu hastalarda PLA₂ konsantrasyonları arasındaki fark istatistik olarak anlamlı değildir. Ancak sepsis yada kan kültür negatif bakteriyel enfeksiyonlar ve viral enfeksiyonlar hastalarda PLA₂-II ve CRP kons. arasında güçlü pozitif bir korelasyon bulunmaktadır. Erkeklerde dolaşımda PLA₂'nin yüksek düzeyleri gram-negatif septik şokta bulunmuştur(Vadas *et al.*, 1988).

Sepsis sırasında PLA₂-II, PAF-AH(PAF-açilhidrolaz) ve lökotrien B₄(LTB₄)'ün yüksek plazma düzeyleri belirlenmiştir. Bu sonuçlar plazmada bu medyatörlerin yüksekliğini sepsisli hastalarda vasküler endotel hastaları da kapsadığını göstermektedir. PAF-AH aktivitesi sepsisli, farklı sitokinler ve endotoksinle yakın ilişkisi olan hastalarda belirlendi ve değerlendirildi. PAF-AH aktivitesi ölen 17 hastada kurtarılan 13 hastaya göre daha yüksek bulunmuştur. PAF-AH aktivitesinin plazma endotoksini, TNF- α ve IL-8 düzeyleri ile belirgin korelasyon halinde olduğu görülmüştür. Bu bulgular PAF-AH aktivitesinin patolojik durumun şiddetini yansıttığını önermektedir. Ancak PLA₂-II düzeyleri ve PAF-AH arasında belirgin korelasyon bulunmamaktadır(Endo *et al.*, 1994).

Nitrit(nitrat(NO_x)), PLA₂-II, LTB₄ ve PAF-AH düzeyleri septik şoklu hastalarda daha yüksek bulunmuştur. Sonuçlar Çizelge 4.1'de gösterilmiştir(Nakae *et al.*, 1996).

Çizelge 4.1 NO_x, PLA₂-II, LTB₄ ve PAF-AH'ın septik şoklu ve şoksuz hastalardaki konsantrasyonları.

	<u>Şoklu</u>	<u>Şoksuz</u>	<u>Referans değer</u>
Serum(NO _x)(mmol/l)	125,4±101,3	37,0±16,7	38,3±19,1
PLA ₂ -II(ng/ml)	305,7±202,9	118,0±67,3	<3,7
LTB ₄ (pg/ml)	104±24,1	73,8±31,55	77,0±15,7
PAF-AH(nmol/min/l)	28,5±7,7	18,6±9,3	verilmedi

Bakteriyel karınzarı iltihaplı hastaların kanında iki PLA₂'nin varlığı varlığı belirlendi. Bunlar çözüner Ca²⁺-bağımlı nötral aktif PLA₂ ve Ca²⁺-bağımsız PLA₂'dir. Karın zarı iltihabı, kör bağırsak iltihabı ve akciğer iltihabı olan hastaların serumunda katalitik aktivitenin arttığı görülmüştür(Matsuda *et al.*, 1991).

4.2.6 Çeşitli Organ Tahribatları(MOF)

Cerrahi yoğun bakım hastalarının ölümcüllüğü özellikle MOF sendromunun gelişmesiyle ve şiddetinin derecesiyle belirlenmektedir. Deneysel ve klinik delil, PLA₂'nin MOF'un kritik inflamator medyatörlerini regüle ettiğini göstermektedir. PLA₂-II düzeylerinin belirlenmesi diğer laboratuvar test kombinasyonu ile birlikte ek bilgi verebilir. Bazı araştırmacılar sepsisli, septik şoklu ve MOF'lu hastalarda PLA₂ aktivitesinin yükseldiğini rapor etmişlerdir(Carrico *et al.*, 1986).

PLA₂ aktivitesinin arttığı çeşitli travmalı 39 hasta üzerinde yapılan çalışmada ölümlülük oranıyla korelasyon halinde olduğu görülmüştür. Ancak fatal sonucun tahmini mümkün değildir. PAF-asetatlar ve PLA₂ aktivitesi, septik şoklu hastalar üzerindeki diğer çalışmada septik şok ve takip eden şiddetli travmada hastalığın şiddeti için belirleyici olarak kullanılabileceği bulunmuştur(Sörensen *et al.*, 1994). Serumda PLA₂

konsantrasyonları yüksek risk taşıyan ameliyat sonrası sepsisli yada kontrol hastaları, yayılmış karın zarı iltihabı, çeşitli tahribatlar yaşayan 215 cerrahi yoğun bakım hastalarında belirlenmiştir. Sepsisli ve karın zarı iltihaplı hastalarda PLA₂-II kons. 0-2. gün arası belirgin şekilde yüksek ve 3-4. gün azalmaktadır. Multiple tahribatlarda PLA₂ kons. artmakta ve 3. gün ilk piki yapmaktadır. 2. günde çoklu tahribatlı hastaların serum düzeyleri ölümcül çoklu organ tahribatları meydana gelmektedir(Nyman *et al.*, 1996).

PLA₂ bağırsak mukozada yüksek kons. bulunmuştur. Beraberinde bağırsak reperfüzyon nötrofillerle süperoksid üretimi gerçekleşmiştir(Mansbach *et al.*, 1990; Van Bebbler *et al.*, 1989). Quinacrine ile PLA₂ inhibisyonu bağırsak iskemi reperfüzyondan akciğer tahribatını engelleyen MOF durumunda PLA₂'nin önemli rol oynadığı gösterilmiştir(Otamiri *et al.*, 1988).

4.2.7 Kalp Hastalıklarında PLA₂

Miyokardiyal fosfolipidlerin katabolizması bazı fosfolipazların aracılığında gerçekleşir(PLA ve PLC gibi). Bunların yanında normal köpek miyokardiyumunda ölçülebilen PLA₂ aktivitesinin çoğunu oluşturan Ca²⁺-bağımlı PLA₂'ler sitozolde özellikle mitokondri ve mikrozomlarda bulunmaktadır(Wolf *et al.*, 1996).

Miyokardiyal iskemide, PLA₂ aktive edilmekte ve yağ asidi β-oksidasyonu inhibe edilmektedir. Bu durum iskemik miyokardiyumda lizofosfatidler, serbest araşidonik asid ve uzun zincir açilkarnitin gibi amfifilik metabolitlerin birikmesiyle sonuçlanır. Bu maddelerin birikmesi miyokardiyal büzülme, aritmi ve hücre ölümünün artması gibi fonksiyonel değişiklikleri içine alan iskemik bölgede elektrofizyolojik

alterasyonlarla ilişkilendirilmektedir(Shaik *et al.*, 1981; Katz *et al.*, 1981). Miyokardiyal lizofosfolipidler aşağıda belirtilen birkaç biyokimyasal proseslerin sonucu olarak birikebilir.

1) İskemide doymamış yağ asidlerinin ve lizofosfolipidlerin ayrılması, muhtemelen artan PLA₂ aktivitesinin sonucu olabilir(Hsueh *et al.*, 1977). İskemik bölgede intraselüler Ca²⁺'un birikmesi ve artan H⁺ iyonlarının konsantrasyonu PLA₂ aktivasyonunu stimüle etmektedir. Ek olarak, iskemik bölgede şiddetli lokal beta-adrenerjik stimülasyon PLA₂ aktivitesini artırabilir. Membran bağlı Ca²⁺-bağımsız PLA₂(plazmalojonleri hidrolizler) miyokardiyal iskemi sırasında enzimatik medyatör görevi görür(Hazen *et al.*, 1991). Bu enzimin aktivasyonu dönüşümsüz selüler tahribatı ilerletir ve iskemik miyokardiyumda en erken biyokimyasal değişimler arasındadır(Ford *et al.*, 1991).

2) Tavşan miyokardiyumu, yüksek lizofosfolipaz aktivitesine sahiptir. Bu enzimin aktivitesi 16 kat ile *in vitro* koşullarda PLA₂ aktivitesini geçmektedir. Bu nedenle lizofosfolipaz aktivitesinin indirgenmesi iskemik dokuda lizofosfolipidlerin birikmesinde kritik bir belirleyici olabilir. İskemide uzun zincirli açıl-karnitin, serbest yağ asidi ve lizofosfolipazı inhibe eden açıl-CoA olmak üzere üç metabolit birikir. İskemide maksimum lizofosfatidilkolin konsantrasyonu ve pik aritmisinde PLA₂ aktivitesi inhibe olur. Bu onun birikiminden daha önemli olabilen lizofosfatidilkolin metabolizmasının inhibisyonu öneren ve PLA₂ aktivasyonunu indükleyen iskemi hipotezine zıttır(Mock *et al.*, 1990).

3) Son zamanlarda, fosfatidilkolin sentezinin reaçilasyon yolunun rolüne dikkat çekilmektedir. Miyokardiyal lizofosfatidilkolin transaçilazın inhibisyonu miyokardiyal iskemide lizofosfatidilkolinin birikimine neden

olan adımı olabilir ve dolaylı yoldan prostaglandin üretimi için AA ayrılmasına neden olur(Deka *et al.*, 1986).

İskemik kalp rahatsızlığında miyokardiyal dokunun geri dönüşümsüz tahribatı, dolaşımında hücrel enzimlerin ayrılmasıyla ilişkilendirilmiştir. Miyokardiyal iskeminin patogeneğinde PLA₂'nin karışması sebebiyle kanda PLA₂'nin ölçülmesi (doku ölümü) sırasında doku tahribatının bir belirteci olarak önerilmektedir. Kandaki PLA₂ aktivitesinde belirgin bir artış miyokardiyal doku ölümü sonrası görülmektedir.

Potansiyel antrakinon antitümör ajanı olan doxorubicininin klinik kullanımı, doza bağlı letal kardiotoxik etkileri nedeniyle sınırlıdır. Artan prostaglandin formasyonu doxorubicinle indüklenmiş kardiak tahribatının gerçekleşmesinde önemli rol oynayabilir. Kardiak membranların lipid peroksidasyonu PLA₂'den kolay etkilenen membran fosfolipidlerinin peroksidasyonunun başlangıcında gerçekleşir ve kardiak disfonksiyonuyla artan eikozanoidlerin oluşumuyla sonuçlanır(Langton *et al.*, 1992).

4.2.8 Akciğer Hastalıklarında PLA₂

PLA₂ sağlıklı tavşanların akciğer homojenatlarında, sıçan akciğerinin 20000g süpernatantından ve tavşan akciğer mikrozomlarından saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. PLA₂ aktivitesi bronchoalveolar sıvıda gibi sitozolik formlarda ve membranla ilgili olarak her iki formda da belirlenmiştir(Lindah *et al.*, 1989; Filgueiras *et al.*, 1987).

Bu enzimler aktive hücrelerde aktif lipid türevleriyle fizyolojik üretimde ve dinlenmiş hücrelerde membran fosfolipidlerinin yeniden modellenmesinde önemli rol oynar. Clara hücrelerinin 10 kDa proteini PLA₂ inhibe eder ve akciğerde inflamasyon cevaplarının regülasyonunda önemli olabilir(Singh *et al.*, 1990). PLA₂ siklooksigenaz ve lipoksigenaz, bunun yanında direk etkiyle indüklenen ürünlerde akciğer inflamasyonunun potansiyel medyatörüdür. Yetişkin farelerde PLA₂'nin intratracheal yönetimi akut akciğer tahribatının kullanışlı deneysel bir modeli olarak düşünülmüştür(Cirino *et al.*, 1994).

Akciğer sürfaktan eksikliği 4 haftalık bebeklerde solunum yolu rahatsızlığının(NRDS) ve yetişkin solunum yolu rahatsızlığının(ARDS) gelişmesinde cevap oluşturmaktadır. Genellikle ARDS'li hastalar lavage sıvıda normal fosfolipid düzeyine sahiptir. Fakat fosfolipid tür karışımında ve dipalmitoil fosfatidilkolinde ki bu surfaktanların en aktifidir, belirgin bir indirgenme sözkonusudur. Lavage sıvıda PLA₂ artmış değildir fakat daha yüksek aktiviteler sistemik sirkülasyonda bulunabilir. Son çalışmalar PLA₂ ile surfaktan fosfolipid hidrolizinin gerçekleşmesiyle NRDS ve ARDS'nin gelişmesine neden olduğu belirlenmiştir(Kaiser, 1999). ARDS'li hastalarda plazmada TNF ve PLA₂ aktivitesi yüksektir. Bu yükselmeler arterial(atardamar) PLA₂ aktivitesi için işaretir fakat venöz(toplardamar-kirli) kan içinde değildir. TNF düzeyleri venöz plazmada olduğu gibi arteriyel içinde yüksek olduğu bulunmuştu ve ARDS ve MOF'lu hastalarda prognostik ve etiyolojik işarete sahip olabilir. Seri sistemik TNF ölçümlerinin ARDS-MOF-sepsis sendromlu hastalarda kullanışlı prognostik indikatör olabileceği belirtilmiştir. PLA₂ aktivite düzeyleri yüksek TNF düzeylerinde olduğu gibi ölümün bir işareti değildir(Romaschin *et al.*, 1992).

Alerjik rinitisde nazal(buruna ait) sıvıda indüklenen PLA₂ romatizmalı durumda sinovial sıvıda bulunan ekstraselüler PLA₂'ye çok benzerdir. PLA₂-II'nin nasal sıvı kons. paranasal sinüs sıvısıyla ve serum düzeyleriyle (10.8µg/L) karşılaştırıldığında yüksek(590µg/L) olduğu bulunmuştur(Stadel *et al.*, 1994).

4.2.9 Böbrek Hastılıklarında PLA₂

Eikozanoidlerin büyük bir çoğunluğunu sentezlediği bilinen böbrekler, birkaç farklı PLA₂ içermektedir. Sıçan böbreği homojenatlarında yüksek molekül ağırlıklı bir PLA₂ bulunmuştur(Gronich *et al.*, 1988). İki Ca²⁺-bağımlı PLA₂, sıçan böbreğinin sitozolünden saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Düşük molekül kütleli (14kDa) ve yüksek molekül kütleli enzim(110kDa). Düşük molekül kütleli PLA₂, PLA₂-I gibi aynı N-terminal dizisine sahiptir. Yüksek molekül kütleli enzim mM Ca²⁺ kons. aktiftir ve *sn-2* pozisyonunda araşidonik asitle gliserofosfolipidler için tercih edilmektedir. Sıçan böbreğinin membran fraksiyonunda düşük moleküllü PLA₂ bulunmaktadır. Bu enzimin N-terminal dizisi sıçan PLA₂-II ile identik olduğu bulunmuştur. Yüksek molekül kütleli PLA₂ sıçanlarda ve insan mesajcı hücrelerde de üretilmektedir. 110 kDa'luk molekül kütleli renal PLA₂'nin saflaştırılması ve karakterizasyonu rapor edilmiştir(Gronich *et al.*, 1988). Bu enzim nötrale monoklonal antibadilerle PLA₂-II olarak sınıflandırılmıştır. Alkali optimum pH'ya sahip Ca²⁺-bağımlıdır ve substrat olarak fosfatidiletanolamin kullanır. Bu enzim vazopressin, anjiotensin II, IL-1 ve *Coleus forskolii*'de kardioaktif bir diterpenoid olan forskolin ile stimüle edilmektedir. Artan PLA₂ aktivitesi ve prostaglandin sentezi hipertensif sıçanlarda hipertansiyon gelişmesi ve anlaşılmasında önemli rol oynamaktadır(Nakasato *et al.*, 1991; Kawaguchi *et al.*, 1987).

Pankreatik enzimlerin yüksek aktivite ve konsantrasyonları kronik böbrek bozukluğu olan hastaların kan plazmalarında bulunmuştur. PLA₂ aktivitesi üremik plazmada arttığı belirtilmiştir(hastalar:N:15, 1.97±0.78Umol/L/dk, kontrol:N:12, 0.25±0.47Umol/L/dk). Serumda PLA₂-I konsantrasyonu akut böbrek ve kronik böbrek bozukluğu olan hastalarda yüksektir(Costello *et al.*, 1990; Funakoshi *et al.*, 1991).

Düşük molekül kütleli olması nedeniyle PLA₂ böbrek tarafından filtre edilir ve bu nedenle urinde dedekte edilebilir. Radyoimmünoassay yöntemiyle sağlıklı 18 kişide plazma PLA₂ kons. 4.25±13µg/L ve urinde 0.24±0.1µg/L olarak hesaplanmıştır. Uriner PLA₂ böbrek merkezli olabilir, direk olarak tahrip olmuş tubuler hücrelerden ayrılabilir. Bu yaklaşımın delili bazen oluşan böbrek tubuler bozukluğu olan pankreatik hastalardan sağlanmıştır(Fabris *et al.*, 1992).

4.2.10 Karaciğer Hastalıklarında PLA₂

Sıçan karaciğer mitokondride bulunan PLA₂, dış ve iç membranla ilişkilidir. Sıçan karaciğer mikrozomlarında plazma membranlarında, golgi membranlarında, nüklear membran ve matrix, ve lizozomlarda PLA₂ tesbit edilmiştir(De Winter *et al.*, 1982; Newkirk *et al.*, 1973).

Son çalışmalar kronik karaciğer hastalarında ve hepatoselüler kanserli hastalarda PLA₂'nin bulunabileceğini göstermişlerdir. Kronik karaciğer hastalarında serum PLA₂ aktivitesi şiddetiyle paralel olarak artmaktadır(Kaiser, 1999).

4.2.11 Pankreatik Hastalıklarda PLA₂

4.2.11.1 Dış Salgı Pankreas

Akut pankreatitisli hastaların en önemli problemi mümkün olan en kısa sürede hastalığın şiddetinin belirlenmesi ve tahmini bilgilerin açıklanmasıdır. Akut pankreatitis teşhis edilmektedir ve pankreatitis için hiçbir enzim spesifik olmamasına rağmen serumda amilaz ve lipazın aktiviteleri ölçülmesi ile takip edilmektedir. Tripsin, kimotripsin, elastaz ve ribonükleaz dahil diğer pankreatik enzimlerin belirlenmesinde ki metodlar pankreatik hastalıkların teşhisinde önerilmektedir(Kaiser, 1999). Günümüzde kabul gören görüş, PLA₂'nin akut pankreatitis patogenezinde önemli rol oynamasıdır. PLA₂ inaktif proenzim olarak pankreasın acinar hücrelerinde üretilir ve atak sırasında pankreas içinde aktive olur(Nevalainen, 1988; Nevalainen *et al.*, 1983). Aktif PLA₂ ile hidrolize olan membran fosfolipidlerinden açığa çıkan sitotoksik yağ asitleri ve lizofosfolipidler pankreası tahrip eder ve daha sonra dolaşım içine ayrılmasıyla diğer hücreleride tahrip edebilir. Ayrılan enzim serumda belirlenebilir. Bu yaklaşım diğer çalışmalarla geliştirilebilir. Domuzlarda deneysel hemorajik(kanamayla ilgili) pankreatitisin pankreatik kanallara sodyum taurakolat ve tripsinin infüzyonuyla indüklendiği ve arkasından sekretinin enjeksiyonu ile PLA₂ aktivitesinin plazmada belirgin bir şekilde arttığı görülmüştür. Doğal bir tripsin inhibitörü olan aprotinin hayvanların yaşamını uzatmıştır. Akut pankreatitisin diğer bir domuz modelinde, serumdaki PLA₂ aktivitesi pankreasdan meydana gelmiştir. Artan PLA₂ aktivitesi akut hemorajik pankreatitide pulmonary(akciğer) ödem oluşumuyla pulmonary(akciğer) vasküler geçirgenliği artırabilir(Chen *et al.*, 1989). Sıçanlarda artan plazma PLA₂ aktiviteleriyle kronik etanol tüketimi hayvanların ölüm oranıyla doğru orantılıdır(Raemoe *et al.*, 1986). PLA₂-II konsantrasyonu

sodyum taurakolat indüklü pankreatitide belirgin bir şekilde artmıştır(Uhl *et al.*, 1997).

Akut pankreatitisli hastaların serumunda PLA₂'nin artan katalitik aktivitesi ilk olarak 1961 yılında, daha sonra bazı yazarlar tarafından rapor edilmiştir(Zieve *et al.*, 1961; Matsuda *et al.*, 1986). Serumda amilaz ve lipaz aktiviteleri akut pankreatitisin tahmininde kullanışlı değildir. Ancak serumda PLA₂ aktivitesindeki artış hastalığın şiddetiyle korelasyon halindedir ve hastalığın teşhisinde önemli olabilir(Sternby *et al.*, 1996).

Akut pankreatitisli 37 hastada yapılan çalışmada kanda PLA₂ aktiviteleri ve yağ düzeyleri düşük diagnostik hassasiyette belirlenmiştir ve konvensiyonel total amilaz hiçbir avantaja sahip değildir(Winslet *et al.*, 1991). 58 sağlıklı kişinin serumunda immünoreaktif normal PLA₂(5.5±1.9µg/L) ve akut pankreatitisli(özellikle alkolik pankreatitis ve pankreatik kanser) hastada oldukça yüksektir(42.6±29.5µg/L ve 29.2±21.3µg/L)(Nevalainen *et al.*, 1985). Akut pankreatitisli 48 hastanın, interstinal-ödemli 21 hastanın sıvısında immünoreaktif PLA₂ kütle kons. ve katalitik aktivitesi ölçülmüş, her grupta akut pankreatitisin başlangıcından 48 saat içinde PLA₂ kütle konsantrasyonu 10 kat arttığı bulunmuştur. Pankreatik hastaların (nekrotik pankreatitisli) başlangıcından sonra 1 hafta içinde serum PLA₂ aktivitesi belirgin olarak artmıştır(Kaiser, 1999).

Akut pankreatitisin ödemli yada nekrotik 36 yoğun bakım hastasının serum örneklerinde ilk üç gün içinde PLA₂ katalitik aktivitesinde olduğu gibi PLA₂-I ve PLA₂-II'nin anlamlı kons. artışı göstermiştir. Pankreatik PLA₂ değerleri sadece hastalığın ilk basamağında artmakta ve daha sonra hızla düşmektedir. Sonuçlara göre

akut pankreatitisli hastaların kanında inaktif enzim olarak dolaşmaktadır. Sinovial tip PLA₂ enzimin artan katalitik aktivitesi için cevaptır ve doğrusu hastalığın patofizyolojisiyle ilişkili olabilir(Nevalainen *et al.*, 1993).

Pankreatik kanserli hastalarda PLA₂ kütle kons. kontrole göre artmış ve serum amilaz aktivitesiyle korelasyon halindedir. Pankreatik dokudan PLA₂-I'in ayrılması tümöre ait prosesler tarafından pankreatik dokunun harabiyetine sebebiyet vermektedir. Pankreatik kanserin en yoğun histolojik tipi ductogenic adenokarsinomadır(Morohoshi *et al.*, 1983).

Pankreas transplantasyonunda en büyük problem pankreas allograft(doku transfer) dedeksiyonunda uyumluluk için hassas ve basit bir lab. belirleyicisi olmamasıdır. 5 hastada yapılan çalışmada, transplantasyondan sonra 1 ay içinde yer alan uyum süresinde plazmada PLA₂ ve pankreatik tripsin inhibitörü(PTI) kons. belirlendi. Sonuçlar plazmada PLA₂'nin allograft uyumsuzluğu için kullanışlı bir belirleyici olduğu ancak plazma PTI kadar yüksek olmadığı yönündedir(Suzuki *et al.*, 1994).

4.2.11.2 Endokrin Pankreas-İnsülin Salınımı

Pankreatik isletlerde insülinin glukoz indüklü ayrılması membran fosfolipidlerinin yüksek turnover sayısı ile birlikte gerçekleşmektedir. İnsülin ayrılmasında PLA₂ aktivasyonu, PLA₂'nin ürünleri araşidonik asid ve lizofosfolipidlerle indüklenir. Membran kesme özelliğine sahip ve yüksek konsantrasyonda bulunan PLA₂'nin ürünleri islet hücrelerinin yüzeyinde morfolojik değişiklikleri indükler(Metz, 1986). Daha sonra islet PLA₂'nin bloke edilmesi glukoz-indüklü insülin ayrılmasını inhibe

eder. Bu açıklamalar glukoz-indüklü insülin salınımında PLA₂'nin bir beta hücre glukoz sensörü olarak rol oynayabileceğini önermektedir(Metz, 1984). Bu yaklaşım klinik açıklamalarla doğrulanmaktadır. Kontrolsüz diabetik hastalarda heparin sonrası PLA₂ plazma düzeyi 18.7 U/ml'dir. Bu değer kontrollerden(106 U/ml) ve kontrollü diabetik hastaların(87 U/ml) enzim aktivitelerinden belirgin bir şekilde daha düşüktür. Kontrolsüz diabetiklerin plazmasındaki bu düşük aktivite streptozotocin indüklü diabetik sıçan modelinde de gözlemlenmiştir(Shakir *et al.*, 1986).

4.2.12 Bağırsak Hastalıklarında PLA₂

Sıçan gastrik mukozada PLA₂ belirlenmiştir. Nükleotid dizi analizi, sıçan gastrik mukoza ve akciğerden türevlenen pankreatik tip PLA₂-I cDNA'lar ile sıçan pankreası PLA₂'nin identik olduğunu göstermektedir. Fosfolipaz aktivitesi intestinal(bağırsak) mukozada da belirlenmiştir(Hirohara *et al.*, 1987).

Safra asitleri ve lizolesitinin gastrik mukozayı tahrip etmesi gastrik ülser hastalığının önemli bir nedeni olarak gösterilmektedir. Safra asitleri ve PLA₂ ürünü lizolesitin deney hayvanlarında gastrik ülser neden olabilmektedir ve her ikisinin yüksek konsantrasyonları, gastrik hastalarda sağlıklı kontrollerle karşılaştırılarak rapor edilmiştir. PLA₂ aktivitesi ve lizofosfolipidlerin birikimi ince bağırsak iskemisi ile meydana gelen mukozal tahribata neden olmaktadır(Orchard *et al.*, 1977; Otamiri *et al.*, 1988).

4.2.13 Üreme Organları Hastalıklarında PLA₂

4.2.13.1 Erkek Üreme Organları

İnsan meni plazması oldukça yüksek oranda PLA₂ içermektedir. Bu enzim sinovial tiptedir ve prostat tarafından salgılanır. 16.7 kDa PLA₂ insan spermatozoadan izole edilmiştir. N-terminal dizi analizi yapılmıştır. Dizi insan meni plazmasında bulunan 14 kDa-PLA₂-II'den farklıdır(Takayama *et al.*, 1991; Langlais *et al.*, 1992). Sığır meni plazma PLA₂'si temel tip PLA₂ olarak bulundu ve saflaştırıldı. Ca²⁺ bağımlı enzim 6.5 civarında opt. pH'a sahiptir. Asidik bölgeye kaymaya meyilli enzim heparine karşı afinite göstermiştir ve o-bromofenasil bromür ile inhibe olmamaktadır. Enzim sığır meni plazma proteinleriyle inhibe olmaktadır. Bu proteinlerin sperm yüzeyinin erken lipolizini engellemek için stabilizasyon ajanı olarak rol oynadığından şüphelenilmektedir(Soubeyrand *et al.*, 1997).

Bazı deliller, Ca²⁺ iyonları ve fosfolipazın sperm hareketinde ve sperm kapasitesinde düzenleyici rol oynadığını göstermektedir. Döllenme esnasında spermatozoonun "acrosome reaksiyonu" olarak adlandırılan ekzositotik işlem gerçekleşir ve spermin yumurtaya girişini sağlayacak olan enzimlerin salınımını ve yumurtayla birleşmesini de sağlar(Breitbart *et al.*, 1985; Garbers, 1989). Bazı çalışmalar akrozomal ekzostozis sırasında membran erimesine neden olan olaylar serisinde PLA₂'nin temel rol oynadığına dair güçlü deliller sunmaktadır. Bu durum Ca²⁺ girişinden sonra meydana gelen fosfoinositidaz aracılığındaki polifosfoinosit hidrolizi PLA₂ aktivasyonunu sağladığını göstermektedir, çünkü polifosfoinosit hidrolizi tamamlandıktan sonra hücre stimülasyonunun benzer koşulları altında sadece araşidonat ayrılması gerçekleşmektedir(Roldan *et al.*, 1989).

4.2.13.2 Dişı Üreme Organları

İnsan endometrium(uterus duvarı) ve amniotik membranlarda bir PLA₂ ve PLC aktivitesi bulunmaktadır. Endometriumun glanduler kısmında steroid hormonlarla düzenlenen Ca²⁺ bağımsız optimum pH 7.0 olan bir PLA₂ belirlenmiştir(Bonney *et al.*, 1988). Domuz uterusunda PLA₂ ve PLC 7'den 15 güne kadar prostaglandin sentezini stimüle etmektedir. Korpus luteum plazma membranında luteolizis sırasında PLA₂ aktivitesi belirlenmiştir(Riley *et al.*, 1987). Progesteron PLA₂ aktivitesini inhibe eden uterogloblin, araşidonat ayrılmasını azaltarak hamilelik sırasında uterus üzerine antimobilite etkisini kullanabilir ve uterusda prostaglandin düzeyleri düşer(Levin *et al.*, 1986). Plasentanın ham membran fraksiyonundan PLA₂'nin saflaştırılması rapor edilmiş ve insan eklem sıvısı PLA₂'si ile yapı homolojisine sahip olduğu gösterilmiştir. Daha sonra PLA₂'nin iki türü insan plasental membrandan kısmen saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Eikozanoid biyosentezinin kontrolü çok önemlidir çünkü bu bileşikler uteroplental kan akışı içinde gereklidir(Walsh *et al.*, 1986).

Prostaglandinler ve benzer bileşikler insan ve hayvan çalışmalarının başlangıcında merkezi rol oynamaktadır. Uterin içi membran fosfolipidlerinden araşidonatın ayrılma oranı insan amnion ve decidual hücre membranlarında bulunan PLA₂ ile düzenlenmektedir. Gestational(gebe) doku fosfolipidlerinden araşidonatın ayrılma oranı prostaglandin biyosentezinin büyük bir belirleyicisi olarak da kabul edilmektedir(Skinner *et al.*, 1985). Miyometrial, amniotik, decidual ve plasentada bulunan PLA₂ membran fosfolipidlerinden araşidonatın ayrılmasını katalizler. Normal hamilelik ve pretermde PLA₂-II ve plazma düzeyleri açık bir şekilde artmaktadır(Akesson, 1975; Lopez *et al.*, 1992).

4.2.14 Sinir Sistemi Hastalıklarında PLA₂

PLA₂ nöronal membranlarda bulunur ve beyinde membran yapılarının fonksiyonlarında önemli rol oynar. PLA₂ ile membran fosfolipidlerinin kırılması sinaptik membranlarda fizikokimyasal özelliklerde örneğin transmembran ve yüzey potansiyelleri ve lipid blayer akışkanlığında değişikliğe sebep olur. Sıçan beyinin sitozolik fraksiyonunda Ca²⁺-bağımsız PLA₂ ve Ca²⁺-bağımlı bir PLA₂ belirlenmiştir. Ca²⁺ iyonu sitozolik PLA₂'nin translokasyonunu artırmaktadır(Erin *et al.*, 1985; Yoshihara *et al.*, 1990). PLA₂ ve prostaglandinler glial hücre farklılaşmasının kontrolünde görev alırlar. Membran lipidlerindeki değişikliklerin PLA₂ aktivasyonu ile indüklenmesi, reseptör fonksiyonunun regülasyonu için fizyolojik bir mekanizma olarak önerilmiştir. PLA₂'nin aktivasyonu kopan sinir membranlarının ayrılmasında önemli bir rol oynayabilir(Oliveira *et al.*, 1984; Yawo *et al.*, 1983).

Beyinde eikozanoid düzeyleri normal şartlar altında çok düşüktür. Ancak iskemi yada inflamasyon süreci sırasında artan AA ve prostaglandin sentezi, PLA₂ aktivitesinin sonucu olarak görülmektedir(Gaudet *et al.*, 1980). Miyelin kılıfın yanında inflamasyon makrofajlarından ayrılan PLA₂, merkezi sinir sisteminin inflamasyonel anormal değişikliklerde primer demiyelinasyona katılabilir. Sıçanlarda serebral iskemi, beyin dokusunda membran fosfolipidlerinden ayrılan serbest yağ asitlerinin birikmesine sebep olur(Marion *et al.*, 1979). Cenin beyinde hipoxianın(oksijen iletiminin zayıflaması) başlangıcında PLC medyatörlüğünde diaçilgliserin formu, bir sonraki anda AA'in PLA₂ medyatörlüğünde ayrılmasıyla takip edilir. PLA₂'nin aktivasyonu Mongolian gerbillerde ve köpeklerde serebral iskemi çalışılmıştır. Sinaptik keseciklerde PLA₂ ve PLC aktivasyonu nörotransmitter

formasyonunu büyütmek için ve kese-membran parçalanmasına öncülük ederek sinaptik kese membranlarında konformasyonel değişiklik meydana getirebilir. Gerbil türü hayvanlarda, beyinde iskemi ve reperfusion ile ilişkili hücrel tahribatta majör rol oynayan PLA₂'nin aktivasyonunun sonucudur(Mazzari *et al.*, 1978). Beyinsel iskemide, PLA₂ ile PC yada PE den ayrılan AA'den ziyade çoğunlukla PLC ile inozitol-fosfolipidlerden ayrılır. Tavşan beyinin nekrotik lezyonlar sırasında cryogenic tahribattan sonra dokuda PLA₂'nin belirgin bir şekilde aktivasyonu bulunmaktadır(Edgar *et al.*, 1982).

Bazı çalışmalar şizofreninin fosfolipid metabolizmasının düzensizliğinden kaynaklandığını göstermektedir. Nöroplastik terapi bulunduktan sonra kontrol düzeylerine aktivitenin indirildiği gibi plazmada PLA₂ aktivitesinde belirgin bir artış vardır. PLA₂, birkaç akut faz proteinlerinden biri olması nedeniyle kan PLA₂ yükselmeleri şizofreni ve depresyonla belirlenmiştir ancak spesifik değildir ve şizofreni için spesifik bir belirleyici olarak kullanılamaz(Albers *et al.*, 1993).

