

283813

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNSAN ALYUVAR PİRUVAT KİNAZİNİN
BROMOPİRUVAT İLE MODİFİKASYONU**

**BİYOKİMYA PROGRAMI
BİLİM UZMANLIĞI TEZİ**

N. Leylâ AÇAN

ANKARA - 1984

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNSAN ALYUVAR PİRUVAT KİNAZİNİN
BROMOPİRUVAT İLE MODİFİKASYONU

BİYOKİMYA PROGRAMI
BİLİM UZMANLIĞI TEZİ

N. Leylâ AÇAN

Rehber Öğretim Üyesi: Doç. Dr. Nazmi ÖZER

ANKARA - 1984

İ Ç İ N D E K İ L E R

	<u>Sayfa</u>
GİRİŞ	1
GEREÇ VE YÖNTEMLER	11
GEREÇLER	11
YÖNTEMLER	12
Protein Ölçümü	12
Etkinlik Ölçümü	12
Blue Dextran-Sepharose 4B'nin Hazırlanması	13
Alyuvar Piruvat Kinazının Saflaştırılması	14
İnsan Alyuvar Piruvat Kinazının Bromopiruvat ile Modifikasyonu	15
BULGULAR	17
Alyuvar Piruvat Kinazının Saflaştırılması	17
Piruvat Kinazın Bromopiruvat ile Modifikasyonu	18
TARTIŞMA	30
ÖZET	37
KISALTMALAR	38
KAYNAKLAR	39

G İ R İ Ő

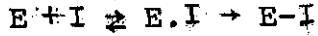
Proteinlerin yapı-fonksiyon ilişkilerinin aydınlatılması amacıyla kullanılan bir çok yöntem vardır. Genellikle bu yöntemlerden yalnızca bir tanesi bu bilgileri sağlamakta yetersizdir; ancak çeşitli yöntemlerle elde edilen bulgular birlikte değerlendirildiklerinde yapı-fonksiyon ilişkileri hakkında önemli bilgiler elde edilebilmektedir.

Proteinlerin yapı ve fonksiyonlarının belirlenmesinde başvurulan yöntemlerin en pratik ve uygulanabilir olanı, kimyasal reaktifler kullanılarak yapılan modifikasyonlardır. Çeşitli kimyasal modifikasyon yöntemleri bulunmakla birlikte, bunlardan en sık kullanılanları "grup özgüllüğü" ve "bölge özgüllüğü" olan kimyasal reaktiflerle yapılan modifikasyon yöntemleridir.

Grup özgüllüğü bulunan kimyasal reaktifler ile modifikasyonda, seçilen reaktifin proteindeki bir veya daha çok amino asitin yan grupları ile özgül olarak tepkimeye girmesi amaçlanmaktadır. Burada göz önünde bulundurulacak en önemli konu, reaktifin modifiye edilecek grup için özgüllüğü sorunudur. Amino asitlerin yan gruplarının çeşitli reaktiflerle tepkimeye girmesi, genellikle "nükleofilik katma" esasına dayandığından; modifiye edilmek istenen grubun yanısıra, diğer grupların da modifiye edilmesi söz konusu olabilir. Böyle durumlarda deney koşulları değiştirilerek, reaktifin bir grup için olan özgüllüğü arttırılabilir. Monohaloasitler ve H_2O_2 gibi özgüllükleri olmayan reaktiflerin yanı sıra (1,2), sisteinlerin modifikasyonunda kullanılan 5,5'-ditiyo-bis-2,2'

dinitrobenzoik asit (DTNB) (3) veya argininlerin modifikasyonunda kullanılan 2,3-butandion (4) gibi son derece özgül reaktifler de vardır.

Gruba özgül kimyasal reaktifler, seçicilik göstermeden proteindeki ilgilenilen grubun tümü ile tepkimeye girer (proteindeki gruplardan bir kısmı gizlenmiyorsa). Fakat proteindeki bir amino asitin tümünü değil, örneğin yalnızca aktif merkezindeki modifiye etmek isteyebiliriz. Bu durumda, kimyasal modifikasyonu yalnızca enzimin aktif merkezi ile sınırlamak gerekir. Kimyasal modifikasyonu aktif merkez ile sınırlamak, yalnızca aktif merkezdeki fonksiyonel gruplar hakkında bilgi verir. Bu amaçla kullanılan kimyasal reaktifler yapı olarak enzimin substratına benzeyen, fakat ilave olarak reaktif grup içeren bileşiklerdir. Kullanılan bileşiğin substrat benzeri kısmının amacı, tipik dissosiyasyon olabilen enzim-inhibitör komplekslerinde olduğu gibi onu enzimin aktif merkezine yerleştirmektir. Bundan sonra ikinci basamak olarak, tersinmez enzim-inhibitör komplekslerinde olduğu gibi, bileşiğin reaktif kısmı enzim ile kovalent olarak bağlanır:



Bu sistemin en tipik örnekleri, proteolitik enzimlerden kimotripsin ve tripsinin, L-(1-tosilamido-2-fenil) etil klorometil keton (TPCK) ve N- α -tosil-L-lizil klorometil keton (TLCK) ile inhibisyonlarıdır (5-8).

Bu tipteki bölgeye özgül reaktiflerin bazı üstünlükleri vardır: TPCK kimotripsinde, TLCK ise tripsinde, aktif merkezdeki katalitik fonksiyonu bulunan histidin ile kovalent olarak bağla-

nırlar. Bu bileşikler aslında histidin reaktifi değildirler; ancak tripsin ve kimotripsine bağlandıklarında, enzimlerin katalitik fonksiyonlarının sonucu olarak histidine bağlanırlar. Dissoziye olmayan bir kompleks oluşturarak bu enzimleri inhibe ederler (1,5,6). Örneğin kimotripsin, substratına benzediği için TPCK'ü kolaylıkla aktif merkezine bağlar. Serin-195 ve aspartat-102 amino asitlerinin katalizdeki fonksiyonuna benzer şekilde, TPCK klorometil grubu ile histidin-57'ye tersinmez olarak bağlanır (9). Bu özelliği nedeniyle, kimotripsinin TPCK ile modifikasyonu, enzim tarafından katalizlenmektedir (1,9).

Bölge özgüllüğü olan reaktifler kullanılarak yapılan modifikasyonlar "affinite işaretleme" (affinity labelling) olarak da bilinmektedir. Karboksipeptidaz A'nın Adenozin-5-trifosfatın (ATP) 2',3'-dialdehid türevi ile (10); mitokondriyel ATP az'ın ve tavşan kası piruvat kinazının (11,12) p-fluorosülfonil (C^{14}) benzoil-5'-adenozin ile modifikasyonu, affinite işaretlemesine örnek olabilecek kimyasal modifikasyonlardır. Affinite işaretleme-lerinde kullanılan diğer bazı bileşiklerde ise, üzerlerinde nükleofilik gruplar bulunmadığı halde, enzime bağlandıktan sonra bu bileşiklerin uyarılması (örneğin diazo grupları içerenlerin irradiyasyonu, vb) ile üzerlerinde nükleofilik veya elektrofilik odaklar yaratılarak, ilgilenilen enzim ile tepkimeye girmesi sağlanmaktadır (13).

Affinite işaretleme-lerinde çok sık kullanılan bir kimyasal reaktif de bromopiruvattır. Bromopiruvat, her ne kadar özgüllüğü az olan S-alkilleyici bir reaktif ise de; izositrat liyaz (14), 2-keto-3-deoksi-6-fosfoglukonik aldolaz (15), alkol dehidrogenaz (16),

malik enzim (17), Brevibacterium adenilat siklazı (18), maya flavositokrom b₂ (19,20), glutamat dekarboksilaz (21), fosfoenolpiruvat karboksikinaz (22) ve maya piruvat kinazı (23) gibi enzimlerde aktif merkez yönelimli kimyasal reaktif olarak başarı ile kullanılmıştır. Bütün bu enzimlerdeki ortak yön, hepsinde de, substrat, ürün veya ligandlardan birinin piruvat veya piruvat analogu bileşikler olmalıdır.

Her ne kadar bromopiruvat yukarıda adı geçen çalışmalarda bölge özgüllüğü bulunan bir reaktif olarak, aktif merkez veya ligand bağlama bölgesi yönelimli bir reaktif diye kullanılıyorsa da, burada kimotripsinin TPCK ile modifikasyonundaki gibi (5,6,9) bir özgüllük söz konusu değildir. Gerçekte, bromopiruvat yalnızca aktif merkez yönelimli değil; fakat genelde bir S-alkilleyici olarak davranmaktadır. Örnek olarak maya piruvat kinazında (23) yalnızca aktif merkezdeki sisteinler ile değil, yüzeysel tüm sisteinler ile tepkimeye girmektedir. Maya piruvat kinazında DTNB ile tepkimeye giren yüzeysel 12 sisteinin tümü bromopiruvat ile de tepkimeye girmektedir. Benzer sonuçlar radyoaktif bromopiruvat kullanılan diğer çalışmalarda da elde edilmiştir (15,17,23-26). Bromopiruvatın affinite işaretleyici olarak kullanıldığı bu çalışmalarda; özgül olmayan bağlanmayı önlemek için, proteinler önce koruyucu substratların bulunduğu ortamda radyoaktif olmayan bromopiruvat ile inkübe edilmiş; reaktifin fazlası ortamdaki uzaklaştırıldıktan sonra radyoaktif bromopiruvat ile modifiye edilmiştir. Bundan sonra, kinetik analizler ve amino asit analizi ile, bromopiruvat ile tepkimeye giren amino asit sayısı ve türü tesbit edilebilir. Bromopiruvat modifikasyonunda, tepkimeye giren fonksiyonel amino asit genellikle sisteindir; ancak, pankreatik ribonükleaz (26) ve kar-

bonik anhidrazda (27) histidinin, 2-keto-3-deoksi fosfoglukonik aldolazda da glutamik asitin (15) bromopiruvat ile tepkimeye girdiği gösterilmiştir. Bunun yanı sıra, 2-keto-3-deoksi-6-fosfoglukonat aldolazda (15) bir sistein modifikasyonu ile enzim inhibe olurken, maya flavositokrom b_2 de ise etkinlikte fonksiyonu bulunan iki sisteinin modifiye olduğu, diğer amino asitlerin ise etkilendiği gösterilmiştir (19).

Piruvat kinaz, heksokinaz ve fosfofruktokinaz ile birlikte glikolizin üç önemli kontrol enziminden biridir. Fosfoenolpiruvattaki (PEP) fosfat grubunu adenzin 5-difosfat'a (ADP) aktararak, ATP sentezini sağlayan piruvat kinaz, glikolizde ATP sentezini katalizleyen önemli bir enzimdir.

Çeşitli dokulardaki dağılımı, immünolojik ve kinetik özelliklerine göre piruvat kinazın dört izozimi bulunmaktadır. Bu izozimlerin hepsi de dört alt birim içeren birer tetramerdir. Bazı dokular piruvat kinazın bir tek izozimini içerirken, bazı dokularda birden fazla izozim bulunmaktadır. Örneğin, piruvat kinazın M-1 tipi kas dokusundaki tek izozim iken, kalp kası ve beyinde çoğunlukta bulunan izozimdir (28). M-1 tipi fruktoz-1,6-difosfat'a (FDP) duyarsızdır ve Michaelis-Menten kinetiğine uyar (29).

Piruvat kinazın M-2 tip izozimi karaciğerde düşük düzeyde bulunurken; akciğer, böbrek, yağ dokusu, lökosit, fetal dokular ve pek çok tümörde ana izozim olarak bulunur. Allosterik olmasına rağmen L tipi izozimden farklı kinetik özellikleri vardır (30-32).

Piruvat kinazın üçüncü izozimi L tipi olup, esas olarak karaciğerde bulunur. FDP allosterik aktivatörü, alanin ve ATP ise allosterik inhibitörüdür (33,34). Kinetik özellikleri alyuvardaki izozim ile oldukça benzerlik gösterir (28,35).

