

283808

T. C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ FAKÜLTESİ

**İNSAN ALYUVAR PİRUVAT KİNAZININ SAFLAŞTIRILMASI
VE 2, 3-BUTANEDİONE İLE MODİFİKASYONU KİNETİKLERİ**

**BİYOKİMYA PROGRAMI
BİLİM UZMANLIĞI TEZİ**

Kamer KILINÇ

ANKARA — 1980

T. C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ FAKÜLTESİ

**İNSAN ALYUVAR PİRUVAT KİNAZININ SAFLAŞTIRILMASI
VE 2, 3-BUTANEDİONE İLE MODİFİKASYONU KİNETİKLERİ**

*BİYOKİMYA PROGRAMI
BİLİM UZMANLIĞI TEZİ*

Kamer KILINÇ

REHBER ÖĞRETİM ÜYESİ : DOÇ. DR. NAZMI ÖZER

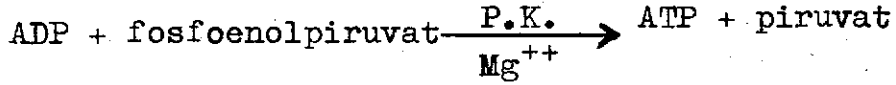
ANKARA — 1980

Sayfa

| | |
|--|----|
| Amonyum Sülfat Çöktürmesi | 24 |
| Sephadex G-75 Kromatografisi | 25 |
| Bleu Dextran-Sepharose 4B affinite Kromatografisi | 25 |
| Batchwise Bleu Dextran-Sepharose 4B affinite Kromatografisi | 30 |
| Piruvat Kinazın Normal ve SDS'li Jel Elektroforezi | 31 |
| Alyuvar Piruvat Kinazının pH Optimumu Tayini | 33 |
| Butanedione Modifikasyonu | 39 |
| -Modifikasyonun pH bağımlılığı | 47 |
| -Modifikasyona Tuzun Etkisi | 47 |
| -Ligantların Koruyucu Etkisi | 47 |
| TARTIŞMA | 53 |
| ÖZET | 62 |
| KISALTMALAR | 63 |
| KAYNAKLAR | 64 |

G İ R İ Ş

Piruvat kinaz (PK), heksokinaz ve fosfofruktokinazdan sonra glikolitik yol'un hızını düzenliyen üçüncü enzim olup, fosfoenolpiruvatın fosforil grubunu ADP'ye aktararak ATP ve piruvatın sentezlenmesini sağlar.



Omurgalı hayvan dokularından piruvat kinazın dört izozimi bulunmuştur(1):

M₁ tipi piruvat kinaz, kasta bulunan tek PK izozimidir. Kalp kası ve beyinde ise çoğunluktadır. Fruktoz 1,6-difosfata (FDP) duyarsız olup, değişik fosfoenolpiruvat (PEP) derişimlerinde Michaelis-Menten kinetiğine uyar. Primer yapıları aynı olan dört altbirimden meydana gelir. Ligant bağlama bölgeleri ile en çok çalışılan PK izozimidir(1, 25, 26,27)

M₂ tipi PK vücudun çeşitli dokularına dağılmış olarak yaygın bir şekilde bulunur. Karaciğerde azınlıkta, böbrek ve lökositte çoğunlukta olan PK izozimidir. Allosterik bir enzim olmasına rağmen diğer allosterik piruvat kinazlardan farklı kinetik özelliklere sahiptir(1)

L tipi piruvat kinaz, karaciğerde çoğunluktaki piruvat kinazdır. Birbirinin aynı olan dört altbirimden meydana gelir.

FDP allosterik aktivatörü, alanin ve ATP allosterik inhibitörüdür(2, 3). Kinetik özellikleri bakımından alyuvarda bulunan PK izozimine benzer(1, 4).

Omurgalı dokularında bulunan dördüncü PK izozimi, R tipi PK olup; alyuvardan saflaştırılan tek PK izozimidir. Kinetik ve immünolojik olarak L tipi izozime benzemesi nedeniyle, uzun süre "L tipi" diye sınıflandırılmıştır. Ancak elektroforezde L tipi izozimden ayrılır ve diğer izozimlerinden farklı olarak; tepkime PEP eklenmesi ile başlatıldığında "hysteretic" davranış gösterir(5).

Piruvat kinazın glikolitik yolda ATP'nin sentezlendiği iki tepkimeden birini katalize etmesi ve bu tepkimenin glikolizin önemli kontrol basamaklarından birini oluşturması bu enzimin önemini gösterir. Hemoglobinin oksijen taşıma yeteneğini 2,3-difosfogliserat üzerinden dolaylı olarak kontrol etmesi ve mitokondrinin bulunmadığı alyuvarlarda tek enerji kaynağının glikoliz olması bu önemi daha da arttırmaktadır.

Alyuvar piruvat kinazı dört altbirimden meydana gelen bir tetramerdir. Piruvat kinazın diğer izozimleri birbirinin aynı olan altbirimlerden meydana gelen birer homotetramer iken; R tipi izozimin altbirimlerin yapısı tamamen altbirimlerin olgunlaşmasına (matürasyonuna) bağlıdır. Retikülosit ve eritroblastlardaki PK, R_4 şeklinde tanımlanan bir homotetramer olup tamamen inaktiftir. R_4 formundaki enzimin altbirimlerin molekül ağırlığı 63 000 iken; alyuvarlarda

proteolitik bir modifikasyon ile, altbirim molekül ağırlığı 58 000 olan ergin alyuvar piruvat kinazına, R_4 'e çevrilir (6).

Dolaşımdaki alyuvarlarda piruvat kinaz, olgunlaşmasına bağlı olarak R_4 şeklindeki homotetramer veya R_2R_2' şeklindeki heterotetramerdir. Bu iki yapı affinite kromatografide iki zirve halinde birbirinden ayrılır. Birinci zirve özgül etkinliği 300 (ünite/mg. protein) civarında olan homotetramer R_4 ; ikinci zirve ise özgül etkinliği 150 civarında olan heterotetramer R_2R_2' şeklindeki piruvat kinazdır (7). Altbirimlerin molekül ağırlıkları değişik olmasına rağmen, R ve R' formlarının antijenik özellikleri aynıdır (7).

Proteolitik modifikasyonla R_4' piruvat kinaz, tamamen R_4 şekline çevrilir. Retikülositte R_4' şeklinde sentezlenen PK; dolaşımdaki alyuvarlarda R_2R_2' şeklinden R_4 şekline gelirken, özgül etkinliği de iki katına çıkar (8). Ergin PK, R_4 şeklindeki PK'dır.

Alyuvar piruvat kinazının olgunlaşmasının böyle bir yol izlediği FDP bağlama deneyleri ile de gösterilmiştir. Nitekim R_2R_2' ; mol enzim başına 2 mol FDP bağladığı halde, R_4 şeklindeki enzimin mol başına 4 mol FDP bağladığı bulunmuştur (9). Bu bulgular, R' formunda FDP bağlama bölgesinin kapalı olduğunu ve ancak proteolitik modifikasyon ile bu bölgenin ortaya çıktığını göstermektedir.

Diğer piruvat kinaz izozimlerinde böyle bir olgunlaşma gözlenememiştir. Karaciğer gibi dokularda proteolitik aktivitenin yüksek olması nedeniyle, diğer PK izozimlerinde trans-lasyon sonrası bu tip bir olgunlaşma gözlenemeyecek kadar kısa sürede olabilir (8).

Alyuvar piruvat kinazı; glikoliz hızını kontrol etmesi ve ATP'nin sentezlendiği tepkimelerden birini katalize etmesi yanında, hücrede dolaylı olarak 2,3-difosfogliserat düzeyini kontrol etmesi nedeniyle alyuvar metabolizmasında merkezi bir rol oynar. Piruvat kinaz etkinliğinin hücredeki ATP düzeyi ile kontrolü ve bu enzimle 2,3-DPGA düzeyinin dolaylı olarak düzenlenmesi, hemoglobinin oksijen taşıma yeteneğini etkiler. Alyuvarlarda en sık rastlanan kalıtsal bozukluklardan birisi olan piruvat kinaz eksikliğinde 2,3-DPGA seviyesi yükselir, hemoglobinden oksijen dissosiasyon eğrisi sağa kayar, alyuvar küreselleşir ve hemoliz hızı artar (11) (Nonsferositik hemolitik anemi).

Alyuvar piruvat kinazının histeretik kinetik göstermesi de, 2,3-DPGA düzeyinin kontrolü ile yakından ilgilidir. Piruvat kinaz tepkimesinin hızı zamana bağlı bir gecikme (lag) gösterir (histeretik davranış). Adenin nükleotidleri ile öninkübasyonda gecikme zamanı uzarken; PEP ile öninkübasyonda tamamen, FDP ile öninkübasyonda kısmen ortadan kalkar (5). Ligant derişimindeki hızlı değişime yavaş cevap veren enzimler Frieden tarafından "Hysteretic enzimler" diye adlandırılmıştır (10). Piruvat kinazdaki bu histeretik cevap, alyuvarlar-

da hemoglobinden oksijenin deoksijenasyonu safhasında PEP derişimini geçici olarak yükseltir. PEP derişimindeki bu yükselme 2,3-DPGA birikimine neden olur ve hemoglobinden oksijenin dokuya kolayca dokuya bırakılmasını sağlar(2, 5, 11).

Alyuvar piruvat kinazı Monod, Wyman ve Changeux'nun "Allosterik Enzim" modeline uygun olarak iki konformasyon gösteren R tip enzimlerden biridir (2, 12). Substrat ve heksoz difosfatların(HDP) R formuna, Adenin nükleotidlerinin de T formuna ilgisi fazladır (3). Enzimin FDP ve PEP bağlayabilmesi için ADP gerekli değildir (3).

Piruvat kinazın allosterik aktivatörü olan heksoz-difosfatlar;

FDP > MDP > GDP sırasına göre enzimi aktive ederler. Heksozdifosfatların enzimi aktive etmesi, aktif substrat olan MgADP için Km'i düşürmeleri ile olur. Doygun PEP derişimlerinde heksozdifosfatların etkisi yoktur (13).

Alyuvar piruvat kinazı eksikliği, nonsferositik hemolitik aneminin iyi bilinen nedenlerinden biridir. Bu hastalarda PK etkinliğinin normalin % 7'sine kadar düştüğü ve ATP düzeyinin azaldığı rapor edilmesine karşın; PK etkinliğinin ve ATP düzeyinin normal, hatta yükseldiğini rapor eden çalışmalarda vardır.(14)

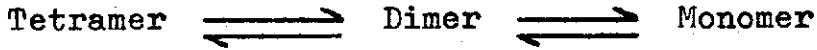
Okside glutatyon (GSSG) ile -SH grupları oksitlenen piruvat kinaz inaktive olur. Bu enzimin aktif şekle çevrilmesi, oksitlenmiş sülfidril gruplarının indirgenmesi ile

başarılabilir. Bu aktivasyon merkaptoetanol ile tümüyle; re-
dükte glutatyon ile kısmen olur (18). Bu özelliklerin, alyu-
var piruvat kinazı eksikliği olan hastalardan elde edilen
PK ezimince de paylaşıldığı ve 2-ME (merkaptoetanol) ile in-
kübe edilen hasta PK'nın kinetiğinin normale döndüğü rapor
edilmiştir (18).

In vitro GSSG ile modifiye edilmiş enzimin kinetik
özelliklerinin hasta piruvat kinazınıniki ile aynı olması, PK
eksikliğinin hücredeki GSSG/GSH oranına sıkı sıkıya bağlı ol-
ması, PK eksikliğinin translasyon sonrası bir modifikasyon
sonucu ortaya çıktığını destekliyen delillerdir. Nitekim GSSG
ile -SH grupları modifiye edildiğinde, hastada alyuvar hemo-
liz hızının arttığı görülmüştür (19). GSSG ile öninkübasyon-
dan sonra enzim PEP'e karşı kooperativ etkileşimini kaybeder,
allosterik inhibitörü olan ATP'ye ilgisi azalır, normal Mic-
haelis-Menten kinetiklerine uyar ve $R \rightleftharpoons T$ formları ara-
sındaki denge tümüyle R formuna kayar (19).

Piruvat kinaz eksikliği görülen kişilerde, PK'ın PEP'e
olan ilgisi artar. Normal PK'da 1.8 mM olan Km değeri 0.07
mM'a düşer(14, 19). PK eksikliği olan hastalarda, ACA-34
Ultrogel kolonunda PK tetramer, dimer, monomer olmak üzere
üç zirve halinde elde edilmiştir (20). Bu da hastalarda en-
zimin monomer ve dimerlerine ayrılabilirdiğini gösterir. Nor-
mal enzimde monomerler PEP için düşük Km değerine sahip iken,
altbirimlerin polimerizasyonu ile oluşan tetramer piruvat
kinazda konformasyon değişiklikleri nedeniyle Km yükselir.

Hastalarda ise monomer ve tetramerlerin, PEP için Km değerlerinin aynı olduğu bulunmuştur (20). Piruvat kinazın sadece tetramer formu FDP tarafından aktive edilmektedir, monomerler ve dimerler için böyle bir aktivasyon gözlenememiştir. Hastalardaki PK'ın allosterik özelliğini kaybetmesi de böyle bir dissosiasyonun olduğuna işaret etmektedir (20). Ancak normal kişilerin PK'nda da



formları arasında, hastalardaki gibi bir assosiasyon ve dissosiasyonun olduğunu söylemek için yeterli hiç bir bilgiye sahip değiliz.

Normal piruvat kinazda böyle bir dissosiasyonun varlığını gösterebilmek, mutant piruvat kinazın normal PK'dan farklılıklarını moleküler düzeyde inceleyebilmek, kısaca PK eksikliğine bağlı nonsferositik hemolitik aneminin nedenlerinin moleküler mekanizmasının açıklanabilmesi için; küçük kan örneklerinden kısa sürede ve mümkün olduğu kadar doğal yapısındaki enzimi saf olarak elde edebilmenin önemi açıktır. Tablo I'den de görüleceği gibi, literatürde rapor edilen saflaştırma çalışmalarının ortak yönleri, çok sayıda saflaştırma basamağı içermesi, verimin düşük olması ve saflaştırma işleminin uzun zaman almasıdır. Özellikle araştırmacıların bu çalışmalarda belirttiği (15, 16, 17) enzimin dayanıksızlığı sorunu (ki bu sorun nonsferositik hemolitik anemili hastaların PK'nda daha da büyüktür) uzun süren saflaştırmalarda büyük bir dezavantaj olmaktadır.

| KULLANILAN YÖNTEM | İŞLEM SAYISI | ÖZGÜL ETKİNLİK (I.U./mg) | SAFLAŞMA ORANI | VERİM (%) | REF. |
|---|--------------|--------------------------|----------------|-----------|--------------|
| Sephadex G-100 kromatografisi | 1 | | | | |
| Amm. sülfat çöktürmesi | 4 | | | | |
| Isı denatürasyonu | 1 | | | | |
| Sephadex G-200 kromatografisi | 1 | | | | |
| SONUÇ : | 7 | 57.9 | 10 400 | 11 | (15) |
| Amm. sülfat çöktürmesi | 4 | | | | |
| CM-selüloz kromatografisi | 1 | | | | |
| CM-selüloz kromatografisi (FDP ile elüsyon) | 1 | | | | |
| DEAE-selüloz kromatografisi | 1 | | | | |
| SONUÇ : | 7 | 77.4 | 29 800 | 8.24 | (16) |
| Amm. sülfat çöktürmesi | 6 | | | | |
| Sephadex G-25 kromatografisi | 4 | | | | |
| DEAE-sephadex batchwise kromatografisi | 1 | | | | |
| Bleu dextran sepharose 4B Aff. kromatografisi | 1 | | | | |
| SONUÇ : | 12 | 290 | 39 000 | 29 | (17) |
| Amm. sülfat çöktürmesi | 1 | | | | |
| Sephadex G-75 kromatografisi | 1 | | | | |
| Bleu dextran sepharose 4B Aff. kromatografisi | 1 | | | | |
| SONUÇ : | 3 | 296 | 31 490 | 59 | (Bu çalışma) |

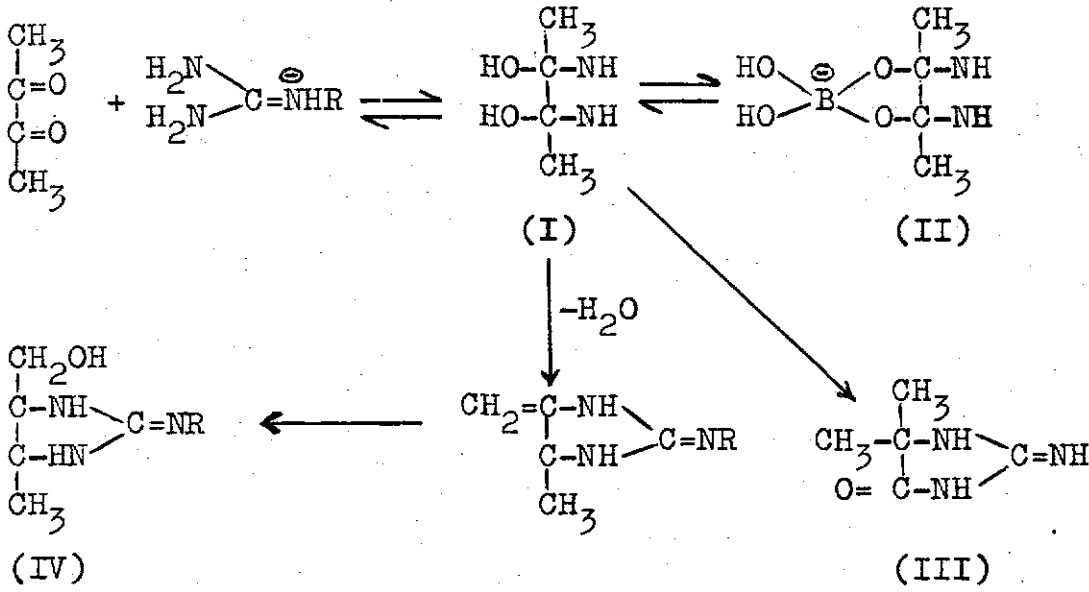
TABLO I : Literatürde rapor edilen Alyuvar PK'ı saflaştırma çalışmaları

Mutant piruvat kinazın moleküler düzeyde normal enzimden farklı yönlerinden ilki, PK'ın allosterik aktivatörü olan FDP bağlama çalışmaları ile gösterilmiştir (9, 20). Mutant enzimin monomer ve tetramerlerinin FDP'a ilgilerinin aynı olması nedeniyle, bu araştırmacılar mutant enzimdeki tetramer yapının, monomerlerinin basit bir agregasyonu ile oluştuğunu savunmuşlardır (20).

Mutant enzim ile ilgili olarak ligant bağlama çalışmalarının yapılmamış olması; normal enzimde ise bu konuda çok az bilgiye sahip olmamız nedeniyle, ligant bağlama bölgeleri bakımından mutant ve normal enzimlerin farklılıklarını karşılaştırabilecek bilgi birikiminden yoksun bulunmaktayız. Alyuvar piruvat kinazının ligant bağlama bölgeleri için yapılan deneyler FDP ile denge diyalizi, N-etilmaleimid inaktivasyonu ve bu inaktivasyonun adenin nükleotidlerce korunması ile sınırlı kalmıştır (10,3). Substrat bağlama bölgesi ile ilgili herhangi bir çalışma da yapılmamıştır.

