

283807

T. C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ FAKÜLTESİ

SIÇAN KARACİĞERİ MİTOKONDRİSEL  
SÜKSİNİK DEHİDROGENAZININ  
ÖZELLİKLERİ

Biyokimya Programı  
DOKTORA TEZİ

PAKİZE DOĞAN

ANKARA — 1979

T. C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ FAKÜLTESİ

SIÇAN KARACİĞERİ MITOKONDRİSEL  
SÜKSİNİK DEHİDROGENAZININ  
ÖZELLİKLERİ

Biyokimya Programı  
DOKTORA TEZİ

PAKİZE DOĞAN

REHBER ÖĞRETİM ÜYESİ : Doç. Dr. KAYA EMERK

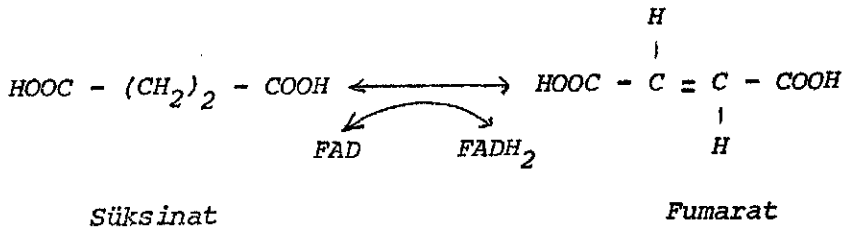
ANKARA — 1979

## İ Ç İ N D E K İ L E R

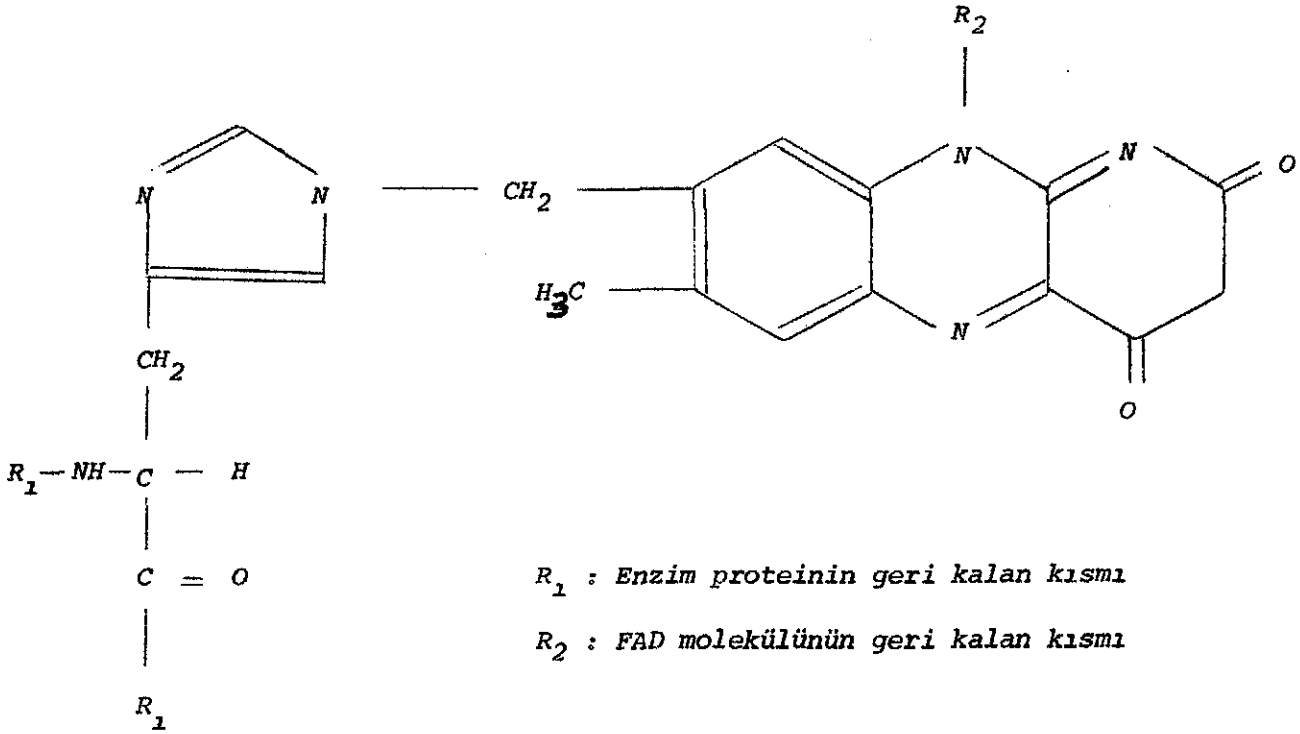
	<u>Sayfa</u>
GİRİŞ _____	1
ARAÇ GEREÇ ve YÖNTEMLER _____	6
- Aktivite Tayini _____	7
- Protein Tayini _____	7
- Jel Elektroforezi _____	8
- Affinite Kromatografisi _____	8
- Koenzim-Q İzolasyonu ve Tayini _____	10
- Flavın Adenin Dinükleotid Tayini _____	11
- Fosfolipid Tayini _____	12
- Toplam Demir Tayini _____	13
- Mitokondri İzolasyonu _____	13
- Çözünürleştirme Yöntemleri _____	13
a- Digitonin _____	14
b- Triton X-100 _____	14
c- Perklorat _____	14
d- pH Değişimi _____	14
e- n-Butanol _____	15
f- Tuzlar ve Sonikasyon _____	15
- Fosfolipid Misellerinin Hazırlanması _____	16
- Fosfolipid Aktivasyonu _____	16
- Eritrosit Zarlarının Hazırlanması _____	17
- Lipaz Aktivitesi _____	18
- Tepkime Parametrelerine Sıcaklığın Etkisi _____	18
- Elektron Mikroskopisi _____	19
BULGULAR _____	21
TARTIŞMA _____	54
ÖZET _____	62
KISALTMALAR _____	63
KAYNAKLAR _____	64

## G İ R İ Ş

Krebs' döngüsünde, mitokondrinin iç zarına en sıkı bağlı olarak bulunan enzim süksinik dehidrogenazdır (EC.1.3.99.1). Bütün canlı dokularında ve bitkilerde bulunan enzim Krebs' döngüsünde süksinatın fumarata çevrilmesinden sorumludur. Tabiatta bulunan, proteine kovalan olarak bağlı flavin taşıyan üç enzimden birisidir. Bu enzimlerden biri karaciğer mitokondrisi dış zarına bağlı olan monoamin oksidaz (1), diğeri ise chromatium sitokrom C-552'dir (2). Enzim anaerobik organizmalarda sitoplazmada, fumarat redüktaz gibi fonksiyon görür. Fakültatif anaeroblarda ise zara bağlı olarak bulunur.



Flavin adenin dinükleotid (FAD) enzime kovalan olarak histidin amino asidinden bağlanmıştır (3).



Oksidasyon redüksiyon işlemi flavin halka sisteminde olur (4).

Süksinik dehidrogenaz sığır kalbi mitokondrisinden ilk defa 1954 (5) yılında çözünür hale getirilmiş, 1970 (6)'de ise saflaştırılmıştır. 1954'den 1970 yılına kadar olan çalışmalar (7-11), enzimin çeşitli metodlarla çözünür hale getirilmesi ve saflaştırılması yönünde olmuştur. Çeşitli araştırmacıların elde etmiş oldukları preparatların saflık derecesine bağlı olarak, enzime kovalan olarak bağlı bulunan flavin miktarı nonhem demir ve labil sülfid miktarları değişik oranlarda rapor edilmiştir. Bu preparatların enzim aktivitelerinin dolayısıyla solunum zincirine elektron taşıyabilme özelliğinin de birbirinden farklı değerler taşıdığı görülmüştür. Buna bağlı olarak, moleküler ağırlık, kompozisyon, aktiviteler ve süksinik dehidrogenazın düzenleyici özellikleri hakkında büyük anlaşmazlıklar ortaya çıkmıştır (12).

Bir kısım araştırmacılar (5,7), sığır kalp kası mitokondrisi aseton tozundan alkali ortamda enzimi çözmüşler, kalsiyum fosfat jeli ve amonyum

sülfat kesitlemesiyle enzimi kısmen saflaştırmış, molekül ağırlığını 200.000, 1 mol enzim başına 1 mol flavin, 4 g-atom demir ölçmüşlerdir. Enzim bu preparatta süksinatı oksitlediği halde solunum zincirine elektronları göndere-memektedir.

Daha sonraki çalışmalarda (10) enzimin solunum zincirine elektron taşıyabilme özelliğinin korunması açısından çözünürlük işlemleri sırasında ortamda süksinatın bulunması gerektiği ileri sürülmüştür. Bu şartlarda çö-zünen enzim mg protein başına; 2.4-3.6 nmol flavin, 8.5:8.1:1 (13) oranın-da demir : sülfid : flavin içermektedir.

1959'da Ziegler ve Doeg (14,15)'in sığır kalbi mitokondrisinden ha-zırladıkları elektronları süksinattan ubikünon'a aktarabilen partiküle çö-zelti Hatefi ve arkadaşları (16,17) tarafından kompleks-II olarak tanım-lanmış ve daha önce süksinik dehidrogenaz için ileri sürülen molekül ağır-lığının (200.000) gerçekte kompleks-II ye ait bir değer olduğu gösteril-miştir. Bundan sonra yapılan çalışmalar kompleks-II den enzimin saflaştırıl-ması yönünden olmuştur (18).

Enzim en son, 1970 yılında sığır kalbi mitokondrisi aseton tozundan elde edilen kompleks-II den, koatropik ajanların yardımıyla çözünür hale getirilmiş ve saflaştırılmıştır (6,17), mg protein başına  $10.3 \pm 4$  nmol flavin bulunmuş, 1 mol enzimin 7-8 : 7-8 : 1 oranında demir : labil sülfid : flavin içerdiği, birbirinden farklı iki alt birimi ve molekül ağırlığının 100.000 olduğu ileri sürülmüştür. Alt birimlerden bir tanesi 70.000 mole-kül ağırlığında ve enzime bağlı demir, labil sülfid ve flavin taşımaktadır, ikincisi ise 30.000 molekül ağırlığındadır.

Enzimin iki ayrı grup araştırmacı tarafından bulunan sedimentasyon katsayısının farklı oluşu [9.22 S (17) ve 6.5 S (18)] enzimin çözelti

içindeki yoğunluğuna, şekline veya polimerize olmasına bağlanmaktaydı fakat polimerizasyonu önlemek amacıyla bir takım ajanların (SDS, triton X-100, 0.5 M sodyum trikloroasetat, setil dimetiletil amonyum bromide) ortama katılması sonucu aynı sedimantasyon kat sayılarının elde edilmesi ve agaroz kolonunda enzimin relatif hareketliliğinin değişmemesi konuya soru işareti getirmektedir. Buna rağmen bir takım araştırmacılar (19) enzimin çözelti içinde monomer-dimer dengesi içinde bulunduğunu ileri sürmektedirler.

Ohnishi ve arkadaşları (20)'nin yaptıkları EPR çalışmalarına göre enzim veya kompleks-II, iki demir-sülfür merkezi içermektedir. Bu bulgulara göre her iki alt birim de demir-sülfür taşımaktadırlar.

Çözünür süksinik dehidrogenaz, fenazin metasülfat (PMS) ve ferrisyanidi elektron alıcısı olarak kullanır ve süksinatı oksitler. PMS ve ubikünon konsantrasyonuna dayanarak ölçülen en yüksek değer  $38^{\circ}\text{C}$  de dakikada 1 mol enzimin 10.000 - 11.000 mol süksinatı oksitlemesidir (18,21,22). Singer ve arkadaşları (19), bozulmamış siğir kalp mitokondrisinde bu değeri 17.000 - 18.000 olarak bulmuşlardır. Bu durum enzimin çözünürlük işlemleri sırasında aktivitesinin bir kısmının kaybolduğunu göstermektedir.

Çeşitli gruplar (22,23) tarafından yapılan deneylerde enzimin  $38^{\circ}\text{C}$  deki  $K_m$  değeri 1.3 mM - 0.3 mM arasında değişmektedir.  $22^{\circ}$  -  $25^{\circ}\text{C}$  de ise bu değer 0.5 mM olarak hesaplanmıştır (19).

Süksinik dehidrogenaz; L-klorosüksinat, L-metil süksinat, D-malat ve L-malat (11), monofluorosüksinat, 2,2 difluorosüksinat (24), gibi birleşikleri oksitlemekte, D-klorosüksinat, D-metil süksinat, malonat, metilen süksinat, maleat, asetoasetat, okzaloasetat (24), ile kompetitif olarak inhibe olmaktadır. Bikarbonat, format, glikolat ve gliokzalat (25), gibi

iyonlar enzime iki yerden bağlanarak kompetitif olarak inhibe etmektedirler. Her inhibitör için  $K_D$  ve  $K_i$  değerleri değişiktir (26,27).

1967 senesinde Cerletti ve arkadaşları (29), 1977 senesinde ise Singer ve arkadaşları (28) zarların ve zar bileşenlerinin çözünür süksinik dehidrogenazı aktive ettiğini bildirmişler ve en fazla % 60 oranında bir aktivasyondan söz etmişlerdir.

Enzimin aktivasyon-deaktivasyon özelliklerinden dolayı tepkime mekanizmasına ait çalışmalar tamamlanmamıştır (27).

Bu araştırmada, süksinik dehidrogenaz sıçan karaciğerinden çeşitli metodlarla çözünür hale getirilmiş, çözülmüş enzimin kromatografik, spektrofotometrik ve fluorometrik özellikleri araştırılmıştır. Çözülmüş enzim aktivitesine fosfolipidlerin, fosfolipidlerle birlikte kolesterol ve sadece kolesterolün etkisi incelenmiş, çözülmüş ve kısmen saflaştırılmış enzimin; toplam demir, fosfolipid, flavinadenin dinükleotid, koenzim-Q miktarı tayin edilmiş ve ayrıca mitokondriden çeşitli yollarla çözülen komplekslerin özellikleri araştırılmıştır.



## ARAÇ GEREÇ ve YÖNTEMLER

Deneyleerde analitik saflıkta kimyasal maddeler kullanıldı. o-fosforiletanolamin, gliseraldehid-3-fosfat, 3-fosfogliseric asit, fosforilkolin klorid, sefalin, sfingomyelin, kolesterol, dithiyotreitol,  $\mathcal{L}$ -kimotripsin, tripsin, fenazinmetosülfat, diklorofenol indofenol, riboflavin-5'-fosfat, Sigma firmasından, Sephadex G-200, Pharmacia'dan, amonyum sülfat, süksinik asit, etilendiamin, BDH firmasından, temin edildi.

Süksinik dehidrogenaz, Hacettepe Üniversitesi Hayvan Laboratuvarından alınan normal sıçan karaciğerinden elde edildi.

Deneyleerde, Zeiss PM-Q-II spektrofotometresi Coleman (Model 6-065) kolorimetresi, Beckman (R)(Model-25) spektrofotometresi, Aminco Bowman spektrofotometresi, Dubnoff Metabolik Çalkalama inkübatörü, fraksiyon toplayıcısı (LKB 700 Ultrolag) kullanıldı.

Bütün deneyleer azot atmosferinde yapıldı. Deneyle süresince kullanılan çözeltiler, kaynatılmış ve içinden azot gazı geçirilerek soğutulmuş iyonuz su ile hazırlandı.

### A k t i v i t e T a y i n i

Süksinik dehidrogenaz (SDH) aktivitesi tayini Baginsky ve Hatefi'-(1969)(16)'nin modifiye ederek kullandıkları 2,6 diklorofenol indofenol (DCI) nin fenazin metosülfat (PMS) tarafından redüklenmesine dayanan spektrofotometrik metod ile yapılmıştır. Metodun esası ürün oluşurken açığa çıkan elektronların PMS'ı redükledikten sonra DCI'e aktarılmasına dayanmaktadır. PMS yeniden oksitlenirken, DCI devamlı olarak redüklenir ve absorbans gittikçe azalır.

Aktivite, son 88.5 mM K-PO<sub>4</sub>, pH = 7.4; 35 µM Etilen diamin tetraasetik asit; 70 µM DCI ve 275 µM PMS içeren üç ml'lik tayin karışımında ölçüldü. Enzim pH = 7.4 63 mM Sodyum Süksinat içinde 37°C de 5 dakika ön inkübasyona tabi tutuldu. Optik dansite değişimi 600 nm dalga boyunda ölçüldü.

Unite (U), 1 ml Enzim çözeltisinin 37°C deki 1 dakikada sebep olduğu optik dansite değişimi olarak tarif edildi.

Spesifik aktivite, U/mg protein olarak tarif edildi.

Sabit DCI konsantrasyonunda, değişik PMS konsantrasyonları ve sabit PMS konsantrasyonunda değişik DCI konsantrasyonlarının aktivite tayinine ( $V_{max}$  'a) etkisi incelendi.

Bütün deneyler aynı gün ve aynı tazelikte enzim kullanılarak yapıldı.

### P r o t e i n T a y i n i

Warburg (30) yöntemi kullanılarak yapıldı. Yöntem BSA (sığır plazma albumini) kullanılarak standardize edildi. Konsantre örnekler için ortamda amonyum sülfat bulunmadığı hallerde Biuret (31), daha hassas tayinler için ise Lowry (32) yöntemi kullanıldı.

## P o l i A k r i l a m i d J e l E l e k t r o f o r e z i

B.J.Davis (23)'in metoduna göre % 10 Akrilamid, 1:45 Bisakrilamid/Akrilamid içeren jellerle, Tris-glisin tamponu, pH = 8.3, olan ortamda yapıldı. Her jele 80-100 µg protein ve 3.5 miliamper akım uygulandı.

### a- Protein Boyaması

2 saat süre ile devam eden elektroforez sonunda jeller bir enjektörle, elektroforez tüplerinin içine su sıkılarak çıkartıldı. Jeller % 10 asetik asit, % 0.25 kommasi mavisi bulunan ortamda bir gece bekletilerek boyandı. Ertesi gün, % 10 asetik asitli ortamda boyanın fazlası tamamen uzaklaşmaya kadar yıkandı.

### b- Glikoprotein boyaması

Poli akrilamid jel elektroforezinden elde edilen örneklerde, Robert ve arkadaşları (34)'nın metoduna uygun olarak glikoproteinler boyandı.

## K o l o n K r o m a t o g r a f i l e r i

Çözünmüş enzim, sefadeks G-200 kolonuna uygulandı. 40 x 2.5 cm boyutlarında olan kolon 20 mM K-PO<sub>4</sub> pH = 7.4 tamponuyla dengelendi, 10 ml çözünmüş enzim kolona uygulandı, 1 ml'lik fraksiyonlar toplandı.

## A f f i n i t e K r o m a t o g r a f i s i

### Sefaroz-4B'nin Aktivasyonu (35)

Sefaroz-4B üzerine eşit hacimde, 0°C de iyonsuz su ilave edildi. 3 ml Sefaroz-4B başına 250 mg syanojen bromür eklendi; 8N NaOH ile karışımın pH sı 11'e ayarlandı, 20°C de 8-12 dakika süre ile bu pH da tutuldu. İnkübasyon sonunda 0°C, 20 mM K-PO<sub>4</sub> pH = 10.5 tamponuyla Buchner hunisinde yıkandı.

### Aktivite Edilen Sefaroz-4B'e 1,6 Diaminohekzan Bağlanması

Aktive edilmiş Sefaroz-4B'e eşit hacimde soğuk iyonsuz suda çözülmüş olan 2 m mol/ml 1,6 diaminohexkan, pH = 10.0 ilave edildi, karıştırıldı. 16 saat süre ile 4°C de bekletildi, sonra 4°C de iyonsuz su ile yıkandı.

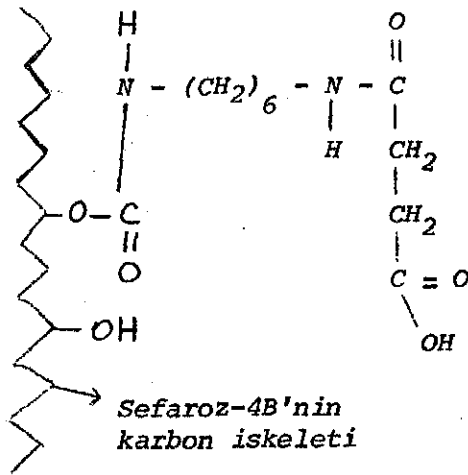
### 1,6 Diaminohekzan Tayini

1 ml 1,6 diaminohexzil sefaroze-4B, 4N HCl içinde 60°C de 45 dakika hidroliz edildi. NaOH ile nötralleştirilerek P. Cuatrecasas (35)'in metoduna göre 1,6 diaminohexkan, trinitrobenzen sulfonik asit (TNBS) ile tayin edildi.

Standard olarak 0.1 mM 1,6 diaminohexkan çözeltisi kullanıldı.

### 1,6 Diaminohekzil Sefaroz-4B'e Süksinik Anhidrid Bağlanması

Sıcaklık 4°C de sabit tutularak, 1 ml paketlenmiş Sefaroz-4B başına 1 m mol süksinik anhidrid ilave edildi. % 20 NaOH ile pH = 6 'ya ayarlandı. 4°C de 10 saat süre ile karıştırıldı.



