

T. C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ FAKÜLTESİ

283826

**TAVŞAN KARACİĞERİNDEN PROLİL HİDROKSİLAZIN
SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI ÖZELLİKLERİNİN
İNCELENMESİ**

Biyokimya Programı

DOKTORA TEZİ

Recep Üyüğü

ANKARA — 1979

44

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ FAKÜLTESİ

TAVŞAN KARACİĞERİNDEN PROLİL HİDROKSİLAZIN
SAFLAŞTIRILMASI ve BAZI ÖZELLİKLERİNİN
İNCELENMESİ

Biyokimya Programı

DOKTORA TEZİ

Recep Üçyiğit

Rehber Öğretim Üyesi: Prof.Dr.Gönenç Ciliv

Ankara - 1979

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
GİRİŞ _____	1
ARAÇ GEREÇ ve YÖNTEMLER _____	9
-Aktivite Tayini _____	11
-Kolon Kromatografisi _____	12
-Protein Tayini _____	13
-Akrilamid ve Jel Elektroforezi _____	13
BULGULAR _____	14
TARTIŞMA _____	31
ÖZET _____	37
KISALTMALAR _____	38
KAYNAKLAR _____	39

GİRİŞ

Tek hücrelilerden çok hücreli organizmalara geçişle beraber bağ dokusunun geliştiği görülmüştür. Bağ dokusu: Hücreleri organizasyona zorlar, görevlerini düzenler ve aralarındaki ilişkiyi sağlar. Gelişmiş çok hücrelilerde ise destek görevinide yapar.

Vertebralılarda en yaygın doku olan bağ dokusu, hücresel kısım ve hücreler arası madde olmak üzere iki bölümden oluşur.

Bağ dokusunun hücreler arası maddesini oluşturan özel proteinleri: Kollajen ve elastin ile özel karbonhidratları olan mukopolisakkaritleri, bu dokunun ana hücresi olan fibroblastlar sentez eder (1).

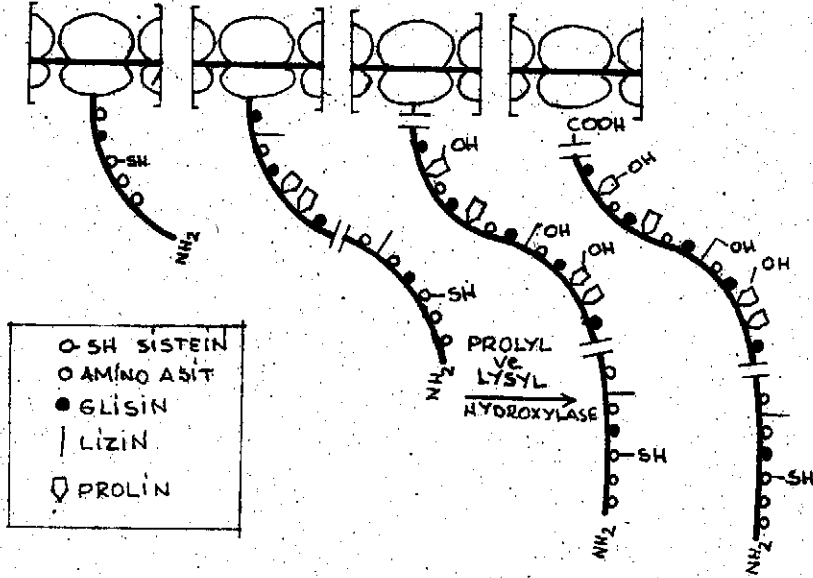
Kollajen: Hücrede bir öncül molekül olan protokollajen halinde sentezlendikten sonra hücreler arası maddeye geçerek burada bazı değişikliklere uğradıktan sonra çok sayıda prokollajenin birbirleriyle çaprazlaşmasıyla oluşur.

Prokollajen ise üç polipeptit zincirinin oluşturduğu bir heliks yapısındadır. Bu helikal yapı genellikle proteinlerde gördüğümüz α -heliks değildir.

Protokollajeni oluşturan polipeptit zincirleri hücrenin diğer proteinleri gibi ribozomlarda sentezlenir. Her bir poli

peptit zinciri de özel bir üçlü peptitin tekrarlanmasıyla oluşmuştur. Bu üçlü peptit (glisin-amino asit₁-amino asit₂) formülü ile gösterilebilir. Burada amino asit₁ ve amino asit₂ yerinde en çok prolin-hidroksiprolin veya lizin-hidroksilizin bulunur. Hidroksillenmiş amino asitler DNA tarafından kodlanmadığı için protein sentezi sırasında bunların yerinde prolin veya lizin konur. Zincir uzadıkça sitoplazmik birer enzim olan prolin hidroksilaz ve lizin hidroksilaz belli bir şifreye göre prolin ve lizinleri hidroksiller. Bu şifre henüz tam açıklığa kavuşmamakla beraber (glisin-prolin-prolin) dizisindeki prolinlerin hidroksillenmediği buna mukabil (prolin-prolin-glisin) dizisindeki prolinleri hidroksillendiği gösterilmiştir (2,3). Şekil 1. Ayrıca peptit yapısında bir hormon olan bradikinin de aynı amino asit dizisine sahip olduğu için hidroksillendiği gösterilmiştir (4).

Hidroksilasyon stabilizasyonu sağlar ve proteinin ısıya dayanıklılığını arttırır (5,6,7).



ŞEKİL 1: Kollajen biyosentezi esnasında prolin ve lizinin Hidroksilasyonu.

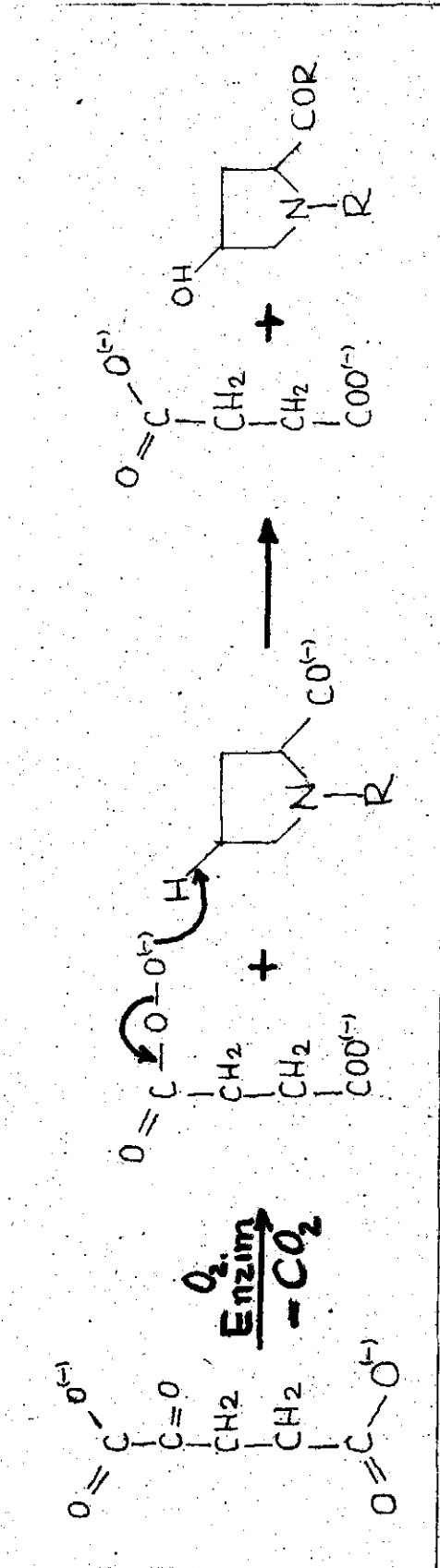
Prolil ve lizil hidroksilaz yaptıkları görev,kullandıkları sübstrat ve kofaktör bakımından birbirlerine çok benzemekle beraber farklı enzimlerdir. Prolil hidroksilaz'ın özellikleri incelendiğinde enzimin kofaktörü moleküler oksijen,iki değerli demir iyonu, α -ketoglutarat ve askorbik asitdir. α -ketoglutarata kosübstrat demek mümkündür (8,9,10,11,12,13).