4.2.15 Eklem Hastalıklarında PLA₂

Eklem romatizmasında eklem inflamasyonu ve kıkırdak tahribatının en önemli yolu olarak eklem hücre enzimleri ve inflamator araşidonik asit metabolitlerinin üretiminin sonucu olduğuna inanılmaktadır(Bomalaski *et al.*, 1993). Eikozanoidlerin yüksek konsantrasyonları RA'lı hastaların eklem sıvısında bulunmuştur ve artan eikozanoidler organ ve hücre kültürleri içinde romatoid synovia tarafından üretilmektedir(Klickstein *et al.*, 1980; Robinson *et al.*, 1975). IL-1 gibi sitokinler eklem tahribatında rol oynayabilmektedir. IL-1 synovial hücrelerde collagenaz, plazminojen aktivasyonu ve nötral

proteoglikanaz aktivitesini artırmaktadır. Araşidonik asit metabolizmasını aktive etmek için IL-1'in olması gerektiği farkına varılmıştır. Örneğin, IL-1 synovial hücrelerde, kondrositlerde ve endotel hücrelerde PGE₂ biyosentezini artırmaktadır(Nolan *et al.*, 1982).

RA, osteoartritisde(OA), kristal-ilişkili artiritis ve olgunlaşmamış RA durumunda eklem sıvısında oldukça önemli PLA₂ katalitik aktiviteleri bulunmuştur. Çeşitli artropatilerde(eklem rahatsızlıklarında) eklem sıvısında bulunan enzim PLA₂-II'dir(Pruzanski *et al.*, 1991; Pruzanski *et al.*, 1992). İnsan eklem sıvısından PLA₂ saflaştırılmış ve detaylı olarak karakterize edilmiştir. 13.7 kDa molekül kütleli Ca²⁺-bağımlı enzimdir, optimum pH'ı 9.0'dur ve karakteristik substrat spesifikliği PE>PS>PC şeklindedir. İnsan eklem sıvısı enzimatik olarak iki farklı PLA₂ aktivitesi içerir(Hara *et al.*, 1988). Biyokimyasal olarak farklı PLA₂'lerin var olması eklem hastalıklarının patolojisi, tanınması ve terapötik tedavisinde öneme sahip olabilir. RA hastaların eklem sıvılarında yüksek düzeylerde bulunan PLA₂'nin saflaştırılmasında ve karakterizasyonundaki ilerleme, bu enzimin bu tür kronik hastalığa yeteri kadar çok katıldığını göstermektedir(Vishwanath *et al.*, 1988). İnsan eklem sıvısından saflaştırılan PLA₂, farelerde taban arterlerine enjeksiyondan sonra ödem oluşumunu indüklemektedir ve sıçanlarda eklem içine enjeksiyonu, inflamasyona ve proliferatif değişikliklere sebep olmaktadır ki bu, insan extraselüler rekombinant PLA₂'nin tavşan eklemlerinde inflamator reaksiyonlarını indüklediği inflamator artirit ve romatoid artiritin(RA) deneysel modelleriyle benzerlik göstermektedir(Vadas *et al.*, 1989).

Serumda PLA₂'nin düzeyi, hastalığın sistematik doğasını yansıtan RA'li hastalarda da yükselmektedir. Serum aktiviteleri eklem sıvısındaki

PLA₂ ile ve hastalık aktivitesinin kliniksel ve laboratuvar belirtileri ile anlamlı olarak korelasyon halindedir(Pruzanski *et al.*, 1988).

RA'li hastaların PLA₂ düzeyleri, OA yada sağlıklı kontrollerin düzeyinden belirgin bir şekilde yüksektir. PLA₂'nin yüksek aktivitesi, RA'de inflamasyon aktivasyonunun duyarlı bir belirteci olarak ele alınmaktadır.

Sinovial sıvıda bulunan PLA₂'nin hücresele orijini şu ana kadar tanıtılmamıştır. İnsan sinovial sıvıda ve eklem kıkırdak bölgesinde PLA₂ büyük miktarlarda bulunmaktadır(Pruzanski *et al.*, 1991; Vignon *et al.*, 1989). PLA₂ aktive edici bir protein(PLAP) eklem sıvısından izole edilmiştir. Bu temel protein mellitin ile biyokimyasal ve antijenik benzerlikler paylaşmaktadır. PLAP nötrofil degranülasyonu ve süperoksit iyon üretimini de harekete geçirmektedir. Yüksek PLA₂ aktivitesi sinovial sıvı içinde polimorfonükleer hücrelerde ve inflamator hücrelerde belirlenmiştir. RA'li hastaların periferal kan nötrofilleri ve monositler, artan PLA₂ aktivitesi göstermektedir(Bomalaski *et al.*, 1989). RA tedavisinde en önemli nonstroidal antiinflamatuvar ajan olan aspirin, kan monositlerinde PLA₂ aktivitesine devamlı etkisi yoktur. Bu inhibisyon doz ve zamana bağımlıdır. İnkübasyon öncesi karışıma sikloheksimid yada aktinomisın D'nin eklenmesi inhibitör etkisini ortadan kaldırmaktadır. İnkübasyon öncesi karışıma artan PLA₂ aktivitesi yada aktinomisın D eklenmesi inhibitör etkisini ortadan kaldırmaktadır. Sinoviada artan PLA₂ aktivitesi eklem içi kortikosteroid enjeksiyonunu takip eden süreçte belirgin bir şekilde azalmıştır(Bomalaski *et al.*, 1989).

4.2.16 Cilt Hastahklarında PLA₂

Epidermisde bulunan PLA₂ araşidonat kaskadın başlaması için cevap oluşturmaktadır. PLA₂'nin tamamen farklı bir ikinci grubu cilt kortikosteroidlerinin tedavisi sırasında PL'lere karşı oldukça yüksek aktiviteyle belirlenmiş ve karakterize edilmiştir(Bergers *et al.*, 1988). Ca²⁺-bağımlı bir PLA₂ sedefli hastaların cildinden ve normal kişilerin epidermisinden saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Sedef yaralarında serbest AA konsantrasyonu, normal epidermisten çok daha yksekdir. Normal epidermisde nisbeten dūřuk PLA₂ aktivitesi PLA₂ lipokortin inhibitörünün varlığı ile ilişkilendirilebilir(Forster *et al.*, 1985). Sedefli epidermis durumunda artan PLA₂ aktivitesi de artan kalmodülin düzeyi ile açıklanabilmektedir. Kalmodülin PLA₂'yi stimüle eder ve böylece sedef yaralarında artan PLA₂ aktivitesi kalmodülinle PLA₂'nin stimülasyonu arasında ilişkilendirilebilir(Moskowitz *et al.*, 1983). Normal cildin ultraviyole ışığa(UV-B) maruz bırakılması kızarma(iltihabla kızarma) ve ödemle karakterize edilen akut inflamasyonu indükler. Bu inflamator reaksiyon PLA₂ ile araşidonat ayrılmasını artırması nedeniyle prostaglandin E₂'nin dramatik artışıyla karakterize edilir. İnsan keratinosit kültürü ve insan cildi üzerinde UV-B etkisi çalışıldı ve UV indüklü PGE₂ sentezinde kritik enzim olduğu kanıtlanan 105 kDa cPLA₂ olduğu kanıtlandı(Gresham *et al.*, 1996).

4.2.17 Tümörlerde PLA₂

PLA₂-II kanserli hücrelerde üretilebilmektedir. Pankreas, göğüs ve mide gibi kanser türlerinin immünokimyasal işaretlemeleri PLA₂ için pozitifdir. Artan ekspresyon ve PLA₂'nin sekresyonu IL-6 ile stimüle edilmiş gastrik kanser hücrelerinde bulundu. 16 karsinoma hücresinin altısında kültür süpernatantında altı hücrenin beşinde IL-6 ve IL-1

olmamasına rağmen PLA₂-II salgılanmıştır. Bu sonuçlar PLA₂-II'nin kanser hastalarının serumda yükselmesine neden olabilen tümör hücreleri tarafından ortaya çıktığını belirtmektedir. PLA₂'nin kanser patogeneğinde bir rol oynayabileceği önerilmektedir. Bu görüş PLA₂-II'nin DNA sentezini fibroblastlarda stimüle ettiği ve siroz kanser dokusunun büyük miktarda PLA₂-II içermesi gibi görüşlerle desteklenmiştir(Kiyohara *et al.*, 1993; Yamashita *et al.*, 1993; Murata *et al.*, 1993; Yamashita *et al.*, 1994).

Sindirim organı kanserleri, özellikle mide kanseri gibi ileri akciğer ve göğüs kanserli hastaların artan serum düzeyleriyle tanımlandı(Yamashita *et al.*, 1993). PLA₂ düzeyi tümörün çıkarılmasıyla takip eden süreçte azaldı. PLA₂-II'nin serum düzeyleri kanser hastalarında hastalığın aşamalarına bağlı olarak rapor edilmiştir. PLA₂-II sonucu önceden gösteren bir faktör olarak ve dokularda potansiyel kanserle de ilişkilendirildi. Farklı kanserli 47 hastanın kanın başka dokulara akışında ki PLA₂ konsantrasyonu sirozla ilişkili su toplama ve sera ile karşılaştırıldığında daha yüksektir. Bu enzim proteini kanserli hücreler ve makrofajlar tarafından üretilmektedir(Abe *et al.*, 1997).

4.3 PLA₂'nin Regülasyonu ve Terapötik Hedef Olarak İnhibisyonu

4.3.1 Hücresel düzenleme

PLA₂'nin anlaşılabilmesi konusunda ortaya çıkan son gelişmeler, sadece bir tek değil çok sayıda PLA₂'nin hücresel düzenlemeye ve lipid mesajcı oluşumuna dahil olduğunu ortaya çıkarmıştır. Çok sayıda PLA₂ şekline ait roller için, çeşitli laboratuvarlarda yürütülmüş olan çalışmalardan elde edilen genel bir mekanizma ileri sürülmüştür. Bu

mekanizma, AA'nın hücrelerde üretilmesinde başlıca cPLA₂ ve sPLA₂ olmak üzere en az iki farklı PLA₂'nin katılımını içerir. cPLA₂'lerin aktivasyonu en önde gelen hadisedir ve fosforilasyon kaskadları, intraselüler Ca²⁺ yükselmesi, ve fosfatidilinozitol 4,5-bifosfat seviyeleri gibi çeşitli sinyalcilerin aracılığıyla gerçekleşebilir(Balsinde *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 1993; Qiu *et al.*, 1998).

Bu sinyallerin senkronize eşleşmesi ise cPLA₂'nin uzamış aktivasyonu gibi bir sonuç üretebilir. sPLA₂ çıkarmayan hücrelerde, hücrel aktivasyon süresince hareketli halde bulunan AA'in büyük çoğunluğu için muhtemelen cPLA₂ sorumludur. Bununla birlikte, sPLA₂ içeren hücrelerde AA salınımının büyük kısmı cPLA₂ değil sPLA₂ aracılığıyla gerçekleşmektedir(Balsinde *et al.*, 1996; Balboa *et al.*, 1996). Tesadüftür ki eikozanoid üreten çok sayıda hücre tipi (ör., fagositler, mast hücreleri, trombositler) sPLA₂ sentezler ve salgılar. Bu enzim, bir kez salındığında, hücre yüzeyleri ile ilişkiye girer ve sonrasında hücreleri eikozanoidleri salgılayacak şekilde çevreleme yardımıyla elde edilebilecek AA açığa çıkarır(Balboa *et al.*, 1996; Murakami *et al.*, 1997; Murakami *et al.*, 1998). Yakın döneme ait çalışmalar, AA spesifitesinin olmaması durumuna karşın sPLA₂'nin diğer yağ asitlerindense AA açığa çıkardığını ortaya koymuştur. Bunun neden bu şekilde olduğu ise bilinmemektedir. İlginçtir ki sPLA₂ aktivitesi bir şekilde aktif cPLA₂'ye bağlıdır(Balsinde *et al.*, 1996). Bu nedenle, yanıtın ana etkeninin sPLA₂ olduğu koşullarda dahi AA sinyali için cPLA₂ anahtar role sahiptir. AA metabolizmasında cPLA₂'nin bu temel rolü, hücrelerin AA kökenli metabolitler ve PAF'ı önemli miktarda düşük seviyede ürettiği cPLA₂ knock-out farelerde gerçekleştirilmiş olan deneylerle açığa kavuşturulmuştur(Bonventre *et al.*, 1997; Uozumi *et al.*, 1997).

iPLA₂'nin durumu nedir? Her ne kadar bu enzim uyarılmış AA salınımının etkilenmesinde doğrudan gerekliliği gibi görünmese de AA metabolizması için, özellikle fosfolipid yağ asidi yeniden modellenmesinde öneme sahiptir(Balsinde *et al.*, 1997; Balsinde *et al.*, 1995). Bu nedenle, iPLA₂, hücrelerin AA ve diğer yağ asitlerini membran fosfolipidlerine birleştirdikleri yol üzerinden asıl yola katkıda bulunmaktadır. Bu ise önemli ve ilgi çekici bir kavramdır. Çünkü AA salınımı yapan PLA₂'lerin salınım için farklı AA havuzları kullandığına dair kuvvetli kanıtlar vardır(Balsinde *et al.*, 1997; Balsinde *et al.*, 1996). Bu sebepten, yağ asidi yeniden modelleme reaksiyonlarını düzenleyerek, iPLA₂, farklı hücre altı kompartmanlardaki AA dağılımını ve her bir kompartmandaki bağıl yağ asidi varlığını etkileyebilir(Balsinde *et al.*, 1999).

4.3.2 Eikozanoid Oluşumunun İnhibisyonu

Çeşitli patolojik proseslerde PL-türevli lipit medyatörlerinin etkisi nedeniyle bu ürünlerin baskılanması terapötik amaçlar için düşünülmektedir. Özel ilgi AA metabolitleridir. Yukarıda belirtildiği gibi AA, geniş eikozanoid ailelerinin özellikle COX1, COX2 ve LOX yollarının prekürsörüdür. Eikozanoidler yukarıdaki bölümlerde de belirtildiği üzere fizyolojik aktivitelerin birçoğunda yer almaktadır ve onların aşırı ürünleri, çoğu hastaların patofizyolojisinde yer almaktadır ki bunlar inflamasyon, alerji, beyin tahribatı, kanser gelişimi, metastaz ve kardiyovasküler hastalıklar v.b(Kaiser, 1999; Balsinde *et al.*, 1999).

Buna göre eikozanoid üretiminin kontrolü bahsedilen hastalıkların tedavisinde hedef olmaktadır. Farklı yaklaşımlar alınmaktadır. Birinci yaklaşım, spesifik bir hastalığın belirlendiği spesifik bir PG yada LT'nin üretimini baskılama yada PGs yada LTs(COX yada

LOX sırasıyla)'nın üretimine öncülük eden enzimatik yolun seçici olarak bloklanması amaçlanmaktadır. Ancak bu yaklaşım birkaç sorunla karşılaşmaktadır.

Bazı patolojik proseslerin agonist ve antagonistlerini içeren PGs yada LTs iyi bilinen eikozanoid ailesinde yer almaktadırlar. Bunun yanında PGs ile indüklenen çoğu patolojik şartlarda yer alan farklı enzimatik yollardan (COX1, COX2, LOX) türevlenmektedir. Bu durum yukarıdaki bölümlerde de bahsedildiği üzere çeşitli hastalıklar için görülmektedir. Bu nedenle eikozanoid oluşumunun seçici bir yolunun bloklanması AA havuzunu diğer yola çevirir ve bu yöndeki senteze yardım etmez yada hatta patolojik şartları kötüleştirebilir(Balsinde *et al.*, 1999).

Örnek olarak COX inhibisyonu ile PGs'ye AA'in dönüşümünü indirgeyen geniş kullanım alanına sahip aspirin benzeri non-steroidal anti-inflamator ilaç(NSAID), AA metabolizmasını LTs'lerin artan ürünlerine kaydırır. Bu durum ödem, bronşspazm ve gastrointestinal sistemin ileri dönük olarak kötüleşmesiyle sonuçlanır(Bomalaski *et al.*, 1989). Çoğu NSAID'ler gastrointestinal ve renal sistemlerde yan etkilere sebep olan COX'un formları COX1 ve COX2'nin her ikisinde inhibe eder. COX2'nin seçici inhibisyonunun bu ters yan etkiler olmadan önemli etkiler sağlayabileceği önerilmektedir. Ancak selektif COX2 inhibitörleriyle klinik denemeler hemen hemen uzak davranmakta ki bu ilaçların kronik kullanımına izin verilmesi nisbeten kısa ve yetersizdir(Jouzeau *et al.*, 1997; Singh *et al.*, 1999). Bundan başka son delil göstermektedir ki COX2 inhibitörleri de belirgin yan etkiler gösterebilmektedir. Eikozanoid üretiminin bir yolunun bloklanmasında diğer bir görüş AA metabolizmasını alternatif bir yol olan LT üretimi için

cevap olan yetersiz antiinflamatuvar potansiyele sahip 5-LOX inhibitörlerinin bulunmasıyla oluşan yoldur(Heller *et al.*, 1998).

AA metabolik yolların seçici inhibisyonundaki bu sınırlamalar spesifik eikozanoidlerin üretimini baskılayan ilaçların geliştirilmesinde güç harcanmasına rağmen bu yaklaşımların çok sınırlı başarılarla bir açıklama sağlar. Bu zemin üzerinde PLA₂ aktivitesinin inhibisyonu AA oluşumunun kontrol edilmesinde “çoklu yol inhibisyonu” denilen alternatif bir yaklaşım önerilmektedir(Yedgar *et al.*, 2000).

4.3.3 PLA₂ Aktivitesinin İnhibisyonu

PLA₂ inhibisyonu AA oluşumunun kontrolü PL-türevli medyatörlerle indüklenen patolojik durumların tedavisinde avantajlı olduğu görülmektedir. Bundan dolayı PLA₂'nin inhibisyonu proinflamator lipitlerin(PG'ler, LT'ler, PAF ve LysoPL) birkaç önemli türlerinin baskılanmasıyla gerçekleştirilebilir. Bu yüzden PLA₂ inhibitörlerinin kullanılması inflamasyon bağlantılı hastalıklarda ve doku tahribatlarının tedavisinde ilginç terapötik bir strateji olarak dikkate alınmaktadır.

Ancak etkili PLA₂ inhibitörlerinin geliştirilmesinde en büyük problem, memeli hücrelerinde yer alan normal PL metabolizması ve AA üretiminde yer alan PLA₂'nin farklı formlarını bulundurmasıdır. PLA₂ aktivitesinin non-selektif inhibisyonu, gerekli PL metabolizmasını ve hücre yaşamını zayıflatmaktadır. Bu yüzden PLA₂ inhibisyonu terapötik olarak kullanıldığında, pro-inflamator lipit medyatörlerin merkezinde yer alan PLA₂ major rol oynar. Burada sPLA₂ enzimlerinin inflamator proseslerinin kontrolünde hedef olabileceği, takip eden durumlar temel alınarak gerçekleştirilmektedir(Yedgar *et al.*, 2000).

Yukarıda ifade edildiği gibi PLA₂, salgılanan ve intraselüler form olmak üzere iki şekilde bulunmaktadır(Dennis, 1997). cPLA₂ ve farklı sPLA₂'lerin her ikisinde AA oluşturmak için aktive olabilmektedirler, oysa iPLA₂'nin membranın tekrar modellenmesinde bir rol oynadığına inanılmaktadır(Murakami *et al.*, 1999; Balsinde *et al.*, 2000; Balsinde *et al.*, 1997). cPLA₂ ve sPLA₂ arasındaki iç ilişki açık değildir. cPLA₂, onun aktivasyonu, membran PL'lerinin hidrolizi ve AA'in oluşumunu artıran sPLA₂'nin aktivasyonu ile takip edildiği için regülatör rol oynadığı düşünülmektedir. Bu mekanizma çoğu hücre tipleri için önerilmiştir fakat diğer çalışmalar sPLA₂'lerin bağımsız olarak aktive edildiklerini ve daha sonra intraselüler cPLA₂'nin aktive olduğunu önermektedir(Balboa *et al.*, 2000; Hernandez *et al.*, 1998). Daha sonraki mekanizma sıçan mesajcı hücrelerin, insan astrositoma, insan nötrofilleri ve fare osteoblastların kullanıldığı son çalışmalarla uyumludur. Bu sistemlerin birkaçında sPLA₂ ile ortaya çıkan PL hidroliz ürünleri LysoPL ve serbest yağ asitleri cPLA₂'nin aktivasyonunu indüklemektedir(Huwiler *et al.*, 1997; Wijkander *et al.*, 1995). Bu durum aynı zamanda ekzojen LysoPC'nin eşek böbrek epitel(BGM) hücrelerinde cPLA₂'yi aktive ettiğinin ortaya koyulduğu bir çalışmanın bulgularıyla uyumludur(Yedgar *et al.*, 2000). Ekzojen sPLA₂'nin reseptör medyatörlüğünde ki bir prosesle cPLA₂'yi aktive edebileceği de önerilmektedir(Hernandez *et al.*, 1998).

Hali hazırda bu durum farklı tipte sPLA₂'lerle oluşturulan AA ve LysoPL'in en önemli kısmıyla sPLA₂'nin baskılandığı hücrelerde ve sPLA₂'nin sentezlendiği ve baskılandığı eikozanoid üreten hücrelerin çoğunda(fagositler, mast hücreleri) tartışmalıdır(Balboa *et al.*, 2000; Huwiler *et al.*, 1997). Bu sebeple sPLA₂'ler patolojik durumlarda LysoPL'den ayrı olarak AA'in aşırı üretiminde en büyük nedendir. Buna ek olarak yukarıda belirtildiği üzere, doku tahribatında diğer inflamasyon

medyatörleriyle (ROS(reaktif oksijen türleri)gibi) sinerjistikdir, normal ve kanser hücrelerinin hücre aktivasyonunda ve proliferasyonunda indükleyen ligand reseptörler olarak rol oynayabilir(Kundu *et al.*, 1997). Bundan dolayı, sPLA₂'ler “inflamator PLA₂'ler” olarak gösterilmektedir(Huwiler *et al.*, 1997). Bu nedenle inflamasyon kaynaklı patolojik durumların kontrolünde inhibisyonu için bir hedef olarak sPLA₂ enzimleri önerilmektedir.

Son zamanlarda Balsinda ve arkadaşları PLA₂ inhibitörlerini inflamator durumların tedavisinde potansiyel ilaçlar olarak önermektedirler(Balsinda *et al.*, 1999). Buna intraselüler PLA₂'lerle oluşturulan hayati PL metabolizmasını engelleyebilen ve hücre devamlılığını zayıflatan hücre geçirgen inhibitörlerde dahildir. Böylece patolojik şartlarda önemli rol oynayan fakat normal PL metabolizmasında değil, sPLA₂ aktivitesinin kontrolü istenen bir durumdur. Son zamanlarda tipII sPLA₂'nin spesifik bir inhibitörü bu amaç için geliştirilmiştir(Mihelich *et al.*, 1999), ancak sPLA₂'nin birden çok tipi inflamator yollarda rol oynadığı için farklı sPLA₂'lerin inhibisyonunda istenmektedir. Bu gerekenleri yerine getiren ekstraselüler PLA₂ inhibitörleri(ExPLI) N-türevli fosfatidiletanolamin gibi temel PLA₂ inhibisyon molekülleriyle ve bilinen bağlanmalarla amaçlanmış ve sentezlenmiştir(Dan *et al.*, 1998). Bunlara hyaluronik asit, heparin ve kondroitin sülfonatlar gibi doğal makromoleküller yada ilaç yerleşiminde ve klinik tedavide kullanılan hidroksi-etilnişasta, poligelin, CMC yada dekstranlar dahildir. Yapıları nedeniyle ExPLIs'lar pro-inflamator reaktiflerden hücre membranının korunmasında ikili etkiye sahiptirler; hücre membranını içine alan lipid hareketi, endojen sPLA₂'nin aktivasyonunu baskılama ve polimerik taşıyıcıların oksidasyon ve diğer inflamator stimülasyondan membranların korunmasında hücre yüzey

GAG taklidi yaptıkları belirtilmektedir(Ginsburg *et al.*, 1997; Balsinde *et al.*, 2000).

ExPLI'ler farklı tip sPLA₂'lerden membranın korunmasında etkili oldukları bulunmuştur, bunlar endojen sPLA₂ inhibisyonuyla, PL hidrolizinden hücrelerin korunması, değişik pro-inflamatör reaktiflerin ve sPLA₂'lerin sinerjistik hareketiyle indüklenen hücre lizisini içermektedir(Ginsburg *et al.*, 1997; Balsinde *et al.*, 2000; Dan *et al.*, 1998) . Böylelikle, ExPLI'leri fagositlerin hareketine duyarlı olan streptokoklar tarafından nötrofil aktivasyonunu, insan tam kanda lipopolisakkarid(LPS)-indüklü TNF üretimi ve sıçan beyin glial hücreleri tarafından PLA₂ ile bağlantılı selüler prosesleride baskılar. *In vivo* denemelerde, ExPLI'lerin sıçanlarda indometasin-indüklü ince bağırsak tahribatı ve TNBS-indüklü colitis(kalın bağırsak iltihabı) de olduğu gibi sıçanlarda ovalbümin-indüklü astımda solunum yolu fonksiyonları ve hamster'lerde bleomycin-indüklü akciğer tahribatı, farelerde ertelenmiş tip yüksek duyarlılığın düzeltilmesinde etkili olduğu bulunmuştur(Breuer *et al.*, 1995). Hücre geçirmez PLA₂ inhibitörleri sıçanlarda ve farelerde akut ve uzun dönem toksitesi test edilerek toksik olmadığı bulunarak seçilen ExPLI'lerle desteklenen geçirgen inhibitörlerin potansiyel toksitesinden kaçınılacaktır(Yedgar *et al.*, 2000)

Burada özet olarak önerilen;

- 1) PLA₂ aktivitesinin kontrolü, inflamasyonda bazı patolojik rahatsızlıkların tedavisinde eikozanoid yolunun inhibisyonunda avantajlara sahiptir.
- 2) Birden çok tip sPLA₂'ler inflamator hastalıkların patofizyolojisinde ve farklı sPLA₂'lerin aktivitesinin kontrolünü gerekli kılan hastalıkların tedavisinde önemli rol oynar.

- 3) Hücre içinden geçemeyen PLA₂ inhibitörlerinin kullanılması inflamatör hastalıkların tedavisinde birincil terapötik amaçtır.
- 4) sPLA₂'lerin farklı tiplerini inhibe eden ve onların etkisinden hücre membranını koruyan polimer yüklü ExPLI'ler PL türevleriyle patolojik durumların tedavisinde hücre geçirmeyen PLA₂ inhibitörlerinin önemli potansiyel prototipleri ortaya koyulmuştur.

4.3.4 Farmakolojik İnhibisyonda Kimyasal İnhibitörler

Belirli bir süreçteki spesifik PLA₂'nin etkilenimini değerlendirmeye dair doğrudan ve en açık yaklaşım, kimyasal inhibitörlerle aktivitesini inhibe etmektir. Daha önceden de belirtildiği gibi, spesifik PLA₂'lerin inhibe edilmesi, hem akut hem de kronik inflamatuvar hastalıkların tedavi edilmesinde potansiyel olarak faydalı bir yaklaşım oluşturmaktadır. Ne yazık ki, araştırmacılar için hiçbir potent ve mutlak tipte spesifik PLA₂ inhibitörü yaygın bir şekilde mevcut değildir. Ancak, bir kısım bileşikler potent ve orta derecede tip-selektif inhibitörler gibi davranır ve bunlar, saha seçici ilaçların geliştirilmesi için prototipler olabilirler.

Bu sPLA₂'ler, tanımlanan, izole edilen ve özellikleri belirlenen ilk PLA₂ formlarıdır ve büyük miktarda rapor, çok sayıda adlandırılmış sPLA₂ inhibitörünün özelliklerini tanımlamıştır. “klasik” PLA₂ inhibitörü olarak bildirilmiş olan tipik bileşikler arasında antimalaryal ilaçlar (ör., mepakrin), aminoglikozidler, alkoller ve poliaminler yer almaktadır. Bu moleküller genellikle PLA₂'yi kendi başlarına inhibe etmezler, ancak PLA₂'nin substratları ve hatta Ca²⁺ ile olan etkileşimini köreltme yoluyla etki gösterirler (Mukherjee *et al.*, 1994). Bu nedenle, söz konusu bu bileşiklerdeki spesifite eksikliği, “PLA₂ inhibitörleri” olarak

kullanılmamalarını belirtmektedir. Yukarıdaki bileşiklerin çoğunun kullanımına dair raporlar, literatüre eklenmeye devam etmektedir.

Benzer şekilde, manoolide ya da p-bromofenasil bromid gibi non-spesifik kovalan-modifiye edici PLA₂ ajanları, PLA₂ inhibitörleri olarak büyük miktarda dikkat çekmektedir(Bianco *et al.*, 1995; Mayer *et al.*, 1993). Bu bileşikler genelde in vitro sPLA₂ inhibisyonu yaparken cPLA₂ ya da iPLA₂'de bu etkiyi göstermezler, bu inhibisyon ise Lys ya da His kalıntılarına maruz kalmış bu bileşiklerin kovalan blokajı nedeniyledir. Bu yüzden, bütün hücre sistemlerinde, söz konusu bu bileşikler, büyük olasılıkla, etkilerine dair belirleyici kararları oluşturmayı imkansız kılacak şekilde çok sayıda farklı proteinle etkileşime gireceklerdir. Bu kısıtlılıklara karşın, bizim yanlış olarak kabul etsek de p-bromofenasil bromid hala yaygın bir şekilde hücrel çalışmalarda ve hatta yakın döneme ait yayımlarda “seçici PLA₂ inhibitörü” olarak anılmaktadır. Fosfolipid substrat analogu olan diğer bileşikler PLA₂'nin geri dönüşümlü inhibitörleri olarak çalışırlar ve sPLA₂ için tercih sebebi olabilirler; bunlar arasında tiyoeter amid fosfolipidler ve fosfat geçiş bölgesi analogları yer almaktadır(Plesniak *et al.*, 1995; Yu *et al.*, 1993). Ne yazık ki, bunların hiçbirisinin ne in vitro ne de in vivo olarak özellikle potansiyel olmadığı görülmektedir. Bunun da ötesinde, bu bileşikler amfipatiktir ve genellikle misel veya membranlara agrege olur ya da katılım gösterirler. Böylesine geri dönüşümlü, kompetitif, aktif bölge inhibitörleri, konsantrasyonlarının “mol fraksiyon birimi” türünden ifade edildiği özel kinetik değerlendirmelerin yapılmasını gerektirirler(Carman *et al.*, 1995). Bu yolla belirlenmiş olan IC₅₀ değerleri hacim birimlerine çevrildiğinde, söz konusu bu bileşikler genellikle düşük milimolar aralıkta inhibe olurlar. Her ne kadar bu türden bir inhibisyon farmakolojik müdahale için gerektiğince yeterli değilse de, bahsettiğimiz bileşikler mekanik temelli çalışmalar açısından fayda sağlayabilir.

Son dönemlerde daha spesifik sPLA₂ inhibitörleri de tanımlanmıştır. Bunlar arasından 3-(3-asetamid-1-benzil-2-etilindolil-5-oksi) propan sulfonik asit muhtemelen en iyi karakterize edilen ve bütün hücre sistemlerindeki AA mobilizasyonunu hedef belirlemiş olan çalışmalar dahilinde seçici sPLA₂ inhibitörü olma açısından faydalı olduğu kanıtlanmış olandır. Bir indol türevi olan bu maddenin kimyasal yapısı, insan Grup IIA sPLA₂'nin aktif bölgesini bir şablon olarak kullanan X-ışını kristalografi ile rafine edilmiştir. Bu bileşik, düşük nanomolar aralıkta bağlanma gerçekleştirir ve Grup IB sPLA₂ üzerinde Grup IIA sPLA₂ için seçicidir; ancak, diğer sPLA₂ gruplarından ayrılmazlar. Her ne kadar bir Grup IIA PLA₂ spesifik inhibitörü olarak tasarlanmışsa da, indol türevi maddenin Grup V sPLA₂'yi de inhibe ettiği bulunmuştur(Schevitz *et al.*, 1995).

AA sinyal mekanizmasındaki merkezi rolü sahiplenmeleri nedeniyle cPLA₂ inhibitörleri, son dönemlerde büyük bir ilgi alanı haline gelmiştir. Mekanizma zemininde iki cPLA₂ inhibitörü, yaygın olarak kullanılmaktadır: araşidonil triflorometil keton (AATFMK, AACOCF₃ olarak da kabul görür) ve metil araşidonil florofosfonat (MAFP)(Conde-Frieboes *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 1996) . Bu iki bileşik ortak bir kimyasal yapıyı paylaşırlar: Ser-reaktif grubuna bağlı bir araşidonil kuyruk. Hem AATFMK hem de MAFP *in vitro* ortamda potent cPLA₂ inhibitörleriyken, bunlardan ikincisi, bütün hücre sistemlerinde ilkinde kıyasla daha yüksek oranda tercih görmektedir. AATFMK'nın geri dönüşümlü, yavaş bağ oluşturan bir inhibitör olmasından dolayı, tam inhibitör aktivitesinin gelişmesi için uzun bir zamana ihtiyaç duyar. Bu durum; *in vitro* koşullarda ve trombositler gibi bazı hücrelerde bir sorun teşkil etmese de, diğer enzimleri inhibe etme davranışı gösterebileceği ya da reaktif olmayan bir alkol nedeniyle azalabileceği diğer hücreler söz konusu olduğunda önemli bir problem oluşturabilir. MAFP'de bu sorun

mevcut değildir. Bunun da ötesinde, MAFP'nin aksine AATFMK siklooksijenazları da inhibe eder(Reindeau *et al.*, 1994).