Sodyum perklorat ekstraksiyonuyla çözünebilir hale gelen enzimin % 30 - % 50 amonyum sülfat kesiti; 0.5 ml, 0.005 mM ditiyotreitöl içeren 20 mM K-PO<sub>4</sub> pH = 7.4 tamponu içinde, aynı tamponla dengelenmiş olan affinite kolonuna uygulandı. 2.4 ml'lik fraksiyonlar toplandı. Kolon bir gece tamponla yı-

kandıktan sonra 0-0.5 M sodyum süksinat gradientine tabi tutuldu. Elde edilen her fraksiyonda aktivite ve protein tayin edildi.

### K o e n z i m - Q İ z o l a s y o n u v e T a y i n i

Mitokondri süspansiyonu ve ekstraklerde Parsons ve Basford (36)'un metoduna göre koenzim-Q tayin edildi.

İzolasyon için 10 mg protein/ml içeren mitokondri süspansiyonu 75°C de, 3 dakika ısıtıldı. Soğutulduktan sonra, 1.5 hacim sikloheksan ile 3 defa çalkalandı, ekstrakler birleştirildi. 37°C lik su banyosunda, vakum altında ekstraklar kurutuldu.

Çökelek mutlak etanol içinde çözüldü. Koenzim-Q miktarı spektrofotometrik olarak tayin edildi. 275 nm dalga boyunda çözeltinin absorpsiyonu ölçüldü. Ortama bir kaç kristal sodyum borohidrid ilave edildikten sonra redüklenen koenzim-Q nun absorpsiyonu ölçüldü, mg protein başına mol Koenzim-Q aşağıdaki formül yardımıyla hesaplandı.

mol Koenzim-Q / mg protein =

$$\left( \frac{\text{oxide-redükte}}{\Delta OD} \right)_{275 \text{ nm}} \left( \frac{\text{Toplam}}{\text{(Ekstrakt)}} \right)_{(ml)} \left( \frac{1}{142 \times 100} \right) \left( \frac{1}{863} \right) \left( \frac{1}{\text{Toplam protein}} \right)_{(mg)}$$

Not =  $\frac{\% 1}{1 \text{ cm}} = 142^{(34)}$ , Koenzim-Q nun molekül ağırlığı = 863

## Süksinik Dehidrogenaza Bağlı Flavin Adenin Dinükleotid (FAD) Tayini

Mitokondri süspansiyonu, n-butanol ekstraktı, sodyum perklorat ekstraktı, alkali ve triton X-100 ekstraktında FAD tayin edildi (37-40). Toplam 200 mg protein içeren mitokondri süspansiyonu 17.000 xg 'de, 15 dakika santrifüjlendi. Çökelek üzerine 2 ml, 0.03 M  $H_3PO_4$ , pH = 2.1 ilave edildi ve 1 saat 38°C'de çalkalanarak, inkübe edildi. Inkübasyon sonunda 0.5 N KOH ile süspansiyonun pH'sı 7.8'e ayarlandı. 20 mg  $\alpha$ -kimotripsin, 20 mg tripsin eklendi ve 4 saat 38°C'de çalkalanarak proteinler triptik sindirime tabi tutuldu.

Proteoliz, 3 dakika, 100°C de kaynatılarak durduruldu ve 17.000 xg de 15 dakika santrifüjlendi. Supernatan bir gece -20°C de bekletildi. Çözülen supernatan tekrar 17.000 xg 'de 15 dakika santrifüjlendi. 2-3 ml'lik bir fraksiyon alındı, 1 N HCl ile pH = 1'e ayarlandı ve 15 dakika 100°C de kaynatılarak proteolizden çıkan flavin peptidlerinin mononükleotid seviyeye parçalanması sağlandı. Hidrolizat 0.5 N KOH ile pH = 3.1'e ayarlandı ve ilk floresans ölçümü yapıldı ( $F_A$ ).

Çözeltinin pH 'sı 0.5 N KOH ile pH = 6.2'e ayarlandı, ölçülen floresans değeri  $F_B$  olarak tespit edildi. Ortama 1  $\mu$ g riboflavin standard olarak eklendi, floresans ölçüldü ( $F_S$ ). Hidrolizata 2 mg sodyum ditiyonit eklendikten sonra tekrar floresans ölçüldü ( $F_D$ ). Ölçülen değerler dilusyon için düzeltildi ( $F_B'$ ,  $F_S'$ ,  $F_D'$ ).

pH = 6.2'de flavin peptidleri floresans vermemektedirler (40). pH = 3.1'de ise; pH = 6.2'de riboflavinin gösterdiği floresansın % 85'i kadar bir floresans verirler (41).

Gram protein başına düşen FAD aşağıdaki formülle hesaplandı.

$$\mu\text{g FAD/g protein} = \left( \frac{1 \text{ (}\mu\text{g eklenen)}}{\text{Riboflavin}} \right) \left( \frac{F_A - F_B'}{F_S' - F_B'} \right) \times \frac{100}{85}$$
$$\times \frac{1000}{\text{Toplam protein (gr)}} \times \frac{\text{Proteolizden elde edilen supernatan hacmi (ml)}}{\text{Floresansı ölçülen fraksiyon hacmi (ml)}}$$

### F o s f o l i p i d T a y i n i

Mitokondri süspansiyonunda ve çeşitli ekstraktlerdeki fosfolipid miktarı, inorganik fosfat üzerinden tayin edildi (42).

250 mM sukroz içeren, 50 mM Tris-HCl pH = 7.4 tamponuyla mitokondri-ler 17.000 xg'de 15 dakika santrifüjlenerek 3 defa yıkandı. Böylece inorganik fosfatdan arındırılmış mitokondri süspansiyonu kullanılarak n-butanol, sodyum perklorat, alkali ve triton x-100 ekstraktları hazırlandı.

### Fosfolipidlerin Ekstraksiyonu

0.4 ml örnek üzerine 19.6 ml mutlak etanol-dietileter 1:1 (v/v) karışımı eklendi, tüplerin ağzı kapatıldıktan sonra 5 dakika vortekslendi, 10 dakika bekletildi, tekrar vortekslendi ve 700 xg'de 15 dakika santrifüjlenerek çöken proteinler atıldı. Lipid ekstraktın 5 ml'si kaynar su banyosunda kurutuldu. Lipid çökelek üzerine 0.4 ml % 70 perklorik asit, 2.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1/9) karışımı eklendi, bek alevinde çalkalayarak hidrolizat tamamen renksiz ve berrak bir hal alıncaya kadar yakıldı, oda sıcaklığında soğutuldu ve iyonsuz su ile 10 ml hacme tamamlandı.

Standartlar, 100 µg inorganik fosfat içeren çözeltiden, örneklerle aynı yöntem ve deney şartları altında hazırlandı. Deney körü ve tayin körü de ayrı ayrı hazırlandı.

Inorganik fosfat spektrofotometrik olarak tayin edildi (43).

#### Toplam Demir Tayini

Ekstraktardaki toplam demir tayini King, Nickel ve Jensen (44)'in kalp kası ve mitokondrilerine uyguladıkları metodun modifikasyonu ile gerçekleştirildi.

1 ml ekstrakt, 1 ml konsantre sülfürik asit ve 3 damla % 30 luk hidrojen peroksit ile yakıldı. % 28 lik sodyum hidroksit ile nötralleştirildi, o-fenantrolin ve hidrokinon ile renklendirildi. Deney körü ve tayin körü ayrı ayrı hazırlandı.

#### Mitokondri Süspansiyonunun Hazırlanışı

Dekapitasyon ile öldürülen sıçanlardan alınan karaciğer buz içinde muhafaza edilerek tartıldı. Makasla ufak parçalara bölündü, yağ ve bağ dokusu ayıklandıktan sonra 1 kısım doku, 3 kısım 20 mM K-PO<sub>4</sub> pH = 7.4, 10 mM sodyum süksinat pH = 7.4, ve 250 mM sukroz içeren tampon içinde cam-teflon homojenizatörde parçalandı. 4 kat gazlı bezden süzüldü.

Süspansiyon, 1200 xg 'de 15 dakika süre ile santrifüjlendi, böylece hücrelerin parçalanmamış zar, çekirdek gibi kısımları uzaklaştırıldı. Süpernatant 27.000 xg'de 15 dakika santrifüjlenerek mitokondriler elde edildi (45). Mitokondri çökeleği 3 defa tampon ile yıkandı. İlk hacmin 1/4'ü kadar bir hacimde 20 mM K-PO<sub>4</sub> pH = 7.4 tamponu ile süspansiyon haline getirildi. Küçük fraksiyonlar halinde -20°C de dondurularak saklandı.

#### Çözünürleştirme Yöntemleri

Süksinik dehidrogenaz, mitokondri süspansiyonundan başlıca beş metod ile çözünür hale getirildi.



1. Metod : Digitonin Ekstraksiyonu

10 mg protein başına değişen miktarlarda Digitonin mitokondri süspansiyonuna eklendi. 0°C de değişik sürelerde inkübe edilerek 27.000 xg'de santrifüjlendi. Süpernatantda aktivite ve protein tayin edildi.

2. Metod : Triton x-100 Ekstraksiyonu

Süksinik dehidrogenazın çözümlenmesi ilk defa tarafımızdan uygulanan Triton X-100 ile gerçekleştirildi.

30-40 mg/ml protein içeren mitokondri süspansiyonu, 50 mM sodyum-süksinat pH = 7.4 tamponu ve % 1.5 oranında triton X-100 bulunan ortamda 37°C de, 4 saat, azot atmosferinde, Dubnof metabolik çalkalama cihazında inkübe edildi.

İnkübasyon sonunda 27.000 xg'de 15 dakika santrifüjlenerek süpernatant'ta enzim elde edildi.

3. Metod : NaClO<sub>4</sub> Ekstraksiyonu

Davis ve Hafezi (17)'nin geliştirdikleri metodla enzim çözümlenme halde elde edildi. Son konsantrasyonu 12 mg protein/ml olacak şekilde mitokondri süspansiyonu, 20 mM sodyum-süksinat, 5 mM dithiyoreitol içeren 50 mM tris-HCl pH = 8.0 tamponu içinde seyreltildi. Süspansiyona son konsantrasyonu 0.4 N NaClO<sub>4</sub> olacak şekilde 6.2 N NaClO<sub>4</sub> eklenerek buz banyosunda, azot atmosferinde 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda enzim çözümlenmesi 4°C de 80 dakika süre ile 27.000 xg'de santrifüjlendi. Enzim süpernatant'ta elde edildi.

4. Metod : Alkali Ekstraksiyonu (46)

40 mg/ml protein içeren mitokondri süspansiyonu, 50 mM sodyum süksinat

sinat pH = 7.4 bulunan ortamda 0°C de 1 saat inkübe edildi. Inkübasyon sonunda 1 N NaOH ile süspansiyon pH = 10.1'e ayarlandı, derhal 0.5 N HCl ile pH = 7.4'e düşürüldü ve 4°C de 15 dakika 27.000 xg'de santrifüjlendi. Çözünmüş enzim süpernatanda elde edildi.

#### 5. Metod : n-butanol Ekstraksiyonu (47)

40 mg/ml protein içeren mitokondri süspansiyonu, 100 mM sodyum-süksinat pH = 7.4 (v/v) karıştırıldı. Azot atmosferinde, 4°C de 12 saat bekletildi. Inkübasyon sonunda -20°C de n-butanol ile 1/5 oranda karıştırılarak 20 dakika 0°C de inkübe edildi. Çözelti 1.500 xg'de 15 dakika santrifüjlenerek, açık sarı sulu fazda aktivite takip edildi.

Yukarıdaki metodlardan başka çeşitli tuzların ve deterjanların enzimi çözünür hale getirmesi için çalışıldı. Bu amaçla 5 mM okzalik asit, laktat, fumarat, sitrat, etilendiamintetraasetik asit, trikarbalillat ve sodyum klorür bulunan ortamda, pH = 7.4'de mitokondri süspansiyonu her tuz ile ayrı ayrı 0°C ve 37°C de değişik sürelerde çalkalanarak inkübe edildi. Her iki inkübasyon şartında da % kayıp ve % çözülme hesaplandı.

Enzimi çözünürleştirmek amacıyla çeşitli deterjanlar, triton DF-12, triton N-101, triton QS-15, triton CF-54 ve brij-35 SP kullanıldı. 30-40 mg/ml protein içeren mitokondri süspansiyonu 50 mM sodyum-süksinat bulunan ortamda 37°C de, 4 saat çalkalanarak 17.000 xg'de 15 dakika santrifüjlendi. % çözülme ve % kayıp hesaplandı.

#### Sonikasyon İşlemiyle Enzimin Çözünürleştirilmesi

60 Hz'de, 5 dakika süre ile sonifikasyona tabi tutulan stok mitokondri çözeltisi, 15 dakika 27.000 xg'de santrifüjlendikten sonra süpernatanda aktivite takip edildi.

### Fosfolipid Miseli Hazırlanması

3 hacim kloroform, 1 hacim etilalkol karışımında lesitin (10 mg/ml), sfingomyelin (5 mg/ml), fosforilkolin klorid (5 mg/ml) ve kolesterol (10 mg/ml) çözeltileri hazırlandı.

Bu stok çözeltilerden 0.1 ml lesitin, 0.1 ml sfingomyelin, 0.02 ml fosforilkolin klorid, 0.02 ml kolesterol, bir tüpe pipetlendi. Azot atmosferi altında vortekslenerek kurutuldu. Üzerine uygun tampon çözeltisi ilave edilerek 5 ile 20 dakika vortekslendi. Bazı deneylerde bu karışım buz banyosu içinde, 2 dakika süre ile 100 Watt'da sonifiye edildi.

### Süksinik Dehidrogenaz'ın Fosfolipidlerle İnkübasyonu

Mitokondri zarından n-butanol ekstraksiyonu ile çözünür hale getirilmiş ve böylece kısmen saflaştırılmış enzim üzerine fosfolipidlerin etkileri incelendi. Bu amaçla çözünür enzim ile fosfolipidler 37°C de inkübe edildi.

Fosfolipid miselleri ortamda bulunması istenen konsantrasyonun iki katı yüksek konsantrasyonda 37°C de, 20 mM K-PO<sub>4</sub> pH = 7.4 tamponu içinde 5 dakika vortekslenerek hazırlandı.

Optimum fosfolipid konsantrasyonunu tayin edebilmek için çeşitli konsantrasyonlarda (0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4 mg/ml) fosfolipidler çözünür enzim üzerine (v/v) eklendikten sonra 37°C lik su banyosunda inkübe edildi. İnkübasyon sırasında 0, 30, 60, 90 ve 120 ci dakikalarda örnekler alınarak PMS-DCI spektrofotometrik metoduyla enzim aktivitesi izlendi.

Her konsantrasyondaki fosfolipidler için, 0 ıncı dakikadaki  $\Delta OD_{600 \text{ nm}}/\text{dakika}$  değişimi % 100 enzim aktivitesi olarak kabul edildi.

Kontrol deney olarak, çözülmüş enzim 20 mM K-PO<sub>4</sub> pH = 7.4 tamponu ile (v/v) sulandırıldı ve 37°C de inkübe edildi. İnkübasyon süresince 0, 30, 60, 90 ve 120 ci dakikalarda örnekler alınarak enzim aktivitesi tayin edildi.

#### Çözülmüş Süksinik Dehidrogenaz'ın Fosfolipidlerle Birlikte Koenzim-Q ile İnkübasyonu

Hazırlanan fosfolipid miselinden son konsantrasyonlar 25 µg/ml lesitin, 12.5 µg/ml sefalin, 2.5 µg/ml fosforil kolin klorid, 5 µg/ml kolesterol olacak şekilde ön inkübasyon sürecinde enzime katıldı. 5 dakika 37°C de süksinatlı ortamda inkübasyondan sonra aktivite tayini yapıldı.

Sıçan karaciğer mitokondrisinden saflaştırılan koenzim-Q, son  $1 \times 10^{-2}$  µmol olacak şekilde ön inkübasyon sürecinde enzime katıldı ve aktivite tayini yapıldı.

Yukarıda bildirilen oranlarda fosfolipid karışımı ve koenzim-Q birlikte ön inkübasyon sürecinde enzime katıldı ve aktivite tayin edildi.

#### Eritrosit Zarlarınınin (ghost) Hazırlanması (48)

Hacettepe Üniversitesi Kan Bankası'ndan alınan kullanma süresi dolmamış asit-sitrat dekstroz içinde bulunan kanın eritrositleri üç defa izotonik sodyum klorür ile 4°C de 700 xg'de santrifüjlenerek yıkandı. Toplanan eritrosit çökeleği ilk hacminin 14 katı kadar bir hacimde 20 mM tris-HCl pH = 7.5, 0.1 mM etilendiamin tetraasetikasit bulunan ortamda hemoliz edildi. 4°C de 25.000 xg'de 10 dakika santrifügasyondan sonra toplanan zarlar iki defa yukarıdaki tamponla, iki defa 10 mM tris-HCl pH = 7.5 olan tamponla yıkandı. -20°C de dondurularak saklandı.

### Eritrosit Ghost'u Süksinik Dehidrogenaz Kompleksinin Hazırlanması

Alkali ekstraksiyonu ile çözünürleştirilmiş enzim ağırlıkça 1/3 oranında eritrosit ghost'u çözeltisi ile (v/v) karıştırılarak 10 dakika, azot atmosferinde, 37°C de inkübe edildi. İnkübasyon karışımı 29.000 xg'de 15 dakika santrifüjlenerek supernatanda aktivite ve protein tayin edildi. Çökelek ise üç defa 20 mM K-PO<sub>4</sub> pH = 7.4 tamponu ile yıkandı. İlk hacme tampon ile sulandırıldı, aktivite ve protein tayin edildi.

### Lipaz (Tip I) Aktivitesi Tayini (49)

Süstrat çözeltisi olarak 10 ml 0.02 M Sodyum asetat, 5 ml Triasetin, 1 ml 0.02 % fenilred, 9 ml iyonsuz su, karışımı hazırlandı. 2 mg lipaz tip I/ml içeren çözeltinin 1 ml'si ile 5 ml süstrat çözeltisi 37°C de 20 dakika süre ile inkübe edildi. İnkübasyonun başlangıcında ve sonunda, çözelti 0.02 N NaOH kullanılarak titre edildi. 1 ml 0.02 N NaOH'ın 100 lipaz ünitesine eşit olduğundan giderek 1 dakikada 37°C de 2.82 ünite hesaplandı.

### Çözünürleştirilmiş Enzimin Lipaz (Tip I) ile İnkübasyonu

Digitonin ile çözünürleştirilen enzim üzerine 1/10 (w/w) oranında lipaz (tip I) katıldı. 37°C de, azot atmosferinde inkübe edildi. 0, 15, 30, 45 ve 60 ıncı dakikalarda alınan örneklerde aktivite tayin edildi.

### Tepkime Parametrelerine Sıcaklığın Etkisi

n-butanol ve alkali ekstraksiyonları ile çözünürleştirilen enzim örnekleri kullanıldı. Ön inkübasyon ve tayin değişik sıcaklıklarda yürütülerek V<sub>max</sub> 'ın 1/T ile değişimi incelendi. Aynı deneyler fosfolipid karışımı içeren ortamda tekrarlandı. İlk hız olarak optik dansite değişiminin doğru-

sal olduğu toplam sübstratın % 10'undan azının tepkimeye girdiği bölgelerdeki hız kullanıldı.

## E l e k t r o n M i k r o s k o p i s i

### Gridlerin Kaplanması

İzoamilasetat içinde çözünen % 2 lik kollodyon çözeltisinden birkaç damla pastör pipeti ile içinde su bulunan petri kutusuna damlatıldı. Su yüzeyinde dağılan kollodyon ince şeffaf bir zar oluşturunca bakır gridler üzerine dikkatle yerleştirildi. Bir süzgeç kağıdı gridlerin üzerine kapatılarak su yüzeyinden kağıt üzerine üst yüzleri kollodyon ile kaplanan gridler alındı. Oda sıcaklığında 24 saat bekletilerek kurutuldu.

Son konsantrasyonları 25 µg/ml lesitin, 12.5 µg/ml sefalin, 2.5 µg/ml fosforil kolin klorid, 5 µg/ml kolesterol olan kloroform-metanol karışımı vortekslenerek azot atmosferinde kurutuldu. 0.5 mg/ml protein içeren 2 ml çözünmüş enzim kurutulan fosfolipidlerin üzerine pipetlenerek 4°C, 20 dakika süre ile azot atmosferinde vortekslendi.

### % 4 Fosfotungustik Asit ile Lipozomlarda Protein Boyaması (50)

Yukarda anlatılan şekilde hazırlanan lipozomlardan bir damla kollodyon ile kaplı grid üzerine damlatıldı, 3 dakika çökmeleri için beklendi, fazlası kağıt ile emildi. Üzerine 1 damla % 4 fosfotungustik asit damlatıldı, 5 dakika beklendikten sonra süzgeç kağıdı ile fazlası emildi, iyon-suz su ile yıkandı ve infrared lambası ile kurutularak elektron mikroskopunda incelendi.

### Lipozomlarda Enzim Aktivitesi Boyaması

18 mM sodyum-süksinat, 65 mM K-fosfat pH = 7.4, 3 mM sodyum-sitrat,

3 mM bakır sülfat, 5 mM potasyum ferrisyanid bulunan ortamdan, grid üzerine daha önce tatbik edilmiş olan fosfolipid miseli-enzim kompleksi üzerine 1 damla damlatıldı. 5 dakika bekletildikten sonra, fazlası emildi, 1 damla iyonsuz su ile yıkanarak infrared lambası ile kurutuldu ve elektron mikroskopunda incelendi (51).

