

T. C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

283810

İNSAN ALYUVAR PİRUVAT KİNAZI
AKTİF MERKEZ YÖNELİMLİ KİMYASAL MODİFİKASYONLARI
VE KİNETİK ÖZELLİKLERİ

Biyokimya Programı
DOKTORA TEZİ

KAMER KILINÇ

Ankara — 1983

105

**T. C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İNSAN ALYUVAR PİRUVAT KİNAZİ
AKTİF MERKEZ YÖNELİMLİ KİMYASAL MODİFİKASYONLARI
VE KİNETİK ÖZELLİKLERİ**

**Biyokimya Programı
DOKTORA TEZİ**

KAMER KILINÇ

REHBER ÖĞRETİM ÜYESİ : DOÇ. DR. NAZMI ÖZER

Ankara — 1983

İÇİNDEKİLER

Sayfa

1. GİRİŞ	1
1.1. Kimyasal Modifikasyonların Prensipleri ve Amacı	1
1.2. Arjinin Modifikasyonu	6
1.3. Histidin Modifikasyonu	8
1.4. Sistein Modifikasyonları	9
AMAC	16
2. GEREÇ VE YÖNTEMLER	17
2.1. Gereçler	17
2.2. Yöntemler	18
2.2.1. İnsan Alyuvar Piruvat Kinazının Saflaştırılması	18
2.2.2. Blue Dextran-Sepharose 4B'nin Hazırlanması	19
2.2.3. Etkinlik ve Protein Tayini	19
2.2.4. İnsan Alyuvar Piruvat Kinazının 2,3-Butanedione ile Modifikasyonu	19
2.2.5. İnsan Alyuvar Piruvat Kinazının Dietilpirokarbonat ile (DPC) Modifikasyonu	20
2.2.6. İnsan Alyuvar Piruvat Kinazının N-Etilmaleimid ile Modifikasyonu	21
2.2.7. İnsan Alyuvar Piruvat Kinazının DTNB ve Okside Ditiyoeritritol (DSSD) ile Modifikasyonu	22
3. BULGULAR	25
3.1. Piruvat Kinazın Butanedione ile Modifikasyonu	25
3.2. Piruvat Kinazın Dietilpirokarbonat ile Modifikasyonu	45
3.3. Piruvat Kinazın N-Etilmaleimid ile Modifikasyonu	52

	<u>Sayfa</u>
3.4. Piruvat Kinazın DTNB ile Modifikasyonu	63
3.5. İnsan Alyuvar Piruvat Kinazının Bazı Kinetik Özellikleri ...	73
4. TARTIŞMA	88
ÖZET	110
KISALTMALAR	111
KAYNAKLAR	112

1. G I R I Ş

1.1. KİMYASAL MODİFİKASYONLARIN PRENSİP ve AMACI

Biyolojik olarak aktif moleküllerin etki mekanizmalarının aydınlatılması çağdaş biyokimyanın önemli konularının başında gelir. Bu amaç için başlıca fiziksel, kimyasal veya biyolojik yöntemlere başvurulur. Canlı organizmalardaki aktif fonksiyonel makromoleküllerin başında proteinler; özel olarak da proteinlerin özelleşmiş bir grubu olan enzimler gelir.

Enzimlerin kataliz mekanizmasını aydınlatmak için başvurulan en eski yöntemlerin başında kimyasal modifikasyon yöntemleri gelir. Her ne kadar son zamanlarda geliştirilen x-ışınları kristallografi yöntemleri, enzim kinetikleri, stereokimya ve nükleer manyetik rezonans (NMR) teknikleri de enzimatik katalizin mekanizmasını açıklamak için kullanılıyorsa da; pek çok durumda kimyasal modifikasyonlar, kataliz için önemli fonksiyonel grup tesbiti veya kataliz sırasında oluşan zorunlu ara ürünlerin yapısının aydınlatılmasında en yararlı bilgileri sağlamaktadır. Bunun yanısıra yukarıda sayılan teknikler ile ileri sürülen bulguların, kimyasal modifikasyonlar ile de sınanarak doğruluğu pekiştirilebilir. Kimyasal modifikasyonların bir üstünlüğü ve kolay yapılabilir yönü de, fazla miktarda protein gerektirmemesi ve proteini kristalize etme zorunluluğunun olmamasıdır.

Genel olarak modifikasyonlar yalnızca kimyasal modifikasyonlarla sınırlı olmayıp, enzimatik ve genetik modifikasyonların yapılması da mümkündür. Yine

kimyasal modifikasyonlar da yalnızca enzimlerle sınırlı kalmayıp; bütün biyolojik aktif sistemlere, fonksiyonel protein ve diğer makromoleküllere uygulanabilir.

Enzimlerin aktif merkezinde bulunan, ligandların bağlanması veya kataliz olayında fonksiyonel iş gören grupların tesbiti için çok sayıda kimyasal modifikasyon yöntemleri vardır. Bu yöntemlerden en önemlileri şunlardır:

- 1- Grup özgüllüğü olan reaktif kullanma
- 2- Bölge özgüllüğü olan reaktif kullanma (affinite işaretlemeleri)
- 3- Yalancı substrat kullanma
- 4- "Suicide" substrat kullanma
- 5- Enzim üzerinde kataliz sırasında oluşan reaktif ara ürünleri yakalayabilme
- 6- Enzimin C veya N ucundan amino asit veya peptit delesyonu
- 7- Primer yapısı bilinen ve sentetik olarak hazırlanan peptit veya proteinde ilgilenilen bir amino asidin eksikliği ile görülen fonksiyonel değişimi incelemek

Bu modifikasyonlar ile ilgilenilen enzimin fonksiyonel grupları ve kataliz mekanizması hakkında çok değerli bilgiler elde edilebilir. Diğer taraftan gruba özgül reaktif kullanma veya affinite işaretlemeleri ile belirli bir bölgenin modifikasyonu kendi başına kataliz mekanizması hakkında bilgi vermeyebilir. Biyolojik etkinliğin kaybolması her zaman katalitik bir grubun modifiye edilmiş olması anlamına gelmeyeceğinden, modifiye edilen grubun katalizde rol aldığını hemen söylemek zordur. Etkinliğin kaybolması aktif merkezin konformasyonunun değişmesi, oligomerik bir protein ise alt birimlerine dissosiyeye olması veya büyük hacimli reaktiflerin sterik engellemesinden de ileri gelebilir. Kimyasal modifikasyonlarda böyle bir durumun olup olmadığının araştırılmasında ultrasantrifügasyon, kromatografi, ORD (optical rotatory dispersion), CD (circular dichroism) ve x-ışınları analizi değerli bilgiler sağlar.

Proteinlerin kimyasal modifikasyonlarında ana mekanizma, proteinlerdeki

amino asitlerin yan gruplarının nükleofilik özelliğine veya oksidasyona uğrama yeteneklerine dayanır. Basit monomerler halinde iken, amino asitler genellikle ortak tepkimelere girerler. Ancak proteinlerin yapısında iken N ve C uçları dışındada, amino asitlerin yalnızca yan grupları tepkimeye girer. Amino asitlerin yan gruplarının tepkimeleri de monomer ve doğal (native) proteindeki şeklinde aynı değildir. Bazı grupların reaktivitesi baskılanır veya azaltılırken, bazılarınıniki ise arttırılır. Belirli bir gruptaki reaktivitenin arttırılması ile meydana getirilen "süper-reaktivite" kimotripsinde olduğu gibi (1) katalitik fonksiyon için çok önemli olabileceği gibi, hiç önemli de olmayabilir(2). Proteindeki bir fonksiyonel grubun reaktivitesinin arttırılması veya azaltılması ; a) ilgilenilen grubun "protein çevre" içindeki yeri ve bu çevrenin reaktif gruba etkisi, b) "protein çevre"nin kullanılan reaktif ajana etkisi veya her ikisi tarafından beraberce sağlanır(2).

Proteinlerin kimyasal modifikasyonlarındaki ana prensip ve amaç ; proteinlerin yapısındaki amino asitlerin yan gruplarının reaktif özelliklerinden yararlanarak, ilgilenilen bir amino asidin proteindeki fonksiyonunu göstermektir. Bu amaçla belirli gruplara özgül reaktifler kullanılarak bir proteinde konformasyonda ve biyolojik etkinlikte rolü olan amino asitler tesbit edilebilir ve bir enzim için katalizin moleküler mekanizması aydınlatılabilir.

Proteinlerde kimyasal modifikasyonların yapılmasına olanak sağlayan başlıca fonksiyonel gruplar; karboksil grupları(dikarboksilik amino asitler ve polipeptidin C ucu), amino grupları(lizinin ϵ -amino grubu ve polipeptidin N ucu), tirozinin fenolik hidroksil grubu, triptofanın indol imino grubu, histidinin imidazol amino grubu, serin ve treonindeki alifatik hidroksil grupları, sisteinin tiyol(-SH) grubu, metiyoninin metil sülfid grubu, fenilalanindeki fenil radikal-leri, amidler ve peptid bağlarıdır(2,3).

Proteinde kimyasal modifikasyonlar yapılacağı zaman, modifiye edilecek grup için reaktif seçilirken, en azından şu özelliklere dikkat edilmelidir:

- 1- Seçilen reaktif mümkün olduğu kadar modifiye edilecek grup için özgül olmalıdır.
- 2- Reaktif, modifiye edilecek grup ile aşırı pH sınırları ve koşullar gerektirmeden, nötral pH'da veya proteinin biyolojik etkinliğinin devam ettiği pH'da tepkimeye girebilmelidir.
- 3- Tepkimededen sonra yan etkilere neden olabilecek bir ürün oluşmamalıdır (örneğin modifikasyonda yan ürün olarak H_2O_2 oluşmamalı veya iyodoasetamid ile alkilasyonda olduğu gibi oksitleyici bir bileşik olan serbest iyot vermemelidir)(8,9).
- 4- Kullanılan reaktifin hacmi ve polaritesi modifiye edilecek gruba yaklaşması için sınırlayıcı faktör olmamalıdır.
- 5- Fonksiyonel grup ile tepkimeye giren reaktif, proteinde önemli yük farkı oluşmasına neden olmamalıdır.
- 6- Tepkimededen önce veya sonra, reaktifin veya ürünün miktarı; veyahut da modifiye edilen proteinin modifikasyon ile değişen durumu, değişen bir özelliğinden izlenebilmelidir.

Bu özelliklere uygun olarak en çok kullanılan gruba özgül reaktiflerden seçilen örnekler ve modifiye ettikleri gruplar Tablo I'de özet halinde verilmiştir. Burada örnek olarak verilen reaktifleri daha da arttırmak mümkündür. Ancak reaktiflerin pek çoğu özgül değildir. Ayrıca özgül olsalar bile, modifikasyon için çok değişik ve güç koşullar gerektirdiğinden biyolojik etkinlik ile modifikasyonu birlikte izlemek mümkün değildir. Bu duruma karşılaştırmalı örnekler Tablo II'de verilmiştir. Tablo II'dekine benzer örnekler, proteinlerdeki diğer amino asitlerin modifikasyonları için de verilebilir. Her ne kadar amino asitlerin yan gruplarının modifikasyonu için çok sayıda reaktif ve yöntem varsa da; reaktiflerin pek çoğu bir tek grup için özgül değildir, özgül bile olsalar modifikasyonun ilerleyişi ile biyolojik etkinliği aynı koşullarda birlikte izlemek mümkün olamamaktadır (Tablo I ve II).

Tablo I. Proteinlerin Kimyasal Modifikasyonlarında En Sık Kullanılan Reaktifler ve Modifiye Ettiği Gruplar

Modifiye edilen grup	Reaktif	Yan tepkime	Kaynak
Arjinin	2,3-Butanedione	-	(4)
"	Glioksal	-NH ₂ grubu	(5)
"	Fenilglioksal	-NH ₂ ve -SH grubu	(6)
"	1,2-Sikloheksandion	-	(7)
Sistein	α -Haloasitler	Met., His.	(2,8)
"	N-Etilmaleimid	-	(2,8,9)
"	Metantiyosülfonik asit	-	(10)
"	DTNB (ve diğer organik disülfidler)	-	(2,9,11, 12)
Triptofan	2-Asetoksi-5-nitrobenzil klorür	-	(8,13,14)
"	2,4-Dinitrofenil-1,5-sülfe-nil klorür	-SH grubu	(8)
Metiyonin	α -Haloasitler	His., Cys.	(2,9,15, 16)
Histidin	α -Haloasitler	Cys., Met.	(2,8,17)
"	Dietilpirokarbonat	-	(18,19,20)
"	Diazonyum-1H-tetrazol	Tyr.	(2,8)
Tirozin	Tetranitrometan	Cys	(8,9,21, 22)
Lizin	Trinitrobenzensülfonik asit	-	(23)
"	O-Trimetilizolüre	-	(2,9)
Serin	Diizopropilfluorofosfat	-	(1)
Karboksil grup-ları	NaBH ₄ , LiBH ₄	Bütün karboksil grupları	(2)

Kısaltmalar: Met.; metiyonin, His.; histidin, Cys.; sistein, Tyr.; tirozin.

Tablo II. Arjinin Modifikasyonu için Kullanılan Reaktifler, Modifikasyon Koşulları ve Özgüllükleri (Kaynak 8, s.569).

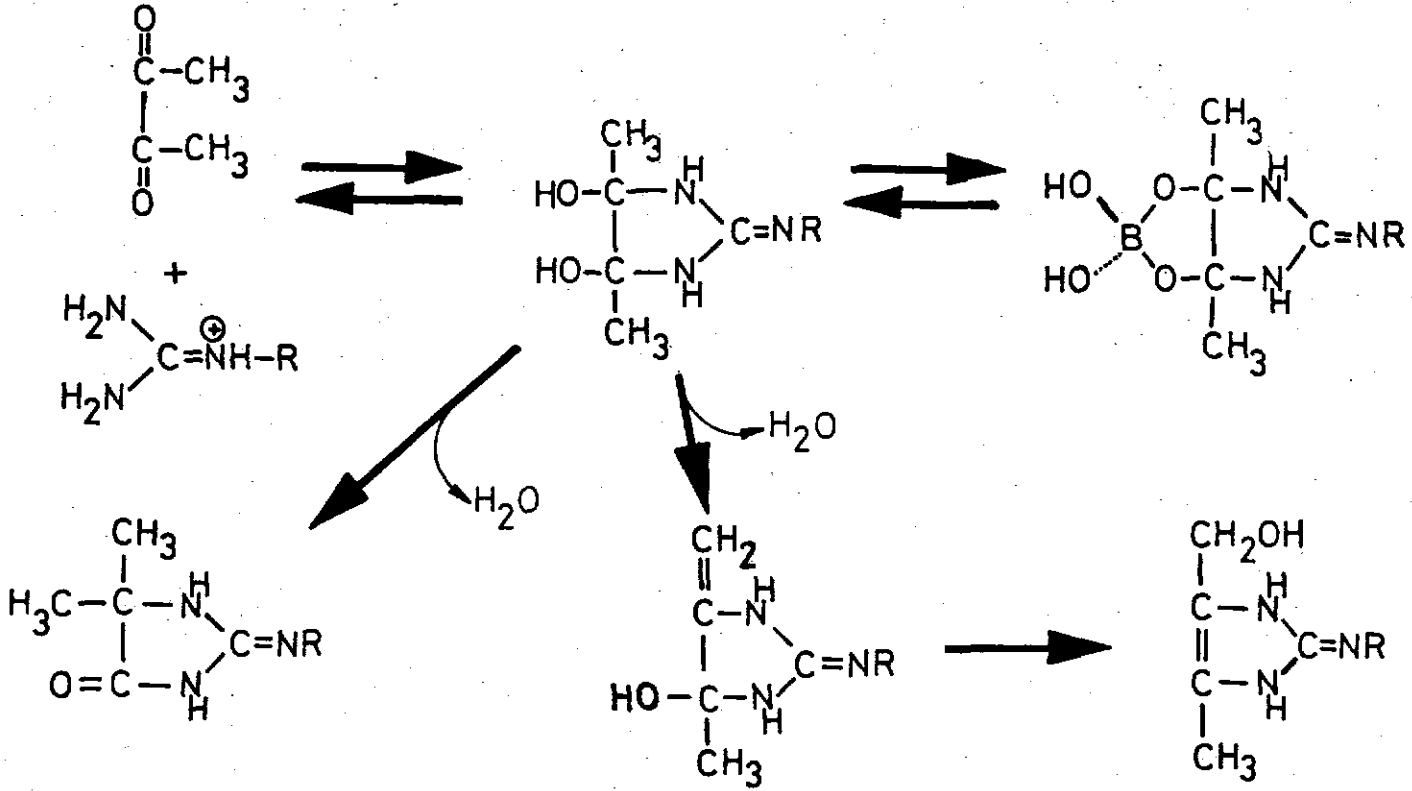
Reaktif	Koşullar (25°C'de)	Yan Tepkime
2,3-Butanedione	Borat tamponu, pH:7.5	-
Dimerik Butanedione	Fosfat tamponu, pH:7.0	-NH ₂ grubu
Trimerik Butanedione	Fosfat tamponu, pH:7.0-8.0	-NH ₂ ve -SH grupları
Gliksal	Bikarbonat tamponu, pH:9.2	-NH ₂ grubu
Fenilgliksal	N-Etilmorfolinoasetat tamponu, pH:7.0-8.0	-NH ₂ ve -SH grupları
1,2-Sikloheksandion	0.05-0.2 N NaOH içinde	-
Malonilaldehit	10 N HCl içinde	peptit bağı kırılır

1.2. ARJİNİN MODİFİKASYONU

Proteinlerde arjinin gruplarının modifikasyonu için çok sayıda yöntem ve reaktif bulunmasına rağmen (2,4-9,24), pek çoğunda tepkimenin olması yüksek pH ve güç koşullar gerektirmekte veya özgül olmayıp diğer amino asitlerin yan grupları da tepkimeye girmektedir. Bu amaç için en uygun ve özgül reaktif 2,3-Butanedione'dur.

Borders ve Riordan, anyonik substrat ve kofaktörlere sahip olan enzimlerin, bu ligandları bağlama bölgelerinde genellikle arjinin içerdiklerini ileri sürmüşlerdir (25). Gerçekten de arjinine özgül reaktifler kullanılarak bu özelliklere sahip pek çok enzimin bağlama bölgelerinde fonksiyonel arjinin bulunduğu gösterilmiştir (4,24,26-29). Bu modifikasyonlarda genellikle borat tamponunda 2,3-Butanedione veya bikarbonat tamponunda fenilgliksal reaktif olarak kullanılmaktadır. Gliksal ve fenilgliksal kısmen de olsa amino ve tiyol grupları ile de tepkimeye girebilirler (5,6).

Arjininin 2,3-Butanedione ile modifikasyonunun mekanizması Riordan'ın önerdiği biçimde aşağıda verilmiştir(4).



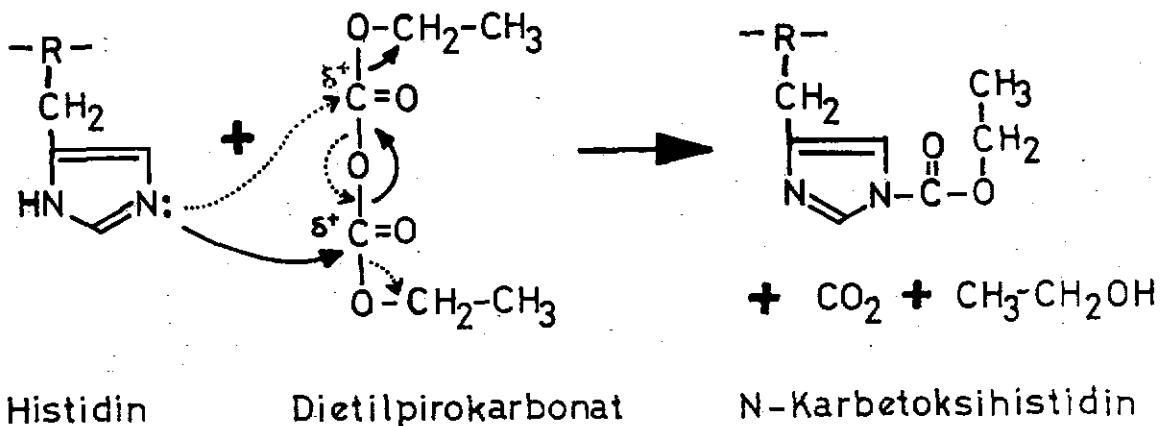
Bu mekanizmaya göre; Butanedione, arjininin protone olmayan guanido grubu ile tepkimeye girerek bir cis-diol oluşturur ve oluşan cis-diol kompleksi borat tarafından stabilize edilir. Bu basamakta tepkime tersinirdir, boratın uzaklaştırılması ile tepkime tersine çalışır ve proteinin etkinliğinin tamamı geri kazanılabilir. Eğer tepkime uzun sürecek olursa, cis-diol ara ürünü pinacol-tip düzenlenmeye gider ve disosiyeye olmayan bir ürün oluşturur. Bu yeniden düzenlenmeden sonra tepkime tersinmezdir, artık etkinlik geriye kazanılamaz (4).

1.3. HISTİDİN MODİFİKASYONU

Enzimlerin aktif merkezinde genellikle kuvvetli nükleofil gruplar yer alır ve kataliz olayına doğrudan katılırlar. Katalizde önemli rol oynayan bu grupların en önemlileri başlıca , serin'in hidroksil grubu, sistein'in tiyol grubu, histidin'in imidazol amino grubu ve lizin'in epsilon amino grubudur. Bu özellikleri nedeniyle enzimler "serin sınıfı","sistein sınıfı","lizin sınıfı" ve "histidin sınıfı" olarak da sınıflandırılmaktadır (30). Histidin sınıfı enzimler, fosfat transferi yapan çeşitli enzimlerde olduğu gibi (süksinil CoA sentetaz,glukoz-6-fosfataz) katalitik merkezde histidin içerirler. Süksinil CoA sentetazda olduğu gibi bazı enzimlerde, katalitik merkezdeki histidin kataliz sırasında fosforile edilir(kovalan kataliz)(30).

Histidin modifikasyonlarında sıklıkla kullanılan reaktifler monohaloasitlerdir. Monohaloasitlerle tepkime sonunda histidin'in imidazol grubu her iki azottan da karboksimetillenir. Ancak monohaloasitlerin histidin ile tepkimesi özgül değildir, sistein ve metiyonin de alkilenebilir. S-alkilasyonu, N-alkilasyonundan daha hızlıdır (8,31).

Histidin modifikasyonu için kullanılan en özgül reaktif dietilpirokarbonat'tır (18-20). Bu reaktifin pH:6.0 ve daha yüksek daha pH'da histidin ile tepkimesi son derecede özgüldür. Bu nedenle proteinlerde histidin modifikasyonu için başarı ile kullanılmaktadır (18-20,32,33). Tepkimenin mekanizması aşağıda verilmiştir.



Histidinin dietilpirokarbonat ile tepkimesi sonucu, histidinin karbeto-
toksi türevi oluşur. Oluşan N-karbetoksihistidin 242 nm'de absorpsiyon verir.
Böylece modifikasyon 242 nm'deki absorpsiyon artışı ($\epsilon = 3200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ile de
izlenebilir (20).

1.4. SİSTEİN MODİFİKASYONLARI

Enzimlerdeki önemli fonksiyonel nükleofillerden biri de sisteindir.
Sisteinler pek çok enzimin substrat bağlama bölgesi veya katalitik merkezinde
yer alırlar. Sisteinlerin oksidasyona uğrayabilmelerinin de ayrı bir önemi var-
dır. Böylece iki sistein arasında oluşan disülfit bağları proteinlerin tersiyer
yapılarının sağlanmasında yaşamsal önem taşırlar.

Enzimlerde sistein modifikasyonu için pek çok yöntem ve reaktif vardır.
Bu amaç için seçilen kimyasal reaktiflerin bir kısmı özgül değildir (H_2O_2 ile
oksidasyon ve alfa-haloasitlerle karboksimetilasyon gibi). Ancak son derece
özgül reaktifler de vardır. Bunların başında organik disülfitler ve N-etilmale-
imid gelir (8,9).

Sisteinlerin tiyol grubunun N-etilmaleimid ile tepkimesi, N-etilmaleimid-
deki çift bağa nükleofilik katma ile olur. Tepkime sonucu S-(N-süksinimido)-sis-
tein oluşur. Bu yapı son derece stabildir. Proteinin asit hidrolizi ile, modifi-
ye olan sistein S-süksinilsistein halinde serbest kalırken, eşmolar miktarda da
etilenamin açığa çıkar (34). N-Etilmaleimidin 305 nm'de maksimum absorpsiyonu
vardır. Modifikasyon devam ederken N-etilmaleimiddeki azalma spektrofotometrik
olarak izlenebilir. N-Etilmaleimidin sisteinlerin tiyol grupları ile tepkimesi-
nin mekanizması aşağıda verilmiştir.

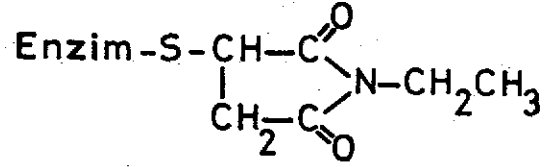
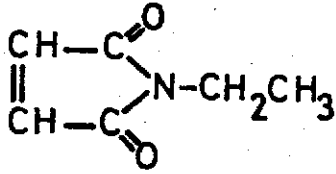
Sistein modifikasyonlarında kullanılan özgül bir reaktif de metantiyo-
sülfonik asittir. Bu reaktif ile tavşan kası piruvat kinazı modifiye edilmiş ve
inaktivasyona karşı ligandların koruyucu etkisi $\text{ADP} \rangle \text{ATP} \rangle \text{Mg}^{++} \rangle \text{PEP}$ şeklinde
görülmüştür (10).

Enzim-SH



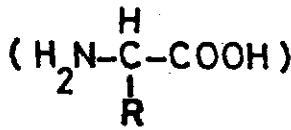
Enzim-S[⊖]

+



S-(N-Süksinimido)-sistein

Asit hidrolizi yapılırsa

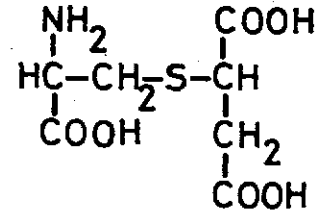


Amino asit

+

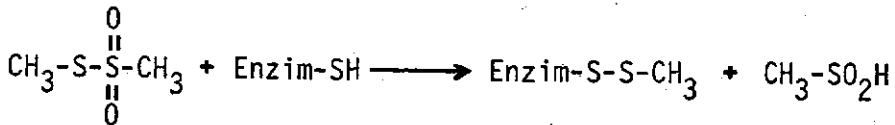


+



S-Süksinilsistein

Metantiyosülfonik asidin proteinlerdeki sisteinler ile tepkimesi şöyledir:

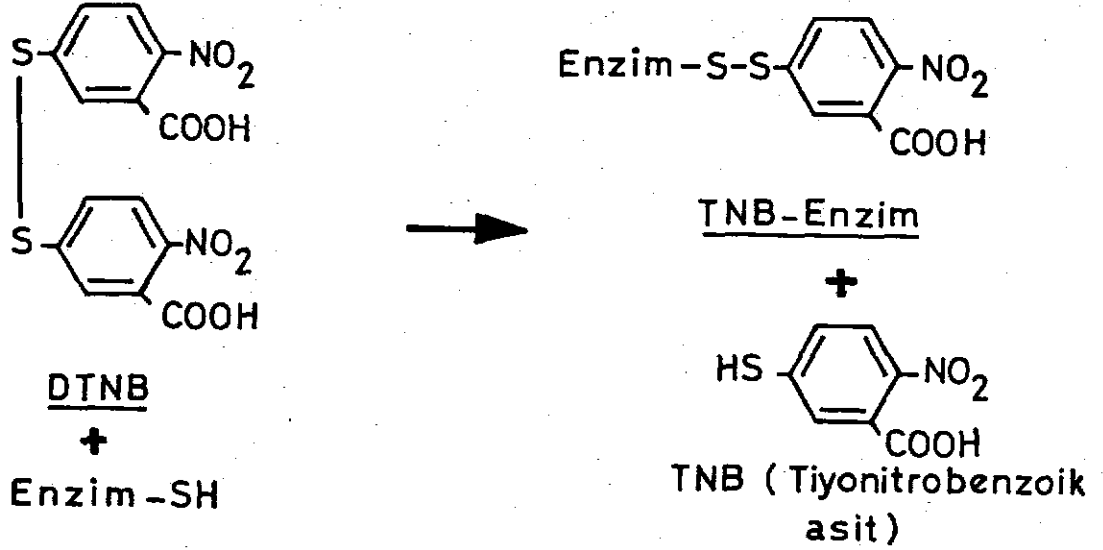


Modifikasyonda böyle bir reaktif kullanılmasının iki önemli üstünlüğü vardır:

- Sistein ile tepkimeye giren grup, proteinde net yük farkına neden olmaz,
- Reaktifin küçük bir molekül olması nedeniyle , sisteinlere yaklaşması protein tarafından sterik olarak engellenmez.

Sisteinlerin modifikasyonlarında kullanılan en duyarlı ve özgül reaktif DTNB (5,5'-ditiyo-bis-2-nitrobenzoik asit)'dir. Bir aromatik disülfid olan DTNB

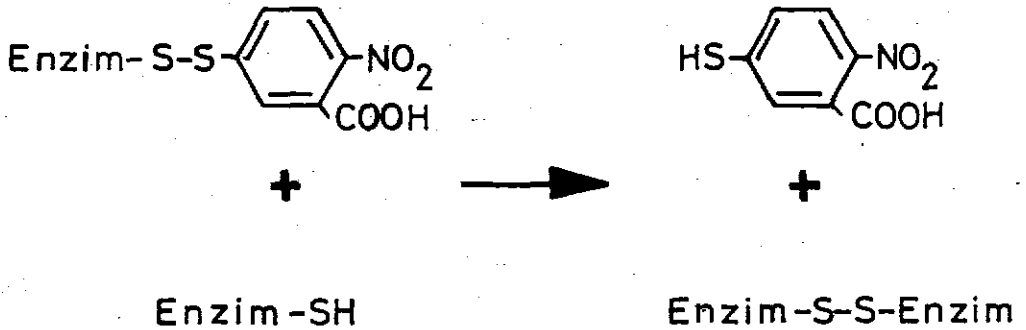
alifatik analoglarına oranla daha yüksek oksido-redüksiyon potansiyeline sahiptir ve bu nedenle alifatik tiyoller ile kolayca tepkimeye girer (8,11,12). Tepkimenin mekanizması şöyledir:



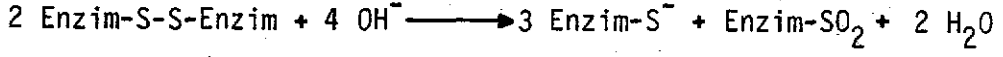
Tepkime sonucu oluşan TNB 412 nm'da absorpsiyon verir ($\epsilon=13600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (11). Oluşan TNB spektrofotometrede duyarlı olarak tayin edilebilir. Bu özelliği reaktife bir üstünlük daha sağlar.

Özgül ve duyarlı bir reaktif olmasına karşılık, DTNB'nin iki önemli dezavantajı vardır(35):

a) Proteinde disülfid oluşumuna neden olabilir.



b) Alkali koşullarda disülfidler bozunarak tekrar DTNB ile tepkimeye girebilirler.



DTNB'nin proteinlerde disülfid oluşumuna neden olduğu, tavşan kası piruvat kinazında da gösterilmiştir (37). Tavşan kası piruvat kinazı DTNB ile tepkimeye girdiğinde, önce TNB-S-Enzim kompleksi oluşur ve enzimin molü başına dört mol TNB serbest bırakılır. TNB-S-Enzim kompleksi katalitik olarak aktif, fakat dayanıksızdır, enzimde alt birimler arası disülfid oluşumu ile enzime bağlı olan TNB de serbest bırakılmaktadır. Düşük pH'da disülfid oluşumunun yavaş olmasından yararlanılarak, tavşan kası piruvat kinazında TNB-S-Enzim kompleksi serbest TNB'den jel filtrasyonu ile ayırılabilmiştir (37).

Alkali koşullarda organik disülfidler bozunumu özellikle pH 10'un üzerinde çok hızlanır. Böylece yüksek pH'da hem DTNB'nin kendisi bozunur, hem de tiyollerde oluşturduğu disülfidler bozunarak DTNB ile tekrar tepkimeye girerler (35).

Glikolitik yolun önemli kontrol enzimlerinden biri olan piruvat kinaz, fosfoenolpiruvat'tan (PEP) fosforil grubunun ADP'ye aktarılarak ATP'nin sentezlendiği tepkimeyi katalize eder. Çeşitli dokulardaki dağılımına göre piruvat kinazın M_1 , M_2 , L ve R tipi olmak üzere dört izozimi tanımlanmıştır (36).

Piruvat kinazın M_1 tipi, kas dokusunda bulunan tek izozimdir, kalp kası ve beyinde çoğunluktadır. Fruktoz difosfata (FDP) duyarlıdır, Michealis-Menten kinetiğini gösterir. Primer yapısı aynı olan dört alt birimden oluşur. Ligand bağlama bölgeleri en iyi tanımlanmış piruvat kinaz izozimidir (23,32, 36,37).

Piruvat kinazın M_2 tipi çeşitli dokulara dağılmış olarak yaygın bir şekilde bulunur. Karaciğerde azınlıkta, böbrek ve lökositte çoğunlukta bulunan izozimdir. Allosterik bir enzim olmasına rağmen diğer allosterik piruvat kinazlardan farklı kinetik özelliklere sahiptir (36).

L tipi piruvat kinaz, karaciğerdeki ana izozimdir. Birbirinin aynı olan dört alt birim içerir. FDP allosterik aktivatörü, alanin ve ATP ise allosterik inhibitörüdür (38,39).

Omurgalı hayvan dokularında bulunan dördüncü piruvat kinaz izozimi, yalnızca alyuvarda bulunan R tipi piruvat kinazdır. Kinetik ve immünolojik olarak L tipine benzemesine rağmen, elektroforezde L tipinden ayrılır (36), ve diğer izozimlerden farklı olarak tepkime PEP ile başlatıldığında "hysteretic" tipte davranış gösterir (40).

Alyuvar piruvat kinazı dört alt birimden oluşan bir tetramerdir. Bu alt-birimlerin yapısı enzimin olgunlaşmasına (maturasyon) bağlıdır. Retikülosit ve eritroblastlarda ilk sentezlendiğinde, R'_4 şeklinde tanımlanan, tümüyle inaktif olan ve olgun piruvat kinazdan daha büyük molekül ağırlığında olan bir homotetramerdir (41). Alyuvar olgunlaştıkça proteolitik bir modifikasyon ile R_4 şeklindeki

olgun piruvat kinaza çevrilir (41). Dolayışındaki alyuvarlar, olgunlaşmalarına bağılı olarak piruvat kinazın R_4 şeklindeki homotetramer veya $R_2R'_2$ şeklindeki heterotetramer formunu içerirler. Enzimin bu iki formu affinite kromatografisinde birbirinden ayrılırlar: Birinci zirve özgül etkinliğı 300 U/mg protein kadar olan homotetramer R_4 ; ikinci zirve ise özgül etkinliğı 150 U/mg protein olan heterotetramer $R_2R'_2$ piruvat kinazdır (42). $R_2R'_2$ formundaki piruvat kinaz dolayışındaki alyuvarda R_4 formuna çevrilirken özgül etkinliğı de iki katına çıkar (43). $R_2R'_2$ formunun FDP bağılama bölgesi kapalıdır, bu form enzimin molü başına iki mol FDP bağılar. Oysa proteolitik modifikasyon ile FDP bağılama bölgesi açığa çıkarıldığında enzimin molü başına dört mol FDP bağılanır (44).

Diğer piruvat kinaz izozimlerinde böyle bir olgunlaşmanın gözlenememesinin nedeni; karaciğer gibi proteolitik etkinliğın yüksek olduğı dokularda translasyon sonrası olgunlaşmanın gözlenemeyecek kadar kısa sürede olabilmesine bağılanmaktadır (43).

Piruvat kinazın alyuvar metabolizmasındaki yaşamsal önemi üç özelliğinden ileri gelir: a) Piruvat kinaz ile katalizlenen tepkime glikolizin kontrolünde önemli bir basamaktır. b) Alyuvarda tek enerji kaynağı glikolizdir. Bu nedenle piruvat kinaz ile katalizlenen tepkime, kullanılabilir kimyasal enerji (ATP) sağılanması için önemlidir. c) Piruvat kinaz tepkimesi alyuvarda 2,3-difosfogliserat düzeyini dolaylı olarak düzenler. Piruvat kinaz eksikliğı sonucu 2,3-difosfogliserat düzeyinin artması alyuvarlarda hemoglobinden oksijen disosiyasyonuna neden olduğundan hemoglobinin oksijen taşıma yeteneğini azaltır (45).

Piruvat kinaz eksikliğı nonsferositik hemolitik aneminin bilinen nedenlerinden biridir (46). Bu eksikliğın translasyon sonrası bir modifikasyon sonucu olduğunu destekleyen bulgular vardır. Bu modifikasyonların başında hücrede GSH/GSSG oranının değışmesi sonucu enzimde sülfidril gruplarında meydana gelen oksidasyonlardır (47). Gerçekten de GSSG ile muamele edilmiş normal piruvat kinaz ile hasta kişinin piruvat kinazı aynı kinetik özellikler göstermekte, allosterik

özelliğini yitirmekte ve FDP ile aktive olamamaktadır(48, 49). Piruvat kinazın yalnızca tetramer formu FDP tarafından aktive edilir. Piruvat kinaz eksikliği olan hastalarda piruvat kinaz etkinliği kromatografide tetramer, dimer ve monomer olarak elde edilmiştir (49). Bu kişilerin alyuvar piruvat kinazının GSSG ile muamele edilen normal piruvat kinaz ile aynı kinetik özellik göstermesi, normal enzimde de tetramer, dimer ve monomerler arasında bir denge olabileceğini düşündürüyorsa da, bunu destekleyen deliller mevcut değildir.

Piruvat kinaz izozimlerinden kinetik özellikleri en iyi tanımlananı L izozimidir. Kimyasal modifikasyonlardan yararlanılarak ligand bağlama bölgeleri ve kataliz mekanizması en çok M_1 tipi ile çalışılmıştır. Kimyasal modifikasyonlar ile domuz kalbi (50) ve tavşan kası (51) piruvat kinazlarının PEP bağlama bölgesinde arjinin; tavşan kası piruvat kinazının nükleotid bağlama bölgesinde lizin (23) ve PEP bağlama bölgesinde histidin (32) bulunduğu gösterilmiştir. Ayrıca piruvat kinaz için aktif merkez yönelimli bir reaktif olan Bromopiruvat kullanılarak, maya piruvat kinazının PEP bağlama bölgesinde sistein bulunduğu gösterilmiş (52) ve bu enzimdeki sisteinler DTNB'ye olan reaktivitelerine göre sınıflandırılmıştır (53).

İnsan alyuvar piruvat kinazında ise, kimyasal modifikasyonlar, enzimin N-Etilmaleimid ile inaktive olduğunun ve inaktivasyona karşı PEP tarafından korunduğunun gösterilmesi ile sınırlı kalmıştır (40).

Bu çalışmada ise insan alyuvar piruvat kinazının, çeşitli "gruba özgül" kimyasal reaktifler ile modifikasyonları incelenmiştir. 2,3-Butanedione ile arjininlerin modifikasyonları değişik koşullarda yapılmış; histidinlerin modifikasyonu için, en özgül reaktifi olan Dietilpirokarbonat kullanılmıştır. Sistein modifikasyonu için ise; N-Etilmaleimid, DTNB, İyodoasetamid ve okside Ditiyoeritritol kullanılmış ve sonuçları karşılaştırmalı olarak tartışılmış-

tır. Ayrıca pH: 6.8 ve 7.4'de, değişik koşullarda hazırlanmış olan enzim kinetik özellikleri araştırılmıştır.

A M A Ç

Bu çalışmada, bazı amino asitler ile özgül olarak tepkimeye giren kimyasal reaktifler kullanılarak, insan alyuvar piruvat kinazının yapı-işlev ilişkisinin aydınlatılması amaçlandı. Bu nedenle; arjinin 2,3-Butanedione ile, histidin Dietilpirokarbonat ile ve sistein ise N-Etilmaleimid, okside Ditiyoeritritol, İyodoasetamid ve 5,5'-Ditiyo-bis-2-nitrobenzoik asit ile modifiye edildi. Ayrıca, enzimin oksidasyon-redüksiyon ve disosiyasyon-polimerizasyon ilişkilerinin pH ile değişiminin kinetik parametrelere yansımalarının nicelleştirilmesi amaçlandı.

2. GEREÇ VE YÖNTEMLER

2.1. GEREÇLER

Piruvat kinazın saflaştırıldığı insan kanı Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Kan Bankası, Ankara'dan; Sephadex G-25, Sephadex G-75, Sephadex g-150, Sepharose 4B, Blue Dextran 2000 Pharmacia, İsveç'ten; Laktat dehidrogenaz (tavşan kası), NADH (nikotinamidadenin dinükleotit-indirgenmiş formu), Bicine (N,N-Bis-2-hidroksietil-glisin) ve DTNB (5,5'-Ditiyobis-2-nitrobenzoik asit) Boehringer-Mannheim, B.Almanya'dan; Siyanojen bromür, Adenozin-5'-difosfat (potasyum tuzu), Fosfoenolpiruvat (potasyum tuzu ve monosikloheksilamonyum tuzu), Fruktoz-1,6-difosfat (sodyum tuzu), Ditiyotreitöl (DTT), Ditiyoeritritöl (DTE), N-Etilmaleimid (NEM) ve İyodoasetamid Sigma, ABD'den; 2,3-Butanedione (BD) Eastman Kodak, ABD'den; HEPES (N-2-hidroksietilpiperazin-N'-etansül fonik asit) Serva, B.Almanya'dan; Sistein Mann Research Lab., ABD'den; Diethylpirokarbonat (DPC) Bayer, B.Almanya'dan sağlandı. Deneylerde kullanılan diğer kimyasal gereçler analitik saflıkta idi.

Alyuvarların ayırılması ve yıkanmasında IEC-International klinik tip santrifüjü, alyuvar zarlarının uzaklaştırılması ve amonyum sülfat çöktürmelerinde Sorwall SS-3 otomatik süpersantrifüjü kullanıldı. Kromatografilerde fraksiyonlar kollektör (LKB, Ultrorac 7000) ile toplandı. Seyreltik enzim örnekleri Amicon Centriflo C-25 filtreleri ile veya Amicon Model-12 ultrafiltrasyon hü-

relerinde XM-10 filtreleri kullanılarak azot gazı altında değiştirildi. Enzim uzun süreli saklamalarda % 30 gliserol (v/v) içerisine aktarılarak -20°C 'de saklandı. Protein tayini, etkinlik tayini, kinetik deneyler ve kimyasal modifikasyonlarda Beckman Model 25 Kinetik Sistem spektrofotometresi kullanıldı.