Prolil hidroksilaz enziminin muhtemel mekanizması Şekil II'de gösterilmiştir (3,14).

Buradaki α -Ketoglutarat'dan karbondioksit ve süksinat oluşumu,mitokondri içindeki α -Ketoglutaratın dekarboksilasyonundan farklı bir olaydır.

Bu reaksiyonda askorbik asitin rolü henüz kesinlikle bilinmemektedir. Udenfriend,S. ve arkadaşları (15),askorbatlı ortamda enzim aktivitesinin % 100 kabul ettiği zaman izoaskorbatın % 104,tetrahidropteridinin % 56, tetrahidrofolatında % 43, rölatif aktivite verdiğini gözlemişlerdir. Buna göre askorbatın yerini başka bir redüktör madde alabilmektedir. Stassen,F.L.H., ve arkadaşları da (16) askorbatın prolil hidroksilazın öncül molekülünün aktivasyonunda rol oynadığını ileri sürdüler. Cardinale, G.J., ve arkadaşları(17).

¹⁸
O₂ ile yaptıkları deneylerde bir atom oksijenin süksinata,bir



Şekil II: Prolil hidroksilaz enziminin mekanizması.

atomunda hidrokspiroline girdiğini gözlediler. Reaksiyon sırasında demir iyonları oksitlenir ve muhtemelen α -Ketoglutarat ile bir kompleks yapar. Bu enzimin etki mekanizmasının anlaşılması için çeşitli inhibitörler kullanılmıştır. Bir demir bağlayıcı ajan olan α - α' -dipiridil enzim aktivitesini inhibe etmekte ayrıca demir yerine başka hiç bir metal kullanılmamaktadır (18).

Demir'in enzime bağlanması enzimin hidrofobik kısımlarından olur. Bir mol enzim bir mol demir bağlar. Bu bağlanma irreversible olup denatürasyonla veya şelat yapan ajanlarla bozulmaz. Bağlanan demir moleküler oksijen aracılığı ile oksitlenir.

α -Ketoglutaratın enzimin reaksiyon mekanizmasındaki rolü henüz aydınlanmamış olup yerine hiç bir madde konulamamaktadır. Her bir mol peptidil hidrokspiril oluşmasında 1 mol α -Ketoglutarat kullanılır. Süksinat oluşması stokiometriktir.

$1-C^{14}$ - α -Ketoglutarat kullanıldığı zaman oluşan radyoaktif CO_2 de oluşan hidrokspiril miktarıyla doğru orantılıdır.

Piril hidrokasilaz α -Ketoglutarat dehidrogenaz ile aynı kofaktörleri kullanmadığı için aktivite ölçümlerinde kontaminasyonu düşünülemez. Enzimin aktivitesine etkili faktörlerden biri katalazdır. Reaksiyon sonucu oluşan H_2O_2 yi uzaklaştırdığı için gereklidir. Şayet denatüre katalaz kullanılırsa enzim aktivitesinde düşüş gözlenmiştir (19).

Lizil hidroksilaz, prolil hidroksilaz ile aynı sübstratı ve aynı kofaktörleri kullanır. Lizil hidroksilaz aktivitesi için de, sübstrat peptitdeki amino asit dizisinin (X-lizin-glisin) şeklinde olması gerektiği ve reaksiyon sonunda 5-hidroksi lizinin oluştuğu açıklanmıştır (20,21).

Protokollajen üzerindeki hidroksi lizinler glukoz ve galaktozların takıldığı noktalardır.

Kollajen sentezinde hidroksillenmeden sonraki kademe özel transferazlar aracılığıyla moleküle karbonhidrat ünitelerinin takılmasıdır.

Böylece bir glikoprotein olarak uzayan bu peptitler daha sonra heliks yapısı kazanır, aralarındaki disülfid köprülerinin gelişmesiyle tek bir fibril halini alarak hücre dışına atılır (22).

Burada prokollajen peptidazların etkisiyle N- ve C- uçlarından ziyade sistin taşıyan kısımlar koparılır (23).

Helikal yapıdaki prokollajenler bakır içeren bir enzim olan lizil oksidaz aracılığı ile önce bir şif bazı oluşumu sonrada bir aldol kondansasyonu ile çaprazlaşarak (Cross-Linking) kollajen liflerini oluştururlar (24). Bu çaprazlaşma olayı protein molekülünün matürasyonu olarak kabul edilir ve

bu protein artık fizyolojik pH'da çözünmez. Kollajen sentezini düzenliyen mekanizma henüz aydınlığa kavuşmamıştır. Prolil hid-roksilaz aktivitesinin kollajen sentezinde hız kısıtlayıcı kademe olduğu ileri sürülmektedir (25,26,27).

Bu çalışmada kullanılan aktivite ölçüm metodunun esası radyoaktif α -Ketoglutarat ($1-C^{14}-\alpha$ -KG) kullanılarak oluşan $^{14}CO_2$ in toplanmasıdır.

Poli akrilamid jel elektroforezinde iki bant olacak kadar saflaştırılan (143 kez) tavşan karaciğeri enziminin bazı özellikleri incelenmiştir.

ARAÇ GEREÇ ve YÖNTEMLER

Araç ve Gereçler:

Deneylerde, santrifüj (Sorval Super Speed SS-3), mekanik karıştırıcı inkübatör (Dubnoff), kollektör (LKB 700 Ultralag), spektrofotometre (Zeiss PMQ 2), elektroforez cihazı (Buchler), kolonlar (Pharmacia), sıvı radyoaktif sayaç (Packard), özel sayım şişeleri ve inkübasyon erlenleri (Kontes) kullanıldı.

$1-C^{14}$ - α -Ketoglutarat ($1-C^{14}$ - α KG) New England Nuclear, vitamin C, Mann, katalaz, α -Ketoglutarat (α -KG), fenilmetil sulfonilflorid (PMFS), ditiotreitol (DTT), bradikinin, iso-askorbik asit, naftalen, etilen glikol, 2,5-difeniloksazol (PPO), (1,4-bis [2(5-feniloksazolil)]benzen (POPOP), Sigma Chemical Company'den, DEAE Sephadex A-50, Sephadex G-200 Pharmacia'dan, substrat olarak kullanılan poly (L-proly glycyll-L-proline)_n, Miles-Yeda (İsrail), akrilamid, amonyum persulfat, N-N-Metilen bisakrilamid, N-N-N'-N'-Tetrametiletilediamin (TEMED), BDH firmalarından temin edildi. Kullanılan diğer bütün kimyasal bileşikler analitik saflıkta idi.

