

283868

T. C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KUZU KARACİĞERİ M₂ VE L-TİP PİRUVAT KİNAZ İZOMİMLERİNİN
KİSMİ SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI KİNETİK ÖZELLİKLERİ**

BİYOKİMYA PROGRAMI
BİLİM UZMANLIĞI TEZİ

NELİN GÖMÜLÜ

ANKARA — 1986

53

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KUZU KARACİĞERİ M_2 VE L-TİP PİRUVAT KİNAZ İZOMERLERİNİN
KİSMİ SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI KİNETİK ÖZELLİKLERİ

BİYOKİMYA PROGRAMI
BİLİM UZMANLIĞI TEZİ

NELİN GÖMÜLÜ

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ : DOÇ. DR. NAZMI ÖZER

ANKARA - 1986

İ Ç İ N D E K İ L E R

| | <u>SAYFA NO.</u> |
|----------------------------------------------------------------------|------------------|
| TABLolar | III |
| ŞEKİLLER | IV |
| KISALTMALAR | V |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GEREÇLER ve YÖNTEMLER | 13 |
| 2.1. Gereçler | 13 |
| 2.2. Yöntemler | 13 |
| 2.2.1. M ₂ -tip Piruvat Kinazın Saflaştırılması | 13 |
| 2.2.2. L-tip " " " | 14 |
| 2.2.3. Protein Ölçümü | 15 |
| 2.2.4. Etkinlik Tayini | 15 |
| 2.2.5. Isı-Bozunum Deneyleri | 16 |
| 3. BULGULAR | 18 |
| 3.1. İzozimlerle Yapılan Kinetik Deney Bulguları | 18 |
| 3.2. Isı-Bozunum Deney Bulguları | 29 |
| 4. TARTIŞMA | 44 |
| ÖZET | 50 |
| KAYNAKLAR | 52 |

T A B L O L A R

| <u>TABLO</u> | | <u>SAYFA NO.</u> |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| 1 | M ₁ -tip piruvat kinazın bazı kinetik özellikleri | 2 |
| 2 | L-tip piruvat kinazın FDP varlığında ve yokluğunda K _m değerleri | 3 |
| 3 | L-tip piruvat kinazda fosforlamanın etkileri | 5 |
| 4 | M ₂ -tip piruvat kinazın değişik serbest Mg ⁺² derişimlerinde PEP için K _m değerleri | 10 |
| 5 | Isı-bozunum deneylerinde kullanılan ligant derişimleri | 17 |
| 6 | Kuzu karaciğeri M ₂ -tip piruvat kinazın ısı bozunumu ile ilgili bozunumun değişik evrelerine ait sonuçların dökümü | 29 |
| 7 | Kuzu karaciğeri M ₂ -tip piruvat kinazının ısı-bozunumu ile ilgili bazı kinetik sonuçlar | 36 |
| 8 | Kuzu karaciğeri L-tip piruvat kinaz için 60°C'de değişik ligandlar varlığında ısı-bozunumunun değişik evrelerine ait sonuçların dökümü | 37 |
| 9 | Kuzu karaciğeri L-tip piruvat kinazın ısı-bozunumu ile ilgili bazı kinetik sonuçlar | 39 |

Ş E K İ L L E R

| <u>ŞEKİL</u> | | <u>SAYFA NO.</u> |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| 1 | M ₂ -tip piruvat kinazın PEP'e değişik affinitesi olan formları | 7 |
| 2 | Yağ dokusu M ₂ -tip izozimlerinin birbirine dönüşümü | 10 |
| 3 | M ₂ -tip piruvat kinazın fosforilasyonu | 12 |
| 4 | A) L-tip piruvat kinazın PEP'e karşı Michaelis-Menten grafiklemesi B) M ₂ -tip piruvat kinazın PEP'e karşı Michaelis-Menten grafiklemesi | 20 |
| 5 | L-tip piruvat kinazın PEP'e karşı Lineweaver-Burk grafiklemesi | 21 |
| 6 | A) L-tip piruvat kinazın ADP'ye karşı Michaelis-Menten grafiklemesi B) M ₂ -tip piruvat kinazın ADP'ye karşı Michaelis-Menten grafiklemesi | 22 |
| 7 | L-tip piruvat kinazın ADP'ye karşı Lineweaver-Burk grafiklemesi | 23 |
| 8 | A) L-tip piruvat kinaz için Mg ⁺² doygunluk eğrisi B) M ₂ -tip piruvat kinaz için Mg ⁺² doygunluk eğrisi | 24 |
| 9 | M ₂ -tip piruvat kinaz için PEP'e karşı Lineweaver-Burk grafiklemesi | 25 |
| 10 | M ₂ -tip piruvat kinaz için ADP'ye karşı Lineweaver-Burk grafiklemesi | 26 |
| 11 | L-tip piruvat kinaz için Mg ⁺² 'ye karşı Lineweaver-Burk grafiklemesi | 27 |
| 12 | M ₂ -tip piruvat kinaz için Mg ⁺² 'ye karşı Lineweaver-Burk grafiklemesi | 28 |
| 13 | M ₂ -tip için ADP ve MgADP varlığında 60 ⁰ C'de ısı-bozunum sonuçlarının semi-logaritmik grafiklemesi | 31 |

ŞEKİLSAYFA NO.

| | | |
|----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 14 | M ₂ -tip için FDP ve (Mg ⁺² + FDP) varlığında 60°C'de ısı - bozunum sonuçlarının semi-logaritmik grafiklemesi | 32 |
| 15 | M ₂ -tip için (ADP + FDP) ve (MgADP + FDP) varlığında 60°C'de ısı-bozunum sonuçlarının semi-logaritmik grafiklemesi | 33 |
| 16 | M ₂ -tip için PEP ve (Mg ⁺² + PEP) varlığında 60°C'de ısı-bozunum sonuçlarının semi-logaritmik grafiklemesi | 34 |
| 17 | M ₂ -tip için kontrol ve Mg ⁺² varlığında 60°C'de ısı - bozunum sonuçlarının semi-logaritmik grafiklemesi | 35 |
| 18 | L-tip için ADP ve MgADP varlığında 60°C'de ısı-bozunum sonuçlarının semi-logaritmik grafiklemesi | 40 |
| 19 | L-tip için FDP ve (Mg ⁺² + FDP) varlığında 60°C'de ısı-bozunum sonuçlarının semi-logaritmik grafiklemesi | 41 |
| 20 | L-tip için (ADP + FDP) ve (MgADP + FDP) varlığında 60°C'de ısı-bozunum sonuçlarının semi-logaritmik grafiklemesi | 42 |
| 21 | L-tip için kontrol ve PEP, (Mg ⁺² + PEP), Mg ⁺² varlığında 60°C'de ısı-bozunum sonuçlarının semi-logaritmik grafiklemesi | 43 |

K I S A L T M A L A R

| | | |
|-------------------|---|------------------------------------------------|
| PEP | : | Fosfoenolpiruvat |
| FDP | : | Fruktoz-1,6-difosfat |
| AMP | : | Adenozin-5'-monofosfat |
| ADP | : | Adenozin-5'-difosfat |
| ATP | : | Adenozin-5'-trifosfat |
| HEPES | : | N-2-hidroksietilpiperazin-N'-etansülfonik asit |
| ϵ -ACA | : | ϵ -aminokaproik asit |
| K-PO ₄ | : | Potasyum fosfat |
| DNPH | : | Dinitrofenil hidrazin |

I . G İ R İ Ş

Glukoz ve diğler heksos fosfatların glikolitik yolda yıkım hızını düzenleyen üç enzimden biri olan piruvat kinaz (EC 2.7.1.40), glukoneogenez ve glikoliz arasındaki dinamik dengeyi sağlayan önemli bir enzimdir (1,2). Piruvat kinaz glikolitik yolda fosfoenolpiruvat (PEP)'tan fosforil grubunun adenzindifosfat (ADP)'a aktarılarak adenzintrifosfat (ATP)'ın sentezlendiğı tepkimeyi katalize eder. Piruvat kinaz enzimi önceleri dokuya bağılı olarak adlandırılmış; piruvat kinaz K (Kidney : böbrek), piruvat kinaz S (spleen : dalak), piruvat kinaz L (liver : karaciğler) v.b. daha sonra daha ileri fizikokimyasal karakterizasyonları piruvat kinazları dört grup (izozim) altında toplamanın doğru olacağını göstermiştir. Bu izozimler M_1 , R, L ve M_2 dir (3).

M_1 -tip piruvat kinaz, kalb kası ve beyinde bulunan ana izozimdir ve yetişkin iskelet kasında bulunan tek piruvat kinaz izozimidir. Diğler izozimlere oranla en kolay izole edilip saflaştırılabilen tiptir. M_1 -tip piruvat kinazların ADP için K_m 'i 0.3 mM civarında ve ATP için inhibisyon sabiti ise 3.0-3.7 mM arasındadır. Değişik dokulardan elde edilen M_1 -tip izozimler fruktozdifosfat (FDP)'a duyarsızdırlar, PEP ile Michaelis - Menten kinetiğı gösterirler ve K_m değerleri 0.04-0.09 mM arasındadır (Tablo 1). Optimum pH'ları 7.5 civarındadır, izoelektrik noktaları (pI) ise 8.5-8.9 arasındadır. Değişik kaynaklardan elde edilen M_1 -tip izozimlerin moleköl ağırlıkları 212-250.000 arasındadır. M_1 -tip piruvat kinazlar

molekül ağırlıkları eşit dört altbirimden oluşurlar. Amino asit analizlerinde gözlenen ortak özellik düşük triptofan seviyeleridir (3).

Tablo 1 : M₁-tip piruvat kinazın bazı kinetik özellikleri.

| Substrat | Inhibitör | K _m ; mM | K _i ; mM |
|----------|-----------|---------------------|---------------------|
| ADP | - | 0.3 | - |
| PEP | - | 0.04-0.09 | - |
| - | ATP | - | 3.0-3.7 |

R izozimi omurgalılarda sadece alyuvarlarda bulunur. R-tip piruvat kinaz ergin alyuvarlarda homotetramer, R₄, retikülositlerde heterotetramer, R₂R₂' ve eritroblastlarda ise yine homotetramer, R₄', olarak bulunur. R₄' ve R₂R₂' tipi piruvat kinazlar proteolitik olarak R₄ (ergin) formuna çevrilebilir. R-tip piruvat kinaz allosterik bir enzimdir. FDP allosterik aktivatörü, ATP ise allosterik inhibitörüdür. Diğer izozimlerden farklı olarak tepkime PEP ile başlatıldığında "hysteretic" tipte davranış gösterirler. Eksikliğinde nonsferositik hemolitik anemi gelişir. Amino asit kompozisyonu açısından L-izozimine çok benzerdir. Aradaki ana fark R-tipindeki fazla arjinin ve triptofandır (3,4).

L-tip piruvat kinaz karaciğerdeki ana izozimdir. L-izozimi karaciğer parankimal hücrelerde bulunur. L-tip piruvat kinaz düzenleyici bir enzimdir. Uygulanan diyet ve hormonlar bu tip enzimin karaciğerdeki miktarını etkiler. Allosterik bir enzim olan L-izozimi PEP derişimine bağlı kooperatif kinetik gösterir. Değişik araştırmacılarca L-tip piruvat kinaz

için rapor edilen molekül ağırlığı 193.000-265.000 arasındadır. Enzimin tetramerik bir yapısı vardır ve alt birimler eşit ağırlıktadır (3,5).

Inorganik fosfat (P_i) L-tip piruvat kinazı PEP derişiminden bağımsız olarak uyarır. P_i 'nin etkisi ADP derişimine bağılıdır. Yüksek ADP derişiminde P_i uyarıcı olarak etkin olduğu halde düşük ADP derişiminde P_i inhibitör olarak görev yapmaktadır (1).

L-izozimin etkinliği FDP yokluğunda PEP'e karşı grafiklendiğinde sigmoidal eğriler elde edilmiştir. FDP eklendiğinde bu eğriler Michaelis-Menten tipi kinetiğe dönmektedir. Taze hazırlanmış L-tip piruvat kinazın PEP için görünür K_m değeri FDP varlığında 0.08-0.1 mM arasındadır, FDP yokluğunda ise PEP için görünür K_m değeri 0.84-2.5 mM arasındadır. L-izozimi oksitlenmiş 2-merkaptotanol ile yükseltgendiği zaman K_m değeri FDP varlığında 0.7 mM dır (bkz Tablo 2), FDP yokluğunda ise bu değer ölçülememiştir (5,8,9).

Tablo 2 : L-tip piruvat kinazın FDP varlığında ve yokluğunda K_m değerleri.

| | K_m ; mM | |
|---------------------|------------|-------------|
| | +FDP | -FDP |
| Taze Enzim | 0.08-0.1 | 0.84-2.5 |
| Yükseltgenmiş Enzim | 0.7 | ölçülememiş |

Tablo 2'den görüldüğü gibi yükseltgenmiş formun K_m değeri, indirgenmiş formunkinden yüksektir. Bu farkın fizyolojik bir önemi olabilir. Yükseltgenmiş L-izoziminde PEP bağlama bölgelerinin etkileşimi artar ve FDP tepkimeyi uyarabilir. Fakat etkinliğinin tamamını elde etmek için

gerekli FDP derişimi karaciğer FDP derişiminden yüksektir. PEP ve FDP için enzim affinitesindeki düşüş, açlık ve glukoneogenezde önemli olabilir (9).

L-tip piruvat kinazın PEP için K_m değeri ADP'nin inhibitör derişimine ulaşılan kadar ADP'den etkilenmez. ADP'nin inhibe edici derişimleri K_m 'i yükseltir ama n_H değerini değiştirmez (7).

L-tip piruvat kinazın FDP için K_m değeri 2×10^{-6} M dir (7). Taze homojenat'taki L-tip piruvat kinaz ve kısmi saflaştırılmış enzim FDP ile aktive edilemezler. Bu; iki tip piruvat kinaz olduğunu ve bunlardan yalnızca birinin FDP ile aktive olduğunu gösterir (5). Mol piruvat kinaz (250.000 dalton) için 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 piruvat kinaza bağlanması pozitif kooperativite gösterir. Effektörlerin yokluğunda $[FDP]_{1/2}$ değeri $2.6 \mu M$, n_H değeri ise 2.7 dir. Ortamdaki piruvat ve PEP, FDP bağlanmasını artırır. ATP veya ADP'nin tek başına eklenmesinin FDP bağlanmasının üzerine etkisi çok azdır. Buna karşın ATP ve ADP; PEP ve piruvatın meydana çıkardığı bağlanmayı artırıcı etkiyi azaltırlar. Alanin, FDP bağlanmasını inhibe eder. Alaninin inhibe edici etkisi hem FDP, hem de alanin derişimine bağlıdır. Alanin bağlanma bölgesi, FDP bağlanma bölgesinden farklıdır. FDP bağlanması fosforilasyondan etkilenir. Fosforlanmış enzim için $[FDP]_{1/2}$ $5 \mu M$, n_H ise 1.7 dir (6).(Tablo 3).

Tablo 3 : L-tip piruvat kinazda fosforlanmanın etkileri.

| | Fosforlanmış Enzim | Fosforlanmamış Enzim |
|---------------|--------------------|----------------------|
| $[FDP]_{1/2}$ | 5 μ M | 3 μ M |
| n_H | 1.7 | 2.7 |

ATP, L-tip piruvat kinazın allosterik inhibitörüdür. ATP için K_i 1.5×10^{-4} M dır. Mg^{+2} derişiminin yükseltilmesi, ATP inhibisyonunu kaldırmaz. ATP'nin allosterik inhibisyonu FDP varlığında, FDP'nin ATP ile yarışması sonucu geri döndürülür. ATP için yarı inhibitör derişimi FDP eklenmesi ile 10 kat artar. FDP'nin ATP inhibisyonunu kaldırıcı bu etkisi, ATP için fizyolojik derişim olan 1 mM'da gözlenmiştir. Enzimin yaşlanması ATP'ye olan duyarlılığını azaltır (5,8). L-tip piruvat kinazın allosterik bir inhibitörü olan L-alanin için K_i 0.22 mM dır. Alanin inhibisyonu pH bağımlıdır. Bu inhibisyon, 0.1 mM PEP derişiminde, 0.1 mM FDP ile geri döndürülür. D-alanin inhibitör değildir. Fenilalanin de inhibitördür ve K_i değeri 2.4 mM dır (7,12). Düşük enzim derişimine (1 μ g/ml'den az) 0.02 mM veya daha fazla FDP eklendiğinde; MgATP ve L-alanin inhibisyonları geri döndürülür ve enzimin maksimum etkinliğinin % 50'si elde edilir. Aynı değer, inhibitörlerin yokluğunda 0.15 mM PEP ile elde edilir. Hidrojen iyonu derişiminin yükseltilmesi (pH 6.5), FDP yokluğunda kısmi olarak MgATP ve L-alanin inhibisyonunu azaltır. MgATP ve L-alanin'in pH 6.5'taki inhibisyonunu tamamiyle kaldırmak için sadece 5 μ M FDP yeterliyken, pH 7.5'ta MgATP ve L-alanin'in yaptığı inhibisyonu tümüyle kaldırmak için daha yüksek derişimde FDP'ye ihtiyaç vardır. Fakat preinkübasyon yapıldığında 20 μ M FDP, inhibisyonu kaldırmak için yeterlidir (11).

