

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

79375

**İNSAN ERİTROSİT VE KARACİĞER DOKU PİRÜVAT
KİNAZİNİN KİNETİK ÖZELLİKLERİ**

DOKTORA TEZİ

Seval YILMAZ

F.Ü. TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

T.C. YUMURT

1997

DANIŞMAN
Y. Doç. Dr. Necip İLHAN

79375

ELAZIĞ - 1997

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
1-GİRİŞ.....	1
2-MATERYAL VE METOT.....	28
3-BULGULAR.....	39
4- TARTIŞMA VE SONUÇ.....	82
5- ÖZET.....	92
6-SUMMARY.....	93
7-KISALTMALAR.....	94
8-KAYNAKLAR.....	95
9- ÖZGEÇMİŞ.....	105
10-TEŞEKKÜR.....	106

I. ÖNSÖZ

Enzimler, çok az miktarları ve üstün katalitik güçleri ile biyolojik sistemlerdeki biyokimyasal reaksiyonları hızlandıran protein yapısındaki katalistlerdir. Enzimler; enerji açısından gerçekleştirmelerine engel olmayan tepkimeleri metabolik yollar oluşturacak şekilde yönlendirmektedirler. Katalizledikleri tepkimeler sırasında değişikliğe uğrayan enzimler tepkimelerin bitiminde tekrar eski şekillerine geri dönmektedirler. Yani biyokimyasal reaksiyonlar sırasında enzimler harcanarak ortadan kaybolmazlar. Yalnızca bir tek enzim molekülü pek çok sayıda substratın ürüne dönüşmesini sağlayabilmektedir.

Allosterik enzimler, katalitik bölgelerle beraber düzenleyici bölgeleri de içeren enzimlerdir. Bunlardan katalitik bölgeye substrat, düzenleyici bölgeye de modülatör bağlanır. Pozitif modülatörün düzenleyici bölgeye bağlanması enzimin yapı düzeninde oluşturduğu değişme yolu ile katalitik bölgeye yansır ve bu da katalitik bölgenin aktif olmasına ve yüksek aktiviteli substrat ile bağlanmasına imkan verir. Bu modülatörün düzenleyici bölgeden ayrılması enzimi tekrar eski inaktif veya az aktif şekline dönüştürür.

Karaciğer hayatın devamı için gerekli olan glikoliz ve glikoneogenezisin olduğu önemli bir organdır. Bu yüzden araştırmacılar tarafından devamlı incelenmiş ve bundan sonra da çeşitli incelemelere tabi tutulacaktır. Çalışmamızda insan eritrosit ve karaciğer dokusunda pirüvat kinaz enziminin kinetik özellikleri ile bazı biyokimyasal koşullarını optimize etmeyi, enzimin bazı modülatörlere (aktivatör ve inhibitörler) karşı ilgisini araştırmayı amaçladık. Enzimin her iki dokudaki özellikleri karşılaştırılacaktır. Çalışmamızın eritrosit ve karaciğer pirüvat kinaz enzimi ile ilgili yapılacak olan bundan sonraki biyokimyasal çalışmalara ışık tutacağına inanıyoruz.

II. GİRİŞ

II. A. Enzimler

Gerçek birer katalist olan enzimler, biyolojik reaksiyonların hızlarını, kendileri bir değişikliğe uğramadan ve ortamda harcanmadan artırma yeteneğine sahiptirler. Enzimlerin yalnız kinetik (harekete geçirme) etkileri vardır. Enzimler reaksiyonların termodinamik özelliklerini etkilemezler. Başka bir deyişle reaksiyonun toplam serbest enerji değişimi reaksiyonun son denge durumuna etki etmez. Enzimler katalitik etkilerini biyokimyasal reaksiyonun enerji engelini düşürmek suretiyle yaparlar. Enzimler aktivasyon enerjisini düşürdüklerinden, enzimatik reaksiyonların oluşumu daha az bir ısıya gereksinim duyar. Bu nedenle enzimatik reaksiyonlar normal vücut ısısı gibi düşük ısıda kolayca oluşur (4,26).

Enzimler genellikle büyük moleküllerdir. Buna karşılık substratlar ise küçük moleküllerdir. Protein yapıda olan enzimlerin yüzeyinde substratlarla kompleks yapmalarını sağlayan dar bir bölge vardır ki bu bölgeye katalitik bölge veya aktif merkez adı verilmektedir. Enzimin aktif merkezinde en az bir amino asit özel bir rol oynamaktadır. Aktif merkezde sadece aminoasitler değil çeşitli kofaktör ve koenzimler de yer almaktadır (26). Aktif bölgedeki bazı bölgeler substratı bağlamakta başka bir bölgede kataliz olayını başarmaktadır. O halde enzimlerin aktif merkezinde iki bölge bulunmaktadır. Bunlardan biri bağlanma bölgesi diğeri ise katalitik aktive bölgesidir (55).

Aktif bölgelerde kofaktörler bulunabileceği gibi -SH, OH, NH₃, COO⁻ gibi reaktif gruplar bulunur. -SH grupları sistein tarafından, OH serinden, NH₃ lizin, arginin gibi bazik amino asitlerden, COO⁻ ise aspartik ve glutamik asit gibi asidik amino asitlerden sağlanır (55).

Enzimler bir veya birkaç substratı etkilerken aktive göstermek için bazı hallerde koenzime, bazende kofaktöre ihtiyaç duyarlar. Enzimlerin aktiviteleri için gerekli ikinci bileşik inorganik ise kofaktör, organik ise koenzim adını alır (26).

II. B. Allosterik Enzimler

Üzerlerinde yer aldıkları metabolik yolun düzenli çalışmasını sağlayan ve o metabolik yol ile ilgili son ürün veya başka bir molekül tarafından kontrol

edilen enzimlere allosterik enzim veya düzenleyici enzim adı verilmektedir (55).

Allosterik enzimlerin aktivitelerini değiştiren bileşiklere modülatör adı verilmektedir. Modülatör stimölasyon etkisi gösterdiği ve enzimi aktivite ettiği zaman pozitif modülatör veya allosterik aktivatör, enzimi inhibe ettiği zaman negatif modülatör veya allosterik inhibitör adını almaktadır (4).

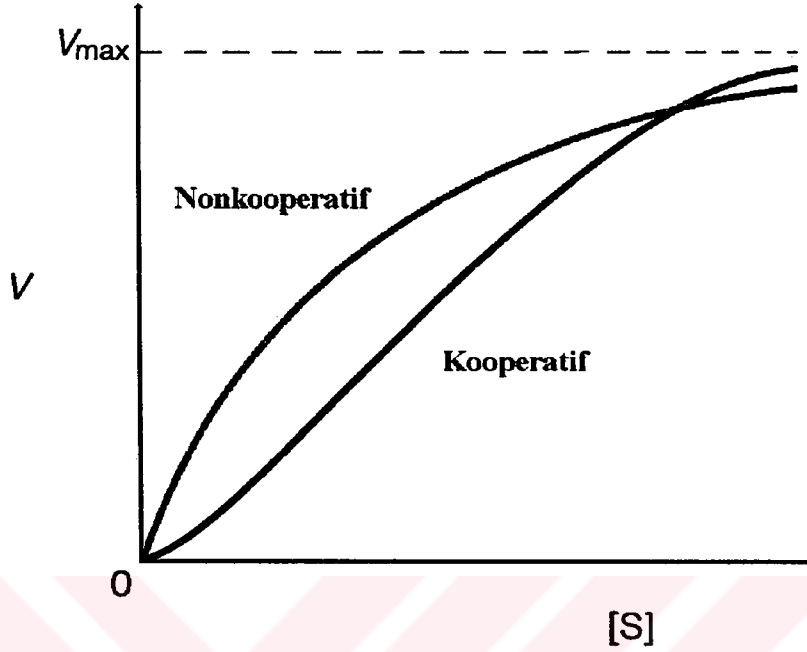
Daha çok karmaşık olan bu tip enzimlerde her modülatörün kendi spesifik allosterik bölgesi vardır. Bu bölge işgal edildiği zaman modülatör enzimin katalitik etkisini hızlandırıcı veya yavaşlatıcı işaretler verir (4).

Allosterik enzimlerde katalitik ve düzenleyici olmak üzere iki bölge vardır. Bu iki bölge ayrı ayrı yerlerde bulunur. Bunlardan katalitik bölgeye substrat, düzenleyici bölgeye de modülatör bağlanır. Pozitif modülatörün düzenleyici bölgeye bağlanması enzimin yapı düzeninde oluşturduğu değişme yolu ile katalitik bölgeye yansır ve bu da katalitik bölgenin aktif olmasına ve yüksek aktiviteli substrat ile bağlanmasına olanak verir. Bu modülatörün düzenleyici bölgeden ayrılması enzimi tekrar inaktif veya aktif şekline dönüştürür (4,26,91).

II. B. 1. Regölasyonu Sağlayan Allosterik Enzimler Üç Ana Grup Altında Toplanır :

1-Homotropik Enzimler : Bu tip enzimlerde substrat molekülü yalnız substrat değil aynı zamanda enzimi aktive eden bir ajan olarak da rol oynamaktadır. Birinci substratın bağlanması ikinci substratın bağlanmasını kolaylaştırdığı için enzim aktive olmaktadır. Substrata kooperatif olarak bağlanan enzim, düşük substrat konsantrasyonlarında düşük bir bağlanma eğilimi (affinite) gösterir. Bu koşullarda enzimin K_m 'i büyüktür. Substrat düzeyi arttığı zaman ise daha fazla substrat enzime bağlanır ve bağlanma gittikçe artar. Substrat enzime bağlanınca, enzimde konformasyonel bir değişim olur. Enzim T (Tens) formundan R (Relax) formuna dönüşür (55).

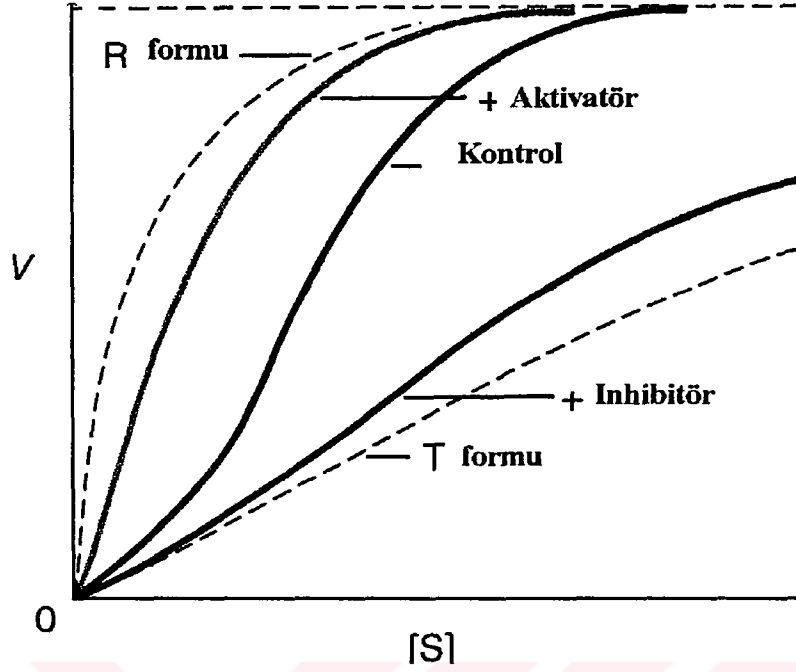
T formundaki enzime substrat zayıf olarak bağlanır ve bu durum düşük substrat konsantrasyonlarında görölür. R formunda ise substrat enzime çok kuvvetli olarak bağlanır. Substrat düzeyinin yüksek olduğu durumlarda enzim R formundadır (26,55).



Şekil 1 : Homotropik Bir Enzime Substrat Bağlanması

2- Heterotropik Enzimler : Bu tip enzimlerde substratın bağlanma yerinden farklı olarak bir de modifikatörün bağlanma yeri vardır. Bu modifikatör enzimi ya aktive yada inhibe eder. Allosterik kontrolün en önemli kısmı "heteroallosterik etken" ler tarafından sağlanır. Bu etkenler aktivatör veya inhibitör olabilirler. Bu tip enzimlerde aktivatör veya inhibitörler enzimin belli bir bölgesine bağlanırlar. Bu bağlanma sonucu enzim T ve R formlarına dönüşür. Allosterik inhibitörler enzimi T (Tens), allosterik aktivatörler ise R (Relax) formuna sokarlar (26,55).

3- Bu gruptaki enzimler ise hem homotropik özellik, hem de heterotropik özelliğin ikisini birden gösterirler. Eğer ortamda yalnız substrat var ise aktive olarak homotropik özellik gösterir. Şayet modifikatör var ise ya aktive yada inhibe olarak heterotropik özellik göstermektedirler (26,55).



Şekil 2 : Heterotropik Bir Enzimin Kontrolü

II. B. 2. Allosterik Enzimlerin Özellikleri

1- Allosterik enzimler, diğer basit enzimler gibi substratı bağlayan ve onu dönüştüren katalitik yani aktif bölgelere de sahiptir. Bu aktif bölgenin yanısıra bir veya birkaç bölgesi substratı için spesifik olduğu gibi allosterik bölgesinde modülatör için spesifiktir. Bu nedenle allosterik bir enzimde substrat aktif bölgeye ve modülatör ise allosterik bölgeye bağlanır. Effektör (modülatör), allosterik yani düzenleyici bir enzimin allosterik bölgesine bağlandığı zaman bu enzimin kinetik özelliklerini değiştiren bir metabolittir. Metabolit ise metabolizmanın enzimle katalize reaksiyonlarındaki kimyasal bir ara üründür.

2- Genellikle allosterik enzimlerin molekülleri, basit enzim moleküllerinden daha büyük ve karmaşıktır. Allosterik enzimlerin çoğu iki veya daha fazla polipeptid zincirlerinden oluşmuştur.

3- Allosterik enzim Michaelis-Menten denklemi ile elde edilen eğriye benzer bir eğri vermez. Bunlar daha ziyade sigmoid (S) biçimi bir eğri verir. Bu enzimlerin ilk defa ayırt edilmeleri de bu özelliğinden kaynaklanmıştır (4).

II. B. 3. Allosterik Enzimlerin Mekanizması

Allosterik enzimlerde V reaksiyon hızı substrat konsantrasyonuna [S] göre grafiklenecek olursa Michaelis-Menten kinetiği yani hiperbolik bir eğri yerine sigmoid bir eğri elde edilir. Bu genellikle substratın bir çok bölgelerde kooperatif olarak bağlandığını göstermektedir. Bir tek bölgeye bağlanma, diğer bölgelere bağlanmayı da etkiler. Allosterik enzimlerin bu sigmoid satürasyon eğrisi üzerinde reaksiyon hızının yarı maksimal olduğu bir noktayı saptamak mümkündür. Ancak bu noktayı Michaelis-Menten sabiti (Km) ile tanımlamak olanağı yoktur. Çünkü allosterik enzim Michaelis-Menten denkleminin verdiği hiperbolik eğriye uyum sağlamaz. Bir allosterik enzimde yarı maksimal hızı veren substrat konsantrasyonu, Km yerine S_{0.5} veya K_{0.5} sembolleri ile ifade edilir (4,91).

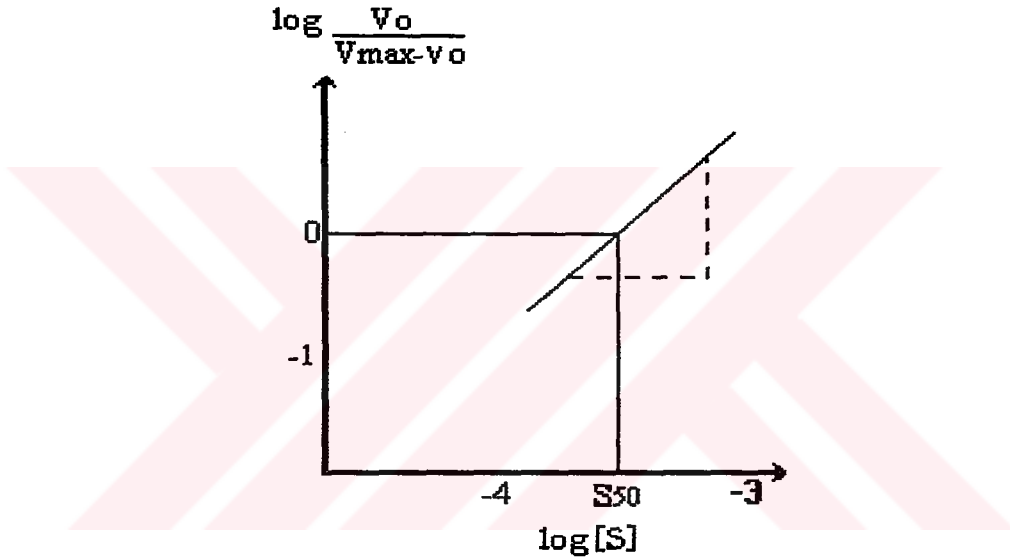
Heterotropik enzimlerle, modülatörleri substrattan başka olan substrat satürasyon eğrisi hakkında genel bir bilgi vermek güçtür. Bu durum modülatörün pozitif (stimülatör) veya negatif (inhibitör) olmasıyla ilişkilidir. Modülatör stimüle edici ise bu substrat satürasyon eğrisinin daha çok hiperbolik olmasına neden olur. Bu durumda K_{0.5} azalmıştır. Fakat V_{max} değişmemiştir ve bu da sabit substrat konsantrasyonunda reaksiyon hızının çoğalmasına neden olur. Diğer allosterik enzimler stimüle edici modülatöre V_{max} ta bir artma, K_{0.5} te küçük bir değişme ile cevap verir. Modülatör negatif veya inhibe edici olduğu zaman substrat satürasyon eğrisi K_{0.5}'in artması ile beraber daha çok sigmoid olur. Bundan dolayı allosterik enzimler substrat aktivitelerine karşı cevap verir. Çünkü bazılarının inhibe edici modülatörleri, bazılarının ise stimüle edici modülatörleri ve bazıları da ikisine sahiptir (26,55,91).

Sigmoid substrat satürasyon kinetikleri için yarı maksimal hız veren substrat konsantrasyonunun grafiksel değerlendirme metodu burada uygulanamaz. Çünkü burada doğru bir eğri elde edilemez. Bundan dolayı sigmoid satürasyon kinetiklerini değerlendirmek için Hill denkleminin grafiksel şekli kullanılır. Hill grafiği doğru bir hat biçimindedir.

$$\text{Hill denklemini} = \log \frac{V_o}{V_{\max} - V_o} = n \log [S] - \log k'$$

şeklinde ifade edilir. Bu denklemde k' kompleks sabitini tanımlamaktadır. Burada k' sabitine göre substrat konsantrasyonu düşük olduğu zaman bu reaksiyon hızının substratın n kuvveti kadar arttığını ifade etmektedir.

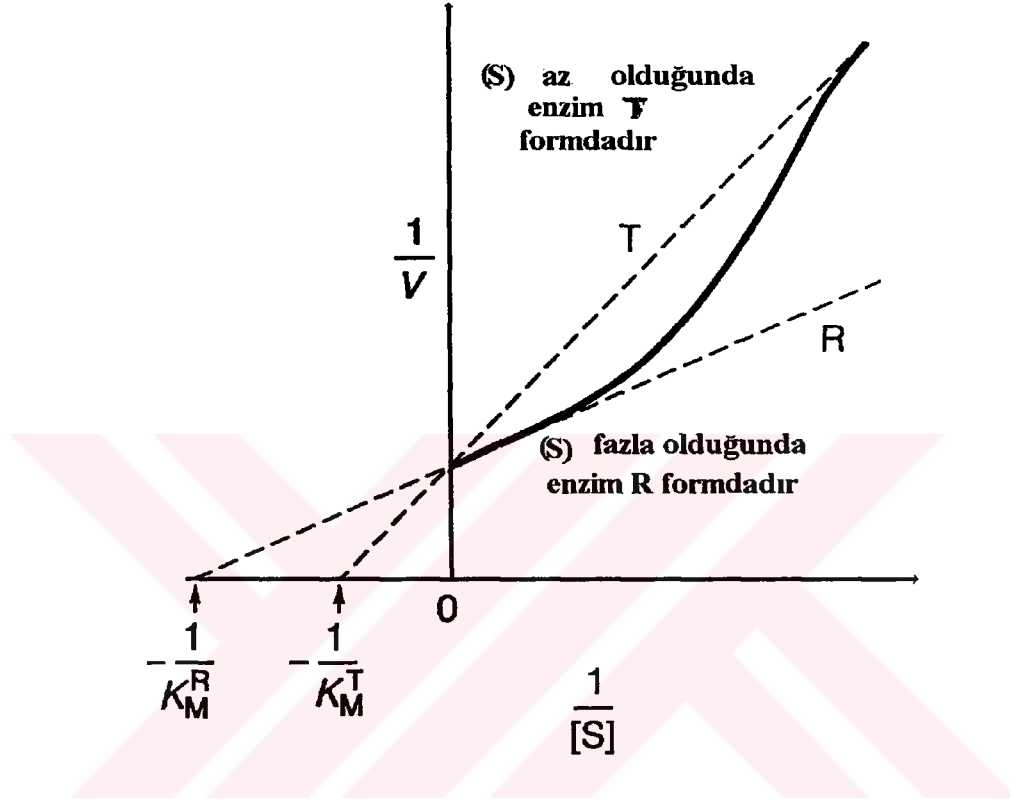
Hill grafiği, $\log [S]$ ye karşı $\log V_o / V_{max} - V_o$ in çizilmesi ile elde edilen bir doğru grafikdir. Bu grafiğin eğimi n ile tanımlanır. Burada ampirik bir parametre olan n 'in değeri substratı bağlayan bölgelerin sayısına ve bağlanma bölgeleri arasındaki karşılıklı etkinin sayı ve tiplerine bağlıdır (4,91).



Şekil : Hill Denkleminin Grafıksel Değerlendirilmesi : Substrat konsantrasyon kinetikleri sigmoid olduğu zaman yarı maksimal hızı oluşturan substrat konsantrasyonu tayin etmek için kullanılır.

$n = 1$ olduğu zaman bağlanma bölgeleri diğer bağlantı bölgelerine karşı bağımsız davranır. $n > 1$ olduğu zaman bağlanma bölgeleri kooperatiftir ve birinci substrat veya efektör molekülün bağlanması ikinci bir substrat molekülünün bağlanmasını artırır ve aktivasyon oluşur. n değeri ne kadar büyük olursa kooperativite o kadar kuvvetli olur ve böylece saturasyon kinetikler daha da belirgin sigmoid biçim alır. Yarı maksimum hız da ($V_o = V_{max}/2$) $V_o/V_{max} - V_o = 1$ dir ve bundan dolayı $\log V_o/V_{max} - V_o = 0$

olur. $S_{0.5}$ 'i yani yarı maksimal hızı oluşturan substrat konsantrasyonunu tayin etmek için dikey çizgi $\log V_0 / V_{max} - V_0 = 0$ olduğu noktadan x eksenine doğru çizilir (4,91).



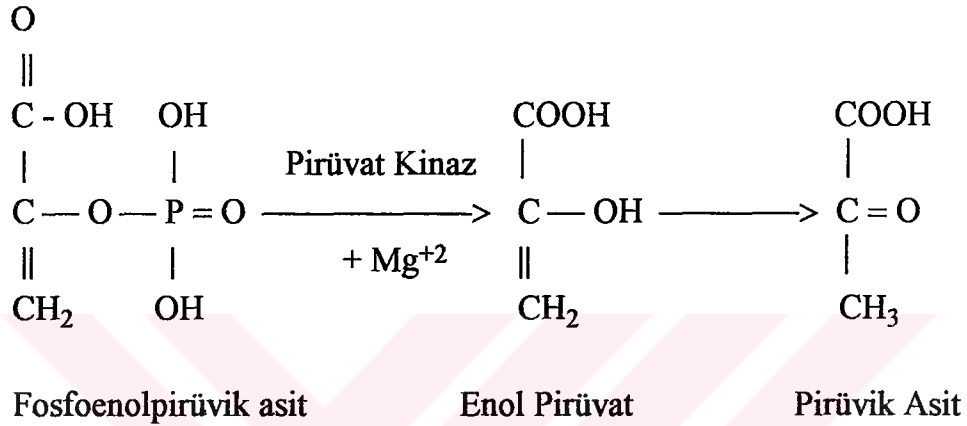
Şekil 4 : Kompetitif ve Nonkompetitif İnhibisyon

Negatif kooperativite efektör veya substratların allosterik bir enzimin substrat bölgesine veya subünitesine sonraki substrat molekülünün bağlanmasını azaltır. Negatif kooperativitedeki n değeri daima 1'den küçüktür (55,91).

Allosterik enzimleri ısıtacak veya üre ile muamele edecek olursak yapılarını biraz bozabiliriz. O zaman bu enzimin, substrat konsantrasyonuna karşı gösterdiği sigmoid şekilli hız eğrisi kaybolur onun yerine normal enzim ilişkisi gösteren hiperbolik bir eğri meydana gelir. Bu olaya enzimin desensitizasyonu denir (26).

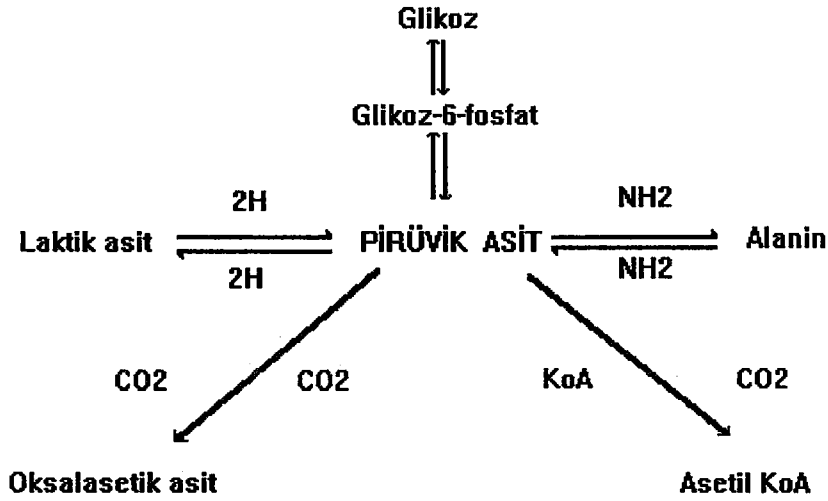
II. C. Pirüvat Kinaz Enzimi ve Önemi

Glikolitik yolun önemli kontrol enzimlerinden biri olan pirüvat kinaz, (EC 2.7.1.40 veya ATP : pirüvat 2-0-fosfotransferaz) bir fosforil grubunu fosfoenolpirüvat (PEP)'tan adenzindifosfat (ADP)'a aktararak adenzintrifosfat (ATP)'ın sentezlendiği tepkimeyi katalize eder (19,22,37,39, 66,80,88,94).



Pirüvat kinaz, ADP'nin substrat düzeyinde fosforilasyonunu katalize eden glikolizisin anahtar regülatör, allosterik bir enzimdir. Bu reaksiyonda oluşan enol pirüvat spontan olarak pirüvatın keto şekline çevrilir. Bu tepkimede önemli derecede serbest enerji açığa çıkar yani tepkime geriye dönüşümsüzdür. PEP'in fosforil grubunun transfer potansiyeli $-14.5 \text{ kcal mol}^{-1}$, ATP'nin ise $7.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ dir. Bu da fosforil grubu transfer dengesini ATP ve pirüvat oluşumu yönüne kaydırır (21,87,90).

Pirüvat kinaz, bir sülfüril grubunun adenzin-5'-sülfatopirofosfattan ADP'ye transferini katalize eder (76). Pirüvat kinaz ATP kullanarak hidroksilamin ve flor iyonunun da fosforilasyonunu sağlar. Glikolizisin ara ürünü olan 2,3-difosfogliserat (2,3-DPG) eritrositlerde oldukça yüksek konsantrasyonda bulunur ve oksijen transportunun regülasyonunda önemli bir rolü vardır. Pirüvat kinazın hemoglobinin allosterik efektörü olan 2,3-DPG düzeyinin ayarlanmasında rolü büyüktür. Enzim düşük nükleotid spesifitesine sahiptir ve guanidin, inosin, üridin ve sitidin 5' difosfatları fosfor akseptörü olarak kullanılır (7).



Şekil 5 : Pirüvik Asit Üzerinden Geçen Glukoz Yıkımları

Glikolitik yolda pirüvat oluştuğundan sonra, çevresel şartlara ve metabolik yolların işleyişine bağlı olarak hücre çeşitli seçeneklere sahiptir. Eğer anaerobik şartlar egemen olursa, indirgeyici ekivalanların solunum zinciri üzerinden oksijene transferi aracılığı ile nikotinamid adenin dinükleotid'in (NADH) yeniden oksidasyonu önlenir. Pirüvat, NADH tarafından laktata indirgenir, bu reaksiyon laktat dehidrogenaz tarafından katalize edilir. Hücre bol miktarda oksijenleniyorsa, pirüvat asetil-CoA'ya dönüşür. Redükte NADH+H⁺ üzerindeki elektronlar ve protonlar ise önce flavoproteine, sonra sitokromlara daha sonra ise oksijenlere nakledilir (26,55,94).

Pirüvat kinaz, Embden-Meyerhoff glikolitik yolunda akışı düzenleyen enzimlerin biri olarak kabul edildiğinden eritrosit metabolizmasında önemli bir role sahiptir. Pirüvat kinazın eritrosit metabolizmasındaki yaşamsal önemi önemli üç özelliğinden ileri gelir :

1- Pirüvat kinaz ile katalizlenen tepkime glikolizin kontrolünde önemli bir basamaktır.

2- Eritrositlerde tek enerji kaynağı glikolizdir. O nedenle, pirüvat kinaz ile katalizlenen tepkime, kullanılabilir kimyasal enerji sağlanması için önemlidir.

3- Pirüvat kinaz tepkimesi eritrositlerde 2,3-DPG düzeyini dolaylı olarak düzenler. Pirüvat kinaz eksikliği sonucu 2,3-DPG düzeyinin artması eritrositlerde hemoglobinden oksijen dissosiyasyonuna neden olduğundan hemoglobinin oksijen taşıma yeteneğini azaltır (14,86).

Optimal şartlarda yapılan çalışmalar sonucunda pirüvat kinaz aktivitesi insan karaciğerinde 15.5-21 $\mu\text{mol/g}$ dakika, rat karaciğerinde ise 30-35 $\mu\text{mol/g}$ dakika olarak bulunmuştur (35). Saflaştırılmış karaciğer pirüvat kinaz fraksiyonunda L-tip izoenzimin (A) spesifik aktivitesi (201 IU / mg protein), M_2 -tip izoenzimin (B) spesifik aktivitesinden (46 IU / mg protein) daha fazla olarak bulunmuştur. Saflaştırılmış rat hepatoma pirüvat kinaz fraksiyonunda M_2 -tip izoenzimin (A) spesifik aktivitesinde önemli bir artış gösterir iken (762 IU / mg protein), L-tip izoenzimin (A) spesifik aktivitesi normal rat karaciğerine benzerdir (295 IU / mg protein) (32).

İnsanda pirüvat kinaz aktivitesi sekse bağlıdır. Erkeklerden alınan örneklerdeki pirüvat kinaz aktivitesi kadınlardaki aktiviteden yaklaşık olarak 1/3 den daha fazladır. Enzim aktivitesi ve yaş arasında bir ilişki bulunmamıştır (35).

Fötusta karaciğer pirüvat kinaz düzeyi, pediatrik ve erişkin karaciğer enzim düzeylerinden daha düşüktür. 34-36 haftalık fötusunta karaciğer pirüvat kinaz aktivitesinde belli bir azalma görülmüştür. Enzimin 4 haftalık gebelikte hiperbolik bir kinetik gösterir iken düşük aktivite gösteren 34-36 haftalık gebelik periyodu sırasında sigmoidal kinetik gösterdiği açıklanmıştır (90). Hızlı olarak gelişen hücrelerde pirüvat kinazın spesifik aktivitesi normal gelişen hücrelere göre daha fazladır (43).

Eritrositteki enzim aktivitesi, sağlıklı insan kanı kullanılarak farklı sıcaklık derecelerinde saptanmıştır. Tablo I'de belirtilen enzim aktiviteleri Enzim Ünite / g Hb olarak verilmiştir (10).

Tablo I : Farklı Sıcaklık Derecelerinde Eritrosit Pirüvat Kinaz Değerleri

Enzim (U/g Hb)	37 °C	30 °C / 37 °C	25 °C / 37 °C
Pirüvat Kinaz	15.0±1.99 (n:5)	0.689±0.037 (n:5)	0.432±0.026 (n:5)
Düşük Substrat (%)	14.9±3.71 (n:5)	0.868±0.034 (n:5)	1.170±0.081 (n:5)
Düşük Substrat+FDP (%)	43.5±2.46 (n:5)	0.976±0.065 (n:5)	1.063±0.050 (n:5)

Yeni doğan ve küçük çocuklarda enzim aktivitesi, erişkin değerlerinden farklılık gösterir. Bu farklılığın nedenleri :

Birincil olarak ; Yeni doğan bebekte eritrositlerin ortalama yaşı yetişkin eritrositlerin ortalama yaşından daha azdır.

İkincil olarak ; Hücre yaş dağılımındaki farklılıkların temelinde açıklanamayan yeni doğanın eritrositlerinin enzim aktivitesinde farklılıklar vardır. Örneğin, yeni doğanların eritrositlerinde NADH aktivitesi erişkinlerinkinden daha düşüktür (10).

II. C. 1. Pirüvat Kinazın İzoenzimleri

Pirüvat kinaz, amfibialar hariç birçok kaynaktan izole ve karakterize edilmiştir (39). Bakteri, bitki ve hayvan kaynaklarından izole edilen pirüvat kinaz, en az 500 amino asitten oluşan bir homotetramerdir (7,59,96,99).

Pirüvat kinazın önceleri her biri 4 alt üniteli 3 izoenzim forma sahip olduğu bilinmekteydi. Bunlardan M-tipi kas ve beyinde, L-tipi karaciğer parankimal hücrelerinde, çok az miktarda da böbreklerde ve eritrositlerde, K-tipi de (A veya M₂) böbreklerde ve karaciğerin parankimal olmayan hücrelerinde bulunur. İleri fizyokimyasal karakterizasyonları pirüvat kinazları 4 grup altında toplamanın doğru olacağını göstermiştir (20,43).

Çeşitli dokulardaki dağılımına göre insan pirüvat kinazı 4 farklı izoenzime (M₁, M₂, L ve R) sahiptir (18,23,40,56,71).

M₁-tipi pirüvat kinaz, yetişkin iskelet kasında bulunan tek izoenzim olup kalp kası ve beyinin ana izoenzimidir (28,66).

M₂-tipi pirüvat kinaz (K ve A tipi), böbrek, barsak, akciğer, fibroblast, testis, adipoz doku ve mide gibi birçok dokuda yaygın bir şekilde bulunur. Karaciğerde, böbrek ve lökositlere göre daha az konsantrasyondadır. M₂ tipi pirüvat kinaz fötüs ve tümör dokularının major izoenzimi olup en fazla erişkin dokularda bulunur. Yağ depolayan hücreler yalnız M₂-tipi pirüvat kinaz içerirler. Eritrositlerde ve iskelet kasında bulunmaz (7,18,28,41,75,89).

Fötal tip olarak kabul edilen M₂-tipi pirüvat kinaz, fötal kas, karaciğer ve beyinde ana izoenzimidir. Fötal dönemden erginlik dönemine kadar geçen zamanda M₂-tipi pirüvat kinaz azalır; beyin ve iskelet kasında M₁-tipi izoenzim, karaciğerde L-tipi izoenzim ana izoenzim haline geçer. L izoenzimi doğumdan önce yoktur veya çok düşük düzeydedir. M₂ izoenzimi doğumdan 4 gün sonra kaybolur (18,99).

M_2 -tip homotetramerlere eritroid prekürsörlerde sık olarak rastlanır. L-tip pirüvat kinaz eritroblast olgunlaşmasının tüm evrelerinde bulunur. M_2 -tip pirüvat kinaz proeritroblastlarda orthokromatik eritroblastlardan daha fazladır. Eritroid matürasyonla M_2 subünitelerinin sentezi azalır ve L izoenzimi ana izoenzim haline geçer. Eritrositlerdeki M_2 -tip pirüvat kinazın varlığı farklı patolojik durumlarda oluşabilir ve pirüvat kinaz eksikliği olan bazı hastaların eritrositlerinde mevcuttur (18,56,61,84,98).

Gelişim ile ilgili çalışmalar M_2 -tip izoenzimin en erken görünen pirüvat kinaz izoenzimi olduğunu göstermiştir. Böylece diğer izoenzimler M_2 -tip izoenzimin türev formlarını göstermektedir (92,98,99).

R-tip pirüvat kinaz, yalnız olgun eritrositlerde bulunur, diğer dokularda bulunmaz. R-tip pirüvat kinaz poliakrilamid jel elektroforezi ile homotetramer olan R_1 -pirüvat kinaz ve heterotetramer olan R_2 -pirüvat kinaz gibi iki parçaya ayrılır. R_1 -pirüvat kinaz eritroblastlarda ve R_2 -pirüvat kinaz eritrositlerde daha fazla bulunmaktadır (18,46,57,71,73).

