

T. C.

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ FAKÜLTESİ

YAPAY ZAR OLUŞTURULMASI VE BU ZARDAN
 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ İYONLARININ TAŞINMASINDAN SORUMLU
 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATP AZININ ÖZELLİKLERİ

Biyokimya Programı

DOKTORA TEZİ

Engin Halit SERPERSU

ANKARA — 1978

T. C.

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ FAKÜLTESİ

YAPAY ZAR OLUŞTURULMASI VE BU ZARDAN
 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ İYONLARININ TAŞINMASINDAN SORUMLU
 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATP AZININ ÖZELLİKLERİ

Biyokimya Programı

DOKTORA TEZİ

Engin Halit SERPERSU

REHBER ÖĞRETİM ÜYESİ : Prof. Dr. Göneng CİLİV

ANKARA — 1978

TEŐEKKÜR

Çalışmamızda büyük önemi olan ultrasantrifüjü kullanmamıza izin veren Hacettepe Üniversitesi Viroloji Laboratuvarı Őefliđine, ayrıca elektron mikroskopî çalıőmalarında yardımlarını esirgemeyen ODTÜ Kimya Bölümüne ve özellikle Dr. Őahende Demirci'ye teőekürü bir borç biliriz.

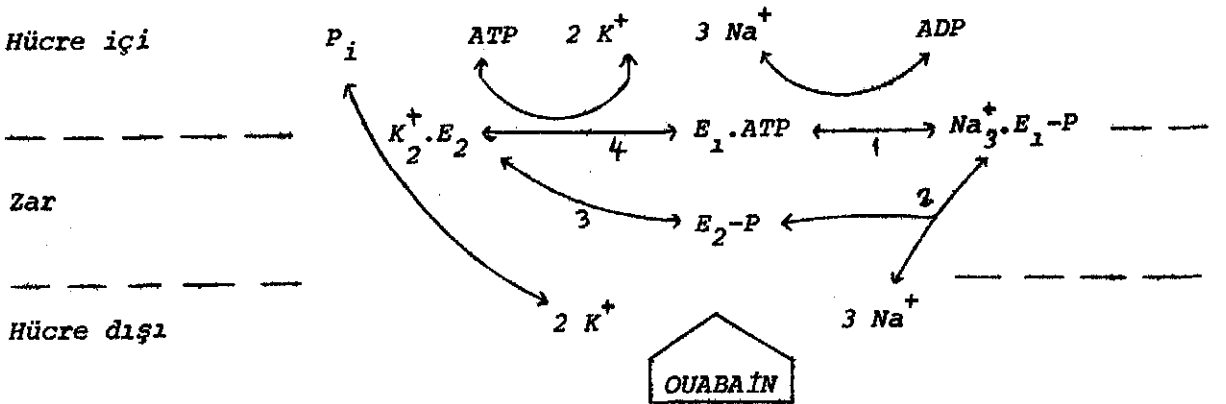
İ Ç İ N D E K İ L E R

	<u>Sayfa</u>
GİRİŞ _____	1
ARAÇ, GEREÇ ve YÖNTEMLER _____	3
- Eritrosit Zarlarının Hazırlanması _____	4
- (Na ⁺ - K ⁺) ATP az Aktivitesinin Tayini _____	4
- (Na ⁺ - K ⁺) ATP az Aktivitesinin Tayini İçin Uygun Şartların Saptanması _____	5
- (Na ⁺ - K ⁺) ATP azın Eritrosit Zarlarından Çözünmesi _____	6
- (Na ⁺ - K ⁺) ATP azın Saflaştırılması _____	6
- SDS Jel Elektroforezi _____	6
- Üre ve Guanidin-HCl ile Jel Elektroforezi _____	8
- Molekül Ağırlığı Tayini _____	9
- Yapay Zarların Oluşturulması, Saf Enzimin Zarlara Yerleştirilmesi ve Elektron Mikroskopisi _____	10
BULGULAR _____	12
TARTIŞMA _____	30
ÖZET _____	37
KAYNAKLAR _____	38

G İ R İ Ő

$(Na^+ - K^+)$ Adenozintrifosfataz enziminin (ATP fosfohidrolaz, $(Na^+ - K^+)$ ATP az, E.C. 3.6.1.3) yaygın olarak hücre ile organel zarlarında bulunduğu ve zarlardan Na, K iyonlarının geçişini düzenlemekten sorumlu olduğu bilinmektedir (1-9).

$(Na^+ - K^+)$ ATP az enzimi, hücre zarının iç ve dış yüzeyinde farklı aktif bölgeler taşır. İç yüzeyinde Na^+ , ATP bağlanma yerleri ve içeri taşınmış olan K^+ ile tepkime sırasında açığa çıkan ADP ve inorganik fosfatı bırakma yerleri vardır. Dış yüzeyinde ise K^+ bağlama yeri, taşınmış olan Na^+ nu bırakma yeri ile ouabain gibi glikozidlerin bağlanma yeri vardır. Yapılan ölçümlerde eritrositlerde içeri alınan her 2 mol K^+ için 3 mol Na^+ nun dışarı atıldığı gözlenmiştir. $(Na^+ - K^+)$ ATP az sisteminin aşağıdaki şemada gösterilen şekilde çalıştığı düşünülmektedir (10-13).



Bu enzim eritrosit zarlarında da vardır ve son yıllarda bazı klinik durumlarda ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) ATP az aktivitesinin eritrositlerde değiştiğinin gözlemlendiği bildirilmiştir (14-21). Diğer taraftan, enzimin aktivitesinin tayini için gerekli olan en uygun şartlar tam olarak belirlenememiştir. Ayrıca ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) ATP az eritrosit zarından ayrılıp çözünür halde elde edilemediği için kinetik özellikleri hakkında geniş bilgi henüz sağlanamamıştır.

Bu çalışmada amacımız enzim aktivitesinin en uygun şartlarını saptamak ve enzimi eritrosit zarlarından ayırıp çözünür hale getirerek bir miktar saflaştırmaktır. Bu sayede zar üzerindeki enzim ile çözülmüş enzimin aktivitelerinin tayini için gerekli olan en uygun şartların ve bazı kinetik özelliklerinin karşılaştırılması mümkün olmuştur. Ayrıca saf enzimi fosfolipidlerden (fosfatidilkolin ve fosfatidiletanolamin) yapılmış lipozomlara yerleştirmeye çalışmakla yapay zar oluşturma için ön çalışmalar yapılmıştır.

ARAÇ , GEREÇ ve YÖNTEMLER

Araç ve Gereçler :

Deneylerde, ultrasantrifüj (Beckman L3-50 tipi), sonikatör (Bronson Sonic Power Co. B-12 tipi), spektrofotometre (Beckman Model 25), elektroforez cihazı (Buchler), ultrafiltrasyon cihazı (Amicon) ve elektronmikroskopu (RCA-3G) kullanıldı.

Deoksikolik asit (DOC), British Drug House (İngiltere) firmasından sağlandı ve bir kere kristalize edilerek kullanıldı. Bunun için J.R. Slack ve arkadaşlarının yöntemi uygulandı (22). Kaynayan etanol içinde doymuş bir DOC çözeltisi hazırlandı. Çözelti soğumadan aktif karbondan süzülerek renginden ve yabancı maddelerden arıtıldı. Daha sonra 4°C 'a soğutulan çözeltiye eşit hacimde saf su ilave edilerek DOC çöktürüldü. Karışım süzüldü ve elde edilen DOC kristalleri desikatör içinde oda ısısında kurutularak saklandı.

Yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanmış olan 10 g. DOC bir miktar saf su içinde çözüldü. Bu çözelti, NaOH ilavesiyle pH = 7.5 a getirildi ve 100 ml. ye su ile tamamlanarak oda ısısında saklandı.

Brij-58 (polioksietilen 20 setileter), ouabain, fosfatidiletanolamine ve fosfatidilkolin Sigma Chemical Co. (Amerika)'dan sağlandı. Kullanılan diğer bütun kimyasal maddeler analitik yönden çok saftı. Bütun çözeltilerin hazırlanmasında camda distile edilmiş deiyonize su kullanıldı.

Yöntemler :

Eritrosit Zarlarının Hazırlanması :

P.A.G. Forter ve arkadaşlarının yöntemine göre (23) asit sitrat-deks-troz (ACD) içine alınmış ve kullanılma süresi dolmamış kan 2500 devirde 4°C ta santrifüj edildi. Çöken eritrositler 20 mM Tris-HCl (2-amino-2(hid-roksimetil)-1,3 propandiol-HCl) pH = 7.5 tamponu içinde hazırlanmış % 0.9 NaCl çözeltisi ile 4 kez yıkandı. Yıkanmış eritrositler hacımlarının 14 mis-li 1 mM EDTA (etilendiamintetraasetik asit), 10 mM Tris-HCl pH = 7.5 çözel-tisi içinde hemoliz edildi. Hemolizat bir gece 4°C ta bekletildi. Daha son-ra 20 000 xg de 30 dakika, 4°C ta santrifüj edilerek üstte kalan kısım a-tıldı. Çöken eritrosit zarları 4 kez 20 mM Tris-HCl pH = 7.5 tamponu ile her seferinde 20 000 xg de santrifüj edilerek yıkandı.

Yıkanmış zarlar 20 mM Tris-HCl pH = 7.5 tamponu içinde yaklaşık 3 mg/ml zar proteini bulunacak şekilde süspansiyon haline getirildi ve -20°C ta saklandı.

(Na⁺ - K⁺) ATP az aktivitesinin tayini :

(Na⁺ - K⁺) ATP az aktivitesi, inkübasyon ortamında açığa çıkan inor-ganik fosfat (P_i) miktarı üzerinden tayin edildi. Total ve (Na⁺ - K⁺) ATP az aktivitesinin tayini için aşağıda anlatıldığı şekilde saptanan uygun substrat,

iyon derişimleri (ATP, Na⁺, K⁺, Mg²⁺ sıra ile nihai derişimleri 3.3, 50.0, 20.0 ve 3.0 mM) ve pH da (225 mM Tris-HCl pH = 7.4) hazırlanmış inkübasyon ortamları kullanıldı. Inkübasyon süresi 60 dakika tutuldu. Bütün deneylerde tepkime, son derişimi % 7.5 olan TCA (triklorasetik asit) ile durduruldu. Santrifüj ile çökelek uzaklaştırıldıktan sonra üstte kalan kısımda inorganik fosfat tayini C.H. Fiske ve Y. Sublearrow yöntemi ile yapıldı (24). (Na⁺ - K⁺) ATP az aktivitesinin tayini için yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanmış ikinci grup inkübasyon ortamlarına, derişimi, 1 mM olacak şekilde ouabain ilave edildi ve bu tüplerde de inorganik fosfatın açığa çıkışı takibedildi. (Na⁺ - K⁺) ATP az aktivitesi ouabainli ve ouabainsiz inkübasyon tüplerinde açığa çıkan inorganik fosfat miktarlarının farkından hesaplandı. Aktivite 1 mg protein tarafından bir saatte açığa çıkarılan μ mol inorganik fosfat miktarı olarak ifade edildi.

Protein O.H. Lowry ve arkadaşlarının yöntemine göre tayin edildi (25).

(Na⁺ - K⁺) ATP az aktivitesinin tayini için uygun şartların saptanması :

Bu amaçla değişik derişimlerde ATP, Na⁺, K⁺, Mg²⁺ ve uygun tampon içeren inkübasyon ortamları hazırlandı. Bu ortamlardaki sübstrat ile iyon derişimleri, ortamların pH ve ısısı ile inkübasyon süresi her şeklin altında açıklanmıştır (Şekil 1, 4, 5, 6, 7, 8, 9).

(Na⁺ - K⁺) ATP azın eritrosit zarlarından çözünmesi :

İzole edilmiş zar süspansiyonuna, nihai olarak proteine eşit miktarda, DOC ve bunun dörtte biri miktarında Brij-58 içerecek şekilde 0-4°C a

soğutulmuş deterjan çözeltisi ilave edildi. Karışım hafifçe alt üst edildikten sonra 10 dakika aynı ısıda bekletildi. Daha sonra 60 watt güç verilerek zar çözeltisi 40 saniye sonike edildi. Sonikasyondan sonra karışım 70 000 xg de 40 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan ve enzimi içeren kısımda ($Na^+ - K^+$) ATP az aktivitesi ve protein tayini yapıldı.