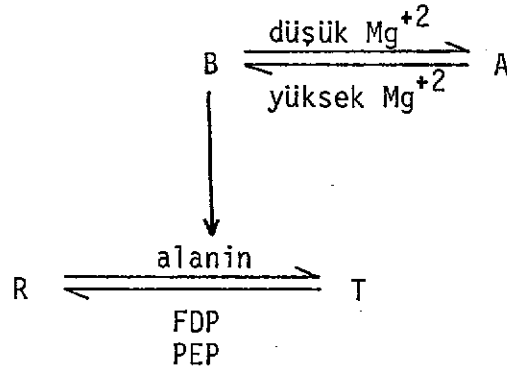
L-tip piruvat kinaz için PEP doyunluk kinetikleri çalışılmıştır. Bu çalışmalarda, aktivatör katyon Mn^{+2} olduğu zaman hiperbolik hız eğri-leri elde edilmiştir, fakat Mg^{+2} aktivatör katyon olarak kullanıldığında sigmoidal eğriler elde edilmiştir. Yükselen derişimlerde bu katyonlar kul-lanıldığında, Mn^{+2} varlığında V_m belirgin şekilde düşüktür. Mn^{+2} katali-tik olarak Mg^{+2} 'den daha az verimlidir. Fakat Mn^{+2} , düşük aktivite göste-ren konformasyondaki enzimi aktive eder. Fonksiyonel olarak Mn^{+2} 'in, Mg^{+2} 'den daha değişik etkisi vardır. Büyük bir olasılıkla iki katyon, enzim üzerinde değişik bölgelere bağlanmaktadır. Mn^{+2} varlığındaki V_m , Mg^{+2} varlığındaki V_m 'in % 50 si kadardır. İki değerlikli metal iyonu en-zimin PEP'e olan affinitesini artırır. Mg^{+2} varlığında ve FDP yokluğunda $[PEP]_{1/2}$ yaklaşık 1 mM dır ve FDP'nin eklenmesi ile bu değer yaklaşık 0.1 mM'a düşer. Fakat Mn^{+2} çift değerlikli metal iyonu olarak kullanıldı-ğında, FDP varlığında ve yokluğunda $[PEP]_{1/2}$ değişmez. Bu nedenle L-tip piruvat kinaz için Mn^{+2} ile beraber FDP kullanıldığında belirgin bir ak-tivasyon gözlenmez. Mg^{+2} varlığında Mn^{+2} 'ye cevap, PEP ve FDP derişimleri-ne bağlıdır (6,7).

Piruvat kinaz L-izozimi c-AMP bağımlı protein kinaz tarafından fos-forlanır. Enzimin fosforilasyonu serin amino asitleri üzerinden olur. L-tip piruvat kinazın c-AMP bağımlı protein kinazın substratı olması için aktif halde olması gerekmez. Fosforlanmış L-tip piruvat kinazın etkinliği özellikle alçak PEP derişimlerinde düşüktür (13,14).

M_2 -tip piruvat kinaz yetişkinlerin karaciğer, böbrek, yağ dokusu gibi dokularında, fetal ve tümör dokularında bulunur. M_2 -izoziminin mole-kül ağırlığı 190.000-250.000 olarak rapor edilmiştir. Eşit molekül ağırlı-

ğında ve benzer primer yapıda 4 monomerden oluşur. Polipeptidlerin amino uçları diğer piruvat kinaz izozimlerinde olduğu gibi kapalıdır. M_2 -izozimi bulunduğu dokuya bağlı olarak değişik kinetik özellikler göstermektedir (3).

Karaciğer M_2 -izozimi başlangıç hızı PEP ve ADP derişimlerine karşı grafiklendiğinde hiperbolik eğriler verir. FDP varlığında ve düşük PEP derişiminde Michaelis-Menten kinetiği veren M_2 -izozimi, PEP derişimi yükseldikçe allosterik davranış gösterir. Bu enzimin PEP'e değişik affinitesi olan iki tipinin olduğunu gösterir (bkz Şekil 1).



Şekil 1 : M_2 -tip piruvat kinazın PEP'e değişik affinitesi olan formları.

Şekil 1'den görüldüğü gibi FDP ve PEP, R formuna, diğer inhibitörler ise T formuna bağlanırlar. Mg^{+2} derişimi düşünce A formu oluşur, bu formun PEP'e affinitesi düşük ve FDP'ye duyarsızdır. B formunun FDP'ye yüksek affinitesi vardır. FDP, A formunu B formuna çevirir ve B formu yüksek Mg^{+2} derişimlerinde aktive olur. Karaciğer, beyin ve böbrekte Mg^{+2} derişimi sabit olduğundan $B \rightleftharpoons A$ dengesi FDP derişimine bağımlıdır (17).

Sıçan böbreği M_2 -izozimi PEP'e karşı sigmoid kinetik gösterir.

PEP'e karşı bu enzim homotropik kooperativite gösterir ve bu pH bağımsızdır (19,20).

Domuz böbrek tip-A piruvat kinazı PEP ile sigmoidal davranış göstermez ve Hill sabiti, n_H , 0.8 dir. Bu enzimin PEP'e olan bağımlılığı pH ile değişir. Bu izozim pH 5.5'tan pH 7.0'ye kadar Michaelis-Menten kinetiği gösterir ve K_m değeri 0.08 mM dır. Buna karşın pH 7.5-8.0 arasında PEP için iki K_m değeri vardır. Bu değerlerden biri düşük; 0.1 mM, diğeri ise yüksek; 0.3-0.6 mM dır. FDP, pH 7.5'ta izozimi, PEP için düşük K_m 'i olan kinetik forma çevirir. Fakat alanin veya fenilalanin varlığında izozim PEP için yüksek K_m 'i olan forma döner (16).

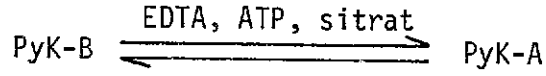
Karaciğer M_2 -tip piruvat kinazın FDP yokluğunda pI'sı 7.8 dir. FDP için iki bağlama bölgesi vardır. M_2 -tip piruvat kinaz pI 7.8 izozimi 0.1 M dan yüksek iyonik kuvvette FDP bağlamaz. Bu nedenle FDP, yüksek iyonik kuvvette bu izozimi uyarmaz. Karaciğer M_2 pI 7.8 izoziminin birinci bağlama bölgesi 0.1 M'dan düşük iyonik kuvvette FDP ile karıştırıldığında FDP bağlar. Birinci bağlama bölgesine FDP bağlanması enzimin pI'sını 6.6'ya kaydırır. Birinci bölgeye FDP bağlandıktan sonra yüksek iyonik kuvvet altında bile ikinci bağlama bölgesine FDP bağlanabilir. Bu nedenle, FDP'nin birinci bağlama bölgesine bağlanması, FDP derişimi ile iyonik kuvvet arasındaki denge tarafından düzenlenir (15).

Yağ dokusundan piruvat kinazın ekstrakte edilme şekline göre değişik özellik gösteren iki tipi elde edilir. EDTA'nın varlığında ekstrakte edilen tipe PyK-A denmektedir ve bu tip FDP ile aktivasyona duyarlıdır. EDTA yokluğunda ekstrakte edilen PyK-B ise FDP'ye duyarsızdır. PyK-A'nın PyK-B'ye dönüşümünün aracısı FDP dir (18).

Karaciğer M_2 -izozimi ATP tarafından inhibe edilir. Bu inhibisyon ATP'nin Mg^{+2} bağlaması ile oluşur ve FDP tarafından kaldırılır. MgATP fizyolojik derişimde enzimin PEP'e olan affinitesi üzerine etkimez ve bu nedenle kontrol açısından önemsizdir (17). Alanin karaciğer M_2 -izozimini allosterik olarak inhibe eder. PEP derişimi 0.5 mM olduğunda alanin için K_i 0.042 mM dır. Yarı maksimum inhibisyon 0.06 mM alanin ile elde edilmiştir. M_2 -tip karaciğer izoziminin fenilalanin inhibisyon eğrisi hiperboliktir ve pH-bağımsızdır. Yarı maksimum inhibisyon 0.11 mM fenilalanin ile elde edilir (21,23).

Böbrek M_2 -izozimi ATP, alanin ve fenilalanin tarafından inhibe edilir. ATP inhibisyonu; pH-bağımsızdır, FDP ile geri çevrilemez ve enzimin hem PEP ile doyurulmuş, hem de PEP ile doyurulmamış formu için gözlenir. ATP varlığında izozim PEP için hem yüksek (0.3-0.6 mM), hem düşük (0.1 mM) K_m gösterir. Piruvat kinazın inhibitörlerinden biri olan alanin 5 mM'da diğer bir inhibitör olan fenilalanin'in inhibisyonunu daha az belirgin kılar. FDP derişimi 5 μM ve PEP derişimi 1.0 mM'dan düşük ise alanin inhibisyonu gözlenmez. Fenilalanin ise bu izozimi (pH 7.5'ta) PEP için yüksek K_m 'i (0.3-0.6 mM) olan forma çevirir. Fenilalanin enzimi inhibe eder fakat fenilalanin varlığında PEP için sigmoidal bağımlılık gözlenmez. Inhibisyon 5 μM FDP ile tamamiyle kaldırılır. Böbrek M_2 -izozimi için 2.5 veya 5.0 mM Ca^{+2} , etkinlikte belirgin düşüğe neden olur. Bu inhibisyon, Mg^{+2} derişiminin yükseltilmesi ile kısmi olarak kaldırılır (16,22).

Yağ dokusunda, PyK-A ATP ile kooperatif etkileşim gösterirken PyK-B Michaelis-Menten kinetiği verir.



Şekil 2 : Yağ dokusu M_2 -tip izozimlerinin birbirine dönüşümü.

Şekil 2'den görüldüğü gibi PyK-B'nin PyK-A'ya dönüşümünde EDTA, ATP ve sitrat aracılık eder. PyK-A'nın PyK-B'ye dönüşümünü ATP fizyolojik derişimde inhibe eder (18).

Serbest Mg^{+2} derişimi M_2 -tip karaciğer izoziminin hem V_m değerini, hem de PEP'e olan affinitesini etkiler (bkz Tablo 4).

Tablo 4 : M_2 -tip piruvat kinazın değişik serbest Mg^{+2} derişimlerinde PEP için K_m değerleri.

| $[Mg^{+2}]$ serbest ; mM | $K_{0.5}$ (PEP) ; mM |
|--------------------------|----------------------|
| 0.5 | 0.45 |
| 1.0 | 0.34 |
| 10.0 | 0.16 |
| 23.0 | 0.14 |

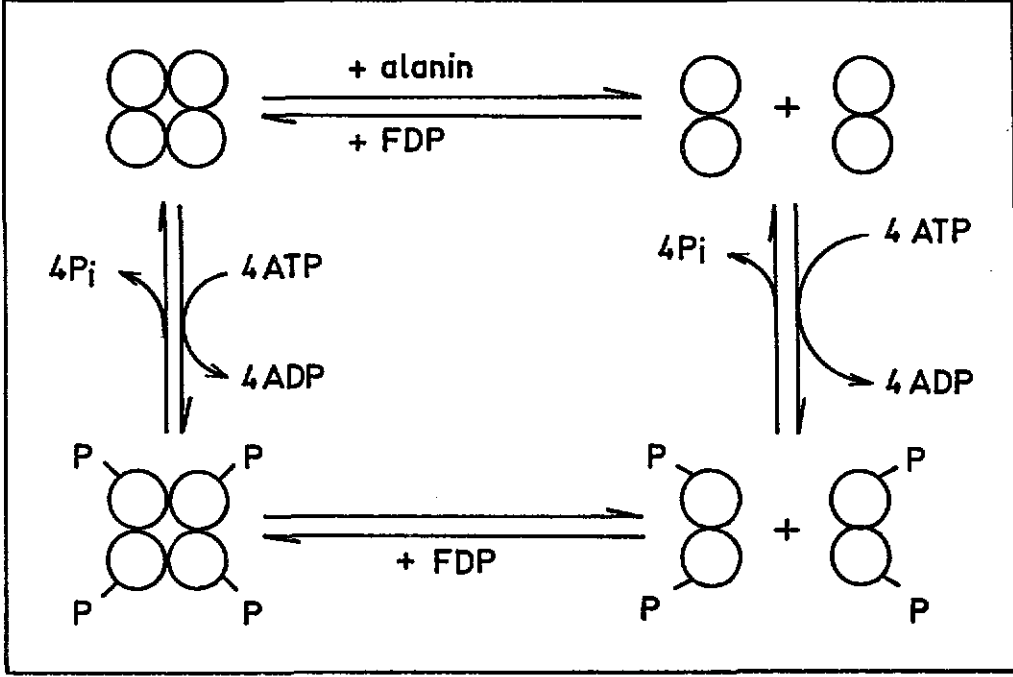
Serbest Mg^{+2} derişimi 0.5 mM'da PEP için $K_{0.5}$ 0.34 mM iken, serbest Mg^{+2} derişimi 23 mM'a çıkartıldığında bu değer 0.14 mM'a düşer. İzozim PEP için değişik affiniteleri olan iki formu arasındaki oran serbest Mg^{+2} derişiminden etkilenir. Düşük PEP derişiminde aktif formun n_H değeri serbest Mg^{+2} derişimi düştükçe azalır. Serbest Mg^{+2} derişimi ADP için K_m 'i etkilemez (17).

Böbrek M_2 -tip piruvat kinaz K^+ ve Mg^{+2} yokluğunda inaktif haldedir. Maksimum etkinlik 50 mM KCl'da gözlenmiştir ve K^+ -doygunluk eğrileri hiperboliktir. Mg^{+2} ile geniş etkinlik maksimumu gözlenir (5-15 mM $MgCl_2$). Yarı maksimal inhibisyon 35 mM $MgCl_2$ ile elde edilir (16).

Yağ dokusunda : PyK-A, Mg^{+2} , K^+ , NH_4^+ ile, PyK-B'de, K^+ ve NH_4^+ ile kooperatif etkileşim gösterir. PyK-B, Mg^{+2} ile Michaelis-Menten kinetiği verir. NH_4^+ ve K^+ her iki formunda aktivatörüdür ve NH_4^+ daha etkindir. Yüksek K^+ derişimi inhibisyona neden olur. PyK-A 0.2 mM Cu^{+2} ile inhibe olur, PyK-B ise Cu^{+2} 'ye duyarsızdır (18).

M_2 -tip piruvat kinaz c-AMP bağımsız protein kinaz tarafından fosforlanır ve inaktif hale geçer. Fosforlanmış enzimin inaktivasyonu piruvat kinaz tepkimesi sırasında oluşan ATP'nin, heksokinazın aracılığı ile uzaklaştırılmasıyla ortadan kaldırılır. Fakat, bir kere fosforlanma ile inaktive edilmiş M_2 -izozimi ATP'nin ortamdaki uzaklaştırılması ile veya FDP eklenmesi ile tekrar aktive edilemez. c-AMP bağımsız protein kinazın piruvat kinazı tercihan dimer halde fosforladığı, daha ender olarak da tetramer olarak fosforladığı (bkz Şekil 3) tahmin edilmektedir (24).

M_2 ve L-tip piruvat kinazlar allosterik enzimlerdir. PEP için K_m değerleri FDP yokluğunda her iki izozim için yaklaşık aynıdır. FDP eklenmesi ile K_m 'de görülen düşüş M_2 izozimi için L-izoziminden daha azdır. Her iki izozimde ATP tarafından inhibe edilirken, L-izozimi bu inhibisyona daha duyarlıdır. ATP inhibisyonu L-tip için FDP tarafından geri çevrilebilir, fakat aynı durum M_2 -tip için geçerli değildir. Alanin her iki izozimin de allosterik inhibitörüdür. ADP için K_m her iki izozim için de aynıdır. L-tip piruvat kinaz c-AMP bağımlı protein kinaz ile fosforlanırken M_2 -tipinde fosforilasyon c-AMP bağımsız protein kinaz ile gerçekleşir.



Şekil 3 : M₂-tip piruvat kinazın fosforilasyonu.

Şimdiye değin çeşitli araştırmacıların değişik tür ve dokulardan elde ettikleri L ve M₂-tip piruvat kinazlarla yaptıkları kinetik çalışmalar sonucunda aynı izozimler için bile farklı sonuçlar elde etmeleri ve bütün araştırmacıların yalnızca kinetik parametreleri kullanmış olmaları nedeniyle her iki izozimde kuzu karaciğerinden kısmen saflaştırılarak; efektörlerle kinetik çalışmaların yanı sıra, ısı-bozunum kinetikleri de incelenerek izozimler hakkında daha ileri bilgiler elde edebilmek için bu çalışma gerçekleştirildi.

2 . GEREÇLER VE YÖNTEMLER

2.1. Gereçler

Deneylerde kullanılan fosfoenolpiruvat (Tri(monoheksilamonyum) tuzu), D-fruktoz-1,6-difosfat (trisodyum tuzu), adenozin 5-fosfat (sodyum tuzu) ve L-laktikdehidrogenaz (tavşan kası) Sigma, A.B.D.'den; nikotinamidadenin-dinukleotid-indirgenmiş formu ve N-2-hidroksietilpiperazin-N'-etansülfonik asit (HEPES) Serva, B.Almanya'dan; Sephadex G-25, CM-Sephadex C-25, DEAE-Sephadex A-50; Pharmacia; CM-trisacryl LKB, İsveç'ten; 2-Merkaptoetanol, BDH, İngiltere'den temin edildi. Kullanılan diğer kimyasal gereçler analitik saflıkta idi.

Karaciğerin homojenizasyonu için Waring Blender kullanıldı. Homojenizasyon sonrası çöktürme ve pH çöktürmesi sonunda Sorvall RC-2B süper-santrifüjü kullanıldı. Kromatografilerde fraksiyonlar LKB, Ultrorac 7000 kollektörü ile toplandı. Konsantrasyon basamaklarında Amicon basınçlı ultra-filtrasyon aleti kullanıldı. Protein absorbans ölçümlerinde ve etkinlik tayininde Beckmann Kinetik Model T25 spektrofotometresi kullanıldı.