R-tip pirüvat kinaz normal eritrositlerde bulunan tek izoenzim iken hem M_2 hem de R-tip pirüvat kinaz olgunlaşmamış eritroblastlarda bulunur (57).

Bazı yazarlar, eritrosit pirüvat kinazının L ve M_2 -tip pirüvat kinazın bir hibriti (melezi) olduğunu öne sürmüşlerdir. L- M_2 hibrid seti bağırsak ve böbrekte, M_1 - M_2 hibrid seti fetal kasta oluşmaktadır (38).

R izoenzimi L izoenziminden 31 amino asit daha uzundur. Eritrosit pirüvat kinaz eksikliği olan hastalarda anormal karaciğer L pirüvat kinaz enzimi de olabilir (38).

L-tip pirüvat kinaz, karaciğer ve böbrek gibi glukoneojenik dokularda bulunur. Karaciğerin major, böbreğin minör izoenzimidir (7,43,46,47,79,104).

Karaciğer iki tip pirüvat kinaz izoenzimi içermektedir. L-tip pirüvat kinaz karaciğerin major enzimi olup parankimal hücrelerde bulunur. M_2 -tip pirüvat kinaz ise kupfer hücrelerinde bulunur. Yapılan çalışmalar, parankimal hücrelerin hem glikolitik hem de glukoneogenetik kapasiteye sahipken parankimal olmayan hücrelerin yalnızca glikolitik kapasiteye sahip olduğunu göstermiştir (42,46).

Karaciğer hücrelerinde bulunan L-tip pirüvat kinaz kinetik, elektroforetik ve immunolojik özellikleri ile R-tip pirüvat kinaza çok benzerdir, fakat aynı değildir. Son zamanlarda R ve L-tip pirüvat kinazın farklı elektroforetik mobiliteleri açıklanmıştır. Bu iki form aynı gen fakat farklı mRNA'larla kod edilmektedir. M_1 ve M_2 -tip pirüvat kinazın farklı gen ile kodlandığı saptanmıştır (56,57,73,84,92).

Yapılan çalışmalarda, domuz karaciğerinde pirüvat kinazın aralarında değişebilen iki formu tanımlanmıştır. Birincisi fruktoz-1,6-difosfat (FDP) ile yüklenmiş asit form ($pI:5.3$) olup bu form karaciğer kuru ekstraktındaki ana formdur. İkincisi ise saflaşmış örneklerde bulunan FDP ile yüklenmemiş alkali formdur ($pI:6.1$) (38).

II. C.2. Pirüvat Kinaz İzoenzimlerinin Moleküler Ağırlıkları

Pirüvat kinaz enzimi saf kristal halde elde edilmiş ve moleküler ağırlığı 250.000 dalton olarak saptanmıştır. R izoenzimi hariç bütün izoenzimler birbirinin aynı olan dört alt birimden oluşmaktadır (39).

Eritrosit pirüvat kinazı dört alt birimden oluşan bir tetramer yapısındadır (molekül ağırlığı 230.000 dalton) ve SDS-PAGE (Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez) ile tek bir band gösterir (28,39).

M_1 izoenziminin moleküler ağırlığı 212.000-250.000 dalton arasındadır. M_1 izoenziminin sodyum dodesil sülfat jel elektroforezi veya guanidin HCl / üre solüsyonu içinde ultrasantrifügasyonu ile moleküler ağırlıkları saptanmış ve dört alt birimden oluştuğu gösterilmiştir (75).

Karaciğer M_2 -tip pirüvat kinazının FDP yokluğunda pI 'sı (izoelektrik nokta) 7.8 dir. Karaciğer M_2 izoziminin birinci bağlanma bölgesi FDP'yi 0.1 M'dan düşük pI 'da bağlar. FDP için iki bağlama bölgesi içeren M_2 -tip pirüvat kinaz 0.1 M'dan daha yüksek pI 'da FDP'yi bağlamaz. Bu nedenle, FDP yüksek pI 'da bu izozimi uyarmaz. Birinci bağlanma bölgesine FDP bağlanması enzimin pI 'sını 6.6'ya kaydırır. FDP birinci bölgeye bağlandıktan sonra yüksek pI altında bile ikinci bağlanma bölgesine de bağlanabilir. FDP'nin bu bölgeye bağlanması FDP konsantrasyonu ile iyonik kuvvet arasındaki denge tarafından düzenlenir (69).

L izoenziminin moleküler ağırlığı 193.000-265.000 dalton arasındadır. İnsan karaciğerinden L-tip pirüvat kinazın iki büyük ($pI:6.28 \pm 0.03$ ve 5.85 ± 0.09) ve daha asit olan bir küçük formu ($pI:5$) tanımlanmıştır. Bu farklı formlar akrilamid amfolin kalın jelde keşfedilmiştir. Büyük formlar FDP, SH ayıraçlar ile asit forma, hemolizat ve karaciğer ekstraktlarından amonyum sülfat fraksiyonları ile ekstrakte edilmiş proteolitik faktörler ile alkali forma dönüştürülebilirler (31,38).

L izoenziminin pH 'sı pH optimumunu yükselten FDP varlığında dahi M_1 izoziminin pH 'sından düşüktür. M_1 izoziminin izoelektrik noktası ise L izoziminin izoelektrik noktasından daha bazikdir. Fakat L izoenziminin izoelektrik noktası FDP ile düşürülebilir. M_2 izoenziminin izoelektrik noktası L ve M_1 izoenzimleri arasındadır (17).

Eritrosit pirüvat kinazı, karaciğer pirüvat kinazından daha yüksek bir izoelektrik noktasına sahiptir. Eritrosit izoenzimin L-tip subünite içerdiği ve M_1 , M_2 -tip subünite içermediği görülmüştür (38). Saflaştırılmış karaciğer pirüvat kinazının anoda göçü normal karaciğer pirüvat kinazından daha yavaştır. Hem eritrosit izoenzimleri (R_1 ve R_2) hem de karaciğer izoenzimleri (L_4) farklı genetik kontrol altındadır (23,57,84,92).

İnsan L ve M_2 pirüvat kinazının genleri 1. kromozomun (1q 21) ve 15. kromozomun (15q 22) üzerinde sırayla yer almış ve klonlaşmıştır. Deoksiribonükleik asit (DNA) sırası üzerinde yapılan çalışmalarda L-subünitesinin 543 amino asitten meydana geldiği açıklanmıştır (71).

Pirüvat kinazın L, M_1 , M_2 tipleri farklı üç genin ürünü olarak kabul edilir. Bunlar poliakrilamid jel elektroforezinde ayırt edilebilirler. L izoenzimi anoda en hızlı, M_2 izoenzimi ise anoda en yavaş hareket eden izoenzimdir (32).

M_1 ve L izoenzimleri arasında amino asit bileşimi bakımından belirgin farklılığın olduğu görülmektedir. Çünkü bu izoenzimler farklı genlerin ürünleridir. L ve R-tip pirüvat kinazların amino asit bileşimi ise birbirine çok benzemektedir. Aralarındaki fark; R izoenziminde fazla miktarda arginin ve triptofan amino asitlerinin bulunmasıdır. Bu nedenle eritrosit pirüvat kinazının izoelektrik noktası daha yüksektir. M_2 , L ve R izoenzimlere FDP eklenmesi izoelektrik noktayı daha düşük pH derecelerine kaydırır. Bazı yazarlar pirüvat kinaz izoenzimlerinin N terminal uçlarının bloke olduğunu göstermişlerdir (38).

Rat pirüvat kinaz genlerindeki ayrıntılı çalışmalar, L ve R izoenzimlerinin her ikisinin farklı promotorların kullanımıyla aynı yapısal genden transkript edildiğini göstermiştir. R izoenziminin amino-terminal ucu L izoenziminde bulunmayan 33 amino asit içerir. Oysa kalan 541 amino asit kalıntısı L ve R izoenzimleri için geneldir (37,71,89).

II. C. 3. Pirüvat Kinaz Enziminin Aktivatör ve İnhibitörleri

Pirüvat kinaz enziminin kinetik özellikleri çeşitli dokularda birçok araştırmacı tarafından ortaya konulmuştur. Extrasellüler enzimler aktivasyon için kalsiyum (Ca^{++}) iyonlarına ihtiyaç duyarlar. İntrasellüler enzimler ise aktivite için magnezyum (Mg^{++}) iyonlarına ihtiyaç gösterirler. Çoğu durumda Mg^{++} iyonları, mangan (Mn^{++}) iyonlarının yerine konulabilir. Pirüvat kinaz enziminin maksimum aktivite gösterebilmesi için Mg^{++} ve potasyum (K^+) gibi bazı metal iyonlarına veya amonyum (NH_4^+) iyonuna kofaktör olarak ihtiyaç vardır. Enzimle substrat arasındaki etkileşim enzime bağlanan bu katyonlar

vasıtası ile olur. Mg^{++} fosfat içeren reaksiyonları katalize eden enzimler için de gereklidir. Tek değerlikli metal iyonu, PEP'in karboksil grubunun bağlanmasında gereklidir (7,27,39,87).

Pirüvat kinaz ile katalize edilmiş reaksiyon siklik bir metal köprü kompleksi içerir. Metal köprü kompleksleri substrat olarak pirüvat veya PEP kullanan birçok enzimlerde bulunur. Enzim aktivite gösterebilmek için substrata bağlanmadan önce Mg^{++} iyonları veya Mn^{++} iyonları ile kompleks yapmaktadır. Bundan dolayı konformasyonel değişiklik bir E-Mn-PEP kompleksine bağlı reaksiyonun ilerlemesini kolaylaştıran bir konum alır (26,39).

Daha çok intrasellüler katyon olan K^+ iyonunun çoğu enzimi aktive ettiği bilinmektedir. K^+ iyonları pirüvat kinazın fizyolojik aktivatörü olarak kabul edilmektedir. Beutler'e (9) göre; K^+ iyonunun aktivatör etkisi ADP'nin enzim affinitesi artırılarak oluşur. Aktiviteleri için K^+ iyonuna ihtiyaç duyan enzimler genellikle sodyum (Na^+) iyonları ile inhibe edilirler. K^+ iyonlarının enzime bağlanması ile enzimde konformasyonel bir değişikliğinin ortaya çıktığı ve enzimin daha aktif şekle dönüştüğü görülür. Bazı vakalarda substrata bağlanmak için de yardım eder. Çeşitli çalışmalar, PEP'in karboksil grubunun enzime bağlanmış K^+ iyonlarına bağlandığını göstermiştir. Ca^{++} iyonları insan eritrosit pirüvat kinazını inhibe eder ve Ca^{++} iyonlarının inhibitör etkisi K^+ iyonları ile kısmen azaltılır (39).

Major subüniteler arasında bağlantı, K^+ iyonlarının yokluğunda tek değerlikli katyon yerini işgal edebilen ve guanido grubu olan Arg-341 ile sağlanır, böylece yapı daima korunur (7).

Fare kasındaki pirüvat kinaz enzimi tek değerlikli katyonların (K^+ , Rb^+ veya Cs^+) varlığına ihtiyaç duyar. K^+ , Mg^{++} ve Ca^{++} iyonları amfibia eritrosit pirüvat kinazı üzerinde aktive edici, Na^+ iyonu ise inhibe edici bir etkiye sahiptir (39).

Glikolitik yoldaki son enzim olan pirüvat kinazda FDP'nin etkisi allosterik aktivasyona bir örnektir. L-tip izoenzim FDP ve 6-fosfoglukonat ile allosterik olarak aktive edilir (29,93).

Pirüvat kinaz enzimi üzerine ATP, Adenozin-5'-monofosfat (AMP), izositrat, 2-oksoglutarat, malat, 2-fosfogliserat, 2,3-bifosfogliserat, 3-fosfogliserogliserol, gliserol-3-fosfat, fosfoglikolat'ın inhibitör etkisi olduğu yapılan çalışmalarla açıklanmıştır. ATP ve 3-fosfogliserat (3-PG) PEP'e olan ilgisiyle karışık tip inhibisyon gösterir. Yüksek ATP düzeyi pirüvat kinazın substrata olan ilgisini azaltır. ADP ise 1 mM konsantrasyonunun altında

karışık tip bir inhibitör etki gösterir (80). Diğer inhibitörlerin kompetitif inhibisyon yaptıkları açıklanmıştır. Malat, 2-oksoglutarat, fosforile edilmiş trioz şekerler veya fosfoglikolat ile inhibisyon pH 7.2'de pH 7.8'den daha belirgindir (93).

Pirüvat kinaz enzimi üzerinde yapılan çalışmalar, rat karaciğerinde; ATP, Ca^{++} , sistein, glutatyonla okside edilmiş yağ asitleri, laurik asit, miristik asit, oktanik asit, feniletibiguanidin, süksinil CoA ve pirüvik asidin, kasda; quercetin'in, tümör hücrelerinde ise sisteinin pirüvat kinaz enzimini inhibe ettiği açıklanmıştır (107). ATP ve pirüvik asit kompetitif inhibisyona neden olur. Pirüvat kinazın L izoenzimi ADP, L-alanin, AMP, ATP, L-fenilalanin, fosfat ve sülfat tarafından inhibe edilir (74,83,107).

Pirüvat kinaz yağ asidi oksidasyonu sonucu oluşan asetil CoA ile de inhibe edilir. Glukoz-1-fosfat (G-1-P) ve fruktoz-6-fosfat (F-6-P) pirüvat kinaz aktivitesi üzerine etkili değil iken inorganik fosfat (Pi) ve glukoz-6-fosfatı (G-6-P) takiben FDP'nin daha etkili bir aktivatör olduğu bulunmuştur (15).

L-fenilalanin karaciğer pirüvat kinazını etkilemez iken kas ve beyin pirüvat kinazını inhibe eder (18).

2,3-DPG'nin enzimi başlangıçta aktive daha sonra ise inhibe ettiği bulunmuştur. 2,3 DPG'nin inhibitör etkisi düşük PEP düzeylerinde daha güçlüdür (15).

L-sistein, tümör hücrelerinin sitozolünde aerobik glikolizisi spesifik olarak inhibe eder, fakat normal dokuları ve yağ asitlerini etkilemez. L-sistein neoplastik pirüvat kinazı tiyol gruplarından dolayı inhibe eder. Son zamanlarda, tümör kromatin ekstraktlarının poliakrilamid jel elektroforezi ile pirüvat kinaz varyantının normal bir molekül gibi ve ATP'ye duyarlı olan, yavaş göç eden gama izoenzimi gibi görüldüğü bulunmuştur (32,43).

Tavşan kasından saflaştırılan M_1 izoenziminin dietilstilbestrol ve östrojenik steroidlerle inhibe olduğu gösterilmiştir. Fenilalaninin iskelet kası pirüvat kinazını inhibe ettiği ve bu inhibisyonun pH'ya bağımlı olduğu, serin, sistein, alaninin bu inhibisyonu kaldırdığı bulunmuştur (100).

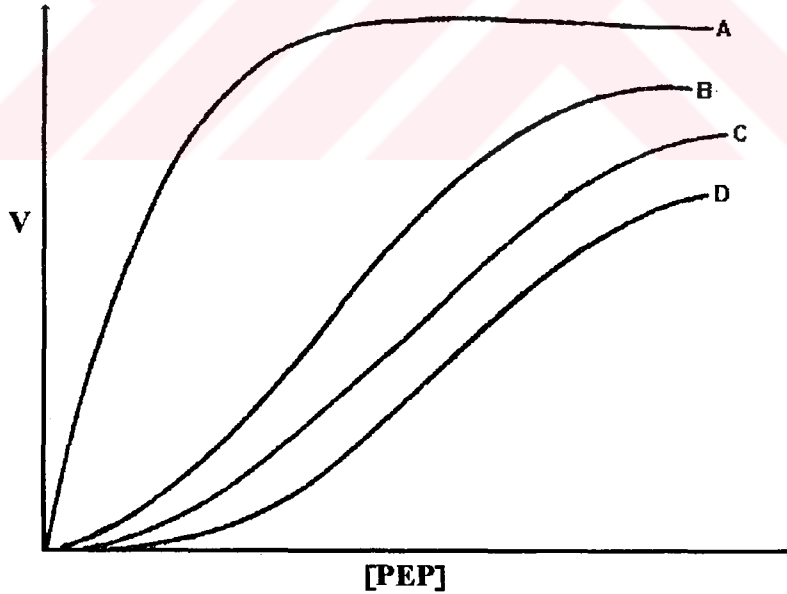
Bir parazit olan *Rana ridibunda* eritrosit pirüvat kinazı FDP ve Ca^{++} iyonlarıyla aktive, ATP, G-6-P ve Na^+ iyonları ile inhibe edilir. FDP enzim için gerekli olmasına rağmen enzim aktivitesini artırır. FDP'nin pozitif etkisi, kooperatif kinetiği artıran Pi ile azaltılır. Rat karaciğeri ve adipoz doku pirüvat kinazının FDP ile sigmoidal bir kinetik gösterdiği bildirilmektedir (30,39,93).

Maya pirüvat kinazı alkali metal iyonları (K^+ , Mg^{++}) ve amonyum iyonlarına ihtiyaç duyar. K^+ ve NH_4^+ iyonları hem FDP varlığında hem de FDP yokluğunda aktivatördür. Nitekim Na^+ iyonları ise sadece FDP varlığında etkilidir. ADP, enzim pH'sına bağlı kompleks bir hız gösterir ve FDP tarafından etkilenmez (5,30).

Civcivlerde memelilerden farklı olarak besinsel fruktoz ve lipidin, karaciğer pirüvat kinaz üzerine etkisi yoktur. Memelilerde ise azaltıcı bir etki gösterir (15). Normal karaciğer pirüvat kinazında hem L hem de M_2 -tip pirüvat kinaz PEP'e karşı sigmoidal kinetik gösterirken hepatomada L-tip pirüvat kinaz sigmoidal, M_2 -tip pirüvat kinaz ise hiperbolik bir kinetik gösterir (32).

Maya, E. coli, rat karaciğer ve adipoz doku pirüvat kinazında FDP'nin PEP kinetiğindeki etkisinin benzer olduğu yapılan çalışmalarla açıklanmıştır. Mg^{++} kinetiğinde K_m değerinin benzer olduğu fakat maya enziminin yüksek kooperativite gösterdiği saptanmıştır (30,95).

II. C. 4. Pirüvat Kinaz Enziminin Kinetik Özellikleri



Şekil 6 : Karaciğer Pirüvat kinazının kontrolünün şematik ifadesi. M_2 izoenziminde, A; normal substratla enzimi, B; yüksek konsantrasyonda ATP'nin etkisini gösterir. L izoenziminde, A; FDP'nin etkisini, B; normal substratla enzimi, C; ATP'nin etkisini, D; hem ATP hem de alanindeki artışın etkisini gösterir.

Şekil 6'da görüldüğü gibi pirüvat kinazın M_2 formu normal olarak hiperbolik bir kinetiğe sahiptir fakat allosterik efektör olan ATP ve PEP varlığında K_m 'de bir artışla belirgin sigmoidal bir kinetik meydana getirerek reaksiyonu inhibe eder. Buna karşılık L formu normal olarak substratla sigmoidal kinetiğe sahiptir. Ayrıca bu etki ATP veya alanin gibi negatif efektörlerle artırılır. Pozitif bir efektör olan FDP hiperbolik kinetiğe izin vererek negatif efektörleri yener. ATP ve alanin L izoenziminin PEP için K_m 'ini artırır. FDP ise PEP için K_m 'i azaltır. Bundan dolayı karaciğerde FDP'nin etkisi pozitif regülasyonun, ATP ve alaninin etkisi ise negatif regülasyonun bir örneğidir (94).

M_1 -tip izoenzimin büyük çoğunluğu FDP'ye duyarsızdır ve inorganik fosfat ile ADP konsantrasyonuna bağlı olarak aktive veya inhibe edilebilir (18,25,46,75,100).

Sığır beyninden saflaştırılmış M_1 -tip pirüvat kinazının ADP (0.3 mM) ve PEP (0.04 mM) için K_m değerleri sığır kalp kası ve iskelet kası pirüvat kinaz değerleriyle aynıdır ve her iki substrat içinde Hill katsayısı (n_H) 1 dir. Sığır beyin pirüvat kinazının ADP için K_m 'i tavşan, kobay, rat beyin pirüvat kinazı ile benzerdir. Fakat rat beynindeki M_1 -tip pirüvat kinazın PEP için K_m değeri (0.18 mM) sığır beyni pirüvat kinazından (0.04 mM) daha yüksektir. Sığır beyin M_1 -tip pirüvat kinazı PEP ve ADP varlığında kas pirüvat kinazı gibi davranır. Hill katsayısı her iki substratta da 1 dir (100).

Tavşan iskelet kası, sığır kalp kası ve beyni ve kobay beyninden saflaştırılmış pirüvat kinazda ATP'nin etkisi aynı olup bu etki ATP'nin konsantrasyonuna bağlıdır. ATP düşük konsantrasyonda (1-2 mM) aktivatör, yüksek konsantrasyonda (6 mM>) inhibitör etki gösterir. Ayrıca tavşan ve rat beynindeki pirüvat kinazlarda ATP'nin sadece inhibitör etkisi bulunmuştur (100).

Yağ dokusundan ekstrakte edilme ortamının bileşimine göre pirüvat kinazın değişik özellik gösteren iki tipi elde edilmiştir. Etilen-diamintetraasetik asit (EDTA)'in varlığında elde edilen pirüvat kinaza "Pirüvat Kinaz A" denilmiş ve bu tipin FDP ile aktivasyona duyarlı olduğu gözlenmiş; EDTA yokluğunda elde edilen pirüvat kinaza ise "Pirüvat Kinaz B" denilmiş ve bu formun FDP'ye duyarsız olduğu saptanmıştır. Pirüvat kinaz B'nin pirüvat kinaz A'ya dönüşümünü FDP katalize etmektedir (82).

Brochotrix thermosphacta'da pirüvat kinaz FDP'nin yokluğunda sigmoidal kinetik gösterir. FDP varlığında enzim aktivitesi artar ve hiperbolik kinetiğe dönüşür. FDP'nin pozitif etkisi inorganik fosfat ile azaltılır. G-6-P ise yarışmasız bir inhibisyon gösterir (93).

M₁-tip pirüvat kinazın kinetik ve regülatör özelliklerinin diğer 3 formdan çok farklı olduğu görülür. Pirüvat kinazın M₁ tipi Michaelis-Menten kinetiği gösterir ve allosterik olarak regüle edilmez (7,18,46,99).

M₂-tip pirüvat kinaz, PEP'e ilgisiyle sigmoidal kinetik gösterir ve L-alanin ile inhibe olur. Düşük PEP konsantrasyonunda, FDP varlığında ve yüksek PEP konsantrasyonunda, FDP yokluğunda hiperbolik Michaelis-Menten kinetiği veren karaciğer M₂ izoenzimi ADP ile FDP olsun veya olmasın hiperbolik Michaelis-Menten kinetiği gösterir. M₂-tip pirüvat kinazın PEP için Km'i, uygun şartlar altında FDP ve alanin ile artırılabilir veya azaltılabilir. Mg⁺⁺ iyonunun düşük konsantrasyonda M₂ izoenzimini aktive, yüksek konsantrasyonda ise inhibe ettiği saptanmıştır (18,20,46,93).

Böbrek M₂ izoenziminin ATP, alanin ve fenilalanin tarafından inhibe edildiği, ATP inhibisyonunun pH'dan bağımsız olduğu, PEP varlığında ve yokluğunda bu inhibisyonun FDP tarafından kaldırılmadığı bulunmuştur. M₂ izoenziminin ATP varlığında PEP için iki Km'inin olduğu bildirilmiştir (0.3-0.6 mM; yüksek Km, 0.1 mM; düşük Km). Pirüvat kinazın inhibitörlerinden biri olan alanin 5 mM konsantrasyonda diğer bir inhibitör olan fenilalanin inhibisyonunu ortadan kaldırır. FDP derişiminin 1.0 mM'dan küçük olduğu koşullarda alanin inhibisyonu gözlenmezken fenilalaninin pH 7.5'de M₂ izoenzimini PEP için yüksek Km'i olan (0.3-0.6 mM) forma çevirdiği bulunmuştur. Fenilalaninin enzimi inhibe ettiği ve aynı zamanda PEP için gözlenen sigmoidal eğriyi ortadan kaldırdığı gözlenmiştir (7,8).

Sıçan böbreğinde pirüvat kinazın PEP'e karşı sigmoidal kinetik gösterdiği ve PEP'e karşı gösterilen bu homotropik kooperatif davranışın pH'ya bağımlı olmadığı açıklanmıştır (101).

Karaciğer pirüvat kinazı PEP'e olan ilgisiyle sigmoidal bir kinetik gösterir. FDP yokluğunda sigmoidal eğri verirken, FDP ilave edildiğinde bu eğri hiperbolik Michaelis-Menten tipi kinetiğe dönüşmektedir. Enzim PEP'e yarışmalı olarak bağlanır. Taze hazırlanmış karaciğer pirüvat kinazının PEP için görünür Km değerinin FDP varlığında 0.08-0.1 mM ve FDP yokluğunda 0.8-2.5 mM olduğu bulunmuştur (18).

L-tip pirüvat kinazın molü başına en çok dört mol FDP'nin bağlanabildiği gösterilmiştir. Bu değer enzimin her alt birimi için bir FDP bağlama bölgesi

olduğunu gösterir. FDP'nin L-tip pirüvat kinaza bağlanması pozitif kooperativite gösterir. Pirüvat ve PEP, L-tip izozime FDP bağlanmasını artırırken, ADP'nin FDP bağlanmasını artırıcı etkisinin çok az olduğu bulunmuştur. Alanin, FDP bağlanmasını inhibe eder. Alaninin inhibe edici etkisi hem FDP hem de alanin konsantrasyonuna bağlıdır. Alanin bağlanma bölgesi FDP bağlanma bölgesinden farklıdır ve FDP bağlanması fosforilasyondan etkilenir. PEP ve FDP için enzim affinitesindeki düşüş, açlık ve glukoneogenezde önemli olabilir (11).

Karaciğer pirüvat kinazında aktivatör Mn^{++} iyonu olduğu zaman PEP için hiperbolik hız eğrileri elde edilirken aktivatör Mg^{++} iyonu olduğu zaman sigmoidal eğriler elde edilir. Artan konsantrasyonlarda bu katyonlar kullanıldığında, Mn^{++} iyonu varlığında V_{max} belirgin şekilde düşüktür. Mn^{++} iyonu katalitik olarak Mg^{++} iyonundan daha az verimlidir. Fakat Mn^{++} iyonları, düşük aktivite gösteren konformasyondaki enzimi aktive eder. Fonksiyonel olarak Mn^{++} iyonlarının Mg^{++} iyonlarından daha değişik etkisi vardır. Büyük bir olasılıkla iki katyon, enzim üzerinde değişik bölgelere bağlanmaktadır. İki değerlikli metal iyonu enzimin PEP'e olan affinitesini artırır. Magnezyum varlığında ve FDP yokluğunda K_m yaklaşık 1 mM'dür ve FDP'nin eklenmesi ile bu değer yaklaşık 0.1 mM'a düşer. Fakat mangan çift değerlikli metal iyonu olarak kullanıldığında, FDP varlığında ve yokluğunda K_m değişmez. Bu nedenle L-tip pirüvat kinaz için Mn^{++} iyonu ile beraber FDP kullanıldığında belirgin bir aktivasyon gözlenmez. Magnezyum varlığında mangana cevap PEP ve FDP konsantrasyonlarına bağımlıdır (11).

ATP, enerji değişimi yüksek olduğunda glikolizisi yavaşlatmak için L-tip pirüvat kinazı allosterik olarak inhibe eder. Magnezyum konsantrasyonunun yükselmesi ATP inhibisyonunu kaldıramaz. ATP'nin allosterik inhibisyonu FDP varlığında, FDP'nin ATP ile yarışması sonucu önlenir. FDP'nin ATP inhibisyonunu kaldıracı etkisi 1 mM da gözlenmiştir (46).

İnorganik fosfat, L-tip pirüvat kinazı PEP konsantrasyonuna bağımlı olmaksızın uyarır. Yüksek ADP konsantrasyonunda inorganik fosfat uyarıcı olarak etkin olduğu halde düşük ADP konsantrasyonunda inhibitördür (15).

R-tip pirüvat kinazın FDP tarafından aktive edildiği ve enzimin artan PEP derişimine olan sigmoidal yanıtının FDP tarafından hiperbolik duruma getirildiği birçok araştırmacı tarafından gösterilmiştir (6,18).

Eritrositlerin $R_2R'_2$ formunun FDP bağlama bölgesi kapalıdır, bu form enzimin molü başına iki mol FDP bağlar. Oysa proteolitik modifikasyon ile

FDP bağlama bölgesi açığa çıkarıldığında enzimin molü başına dört mol FDP bağlanır (45).

Eritrosit pirüvat kinazının FDP yokluğunda sigmoidal kinetik göstermesi pH'ya bağlıdır. PEP için pH 8.0 de gösterdiği sigmoidal davranış pH 5.9 da hiperbolik kinetige dönüşmektedir. Araştırmacılar, eritrosit pirüvat kinazının pH 8.0 de, FDP varlığında 2 olan Hill sabitinin FDP yokluğunda 0.8'e düştüğünü ve pH 5.9' de ise FDP varlığında ve yokluğunda Hill sabitinin 0.8 olduğunu açıklamışlardır (16).

E. coli'de iki tip pirüvat kinaz varlığı kinetik ve düzenleyici özelliklerinden yararlanılarak gösterilmiştir. Bu izoenzimlerden tip 1, FDP ile tip 2 ise AMP ile aktive olmaktadır. E.coli pirüvat kinaz enziminin kinetik özellikleri araştırılmış fakat yapısal özellikleri ise hala bilinmemektedir (95).

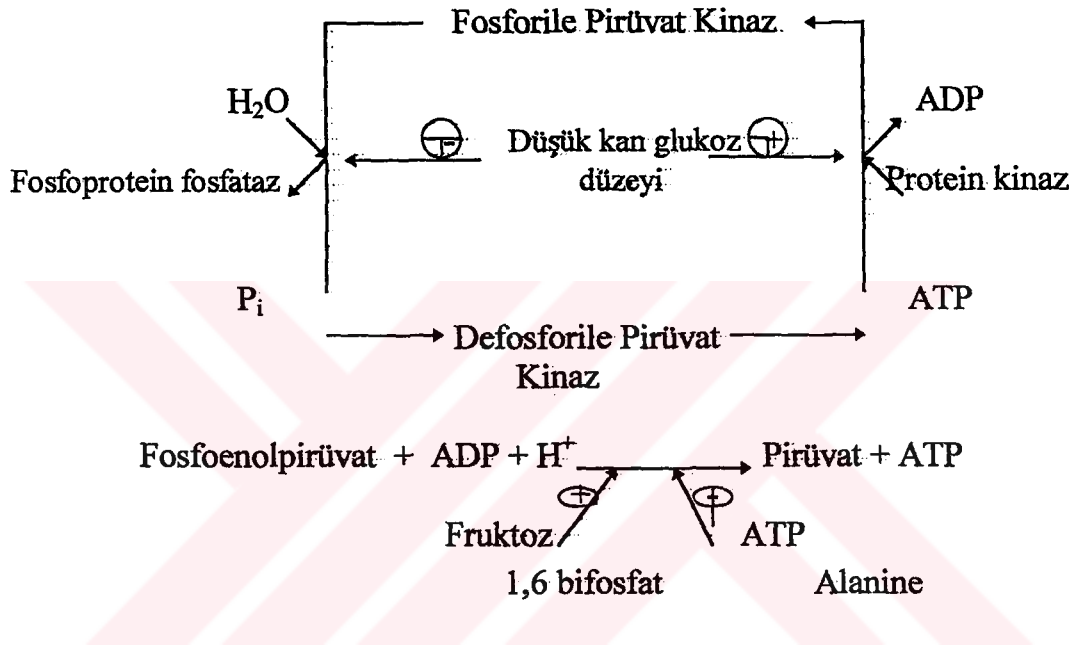
II. C. 5. Beslenme ve Hormonların Pirüvat Kinaz Üzerine Etkisi

Hepatik glikolizisi düzenleyen enzimler 6-fosfoglikokinaz ve pirüvat kinazdır. Pirüvat kinaz düzeyi glikoneogenezisin aktif olduğu bir durum olan açlıkta düşer ve glikoneogenezise az ihtiyaç duyulan bir durum olan karbonhidrattan zengin bir diyetle artar. Yüksek karbonhidratla beslenmenin sonucu olarak enzim sentezinden 10 kat daha fazla artar. Diyetset karbonhidrat alımının yüksek olduğu durumlarda karaciğer fazla karbonhidratı trigliseride çevirir. Bu, fosfofruktokinaz ve pirüvat kinaz gibi glikoliz; asetil CoA karboksilaz, yağ asidi sentetaz ve malik enzim gibi yağ asidi sentezi; trigliserid sentez enzimleri ile apoprotein E gibi transport proteinlerinin indüklenmesine yanıtır. Birçok durumda enzim indüksiyonu artmış gen transkripsiyonunun direkt sonucudur. Pirüvat kinazın diğer bir kontrol noktası, glikojen fosforilazla katalize edilen glikojenin düşmesidir. M₁ izoenzimi diyet ve hormonal stimülasyondan etkilenmez (22,33,35,60,83,85).

Eritrosit pirüvat kinazı 3',5' siklik-adenozin monofosfat (c-AMP)'a bağımlı protein kinaz tarafından fosforlanır ve inaktif hale geçer. Fosforlanma ile inaktive edilmiş R izoenzimi fosfo-protein fosfataz tarafından defosforile edilirse tekrar aktive olur. R-tip pirüvat kinazın fosforilasyonu 2,3-DPG tarafından inhibe, Ca⁺⁺-Kalmodulin kompleksi tarafından regüle edildiği bulunmuştur (7).

M₁ izoenziminin fosforilasyonu c-AMP'ye bağımsız protein kinaz tarafından gerçekleştirildiği bildirilmiştir. Pirüvat kinazın kas ve böbrekteki izoenzimleri, hormonal stimülasyondan etkilenmez. Kaslardaki PEP'in tamamı kas kontraksiyonu için gerekli ATP'yi üreterek pirüvata çevrilir (33).

M_2 -tip pirüvat kinaz c-AMP'ye bağımsız protein kinaz tarafından fosforile edilir ve inaktif hale geçer. c-AMP'ye bağımsız protein kinazın pirüvat kinazın dimer formunu fosforladığı, daha ender olarak da tetramer formunu fosforladığı tahmin edilmektedir. Fosforlanma ile inaktive edilmiş M_2 izoenzimi ATP'nin ortamdaki uzaklaştırılması ile veya FDP eklenmesi ile tekrar aktive edilemez (20,79).



Şekil 7 : Pirüvat Kinazın Katalitik Aktivitesinin Kontrolü

Hepatik glikolitik ve glukoneogenetik yolun kontrolünde L-tipi pirüvat kinazın kısa vadeli regülasyonu önemli bir rol oynar. Karaciğerde bulunan adenilat siklazın reseptör yerleri glukagona karşı duyarlıdır. Glukagonun karaciğere gelişinden sonraki dakikalarda c-AMP düzeyi artar. c-AMP'de protein kinazı aktive eder ve karaciğer fosforilazında bir artış olur. Bu da hepatic glikojenolizi hızlandırır. Pirüvat kinazın glukagon regülasyonu endotoksinle değişmez (3,53).

Karaciğerdeki pirüvat kinaz aktivitesi, enzimin fosforilasyon ve defosforilasyonu ile da düzenlenir. Karaciğer sitozolünün L-tip pirüvat kinazı, c-AMP'ye bağımlı protein kinaz tarafından fosforile edilir. Ayrıca protein kinaz-C de akut olarak inaktive edilir (PEP substratı için K_m artırılır). Enzimin

fosforilasyonu serin amino asitleri üzerinden olur. L-tip pirüvat kinazın c-AMP bağımlı protein kinazın substratı olması için aktif olması gerekmez. L-tip pirüvat kinazın fosforile formu özellikle düşük PEP konsantrasyonunda defosforile formdan daha az aktiftir ve PEP için daha yüksek bir Km'e sahiptir. Hormonal uyarı üzerine enzimin c-AMP'ye bağımlı protein kinaz tarafından fosforlanması, sigmoiditeyi belirginleştirmekte; fizyolojik PEP konsantrasyon sınırları içinde enzim aktivitesini asgariye indirmektedir. Buna karşılık FDP düzeyi yükseldiğinde, gerek fosforile gerekse defosforile enzimin PEP ile saturasyonu hiperbolik bir fonksiyona dönüşmekte ve pirüvat kinaz aktivitesi, glikolitik hızı kısıtlayıcı olmaktan çıkmaktadır (78,87).

Pirüvat kinazın fosforile formu ATP ve alanin ile inhibisyona daha duyarlıdır. Pirüvat kinazın defosforilasyonu c-AMP'ye bağımlı protein kinazla da düzenlenen bir fosfoprotein fosfotazla katalize edilir. Böylece glukagonun net etkisi, stimüle olan glikoneogenezdeki diğer etkileriyle birleştiğinde glukozun laktata akışını azaltır (7,22).

Hormonal kontrol altında olan bu yöntem yağ asidi okside olduğunda glikoneogenez için PEP ilgisini başka yere çeker ve sitrik asit siklusu hücrenin enerji ihtiyacını karşılamak için daima yeterli hızda işlem görür. Kasda üretilen PEP'in hemen hemen tümü pirüvata dönüşür. L izoenzimi PEP için Km'i c-AMP'ye bağımlı protein kinazla fosforilasyona sebep olmasıyla artırır. Fosforilasyonda değişmeler, örneğin glukagon varlığında c-AMP'nin artmış doku konsantrasyonuyla birleşmiş karaciğer terkinde vuku bulur (7,22,34,47).

