

T. C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ FAKÜLTESİ

SİĞİR BEYİNİ KORTEKSİNDEN BRİJ - 58 İLE  
ÇÖZÜLEN ADENİLAT SIKLAZIN BAZI  
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Biyokimya Programı  
DOKTORA TEZİ

NURİMAN ÖZGÜNEŞ

ANKARA - 1979

T.C.

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ FAKÜLTESİ

SIĞIR BEYİNİ KORTEKSİNDEN BRIJ-58 İLE  
ÇÖZÜLEN ADENİLAT SIKLAZİN BAZI  
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Biyokimya Programı

DOKTORA TEZİ

NURİMAN ÖZGÜNEŞ

Rehber Öğretim Üyesi

Dr. Nazmi Özer

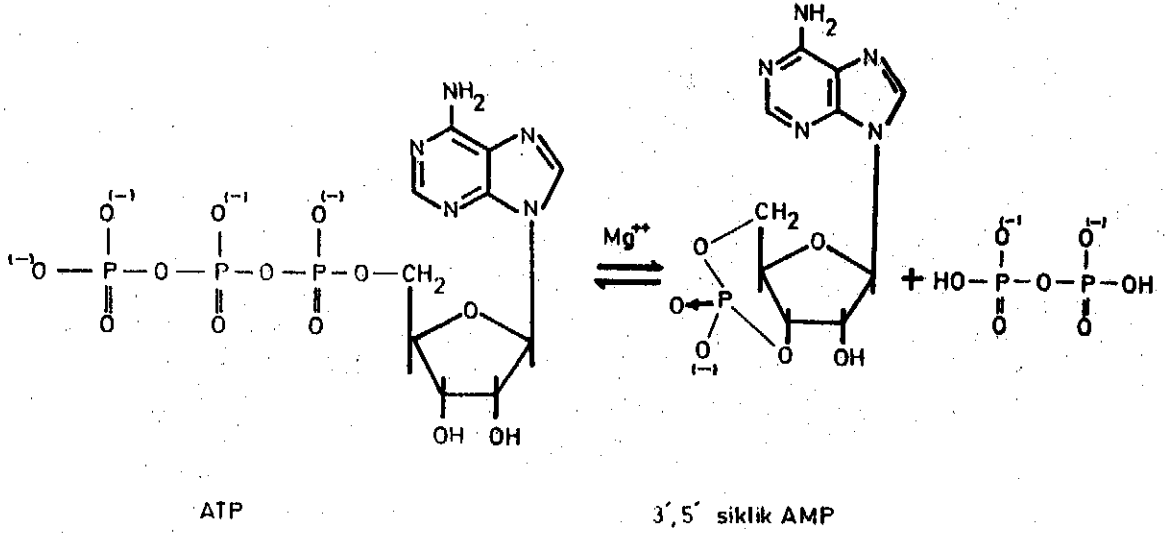
ANKARA - 1979

## İ Ç İ N D E K İ L E R

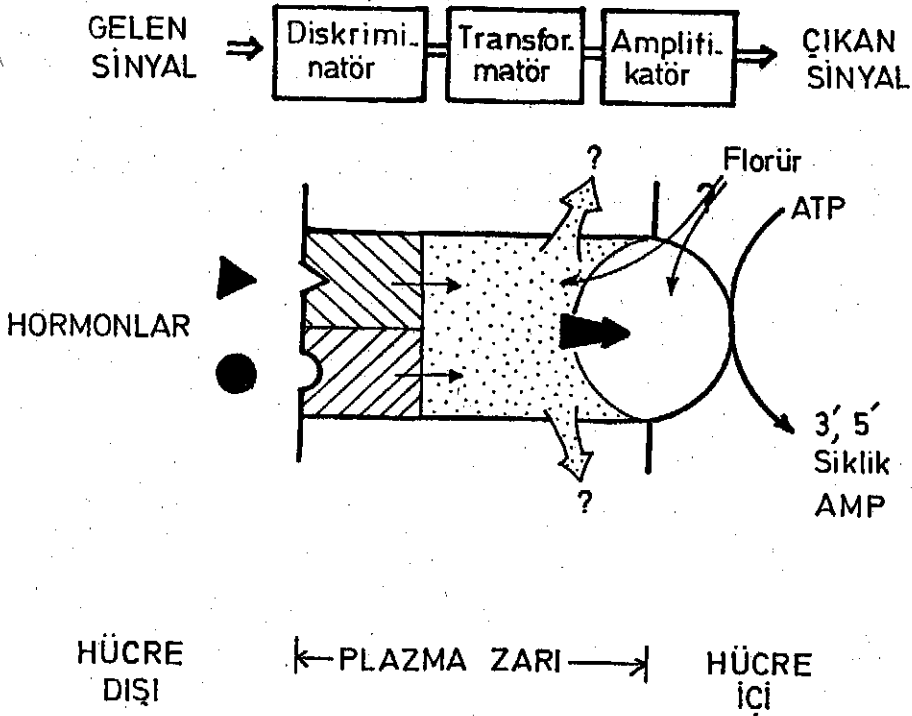
|                               | <u>Sayfa</u> |
|-------------------------------|--------------|
| GİRİŞ.....                    | 1            |
| ARAÇ, GEREÇ VE YÖNTEMLER..... | 9            |
| Araçlar.....                  | 9            |
| Gereçler ve Kaynakları.....   | 9            |
| Yöntemler.....                | 10           |
| BULGULAR.....                 | 13           |
| TARTIŞMA.....                 | 28           |
| ÖZET.....                     | 36           |
| KISALTMALAR.....              | 37           |
| KAYNAKLAR.....                | 38           |

## G İ R İ Ő

Sempatomimetik aminler ve glukagonun etki mekanizmaları hayvan dokularında araştırılırken bir siklik adenin ribonükleotidin varlığı anlaşıldı (1-4). Derinleştirilen çalışmalar bu ribonükleotidin, adenzin 3',5' - siklik monofosfat olduğunu gösterdi (5). Bazı araştırmacılar bu bileşiğin kimyasal özellikleri üzerine eğilirken (6), Sutherland ve arkadaşları da çalışmalarını bileşiği oluşturan enzime yönelttiler. Araştırmalarının sonuçlarını bir dizi makale ile açıkladılar (7-10) ve bu enzim için ilk defa adenil siklaz adını kullandılar. Enzimsübtrat olarak ATP'yi kullandığını, sübstratın yanında  $Mg^{++}$  iyonuna gerek duyduğunu ve (1.) şekilde gösterilen tepkimeyi katalizlediğini de bu makalelerinde belirttiler. Adenilet siklazın zarsal bir enzim olduğunu, en az dört hayvan türünün dokularında bulunduğunu, aktivitesinin  $NaF$  'le arttığını ve değişik hormonlardan dokuya-özgü bir şekilde etkilendiğini de gözlemişlerdi. Birçok hormonun adenilat siklazla olan ilişkisini gözlemelerinden sonra, Sutherland ve arkadaşları, hormonların, hücredeki etkilerini, bu enzimin ürünü olan CAMP aracılığı ile gerçekleştirebilecekleri görüşünü ortaya attılar (11,12). Daha sonraki birçok çalışma da bu görüşü destekledi (13-15). Böylece, hormon-hedef hücre ilişkisinde, CAMP'yi ara molekül kabul eden görüşün giderek güçlenmesi ile, adenilat siklaz üzerindeki çalışmalar yoğunlaştı.



1. Şekil : Adenilat Siklazın katalizlediği tepkime



2. Şekil : Adenilat siklaz sistemi için Rodbell ve arkadaşlarının getirdiği üç parçalı model (33).

Bu arada , adenilat siklazın türlere dağılımı da araştırıldı ve bazı durumlarda adenilat siklazın aktivitesi doğrudan gözlenerek, bazı durumlarda ise enzimin ürünü olan cAMP'nin varlığının gösterilmesi ile, bu enzimin bütün hayvan türlerinde ve en az on bakteri türünde bulunduğu anlaşıldı (16). Memeli ve bakteri adenilat siklazları incelenerek kıyaslandı ve özelliklerinde belirgin farklılıklar gözlemlendi. Şöyle ki, memeli adenilat siklazı hormona duyarlı olarak aktivitesini düzenlerken, bakteri adenilat siklazı bakterinin beslendiği ortama göre cAMP yapımını azaltmakta veya arttırmaktadır (17).

Memelilerde enzimin çeşitli dokulara dağılımı da incelenmiş ve köpek eritrositleri (7) ve sıçan hepatoma hücreleri (18) dışında incelenen her dokuda, ya cAMP'nin varlığı veya doğrudan adenilat siklaz aktivitesi gösterilmiştir. Üzerinde durulan bir diğer nokta da enzimin hücre içindeki konumudur. Bu konudaki birçok araştırmanın (7, 19 - 25) getirdiği bulguların değerlendirilmesi ile ulaşılan yaygın görüş, adenilat siklazın memelilerde esas olarak plazma zarında yerleştiği, fakat, hücre içindeki diğer zarsal yapılarda da bulunabileceği şeklindedir.

Gelişen araştırmalar; adenilat siklazın bazal aktivitesinin hemen her dokuda benzer olmasına karşın, farklı dokularda hormona duyarlılığın farklı olduğunu (6, 25); ve ayrıca, enzimin hormona duyarlılığının kaybolduğu durumlarda katalitik aktivitenin çok az değiştiğini gösterdi (26-32). Bu bulgulara dayanarak, enzimin, düzenleme ve kataliz işlemlerinden sorumlu iki ayrı parçadan oluşabileceği görüşü ortaya çıktı. Araştırmacılar,

bu temel görüşün ayrıntılarını içeren çeşitli modeller öne sürdüler. Örneğin; Sutherland ve arkadaşları, düzenleyici altbirimin zarın dış yüzünde, katalizden sorumlu altbirimin ise zarın iç yüzünde yerleştiğini ileri sürdüler (33). Bu modele göre; düzenleyici birimin hormonla etkileşmesi sonucunda bu birimde meydana gelen değişim katalitik birimi etkileyerek ürün miktarını belirlemektedir. Daha sonra, bazı farklılıklar getiren daha ayrıntılı modeller öne sürülmüştür. Bunlar arasında Rodbell ve arkadaşlarının getirdiği ayrıntılı bir model (2.) şekilde görüldüğü gibi, düzenleyici ve katalitik birimlerin yanında, bir de ara-birim kapsamaktadır (33). Ancak, adenilat siklazin şimdiye kadar belirlenen özellikleri kesin bir model getirilebilmesini sağlayacak nitelikte değildir. Şu andaki bulgularla, enzim; dinamik bir lipid matriksi içinde yerleştiği için birbirleriyle kolayca etkileşebilen iki veya daha fazla parçadan oluşabileceği gibi, allosterik bölgesi ile hormonla etkileşebilen regülatör bir enzim olarak da düşünülebilir.

Adenilat siklazin kolayca aktivite yitirmesi nedeniyle, birçok araştırmacı, bu enzimin özelliklerini belirlemek için homojenatlarda ve yıkanmış zar parçacıklarında çalışmayı yeğlemişlerdir (7,34-42). Deterjanlarla çözülmüş enzim örnekleriyle yapılan çalışmalar ise daha kısıtlıdır ve aynı deterjanla çalışan araştırmacılar bile çelişkili sonuçlar belirtmektedirler (43-47).

Adenilat siklaz enziminin iki değerlikli katyonlara duyduğu gereksinme, bu çalışmada da gözlenen ve birçok araştırmacının üzerinde durduğu bir noktadır. Bu özellik, sıçan beyinde (35), yağ hücrelerinde (48) ve siğır beyinde (34) çözülmemiş enzimle yapılan çalışmalarda gözlenmiştir. Herbir araştırmacının kullandığı ATP ve  $Mg^{++}$  derişimleri farklılık göstermektedir, ancak bu konuda bütün araştırmacıların üzerinde birleştiği sonuç şudur: Enzimin etkinlikle çalışabilmesinde ortamdaki süstrat ve  $Mg^{++}$  iyonlarının birbirine oranının önemi vardır. Maksimum etkinlik, ancak  $Mg^{++}$  derişiminin süstrat derişiminden yüksek olduğu durumlarda gözlenebilmektedir. Ancak araştırmacıların hiçbiri  $Mg^{++}$  / ATP oranının beşten yüksek olduğu bir durumu denememişlerdir. Deterjanla çözülmüş enzimde ise  $Mg^{++}$  'un etkisi sıçan beyinde çalışılmış ve benzer sonuçlar alınmıştır (45).  $Mg^{++}$  yerine  $Mn^{++}$  konarak bu iyonun da enzim aktivitesine etkisi araştırılmış ve  $Mn^{++}$  'in varlığında enzimin daha etkin olduğu görülmüştür (45). Bu çalışmada,  $Mg^{++}$  ve  $Mn^{++}$  'in etkileri siğır beyni korteksinden çözülmüş enzimde geniş bir derişim aralığında çalışıldı ve benzer sonuç elde edildi.