2.2. YÖNTEMLER

2.2.1. İnsan Alyuvar Piruvat Kinazının Saflaştırılması:

Alyuvar piruvat kinazı; amonyum sülfat çöktürmesi, Sephadex G-75 kromatografisi ve Blue Dextran-Sepharose 4B affinite kromatografisi basamaklarını içeren bir yöntemle saflaştırıldı (54).

Blue Dextran-Sepharose 4B affinite kromatografisinde piruvat kinaz etkinliği iki zirve olarak elde edildi (54,55). Her zirve ayrı ayrı toplanarak değiştirildi, amonyum sülfat çöktürmesi ile toplandı ve jel elektroforezi ile analizi yapıldı.

Davies'in Schuster tarafından modifiye edilen yöntemine göre (56) yapılan enzimin poliakrilamid jel elektroforezinde, her iki etkinlik zirvesi de tek protein bandı verdi. Weber ve Osborn'un yöntemine göre (57) yapılan SDS'li poliakrilamid jel elektroforezinde, birinci etkinlik zirvesi 57500 molekül ağırlığında tek protein bandı (R_4); ikinci etkinlik zirvesi ise 57500 (R_4) ve 60000 (R_2R_2') molekül ağırlığında iki protein bandı olarak görüldü(54).

Affinite kromatografisinde elde edilen piruvat kinazın birinci etkinlik zirvesi (homotetramer, özgül etkinliği 297 ünite/mg protein) yaklaşık olarak 4 mg/ml'ye kadar değiştirildikten sonra % 75 amonyum sülfat doygunluğuna getirilerek santrifüj ile toplandı. Toplanan enzim, 100 mM potasyum fosfat tampounda (pH: 6.8) çözülerek -10°C 'de saklandı. Uzun süreli saklamalarda, % 30(v/v) olacak şekilde gliserol eklenerek -20°C 'de bekletildi. Kimyasal modifikasyonlar ve kinetik deneylerde bu şekilde hazırlanmış homotetramer piruvat kinaz kullanıldı.

2.2.2. Blue Dextran-Sepharose 4B'nin Hazırlanması:

Sepharose 4B, Cuatrecasas ve Anfinsen'in yöntemine göre (58) siyanojen bromür ile aktive edildi, aktive edilen Sepharose 4B'ye Ryan ve Westling'in yöntemine göre (59) Blue Dextran 2000 kovalan olarak kenetlendi.

2.2.3. Etkinlik ve Protein Tayini:

Enzimin saflaştırılması basamaklarında piruvat kinaz etkinliği Kimberg ve Yielding'in kolorimetrik yöntemine göre (60) , kimyasal modifikasyonlar ve kinetik deneylerde ise "piruvat kinaz-laktat dehidrogenaz kenetlenmiş spektrofotometrik tayin yöntemi"ne göre (61) tayin edildi. Değişiklik belirtilmedikçe etkinlik tayin ortamının bileşimi şöyle idi: 50 mM HEPES-KOH tamponu(pH: 7.4), 25 mM MgSO₄, 0.1 mM fruktoz-1,6-difosfat (FDP), 2 mM ADP, 2 mM PEP, 0.1 mM DTT, 0.18 mM NADH, 12.5 U/ml laktat dehidrogenaz ve enzim çözeltisi(piruvat kinaz). Toplam etkinlik tayin ortamı 0.4 ml idi ve etkinlik 37⁰C'de (histidin,sistein modifikasyonları ve kinetik deneylerde 30⁰C'de) tayin edildi. Tepkime her zaman ADP eklenmesi ile başlatıldı ve tepkimenin ilk hızı spektrofotometrede yazıcı ile kaydedildi.

Enzimin saflaştırılması basamaklarında protein tayini Warburgh'un yöntemine göre (62) saf ve seyreltik örneklerdeki protein tayini ise Schaffner ve Weissmann'ın yöntemine göre(63) yapıldı.

2.2.4. İnsan Alyuvar Piruvat Kinazının 2,3-Butanedione ile Modifikasyonu:

Butanedione'un(BD) özgülülüğünün ışıkta kaybolması nedeniyle (64), piruvat kinazın BD ile modifikasyonu karanlıkta yapıldı. Modifikasyon ortamı tamponu olarak 200 mM Bicine-KOH (pH: 8.0) veya 200 mM Bicine-50 mM Borate (sodyum tetraborat-borik asit, pH: 8.0) tamponu kullanıldı.

BD kullanılmadan önce distile edilerek hazırlandı. Bicine veya borat tamponunda BD çözüldükten sonra pH'sı dikkatlice 8.0'e ayarlandı. Enzimin Bicine

tamponunda 15 dakika inkübasyonundan sonra BD eklenmesi ile modifikasyon başlatıldı. Modifikasyon ortamından değişik zaman aralıklarında çekilen örneklerde kalan piruvat kinaz etkinliği spektrofotometrik olarak tayin edildi. Enzimin tamponda inkübasyonu ve BD ile modifikasyonu 25°C'de ; kalan piruvat kinaz etkinliğinin tayini ise 37°C'de yapıldı.

Piruvat kinazın BD ile modifikasyonuna substrat ve ligandların koruyucu etkilerinin araştırılmasında , değişik substrat ve ligandlar ile enzimin tamponda 15 dakika inkübasyonundan sonra BD eklenerek modifikasyon başlatıldı ve zamana bağlı olarak kalan piruvat kinaz etkinliği tayin edildi.

BD ile modifikasyonun BD derişimine bağımlılığı, ligandların koruyucu etkileri, modifikasyonun pH bağımlılığı ve tersinir olup olmadığı borat içeren ve içermeyen tampon sistemleri kullanılarak araştırıldı. Borat içeren modifikasyon deneylerinde iyonik kuvvet KCl ile sabit tutuldu. Her deneyde, aynı koşullarda fakat BD içermeyen bir örnek de kontrol olarak çalışıldı. Borat tamponu varlığındaki modifikasyonun pH bağımlılığının araştırılması deneylerinde 200 mM Bicine-100 mM Borat tamponu kullanıldı. Çalışılan her pH'da, aynı koşullardaki fakat reaktif içermeyen bir örnek de kontrol olarak bulunduruldu.

BD modifikasyonu ile piruvat kinazın alt birimlerine disosiyeye olup olmadığı, modifiye edilen ve edilmeyen enzimin Sephadex G-150 kromatografisi ile araştırıldı, kontrol olarak hemoglobin kullanıldı.

2.2.5. İnsan Alyuvar Piruvat Kinazının Dietilpirokarbonat (DPC) ile Modifikasyonu:

DPC,kullanılmadan önce 16 mm civa basıncı altında, 90°C'de distile edilerek hazırlandı. DPC modifikasyonda kullanılacağı zaman önce 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH: 6.8) içeren % 50'lik soğuk etanol içine 89 mM olacak şekilde seyreltildi. Böylece reaktifin çözünmesi sağlandıktan sonra hemen 30°C'deki saf su içinde 8.9 mM'a seyreltildi ve buradan hemen çekilen reaktif ile modifikasyon başlatıldı. Modifikasyon başlatılmadan önce enzim, % 2.5 gliserol (v/v) içeren 150 mM potasyum

fosfat tamponunda (pH: 6.8) 30 dakika inkübe edildi.

DPC'nin çabuk bozunması nedeniyle , her seferinde reaktif belirtilen şekilde, taze ve çabuk olarak hazırlandı. Kısa sürelerle modifikasyon ortamından çekilen örneklerde kalan piruvat kinaz etkinliği spektrofotometrik olarak tayin edildi.

Ligandların inaktivasyona karşı koruyucu etkilerinin araştırılmasında da enzimin değişik ligandlar ile 30 dakika inkübasyonundan sonra DPC ile modifikasyonu başlatıldı. Enzimin DPC ile modifikasyonu ve kalan etkinliğin tayini 30°C'de yapıldı. DPC modifikasyonunda kullanılan enzimin hazırlanması, Bulgular bölümünde verilmiştir.

2.2.6. İnsan Alyuvar Piruvat Kinazının N-Etilmaleimid (NEM) ile Modifikasyonu:

Piruvat kinazın NEM ile modifikasyonu % 2.5 gliserol (v/v) içeren 150 mM HEPES tamponunda (pH: 7.55) yapıldı. Enzimin HEPES tamponunda 15 dakika inkübasyonundan sonra, suda çözülen NEM eklenmesi ile modifikasyon başlatıldı. Değişik zaman aralıkları ile çekilen örneklerde kalan piruvat kinaz etkinliği tayin edildi (DTT içermeyen etkinlik tayin ortamında). NEM ile modifikasyon ve kalan etkinlik tayini 30°C'de yapıldı. Her deney için aynı koşullarda fakat reaktif içermeyen bir enzim örneği kontrol olarak çalışıldı.

Piruvat kinazın NEM ile inaktivasyonuna karşı ligandların koruyucu etkilerinin araştırılmasında da, aynı koşullarda enzimin ligand ile 15 dakika inkübasyonundan sonra modifikasyon başlatıldı ve zamana bağlı olarak kalan piruvat kinaz etkinliği spektrofotometrik olarak tayin edildi.

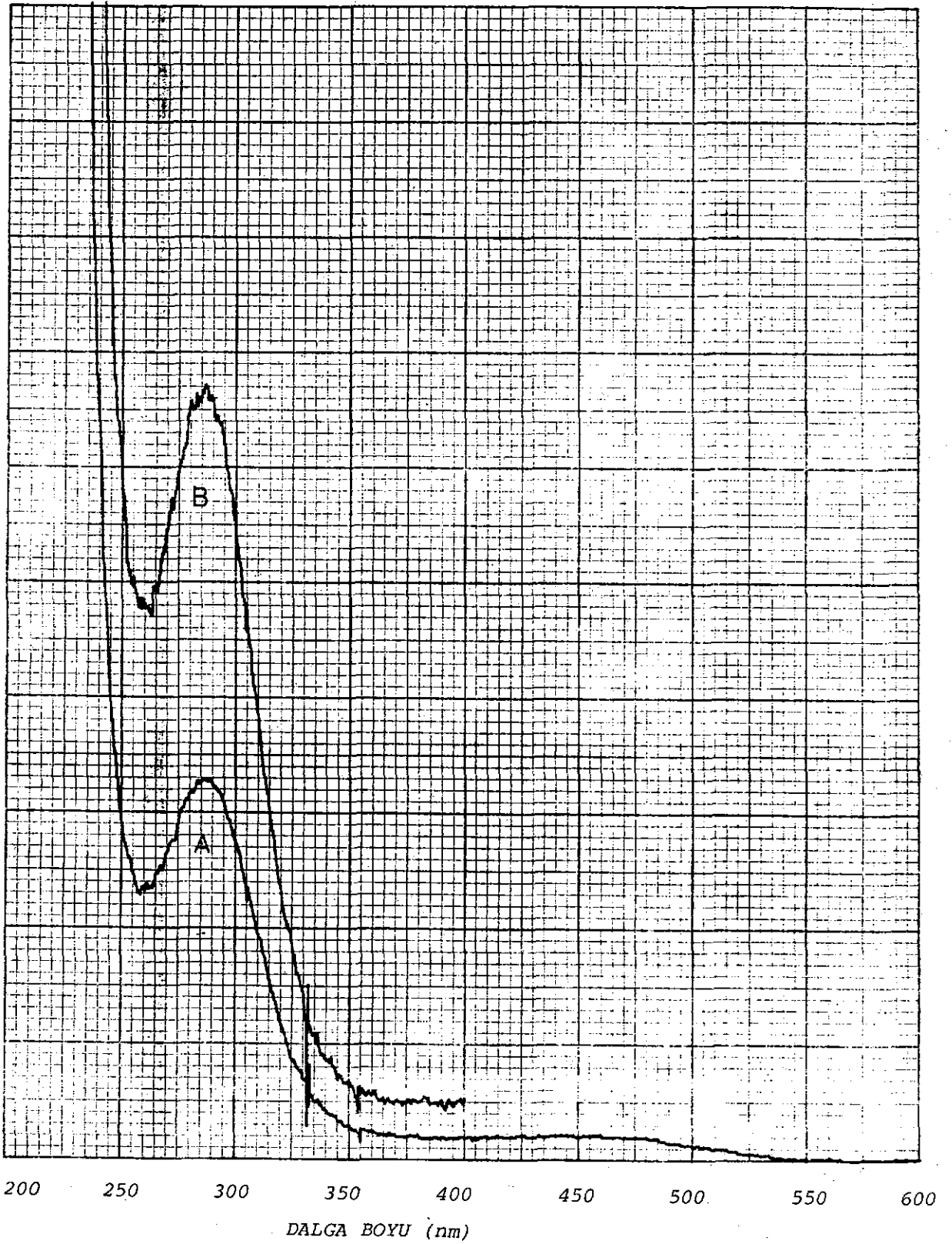
Iyodoasetamid kullanılarak yapılan modifikasyonlarda da, yukarıda NEM modifikasyonu için açıklanan yöntemler uygulandı.

2.2.7. İnsan Alyuvar Piruvat Kinazının DTNB ve Okside Ditiyoeritritol (DSSD) ile Modifikasyonu:

DTNB, potasyum tuzuna çevrildikten sonra modifikasyonda kullanıldı (12). Bunun için 2 gram DTNB 30 ml suya eklenerek, pH-metre altında devamlı karıştırılmak suretiyle yavaş yavaş 0.5 N KOH ile titre edildi. Bütün asit çözüldükten sonra son damla KOH pH'yı 7.0'ye çıkardı. Bu çözeltiye hemen 1 gram aktif kömür (charcoal) eklendi, karıştırıldıktan sonra süzüldü ve aynı işlem iki kez tekrarlandı. Bu süzüntüye eşit hacimde etanol eklenerek derin dondurucuda soğutuldu. Santrifüj ile toplanan K_2 DTNB etanol ile yıkandıktan sonra, düşük basınç altında etanol uçuruldu ve iyice kurutulduktan sonra kullanıldı.

DTNB modifikasyonu 150 mM HEPES tamponunda (pH: 7.55), 30°C'de yapıldı. DTNB modifikasyonunda kullanılan enzim 10 mM DTE ile indirgendikten sonra Sephadex G-25 kolonundan geçirilip DTE'nin fazlası uzaklaştırılarak kullanıldı. Bu şekilde hazırlanan enzimin HEPES tamponunda 15 dakika inkübasyonundan sonra DTNB eklenerek modifikasyon başlatıldı ve zamana bağlı olarak kalan piruvat kinaz etkinliği 30°C'de tayin edildi (DTT içermeyen etkinlik ortamında). DTNB modifikasyonunda tepkimenin ilerleyişi hem etkinlik kaybı, hem de 412 nm'de açığa çıkan TNB tayini ile izlendi. Modifikasyonun 412 nm'de izlendiği deneyde, DTNB ile modifikasyon başlatıldıktan sonra absorpsiyon artışı spektrofotometrede sürekli olarak kaydedildi.

Sistein modifikasyonunda kullanılan DSSD, ferrisiyanür ile oksidasyon yöntemi ile DTE'den hazırlandı (65). Bunun için 2 gr DTE 50 ml suda çözüldükten sonra 0.8 M potasyum ferrisiyanür ile, 0.5 M KOH eklenerek titre edildi. Titrasyon pH-metre altında yapıldı ve pH: 7.0'nin altında tutuldu. Sarı bir renk görününceye kadar titrasyona devam edildi. Titrasyondan sonra çözeltinin hacmi buharlaştırma ile 10 ml'ye indirildi, 200 ml etanol eklenerek süzüldü ve kurutuldu. Çökelek etil asetatda çözüldü, buna hekzan eklenerek kristalize edildi ve süblime edilerek toplandı. Böylece hazırlanan DSSD'nin spektrumu alındı (Şekil 1) ve



ŞEKİL 1. Hazırlanan Okside Ditiyoeritritol'ün Spektrumu, 0.6 mM (65)

A: skala 0.5 absorbans, B: skala 0.25 absorbans

($\epsilon = 273 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\lambda_{\text{max}} = 283 \text{ nm}$)

modifikasyonda kullanıldı.

DSSD ile modifikasyon 150 mM HEPES tamponunda pH: 7.55 ve 30°C'de yapıldı. Tamponda enzimin 15 dakika inkübasyonundan sonra DSSD eklenerek modifikasyon başlatıldı ve değişik zaman aralıklarında çekilen örneklerde kalan piruvat kinaz etkinliği 30°C'de (DTT içermeyen ortamda) tayin edildi.

DTNB ve DSSD modifikasyonunda kullanılan enzim DTE ile indirgendikten sonra kullanıldı. Enzimin hazırlanışına ait ayrıntılar Bulgular bölümünde verilmiştir.

İnsan alyuvar piruvat kinazı ile yapılan kinetik çalışmalarda uygulanan yöntemler, konunun bütünlüğü ve tekrardan kaçınmak amacıyla, kinetik deneylere ait Bulgular bölümünde verilmiştir.

3. B U L G U L A R

3.1. PİRUVAT KİNAZİN BUTANEDİONE İLE MODİFİKASYONU

Daha önceki çalışmamızda insan alyuvar piruvat kinazının, özgül bir arjinin reaktifi olan BD ile inaktive olduğunu, inaktivasyona karşı enzimin substrat ve diğer ligandlarının koruyucu etki göstermediğini, artan iyonik kuvvetin inaktivasyonu geciktirdiğini, modifikasyonun tersinmez olduğunu göstermiş ve modifiye edilen arjininlerin enzimin altbirimlerinin etkileşimi veya konformasyonundan sorumlu olabileceğini savunmuştuk (54). Söz konusu çalışmada modifikasyon ortamı tamponu olarak, arjininin BD ile tepkimesi için gerekli olduğu kabul edilen borat (4) içeren tampon sistemi (Bicine-borat) kullanılmıştı.

BD özgül bir arjinin reaktifi olmasına rağmen; ultraviyole ışığı varlığında aromatik amino asitler ve histidin ile de tepkimeye girebilmektedir (64). Sistemimizde tepkime ışıktan etkilenmediği halde, yine de bütün BD modifikasyonu çalışmaları karanlıkta yapıldı. Ayrıca, borat gliserol ile tepkimeye girerek, ortamın pH'sının düşmesine neden olduğu için; BD modifikasyonunda kullanılan enzim gliserol içermeyen ortamda (100 mM potasyum fosfat tamponu, pH: 6.8) saklandı. Bütün BD modifikasyonunda bu şekilde hazırlanan enzim kullanıldı.

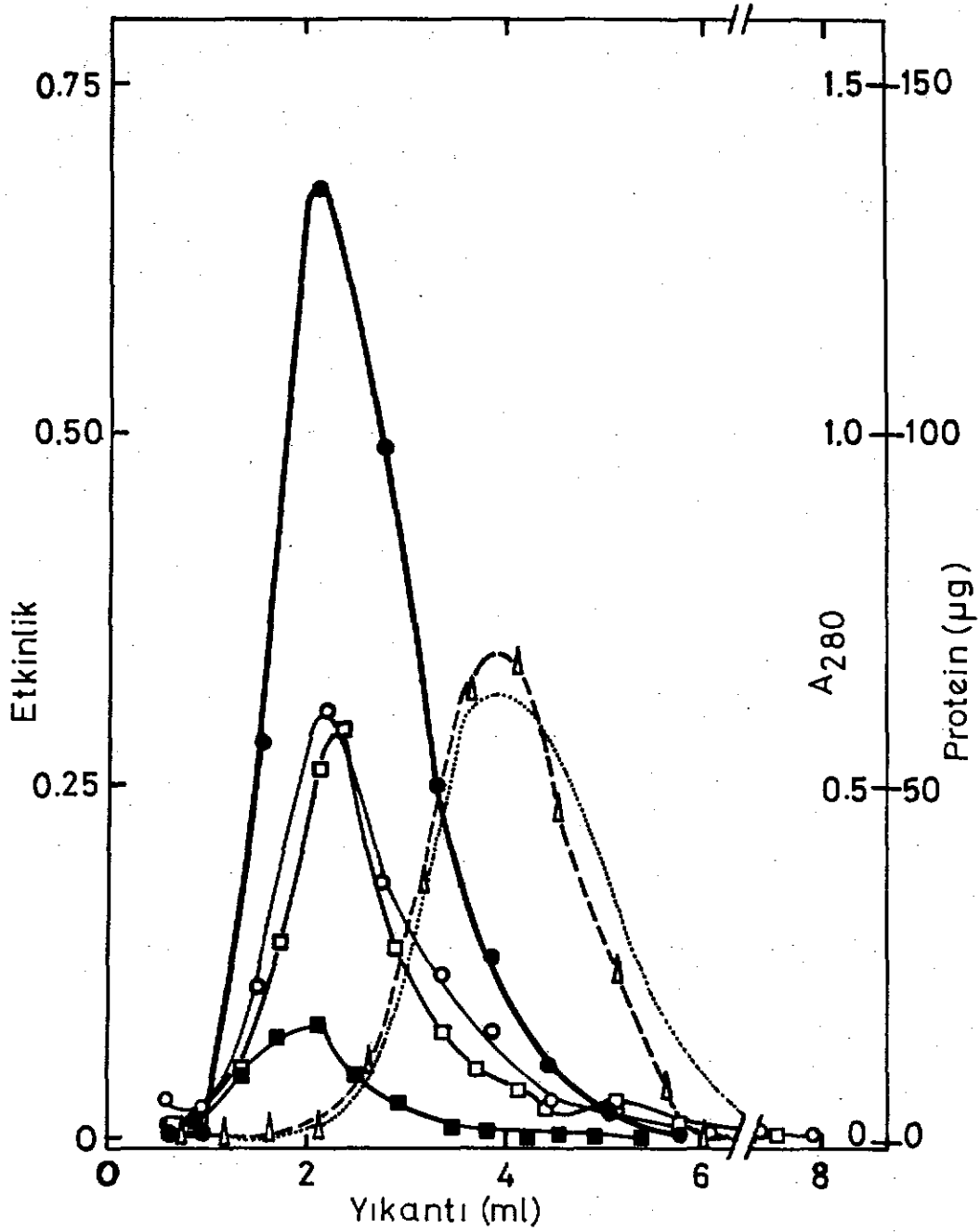
Bu çalışmaya öncelikle BD ile inaktivasyonun mekanizmasının araştırılması ile başlandı. Modifikasyon ile enzimin alt birimlerine disosiyasyon olup olmadığı

ğını araştırmak için Sephadex G-150 kromatografisi yapıldı. Bu amaçla 230 mikrogram proteinden oluşan iki ayrı enzim örneği hazırlandı. Örneklerden biri 200 mM BD ile 100 mM borat-200 mM Bicine (pH: 8.0) tamponunda % 80 etkinliğini yitirmeye kadar muamele edildi. Böylece % 80 modifiye edilen enzim derhal, 50 mM borat-100 mM Bicine tamponu (pH: 8.0) ile dengelenmiş 0.5x17 cm boyutlarındaki Sephadex G-150 kolonuna uygulandı. Aynı tamponla kolon yıkanarak 0.4 ml'lik kesitler toplandı. Diğer enzim örneği de , normal (modifiye olmamış) enzim olarak aynı oranda seyreltildi ve aynı kolona uygulandı. Ayrıca aynı kolona bir kez de 250 mikrogram hemoglobin (enzim örnekleriyle aynı hacimde) uygulandı. Her üç Sephadex G-150 kromatografisinde de akış hızı değişmez tutuldu ve 0.4 ml'lik kesitler toplandı. Kromatografiden sonra kesitlerde protein ve etkinlik tayini yapıldı.

BD tarafından modifiye edilen ve edilmeyen enzim ile hemoglobinin Sephadex G-150 kromatografisindeki elüsyonlarının profili Şekil 2'de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi modifiye edilen ve edilmeyen enzimin kolondan elüsyon profilleri tümüyle çakışmakta ve her hangi bir kayma görülmemektedir. Buna göre BD modifikasyonu ile piruvat kinazın alt birimlerine disosiyasyon olması söz konusu değildir.

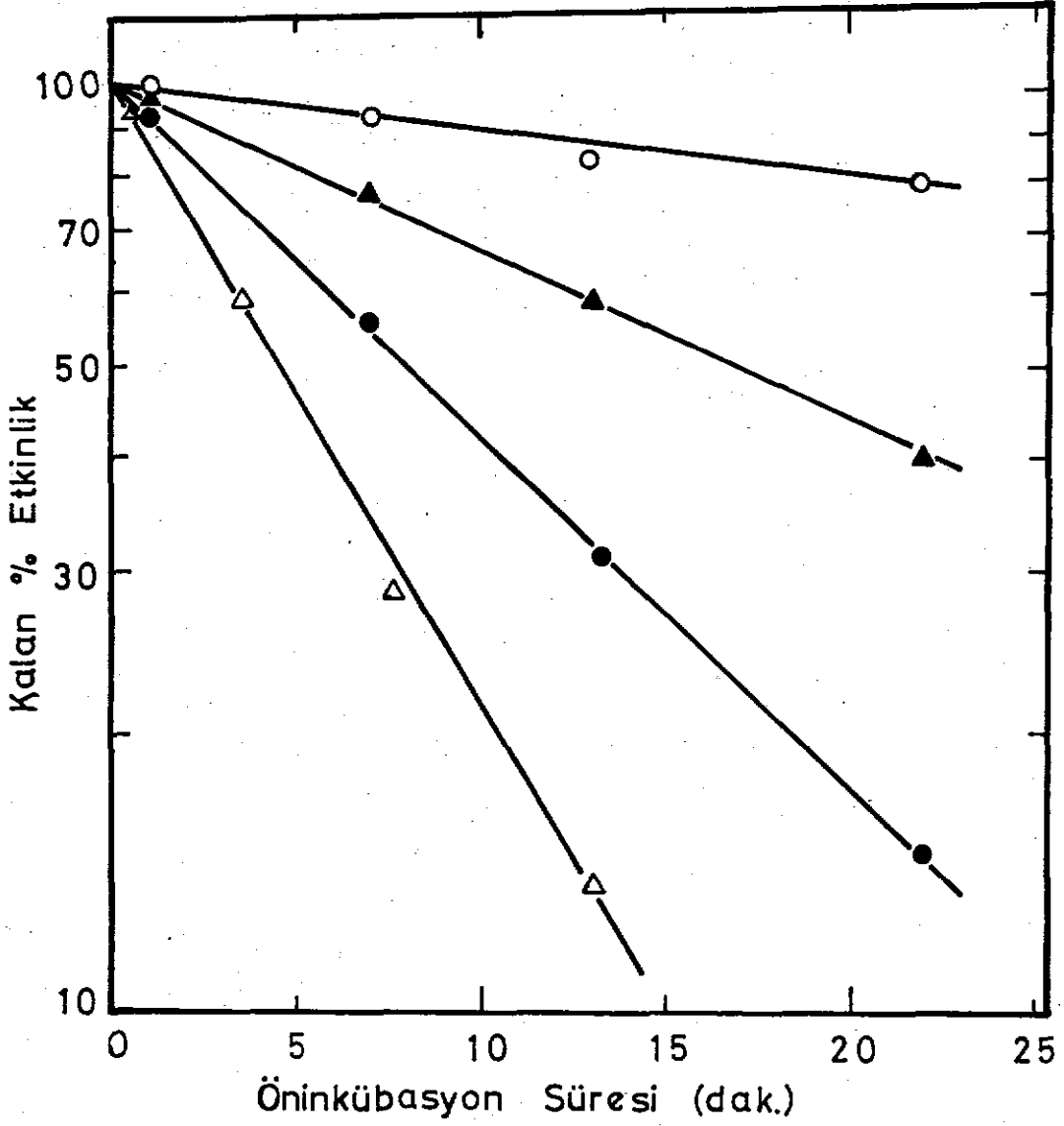
Daha önceki çalışmaların tersine (4,66) BD ile modifikasyon için borat varlığının zorunlu olmadığı görüldü (Şekil 3 ve 4). Boratın varlığında ve yokluğunda piruvat kinazın BD ile modifikasyonu görünür birinci derece kinetiğine uymakta (Şekil 3 ve 4); eklenen borat ikinciden hız değişmezini (k_{BD}) 2.14'ten 2.74 $M^{-1}dak^{-1}$ 'e çıkarmak dışında modifikasyonda önemli etki göstermemektedir (Şekil 5). Borat varlığında ve yokluğundaki modifikasyon ile BD derişimi arasındaki lineer ilişki Şekil 6'da görülmektedir.

BD ile modifikasyonda inaktivasyon hız değişmezleri (k_{BD}) üzerine boratın etkisinin önemsiz olmasına rağmen ligandlar ile koruma deneylerinde tümüyle farklı sonuçlar elde edildi. Borat içeren ortamda inaktivasyonu önemli ölçüde geciktiren



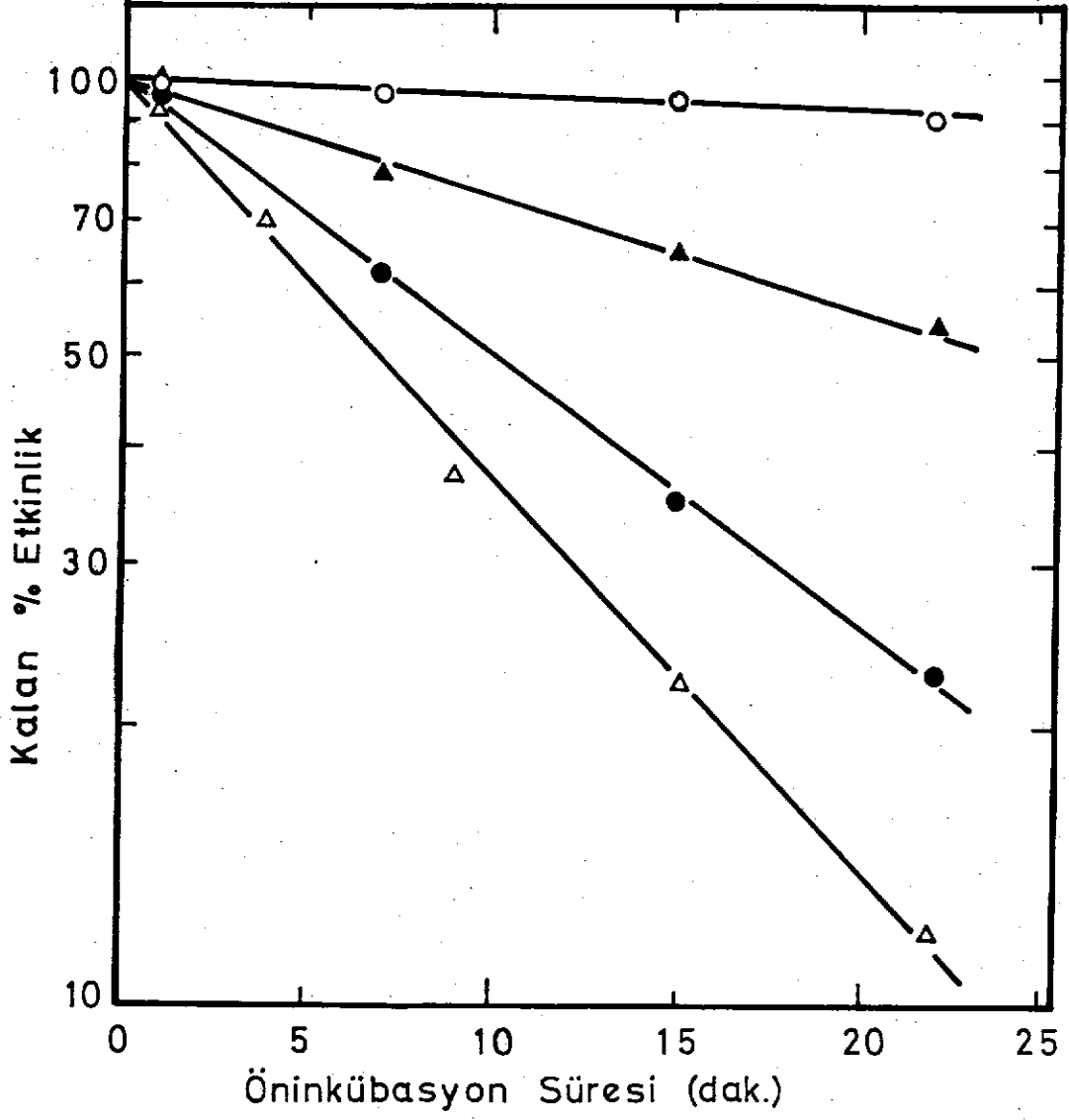
ŞEKİL 2. Butanedione ile Modifiye Edilen ve Edilmeyen Alyuvar Piruvat Kinazının Sephadex G-150 Kromatografisi

(—●—) Modifiye edilmeyen kontrol enzimin etkinliği,
(—■—) Modifiye edilen enzim etkinliği, (—○—) Kontrol enzimde protein (µg), (—□—) Modifiye edilen enzimde protein (µg), (—▲—) Hemoglobin, (.....) Butanedione.



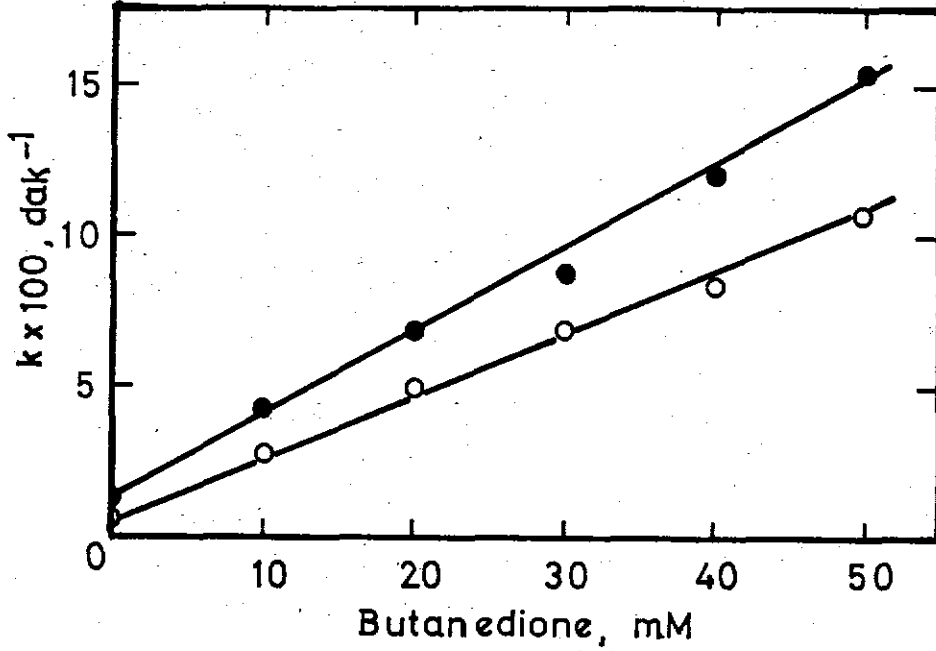
ŞEKİL 3. İnsan Alüvar Piruvat Kinazının Bicine-Borat Tampomunda (200 mM Bicine-50 mM Borat, pH:8.0) BD ile Modifikasyonu

(—○—) Kontrol, (—▲—) 10 mM BD, (—●—) 30 mM BD, (—△—) 50 mM BD. (2.56 µg protein/0.1 ml modifikasyon ortamı).



ŞEKİL 4. İnsan Alyuvar Piruvat Kinazının Borat İçermeyen Bicine Tamponunda (200 mM Bicine, pH: 8.0) BD ile Modifikasyonu.

(—○—) Kontrol, (—▲—) 10 mM BD , (—●—) 30 mM BD , (—△—) 50 mM BD. (2.56 µg protein/ 0.1 ml modifikasyon ortamı).



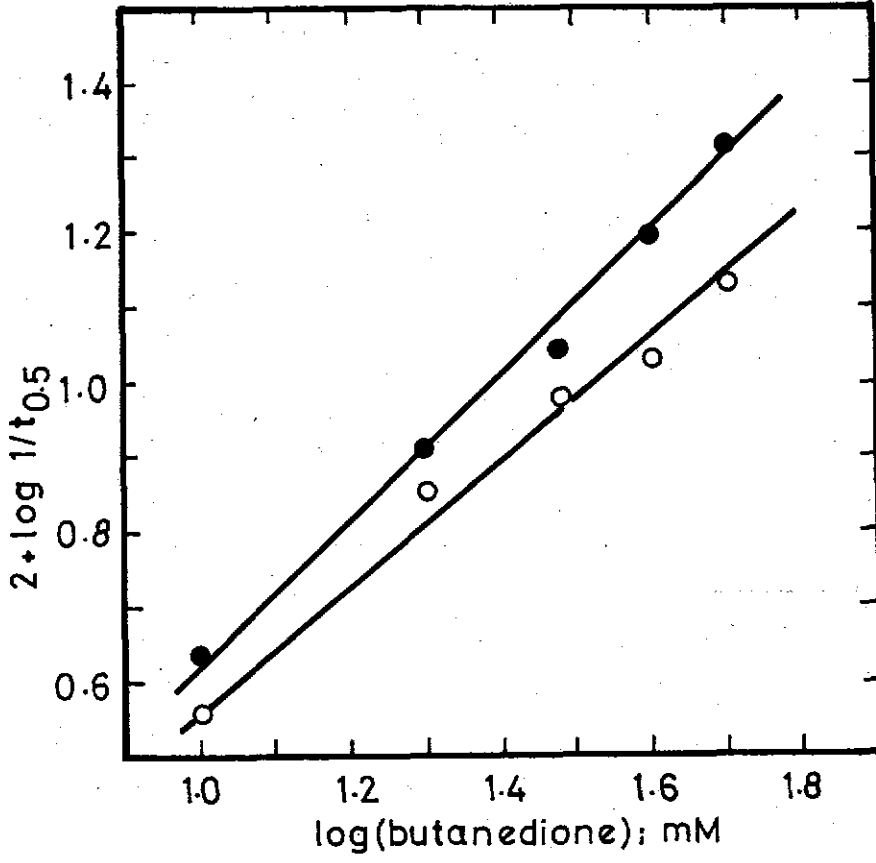
ŞEKİL 5. Şekil 3 ve 4'ten Elde Edilen Görünür Birinci Dereceden Hız Değişmezlerinin (k) BD Derişimine Karşı Çizimi.

(—○—) Bicine tamponunda (n=2.14)

(—●—) Bicine-borat tamponunda (n=2.71)

iyonik kuvvet, borat içermeyen ortamda bu etkiden yoksundur (Şekil 7). Bu nedenle yalnızca borat içeren ortamdaki koruma deneylerinde iyonik kuvvet KCl ile sabit tutuldu.

Borat içeren modifikasyon ortamında PEP, ADP, ATP ve diğer ligandlar inaktivasyona karşı koruyucu etki göstermedikleri halde (54) borat içermeyen Bicine tamponunda önemli derecede koruyucu etki gösterdiler. PEP, ADP ve ATP'nin koruyucu etkileri Şekil 8,9 ve 10'da görülmektedir. Bu ligandların koruyucu etkileri Şekil 11'de karşılaştırılmalı olarak verilmiştir. Enzim BD modifikasyonuna karşı PEP tarafından kısmen; ADP tarafından ise oldukça etkili olarak korunmaktadır. ATP de, düşük derişimlerinde ADP kadar koruyucu etki göstermekte (Şekil 9)

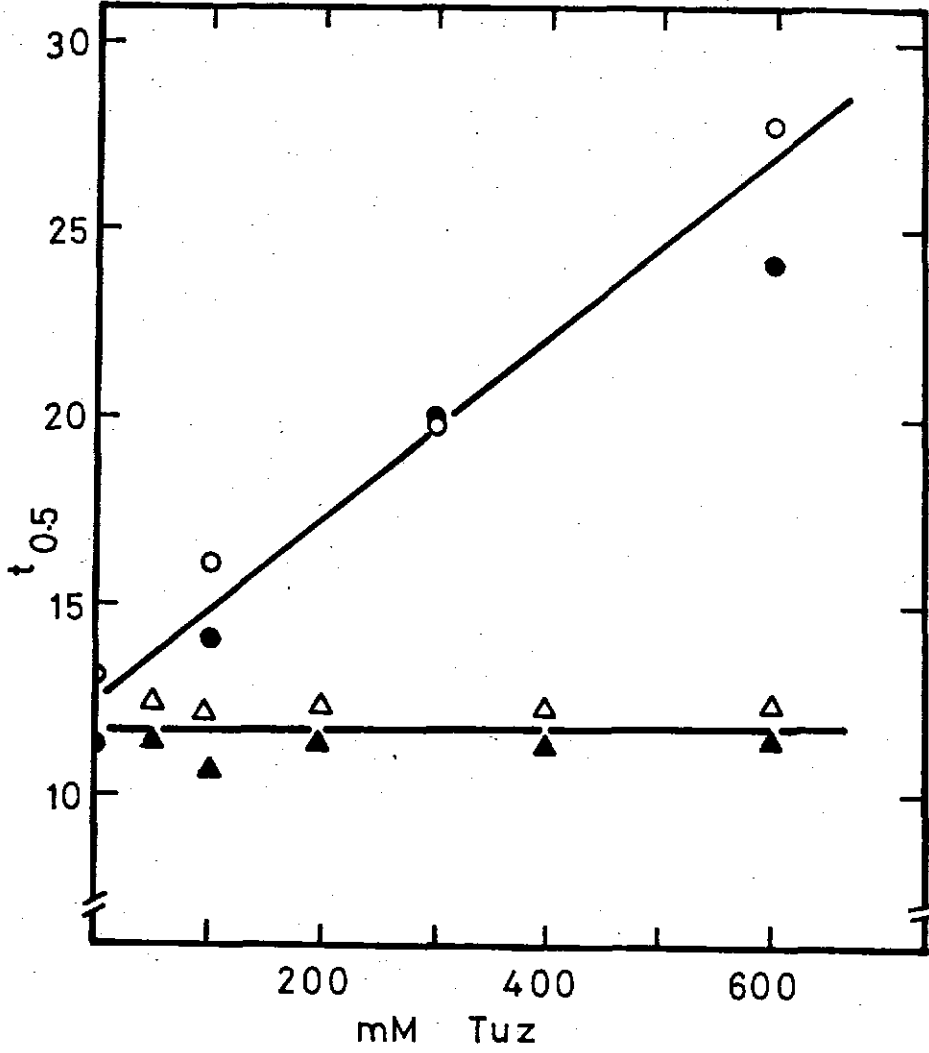


ŞEKİL 6. İnsan Alyuvar Piruvat Kinazının BD ile Modifiyonunun, BD Derişimine Göre Görünür Derecesi.