Piruvat kinazın dördüncü izozimi ise yalnızca alyuvarda bulunan R tipidir. R tipi izozim alyuvarda bulunan tek piruvat kinazdır. Kinetik ve immünolojik olarak L tipi izozime benzemekle beraber, elektroforetik olarak L tipinden ayrılır. FDP allosterik aktivatörü, ATP ise allosterik inhibitörüdür (36,38). Alyuvar piruvat kinazı diğer izozimlerden farklı olarak "hysteretic" tip kinetik davranış gösterir (39).

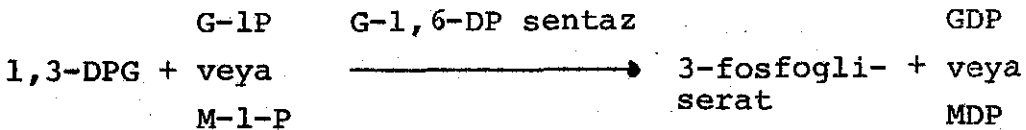
Piruvat kinaz, alyuvar metabolizmasında özel bir öneme sahiptir. Bu önem, piruvat kinazın, tek enerji kaynağı glikoliz olan alyuvarlarda ATP sentez tepkimelerinden birini katalizlemesinin yanı sıra; dolaylı olarak 2,3-difosfogliserat (2,3-DPGA) düzeyini ayarlamasından ileri gelir. Nonsferositik hemolitik aneminin nedenlerinden biri olarak bilinen piruvat kinaz eksikliği durumunda (40), PEP düzeyi yükselir. Bu kalıtsal bozukluk sonucu artan PEP derişimi, 2,3-DPGA düzeyinin yükselmesine neden olur. 2,3-DPGA hem glukoz-6-fosfat dehidrogenazın (kompetitif), hem de 6-fosfoglukonat dehidrogenazın (nonkompetitif) inhibitörüdür (40). O nedenle, piruvat kinaz eksikliği olan kişilerde redükte nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH), dolayısıyla redükte glutatyonun düzeyi düşecektir. Bu da alyuvarların normal zar yapılarının bozulmasına ve daha kırılğan hale geçmelerine neden olur.

Piruvat kinaz izozimlerinin hepsi birer tetramerdir. İlk sentezlendiklerinde, etkinlikleri bulunmayan pro formu şeklindedirler. Proteolitik bir translasyon sonrası modifikasyon ile olgun piruvat kinaza çevirilirler. Bu modifikasyon L tipi izozimde çok hızlı (41), insan alyuvar piruvat kinazında ise çok daha yavaş olmaktadır. Eritroblast ve retikülositlerde, R'₄ diye tanımlanan pro-tetramer tümüyle inaktif iken; dolaşıma geçen alyuvar-

larda bulunan $R_2R'_2$ (heterotetramer) formu oldukça aktif ve R_4 (olgun homotetramer) formu ise enzimin ergin formu olup en aktif şeklidir (42). Alyuvar piruvat kinazının $R_2R'_2$ formu ile R_4 formu affinite kromatografisi ile birbirinden ayrı olarak elde edilmiştir (43,44).

Alyuvar piruvat kinazının FDP bağlama bölgelerinin, enzimin olgun olmayan formlarında kapalı olduğu Gaurreau v.d. tarafından gösterilmiştir (37). Adı geçen çalışmada, enzimin $R_2R'_2$ formu, mol başına iki mol FDP bağlarken; R_4 formu dört mol FDP bağlamaktadır. Bu bulgulara göre, FDP bağlama bölgesi enzimin pro-formunda kapalı bulunmakta ve proteolitik modifikasyonla enzim olgunlaşırken FDP bağlama bölgesi açığa çıkmaktadır.

Allosterik bir enzim olan alyuvar piruvat kinazının pozitif allosterik modülatörü heksoz difosfatlardır. Heksoz difosfatların aktive edici etkisi FDP >Mannoz-1,6-difosfat (MDP) >Glukoz-1,6-difosfat (GDP) sırasına göre (45). FDP'in hücre içi derişimi 2-4 μ M düzeyinde, MDP derişimi ise 100-200 μ M kadardır (46,47). Bu nedenle MDP, alyuvar içi metabolik aktivatör olarak fonksiyon görmektedir. Alyuvar, glukoz-1,6-difosfat sentaz (G-1,6-DP sentaz) enzimi ile aşağıdaki tepkimeye göre MDP ve GDP sentezleyebilir (48).



Heksoz difosfatlar, piruvat kinazın PEP'e olan K_m 'nin düşürerek enzimi aktive ederler; doygun PEP derişiminde bu etkileri ortadan

kalkar (45). Hücre içi PEP deşiminin 15-20 μ M olduğu göz önünde bulundurulursa (34); piruvat kinazın heksoz difosfatlar ile aktivasyonu alyuvarlarda her zaman önemlidir.

Alyuvarlarda, MDP gibi GDP de 0.1-0.2 mM gibi yüksek derişimdedir; MDP, GDP'den sekiz kez daha etkili olarak piruvat kinazı aktive eder (45). Adı geçen bu iki heksoz difosfatın alyuvardaki yüksek derişimine rağmen; yapılan çalışmalarda, daha etkili bir aktivatör olması nedeniyle, daha düşük derişimde bulunan FDP kullanılmaktadır. Alyuvarlarda FDP'ın derişimi 2-4 μ M gibi düşük bir düzeydedir. Ancak, düşük FDP derişimi piruvat kinaz aktivasyonu açısından bir sorun teşkil etmez; çünkü, alyuvar piruvat kinazının FDP için K_m 'i 0.37 mikromolardır (45).

Yukarıda anlatıldığı gibi alyuvar piruvat kinazı eksikliği nonsferositik hemolitik aneminin bilinen nedenlerinden biridir. Bu hastalarda piruvat kinaz etkinliği ve ATP düzeyinin azalması yanı sıra, normal, hatta yüksek olduğu durumlar da bildirilmiştir (49).

Normal alyuvar piruvat kinazı okside glutatyon (GSSG) ile muamele edildiğinde, nonsferositik hemolitik anemili hastaların piruvat kinazı ile aynı kinetik özellikleri göstermekte, allosterik özelliğini yitirmekte ve FDP'a duyarlılığını kaybetmektedir (50,51). Bu bulgular, piruvat kinaz eksikliğine bağlı nonsferositik hemolitik aneminin nedeninin kalıtsal bir bozukluktan ziyade, translasyon sonrası, özellikle sisteinlerin oksidasyonu ile ortaya çıkan bir hastalık olduğuna işaret etmektedir. Her ne kadar adı geçen hastalıkta piruvat kinaz eksikliğinden bahsediliyorsa da, gerçekte bu konu henüz kanıtlanamamıştır. Çünkü piruvat kinaz

etkinliğinin bazı kişilerde az bulunmasının, protein sentezindeki eksiklikten mi, yoksa sentezlenen enzimin inaktif oluşundan mı ileri geldiği bilinmemektedir. Kinetik çalışmalardan elde edilen bulgulara göre, bu hastalarda sisteinlerin modifikasyonu önemli olmaktadır. Ancak bu konuda kesin bilgilerin elde edilmesi için, normal ve hasta kişilerin piruvat kinazında sisteinlerin fonksiyonunu belirleyecek çalışmalar gereklidir. Bu tip hastalardan alınacak kanın ne kadar sınırlı olduğu dikkate alınırca, öncelikle normal kişilerdeki enzimin kimyasal yapısının tanımlanması zorunluluğu açıktır. Normal enzimin yapısal ve fonksiyonel özelliklerinin tanımlanmasından sonra, mutant enzim ile elde edilen bilgiler daha bir anlam kazanacaktır.

Diğer proteinlerde olduğu gibi, piruvat kinaz izozimlerinde de, gruba özgül kimyasal reaktifler kullanılarak enzimin ligand bağlama bölgesinde ve aktif merkezinde bulunan ve katalizden sorumlu (fonksiyonel) amino asitlerden bir çoğu tesbit edilmiştir. Grup özgüllüğü olan kimyasal reaktifler kullanılarak yapılan çalışmalar ile, domuz kalbi (52) ve tavşan kası (53) piruvat kinazlarının PEP bağlama bölgesinde arginin; tavşan kası piruvat kinazının ADP bağlama bölgesinde lizin (54) ve PEP bağlama bölgesinde histidin (55) bulunduğu gösterilmiştir. Ayrıca, piruvat kinaz için aktif merkez yönelimli bir reaktif olan bromopiruvat kullanılarak, maya piruvat kinazının PEP bağlama bölgesinde sistein bulunduğu gösterilmiş (23) ve bu sisteinler DTNB'ye olan reaktivitelerine göre sınıflandırılmıştır (56). Ayrıca tavşan kası piruvat kinazının katalitik aktivitesi için gerekli iki sistein grubu tesbit edilmiş (57) ve bu sisteinler arasında disülfid oluşturulduğunda enzimin tümüyle inaktive olduğu gösterilmiştir.

Alyuvar piruvat kinazında ise ADP bağlama bölgesinde arginin (58), PEP bağlama bölgesinde bir sistein grubu (59) tesbit edilmiştir. Özgül bir histidin reaktifi olan dietil pirokarbonat kullanılarak aktif merkez dışında enzimin aktif konformasyonundan sorumlu bir histidinin bulunduğu ve ayrıca, enzimin aktif merkezinde PEP ile ADP bağlama bölgelerinin üst üste düştüğü bölgede bir ikinci histidinin bulunduğu ve bu histidinin katalizde görev aldığı gösterilmiştir (60).

Bu çalışmada ise, insan alyuvar piruvat kinazı saflaştırılmış ve enzimin aktif merkez yönelimli bir reaktifi olan bromopiruvat ile inaktivasyonu incelenmiştir. Bromopiruvat modifikasyonunda enzimin R_4 formu kullanılmıştır (43,44). Değişik koşullarda gerçekleştirilen bromopiruvat inaktivasyonunun enzimin kinetik değişmezlerine yansımaları incelenerek, modifiye edilen grubun niteliği ve yeri konusunda bilgi edinilmeye çalışılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

GEREÇLER :

Alyuvar piruvat kinazının saflaştırıldığı insan kanı Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri, Kan Bankası ve Kızılay Kan Merkezi, Ankara'dan; Sephadex G-75, Sephadex G-25, Sepharose 4B, Blue Dextran 2000, Pharmacia, İsveç'ten; tavşan kası laktat dehidrogenazı, nikotinamid adenin dinükleotid-indirgenmiş formu (NADH, disodyum tuzu) Boehringer, F. Almanya'dan; siyanojen bromür, adenzin-5'-difosfat (ADP, monopotasyum tuzu), fosfoenolpirüvat (PEP, monopotasyum tuzu), fruktoz-1,6-difosfat (FDP, disodyum duzu), ditiyotreitöl (DTT), bromopirüvat, Sigma, A.B.D.'den; HEPES, Serva, F. Almanya'dan; amonyum sülfat ise Riedel ve Merck, F. Almanya'dan temin edildi. Deneylerde kullanılan diğer bütün kimyasal bileşikler analitik saflıkta idi.

Alyuvarların ayrılması ve yıkanmasında IEC—International klinik tip santrifüjü, alyuvar zarlarının uzaklaştırılması ve amonyum sülfat çöktürmelerinde Sorvall SS-3 otomatik süpersantrifüjü kullanıldı. Jel kromatografisinde fraksiyonlar LKB, Ultrorac 7000 kollektörü ile toplandı. Seyreltik enzim örnekleri Amicon Model-12 ultrafiltrasyon hücrelerinde XM-10 filtreleri kullanılarak basınçlı azot gazı altında değiştirildi. Protein ölçümü, etkinlik ölçümü, kinetik deneyler ve bromopirüvat ile alyuvar piruvat kinazının modifikasyonunda Beckman Model 25 kinetik sistem spektrofotometresi kullanıldı.

YÖNTEMLER :

Protein Ölçümü : Enzimin saflaştırılması basamaklarında etkinlik ölçümü Warburgh'un yöntemine göre yapıldı (61). Protein örneklerinin 280 nm ve 260 nm deki absorpsiyonları (A) ölçüldükten sonra;

$$\text{mg protein/ml çözelti} = (1.55 \times A_{280}) - (0.76 \times A_{260})$$

eşitliğine göre protein miktarı hesaplandı. Protein derişiminin çok düşük olduğu örneklerde ise, protein ölçümü Shaffner ve Weissman'ın yöntemine göre yapıldı (62).