2.2. Yöntemler

2.2.1. M_2 -tip piruvat kinazın saflaştırılması :

Kuzu karaciğeri gram yaş doku için 3 ml, 1 mM ϵ -aminokaproik asit (ϵ -ACA) içeren su içerisinde homojenize edildi. Homojenat 1 saat $+4^{\circ}\text{C}$ 'de bekletildi ve 2 kat gazlı bezden süzüldükten sonra SS-34 rotoru ile 10.000

rpm'de 30 dakika santrifüj edilerek parçalanmamış hücreler, hücre zarı ve çekirdek çöktürüldü. Süpernatant'ın pH'sı 1 M asetik asit ile 4.7 ye düşürüldü ve oluşan çökelek SS-34 rotoru ile 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek uzaklaştırıldı. Süpernatant'ın pH'sı 1 M tris bazı ile 6.8'e getirildi ve SS-34 rotoru ile 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek berrak asit süpernatantı elde edildi. Asit süpernatantı 10 mM potasyum fosfat ($K-PO_4$) pH 6.45'e karşı bir gece dializ edildi. Dializat'ın bir kısmı 10 mM $K-PO_4$, pH 6.45, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM ϵ -ACA, 0.5 mM EDTA, 2 mM 2-Merkaptoetanol (tampon A) ile dengelenmiş CM-Sephadex C-25 kolonuna uygulandı. Aynı tamponla yıkanan kolondan enzim içerisinde 0.25 M KCl içeren tampon A ile söküldü ve etkinlik gözlenen fraksiyonlar birleştirilerek içerisine son derişimi 20 mM olacak şekilde $MgCl_2$ eklendi. Ultrafiltrasyon aleti ile deriştirilen örnek, M_2 -tip piruvat kinaz kaynağı olarak kullanıldı. X

2.2.2. L-tip piruvat kinazın saflaştırılması :

Kuzu karaciğeri gram yaş doku için 1 ml soğuk su içinde yüksek hızda, 1 dakika Sorvall Omnimixer ile homojenize edildi. Homojenat 1 saat buzdolabında bekletildi ve GS-3 rotoru ile 1 saat 7.000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant'ın pH'sı 4.83'e 1 M asetik asit ile getirildi ve GS-3 rotoru ile 20 dakika 8.000 rpm'de santrifüj edilerek oluşan çökelek uzaklaştırıldı. Süpernatant'ın pH'sı 6.83'e 1 M tris bazı ile getirildi. Süpernatant % 38 amonyum sülfat doygunluğuna getirildi ve bir gece $+4^{\circ}C$ 'de bekletildi ve GS-3 rotoru ile 7.000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Süpernatant % 50 amonyum sülfat doygunluğuna getirildi, 1 saat bekletildikten sonra GS-3 rotoru ile 7.000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek çökelek toplandı. Elde edilen çökelek 15 mM $K-PO_4$, pH 7.10, 10 mM 2-Merkaptoetanol (tampon B) ile çözüldü ve tampon B'ye karşı dializ edildi. Yüzde 38-50

amonyum sulfat kesiti tampon B ile dengelenmiş DEAE-trisacryl kolonuna uygulandı. Uygulama sonunda kolona tampon B içinde 0/0.5 M NaCl gradienti bağlantı. Etkinlik gözlenen fraksiyonlar toplandı ve birleştirilerek 20 saat 20 mM tris-HCl pH 6.9, 5 mM MgCl₂, 0.4 mM EDTA, 10 mM 2-Merkaptoetanol (tampon C)'e karşı dializ edildi. Dializat tampon C ile dengelenmiş Blue-Dextran-Sepharose 4B kolonuna uygulandı. Uygulama sonunda kolon ilk önce tampon C içinde 1 mM AMP ile daha sonra da tampon C ile yıkandı. Yıkama sonunda kolona tampon C içinde 0/0.3 M KCl gradienti uygulandı ve etkinlik gözlenen fraksiyonlar L-tip piruvat kinaz kaynağı olarak kullanıldı.

2.2.3. Protein Ölçümü :

Enzimin saflaştırılması basamaklarında protein ölçümü Warburg - Christian yöntemine (25) göre yapıldı. Örneklerin absorpsiyonları 280 ve 260 nm'de ölçüldü ve

$$\text{mg protein/ml çözelti} = 1.55 \times 0.D_{280} - 0.76 \times 0.D_{260}$$

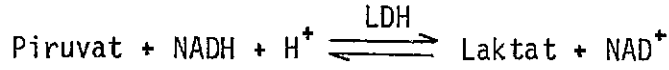
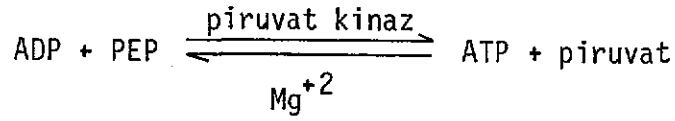
denklemine göre protein ölçümü yapıldı.

2.2.4. Etkinlik Tayini :

Saflaştırma basamaklarında modifiye Kimberg-Yielding'in kolorimetrik yöntemi kullanıldı (26). Metodun esası, gerekli bileşikler ve piruvat kinazın bulunduğu ortamda, tepkime sonunda oluşan piruvik asit'in dinitro-fenilhidrazin (DNPH) ile renk oluşturmasıdır. DNPH ile oluşan hidrazon alkali ortamda renklendirilerek oluşan rengin şiddeti 520 nm'de optik dansite (0.D) olarak ölçülür. Toplam 250 µl olan tepkime ortamı 50 mM HEPES-KOH pH 7.4, 2.1 mM ADP, 1 mM FDP, 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl içermektedir. Bu ortamda enzim 15 dakika ön inkübasyona tabi tutulduktan sonra tepkime ADP eklenmesi ile başlatıldı ve 1, 3, 5, 10, 15 inci dakikalarda

50 µl örnek alınarak 50 µl DNPH içeren ortamda tepkime durduruldu ve açığa çıkan piruvik asit'in DNPH'le oluşturduğu kırmızı renk 520 nm'de ölçüldü.

Kinetik çalışmalarda ve ısı-bozunum deneylerinde etkinlik tayini piruvat kinaz-laktat dehidrogenaz kenetlenmiş spektrofotometrik yöntemi (27) ile yapıldı.



Bu kenetlenmiş tepkimelerin sonunda NADH'ın oksitlenmesine bağlı 340 nm'deki absorbanans düşüşü takip edilerek etkinlik ölçümü yapıldı.

2.2.5. Isı-bozunum deneyleri :

Isı-bozunum deneylerinde ligandlar eklendi. Oda sıcaklığında ön inkübasyon yapıldı. Daha sonra 0. dakika örnekleri alındı ve 60°C'deki su banyosuna konuldu. Belirli zamanlarda örnekler alınarak spektrofotometrik yöntemle etkinlik tayinleri yapılarak zaman içinde 60°C'de bozunum incelendi. Örneklerle değişik ligandlar eklenerek 60°C'de bozunum üzerine yaptığı etkiler gözlemlendi. Kullanılan ligandların derişimleri Tablo 5'te verilmiştir.

Tablo 5 : Isı-bozunum deneylerinde kullanılan ligand derişimleri.

| Ligand | Son derişim; mM |
|------------------|-----------------|
| Mg ⁺² | 10 |
| ADP | 2 |
| FDP | 1 |
| PEP | 2 |

Isı-bozunum deneylerinde kullanılan enzimlerin son derişimleri M₂-tip için, 257 µg/ml ve L-tip için 5.76 µg/ml idi.

3 . B U L G U L A R

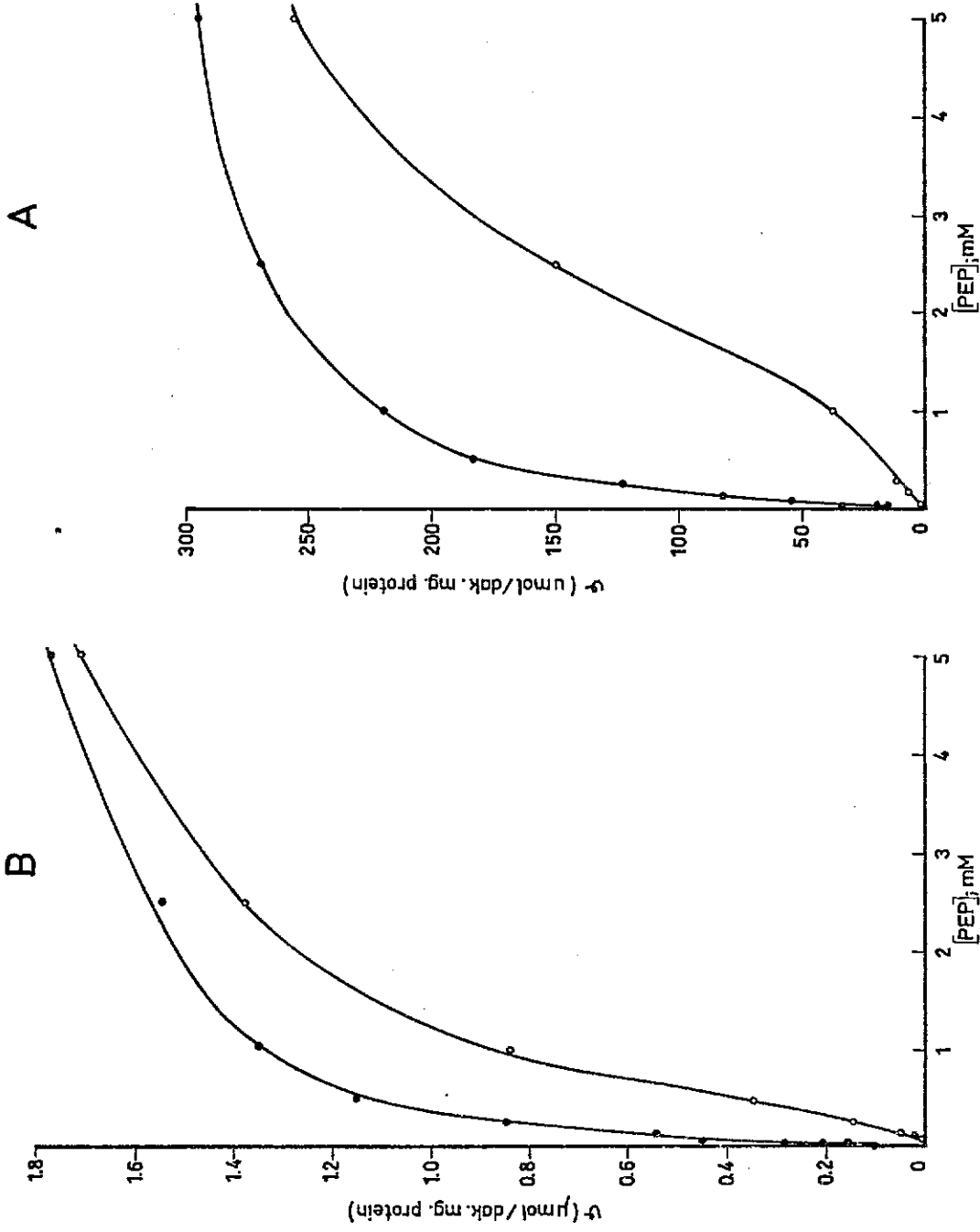
3.1. İzozimlerle yapılan kinetik deney bulguları :

Kinetik çalışmalarda spektrofotometrik etkinlik tayin yöntemi kullanıldı (bkz 2.2.4).

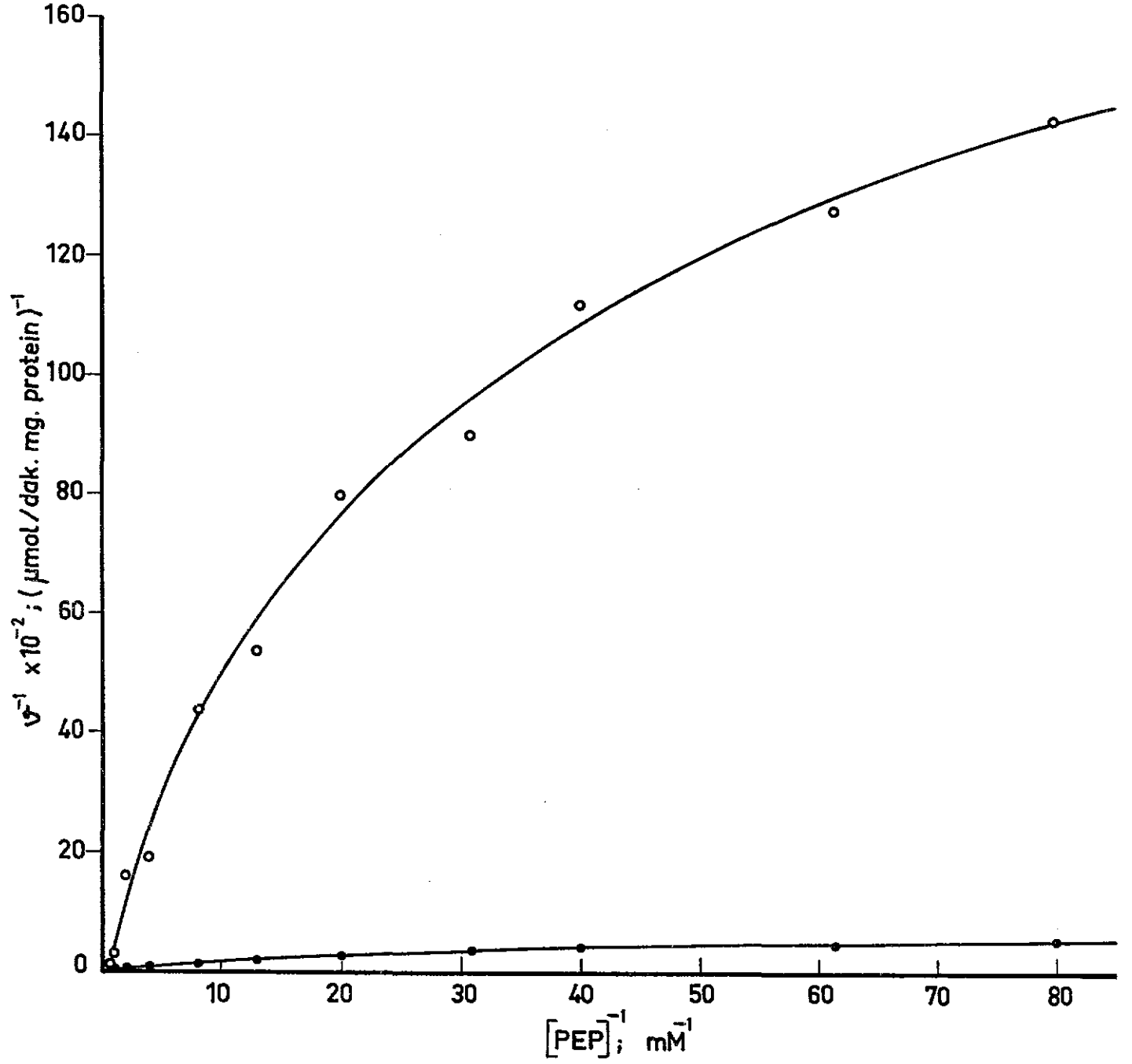
Karaciğer L-tip piruvat kinaz Michaelis-Menten'e göre PEP'e karşı FDP varlığında ve yokluğunda grafiklendiğinde sigmoidal tipte kinetik gösterdi (Şekil 4A). FDP varlığında ve yokluğunda Lineweaver-Burk grafikleri çizildiğinde her iki durumda da enzimin negatif kooperativite gösterdiği bulundu (Şekil 5). Bu nedenle enzimin K_m ve V_m değerleri hesaplanamadı. L-izozimi ADP'ye karşı FDP varlığında ve yokluğunda Michaelis-Menten kinetiği gösterdi (Şekil 6A). Lineweaver-Burk grafiklemesinden ADP için FDP varlığında ve yokluğunda K_m^{ADP} 0.25 mM olarak saptandı. FDP varlığında V_m değeri 143 $\mu\text{mol/dak.}-\text{mg.}$ protein, FDP yokluğunda ise 105 $\mu\text{mol/dk.}-\text{mg.}$ protein idi (Şekil 7). Mg^{+2} doyumluk eğrileri çizildiğinde FDP'li ve FDP'siz ortamda Michaelis-Menten tipte kinetik elde edildi. FDP varlığında V_m 'in 175 $\mu\text{mol/dak.}-\text{mg.}$ protein olduğu ve v 'nin 2 mM Mg^{+2} derişiminde V_m 'in % 85 ine ulaştığı, FDP yokluğunda ise V_m 'in 85 $\mu\text{mol/dak.}-\text{mg.}$ protein'de kaldığı ve Mg^{+2} derişimi 2 mM olduğunda v 'nin, V_m 'in ancak % 55 ine ulaştığı bulundu (Şekil 8A).

Karaciğer M_2 -tip piruvat kinaz'ın PEP'e karşı Michaelis-Menten grafiklenimi FDP varlığında ve yokluğunda sigmoidal tip kinetik gösterdi (Şekil 4B). Aynı sonuçların Lineweaver-Burk çizimlerinde FDP yokluğunda

pozitif kooperative gösteren enzim, 1 mM FDP varlığında negatif kooperativite gösterdi ve bu nedenle K_m ve V_m değerlerini hesaplamak mümkün olmadı (Şekil 9). Bu izozimde L-tip gibi ADP'ye karşı FDP'li ve FDP'siz ortamda Michaelis-Menten kinetiği gösterdi (Şekil 6B). Lineweaver-Burk grafiklemesinden K_m^{ADP} değeri FDP varlığında ve yokluğunda 1.25 mM olarak bulundu. V_m değeri FDP varlığında 14.3 $\mu\text{mol/dak.}-\text{mg. protein}$, yokluğunda ise 11.1 $\mu\text{mol/dak.}-\text{mg. protein}$ idi (Şekil 10). Mg^{+2} doygunluk deneylerinde M_2 -tip piruvat kinazın Mg^{+2} 'ye karşı FDP'li ve FDP'siz ortamda Michaelis-Menten kinetiği gösterdiği saptandı. FDP varlığında ve yokluğunda M_2 -tip piruvat kinaz, L-tip piruvat kinazdan değişik olarak, 2 mM Mg^{+2} derişiminde v 'nin, V_m 'in % 85 ine ulaştığı bulundu (Şekil 8B).