Özgül amino asit reaktifleri kullanılarak ligant bağlama bölgeleri ile ilgili çalışmalar PK'da özellikle M_1 tip izozimle yapılmıştır. PK ve diğer enzimlerle yapılan bu şekildeki çalışmalarla (21, 22, 23, 24, 37) arjinil grubunun anyonik substrat ile ligantların tanınmasında; PK tepkimesinde ise fosforil grubunun PEP'dan ATP'ye aktarılmasında görev aldığı gösterilmiştir.

Enzimlerin aktif bölgesindeki arjinil gruplarının tayini için glyoxal, phenylglyoxal, özellikle arjinil grubu için son derece özgül bir reaktif olan 2,3-butanedione



ŞEMA I : Riordan tarafından (21) arjinin-2,3 butanedione tepkimesi için önerilen mekanizma.

kullanılmaktadır. Butanedione, argininin guanido grubu ile önce zayıf bir bağlanma ile bir cis-diol(dihidroksiimidazolin türevi) oluşturur (21). Dayanıksız olan bu yapı borat ile hızla stabil; ancak yine tersinir olan bir kompleks oluşturur. Tepkime borat varlığında ürün stabilizasyonu yönünde ilerler (38). Ortamdan boratın uzaklaştırılması ile modifikasyon tersine çalışır ve modifiye olmuş arjinil grupları tekrar serbest hale geçerler (21, 24).

Arjinin modifikasyonunun gerçekleştiği tepkime her ne kadar tersinir ise de, modifikasyon çok uzun sürdüğü takdirde (20 saat kadar) tepkime tersinmez hale gelir. Muhtemelen oluşan bileşik su kaybeder, yeni bir düzenlemeye gider. Bununla ilgili olarak önerilen mekanizma şema I'de gösterilmiştir (21).

Butanedione modifikasyonu çalışmaları ile, domuz kalbi (37) ve tavşan kası (24) piruvat kinazlarının PEP bağlama bölgelerinde arjinil grubunun bulunduğu, PEP tarafından inaktivasyona karşı korunduğu ve ATP'nin de (37) kısmen koruyucu etki gösterdiği tesbit edilmiştir. Diğer özgül amino asit reaktifleri ile yapılan çalışmalarla da bir lizil (25) ve bir sisteinil (26) grubunun tavşan kası piruvat kinazında nükleotid bağlama bölgesinde; bir histidinil (27) grubunun da PEP bağlama bölgesinde bulunduğu gösterilmiştir.

Bu çalışmada insan alyuvar piruvat kinazının üç basamakta, % 59 verim ve çok kısa sürede saflaştırılmasını kapsayan yeni bir yöntem tanımlanmaktadır. Saflaştırılan enzimin 2,3-butanedione modifikasyonu ile; enzimin etkinliğinden sorumlu, altbirim başına bir arjinil grubu içerdiği; ancak koruma deneyleri ile bu arjinil grubunun ne substrat ne de ligant bağlama bölgelerinde olmadığı gösterilmektedir.

G E R E Ç v e Y Ö N T E M L E R

GEREÇLER:

İnsan kanı Hecettepe Üniversitesi Hastanesi Kan Bankası, Ankara'dan; sephadex G-25, sephadex G-75, sepharose 4B, bleu dextran 2000, Pharmacia, İsveç'ten; laktat dehidrogenaz (tavşan kası), bicine, Boehringer, F.Almanya'dan; siyanojen bromür, monopotasyum adenzin 5'- difosfat (ADP), disodyum adenzin 5'-trifosfat (ATP), monopotasyum fosfoenol piruvat (PEP), monohekzilamin fruktoz 1,6-difosfat, dithiothreitol, dithioerythriol, protein standartları (BSA, pepsin, tripsin, lizozim, ovalbumin, β -laktoglobulin), Sigma, ABD'den; 2,3 butanedione, Estman Kodak, ABD'den; HEPES, Serva, F. Almanyadan; amonyum sülfat, Riedel ve Merck, F. Almanya'dan temin edildi. Deneylerde kullanılan diğer bütün kimyasal bileşikler analitik saflıkta idi.

Deneylerde santrifüj (Sorval superspeed SS-3 ve IEC klinik santrifüj), spektrofotometre (Beckman model 25 kinetik sistem ve Zeiss PMQ II), Elektroforez cihazı, Centriflo C-25 filtreleri (Amicon), fraksiyon toplayıcısı (IKB 7000 Ultrorac) kullanıldı.

YÖNTEMLER:**Protein Tayini:**

Enzimin saflaştırılması kademelerinde protein tayini Warburgh'un yöntemine göre (28) yapıldı. Protein çözeltilerinin 280 nm ve 260 nm. deki absorpsiyonları optik dansite (D.D.) olarak ölçülerek;

$$\text{mg protein/ml çözelti} = 1.55 \times \text{OD}_{280} - 0.76 \times \text{OD}_{260}$$

eşitliğine göre protein tayini yapıldı. Protein derişiminin düşük olduğu örneklerde, protein tayinlerinde Schaffner ve Weissman'ın yöntemi (29) kullanıldı. Bu yöntemle mililitrede bir mikrograma kadar seyreltik protein derişimleri duyarlılıkla tayin edilebildi.

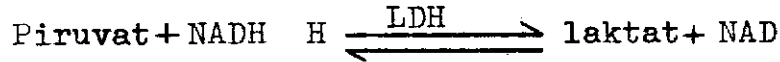
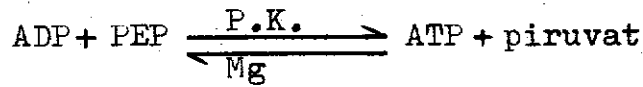
Etkinlik Tayini:**-Kolorimetrik Yöntem:**

Piruvat kinaz etkinliği, 37°C de Kimberg ve Yielding'in yöntemine göre (30) tayin edildi. Metodun esası, gerekli bileşikler ve piruvat kinazın bulunduğu ortamda, tepkime sonunda oluşan piruvik asitin, dinitrofenilhidrazin (DNPH) ile renk oluşturmasıdır. DNPH ile oluşan hidrazon, alkali ortamda renklendirilerek, rengin şiddeti 520 nm. de optik dansite olarak ölçüldü ve tepkime sonunda oluşan piruvik asit, DNPH' li piruvat standardından tayin edildi. Saflaştırma çalışmalarında etkinlik tayini bu yöntemle yapıldı. Toplam 250 µl olan (kolon taramalarında 50 µl) tepkime ortamı; 50 mM HEPES-KOH tamponu (pH: 7.4), 2.1 mM ADP, 1 mM FDP, 10 mM MgSO₄, 100 mM KCl ve 0.1 mM DTT içermekteydi. Bu ortamda enzimin 15 dakika öninkübasyonundan sonra, ADP eklenmesi ile tepkime başlatıldı. 1,3,6

ve 10.ncu dakikalarda 50`er μ l lik örnekler çekilerek DNPH içeren ortamda (125 mg DNPH/100 ml 2N HCl) tepkime durduruldu ve açığa çıkan piruvik asit miktarı tayin edildi. Enzimin bir ünitesi; 1 dakikada, 1 mikromol piruvat açığa çıkaran enzim miktarı; özgül etkinlik ise, mg enzim başına düşen ünite olarak alındı.

-Spektrofotometrik Yöntem:

Kenetlenmiş piruvat kinaz-laktat dehidrogenaz yöntemi kullanıldı; (31)



kenetlenmiş tepkimelerinin sonucuna göre, 340 nm deki absorbans düşüşü izlendi.

400 μ l olan tepkime ortamındaki son derişimler şöyle idi: 50 mM HEPES-KOH tamponu (pH:7.5), 0.18 mM NADH, 2.1 mM ADP, 1 mM PEP, 1mM FDP, 10 mM MgSO_4 , 100 mM KCl, 0.1 mM DTE, 4 μ gr LDH ve piruvat kinaz.

Enzimin tepkime ortamında, 37°C de 5 dakika öninkübasyonundan sonra, ADP eklenmesi ile tepkime başlatıldı ve Beckman model-25 spektrofotometresinde sürekli absorbans düşüşü 5 dakika izlendi. NADH`nın molar absorpsiyonu 6.22×10^3 olarak alınarak, 37 °C de, 1 mikromol NADH yı NAD haline çeviren enzim miktarı, 1 enzim ünitesi olarak alındı.

Bleu Dextran Sepharose 4B nin Hazırlanması:

Sepharose 4B, Cuatrecassas ve Anfinsen'in yöntemine göre(32) siyanojen bromür ile aktive edildi. Aktive edilen sepharose 4B, Ryan ve Westling'in yöntemine göre (33) Bleu Dextran 2000 ile kovalent olarak kenetlendi.

Poliakrilamid Jel Elektroforezi:

Akrilamid ve çapraz bağlayıcı (cros-linker)olarak kullanılan N,N-metilen-bis-akrilamidin polimerize edilmesi ile hazırlanan poliakrilamid jeli; proteinleri elektroforezde elektrik yüklerine, molekül ağırlıklarına ve molekül biçimlerine göre ayırır (34). Polimerizasyonda katalizör olarak amonyum persülfat-TEMED (N,N,N',N'-tetrametilen diamin) kullanıldı.

-Normal Disk Jel Elektroforezi:

Davies'in Schuster tarafından düzenlenmiş yöntemine göre (35) yapıldı. Geniş gözenekli (spacer) jel pH: 6.8 ve jel yüzdesi %3; sık gözenekli (separatör) jel pH: 8.9 ve jel yüzdesi %5 olacak şekilde hazırlandı. Elektroforez 25 mM Tris-glisin tamponunda (pH: 8.9) ve oda sıcaklığında yapıldı. 0.6x 10 cm boyutlarındaki tüplere tüp başına 2.5 mA olacak şekilde sürekli akım uygulandı ve brom fenol mavisi jel çıkışına 1 cm yaklaşıncaya kadar sürdürüldü.

Protein boyaması için çıkarılan jeller, brom fenol mavisi çini mürekkeple işaretlendikten sonra, %10 TCA da 10 dakika tutuldu. Bu sürede fikse olan proteinler;455 ml %50

metanol ve 45 ml glasiyel asetik asitte çözülmüş 2,5 gr Commasie Brilliant Bleu çözeltisinde 45 dakika boyandı. Jeldeki bant dışı boya, jelin rengi tamamen açılincaya kadar %5 metanol ve %7 asetik asit içeren boya giderici çözeltide yıkandı.

-Sodyum Dodesil Sülfatlı (SDS'li)Jel Elektroforezi:

SDS'li jel elektroforezi Shapiro ve diğerleri tarafından bulunmuş; Weber ve Osborn tarafından geliştirilmiştir (36). Bu yöntem oligomerik proteinlerin yapısında yer alan alt birimlerin molekül ağırlıklarınının saptanmasında kullanılır. Elektroferez anyonik bir deterjan olan SDS'li ortamda yapılır. SDS, protein alt birimlerine bağlanarak birbirinden ayırır, konformasyonlarını değiştirerek yeniden birleşmelerini önler. Altbirimlerin molekül ağırlıkları, molekül ağırlığı bilinen proteinler kullanılarak tayin edilir. Standart olarak kullanılan proteinlerin molekül ağırlığınının logaritması, proteinlerin hareketliliğine karşı çizilerek standart bir eğri elde edilir. Molekül ağırlığı tayin edilecek olan alt birimin molekül ağırlığı, alt birimin hareketliliğinden (R_f) yararlanılarak, standart eğriden tayin edilir.

Standart proteinler(BSA, pepsin, tripsin, lizozim, ovalbumin, β -laktoglobulin) ve piruvat kinaz örnekleri %1 SDS içeren 10 mM sodyum fosfat tamponunda (pH: 7.2) çözüldükten sonra, %20 olacak şekilde gliserol ve 20-50 μ l'sine 3 μ l %0.05 brom fenol mavisi eklenerek 0.6x10 cm boyundaki jellere uygu-

landı. Jeller %10, %5 akrilamid ve 1/37 konsantrasyonunda BIS içerecek şekilde hazırlandı. Elektroforez tamponu olarak %0.2 SDS içeren 0.1 M sodyum fosfat tamponu (pH:7.2) kullanıldı. Elektroforez sonunda brom fenol mavisinin ilerlediği nokta çini mürekkeple işaretlendikten sonra, normal disk jel elektroforezinde olduğu gibi protein boyaması yapıldı. Protein bantlarının hareketliliği;

$$\text{Hareketlilik} = \frac{\text{protein bandının aldığı yol}}{\text{boyamadan sonraki jel boyu}} \times \frac{\text{boyamadan önceki jel boyu}}{\text{Bromfenol mavisinin aldığı yol}}$$

eşitliğinden hesaplandı.

Alyuvar Piruvat Kinazının Saflaştırılması:

Alyuvarların yıkanması ve hemolizi:

Hacettepe Üniversitesi Kan Bankasından temin edilen kanlar, 450 ml. lik plastik tüplerde, IEC klinik santrifüj ile 2500 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek plazma ve alyuvarlar aspirasyon ile atıldı. %0.9 NaCl ile 5-6 kez yıkama ve santrifüj işlemleri ile, alyuvar dışındaki hücreler ve plazma muhtevası atıldı. Son yıkamadan sonra, %50 deiyonize su ve ϵ -amino kaproik asit, 1 mM; EDTA, 2 mM; 2-ME, 2 mM; fenil metil sülfonil florür, 50 μ M son konsantrasyonları olacak şekilde eklenerek -20 °C de donduruldu. Alyuvarların hemolizi 4-5 kez dondurup-çözme işlemi tekrarlanarak sağlandı. Sorval SS-3 GSA başlığı ile, 9500 rpm' de bir saat santrifüj sonunda alyuvarların zarları ayırılarak süpernatant toplandı.

Alyuvar Hemolizatınının %41 Amonyum Sülfat Çöktürmesi:

Alyuvar hemolizatınının zarlar uzaklaştırılarak toplanan süpernatana litrede 250 gram olacak şekilde, yavaş yavaş amonyum sülfat eklenerek %41 doygunluğu getirildi. Bu işlem pH metre altında yapıldı ve 1 M Tris veya 2 N HCl ile pH sürekli olarak 6.8 de tutuldu. Çöktürme işlemi +4 °C de bir gece bekletilerek tamamlandı. %41 amonyum sülfat çökeleği, Sorval GSA başlığı ile 9500 rpm' de bir saat santrifüj edilerek toplandı ve aynı çökelek 2 kez % 41 amonyum sülfat çözeltisi ile yıkanarak süpernatan atıldı. Son çökelek 2mM merkaptto etanol (2-ME), 1 mM ϵ -ACA, 2 mM EDTA, 50 μ M PMSF içeren 25 mM potasyum fosfat tamponunda (pH: 6.8) çözülerek, sephadex G-75 kromatografisi için kullanıldı veya -20 °C de saklandı.

Sephadex G-75 Kromatografisi:

Yukarıda belirtilen tamponda çözülen % 41 amonyum sülfat çökeleğinin çözünür kısmı tamamen ekstrakte edildikten sonra, presipite olan kısım atıldı. 200-250 ml kadar hacimdeki ekstraksiyon, 5.8x125 cm boyutlarındaki sephadex G-75 kolonuna uygulandı. Kolon; 2 mM 2-ME, 1mM ϵ -ACA, 50 μ M FDP içeren 25 mM potasyum fosfat tamponu (pH: 6.8) ile dengelenmişti. Akış hızı 90 ml/saat olarak tutuldu ve LKB 7000 Ultrorac fraksiyon toplayıcısı ile 18 ml'lik fraksiyonlar toplandı. Kromatografiden sonra aktif fraksiyonlar birleştirilerek

pH metre altında, pH= 6.8' de sabit tutularak % 75 amonyum sülfat doygunluğuna getirildi. Çöktürme, +4 °C de bir gece bekletilerek tamamlandıktan sonra, Sorval SS-34 başlığı ile 17000 rpm' de bir saat santrifüj edilerek çökelek toplandı ve 2mM 2-ME, 1 mM ϵ -ACA, 50 μ M PMSF içeren 25 mM potasyum fosfat tamponunda (pH: 6.8) çözüldü.

Tuzdan Arındırma:

Sephadex G-75 kromatografisi sonunda toplanan % 75 amonyum sülfat çökeleği, yukarıda belirtilen tamponda çözüldükten sonra 40 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl(pH: 7.5) tamponu ile dengelenmiş olan 3.4x 85 cm boyutlarındaki sephadex G-50 kolonuna uygulanarak tuzdan arındırıldı. veya 40 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH: 7.5) tamponuna karşı, amonyum sülfat derişimi mikromolar düzeyine düşünceye kadar diyaliz edildi.

Bleu Dextran-Sepharose 4B Affinite Kromatografisi:

Tuzdan arındırılan sephadex G-75 sonrası enzim örneği, 40 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl tamponu (pH: 7.5) ile dengelenmiş olan 2.5x20 cm boyutlarındaki bleu dextran-sepharose 4B kolonuna uygulandı. Akış hızı 60 ml/saat olarak tutuldu ve 10'ar ml lik fraksiyonlar toplandı. 100 ml kadar kolonun dengelendiği tamponla yıkandıktan sonra, aynı tampondaki NaCl derişimi 80 mM'a çıkarılarak, kolondan yıkamaya devam edildi. Yıkama işlemleri iki gün süre ile 280 nm deki absorpsiyon 0.020 nin altına düşünceye kadar sürdürüldü.

Aynı yıkama tamponunda 0 ila 0.3 mM arasındaki FDP gradienti ile piruvat kinaz kolondan elüe edildi. Aktif fraksiyonlar birleştirilerek Centriflo-25 filtrelerinde, 280 nm deki absorpsiyon 0.150 nin üzerine çıkıncaya kadar konsantre edildi. % 80 amonyum sülfat doygunluğuna getirilerek, santrifüj ile çökelek toplandı. Amonyum sülfat çökeleği, 0.1 mM DTE, 1 mM ϵ -ACA içeren 5 mM potasyum fosfat tamponunda (pH: 6.8) çözüldü; aynı tampon ile dengelenmiş 1x20 cm boyutlarındaki sephadex G-25 kolonunda tuzdan arındırıldı veya aynı tampona karşı diyaliz edildi. Enzim tuzsuzlaştırıldıktan sonra % 50 olacak şekilde gliserol eklenerek -20 °C de saklandı.

Batchwise Bleu Dextran-Sepharose 4B Affinite
Kromatografisi:

Tamponunda FDP içermiyen sephadex G-75 kromatografisi sonunda birleştirilen aktif fraksiyonların pH'ı 1 M Tris bazı ile pH= 7.5'e getirildikten sonra; 2 mM 2-ME, 1 mM ϵ -ACA, 40 mM NaCl içeren 50 mM Tris-HCl tamponu (pH: 7.5) ile yıkanıp dengelenen 80 ml bleu dextran-sepharose 4B jeline bir beherde uygulandı. İki saat hafifçe karıştırıldıktan sonra, bir Buchner hunisine aktarılarak vakum pompası yardımı ile 300 ml kadar jelin dengelendiği tamponla yıkandı. Bundan sonraki yıkama işlemi; 2 mM 2-ME, 1 mM ϵ -ACA, 0.1 mM DTE, 60 mM KCl içeren 50 mM Tris-HCl tamponu (pH: 7.5) ile sürdürüldü. Yıkama işlemine 280 nm ve 410 nm' deki absorpsiyon 0.002 ye düşünceye kadar devam

edildi. Jel 2.5x20 cm boyutlarındaki kolona aktarılarak 100 ml aynı tamponla yıkandı. 280 nm ve 410 nm' deki absorpsiyonlar tekrar kontrol edilerek, 0.1 mM^{pp} içeren son yıkama tamponu ile piruvat kinaz kolondan elüe edildi. İki etkinlik zirvesine ait fraksiyonlar ayrı ayrı toplanarak konsantre edildi. Her iki örnek de % 85 amonyum sülfat doygunluğuna getirilerek enzim çöktürüldü ve santrifüj ile toplandı; tuzdan arındırıldıktan sonra, -20 °C de saklandı.