Etkinlik Ölçümü : Enzimin saflaştırılması çalışmalarında piruvat kinaz etkinliği, 37°C da Kimberg ve Yielding'in kolorimetrik yöntemine göre ölçüldü (63). Bu yöntemin prensibi, piruvat kinaz ile katalizlenen tepkime sonunda oluşan bir α -keto asit olan pirüvatın, 2,4-dinitrofenil hidrazin ile hidrazon oluşturarak renklendirilmesidir. Oluşan rengin şiddeti, aynı koşullarda hazırlanmış köre karşı 520 nm de ölçülür. Bu yöntemde etkinlik ölçüm ortamının bileşimi şöyleydi: 50 mM HEPES-KOH tamponu (pH : 7.4;), 2.0 mM ADP, 1 mM FDP, 2 mM PEP, 10 mM MgSO₄, 100 mM KCl. Etkinlik ölçüm ortamının hacmi 50 mikrolitre (kantitatif ölçümlerde ise 250 mikrolitre) idi. ADP'sız tepkime karışımı ile enzim 5 dakika inkübe edildikten sonra, tepkime ADP eklenmesi ile başlatıldı. Tepkime başlatıldıktan 5 dakika sonra 50 mikrolitre 2,4-dinitrofenil hidrazin (120 mg/100 ml 2N HCl) eklenerek tepkime durduruldu. Hidrazon oluşumu için 5 dakika beklendikten sonra, 50 mikrolitre 10 N NaOH ile renklendirildi ve 500 mikrolitre etanol eklenip iyice karıştırıldıktan sonra, 520 nm'de köre karşı absorbansları

ölçüldü. Kantitatif ölçümlerde ise, tepkime ADP ile başlatıldıktan sonraki 1,3,6. ve 10. dakikalarda ortamdan 50'şer mikrolitrelilik örnekler çekilip, 50 µl 2,4-dinitrofenilhidrazin çözeltisi üzerine eklenerek tepkime durduruldu. Piruvat kinazın bir ünitesi, 37°C'da 1 dakikada, 1 mikromol piruvat açığa çıkaran enzim miktarı; özgül etkinliği ise, miligram enzim başına düşen ünite olarak alındı. Açığa çıkan piruvat miktarı aynı koşullarda hazırlanmış standart piruvat eğrisinden hesaplandı.

Kinetik ve bromopiruvat ile enzimin modifikasyonu deneylerinde ise piruvat kinaz etkinliği, piruvat kinaz laktat dehidrogenaz'a (LDH) kenetlenip NADH'in oksitlenmesine bağlı absorbands düşüşü takip edilerek spektrofotometrik olarak ölçüldü (64). Farklılık belirtilmedikçe, spektrofotometrik yöntemde toplam 400 mikrolitre olan etkinlik ölçüm ortamının bileşimi şöyleydi: 50 mM HEPES-KOH tamponu (pH:7.4), 0.18 mM NADH, 2 mM ADP, 2 mM PEP, 0.25 mM FDP, 100 mM MgSO₄, 100 mM KCl, 0.1 mM DTT, 4µgLDH ve piruvat kinaz. Enzimin 30°C de 5 dakika ön inkübasyonundan sonra, ADP eklenmesi ile tepkime başlatıldı ve tepkimenin ilk hızı, Beckman Model 25 spektrofotometresinde yazıcı ile 3-5 dakika çizdirildi. NADH'in molar absorpsiyon değişmezi 6.22×10^3 olarak alındı ve 30°C de 1 mikromol NADH'ı 1 dakikada oksitleyen enzim miktarı, 1 enzim ünitesi olarak tanımlandı.

Blue Dextran-Sepharose 4B'nin Hazırlanması : Sepharose 4B, Cuatrecassas ve Anfinsen'in yöntemine göre (65) siyanojen bromür ile aktive edildi. Aktive edilmiş Sepharose 4B'ye Ryan ve Westling'in yöntemine göre (66) Blue Dextran 2000 kovalent olarak bağlandı.

Alyuvar Piruvat Kinazının Saflaştırılması : İnsan alyuvar piruvat kinazı, amonyum sülfat çöktürmesi, Sephadex G-75 kromatografisi ve Blue Dextran-Sepharose 4B affinite kromatografisi basamaklarını içeren bir yöntemle saflaştırıldı (44). Bu saflaştırma işlemi aşağıda kısaca özetlendi.

Hacettepe Üniversitesi Hasteneleri Kan Bankası ve Kızılay Kan Merkezinden alınan günü geçmiş kanlar 700 g'de 20 dakika santrifüj edilerek plazma ve alyuvarlar aspirasyon ile atıldı. Binde 9 (ağırlık/hacim) NaCl ile en az 5 kez yıkamadan sonra alyuvarlar toplandı. Alyuvarlar 1 mM ϵ -amino kaproik asit (ϵ -ACA) ve 1 mM 2-merkaptoetanol (2-ME) içeren 3 hacim su ile seyreltildi. Birkaç kez -35°C 'da dondurulup, $+37^{\circ}\text{C}$ 'da çözülerek hemoliz olmaları sağlandı. Alyuvarların hemolizinden sonra, stroma 1 saat süre ile 15.000 g de santrifüj edilerek uzaklaştırıldı. Toplanan süpernatant % 41 amonyum sülfat doygunluğuna getirildikten sonra bir gece ($0-4^{\circ}\text{C}$)'da bekletildi. Amonyum sülfat çökeleği 15.000 g'de 60 dakika santrifüj edilerek toplandı ve en az bir kez daha % 41'lik amonyum sülfat çözeltisi ile yıkandı. Bu işlemler sonunda hemoglobinin tamamına yakın kısmı atılmış oldu (bkz. bulgular).

Santrifügasyon ile toplanan amonyum sülfat çökeleği 1 mM EDTA, 1 mM ϵ -ACA, 0.1 mM DTT içeren 250 ml 25 mM Tris-Asetat tamponunda (pH:6.8) çözüldü. Çözünmeyen kısım santrifügasyon ile uzaklaştırıldıktan sonra, süpernatant, 2mM 2-ME içeren 25 mM Tris-Asetat (pH: 6.8) tamponu ile dengelenmiş 5.8 x125 cm boyutlarındaki Sephadex G-75 kolonuna uygulandı. Kolon aynı tampon ile yıkılarak enzimin kolondan elüsyonu sağlandı.

Sephadex G-75 kromatografisi sonucu piruvat kinaz etkinliği bulunan tüpler birleştirilerek, 40 mM NaCl ve 2 mM 2-ME içeren 25 mM Tris-asetat tamponu (pH: 6.8) ile dengelenmiş 2.5 x 22 cm boyutlarındaki Blue Dextran Sepharose 4B kolonuna uygulandı; 100 ml aynı tampon ile yıkandı. Daha sonra aynı tampondaki NaCl derişimi 80 mM'a çıkarılarak, yıkantınının 280 nm ve 410 nm'deki absopsiyonu 0.01'in altına düşene kadar yıkama işlemi sürdürüldü. Piruvat kinaz kolondan, 0.1 mM FDP içeren son yıkama tamponu ile elüe edildi. Affinite kromatografisinde, daha önceki çalışmalara uygun olarak (44,67), piruvat kinaz etkinliği iki zirve halinde elde edildi. Bu çalışmadaki kinetik ve bromopiruvat modifikasyonu deneylerinde piruvat kinazın ergin (R₄) formunu içeren birinci etkinlik zirvesi kullanıldı (44).

İnsan Alyuvar Piruvat Kinazının Bromopiruvat ile Modifikasyonu :

Alyuvar piruvat kinazı saflaştırıldıktan sonra, affinite kromatografisi sonrası elde edilen iki etkinlik zirvesi ayrı ayrı deriştirildi. Enzim ya bu hali ile, veya % 80 amonyum sülfat doygunluğuna getirilip çöktürüldükten sonra 25 mM Tris-Asetat tamponunda (pH: 6.8) çözülerek saklandı.

Deneylerde kullanılacağı zaman enzim, 200 mM 2-ME ile indirgendikten sonra (25°C'da, 120 dakika) 0.1 mM EDTA içeren 50 mM HEPES-KOH tamponu (pH:7.4) ile dengelenmiş 1x25 cm boyutlarındaki Sephadex G-25 kolonundan geçirilerek tuzdan ve 2 ME'den arındırıldı. Bu şekilde tümüyle indirgenmiş ve amonyum sülfattan arındırılmış enzim bromopiruvat modifikasyonunda kullanıldı.

Enzimin bromopiruvat ile modifikasyonu 25°C da; kalan enzim etkinliğinin ölçümü ise 30°C da yapıldı. Piruvat kinaz 0.1 mM EDTA içeren 50 mM HEPES-KOH tamponunda (pH:7.4) inkübe edildikten sonra, ortama bromopiruvat eklenmesi ile modifikasyon başlatıldı. Modifikasyon ortamından farklı zamanlarda çekilen örneklerde, enzimin kalan etkinliği ölçüldü. Enzimin ligandlarının koruyucu etkileri araştırıldığı zaman ise, ligand içeren ortamda enzimin inkübasyonundan sonra modifikasyon başlatıldı. Başta FDP olmak üzere, ligandların koruyucu etkileri değişik koşullarda araştırıldı. Tekrarlardan sakınmak ve bütünlüğü sağlamak amacı ile, kinetik deneyler ve modifikasyonda kullanılan enzimin hazırlanması ve deneylerin ayrıntıları "Bulgular" bölümünde verilmiştir.

BULGULAR

Alyuvar Piruvat Kinazının Saflaştırılması :

İnsan alyuvar piruvat kinazı, daha önce bildirilen yöntem uygun olarak (44), amonyum sülfat çöktürmesi, Sephadex G-75 kromatografisi ve Blue Dextran-Sepharose 4B affinite kromatografisi basamaklarını içeren bir yöntemle saflaştırıldı. Bu saflaştırma basamaklarından affinite kromatografisi basamağı hariç olmak üzere bütün saflaştırma basamaklarının verimi % 80-100 arasında değişmekteydi. Affinite kromatografisinde kullanılan jelin (Blue Dextran-Sepharose 4B) eski veya yeni olması durumuna göre aşağıda belirtilen özellikler gözlemlendi:

Yeni hazırlanan jel, uygulanan protein ile tepkimeye girmekte (44,69) ve bunun sonucu piruvat kinazın da inaktivasyonuna neden olmaktadır. Bu nedenle yeni hazırlanan jelle örnek uygulanmadan önce, jelden hemolizat geçirildi (44) ve ardından 1 M NaCl ile yıkanarak rejenerasyonu sağlandı. Bu uygulama ve rejenerasyon iki kez tekrarlandıktan sonra jel, tampon ile dengelendi. Her rejenerasyon işleminde, 1M NaCl ile yıkama sırasında jelin bir miktar boya yitirdiği görüldü. Bu nedenle, rejenerasyonun kısa sürede yapılmasına ve kolonda uzun süre jelin tuza maruz kalmamasına özen gösterildi. Aynı özellikler fosfat tamponunda da gözlemlendi. Bu sorunlar pH: 7.4'de Tris-HCl, pH: 6.8 de ise Tris Asetat kullanılarak çözüldü.

Blue Dextran-Sepharose 4B jeli kullanımının sınırsız olmadığı, kullanma sayısı arttıkça jelin boya yitirmesine bağlı olarak jelin enzimi bağlama yeteneğinin azaldığı bulundu. Bağlama yeteneği pH'ya bağımlı bir olay olduğu için (70), pH: 7.4 de Tris-HCl ile bağlama yeteneği azalan jel, pH: 6.8'de Tris-Asetat tamponu ile dengelendiğinde, daha fazla protein bağlayabilmekle birlikte bu özelliğinin uzun süre devam etmediği gözlemlendi. Ortalama 8-10 kromatografiden sonra, yeniden Blue Dextran-Sepharose 4B jeli sentezlemek gerekiyordu. Bu sorun Sepharose 4B yerine "Sephacryl" türü jel kullanılarak çözülebilir.