EGTA'nın adenilat siklaz üzerindeki etkisi çelişkili bulguların elde edildiği bir konudur. Birçok araştırmacı EGTA'nın oldukça düşük bir derişimde bile (0.1 mM) enzimi önemli ölçüde (~ %60) inhibe ettiğini belirtirken (34,48,49) bazıları da EGTA'nın, sadece enzimin hormona duyarlılığını kaldırdığı ve katalitik aktivitesini etkilemediği sonucuna ulaşmışlardır (50-52). Siğır beyinde EGTA'nın etkisi, özellikle zara bağlı



enzimde incelenmiş ve düşük derişimlerde bile EGTA'nın enzimi % 50-80 oranında inhibe ettiği gözlenmiştir (34,48,49). Deterjanla çözülmüş enzime EGTA'nın etkisi ise Lubrol PX'le çözülmüş sıçan beyni enziminde değişik EGTA derişimlerinde denenmiş ve enzimin, 0.1 mM EGTA derişiminde %90 oranında inhibe olduğu görülmüştür (45,57). EGTA'nın adenilat siklazı inhibe ettiğinin belirlenmesinden sonra, EGTA'nın  $Ca^{++}$  iyonu ile şelat yapıcı özelliğinden yola çıkarak ;  $Ca^{++}$  'un , çok düşük derişimlerde de olsa, adenilat siklaz için gerekli olduğu görüşü ortaya çıktı. Gerçekten de, zara bağlı sığır beyni enziminde EGTA'ya eşit derişimde  $Ca^{++}$  ortama eklendiğinde, inhibisyonun ortadan kalktığı gözlendi (54). Lubrol PX'le çözülmüş sığır beyni enziminin de  $Ca^{++}$  'a gereksinimi gösterildi. Bazı araştırmacılar,  $Ca^{++}$  gereksinmesinin; beyin adenilat siklazını aktive eden bir aktivatör proteinin,  $Ca^{++}$  bağlıyarak etkin hale geçmesinden doğduğu görüşünü ortaya attılar (57).  $Ca^{++}$  'un yüksek derişimlerinin ise sığır beyni enziminin çözülmemiş preparatlarında ve sıçan beyni çözülmüş enziminde inhibisyona yol açtığı gözlenmiştir (45,53). Bu çalışmada, Brij -58 ile çözülmüş sığır beyni adenilat siklazının 0.1 mM EGTA ile % 55, 1 mM EDTA ile ise % 35 oranında inhibe olduğu ve bu inhibisyonların tersinir olup, inhibitöre eş derişimde  $Ca^{++}$  ve  $Mn^{++}$  ile kalktığı görüldü.

NaF'ün adenilat siklazı aktive ettiğinin anlaşılması şaşırtıcı bir bulgu olmuştur (3,7). Ancak, hormonlardan farklı olarak, NaF'ün etkisi seçici değildir ve farklı dokuların enzimlerinde bu etki gözlenebilmiştir (35). NaF, hücre içine kolayca girmesine rağmen, dokunulmamış-hücre adenilat siklazını

etkileyememektedir (65). NaF'ün etki mekanizması henüz aydınlatılmış değildir, ancak bu etkinin kaynağının  $F^-$  iyonu olduğunu düşündüren bulgular elde edilmiştir (58). Farklı dokulardan elde edilen enzimler için NaF' ün etkin derişimleri çok farklıdır ve bu konudaki bulgular kıyaslama yapılmasına olanak vermiyecek kadar farklı koşullar altında yapılmıştır (66). Bu çalışmada, NaF'ün etkisi geniş bir derişim aralığında denenmiştir. Ayrıca, şimdiye kadar yapılan çalışmalardan farklı olarak, çeşitli öninkübasyon sürelerinin de etkisi incelenmiş ve bu çalışmanın konusu olan enzim için optimum derişim ve öninkübasyon süresi belirlenmiştir.

Literatürde adenilat siklazın özellikleri konusunda pek çok çelişkili sonuç vardır. Bu çelişkiler, büyük ölçüde, adenilat siklazın aktivitesini kolayca yitiren bir enzim olması nedeniyle saflaştırılamayıp, çalışmaların kaba homojenat veya bu homojenatlardan hazırlanan çözülmüş enzim örnekleriyle yapılmasından kaynaklanmaktadır. Böylece, enzim örnekleri içinde ATP' az ve cAMP-PDE'az enzimlerinin de bulunması ; adenilat siklaz enzimiyle yapılan çalışmalarda, enzim aktivitesinin korunması yanında, bir de sübstratın ve ürünün korunması gibi sorunları da getirmektedir. Bu nedenle, tayin metodunun başarısı, bu üç olumsuz etkenin kontrol altına alınmasına bağlıdır.

Bu çalışmada, adenilat siklazın çözülmesi için daha önce denenmemiş bir deterjan olan Brij - 58 kullanıldı ve Brij-58 ile ekstre edilen siğır beyni korteksi adenilat siklazının bazı özellikleri belirlendi. Bu amaçla; adenilat siklaz tayinini

olumsuz yönde etkileyen ve yukarda belirtilmiş olan her üç etken aynı dikkatle ele alınarak bir metod geliştirildi ve bu enzimin özelliklerinin belirlenmesinde kullanıldı.

## A R A Ç , G E R E Ç V E Y Ö N T E M L E R

### 1- Araçlar

Deneylerde teflon-cam homojenizatör, santrifüj (Sorval Super Speed SS-3), spektrofotometre (Zeiss PMQZ), inkübatör (Dubnoff metabolik çalkalayıcı), sıvı sintilasyon sayacı (Mark II liquid scintillation system) ve kromatografi tankı (Camag) kullanılmıştır.

### 2- Gereçler ve Kaynakları :

Deneylerde kullanılan maddeler ve kaynakları şöyledir:

Adenozin 5' - trifosfat (ATP) , adenozin, folin reaktifi, etilendiamintetra asetik asit ve tolüen BDH firmasından (İngiltere); adenozin 5' - monofosfat (AMP), adenozin 3', 5' - siklik monofosfat (cAMP), ditiyotreitöl, polietilen 20- setil eter (Brij 58), 2,5 Difenilokzazol (PPO), 1.4-di-2- (5- fenilokzazozil)- benzen (POPOP) ve etilenglikol-bis- ( $\beta$ - aminoetileter) N, N' - tetraasetik asit) Sigma firmasından (A.B.D.) ; polietilenimin selüloz - F ince tabakaları Merck firmasından (Almanya) ; siğir serum albumini (BSA) Armour Pharmaceutical firmasından (A.B.D.);  $8^{14}\text{C}$  işaretli adenozin-5' - trifosfat (1.04 mCi/mmol) The Radiochemical Centre firmasından (İngiltere) elde edilmiştir. Kullanılan diğer maddeler analitik saflıkta idi.

Enzim kaynağı olan siğır beyni, Ankara Et ve Balık Kurumu Mezbahasından sağlanmıştır.

Yöntemler :

1. Enzimin Elde Edilişi :

Enzim, Lin tarafından (67) anlatıldığı şekilde fakat farklı bir deterjanla siğır beyni korteksinden elde edildi. Mezbahada hayvanın öldürülmesinden hemen sonra alınan beyinler derhal temiz bir naylon torba içinde sıvı nitrojende donduruldu. Aynı gün 4 °C' da çözülerek dış zarı soyuldu ve böylece herhangi bir kirliliğin gelmesi önlendi. Beynin korteks kısmı beyaz kısımlar mümkün olduğu kadar ayıklanıp atılarak elde edildi. Bundan sonra enzim elde edilene kadar bütün işlemler 4°C'da yürütüldü. Elde edilen korteks tartıldı ve doku gramı başına 9 ml. pH'si 7.6 olan 50 mM TRIS-HCl tamponu (5 mM MgSO<sub>4</sub> bulundurur) kullanılarak teflon-cam homojenizatörünün birkaç vuruşu ile homojenize edildi. Homojenat 30000 g' de 20 dakika santrifüjlendi, çökelek-üstü atıldı. Çökelek başlangıçtaki doku gramı başına 3 ml. deterjan kullanılarak ekstre edildi. Ekstraksiyon, % 1'lik Brij-58'le (3 mM DDT ve 10 mM NaF bulundurur.) üç kere ve homojenizasyon yoluyla yapıldı. Ekstreler her seferinde homojenatın 30000 g'de 30 dakika santrifüjlenmesi ve çökelek üstünün alınması ile toplandı. Sonunda ekstreler birleştirildi ve 1 ml.'lik parçalar halinde CO<sub>2</sub> karında veya sıvı nitrojende dondurularak -20°C'da saklandı.

2. Enzimin Etkinliğinin Tayini :

60 µl'lik tepkime ortamında bulunan maddeler ve son

derişimleri başka bir belirtme olmadığı durumlarda şöyleydi :

1mM ATP

9mM MgCl<sub>2</sub>

6mM NaF

1mM izobütümetilksantin

1mM Soğuk cAMP

1mM ditiyotreitol

20mM Sodyum azid

1Mg/ml. Sığır serum albumini

66mM TRIS-HCl tamponu, pH = 7.6

1mg/ml. Protein derişimi verecek kadar enzim preparatı

60 µl'lik tepkime ortamına, 200 000 dpm'lik sayım verecek kadar <sup>14</sup>C- işaretli adenozin 5' - trifosfat katılmıştır.

Tepkime başlamadan önce, sübstrat dışındaki bileşenler, 20°C'da 10 dakikalık bir öninkübasyonla enzimle bir araya getirildi. Bu sürenin sonunda 20°C'a getirilmiş sübstratın eklenmesi ile tepkime başlatıldı ve 20°C'da 8 dakika sürdürüldü. Bu sürenin sonunda tepkime ortamına 20 µl 0°C sıcaklığındaki 1M asetat tamponu (pH = 3.7) eklendi ve deney tüpü derhal buza alındı. Buz içinde hazırlanan kör tüpüne 1M asetat tamponu (pH=3.7) başlangıçta kondu ve sonra enzim, diğer bileşenler ve sübstrat sırayla eklendi.

Asetat tamponunun da eklenmesiyle 80 µl'ye çıkan karışımın 15 µl'si 1.5 cm'lik çizgiler halinde PEI selülöz-F ince tabakasına tatbik edildi . Numunelerin üstüne taşıyıcı cAMP'nin tatbikinden sonra 0.2 M LiCl (%0.2 Brij-58 bulundurur). Çözeltisi ile kromatografi işlemi yürütüldü. cAMP'ye ait noktalar karanlıkta UV

Örneğin, 6 gr. PPO ve 0.01 gr. POPOP'un toluende çözülüp 1 lt.'ye tamamlanması ile elde edilmiştir.(68).  
lâmbası altında belirlendi ve kesilerek 10 ml.'lik sayım çözeltilisinde sayıldı.

Sayım çözeltilisi, 6 gr. PPO ve 0.01 gr. POPOP'un toluende çözülüp 1 lt.'ye tamamlanması ile elde edilmiştir.(68).

### 3. Protein Tayinleri

Folin Ciocalteu metoduna (69) göre yapıldı. Standart olarak siğir serum albumini kullanıldı.

## B U L G U L A R

Yöntemler kısmında anlatıldığı şekilde, adenilat siklaz, siğır beyni korteksinden, daha önce adenilat siklaz için kullanılmamış bir deterjan olan Brij-58'le ekstre edildi. Elde edilen ekstrede 30000 g çökelek üstünde aktivitenin varlığı gözlemlendi ve enzimin bazı özellikleri belirlendi.

Brij-58'le Siğır Beyni Korteksinden Çözülen Adenilat Siklazin Dayanıklılığı :

Brij-58 ile siğır beyni korteksinden çözülen enzim, saklamak amacıyla ile dondurulurken bu işlemin hızlı olmasının aktiviteyi korumak bakımından gerekli olduğu görüldü.  $-20^{\circ}\text{C}$ 'da donmaya bırakılan enzimin aktivitesini yitirdiği, sıvı nitrojen veya karbondioksit karında dondurulduğunda ise aktivitenin korunduğu görüldü. Sıvı nitrojende dondurulmuş enzimin, bir kere çözüldükten sonra tekrar hızla dondurulup  $-20^{\circ}\text{C}$ 'da saklandığında da, aktivitesini koruduğu görüldü.