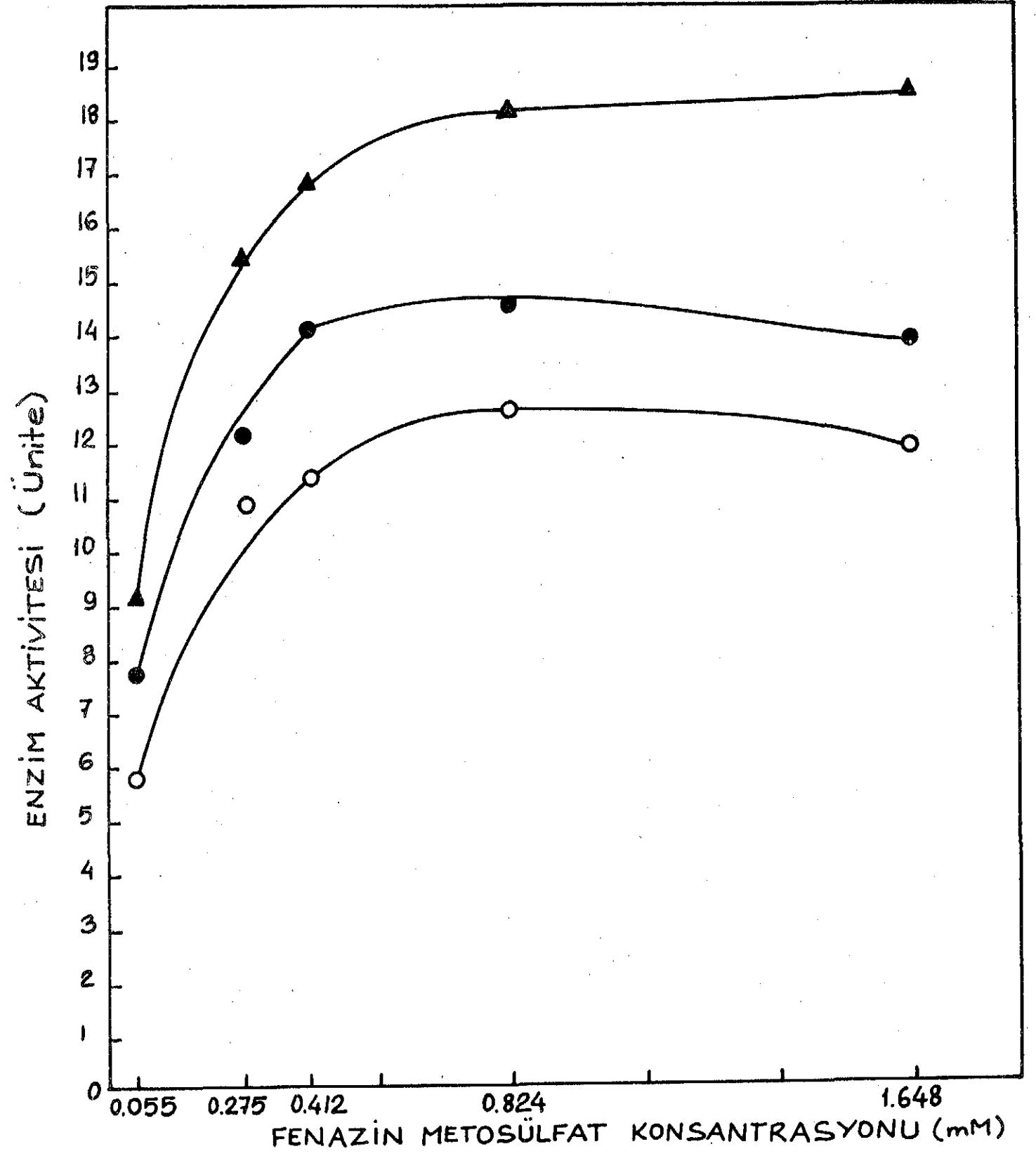
## B U L G U L A R

Enzim aktivitesinin tayininde 2,6-diklorofenol indofenol'ün fenazin metasülfat aracılığıyla redüksiyonu sonucu 600 nm dalga boyunda absorpsiyon azalışı kullanıldı. Yapay boyaların aktivite tayinine etkisi Şekil 1 de görülmektedir. Değişik enzim konsantrasyonlarında tayin stoki-yometrisi iki ayrı PMS konsantrasyonunda denendi (Şekil 2). Tayin şartla-rında geniş bir PMS konsantrasyonu aralığında enzim konsantrasyonuna bağımlılığın lineer olduğu gözlemlendi.

Değişik zamanlarda literatürde son derece dayanıksız ve tekrarlanamayan sonuçlar veren (22,23) bir enzim olarak rapor edilen süksinik dehidrogenazın aktivitesinin değişik dilusyonlarda stokiyometrik olarak tayin edilebilmesi için dilusyona bağlı inaktivasyonun aktivite tayin sistemlerindeki etkisi araştırıldı ve sonuçlar Şekil 3 de gösterildi. Aynı enzim preparatından farklı dilusyonlar yapıldı ve 32 kat dilusyona kadar enzim aktivitesinin lineer olduğu gözlemlendi.

Şekil 4 de değişik sıcaklıklarda enzimin dayanıklılığı görülmektedir. 45°C de 5 dakikada enzim, aktivitesinin % 20 sini kaybetmektedir.

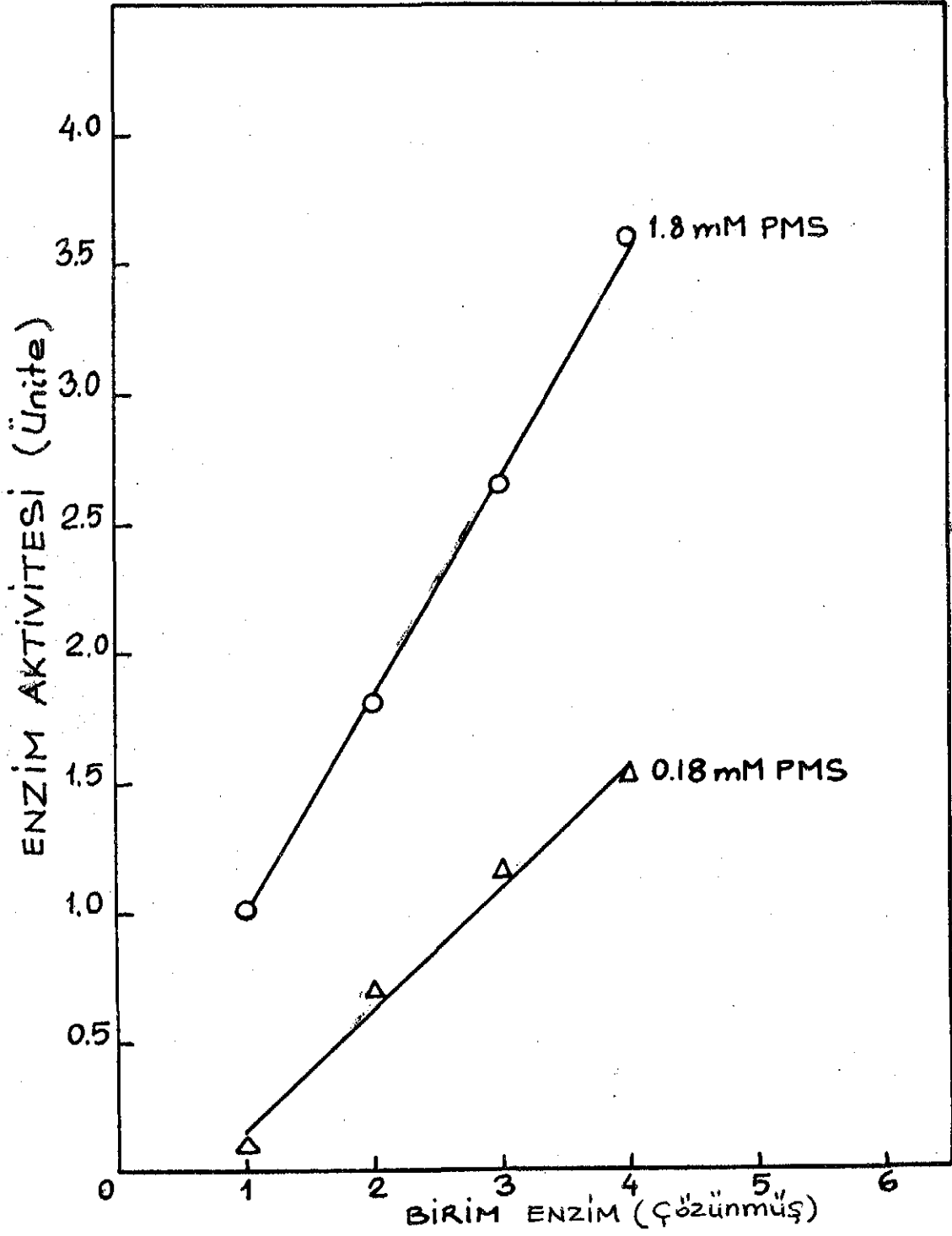




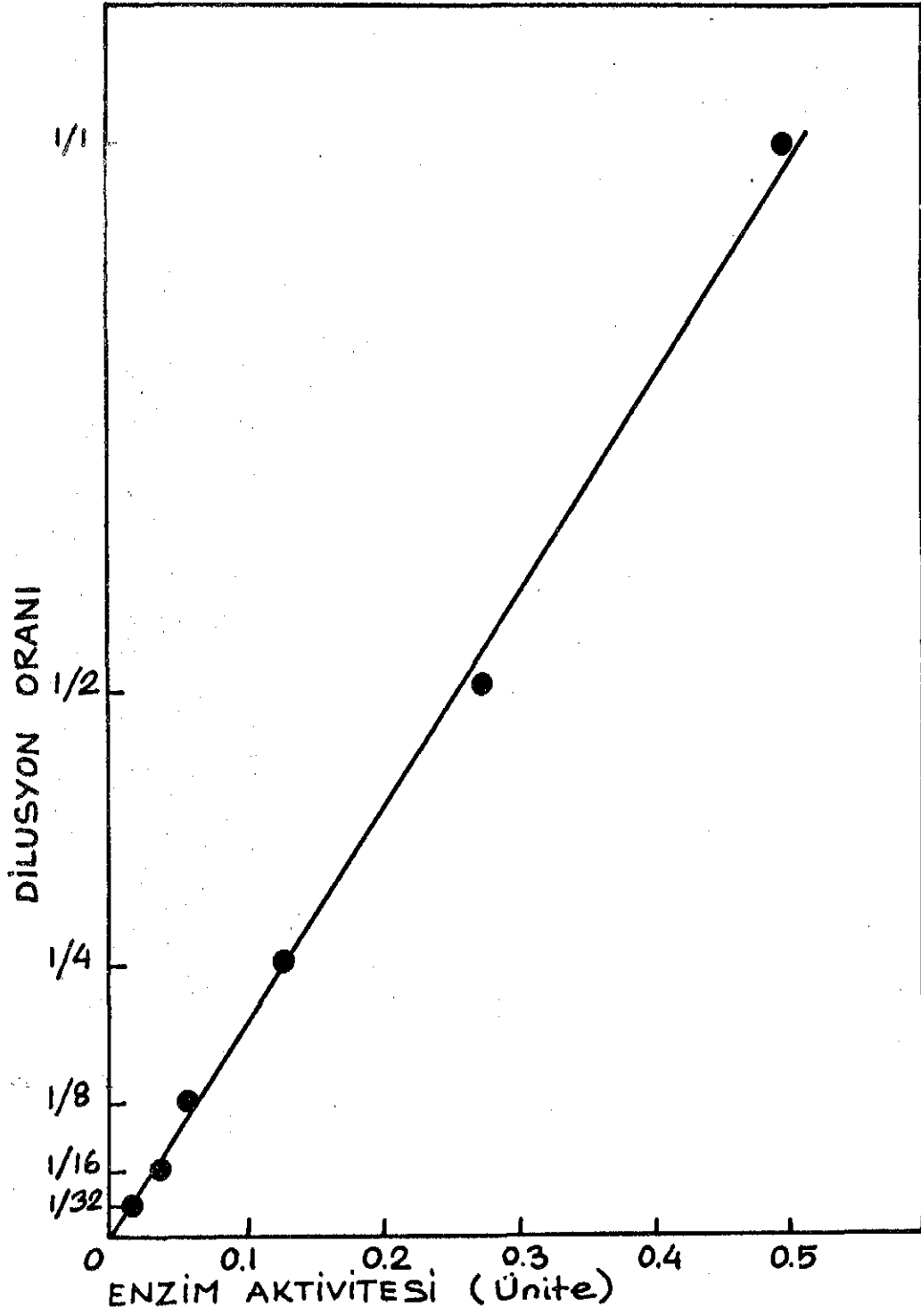
ŞEKİL 1 : Değişen DCI konantrasyonlarında aktivitenin PMS konantrasyonuna bağımlılığı. Tayin ortamı yöntemlerde verilmiştir.

(o) 34.9 µM DCI, (●) 46.6 µM DCI,

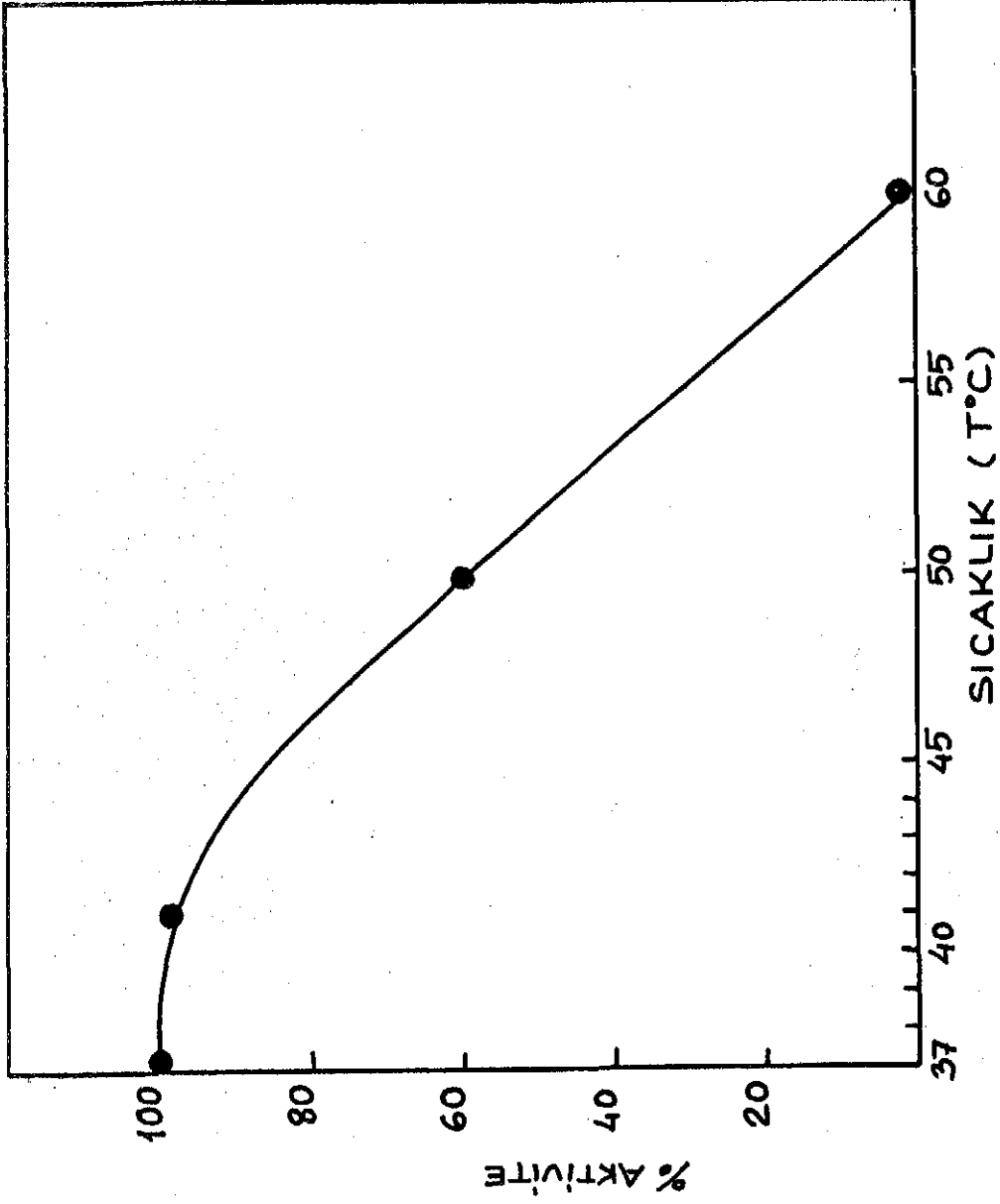
(▲) 70 ve 93.3 µM DCI



ŞEKİL 2 : Değişik PMS konsantrasyonlarında aktivitenin enzim konsantrasyonuna bağımlılığı. Tayin ortamı yöntemlerde verilmiştir. DCI konsantrasyonu 70  $\mu$ M dir.  
( $\Delta$ ) 0.18 mM PMS, (o) 1.8 mM PMS



ŞEKİL 3 : Değişik dilusyonların enzim aktivitesine etkisi. Dilusyonlar stok enzim çözeltisinden 0°C de 20 mM K-PO<sub>4</sub> pH = 7.4 çözeltisi ile yapıldı. Her tayin için eş hacim enzim çözeltisi kullanıldı. Tayin ortamı yöntemlerde verilmiştir.



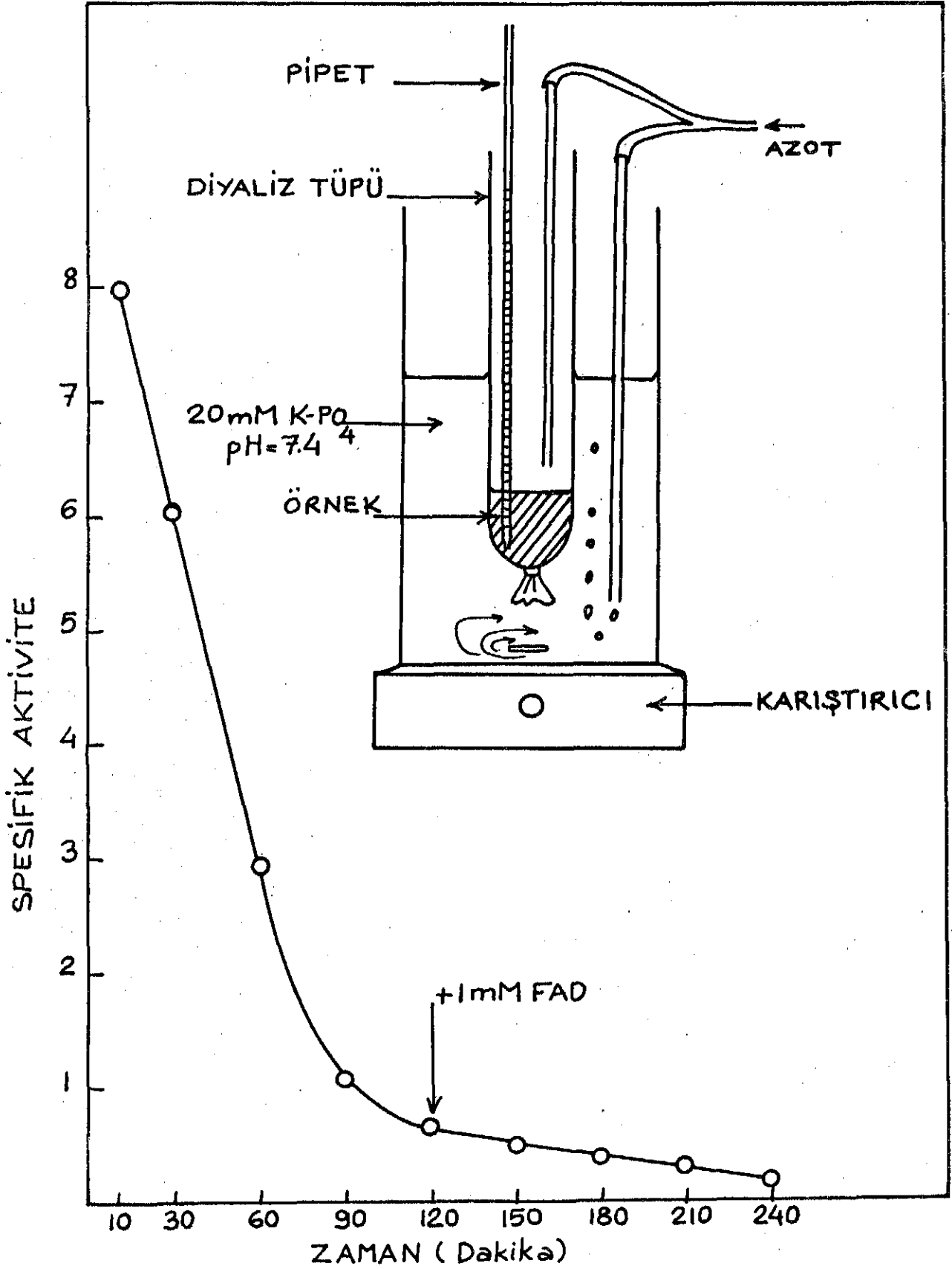
ŞEKİL 4 : Değişik sıcaklıklarda süksinik dehidrogenazın dayanıklılığı. Digitonin ile çözündürülmüş enzim 2.5 mg/ml protein konsantrasyonunda, şekilde belirtilen sıcaklıklarda 5 dakika süre ile ısıtıldı. Soğuk tayan ortamı içine dilue edildi ve aktivite bakıldı. Aktivite sonuçları 3 ayrı deneyin ortalamasıdır.