Saflaştırılan enzim değiştirilip amonyum sülfat ile çöktürüldükten sonra, amonyum sülfat çökeleği % 30-40 gliserol içeren 25 mM Tris-Asetat (pH: 6.8) tamponunda çözülerek saklandı. Bu şekilde hazırlanan stok -20°C'de saklandığında aylarca herhangi bir etkinlik kaybı gözlenmedi.

Pyruvat Kinazın Bromopyruvat ile Modifikasyonu :

Bromopyruvat modifikasyonunda kullanılan enzim, affinite kromatografisinden sonra değiştirilip % 80 amonyum sülfat doygunluğuna getirilerek çöktürüldü. Fruktoz difosfatın tümüyle uzaklaşmasını sağlamak için, iki kez aynı doygunluktaki amonyum sülfat çözeltisi ile yıkandı. 25 mM Tris-Asetat (pH: 6.8) içinde çözülen enzim, modifikasyondan önce tümüyle indirgendi. Bu işlem için enzim örneği 200 mM 2-ME ile, 50 mM HEPES-KOH (pH: 7.4), 0.1 mM EDTA içeren ortamda, 25°C da iki saat inkübe edildi. Bu süre sonunda 2-ME, aynı tampon ile dengelenmiş 1x25 cm boyutlarındaki Sephadex G-25 kolonunda ayrıldı. Açıklandığı şekilde hazırlanan enzim, bromopyruvat ile modifiye edildi. Enzim öninkübasyon ortamında (50 mM HEPES-KOH, pH: 7.4, 0.1 mM EDTA) 15 dakika inkübe edildikten sonra,

60, 120, 240, 360 μ M bromopiruvat eklenecek modifikasyon başlatıldı. Farklı zaman aralıklarında örnekler çekilerek kalan piruvat kinaz etkinliği 30°C'da, 2-ME (veya DTT) ve FDP içermeyen ortamda ölçüldü. Bu koşullarda, alyuvar piruvat kinazının bromopiruvat tarafından inaktivasyonunun, görünür birinci derece kinetiğine uygun olarak sürdüğü gözlemlendi (Şekil 1).

Bromopiruvat inaktivasyonundan elde edilen görünür inaktivasyon hız değişmezlerinin bir bölümü, bromopiruvat derişiminin bir bölümüne karşı çizildiğinde bir doğru elde edilmesi, elde edilen görünür hız değişmezlerinin bromopiruvat derişiminin doğrusal bir fonksiyonu olmadığını, fakat inaktivasyondan önce bir enzim-inhibitör kompleksinin oluştuğu gösterir (23). Bu durumda enzim-inhibitör ilişkisi aşağıdaki eşitliğe göre ifade edilebilir:

$$k_{\text{gör}} = \{k [I] / (K_D + I)\}$$

Bu denklemin bir bölümü alınacak olursa;

$$\frac{1}{k_{\text{gör}}} = \frac{K_D}{k} \cdot \frac{1}{I} + \frac{1}{k} \quad \text{elde edilir.}$$

Burada $k_{\text{gör}}$ = görünür inaktivasyon hız değişmezi,

K_D = (E-I) kompleksinin dissosiyasyon değişmezi ve,

k = bromopirüvatın doyunluk inaktivasyon hız değişmezidir.

Bu eşitliğe göre sonuçlar değerlendirildiğinde, insan alyuvar piruvat kinazının bromopiruvat tarafından inaktivasyonunda bir saturasyon olayının varlığı gözlemlendi (Şekil 2). Şekil 2'den doyunluktaki bromopiruvat inaktivasyon hız değişmezi, k , 0.0343 dakika⁻¹; inhibitör enzim kompleksinin dissosiyasyon değişmezi, K_D

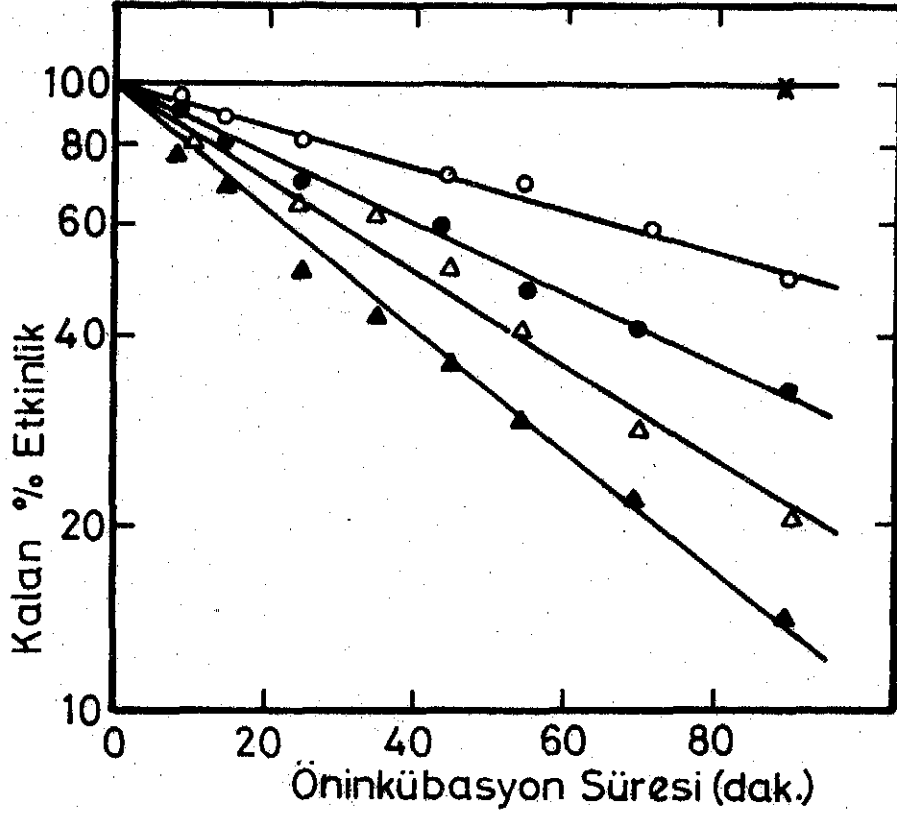
ise 0.20 mM olarak bulundu. Elde edilen doğrunun korrelasyon değişmezi, r^2 , 0.99 dur.

Inaktivasyonun görünür hız değişmezleri ($k_{g\ddot{o}r}$) bromopiruvat derişimine karşı grafiklendiğinde eğimi $45.2 \text{ M}^{-1} \text{ dak}^{-1}$ olan bir doğru elde edildi (Şekil 3). Bu değer, k_{cat} , inaktivasyonun katalitik hız değişmezidir. Diğer taraftan, değişik bromopiruvat derişimlerinde elde edilen yarı ömürlerin bir bölüsünün logaritması, bromopiruvat derişimlerinin logaritmasına karşı grafiklendiğinde eğimi 1.08'e eşit olan bir doğru elde edildi (Şekil 4). Kinetik analizlerde böyle bir doğrunun eğiminin 1 olması, enzimde altbirim başına, etkinlikten sorumlu bir fonksiyonel grubun modifiye olduğunu gösterir (53,54,71).

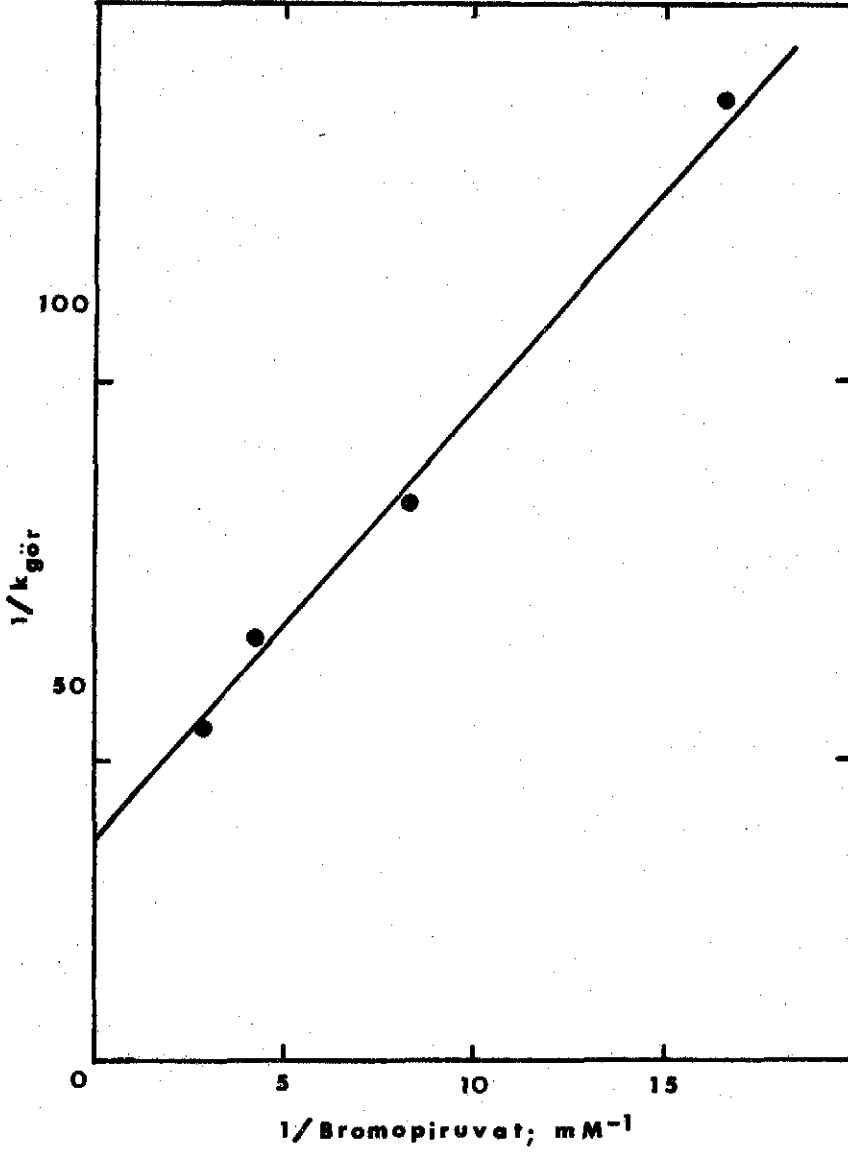
Alyuvar piruvat kinazının bromopiruvat ile modifikasyonunda, modifikasyon ortamında PEP, ADP veya FDP gibi ligandlardan birinin bulunması durumunda; veya etkinlik ölçüm ortamında FDP'nin bulunması durumunda; inaktivasyonun görünür birinci dereceden saptığı bulundu (Şekil 5). Sonuçlar aşağıda tablo halinde özetlenmiştir (Tablo I).