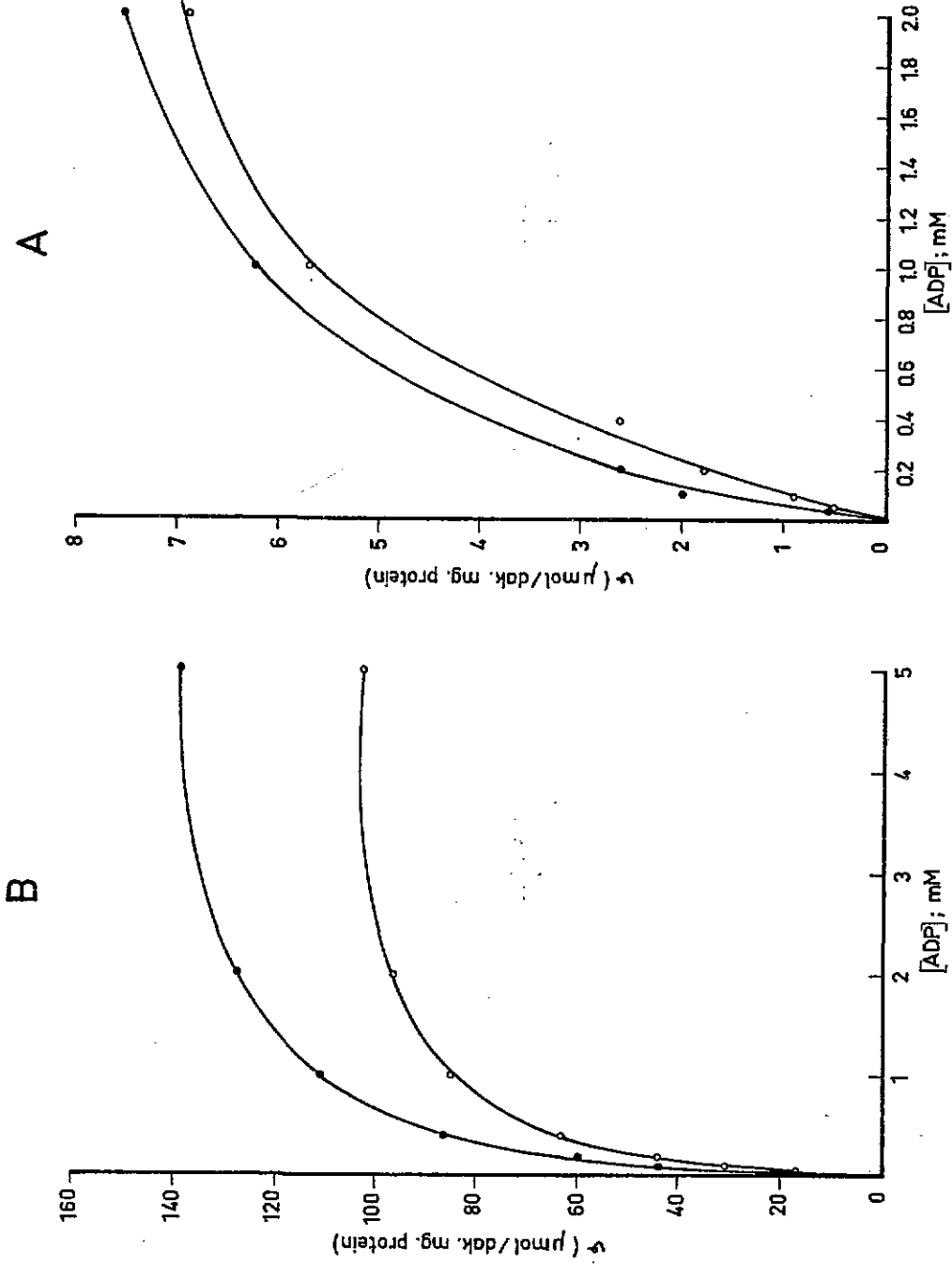
Şekil 4 : A) L-tip piruvat kinazın PEP'e karşı Michaelis-Menten grafiklemesi.
B) M_2 -tip piruvat kinazın PEP'e karşı Michaelis-Menten grafiklemesi.
● FDP varlığında; ○ FDP yokluğunda : |FDP| = 1 mM, |ADP| = 2 mM, |Mg⁺²| = 10 mM



Şekil 5 : L-tip piruvat kinazın PEP'e karşı Lineweaver-Burk grafiklemesi.

● FDP varlığında; ○ FDP yokluğunda :

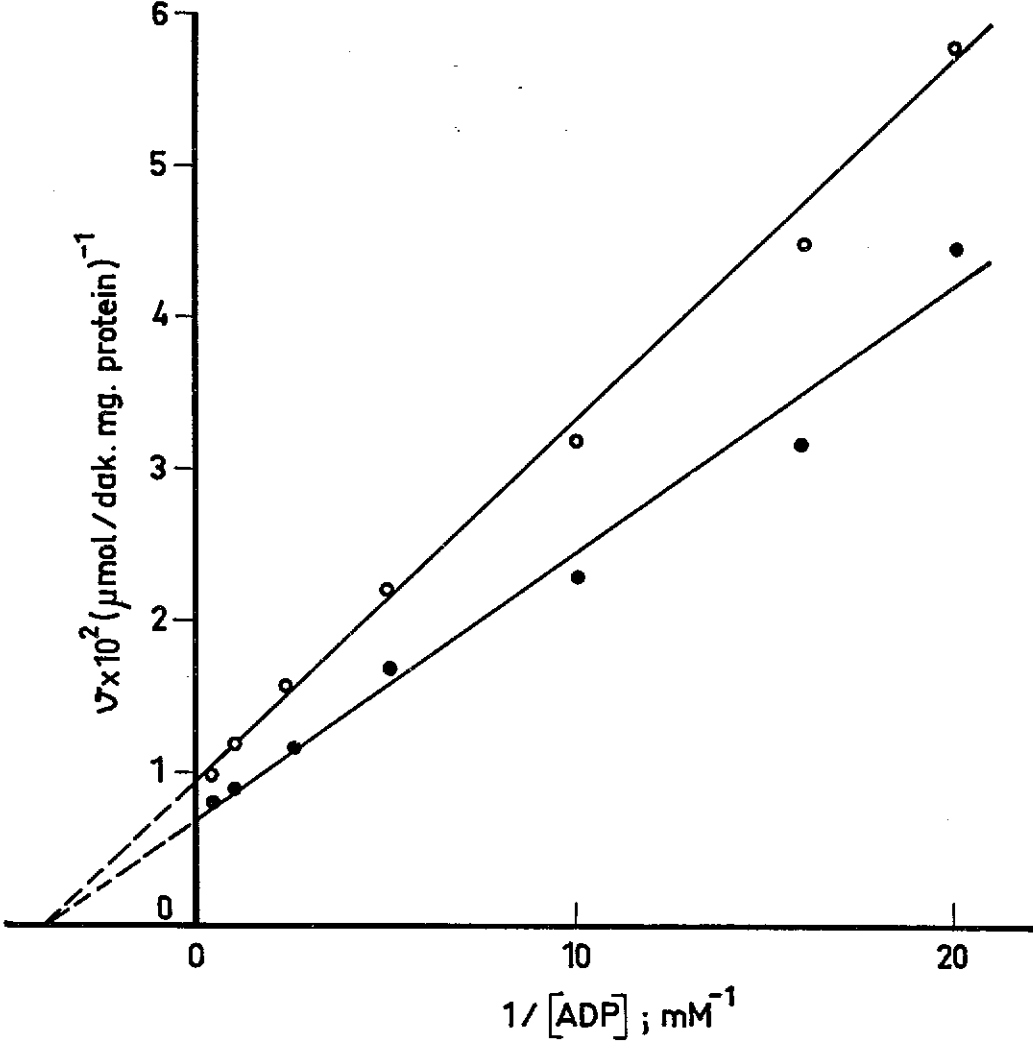
FDP = 1 mM, ADP = 2 mM, Mg^{+2} = 10 mM



Şekil 6 : A) L-tip piruvat kinazın ADP'ye karşı Michaelis-Menten grafiklemesi.

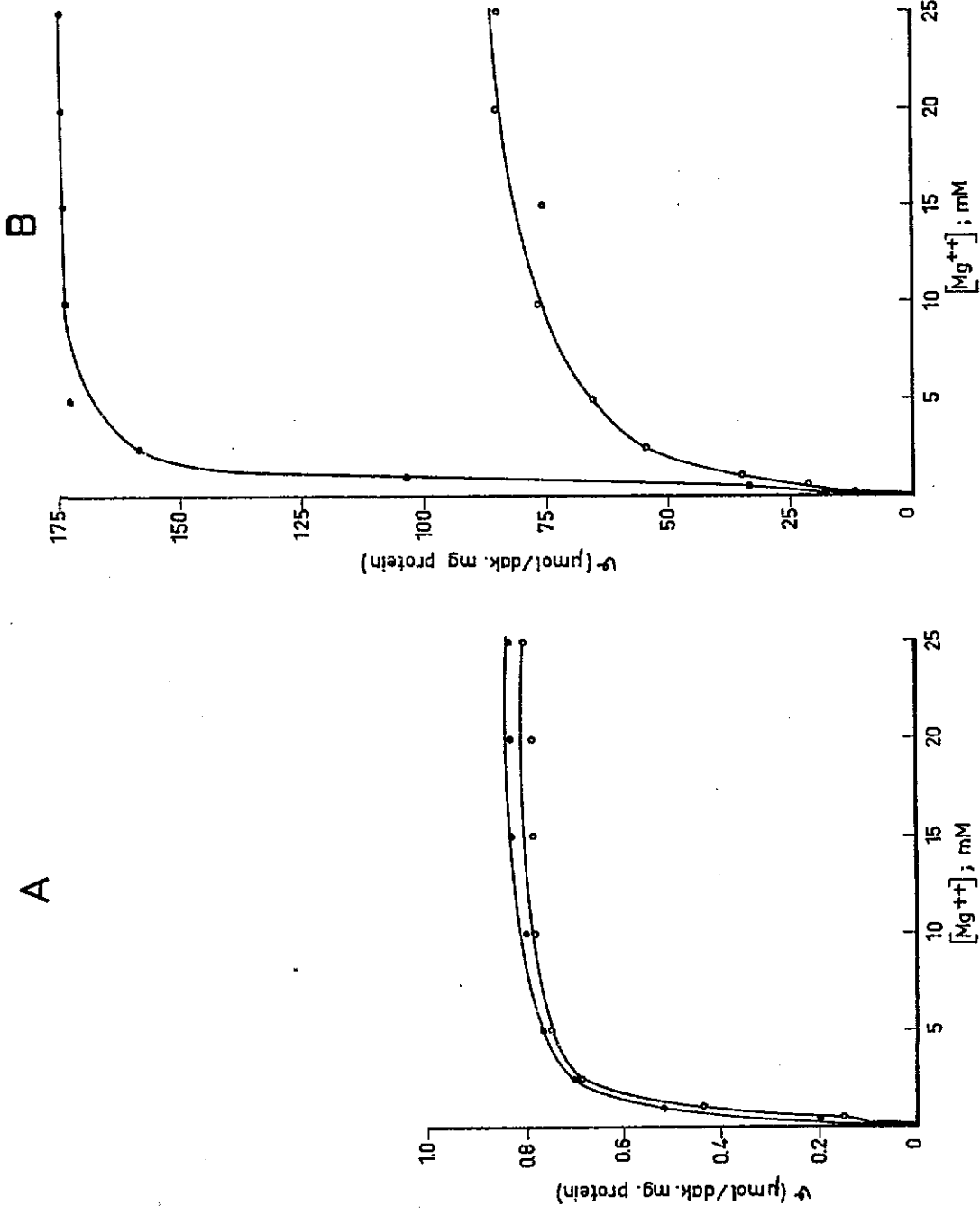
B) M_2 -tip piruvat kinazın ADP'ye karşı Michaelis-Menten grafiklemesi.

● FDP varlığında; ○ FDP yokluğunda : $[\text{FDP}] = 1 \text{ mM}$, $[\text{PEP}] = 2 \text{ mM}$, $[\text{Mg}^{+2}] = 10 \text{ mM}$



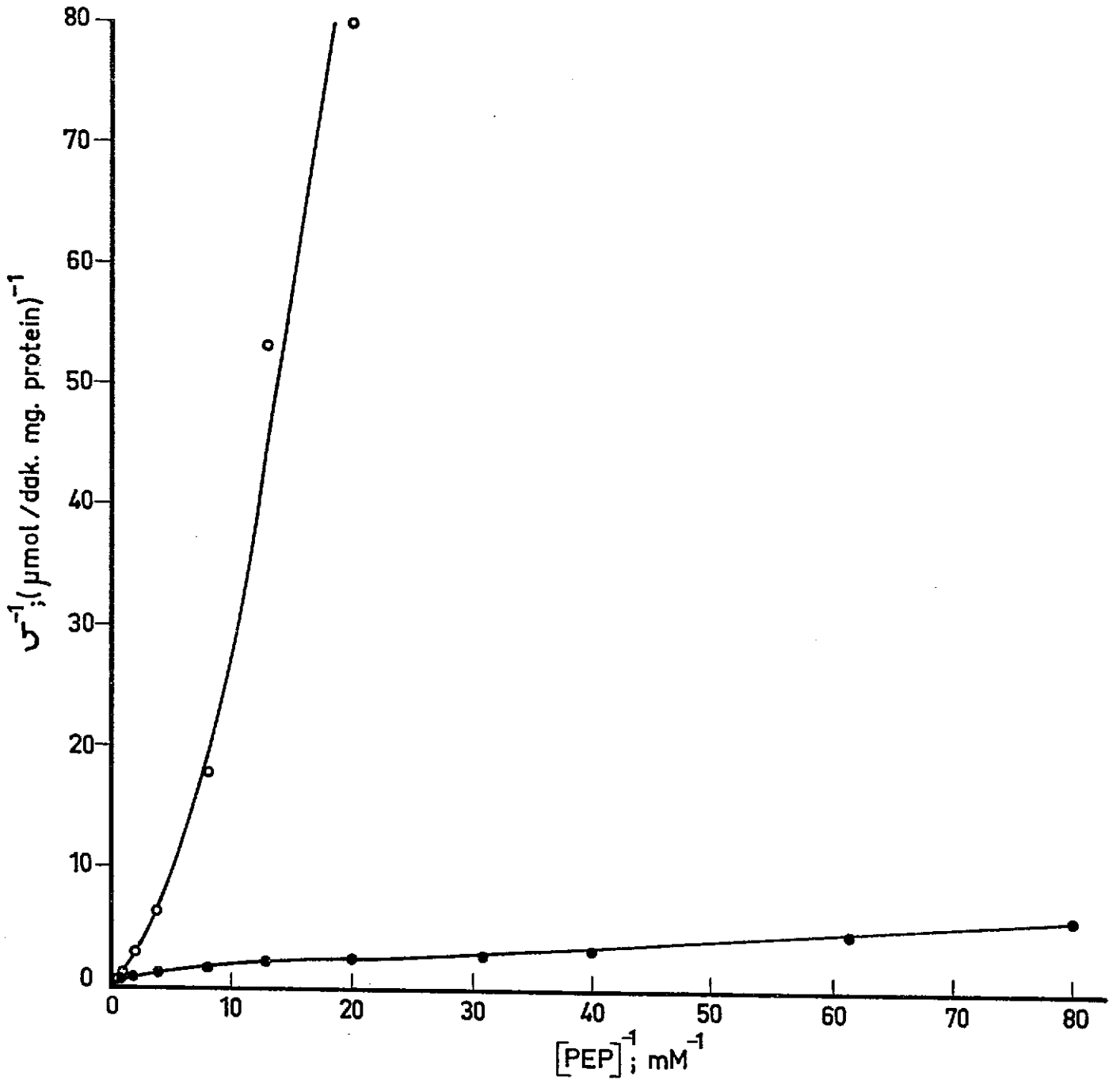
Şekil 7 : L-tip piruvat kinazın ADP'ye karşı Lineweaver-Burk grafiklemesi.

● FDP varlığında; ○ FDP yokluğunda :
|FDP| = 1 mM, |PEP| = 2 mM, |Mg⁺²| = 10 mM



Şekil 8 : A) M_2 -tip piruvat kinaz için Mg^{+2} doygunluk eğrisi.
B) L_2 -tip piruvat kinaz için Mg^{+2} doygunluk eğrisi.

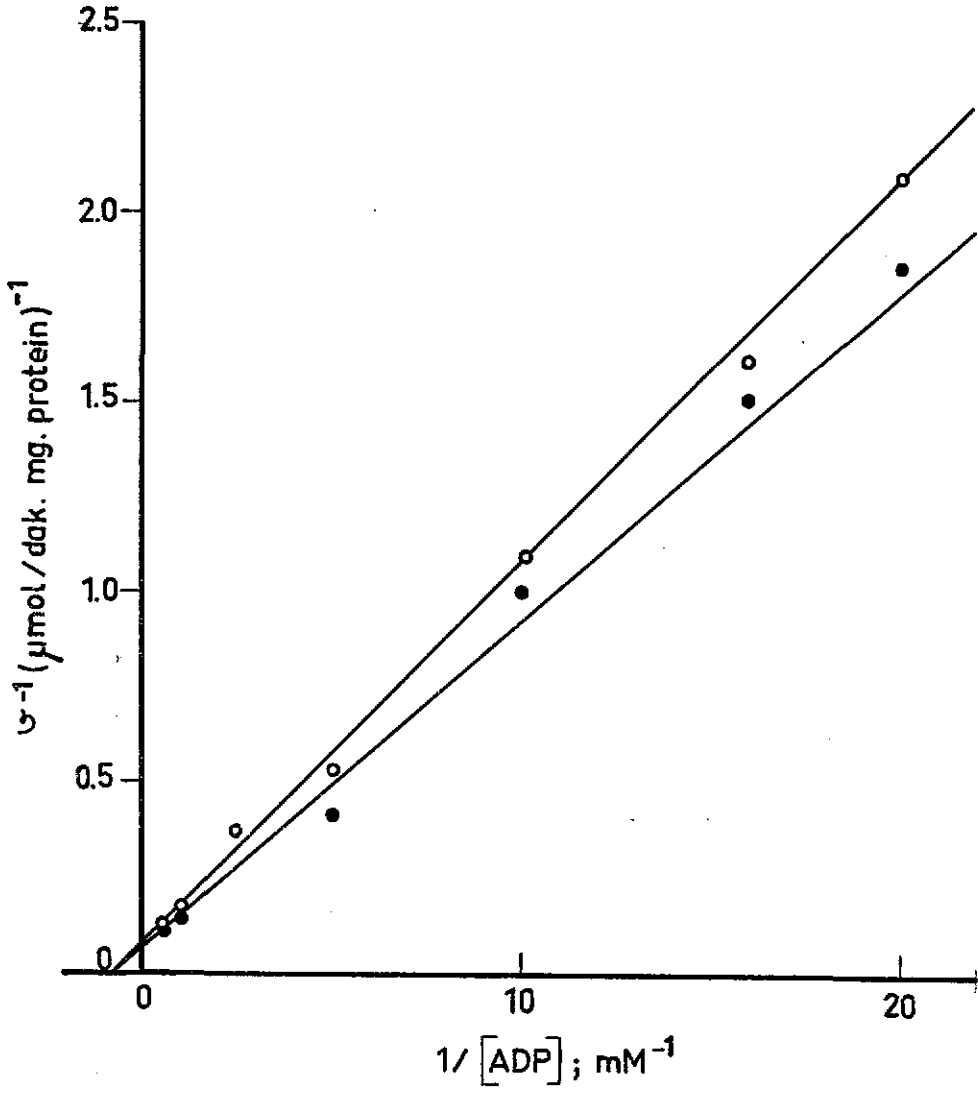
● FDP varlığında; o FDP yokluğunda : $|\text{FDP}| = 1 \text{ mM}$, $|\text{PEP}| = 2 \text{ mM}$, $|\text{ADP}| = 2 \text{ mM}$



Şekil 9 : M₂-tip piruvat kinaz için PEP'e karşı Lineweaver-Burk grafiklemesi.