Gerek sıcaklık dayanıklılığı gerekse soğukta yürütülen işlemler sonucu çok miktarda aktivite kaybı enzimin reaktivasyonu denenmesi şartını ortaya koydu. Bu amaçla daha önce enzim aktif merkezinde bulunduğu belirtilen -SH gruplarının korunması (15), kofaktörü olan FAD'nin dışardan ilavesi ve enzim aktivitesinde önemli rolü olduğu bilinen demir sülfür proteinlerinin rejenerasyonu ile enzim reaktivasyonuna çalışıldı. -SH gruplarını korumak için 2-merkaptoetanol (2 ME) ve dithioeritritol (DTT) ile inkübasyon demir sülfür proteinlerinin rejenerasyonu için demir-2-amonyum sülfat ve sodyum sülfid karışımı (4 mM : 4 mM), FAD'nin rejenerasyonu için açık dializde dışardan değişik oranlarda FAD katılması denendi.

2 ME ve DTT'nin yapay boyalarla aktivite tayinini bozduğu ve DCI'i nonenzimatik redüklediği tespit edildi. Ferrous sülfat ve demir sülfür rejenerasyonunda ortamda bol miktarda demir sülfür çöktü. Bu sebeplerden her iki tip rejenerasyon için gerçekleştirilen inkübasyondan sonra enzim örnekleri 10x0.5 cm boyutlarında void hacmi 2.5 cm<sup>3</sup> olan bir sefadeks G-25 kolonunda yukarıda adı geçen birleşiklerden uzaklaştırıldı.

Aktif eluatlarda gerek dönüşüm katsayısı (Turnover number) gerekse spesifik aktivite açısından bir artma gözlenmedi. Ayrıca bu preparatlar sıcaklık dayanımı açısından da natif enzimden farklı değildi.

FAD'nin etkisini incelemek üzere yukarıda açıklanan şekilde regenerate edilmeğe çalışılmış preparatlar azot atmosferinde açık dialize tabi tutuldu (Şekil 5) ve değişik zaman aralıklarında alınan örneklerde aktivite tayin edildi (Şekil 5). İki saat sonunda enzim çözeltisine son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde FAD katıldı. Ayrıca aktivite tayinleri 1 mM FAD içeren ortamlarda tekrarlandı. Bu şartlarda enzim aktivitesinde bir rejenerasyon gözlenmedi.



ŞEKİL 5 : FAD'nin enzim aktivitesine etkisi. 2.4 mg/ml protein konsantrasyonunda enzim çözeltisi ve 20 mM, pH = 7.4, K-PO<sub>4</sub> tamponu kullanıldı. Aktivite tayini 1 mM FAD içeren ve içermeyen ortamlarda yapıldı. Aktivite sonuçları 3 ayrı deneyin ortalamasıdır.

Enzimin mitokondri zarında çözünürleştirilmesi için çok sayıda değişik yöntem denendi. Tablo I de değişik digitonin/protein oranlarında ve değişik sıcaklıklarda inkübasyon sonucu çözünürleştirilen süksinik dehidrogenazın spesifik aktiviteleri görülmektedir. En uygun çözünme şartı olarak 2.5 mg digitonin/10 mg protein, 37°C ve 120 dakikalık inkübasyon süresi seçilmiştir. Bu şartlarda yaklaşık olarak 3 kez bir saflaşma (spesifik aktivite artışı) gözlenmiştir.

Yukarıdaki şartlarda ekstraksiyon sonucu elde edilen çökelek aynı şartlarda ikinci kez ekstraksiyona uğratıldığında görünürde daha yüksek aktiviteler, fakat çok düşük total üniteler elde edilmiştir.

Bir diğer çözünürleştirme yöntemi olarak deterjanlar kullanıldığında en uygun deterjan olarak Triton X-100 seçilmiştir.

50 mM sodyum-süksinat içeren ortamda deterjanların değişik konsantrasyonları ve değişik sıcaklık ve inkübasyon süreleri denenmiştir. Tablo II de, kullanılan deterjanların çözülmeye etkileri gösterilmiştir. Çözünme şartlarınının saptanmasında uygulanan yöntemlere bir örnek Triton X-100 için Şekil 6 da gösterilmiştir.

Üçüncü bir çözünürleştirme yöntemi olarak Davis ve Hatefi (17)'nin perklorat ekstraksiyonu kullanılmıştır. Bu yöntemle çözünürleştirilen enzim değişik DTT konsantrasyonlarında amonyum sülfat kesitlemesine tabi tutulmuştur. 50 µm DTT içeren ortamda amonyum sülfat konsantrasyonuna bağımlılık Şekil 7 de gösterilmiştir.

DTT konsantrasyonunun 10 katı artışı aynı spesifik aktiviteyi elde edebilmek için amonyum sülfat konsantrasyonunun % 2 ile %4 lük artışını gerektirmiştir.

ZAMAN (Dakika)	mg DIGITONIN / 10 mg Protein				
	1.5	2.0	2.5	3.0	5.0
20	—	—	0.307	0.324	0.229
40	0.250	0.205	0.350	0.382	0.337
80	0.137	0.227	0.290	—	—
120	0.167	0.324	0.340	—	—
	0.509 <sup>x</sup>	—	0.721 <sup>x</sup>	0.715 <sup>x</sup>	0.670 <sup>x</sup>

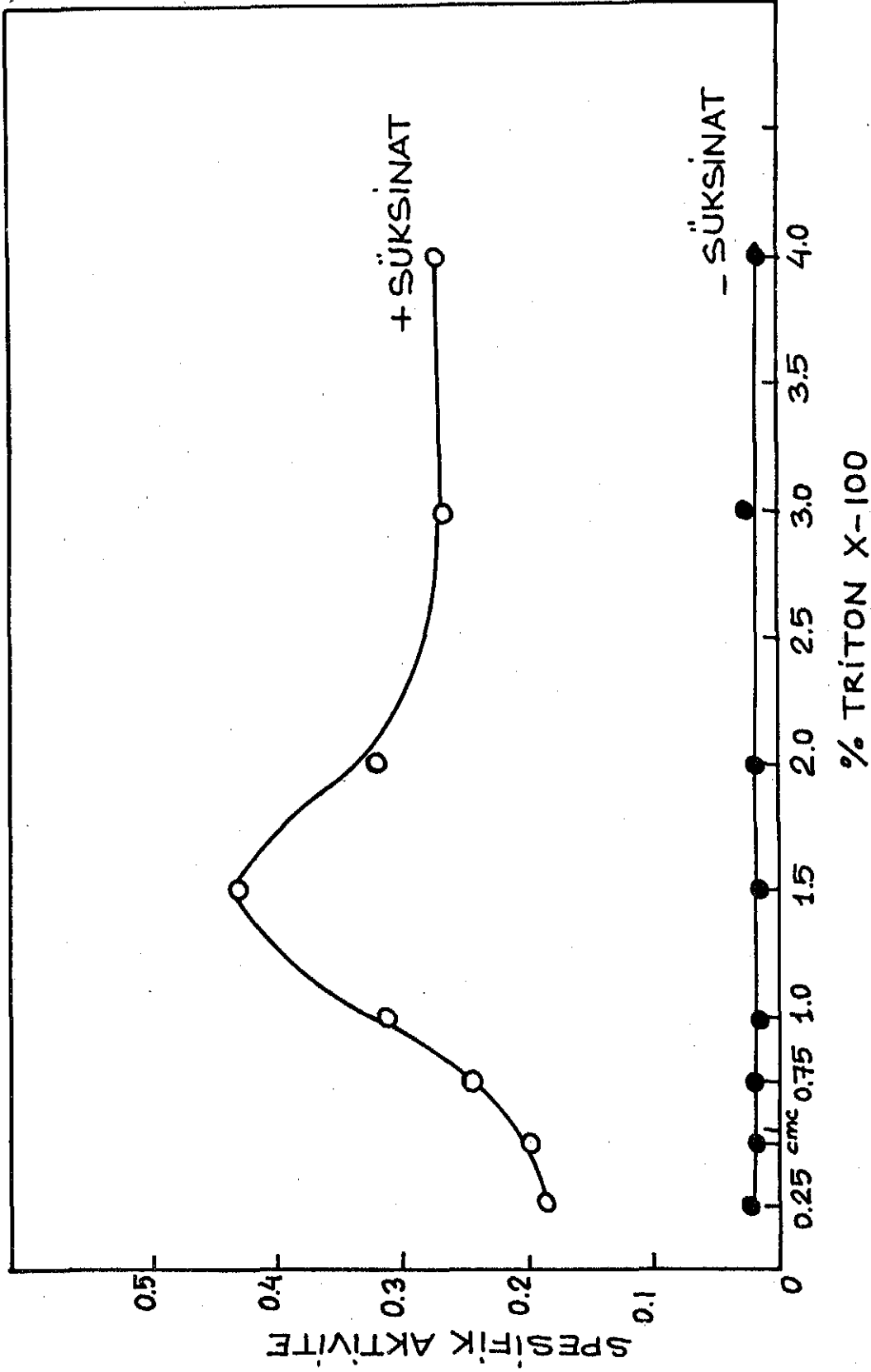
TABLO I : Çeşitli sıcaklıklarda, değişen digitonin miktarlarında çözünen süksinik dehidrogenazın spesifik aktivite değerleri.

<sup>x</sup> 37°C de inkübe edilen çözeltililerdeki spesifik aktivite değerleri.

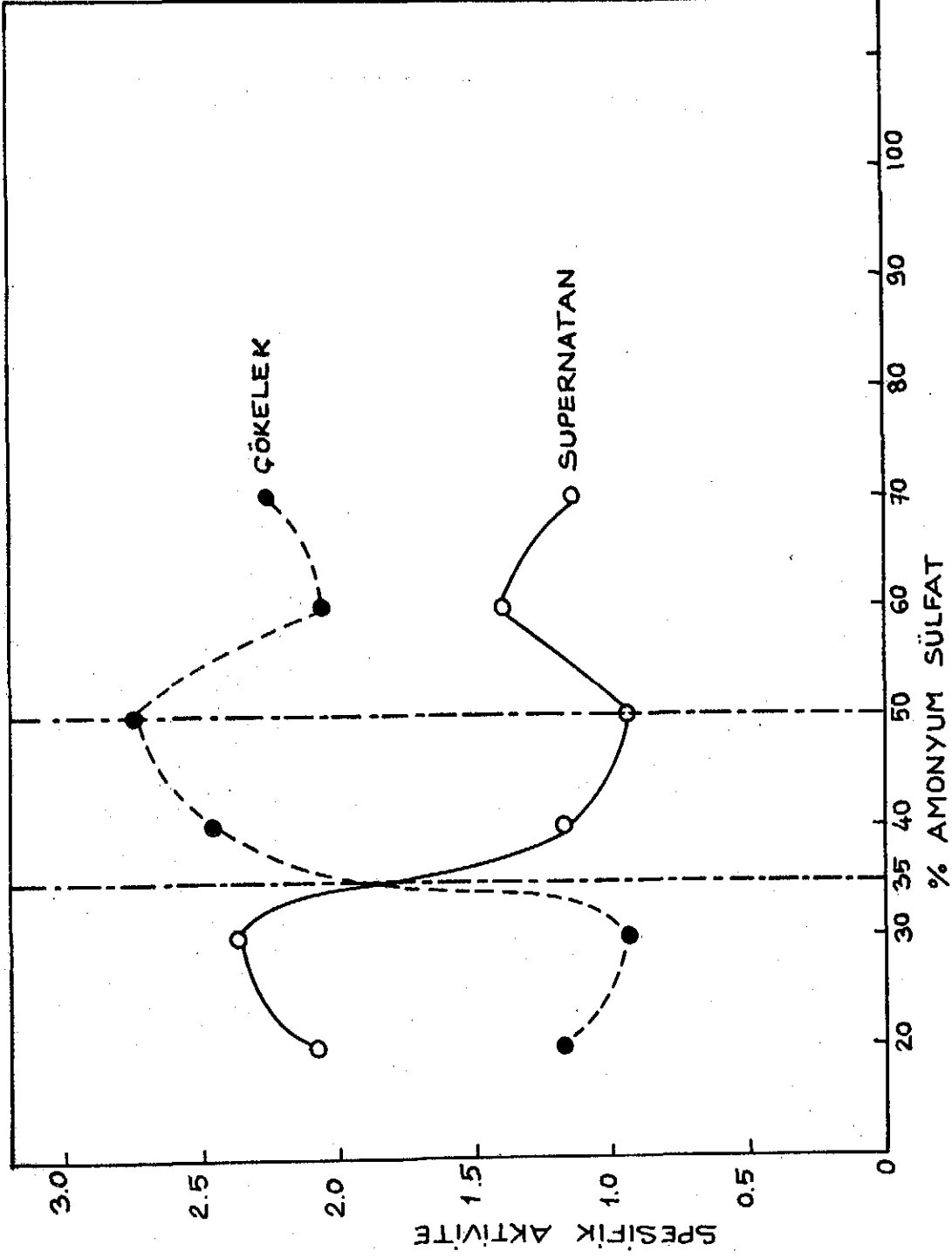


	Spesifik Aktivite	Saflaşma Oranı	Turn Over Sayısı
Mitokondri	0.276	1	2628
Çözünürlükte kullanılan deterjan	0.435	1.570	4141
	Triton X-100		
Triton CF-54	0.258	0.934	2457
Triton DF-12	0.193	0.701	1842
Triton N-101	0.471	1.706	4490
Brij 35-SP	0.244	0.885	2328

TABLO II : Çeşitli deterjanların, süksinik dehidrogenazı mitokondri zarından çözünürlükle elde edilen spesifik aktivite ve saflaşma oranları. Turn Over Sayısı : 37°C de, mol Oksitlenen Süksinat / mol Enzim / dakika.



ŞEKİL 6 : Değişik deterjan konsantrasyonlarının SDH' in çözünürlüğüne etkisi.  
 21.5 mg/ml protein içeren mitokondri süspansiyonu 50 mM Na-süksinat  
 bulunduran pH = 7.4 ortamda 37°C de 4 saat süre ile değişik triton  
 X-100 konsantrasyonlarında çalkalanarak inkübe edildi. 4°C da 27.000  
 xg'de, 15 dakika süre ile santrifüjlendi.  
 CMC : Kritik misel konsantr.



ŞEKİL 7 : Perklorat ekstraksiyonu ile çözündürleştirilmiş süksinik dehidrogenazın amonyum sülfat kesitlenmesi. Spesifik aktivitesi 1.04 olan sodyum perklorat ekstraksiyonu süpernatını değişik amonyum sülfat doyumluklarına getirildi. Çökelek ve süpernatanda aktivite ve protein tayin edildi.

- (●) Amonyum sülfat çökeleği
- (○) A.S. Süpernatanı

Süksinik dehidrogenaz mitokondri zarından alkali ekstraksiyonu ile de çözünürleştirilmiştir. Literatürde değişik araştırmacıların bir saat süre ile pH = 9.8 ile pH = 10.5 da inkübe ederek çözünürleştirdiklerini bildirdikleri enzim (46) bizim şartlarımızda bu süre içinde büyük ölçüde inaktive olmuştur. Bu sebepten ekstraksiyon yöntemlerinde bildirildiği şekilde modifiye edilmiş ve % 60 verimle enzim çözünürleştirilmiştir.

Bir diğer çözünürleştirme yöntemi olarak n-butanol kullanılmış ve enzim % 37 verimle mitokondri zarından çözünmüştür (47).

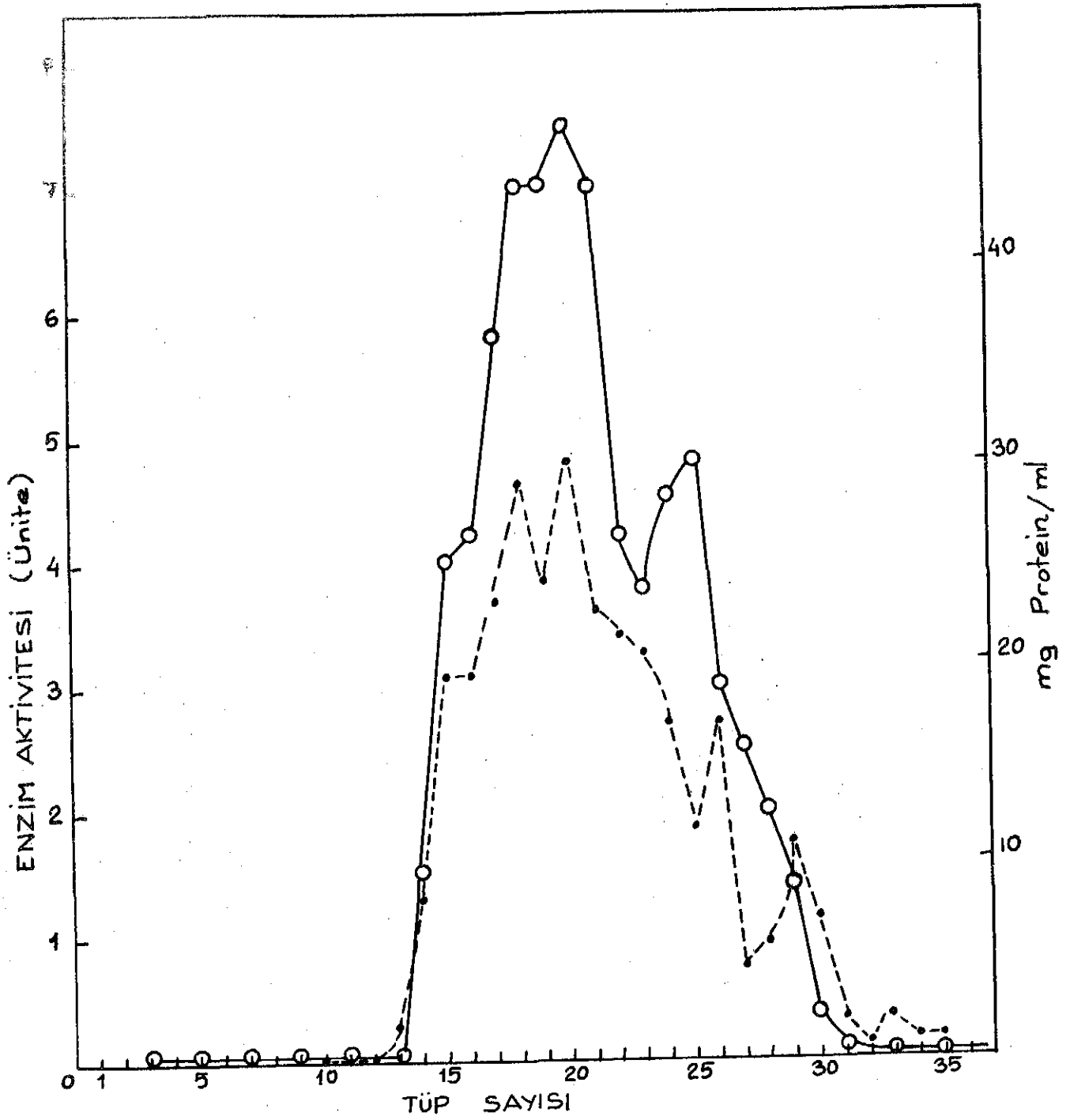
Değişik tuzlar ve sonikasyonda çözünürleştirme yöntemi olarak denenmiştir. Yukarıda açıklanan yöntemler ile çözünürleştirilen enzim preparatının bazı özellikleri Tablo III de görülmektedir.

Digitonin ile çözünürleştirilmiş enzimin Sefadex G-200 elusyon profili Şekil 8 de görülmektedir. Aktivitenin tümü kolonun boş hacminde (void volume) % 90 verimle elde edilmiştir. En yüksek spesifik aktiviteyi içeren fraksiyonlar (tüp 15-26) toplanarak daha ileri saflaştırma elde etmek amacıyla değişik iyon değiştiricilere uygulanmıştır. Karboksimetil seluloz (CM-C) dietilaminoetil seluloz (DEAE), alumina, bentonit, kalsiyum fosfat jeli gibi iyon değiştirici ve adsorblayıcılar kullanıldığında gerek sübstratlı, gerekse sübstratsız ortamlarda kolonlardan iyon şiddeti ve pH değiştirerek enzimi elue etmek mümkün olmamıştır.

Enzimi saflaştırmak amacıyla süksinillenmiş diaminohekzil sefaroza kullanılmıştır. Hazırlanan diaminohekzil sefaroza asit hidrolize tabi tutularak 3.5 µMol/ml jele diaminohekzan katıldığı saptanmış ve 1x30 cm boyutlarında kolonda gerçekleştirilen affinite kromatografisi sonuçları Şekil 9 da görülmektedir. Kolona uygulanan proteinin % 92 si A, B ve C fraksiyonlarında geriye alınmıştır.