(—○—) Bicine tamponunda (n=0.94)

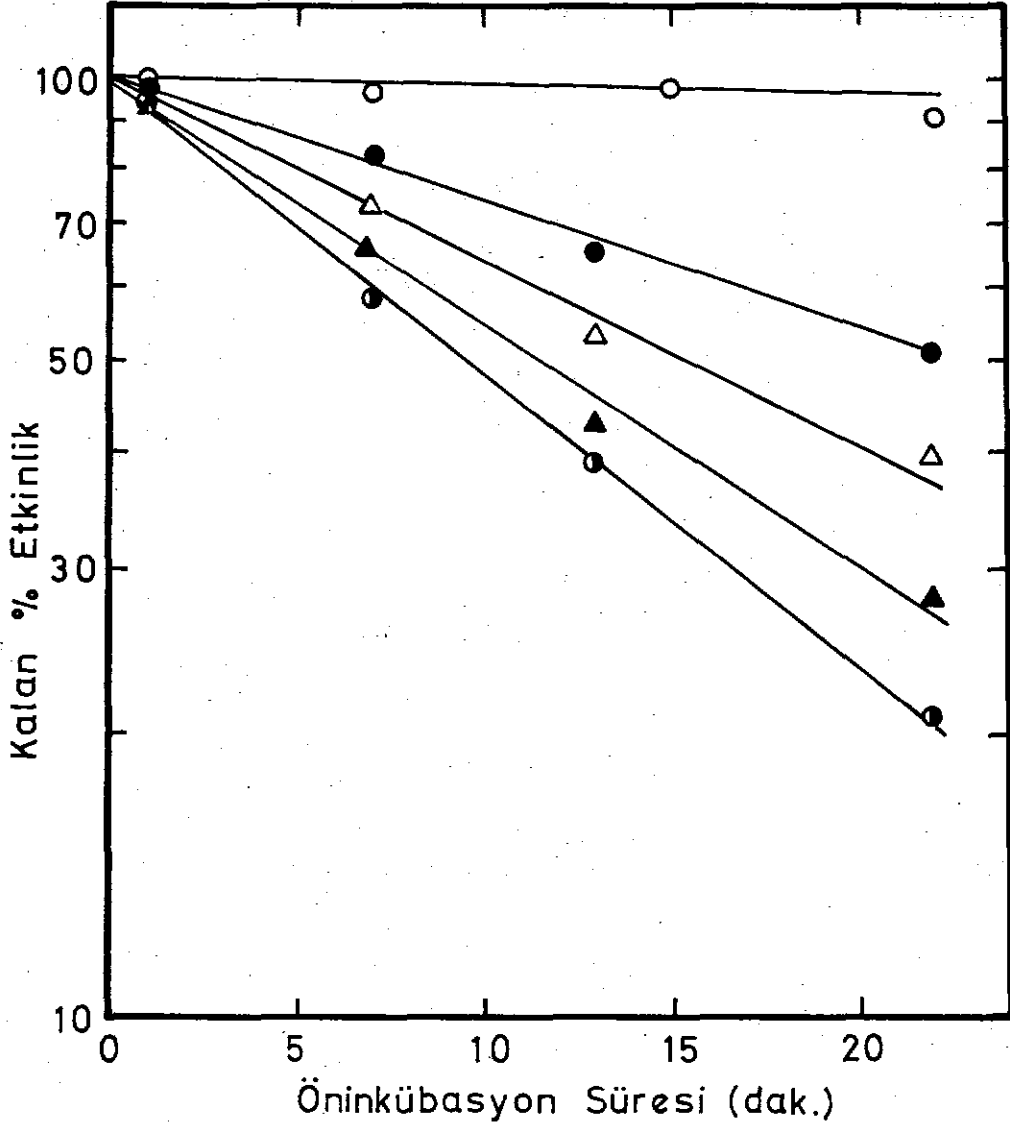
(—●—) Bicine-borat tamponunda (n=0.99)

(t_{0.5} değerleri Şekil 3 ve 4'ten hesaplanmıştır).



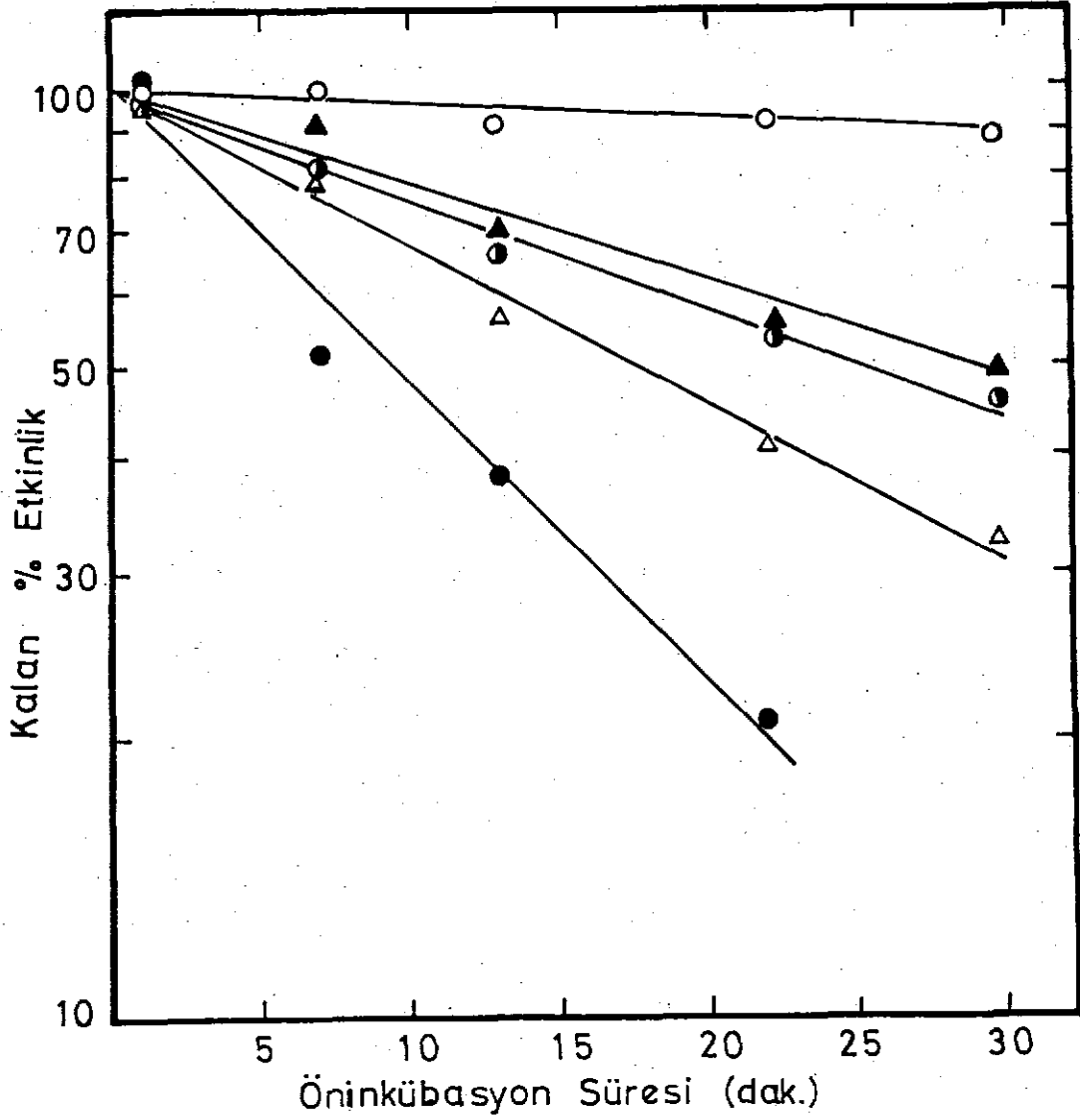
ŞEKİL 7. Alyuvar Piruvat Kinazının BD ile Modifikasyonuna İyonik Kuvvetin Etkisi (50 mM BD, pH: 8.0'de).

- (—○—) NaCl, Bicine-borat tamponunda
- (—●—) KCl, Bicine-borat tamponunda
- (—△—) NaCl, Bicine tamponunda
- (—▲—) KCl, Bicine tamponunda



ŞEKİL 8. İnsan Alyuvar Piruvat Kinazının Bicine Tamponunda (pH: 8.0, 40 mM BD) BD ile Modifikasyonuna PEP'in Koruyucu Etkisi.

(—○—) Kontrol, (—●—) 40 mM BD içeren kontrol, (—▲—) 0.1 mM PEP, (—△—) 1 mM PEP, (—●—) 5 mM PEP.
(Enzim miktarı 3.8 µg/ 0.1 ml modifikasyon ortamı).



ŞEKİL 9. İnsan Alyuvar Piruvat Kinazının Bicine Tamponunda (pH: 8.0, 40 mM BD) BD ile Modifikasyonuna ATP'nin Koruyucu Etkisi.

(—○—) Kontrol, (—●—) 40 mM BD içeren kontrol, (—△—) 0.1 mM ATP, (—○—) 1 mM ATP, (—▲—) 5 mM ATP.
(Enzim miktarı 3.8 µg/ 0.1 ml modifikasyon ortamı).

fakat bu koruyucu etkisi PEP ve ADP'den daha düşük derişiminde doğunluk göstermektedir (Şekil 11). Borat içeren ve içermeyen modifikasyon ortamında inaktivasyona karşı ligandların koruyucu etkileri toplu olarak Tablo III'te verilmiştir.

Piruvat kinazın BD ile modifikasyonu artan pH'ya oldukça bağımlı görünmektedir (Şekil 12). Fakat bu ilişki lineer değildir. Modifikasyonun pH bağımlılığı borat varlığında ve yokluğunda birbirine oldukça benzemektedir. Her iki durumda da modifikasyonun pH bağımlılığı profilinden, modifiye olan reaktif grubu pK'sı 8.1 (borat içermeyen modifikasyon ortamında) ve 8.3 (borat içeren modifikasyon ortamında) olarak bulundu (Şekil 12).

Borat, modifikasyon ortamında bulunduğu durumlarda, modifikasyona karşı ligandların koruyucu etkilerini bozmaktadır. Bu etkiyi özellikle ADP ve ATP ile kompleks yaparak göstermektedir. ADP ile borat-ADP kompleksi yapan borat; ortamda bulunan serbest ADP derişimini azaltmaktadır (Şekil 13). Boratın bu etkisi incelendiğinde; boratın piruvat kinazın kompetitif inhibitörü gibi davrandığı görülmektedir (Şekil 14). Bu kompetitif inhibisyon aşağıda verilen eşitlikle ifade edilebilir:

$$v_i = \frac{v_m \left(\frac{K}{K-B} \right) (ADP_t)}{K_m + \left(\frac{K}{K-B} \right) (ADP_t)}$$

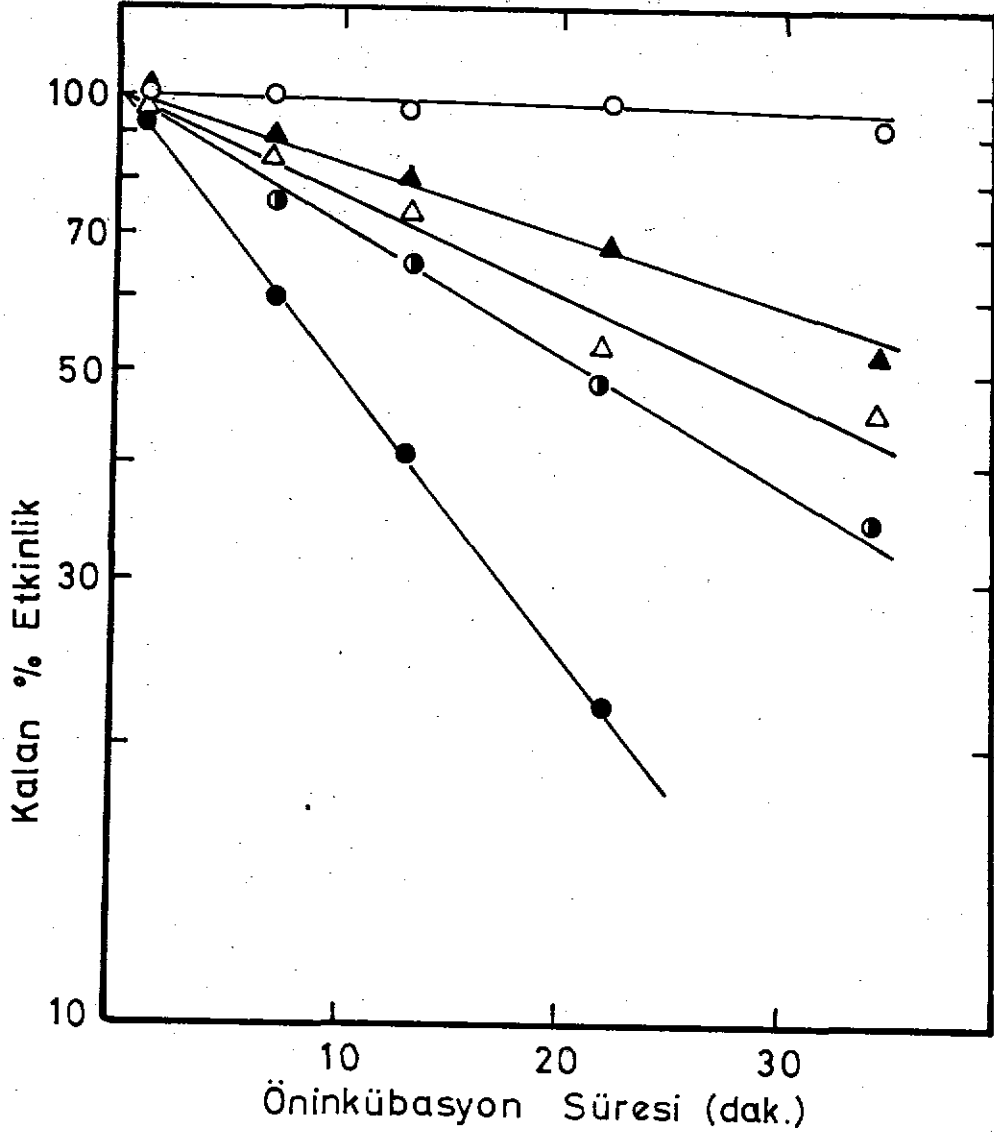
Bu eşitlikte; B borat derişimini, ADP_t toplam ADP derişimini, K ADP-borat kompleksinin gözlenen disosiyasyon değişmezini ve v_i ise inhibitör varlığında elde edilen hızı göstermektedir. Bu eşitlikten yararlanarak ADP-borat kompleksinin gözlenen disosiyasyon değişmezi (K) 25 mM Mg^{++} iyonu varlığında 50 mM olarak hesaplandı.

Piruvat kinazın BD ile modifikasyonunun, modifikasyon ortamı borat içersin veya içermesin tersinmez olduğu bulundu (Şekil 15 ve 16). Borat içermeyen

Tablo III. İnsan Alyuvar Piruvat Kinazının Bicine (200 mM, pH: 8.0) ve Bicine-Borat (200 : 50 mM, pH: 8.0) Tamponlarında Butanedione ile (40 mM) İnaktivasyonuna Çeşitli Ligandların Koruyucu Etkileri

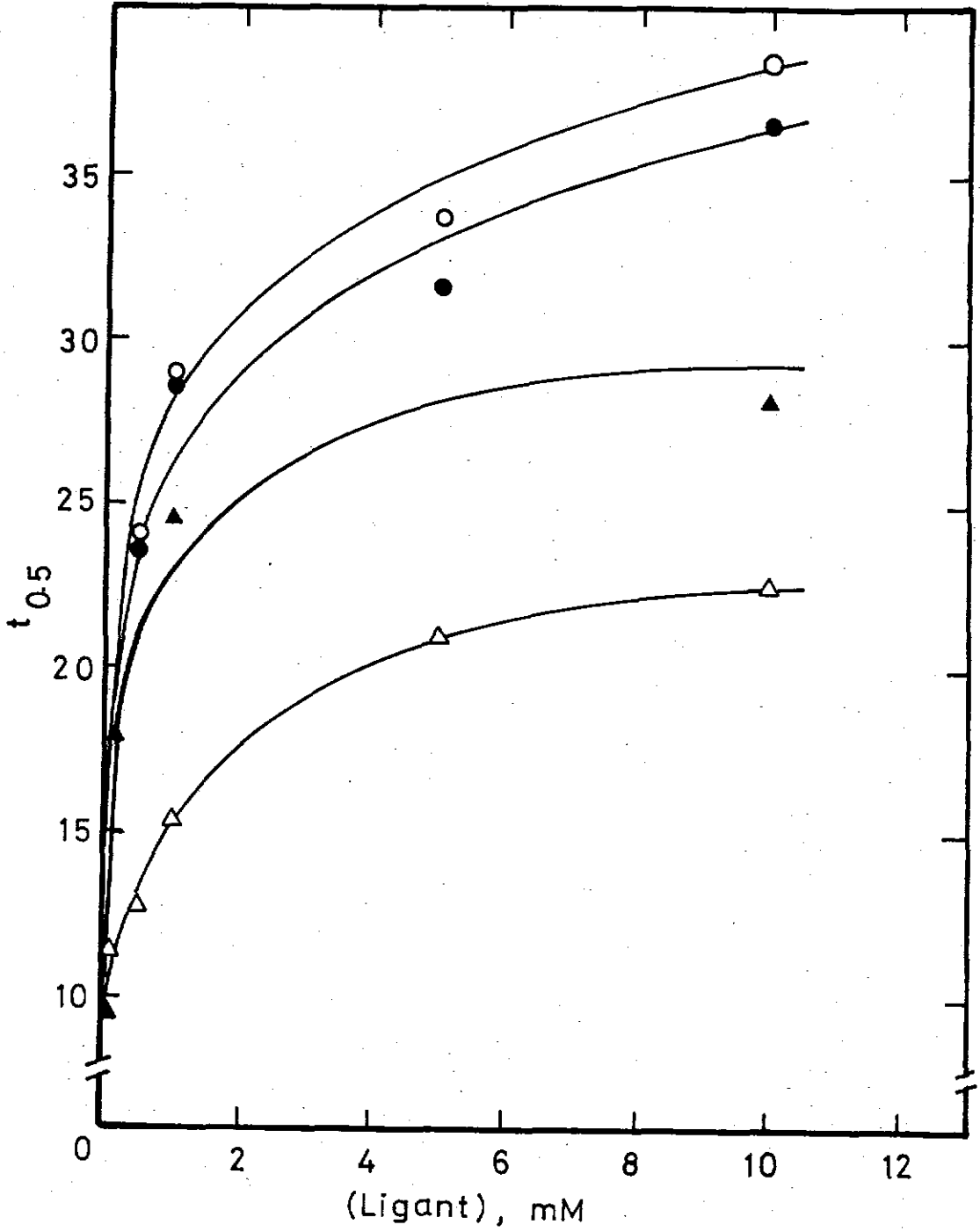
Ligand; mM	Kısmi İnaktivasyon Hızı	
	Bicine'de	Bicine-Boratta
Hiçbiri	1.00	1.00
ADP, 0.5	0.43	-
1.0	0.34	0.94
5.0	0.29	-
10.0	-	0.83
MgADP, 5.0	0.35	0.55
PEP, 0.1	0.84	-
0.5	0.79	-
1.0	0.65	0.97
5.0	0.44	0.66
10.0	0.50	0.76
FDP, 0.1	0.95	-
1.0	0.81	0.94
ATP, 0.1	0.51	-
1.0	0.35	0.78
10.0	0.33	0.76
ADP+PEP (1:1) 1.0	0.32	-
5.0	0.30	-

200 mM Bicine tamponunda (pH: 8.0), 200 mM BD ile 190 mikrogram enzim, % 13 etkinlik kalıncaya kadar muamele edildi (tepkime süresi 7 dak.). Böylece % 87 modifiye edilen enzim derhal 50 mM Bicine tamponu (pH: 8.0) ile dengelenmiş 0.6 x 10 cm boyutlarındaki Sephadex G-25 kolonuna uygulandı. Elüsyon, aynı tampon ile kolon yıkanarak sağlandı ve enzimin BD'den ayrıldığı görüldü (Şekil 15). Aynı modifikasyon bir kez de 100 mM borat içeren 200 mM Bicine tamponunda (pH: 8.0) yapıldı. Burada 250 mikrogram enzim, 140 mM BD ile % 35 etkinlik kalıncaya kadar muamele edildikten sonra aynı kolona uygulandı ve borat ile BD'den enzimin ayrılması sağlandı (Şekil 16). Yukarıda açıklanan her iki durumda da, enzim BD'den ve borat-BD'den ayrıldıktan sonra hiç bir etkinlik artışı göstermedi (Şekil 15 ve 16).



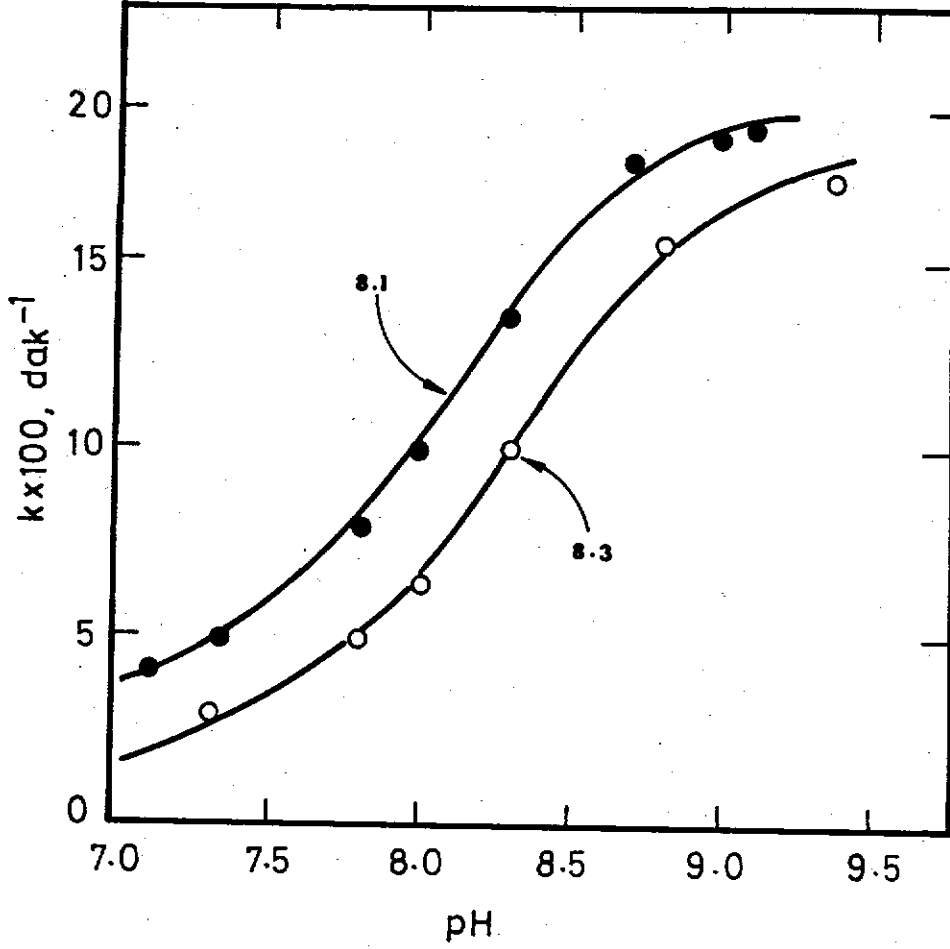
ŞEKİL 10. İnsan Alyuvar Piruvat Kinazının Bicine Tamponunda (pH: 8.0, 40 mM BD) BD ile Modifikasyonuna ADP'nin Koruyucu Etkisi.

(—○—) Kontrol, (—●—) 40 mM BD içeren kontrol, (—●—) 0.5 mM ADP, (—△—) 1 mM ADP, (—▲—) 5 mM ADP.
(Enzim miktarı 3.8 µg/ 0.1 ml modifikasyon ortamı).



ŞEKİL 11. İnsan Alyuvar Piruvat Kinazının BD ile Modifikasyonuna PEP, ATP ve ADP'nin Koruyucu Etkileri. ($t_{0.5}$ değerleri, Şekil 8, 9 ve 10'dan hesaplanmıştır).

(—△—) PEP, (—▲—) ATP, (—●—) ADP, (—○—) ADP - PEP(1:1).

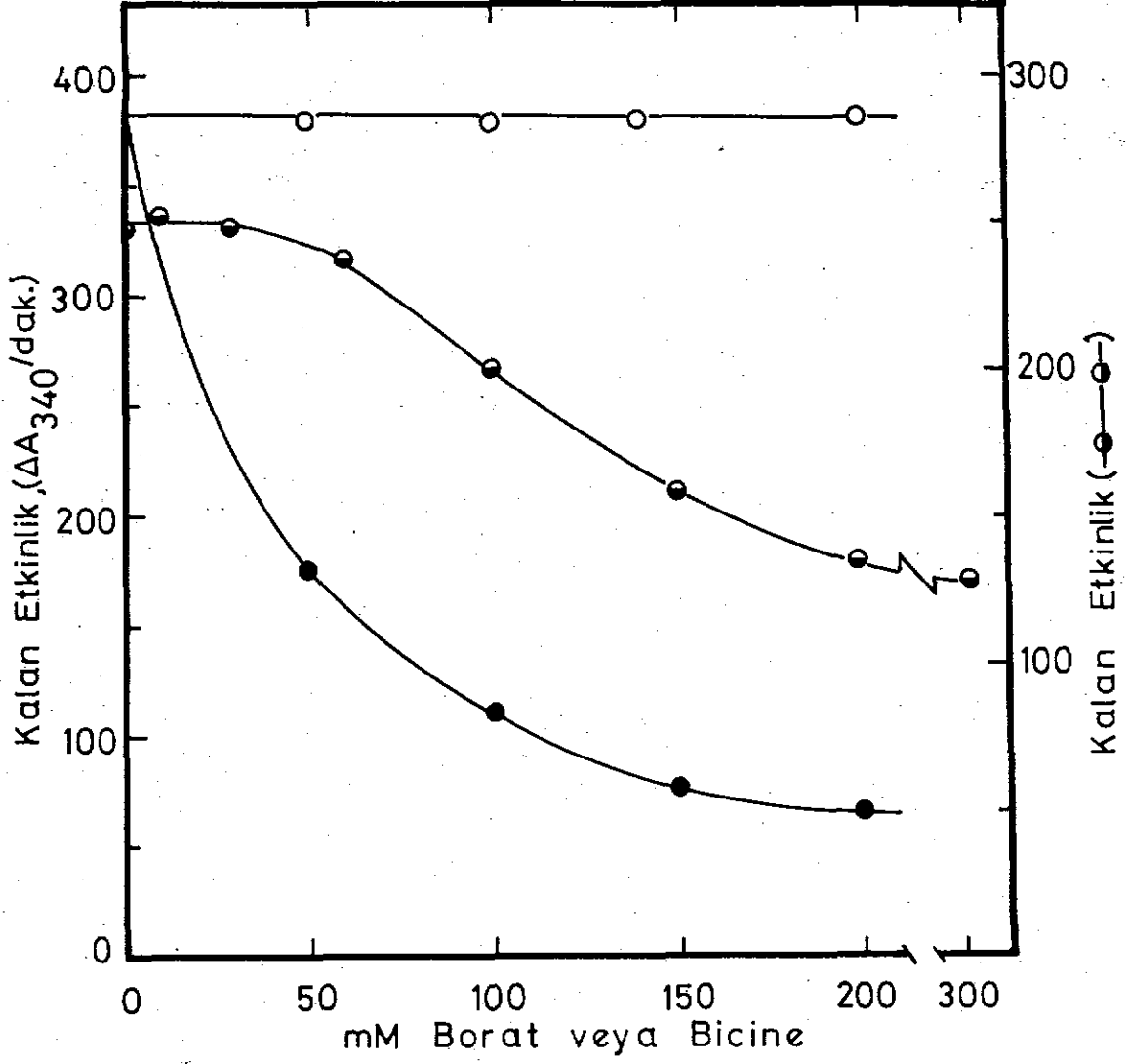


ŞEKİL 12. İnsan Alyuvar Piruvat Kinazının BD ile Modifikasyonunun pH Bağımlılığı.

(—○—) Bicine tamponu (200 mM)

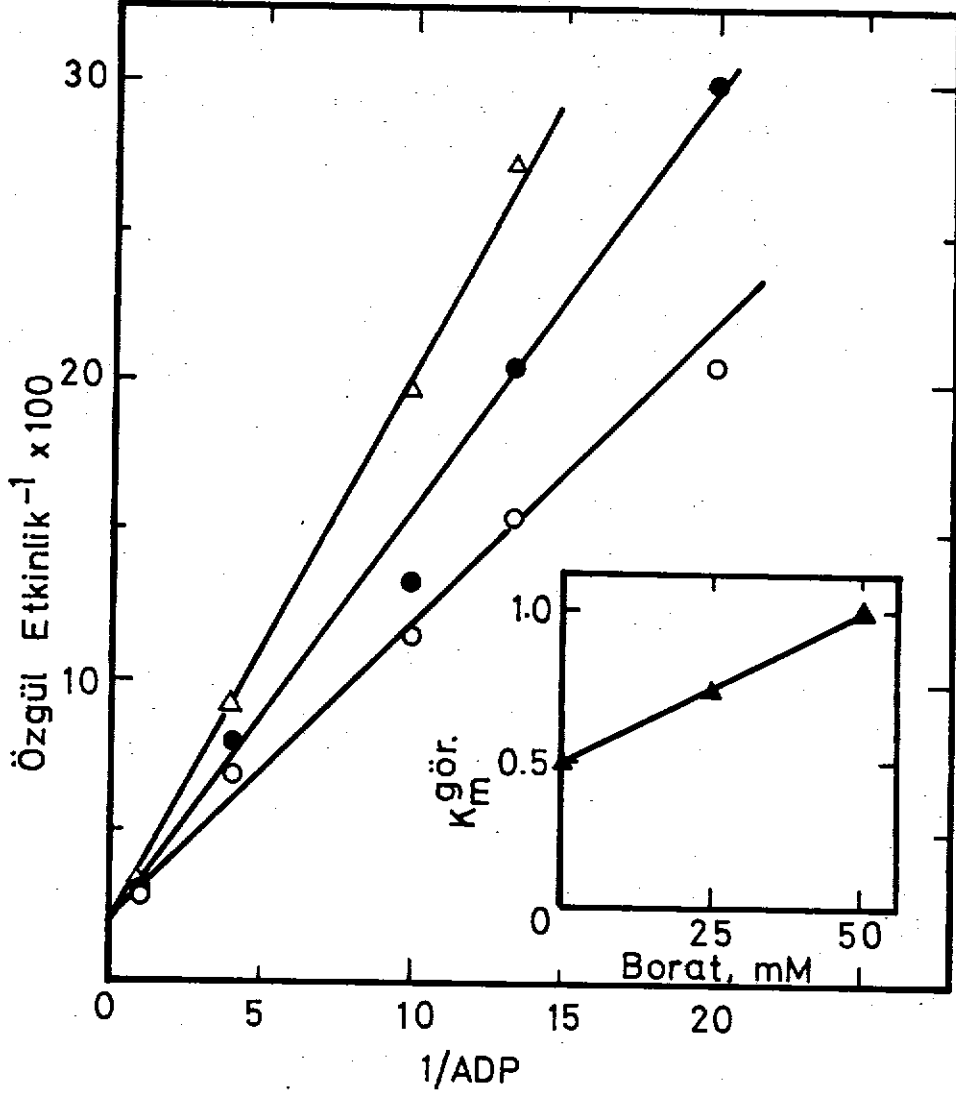
(—●—) Bicine-borat tamponu (200 mM-100 mM)

(Enzim miktarı 2.56 µg/ 0.1 ml modifikasyon ortamı, 50 mM BD).



ŞEKİL 13. İnsan Alyuvar Piruvat Kinazına Boratın Etkisi.

- (—●—) Borat tamponunda (pH: 8.0) etkinlik, ADP - 2 mM.
- (—○—) Borat tamponunda (pH: 8.0) etkinlik, ADP - 0.2 mM.
- (—○—) Bicine tamponunda (pH: 8.0) etkinlik, ADP - 2 mM.



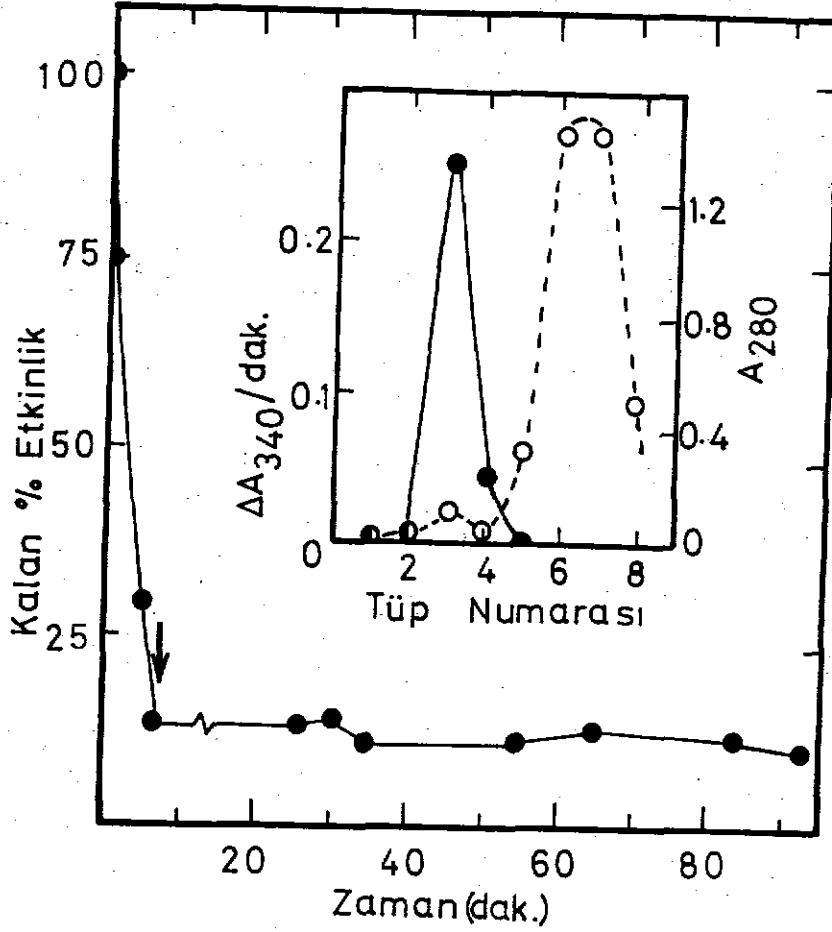
ŞEKİL 14. İnsan Alyuvar Piruvat Kinazının Çeşitli Borat Derişim-
lerindeki Etkinliğinin Lineweaver-Burk Çizimi (pH: 8.0).

(—○—) Borat içermeyen kontrol

(—●—) 25 mM borat varlığında

(—△—) 50 mM borat varlığında

(İçteki şekilde gözlenen K_m değerlerinin borat derişimine bağlı olarak artışı görülmektedir).

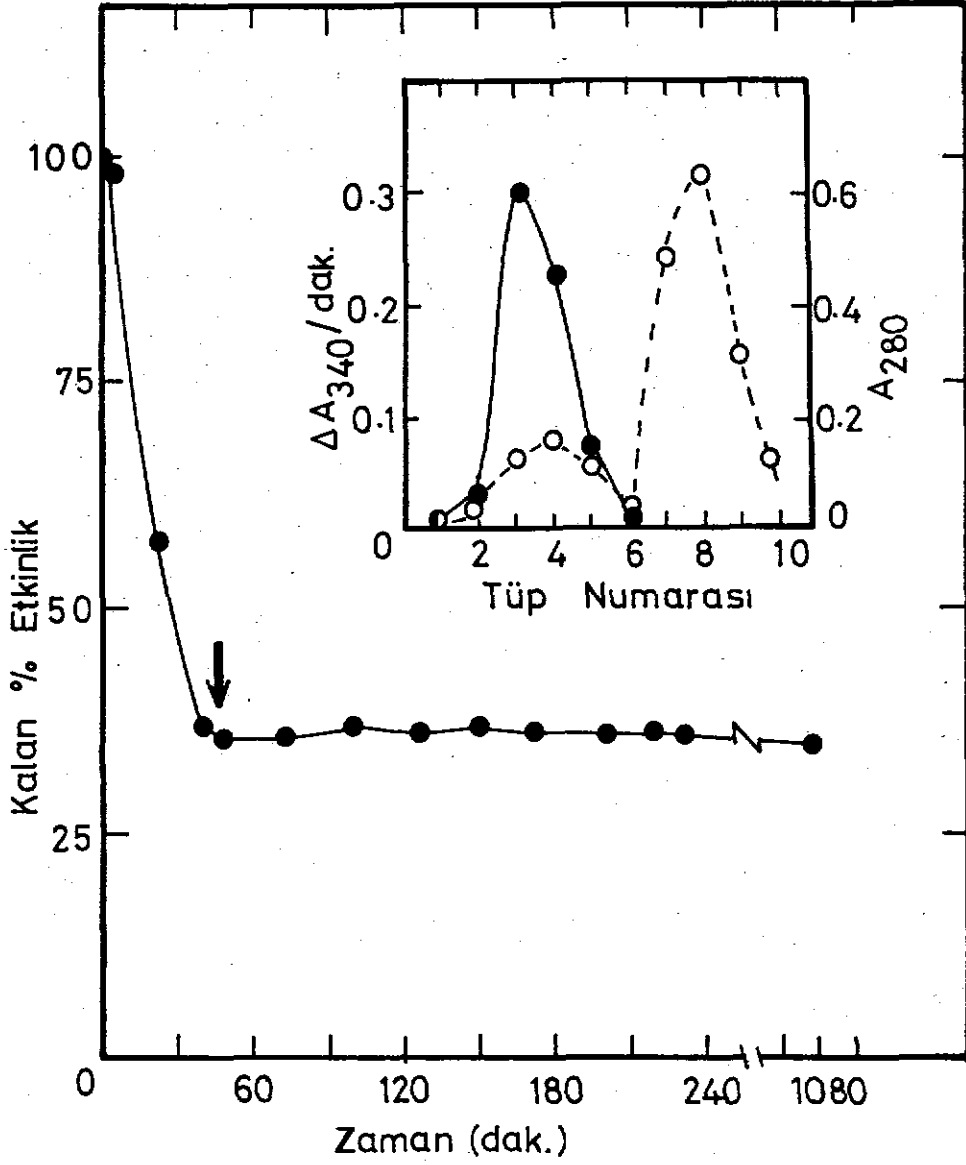


ŞEKİL 15. İnsan Alyuvar Piruvat Kinazının Bicine Tamponunda (200 mM Bicine, pH: 8.0) BD ile (200 mM) Modifikasyonunun Tersinirliği. Toplam protein 190 µg, kesit hacmi 0.4 ml.

(—●—) Etkinlik

(---○---) Absorbans, 280 nm

(Ok ile işaretlenen noktada Sephadex G-25 kolonuna uygulandı. İçteki şekilde kromatografi ile enzimin BD'den ayrıldığı görülmektedir).



ŞEKİL 16. İnsan Alyuvar Piruvat Kinazının Bicine-Borat Tampomunda (200 mM-100 mM, pH: 8.0) BD ile (140 mM) Modifikasyonunun Tersinirliği. Toplam protein 250 μ g, kesit hacmi 0.4 ml.

(—●—) Etkinlik

(--○--) Absorbans, 280 nm

(Ok ile işaretlenen noktada Sephadex G-25 kolonuna uygulandı. İçteki şekilde kromatografi ile enzimin BD'den ayrıldığı görülmektedir).

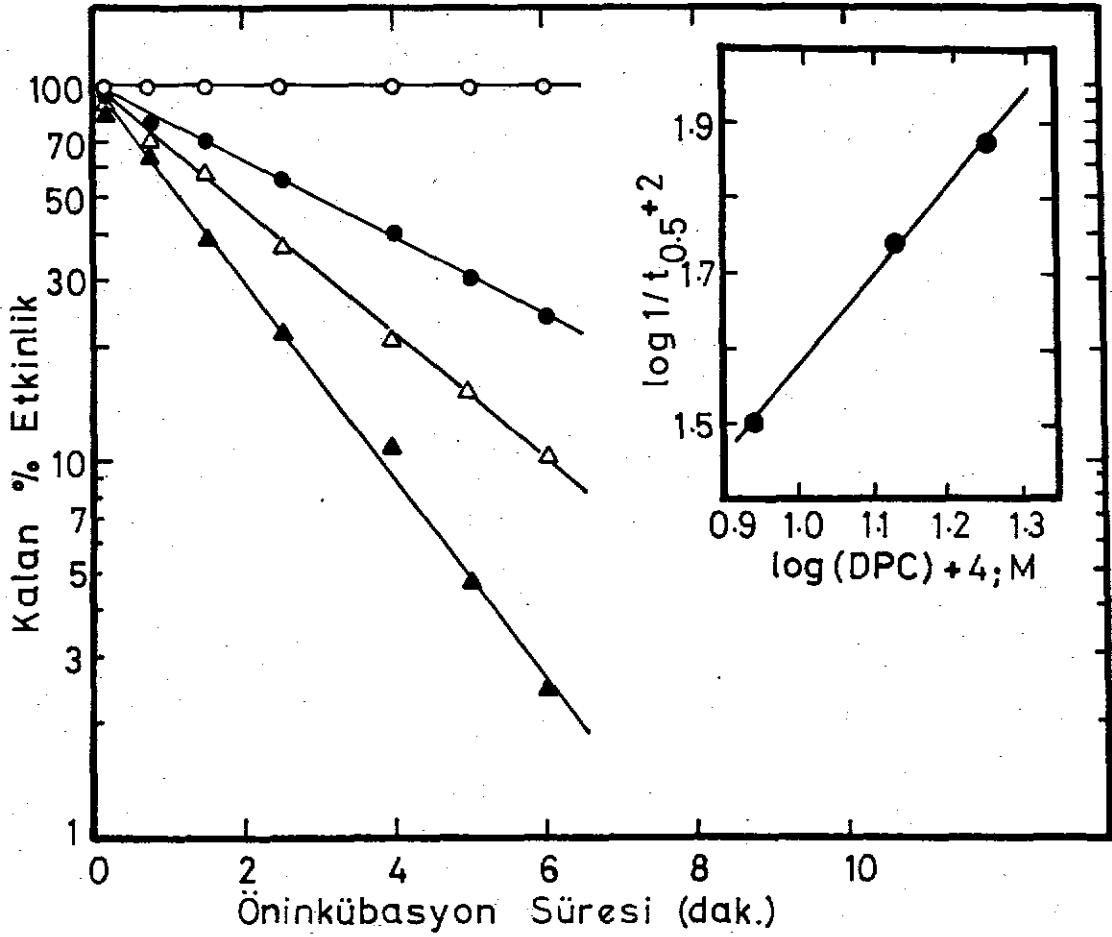
3.2. PİRUVAT KİNAZIN DİETİLPIROKARBONAT İLE MODİFİKASYONU

İnsan alyuvar piruvat kinazı özgül bir histidin reaktifi olan DPC ile inaktive edildi. DPC ile inaktivasyonun görünür birinci dereceden kinetiğine uyduğu Şekil 17'de görülmektedir.