Batchwise affinite kromatografi ile yapılan bu son değişiklikten sonra, alyuvar piruvat kinazının saflaştırılması;

- a-) % 41 amonyum sülfat çöktürmesi,
- b-) Sephadex G-75 kromatografisi,
- c-) Batchwise bleu dextran-sepharose 4B affinite kromatografisi

basamaklarını içermekteydi.

Alyuvar Piruvat Kinazının pH Optimumu Tayini:

Alyuvar piruvat kinazının pH optimumu tayininde, değişik pH aralıkları için, beş farklı tampon sistemi kullanıldı. Bunlar: Tris-HCl tamponu (pH: 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5 için), Hepes-KOH tamponu (pH: 7.0, 7.5, 8.0 için), imidazol-HCl tamponu (pH: 6.4, 6.8, 7.2 için), asetat-KOH tamponu (pH: 5.0, 5.5, 6.0 için) ile potasyum fosfat tamponu (pH: 5.0, 5.5 için) sistemleri idi.

Etkinliğin tayin edileceği her pH için; verilen pH'daki tampon içinde inkübasyon ortamı hazırlandı. Toplam 400 µl olan

inkübasyon ortamında 0.0685 µgr enzimin 5 dakika ön inkübasyonundan sonra, ADP ilavesi ile tepkime başlatıldı. Değişik pH' lardaki etkinlik; kenetlenmiş piruvat kinaz-laktat dehidrogenaz yöntemi ile, 37 °C de spektrofotometrik olarak tayin edildi. Her 400 µl'lik test başına 4 µgr laktat dehidrogenaz kullanıldı. Aşırı pH'larda laktat dehidrogenaz etkinliğinin tepkime hızını sınırlamadığı; piruvat kinazın bulunmadığı tepkime ortamına piruvik asit eklenerek kontrol edildi.

Alyuvar Piruvat Kinazının Butanedione Modifikasyonu:

Butanedione modifikasyonu çalışmalarında bicine-NaOH ve boraks-borik asit tamponları kullanıldı. Butanedione 100 mM borat tamponunda (pH: 8.0) çözüldükten sonra pH tekrar ayarlandı. Enzimin bicine-NaOH tamponunda (pH: 8.0), 25 °C de 15 dakika öninkübasyonundan sonra, borat tamponunda çözünen butanedione eklenmesi ile modifikasyon başlatıldı. Kontrole ise, aynı pH ve derişimde olacak şekilde borat tamponu eklendi. Kontrolden ve değişik derişimlerde butanedione'un bulunduğu örneklerden belirli zaman aralıkları ile çekilen enzimin tepkime ortamında iki dakika inkübasyonundan sonra, ADP eklenmesi ile tepkime başlatıldı. Zamana bağlı olarak kalan etkinlik, 37 °C de, spektrofotometrede 5 dakika izlenerek tesbit edildi.

Ligantların inaktivasyon üzerindeki etkisini araştırmada da etkinlik aynı şekilde tayin edildi. Burada etki-

si araştırılmak istenen ligant, enzimin 15 dakika öninkübasyonunun yapıldığı bicine tamponuna eklenmişti.

Modifikasyonun pH bağımlılığı ile ilgili deneylerde ise, modifikasyonun yapılacağı pH'daki 100 mM bicine tamponunda 15 dakika öninkübasyondan sonra butanedione eklenmesi ile modifikasyon başlatıldı.

Modifikasyonun tersinir olup olmadığını araştırmak için; modifikasyon aynı koşullarda iki örnekte birden başlatıldı. İnaktivasyon istenen yüzdeye ulaştıktan sonra, 0.3'er ml. lik örneklerden biri; % 10 gliserol, 0.1 mM FDP, 0.1 mM DTE içeren 100 mM Tris-HCl (pH: 8.0) tamponu ile dengelenmiş kolondan; diğeri ise % 10 gliserol, 0.1 mM FDP, 0.1 mM DTE içeren 100 mM borat tamponu (pH: 8.0) ile dengelenmiş kolondan (0.7x9.5 cm boyutlarında sephadex G-25 kolonu) geçirildi. Böylece örneklerin birinden sadece enzime bağlanmayan butanedione uzaklaştırılırken; diğeri örnekte hem bağlanmayan butanedione, hem de borat tamponu uzaklaştırıldı. Bu işlemde sonra da her iki örnekten belirli aralıklarla çekilen enzimde kalan etkinlik tayin edildi.

B U L G U L A R

Alyuvarların Yıkanması ve Hemolizi:

Çalışma süresince hemolizli olmamasına özen gösterilen 45 litre kan yıkandı ve kullanıldı. Hücreler dışı kontaminasyonu önlemek için alyuvarların % 0.9 NaCl ile yıkanması en az beş kez tekrarlandı (16). Safılaştırma süresince, bulunması mümkün proteazlara karşı ortamda devamlı ϵ -ACA ve PMSF bulunduruldu. Literatürde hemoliz işlemi genellikle toluen ile gerçekleştirilmesine rağmen; toluen ile hemoliz sonucu alyuvar zarlarından sisteme karışan proteinlerin, hem safılaştırmada sorun yaratması hemde hacim artışına neden olması gözönüne alınarak, toluen yerine dondurup-çözme ile hemoliz sağlandı. Toluen ile yapılan hemolizde üstteki lipid tabakasının aspirasyon ile atılması bir miktar enzim kaybına neden olacaktır. Karşılaştırma amacı ile toluenle yapılan hemolizde böyle bir kayıp görüldü.

Amonyum Sülfat Çöktürmesi:

Alyuvar zarları santrifüj ile uzaklaştırıldıktan sonra hemolizat % 41'lik amonyum sülfat doygunluğuna getirildi. Santrifüj ile çökelek toplandıktan sonra; süpernatandaki amonyum sülfat diyaliz ile uzaklaştırılarak süpernatanda PK etkin-

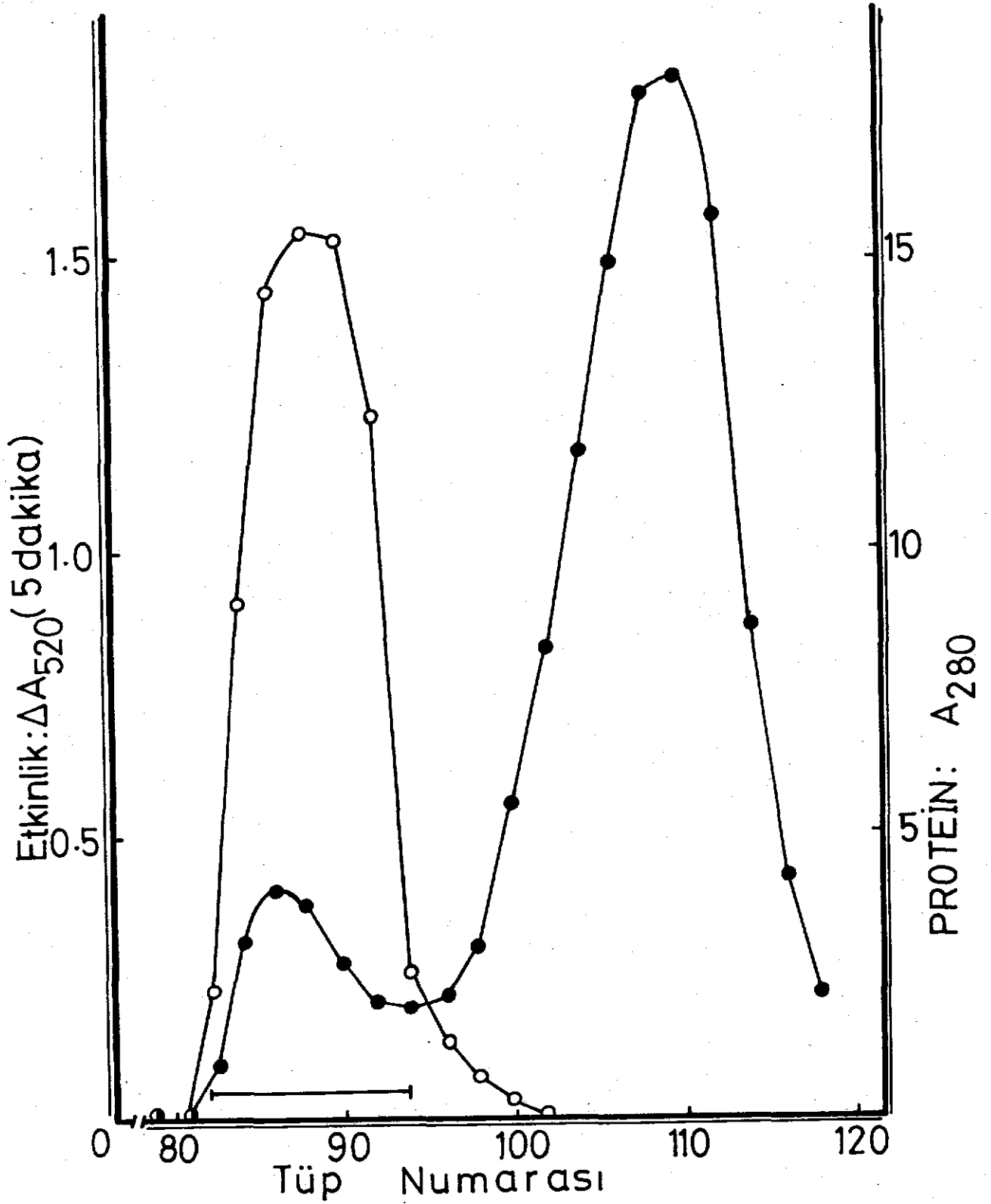
liginin kalıp kalmadığı araştırıldı ve tüm etkinliğin % 41 lik amonyum sülfat çökeleğinde olduğu görüldü. Bu şekilde bir tek çöktürmenin çok sayıda amonyum sülfat kesitlemelerini (15, 16, 17) dışlaması nedeniyle, doğal yapısındaki enzimi elde etmede kolay bir basamak olduğu düşüncesi ile, çalışma boyunca bu yol izlendi. Bu çöktürme ile çok miktarda protein, özellikle hemoglobinin atılması sağlandı ve yaklaşık 40 kezlik bir saflaşma elde edildi. Çöktürülen kısımdan PK etkinliği % 80-90 arasında değişen verim ile elde edildi.

Sephadex G-75 Kromatografisi:

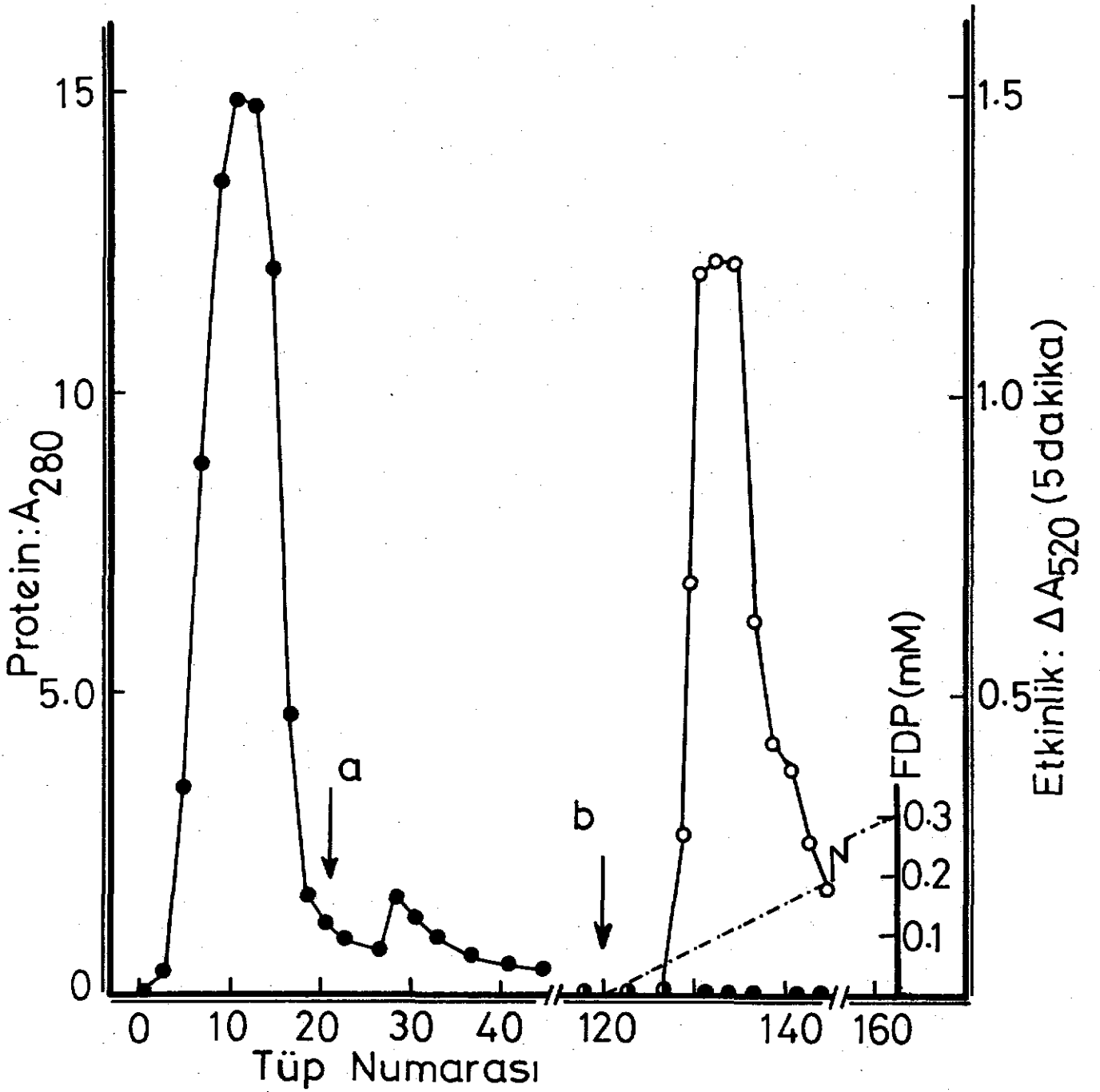
Sephadex G-75 kromatografisinden sonra yapılacak olan affinite kromatografisine bağlı olarak, kolon 50 μ M FDP içeren veya içermiyen tamponlarla dengelenmişti. Sephadex G-75 kromatografisinde hemoglobinden tam bir ayrılma sağlandı (Şekil : 1). Tuzdan arınma nedeniyle kromatografi sonunda toplam etkinlikte artış görüldü (Tablo:II). Kolona uygulanan örneklerin hacmi 250 ml olduğu zaman etkinliğin çok iyi ayrıldığı gözlemlendiğinden, kolona uygulanan enzim örneklerinin hacmi 250 ml civarında tutuldu.

Bleu Dextran-Sepharose 4B Affinite Kromatografisi:

Bleu dextran-sepharose 4B bir çok kinaz (39, 40), dehidrogenaz (41, 42) ve diğer (43) enzimlerin saflaştırılmasında kullanılmaktadır. Jel'e özgül olarak bağlanan en-



ŞEKİL 1 : Alyuvar Piruvat Kinazı'nın sephadex G-75 kromatografisi. Kolon boyutları, 5.8 x 125 cm; akış hızı, 90 ml/saat; fraksiyon hacmi, 18 ml; (—●—), protein : 280 nm absorpsiyonu; (—○—), etkinlik: 5 μ l çözeltinin, 5 dakikada, 520 nm'deki absorpsiyon değişimi.

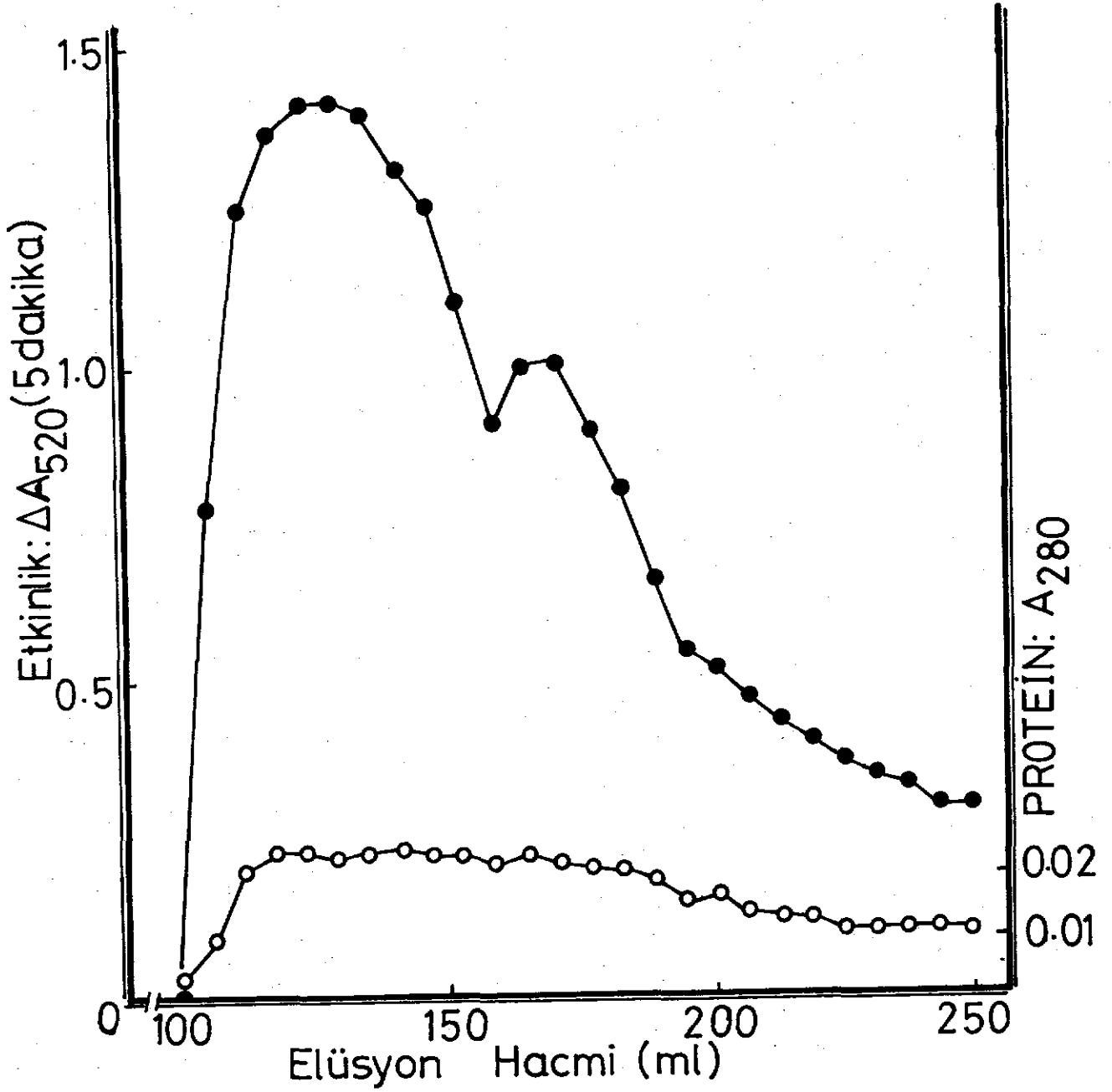


ŞEKİL 2 : Alyuvar Piruvat Kinazının Bleu Dextran-Sepharose 4B affinite kromatografisi. Kolon boyutları, 2.5 x 20 cm; Akış hızı, 60 ml/saat; fraksiyon hacmi 10 ml. Çözeltinin uygulanması ve yıkama işlemi kolonda yapıldı. a : NaCl de-rişimi 80 mM'a çıkarıldı. b : FDP gradientinin başlangıcı. (—●—), protein: 280 nm absorpsiyonu; (—○—), etkinlik: 5 µl enzimin, 5 dakikada, 520 nm deki absorpsiyon değişimi; (-----), FDP gradienti.

zimler, özgül ligantlarla seçici olarak elüe edilmektedir. Bu jele bağlanan piruvat kinaz ise, pozitif allosterik aktivatörü olan FDP ile enzimdeki bir konformasyon değişimi sonucu kolondan özgül olarak elde edilmektedir.