Tavşan karaciğeri, H.Ü. Deney Hayvanları Laboratuvarından sağlandı.

YÖNTEMLER:

Karaciğer Homojenatının Hazırlanması:

Robert, E. Rhoads ve arkadaşlarının yöntemine göre (28). Taze olarak buz içine alınan tavşan karaciğeri küçük parçalara bölünerek 10 gr tartıldı. Ağırlığının iki misli hacimde % 0.5 PMSF ihtiva eden 0.25 M sukkoz ilavesiyle cam teflon homojenizatöründe +4°C'da on dakika homojenize edildi. Homojenata son derişimi 0.1 mM DTT ile 0.01 mM olacak şekilde EDTA ilave edilerek bir dakika daha homojenisyona tabi tutuldu. +4°C'da 3000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek çökelek atıldı.

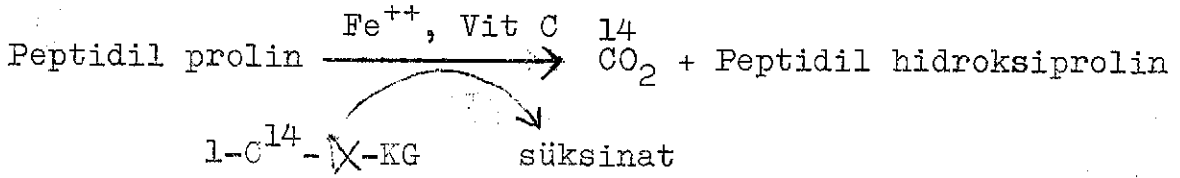
Amonyum Sülfat Tuz Çöktürmesi:

Doku artıkları atıldıktan sonra supernatant hacminin iki katı kadar satüre amonyum sulfat pH= 7.0 ile mekanik karıştırıcıda yavaş yavaş ilave edilerek yarım saat +4°C'da karıştırıldı. Daha sonra 26 000 x g de 20 dakika, +4°C'da santrifüj edilerek üste kalan kısım atıldı. Çökelek 0.2 M NaCl içeren 10⁻⁵M Tris-HCl pH= 7.2 tamponu ile minimal hacimde çözüldü.

Elde edilen enzim numunesi diyaliz torbasına aktarılarak 0.2 M NaCl içeren 10⁻⁵M Tris-HCl pH= 7.2 tamponu ile +4°C'da dört saat diyaliz edildi. Diyaliz suyu iki kez değiştirildi.

Prolil Hidroksilaz Aktivitesinin Tayini:

Prolil hidroksilaz aktivitesi, yapay peptid olan poli (L-proli glisil-L-proline)_n, Fe⁺⁺, askorbik asit, 1-C¹⁴-X-KG ve katalaz tepkimesi sonucu açığa çıkan ¹⁴CO₂ in toplanmasıyla tayin edildi.



Prolil hidroksilaz aktivitesinin tayini, 1 ml içinde son derişimi, 5x10⁻⁵M Tris-HCl pH= 7.2, 10⁻⁶M L-askorbik asit, 10⁻⁶M X-KG, 30 µg katalaz, 1 mg denatüre BSA, 10⁻⁶M demir amonyum sülfat, 250 µg yapay substrat, 100.000 cpm veren 1-C¹⁴-X-KG olacak şekilde hazırlanmış inkübasyon ortamları kullanıldı.

Tepkime sonucu oluşan ¹⁴CO₂, peptidil hidroksi prolin'in hidroksilasyonu ile doğru orantılıdır. ¹⁴CO₂ in toplanması özel inkübasyon erlenlerinde yapılmış olup bu erlenler sayım şişelerine bağlı olarak bulunmaktadır.

İnkübasyonu sonucu oluşan ¹⁴CO₂ di tutmak için sayım şişelerinin içine yerleştirilmiş olan filtre kağıtları % 10'luk KOH ile emdirilmiştir.

İnkübasyon karışımı kapalı sistemde ve mekanik karıştırıcılı inkübatörde yavaş hızla 30°C da 1 saat süreyle inkübe edildi (29). Daha sonra sayım şişeleri özel erlenlerden ayrılarak hemen 10 ml sayım solüsyonu ilave edilerek karanlıkta 1 saat bekletildikten sonra sayım yapıldı. Sayımlar 10 dakika süreyle yapılmış olup cmp cinsinden değerlendirildi.

Sayım Solüsyonunun Hazırlanışı:

Bray George yöntemine göre (30), hazırlanmış olan sayım solüsyonu aşağıdaki maddeleri içermektedir. 4 gr PPO, 0.2 gr POPOP, 60 gr naftalen, 20 ml etilen glikol, 100 ml absolut metanol ile karıştırılarak 1-4 Dioksan ile bir litreye tamamlanır.

Kolon Kromatografileri:

DEAE-Sephadex A-50 ve Sephadex G-200 reçineleri Paterson ve Sober (31) yöntemine göre elüsyonları yapılmıştır. Reçineler 2.5x60 cm'lik kolonda 0.2 M NaCl içeren 10^{-5} M Tris-HCl pH= 7.2 tamponu ile dengelendikten sonra enzim tatbik edildi. Elüsyon, 0.2-0.8 M NaCl gradienti ile yapılmıştır. LKB kollektörü ile 10 ml numuneler toplandı.

Protein Tayinleri:

Protein miktarları Folin Lowry ve 260-280 nm deki absorpsiyon yöntemleriyle tayin edildi (32-33).

Jel Elektroforezi:

Poli akrilamid jel elektroforezi B.J.Davis'in metoduna göre (34), % 7 akrilamid, 1:38 bisakrilamid/akrilamid içeren jeller'de ve pH= 8.3 olan Tris-Glisin tamponunda yapıldı. Jel başına 5 miliamper akım, 70-75 µgr protein olacak şekilde gliserol içinde ve 5 µl % 1 lik bromfenol mavisi uygulandı. Elektroforez 1.5-2 saat süre ile devam etti.

Protein Boyaması:

Paralel çalışılan jel örnekleri bir enjektörle elektroforez tüplerine su sıkılarak çıkartıldı. Bu jeller, hem % 50 metanol + % 12.5 asetik asit karışımı içinde hazırlanmış % 25 lik Komasi mavisi, hem de % 10 asetik asit içinde hazırlanmış % 0.01 lik amido siyahı boyasıyla bir gece süresince boyandı. % 7 lik asetik asit çözeltisi içinde bantlar iyice gözlenene ve jel renksizleşinceye kadar yıkama yapıldı (34, 35).

BULGULAR

Enzim aktivitesi ölçümlerinde kör değerinin yüksek olması nedeniyle kontrol deneyine enzim hariç konulacak maddeler tek tek denendi. En uygun kontrol deneyi olarak radyoaktif kofaktörü ve yapay substratı içeren sistem kabul edildi. Diğer kofaktörlerin herhangi bir etkisi gözlenmedi.

