

T.C
Marmara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Biyokimya Anabilim Dalı

İNSAN TROMBOSİT GAMMA-GLUTAMİL TRANSFERAZ'IN KARAKTERİZASYONU

DOKTORA TEZİ

Ecz. Azize Yaman Şener

44812

Danışman
Prof. Dr. Turay Yardımcı
M.Ü. Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı

İstanbul 1995

ÖNSÖZ

Bu tezin hazırlanmasında değerli katkı ve yardımları için danışmanım Prof. Dr. Turay Yardımcı'ya , grafik çizimlerdeki yardımları için eşim Mak. Müh. Okan Şener'e ve tezin yazımındaki katkılarından dolayı Vildan Şener'e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. GAMMA-GLUTAMİL TRANSFERAZ	2
2.1.1. Dokularda Dağılımı	2
2.1.2. GGT'nin Görevleri	3
2.1.3. GGT'nin Yapısı ve İzoenzimleri	5
2.1.4. Substrat ve İnhibitörleri	7
2.1.5. Patolojik Durumlarda GGT	8
2.2. TROMBOSİTLER	9
2.2.1. Trombosit Fonksiyonları	9
2.2.2. Trombosit Biyokimyası	10
2.2.3. Trombosit Membranı	11
2.2.4. Trombosit GGT'si	12
3. MATERYAL VE METOD	13
3.1. KULLANILAN MATERYALLER	13
3.1.1. Kimyasal Maddeler	13
3.1.2. Cihazlar ve Diğer Gereçler	13
3.2. METOTLAR	14
3.2.1. Trombositlerin Eldesi	14
3.2.2. GGT Aktivitesi Tayini	15
3.2.3. Adrenalinle Uyarılan Trombosit Sekresyonunun GGT Aktivitesi Üzerine Etkisi	15
3.2.4. Trombositlerden GGT Eldesi ve Saflaştırılması	16
3.2.5. Kobay Karaciğer ve Böbreğinden GGT'nin Kısmi Saflaştırılması	17
3.2.6. Elektroforez Yöntemleri	17
3.2.7. GGT İzoenzimlerinin Saptanması	19
3.2.8. Trombosit GGT'si ile kinetik çalışmalar	20

4. BULGULAR	23
4.1. Adrenalinle Uyarılan Trombosit Sekresyonunun GGT Aktivitesi Üzerine Etkisi	23
4.2. Trombosit GGT'sinin Saflaştırılması	23
4.3. Elektroforez Çalışmaları	28
4.4. GGT İzoenzimleri	29
4.5. Trombosit GGT Kinetiği	31
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	46
6. ÖZET	53
7. SUMMARY	54
8. KAYNAKLAR	55



KISALTILMIŞ TERİMLER DİZİNİ

a a	:amino asid
ADP	:adenosin difosfat
AT-125	:(α S, 5S)- α - amino 3 kloro 4,5 dihidro 5 izoksalo asetik asid
ATP	:adenozin trifosfat
BKY	:bromkresol yeşili
Con A	:concanavalin A
Davis-PAGE	: Davis poliakrilamid gel elektroforezi
DEAE-selüloz	:diethylaminoethyl selüloz
DON	:6 diazo 5 okso norlösin
DNA	: deoksiribonükleik asid
EDTA	:etilendiamine tetra asetik asid
GGT	:gamma-glutamyl transferaz
Gli	:glisin
Glu	:glutamik asid
GSH	:indirgenmiş glutatyon
HPLC	:yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
LTC ₄	:lökotrien C ₄
LTD ₄	:lökotrine D ₄
MPA	:Maclura Pamifera
NADPH	:nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
PGD ₂	:prostaglandin D ₂
PGE ₁	:prostaglandin E ₁
PGI ₂	:prostaglandin I ₂
PPP	:trombositten fakir plazma
PRP	:trombositten zengin plazma
RCI	:Ricinus Commun I
RCII	:Ricinus Commun II
SDS-PAGE	:sodyum dodesil sülfat poliakrilamid gel elektroforezi
Sis	:sistein

TCA	:trikloro asetik asid
Tris	:trishidroksi metil aminometan
UEA	:Ulex Europaeus
vWF	:von Willebrant Faktör



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Gamma - glutamil transferaz (GGT) heterodimerik glikoprotein yapısında membrana bağılı bir enzimdir(1,2). Böbrek, karaciğer, pankreas, prostat, testis, ince bağırsak, dalak gibi organlarda vücut sıvılarında varlığı gösterilen(3,4) GGT'nin amino asitlerin ve peptidlerin transportunda, glutatyon metabolizmasında, merkapturik asit oluşumunda görev aldığı bildirilmiştir(5).

Trombositlerde GGT ile ilgili az sayıda çalışma bulunmaktadır. GGT aktivitesinin aterosklerozlu olguların trombositlerinde azaldığı(6) ve antitrombotik bir ilaç olan defibrotidin in vivo etkisiyle bu azalmanın normale döndüğü laboratuvarımızda tesbit edilmiştir(7). Bu çalışmada normal olguların trombositlerinde GGT karakterizasyonuna gidilmesi amaçlanmıştır. Deterjanlarla solubilizasyon, amonyum sülfat çöktürmesi, gel filtrasyon, iyon değiştirici kromatografi, grup afinite kromatografi yöntemleri ile GGT'nin saflaştırılması, γ -glutamil p-nitroanilid ve glisilglisin substratları kullanılarak GGT kinetiğinin belirlenmesi, enzimin optimum pH, optimum temperaturün saptanması, L-serin-borat kompleksi, bromkresol yeşili gibi spesifik inhibitörlerin etkisi ve enzimin trombosit izoenziminin saptanması planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. GAMMA-GLUTAMİL TRANSFERAZ

Gamma-glutamil transferaz (GGT, γ -GT), (5-glutamil peptid-amino asit 5-glutamil transferaz, EC 2.3.2.2) membrana bağılı bir enzimdir(1). GGT hücrelerin plazma membranlarının dış yüzeyinde yer alır(2).

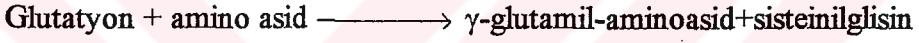
2.1.1. Dokularda Dağılımı

GGT başlıca yüksek sekresyon ve absorbtif kapasiteye sahip hücrelerin membranlarında bulunur(3). Böbrek, pankreas, karaciğer , prostat, testisler, ince bağırsak, dalak(3,4), santral sinir sisteminde(8), trombositler(6,9), lökositler ve kemik iliği hücrelerinde(9) varlığı gösterilmiştir. İskelet kası ve miyokardiyumda ise ölçülebilecek düzeyde GGT aktivitesine rastlanmamıştır. En yüksek GGT aktivitesi böbrekte bulunur. Daha sonra sırasıyla karaciğer, pankreas ve ince bağırsak gelir. Bu organlarda GGT aktivitesi özellikle proksimal böbrek tübülleri, safra sisteminin iç epitel hücreleri, hepatik kanal, pankreatik kanallar ve ince bağırsaktaki fırça kenarlı hücrelerde lokalize olmuştur(3). Fetal karaciğer yetişkin karaciğerinden daha fazla GGT aktivitesi içerir(10). Akciğer çok düşük düzeyde GGT aktivitesine sahiptir(4,11).

Sağlıklı kişilerin serumları böbrekteki yüksek aktivite ile kıyaslanınca eser miktarda GGT aktivitesi içerir. GGT aktivitesi serum dışında safra(5), idrar(12), beyin omurilik sıvısı(8), seminal sıvı ve tükürkte(13) bulunur.

2.1.2. GGT'nin Görevleri

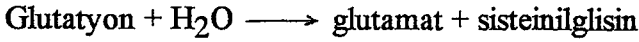
1- GGT indirgenmiş glutatyonun (GSH) yıkımında rol oynar. γ -glutamil artığını çeşitli amino asitlere, peptidlere veya suya transfer eder.



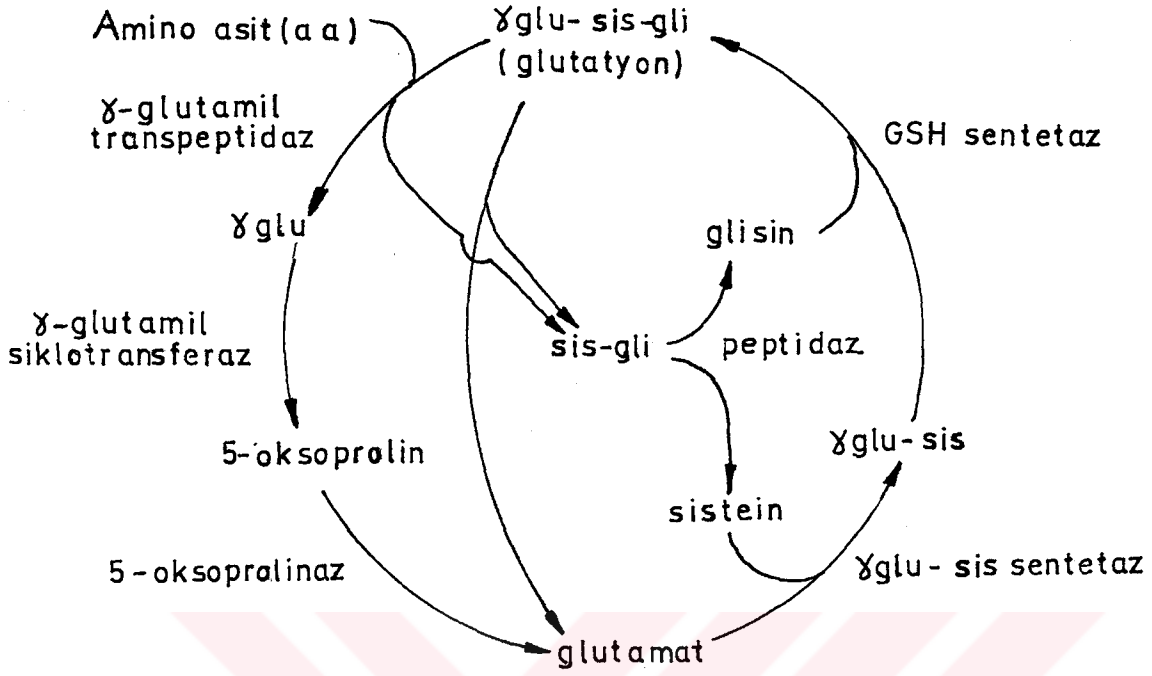
Bazen akseptör glutatyonun kendisinde olabilir;



eğer akseptör su ise glutatyonun hidrolizi gerçekleşir(5,14).

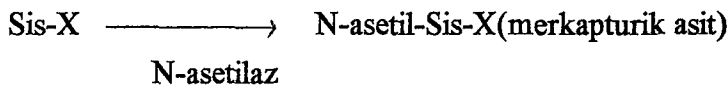
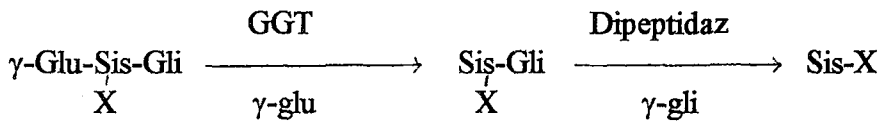
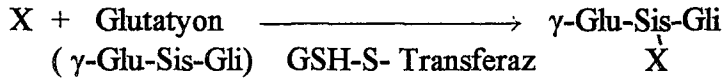


2- GGT'nin bir diğer görevinde amino asitlerin hücre içine alınmasıdır. Bu olay γ -glutamil siklusu adı verilen ve glutatyonun sentez ve yıkımında içine alan sıklusta gerçekleşir. Bu sıklusta glutatyonun γ -glutamil grubu amino asitlere transfer edilirken hücre içine alınan γ -glutamil amino asit γ -glutamil siklotransferazın etkisiyle 5-oksoprolin ve amino aside ayrılır. Hücre içine alınan amino asit tekrar kullanılmak üzere amino asit havuzunu oluşturur. İndirgenmiş glutatyon γ -glutamil siklusunda tekrar oluşturulur ve muhtelif intraselüler enzimatik reaksiyonlarda koenzim olarak rol oynar(1,5,15,16).

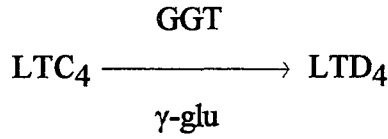


Şekil 1.1. γ -glutamil siklusu (1)

3- Glutatyon-S-konjugatlarından merkapturik asid oluşumu sırasında görevli enzimlerden biridir. Elektrofilik merkezi olan birleşikler (ilaçlar) glutatyonla kolayca konjuge olabilirler(5).



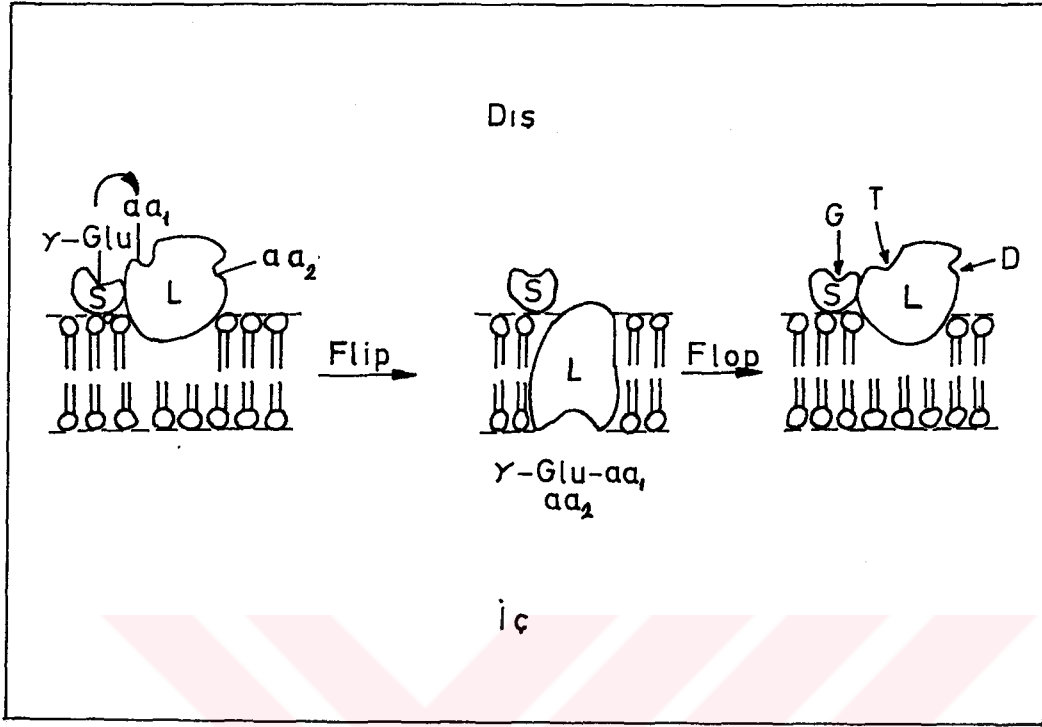
4- İnflamasyon ve alerjik cevaplarda önemli rollere sahip biyolojik mediatörler grubun dan biri olan lökotrien D'nin oluşumunda görevlidir(17).



5- Hücre yaşlanması, hücre farklılaşması ve bir takım dokuların preneoplastik değişiklikleri için yararlı bir marker enzim olabilir(14).

2.1.3. GGT'nin Yapısı ve İzozimleri

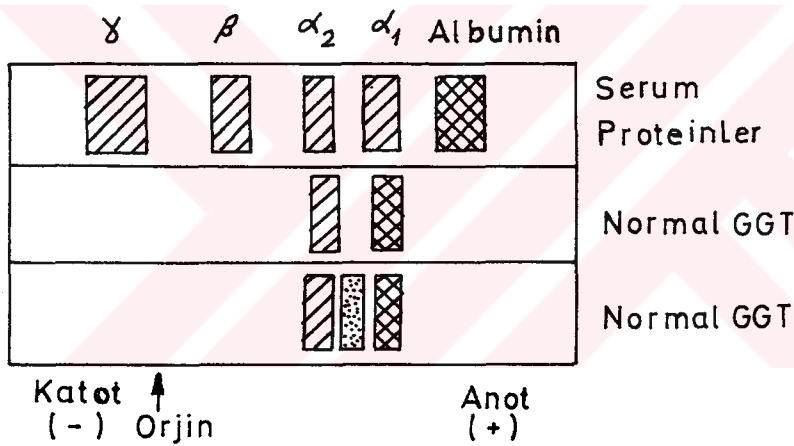
Membrana bağlı bir enzim olan GGT heterodimerik bir sialoglikoproteindir(18). GGT iki sübüniteden oluşmuştur. Yapısında hidrofilik ve hidrofobik grupları bulundurur. Bu nedenle amfilik özellik gösterir. Çeşitli dokulardan elde edilen GGT molekül ağırlığı ve yükü yönünden farklılıklar gösterir. Karaciğerden izole edilen GGT'nin molekül ağırlığının kullanılan metoda bağlı olarak 90.000-120.000 Da arasında değiştiği gözlenmiştir(3). Sıçan böbreğindeki GGT'nin 22.000 Da molekül ağırlığındaki hafif subunitesinin (L) enzimin hidrofilik kısmını oluşturduğu hidrofobik özellik gösteren kısım ise 51.000 Da molekül ağırlığındaki ağır subünitede (H) olduğu gösterilmiştir. Enzimin katalitik kısmı hafif subünitedir ve enzim membrana ağır subunitin N-terminal kısmı ile bağlanmıştır. Hafif subunit ağır subuniteye nonkovalan olarak bağlıdır(3,19). Osuji'ye (20) göre GGT amino asidi veya peptidi hücre içine şekil 2.2'deki modele göre flip flop mekanizması ile aktarır.



Şekil 2.2. Hücre membranının karşısına amino asitlerin translokasyonu için flip flop mekanizmasının gösterimi (20). (S ve L, küçük ve büyük subuniteleri, G,T,D harfleri ise γ -glutamil grubunun bağlandığı yeri, transpeptidasyon ve diffüzyon bölgelerini göstermektedir.)

Safra asitleri veya Triton X-100 gibi deterjanlarla ekstre edildiğinde GGT'nin tümü solubilize edilebilirken, papain tripsin gibi proteazlar kullanıldığında hidrofobik kısmın membrana bağlı kaldığı hidrofilik kısmın solubilize olduğu görülür. Böylece aktif bölge membrana bağlı kısımdan ayrılır(3). GGT erkek sıçan böbreklerinden papain ve Triton X-100 ile ayrı ayrı solubilize edilmiş ve iki metod arasında kıyaslama yapılmıştır. Bu çalışmaya göre hafif subünitenin her iki metotda da aynı molekül ağırlığında olduğu gözlenmiş ve hem N terminallerinde hemde C terminallerinde aynı amino asid kalıntılarının bulunduğu görülmüştür. Ağır subünitenin her iki metotla farklı molekül ağırlığında olduğu, C terminal amino asid kalıntılarının aynı fakat N terminalde Tritonla solubilize edilen kısmı methionin içerirken, papainle solubilize edilen kısmın glisin içerdiği saptanmıştır. Yine her iki metotla elde edilen GGT'nin oligosakkarit zincir sayıları araştırıldığında hafif subünitede hem papain hemde Tritonla 3 oligosakkarit zinciri bulunurken, ağır subünitede Tritonla 3, papain ile 2 oligosakkarit zinciri tespit edilmiştir(14).

GGT dokulardan ekstre edildiğinde molekül ağırlığında ve yükünde heterojenite gösterir. Bir çok çalışmalarda serum GGT aktivitesinin kaynağının büyük bölümünü karaciğerin oluşturduğu düşünülmektedir. Böbrek, pankreas ve ince bağırsak serumdaki normal aktivitenin çok azını oluşturur. Karaciğer ve serum GGT'si aynı kinetik özelliklere sahiptir. Serum GGT izoenzimleri için sağlıklı kişilerde 2 veya 3 bant gözlenmiştir(3). Şekil 2.3 de serum GGT izoenzimleri selüloz asetat elektroforez yöntemi kullanılarak serum proteinleri ile karşılaştırılmaktadır. Normal kişilerde α_1 -globulin ve α_2 -globulin fraksiyonlarında iki GGT izoenzimi bazı kişilerde de α_1 -globulin ve α_2 -globulin arasında bir üçüncü GGT izoenzimi bulunmuştur(21). İzoenzimleri belirlemek amacıyla kağıt, nişasta gel, agaroz, selüloz asetat ve poliakrilamid gel elektroforezi yöntemleri kullanılmıştır. Kağıt ve gel üzerinde GGT bantlarını belirlemek amacıyla substrat olarak, L- γ - glutamil p-nitroanilid, γ -glutamil (α veya β) naftilamid ve γ - glutamil 7- amino metil kumarin kullanılmıştır(3).