Fenilalaninle aracılık edilmiş pirüvat kinazın inhibisyonunun insülinle ters çevrildiği ve allosterik aktivatör olan FDP'nin konsantrasyonundaki değişikliğe bağılı olmadığı açıklanmıştır. İnsülin glukojen sentetaz, glukojen fosforilaz ve glukoneogenezde fenilefrinin etkilerini ters çevirmesine rağmen taze izole edilmiş hepatositlerdeki vazopressinin etkisini değiştirmez (7,33,60,78,88).

İnsülinin etkileri hem in vivo hem de in vitro denemelerle açıklanmıştır. İnsülin, glukagon ve c-AMP'nin suboptimal dozları ve epinefrinin maksimal dozu pirüvat kinaz aktivitesi ve glukoneogenez üzerindeki etkilerini antagone eder (20,56).

Epidermal growth faktör (EGF) serin kalıntıları üzerinde enzimin fosforilasyonunu artırarak hepatic pirüvat kinazın aktivasyonunu önler. Pirüvat kinaz serin üzerinde c-AMP'ye bağılı protein kinazla ayrıca serin-12 ve treonin

üzerinde in vitro Ca^{++} -kalmodulene bağlı protein kinazla fosforile olur (65,78).

Hepatositlerde EGF benzeri vazopressin, intrasellüler Ca^{++} konsantrasyonunda hızlı bir artış meydana getirir. Vazopressinle neden olunan Ca^{++} artışı daha kısa ve geçicidir. Pirüvat kinaz fosforilasyonunda EGF'nin etkisi vazopressinin etkisinden daha yavaştır (65).

Epinefrin ve glukagon, c-AMP'nin konsantrasyonunu artırarak enzimi inhibe eder. Fenilefrin ve vazopressin pirüvat kinaz aktivitesini inhibe eder. Bu ajanlar tarafından neden olunan pirüvat kinaz aktivitesinin inhibisyon süresi ve pirüvat kinazın fosforilasyon derecesi hem glukagon hem de c-AMP ile gözlenen etkilerinden daha kısadır (2,22,64,77).

II. C. 6. Pirüvat Kinaz Enziminin Klinik Önemi

Pirüvat kinaz eksikliği anemi ile seyreden sık rastlanan glikolitik bir enzim yetmezliği olup herediter hemolitik aneminin bilinen nedenlerinden biridir. Bu eksikliğin translasyon sonrası bir modifikasyon sonucu olduğunu destekleyen bulgular vardır. Vakaların çoğunluğu Kuzey Avrupa orjinalidir. Sporadik vakalar; Zencilerde, Japonlarda, Çinlilerde, Meksikalılarda, Güney Avrupalılarda ve Suriyelilerde rastlanmıştır. İnsandaki pirüvat kinaz eksikliğine benzeyen hemolitik anemi Basenji köpeklerde ve av köpeklerinde tanımlanmıştır. Pirüvat kinaz eksikliğinin R ve L izoenzimi içerdiğine, M_1 ve M_2 izoenzimi içermediğine inanılmaktadır (1,12,20,23,40,58,63,71,84,92,98).

Pirüvat kinaz eksikliğinde, eritrositlerde 2,3-DPG konsantrasyonu normal değerın 3 katını aşabilir. Yüksek 2,3-DPG düzeyleri ile birlikte Hb-oksijen dissosiasyon eğrisinin sağa doğru yer değiştirdiği görülür. Verilen herhangi bir pO_2 değerinde hemoglobinden daha fazla oksijen elde edilebilme yeteneğinin böyle sağa dönmüş bir eğri ile assosiyasyon olması, pirüvat kinaz eksikliği olan hastaların eksersiz toleransını artırır. Böyle hastalar anemik olmalarına rağmen beklenen halsizlik ve eksersiz toleransı semptomlarından hiçbirini göstermezler (63,102).

Eritrositlerde 2,3-DPG veya 3-PG düzeylerinin yükselmiş olarak bulunması, pirüvat kinaz eksikliğinin klinik tanısının konulmasını sağlayabilir. Normal redükte nikotinamid adenin dinükleotidin (NADH) okside nikotinamid adenin dinükleotid (NAD)'e oranındaki değişikliklerin ve aynı zamanda pirüvat kinaz ve 2,3-DPG'nin hızını düzenleyen maddelerdeki değişikliklerin, normal eritrositlerde G-1-P ilavesi ile trioz fosfat toplanmasından sorumlu oldukları görülmektedir. Trioz fosfat ara metabolitlerindeki belirgin yükselme hem kontrol ve hem de pirüvat kinaz eksikliği olan eritrositlerde eksojen

pirüvat veya diğer oksidan maddelerin ilavesiyle normale döndürülebilir (44,63).

Pirüvat kinaz eksikliğinde eritrosit ATP'si ve fosforibosil pirofosfat formasyonu anormal derecede düşüktür. Genellikle % 25'ten daha fazla retikülosit sayısı olan hastalar normal ATP düzeylerine sahiptirler. Yüksek retikülositli kanda glikozla inkübasyonda ATP normal eritrositlerden zengin kandakine göre daha az stabildir. Pirüvat kinaz eksikliğinde retikülositler glukoz olmadan inkübe edildiği zaman, ATP'yi normal hücreden daha başarılı bir şekilde sağlarlar. Retikülosit, oksidatif fosforilasyon yoluyla glukozdan başka kaynaklardan ATP'yi üretme yeteneğine sahiptir. Pirüvat kinaz eksikliğinde retikülositler glukozu kullanmaya zorlandığı zaman (örneğin yüksek glukoz ortamında) retikülosit fonksiyonları bozulur ve ATP düzeyleri düşer (50,51,70).

Oksijen harcanması, in vitro venöz pO₂ düzeylerindeki hipoksi ile ortadan kaldırılır. Eritrositler in vivo uzamış hipoksi peryoduna mağruz kaldığı zaman ATP kaybına uğrarlar. Olgun eritrositlerin ihtiyacı olan ATP pirüvat kinaz eksik hücrelerin glikolitik aktivitesindeki azalması ile bir süre idare edilir (70).

ATP eksikliği, pirüvat kinaz düzeyi çok düşük olan eritrositlerin katyon permeabilitesini artırır. Bu kısmen quabain ile inhibe edilebilen ATP'ase katyon pompasının yetersizliği sonucu meydana gelir. Başlangıçta ATP konsantrasyonu azalmış hücrelerde, potasyum kaybı sodyum kazancını aşar. Katyonların net kaybı, suyun zorunlu olarak osmotik kaybı ve hücre volümünde azalma ile birliktedir. Pirüvat kinaz eksikliğinde retikülositlerde ATP eksikliğiyle büzölmüş, tırtıllı hücreler meydana gelir. Bu tırtıllı hücreler 8 µmilipore filtrelerden güçlükle geçerler. Hücre süspansiyonlarının viskozitesindeki artış Wells-Brookfield viskozimetre ile gösterilir. ATP düzeyi azalmış eritrositlerde dehidratasyon meydana gelir (16,44,63).

Enzim eksikliğinde eritrositler yaşlanırken glikolizde progressiv azalma enzim proteinin azalmasına bağlı olarak meydana gelir. Böylece glikolizde bozulma ATP azalmasıyla sonuçlanacak ve sonunda hemolize yol açacaktır. İn vivo yaşlanmada hem normal hem de varyant enzimlerde katalitik yetenekte bozulma meydana geldiği rapor edilmiştir (13).

Radyoaktif işaretli pirüvat kinaz eksikliği olan eritrositlerin normal veya normale yakın yaşam süresinin bulunması pirüvat kinaz aktivitesinin, hasta eritrositlerin yaşam süresini etkilemediği görölmüştür. Bazen bifazik eritrosit yaşam eğrileri elde edilir ve iki grup hücre popölasyonunun mevcut olduğunu

düşündürür. Bir grup eritrosit hemen harap olur, diğer grup ise daha iyi bir yaşam süresine sahip olabilir (63).

Pirüvat kinaz eksikliği olan insan eritrositlerinin tahribinde hücre dehidratasyonu önemli bir rolü oynamasına rağmen pirüvat kinaz eksikliği olan Basenji köpeklerinde hemolitik sürecin önemli olmadığı görülmektedir. Köpek hücreleri in vitro siyanüre mağruz bırakıldığı zaman, bunlar hızla ATP kaybederler. Açığa çıkan K^+ kaybı, eşdeğerde ekivalan Na^+ kazancı ile dengelenir. Böylece hücrel dehidratasyon olmaz (44).

Pirüvat kinaz eksikliğinde, kronik hemoliz (anemi, sarılık ve splenomegali) ile birlikte klinik anormallikler görülür. Anemi belirgin olabilir ve erken bebeklik çağında görülebilir ve yaşam için sık kan transfüzyonların gerektirebilir. Buna karşılık anemi geç çocukluk hatta erişkin dönemde tanı konulana kadar çok hafif olabilir. Bazı vakalarda anemi yoktur, hemoliz tamamen kompanse edilmiş olup, sarılık tek klinik belirti olabilir. Sarılık hamilelik sırasında daha ciddi seyirli olabilir. Anemi mevcut olduğu zaman hayat boyu görülür ve genellikle şiddet bakımından hafif değişiklik gösterir. Anemi atakları sık değildir ve genellikle enfeksiyonları müteakip geçici eritroid hipoplaziden veya nadiren bilinmeyen sebebe bağlı hemoliz artmasından meydana gelir. Hematopoitik sistem dışında pirüvat kinaz belirtileri sık değildir. Pirüvat kinaz eksikliği olan aile üyelerinde kronik bacak ülserleri anemi ile birlikte gözlenmiştir (17,61,62,67,83,102).

Pirüvat kinaz eksikliğinde, yeni doğanlarda hiperbilirubinemiye sık olarak rastlanır ve kan transfüzyonu gerektirebilir. Serum ankonjuge bilirubin düzeyleri sonraki yaşamda yüksek kalabilir. Safra taşları 8 yaşına kadar erken dönemde hastaların % 10'unda meydana gelebilir. Ankonjuge bilirubin düzeyleri 6 mg/dl'nin üzerine arasıra yükselebilir (17,36,71,103).

Rutin laboratuvar çalışmaları ayrıca tanıda yardımcı olmaz. Lökositlerin ve trombositlerin sayı ve görünüşleri normaldir. Periferik yaymada makrositosis, arasıra bükülmüş çıkıntılı eritrositler ve nadiren akantositler görülebilir. Bu değişiklikler splenektomi ile artabilir. Bazen eritrosit morfolojisinde daha belirgin değişiklikler görülebilir. Pirüvat kinaz eksikliğinde eritrosit yapısındaki bu anormallikler yetersiz ATP sentezinden dolayı meydana gelebilir. Pirüvat kinaz eksikliği olan hastalarda askorbat siyanid testi anormaldir ve stimüle edilmiş heksos monofosfat aktivitesi düşmüştür (105,106).

Plazma lipid anormallikleri benzer morfolojik değişikliklerle birlikte olmasına rağmen, pirüvat kinaz eksikliğinde bu anormallik bulunamamıştır.

Retikülosit sayısındaki paradoksal yükselme sıklıkla splenektomiye takiben gelişir. Retikülosit sayıları % 90'ı aşabilir ve bir çok hastalarda yıllarca % 40-70 oranında bulunabilir. Bazı hastalar splenektomiden sonra retikülositte beklenen azalmayı gösterebilirler. Taze ve inkübe eritrositlerin osmotik fragilitesi sıklıkla normal bulunur. Bununla beraber arasıra hastalarda, inkübasyondan sonra minör fragil popülasyonlara veya rezistan hücrelere rastlanabilir. Otohemoliz testi hastadan hastaya değişmekle birlikte genellikle anormaldir. Serum fizyolojik içinde 48 saat inkübasyondan sonra eritrositlerin % 50'i hemoliz olabilir. Başlangıçta glikoz ilavesi bazı hastalarda hemolizi artırabilir, fakat sıklıkla glikozun az etkisi vardır. Gerçekte retikülosit sayısı % 25'i aşar ve glukozla inkübasyon muntazam olarak hemolizi artırır. Bu fenomenin glukozla oksidatif fosforilasyonun inhibisyonuna bağlı olduğu kabul edilmiştir (Krabtre etkisi) (50,63,70,71,102).



III. MATERYAL VE METOT

III. A. Materyal

III. A. 1. Doku Örneklerinin Sağlanması

Çalışmada kullanılan materyaller Fırat Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Genel Cerrahi Kliniği ve Biyokimya Laboratuvarından temin edildi. Çalışmada kullanılan karaciğer örnekleri, Genel Cerrahi Kliniği tarafından alınan ama patolojik olmayan biopsilerden ve eritrosit örnekleri biyokimya laboratuvarına rutin testler için başvuran sağlıklı kişilerden sağlandı. Alınan karaciğer örnekleri bekletilmeden soğuk serum fizyolojik (% 0.9 NaCl) ile yıkanarak dokuların kandan temizlenmesi sağlandı. Doku örnekleri pirüvat kinaz enzim aktivite tayini yapılmaya kadar -20 °C'de derin dondurucuda saklandı.

III. A. 2. Hemolizat Hazırlaması ve Saklanması

Hemolizat hazırlanması için alınan 2 ml kan EDTA'lı tüpe aktarıldı. Tüpün ağzı kapatılarak alt-üst edildi ve pıhtılaşması engellendi. Tüpteki kanın hacmi işaretlendikten sonra Hettich-Üniversal marka santrifüjde 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Daha sonra üstteki plazma uzaklaştırıldı, 10 ml soğuk serum fizyolojik ilave edilerek tekrar santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Bu işlem 3 defa tekrarlandıktan sonra eritrositlere eşit miktarda serum fizyolojik ilave edildi. 0.2 ml eritrosite 1.8 ml hemolizat solüsyonu (0.27 mol / L Na₂EDTA' dan 10 ml, 0.07M 2-merkaptioethanoldan 0.05 ml konur ve pH 8'e ayarlandıktan sonra son hacim 1 litreye tamamlanır, +4 °C'de saklanır) ilave edildi ve alt üst edilip, buzdolabında +4 °C'de bekletilerek hemoliz olması sağlandı. Tam hemoliz sağlandıktan sonra materyal hemen kullanıldı veya ileride kullanılmak üzere -20 °C'de derin dondurucuda saklandı.

Çalışmamızda enzim kaynağı olarak kullanılan dokulardaki pirüvat kinaz aktivitesi, hemolizatta; oda ısısında 1 gün, +4 °C'de 6 gün (35), karaciğer dokusunda ise; -20 °C'de birçok araştırmacı tarafından kabul edildiği (88) ve bizim laboratuvar çalışmalarımızda belirlediğimiz gibi 6 hafta aktivite kaybı olmaksızın saklanabilmektedir.

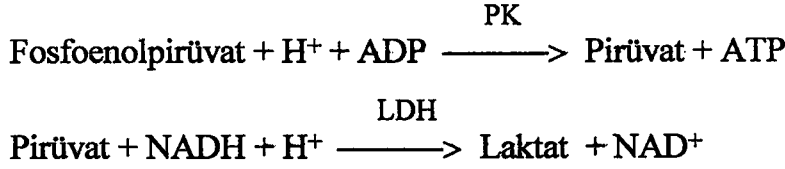
III. A. 3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Araştırmada kullanılan bütün kimyasal maddeler analitik saflıkta olup Merk (Almanya) ve Sigma (A.B.D.) firmalarından temin edilmiştir.

III. B. Metotlar

III. B. 1. Eritrosit ve Karaciğer Dokusu Pirüvat Kinaz Aktivitesinin Ölçümü

Farklı dokulardaki (karaciğer, böbrek, beyin, eritrosit v.b.) pirüvat kinaz enzim aktivitesinin ölçümü için birçok metod geliştirilmiştir. Bu ölçümlerde, pirüvat kinaz reaksiyonu NADH'ın NAD'ye oksidlendiği laktat dehidrogenaz reaksiyonu ile ilişkilidir.



LDH fazlalığında, NADH oksidasyon hızı pirüvat kinaz aktivitesi ile sınırlanır (35,39,97).

Bu çalışmada eritrosit ve karaciğer pirüvat kinaz aktivitesi Beutler'in (10,24) metodu ile ölçülmüştür. Bu metotta ilke; 340 nm'de NADH'ın azalan absorbans hızının ölçülmesi esasına dayanır (35).

Ayırıcılar :

1- 0.002 M Nikotinamid Adenin Dinükleotid (NADH) (indirgenmiş form) : 1.5 mg NADH 1 ml distile suda çözüldü.

2- 0.03 M Adenozin-5'-difosfat (ADP) : 14 mg ADP 1 ml distile suda çözüldü.

3- 0.05 M Fosfoenolpirüvat (PEP) : 9.5 mg PEP 1 ml distile suda çözüldü.

4- 0.01 M Fruktoz-1,6-difosfat (FDP) : 0.340 mg 100 ml distile suda çözüldü.

5- 60 U Laktat Dehidrogenaz (LDH) (tavşan kası): 3 mg LDH 1 ml distile suda çözüldü.

NADH, ADP ve PEP solüsyonu önceden hazırlanabilmekte ve 1 ay kadar +4 °C'de saklanabilmektedir.

6- Stok Çözelti :

a- 1 M Tris-HCl Tamponu : 1.21 g Tris bir miktar distile suda çözüldü ve 0.1 N HCl ile pH 8'e ayarlandıktan sonra son hacim 100 ml'ye tamamlandı.

b- 0.1 M Magnezyum II Klorür Çözeltisi (MgCl₂) : 2.03 g MgCl₂ bir miktar distile suda çözüldükten sonra distile su ile 100 ml'ye tamamlandı ve buzdolabında +4 °C'de saklandı.

c- 1 M Potasyum Klorür Çözeltisi (KCl) : 7.46 g KCl bir miktar distile suda çözüldükten sonra distile su ile 100 ml'ye tamamlandı. Buzdolabında +4 °C'de saklandı.

Eritrosit ve karaciğer pirüvat kinaz enzim aktivitesi çalışmalarında $MgCl_2$ ve KCl çözeltisinden dilüe edilerek gereken konsantrasyonlarda çözelti hazırlandı.

Stok çözelti için 0.9 ml Tris-HCl tamponu, 0.9 ml $MgCl_2$, 0.9 ml KCl, 2.97 ml distile su karıştırıldı. Stok çözelti, kullanma anına kadar buzdolabında +4 °C'de saklanmalıdır. En az 1 ay dayanıklıdır. Eğer fazla miktarda enzim tayini yapılacak ise, solüsyon fazla miktarda hazırlanır ve porsiyonlara bölünerek çalışılır (24,35).

III. B. 2. Enzim Aktivitesinin Ölçümü

1- Bütün örnekler çift olarak çalışıldı. Çalışmaya başlamadan önce daha önce hazırlanmış ve oda ısısına gelmiş hemolizat ve homojenata aşağıdaki işlemler uygulandı:

a- Hemolizat oda ısısına gelmiş hemolizat solüsyonu ile 1/10 oranında sulandırıldı.

b- Karaciğer homojenatı 1 M Tris-HCl tamponu ile 1/10 oranında sulandırıldı.

2- Örnek ve kör tüpüne stok çözeltisinden 1.26 ml ilave edildi.

3- Tüplere NADH ve LDH çözeltisinden 0.2 ml ilave edildi.

4- Örnek tüplerine 0.04 ml ADP, 0.1 ml FDP ilave edildi fakat kör tüpüne ADP ve FDP ilave edilmedi.

5- Kör tüpüne 0.1 ml, örnek tüpüne ise 0.15 ml distile su ilave edildi.

6- 37 °C'ye getirilmiş enzim kaynağından deney tüplerine 0.04 ml ilave edilerek karıştırıldı.

7- Tüpler kapatılarak karıştırıldı ve inkübasyon için 37 °C' de metabolik su banyosunda 10 dakika bekletildi.

8- Bu süre sonunda tüpler metabolik su banyosundan alındı, kör tüpüne 0.2 ml, örnek tüpüne 0.01 ml PEP solüsyonu ilave edildi ve tekrar kapatılarak karıştırıldı.

9- 340 nm'de örneklerdeki absorbans köre karşı okundu.

10- Örnekler 37 °C'de 10 dakika bekletildikten sonra optik dansitedeki azalma ölçüldü.

İşlem :

	<u>Kör</u>	<u>Örnek</u>
Stok Ayıraç (ml)	1.26	1.26
NADH (ml)	0.20	0.20
ADP (ml)	-	0.04
LDH (ml)	0.20	0.20
FDP (ml)	-	0.10
Enzim Kaynağı (ml)	0.04	0.04
Distile Su (ml)	0.10	0.15
İyice karıştırılıp 37 °C'de 10 dakika inkübe edildi.		
PEP (ml)	0.20	0.01

Tekrar karıştırıldıktan sonra 340 nm'de örneklerin köre karşı başlangıç absorbensları (A₁) okundu. Örnekler 37 °C'de 10 dakika bekletildikten sonra son absorbensları (A₂) tekrar okundu.

Hesaplanma :

1- Birinci ile onuncu dakikadaki absorbenslar çıkarılarak absorbens farkı bulundu.

2- Absorbans farkları 10 dakikaya bölünerek 1 dakikadaki absorbenslar bulundu.

3- Kan örneklerine ait hemoglobin değerleri Drabkin yöntemi ile ölçüldü, g-Hb/ml'ye çevrildi.

4- Örneklere ait protein değeri Lowry yöntemi ile ölçüldü, mg/ml'ye çevrildi.

5- Enzim kaynağının sulandırma oranı, NADH absorbens değerinden faydalanılarak bir faktör bulundu.

Eritrosit

$$\Delta A/\text{dakika} = \frac{A_{10\text{dak}} - A_{0\text{dak}}}{10}$$

$$\text{Ünite/ml} = \frac{\Delta A}{\text{Dakika}} \times \frac{1000 \times 2}{6.22 \times 0.04}$$

Burada;

2 sayısı küvetteki toplam hacmini, 0.04 sayısı tüplere ilave edilen hemolizat hacmini, ΔA absorbans farkını, 6.22×10^{-3} ise 1 μmol NADH'ın 1 cm'lik ışık yolunda ve 340 nm'de verdiği absorbans değerini ifade etmektedir.

6- Örneğe ait net absorbans yukarıda belirtilen faktör ile çarpılarak ünite/ml/dakika cinsinden enzim aktivitesi elde edildi.

7- Enzim aktivitesini spesifik aktivite cinsinden bulmak için enzim aktivitesi, hemoglobin (g-Hb) değerine bölündü ve enzim aktivitesi U/g-Hb/dakika birimi ile tarif edildi.

Enzim Aktivitesi : Eritrosit için bulunan bir ünite enzim aktivitesi, bir dakikada 37 °C'de 1 μmol pirüvatı ürüne dönüştüren enzim aktivitesinin g-Hb cinsinden ifadesidir.

Karaciğer

$$\text{Ünite/ml} = \frac{\Delta A}{\text{Dakika}} \times \frac{1000 \times 2}{6.22 \times 0.04}$$

8- Örneğe ait net absorbans faktör ile çarpılarak ünite/ml/dakika cinsinden enzim aktivitesi elde edildi.

9- Enzim aktivitesini spesifik aktivite cinsinden bulmak için; enzim aktivitesi mg protein/ml değerine bölündü ve enzim aktivitesi U/mg protein/dakika cinsinden elde edildi.

Enzim Aktivitesi : Karaciğer dokusu için bulunan bir ünite enzim aktivitesi, bir dakikada 37 °C'de 1 μmol pirüvatı ürüne dönüştüren enzim aktivitesinin mg protein cinsinden ifadesidir.

III. B. 3. Biyolojik Sıvılarda Protein Tayini

Çalışmamızda kullanılan homojenatlardaki protein miktarı Lowry (52) yöntemine göre ölçüldü. Bu yöntemin ilkesi; proteinlerin alkali ortamda Folin-Fenol ayıracağı ile mavi bir renk oluşturmasıdır.

Ayıracılar

1- **Alkali Bakır Ayıracı** : 10 g Na₂CO₃, 0.1 g Potasyum tartarat ve 0.05 g Bakır sülfat 0.5 N NaOH içinde çözüldü ve 100 ml'ye tamamlandı. Bu çözelti oda ısısında 30 gün dayanıklıdır.

2- **Fenol Ayıracı** : 3.75 ml 2.0 N Folin-Ciocalteu-Fenol ayıracı 63.75 ml distile suya ilave edildi. Bu çözelti örnek sayısına göre çalışma anında hazırlanarak taze olarak hazırlanır.

3- Günlük çalışma için kullanılan protein standartının konsantrasyonu 150 µg/ml'dir.

4- Okuma sınırlarına getirilmiş (sulandırılmış) örnek

İşlem :

	<u>Kör</u>	<u>Standart</u>	<u>Örnek</u>
Alkali Bakır Ayıracı (ml)	1.0	1.0	1.0
Günlük Std. (ml)	-	1.0	-
Örnek (ml)	-	-	1.0
Deiyonize Su (ml)	1.0	-	-
Tüpler iyice karıştırıldı ve 10 dakika hiç oynatmadan oda ısısında bekletildi.			
Fenol Ayıracı (ml)	4.0	4.0	4.0

Tüpler iyice karıştırıldı ve 55 °C'de 5 dakika bekletildi. İnkübasyon sonucu hemen soğutuldu. Daha sonra standart ve örnek tüplerin absorbansı 650 nm'de kör tüpüne karşı okundu.

Hesaplama :

Doku protein miktarları aşağıdaki formüle göre hesaplanır.

$$\mu\text{g protein/ml} = \frac{\text{Örnek Absorbansı}}{\text{Std. Absorbans}} \times \text{Std. Konsantrasyonu}$$

III. B. 4. Hemoglobin Tayini

Hemolizat hemoglobin miktarı Drabkin (24) yöntemi ile ölçüldü. Bu yöntemde ferrisiyanür, hemoglobindeki demiri oksitleyerek iki değerlikli demiri üç değerlikli demire çevirir ve methemoglobine dönüşmesini sağlar. Bunu takiben potasyum siyanid ile kararlı bir pigment olan

siyanmethemoglobin meydana gelir. Siyanmethemoglobinin absorbanı spektrofotometrik olarak 546 nm'de okunur.

Ayırıklar :

1-Drabkin Çözeltisi : 50 mg KCN
200 mg $K_3Fe(CN)_6$
1 g $NaHCO_3$

Yukarıda miktarı belirtilen kimyasal maddeler bir miktar distile suda çözüldükten sonra son hacim 1 litreye tamamlandı. Drabkin çözeltisi koyu renkli şişede ve oda ısısında ağzı sıkıca kapalı bir vaziyette bir yıl boyunca saklanabilmektedir.

2- Hemoglobin Standartı : Sigma firmasının 18 g liyofilize hemoglobin standartı 100 ml distile suda çözüldü. Bu standart 18 g/dl hemoglobin içermektedir.

İşlem :

	<u>Kör</u>	<u>Standart</u>	<u>Örnek</u>
Drabkin Çözeltisi (ml)	5.0	5.0	5.0
Hemoglobin Std. (ml)	-	0.02	-
Hemolizat (ml)	-	-	0.02

Tüpler iyice karıştırıldı ve oda ısısında 20 dakika bekletildikten sonra 546 nm'de köre karşı diğer tüplerin absorbanları okundu.

Hesaplama :

$$\text{Hemoglobin (g/dl)} = \frac{\text{Örnek Absorbansı}}{\text{Std. Absorbansı}} \times \text{Std. Konsantrasyonu}$$

III. B. 5. Karaciğer Pirüvat Kinazının Saflaştırılması :

Enzim saflaştırması için Grzegorz (100) tarafından pirüvat kinaz saflaştırılmasında kullanılan metod uygulandı.

Ayırıklar

1- Tampon Çözelti (50 mM Fosfat Tamponu);

a- 4.477 g Na_2HPO_4 bir miktar distile suda çözüldü ve 1 litreye distile su ile tamamlandı.

b- 1.95 g NaH_2PO_4 bir miktar distile suda çözüldü ve 1 litreye distile su ile tamamlandı.

Tampon çözelti; 50 mM Na₂HPO₄ çözeltisi bir behere konuldu ve 50 mM NaH₂PO₄ çözeltisi ile pH 7.5'e getirildi.

2- Homojenizasyon Çözeltisi;

100 mM KCl, 6 mM 2-merkптоethanolamin 50 mM'lük fosfat tamponu (pH:7.5) içinde hazırlandı.

Safıaştırma Metodu :

1-Tamponda Homojenizasyon : Biyopsi ile alınan karaciğer % 0.9'luk NaCl ile +4 °C'de yıkanarak dokunun kanından temizlenmesi sağlandı. Doku örnekleri homojenize edilmeden önce iki süzgeç kağıdı arasında kurutuldu. Keskin bir makasla küçük parçalar haline getirilen doku tartıldı ve ağırlığının 1.3 katı hacime soğuk fosfat tamponu ile tamamlanıp, kırılmış buz içinde homojenatörde (Sorvall Omni Mixer) 5 dakika homojenize edildi. Homojenat iki kat tülbentten süzüldü.

2- Homojenat Santrifügasyonu : Homojenat soğutmalı santrifüjde (Sorvall RC-5B) +2 °C'de 9000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi. Parçalanmış hücreler, çekirdek, bağ dokusu çöktürüldü. Süpernatant buzdolabında saklandı. Çökelek tekrar aynı hacimde tampon çözeltisiyle çözülerek kırılmış buz içerisinde, karıştırıcıda 30 dakika karıştırıldı ve soğutmalı santrifüjde 9000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilerek süpernatant alındı. İki süpernatant birleştirildi.

3- (NH₄)₂SO₄ ile Doyurma : Elde edilen süpernatanta kırılmış buz içerisinde sürekli karıştırmak suretiyle % 20 doygunluğa ulaşınca kadar katı amonyum sülfat 1 saat süreyle karıştırarak yavaş yavaş ilave edildi. Amonyum sülfat tamamen çözüldükten sonra 0 °C'de 20 dakika süreyle 9000 rpm'de santrifüj edildi ve üstteki süpernatant alındı. Süpernatanta yukarıda bahsedildiği şekilde % 40 doygunluğa tekabül edecek miktarda amonyum sülfat ilave edilerek santrifüj edildi. Buradan elde edilen süpernatant tekrar % 70 doygunluğa ulaşınca kadar katı amonyum sülfat ilave edilerek aynı işlemler tekrarlandı ve süpernatant atıldı (100).

4- Dializ : Pirüvat kinaz enzimi içeren çökelti, 20 ml 50 mM fosfat tamponu (pH:7.5, 100 mM KCl ve 6 mM merkптоethanolamin içerir) ile süspansiyon haline getirildi. Bu fraksiyon dializ torbasına aktarılarak aynı tampona karşı 24 saat dializ işlemine tabi tutuldu. Tampon belirli aralıklarla 3 kez değiştirilerek değişik metallerin tampona geçişi sağlandı. Dializat 4000 rpm'de 40 dakika santrifüj edildi (88).

5- Aseton İle Muamele : Bir önceki basamaktan elde edilen süpernatanta hacmi 22.2 misli (% 55) oluncaya kadar -25 °C'de bekletilmiş

asetondan damla damla ilave edilerek, kırılmış buz içerisinde 30 dakika karıştırıldı. Karışım 14000 rpm'de -10 °C'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atıldı, elde edilen çökeltiye 4 ml tampon ilave edilerek cam-teflon homojenizatörde homojenize edildi.

5- Kolon Kromatografisi :

a- Jellerin Hazırlanması : 50 mM fosfat tamponundan bir behere 50 ml konuldu. 2 g Sephadex G-200 yavaş yavaş yüzeyle temas edecek şekilde tampona ilave edilerek bagetle karıştırıldı. Bu karışım 4-6 saat kaynatılarak jellerin şişmesi ve tampon ile dengelenmesi temin edildi.

b- Jelin Kolona Doldurulması ve Örneğin Uygulanması :

Hazırlanan jel Sephadex G-200 (2.5cm x 60 cm) kolonuna yavaş yavaş dolduruldu. Bir bagetle yavaşça karıştırılarak hava kabarcıklarının oluşmaması sağlandı. Jel kolona doldurulup, normal akış hızına kavuştuktan sonra 100 mM KCl, 6 mM 2-merkaptolanolamin içeren 50 mM fosfat tamponu (pH:7.5) kolondan geçirilerek kolon dengelendi. Süpernatant kolona 12 ml/saat lik akış hızıyla uygulandı ve tekrar aynı tampon kolondan geçirilerek 3 ml'lik fraksiyonlar halinde eluatlar alındı. Kolon çıkışının 280 nm'deki absorpsiyonu ($A_{280} < 0.005$) oluncaya kadar tamponla yıkama sürdürüldü. Absorbansları yüksek olan tüplerde enzim aktivitesine bakılarak, yüksek enzim aktivitesi gösteren tüpler birleştirildi ve +4 °C'de saklandı (100).

III. B. 6. SDS-PAGE Elektroforezi

Elektroforez, bir çözeltideki yüklü partikülleri doğru elektrik akımı ile birbirinden ayırma yöntemidir.

Elektroforetik yöntemler ile protein analizlerinin esası, solüsyon halindeki protein molekülündeki net elektro-kimyasal yükün ortamın pH'sından etkilenmesi sonucu elektriksel alanda yüklü moleküllerin hareketidir. Hareketin protein molekülünün özelliğine bağımlı olması gerçeği, protein karışımlarının analizinde kullanılmaktadır. Protein molekülleri, boyut ve yüke bağlı olarak birbirinden ayrılmaktadır. Her protein için, belirli pH ve iyonik kuvvette, molekülün hareketi sabittir.

Taşıyıcı ortamlar arasında en fazla tercih edilenler selüloz asetat ve poliakrilamidir. Poliakrilamidde teknik; elektroforez ile moleküler eleme özelliklerini birleştirmektir. Jeldeki konsantrasyonunu ve çapraz bağ teşkili derecesini değiştirerek moleküler eleme özellikleri kontrol edebilmektedir.

Elektroforezde ayrılan bölgeleri görünür duruma getirmekte Evans Mavisi, Amido Siyahı, Bromfenol Mavisi, Tiyazin Kırmızısı, Ponceau-S, Komasi mavisi gibi boyalardan yararlanılmaktadır. Elde edilen

elektroferogramda spesifik bandların varlığı belirlenmekte yada optik tarama yoluyla banddaki bileşenlerin miktarı saptanmaktadır.

a. Jel Teşekkülü

Poliakrilamid jeli, akrilamid monomerlerinin, metilen-bis-akrilamid ile uygun katalizörlerin varlığında polimerizasyonu ile oluşur. Oluşan polimerin kısımları öyle bir şekilde düzenlenir ki, aktivatör bir maddenin ortama ilavesiyle (TEMED, amonyum persülfat), oda sıcaklığında 10-20 dakika içinde sert bir jel şekillenir. Jel metilen gruplarıyla birbirine bağlanmış uzun hidrokarbon zincirlerinden oluşan üç boyutlu bir yapıya sahiptir.

Jelleşme, fotokimyasal olarak da sağlanabilir. Ortama riboflavin konulduğunda, riboflavin ışığı absorblayarak serbest radikal oluşur ve bu radikalın işlevi ile akrilamidin polimerizasyonu başlar.

Akrilamid ve metilen-bis-akrilamid monomerlerinden hareketle % 2.5-30 akrilamid içeren jeller hazırlanabilmektedir. Jeldeki akrilamid konsantrasyonu ve oluşturulan polimerin çapı, yöntemin kullanılış amacına göre ayarlanabilmektedir.

b. Poliakrilamid Jelin Hazırlanması

1- Alt Jel (% 10 akrilamid)

a- % 30 Akrilamid (30 g akrilamid + 0.8 g bis-akrilamid)

b- Alt Tampon (pH 8.8, 0.75 M Tris-HCl tampon, % 0.1 SDS)

c- % 10 Amonyum Persülfat

d- TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletildiamin)

Alt Jelin Hazırlanması:

%10 luk poliakrilamid jel elektroforez için; 5 ml % 30 akrilamid, 7.5 ml alt tampon, 2.4 ml distile su, 60 µlt % 10 amonyum persülfat karıştırılır, 5 dakika havası alınır. Süre sonunda 10 µlt TEMED ilave edilerek cam plakalar arasına doldurulur. Oda ısısında 20 dakika sonra polimerizasyon meydana gelir.

2- Üst Jel (% 4 akrilamid)

a- % 30 Akrilamid

b- Üst Tampon (pH 6.8, 0.25 M Tris-HCl, % 0.1 SDS)

c- % 10 Amonyum Persülfat

d- TEMED

Üst Jel Solüsyonun Hazırlanması :

1 ml % 30 akrilamid, 3.75 ml üst tampon, 2.7 ml distile su, 50 µlt % 10 amonyum persülfat ilave edilir. 5 dakika havası alındıktan sonra 10 µlt

TEMED ilave edilir. Tarak takılı boşluğa doldurularak polimerize olması beklenir.

3- Taşıma Tamponu : 3.02 g tris, 14.4 g glisin, 1 g SDS (pH 8.3)

4- Örnek Tamponu : % 10 gliserol, % 2 merkaptioethanolamin, % 1 SDS, % 1 bromfenol blue

5- Boyama Solüsyonu (Comassie Blue) : 250 ml Comassie blue R-250, 400 ml methanol, 70 ml asetik asit distile su ile 1 lt ye tamamlanır.