Daha sonraki işlemler için enzim çözeltisi Amicon, Diatlo UM 2 filtresi ile ortalama olarak iki kez deriştirildi. Bu işlem $4^{\circ}C$ ta 3 atm. basınç altında yapıldı. Bu şekilde deriştirilmiş olan enzimden bundan sonra "derişik enzim" olarak söz edilecektir. Daha sonra enzim çözeltisine oranı (hacim/hacim) % 40 olacak şekilde gliserol ilave edilerek enzim $-30^{\circ}C$ ta saklandı.

($Na^+ - K^+$) ATP azın saflaştırılması :

0.8 mg/ml DOC, 0.2 mg/ml Brij-58, % 40 gliserol içeren 20 mM Tris-HCl pH = 7.5 tamponu ile 24 saat dengelenmiş DEAE-seluloz, 1-2 dakikalık düşük devirde bir santrifüj işleminden sonra, santrifüj tüpünün dibine toplandı. 0.5-1.0 mg protein içeren deriştirilmiş enzim çözeltisi, 6-7 g. ıslak DEAE-seluloz üzerine kondu. Hafifçe alt üst edilen tüp 15 dakika $4^{\circ}C$ ta bekletildi. Santrifüj işlemi ile reçine tekrar çöktürüldü. Üst kısımda enzim aktivitesi ve protein tayini yapıldı.

Sodyum dodesil sülfat (SDS) jel elektroforezi :

Jellerin hazırlanması ve elektroforez K. Weber ve M. Osborn'un yöntemine göre (26-27), protein ve glikoprotein için boyama G. Fairbanks ve arkadaşlarının yöntemine göre yapıldı (28).

A- Protein çözeltisinin hazırlanışı

Protein derişimi 0.2-0.6 mg/ml olacak şekilde hazırlanan ve % 1 SDS, % 1 β -merkaptoetanol, 0.01 M sodyum fosfat tamponu (pH = 7.0) içeren karışım 5 dakika kaynar su banyosunda tutuldu.

B- Jellerin hazırlanması

Litresinde 7.8 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 38.6 g. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ bulunan ve pH = 7.0 olan tampona 2 mg/ml derişimde olacak şekilde SDS ilave edildi. Bu karışımın 15 ml. si üzerine % 22.2 akrilamid ve % 0.6 NN'-metilenbis-akrilamid çözeltisinden 13.5 ml ilave edildi. Hava kabarcıklarını çıkarmak için karışım bir-kaç dakika vakuma bağlandı. Daha sonra çözeltinin üzerine yeni hazırlanmış 15 mg/ml derişiminde 1.5 ml amonyum persülfat ve 45 μl TEMED (NNN'N" tetrametiletildiamin) ilave edildi. Çözelti 0.6 cm çapında ve 10 cm uzunluğundaki elektroforez tüplerine doldurularak jel çözeltisinin üzeri bir-iki damla su ilavesiyle kapatıldı. Tüpler 15-20 dakika normal ışıkta ve oda ısısında bekletildi. Bundan sonra her jel için su içinde hazırlanmış 5 μl % 1 lik bromfenol mavisi, 1 damla gliserol, 5 μl β -merkaptoetanol, 100 μl yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanmış protein çözeltisi ve 50 μl 0.01 M sodyum fosfat tamponu ayrı bir tüpte karıştırıldı ve karışımlardan alınan 0.1 ml çözelti jellerin üzerine uygulandı. Tüp başına 8 mA akım verilerek elektroforez başlatıldı ve bromfenol mavisi jel uzunluğunun 3/4 ü kadar ilerleyince elektroforez durduruldu.

Her örnek için yukarıda anlatıldığı şekilde 2 jel hazırlandı. Jellerden biri protein, diğeri de glikoprotein için boyandı. Boyamadan önce, elektroforezden alınan jeller fikse edilmek üzere önce bir gece 50-60 ml % 25 isopropil alkol, % 10 asetik asit karışımı içinde bekletildi. İkinci

gün jeller 6-9 saat süreyle 50-60 ml % 10 isopropil alkol, % 10 asetik asit içinde bırakıldı. Bundan sonra protein için boyanacak jeller bir gece % 10 asetik asit, % 0.01 amidoblack boyası içinde bırakıldılar. Sonra da bantlar açığa çıkıncaya kadar % 10 asetik asit ile jeller yıkandı.

Glikoprotein için boyanacak jeller ise PAS (periyodik asit-Shiff) boyası ile boyandı. Bunun için fikse edilmiş jel sıra ile 2 saat % 0.5 periyodik asit, 30-60 dakika % 0.5 sodyumarsenit, % 5 asetik asit karışımı, 20 şer dakika olmak üzere iki kez % 0.1 sodyum arsenit % 5 asetik asit karışımı içinde tutuldu. Sonra 10-20 dakika asetik asit içinde bekletildi. Daha sonrada jel 10 ml Shiff çözeltisi içeren bir tübe aktarıldı ve bir gece bekletildi. Sonraki gün jel bantlar açığa çıkıncaya kadar birkaç kez % 0.1 sodyum metabisülfid ve 0.01 N HCl içeren çözelti ile yıkandı. Pembe renkli bantlar jeller Shiff çözeltisine konduktan 5-10 dakika sonra görülmeye başlamıştı.

Shiff çözeltisini hazırlamak için 2.5 g. bazik fuksin 500 ml. suda çözüldü, üzerine 5 g. sodyum metabisülfid ve 50 ml 1 N HCl ilave edildi. Çözelti birkaç saat karıştırıldı ve 2 g. aktif kömür ile fazla renk giderildi.

Üre ve Guanidin-HCl ile jel elektroforezi :

Bunun için K. Weber ve M. Osborn'un yöntemi aynen uygulandı (26,27).

Üre elektroforezi için jellerin hazırlanması yukarıda anlatılan SDS li yöntemin aynı idi. İkisi arasındaki tek fark tamponun 8 M üre içermesidir.

Guanidin-HCl elektroforezi için ise yine SDS li tampon aynen hazırlandı yalnız SDS yerine 6 M guanidin-HCl içermekte idi. Kaynar durumdaki tampona enzim ilave edilerek 2-3 dakika kaynar suda bekletildi. Guanidin-HCl süz tampona karşı 4°C ta bir gece ve sonra SDS li tampona karşı bir gece daha dializ edildi. Her iki dializ 500 kısım tampona karşı iki defa değiştirilerek yapıldı. Bundan sonraki elektroforez işlemi yukarıda anlatıldığı şekilde yapıldı.

Molekül ağırlığı tayini :

Safılaştırdığımız enzimin molekül ağırlığı tayini K. Weber ve M. Osborn'un metoduna göre yapıldı (26,27).

Jel elektroforezi kısmında anlatıldığı gibi hazırlanmış olan jelle-re insan serum γ -globulini (kısım II), sığır serum albumini, katalaz ve tripsin uygulandı. Bu proteinlerin SDS içinde molekül ağırlıkları sıra ile 150 000, 68 000, 58 000 ve 23 000 dir. Bu proteinlerin jellere uygulanmasından önce SDS ile muameleleri, elektroforezden sonra fikse edilip protein için boyanmaları yukarıda anlatıldığı şekilde yapıldı. Neticede her jel'e uygulanan protein miktarı 20 μ g idi.

Boyamadan sonra açığa çıkan bantların orijine göre katettikleri mesafe ölçüldü ve mobilite aşağıdaki formülden hesaplandı :

$$M = \frac{\text{Proteinin katettiği mesafe}}{\text{Boyamadan sonraki jel uzunluğu}} \times \frac{\text{Boyamadan önceki jel uzunluğu}}{\text{Bromfenol mavisinin katettiği mesafe}}$$

Her proteinin mobilitesi molekül ağırlığına karşı semi-logaritmik olarak grafiklendi. Bu noktalardan geçen doğru yardımıyla saf enzime ait bantların molekül ağırlıkları bulundu (Şekil 12).

Yapay zarların oluşturulması, saf enzimin zarlara yerleştirilmesi ve elektron mikroskopisi :

Yapay zarların (lipozom) oluşturulması, esas olarak, E.Racker ve arkadaşlarının yöntemine göre yapılmıştır (29). Bunun için fosfatidiletanol amin : fosfatidilkolin (4 : 1 mg/mg) karışımı kloroform içinde hazırlandı. Bu karışımdan 0.3 ml küçük bir tüpün içine pipetlendi ve azot atmosferinde kloroform uçurularak tüpün dibinde fosfolipitlerin ince ve düzenli bir film oluşturması sağlandı. Bunun üzerine 0.3 ml saf enzim çözeltisi kondu ve tüp N_2 ile doyurularak $4^{\circ}C$ ta 60 dakika süreyle şiddetle vortekslendi. Bu süre içinde koyu opalesan görünüm biraz berraklaştı. Enzimin lipozomlara yerleştiğini göstermek için iki yöntem uygulandı.

A- % 4 fosfotungstik asit ile lipozomlarda protein boyanması : Fosfotungstik asit ile muamele edilen proteinler elektron mikroskopunda siyah bir görünüm verir (30). Yukarıda anlatılan şekilde elde edilen lipozomlardan bir damla, kollodionlu "grid" üzerine damlatıldı, 3 dakika çökmele-ri için beklendi, fazla sıvı kurutma kağıdı ile emildi ve grid üzerine bir damla % 4 fosfotungstat (pH = 7.0) damlatıldı, 5 dakika bekletildi, fazla sıvı kurutma kağıdı ile emildi ve bir kez damıtık su ile yukarıdan sonra elektron mikroskopunda incelendi.

B- Lipozomlarda ($Na^+ - K^+$) ATP az aktivitesi tayini : Bunun için kurşunun, kurşun fosfat halinde çökmesine dayanan yöntem kullanıldı (31-33).

Oluşturulan ATP azlı lipozomlar, normal olarak enzim aktivitesine bakmış olduğumuz inkübasyon ortamında 37°C ta bir saat inkübe edildi. Bu inkübasyon karışımında ilave olarak 0.1 mM Pb (NO₃)₂ vardı. Tepkime 1 : 1 oranında 35 mM asetat-veronal tamponu (pH = 7.2) içinde % 2 osmik asit içeren çözeltinin eklenmesiyle durduruldu. 45 dakika sonra da bu karışımdan bir damla grid üzerine damlatıldı. 3 dakika bekledikten sonra fazla sıvı kurutma kağıdı ile alındı ve bir kez damıtık su ile yıkandıktan sonra elektron mikroskobunda incelendi.

B U L G U L A R

(Na⁺ - K⁺) ATP az aktivitesine ATP derişiminin etkisi :

En uygun ATP derişimi zardaki enzim için 3.3 mM, saf enzim için ise 3.0 mM olarak bulundu. Her iki halde de yüksek ATP derişiminin aktiviteyi inhibe ettiği gözlemlendi (Şekil 1).

ATP için K_m ve V_{max} değerleri zar enzimi için sırasıyla 11 mM ve 0.28 μ mol P_i /saat/mg protein, saf enzim için ise sırasıyla 2.5 mM ve 0.6 μ mol P_i /saat/mg protein olarak Lineveawer-Burk eğrilerinden hesaplandı (Şekil 2 ve 3).