Şekil 2.3. Serum proteinlerine göre kıyaslandığında normal GGT bantları (21).

2.1.4. Substrat ve İnhibitörleri

γ -glutamil transferaz tayininde önceleri substrat olarak serum için α (N- γ -DL-glutamil) amino nitrit(22), dokudaki ölçümler içinde γ -glutamil naftilamid kullanılmıştır(23). Ayrıca N-(DL- γ -glutamil)anilin ve L- γ -glutamil 7-amino metil kumarinde substrat olarak kullanılmıştır (4). Son zamanlarda substrat olarak L- γ -glutamil 3 karboksi 4 nitroanilid(24), akseptör glisilglisin veya substrat L- γ -glutamil p-nitroanilid, glisilglisin

akseptör olarak kullanılmaktadır(25). Akseptör olarak zaman zaman çeşitli amino asitler ve glutatyonda kullanılmıştır. L- γ -glutamil 7-amino metil kumarin de substrat olarak halen kullanılmaktadır. Kumarin türevleri p-nitroanilid türevlerine göre daha kolay çözünürlüğe sahiptir. Özellikle izoenzim çalışmalarında kullanılmaktadır. Reaksiyon sonunda büyük analitik hassasiyete sahip fluerasan ürünler verirler(21,26).

GGT'nin inhibitörlerinden biri L-serin-borat karışımıdır. Serinin hidroksil ve amino grupları inhibisyon için gereklidir. GGT için L-serin, borat varlığında, D-serinden daha güçlü bir inhibitördür. Muhtemelen L-serin ve borat kompleksi γ -glutamil peptidler olan normal substratların yapısını taklit eder ve hafif zincir üzerinde yer alan ve γ -glutamil artığının bağlandığı aktif merkezle birleşir. Borat anyonunda aktif kısımdaki hidroksil grubu ile serinin hidroksil grubu arasında bir köprü kompleks oluşturur. Kompleks stabil olmamasına rağmen aktif merkeze yakın bir grup ile örneğin bir şeker molekülü ile kombinasyonla stabilize olabilir (27,28).

Transpeptidaz glutamin antagonistleri (L-azaserin, DON (6-diazo 5-okso norlösin)), AT-125 ((α S,5S)- α -amino 3 kloro 4,5 dihidro 5 izoksalo asetik asit) ile inkübasyon sonucu irreversible olarak inhibe olur. DON ve L-azaserin hidrosi-amino asit kalıntısı ile aktif merkeze bağlanırken AT-125 muhtemelen farklı bir kalıntısı ile bu kısma bağlanır(14).

Brom kresol yeşili enzimin ağır subunitiyle ilişkiye girerek enzimi inhibe eder(29).

2.1.5. Patolojik Durumlarda GGT

GGT 1963 yılında Goldbarge ve arkadaşlarının çalışmalarına kadar klinik amaçlı kullanılmamıştır(4). Bu ve benzeri çalışmalardan sonra klinik teşhisteki önemi anlaşılmıştır. Serumdaki GGT düzeyleri bazı hastalıklarda özellikle karaciğer hastalıklarında artmaktadır. Serum GGT düzeylerinin normale oranla az veya çok artış gösterdiği durumlar;

- 1- Çeşitli karaciğer hastalıkları (karaciğer kanseri, kronik aktif hepatit, alkole bağlı hepatit, inaktif siroz, tıkanma sarılığı (3,30,31,32,33,34).
- 2- İlaçlar (antikoagülanlar, anal jezikler, antikonvulsanlar,alkol barbutiratlar, gb) (3,35,36, 37,38).
- 3- Diğer hastalıklar: şeker hastalığı(39), hipertroidizm(40), böbrek hastalıkları(41), nörolojik hastalıklar(42), miyokardiyal infarkt(43), romatoid atrit(44), malnutrisyon(45), menenjit(46), hiperlipidemi(47), hipertansiyon(36).

GGT izoenzimlerinin ölçümü, total serum GGT ölçümünden daha çok spesifik bilgi vereceği düşünülerek GGT izoenzimlerinin analizi, karakterizasyonu ve purifikasyonu üzerine yoğun çalışmalar son on yıldır sürdürülmektedir. Hala çeşitli GGT izoenzimlerinin klinik anlamı üzerinde farklılıklar vardır. Tam olarak mekanizması bilinmemekle birlikte şilomikronlar, kolesterol, LDL ve trigliseritlerin GGT ile kompleks oluşturabildiği ve bu kompleksin büyüklüğünün elektroforetik mobilitayı etkilediği belirtilmiştir(3).

2.2. TROMBOSİTLER

Kanm şekilli elementlerinin en küçüğü olup kemik iliğinde megakaryositlerin sitoplazmasından gelişirler. İnsan kanında yaşam süreleri 9-10 gün arasında değişir. Alt aşamadaki canlılarda çekirdekli olup memelilerde çekirdeksizdir. Mitokondri, ribozom ve endoplazmik retikulum içerirler. DNA sentezi yoktur, ancak protein sentezi vardır. Trombositler granülalara sahiptirler. Dense granülalarda ADP, ATP, Ca^{2+} serotonin ve α granülalarda spesifik proteinler (β -Thromboglobulin, trombosit faktör 4, trompospondin, vWF, prostaglandinler) bulunur. Lizozomal organellerden veya granülalardan çok zengin olan bu hücreler sekresyonun olduğu ve fagositoz için önemli olan membran ile bağlantılı tübüler sisteme sahiptirler(48,49,50).

2.2.1. Trombosit Fonksiyonları

Trombositler hemostaz ve trombozda çok önemli elemanlar olup dolaşımda istirahat halinde bulunurlar. Normalde dolaşımda disk şeklinde bulunurlar; buradan uzaklaştırıldığında küresel şekle dönüşürler(50). Yabancı bir yüzeyle temas halinde veya aktivatörlerle aktivasyon sonucu adezyon agregasyon sekresyon fonksiyonlarını gerçekleştirirler. Fizyolojik uyarıya (kollagen, ADP, trombin) cevaben trombositler disk şeklinde sferik şekle dönüşerek şekil değiştirirler ve organellerinde depoladıkları bir takım maddeleri (ADP, serotonin) ortama verirler (sekresyon). Şayet ekstraselüler kalsiyum iyonları mevcut ise agrege olurlar (agregasyon). Bu cevaplar PGD_2 , E_1 , ve I_2 ile inhibe olur (51).

2.2.3. Trombosit Biyokimyası

Trombositler fonksiyonlarını gerçekleştirebilmek için metabolik enerjiye ihtiyaç duyarlar. İhtiyaç duyulan metabolik enerjinin büyük bölümü glikoz ve glikojenin pirüvat ve laktata dönüşümünden sağlanır. Glikojen en fazla bulunan karbonhidrattır. Embden mayerhoff yolu, heksoz monofosfat yolu trikarboksilik asit siklusu ve glikoneojenik yol trombositlerde vardır. Anaerobik glikolizis, oksidatif fosforilasyon ve bu metabolik yollarla ilişkili enzimler trombositlerde bulunur. Glukozun büyük bölümü glikolizle pirüvat ve laktata dönüşürken yalnızca 1/5'i CO₂ ve H₂O'ya dönüşür(48). Glikolizin ilk kontrol basamağı glukozun hücre içine transportudur. Glukozun trombositlere aktif transport ile Na⁺/K⁺ pompa sistemini kullanarak girdiği bildirilmiştir(52,53). Galaktozun da trombositlere aktif transport sistemi ile girdiği bildirilmiştir(54).

Trombositler için heksoz monofosfat yolu enerji temin eden yol olmaktan çok NADPH oluşumunda rol oynamasından dolayı önemlidir. Bu yolun en önemli enzimi olan glukoz 6-fosfat dehidrogenazın trombositlerde mitokondri veya α-granülalarda bulunabileceği bildirilmiştir(55). Heksoz monofosfat yolunda elde edilen NADPH'lar yağ asidi sentezi ve glutatyonun indirgenmesi için kullanılır. Hidroperoksitler özellikle H₂O₂ trombositler tarafından tüketilir. Bu tüketim heksoz monofosfat yolunun daha çok uyarılmasıyla birlikte olur. Bu uyarılma muhtemelen glutatyon peroksidaz - glutatyon redüktaz sistemi tarafından hidroperoksitlerin indirgenmesi esnasında akut NADPH ihtiyacından dolayı olabilir. Trombositler hem direkt hemde indirekt olarak radikal oksijen tipleri tarafından etkilenir. Trombosit membran lipidlerinin, proteinlerin ve DNA'nın oksidasyonuna neden olabilirler. Trombositlerin bu oksidasyondan korunmaları için yeterli indirgenmiş glutatyon stoğu olmalıdır(56,57).

Trombositlerde taurin, alanin, glisin, valin, lösin, isolösin, treonin, serin, tirozin, fenilalanin, histidin, arginin, glutamik asid, aspartik asid, methionin, prolin, sistin vb. amino asidler bulunmaktadır(48). Diğer hücreler gibi amino asidler trombosit membranından aktif olarak transport edilirler. Trombositlerde en az 5 grup amino asid transport sistemi mevcuttur. Bunlar nötral, asidik, bazik, aromatik ve kükürt içeren amino asid sistemleridir. Bunlara ek olarak nötral amino asidlerden lösin, isolösin ve valin transportunu yapan aktif bir sistem vardır(58). Osmotik şok metodu ile muamele edilen trombositlerin şok sıvısında lösin bağlayıcı protein ve histidin bağlayıcı protein aktivitesi gösterilmiş ve şoka uğrayan trombositlerde amino asid transportunun olmadığı gözlenmiştir(59,60).

Trombositler yapılarında çeşitli fosfolipidleri, kolesterol ve kolesterol esterlerini, tri, di ve monogliseritleri içerirler. Bu lipidler özellikle membranda lokalize durumdadır(56).

2.2.3. Trombosit Membranı

Trombosit membranı orjini megakaryositlerin endoplazmik retikulumundan alır. Bir protein, iki lipid tabakası içeren trombosit membranı sialik asid yönünden zengindir ve bu nedenle de trombosit yüzeyi negatif yük taşır. Çevresi ruthenyum kırmızısıyla pozitif olan ve glikoprotein ve mukopolisakkaritler açısından zengin kalın bir örtüyle çevrelenmiştir(48,51).

Seçici geçirgenlik işlevi gören trombosit membranı trombositlere özgü hücrenel reaksiyonlarda da rol oynar ve membranda yer alan proteinler bu açıdan önem taşırlar. Memeli hücre membranlarının proteinleri ikiye ayrılır: Hücre membranının dış plazma yüzeyinde yer alan periferel proteinler membranın lipid bütünlüğünü bozmadan ozmotik şok gibi çeşitli yöntemlerle ayrılabilirler. Lipid membran ile ilişkili olan integral proteinler deterjanlar ile lipid bütünlüğü bozulduktan sonra solubilize edilebilirler. İntegral proteinler plazma yüzüne bakan, sitoplazmik yüze bakan ve hücre membranı boyunca uzanan transmembran proteinler olarak 3 gruba ayrılırlar(51).

Trombosit membran proteinlerinin çoğu glikoprotein yapısındadır ve bunlar trombin, kollagen gibi trombosit aktivasyon ajanlarının adezyonda rol alan von Willebrandt faktörünün ve trombosit agregasyonunda rol alan fibrinojenin ve trombospondinin reseptörlerini oluştururlar. Trombosit glikoproteinleri molekül ağırlıklarına göre I, II, III,.....,IX gibi grublara ayrılırlar. Alt grublara ise büyükten küçüğe doğru küçük harflerle Ia, Ib, Ic gibi gösterilerek sınıflandırılmıştır(54,61).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda adezyon molekülleri adı verilen moleküller tanımlanmışlardır. Bu moleküller integrin, selektin ve immunglobulin benzeri süpergen ailesidir. 1980'li yıllarda trombosit GP IIb/IIIa, VLA ismi verilen lenfosit yüzeyinde adezyon proteinleri ailesi, ekstrasellüler matriksde yer alan fibronectin'e yapışan özgül hücre yüzey reseptörlerinin temelde benzer yapısal özellik taşıdıkları gösterilmiş ve bu yapılara integrin'ler adı verilmiştir. İntegrinler hücre adezyonuna yardım eden hücre yüzey proteinlerinin bir ailesidir, temel yapı olarak membranda bulunurlar ve glikoprotein yapısında olup iki subüniteden (α, β) oluşmuşlardır. Trombosit glikoproteinleri buna göre isimlendirildiklerinde örneğin glikoprotein Ic/IIa VLA₅ veya α_5, β_1 (fibronectin reseptör), glikoprotein Ia/IIa VLA₂ veya α_2, β_1 (kollagen reseptör) gibi adlandırılmışlardır. Selektinler olarak bilinen ikinci grup adezyon moleküllerinden trombosit ve endotel hücrelerinin yüzeylerinde yer alan P-selectin trombin aktivasyonu sonrasında endotel hücresinde nötrofiller ve monositlerin yapışmalarını sağlamaktadır. İmmunglobulin benzeri

süpergen ailesinden olan PECAM (Platelet/endothelial cell adhesion molecule) da trombosit adezyon moleküllerindedir (62,63,64).

2.2.4. Trombosit GGT'si

Trombosit membranı ve sitoskelet proteinin SH grupları oksidasyondan glutatyon tarafından korunur(65). Glutatyon trombosit agregasyonu esnasında araşidonik asit oksidatif metabolizmasında başlıca rol oynar. Lipoksijenaz yolunda peroksidaz aktivitesi glutatyona bağlıdır(66). Glutatyon metabolizmasında görevli önemli enzimlerden biri olan GGT trombosit membranında yer almaktadır(6,9). Trombosit GGT'sinin LTC₄'ün LTD₄'e dönüşümünde rol oynadığı bildirilmektedir(67).



3. MATERYAL VE METOTLAR

3.1. KULLANILAN MALZEMELER

3.1.1. Kimyasal Maddeler

Bovin serum albumin, bromkresol yeşili, Con A sepharose 4B, EDTA, glisilglisin, γ -glutamil p-nitroanilid (GpNA) metil α -D-mannopiranosid, naftiletilediamin dihidroklorür, L-serin, Triton X-100 ve elektroforez maddeleri (akrilamid, BIS (N,N'-metilen bisakrilamid), TEMED (N, N, N', N'-tetrametil etilen diamin), MET (merkaptöetanol), BFB (bromfenol mavisi), APS (amonyum persülfat), coomassie parlak mavisi) Sigma'dan, borat Riedel'den, sephadex G-200 Pharmacia'dan, DEAE selüloz (DE-52) Whatman'dan, Adrenalin Albio'dan periyodik asit ve fuksin Merck firmasından temin edilmiştir.

Diğer kullanılan kimyasal maddeler Merck firmasının amaca uygun saflıkta maddeleridir.

3.1.2. Kullanılan Aletler

Analitik Santrifüj (Beckman Model J.21B, Rotor no:J20)

Klinik Santrifüj (Heraeus, Labofuge 200)

pH Metre (Orion research, ionanalyzer/Model 407A)

Faz kontrast Mikroskop (Olympus)
Fotometre (Boehringer Mannheim, photometer 4010)
Liyofilizatör (Leybold Heraeus, Lyovac GT2)
Magnetik karıştırıcı (Heidolph)
Homojenizatör (Janke-kunkel, Ika-Werk RW 14 H)
Spektrofotometre (Schimadzu spektrofotometer UV-120-02)
UV Kabin (Aymes)
Elektroforez sistemi (El yapımı)
Elektroforez güç kaynağı (Pharmacia)
Etüv (Heraeus)
Agregometre (Chrono-log, Lumi-Aggregometer)
Kromatografi kolonları (Pharmacia ve el yapımı)

3.2. METODLAR

3.2.1. Trombositlerin Eldesi

Çalışmamızda kullanılan olgular yaşları 20-30 arasında değişen, klinik laboratuvar bulguları normal ve herhangi bir ilaç kullanmayan kişilerden seçildi. Başlangıçta normal 20 olguyla çalışıldı ve trombosit GGT düzeyi ortalama: 40.0 ± 7.3 mU/ 10^9 trombosit olarak belirlendi. Bu kişiler arasından seçilen 7 sağlıklı kişinin kan örneklerinden elde edilen trombositler kinetik çalışmalarda kullanıldı.

Sağlıklı 7 kişiden 20 ml kan 1:9 oranında 0.077 mol/L EDTA ile alınıp oda ısısında 20 dakika bekletildi. 5 dakika 1500 rpm'de (klinik santrifüjde) santrifüj edilerek trombosit zengin plazma (PRP) ayrıldı. PRP plastik tüplerde 10.000 rpm'de 15 dakika (analitik santrifüjde) santrifüj edildi. Trombosit pelletleri PRP hacminin iki misli kadar Tris-NaCl-EDTA (0.013 mol/L Trishidroksimetil aminometan + 0.12 mol/L NaCl + 0.005 mol/L EDTA, pH 7.4) tamponu ile yıkandı ve trombosit pelletleri biraraya getirilip 3 kere daha yıkandı ve 10.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Aynı tamponda süspansiyon yapılarak Brecher Cronkite (68) yöntemi ile trombosit sayımı yapıp mm^3 'de 500.000 trombosit olacak şekilde distile suyla süspansiyon yapıldı ve 4 kez dondurulup eritildi. 10.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Çökelti %1 Triton X-100 ile sürekli karıştırılarak 16 saat + 4 C de muamele edilerek solubilizasyon işlemine tabi tutuldu. 10.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilip üst fazda GGT aktivitesine bakıldı.

3.2.2. GGT Aktivitesi Tayini

GGT aktivitesi tayini Szasz'ın (25) metoduna göre yapıldı. Substrat olarak γ -glutamil p-nitroanilid akseptör olarak glisilglisin kullanıldı. 4mmol/L γ -glutamil p-nitroanilid, 1 ml 57 mmol/L hidroklorik asitde çözüldü. Aynı hacimde glisilglisin (40 mmol/L) Tris (185 mmol/L) içeren tamponla karıştırıldı. Karışımın son pH'sı 8.2'ye ayarlandı. Bu çözeltinin oda ısısında 8 saat dayanıklı olduğu tespit edildi. GGT tayini için 100 μ l örnek üzerine 1 ml hazırlanan çözeltiden ilave edildi. 37°C de 405 nm'de 1., 2., 3. dakikalarda okunan absorbanslar arası farkın (ΔA) zamana bölünmesi ile GGT aktivitesi aşağıdaki formülle hesaplandı (p-nitroanilinin mikromolar ekstinksiyon katsayısı: 0.0099).

$$\frac{\Delta A / \text{dakika}}{\text{Absorbivite}(0.0099)} \times \frac{\text{Total Hacim}(1.1 \text{ ml})}{\text{Örnek Hacmi}(0.1 \text{ ml})} = \Delta A / \text{dakika} \times 1111 = \text{GGT U/L}$$

3.2.3. Adrenalinle Uyarılan Trombosit sekresyonunun GGT Aktivitesi Üzerine Etkisi

Biri 23 diğeri 40 yaşlarında iki kişi ile yapılan bu çalışmada 1:9 oranında sitratlı kanlardan elde edilen PRP kullanıldı. 5 μ g/ml konsantrasyon adrenalinin agregasyon için yeterli konsantrasyon olduğu görüldü. Elde edilen PRP'nin bir kısmında PPP elde edildi. 1.8 ml PRP'ye son konsantrasyon 0.5 μ g/ml olacak şekilde 200 μ l Adrenalin ilave edildi. Kontrol olarak da 1.8 ml PRP üzerine 200 μ l serum fizyolojik ilave edildi. 37°C de 15 dakika inkübasyonu takiben trombositler 10.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Üst kısımda ve PPP'de GGT aktivitesi tayin edildi. Trombosit Pelleti 3 kez Tris-NaCl tamponu ile yıkandı ve trombosit miktarı mm^3 de 250.000 trombosit olacak şekilde distile suda süspansiyon yapıldı. 4 kez dondurulup eritildi ve 10.000 rpm'de 15 dakika santrifüj yapıp 16 saat + 4°C de karıştırılarak bekletildi ve bu kısımda GGT aktivitesi 3.2.2 de olduğu gibi tayin edildi.