<u>Modifikasyon ortamı</u>			<u>Aktivite ölçüm ortamı</u>	<u>Inaktivasyon kinetiği</u>
<u>FDP</u>	<u>ADP</u>	<u>PEP</u>	<u>FDP</u>	
-	-	-	-	görünür birinci dereceden (gbd)
+	-	-	-	gbd değil
-	-	-	+	"
+	-	-	+	"
-	+	-	+	"
-	+	-	-	"
-	-	+	+	"
-	-	+	-	"

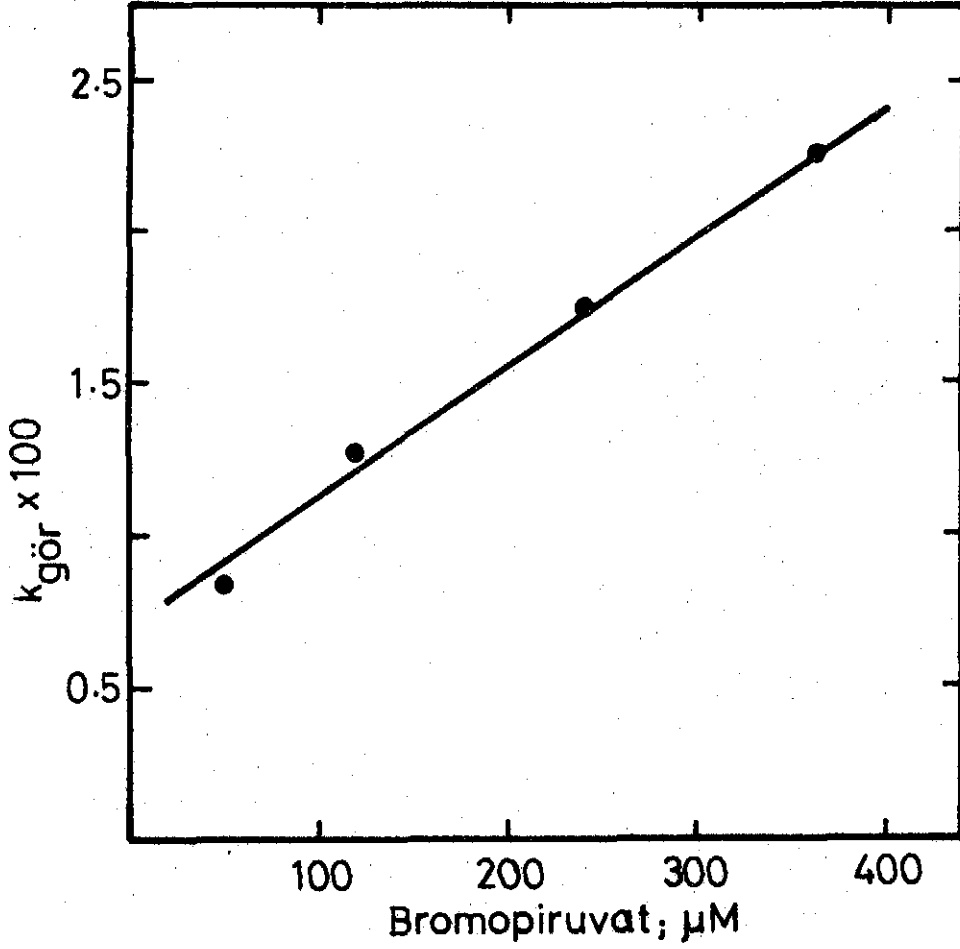
Tablo I: Alyuvar piruvat kinazının bromopiruvat ile modifikasyonunda modifikasyon ortamında PEP, ADP ve FDP gibi ligandlardan birinin bulunması durumunda veya etkinlik ölçüm ortamında FDP'nin bulunması durumunda inaktivasyon kinetikleri.



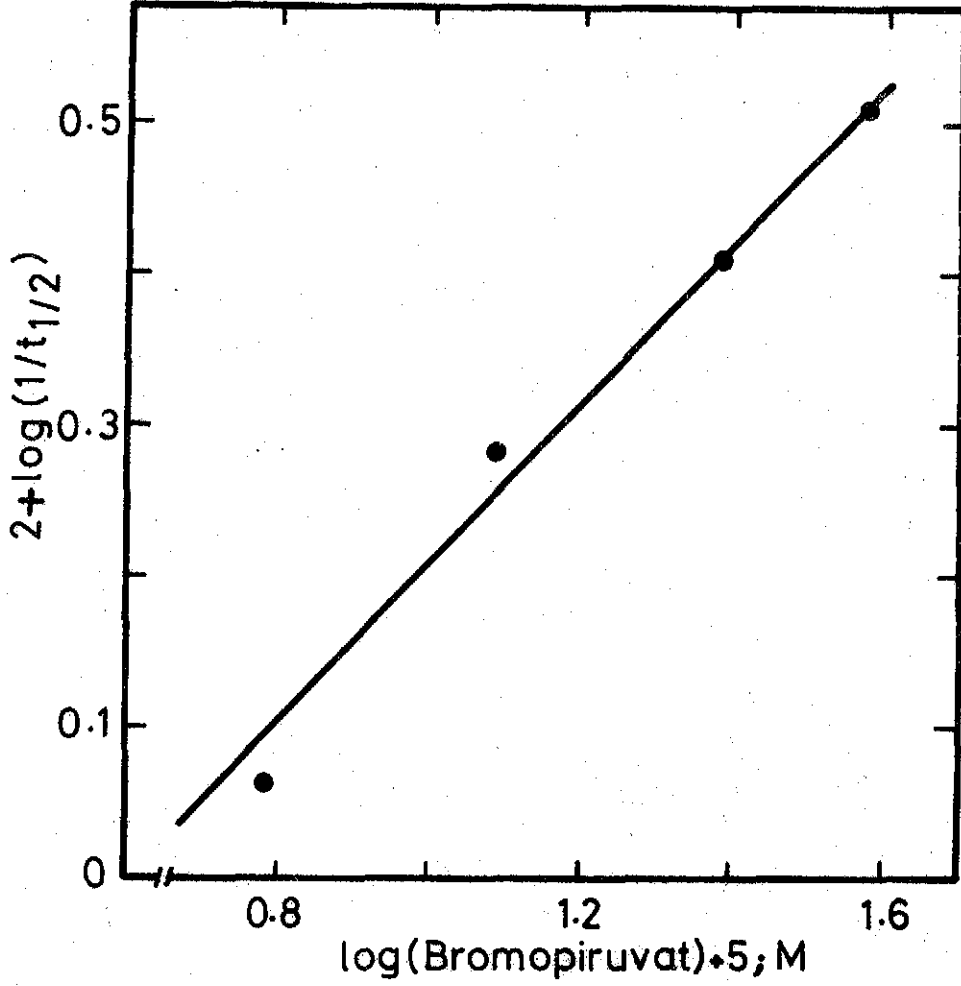
Şekil 1: İnsan alyuvar piruvat kinazının bromopiruvat ile inaktivasyonu: PDP'siz enzim, FDP içermeyen ortamda bromopiruvat ile inaktive edildi ve kalan etkinlik FDP içermeyen ortamda ölçüldü. (-x-) kontrol; (-O-) 60 μM, (-●-) 120 μM, (-Δ-) 240 μM, (-▲-) 360 μM bromopiruvat.



Şekil 2: İnsan alyuvar piruvat kinazının bromopiruvat inaktivasyonunda elde edilen görünür birinci dereceden hız değişmezleri bir bölüsünün, bromopiruvat derişimi bir bölüsüne karşı çizimi. Doğrunun ordinatı kesim noktası, satürasyondaki inaktivasyon hız değişmezinin, k , bir bölüsünü ve eğimi de, K_D/k 'yı verir. Buradan, $k=0.0343 \text{ dak}^{-1}$ ve $K_D=0.20 \text{ mM}$ bulundu. Doğrunun korrelasyon değişmezi r^2 , 0.99 olarak saptandı.



Şekil 3: İnsan alyuvar piruvat kinazının bromopiruvat ile inaktivasyonundan elde edilen görünür inaktivasyon hız değişmezlerinin bromopiruvat derişimine karşı grafiklenmesi: $k_{gör}$ değerleri Şekil 1'den hesaplandı. Katalitik inaktivasyon hız değişmezi, k_{cat} , $45.2 \text{ M}^{-1} \text{ dak}^{-1}$ ve korrelasyon değişmezi, r^2 , 0.96 olarak hesaplandı.

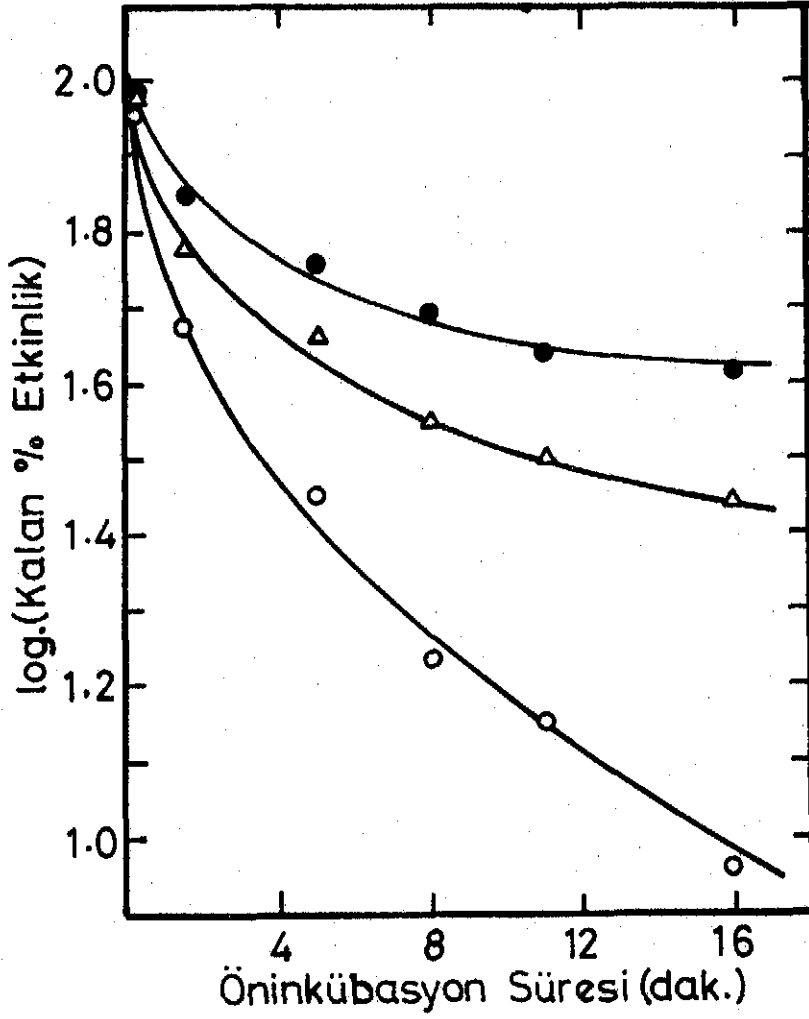


Şekil 4: İnsan alyuvar piruvat kinazının bromopiruvat ile modifikasyonunda gözlenen inaktivasyondan sorumlu amino asit sayısının saptanması. Yarı ömür, $t_{1/2}$, değerleri Şekil 1'den hesaplandı ($n=1.08$).

Alyuvar piruvat kinazının bromopiruvat ile inaktivasyonuna karşı FDP, PEP ve ADP'in koruyucu etkileri araştırıldığında; FDP'in koruyucu etkisinin önemsiz olduğu, PEP ve ADP'in enzimi daha iyi koruduğu görüldü (Şekil 5). PEP ve ADP'in koruyucu etkilerinin de mutlak bir korumadan ziyade, kısmî bir koruma olduğu bulundu (Şekil 5).

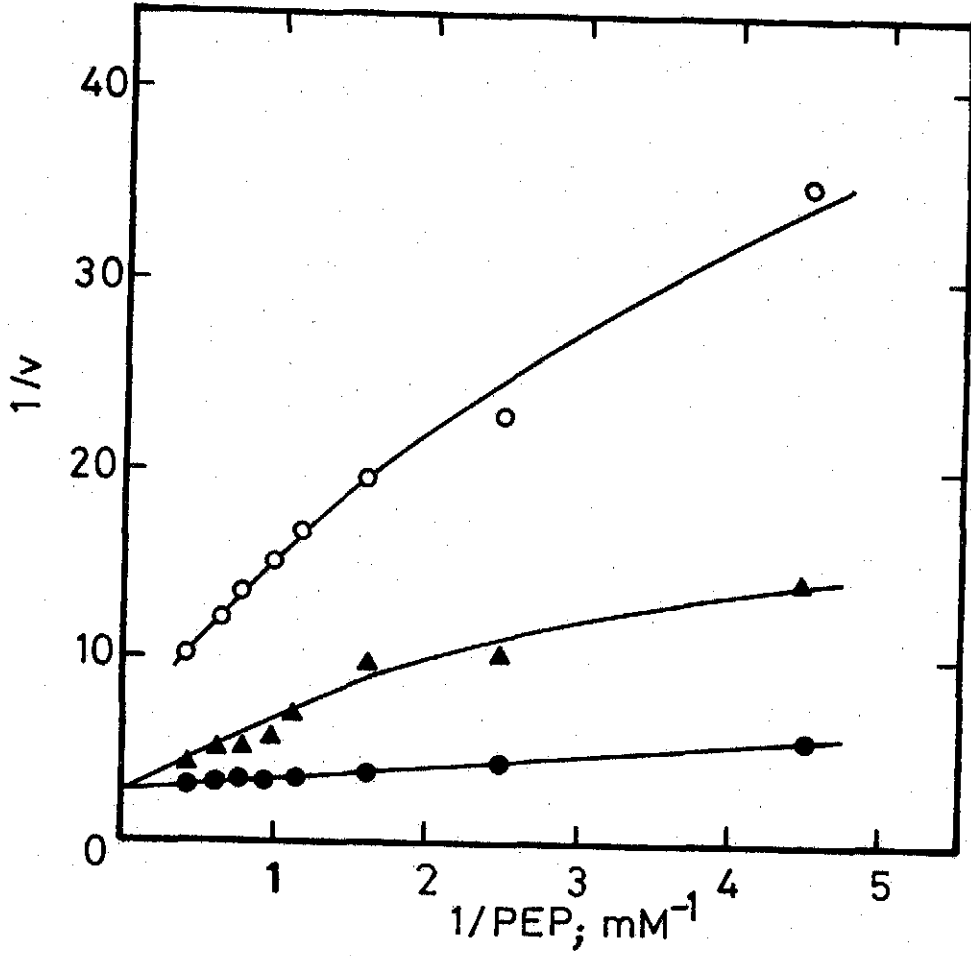
Bromopiruvat ile modifiye edilen ve edilmeyen enzimin, PEP'a olan ilgisi araştırıldığında, modifiye edilen enzimin PEP'a olan ilgisinin azaldığı bulundu (Şekil 6). FDP yokluğunda, PEP derişimine negatif kooperatif etkileşim görülürken, enzimin pozitif allosterik modülatörü olan FDP, bu etkiyi ortadan kaldırmakta ve Lineweaver-Burk grafiklemesinde bir doğru elde edilmesini sağlamaktadır. Fakat FDP bu etkiyi, bromopiruvat ile modifiye edilmiş enzimde gösterememektedir. Nitekim Şekil 6'dan da görüldüğü gibi 100 μ M FDP enzimi doygunluğu ulaştıramamaktadır.

