

GENİŞ ÖZET

14 punto, kalın
büyük harflerle

Sülfanilamid Türevleri Kullanılarak Memeli Sütlerinden Laktoperoksidaz Enziminin Saflaştırılması

Köksal, Zeynep

12 punto, kalın,
başharfleri büyük

Doktora Tezi, Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hasan Özdemir

12 punto, kalın
değil, başharfleri
büyük

Ekim 2015

Eski çağlardan beri süt ve süt ürünlerinin beslenmede hayati bir role sahip olduğu ve insan sağlığına önemli katkıda bulunduğu bilinmektedir. İmmünoglobülinler, enzimler, hormonlar, büyüme faktörleri, antibakteriyel maddeler, yağ asitleri, vitaminler ve mineralleri içeren zengin içeriğinden dolayı yaşam üzerinde çok önemli etkileri vardır. Peroksidazlar (POD), gıda ve ilaç endüstrisi başta olmak üzere metabolik fonksiyonlar, enzimatik reaksiyonlar ve klinik teşhislerde önemli kullanım alanına sahiptirler. Memeli POD enzimlerinden laktoperoksidaz (LPO) süt, tükürük ve gözyaşında (hidrojen peroksit oksidoredüktaz E.C 1.11.1.7) lokalize olurken, miyeloperoksidaz lökositler ve trombositlerde lokalizedir. LPO enzimi hidrojen peroksit eşliğinde tiyosiyanatın antibakteriyel özelliklere sahip hipotiyosiyanata dönüşümünü katalizler.

Peroksidazlar (POD: H_2O_2 -Oksidoredüktaz E.C.1.11.1.7), oksidoredüktaz enzimleridir ve metabolizma sırasında oluşan reaktif oksijen türlerini katalize eder ve zararsız moleküllere dönüştürürler. Bunlar, antioksidan özellikler sergilemekte ve elektron alıcısı olan hidrojen peroksit ile birlikte organik ve inorganik substratların oksidasyonunu katalizlemektedir. Bu enzimler ökaryotlarda, prokaryotlarda ve fotosentetik hücrelerde bulunurlar.

Laktoperoksidaz (LPO, E.C. 1.11.1.7) oksidoredüktaz aktivitesi olan sütün önemli enzimlerinden biridir. Sütten izole edilen peroksidaza laktoperoksidaz adı verilmiştir ve sütte bulunduğu bildirilen ilk enzimdir. LPO enzimi genellikle insan, sığır, manda, keçi, koyun, lama, inek, deve ve fare gibi memelilerde, tükürük, gözyaşları, meme, tükürük ve gözyaşı bezlerinde bulunur. Enzimin ana işlevi, hidrojen peroksit varlığında moleküllerin oksidasyonunu katalize etmek ve geniş bir antimikrobiyal aktivite ile ürünlerin üretimine yardımcı olmaktır. Psödohalojenler, tiyosiyanatlar veya halojenler, enzim için bu gibi antimikrobiyal etkileri gösteren ikinci substratlar olarak işlev görürler. LPO enzimi, sığır sütünde önemli bir koruyucu etki göstermektedir. Sistemin aktivasyonu iki reaksiyon maddesinin tiyosiyanat ve hidrojen peroksit konsantrasyonuna bağlıdır. Bu enzim hidrojen peroksit varlığında, tiyosiyanatın antibakteriyel özelliklere sahip hipotiyosiyanata dönüşmesini katalize eder. Pek çok çalışma, bu enzimin birçok bakteri ve mantar suşunu yok ettiğini göstermektedir. Laktoperoksidaz geniş bir antifungal aktiviteye sahiptir. Mastit