3.2.4. Trombositlerden GGT Eldesi ve Saflaştırılması(29)

Sağlıklı bir kişiden alınan 200 ml EDTA' lı kandan elde edilen trombositler Triton X-100 ile muamele edilerek solubilize edildikten sonra Tritonlu kısım GGT'nin saflaştırılması için kullanıldı. Tritonlu kısım % 90 kesitli $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ presipitasyonuna tabi tutuldu. 10.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek elde edilen çökelti çözünemediği en az hacimde 10 mmol/L Tris-HCl tamponunda çözüldü. Aynı tampona karşı 24 saat dializ uygulandı. Protein miktarı ve GGT aktivitesi tayinleri yapıldı. Burdan elde edilen örnek gel filtrasyona tatbik edildi. Bu amaçla sephadex G-200 bir gün önceden ıslatılarak şişirildi. Kolona homojen olarak döküldü. Kolondan (0.9x23cm) 3 kolon hacmi kadar % 0.2 Triton X-100 içeren 10 mmol/L Tris-HCl tamponu (pH: 8.3) geçirilerek kolonun dengelenmesi sağlandı %0.1 "Blue dextran" geçirilerek boşluk ("void") hacmi hesaplandı. Kolon hacmi 4ml, blue dextran ise 5-9 ml'de çıktı. 1,5 ml örnek kolona tatbik edildi ve aynı tampon geçirilerek 1.2 ml'lik fraksiyonlar toplandı. Akış hızı 12 ml/saat idi. Toplanan fraksiyonlarda Lowry yöntemi (69) ile protein tayini ve GGT aktivitesi tayini yapıldı. Fraksiyonların 280 nm dalga boyundaki absorpsiyonları okundu.

Sephadex G-200'den elde edilen ve GGT aktivitesi belirlenen fraksiyonlar biraraya getirilerek 14 saat liyofilize edildi. Liyofilize edilen kısımda GGT aktivitesi ve protein miktarı tayin edildi. Buradan elde edilen kısım DEAE- selüloz (DE-52) iyon değiştiriciye tatbik edildi. DEAE selüloz hazır halde olduğundan direkt kolona döküldü. Kolona (0.6x8cm) 10 mmol/L Tris-HCl (PH 8.3) (75mmol/L NaCl ve %0.2 Triton X-100 içeren) tamponu ile yıkandı ve dengelendi. 1 ml örnek tatbik edildi. Aynı tamponla iyon değiştiriciye bağlanmayan proteinler ortamdan tamamen uzaklaştırıldıktan sonra 75 mmol/L NaCl, %0.2 Triton X-100 ihtiva eden 10 mmol/L Tris-HCl (pH: 8.3) ile 0.5 mol/L NaCl, 10 mmol/L MgCl_2 , 10 mmol/L CaCl_2 ve % 0.2 Triton X-100 ihtiva eden 10 mmol /L Tris-HCl tamponları kullanılarak 75 mmol/L-0.5 mol/L lineer NaCl tuz gradienti sağlayacak şekilde tampon geçirildi. 1 ml'lik fraksiyonlar toplandı. Aktivite bulunan fraksiyonlar biraraya toplandı ve 24 saat 10 mmol/L Tris-HCl tamponu (%0.2 Triton X-100 içeren) ile dialize tabi tutuldu. Dializ sonrası elde edilen kısım 14 saat liyofilize edildi. Tekrar GGT ve protein tayini yapıldı. DE-52'den elde edilen kısım Grup afinite kromatografisine tatbik edildi. Bu amaçla Con A Sepharose 4 B kullanıldı. Con A Sepharose 4 B 0.5 mol/L NaCl, 10 mmol/L MgCl_2 , 10 mmol/L CaCl_2 ve %0.2 Triton X-100 içeren 10 mmol/L Tris-HCl (pH: 8.3) tampon ile iyice yıkandıktan sonra 5 ml Con A Sepharose 4 B 0.8 ml DE-52'den elde edilen fraksiyon ile arasıra karıştırılarak 37°C'de 3 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra kolona döküldü (0.9x5cm) ve aynı tamponla (30 ml) dengelendi. Bu

şekilde Con A sepharose 4 B'ye bağlanmayan proteinler ortamdaki tamamen uzaklaştırıldı. Daha sonra aynı tampona 0.3 mol/L metil α -D-mannopiranosid ilave edildi ve bu tampon kolondan geçirildi. 0.8 ml fraksiyonlar toplandı. Toplanan fraksiyonlarda protein miktarı ve GGT aktivitesi tayin edildi. Aktivite bulunan fraksiyonlar biraraya toplanarak 24 saat dializ ve 14 saat liyofilizasyondan sonra tekrar GGT aktivitesi ölçüldü.

3.2.5. Kobay Karaciğer ve Böbreğinden GGT'nin Kısmi Saflaştırılması(29)

Kobay'dan alınan 1.8 g böbrek ve 3.98 g karaciğerle çalışıldı. Dokular 0.1 mmol/L Tris-HCl tamponu (pH: 7.4) ile homojenize edildi. 10.000 rpm'de santrifüj edildi. Homojenat aynı tampon ile iki kez yıkandı. % 1 Triton X-100 ile 16 saat solubilize edilen dokular 10.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Tritonla solubilize edilen kısım 3.2.4.'de olduğu gibi amonyum sülfat çöktürmesi, dializ ve sephadex G-200 yöntemleri ile kısmi olarak saflaştırıldı.

3.2.6. Elektrovez Yöntemleri

Poliakrilamid gel elektroforezi: Saflaştırma çalışmalarının her kademesinde Davis poliakrilamid gel elektroforezi (Davis PAGE) (70) uygulandı.

Kullanılan Çözeltiler:

1- Ayırma geli için (% 7.5 geller kullanıldı)

<u>Solüsyon</u>	<u>Madde</u>	<u>20 ml için madde miktarı</u>	<u>Solüsyonların karışım oranı</u>
A	Akrilamid	6 g	1
	Bis-akrilamid	0.18 g	
B (pH:9)	1 N HCl	4.8 ml	1
	Tris	3.63 g	
	TEMED	0.06 ml	

C	APS	0.072 g	2
---	-----	---------	---

(taze hazırlanır)

2- Konsantrasyon geli

D	Akrilamid	1 g	
	Bis-akrilamid	0.18 g	2

E (pH:7.5)	1 N H ₃ PO ₄	2.56 ml	
	Tris	0.57 g	1
	TEMED	0.02 ml	

F	Riboflavin	0.4 mg	
	Sukroz	8 g	1

3- Marker Çözeltisi

Tris	2.85g	
1N H ₃ PO ₄	12.8ml	
Sukroz	20 g	
BFB	2 g	100 ml'ye distile su ile tamamlanır.

4- Anod Çözeltisi

Tris	12.1 g
1 N HCl	50 ml distile su ile 1 litreye tamamlanır (pH:8.1).

5- Katod Çözeltisi

Tris	6.32 g
Glisin	3.94 g distile su ile 1 litreye tamamlanır (pH:8.7).

6- Boyama Çözeltisi

Commassie Brilliant Blue R 250	0.625 g
Metanol	113.5 ml
Asetik asid	23 ml
Distile su	113.5ml

7- Boya çıkarma çözeltisi

Metanol	50 ml
Asetik asid	75 ml
Distile su	875 ml

Gellerin hazırlanması; 0.5 cm çapında ve 10 cm uzunluğunda gel tüpleri kullanıldı. Gel tüpleri üzerinde 7 cm işaretlendi. Tüplerin altı parafilm ile kapatıldı. TEMED konulmadan belirtilen oranlarda hazırlanan ayırma gelinin liyofilize aletinde havası alındı. Üzerine TEMED ilave edilip karıştırıldı ve tüplere yavaşça döküldü. Gellerin üzerine 2-3 mm yüksekliğinde distile su yayıldı. Geller polimerleştikten sonra üzerlerindeki su emici bir kağıtla kurulandı. Hazırlanan konsantrasyon geli ayırma geli üzerine 1 cm yüksekliğinde döküldü. Yine konsantrasyon geli üzerine 2-3 mm yüksekliğinde distile su yayıldı ve tüpler UV lambanın altına yerleştirildi. Fotopolimerizasyon olayının tamamlandığı gel ile su arasında oluşan ince çizgiden anlaşıldı. 50 µl marker solüsyonu, 50 µl örnek solüsyonu ilave edilerek hazırlanan protokol sıvılarından gellerin üzerine gel başına 50 µl uygulandı. Üst kaba katod solüsyonu dikkatli bir şekilde konuldu. Alt kaba anod sıvısı kondu. Doğru akım güç kaynağının, alt kap pozitif, üst kap negatif uçlarına bağlandı. Gel başına 2 mA akım uygulandı. Protokol sıvısı konsantrasyon gelini geçtikten sonra, akım gel başına 4 mA'e çıkarıldı. Marker çizgisi tüpün bitimine 1 cm kalan seviyeye geldiğinde akım kesildi. Sonra geller tüplerden çıkarıldı. Geller deney tüplerine alındı ve gelleri örtecek yükseklikte boyama çözeltisi konulup bu çözeltide 30 dakika bekletildi. Sonra boya çıkarma solüsyonunda boyaları çıkarıldı. %7.5'luk asetik asid çözeltisi konulmuş kapalı tüplerde (+ 4° C de) saklandı.

3.2.7. GGT İzoenzimlerinin Saptanması

GGT'nin trombositlerde bulunan izoenzimini belirlemek ve serum GGT izoenzimleri ile karşılaştırmak amacıyla trombositlerden Triton X-100 ile elde edilen ve saflaştırılan GGT, serum örneği ve kobay karaciğer ve böbreğinden kısmi olarak saflaştırılan GGT örnekleri Davis-PAGE uygulandıktan sonra aşağıda belirtilen GGT'ye özel reaksiyonla boyandı. Bu şekilde yalnızca GGT bantlarının bulunduğu kısımlar gel üzerinde belirlendi.

Geller üzerinde GGT'nin Belirlenmesi (71): Elektroforez'den hemen sonra akrilamid geller 0.2 mol/L Tris-HCl (pH:8.3), 4mmol/L γ -glutamil p-nitroanilid, 80 mmol/L

glisilglisin, %0.1 sodyum nitrit ve %0.4 naftiletilendiamin dihidroklorür içeren staining çözeltisinde 37°C'de 1 saat bekletildi. İnkübasyondan sonra geller 0.05 mol/L Tris-HCl (pH:8.5) ile iki kez yıkandı. Yıkama işlemini takiben 0.38 mol/L TCA (soğuk) geller üzerine ilave edildi. TCA ilavesinden sonra 10 dakika içinde enzimin bulunduğu bölgelerde pembe bantlar oluştu. Geller distile suda kapalı tüplerde saklandı.

Glikoprotein Boyama Yöntemi(72): Trombositlerden saflaştırma sonucu elde edilen GGT, serum örneği ve kobay karaciğer ve böbreğinden elde edilen GGT içeren kısım poliakrilamid gel elektroforezini takiben glikoprotein boyası ile boyandı.

Kullanılan çözeltiler:

- 1- %12.5 trikloroasetik asid (TCA) çözeltisi
- 2- %3 asetik asid ile hazırlanmış %1 periyodik asid
- 3- %0.5 sodyum metabisülfid çözeltisi
- 4- Schiff Boyası ; 2 g fuksin 400 ml kaynar suda çözüldü. Soğutulup süzöldü ve üzerine 10 ml 2 N HCl ile 4 g sodyum metabisülfid ilave edildi. Karıştırılıp 1 gece karanlıkta bekletildi. 1 g aktif kömür konup çalkalandı ve süzöldü. Üzerine süzgeç kağıdı pembeye boyanmıcaaya kadar 1N HCl eklendi. Çözelti renksiz olmalıdır pembe olduğu zaman bozulmuş demektir. Boya buzdolabında karanlıkta saklandı.

PAGE işleminden sonra geller %12.5 TCA içinde 30 dakika tutuldu. 15 saniye suda çalkalanıp %1 periyodik asid çözeltisi içinde 50 dakika tutuldu. Sonra distile su ile karıştırarak ve 5-6 kez suyu değiştirilerek 1 gece yıkandı. Geller karanlıkta Schiff boyası içinde 50 dakika tutuldu ve %0.5'lik sodyum metabisülfid ile her biri 10 dakika olmak üzere 3 kere (toplam 30 dakika) yıkandı. Boya tamamıyla çıkmıcaaya kadar suyunu sık sık değiştirerek bir gece yıkandı. Geller distile su içinde saklandı.

3.2.8. Trombosit GGT'si ile Kinetik çalışmaları

Bu çalışmaları için 7 sağlıklı kişinin trombositlerinden Triton X-100 solubilizasyonu sonucu elde edilen fraksiyonlar kullanıldı. Her kişinin trombosit GGT aktivitesi önceden belirlendi.

Substrat γ -glutamil p-nitroanilid için K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi; Bu amaçla γ -glutamil p-nitroanilidin 0.05-20 mmol/L arasında değişen konsantrasyonlarında trombosit GGT aktivitesi tayin edildi. Glisilglisin konsantrasyonu 40 mmol/L, pH:8.2, temperatur 37°C olacak şekilde sabit tutuldu.

Akseptör glisilglisin için K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi: Substrat konsantrasyonu 4 mmol/L ve diğer şartlar sabit tutularak glisilglisinin 1-100mmol/L değişen konsantrasyonlarında trombosit GGT aktivitesi ölçüldü.

Optimum pH'nın belirlenmesi; Trombosit GGT'sinin optimum pH'sını belirlemek için γ -glutamil p-nitroanilid 4 mmol/L, glisilglisin 40 mmol/L, temperatur 37°C olacak şekilde tüm şartlar sabit tutuldu. pH:5.8-9.0 arasında değişen pH'larda tamponlar hazırlanarak bu tamponlarla çalışmalar yapıldı. pH:5.8-7.2 arasında 0.2 mol/L fosfat tamponu, pH:7.8-9 arasında 0.1 mol/L Tris-HCl tamponu kullanıldı. Seçilen pH'larda trombosit GGT aktivitesi ölçüldü.

Optimum temperaturün belirlenmesi ve termal stabilite çalışmaları: Optimum temperaturünün belirlenmesi için diğer tüm şartlar sabit tutularak 20°C-56°C arasında değişen sıcaklıklarda 10 dakika inkübasyonu takiben aynı sıcaklıkta GGT aktivitesi ölçüldü. Ayrıca aynı sıcaklıklarda 1 dakika inkübasyonla da GGT aktivitesine de bakıldı.

Enzimin termal stabilitesini görmek amacıyla belli bir ısıda değişen zaman periyotlarında seçilen ısıyla inkübasyon sonucu zamana bağlı olarak GGT aktivitesinin değişimi saptandı. Termal stabilite çalışması için 56°C de çalışıldı. 1-30 dakika arasında değişen inkübasyon zamanlarında GGT aktivitesi ölçüldü.

İnhibitör Çalışmaları; Borat varlığında L-serin (28) ve bromkresol yeşili (29) enzimin inhibitörleridir. Trombosit GGT'si üzerine bu inhibitörlerinin etkisi incelendi. Borat varlığında L-serin ile inhibisyon çalışmasında; substrat γ -glutamil p-nitroanilid konsantrasyonu 4 mmol/L, glisilglisin 40 mmol/L, pH:8.2 olarak sabit tutuldu ve çalışmalar 37°C de yapıldı. 10 mmol/L borat varlığında L-serinin 0.25-5mmol/L arasında değişen konsantrasyonlarında 1 dakika inkübasyonu takiben GGT aktivitesi belirlenerek % nispi aktivite hesaplandı.

İnhibisyon tipini belirlemek için de γ -glutamil p-nitroanilidin 2-10mmol/L konsantrasyonlarında ve 10 mmol/L borat varlığında, L-serin 0.1 mmol/L, 0.5 mmol/L, 1.25 mmol/L, 2.5 mmol/L, 5 mmol/L konsantrasyonlarında ilave edilip 1 dakika inkübasyon sonrası GGT aktiviteleri ölçüldü. İnhibitörün K_i 'sini bulmak için diğer tüm şartlar sabit tutularak 10 mmol/L borat varlığında L-serin'in 0.05-2 mmol/L konsantrasyonlarında çalışıldı. Substrat

γ -glutamil p-nitroanilid 4 mmol/L ve 8 mmol/L konsantrasyonlarında ortama ilave edilerek iki değişik substrat konsantrasyonu içinde değişen konsantrasyonlarda inhibitör varlığında GGT aktivitesi tayin edilip Dixon grafiği (73) kullanılarak K_i hesaplandı.

Brom kresol yeşili ile inhibisyon; bromkresol yeşilinin 0.005-0.1 mmol/L konsantrasyonlarında diğer tüm şartlar sabit tutularak inhibitörün trombosit GGT'sinin inhibe etme oranı belirlendi. İnhibisyon tipinin tayini içinde γ -glutamil p-nitroanilidin 2-10 mmol/L konsantrasyonlarında bromkresol yeşili 0.005 mmol/L, 0.01 mmol/L, 0.05 mmol/L konsantrasyonlarda olacak şekilde ortama ilave edildi ve 1 dakika inkübasyonu takiben GGT aktivitesi ölçüldü.

Enzimin transfer reaksiyon mekanizmasının aydınlatılması; Substrat γ -glutamil p-nitroanilid kullanılarak trombosit GGT'sinin transfer reaksiyonu mekanizma tipinin belirlenmesi amacıyla substratın üç değişik konsantrasyonunda (4 mmol/L, 6 mmol/L, 8 mmol/L) akseptör glisilglisin 10-100 mmol/L konsantrasyonlarında ortama ilave edilerek trombosit GGT aktivitesi belirlendi.

4. BULGULAR

4.1. Adrenalinle Uyarılan Trombosit Sekresyonunun GGT Aktivitesi Üzerine Etkisi

İki kişiden alınan kanlarla yapılan bu çalışmada PRP'ye 5 µg/ml adrenalin ilave edilerek (son konsantrasyon 0.5 µg/ml) trombositler sekresyona uğratıldıktan sonra PRP de ve trombosit pelletinin Triton X-100 ile solubilizasyonu ile elde edilen kısımda GGT aktivitesinde bir farklılık olmadığı , adrenalinle uyarılan trombositlerde GGT' nin sekresyona uğramadığı gözlemlendi (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. GGT aktivitesine adrenalinle sekresyonun etkisi

Olgu No	PRP+SF (U/L)	PRP+Adrenalin (U/L)	Trombosit+ SF (mU/10 ⁹ Tr.)	Trombosit+Adrenalin (mU/10 ⁹ Tr.)
1 A.Y.	2	2	37	37
2 S.Ç.	7	7	16	16

4.2. Trombosit GGT'sinin Saflaştırılması

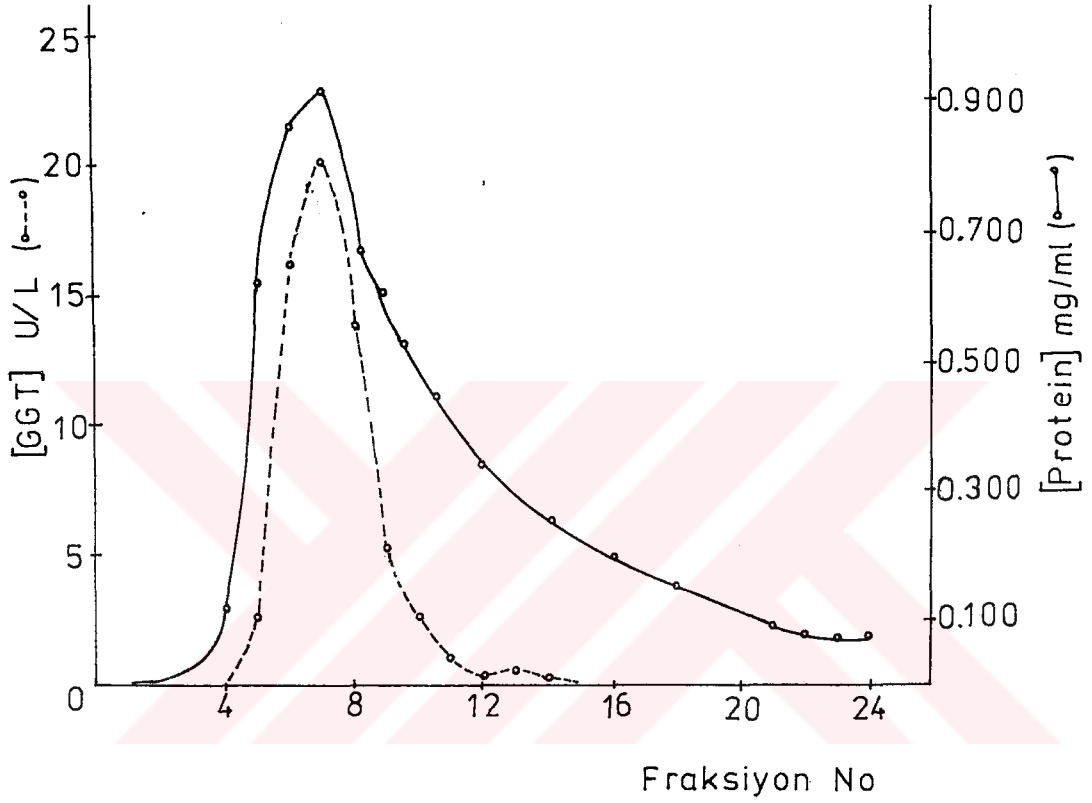
Normal bir kişiden alınan 200 ml kandan ayrılan trombositlerin %1 Triton X-100 ile solubilizasyonunu takiben %90 kesitli (NH₄)₂SO₄ ile çöktürülen protein fraksiyonunun sephadex G-200 kolon kromatografisi, DEAE-selüloz (DE-52) iyon değiştirici

kromatografisi, Con A sepharose 4B ile grup afinite kromatografisi, liyofilizasyon ve dializ yöntemleri kullanılarak GGT saflaştırıldı. Her aşamada protein miktarı ve GGT aktivitesi ölçüldü. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürmesi ile elde edilen proteinler dializ sonrası sephadex G-200 kolon kromatografisine tatbik edildiğinde protein pikine tekabül eden tüplerde GGT aktivitesi görüldü (Şekil 4.1). Yüksek GGT aktivitesi görülen fraksiyonlar (6, 7, 8, 9) biraraya getirildi. Liyofilizasyonu takiben bu protein havuzu DEAE selüloz kolon kromatografisine uygulandı. DEAE selüloz kolon kromatografisinden 0.075 mol/L - 0.5 mol/L arasında lineer NaCl gradienti uygulanarak elde edilen kromatogram şekil 4.2 de görülmektedir. Yaklaşık olarak 0.2 mol/L NaCl konsantrasyonunda GGT'nin elüe olmaya başladığı gözlemlendi. GGT aktivitesi içeren 43-48 nolu fraksiyonlar biraraya toplanarak dializ ve liyofilizasyona tabi tutulup Con A sepharose 4B grup afinite kromatografisine tatbi tutuldu. Grup afinite de tek bir protein piki olarak 6, 7, 8, 9,10 nolu fraksiyonlarda GGT aktivitesi tesbit edildi (Şekil 4.3).

