

283825

T. C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ FAKÜLTESİ

**NADP⁺ BAĞIMLI SIĞIR KALP ve KARACİĞER
İZOSİTRAT DEHİDROGENAZLARININ SAFLAŞTIRILMASI
ve
ÖZELLİKLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Biyokimya Programı
DOKTORA TEZİ

AHMET BALAMİR

ANKARA — 1978

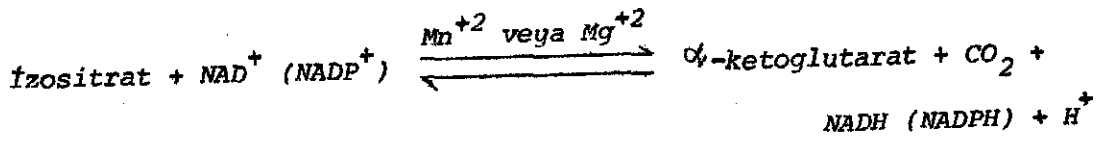
65

İ Ç İ N D E K İ L E R

	<u>Sayfa</u>
GİRİŞ _____	1
GEREÇ ve YÖNTEMLER _____	5
- Aktivite Tayini _____	5
- Protein Tayini _____	6
- Jel Elektroföresi _____	6
- Affinite Kromatografisi _____	7
- Tuzdan Arındırma _____	8
- Kalp İzoziminin Saflaştırılması _____	9
a) Homojenizasyon _____	9
b) Sonifikasyon _____	9
c) $(NH_4)_2SO_4$ Kesitlemeleri _____	10
d) Kolon Kromatografileri _____	10
- Karaciğer İzoziminin Saflaştırılması _____	11
a) Homojenizasyon _____	11
b) Proteolitik Enzimlerin İnhibisyonu _____	12
c) Birinci Isı Denatürasyonu _____	12
d) $(NH_4)_2SO_4$ Kesitlemeleri _____	12
e) İkinci Isı Denatürasyonu _____	13
f) Kolon Kromatografileri _____	13
- Aktif Kömür Deneyleri _____	14
- Isı Deneyleri _____	14
- Üre Deneyleri _____	15
- Kinetik Deneyler _____	15
- Kinetik İnhibisyon Deneyleri _____	16
SONUÇLAR _____	17
TARTIŞMA _____	51
ÖZET _____	61
KISALTMALAR _____	63
KAYNAKLAR _____	64

G İ R İ Ş

Izositrat dehidrogenaz (İDH), Krebs dñngüsünde izositratı α-keto glutarata yükseltgeyen bir enzimdir. Bu yükseltgenme sırasında kofaktör olarak nikotinamid adenin dinükleotid (NAD⁺) veya nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP⁺) kullanılır. İDH'lar, mekanizması farklı iki reaksiyonu; dehidrogenasyon ve dekarboksilasyonu birlikte gerçekleştiren enzimlerdir (1-4). Bu iki tepkime enzim yüzeyinde peşpeşe gerçekleştirilerek α-ketoglutarat ve CO₂ son ürünleri oluşur.



Tabiatta hem NAD⁺ 'yi hem de NADP⁺ 'yi kofaktör olarak kullanan iki ayrı tip İDH bulunmaktadır. NAD⁺ bağımlı olan enzim sistematik olarak threo-D-izositrat-NAD oksidoredüktaz (EC 1.1.1.41), NADP⁺ bağımlı olan enzim ise; threo-D-izositrat-NADP-oksidoredüktaz (EC 1.1.1.42) şeklinde isimlendirilmektedir.

Memeli hücrelerinde ve mayada, NAD⁺ 'ye özgül enzim mitokondride, NADP⁺ kullanan enzim ise hem mitokondride hem de sitoplazmada bulunur (5).

E.Coli'de ve bir çok başka bakteride yalnız NADP'ye özgül olan izositrat dehidrogenaz enzimi bulunmaktadır (6,7).

NADP⁺ bağımlı enzimin de iki tipi olduğu yani izoenzimlerinin bulunduğu bugün için bilinmektedir.

Bu izozimlerden birisinin memeli kalbi mitokondrisinde diğerinin ise memeli karaciğeri sitoplazmasında etkin olarak bulunduğu, Bell ve Baron'un deneyleriyle gösterilmiştir (8).

Aynı araştırmacılar sıçan karaciğer ve kalp İDH'lerinin özelliklerini karşılaştırmışlar, pH'ya bağlı inaktivasyon, civa iyonu ile inhibisyon ve sübstratları olan izositrat ve NADP⁺ için Michaelis değişmezleri bakımından farklılıklar saptayamamışlarsa da izozimler arasında ısı dayanıklılığı, bakır iyonları ve para-kloromerküri benzoat ile inaktivasyon, amonyum sülfat ile ise aktivasyon bakımından bazı farklılıklar bulmuşlardır (9). Deneylerinin sonuçları, kalp izoziminin ısıya karaciğer izoziminden daha az dayanıklı olduğunu ve 0.8 M (NH₄)₂SO₄ ile karaciğer izoziminin etkilenmemesine karşın kalp izoziminin % 200 oranında aktive olduğunu göstermektedir.