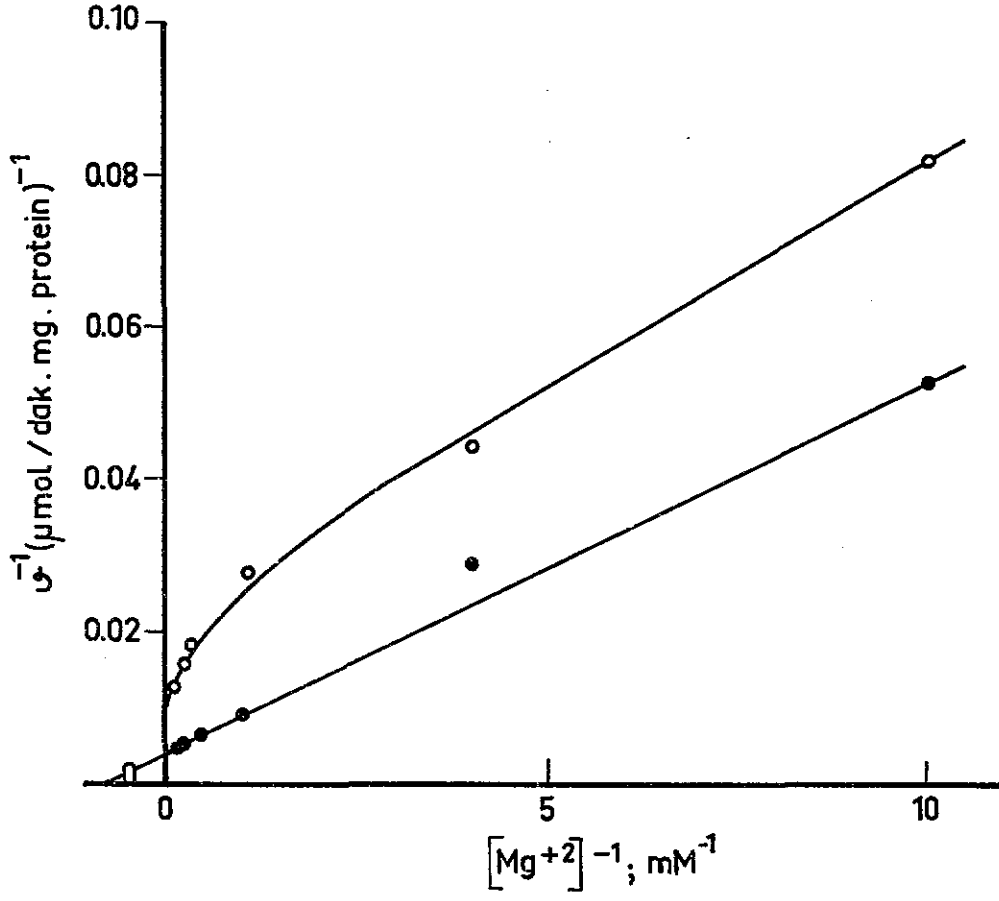
● FDP varlığında; o FDP yokluğunda :

|FDP| = 1 mM, |ADP| = 2 mM, |Mg⁺²| = 10 mM



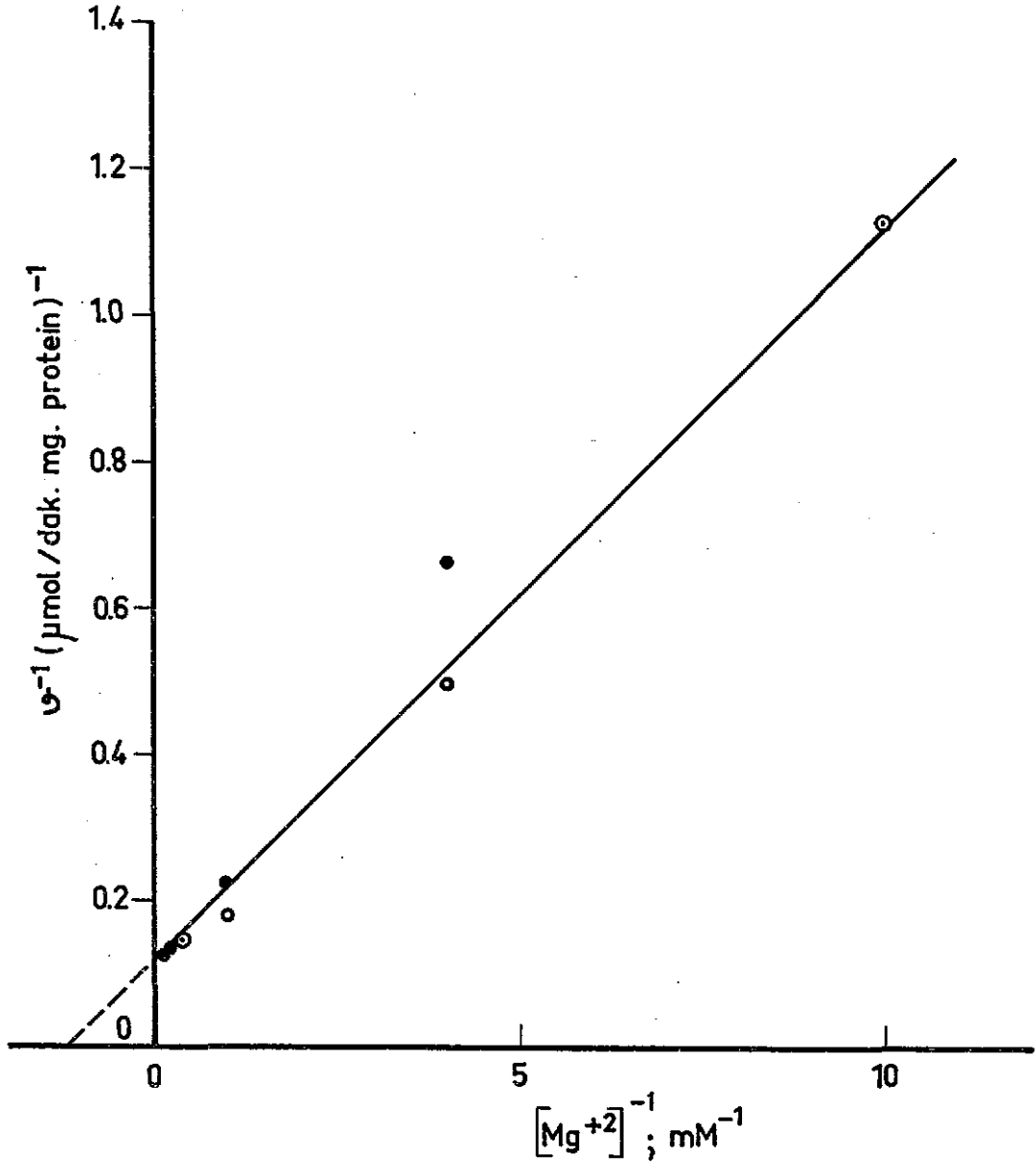
Sekil 10 : M₂-tip piruvat kinaz için ADP'ye karşı Lineweaver-Burk grafiklemesi.

● FDP varlığında; o FDP yokluğunda :
|FDP| = 1 mM, |PEP| = 2 mM, |Mg⁺²| = 10 mM



Şekil 11 : L-tip piruvat kinaz için Mg^{+2} ,ye karşı Lineweaver-Burk grafiklemesi.

- FDP varlığında; ○ FDP yokluğunda :
- $|\text{FDP}| = 1 \text{ mM}, |\text{ADP}| = 2 \text{ mM}, |\text{PEP}| = 2 \text{ mM}$



Şekil 12 : M₂-tip piruvat kinaz için Mg⁺²'ye karşı Lineweaver-Burk grafiklemesi.

● FDP varlığında; ○ FDP yokluğunda :
|FDP| = 1 mM, |ADP| = 2 mM, |PEP| = 2 mM

3.2. Isı-bozunum deneyi bulguları :

Kuzu karaciğeri M_2 -tip piruvat kinaz için $60^{\circ}C$ 'de ısı bozunum deneyleri yapıldı. Bu deneylerde enzimin değişik ligandları kullanıldı ve aşağıda Tablo 6'da verilen sonuçlar elde edildi.

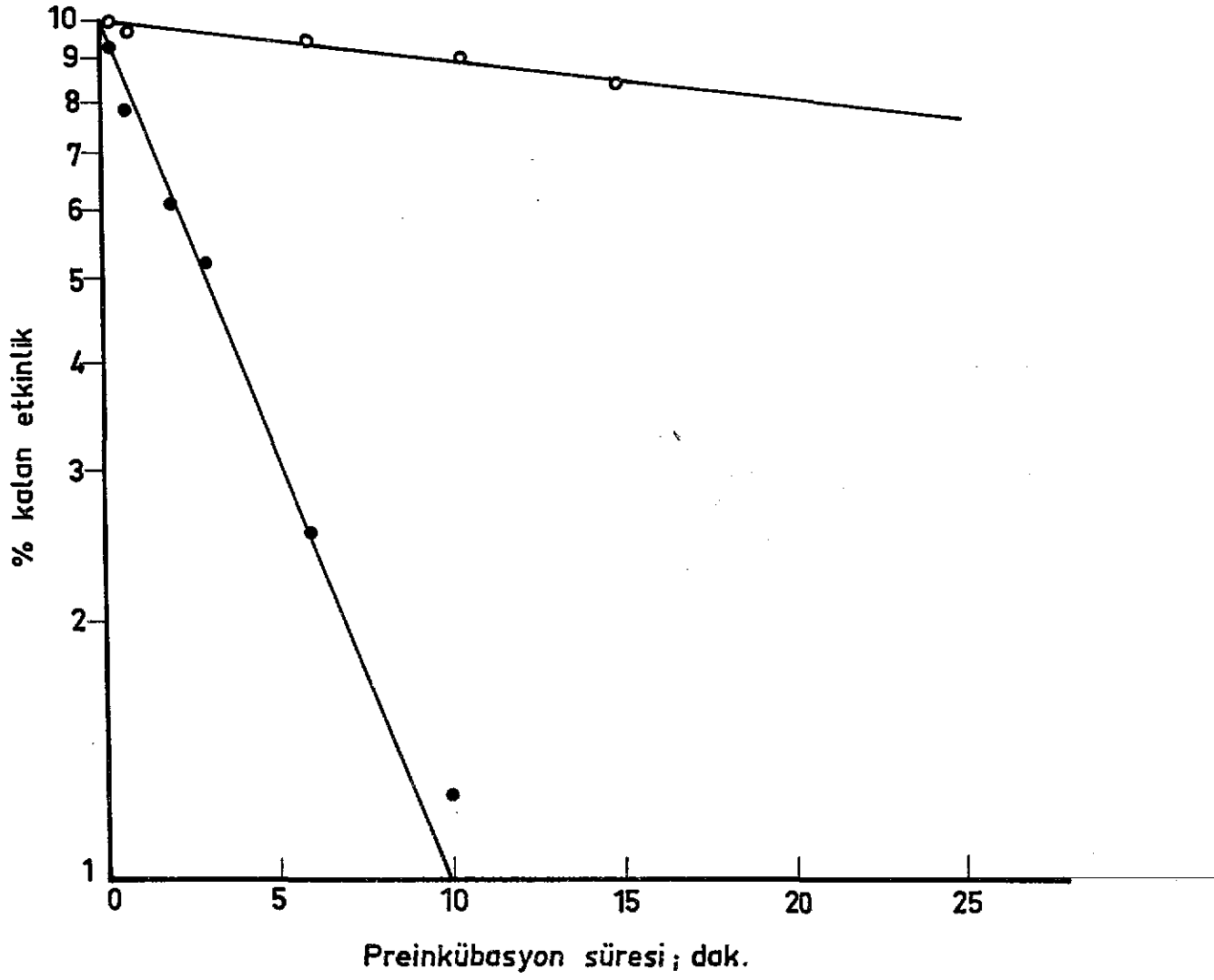
Tablo 6 : Kuzu karaciğeri M_2 -tip piruvat kinazın ısı bozunumu ile ilgili bozunumun değişik evrelerine ait sonuçların dökümü.

| Eklenen ligandlar | Kalan % Etkinlik ^a | | | |
|----------------------|-------------------------------|----|----|-----|
| | Preinkübasyon süresi (dak.) | | | |
| | 5 | 15 | 40 | 120 |
| Mg^{+2} | 98 | 96 | 94 | 92 |
| PEP | 98 | 92 | 86 | 52 |
| Mg^{+2} , PEP | 100 | 99 | 98 | 93 |
| ADP | 95 | 86 | 72 | - |
| Mg^{+2} , ADP | 31.5 | 4 | 0 | 0 |
| FDP | 58 | 19 | 0 | 0 |
| Mg^{+2} , FDP | 100 | 99 | 99 | - |
| ADP, FDP | 60 | 22 | 0 | 0 |
| Mg^{+2} , ADP, FDP | 31 | 0 | 0 | 0 |
| -- | 95 | 88 | 87 | 83 |

a) Tabloda verilen değerler sıfırıncı dakikada elde edilen etkinlik % 100 etkinlik kabul edilerek hesaplanmıştır.

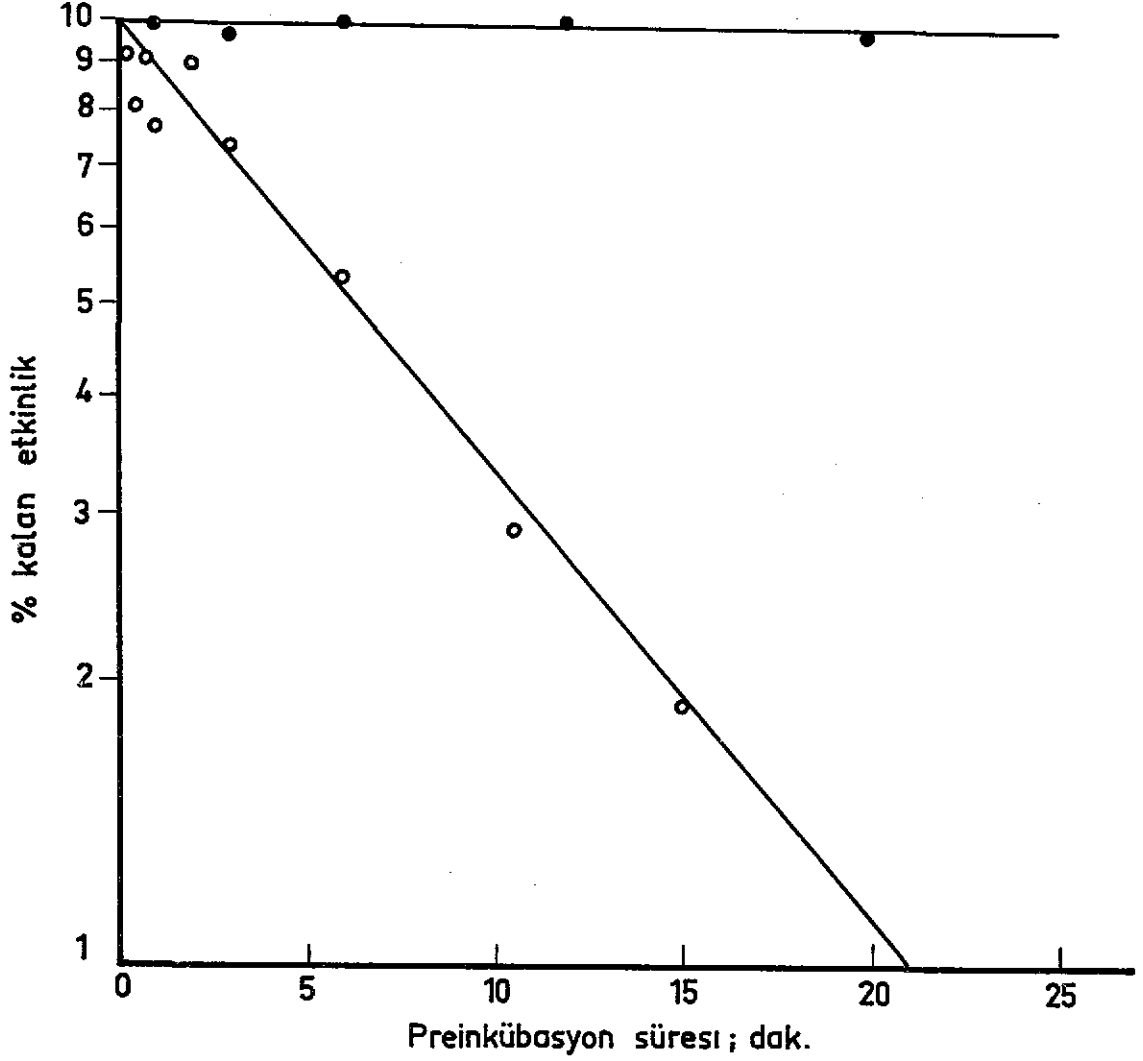
ADP tek başına ligand olarak eklendiğinde 15 dakika sonunda enzim % 86 etkinlik gösterdiği halde Mg ADP olarak ortama eklendiğinde, 15 dakika sonra etkinliğin % 4'e düştüğü gözlemlendi. Enzimin yalnız ADP varken 65.5 dakika olan yarıömrünün ($t_{1/2}$) Mg ADP ile 3 dakikaya düştüğü bulundu (Şekil 13). Bir allosterik aktivatör olan FDP ortama yalnız başına eklen-

diğinde 15 dakikada etkinliğin % 19'u kaldığı halde, FDP ortama Mg^{+2} ile birlikte (MgFDP) eklendiğinde aynı sürede etkinliğinin % 99'unu koruduğu gözlemlendi. Enzimin MgFDP ile yarıömrü 858 dakika ve FDP ile yarıömrü 6.2 dakika idi (Şekil 14). Bir başka sette (ADP+FDP) ve (MgADP+FDP) karşılaştırıldı ve Mg^{+2} 'nin bulunduğu ortamda daha hızlı etkinlik kaybı gözlemlendi. (MgADP+FDP)'li ortamda 15 dakika sonunda etkinliğin sıfıra gittiği gözlemlenirken, (ADP+FDP)'li ortamda etkinlik 15 dakika sonunda % 22'de kaldı. Enzimin yarıömrü (ADP+FDP)'li ortamda 6.8 dakika, (MgADP+FDP)'li ortamda 3.2 dakika olarak bulundu (Şekil 15). Substratlardan biri olan PEP tek başına ve Mg^{+2} ile birlikte eklendiğinde 120 dakika sonunda etkinlik sırasıyla % 52 ve % 93 olarak gözlemlendi. PEP ile birlikte enzimin yarıömrü 129 dakika, MgPEP ile birlikte ise 1164 dakikadır (Şekil 16). Kontrol enzimi (hiçbir ligand içermeyen) ile Mg^{+2} içeren enzimin 120 nci dakikada kalan yüzde etkinlikleri karşılaştırıldığında Mg^{+2} li enzimin etkinliğinin % 94 ünü, kontrol enziminin ise % 83'ünü koruduğu gözlemlendi. Enzimin yarıömrü Mg^{+2} varlığında 1343 dakika, yokluğunda (kontrol) ise 388 dakika olarak bulundu (Şekil 17). M_2 -tip piruvat kinaz ile yapılan ısı-bozunum deneylerinden elde edilen sonuçlar : % etkinliğe karşı preinkübasyon süresi yarı logaritmik kağıda çizildiğinde, tüm ısı-bozunumların görünür birinci derece kinetiğe uydukları gözlemlendi. Kuzu karaciğeri piruvat kinaz- M_2 izozimi, ile yapılan $60^{\circ}C$ 'de ısı-bozunum deneylerinden elde edilen bazı sonuçlar Tablo 7'de verilmiştir.