Alyuvar piruvat kinazının FDP'a olan ilgisi çok yüksektir. Şekil 7'de görüldüğü gibi, 40 μ M FDP enzimi tümüyle maksimum aktivasyona ulaştırmaktadır. FDP varlığındaki ve yokluğundaki hızların farkı, bağıl etkinlik, Δv , alınarak Lineweaver-Burk grafiklemesi yapıldığında normal enzimin FDP'a olan K_m 'inin 3.3 μ M olduğu bulundu (Şekil 8).



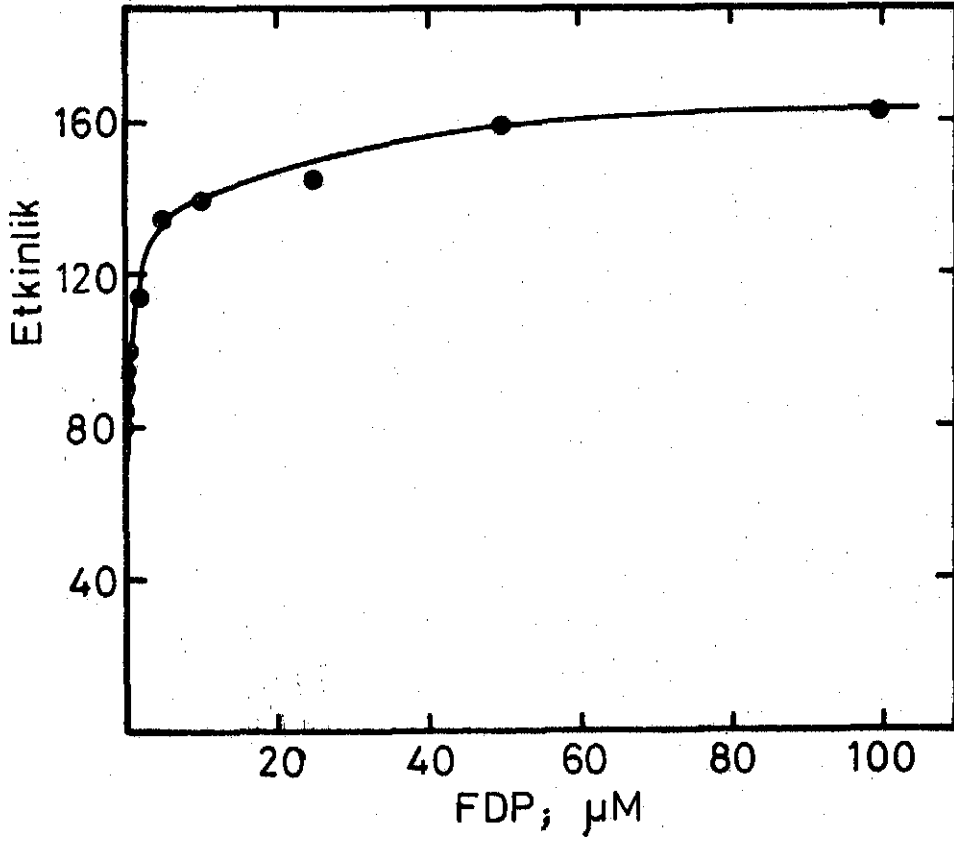
Şekil 5: İnsan alyuvar piruvat kinazının bromopiruvat ile inaktivasyonuna FDP, ADP ve PEP'in etkileri

[Bromopiruvat] = 0.5 mM, (-●-) 2 mM PEP, (-Δ-) 4 mM ADP, (-○-) 0.05 mM FDP

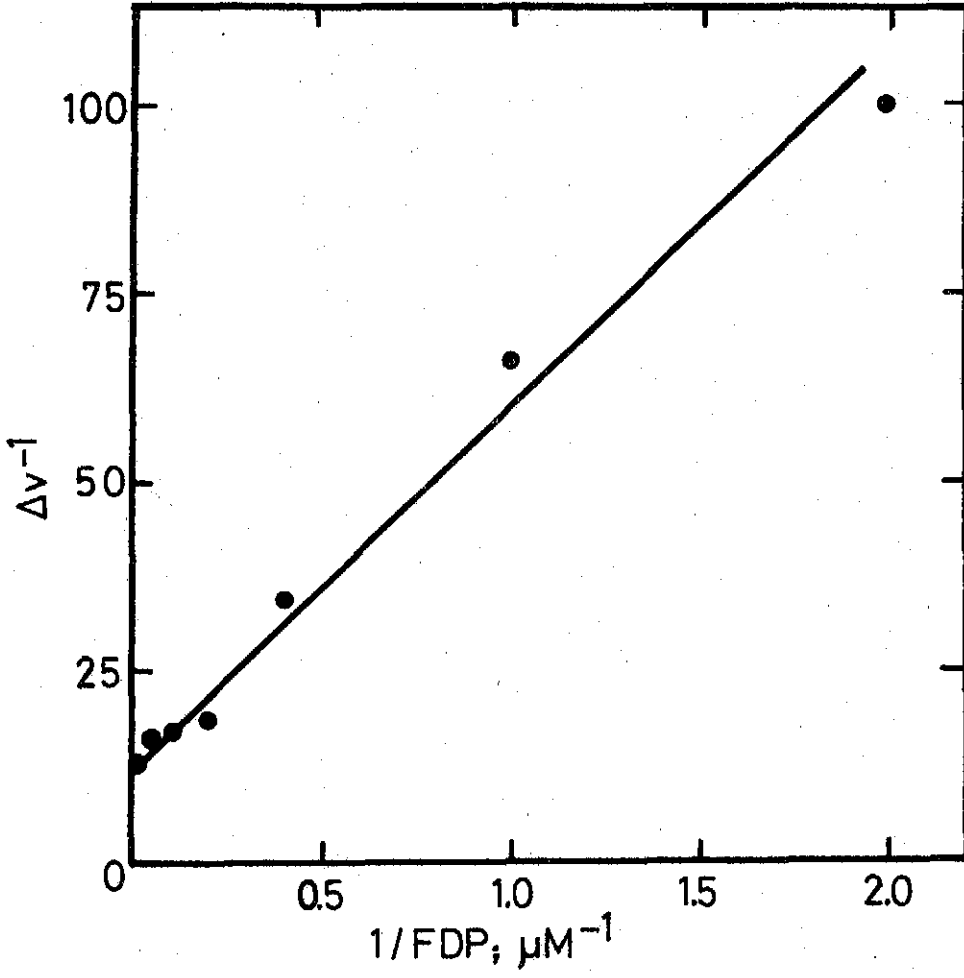


Şekil 6: Normal ve bromopiruvat ile modifiye edilmiş alyuvar piruvat kinazının PEP'a olan ilgisi:

(-●-), normal enzim, 0.1 mM FDP varlığında; (-△-), normal enzim, FDP yokluğunda; (-○-), bromopiruvat ile modifiye edilmiş enzim, 0.1 mM FDP varlığında.



Şekil 7: İnsan alyuvar piruvat kinazının FDP ile aktivasyonu



Şekil 8: İnsan alyuvar piruvat kinazının FDP'a ilgisinin Lineweaver-Burk grafiklenmesi. Δv^{-1} : Bağlı etkinliğin bir bölüsü. Bağlı etkinlik, FDP varlığında elde edilen değerlerden, yokluğunda elde edilen değerlerin çıkartılması ile elde edildi.

TARTIŞMA

Proteinlerin yapı ve fonksiyonlarının belirlenebilmesi için, öncelikle ilgilenilen proteinlerin saflaştırılmasının önemi açıktır. Geliştirilen affinite kromatografisi yöntemleri bu konuda çok büyük avantajlar sağlanmıştır. Bu yöntemlerin yardımı ile kısa sürede, çok daha az sayıda saflaştırma kademesi ile daha fazla proteini saflaştırmak mümkün olmuştur (72).

Affinite kromatografisinde temel prensip, agaroz veya poliakrilamid gibi destek maddelerine, saflaştırılacak proteinin bağlanacağı bir ligandı (antijen, antikor, Blue Dextran, vb) kovalent olarak bağlamak; proteinin bu liganda bağlanması temin edildikten sonra özgül bir madde ile proteini bağlandığı yerden elüe etmektir (73). Proteinin destek maddesinden elüsyonunu sağlayan maddeler, proteinin jele tutunduğu bağlama bölgesi ile yarışarak bu işlevi yapabildikleri gibi, proteinin başka bir yerine bağlanıp konformasyon değişikliğine neden olarak da elüsyonu sağlayabilirler.

Affinite kromatografisinde kullanılan Blue Dextran-Sepharose 4B'ye proteinlerin bağlanması bir veya birkaç grup aracılığı ile değil, "dinükleotid cebi" diye tanımlanan özel bir sekonder yapı aracılığı ile olur (74). Bu yapıyı pek çok kinaz ve dehidrogenaz enzimi içerir; o nedenle jele bağlanan proteinler özgül olarak NADH, NAD⁺, NADPH, NADP⁺, GTP, ADP, ATP, AMP gibi dinükleotid veya benzeri yapı içeren ligandlar ile jelden elüe edilmektedir-

ler (74). Bu ligandlar proteinin jele bağlanma bölgesi ile yarışarak elüsyonu sağlarlar. Blue Dextran-Sepharose 4B kolonundan proteinler, tuz gradienti ile veya tampon pH'sının değiştirilmesi ile de sökülebilir (70).

Piruvat kinazın Blue Dextran-Sepharose 4B affinite kromatografisinde, enzimin elüsyonu için fruktoz difosfat kullanılmaktadır. Diğer proteinlerdekinin aksine, fruktoz difosfat piruvat kinazın jele bağlandığı bölge ile yarışarak değil; enzime bağlanıp, dinükleotid cebinin konformasyonunu değiştirerek elüsyonu sağlamaktadır (67).

Bu çalışmada insan alyuvar piruvat kinazı daha önce bu laboratuarda uygulanan yöntemle göre saflaştırıldı (44). Bu yöntemin daha önce yayınlanmış olan diğer saflaştırma yöntemlerinden (36, 67,75) üstün yanı, çok sayıda amonyum sülfatlama ve saflaştırma basamaklarının aşılması ve enzimin çok kısa sürede, yüksek verimle ve saf olarak elde edilmesidir. Daha önce "Bulgular" bölümünde de açıklandığı gibi, enzimin saflaştırılmasında Blue Dextran-Sepharose 4B jelinin kullanım sayısının saflaştırma verimini etkilediği; en yüksek verime jelin dördüncü kullanımından sonra ulaşıldığı ve on veya daha yüksek sayılarda kullanıldığında jelin bağlama yeteneğinin düştüğü gözlemlendi. Bu sorun ancak kromatografide yeni bir jelin kullanılması ile aşılabildi.