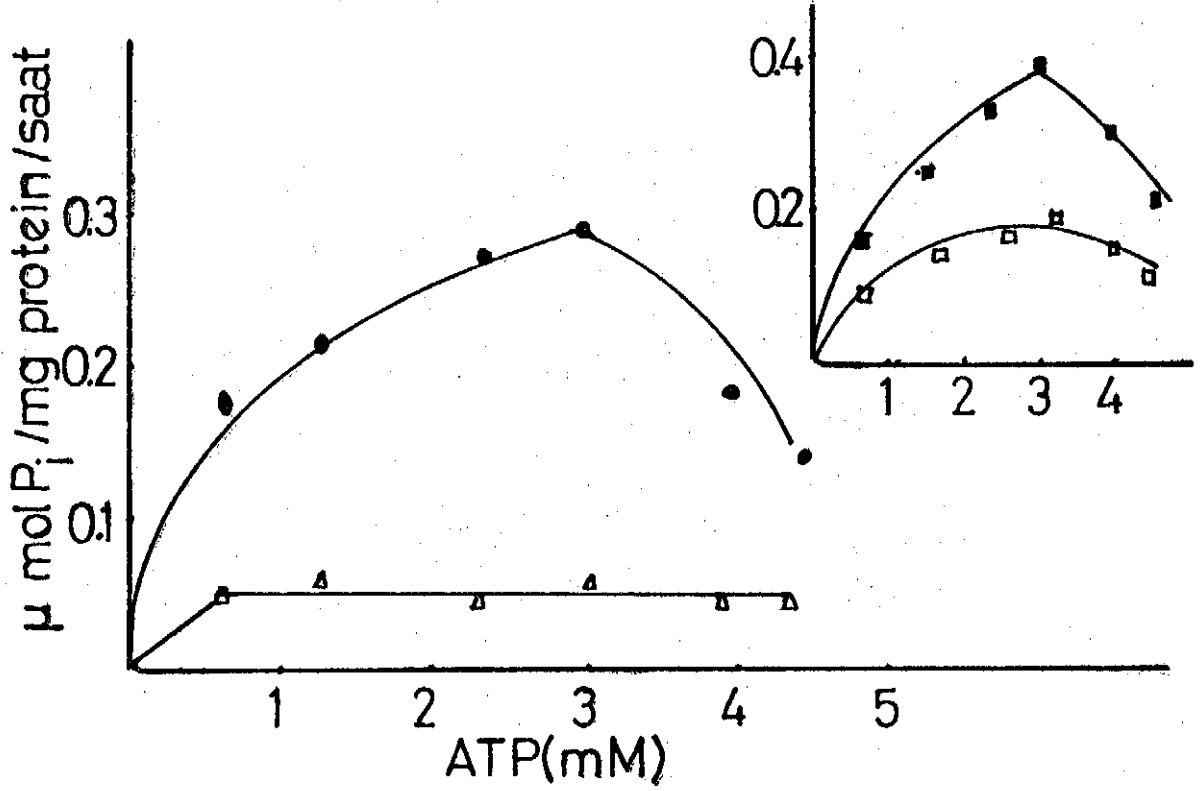
Na⁺, K⁺ ve Mg²⁺ derişimlerine bağlı ATP hidrolizi :

Şekil 4, 5 ve 6 da zardaki ve saf enzim için en uygun Na⁺, K⁺ ve Mg²⁺ derişimlerinin sırayla 50.0, 20.0 ve 3.0 mM olduğu görülmektedir.

Şekil 4 de artan Na⁺ derişiminin (Na⁺ - K⁺) ATP az aktivitesini inhibe ederken ouabaine bağlı olmayan aktiviteyi etkilemediği görülmektedir.

Diğer taraftan artan K⁺ derişimi her iki tür aktiviteyi de inhibe etmektedir (Şekil 5).

Mg²⁺ nun artan derişimiyle (Na⁺ - K⁺) ATP az aktivitesi inhibe olurken, ouabaine duyarlı olmayan aktivite artmaktadır (Şekil 6).



ŞEKİL 1. ATP derişiminin ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) ATP az aktivitesine etkisi :

Toplam ATP az aktivitesi için inkübasyon ortamı, 50 mM Na^+ , 20 mM K^+ , 3 mM Mg^{2+} , 225 mM Tris-HCl (pH = 7.4) ve değişik ATP derişimleri içermektedir. Inkübasyon 37°C ta 60 dakika yapılmıştır.

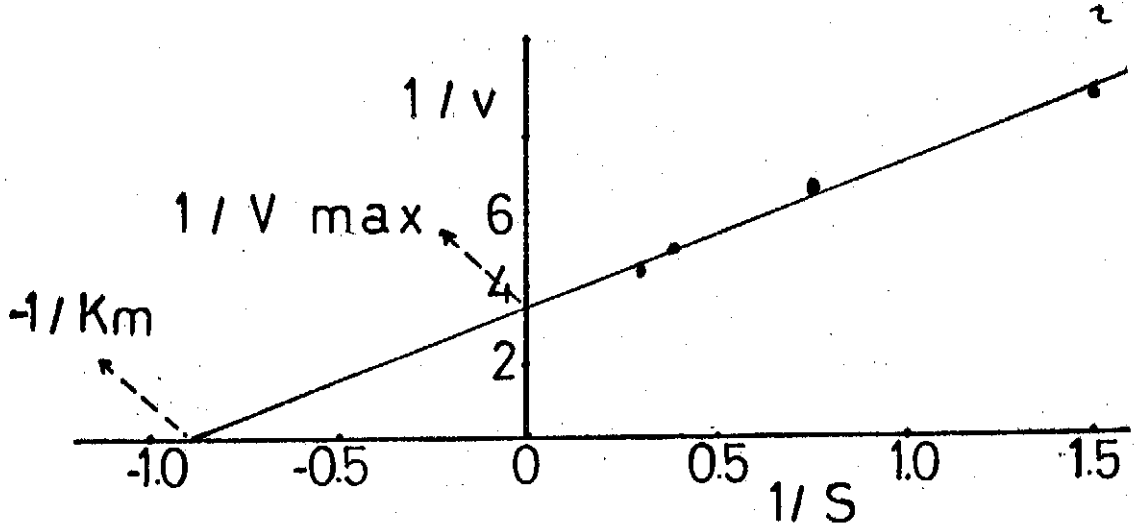
(● - ●) ouabainsiz aktivite.

(Δ - Δ) ouabainli aktivite

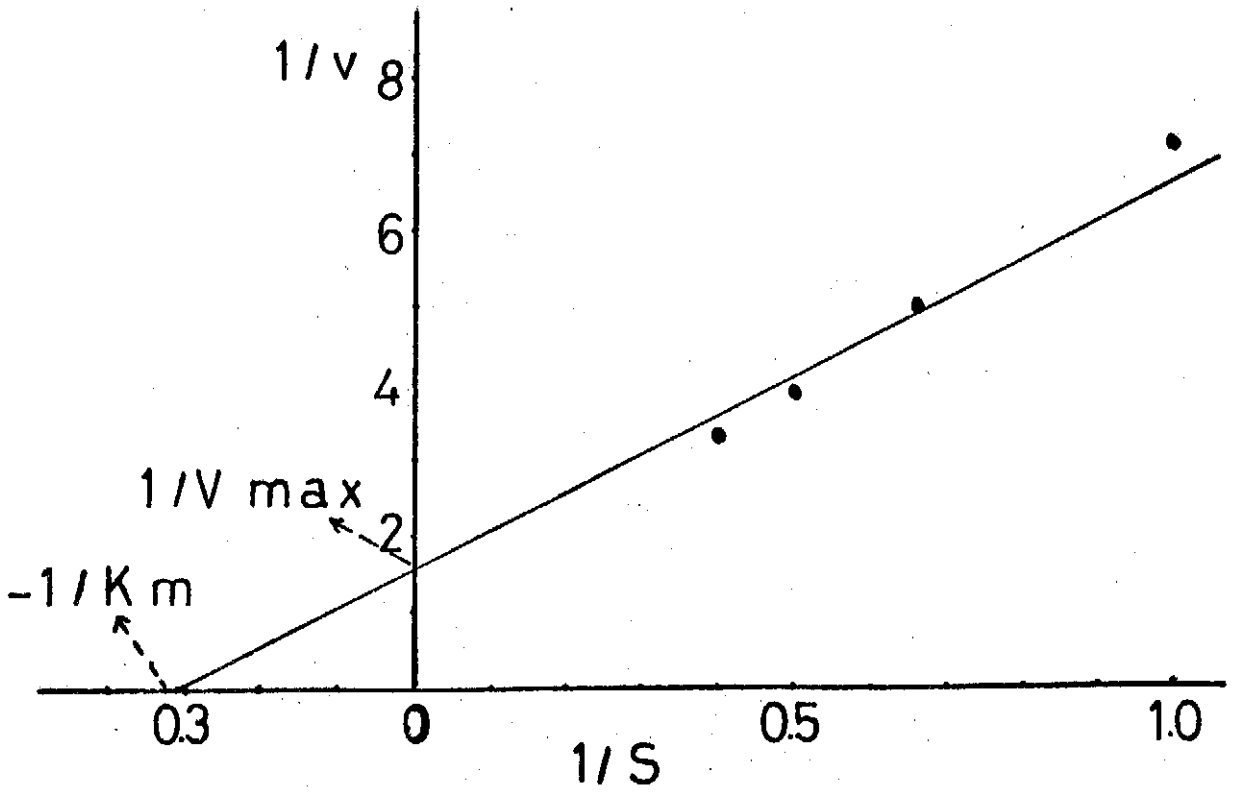
İç grafikte,

(□ - □) zardaki ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) ATP az aktivitesi

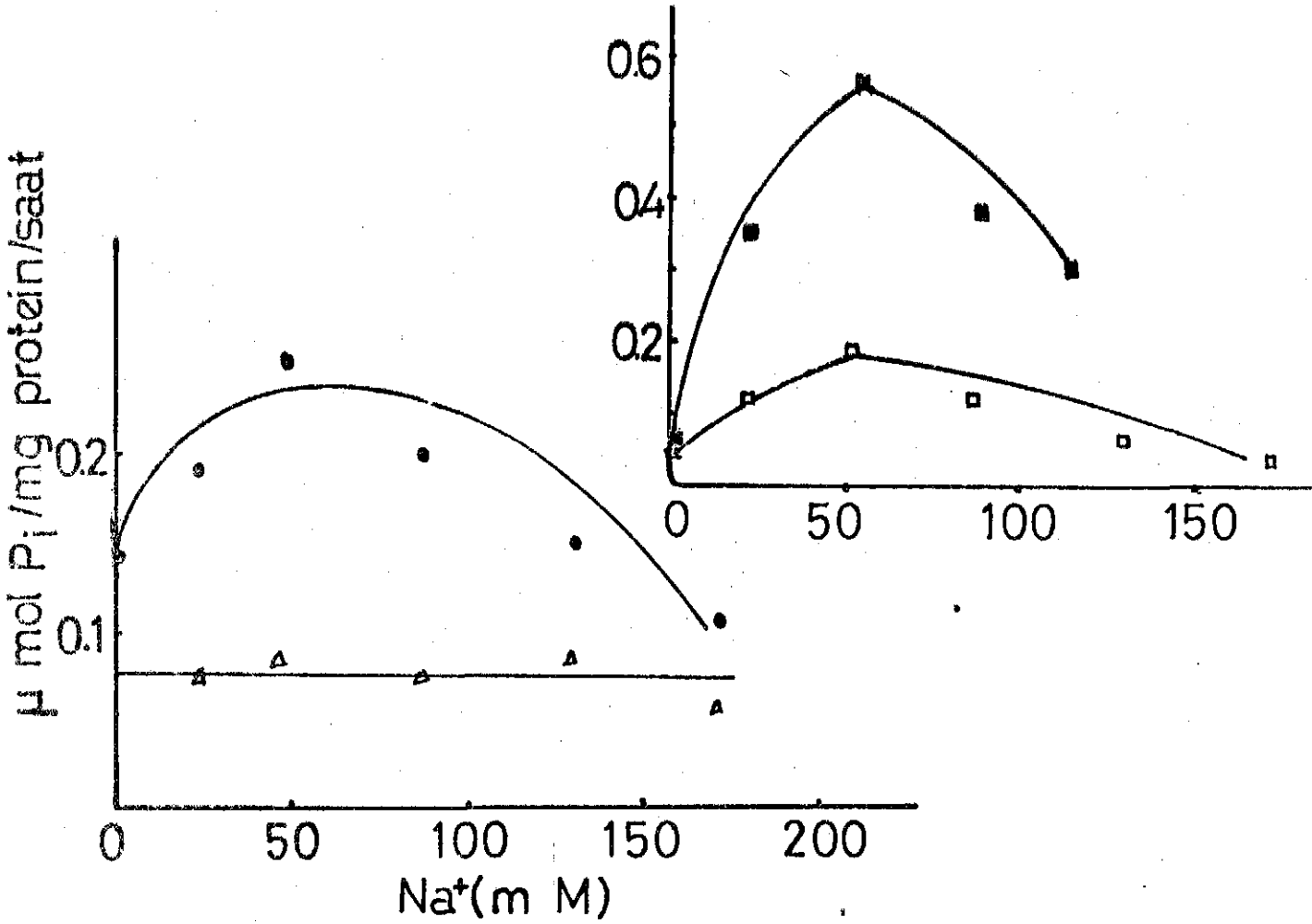
(■ - ■) saflaştırılmış ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) ATP az aktivitesi



ŞEKİL 2. Zardaki ($Na^+ - K^+$) ATP az için Lineweaver-Burk eğrisi. K_m ve V_{max} değerleri oklarla gösterilmiştir.