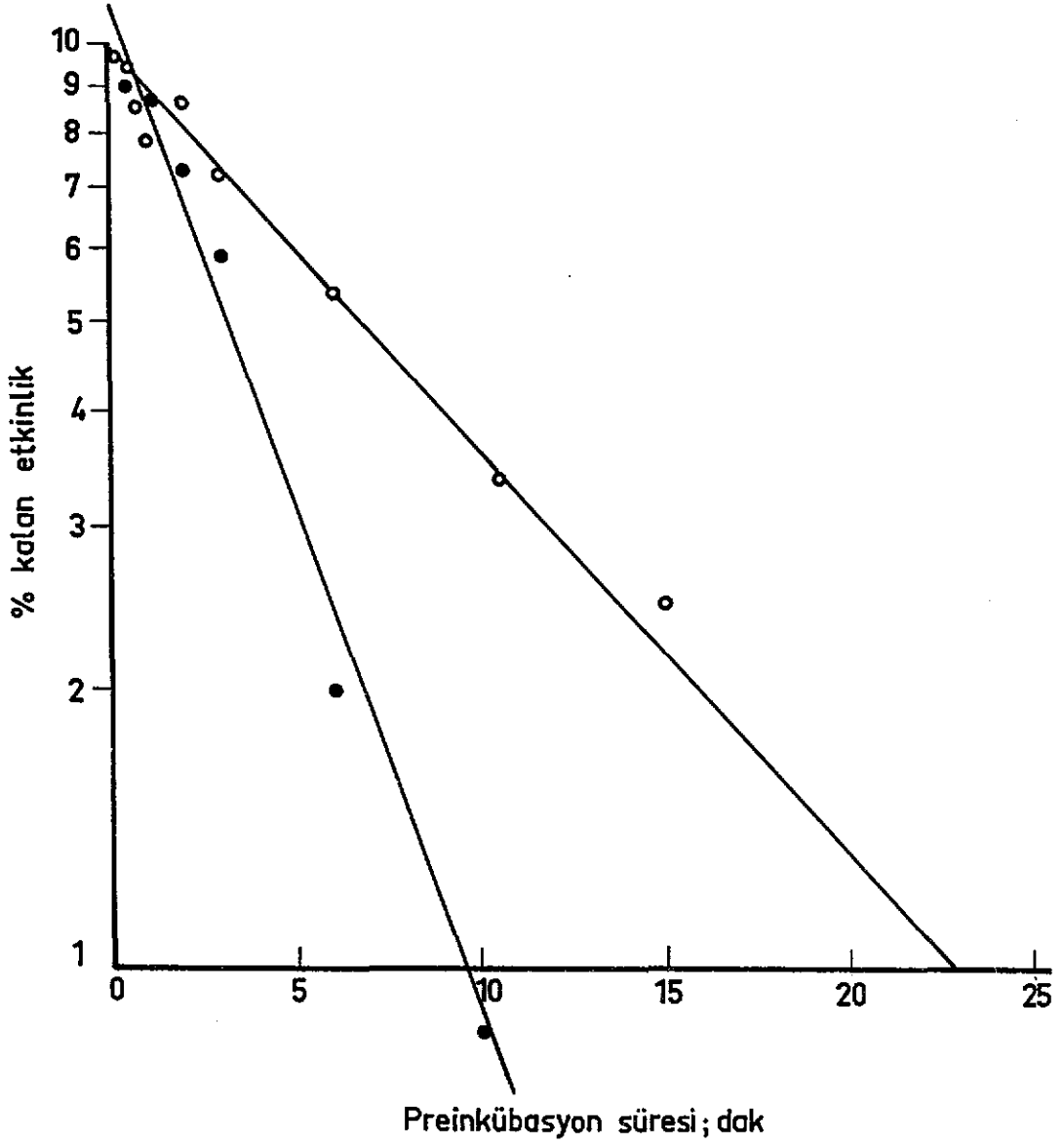
Şekil 13 : M_2 -tip için ADP ve MgADP varlığında $60^{\circ}C$ 'de ısı-bozunum sonuçlarının semi-logaritmik grafiklemesi.

o ADP; ● MgADP : $|ADP| = 2 \text{ mM}$, $|Mg^{+2}| = 10 \text{ mM}$



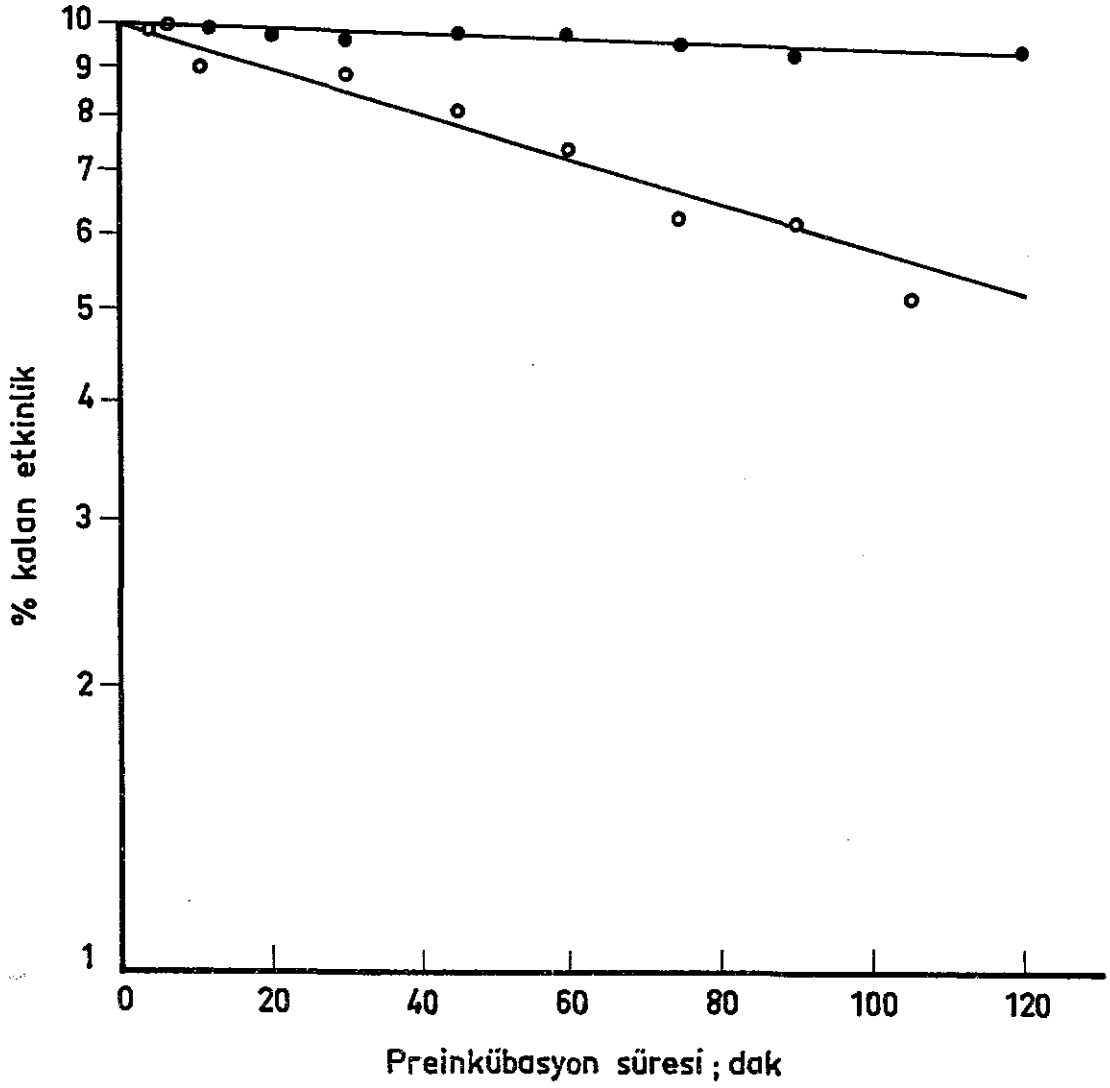
Şekil 14 : M₂-tip için FDP ve (Mg⁺² + FDP) varlığında 60^oC'de ısı-bozunum sonuçlarının semi-logaritmik grafiklemesi.

o FDP, • Mg⁺² + FDP : |FDP|= 1 mM, |Mg⁺²|= 10 mM



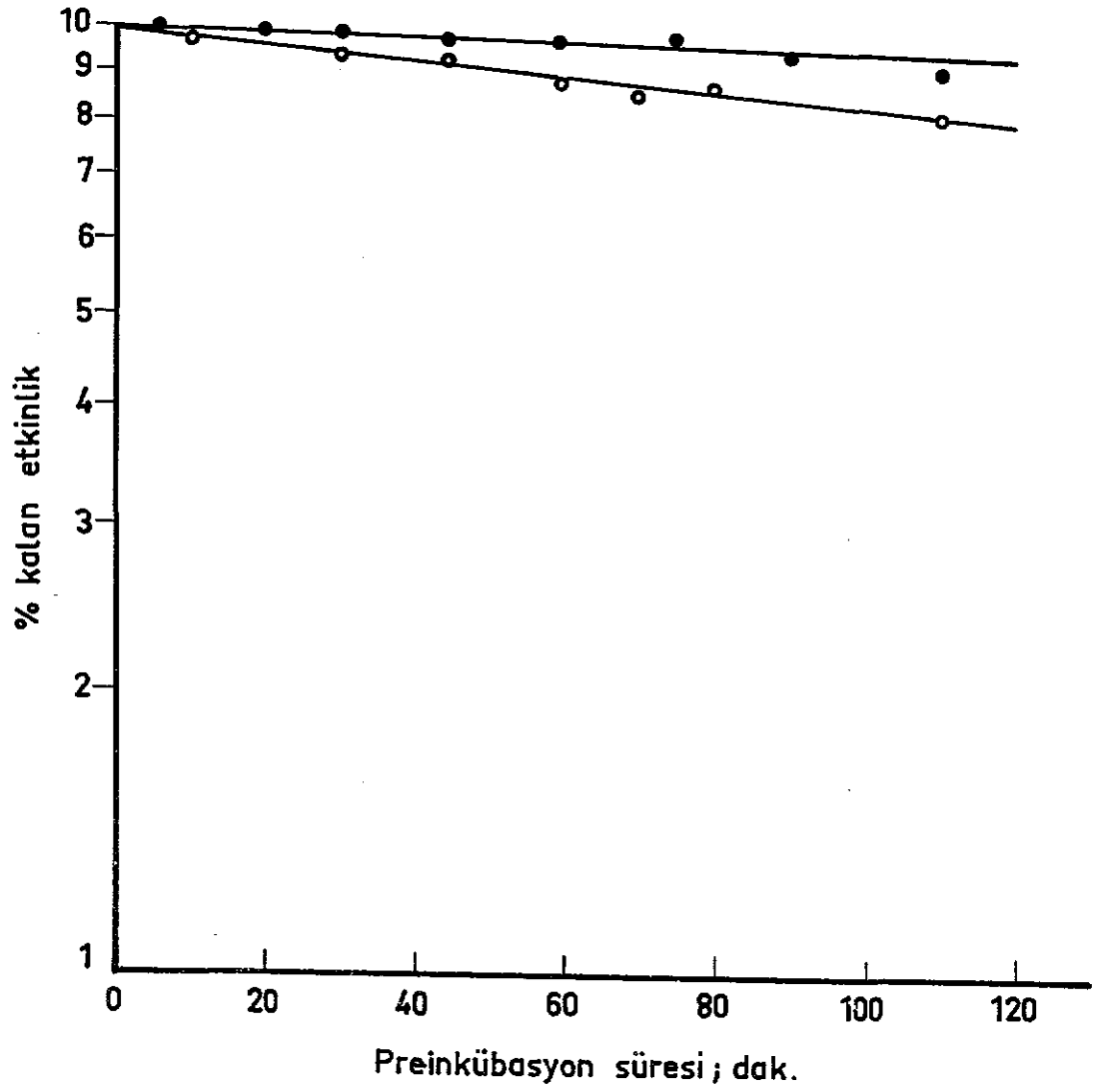
Şekil 15 : M_2 -tip için (ADP + FDP) ve (MgADP + FDP) varlığında 60°C 'de ısı-bozunum sonuçlarının semi-logaritmik grafiklemesi.

o ADP+FDP; ● MgADP+FDP : $[\text{ADP}] = 2 \text{ mM}$, $[\text{FDP}] = 1 \text{ mM}$, $[\text{Mg}^{+2}] = 10 \text{ mM}$



Şekil 16 : M₂-tip için PEP ve (Mg⁺²+PEP) varlığında 60°C'de ısı-bozunum sonuçlarının semi-logaritmik grafiklemesi.

o FDP; ● Mg⁺²+FDP : |FDP|= 1 mM, |Mg⁺²|: 10 mM



Şekil 17 : M₂-tip için kontrol ve Mg²⁺ varlığında 60°C'de ısı-bozunum sonuçlarının semi-logaritmik grafiklemesi.

o Kontrol; ● Mg²⁺ : |Mg²⁺| = 10 mM

Tablo 7 : Kuzu karaciğeri M₂-tip piruvat kinazının ısı-bozunumu ile ilgili bazı kinetik sonuçlar.

| Eklenen ligand | Derişim, mM | Inaktivasyon Sabiti k x 10 ³ , dak. ⁻¹ | Yarıömür t _{1/2} , dak. |
|---------------------------|------------------|-----------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| - | - | 1.786 | 388 |
| Mg ⁺² | 10 | 0.516 | 1343 |
| PEP | 2 | 5.373 | 129 |
| Mg ⁺² , PEP | sırasıyla 10,2 | 0.595 | 1164 |
| ADP | 2 | 10.582 | 65.5 |
| Mg ⁺² , ADP | sırasıyla 10,2 | 231.033 | 3 |
| FDP | 1 | 111.790 | 6.2 |
| Mg ⁺² , FDP | sırasıyla 10,1 | 0.808 | 858 |
| ADP, FDP | sırasıyla 2,1 | 101.927 | 6.8 |
| Mg ⁺² ,ADP,FDP | sırasıyla 10,2,1 | 216.594 | 3.2 |

Kuzu karaciğeri L-tip piruvat kinaz için 60⁰C'de ısı-bozunum deneyleri yapıldı ve aşağıdaki sonuçlar elde edildi (Tablo 8).

Tablo 8 : Kuzu karaciğeri L-tip piruvat kinaz için 60°C'de değişik ligandlar varlığında ısı-bozunumun değişik evrelerine ait sonuçların dökümü.

| Eklenen Ligandlar | Kalın % Etkinlik ^a | | |
|-----------------------------|-------------------------------|----|----|
| | Preinkubasyon süresi (dak.) | | |
| | 5 | 15 | 30 |
| Mg ⁺² | 98 | 96 | 92 |
| PEP | 76 | 47 | 22 |
| Mg ⁺² , PEP | 98 | 97 | 96 |
| ADP | 60 | 40 | 28 |
| Mg ⁺² , ADP | 39 | 5 | 0 |
| FDP | 46 | 9 | 0 |
| Mg ⁺² , FDP | 86 | 68 | 48 |
| ADP, FDP | 30 | 0 | 0 |
| Mg ⁺² , ADP, FDP | 30 | 0 | 0 |
| -- | 96 | 88 | 78 |

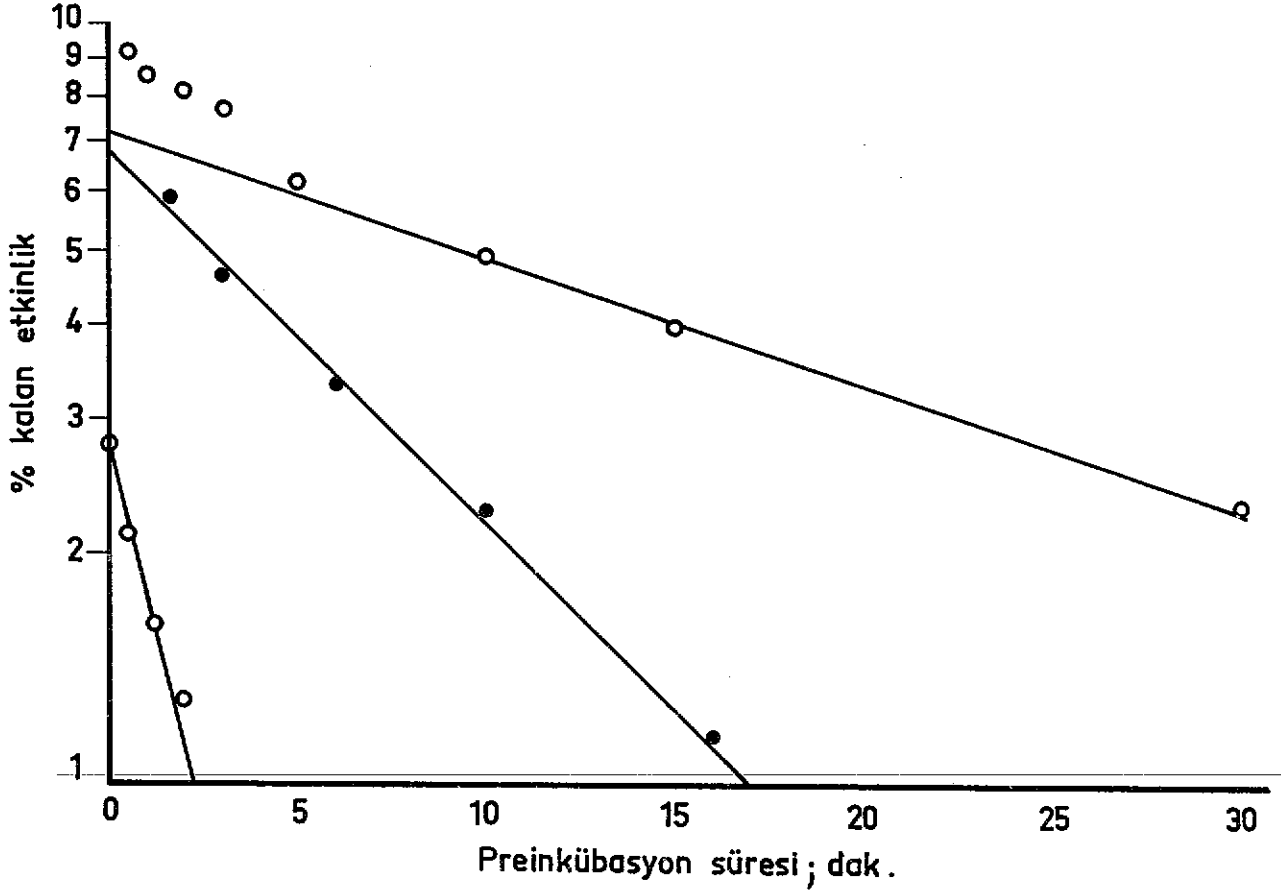
a) Tabloda verilen değerler sıfırıncı dakikada elde edilen etkinlik % 100 etkinlik kabul edilerek hesaplanmıştır.