DPC modifikasyonunda kullanılan enzim, % 10 gliserol (v/v) içeren 50 mM potasyum fosfat tamponuna karşı (pH: 6.8) iki kez diyaliz edildi (Toplam 36 saat süre ile). Böylece DPC ve türevleri ile tepkimeye giren, amonyum sülfattan gelen nitrojen bazı (32) uzaklaştırıldı. Bu şekilde hazırlanan enzimin DPC ile modifikasyonu ve modifikasyonun DPC derişimine olan bağımlılığı Şekil 17 ve 18'de görülmektedir.

Dietilpirokarbonat ile piruvat kinazın inaktivasyonun PEP, ADP, ATP, veya $MgSO_4$ 'ın modifikasyon ortamında bulunması durumunda görünür birinci derece kinetiğine uyma özelliğini yitirdiği gözlemlendi (Şekil 19-21). Ortamda bu koruyucu ligandlardan birinin bulunması durumunda iki faz halindeki bir inaktivasyon görüldü. İnaktivasyonun birinci fazı koruyucu liganddan hiç bir şekilde etkilenmediği halde; inaktivasyonun ikinci fazının, ligandın çeşidine ve derişimine bağlı olmak üzere değişik oranlarda korunduğu bulundu (Şekil 19-21). $MgADP$ 'nin ADP'den daha etkili olarak inaktivasyonun ikinci fazını koruduğu, inaktivasyonun birinci fazının ise Mg^{++} 'un varlığı veya yokluğu ile etkilenmediği bulundu (Şekil 19). Enzimin DPC ile inaktivasyonuna PEP tarafından gösterilen koruyucu etkinin ATP ve ADP'den az olduğu görüldü (Şekil 20). Keza FDP enzimin DPC ile inaktivasyonuna karşı tümüyle etkisizdir (Şekil 20).

Yalnız başına, piruvat kinazın DPC ile inaktivasyonuna karşı önemli oranda koruyucu etki göstermeyen Mg^{++} 'un ADP'nin ve özellikle de ATP'nin koruyucu etkilerini arttırdığı bulundu (Şekil 21). Koruyucu etkilerin bir özelliği de; koruyucu ligand, çeşidine ve derişimine bağlı olarak ikinci fazdaki inaktivasyonun yarı ömrünü ($t_{0.5}$) arttırırken, diğer taraftan $t_{0.5}$ 'e

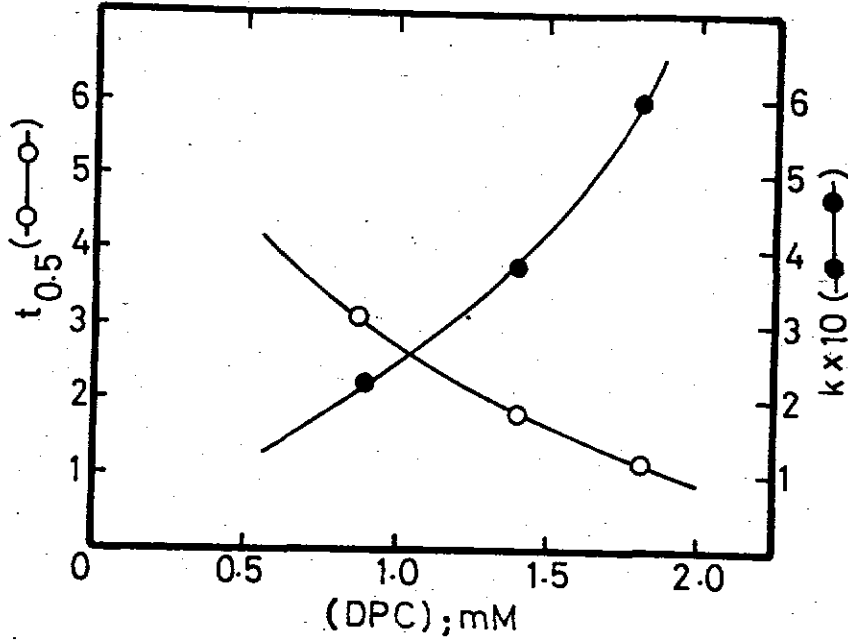


ŞEKİL 17. İnsan Alyuvar Piruvat Kinazının Diethylpirokarbonat ile Modifikasyonunun DPC Derişimine Bağımlılığı.

(—○—) Kontrol, (—●—) 0.89 mM DPC, (—△—) 1.34 mM DPC,
(—▲—) 1.78 mM DPC.

(İçteki şekilde DPC ile modifikasyonun DPC derişimine göre görünür derecesi görülmektedir n=1.30).

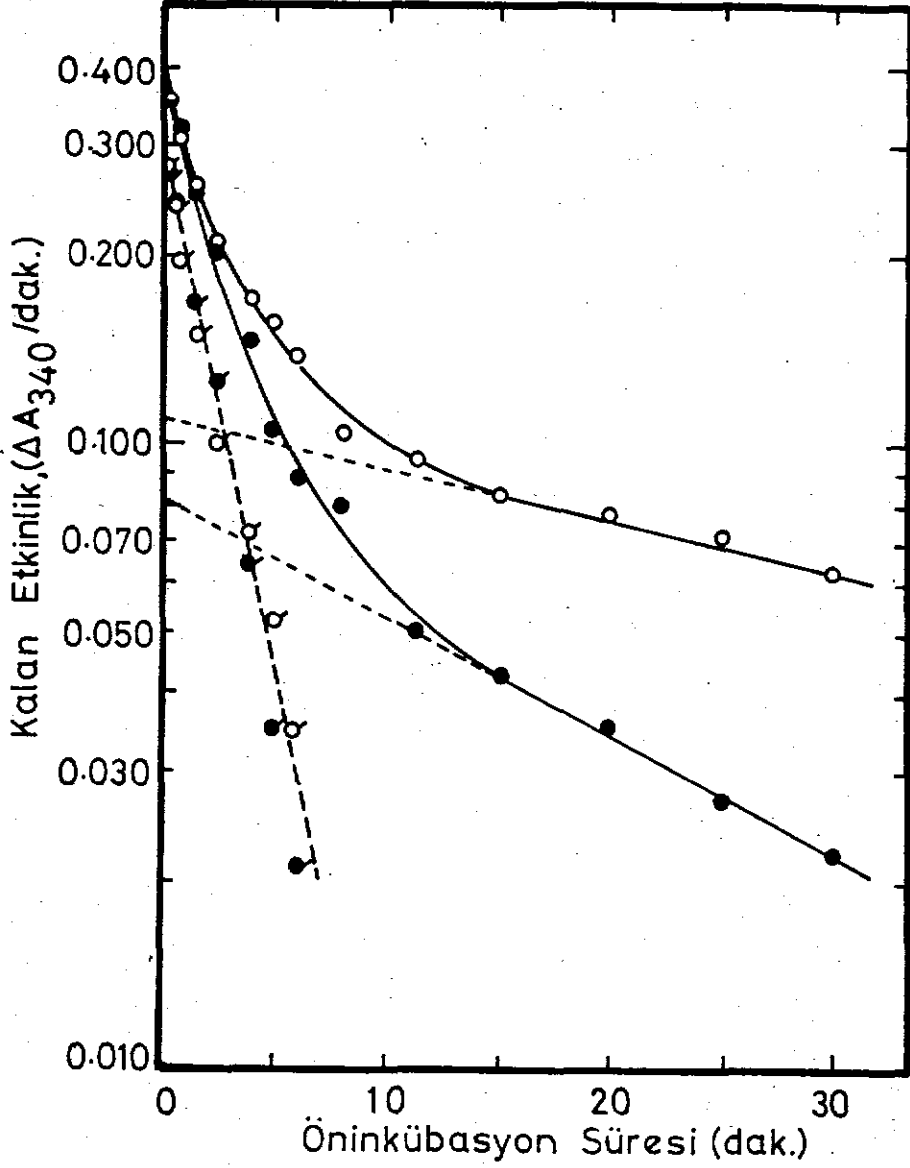
(pH: 6.8, Enzim miktarı 2 µg/ 0.1 ml modifikasyon ortamı)



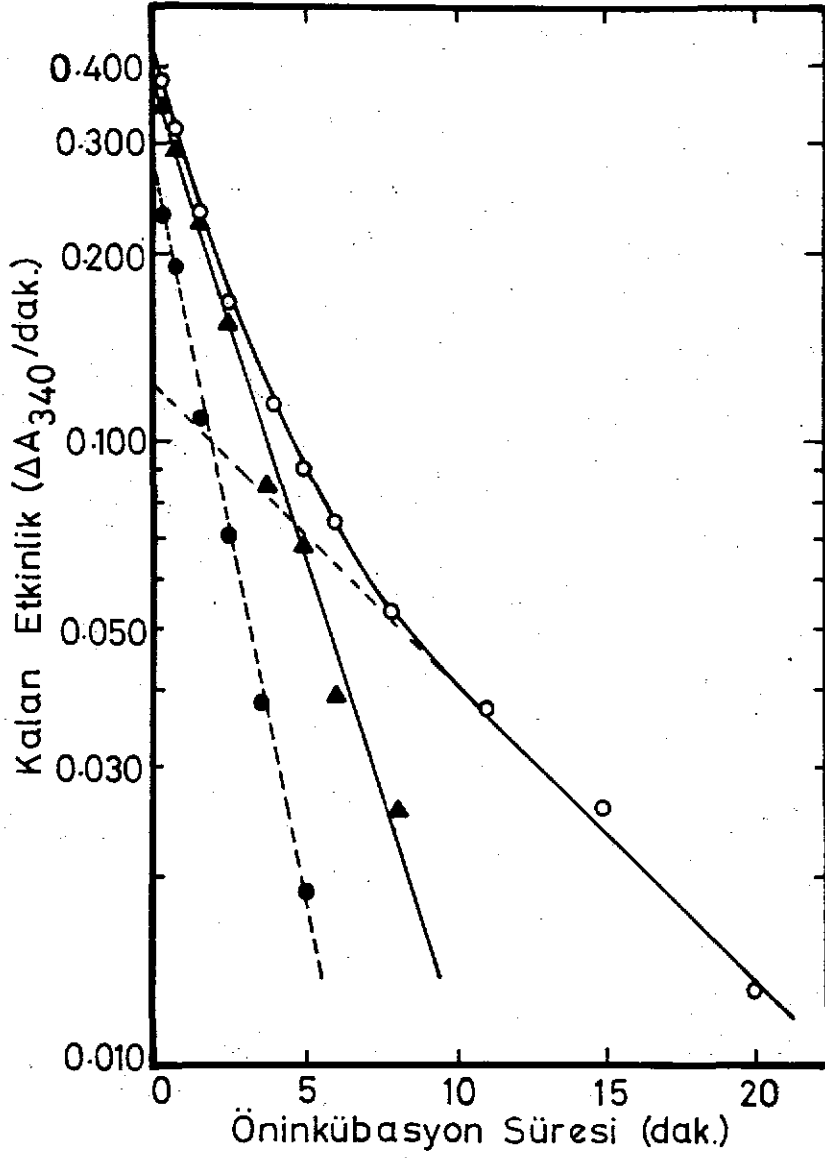
ŞEKİL 18. İnsan Alyuvar Piruvat Kinazının DPC ile Modifikasyonunda DPC Derişimi ile İnaktivasyon Hız Değişmezleri ve $t_{0.5}$ Arasındaki ilişki.

(—●—) İnaktivasyon Hız Değişmezleri, (—o—) $t_{0.5}$.

bağlı olmaksızın enzimi ne oranda koruyacağını belirlemektedir. Örneğin, inaktivasyonun birinci fazı gözönüne alınmazsa, MgATP enzimi DPC inaktivasyonuna karşı % 100'e yakın bir verimle koruyor görünmektedir (Şekil 21). İnaktivasyonun ikinci fazındaki ve ikinci fazdaki etkinlik değerlerinin çıkarılması ile elde edilen birinci fazındaki inaktivasyona çeşitli ligandların koruyucu etkileri Tablo IV'de verilmiştir.



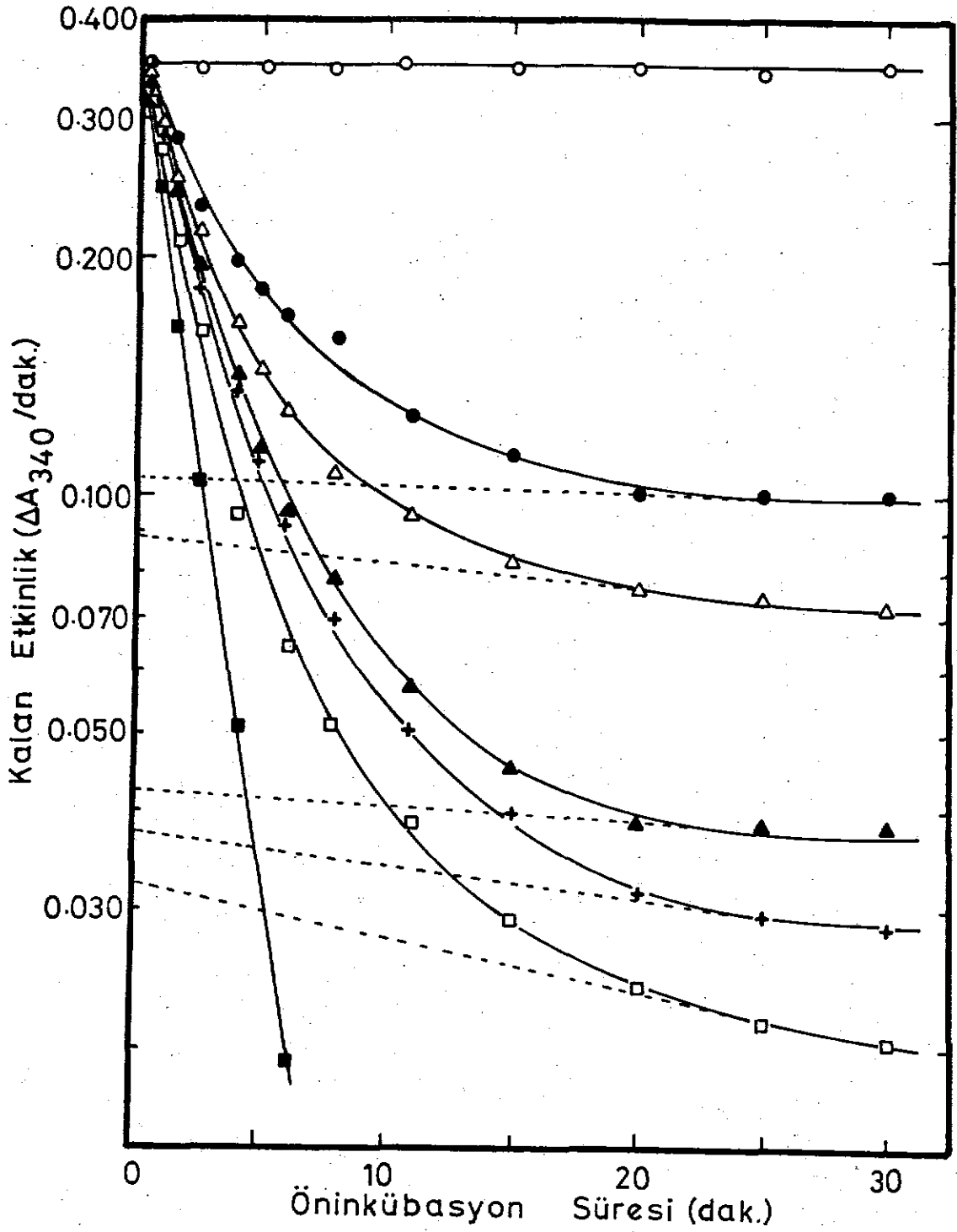
ŞEKİL 19. İnsan Alyuvar Piruvat Kinazının DPC (1.34 mM) ile Modifikasyonuna ADP ve MgADP'nin Koruyucu Etkileri. (—●—) 4 mM ADP, (—○—) 4 mM ADP + 25 mM MgSO_4 , (---○---) ve (---●---) ADP ve MgADP İçeren Ortamda İnaktivasyonun Birinci Fazı. (pH: 6.8, Enzim miktarı 2 $\mu\text{g}/0.1$ ml modifikasyon ortamı)



ŞEKİL 20. İnsan Alyuvar Piruvat Kinazının DPC (1.34 mM) ile Modifikasyonuna PEP ve FDP'nin Etkileri.

(—▲—) 1 mM FDP, (—○—) 4 mM PEP, (--●--) 4 mM içeren Ortamda İnaktivasyonun Birinci Fazı.

(pH: 6.8, Enzim miktarı 2 µg / 0.1 modifikasyon ortamı)



ŞEKİL 21. İnsan Alyuvar Piruvat Kinazının DPC (1.34 mM) ile Modifikasyonuna Mg ve MgATP'nin Koruyucu Etkileri.

(—○—) Kontrol, (—●—) 4 mM ATP + 25 mM MgSO₄, (—△—) 1 mM ATP + 25 mM MgSO₄, (—▲—) 0.25 mM ATP + 25 mM MgSO₄, (—+—) 4 mM ADP, (—□—) 25 mM MgSO₄, (—■—) 1.34 mM DPC İçeren Kontrol.

(pH: 6.8, Enzim miktarı 2 µg/ 0.1 ml modifikasyon ortamı)

Tablo IV. İnsan Alyuvar Piruvat Kinazının Diethylpirokarbonat ile inaktivasyonunun Birinci ve İkinci Fazında Çeşitli Ligandların Koruyucu Etkileri^a

Ligand ve Derişimi	I Faz	II Faz
Hiçbiri	1.81	-
PEP, 4 mM	1.30	5.80
FDP, 1 mM	2.00	-
MgSO ₄ , 25 mM	1.80	25.00
ADP, 4 mM	1.80	25.50
MgADP, 4 mM ADP + 25 mM MgSO ₄	2.00	34.30
ATP, 4 mM	1.80	19.50
MgATP, 0.25 mM ATP + 25 mM MgSO ₄	2.45	68.30
1 " "	2.50	70.00
4 " "	2.60	112.80

^aInaktivasyonun birinci fazı, ikinci fazın ekstrapolasyonu ile bulunan etkinlik değerlerinin toplam etkinlik değerlerinden çıkarılması ile elde edilmiştir (Şekil 19-21).

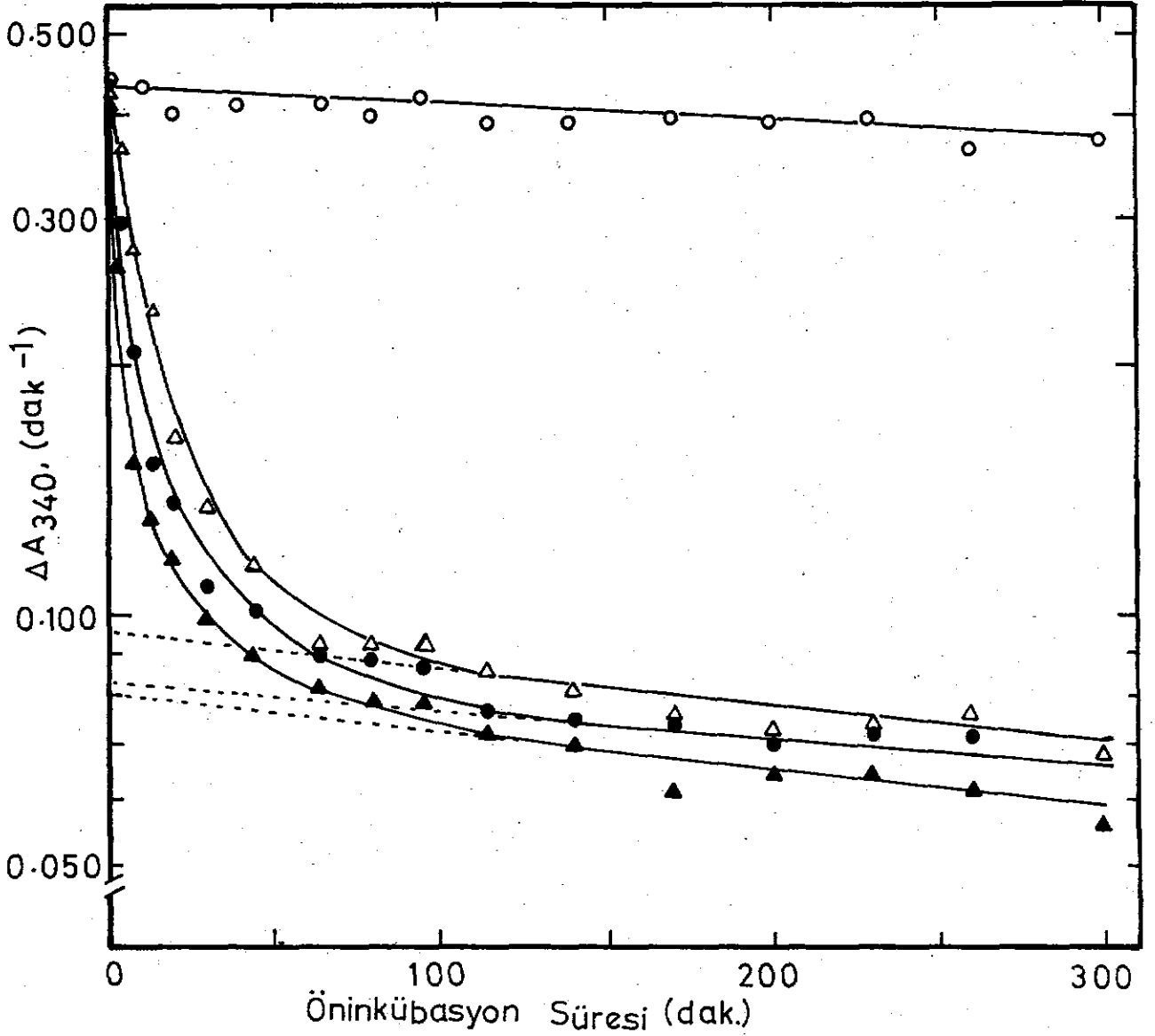
3.3. PİRUVAT KİNAZIN N-ETİLMALİİMİD İLE MODİFİKASYONU

Alyuvar piruvat kinazı, özgül sistein reaktiflerinden biri olan NEM ile inaktive edildi. NEM ile modifikasyonda enzim tümüyle inaktive olamamakta; % 18-20 oranındaki etkinliğini devamlı olarak korumaktadır (Şekil 22). Bu kalan etkinlikte, uzun süre izlenme ile gözlenen etkinlik kaybı, reaktif içermeyen kontrol örneğinde de görülen etkinlik kaybı ile paralel görünmektedir (Şekil 22).

Piruvat kinazın NEM ile inaktivasyonunun NEM derişimine olan bağımlılığı Şekil 23'de verilmiştir. Enzimin modifikasyon ile yitirmediği etkinlik değerleri, toplam etkinlik değerlerinden çıkarılırsa, NEM ile inaktivasyonun görünür birinci dereceden kinetiğine uyduğu Şekil 24'de görülmektedir.

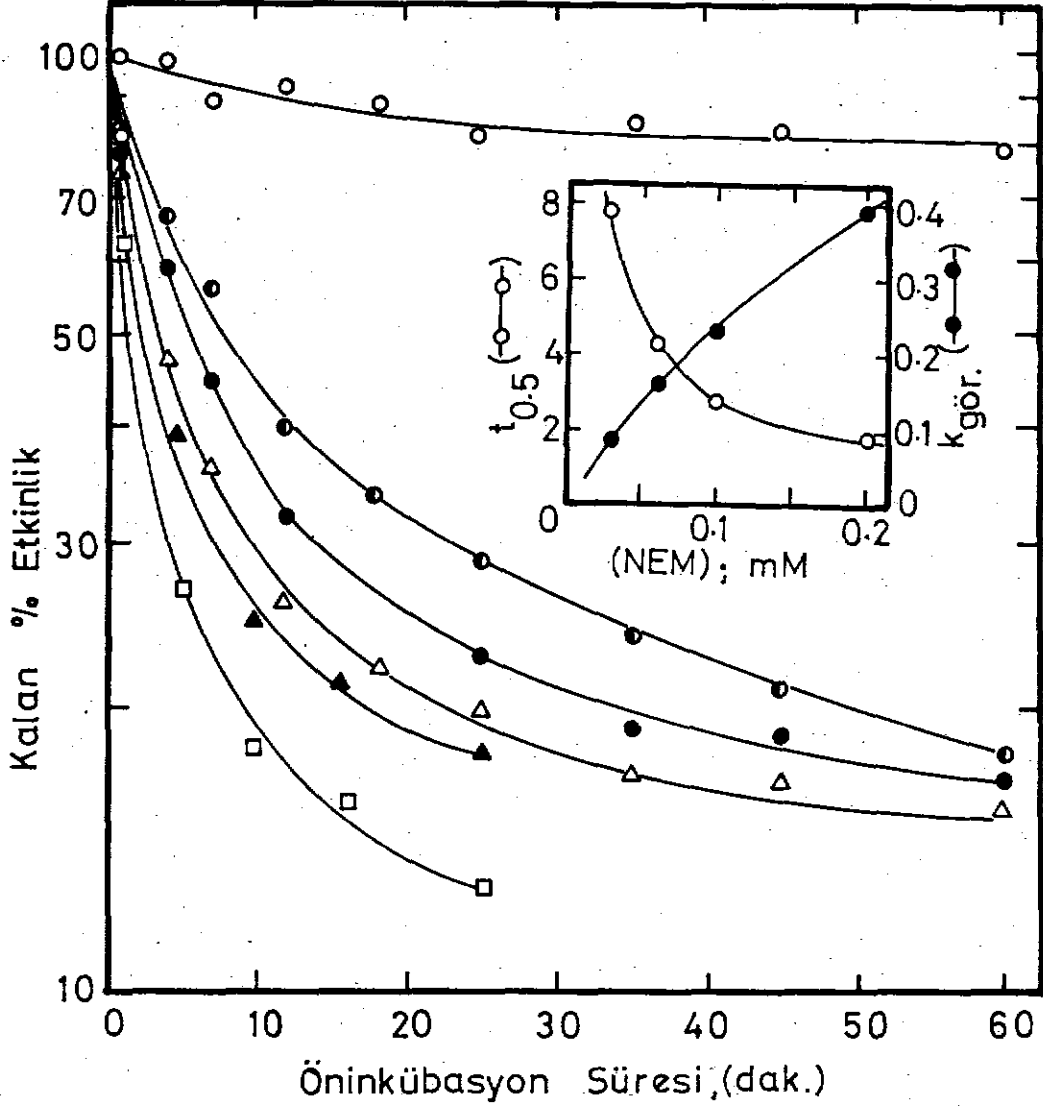
Piruvat kinazın NEM ile inaktivasyonuna karşı adenin nükleotidlerinin hiç bir koruyucu etkisi görülmedi. KCl ve FDP'da koruyucu etkiden yoksundur (Şekil 25). Buna karşın $MgSO_4$ kısmen, PEP ise etkili bir şekilde inaktivasyona karşı koruyucu etki göstermektedir (Şekil 25, 26). $MgSO_4$ 'ın kısmi koruyucu etkisi, modifikasyon ortamında ADP varsa ortadan kalkmaktadır (Şekil 26). $MgSO_4$ 'ın koruyucu etkisinin Mg^{++} 'dan mı, yoksa $SO_4^{=}$ 'dan mı geldiği araştırıldığında; $MgCl_2$ 'nin $MgSO_4$ kadar etkili bir şekilde inaktivasyonu engellediği; buna karşılık Na_2SO_4 'ın etkisiz olduğu gözlemlendi (Şekil 26).

NEM ile modifikasyonda enzimin yitirmediği etkinlik değerleri, toplam etkinlik değerlerinden çıkarılarak grafikleme yapıldığında, adenin nükleotidleri ve Na_2SO_4 içeren enzim örnekleri birinci dereceden kinetiğine uygun olarak inaktive oldukları halde (Şekil 27); PEP, KCl, FDP, $MgCl_2$ ve $MgSO_4$ 'ın koruyucu olarak kullanıldıkları deneylerde, inaktivasyonun kinetiğini görünür birinci dereceden bir inaktivasyona indirgeyemediler (Şekil 27, 28).



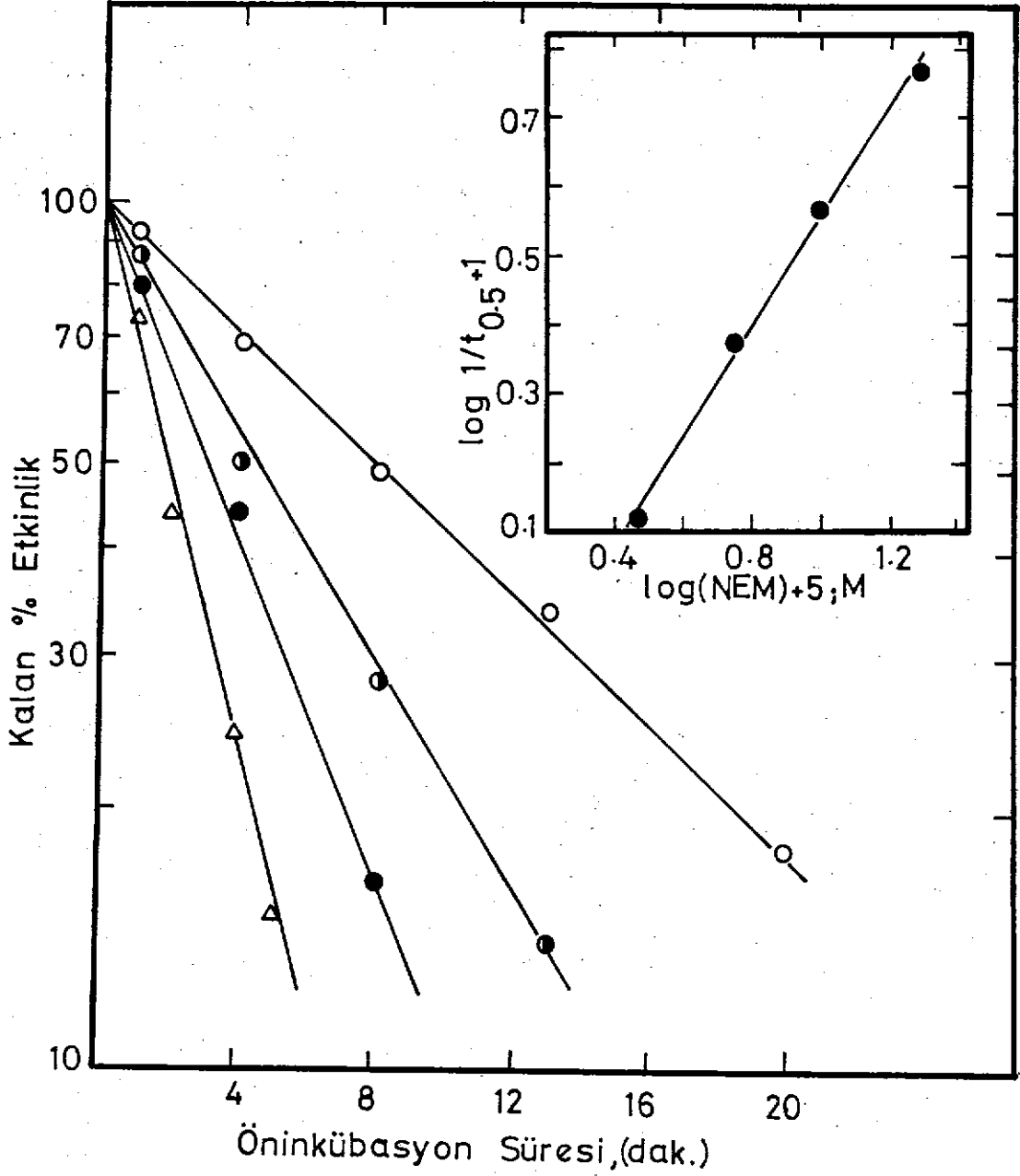
ŞEKİL 22. İnsan Alyuvar Piruvat Kinazının NEM ile Modifikasyonu
(pH: 7.55, Enzim miktarı 2.1 $\mu\text{g}/0.1$ ml modifikasyon ortamı)

(— Δ —) 0.03 mM NEM, (— \bullet —) 0.06 mM NEM, (— \blacktriangle —) 0.1 mM NEM
(— \circ —) Kontrol



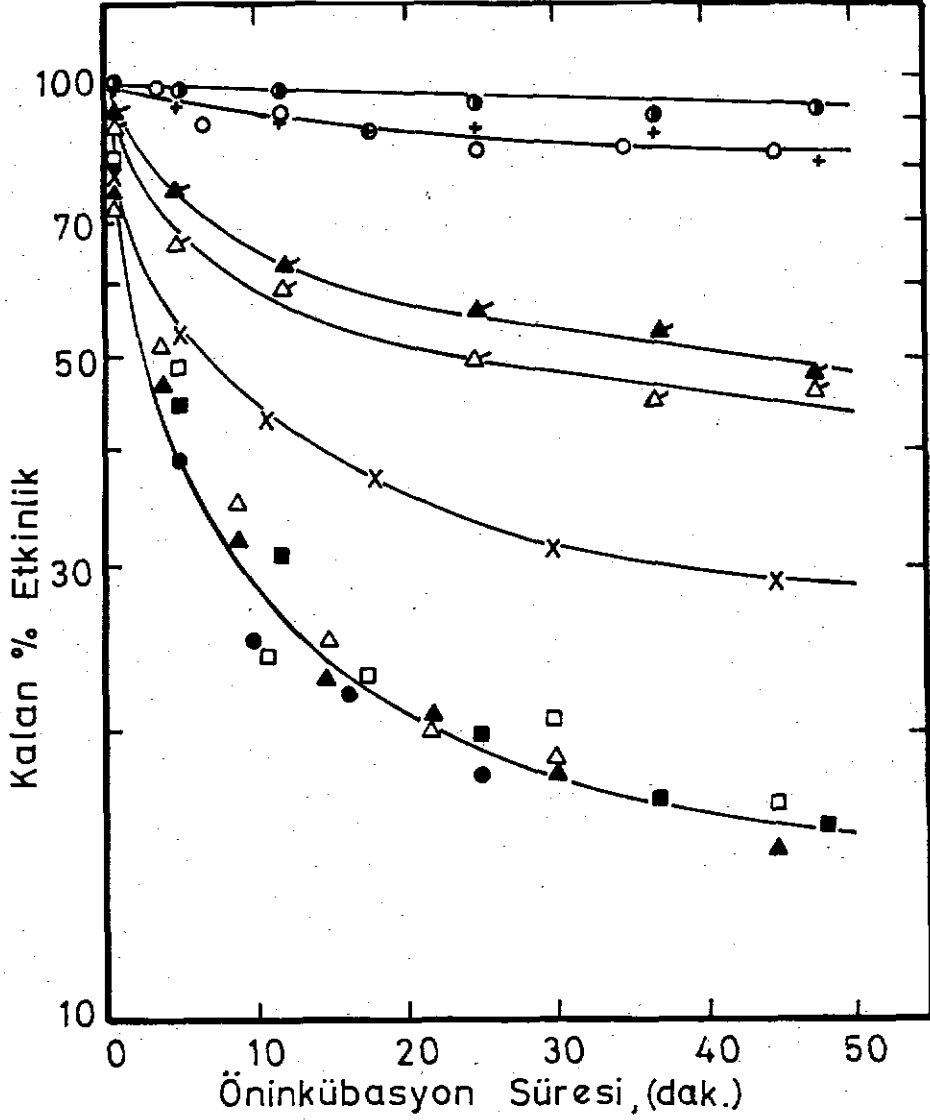
ŞEKİL 23. İnsan Alyuvar Piruvat Kinazının NEM ile Modifikasyonunun NEM Derişimine Bağımlılığı (pH: 7.55, Enzim miktarı 2.1 µg/ 0.1 ml modifikasyon ortamı)

(—○—) 0.025 mM NEM, (—●—) 0.050 mM NEM, (—△—) 0.075 mM NEM
(—▲—) 0.100 mM NEM, (—□—) 0.200 mM NEM, (—○—) Kontrol
(İçteki şekilde NEM derişimi ile $t_{0.5}$ ve $k_{gör}$ arasındaki ilişki görülmektedir)



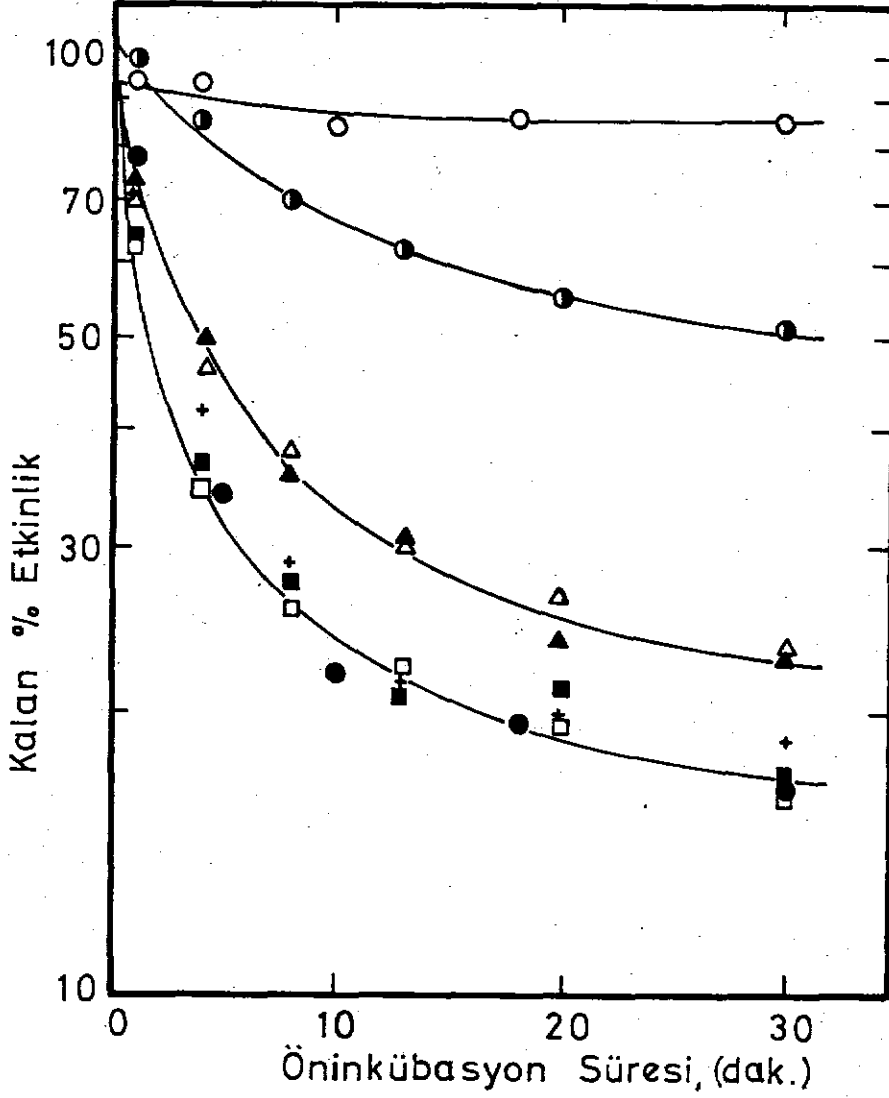
ŞEKİL 24. İnsan Alyuvar Piruvat Kinazının NEM ile Modifikasyonunda İnaktivasyonun Birinci Fazı (Kalan etkinlik değerleri, Şekil 22 ve 23'deki yitirilmeyen etkinlik değerlerinin toplam etkinlik değerlerinden çıkarılması ile elde edilmiştir).