ŞEKİL 3. Saflaştırılmış ($Na^+ - K^+$) ATP az için Lineweaver-Burk eğrisi. K_m ve V_{max} değerleri oklarla gösterilmiştir.



ŞEKLİ 4. Na^+ derişiminin ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) ATP az aktivitesine etkisi.

İnkübasyon ortamı 3.3 mM ATP, 20 mM K^+ , 3 mM Mg^{2+} , 225 mM Tris-HCl (pH = 7.4) ve değişik Na^+ derişimleri içermektedir. İnkübasyon 37°C ta 60 dakika yapılmıştır.

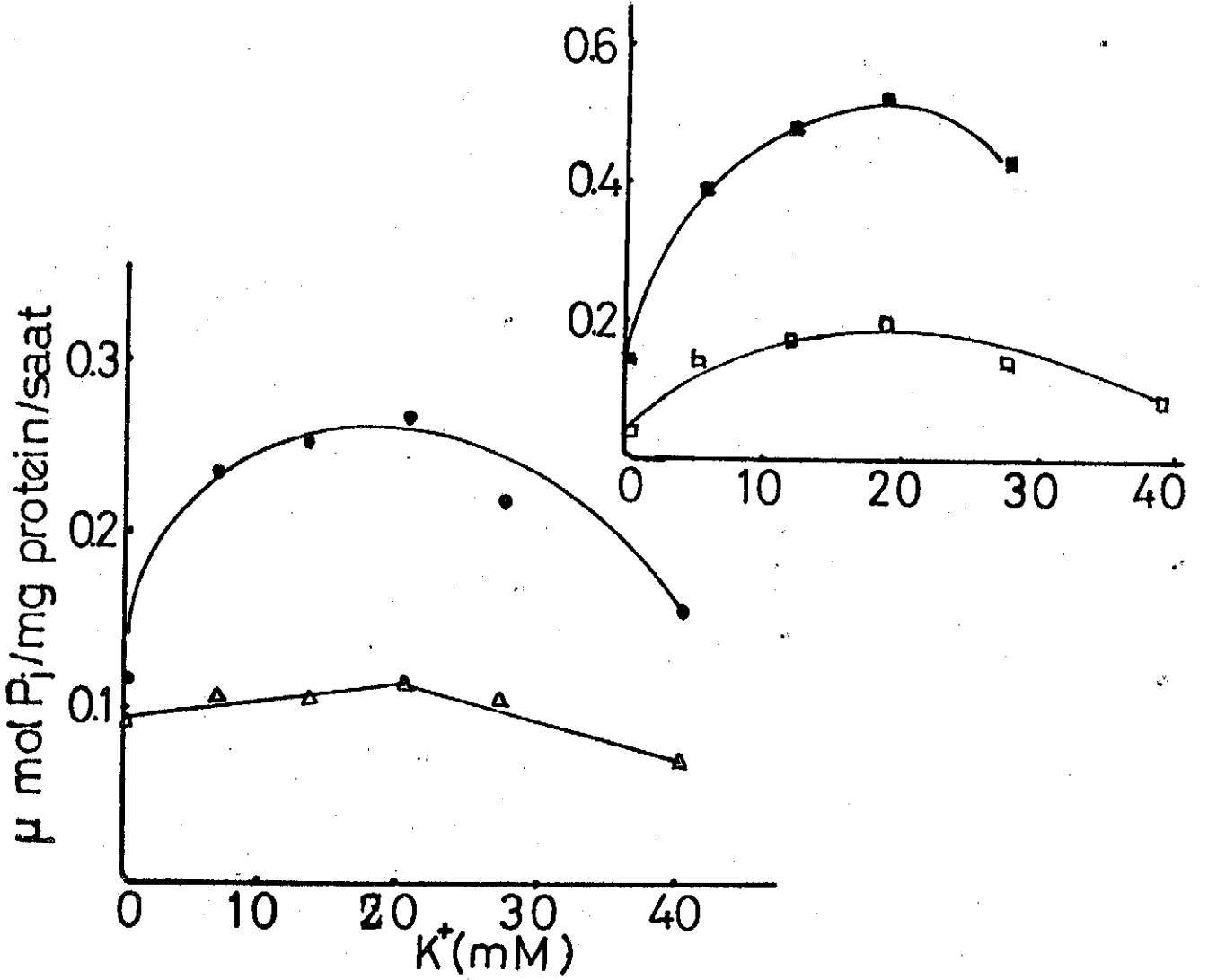
(● - ●) ouabainsiz aktivite

(Δ - Δ) ouabainli aktivite

İç grafikte,

(\square - \square) zardaki ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) ATP az aktivitesi

(\blacksquare - \blacksquare) saflaştırılmış ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) ATP az aktivitesi



ŞEKİL 5. K^+ derişiminin ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) ATP az aktivitesine etkisi.

İnkübasyon ortamı 3.3 mM ATP, 50 mM Na^+ , 3 mM Mg^{2+} , 225 mM Tris-HCl (pH = 7.4) ve değişik K^+ derişimleri içermektedir. İnkübasyon 37°C ta 60 dakika yapılmıştır.

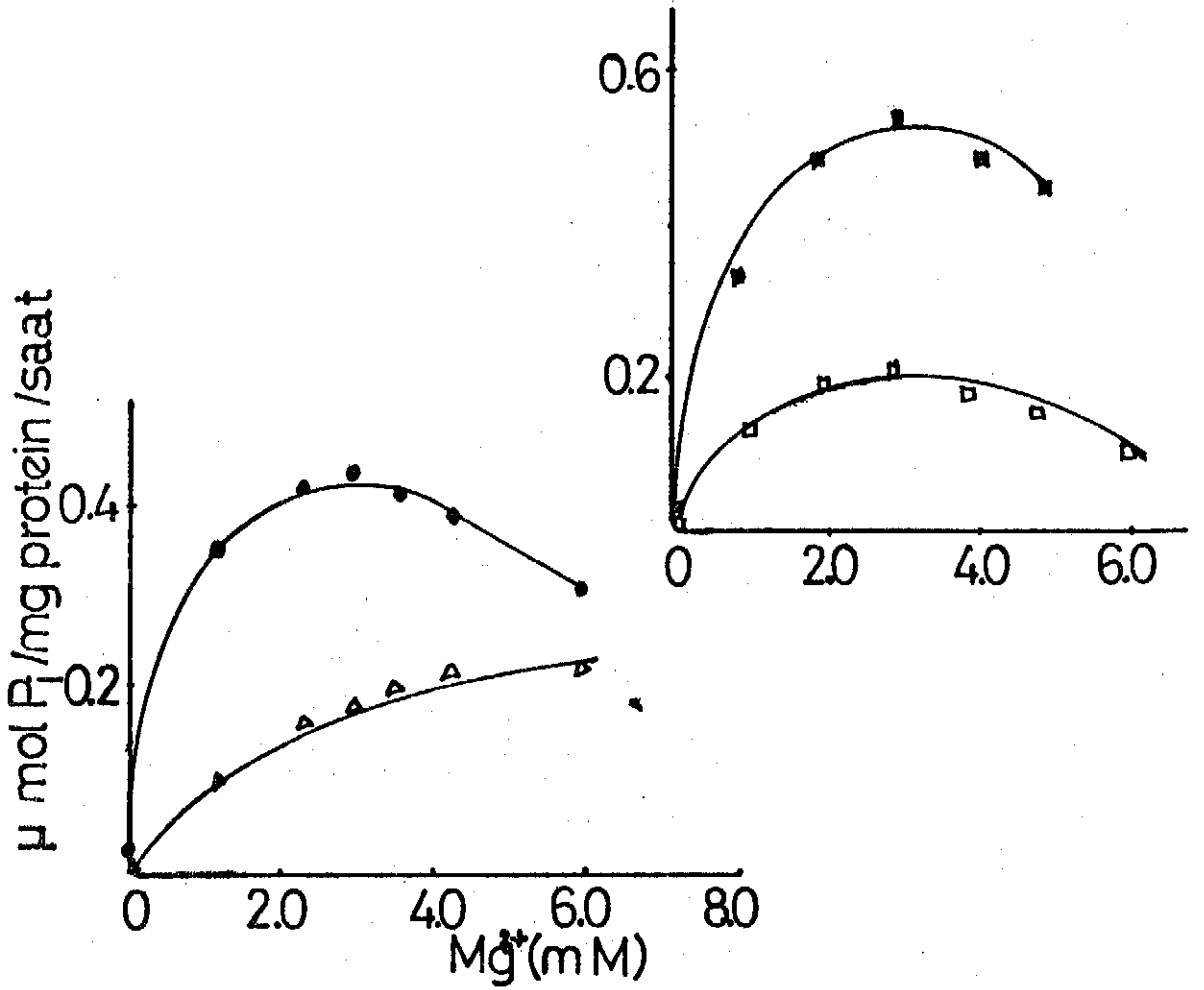
(● - ●) ouabainsiz aktivite

(Δ - Δ) ouabainli aktivite

İç grafikte,

(□ - □) Zardaki ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) ATP az aktivitesi

(■ - ■) saflaştırılmış ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) ATP az aktivitesi



ŞEKİL 6. Mg^{2+} derişiminin $(\text{Na}^+ - \text{K}^+)$ ATP az aktivitesine etkisi.

İnkübasyon ortamı 3.3 mM ATP, 50 mM Na^+ , 20 mM K^+ , 225 mM Tris-HCl (pH = 7.4) ve değişik Mg^{2+} derişimleri içermektedir. İnkübasyon 37°C ta 60 dakika yapılmıştır.

(● - ●) ouabainsiz aktivite,

(▲ - ▲) ouabainli aktivite

İç grafikte,

(□ - □) zardaki $(\text{Na}^+ - \text{K}^+)$ ATP az aktivitesi

(■ - ■) saflaştırılmış $(\text{Na}^+ - \text{K}^+)$ ATP az aktivitesi.

Saf enzimde ouabaine bağlı olmayan aktivite hiç gözlenmemiştir. Uygun Na^+ , K^+ ve Mg^{2+} derişimleri zardaki enzim ile aynıdır. Ayrıca saf enzim de artan Na^+ , K^+ ve Mg^{2+} derişimleriyle inhibe olmaktadır.