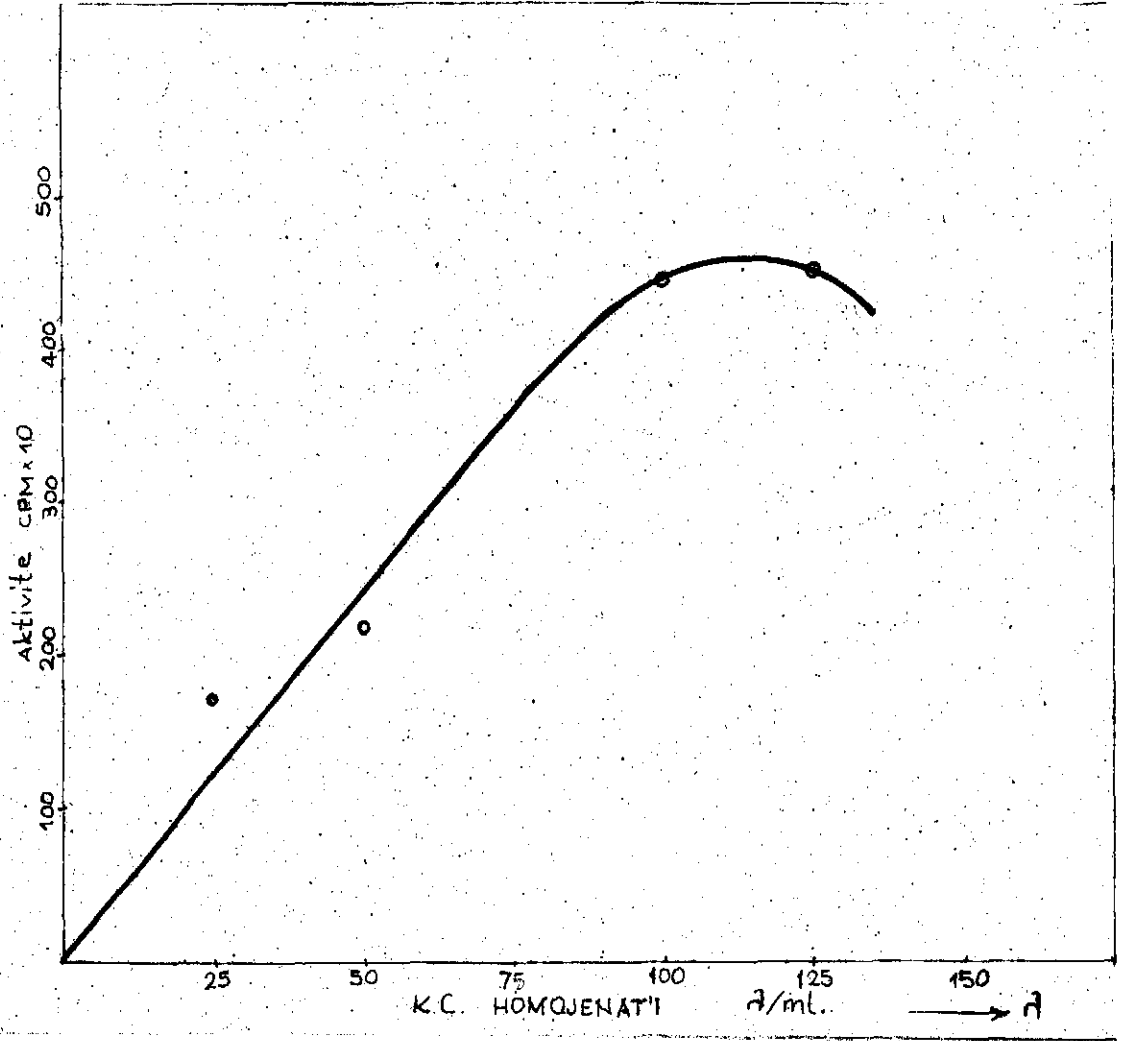
Kaba ekstrelerde nonspesifik dekarboksilasyonun katkısı yüksek olduğundan bu deneylerde kontrolden gayri dokunun bulunduğu fakat yapay substrat'ın bulunmadığı ikinci bir kontrol sistemi konmuştur (Tablo I). Verilen değerler her iki kontrol değerinden çıkarılmış net neticelerdir (cpm). Bütün sayımlar on dakikalık olup bir dakika üzerinden cpm olarak verilmiştir.

Deneylerde kullanılacak en uygun enzim konsantrasyonunu bulmak için kaba ekstreden değişik konsantrasyonlarda, 20 μ , 50 μ , 100 μ ve 125 μ , enzim aktivitesine bakıldı.

Şekil 3'de görüldüğü gibi en yüksek aktivite 100 μ 'da ölçüldü.

Örnek	1-C ¹⁴ - α -KG	Yapay substrat	Enzim	cpm
Kontrol	+	+	-	409
Numune Kontrol	+	-	+	6701
Numune	+	+	+	13930

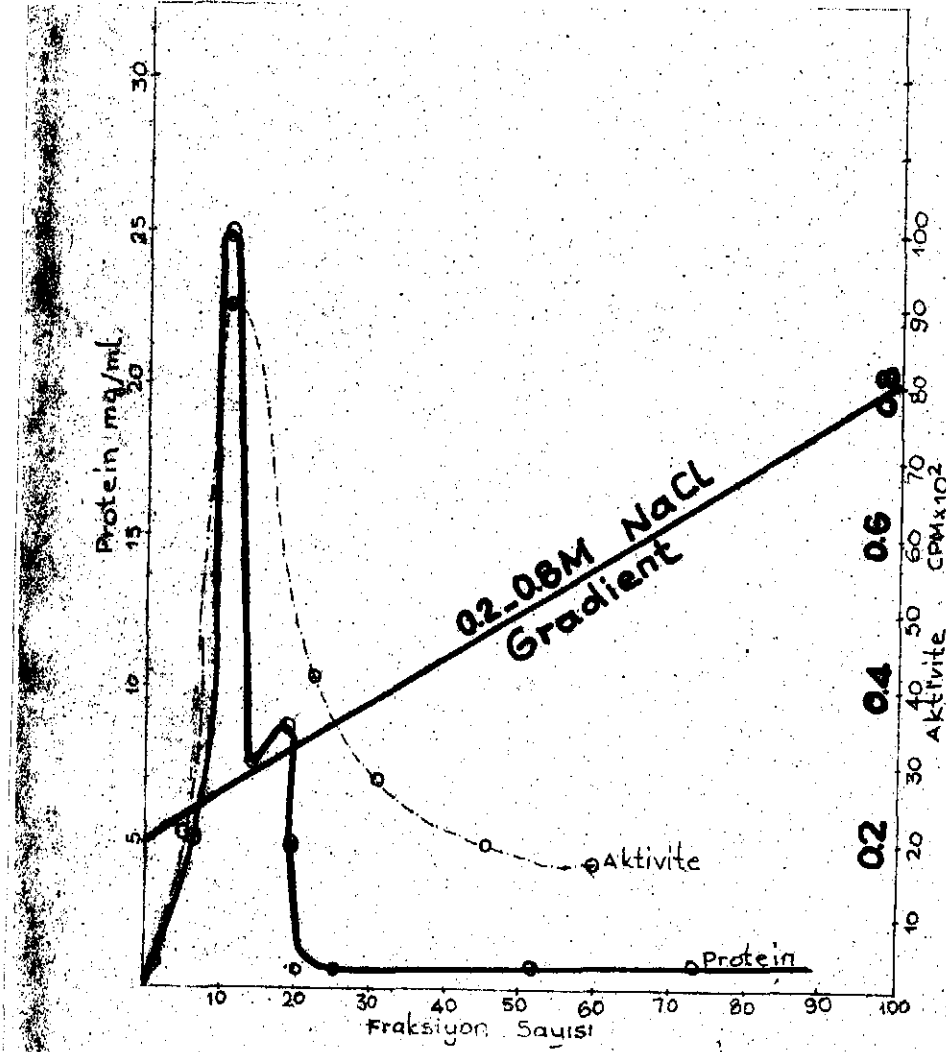
Tablo I: Tavşan karaciğerindeki prolil hidroksilaz Enziminin kaba ekstresindeki non-spesifik dekarboksilasyon inkübasyon ortamı: 1 ml içinde son derişimi 5×10^{-5} M Tris-HCl pH=7.2, 10^{-6} M askorbik asit, 10^{-6} M α -KG, 30 μ g katalaz, 1 mg denatüre BSA, 10^{-6} M demir amonyu sülfat, 250 μ g yapay substrat, 100.000 cpm veren ¹⁴1-C - α -KG olacak şekilde hazırlanmıştır. Aktivite: ¹⁴CO₂ in dakikadaki sayımı.