(—○—) 0.03 mM NEM, (—●—) 0.06 mM NEM, (—●—) 0.1 mM NEM,
(—△—) 0.2 mM NEM (n = 0.78)



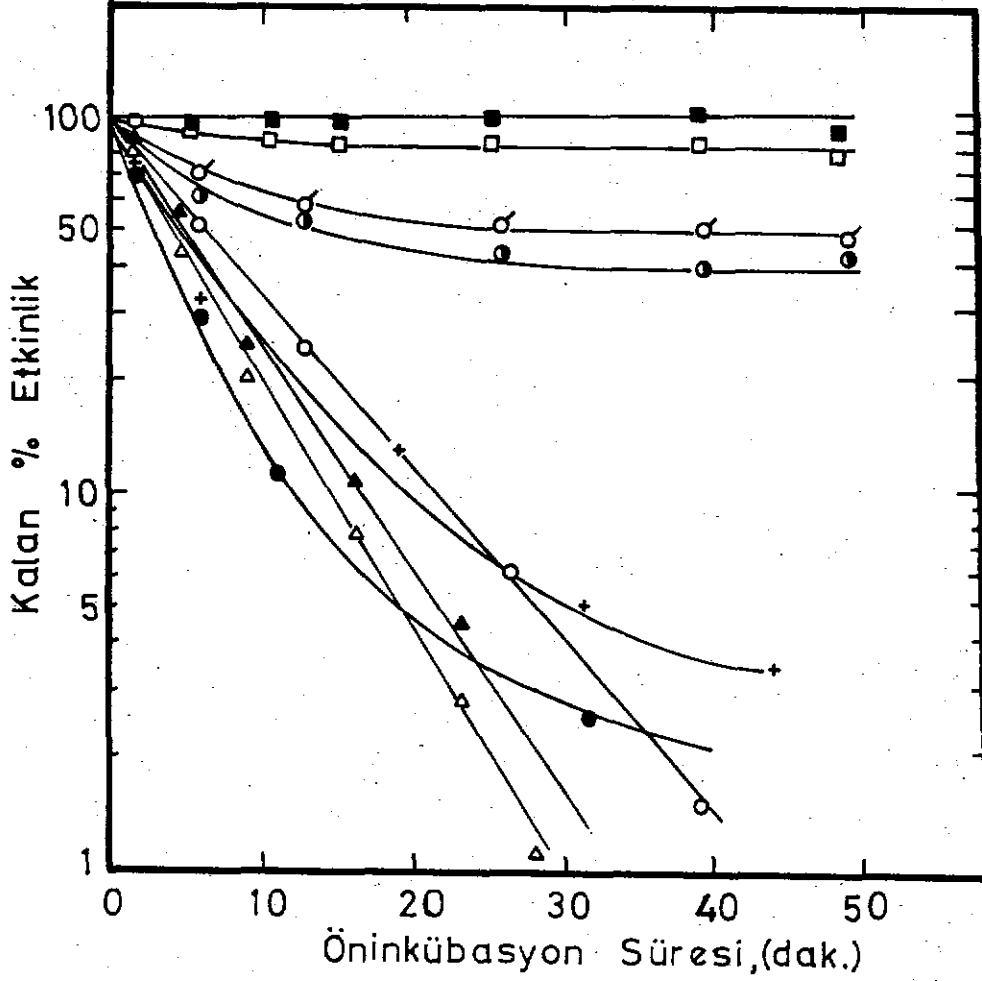
ŞEKİL 25. İnsan Alyuvar Piruvat Kinazının NEM ile İnaktivasyonuna çeşitli ligandların Koruyucu Etkileri (pH:7.55, Enzim miktarı 2.1 µg/ 0.1 ml modifikasyon ortamı, 0.1 mM NEM)

(—○—) Kontrol, (—●—) 0.5 mM PEP, (—+—) 0.2 mM PEP, (—▲—) 0.1 mM PEP, (—△—) 0.05 mM PEP, (—×—) 25 mM MgSO₄, (—■—) 4 mM ADP, (—□—) 0.5 mM FDP, (—▲—) 100 mM KCl, (—△—) 4 mM ATP, (—●—) NEM içeren kontrol



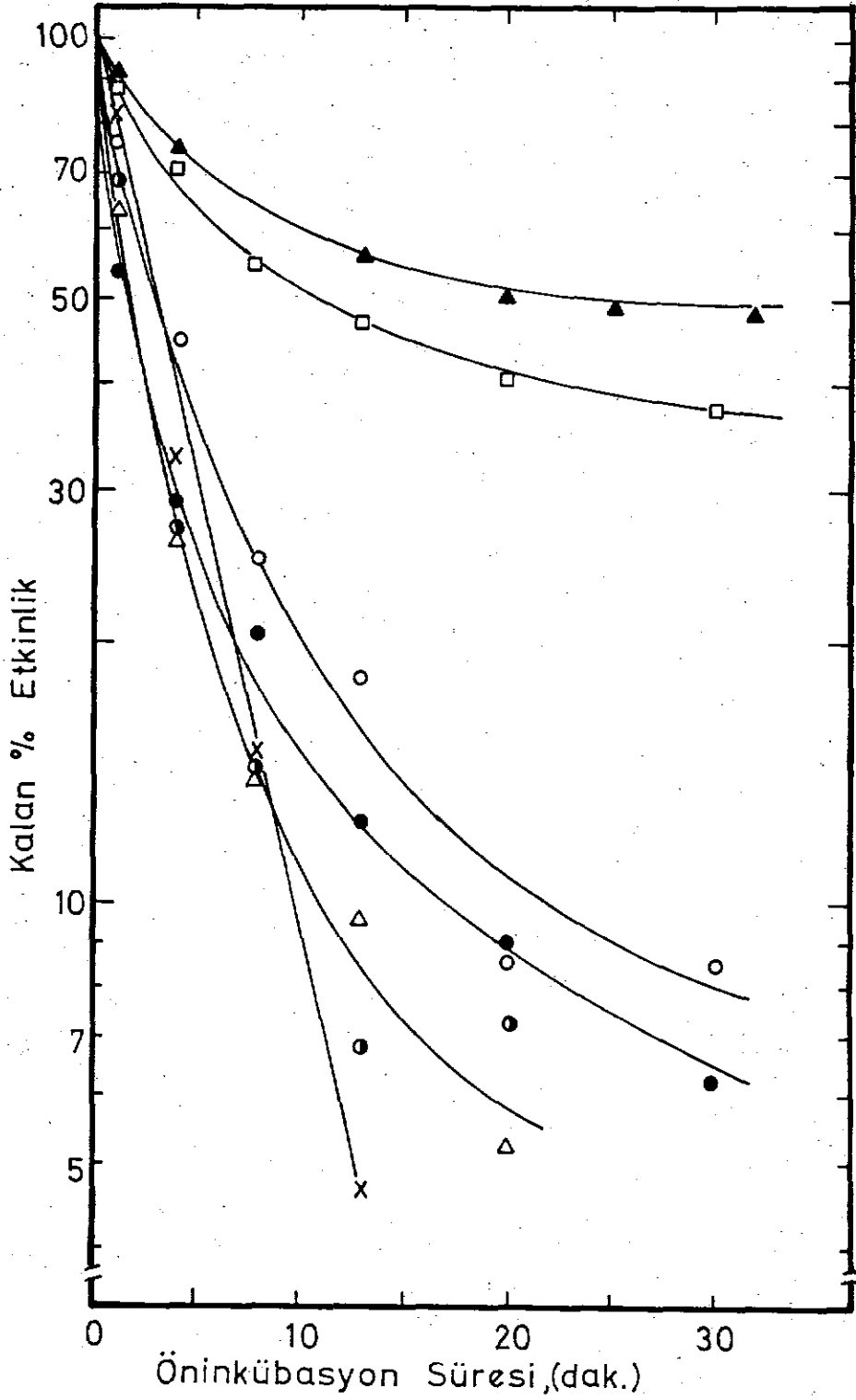
ŞEKİL 26. İnsan Alyuvar Piruvat Kinazının NEM ile İnakti-
vasyonuna Çeşitli Ligandların Koruyucu Etkileri (pH: 7.55,
Enzim miktarı 2.1 µg/ 0.1 ml modifikasyon ortamı, 0.1 mM NEM)

(—○—) Kontrol, (—○●—) 0.1 mM PEP, (—△—) 25 mM MgSO₄,
(—+—) 25 mM Na₂SO₄, (—▲—) 25 mM MgCl₂, (—■—) 4 mM ADP
+ 25 mM MgSO₄, (—□—) 4 mM ATP + 25 mM MgSO₄, (—●—) NEM
içeren kontrol



ŞEKİL 27. Alyuvar Piruvat Kinazının NEM ile İnaktivasyonunun Birinci Fazına Çeşitli Ligandların etkileri

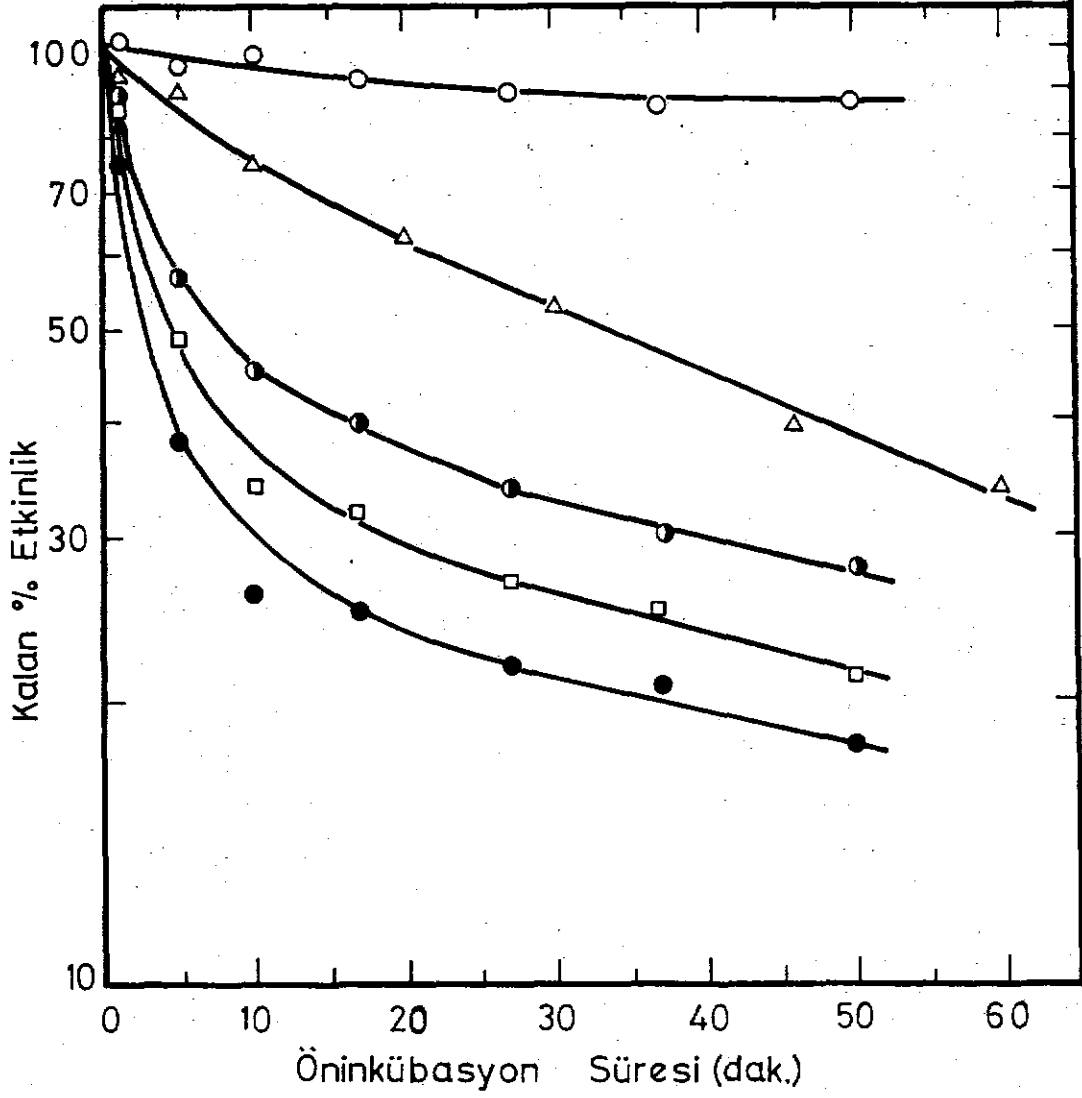
(—■—) 1 mM PEP, (—□—) 0.2 mM PEP, (—○—) 0.1 mM PEP, (—●—) 0.05 mM PEP, (—+—) 0.5 mM FDP, (—●—) 100 mM KCl, (—○—) 2 mM ADP, (—△—) 4 mM ADP (—▲—) 4 mM ATP



ŞEKİL 28. Alyuvar Piruvat Kinazının NEM ile İnaktivasyonunun Birinci Fazına Çeşitli Ligandların Etkileri

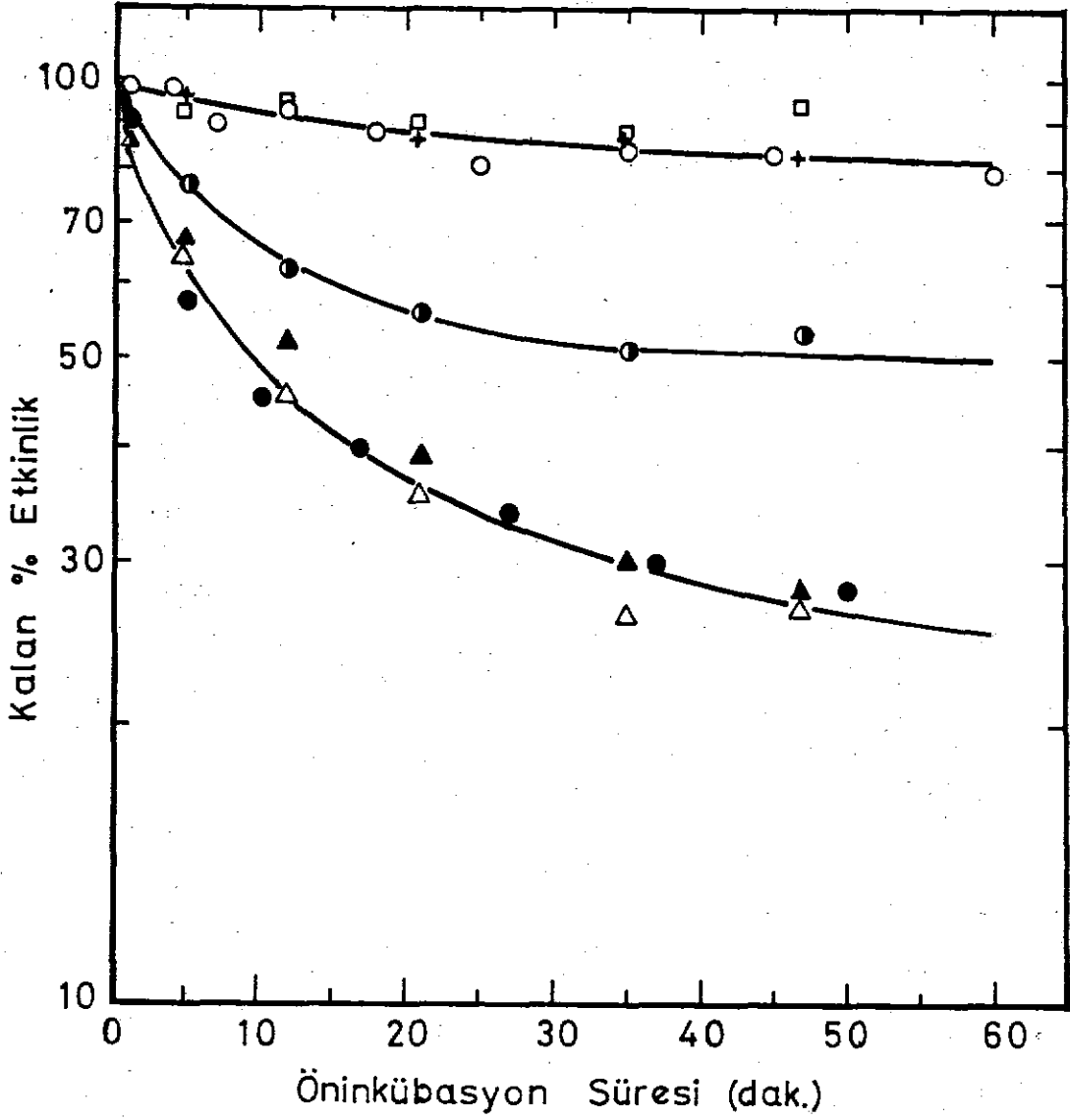
(—▲—) 0.1 mM PEP, (—◻—) 0.1 mM PEP + 25 mM MgSO₄, (—○—) 25 mM MgCl₂, (—●—) 25 mM MgSO₄, (—◐—) 4 mM ADP + 25 mM MgSO₄, (—△—) 4 mM ATP + 25 mM MgSO₄, (—×—) 25 mM Na₂SO₄

İnsan alyuvar piruvat kinazı, histidin ile de tepkimeye girebilen daha az özgül bir sistein reaktifi olan İyodoasetamid ile de inaktive edildi (Şekil 29). Alyuvar piruvat kinazı histidin reaktiflerine karşı duyarlı olduğundan (bkz. DPC ile modifikasyon), enzimin İyodoasetamid ile modifikasyonu detaylı olarak çalışılmadı. Şekil 29 ve 30'dan görüldüğü gibi, piruvat kinazın İyodoasetamid ile modifikasyonunun kinetiği NEM ile modifikasyonun kinetiğine oldukça benzerlik göstermektedir. NEM modifikasyonunda olduğu gibi, piruvat kinazın İyodoasetamid ile modifikasyonunda adenin nükleotidlerinin inaktivasyona karşı hiç bir koruyucu etkileri gözlenmediği halde, PEP'in etkili bir şekilde koruyucu olarak davrandığı bulundu (Şekil 30).



ŞEKİL 29. Alyuvar Piruvat Kinazının İyodoasetamid ile Modifikasyonunun, İyodoasetamid Derişimine Bağımlılığı (pH: 7.55, Enzim miktarı 2.1 µg/ 0.1 ml modifikasyon ortamı)

(—○—) Kontrol, (—△—) 0.2 mM İyodoasetamid, (—○—) 0.5 mM İyodoasetamid, (—□—) 1.0 mM İyodoasetamid, (—●—) 1.5 mM İyodoasetamid



ŞEKİL 30. Alyuvar Piruvat Kinazının İyodoasetamid ile İnaktive-
vasyonuna PEP, ADP ve ATP'nin Koruyucu Etkileri (pH: 7.55,
Enzim miktarı 2.1 µg/ 0.1 ml modifikasyon ortamı, 0.5 mM
İyodoasetamid)

(—○—) Kontrol, (—▲—) 4 mM ATP, (—△—) 4 mM ADP, (—●—)
0.05 mM PEP, (—+—) 0.2 mM PEP, (—□—) 4 mM PEP
(—●—) 0.5 mM İyodoasetamid içeren kontrol

3.4. PİRUVAT KİNAZIN 5,5'-DİTİY0-BİS-2-NİTROBENZOİK ASİT İLE MODİFİKASYONU

Oldukça özgül bir reaktif olan NEM ve daha az özgülükte olan iyodoasetamid ile sistein modifikasyonu, sistein için çok özgül bir reaktif olan DTNB ile tekrarlandı. Sistein modifikasyonlarında DTNB kullanılmasının şu üç önemli üstünlüğü vardır:

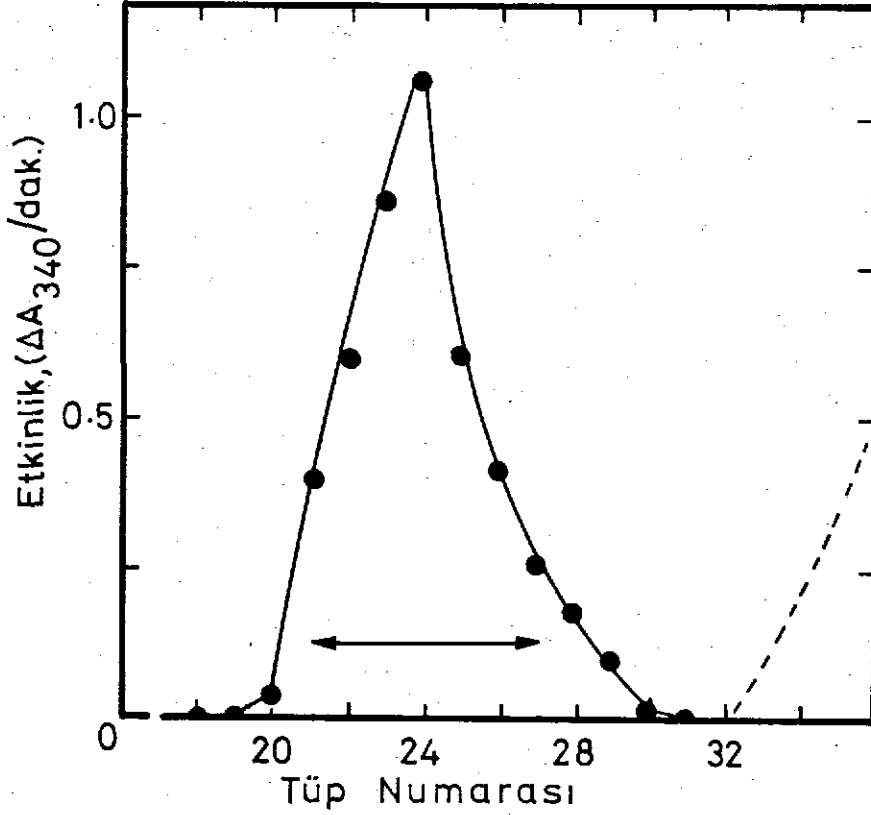
a) Sisteinler için son derece özgüldür, başka bir yan tepkimesi yoktur. Nötral pH'da sisteinler ile kolayca tepkimeye girebilir.

b) Alifatik analoglarına oranla DTNB daha yüksek oksido-redüksiyon potansiyeline sahiptir. Bu nedenle sisteinler ile tepkimesi oldukça kolaydır.

c) DTNB'nin bir mol sistein ile tepkimesi sonunda, bir mol TNB serbest kalır. Açığa çıkan bu ürünü spektrofotometrik olarak tayin etmek son derece kolaydır ($\epsilon=13600$) (67).

Maya (53) ve tavşan kası piruvat kinazlarında (37) olduğu gibi, insan alyuvar piruvat kinazının da DTNB ile inaktivasyona uğradığı bulundu. Alyuvar piruvat kinazı DTNB ile modifiye edilmeden önce, enzim 50 mM HEPES tamponunda (pH: 7.55) 10 mM DTE ile, 30°C'de bir saat inkübe edildi. Böylece enzimin tümüyle indirgenmesi sağlandıktan sonra, 50 mM HEPES tamponu (pH: 7.55) ile dengelenmiş 1x15 cm boyutlarındaki Sephadex G-25 kolonuna uygulandı. Kolon aynı tampon ile yıkanarak enzimin DTE'den ayrılması sağlandı (Şekil 31). Kolondan DTE'nin çıktığı tüpler DTNB ile kontrol edildi. Piruvat kinazın DTNB ile modifikasyonu deneylerinde bu şekilde hazırlanmış enzim kullanıldı.

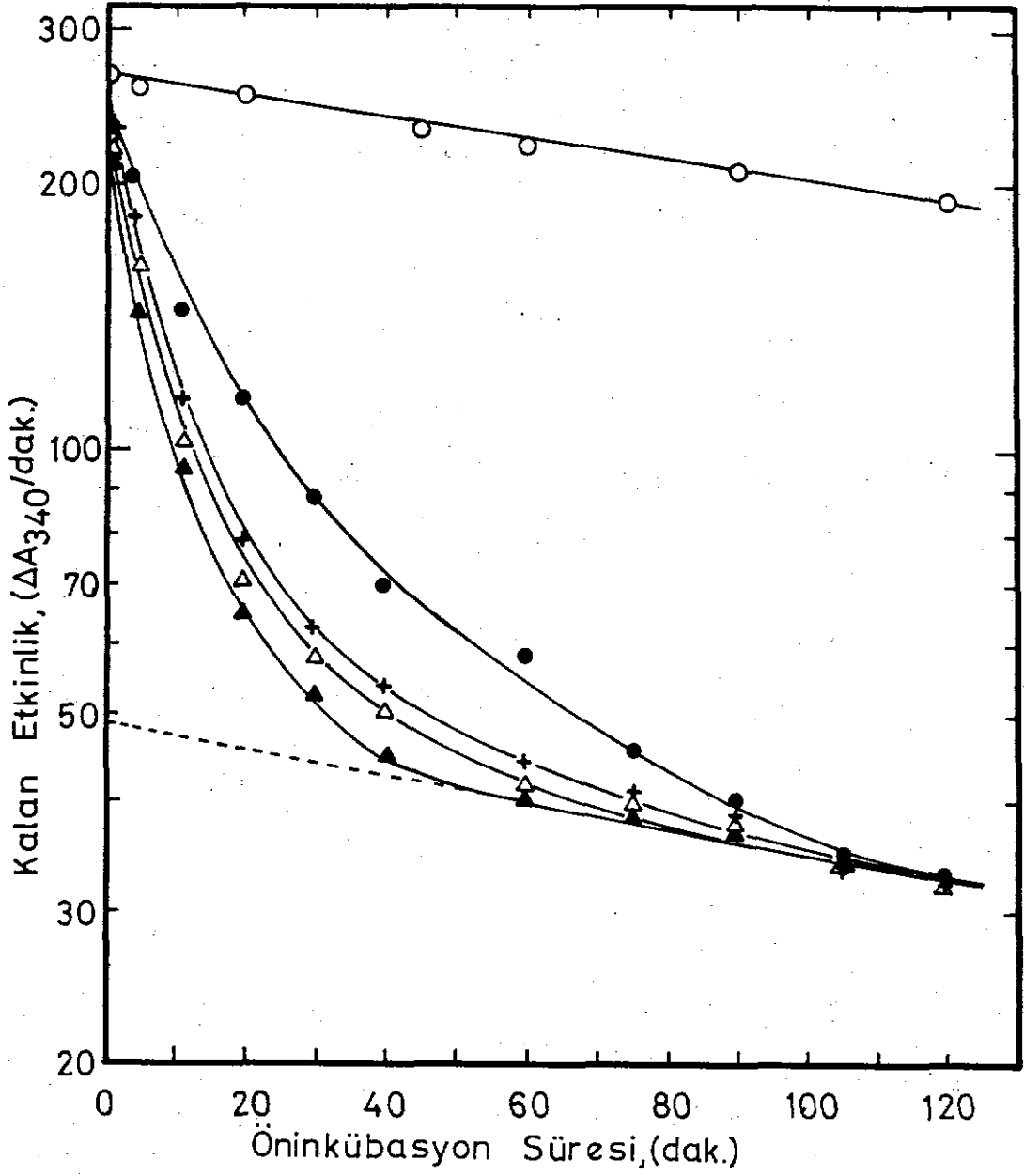
NEM ile modifikasyonda olduğu gibi, piruvat kinazın DTNB ile modifikasyonunda da enzimin tüm etkinliğini yitirmediği ve % 20 kadar etkinliğini koruduğu görüldü (Şekil 32). Enzimin yitirmediği bu etkinlik oranı, DTNB de-



ŞEKİL 31. DTE ile indirgenen Alyuvar Piruvat Kinazının Sephadex G-25 Filtrasyonu

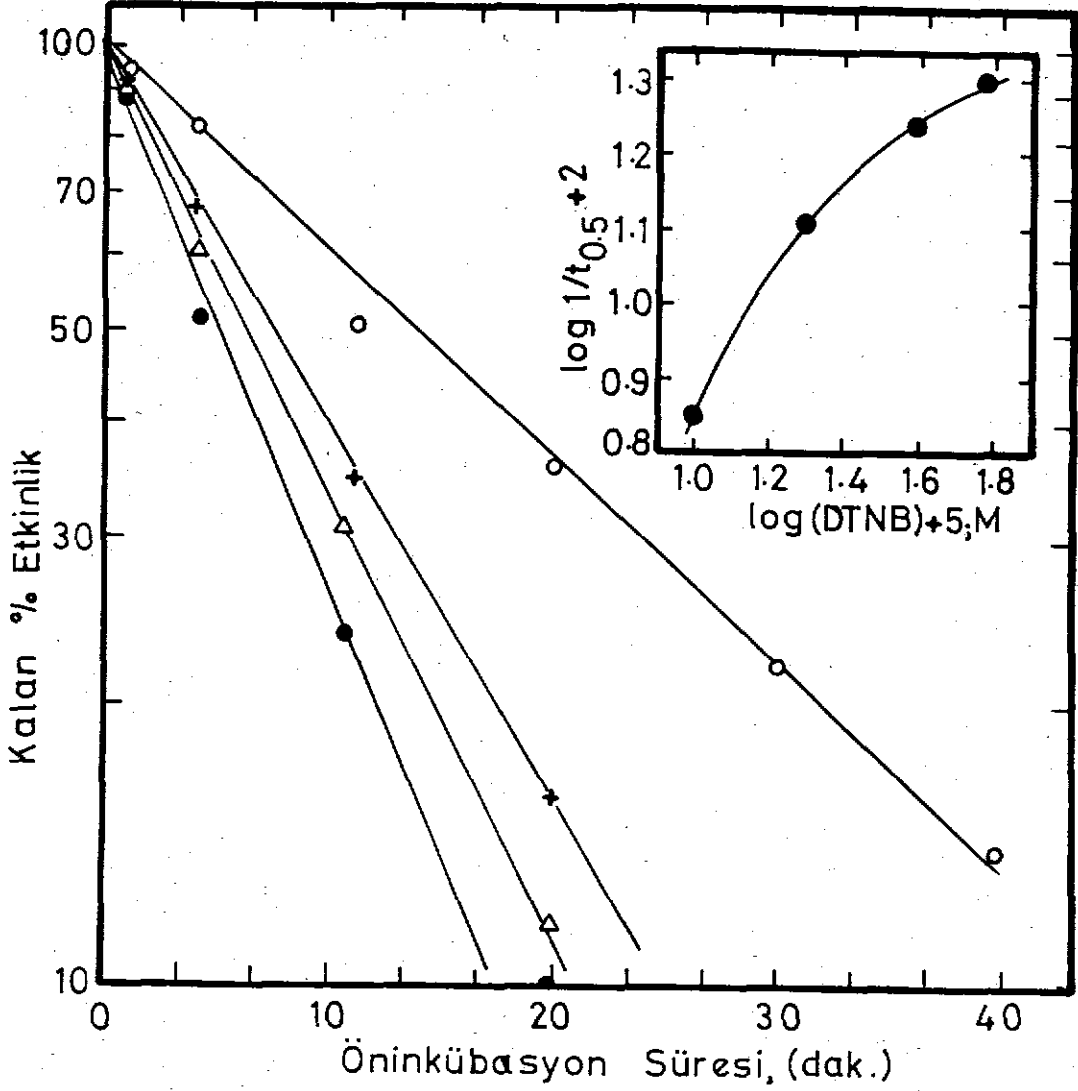
(—●—) Piruvat Kinaz Etkinliği (----) DTNB ile Kontrol edilerek DTE'nin gelmeye başladığı tüpler (HEPES tamponu, pH: 7.55; Kolon boyutları 1x15 cm)

rişiminden bağımsız görünmektedir (Şekil 32). Bu etkinlik değerleri toplam etkinlik değerlerinden çıkarılarak DTNB ile modifikasyon incelenirse, enzimin birinci dereceden kinetiğine uygun olarak inaktive olduğu Şekil 33'de görülmektedir. Modifikasyon ile artan DTNB derişimi arasındaki ilişkinin lineer olmadığı bulundu (Şekil 33'ün iç şekli). Piruvat kinazın DTNB ile modifikasyonunda gözlenen inaktivasyon hız değışmezleri ve $t_{0.5}$ ile DTNB derişimi arasındaki ilişki Şekil 34'de grafiklenmiştir.



ŞEKİL 32. İnsan Alyuvar Piruvat Kinazının DTNB ile Modifi-
kasyonunun DTNB Derişimine Bağımlılığı (pH: 7.55)

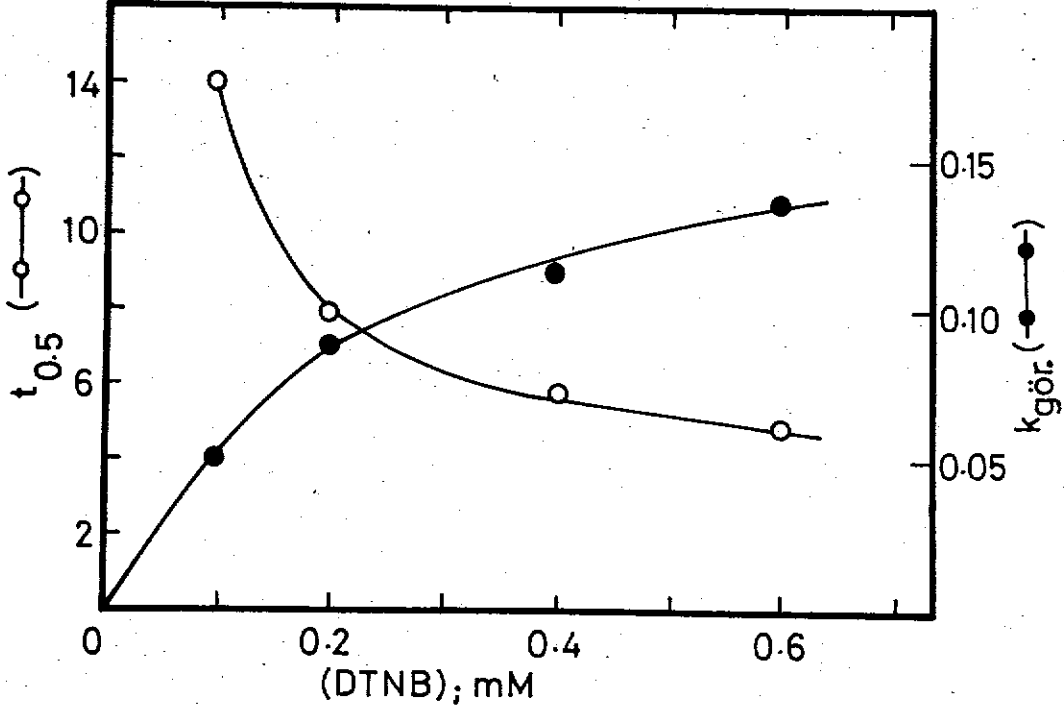
(—○—) Kontrol, (—●—) 0.1 mM DTNB, (—+—) 0.2 mM DTNB,
(—△—) 0.4 mM DTNB, (—▲—) 0.6 mM DTNB



ŞEKİL 33. Alyuvar Piruvat Kinazının DTNB ile Modifikasyonunda İnaktivasyonun Birinci Fazı (Şekil 32'den yararlanılmıştır).

(—○—) 0.1 mM DTNB, (—+—) 0.2 mM DTNB, (—△—) 0.4 mM DTNB,
(—●—) 0.6 mM DTNB

(İçteki şekilde inaktivasyonun DTNB derişimine lineer olmayan bağımlılığı görülmektedir)



ŞEKİL 34. Piruvat Kinazın DTNB ile Modifikasyonunda DTNB Derişimi ile $t_{0.5}$ ve $k_{g\ddot{o}r}$ Arasındaki İlişki ($t_{0.5}$ değerleri Şekil 33'ten alınmıştır)

(—○—) $t_{0.5}$, (—●—) $k_{g\ddot{o}r}$ değerleri

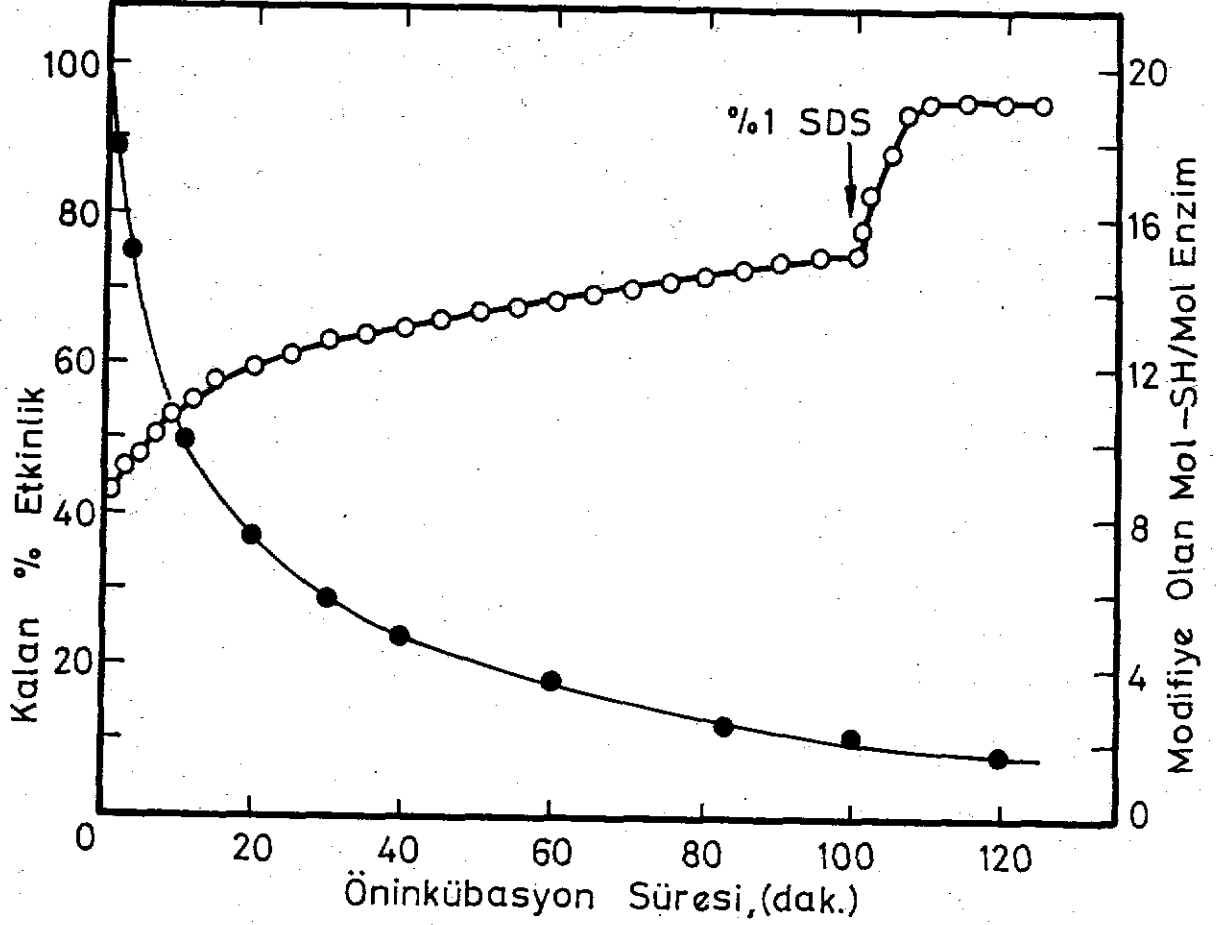
Alyuvar piruvat kinazında DTNB ile modifiye edilen sisteinlerin sayısı ve bunun etkinlik kaybı ile olan ilişkisini incelemek amacıyla; modifikasyon hem 412 nm'de oluşan TNB tayini, hemde 340 nm'deki etkinlik tayini yapılarak izlendi. DTE ile tümüyle indirgenmiş 40 mikrogram piruvat kinaza, 50 mM HEPES tamponunda (pH: 7.55) 0.3 mM olacak şekilde DTNB eklenerek modifikasyon başlatıldı ve derhal tepkime 412 nm'de izlenmeye başlandı. Kör kuvetine de aynı derişimde olacak şekilde DTNB eklendi.

Piruvat kinazın DTNB ile tepkimesi 412 nm'deki TNB absorpsiyonundaki artış izlenerek incelendiğinde, bir mol enzim başına 8 mol sisteinin (alibi-

rim başına 2 sistein) daha reaktif ile enzim karıştırılırken tepkimeye girdiği bulundu. Enzimin molü başına 4 mol sistein (altbirim başına bir sistein) oldukça hızlı tepkimeye girmekte ve bu sırada enzimde önemli oranda etkinlik kaybına neden olmaktadır (Şekil 35). Bir mol enzim başına 4 mol sistein (altbirim başına bir sistein) ise daha yavaş olarak tepkimeye girmekte ve buna paralel olarak etkinlik kaybı devam etmektedir. Bu noktadan sonra hem köre, hem de protein örneğini içeren küvete % 1 olacak şekilde SDS eklenirse 4 mol sistein daha (altbirim başına bir sistein) DTNB ile tepkimeye girmektedir (Şekil 35). Böylece doğal konformasyonunda DTE ile indirgenmiş enzimde, enzimin molü başına yaklaşık olarak 20 mol sistein (altbirim başına 5 sistein) DTNB ile tepkimeye girmektedir. Alyuvar piruvat kinazında modifiye edilen sisteinler ile etkinlik arasındaki ilişki Şekil 36'da verilmiştir.

Piruvat kinazın DTNB ile modifikasyonuna PEP ve ADP'nin koruyucu etkileri Şekil 37'de verilmiştir. PEP'in DTNB ile inaktivasyona karşı koruyucu etki göstermesi, NEM ve İyodoasetamid modifikasyonları ile uygunluk göstermektedir (bkz. NEM ve İyodoasetamid ile modifikasyon). Buna karşılık, enzimin NEM ve İyodoasetamid ile inaktivasyonunda hiç bir etkisi olmayan ADP'nin enzimi önemli oranda koruması çelişki gibi görünmektedir. Bu korumanın nedenleri daha sonra (Tartışma bölümünde) tartışılmıştır.

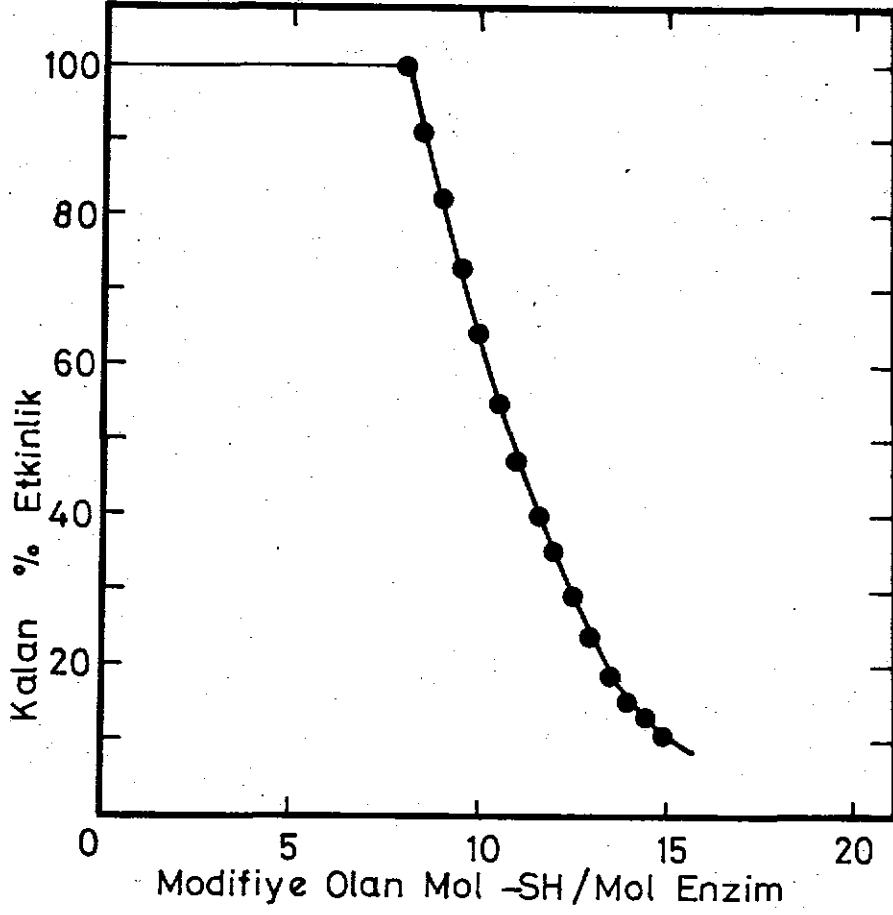
Alyuvar piruvat kinazı, Gereç ve Yöntemler bölümünde açıklandığı gibi elde edilen bir organik disülfid olan okside DTE (DSSD) ile de inaktive edildi (Şekil 38). Kullanılan yüksek DSSD derişimine rağmen etkili bir modifikasyon gözlenmedi. Bununla ilgili yorum Tartışma bölümünde verilmiştir.