Sephadex G-75 kromatografisinden sonra amonyum sülfat çökeleği halinde toplanan enzim örneği, tuzdan arındırıldıktan sonra bleu dextran-sepharose 4B kolonuna uygulandı. Bağlanmayan proteinler ölü hacimde gelirken, jelin kapasitesinden fazla uygulanmadıkça piruvat kinazın tamamının kolonda bağlandığı gözlemlendi (Şekil : 2). Kolona özgül olmayan bir şekilde bağlanan proteinlerin uzaklaştırılması için, aynı tampondaki NaCl derişimi 80 mM'a çıkarılarak yıkama işlemi sürdürüldü. İki günden fazla süren yıkama sonunda 280 nm deki absorpsiyon ancak 0.020'ye kadar düştü. Bundan sonra FDP gradienti ile piruvat kinaz kolondan elüe edildi. Bu basamakta gerçekleşen verim % 25 kadardı (Şekil: 2).

Enzimlerin saflaştırılmaları çalışmalarında kullanılan bleu dextran boyasının içerdiği bazı gruplar, enzimlerle tepkimeye girerek inaktivasyonuna neden olabilirler (44). Günlerce devam eden yıkama süresince, kolonda zamana bağlı bir inaktivasyon ve enzimin altbirimlerine dissosiasyonu da sözkonusu idi. (Nitekim 280 nm'deki absorpsiyonun ancak 0.020'ye kadar düştüğü preparatta da poliakrilamid jel elektroforezinde tek protein bandı elde edildi. Şekil: 4A). Affinite kromatografisindeki verim düşüklüğü yukarıda sayılan nedenlere bağlanarak; kolona özgül olmadan bağ-



ŞEKİL 3 : Alyuvar Piruvat Kinazının Batchwise Bleu Dextran Sepharose 4B affinite kromatografisi. Çözeltilinin uygulanması ve yıkanması batchwise; enzimin FDP ile elüsyonu kolonda yapıldı. Akış hızı 30 ml/saat; fraksiyon hacmi, 2 ml. (—○—), protein: 280 nm absorpsiyonu; (—●—), etkinlik: 5 μ l enzimin, 5 dakikada 520 nm'deki absorpsiyon değişimi.

lanan proteinlerin daha hızlı yıkanması ve en kısa sürede enzimin kolondan elüsyonu için batchwise affinite kromatografi yapıldı.

Batchwise Bleu Dextran-Sepharose 4B affinite Kromatografisi:

Bleu dextran-sepharose 4B jeline uygulanan çözeltinin pH'sı düştükçe piruvat kinazın kolona bağlanma yeteneğinin azaldığı gözlemlendiğinden, sephadex G-75 kromatografisinden sonra toplanan aktif fraksiyonların pH'sı 7.5'e ayarlandıktan sonra affinite kromatografisi yapıldı. Enzim örneği jele uygulandıktan sonra zaman zaman jelin üzerinden alınan örnekte etkinlik tayini yapılarak, piruvat kinazın tamamı jele bağlanınca yıkama işlemine geçildi. böylece günlerce devam eden yıkama süresi 1.5-3 saate indirilirken, 280 nm'deki absorpsiyonun sıfıra düşüşü de sağlanarak enzimin kolondan 0.1 mM FDP ile elüsyonu başlatıldı.

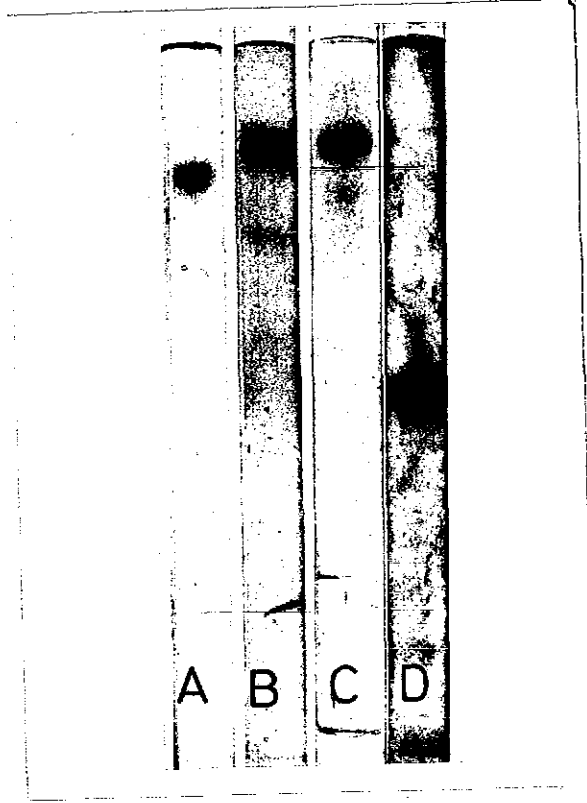
Bu basamaktaki elüsyonda J. Marie vd. nin (8) bulgularına uygun olarak iki etkinlik zirvesi elde edildi (Şekil : 3). Birinci zirve R_4 , ikinci zirve de $R_2R'_2$ formundaki PK'a aittir. Affinite kromatografisinin tamamen kolonda yapıldığı durumda; ne FDP gradienti ne de 0.1 mM FDP ile elüsyonda hafif omuz vermesi dışında ayrı etkinlik zirveleri gözlenmedi (Şekil : 2). Bu da uzun süren yıkama sırasında R' formundaki altbirimlerin R formuna çevrilmiş olabileceğine işaret eder.

Elüsyondan sonra ayrı ayrı toplanan iki etkinlik zirvesine ait fraksiyonlar konsantre edildikten sonra amonyum sülfat çökeleği halinde toplandı ve tuzdan arındırıldı. Preparat miktarının az olduğu durumda amonyum sülfatlama işlemi yapılmadan, Centriflo C 25 filtreleri ile ileri derecede konsantre edildi. Homojen halde elde edilen enzim % 50 gliserol, 0.1 mM ϵ -ACA, 0.1 mM DTE içeren 5 mM potasyum fosfat tamponunda saklandı. Değişik aralıklarla yapılan etkinlik tayininde PK etkinliğinde bir kayıp gözlenmedi. Batchwise kromatografiden sonra alyuvar piruvat kinazı 3 basamakta, % 59 verimle ve kısa sürede saf olarak elde edildi (Tablo : 2).

Piruvat Kinazın Normal ve SDS'li Jel Elektroforezi:

Normal poliakrilamid jel elektroferezinde bütün preparatlarda tek protein bandı elde edildi. Affinite kromatografisinde 410 nm'deki absorpsiyonun sıfıra düşmediği zamanlarda, normal poliakrilamid jelinde brom fenol mavisi ile paralel giden bir pigment gözlemlendi; ancak 410 nm'deki absorpsiyonun sıfıra düşmesi ile bu pigment giderildi. (Şekil: 4A)

SDS'li jel elektroferezinde birinci zirve %10 ve % 5 lik jellerde bir tek protein sandı verdi (Şekil : 4C ve 4D). FDP gradienti ile elüe edilen ve iki zirvesi birleştirilen örneklerde, % 5 lik jelde tek protein bandı gözlemlendi. İki zirvesi birleştirilen, ancak bir süre bekliyen enzim % 10 luk jelde tek protein bandı verirken, affinite kroma-



ŞEKİL 4 : Alyuvar Piruvat Kinazının normal ve SDS'li jel elektroforezi.

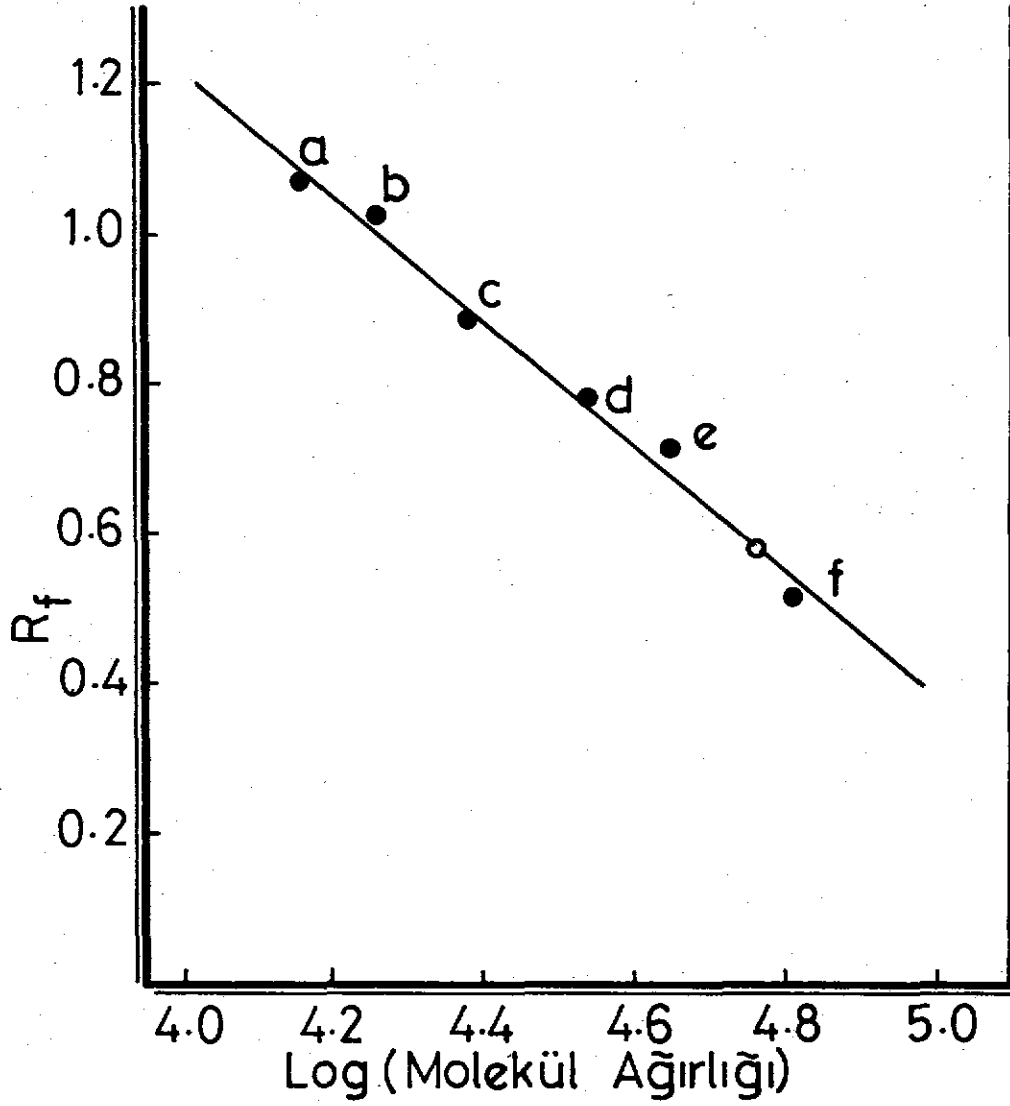
- A : Piruvat kinazın % 5 lik poliakrilamid jel elektroforezi,
- B : Affinite kromatografiden hemen sonra birleştirilen iki zirvenin %10 luk SDS'li jel elektroforezi,
- C : Affinite kromatografide birinci zirvenin % 10 luk SDS'li jel elektroforezi,
- D : Affinite kromatografide birinci zirvenin % 5 lik SDS'li jel elektroforezi.

tografiden hemen sonra, % 10 luk jeldeki elektroforezde R formundaki altbirimlerden oluşan ana protein bandının üzerinde R' formuna ait ikinci bir protein bandı daha görüldü (Şekil : 4B)

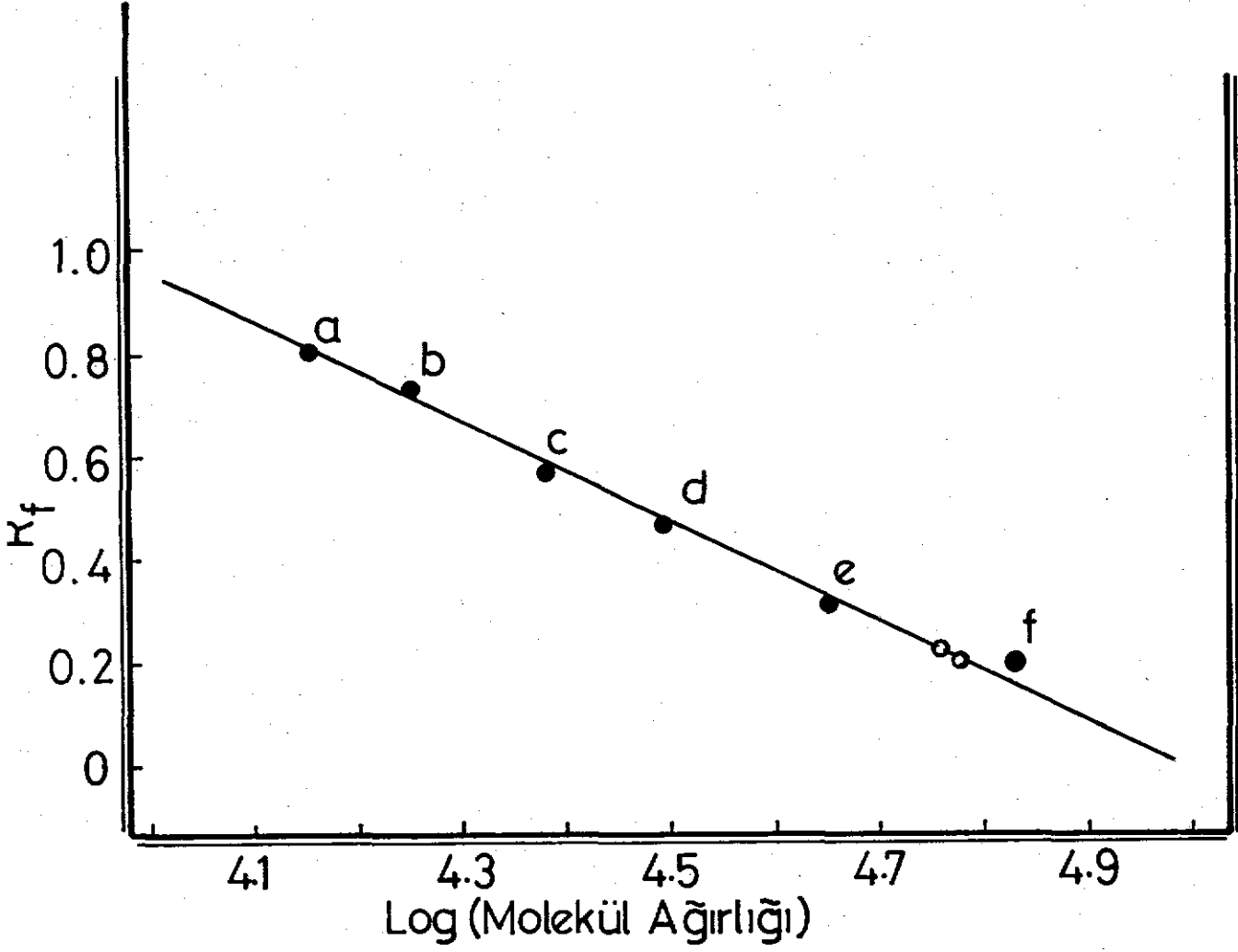
Standart proteinlerin % 5 ve % 10 luk SDS'li jel elektroforezinden elde edilen hareketlilik değerleri molekül ağırlıklarının logaritmasına karşı grafiklendi. Elde edilen standart doğru ve piruvat kinazın altbirimlerinin hareketliliğinden yararlanılarak PK'ın altbirimlerinin molekül ağırlığı bulundu. % 5 lik jelde 60 000 molekül ağırlığına rastlayan yerde bir protein bandı görülürken (Şekil : 5); % 10 luk jelde R ve R' formlarına ait protein bantları 57 500 ve 60 000 molekül ağırlığına rastlayan yerde gözlemlendi (Şekil : 6).

pH Optimumu Tayini:

pH optimumu tayininde beş farklı tampon sistemi ve iyonik gücün piruvat kinaz etkinliği üzerinde görülen etkisi nedeniyle de her tamponun da üç ayrı derişimi kullanıldı (Şekil : 7). Üç ayrı tampon derişimindeki etkinliklerden, sıfır tampon derişimine ekstrapolasyon ile elde edilen etkinlik değerleri pH'lara karşı grafiklenerek pH optimumu eğrisi çizildi (Şekil : 8). Çizilen grafikten piruvat kinaz etkinliğinin optimum pH'sı 6.8 olarak bulundu.