Ne yazık ki hem AATFMK hem de MAFP Grup VI iPLA₂'yı kuvvetli bir şekilde inhibe etmektedir(Frieboes *et al.*, 1996; Lio *et al.*, 1996). Bu bulgu, hem cPLA₂ hem de iPLA₂'nın kataliz için merkezi bir Serin'i ve muhtemelen benzer katalitik mekanizmaları kullanmaları nedeniyle şaşırtıcı değildir. AATFMK ve MAFP'nin inhibitör etkilerinin cPLA₂ mi yoksa iPLA₂ nedeniyle mi olduğunu belirlemenin mümkün görüldüğü bir durum söz konusudur. Bu, PLA₂ türlerinden cPLA₂ için selektif bir inhibitör olan bromoenol lakton'un [BEL, ayrıca haloenol lakton intihar substratı (HELSS) olarak da anılır] paralel kullanımını kapsar. Buradan hareketle, eğer belirli bir yanıt BEL değil AATFMK ve MAFP tarafından inhibe ediliyorsa, cPLA₂'nin sorumluluğu söz konusudur(Balsinde *et al.*, 1996). Diğer PLA₂'lere kıyasla daha iyi bir selektif iPLA₂ inhibitörü olsa da, BEL'in sinyal iletimine dahil olan diğer önemli efektörleri, örneğin fosfotidat fosforilaz ve yüksek konsantrasyonlardaki cPLA₂'yi inhibe ettiği bilinmektedir(Tang *et al.*, 1997; Balboa *et al.*, 1998). Bu yüzen, bozulmamış hücrelerde BEL ile elde edilmiş olan pozitif sonuçların yorumlanması esnasında dikkatli davranılmalı, ve bu dikkat AATFMK ve MAFP için de geçerli olmalıdır. Ne yazık ki, literatürdeki çok sayıda makale, iPLA₂'yi sorumlu tutmak için bir sürecin sadece BEL tarafından inhibisyonuna itimat etmiştir ve bunun yanlış bir tutum olduğuna inanılmaktadır(Balsinde *et al.*, 1999).

4.3.5 Antisense İnhibisyon

Hali hazırda mevcut olan kimyasal inhibitörlerin kullanımı ile ilişkili olan konuya özgü spesifite eksikliği sorunları, antisense oligonükleotidlerin yardımıyla PLA₂ salınım inhibisyonu ile atlatılabilir.

Bu strateji, belirli bir PLA₂ formu için spesifik olan düşük toksisiteli olup farmakolojik olarak aktif inhibitörlerin elde edilmesi açısından umut vaat etmesi en olası stratejidir. Ancak, bu oligonükleotidlerin dahi istenmeyen yan etkileri mevcuttur; dağılım ve dağıtım sorunları vardır, ve yeterlilik seviyeleri vakadan vakaya değişiklik gösteren bir zeminde belirlenmelidir(Stein *et al.*, 1993).

Antisense oligonükleotidlerle PLA₂ inhibisyonu ilk olarak sPLA₂ için tanımlanmıştır ve o zamandan beri, hücrelerde mevcut tüm ana PLA₂ formları olan Grup V sPLA₂, cPLA₂, ve iPLA₂ için de tanımlı hale gelmiştir(Barbour *et al.*, 1993; Balboa *et al.*, 1996; Wong *et al.*, 1998; Balsinde *et al.*, 1997). Bu çalışmalar genellikle kimyasal inhibitörlerle elde edilen kanıtları teyit etmekte ve bu sayede her bir PLA₂ tipinin AA sinyali ve hücre işlevinde farklı bir rol oynadığını gösterecek kuvvetli kanıtlar sağlamaktaydı. Ancak, antisense nükleotidler, insan için farmakolojik olarak faydalı inhibitörlere kolayca çevrilememektedir.

5. ENZİM SAFLAŞTIRILMASI VE ÖNEMİ

Sayırsız hayat fonksiyonu proteinlere dolayısıyla enzimlere bağlıdır ve proteinsiz bir canlı söz konusu olamaz. Her hücrenin bileşeni olan proteinlerin transport, immün koruma, büyüme ve farklılaşmanın kontrolü ve en önemlisi diyebileceğimiz enzimatik kataliz gibi fonksiyonları vardır(Telefoncu, 1997).

Protein saflaştırması bu fonksiyonları yapan molekülün belirlenmesi ve olayın mekanizmasının, aktivitesinin araştırılarak bu aktiviteden biyoteknolojik üretim, analitik veya terapötik amaçla yararlanılmasına yönelik olabileceği gibi, protein yapısının veya yapı-fonksiyon ilişkisinin araştırılmasını da hedefleyebilir. Amaca uygun bir

protein preparatı hazırlayabilmek için gerekli saf protein miktarı, ne düzeyde bir protein kaybının tolere edilebileceği, ne düzeyde bir saflık istendiği ve saflaştırma işlemi için ne kadar zaman ve para harcanabileceği gibi durumların belirlenmesi gerekmektedir. Endüstriyel uygulamalar için büyük ölçekte üretim söz konusudur ve saflık ikinci derecede önem taşır. Terapötik uygulamalar için hazırlanan protein preparatının ise yüksek saflıkta olması gerekir.

Protein aktivitesinin belirlenmesi hedefleniyorsa kesinlikle aktif formda elde edilmelidir. Bunun için az miktarda protein yeterlidir. Fakat amaç proteinin aktivitesinden yararlanmak ise daha fazla protein gerekecektir. İnert proteinlerin bulunması her iki amaç için de engel oluşturmadığından yabancı aktiviteler tamamen uzaklaştırılmış ise daha ileri düzeyde bir saflaştırma gereksizdir. Saflaştırmada uygulanacak her yeni adım zaman ve aktivite kaybına sebep olacağı gibi verimi düşürüp maliyeti artıracaktır.

Yapı araştırma çalışmalarında ise oldukça fazla miktarda ve yüksek saflıkta proteine gereksinim vardır. Bu durumda maliyet ve zaman ikinci derecede önemlidir. Fakat yapı fonksiyon ilişkisi araştırılıyorsa saflaştırma işlemi süresince aktivite kaybını minimuma indirmek için işlem süresinin olabildiğince kısaltılması gerekir.

Proteinin kullanım amacına bağımlı olarak istenilen saflık düzeyi de değişir. Terapötik amaçla kullanılacak protein preparatının çok saf olması istenir. Proses katkı maddeleri, nükleik asit kalıntıları gibi safsızlıkların kesinlikle uzaklaştırılması gerekir. Yüksek düzeyde saflığa ulaşabilmek için yapılan saflaştırma adımları bir yandan protein verimini düşürürken diğer taraftan maliyeti çok artırır. Bilimsel araştırmalarda birkaç ilave saflaştırma basamağı önemli olmayabilir ancak ticari üretim

durumunda en ekonomik koşullarda çalışılmalıdır. Saflaştırılan protein bir enzim olduğunda ve yalnız enzimatik aktiviteden yararlanılacaksa toplam protein oranının % 80-90 arasında olması yeterlidir. Ancak protein olmayan safsızlıklar enzim aktivitesini interfere edecek yabancı enzimleri özellikle proteolitik enzimleri içermemelidir. Yapı araştırmalarında kullanılacak proteinlerin saflık düzeyi terapötik amaçla kullanılanlar kadar olmasa da en az % 95 saf protein içermelidir.

Belirli bir miktar çıkış maddesinden elde edilecek saf protein miktarı saflaştırma adımlarının toplam verimine bağlıdır. Adım sayısı verim ile ters fakat saflık derecesi ise doğru orantılıdır. En az saflaştırma adımı ile amaca uygun saflıkta protein preparatı hazırlamak çok önemlidir. Özellikle affinite kromatografisi ve affinite-ultrafiltrasyon teknikleri protein saflaştırmasında adım sayısını dramatik biçimde dşurmektedir.

Bir proteinin saflaştırılmasında uygun bir işlem dizisinin optimizasyonu çok önemlidir. En etkili, en hızlı ve en ekonomik ayırma ve saflaştırma proseslerinin mevcut bilgiler yardımı ile belirlenmesi hedeflenir. Uygulanacak ayırma ve saflaştırma teknikleri proteinin biyolojik aktivitesini olumsuz etkilememelidir(Telefoncu, 1997).

6. AFİNİTE-ULTRAFİLTRASYON TEKNİĞİ

1993'te dünya pazarındaki teknik enzimlerin toplam maliyeti 900 milyon Amerikan dolarydı. Ekonomik faktörler bu proteinleri saflaştırmak için kromatografinin kullanımına engel oldu. Bu yüzden, yeni saflaştırma yöntemlerinin geliştirilmesi önemli bir görev haline gelmiştir(Galaev, 1999).

Protein saflaştırma yöntemlerinin her biri şu sorunlarla baş etmelidir: 1) Farklı fazlardaki hedef ve istenmeyen proteinlerin seçici deriştirilmesi; 2) İki fazın mekanik ayrılması; 3) Hedef proteince zenginleştirilmiş fazdan hedef proteinin izolasyonu; 4) En az bir fazın rejenerasyonu.

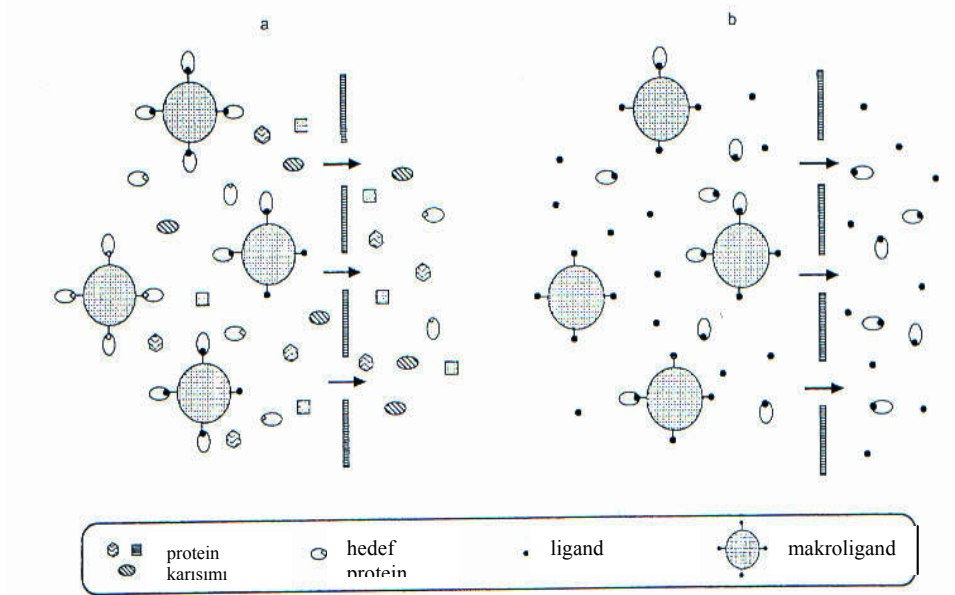
Afinite etkileşimleri birçok proteinin karakteristiğidir. Bir hedef proteinin bir karışımda seçici bağlanması için yaygın olarak kullanılır(Jones *et al.*, 1995). İki fazın mekanik ayrılması çoğunlukla bir kromatografik kolonun kullanılmasıyla yapılır. Sabit faz bağlanmış bir ligandlı sorbenttir. Ham ekstrakt içeren mobil faz, yeterli bir süre için hedef proteine sabit fazla etkileşmeye izin veren kolondan geçer. Kromatografinin birtakım dezavantajları vardır. Eğer akış hızı yüksekse, kolonda yüksek bir hidrodinamik direnç vardır. Yüksek akış hızından bahsetmek için sistemde yüksek bir basınç gerekir. Kolona uygulanan çözelti oldukça saydam olmalıdır. Makromoleküler yığılmadan dolayı konsantre protein çözeltilerinde oluşan küçük parçacıklar bile sorbent katman tarafından tutulur, bununla ilgili olarak akış direncinde bir yükselme olur ve sonunda mobil fazın kolondan geçişi olanaksız hale gelir.

Genişleyen katman kromatografisi sıradan kromatografinin bu dezavantajının üstesinden gelmeye çalışır. Diğer yeni yöntemler hedefte zenginleştirilmiş iki fazın ayrılması şeklinde geliştirilmişti ve istenmeyen proteinler kolon kromatografisiyle karşılaştırıldığında farklı bir tarzda yapıldı. Afinite kromatografisinde, istenen protein, istenmeyen proteinleri içeren süpernatanttan santrifüjle ya da filtrasyonla ayrılan bir polimer çökeltide yoğunlaştırılır(Galaev, 1999).

Ultrafiltrasyon por büyüklüğü 0.001 - 0.1 μm olan bir membrandan çözelti filtrasyonuna dayanır. Moleküller büyüklük ve şekillerindeki farklılıkları sonucu ayrılırlar. Makromolekül çözeltilerindeki önemsiz ozmotik basınç, nispeten önemsiz (2 bar'dan 5 bara kadar) basınç gradyanına rağmen işlemin yapılmasına izin verir. Tanjantal akış (çapraz akış) ultrafiltrasyonu özellikle verimlidir. Süzölmüş çözelti membran yüzeyine paralel yönde yeniden dolaşır. Yeniden dolaşım hızı, konsantrasyona bağlı polarizasyonu yada membran yüzeyinde süzölmüş maddenin bir katmanının tortulaşmasını engellemek için yeterlidir.

Ultrafiltrasyonun kalbi membrandır ve membranların ultrafiltrasyonda başarılı ve verimli kullanılabilmesi için aşağıda belirtilen karakteristik özelliklere sahip olmalıdır.1) İlimli basınçlarda su geçirgenliği yüksek olmalı. 2) Gözenek boyutu aralığı, keskin olmalı ki spesifik boyutların üzerindeki bütün molekülleri tutmalı ve daha küçük molekülleri geçirmeli. 3) Mekanik ömrü uzun olmalı. 4) hidrolik geçirgenliğin düşmesiyle gözenek ağı içine çözeltideki maddelerin tutulması ve adsorblanmasına karşı meyilli olmamalı ve kirlenmeye karşı yüksek dirence sahip olmalı. 5) Kolayca temizlenebilmeli ve steril edilebilmeli. 6) Membran ömrü uzun olmalı.

Afinite ultrafiltrasyonunun prensibi kısaca şöyledir; hedef proteinin makroliganda bağlanması ve diğer proteinlerin membrandan geçmesidir. Diğer proteinler sistemden taşıyıcı sıvıyla uzaklaştırılır. Sonradan, uzaklaştırılanlar sisteme eklenir, ve hedef proteinler makroligand kompleksinden ayrılır ve membranı geçer. Membranda tutulan makroligand rejenerasyondan sonra tekrar kullanılabilir(Galaev, 1999).



Şekil 6.1 Afinite Ultrafiltrasyonun Temel Prensibi: a)Hedef proteinin makroliganda bağlanması ve diğerlerinin ayrılması, b) Serbest ligand moleküllerinin bulunduğu ortamdan protein-makroligand kompleksinin ayrılması ve saf proteinin membran dışına transferi, c)Makroligandın rejenarasyonu.

Afinitive ultrafiltrasyonu parti halinde, yarı-sürekli yada sürekli yapılabilir. İşlemin verimliliği hedef proteinin nispi büyüklüğüne ve makroliganda ve membran sınırına bağlıdır. Membran makroligand-geçirmez olmalıdır, ancak hedef ve katkı proteinleri zardan kolayca geçebilmelidir. Başlangıç karışımındaki protein-protein etkileşimleri sistemin davranışını etkileyebilir. Örneğin, insan üresindeki ürokinaz ultrafiltrasyonu, geçirgenlik indeksi yüksek moleküler ağırlık toplamı oluşumundan dolayı 100,000 (bir 100,000 membran; bu sayı membranı geçen maddenin maksimum moleküler ağırlığını gösterir) olan bir membranda ürokinaz tutulmasını içerir. 2 M NaCl eklenmesi tam ayrışmayla sonuçlanır, ve ürokinazın yaklaşık % 70'i membranı geçer(Male *et al.*, 1990).

Afinite ultrafiltrasyonundaki protein bağlanmasının verimliliği büyük ölçüde makroligand konsantrasyonuna bağlıdır. Makroligand kapasitesi başlangıçta ligand molekül konsantrasyonunda bir artış gösterir. Sonradan, doymuş hale gelir, çünkü ligand moleküllerinin bir kısmı hedef proteinlere sterik olarak ulaşamaz olur. Benzer bir etkinin afinite kromatografisi sırasında ortaya çıktığı bilinmektedir(Scopes *et al.*, 1994).

Bağlanmamış protein, sisteme filtrasyonun devam ettiği akış hızında tampon eklenerek karışım hacminin sabit tutulması yoluyla, diyafiltrasyonla uzaklaştırılır(Kaul *et al.*, 1993). Kayıpları önlemek için, hedef protein afinite ultrafiltrasyonunda makroliganda afinite kromatografisinde olduğundan daha sıkıca bağlanmalıdır. Ling ve Mattiasson'un hesaplamaları temel alındığında, başarılı afinite ultrafiltrasyonu makroligand-protein bağının 10^6 M^{-1} üstünde sabit tutulmasını gerektirir(Ling *et al.*, 1989). Ancak, makroligand olarak Cibacron mavi-agarozu ile insan serumu albüminin afinite ultrafiltrasyonu, bağlı proteinin ağır bir desorpsiyon kinetiği ile karakterize edilmiştir. Protein uzaklaştırılmasının denge-dışı koşullar altında gerçekleştiği gösterilmiştir. Bu gerçek bizim afinite ultrafiltrasyonunda 10^6 M^{-1} 'ın altında afiniteli ligandları kullanmamızı sağlar.

Diğer afinite saflaştırma tekniklerine benzer şekilde, makroliganda bağlanmış proteinin uzaklaştırılması, rekabetçi bir afinite ligandı eklenerek yada protein bağlanmasını zayıflatan koşulları (pH ve iyonik güç değerleri gibi) yaratarak yürütülür. Birinci durumda, uzaklaştırma hedef proteini inaktive etme riskinin önemsenecek kadar az olması için çok hafif koşullarda yapılır. Bu yöntemin dezavantajı afinite ligandının genellikle çok pahalı olmasıdır. Uç pH değerlerindeki yada

yüksek iyonik güçteki nonspesifik bağlanma masraflı bir prosedür değildir, ancak hedef proteinin, makroligandın yada membranın kendisinin özelliklerini olumsuz yönde etkileyebilir.

Afinite ultrafiltrasyonu bir eluant dışında ideal karıştırma davranışına uyan bir sistemde ilerler, yani (afinite kromatografisinde olduğu gibi) bir eluant dışında, makroligand için hedef proteinin afinitesi, yıkama tamponu elüent ile yer değiştirdikçe giderek azalır. Sonuç olarak, afinite ultrafiltrasyonundaki uzaklaştırma işlemi afinite kromatografisindekinden daha yavaştır, böylece elüent daha seyreltiktir. Afinite ultrafiltrasyonu sıklıkla, hedef proteini konsantre etmek ve afinite ligandını elüentten (gerekliyse) uzaklaştırmak için yapılan konvensiyonel ultrafiltrasyon tarafından takip edilir.

Uzaklaştırma aşamasından sonra, makroligand rejenere olmalı ve hedef proteini bağlamak için kullanılan tamponla dengelenmelidir. Rejenerasyon makroliganda nonspesifik bağlanmış ve elüent tarafından desorbe edilmeyen proteinleri uzaklaştırmayla sonuçlanmalıdır. Bu amaçla kullanılan uç pH değerleri yada yüksek tuz derişimleri makroligand/mikroligand özelliklerini olumsuz yönde etkileyebilir. Bu yüzden makroligand, proteinlerle minimal nonspesifik etkileşim karakterinde olan bir taşıyıcı polimer bazında sentezlenmelidir(Galaev, 1999).

6.1 Afinite Ultrafiltrasyonu için Çözünür Makroligandlar

Makroligandlar aşağıda verilen talepleri karşılamalıdır.

1. Başlangıç karışımında hedef proteinin seçici ve sıkı bağlanması, diğer proteinlerle minimal nonspesifik etkileşimle bağlanması.

2. Yüksek kapasite, yani, taşıyıcının her gramı için yeterli miktarda hedef proteine bağlanması.

3. Kimyasal stabilite, yani, birçok afinite ultrafiltrasyon döngüsünü ligand filtresi yada polimer yıkımı olmadan sürdürebilme yeteneği.

4. Mekanik stabilite, yani, sıvı akışından kaynaklanan (çarpışmaları da içeren) mekanik zorluklarla baş etme yeteneği.

5. Kabul edilebilir toksisite ve pürüzlülük seviyeleri, vs.

Suda çözünen makroligandların avantajı şudur; çözültideki kovalent ligand-polimer bağlanması nispeten basit bir işlemdir, bu yüzden polimer taşıyıcının her gramının yüksek ligand içermesi mümkündür. Çözünür makroliganda protein bağlanması en çok denge koşulları altında olur, ve difüzyon işlemi hiçbir zorluk meydana getirmez.

Çözünür polimer-bazlı makroligandlar çözünmez makroligandlardan daha küçüktür. Çözünür makroligandla afinite ultrafiltrasyonu nispeten küçük por büyüklüğü olan membranları gerektirir, düşük membran geçirgenliği ve yüksek filtrasyon süresi; alternatif olarak daha geniş bir aktif yüzeye sahip membranların gerekliliğidir. Protein-makroligand kompleksinin büyüklüğünün karışımını de epeyce aşması gerekir. Çözünür proteinlerin çoğu 100,000'in altında moleküler ağırlıklara sahiptir; buna göre, makroligandın moleküler ağırlığı 100,000'den fazla olmalıdır. Bu kadar yüksek moleküler ağırlıklı polimerlerin sulu çözültileri düşük polimer konsantrasyonlarında bile yüksek viskozite gösterir, çünkü polimer zincirleri birbirine geçmiştir. Suda çözünen makroligandlar suda çözünmeyen makroligandlardan farklı olarak bir sıvı akış sisteminde mekanik olarak yıkılmazlar.

Suda çözünen polimerlerin nispeten sınırlı sayıdaki bir bölümü moleküler ağırlıkları yeteri kadar yüksek olduğundan (10^5 - 10^6) sentezlemek için uygundur. Aslında, sadece iki seçenek vardır: polisakkaritler (dekstran, aljinat, kitosan ve nişasta) ve poliakrilamid bazlı polimerler (Choe *et al.*, 1986; Hubert *et al.*, 1980). Ancak, bu taşıyıcılar sıklıkla, örneğin dekstran-tutunmuş tripsin inhibitörlerini kullanarak tripsin-kimotripsin karışımlarını engelleyen proteinlerle girdikleri nonspesifik etkileşimlerle karakterize edilirler (Choe *et al.*, 1986).

Poliakrilamid bazlı makroligandlar tripsin saflaştırılması için daha uygundur (Male *et al.*, 1990; Sigmundsson *et al.*, 1996). Akrilamidin ve N-akriloil-*m*-aminobenzamidinin ko-polimerizasyonu ile sentezlenirler. N-akriloil-*m*-aminobenzamidin özellikle tripsinin aktif merkezine bağlanan bir benzamidin grubu içerir. Enzim böyle makroligandlara kompetitif bir tarzda bağlanır, ve bağlanma sabiti makroliganddaki benzamidin içeriğine bağlıdır. Eğer benzamidin içeriği çok yüksekse, inhibisyon verimi düşmeye eğilimlidir, optimum içerik % 17' dir. Moleküler ağırlığı 10^5 (100,000 membran kullanılarak kısımlara ayırma yöntemiyle elde edilmiştir) olan böyle bir makroligand bir deneme tripsin-kimotripsin karışımını ayırmak için kullanılmıştı. Optimum koşullar altında, afinite ultrafiltrasyonu %98 saflık derecesiyle ve % 90 verimle tripsin izolasyonu sağladı (Luong *et al.*, 1992). Tripsin-makroligand bağlanması çok hızlı gerçekleşir, ve bu yüzden, ekstrakt ile birlikte makroligand ön inkübasyon gerekmez. Aralıksız bir saflaştırma işlemindeki tekrarlanan makroligand kullanımı pankreatik ekstraktan % 97 saflık derecesi ve % 77 verimle tripsin elde etmeyi mümkün hale getirmiştir. Polimer konsantrasyonunu % 0,75 'ten % 0,5'e indirmek tripsin bağlanmasının verimini % 90 'dan % 54'e düşürür. Afinite ultrafiltrasyonu sırasında, her iki protein için de membran geçirgenliği pH'ın artması ve azalmasında da azalmış ve tripsin-kimotripsin

karşımının pH değeri 8 civarında olmalıdır. Buna göre, benzamidin içeren kromatografik matrikslerden tripsin desorpsiyonu için kullanılan, asidik pH değerlerinde elüsyon bu sistemde uygulanmaz. Onun yerine, elüent olarak benzamidin (50 mM) yada arginin (1 M) kullanılmıştır. Makroligand çözeltileri birkaç ay boyunca stabildirler, ve tripsin makroliganda bağlandıktan sonra otolize daha dirençli hale gelir(Luong *et al.*, 1988).

Aynı akrilamit-N-akrokoil-*m*-aminobenzamidin kopolimeri bir peroksidaz içeren bir deneme karşımından ve insan üresinden ürokinaz saflaştırılmasında kullanılmıştır(Male *et al.*, 1990). Toplamda, afinite ultrafiltrasyonu % 49 verimle 7 kat ürokinaz saflaştırılması ile sonuçlanmıştır.

6.2 Afinite Ultrafiltrasyonu için Çözünmez Makroligandlar

Tanım olarak, çözünmez makroligandlar hedef protein-makroligand kompleksinin karışımından ayrılmasını kolaylaştıran çözünür makroligandlardan önemli miktarda büyüktür. Afinite ultrafiltrasyonu için makroligand parçacıklarının büyüklüklüğü kromatografide kullanılan granüllerinkine erişecek kadar büyük olabilir. Nişasta granüllerinin yada agarozun süspansiyonları ultrafiltrasyon sistemlerinden kolayca pompalanabilir ve membranları engellemezler. Ancak, bu sistemler mekanik olarak kararsızdır. Daha güçlü bir materyalden, çapraz-bağlı agaroz jelinden (Sefaroz CL-6B), yapılmış olan granüller 24 saatlik operasyondan sonra % 5 yıkılmıştır. Daha yumuşak bir jel (affi-jel mavisi) 3 saat sonra %30-40 yıkılmıştır(Herak *et al.*, 1989). β -Galaktozidaz, agaroz granülleriyle kovalent bağlı bir ligand, *p*-aminofenil-1-thio- β -D-galaktopriyanozit kullanılarak afinite

ultrafiltrasyonu ile *E.coli* homojenatından başarıyla saflaştırılmıştır(Pungor *et al.*, 1987).

Afinite ultrafiltrasyonu tercihen yüksek bir ligand konsantrasyonu ile (v/v) yapılır, sistemin veriminde ve elüentteki hedef proteinin konsantrasyonunda bir artışla sonuçlanır. Eğer ligand çözünmez bir taşıyıcıya bağlıysa, taşıyıcının yüzey alanı maksimum ligand miktarını sınırlar. Yüzey alanı küçük yada porlu (örneğin agaroz jeli) parçacıklar kullanılarak yükseltilebilir. porlu parçacıklarla, bağlanma/ desorpsiyon kinetiği difüzyonla yavaşlatılır.

Afinite ultrafiltrasyonunda ilk makroligandlardan biri olarak gösterilen, ısıyla öldürülmüş *Saccharomyces cerevisiae* hücreleri (ortalama çap 5 µm) kullanılmıştır. Bu hücrelerden hücre yüzeyinde lektin bağlı karbonhidrat ligandları baz alınarak, fasulye ekstraktından lektin ve konkanavalin A saflaştırılmasında yararlanılmıştır. Hücre karışımı ve başlangıç ekstraktı 500 ml/dak akış hızına sahip içi boş fiber-bazlı (geçirgenlik sınırı 1,000,000 olan) ultrafiltrasyon sisteminden geçirilmiştir. Hücreye bağlı konkavalin A daha sonra sonuç çözeltisinin bir 35,000 membran kullanılarak ultrafiltrasyonu ile kısmen uzaklaştırılan bir yüksek glikoz konsantrasyonu (150 g/l) kullanılarak elue edilmiştir. Yüksek oranda saflaştırılan konkanavalin A % 70 verimle elde edilmiştir.

Yüzeyde tespit edilen Cibacron blue ligandı ile (12 nm'lik bir çap ve 200 m²/g 'lık bir yüzey alanıyla) silikon dioksit parçacıkları maya alkol dehidrojenaz ve domuz kalbi laktat dehidrojenaz'ı saflaştırmak için kullanılmıştır(Ling *et al.*, 1989). Küçük boyutları nedeniyle, silikon dioksit mikropartikülleri kararlı süspansiyonlar oluştururlar, ve tespit edilen bir liganda, çözünür bir ligand kadar hızlı bağlanırlar. Bu durumda

filtrasyon hızının öncekinden önemli ölçüde yüksek olmasına rağmen, filtrasyon bütün işlemin hız-sınırlayıcı basamağında kalmıştır.

Kovalent bağlı bir ligand ile fosfolipid lipozomlar afinite ultrafiltrasyonunda başarıyla kullanıldılar(Powers *et al.*, 1989; Powers *et al.*, 1990). 200-700 Å çaplı lipozomlar porlu silika jelin yüzey alanıyla karşılaştırılan, yüz m^2/ml 'den fazla bir yüzey alanına sahiptir. Lipozom yüzeyi hidrofilik olduğundan, non spesifik protein adsorpsiyonu minimumda tutulur. Lipozomların agrega olma olasılığı yoktur, ve bu yüzden, membran polarizasyonu ve filtre engellemesi ultrafiltrasyon sırasında önemsizdir.

Afinite ligandı yüzeyde bir aktif grup içeren bir doğrudan kimyasal etkileşim yoluyla lipozoma kovalent bağlıdır. Alternatif olarak, bir ligand- modifikasyon öncesi lipit lipozomları oluştururken membranla birleştirilebilir. Lipozomlar her iki modifikasyon tipi dikkate alınınca stabildir.

Lipozom yüzeyinin modifikasyonu tripsin saflaştırılması için kullanılmıştır. Dimristoilfosfatidilkolin, dimristoilfosfotidiletanolamin ve kolesterol içeren lipozomların yüzeylerindeki amino grupları diglikolik aldehit ile modifiye edildi ve bir afinite ligandı, p-aminobenzamidin, karbodiimit yöntemiyle terminal karboksil gruplarına tutturulmuştur. Lipozom bağlı tripsin afinite ligandı benzamidin ile uzaklaştırılmış ve bu lipozomlar kullanılarak, tripsin kimotripsin içeren bir deneme karşımından izole edildi ve bir pankreatik ekstraktan % 98 saflık derecesi ve % 68 verimle saflaştırılmıştır. Tripsin lipozoma nispeten zayıf olarak bağlandığı için (ayırışma sabiti 1.7×10^4 M) yıkama aşamasında kısmen kaybedilir. Afinite lipozomları stabildir, ve pek çok

adsorption/elüsyon döngüsünden sonra bir ay boyunca tripsine bağlanabilir(Powers *et al.*, 1990).

Emülsiyon polimerizasyonu kullanılarak bir yoğun polistiren esaslı ve bir çapraz-bağlı glisidil metakrilatın bir hidrofilik kabuğundan oluşan kompozit alt-mikron lateksleri, ve vinil sülfonat kopolimeri elde edilmiştir(Gebben *et al.*, 1994). Epoksit grupları aracılığıyla latekse tutturulan cibacron mavisini (bir triazin boyası) bir afinite ligandı olarak kullanılmıştır. Lateks bağlanmış ligandın niceliği reaksiyon ortamındaki iyonik gücün kontrolü altındadır. Lateks bağlı bovin albüminin niceliği ligand yoğunluğuyla doğru orantılıdır ve 1 dakika sonra maksimum değerini % 70'ine erişmiştir. Yüzeyinde ligand olan lateksler yüksek koloidal stabilite ve düşük nonspesifik protein adsorpsiyonu göstermiştir.

Suda çözünen polimerler yaygın olarak koloidal sistem stabilizatörleri olarak kullanılır(Sato *et al.*, 1997) . Polimer-stabilize lateksler eğer hedef protein polimer için bir afiniteyle karakterize edilmişse, bir afinite olarak kullanılabilir. Örneğin, konkavalin A dekstran-stabilize polimetil metakrilat lateks ile verimli bir şekilde bağlanır(Chern *et al.*, 1997). Endopektin liyazlarının geri dönüşümlü bağlanmaları için 2.0 – 7.7 µm çaplı fonksiyonel mikroküreler polimer stabilizatör olarak Eudragit L (metakrilik asit ve etilakrilatın istatistiksel olarak 1:1 kopolimeri) kullanarak stirenin radikal dispersiyon polimerizasyonundan elde edilmiştir(Dinella *et al.*, 1996). Enzim mikroküreler ile bağlanmış(pH 4.7) ve hemen nicel olarak elue edilmiştir (pH 6.6). Mikrokürelere 1.2 µm'lik por çaplı membrandan filtrasyon ile ayrılmıştır. Mikroküreye bağlı enzim depo sırasında yüksek stabilite gösterdi, ve aktivitesinin % 60'ını korumuştur, demek ki bağlanma yeri aktif merkezden yeteri kadar uzaktadır.

Çeşitli dizaynlı ve farklı verim düzeyli ultrafiltrasyon sistemlerinin ticari olarak bulunabilmesi, önceden sentezlenmiş makroligandlar ve endüstriyel olarak imal edilmiş lateksler (bunlar kolayca mikroligandlara çevrilebilirler) dolayısıyla, afinite ultrafiltrasyonları diğer protein saflaştırma yöntemlerine cazip bir alternatif olarak sayılabilir. Ek olarak, yöntem şu avantajlara da sahiptir. 1) Büyük çözelti hacimlerinde hızlı işlem yapmaya olanak verir; 2) Yükseltme ve otomasyon basit prosedürleridir; ve 3) Aynı donanım farklı proteinleri saflaştırmak için kullanılabilir(Galaev, 1999).

Bütün bu bilgilerin ışığında yapılan bu tez çalışmasında, PLA₂ için uygulanan saflaştırma tekniği olarak seçilen afinite-ultrafiltrasyon tekniğinde, afinite ligandı olarak enzimin substrat ve inhibitörüyle aljinat ve kitosan tabanlı hazırlanan makroafinite ligandları kullanıldı. Farklı miktarlardaki örneklerin ultrafiltre edilmesinde farklı hacimlerde ultrafiltrasyon hücreleri kullanılmaktadır. Bu tez projesinde kullanılan ultrafiltrasyon hücreleri Şekil 6.2’de verildi.



Şekil 6.2 Tez çalışmasında kullanılan ultrafiltrasyon hücreleri
(A) 50 ml (B) 200 ml

7. MATERYAL METOD

7.1 Materyal

Bu çalışmada kullanılan cihazlar ve yöntemlere ait bilgiler ilgili bölümlerde ayrıntılı olarak verilmiştir.