Dondurularak saklanan enzimin çözülmesi sırasında yine işlemin hızlı yürütülmesine özen gösterildi. Enzim  $20^{\circ}\text{C}$ 'da çözülüp içindeki son buz kırıntıları kaybolmadan buza aktarıldığında, aktivitesini iki saat süreyle kaybetmedi.

Brij-58 ile çözülmüş enzim,  $20^{\circ}\text{C}$ 'da ancak BSA ve DTT katılmış ortamda aktivitesini koruyarak, sekiz dakika süreyle



lineer tepkime verdi (3. Şekil). BSA ve DTT katılmamış ortamlarda, 20°C'da bile lineer tepkime hızı elde edilemedi. 30°C'ın üstünde, BSA ve DTT bulunduran ortamda bile, Brij-58 ile çözülmüş enzim aktivite yitirdi (10. Şekil).

#### Ürünün Korunması:

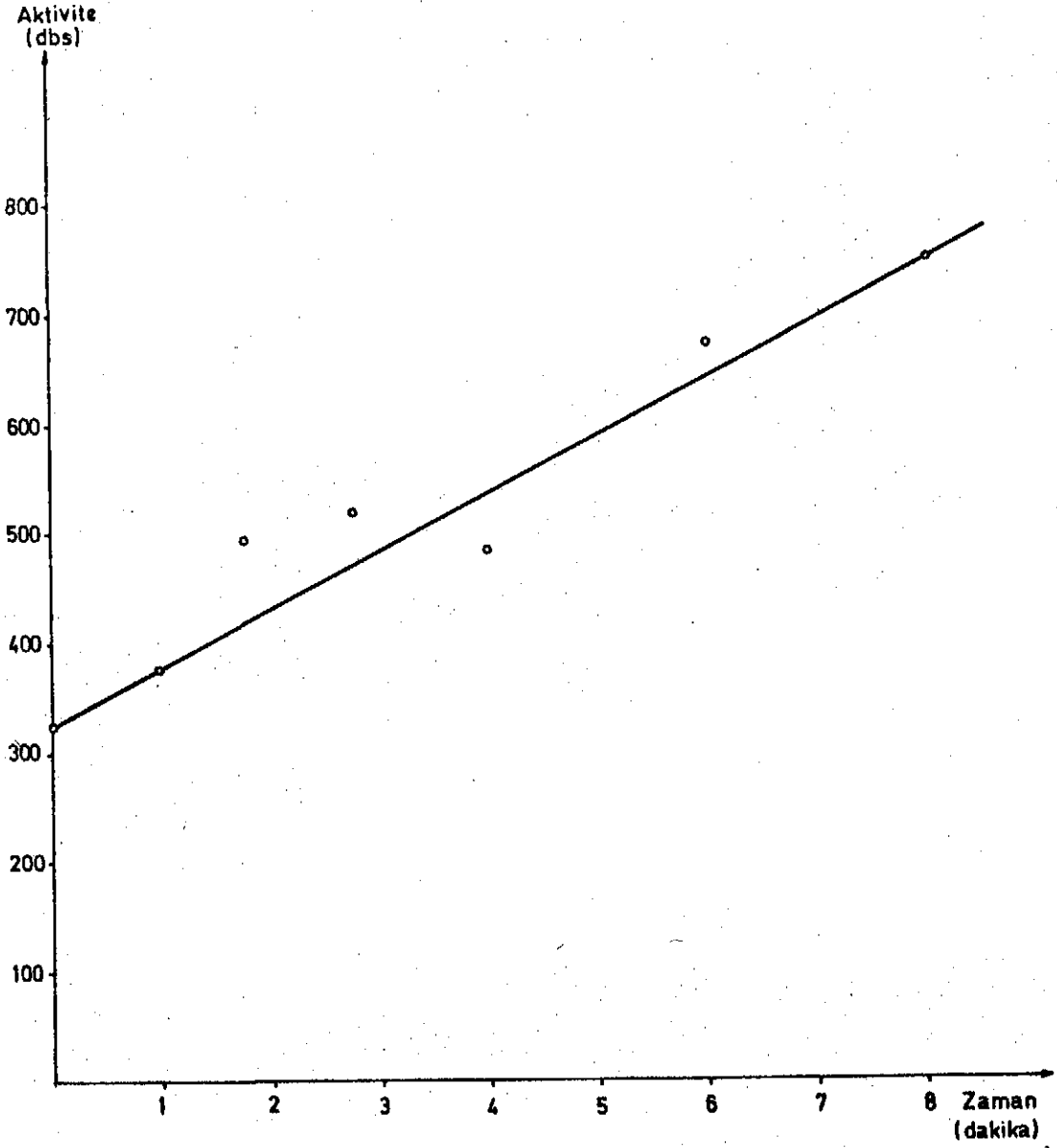
Enzim örneği içinde adenil siklaz ile beraber gelen cAMP-PDE'az'ın etkisinden ürünü korumak için inkübasyon ortamına 1mM izobütilmetilksantin eklendi fakat bu durumda ürünün korunmadığı gözlemlendi. Ortama 1mM izobütilmetilksantin yanında 1mM soğuk cAMP bulunduğu ise, 8 dakika süreyle lineer tepkime hızı elde edilebilecek şekilde ürünün korunduğu gözlemlendi (3.Şekil).

#### Sübstratın Korunması :

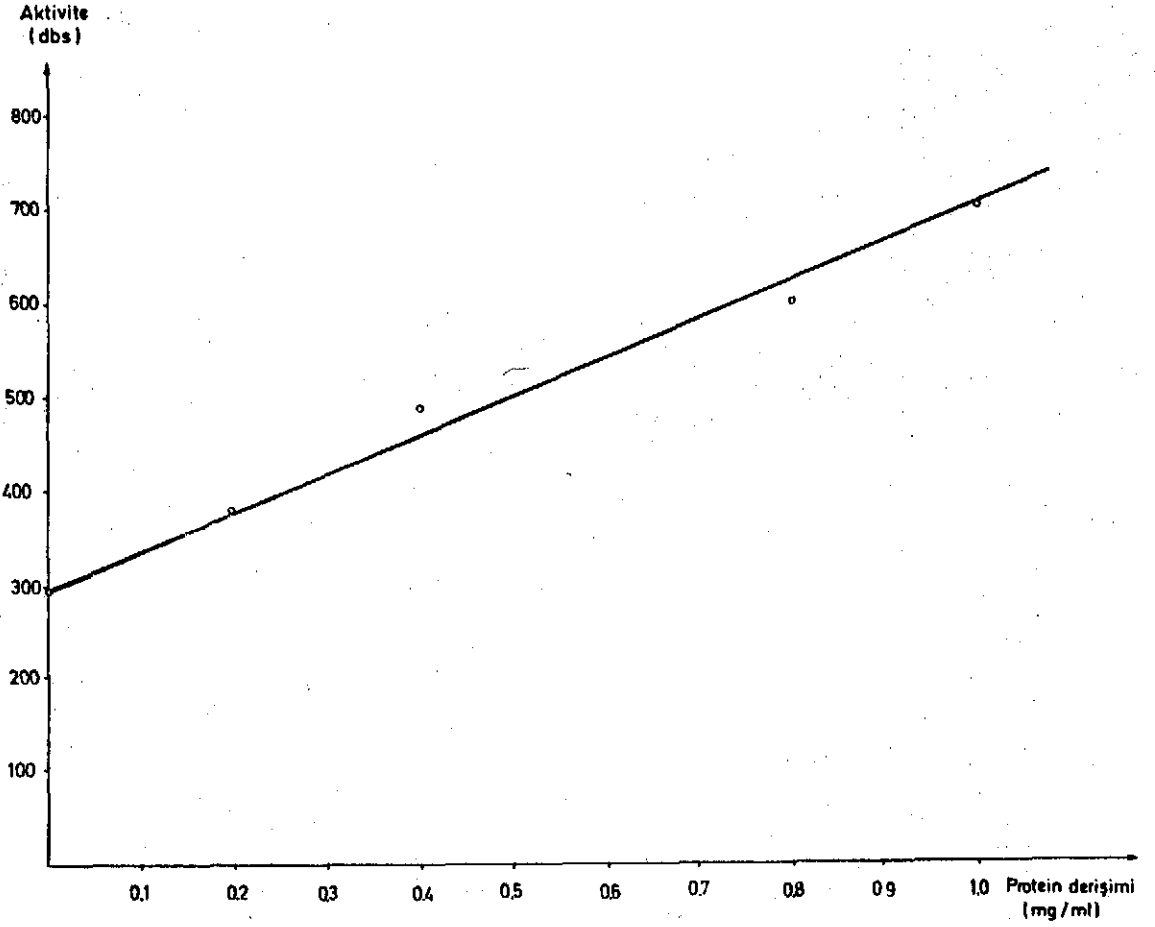
Inkübasyon ortamına enzim örneği içinde ATP'az enzimi de gelmekte ve sübstrat derişimini enzimi doyuran düzeyin altında düşürmektedir. Bunu önlemek için ATP'az'ın inhibisyonu yoluna gidildi. ATP'az inhibitörü olarak 20 mM sodyum azid kullanıldı ve 8 dakika süre ile lineer tepkime hızı elde edecek şekilde sübstrat korundu (3. şekil).

#### Tepkimenin Enzim Miktarına Bağımlılığı:

66 mM, pH = 7.6 TRIS - HCl tamponu içinde 1mM ATP, 20 mM sodyum azid, 1mM DTT, 9 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NaF, 1 mg/ml. olacak şekilde BSA içeren inkübasyon ortamında ve 20°C'da ürünün enzim miktarına bağımlılığı; ortama, nihaî protein derişimi 0.1-1 mg/ml. olacak şekilde enzim örneği eklenerek denendi. Öninkübasyon 5 dakika süre ile yürütüldü. Ürünün bu aralıkta



3. Şekil : Sığır beyni korteksinden Brij-58 ile çözülmüş adenilat siklazın katalizlediği tepkimenin inkübasyon süresine bağımlılığı (Yöntemlerde belirtilen inkübasyon ortamı, 10 mM NaF ve 5 dakika öninkübasyon (20°C) süresi ile kullanıldı).



4. Şekil : Brij - 58 ile çözülmüş siğır beyni adenilat siklazının katalizlediği tepkimenin enzim miktarına bağımlılığı.

(Yöntemlerde belirtilen inkübasyon ortamı 10 mM NaF ve 5 dakika öninkübasyon ( 20°C ) süresi ile kullanıldı.

düzgün olarak arttığı gözlemlendi (4. Şekil). İyon ve inhibitörlerin etkisi denenirken, ortama, derişimi 1mg/ml. olacak kadar protein getiren enzim eklendi.

**Tepkimenin İnkübasyon Süresine Bağımlılığı :**

Yine bir önceki bölümde belirtilen inkübasyon ortamı kullanılarak 20 °C'da ürünün lineer olarak arttığı süre araştırıldı. (3.)Şekilde görüldüğü gibi tepkimenin 8 dakika süre ile lineer yürüdüğü görüldü.