<i>Çözünme Yöntemi</i>	<i>% Kayıp</i>	<i>% Çözülme</i>	<i>Spesifik Aktivite</i>	<i>Turn Over Sayısı</i>
<i>Digitonin Ekstraksiyonu</i> <i>2.5 mg/10 mg protein</i> <i>37°C, 120 dk. (n = 8)</i>	12.6	52.5	0.721	6866
<i>NaClO<sub>4</sub> Ekstraksiyonu % 35-50</i> <i>Amonyum sülfat kesiti (n = 7)</i>	29.0	46.0	1.040	9904
<i>Alkali Ekstraktı</i> <i>pH = 10.1-7.4 arası (n = 7)</i>	14.1	59.5	0.329	3133
<i>n-Butanol Ekstraktı</i> <i>1:5, v/v (n = 6)</i>	54.0	37.0	0.680	6476
<i>% 1.5, 37°C de 4 saat</i>				
<i>Triton X-100 (n = 6)</i>	21.5	74.0	0.435	4141
<i>Triton CF-54 (n = 2)</i>	77.3	22.7	0.258	2457
<i>Triton DF-12 (n = 2)</i>	73.3	26.7	0.193	1842
<i>Triton N-101 (n = 2)</i>	53.3	46.7	0.471	4490
<i>Brij-35 SP (n = 2)</i>	73.5	26.5	0.244	2328
<i>5 mM, 5 dak. 0°C de</i>				
<i>Okzaloasetik asit (n = 2)</i>	62.6	0	0	0
<i>Laktat (n = 2)</i>	55.5	2.5	0.193	1835
<i>Fumarat (n = 2)</i>	71.0	0	0	0
<i>Sitrat (n = 2)</i>	59.6	2.5	0.152	1435
<i>EDTA (n = 2)</i>	40.5	3.0	0.270	2565
<i>Trikarballilat (n = 2)</i>	50.6	1.2	0.084	400
<i>0.15 M NaCl (n = 1)</i>	45.0	6.8	0.075	716
<i>0.50 M NaCl (n = 1)</i>	47.0	7.8	0.081	772
<i>1.00 M NaCl (n = 1)</i>	48.0	6.9	0.058	553
<i>1.50 M NaCl (n = 1)</i>	56.0	11.4	0.096	915
<i>2.00 M NaCl (n = 1)</i>	72.0	13.7	0.115	1095
<i>Sonikasyon (n = 2)</i>	20.0	46.0	0.100	952

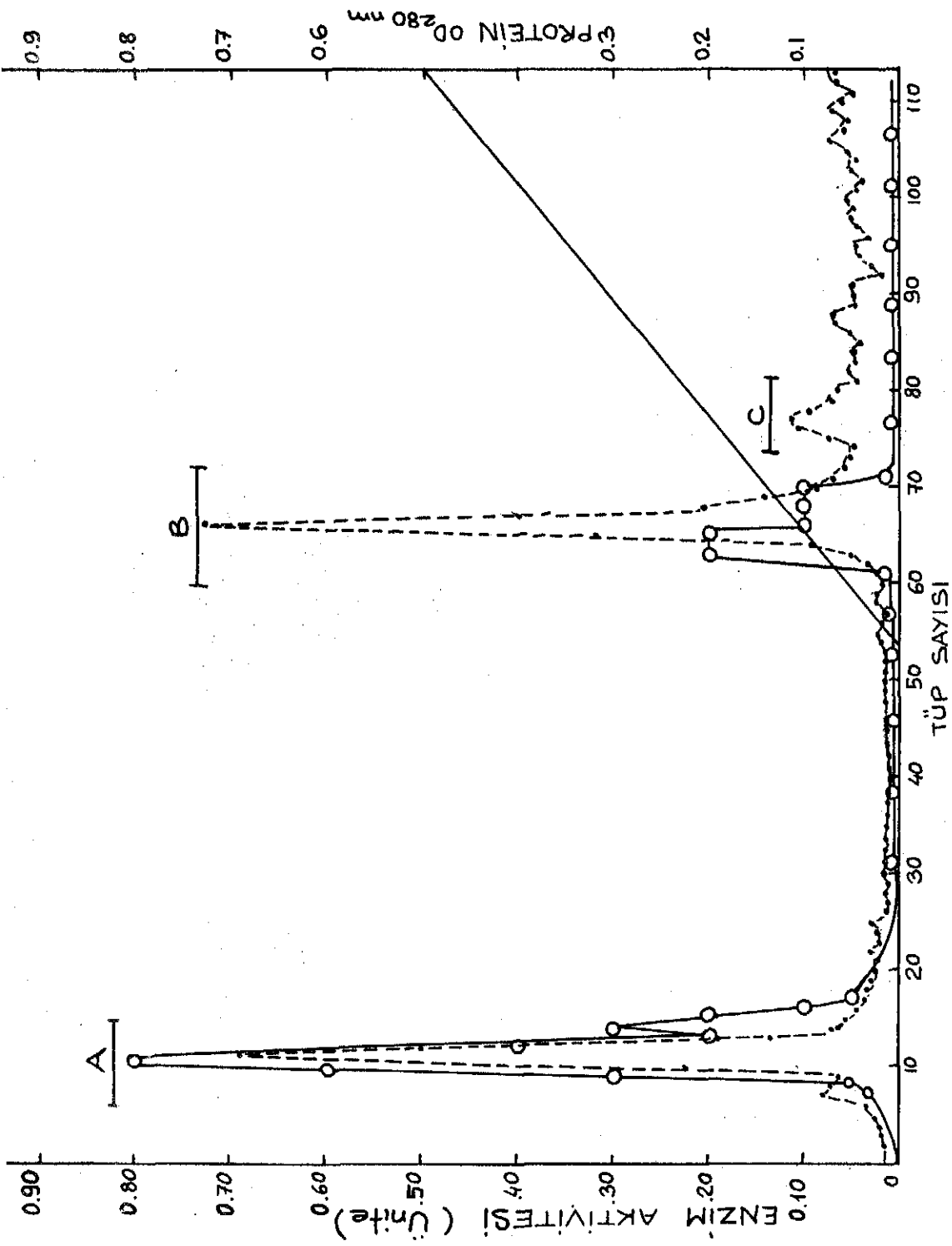
**TABLO III : Çeşitli çözünme yöntemlerine göre elde edilen % çö-  
zülme, % kayıp, spesifik aktivite ve turn over sayıları  
(n = deney sayısı).**



SEKİL 8 : Süksinik dehidrogenazın sefadeks G-200 kolonundan elusyonu. 2.5 x 40 cm boyutlarında kolon 20 mM K-PO<sub>4</sub> pH = 7.4 tamponu ile dengelendi. 10 ml enzim uygulandı. 3'er ml'lik fraksiyonlar toplandı.

(●) mg protein/ml, 280 nm okuması

(○) Enzim aktivitesi,  $\Delta OD_{600 \text{ nm}} / \text{ml} / \text{dakika}$



SEKİL 9 : Süksinik dehidrogenazın affinite kolonundan elusyonu.  
 1x30 cm boyutlarında kolon 20 mM K-P04 pH = 7.4 tamponu ile dengelendi.  
 2 ml NaClO<sub>4</sub> ekstraktının % 35-50 amonyum sülfat kesiti kolona uygulan-  
 di. 2.4 ml'lik fraksiyonlar toplandı. 54-115 numaralı tüpler arasında  
 0-500 mM sodyum süksinat pH = 7.4 gradieni uygulandı.

(●) mg protein/ml, 280 nm okuması.

(○) Enzim aktivitesi,  $\Delta OD_{600}$  nm / ml / dakika.

A : 7-15 numaralı tüplerin toplamı

B : 61-72 " " " "

C : 73-81 " " " "

Bu fraksiyonlarda yapılan aktivite tayinleri, A'nın total aktivitenin % 7.5 'unu, B'nin total aktivitenin % 3.5'ünü içerdiğini ortaya koymuştur. C fraksiyonunda ise aktivite bulunamamıştır. Bu fraksiyonlardan hazırlanan karışımların aktiviteleri Tablo IV de görülmektedir. Ayrıca bu fraksiyonlara 4 mm : 4 mm demir-2-amonyum sülfat ve sodyum sülfat karışımı, 100 mM FAD katılması aktivite artışına neden olmamıştır.

Süksinat gradieni ile elde edilen profil (B ve C fraksiyonları) sodyum klorür gradieni ile de (0-500 mM) elde edildi. Bu tip elusyonlarda B fraksiyonunda aktivite elde edilemedi. Ayrıca B ve C fraksiyonları daha yüksek iyon şiddetinde elue edilebildi.

Değişik yöntemlerle çözünürleştirilmiş enzimin, tripsin- $\alpha$  kimo-tripsin ile proteolize uğratılmış enzimin ve proteolizden sonra pH = 1 de 100°C da 15 dakika hidroliz edilmiş enzimin görünür bölgedeki absorpsiyon spektrumları alındı. Süksinik dehidrogenaza özgül 440 nm 'daki absorpsiyon proteoliz ve hidrolizden sonra gözlendi. Natif preparatlarda ise 410 nm dalga boyunda bariz bir absorpsiyon gözlendi (Şekil 10; A,B,C,D). FAD kofaktörünün 440 nm dalga boyundaki özgül absorpsiyonu natif enzimde 410 nm'de gözlenmektedir. 555 nm dalga boyundaki absorpsiyon tepesi ise proteoliz ve hidrolizden etkilenmemektedir. Yine Şekil 10 da ortama fosfolipid misellerinin katılmasından sonra görünür bölgedeki absorpsiyon spektrumu gösterilmiştir. Gerek absorpsiyon maksimalarında gerekse absorpsiyon şiddetlerinde bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 10 (---) ).

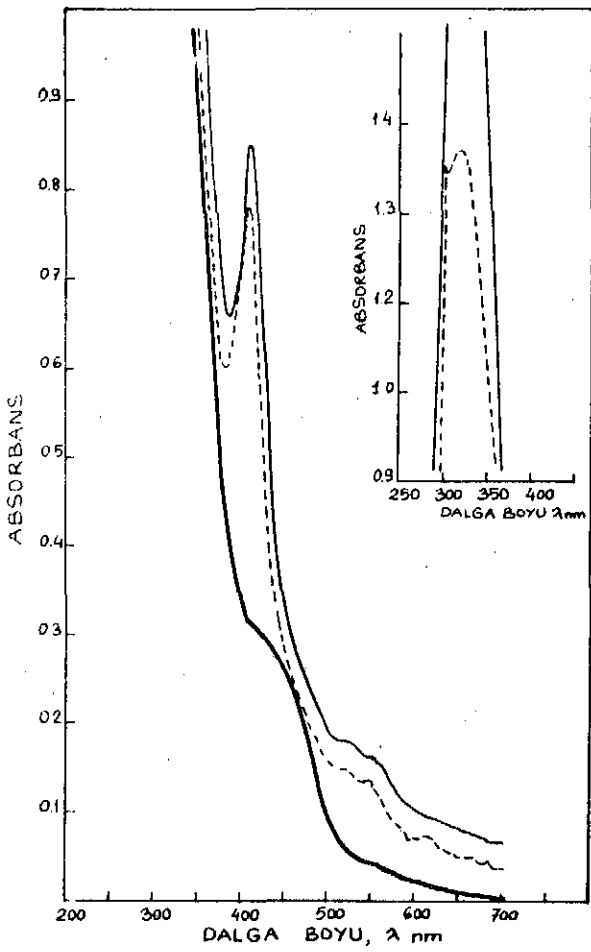
Değişik yöntemlerle çözünürleştirilmiş enzimin floresans spektrumları 275 nm ve 375 nm dalga boyunda eksite edilip çekildiğinde bütün ekstraksiyonlar için 350 nm dalga boyunda kuvvetli bir floresans 520 ve 675 nm dalga boylarında ise zayıf iki floresans tepesi gözlendi. 520 nm dalga boyundaki floresans tepesi, 375 nm dalga boyunda eksite edilerek yaklaşık



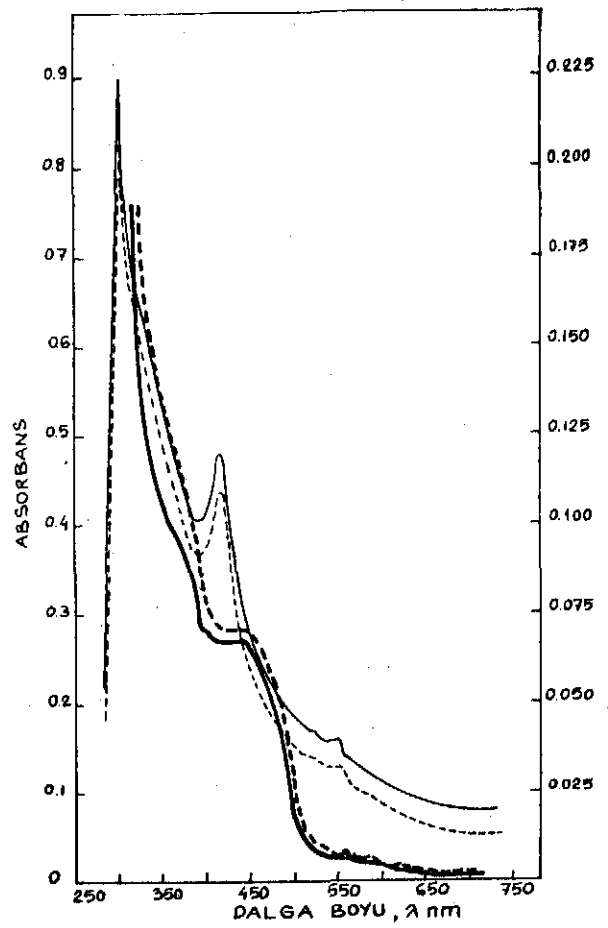
FRAKSİYON	% AKTİVİTE
A .....	7.5
B .....	3.5
C .....	0.0
A+B .....	14.0
A+C .....	7.5
A+B+C .....	14.0
A+B+Fosfolipid <sup>x</sup> .....	28.0

TABLO IV : Affinite kolonundan elde edilen çeşitli fraksiyonların ve bu fraksiyonlardan hazırlanan karışımları % aktivite değerleri.

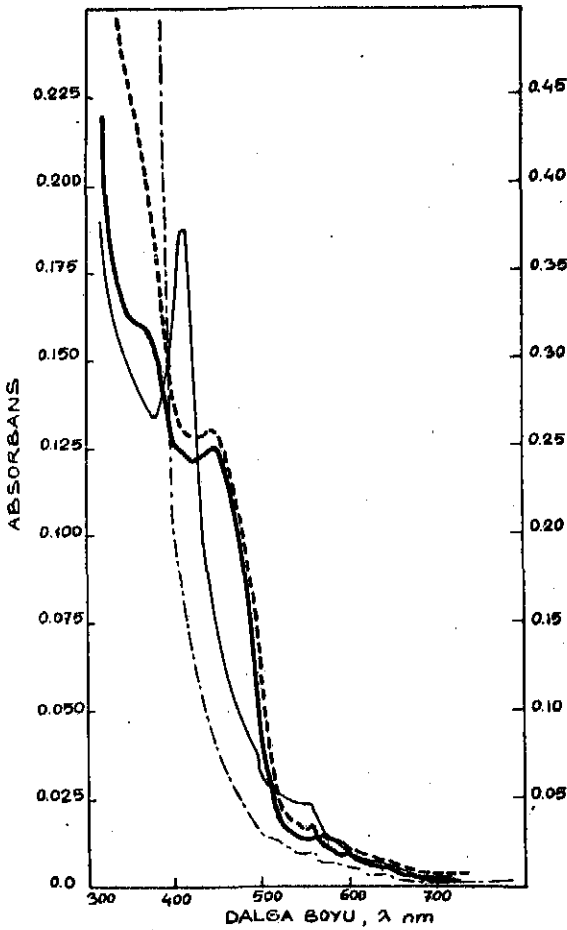
<sup>x</sup> Fosfolipid miselleri gereç ve yöntemlerde anlatıldığı şekilde hazırlanmış ve eş hacimde deney ortamına katılarak 37°C de 30 dakika azot atmosferinde inkübe edilmiştir.



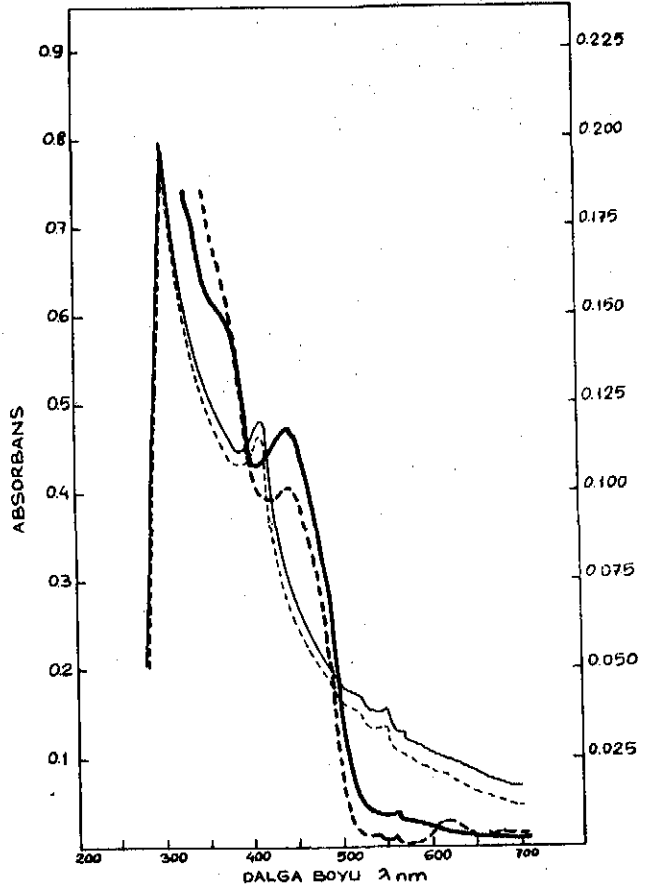
SEKİL 10 A : Triton X-100 ekstraktının absorpsiyon spektrumları; (—) Triton X-100 ekstraktı, (---) Yöntemlerde anlatılan şekilde ortama fosfolipid eklenmesinden sonraki absorpsiyon spektrumu, (—) ekstraktın tırtıkli sındırma sonrası absorpsiyon spektrumu, 250-400 nm dalga boyları arasındaki absorpsiyon sağ üst köşede verilmiştir.



SEKİL 10 B : NaClO<sub>4</sub> ekstraktının absorpsiyon spektrumları; (—) NaClO<sub>4</sub> ekstraktının absorpsiyon spektrumu, (---) Fosfolipid misellerinin ortama eklenmesiyle elde edilen spektrum, (—) Ekstraktın tırtıkli sındırma sonrası absorpsiyon spektrumu, (—) tırtıkli sındırma sonrası enzim çözeltisinin pH = 1'de 15 dakika 100°C'de hidrolizlendikten sonraki absorpsiyon spektrumu.



SEKİL 10 C : Alkali ekstraktının absorpsiyon spektrumları; (—) Alkali ekstraktı, (---) Ekstraktın tırtıkli sındırma sonrası absorpsiyon spektrumu, (—) Tırtıkli sındırma sonrası enzim çözeltisinin pH = 1'de 100°C'de 15 dakika süre ile hidrolizlendikten sonra elde edilen spektrum, (---) Ortama 2 mg Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> eklenmesiyle redukleme sonrası enzim absorpsiyon spektrumu.



SEKİL 10 D : n-Butanol ekstraktının absorpsiyon spektrumları; (—) n-Butanol ekstraktı, (---) ortama fosfolipid eklenmesiyle elde edilen absorpsiyon spektrumu, (—) Tırtıkli sındırma sonrası n-Butanol ekstraktının absorpsiyon spektrumu, (—) Tırtıkli sındırma sonrası enzim çözeltisinin pH = 1'de 15 dakika süre ile hidrolizlendikten sonraki absorpsiyon spektrumu (Sol iki spektrum için şeklin sağ tarafında bulunan absorpsiyon eksenli geçerlidir).

5-10 kez kuvvetlendirilebildi (Tablo V). Aynı spektrumlar fosfolipid micsellerinin (lipozom) bulunduğu ortamda çekildiğinde 350 nm dalga boyundaki floresans tepeciği % 20-30 oranında baskılandı. 520 ve 675 nm dalga boyundaki floresans emisyonu ise lipozomlardan etkilenmedi. Yapılan kontrol deneyleri seyreltme ile floresans emisyonunun stokiyometrik olduğunu, lipozomların ise bu dalga boylarında bir floresans emisyonu vermediğini ortaya koydu. Örnek bir floresans spektrumu ve lipozomların etkisi Şekil 11 de görülmektedir. Bu sonuçlar alkali ekstraksiyonu, perklorat ekstraksiyonu ve n-Butanol ekstraksiyonu için geçerlidir. Triton X-100 kullanılarak yapılan çözünürleştirmede lipozomların floresans spektrumuna bariz bir etkisi gözlenememiştir.