6- Yıkama Solüsyonu : % 5 metanol, % 7.5 asetik asit

c. Elektroforez İşlemi

Elektroforez uygulaması O' Farrel ve Laemmli (49,72) yöntemine göre yapıldı. % 4'lük alt jel önceden hazırlanmış slap jel ünitesine (1 mm kalınlığında, 8 x 8 cm ebatında) dolduruldu. Solüsyonun üzeri 2 mm kalınlığında distile su fazı ile hava ile irtibatı kesildi. 30 dakika sonra polimerizasyon gerçekleşti. Polimerize olan solüsyon bir gece +4 °C bekletildi. Sabah üst jel karışımı hazırlandı ve daha önce yapıldığı gibi solüsyonun 10 dakika havası alındı. Slap jel ünitesine tarak yerleştirildi. Üst jel solüsyonu hava kabarcığı yaptırmadan boşluğa dolduruldu. 30 dakika sonra jel oluştu. Tarak yerinden çıkartıldı ve oluşan line'lar bir kaç defa tamponla yıkanarak kalıntı akrilamid uzaklaştırıldı. Artık slap jel poliakrilamid jel elektroforeze uygulanabilir duruma geldi. Tanklara taşıma tamponu dolduruldu.

Her saflaştırma kademesinden alınan protein örnekleri örnek tamponla 1/1 oranında karıştırıldı ve her line 20-30 µl hacimde uygulandı. Aynı şekilde hazırlanan standart çözeltisinde her line 20-30 µl olacak şekilde uygulandı. 200 volt elektrik akımı verilerek işlem başlatıldı. Bromfenol blue boyasının jelin en alt mesafesine ulaşmasıyla elektrik akımı kesildi (yaklaşık 2.5 saat).

d. Jellerin Boyanması

Elektroforez işlemi sonunda, slap jel ünitesi tanktan çıkartıldı. Cam plakların birbirinden ayrılması ile jel serbest hale getirildi. Bir gece boyama solüsyonu ile protein bandları boyandı. 12 saat sonra protein bandları dışındaki boyayı atmak için yıkama işlemi yapıldı. Jel yıkama solüsyonu içinde solüsyon 6 saatte bir defa değiştirilmek üzere en az 12 saat bekletildi. Böylece protein bandları dışındaki kısımlar şeffaflaştı ve protein bandları belirgin olarak ayrıldı. Eğer jel uzun süre saklanacak ise % 5 asetik asit solüsyonuna atılarak muhafaza edilebilir. Elde edilen elektroferogramların resimleri çekildi.

IV. BULGULAR

IV. A. Karaciğer Pirüvat Kinaz Enziminin Saflaştırılması

Karaciğer pirüvat kinaz enzimi saflaştırma işlemi sonunda Tablo II'de özetlendiği gibi % 13.2 verimle 26.3 kat saflaştırıldı. Homojenat % 20, % 40 ve % 70 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ile doyuruldu. % 20 ve % 40 doyumadan sonra enzim aktivitesi süpernatantlarda, % 70 doygunlukta ise aktivite çökeltide yüksek bulundu. İnsan karaciğer pirüvat kinazı % 20 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ile doygunlukta 1.08, % 40 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ile doygunlukta 1.21, % 70 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ile doygunlukta ise 1.58 kat saflaştırıldı.

Karaciğer pirüvat kinaz enzimi üzerine dializin etkisi incelendi. Dializ 24 saat 50 mM fosfat tamponuna karşı yapıldığında enzim aktivitesi % 247.5 oranda arttı. Saflaştırmada en önemli aşama Sephadex G-200 kromatografisi aşamasıdır. Şekil 8'de dializ işleminden sonra karaciğer doku pirüvat kinazının Sephadex G-200 jel filtrasyonuna uygulanması ve elüsyon profilini görülmektedir. Enzim Sephadex G-200 kromatografisine uygulandıktan sonra 26.3 kat saflaştırıldı ve spesifik aktivite 2.6 U/mg protein olarak bulundu.

Homojenat, % 20, % 40 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ile doyurulmuş pirüvat kinaz enzimi ve kromatografi uygulanmış pirüvat kinaz enzimine elektroforez uygulandığında en son basamakta 2 band elde edildi. Birinci band albumin bandı, ikinci band ise pirüvat kinaz bandıdır. Standart olarak sığır serum albumini kullanıldı. Saflaştırma basamaklarıyla diğer proteinlerin elimine edildiği ve kromatografi basamağından sonra enzimin önemli derecede saflaştırıldığı şekil 10'da görülmektedir.

Tablo II : Karaciğer Pirüvat Kinazın Saflaştırma Basamakları

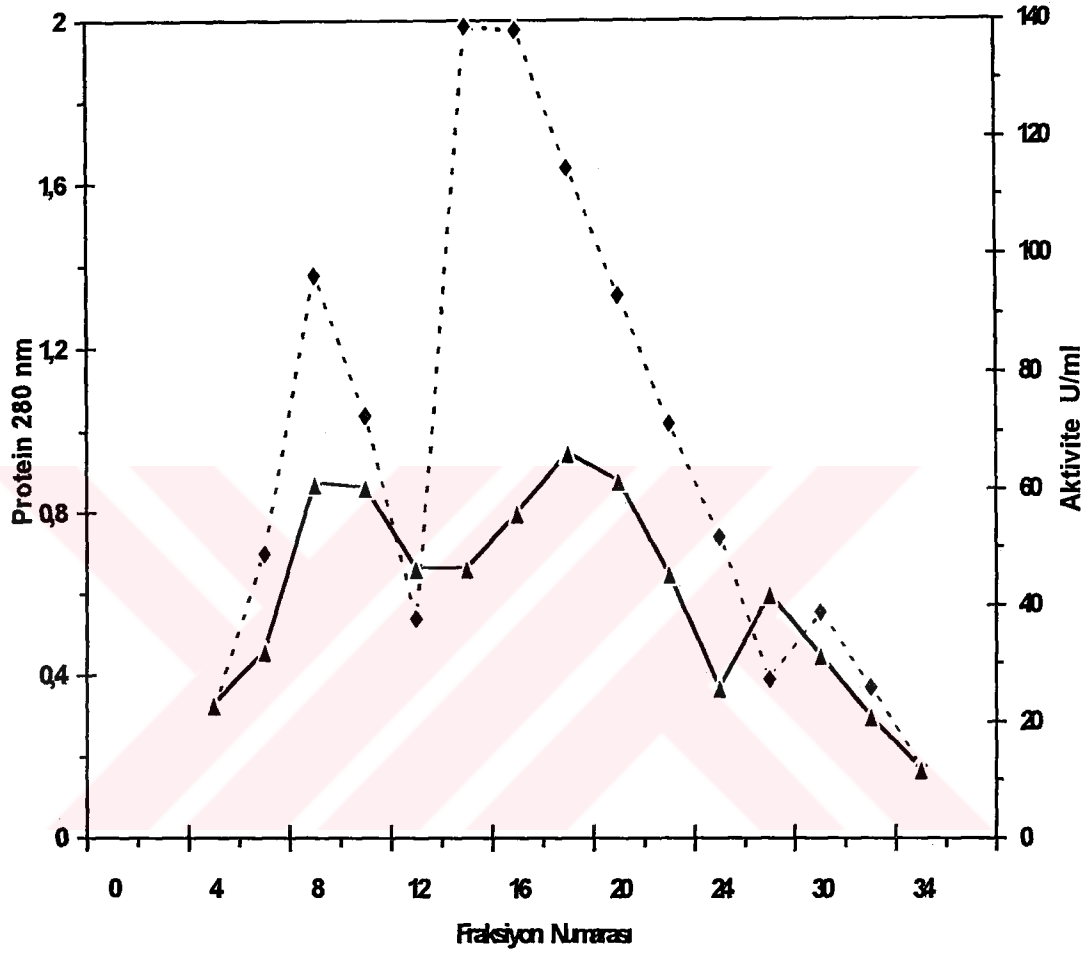
Saflaştırma Basamağı	Protein (mg/ml)	Total Aktivite (U)	Spesifik Aktive (U/mg) ◆	Saflaştırma (kat)	Verim (%)
Homojenat	9.9	985	0.099	–	100
% 20 (NH ₄) ₂ SO ₄ Süpernatant	7.9	849	0.107	1.08	86.2
% 40 (NH ₄) ₂ SO ₄ Süpernatant	4.2	515	0.12	1.21	52.3
% 70 (NH ₄) ₂ SO ₄ Çökelti	1.8	280	0.156	1.575	28.4
Dializ	0.45	155	0.344	3.48	15.7
Sephadex G-200 Jel Filtrasyon	0.05	130	2.6	26.3	13.2

Total enzim aktivitesi

◆ Ünite/ml : _____ : Spesifik aktivite

Total protein

◆ Fraksiyonlar birleştirildi. Buradaki spesifik aktivite ortalamayı göstermektedir.



Şekil 8 : Karaciğer Pirüvat Kinazının Sephadex G-200 Kolonuna Uygulanma ve Elüsyon Profili. Akış hızı 12 ml/saat, fraksiyon hacmi 20 ml. Kromatografi (— : aktivite, --- : A_{280}).



a b c d e

Şekil 9: Saflaştırılmış İnsan Karaciğerinin Poliakrilamid Jel Elektroforezi.

a- Standart, *b-* Homojenat, *c-* % 20 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ile doyurulmuş pirüvat kinaz enzimi, *d-* % 40 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ile doyurulmuş pirüvat kinaz enzimi, *e-* % 70 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ile doyurulmuş, dializ ve kolon kromatografisi uygulanmış pirüvat kinaz enzimi. Saflaştırılmış karaciğer pirüvat kinaz poliakrilamid jel elektroforezde 2 band verdi. Birinci band albumin, ikinci band ise enzimi göstermektedir. Standart olarak sığır serum albumini kullanıldı.

IV. B. Eritrosit ve Karaciğer Pirüvat Kinaz Aktivitesinin Saptanması

Eritrosit ve karaciğer dokusunda pirüvat kinaz aktivitesi materyal ve metot kısmında belirtilen pirüvat kinaz tayin yöntemi ile saptanmıştır. Daha sonra kinetik özellikler ve optimum koşullar tesbit edilmiştir.

IV. B. 1. Optimal İnkübasyon Zamanının Belirlenmesi

Eritrosit

Eritrosit pirüvat kinaz aktivitesi için en uygun inkübasyon süresini saptamak amacı ile enzim 37 °C'de değişik zaman süreçlerinde inkübasyona tabi tutuldu. Şekil 10'da görüldüğü gibi maksimum enzim aktivitesini elde etmek için gerekli inkübasyon zamanı 10 dakika olarak belirlendi.

Karaciğer

Şekil 11'de görüldüğü gibi karaciğer pirüvat kinaz enzimindeki artış zamana bağlı olarak 20 dakikaya kadar doğrusal olup, bu sürenin sonunda doğrusallık yerini hiperbolik bir görünüme bıraktı. Bundan dolayı enzim için en uygun inkübasyon süresi 20 dakika olarak belirlendi.

IV. B. 2. pH'nın Enzim Aktivitesine Etkisi

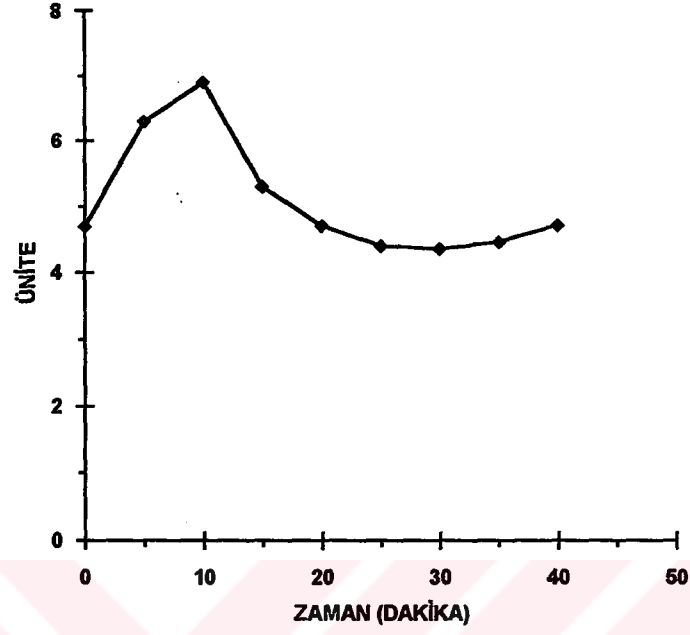
Optimum pH'yı saptamak için pH 6-11.5 arasında değişen farklı tampon sistemleri kullanıldı. Bu tampon sistemleri pH 5-8 arası fosfat, pH 7.1-8.9 arası Tris HCl, pH 8.6-10.6 arası glisin tamponları olarak kullanıldı. Elde edilen veriler bir grafikte verildikten sonra bizim optimum olarak belirlediğimiz tampon sistemi ile farklı pH derecelerinde çalışılarak optimal pH saptandı.

Eritrosit

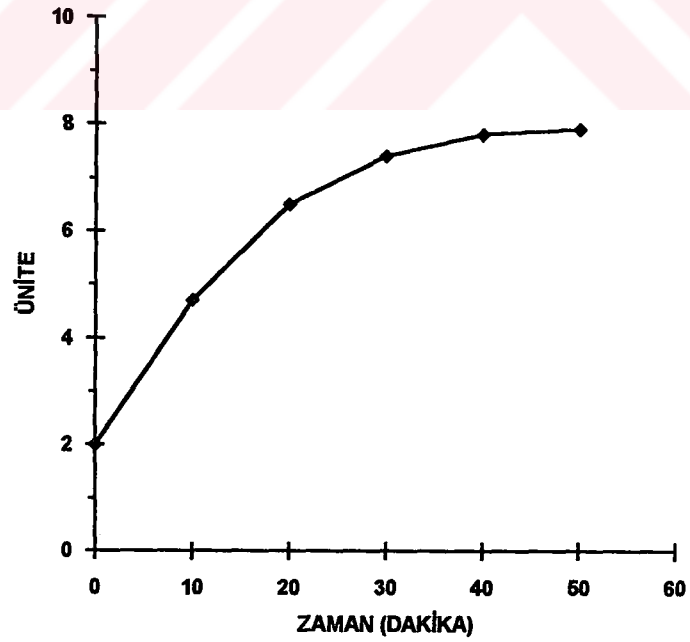
Şekil 12'de çeşitli tampon sistemlerinde ve pH değişikliklerinden anlaşılacağı gibi eritrosit pirüvat kinaz aktivitesinin ölçümü için en uygun tampon, Tris-HCl ve en uygun pH 8 olarak görülmektedir. Şekil 13'de ise Tris-HCl tampon sisteminde çeşitli pH değerlerine bağlı olarak eritrosit pirüvat kinaz aktivitesindeki değişiklikler gösterildi.

Karaciğer

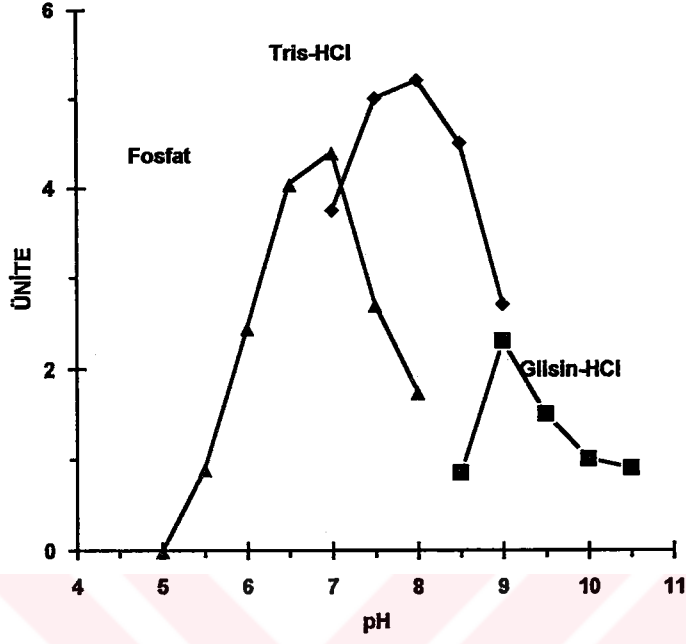
Şekil 14'de görüldüğü gibi enzim en yüksek aktiviteyi Tris-HCl ile pH 7.4'de verdi. Bu pH enzim için optimal pH olarak kabul edildi. Şekil 15'de Tris-HCl tampon sisteminde çeşitli pH değerlerine bağlı olarak karaciğer pirüvat kinaz aktivitesindeki değişiklikler gösterildi.



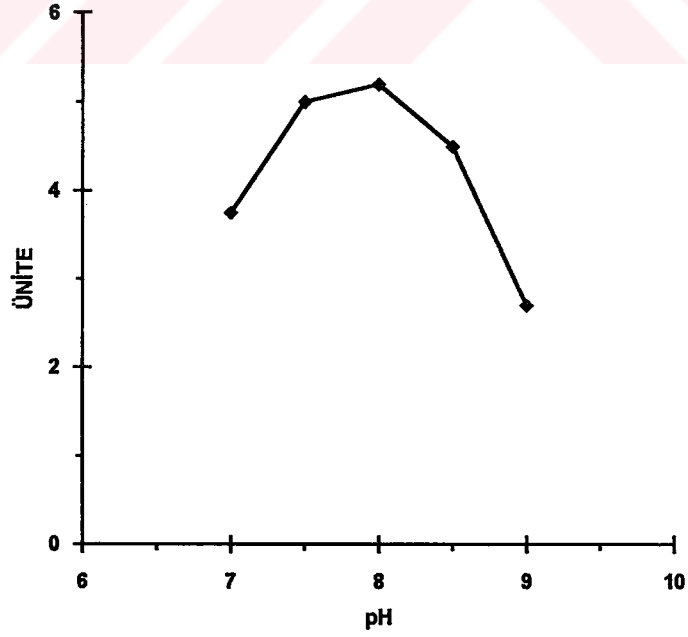
Şekil 10 : Eritrosit Pirüvat Kinaz Aktivitesinin İnkübasyon Zamanına Bağlı Olarak Değişimi



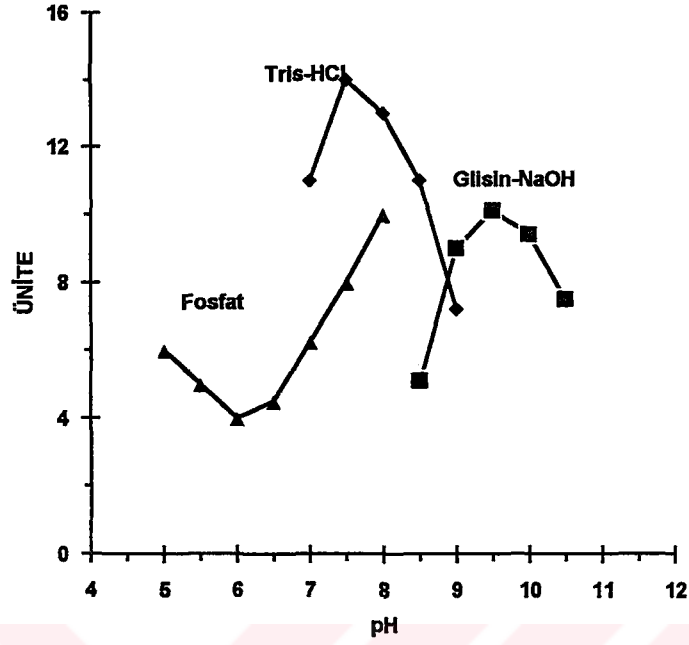
Şekil 11 : Karaciğer Pirüvat Kinaz Aktivitesinin İnkübasyon Zamanına Bağlı Olarak Değişimi



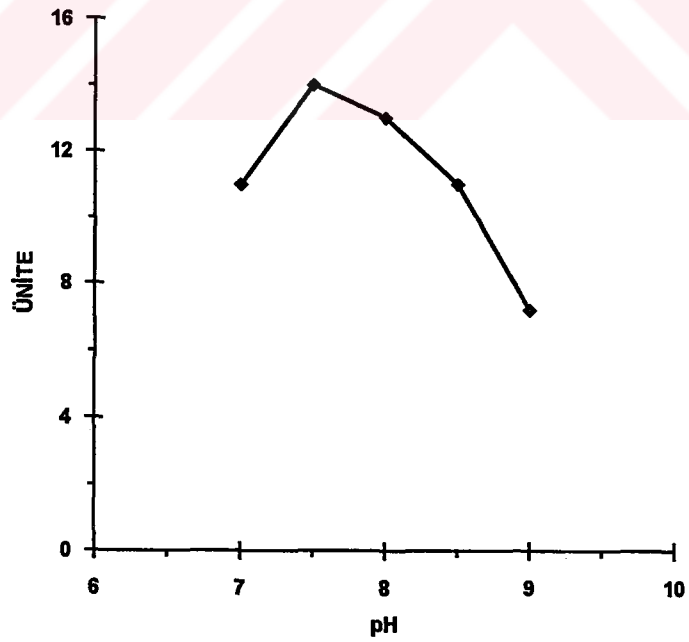
Şekil 12 : Eritrosit Pirüvat Kinaz Aktivitesinin Bazı Tampon Sistemleri ve pH Değerlerine Göre Değişimi



Şekil 13 : Eritrosit Pirüvat Kinaz Aktivitesinin Tris-HCl Tampon Sisteminde pH'ya Göre Değişimi



Şekil 14 : Karaciğer Pirüvat Kinaz Aktivitesinin Bazı Tampon Sistemleri ve pH Değerlerine Göre Değişimi

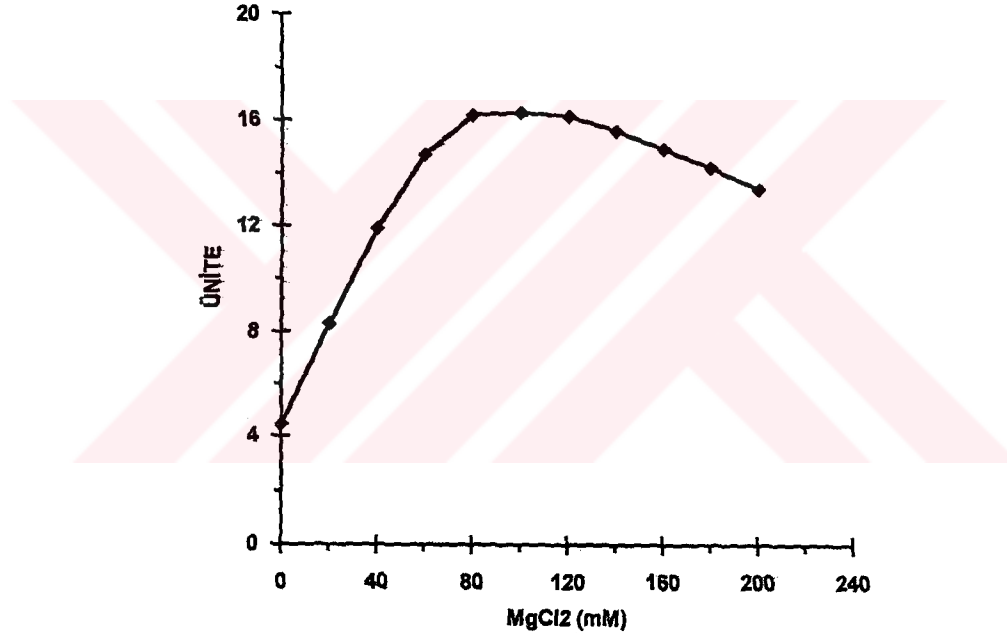


Şekil 15 : Karaciğer Pirüvat Kinaz Aktivitesinin Tris-HCl Tampon Sisteminde pH'ya Göre Değişimi

IV. B. 3. Eritrosit Enzim Aktivitesinin $MgCl_2$ Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişimi

Eritrosit

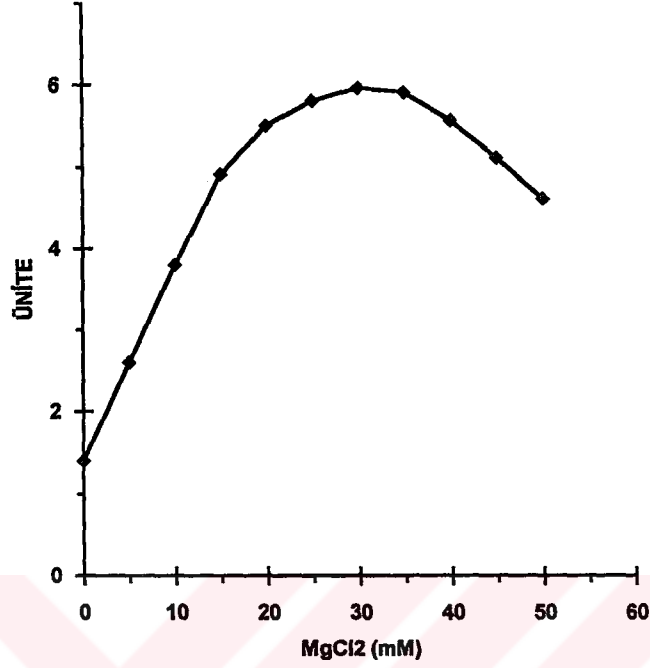
Şekil 16'da görüldüğü gibi enzim en yüksek aktiviteyi 100 mM $MgCl_2$ konsantrasyonunda gösterdi. İnkübasyon ortamına $MgCl_2$ ilave edilmediği zaman bir miktar enzim aktivitesi saptandı. 100 mM $MgCl_2$ varlığında ise enzim aktivitesi 3.7 kat artış gösterdi.



Şekil 16 : Eritrosit Pirüvat Kinaz Aktivitesinin $MgCl_2$ Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişimi

Karaciğer

İnkübasyon ortamında optimal $MgCl_2$ iyon konsantrasyonunun tespiti amacıyla ortalama 0-50 mM arasında değişen konsantrasyonlarda $MgCl_2$ ilave edildi ve 30 mM $MgCl_2$ iyonları varlığında en yüksek aktivite elde edildi. Enzim aktivitesi 20 mM $MgCl_2$ varlığında 3.9 kat, 30 mM $MgCl_2$ varlığında ise 4.3 kat artış gösterdi.



Şekil 17 : Karaciğer Pirüvat Kinaz Aktivitesinin MgCl₂ Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişimi

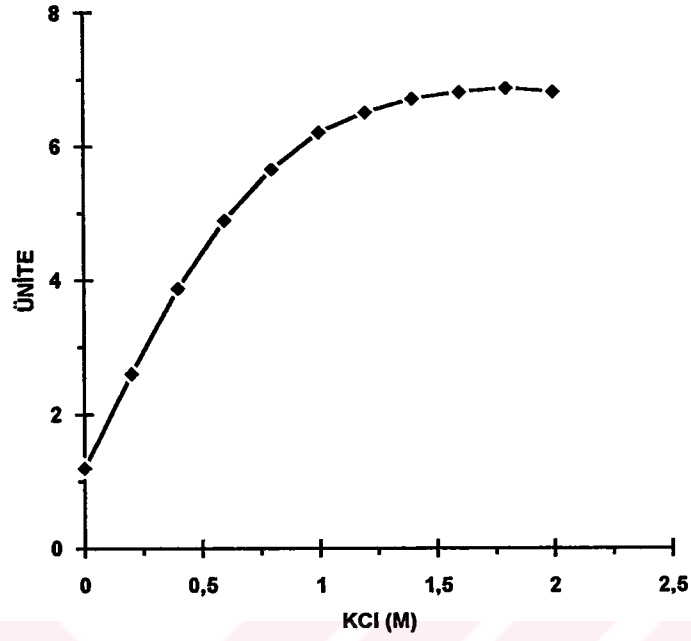
IV.B. 4. Enzim Aktivitesinin KCl Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişimi

Eritrosit

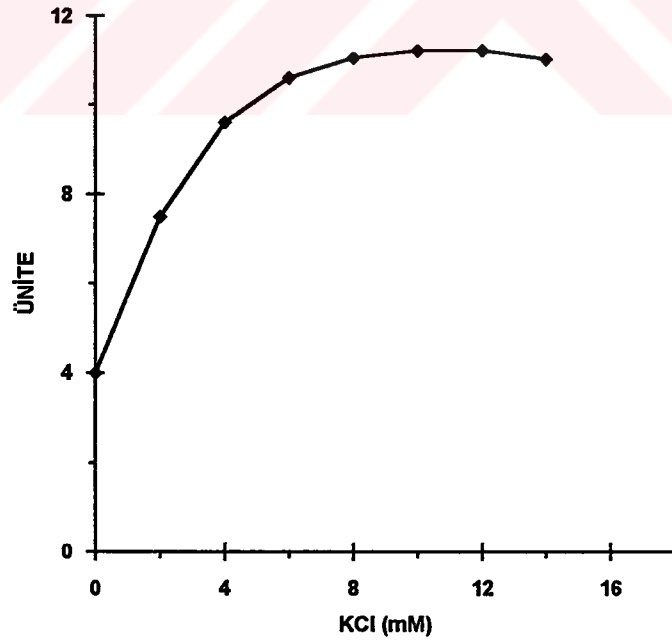
Optimal KCl konsantrasyonu saptamak için inkübasyon ortamına 0.2-2 M arasında değişen konsantrasyonlarda KCl ilave edildi ve şekil 18'de görüldüğü gibi enzim en yüksek aktiviteyi 1.6 M KCl varlığında gösterdi. 1.6 M KCl enzim aktivitesini 5.7 kat artırdı.

Karaciğer

Karaciğer doku pirüvat kinazı ile yapılan çalışmada, KCl konsantrasyonu tespit edilirken inkübasyon süresi 5 dakika, sıcaklığı 37 °C olarak alındı. Bu çalışmada da şekil 19'da görüldüğü gibi, maksimum aktivite için gerekli olan KCl konsantrasyonu 10 mM olarak saptandı.



Şekil 18 : Eritrosit Pirüvat Kinaz Aktivitesinin KCl Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişimi

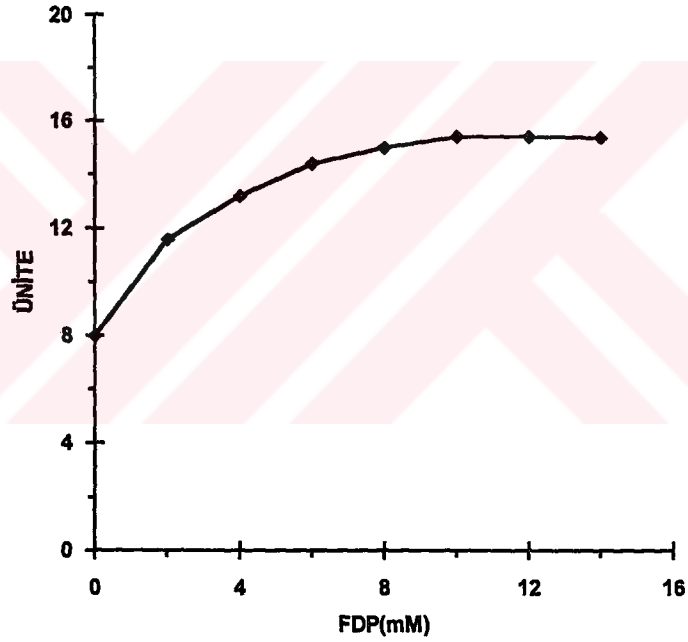


Şekil 19 : Karaciğer Pirüvat Kinaz Aktivitesinin KCl Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişimi

IV. B. 5. FDP'nin Pirüvat Kinaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Eritrosit

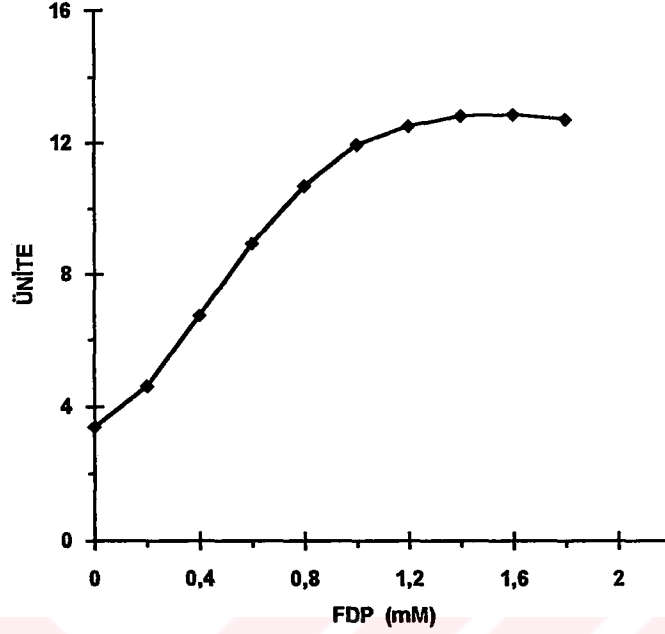
Eritrosit pirüvat kinazı ile yapılan çalışmada FDP konsantrasyonu tespit edilirken inkübasyon sıcaklığı 37 °C, inkübasyon süresi 10 dakika olarak alındı. Şekil 20'de görüldüğü gibi maksimum aktivite için gerekli FDP konsantrasyonu 10 mM olarak bulundu. 1 mM FDP konsantrasyonu enzim aktivitesini 3.74 kat, 10 mM FDP konsantrasyonu ise enzim aktivitesini 1.93 kat artırdı.



Şekil 20 : Eritrosit Pirüvat Kinaz Aktivitesi Üzerine FDP'nin Etkisi

Karaciğer

0.2-2 mM arasında değişen FDP varlığında karaciğer doku pirüvat kinaz aktivitesi tayin edildi. Şekil 21'de görüldüğü gibi karaciğerde enzim en yüksek aktiviteyi 1.4 mM FDP konsantrasyonunda gösterdi. 1.4 mM FDP konsantrasyon enzim aktivitesini 3.8 kat artırdı.



Şekil 21 : Karaciğer Pirüvat Kinaz Aktivitesi Üzerine FDP'nin Etkisi

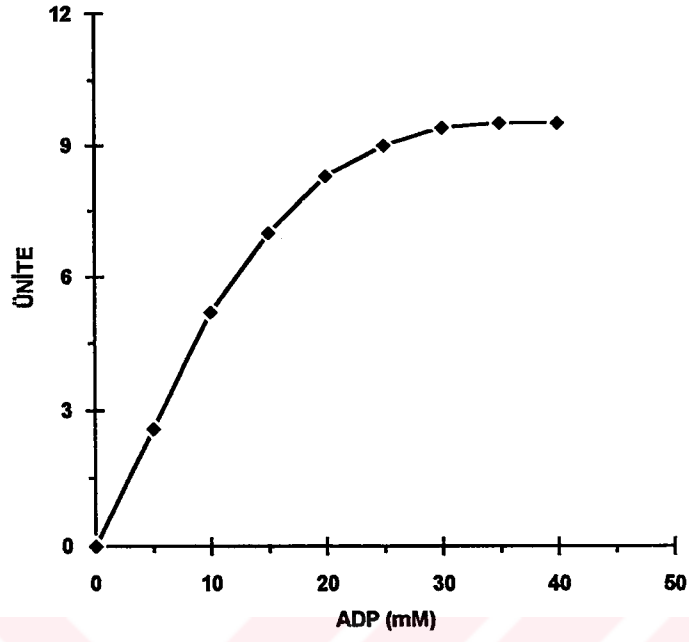
IV. B. 6. ADP'nin Pirüvat Kinaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Eritrosit

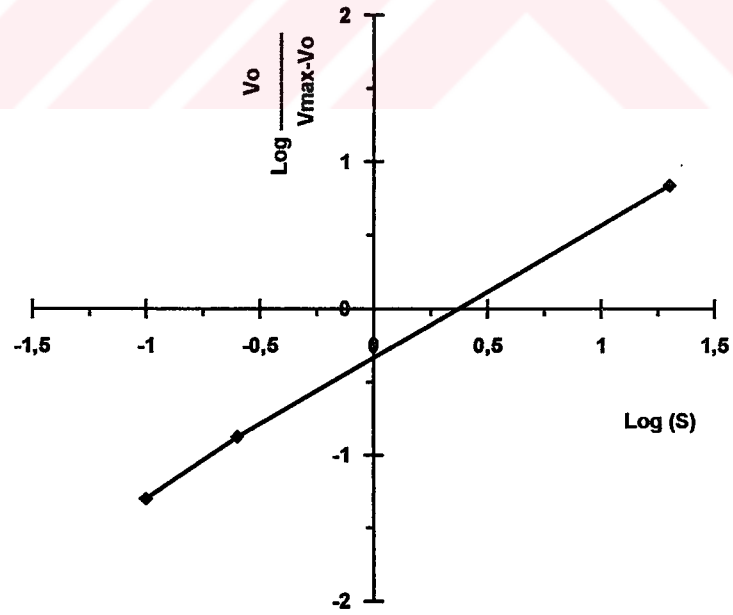
Farklı konsantrasyondaki ADP iyonunun eritrosit pirüvat kinaz aktivitesine olan etkisi incelendi. Şekil 22'de görüldüğü gibi enzim en yüksek aktiviteyi 30 mM ADP konsantrasyonda gösterdi. Elde edilen sonuçlara bakarak kullanılabilir ADP konsantrasyonu 30 mM olarak saptandı. Şekil 23'de ADP'nin eritrosit pirüvat kinazı üzerine olan etkisi Hill grafiği ile gösterildi.