Şekil 3: Tavşan karaciğeri kaba ekstresindeki prolil hidroksilaz'ın değişik konsantrasyonlardaki enzim aktivitesi.

Aktivite: $\frac{14}{CO_2}$ in dakikadaki sayımı.

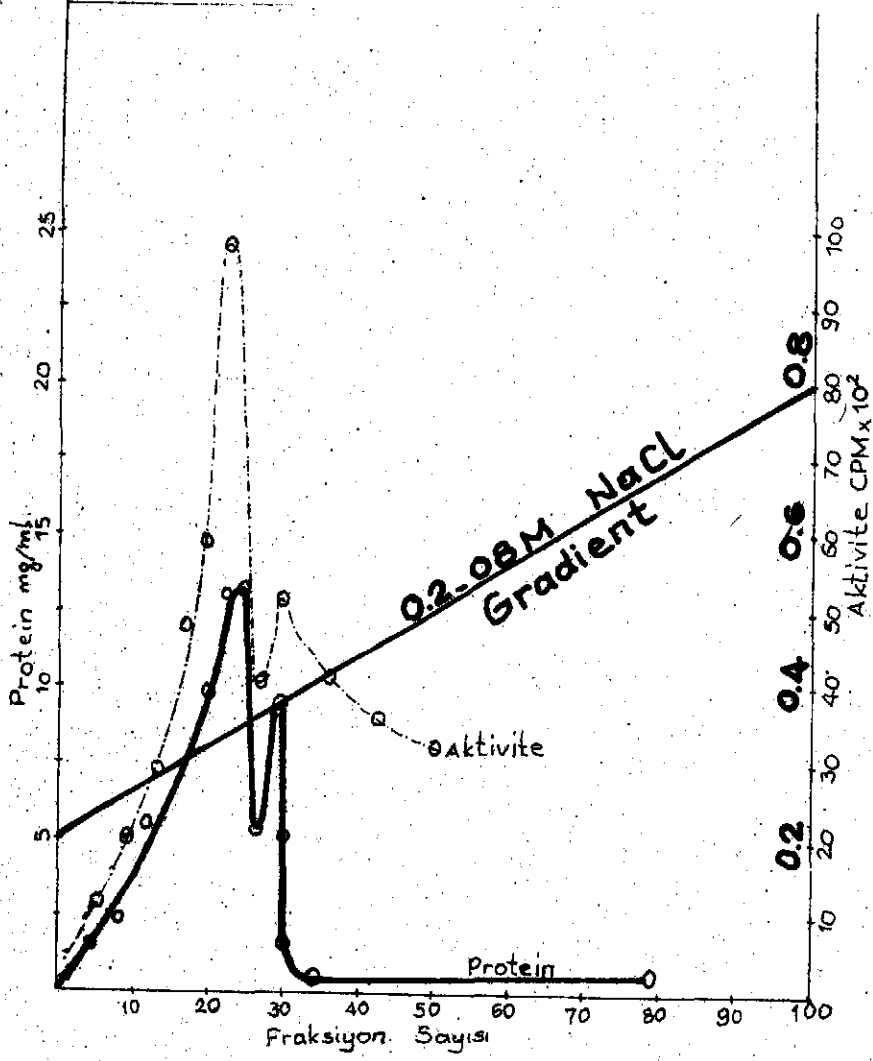
Amonyumsülfat tuz çöktürmesinden elde edilen enzim numunesi DEAE Sephadex A-50 kolonuna tatbik edildikten sonra, enzim 0.2 - 0.8 M NaCl ile elüe edilmiştir. Şekil 4.



Şekil 4: Tavşan karaciğeri prolil hidroksilazın DEAE Sephadex A-50 kolonundan elüsyonu. Kolon 0.2 M NaCl içeren 50 mM Tris-HCl pH=7.2 tamponuyla dengelendi. Enzim 0.2-0.8 M NaCl gradienti ile elüe edildi. Fraksiyon hacmi 7,5 ml. Protein: 260-280 nm absorpsiyonu. Aktivite: ¹⁴CO₂ in dakikadaki sayımı.

Şekil 4'de görüldüğü gibi en yüksek aktivite 9,10 ve 11. tüplerde gözleendiğinden bu tüplerdeki numune hacimleri birleştirildi. Total hacimdeki aktivite ve protein tayininden sonra, numune sephadex G-200 kolonuna tatbik edildi. 0.2-0.8 M NaCl gradientiyle enzim elüe edildi (Şekil 5).

Kolondan elüe edilen enzimin aktivite ve proteine bakıldıktan sonra ileri çalışmalarda kullanılmak üzere fraksiyonlar toplanarak -20°C 'de saklanmıştır.



Şekil 5: Tavşan karaciğeri prolil hidroksilaz enziminin Sephadex G-200 kolonundan elüsyonu.

Kolon 0.2 M NaCl içeren 50 mM Tris-HCl pH=7.2 tamponu ile dengelendi. Enzime 0.2-0.8 M NaCl gradienti ile elüe edildi. Fraksiyon hacmi 7.5 ml.

Protein: 260-280 nm absorpsiyonu.

Aktivite: ¹⁴CO₂ ın dakikadaki sayımı.

Enzim saflaşma tablosunda görüldüğü gibi saflaşma 142 kezdir (Tablo II).