**Ürünün Diğer Maddelerden Ayırımı**

Tepkimenin ana ürünü olan cAMP'nin yan tepkimelerden gelebilen AMP, ADP, adenzinden ve sübstrat olan ATP' den ayırımı

1. Tabloda özetlenmiştir.

1. Tablo : ATP, ADP, AMP cAMP ve adenzinin PEI-selü-löz F tabakasında 0.2 M LiCl(%0.2 Brij-58 içerir) ile ayrılması.

---

| Maddeler | Rf değerleri |
|----------|--------------|
| ATP      | 0            |
| ADP      | 0            |
| AMP      | 20.3         |
| cAMP     | 44.0         |
| Adenzin  | 54.0         |

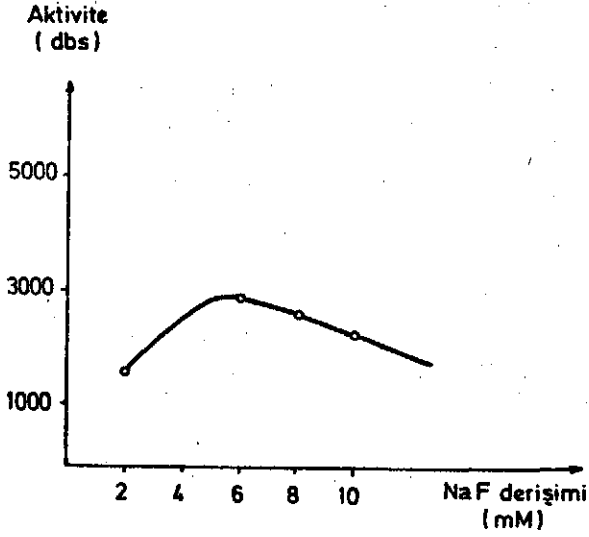
---

Brij - 58 ile Çözölmüş Sığır Beyni Korteksi Adenilat Siklazının NaF ile Aktivasyonu :

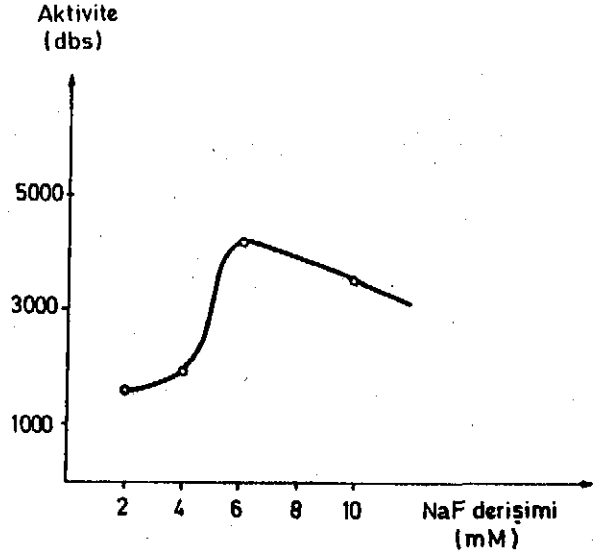
Brij-58 ile sığır beyni korteksinden çözülmüş enzimin NaF'le aktive olup olmadığı, oluyorsa en etkin NaF derişiminin ve öninkübasyon süresinin ne olduğu araştırıldı. NaF dışında, yöntemler kısmında belirtilen inkübasyon ortamı kullanıldı ve her seferinde ortama, belirtilen derişimde NaF eklendi. Denenen öninkübasyon süreleri, 20°C'da 5,10,15 dakika ve 4°C'da 30 dakikadır. 30 dakikalık öninkübasyonun 4°C'da yapılmasının amacı, enzimin inaktivite olmasını önlemektir. Bu öninkübasyon sürelerinin herbirinde, beş ayrı NaF derişiminin (2-10 mM) etkisi araştırıldı.(5.a.e)Şekilde göröldüğü gibi, denenen öninkübasyon sürelerinin hepsinde de enzimi aktive etmek için en etkin NaF derişiminin 6 mM olduğu göröldü. 6 mM'ın üzerindeki derişimlerde ise NaF inhibitör etkisi gösterdi. Bu bulgular, 6 mM'lik NaF derişiminde en etkin öninkübasyon süresini aramak için değerlendirildiğinde ise, 10 dakikanın en etkin öninkübasyon süresi olduğu göröldü. Bu nedenle, iyon ve inhibitör etkileri araştırılırken, ortamda 6 mM NaF bulunduruldu ve öninkübasyon 10 dakika süre ile yürütöldü.

Mg<sup>++</sup> ve Mn<sup>++</sup> İyonlarının Etkisi :

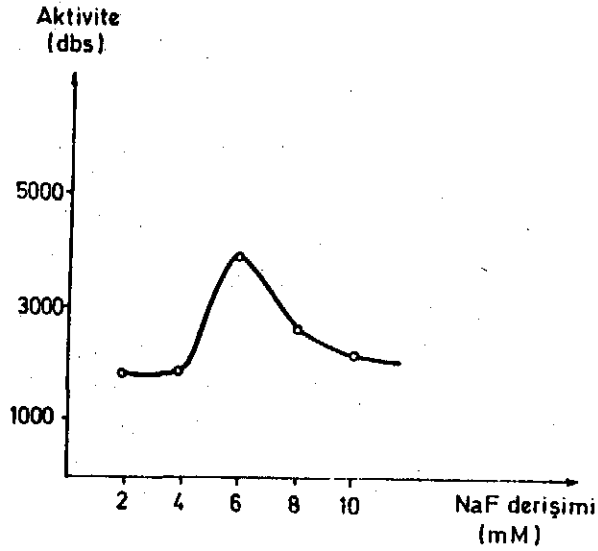
Enzimin, aktivite gösterebilmek için Mg<sup>++</sup> iyonuna gereke duyduğu, fakat, Mg<sup>++</sup> yerine Mn<sup>++</sup>'i, daha da yüksek aktivite göstererek kullanabildiği gözlendi (6. Şekil). Daha önce belirtildiği gibi inkübasyon ortamındaki sübstrat derişimi 1 mM'dır. (6.) şekilde göröldüğü gibi, ancak Mg<sup>++</sup> iyonunun derişimi sübstratinkinden yüksek olduğu zaman enzim etkin bir şekilde çalışabildi.



5. Şekil (a): Öninkübasyon süresi: 5 dakika (20°C)

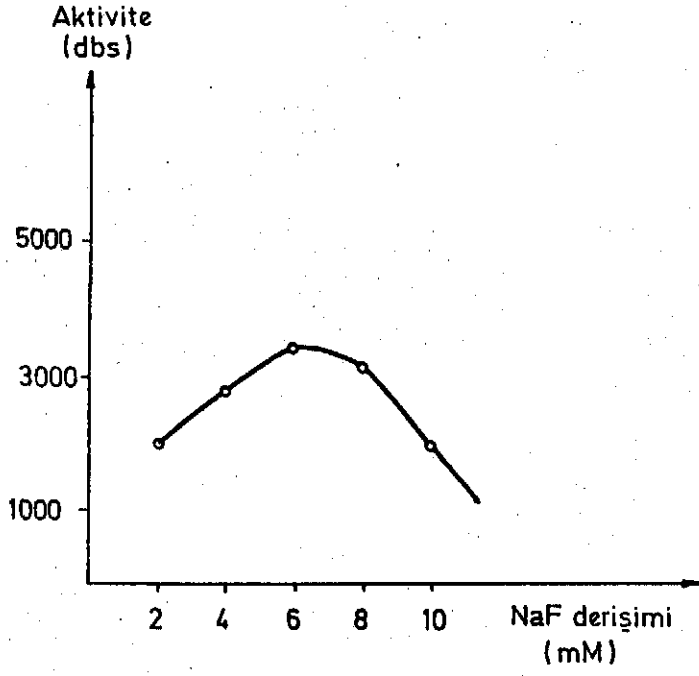


5. Şekil (b): Öninkübasyon süresi: 10 dakika (20°C)

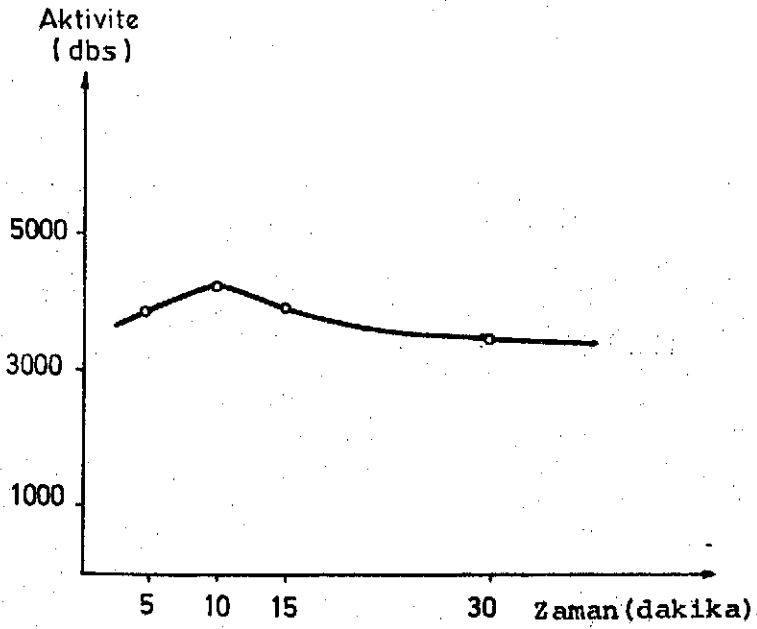


5. Şekil (c): Öninkübasyon süresi: 15 dakika (20°C)

5. Şekil : (a,b,c) Brij-58 ile çözülmüş siğır beyni korteksi adenilat siklazının farklı öninkübasyon sürelerinde NaF ile aktivasyonu (NaF dışında yöntemlerde belirtilen inkübasyon ortamı kullanıldı, belirtilen derişimde NaF eklendi.)

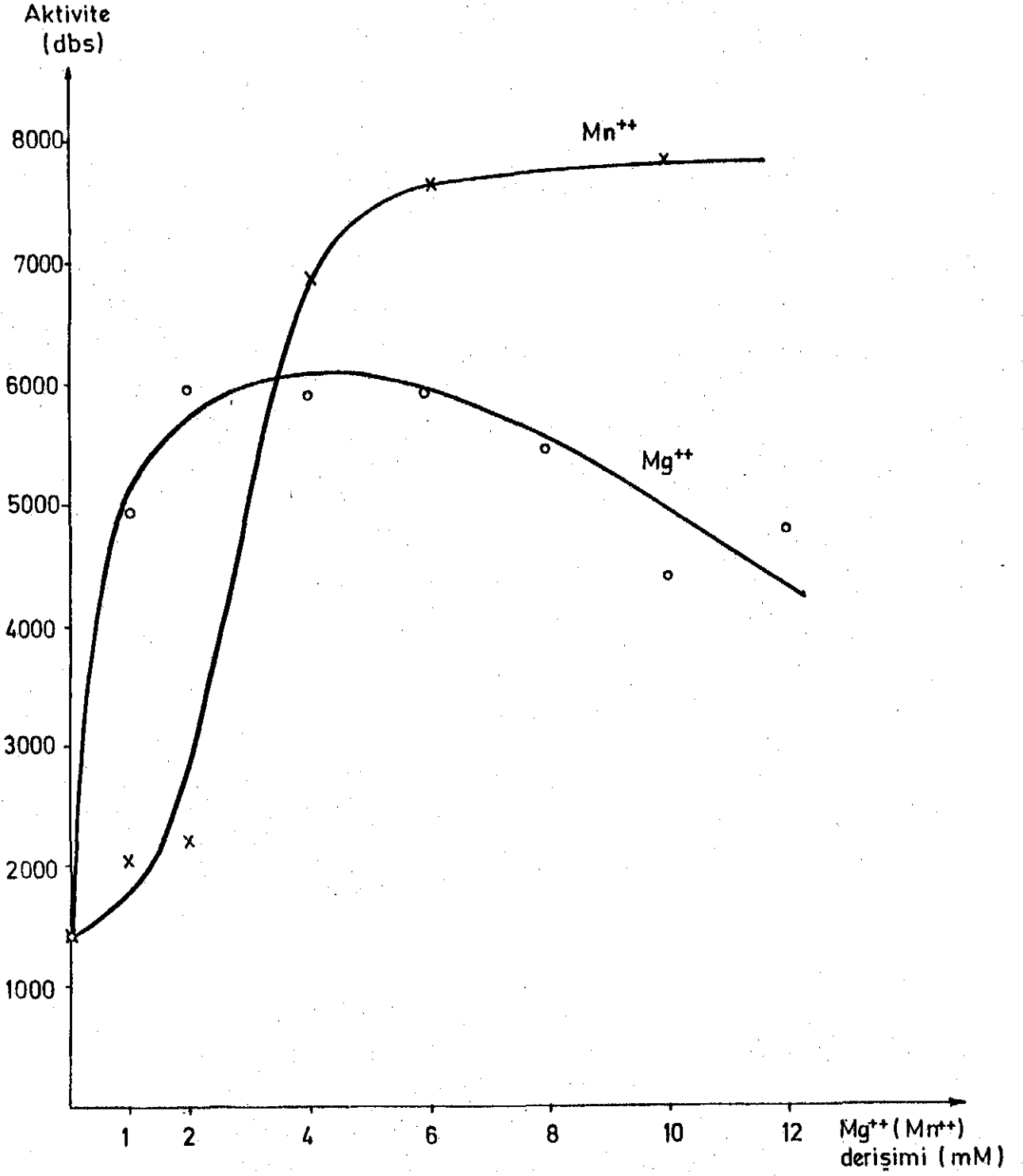


5. Şekil (d): Öninkübasyon süresi:  
30 dakika (4° C)



5. Şekil (e): 6mM NaF varlığında öninkü-  
basyon sürelerinin aktiviteye  
etkisi

5. Şekil : (d,e) Brij-58 ile çözülmüş siğir beyni korteksi adenilat siklazinin farklı öninkübasyon sürelerinde NaF ile aktivasyonu (NaF dışında, yöntemlerde belirtilen inkübasyon ortamı kullanıldı, belirtilen derişimde NaF eklendi.)