Karaciğer

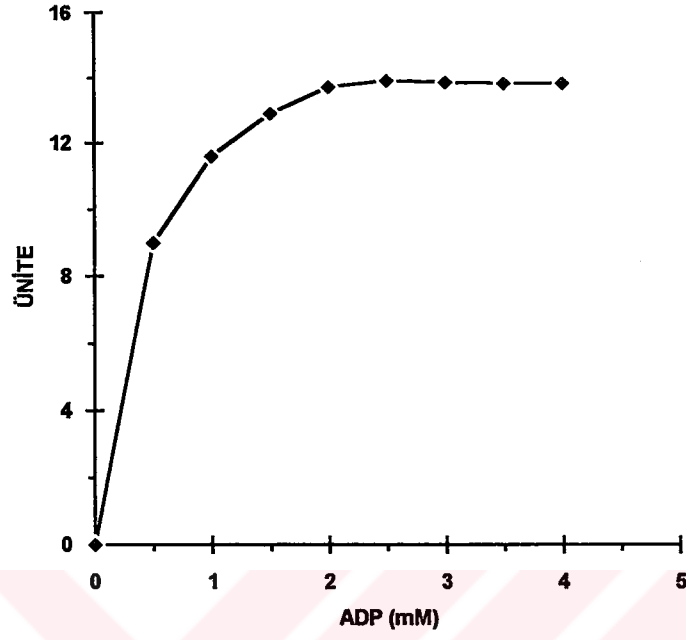
Karaciğer dokusunda uygun ADP konsantrasyonunu bulmak amacıyla 0,5 mM ile 5 mM arasında değişen konsantrasyonlarda çalışıldı. Şekil 24'de görüldüğü gibi 0,5 mM'a kadar olan ADP konsantrasyonunda aktivitede lineer bir artış görüldü ve bu konsantrasyondan sonra eğri doğrusallığını kaybederek hiperbolik bir görünüm kazandı. 2 mM ADP konsantrasyonunda enzim maksimum aktivite gösterdi. Şekil 25'de ADP'nin eritrosit pirüvat kinazı üzerine etkisinin Hill grafiği ile gösterildi.



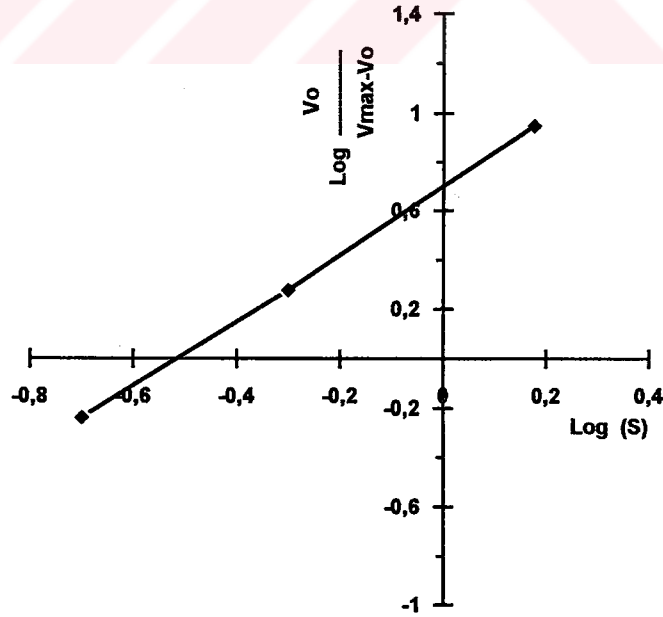
Şekil 22 : Eritrosit Pirüvat Kinaz Aktivitesi Üzerine ADP'nin Etkisi



Şekil 23 : ADP'nin Eritrosit Pirüvat Kinaz Enzimi Üzerine Etkisinin Hill Grafiği



Şekil 24 : Karaciğer Pirüvat Kinaz Aktivitesi Üzerine ADP'nin Etkisi



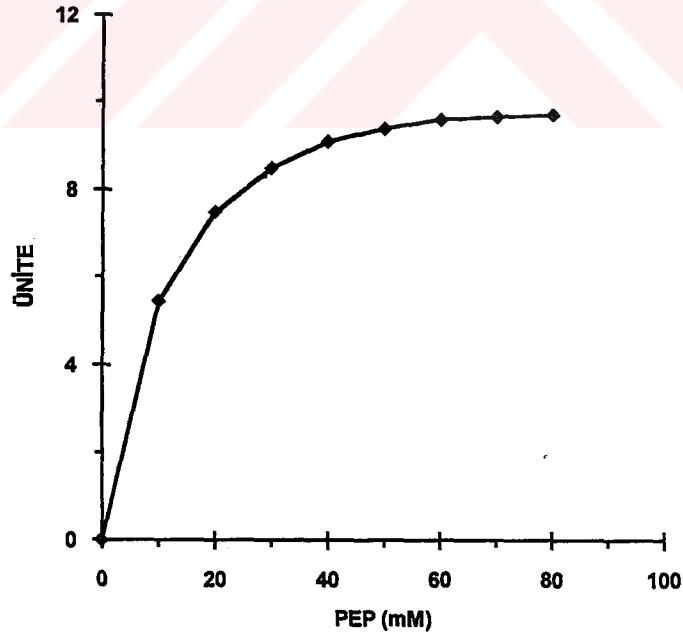
Şekil 25 : ADP'nin Karaciğer Pirüvat Kinaz Enzimi Üzerine Etkisinin Hill Grafiği

IV. B. 7. Pirüvat Kinaz Aktivitesinin PEP Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişimi

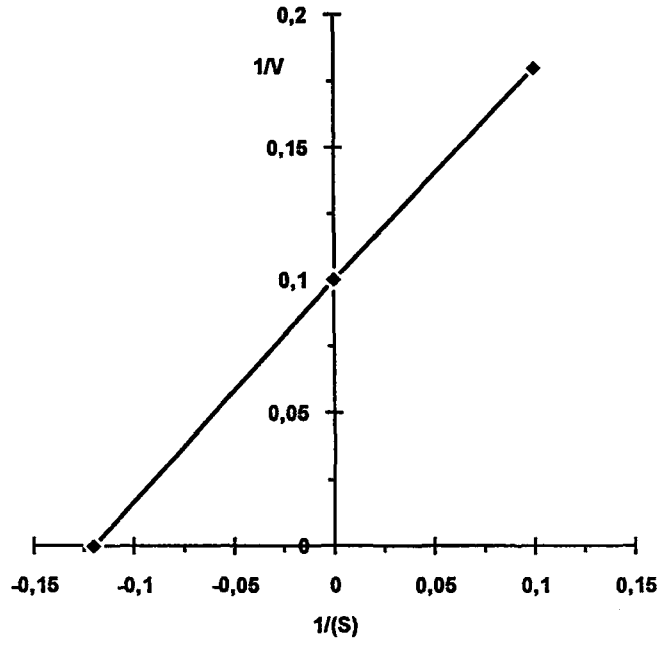
Eritrosit ve karaciğer için optimal şartlar belirlendikten sonra enzimin substratı olan fosfoenolpirüvata (PEP) karşı Km'i tespit edildi. Şekillerde de görüldüğü gibi enzim konsantrasyonu sabit tutulup substrat konsantrasyonu artırıldığında enzimatik reaksiyon hızı artmaktadır.

Eritrosit

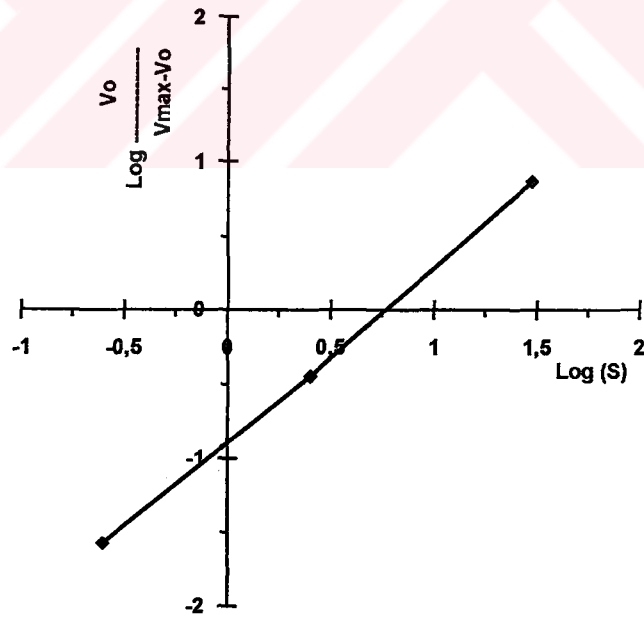
Enzim aktivitesinin substrat konsantrasyonuna bağlı olarak değişimi Michaelis-Menten kinetiği ile incelendi (Şekil 26). Eritrosit pirüvat kinazı Şekil 26'da görüldüğü gibi 60 mM substrat konsantrasyonundan sonra enzimatik reaksiyon sabit hızla devam etmektedir. Enzim aktivitesinin substrat konsantrasyonuna bağlı olarak değişimi Lineweaver-Burk ve Hill kinetik yöntemi ile de değerlendirildi (Şekil 27-28). Michaelis-Menten grafiğinde pirüvat kinazın PEP'e karşı olan Km'i 8.5 mM civarında bulundu. Hill grafiğinde ise enzimin nH değeri 1.8 mM olarak bulundu.



Şekil 26 : Eritrosit Pirüvat Kinaz Aktivitesinin Fosfoenolpirüvat Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişimi



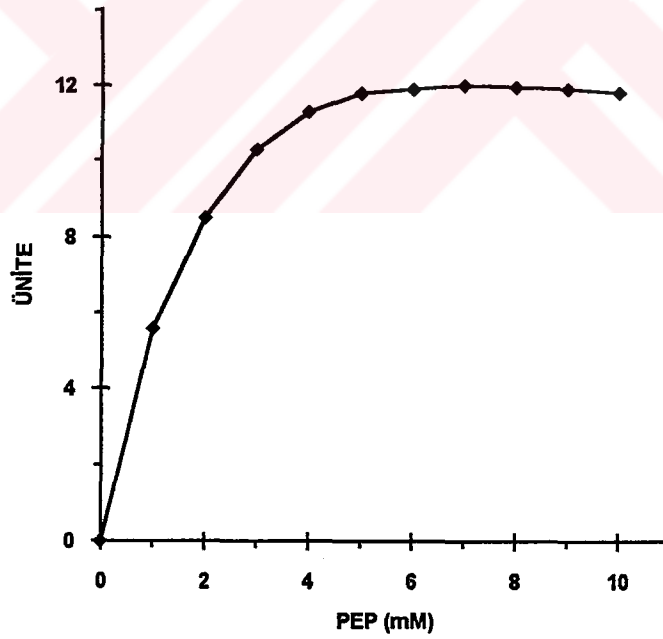
Şekil 27 : Eritrosit Pirüvat Kinazının Fosfoenolpirüvata Karşı Olan K_m 'nin Lineweaver-Burk Yöntemiyle Saptanması



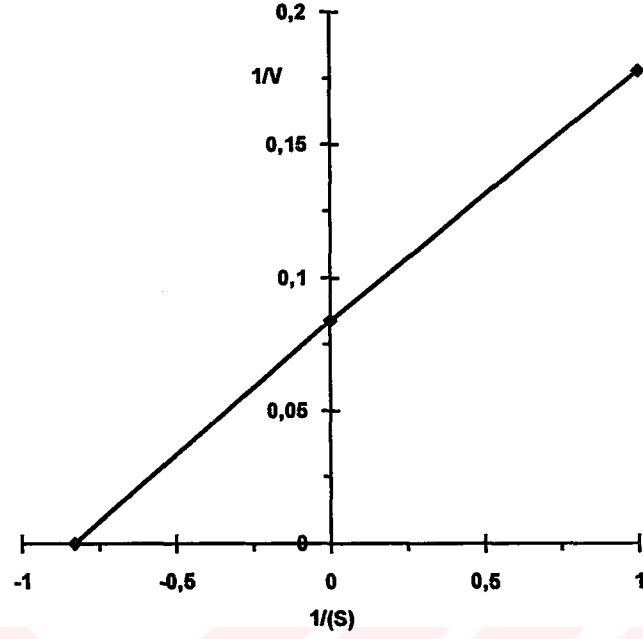
Şekil 28 : PEP'in Eritrosit Pirüvat Kinaz Enzimi Üzerine Etkisinin Hill Grafiği

Karaciğer

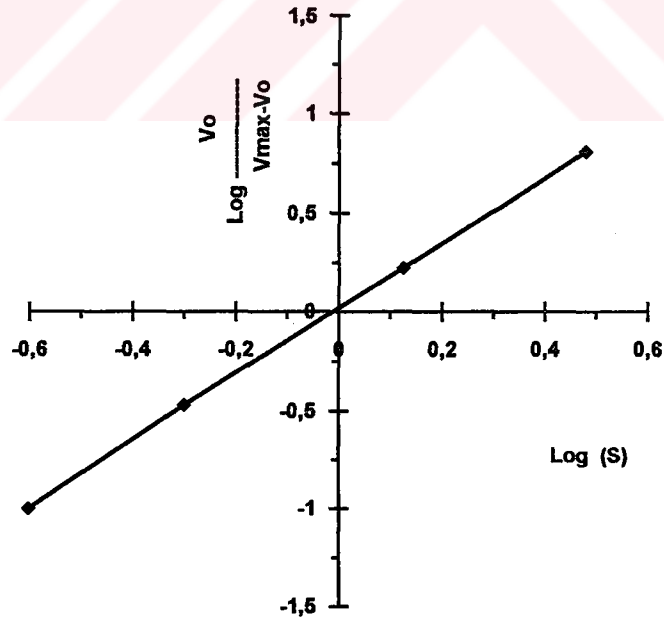
Şekil 29'da görüldüğü gibi başlangıçta substrat (PEP) konsantrasyonuna bağlı olarak reaksiyon hızı artış göstermekte ve bu artış 5 mM substrat konsantrasyonuna kadar devam etmektedir. 5 mM PEP konsantrasyonundan sonra enzim substratı ile doygunluğa ulaşmıştır. Enzim aktivitesinin substrat konsantrasyonuna bağlı olarak değişimi Lineweaver-Burk ve Hill kinetiği ile de değerlendirildi (Şekil 30-31). Michaelis-Menten yönteminde karaciğer pirüvat kinazının PEP karşı olan K_m 'i 1.2 mM civarında bulunurken Hill yönteminde nH değeri 0.95 mM civarında bulundu.



Şekil 29 : Karaciğer Pirüvat Kinaz Aktivitesinin Fosfoenolpirüvat Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişimi



Şekil 30 : Karaciğer Pirüvat Kinazının Fosfoenolpirüvata Karşı Olan K_m 'nin Lineweaver-Burk Yöntemiyle Saptanması



Şekil 31 : PEP'in Karaciğer Pirüvat Kinaz Enzimi Üzerine Etkisinin Hill Grafiği

IV. B. 8. $MnCl_2$ 'ün Pirüvat Kinaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

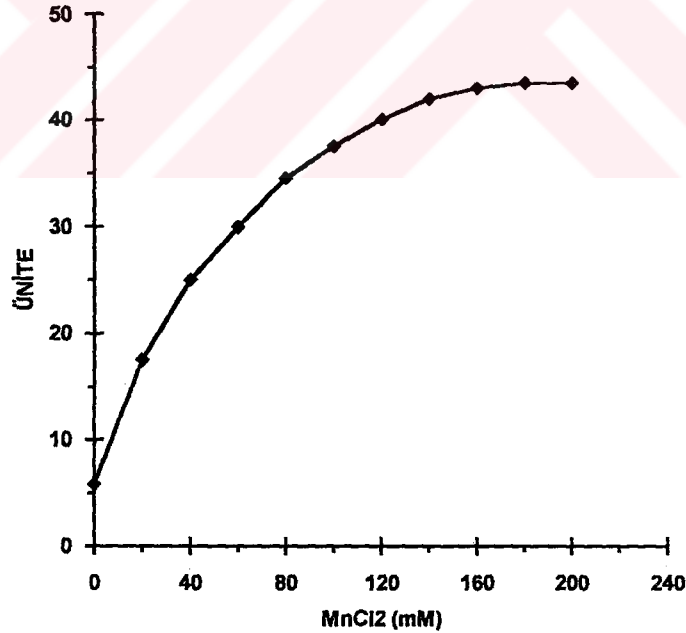
Sabit PEP konsantrasyonu üzerine artan konsantrasyonda $MnCl_2$ ilave edilerek pirüvat kinaz aktivitesi ölçüldü.

Eritrosit

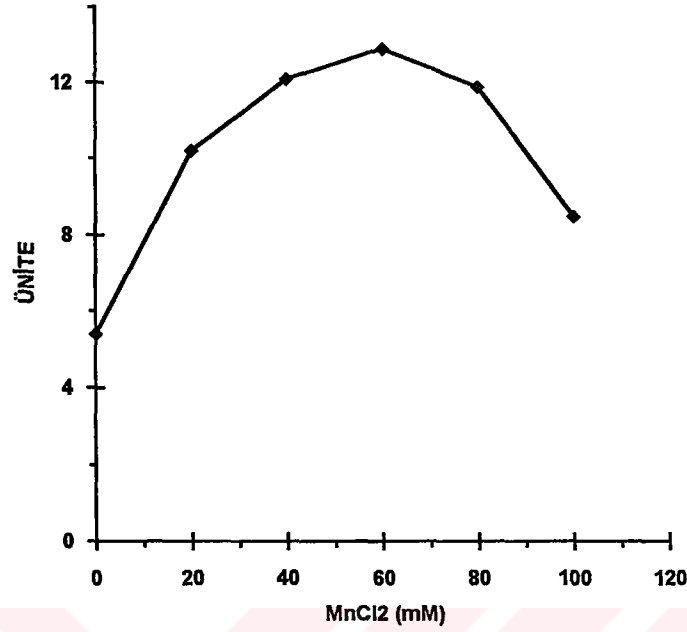
Artan konsantrasyonda $MnCl_2$ deney ortamına ilave edildiğinde şekil 32'de görüldüğü gibi 160 mM $MnCl_2$ 'ün eritrosit pirüvat kinaz aktivitesini 7.3 kat artırdığı görüldü.

Karaciğer

Şekilde 34'de olduğu gibi $MnCl_2$ 'lü ortamda pirüvat kinaz aktivitesinde bir artış görüldü. Bu artışın ise 60 mM konsantrasyonda yaklaşık 2.4 kat dolayında olduğu elde edilen verilerden anlaşıldı.



Şekil 32 : $MnCl_2$ 'ün Eritrosit Pirüvat Kinaz Aktivitesi Üzerine Etkisi



Şekil 33 : MnCl₂'ün Karaciğer Pirüvat Kinaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

IV. B. 9. NaCl'ün Pirüvat Kinaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

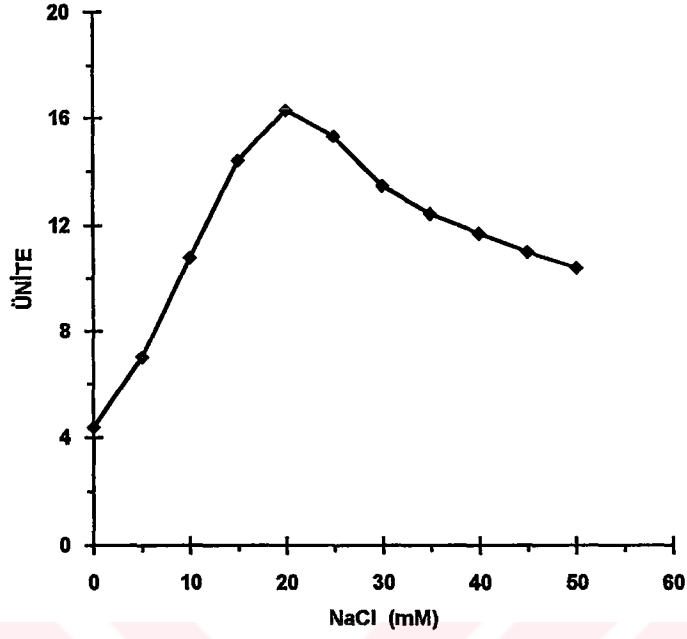
Değişik konsantrasyonlardaki NaCl'ün pirüvat kinaz aktivitesi üzerine etkisi araştırıldı. Bu amaçla eritrositte 5-50 mM, karaciğerde 11-60 mM arasında değişen konsantrasyonlarda NaCl kullanıldı.

Eritrosit

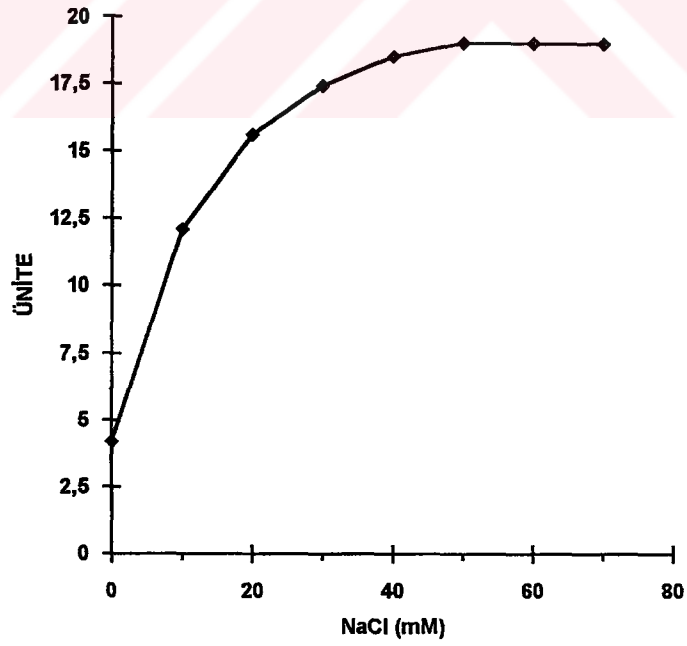
Şekil 34'de görüldüğü gibi; NaCl'ün 20 mM'a kadar eritrosit pirüvat kinaz enzimini aktive ettiği, 20 mM'dan fazla konsantrasyonlarda ise enzimi inhibe etmeye başladığı görüldü. 20 mM NaCl konsantrasyonunda enzim aktivasyonunun 3.7 kat arttığı saptandı.

Karaciğer

Karaciğer doku pirüvat kinazı ile yapılan çalışmada, NaCl konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisi tespit edilirken inkübasyon süresi 5 dakika, ısısı 37 °C olarak alındı. Bu çalışmada şekil 35'de görüldüğü gibi; enzim aktivitesinin 10 mM NaCl'ün varlığında 2.9 kat, 50 mM NaCl varlığında ise 4.5 kat arttığı bulundu.



Şekil 34 : NaCl'ün Eritrosit Pirüvat Kinaz Aktivitesi Üzerine Etkisi



Şekil 35 : NaCl'ün Karaciğer Pirüvat Kinaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

IV.B. 10. Bazı Metabolitlerin Eritrosit ve Karaciğer Pirüvat Kinaz Aktivitesine Etkileri

Eritrosit ve karaciğer pirüvat kinazı üzerine bazı metabolitlerin etkileri incelendi. Bu nedenle metabolitler 5 mM konsantrasyonlarda inkübasyon ortamına ilave edilerek enzim aktivitesi tayin edildi. Tablo III'de görüldüğü gibi alanin varlığında karaciğer pirüvat kinaz enzim aktivitesi inhibe olurken diğer bileşiklerin varlığında enzim aktivitesinde artışlar saptandı.

Tablo III : Eritrosit ve Karaciğer Pirüvat Kinaz Aktivitesi Üzerine Bazı Metabolitlerin Etkisi

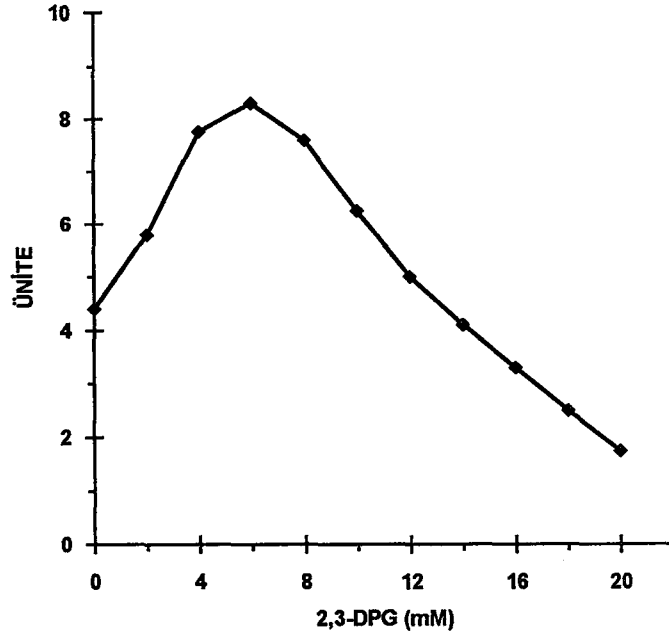
Metabolit	Eritrosit (% Aktivite)	Karaciğer (% Aktivite)
Kontrol (5 mM)	100	100
G-1-P (5 mM)	127	108
G-6-P (5 mM)	194	126
2,3-DPG (5 mM)	188	880
İnsülin (5 mM)	134	146
Alanin (5 mM)	133	29

IV. B. 11. 2,3-DPG'nin Pirüvat Kinaz Aktivitesi Üzerine Etkisi Eritrosit

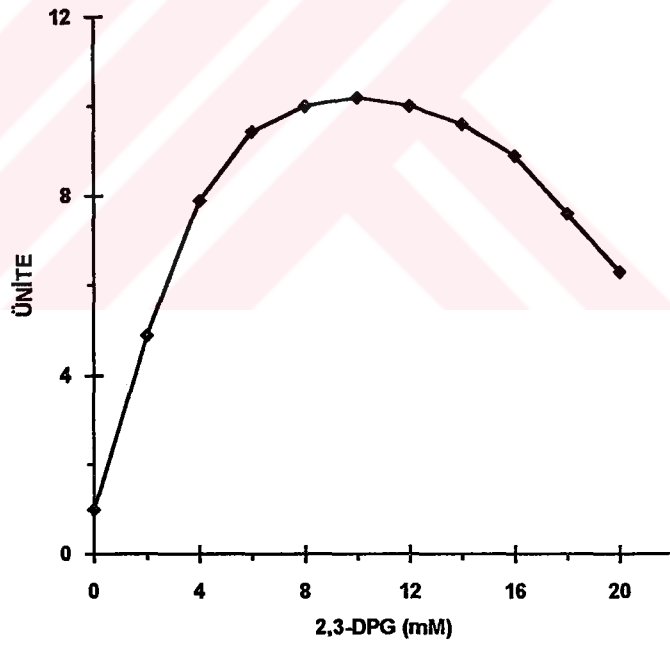
2,3-DPG konsantrasyonu artışına bağlı olarak eritrosit pirüvat kinaz aktivitesinin başlangıçta arttığı daha sonra azaldığı görüldü. Şekil 36'da görüldüğü gibi enzim aktivitesini 5.5 mM 2,3-DPG konsantrasyonunda % 88.6 oranında aktive ederken, 16 mM 2,3-DPG konsantrasyonunda ise % 25 oranında inhibe ettiği bulundu.

Karaciğer

2-18 mM arasında değişen konsantrasyonlarda 2,3-DPG enzim aktivitesi üzerine etkisi incelendi. Şekil 37'de görüldüğü gibi 8 mM 2,3-DPG'nin karaciğer pirüvat kinaz aktivitesini % 20 oranında artırdığı saptandı.



Şekil 36 : Eritrosit Pirüvat Kinaz Aktivitesi Üzerine 2,3-DPG'nin Etkisi



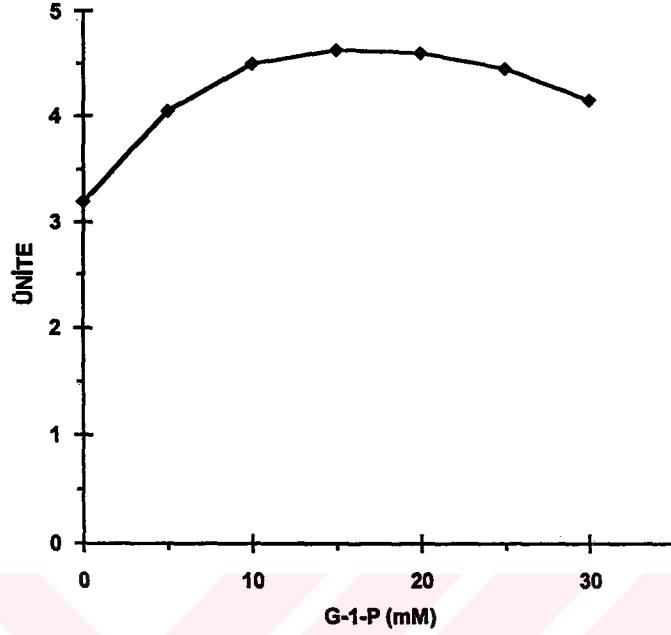
Şekil 37 : Karaciğer Pirüvat Kinaz Aktivitesi Üzerine 2,3-DPG'nin Etkisi

IV. B. 12. G-1-P'in Pirüvat Kinaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Eritrosit

G-1-P'in eritrosit pirüvat kinaz enzimi üzerine etkisi araştırıldı. Optimal pirüvat konsantrasyonu üzerine 15mM konsantrasyonda G-1-P ilave

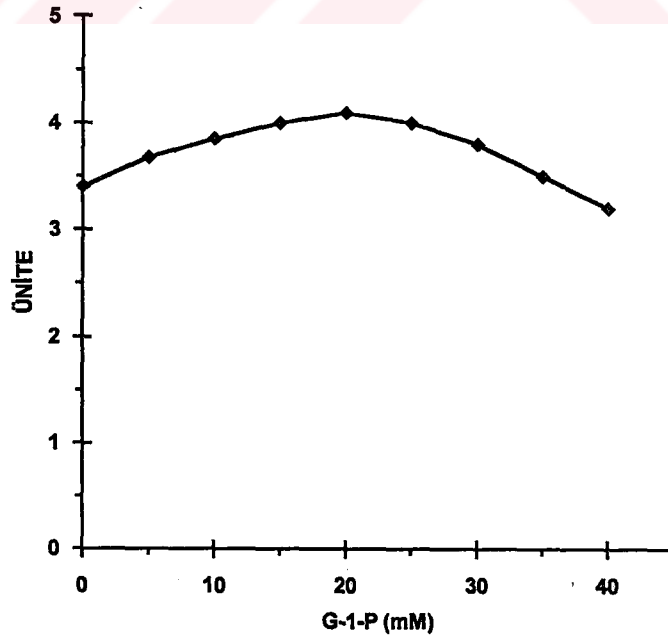
edildiğinde, Şekil 38'de olduğu gibi G-1-P'in eritrosit enzim aktivitesini % 44.6 oranında artırdığı görüldü.



Şekil 38 : G-1-P'in Eritrosit Pirüvat Kinaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Karaciğer

Şekil 39'da görüldüğü gibi 20 mM G-1-P'in karaciğer doku pirüvat kinaz aktivitesini % 20.6 oranında artırdığı görüldü.

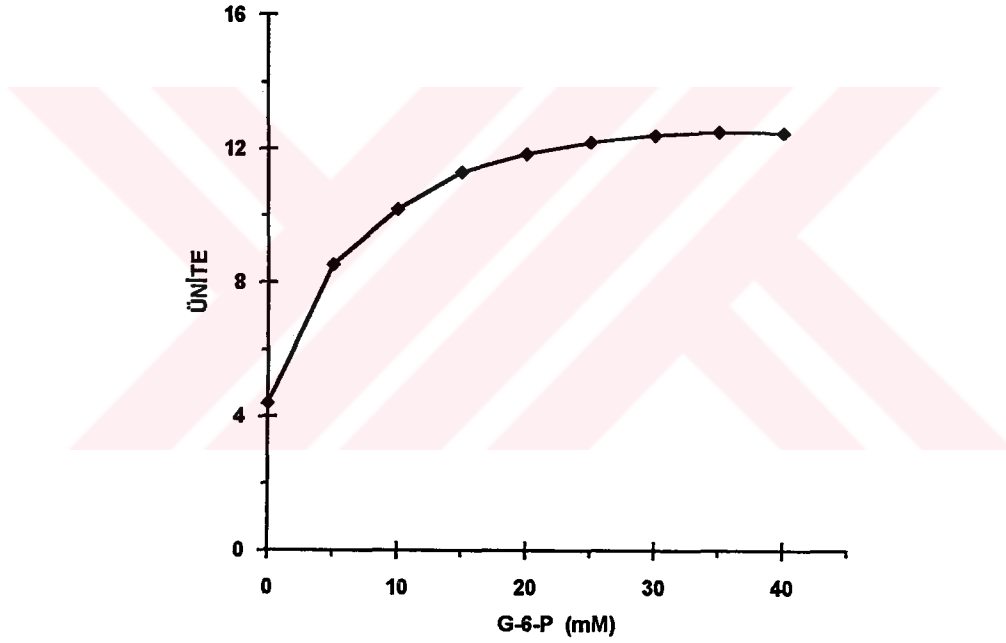


Şekil 39 : G-1-P'in Karaciğer Pirüvat Kinaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

IV. B. 13. G-6-P'in Pirüvat Kinaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Eritrosit

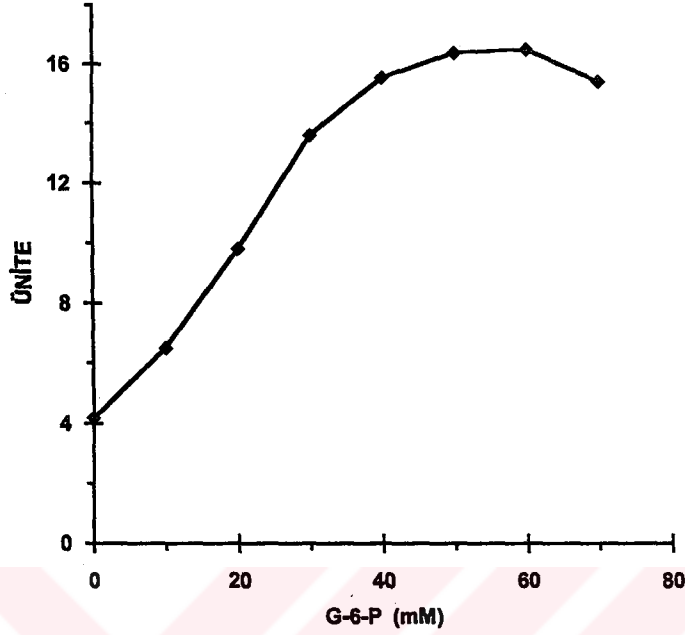
Eritrosit için saptanan optimum PEP konsantrasyonu üzerine artan konsantrasyonlarda G-6-P ilave edildiğinde, şekil 40'da görüldüğü gibi 25 mM konsantrasyonda G-6-P'in eritrosit pirüvat kinaz aktivitesini 2.8 kat artırdığı saptandı.



Şekil 40 : G-6-P'in Eritrosit Pirüvat Kinaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Karaciğer

Şekil 41'de görüldüğü gibi G-6-P karaciğer pirüvat kinaz aktivitesini artırmaktadır. 50 mM G-6-P konsantrasyonunun pirüvat kinaz aktivitesini yaklaşık olarak 3.9 kat artırdığı bulundu.



Şekil 41 : G-6-P'nin Karaciğer Pirüvat Kinaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

IV. B. 14. İnsülinin Pirüvat Kinaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

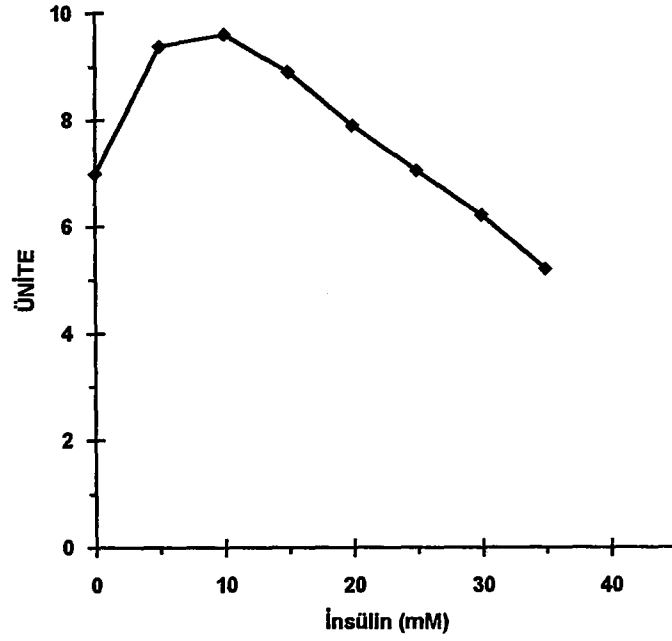
İnsülinin pirüvat kinaz aktivitesi üzerine olan etkisini incelemek amacıyla farklı konsantrasyonlarda insülin çözeltisi inkübasyon ortamına ilave edilerek enzim aktivitesi tayin edildi.