İřlem	Hacım	Total protein mg/ml	Total aktivite cpm	Özgöl aktivite	kaç kez saflaştığı
Homojenat	35	262.5	6820	26	-
(NH ₄) SO ₄ Çökeleđi	20	174.3	6770	389	14.9
DEAE-Sephadeks A-50 kolonu	15	12.02	9900	825	31.9
Sephadeks G-200 kolonu	33	0.743	2750	3700	142,3

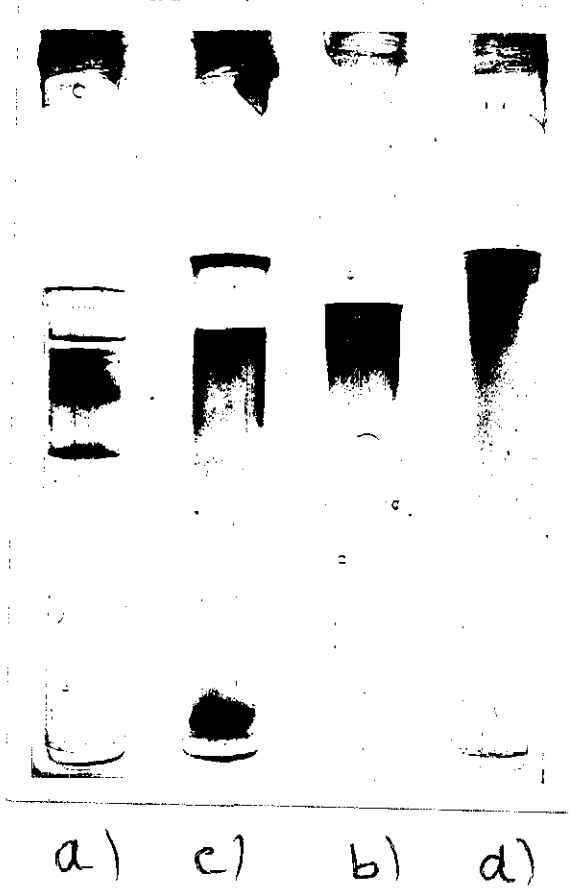
Tablo II: Tavşan karaciğeri prolil hidroksilazının saflaştırılması.

Protein: 260-280 nm absorpsiyonu.

Özgöl aktivite: cpm/mg protein.

Aktivite: ¹⁴CO₂ ın dakikadaki sayımı.

Sağlaşma akrilamid jel elektroforeziyle kontrol edilerek sefadeks G-200 eluatında iki bant gözlemlendi (Şekil 6).



Şekil 6: Tavşan karaciğerinden 142 kez saflaştırılan prolil hidroksilaz enziminin çeşitli kademe-lerinde yapılan poli akrilamid jel elektrofo-rezi.

- a) Homojenat
- b) DEAE-Sephadex A-50 kolonu
- c) $(NH_4)_2SO_4$ sonrası
- d) Sephadex G-200

Şekil 6'da görüldüğü gibi saflaşma kademelerinin poli akrilamid jel elektroforezi ile kontrolünde kaba homojenatta 9 bant varken 142 kez saflaşmış enzim preparatı iki bant vermektedir.

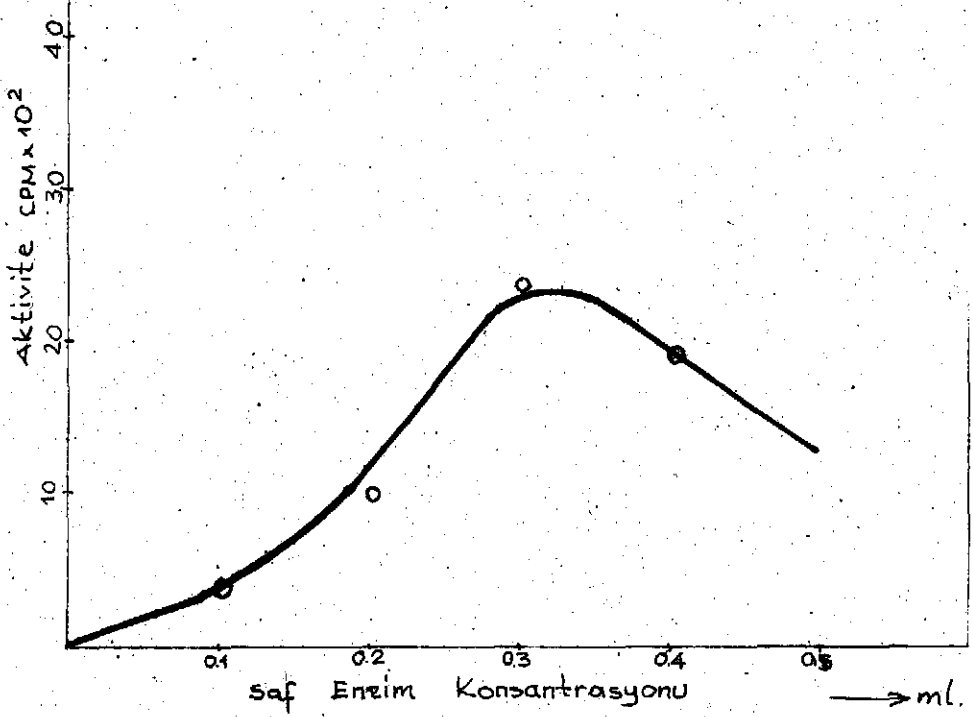
Bu kademeye kadar saflaşmış tavşan karaciğeri prolil hidroksilazın bazı özellikleri incelendi.

Enzimin değişik konsantrasyonlardaki aktivite eğrisi şekil 7'de görülmekte olup en uygun konsantrasyon 0.3 ml dir.

Değişen substrat konsantrasyonları için enzim aktivitesindeki değişim, şekil 8'de görülmektedir. Burada 50 µg, 75 µg, 125 µg ve 500 µg olacak şekilde inkübasyon karışımları hazırlanmıştır. En yüksek aktivite 250 µg konsantrasyonda gözlenmiştir.

Enzim aktivitesinin zaman ile ilgisi incelendiğinde bir saatin en uygun zaman olduğu saptanmıştır (Şekil 9).

pH değişimi ile enzim aktivitesine bakıldığı zaman pH=7.2 de aktivite maksimuma erişmekte, pH=8.5'da ise hızla düşmektedir (şekil 10). Burada, pH=4 asetat tamponu, pH=5 fosfat tamponu, pH=6.2'da ise yine fosfat tamponu, pH=7.2'de de Tris-HCl tamponu ve en son olarak pH=8.5'da Tris-glisin tamponu kullanılmıştır.



Şekil 7: Saf enzimin değişik konsantrasyonlarındaki aktivite değerleri eğrisi.

Ortamda: 50 mM Tris-HCl pH=7.2, 10^{-6} M askorbik asit, 10^{-6} M X-KG, 30 µg katalaz, 1 mg denatüre BSA, 10^{-6} M demir amonyum sulfat, 250 µg yapay substrat, 100 000 cpm veren $1-C^{14}-X-KG$, ve 0.3 ml enzim bulunur. Total hacim 1 ml, inkübasyon süresi 1 saat ve ısı $30^{\circ}C$ dir.

Aktivite: $^{14}CO_2$ in dakikadaki sayımı.

Isının etkisi incelendiğinde 30°C ye kadar aktivitenin lineer olarak arttığı, bundan sonraki ısı artışlarında aktivitenin yavaş yavaş azaldığı şekil 11'de görülmektedir.

Enzimin substratına çok benzeyen ve biyolojik bir madde olan bradikinini de substrat gibi kullandığı bilindiği için bradakininin değişik konsantrasyonlarında enzimin aktivitesine bakıldı (Şekil 12).

Prolil hidroksilaz enziminin redüktör bir ajan olarak askorbik asitten başka maddesinde kofaktör olarak kullandığı bilindiğinden bu enzimin aktivitesi iso-askorbik asit ile de ölçüldü (Tablo III).

Kullanılan substrat	Askorbik asit	İso-askorbik asit	cmp
Yapay substrat	+	-	3720
Bradikinin	+	-	2050
Yapay substrat	-	+	3060
Bradikinin	-	+	1620

Tablo III: Saf enzimin, askorbik asit ve iso-askorbik asitle aktivite değişimi.