Kullanılan kimyasal maddeler; Kitosan(deasetillenmiş kitinden)(poly-[1→4]-β-D-glukozamin),Aljinat, Hekzametilendiamin (HMMA), Glutaraldehyd, Trimetilamin, Sodyumdeoksikolat, Sığır Serum Albumini(BSA;Albumin Fraksiyon V), Sodyum Dodesil Sülfat(SDS), Akrilamid, N,N'-Metilenbisakrilamid, N,N,N',N'-Tetrametilendiamin(TEMED), Amonyum Persülfat, Bromfenol mavisi ve 2-merkaptotanol Sigma Chemical Co.(St. Louis,CA)'den, Fosfatidilkolin(α-Lesitin), Fosfatidiletanolamin(α-Kefalin), Coomassie Blue, 1-etil-3(3-dimetilaminopropil) karbodimid(EDC), 2-kloro-2-oxo-1,3,2-dioxofosfolan ve Glisin Fluka'dan, Oleiklorür ve Trietanolamin E.Merck(Darmstad FRG)'den, Tris Hidroksiaminometan, NaCl ve CaCl₂ Riedel'den temin edilmiştir.

Fosfolipaz A₂ kaynağı olarak kullanılan pankreaslar Holstein türü sığır pankreası olup Pınar Entegre Et tesislerinden temin edilmiştir.

7.2 Fosfolipaz A₂ Aktivitesi Tayini

PLA₂'nin aktivite tayininde substrat olarak 3-*sn*-fosfatidilkolin(lesitin) kullanıldı. % 0,1'lik sodyum deoksikolat (2,6 mM) distile suda çözüldü. Üzerine % 2,5 lesitin ilave edilerek 40°C'de 30 dakika boyunca karıştırıldı. Karışım 10 dakika

ultrasonike(Ultrasonic LC30) edildi. Substrat her seferinde taze hazırlandı. Saflaştırma aşamalarının tümünün aktivitesi bu lesitin emülsiyonu kullanılarak 37°C'de pH-Stat titrasyonu ile belirlendi. Açığa çıkan serbest yağ asitleri 0,01 M NaOH çözeltisi kullanılarak otomatik titratör (718 Stat Titrino, Metrohm Ltd., Switzerland) ile belirlendi. Aktivite tayininde reaksiyon kabına 40 mM NaCl, 10 mM CaCl₂ ve % 2,5'luk lesitin emülsiyonu ilave edilerek birkaç dakika reaksiyon ortamının sıcaklığının 37°C'ye yükselmesi için beklendi. Ardından ortamın pH'sı 8,0'e ayarlanarak üzerine 100µl serbest enzim çözeltisi ilave edilerek aktivite tayin edildi. Bir PLA₂ aktivite birimi yukarıda belirtilen koşullar altında dakikada 1µmol yağ asidi açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlandı(Unit).

7.3 Protein Tayini (Bradford Metodu)

Saflaştırma öncesi homojenat ve sonrasında elde edilen tüm örneklerin protein konsantrasyonlarının tayini Bradford yöntemi(Coomassie Blue) ile gerçekleştirildi(Bradford, 1976).

Sığır serum albumininin (BSA), distile suda hazırlanmış 10 mg/ml'lik stok standart çözeltisinden 0,02-0,2 mg/ml konsantrasyon aralığı ile hazırlanan standart grafiği kullanılarak örnek protein konsantrasyonları hesaplandı.

Protein tayini için gerekli olan reaktifler:

Bradford reaktifi: 40mg Coomassie Brilliant Blue G-250, % 95'lik 50 etanolde çözülür, üzerine 55 ml % 88'lik fosforik asit ilave edilerek distile su ile 1 lt'ye tamamlanıp filtre edilir.

Standart Protein Çözeltisi: Sığır serum albumininin (BSA) 0,02-0,2 mg/ml konsantrasyon aralığındaki çözeltileri.

Her bir örneğin(standartlar ve bilinmeyen protein örnekleri) protein miktarı aşağıdaki prosedüre göre belirlendi:

a) 0,1 ml standart protein, bilinmeyen protein örneği ve distile su (kör için) küvetlere pipetlenir.

b) 2 ml Bradford reaktifi ilave edilir ve oda sıcaklığında 10 dakika bekletilir.

c) Her bir örneğin 595 nm'de absorbansı okunur(Jasco V-530).

Protein konsantrasyonları, hazırlanan standart grafiği(0,02-0,2 mg/ml BSA standartları) kullanılarak hesaplanır.

7.4 Fosfolipaz A₂'nin Sığır Pankreasından İzolasyonu ve Kısmi Saflaştırılması

Fosfolipaz A₂ (PLA₂; EC 3.1.1.4) pankreas ve farklı dokulardan daha önce yapılan saflaştırma çalışmaları baz alınarak sığır pankreasından kısmi olarak saflaştırmaya çalışıldı(Van Wezel, *et al.*, 1975; Eskola *et al.*, 1983; Tojo *et al.*, 1983; Bennett *et al.*, 1990; Aaen *et al.*, 1995; Rana *et al.*, 1998; Kishimura and Hayashi, 1999). Sığır pankreası enzim kaynağı olarak zengin ve kolay bulunabilir olması nedeniyle seçildi. PLA₂ saflaştırması için kullanılan sığır pankreasları Pınar Entegre Et tesislerinden temin edildi.

Aşağıda tanımlanacak olan saflaştırma protokolü kesikli bir sistem içinde bazı adımların farklılandırılmasıyla diğer izolasyonlar temel alınarak şekillendirildi. Bu tezde kullanılan teknikler genel olarak sırasıyla homojenizasyon, santrifüj ve afinite-ultrafiltrasyon şeklindedir. Bütün saflaştırma adımları soğuk odada 4°C'de gerçekleştirildi.

7.4.1 Homojenizasyon ve Santrifüj

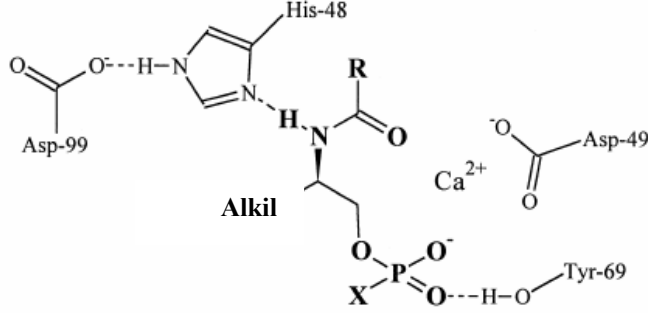
Pankreasın yağimsı kısımları ayrıldıktan sonra küçük parçalara ayrıldı. Ardından, 5 mM CaCl₂ içeren pH; 7,5 100 mM Tris-HCl tamponunda önce bir blender(Waring Christison,18445, U.K.) ve sonrasında bir homojenizatör(Silverson STL2) yardımı ile homojenize edildi. Homojenat, pankreasın yapısından gelen sinir ve artıkları uzaklaştırmak için bir tül bent bezinden süzüldü. Filtrat 600 rpm'de 15 dakika 4°C'de santrifüjlendi(S1) ve cam pamuğundan süzüldü. Ardından 10000 rpm'de 20 dakika 4°C'de santrifüjlendi(S2) (Hettich 30RF, FRG). Santrifüjata(S2) % 25-70 Amonyum sülfat çöktürmesi uygulandı ve elde edilen çökelek saf suya karşı 4°C'de diyalizlendi. Hazırlanan bu preparat afinite-ultrafiltrasyona uygulandı.

7.5 Afinite-Ultrafiltrasyon

7.5.1 İnhibitör Sentezi

Bu çalışmada saflaştırılmasında hedeflenen enzim, yukarıda da belirtildiği gibi PLA₂ ailesinin 14 kDa'luk pankreasdan salgılanan alt sınıfına aittir. Birçok çalışmada farklı kaynaklarda bulunan 14 kDa'luk PLA₂'lerin hidrolizlenemeyen 2-açilamino-alkil-fosfolipid türevlerinin inhibitör etkileri incelenmiştir(de Hass *et al.*, 1990; Yu *et al.*, 1990; Dijkman *et al.*, 1994; Bartel *et al.*, 2000). Bu substrat analogları enzimin doğal substratları olan gliserofosfolipidlerden iki yönüyle farklıdır. Birincisi, *sn*-2 ester bağının bir amid bağı şeklinde değiştirilmesi ki bu enzimin spesifikliğı açısından önemlidir. İkincisi, *sn*-1 ester bağının metilen gruplarıyla değiştirilmesidir(Kley *et al.*, 1998,). Enzim aktif merkezde Ca²⁺ iyonuna bağımlı olup kompetitif

bir inhibisyon şeklinde gerçekleşen reaksiyonun aktif merkezdeki mekanizması Şekil 7.1’de verildi.

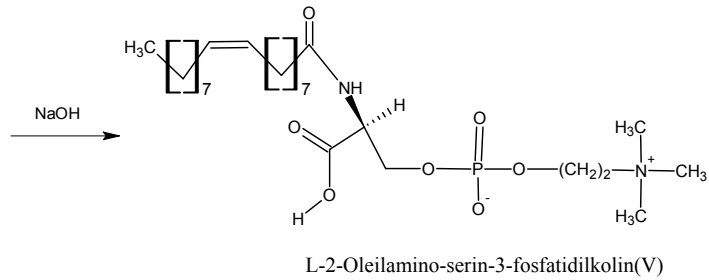
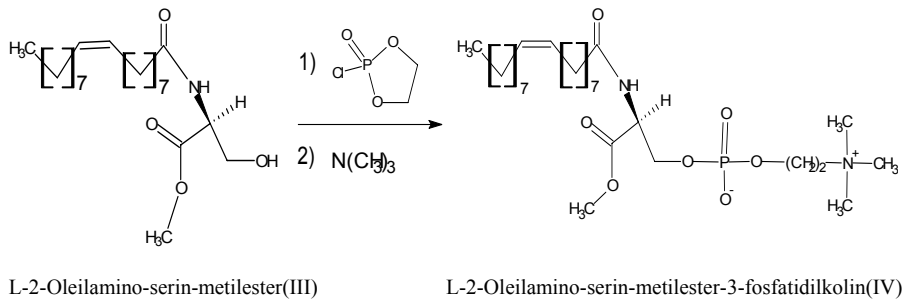
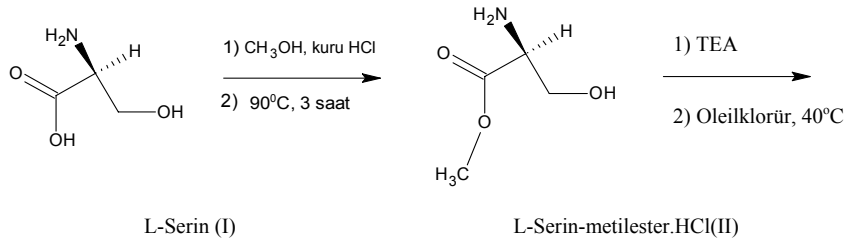


Şekil 7.1 2-açilamino-alkilfosfolipid inhibitörünün 14kDa-PLA₂'nin aktif merkezine bağlanma mekanizması(Kısaltmalar; R: yağ asidi, X: O-CH₂-CH₂-N⁺(CH₃)₃).

Bu tez projesinde kullanılacak olan affinite reçinesi için sentezlenen inhibitörün sentez yolu Şekil 7.2’de verildi. İnhibitörün sentezi için çıkış maddesi olarak L-Serin aminoasidi kullanıldı.

7.5.1.1 L-Serin-metilester.HCl (II) Sentezi

50 ml kuru metanol içindeki L-Serin(I)(10 g, 87 mmol) çözeltisi kuru HCl gazı ile doyuruldu. L-Serin tamamen çözüldükten sonra çözelti 90°C’de 3 saat geri soğutucu altında kaynatıldı. Ortamdaki fazla metanol evaporatörde uzaklaştırıldıktan sonra suyun alınması için Na₂SO₄ ile 30 dk muamele edildi. Oluşan ester dietileterde (3:1) kristallendirildi. **E.N:**150-155°C, **IR:** Ester C=O(v:1667cm⁻¹), C-O(v:1253cm⁻¹).



Şekil 7.2 İnhibitörün sentez adımları.

7.5.1.2 L-2-Oleilamino-serin-metilester (III) Sentezi

1 g (13mmol) L-Serin-metilester.HCl 50 ml kloroformdaki çözeltilisine 1,8 ml (26 mmol) trietanolamin(TEA) ilave edildi. Çözelti su banyosunda 40°C'ye ısıtıldıktan sonra 2,22 ml (13 mmol) Oleil klorür damla damla ilave edildi. 40°C'de 6 saatlik karıştırmadan sonra çözgen vakum altında uçuruldu. Katı ürün üzerine hekzan ilave edilerek reaksiyona girmeyen oleil klorür süzülerek beyaz üründen ayrıldı. Kloroformda kristallendirildi. Ninhidrin testi sonucunda maddenin amin grubu içermediği görüldü. **E.N:**175-180°C, **IR:** Amid C-N(ν :1100cm⁻¹).

7.5.1.3 L-2-Oleilamino-serin-metilester-3-fosfatidilkolin (IV) Sentezi

25 ml kuru benzende 0,5 g (1,36 mmol) L-2-Oleilamino serin-metilester(III) süspansiyon halinde karıştırıldı ve üzerine 0,4 ml (0.272 mmol) trietanolamin(TEA) ilave edildi. Rengi berraklaşan çözeltiliye 10 ml kuru benzende çözülen 125 µl (1,36 mmol) 2-kloro-2-oxo-1,3,2-dioxofosfolan damla damla ilave edildi. Karışım oda sıcaklığında bir gece karıştırıldı. Çöken TEA.HCl filtrasyonla ayrıldı. Çözelti 100 ml'lik bir balona alınarak üzerine 1,13g trimetilamin(TMA) ilave edildi ve 70°C'de geri soğutucu altında 2 gün boyunca kaynatıldı. Çözelti soğutulduktan sonra çözgen evaporatörde uzaklaştırıldı ve ham fosfatidilkolin analogu eluant olarak CHCl₃/MeOH/H₂O(65:25:5) çözgen sistemi kullanılarak Silikajel 60 kolonundan geçirildi. Çözgeni uzaklaştırılan ürüne molibdat testi uygulandı. Oluşan sarı kristaller ürünün fosfat grubu içerdiğini göstermektedir. **E.N:**130-135°C, **IR:**C-N(Amonyum, ν :1029cm⁻¹), POOH(ν :2742cm⁻¹), P=O(ν :1178cm⁻¹).

7.5.1.4 L-2-Oleilamino-serin-3-fosfatidilkolin (V) Sentezi

0,25 g (0,543 mmol) L-2-Oleilamino-serin-metilester-3-fosfatidilkolin(IV) 1 ml suda çözüldü ve üzerine 2 ml 1 M NaOH'in metanol içindeki çözeltisi ilave edildi ve 3 saat 37°C'de karıştırıldı. Çözelti HCl ile asitlendirildikten sonra ürün kloroform fazına çekildi. Çözgen uzaklaştırıldı ve beyaz ürün elde edildi. Madde FeCl₃ ile muamele edilerek karboksilik asit içerdiği belirlendi. E.N: 120-130°C IR:O-H(asit, ν :960cm⁻¹).

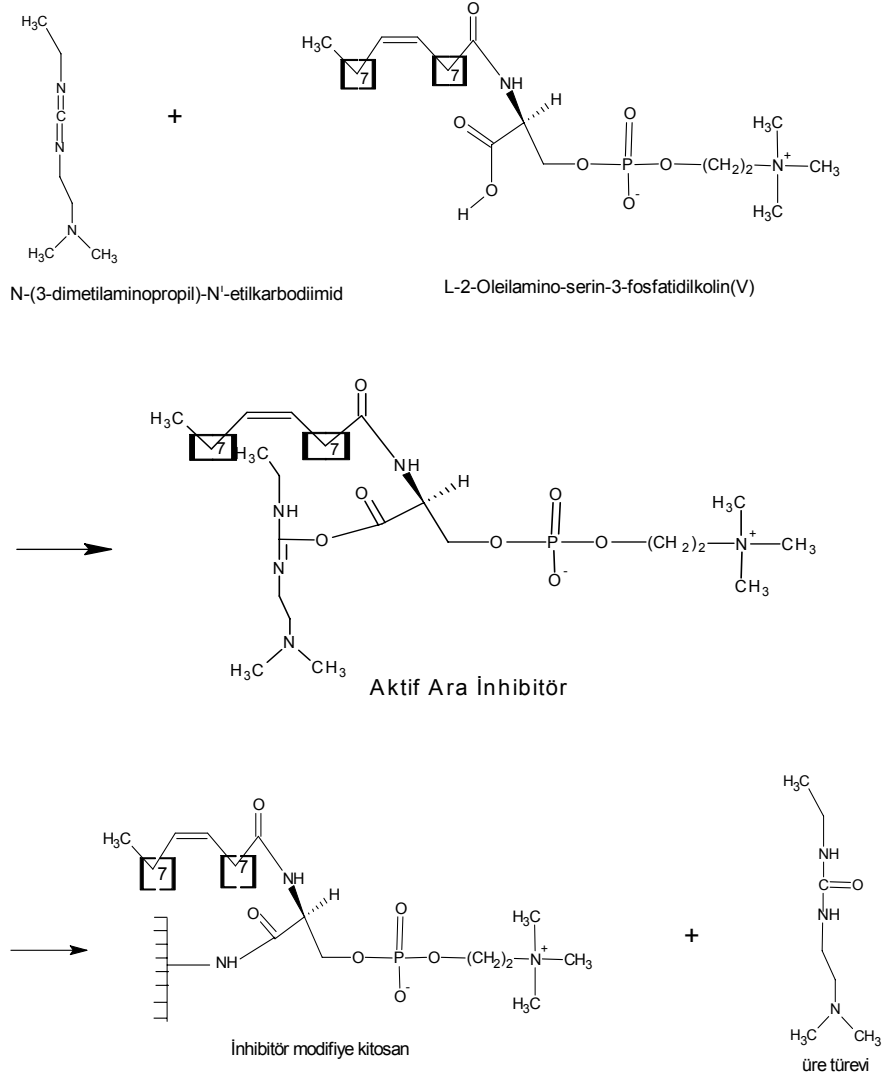
7.5.1.5 L-2-Oleilamino-serin-3-fosfatidilkolin (V)'in PLA₂ Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi ve İnhibisyon Tipinin Belirlenmesi

PLA₂'nin saflaştırılmasında yapı, sentez ve saflaştırma amacıyla tarafımızdan orijinal olarak sentezlenerek afinite ligandı olarak kullanılan L-2-Oleilamino-serin-3-fosfatidilkolin(V), üzerinde(*sn*-2 karbonunda) enzimin kendi substratlarında bulunan ester bağı yerine, amid bağı oluşturarak enzim için inhibitör görevi görmesi amacıyla sentezlendi. Bu bölümde sığır pankreasından saflaştırılan PLA₂ aktivitesi üzerine bu inhibitörün etkisi de incelendi. Bu doğrultuda fosfatidilkolin substrat olarak kullanıldı ve inhibitörün farklı konsantrasyonları(0,1-0,5-1,0 mM) kullanılarak aynı aktivite koşullarında enzimin aktivitesi belirlendi. Bu bölümün son kısmında inhibitörün neden olduğu inhibisyon tipi belirlendi. Bunun için 0,5 mM inhibitör konsantrasyonu ile farklı substrat konsantrasyonlarında enzim aktiviteleri belirlendi. Lineweaver-Burk diagramından kinetik sabitler de hesaplanarak inhibisyon tipi belirlendi.

7.5.2 Afinite Reçinelerinin Hazırlanması ve Fosfolipaz A₂ Saflaştırılmasında Kullanılması

7.5.2.1 Kitosan-İnhibitör afinite reçinesinin hazırlanması (Yöntem 1)

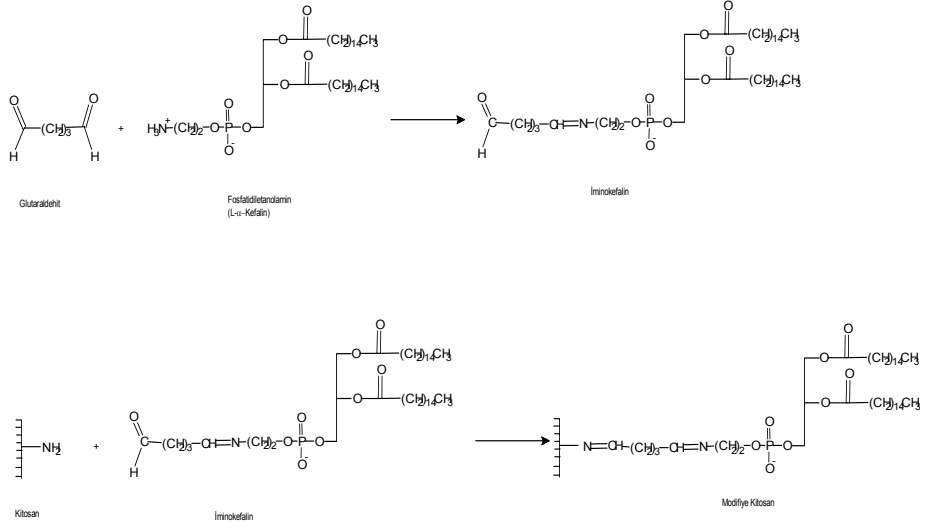
0,1mmol (50 mg) L-2-oleilamino-serin-3-fosfatidilkolin(V) öncelikle 0,5mmol (100mg) 1-etil3-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimid hidroklorür(EDC) ile pH 7,0 Tris-HCl tamponunda 1 saat oda sıcaklığında karıştırılarak aktive edildi. Aktif inhibitör, %0,5'lik(10ml) kitosan(küçük partiküllerin ayrılması için önceden 100000 cut-off membrandan geçirilerek ön işleme tabi tutuldu) bulunan ultrafiltrasyon hücresi(Sartorius, SM 16526) içine(100000 cut-off membran bulunan) ilave edildi ve 24 saat oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra bağlanmayan inhibitör ve diğer reaktiflerin uzaklaştırılması amacıyla reçine basınç altında yıkandı. Amonyum sülfat çöktürmesinden sonra diyalizi yapılan sığır fosfolipaz A₂ enzimi 1 mM NaCl ve 10 mM CaCl₂'lü ortamda reçine içine ilave edildi ve enzimin bağlanması için 2 saat 4°C'de karıştırıldı. Bu süre sonunda reçineye bağlanmayan proteinler 1 atm basınç uygulanarak filtre edildi ve protein miktarları 280nm'de izlendi. Filtrat aktivite ve protein ölçümleri için saklandı. Retentat kitosan-inhibitör-enzim kompleksi içermektedir. Reçineye bağlı enzimin elüsyonu için ortama 50 mM EDTA ve 0,2 M KCl çözeltisi ilave edildi ki bu ortamdaki Ca²⁺ iyonlarının uzaklaşmasını sağlayarak enzimin reçineden ayrılmasını kolaylaştırmaktadır. 1 saat karıştırıldıktan sonra reçineye bağlanan fosfolipaz A₂ enziminin basınç altında elüsyonu ve diyalizi gerçekleştirildi. Aktivite ve protein tayinleri standart yöntemlerle yapıldı.



Şekil 7.3 Kitosan-İnhibitör affinite reçinesinin hazırlanması

7.5.2.2 Kitosan-Glutaraldehid-Substrat afinite reçinesinin hazırlanması(Yöntem 2)

50 mg Fosfatidiletanolamin(PLA₂ substratı) % 0,5'lik glutaraldehit (150 µl) ile pH 8,0 Tris-HCl tamponunda gece boyu oda sıcaklığında karıştırıldı. % 0,5'lik kitosan(10 ml)(küçük partiküllerin ayrılması için önceden 100000 cut-off membrandan geçirilerek ön işleme tabi tutuldu) içine ilave edildi ve gece boyu oda sıcaklığında karıştırıldı. Reçine 100000 cut-off membran bulunan ultrafiltrasyon hücresine(Sartorius, SM 16526) alınarak reaksiyona girmeyen reaktifler basınç altında filtre edildi ve yıkandı. Amonyum sülfat çöktürmesinden sonra diyalizi yapılan sığır fosfolipaz A₂ enzimi 1 mM NaCl ve 10 mM CaCl₂'lü ortamda reçine içine ilave edildi ve enzimin bağlanması için 2 saat 4°C'de karıştırıldı. Bu süre sonunda reçineye bağlanmayan proteinler 1 atm basınç uygulanarak filtre edildi ve protein miktarları 280nm'de izlendi. Filtrat aktivite ve protein ölçümleri için saklandı. Retentat kitosan-substrat-enzim kompleksi içermektedir. Reçineye bağlı enzimin elüsyonu için ortama 50 mM EDTA ve 0,2 M KCl çözeltisi elave edildi ki bu ortamdaki Ca²⁺ iyonlarının ayrılmasını sağlayarak enzimin reçineden ayrılmasını kolaylaştırmaktadır. 1 saat karıştırıldıktan sonra reçineye bağlanan fosfolipaz A₂ enziminin basınç altında elüsyonu ve diyalizi gerçekleştirildi. Aktivite ve protein tayinleri standart yöntemlerle yapıldı.

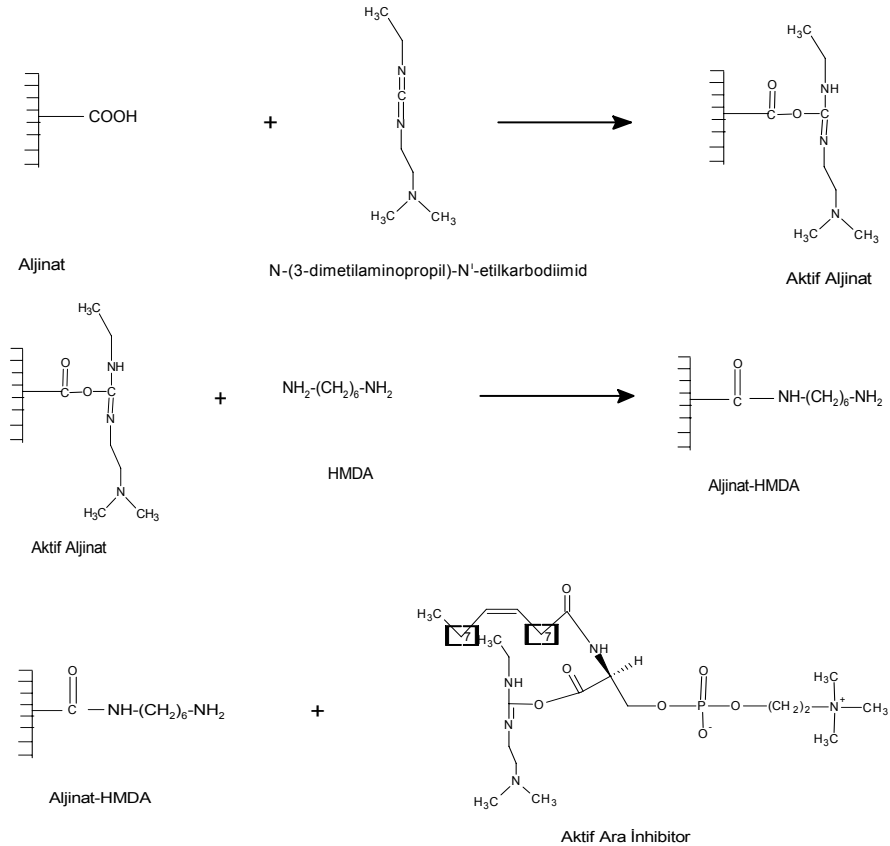


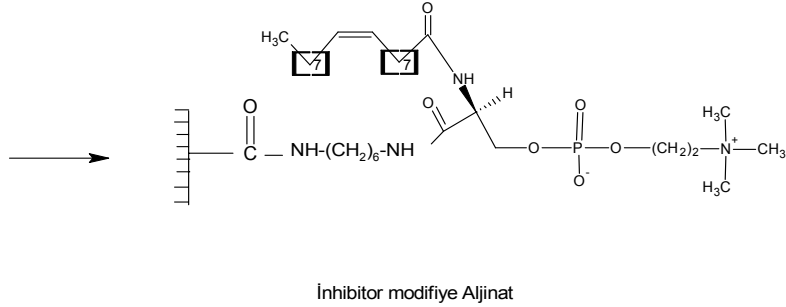
Şekil 7.4 Kitosan-Glutaraldehit-Substrat affinite reçesinin hazırlanması

7.5.2.3 Aljinat-HMDA-İnhibitör afinite reçesinin hazırlanması(Yöntem 3)

% 0,5'lik aljinat(10 ml) 0,5 mmol (100 mg) EDC ile pH 7,0 Tris-HCl'de 1 saat oda sıcaklığında karıştırılarak aktive edildi. Üzerine 0,5 mmol (58 mg) heksametilendiamin(HMDA) ilave edildi ve gece boyu oda sıcaklığında karıştırıldı. Daha sonra 0,5mmol(100 mg) N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimid hidroklorür(EDC) ile aktive edilmiş 0,5 mmol(250 mg) L-2-oleilamino-serin-3-fosfatidilkolin(V) enzim inhibitörü ilave edildi ve gece boyu oda sıcaklığında karıştırıldı. Karışım 100000 cut-off membran bulunan ultrafiltrasyon hücresine(Sartorius, SM 16526) alındı ve reaksiyona girmeyen reaktifler basınç altında filtre edildi. Amonyum sülfat çöktürmesinden sonra diyalizi yapılan sığır fosfolipaz A₂ enzimi 1mM NaCl ve 10mM CaCl₂'lü ortamda reçine içine ilave edildi ve enzimin bağlanması için 2 saat 4°C'de karıştırıldı. Bu süre sonunda

reçineye bağlanmayan proteinler 1 atm basınç uygulanarak filtre edildi ve protein miktarları 280nm’de izlendi. Filtrat aktivite ve protein ölçümleri için saklandı. Retentat aljinat-inhibitör-enzim kompleksi içermektedir. Reçineye bağlı enzimin elüsyonu için ortama 50 mM EDTA ve 0,2 M KCl çözeltisi ilave edildi ve ortamdaki Ca^{2+} iyonlarının uzaklaşması sağlanarak enzimin reçineden ayrılmasını kolaylaştırdı. 1 saat karıştırıldıktan sonra reçineye bağlanan fosfolipaz A₂ enziminin basınç altında elüsyonu ve diyalizi gerçekleştirildi. Aktivite ve protein tayinleri standart yöntemlerle yapıldı.





Şekil 7.5 Aljinat-HMDA-İnhibitör affinite reçinesinin hazırlanması

7.6 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) ve Moleküler Kütle Tayini

SDS-PAGE, poliakrilamid jel elektrofrezinin en yaygın kullanılanı olup, protein karışımlarının özelliklerini analizlemek açısından önemlidir. Protein saflık kontrolünün bir ölçüsüdür ve protein molekül boyutuna göre bir ayırım yapması nedeniyle bağıl molekül kütlesi tayininde de kullanılır. Bu nedenle sığır pankreasından izole edilerek saflaştırılan fosfolipaz A₂ preparatının saflığını kontrol etmek ve molekül kütesinin belirlemek için SDS-PAGE metodu kullanılmıştır.

Poliakrilamid jel elektrofrez, % 0,1 SDS varlığında slab jel cihazında Laemmli (Laemmli, 1970) tarafından geliştirilen metoda göre gerçekleştirilmiştir. Yöntem heterojen tampon sistemi temeline dayanır. Ayırma kapasitesi oldukça iyi olan bu yöntemde, çalışılan proteinler yürütücü jele girmeden önce düzenleyici jelde, elektrofrez tamponu ve jel arasındaki pH ve iyonik şiddet vasıtasıyla dengelenerek konsantre edilirler(Zihnioğlu, 1996).

Tayin için gerekli olan çözeltiler:

Akrilamid/bis(A/B): 30 g Akrilamid ve 0,8 g bis-N,N'-metilenbisakrilamid distile suda çözülerek 100 ml'ye tamamlanır, filtre edilir ve kahverengi şişede 4°C'de saklanır.

Alt Tris(LT): 18,2 g Tris-hidroksiaminometan, 2 ml % 20 SDS distile suda çözülür, pH'sı derişik HCl ile 8,8'e ayarlanır ve distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak 4°C'de saklanır.

Üst Tris(UT): 6,06 g Tris, 2 ml % 20'lik SDS distile suda çözülür, pH'sı derişik HCl ile 6,8'e ayarlanır ve distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak 4°C'de saklanır.

Amonyum persülfat(AP): 20 mg/ml'lik sulu çözeltisi. Taze hazırlanmalıdır.

Reservuar tamponu: 15 g Tris, 72 g glisin ve 5 g SDS 5 litre distile suda çözülerek hazırlanır.

7.6.1 Polimerizasyon protokolü

Poliakrilamid jeller akrilamid monomerlerinin bir çapraz bağlayıcı ajan ile kopolimerizasyonu sonucu oluşur. Poliakrilamid jeller için en çok kullanılan çapraz bağlayıcı ajan da bis-N,N'-metilenbisakrilamid'dir. Akrilamid polimerizasyonu serbest radikal katalize bir örnektir. Reaksiyon, amonyum persülfat ve N,N,N',N'-tetrametilendiamin(TEMED) ile başlatılır. TEMED, persülfat iyonunun dekompozisyonunu katalizleyerek serbest bir radikal oluşumunu sağlar. Aktif moomer, aktiflenmemiş monomer ile reaksiyon verir ve polimer zincirin uzaması başlar. Uzayan polimer zincir çapraz bağlı metilen bisakrilamid ile birlikte yapılır. Oksijen, serbest radikalleri uzaklaştırdığından ve polimerizasyonu

engellediğinden tüm jel çözeltilerinden kullanılmadan önce vakumla uzaklaştırılmalıdır.

Kaliteli bir SDS-PAGE için şu faktörlere dikkat etmek gerekir: Oldukça yüksek saflıkta reaktifler, doğru başlangıç konsantrasyonları(yürütücü jel için % 0,04 ve düzenleyici jel için % 0,1), sıcaklık polimerizasyon için genellikle 23°C), çözeltilerin oksijeninin giderilmesi(oksijen polimerizasyonun inhibitörüdür) ve jel oluşturma tamponlarının pH'sı.