NADP⁺ bağımlı İDH; siğir, domuz ve sıçan kalp ve karaciğerinden ve *E.Coli*'den değişik yöntemlerle saflaştırılmıştır.

Saflaştırma yöntemlerinde genel olarak değişik amonyum sülfat kesitleri, ısı denatürasyonu ve iyon değiştiriciler kullanılmıştır.

Literatürde bildirilen özgül aktiviteler dokudan dokuya fark gösterdiği gibi aynı doku için farklı özgül aktiviteler de rapor edilmiştir.

Siğir karaciğeri için rapor edilen en yüksek özgül aktivite 18 U/mg

(10), sığır kalbi izozimi için ise 39 U/mg'dır (11).Saflaştırma işlemleri % 20 ila % 30 verimle gerçekleştirilmiştir.

Pantoloni ve arkadaşları 1973 senesinde, kısmen saflaştırılmış $NADP^+$ (Bkz. TARTIŞMA) bağımlı sığır karaciğeri İDH'ı ile yaptıkları deneylerde, enzimin sitoplazmik olduğunu, tamamen mitokondriyel bir enzim olan glutamat dehidrogenaz aktivitesini takip ederek göstermişler ve polipeptitteki α -heliks yüzdesi, kısmi özgül hacim, molekül ağırlığı, özgül absorpsiyon katsayısı gibi bazı fizikokimyasal parametrelerini hesaplamışlardır (10).

Mitokondriyel ve sitoplazmik $NADP^+$ - İDH'ların birbirinden bağımsız genlerce kontrol edildiği gösterilmiştir (12,13).

$NADP^+$ bağımlı İDH'ların dördüncül yapıları ve molekül ağırlıkları konusunda birbirinden farklı sonuçlar rapor edilmektedir (11,14-16).

Sığır kalbi (11) ve domuz kalbi için (14) 30.000, 60.000 ve 90.000 gibi değerler, sığır karaciğeri (10) ve domuz karaciğeri (18) için ise sırası ile 96.000 ve 75.000 gibi değerler bulunmuştur.

Gerek sığır ve domuz kalbinden gerekse sığır karaciğerinden elde edilen İDH'ların gerçek sübstratlarının serbest izositrat olmayıp, Mg^{+2} veya Mn^{+2} iyonlarının izositratla yaptıkları kompleksin olduğu gösterilmiştir (10).

Eldeki bilgiler trikarboksilik asit döngüsünde, izositratın oksidasyonundan, esas olarak, allosterik bir enzim olan NAD^+ bağımlı enzimin sorumlu olduğunu göstermektedir (19). Bu enzimin aktivitesi hücre AMP ve ADP konsantrasyonları tarafından kontrol edilmektedir (20,21).

$NADP^+$ bağımlı izositrat dehidrogenaz enzimi için mevcut bilgiler allosterizmi kanıtlayacak düzeyde değilse de bazı bulgular, düşük metal

iyonu konsantrasyonunda veya düşük enzim konsantrasyonunda, bu enzimin tayin ortamına ilavesi ile, tepkimenin belirli hıza erişmesi arasında belli bir zaman aralığının geçtiğini (time lag) ve bu zaman aralığının NADPH ve EDTA ile ortadan kaldırıldığını göstermiştir (10,22,23).

Bu araştırmada $NADP^+$ bağımlı sığır kalbi IDH'ı saflaştırıldı ve homojen olarak elde edildi. Karaciğer IDH'ı ise büyük ölçüde saflaştırıldı.

İki izozim, ısı inaktivasyonuna karşı stabilizasyon özellikleri bakımından karşılaştırıldı ve önemli farklılıklar saptandı (24). Bazı tuzların IDH'lar üzerinde farklı stabilizasyon etkileri oluşturduğu bulundu. Ayrıca izozimler arasında kinetik farklılıklar gözlemlendi.

G E R E Ç v e Y Ö N T E M L E R

Deneyleerde kullanılan nikotinamid adenin dinükleotid fosfat, DL-izositrat, fenazin metosülfat, p-nitroblue tetrazolyum, dietilaminoetil selüloz, karboksimetil sephadex C-50 ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat agaroz (5 $\mu\text{mol NADP}^+$ / 1 ml agaroz) Sigma Chem. Co.'dan, Sephadex G-150, DEAE Sephadex A-50 ve 2',5' ADP-Sepharoz Pharmacia'dan, amonyum sülfat ise MERCK'ten temin edildi. Kullanılan diğer bütün kimyasal bileşikler analitik saflıkta idi.