Eritrosit

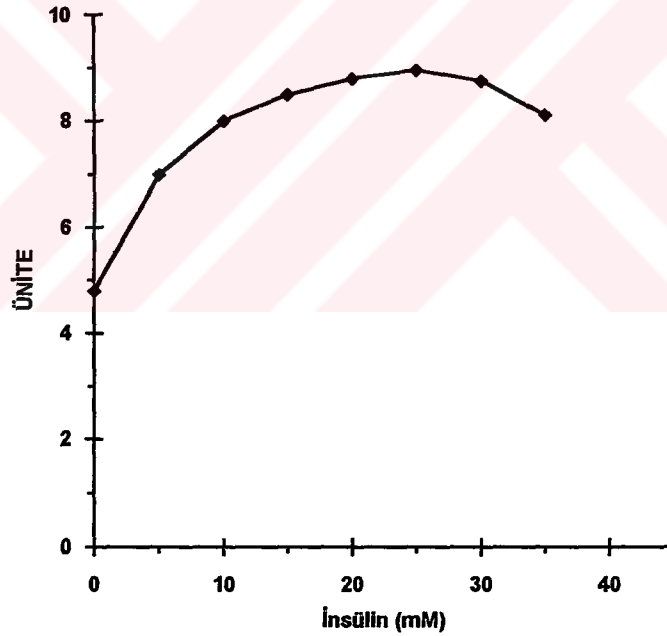
Optimal PEP konsantrasyonu üzerine artan konsantrasyonlarda insülin ilave edildi. Şekil 42'de görüldüğü gibi; 10 mM konsantrasyondaki insülin eritrosit enzim aktivitesini % 37.1 oranında aktive eder iken, 30 mM konsantrasyondaki insülinin ise enzim aktivitesini % 11.4 oranında inhibe ettiği saptandı.

Karaciğer

Şekil 44'de olduğu gibi 20 mM insülin varlığında pirüvat kinaz aktivitesinde bir artış görüldü. Bu artışın ise yaklaşık % 83.3 dolayında olduğu elde edilen verilerden anlaşıldı.



Şekil 42 : Eritrosit Pirüvat Kinaz Aktivitesine İnsülinin Etkisi



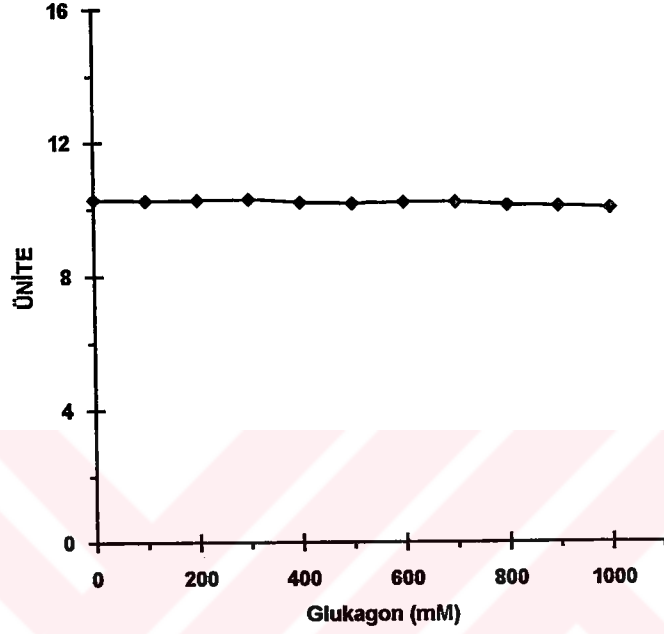
Şekil 43 : Karaciğer Pirüvat Kinaz Aktivitesi Üzerine İnsülinin Etkisi

IV. B. 15. Glukagonun Pirüvat Kinaz Aktivitesi Üzerine Etkisi Eritrosit

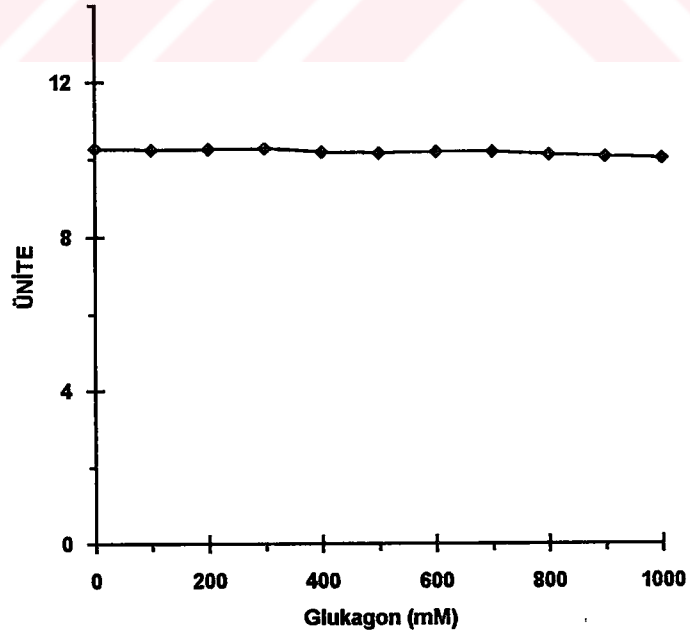
Optimum PEP konsantrasyonu üzerine artan konsantrasyonlarda glukagon ilave edildiğinde, şekil 44'de olduğu gibi eritrosit pirüvat kinaz enzim aktivitesinde herhangi bir değişimin meydana gelmediği görüldü.

Karaciğer

Karaciğer için saptanan optimal şartlarda glukagon inkübasyon ortamına in vitro olarak ilave edildiğinde, glukagonun karaciğer pirüvat kinaz enzim aktivitesinde bir değişiklik meydana getirmediği şekil 45'de görüldü.



Şekil 44 : Eritrosit Pirüvat Kinaz Aktivitesi Üzerine Glukagonun Etkisi

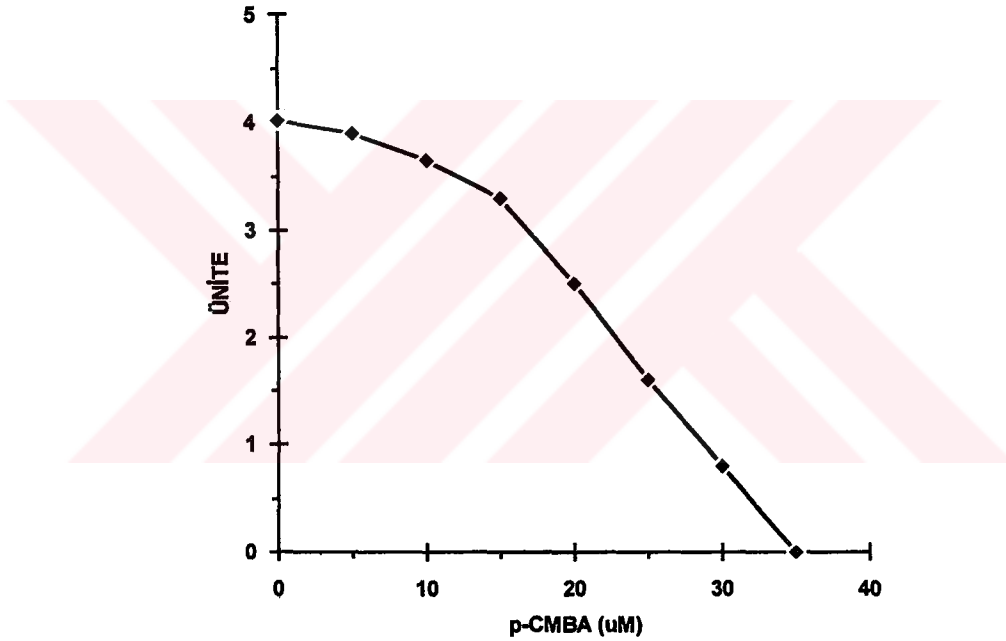


Şekil 45 : Karaciğer Pirüvat Kinaz Aktivitesi Üzerine Glukagonun Etkisi

IV. B. 16. p-Kloromerküri Benzoik Asitin (p-CMBA) Pirüvat Kinaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Eritrosit

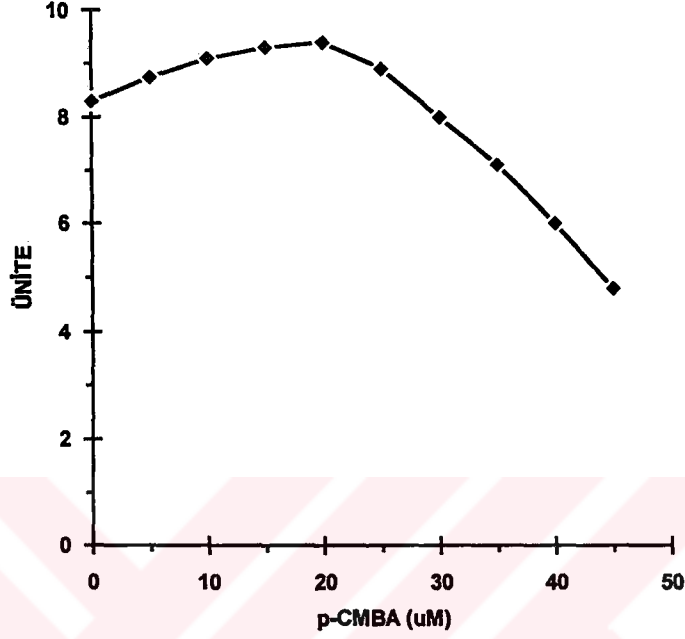
Enzim aktivitesi için gerekli sülfidril (-SH) gruplarının varlığını saptamak amacı ile 2.5 μM ile 40 μM arasında değişen konsantrasyonlarda p-CMBA'in eritrosit pirüvat kinazı üzerine etkisi incelendi. Şekil 46'da görüldüğü gibi 25 μM p-CMBA'in enzim aktivitesini % 61.6 oranında inhibe ettiği bulundu.



Şekil 46 : p-CMBA'in Eritrosit Pirüvat Kinaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

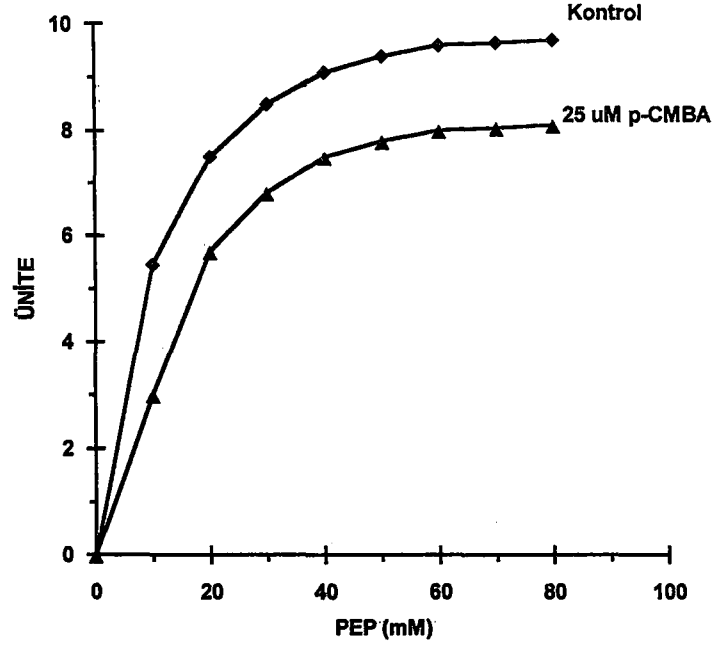
Karaciğer

p-Kloromerküri benzoik asidin karaciğer pirüvat kinaz aktivitesi üzerine etkisini araştırmak için 5-40 μM arasında değişen konsantrasyonlarda p-kloromerküri benzoik asit ortama ilave edilerek pirüvat kinaz aktivitesi ölçüldü. Şekil 47'de görüldüğü gibi 40 μM p-Kloromerküri benzoik asidin karaciğer enzim aktivitesini % 34.2 oranında inhibe ettiği görüldü.

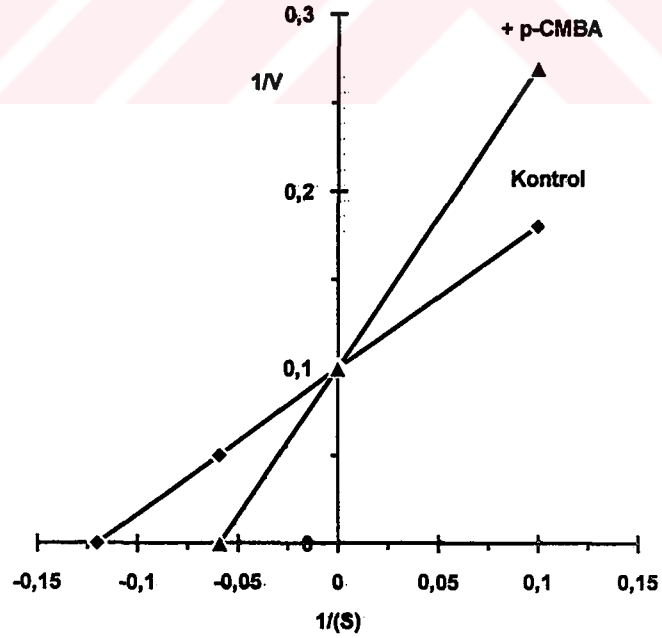


Şekil 47 : p-CMBA'in Karaciğer Pirüvat Kinaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

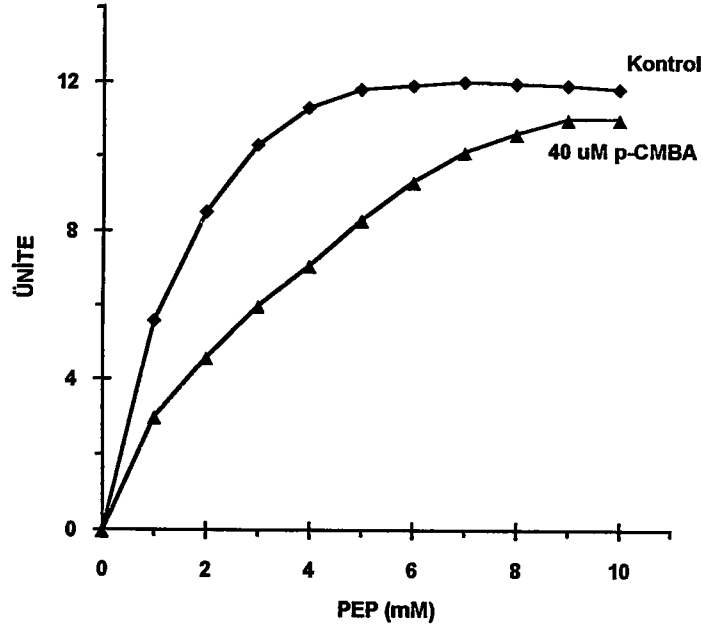
p-CMBA'in yaptığı inhibisyonun tipini belirleyebilmek için pirüvat kinaz aktivitesi değişen PEP konsantrasyonlarında eritrositte 25 μ M, karaciğerde 40 μ M p-CMBA varlığında ölçüldü. Sonuçlar Michaelis-Menten ve Liewear-Burk yöntemi ile değerlendirildi (Şekil 48-53). Belirlenen konsantrasyonlarda p-CMBA varlığında enzimin V_{max} 'ının değişmediği buna karşılık K_m 'inin arttığı bulundu. Eritrositte enzimin PEP'e karşı K_m 'inin 17 mM, karaciğerde ise 2.63 mM civarında olduğu belirlendi ve p-CMBA'in enzimi kompetitif olarak inhibe ettiği saptandı.



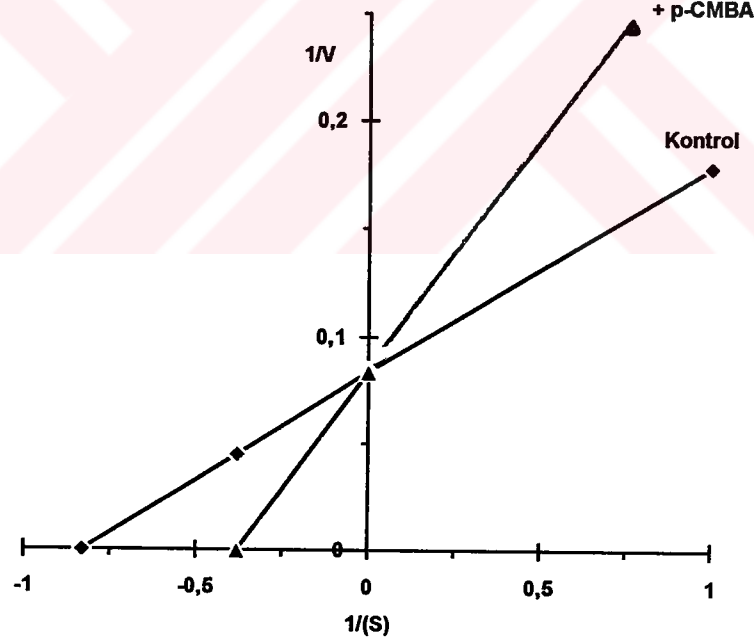
Şekil 48 : p-CMBA'in Eritrosit Pirüvat Kinazı Üzerine İnhibisyonunun Michaelis-Menten Yöntemi ile Saptanması



Şekil 49 : p-CMBA'in Eritrosit Pirüvat Kinazı Üzerine İnhibisyonunun Lineweaver-Burk Yöntemi ile Saptanması



Şekil 50 : p-CMBA'in Karaciğer Pirüvat Kinazı Üzerine İnhibisyonunun Michaelis-Menten Yöntemi ile Saptanması



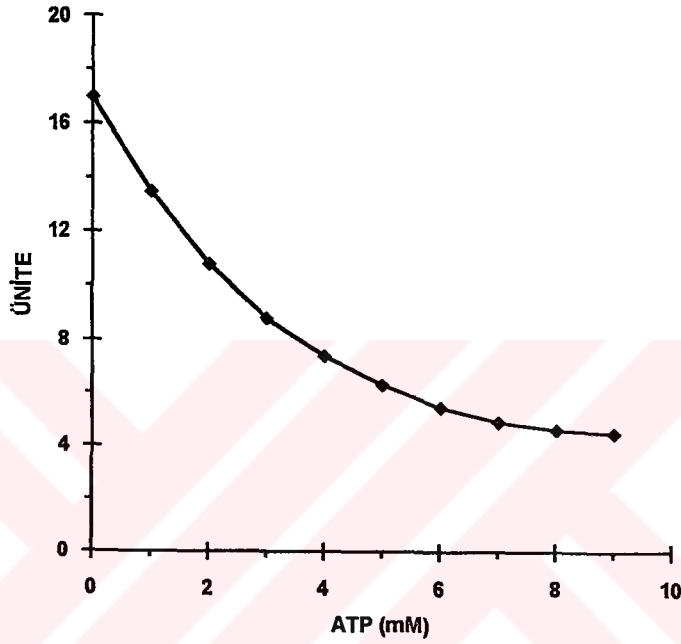
Şekil 51 : p-CMBA'in Karaciğer Pirüvat Kinazı Üzerine İnhibisyonunun Lineweaver-Burk Yöntemi ile Saptanması

IV. B. 17. ATP'nin Pirüvat Kinaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

ATP'nin pirüvat kinazın nonkompetitif inhibitörü olduğu bilinmektedir. Bu amaçla ATP'nin pirüvat kinaza olan etkisi araştırıldı.

Eritrosit

Değişen konsantrasyonlardaki ATP'nin eritrosit pirüvat kinaz aktivitesi üzerine etkisi araştırıldı. Bu amaçla 0.4-3 mM arasında değişen konsantrasyonlarda ATP kullanıldı. Şekil 52'de görüldüğü gibi eritrosit pirüvat kinaz aktivitesini 2 mM ATP'nin % 36.5, 7 mM ATP'nin ise % 71.2 oranında inhibisyona uğrattığı saptandı.

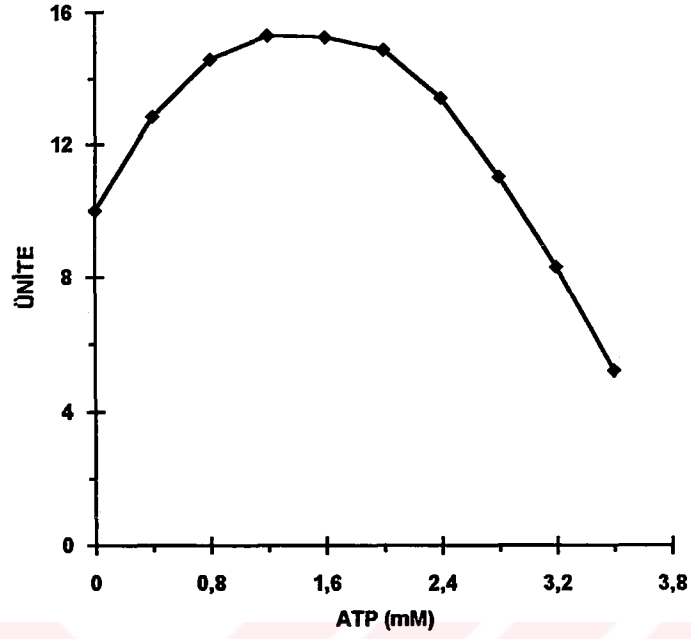


Şekil 52 : ATP'nin Eritrosit Pirüvat Kinaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

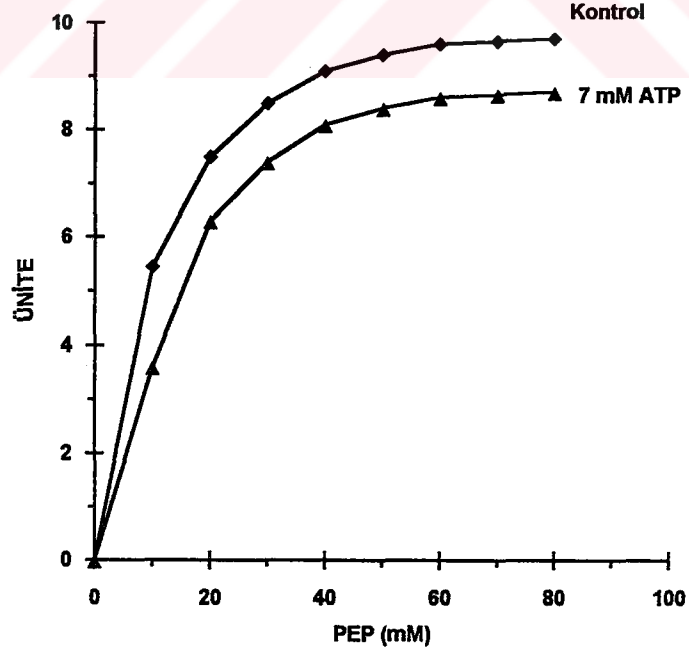
Karaciğer

ATP'nin karaciğer pirüvat kinaz aktivitesi üzerine etkisi şekil 53'de görülmektedir. ATP'nin pirüvat kinaz aktivitesi üzerine etkisinin ATP konsantrasyonuna bağlı olduğu görülmektedir. 1 mM ATP varlığında enzim aktivitesinin 1.51 kat arttığı, 3 mM ATP varlığında ise enzim aktivitesinin 0.94 kat azaldığı saptandı.

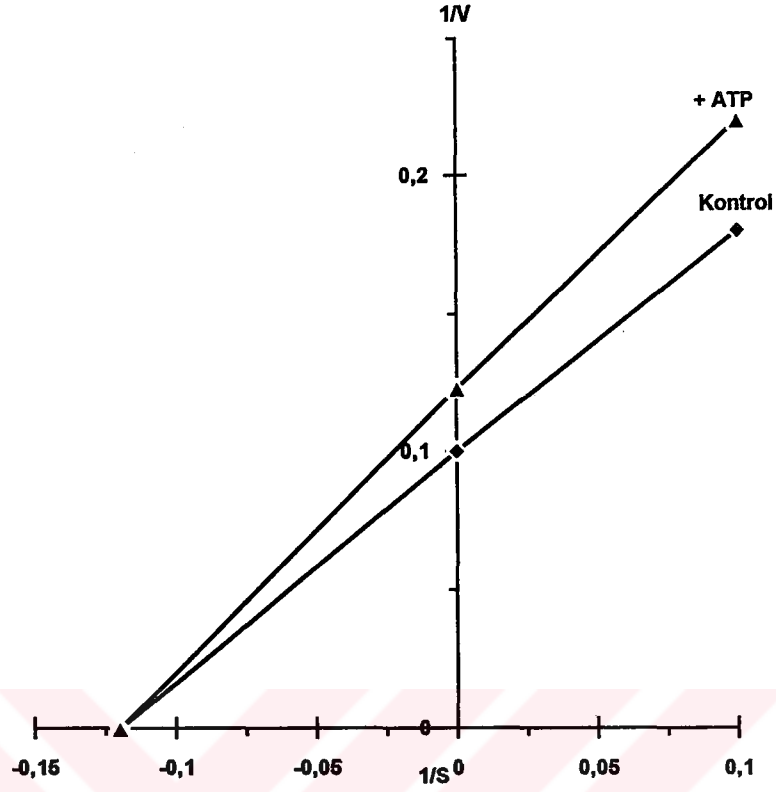
ATP'nin neden olduğu inhibisyon tipini belirlemek amacı ile; eritrosit pirüvat kinaz aktivitesi 7 mM ATP varlığında, karaciğer pirüvat kinaz aktivitesi 3 mM ATP varlığında artan PEP konsantrasyonlarında tayin edildi. Sonuçlar Michaelis-Menten, Linewear-Burk kinetik yöntemleri ile değerlendirildi. Şekil 55 ve 57'de görüldüğü gibi ATP varlığında enzimin V_{max} 'ının değiştiği fakat K_m 'inin değişmediği bulundu. Eritrositte enzimin PEP'e karşı K_m 'nin 8.5 mM, karaciğerde ise 1.2 mM civarında olduğu bulundu ve ATP'nin enzimi nonkompetitif olarak inhibe ettiği saptandı.



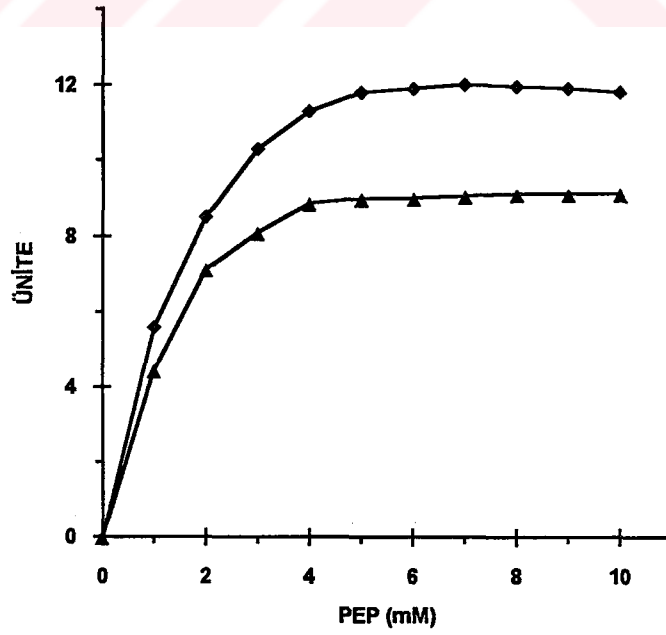
Şekil 53 : ATP'nin Karaciğer Pirüvat Kinaz Aktivitesi Üzerine Etkisi



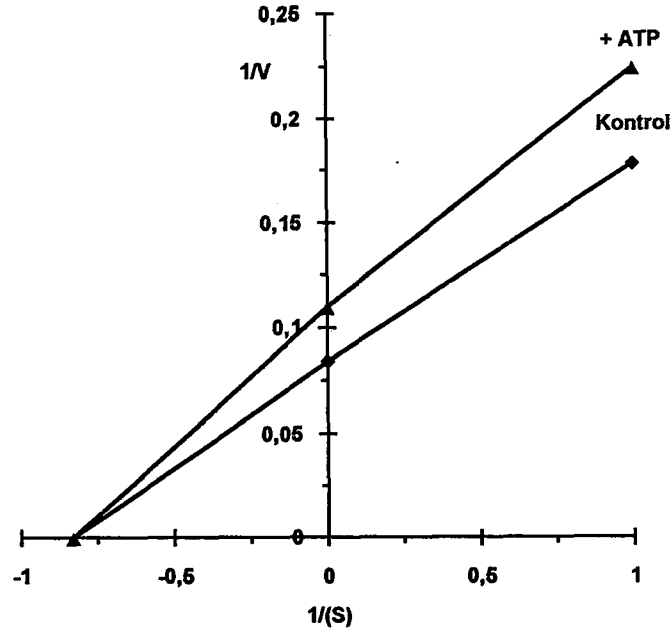
Şekil 54 : ATP'nin Eritrosit Pirüvat Kinazı Üzerine İnhibisyonunun Michaelis-Menten Yöntemi ile Saptanması



Şekil 55 : ATP'nin Eritrosit Pirüvat Kinazı Üzerine İnhibisyonununun Lineweaver-Burk Yöntemi ile Saptanması



Şekil 56 : ATP'nin Karaciğer Pirüvat Kinazı Üzerine İnhibisyonununun Michaelis Menten Yöntemi ile Saptanması



Şekil 57 : ATP'nin Karaciğer Pirüvat Kinazı Üzerine İnhibisyonununun Lineweaver-Burk Yöntemi ile Saptanması

IV. B. 18. CaCl₂'ün Pirüvat Kinaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

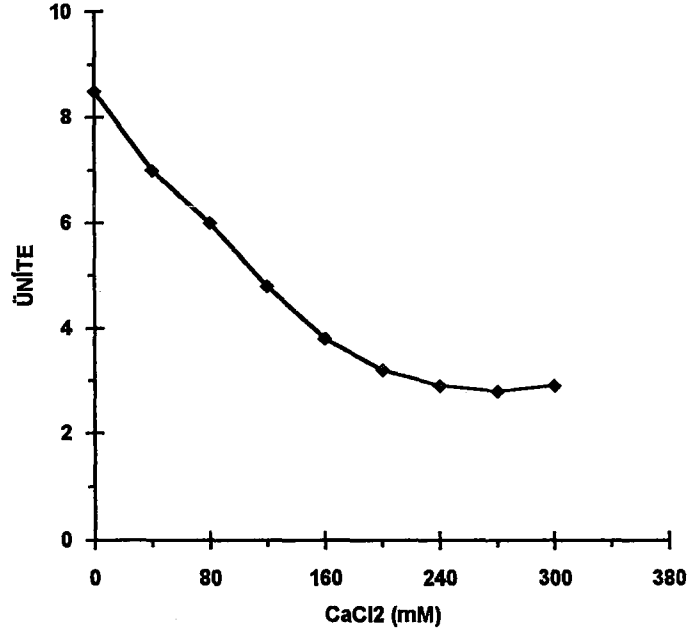
Sabit optimal PEP konsantrasyonuna farklı konsantrasyonlarda CaCl₂ ilave edildi ve sonuçlar aşağıdaki grafiklerle şekillendirildi.

Eritrosit

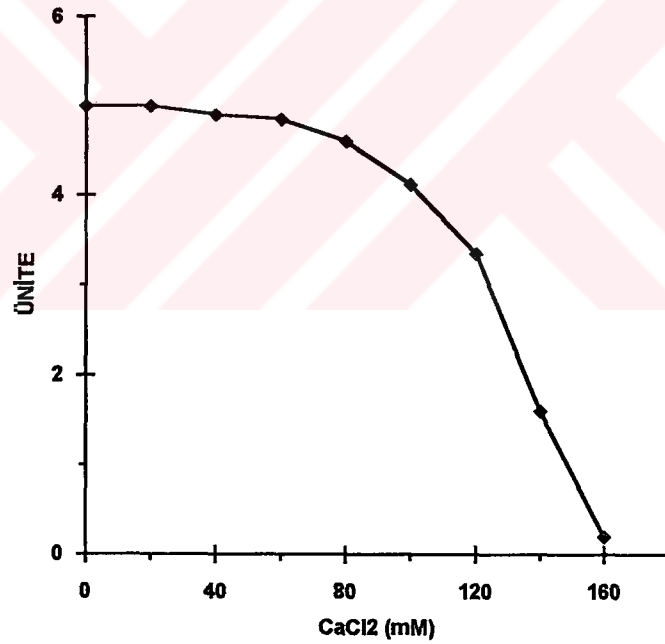
20 mM ile 300 mM arasında değişen konsantrasyonlarda CaCl₂'ün eritrosit pirüvat kinaz aktivitesi üzerine etkisi incelendi. Şekil 58'de görüldüğü gibi CaCl₂'ün enzim aktivitesini 40 mM konsantrasyonda % 17.7, 200 mM CaCl₂ konsantrasyonunda ise % 62.4 oranında inhibe ettiği saptandı.

Karaciğer

20mM ile 160 mM arasında değişen konsantrasyonlarda CaCl₂'ün karaciğer pirüvat kinaz aktivitesi üzerine etkisi şekil 59'da gösterildi. İnkübasyon ortamına farklı konsantrasyonlarda CaCl₂ ilave edildiğinde, CaCl₂'ün 80 mM konsantrasyona kadar enzim aktivitesini etkilemediği, 80 mM'den sonra inhibitör olarak etki ettiği görüldü. 140 mM konsantrasyonda ise enzim aktivitesini 27.5 kat inhibe ettiği saptandı.

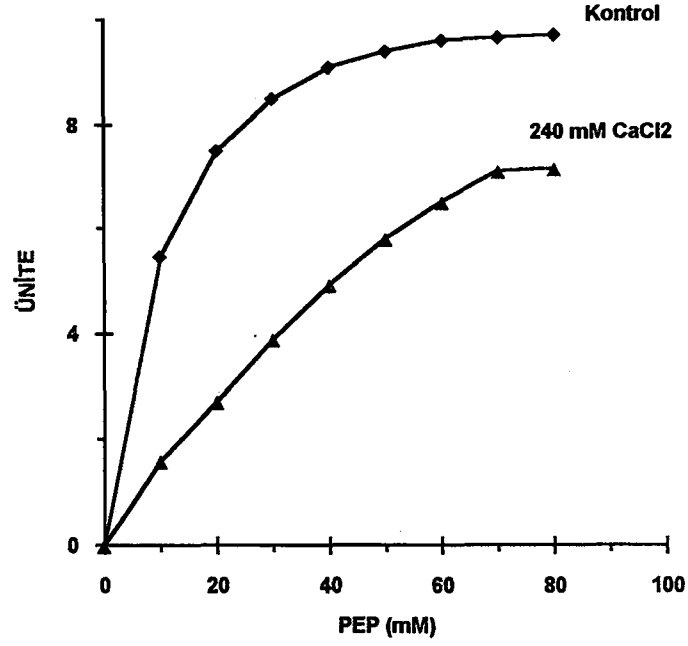


Şekil 58 : CaCl₂'ün Eritrosit Pirüvat Kinaz Enzimi Üzerine Etkisi

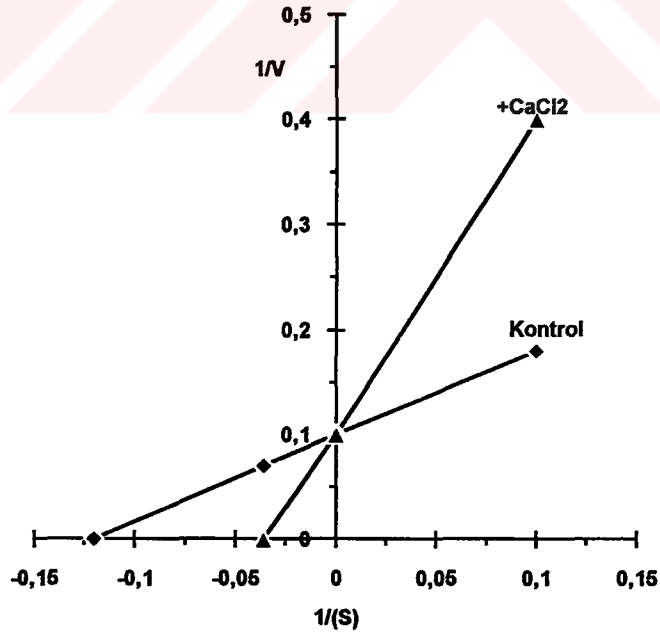


Şekil 59 : CaCl₂'nin Karaciğer Pirüvat Kinaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

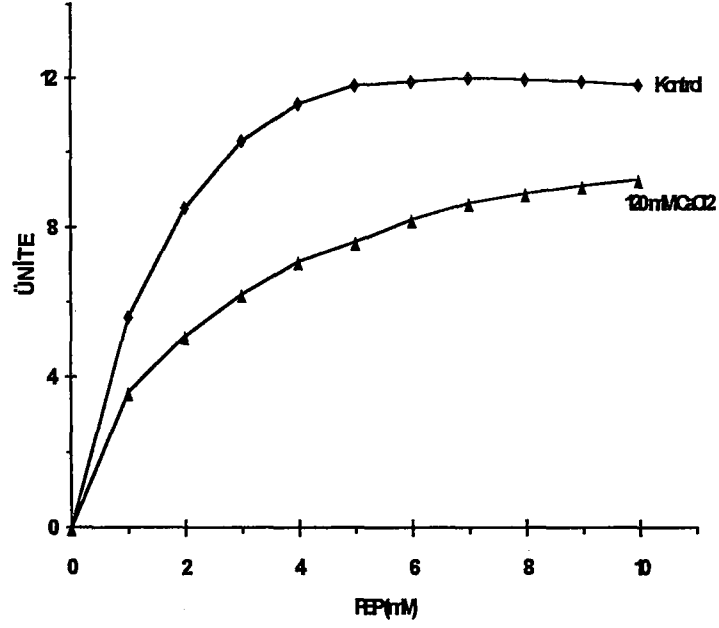
CaCl₂'ün inhibisyon tipini belirlemek amacı ile; eritrositte 240 mM, karaciğerde 120 mM CaCl₂ varlığında değişen PEP konsantrasyonlarında enzim aktivitesi tayin edildi. Sonuçlar Michaelis-Menten kinetik yöntemleri ile değerlendirildi (Şekil 60-62). CaCl₂'ün varlığında enzimin V_{max}'ının değişmediği fakat K_m'inin büyüdüğü saptandı ve CaCl₂'ün karaciğer pirüvat kinaz enzimini kompetitif olarak inhibe ettiği bulundu.