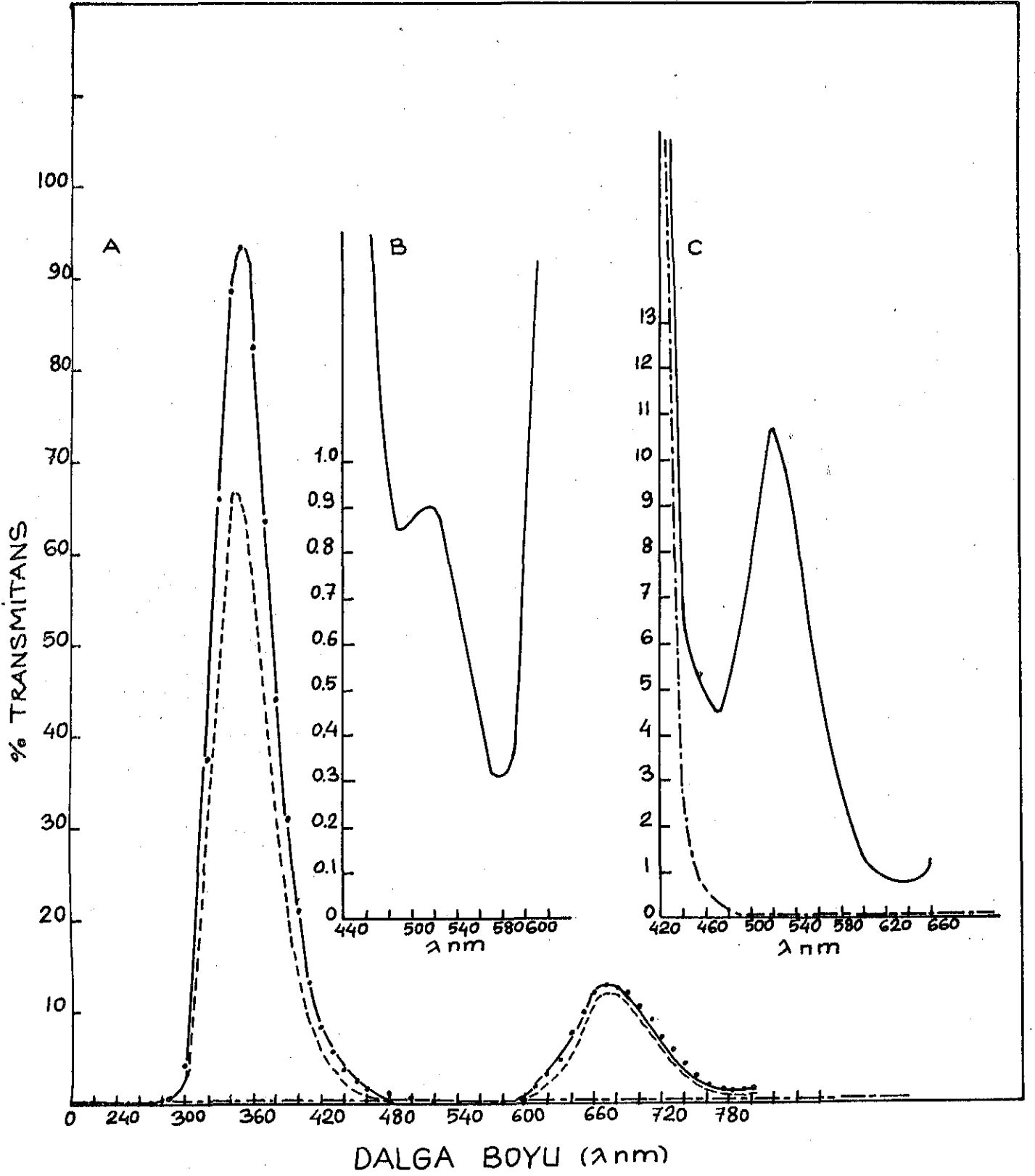
Tablo VI da mitokondri ve değişik yöntemlerle çözünürleştirilmiş enzim çözeltilerinin önemli bazı bileşenlerinin konsantrasyonları gösterilmiştir.

Şekil 12 de ise değişik yöntemlerle çözünürleştirilmiş enzimlerin akrilamid jel elektroforezi paternleri görülmektedir. Jeller protein ve karbonhidrat için ayrı ayrı boyandığında, yalnız Triton X-100 çözünürleştirilmesinde bir glikoprotein bandı gözlenmiştir. Ayrıca tüm jellerde ortak olan iki band gözlenmiştir (Şekil 12, okla işaretli bandlar). Denenen bütün preparatlar aktif olduğundan aktivite için mutlak şart olan proteinlerin işaretli proteinler olduğu sonucuna varılmıştır. Jellerde aktivite boyaması için uygulanan değişik yöntemler enzimin dayanıksızlığı nedeniyle sonuç vermemiştir.

Değişik fosfolipid, kolesterol ve organik fosfat bağı taşıyan bileşiklerin, ayrıca bu bileşiklerin değişik karışımlarının enzim aktivitesine etkileri incelendi. Değişik konsantrasyonlarla 37°C de inkübasyon deneyleri ile tek tek fosfolipidler için optimum aktivasyon konsantrasyonu olarak 1 mg/ml saptandı (63).

Ekstraksiyon Yöntemi	Eksitasyon : 275 nm			Eksitasyon : 375 nm
	emm.: 350nm	emm.: 520nm	emm.: 675 nm	
Triton X-100	6.4	0.85	0.8	26.3
n-Butanol	68.0	3.50	9.0	20.1
Alkali	93.5	0.90	13.5	10.6
NaClO <sub>4</sub>	87.5	2.00	15.0	6.1

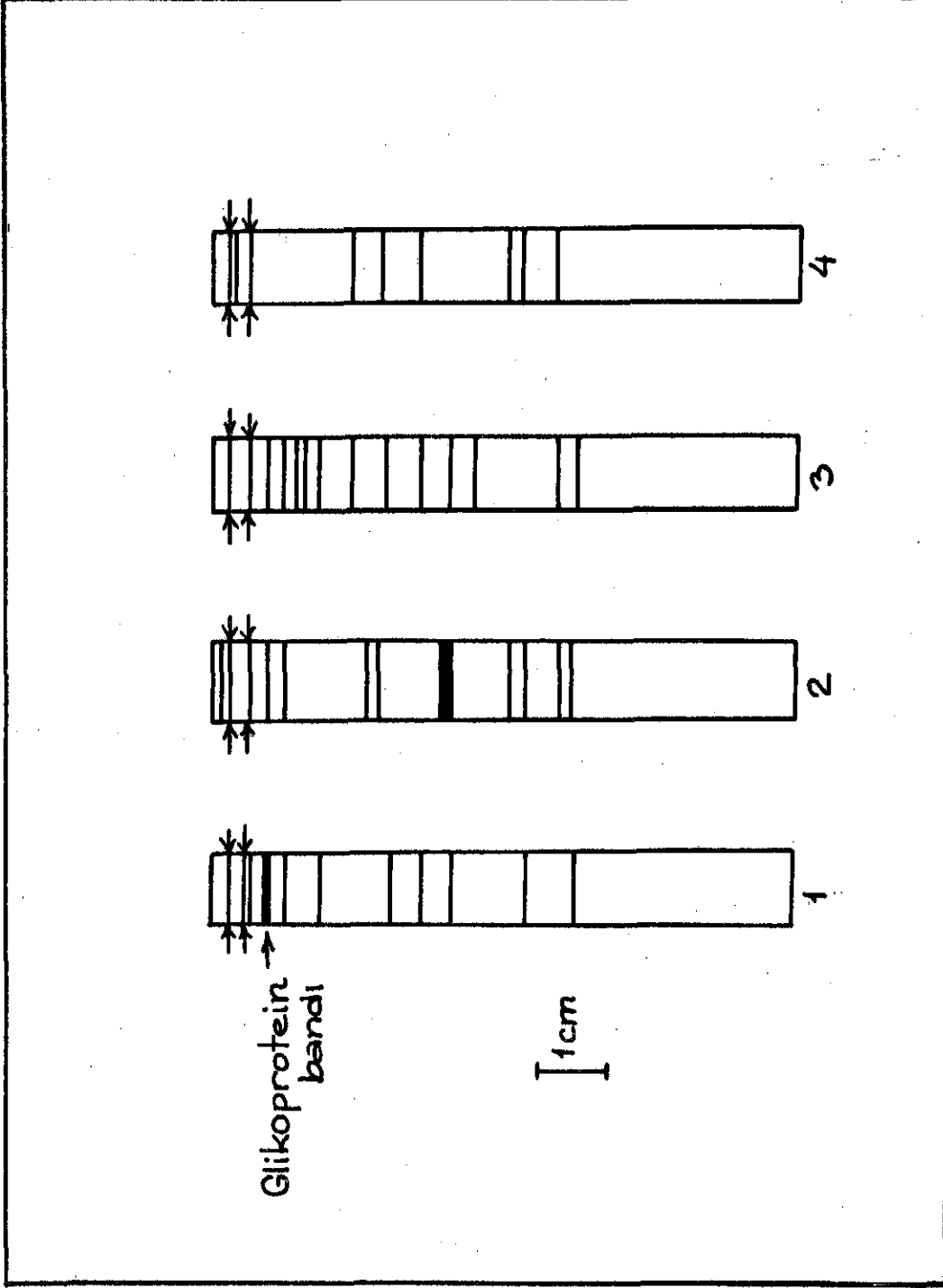
TABLO V : Değişik yöntemlerle çözünürleştirilmiş enzimün 275 ve 375 nm dalga boylarında eksitasyonu sonucu; 350, 675 ve 520 nm dalga boylarında elde edilen floresans maksimumları (% T cinsinden).



ŞEKİL 11 : Alkali ekstraksiyonu ile çözünürleştirilmiş enzimın floresans spektrumu.  
A,B; (—) 275 nm dalga boyunda eksite edilen 1 mg/ml protein içeren ekstraktın floresans spektrumu, (---) ortama yöntemlerde açıklanan şekilde hazırlanan 25 µg/ml lesitin, 12.5 µg/ml sefalın, 2.5 µg/ml fosforil kolin klorid, 5 µg/ml kolesterol içeren fosfolipid misellerinin katılmasından sonraki floresans spektrumu, (---) 2 mg Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (Sodyum dithiyonit) eklenmesinden sonraki floresans spektrumu.  
C; (—) 375 nm dalga boyunda eksite edilen enzim çözeltisinin floresans spektrumu, (---) 2 mg sodyum dithiyonit eklenmesinden sonra redüklenen çözeltinin floresans spektrumu.

ÖRNEK	Toplam Demir $\mu\text{mol}/\text{gr protein}$ $n=1$	FAD $\mu\text{mol}/\text{gr protein}$ $n=3$	İnorganik Fosfat $\mu\text{gr}$ $n=3$	Koenzim-Q <sub>4</sub> $\mu\text{mol}/\text{mg protein}$ $n=4$
Mitokondri	22.6	$2.7 \pm 0.48$	$148 \pm 0.3$	$6.54 \pm 1.40$
Triton X-100 E.	35.7	$11.5 \pm 1.80$	$78.1 \pm 4.5$	-
n-Butanol E.	61.9	7.5	0	$1.97 \pm 0.40$
Alkali E.	14.8	$7.0 \pm 1.2$	$2.6 \pm 0.5$	$1.55 \pm 0.17$
$\text{NaClO}_4$ E.	3.65	$12.1 \pm 0.9$	$6.52 \pm 1.9$	5.54

TABLO VI : Mitokondri süspansiyonu ve çeşitli ekstraktlarda tayin edilen toplam demir, flavinadenindinükleotid (FAD), koenzim-Q ve fosfolipidlerin hidrolizlenmesiyle elde edilen inorganik fosfat ( $\text{P}_i$ ) değerleri.



ŞEKİL 12 : Değişik yöntemlerle çözünürleştirilmiş süksinik dehidrogenazın akrilamid jel elektroforezi örnekleri.

- 1- Triton X-100 ekstraktı,
- 2- Digitonin ekstraktı,
- 3- n-Butanol ekstraktı,
- 4- Alkali ekstraktı.

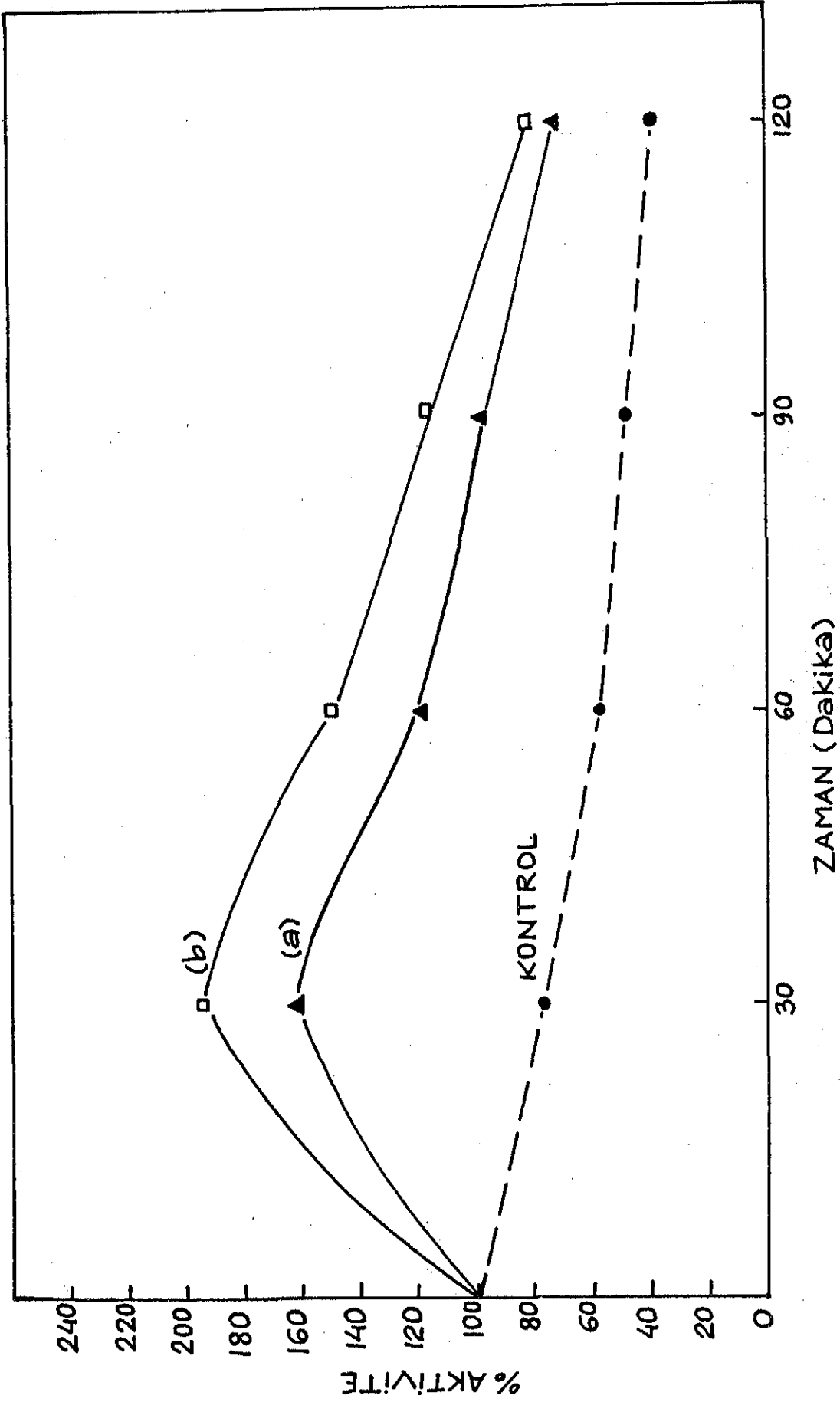
Aktivasyon deneyleri için en düşük fosfolipid içerdği saptanan n-butanol ile çözünürleştirilmiş enzim kullanıldı (Tablo VI). Şekil 13 de sfingomyelinin ve kolesterol + sfingomyelin'in aktivasyon paterni görülmektedir. Ortamda ayrıca organik fosfat bağı içeren gliseraldehid-3-fosfat bulunmaktadır. Bu şartlarda 30 dakikada % 192 oranında aktivasyon gözlenmiştir. Şekil 14 de ise değişik fosfolipidlerin karışımının kolesterolun ve karışım + kolesterolun gerçekleştirdiği aktivasyon görülmektedir. Tablo VII de değişik fosfolipidlerin, organik fosfat bileşiklerinin maksimum aktivasyon değerleri ve kolesterolün bu aktivasyona etkisi gösterilmiştir.

Değişik fosfolipid türlerinin karışımları en yüksek aktivasyona neden olduğundan bu karışımı natif oranlarda bulunduran eritrosit zarları ve alkali ekstraksiyonundan geriye kalan mitokondri zarları aktive edici sistemler olarak kullanıldı. Süksinik dehidrogenazı, alkali ekstraksiyonu ile uzaklaştırılmış mitokondri zarları, n-butanol ile çözünürleştirilmiş enzim üzerine katıldığında % 210 aktivasyon gözlendi. Eritrosit goast'ları ise bir aktivasyona neden olmadı, ancak çözünür enzimin % 70'i 17.000 xg'de çöken eritrosit goastlarına yapıştı. Enzimi bu zar sistemin-den yeniden çözünürleştirmek amacıyla kullanılan yüksek tuz konsantrasyonu dondurup çözme, sonikasyon, organik çözücüler ve lipaz ile muamele sonuç vermedi.

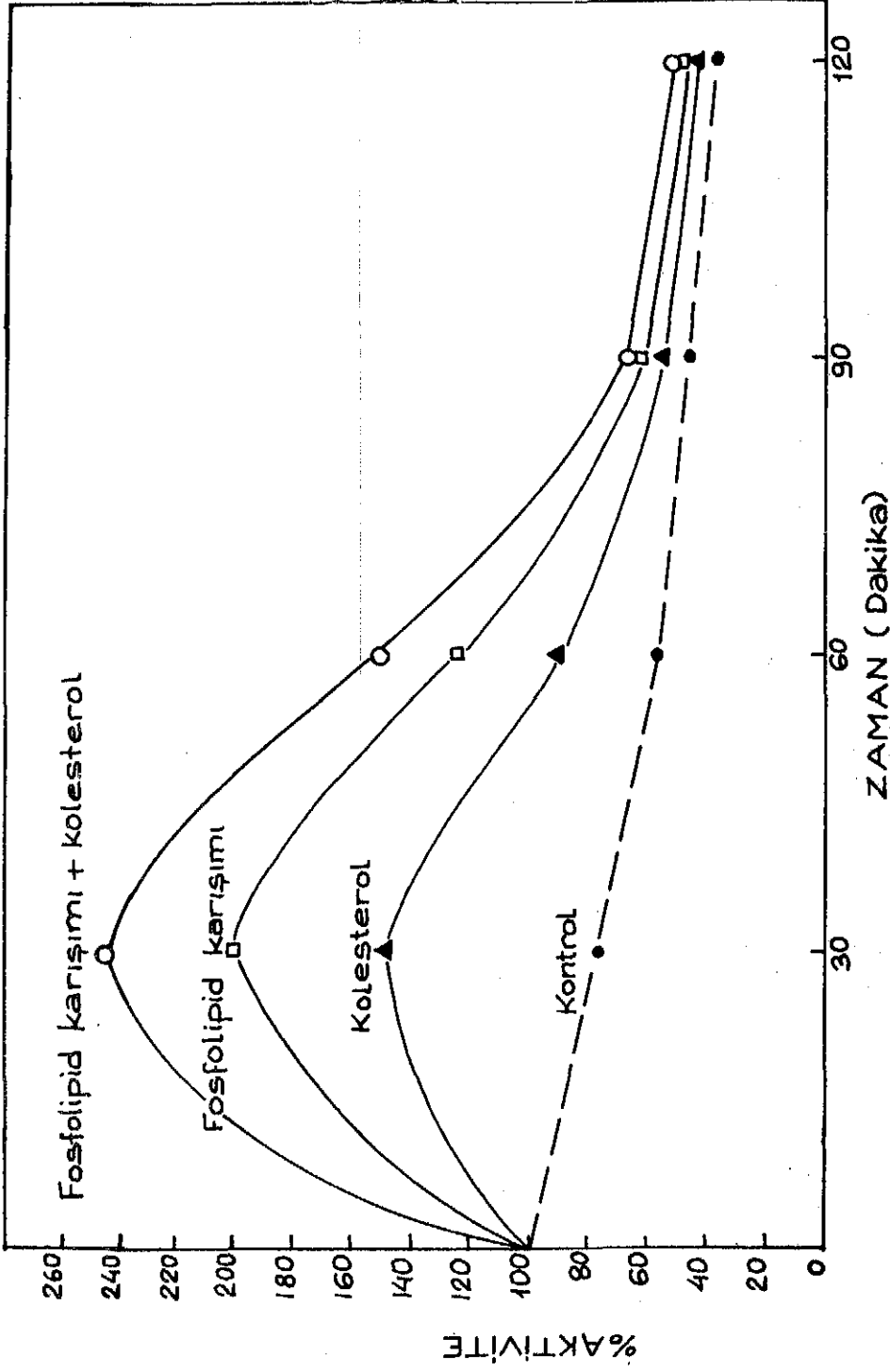
Şekil 15 de digitonin ile çözünürleştirilmiş enzimin lipaz ile inkübasyonu sonucu aktivite değişimi gözlenmektedir. 30 dakika sonunda lipaz ile muamele edilmiş enzim % 33 oranında aktivite kaybına uğramıştır. Kontrol da ise % 9 oranında bir aktivite kaybedilmiştir.

Mitokondri zarından izole edilen koenzim-Q  $1 \times 10^{-2}$   $\mu$  mol konsantrasyonda ön inkübasyon ortamına katıldığında yaklaşık % 15 aktivasyon gözlendi. Fosfolipidli ortamda ise koenzim-Q daha fazla bir aktivasyon göstermedi.





ŞEKİL 13 : (a) n-Butanol ekstraktının, 1 mg/ml konsantrasyondaki sfingomyelin - gliseraldehid 3-fosfat ile 37°C deki inkübasyonu.  
 (b) 1 mg/ml kolesterol'ün a ortamına eklenmesiyle 37°C lik inkübasyon sürecinde enzim aktivitesinin değişimi.



ŞEKİL 14 : ( □ ) fosfolipid karışımının ve kolesterol'un SDH aktivitesine etkisi : 1 mg/ml konsantrasyonda fosfolipid karışımı ile inkübe edilmiş enzimnin aktivite değişimi.