memelilerde bakteri inflamasyonudur. Birkaç antibakteriyel ve antifungal suş üzerinde farklı konsantrasyonlarda tiyosiyanat-H₂O₂ maddesinin etkileri, bu süt endüstrisi sorununu çözmek için incelenmiştir. Bakteriyel büyümeyi hücre zarlarına zarar vererek ve çeşitli sitoplazmik enzimlerin aktivitelerini inhibe ederek azaltabilirler. LPO enzimi % 8-10 karbondihidrattan oluşan bir glikoproteindir, 612 amino asidi ihtiva eden bir zincir içerir. Yaklaşık 78 kDa'lık molekül ağırlığına sahip tek bir polipeptit zincirinden oluşur. İzoelektrik pH değeri 9.2 olan Prostetik grubu olarak hem içeren temel bir proteindir. Ayrıca, asidik pH'ta çok aktiftir. LPO molekülü oldukça hacimlidir. Ca²⁺ iyonu enzimi dengede tutar. Ca²⁺ iyonu pH 5.0 altında kaybolur ve bu da enzimin kararlılığını azaltır. Bu enzimin biyolojik önemi, mikroorganizmaların istilasına karşı doğal bir koruma sistemi içermesidir. Bu antiviral etki yanında hayvan hücrelerini çeşitli zararlar ve peroksidatif etkilere karşı koruduğu bildirilmektedir. Laktoperoksidaz, yenidoğan bebeklerinin sindirim sistemindeki patojen mikroorganizmalara karşı savunma sisteminin önemli bir ajanıdır. LPO enzimi, memelilerin immün olmayan biyolojik savunma sisteminin doğal bir bileşeni olarak işlev görür ve tiyosiyanat iyonunun antibakteriyel hipotiyosiyanata oksidasyonunu katalize eder. Fenolik maddeler en önemli doğal antioksidan bileşiklerdir ve biyolojik, farmakolojik ve tıbbi özelliklerinden dolayı en önemli doğal maddelerdir. Antikanserojenik, antibakteriyel, antiviral, anti-inflamatuar etkilere sahiptirler. Aynı zamanda güçlü antioksidan aktivite gösterirler. Şimdiye kadar, enzimlerin fenolik maddelerle etkileşimini incelemek için birçok çalışma yapılmıştır. Örneğin propofol, dimerik fenol türevlerinin antioksidan özelliklere sahip oldukları ve antioksidan gıda katkı maddeleri veya ilaçlar olarak kullanıldığı gösterilmiştir. Örneğin, yapılan son araştırmada, ellajik asit, gallik asit, ferulik asit, kafeik asit, p-kumarik asit, p-hidroksibenzoik asit ve syrinjik asitin insan karbonik anhidraz I (hCAI) ve II (hCAII) izoenzimleri üzerindeki inhibisyon etkisi incelendi ve bu fenolik asitlerin, hCAI ve hCAII izoenzimleri üzerine güçlü inhibisyon etkisi olduğu gösterilmiştir. Başka bir çalışmada, farklı fenolik bileşiklerin glukoz-6- fosfat dehidrogenaz ve 6-fosfoglukonat dehidrogenaz üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Kafeik asit, ellajik asit, ferulik asit ve sinapik asitin her iki enzimin aktivitelerinde inhibisyon etkileri olduğunu ancak klorojenik asit, p-kumarik asit ve syrinjik asit'in iki enzim aktivitesinde bir etki göstermediğini bildirdiler. Ek olarak, Sarıkaya ve ark. ellajik asit, gallik asit, ferulik asit, kafeik asit, p-kumarik asidin sığır LPO enzimi üzerindeki inhibisyon etkilerini araştırdılar. Bu çalışma bulgularına göre, fenolik asitler, sığır LPO enzimi üzerinde güçlü inhibisyon etkisi sergilemektedir. Bununla birlikte, sığır sütünden saflaştırılmış LPO üzerine tannik asit, 3,4-dihidroksibenzoik asit, 3,5-dihidroksibenzoik asit, klorojenik asit, sinapik asit, 4-hidroksibenzoik asit, vanilik asit, salisilik asit ve 3-hidroksibenzoik asidin etkileri araştırılmış, güçlü inhibisyon etkisi bulunmuştur.

Bu çalışmanın amacı, farklı memeli (Sığır, manda, koyun ve keçi) sütlerinden saflaştırılmış LPO enzimi üzerine 5-amino-2- metilbenzensulfonamid, 3,5-diklorosülfanilamid, 2-amino-5-metil-1,3- benzendisülfonamid, sulfisomidin, sulfadiazin, sulfamerazin, sulfametazin, sulfisokzol, sulfasetamid, sulfametoksipiridazin, sulfaguanidin inhibisyon etkilerini belirlemektir.