Bu saflaştırma yönteminin bir üstünlüğü de, mikro bir sistem kurulduğunda, nonsferositik hemolitik anemili hastalardaki gibi fazla kan alınmadığı durumlarda az miktardaki kandan enzimin saflaştırılabilmesidir. Piruvat kinaz eksikliği bulunan bu kişilerde, piruvat kinazın moleküler yapısındaki bozukluğun tanım-

lanabilmesi için böyle bir yönteme veya geliştirilecek daha pratik bir yönteme gereksinim vardır. Bu bozukluğun moleküler temelinin tanımlanabilmesi, enzimin saf ve normal yapısını koruyacak şekilde elde edilmesini gerektirir. Piruvat kinaz eksikliğinin neden veya nedenlerinin tanımlanabilmesi, ancak normal enzimin yapısal ve fonksiyonel özelliklerinin bilinmesi ile olasıdır.

Alyuvar piruvat kinazın çeşitli sistein reaktiflerine duyarlı olduğu, enzimdeki sistein gruplarının modifiye edilmesi ile inaktivasyon gözlemlendiği, daha önceki çalışmalarda belirtilmiştir (39,59). Bu özellikler alyuvar piruvat kinazı yanı sıra, diğer piruvat kinaz izozimlerinde de paylaşılmaktadır (23,56,57). Piruvat kinaz eksikliği bulunan kişilerin enzimi ile, sisteinleri modifiye edilmiş normal piruvat kinazın bazı özelliklerinin benzerliği gözönünde tutulduğunda (76), alyuvar piruvat kinazında sisteinlerin yeri ve fonksiyonlarının önemi ortaya çıkmaktadır. Sayılan özellikler gözönünde bulundurularak bu çalışmada alyuvar piruvat kinazının, aktif merkez yönelimli bir reaktifi olan bromopiruvat ile sisteinlerinin modifikasyonu çalışılmıştır.

İnsan alyuvar piruvat kinazının bromopiruvat ile, görünür birinci dereceden kinetiği ile inaktivasyona uğradığı bulundu (Şekil 1). Etkinlik ölçüm ortamı veya modifikasyon ortamında fruktoz difosfat bulunması, inaktivasyonun görünür birinci dereceden sapmasına neden olmakta idi (Şekil 5). Bu nedenle bromopiruvat ile enzimin modifikasyonunda, lineer hız elde etmek amacıyla, enzimin kalan etkinliği FDP içermeyen ortamda ölçüldü. Alyuvar piruvat kinazının, bromopiruvat ile inaktivasyonunda FDP'in bu etkisi, maya piruvat kinazında da gözlenmiştir (23). Maya piruvat kinazının bromopiruvat ile modifikasyonunda inaktivasyonun gözlenen hız

değişmezleri bromopiruvat derişimine karşı grafiklendiğinde lineer bir doğru değil; fakat enzimin inhibitöre doyunluk gösterdiğini belirten, sağa bükülen bir eğri elde edilmiştir (23). Gözlenen inaktivasyon hız değişmezlerinin tersi inhibitörün tersine karşı çizildiğinde maya piruvat kinazı (23), maya flavositokrom b_2 'de (68) ve insan alyuvar piruvat kinazında (Şekil 2), birer doğru elde edilmiş ve bu doğrudan yararlanılarak enzim-inhibitör kompleksinin dissosiyasyon değişmezleri (K_D) tesbit edilmiştir. İnsan alyuvar piruvat kinazı için de k (inhibitörün doyunluk derişiminde elde edilen inaktivasyon hız değişmezi), K_D (Inhibitör-enzim kompleksinin dissosiyasyon değişmezi) ve k_{cat} (katalitik hız değişmezi) Şekil 2 ve 3'ten sırasıyla 0.0343 dak^{-1} , $0,20 \text{ mM}$ ve $45.2 \text{ M}^{-1} \text{ dak}^{-1}$ olarak hesaplandı. Daha önceki çalışmalarda da bromopiruvat için elde edilen dissosiyasyon değerinin, substratı piruvat olan bu enzimlerin piruvat için olan K_m değerlerine yakın olduğu saptanmıştır (14,21,68,78,83). Bu çalışmada da bromopiruvat için elde edilen dissosiyasyon değişmezi, enzimin PEP için olan K_m 'ine oldukça yakındır (59). Maya piruvat kinazının bromopiruvat modifikasyonunda elde edilen katalitik hız değişmezi, k_{cat} , $4.65 \text{ M}^{-1} \text{ dak}^{-1}$ olarak rapor edilmiştir (23). İnsan alyuvar piruvat kinazı için ise elde edilen k_{cat} değeri $45.2 \text{ M}^{-1} \text{ dak}^{-1}$ olarak saptandı (Şekil 3). Bu bulgu insan alyuvar piruvat kinazında modifiye olan grubun daha reaktif olduğunu göstermektedir. Nitekim, maya piruvat kinazı için elde edilen inaktivasyon hızı, alyuvar piruvat kinazında 10 kez daha düşük bromopiruvat derişimi kullanılarak elde edilebilmektedir (23: Şekil 2A ve "Bulgular", Şekil 3).

Kimyasal modifikasyonlarda, inaktivasyon yarı ömürlerinin tersinin logaritması, reaktifin logaritmasına karşı çizildiğinde elde edilen doğrunun eğiminin 1'e eşit olması, gözlenen inaktivasyondan sorumlu grup sayısının altbirim başına bir tane olduğu şeklinde yorumlanmaktadır (53,54,71). Alyuvar piruvat kinazının NEM, DTNB v.b. gibi sistein reaktifleri ile modifikasyonunda, farklı reaktivitelerde birden çok sisteinin modifiye olduğu gösterilmiştir (59). PEP varlığında DTNB ile 12 sülfhidril grubunun modifiye olması, enzimde herhangi bir aktivite kaybına neden olmamaktadır. Aynı çalışmada PEP tarafından 4 sülfhidrilin korunduğu gösterilmiştir. Bromopiruvat ile aynı sülfhidril gruplarının tepkimeye girmesi olasılığı dışlanamaz; ancak, reaktifin oldukça düşük derişimde etkili olması, modifikasyonun yalnızca aktif merkezde olması olasılığını güçlendirmektedir. Nitekim, alyuvar piruvat kinazının bromopiruvat inaktivasyonunda saturasyonun olması, bu olasılığı güçlendirmektedir (Şekil 2). Ayrıca alyuvar piruvat kinazının dietil pirokarbonat ile modifikasyonunda olduğu gibi (60), etkinlikte fonksiyonu bulunan birden fazla grup modifiye edilseydi ve bunun sonucu iki fazlı bir inaktivasyon gözlenseydi, o zaman $\log 1/t_{1/2}$ değerleri reaktif derişiminin logaritmasına karşı grafiklendiğinde, eğimi birden büyük bir doğru elde edilirdi.

Alyuvar piruvat kinazı için yukarıda tartışılan bulgular, modifikasyon ortamında hiç bir ligand bulunmadığı ve etkinlik ölçüm ortamının da FDP içermediği koşullar için doğrudur. FDP'in etkinlik ölçüm ortamında bulunması durumunda, inaktivasyon görünür birinci dereceden saptamaktadır (Tablo I, Şekil 5). Benzer şekilde, alyuvar piruvat kinazının bromopiruvat ile modifikasyonunda,

modifikasyon ortamında PEP ve ADP bulunması, enzimi inaktivasyona karşı tümüyle koruyamadığı gibi, inaktivasyonun lineeriteden sapmasına da neden olur (Şekil 5). PEP'in koruyucu etkisi, ADP'dan biraz fazladır. Bu bulgular, özellikle PEP'in korumadaki yetersizliği, enzimin N-etil maleimid, DTNB gibi özgül sistein reaktifleri ile modifikasyonundaki koruyucu etkisi ile çelişmektedir (59). Çünkü bahsedilen çalışmada (59), PEP enzimi inaktivasyona karşı tümüyle korumaktadır. Bromopiruvat inaktivasyonuna karşı PEP'in enzimi etkili olarak koruyamaması, bromopiruvatın sisteinler dışındaki amino asitler ile tepkimeye girebilmesi (15, 26,27) veya proteinde net yük farkına neden olan bromopiruvatın enzimde konformasyon değişikliğine neden olması ve bunun sonucunda da merkezdeki sisteinlerin bromopiruvata ekspozit olmasından ileri gelebilir. Ayrıca, PEP gibi ADP'in da, PEP'a göre biraz düşük olsa da koruyucu etki göstermesi ve N-etil maleimid inaktivasyonunda ise PEP mutlak koruyucu iken ADP'in tümüyle etkisiz olması; modifiye edilen grubun gerek yeri, gerekse niteliği konusunda bazı kuşku- ları da beraberinde getirmektedir. Her ne kadar N-etil maleimid modifikasyonunda proteine fazladan bir pozitif, bromopiruvat mo- difikasyonunda ise fazladan bir negatif yük takılıyorsa da, iki grup arasındaki farkı bu takılan yükün niteliği ile açıklamak müm- kün görülmemektedir. Nitekim, DTNB modifikasyonunda da ADP kısmı bir koruyucu etki gösterir; ancak, bu etkinin sterik yapıdan kaynak- landığı, DTNB ile uzun süre modifiye edilen enzimde ADP varlığın- da ve yokluğunda aynı sayıda sülfhidrilin modifiye edilmesi ile gösterilmiştir (77). O nedenle, ADP'in koruyucu etkisinin gözlen- mesi, modifiye edilen grubun ADP bağlanma bölgesi ile PEP bağ- lanma bölgesinin üst üste düştüğü yerde olabileceğini düşündürmek-

tedir. Bromopiruvat sülfhidril yanında diğer elektrofilik gruplarla da tepkimeye girebileceği göz önüne alınır ve ADP ile PEP' in dietil pirokarbonat tepkimesindeki koruyucu etkileri anımsanacak olursa (60), modifiye edilen grubun sistein'in yanı sıra histidin de olabileceği kuşkusudoğmaktadır. Ancak, bromopiruvat ile modifiye edilmemiş enzimin Lineweaver-Burk eğrisi FDP (0.1 mM) varlığında tümüyle doğrusal hale çevrilebildiği halde, modifiye edilen enzimin çevirilememektedir (Şekil 6). Paralel bulgular maya piruvat kinazı ile radyoaktif bromopiruvat kullanılarak gösterilmiştir (23). Maya piruvat kinazı ile yapılan çalışmada histidine bağlanma olup olmadığı araştırılmamış ise de, daha önceki sülfhidril reaktifleri ile yapılan çalışmalarının etkisi ile modifiye edilen grubun sülfhidril olduğu sonucuna varılmış gibi görülmektedir. Her ne kadar bizim bulgularımız modifiye edilen grubun sülfhidril olması olasılığını dışlamıyorsa da, histidin olmasını da dışlamamaktadır. Eğer modifiye edilen grup sülfhidril ise, bu sülfhidrilin görevi katalitik değil, bağlanma veya aktif merkez oluşumundan sorumlu olmalıdır. Bu iddia, FDP yokluğunda tüm etkinliğini yitirmiş enzimin FDP varlığında etkinlik göstermesi ile güçlenmektedir. Ancak, modifiye edilen grubun niteliği ve görevinin tümüyle anlaşılabilmesi, radyoaktif işaretli bromopiruvat ile ligandların varlığında ve yokluğunda modifikasyon yapılarak, sülfhidril ve histidinlerin miktarlarının amino asit analizörü ile kantite edilmesiyle mümkün olacaktır.

Ö Z E T

İnsan alyuvar piruvat kinazı, % 41 amonyum sülfat çöktürmesi, Sephadex G-75 kromatografisi ve Blue Dextran-Sepharose 4B affinite kromatografisi basamaklarını içeren bir yöntemle saflaştırıldı. Affinite kromatografisinde enzim, kolondan 0.1 mM fruktoz difosfat ile iki etkinlik zirvesi halinde elüe edildi. Enzimin olgun formuna (R_4) ait olan birinci etkinlik zirvesi toplandı. Enzimin bu formu bromopiruvat ile modifiye edildi.