Ortama ligand olarak ADP eklendiğinde, etkinliğin iki faza ayrıldığı gözlemlendi. İkinci faz daha dayanıklı ve yarıömrü 18.3 dakikadır. Birinci faz dayanıksız ve yarıömrü 1.4 dakikadır. ADP'ye ek olarak Mg⁺² ortama eklendiğinde de, iki faz gözlemlendi ve dayanıklı faz için yarıömür 3.6 dakika olarak belirlendi. Dayanıksız birinci faz ise deney koşullarımızda tespit edilemeyecek kadar hızlı idi. ADP ortama eklendiğinde dayanıklı faz için 15 dakika sonunda % 40 etkinlik gözlemlendi, ADP'ye ek olarak Mg⁺² eklendiğinde ise; 15 dakika sonunda etkinliğin % 5'e düştüğü bulundu (Şekil 18).

Allosterik aktivator olan FDP eklendiğinde de iki faza ayrılan kinetik gözlemlendi. Dayanaksız birinci faz deney koşullarımızda gözlenemedi. Dayanıklı ikinci faz için 15 dakika sonunda etkinlik % 9 iken, FDP'ye ek olarak Mg^{+2} da eklendiğinde bu değer % 68'e çıktığı görüldü. Enzimin yarı-ömrünün FDP ve FDP ile Mg^{+2} varlığında sırasıyla 6.2 dakika ve 28.4 dakika olduğu gözlemlendi (Şekil 19). Ligand olarak (ADP+FDP) ve Mg^{+2} ile birlikte (ADP+FDP) eklendiğinde her iki durum içinde görünür birinci derece kinetik gözlemlendi ve yarıömür her iki durum için 3 dakika olarak bulundu. Her iki durumda da 10 dakika sonunda etkinliğin tümüyle yok olduğu gözlemlendi (Şekil 20). Enzimin substratı olan PEP tek başına ısı-bozunum ortamına eklendiğinde 15 dakikada etkinlik % 47'ye düşerken, PEP'e ek olarak Mg^{+2} da eklendiğinde enzimin aynı sürede etkinliğinin % 96 sını koruduğu bulundu. Enzimin PEP ile yarıömürü 13.6 dakika, PEP ile birlikte Mg^{+2} ile yarı-ömürü 130 dakika idi ve her iki durum içinde görünür birinci derece kinetik gözlemlendi (Şekil 21). Enzim tek başına ısıtıldığında 30uncu dakikada etkinlik % 78 iken, ortama Mg^{+2} eklendiğinde bu değere 90 ıncı dakikada ulaşıldı. Enzimin yarıömürü tek başına ve Mg^{+2} ile birlikte sırasıyla 77.3 dakika ve 265 dakika olarak bulundu. L-tip piruvat kinaz ile yapılan ısı-bozunum deneylerinden elde edilen bazı kinetik değerler Tablo 9 da verildi.

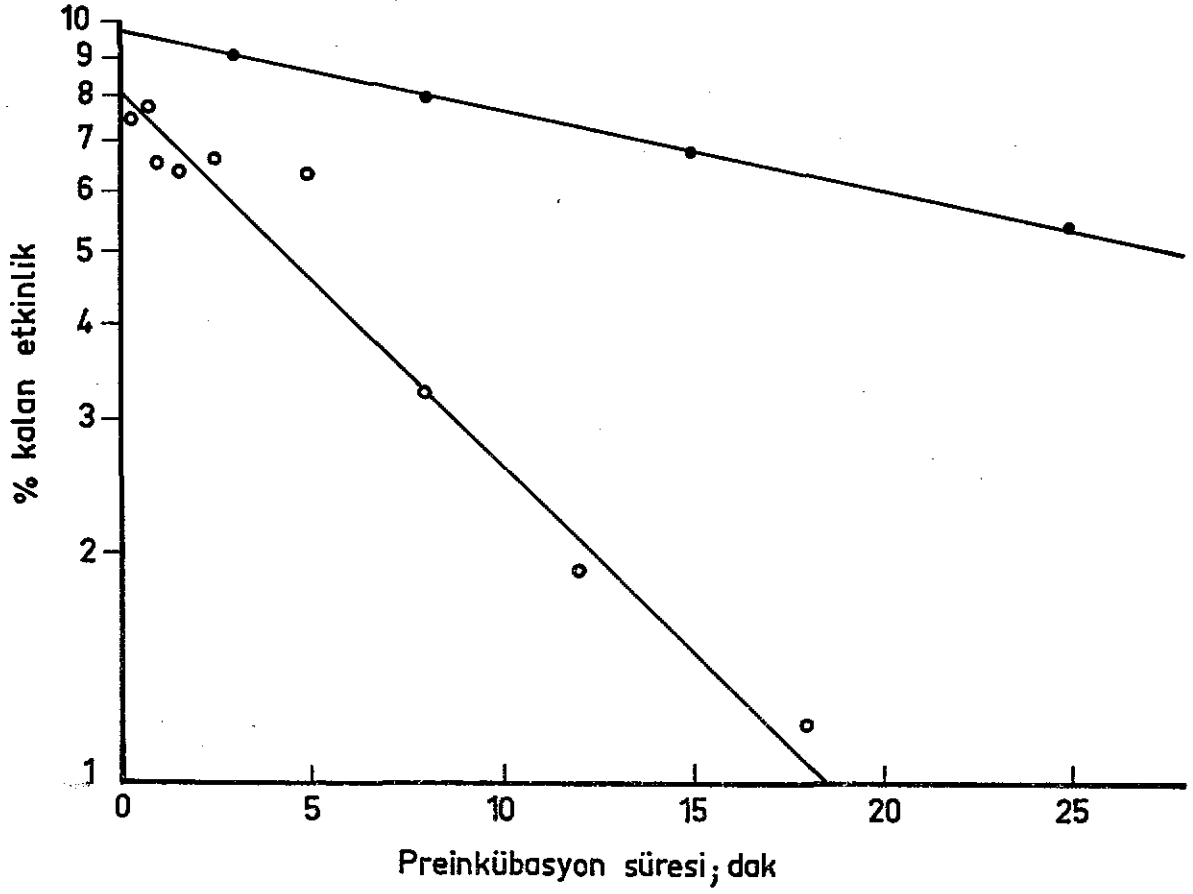
Tablo 9 : Kuzu karaciğeri L-tip piruvat kinazın ısı-bozunumu ile ilgili bazı kinetik sonuçlar.

| Eklenen ligand | Derişim; mM | Aktivasyon sabiti $k \times 10^3$; dak. ⁻¹ | Yarıömür $t_{1/2}$; dak. |
|---------------------------|--------------------|-----------------------------------------------------------|------------------------------|
| -- | - | 8.62 | 77.3 |
| Mg ⁺² | 10 | 2.76 | 265 |
| PEP | 2 | 51.30 | 13.6 |
| Mg ⁺² , PEP | sırasıyla 10, 2 | 2.76 | 130 |
| ADP | 2 | I.faz 477 II.faz 37.8 | I.faz 1.4 II.faz 18.3 |
| Mg ⁺² , ADP | sırasıyla 10, 2 | I.faz hesaplanamadı II.faz 113 | I.faz - II.faz 3.6 |
| FDP | 1 | I.faz hızlı II.faz 113 | I.faz - II.faz 6.2 |
| Mg ⁺² , FDP | sırasıyla 10, 1 | 24.3 | 28.4 |
| ADP, FDP | sırasıyla 2, 1 | 231 | 3 |
| Mg ⁺² ,ADP,FDP | sırasıyla 10, 2, 1 | 231 | 3 |



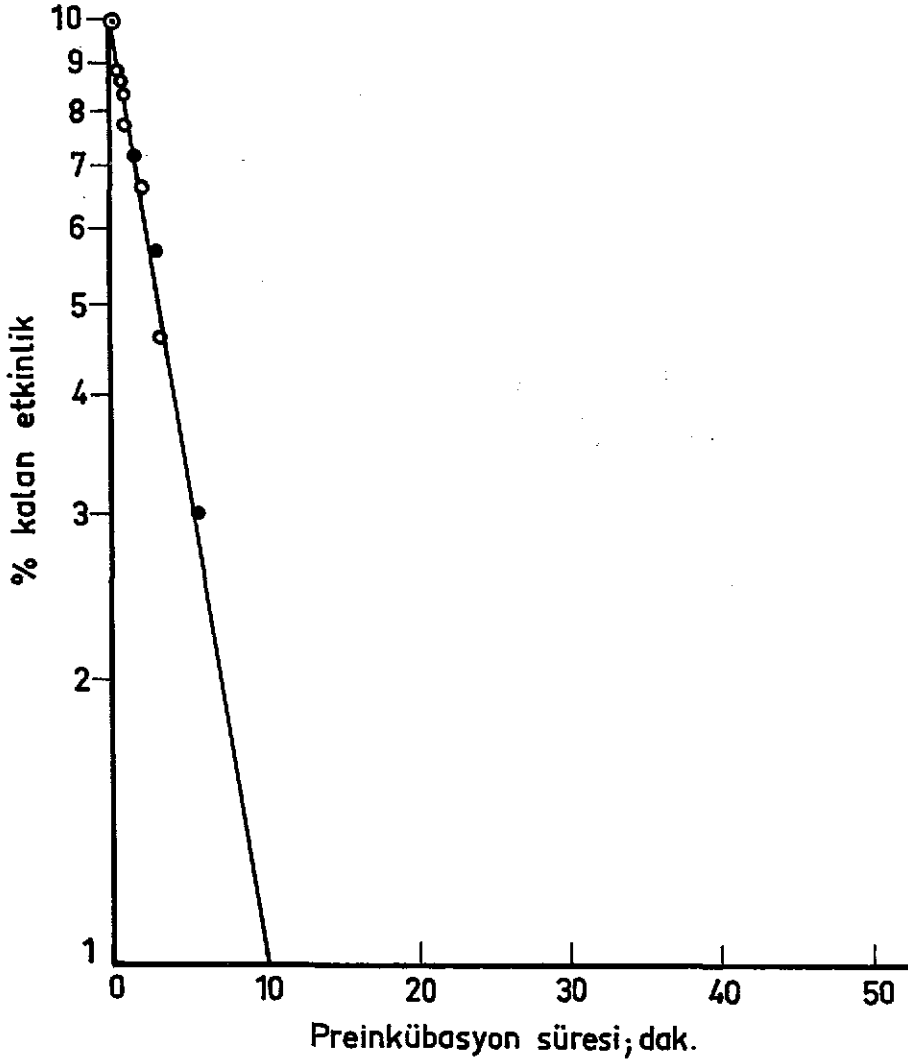
Şekil 18 : L-tip için ADP ve MgADP varlığında 60°C'de ısı-bozunum sonuçlarının semi-logaritmik grafiklemesi.

o ADP; ● MgADP : |ADP|= 2 mM, |Mg⁺²|= 10 mM



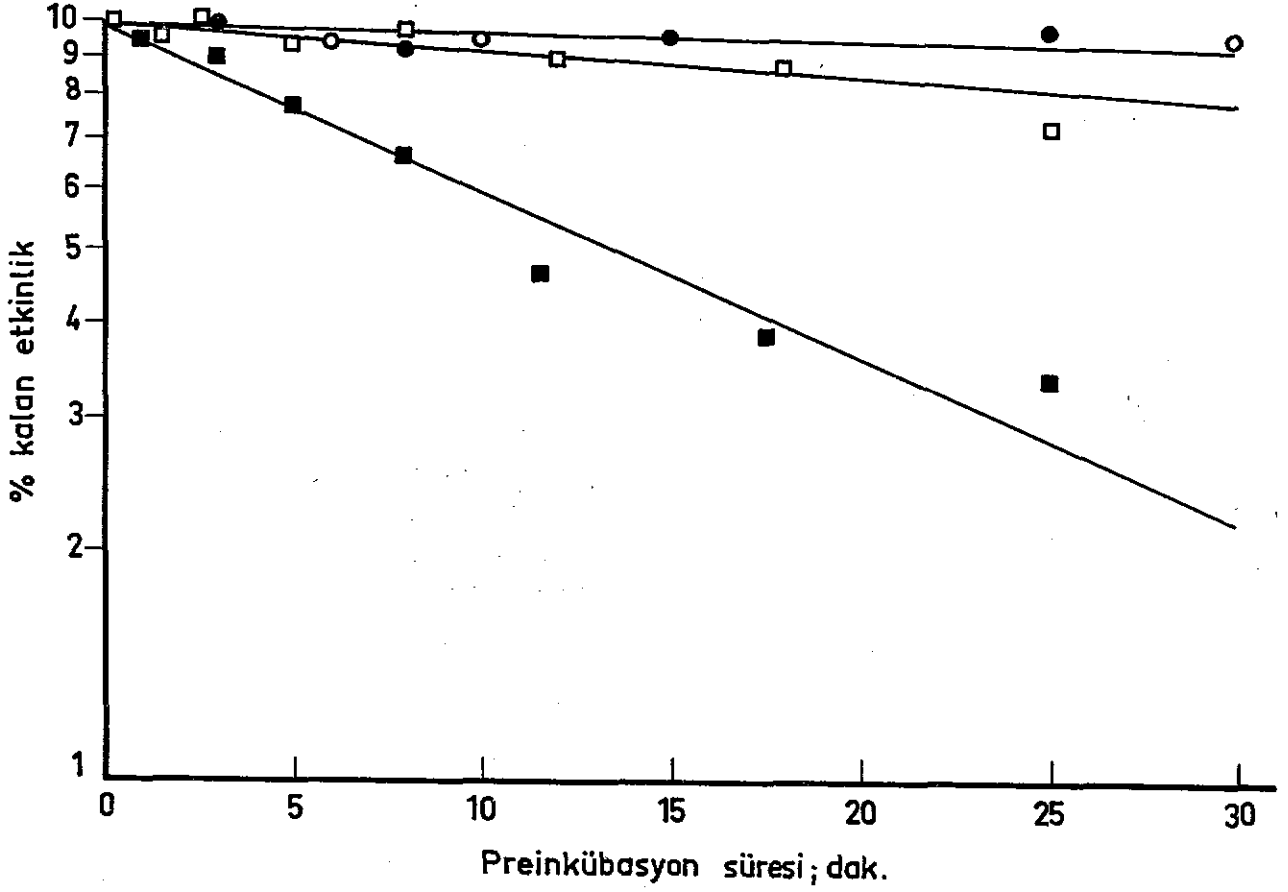
Şekil 19 : L-tip için FDP ve (Mg⁺²+FDP) varlığında 60°C'de ısı-bozunum sonuçlarının semi-logaritmik grafiklemesi.

o FDP; ● Mg⁺²+FDP : |FDP|= 1 mM, |Mg⁺²|= 10 mM



Şekil 20 : L-tip için (ADP+FDP) ve (MgADP+FDP) varlığında 60°C'de ısı-bozunum sonuçlarının semi-logaritmik grafiklemesi.

o ADP+FDP; ● MgADP+FDP : |ADP|= 2 mM, |FDP|= 1 mM, |Mg⁺²|= 10 mM



Şekil 21 : L-tip için kontrol ve PEP, (Mg⁺²+PEP), Mg⁺² varlığında 60⁰C'de ısı-bozunum sonuçlarının semi-logaritmik grafiklemesi.

■ PEP; ○ Mg⁺²+PEP; □ Kontrol; ● Mg⁺² :
|PEP| = 2 mM, |Mg⁻²| = 10 mM

4 . T A R T I Ş M A

Kinetik çalışmalarda L-tip piruvat kinazın PEP için Lineweaver-Burk grafiklemesi FDP varlığında ve yokluğunda yapıldı ve linear sonuçlar elde edilemedi (Şekil 5). Böyle sonuçların elde edilmesinin, enzim örneklerinin beklemiş olmasından kaynaklanabileceği düşünüldü çünkü bekleme süresinin enziminin PEP'e karşı davranışını sigmoidal kinetiğe çevirdiği, ancak ADP'ye karşı davranışını etkilemediği daha önce de gözlenmiştir (28). Bizim kullandığımız enzim de beklemiş olduğu için benzer sonuçların elde edilmesi, beklemiş L-tip izozimin PEP'le pozitif kooperativite gösterdiğini doğrulamaktadır. Nitekim, L-tip izozimin PEP ile Lineweaver-Burk grafiklemesinde linear sonuçlar vermezken, ADP ile linear sonuçlar elde edildi (Şekil 5,7). Karaciğer L-tip piruvat kinaz için yapılan Mg^{+2} doygunluk deneylerinden elde edilen sonuçlar ile Lineweaver-Burk grafiklemesi yapıldığında FDP varlığında linear sonuç elde edilirken, FDP yokluğunda negatif kooperativite gözlemlendi (Şekil 11).