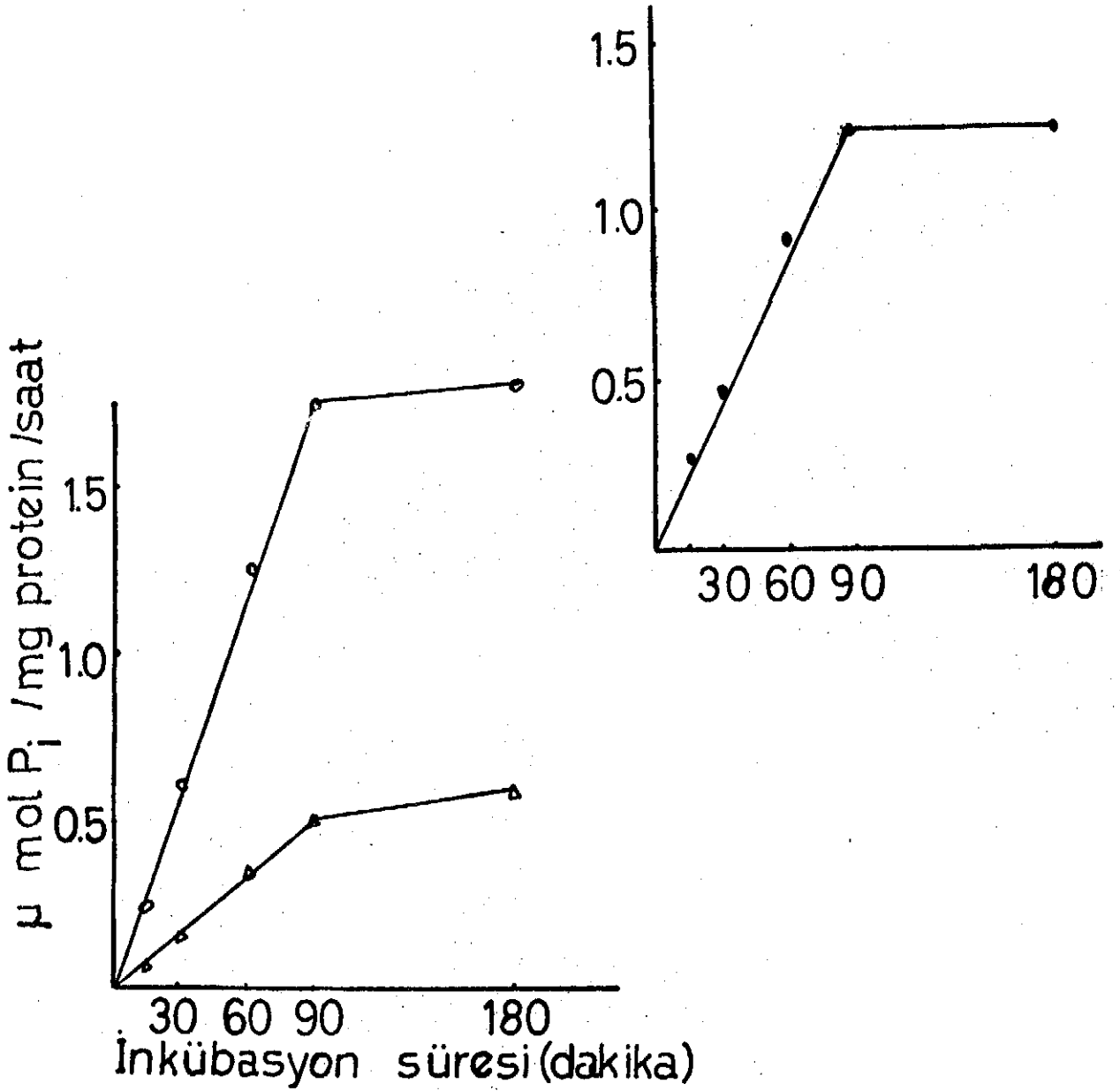
Inkübasyon süresinin etkisi :

Zar enzimi ile yapılan deneylerde ağığa çıkan P_i miktarı 90 dakikalık inkübasyon süresine kadar doğrusal olarak artmaktadır (şekil 7).

Isı ve PH 'nın etkisi :

Zar enzimi ile yapılan deneylerde her iki aktivitede yükselen ısı ile artmakta ve 42°C ta en yüksek değerine ulaşmaktadır (şekil 8).

şekil 9 da eritrosit zarında her iki aktivite için en uygun pH değerinin 7.4 olduğu görülmektedir. Inkübasyon ortamları uygun pH değerine 225 mM asetat (pH = 6.0), 225 mM imidazol-HCl (pH = 6.5 ve 7.0) ve 225 mM Tris-HCl (pH = 7.4 ve 8.0) tamponları ile ayarlanmıştır.

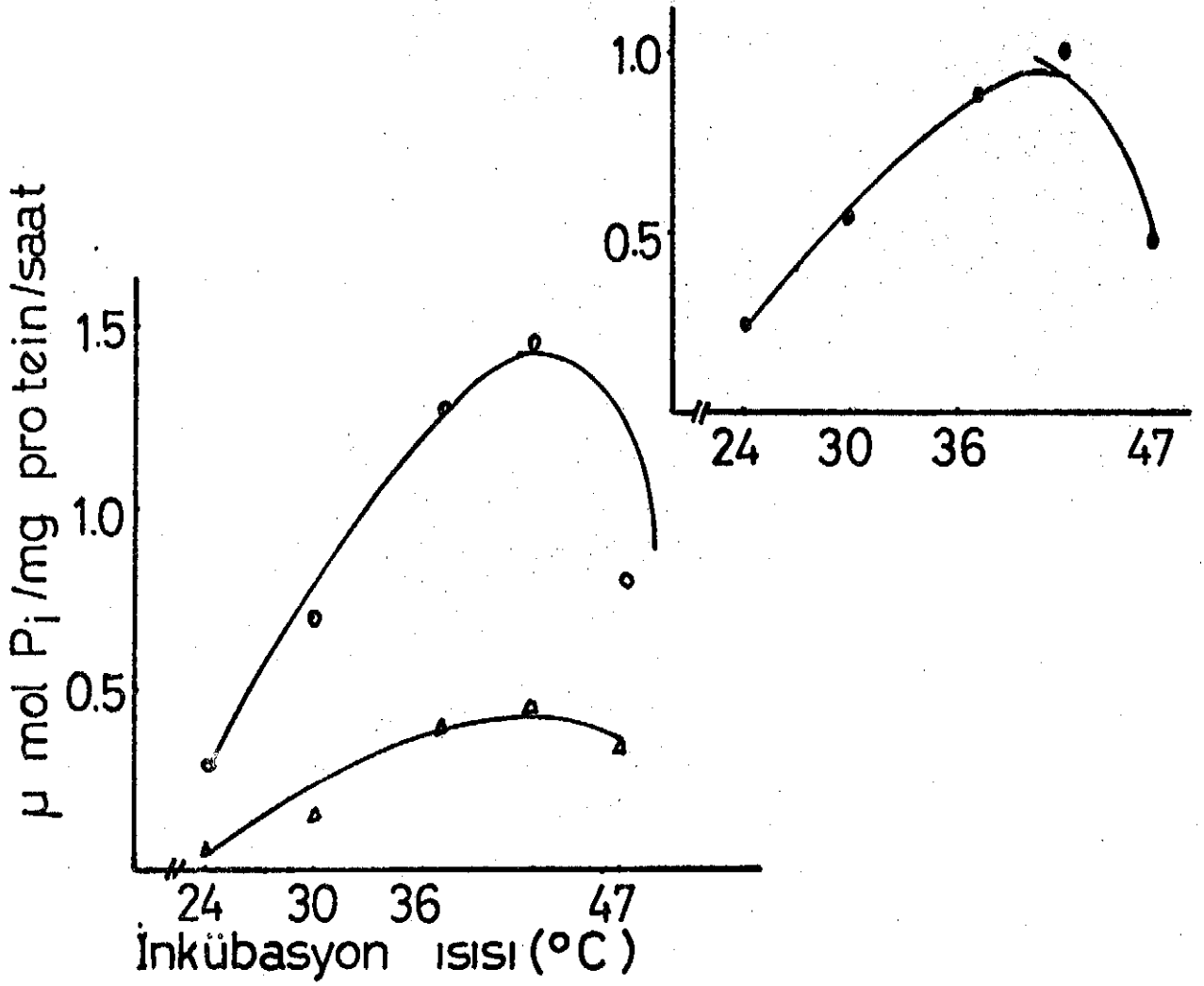


ŞEKİL 7. (Na⁺ - K⁺) ATP az aktivitesinin inkübasyon süresine olan bağımlılığı. İnkübasyon karışımı 3.3 mM ATP, 50 mM Na⁺, 20 mM K⁺, 3 mM Mg²⁺ ve 225 mM Tris-HCl (pH = 7.4) içermektedir. İnkübasyon 37°C ta yapılmıştır.

(● - ●) ouabainsiz aktivite

(Δ - Δ) ouabainli aktivite

İç grafikte (Na⁺ - K⁺) ATP az aktivitesi görülmektedir.

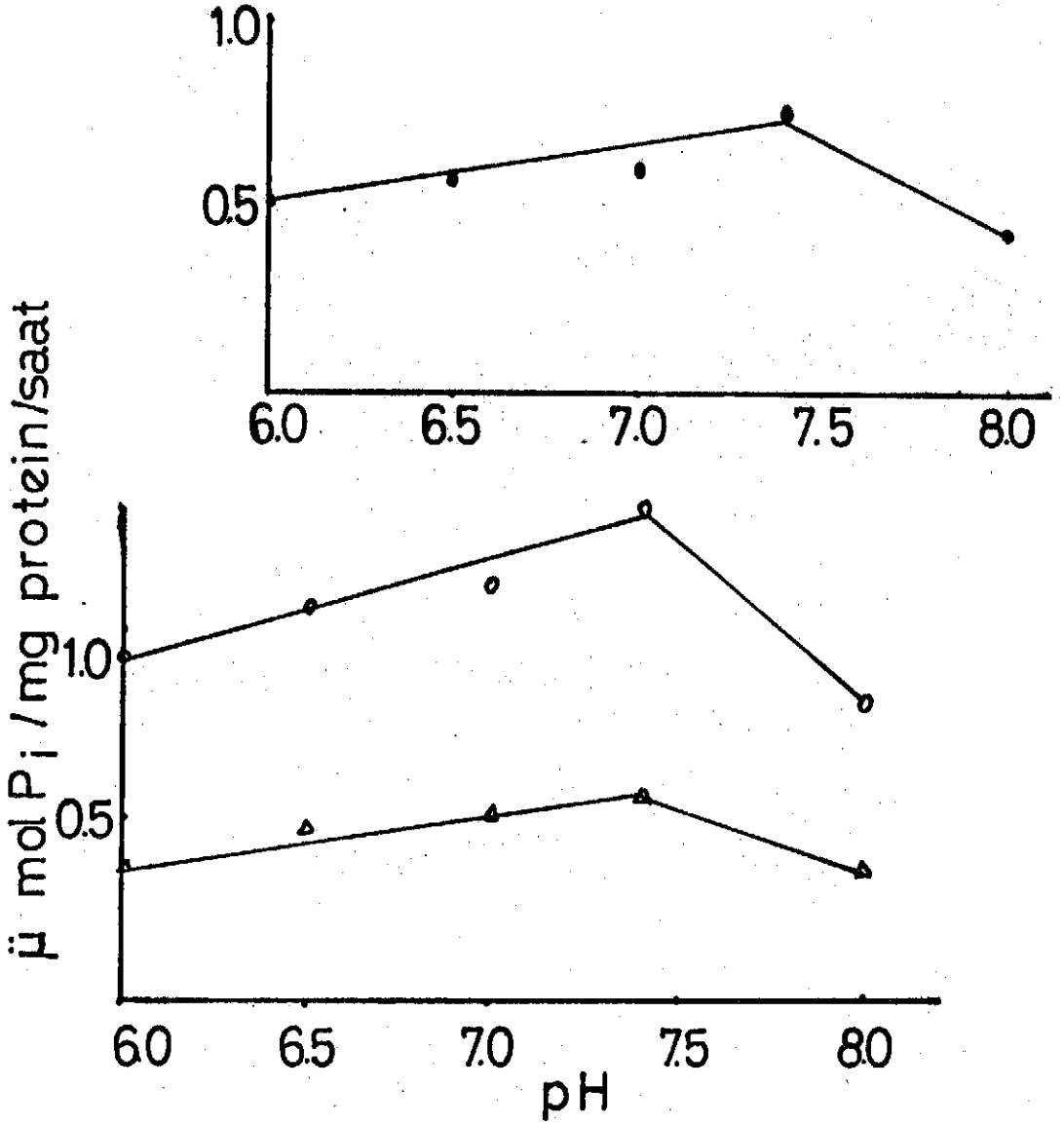


ŞEKİL 8. İnkübasyon ısısının (Na⁺ - K⁺) ATP az aktivitesine etkisi. İnkübasyon ortamı Şekil 7 deki gibidir. İnkübasyon 60 dakika yapılmıştır.

(● - ●) ouabainsiz aktivite

(Δ - Δ) ouabainli aktivite

İç grafikte (Na⁺ - K⁺) ATP az aktivitesi görülmektedir.