Alyuvar piruvat kinazının substrat ve ligandlarının bulunduğu ortamda enzim bromopiruvat ile modifiye edildiğinde ve kalan etkinlik fruktoz difosfat içermeyen ortamda ölçüldüğünde, enzimin görünür birinci derece kinetiği ile inaktivasyona uğradığı görüldü. Modifikasyon ortamında veya etkinlik ölçüm ortamında fruktoz difosfat bulunduğunda, birinci derece kinetiğinden sapan bir inaktivasyon gözlemlendi. İnaktivasyonun kinetik analizinden, enzimin alt birim başına bir fonksiyonel grubunun modifiye olduğu bulundu. Piruvat kinazın bromopiruvat ile inaktivasyonuna karşı PEP ve ADP'in koruyucu etki gösterdiği; PEP'in koruyucu etkisinin ADP'a göre daha fazla olduğu ve FDP'da olduğu gibi inaktivasyonun birinci dereceden sapmasına neden oldukları tesbit edildi. İnaktivasyonun ve korumanın kinetik özellikleri daha önceki çalışmaların bulguları ile karşılaştırılarak tartışıldı.

KISALTMALAR

ε - ACA	: ε -aminokaproik asit
ADP	: adenzin-5'-difosfat
AMP	: adenzin-5'-monofosfat
ATP	: adenzin-5'-trifosfat
1,3-DPG	: 1,3-difosfogliserat
2,3-DPGA	: 2,3-difosfogliserat
DTNB	: 5,5'-ditiyo-bis-2,2'-dinitrobenzoik asit
DTT	: ditiyotreitol
EDTA	: etilendiamin-N,N,N',N'-tetraasetik asit
FDP	: fruktoz-1,6-difosfat
G-1-P	: glukoz-1-fosfat
GDP	: glukoz-1,6'-difosfat
G-1,6DP	
sentaz	: glukoz-1,6-difosfat sentaz
GSSG	: okside glutatyon
GTP	: guanozin-5'-trifosfat
HEPES	: N-2-hidroksietilpiperazin-N'-etansülfonik asit
M-1-P	: mannoz-1-fosfat
MDP	: mannoz-1,6-difosfat
2-ME	: 2-merkaptotanol
NAD ⁺	: nikotinamid adenin dinükleotid- okside form
NADH	: nikotinamid adenin dinükleotid- redükte form
NADP ⁺	: nikotinamid adenin dinükleotid fosfat - okside form
NADPH	: nikotinamid adenin dinükleotid fosfat-redükte form
NEM	: N-etilmaleimid
PEP	: fosfoenopiruvat
TLCK	: N-α-tosil-L-lizil klorometil keton
TPCK	: L-(1-tosilamido-2-fenil) etil klorometil keton
LDH	: Laktat dehidrogenaz

KAYNAKLAR

1. Colowick, S.P., Kaplan, N.O.; Methods in Enzymology, Cilt XI, Sa: 481-714 (1967)
2. Colowick, S.P., Kaplan, N.O.; Methods in Enzymology, Cilt XXV, Sa: 387-671 (1973)
3. Ellman, G.L.; Arch. Biochem. Biophys. 82,70 (1959)
4. Riordan, J.F., Biochemistry 12, 3915 (1973)
5. Schoellmann, G., Shaw, E., Biochem. Biophys. Res. Commun. 7, 36 (1962)
6. Schoellmann, G., Shaw, E., Biochemistry. 2, 252 (1963)
7. Mares-Guia, M., Shaw, E., Federation Proceedings 22, 528 (1963)
8. Shaw, E., Mares-Guia, M., Cohen, W., Biochemistry. 4, 2219 (1965)
9. Zubay, G., Biochemistry, Addison-Wesley Publishing Company, Amsterdam, Sa: 133-174 (1983)
10. Easterbrook, S.B., Eur.J.Biochem. 52, 125 (1976)
11. Esch.F., S., Allison, S.W., J.Biol. Chem. 253, 6100 (1978)
12. Wyatt. J.L., Colman, R.F., Biochemistry. 16, 1333 (1977)
13. Colowick, S.P., Kaplan, N.O., Methods in Enzymology, Cilt XCI, Sa: 613-633 (1983)
14. Roche, T,E., Mc.Fadden, B.A., Biochem. Biophys. Res. Commun. 37, 239 (1969)
15. Meloche, H.P., Biochemistry. 9, 5050 (1970)
16. Rashed, N., Rabin, B.R., Eur. J. Biochem. 248, 82 (1968)

17. Chang, G.G., Hsu, R.Y., *Biochemistry* 16, 311 (1977)
18. Özer, İ., Doçentlik Tezi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi (1977).
19. Alliel, P.M., Mulet, C., Lederer, F., *Eur. J. Biochem.* 105, 343 (1980)
20. Alliel, P.M., Guiard, B., Ghrir, R., Becam, A.M., Lederer, F., *Eur. J. Biochem.* 122, 553 (1982)
21. Fonda, M.L., *J. Biol. Chem.* 251, 229 (1976)
22. Silverstein, R., Lin, C.C., Fanning, K.W., Hung, B.S.T., *Biochim. Biophys. Acta.* 614, 534 (1980)
23. Yun, S.L., Suelter, C.H., *J. Biol. Chem.* 254, 1811 (1979)
24. Okamoto, M., Marino, Y., *J. Biol. Chem.* 248, 82 (1973)
25. Meloche, H.P., *Biochemistry* 6, 2273 (1976)
26. Heinrickson, R.L., Stein, W.H., Crestfield, A.M., Moore, S., *J. Biol. Chem.* 244, 3999 (1965)
27. Göthe, P.O., Nyman, P.O., *FEBS Letters* 21, 159 (1972)
28. Hall, E.R., Cottom, G.L., *Int. J. Biochem.* 9, 785 (1978)
29. Tanaka, T., Haramo, Y., Sue, F., Morimura, H., *J. Biochem.* 62, 71 (1976)
30. Imamura, K., Taniuchi, K., Tanaka, T., *J. Biochem.* 72, 1001 (1972)
31. Corcoran, E., Phelan, J.J., Fottrell, P.F., *Biochim. Biophys. Acta* 466, 96 (1976)
32. Eigenbordt, E., Schoner, W., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 358, 1033 (1977)
33. Black, J.A., Henderson, M.H., *Biochim. Biophys. Acta* 284, 115 (1972)
34. Garreau, H., Temkine, H.B., *Biochimie* 54, 1103 (1972)
35. Koster, J.F., Hulsmann, W.C., *Arch. Biochem. Biophys.* 141, 98 (1970)

36. Blume, K.G., Hoffbauer, R.W., Ruch, D., Arnold, H., Löhr, G.W., *Biochim. Biophys. Acta* 227, 364 (1971)
37. Garreau, H., Columelli, S., Marie, J., Kahn, A., *FEBS Letters* 78, 95 (1977)
38. Staal, G.E.J., Koster, J.F., Kamp, H., Van Milligen-Boersma, L., Veeger, C., *Biochim Biophys. Acta* 227, 86 (1971)
39. Badwey, J.A., Westhead, E.W., *J. Biol. Chem.* 251, 5600 (1976)
40. Tomoda, A., Lachant, L.A., *British Journal of Haematology* 54, 475 (1983)
41. Marie, J., Garreau, H., Kahn, A., *FEBS letters* 78, 91 (1977)
42. Peterson, J.S., Chern, C.J., Harkins, R.N., Black, A.J. *FEBS letters* 49, 73 (1974)
43. Kahn, A., Marie, J., Garreau, J., Sprengers, E.D., *Biochim. Biophys. Acta* 523, 59 (1978)
44. Kilingç, K., Özer, N., *Biochemical Medicine*, 1984, Baskıda.
45. Badwey, J.A., Westhead, E.W., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 77, 275 (1977)
46. Barlet, G.L., *Biochim. Biophys. Acta* 156, 231 (1958)
47. Rose, I.A., Warms, J.V.B., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 59, 1333 (1974)
48. Rose, I.A., Warms, J.V.B., Kahlij, G., *J. Biol Chem.* 250, 3466 (1975)
49. Van-Berkel, J.C., Koster, J.F., Staal, G.E.J., *Biochim. Biophys. Acta* 321, 496 (1973)
50. Van-Berkel, J.C., Staal, G.E.J., Koster, J.F., Nyessen, J.G., *Biochim. Biophys. Acta* 334, 361 (1974)
51. Adachi, K., Ghory, P.K., Asakura, T., Schwarts, E., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, 501 (1977)

52. Berghauser, J., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 358, 1565 (1977)
53. Cardemil, E., Eyzaguirre, J., Arch. Biochem. Biophys. 192, 533 (1979)
54. Hollenberg, P.F., Flashner, M., Coon, M., J. Biol. Chem. 246, 946 (1971)
55. Dann, L.G., Britton, H.G., Biochem. J. 137, 405 (1974)
56. Yun, S., Suelter, C.H., J. Biol. Chem. 254, 1806 (1979).
57. Flashner, M., Hollenberg, P.F., Coon, M.J. J. Biol. Chem. 247, 8114 (1972)
58. Kılınç, K., Özer, N., Arch. Biochem. Biophys., 1984 Baskıda.
59. Kılınç, K., Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 1983.
60. Kılınç, K., Özer, N., Biyokimya Dergisi, Cilt: VII, Sayfa: 16 (1982).
61. Warburgh, O., Christian, W., Biochem. Z. 310, 384 (1941)
"Alınmıştır". Colowick, S.P., Kaplan, N.O., Methods in Enzymology Cilt, III. Sa: 454 (1957)
62. Schaffner, W., Weissman, C., Anal, Biochem. 56, 502 (1973)
63. Kimberg, D.V., Yielding, L., J. Biol. Chem. 237, 3233 (1962)
64. Tietz, A., Ochoa, S., Arch. Biochem. Biophys. 78, 477 (1958)
65. Cuatrecasas, P., Anfinsen, C.B., Edited by Jakoby, W.P., Methods in Enzymol., Cilt XXII, S.: 345 (1971)
66. Ryan, L.D., Westling, C.S., Arch. Biochem. Biophys. 160, 279 (1974)
67. Marie, J., Kahn, A., Boivin, P., Biochim. Biophys. Acta 481, 96 (1977)
68. Mulet, C., Lederer, F., Eur. J. Biochem. 73, 433 (1977)

69. Weber, B.H., Willeford, K., Moe, J.G., Biochem. Biophys. Res. Commun. 86, 252 (1979)
70. Dean, P.D., Watson, D.H., Journal of Chromatography 165, 301 (1979)
71. Marcus, F., Schuster, S.M., Lardy, H.A., J.Biol. Chem. 251, 1775 (1976)
72. Lehninger, A., Biochemistry, Worth Publishers Inc. New York, Sa: 172 (1975).
73. Cuatrecasas, P., J. Biol. Chem. 245, 3059 (1970).
74. Thampson, S.T., Cass, K.H., Stellwagen, E., Proc. Natl. Acad. Sci. 72, 669 (1975)
75. Chern, C.J., Rittenberg, M.B., Black, J.A., J. Biol. Chem. 247, 3173 (1972)
76. Badwey, J.A., Westhead, E.W., Biochem. Biophys. Res. Commun. 74, 1326 (1977)
77. Özer, N., Kılınç, K., Biyokimya Dergisi, Cilt: 8, Sayı 2, Baskıda.
78. Meloche, H.P., Biochem. Biophys. Res. Commun. 18, 277 (1965)
79. Kitagawa, Y., Sugimoto, E., Chiba, H., Agric. Biol. Chem. 39, 199 (1975)
80. Chang, G-G. , Hsu, R.Y., Biochem. Biophys. Res. Commun. 55, 580 (1973)
81. De Vries, G.H. , Binkley, S.B., Arch. Biochem. Biophys. 151, 234 (1972)
82. Staub, M. , Denes, G., Biochem. Biophys. Acta 178, 599 (1969)
83. Gale, G.R., Arch. Biochem. Biophys. 94, 236 (1961).