6. Şekil :  $Mn^{++}$  ve  $Mg^{++}$  'un , sıçır beyni korteksinden Brij-58 ile çözülmüş adenilat siklaz aktivitesine etkileri (inkübasyon ortamı belirtilen derişimde  $Mn^{++}$  veya  $Mg^{++}$  içermektedir. Inkübasyon ortamının diğer bileşenleri yöntemler bölümünde belirtildiği gibidir.



1 mM sübstrat varlığında optimum  $Mg^{++}$  derişiminin 2-6 mM olduğu gözlemlendi.

$Ca^{++}$   
Ca İyonunun Enzime Etkisi :

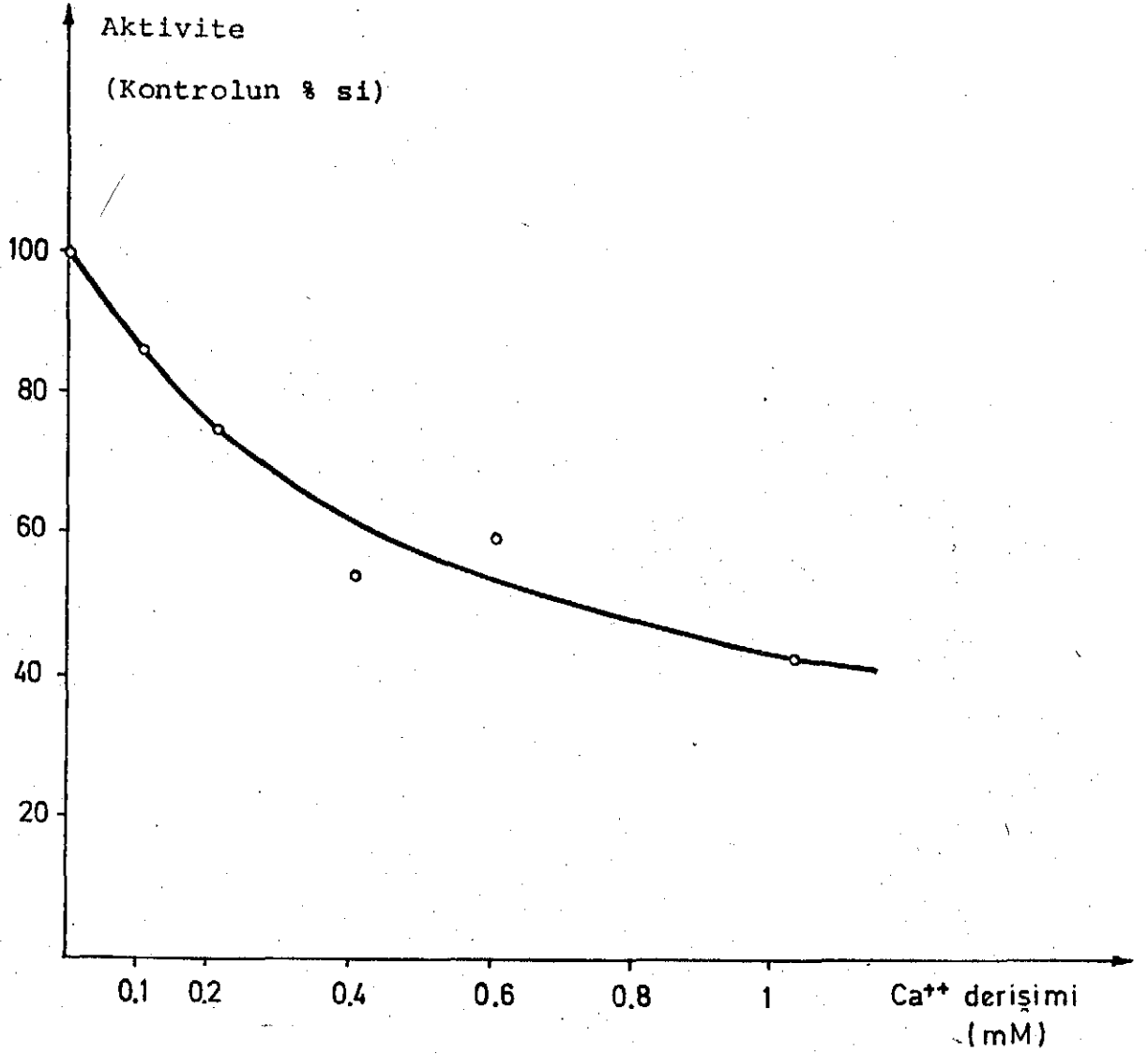
(7.) şekilde görüldüğü gibi 0.1 mM gibi düşük bir derişimde bile,  $Ca^{++}$  iyonu, sığır beyni adenilat siklazının aktivitesini % 15 oranında inhibe etti. Artan  $Ca^{++}$  iyonu derişimi ile inhibisyon da arttı ve 1 mM  $Ca^{++}$  derişiminde % 60'a ulaştı.

EGTA ve EDTA'nın Enzime Etkisi :

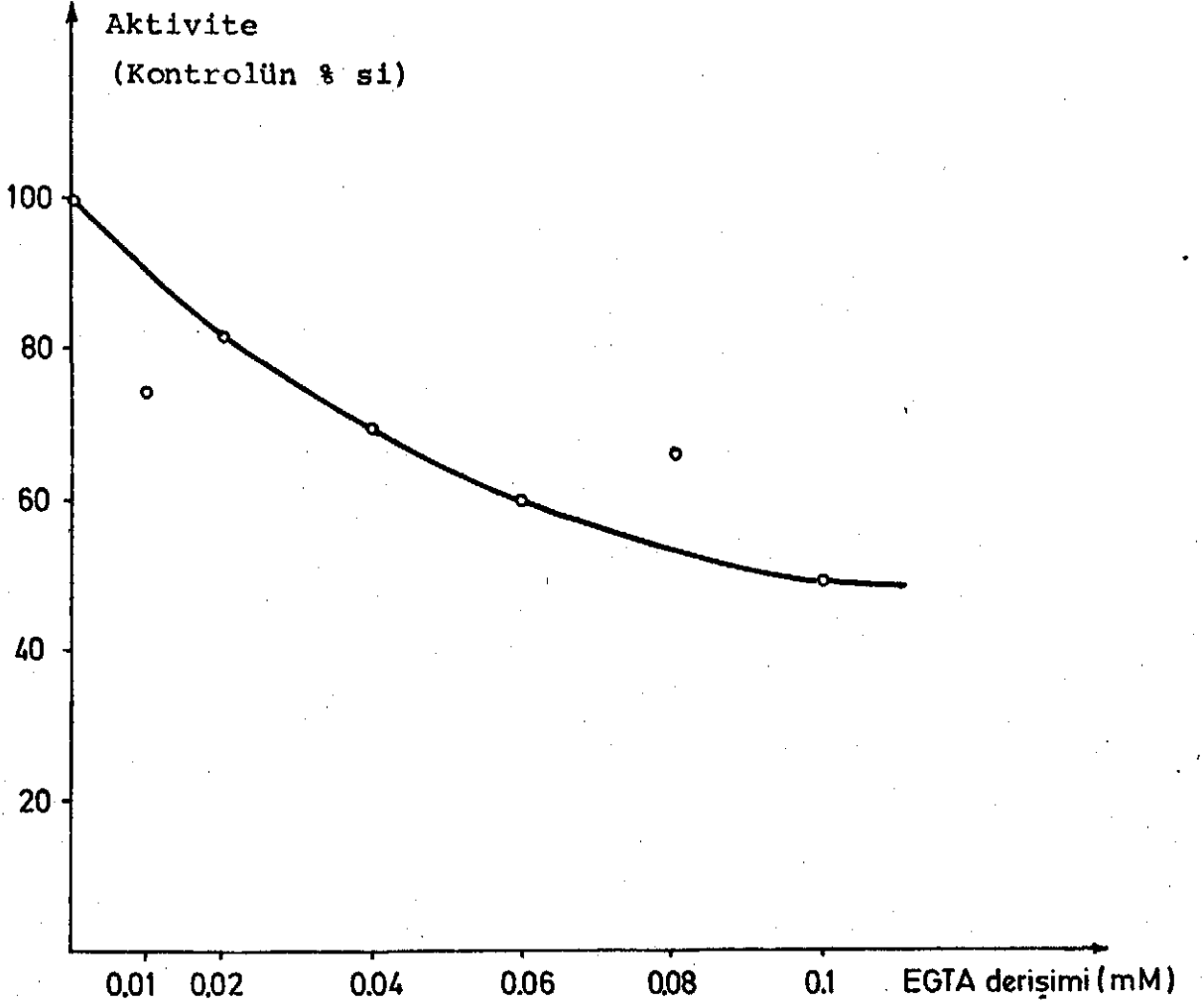
(8.) ve (9.) şekillerde görüldüğü gibi inkübasyon ortamına eklenen EGTA ve EDTA, Brij-58 ile çözülmüş sığır beyni adenilat siklazının inhibisyonuna yol açtılar. Artan EGTA ve EDTA derişimleri ile inhibisyon oranı da arttı. EGTA'nın enzimi inhibe edebilme özelliğinin EDTA' dan daha fazla olduğu gözlemlendi. 0.1 mM derişimdeki EGTA % 55 oranında bir inhibisyona yol açarken, 1 mM derişimdeki EDTA ancak % 35 oranında bir inhibisyon gösterdi. (8. ve 9. şekiller).

EGTA ve EDTA inhibisyonlarının tersinir olup olmadığı da, en etkin inhibisyonu gösterdikleri derişimde denendi. (2. Tablo). Nihai derişimi 0.1 mM olacak kadar EGTA ve aynı derişimde  $Mn^{++}$  veya  $Ca^{++}$  inkübasyon ortamına eklendi. Her iki durumda da inhibisyon ortadan kalktı (2. Tablo).