Sığır kalbi ve karaciğeri, Ankara Et Balık Kurumu Mezbahası'ndan alındı.

Deneyleerde santrifüj (Sorval Superspeed SS-3), sonikatör (Bronson Soniç Power Co. B-12), spektrofotometre (Beckman Model 26, Zeiss PMQ 2), elektroforez cihazı (Buchler), Ultrafiltrasyon cihazı (Amicon), milipor-filtre ve fraksiyon toplayıcısı (LKB 7000 Ultrolag) kullanıldı.

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

Izositrat dehidrogenaz aktivitesi, izositrattan alfa-ketoglutarat meydana gelirken elektronları alarak indirgenen NADP^+ 'nin, 340 nm dalga

boyunda verdiği absorpsiyon ölçülerek tayin edildi. Tayin 0.1 M, pH = 7.5 tris tamponu içinde, 1 mM Mn^{+2} , 0.33 mM DL-izositrat, 0.1 mM $NADP^+$, 1 mM KCN ve 20 mM nikotinamid bulunduran ortamda, artan absorpsiyon Zeiss PMQ 2 spektrofotometresi ile takip edilerek yapıldı (25). Artan absorpsiyon değerleri otuz saniye aralıklarla takip edildi ve ilk hızların hesaplanmasında süstratın ($NADP^+$) % 10 dan fazlasının kullanılmamış olmasına dikkat edildi.

Unit (U), 37°C 'ta, 1 dakikada 1 μ mol NADPH oluşturan enzim miktarı olarak tarif edildi.

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

Protein tayinleri 280 nm deki absorpsiyonun takibi ile yapıldı (26).
 $A_{280}^{1\%} = 11.8$ olarak kabul edildi (11).

J e l E l e k t r o f o r e z i

Poliakrilamid jel elektroforezi B.J. Davis'in metoduna göre (27), pH = 8.3 olan tris-glisin tamponu ve % 7 akrilamid, 1 : 38 Bisakrilamid / akrilamid içeren jellerde yapıldı. Jel başına, gliserol içinde 40-80 μ gr protein ve 5 miliamper akım uygulandı. Numune hacimlerinin 75 μ lt'den daha fazla olmamasına dikkat edildi.

i) Protein Boyaması :

Yaklaşık olarak 1-1.5 saat süre devam eden elektroforez sonunda jeller, bir enjektör ile elektroforez tüpleri içine su sıkılarak çıkartıldı. Paralel çalışılan örnekler hem % 10 asetik asit içinde % 0.01 lik amido black, hem de % 50 metanol, % 12.5 Asetik asit içinde % 0.25 lik Comassie blue boyaları ile boyandı ve fikse edildi (27,28). Boyama bir gece bekle-

tilerek yapıldı.

Daha sonra jeller boyanan bantlar iyice gözlenene ve jel renksizleşinceye kadar % 7 lik asetik asit çözeltisi ile yıkandı.

ii) Aktivite Boyaması :

Henderson'un metodunun modifikasyonu ile yapıldı (29). $NADP^+$ den alınan elektronların fenazin metosülfat aracılığıyla p-nitroblue-tetrazolyum'a taşınması sonucu elde edilen menekşe rengi, jel elektroforezine tabi tutulmuş enzim tarafından, jel üzerinde oluşturulup stabilleştirildi.

Boyama ortamında : 2.5 mM izositrat, 0.2 mM $NADP^+$, % 0.01 p-nitroblue-tetrazolyum (0.05 M tris-Cl tamponu içinde) bulunuyordu.

Jel elektroforezinden alınan örnekler vakit geçirilmeksizin, boyama ortamına konuldu. Yaklaşık olarak 20 dakika süre içinde belirginleşen boyanın rengi belirli bir koyuluğa geldikten sonra, boyama ortamından çıkarılan jel, % 7 lik asetik asit çözeltisinde sabitleştirildi.

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

Bunun için 0.5 x 5 cm boyutlarında cam kolonlar kullanıldı. 2',5' ADP-Sepharose 4B, 1 M NaCl, pH = 7 çözeltisi ile rejenere edildi (30) ve 10 kolon hacmi kadar 0.025 M tris-sitrat pH = 7.4 tamponuyla yıkandı. Aynı konsantrasyona ve pH'ya ayarlanmış olan kalp ve karaciğer örnekleri kolona uygulandı.

Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat-agarose kolonu, 2 M KCl ile rejenere edildi ve 0.5 x 5 cm boyutlarındaki kolon 10 kolon hacmi kadar, 10 mM sitrat-fosfat, 2 mM $MgCl_2$, % 10 gliserol ve uygun pH'daki (5-7.4)

tamponla yıkandı (31). Bu şartlara getirilmiş örnekler kolona uygulandı.