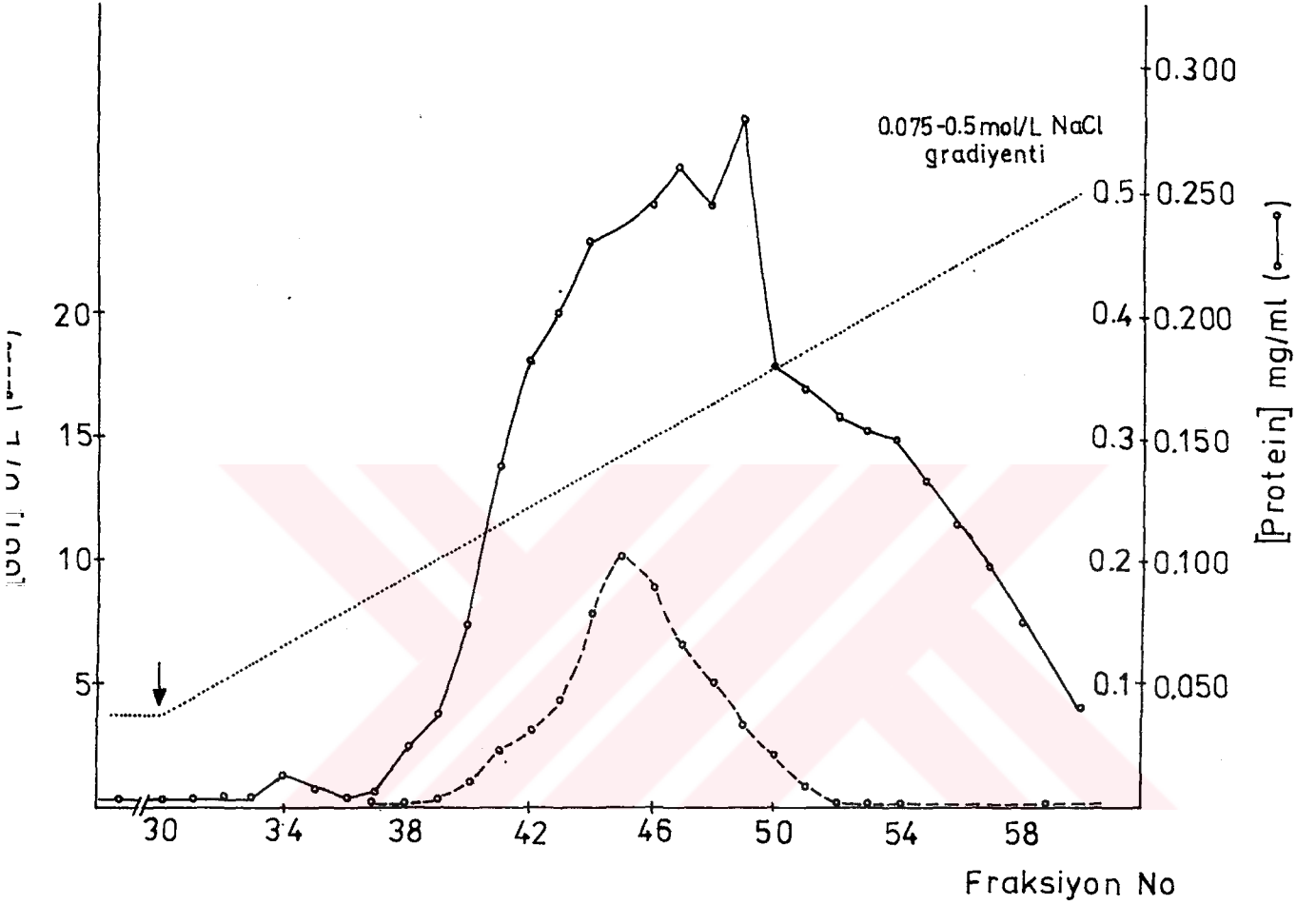
Tablo 4.2'de saflaştırma kademelerinin her basamağında elde edilen protein miktarları, GGT aktiviteleri, spesifik aktiviteler, % ürün ve saflaştırma katsayıları görülmektedir. Amonyum sülfat ile çöktürme sonucu spesifik aktivite 1.35 kere artarken, Sephadex G-200 ile 2.18, DE-52 anyon değıştirici ile 3.76 kere arttığı görüldü. Con A sepharose 4B ile spesifik aktivite Triton X-100 ile solubilize edilen kısma oranla 10.23 kez daha saf olarak elde edildi.

Tablo 4.2. Trombosit GGT'sinin saflaştırılması

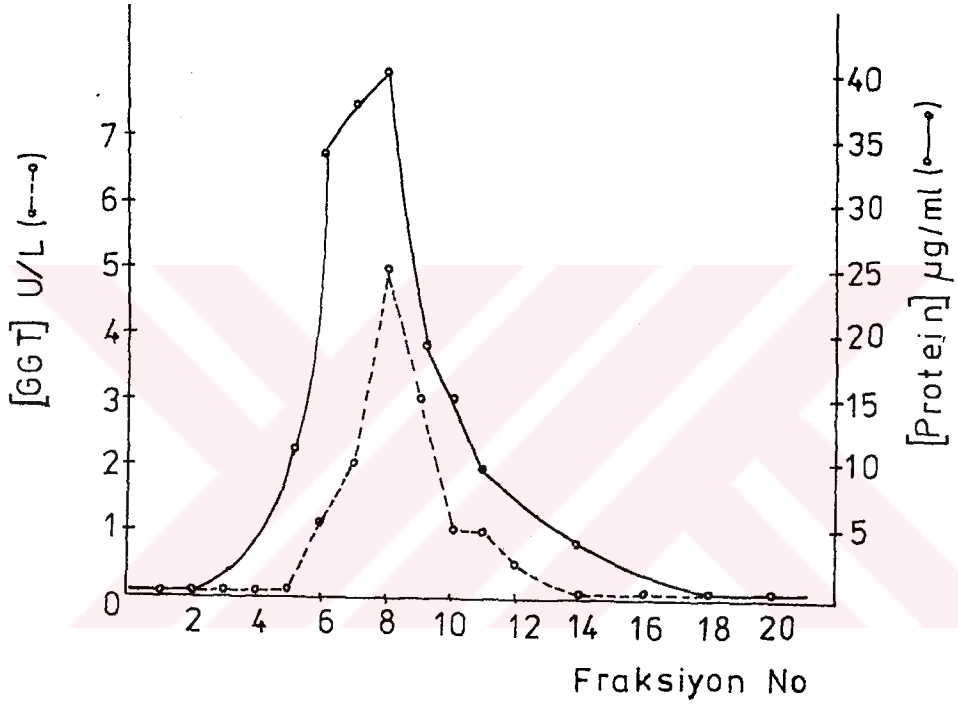
Saflaştırma basamakları	Protein mg/ml	GGT mU/ml	Spesifik aktivite mU/mg protein	% ürün	Saflaştırma katsayısı
Triton X-100 ile solubilizasyon	2.180	65.0	23.3	100	1.00
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ile çöktürme	1.470	46.0	31.29	70.76	1.35
Sephadex-G200 kolon kromatografi	0.813	41.0	50.43	63.07	2.18
DE-52 anyon değıştirici kromatografi	0.218	19.0	87.15	29.23	3.76
Con A sepharose 4B (afinite kromatografi)	0.030	7.1	236.66	10.93	10.23



Şekil 4.1. Triton X-100 ile solubilize edilmiş, %90 kesitli amonyum sülfat ile çöktürülmüş trombosit protein fraksiyonunun Sephadex G-200 kolon kromatografisi (kolon ebatı: 0.9x23 cm, akış hızı: 20ml/saat, denge ve elüsyon tamponu: %0.2 Triton X-100 içeren 10mmol/L Tris-HCl).



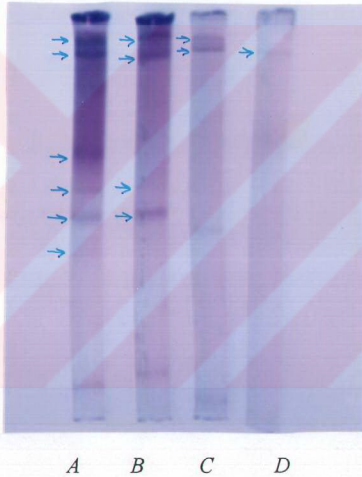
Şekil 4.2. Sephadex G-200 kolon kromatografisinden elde edilen GGT aktiviteli protein havuzunun DEAE-selüloz (DE-52) kolon kromatografisi (kolon ebatı: 0.6x8 cm, akış hızı: 60 ml/saat, denge tamponu: 75mmol/L NaCl, %0.2 Triton X-100 ihtiva eden 10 mmol/L Tris-HCl (pH8.3), elüsyon tamponu: denge tamponu ile 0.5mol/L NaCl, 10 mmol/L CaCl₂, 10 mmol/L MgCl₂, % 0.2 Triton X-100 içeren 10 mmol/L Tris HCl arasında lineer gradient. Ok işareti gradientin başladığı noktayı göstermektedir.)



Şekil 4.3. Con A sepharose 4B kolon kromatografisi kromatogramı (kolon ebatı: 0.9x5 cm, denge tamponu: 0.5mol/L NaCl, 10mmol/L MgCl₂ 10mmol/L CaCl₂ ve %0.2 Triton X-100 ihtiva eden 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), elüsyon tamponu: denge tamponu + 0.3 mol/L metil α -D-mannopiranosid).

4.3. Elektroforez Çalışmaları

Trombosit GGT'sinin saflaştırma kademelerindeki Davis PAGE gelleri Resim 4.1' de görülmektedir. Triton X-100 ile solubilize edilen kısımda 6 protein bandı, sephadex G-200 kolon kromatografisinden elde edilen GGT aktivitesi görülen fraksiyon havuzunda 4 protein bandı görülürken, DE-52 kolon kromatografisi sonucu GGT aktivitesi görülen fraksiyon havuzunda 3 protein bandı, Con A sepharose 4B afinite kromatografisinden elde edilen havuzda ise bir protein bandı görüldü.



Resim 4.1. Trombosit GGT'nin saflaştırma kademelerinin Davis PAGE (% 7.5) gelleri

- A- Triton X-100 ile solubilize edilen protein fraksiyonu
- B- Sephadex G-200 kolon kromatografisinden elde edilen GGT aktiviteli protein havuzu
- C- DE-52 anyon değiştirici kolon kromatografisinden elde edilen GGT aktiviteli protein havuzu
- D- Con A sepharose 4B afinite kromatografisinden elde edilen GGT aktiviteli protein havuzu

4.4. GGT İzoenzimleri

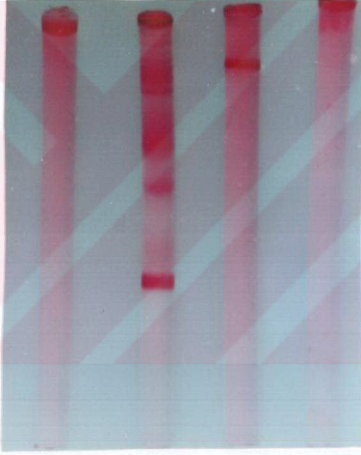
Serumdaki GGT izoenzimlerini ve trombositlerde bulunan GGT'nin izoenzim tipini belirlemek amacıyla serum ve trombosit GGT'si ile kobay karaciğer ve böbreğinden kısmi saflaştırma sonucu elde edilen GGT %7.5 poliakrilamid gel elektroforezini takiben yalnız GGT'nin bulunduğu kısımlar belirgin hale gelecek şekilde boyandı. Resim 4.2 de görüldüğü gibi trombositlerde tek bir GGT bandı gözlemlendi. Kobay karaciğer ve böbreği ile yaptığımız çalışmada, GGT Triton X-100, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürülmesi ve sephadex G-200 kolon kromatografisi yöntemleri ile saflaştırıldı. Bu yöntemle böbrek GGT'si Tritonlu kısma oranla 3 kez, karaciğer GGT'si 2.2 kez saflaştırıldı. Kısmi saflaştırılan karaciğer ve böbrek GGT'leri poliakrilamid gel elektroforezine uygulandı. Geller üzerinde GGT bantları naftiletilen diamin, sodyum nitrit ve TCA ile belirgin hale getirildiğinde hem karaciğer hem de böbrekte bir GGT bandı gözlemlendi. Karaciğer GGT'sinin böbrekteki enzime oranla daha fazla elektroforetik mobiliteye sahip olduğu saptandı. Serumda ise dört zayıf GGT bandı (α_1 -GGT, α_2 -GGT, β -GGT, γ -GGT) belirlendi (Resim 4.2).



Resim 4.2. Poliakrilamid geller (%7.5) üzerinde GGT bantları

- A- İnsan trombositlerinden saflaştırılan GGT
- B- Serum GGT izoenzimleri
- C- Kobay karaciğerinden kısmi saflaştırılan GGT
- D- Kobay böbreğinden kısmi saflaştırılan GGT

Serum, insan trombositlerinden Triton X-100 ile solubilize edilip saflaştırılan GGT, kobay karaciğer ve böbreğinden kısmi olarak saflaştırılan GGT poliakrilamid gel elektroforezini takiben glikoprotein boyasıyla boyandı. Glikoproteinlerin bulunduğu bölgeler belirlendi. Trombositlerden Triton X-100 ile solubilizasyonu ve saflaştırma çalışmaları sonucu elde edilen kısımda bir glikoprotein bandının bulunduğu gözlemlendi (Resim 4.3). Bu glikoprotein bandının GGT'nin bulunduğu kısma tekabül etmektedir. Aynı şekilde kobay karaciğer ve böbreğinden elde edilen örneklerde de gellerde GGT'nin bulunduğu bölgelere tekabül eden yerlerde tek glikoprotein bandı gözlemlendi.



A B C D

Resim 4.3. Gellerde Schiff boyası ile belirlenmiş glikoprotein bantları

- A- İnsan trombositlerinden saflaştırılan GGT
- B- Serum glikoproteinleri
- C- Kobay karaciğerinden kısmi saflaştırılan GGT
- D- Kobay böbreğinden kısmi saflaştırılan GGT

4.5. Trombosit GGT Kinetiği

Sağlıklı 7 kişinin trombosit GGT düzeyleri Tablo 4.1 de görülmektedir. Olguların trombosit GGT aktivitelerinin 32-55 mU/10⁹trombosit arasında değiştiği görüldü. Ortalama 44.3 ± 8.1 olarak saptandı. Bu 7 olgunun trombositlerinin Triton X-100 ile solubilizasyonu sonucu elde edilen ekstre kinetik çalışmalarda kullanıldı.

Tablo 4.3. Kinetik çalışmalarda kullanılan 7 sağlıklı kişinin trombosit GGT düzeyleri

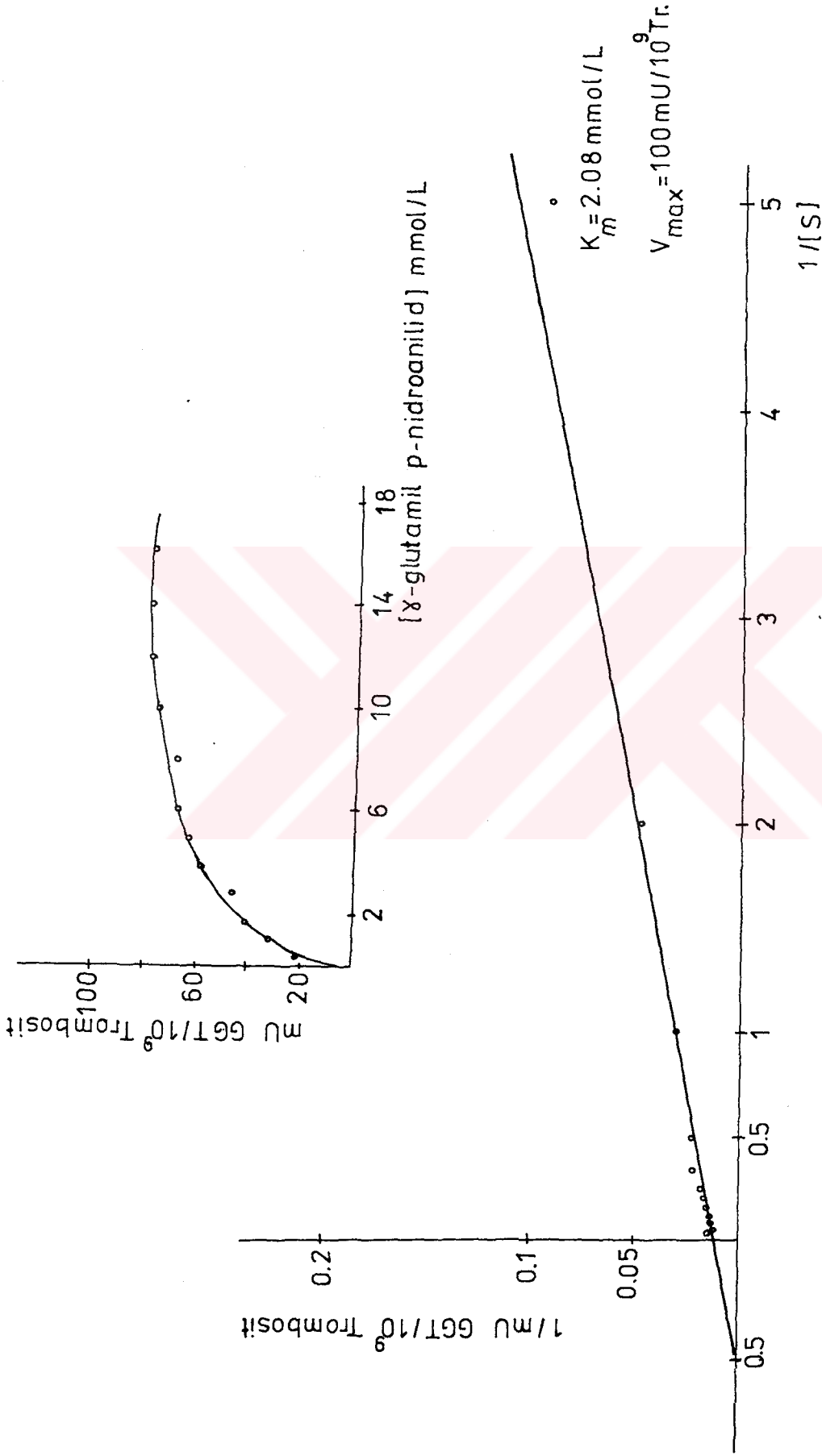
Olgu No	Trombosit GGT (mU/10 ⁹ Tr.)
1	42
2	53
3	38
4	47
5	55
6	32
7	43
$\bar{X} \pm SD$	44 ± 8.1

Substrat ve akseptör için Km ve Vmax değerlerinin belirlenmesi ; γ -glutamil p-nitroanilidin değişen konsantrasyonlarına karşı enzimatik reaksiyon hızları saptandı. Tablo 4.4 de trombosit GGT'sinin substrat bağımlılığı görülmektedir. Bu değerler kullanılarak Michaelis Menten ve Lineweaver Burk grafikleri çizildi (Şekil 4.4). Lineweaver Burk grafiği kullanılarak trombosit GGT'sinin γ -glutamil p-nitroanilid için Km değeri 2.08 mmol/L, Vmax değeri 100 mU/10⁹ trombosit olarak bulundu.