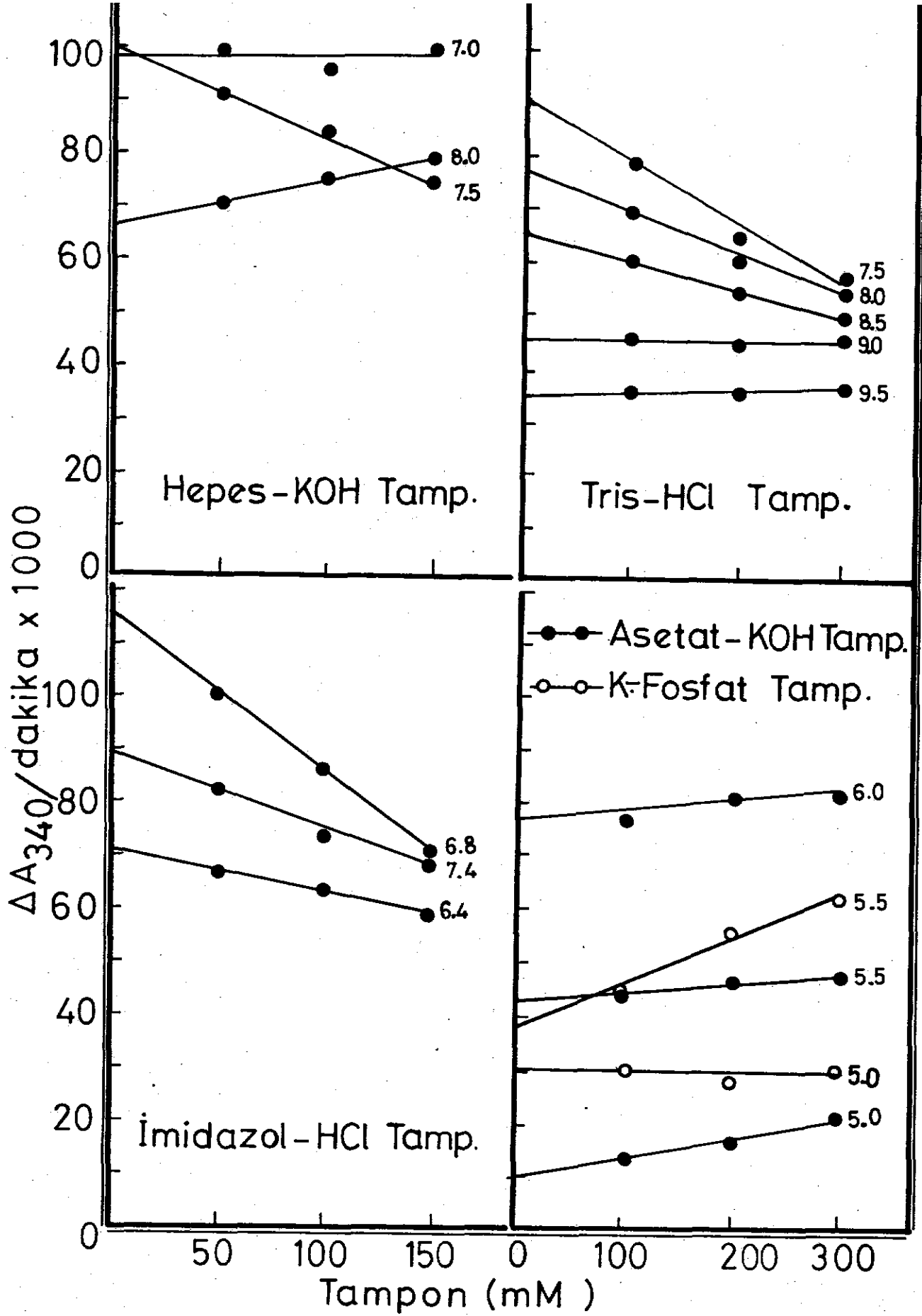
ŞEKİL 5 : Alyuvar Piruvat Kinazının SDS jel elektroforezi. Jel yüzdesi: 5. a : Lizozim; b : β -laktoglobulin; c : tripsinojen; d : pepsin; e : ovalbumin; f : BSA. İçi boş nokta piruvat kinazdır.



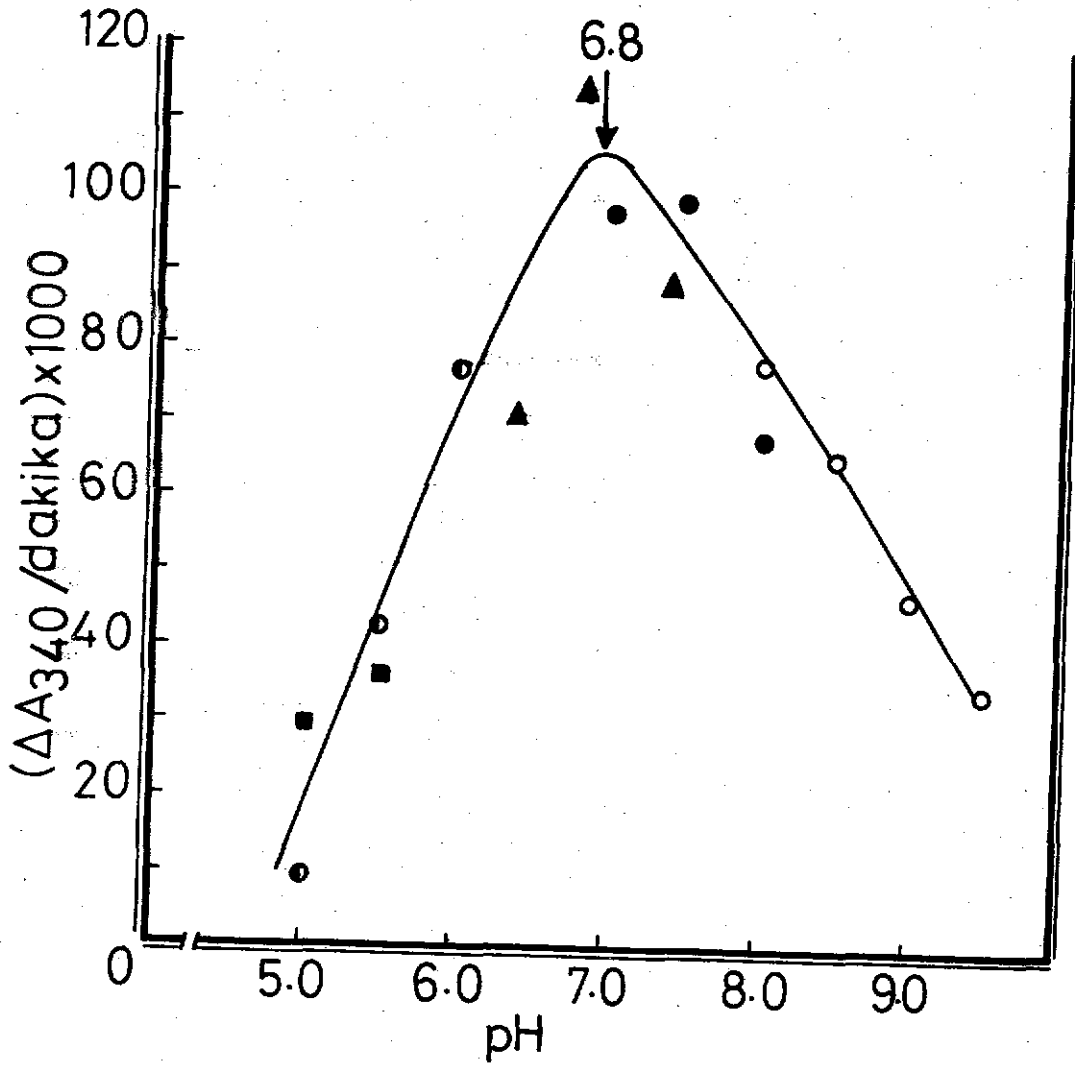
ŞEKİL 6 : Alyuvar Piruvat Kinazının SDS jel elektroforezi. Jel yüzdesi: 10. a : Lizozim; b : β -laktoglobulin; c : tripsinojen; d : pepsin; e : ovalbumin; f : BSA. İçi boş noktalar piruvat kinazın R ve R' formundaki alt birimleridir.

| İŞLEM | TOPLAM PROTEİN (mg) | TOPLAM ÜNİTE (I.U.) | ÖZGÜL ETKİNLİK (I.U./mg) | SAFLAŞMA ORANI | VERİM (%) |
|---|---------------------------|---------------------------|--------------------------------|-------------------|--------------|
| Hemolizat | 565 425 | 5 315 (33 560) | 0.0094 | 0 | 100.0 |
| % 41 Amonyum sülfat çöktürmesi | 11 735 | 4 577 (28 900) | 0.39 | 41.5 | 86.1 |
| Sephadex G-75 kromatografisi | 393 | 4 593 (29 000) | 11.70 | 1244.7 | 86.4 |
| Bleu dextran sepharose 4B Aff. kromatografisi (Zirve: I) | 6.34 | 1 878 | 296 | 31 490 | 41.0 |
| Bleu dextran sepharose 4B Aff. kromatografisi (Zirve: II) | 4.68 | 832 | 179 | - | 18.0 |
| Toplam (Zirve: I+II) | 11.02 | 2 710 | - | - | 59.0 |

TABLO II : Alyuvar Piruvat Kinazı'nın Saflaştırılması.



ŞEKİL 7 : Alyuvar Piruvat Kinazının pH optimumu tayini.



ŞEKİL 8 : Alyuvar Piruvat Kinazı'nın pH optimumu. Şekil 7'den elde edilen sıfır tampon derişimindeki etkinlik değerleri pH'a karşı çizildi.

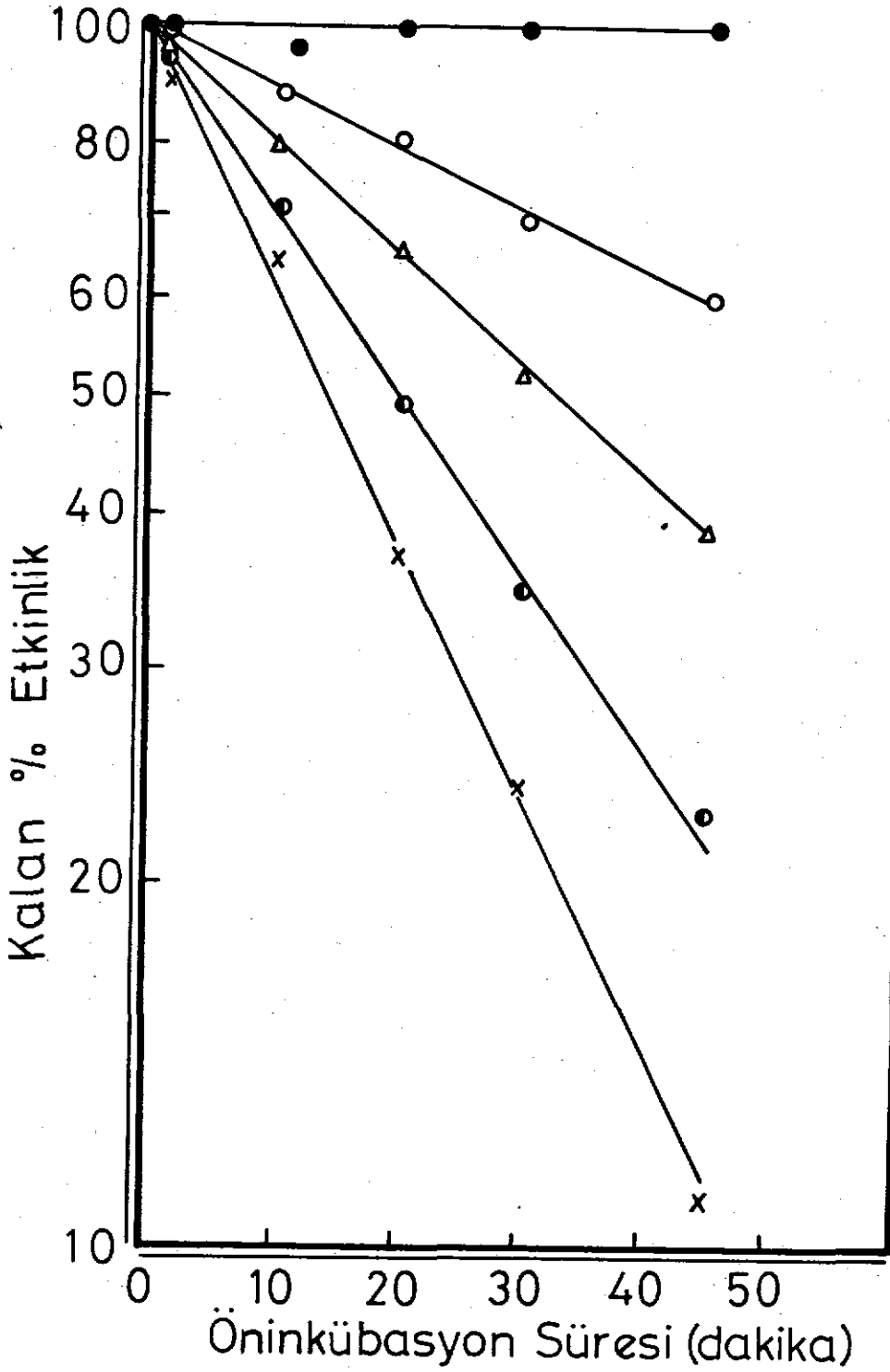
- : Potasyum fosfat tamponu, pH: 5.0, 5.5
- : Asetat-KOH tamponu, pH: 5.0, 5.5, 6.0
- ▲— : İmidazol-HCl tamponu, pH: 6.4, 6.8, 7.4
- : Hepes-KOH tamponu, pH: 7.0, 7.5, 8.0
- : Tris-HCl tamponu, pH: 7.5, 8.0, 8.5, 9.0 ve 9.5

Butanedione Modifikasyonu:

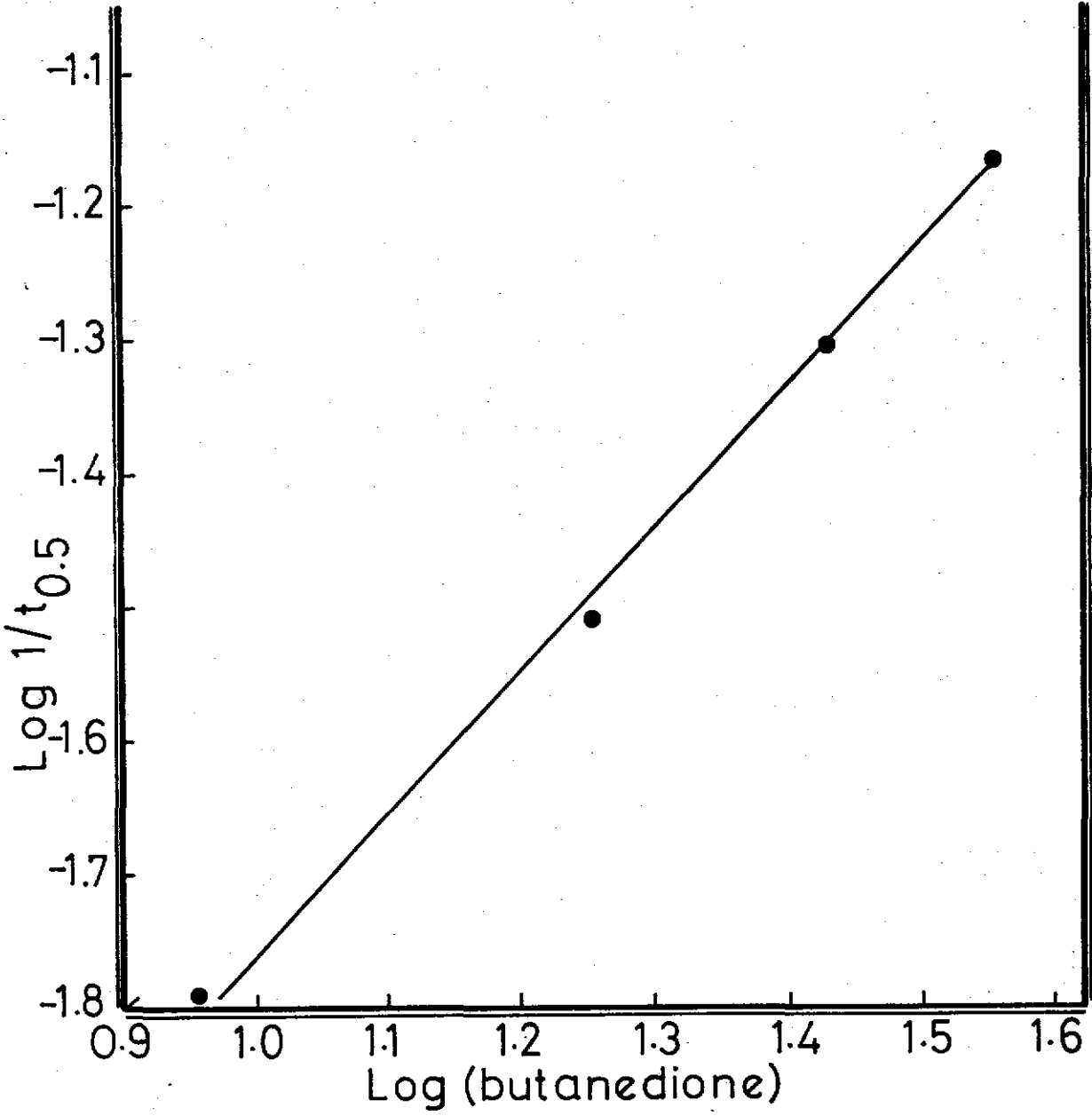
Butanedione modifikasyonunun borat tamponu içinde yapılmasının zorunlu olması (21) ve PK etkinliği kaybının önlenmesi için ortamda gliserol bulunmasının zorunlu olması (bu çalışma) nedeniyle, inkübasyon ortamı sürekli borat ve % 10 gliserol içermekte idi. Ancak bu bir sorunu da birlikte getirdi çünkü, gliserol boratın iyonize formu ile tepkimeye girerek ortamın pH'sını borik asitin pK'sına düşürüyordu. Bu nedenle tampon sistemi borat-bicine-NaOH üçlüsüne dayandırıldı. Bu tampon sistemi içerisinde, 37 °C de, üç saat süresince piruvat kinaz kontrol örneğinde etkinlik kaybı gözlenmedi.

Piruvat kinaz inaktivasyonunun butanedione derişimine sıkı sıkıya bağımlı ve görünür birinci dereceden olduğu şekil 9'dan görülmektedir. İnaktivasyon yarı logaritmik olarak zamana karşı çizildiğinde düz doğrular elde edildi. İnaktivasyonun görünür birinci derecedenliği takip edilen % 90 etkinlik kaybına kadar değişmedi (Şekil : 9).