ŞEKİL 35. İnsan Alyuvar Piruvat Kinazının DTNB ile Modifikasyonu. (pH: 7.55, Enzim miktarı 40 mikrogram, 0.3 mM DTNB)

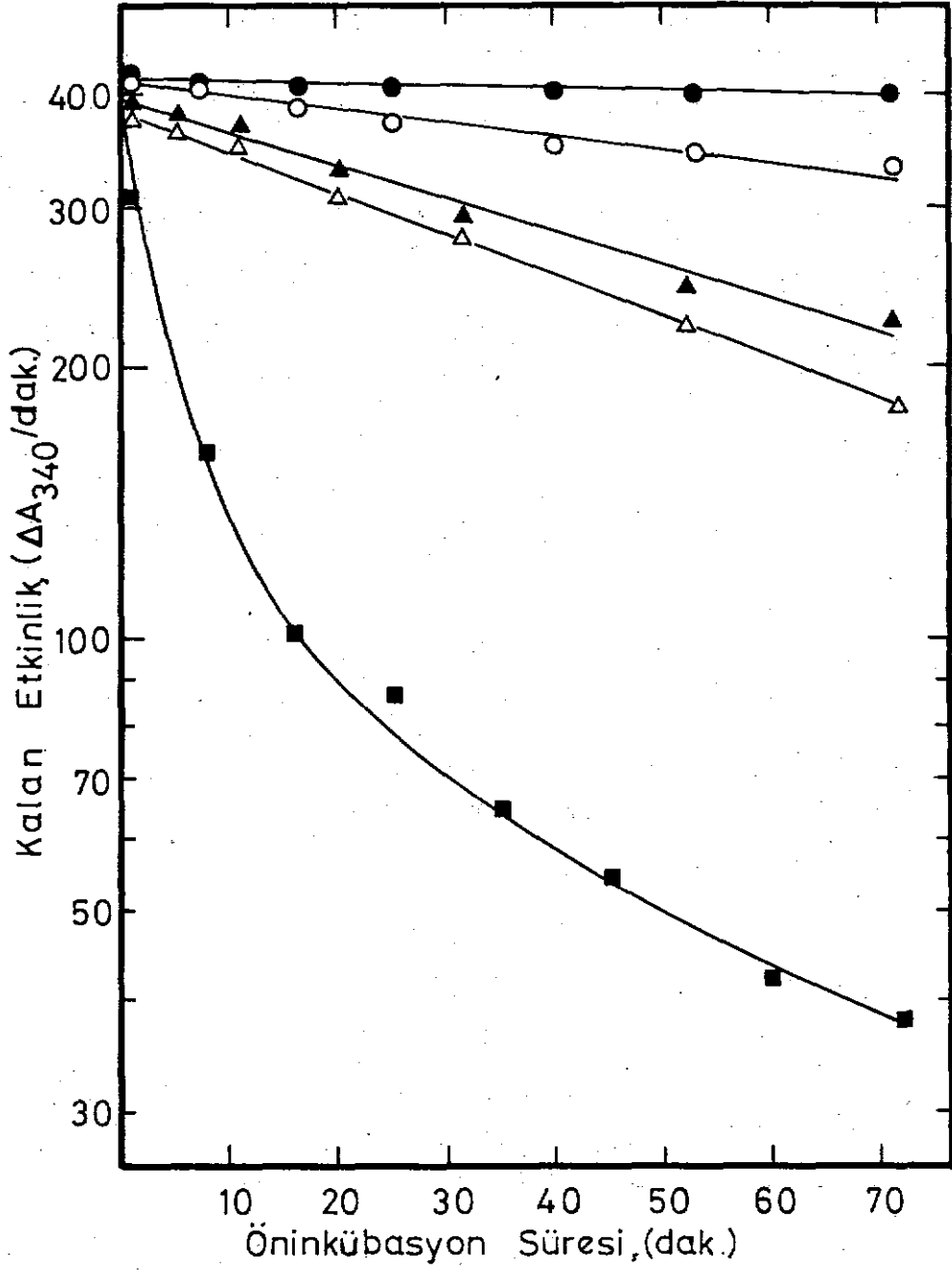
(—○—) Enzimin molü başına modifiye olan sistein sayısı

(—●—) Kalan piruvat kinaz etkinliği



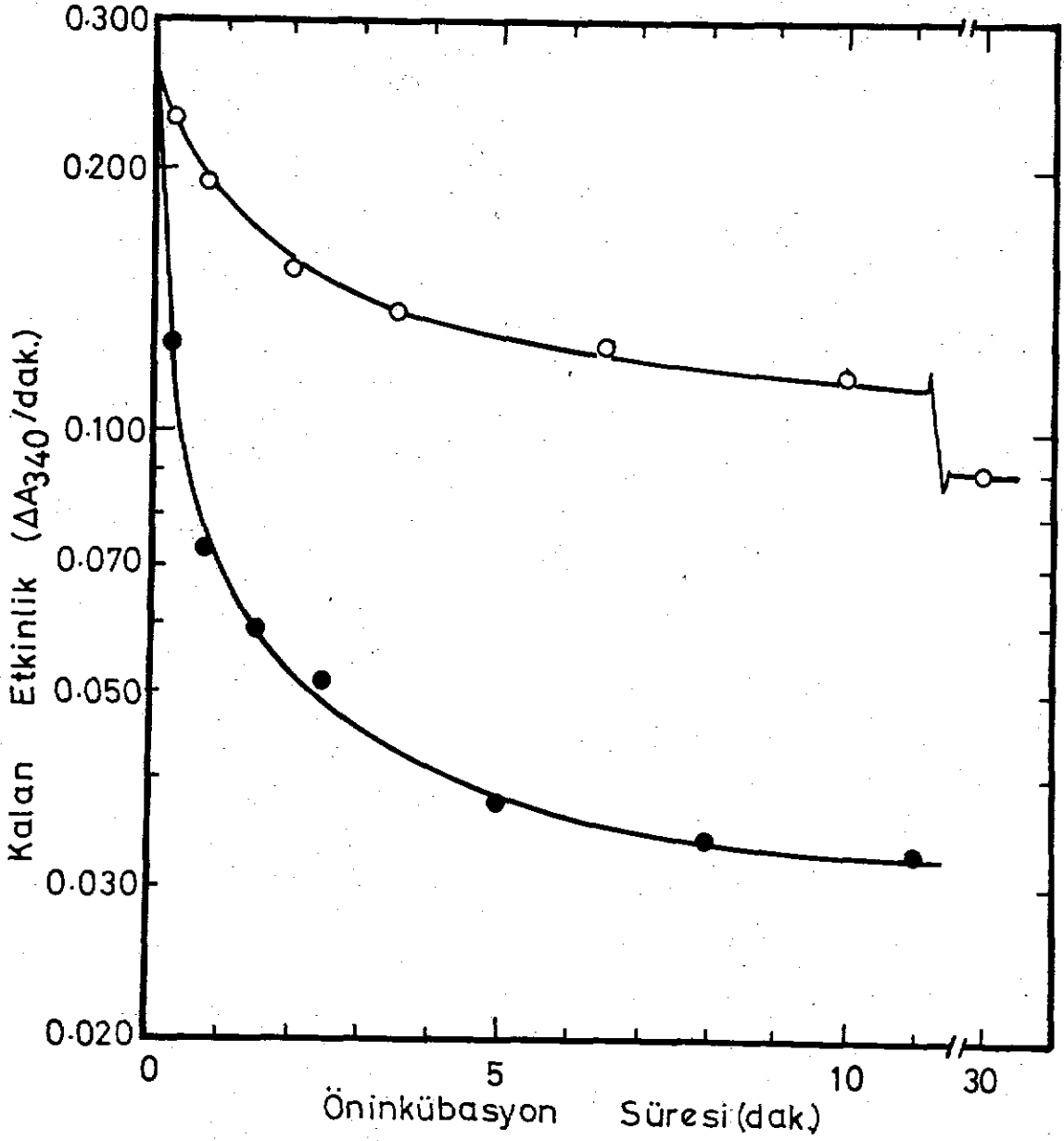
ŞEKİL 36. Alyuvar Piruvat Kinazının DTNB ile Modifi-
fikasyonunda, Kalan etkinlik ile Enzimin Molü Başı-
na Modifiye Olan Sisteinler Arasındaki İlişki.

(Şekil 35'ten yararlanılarak çizilmiştir)



ŞEKİL 37. Alyuvar Piruvat Kinazının DTNB ile İnaktivasyonuna PEP ve ADP'nin Koruyucu Etkileri (pH: 7.55, 1 mM DTNB)

(—●—) 4 mM PEP, (—○—) 4 mM ADP, (—▲—) 2 mM PEP,
(—△—) 2 mM ADP, (—■—) 1 mM DTNB içeren kontrol



ŞEKİL 38. İnsan Alyuvar Piruvat Kinazının Okside DTE (DSSD) İle İnaktivasyonu (pH: 7.55)

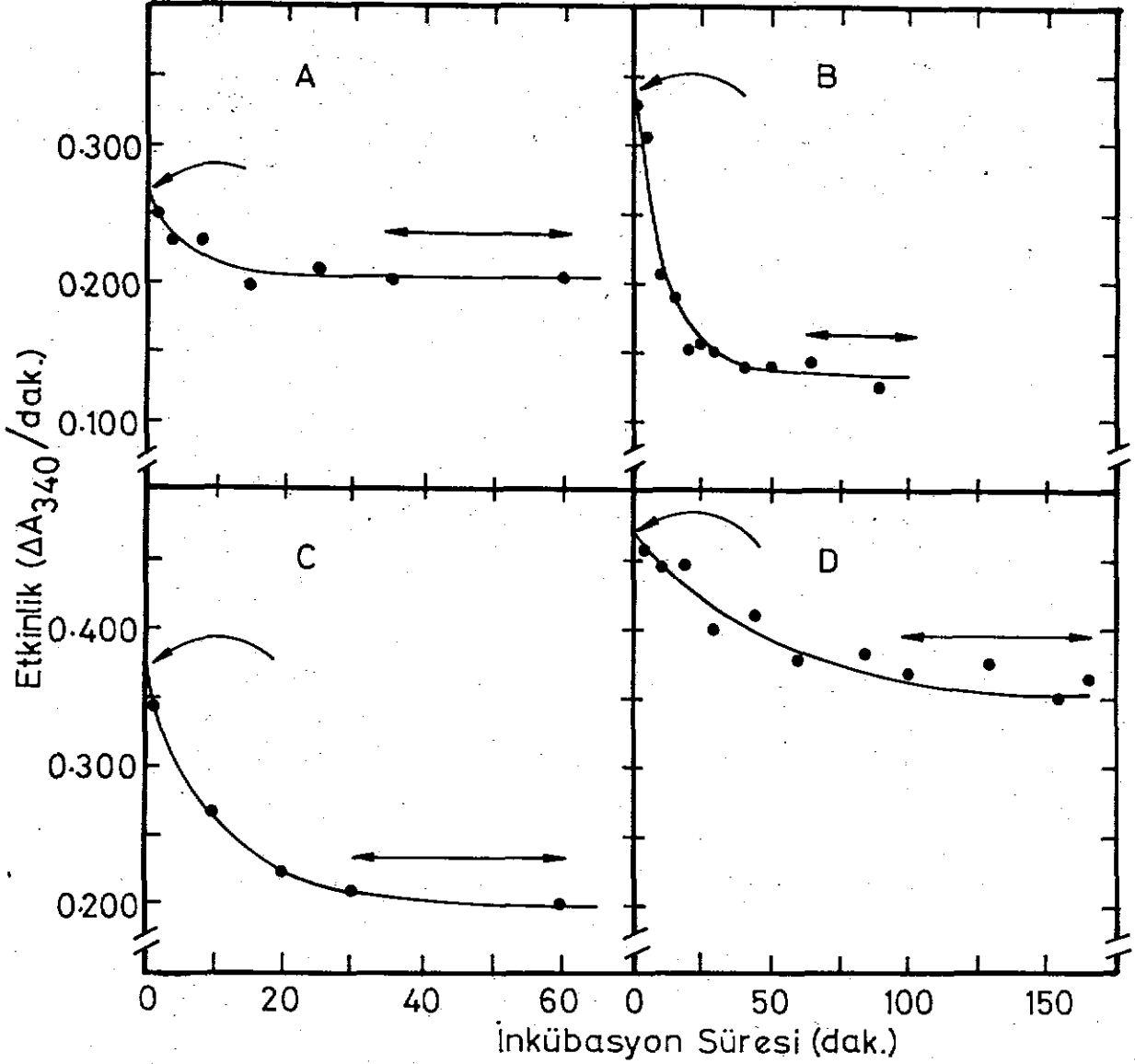
(—○—) 5 mM DSSD, (—●—) 7.5 mM DSSD

3.5. İNSAN ALYUVAR PIRUVAT KINAZININ BAZI KINETİK ÖZELLİKLERİ

Saflaştırıldıktan sonra deriştirilen alyuvar piruvat kinazının, herhangi bir seyrelme durumunda, seyrelme koşullarına bağılı olarak belirli oranda etkinliğini yitirdiğı görüldü. Enzimin bu özelliğini incelemek amacıyla farklı pH'da ve farklı koşullarda deriştirilmiş ve seyreltilmiş enzimin kinetik özellikleri araştırıldı.

Kinetik deneylerde kullanılan enzim, affinite kromatografisinden sonra deriştirilerek amonyum sülfat çöktürmesi ile toplandı ve enzim çökeleğı 100 mM potasyum fosfat tamponunda (pH: 6.8) çözülüp 4°C'de saklandı. Bu şekilde hazırlanan ve 3.85 mg/ml derişiminde olan enzim, ana stok (derişik enzim) olarak kullanıldı. Etkinlik tayinleri indirgeyici ajan (DTT) içermeyen ortamda yapıldı.

Derişik enzim; 50 mM Tris-Maleat tamponu, pH: 6.8 (2mM 2-ME içeren ve içermeyen) veya 50 mM HEPES-KOH tamponu, pH: 7.4 (2 mM 2-ME içeren ve içermeyen) içinde 500 kez seyreltildi (son protein derişimi 7.7 mikrogram/ml), ve değışik zaman aralıkları ile 25 mikrolitre çekilerek, spektrofotometrik olarak etkinlik tayini yapıldı. Seyrelmeden sonraki inkübasyon ve etkinlik tayinleri 30°C'de yapıldı. Şekil 39'da görüldüğü gibi, seyrelme ile enzim belirli oranda etkinlik yitirmekte ve bir süre sonra etkinlik yitirmesi durmaktadır. Seyrelme koşullarına bağılı olarak enzimin yitirdiğı etkinlik oranları; pH 6.8'de seyrelme ortamında 2-ME yoksa % 26 (Şekil 39 A), 2-ME varsa % 47 (Şekil 39 C); pH 7.4'de ise, 2-ME yoksa % 62 (Şekil 39 B), 2-ME varsa % 26 (Şekil 39 D) dır. Belirtilen koşullarda seyreltildikten sonra belirli oranda etkinliğini yitirmiş enzime, "enzimin D formu" denildi. Derişik enzimin, 10 mM 2-ME ile indirgenmiş ve indirgenmemiş şekline ise "enzimin N formu" denildi (Bu şekildeki tanımlamanın nedeni için Tartışma bölümüne bakınız).



ŞEKİL 39. Alyuvar Piruvat Kinazı Seyreltilmeden; veya Sereltil-
diğinde etkinlik Yitirmesinin Durduğu, Oklar ile İşaretli Nokta-
larda Kinetik Deneyler Yapıldı (Seyreltildikten sonra etkinlik
yitirmesinin durduğu formdaki enzime D formu; seyrelmenin sıfı-
rınca dakikasındaki enzimin formuna N formu denildi)

A; pH: 6.8, 2-ME içermeyen seyreltilme ortamında

B; pH: 7.4, 2-ME içermeyen seyreltilme ortamında

C; pH: 6.8, 2-ME içeren seyreltilme ortamında

D; pH: 7.4, 2-ME içeren seyreltilme ortamında

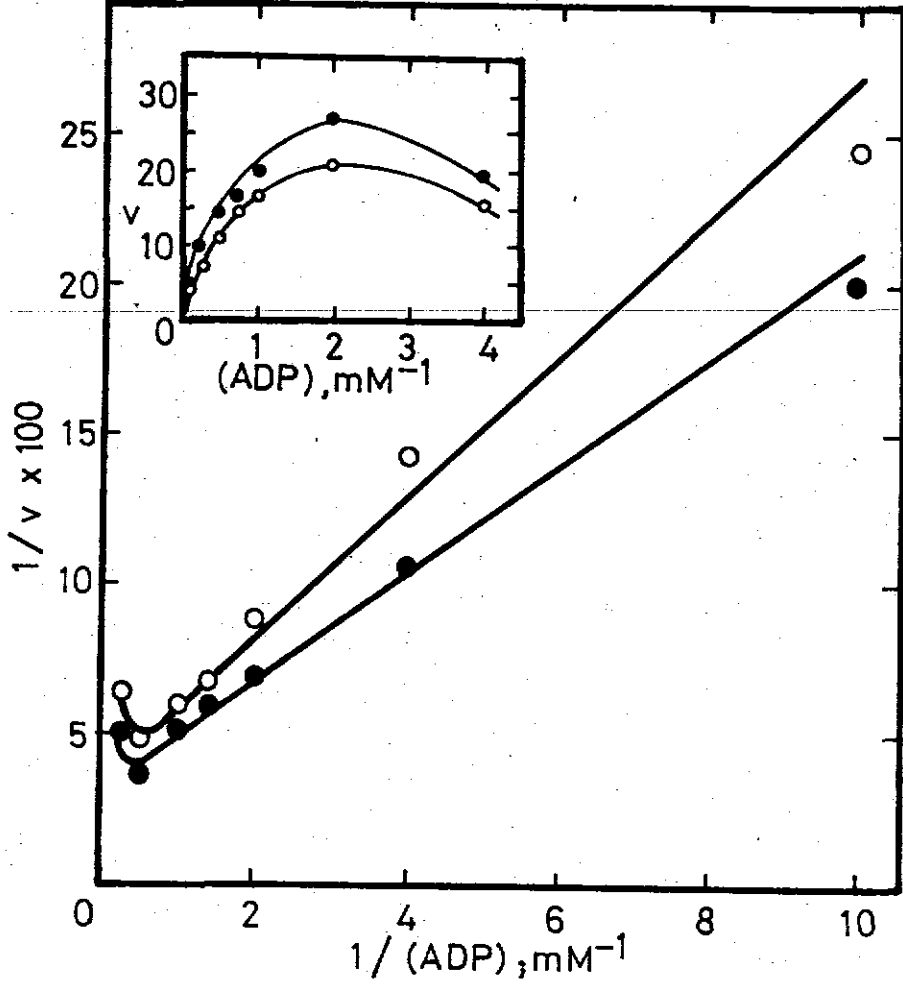
Yukarıda belirtilen şekilde hazırlanan enzimin N ve D formlarının kinetik özellikleri, Şekil 39'da oklar ile gösterilen aralıklarda ve koşullarda, FDP'nin varlığında ve yokluğunda etkinlik tayinleri yapılarak araştırıldı.

Şekil 40'da (pH: 6.8'de), piruvat kinazın ADP'ye olan ilgisi görülmektedir. Bu ilginin Eadie-Hofstee ve Hill grafiklemeleri Şekil 41'de verilmiştir. Şekillerden de görüldüğü gibi, piruvat kinazın ADP'ye olan ilgisi Michealis-Menten kinetiğine uymakta, ancak yüksek ADP derişiminde inhibisyon görülmektedir. Bu koşullarda FDP varlığında ve yokluğunda enzimin değişmeyen V_m 'i 27.7 olarak hesaplandı. Ancak FDP varlığında 0.47 mM olarak hesaplanan enzimin K_m değeri, FDP yokluğunda 0.65 mM'a çıkmaktadır (Şekil 40).

Piruvat kinazın 2-ME ile indirgenmiş ve indirgenmemiş N ve D formlarının, pH: 6.8'de, FDP varlığında ve yokluğunda PEP'e olan ilgisini gösteren sonuçlar Şekil 42 ve 43'de verilmiştir. Aynı sonuçların Hill ve Eadie-Hofstee grafiklemeleri de Şekil 44 ve 45'de görülmektedir.

pH: 6.8'de, 2-ME ile indirgenmiş enzimin hem N, hem de D formu yüksek PEP derişimi ile inhibe olurken (Şekil 42 B, D); aynı etki indirgenmemiş enzimde görülmemektedir (Şekil 42 A, C). Etkinlik tayin ortamında FDP bulunması veya bulunmaması bu özelliği değiştirmedir (Şekil 42).

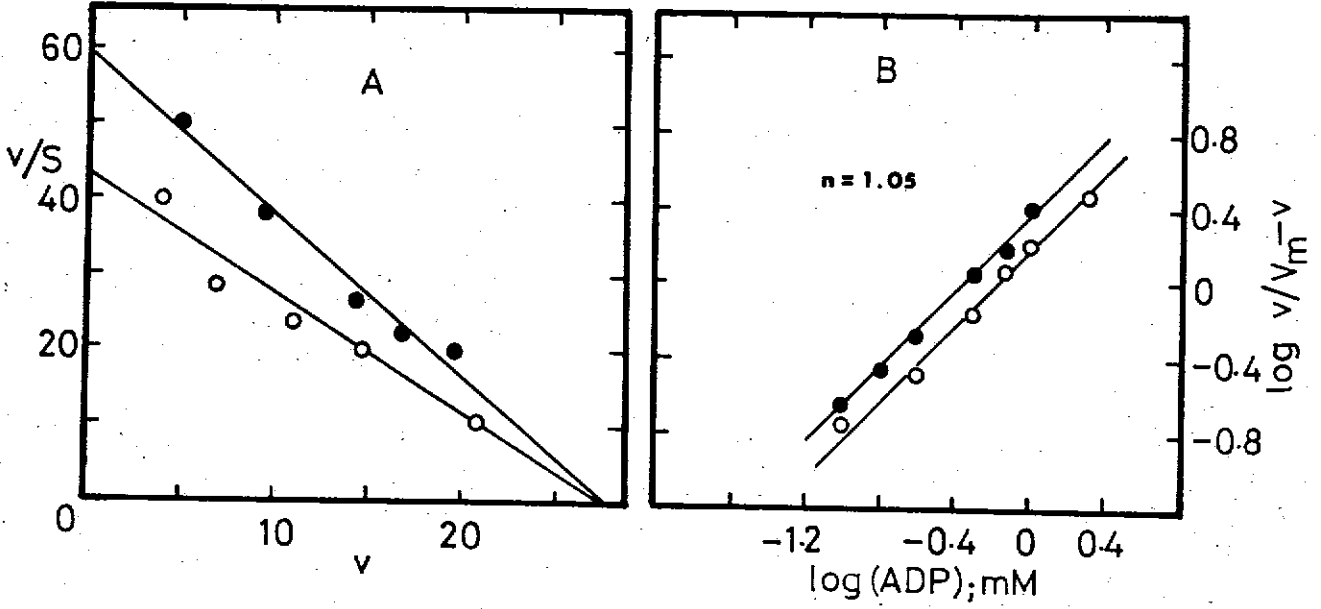
İnsan alyuvar piruvat kinazı FDP yokluğunda PEP'e karşı negatif kooperativite göstermektedir (Şekil 44,43,45). FDP enzimin hem D, hem de N formunda negatif kooperativiteyi ortadan kaldırmaktadır (Şekil 43). pH: 6.8'de çalışılan her koşulda piruvat kinazın PEP'e karşı negatif kooperativite gösterdiği ve bu kooperativitenin FDP tarafından tümüyle ortadan kaldırıldığı Şekil 44 ve 45'deki Hill ve Eadie-Hofstee grafiklemeleri ile de güçlenmektedir. pH: 6.8'de, çalışılan bütün koşullarda, etkinlik tayin ortamında FDP yoksa, enzimin K_m ve V_m değerleri farklı iki formu bulunmaktadır (Şekil 43).



ŞEKİL 40. Alyüvar Piruvat Kinazının ADP'ye ilgisi (pH: 6.8, 2 mM PEP)

(—●—) 0.1 mM FDP içeren ortamda etkinlik

(—○—) FDP içermeyen ortamda etkinlik



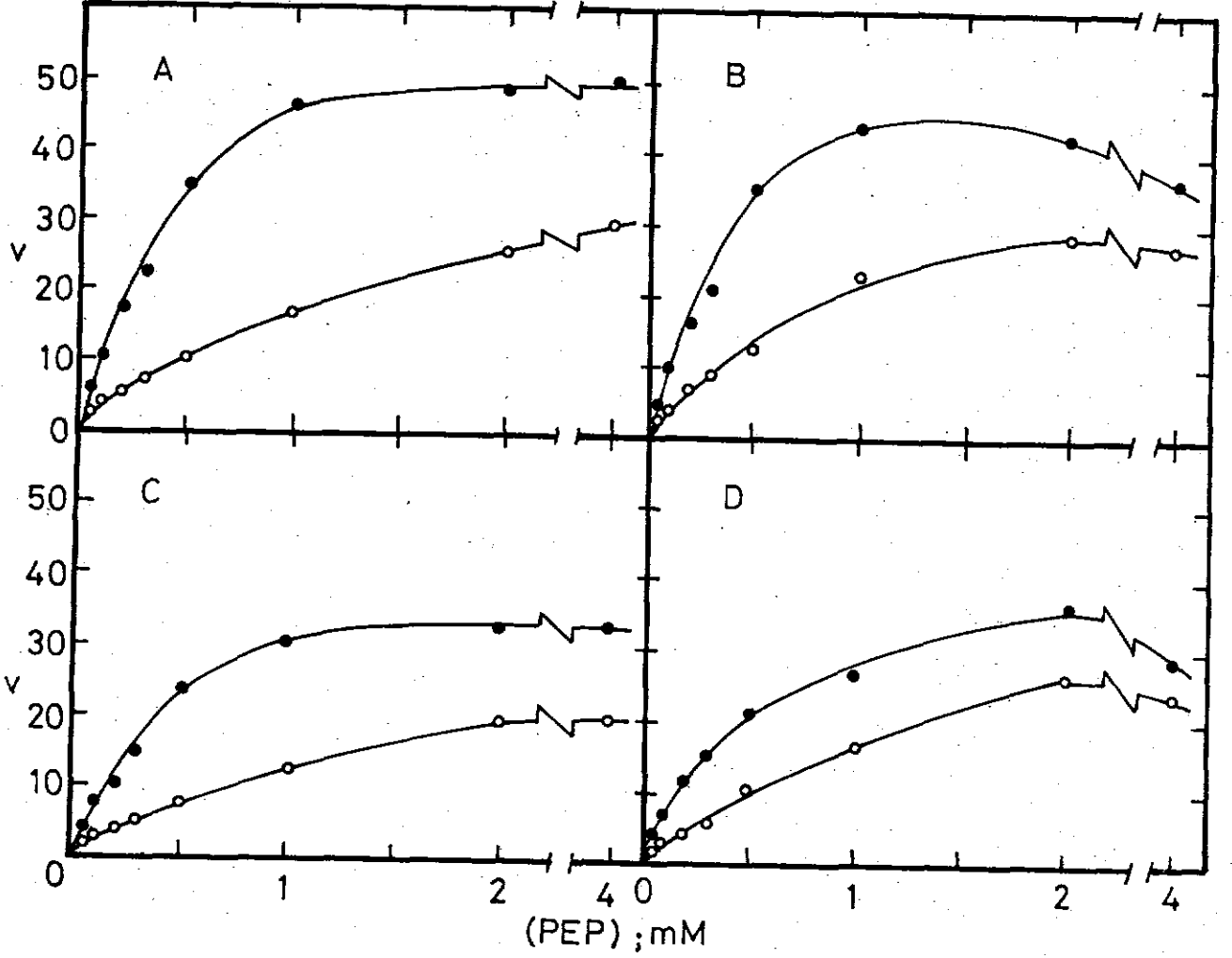
ŞEKİL 41. Alyuvar Piruvat Kinazının ADP'ye İlgisinin Eadie-Hofstee ve Hill Grafikleme

A; Eadie-Hofstee grafikleme

B; Hill grafikleme

(—●—) FDP içeren ortamda

(—○—) FDP içermeyen ortamda



ŞEKİL 42. İnsan Alyuvar Piruvat Kinazının PEP'e Olan İlgisinin Michealis-Menten Grafiklemesi (pH: 6.8'de)

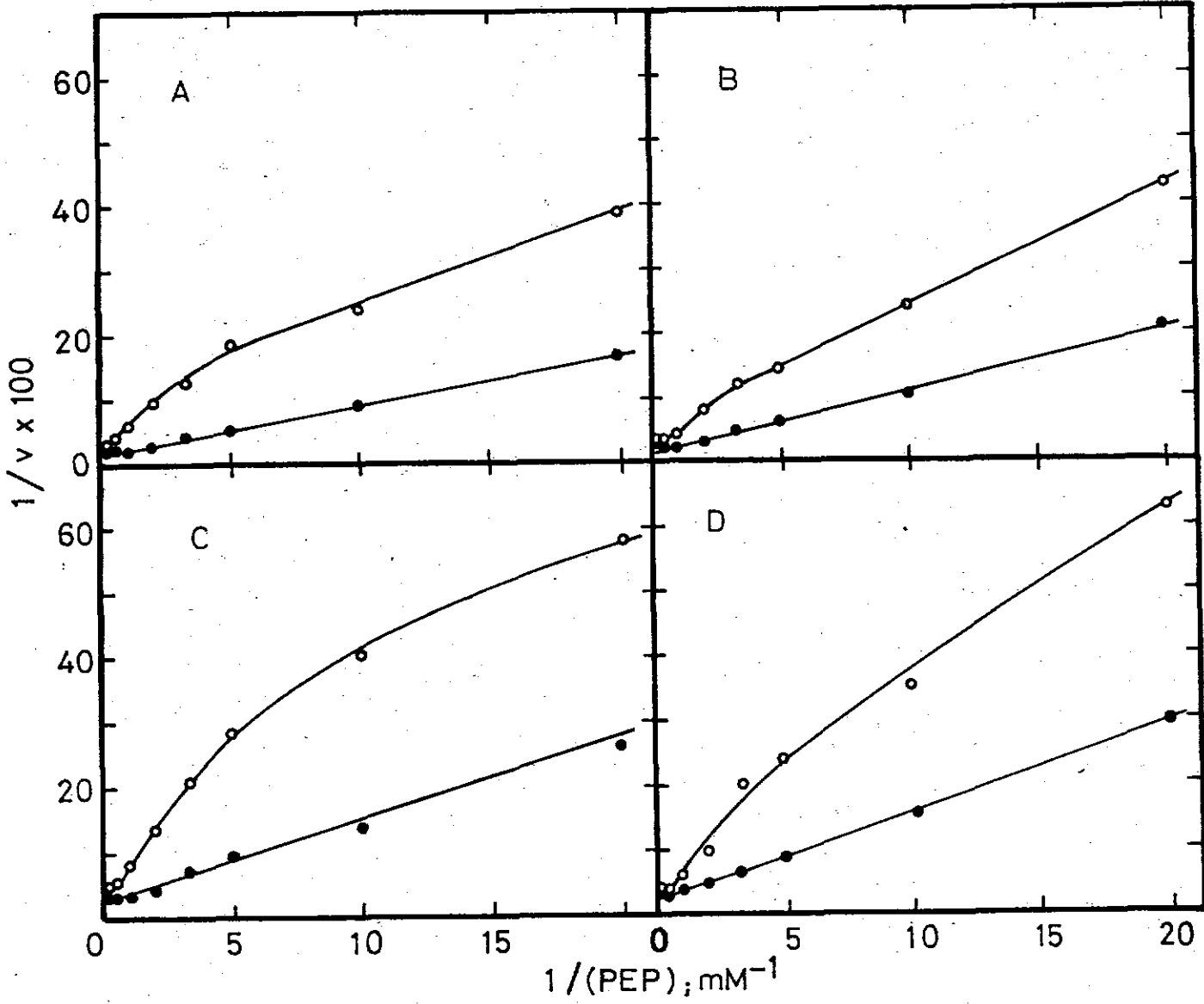
(—●—) FDP içeren, (—○—) FDP içermeyen ortamda etkinlik

A: 2-Merkaptoetanol içermeyen ortamda, enzimin N formu

B: " içeren ortamda, enzimin N formu

C: " içermeyen ortamda, enzimin D formu

D: " içeren ortamda, enzimin D formu



ŞEKİL 43. İnsan Alyuvar Piruvat Kinazının, Farklı Koşullarda PEP'e İlgisinin Lineweaver-Burk Grafikleme (pH: 6.8)

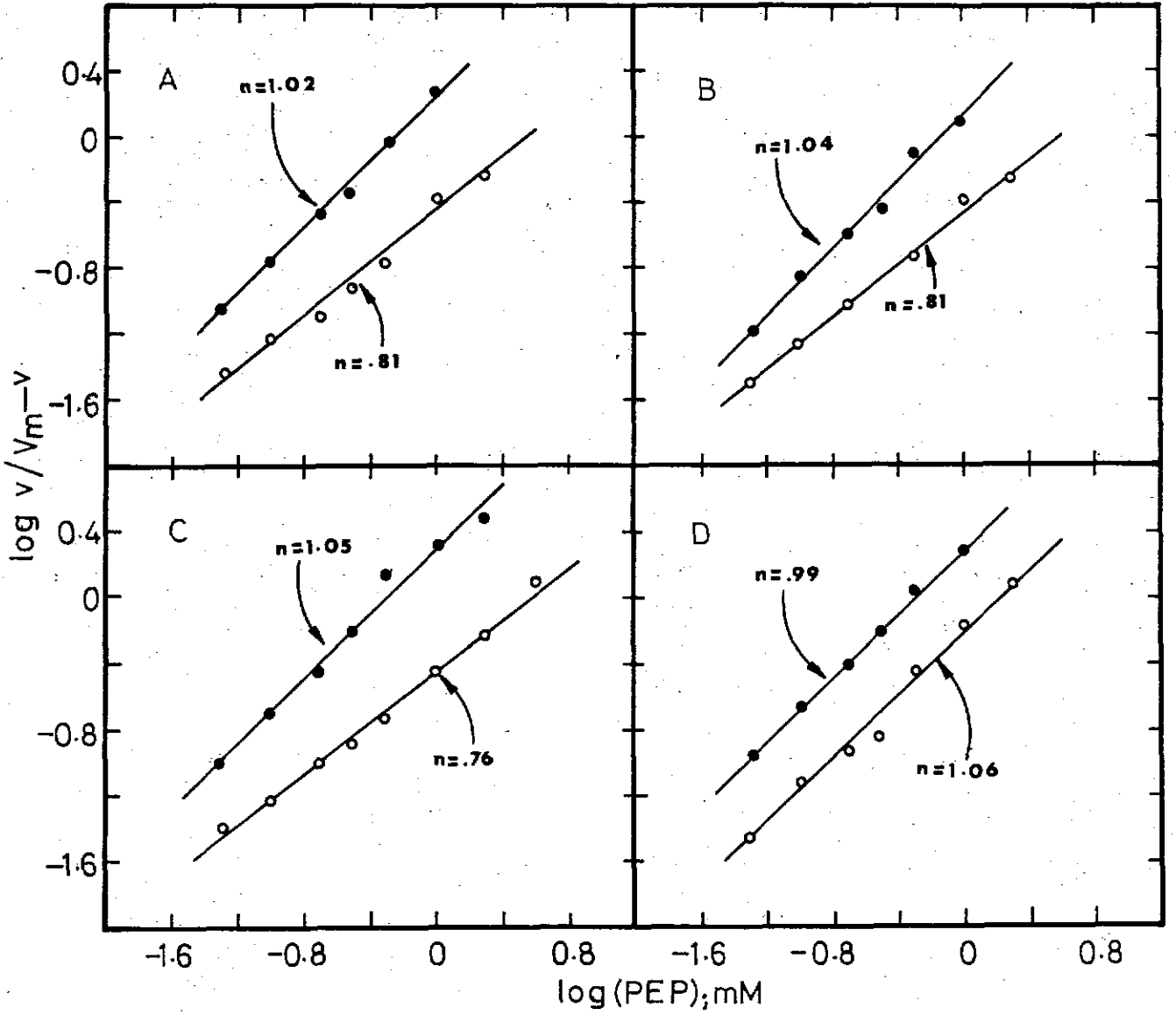
(—●—) FDP içeren, (—○—) FDP içermeyen Ortamda

A: 2-Merkaptoetanol içermeyen ortamda, enzimin N formu

B: " içeren ortamda, enzimin N formu

C: " içermeyen ortamda, enzimin D formu

D: " içeren ortamda, enzimin D formu



ŞEKİL 44. İnsan Alyuvar Piruvat Kinazının, Farklı Koşullarda PEP'e İlgisinin Hill Grafiklemesi (pH: 6.8)

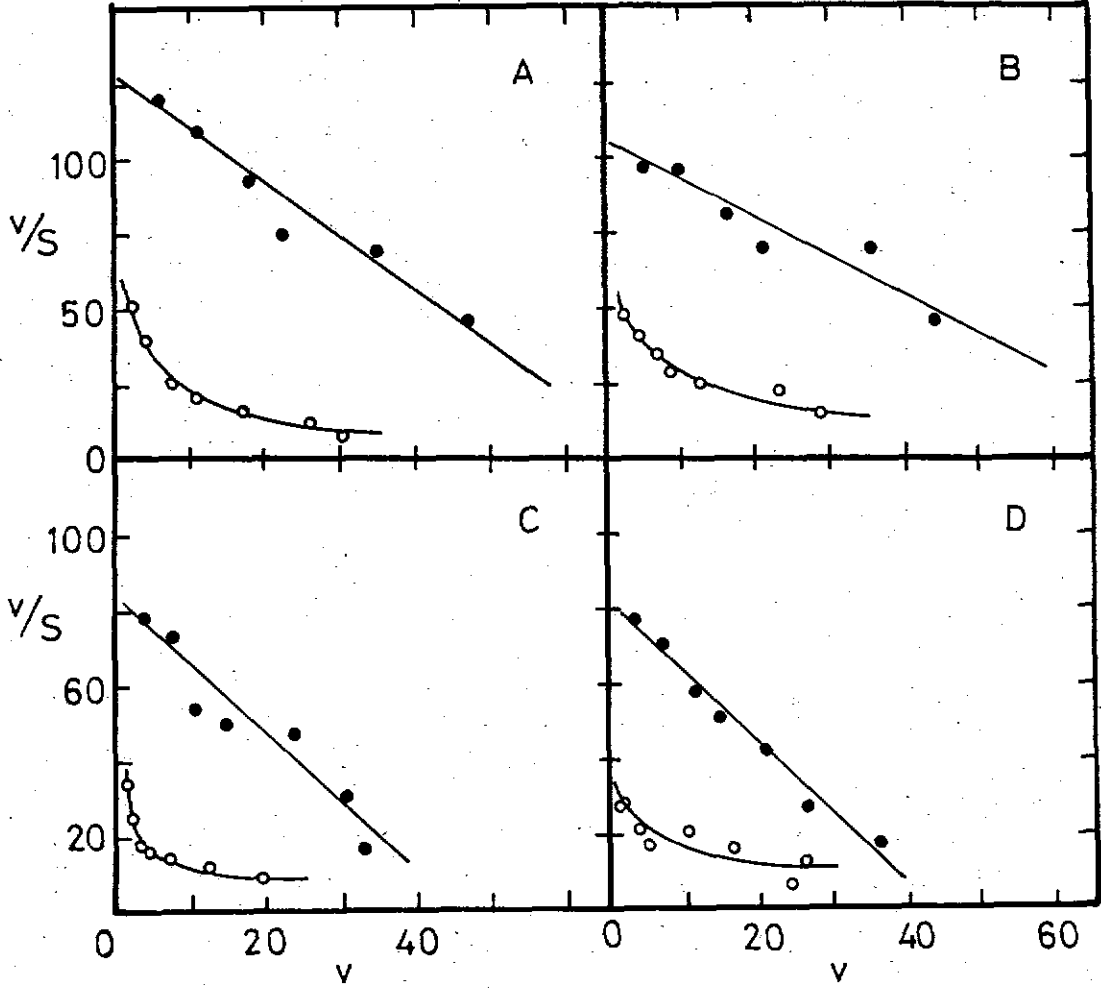
(—●—) FDP içeren, (—○—) FDP içermeyen ortamda

A: 2-Merkaptoetanol içermeyen ortamda, enzimin N formu

B: " içeren ortamda, enzimin N formu

C: " içermeyen ortamda, enzimin D formu

D: " içeren ortamda, enzimin D formu



ŞEKİL 45. İnsan Alyuvar Piruvat Kinazının, Farklı Koşullarda PEP'e İlgisinin Eadie-Hofstee Grafikleme (pH: 6.8)

(—●—) FDP içeren, (—○—) FDP içermeyen ortamda

A: 2-Merkaptoetanol içermeyen ortamda, enzimin N formu

B: " içeren ortamda, enzimin N formu

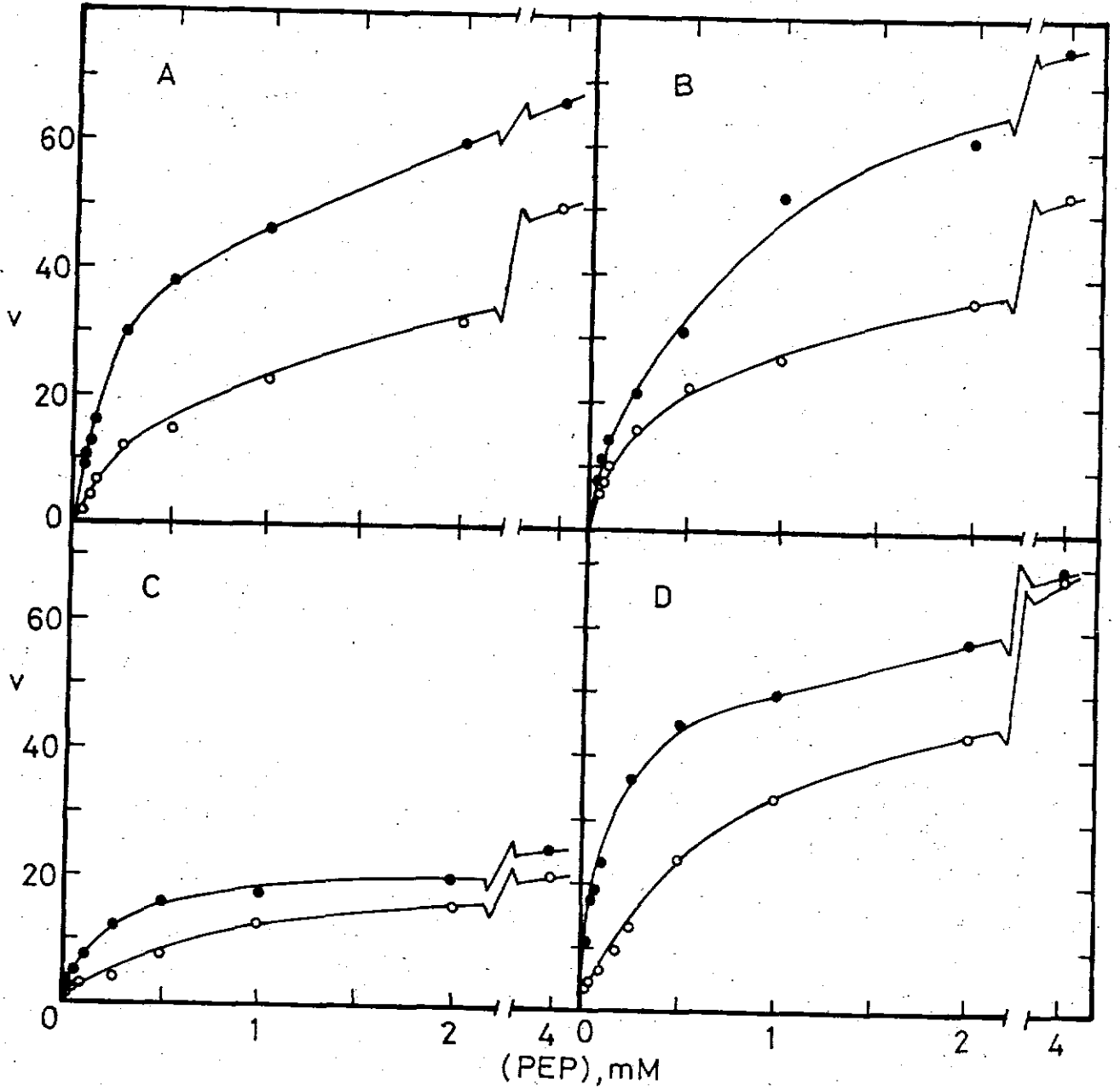
C: " içermeyen ortamda, enzimin D formu

D: " içeren ortamda, enzimin D formu

FDP yokluğunda görülen piruvat kinazın bu iki formunun, değişik koşullardaki K_m ve V_m değerleri Tablo V'de verilmiştir.