Çalışmada, moleküllerinin inhibisyonları incelenerek IC₅₀, Ki ve inhibisyon tipleri belirlendi. İnhibisyon gösteren sülfanilamid türevi moleküller için afinite kolonları sentez edilip daha iyi verimle memeli LPO enzimlerinin saflaştırılması sağlandı.

Yöntem olarak, Afinite kromatoğrafisi ile çeşitli memeli sütlerinden LPO saflaştırıldı. Saflaştırılan enzimlerin Aktivite Ölçümü H₂O₂ tarafından 2,2'-azino-bis(3- etilbenziazolin-6-sulfonik asit) (ABTS) kromojenik substratın yükseltgenmesi ve oluşan renkli bileşiğin meydana getirdiği absorbans artışının 412 nm'de izlenmesi esasına dayanır. Aktivite tayininde şu prosedür takip edildi; 3 mL'lik spektrofotometre küvetine 2.8 mL 1 mM ABTS ve 0.1 mL 3.2 mM H₂O₂ pipetlendi. 0.1 mL enzim çözeltisi ilave edilerek, küvet alt üst edildikten sonra spektrofotometreye yerleştirilerek köre karşı 412 nm'de absorbans artışı, 3 dakika süreyle her 60 saniyede bir olmak üzere kaydedildi. Kör olarak enzim çözeltisi yerine 0.1 M fosfat tamponu pH=6,0 konularak diğer çözeltiler aynı oranda kullanıldı. Aktivite hesabında 1 dakikalık absorbans artışı esas alınmıştır.

Afinite Kromatoğrafisi Yöntemi ile Sığır, Manda, Koyun ve Keçi Sütlerinden Laktoperoksidaz Enziminin Saflaştırılma Prosedürü; Memeli sütlerinin yağının çıkarılması için sığır sütü, 3000 x g'da 4 ° C'de 15 dakika santrifüjlendi. Amberlit CG₅₀ NH₄⁺ reçinesi, 4.4 g / 150 mL oranında ilave edildi. Daha sonra reçine damıtılmış su ve sodyum asetat çözeltisi (0.5 mM, pH 6.8) ile yıkandı. Bağlanan proteinler, sodyum asetat çözeltisi (2 M, pH 6.8) ile yıkandı. Elde edilen madde saflaştırılmış LPO'yu elde etmek için Sefaroz-4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite kolonuna uygulandı. İn vitro İnhibisyon Araştırmaları Sabit substrat konsantrasyonunda (ABTS) 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda her bir inhibitör için aktivite değerleri hesaplandı, %Aktivite ve buradan %50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonu değerleri IC₅₀ çalışıldı. Daha sonra 5 farklı sabit substrat konsantrasyonun da ve her bir inhibitör için 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonlarında Linewaver-Burk grafikleri yardımıyla Ki değerleri tespit edildi. Protein konsantrasyonu belirlenirken, sığır serum albüminin standart olarak kullanılması ile Bradford metodu ile hesaplanmıştır.

Araştırma Bulguları, Çalışmalarımız için hazırlanan afinite kolonlarından elde edilen elüatlardaki enzim muhtevası, 280 nm ve 412 nm deki absorbans değerleri ölçülerek R_Z=A₄₁₂/A₂₈₀ oranı olarak belirlendi. R_Z değeri 0,6 den büyük olan elüatlar birleştirildi. Bu değer LPO enziminin saflaştırılması çalışmalarında hemen bütün araştırmacılar tarafından kullanılmıştır. Kantitatif protein tayinleri Bradford