Zamana karşı çizilmiş butanedione inaktivasyon grafiğinden (Şekil : 9) elde edilen yarı ömürlerin tersinin logaritması, butanedione derişimlerinin logaritmasına karşı çizildiğinde, eğimi 1.08 ± 0.08 olan bir doğru elde edildi (Şekil : 10). Bu doğrunun eğiminin bir olması, piruvat kinazın altbirimi başına bir arjinil grubunun modifiye olduğunu göstermektedir (23, 24, 25). Görünür hız sabiteleri butanedione derişimine karşı çizildiğinde (Şekil : 11)

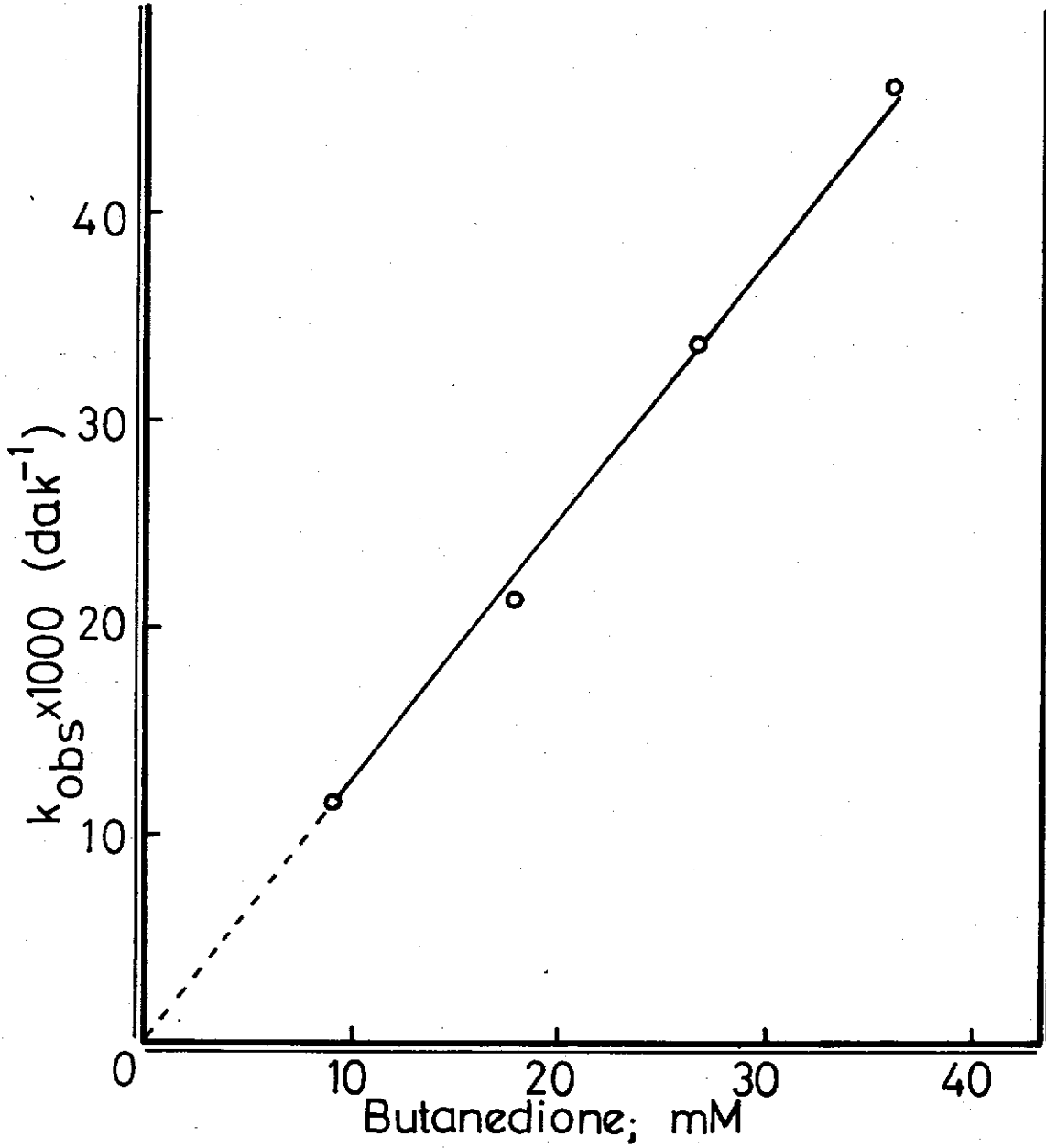


ŞEKİL 9 : Alyuvar Piruvat Kinazının butanedione modifi-
kasyonu. pH : 8.0; (—●—), kontrol; (—○—), 9 mM; (—△—),
18 mM; (—●—), 27 mM; (—x—), 36 mM butanedione.



ŞEKİL 10 : Piruvat Kinaz inaktivasyonunun kinetik sabitelerinin grafiksel tayini.

Piruvat Kinazın butanedione ile tepkimesinin butanedione derişimine göre görünür derecesi. Log 1/t^{0.5} değerleri şekil 9 dan hesaplandı.



ŞEKİL 11 : Piruvat Kinaz inaktivasyonunun kinetik sabitelerinin grafiksel tayini .

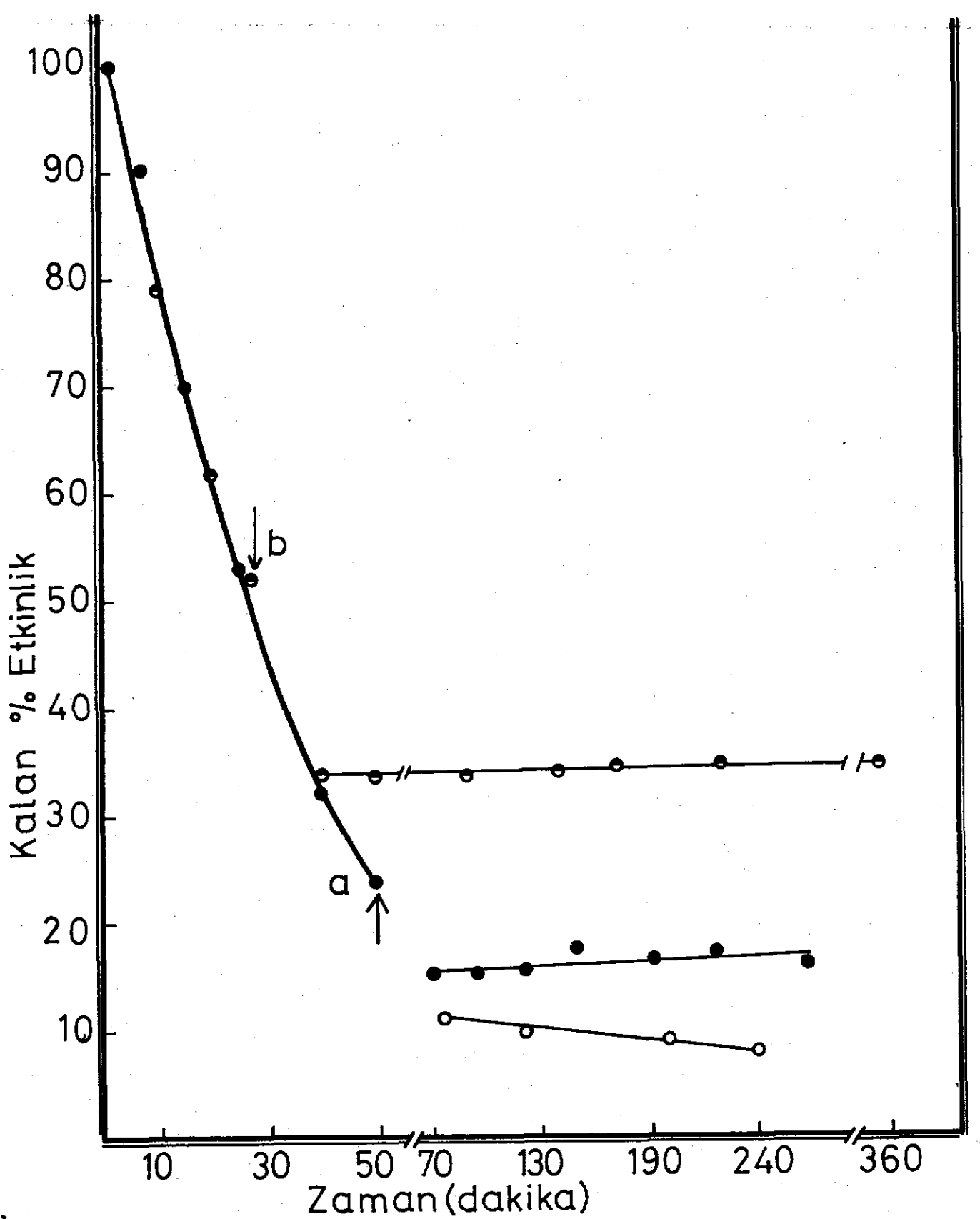
Şekil 9 dan elde edilen görünür birinci dereceden hız sabitelerinin butanedione derişimine karşı çizimi.

doğrunun orijinden geçmesi tepkimenin bimoleküler bir tepkime olduğunu gösterir (45).

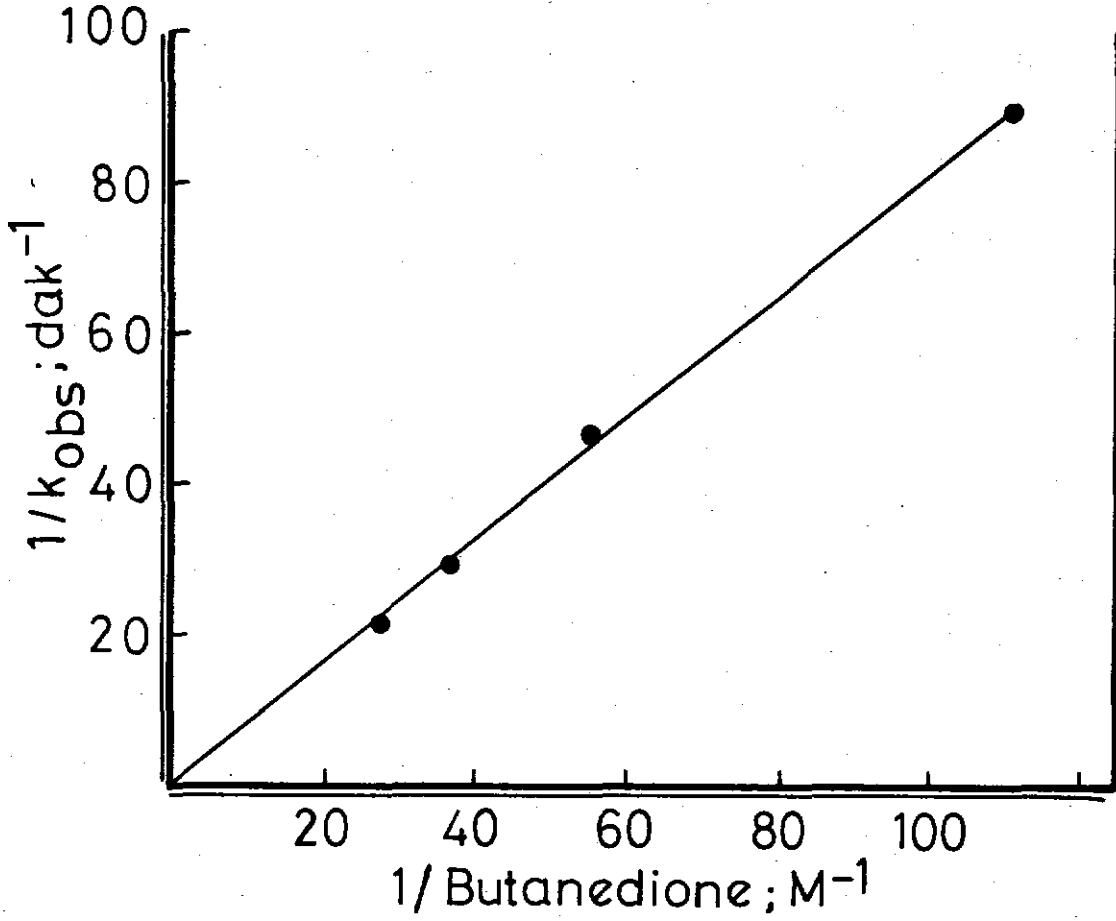
Piruvat kinaz ve diğer enzimlerle yapılan butanedione ile modifikasyon çalışmaları, butanedione modifikasyonunun tersinir olduğunu göstermiştir (21, 24). Modifikasyon ortamında butanedione ve borat tamponu uzaklaştırılacak olursa enzimin tüm etkinliğini yeniden kazandığı görülmüştür (24).

İnsan alyuvar piruvat kinazının arjinin modifikasyonunun tersinmez olduğu bulundu. Butanedione ile inaktivasyon % 24'e ulaştığında örneğin yarısı borat tamponu, diğer yarısı ise tris/HCl tamponu ile dengelenmiş sephadex G-25 kolonundan geçirildikten sonra her iki örnekte de etkinliğin yeniden kazanılması görülmedi (Şekil : 12). Borat tamponu ile dengelenmiş kolondan geçirilen örnekte inaktivasyon devam ederken; tris/HCl tamponu ile dengelenen kolondan geçirilen örnekte inaktivasyon aynı düzeyde kaldı (Şekil : 12). İnaktivasyonun çok ilerlemediği koşullarda (% 54'ye ulaştığında) aynı deney tekrarlandığında sonuç değişmedi (Şekil : 12).

Gerek şekil 12'den elde edilen bulgulardan, gerekse şekil 9'dan elde edilen görünür birinci dereceden hız sabitlerinin tersinin butanedione derişiminin tersine karşı çizildiğinde (Şekil : 13), piruvat kinazın butanedione ile inaktivasyonu mekanizmasının Strickland v.d. nin önerdiği ikinci tip mekanizmaya (46) uyduğu gözlemlendi.



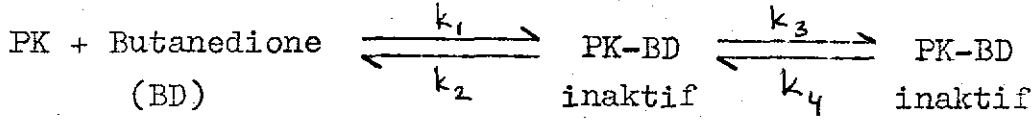
ŞEKİL 12 :Butanedione modifikasyonunun tersinirliği. a : İnaktivasyon yüzde 24'e, b : inaktivasyon yüzde 52'ye ulaşınca tepkime durduruldu. (—●—), İnaktivasyon yüzde 52'ye ulaşınca butanedione uzaklaştırıldıktan sonraki etkinlik. (—○—), inaktivasyon yüzde 24'e ulaşınca butanedione uzaklaştırıldıktan sonraki etkinlik; (—●—), borat ve butanedione uzaklaştırıldıktan sonraki etkinlik.



ŞEKİL 13 : Piruvat kinaz inaktivasyonunun kinetik sabitelerinin grafiksel tayini.

Şekil 9'dan elde edilen görünür birinci dereceden hız sabitlerinin tersi, butanedione derişiminin tersine karşı çizildi.

Bu mekanizmaya göre;



$$k_{\text{obs}} = \frac{k_1 [\text{BD}] (k_3 + k_4) + k_2 k_4}{k_1 [\text{BD}] + k_2 + k_3} ;$$

Şekil 12 ve 13 den; $k_4 = 0$; $k_2 \gg k_1$ ve $k_3 \ll k_1$ dir.

Buna göre yukardaki eşitlik yeniden düzenlenecek olursa;

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_1 k_3 [\text{BD}]}{k_1 [\text{BD}] + k_3} \text{ olacaktır. Bu eşitliğin tersi}$$

alınırsa:

$$\frac{1}{k_{\text{obs}}} = \frac{1}{k_3} + \frac{1}{k_1} \cdot \frac{1}{[\text{BD}]} \text{ elde edilir.}$$

Bu eşitlik ve şekil 13 den yararlanılarak, $k_1 = 1.24 \text{ M}^{-1} \text{dak}^{-1}$ ve $k_3 = 8.70 \text{ M}^{-1} \text{dak}^{-1}$ bulundu.

Deney sonuçlarından doğrunun orijinden geçtiği izlenimi alınıyorsa da, gerçekte ordinatı kesim analizinin ancak bilgisayar ile anlaşılabilceğine Strickland v.d. tarafından işaret edilmiştir.(46)

Modifikasyonun pH Bağımlılığı:

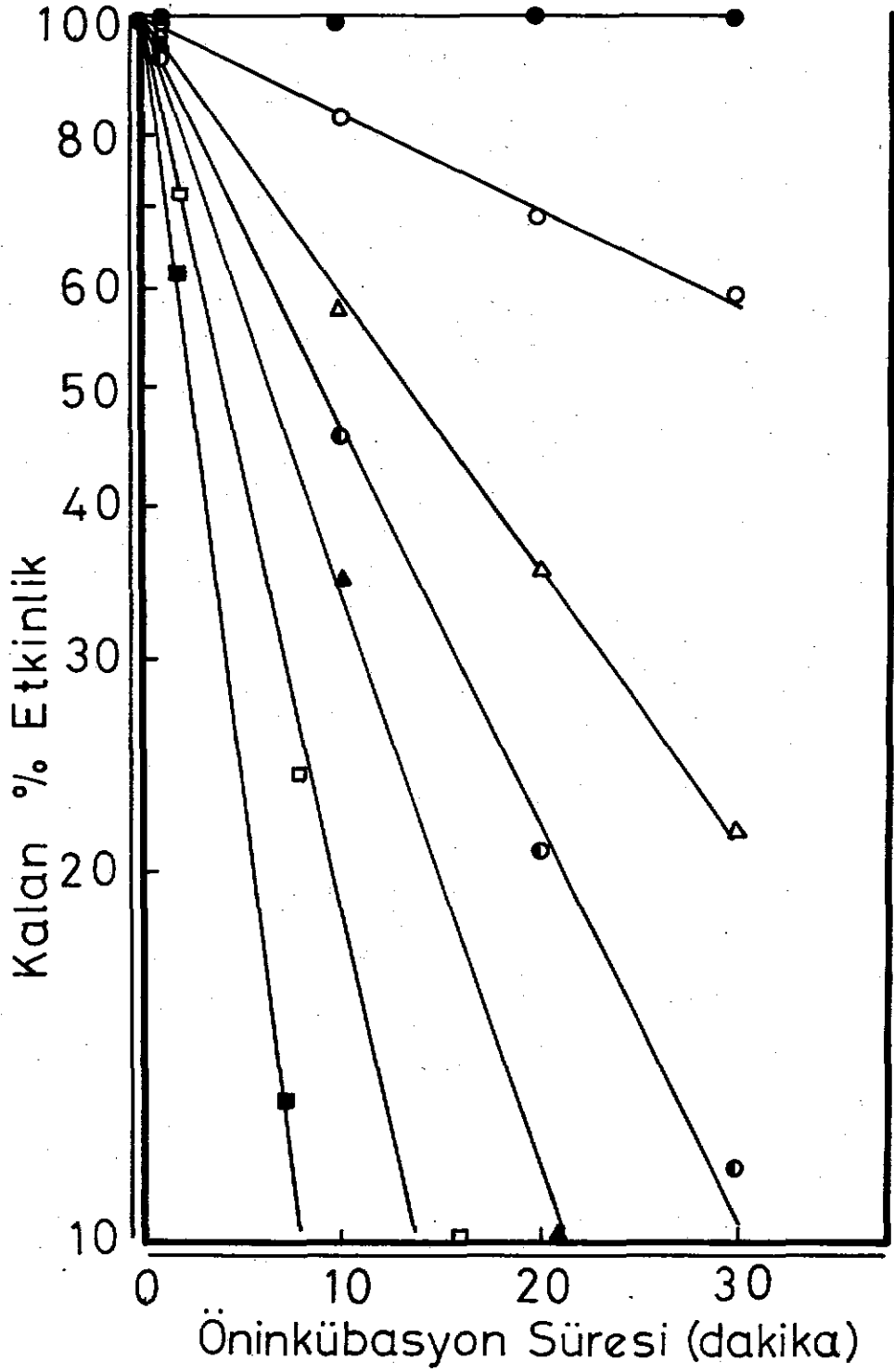
İnsan alyuvar piruvat kinazının butanedione modifikasyonunun pH'ya çok bağımlı olduğu bulundu (Şekil : 14, 15). pH yükseldikçe inaktivasyonun da artması, modifiye olan grubun arjinin olduğunu güçlendirirken, butanedione'un protonlanmış guanido grupları ile tepkimeye girdiğini göstermektedir.