Sığır pankreatik fosfolipaz A₂'nin SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi için, % 12,5'luk Akrilamid-Bisakrilamid monomerleri kullanılmıştır. Polimerizasyon protokolü (iki jel için) aşağıda verilmiştir:

- 1) Çözelti 1, 2 ve 3 oda sıcaklığına getirildikten sonra karıştırılır.
- 2) 5 dakikalık oksijen giderme işlemi ardından çözelti 4 ve 5 sırasıyla eklenerek, yavaşça karıştırılır.
- 3) Yürütücü jel dökülür, minimum 3 saat veya gece boyu bekletilir. Ardından düzenleyici jel dökülerek 1-1,5 saat polimerizasyona bırakılır.

Reaktif	Yürütücü Jel (%12,5)	Düzenleyici Jel (%3)
1. Distilesu(ml)	19	12,7
2. AB (ml)	25	2
3. LT /UT(ml)	15 (LT)	5 (UT)
4. AP (ml)	0,9	0,3
5. TEMED(μl)	20	20

7.6.2 Örneklerin hazırlanması ve elektroforeze uygulanması

SDS-PAGE'de ayrılacak örnekler(önceden protein tayini yapılmış) doğru protein yüklemesi yapabilmek için önce deriştirme işlemine tabi tutulur yada 0,1 M Tris/HCl (pH 6,8) ile seyreltilir. Bu amaçla 48µg/ml bulunan sığır pankreasından saflaştırılan PLA₂ örneği, 48µg/100µl olacak şekilde liyofilize(Leybold G07/00, Germany) edilerek deriştirildi. 7,5 mg/ml protein içeriğine sahip santrifüjat2(S2) örneği ise 2:1 oranında örnek hazırlama tamponu ile karıştırılarak hazırlandı. Bu tampon; 200 µl Tris/Bromfenol mavisi, 200 µl % 60'lık sukroz, 400 µl % 20'lik SDS ve 200 µl 2-merkaptotanol içerir. Merkaptotanol, proteinin tersiyer yapısını bir arada tutan disülfid bağlarını indirger. SDS; proteini denatüre ederek iki aminoasit artığına bağlanarak yükü maskeler. Bromfenol mavisi; iyonize olabilen bir boyadır ve elektroforezin kolay izlenebilmesi için ortama ilave edilir. Sükroz ise örnek çözeltiye bir yoğunluk kazandırır ve örneğin elektroforez tamponunda kolayca çökmesi sağlanır.

50 µl örnek, 25 µl örnek tamponu ile karıştırılıp 100°C'lik su banyosunda 3 dakika kaynatılır. Genel olarak yürütücü jelin her aralığına 50 µl örnek uygulanır.

Anod ve katod rezervuarlarındaki Tris/glisin/SDS tamponu ile elektroforez yürütülür. Proteinlerin elektroforezinde düzenleyici jelde 25 mA/jel yürütücü jelde 35 mA/jel akım uygulanır. Bromfenol mavisinin oluşturduğu bant jele ulaşmadan 0,5 cm önce elektroforez işlemine son verilir.

7.6.3 Protein bantlarının boyanması (Coomasie-Brilliant Blue)

Jellerin boyanmasında Coomasie-Brilliant Blue kullanılmıştır. Bu boyama metodunda esas, boyanın asidik pH'da proteinlere bağlanmasıdır. Jeller, Coomasie Blue (% 45 metanol, % 9 asetik asitte hazırlanmış % 0,25'lik çözeltisi) çözeltisi ile 1 saat boyunca yavaşça çalkalanır. Jelde oluşan mavi zemin, jelin % 10 metanol ve % 14 asetik asitten oluşan sulu çözeltisi ile gece boyunca yıkanarak boyadan temizlenir.

7.7 PLA₂'nin Karakterizasyonu

7.7.1 PLA₂ Aktivitesine Substrat Konsantrasyon Etkisinin İncelenmesi

Optimum substrat konsantrasyonu ve bağımlı olarak enzim aktivitesinin değişimi izlendi. Substrat olarak L- α -fosfatidilkolinin 0,1-4 mM(34 mM stok çözeltiden) aralığında değişen konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlandı ve aktiviteler tayin edildi. Lineweaver-Burk grafiğinden K_m ve V_{max} değerleri belirlendi.

7.7.2 PLA₂ Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi

Enzimlerin katalitik aktivitesi kimyasal katalizörlerde olduğu gibi sıcaklığa çok bağlıdır ancak enzim protein yapısının denatürasyonu nedeniyle belirli bir sıcaklığın üstünde sıcaklıkla aktivite kaybı gözlenmektedir.

Enzim aktivitesi üzerine sıcaklık etkisini belirlemek amacıyla inkübasyon sıcaklıkları değiştirildi. Standart aktivite tayin koşullarında sıcaklık 25-60°C aralığında değiştirildi(25, 30, 37, 40, 45, 50, 55, 60 °C). Kör denemeler de her bir nokta için belirlendi.

7.7.3 PLA₂ Aktivitesine pH Etkisi

Enzimler protein yapıda oldukları için katalitik aktiviteleri çevre koşullarından, özellikle ortam pH'ından ciddi olarak etkilenmektedirler.

Enzim aktivitesi üzerine pH etkisinin incelenmesinde pH; 7,5-10 arasında değiştirildi. Aktiviteler belirli koşullar altında ölçülerek optimum pH değeri belirlendi.

7.7.4 PLA₂ Aktivitesine CaCl₂ Konsantrasyonu Etkisi

Çoğu enzimler aktivite gösterebilmeleri için koenzim, prostetik grup veya metal iyonlarına ihtiyaç duyarlar. Metal iyonlarının genelde enzim aktivitesini artırıcı etkileri vardır ve çözültide serbest formda bulunurlar.

Sığır pankreatik düşük molekül ağırlıklı PLA₂ enzimi de Ca²⁺-bağımlı bir enzim olduğundan aktivite gösterebilmesi için Ca²⁺ iyonlarına ihtiyaç duyar. Bu etkinin Ca²⁺ konsantrasyonuna bağımlılığını 1-10 mM aralığında değişen konsantrasyonlarda incelendi.

7.7.5 PLA₂ Aktivitesine İyon Şiddetinin Etkisi

Genellikle tuz konsantrasyonunun artması enzimatik aktiviteyi olumsuz yönde etkilemektedir. Bu nedenle iyon konsantrasyonunun PLA₂ aktivitesine etkisini incelemek amacıyla 5,0-60 mM arasında değişen konsantrasyonlarda NaCl çözeltileri hazırlanarak standart aktivite koşullarında iyon etkisi incelendi. İyon şiddeti etkisi bütün ölçümlerde 10 mM CaCl₂ varlığında belirlendi.

7.7.6 PLA₂'nin Termal Stabilitesinin Belirlenmesi

Enzimlerin aktivitesi kimyasal reaksiyonlarda olduğu gibi sıcaklıkla artar. Ancak enzimler protein yapılı oldukları için yüksek sıcaklıklarda denatüre olurlar ve kararlı değildirler. Bu nedenle enzim reaksiyonları pratik olarak yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilemez.

Enzimin termal stabilitesini belirlemek için enzim önce farklı sıcaklıklarda(°C; 4, 15, 30, 45, 60, 70) 30 dakika inkübe edildi ve daha sonra standart aktivite ölçüm koşullarında aktiviteler belirlenerek termal stabilite etkisi incelendi.

Enzimin zamana bağımlı termal stabilitesini incelemek için enzim önce farklı sıcaklıklarda(°C; 37, 45), farklı sürelerde(t(dak);10, 20, 30, 40, 50, 60) inkübe edildi ve daha sonra standart aktivite tayin koşullarında aktiviteler belirlendi.

7.7.7 Bazı Divalent Katyonların ve EDTA'nın PLA₂ Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

CaCl₂ konsantrasyonunun etkisi dışında diğer divalent katyonların(CoCl₂.6H₂O, BaCl₂.2H₂O, MgCl₂.6H₂O, HgCl₂) ve etilendiamintetraasetik asit(EDTA) etkisi, 10 mM metal klorür ve CaCl₂ yerine 10 mM EDTA içeren reaksiyon karışımında çalışıldı. Aktivatör yada inhibitör etkileri standart aktivite tayin koşullarında yapıldı.

7.8 Afinite Reçinesinin Tekrar Kullanılabilirliğinin İncelenmesi

Afinite ultrafiltrasyonun en önemli avantajlarından bir tanesi makroligandın rejenerasyondan sonra tekrar kullanılabilmesidir. Bu amaçla makroligand yüksek tuz konsantrasyonunda rejenere edildikten sonra, hedef proteini bağlamak için kullanılan tamponla dengelenmelidir.

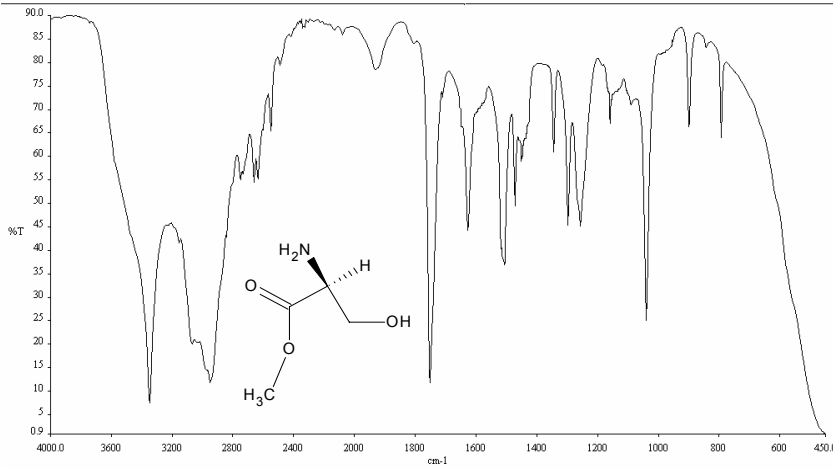
Bu tez çalışmasında sentezlenen kitosan-glutaraldehid-fosfatidiletanolamin temelli reçine, 2 M NaCl ile rejenere edilerek çalışma tamponu ile dengelendikten sonra, aynı protein miktarında(5mg/ml) santrifüj(S2) ilavesi ile tekrar kullanılabilirlik çalışıldı.

8. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

8.1 İnhibitörün Karakterizasyonu

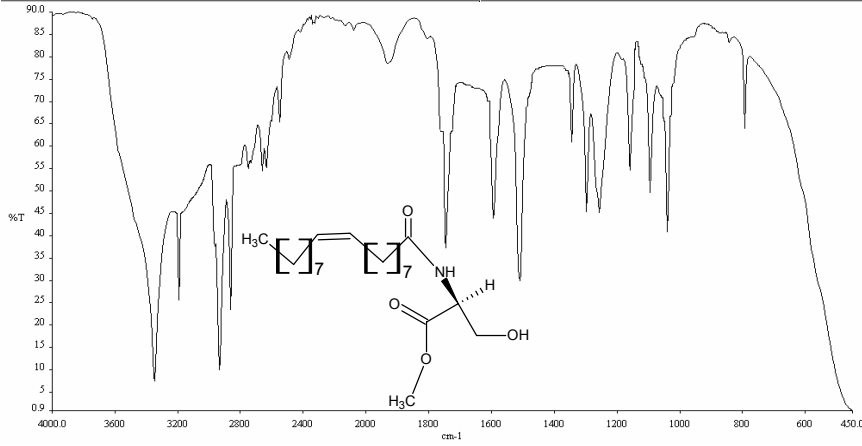
Bu tez projesinde kullanılacak olan affinite reçinesi için sentezlenen inhibitör, orijinal olup ilk olarak tarafımızdan sentezlendi. Çıkış maddesi olarak L-Serin aminoasidi kullanıldı. Bu amaçla afinite

ligandı olarak kullanılacak inhibitör, matrikse bağlamak amacıyla üzerinde fonksiyonel grup olarak karboksilik asit(-COOH) grubu bulundurmaktadır. Yapı olarak substrat analoglarına benzetilmeye çalışılan inhibitörün sentezi için L-Serin'in(I) karboksil ucu, diğer reaksiyon adımlarından etkilenmemesi amacıyla öncelikli olarak fonksiyonel grup korunmasına gidilmek suretiyle karboksilik asit metil esteri şeklinde gerçekleştirildi. L-Serin-metilester(II)'in IR spektrumu(Perkin Elmer Spectrum 100) Şekil 8.1'de verildi. Buna göre spesifik olarak C=O(ester) gerilme titreşimi 1667cm^{-1} 'de, C-O(ester) gerilme titreşimi ise 1253cm^{-1} 'de belirgindir.



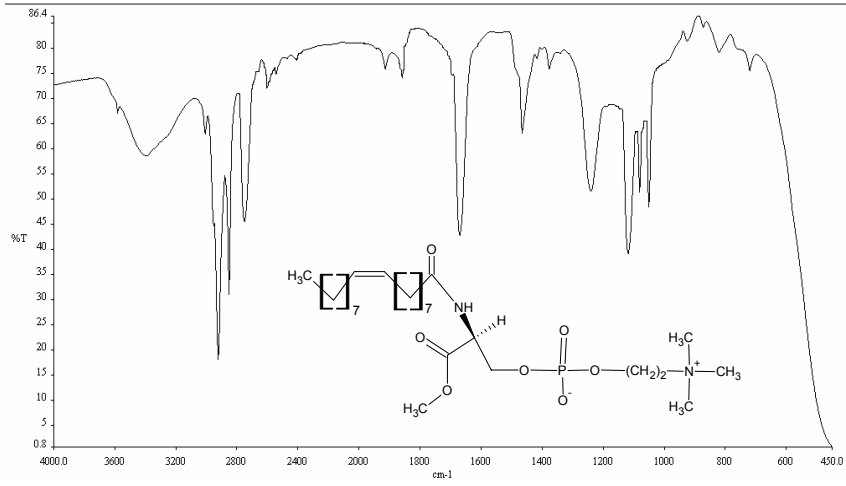
Şekil 8.1 L-Serin-metilester(II)'in IR spektrumu

İnhibitör sentezinin ikinci adımında, inhibitörün substrata benzetilmesi amacıyla ikinci karbona bağlı amino ucuna, substrat taklidi yapabilmesi ve aynı zamanda amid bağı oluşturarak sentez gerçekleştirildi. L-2-Oleilamino-serin-metilester(III)'inin IR spektrumu Şekil 8.2'de verildi. Şekilde de görüldüğü üzere spesifik C-N(amid) gerilme titreşimi 1100cm^{-1} 'de belirgindir.



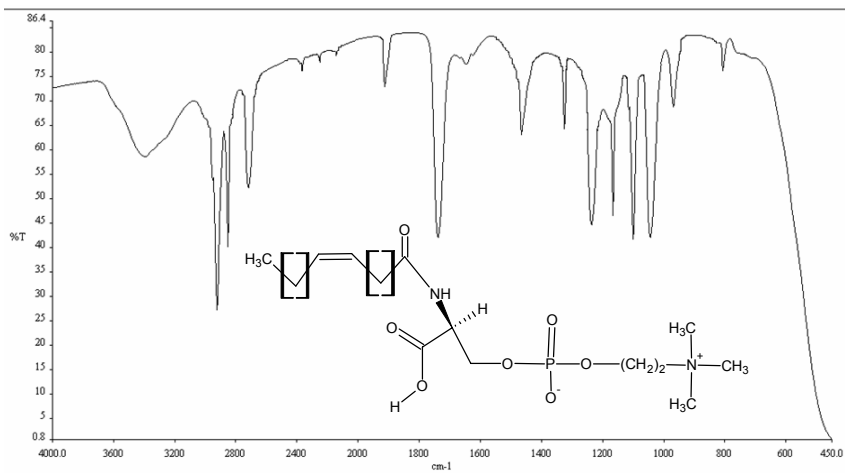
Şekil 8.2 L-2-Oleilamino-serin-metilester(III)'in IR spektrumu

Aktif merkezinde histidin içeren PLA₂ gruplarının(salgılanan) katalitik mekanizmasında, enzimin inhibitöre afinite etkileşimi ile bağlanması açısından aktif merkezde oksijen-anyon deliğini oluşturan ve oluşan tetrahedral geçiş ara kompleksinin stabil olması için Ca²⁺ ile iyonik etkileşime girebilecek olan fosfolipitlerdeki fosfat baş grup ve ardından zwitteriyon karakterini kazandırmak amacıyla TMA bağlanarak sentez tamamlanmıştır. L-2-Oleilamino-serin-metilester-3-fosfatidilkolin(IV)'in IR spektrumu Şekil 8.3' verildi. Şekilde karakteristik -POOH gerilme titreşimi 1274cm⁻¹'de, P=O çift bağ gerilme titreşimi 1178cm⁻¹'de ve kolin grubunda oluşan C-N bağ titreşimi 1029cm⁻¹'de belirgindir.



Şekil 8.3 L-2-Oleilamino-serin-metilester-3-fosfatidilkolin(IV)'in IR spektrumu

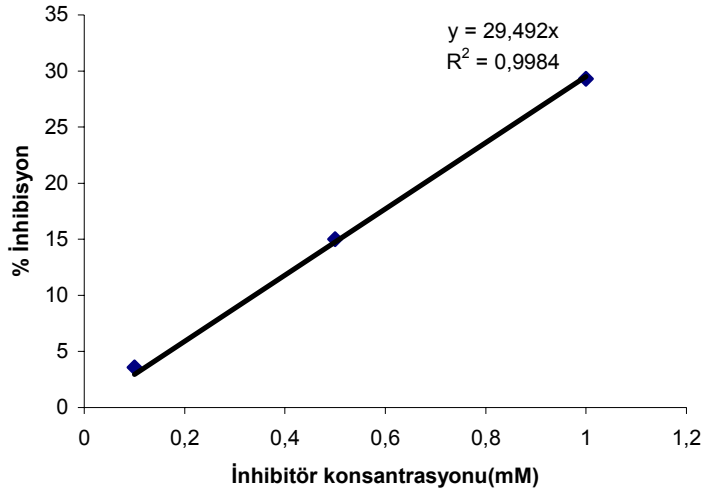
İnhibitör sentezinin son adımında, inhibitör sentezinin ilk adımında korunmuş olan ve taşıyıcıya bağlamada afinite ligandı olarak kullanılacak olan inhibitörün metillenmiş karboksil grubunun bazik hidrolizi gerçekleştirildi. Hidroliz sonrası elde edilen L-2-Oleilamino-serin-3-fosfatidilkolin(V)'in IR spektrumu Şekil 8.4'de verildi. Şekilde spesifik asit bağı(O-H) gerilme titreşimi 960cm^{-1} 'de belirgin olarak görülmektedir.



Şekil 8.4 L-2-Oleilamino-serin-3-fosfatidilkolin(V)'in IR spektrumu

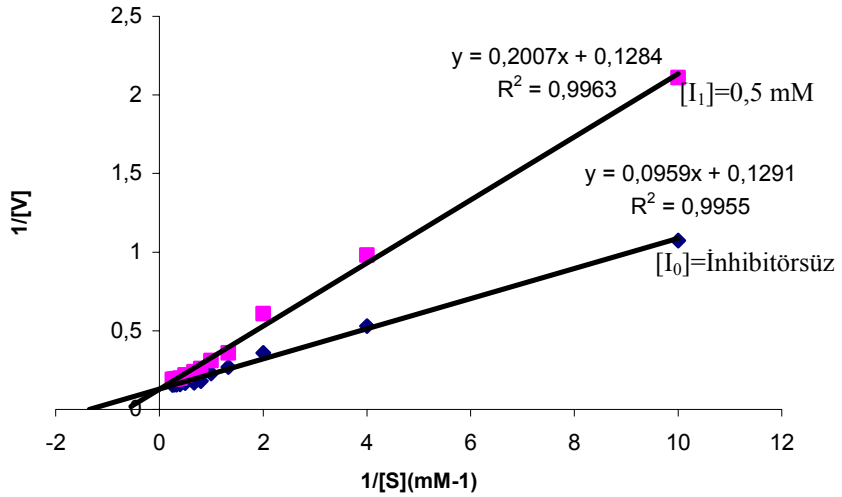
8.2 L-2-Oleilamino-serin-3-fosfatidilkolin(V)'in PLA₂ Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi ve İnhibisyon Tipinin Belirlenmesi

Sığır pankreasından PLA₂'nin saflaştırılmasında tarafımızdan orijinal olarak sentezlenerek afinite ligandı olarak kullanılan L-2-Oleilamino-serin-3-fosfatidilkolin(V) türevleri ve farklı substrat analoglarının PLA₂ aktivitesi üzerine inhibitör etkisi birçok çalışmada belirtilmiştir(de Hass *et al.*, 1990; Yu *et al.*, 1990; Dijkman *et al.*, 1994; Bartel *et al.*, 2000). Bu inhibitörün enzim aktivitesi üzerine etkisi üç farklı konsantrasyonda(0,1-0,5-1 mM) standart koşullar altında belirlendi ve veriler Şekil 8.5'de verildi.



Şekil 8.5 PLA₂ aktivitesi üzerine L-2-Oleilamino-serin-3-fosfatidilkolin(V) etkisi.

Şekil 8.5’de gösterildiği gibi L-2-Oleilamino-serin-3-fosfatidilkolin(V)’in artan konsantrasyonu ile enzim inhibe olmaktadır. Grafiğe göre inhibitörün IC_{50} değeri 1,7 mM olarak hesaplandı. Bu inhibisyonun tipi 0,5 mM inhibitör konsantrasyonunda belirlendi. Şekil 8.6’da verilen Lineweaver-Burk diagramından inhibisyon tipinin yarışmalı olduğu bulundu.



Şekil 8.6 Sığır pankreası PLA_2 'sinin Lineweaver-Burk diagramına L-2- Oleilamino-serin-3-fosfatidilkolin(V) inhibitörünün etkisi.

Şekil 8.6’da verilen grafikten kinetik sabitler (K_m , V_{max} , K_m^I , V_{max}^I) hesaplandı. Değerler Çizelge 8.1’de verildi. Çizelgede görüldüğü gibi değerler, yarışmalı inhibisyonun karakteristik Lineweaver-Burk diyagramını desteklemektedir. İnhibisyonlu ve inhibisyonlu V_{max} değerlerinin birbirine çok yakın olması ve K_m^I değerinin daha yüksek çıkması yarışmalı inhibisyon olduğunu göstermektedir.

Çizelge 8.1 Sığır pankreası PLA₂'sinin kinetik sabitleri [substrat:fosfatidilkolin, inhibitör: L-2- Oleilamino-serin-3-fosfatidilkolin(V)].

Kinetik Sabitler	[I₀]	[I₁]=0,5 mM
K _m (mM)	0,74	—
V _{max} (μmol/dk)	7,75	—
K _m ¹ (mM)	—	1,56
V _{max} ¹ (μmol/dk)	—	7,79

Bu sonuçlar doğrultusunda, tarafımızdan sentezlenen inhibitör, yarışmalı tip karakterinde olması nedeniyle afinite reçinesi için ligand olarak kullanıldı.

8.3 PLA₂'nin Afinite-Ultrafiltrasyon İle Saflaştırılması

Sığır pankreası Fosfolipaz A₂ enzimi Bölüm 7.4.1'de olduğu gibi kısmi olarak saflaştırıldı ve Bölüm 7.5.2'de anlatıldığı şekilde üç ayrı yöntem kullanılarak afinite ultrafiltrasyona uygulandı. Taşıyıcının kapasitesi ve bağlanma etkileri de incelendi. Sonuçlar aşağıdaki bölümde ilgili tablolarda verildi ve tartışıldı.

Çizelge 8.2 Kısmi Saflaştırma ve Affinite-Ultrafiltrasyon Sonrası(Yöntem1,2,3) Saflaştırma Sonuçları.

	Aktivite (U)	Protein (mg)	SpesifikAkt. (U/mg)	A.Verim* (%)	Saflaştırma katı
Homojenat	23,0	295	0,078	100	1
Santrifüj1(S1)	22,4	280	0,080	97,4	1,03
Santrifüj2 (S2)	22,3	182	0,123	96,9	1,58
(NH ₄) ₂ SO ₄ (%25-70)	11,3	39	0,290	49,1	3,72
Yöntem 1	-	0,020	-	-	-
Yöntem 2	8,2	1,524	5,382	35,7	69
Yöntem 3	0,4	0,223	1,794	1,7	23

*Verimler, aktivite değerleri(U) temel alınarak hesaplanmıştır.

Fosfolipaz A₂ enziminin sığır pankreasından kısmi saflaştırılması amonyum sülfat çöktürmesi adımına kadar % 49,1 verim ve 3.72 kat olarak gerçekleştirildi. Bu adımdan sonra affinite-ultrafiltrasyon tekniği ile saflaştırma adımına geçildi ve üç ayrı yöntem kullanıldı. Çizelge 8.2’de görüldüğü gibi yöntemlerden aktivite verimi açısından % 35,7 ve 69 saflaştırma katı ile en iyi olan *yöntem 2*’dir. *Yöntem 1*’de protein görülmesi ancak aktivitenin görülmemesi non-spesifik etkileşimle tutunan protein olduğu düşünülmektedir. Bu reçineye enzimin bağlanamamasının nedeninin matriks olarak seçilen kitosan ile inhibitörün çok yakın bağlanmasıyla enzimin inhibitöre bağlanamadığı düşünülmektedir. Nitekim *yöntem 3*’te HMDA uzatıcı kolu kullanıldığında Aljinat-inhibitör makroligandı ile 23 saflaştırma katına ulaşılması bunun için iyi bir delildir. *Yöntem 2*’nin ise diğer yöntemlere göre daha iyi sonuç vermesinin nedeni kitosan matriks ile substrat arasında bir kol takılarak (glutaraldehid) enzimin bağlanma sırasında sterik engelden kurtularak daha rahat tutunmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. *Yöntem 3* ise *2*’ye göre daha az verim ve saflaştırma katına sahip olup *1*’e göre de daha iyi olduğu görülmektedir.

Sığır pankreasından PLA₂ saflaştırılması, kısmi adımlar amonyum sülfat çöktürmesi adımına kadar yapıldıktan sonra affinite-ultrafiltrasyona geçmişti. Ancak bu adıma kadar (amonyum sülfat çöktürmesinde) olan aktivite kaybını (~%50) engellemek, zaman ve maliyet açısından avantaj sağlamak amacıyla S2 adımına kadar kısmi izolasyonu gerçekleştirildi. Daha sonra S1 ve S2 adımından alınan enzim örnekleri *Yöntem 2*’ye uygulandı. S1’den alınan enzim örneği *Yöntem 2*’ye uygulandıktan sonra aktivite gözlenmedi. S2 ile yapılan denemede ise protein miktarının taşıyıcının kapasitesine etkisini incelemek amacıyla farklı protein miktarlarında (5-10-25 mg) S2 adımından alınarak affinite-ultrafiltrasyona uygulandı. Çizelge 8.3’de verilen sonuçlara göre

saflaştırma katı ve spesifik aktivite açısından en iyi protein miktarı 25 mg, ancak aktivite verimi açısından 5 mg olarak belirlendi. İlave protein miktarı açısından değerlendirildiğinde, 5 mg protein ilavesi ile saflaştırılan protein miktarı, özellikle 25 mg protein ilavesi ile yapılan saflaştırmadan yaklaşık 2 kat daha iyi olduğu görülmektedir.

Çizelge 8.3 Protein miktarının taşıyıcının kapasitesine etkisinin incelenmesi.

	Aktivite (U)	Protein (mg)	Spesifik Akt. (U/mg)	A.Verim* (%)	Saflaştırma katı
Ham Ekstrakt İlave (S2)	0,896	5	0,179	100	1
	1,792	10			
	4,480	25			
Ultrafiltrasyon (5mg)	0,737	0,069	10,68	82,3	60
Ultrafiltrasyon (10mg)	1,196	0,107	11,18	66,7	63
Ultrafiltrasyon (25mg)	2,510	0,184	13,64	56	76

* Verimler, aktivite değerleri(U) temel alınarak hesaplanmıştır.

Bu sonuçlar doğrultusunda hem maliyet açısından hemde aktivite kaybının daha aza indirilmesi amacıyla 5 mg için 2 saatlik bağlanma süresi 4 saate çıkarılarak tekrar denendi. Çizelge 8.4’de verilen sonuçlara göre bağlanma süresinin 2 katına çıkarılmasıyla, hem saflaştırma katında artışa hem de aktivite veriminin ~%90’a kadar yükseltmesi oldukça iyi bir sonuç olarak değerlendirilmektedir.

Çizelge 8.4 Bağlanma süresinin incelenmesi.

	Aktivite (U)	Protein (mg)	Spesifik Akt. (U/mg)	A.Verim* (%)	Saflaştırma katı
Ham Ekstrakt (S2)	0,896	5	0,179	100	1
Ultrafiltrasyon (2 saat)	0,737	0,069	10,68	82,3	60
Ultrafiltrasyon (4 saat)	0,804	0,068	11,92	89,7	67

* Verimler, aktivite değerleri(U) temel alınarak hesaplanmıştır.

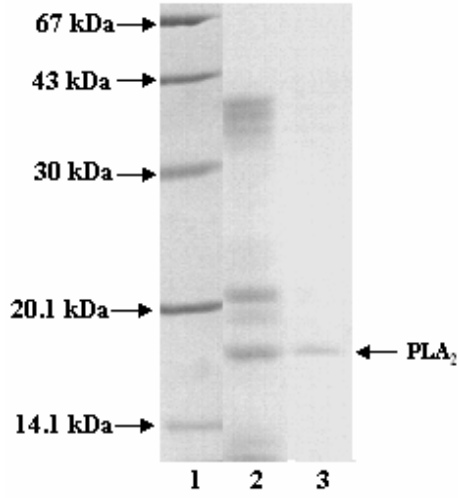
Protein miktarının optimizasyonu ve bağlanma süresinin optimizasyonu gibi plot çalışmalar sonrasında skala büyütme(100mg/g kitosan) işlemine geçildi. Bu amaçla 5 mg enzim miktarı baz alınarak 4 saatlik bağlanma süresi ile saflaştırmalar gerçekleştirildi.

Çizelge 8.5 5 mg protein miktarı ile skala büyütme(100mg/g kitosan) saflaştırma sonuçları.

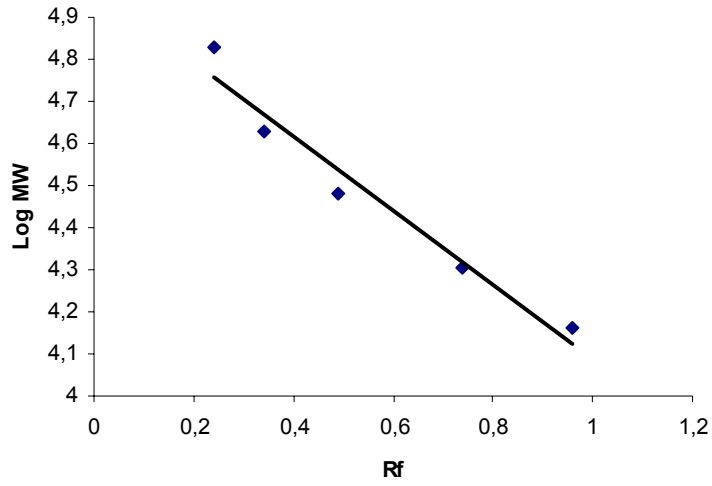
	Aktivite (U)	Protein (mg)	Spesifik Akt. (U/mg)	A.Verim* (%)	Saflaştırma katı
Ham Ekstrakt (S2)	8,132	50	0,163	100	1
Ultrafiltrasyon (100000 cut-off)	6,353	0,572	11,11	78,1	68
Ultrafiltrasyon (30000 cut-off)	6,206	0,480	12,93	76,3	79

* Verimler, aktivite değerleri(U) temel alınarak hesaplanmıştır.

Çizelge 8.5’de verilen sonuçlar doğrultusunda bu enzimle SDS-PAGE elektroforezi ile saflık testine geçildi. Jelde 45-60 kDa arasında enzimden ayrı 3 ayrı bant gözlemlendi. Bunun nedeni, retentantın yıkanmasına rağmen çeperde kalan proteinlerin olabileceği düşünülmektedir. Bu sorunu engellemek amacıyla aynı örnek 30000’lik cut-off membrandan geçirildi. Sonuç olarak enzim skala büyütme işlemine rağmen %76,3’lük aktivite verimi ve daha yüksek bir saflaştırma katıyla(79) saflaştırıldı. Tekrar jele uygulandığında Şekil 8.7’de görüldüğü üzere tek band olduğu gözlemlendi. Şekil 8.8’de değerlerinin $\log M_w - R_f$ ’ye karşı çizilen standart grafiğe göre enzimin rölatif molekül kütlesi 16 kDa civarındadır.



Şekil 8.7 Sığır Pankreasından Saflaştırılan Fosfolipaz A₂ enziminin SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi. 1- Moleküler kütle standartları 2- Santrifüjat(S2) 3- PLA₂ örneği



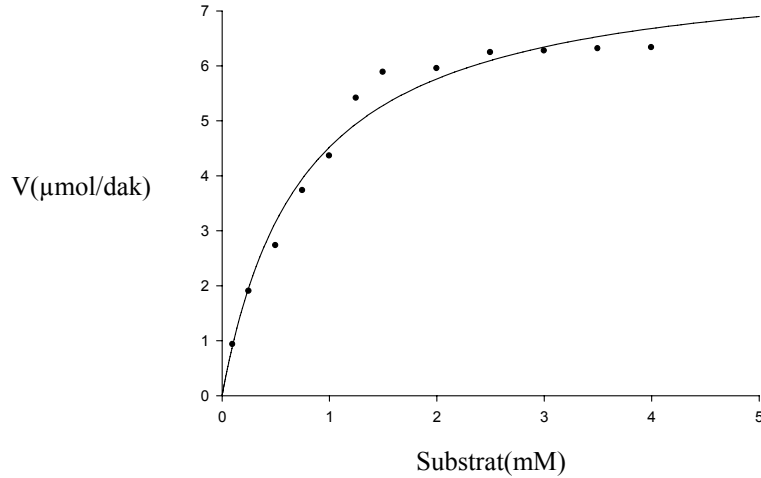
Şekil 8.8 SDS-PAGE Standart Grafiği.