Tablo 4.4. γ -glutamil p-nitroanilidin değişen konsantrasyonlarına karşı trombosit GGT aktiviteleri

[S] (mmol/L)	GGT (mU/10 ⁹ Trombosit)*
0.05	3.4
0.1	6.9
0.2	8.5
0.5	18.0
1	30.0
2	43.0
3	45.0
4	57.0
5	62.2
6	65.9
8	69.4
10	76.3
12	79.7
14	79.0
16	79.0
20	79.5

* Değerler ikili çalışmaların ortalamalarıdır.



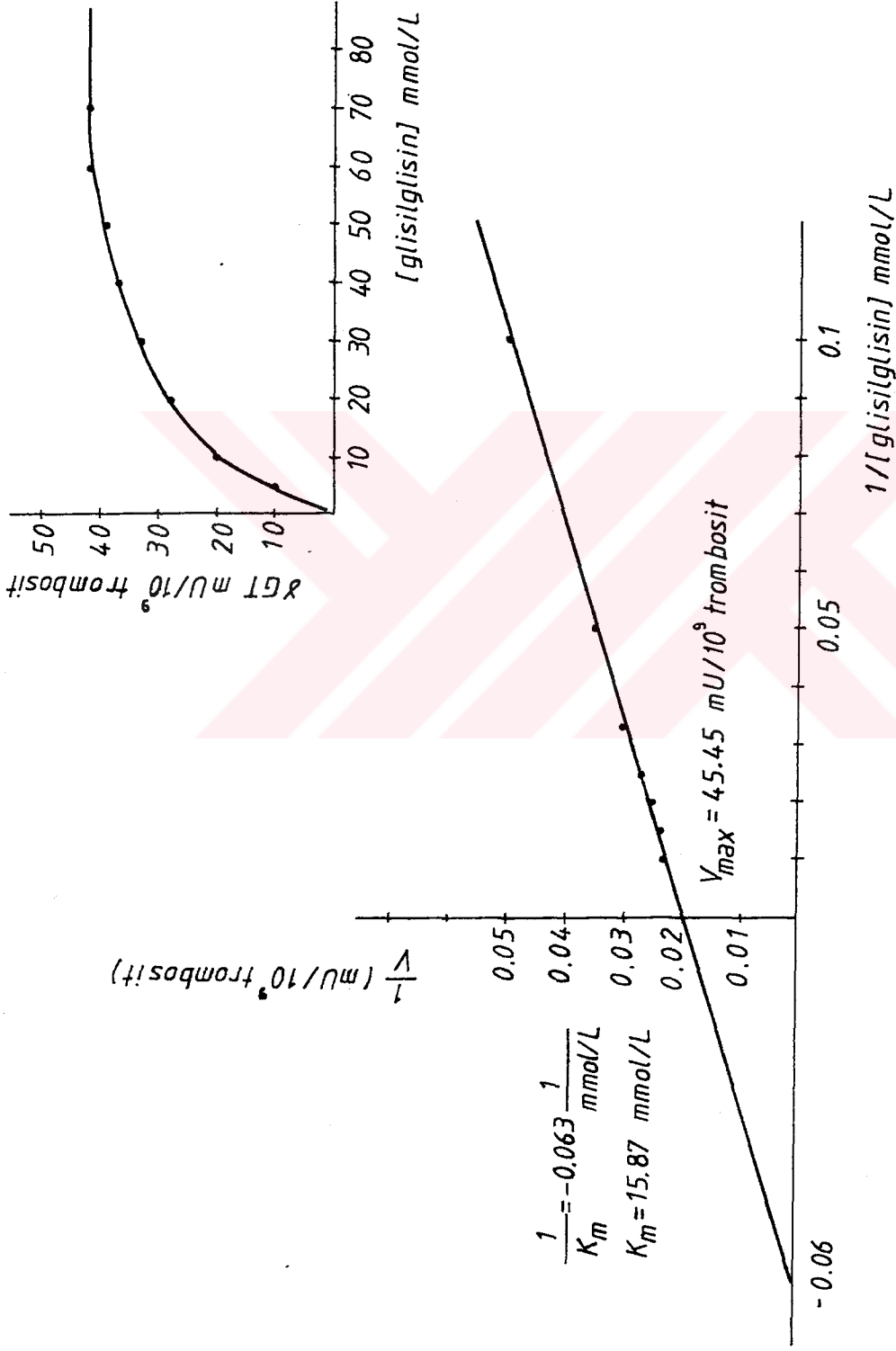
Şekil 4.4. γ -glutamyl p-nitroanilidin çeşitli konsantrasyonlarında belirlenen trombosit GGT aktivitelerinin Michaelis Menten ve Lineweaver Burk grafikleri (glisilglisin 40 mmol/L , pH 8.2, 37°C)

Akseptör glisilglisin için normal trombosit GGT'si ile yapılan çalışmada glisilglisinin çeşitli konsantrasyonlarına karşı trombosit GGT aktiviteleri belirlendi (Tablo 4.5). Lineweaver Burk grafiği kullanılarak glisilglisin için Km değeri 15.87 mmol/L, Vmax değeri 45.45mU/10⁹ trombosit olarak hesaplandı(Şekil 4.5).

Tablo 4.5. Akseptör olarak kullanılan glisilglisin konsantrasyonuna bağımlı trombosit GGT aktivitesi

S (mmol/L)	GGT (mU/10 ⁹ Trombosit)*
1	2.5
2.5	10.0
5	15.0
10	20.0
20	28.0
30	33.0
40	37.0
50	39.0
60	42.0
70	43.0
80	44.0
90	44.0
100	44.0

* Değerler ikili çalışmaların ortalamalarıdır.



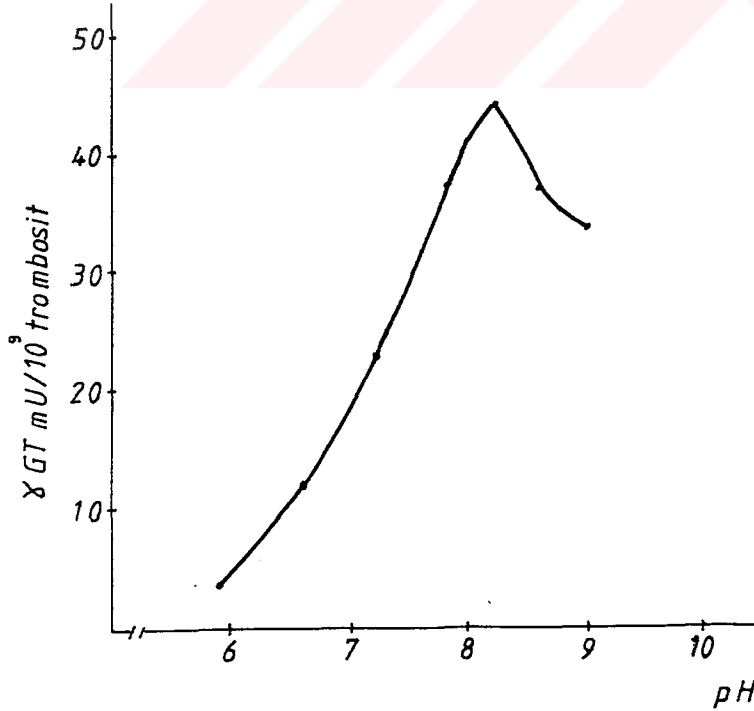
Şekil 4.5. Çeşitli glisilglisin konsantrasyonlarının trombosit GGT aktivitesi üzerine etkisi ve Lineweaver Burk grafiği (γ -glutamil p-nitroanilid 4 mmol/L, pH: 8.2, 37°C).

Trombosit GGT'sinin optimum pH'sı ve optimumu temperaturü; Trombosit GGT'sinin optimum pH ve optimum temperatur çalışmaları sırasında γ -glutamil p-nitroanilid konsantrasyonu 4 mmol/L, glisilglisin konsantrasyonu 40 mmol/L olarak sabit tutuldu. Değişik pH'larda (5.8-9.0) yapılan GGT aktivitesi ölçümleri sonucunda optimum pH: 8.2 olarak belirlendi(Tablo 4.6, Şekil 4.6).

Tablo 4.6. Değişik pH'larda trombosit GGT aktivitesi

pH	GGT (mU/10 ⁹ Trombosit)*
5.8	3.4
6.6	10.2
7.2	20.3
7.8	37.6
8.2	44.6
8.6	37.6
9.0	34.2

* Değerler ikili çalışmaların ortalamalarıdır.

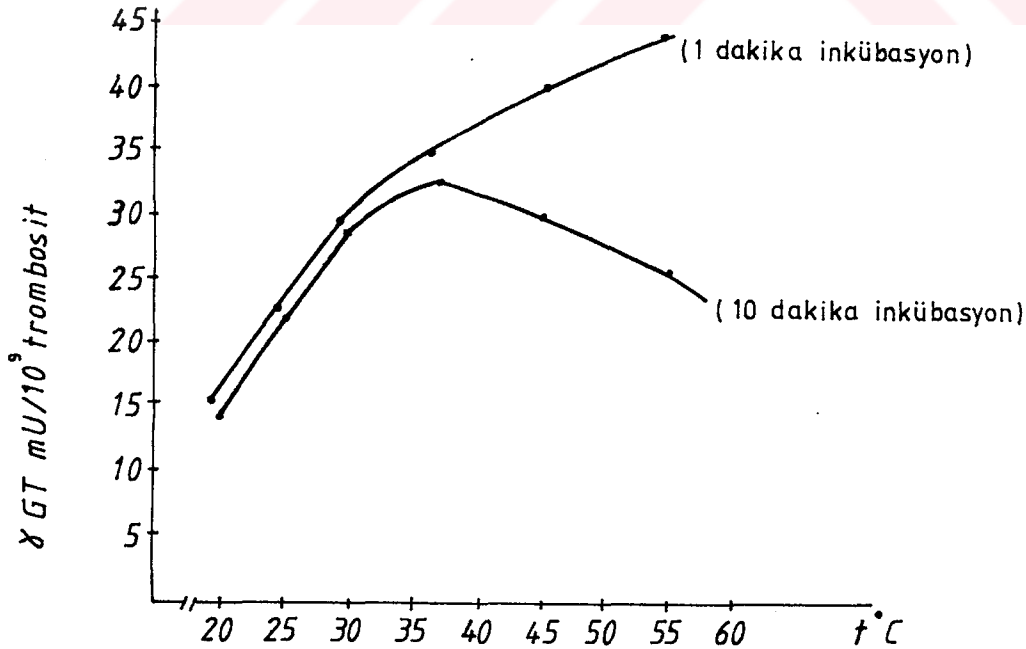


Şekil 4.6. Trombosit GGT aktivitesi üzerine pH etkisi

Trombosit GGT'sinin optimum temperaturünü belirlemek ve inkübasyon zamanının GGT üzerinde etkisini görmek için 20°C ile 56°C arasında değişen sıcaklıklarda 1 ve 10 dakika inkübasyonu takiben GGT aktiviteleri ölçüldü. Tablo 4.7'de görüldüğü gibi 10 dakikalık inkübasyon sonrası GGT aktivitesi 37°C'de en yüksek aktiviteye sahip iken 1 dakika inkübasyon sonrasında GGT aktivitesinin 56°C'ye kadar artış gösterdiği görüldü (Şekil 4.7).

Tablo 4.7. Değişik sıcaklıkların trombosit GGT aktivitesi üzerine etkisi

Temperatür(°C)	GGT (mU/10 ⁹ Trombosit) 1 dakika inkübasyon	GGT (mU/10 ⁹ Trombosit) 10 dakika inkübasyon
20	16.0	14.5
25	23.5	22.0
30	29.8	29.0
37	34.2	32.5
45	42.0	30.5
56	44.3	26.0

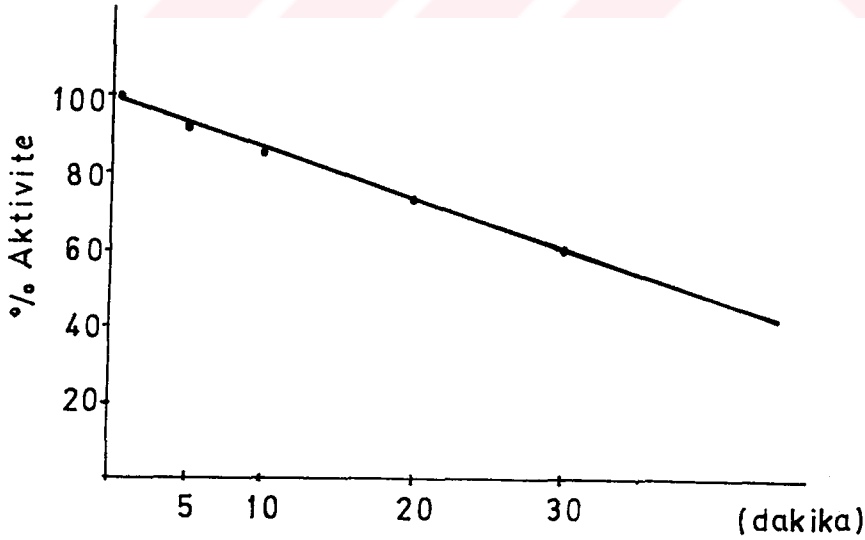


Şekil 4.7. Trombosit GGT aktivitesi üzerine sıcaklık etkisi

Enzimin termal stabilitesini saptamak için 56°C de 1 ile 30 dakika arasında değişen zaman periyodlarında ölçülen GGT aktiviteleri Tablo 4.8 de görölmektedir. 1 dakikalık inkübasyon sonucu bulunan GGT aktivitesi %100 kabul edilerek % aktiviteye karşı çizilen inkübasyon zamanı grafiğindedey görüldüğü gibi 56°C de 30 dakika inkübasyon sonucu trombosit GGT aktivitesi %36 oranında azaldı (Şekil 4.8).

Tablo 4.8. 56°C de değişen inkübasyon zamanlarında trombosit GGT aktivitesi

İnkübasyon Zamanı (dakika)	GGT (mU/10 ⁹ Trombosit)	% Nispi Aktivite
1	63.8	100.0
5	58.3	91.3
10	55.5	86.9
20	47.5	74.4
30	40.4	63.3



Şekil 4.8. 56°C de trombosit GGT aktivitesinin termal stabilitesi

GGT' ye spesifik inhibitörlerin etkisi; İnhibitör çalışmalarında substrat konsantrasyonu 4 mmol/L, akseptör konsantrasyonu 40 mmol/L, pH 8.2 olarak sabit tutuldu ve 37°C 'de çalışıldı.

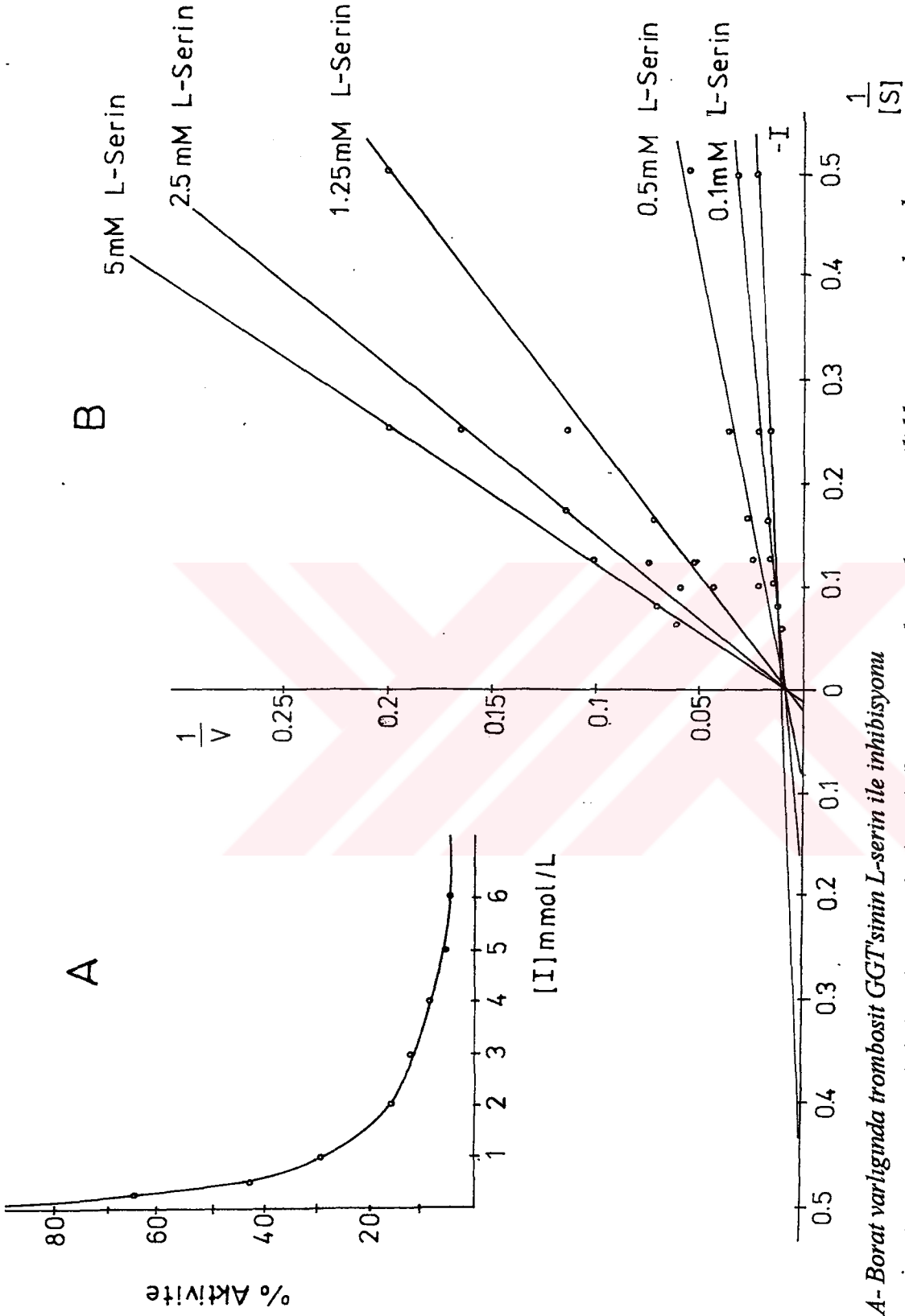
Borat varlığında (10 mmol/L), 0.25 mmol/L ile 5 mmol/L arasında değişen L-serin konsantrasyonlarında belirlenen trombosit GGT aktiviteleri Tablo 4.9'da görülmektedir. 5mmol/L L-serinle trombosit aktivitesinin %93 oranında inhibe olduğu saptandı (Şekil 4.9). γ -glutamil p-nitroanilidin çeşitli konsantrasyonlarında ,inhibitörsüz ve ortama 0.1 mmol/L, 0.5 mmol/L, 1.25 mmol/L, 2.5 mmol/L 5 mmol/L konsantrasyonlarında L-serin ilave edilerek GGT aktivitesinin inhibisyon düzeyleri saptandı. Bu değerler kullanılarak Lineweaver Burk grafiği çizildi ve borat varlığında L-serinle trombosit GGT'sinin kompetitif olarak inhibe olduğu Vmax değerinin değişmediği buna karşın Km değerinin arttığı görüldü(Tablo 4.10, Şekil 4.9).