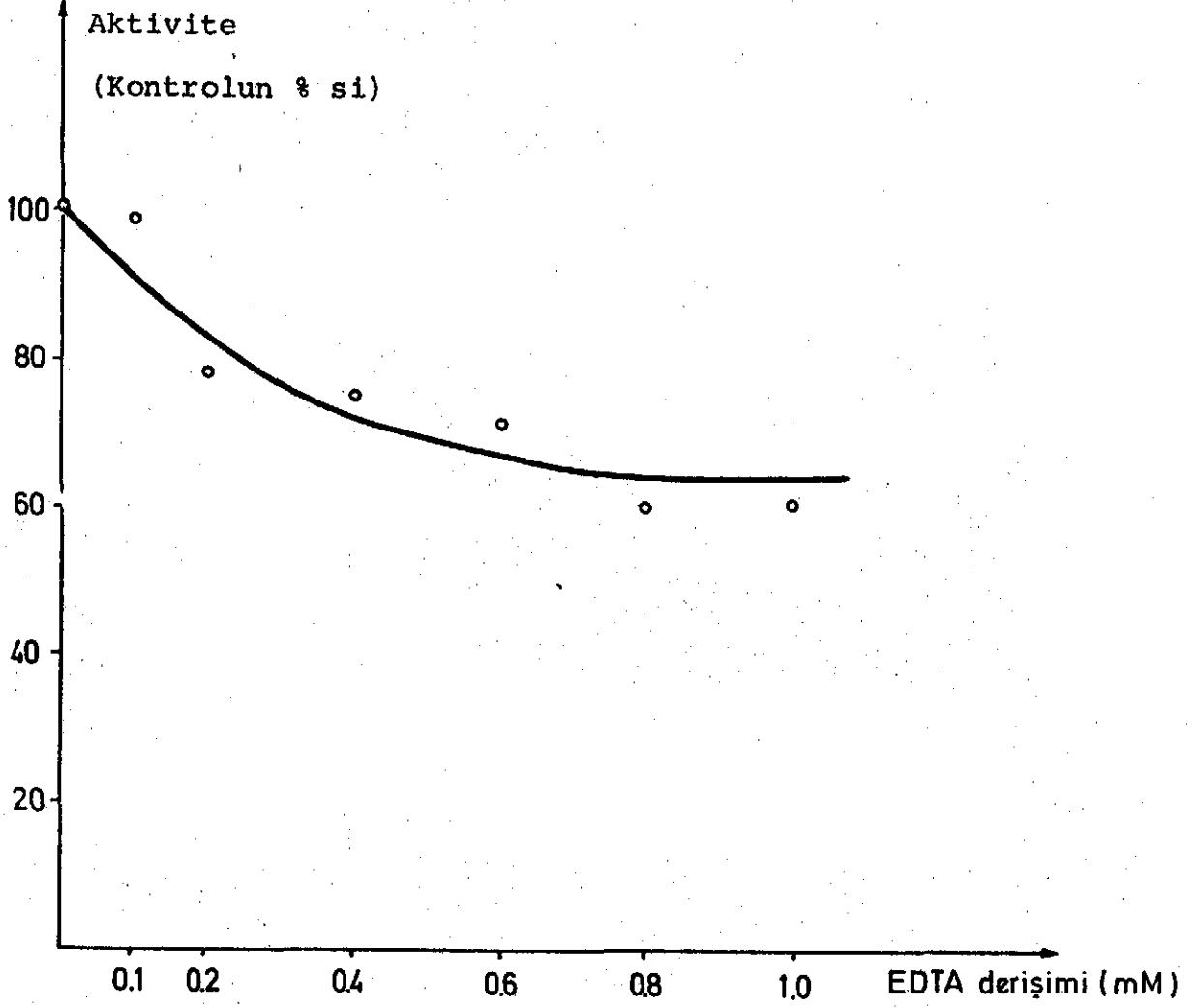
EDTA inhibisyonunun tersinir olup olmadığı da inkübasyon ortamındaki EDTA nihai derişimi 1 mM'a getirilerek ve aynı derişimde  $Ca^{++}$  veya  $Mn^{++}$  eklenerek denendi ve inhibisyonun ortadan kalktığı gözlemlendi (2. Tablo).



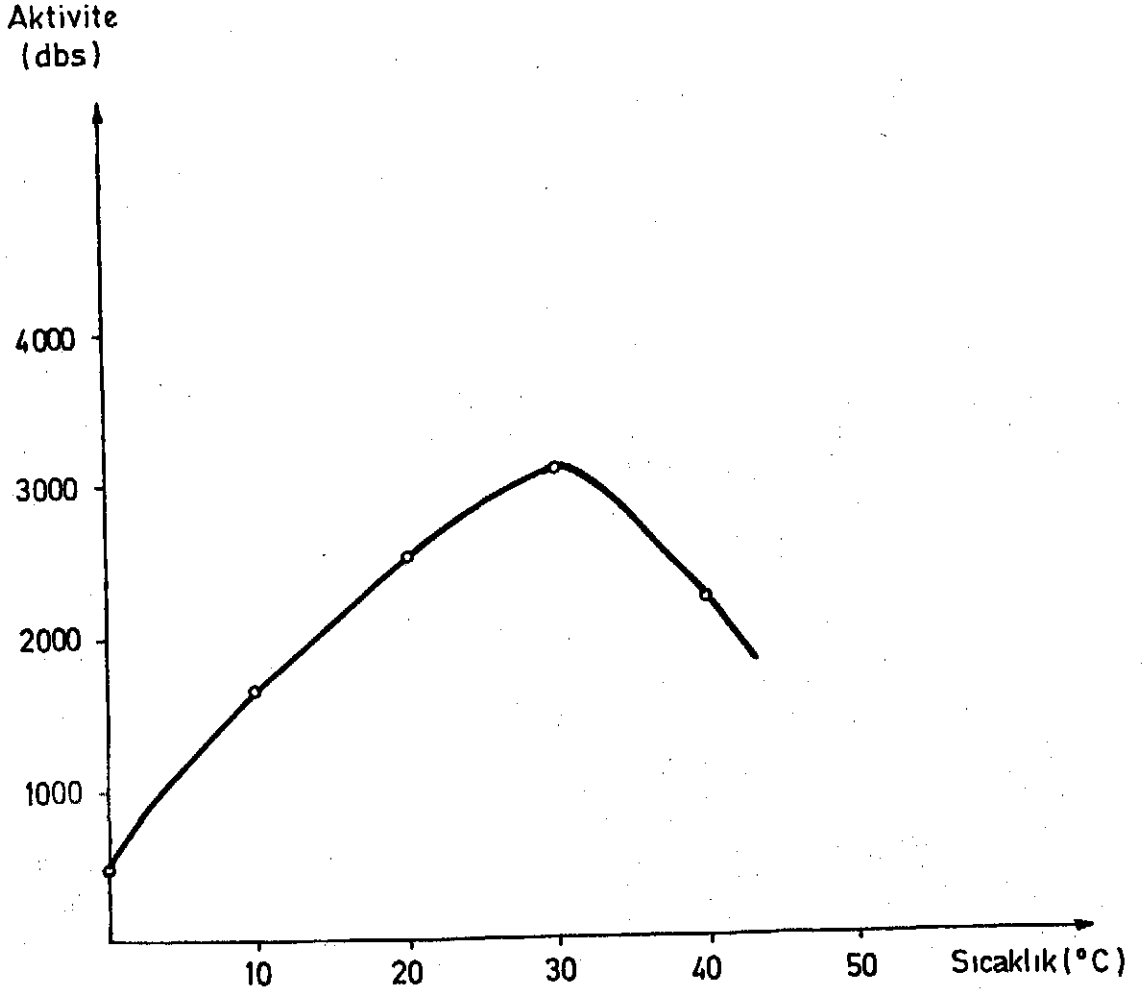
7. Şekil : Ca<sup>++</sup> 'un siğır beyni korteksinden çözülmüş adenilat siklaz aktivitesine etkisi. (Yöntemler bölümünde belirtilen inkübasyon ortamı belirtilen derişimde Ca<sup>++</sup> içermek üzere kullanıldı.)



8. Şekil : EGTA' nın siğir beyni korteksinden çözülmüş adenilat siklaz aktivitesine etkisi (Yöntemler bölümünde açıklanan inkübasyon ortamı, belirtilen derişimde EGTA içermek üzere kullanıldı).



9.Şekil : EDTA'nın siğır beyni korteksinden çözülmüş adenilat siklaz aktivitesine etkisi (Yöntemler bölümünde açıklanan inkübasyon ortamı belirtilen derişimde EDTA içermek üzere kullanıldı.)



10. Şekil : Sıcaklığın, siğir beyni korteksinden çözülmüş adenilat siklaz aktivitesine etkisi (Yöntemlerde belirtilen inkübasyon ortamı ile belirtilen sıcaklıkta öninkübasyon ve inkübasyon yürütüldü.)

2. Tablo : Brij - 58 ile çözülmüş siğır beyni enziminin EGTA ve EDTA ile inhibisyonuna  $Ca^{++}$  ve  $Mn^{++}$  'ın etkileri

| Maddeler ve inkübasyon ortamındaki derişimleri | Aktivite (dbs) |
|--|----------------|
| Kontrol değeri                                 | 1756           |
| EGTA (0.1 mM), $Ca^{++}$ (0.1 mM)              | 1706           |
| EGTA (0.1 mM), $Mn^{++}$ (0.1 mM)              | 2056           |
| EDTA (1 mM ), $Ca^{++}$ ( 1 mM )               | 1688           |
| EDTA (1 mM) , $Mn^{++}$ ( 1 mM )               | 2006           |

Siğır Beyni Adenilat Siklazına Sıcaklığın Etkisi :

Sıcaklığın, enzim aktivitesine etkisi yöntemler kısmında belirtilen inkübasyon ortamı kullanılarak denendi. (10.) şekilde görüldüğü gibi enzimin  $30^{\circ}C$  'da en etkin şekilde çalıştığı ve  $30^{\circ}C$ 'ın üstünde aktivite yitirdiği gözlemlendi.

## T A R T I Ő M A

Adenilat siklaz siğır beyni korteksinden Brij-58 ile ekstre edildi. Ekstre 30 000 g'de santrifüjlendi. Çökelek üstü ile çalışılarak enzimin bazı özellikleri belirlendi. Enzimatik tepkime, enzim ve sübstrata ek olarak; pH = 7.6 TRIS - HCl tamponu, Mg<sup>++</sup>, BSA, DDT, izobütümetilksantin, soğuk CAMP, sodyum azid içeren bir inkübasyon ortamında yürütüldü. <sup>14</sup>C işaretli sübstrattan oluşan işaretli ürün, ince tabaka kromatografisi ile diğer nükleotidlerden ayrıldı ve sıvı sintilasyonu ile sayıldı.

Adenilat siklaz kolayca aktivite yitiren bir enzim olduğu için, araştırıcılar; kaba homojenatlar, yıkanmış zar örnekleri veya bunlardan elde edilen çözülmüş enzim örnekleri ile çalışmaktadırlar. Bu durumda adenilat siklazın yanında ortama bol miktarda ATP'az ve PDE'az enzimleri de gelmektedir (12). Böylece, enzim aktivitesinin inkübasyon süresince korunması yanında, sübstrat ve ürün korunması sorunları da ortaya çıkmaktadır. Bu sorunların çözüm biçimini etkileyen faktörlerden biride radyoaktif veya soğuk çalışma yönteminin seçilmesidir.

Radyoaktif çalışma biçiminin seçilmesi, tayin yöntemine bazı kısıtlamaları da beraberinde getirerek, yukarda anlatılan sorunların çözüm şeklini etkilemektedir. Örnekte, radyoaktif çalışmadakinin aksine olarak soğuk çalışmalarda, yöntemin hassasiyetini etkilemeden sübstrat derişimi ve inkübasyon hacmi istenildiği kadar

arttırılabilir. Bu birtakım kolaylıklarıda beraberinde getirir. Örneğe, sübstrat derişimi arttırılarak sübstratın ATP'azdan korunması sorunu kolayca çözümlenebilir. Böylece yöntemin hassasiyeti, sadece, cAMP'nin ayırım ve tayininde kullanılan metodun hassasiyetine bağlıdır. Radyoaktif çalışmalarda ise, sübstrat derişimi ve inkübasyon hacmi, yöntemin hassasiyetini belirleyen çok önemli faktörlerdir.

Sübstrat derişimi ve ortama konan toplam radyoaktivite sabit tutularak inkübasyon hacmi düşürülürse, ürüne çevrilen sübstrat moleküllerinin sayısı değişmemekle birlikte, ürüne çevrilen işaretli sübstrat fraksiyonu artmaktadır. Ayrıca inkübasyon hacmini düşürmenin bir yararı da, böylece toplam nükleotid miktarı düşük olacağı için, ürünün ayırımında küçük kolonların veya ince tabakanın kullanılabilmesidir. Radyoaktif çalışma, inkübasyon hacmi yanında, sübstrat derişimini de kısıtlamaktadır. Genellikle adenilat siklaz tayinlerinde sübstratın enzimi doyurarak  $V = V_{max}$  koşulunu sağladığı durum, ATP derişiminin  $1mM$ 'dan yüksek veya  $1mM$ 'a eşit olduğu durumdur (53). Daha yüksek sübstrat derişimi, hızı belirgin ölçüde arttırmazken, işaretli sübstrat oranını düşürür. Getirdiği bu kısıtlamalara karşın, radyoaktif çalışmada, ürün çok küçük miktarlarda da olsa kolaylıkla tayin edilebilmektedir. İşaretsiz sübstratla yapılan çalışmalarda ise ürünün tayin işlemi çok zaman alıcıdır. Bu yüzden radyoaktif çalışma biçimi seçilmiştir.

Inkübasyon hacminin küçük tutulması ile de, ürünün ayırımında ince tabakanın kullanılması mümkün olmuştur.

Bu çalışmada kullanılan polietilenimin-selüloz tebakalarının, siklik nükleotidlerin ayırımında diğer anyon değiştiricilere olan



üstünlüğü K. Randerath tarafından gösterilmiştir (54). Sistemimizde ürün sayımını özellikle etkileyebilecek olan AMP ve ADP'den cAMP'nin çok iyi bir şekilde ayrıldığı (1.) tablodaki hrf değerleri kıyaslanarak görülebilir.