ŞEKİL 9. pH'nin etkisi. İnkübasyon ortamı Şekil 7 deki gibidir. Sadece tampon çözeltiler yöntemler kısmında anlatıldığı gibi hazırlanmıştır.

(● - ●) ouabainsiz aktivite

(Δ - Δ) ouabainli aktivite

İç grafikte ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) ATP az aktivitesi görülmektedir.

(Na⁺ - K⁺) ATP azın zardan çözünmesi :

J.R. Slack ve arkadaşlarının yöntemine göre sadece DOC ile çözünme denenmiştir (22). Zarlar, son DOC : protein oranı 1:1, 1:4, 1:2, 3:4, 1:1, 5:4 ve 3:1 olacak biçimde DOC ile karıştırılıp 30 dakika 0-4°C ta inkübe edildi. DOC : protein oranı 3:1 olduğunda 70 000 xg de santrifüj sonunda çökelti kalmadığı halde çözünür kısımda aktivite saptanamadı. Daha sonra Brij-58 ile aynı şekilde Brij-58 : protein oranı 1:30, 1:25, 1:20, 1:15, 1:12, 1:10, 1:8, 1:6, 1:4, 1:3, 1:2 ve 3:5 olacak şekilde çözünme deneyleri 0-4°C ta yapıldı (34-36). Ancak bu derişimlerde de 70 000 xg çökeleğinde aktivite azalmaya başlamasına rağmen üst kısımda aktivite bulunamadı. Daha yüksek Brij-58 derişimi fosfat tayininde bulanıklık oluşturduğu için bu deterjanın miktarı daha fazla artırılmadı.

Bundan sonra değişik oranlarda triton X-100, digitonin, Brij-36, Brij-35, SDS, Tween 80 gibi deterjanlarla yapılan çalışmalarda da enzim çözünür halde elde edilemedi. Ortamda deterjan yokken 5, 10, 20, 30 ve 40 saniye süreyle zarlara uygulanan 60 watt güçteki sonikasyon sonucunda çözünür kısımda enzim aktivitesi bulunamadı. Çökelekteki enzim aktivitesi ise 40 saniye sonikasyonda azalmaya başladı.

P_i tayinini bozmayan ve enzim aktivitesini azaltmayan en yüksek miktarda Brij-58 bulunan (protein : Brij-58 = 4/1 mg/mg) ortama değişik miktarlarda DOC koyarak enzimin çözünür halde elde edilmesine çalışıldı. DOC : Brij-58 oranı 0 - 7.5 : 1 arasında artırıldığı halde çözünme gözlenemedi. DOC : Brij-58 oranı 7.5:1 olduğunda 70 000 xg çökeleğinde aktivite azalması gözlenmedi fakat P_i tayininde bulanıklık meydana gelmesi nedeniyle daha yüksek oranlara çıkılmadı. Bunun üzerine çeşitli oranlarda

DOC, Brij-58 ve protein içeren bu karışımların her biri ayrı ayrı 10, 20, 30 ve 40 saniye olmak üzere sonike edildiler. Sonikasyonlar sonunda 40 saniyenin en uygun süre olduğu görüldü. 40 saniye sonike edilmiş karışımların 70 000 xg santrifüjlemesinden sonra yukarıda kalan kısımda saptanan aktiviteler Tablo I de gösterilmiştir.

DOC : Brij-58 (1) (mg/mg)	Özgül aktivite (u mol P _i /saat/mg prt.)	% verim (2)
1:1	-	-
2:1	-	-
3:1	-	-
4:1	0.143 ± 0.02	49.8 ± 5.4
5:1	0.121 ± 0.02	42.3 ± 4.3

Tablo I : Çeşitli DOC : Brij-58 oranları kullanılarak 40 saniye sonike edilmiş örneklerde enzimin çözünme miktarı.

(1) zar proteini : Brij-58 e göre 4:1 (mg/mg) olacak şekilde sabit tutuldu.

(2) zardaki toplam aktivite = % 100

Tablodan da anlaşıldığı gibi protein : DOC oranı 1:1 (mg/mg) ve DOC : Brij-58 oranı 4:1 (mg/mg) olduğunda 40 saniye sonikasyondan sonra % 49.8 verimle en fazla çözünme sağlanmıştır.

Çözünmüş enzimin deriştirilmesi için yapılan ultrafiltrasyon enzim aktivitesini bozmamaktadır.

(Na⁺ - K⁺) ATP azın saflaştırılması :

Yöntemler kısmında anlatıldığı gibi, kolon kurmadan DEAE seluloz kromatografisi uygulanmıştır. Zardan itibaren saflaştırma miktarı ve verim Tablo II de görülmektedir.

	Özgül aktivite (μ mol P _i /saat/mg prt.)	Saflaştırma miktarı	% verim (*)
Zardaki enzim (n= 21)	0.157 \pm 0.018	1.00	100
Değişik enzim (n= 19)	0.143 \pm 0.02	0.91 \pm 0.02	49.8 \pm 5.4
Saf enzim (n= 19)	0.672 \pm 0.13	3.98 \pm 0.64	34.9 \pm 9.1

TABLO II : (Na⁺ - K⁺) ATP azının saflaştırma miktarları. (*) zardaki enzimin toplam aktivitesi % 100 kabul edilerek diğerleri hesaplanmıştır.

Tablo II de görüldüğü gibi zar'a göre DEAE sonrası enzim 3.98 kez % 34.9 verimle saflaştırılmış bulunmaktadır.

(NH₄)₂ SO₄ saflaştırma amacıyla kullanılamamıştır çünkü daha sonra anlatılacağı gibi enzim uzun süre 4°C ta dializ edilmeye dayanıklı değildir.

Saflaştırma için sefadeks G-200 denenmiş ancak özgül aktivitede bir artma gözlenmemiştir.

CM-seluloz ile yapılan kromatografide 0.8 mg/ml DOC ve 0.2 mg/ml Brij-58 içeren 10 mM Tris-HCl pH = 7.5 tamponu kullanıldığında, DEAE-seluloz kromatografisinde olduğu gibi, enzim reçineye tutunamamıştır. Ancak CM-seluloz kromatografisinde daha fazla protein reçineye tutunamadığından özgül aktivite artışı olmamıştır.

Jel elektroforezi :

Şekil 10 da enzimin zarda, ultrafiltrasyon ile deriştirildikten ve DEAE-seluloz kromatografisinden sonra yapılan SDS jel elektroforezi sonuçları görülmektedir.

Zardaki ve derişik haldeki enzimin protein boyamasında yaklaşık 10-15 band olduğu halde saf enzim jelinde 2 protein bantı saptanmıştır.

Aynı örneklerin glikoprotein için boyanmasında; zar ve derişik enzim jellerinde üçer bant saf enzim jelinde ise tek bant gözlenmiştir. Bu bant saf enzimin anoda yakın olan protein bantı ile aynı mobiliteye sahiptir (Şekil 11).

Molekül ağırlığı tayini :

Saf enzimde gözlenen iki protein bantından anoda en yakın olanının yaklaşık 33 000, en yavaş hareket eden diğesinin ise yaklaşık 150 000 molekül ağırlığında olduğu yöntemler kısmında anlatılan metodla saptanmıştır (Şekil 12).

Enzimin dayanıklılığı :

Zardaki enzim 20 mM Tris-HCl pH = 7.5 tamponu içinde 4°C ta 8-10 saat, -20°C ta 4-5 hafta dayanıklıdır.

Derişik ve saf enzim çözeltileri 0.8 mg/ml DOC ve 0.2 mg/ml Brij-58 içeren aynı tampon içinde 4°C ta 6-8 saat, -20°C ta 15-16 saat dayanıklıdır. Enzimin dayanıklılığını artırmak için % 30, 40, 50, 60 (hacim/hacim) oranlarında gliserol içinde enzim 5 gün bekletilmiş ve hergün alınan örneklerde

aktiviteye bakılmıştır. En uygun gliserol oranının % 40 olduğu sonucuna varılmıştır çünkü böyle bir karışım da enzim aktivitesi 5 gün % 10 gibi az bir kayıpla dayanıklı kalabilmiştir (Şekil 13). Daha düşük gliserol oranlarında aktivite kaybı ilk günlerden başlamıştır.

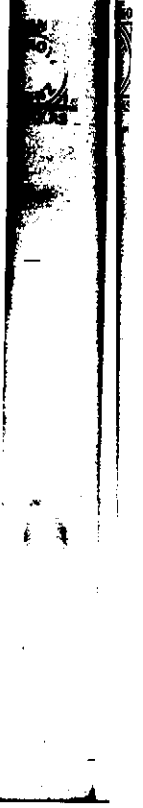
Yapay zarların oluşturulması, saf enzimin zarlara yerleştirilmesi ve elektron mikroskopisi :

% 4 fosfotungstat ile boyanmış olan lipozomların büyük bir çoğunluğunda zarlar koyu siyah bir görünüm vermektedir (Şekil 14). Bu da enzimin lipozom zarında homojen olarak yerleştiğini göstermektedir.

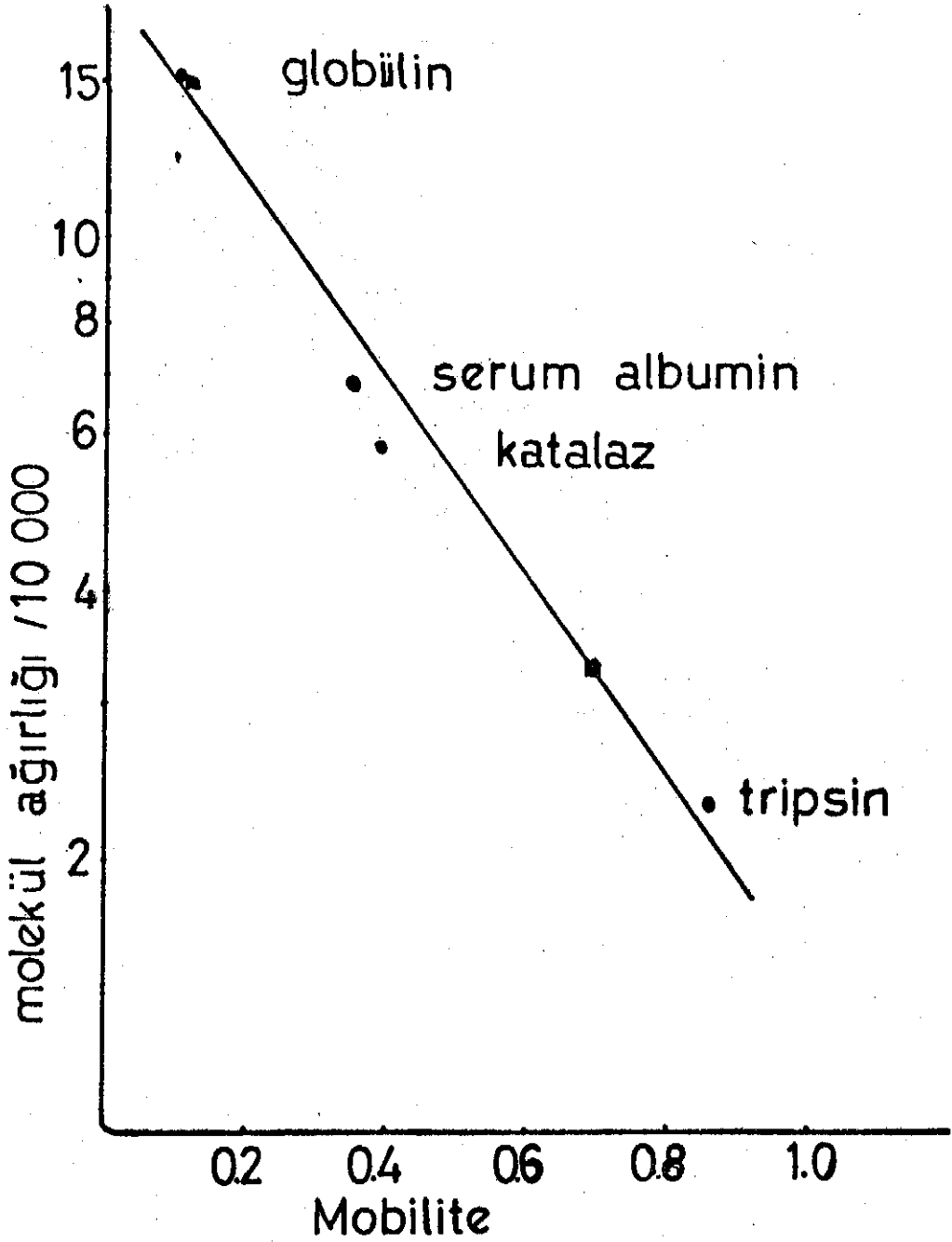
Lipozomlarda ATP azı göstermek için hazırlanan örneklerdeki görünüm ise yukardakinden biraz daha farklıdır (Şekil 15). Lipozomların çevresinde noktalar halinde siyah çökelekler görülmektedir.