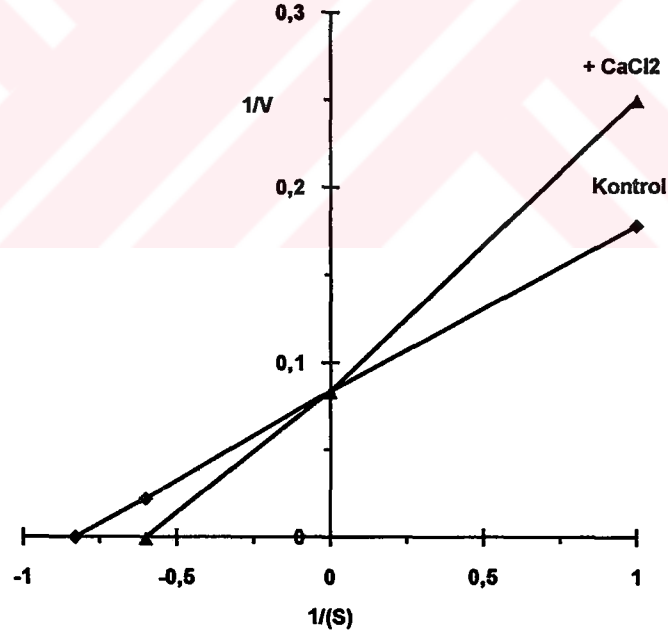
Şekil 60 : CaCl₂'ün Eritrosit Pirüvat Kinazı Üzerine İnhibisyonunun Michaelis-Menten Yöntemi ile Saptanması



Şekil 61 : CaCl₂'ün Eritrosit Pirüvat Kinazı Üzerine İnhibisyonunun Lineweaver-Burk Yöntemi ile Saptanması



Şekil 62 : CaCl₂'ün Karaciğer Pirüvat Kinazı Üzerine İnhibisyonunun Michaelis Menten Yöntemi ile Saptanması

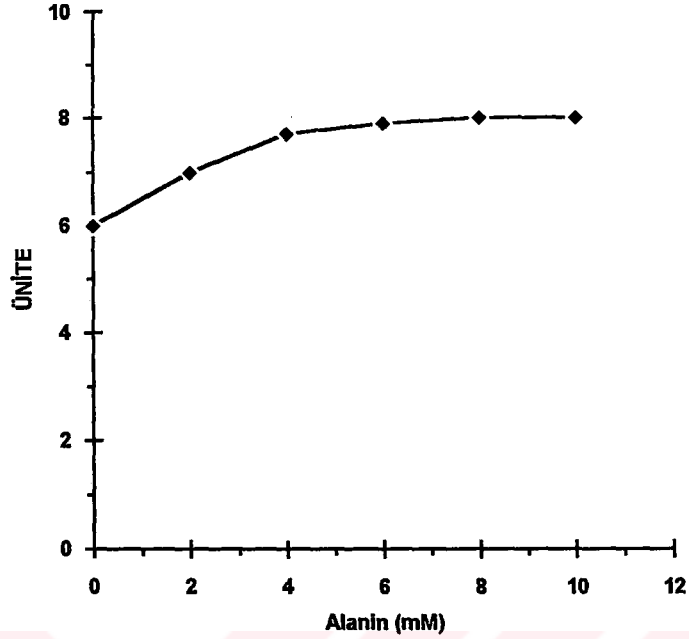


Şekil 63 : CaCl₂'ün Karaciğer Pirüvat Kinazı Üzerine İnhibisyonununun Lineweaver-Burk Yöntemi ile Saptanması

IV. B. 19. Alaninin Pirüvat Kinaz Aktivitesi Üzerine Etkisi Eritrosit

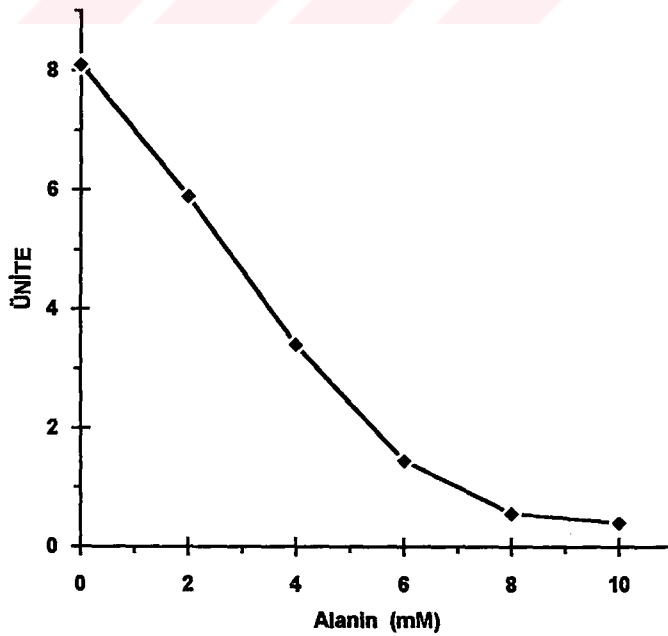
1 mM ile 10 mM arasında değişen konsantrasyonlarda alaninin eritrosit pirüvat kinaz aktivitesi üzerine etkisi şekil 64'de gösterildi. Şekilde görüldüğü

gibi alaninin eritrosit pirüvat kinazı üzerine önemli bir etkisi görülmedi.



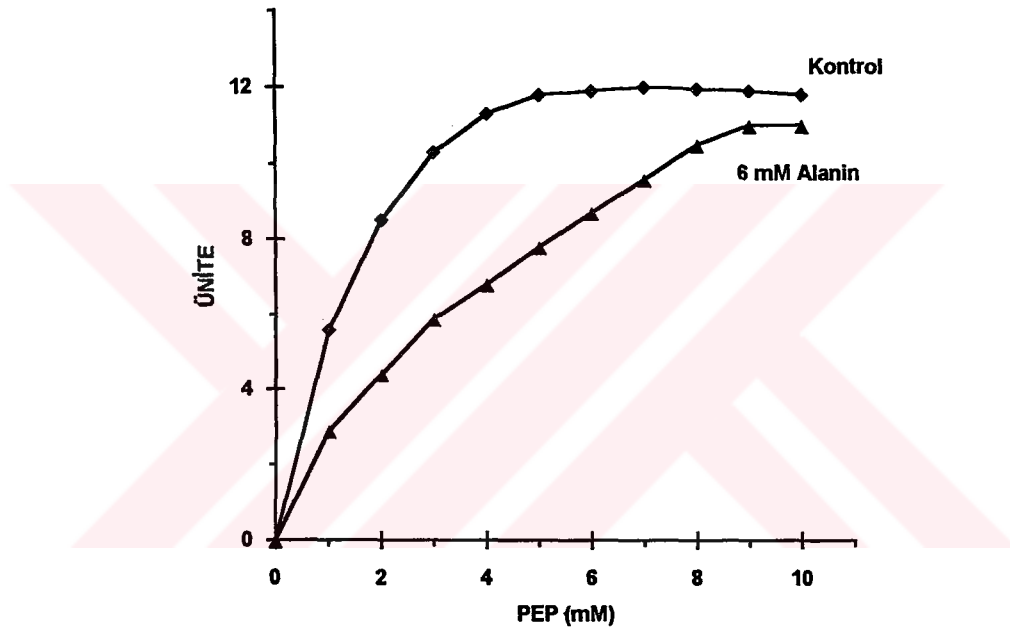
**Şekil 64 : Alaninin Eritrosit Pirüvat Kinaz Aktivitesi Üzerine Etkisi
Karaciğer**

Reaksiyon karışımındaki PEP konsantrasyonu sabit tutulup karışıma muhtelif konsantrasyonlarda alanin ilave edildiğinde şekil 65'de olduğu gibi alaninin bir inhibitör olarak davrandığı görülmektedir. Enzim aktivitesini 2 mM alanin % 11.1 oranında, 8 mM alanin ise % 92.6 oranında inhibe etmiştir.

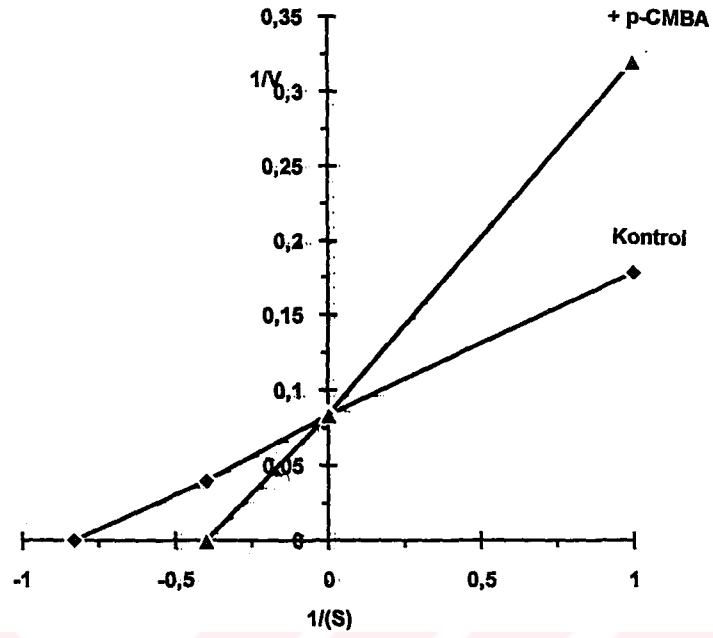


Şekil 65 : Alaninin Karaciğer Pirüvat Kinaz Enzimi Üzerine Etkisi

Alaninin neden olduğu inhibisyon tipini belirlemek için pirüvat kinaz aktivitesi farklı PEP konsantrasyonlarında 6 mM alanin varlığında ölçüldü. Sonuçlar Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk yöntemi ile değerlendirildi (Şekil 66-67). Her iki yöntem ile değerlendirme sonucunda alaninin kesin bir inhibisyon yaptığı görüldü. Şekil 67'de kontrol eğrisinin Km değeri 1.2 mM civarında iken alaninin sebep olduğu inhibisyon dolayısıyla Km değerinin 2.7 mM civarına yükseldiği görülmektedir.



Şekil 66 : Alaninin Karaciğer Pirüvat Kinazı Üzerine İnhibisyonunun Michaelis-Menten Yöntemi ile Saptanması



Şekil 67 : Alaninin Karaciğer Pirüvat Kinazı Üzerine İnhibisyonununun Lineweaver-Burk Yöntemi ile Saptanması

V. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada; eritrosit ve karaciğer dokusunda pirüvat kinazın varlığı saptanarak enzimin kinetik özelliklerinin tespiti amaçlanmıştır.

V. 1. Saflaştırma

Karaciğer pirüvat kinaz enzimi (% 20, % 40, % 70) amonyum sülfat ile çöktürülerek dializ edildi ve sephadex G-200 kolon kromatografisi kullanılarak % 13.2 verimle 26.3 kat saflaştırıldı. Bu aşamalar sonunda spesifik aktivitesi 2.6 U/mg protein olan kısmen saf pirüvat kinaz elde edildi. SDS jel elektroforezde, uygulanan saflaştırma ile karaciğer subünitesinin 2 banda kadar indiği görüldü. Birinci band albumin bandı, ikinci band ise saflaştırılmış pirüvat kinaz bandıdır.

Saflaştırılmış insan eritrosit pirüvat kinazının SDS-PAGE'de tek bir band gösterdiği ve takriben 57.000 dalton olan 4 benzer subüniteden meydana geldiği açıklanmıştır (28,39).

Calomenopoulou ve ark. (15) da güvercin eritrosit pirüvat kinazında benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Saflaştırılmış eritrosit pirüvat kinazının kinetik özelliklerinin memeli eritrosit pirüvat kinazının kinetik özelliklerine çok benzediği saptanmıştır.

Kedryna ve ark. (43), iki tip pirüvat kinaz fraksiyonu ayırmışlardır. Fraksiyon A % 21-30 arasında , fraksiyon B % 51-60 arasında amonyum sülfatla çöktürülmüştür. Saptanan karaciğer pirüvat kinazının A ve B fraksiyonu sırası ile L ve M-tip olarak kabul edilir. Kas ve tümörde bulunan fraksiyon B, M₁ ve M₂-tipe benzetilebilir. Fraksiyon A kas ve tümörde çok az miktarda bulunur.

Diğer araştırmacılar, insan eritrosit pirüvat kinazının denatüre şartlar altında iki ayrılmış band gösterdiğini bulmuşlardır (38). Kedryna ve ark. (43) tarafından Erlich asit tümöründen pirüvat kinaz saflaştırmasında (% 21-% 51) amonyum sülfat presipitasyonu, Sephadex G-25 jel elemesi ve iyon değiştirme kromatografisi kullanıldığında ölü hacimde K₃M, K₂M₂, KM₃, M₄'ün elüe olduğu gösterilmiştir. K₄ ise kolondan tuz gradienti kullanılarak elüe edilmiştir.

Terlecki (100), elektroforez ile ilgili olarak yaptığı çalışmalarda, sıgır beyin pirüvat kinazını % 38 ürünle 241 kat saflaştırmış ve spesifik aktivite 217 U/mg protein olarak bulmuştur. Saflaştırılmış enzimin disk SDS elektroforezin

hem varlığında hem de yokluğunda tek bir band verdiğini göstermiştir. Çok saflaşmış fraksiyonda gözlenen belirsiz bandların enzimin proteolitik veya oksidatif modifikasyonlarından ziyade muhtemelen protein kontaminantları olduğu ileri sürülmüştür.

Kösebalaban (48), asit kesitlemesi Sephadex G-25 jel elemesi ve iyon değiştirme kromatografisi kullanarak (% 60 verim ve 62 U/mg'lık özgül etkinlikle) plasental pirüvat kinazı saflaştırmıştır. Enzimi kromatofokuslama ile daha iyi saflaştırmaya çalışmış fakat polybuffer'da bulunan bir tampon bileşeni nedeni ile enzim inaktive edildiği için bu mümkün olmamıştır.

V. 2. Enzim Aktivasyonunun İnkübasyon Zamanına Bağlı Olarak Değişimi

Enzimatik reaksiyonlar vücut ısısında cereyan ettiğinden inkübasyon ısı 37 °C olarak alındı ve bu ısıda sürenin enzim aktivitesini nasıl etkilediği ve ideal sürenin kaç dakika olabileceği araştırıldı.

Eritrosit pirüvat kinaz aktivitesinin inkübasyon ortamında zamana bağlı olarak azaldığı saptandı (Şekil 10). Bu nedenle eritrosit pirüvat kinazı için inkübasyon süresinin 10 dakika olarak alınması uygun görüldü.

Karaciğer pirüvat kinaz aktivitesi için yapılan çalışmada elde edilen veriler grafiğe uygulandığında şekil 11'den anlaşılacağı gibi enzim aktivitesi 10 dakikaya kadar doğrusal bir artış göstermektedir. Bu doğrusallık göz önünde bulundurularak inkübasyon süresi karaciğer için 5 dakika olarak alındı ve hesaplar buna göre yapıldı.

Beutler ve ark. (10), eritrosit pirüvat kinazı için bu süreyi 10 dakika, Wimmer ve ark. (104) ise bu süreyi karaciğer dokusu için 30 dakika olarak almıştır.

Eritrosit için belirlenen inkübasyon zamanı Beutler'in bulguları ile benzerlik göstermektedir. İnkübasyon süresi kullanılan metoda göre değişiklik gösterebildiğinden bu süre araştırmacı tarafından ayarlanabilme özelliğindedir.

V. 3. pH'nın Pirüvat Kinaz Aktivitesine Etkisi

Pirüvat kinaz aktivitesinin tayininde pH'nın tesbiti uygun tampon seçimi ile birlikte yapıldı. Bu amaçla Tris-HCl, K_2HPO_4 / KH_2PO_4 , glisin-NaOH tampon sistemleri ile pH taraması eritrosit ve karaciğer dokusu için ayrı ayrı çalışıldı. Bu çalışmada eritrosit için optimal pH değeri 8 ve karaciğer dokusu için ise optimal pH değeri 7.4 olarak bulundu (Şekil 12-14). Belirlenen bu optimal pH derecesi diğer doku pirüvat kinazları için belirlenmiş olan pH değerleri ile benzerlik göstermektedir.

Pirüvat kinaz enziminin optimal pH'sı birçok dokuda çalışılmıştır. Pirüvat kinaz için gerekli optimal pH'nın doku türüne göre değiştiği ve bu pH'nın 6.5-8.5 arasındaki pH sınırları içinde olduğu bildirilmiştir (43,100).

Pirüvat kinaz enzimi ölçümünde araştırmacılar farklı tampon sistemleri kullanmışlardır. Wimmer ve ark. (104), K_2HPO_4 / KH_2PO_4 tampon sistemini kullanmış ve insan karaciğer doku pirüvat kinazının pH 7.5 civarında aktivite gösterdiğini tesbit etmişlerdir. Peliska ve O'Leary (78) ise HEPES tampon sistemini (pH 7.5) kullanmışlardır.

Singh ve Rogers (93) yaptıkları çalışmada Tris-HCl tamponu kullanmışlar ve enzimin pH 5-10 arasında aktif olduğunu saptamışlardır. FDP varlığında maksimum aktivite pH 7'de saptanmış ve inorganik fosfat ilavesinin eğriyi değiştirmedini ve aktivite için optimal pH'nın aynı kaldığını bulmuşlardır. 2.5 mM ATP'nin optimal pH değerini artırdığını, daha yüksek konsantrasyondaki ATP'nin ise pH değerini fazla etkilemediğini tespit etmişlerdir.

Karaciğerde; Kahn ve Boivin (38) Tris-HCl tamponu (pH 8), Cuenllas ve ark. (18) Tris-Maleat tamponunu (pH 6.9) kullanmışlardır. İnsan fetal karaciğer dokusunda Sadava ve ark. (88) yaptığı çalışmada tampon olarak triethanolamin (TEA) kullanılmış ve pirüvat kinazın optimal pH 7.6 olarak bulunmuşlardır.

Kedryna ve ark. (43) rat karaciğer ve iskelet kası pirüvat kinaz enzimi için en uygun tamponun Tris-HCl tamponu olduğunu tespit etmişlerdir.

Terlecki (100), triethanolamin / HCl (pH 7.3) kullanmış ve yaptıkları çalışmada sığır beyni için optimum pH'nın inorganik fosfat varlığında değişmediğini, enzim aktivitesinin önemli olarak arttığını saptamıştır.

Yukarıda verilen örneklere benzer bir çok çalışma araştırmacılar tarafından yapılmıştır. Bizim çalışmamızda kullandığımız tampon sistemi ile tespit ettiğimiz pH değerleri verilen örneklerden de anlaşılacağı gibi, bu konuda yapılan çalışmalar ile uyum içindedir.

V. 4. Metal İyonlarının Pirüvat Kinaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Enzimlerin aktiteleri için gerekli bileşiklere kofaktör denir ve enzimler için kofaktörler mutlak gereklidir. Mg^{++} ve K^+ pirüvat kinazın vazgeçilmez kofaktörleridir. Bu amaçla pirüvat kinaz enzimi için uygun Mg^{++} ve K^+ konsantrasyonu tespiti yapıldı.

Eritrosit ve karaciğer doku pirüvat kinaz aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisi incelendiğinde; eritrosit pirüvat kinaz aktivitesi 100 mM

MgCl₂, 1.6 M KCl iyonları varlığında, karaciğer doku pirüvat kinaz aktivitesi ise 30 mM MgCl₂ ve 10 mM KCl varlığında maksimum aktivite göstermektedir. Bu konuda birçok çalışma yapılmış olup hepsinin ortak noktası Mg⁺⁺ ve K⁺un pirüvat kinaz enzimi için vazgeçilmez olduğudur. Aradaki tek fark çalışmadaki Mg⁺⁺ ve K⁺ iyon konsantrasyonundaki küçük değişikliklerdir.

Rosa ve ark. (85), diğer dokulardaki gibi insan eritrosit pirüvat kinazının da aktivite gösterebilmesi için K⁺ ve Mg⁺⁺ iyonlarına ihtiyaç duyduğunu ileri sürmüşlerdir. Beutler'e (9) göre; K⁺un stimulatör etkisi ADP'nin enzim affinitesi artırılarak oluşur.

K⁺, Mg⁺⁺ ve Ca⁺⁺ iyonlarının amfibia eritrosit pirüvat kinazını aktive, Na⁺ iyonunun ise pirüvat kinaz aktivitesini inhibe ettiği, ayrıca K⁺ iyonun E. coli pirüvat kinazını aktive etmediği yapılan çalışmalar sonucu bulunmuştur (30,39).

Calomenopoulou ve ark. (15) yaptığı bir çalışmada güvercin eritrosit pirüvat kinazında K⁺un stimulatör etkisinin hiperbolik bir eğri gösterdiğini, Mg⁺⁺un hafif olarak sigmoidal (nH:1.15) bir eğri gösterdiğini ve suboptimal konsantrasyonda güvercin eritrosit pirüvat kinazındaki K⁺ ve Mg⁺⁺un pozitif etkisi ile insan ve amfibia eritrosit pirüvat kinazındaki K⁺ ve Mg⁺⁺un pozitif etkisine benzerlik gösterdiğini tesbit etmişlerdir.

Bazı dokular için tespit edilen Mg⁺⁺ iyon konsantrasyonuna baktığımızda bunun insan ve rat karaciğeri için 10 mM, insan eritrositi için 5 mM, güvercin eritrositi için 10 mM, K⁺ iyon konsantrasyonuna baktığımızda insan karaciğeri için 100 mM, sıçan karaciğeri için 115 mM, insan eritrositi için 30 mM, güvercin eritrositi için 80 mM olarak tespit edildiğini görmekteyiz. Bu çalışmalar ile bizim çalışmamız arasında tam bir uyum mevcuttur (15,38,43).

Peliska ve O'Leary (78), pirüvat kinaz aktivite tayininde; 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂ veya 3 mM MnCl₂ iyonlarını kofaktör olarak kullanmışlardır.

Eritrosit pirüvat kinaz aktivitesini, 160 mM MnCl₂ 7.3 kat artırırken, NaCl başlangıçta aktive daha sonra ise inhibe etmiştir. 200 mM CaCl₂ ise % 59.8 oranda inhibe etmiştir.

Karaciğer pirüvat kinaz aktivitesini 60 mM MnCl₂ % 188.9 oranında, 50 mM NaCl % 188 oranında aktive, 140 mM CaCl₂ % 62.7 oranında inhibe etmiştir.

PEP üzerine CaCl₂ ilave edildiğinde şekil 58-59'dan anlaşılacağı gibi pirüvat kinaz enzimi inhibe edilmektedir. Eritrosit pirüvat kinazının PEP'e

karşı olan K_m 'i 8.5 civarında iken $CaCl_2$ 'lü ortamda K_m 'i 23 olmaktadır. Yani enzimin substrata karşı ilgisi azalmaktadır. Şekil 61-63'de $CaCl_2$ 'ün pirüvat kinaz enzimini kompetitif olarak inhibe ettiği görülmektedir.

Ca^{++} iyonu insan eritrosit pirüvat kinazını inhibe eder ve Ca^{++} 'un inhibitör etkisi K^+ ile engellenir. Buna karşılık bir parazit olan *Rana ridibunda* eritrosit pirüvat kinazı Ca^{++} iyonları ile aktive olur. Na^+ iyonları *Rana ridibunda* eritrositinde inhibitör etkiye sahiptir (15,39).

V. 5. Pirüvat Kinazın PEP'e Karşı Olan K_m 'i

Çalışmamızda eritrosit ve karaciğer doku pirüvat kinazının substratına karşı olan ilgisini belirlemek amacıyla K_m 'in sayısal değeri hesaplandı. Eritrosit ile ilgili olarak yapılan çalışmada şekil 26'da görüldüğü gibi 60 mM dan sonra artışın yavaş yavaş doğrusallıktan ayrıldığı ve reaksiyonun sabit hızla ilerlediği, enzimin substratıyla doygun hale geldiği görülmektedir. Eritrosit pirüvat kinazının PEP substratına karşı V_{max} 'ı 9.65 U, K_m 'i ise 4.83 mM olarak bulundu. Karaciğer pirüvat kinazının PEP'e karşı V_{max} 'ının 11.9 U, K_m 'inin 1.2 olduğu saptandı (Şekil 29).

Araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda farklı türdeki enzim kaynaklarında pirüvat kinazı PEP'e karşı olan K_m değerinin değiştiği açıklanmıştır. Terlecki (100) yaptığı çalışmada; sığır ve ratta pirüvat kinazın K_m 'lerini tayin etmişler ve rat beynindeki PEP için K_m değerinin (0.18 mM) sığır beynindekinden daha yüksek olduğunu ve normal Michaelis-Menten kinetiği gösterdiğini bulmuştur.

Sığır beyin pirüvat kinazının PEP ve ADP için normal Michaelis-Menten kinetiği sergilediğini, ADP için K_m değerinin (0.04 mM) tavşan, kobay, rat beynindeki değerlerle paralellik gösterdiğini rapor edilmiştir. Sığır beyin pirüvat kinazının PEP ve ADP konusunda kasdaki pirüvat kinaz gibi davrandığı görülür ve her iki substrat için bulunan Hill katsayısı 1'dir (100).

Calomenopoulou ve ark. (15) tarafından yapılan pirüvat kinaz kinetik çalışmaları, taze hazırlanmış saflaşmamış güvercin eritrositinde enzimin PEP'e karşı sigmoidal bir doygunluk eğrisi gösterdiğini ve K_m değerinin 0.33 mM, Hill katsayısının (n_H) 2 olduğunu, saflaşmış eritrosit pirüvat kinazının substrat için hiperbolik bir eğri gösterdiğini ve K_m değerinin 0.46 mM olduğunu açıklamıştır.

Ehrlich ascites tümör ve iskelet kasdaki pirüvat kinazın fraksiyon A'da PEP için K_m değerleri (sırası ile 0.45 mM, 0.19 mM) karaciğer pirüvat kinazınkinden (0.96 mM) daha düşüktür. Tümör, kas ve karaciğerdeki

pirüvat kinazın fraksiyon B'nin PEP için Km arasında bir ilişki görülmüştür (0.19 mM, 0.25 mM, 0.7 mM) (43).

Kedryna ve ark. (43), fare karaciğerinde yaptığı çalışmada; ham ekstraktın Vmax'ının 402.1 U/g protein, fraksiyon A'nın (% 21-30 amonyum sülfat) Vmax'ının 2411.2 U/g protein, fraksiyon B'nin (% 51-60 amonyum sülfat) Vmax'ının 4412.3 U/g protein olduğunu bulmuşlardır. Km değeri karaciğerde 0.4-2.5 mM, kasda 0.2-0.8 mM civarında saptanmıştır. Kiffmeyer ve Farrar (46), domuz karaciğer ve kalp PK'ının FDP ile aktive olduğunu, kalp enziminin PEP ile hiperbolik kinetik gösterirken, karaciğer enziminin sigmoidal kinetik gösterdiğini saptamıştır. Domuz kalp pirüvat kinazının FDP yokluğunda PEP için Km değerinin 0.1 mM olduğunu ve 1.0 mM FDP varlığında Km değerinin 0.03 mM'e düştüğünü bildirmişlerdir. FDP, özellikle düşük substrat konsantrasyonunda mükemmel bir aktivatör olarak etkir.

Yapılan çalışmalarla; taze saflaştırılmış plasenta pirüvat kinaz enzimi değişken substrat olarak PEP kullanıldığında indirgenmiş olsun olmasın, FDP varlığında ve yokluğunda hiperbolik Michaelis-Menten grafiği vermiştir. Bu bulguların Lineweaver-Burk grafiklenmesi yapıldığında enzimin FDP tarafından aktive edildiği ve PEP için Km'inin 0.33 mM'dan 0.20 mM'a düştüğü bulunmuştur (48).

Koyun karaciğerinden saflaştırılmış pirüvat kinazla yapılan kinetik çalışmalarda PEP için Km değerinin saklanmış enzim karışımında taze enzime göre 155 kat daha fazla olduğu bulunmuştur. Bu da yüksek affiniteden düşük affiniteye geçişin sülfidril grup oksidasyonundan kaynaklanmadığını göstermiştir (79).

Rana ridibunda ve Brocchothrix thermosphacta parazitlerinde yapılan çalışmalarda saflaştırılmış Rana ridibunda eritrosit pirüvat kinazının pH 7.35'de PEP için Km'i 0.095 mM, ADP için 0.98 mM olarak lineer Lineweaver-Burk eğrisiyle saptanmıştır. Enzimin 0.65 mM PEP konsantrasyonunda ve düşük FDP konsantrasyonunda yaklaşık olarak % 20 aktive edildiği bulunmuştur. Brocchothrix thermosphacta enziminin PEP için substrat doygunluk eğrisi FDP yokluğunda sigmoidal kinetik gösterir ve nH değeri 3, Km'i 4.5 mM, Vmax'ı 28 U dir. FDP konsantrasyonu arttığında enzim aktivitesi artar ve hiperbolik kinetik gösterir (39,93).

Yukarıda verilen bazı örneklerden de anlaşılacağı gibi pirüvat kinaz enziminin PEP'e karşı ilgisini belirten Km değeri dokuların farklılığına göre değişik değerlere sahiptir. Ancak benzer doku çalışmalarında da net bir sonuç görmek zordur. Çünkü bu konu ile ilgili olarak yapılan çalışmalar arasında bir

uyumsuzluk görülmektedir. Eritrosit ve karaciğer için tespit ettiğimiz değerler bazı araştırmacıların çalışmaları ile paralellik içerisinde iken bazı çalışmalar ile uyumsuzluk göstermektedir.

V. 6. FDP ve ADP'nin Pirüvat Kinaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

FDP'nin pirüvat kinaz aktivitesi üzerine etkisi incelendiğinde 10 mM FDP konsantrasyonunun eritrosit pirüvat kinaz aktivitesini 1.93 kat, 1.4 mM FDP'nin ise karaciğer pirüvat kinaz aktivitesini 3.8 kat artırdığı saptandı.

Çalışmamızda; eritrosit pirüvat kinazın ADP'ye karşı V_{max} 'ı 9.5 U, K_m 'i 10.75 mM, karaciğer pirüvat kinazının ADP'ye karşı V_{max} 'ı 13.9 U, K_m 'i 0.3 mM olarak bulundu. Bu sonuçlar, daha önceki çalışmalar ile uygunluk göstermektedir.

Allosterik bir enzim olan eritrosit pirüvat kinazının FDP tarafından aktive edildiği ve enzimin artan PEP konsantrasyonuna olan sigmoidal cevabının FDP tarafından hiperbolik duruma getirildiği birçok araştırmacı tarafından gösterilmiştir. Bu araştırmacılar eritrosit pirüvat kinazının pH 8'de FDP varlığında 2 olan nH değerinin FDP yokluğunda 0.8'e düştüğünü ve pH 5.9'da ise FDP varlığında veya yokluğunda nH değerinin 0.8 olduğunu rapor etmişlerdir (45).

Kösebalaban (48), FDP için K_m değerinin PEP derişimi arttıkça düştüğünü gözlemiş, K_m değeri 40 μ M PEP konsantrasyonunda 5.6, 100 μ M PEP konsantrasyonunda 2.9 ve 2500 μ M PEP konsantrasyonunda 2.0 olarak bulmuştur.

FDP yokluğunda PEP K_m 'i 0.07, ADP K_m 'i 0.046 iken FDP varlığında PEP K_m 'inin 0.046, ADP K_m 'inin ise 0.044 olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (54,75).

Kılınç (45), eritrosit pirüvat kinazının ADP'ye ilgisinin nH değerini 1.05 olarak bulmuş, FDP varlığı veya yokluğunun bu sonucu değiştirmediğini fakat FDP yokluğunda enzimin ADP'ye olan K_m 'inin arttığını rapor etmiştir.

Singh ve Rogers (93) tarafından yapılan çalışmalarda; FDP'nin K^+ ve Mg^{++} iyonları gibi PEP substratına karşı enzimin affinitesini artırarak pirüvat kinazı allosterik olarak aktive ettiği bulunmuştur. FDP yokluğunda ADP için Hill katsayısının (nH) 1.5, K_m 'in 0.05, V_{max} 'ın 36 olduğunu, 5 mM FDP varlığında nH değerinin 1'e, K_m değerinin ise 0.02 ye düştüğünü göstermişlerdir. Kaloyianni-Dimitriades (39), FDP'nin güvercin eritrosit pirüvat kinaz aktivitesi üzerine etkisinin insan karaciğer ve eritrositlerinde, amfibia eritrositlerinde saptanan sonuçlarla benzer olduğunu göstermiştir.

Chern ve ark. (16), FDP'nin pirüvat kinazın R, L ve M₂ izoenzimlerini aktive ettiğini, M₁ izoenzimi etkilemediğini açıklamışlardır.

Yapılan çalışmalarda, FDP'nin düşük substrat konsantrasyonunda domuz, sığır ve insan karaciğer pirüvat kinazının önemli bir aktivatörü olduğunu gösterilmiştir. Bu aktivasyonun, tavuk karaciğer, insan akciğer, köpek akciğer ve tümör, rat hepatoma, rat karaciğerdeki enzimde de meydana geldiğini saptanmıştır. Karaciğer, böbrek, akciğerdeki pirüvat kinazın PEP'e karşı Km'i FDP varlığında düşmektedir. İskelet kasındaki pirüvat kinazın FDP ile aktive olmadığı görülür (46,75).

Yukarıda verilen örneklere benzer bir çok çalışma araştırmacılar tarafından yapılmıştır. Bizim çalışmamızda kullandığımız FDP ve ADP değerleri bu konuda yapılan çalışmalar ile uyum içindedir.

V. 7. 2,3-DPG ve Alaninin Pirüvat Kinaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Pirüvattan birinci basamakta sentez edilen alaninin eritrosit ve karaciğer pirüvat kinaz aktivitesi üzerine etkileri incelendiğinde, alaninin eritrosit pirüvat kinaz aktivitesi üzerine önemli bir etkisi bulunamadı. Alaninin 8 mM konsantrasyonda karaciğer enzim aktivitesini % 92.6 oranında inhibe ettiği bulundu (Şekil 65-66).

Poole ve ark. (83), karaciğer pirüvat kinaz enziminin alanin ile inhibe edildiğini göstermişlerdir. L-alaninin beyin enziminde inhibitör etkisinin olmadığı, adipoz doku pirüvat kinazını inhibe ettiği yapılan çalışmalarla bulunmuştur. Alanin inhibisyonunun pH'ya bağlı olduğu ve alaninin L izoenzimin PEP'e karşı Km'ini artırdığı saptanmıştır (20,100).

2,3-DPG'nin eritrosit pirüvat kinaz aktivitesini 6 mM'e kadar aktive daha sonra ise inhibe ettiği, karaciğerde ise enzim aktivitesini 10 kat artırdığı bulundu. Bu çalışmanın sonucu Maria'nın çalışmalarındaki sonuçlar ile uyum içerisindedir.

Calomenopoulou ve ark. (15) yaptığı çalışmalarla 2,3-DPG'nin güvercin eritrosit enzimini başlangıçta aktive, ardından inhibe ettiğini, 2,3-DPG'nin inhibitör etkisinin düşük PEP düzeylerinde daha kuvvetli olduğunu bulmuşlardır. 2,3-DPG'nin pirüvat kinaz aktivitesi üzerine etkisinin insan eritrosit pirüvat kinazı için de aynı olduğu bildirilmişlerdir.

Beutler'e (9) göre, pirüvat kinaz enzimi üzerinde 2,3-DPG'nin etkisi 2,3-DPG ile ADP'nin Mg⁺⁺ iyonu için yarışmasına bağlıdır.

V. 8. G-1-P ve G-6-P'in Pirüvat Kinaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Bu çalışmada; 15 mM G-1-P'in eritrosit enzim aktivitesini % 44.6, 25 mM G-6-P'in ise % 177.2, oranında aktive ettiği bulundu. Karaciğer pirüvat

kinaz aktivitesini 20 mM G-1-P % 20.6, 50 mM G-6-P % 290 oranında aktive etmiştir.

Brochothrix thermosphacta pirüvat kinazı üzerinde yapılan çalışmalarda, G-6-P'in pirüvat kinazı nonkompetitif olarak inhibe ettiği gösterilmiştir (93). Pirüvat kinaz enzimi G-6-P'a karşı duyarlı olup 20 mM G-6-P konsantrasyonunda inhibisyon % 50 olarak bulunmuştur (34).