Modifikasyona Tuzun Etkisi:

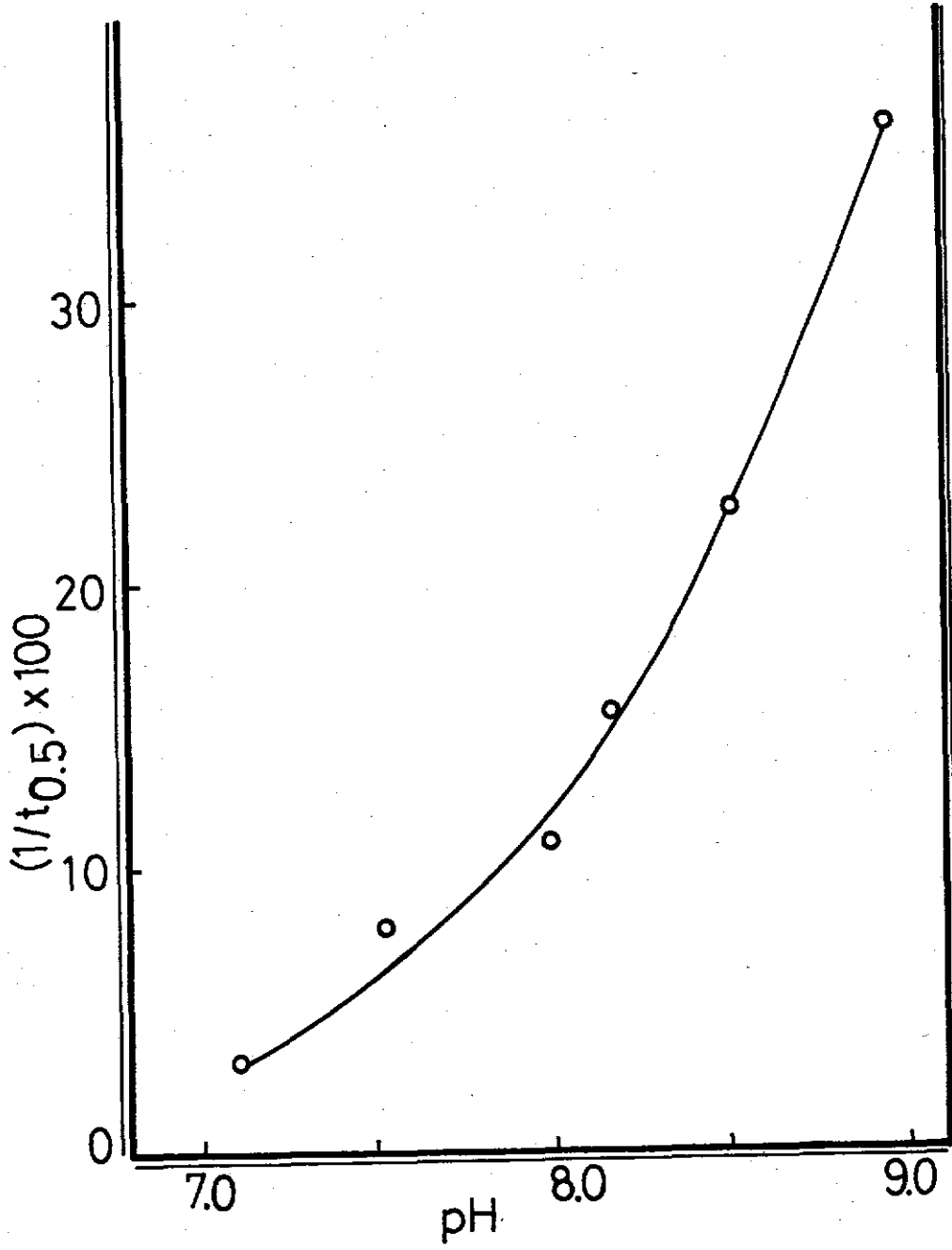
NaCl ve KCl'ün butanedione ile inaktivasyona karşı piruvat kinazı korudukları görüldü (Şekil : 16). Potasyum iyonları enzimin aktivatörü, sodyum iyonları ise inhibitör olarak bilinmesine karşın (47), koruyucu etkileri arasında fark görülmedi (Şekil :17).

Ligantların Koruyucu Etkisi:

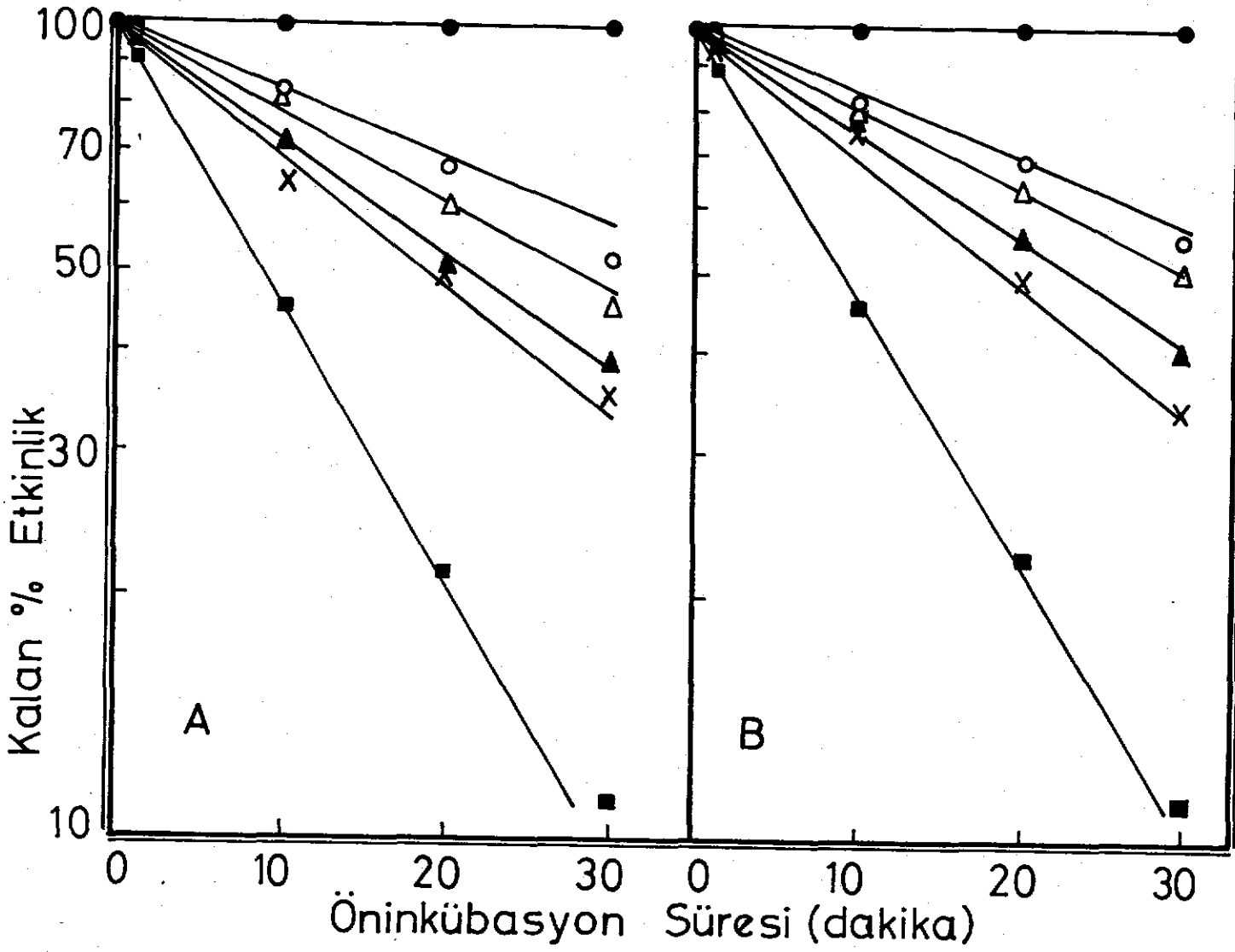
Inaktivasyona karşı etkisi araştırılan ligantların (ADP, PEP, FDP, ATP) pH'sı modifikasyonun yapıldığı pH 8.0'a ayarlandıktan sonra çalışıldı. Etkisi araştırılacak olan ligantın enzimle öninkübasyonundan sonra modifikasyon başlatılarak; değişik zaman aralıklarında çekilen örneklerde etkinlik tayini yapıldı. Görülen koruyucu etkinin tamamen ligantların sağladığı iyonik güçten kaynaklandığı tesbit edildi. Bu nedenle NaCl ile modifikasyonda iyonik güç ($\mu=120$) sabit tutularak yapılan deneylerde, ligantlardan hiçbirinin koruyucu etkiye sahip olmadıkları ve inaktivasyon hız sabiteleri ($k_{inaktivasyon}$) arasında fark olmadığı bulundu (Tablo : III).



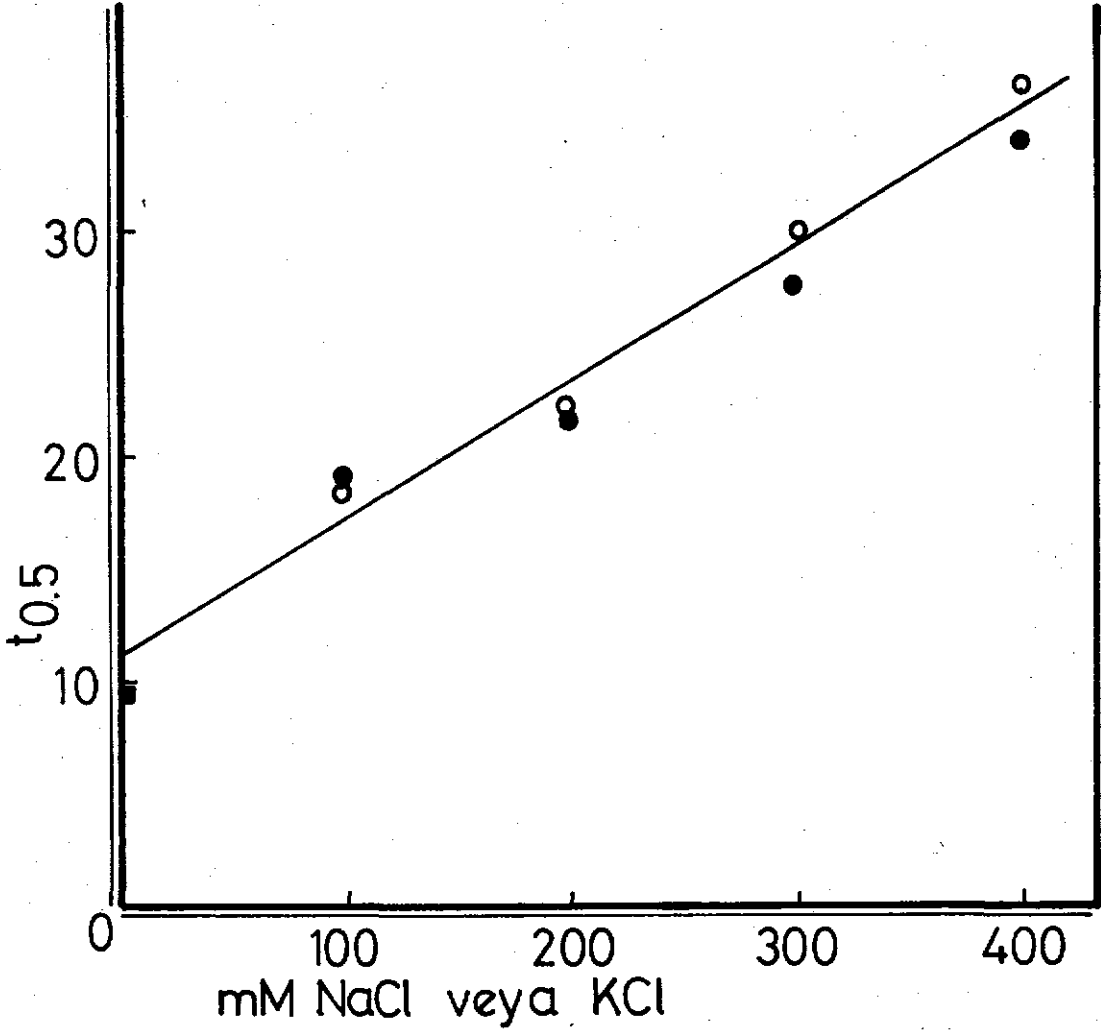
ŞEKİL 14 : Alyuvar Piruvat Kinazının değişik pH'larda butanedione ile inaktivasyonu. Butanedione, 50 mM; (-●-), pH: 8.0, kontrol; (-○-), pH: 7.1; (-△-), pH: 7.52; (-●-), pH: 8.0; (-▲-), pH: 8.17; (-□-), pH: 8.52, (-■-), pH: 8.94. (Modifikasyonun yapıldığı her pH'da bir adet kontrol örneği ile paralel çalışıldı.)



ŞEKİL 15 : Alyuvar Piruvat Kinazının butanedione ile inaktivasyonunun pH bağımlılığı. Butanedione, 50 mM.



ŞEKİL 16 : Alyuvar Piruvat Kinazının butanedione ile inaktivasyonuna tuzun koruyucu etkisi. Butanedione, 50 mM; pH, 8.0; (—●—), kontrol; (—■—), butanedione'lu kontrol; (—○—), 100 mM; (—△—), 200 mM; (—▲—), 300 mM; (—×—), 400 mM tuz. A : NaCl; B : KCl.



ŞEKİL 17 : Alyuvar Piruvat Kinazın butanedione ile inaktivasyonuna NaCl ve KCl'ün koruyucu etkileri. (—●—), NaCl; (—○—), KCl.

Ligant ve Derişimi k_i inaktivasyon, dak.⁻¹

| | |
|---------------------------|-------|
| Hiçbiri | 0.039 |
| PEP, 0.1 mM | 0.035 |
| 1.0 mM | 0.035 |
| 10.0 mM | 0.036 |
| ADP, 0.1 mM | 0.030 |
| 1.0 mM | 0.030 |
| 10.0 mM | 0.030 |
| PEP(5 mM) + ADP(1 mM) | 0.037 |
| PEP(5 mM) + ADP(5 mM) | 0.030 |
| ATP, 5 mM | 0.030 |
| FDP, 50 uM | 0.039 |
| 1 mM | 0.033 |
| MgSO ₄ , 10 mM | 0.032 |
| KCl, 100 mM | 0.031 |

TABLO 3 : Çeşitli ligantların Alyuvar Piruvat Kinazı'nın Butanedione ile inaktivasyonuna etkileri.*

* pH=8.0; [Butanedione]=50 mM; İyonik kuvvet=120 mM (NaCl ile sağlandı). Bu iyonik kuvvet değerine Borate-Bicine-NaOH tampon sistemlerinin sabit olan iyonik kuvvet katkıları dahil edilmemiştir.

T A R T I Ő M A

Agaroz ve poliakrilamid türevleri affinite kromatografi ile proteinlerin saflaştırılmalarında kullanılmaktadır (49). Affinite kromatografisinde esas olarak, a) jel matrisinden çeşitli uzunluktaki hidrokarbon zincirleri aracılığı ile ligantlar jele kovalent olarak bağlanır, b) agaroz ve poliakrilamid türevlerine ligantların kovalent olarak bağlanması amino, karboksil, fenolik veya imidazol grupları aracılığı ile olur ve c) jele kovalent olarak bağlı olan liganta özgül olarak bağlanan proteinler, bu bağı özgül olarak kırabilen bir ligant ile elüe edilirler.

Affinite kromatografisinde kullanılan sepharose 4B jelinde ise, proteinin jele bağlanması bir tek grup ile değil; proteindeki çok özel bir ikincil yapı aracılığı ile olur. Dinükleotid cebi denilen (dinucleotide fold) bu özel ikincil yapıyı içeren geniş bir grup protein, bleu dextran ile bir kompleks oluştururlar (50). Dinükleotid cebi 5-6 zincirden oluşan β -tabakalarının α -helikal zincir içi kıvrımlarla birbirlerine bağlanmaları ile oluşur ve bu yapı 120 aminoasit içerir. Bu yapıyı içeren proteinler düşük iyonik kuvvet koşullarında sepharose 4B jeline takılan bleu dextrana

bağlanırlar. Bağlanan her protein dinükleotid içeren bir ligant ile elüe edilebilir. Elüsyonda kullanılan bu ligantlar genellikle NAD, NADH, NADP, NADPH, ADP, GTP gibi dinükleotid yapı içeren bileşiklerdir (50).

Piruvat kinazın bleu dextran-sepharose 4B' den elüsyonu FDP ile sağlanmaktadır. Ancak FDP nin elüsyondaki görevi diğer ligantlarinkinden değişiktir. Diğer ligantlar doğrudan dinükleotid cebini etkiledikleri, yani bleu dextranın proteine bağlanan bölgesi ile yarışmaya girerek elüsyonu sağladıkları halde, FDP enzimin konformasyonunu değiştirerek, dinükleotid cebininin yitirilmesini sağlayarak elüsyonu başarmaktadır (17).

Bu çalışmada alyuvar piruvat kinazının saflaştırılması için geliştirilen yöntem her ne kadar literatürde rapor edilenden iki misli daha fazla verim sağlıyorsa da; bu yöntemin asıl avantajlı yönü, çok sayıdaki saflaştırma basamaklarından geçmeden enzimin kısa sürede saf olarak elde edilmesidir (tablo 2). Rapor edilen saflaştırma çalışmaları çok sayıda amonyum sülfat kesitlemeleri, jel filtrasyonları, ısı denatürasyonu ve iyon değiştirici kromatografileri basamaklarını içermektedir. Alyuvar piruvat kinazının saflaştırılması için önerilen yöntemlerin içinde en pratik ve verimin en yüksek olduğu çalışmada bile, ancak litrelerce kan ile başlanabilecek olan saflaştırma işlemi en az bir hafta sürmektedir (17). Ayrıca bu çalışmada amonyum sülfat kesitlemeleri yerine %41 lik amonyum sülfat çöktürme-

si ile ilk basamakta enzim deriştirilmiş ve alyuvar proteinerinin % 90 ının hemoglobinin olduğu düşüncesi ile sephadex G-75 kromatografisi yapılarak hem enzimin tuzdan arındırılması için gerekli diyaliz veya sephadex G-25 kromatografileri atlanarak gereksiz gereç israfı önlenmiş, hem de % 41 lik amonyum sülfat çökeleğine geçen hemoglobinin de tamamen atılması sağlanmıştır (şekil : 1).

Batchwise yapılan affinite kromatografisi ise oldukça zaman kazandırmış ve enzimin muhtemel proteolitik yıkımı önlenmiştir (şekil: 3). Nitekim enzim bleu dextran sepharose 4B'ye kolonda uygulanıp, yıkama yine kolonda yapılacak olursa hem verim düşmekte, hemde $R_2R'_2$ ne özgöl 60 000 molekül ağırlıklı protein bandı gözlenememektedir (şekil: 2).

Alyuvar piruvat kinazının eksikliği nonsferositik hemolitik aneminin bilinen nedenlerinden biridir. Mutant enzimin bozukluklarını tesbit edebilmek için, öncelikle normal enzimin yapısal özelliklerinin moleküler düzeyde açıklanması gerekir. Alınabilecek kan miktarının ve enzimin dayanıklılığının önemli birer faktör olduğu nonsferositik hemolitik anemili hastaların piruvat kinazının saflaştırılmasında diğer araştırıcılarca önerilen yöntemlerin uygulanması imkansızdır, çünkü çok sayıda saflaştırma işlemi ve çok zaman almaktadır. Bu da birden fazla formu olan piruvat kinazın doğal yapısında elde edilmesini engelliyecektir.

Burada önerilen yöntemle iki gün içinde, üç basamakta ve % 60 verimle 11 mg saf alyuvar piruvat kinazı elde

edildi (Tablo 2). Affinite kromatografisindeki verim sürekli artmakta idi. Bunun nedeni bleu dextran boyasındaki reaktif grup sayısının azalmasına bağlı olabilir (44).