8.4 Enzimin Karakterizasyonu

8.4.1 PLA₂ Aktivitesine Substrat Konsantrasyon Etkisinin İncelenmesi

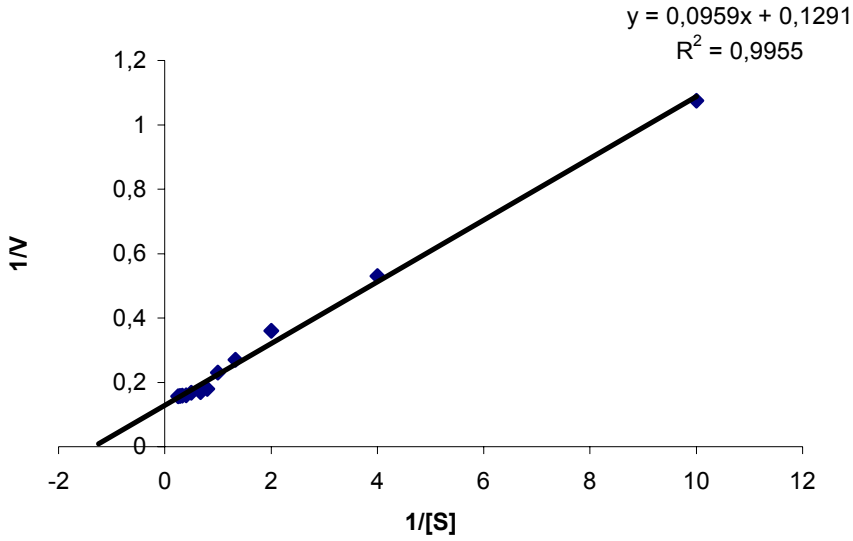
Deneyin bu bölümünde, saflaştırılan enzim preparatı ile substrat olarak fosfatidilkolin için K_m ve V_{max} kinetik parametreleri bölüm 7.7.1'de açıklandığı şekilde belirlendi. Veriler 0,1-4 mM substrat konsantrasyon aralığında değiştirilerek Lineweaver-Burk diyagramından hesaplandı.

PLA₂ aktivitesine fosfatidilkolin konsantrasyonunun etkisi Şekil 8.9'da gösterildi. Şekil 8.9'da görüldüğü gibi Fosfolipaz A₂ için maksimum fosfatidilkolin konsantrasyonu 2,5 mM olarak bulundu.



Şekil 8.9 PLA₂ aktivitesine substrat konsantrasyonunun etkisi.

Fosfatidilkolinle çizilen Lineweaver-Burk diyagramı Şekil 8.10'da verildi. Diyagramdan yapılan hesaplama göre doymuş substrat konsantrasyonunun 2,5 mM, K_m : 0,74 mM ve V_{max} : 7,75 $\mu\text{mol/dak}$ olarak hesaplandı.

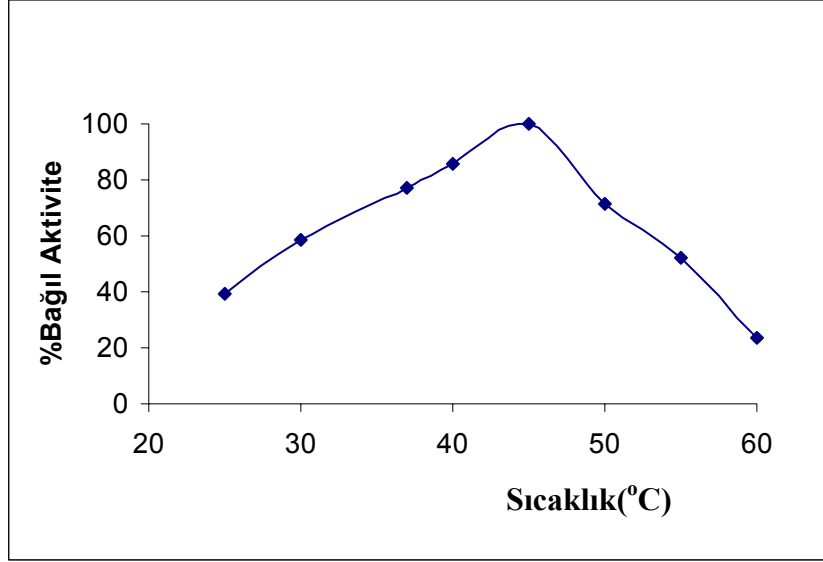


Şekil 8.10 Sığır pankreatik PLA_2 enziminin Lineweaver-Burk diyagramı (Substrat: fosfatidilkolin).

8.4.2 PLA_2 Aktivitesine Sıcaklık Etkisi

PLA_2 aktivitesine sıcaklığın etkisi Şekil 8.11'de gösterildi. Şekil'de de gösterildiği gibi enzim optimum sıcaklığı 45°C olarak bulundu. Bu noktadan sonra denatürasyon etkisi ile hızlı bir düşüş göstermektedir. Literatür verileri ile karşılaştırıldığında, bu değer pankreatik PLA_2 'lerle uyumluluk göstermektedir. Ancak farklı doku ve kaynaklardan elde edilen PLA_2 'lerin (yılan zehiri, eklem sıvıları, dalak, karaciğer gibi) optimum sıcaklıklarının $40\text{-}65^\circ\text{C}$ aralığında değiştiği

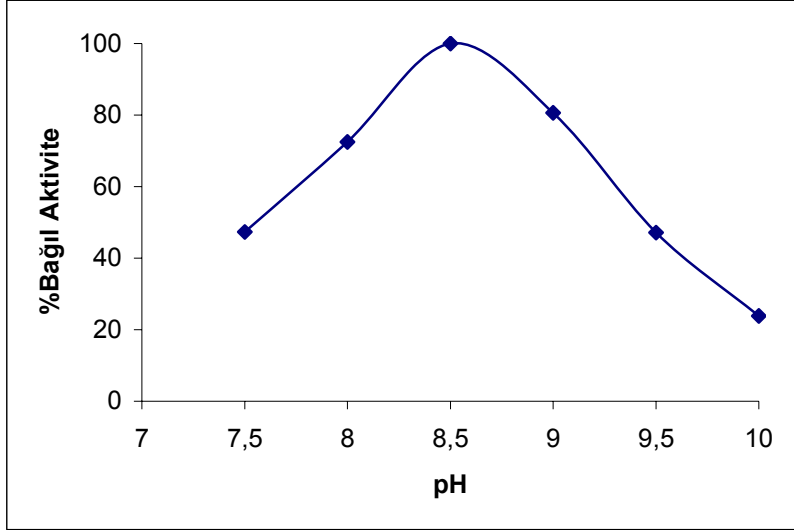
rapor edilmiştir(Reynold *et al.*, 1991; Kaiser, 1999; Kishimura *et al.*, 1999).



Şekil 8.11 PLA₂ aktivitesine sıcaklığın etkisi.

8.4.3 PLA₂ Aktivitesine pH Etkisi

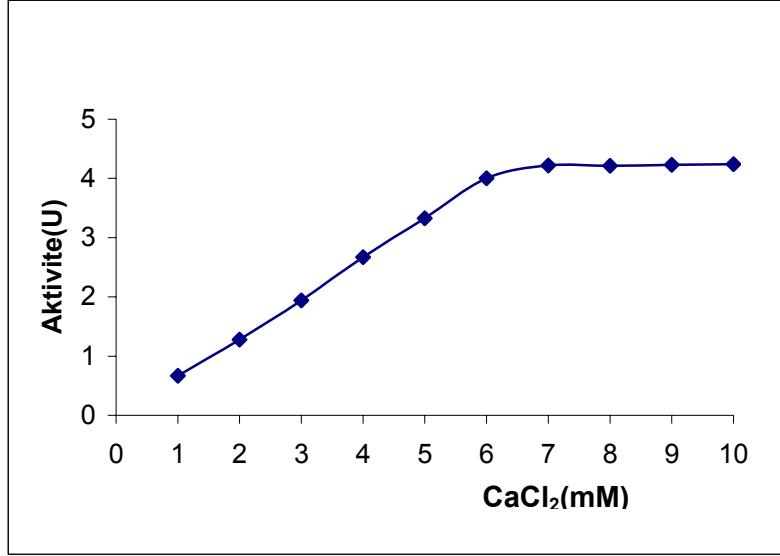
PLA₂ aktivitesine pH etkisi Şekil 8.12'de gösterildi ve optimum pH 8,5 olarak bulundu. Literatür verilerine bakıldığında, diğer pankreatik PLA₂'lerin pH 8-9 aralığında optimuma sahip oldukları ve bu sonuçlarla da benzer olduğu görülmektedir. Ancak farklı dokulardan elde edilen enzim preparatlarının pH 7-10 aralığında optimum pH özelliğine sahip olduğu rapor edilmiştir(Kishimura *et al.*, 1999; Stahl *et al.*, 1998, Reynold *et al.*, 1991, Bennett *et al.*, 1990).



Şekil 8.12 PLA₂ aktivitesine pH etkisi.

8.4.4 PLA₂ Aktivitesine CaCl₂ Konsantrasyonu Etkisi

Sığır pankreatik PLA₂ enzimi Ca²⁺-bağımlı bir enzimdir. Ca²⁺ iyon konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi bölüm 7.7.4'de anlatıldığı gibi incelendi ve PLA₂ aktivitesine CaCl₂ konsantrasyonunun etkisi Şekil 8.13'de verildi. Şekilde görüldüğü gibi enzim 1 mM'da aktive olmakta ve maksimum aktivite için 7 mM Ca²⁺'a ihtiyaç duymaktadır. Bu noktadan sonra aktiviteler sabit kalmaktadır. Literatür verilerine bakıldığında, kaynağına bağlı olarak maksimum aktivitesi için 10 mM'a kadar çıkan Ca²⁺ konsantrasyonlarına da ihtiyaç duyduğu belirtilmektedir(Six *et al.*, 2000; Kishimura *et al.*, 1999; Kaiser, 1999).

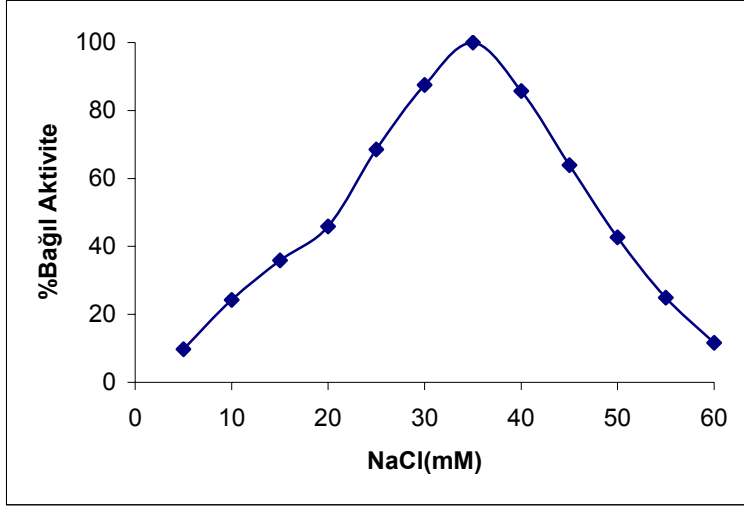


Şekil 8.13 PLA₂ aktivitesine CaCl₂ konsantrasyonunun etkisi.

8.4.5 PLA₂ Aktivitesine İyon Şiddetinin Etkisi

Genellikle tuz konsantrasyonunun artması enzimatik aktiviteyi olumsuz yönde etkilemektedir. PLA₂ aktivitesine iyon konsantrasyonunun etkisi bölüm 7.7.5’de anlatıldığı gibi incelendi.

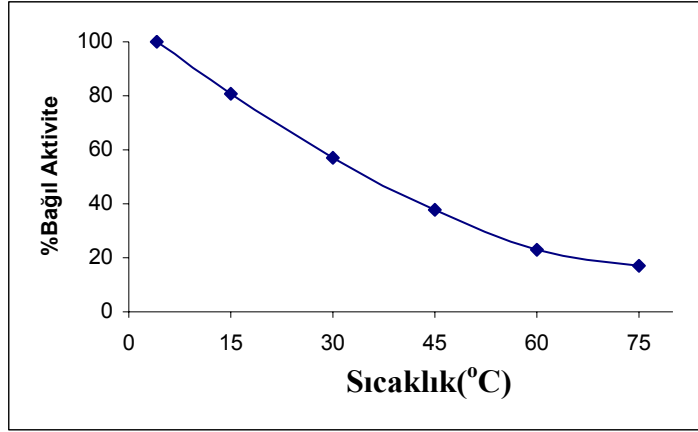
PLA₂ aktivitesine iyon konsantrasyonunun etkisi (NaCl) Şekil 8.14’de gösterildi. Şekilde görüldüğü gibi enzim 35 mM NaCl konsantrasyonunda maksimum aktivite gösterdi ve bu konsantrasyondan sonra enzim aktif merkezi ile substrat etkileşimini sterik olarak engellemesi, ayrıca enzim-kalsiyum-substrat ilişkisini etkilemesi nedeniyle aktiviteyi giderek azalttığı düşünülmektedir.



Şekil 8.14 PLA₂ aktivitesine iyon konsantrasyonunun etkisi(NaCl).

8.4.6 PLA₂'nin Termal Stabilitelerinin İncelenmesi

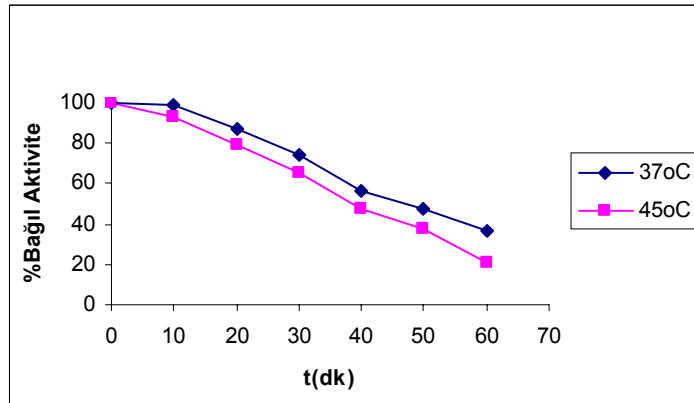
Sığır pankreatik PLA₂'nin termal stabilitesi bölüm 7.7.6'da olduğu gibi belirlendi. Şekil 8.15'de de görüldüğü gibi enzim 0-75 °C aralığında oldukça kararlı olduğu görülmektedir. 75°C'de ki bu noktada bağıl aktivitenin % 20 civarında olması, enzimin yüksek sıcaklıklarda bile stabil olduğunu göstermektedir. Ancak özellikle yılan zehiri PLA₂ türlerinin daha termostabil oldukları ve 75°C civarında bile % 50 oranında aktivite gösterebildikleri de belirtilmektedir(Kaiser, 1999; Six *et al.*, 2000). Bu durum, disülfid bağlarının çokluğu nedeniyle enzimin üç boyutlu yapısının daha kararlı olmasından kaynaklandığı düşünülebilir.



Şekil 8.15 PLA₂'nin termal stabilitesi.

PLA₂ aktivitesinin zamana bağımlı termal stabilitesi de bölüm 7.7.6'da olduğu gibi incelendi. Alınan sıcaklık değerleri, vücut sıcaklığı ve enzimin belirlenen optimum sıcaklığı baz alınarak seçildi. Enzimler optimum sıcaklıkları yanında termal stabilite ve bu sıcaklıklarda uzun süre aktivite gösterebilmeleri açısından enzimatik proseslerde önemlidir.

Enzim için seçilen her iki sıcaklıkta, optimum deney koşullarında bir saat sonunda yaklaşık % 20-30 civarında aktivite gösterebildiği belirlendi(Şekil 8.16).



Şekil 8.16 PLA₂'nin termal stabilitesinin zamana bağımlı değişimi.

8.4.7 Bazı Divalent Katyonların ve EDTA'nın PLA₂ Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

Bölüm 7.7.7' de açıklandığı şekilde bazı divalent iyonların (10 mM) ve EDTA'nın belirli konsantrasyonda (10 mM) enzim aktivitesi üzerine etkisi incelendi. Çizelge 8.6'da sığır pankreasından elde edilen PLA₂ enzimi için metal iyonlarının aktivite üzerine etkisi ayrı ayrı verildi.

Çizelge 8.6 Bazı divalent katyonların ve EDTA'nın PLA₂ aktivitesi üzerine etkisi.

Efektör Adı	10 mM
Kontrol	100
CaCl ₂ .2H ₂ O	459
CoCl ₂ .6H ₂ O	289
BaCl ₂ .2H ₂ O	174
MgCl ₂ .6H ₂ O	111
HgCl ₂	17
EDTA	33

Çizelge 8.6'dan da görüldüğü gibi kontrole kıyasla Hg²⁺ ve EDTA ile güçlü inhibisyon gösterirken Co²⁺, Mg²⁺, ve Ba²⁺ iyonlarını takiben Ca²⁺ iyonlarının ilavesi PLA₂ aktivitesini artırmaktadır. Hg²⁺'nin inhibisyon etkisi göstermesi, Cys'nin SH gruplarını bloke etmesinden kaynaklanmaktadır. EDTA'nın ise Ca²⁺ ile şelat özelliği nedeniyle inhibisyon gösterdiği düşünülmektedir. Literatürlerde Ca²⁺ iyonlarının PLA₂ aktivitesi için gerekli bir iyon olduğu ve daha düşük konsantrasyonlarda bile aktive olduğu belirtilmiştir. Çizelge 8.6'da verilen sonuçlar, diğer literatür verileri ile benzerlik göstermektedir(Kishimura *et al.*, 1999).

8.5 Afinite Reçinesinin Tekrar Kullanılabilirliği

Daha önceki bölümlerde de bahsedildiği gibi afinite ultrafiltrasyonun en önemli avantajı, reçinenin tekrar kullanılabilirliği ve otomasyona uygulanabilir olmasıdır. Bu bilgi dahilinde saflaştırma için kullanılan kitosan-glutaraldehid-fosfatidiletanolamin reçinesinin aynı miktarlar göz önünde bulundurularak tekrar kullanımı 5 tekrar ile belirlendi ve saflaştırma sonuçları Çizelge 8.7’de verildi. Reçine her kullanımdan önce 2 M NaCl ile yıkandıktan sonra çalışma tamponu ile dengeye getirildikten sonra kullanıldı.

Çizelge 8.7 Reçinenin tekrar kullanılabilirliği.

Tekrar Kullanım Sayısı	Aktivite (U)	Protein (mg)	Spesifik akt. (U/mg)	A.Verim* (%)	Saflaştırma Katı
Ham ekstrakt ilave(5mg)	0,95	5	0,19	100	1
1.	0,89	0,059	15,04	93,2	77,5
2.	0,83	0,075	11,09	87,8	57,2
3.	0,75	0,079	9,49	78,8	40,6
4.	0,71	0,109	6,50	75,2	38,8
5.	0,43	0,120	3,57	44,9	23,1

* Verimler, aktivite değerleri(U) temel alınarak hesaplanmıştır.

Afinite reçinesinin kullanım sayısı arttıkça verim ve saflaştırma katında giderek bir azalma görülmektedir. Özellikle 3. ve 4. kullanımdan sonra önemli miktarda aktivite ve saflaştırma katı düşüşü görülmektedir. Bu durum, reçinenin tekrarlanan her kullanım sonrası sentezlenen inhibitörün bozularak ligand kaybı nedeniyle non-spesifik bağlanmaların gerçekleşmesi ve dolayısıyla spesifik aktivitenin düşmesine(artan protein miktarı) bağlanmaktadır.

8.6 Fosfolipaz A₂ (EC 3.1.1.4) Enziminin Sığır Pankreasından Saflaştırılmasının Genel Olarak Değerlendirilmesi

Fosfolipaz A₂ (EC 3.1.1.4) enzimi ile ilgili izolasyon, saflaştırma ve karakterizasyon çalışmaları 1870'li yıllardan bu yana devam etmektedir(Bokay, 1877/78). Bir çok farklı tür kaynaktan; mikrobiyal (De Silva *et al.*, 1986), bitkisel (Stahl *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1999), yılan ve böcek zehiri (Fairbairn, 1945; Reynolds *et al.*, 1991; Dennis, 1991; Dudler *et al.*, 1992), deniz yıldızı ve balık türünde(Kishimura and Hayashi 1999; Aaen *et al.*, 1995), insan ve hayvan dokularından(Van Wezel *et al.*, 1975; Eskola *et al.*, 1983; Tojo *et al.*, 1983; Bennett *et al.*, 1990; Van Den Bosch *et al.*, 1991; Kramer *et al.*, 1991; Tojo *et al.*, 1991) bilinen genel izolasyon ve saflaştırma teknikleri kullanılarak izole edilip saflaştırılan enzimin, karakterizasyonu yapılarak uygulamaya konulmuştur. Daha önceki bölümlerde de ayrıntılı olarak izah edildiği üzere enzim, biyokimyası açısından önemli bir yere sahiptir. Metabolizma açısından böyle önemli bir enzim, farklı afinite kolonlarının ardı sıra kullanıldığı afinite kromatografisi(Dennis, 1991; Reynolds *et al.*, 1991; Van Den Bosch *et al.*, 1991) ve HPLC(Dudler *et al.*, 1992; Tojo *et al.*, 1991) teknikleri ile saflaştırılmış, ancak bu tez çalışmasında gerçekleştirilen afinite ultrafiltrasyon tekniği ile saflaştırma çalışmasının olmaması dikkate değer bir durumdur.

Bu çalışmada sığır pankreası Fosfolipaz A₂(PLA₂) enzimi farklı matriks-PLA₂ inhibitörü ve matriks-PLA₂ substratı ile hazırlanan afinite reçineleri hazırlanarak saflaştırılması amaçlandı. Sığır pankreası; gerek enzim kaynağı ve kolay bulunabilir olması, gerekse enzim miktarı açısından önemli bir materyaldir. Enzim bu kaynaktan oldukça iyi ve yüksek kararlı bir yapıdadır. Saflaştırmada taşıyıcı matriks olarak aljinat

ve kitosan, afinite ligandı olarak tarafımızdan sentezlenen enzim inhibitörü (L-2-Oleilamino-serin-3-fosfatidilkolin) ve substratının (fosfatidiletanolamin) oluşturduğu üç farklı afinite makroligandı hazırlandı. En iyi sonucu 69 saflaştırma katı ile kitosan-glutaraldehid-fosfatidil etanolamin afinite matriksi verdi. Bu makroligand için protein bağlama kapasitesi ve bağlanma süresi de karakterize edildi. Bağlama kapasitesi üç farklı protein miktarıyla(5-10-25 mg) denendi. En iyi sonuca % 82,3'lük aktivite verimi ile 5mg protein konsantrasyonunda ulaşıldı(Çizelge 8.3). Bağlama süresi 2 saatten 4 saate çıkarılarak 5 mg protein konsantrasyonu için denendi. % 89,7'lik aktivite verimi ile yine 5 mg protein miktarında en iyi sonuca ulaşıldı(Çizelge 8.4). Daha sonra 5 mg protein miktarı 4 saat bağlanma süresi ile skala büyütme işlemine geçildi(100mg/g kitosan). Skala büyütme işleminde 68 katlık bir saflaştırmadan sonra bu örnek jele uygulandı. Ancak 45-60 kDa civarında üç ayrı bant gözlemlendi ve bu örnek 30000 cut-off membrandan geçirilerek 79 kat saflaştırıldı. Bu adımdan sonra enzimin saflık testine geçildi. SDS-PAGE ile yapılan saflık testinde, enzim tek band olarak gözlemlendi(Şekil 8.7) ve $\log M_w - R_f$ standart grafiğinden(Şekil 8.8) enzimin molekül kütleinin 16kDa civarında olduğu belirlendi.

Bir enzimin aktivitesinin, enzim ve substrat konsantrasyonlarına bağımlı olduğu bilinmektedir. Aktiviteye etki eden diğer faktörler; sıcaklık, pH, iyon şiddeti, kimyasal etkiler(aktivasyon inhibisyon), kofaktörler ve inhibitörler olarak sıralanabilir.

PLA₂ aktivitesine fosfatidilkolin(substrat) konsantrasyonunun etkisi incelendi. Fosfolipaz A₂ için maksimum fosfatidilkolin konsantrasyonu 2,5 mM olarak bulundu. Fosfatidilkolinle çizilen Lineweaver-Burk diyagramından(Şekil 8.10) yapılan hesaplama göre Km: 0,74 mM, Vmax: 7,75 $\mu\text{mol/dak}$ olarak hesaplandı.

Enzim optimum sıcaklığı için 25-65°C aralığında çalışıldı ve 45°C olarak bulundu(Şekil 8.11). Bu noktadan sonra denatürasyon etkisi ile hızlı bir düşüş göstermektedir. Literatür verileri ile karşılaştırıldığında, bu değer pankreatik PLA₂'lerle uyumluluk göstermektedir. Ancak farklı doku ve kaynaklardan elde edilen PLA₂'lerin optimum sıcaklıklarının 40-65°C aralığında değiştiği rapor edilmiştir(Reynold *et al.*, 1991). Enzimler optimum sıcaklıkları yanında termal stabilite ve bu sıcaklıklarda uzun süre aktivite gösterebilmeleri açısından enzimatik proseslerde önemlidir. Pankreatik PLA₂, içerdiği disülfid bağları nedeniyle(6-8 arasında) termal stabilite açısından kararlılık göstermektedir. Bu nedenle sığır pankreatik PLA₂'nin termal stabilitesi 4-70°C aralığında, zamana bağımlı stabilitesi 37 ve 45°C'de denendi. Disülfid bağlarının stabiliteye katkısı nedeniyle enzim 70°C'de aktivitesini %20 civarında koruyabilmektedir ancak çok iyi bir sonuç olarak görülmemektedir(Şekil 8.15). Bu deneme zamana bağımlı olarak yapıldığında ise bir saat boyunca her iki sıcaklıkta aktivitesini %20-30 arasında koruyabilmektedir(Şekil 8.16). PLA₂ aktivitesine pH etkisi incelendi ve optimum pH 8,5 olarak bulundu(Şekil 8.12). Literatür verilerine bakıldığında, diğer pankreatik PLA₂'lerin pH 8-9 aralığında optimuma sahip oldukları ve bu sonuçlarla da benzer olduğu görülmektedir. Farklı kaynaklardan PLA₂'lerin ise pH 7-10 aralığında optimum gösterdikleri bilinmektedir(Stahl *et al.*, 1998, Reynold *et al.*, 1991).

Pankreatik PLA₂'nin aktivite için Ca²⁺ iyonlarına 10 mM'lık konsantrasyona kadar ihtiyaç duyduğu bilinmektedir(Six *et al.*, 2000). Bu doğrultuda, saflaştırılan sığır pankreatik PLA₂'nin Ca²⁺ konsantrasyon etkisi 1-10 mM aralığında denendi ve maksimum aktivite için 7 mM Ca²⁺'a gereksinim duyduğu belirlendi(Şekil 8.13). PLA₂ aktivitesine iyon konsantrasyonunun etkisi(NaCl) de incelendi. Şekil 8.14'de görüldüğü

gibi enzim 35 mM NaCl konsantrasyonunda maksimum aktivite gösterdi ve bu konsantrasyondan sonra enzim aktif merkezi ile substrat etkileşimini sterik olarak engellemesi, ayrıca enzim-kalsiyum-substrat ilişkisini etkilemesi nedeniyle aktiviteyi giderek azalttığı düşünülmektedir.

Birçok enzim aktivite gösterebilmesi için kofaktöre ihtiyaç duymaktadır. Sığır pankreatik PLA₂'nin Ca²⁺ iyonlarına ihtiyaç duyduğunu daha önce belirtmiştik. Bu iyon yanında diğer bazı divalent katyonların(Co²⁺, Ba²⁺, Mg²⁺, Hg²⁺) ve EDTA'nın aktivite üzerine etkisinde incelendi. Kontrole kıyasla Co²⁺, Ba²⁺ ve Mg²⁺'un Ca²⁺ gibi enzim aktif merkez ile substrat arasındaki iyonik etkileşimin sağlanması açısından aktivatör görevi görebildikleri belirlenmiştir. Ancak Hg²⁺'nın inhibisyon etkisi göstermesi, Cys'nin SH gruplarını bloke etmesinden kaynaklanmaktadır. EDTA'nın ise Ca²⁺ ile şelat özelliği nedeniyle inhibisyon gösterdiği düşünülmektedir.

Sığır pankreasından PLA₂'nin saflaştırılmasında afinite ligandı olarak kullanılan ve tarafımızdan sentezlenen L-2-Oleilamino-serin-3-fosfatidilkolin(V) türevleri ve farklı substrat analoglarının PLA₂ aktivitesi üzerine inhibitör etkisi bazı çalışmalarla belirtilmiştir(Dijkman *et al.*, 1994; Bartel *et al.*, 2000). Tarafımızdan orijinal olarak sentezlenen inhibitörün enzim aktivitesi üzerine etkisini belirlemek amacıyla artan inhibitör konsantrasyonlarında(0,1-0,5-1 mM) aktiviteler belirlendi ve aktivitenin giderek azaldığı gözlemlendi(Şekil 8.5). Grafiğe göre inhibitörün IC₅₀ değeri 1,7 mM olarak hesaplandı. Bu inhibisyonun tipi 0,5 mM inhibitör konsantrasyonunda belirlendi. Şekil 8.6'da çizilen diyagramdan kinetik sabitler(K_m, V_{max}, K_m^I, V_{max}^I) hesaplandı. Değerler Çizelge 8.1'de verildi. Çizelgede görüldüğü gibi değerler, yarışmalı inhibisyonun karakteristik Lineweaver-Burk diyagramını desteklemektedir.

Afinite ultrafiltrasyonun en önemli avantajı, reçinenin tekrar kullanılabilirliği ve otomasyona uygulanabilir olmasıdır. Saflaştırma için kullanılan kitosan-glutaraldehid-fosfatidiletanolamin reçinesinin aynı miktarlar göz önünde bulundurularak tekrar kullanımı 5 tekrar ile belirlendi. Çizelge 8.7’de görüldüğü gibi her tekrarda verim ve saflaştırma katındaki azalma, reçinenin tekrarlanan her kullanım sonrası, sentezlenen makroliganda ki inhibitörün bozularak ligand kaybı nedeniyle non-spesifik bağlanmaların gerçekleşmesi ve dolayısıyla spesifik aktivitenin düşmesine(artan protein miktarı) bağlanmaktadır.