Calomenopoulou ve ark. (15) tarafından yapılan çalışmalarda, G-1-P ve F-6-P'in eritrosit pirüvat kinazında etkili olmadığı, buna karşılık en etkili aktivatörün Pi ve G-6-P'i takiben FDP olduğu bulunmuştur.

V. 9. İnsülin ve Glukagonun Pirüvat Kinaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Bazı hormonların pirüvat kinaz enzimi üzerindeki etkilerini incelemek amacı ile yapılan bu çalışmada insülinin pirüvat kinaz aktivitesini eritrositte 1.37 kat, karaciğerde 1.83 kat aktive ettiği bulundu. Glukagonu deney ortamına in vitro olarak ilave ettiğimizde pirüvat kinaz aktivitesi üzerine herhangi bir etkisi bulunamadı.

Poole ve Bloxham (83) rat karaciğerinde yaptığı çalışmada, kültür ortamında fruktoz ve insülin varlığında 48 saat aç bırakılmış ratlardan izole edilen hepatositlerde L-tip pirüvat kinazın sentezinin arttığını saptamıştır. Karaciğer pirüvat kinazının yalnız beslenme ve hormonal kontrol altında olduğu rapor edilmiştir. Açlık halinde pirüvat kinaz aktivitesi azalır ve karbonhidrattan zengin diyetle besili ratlardaki karaciğer pirüvat kinazı defosforile formda bulunur.

Fare epididimal adipoz doku pirüvat kinaz üzerine insülinin etkisi incelenmiş ve enzim aktivitesinin insülin varlığında 2 kat arttığı bulunmuştur (20).

Alston-Smith ve ark. (3) tarafından yapılan çalışmalarda, karaciğer pirüvat kinaz aktivitesinin hem c-AMP artmasına neden olan glukagonla hem de epinefrinle inhibe edildiği bulunmuştur. Glukagon veya c-AMP analogları, PEP substratı için enzim affinitesinde azalmaya yol açan c-AMP'ye bağlı protein kinazla enzimin fosforilasyonu sonucu pirüvat kinaz aktivitesini inhibe ederler. İnsülin bu etkilerin tersini gösterir ve tek başına pirüvat kinaz enzimini aktive eder. Fenilefrin tarafından oluşturulan inhibisyon insülinle önlenir (78).

V. 10. ATP'nin Pirüvat Kinaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

ATP'nin pirüvat kinaz aktivitesi üzerine etkisi incelendiğinde; eritrosit pirüvat kinazını nonkompetitif olarak inhibe ettiği, karaciğer pirüvat kinaz aktivitesi üzerine etkisinin ise ATP konsantrasyonuna bağlı olduğu bulundu.

Enzim aktivitesinde ATP'nin etkisinin ATP konsantrasyonuna bağlı olduğunu, düşük konsantrasyonda aktivatör, yüksek konsantrasyonda inhibitör etkisi gösterdiğini ve 4 mM'den küçük konsantrasyonlarda ATP'nin aktiviteyi artırdığını, 6 mM'den fazla konsantrasyonda enzim aktivitesini inhibe ettiğini, maksimum aktiviteyi 1-2 mM ATP'de gösterdiği belirtilmiştir (100).

Tavşan ve rat beynindeki pirüvat kinaz enziminde ATP'nin inhibitör etkisi bulunmuştur. Kaloyianni-Dimitriades ve Beis (39), ATP'nin Rana ridibunda eritrosit pirüvat kinazını inhibe ettiğini ve bu inhibisyonun FDP ile kısmen önlenebileceğini belirtmişlerdir.

Kösebalaban (48), FDP varlığında ve yokluğunda; 2.5 mM PEP, 5 mM MgCl₂, 0.2 mM NADH, 100 mM KCl, 12.5 Ünite/ml laktat dehidrogenaz içeren tampon içinde 0.5 mM ditiyotritol ile 37 °C'de 30 dakika inkübe edilerek indirgenmiş plasental pirüvat kinazla ATP inhibisyonu çalışmaları yapmıştır. ATP'nin enzimi ADP ile kompetitif türde inhibe ettiği FDP'nin ve indirgenmenin genel kinetik davranışı etkilemediğini rapor etmiştir.

ATP'nin güvercin eritrosit pirüvat kinazını inhibe ettiği ve düşük Pi konsantrasyonunda pirüvat kinazın ATP ile inhibisyonunu engellediği bulunmuştur (15).

Graaff ve ark.(27), enzim aktivitesinin hem substrat (PEP) hem de ürünle (ATP) , ayrıca diğer allosterik efektörlerle (NH₄⁺, Mg⁺⁺, FDP) allosterik olarak kontrol edildiğini ileri sürmüşlerdir.

Rat karaciğer enziminin ATP ile inhibe olduğu ancak Dictyostelium discoideum enziminin ATP ile inhibe olmadığı ifade edilmiştir (54).

V. 11. p-CMBA'in Pirüvat Kinaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

p-CMBA'in insan eritrosit ve karaciğer pirüvat kinaz enzimi ile ilişkisi incelendiğinde; eritrositte 25 µM p-CMBA'in % 61.6; karaciğerde 40 µM p-CMBA'in % 34.2 oranında enzimin inhibisyonuna neden olduğu bulundu (Şekil 46-47).

p-CMBA, enzimlerin aktif merkezlerinde -SH grubu içeren amino asitlerin olup olmadığını belirlemek amacıyla kullanılan bir kimyasal maddedir. Pirüvat kinaz enzimi p-CMBA varlığında kompetitif olarak inhibe edilmekte olup enzimin -SH gruplarının p-CMBA tarafından bloke edildiği düşünülmektedir. Bu sonuç pirüvat kinazın fonksiyonel -SH grupları içerdiğini açıklamaktadır (45).

VI. ÖZET

Bu çalışma ile insan eritrosit ve karaciğer doku pirüvat kinazının bazı kinetik özelliklerini incelemek amaçlandı. Çalışma materyalleri Fırat Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi'nin ilgili kliniklerinden sağlandı. Çalışma metodu olarak Beutler'in metodu kullanıldı.

İnsan eritrositinde R-tipi pirüvat kinaz (E.C.2.7.1.40), karaciğerde ise L-tipi pirüvat kinaz olduğu gözlemlendi. Karaciğer pirüvat kinazı, Sephadex G-200 jel kromatografisi kullanılarak % 13.2 verimle 26.3 kat saflaştırıldı ve spesifik aktivitesi 2.6 ünite/mg protein bulundu. Elde edilen enzim 0 °C'de amonyum sülfatla doyurulup -20 °C'de saklandığında aktivite kaybına uğramadığı bulundu.

Bu çalışmada; insan eritrosit pirüvat kinazı için 100 mM Mg⁺⁺, 1.6 M K⁺, karaciğer pirüvat kinazı için 30 mM Mg⁺⁺ ve 10 mM K⁺ iyonlarının kofaktör olarak gerekli olduğu saptandı. Her iki doku için tris-HCl tamponu kullanıldı ve enzimin optimal pH'sı eritrosit için 8, karaciğer için 7.4 olarak bulundu. ATP, p-CMBA (parakloro merkür benzoik asit) ve Ca⁺⁺ iyonunun enzimi inhibe ettiği, insülin, 2,3-DPG, G-6-P, NaCl'ün enzimi aktive ettiği ve G-1-P'in enzim aktivitesini önemli derecede etkilemediği görüldü. CaCl₂ ve p-CMBA pirüvat kinazı kompetitif olarak, ATP ise pirüvat kinaz enzimini nonkompetitif olarak inhibe etti. Alaninin insan karaciğer pirüvat kinazını kompetitif olarak inhibe ettiği ama eritrosit pirüvat kinazını inhibe etmediği görüldü. Deney ortamına in vitro ilave edilen glukagonun eritrosit ve karaciğer pirüvat kinaz enzim aktivitesine herhangi bir etkisi bulunmadı.

Pirüvat kinazının substratı olan PEP (fosfoenolpirüvat)'e karşı olan Km'i eritrosit için 8.5 mM, karaciğer için 1.2 mM civarındadır. PEP için Vmax değeri eritrositte 9.65 U, karaciğerde 11.9 U olarak bulundu. Pirüvat kinaz aktivitesinin zamana bağlı olarak azaldığı gözlemlendi.

VII. SUMMARY

This study was designed to examine some kinetic properties of human erythrocyte and liver pyruvate kinase.

Samples were obtained from the relevant clinics of Research and Practice Hospital at Firat University. The method used in this study was Beutler method. It was observed that there are R-type pyruvate kinase in the human erythrocyte and L-type pyruvate kinase in the human liver. Liver pyruvate kinase was purified by using Sephadex G-200 gel chromatography. The yield and specific activity of the partially purified pyruvate kinase were 13.2 percent and 2.6 units per milligram protein, respectively. The purified enzyme was stable when stored at -20°C .

In this study, Mg^{++} and K^{+} concentration were determined as 100 mM and 1.4 M for human erythrocyte pyruvate kinase, 30 mM and 10 mM for liver pyruvate kinase, respectively. Tris-HCl buffer was used for all samples and optimal pH is around 8 for erythrocyte, 7.4 for liver. It was seen that ATP, p-CMBA and CaCl_2 inhibited the enzyme, whereas insulin, 2,3-DPG, G-6-P, NaCl activated the enzyme and G-1-P didn't effect the enzyme activity considerably.

CaCl_2 and p-CMBA inhibited the pyruvate kinase competitively, but ATP inhibited the enzyme noncompetitively. It was seen that although alanin inhibited the enzyme of liver pyruvate kinase competitively, it didn't effect the erythrocyte pyruvate kinase. Glucagon added as in vitro to experiment medium didn't effect the activity of erythrocyte and liver pyruvate kinase enzyme.

The K_m of pyruvate kinase for PEP is around 8.5 mM for erythrocyte, 1.2 mM for liver. The V_{max} values for PEP were 9.65 U at erythrocyte, 11.9 U at liver. It was seen that the activity of pyruvate kinase decreased with time.

VIII. KISALTMALAR

PEP	:	Fosfoenolpirüvat
FDP	:	Fruktoz-1,6-difosfat
AMP	:	Adenozin-5'-monofosfat
ADP	:	Adenozin-5'-difosfat
ATP	:	Adenozin-5'-trifosfat
NADH	:	Nikotinamid adenin dinükleotid
2,3-DPG	:	2,3-difosfogliserat
3-PG	:	3-fosfogliserat
G-1-P	:	Glikoz-1-fosfat
G-6-P	:	Glikoz-6-fosfat
F-6-P	:	Fruktoz-6-fosfat
p-CMBA	:	p-kloromerküri benzoik asit
SDS-PAGE	:	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
EGF	:	Epidermal growth faktör

IX. KAYNAKLAR

- 1- **Abu-Melha, A.M., Ahmed, M.A.M., Knox-Macaulay, H., Al-Sowayan, S.A., El-Yahia, A.** (1991). Erythrocyte Pyruvate Kinase Deficiency in Newborns of Eastern Saudi Arabia. *Acta Haematol.* 85, 192-194.
- 2- **Ainsworth, S., Macfarlane, N.** (1973). A Kinetic Study of Rabbit Muscle Pyruvate Kinase. *Biochem. J.* 131. 223-236.
- 3- **Alston-Smith, J., Ljungqvist, O., Boija, P.O., Ware, J. and Ekdahl, K.N.** (1990). Endotoxin, Epinephrine, Glucagon, Insulin and Calcium Ionophore A23187 Modulation of Pyruvate Kinase Activity in Cultured Rat Hepatocytes. *Acta Chir Scand.* 156,677-681.
- 4- **Aras, K. ve Erşen, G.** (1988). Tıbbi Biyokimya Teorik ve Klinik Enzimoloji. Ankara Üniversitesi Basımevi. Ankara.
- 5- **Arriaga, D., Busto, F., Valle, P. and Soler, J.** (1989). A Kinetic Study of the pH Effect on the Allosteric Properties of Pyruvate Kinase from *Phycomyces blakesleeanus*. *Biochimica et Biophysica Acta.* 998, 221-230.
- 6- **Ashizawa, K., Willingham, M.C., Liang, C. and Cheng, S.** (1991). In vivo Regulation of Monomer-Tetramer Conversion of Pyruvate Kinase Subtype M₂ by Glucose is Mediated via Fructose-1,6-Bisphosphate. *The Journal of Biological Chemistry.* Vol:266, No:25, 16842-16846.
- 7- **Assimacopoulos-Jeannet, F. and Jeanrenaud, B.** (1990). Insulin Activates 6-phosphofructo-2-kinase and Pyruvate Kinase in the Liver. *The Journal of Biological Chemistry.* Vol:265, No:13, 7202-7206.
- 8- **Berglund, L., Ljungström, O. and Engström, L.** (1977). Purification and Characterization of Pig Kidney Pyruvate Kinase. *J. Biol. Chem.* 252, 6108-6111.
- 9- **Beutler, E., Matsumoto, F. and Guinio, E.** (1974). The Effect of the 2,3-DPG on Red Cell Enzymes. *Experientia.* 30, 190-191.
- 10- **Beutler, E., Blume, K.G., Kaplan, J.C., Löhr, G.W., Ramot, B., and Valentine, W.N.** (1977). International Committee for Standardization in Haematology : Recommended Methods for Red-Cell Enzyme Analysis. *British Journal of Haematology.* 35, 331-340.

11- Blair, J.B. and Walker, R.G. (1984). Rat Liver Pyruvate Kinase. Influence of Ligands on Activity and Fructose-1,6-biphosphate Binding. *Arch. Biochem. Biophys.* 232, 202-213.

12-Boivin, P., Galand, C., Hakim, J. and Kahn A. (1975). Acquired Erythroenzymopathies in Blood Disorders : Study of 200 Cases. *British Journal of Haematology.* 31, 531-542.

13- Bossu, M., Dacha, M. and Fornaini, G. (1968). Neonatal Hemolysis Due to a Transient Severity of Inherited Pyruvate Kinase Deficiency. *Acta Haemat.* 40, 166-175.

14- Brewer, G.J. and Eaton, J.W. (1971). Erythrocyte Metabolism : Interaction with Oxygen Transport, *Science.* 171, 1205-1211.

15- Calomenopoulou, M., Kaloyianni, M. and Beis, I.D. (1989). Purification and Regulatory Properties of Pigeon Erythrocyte Pyruvate Kinase. *Comp. Biochemistry Physiol.* Vol:93 B, No:3, 697-706.

16- Chern, J.C., Rittenberg, M.B. and Black, J. A. (1972). Purification of Human Erythrocyte Pyruvate Kinase. *J. Biol. Chem.* 247, 7173-7218.

17- Corrons, J.V., Garcia, A.M., Sosa, A.M., Pujades, A., Colomer, D. and Linares, M. (1991). Heterozygous Pyruvate Kinase Deficiency and Severe Hemolytic Anemia in a Pregnant Woman with Concomitant, Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Deficiency. *Ann Hematol.* 62 : 190-193.

18- Cuenllas, E., Gaitan, S., Bueren, J.A. and Tejero, C. (1990). Kinetic Studies of Pyruvate Kinase During in vitro Differentiation of GM-CFC Haemopoietic Precursor and Bone Marrow Cells in Mice. *Bioscience Reports.* Vol:10, No:2, 141-154.

19- DeCamp, D.L., Lim, S. and Colman, R.F. (1988). Reaction of Pyruvate Kinase with the New Nucleotide Affinity Labels 8-[(4-Bromo-2,3-dioxobutyl)thio] Adenosine 5'-Diphosphate and 5'-Triphosphate. *Biochemistry.* 27, 7651-7658.

20- Denton, R.M., Edgell, N.J., Bridges, B.J. and Poole, G.P. (1979). Acute Regulation of Pyruvate Kinase in Rat Epidermal Adipose Tissue by Insulin. *Biochem. J.* 180, 523-531.

21- Dillon, P.F. and Clark, J.F. (1990). The Theory of Diazymes and Functional Coupling of Pyruvate Kinase and Creatine Kinase. *J. Theor. Biol.* 143, 275-284.

22- Ekdahl, K.N. (1987). Studies on the Regulation of Rat Liver Pyruvate Kinase and Fructose-1,6-Biphosphatase. *Upsala J. Med. Sci.* 92, 217-232.

23- Erp, H.E., Roholl, P.J.M., Rijksen, G., Spengers, E.D., Veelen, C.W.M. and Staal, G.E.J. (1988). Production and Characterization of Monoclonal Antibodies Against Human Type K Pyruvate Kinase. *European Journal of Cell Biology.* 47, 388-394.

24- Fairbank, V.F. and Klee, G.G. (1986). Biochemical Aspects of Hematology. P.1506-1507. Ed. N.W. Tietz In: 'Textbook of Clinical Chemistry'. 2nd ed, W.B. Saunders Company,

25- Fanjul, A.N. and Farias, R.N. (1993). Cold-sensitive Cytosolic 3,5,3'-Triiodo-L-thyronine-binding Protein and Pyruvate Kinase from Human Erythrocytes Share Similar Regulatory Properties of Properties of Hormone Binding by Glycolytic Intermediates. *The Journal of Biological Chemistry.* Vol:268. No:1, 175-179.

26-Gözükara, E.M. (1989). Enzimler. 572-630. 'Biyokimya'. Birinci Baskı, Ofset Repromat Ltd. Şti., Ankara.

27- Graaff, L., Broek, H. and Visser, J. (1988). Isolation and Transformation of the Pyruvate Kinase Gene of *Aspergillus nidulans*. *Curr. Genet.* 13:315-321.

28- Heinrichs, M., Jacobasch, G., Scheiner-Bobis, K., Bertram, S., Eigenbrodt, E. and Reinacher, M. (1987). Human Erythrocyte Pyruvate Kinase (L/R-PK) : Production and Characterization of a Monoclonal Antibody. *Biomed. Biochim. Acta.* 46. 2/3, 223-228.

29- Holzhutter, H-G., Schuster, R., Buckwitz, D. and Jacobasch, G. (1990). Mathematical Modelling of Metabolic Pathways Affected by an Enzyme Deficiency. *Biomed. Biochem. Acta.* 49. 8/9, 791-800.

30- Hunsley, J.R. and Suelteri, C.H. (1969). Yeast Pyruvate Kinase. *The Journal of Biological Chemistry.* Vol:244. No:18, 4819-4822.

31- Ibsen, K.H. and Trippet, P. (1971). Human Erythrocyte Pyruvate Kinase Conformers Obtained by Electrofocusing., *Life Sciences* Vol:10.II, 1021-1029.

32- Ignacak, J. and Guminska, M. (1993). Comparison of Pyruvate Kinase Variants from Rat Liver and Morris Hepatoma 7777, Obtained by an Affinity Chromatography on Blue Sepharose CL-6B. *Acta Biochimica Polonica.* Vol:10, No:2, 261-267.

33- Imai, E., Yamauchi, A., Noguchi, T., Tanaka, T., Fujii, M. and Mikami, H. (1987). Effects of Chronic Renal Failure on the Regulation of Pyruvate Kinase. *Metabolism.* Vol:36. No:6, 601-606.

34- Imarai, M., Hinrichsen, P., Bazaes, S., Wilkens, M. and Eyzaguirre, J. (1988). Yeast Pyruvate Kinase : Essential Lysine Residues in the Active Site. *Int. J. Biochem.* Vol:20. No:9, 1001-1008.

35- International Committee for Standardization in Haematology. (1979). Recommended Methods for the Characterization of Red Cell Pyruvate Kinase Variants. *British Journal of Haematology.* 43, 275-286.

36- Ivey, H., Sabio, H. (1979). Multiple Exchange Transfusions in the Treatment of a Newborn with Pyruvate Kinase Deficiency. *Clinical Pediatrics.* 12, 756-758.

37- Johnson, M.L., Jones, D.P., Freeman, J.M., Wang, W. (1991). Biochemical and Molecular Characterization of Variant Pyruvate Kinase Enzymes and Genes from Three Patients with Red Blood Cell Pyruvate Kinase Deficiency. *Acta Haematol.* 86:79-85.

38- Kahn, A., Marie, J., Boivin, P. (1976). Pyruvate Kinase Isozymes in Man. *Hum. Genet.* 33, 35-46.

39- Kaloyianni-Dimitriades, M.G. and Beis, I.D. (1984). Purification Catalytic and Regulatory Properties of *Rana ridibunda* Erythrocyte Pyruvate Kinase. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol:7 B. No:2, 245-250.

40- Kanno, H., Fujii, H., Hirono, A., Omine, M. and Miwa, S. (1992). Identical Point Mutations of the R-Type Pyruvate Kinase (PK) cDNA Found in Unrelated PK Variants Associated with Hereditary Hemolytic Anemia. *Blood.* Vol:79. No:5, 1347-1350.

41- Kassner, G., Scheibe, R., Wenzel, K.W. and Hofmann E. (1988). Isoenzyme Patterns of Pyruvate Kinase, Lactate Dehydrogenase, and Alkaline Phosphatase in Isolated Fat-Storing Cells of Rat Liver. *Biomed. Biochim. Acta.* 47, 551-556.

42- Kassner, G., Neupert, G., Scheibe, R. and Wenzel K.W. (1991). Isoenzymes of Pyruvate Kinase, Lactate Dehydrogenase and Alkaline Phosphatase in Epithelial Cell Lines of Rat Liver. *Exp. Pathol.* 43:51-56.

43- Kedryna, T., Guminska, M. and Marchut, E. (1990). Pyruvate Kinase from Cytosolic Fractions of the Ehrlich Ascites Tumour, Normal Mouse Liver and Skeletal Muscle. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1039, 130-133.

44- Keitt, A.S. and Bennett, D.C. (1966). Pyruvate Kinase Deficiency and Related Disorders of Red Cell Glycolysis. *American Journal of Medicine.* 41, 762-785.

45- Kılınç, K. (1983). İnsan Alyuvar Pirüvat Kinazı Aktif Merkez Yönelimli Kimyasal Modifikasyonları ve Kinetik Özellikleri. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi. Ankara.

46- Kiffmeyer, W.R., and Farrar, W.W. (1991). Purification and Properties of Pig Heart Pyruvate Kinase. *Journal of Protein Chemistry*. Vol:10, No:6, 585-591.

47- Klimek, F. and Bannasch, P. (1990). Biochemical Microanalysis of Pyruvate Kinase Activity in Preneoplastic and Neoplastic Liver Lesions Induced in Rats by N-nitrosomorpholine. *Carcinogenesis*. Vol:11. No:8, 1377-1380.

48- Kösebalaban, Ş. (1992). Pirüvat Kinazın Plasentadan Kısmi Saflaştırılması ve Kinetik Özellikleri. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi.

49- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680-685.

50- Lakomek, M., Winkler, H., Linne, S. and Schröter, W. (1989). Erythrocyte Pyruvate Kinase Deficiency : A Kinetic Method for Differentiation Between Heterozygosity and Compound-Heterozygosity. *American Journal of Hematology*. 31, 225-232.

51- Lakomek, M., Neubauer, B., Lehu, A., Hoch, G., Winkler, H., Schröter, W. (1992). Erythrocyte Pyruvate Kinase Deficiency : Relations of Residual Enzyme Activity, Altered Regulation of Defective Enzymes and Concentrations of High-Energy Phosphates with the Severity of Clinical Manifestation. *Eur. J. Haematol.* 49, 82-92.

52- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein Measurements with the Folin Fenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193-265.

53- Lyonnet, S., Coupe, C., Girard, J., Kahn, A. and Munnich, A. (1988). In vivo Regulation of Glycolytic and Gluconeogenic Enzyme Gene Expression in Newborn Rat Liver. *J. Clin. Invest.* 1682-1689.

54- Marshall, J. and Wheldrake, J.F. (1990). Purification and Properties of Pyruvate Kinase from *Dictyostelium discoideum*. *Biochemistry International*. Vol:21. No:4, 615-622.

55- Mathews, C.K. (1990). *Biochemistry*. First Edition. The Benjamin / Cummings Publishing Company. Redwood City.CA. 389-390.

56- Matsuda, T., Noguchi, T., Takenaka, M., Yamada, K. and Tanaka, T. (1990). Regulation of L-Type Pyruvate Kinase Gene Expression by Dietary Fructose in Normal and Diabetic Rats. *J. Biochem.* 107, 655-660.

57- Max-Audit, I., Kechemir, D., Mitjavila, M. T., Vainchenker, W., Rotten, D. and Rosa, R. (1988). Pyruvate Kinase Synthesis and Degradation by Normal and Pathologic Cells During Erythroid Maturation. *Blood*. 72.3, 1039-1044.

58- Medicis, E., Ross, P., Friedman, R., Hume, H., Marceau, D., Milor, M., Lyonnais, J., Braekeleer, M. (1992). Hereditary Nonspherocytic Hemolytic Anemia Due to Pyruvate Kinase Deficiency : A Prevalence Study in Quebec (Canada). *Hum. Hered.* 42:179-183.

59- Meienhofer, M., Medicis, E., Cognet, M. and Kahn, A. (1987). Regulation of Genes for Glycolytic Enzymes in Cultured Rat Hepatoma Cell Lines. *Eur. J. Biochem.* 169, 237-243.

60- Miralpeix, M., Decaux, J., Kahn, A. and Bartrons, R. (1991). Vanadate Induction of L-Type Pyruvate Kinase mRNA in Adult Rat Hepatocytes in Primary Culture. *Diabetes*. 40, 462-464.

61- Miwa, S., Nakashima, K., Ariyoshi, K., Shinohara, K., Oda, E. and Tanaka, T. (1975). Four New Pyruvate Kinase (PK) Variants and a Classical PK Deficiency. *British Journal of Haematology*. 29, 157-169.

62- Miwa, S., Fujii, H., Takegawa, S., Nakatsuji, T., Yamato, K., Ishida, Y. and Ninomiya, N. (1980). Seven Pyruvate Kinase Variants Characterized by the ICSH Recommended Methods. *British Journal of Haematology*. 45, 575-583.

63- Miwa, S., Fujii, H. (1990). Pyruvate Kinase Deficiency. *Clin. Biochem.* Vol:23, 155-157.

64- Mosca, A., Tagarelli, A., Paleari, R., Scarpelli, P. and Brancati, C. (1993). Rapid Determination of Erythrocyte Pyruvate Kinase Activity. *Clin. Chem.* 39/3, 512-516.

65- Moule, S.K. and McGivan, J.D. (1991). Epidermal Growth Factor Stimulates the Phosphorylation of Pyruvate Kinase in Freshly Isolated Rat Hepatocytes. *FEBS*. Vol:280. No:1, 37-40.

66- Murhead, H. (1990). Isoenzymes of Pyruvate Kinase. *Biochem. Soc. Trans.* Vo:18. No:2, 193-196.

67- Muller-Soyano, A., Roura, E. T., Duke, P., Acquatella, G. C., Arends, T., Guinto, E. and Beutler, E. (1976). Pyruvate Kinase Deficiency and Leg Ulcers. *Blood*. Vol:47. No:5, 807-813.

68- Munnich, A., Lyonnet, S., Chauvet, D., Schaftingen, E. and Kahn, A. (1987). Differential Effects of Glucose and Fructose on Liver

L-Type Pyruvate Kinase Gene Expression in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol:262. No:35, 17065-17071.

69- Muroya, N., Nagao, Y., Miyazaki, K. Nishikawa, K. and Horio, T. (1976). Pyruvate Kinase Isozymes in Various Tissues of Rat and Increase of Spleen-Type Pyruvate Kinase in Liver by Injecting Chromating from Spleen and Tumor. *Biochem. J.* 79, 203-215.

70- Nathan, D.G., Oski, F.A., Miller, D.R. and Gardner, F. (1968). Life-Span and Organ Sequestration of the Red Cells in Pyruvate Kinase Deficiency. *The New England Journal of Medicine*. Vol:278. No:2, 73-81.

71- Neubauer, B., Lakomek, M., Winkler, H., Parke M., Hofferbert, S. and Schröter, W. (1991). Point Mutations in the L-Type Pyruvate Kinase Gene of Two Children with Hemolytic Anemia Caused by Pyruvate Kinase Deficiency. *Blood*. Vol:77, No:9, 1871-1875.

72- O'Farrell, P.H. (1975). High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins. *J. Biol. Chem.* 4007-21.

73- Paglia, D.E., Valentine, W.N., Baughan, M., Miller, D.R., Reed, C.F. and McIntyre, O.R. (1968). Identification of a Kinetically Aberrant Isozyme Associated with Premature Hemolysis. *The Journal of Clinical Investigation*. Vol:47, 1929-1946.

74- Pagadopoulos, A.I., Gaitanaki, C.J. and Beis, I.D. (1989). Pyruvate Kinase Isoenzymes in Marine Invertebrates : A Comparative Study by the Use of Monoclonal Antibodies. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol:96 B. No:2, 229-234.

75- Parkison, C., Ashizawa, K., McPhie, P., Lin, K. and Cheng, S. (1991). The Monomer of Pyruvate Kinase, Subtype M₁, is Both A Kinase and a Cytosolic Thyroid Hormone Binding Protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol:179. No:1, 668-674.

76- Peliska, J.A. and O'Leary, M.H. (1988). Sulfuryl Transfer Catalyzed by Pyruvate Kinase. *Biochemistry*. 28, 1604-1611.

77- Picat, C., Dhermy, D., Buc, H., Morin, M. and Boivin, P. (1984). Erythrocyte Pyruvate Kinase Deficiency and Hemolytic Anemia Inherited as a Dominant Trait. *Am. J. Hematol.* 17, 251-260.

78- Pittner, R.A., Fain, J.N. (1988). Insulin Regulation of Pyruvate Kinase Activity in Cultured Rat Hepatocytes, in the Presence of Vasopressin, Ionophore A23187 or 4 β -Phorbol 12 β -Myristate 13 α -Acetate. *Biochem. J.* 252, 717-721.

- 79- **Plested, C.P., Taylor, E., Brindley, D.N. and Vernon, R.G.** (1987). Interactions of Insulin and Dexamethasone in the Control of Pyruvate Kinase Activity and Glucose Metabolism in Sheep Adipose Tissue. *Biochem. J.* 247, 459-465.
- 80- **Podesta, F.E. and Plaxton, W.C.** (1991). Kinetic and Regulatory Properties of Cytosolic Pyruvate Kinase from Germinating Castor Oil Seeds. *Biochem. J.* 279, 495-501
- 81- **Podesta, F.E., and Plaxton, W.C.** (1992). Plant Cytosolic Pyruvate Kinase : A Kinetic Study. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1160, 213-220.
- 82- **Pogson, C.I.** (1968). Adipose-Tissue Pyruvate Kinase. Properties and interconversion of two active forms. *Biochem. J.* 110, 67-77.
- 83- **Poole, G.P. and Bloxham, D.P.** (1982). The Turnover of L-Type Pyruvate Kinase in Cultured Rat Hepatocytes. *Biochem. J.* 204, 89-95.
- 84- **Rijksen, G., Veerman, A.J.P., Schipper-Kester, G.P.M. and Staal, G.E.J.** (1990). Diagnosis of Pyruvate Kinase Deficiency in a Transfusion-Dependent Patient with Severe Hemolytic Anemia. *American Journal of Hematology.* 35, 187-193.
- 85- **Rosa, J., Bartrons, R. and Tauler, A.** (1992). Gene Expression of Regulatory Enzymes of Glycolysis / Gluconeogenesis in Regenerating Rat Liver. *Biochem. J.* 287, 113-116.
- 86- **Rose, I.A. and Warms, J.B.** (1970). Control of Red Cell Glycolysis. The Cause of Triose Phosphate Accumulation., *J. Biol. Chem.* 245, 4009-4015.
- 87- **Rose, I.A., Kuo, D.J. and Warms, J.V.B.** (1991). A Rate-Determining Proton Relay in the Pyruvate Kinase Reaction. *Biochemistry.* 30, 722-726.
- 88- **Sadava, D., Frykman, P., Harris, E., Majerus, D., Mustard, J. and Bernard, B.** (1992). Development of Enzymes of Glycolysis and Gluconeogenesis in Human Fetal Liver. *Biological Neonatal.* 62, 89-95.
- 89- **Sahizawa, K., Mcphie, P., Lin, K. and Cheng, S.** (1991). An in vitro Novel Mechanism of Regulating the Activity of Pyruvate Kinase M_2 by Thyroid Hormone and Fructose 1,6-bisphosphate. *Biochemistry.* 30, 7105-7111.
- 90- **Seeholzer, S.H., Jaworowski, A. and Rose, I.A.** (1991). Enolpyruvate : Chemical Determination as a Pyruvate Kinase Intermediate

91- Segel, I.H. (1975). Multisite and Allosteric Enzymes. P. 371-381. In: 'Enzyme Kinetics. Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems'. Wiley-Interscience, New York.

92- Shinohara, K., Miwa, S., Nakashima, K., Oda, E., Kageoka, T. and Tsujino, G. (1976). A New Pyruvate Kinase Variant (PK Osaka) Demonstrated by Partial Purification and Condensation. *Am. J. Hum. Genet.* 28, 474-481.

93- Singh, S.P. , and Rogers, P.J. (1991). Purification and Kinetic Properties of Pyruvate Kinase from *Brochothrix thermosphacta*. *Biochemistry International.* 25, 35-45.

94- Smith, E.L., Hill, R.L., Lehman, I.R., Lefkowitz, R.J. Handler, P. and White, A. (1983). *Principles of Biochemistry.* 405-417.

95- Speranza, M.L., Valentini, G., Iadarola, P., Stoppini, M., Malcovati, M., and Ferri, G. (1989). Primary Structure of Three Peptides at the Catalytic and Allosteric Sites of the Fructose-1,6-biphosphate-Activated Pyruvate Kinase from *Escherichia coli*. *Biol. Chein. Hoppe-Seyler.* Vol:370, 211-216.

96- Speranza, M.L., Valentini, G. and Malcovati, M. (1990). Fructose-1,6-biphosphate-Activated Pyruvate Kinase from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 191, 701-704.

97- Susor, W.A. and Rutter, W.J. (1971). Method for the Detection of Pyruvate Kinase, Aldolase, and Other Pyridine Nucleotide Linked Enzyme Activities after Electrophoresis. *Analytical Biochemistry.* 43, 147-155.

98- Takegawa, S and Miwa, S. (1984). Change of Pyruvate Kinase (PK) Isozymes in Classical Type PK Deficiency and Other PK Deficiency Cases During Red Cell Maturation. *American Journal of Haematology.* 16, 53-58.

99- Takenaka, M., Noguchi, T., Sadahiro, S., Hirai, H., Yamada, K., Matsuda, T., Imai, E. (1991). Isolation and Characterization of the Human Pyruvate Kinase M Gene. *Eur. J. Biochemistry.* 198, 101-106.

100- Terlecki, G. (1989). Purification and Properties of Pyruvate Kinase Type M₁ from Bovine Brain. *Int. J. Biochem.* Vol:21, No:9, 1053-1060.

101- Van Berkel, T.J.C., Kruijt, J.K., Van Den Berk, G.B. and Koster, J.F. (1978). Difference in the Effect of Glucagon and Starvation upon L Type Pyruvate Kinase from Rat Liver. *Eur. J. Biochem.* 92, 553-561.

102- Volpato, S., Vigi, V. and Cattarozzi, G. (1968). Nonspherocytic Haemolytic Anaemia and Severe Jaundice in a Newborn with Partial Pyruvate Kinase Deficiency. *Acta Paediat Scand.* 57, 59-64.

103- Wei, D.C., Chan, L.C. and Li, A. (1992). Homozygous Pyruvate Kinase Deficiency in Hong Kong Ethnic Minorities. *J. Paediatr. Child Health.* 28, 334-336.

104- Wimmer, M., Luttringer, C. and Colombi, M. (1990). Enzyme Activity Patterns of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase, Pyruvate Kinase, Glucose-6-Phosphate-Dehydrogenase and Malic Enzyme in Human Liver. *Histochemistry.* 93, 409-415.

105- Zanella, A., Colombo, M., Miniero, R., Perroni, L., Meloni, T. and Sirchia, G. (1988). Erythrocyte Pyruvate Kinase Deficiency : 11 New Cases. *Br. J. Hematol.* 69, 399-404.

106- Zi-Liang, W., We-Dong, Y. and Shun-Cun, C. (1985). Frequency of Erythrocyte Pyruvate Kinase Deficiency in Chinese Infants. *Am. J. of Hematol.* 20, 139-144.

107- Zollner, H. (1993). Hand Book of Enzyme Inhibitors. Part A, 2nd ed, Weinheim, New York.

X. ÖZGEÇMİŞ

1968 yılında Elazığ'da doğdum. İlkokul, ortaokul ve lise tahsilimi Elazığ'da tamamladım. 1985 yılında Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nde öğrenimime başladım ve 1990 yılında bu fakülteden mezun oldum. 1991 yılında Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünün açmış olduğu sınavı kazanarak Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalına doktora öğrencisi olarak girdim. Halen Biyokimya Anabilim dalında araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım. Evliyim ve 1 çocuk annesiyim.



XI. TEŞEKKÜR

Tez konumun seçiminde ve tez çalışmalarım sırasında destek ve yardımlarını gördüğüm değerli hocam Y. Doç. Dr. Necip İlhan'a teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarım sırasında yardımını benden esirgemeyen Anabilim Dalı öğretim üyesi Y. Doç. Dr. İhsan Halifeoğlu'na, asistan arkadaşlarıma ve hastanemiz biyokimya laboratuvarı çalışanlarına teşekkür ederim.

Materyal temininde bana yardımcı olan Genel Cerrahi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mehmet Ali Akkuş'a da teşekkürlerimi sunarım.