Bu çalışmada kullanılan yöntem her ne kadar üç basamak içeriyorsa da küçük kan örnekleri için saflaştırma iki basamakta sağlanabilir. Bunun için hemolizattaki amonyum sülfat çöktürmesi işlemi kaldırılarak, hemolizattan doğrudan sephadex G-75 kromatografisi yapıldı. Bu kromatografide de, hemolizatın % 41 lik amonyum sülfat çöktürmesinden sonraki kromatografide olduğu gibi hemoglobinden tam bir ayrılma görüldü. Hemolizat doğrudan bleu dextran-sepharose 4B'ye uygulandığında her ne kadar aşırı hemoglobin tüm piruvat kinazın boyaya bağlanmasını etkiliyorsa da, bağlanan enzimin % 10-25 kadarını saf olarak elde etmek mümkün oldu (bu son çalışmalar sürmektedir ve bunlarla ilgili bulgular verilmemiştir).

Piruvat kinaz eksikliğine bağlı nonsferositik anemide; bir tetramer olan piruvat kinazın monomer ve dimerlerine dissosiyeye olduğu gösterilmiştir (20). Aynı araştırmacılar piruvat kinazın monomer, dimer ve tetramer yapılarının arasında bir dengenin bulunduğunu ve bu dengenin hastalarda altbirimlerin dissosiasyonu yönüne kaydığını savunmuşlardır (20). Böyle bir dengenin varlığını normal enzimde de gösterebilmek önemli olacaktır. Alyuvar piruvat kinazının etkinliği hücredeki GSSG/GSH oranı ile yakından ilgilidir (51). İnvitroda GSSG ile muamele edilen normal enzimin kinetik özelliklerinin, mutant enzimin kinetik özelliklerine benzediği gösterilmiştir (51).

Sülfidril gruplarının GSSG ile oksidasyonu sonucunda enzimde oluşan disülfid bağlarının altbirimlerin kendi üzerinde mi yoksa psödokolinesterazda olduğu gibi (55) iki altbirim arasında mı olduğu araştırıldı. Enzim örnekleri 2-3 saat 2-ME (5 mM) veya GSSG (5 mM) ile inkübe edildikten sonra % 10 luk SDS jeline uygulandığında aynı sonuçlar elde edildi (bulgular verilmedi). Bu, enzimde oluşan disülfid köprülerinin ya altbirimlerarası olmadığına ya da GSSG nin altbirimlerarası disülfid bağı oluşturmak için (sterik yapısı nedeniyle) gerekli sülfidrillere ulaşamadığına işarettir. Adachi v.d. nin (20) nonsferositik anemili hastaların piruvat kinazı ile olan çalışmaları disülfidlerin aynı altbirim üzerinde olduğu ve disülfid oluşumunun enzimi monomer yönüne kaydıracağı kuramını desteklerken; Van Berkel, Badwey v.d. nin (14, 18, 19) oksitlenmiş piruvat kinazın reaktivasyonunda 2-ME'ün GSH'tan çok daha etkin olduğu yolundaki bulguları, GSSG'nin (sterik yapısı nedeniyle) gerekli sülfidrillere ulaşamadığı görüşünü desteklemektedir. Ancak kesin bir yargıya varabilmek için bu konuda daha etraflı çalışmalar gerekmektedir.

Kinetik özellikleri ayrıntılı olarak gösterilmesine rağmen, alyuvar piruvat kinazının ligant bağlama bölgeleri ve diğer moleküler özellikleri hakkında çok az şey bilinmektedir. Enzimlerin ligant bağlama bölgelerindeki aminoasitlerin tayininde özgül aminoasit reaktifleri kullanılmakta ve enzimin ligantlarının inaktivasyona karşı koruyucu etkilerinden yararlanılarak modifiye olan aminoasidin hangi ligantın bağlanmasında rol aldığı tayin edilmektedir (21, 25, 52).

İnsan alyuvar piruvat kinazı da bir arginine reaktifi olan 2,3-butanedione ile inaktive edildi ve inaktivasyon kinetiği görünür birinci derece kinetiğine uygunluk gösterdi (Şekil : 9). Gerek enzimin substratları olan PEP ve ADP, gerekse de denetleyicileri olan ATP ve FDP'nin butanedione inaktivasyonuna karşı enzimi koruyamadıkları bulundu (Tablo 3). Bu bulgular modifiye olan arjinil grubunun etkinlik için zorunlu olmakla birlikte, ne substrat ne de diğer ligant bağlama bölgesinde yer almadığını göstermektedir. Modifiye olan arjinil grubunun, literatürde de spekülasyonu yapıldığı gibi ya altbirimlerarası etkileşimde (53, 54), ya da konformasyon değişikliğinde görev aldığını sanmakla birlikte; bu konuda kesin bir sav ileri sürebilmek için enzimin butanedione ile modifikasyonundan sonra; şayet birinci varsayım doğru ise enzimin altbirimlerine ayrıldığının, ikinci varsayım doğru ise absorpsiyon spektrumunda değişiklik gözlenmesi gerekir. Ancak bu konudaki çalışmalarımız tamamlanmış değildir.

Arjinin için daha az özgül bir reaktif olan phenylglyoxal ile yapılan çalışmalarla alyuvar piruvat kinazının bifazik inaktivasyonu gözlemlendi. Phenylglyoxal'ın hem arjinin hem de lizin için bir reaktif olduğu düşüncesi ile, özgül lizin reaktifi olan pyridoxal phosphate ile yapılan inaktivasyon çalışmalarında pyridoxal phosphate'ın alyuvar piruvat kinazını inaktive etmediği bulundu. Adı geçen son çalışmalar tamamlanmamış olup, çalışmaların sonuçları verilmemiştir.

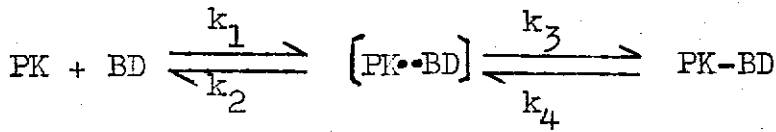
Piruvat kinazın butanedione modifikasyonunun yarı ömürlerinin tersinin logaritması butanedione derişiminin logaritmasına karşı çizildiğinde elde edilen doğrunun eğiminin 1 olması (Şekil : 10) literatürde altbirim başına bir tek arjinin grubunun modifiye olduğu şeklinde yorumlanmaktadır (23, 24, 25). Ancak bu yorumun bir tek arjinin yerine, 'reaktivitesi aynı olan bir grup arjinin' olarak yapılması gerekir. Çünkü, reaktivitesi aynı olan bir grup arjininin modifikasyonu ile de eğimi 1 olan bir doğru elde edilecektir. Diğer yandan, modifikasyonu enzimin aktivitesini etkilemeyen arjinin gruplarının varlığı da yukarıdaki yorumu aşmaktadır. Örneğin, fosfogliserat kinazda 7 arjinin grubu modifiye olduğu halde, bunlardan yalnızca 1-2 tanesi etkinlik için zorunludur (48). Yine karboksipeptidaz A'da modifiye olan 2-3 arjinin grubundan yalnızca bir tanesi etkinlikten sorumludur (21)

Modifikasyonun pH bağımlı olması (Şekil : 15) da beklenen bir sonuçtur. Çünkü arjinin'in yalnızca protone olmayan şekli butanedione ile tepkimeye girebilmektedir (21). Bu nedenle pH'nın yükselmesi protone olmayan arjinin'in artmasına neden olacak, bu da inaktivasyonun hızını arttıracaktır.

Ortaman iyonik gücünün arttıkça inaktivasyon hızının düşmesi (Şekil : 17) iyonik güç nedeniyle enzimin daha kapanmış bir yapı almasına bağlanabilir. Piruvat kinazın özgül aktivatörü olan Potasyum iyonunun (47) sodyum iyonu ile aynı etkiyi göstermesi ancak bu şekilde yorumlanabilir.

Arjinin grubunun butanedione tarafından inaktivasyonu tersinir olarak rapor edilmiş olmasına rağmen (21, 24) bu çalışmadaki inaktivasyonun tersinir olmadığı gözlemlendi (Şekil: 12). Tersinmezliğin inaktivasyonun ilerleme derecesine bağlı olmadığı, değişik inaktivasyon yüzdelerinde aşırı butanedione ortamda uzaklaştırıldığında aynı bulguların gözlenmesi ile kanıtlandı.

Alyuvar piruvat kinazının butanedione ile inaktivasyonunun tersinmezliği Strickland v.d. nin önerdiği ikinci mekanizmaya uygunluk göstermektedir (46).



Burada tepkimenin tersinmez oluşu, $k_4 = 0$ demektir ve butanedione ortamda uzaklaştırıldığında enzim etkinliğinde artış gözlenmemesi (Şekil: 12), başka bir deyişle inaktivasyonun aynı düzeyde kalması, $k_3 > k_1 \gg k_2$ olduğunu gösterir.

Buna göre literatürde oldukça uzun sürede gözlenen tersinmezlik (21) insan alyuvar piruvat kinazında çok çabuk olmaktadır. Nitekim Strickland v.d. nin (46) ikinci mekanizmalarından yararlanarak k_1 için $1.24 \text{ M}^{-1} \text{ dak}^{-1}$ bulunurken, k_3 için $8.70 \text{ M}^{-1} \text{ dak}^{-1}$ bulunması bu spekülasyonu güçlendirmektedir.

Bu çalışmanın getirdikleri çok kısa ve verimli bir yöntem ile insan alyuvar piruvat kinazının saflaştırılması ve etkinlik için zorunlu periferel bir arjinin grubunun

gösterilmesidir. İnsan alyuvar piruvat kinazının substrat ve ligant bağlama bölgelerindeki amino asitlerin özgül amino asit reaktifleri ile tanımlanması ve bunun nonsferositik hemolitik anemili hastaların piruvat kinazları ile karşılaştırılması, bu hastalığın moleküler düzeyde tanımlanmasına yardımcı olacağı inancındayız.

Ö Z E T

Alyuvar piruvat kinazı insan kanından kısa sürede ve % 59 verimle saflaştırıldı. Saflaştırmada sıra ile alyuvarların yıkanması ve hemolizi, hemolizattan % 41 lik amonyum sülfat çöktürmesi, sephadex G-75 kromatografisi ve batchwise bleu dextran-sepharose 4B affinite kromatografisi kademeleri uygulandı. Küçük kan örneklerindeki saflaştırma için de, amonyum sülfat çöktürmesi yapılmadan, sephadex G-75 ve affinite kromatografisi kademeleri uygulanacak şekilde değişiklik yapıldı.

Piruvat kinazın normal poliakrilamid jel elektroforezinde tek protein bandı elde edildi. Enzim % 5 lik SDS'li jel elektroforezinde tek band verirken; % 10 luk jelde 60 000 (R' formu) ve 57 500 (R formu) molekül ağırlığındaki iki band verdi.

2,3-Butanedione ile görünür birinci dereceden bir tepkime ile inaktivasyona uğrayan alyuvar piruvat kinazının iyonik kuvvet tarafından inaktivasyona karşı korunduğu; ancak bu korumanın özgül olmadığı bulundu. Modifikasyonun pH bağımlı olduğu, pH yükseldikçe inaktivasyonun arttığı ve enzimin altbirimi başına bir arjinil grubunun modifiye olduğu görüldü. Enzimin substrat ve ligantlarından hiçbirinin koruyucu etkiye sahip olmamaları nedeniyle; modifiye olan arjinil grubunun ligant veya substrat bağlama bölgesinde bulunmadığı; ancak enzimin etkinliği için zorunlu olan konformasyonu alması için, altbirim etkileşiminin sağlandığı bölgelerde rol aldığı veya enzimin altbirimlerine dissosiasyonuna neden olduğu şeklinde yorumlandı.

KISALTMALAR

| | | |
|-----------------|---|--|
| PK | : | Piruvat kinaz |
| PEP | : | Fosfoenol piruvat |
| FDP | : | Fruktoz 1,6-difosfat |
| ADP | : | Adenozin 5'-difosfat |
| ATP | : | Adenozin 5'-trifosfat |
| DPGA | : | 2,3-difosfo gliserik asit |
| MDP | : | Mannoz difosfat |
| GDP | : | Glukoz difosfat |
| HDP | : | Heksoz difosfat |
| GSSG | : | Okside glutatyon |
| GSH | : | Redükte glutatyon |
| DNP | : | Dinitro fenil hidrazin |
| ϵ -ACA | : | ϵ -Amino kaproik asit |
| PMSF | : | Fenil metil sülfonil florür |
| DTT | : | Dithiothreitol |
| DTE | : | Dithioerythriol |
| HEPES | : | N-2-Hydroxyethyl piperazine-N'-ethane sülfonic acid |
| EDTA | : | Etilen diamin tetra asetik asit. |

K A Y N A K L A R

1. Hall, E.R., Cottom, G.L., *Int. J. Biochem.*, 9, 785 (1978).
2. Black, J.A., Henderson, M.H., *Biochim. Biophys. Acta*, 284, 115 (1972).
3. Garreau, H., Temkine, H.B., *Biochimie*, 54, 1103 (1972).
4. Koster, J.F., Hulsmann, W.C., *Arc. Biochim. Biophys.* 141, 98 (1970).
5. Badwey, J.A., Westhead, E.W., *J. Biol. Chem.*, 251, 5600 (1976).
6. Peterson, J.S., Chern, C.J., Harkins, R.N., Black, A.J., *FEBS Letters*, 49, 73 (1974). ve ref. 8.
7. Kahn, A., Marie, J., Garreau, H., Sprengers, E.D., *Biochim. Biophys. Acta*, 523, 59 (1978).
8. Marie, J., Garreau, H., Kahn, A., *FEBS Letters*, 78, 91 (1977).
9. Garreau, H., Columelli, S., Marie, J., Kahn, A., *FEBS Letters*, 78, 95 (1977).
10. Frieden, C., *J. Biol. Chem.*, 245, 5788 (1970).
11. Walker, F.D., Hild, W.J., *Science*, 165, 601 (1969).
12. Monod, J., Wyman, J., Changeux, J.P., *J. Mol Biol.*, 12, 88 (1965).
13. Badwey, J.A., Westhead, E.W., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 77, 275 (1977).
14. Van Berkel, J.C., Koster, J.F., Staal, G.E.J., *Biochim. Biophys. Acta*, 321, 496 (1973).
15. Blume, K.G., Hoffbauer, R.W., Bush, D., Arnold, H., Löhr, G.W., *Biochim. Biophys. Acta*, 227, 364 (1971).
16. Chern, C.J., Rittenberg, M.B., Black, J.A., *J. Biol. Chem.*, 247, 7173 (1972).

17. Marie, J., Kahn, A., Boivin, P., *Biochim. Biophys. Acta*, 481, 96 (1977).
18. Badwey, J.A., Westhead, E.W., *Biochem. Biophys. Res Commun.*, 74, 1326 (1977).
19. Van Berkel, J.C., Staal, G.E.J., Koster, J.F., Nyessen, J.G., *Biochim. Biophys. Acta*, 334, 361 (1974).
20. Adachi, K., Ghory, P.K., Asakura, T., Schwartz, E., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74, 501 (1977).
21. Riordan, J.F., *Biochemistry*, 12, 3915 (1973).
22. Pillai, R.P., Marshal, M., Villafranca, J.J., *Arc. Biochem. Biophys.*, 199, 16 (1980).
23. Marcus, F., Schuster, S.M., Lardy, H.A., *J. Biol. Chem.*, 251, 1775 (1976).
24. Cardemil, E., Eyzaguirre, J., *Arc. Biochem. Biophys.* 192, 533(1979).
25. Hollenberg, P.F., Flashner, M., Coon, M.J., *J. Biol. Chem.*, 246, 946 (1971).
26. Flashner, M., Hollenberg, P.F., Coon, M., *J. Biol. Chem.*, 247, 8114 (1972).
27. Dann, L.G., Britton, H.G., *Biochem. J.*, 137, 405 (1974).
28. Warburgh, O., Christian, W., *Biochem. Z.*, 310, 384 (1941) "Alınmıştır" Colowick, S.P., Kaplan, N.O., *Methods in Enzymology*. Academic Press Inc., Publishers, New York, 1957, III. Sa. 454.
29. Schaffner, W., Weissman, C., *Anal. Biochem.*, 56, 502 (1973).
30. Kimberg, D.V., Yielding, L., *J. Biol. Chem.*, 237, 3233 (1962).
31. Tietz, A., Ochoa, S., *Arc. Biochem. Biophys.*, 78, 477 (1958).
32. Cuatrecasas, P., Anfisen, C.B., (1971), Edited by Jakoby, W.P., *Methods in Enzymol.*, Acad. Press Inc. New York ve Londra, Vol. XXII. Sa. 345.

33. Ryan, L.D., Westling, C.S., *Arc. Biochem. Biophys.*, 160, 279 (1974).
34. Ornstein, L., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121, 321 (1964).
35. Schuster, L., Edited by Clowick, S.P., Kaplan, N.O., *Methods in Enzymol.*, Acad. Press Inc., New York ve Londra, 1971, Vol. XXII. Sa. 412.
36. Weber, K., Osborn, M., *J. Biol. Chem.*, 244, 4406 (1969).
37. Berghauser, J., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 358, 1565 (1977).
38. Roy, G.L., Laferriere, A.L., Edwards, J.O., *J. Inorg. Nuc. Chem.*, 4, 106 (1957).
39. Haeckel, R., Hess, B., Lauterborn, W., Wüster, K.H., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 699, 713 (1968).
40. Böhme, H.J., Kopperschlager, G., Schulz, J., Hofmann, E., *J. Chromatogr.*, 69, 209 (1972).
41. Ryan, D.L., Westling, S.C., *Arc. Biochem. Biophys.*, 160, 284 (1974).
42. Easterday, R.L., Easterday, I.M., *Adv. Exp. Med. Biol.*, 42, 123.
43. Staal, G.E.J., Visser, J., Veeger, C., *Biochim. Biophys. Acta*, 185, 39 (1969).
44. Weber, B.H., Willeford, K., Moe, J.G., Piszkiwicz, D., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 86, 252 (1979).
45. Wilson, I.B., Kitz, R., *J. Biol. Chem.*, 237, 3245 (1962).
46. Strickland, S., Palmer, G., Massey, V., *J. Biol. Chem.*, 250, 4048 (1975).
47. Lehninger, A.L., *Biochemistry*, Worth Publishers Inc., Sa. 431, New York (1976).
48. Rogers, K., Weber, B.H., *Arc. Biochem. Biophys.*, 180, 19
49. Cuatrecasas, P., *J. Biol. Chem.*, 245, 3059 (1970).

50. Thampson, S.T., Cass, K.H., Stellwagen, E., Proc. Natl. Acad. Sci., 72, 669 (1975),
51. Sprengers, E.D., Clin. Chim. Acta, 80, 415 (1977) ve Ref. 14.
52. Flashner, M., Hollenberg, P.F., Coon, M., J. Biol. Chem., 247, 8114 (1972).
53. Rosing, J., Harris, D.A., Kemp, A., Slater, E.C., Biochim. Biophys. Acta, 376, 13 (1975).
54. Penefsky, H.S., Warner, R.C., J. Biol. Chem., 240, 4694 (1965).
55. Lockridge, O., Eckerson, H.W., La Du, B., J. Biol. Chem., 254, 8324 (1979).