Aktivite: $\frac{14}{\text{CO}_2}$ 'ın dakikadaki sayımı.

TARTIŞMA

Prolil hidroksilaz aktivitesinin ölçülmesi için çeşitli metodlar tarif edilmiştir.

Bunlardan Peterofsky ve arkadaşı (36) tarafından modifiye edilen C^{14} -prolinin, prolin hidroksilaz inhibitörü bulunan ortamda hidroksillenmemiş peptide girmesi ve bu işaretli peptidin substrat olarak kullanılması esasına dayanmaktadır. İzole C^{14} prolin taşıyan substrat daha sonra aktivitesi ölçülecek enzim ile inkübe edildiğinde işaretli prolinlerin bir kısmı hidroksi proline çevrilmektedir. Bunların sayılması ve hidroksi prolin tayin edilmesiyle enzim aktivitesi hakkında bir fikir sahibi olunabilmektedir.

Aynı yöntemle H^3 -prolin kullanılarak substrat hazırlanırsa (37,38) ve H^3 -prolin taşıyan prokollajen peptidi ile enzim aktivitesine bakılırsa oluşacak ürün H^3OH dır. Bu oluşan işaretli su inkübasyon ortamından buharlaştırılıp sonra yoğunlaştırılarak sayılabilir veya Dovex-X 50 kolonundan su ile işaretli su elüe edilebilir (39).

Bu metodlarda suyun izolasyonu sırasında kayıp gözlenmektedir. Ayrıca hepsi uzun yöntemler olup, önceden işaretli

substrat hazırlanmasına ihtiyaç göstereceği için çok sağlıklı değillerdir.

Yaptığımız çalışmada kullanılan metod ise yapay olarak hazırlanmış poli(L-proli-glisil-L-prolin)_n peptidinin substrat olarak kullanılması esasına dayanmaktadır. Gerekli kofaktörlerden olan α-KG'ın birinci karbonundan işaretli (1-C¹⁴-α-KG) olan şeklinin kullanılmasıyla, birinci karbonun dekarboksilasyonu sonucu oluşan CO₂¹⁴ hiç kayba uğramadan hemen sayım şişesi içinde tutulmaktadır (15,28).

Bu yöntem bilhassa saf enzim numuneleri için çok uygundur. Çalışmada kaba ektrelerdeki enzim aktivitesi ölçümlerinde kör değerlerinin yüksek oluşu, başka α-KG kullanan tepkimelerin katkısından ileri gelmektedir. 142 kez saflaştırılmış enzimle yapılan deneylerde kontrol değerlerinde düşüş göstermiştir.

Prolil hidroksilaz enzimin aktivitesi çeşitli türlerin çeşitli dokularında bakılmış ve en yüksek aktiviteye sırayla deri, akciğer, böbrek, kalp ve karaciğerde rastlanmıştır ve tablo IV'de değerler gösterilmiştir (40,41,42,43).

		Ünite/gr doku başına
Fare	Deri	1.8
	Akciğer	1.6
	Böbrek	1.4
	Kalp	1.4
	Karaciğer	0.5
Sıçan	Deri	1.6
	Akciğer	0.8
	Karaciğer	0.3

Tablo IV: Değişik dokulardaki prolil hidroksilaz aktivitelerinin gram doku başına değerleri.

Karaciğerde düşük aktivite bulunması, karaciğerin kollajen dokusu bakımından diğer dokulara nazaran fakir oluşudur.

Buna rağmen prolil hidroksilaz aktivitesinin mevcudiyeti bu dokuda kolaylıkla fibrozis gelişmesinin potansiyel gücünü taşır.

Serum prolil hidroksilaz aktivitesinden sorumlu olan da karaciğer enzimidir (44).

Bu çalışmada tavşan karaciğerinden prolil hidroksilaz 142 kez saflaştırılmış ve saflığı akrilamid jel elektroforezinde

iki bant oluşu ile kontrol edilmiştir. Kısmen saf enzim ile bazı özellikleri incelenmiştir.

Deneylerde denatüre sığır serum albumini (BSA) kullanılmıştır. Denatüre olmayan BSA'na çok az da olsa substrat gibi davrandığı gösterilmiştir (45).

Kısmen saf enzimle değişik konsantrasyonlarda yaptığımız deneylerde Şekil 7'de görüldüğü gibi en yüksek aktivite 0.3 ml lik konsantrasyonundadır.

Bundan sonra yaptığımız bütün çalışmalarda enzim miktarını 0.3 ml olarak kullandık.

Değişik zaman aralıkları kullanıldığı zaman en uygun inkübasyon süresini 1 saat olarak saptadık. Şekil 9. Bazı araştırmacılar bu müddeti 30 dakika olarak göstermişlerdir (15,43, 47). Şekil 9'da görüldüğü gibi birinci saatten sonra tepkime hızında bir düşme olmaktadır. Su zamanla enzimin denatüre olmasından ileri gelmektedir (50).

Isının etkisi incelendiği zaman, oda ısısında aktivitenin düşük olduğu buna karşın 30°C'da en yüksek aktivitenin elde edildiği, 45°C'da aktivitenin düştüğü gözlemlendi (Şekil 11). Bazı araştırmacılar 30°C'in uygun olduğunu (15,43), bazıları da 37°C'in uygun olduğunu ileri sürmüşlerdir (48).

Çalışmamızda bütün deneylerde inkübasyon 30°C'de yapıldı. pH'ın etkisi incelendiği zaman en uygun pH=7.2 olduğunu gözledik. (Şekil 10). Hemen hemen bu konuda yapılan tüm çalışmalarda aynı pH kullanıldı (15,28,40,41,42,43,49).

Uygun yapay substrat konsantrasyonunun tayini önce homojenat sonra saf enzim kullanılarak uygun substrat konsantrasyonu sağlandı. Şekil 8'de görüldüğü gibi en uygun konsantrasyon 250 µg/ml olarak bulundu.

Substrat analogu olarak bradikinin kullanılmış ve enzim aktivitesi incelenmiştir (46). Bradakininin uygun konsantrasyonunu bulmak için ,substratta kullandığımız aynı konsantrasyonlar denendi. Şekil 12'de görüldüğü gibi enzim aktivite değerlerinde bir düşme gözlemlendi. Fakat konsantrasyon eğrilerinde büyük bir değişme olmadı.

Kofaktör olarak askorbik asidin yerine iso-askorbik asitin kullanıldığı deneylerde Tablo III enzim aktivitesinde büyük bir değişiklik gözlenmemiştir. Aynı deney bradikinin ile de yapılmış olup fark gözlenmedi. Bu tür deneyler Udenfriend ve arkadaşları (15) tarafından yapılmış olup,askorbik asitin % 104 rölatif aktivite olduğunu göstermişler. Bizim yaptığımız deneylerde askorbik asit % 100 iken iso-askorbik

asidinki % 84 gözlenmiştir. Bu deneylerde kullanılan sıcak α -KG konsantrasyonu çok düşük olduğu için tepkimesinin kofaktör ihtiyacı soğuk α -KG konarak sağlanmıştır.

Saf enzimle yaptığımız poli akrilamid jel elektroforezinde şekil 6'da görüldüğü gibi iki bant gözledik. Halbuki Richard ve arkadaşlarının (51) tavuk embriyosundan affinite kromatografisiyle elde ettikleri ve poli akrilamid jel elektroforezine tatbik ettikleri enzimde tek bant gözlemişler.