Tablo 4.9. Borat varlığında değişen L-serin konsantrasyonlarında trombosit GGT aktivitesinin inhibisyonu

[I] (mmol/L)	GGT (mU/109 Trombosit)*	% Nispi Aktivite
0	54.3	100.0
0.25	35.6	65.5
0.50	23.5	43.2
1	16.0	29.4
2	8.6	15.8
3	6.2	11.4
4	4.9	9.0
5	3.7	6.8

Tablo 4.10. Borat varlığında L-serinin ve γ -glutamil p-nitroanilidin (mmol/L) değişik konsantrasyonlarında trombosit GGT aktiviteleri

γ -glutamil p-nitroanilid	I ⁻	[I] (0.1 mmol/L)	[I] (0.5 mmol/L)	[I] (1.25 mmol/L)	[I] (2.5 mmol/L)	[I] (5 mmol/L)
2	38.4	27.1	17.0	4.8	3.2	2.0
4	59.2	48.9	25.1	8.6	6.0	4.9
6	64.2	59.1	34.4	13.6	8.7	9.8
8	71.5	64.0	40.0	18.6	13.6	14.0
10	73.0	69.1	44.0	22.2	17.1	15.0



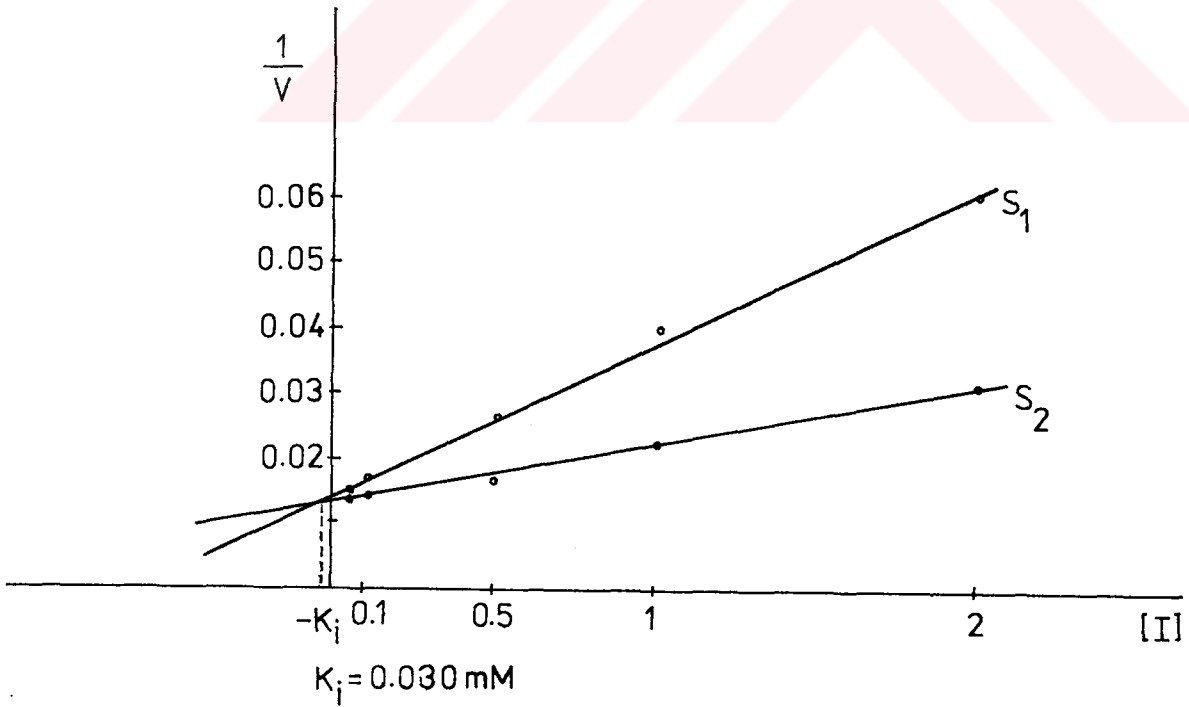
Şekil 4.9. A- Borat varlığında trombosit GGT'sinin L-serin ile inhibisyonu

B- İnhibisyonun tipini belirlemek amacıyla değişik L-serin ve γ -glutamil p-nitroanilid konsantrasyonlarında trombosit GGT aktivitesinin Lineweaver Burk grafiği

İnhibitörün K_i değeri γ -glutamil p-nitroanilidin 4 ve 8 mmol/L konsantrasyonları arasında çalışılarak borat varlığında (10 mmol/L), 0.05 mmol/L ile 2 mmol/L L-serin ile GGT aktivitesi saptandı (Tablo 4.11). Dixon grafiği kullanılarak inhibitörün K_i değeri 30 μ mol/L olarak hesaplandı (Şekil 4.10)

Tablo 4.11. Borat varlığında L-serinin ve γ -glutamil p-nitroanilidin değişen konsantrasyonlarında GGT aktivitesi

L-serin mmol/L	γ -glutamil p-nitroanilid 4 mmol/L	γ -glutamil p-nitroanilid 8 mmol/L
0.05	66.66	76.92
0.1	58.82	71.42
0.5	37.75	62.50
1	25.00	43.55
2	16.66	32.25



Şekil 4.10. Borat varlığında L-serinin K_i değerinin belirlenmesi (Dixon grafiği)

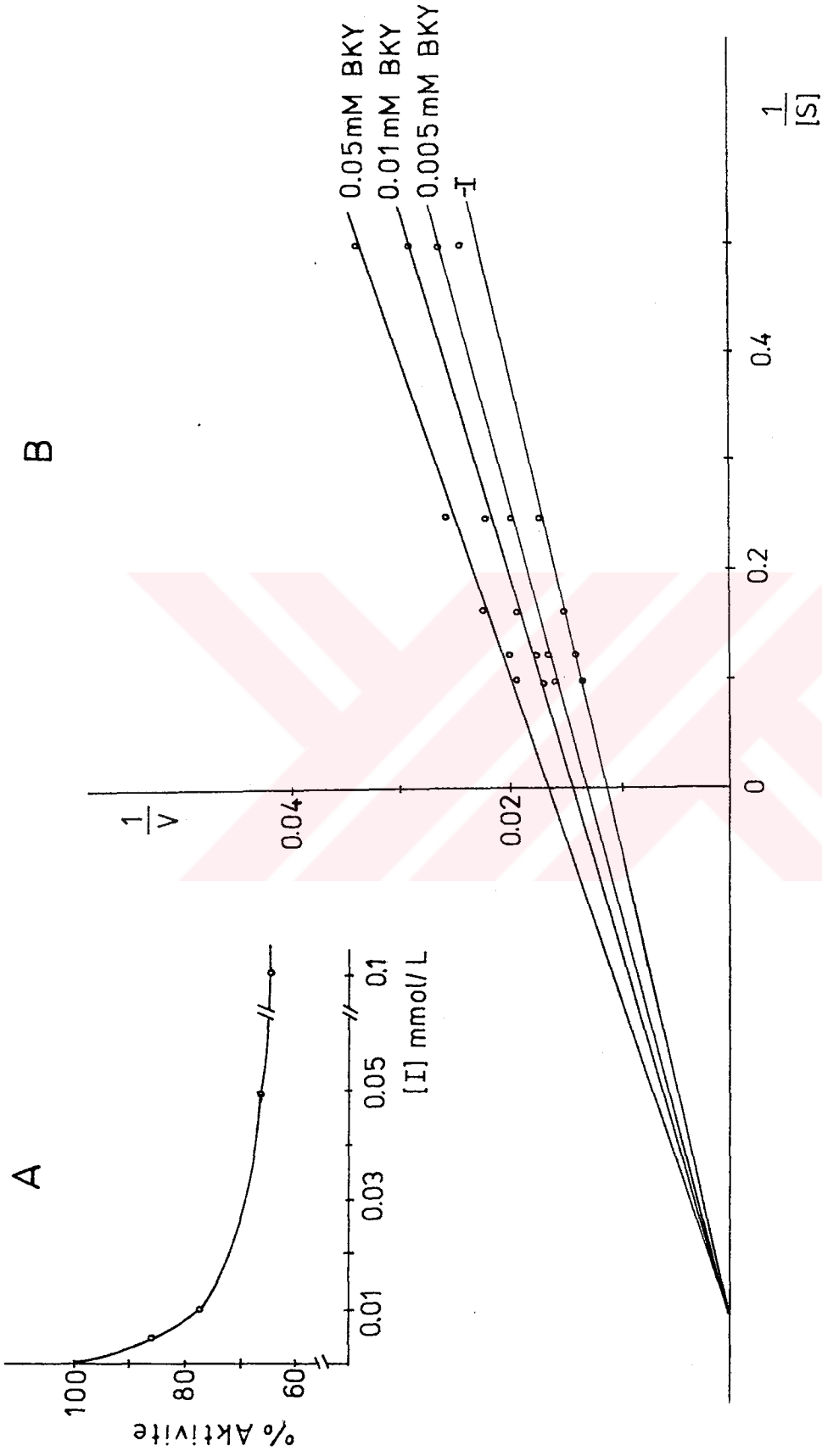
İnhibitör olarak bromkresol yeşili kullanıldığında 0.005- 0.1 mmol/L arasında değişen konsantrasyonda bromkresol yeşili ortama ilave edildi. 0.1mmol/L bromkresol yeşili ile enzimin %34 oranında inhibe olduğu görüldü.(Tablo 4.12). Bromkresol yeşili 0.005 mmol/L, 0.01mmol/L, 0.05 mmol/L konsantrasyonlarında ortama ilave edilerek değişen γ glutamül p-nitroanilid konsantrasyonlarında GGT aktivitesi ölçüldü(Tablo 4.13). Lineweaver Burk grafiği kullanılarak bromkresol yeşilinin enzimin K_m değerini değiştirmediği buna karşın V_{max} değerini azalttığını bulduk. Bromkresol yeşilinin GGT'nin nonkompetitif inhibitörü olduğunu saptadık(Şekil 4.11).

Tablo 4.12. Bromkresol yeşili ile trombosit GGT aktivitesinin inhibisyonu

[I] (mmol/L)	GGT (mU/10 ⁹ Trombosit)	% Nispi Aktivite
0	57.1	100.0
0.005	50.0	87.5
0.01	44.4	77.7
0.05	38.4	67.2
0.1	37.8	66.6

Tablo 4.13. Değişik bromkresol yeşili ve γ -glutamül p-nitroanilid konsantrasyonlarında (mmol/L) trombosit GGT aktiviteleri (mU/10⁹ Trombosit)

γ -glutamül p-nitroanilid	I ⁻	[I] (0.005 mmol/L)	[I] (0.01 mmol/L)	[I] (0.05 mmol/L)
2	40.0	36.1	33.8	29.0
4	57.1	49.0	44.4	38.4
6	64.5	57.1	51.2	44.4
8	71.4	60.6	57.1	48.8
10	74.0	62.7	60.6	51.6

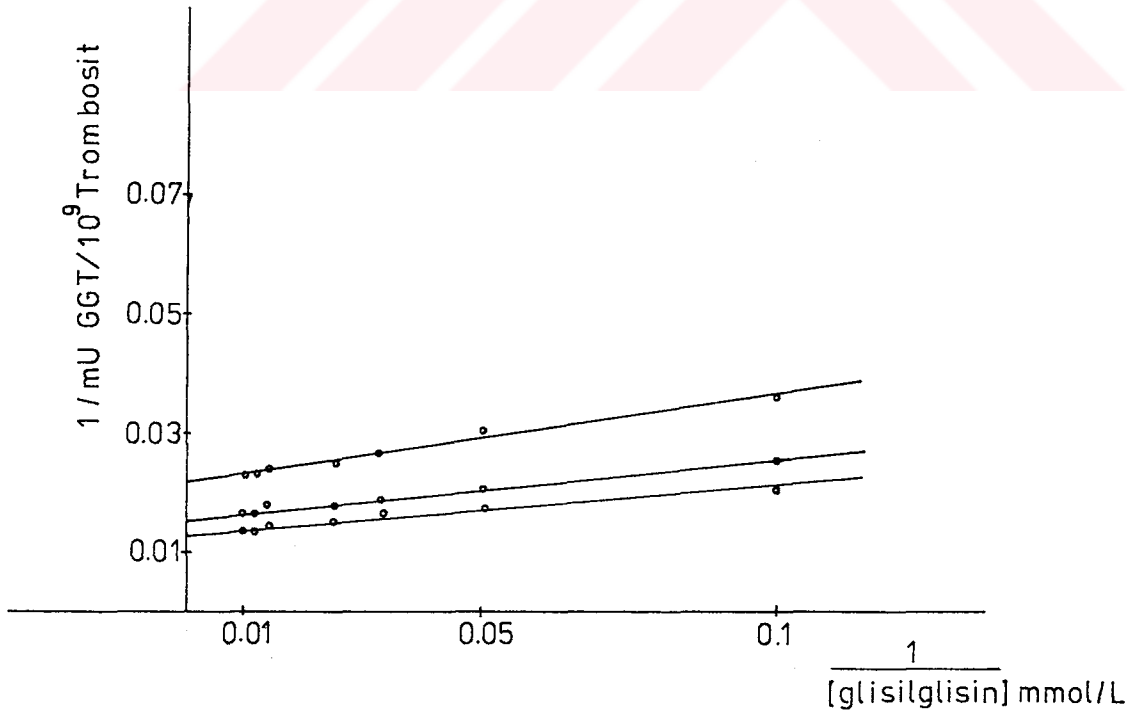


Şekil 4.11. A- Bromkresol yeşili (BKY) ile inhibisyon sonucu trombosit GGT'sinin % aktivitesi
B- Bromkresol yeşili ile değişen γ -glutamil p-nitroanilid konsantrasyonlarında trombosit GGT aktivitesinin
Lineweaver Burk grafiği

Enzimin transfer reaksiyonu için mekanizma tipini belirlemek amacıyla yaptığımız çalışmada γ -glutamil p-nitroanilidin 4, 6, 8 mmol/L konsantrasyonlarında ve glisilglisin 10-100 mmol/L arasında değişen konsantrasyonları sonucu bulunan GGT aktiviteleri Tablo 4.14'de görülmektedir. Glisilglisin substrat olarak kullanıldığında Lineweaver Burk grafiğinden GGT'nin transfer reaksiyonu için üçlü kompleksden ziyade ping-pong mekanizmasına benzer bir kinetik verdiği gözlemlendi (Şekil 4.12).

Tablo 4.14. GGT'nin transfer reaksiyonu için mekanizmasının belirlenmesi (GGT aktivitesi : mU/10⁹ Trombosit)

γ -glutamil p-nitroanilid			
Glisilglisin (mmol/L)	4 (mmol/L)	6 (mmol/L)	8 (mmol/L)
10	27.7	40.0	47.6
20	33.3	47.6	58.8
30	38.0	52.6	62.5
40	40.0	55.3	64.7
60	42.3	58.8	66.6
80	43.4	62.5	71.4
100	43.4	62.5	71.4



Şekil 4.12. GGT'nin transfer reaksiyonu mekanizması için Lineweaver Burk grafiği

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Gamma-glutamil transferaz (GGT) ile ilgili çalışmalar özellikle karaciğer, böbrek, ince bağırsak vb organlarda yoğunlaşmıştır. Kan hücreleri ile ilgili çalışmalar ise daha az sayıdadır.

Membrana bağlı bir enzim olan GGT'nin membrandan solubilizasyonu için proteazlar veya deterjanlar kullanılır(3). Sıçan böbreklerinde papain ve Triton X-100 ile yapılan bir çalışmada Tritonla enzimin tamamının solubilize olduğu gösterilmiştir(14). Membran proteinleri ile yapılan çalışmalarda kullanılan deterjanların membranla interaksyonu tam olarak bilinmemekle birlikte membranın solubilizasyonuna sebep olduğu bilinmektedir(74).

GGT'nin en önemli görevlerinden biri de amino asitlerin ve peptidlerin hücre içine transferi olduğu bildirilmiştir. Ancak bu konuda yapılan çalışmalar oldukça tartışmalıdır. İnce bağırsak amino asit absorpsiyonunda çok önemli bir organdır ve çeşitli hayvanların ince bağırsağında GGT aktivitesi gösterilmiştir. 1976'da Garvey ve arkadaşları amino asit transportunda GGT'nin rolünün olduğunu bildirmişlerdir(75). Ancak Berteloot ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada 'İntestinal brush border' membran vesiküllerinin papain ile muamelesi sonucu GGT membrandan ayrıldığı halde lösin alınımının spesifik aktivitesinin arttığını göstermişler ve amino asit transportunda GGT'nin rolünün olmadığını savunmuşlardır(76). Ayrıca GGT'nin bir inhibitörü AT₁₂₅ ile GGT'nin *in vivo* ve *in vitro* inhibisyonunun, sistein, glutamin, prolin, glisin, methionin, lizin, lösin transportlarına etkisi olmadığı gösterilmiştir(77).

Soğuk ozmotik şok yöntemi integral proteinler dışındaki membrana hafifçe bağlı proteinlerin şok sıvısına geçtiği bir yöntemdir. Bu yöntemle trombositler bütünlüklerini kaybetmezler(78). Trombositlerde ozmotik şok çalışmaları, esnasında glikoz, lösin, histidin bağlayıcı proteinlerin ozmotik şok sıvısına geçtiği, şoka uğramış trombositlerin bütünlüğü değişmediği halde şeker ve amino asit aktif transport sistemlerinin kaybolduğu gösterilmiştir

(59,60). Ozmotik şok çalışmamız esnasında şoka uğramış trombosit membranında GGT aktivitesinin bulunduğunu gösterdik (6,79). Bu çalışmalar sonunda GGT'nin aktif olarak amino asit transportunda rol almadığını, GGT'nin amino asit transportundan çok lökotrienler ve glutatyon metabolizması ile ilgili görevleri olduğunu düşünmekteyiz

GGT'nin dokularda saflaştırılması için genel olarak proteazlar veya deterjanlarla solubilizasyonu takiben kromatografik yöntemler kullanılmaktadır. Böbrek 'brush border' membran proteinlerinin saflaştırma çalışmaları sırasında Triton X-114 faz partisionunun kullanılması başlangıçta istenmeyen proteinlerin solubilizasyonunu engelleyerek saflaştırmanın ilk basamağı olarak kolaylık sağladığı gözlenmiştir. Bazı proteinler düşük, bazı proteinler ise daha yüksek Triton X-114 konsantrasyonlarında solubilize edilebilirler(80).

Çeşitli patolojik durumlarda ve normal olgularda serum GGT'si üzerinde yapılan afinite kromatografi çalışmalarında 5 lektin çeşidi denenmiştir. Bunlar Concanavalin A (ConA), Ricinus Commun I ve II (RCI, RCII), Maclura Pamifera (MPA), Ulex europaeus agglutinin (UEA)dir. Diğer lektinlere oranla en fazla bağlanma Con A da görülmüştür(81). GGT insan beyin korteks mikrodamarlarından gel filtrasyon, iyon değiştirici ve grup afinite kolon kromatografi yöntemleri ile iki ayrı şekilde saflaştırılmıştır. GGT'nin deterjan formu korteks homojenatından 320 kez, proteolitik formu 830 kez saflaştırılmıştır. Proteolitik formun molekül ağırlığı gel filtrasyon kromatografisi ile yaklaşık 90.000 Da olarak bildirilmiştir(29).

Saflaştırma çalışmalarımızda trombositlerden Triton X-100 ile solubilizasyon sonucu elde edilen solubilize kısımdan %90 kesitli $(NH_4)_2SO_4$ çöktürmesi, Sephadex G-200 kolon kromatografisi, DEAE-selüloz (DE-52) kolon kromatografisi ve Con A sepharose 4B ile grup afinite kolon kromatografisi yöntemleri kullanılarak GGT Davis-PAGE'de tek bant olacak şekilde 10 kez saflaştırıldı.

Memeli böbreklerinde (insan, sığır, sıçan) GGT'nin hafif subunitesinin molekül ağırlığının 21-25 Kd, ağır subunitesinin 51-72 Kd arasında değiştiğini ancak kimyasal deglikozilasyonla bu enzimin molekül ağırlığının hafif subunite için 19 Kd, ağır subunite için 41 Kd olduğu rapor edilmiştir. Subunitelerin molekül ağırlığındaki bu farklılığın proteinlerin glikozilasyon derecesinden ileri geldiği sonucuna varılmıştır(82).