Daha önce anlatılan nedenlerle, sübstrat derişimi 1 mM olarak seçilmiştir. Literatürde, 0.2 - 3.2 mM sübstrat derişimi arasında çalışan araştırıcıların, sübstratı korumak için; kreatin fosfat-kreatin kinaz, fosfoenol pirüvat-pirüvat kinaz gibi ATP rejenere edici sistemler kullandıkları görölmektedir. Bu çalışmada, inkübasyon ortamınının 1 mM soğuk cAMP içermesi nedeniyle, bir ATP rejenere edici sistem kullanılmasından kaçınılmıştır. Çünkü bu durumda; adenilat kinaz aktivitesi uygunsa, işaretsiz cAMP'nin ADP'ye ve oluşan ADP'nin de, rejenere edici sistemle ATP'ye çevrilmesi sonucu işaretli ATP seyrelmektedir (55). Bu yüzden bir ATP'az inhibitörü kullanılması yoluna gidilmiş ve 20 mM sodyum azid kullanılarak sübstrat korunmuştur.

Adenilat siklaz çalışmalarında ürünü korumak için genellikle çeşitli derişimlerde teofilin veya kafein kullanıldığı görölmektedir. (21,34,36,37,45,46,49). Bu amaçla, sadece işaretsiz cAMP (38,41,56), sadece izobütümetilksantin (42), teofilin veya kafeinin yanında işaretsiz cAMP kullananlar da vardır (35,57). Ancak yüksek derişimlerde olsa bile teofilinin PDE'azı inhibe edemediğini öne süren araştırıcılar olduğu gibi (58), bazı durumlarda adenilat siklazı inhibe ettiği de belirtilmektedir (59,60). İzobütümetilksantin varlığında ise PDE'azın kısmen de olsa inhibe edildiği belirtilmektedir (55). Bu çalışmada sadece izobütümetilksantin ürününü koruyamadığı gözlemlendi ve ancak ortama izobütümetilksantin yanında 1 mM soğuk cAMP eklenerek ürün korunabildi.

Enzim aktivitesinin, inkübasyon süresince korunması sorunu ise, kısa inkübasyon süresi kullanarak çözümleyen araştırmacılar (61) olduğu gibi, kısa süre ve DDT (62), sadece DDT (67), sadece BSA (46) veya BSA ve DDT'yi beraberce kullanan (63,45) araştırmacılar da vardır.

Bu çalışmada, enzim aktivitesinin 20°C'da 8' süreyle, lineer bir tepkime hızı verecek şekilde korunabilmesi için, inkübasyon ortamında; hem BSA, hem de DDT'nin bulunmasının gerekli olduğu görüldü. Ortamında koruyucu hiç bir madde kullanmamış bir araştırmacının sistemi incelendiğinde, enzimi deterjanla çözmeden önce, bir GTP analogu olan ve adenilat siklazı aktive ettiği belirlenen (64) Gpp (NH)p ile muamele ettiği görülmüştür. Bu durumda, enzimin hem aktivitesi hem de dayanıklılığı arttığı için, sadece DDT aktiviteyi korumuştur (43).

Sistemden gelen güçlükler, yukarıda anlatıldığı şekilde çözüldükten sonra enzimin bazı özellikleri belirlenmiştir.

Adenilat siklaz aktivitesi birçok faktörden etkilenmektedir. Bu faktörlerden biri olan  $Mg^{++}$  iyonu gereksinmesini; Sutherland ve arkadaşları, çeşitli dokulardan elde edilen adenilat siklazların ortak özelliği olarak belirtmişlerdir. Bu çalışmada, Brij-58 ile çözülmüş siğir beyni korteksi adenilat siklazının  $Mg^{++}$  ve  $Mn^{++}$  ilgisi incelendi. Enzimin, etkinlik gösterebilmek için  $Mg^{++}$  veya  $Mn^{++}$  iyonuna gerek duyduğu görüldü (6. şekil). Ancak, enzim,  $Mg^{++}$  ve  $Mn^{++}$  derişimlerinin sübstrat derişiminden yüksek olduğu durumlarda etkinlikle çalıştı (6. şekil). Bu bulgu, adenilat siklazın sübstrat olarak ATP'yi değil, ATP -  $Mg^{++}$  kompleksini kullandığı görüşünü

doğrulamaktadır (48). (6.) şekilde görüldüğü gibi, 1 mM sübstrat derişiminde, optimum  $Mg^{++}$  derişimi 3-5 mM, optimum  $Mn^{++}$  derişimi ise 6 mM civarındır. Yani enzim etkinlikle çalışabilmek için ATP'yi doyan düzeyin üstünde serbest  $Mg^{++}$  veya  $Mn^{++}$  iyonuna gerek duymaktadır.  $Mg^{++}$  ve  $Mn^{++}$  iyonlarının enzim üzerindeki etkileri karşılaştırıldığında ise,  $Mn^{++}$  varlığında enzimin daha aktif olduğu görüldü (6. şekil).  $Mg^{++}$  iyonu belli bir derişime kadar enzimi aktive ederken, bu derişimin üstünde, inhibitör etkisi gösterdi (6. şekil) Literatürde sadece  $Mn^{++}$  iyonunun yüksek derişimlerde inhibitör etkisi gözlenmiştir (35). Yukarda anlatılan bulguların benzerleri ise zara-bağlı sığır beyni ve çözülmüş sıçan beyni enzimleri ile çalışılarak elde edilmiştir (34,35,45).

Bu çalışmadan ve literatürden elde edilen bulgular,  $Mg^{++}$  veya  $Mn^{++}$  'ın enzim için mutlaka gerekli kofaktör olmalarının yanında; enzimi, katalitik bölgenin dışında bir yere bağlanarak aktive ettiklerini düşündürmektedir. Yüksek derişimdeki  $Mg^{++}$  'un enzimi inhibe etmesi ise, değerlendirilmesi daha zor bir bulgudur. Belki yüksek derişimlerde  $Mg^{++}$ , enzim için eser miktarda gerekli olduğu belirlenen  $Ca^{++}$  (57) ile rekabete girerek inhibisyona yol açmaktadır.

Daha önce de belirtildiği gibi, EGTA'nın adenilat siklaz üzerindeki etkisi tartışmalı bir konudur. EGTA'nın adenilat siklazın katalitik aktivitesini inhibe ettiğini belirten araştırmacılar olduğu gibi (34,48,49), bu maddenin sadece enzimin hormona duyarlılığını kaldırdığını öne sürenlerde vardır (50-52). Beyin dışındaki dokularda, örnekte yağ dokusu (51) ve kalp dokusunda (58) aktiveyi arttırdığıda görülmüştür. Bu çalışmada, EGTA'nın adenilat

siklaza etkisi, Brij-58 ile çözülmüş siğır beyni enziminde incelendi ve EGTA'nın katalitik aktiviteyi inhibe ettiği gözlemlendi (8. şekil). EGTA, oldukça düşük bir derişimde (0.1 mM) bile enzimi önemli ölçüde inhibe etti (% 55). Bu inhibisyonun tersinir olduğu ve hem  $Ca^{++}$ , hem de  $Mn^{++}$  iyonları ile ortadan kaldırılabildiği de gösterildi (2. Tablo). İnkübasyon ortamına, maksimum inhibisyon gösteren derişimde EGTA ve ayrıca aynı derişimde  $Ca^{++}$  veya  $Mn^{++}$  katıldı. Her iki durumda da inhibisyon ortadan kalktı.  $Mg^{++}$  ise, yüksek bir derişimde olsa bile (9 mM) 0.1 mM'lik EGTA'nın etkisini ortadan kaldırmadı (8. şekil). Bu iyonların EGTA inhibisyonuna farklı etkileri, EGTA ile oluşturdukları komplekslerin farklı denge sabitlerinden kaynaklanabilir. EGTA'nın, beyin adenilat siklazını, az miktarda gereksindiği  $Ca^{++}$ 'u bağılı olarak inhibe ettiği görüşünü (57) ve EGTA şelatlarının denge sabitlerini göz önüne alarak bu bulguları açıklayabiliriz: EGTA- $Ca^{++}$  denge sabiti  $10^{10.9}$ , EGTA- $Mn^{++}$  denge sabiti  $10^{12.3}$ , EGTA- $Mg^{++}$  denge sabiti ise  $10^{5.21}$  olarak belirlenmiştir (45). Bu denge sabitlerinden görülebileceği gibi;  $Mn^{++}$  iyonu EGTA- $Ca^{++}$  şelatını kolayca etkileyebilirken,  $Mg^{++}$  iyonu  $Ca^{++}$  ile rekabete giremez.

EDTA'nın beyin adenilat siklazına etkisi konusunda da çelişkili bulgulara rastlanmaktadır. Bazı araştırmacılar mM EDTA'nın çözülmüş siçan beyni enzimini % 20 oranında inhibe ettiğini belirtirken (45), siğır beyni enzimi ile çalışanlar EDTA'nın hiçbir inhibitör etkisini gözlememişlerdir (48). Bu çalışmada, derişimi 1 mM olan EDTA'nın Brij-58 ile çözülmüş siğır beyni enzimini % 35 oranında inhibe ettiği görüldü (9. şekil). EDTA'nın etkisinin de EGTA'nınki gibi tersinir olduğu gözlemlendi

(2. Tablo).

EGTA 0.1 mM gibi düşük bir derişimde % 55 oranında inhibisyon gösterirken, EDTA'nın 1 mM gibi yüksek bir derişimde ancak % 35 oranında bir inhibisyon göstermesini, yine bu iki şelat yapıcının çeşitli iyonlara ilgisi açısından tartışabiliriz. Literatürden belirlediğimize göre, EGTA ve EDTA arasındaki en önemli farklılık  $Mg^{++}$  iyonuna olan ilgilidir.  $Mg - EDTA$  denge sabiti  $10^{8.69}$  iken,  $Mg - EGTA$  denge sabiti  $10^{5.21}$  dir. (45). Bu sabitlerden görüldüğü gibi,  $Mg^{++}$ ,  $EDTA - Ca^{++}$  ilişkisini etkileyebilirken, EGTA'ya bağlı  $Ca^{++}$  ile rekabete giremez. Nitekim, yüksek derişimdeki  $Mg^{++}$  (inkübasyon ortamında bulunuyor) EGTA inhibisyonunu önleyemezken, EDTA'yı belirgin şekilde etkilemektedir.

Sığır beyni adenilat siklazı için  $Ca^{++}$  'un düşük miktarlarda gerekli olduğu belirlenmiştir (57), bu çalışmada ise, dolaylı olarak EGTA inhibisyonu ile gösterildi (8. şekil). Ancak, 0.1 mM gibi düşük bir derişimde bile  $Ca^{++}$  iyonu çözülmüş sığır beyni adenilat siklazını % 15 oranında inhibe etti ve 1 mM derişimde inhibisyon % 60'a ulaştı. Literatürde de benzer sonuçlar, zara bağlı sığır beyni enzimi (34) ve zara bağlı sıçan beyni enzimi (36) ile alınmıştır.

Brij-58 ile çözülmüş sığır beyni adenilat siklazının, bu çalışmada denenen bir özelliği de, NaF ile aktivasyonu ve inhibisyonudur (5. (a,b,c,d,e) şekil). Enzimin 6 mM'a kadar NaF derişimleri ile aktive olduğu, 6 mM'dan yüksek derişimlerde ise NaF'un inhibitör gibi davrandığı gözlemlendi. Çeşitli öninkübasyon sürelerinin NaF aktivasyonunu ne şekilde etkilediği de araştırıldı.

Dört değişik öninkübasyon süresinde (20°C'da 5,10,15 dakika ve 4°C'da 30 dakika), farklı NaF derişimlerinin (2-10 mM) etkisi incelendi ve her seferinde 6 mM NaF'ün maksimum aktivasyona yol açtığı gözlemlendi (5.(a,b,c,d) şekil). Bu bulgular optimum öninkübasyon süresini belirlemek için değerlendirildiğinde bu sürenin 10 dakika olduğu görüldü (5.(e) şekil). Literatürde NaF aktivasyonu ile ilgili bulgular, bir kıyaslama yapılmasına meydan vermiyecek kadar farklı koşullar altında elde edilmiştir. NaF'ün adenilat siklazı hangi mekanizma ile aktive ettiği, bu konuda bazı görüşler olmasına rağmen, henüz kesin olarak belirlenmemiştir.