metoduyla ile yapıldı ve afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltisi ve hemolizattaki protein miktarları bu yöntemle bulundu. Bu yöntem, proteine coomassie brilliant blue G-250'nin bağlanması esasına dayanır. Oluşan kompleks 595 nm'de maksimum absorpsiyon gösterir. Proteine boyanın bağlanması çok hızlı olur. Protein-boya kompleksi çözeltilerde uzun süre kalır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır. LPO enziminin aktivitesi, ABTS kromojenik substratın H₂O₂ tarafından yükseltgenmesi ve oluşan renkli bileşiğin meydana getirdiği absorpsiyon artışının 412 nm'de izlenmesi esasına dayanır. Kromatografik işlemler sonucunda elde edilen elüatlarda LPO enziminin aktivitesinin belirlenmesinde bu yöntemin tercih edilmesinin sebebi, literatürde enzimin bilinen en iyi substratı olması ve molar ekstinksiyon katsayısının literatürde verilmesidir ($\epsilon_{412}=32400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Enzim aktivite ölçümleri sonuçları için 1 enzim ünitesi 20°C'de 1 dakikada 1 µmol ABTS'nin oksidasyonunu katalizleyen enzim miktarı olarak tanımlandı. LPO enzimi sığırdan sülfanilamid ligandı ile %74,00 verimle 428,57 kat saflaştırıldı. Saflaştırılan enzim için Km değeri 0,11 mM ve Vmax değeri 0,50 EÜ/mL olarak bulundu. SDS-PAGE ile enzimin saflığı kontrol edildi ve literatürde belirtildiği gibi tek bant yaklaşık olarak 80 kDa'da bulundu (Şekil 4.4.). 1. kuyuya standartlar; a. (170 kDa), b. (130 kDa), c. (100 kDa), d. (70 kDa), e. (55 kDa), f. (40 kDa), g. (35 kDa), h. (25 kDa), ı. (15 kDa) konuldu, 2. Kuyuya ise sülfanilamid ile saflaştırılan sığır LPO enzimi konuldu. Saflaştırılan LPO enzimi üzerine 5-amino-2-metilbenzensülfonamid, 3,5-diklorosülfanilamid, 2-amino-5-metil-1,3-benzendisülfonamid, sulfisomidin, sulfadiazin, sulfamerazin, sulfametazin, sulfisokzol, sulfasetamid, sulfametoksipiridazin, sulfaguanidin inhibitörleri için detaylı kinetik çalışma yapıldı bu çalışmalar sırasında küvetteki inhibitör konsantrasyonları gösterildi. ABTS substratına bağlı olarak inhibisyon etkisini incelemek amacıyla, doygun olmayan ABTS ($26.67 \times 10^{-2} \text{ mM}$) reaksiyon ortamına farklı konsantrasyonlarda inhibitör ilave edilerek aktivite değerleri hesaplandı. Elde edilen bu değerlerle %Aktivite-Konsantrasyon grafikleri çizilerek IC₅₀ değerleri bulundu. Sığır LPO için bu grafikler gösterildi. IC₅₀ değerleri 5-amino-2- metilbenzensülfonamid için; 0,69 µM, 3,5-diklorosülfanilamid için; 346,50 µM, 2- amino-5-metil-1,3-benzendisülfonamid için; 115,00 µM, sulfisomidin için; 173,00 µM, sulfadiazin için; 92,24 µM, sulfamerazin için; 309,00 µM, sulfametazin için; 346,50 µM, sulfisokzol için; 221,70 µM, sülfasetamid için; 3,45 µM, sulfametoksipiridazin için; 173,20 µM sulfaguanidin için; 17,15 µM olarak bulundu. Tüm moleküllerin IC₅₀ değerlerinin sonuçlarına bakıldığında LPO enziminin inhibitörü olabileceği ortaya konuldu. İnhibisyon tiplerini belirlemek amacı ile Ki değerlerinin hesaplanması çalışmalarına geçildi. Sığır LPO için bu grafikler gösterildi. Ki değerleri 5-amino-2- metilbenzensülfonamid için 0,41 nM, 3,5-diklorosülfanilamid için 103,32 µM, 2-amino-5-metil-1,3-benzendisülfonamid için 16,37 µM, sulfisomidin için 122,00 µM, sulfadiazin için 90,66 µM, sulfamerazin için 78,00 µM, sulfametazin için 198,00 µM, sulfisokzol için 182,66 µM, sulfasetamid için 870,00 µM,

sulfametoksipiridazin için 56,30 μM , sulfoguanidin için 1,24 μM 'dir. Böylece saflaştırmada kullanılan ligandların detaylı kinetik parametreleri ve inhibisyon tipleride ilk kez tespit edilmiş oldu. Çalışılan sülfanilamid molekülleri LPO enziminin yeni inhibitörleri olarak tespit edildi ve inhibisyon etkisi gösteren bu moleküllerin her biri için afinite jelleri sentezlendi.

CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B matriks, L-tirozin ise uzantı kolu olarak kullanıldı ve pH: 10 tamponunda karıştırılarak 4°C'de 16 saat boyunca şişirildi. Her bir inhibitörden 25 mg alınarak Sepharose-4B-L-tirozin-ligand jelleri hazırlandı. Hazırlanan afinite kolonlarına yağı alınarak süt içerisine zayıf asidik katyon değiştirici olan Amberlit CG 50 H+ katılarak kısmı bir saflaştırma yapıldı. Homojenat hazırlanan kolonlara tatbik edildi, Rz değeri ($Rz=A412/A280$) 0,6'dan büyük olan tüpler birleştirildi ve absorbanslarına bakıldı. Afinite jellerinin sentezlendiği sülfanilamid türevlerinin diazonyum tuzu oluşturarak jelin renklenmesinden anlaşıldı. Diazonyum tuzları bileşikleri renkli ürünler verdiği literatürde bilinmektedir. 200 mL memeli sütü-amberlit ile hazırlanan homojenatların herbirinden 50 mL, 5-amino-2-metilbenzensülfonamid afinite kolonuna tatbik edildiğinde saflaştırma basamaklarının sonunda enzim sığır sütünden 84,75 spesifik aktiviteyle %82,68 verimle 1059,37 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırma sonunda 200 mL süttten 0,12 mg LPO elde edilmiştir. Literatürde ise 1 litre sığır sütünden 6-9 mg LPO elde edilmiştir. Elde ettiğimiz miktar literatüre yakındır. Enzim manda sütünden 168,00 spesifik aktivite ile %35 verimle 509,09 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırma sonunda 200 mL süttten 0,09 mg LPO elde edilmiştir. LPO enzimi koyun sütünden 6,97 spesifik aktivite ile %14,3 verimle 232,558 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırma sonunda 200 mL süttten 0,43 mg LPO elde edilmiştir ve keçi sütünden 11,30 spesifik aktivite ile %11 verimle 161,90 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırma sonunda 200 mL süttten 0,09 mg LPO elde edilmiştir. Sülfanilamid molekülü ile yaptığımız çalışmada sığır sütü %74 verimle 428,57 kat saflaştırılmıştı, 5-amino-2-metilbenzensülfonamid ile %82,68 verimle saflaştırma katsayısı iki katına çıkarılmıştır. Aynı kolondan ilk defa manda sütünün 509,09 kat, koyun sütünün 232,55 kat ve keçi sütünün 161,90 kat saflaştırılmasında oldukça önemlidir ve ilk defa yapılmıştır. 2-amino-5-metil-1,3-benzendisülfonamid, 3,5-diklorosülfanilamid, sulfisomidin, sulfadizin, sülfametazin, sulfometoksipiridazin, sulfaguanidin ve sulfisokzol ligand olarak kullanıldığında sığır, keçi, koyun ve manda sütünden saflaştırma hiç gerçekleştirilemediği gözükmektedir. Ligand olarak saflaştırılmada kullanılması uygun değildir. Sulfamerazin ligand olarak kullanıldığında sığır, keçi, koyun ve manda sütünden saflaştırmada; manda sütünden enzim 36,69 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırma basamakları sonunda yüzde verim değeri ise 1,88 olarak bulunmuştur, koyun sütünden enzim 65,11 kat saflaştırılmıştır, keçi sütünden 36,85 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırılmalar da verimler çok düşüktür saflaştırma katsayıları da dikkate değer bulunmamıştır. Ligand olarak saflaştırılmada kullanılması uygun değildir.