Alıyuar piruvat kinazı pH: 7.4'de daha farklı kinetik özellikler göstermektedir. pH: 6.8'de enzimin 2-ME ile indirgenmiş N ve D formlarında görülen substrat inhibisyonu, pH: 7.4'de olmamakta, ve 4 mM'a kadar artan PEP derişimine uygun olarak enzimin etkinliği de artmaktadır (Şekil 46). pH: 7.4'deki sonuçların Lineweaver-Burk grafiklemesi yapılırsa, enzimin indirgenmemiş N ve D formlarında düşük PEP derişiminde pozitif kooperativite, daha yüksek PEP derişiminde ise negatif kooperativite görölmektedir ve FDP bu etkileri ortadan kaldırmaktadır (Şekil 47 A, C). FDP yokluğunda, indirgenmiş enzimin N ve D formlarında ise yalnızca negatif kooperativite görölmektedir (Şekil 47 B, C), ve FDP bu etkiyi ortadan kaldırmaktadır. pH: 6.8'de olduğu gibi, pH: 7.4'de de, FDP yokluğunda enzimin birden fazla formu vardır (Şekil 47).

Şekil 47'de, her ne kadar Lineweaver-Burk grafiklemesinde negatif kooperativitenin FDP tarafından kaldırıldığı görölüyorsa da, negatif kooperativitenin tümüyle ortadan kaldırıldığı Hill ve Eadie-Hofstee grafiklemeleri ile desteklenmemektedir (Şekil 48, 49). Hill ve Eadie-Hofstee grafiklemelerine göre, FDP varlığında da negatif kooperativite devam etmekte ve tümüyle yok edilememektedir. pH: 7.4'de değişik koşullarda hesaplanan enzimin K_m ve V_m değerleri Tablo V'de verilmiştir. Şekil 47'den de görölebileceği gibi, FDP yokluğunda K_m değerleri hesaplanamadığından Tablo'da verilmemiştir.



ŞEKİL 46. İnsan Alyuvar Piruvat Kinazının Farklı Koşullarda PEP'e ilgisinin Michealis-Menten Grafiklemesi (pH: 7.4)

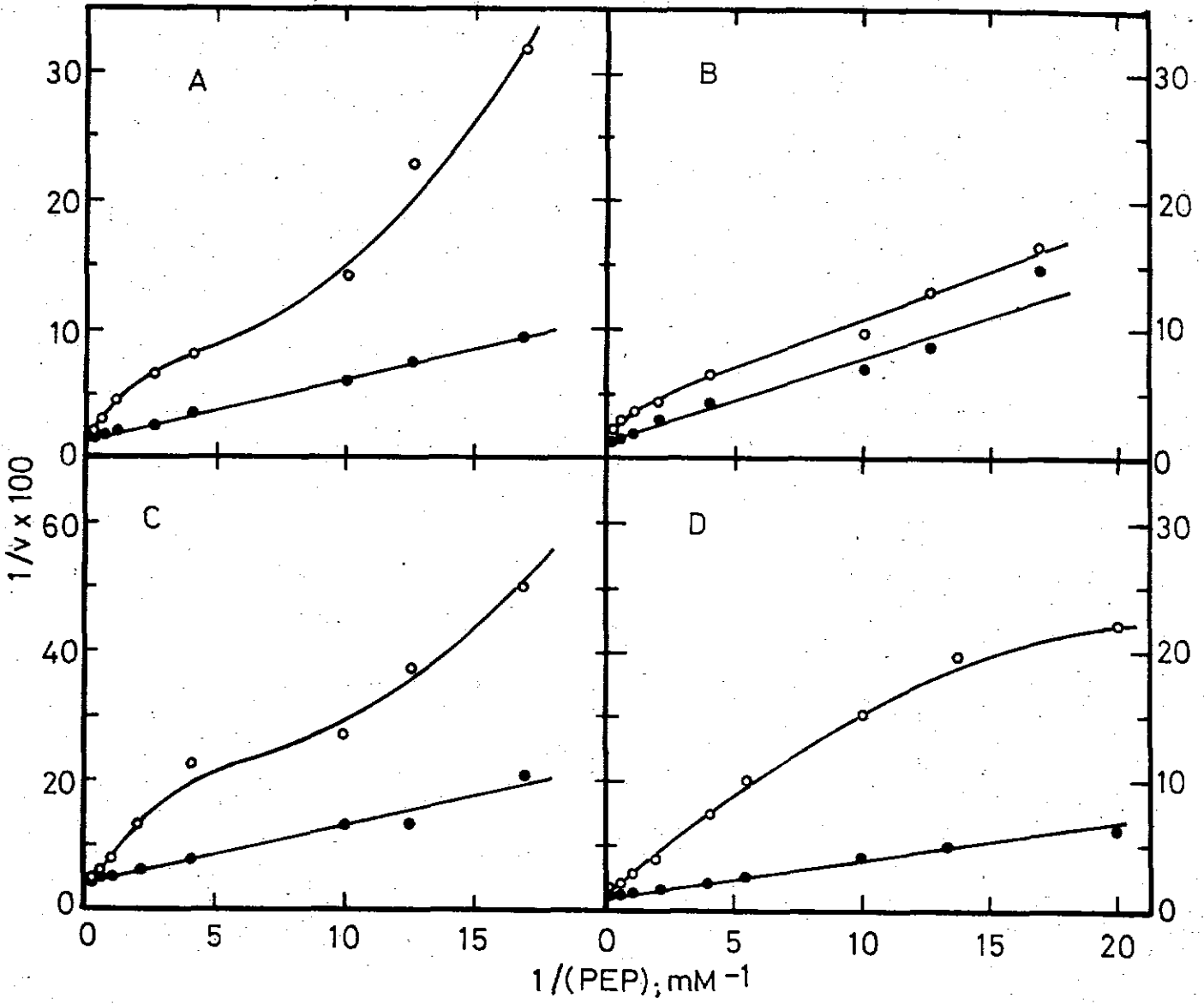
A: 2-Merkaptoetanol içermeyen ortamda, enzimin N formu

B: " içeren ortamda, enzimin N formu

C: " içermeyen ortamda, enzimin D formu

D: " içeren ortamda, enzimin D formu

(—●—) FDP içeren, (—○—) FDP içermeyen ortamda etkinlik



ŞEKİL 47. İnsan Alyuvar Piruvat Kinazının Farklı Koşullarda PEP'e İlgisini Lineweaver-Burk Grafikleme (pH: 7.4)

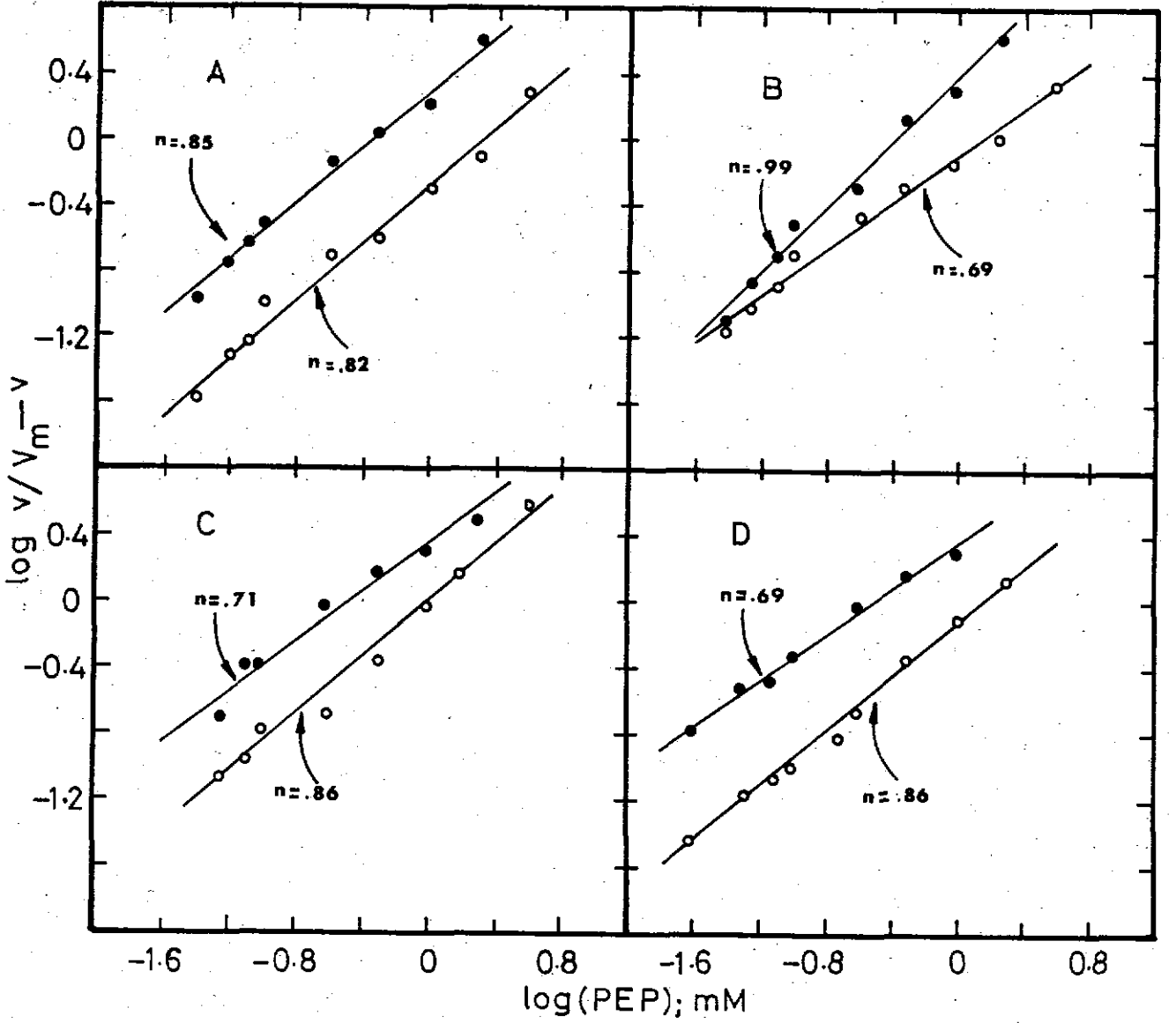
(—●—) FDP içeren, (—○—) FDP içermeyen ortamda

A: 2-Merkaptoetanol içermeyen ortamda, enzimin N formu

B: " içeren ortamda, enzimin N formu

C: " içermeyen ortamda, enzimin D formu

D: " içeren ortamda, enzimin D formu



ŞEKİL 48. İnsan Alyuvar Piruvat Kinazının Farklı Koşullarda PEP'e İlgisinin Hill Grafikleme (pH: 7.4)

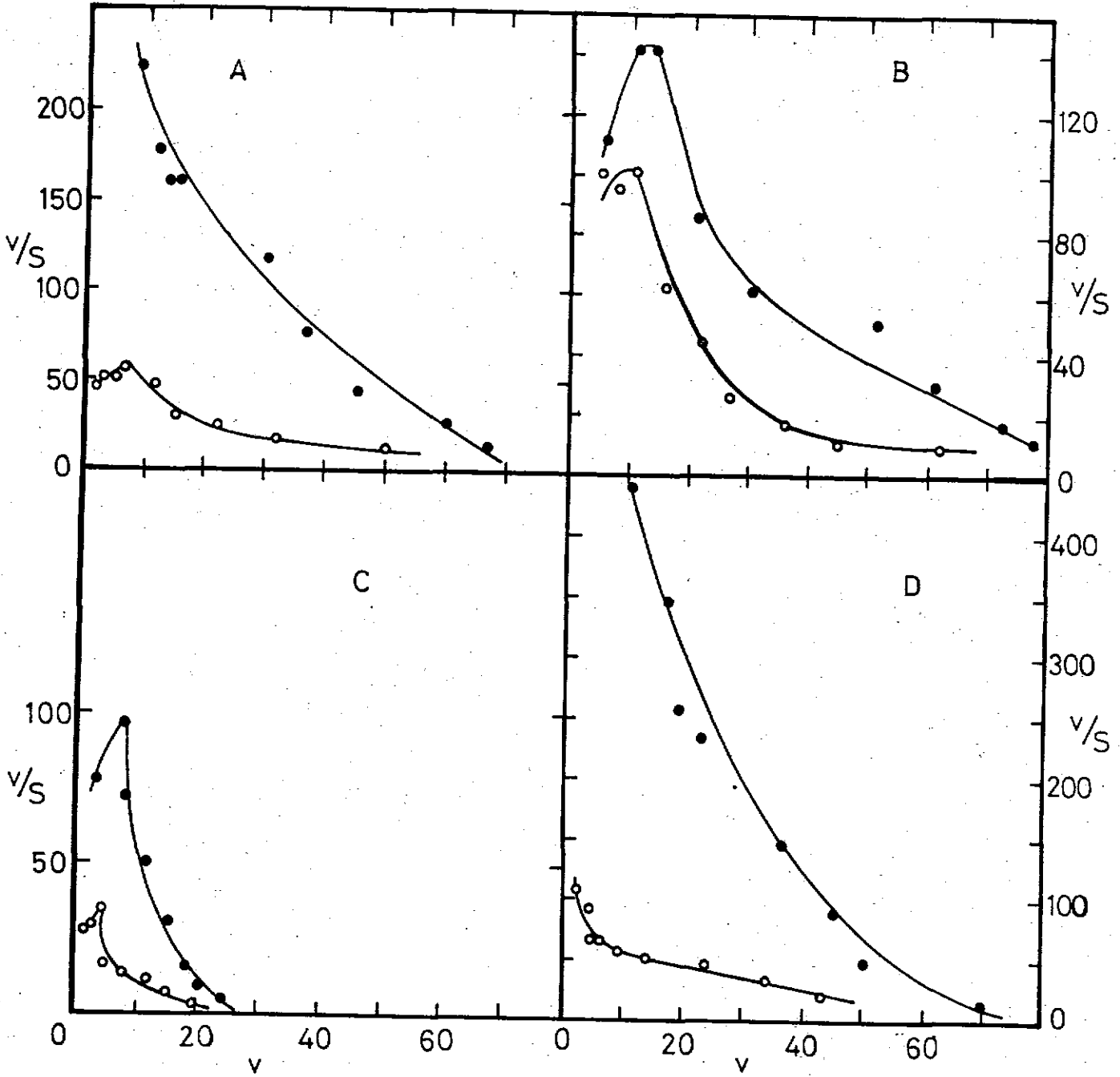
(—●—) FDP içeren, (—○—) FDP içermeyen ortamda

A: 2-Merkaptoetanol içermeyen ortamda, enzimin N formu

B: " içeren ortamda, enzimin N formu

C: " içermeyen ortamda, enzimin D formu

D: " içeren ortamda, enzimin D formu



ŞEKİL 49. İnsan Alyuvar Piruvat Kinazının Farklı Koşullarda PEP'e İlgisinin Eadie-Hofstee Grafikleme (pH: 7.4)

(—●—) FDP içeren, (—○—) FDP içermeyen ortamda

A: 2-Merkaptoetanol içermeyen ortamda, enzimin N formu

B: " " içeren ortamda, enzimin N formu

C: " " içermeyen ortamda, enzimin D formu

D: " " içeren ortamda, enzimin D formu

		pH:6.8				pH:7.4			
		-ME		+ME		-ME		+ME	
		-FDP	+FDP	-FDP	+FDP	-FDP	+FDP	-FDP	+FDP
Z Formu	r_H	0.81	1.02	0.81	1.04	0.82	0.85	0.69	0.99
	K_m	0.111	0.560	0.333	0.904	—	1.600	—	0.667
		2.000		3.330		—		—	
V_m	7.2	72	9.1	94	83	83	110	110	110
	72		94						
D Formu	r_H	0.76	1.05	1.06	0.99	0.86	0.71	0.86	0.69
	K_m	0.083	0.475	0.220	0.500	—	0.250	—	0.286
		2.000		3.330		—		—	
V_m	4.27	35.71	8.9	28.57	26.32	26.32	26.32	80	80
	35.71		28.57						

Tablo V. İnsan Alyuvar Piruvat Kinazının N ve D Formlarının Farklı Koşullarda PEP'e İlgisinin r_H , K_m ve V_m Değerleri

4. T A R T I Ő M A

Protein modifikasyonları, proteinlerin yapılarının ve fonksiyonlarının araştırılmasında en çok başvuru olan yöntemlerdir. Sayısız denilebilecek kadar çeşitliliği ve biyolojik modifikasyonlara oranla kolaylığı nedeniyle protein modifikasyonlarının başında da kimyasal modifikasyonlar gelir. Kimyasal modifikasyonlarda da oldukça farklı yöntemler vardır (bkz. Giriş bölümü). "Gruba özgül reaktif" kullanılarak yapılan protein modifikasyonları, kimyasal yöntemlerden biridir.

Kimyasal modifikasyonlarda ilk adım, ilgilenilen proteinin belirli bir grup özgüllüğü olan reaktife duyarlı olup olmadığını tesbit etmektir. Proteinde, grup özgüllüğü olan reaktif ile tepkimeye giren fonksiyonel grup varsa, proteinde fonksiyon kaybı görülecektir. Bu aşamadan sonra yapılması gereken iş, modifiye edilen fonksiyonel grubun proteindeki görevi ve proteinde etkinlik kaybının mekanizmasını araştırmaktır.

Borat içeren ortamda 2,3-Butanedione, proteinlerde arjinin gruplarının modifikasyonunda kullanılan en uygun reaktiftir (4, 26, 50-51). Ultraviyole ışık ile uyarılmış aminoasitler (aromatik aminoasitler ve histidin) ile olan tepkimesi dışında (64), Butanedione'un herhangi bir yan tepkimesi tesbit edilmemiştir. İnsan alyuvar piruvat kinazının da borat içeren modifikasyon ortamında Butanedione ile inaktive olduğunu daha önceki çalışmamızda göstermiş (54), fakat bulguların yeterli olmaması nedeniyle inaktivasyonun

mekanizmasını tanımlayamadık.

Piruvat kinazın BD ile borat içeren ortamda modifikasyonunda hiç bir ligand ile koruyucu etki görülmez; enzimin modifikasyon ile altbirimlerine disosiyasyon ihtimali araştırıldığında, böyle bir disosiyasyonun olmadığı, modifiye edilen ve edilmeyen enzimin Sephadex G-150 kromatografisi analizi ile görüldü (Şekil 2).

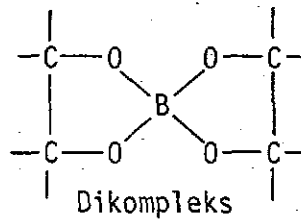
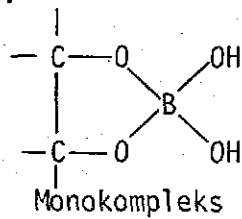
Borat içermeyen modifikasyon ortamında da alyuvar piruvat kinazının BD ile inaktive olduğu ve literatürde rapor edilen modifikasyon için borat gerekliliği ve boratın modifikasyonu önemli oranda hızlandırıcı etkisi (4) bu çalışmadaki alyuvar piruvat kinazı için gözlenmedi (Şekil 3-6). Şekil 3-6'dan da görüldüğü gibi, arjininin BD ile tepkimesi için modifikasyon ortamında borat varlığı gerekli olmamakta; ancak borat inaktivasyonu bir miktar hızlandırarak, ikinci dereceden inaktivasyon hız değişimini (k_{BD}) 2.14'den $2.74 \text{ M}^{-1} \text{ dak}^{-1}$ 'e çıkarmaktadır. Borat bu etkiyi de, modifiye edilen fonksiyonel arjinin grubunun pK'sını 8.3'den 8.1'e düşürerek göstermektedir (Şekil 12).

Alyuvar piruvat kinazının borat içeren ortamda BD ile modifikasyonunda, inaktivasyona karşı tek koruyucu etki iyonik kuvvet tarafından gösterilirken, bu etki borat içermeyen modifikasyon ortamında görülmemektedir (Şekil 7). İyonik kuvvetin BD inaktivasyonuna karşı enzimi koruması, çeşitli tuzların reaktif ile etkileşiminden değil; fakat enzime olan etkisinden ileri gelmektedir. Genel olarak ortamda iyonik kuvvetin yüksek olması piruvat kinazın stabilitesini arttırır. Enzimi daha stabil formda tutan değişik tuzlar, enzimin aktif merkezini de daha kapalı bir durumda tutmalıdır. Cis-diol-ler ile olduğu gibi (68), borat BD ile tepkimeye girerek asidik kompleksler oluşturur. Borat varlığında kompleks oluşturan BD, daha büyük bir reaktif

kompleksi durumuna gelmekte ve iyonik kuvvet tarafından daha kapalı duruma getirilmiş aktif merkezdeki arjinine çok kolay ulaşmamaktadır. Borat yokluğunda ise, reaktif, monomerik BD halinde bulunduğundan böyle bir sterik engellenme ile karşılaşmamaktadır.

Borat içeren ortamda BD ile inaktivasyona karşı çok düşük bir koruyucu etki gösteren enzimin ligandları, modifikasyonun borat içermeyen ortamda yapılması durumunda önemli ölçüde koruyucu etki göstermektedirler (Şekil 8-11 ve Tablo III). Ligandların koruyucu etkileri karşılaştırıldığında, ATP ve ADP'nin PEP'den daha etkili olarak inaktivasyona karşı enzimi korudukları görülmektedir. Yüksek ATP derişiminde, koruyucu etkinin artan ATP derişimi ile uyumlu olarak artmaması, etkinlik tayin ortamında ATP'nin inhibitör etkisinden ileri gelmektedir (76, 87).

Borat iyonu, $B(OH)_4$, polioller içeren karbohidratlar ve türevleri ile tepkimeye girer. Bu tepkime, özellikle borat ve iki komşu cis-hidroksil grupları arasında olur ve tepkime sonucu mono veya dikompleksler oluşturur (68, 69).



Borat ile oluşan bu kompleksler kuvvetli asidik özelliktedirler ve birbirileri ile denge halindedirler (68).

Canlılar için toksik etkili olan borat, gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (70), alkol dehidrogenaz (71), ve diğer pek çok dehidrogenaz enzimlerini (72-74) kompetitif olarak inhibe eder. Bu sistemlerde, boratın inhibitör etkisinin, NAD^+ ve FMN koenzimleri ile etkileşiminden ileri geldiği gösterilmiştir.

Bu çalışmada alyuvar piruvat kinazının da borat tarafından kompetitif olarak inhibe olduğu bulundu (Şekil 14). Piruvat kinazdaki boratın inhibitör etkisi, ATP ve ADP'deki dioller ile tepkimeye girerek kompleks oluşturmamasından ileri gelmektedir. ADP derişimi değişmez tutulup, artan borat derişimi içeren ortamda piruvat kinazın etkinliği tayin edilirse, ortamda serbest ADP derişimi yeterli oldukça enzimde etkinlik kaybı olmamakta, fakat artan borat derişimi serbest ADP derişimini azaltınca etkinlik kaybı görülmeye başlamaktadır (Şekil 13). Alyuvar piruvat kinazında görülen bu inhibisyon, adenin nükleotidleri kullanan tavşan kası piruvat kinazı (51), glutatyon redüktaz (28), domuz kalbi piruvat kinazı (50), mitokondriyel ATPase (66) ve karbarat kinazda görülmemektedir(26). Bu bakımdan, alyuvar piruvat kinazında BD ile modifiye edilen grubun protein çevresi ve aktif merkezin özellikleri tavşan kası ve domuz kalbi piruvat kinazından farklı özellikler göstermektedir.

Alyuvar piruvat kinazının BD ile modifikasyonu, modifikasyon ortamı borat içersin veya içermesin, tümüyle tersinmez olarak bulundu (Şekil 15,16). Bu duruma göre, literütürde modifikasyonun uzun sürmesi durumunda görülen tersinmezlik (4. 51), alyuvar piruvat kinazında çok kısa sürede olmaktadır. Alyuvar piruvat kinazının BD ile modifikasyonunda gözlenen bu tersinmezlikte, modifiye edilen gruba, aktif merkezdeki protein çevrenin önemli etkisi olmalıdır.

Butanedione ile modifikasyonda, yarı ömürlerin tersinin logaritması BD derişiminin logaritmasına karşı grafiklendiğinde, lineer bir doğru elde edilmesi ve elde edilen doğrunun eğiminin 1.0 olması, literatürde enzimin altbirimi başına bir tek arjinin grubunun modifiye olduğu şeklinde yorumlanmaktadır (23, 66, 77). Alyuvar piruvat kinazında da böyle bir grafikleme yapıldığında, elde edilen doğruların eğimi, borat varlığında 0.99, borat yokluğunda ise 0.94 olarak hesaplandı (Şekil 6). Ancak bu yorumun, bir

tek arjinin yerine, "reaktivitesi aynı olan bir grup arjinin" in modifiye olduğu şeklinde olmalıdır. Örneğin fosfogliserat kinazda (75) 7 arjinin modifiye olmakta ve bunlardan ancak 1-2 tanesi etkinlikten sorumludurlar.

Alyuvar piruvat kinazında da BD ile modifiye edilen arjininlerin BD'a reaktiviteleri aynıdır ve modifikasyon ortamında boratın bulunması bu özelliği değiştirmemektedir (Şekil 6). Aktif merkez dışında modifiye olan arjinin varsa bile, bunların etkinlikten ve enzimin konformasyonunda hiç bir sorumlulukları yoktur.

Alyuvar piruvat kinazının NEM ile inaktivasyonunda da, böyle bir grafikleme yapıldığında, elde edilen lineer doğrunun eğimi 0.78 olarak hesaplandı (Şekil 24). DTNB ile modifikasyonda da, altbirim başına iki fonksiyonel sisteinin modifiye olduğu bulundu (Şekil 35). Modifiye edilen sisteinlerin NEM'e reaktivitelerinin aynı oluşu nedeniyle eğimi 0.78 olan lineer doğru elde edilirken; DTNB'ye reaktivitelerinin farklılığı nedeniyle lineer olmayan bir ilişki (Şekil 33) bulundu.

Aynı yöntemden yararlanılarak, bir mol Florodinitrobenzen'in piruvat karboksilazda, lizin ile tepkimeye girmesiyle enzimin inaktive olduğu ($n=1.0$) bulunmuştur (94). Keza piruvat karboksilazın iki mol avidin ($n=1.4$) bağlayarak (95); miyozinin ise 3 mol dinitrofenol bağlayarak (96) inaktive oldukları gösterilmiştir.

Birçok enzimin histidine özgül bir reaktif olan Dietilpirokarbonat tarafından inaktive edildiği değişik araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (18-20, 32-33, 79-81). İnsan alyuvar piruvat kinazı da DPC ile inaktive olmakta ve inaktivasyon görünür birinci derece kinetiğine uygunluk göstermektedir (Şekil 17). Değişik reaktif derişimlerinde elde edilen yarı ömürlerin tersinin logaritması, reaktif derişimlerinin logaritmasına karşı grafiklendiğinde elde edilen doğrunun eğiminin birden büyük olması ($n=1.3$) (Şekil 17'nin iç şekli), enzimin altbirimi başına, etkinlikte fonksiyonu bulunan birden çok histidinin modifiye edildiğini göstermektedir (66, 77-78, 94-96).

Piruvat kinazın substrat ve ligandlarının varlığında, DPC ile modifikasyon incelendiğinde, inaktivasyonun görünür birinci derece kinetiğinden saptığı (Şekil 19-21) ve ancak ikinci faz çıkarıldığında yine görünür birinci derece kinetiklerinin elde edildiği bulundu. Bu bulgular, enzimde etkinlikten sorumlu iki tip histidinin varlığını göstermektedir. Modifiye edilen histidinlerden biri enzimin aktif merkezinde ve katalizden sorumlu; diğeri ise aktif merkez dışında ve enzimin etkinlik gösterebilmesi için gerekli konformasyonun sağlanmasından sorumlu görünmektedir. Çünkü, aktif merkezdeki histidin enzimin ürün ve substratları ile korunabilirken; aktif merkez dışındaki histidin hiç bir ligand ile korunamamaktadır. Buna uygun olarak, inaktivasyonun birinci fazının yarı ömrü hiç bir ligand ile önemli bir değişikliğe uğramamakta (Şekil 19-21 ve Tablo IV) fakat ikinci fazın yarı ömrü koruyucu ligand ile etkili bir şekilde arttırılmaktadır. Bu bulgular, herne kadar kinetik analizler yapmamışlarsa da, Dann ve Britton'ın tavşan kası piruvat ile elde ettikleri sonuçlarla uyum içindedir (20).

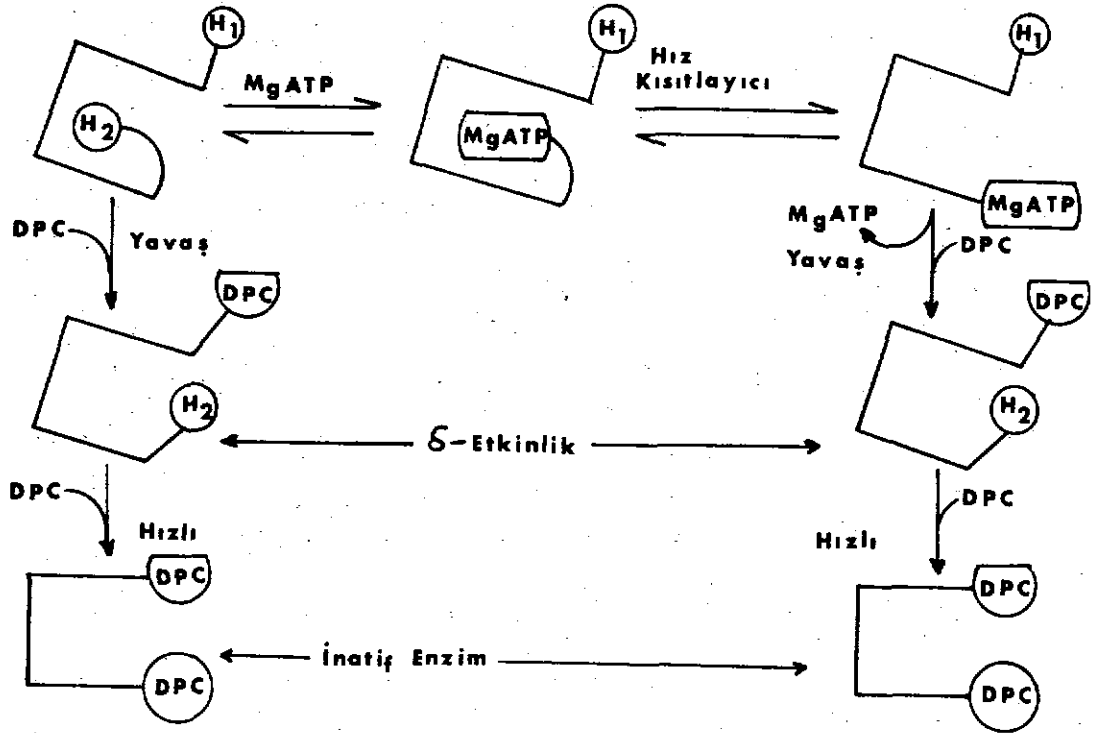
Enzimin aktif merkezinde bulunan ve kataliz olayında görev alan histidinin modifikasyonu, ancak aktif bölge dışındaki histidinin modifiye edilmesi ile başarılabilmektedir. Aktif merkez dışındaki histidinin DPC ile

olan tepkimesi, aktif merkezdeki histidinin açığa çıkışı için konformasyon değişikliği (ligandların yokluğunda) hız kısıtlayıcı basamak olmaktadır (Şekil 21).

Substrat MgADP veya ürün olan MgATP varlığında ise, hız kısıtlayıcı basamak bu ligandlar bağlandıktan sonra enzimde oluşan konformasyon değişikliğidir. Konformasyon değişikliği sonucunda oluşan enzim-MgATP kompleksinin aktif bölge dışındaki histidinin DPC ile modifikasyonu, enzimin aktif bölgesindeki ATP'nin disosiyasyonuna neden olmakta ve bu da, açığa çıkan histidinin hızlı bir şekilde modifikasyonu ile sonuçlanmaktadır. Adenin nükleotidleri ile alyuvar piruvat kinazında konformasyon değişikliği olduğu, enzimin histeretik kinetik göstermesi ile de güçlenmektedir (40).

Enzimin aktif merkezindeki histidinin DPC tarafından modifikasyonu, PEP ve Mg^{++} tarafından kısmen, ADP ve ATP tarafından ise daha etkili olarak engellenmektedir. ADP ve ATP'nin koruyucu etkileri Mg^{++} varlığında güçlenmektedir. Bu sonuçlar tavşan kası piruvat kinazı ile elde edilen sonuçlar ile paralellik göstermektedir (20). MgATP'nin aktif bölgedeki histidini % 100 koruyabilmesi, MgADP'nin MgATP'ye göre korumada daha az etkili olması ve PEP'in ise koruyucu olarak her ikisinden de daha az etkili olması, bize aktif merkezdeki histidinin konumu hakkında az çok bilgi vermektedir. Bu sonuçlara göre histidin, birbiri üzerine düşen komşu ADP ve PEP bağlama bölgesinde bulunmaktadır. Bu bölge, Mg^{++} bağlayan bölge ile de komşu durumdadır. MgATP'nin MgADP'ye göre korumada daha etkili olması ise ATP'deki γ -fosfat grubunun, modifiye edilen histidini daha iyi örttüğü düşüncesini güçlendirmektedir.

İnsan alyuvar piruvat kinazının Dietilpirokarbonat ile modifikasyonunda, yukarıda sayılan bulgular gözönüne alınarak, enzimin inaktivasyonunun ve ligantların koruyucu etkilerinin mekanizması aşağıda şematik olarak çizilmiştir.

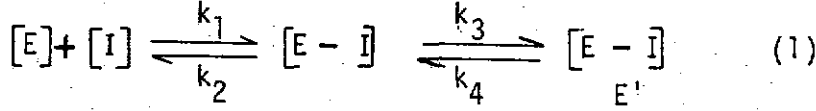


İnsan alyuvar piruvat kinazı da, diğer piruvat kinaz izozimlerinde olduğu gibi (37, 52-53, 82), çeşitli sistein reaktifleri ile modifiye edildiğinde, fonksiyonel sisteinlerin modifikasyonuna bağlı olarak inaktive olmaktadır.

Alyuvar piruvat kinazının modifikasyonunda hangi sistein reaktifini kullanılırsa kullanılsın, enzim modifikasyon ile enzim etkinliğini tümüyle yitirmemektedir. Yitirilmeyen etkinlik değerleri, toplam etkinlik değerlerinden çıkarıldığında, sisteinlerin modifikasyonu ile enzimin görünür birinci derece kinetiğine uygun olarak inaktive olduğu görülmektedir.

DTNB modifikasyonunda inaktivasyon hız değişmezleri, DTNB derişimine karşı grafiklendiğinde, artan DTNB derişimlerinde eğrinin aşağı bükülmesi, enzimin DTNB ile inaktive olmadan bir kompleks oluşturduğunu göstermektedir

(Şekil 34). Böyle bir özellik, daha az olmakla birlikte, NEM modifikasyonunda da gözlemlendi (Şekil 23'de iç Şekil). Her iki reaktif ile de elde edilen sonuçlar Strickland v.d. nin yöntemine göre analiz edilecek olursa (83);



E: Serbest aktif enzim,

E - I: Düşük etkinliği olan enzim-inhibitör kompleksi,

E': İnaktif enzim.

Modifikasyonun, indirgeyici sülfidril ajanları yokluğunda tersinmezliği nedeniyle $k_4 \approx 0$ olur.

$$[E_t] = [E] + [E - I] + [E'] \quad (2) \quad \text{ve} \quad K_I = \frac{[I][E]}{[E - I]} \quad \text{dir.} \quad (3)$$

E_t = Toplam enzim miktarı

Enzim-inhibitör karışımı etkinlik tayini için, modifikasyon ortamından etkinlik tayin ortamına aktarıldığında yüksek düzeyde (40 kez) seyrelmektedir. Bu nedenle gözlenen etkinlikten sorumlu toplam enzim miktarı:

$$[E_t] = [E] + [E - I] \quad \text{olur.} \quad (4) \quad \text{Buna göre toplam enzim miktarı:}$$

$$[E_t] = [E] + [E'] \quad \text{dır.} \quad (5)$$

$$\text{Diğer taraftan enzimin inaktivasyon hızı:} \quad -\frac{dE}{dt} = k_3 [E - I] \quad \text{dir.} \quad (6)$$

Bu denklem integre edilecek olursa:

$$\ln \frac{[E]}{[E_t]} = -\frac{k_3 t}{1 + K_I/I} \quad (7) \quad \text{elde edilir.}$$

$$I \gg E_t \quad \text{ise; bu durumda} \quad k_{\text{gör}} = \frac{k_3}{1 + K_I/I} \quad \text{olur} \quad (8)$$

Bu eşitliğin tersi alınacak olursa:

$$\frac{1}{k_{\text{gör}}} = \frac{1}{k_3} + \frac{K_I}{k_3} \cdot \frac{1}{I} \quad (9) \quad \text{elde edilir.}$$

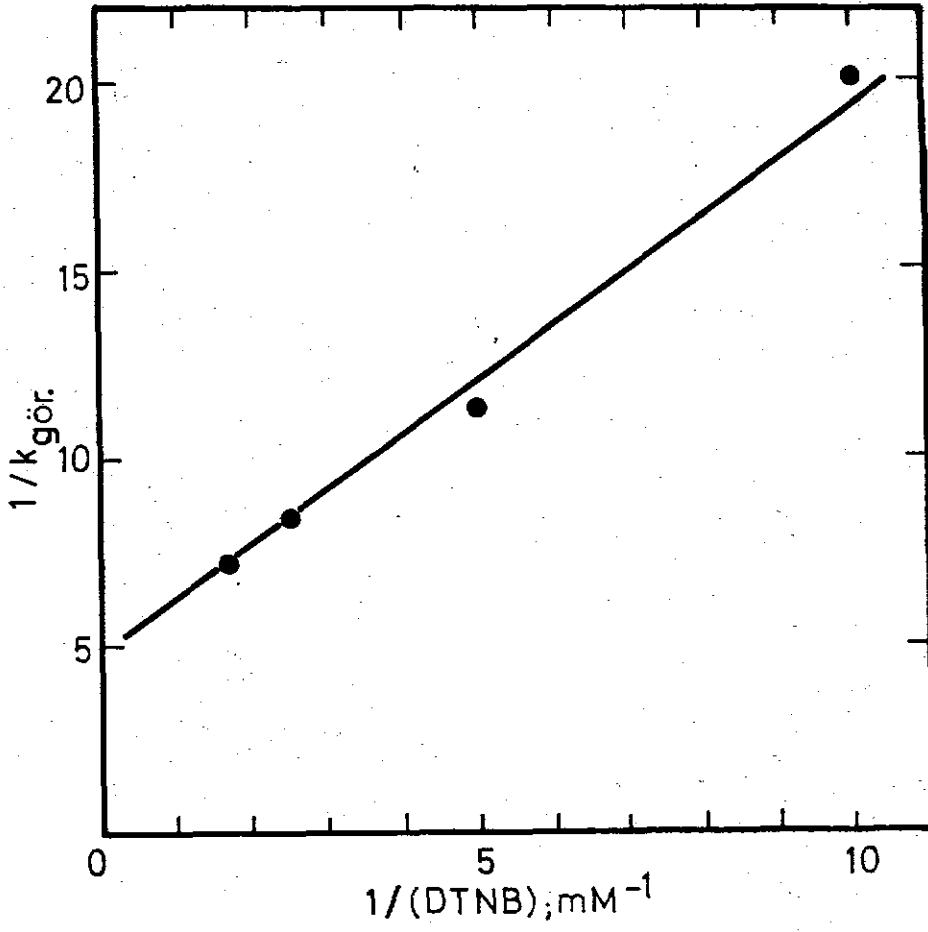
Sayet $I \ll K_I$ ise 8 numaralı eşitlik; $k_{\text{gör}} = \frac{k_3}{K_I} [I]$ ve bu da

$k_{\text{gör}} = k' \cdot [I]$ haline gelir. (10) Böyle bir modifikasyonun kinetiği, basit bimoleküler mekanizmadan ayırdedilemez (83).