ŞEKİL 10 : SDS jel elektroforezi sonucunda protein için boyanan jeller. Soldan sağa doğru eritrosit zarı, derişik enzim ve saf enzim.

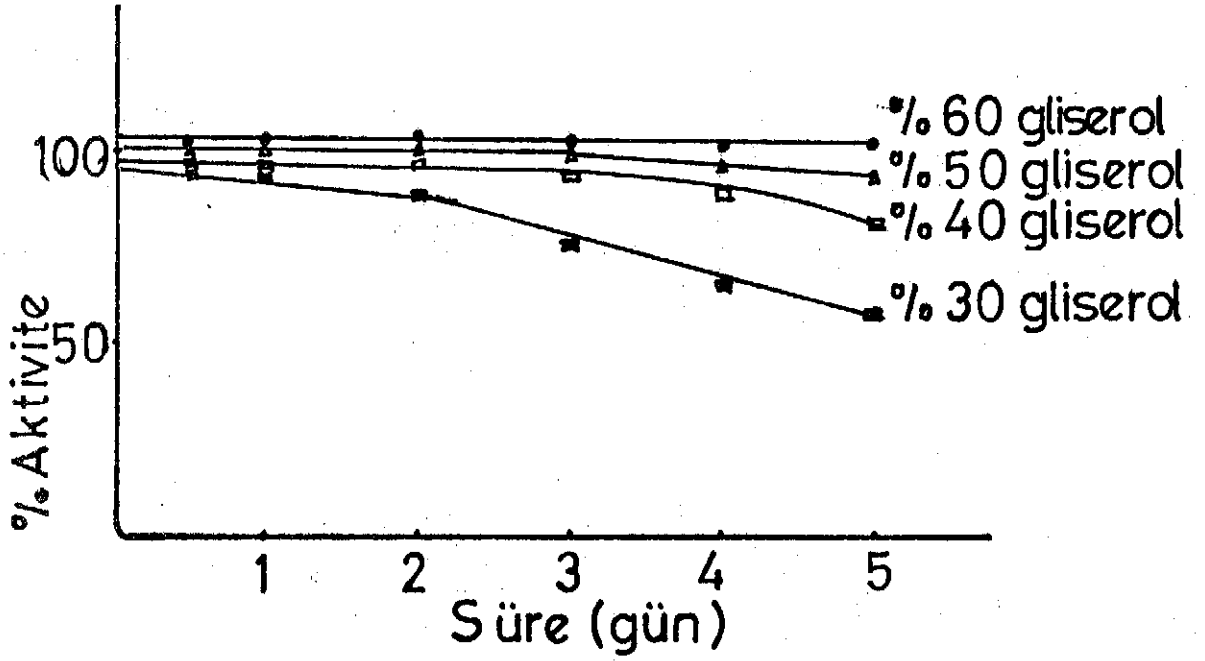


ŞEKİL 11 : SDS jel elektroforezi sonucunda glikoprotein için boyanan eritrosit zarı jel



ŞEKİL 12. SDS jel elektroforezi ile yapılan molekül ağırlığı tayini.

(■) (Na⁺ - K⁺) ATP azın alt birimleri.



ŞEKİL 13. Değişik enzim çözeltisindeki ($Na^+ - K^+$) ATP az aktivitesinin değişik gliserol oranlarında $-30^{\circ}C$ ta dayanıklılığı.



ŞEKİL 14 : Lipozomlarda fosfotungstat ile protein boyaması.



ŞEKİL 15 : Lipozomlarda (Na^+ - K^+) ATP az aktivitesinin boyanması.

T A R T I Ş M A

Eritrosit zarlarında ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) ATP az aktivitesinin varlığı gösterilmiştir fakat enzimin özellikleri hakkında fazla bir şey bilinmemektedir (1-9). Örneğin bazı araştırmacılar inkübasyon karışımında 140 mM, bazıları ise 40 mM Na^+ derişimi kullanarak enzim aktivitesini tayin etmişlerdir (1,5,7-9,11,15,18-20). Bu, büyük bir olasılıkla, ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) ATP az aktivitesinin eritrositte diğer dokulara nazaran daha düşük olması nedeniyledir.

Eritrosit zarlarındaki Ca^{2+} ATP azı daha iyi çalışılabilmiştir (21-25). Diğer taraftan ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) ATP azı muhtemelen eritrosit zarına daha sıkı tutunmuştur. Bu nedenle eritrosit zarı ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) ATP azının kinetik özellikleri hakkında fazla bilgi elde edilememiştir (5,8,15,18,19).

Şimdiye kadar eritrosit zarlarının hazırlanması için bir çok yöntem tarif edilmiştir (23,37,38). Bizim kullandığımız yöntem gere de hemoglobinden hemen hemen tamamen arınmış zarlar elde edilebilmiştir. Bu şekilde hazırlanmış olan eritrosit zarlarındaki enzim aktivitesinin -20°C ta en az 4 hafta dayanıklı olduğu gözlenmiştir. Bu arada zarların çözülüp tekrar dondurulması aktivite kaybına yol açmaktadır.

Şimdiye kadar eritrositlerden ($Na^+ - K^+$) ATP azın saflaştırıldığı yayınlanmamıştır. Yanlız enzimin tavşan böbreği medullasının dış kısmından çeşitli deterjanlarla veya sukroz densite gradieni ile saflaştırıldığı bildirilmiştir (34,39). Sığır beyninden ($Na^+ - K^+$) ATP azın çözünmesine çalışılmıştır (12,40). Bunun için doku ATP, Na^+ ve Mg^{2+} iyonlarını içeren ortamda DOC ile muamele edilmiştir.

Diğer birkaç memeli dokusunda ve *electrophorus electricus* gibi canlılardan da ($Na^+ - K^+$) ATP azının izole edildiği bildirilmiştir (35,41-43).

Eritrositlerden ($Na^+ - K^+$) ATP azının saflaştırılmasına şimdiye kadar çalışılmamasının nedeni yukarda da belirtilmiş olduğu gibi, enzimin zara sıkıca bağlı ve aktivitesinin çok düşük olmasıdır.

Çalışmamızda biri iyonik olmayan (Brij-58) diğeri iyonik olan (DOC) iki deterjan ile beraber fiziksel bir parçalama yöntemi olan sonikasyon beraberce kullanılmış ve % 49.8 verimle enzimin zardan çözünmesi sağlanmıştır. Brij-58, enzim aktivitesinin korunmasında yararlı olmuştur. Enzim aktivitesini koruyacak en az miktarda Brij-58 içeren zar ortamına DOC ilave edildiği zaman zar yapısının bozulduğu söylenebilir. Bundan sonra sonikasyon, bir çok protein ile birlikte ($Na^+ - K^+$) ATP az aktivitesinin de zardan ayrılmasını sağlamaktadır.

Bu deterjanlar ile bulgular kısmında söz edilen çeşitli iyonik, iyonik olmayan deterjanlar ve sonikasyon tek başlarına çözünmede etkili olmamışlardır. Bunlar ya enzimi inaktive etmekte, ya inorganik fosfat tayinini bozmakta veya enzim proteinini hiç çözememektedirler. Örneğin, enzimin DOC içinde alt birimlerine ayrılarak aktivitesini kaybettiği düşünülmektedir. Aktif olan enzimin diurez olduğu tahmin edilmektedir (44-49).

Çözünmüş enzimin derişimini artırmak için kullanılan ultrafiltrasyon metodu aktiviteyi bozmamaktadır. Böylece bu işlem inorganik fosfat tayinine dayanan aktivite gözlenmesini daha güvenilir sınırlar içine almaktadır. Ayrıca saflaştırma için kullanılan DEAE-seluloz ile muameleden önce protein çözeltisinin çok seyreltik olmaması gerekir.

Saflaştırmada kolon yerine tüp içinde DEAE-seluloz kromatografisi kullanılmıştır çünkü kullanılan kromatografi koşulları içinde aktivite reçineye bağlanmamaktadır. Büyük bir grup proteinin reçineye bağlanması ve ($Na^+ - K^+$) ATP az aktivitesinin bağlanmaması 3.98 kez saflaştırmayı sağlamıştır. Poliakrilamid jel elektroforezi de enzimin saflaştırıldığını göstermektedir. Zar ve çözünmüş enzimin SDS li jel elektroforezinde 10-15 protein bantı varken DEAE-seluloz sonrası aktivitesinin elektroforezinde 2 protein bantı kalmaktadır. Bunlardan, düşük molekül ağırlığı olanı bir glikoproteindir.

Çözünmüş enzim $4^{\circ}C$ ta 5-6 saat sonra aktivitesini kaybetmeye başladığından sefadeks G-200 kolonu saflaştırmada yardımcı olmamıştır. İşte tüpte DEAE-seluloz kromatografisi yapmanın bir üstünlüğü de zaman kazandırmış olmasıdır.

Saf enzimin SDS, SDS - üre ve guanidin-HCl - SDS ile yapılan jel elektroforezinde görülen iki banttan glikoprotein olanı yaklaşık 33 000 diğeri 150 000 molekül ağırlığına sahiptir. Diğer dokulardan saflaştırılarak molekül ağırlıkları tayin edilmiş olan ($Na^+ - K^+$) ATP azının iki alt birimi olduğu ve bunlardan glikoprotein olan bir tanesinin molekül ağırlığının 35-57 000 diğeri ise 100-140 000 civarında olduğu yayınlanmıştır (44-49).

Biz bu çalışmada zara bağlı ve çözünerek saflaştırılmış ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) ATP az aktivitesinin tayini için gerekli olan en uygun şartları araştırdık. Bir çok araştırmacı değişik dokulardaki ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) ATP az aktivitesinin tayini için 1-5 mM arasında değişen ATP derişimleri kullanmıştır (26-37). Bu çalışmada zardaki enzim için en uygun ATP derişimi 3.3 mM, saf enzim için ise 3.0 mM olarak saptandı. ATP için K_m ve V_{max} ise zardaki enzim için 1.1 mM ve 0.28 μ mol/saat/mg prt, saf enzim için 2.5 mM ve 0.6 μ mol/saat/mg prt olarak bulundu. Saf enzim K_m değerinin zardaki enzime göre daha büyük, V_{max} değerinin daha az bulunmuş olması, saflaştırılmış enzimin fosfolipit ve proteinlerden arınarak yapısal değişikliklere uğramış olma olasılığıyla açıklanabilir. Bizi bu şekilde düşündüren bu konuda yapılmış olan bazı yayınlardır. Örneğin eritrosit zarlarında olan ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) ATP az fosfatidilserin ile aktive edilebilmiştir (50) veya çeşitli fosfolipazlarla muamele edilen zarlarda enzim aktivitesinin azaldığı ve fosfatidilserin ile fosfatidik asit ilavesiyle aktivitenin geriye getirildiği tebliğ edilmiştir (50,51).

Hem zardaki hem de saf enzim için en uygun Na^+ derişimi 50 mM olarak gözlemlendi. Daha yüksek Na^+ derişimlerinde her iki enzim aktivitesinin de inhibe olduğu saptandı. Daha önceki bir çalışmada da yüksek Na^+ derişiminde enzim aktivitesinin azaldığı bildirilmiştir (5). Bu arada ouabain'e bağlı olmayan aktivite Na^+ derişimine bağımlılık göstermedi (Şekil 4).