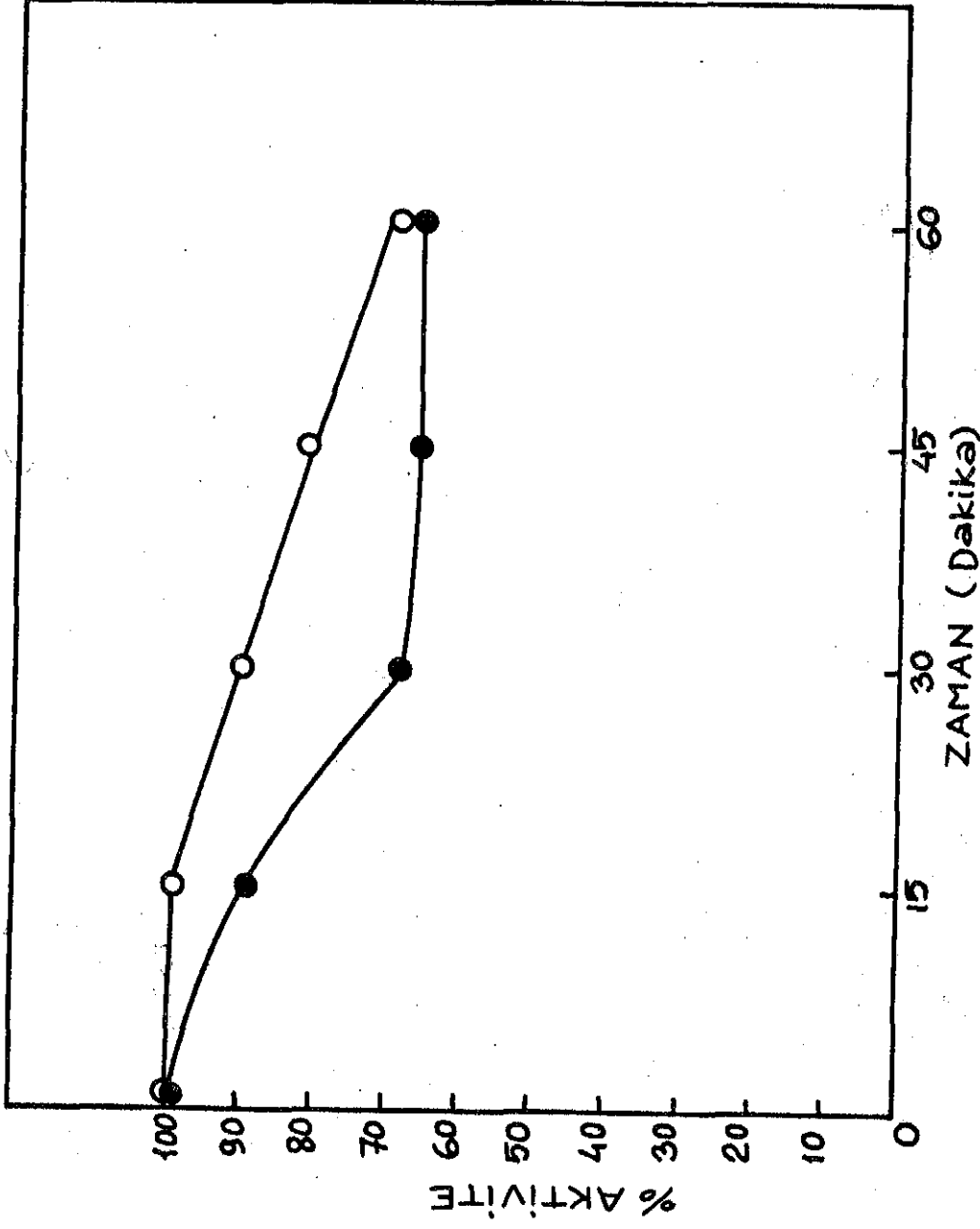
( ▲ ) Kolesterol ile inkübe edilmiş enzimnin aktivite değişimi (1 mg/ml konsantrasyonda).

( ○ ) Fosfolipid karışımı + 1 mg/ml kolesterol ile 37°C de inkübe edilen çözünmüş enzimnin aktivitesinin değişimi.

Enzim n-butanol ekstraksiyonu yöntemiyle çözündürüldü.

BİRLEŞİK (1mg/ml)	% AKTİVİTE
3-Fosfogliseric asit	112
Fosforil Kolin Klorid	114
Gliseraldehid-3-fosfat	117
o-Fosforil etanolamin	122
Sfingomyelin	124
Lesitin	135
Sfingomyelin + Kolesterol	192
Lesitin + Sfingomyelin + Kolesterol + Fosforil Kolin Klorid	244

TABLO VII : 1 mg/ml konsantrasyonda fosfolipid ve organik fosfat bağı içeren birleşiklerle çözülmüş enzim 37°C de, 30 dakika inkübe edilmesiyle değişen % aktivite değerleri.



ŞEKİL 15 : Digitonin ile çözümlenmiş enzim Lipaz (Tip I) ile 37°C de inkübasyonu sonucu % aktivite değişimi. 0 ıncı dakikada enzim aktivitesi (Ünite) % 100 olarak kabul edildi. İnkübasyon ortamına 10 mg protein başına 1 mg lipaz (Tip I) eklendi. Lipaz'ın enzim aktivitesi 2.82 Unite/dakika/37°C dir (48).

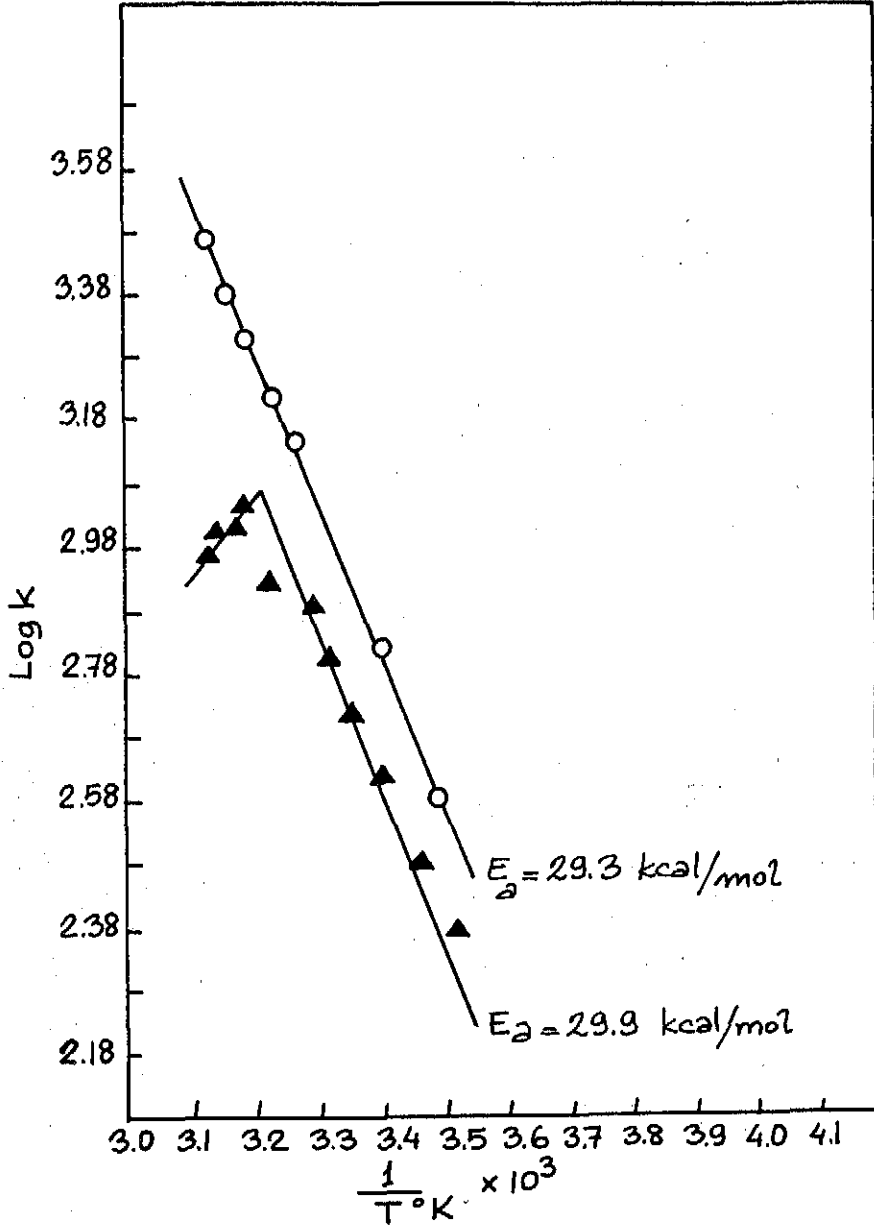
(o) Digitonin ile çözümlenmiş enzim

(●) Çözümlenmiş enzim + Lipaz (Tip I) inkübasyonu

Lipozomların enzim aktivitesine etkisini yapay boyalarla elektron alış verişini etkileyip etkilemediğini araştırmak amacıyla lipozumlu ve lipozomsuz ortamlarda 10-45°C arasında tepkime izlendi. Şekil 16 ve 17 de mitokondri, alkali ekstraktı, n-butanol ekstraktı ve bu ekstrakta lipozomların katılmasıyla oluşan ortamlarda Arrhenius grafikleri görülmektedir.

Enzim sübstrat aktif kompleksi için aktivasyon enerjileri mitokondri, alkali ekstraktı, n-butanol ekstraktı ve n-butanol + lipozumlu ortamlarda sırasıyla; 32.5 kcal/mol, 22.0 kcal/mol, 29.9 kcal/mol, 29.3 kcal/mol olarak hesaplanmıştır.

Çalışılan fosfolipid konsantrasyonlarında vorteksleme ile lipozom oluşup oluşmadığı, bu lipozomlarda bağlı protein bulunup bulunmadığı ve aktivite elektron mikroskopisi ile incelendi. Şekil 18 de fosfotungustat ile boyanmış lipozomlar x20.000 büyütmede görülmektedir. Enzim aktivitesi boyamak için yapılan deneyler elektron opak boyama ortamında lipozomların dayanıksız olması nedeniyle sonuç vermemiştir.



ŞEKİL 16 : n-Butanol ekstraktının ve fosfolipid miseli ile inkübe edilen n-butanol ekstraktının sıcaklığa bağımlı olarak tepkime parametresinin değişimleri (Arrhenius eğrisi).

- (o) n-Butanol ekstraktı ile fosfolipid misellerinin 1 hacim : 1 hacim oranında ön inkübasyon sürecinde karıştırılmış ve tepkime bildirilen sıcaklıklarda yüksek süksinat konsantrasyonunda yürütülmüştür.

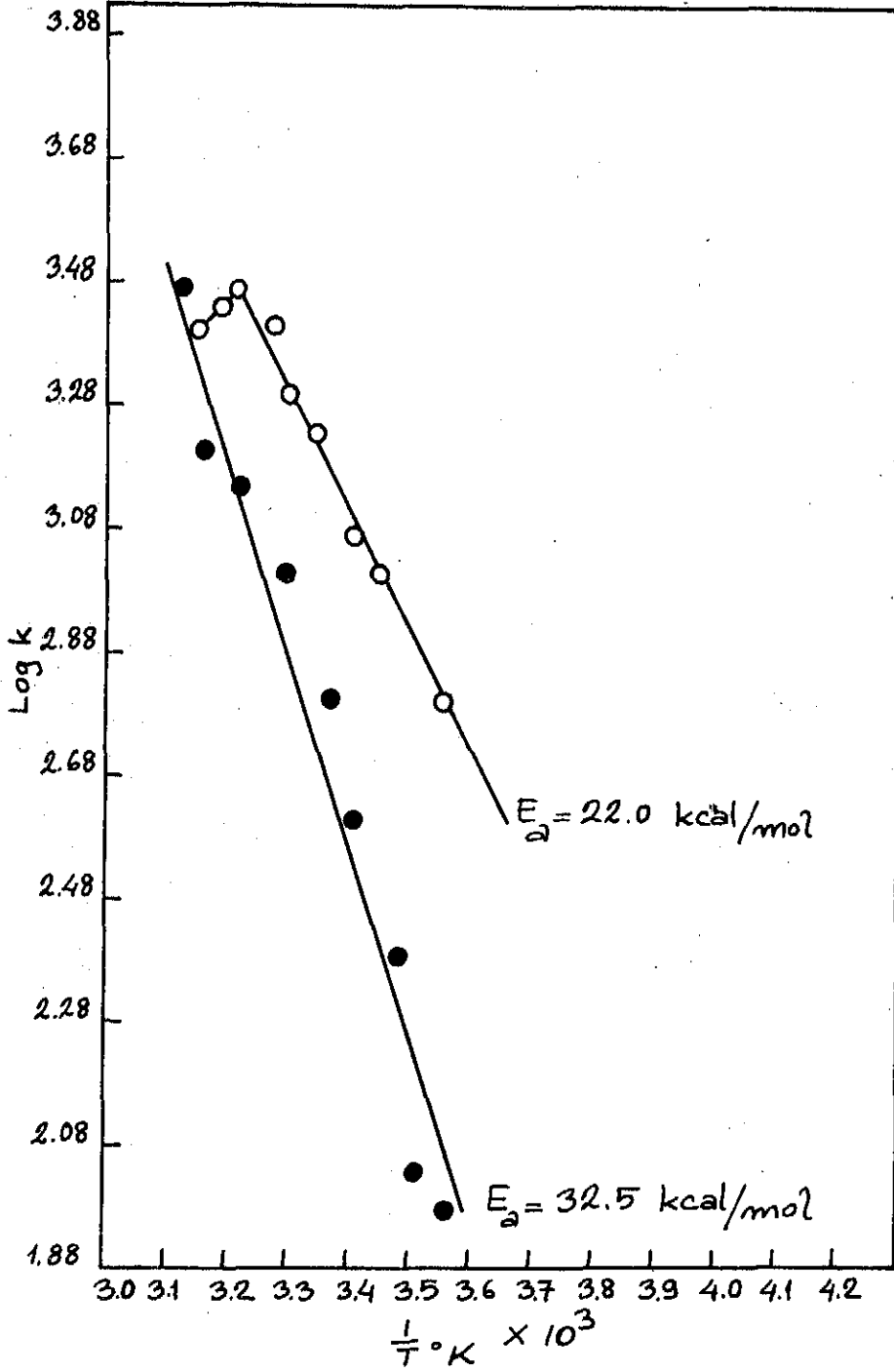
$$\text{Eğim} = \frac{E_a}{2.303 R} = -2.397$$

- (▲) n-Butanol ekstraktında sıcaklığa bağımlı olarak tepkime parametresinin değişimi.

$$\text{Eğim} = \frac{E_a}{2.303 R} = -2.523$$

*oksidlenen süksinat*  
 $k = \mu\text{m mol/dakika/mol enzim}$

Eğriler regresyon denklemi uygulanarak çizildi. Eğimler regresyon doğrusunun eğimidir.



ŞEKİL 17 : Değişik sıcaklıklarda enzimin tepkime parametresinin değişimi (Arrhenius eğrisi).

( • ) Mitokondri süspansiyonu  $Eğim = \frac{E_a}{2.303 R} = -3.0947$

( o ) Alkali ekstraktı  $Eğim = \frac{E_a}{2.303 R} = -1.934$

k = m mol/dakika/mol enzim

Eğriler regresyon denklemi uygulanarak çizildi. Eğimler regresyon doğrusunun eğimidir.



**ŞEKİL 18 :** Yöntemlerde açıklandığı şekilde hazırlanan fosfolipid miseli-protein kompleksinin elektron mikroskopik görünümü. % 4 fosfotungstat ile boyanan preparat x20.000 büyütüldü (Fotoğraf X2 büyütmede).  
A; sonifiye lipozomlar, B; normal lipozomlar (2 kez yıkanmış)



## T A R T I Ş M A

Elektron transport zincirinin 4 ana kompleksinden ikincisi süksinatın oksidasyonu sonucu elektronları koenzim-Q aracılığıyla sitokrom b'e aktaran kompleks II dir. Kompleks II nin en önemli üyesi olan süksinik dehidrogenaz bu elektron akışında aktivasyon enerjisinin düşük olmasını sağlayan proteindir. Süksinik dehidrogenaz aktivitesi ancak ortamda bir elektron alıcı bulunduğu zaman ölçülebilir. O halde natif aktivite, elektron alıcının koenzim Q - sitokrom b sistemi olduğu durumda gözlenen aktivite olacaktır (53). Pratikte süksinik dehidrogenaz aktivitesini tayin için oxido-redüksiyon potansiyeli uygun boyalar kullanılmaktadır. Bu tip tayin metodları enzim aktivitesi hakkında ancak muhayeseli bir fikir verebilir. PMS kullanılarak enzim aktivitesinin tayini natif aktivite hakkında fazla bir bilgi vermemekle beraber gerek pratikliği gerekse belli aralıklar içinde stokiyometrik oluşu nedeniyle çok uzun senelerdir bu enzimin aktivitesinin takibi için bütün araştırmacılar tarafından kabul edilmiş bir yöntemdir (14,19). Değişik enzim preparatları için değişik stokiyometri aralıkları tarif edildiğinden, bu çalışmada gerek PMS gerekse DCI konsantrasyonlarının aktivite tayinine etkisi incelenmiş ve PMS-DCI elektron transferi hızının hız kısıtlayıcı olmadığı konsantrasyonlarda çalışılmıştır. Ayrıca enzim aktivitesi ile konsantrasyonu arasındaki bağımlılığın lineer olduğu bölge seçilmiştir (Şekil 1-2).

Çok eser oksijen bulunduran ortamlarda dahi son derece dayanıksız bir enzim olarak rapor edilen süksinik dehidrogenaz ayrıca literatürde tekrarlanamayan sonuçlar veren bir enzim olarak da tanınmaktadır (19,22, 23,52). Pek çok değişik parametresi değişik araştırmacılar tarafından farklı rapor edilen bu enzimle çalışmada ana problemler : 1- Çözünürleştirilmiş enzimin dayanıksızlığı, 2- Farklı çözünürleştirme yöntemlerinin muhtemelen farklı kompleksler çözmesi olarak saptanmış ve bu noktadan hareketle değişik çözünürleştirme yöntemleri ile elde edilen çözünür komplekslerin özellikleri araştırılmıştır.

Bizim şartlarımızda dilusyonun bir saatlik süre içinde enzim aktivitesine bir etkisi olmadığı, aktivitenin sıcaklığa şiddetle bağımlı olduğu, kofaktörün ve demir-sülfür alt biriminin rejenerasyonunun PMS tayini ile takip edilen aktiviteye bir etkisi bulunmadığı gözlenmiştir (Şekil 3-4-5).

Değişik çözünürleştirme yöntemleri -gerek ilk defa bu çalışmada bildirilen triton X-100 ve digitonin çözünürleştirilmesi, gerekse literatürde bildirilen  $\text{NaClO}_4$ , pH değişimi ve n-butanol çözünürleştirilmesi- çözümlenen komplekslerin özellikleri açısından karşılaştırılmıştır.

Triton X-100 ve digitonin çözünürleştirilmeleri bu ajanların kritik misel konsantrasyonlarının biraz üzerindeki konsantrasyonlarda optimum çözünürleştirme gerçeğini ortaya koymuştur (Şekil 6). Gerek bu bulgu gerekse amonyum sülfat bağımlılığı (Şekil 7) ve sefadeks G-200 kromatografisi (Şekil 8) enzimin son derece lipofilik bir protein olduğunu bu yüzden de aktivitesinin lipofilik ajanlar / ortamlarla kontrolü olasılığını vurgular (Denenen saflaştırma yöntemleri enzim aktivitesinin dayanıksızlığı ve fosfolipidsiz ortamlarda korunamayışı nedeniyle fazla başarılı olmamıştır). Şekil 9 da görülen affinite kromatografisi profili, perklorat eks-

traksiyonu ve amonyum sülfat sonrası enziminin büyük ölçüde saflaşmış olduğunu göstermektedir. Çok düşük aktivitelere sebep olmasına rağmen bu yöntem enzim aktivitesi için fenazin metosülfat bağımlı tayinde dahi birden fazla komponentin gerekliliğini ortaya koymuştur. Bu yöntemle elde edilen A ve B fraksiyonlarının yapıları hakkında bilgi verecek yeterli sonuç elde olmamakla beraber bu fraksiyonların labil demir sülfür proteini içerdiği açısından farklı oldukları ileri sürülebilir. Bu varsayım adı geçen fraksiyonların birbirlerini aktive edişleri sonucuyla kuvvetlenmektedir.

Saflaştırma işlemleri esnasında ortaya çıkan, yukarıda bahsedilen problemler, değişik saflaştırma yöntemlerinin çözünürleştirdiği komplekslerin özelliklerinin araştırılmasına yol açmıştır.