Sonuç olarak, 11 ticari sülfanilamid türevi molekülün sığır LPO enzimi üzerine kinetik çalışması yapıldı. Çalışılan 11 molekülün enzimin yeni, dönüşümlü ve etkili inhibitör olduğu tespit edildi ve ligand olarak kullanılma potansiyelleri ortaya konuldu. Bu moleküllerden hazırlanan afinite kolonlarından sadece sığır sütü LPO enzimi değil, ilk defa manda, koyun ve keçi sütleri de tek basamakta saflaştırıldı. LPO saflaştırılmasında; 5-amino-2-metilbenzensulfonamid çalıştığımız moleküller içerisinde en etkili ligandlar olarak tespit edildi. Mevcut yöntemde sülfanilamid ligandı ile 409,00 kat saflaştırılan sığır LPO enzimi 5-amino-2-metilbenzensulfonamid molekülü ile 1059,37 kat saflaştırıldı. Sonuçlar literatür ile kıyaslandığında tekbir molekül ile dört memeli sütünü saflaştıracak hiçbir ligand olmadığı görülmektedir. 4. Böylece mevcut tez kapsamında bize ait olan yöntemimiz geliştirilerek tek kademedede ve ucuz maliyette LPO saflaştırması yapabilen 5-amino-2- metilbenzensulfonamid molekülü literatüre kazandırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Enzim inhibisyonu, Sülfanilamid, Laktoperoksidaz, Memeli sütleri, Saflaştırma

ABSTRACT

Purification of the Lactoperoxidase Enzyme With Using Sulfanilamide Derivatives From Mammalian Milk

Köksal, Zeynep

Ph.D. Thesis, Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Hasan Özdemir

October 2015

To investigate the usability for the purification of the Lactoperoxidase (LPO E.C.1.11.1.7) enzyme from different mammalian milk, 5-amino-2-methylbenzenesulfonamide, 3,5-dichlorosulfanilamide, 2-amino-5-methyl-1,3-benzenedisulfonamide, sulfisomidin, sulfadiazine, sulfamerazine, sulfamethazine, sulfisoxazole, sulfacetamide, sulfamethoxypyridazine, sulfaguanidine molecules, which are sulfanilamide derivatives, were studied. For this purpose, the kinetic parameters of the molecules is determined using a pre-purified bovine LPO enzyme. Half maximal inhibitory concentration IC_{50} values were calculated for each molecules respectively 0.693, 115.00, 346.50, 173.00, 92.24, 309.00, 346.50, 221.70, 3.4, 173.20 and 17.15 and on the other hand K_i values were determined respectively 0.0004, 16.37, 103.32, 122.00, 90.66, 78.00, 198.00, 182.66, 870.00, 56.30 and 1.24 μM . Affinity columns were synthesized for each molecules which showed alternately inhibition and purification tables were prepared for each mammalian LPO enzyme. As a result of the purification step, 5-amino-2-methylbenzenesulfonamide is the highest potential among used molecules. Bovine LPO enzyme was purified 1059.37-fold with 82.68% yield, buffalo LPO was purified 509.09-fold with 34.67% yield, sheep LPO was purified 232.55-fold with 14.35% and goat LPO was purified 161.90-fold with a yield of 11.30%. The purity of the purified enzyme was checked by SDS-PAGE and only one band approximately 80 kDa was found. Kinetic parameter of bovine LPO that purified from 5-amino-2-methylbenzenesulfonamide column, was performed for this purpose optimum pH: 6.0, optimum temperature 45°C, K_m value 0.15 mM and V_{max} value 0.6 EU/mL while for buffalo LPO optimum pH: 5.5, optimum temperature 70°C, K_m value 0.08 mM and V_{max} value 0.46 EU/mL were determined. Binding capacity was determined 0.05 mg/g gel at 15°C pH: 8.0 and at a concentration of 0.3 M ionic strength.

Keywords: Purification, Enzyme inhibition, Lactoperoxidase, Mammalian milk, Sulfanilamide