Bu çalışmada tavşan karaciğeri prolil hidroksilaz enzimi 142 kez saflaştırılmış olup bazı özellikleri incelenmiştir. Tavşan karaciğeri ile şimdiye kadar yapılmış deneyler aktivite ölçümünden ileri gitmemiştir.

ÖZET

Tavşan karaciğeri prolil hidroksilaz enzimi DEAE Sefadeks A-50 ve Sefadeks G-200 kolon kromatografileri ile 142 kez saflaştırılıp poli akrilamid jel elektroforezinde iki band halinde gözlenmiştir.

Kısmen saflaştırılmış enzim aktivitesinin, substrat, pH, ısı ve zaman ile değişimleri incelendi.

Ayrıca bir substrat analogu olan bradikinin ile bir kofaktör analogu olan iso-askorbik asitle aktivite değişimleri incelendi.

KISALTMALAR

BSA : Sığır serum albumini

PMSF: Fenil metil sulfonil florür

DTT : Ditiotreitol

DEAE: Dietil aminoetil

Tris: 2-Amino 2(hidroksimetil) propan 1,3 diol

cpm : Dakikadaki sayım

KAYNAKLAR

1. Goldberg, B., Epstein, E.H. Jr., Sherr, C.J., Proc. Nat. Acad. Sci., 69, 3655 (1972).
2. Kivirikko, K.I., Prockop, D.J., J. Biol. Chem., 242, 4007 (1967).
3. George, J., Cardinale, Sidney Udenfriend, "Advances in Enzymology", A., Meister (derleyen), Interscience Publication, New York and London, 41, 280 (1974).
4. Rhoads, R.E., Udenfriend, S., Arch. Biochim. Biophys., 133, 108 (1969).
5. Rosenbloom, J., Harsch, H., Jimenez, S., Arch. Biochem. Biophys., 158, 478 (1973).
6. Jimenez, S.A., Dehm, P., Olsen, B.R., Prockop, J.D., J. Biol. Chem. 248, 720 (1973).
7. Hurych, J., Nordwing, A., Biochem. Biophys. Acta 140, 168 (1967).
8. Kivirikko, K.I., Prockop, D.J., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 57, 782 (1967).

9. Popenoe, E.A., Aranson, R.B., Vanslyke, D.D., Arch. Biochem. Biophys., 133, 286 (1969).
10. Rhoads, R.E., Hutton, J.J., Udenfriend, S.S., Arch. Biochem. Biophys., 122, 805 (1967).
11. Rhoads, R.E., Udenfriend, S., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 60, 1473 (1968).
12. Rhoads, R.E., Udenfriend, S.S., Arch. Biochem. Biophys., 139, 329 (1970).
13. Grant, M.E., Prockop, D.J., N. Engl. J. Med., 286, 194-242-291 (1972).
14. Gallop, M.P., Blumenfeld, O.O., Seifter, S., Ann. Rev. Biochem., 41, 617 (1972).
15. Udenfriend, S., Hutton, J.J., Tappel, A.L., Arch. Biochem. Biophys. 118, 231 (1967).
16. Stassen, F.L.H., Cardinale, G.J., Udenfriend, S., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 70, 1090 (1973).
17. Cardinale, G.J., Rhoads, R.E., Udenfriend, S., Biochem. Biophys. Res. Commun., 43, 537 (1971).

18. Bhatnagar, R.S., Ropaka, S.S.R., Liu, T.Z., Wolfe, S.M., *Biochim. Biophys. Acta*, 271, 125 (1972).
19. Rhoads, R.E., Udenfriend, S., *Arch. Biochem. Biophys.* 139, 329 (1970).
20. Kivirikko, K.I., Shudo, K., Sakakibara, S., Prockop, D.J., *Biochemistry*, 11, 122 (1972).
21. Butler, W.F., *Science*, 161, 796 (1968).
22. Burgenson, R.E., Wyke, A.W., Fessler, J.H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 48, 892 (1972).
23. Peterkofsky, B., Prockop, D.J., *Anal. Biochem.*, 4, 400 (1962).
24. Bhagavan, N.V., *Biochemistry*, J.B. Lippincott Company Philadelphia - Toronto, S. 358 (1973).
25. Mussini, E., Hutton, J.J., Udenfriend, S., *Science*, 157, 927 (1967).
26. Mc.Gree, J.O., O'Hare, R.P., Patrick, R.S., *Nature New Biol.*, 243, 121 (1973).
27. Schmitt, F.O., *Fed. Proc.*, 23, 618 (1964).

28. Kaplan, N.O., Colowick, S.P., "Methods in Enzymology" Acad. Press, New York and London., C. XVII, 313 (1971).
29. Kaplan, N.O., Colowick, S.P., "Methods in Enzymology" Acad. Press, New York and London., C. XVII, 308 (1971).
30. Bray, George, A., Analytical Biochemistry, 1, 279 (1960).
31. Peterson, E.A., Sober, H.A., "Methods in Enzymology" (derleyenler) Colowick, S.P., Kaplan, N.O., Acad. Press. New York and London, C.V , 3 (1962).
32. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., J. Biol. Chem., 193, 265 (1951).
33. Layne, E., "Methods in Enzymology" Colowick, S.P., Kaplan, M.O., (derleyenler), Acad. Press. New York and London, C. III , 447 (1956).
34. Davis, B.J., Ann. New York. Acad. Sci. 121, 404 (1964).
35. Weber, K., Osborn, M., J. Biol. Chem., 244, 4406 (1969).
36. Peterkofsky, B., Udenfriend, S., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 53, 335 (1965).

37. Robertson, A.V., Witkop, B., J. Am. Chem. Soc 84, 1697 (1962).
38. Stone, N., Meister, A., Nature, 194, 555 (1962).
39. Peterkofsky, B., Blasio, R., Anal. Biochem., 66, 279 (1975).
40. Lewis, M.S., Piez, K.A., J. Biol. Chem. 239, 3336 (1964).
41. Bornstein, P., Nesse, R., Arch. Biochem. Biophys., 138, 443 (1970).
42. Epstein, E.M. Jr., Scott, R.D., Miller, E.J., Piez, K.A., J. Biol. Chem. 246, 1718 (1971).
43. Stassen, L.H.F., Cardinale, J.G., Udenfriend, S., Arch. Biochem. Biophys., 160, 340 (1974).
44. Stein, D.H., Keiser, R.H., Sjoerdsma, A., Lancet, January, 17, 106 (1970)
45. Bronstein, P., Ann. Rev. Biochem., 44, 567 (1974).
46. Rhoads, R.E., Udenfriend, S., Arch. Biochem. Biophys., 133, 108 (1969).
47. Oikarinen, A., Biochemical Pharmacology, Pergamon Press, Printed in Great Britain, 26, 875 (1977).

48. Kerwar, S.S., Felix, A.M., J. Biol. Chem., 251, 503 (1976).
49. Cutroneo, K.R., Counts, D.F., Mol. Pharmacol., 11, 44 (1975).
50. Huttoh, J.J., Tappel, A.L., Udenfriend, S., Anal. Biochem.,
16, 384 (1966).
51. Richard, A.B., Prockop, J.D., J. Biol. Chem., 248, 1176 (1973).