Süksinik dehidrogenazın kovalan bağlı kofaktörü olan FAD'nin görünür bölgede verdiği ışık absorpsiyonundan yararlanılarak değişik yöntemlerle çözünürleştirilmiş enzimin içerdiği komponentlerin farklılıkları incelenmeye çalışılmıştır. Çözünmüş komplekste bulunan ve süksinik dehidrogenazla ilişkide olan gerek değişik proteinler gerekse kompleks içinde süksinik dehidrogenazın değişik konformerleri FAD absorpsiyonundaki farklılıklarla belirlenebilir. Şekil 10 ve Tablo VI'in birlikte incelenmesi değişik oranlarda FAD içeren komplekslerin 410 nm dalga boyundaki absorpsiyonlarının içerdikleri FAD miktarıyla orantılı olmadığını ortaya koyar. Ayrıca maksimum absorpsiyon gözlenen dalga boyunun proteoliz ve hidrolizden sonra aynı olmasına rağmen natif durumda farklılıklar göstermesi yine komplekslerin süksinik dehidrogenazla direkt ilişkide olan ve baskılayan ve dalga boyunu kaydıran FAD absorpsiyonunu etkileyen farklı bileşenler içerdiğinin göstergesidir.

Bu komplekslerin floresans spektrumlarının incelenmesi denenen değişik eksitasyon dalga boylarında FAD içindeki riboflavine özgü 275 ve

375 nm dalga boyunda eksite olan 350, 520 ve 675 nm dalga boylarında emisyon maksimumu veren paternlerin elde edilmesini sağlamıştır. Bu spektrumlarda değişik yöntemlerle çözünürleştirilmiş enzimin emisyon dalga boylarında bir fark gözlenmemekle beraber emisyon şiddetlerinde önemli farklılıklar gözlenmiştir (Tablo V).

Çözünürleştirilen komplekslerin jel elektroforezinde pek çok protein bandı gözlenmiş ancak bütün komplekslerde ortak bulunan 2 protein tarif edilmiştir. Glikoprotein ise yalnız triton X-100 çözünürleştirilmesinde gözlenmiştir.

Bütün bu bulguların ışığı altında çözünürleştirilen komplekslerin özellikleri şu şekilde özetlenebilir :

1- Triton X-100 :

Noniyonik deterjanlar zar yapısında bol miktarda bulunan lipidlerle yer değiştirerek aynı zamanda proteinin içinde çözüleceği miseller oluşturarak lipofilik proteinleri çözerler (54). Süksinik dehidrogenazın mitokondri iç zarından çözünürleştirilmesinde fosfolipidden FAD'den ve demirden zengin bir kompleks elde edilmiştir. Ayrıca mitokondri zarında bulunan bir glikoprotein de kompleksle birlikte çözülmüştür. Bu kompleks görünür bölgede (405-410 nm) en yüksek absorpsiyonu gösterirken, floresans spektrumunda ise en düşük absorpsiyon tepediklerini vermektedir.

2- n-Butanol :

Organik çözücüler zardaki lipidleri yüksek çözünürlüklerinden dolayı proteinlerden ayırırken genel olarak protein denatürasyonuna da yol açarlar. Süksinik dehidrogenazın çözünürleştirilmesinde denatürasyona bağlı en yüksek kayıp gözlenmişse de kompleksin gerek fosfolipid içermemesi, gerekse yüksek demir içermesi bu yöntemin çözülmüş komplekslerin özellik-

lerini araştırma yönünden önemli olduğu kanısını vermektedir. Ayrıca enzim aktivitesine değişik fosfolipidlerin etkisini incelemeye uygun bir kompleks çözünürleştirdiği için tercih edilmiştir. Bu kompleksde görünür bölgede FAD absorpsiyonunu baskılayan komponentler bulunmamaktadır.

### 3- Sodyum Perklorat :

Koatropik ajanlar proteinler ve lipidler arasındaki hidrofobik etkileşimleri içinde buldukları düzenli su ortamını bozarak zayıflatırlar, böylece zarların apolar bileşenlerinin suya taşınmasındaki eritropik engel aşılmış olur ve zar dayanıklılığı azalarak ilişkide olduğu proteinler su fazına yönelirler. Süksinik dehidrogenazın sodyum perklorat ile çözünürleştirilmesi sonucu elde edilen kompleks, fosfolipid ve koenzim-Q dan oldukça zengin, labil demir sülfür proteininden ise fakirdir. Az sayıda protein içeren bu kompleksin görünür bölgedeki FAD absorpsiyonu n-butanol ve alkali ekstraksiyonları ile elde edilen komplekslerinkine yakın, ancak maksimum absorpsiyonun gözleendiği dalga boyu diğer çözünürleştirme yöntemlerinde gözleendiğinden uzundur. Floresans spektrumunda 350 nm deki emisyon çok kuvvetlidir.

### 4- pH Değişimi :

Hidrojen iyonu konsantrasyonunun değişimi gerek proteinlerin tersiyer ve sekonder yapılarında yaptığı değişiklikler gerekse hidrojen bağlarını etkileyerek su ağında yaptığı değişiklikler sonucu protein-lipid etkileşimlerini azaltır ve oldukça özgül olarak bazı lipofilik proteinleri çözünürleştirir. Organik çözücülerde olduğu gibi burada da protein denatürasyonuna dikkat edilmesi gerekmektedir. Süksinik dehidrogenazın alkali pH da çözünürleştirilmesi en yüksek çözülme oranını vermekle beraber, en düşük spesifik aktiviteye de sebep olmaktadır. Diğer adı geçen yöntemlere nazaran oldukça az sayıda protein çözmesine rağmen, spesifik aktivi-

tenin düşük oluğu denatürasyona bağlanabilir. Bu yolla çözünürleştirilen kompleks labil demir sülfür proteininden oldukça zengin olmasına karşın düşük fosfolipid ve düşük koenzim-Q içermektedir. Görünür bölgedeki FAD absorpsiyonu, koatropik ajanlar ve organik çözücülerle yapılan çözünürleştirilmeye benzemektedir. Floresans emisyonu ise 350 nm'de diğer bütün yöntemlerden daha yüksek saptanmıştır (Tablo V).

Mitokondriler ağırlıkça % 26 oranında lipid içerirler. Bu lipidlerin %90'ını fosfolipidler % 10'unu ise ubikinon, kolesterol, karotenoid ve gliserid esterleri oluşturur. Mitokondriyel enzimlerin bazıları aktivitesi için mutlak olarak fosfolipide gereksinme gösterirken (55), bazıları da fosfolipidlerle sadece aktivasyon gösterir (56-60). Süksinik dehidrogenaz ikinci bahsedilen enzim sınıfına girmektedir.

Süksinik dehidrogenaz yüksek oranda fosfolipid içeren, eritrosit zarlarıyla (ghost) inkübe edildiğinde belli bir aktivasyon gözlenmemiştir. Ancak enzimin lipofilik karakteri son derece bariz olarak bir kere daha ortaya konmuştur. Eritrosit zarlarına % 70 oranında bağlanan, iyon şiddeti, organik çözücü, sonikasyon ve lipaz ile bu zarlardan ayrılmayan enzim dayanıklılık kazanmış fakat aktive olmamıştır.

Digitonin ekstraksiyonu ile çözünürleştirilen ve lipid içeriği yüksek kompleksin lipazla muamelesi sonuçları aktivasyon ve dayanıklılığın kısmen nötral lipidlere de bağlı olduğunu işaret etmektedir.

Lipidle doyurulan çözeltilerde koenzim-Q nun ilave bir aktivasyonu gözlenmemiştir.

Son derece lipofilik bir enzim olan süksinik dehidrogenazın aktivitesinin fosfolipid bağımlılığı, PMS bağımlı aktivite ölçülerek incelendiğinde, gerek tek tek fosfolipidlerin gerekse fosfolipid karışımlarının

enzimi aktive ettiği gözlemlendi. Diğer taraftan organik fosfat bağı taşıyan birleşikler de aktivasyona neden oldu (Tablo VII). Lesitin, sfingomyelin, fosforil kolin klorid ve kolesterolden oluşan fosfolipid miselleri deney şartlarında oldukça büyük lipozomlar oluşturmakta (Şekil 18) aynı zamanda bu karışım enzimi 2.5 kere aktive etmektedir. Kolesterolün bu aktivasyondaki rolü, fosfolipidlerdeki hidrokarbon zincirlerinin moleküler hareketlerini kısıtlayarak (61) daha az akışkan miseller elde edilmesini sağlamasıdır. Fosfolipidlerle aktivasyon; 1- elektronların yapay boyalar üzerine uygun transferini sağlayan bir ortam oluşturmaları, 2- doğrudan doğruya süksinik dehidrogenazla birleşerek enzime uygun konformasyon vermesiyle izah edilebilir. Bizim bulgularımız ikinci olasılığın doğru olduğunu ispat etmektedir. FAD'nin floresansının lipozomlarla baskılanması enzim proteininin lipozomlarla etkileşerek özellikle FAD'nin bağlı olduğu bölgede veya bu bölgeyi şiddetle etkileyen konformasyon değişikliklerine işaret eder. Diğer taraftan lipozom bulunan ortamlarda tepkime parametrelerinin incelenmesi  $E_a$  aktivasyon enerjisinin lipozomların ilavesiyle değişmediğini ortaya koymuştur. Bu bulgu da yapay boyalara elektron transferinin kolaylaştırılmasının önemli bir rolü olmadığını bir delilidir. Arrhenius grafiklerinin incelenmesi gerek lipozomlu ortamda, gerekse sağlam mitokondride sıcaklığa, bağlı inaktivasyonun gözlenmediğini, alkali ve n-butanol ekstraktlarında ise  $37^{\circ}\text{C}$  nin üzerinde inaktivasyona bağlı kırılmaların bulunduğunu ortaya koymuştur. Bu tip kırılmalar başka enzim sistemleri için de literatürde bildirilmektedir (62). Arrhenius grafiklerinde genel olarak zarsal sistemlerde tarif edilen sıcaklığa bağımlı kırılmaların (64) bizim sistemimizde gözlenmemesi lipozomların yüksek oranda kolesterol içermeleri ve fosforil kolin klorid gibi, polar kısımlarla apolar kısımlar arasında yerleşerek geçirgenlik ve sağlamlığı etkileyen, birleşiklerin ortamda bulunmasındandır (61).

Sonuç olarak değişik yöntemlerle zardan çözme, zarsal enzimlerin aktivitesine etkili olabilecek değişik bileşenleri çözünürleştirir. Bu bileşenlerden, özellikle çift tabakalı zar yapısında bulunan, fosfolipid, nötral lipid vb. gibi moleküller enzim aktivitesini, konformasyon değişikliği, aktif merkez oriyantasyonu ve diğer bileşenlerle etkileşim yolları ile etkileyerek çözünmüş enzim ile zarsal enzim arasında önemli farklılıklar yaratırlar. Süksinik dehidrogenaz sisteminde değişik yöntemlerle farklı bileşenler içeren komplekslerin çözünürleştirilmesi bu komplekslerdeki yukarıda adı geçen değişikliklerin absorpsiyon ve floresans spektrumlarındaki değişikliklerle saptanması ve kontrollu fosfolipid karışımlarının sebep olduğu aktivasyonun kullanılan tayin yöntemlerine bağlı olmadığını ortaya konması, bu enzimin kontrol mekanizmalarında zarların önemli bir yer tuttuğunu vurgular. Adı geçen sistemlerin enzimin esas işlevi olan koenzim Q - sitokrom b sistemine elektron transferi üzerine etkilerinin araştırılması konuyu bütünleştirecektir.



## Ö Z E T

Bu çalışmada sıçan karaciğer mitokondrisinden; n-butanol, triton X-100, digitonin, sodyum perklorat ve pH değişimi kullanılarak çözünürleştirilen süksinik dehidrogenazın, çözünürleştirme yöntemine bağlı olarak değişik miktarlarda; protein, FAD, koenzim-Q, toplam demir ve fosfolipid içerdiği saptandı.

Sefadeks G-200 kolonundan, çalışılan deney şartlarında saflaştırılmayan çözünmüş enzim süksinillenmiş sefaroze-4B affinite kolonundan sodyum süksinat gradienti ile oldukça saf elde edildi.

Çözünmüş enzimin lipaz ile muamelesi sonucu dayanıklılığının azalması, eritrosit zarlarına sıkıca tutunması, fosfolipidlerle, organik fosfat bağı içeren birleşiklerle ve kolesterolle aktivitesinin artması enzimin son derece lipofilik bir karakteri olduğunu belirledi. Fosfolipidlerin enzim aktivitesini artırması, elektronların yapay boyalar üzerinden uygun bir ortamda transfer olmasından çok, enzimle birleşerek, enzime yeni bir konformasyon vermeleri ve aktif merkez oriyantasyonuna bağlandı. Fosfolipidlerden zengin olan enzim çözeltilerinde FAD'nın floleransının baskılanması ve aktivasyon enerjilerinin değişmemesi bu sonuçla bağdaştırıldı.

## K I S A L T M A L A R

- FAD** : *Flavin Adenin Dinükleotid*
- PMS** : *Fenazir Meto Sülfat*
- DCI** : *2,6-Diklorofenolindofenol*
- SDH** : *Süksinik Dehidrogenaz*
- SDS** : *Sodyum Dodesil Sülfat*
- EPR** : *Elektron Paramagnetik Rezonans*
- TNBS** : *Tri Nitro Benzen Sülfonik Asit*
- DTT** : *Ditiyotreititol*
- EDTA** : *Etilendiamin Tetra Asetik Asit*
- K-PO<sub>4</sub>** : *Potasyum fosfat tamponu*
- 2ME** : *2-Merkapto etanol*
- CM-C** : *Karboksimetil Seluloz*
- DEAE** : *Dietilaminoetil seluloz*
- CMC** : *Kritik Misel Konsantrasyonu*

K A Y N A K L A R

1. Kearney, E.B., Salach, J.I., Walker, W.H., Seng, R., Kenney, W.C., Zeszotek, E., Singer, T.P., *Eur. J. Biochem.*, 24, 321 (1971).
2. Kenney, W.C., Edmondson, D., Seng, R., Singer, T.P., *BBRC*, 52, 434 (1973).
3. Hemmerich, P., Ehrenberg, A., Walker, W.H., Eriksson, L.E.G., Salach, J., Bader, P., Singer, T.P., *FEBS Lett.*, 3, 37 (1969).
4. Salach, J., Walker, W.H., Singer, T.P., Ehrenberg, A., Hemmerich, P., Ghisla, S., Hartman, U., *Eur. J. Biochem.*, 26, 267 (1972).
5. Singer, T.P., Kearney, E.B., *Biochem. Biophys. Acta*, 15, 151 (1954).
6. Hatefi, Y., Davis, K.A., Hanstein, W.G., Ghalambor, M.A., *Arch. Biochem. Biophys.*, 137, 286 (1970).
7. Bernath, P., Singer, T.P., "Methods in Enzymology," C. 5, s. 597 (1962).
8. Basford, R.E., Tisdale, H.D., Green, D.E., *Biochem. Biophys. Acta*, 24, 290 (1957).
9. Keilin, D., King, T.E., *Nature (London)*, 181, 1520 (1958).

10. King, T.E., *J. Biol. Chem.*, 238, 4037 (1963).
11. Veeger, C., DerVartanian, D.V., Zeylemaker, W.P., "Methods in Enzymology", C.13, s. 81 (1969).
12. Carlson, C.W., Brosemer, R.W., *Biochemistry*, 10, 2113 (1971).
13. Ziegler, D.M., Doeg, K.A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1, 344 (1959).
14. Ziegler, D.M., Doeg, K.A., *Arch. Biochem. Biophys.*, 97, 41 (1962).
15. Baginsky, M.L., Hatefi, Y., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 32, 945 (1968).
16. Baginsky, M.L., Hatefi, Y., *J. Biol. Chem.*, 244, 5313 (1969).
17. Davis, K.A., Hatefi, Y., *Biochemistry*, 10, 2509 (1971).
18. Allison, W.S., Kaplan, N.O., *J. Biol. Chem.*, 239, 2140 (1964).
19. Coles, C.J., Tisdale, H.D., Kenney, W.C., Singer, T.P., *Physiol. Chem. Phys.*, 4, 301 (1972).
20. Ohnishi, T., Winter, D.B., Lim, J., King, T.E., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 53, 231 (1973).
21. Hanstein, W.G., Davis, K.A., Ghalambor, M.A., Hatefi, Y., *Biochemistry*, 10, 2517 (1971).
22. King, T.E., Takemori, S., *J. Biol. Chem.*, 239, 3559 (1964).
23. Porodie, J.D., Nicholls, P., *Biochem. Biophys. Acta*, 198, 423 (1970).
24. Zeylemaker, W.P., Klaase, A.D.M., Slater, E.C., Veeger, C., *Biochem. Biophys. Acta*, 198, 415 (1970).
25. Der Vartanian, D.V., Veeger, C., *Biochem. Biophys. Acta*, 92, 233 (1964).

26. Zeylemaker, W.P., DerVartanian, D.V., Veeger, C., Slater, E.C.,  
Biochem. Biophys. Acta, 178, 213 (1969).
27. Rétey, J., Seibl, J., Arigoni, D., Cornforth, J.W., Ryback, G.,  
Zeylemaker, W.P., Veeger, C., Eur. J. Biochem., 14, 232 (1970).
28. Ackrell, B.A.C., Kearney, E.B., Singer, T.P., J. Biol. Chem., 252,  
1582 (1977).
29. Cerletti, P., Giovenco, M.A., Giordano, M.G., Giovenco, S., Strom,  
R., Biochem. Biophys. Acta, 146, 380 (1967).
30. Layne, E., "Methods in Enzymology", Colowick, S.P., Kaplan, N.O.,  
(derleyenler), Acad. Press., New York ve London, C. III., s. 447  
(1956).
31. Tietz Norbert, "Fundamentals of Clinical Chemistry", W.B. Saunders  
Company, Philadelphia, London, Toronto. s. 302, (1976).
32. Lowry, O.H., ve ark., "Methods in Enzymology", Colowick, S.P.,  
Kaplan, N.O., (derleyenler), Acad. Pres., New York ve London,  
C. III., s. 448 (1957).
33. Davis, B.J., Annals of N. York Academy of Sciences, c 121 A-1, s. 406  
(1964).
34. Zacharius, R.M., Zell, E.T., Anal. Biochem., 30, 148 (1966).
35. Cuatrecases, P., J. Biol. Chem., 245, 3060 (1970).
36. Parsons, P. Basford, R.E., J. Neurochem., 14, 823 (1967).
37. Cerletti, P., Strom, R., Giordano, M.G., Arch. Biochem. and Biophys.,  
101, 423 (1963).

38. Cerletti, P., Strom, R., Balestrero, F., Giovenco, M.A., Giordano, M.G., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 14, 408 (1964).
39. King, T.E., Howard, R.L., Wilson, D.F., Li, J.C.R., *J. Biol. Chem.*, 237, 2941 (1962).
40. Bessey, A.O., Lowry, O.H., Love, R., *J. Biol. Chem.*, 180, 755 (1949).
41. Kearney, E.B., *J. Biol. Chem.*, 235, 865 (1960).
42. Tietz, N., "Fundamentals of Clinical Chemistry", W.B. Saunders Co., Philadelphia, London, Toronto. s. 518 (1976).
43. Tietz, N., "Fundamentals of Clinical Chemistry", W.B. Saunders Co., Philadelphia, London, Toronto, s. 915 (1976).
44. King, T.E., Nickel, K.S., Jensen, D.R., *J. Biol. Chem.*, 239, 1989 (1964).
45. Smith, A.L., "Methods in Enzymology", Colowick, S.P., Kaplan, N.O., (derleyenler) Acad. Press. Newyork ve London, c: X, s. 81 (1967).
46. King, T.E., *Biochem. Biophys. Acta.*, 58, 375 (1962).
47. O'Malley, B.W., Hardman, J.G., "Methods in Enzymology", Colowick, S.P., ve Kaplan, N.O. (derleyenler). Acad. Press. New York, c: XIII, s. 81 (1974).
48. Forter, P.A.G., Ellory, J.C., Lew, L.L., *Biochem. Biophys. Acta*, 318, 262 (1973).
49. Gomori, G., "Methods in Enzymology", Colowick, S.P. Kaplan, N.O., (derleyenler). Acad. Press. New York ve London, c: 1, s. 631 (1955).

50. Grimstone, A.V., "The Electron Microscope in Biology", William Clowes and Sons Ltd. London. s. 19 (1968).
51. Ogawa, K., Saito, T., Mayahara, H., *J. Histochem. Cytochem.*, 16, 49 (1968).
52. Coles, C.J., Tisdale, H.D., Kenney, W.C., Singer, T.P., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 46, 1843 (1972).
53. Vinogradov, A.D., Grivennikova, V.G., Gavrikova, E.V., Gavrikov, V.G., 12<sup>th</sup> Febs Meeting, Dresden, July 2-8 (1978).
54. Watanabe, H., *J. Biochem.*, 69, 275 (1971).
55. Sekuzu, F., Green, D.E., Jurtshuk, P., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 6, 71 (1961).
56. Brierley, G.P., Merola, A.J., Fleischer, S., *Biochem. Biophys. Acta*, 64, 218 (1962).
57. Brierley, G.P., Merola, A.J., *Biochem. Biophys. Acta*, 64, 205 (1962).
58. Martonosı, A., *J. Biol. Chem.*, 243, 71 (1968).
59. Jarnfelt, T., *Biochem. Biophys. Acta*, 266, 91 (1972).
60. Tobarı, J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 15, 50 (1964).
61. Papahadjopoulos, D., Nir, S., Ohki, S., *Biochem. Biophys. Acta*, 266, 561 (1971).
62. Peckey, D.T., Graham, A.B., Wood, G.C., *Biochem. J.*, 175, 115 (1978).
63. Doğan, P., Emerk, K., *Biyokimya Dergisi*, II, 118 (1977).
64. Sandermann, H. Jr., *Biochem. Biophys. Acta*, 515, 209 (1978).