Elde edilen sonuçlara göre bu teknikle yapılan saflaştırma çalışmalarının literatüre olumlu yönde katkısı olacağı düşünülmektedir. Geleceğe dönük PLA₂ saflaştırılması ve uygulamaları konusunda bir çok nokta göze çarpmaktadır. Bunlardan birkaçı; enzimin farklı kaynaklardan ve farklı afinite reçineleri elde edilerek tek adımlı ve yüksek verimde enzim preparatlarının hazırlanması, enzimoterapi ve enzim immobilizasyon çalışmalarında kullanılması açısından önemlidir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Aaen, B., Jessen, F., Jensen, B.,** 1995, Partial purification and characterization of a cellular acidic phospholipase A₂ from cod (*Gadus morhua*) muscle, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 110B: 547-554.
- Abe, T., Sakamoto, K., Kamohara, H., et al.,** 1997, Group II phospholipase A₂ is increased in peritoneal and pleural effusions in patients with various types of cancer, *International Journal of Cancer*, 74: 245-251.
- Ackermann, E.J., Kempner, E.S., Dennis, E.A.,** 1994, Ca(2+)-independent cytosolic phospholipase A₂ from macrophage-like P388D1 cells. Isolation and characterization, *Journal of Biological Chemistry*, 269: 9227-9233.
- Ackermann, E.J., Dennis, E.A.,** 1995, Mammalian calcium-independent phospholipase A₂, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1259:125-136.
- Ackermann, E.J., Conde-Frieboes, K., Dennis, E.A.,** 1995, Inhibition of Macrophage Ca(2+)-independent Phospholipase A₂ by Bromoenol Lactone and Trifluoromethyl Ketones, *Journal of Biological Chemistry*, 270: 445-450.
- Akesson, B.,** 1975, Work in Progress. Occurrence of phospholipase A₁ and A₂ in human decidua, *Prostaglandins*, 9: 667-673.
- Albers, M., Meurer, H., Marki, F., et al.,** 1993, Phospholipase A₂ activity in serum of neuroplastic psychiatric in patients, *Pharmacopsychiatry*, 26: 94-98.
- Alonso, F., Henson, P.M., Leslie, C.C.,** 1986, A cytosolic phospholipase in human neutrophils that hydrolyzes arachidonoyl-containing phosphatidylcholine, *Biochimica et Biophysica Acta*, 878:273-280.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Arita, H., Hanasaki, K., Nakano, T., et al.,** 1991, Novel proliferative effect of phospholipase A₂ in Swiss 3T3 cells via specific binding site, *Journal of Biological Chemistry*, 266: 19139-19141.
- Arni, R.K., Ward, R. J.,** 1996, Phospholipase A₂—a structural review, *Toxicon*, 34:827-841.
- Balboa, M.A., Balsinde, J., Winstead, M.V., et al.,** 1996, Novel Group V Phospholipase A₂ Involved in Arachidonic Acid Mobilization in Murine P388D₁ Macrophages, *Journal of Biological Chemistry*, 271: 32381-32384.
- Balboa, M.A., Balsinde, J., Jones, S.S., Dennis, E.A.,** 1997, Identity between the Ca²⁺-independent Phospholipase A₂ Enzymes from P388D₁ Macrophages and Chinese Hamster Ovary Cells, *Journal of Biological Chemistry*, 272:8576-8580.
- Balboa, M.A., Balsinde, J., Dennis, E.A.,** 1998, Involvement of Phosphatidate Phosphohydrolase in Arachidonic Acid Mobilization in Human Amnionic WISH Cells, *Journal of Biological Chemistry*, 273: 7684-7690.
- Balboa, M.A., Balsinde, J., Dennis, E.A.,** 2000, Phosphorylation of Cytosolic Group IV Phospholipase A₂ Is Necessary but Not Sufficient for Arachidonic Acid Release in P388D₁ Macrophages, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 267: 145-148.
- Balsinde, J., Bianco, I.D., Ackermann, E.J., et al.,** 1995, Inhibition of Calcium-Independent Phospholipase A₂ Prevents Arachidonic Acid Incorporation and Phospholipid Remodeling in P388D₁ Macrophages, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92: 8527-8531.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Balsinde, J., Dennis, E.A.,** 1996, Distinct Roles in Signal Transduction for Each of the Phospholipase A₂ Enzymes Present in P388D₁ Macrophages, *Journal of Biological Chemistry*, 271: 6758-6765.
- Balsinde, J., Dennis, E.A.,** 1997, Function and Inhibition of Intracellular Calcium-independent Phospholipase A₂, *Journal of Biological Chemistry*, 272: 16069-16072.
- Balsinde, J., Balboa, M.A., Dennis, E.A.,** 1997, Antisense Inhibition of Group VI Ca²⁺-independent Phospholipase A₂ Blocks Phospholipid Fatty Acid Remodeling in Murine P388D₁ Macrophages, *Journal of Biological Chemistry*, 272: 29317-29321.
- Balsinde, J., Balboa, M.A., Insel, P.A., Dennis, E.A.,** 1999, Regulation and Inhibition of phospholipase A₂, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 39:175-189.
- Balsinde, J., Balboa, M.A., Yedgar, S., Dennis, E.A.,** 2000, Group V Phospholipase A₂-mediated Oleic Acid Mobilization in Lipopolysaccharide-stimulated P388D₁ Macrophages, *Journal of Biological Chemistry*, 275: 4783-4786.
- Balsinde, J., Balboa, M.A., Li, W-H., et al.,** 2000, Cellular Regulation of Cytosolic Group IV Phospholipase A₂ by Phosphatidylinositol Bisphosphate Levels, *Journal of Immunology*, 164: 5398-5402.
- Barbour, S.E., Dennis, E.A.,** 1993, Antisense inhibition of group II phospholipase A₂ expression blocks the production of prostaglandin E₂ by P388D₁ cells, *Journal of Biological Chemistry*, 268: 21875-21882.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Bartel, M., Rattay, B., Nuhn, P.,** 2000, Synthesis of enantiomerically pure, *sn*-1 modified *sn*-2-deoxy-2-amido-glycero-3-phospholipids, *Chemistry and Physics of Lipids*, 107: 121-129.
- Bennett, C.F., McCarte, A., Crooke, S.T.,** 1990, Purification and characterization of a soluble phospholipase A₂ from guinea pig lung, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1047: 271-283.
- Bergers, M., Verhagen, D.R., Jongerius, M., et al.,** 1988, A unique phospholipase A₂ in human epidermis: its physiological function and its level in certain dermatoses, *Journal of Investigative Dermatology*, 90: 23-25.
- Bianco, I.D., Kelley, M.J., Crowl, R.M., Dennis, EA.,** 1995, Identification of two specific lysines responsible for the inhibition of phospholipase A₂ by manoalide, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1250: 197-203.
- Bingham III, C.O., Fijneman, R.J.A., Friend, D.S., et al.,** 1999, Low Molecular Weight Group IIA and Group V Phospholipase A₂ Enzymes Have Different Intracellular Locations in Mouse Bone Marrow-derived Mast Cells, *Journal of Biological Chemistry*, 274: 31476-31484.
- Bokay, A.,** 1877/78, Ueber die Verdaulichkeit des Nucleins und Lecithins, *Zeitschrift für Physiologische Chemie*, 1:157-164.
- Bomalaski, J.S., Clark, M.A., Zurier, R.B.,** 1986, Enhanced phospholipase activity in peripheral monocytes from patients with rheumatoid arthritis, *Arthritis & Rheumatism*, 29: 312-318.
- Bomalaski, J.S., Hirata, J.S., Clark, M.A.,** 1986, Aspirin inhibits phospholipase C, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 139: 115-121.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Bomalaski, J.S., Baker, D., Resurreccion, N.V., et al.,** 1989, Rheumatoid arthritis synovial fluid phospholipase A₂ activating protein (PLAP) stimulates human neutrophil degranulation and superoxide ion production, *Agents Actions*, 27: 425-427.
- Bomalaski, J.S., Clark, M.A.,** 1993, Phospholipase A₂ and arthritis, *Arthritis & Rheumatism*, 36: 190-198.
- Bonney, R.C., Franks, S.,** 1988, Hydrolysis of phosphatidylinositol by human endometrium: Modulating effects of steroids on arachidonic acid and 1,2-diacylglycerol release, *Journal of Endocrinology*, 117: 309-314.
- Bonventre, J.V., Huang, Z., Taheri, M.R., et al.,** 1997, Reduced fertility and postischaemic brain injury in mice deficient in cytosolic phospholipase A₂, *Nature*, 390:622-625.
- Botes, D.P., Viljoen, C.C.,** 1974, *Bitis gabonica* Venom. the amino acid sequence of phospholipase A, *Journal of Biological Chemistry*, 249: 3827-3835.
- Bradford, M.M.,** 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Breitbart, H., Rubinstein, S., Nass-Arden, T.,** 1985, The role of calcium and Ca-ATPase in maintaining motility in rat spermatozoa, *Journal of Biological Chemistry*, 260: 11548-11553.
- Breuer, R., Lossos, I.S., Or, R., et al.,** 1995, Abatement of bleomycin-induced pulmonary injury by cell-impermeable inhibitor of phospholipase A₂, *Life Sciences*, 27: PL237-PL240.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Capper, E.A., Marshall, L.A.,** 2001, Mammalian phospholipase A₂:mediators of inflammation, proliferation and apoptosis, *Progress in Lipid Research*, 40:167-197.
- Carman, G.M., Deems, R.A., Dennis, E.A.,** 1995, Lipid Signaling Enzymes and Surface Dilution Kinetics, *Journal of Biological Chemistry*, 270: 18711-18714.
- Carrico, C. J., Meakins, J. L., Marshall, J. C., et al.,** 1986, Multiple-organ-failure syndrome, *Archives of Surgery*, 121:196-208.
- Chen, J., Engle, S.J., Seilhamer, J.J., Tischfield, J.A.,** 1994, Cloning and recombinant expression of a novel human low molecular weight Ca(2+)-dependent phospholipase A₂, *Journal of Biological Chemistry*, 269:2365-2368.
- Chen, J., Engle, S.J., Seilhamer, J.J., Tischfield, J.A.,** 1994, Cloning and characterization of novel rat and mouse low molecular weight Ca(2+)-dependent phospholipase A₂s containing 16 cysteines, *Journal of Biological Chemistry*, 269: 23018-23024.
- Chen, S., Ding, Z., Wu, Z., et al.,** 1989, Phospholipase A₂ and its relationship with acute lung injury in acute pancreatitis in dog, *J Med Coll PLA*, 4:129-134.
- Chern, C.S., Lee, C.K., Tsai, Y.J.,** 1997, Dextran stabilized poly(methyl methacrylate) latex particles and their potential application for affinity purification of lectins, *Colloid and Polymer Science*, 275: 841-849.
- Chi, E.Y., Henderson, W.R., Klebanoff, S.J.,** 1982, Phospholipase A₂-induced rat mast cell secretion. Role of arachidonic acid metabolites, *Laboratory Investigation*, 47:597-599.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Choe, T. B., Masse, P., Verdier, A.,** 1986, Separation of trypsin from trypsin α -chymotrypsin mixture by affinity-ultrafiltration, *Biotechnology Letters*, 8: 163-168.
- Churcher, Y., Allan, D., Gomperts, B.D.,** 1990, Relationship between arachidonate generation and exocytosis in permeabilized mast cells, *Biochemical Journal*, 266:157-163.
- Cirino, G., Cicala, S., Sorrentino, L., et al.,** 1994, Recombinant secreted nonpancreatic phospholipase A₂ induces a synovitis-like inflammation in the rat air pouch, *The Journal of Rheumatology*, 21:824-829.
- Clark, J.D., Lin, L.L., Kriz, R.W.,** 1991, A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA₂ contains a Ca²⁺-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP, *Cell*, 65:1043-1051.
- Conde-Frieboes, K., Reynolds, L.J., Lio, Y.C., et al.,** 1996, Activated Ketones as Inhibitors of Intracellular Ca²⁺-Dependent and Ca²⁺-Independent Phospholipase A₂, *Journal of The American Chemical Society*, 118: 5519-5525.
- Costello, J., Franson, R.C., Landwehr, K., et al.,** 1990, Activity of phospholipase A₂ in plasma increases in uremia, *Clinical Chemistry*, 36:198-200.
- Cupillard, L., Koumanov, K., Mattei, M.G., et al.,** 1997, Cloning, Chromosomal Mapping, and Expression of a Novel Human Secretory Phospholipase A₂, *Journal of Biological Chemistry*, 272: 15745-15752.
- Dan, P., Dagan, A., Krinsky, M.,** 1998, Inhibition of Type I and Type II Phospholipase A₂ by Phosphatidyl-Ethanolamine Linked to Polymeric Carriers, *Biochemistry*, 37: 6199-6204.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Davidson, F.F., Dennis, E.A.**, 1990, Evolutionary relationships and implications for the regulation of phospholipase A₂ from snake venom to human secreted forms, *Journal of Molecular Evolution*, 31(3):228-238.
- Dawson, R.M.C., Hauser, H.**, 1967, On the mechanism of the stimulation by anionic amphipaths of lecithin hydrolysis by phospholipase B of *Penicillium notatum*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 137: 518-524.
- De Haas, G.H., Postema, N.M., Nieuwenhuizen, W et al.**, 1968, Purification and properties of phospholipase A from porcine pancreas, *Biochimica et Biophysica Acta*, 159:103-117.
- De Hass, G.H., Dijkman, R., Ransac, S., Verger, R.**, 1990, Competitive inhibition of lipolytic enzymes. IV. Structural details of acylamino phospholipid analogues important for the potent inhibitory effects on pancreatic phospholipase A₂, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1046: 249-257.
- De Silva, N.S., Quinn, P.A.**, 1986, Endogenous Activity Phospholipases A and C in *Ureaplasma urealyticum*, *Journal of Clinical Microbiology*, 23: 354-359.
- De Winter, J.M., Vianen, G.M., Van den Bosh, H.**, 1982, Purification of rat liver mitochondrial phospholipase A₂, *Biochimica et Biophysica Acta*, 712:332-341.
- Deka, N., Sun, G.Y., MacQuarrie, R.**, 1986, Purification and properties of acyl-CoA: 1-acyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine-O-acyltransferase from bovine brain microsomes, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 246: 554-563.
- Dennis, E.A.**, 1991, Phospholipases, *Methods in Enzymology*, 197:1-615.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Dennis, E.A.**, 1994, Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A₂, *Journal of Biological Chemistry*, 269: 13057-13060.
- Dennis, E.A.**, 1997, The growing phospholipase A₂ superfamily of signal transduction systems, *Trends in Biochemical Sciences*, 22:1-2.
- Derewenda Z.S., Ho, Y.S.**, 1999, PAF-acetylhydrolases, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1441:229-236.
- Dessen, A., Tang, J., Schmidt, H., et al.**, 1999, Crystal Structure of Human Cytosolic Phospholipase A₂ Reveals a Novel Topology and Catalytic Mechanism, *Cell*, 97:349-360.
- Dijkman, R., Cox, R., van den Berg, L., et al.**, 1994, Competitive inhibition of lipolytic enzymes. X. Further delineation of the active site of pancreatic phospholipase A₂ from pig, ox and horse by comparing the inhibitory power of a number of (R)-2-acylamino phospholipid analogues, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1212: 50-58.
- Dinella, C., Doria, M., Laus, M., Lanzarini, G.**, 1996, Reversible adsorption of endopectin-lyase to tailor-made core-shell microspheres prepared by dispersion polymerization, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 23: 133-140.
- Dudler, T., Chen, W.Q., Wang, S., et al.**, 1992, High-level expression in *Escherichia coli* and rapid purification of enzymatically active honey bee venom phospholipase A₂, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1165: 201-210.
- Dufton, M.J., Hider, R.C.**, 1983, Classification of phospholipases A₂ according to sequence. Evolutionary and pharmacological implications, *European Journal of Biochemistry*, 137:545-551.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Dutilh, C.K., van Doren, P.J., Verheul, F.E.A.M., et al., 1975,** Isolation and properties of prophospholipase A₂ from ox and sheep pancreas, *European Journal of Biochemistry*, 53:91-97.
- Edelson, J.D., Vadas, P., Viallar, J., et al., 1991,** Acute lung injury induced by phospholipase A₂: structural and functional changes, *American Review of Respiratory Disease*, 143:1102-1109.
- Edgar, A.D., Strosznajder J., Horrocks, L.A., 1982,** Activation of ethanolamine phospholipase A₂ in brain during ischemia, *Journal of Neurochemistry*, 39: 1111-1116.
- Elsbach, P., Weiss, J., 1988,** Phagocytosis of bacteria and phospholipid degradation, *Biochimica et Biophysica Acta*, 947:29-52.
- Endo, S., Inada, K., Yamashita H., et al., 1994,** Platelet-activating factor (PAF) acetylhydrolase activity, type II phospholipase A₂ and cytokine levels in patients with sepsis, *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*, 83:289-295.
- Erin, A.N., Tyurin, V.A., Brusivanik, V.I., et al., 1985,** Changes in the physicochemical parameters of the synaptosomal membranes under the action of phospholipase A₂, *Biochemistry*, 50: 431-436.
- Eskola, J.U., Nevalainen, T.J., Aho, H.J., 1983,** Purification and characterization of human pancreatic phospholipase A₂, *Clinical Chemistry*, 29:1772-1776.
- Evenberg, A., Meyer, H., Verheij, H.M., et al., 1977,** Isolation and properties of phospholipase A₂ from horse pancreas and horse pancreatic juice, *Biochimica et Biophysica Acta*, 491:265-274.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Fabris, C., Basso, D., Panozzo, M.P., et al.,** 1992, Urinary phospholipase A₂ excretion in chronic pancreatic diseases, *International Journal of Pancreatology*, 11:178-184.
- Fairbairn, D.,** 1945, The phospholipase of the venom of the cottonmouth moccasin (*agkistrodon piscivorus l*), *Journal of Biological Chemistry*, 157:633-644.
- Filgueiras, O.M.O., Possmayer, F.,** 1987, Characterization of phospholipase A₂ from rabbit lung microsomes, *Lipids*, 22:731-735.
- Fleer, E.A., Verheij, H.M., De Haas, G.H.,** 1978, The primary structure of bovine pancreatic phospholipase A₂, *European Journal of Biochemistry*, 82: 261-269.
- Ford, D.A., Hazen, S.L., Saffitz, J.E., et al.,** 1991, The rapid and reversible activation of a calcium-independent plasmalogen-selective phospholipase A₂ during myocardial lysophospholipase-transacylase, *Journal of Clinical Investigation*, 88: 331-335.
- Forst, S., Weiss, J., Elsbach, P., et al.,** 1986, Structural and functional properties of a phospholipase A₂ purified from an inflammatory exudate, *Biochemistry*, 25:8381-8385.
- Forster, S., Ilderton, E., Norris, J.F.B., et al.,** 1985, Characterization and activity of phospholipase A₂ in normal human epidermis and in lesion-free epidermis of patients with psoriasis or eczema, *British Journal of Dermatology*, 112: 135-147.
- Fujii, S., Unezaki, S., Okumura, T., et al.,** 1994, Asparagine-Linked Carbohydrate of *Penicillium notatum* Phospholipase B, *Journal of Biochemistry*, 116: 204-208.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Fujishima, H., Sanchez Mejia, R.O., Bingham III, C.O., et al.,** 1999, Cytosolic phospholipase A₂ is essential for both the immediate and the delayed phases of eicosanoid generation in mouse bone marrow-derived mast cells, *The Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 96: 4803-4807.
- Funakoshi, A., Yamada, Y., Ito, T., et al.,** 1991, Clinical usefulness of serum phospholipase A₂ determinations in patients with pancreatic diseases, *Pancreas*, 6:588-594.
- Galaev, I.Y.,** 1999, New methods of protein purification. Affinity ultrafiltration, *Biochemistry(Moscow)*, 64: 849-856.
- Garbers, D.L.,** 1989, Molecular Basis of Fertilization, *Annual Reviews of Biochemistry*, 58: 719-742.
- Garcia-Gil M., Siraganian, R.P.,** 1986, Phospholipase A₂ stimulation during cell secretion in rat basophilic leukemia cells, *The Journal of Immunology*, 136: 259-263.
- Gaudet, R.J., Alam, I., Levine, L.,** 1980, Accumulation of cyclooxygenase products of arachidonic acid metabolism in gerbil brain during reperfusion after bilateral common carotid artery occlusion, *Journal of Neurochemistry*, 35: 653-658.
- Gebben, B., van Houwelingen, G.D.B., Zhang, W., et al.,** 1994, Protein separation using affinity binding 1. Polystyrene core-shell latex as ligand carrier, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 3: 75-84.
- Gelb, M.H., Min, J.H., Jain, M.K.,** 2000, Do membrane bound enzymes access their substrates from the membrane or aqueous phase: Interfacial versus non-interfacial enzymes, *Biochimica et Biophysica Acta* ,1488:20-27.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Gijon, M.A., Spencer, D.M., Kaiser, A.L., Leslie, C.C.,** 1999, Role of Phosphorylation Sites and the C2 Domain in Regulation of Cytosolic Phospholipase A₂, *Journal of Cell Biology*, 145: 1219-1232.
- Ginsburg I, Yedgar S, Varani J.,** 1997, Diethyldithiocarbamate and nitric oxide synergize with oxidants and with membrane damaging agents to injure mammalian cells, *Free Radical Research*, 27: 143-164.
- Goppelt-Struebe, M., Kvas U., Resch, K.,** 1986, Phospholipase A₂ activity in T-lymphocytes, *FEBS Letters*, 202:45-48.
- Grataroli, R., Dijkman, R., Dutilh, C.E., et al.,** 1982, Studies on phospholipase A₂ and its enzyme from human pancreatic juice. Catalytic properties and sequence of the N-terminal region, *European Journal of Biochemistry*, 122:111-117.
- Gresham, A., Masferrer, J., Chen, X., et al.,** 1996, Increased synthesis of high-molecular-weight cPLA₂ mediates early UV-induced PGE₂ in human skin, *American Journal of Physiology*, 270: 1037-1050.
- Gronich, J.H., Bonventre, J.V., Nemenoff, R.A.,** 1988, Identification and characterization of a hormonally regulated form of phospholipase A₂ in rat renal mesangial cells, *Journal of Biological Chemistry*, 263:16645-16651.
- Hackeng, T.M., Mounier, C.M., Bon, C., et al.,** 1997, Total chemical synthesis of enzymatically active human type II secretory phospholipase A₂, *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, 94:7845-7850.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Hanasaki, K., Ono, T., Saiga, A., et al.,** 1999, Purified Group X Secretory Phospholipase A₂ Induced Prominent Release of Arachidonic Acid from Human Myeloid Leukemia Cells, *Journal of Biological Chemistry*, 274: 34203-34211.
- Hara, S., Kudo, I., Matsuta, K., et al.,** 1988, Amino Acid Composition and NH₂-Terminal Amino Acid Sequence of Human Phospholipase A₂ Purified from Rheumatoid Synovial Fluid, *The Journal of Biochemistry*, 104: 326-328.
- Hara, S., Imai, Y., Murakami, M., et al.,** 1993, Dynamics and Participation of Type II Phospholipase A₂ in Rat Zymosan-Induced Pleurisy, *The Journal of Biochemistry*, 114: 509-512.
- Hattori, M., Adachi, H., Aoki, J., et al.,** 1995, Cloning and Expression of a cDNA Encoding the β -Subunit (30-kDa Subunit) of Bovine Brain Platelet-activating Factor Acetylhydrolase, *Journal of Biological Chemistry*, 270: 31345-31352.
- Hattori, K., Adachi, H., Matsuzawa, A., et al.,** 1996, cDNA Cloning and Expression of Intracellular Platelet-activating Factor (PAF) Acetylhydrolase II. Its homology with plasma paf acetylhydrolase, *Journal of Biological Chemistry*, 271: 33032-33038.
- Hayakawa, M., Kudo, I., Tomita, M., Inoue, K.,** 1988, Purification and Characterization of Membrane-Bound Phospholipase A₂ from Rat Platelets, *The Journal of Biochemistry*, 103: 263-266.
- Hazen, S.L., Ford, D.A., Gross, R.W.,** 1991, Activation of a membrane-associated phospholipase A₂ during rabbit myocardial ischemia which is highly selective for plasmalogen substrate, *Journal of Biological Chemistry*, 266: 5629-5633.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Heller, A., Koch, T., Schmeck, J., von Ackern, K.,** 1998, Lipid mediators in inflammatory disorders, *Drugs*, 55: 487-496.
- Herak, D.C., Merrill, E.W.,** 1989, Affinity cross-flow filtration: experimental and modeling work using the system of HSA and Cibacron blue-agarose, *Biotechnology Progress*, 5: 9-17.
- Hernandez, M., Burillo, S.L., Crespo, M.S., Nieto, M.L.,** 1998, Secretory Phospholipase A₂ Activates the Cascade of Mitogen-activated Protein Kinases and Cytosolic Phospholipase A₂ in the Human Astrocytoma Cell Line 1321N1, *Journal of Biological Chemistry*, 273: 606-612.
- Hirohara, J., Sugatani, J., Okumura, T.,** 1987, Properties and localization of phospholipase A₂ activity in rat stomach, *Biochimica et Biophysica Acta*, 919(3):231-238.
- Ho, Y.S., Swenson, L., Derewenda, U., et al.,** 1997, Brain acetylhydrolase that inactivates platelet-activating factor is a G-protein-like trimer, *Nature*, 385: 89-93.
- Hoffmann, G.E., Hiefinger, R., Steinbrueckner, B.,** 1989, Serum phospholipase A in hospitalized patients, *Clinica Chimica Acta*, 183:59-64.
- Huang, Z., Payette, P., Abdullah, K.,** 1996, Functional Identification of the Active-Site Nucleophile of the Human 85-kDa Cytosolic Phospholipase A₂, *Biochemistry*, 35: 3712-3721.
- Hubert, P., Dellacherie, E.,** 1980, Use of water-soluble biospecific polymers for the purification of proteins, *Journal Chromatography A*, 184: 325-333.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

Humphrey, D.M., McManus, L.M., Satouchi, K., et al., 1982, Vasoactive properties of acetylglyceryl ether phosphorylcholine and analog, *Laboratory Investigation*, 46:422-427.

Huwiler, A., Staudt, G., Kramer, R.M., Pfeilschifter, J., 1997, Cross-talk between secretoryphospholipase A₂ and cytosolic phospholipase A₂ in rat renal mesangial cells, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1348: 257-272.

Ishizaki, J., Suzuki, N., Higashino, K., et al., 1999, Cloning and Characterization of Novel Mouse and Human Secretory Phospholipase A₂s, *Journal of Biological Chemistry*, 274: 24973-24979.

Jones, C., Patel, A., Griffin, S., et al., 1995, Current trends in molecular recognition and bioseparation, *Journal of Chromatography A*, 707: 3-22.

Jouzeau, J.Y., Terlain, B., Abid. A., et al., 1997, Cyclooxygenase isoenzymes. How recent findings affect thinking about nonsteroidal anti-inflammatory drugs, *Drugs*, 53:563-582.

Kaiser, E., 1999, Phospholipase A₂:Its Usefulness in Laboratory Diagnostics, *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 36(2):65-163.

Katz, A.M., Messineo, F.C., 1981, Lipid-membrane interactions and the pathogenesis of ischemic damage in the myocardium, *Circulation Research*, 48: 1 - 16.

Kawaguchi, H., Saito, H., Yasuda, H., 1987, Renal prostaglandins and phospholipase A₂ in spontaneously hypertensive rats, *Journal of Hipertension*, 5:299-304.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Kim J.Y., Chung Y.S., Ok S.H., et al.,** 1999, Characterization of the full-length sequences of phospholipase A₂ induced during flower development, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1489:389-392.
- Kinkaid, A.R., Wilton, D.C.,** 1995, Enhanced hydrolysis of phosphatidylcholine by human group II non-pancreatic secreted phospholipase A₂ as a result of interfacial activation by specific anions. Potential role of cholesterol sulphate, *Biochemical Journal*, 308, 507-512.
- Kishimura, H., Hayashi, K.,** 1999, Isolation and characteristics of phospholipase A₂ from the pyloric ceca of the starfish *Asterina pectinifera*, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 124: 483-488.
- Kiyohara, H., Egami, H., Kako, H., et al.,** 1993, Immunohistochemical localization of group II phospholipase A₂ in human pancreatic carcinoma, *International Journal of Pancreatology*, 13:49-57.
- Klickstein, L.B., Shapleigh, C., Goetzl, E.J.,** 1980, Lipoxygenation of arachidonic acid as a source of polymorphonuclear leukocyte chemotactic factors in synovial fluid and tissue in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis, *The Journal of Clinical Investigation*, 66: 1166-1170.
- Kley, J.T., Unger, C., Massing, U.,** 1998, Inhibition of 14-kDa PLA₂ by 2-acylamino-alkylphospholipids:the influence of amide acidity, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1392: 193-201.
- Kramer, R.M., Pritzker, C.R., Deykin, D.,** 1984, Coenzyme A-mediated arachidonic acid transacylation in human platelets, *Journal of Biological Chemistry*, 259: 2403-2406.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Kramer, R.M., Checani, G.C., Deykin, A., et al.,** 1986, Solubilization and properties of Ca^{2+} -dependent human platelet phospholipase A_2 , *Biochimica et Biophysica Acta*, 878:394–403.
- Kramer, R.M., Hession, C., Johansen, B., et al.,** 1989, Structure and Properties of a Human Non-pancreatic Phospholipase A_2 , *Journal of Biological Chemistry*, 264:5768-5775.
- Kramer, R.M., Johansen, B., Hession, C., et al.,** 1990, Structure and properties of a secretable phospholipase A_2 from human platelets, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 275:35-54.
- Kramer, R.M., Pepinsky, R.B.,** 1991, Assay and Purification of Phospholipase A_2 from Human Synovial Fluid in Rheumatoid Arthritis, *Methods in Enzymology*, 197: 373-381.
- Kramer, R.M., Roberts, E.F., Manetta, J.V., et al.,** 1993, Thrombin-induced phosphorylation and activation of $\text{Ca}(2+)$ -sensitive cytosolic phospholipase A_2 in human platelets, *Journal of Biological Chemistry*, 268: 26796-26804.
- Kröner, E.E., Peskar, B.A., Fischer, H., Ferber, E.,** 1981, Control of arachidonic acid accumulation in bone marrow-derived macrophages by acyltransferases, *Journal of Biological Chemistry*, 256: 3690-3697.
- Kuchler, K., Gmachl, M., Sippl, M.J., Kreil, G.,** 1989, Analysis of the cDNA for phospholipase A_2 from honeybee venom glands. The deduced amino acid sequence reveals homology to the corresponding vertebrate enzymes, *European Journal of Biochemistry*, 184:249-254.
- Laemmli, U.K.,** 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227: 680-685.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Langton, S.R., Jarnicki, A.,** 1992, Serum phospholipase A₂ and lysolecithin changes following myocardial infarction, *Clinica Chimica Acta*, 205:223-231.x
- Langlais, J., Chafouleas, J.G., Ingraham, R., et al.,** 1992, The phospholipase A₂ of human spermatozoa; purification and partial sequence, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 182: 208-214.
- Larsson, P.K.A., Claesson, H.E., Kennedy, B.P.,** 1998, Multiple Splice Variants of the Human Calcium-independent Phospholipase A₂ and Their Effect on Enzyme Activity, *Journal of Biological Chemistry*, 273: 207-214.
- Lefkowitz, L.J., Deems, R.A., Dennis, E.A.,** 1999, Expression of Group IA Phospholipase A₂ in *Pichia pastoris*: Identification of a Phosphatidylcholine Activator Site Using Site-Directed Mutagenesis, *Biochemistry*, 38:14174:14184.
- Leslie, C.C.,** 1997, Properties and Regulation of Cytosolic Phospholipase A₂, *Journal of Biological Chemistry*, 272:16709-16712.
- Levin, S.W., Butler, J.D., Schumacher, U.K.,** 1986, Uteroglobin inhibits phospholipase A₂ activity, *Life Sciences*, 38: 1813-1819.
- Lin, L.L., Wartmann, M., Lin, A.Y., et al.,** 1993, cPLA₂ is phosphorylated and activated by MAP kinase, *Cell*, 72: 269-278.
- Lindahl, M., Von Schenck, H., Tagesson, C.,** 1989, Isolation and characterization of phospholipase A₂ from rat lung with affinity chromatography and two-dimensional gel-electrophoresis, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1003: 282-288.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Ling, T.G.I., Mattiasson, B.,** 1989, Membrane filtration affinity purification (MFAP) of dehydrogenases using cibacron blue, *Biotechnology and Bioengineering*, 34: 1321-1325.
- Lio, Y.C., Reynolds, L.J., Balsinde, J., Dennis, E.A.,** 1996, Irreversible inhibition of Ca^{2+} -independent phospholipase A_2 by methyl arachidonyl fluorophosphonate, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1302: 55-60.
- Lio, Y.C., Dennis, E.A.,** 1998, Interfacial activation, lysophospholipase and transacylase activity of Group VI Ca^{2+} -independent phospholipase A_2 , *Biochimica et Biophysica Acta*, 1392:320-332.
- Loeser, R.F., Smith, D.M., Turner, R.A.,** 1990, Phospholipase activity in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis, osteoarthritis and crystal-associated arthritis, *Clinical and Experimental Rheumatology*, 8:379-386.
- Lopez, B.A., Newman, G.E., Phizackerley, P.J.R., et al.,** 1992, Human placental phospholipase A_2 activity in term and preterm labour, *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 43: 185-192.
- Luong, J.H.T., Male, K.B., Nguyen, A.L.,** 1988, Synthesis and characterization of a water-soluble affinity polymer for trypsin purification, *Biotechnology and Bioengineering*, 31: 439-446.
- Luong, J.H.T., Nguyen, A.L.,** 1992, Novel separations based on affinity interactions, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 47: 138-158.
- Male, K. B., Nguyen, A. L., Luong, J. H. T.,** 1990, Isolation of urokinase by affinity ultrafiltration, *Biotechnology and Bioengineering*, 35: 87-93.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Mancuso, D.J., Jenkins, C.M., Gross, R.W.,** 2000, The Genomic Organization, Complete mRNA Sequence, Cloning, and Expression of a Novel Human Intracellular Membrane-associated Calcium-independent Phospholipase A₂, *Journal of Biological Chemistry*, 275: 9937-9945.
- Mansbach, C.M.,** 1990, Phospholipases: old enzymes with new meaning, *Gastroenterology*, 98:1360-1362.
- Marion, J., Wolfe, L.S.,** 1979, Origin of the arachidonic acid released post-mortem in rat forebrain, *Biochimica et Biophysica Acta*, 574: 25-32.
- Matsuda, Y., Ogawa, M., Nishijima, J., et al.,** 1986, Usefulness of determination of serum immunoreactive pancreatic phospholipase A₂ content for early identification of severe acute pancreatitis, *Hepatogastroenterology*, 33: 214-216.
- Matsuzawa, A., Hattori, K., Aoki, J., et al.,** 1997, Protection against Oxidative Stress-induced Cell Death by Intracellular Platelet-activating Factor-Acetylhydrolase II, *Journal of Biological Chemistry*, 272: 32315-32320.
- May, C., Preisig-Müller, R., Höhne, M., et al.,** 1998, A phospholipase A₂ is transiently synthesized during seed germination and localized to lipid bodies, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1393:267-276.
- Mayer, R.J., Marshall, L.A.,** 1993, New insights on mammalian phospholipase A₂(s); comparison of arachidonoyl-selective and -nonselective enzymes, *The Federation of American Societies for Experimental Biology*, 7: 339-348.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Mazzari, S., Finesso, M.,** 1978, Effect of ischemia on energy metabolism and catecholamine levels in the gerbil brain and in vitro, *In: Neuhoff V, Proceedings of the European Society for Neurochemistry*, 310-312.
- McIntosh, J.M., Ghomashchi, F., Gelb, M.H., et al.,** 1995, Conodipine-M, a Novel Phospholipase A₂ Isolated from the Venom of the Marine Snail *Conus magus*, *Journal of Biological Chemistry*, 270: 3518-3526.
- McIntyre, T.M., Zimmerman, G.A., Prescott, S.M.,** 1999, Biologically Active Oxidized Phospholipids, *Journal of Biological Chemistry*, 274: 25189-25192.
- Metz, S.A.,** 1984, Is phospholipase A₂ a "glucose sensor" responsible for the phasic pattern of insulin release?, *Prostaglandins*, 27:147-158.
- Metz, S.A.,** 1986, Ether-linked lysophospholipids initiate insulin secretion. Lysophospholipids may mediate effects of phospholipase A₂ activation on hormone release, *Diabetes*, 35: 808-817.
- Mihelich, E.D., R.W., Schevitz,** 1999, Structure-based design of new class of anti-inflammatory drugs: secretory phospholipase A(2) inhibitors, SPI, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1441: 223-228.
- Min, J.H., Jain, M.K., Wilder, C., et al.,** 1999, Membrane-Bound Plasma Platelet Activating Factor Acetylhydrolase Acts on Substrate in the Aqueous Phase, *Biochemistry*, 38:12935-12942.
- Mock, T., Man, R.Y.K.,** 1990, Mechanism of lysophosphatidylcholine accumulation in the ischemic canine heart, *Lipids*, 25:357-362.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Morohoshi, T., Held, G., Klöppel, G.,** 1983, Exocrine pancreatic tumors and their histological classification. A study based on 167 autopsy and 97 surgical cases, *Histopathology*, 7:645-661.
- Mosior, M., Six, D.A., Dennis, E.A.,** 1998, Group IV Cytosolic Phospholipase A₂ Binds with High Affinity and Specificity to Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Resulting in Dramatic Increases in Activity, *Journal of Biological Chemistry*, 273:2184-2191.
- Moskowitz, N., Shapiro, L., Schook, W., et al.,** 1983, Phospholipase A₂ modulation by calmodulin, prostaglandins and cyclic nucleotides, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 115: 94-99.
- Mukherjee, A.B., Miele, L., Pattabiraman, N.,** 1994, Phospholipase A₂ enzymes: Regulation and physiological role, *Biochemical Pharmacology*, 48: 1-10.
- Murakami, M., Kudo, I., Nakamura, H., et al.,** 1990, Exacerbation of rat adjuvant arthritis by intradermal injection of purified mammalian 14-kDa group II phospholipase A₂, *FEBS Letters*, 268:113-116.
- Murakami, M., Kudo, I., Inoue, K.,** 1993, Molecular nature of phospholipases A₂ involved in prostaglandin I₂ synthesis in human umbilical vein endothelial cells. Possible participation of cytosolic and extracellular type II phospholipases A₂, *Journal of Biological Chemistry*, 268: 839-844.
- Murakami, M., Nakatani, Y., Atsumi, G., et al.,** 1997, Regulatory functions of phospholipase A₂, *Critical Reviews in Immunology*, 17: 225-284.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

Murakami, M., Shimbara, S., Kambe, T., et al., 1998, The Functions of Five Distinct Mammalian Phospholipase A₂s in Regulating Arachidonic Acid Release, *Journal of Biological Chemistry*, 273: 14411-14423.