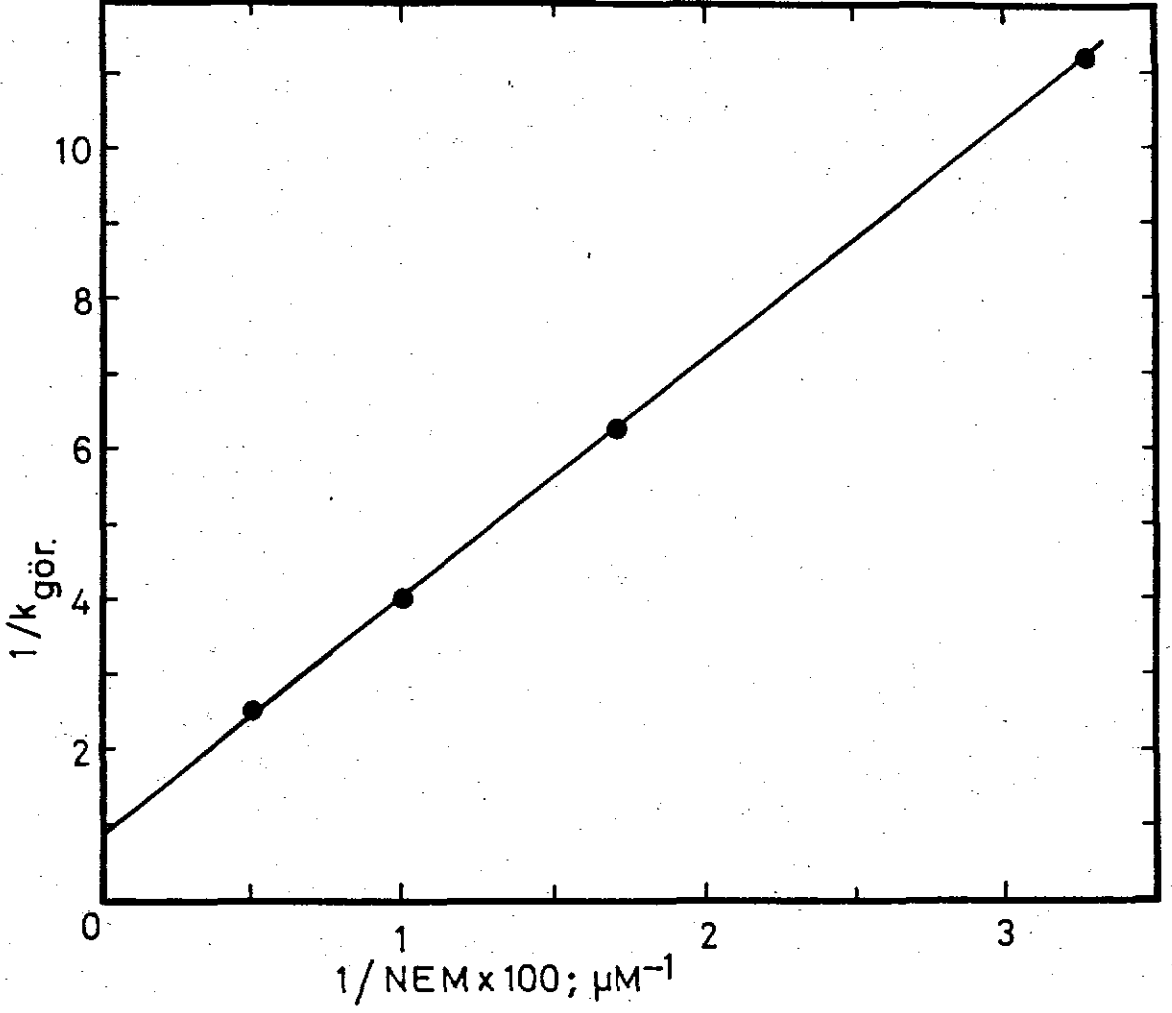
$1/k_{\text{gör}}$ 'e karşı $1/I$ grafiklendiğinde, doğrunun ordinatı kesim noktası $1/k_3$ ve doğrunun eğimi de K_I/k_3 olacağından (Şekil 50, 51), buradan K_I ve k_3 değerlerini hesaplamak mümkündür. Hesaplanan K_I değerleri DTNB için 0.365 mM; NEM için ise 0.348 mM olarak bulundu. k_3 Değerleri ise DTNB ile modifikasyonda 0.243; NEM ile modifikasyonda ise 1.119 dak^{-1} olarak hesaplandı. (k_3 inhibitör derişiminin sonsuz olduğu inaktivasyon hız değişmezidir).

Her iki reaktif ile modifikasyonda hesaplanan kinetik hız değişmezleri, modifikasyonun kinetiği ile uygunluk göstermektedir. Enzim her iki reaktif ile de E-I kompleksi oluşturmaktadır. Her iki reaktif için de K_I değerleri birbirine yakın olmakla birlikte, NEM için bulunan k_3 değerinin DTNB için bulunan k_3 değerinden 4.79 kez daha büyük bulunması, enzimin NEM ile daha hızlı inaktive olduğunu, yani E-I kompleksinin daha hızlı E' (inaktif enzim) haline geldiğini gösterir. Modifiye edilen sisteinlerin NEM'e olan reaktivitelerinin DTNB'ye göre daha yüksek olduğu; aynı düzeyde inaktivasyon için daha düşük NEM derişimine gerek duyulması ile de güçlenmektedir (Şekil 24 ve 33).

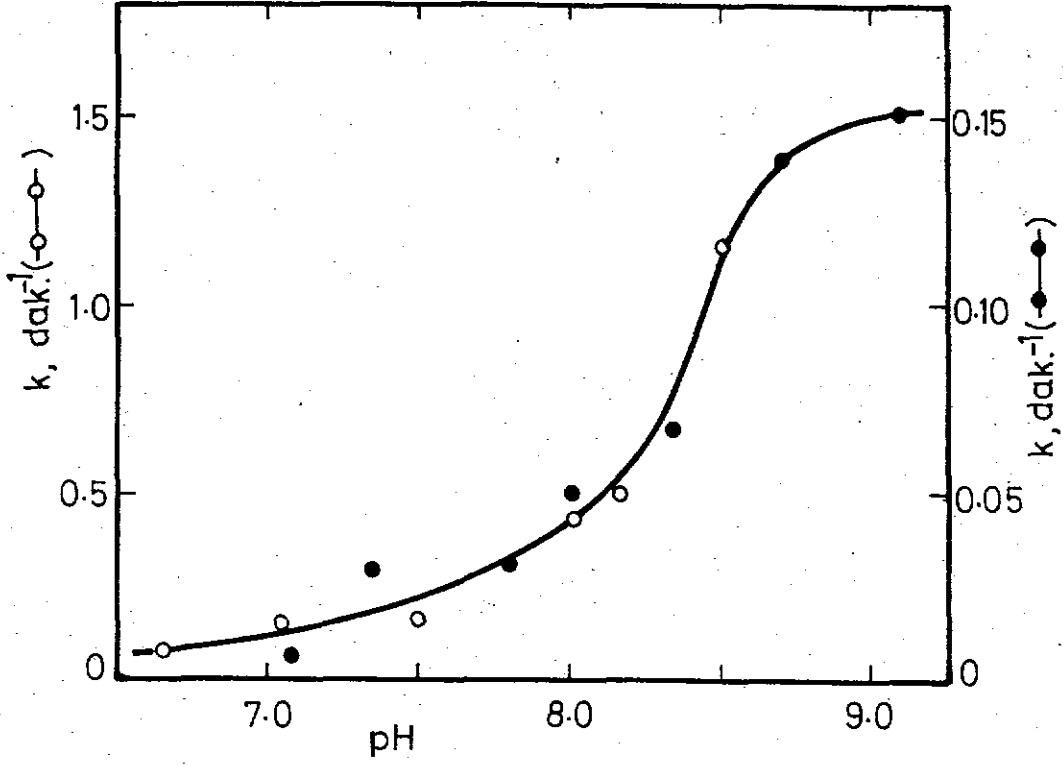
Gerek NEM, gerekse de DTNB ile, etkinlikten sorumlu aynı sisteinlerin modifiye edildiği, inaktivasyonun ve ligandların koruma özelliklerinin benzer olması, ayrıca her iki reaktif ile modifikasyonun pH bağımlılığının çok benzer olması ile de (Şekil 22-25, 32, 33, 37, 52) desteklenmektedir. Ancak NEM ile modifikasyonda gözlenen inaktivasyon hız değişmezlerinin, DTNB ile modifikasyonda gözlenenden daha büyük bulunması, NEM'in DTNB'ye göre daha aktif olmasının yanısıra, reaktiflerin arasındaki sterik etki farklılığının



ŞEKİL 50. İnsan Alyuvar Piruvat Kinazının DTNB ile İnaktivasyonunun Kinetik Hız Değişmezlerinin Tayini (pH: 7.55)



ŞEKİL 51. İnsan Alyuvar Piruvat Kinazının N-Etilmaleimid ile İnaktivasyonunun Kinetik Hız Değişmezlerinin Tayini (PH: 7.55)



ŞEKİL 52. İnsan Alyuvar Piruvat Kinazının DTNB ve NEM ile İnaktivasyonlarının pH Bağımlılığı (0.05 mM DTNB, 0.10 mM NEM)

(—○—) DTNB, (—●—) NEM

bir sonucu olarak da düşünülebilir. Nitekim DTNB inaktivasyonuna karşı enzimi oldukça etkili bir şekilde koruyabilen ADP'nin NEM ile inaktivasyona karşı tümüyle etkisiz olması; reaktifler arasında böyle bir sterik yapı farkı bulunduğunu ve bu nedenle de ADP'nin DTNB ile inaktivasyonu engellediğini göstermektedir (Şekil 25, 26, 37).

Alyuvar piruvat kinazında, enzimin altbirimi başına, aktif merkez dışında ve enzimin yüzeyinde açıkta bulunan iki sisteinin DTNB ile çok hızlı tepkimeye girdiği, fakat bu sisteinlerin enzimin fonksiyonu için önemli bir görev üstlenmediği bulundu. Benzer şekilde Flashner v.d. (37) tavşan kasi piruvat kinazında da dört sülfidrilin modifiye edilmesinin enzimin etkinliğini inhibe etmediği gibi; % 40'a varan bir aktivasyona neden olduğunu göstermişlerdir. Keza maya piruvat kinazında da 4 sistein çok hızlı olarak modifiye olmakta ve bu sisteinlerin de enzimin etkinliğinde fonksiyonu bulunmamaktadır (53).

DTNB ile modifikasyondan görüldüğü gibi (Şekil 35), enzimin altbirimi başına modifiye edilen iki sistein yitirilen etkinliğin tümünden sorumludurlar. Maya piruvat kinazında da altbirim başına modifiye edilen iki sistein yitirilen etkinlikten sorumludurlar (53), ancak maya piruvat kinazındaki bu sisteinlerin DTNB'ye reaktiviteleri aynıdır. Oysa alyuvar piruvat kinazında ise, NEM'e olan reaktiviteleri, DTNB'ye olan reaktivitelerinden daha büyüktür ve DTNB'ye olan reaktiviteleri de aynı değildir (Şekil 35).

Alyuvar piruvat kinazının DTNB ile modifikasyonunda, gözlenen inaktivasyondan sorumlu olan sisteinler (altbirim başına iki sistein) PEP bağlama bölgesinde bulunmakta ve PEP bulunan ortamda enzimi modifikasyona karşı % 100 gibi bir verimle korumaktadırlar (Şekil 25 ve 37). PEP bağlama bölgesinde tanımladığımız bu sisteinler modifiye edilse bile, enzim etkinliğini tümüyle yitirmemektedir. Alyuvar piruvat kinazı, sisteinlerin oksidasyonuna

oldukça duyarlıdır ve oksidasyon ile de etkinliğinin tümünü yitirmez (46, 48). Buna göre PEP bağlama bölgesindeki sisteinler oksidasyon ile disülfid oluşturabilmektedirler. İster oksidasyon, ister kimyasal modifikasyon ile sisteinler modifiye edilsin, enzim etkinliğini tümüyle yitirmemektedir. Modifikasyon ile PEP bağlama bölgesinin konformasyonu değişmekte, fakat kataliz düşük hızda devam edebilmektedir. Modifikasyon ile sisteinlere kimyasal bir grup takıldığından, konformasyon değişimi daha önemli ölçüde olmakta ve etkinlik kaybı da daha fazla artmaktadır.

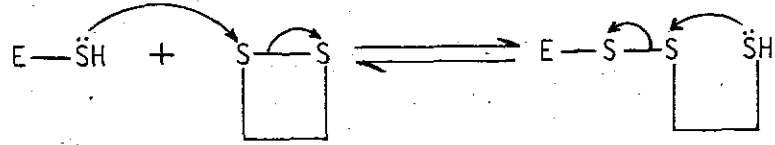
Özgül olarak Mg^{++} iyonu da, NEM ile inaktivasyona karşı kısmi koruyucu etki göstermektedir. Bu etki, daha önce histidin modifikasyonunda tartışıldığı gibi, Mg^{++} bağlayan bölgenin, PEP bağlama bölgesine yakın olmasından ileri geldiği düşünülebilir. ADP varlığında Mg^{++} 'un koruyucu etkisinin kalmaması, enzime bağlanan ADP'nin neden olduğu konformasyon değişiminden ileri gelir.

NEM ile modifikasyonda ister total inaktivasyon, ister inaktivasyonun birinci fazı incelensin, adenin nükleotidlerinin hiç bir koruyucu etkisi görülmedi (Şekil 25-27). Bu özellikler iyodoasetamid ile modifikasyonda da görülmektedir. KCl ve FDP'nin gösterdiği çok az orandaki koruyucu etki, K^+ ve FDP'nin enzimi aktive etmesinden ileri geldiği düşünülebilir (Şekil 27).

NEM ve iyodoasetamid modifikasyonlarında, modifikasyona hiç bir etkisi olmayan ADP, DTNB ile modifikasyonda enzimi inaktivasyona karşı önemli oranda korumaktadır. Bu koruyucu etki, ADP'nin enzimin aktif merkezine bağlanmasından sonra, daha önce de tartıştığımız gibi, DTNB'nin PEP bağlama bölgesindeki sisteinlere ulaşmasının sterik olarak engellenmesinden ileri geldiği şeklinde yorumlandı. Aynı etki maya piruvat kinazında görülmemektedir (53). Bu bakımdan, insan alyuvar piruvat kinazının PEP bağlama bölgesi maya piruvat kinazından; ADP bağlama bölgesi ise tavşan kası ve domuz kalbi

piruvat kinazlarından (50; 51) farklı özellikler göstermektedir.

DTNB'nin sterik etkisini incelemek amacı ile, yapı ve fonksiyon bakımından benzer, ancak daha küçük moleküler yapıda olan okside DTE hazırlandı. Hazırlanan okside DTE 7.5 mM gibi oldukça yüksek derişimde kullanıldığında, NEM ve DTNB modifikasyonundakine benzer bir inaktivasyon görüldü (Şekil 38). DSSD modifikasyonundaki bu özellik; DSSD'nin sisteinler ile tepkimesi sonunda oluşan Enzim-DTE kompleksindeki serbest DTE sülfidrilinin aşağıdakine benzer bir tepkime ile modifikasyonu geri çevirdiği şeklinde yorumlandı:



Nitekim, enzimin DSSD ile modifikasyonunda kullanılan DSSD derişimi arttıkça inaktivasyonun da artması, ancak tepkimenin dengeye ulaşması böyle bir yorumu desteklemektedir (Şekil 38).

Organizmada metabolik yolların düzenlenmesinin ana kontrolü, bu metabolik yollardaki bazı regülatör enzimlerin etkinliklerinin düzenlenmesi ile sağlanır. Bu düzenleme mekanizmalarından biri de, metabolik yolların kontrol rolü oynayan enzimlerinin çeşitli ligandlar ve koşullar ile altbirimlerine disosiyasyonu veya altbirimlerin asosiyasyonunun sağlanması veyahut da konformasyonlarının değiştirilmesi ile sağlanır. Böyle bir regülasyona tümör (84) ve böbrek piruvat kinazları (85) örnek verilebilir.

Alyuvar piruvat kinazının saflaştırılmasında, affinite kromatografisinde enzimin elüsyonu sırasında, enzim kolondan son derece seyrelmiş olarak çıkmaktadır (54). Bu seyreltik enzim deriştirilirken, toplam etkinlikte artma olduğu her saflaştırma çalışmasında da gözlemlendi. Deriştirildiğinde etkinliği artan alyuvar piruvat kinazı, seyreltiğinde de etkinlik yitirmektedir.

Seyrelme ile, seyrelme koşullarına bağlı olarak enzim % 26-62 oranında etkinlik yitirmekte ve daha sonra değişmez bir etkinlik değerine ulaşmaktadır (Şekil 39). Alyuvar piruvat kinazında enzim derişimine bağlı olarak gözlenen etkinlik değişimleri fosfofruktokinaz ve tümör piruvat kinazında da gösterilmiştir (86). Fosfofruktokinaz ve tümör piruvat kinazındaki bu etkinlik değişimlerinin, bu enzimlerin disosiyasyonu ve polimerizasyonundan ileri geldiği bulunmuştur. Tümör piruvat kinazının seyrelmeye bağlı olarak etkinlik yitirmesinin, enzimin dimerlerine disosiye olmasından kaynaklandığı ultrasantrifüjasyon ile gösterilmiştir (86).

Alyuvar piruvat kinazında da, seyrelme ile görülen etkinlik kaybı ve deriştirme ile görülen etkinlik artışının, enzimin altbirimlerine disosiyasyonu veya polimerizasyonundan ileri geldiğini söyleyebilecek durumda değiliz. Çünkü böyle bir varsayımın deneysel bulgularla (dansite gradient santrifüjasyonu, jel filtrasyonu vb.) kanıtlanması gereklidir. Bu yöndeki bir çalışmayı koşullar nedeniyle gerçekleştiremedik. Enzimde disosiyasyon-polimerizasyon dengesinin olup olmadığı poliakrilamid jel elektroforezi ile denendi, ancak olumlu bir sonuç alınamadı (Sonuçlar verilmedi).

Her ne kadar seyrelme ile alyuvar piruvat kinazında görülen belirli orandaki etkinlik kaybı ve kinetik özellikleri disosiyasyonun olduğu sistemleri (örneğin, tümör piruvat kinazı) andırıyorsa da; alyuvar piruvat kinazının seyrelme ile disosiye olduğu şeklinde bir yoruma gidilmedi. Bu nedenle, bu çalışmada "disosiye olmuş" veya "disosiye olmamış" şeklinde bir ifade kullanılmayıp, bunun yerine enzimin N formu (derişik enzim formu) ve D formu (seyreltik enzimin formu) terimleri kullanıldı.

Alyuvar piruvat kinazının kinetik özellikleri pH:6.8 ve pH: 7.4'de araştırıldığında; enzimin konformasyon değişikliği nedeniyle oldukça farklı sonuçlar bulundu. Enzimdeki pH bağımlı konformasyon değişikliği Koster (89)

ve Ibsen'in (92) çalışmalarında da görülmüştür.

pH: 6.8'de enzim seyreltildiğinde, seyrelme ortamı 2-ME içersin veya içermesin enzimin D formlarının etkinliği aynıdır. Fakat 2-ME içeren ortamda seyrelmenin başındaki etkinlik daha yüksektir. pH: 7.4'de ise, seyrelme ile enzimin yitirdiği etkinlik değeri, ortamda 2-ME yoksa oldukça yüksektir; ortamda 2-ME varsa, enzimin yitirdiği etkinlik daha düşük düzeydedir (Şekil 39).

Enzimin indirgenmesi için (pH: 7.4'de) 2-ME yerine sistein kullanıldığında, herikisinde de seyrelmenin başındaki etkinlik değerlerinin birbirine yakın olmasına rağmen, sisteinin enzimi indirgemekte 2-ME'e göre çok daha etkili olduğu bulundu (sonuçlar verilmedi). PEP ile sistein arasındaki yapısal benzerlik nedeniyle, sisteinin PEP bağlama bölgesindeki sistin(ler)i özgül olarak indirgediği düşünülürdü. Ancak PEP ile sisteinin kompetitif olmaması nedeniyle (kinetik çalışmada-sonuç verilmedi) bu düşüncenin yanlış olduğunu gördük. Gerek bu sonuçlardan, gerekse de 2-ME'in GSH'a göre daha etkili olarak enzimi indirgeyebilmesinden (46), indirgenen sistin(ler)in enzimin konformasyonundan sorumlu olduğu şeklinde yorumlandı.

pH: 6.8'de alyuvar piruvat kinazında, FDP yokluğunda PEP'e karşı negatif kooperativite görülmekte ve negatif kooperativite FDP tarafından ortadan kaldırılmaktadır (Şekil 43-45). Ancak bu özelliklerin indirgenmiş enzimin D formunda da bulunduğu, Hill grafiklemesi ile (Şekil 44 D) desteklenmemektedir.

pH: 7.4'de ise, FDP yokluğunda, indirgenmemiş enzimin hem D, hem de N formu düşük PEP derişiminde pozitif kooperativite, daha yüksek PEP derişiminde ise negatif kooperativite gösterirken (Şekil 47 A, C); indirgenmiş enzimin D ve N formu ise yalnızca negatif kooperativite göstermektedir (Şekil 47 B, D). Aynı şekillerde, FDP'nin kooperativiteyi kaldırdığı görülmektedir. Ancak pH: 7.4'de, bu söylediklerimiz Hill ve Eadie-Hofstee grafiklemeleri ile desteklenmemektedir (Şekil 48, 49). Hill ve Eadie-Hofstee grafiklemelerine göre

FDP bulunsun bulunmasın, enzimin tüm formlarında da negatif kooperativite devam etmektedir.

Allosterik bir enzim olan alyuvar piruvat kinazının FDP tarafından aktive edildiği ve enzimin artan PEP derişimine olan sigmoidal cevabının FDP tarafından hiperbolik duruma getirdiği birçok araştırmacı tarafından gösterilmiştir (39, 86, 87). Alyuvar piruvat kinazının FDP yokluğunda sigmoidal kinetik göstermesi oldukça pH bağımlıdır. pH: 8.0'de oldukça net görülen PEP'e karşı sigmoidal davranışı, pH: 5.9'da tümüyle hiperbolik duruma gelmektedir (89). Bu araştırmacılar alyuvar piruvat kinazının pH: 8.0'de FDP varlığında 2 olan n_H değişiminin FDP yokluğunda 0.8'e düştüğünü ve pH: 5.9'da ise FDP varlığında ve yokluğunda Hill değişimini 0.8 olarak rapor etmişlerdir. pH: 7.4'de ise, literatürde rapor edilen çalışmalarda sigmoidal özellik çok net değildir (90). Ayrıca bu özellik, R_4 ve R_2R_2' formları için daha belirgindir (90). Bu çalışmada ise alyuvar piruvat kinazı için sigmoidal özelliği hiç bir koşulda gözleyemedik. Bunun iki nedeni olabilir:

- a) Ya sigmoidal özellik görülen çalışmalarda, enzim yalnızca R_4 formundan değil, fakat R_4 ve R_2R_2' formlarının karışımlarından oluşmaktadır
- b) Hernekadar amonyum sülfat çöktürmesi ile FDP'nin enzimden uzaklaştırıldığı rapor edilmişse de, sistemimizde FDP tümüyle uzaklaştırılmamış olabilir. Alyuvar piruvat kinazının FDP'ye olan K_m 'inin 0.73 mikromolar olduğu (91) anımsanacak olursa ikinci varsayım oldukça önem kazanır. İkinci varsayım arjinin, histidin, sistein ve lizine (sonuçları verilmedi) özgül kimyasal reaktiflerin inaktivasyonuna karşı FDP'nin hiç bir koruyucu etkisinin olmaması ile de güçlenmektedir.

Alyuvar piruvat kinazının PEP'e olan ilgisinin Eadie-Hofstee grafiklemeleri literatürde verilmemiştir. Çalışmamızda Eadie-Hofstee grafiklemeleri ile Hill grafiklemeleri arasında uygunluk bulundu.

Bu çalışmada alyuvar piruvat kinazının ADP'ye ilgisinin n_H değeri 1.05 olarak bulundu, FDP varlığı veya yokluğu bu sonucu değiştirmedir. Bu sonuç, da-da önceki çalışmalar ile uygunluk göstermektedir (91, 92), fakat FDP yokluğunda enzimin ADP'ye olan K_m 'inin arttığı bulundu. Daha önceki çalışmalarda ise FDP yokluğunda enzimin ADP'ye K_m 'inin değiştiği ve değişmediği şeklinde bulgular rapor edilmiştir (90, 91).

Piruvat kinazın PEP'e olan ilgisinin Hill grafiklemesinde, literatürden oldukça farklı sonuçlar bulundu. Literatürde rapor edilen çalışmalarda etkinlik tayin ortamında FDP yoksa, 1.2 ile 2.0 arasında değişen n_H değerleri bulunmuştur ve FDP varlığında n_H değerlerinin 1.0'e indiği görülmüştür (40, 89-92).

Alyuvar piruvat kinazının R_4 formunun PEP'e karşı negatif ve pozitif kooperativite gösterdiği Kahn v.d.'nin çalışmalarında da görülmüştür (93). Adı geçen bu çalışmada n_H katsayısı düşük PEP derişiminde 1.6-1.8; daha yüksek PEP derişiminde ise 0.6 olarak hesaplanmıştır. FDP ile öninkübasyonda pozitif kooperatif etkileşimin ortadan kalktığı; fakat negatif kooperatif etkileşimin tümüyle yokolmadığı bulunmuştur (93).

Bu çalışmada ise, pH: 6.8'de çalışılan her koşulda PEP'e karşı negatif kooperativitenin yalnızca FDP yokluğunda görüldüğü ve bunun FDP tarafından ortadan kaldırıldığı bulundu (Şekil 42-45). pH: 7.4'de ise, FDP yokluğunda, negatif kooperativite enzimin indirgenmiş formlarında; hem pozitif hem de negatif kooperativite ise enzimin indirgenmemiş formlarında görüldü. Pozitif kooperativite FDP varlığında görülmezken; negatif kooperativitenin bütün koşullarda da devam ettiği saptandı (Şekil 47-49).

Alyuvar piruvat kinazında bu çalışmada elde edilen bulgular toparlanacak olursa:

a) İnsan alyuvar piruvat kinazının katalitik merkezinde altbirim başına bir mol arjinin vardır ve bu arjinin ADP bağlama bölgesine yakın bir konumdadır. Daha önce rapor edilen bulgulardan farklı olarak, enzimdeki arjininlerin modifikasyonu için boratın gerekli olmadığı, ayrıca boratın ADP ile borat-ADP kompleksini oluşturduğunu ve bu kompleksin enzimin kompetitif inhibitörü olduğu bulundu. Borat varlığında ligandların koruyucu etkilerinin kalktığı ve enzimin BD ile inaktivasyonunun tersinmez olduğu gösterildi. Bu bulguların ışığı altında, alyuvar piruvat kinazının aktif merkezinin diğer piruvat kinaz izozimlerinininkinden farklı özellikler gösterdiği savunuldu.

b) Alyuvar piruvat kinazında, enzimin etkinliği için önemli iki farklı histidin görev aldığı, bunlardan birinin enzimin aktif merkezinde, diğer histidin ise enzimin aktif konformasyonunun sağlanmasından sorumlu olduğu şeklinde yorumlandı. Aktif merkezdeki histidin enzimin kataliz fonksiyonunda görev aldığı ve histidin bulunduğu bu bölgenin Mg^{++} bağlayan bölgeyi de içerdiği savunuldu.

c) Alyuvar piruvat kinazının PEP bağlama bölgesinde, altbirim başına iki sistein bulunduğu gösterildi. Bu sisteinlerin katalizde doğrudan yer almamaları savı, modifiye edilseler bile, düşük hızda da olsa katalizin devam edebilmesi ile güçlendirildi.

d) Alyuvar piruvat kinazı, FDP yokluğunda, pH: 6.8'de PEP'e karşı negatif kooperatif bir etkileşim göstermekte; bu negatif kooperativitenin FDP tarafından kaldırıldığı bulundu. pH: 7.4'de ise, enzimin indirgenmemiş formunun FDP yokluğunda, PEP'e karşı hem pozitif hem de negatif kooperativite; indirgenmiş formunun ise negatif kooperativite gösterdiği ve pozitif kooperativite FDP tarafından tümüyle kaldırıldığı halde, negatif kooperativitenin tümüyle yok-

edilemediği saptandı.

e) Alyuvar piruvat kinazının seyrelme ile belirli oranda etkinlik yitirdiği; pH: 7.4'de bu etkinlik yitiriminin, indirgeyici ajanlar ile oldukça önlenebildiği gözlemlendi. Bu bulgulardan, etkinlik yitiriminin hem proteinin seyrelmesi hem de sisteinlerin oksidasyonu ile yakından ilgili olduğu şeklinde yorumlandı.

DTNB modifikasyonunda, enzimin etkinliği ile doğrudan ilgili görünmeyen 8 sülfidrilin tepkimesi, koşullarımızda izleyemediğimiz bir hızda olmaktadır. Bu sülfidrillerin modifikasyonunun getireceği konformasyon değişikliği, şayet varsa, aynı anda aktif merkezdeki sülfidrillerin modifikasyonu da başlamış olduğundan gözlenemedi. Etkinlikten sorumlu olan diğer 8 sülfidrilin enzimin PEP bağlama bölgesinde bulunduğu, PEP varlığında bu sülfidrillerin DTNB, NEM ve iyodoasetamid modifikasyonuna karşı enzimi korumaları ile kanıtlandı. SDS varlığında modifiye edilen diğer 4 sülfidrilin görevinin ne olabileceği ise daha ayrıntılı bir çalışmayı gerektirmektedir.

Bu çalışma ile alyuvar piruvat kinazının aktif merkezinde arjinin, Histidin ve sistein amino asitlerinin bulunduğu gösterildi. Ancak çalışma, aktif merkezin topoğrafisini çizebilecek ve kataliz mekanizmasını önerebilecek düzeye ulaşmadığından, böyle bir çabaya girilmedi. Bu yöndeki çalışmalarımız devam etmektedir.

Ö Z E T

İnsan alyuvar piruvat kinazı, özgül bir arjinin reaktifi olan Butanedione ile karanlıkta modifiye edildi. Modifikasyon ile, enzimin altbirimi başına bir mol arjinin Butanedione ile tepkimeye girmekte ve birinci derece kinetiğine uygun olarak enzimin inaktivasyonuna neden olmaktadır. Enzimin ADP bağlama bölgesinde bulunan bu arjininin pK'sı, borat içeren modifikasyon ortamında 8.1; borat içermeyen ortamda ise 8.3 olarak bulundu. ADP ile tepkimeye giren borat, piruvat kinazı kompetitif olarak inhibe etmekte; bu nedenle borat içeren ortamda ligandların inaktivasyona karşı koruyucu etkisi görülmektedir. Piruvat kinazın Butanedione ile inaktivasyonunun, modifikasyon ortamı borat içersin veya içermesin tersinmez olduğu bulundu.

Alyuvar piruvat kinazının Dietilpirokarbonat ile modifikasyonunda, iki fonksiyonel histidin grubu tesbit edildi. Bu histidinlerden biri enzimin aktif merkezi dışında bulunup, enzimin konformasyonundan sorumludur. Aktif merkezde bulunan ikinci histidin ise ADP ve PEP bağlama bölgelerinin çakıştığı bölgede yer almakta ve katalizde fonksiyonu bulunmaktadır. Aktif merkez dışındaki histidin enzimin ligandları ile korunamaması nedeniyle, ligandların yokluğunda görülen birinci dereceden inaktivasyon, koruyucu ligandların varlığında iki faz halinde olmaktadır.

N-Etilmaleimid, DTNB ve İyodoasetamid kullanılarak yapılan sistein modifikasyonlarında, alyuvar piruvat kinazının PEP bağlama bölgesinde iki sisteinin bulunduğu gösterildi. Bu sisteinlerin katalizde rol almadıkları, modifiye edilseler bile enzimin etkinliğinin tümüyle yitirilmemesi ile gösterildi. Yalnızca inaktivasyon fazı incelendiğinde, sisteinlerin modifikasyonu ile enzimin birinci derece kinetiğine uygun olarak inaktive olduğu bulundu.

Alyuvar piruvat kinazının seyrelme ile etkinlik yitirdiği, deriştirme ile etkinlik kazandığı bulundu. Enzimin bu özellikleri pH: 6.8 ve 7.4'de enzimin farklı formlarının kinetik özellikleri incelenerek tartışıldı.

K I S A L T M A L A R

PEP	: Fosfoenolpiruvat
FDP	: Fruktoz-1,6-difosfat
DTT	: Ditiyotreitrol
DTE	: Ditiyoeritritol
DSSD	: Okside Ditiyoeritritol
2-ME	: 2-Merkaptoetanol
DPC	: Dietilpirokarbonat
DTNB	: 5,5'-Ditiyo-bis-2,2'-dinitrobenzoik asit
NEM	: N-Etilmaleimid
ADP	: Adenozin-5'-difosfat
ATP	: Adenozin-5'-trifosfat
HEPES	: N-2-Hidroksietilpiperazin-N'-etansülfonik asit
BD	: 2,3-Butanedione

K A Y N A K L A R

1. Strayer, L., Biochemistry, sayfa 186, W.H. Freeman and Company, San Francisco (1975).
2. Cohen, L.A., Ann. Rev. Biochem., 37, 683-726 (1968).
3. Sigman, D.S., Hooser, G., Ann. Rev. Biochem., 44, 904-955 (1975).
4. Riordan, J.F., Biochemistry, 12, 3915 (1973).
5. Nakaya, K., Horinishi, H., Shibata, K., J. Biochem.(Tokyo), 61, 345 (1967).
6. Takahashi, K., J. Biol. Chem., 243, 6171 (1968).
7. Toi, K., Bynum, E., Norris, E., Itano, H.A., J. Biol. Chem., 242, 1036 (1967).
8. Colowick, S.P., Kaplan, N.O., Methods in Enzymology, Vol. XXV, sa. 387-671 (1973).
9. Colowick, S.P., Kaplan, N.O., Methods in Enzymology, Vol. XI, sa. 481-714 (1967).
10. Bloxham, D.P., Sharma, R.P., Biochim. Biophys. Acta, 525, 61 (1978).
11. Ellman, G.L., Arc. Biochem. Biophys., 82, 70 (1959).
12. Wilson, J.M., Wu, D., DeGrood, R.M., Hupe, D.J., J. Amer. Chem. Soc., 102, 359 (1979).
13. Gutfreund, H., Sturtevant, J.M., Biochem. J., 63, 656 (1955).
14. Kezdy, F.J., Bender, M.L., Biochemistry, 1, 1097 (1962).
15. Szewczuk, A., Connel, G.E., Biochim. Biophys. Acta, 105, 352 (1965).
16. Kravchenko, N.A., Kleopina, G.V., Biochim. Biophys. Acta, 92, 412 (1964).
17. Heinrikson, R.L., J. Biol. Chem., 241, 1393 (1966).
18. Pradel, L.A., Kassab, R., Biochim. Biophys. Acta, 167, 317 (1968).
19. Setlow, B., Mansour, T.E., J. Biol. Chem., 245, 5524 (1970).
20. Morris, D.L., McKee, J.S., Eur. J. Biochem., 29, 515 (1972).

21. Bruice, T.C., Gregory, J.J., Walters, S.L., J. Amer. Chem. Soc. 90, 1612, (1968).
22. Sokolovsky, M., Harell, D., Riordan, J.F., Biochemistry, 8, 4740 (1969).
23. Hollenberg, P.F., Flashner, M., Coon, M., J. Biol. Chem., 246, 946 (1971).
24. Yamasaki, R.B., Vega, A., Feeney, R.E., Analytical Biochemistry, 109, 32 (1980).
25. Borders, C.L., Riordan, J.F., Fed. Proc., 34, 647 (1975).
26. Pillai, R.P., Marshal, M., Villafranca, J.J., Arch. Biochem. Biophys., 199, 16 (1980).
27. Powers, S.G., Riordan, J.F., Proc. Nat. Acad. Sci., 72, 2616 (1975).
28. Boggaram, V., Mannervik, B., Biochim. Biophys. Acta., 701, 119 (1982).
29. Lange, L.G., Riordan, J.F., Vallee, B.L., Biochemistry, 13, 4361 (1974).
30. Lehninger, A., Biochemistry, sayfa 224, Worth Publishers, Inc., New York (1975).
31. Crestfield, A.M., Stein, W.H., J. Biol. Chem., 238, 2413 (1963).
32. Dann, L.G., Britton, H.G., Biochem. J., 137, 405 (1974).
33. Grouselle, M., Thiam, A.A., Pudles, J., Eur. J. Biochem., 39, 431 (1973).
34. Smith, D.G., Nagamatsu, A., Fruton, J.S., J. Amer. Chem. Soc., 82, 4600 (1960).
35. Danehy, J.P., Elia, V., Lavelle, C.J., J. Org. Chem., 36, 1003 (1971).
36. Hall, E.R., Cottom, G.L., Int. J. Biochem., 9, 785 (1978).
37. Flashner, M., Hollenberg, P.F., Coon, M.J., J. Biol. Chem., 247, 8114 (1972).
38. Black, J.A., Henderson, M.H., Biochim. Biophys. Acta., 284, 115 (1972).
39. Garreau, H., Temkine, B.H., Biochimie, 54, 1103 (1972).
40. Badwey, J.A., Westhead, E.W., J. Biol. Chem., 251, 5600 (1976).
41. Peterson, J.S., Chern, C.J., Harkins, R.N., Black, A.J., FEBS Letters, 49, 73 (1974).
42. Kahn, A., Marie, J., Garreau, J., Sprengers, E.D., Biochim. Biophys. Acta, 523, 59 (1978).
43. Marie, J., Garreau, H., Kahn, A., FEBS Letters, 78, 91 (1977).
44. Garreau, H., Columelli, S., Marie, J., Kahn, A., FEBS Letters, 78, 95 (1977).
45. Walker, F.D., Hild, W.J., Science, 165, 601 (1969).
46. Van berkel, J.C., Koster, J.F., Staal, G.E.J., Biochim. Biophys. Acta, 321, 496 (1973).
47. Badwey, J.A., Westhead, E.W., Biochem. Biophys. Res. Commun., 74, 1326(1977).

48. Van Berkel, J.C., Staal, G.E.J., Koster, J.F., Nyessen, J.G., *Biochim. Biophys. Acta*, 334, 361 (1974).
49. Adachi, K., Ghory, P.K., Asakura, T., Schwarts, E., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 74, 501 (1977).
50. Berghauser, J., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 358, 1565 (1977).
51. Cardemil, E., Eyzaguirre, J., *Arc. Biochem. Biophys.*, 192, 533 (1979).
52. Yun, S., Suelter, C.H., *J. Biol. Chem.*, 254, 1811 (1979).
53. Yun, S., Suelter, C.H., *J. Biol. Chem.*, 254, 1806 (1979).
54. Kılınç, K., *Bilim Uzmanlığı Tezi*, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi (1980).
55. Marie, J., Kahn, A., Boivin, P., *Biochim. Biophys. Acta*, 481, 96 (1977).
56. Schuster, L., *Methods in Enzymology* (Colowick, S.P., Kaplan, N.O., eds), vol. XXII, sa. 412, Academic Press, New York (1971).
57. Weber, K., Osborn, M., *J. Biol. Chem.*, 244, 4406 (1969).
58. Cuatrecasas, P., Anfinsen, C.B., *Methods in Enzymology* (Edited by Jakoby, W.P.), Academic Press Inc. New York, vol. XXII, sa. 345 (1971).
59. Ryan, L.D., Westling, C.S., *Arc. Biochem. Biophys.*, 160, 279 (1974).
60. Kimberg, D.V., Yielding, L., *J. Biol. Chem.*, 237, 3233 (1962).
61. Tietz, A., Ochoa, S., *Arc. Biochem. Biophys.*, 78, 477 (1958).
62. Warburgh, O., Christian, W., *Biochem. Z.*, 310, 384 (1941) "Alınmıştır"
Colowick, S.P., Kaplan, N.O., *Methods in Enzymology*, Academic Press Inc. New York, vol. III, sa. 454 (1957).
63. Schaffner, W., Weissman, C., *Anal. Biochem.*, 56, 502 (1973).
64. Gripon, J.C., Hoffman, T., *Biochem. J.*, 193, 55 (1981).
65. Cleland, W.W., *Biochemistry*, 3, 481 (1964).
66. Marcus, F., Schuster, S.M., Lardy, H.A., *J. Biol. Chem.*, 251, 1775 (1976).
67. Ellman, G.L., *Arc. Biochem. Biophys.*, 74, 443 (1958).
68. Malcolm, E.W., Green, J.W., Swenson, H.A., *J. Chem. Soc.*, 4669 (1964).
69. Evans, W.J., McCartney, E.J., Carney, W.B., *Analytical Biochemistry*, 95, 383 (1979).
70. Wolny, M., *Eur. J. Biochem.*, 80, 551 (1977).
71. Smith, K.W., Johnson, S.L., *Biochemistry*, 15, 560 (1976).
72. Deitrich, R.A., *Arc. Biochem. Biophys.*, 119, 253 (1967).
73. Strittmatter, P., *J. Biol. Chem.*, 239, 3043 (1964).
74. Weser, U., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 349, 1479 (1968).

75. Rogers, K., Weber, B.H., *Arc. Biochem. Biophys.*, 180, 19 (1978).
76. Krebs, E.G., Seubert, W., Schoner W., in: *Current Topics in cellular Regulation* (Horecker, B.L., Stadtman, E.R., eds.) vol. 3, sa. 237 (1971).
77. Scrutton, M.C., Utter, M.F., *J. Biol. Chem.*, 240, 3714 (1965).
78. Levy, H.M., Leber, P.D., Ryan, E.M., *J. Biol. Chem.*, 238, 3654 (1963).
79. Baker, M.E., Fanestil, D.D., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 98, 976 (1981).
80. Thome-Beau, F., Lê-Thi-Lan, Olomucki, A., Van Thoai, Nguyen, *Eur. J. Biochem.* 19, 270 (1971)
81. Leonard, N.J., McDonald, J.J., Henderson, R.E.L., Reichman, M.E., *Biochem.* 10, 3335 (1971).
82. Chalkley, R.A., Bloxham, D.P., *Biochem. J.*, 159, 213 (1976).
83. Strickland, S., Palmer, G., Massey, V., *J. Biol. Chem.*, 250, 4048 (1975).
84. Spanmann, G., Schulz, J., Hofmann, E., *FEBS Letters*, 36, 305 (1973).
85. Ibsen, K.H., Trippet, P., *Biochemistry*, 11, 4442 (1972).
86. Hofmann, E., Kurganov, B.I., Schellenberger, W., Schulz, J., Sparmann, G., Wenzel, K.W., Zimmerman, G., *Advances in Enzyme Regulation*, 13, 247 (1974).
87. Staal, G.E.J., Koster, J.F., Kamp, H., Van Milligen, B.L., Veeger, C., *Biochim. Biophys. Acta*, 227, 86 (1971).
88. Blume, K.G., Hoffbauer, R.W., Busch, D., Arnold, H., Lohr, G.W., *Biochim. Biophys. Acta*, 227, 364 (1971).
89. Koster, J.F., Staal, G.E.J., Van Milligen, B.L., *Biochim. Biophys. Acta*, 236, 362 (1971).
90. Sprengers, E.D., Staal, G.E.J., *Biochim. Biophys. Acta*, 570, 259 (1979).
91. Badwey, J.A., Edward, W.W., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 77, 275 (1977).
92. Ibsen, K.H., Schiller, K.W., Haas, T.A., *J. Biol. Chem.*, 246, 1233 (1971).
93. Kahn, A., Marie, J., Garreau, H., Sprengers, E.D., *Biochim. Biophys. Acta*, 523, 59 (1978).
94. Keech, D.B., Farrant, R.K., *Biochim. Biophys. Acta*, 151, 493 (1968).
95. Scrutton, M.C., Utter, M.F., *J. Biol. Chem.*, 240, 3417 (1965).
96. Levy, H.M., Leber, P.D., Ryan, E.M., *J. Biol. Chem.*, 238, 3654 (1963).