Yetişkin sıçan böbreğinden saflaştırılan GGT'nin iki boyutlu gel elektroforezi ile hafif subunitenin molekül ağırlığı 23.000-26.000, izoelektrik noktası 5.4-7, ağır subunitenin molekül ağırlığının 51.000-53.000 izoelektrik noktasının 5.8-7.1 arasında değiştiği bildirilmiştir(83). Yine sıçan böbreği üzerinde yapılan bir başka çalışmada ise GGT'nin doğal ve deglikolize edilmiş formu üzerinde immunolojik araştırmalar yapılmış ve doğal GGT için subunitelerin molekül ağırlıkları 50 Kd ve 30 Kd olarak bulunurken anhidroz hidroflorik asit ile 0°C'de enzimin deglikozilasyonu ile elde edilen GGT'nin subunitelerinin

molekül ağırlıklarının 43-23 Kd olarak belirlenmiştir. Doğal enzime karşı oluşturulan antiserum her iki GGT formunu tanıırken, değlikolize GGT'nin antiserumunun doğal GGT'yi tanımadığı bu nedenle ve molekül ağırlığının farklılığından dolayı doğal enzimin bazı determinantlarının karbonhidrat artıklarıyla maskelenebileceği sonucuna varılmıştır(84).

Trombosit GGT'si ile daha önce yaptığımız çalışmalarda GGT'nin molekül ağırlığını SDS-PAGE yöntemi ile 75.000 Da olarak, HPLC yöntemi ile ise 145.000 Da olarak gözledik. SDS-PAGE ve HPLC yöntemleri arasındaki molekül ağırlığı farklılığının, örneğin denatüre edilmeden HPLC'ye tatbik edilmesinden kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz(6).

GGT'nin serum düzeylerinin bazı hastalıklarda değiştigi bildirilmiştir(3). Lösemili hastalarda sitokimyasal metotla trombosit ve lökosit GGT düzeylerinde lenfoproliferatif hastalıkların çoğunda belirgin bir azalma Hodgkin hastalığı olan tek bir vakada T lenfositlerde GGT aktivitesinde çok az bir değişme, 'multiple myeloma'lı plazma hücreleri ve lösemili plazma hücrelerinde normallere oranla eşit veya daha yüksek GGT aktiviteleri görülmüştür(4).

Aterosklerozlu kişilerin trombositlerinin normal kişilerin trombositlerinden daha düşük düzeyde GGT aktivitesi içerdiğini daha önceki bir araştırmamızda saptadık. Normal trombosit GGT'si (n:10) 35 ± 3.01 mU/10⁹ trombosit iken aterosklerozlularda bu değer 18.66 ± 1.55 mU/10⁹ trombosit olarak gözlenmiştir. Bu iki grup arasında GGT'nin Vmax değerlerinin farklılık gösterdiği, Km değerinin aynı olduğu görüldü. Buna karşılık Glutasyon düzeylerinde ise bu iki grup arasında bir değişiklik saptanmamıştır. Aterosklerozlularda GGT Vmax değerinin düşük bulunması solubilize fraksiyonda konsantrasyonunun azaldığını gösterir(79). Defibrotid adlı antitrombotik ilaç in vivo olarak verildiğinde aterosklerozluların trombosit GGT düzeylerinin normale döndüğü belirlenmiştir(7).

Deneyisel ateroskleroz oluşturulan tavşanların beyin korteksinde GGT aktivitesinde kontrol grubuna oranla %27'lik bir artış bulunurken, yüksek kolesterolü diyetle beslenen tavşanların korteksinin kapillerce zengin fraksiyonlarında GGT aktivitesinde %22'lik bir azalma bulunmuştur(85). Hiperkolesterolemik diette bulunan tavşanların karaciğer GGT'sini eikosapentenoik asid ve Vit E'nin etkilediği gösterilmiştir(86).

1991 yılında yapılan bir araştırmada rat plazma ve doku glutasyon metabolizması üzerine yaşlanmanın etkisi araştırılmış, yaşlanmayla akciğer ve karaciğer glutasyon peroksidaz ve glutasyon -S- transferaz düzeyinde anlamlı bir değişiklik gözlenemezken GGT düzeylerinde anlamlı bir azalma ve bu azalmaya eşlik eden plazma glutasyon düzeylerinde artış saptanmıştır(87).

Serum GGT düzeyleri çeşitli hastalıklarda değişiklik göstermesine rağmen en belirgin artışlar karaciğer hastalıklarında ortaya çıkmaktadır. Karaciğer hastalıklarının teşhisinde serum GGT düzeyinden çok GGT'nin hangi izoenziminin arttığını belirlenmesi hastalığın teşhisine daha fazla yardımcı olmaktadır (3).

GGT izoenzimlerinin belirlenmesi amacıyla pek çok dokuda geniş çaplı araştırmalar yapılmıştır. Shaw ve arkadaşları tarafından insan karaciğer, pankreas, böbrek ve duodenumundan saflaştırılan GGT akrilamid gel elektroforezinde elektroforetik mobilite farklılığı göstermiştir. Bu organlardan elde edilen GGT'nin elektroforetik mobilitesisırasıyla azalarak karaciğer> pankreas> böbrek> duodenum olarak belirlenmiştir(88).

İnsan böbreği ve karaciğerinden izole edilen GGT üzerinde yapılan diğer bir çalışmada da insan karaciğer GGT 'sinin böbreğe oranla daha fazla elektroforetik mobiliteye sahip olduğu bildirilmiştir(89).

Çalışmamızda kobay karaciğeri ve böbreği kullanarak GGT'yi Triton X-100 ile solubilizasyon, %90 kesit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ile çöktürme, sephadex G-200 kolon kromatografisi ile kısmı saflaştırarak %7.5 poliakrilamid gel elektroforezini takiben staining elektroforetik ortam ile bantları belirgin hale getirdiğimizde hem karaciğer hem de böbrek GGT'sinden birer bant olduğunu ve karaciğer GGT'sinin böbreğe oranla daha fazla elektroforetik mobiliteye sahip olduğunu gördük. GGT'nin bu mobilite farklılığın nedeni sentez sonrası glikozilasyon, sializasyon gibi değişikliklere bağlanmaktadır(3). Ayrıca GGT'nin lipoproteinlerle ve proteinlerle kompleks oluşturarak elektroforetik mobilite farklılıklarına neden olabileceği düşünülmektedir(90). GGT'nin birkaç formu serumda bildirilmiştir. Gerastad ve arkadaşının yaptığı çalışmaya göre bu formların çoğu enzim ve dolaşımda bulunan lipoproteinler arasında oluşan komplekslerdir ve enzim özellikle HDL ile de kompleksleşebilmektedir. Hidrofilik GGT'nin yarılanma ömrünün 9 saat, buna karşın HDL ile kompleksleşen GGT'nin ise 20 saat olduğu bildirilmiştir (91).

İdrarda alanin aminopeptidaz, alkalın fosfataz ve GGT üzerinde yapılan agaroz gel elektroforezi çalışmalarına idrar, Triton X-100, n-butanol/disopropil eter, tripsin, nöraminidaz ile muamele edildiğinde normalde idrarda iki GGT bandı varken, Triton X-100 ile muameleden sonra tek bant diğer yöntemlerle ise yine iki bant gözlenmiştir. İdrarın n-butanol/disopropil eter ile ekstraksiyonu sonucu elde edilen GGT bantlarının elektroforetik mobilitesinin farklı olması GGT'nin lipidlerle kompleksleşmesine bağlanmıştır(92).

Karaciğer hastalığı olan kişilerin GGT fraksiyonlarının 'cellogel' üzerinde elektroforezle ayırımı sonucu ayırt edilebilir ve serum protein fraksiyonlarına göre sınıflandırılan 7 zon tesbit edilmiştir. Bu bantlar pre-Albumin-Albumin-GGT (GGT-I), Albumin- α_1 -globulin-GGT (GGT-II), α_1 - α_2 -globulin-GGT (GGT-III), α_2 -globulin-GGT (GGT-IV), α_2 - β -globulin-GGT (GGT-V), β - γ -globulin-GGT (GGT-VI), orjin-GGT (O-GGT)'de sağlıklı kişilerin serumunda ise iki bant (Albumin- α_1 -globulin GGT, α_1 - α_2 -globulin GGT) gözlenmiştir(93).

Normal ve karaciğer hastalığı olan kişilerin serum GGT düzeyleri selüloz asetat elektroforezi ile araştırıldığında normal kişilerde iki bant gözlenmiştir. (α_1 -GGT ve α_2 -

GGT). Bu bantların % oranları α_1 -GGT için % 60-80, α_2 -GGT için %20-40 olarak bildirilmiştir(94).

Serumda yapılan bir diğer çalışmada önce sodyum tungstat ile LDL ve VLDL çöktürüldükten sonra ikinci kademedeki polietilen glikol 6000 ile HDL fraksiyonu çöktürülerek yapılan selüloz asetat elektroforezinde normal kişilerin serumlarında iki GGT izoenzimi, çeşitli karaciğer hastalığı olan kişilerin serumlarında ise ayrıca farklı 4 GGT bandı daha bildirilmiştir. Bu bantlar alb-GGT, α_1 -GGT, α_2 -GGT, beta-GGT, gamma-GGT ve dep-GGT adlandırılmıştır. Karaciğer hastalığı olan kişilerin serum GGT'lerinin lipoproteinlerle kompleksleştiği özellikle beta-GGT, gamma-GGT ve dep-GGT'nin LDL ve VLDL ile, sirozlu hastaların serumunda artış gösteren α_1 -GGT'nin HDL ile kompleks oluşturduğu bildirilmiştir(95).

Freise ve arkadaşları GGT aktivitesi yüksek 53 hasta serumunda yaptıkları çalışmada sephadex DEAE A-50 kolon kromatografisi ile serum GGT'lerinin iki fraksiyona ayrıldığını gözlemişlerdir. 20 hastada ilave parametre olarak protein, protein elektroforezi, serbest ve bağlı kolesterol, bilirubin, trigliseridler, lipoprotein ve lipoprotein X tayinide yapılmış ve bu çalışma sonucunda serum GGT'sinin DEAE A-50 ile iki fraksiyona ayrılması nedeni izoenzimlerinin olamayacağı, bunun nedeninin kolesterol içeren lipoproteinlerin farklı dağılımından dolayı olabileceği kanısına varmışlardır(96)

İnsan trombosit GGT izoenzimini belirlemek üzere substrat olarak gamma-glutamil 7-amino 4-metilkumarin kullanılarak yapılan çalışmada tek bir GGT bandı gözlenmiş ve trombositlerin yalnız tek izoenzim içerdiği bildirilmiştir(97).

Serum ve trombosit GGT izoenzimleri üzerine yaptığımız bu çalışmada trombositlerden saflaştırılan GGT ve serum örneği (%7.5) poliakrilamid gel elektroforezine (Davis- PAGE) tabi tutuldu. Elektroforezi takiben glikoprotein boyama ve GGT'ye özel boyama yöntemiyle bantlar belirgin hale getirildi. Trombosit GGT'si için tek bir bant ve bu banda tekabül eden yerde glikoprotein boyayla da tek bir glikoprotein bandı gözlemlendi. Serumda aynı şekilde GGT için özel boyama yöntemi kullanıldığında 4 GGT izoenzimi saptandı ve bu bantların elektroforetik mobilitelerinin trombosit GGT'sinin elektroforetik mobilitesine benzerlik göstermediği görüldü.

Çok sayıda GGT'nin karakterizasyonu ile ilgili çalışmalar mevcuttur. İnsan karaciğer ve insan böbreğinden izole edilen GGT üzerinde yapılan karşılaştırmalı çalışmalarda substrat γ -glutamil p-nitroanilid için Km değeri karaciğerde 1.44 mmol/L, böbrekte 1.15 mmol/L olarak gözlenmiştir. Akseptör glisilglisin için ise karaciğer GGT'sinin Km değeri 10.6 mmol/L, böbrek GGT'si için 10.7 mmol/L olarak saptanmıştır. Yine bu çalışmada enzimin optimum pH'sının her iki dokuda transpeptidasyon reaksiyonu için 8.1, ototransfer reaksiyonları için 8.6 olduğu gösterilmiştir. Enzimin termal inaktivasyonu (58°C'de 100

dakika inkubasyon sonucu) böbrek GGT'sinin aktivitesinin %64, karaciğer enziminin %76 azaldığı bildirilmiştir (89).

Selvaraj insan yetişkin karaciğeri, fetal karaciğeri ve primer hepatomalı karaciğeri karşılaştırdığı çalışmasında substrat γ -glutamil p-nitroanilid için Km değerlerini yetişkin karaciğer : 1.17 mmol/L, fetal karaciğer : 1 mmol/L, hepatomalı karaciğer : 1.05 mmol/L olarak, glisilglisin için ise Km değerleri; yetişkin karaciğer:12.65 mmol/L, fetal karaciğer 12,5 mmol/L, hepatomalı karaciğer: 12.5 mmol/L olarak bulunmuştur. Optimum pH transfer reaksiyonları için her üçünde de 8.4, ototransfer reaksiyonu için 8.8 olarak, serin ve boratın 15 mmol/L konsantrasyonda yine her üç kaynakta enzimi tamamen inhibe ettiğini, 5 g/L SDS ile %100, 10 mmol/L iyodoasetamid ile %30 oranında enzimin inhibe olduğunu bildirmişlerdir(98).

Tavuk embriyo beyninin snaptosomal membran GGT'si için 20 mmol/L glisilglisin varlığında substrat γ -glutamil p-nitroanilid için Michealis sabiti 1.5 mmol/L olarak gözlenmiş ve kortizol ile bu değerim değişmediği fakat Vmax değerinin bu hormonla arttığı bildirilmiştir (18).

İnsan beyin mikrodamarlarından kısmi saflaştırılmayla elde edilen GGT'nin optimum pH'sının transfer reaksiyonunda substrat γ -glutamil p-nitroanilid, akseptör glisilglisin için 8.2, akseptör L-sistein olunca 9 olarak gözlenmiştir. Enzimin 10 mmol/L borat varlığında 5 mmol/L L-serin ile %95 oranında, bromkresol yeşili ile ise enzimin daha az oranda inhibe olduğu bulunmuştur(29).

Sıçan deciduomasından saflaştırılan GGT'nin optimum pH'sı 8.2, γ -glutamil p-nitroanilid için km değeri 1 mmol/L, glisilglisin için 7.6 mmol/L olarak bulunurken, borat karşısında L-serinin enzimin kompetitif inhibitörü olduğu ve K_i değerinin 22 μ mol/L olduğu bildirilmiştir(99).

Rosalki'nin serum GGT'siyle yaptığı çalışmada γ -glutamil p-nitroanilid için Km değeri 1.9 mmol/L, glisilglisin için Km değeri 12.01 mmol/L olarak rapor etmiştir(100).

Kinetik çalışmalarımızda trombosit GGT'si için substrat γ -glutamil p-nitroanilid için Km değeri 2.8 mmol/L olarak gözlendi. Bu substrat için Vmax değeri 100 mU/10⁹ trombosit olarak gözlendi. Akseptör glisilglisin için Km değeri 15.87 mmol/L, Vmax değeri 45.45 mU/10⁹ trombosit olarak bulundu. Trombosit GGT'si için diğer şartlar sabit tutulduğunda transfer reaksiyonu için optima pH 8.2, optimum temperatur 37°C olarak belirlendi. Enzimin termal stabilitesi 56°C'de 30 dakika izlendiğinde 30 dakika sonunda enzimin aktivitesinin % 36 oranında inhibe olduğunu gördük. Trombosit GGT'si 10 mmol/L borat varlığında 5 mmol/L L-Serin ile % 93 oranında azalmaktadır. L-Serin borat varlığında GGT'nin kompetitif inhibitörü olduğunu ve K_i değerinin 30 μ mol/L olduğunu saptadık. Enzim bromkresol yeşilinin 0.1 mmol/L konsantrasyonunda %34 oranında inhibe

olmaktadır ve bromkresol yeşili trombosit GGT'sinin nonkompetitif inhibitörü olarak saptandı.

Trombosit GGT'si kinetik açıdan diğer dokulara göre substrat ve akseptör K_m ve V_{max} değerleri açısından farklılık göstermekte buna karşın serum GGT'sinin K_m ve V_{max} değerlerine daha yakın görünmektedir. Ancak optimum pH, temperatur ve inhibitör etkisi açısından diğer doku çalışmalarına paralellik göstermektedir. Enzimin transfer reaksiyonu için ping-pong mekanizmasına benzer bir kinetik gösterdiğini saptadık. Trombositlerde GGT'nin tek bir izoenzimi olduğunu ve trombosit GGT izoenzimini normal serumda saptadığımız 4 GGT izoenzimiyle karşılaştırdığımızda elektroforetik mobilitate açısından benzerlik göstermediğini gözledik.



6. ÖZET

Gamma glutamil transferaz (GGT) glikoprotein yapısında bir membran proteindir. GGT gamma-glutamil artıklarının amino asitlere, dipeptidlere ve suya transferinde, glutatyon metabolizmasında ve LTC₄'ün LTD₄'e dönüşümünde rol alır. Bu çalışmada GGT insan trombositlerinden Triton X-100 ile solubilize edilerek karakterize edildi. Kinetik çalışmalar için 7 normal kişiden alınan kanlardan elde edilen trombosit havuzu kullanıldı. Substrat gamma- glutamil p-nitroanilid için V_{max}: 100 mU/10⁹ Trombosit, K_m: 2.08 mmol/L olarak, akseptör glisilglisin için V_{max} : 45.45 mU/10⁹ Trombosit, K_m : 15.87 mmol/L olarak saptandı. İnsan trombosit GGT'sinin optimum pH'sı 8.2, optimum sıcaklık 37°C olarak gözlendi. Enzimin 56°C de termal stabilitesi ölçüldüğünde 30 dakika inkübasyonu takiben aktivitenin %36 oranında azaldığı tespit edildi. İnhibitör çalışmaları sonucunda borat varlığında L-serinin enzimin kompetitif inhibitörü olduğu ve 5 mmol/L L-serin konsantrasyonunda GGT aktivitesinin %93 inhibe olduğu görüldü. L-serin için inhibitör sabiti (K_i) 30 µmol/L olarak hesaplandı. Bromkresol yeşilinin ise enzimin nonkompetitif inhibitörü olduğu ve 0.1mmol/L konsantrasyonda GGT aktivitesini %34 inhibe ettiği gözlendi. Enzimin transfer reaksiyonu için ping pong mekanizmasını kullandığı saptandı.

Trombosit GGT'si, Triton X-100 ile solubilizasyon, gel filtrasyon, iyon değiştirici kromatografi, afinite kromatografi yöntemleri ile başlangıca oranla 10 kez saflaştırıldı. Poliakrilamid gel elektroforezi (PAGE) ile trombositlerde GGT'nin tek bir izoenziminin olduğu saptandı.

7. SUMMARY

CHARACTERIZATION OF HUMAN PLATELET GAMMA-GLUTAMYL TRANSFERASE

Gamma- glutamyl transferase (GGT) is a membrane glycoprotein which is involved in the transfer of gamma glutamyl residues to amino acids, to dipeptides and to water, in glutathione metabolism and in formation of LTD₄ from LTC₄ of the leucotriens. In this work GGT was solubilized with Triton X-100 from human platelet membranes and was characterized. Kinetic studies were performed in pooled platelets of 7 normal subjects. For gamma glutamyl p-nitroanilide as the substrate, V_{\max} was 100 mU/ 10⁹ plts and K_m was 2.08 mmol/L. For glycylglycine as the acceptor, V_{\max} was 45.45 mU/10⁹ plts and K_m was 15.87 mmol/L. Its optimum pH and optimum temperature were 8.2 and 37°C, respectively. The thermal stability tests showed 36% GGT activity decrease after 30 min incubation at 56° C. In the presence of borate, L- serine was found to be competitive inhibitor and GGT activity was inhibited 93% with L-serine at a concentration of 5 mmol/L. Inhibition constant (K_i) was calculated as 30 µmol/L for L-serine. Bromcresol green was a noncompetitive inhibitor and enzyme was inhibited 34% with bromkresol green at a concentration of 0.1 mmol/L. GGT showed ping pong mechanism for transfer reactions.

Only one isozyme was observed through polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). GGT was purified 10 times by Triton X-100 solubilization, gel filtration, ion exchange chromatography and affinity chromatography.