Kuzu karaciğeri M_2 -tip piruvat kinaz için yapılan kinetik çalışmalarda PEP için Lineweaver-Burk grafiklemesinde FDP varlığında negatif kooperativite, FDP yokluğunda ise pozitif kooperativite gözlemlendi (Şekil 9). ADP ile ise enzim Michaelis-Menten kinetiği gösterdi (Şekil 6A). Benzer sonuçlar sıçan ince barsak, sıçan böbrek korteksi ve yağ dokusu piruvat kinazı ile değişik araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda rapor edilmektedir (8,19,29,30). M_2 -tip piruvat kinazın karaciğerde fizyolojik

Mg^{+2} serbest derişiminde iki formda bulunabileceği ve Pyk-B ile adlandırılan formun PEP'e karşı yüksek affinitesi olduğu, buna karşın düşük Mg^{+2} serbest derişiminde oluşan PyK-A formunun PEP'e daha düşük affinitesi olduğu rapor edilmektedir (19). Aynı sonuçlar sıçan böbrek piruvat kinazı ile yapılan çalışmalarda da elde edilmiştir (29). Enzimin PEP ile homotropik kooperatif etki gösterdiği bildirilmektedir. Bir başka araştırmacı ince barsaktan saflaştırılma şekline göre iki ayrı tip piruvat kinaz elde edilmiştir (30). EDTA varlığında PyK-A adı verilen formu elde etmiştir ve bu formun PEP ile pozitif kooperativite verdiğini bildirmektedir. Bu form FDP varlığında PEP'e karşı Michaelis-Menten kinetiği veren PyK-B formuna dnmektedir. PyK-A ve PyK-B, ADP ile Michaelis-Menten kinetiği vermektedir (30). Bizim deney koşullarımızda serbest Mg^{+2} derişimi hep sabit ve yüksek tutulduğundan (10 mM) sadece PyK-A formu gözlenmiş, buna karşın daha düşük serbest Mg^{+2} derişimlerinde görüldüğü rapor edilen (19) PyK-B formu gözlenememiştir. PEP'e karşı yapılan Lineweaver-Burk grafiklemelerinde linear sonuçların elde edilememesinin bu nedenden kaynaklandığı düşünülebilir.

L-tip ve M_2 -tip piruvat kinazla yapılan Mg^{+2} doygunluk deneylerinde L-tip için Michaelis-Menten grafiklemesinde FDP varlığında V_m 'in, FDP yokluğunda elde edilen V_m değerinin yaklaşık iki katı olduğu gözlendi (şekil 8A). Buna karşın M_2 -tip piruvat kinaz için FDP varlığında ve yokluğunda Mg^{+2} için V_m değerini değişmedi (şekil 8B). Lineweaver-Burk grafiklemesinde M_2 -tip için FDP varlığında ve yokluğunda tek $K_d^{Mg^{+2}}$ ve V_m değerini bulunduğu halde (şekil 12) L-tip için FDP varlığında linear sonuç, FDP yokluğunda ise negatif kooperativite gözlendi (şekil 11). Elde edilen bu sonuçlardan L-tipin FDP'ye karşı M_2 -tip piruvat kinazdan duyarlı ve Mg^{+2} ile etkinli-

ğinin FDP'ye bağımlı olduğu, M_2 -tipin ise FDP'ye duyarlılığının daha az ve Mg^{+2} etkinliğinin FDP varlığında ve yokluğunda aynı olması, L ve M_2 -tip piruvat kinazların FDP tarafından aktivasyonunda farklı mekanizmaların çalıştığını ve bu mekanizmalarda FDP'nin Mg^{+2} ile birlikte rol aldığı şeklinde yorumlandı.

Isı-bozunum deneylerinden elde edilen sonuçlara bakıldığında M_2 ve L-tip piruvat kinaz için Mg^{+2} 'nin tek başına enzime bağlanıp enzimi stabilize ettiği görülmektedir (Şekil 17,21). L-tip piruvat kinaz ile yapılan deneylerde iki faza ayrılan kinetik gözlemlendi. Bu sonuçlardan L-tip piruvat kinazda Mg^{+2} 'nin iki ayrı bölgeye bağlandığı sonucuna varılmıştır. Bunlardan biri ADP bölgesidir. Fakat bu bölge dışında bir tane daha Mg^{+2} bağlama bölgesi vardır. M_2 -tip piruvat kinaz ile bu durum söz konusu değildir. Tüm setlerde görünür birinci derece kinetik gözlenmiştir. Mg^{+2} her iki tip için koruyucu etki göstermektedir. ADP tek başına substrat olamamakta, ancak Mg^{+2} ile birlikte enzime bağlanabilmektedir (6,16,17). Bu nedenle Mg^{+2} ile birlikte ADP enzime daha kolay bağlanabilmekte ve bu bağlanma enzimde daha fazla etkinlik kaybına neden olmaktadır. Bunun nedeninin MgADP'nin enzimin konformasyonunu dayanıksız hale dönüştürmesi olduğu şeklinde yorumlanmıştır. L-tip için ortama Mg^{+2} ile birlikte ADP eklendiğinde iki faza ayrılan kinetik gözlemlendi (Şekil 18). Bu iki fazdan birincisi dayanıksızdı ve çok kısa sürede tüm etkinliğini kaybetti. İkinci faz ise daha dayanıklıydı ve etkinliğini daha uzun süre korudu. Bunun ise Mg^{+2} 'nin iki ayrı bölgeye bağlanıyor olmasından kaynaklanmış olabileceği düşünüldü. Dayanıksız birinci fazda Mg^{+2} , ADP ile birlikte MgADP bölgesine bağlanarak enzimi dayanıksız forma dönüştürmekte ve enzimin kısa sürede inaktive olmasına neden olmaktadır. Buna karşın dayanıklı ikinci fazda Mg^{+2} enzime

tek başına da bağlanarak MgADP'nin enzimi inaktive edici etkisinin bir kısmını kaldırmaktadır. Tek başına ADP ise enzime daha evvel de belirtildiği gibi bağlanamadığı için etkinlik kaybı daha az olmaktadır. ADP ve Mg^{+2} ile birlikte ADP arasındaki etkinlik farkı M_2 -tip için daha belirgindir. Bu da Mg^{+2} 'nin M_2 -tipin konformasyonunu değiştirmede daha etkin olduğunu düşündürmektedir.

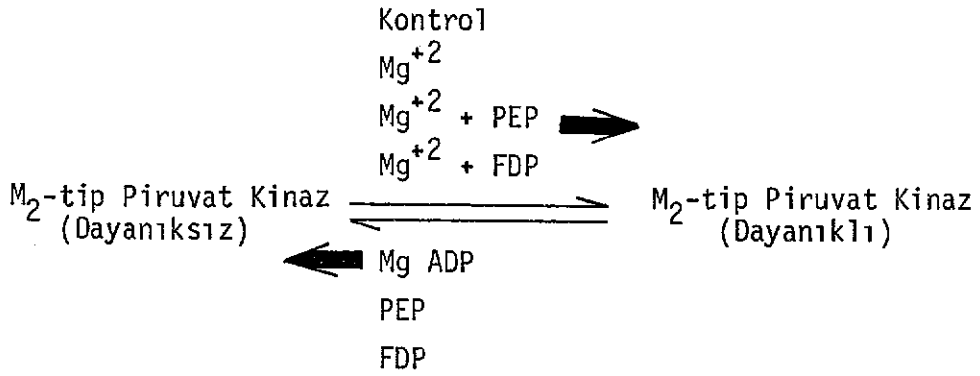
FDP ve Mg^{+2} ile birlikte FDP karşılaştırıldığında her iki tip içinde Mg^{+2} ile birlikte FDP eklendiğinde etkinlik kaybının daha az olduğu gözlenmiştir. FDP, bilindiği gibi allosterik bir aktivatördür (8,15). FDP'nin enzime bağlanması enzimi aktif hale getirirken, enzim yapısını dayanıksız hale getirdiği düşünülmüştür. L-tip için FDP varlığında iki faza ayrılan kinetik gözlenmektedir. Dayanıksız birinci faz deney koşullarında izlenemeyecek derecede hızlıdır. FDP ile birlikte Mg^{+2} eklendiğinde enzimin dayanıklılığının sağlandığı gözlenmiştir (Şekil 14,19).

Substratlardan biri olan PEP tek başına etkinlik kaybını önleyemediği gibi enzimin dayanıklılığını azaltmaktadır. PEP'in yanı sıra Mg^{+2} eklendiğinde enzimin ısıya dayanıklılığını arttırdığı gözlenmiştir.

Ligand olarak (ADP+FDP) ve Mg^{+2} ile birlikte (ADP+FDP) eklendiğinde çıkan değerler karşılaştırıldığında şu sonuçlara varılmıştır. L-tip piruvat kinaz için her iki durumda aynı değerler elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar FDP'nin enzimi tümüyle dayanıksız hale soktuğu ve inaktive ettiği şeklinde yorumlanmıştır. M_2 -tip içinse Mg^{+2} ile birlikte (ADP+FDP) eklendiğinde, (ADP+FDP) eklendiğinden daha fazla etkinlik kaybı gözlenmiştir. Bu ise FDP etkisinin M_2 -tip üzerinde daha az etkin olduğunu düşündürmüştür. Nitekim M_2 -tip piruvat kinaz FDP aktivasyonuna daha az duyarlıdır (Şekil 15,17).

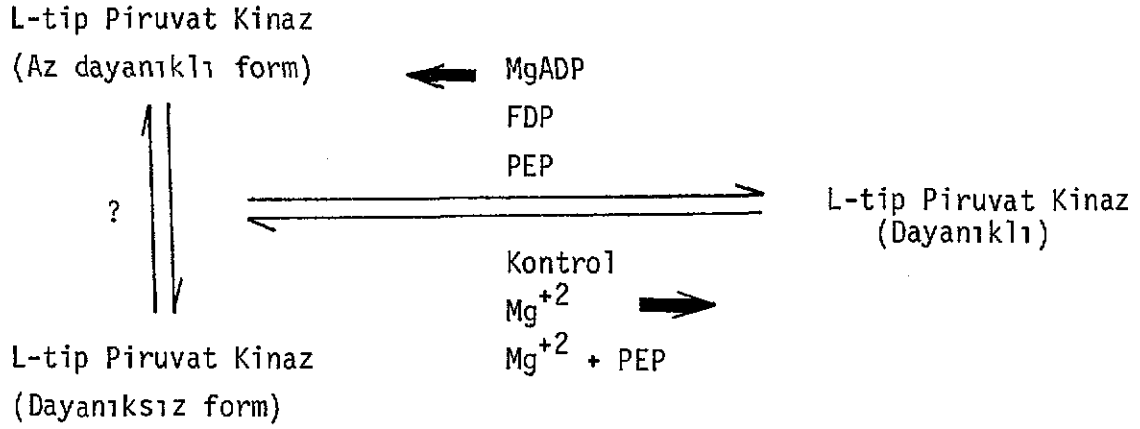
Enzim tek başına ısı-bozunumuna tabi tutulduğunda elde edilen sonuçlara göre L-tip için Mg^{+2} ile birlikte PEP ve tek başına Mg^{+2} dışında her durumdan daha uzun süre etkinliğini korumuş, M_2 -tip içinse tek başına Mg^{+2} , Mg^{+2} ile birlikte PEP ve FDP hariç diğer her durumdan daha uzun süre etkinliğini korumuştur.

Bu sonuçlardan M_2 -tip piruvat kinaz için ligand varlığında bir, yokluğunda da bir formun olduğu düşünülebilir. Bu formlardan (Şekil 22) biri dayanıksız, diğeri ise dayanıklıdır. İki form aynı anda gözükmemektedir.



Şekil 22 : M_2 -tip Piruvat Kinaz'ın değişik formlarının ortaya çıkışı.

L-tip piruvat kinaz içinse ligand varlığında enzim iki form göstermektedir. Bunlardan biri az dayanıklı, diğeri ise dayanıksızdır. Bu iki form dışında Mg^{+2} 'nin varlığında ve yokluğunda değişik formlar gözlenmektedir.



M₂ ve L-tip piruvat kinazlarla yapılan kinetik ve ısı bozunum deneylerinden elde edilen sonuçlardan hernekadar kesin sonuca ulaşmak mümkün değilse de, L ve M₂-tip için değişik denetleme sistemlerinin varlığı ve enzim lokalizasyonu açısından farklı hücrelerde bulunmaları (30), bu iki enzimin fizyolojik görevlerinin farklı olabileceği şeklinde düşünüldü.

Ö Z E T

Yapılan kinetik çalışmalarda PEP için FDP varlığında ve yokluğunda Michaelis-Menten grafiklemesinde M_2 ve L-tip piruvat kinaz için sigmoidal eğriler elde edildi. PEP için Lineweaver-Burk grafikleniminde L-tip için FDP varlığında ve yokluğunda negatif kooperativite bulunurken M_2 -tip için FDP varlığında negatif, yokluğunda ise pozitif kooperativite gözlemlendi.

Her iki izozimde ADP için FDP varlığında ve yokluğunda Michaelis - Menten kinetiği gösterdi.

Mg^{+2} -doygunluk eğrileri her iki izozim içinde hiperbolik idi fakat, L-tip için FDP varlığında, FDP yokluğundaki duruma oranla % 100 aktivasyon gözlenirken M_2 -tip için aktivasyon gözlenmedi.

Isı-bozunum deneylerinde Mg^{+2} ve $Mg^{+2} + PEP$ 'in her iki izozimi de koruduğu gözlemlendi. $Mg^{+2} + FDP$ ligand olarak eklendiğinde M_2 -tipi koruduğu halde L-tip için etkinlik kaybına neden olduğu gözlemlendi. Tek başına PEP ve ADP her iki izozimde etkinlik kaybına neden olurken, ADP L-tip piruvat kinazda M_2 -tipe oranla daha fazla etkinlik kaybına neden oldu. FDP her iki izozimde etkinlik kaybı yaratırken, L-tip'te iki ayrı faz oluştu. Mg^{+2} ile birlikte ADP eklendiğinde her iki izozimde de etkinlik kaybı gözlemlendi, ayrıca inaktivasyonun iki faza ayrıldığı saptandı. (ADP + FDP) ve (MgADP + FDP) ligand olarak eklendiğinde L-tip için aynı inaktivasyon elde edildiği halde M_2 -tip'te (ADP+FDP)'nin (MgADP + FDP)'ye göre daha az etkinlik kaybına neden olduğu gözlemlendi.

Yapılan kinetik ve ısı-bozunum deneylerinden elde edilen sonuçlardan kesin bir sonuca ulaşmak olası değilse de, L ve M₂-tip piruvat kinazlar için değişik denetleme sistemlerinin varlığı ve farklı hücrelerde bulunmaları nedeniyle bu iki enzimin fizyolojik görevlerinin farklı olabileceği düşünüldü.

K A Y N A K L A R

1. Koster, J.F., Hulsmann, W.C., Arch. Biochem. Biophys., 141, 98, (1970).
2. Schering, B., Eigenbrodt, E., Linder, D., Schorer, W., B.B.A., 717, 337, (1982).
3. Hall, E.R., Cottom, G.L., Int. J. Biochem., 9, 785, (1978).
4. Kılınç, K., Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, 1983.
5. Tanaka, T., Sue, F., Morimura, H., Biochem. Biophys. Res. Commun., 29, 3, (1967).
6. Blair, J.B., Walker, R.G., Arch. Biochem. Biophys., 232, 202, (1984).
7. Ibsen, K.H., Trippet, P., Arch. Biochem. Biophys., 156, 730, (1973).
8. Imamura, K., Taniuchi, K., Tanaka, T., J. Biochem., 72, 1001, (1972).
9. Van Berke1, J.C., Koster, J.F., Hülsmann, W.C., BBA, 293, 118, (1973).
10. Van Berke1, J.C., Koster, J.F., Hülsmann, W.C., BBA, 321, 171, (1973).
11. Flory, W., Peczon, B.D., Koeppe, R.E., Spivey, H.O., Biochem. J., 141, 127, (1974).
12. Kayne, F.J., Seulter, C.H., Biochemistry, 7, 1678, (1968).
13. Ljungström, O., Berglund, L., Engström, L., Eur. J. Biochem., 68, 497, 1976.
14. Humble, E., Berglund, L., Titanji, V., Ljungström, O., Edlund, B., Zetterqvist, Ö., Engström, L., Biochem. Biophys. Res. Commun., 66, 614, (1974).
15. Murayo, N., Nagao, K., Miyazaki, K., Nishikawa, K., Hario, T., J. Biochem., 79, 203, (1976).
16. Eigenbrodt, E., Schorer, W., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 358, 1057, (1977).

17. Van Berkel, J.C., B.B.A., 370, 140, (1974).
18. De Asua, L.J., Rozengurt, E., Devalle, J.J., Carminatti, H., B.B.A., 235, 326, (1971).
19. Van Berkel, J.C., De Jonge, H.R., Koster, J.F., Hülsmann, W.C., Biochem. Biophys. Res. Commun., 60, 398, (1974).
20. Costa, L., De Asua, L.J., Rozengurt, E., Bade, E.G., Carminatti, H., B.B.A., 289, 128, (1972).
21. Berglund, L., Humble, E., Arch. Biochem. Biophys., 195, 347, (1979).
22. Berglund, L., Ljungström, O., Engström, L., J. Biol. Chem., 252, 6108, (1977).
23. Hance, A.J., Lee, J., Feitelson, M., Biochem. Biophys. Res. Commun., 106, 492, (1982).
24. Murayo, N., Nagao, Y., Miyazaki, K., Nishikawa, K., Horio, T., J. Biochem., 79, 203, (1976).
25. Warburg, O., Christian, W., Biochem. Z., 310, 384, (1941).
"Alınmıştır" Colowick, S.P., Kaplan, N.D., Methods in Enzymology, Academic Press Inc., New York, Vol III, Sa. 454, (1957).
26. Kimberg, D.V., Yielding, L., J. Biol. Chem., 237, 3233, (1962).
27. Tietz, A., Ochoa, S., Arc. Biochem. Biophys., 78, 477, 1958
28. Kayrın, L., Doktora Tezi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, (Aralık, 1984).
29. De Asua, L.J., Rozengurt, E., Carminatti, H., Febs Letters, 14, 22, (1971).
30. Pogson, C.J., Biochem. J., 110, 67, (1968).