Murakami, M., Kambe, T., Shimbara, S., et al., 1999, Different Functional Aspects of the Group II Subfamily (Types IIA and V) and Type X Secretory Phospholipase A₂s in Regulating Arachidonic Acid Release and Prostaglandin Generation. implications of cyclooxygenase-2 induction and phospholipid scramblase-mediated cellular membrane perturbation, *Journal of Biological Chemistry*, 274: 31435-31444.

Murata, K., Egami, H., Kiyohara, H., et al., 1993, Expression group II phospholipase A₂ in malignant and non-malignant human gastric mucosa, *British Journal of Cancer*, 68: 103-111.

Nakae, H., Endo, S., Inada, K., et al., 1996, Nitrite/nitrate(NO_x) and type II phospholipase A₂, leukotriene B₄ and platelet-activating factor levels in patient with septic shock, *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology*, 92:131-139.

Nakasato, Y., Simonson, M.S., Herman, W.H., et al., 1991, Interleukin-1 α stimulates prostaglandin biosynthesis in serum activated mesangial cells by induction of a non-pancreatic (type II) phospholipase A₂, *Journal of Biological Chemistry*, 266:14119-14127.

Nakatani, Y., Tanioka, T., Sunaga, S., et al., 2000, Identification of a Cellular Protein That Functionally Interacts with the C2 Domain of Cytosolic Phospholipase A₂ α , *Journal of Biological Chemistry*, 275: 1161-1168.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Newkirk, J.D., Waite, M.,** 1973, Phospholipid hydrolysis by phospholipase A1 and A2 in plasma membranes and microsomes of rat liver, *Biochimica et Biophysica Acta*, 298:562-576.
- Nevalainen, T.J., Aho, H.J., Eskola, J.U., et al.,** 1983, Immunohistochemical localization of phospholipase A₂ in human pancreas in acute and chronic pancreatitis, *Acta Pathol Microbiol Scand*, 91: 97-102.
- Nevalainen, T.J., Eskola, J.U., Aho, A.J., et al.,** 1985, Immunoreactive phospholipase A₂ in serum in acute pancreatitis and pancreatic cancer, *Clinical Chemistry*, 31: 1116-1120.
- Nevalainen, T.J.,** 1989, Phospholipase A₂ in acute pancreatitis. A review, *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 23:897-904.
- Nevalainen, T.J., Grönroos, J.M., Korteso, P.T.,** 1993, Pancreatic and synovial type phospholipases A₂ in serum samples from patients with severe acute pancreatitis, *Gut*, 34: 1133-1136.,
- Nolan, J.C., Pickett, W., English, K.,** 1982, Stimulation of prostaglandin E₂ synthesis in chondrocytes by a factor derived from activated macrophages, *Prostaglandins*, 24: 443-450.
- Nyman, K.M., Uhl, W., Forsstrom, J., et al.,** 1996, Serum phospholipase A₂ in patients with multiple organ failure, *Journal of Surgery Research*, 60: 7-14.
- Ohara, O., Tamaki, M., Nakamura, E., et al.,** 1986, Dog and Rat Pancreatic Phospholipase A₂: Complete Amino Acid Sequences Deduced from Complementary DNAs, *Journal of Biochemistry*, 99: 733-739.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Oliveira, C.R., Duarte, E.P., Carvalho, A.P.,** 1984, Effect of phospholipase digestion and lysophosphatidylcholine on dopamine receptor binding, *Journal of Neurochemistry*, 43: 455-465.
- Orchard, R., Reynolds, K., Fox, B., et al.,** 1977, Effect of lysolecithin on gastric mucosal structure and potential difference, *Gut*, 18: 457-461.
- Otamiri, T., Lindahl, M., Tagesson, C.,** 1988, Phospholipase A₂ inhibition prevents mucosal damage associated with small intestinal ischaemia in rats, *Gut*, 29: 489-494.
- Peplow, P.V.,** 1999, Regulation of platelet-activating factor (PAF) activity in human diseases by phospholipase A₂ inhibitors, PAF acetylhydrolases, PAF receptor antagonists and free radical scavengers, *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 61:65-82.
- Pickard, R.T., Strifler, B.A., Kramer, R.M., Sharp, J.D.,** 1999, Molecular Cloning of Two New Human Paralogs of 85-kDa Cytosolic Phospholipase A₂, *Journal of Biological Chemistry*, 274: 8823-8831.
- Pickard, R.T., Chiou, X.G., Strifler, B.A., et al.,** 1996, Identification of Essential Residues for the Catalytic Function of 85-kDa Cytosolic Phospholipase A₂. Probing the role of histidine, aspartic acid, cysteine, and arginine, *Journal of Biological Chemistry*, 271:19225-19231.
- Plesniak, L.A., Boegeman, S.C., Segelke, B.W., Dennis, E.A.,** 1993, Interaction of phospholipase A₂ with thioether amide containing phospholipid analogs, *Biochemistry*, 32: 5009-5016.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Powers, J.D., Kilpatrick, P.K., Carbonell, R.G.,** 1989, Protein purification by affinity binding to unilamellar vesicles, *Biotechnology and Bioengineering*, 33: 173-182.
- Powers, J.D., Kilpatrick, P.K., Carbonell, R.G.,** 1990, Trypsin purification by affinity binding to small unilamellar liposomes, *Biotechnology and Bioengineering*, 36: 506-519.
- Prescott, S.M., Zimmerman, G.A., McIntyre, T.M.,** 1990, Platelet-activating factor, *Journal of Biological Chemistry*, 265: 17381-17384.
- Pruzanski, W., Keystone, E.C., Sternby, B., et al.,** 1988, Serum phospholipase A₂ correlates with disease activity in rheumatoid arthritis, *The Journal of Rheumatology*, 15: 1351-1355.
- Pruzanski, W., Bogoch, E., Wloch, M., et al.,** 1991, The role of phospholipase A₂ in the physiopathology of osteoarthritis, *The Journal of Rheumatology*, 18: 117-119.
- Pruzanski, W., Bogoch, E., Stefanski, E., et al.,** 1991, Enzymatic activity and distribution of phospholipase A₂ in human cartilage, *Life Science*, 48: 2457-2462.
- Pruzanski, W., Scott, K., Smith, G., et al.,** 1992, Enzymatic activity and immunoreactivity of extracellular phospholipase A₂ in inflammatory synovial fluids, *Inflammation*, 16: 451-457.
- Pruzanski, W., Wilmore, D.W., Suffredini, A., et al.,** 1992, Hyperphospholipase A₂ in human volunteers challenged with intravenous endotoxin, *Inflammation*, 16:561-570.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Pungor, E., Afeyan, N.B., Gordon, N.F., Cooney, C.L.,** 1987, Continuous affinity-recycle extraction : a novel protein separation technique, *Bio/Technology* , 5: 604-608.
- Qiu, Z.H., Gijon, M.A., de Carvalho, M.S., et al.,** 1998, The Role of Calcium and Phosphorylation of Cytosolic Phospholipase A₂ in Regulating Arachidonic Acid Release in Macrophages, *Journal of Biological Chemistry*, 273: 8203-8211.
- Rana, R.L., Sarath, G., Stanley, D.W.,** 1998, A digestive phospholipase A₂ in midguts of tobacco hornworms, *Manduca sexta* L., *Journal of Insect Physiology*, 44: 297-303.
- Reynolds, L.J., Dennis, E.A.,** 1991, Cobra Venom Phospholipase A₂: Naja naja naja, *Methods in Enzymology*, 197: 359-365.
- Riendeau, D., Guay, J., Weech, P.K.,** 1994, Arachidonyl trifluoromethyl ketone, a potent inhibitor of 85-kDa phospholipase A₂, blocks production of arachidonate and 12-hydroxyeicosatetraenoic acid by calcium ionophore-challenged platelets, *Journal of Biological Chemistry*, 269: 15619-15624.
- Riley, J.C., Carlson, J.C.,** 1987, Involvement of phospholipase A activity in the plasma membrane of the rat corpus luteum during luteolysis, *Endocrinology*, 121: 776-781.
- Robertson, B., van Golden, L.M.G., Batenberg J.J.,(eds),** 1984, Pulmonary surfactant, *Amsterdam:Elsevier*.
- Robinson, D.R., Tashjian, A.H., Levine, L.,** 1975, Prostaglandin stimulated bone resorption by rheumatoid synovia: a possible mechanism for bone destruction in rheumatoid arthritis, *The Journal of Clinical Investigaiton*, 50: 1181-1188.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Roldan, E.R., Harrison, R.A.,** 1989, Polyphosphoinositide breakdown and subsequent exocytosis in the Ca^{2+} /ionophore-induced acrossome reaction of mammalian spermatozoa, *Biochemical Journal*, 259: 397-406.
- Romaschin, A.D., De Majo, W.C., Winton, T., et al.,** 1982, Systemic phospholipase A_2 and cachectin levels in adult respiratory distress syndrome and multiple-organ failure, *Clinical Biochemistry*, 25:55-60.
- Sato, T., Ruch, R.,** 1980, Stabilization of Colloidal Dispersions by Polymer Adsorption, *Marcell Dekker*, New York.
- Schevitz, R.W., Bach, N.J., Carlson, D.G., et al.,** 1995, Structure-based design of the first potent and selective inhibitor of human non-pancreatic secretory phospholipase A_2 , *Nature Structural & Molecular Biology*, 2: 458-465.
- Schlame, M., Rüstow, B.,** 1990, Lysocardiolipin formation and reacylation in isolated rat liver mitochondria, *Biochemical Journal*, 272:589-595.
- Scopes, R.K.,** 1994, Protein Purification: Principles and Practice, *Springer-Verlag*, New York.
- Scott, D.L., Otwinowski, Z., Gelb, M.H., and Sigler, P.B.,** 1991, Crystal structure of bee-venom phospholipase A_2 : correction, *Science*, 252:764.
- Seilhamer, J.J., Pruzanski, P., Vadas, P., et al.,** 1989, Cloning and recombinant expression of phospholipase A_2 present in rheumatoid arthritic synovial fluid, *Journal of Biological Chemistry*, 264:5335-5338.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Senda, K., Yoshioka, H., Doke, N., Kawakita, K.,** 1996, A Cytosolic Phospholipase A₂ from Potato Tissues Appears to Be Patatin, *Plant and Cell Physiology*, 37: 347-353.
- Shaikh, N.A., Downar, E.,** 1981, Time course of changes in porcine myocardial phospholipid levels during ischemia. A reassessment of the lysolipid hypothesis, *Circulation Research*, 49: 316 - 325.
- Shakir, K.M., Reed, H.L., O'Brian, J.T.,** 1986, Decreased phospholipase A₂ activity in plasma and liver in uncontrolled diabetes mellitus. A defect in the early steps of prostaglandin synthesis?, *Diabetes*, 35: 403-410.
- Sharp, J.D., White, D.L., Chiou, X.G., et al.,** 1991, Molecular cloning and expression of human Ca(2+)-sensitive cytosolic phospholipase A₂, *Journal of Biological Chemistry*, 266: 14850-14853.
- Shott, W.A., Pawlowski, N.A., Mills, J.T., et al.,** 1984, The metabolism of exogenous arachidonic acid by resting macrophages, *Advanced Inflammation Research*, 7:39-49.
- Siddiqi, A.R., Shafqat, J., Zaidi, Z.H., Jörnvall, H.,** 1991, Characterization of phospholipase A₂ from the venom of Horned viper (*Cerastes cerastes*), *FEBS Letters*, 278:14-16.
- Sigmundsson, K., Filippusson, H.,** 1996, Synthesis and characterization of an acrylamide-based water-soluble affinity polymer for trypsin purification, *Polymer International*, 41: 355-362.
- Singh, G., Katyal, S.L., Brown, W.E., et al.,** 1990, Clara cell 10-kDa protein (CC10). Comparison of structure and function to uteroglobin, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1039:348-355.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Singh, G., Triadafilopoulos, G.,** 1999, Epidemiology of NSAID Induced Gastrointestinal Complications, *The Journal of Rheumatology*, 26: 18-24.
- Simonsson, E., Ahren, B.,** 2000, Phospholipase A₂ and Its Potential Regulation of Islet Function, *International Journal of Pancreatology*, 27(1):1-11.
- Six, D.A., Dennis, E.A.,** 2000, The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes:classification and characterization, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1488:1-19.
- Skinner, K.A., Challis, J.R.G.,** 1985, Changes in the synthesis and metabolism of prostaglandins by human fetal membranes and decidua at labor, *Am J Obstet Gynecol*, 151: 519-523.
- Snitko, Y., Han, S.K., Lee, B.I., Cho, W.,** 1999, Differential Interfacial and Substrate Binding Modes of Mammalian Pancreatic Phospholipases A₂: A Comparison among Human, Bovine, and Porcine Enzymes, *Biochemistry*, 38:7803 – 7810.
- Song, C., Chang, J.X., Bean, K.M., et al.,** 1999, Molecular Characterization of Cytosolic Phospholipase A₂-β, *Journal of Biological Chemistry*, 274: 17063-17067.
- Soubeyrand, S., Manjunath, P.,** 1997, Novel seminal phospholipase A₂ is inhibited by the major protein of bovine seminal plasma, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1341: 183-188.
- Sörensen, J., Kald, B., Tagesson, C., Lindahl, M.,** 1994, Platelet-activating factor and phospholipase A₂ in patients with septic shock and trauma, *Journal of Intensive Care Medicine*, 20:555-61.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Stafforini, D.M., Prescott, S.M., McIntyre, T.M.,** 1987, Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase. Purification and properties, *Journal of Biological Chemistry*, 262: 4223-4230.
- Stafforini, D.M., Tjoelker, L.W., McCormick, S.P. A., et al.,** 1999, Molecular Basis of the Interaction between Plasma Platelet-activating Factor Acetylhydrolase and Low Density Lipoprotein, *Journal of Biological Chemistry*, 274: 7018-7024.
- Stahl, U., Ek, B., Stymne, S.,** 1998, Purification and Characterization of a Low-Molecular-Weight Phospholipase A₂ from Developing Seeds of Elm, *Plant Physiology*, 117: 197-205.
- Stahl, U., Lee, M., Sjö Dahl, S., et al.,** 1999, Plant low-molecular-weight phospholipase A₂s (PLA₂s) are structurally related to the animal secretory PLA₂s and are present as a family of isoforms in rice (*Oryza sativa*), *Plant Molecular Biology*, 41: 481-490.
- Stadel, J.M., Hoyle, K., Naclerio, R.M., et al.,** 1994, Characterization of phospholipase A₂ from human nasal lavage, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 11:108-113.
- Stein, C.A., Cheng, Y.C.,** 1993, Antisense oligonucleotides as therapeutic agents--is the bullet really magical?, *Science*, 261: 1004-1012.
- Stephens, W.W., Walker, J.L., Myers, W.,** 1898, *J. Pathol. Bacteriol.*, 5: 279-301.
- Sternby, B., O'Brien, J.F., Zinsmeister, A.R., et al.,** 1996, What is the best biochemical test to diagnose acute pancreatitis? A prospective clinical study, *Mayo Clinic Proceedings*, 71:1138-1144.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Sturk, A., Tencate, J.W., Hosford, D., et al.,** 1989, The synthesis, catabolism, and pathophysiological role of platelet-activating factor, *Advances in Lipid Research*, 23: 219 - 276.
- Suzuki, T., Kuroda, Y., Saitoh, Y.,** 1994, Plasma pancreatic phospholipase A₂ as a marker for clinical pancreas graft rejection, *Pancreas*, 9:391-393.
- Suzuki, Y., Matsumoto, M.,** 1982, Release of Lysosomal Phospholipase A₁ and A₂ into Cytosol and Rapid Turnover of Newly-Formed Lysophosphatidylcholine in FL Cells during Fusion-from-within Induced by Measles Virus, *The Journal of Biochemistry*, 92: 1683-1692.
- Takayama, K., Hara, S., Kudo, J., et al.,** 1991, Detection of 14-kDa group II phospholipase A₂ in human seminal plasma, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 178: 1505-1511.
- Tanaka, H., Takeya R., Sumimoto, H.,** 2000, A Novel Intracellular Membrane-Bound Calcium-Independent Phospholipase A₂, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 272:320-326.
- Tang, J., Kriz, R.W., Wolfman, N., et al.,** 1997, A Novel Cytosolic Calcium-independent Phospholipase A₂ Contains Eight Ankyrin Motifs, *Journal of Biological Chemistry*, 272:8567-8575.
- Telefoncu, A.,** 1997, Enzimoloji, Lisansüstü Yaz Okulu(Editor), Kuşadası/Türkiye.
- Tischfield, J.A., Xia, Y.R., Shih, D.M., et al.,** 1996, Low-Molecular-Weight, Calcium-Dependent Phospholipase A₂ Genes Are Linked and Map to Homologous Chromosome Regions in Mouse and Human, *Genomics*, 32:328-333.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Tischfield, J.A.**, 1997, A Reassessment of the Low Molecular Weight Phospholipase A₂ Gene Family in Mammals, *Journal of Biological Chemistry*, 272:17247-17250.
- Tjoelker, L.W., Eberhardt, C., Unger, J., et al.**, 1995, Plasma Platelet-activating Factor Acetylhydrolase Is a Secreted Phospholipase A₂ with a Catalytic Triad, *Journal of Biological Chemistry*, 270: 25481-25487.
- Tojo, H., Ono, T., Kuramitsu, S., et al.**, 1988, A Phospholipase A₂ in the Supernatant Fraction of Rat Spleen, *Journal of Biological Chemistry*, 263: 5724-5731.
- Tojo, H., Ono, T., Okamoto, M.**, 1991, Spleen Phospholipase A₂, *Methods in Enzymology*, 197: 390-399.
- Underwood, K.W., Song, C., Kriz, R.W., et al.**, 1998, A Novel Calcium-independent Phospholipase A₂, cPLA₂- γ , That Is Prenylated and Contains Homology to cPLA₂, *Journal of Biological Chemistry*, 273: 21926-21932.
- Uozumi, N., Kume, K., Nagase, T., et al.**, 1997, Role of cytosolic phospholipase A₂ in allergic response and parturition, *Nature*, 390: 618-622.
- Vadas, P., Pruzanski, W.**, 1984, Biology of disease. Role of secretory phospholipase A₂ in the pathobiology of disease, *Laboratory Investigation*, 55:391-404.
- Vadas, P., Pruzanski, W., Fornasier, V.**, 1986, Acute inflammation induced by intradermal and intraarticular injection of soluble PLA₂, *Arthritis Rheumatism*, 29:37

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Vadas, P., Pruzanski, W., Stefanski, E.,** 1988, Extracellular phospholipase A₂ causative agent in circulatory collapse of septic shock?, *Agents Actions*, 24:320-325.
- Vadas, P., Pruzanski, W., Kim, J., Fornasier, V.,** 1989, The proinflammatory effect of intra-articular injection of soluble human and venom phospholipase A₂, *The American Journal of Pathology*, 134:807-811.
- Vadas, P., Keystone, J., Stefanski, E., et al.,** 1992, Induction of circulating group II phospholipase A₂ expression in adults with malaria, *Infection and immunity*, 60: 3928-3931.
- Valentin, E., Koduri, R.S., Scimeca, J.C., et al.,** 1999, Cloning and Recombinant Expression of a Novel Mouse-secreted Phospholipase A₂, *Journal of Biological Chemistry*, 1999 274: 19152-19160.
- Valentin, E., Ghomashchi, F., Gelb, M.H., et al.,** 1999, On the Diversity of Secreted Phospholipases A₂. cloning, tissue distribution, and functional expression of two novel mouse Group II enzymes, *Journal of Biological Chemistry*, 274: 31195-31202.
- Valentin, E., Ghomashchi, F., Gelb, M.H., et al.,** 2000, Novel Human Secreted Phospholipase A₂ with Homology to the Group III Bee Venom Enzyme, *Journal of Biological Chemistry*, 275: 7492-7496.
- Van Bebber, I.P.T., Bockholz, W.K.F., Goris, R.J.A., et al.,** 1989, Neutrophil function and lipid peroxidation in a rat model of multiple organ failure, *Journal of Surgery Research*, 47: 471-475.
- Van Den Bosch, H., De Jong, J.G.N., Aarsman, A.J.,** 1991, Phospholipase A₂ from Rat Liver Mitochondria, *Methods in Enzymology*, 197: 365-373.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Van Kuijk, F.J.G.M., Sevanian, A., Handelman, G.J., Dratz, E.A.,** 1987, A new role for phospholipase A₂: protection of membranes from lipid peroxidation damage, *Trends in Biochemical Sciences*, 12:31-34.
- Van Wezel, F., De Haas, G.H.,** 1975, Phospholipase A₂ isoenzyme from porcine pancreas purification and properties, *Biochimica et Biophysica Acta*, 410: 299-309.
- Victor, M., Weiss, J., Klempner, M.S., Elsbach, P.,** 1981, Phospholipase A₂ activity in the plasma membrane of human polymorphonuclear leukocytes, *FEBS Letters*, 136:298-300.
- Vignon, E., Mathieu, P., Louisot, P., et al.,** 1989, Phospholipase A₂ activity in human osteoarthritic cartilage, *The Journal of Rheumatology*, 16: 35-38.
- Vish wanath, B.S., Fawzy, A.A., Franson, R.C.,** 1988, Edema-inducing activity of phospholipase A₂ purified from human synovial fluid and inhibited by aristolochic acid, *Inflammation*, 12: 549-561.
- Waite, M.,** 1990, Phospholipases that share a substrate class, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 279:1-22.
- Walsh, C.E., Dechatelet, L.R., Chilton, F.H., et al.,** 1983, Mechanism of arachidonic acid release in human polymorphonuclear leukocytes, *Biochimica et Biophysica Acta*, 750:32-40.
- Walsh, S.W., Parisi, V.M.,** 1986, Arachidonic acid metabolism and the regulation of placental and other vascular tone during pregnancy, *Seminars in Perinatology*, 10: 288-294.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Weichman, B.M., Berkenhoph, T.W., Marshall, L.A.,** 1989, Phospholipase A₂-induced pleural inflammation in rats, *International Journal of Tissue Reactions*, 11:129-136.
- Weinrauch, Y., Elsbach, P., Madsen, L.M., et al.,** 1996, The Potent Anti-*Staphylococcus aureus* Activity of a Sterile Rabbit Inflammatory Fluid Is Due to a 14-kDa Phospholipase A₂, *The Journal of Clinical Investigation*, 97: 250-257.
- Wery, J.P., Schevitz R.W., Clawson, D.K., et al.,** 1991, Structure of recombinant human rheumatoid arthritic synovial fluid phospholipase A₂ at 2.2 Å resolution, *Nature*, 352:79-82.
- Wijkander, J., O'Flaherty, J.T., Nixon, A.B., Wykle, R.L.,** 1995, 5-Lipoxygenase Products Modulate the Activity of the 85-kDa Phospholipase A₂ in Human Neutrophils, *Journal of Biological Chemistry*, 270: 26543-26549.
- Winslet, M.C., Hall, C., Hendricks, C., et al.,** 1991, Serum phospholipase A₂ and free fatty acid space levels in acute pancreatitis, *Biochemical Society Transactions*, 19:2255.
- Winstead, M.V., Balsinde, J., Dennis, E.A.,** 2000, Calcium-independent phospholipase A₂: structure and function, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1488:28-39.
- Wolf, M.J., Gross, R.W.,** 1996, The Calcium-dependent Association and Functional Coupling of Calmodulin with Myocardial Phospholipase A₂, *Journal of Biological Chemistry*, 271: 20989-20992.
- Wong, J.T., Tran, K., Pierce, G.N., et al.,** 1998, Lysophosphatidylcholine Stimulates the Release of Arachidonic Acid in Human Endothelial Cells, *Journal of Biological Chemistry*, 273: 6830-6836.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Yamashita, S., Yamashita, J., Sakamoto, K., et al.,** 1993, Increased expression of membrane associated phospholipase A₂ shows malignant potential of human breast cancer cells, *Cancer*, 71: 3058-3064.
- Yamashita, S., Ogawa, M., Abe, T., et al.,** 1994, Group II phospholipase A₂ in invasive gastric cancer cell line is induced by interleukin 6, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 198: 878-884.
- Yawo, H., Kuno, M.,** 1983, How a nerve fiber repairs its cut end: involvement of phospholipase A₂, *Sciences*, 222: 1351-1353.
- Yedgar, S., Lichtenberg, D., Schnitzer, E.,** 2000, Inhibition of phospholipase A₂ a therapeutic target, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1488:182-187.
- Yoshihara, Y., Watanabe, Y.,** 1990, Translocation of phospholipase A₂ from cytosol to membranes in rat brain induced by calcium ions, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 170: 484-490.
- Yu, L., Deems, R.A., Hajdu, J., Dennis, E.A.,** 1990, The Interaction of Phospholipase A₂ with Phospholipid Analogues and Inhibitors, *Journal of Biological Chemistry*, 265: 2657-2664.
- Yu, L., Dennis, E.A.,** 1993, Effect of polar head groups on the interactions of phospholipase A₂ with phosphonate transition-state analogs, *Biochemistry*, 32: 10185-10192.
- Zamudio, F.Z., Conde, R., Arevalo, C., et al.,** 1997, The Mechanism of Inhibition of Ryanodine Receptor Channels by Imperatoxin I, a Heterodimeric Protein from the Scorpion *Pandinus imperator*, *Journal of Biological Chemistry*, 272: 11886-11894.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

Zieve, L., Vogel, W.C., 1961, Measurement of lecithinase A in serum and other body fluids, *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 57:586-599.

Zihnioğlu, F.; 1996, Elektroforetik yöntemler, Protein Saflaştırması ve Karakterizasyonu (Yaz Okulu), Editör: A.Telefoncu, 150s.

ÖZGEÇMİŞ

Adı, Soyadı : Mustafa TEKE

Doğum Tarihi : 09/10/1974

Doğum Yeri : Akören / KONYA

Medeni Hali : Evli

Uyruğu : T.C.

E-mail : mustafateke@mail.ege.edu.tr,

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu :

Okul	Derece	Yıl
Selçuk Üniversitesi	Lisans(Kimya)	1992-1996
Muğla Üniversitesi	Yüksek Lisans(Kimya)	1997-2000
Ege Üniversitesi	Doktora(Biyokimya)	2000-2006

Akademik Görevleri : Araştırma Görevlisi 1996-

ULUSLARARASI SCIENCE CITATION INDEX'CE TARANAN DERGİLERDE YAYINLANMIŞ MAKALELERİ

1. Kılınç, A., **Teke, M.**, Önal, S., Telefoncu, A."Immobilization of Lipase on Chitin and Chitosan", Preparative Biochemistry and Biotechnology,36(2), 153-163, 2006.
2. **Teke, M.**, Önal, S., Kılınç, A., Telefoncu, A., "Immobilization of phospholipase A₂ on porous glass and its application for lowering serum cholesterol concentration", Artificial Cells, Blood Substitutes and Biotechnology,31, 467-478, 2003.
3. **Teke M.**, Mercimek B., Özler M.A., Ayar A., "Selective Extraction of Iron(III) from Aqueous Nitrate Solution in the Presence of Cobalt(II), Copper(II) and Nickel(II) Ions Using Bis(D2-2-imidazoliny)-5,5'-dioxime", Analytical Sciences, 20, 853-856, 2004.

ULUSLARARASI BİLİMSEL TOPLANTILARDA SUNULAN BİLDİRİLERİN LİSTESİ

1. **Teke, M.**, Sezgintürk, M.K., Dinçkaya, E., Telefoncu, E., "Preparation and characterization of biosensor based on imprinted urease", 31st FEBS Congress Molecules in Health&Diseases, 24-29 June 2006,İstanbul/Turkey.
2. Teke Baran, A., **Teke, M.**, Telefoncu, A., "Molecularly imprinted polymers for urease recognition", 31st FEBS Congress Molecules in Health&Diseases, 24-29 June 2006, İstanbul/Turkey.
3. Duman E., **Teke M.**, Timur S., Zihnioğlu F., Yılmaz C., Telefoncu A.."Plasma Phospholipase A₂(PLA₂) and Acethylcholineesterase(AChE) Activities in Type 2 Diabetes". DIABETES, 4-8 June 2004, Orlando, Florida, ABD.
4. **Teke M.**, Timur S., Duman E., Zihnioğlu F., Yılmaz C., Telefoncu A.."Plasma Phospholipase A₂(PLA₂) and Acethylcholineesterase(AChE) Activities in Type 2 Diabetes Mellitus". 13th Balkan Biochemical Biophysical and Meeting on Metabolic Disorders, - 12-15 October 2003, Kuşadası, Turkey (Poster presentation-preliminary work).

5. Teke, M., Önal, S., Kılınç, A., Telefoncu, A., “Use of Immobilized Phospholipase A₂ on Porous Glass for Lowering of Serum Cholesterol Concentration” - BIOMED 2002 IXth International Symposium and Technology, September 19-22 2002, Kemer/Antalya.

ULUSAL BİLİMSEL TOPLANTILARDA SUNULAN BİLDİRİLERİN LİSTESİ

1. Teke, M., Telefoncu, A., " Fosfolipaz A₂ Enziminin Affinite-Ultrafiltrasyon İle Sığır Pankreasından Saflaştırılması", XIX.Ulusal Kimya Kongresi, 30 Eylül-4 Ekim 2005, Kuşadası.

2. Teke, M., Telefoncu, A., " Türkiye'de Yetişen Bazı Sarımsak Türlerinin Etkinliğinin Belirlenmesi", XIX.Ulusal Kimya Kongresi, 30 Eylül-4 Ekim 2005, Kuşadası.

3. Teke M., Önal S., Kılınç A., Telefoncu A.,"Kitosanda Pankreatik Lipaz İmmobilizasyonu:Karakterizasyonu ve Esterifikasyon Çalışmaları"18.Ulusal Biyokimya Kongresi,15-19 Mayıs 2004,Trabzon.

4. Önal S., Teke M., Kılınç A., Telefoncu A., "Pankreatik Lipazın Kitinde İmmobilizasyonu, Karakterizasyonu ve Esterifikasyon Reaksiyonlarında Kullanımı"18. Ulusal Biyokimya Kongresi,15-19 Mayıs 2004, Trabzon.

5. Teke M., Zihnioğlu F., Arıkan H., Telefoncu A., "Yılan Zehirinden Fosfolipaz(PLA₂) Enziminin HPLC İle Ayrılması" 18.Ulusal Biyokimya Kongresi,15-19 Mayıs 2004,Trabzon.

6. Teke, M., Kılınç, A., Önal, S., Telefoncu, A.,“Aljinat ve Digliserid Modifiye Aljinat ile Lipaz Enziminin Saflaştırılması”. - XIII. Biyoteknoloji Kongresi, 25-29 Ağustos 2003, Çanakkale.

7. Teke, M., Mercimek, B., Kuş, M., Taşbaş, M., "Bazı vic-Dioksim Türevlerinin Geçiş Metal Seçiciliklerinin İncelenmesi" - XVII. Ulusal Kimya Kongresi, 8-11 Eylül 2003, İstanbul.

8. Taşbaş, M., İrez, G., Kuş, M., Teke, M.," Yeni vic-Dioksim Sentezi ve Bunun Geçiş Metal Komplekslerinin İncelenmesi" - XVII.Ulusal Kimya Kongresi, 8-11 Eylül 2003, İstanbul.

9. Teke, M., Telefoncu, A., "Bazı bitki ekstraktlarının Fosfolipaz A₂ inhibisyon potansiyellerinin araştırılması" - 17. Ulusal Biyokimya Kongresi, 24-27 Haziran 2002,Ankara(Sözlü).

10. Teke, M., Ayar, A., Mercimek, B., "Bis(D2-İmidazolinyl)-5,5'-Dioxime İle Fe⁺³'ün Sıvı-Sıvı Seçimli Ekstraksiyonu", - XVI.Ulusal Kimya Kongresi, 10-13 Eylül 2002, Konya.

11. Teke, M., Önal, S., Kılınç, A., Telefoncu, A., "Gözenekli Camda Fosfolipaz A₂ İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu". - XVI. Ulusal Kimya Kongresi, 10-13 Eylül 2002, Selçuk Üniversitesi, Konya.

12. Teke, M., Zihnioğlu, F., Telefoncu, A., "Merkezi Sinir Sistemi Hastalıklarına Proteomik Yaklaşım", Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu, - 4-11 Ağustos 2002, Çanakkale-Türkiye(Poster Bildiri-Tam Metin).

SONUÇLANDIRILMIŞ ARAŞTIRMA PROJELERİ

1. Telefoncu, A., Kılınç, A., Teke, M. "Afinite Çöktürmesi İle Lipaz Saflaştırılması" Ege Üniversitesi Araştırma Projesi, 2001-Fen-067, 2006.

KATILDIĞI DİĞER MESLEKİ FALİYETLERİ

1. "Anormal Hemoglobinler ve Talasemiler" III. Biyokimya Kış Okulu,E.Ü.Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü,18-19 Aralık 2004,İzmir.

2. "Yaşlanma Sempozyumu, Biyokimyasal Moleküler ve Klinik Yaklaşım", Türk Biyokimya Derneği, DEÜ Sabancı Kültür Merkezi.4 Ocak 2003.

3. "International Workshop And Training Course on Photobioreactors" Ege University Science-Technology Center(EBİLTEM),April 2-4,2003 İzmir,Turkey.

4. “Proteom Analizi: Metodlar ve Uygulamalar” Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu, 4-11 Ağustos 2002, Dardanos-Çanakkale (TUBİTAK), 2002.

5. “Kimyasal Eser Analiz Yaz Okulu II”, E.Ü.Fen Fakültesi Kimya Bölümü, 21-25 Ekim 2002, İzmir.

ÜYESİ OLDUĞU BİLİMSEL KURULUŞLAR

1. Türk Biyokimya Derneği