En uygun K^+ ve Mg^{2+} derişimleri her iki enzim aktivitesi için sırasıyla 20 ve 3 mM olarak bulundu. Bu değerler literatürde verilenlerle uygunluk göstermektedir (1,5,7-11,15,18-20). Şekil 5 te görüldüğü gibi artan K^+ derişimi her iki aktiviteyi de inhibe ederken artan Mg^{2+} derişimi ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) ATP az aktivitesini inhibe etmekte fakat ouabaine duyarlı olmayan aktiviteyi artırmaktadır (Şekil 6).

İşte Na iyonunun yalnızca ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) ATP azını etkilemesi ve ouabaine bağlı olmayan ATP azı etkilememesi, buna karşılık Mg^{2+} nun ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) ATP azını inhibe etmesi, ouabaine bağlı olmayana aktive etmesi ve bu bulguların saf enzimde de aynen gözlenmiş olması ayrıca saf enzimin ouabain ile tamamen inhibe edilebilmesi bize saf ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) ATP az ile uğraştığımızı göstermektedir.

Aktivite 90 dakikalık inkubasyon süresine kadar doğrusal olarak artmaktadır (Şekil 7). Önceki bir çalışmada eritrosit zarı Ca^{2+} ATP azı için 60 dakikalık inkubasyon süresine kadar doğrusal bir aktivite artışı gösterilmiştir (21).

Enzim aktivitesi için en uygun pH değeri pH = 7.4 olarak saptandı.

Saf enzimin jel elektroforezinde literatürde diğer ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) ATP azlar için gözlenen bulguların aynen gözlenmesi de enzimi saflaştırdığımızı düşündürdüren diğer bir bulgudur.

Enzim aktivitesinin % 40 gliserol içinde -30°C ta 5 gün dayanıklı olması çalışmamızı kolaylaştırmıştır.

Fosfolipitlerle lipozom yaptığımızı ve saflaştırdığımız ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) ATP azı bu lipozomlara yerleştirdiğimizi görebilmek için elektron mikroskopundan faydalandık. Bu amaçla iki farklı metod uyguladık. Birincisi fosfotungstat ile genel olarak bir protein yerleşimi olup olmadığını görmek, ikincisi ise bu proteinin ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) ATP az olup olmadığını incelemek idi. Fosfotungstatlı örneklerin resimlerinde lipozomların çevresinde homojen bir görünüm, ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) ATP az aktivitesinin boyandığı resimlerde ise lipozomların çevresinde noktalar halinde siyah çökeleklerin olması bize ;

A- Kullandığımız yöntemle lipozomların oluştuğunu,

B- Ortama koyduğumuz proteinin (saf enzim) lipozom zarına yerleştiğini,

C- Bu proteinin gerçekten ($Na^+ - K^+$) ATP az olduğunu,

göstermiştir.

Protein homojen olarak lipozom zarına yerleştiğine ve bu proteinin de saf ($Na^+ - K^+$) ATP az olduğunu düşündüğümüze göre ($Na^+ - K^+$) ATP az aktivitesini de lipozom çevresinde homojen olarak bulmayı beklerdik. Ancak lipozom oluşturulması sırasında örneği 60 dakika süreyle ve şiddetle çalkalamak bir kısım enzimi inaktif hale geçirmiş olabilir. Bu uygun olmayan koşullar altında aktif kalabilen moleküller sayesinde yer yer kurşun fosfat çökeleklerini görebildiğimizi düşünmekteyiz. Çeşitli araştırmacılar eritrosit zarlarında ve başka hücrelerde ($Na^+ - K^+$) ATP azını elektron mikroskopik olarak incelemişlerdir (31,52,53). Prensipte aynı olmasına rağmen biz bu amaçla diğer deneylerde kullandığımız inkubasyon ortamını kullanmayı daha uygun bulduk.

Çalışmamızın amacı eritrositlerde Na ve K iyonlarının taşınma mekanizmasını incelemektir. Bunun için ana faktörün tek başına izolasyonu ve çeşitli değişkenlerin bu faktörün çalışmasına etkilerinin gözlenmesi faydalı olabilir. Bu nedenle ilk adım olarak ($Na^+ - K^+$) ATP az aktivitesini saflaştırdıktan sonra fosfolipitlerden yapay zar oluşturma yöntemi üzerinde çalıştık. Elde ettiğimiz elektron mikroskobik bulguları yapay zarlar oluşturduğumuzu göstermektedir (Şekil 14-15). Aynı yöntem ile farklı lipit ve fosfolipitlerin değişik karışımlarından yapılacak yapay zarlara enzimin yerleştirilmesi, Na ve K iyonlarının taşınmasını etkileyecek faktörlerin incelenmesini sağlayabilir. Bunun için de elektron mikroskobisi yanında

^{22}Na ve ^{86}Rb kullanarak lipozom içine ve dışına bu iyonların taşınmasının incelenmesi bundan sonraki çalışmamızı oluşturacaktır.

Eritrosit zarı ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) ATP az aktivitesinin bazı klinik vakalarda değiştiği gösterilmiştir (14-21). Örneğin 20, 25 diazokolesterol vermek suretiyle myotoni oluşturulan farelerde ve üremili hastalarda bu değişiklik gözlenmiştir (18,19). Bu aktivite değişikliğinin mekanizması ve etkisi henüz anlaşılamamıştır. Bu değişiklikler üzerinde daha fazla bilgi elde etmek, hastalıkların mekanizmalarına ışık tutması bakımından önemli olabilir.

Ö Z E T

1. İnsan eritrosit zarlarından ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) ATP az aktivitesi DOC, Brij-58 deterjanları ve sonikasyon ile çözünebilmiş ve DEAE-seluloz kromatografisi ile tek kademedede % 34.9 verim ile 3.98 kez saflaştırılabilmıştır. Saf enzimin SDS li, üre ve guanidin-HCl lü jel elektroforezi ile biri 150 000 diğeri ise 33 000 molekül ağırlığında olan alt birimlerden oluştuğu düşünülmektedir. 33 000 molekül ağırlığındaki alt birimin bir glikoprotein olduğu saptanmıştır.

2. Eritrosit zarındaki $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATP az aktivitesi için uygun şartlar aranmış (3.3 mM ATP, 50 mM Na^+ , 20 mM K^+ , 3 mM Mg^{2+} , 225 mM Tris-HCl pH = 7.4) ve K_m ile V_{max} değerleri 1.1 mM ve 0.28 μ mol/saat/mg prt olarak bulunmuştur. Bu değerler saf enzim için biraz değişmektedir (3.0 mM ATP, $K_m = 2.5$ mM, $V_{max} = 0.6$ μ mol/saat/mg prt).

3. Saflaştırılmış enzimin lipozomlara yerleştiği elektron mikroskopisi ile gösterilmiştir.

K A Y N A K L A R

1. Bond, G.H., Hudgins, P.M.,
Biochem. Biophys. Res. Commun., 66: 645 (1975).
2. Bonting, S.L., Caravaggio, L.L.,
Arch. Biochem. Biophys., 101: 37 (1963).
3. Charnock, J.S.,
J. Histochem. Cytochem., 20: 1069 (1972).
4. Huang, W., Askari, A.,
Arch. Biochem. Biophys., 175: 185 (1976)
5. Post, R.L., Merrit, C.R., Kinsolving, C.R., Albright, C.D.,
J. Biol. Chem., 235: 1796 (1960).
6. Post, R.L., Sen, A.K.,
J. Biol. Chem., 239: 345 (1964).
7. Preistland, N.R., Whittam, R.,
Biochem. J., 109: 369 (1968).
8. Schrier, S.L., Giberman, E., Danon, D., Katchalsky, E.,
Biochim. Biophys. Acta., 196: 263 (1970).
9. Toshima, Y.,
Biochem. Biophys. Res. Commun., 55: 630 (1973).
10. C.F.Fox, "Biochemistry of Cell Walls and Membranes"
University Park Press, Baltimore, s.262 (1975).
11. Whittam, R., Chipperfield, A.R.,
Biochim. Biophys. Acta, 415: 149 (1975).
12. Mardh, S., Lindahl, S.,
J. Biol. Chem., 252: 8058 (1977).

13. Yager, P.,
J. Theor. Biol., 66: 1 (1977).
14. Cole, C.H.,
Clin. Sci. Mol. Med., 45: 775 (1973).
15. Cole, C.H., Dirks, J.H.,
Pediat. Res., 6: 616 (1972).
16. Dromgoole, S.H., Campion, D.S., Peter, B.J.,
Biochem. Med., 13: 307 (1975).
17. Hamel, H.K.,
Scand. J. Haematol., 9: 28 (1972).
18. Peter, H.W., Andiman, R.M., Bowman, R., Nagatomo, T.,
Exper. Neurol., 41: 738 (1973).
19. Cole, C.H.,
J. Clin. Endocrinol. Met., 42: 1056 (1976).
20. Matawari, S., Schonberg, M., Olarte, M.,
Arch. Neurol., 33: 489 (1976).
21. Araki, S., Mawatari, S.,
Arch. Neurol., 24: 187 (1971).
22. Slack, J.R., Anderton, B.H., Day, W.A.,
Biochim. Biophys. Acta, 323: 547 (1973).
23. Porter, P.A.G., Ellory, J.C., Lew, L.L.,
Biochem. Biophys. Res. Commun., 14: 118 (1964).
24. Fiske, C.H., Subbarow, Y.,
J. Biol. Chem., 66: 375 (1925).
25. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.,
J. Biol. Chem., 193: 265 (1951).
26. Weber, K., Osborn, M.,
J. Biol. Chem., 244: 4406 (1969).
27. Weber, K., Pringle, J.R., Osborn, M.,
Methods in Enzymology, XXVI : 3 (1972).
28. Fairbanks, G., Steck, T.L., Wallach, D.F.H.,
Biochemistry, 10: 2606 (1971).
29. Racker, E., Fisher, L.W.,
Biochem. Biophys. Res. Commun., 67: 1144 (1976).
30. A.V. Grimstone, "The Electron Microscope in Biology".
William Clowes and Sons Ltd. London, s.19 (1968).

31. Charnock, J.S., Trebilcock, H.A., Casley-Smith, J.R.,
J. Histochem. Cytochem., 20: 1069 (1972).
32. Moses, H.L., Rosenthal, A.S.,
J. Histochem. Cytochem., 16: 530 (1968).
33. Rosenthal, A.S., Moses, H.L., Tice, L., Ganote, C.E.,
J. Histochem. Cytochem., 17: 608 (1969).
34. Estabrook, R.W., Pullman, M.E. (derleyenler), Post, R.L., Sen, A.K.,
"Methods in Enzymology" Academic Press, New York and London,
c.X, s.762 (1967).
35. Swanson, P.D., Bradford, H.F., McIlwain, H.,
Biochem. J., 92: 235 (1964).
36. Nakao, T., Toshima, Y., Nagano, K., Nakao, M.,
Biochem. Biophys. Res. Commun., 19: 755 (1965).
37. Hanahan, D.J.,
Biochim. Biophys. Acta., 300: 319 (1973).
38. Dodge, J.D., Mitchell, C., Hanahan, D.J.,
Arch. Biochem. Biophys., 100: 119 (1963).
39. Jorgensen, P.L., Skou, J.C.,
Biochim. Biophys. Acta, 233: 366 (1971).
40. Skou, J.C., Hilberg, C.,
Biochim. Biophys. Acta, 185: 198 (1969).
41. Uesigi, S., Kahlenberg, A.,
Arch. Biochem. Biophys., 130: 156 (1969).
42. Tanaka, R., Strickland, K.P.,
Arch. Biochem. Biophys., 111: 583 (1963).
43. Medzihradsky, F., Kline, M.H., Hokin, L.E.,
Arch. Biochem. Biophys., 121: 311 (1967).
44. Jorgensen, P.L.,
Biochim. Biophys. Acta, 356: 53 (1974).
45. Maunsbach, A.B., Jorgensen, P.L., Deguchi, N.,
"11th FEBS Meeting", Copenhagen, (1977).
46. Moraes, V.L.G., Faria, M.V.C.,
"11th FEBS Meeting", Copenhagen, (1977).
47. Skou, J.C.,
"11th FEBS Meeting", Copenhagen, (1977).