8. KAYNAKLAR

- 1- Meister, A. Biochemistry of Glutathione. In Metabolism of Sulfur Compounds. Ed: Greenberg, D.M., 101-188, New York, Academic Press, 1975.
- 2- Tsao, B., Curthoys. N.P. The absolute asymmetry of orientation of γ -glutamyl transpeptidase and aminopeptidase on the external surface of the rat renal brush border membrane. J.Biol.Chem., 255,16(25): 7708-7711, 1980.
- 3- Nemesanzky, E., Lott, J.A. Gamma-glutamyltransferase and its isoenzymes: Progress and Problems. Clin. Chem., 31(6):797-803, 1985
- 4- Goldberg, J.A., Pineda, E.P., Smith, E.E. A method for the colorimetric determination of γ -glutamyl transpeptidase in human serum: Enzymatic activity in health and disease. Gastroenterology, 44:127-133, 1963.
- 5- Meister, A. Glutathione. In The Liver: Biology and Pathobiology. Eds: Arios, L., Papper, H., Schacter, D. 17:297-305, New york, Raven Press, 1982
- 6- Yaman, A. Normal ve aterosklerozlu olguların trombositlerinde gamma -glutamil transferaz aktivitesi. Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 1990.
- 7- Yardımcı, T., Yaman, A., Ulutin, O.N. The levels of gamma-glutamyl transfease and glutathione in platelets of normals and atherosclerotic subjects before and after defibrotide. 2nd Mediterranean Congress of Angiology, Antalya, Abs. No. 326, 1990.

- 8- Shire, H.D., Haber, B. Immunocytochemical localization of γ -glutamyl transpeptidase in the rat CNS. *Brain Res.*, 217:339-349, 1981.
- 9- Khalaf, M.R., Hayhoe, F.G.J. Cytochemistry of γ -glutamyl transferase in hepatic cells and malignancies. *Histochem. J.*, 19:385-395, 1987.
- 10- Selvaraj, P., Balasubramanian, K.A., Hill, P.G. Isolation of γ -glutamyl transpeptidase from human primary hepatoma and comparison of its kinetic and catalytic properties with the enzyme from normal adult and fetal liver. *Enzyme*, 26:57-63, 1981.
- 11- Day, B.J., Carlson, G.P. Kinetic comparison of rat pulmonary and renal gamma-glutamyl transpeptidase activities. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 70(3):371-374, 1990.
- 12- Furuta, N., Nakada, J. Study on gamma-GTP activity in urine and renal tissue of drug induced nephrotoxicity in rats. *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi*, 84(7):1197-1207, 1993.
- 13- Jimenez, A.J., Jaimez, L., Barrios, L. Salivary γ -glutamyltransferase activity in internal diseases. *Arch. Intern. Med.*, 144:1804-1806, 1984.
- 14- Tate, S.S., Meister, A. Gamma-glutamyl transpeptidase from kidney. *Methods in Enzymology*, 113(50):400-415, 1985.
- 15- Bannai, S., Tateishi, N, Role of Membrane transport in metabolism and function of glutathione in mammals. *J. Memb. Biol.*, 89:1-8, 1986.
- 16- Griffith, W., Richard, J., Meister, A. Transport of gamma- glutamyl amino acids: Role of glutathione and gamma-glutamyl transpeptidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:6319-6322, 1979.
- 17- Aharony, D. Discriminative effect of γ -GT inhibitor on metabolism of leukotriene C4 in peritoneal cells. *Life Sci.* 19,35(21):2135-2142, 1984.
- 18- Dvorakova, L., Lisy V., Stastny, F. Developmental changes in the activity of membrane-bound γ -glutamyl transpeptidase and in the sialylation of synaptosomal membranes from the chick embryonic brain. *J. Biochem.*, 203:669-672, 1992.

- 19- Stole, E., Meister, A. Interaction of γ -glutamyl transpeptidase with glutathione involves specific arginin and lysine residues of heavy subunit. *J. Biol. Chem.*, 266(27),25:17850-17857, 1991.
- 20- Osuji. G.O. An oscillatory mechanism for the γ -glutamyl transpeptidase mediated translocation of amino acids across the cell membrane. *J. Theor. Biol.*, 109:1-15, 1984.
- 21- Rosalki, S.B., Nemesanzky, E., Foo, A.Y. A new flurescence method for gamma-glutamyltransferase isoenzyme demonstration. *Ann. Clin. Biochem.*, 18:25-27, 1981.
- 22- Szewczuk, A., Orłowski, M. The use of α -(N- γ -DL-glutamyl) aminonitrile for the colorimetric determination of a specific peptidase in blood serum. *Clin. Chim. Acta*, 5:680-684, 1960.
- 23- Glenner, G.G., Folk, J.E. Glutamyl peptidases in rat and guinea pig kidney slices. *Nature*, 192(28):338-342, 1961.
- 24- Shaw, L.M., Stromme, J.H., London, J.L., Theodorsen, L. IFCC methods for measurement of enzymes. Part 4. IFC method for γ -glutamyltransferase ((γ -glutamyl)-peptide: amino acid γ -glutamyl transferase, EC 2.3.2.2.). *Clin. Chem. Acta*, 315F-338F, 1983.
- 25- Szasz, G. A kinetic photometric method for serum γ -glutamyl transpeptidase. *Clin.Chem.*, 15:124-135, 1969.
- 26- Sacchetti, L., Castaldo, G., Salvatore, F. Electrophoretic behavior and partial characterization of disease-associate serum forms of gamma-glutamyltransferase. *Electrophoresis*, 10:619-627, 1989.
- 27- Szewczuk, A., Connell, G.E. The reaction of iodoacetamide with the active center of γ -glutamyl transpeptidase. *Biochim. Biophys. Acta*, 105:352-367, 1965.
- 28- Tate, S.S., Meister, A. Serine-borat complex as a transition-state inhibitor of γ -glutamyl transpeptidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75(10):4806-4809, 1978.

- 29- Vesely, J., Lisy, V., Cernoch, M. Partial purification of γ -glutamyltransferase from human brain microvessels. *Neurochem. Res.*, 10(10):1325-1334, 1985.
- 30- Xu, K., Meng, X.Y., Wu, J.W., Shen, B., Shi, Y.C. Diagnostic value of serum gamma-glutamyltransferase isoenzyme for hepatocellular carcinoma: a 10 year study. *Am. J. Gastroenterol.*, 87(8):991-995, 1992.
- 31- Miyazaki, S., Okumura, M. Change of serum γ -glutamyl transpeptidase level and isoenzyme pattern in hepatobiliary pancreatic disease. *Clin. Chim. Acta.*, 40:193-197, 1972.
- 32- Sawabu, N., Masatoshi ; N., Ozaki K. Clinical evaluation of specific γ -GTP isoenzyme in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 51:327-331, 1987.
- 33- Moinuddun, M., Dean, P., Wander, Z.R., Dragutsky, M., The limitation of liver function test in metastatic carcinoid tumors. *Cancer*, 1, 59(7):1304-1306, 1987.
- 34- Reichling, J.J., Kaplan M.M. Clinical use of serum enzymes in liver disease. *Dig. Dis. Sci.*, 33(12):1601-1612, 1988.
- 35- Whelan, G. Biological markers of alcoholism. *Aust. N.Z. J. Med.*, Apr 22(2):209-213, 1992.
- 36- Yamada, Y., Ishizaki, M., Kido, T., Honda, R., Tsuritani, I., Ikai, E., Yamaya, H. Alcohol, high blood pressure, and serum gamma-glutamyl transpeptidase level. *Hypertension*, 18(6):819-826, 1991.
- 37- Russell, J.J., Staffeldt, E.F., Wright, B.F., Prapuolenis, A., Carnes, B.A., Peraino, C. Effects of rat strain, diet composition and phenobarbital on hepatic gamma-glutamyl transpeptidase histochemistry and on the Induction of altered hepatocyte foci and hepatic tumors by diethylnitrosamine. *Cancer Res.*, 15,47(4):1130-1134, 1987.
- 38- Keeffe, E.B., Sunderland, M.C., Gabourel, J.D. Serum gamma-glutamyl transpeptidase activity in patients receiving chronic phenytoin therapy. *Dig. Dis. Sci.*, 31(10):1056-1061, 1986.

- 39- Shoukry, M.I. Gamma-glutamyl transferase in diabetic rats. The effect of insulin treatment. *Acta. Diabetol. Lat.*, 25(4):299-302, 1988.
- 40- Fernandez, V., Simizu, K., Barros, S.B. Effects of hypertroidizm on rat liver glutathione metabolism: related enzymes activities, efflux, and turnover. *Endocrinology*, 129(1):85-91, 1991.
- 41- Scherberich, J.E. Kidney cell damage and liberation on enzymes. *Wien. Klin. Wochenschr. Suppl.* 189:5-9, 1991.
- 42- D'Erasmus, E., Acco,, M., Medici, F., Pisani, D. Clinical aspects of early increase in serum gamma-glutamyl transferase in cerebral infarction. *Biomed. Pharmacother.*, 47(2-3):89-92, 1993.
- 43- Sokrut, V.N., Iabluchanskii, N.I. Biochemical characteristics of uncomplicated and complicated healing of experimental myocardial infarcts. *Kardiologica*, 31(1):72-75, 1991.
- 44- Spooner, R.J., Smith, D.H., Bedford, D. Serum gamma glutamyl transferase and alkaline phosphatase in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Pathol.*, 32:638-641, 1982.
- 45- Kumari, R., Rao, Y.N., Talukdar, B., Agarwal, S., Puri, R.K. Serum enzyme abnormalities in protein malnutrition. *Indian Pediatr.*, 30(4):460-473, 1993.
- 46- Nand, N., Sharma, M., Saini, D.S., Khosla, S.N. Gamma-glutamyl transpeptidase in menengites. *J. Assoc. Physicians. India*, 40(3):167-169, 1992.
- 47- Cucuianu, M., Zdrenghea, M., Pop, M., Opincaru, A. Increased serum gamma-glutamyl transferase in hypertriglyceridemia: comparison with serum pseudocholinesterase. *Clin. Chim. Chem.*, 71:419-427, 1976.
- 48- Ulutin, O.N. *The Platelets, Fundamental and Clinical Applications.* İstanbul, Kağıt ve Basım İşleri A.Ş., 37-51, 1976.
- 49- Smzinger, H. Role of platelet in atherosclerosis. *Seminars In Thrombosis and Hemostasis*, 12(2)124-132, 1986.

- 50- Bakker, W.W., Poelstra, M.A., Barradas, D.P., Mikhailidis, D.P. Platelets and ectonucleotidases. *Platelets*, 5:121-129, 1994.
- 51- Berndt, M.C., Phillips, D.R., Platelet membrane proteins: composition and receptor function. In *Platelets in Biology and Pathology-2*, ed. Gordon, Elsevier/ North Holland, 3:43-73, 1981.
- 52- Yardımcı, T., Ulutin, O.N. Alteration of platelet glucose transport system in atherosclerosis *Wien. Klin. Wochenschr.*, 98,221-222, 1986.
- 53- Göker, B., Yardımcı, T., Ulutin O.N. Isolation of the glucose transporter from human platelets and restoration of the impaired platelet active transport of glucose in atherosclerotic with defibrotide. *Thrombosis Haemostasis*, 65:1096, 1991.
- 54- Emekli, N.B. Trombositlerde glikoprotein sentezi, galaktoz transportu ve trombosit glikoproteinleri. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Doçentlik Tezi, İstanbul, 1981.
- 55- Rudolf, G., Schmitz, G. Zytochemische nachveiss methoden spezifischer dehydrogenasen in menschlicken thrombozyten. *Folia Haemat.*, 6:379-384, 1962.
- 56- Halmsen, H., Karpatkin, S. Metabolism of platelets. In *Hematology*. Williams, J.W., Beutler, E., Eislw, A., Litcham, M. 3rd ed., Singapore, Mc Graw Hill Book Company, 1149-1176, 1986.
- 57- Belch, J.J.F. Platelets and oxygen free radicals. *Platelets*, 3:175-180, 1992.
- 58- Yardımcı, T., Ulutin, O.N. Some observations on platelet amino acid transport systems. *Thrombosis Heamostasis* 46(1),408, 1981.
- 59-Özbilen, A., Yardımcı, T., Ulutin, O.N. Leucine transport systems in platelets. *Eur. Afr. Div. ISH, V Meeting, Hamburg*, 1979.
- 60- Yardımcı, T., Demir, E., Öndikmen, Ş., Ulutin, O.N. Histidine transport system in human platelets; Recent advances in basic research and clinical aspects. *Excepta Medica, Int. Congr. Ser., Amsterdam* ,355:110-117, 1975.

- 61- Yardımcı, T. Trombosit membran glikoproteinleri ve trombosit membran transport sistemleri. Temel Hematoloji ve Biyokimya Lisansüstü Ders Notları, Adana, 1989.
- 62- Ruoslahti, E. Integrins. *J. Clin. Invest.*, 87:1-5, 1991.
- 63- Springer, T.A. Adhesion receptors of the immune system. *Nature*, 346(2):425-434, 1990.
- 64- Kehrel, B. Platelet receptors for collagens. *Platelets*. 6:11-16, 1995.
- 65- Bosia, A., Spangenberg, P. Effect of GSH depletion by 1-kloro 2-4 dinitrobenzen on human platelet aggregating arachidonic acid oxidative metabolism and cytoskeletal proteins. *Thromb. Res.* 1,37(37):423-434, 1985.
- 66- Bryant, R.W., Simon, T.C., Bailey, J.M. Role of glutathione peroxidase and hexose monophosphate shunt in the platelet lipoxygenase pathway. *J. Biol. Chem.*, 257:14937-14943, 1982.
- 67- Pace-Asciak, C.R., Klein, J., Spielberg S.P. Metabolism of leukotrine A₄ in to C₄ by human platelets. *Biochim. Biophys. Acta*, 877:68-74, 1986.
- 68- Brecher, G., Cronkite, E.P. Morphology and enumeration of human blood platelets. *J. Appl. Physiol.*, 3:365-371, 1950.
- 69- Lowry, O. H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275, 1951.
- 70- Davis, B.J. Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121:404-409, 1964.
- 71- Selvaraj, P., Balasubramanian, K.A. Localization of gamma-glutamyl transferase on polyacrylamide gels using L- γ -glutamyl p-nitroanilide as substrate. *Clin. Chim. Acta*, 121:291-300, 1982.
- 72- Zacharius, R., Zell, T., Morrison, J., Woodlock, J. Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 30:148-154, 1969.

- 73- Dixon, M., Webb, E.C., Thorne, C.J.R., Tipton, K.F. Enzyme Inhibition and Activation. In *Enzymes*. 3rd ed., Longman Group Ltd., 350-351, 1979.
- 74- Shiao, Y.L., Chen, J.C., Wang, C.T. Solubilization and morphological change of human platelets in various detergents. *Biochem. Biophys. Acta*, 986:56-67, 1989.
- 75- Garvey, T. Q., Hyman, R.E. GGT of rat intestine, localization and possible role in amino acid transport. *Gastroenterology*, 71:778-785, 1976.
- 76- Berteloot, A., Bennets, R. W., Ramaswamny, K. Transport characteristics of papain treated brush border membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*, 601:592-604, 1980.
- 77- Hsu, B.Y.L., Foreman, J.W., Corcoran, S.M., Ginkinger, K., Segal, S. Absence of a role of γ -glutamyl transpeptidase in the transport of amino acids by rat renal brush border membrane vesicles. *J. Membrane Biol.*, 80:167-173, 1984.
- 78- Yardımcı, T. The effect of osmotic shock on platelet membrane transport. *Hematologica*, 65:516-522, 1980.
- 79- Yardımcı, T., Yaman, A., Ulutin, O.N. Characterization of platelet gamma-glutamyltransferase and its alteration in cases of atherosclerosis. *Clin. Appl. Thrombosis/Hemostasis*. 1(2):103-113, 1995.
- 80- Vachon, V., Pouliot, J.F., Laprade, R., Beliveau, R. Fractionation of renal brush border membrane proteins with Triton X-114 phase partitioning. *Biochem. Cell Biol.*, 69(2-3):206-211, 1991.
- 81- Delanghe, J.R., De Buyzere, L.M., De Sheerder, I.K., Claeys, R., Vieme, J.R. Lectin affinity chromatography of serum gamma- glutamyltransferase in liver disease. *Clin. Chem. Acta*, 162:311-318, 1987.
- 82- Tate, S.S., Khadse, V. Renal γ -glutamyl transpeptidase; influence of glycosylation on the electrophoretic behavior and molecular weights of their subunits. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 141(3):1189-1194, 1986.

- 83- Cone, J.L., Glowinski, I.B., Wirth, P.J., Grantham, P.H., Roller, P.P. Structural studies and two dimensional gel electrophoresis of γ -glutamyl transpeptidase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 247,1(15):165-170, 1986.
- 84- Coloma, J., Pitot, H.C. Biochemical and immunologic studies on the native and deglycosylated forms of γ -glutamyl transpeptidase of rat kidney. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 135(1):304-308, 1986.
- 85- Eryürek, F.G., Sürmen, E., Öner, P., Altuğ, T., Oz, H. Gamma-glutamyl transpeptidase and acetylcholine esterase activities in brain capillaries of cholesterol fed rabbits. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 69:245-248, 1990.
- 86- Eryürek, F.G., Sürmen, E., Ömer, B. Altuğ T., Öner P., Deniz, G. Modulation of gamma-glutamyl transpeptidase activity by dietary eicosapentenoic acid and Vit E in levels of rabbits on hypercholesterolemic diet. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 65:389-392, 1989.
- 87- Jenkinson, S.G., Duncan, C.A., Brayn, C.L., Lawrence, R.A. Effects of age on rat glutathione metabolism. *Am. J. Med. Sci.*, 302(6):347-352, 1991.
- 88- Shaw, L.M., Archer, P.L., London, J.W., Marsh, E. Electrophoretic, kinetic and immunoinhibition properties of γ -glutamyl transferase from various tissues compared. *Clin. Chem.*, 26(11):1523-1527, 1980.
- 89- Shaw, L., London, J.W., Peterson, L.E. Isolation of γ -glutamyl transferase from human liver and comparison with the enzyme from human kidney. *Clin. Chem.*, 24(6):905-915, 1978.
- 90- Artur, Y., Bednawska, M.W., Jacquier, A., Siest, G. Associations between serum gamma-glutamyl transferase and apolipoproteins relationships with hepatobiliary diseases. *Clin. Chem.*, 30(8):1318-1321, 1984.
- 91- Greostad, M., Huseby, N.E. Clearance of different multiple forms of human γ -glutamyl transferase. *Clin. Chem.*, 39(9):1654-1656, 1990.
- 92- Jung, K., Wischke, U.W. Elektrophoretic variants of alanin aminopeptidase, alkaline phosphatase and γ -glutamyl transferase in urine. *Clin. Chem.*, 30(6):856-859, 1984.

- 93- Patel, S., O'gorman, P. Demonstration of serum γ -glutamyl transpeptidase isoenzymes using cellogel electrophoresis. *Clin. Chim. Acta*, 9:11-17, 1973.
- 94- Sacchetti, L., Castaldo, G., Salvatore, F. The gamma- glutamyl transferase isoenzyme pattern in serum as a signal discriminating between hepatobiliary diseases, including neoplasias. *Clin. Chem.*, 34(2):352-355, 1988.
- 95- Sacchetti, L., Castaldo, G., Fortunato, G., Salvatore, F. Improved procedure for measuring gamma-glutamyltransferase isoenzymes in serum. *Clin. Chem.*, 34(2):419-422, 1988.
- 96- Freise, J., Schmidt, E., Magerstedt, P. Studies on the multiple forms of γ -glutamyltransferase. *Clin. Chim. Acta*, 73:267-275, 1976.
- 97- Gürdöl, F., Nwose, O.M., Mikhailidis, D.P. Gamma-glutamyl transferase activity in human platelet: quantification of activity, isoenzyme characterization and potential clinical relevance. *Platelets*, 1995, In Press.
- 98- Selvaraj, P., Balasubramnian, K.L. Soluble forms of γ -glutamyl transferase in human adult liver, fetal liver and primary hepatoma compared. *Clin. Chem.*, 29(1):90-95, 1983.
- 99- Tarachand, U. Purification and properties of γ -glutamyl transpeptidase from rat deciduoma. *J. Appl. Biochem.* 6:278-288, 1984.
- 100- Rosalki, B.S., Tarlow, D. Optimized determination of γ -glutamyl transferase by reaction-rate analysis. *Clin. Chem.*, 20(9):1121-1124, 1974.