Literatürdeki ve bu çalışmadaki bulgular değerlendirildiğinde; zara bağlı enzimle çözülmüş enzimin, (30 000 g veya daha yüksek devirlerde santrifüjlenmiş ekstrelerden gelmesi fark etmeden), arada, bazı oran, derişim farklılıkları olmasına rağmen, aynı iyon ve maddelerden temelde aynı şekilde etkilendikleri görülmektedir. Zara bağlı enzimle çözülmüş enzim arasındaki en büyük farklılık, hormona duyarlılığın çözülmüş enzimde yok olmasıdır. Bu durumda, eğer Rodbell ve arkadaşlarının öne sürdüğü modelde (1. şekil) olduğu gibi, adenil siklaz enzim sistemi üç ayrı parçadan oluşmuş ise, şöyle bir görüş öne sürebiliriz : Deterjanla çözme işlemi sırasında; katalitik birimde önemli bir değişme olmazken, düzenleyici birim veya düzenleyici ve katalitik birimler arasındaki ilişkiyi sağlıyan birim, önemli ölçüde hasar görmektedir. Deterjanların, lipitlerle yer değiştirmek yolu ile etki gösteren ajanlar olduğu görüşünden yola çıkarak, şunu da söyleyebiliriz: Yapısında lipit bulundurma olasılığı, katalitik birimden ziyade ara-birim ve regülatör birim için vardır.

Ö Z E T

Adenilat siklaz siğır beyni korteksinden Brij-58 ile ekstre edildi. Ekstre 30 000 g'de santrifüjlendi ve çözülmüş enzimi içeren çökelek üstü alınarak enzimin bazı özellikleri incelendi. Enzimin saklanması ve inkübasyonu sırasında aktivitenin korunması için gerekli önlemler ve lineer tepkime hızı elde edilebilmek için gerekli koşullar saptanarak enzimin özellikleri bu koşullar altında incelendi.

$Mg^{++}$ ,  $Mn^{++}$ ,  $Ca^{++}$  iyonlarının enzim aktivitesine etkileri araştırıldı ve enzimin etkinlikle çalışabilmesi için, bu iyonlardan birinin, sübstrat derişiminden yüksek bir derişimde inkübasyon ortamında bulunması gerektiği görüldü. Enzimin  $Ca^{++}$  gereksinmesi dolaylı olarak gösterildi ve 0.1 mM'in üstüne çıkıldığında  $Ca^{++}$  'un siğır beyni adenilat siklazını inhibe ettiği gözlemlendi.

Enzimin NaF ile aktive olduğu da görüldü. Çeşitli NaF derişimleri ve öninkübasyon sürelerinin etkileri incelenerek optimum NaF derişimi ve öninkübasyon süresi belirlendi.

EGTA ve EDTA gibi şelat yapıcılarının siğır beyni adenilat siklazını farklı oranlarda inhibe ettiği gözlemlendi. Bu inhibisyonun tersinir olduğu, eş derişimde  $Mn^{++}$  ve  $Ca^{++}$  katıldığında inhibisyonun kalkması ile gösterildi.

K I S A L T M A L A R

ATP : Adenozin 5' -trifosfat

ADP : Adenozin 5' -difosfat

BSA : Sığır serum albumini

cAMP : Adenozin 3',5' - siklik monofosfat

DTT : Ditiyotreitol

EGTA : Etilenglikol-bis ( $\beta$ - aminoetileter)-  
N,N' - tetra asetik asit

EDTA : Etilendiamintetraasetik asit.

AMP : Adenozin 5' - monofosfat

CAMP - PDE' az : Adenozin 3', 5' - siklikmonofosfat  
fosfodiesteraz.

PEI - Selüloz : Polietileniminselüloz.

dbb : Dakika başına sayım.

PPO : 2,5 difenil okzazol

POPOP : 1,4 - di-2- (5- fenil okzazolil) - benzen.



K A Y N A K L A R

1. Rall, T.W., Sutherland, E.W., ve Berthet, J., J. Biol. Chem., 224, 463 (1957)
2. Sutherland, E.W., ve Rall, T.W., J. Am. Chem. Soc., 79, 3608 (1957)
3. Rall, T.W., ve Sutherland, E.W., J. Biol. Chem., 232, 1065 ( 1958)
4. Sutherland, E.W., ve Rall, T.W., J. Biol. Chem., 232, 1077 ( 1958)
5. Cook, W.H., Lipkin, D., ve Markham, R., J. Am. Chem. Soc., 79, 3067 (1957)
6. Lipkin, D., Cook, W.H., ve Markham, R., J. Am. Chem. Soc., 81, 6198 (1959)
7. Sutherland, E.W., Rall, T.W., ve Mermon, T., J. Biol. Chem., 237, 1220 (1962)
8. Rall, T.W., ve Sutherland, E.H., J. Biol. Chem., 237, 1228 (1962)
9. Murad, F., Chi, Y.M., Rall, T.W., ve Sutherland, E.W., J. Biol. Chem., 237, 1233 (1962 )
10. Klainer, L.M., Chi, Y.M., Freidberg, S.L., Rall, T.W., ve Sutherland, E.W., J. Biol. Chem., 237, 1239, (1962)
11. Sutherland, E.W., ve Rall, T.W., Pharmacological Reviews, 12, 265 (1960)
12. Perkins, J.P., "Advances in Cyclic Nucleotide Research", Greengard, P., ve Robison, G.A. (Derleyenler), Raven Pres, New York, C. 3, S. 2, (1973)

13. Robison, G.A., Butcher, R.W., ve Sutherland, E.W.,  
"Ann. Rev. of Biochemistry", 37, 149 (1968.)
14. Sutherland, E.W., Robison, G.A., ve Butcher, R.W.,  
Circulation, 37, 279 (1968.)
15. Jost, J.P., ve Rickenberg, H.V., "Annual Review of  
Biochemistry", 70, 741 (1971.)
16. Ide, M., Arch. Biochem. Biophys., 144, 262 (1971)
17. Pastan, I., ve Perlman, R., Science, 169, 339 (1970.)
18. Granner, D., Chase, L.R., Aurbach, G.D., ve Tomkins,  
G.M., Science, 162, 1018 (1968.)
19. Schimmer, B.P., Ueda, K., ve Sato, G.H., Biochem. Biophys.  
Res. Commun., 32, 806 (1968.)
20. Davoren, P.R., ve Sutherland, E.W., J. Biol. Chem.,  
238, 3016 (1963.)
21. Wolff, J., ve Jones, A.B., J. Biol. Chem., 246, 3939 (1971.)
22. de Robertis, E., Arnaiz, G.R.D.L., Alberici, M., Butcher,  
R.W., ve Sutherland, E.W., J. Biol. Chem., 242, 3487 (1967).
23. Schimmer, B.P., Ueda, K., ve Sato, G.H., Biochem. Biophys.  
Res. Commun., 32, 806 (1968.)
24. Johnson, C.B., Blecher, M., ve Giorgio, J., Biochem. Biophys.  
Res. Commun., 46, 1035 (1972.)
25. Severson, D.L., Drummand, G.I., ve Sulakhe, P.V., J. Biol.  
Chem., 247, 2949 (1972.)

26. Levey, G.S., Biochem. Biophys. Res. Commun., 38, 86 (1970)
27. Levey, G.S., Biochem. Biophys. Res. Commun., 43, 108 (1971)
28. Levey, G.S., J. Biol. Chem., 246, 7405 (1971)
29. Levey, G.S., ve Klein, I., Jour. Clin. Inves., 51, 1578 (1972)
30. Marcus, R., ve Aurbach, G.D., Biochim. Biophys. Acta ,  
242, 410 (1971)
31. Pohl, S.L., Birnbaumer, L., ve Rodbell, M., J. Biol. Chem.  
246, 1849 (1971)
32. Birnbaumer, L., Pohl, S.L., ve Rodbell, M., J. Biol. Chem.,  
246, 1857 (1971)
33. Perkins, J.P., "Advances in Cyclic Nucleotide Research",  
Greengard, P., ve Robison, G.A. (Derleyenler), Raven Press,  
New York, C.3, s.11 (1973)
34. Bradham, L.S., Biochim. Biophys. Acta, 276, 434 (1972)
35. Perkins, J.P., ve Moore, M.M., J. Biol. Chem., 246, 62 (1971)
36. Duffy, M.J., ve Powell, D., Biochim. Biophys. Acta,  
385, 275 (1975)
37. Finn, F.M., Montibeller, J.A., Ushijima, Y., ve Hofmann, K.,  
J. Biol. Chem., 250, 1186 (1975)
38. Mc Kenzie, S.G., ve Bär, H.P., Can. J. Physiol. Pharmacol.,  
51, 190 (1973)
39. Schram, M., ve Naim, E., J. Biol. Chem., 245, 3225 (1970)
40. Wolff, J., ve Cook, H., J. Biol. Chem., 250, 6897 (1975)

41. Pliego, J.A., ve Rubalcava, B., *Biochim Biophys. Res. Commun.*, 80, 609 (1978 )
42. Hegstrand , L.R., Kanof, P.D., ve Greengard, P., *Nature*, 260, 163. (1976 )
43. Welton, A.F., Lad, P.M., Newby , A.C., Yamamura, H., Nicosia, S., ve Rodbell, M., *Biochim, Biophys. Acta*, 522, 625 ( 1978 )
44. Pastan I., Pruer, W, ve Mackie, J.B., *Metabolism*, 19, 809 ( 1970 )
45. Johnson, R.A, ve Sutherland, E.W., *J. Biol. Chem.*, 248, 5114 (1973.)
46. Neer, E.J., *J. Biol. Chem.*, 253, 1498. ( 1978 )
47. Neer, E.J., *J. Biol. Chem.*, 249, 6527 ( 1974 )
48. Macdonald I.A., *Biochim. Biophys. Acta*, 397, 244 ( 1975 )
49. Bradham, L.S., Holt, D.A. ve Sims, M., *Biochim. Biophys. Acta.*, 201, 250 (1970 )
50. Bär, H.P., ve Hechter, O., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 35, 681 ( 1969 )
51. Birnbaumer, L., ve Rodbell, M., *J. Biol. Chem.*, 244, 3477 ( 1969 )
52. Bär, H.P., ve Hechter, O., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 63, 350 ( 1969 )
53. Schultz, G., " *Methods in Enzymology*", Hardman, J.G., ve O'Malley, B.W. (Derleyenler), C.38-C, S.116 (1973 )
54. Schultz, G., " *Methods in Enzymology*", Hardman, J.G., ve O'Malley, B.W. (Derleyenler), C.38-C, S.27 ( 1973 )
55. Perkins, J.P., " *Advances in Cyclic Nucleotide Research*", Greengard, P., ve Robison, G.A., (Derleyenler), Raven Press, New York, C.3, S.5 (1973 )

56. Mavier, P., ve Hanoune, J., Eur.J. Biochem., 59, 593 (1975)
57. Cheung, W.Y., Bradham, L.S., Lynch, T.J., Lin, Y.M., ve Tallant, E.A., Biochim. Biophys. Acta, 66, 1055 (1975)
58. Drummond, G.I., ve Duncan, L., J. Biol. Chem., 245, 976 (1970)
59. Sheppard, H., Nature, 228, 567 (1970)
60. Weinryb, I., ve Michel, M., Experientia, 27, 1386 (1971)
61. Stealwagen, E., Baker, B., Nature, 260, 163 (1976)
62. Schultz, G., "Methods in Enzymology", Hardman, J.G., O'Malley, B.W. (Derleyenler), C.38-C, S. 129.
63. Brostrom, C.O., Huang, Y.C., Breckenridge, B.M., ve Wolff, D.J., Proc. Natl. Acad. Sci. 72, 64 (1975)
64. Pfeuffer, J., ve Helmreich, E.J.M., J. Biol. Chem., 250, 867 (1975)
65. Oye, I., ve Sutherland, E.W., Biochim. Biophys. Acta, 127, 347 (1966)
66. Perkins, J.P., "Advances in Cyclic Nucleotide Research", Greengard, P., ve Robison, G.A., (Derleyenler), Raven Press, New York, C.3, S.26 (1973)
67. Lin, M.C., "Methods in Enzymology", Hardman, J.G., ve O'Malley, B.W. (Derleyenler), C.38-C, S.128 (1973)
68. Byefield, J.E., ve Soegerbaum, O.H., Analytical Biochemistry, 17, 434 (1966)
69. Layne, E., "Methods in Enzymology", Colowick, S.P., ve Kaplan, W.O., (Derleyenler), C.3, S.448 (1957)