Uygulanan örnek hacmine eş hacimde fraksiyonlar toplandı.

Kolonlarda akış hızı 0.3-0.5 ml/dakika idi.

T u z d a n A r ı n d ı r m a

i) Isı ve Üre Deneylerinde

Deneylerde çeşitli tuzların etkisini gözleyebilmek için enzim çözel-
tisinin tuzdan arındırılması gerekmektedir. Tuzsuz izoenzimler 0°C 'ta don-
madan 10-15 gün dayanıklıdır.

Isı ve üre deneylerinde tuzdan arındırma işlemi gerek amonyum sülfat-
lı kalp izozimi, gerekse Mg-izositratlı ortamda saklanan karaciğer izozimi
için, % 20 Gliserolle dengelenmiş ve 5 mM trisodyum sitrat ve 1 mM EDTA
bulunduran Sephadex G-25 kolonundan enzim geçirilerek başarıldı.

Tuzdan arındırma işleminin verimi, kalp enzimi için sephadex G-25
ten elüe edilen örneklerde, HCl'li ortamda BaCl₂ ile sülfat çökeleği ara-
narak saptandı. Karaciğer enzimi için ise, elüatlarda Mg-izositrat tayin
edilerek saptandı. Bunun için Sephadex G-25 kolonundan elüe edilen örnek-
ler 100°C 'ta protein denatürasyonuna tabi tutuldu. Bu çözelti, izositrat-
tan başka tüm gerekli bileşenleri ve aktif IDH'ı bulunduran ortama ilave
edilip aktivite takip edildi.

BaSO₄ çökeleğinin oluşmaması ve aktivitenin bulunmaması her iki dü-
rumda da tuzdan arındırma işleminin tam verimle gerçekleştirildiğini gös-
terdi.

ii) Kinetik Deneylerde :

Bu deneylerde günlük kullanılan enzim çözeltileri 1 cc lik hacımlar halinde, 5 mM trisodyum sitratla dengelenmiş, 1 x 30 cm boyutlarında Sephadex G-25 kolonundan geçirilerek, ortamda bulunan EDTA, Mn^{+2} , $(NH_4)_2SO_4$ ve izositrattan arındırıldı. Tuzdan arındırma işlemi kalp tipi izositrat dehidrogenaz için pH = 7.5 'ta, karaciğer tipi izositrat dehidrogenaz için ise pH = 6.5 'ta yapıldı. Bu kolonların verimi kinetik deneylerde yapılan kontrol deneyleri ile saptandı.

Kalp İzoziminin Saflaştırılması :
(Tablo I).

Homöjenizasyon

Taze olarak alınan ve buz içinde laboratuvara getirilen sığır kalbi küçük parçalara kesildi, yağ dokusu ve sinirler uzaklaştırıldıktan sonra kıyma makinasından çekildi. Doku; gramı başına 2 cc tampon kullanılarak 0.25 M sukroz, 0.01 M tris-Cl, 1 mM süksinat ve 0.2 mM EDTA bulunduran, pH = 7.8 tamponunda suspansiyon haline getirildi. Çözeltinin 5.8 dolayında bulunan pH'sı, 2 M tris çözeltisi ile 7.8'e ayarlandı.

Suspansiyon, her seferinde 50 cc'lik kısımlar halinde cam-teflon homojenizatör ile parçalandı. Homojenat'ın pH'sı tekrar 2 M tris ile 7.8'e getirildi. 1200 g'de 20 dakika süre ile santrifüj edilerek hücrenin, çekirdek, zar vb. fraksiyonları uzaklaştırıldı. Supernatan 27.000 g'de 20 dakika süre ile santrifüj edildi ve sağlam mitokondriler elde edildi (32).

Sonifikasyon

Homojenizasyonda kullanılan sukrozlu tampon içinde homojen hale getirilen mitokondri çökeleği 10 cc lik kısımlar halinde sonifikasyona tabi

tutuldu. Sonifikasyon Braunsonic 1510 model sonifikatör ile 80 watt güçte 5 dakika süreyle yapıldı. Parçalanmış mitokondriler ikinci bir 27.000 g santrifügasyonu ile çöktürüldü.

$(NH_4)_2SO_4$ Kesitlemeleri

Sonifiye edilmiş mitokondri suspansiyonunun 27.000 g supernatanı, pH'sı amonyakla 7.1'e getirilen doymuş amonyum sülfat çözeltisi ile 2 saat içinde % 45 doygunluğa getirildi. 15.000 g'de 30 dakika süre ile santrifüj edildi ve çökelek atıldı. Süpernatant, katı amonyum sülfatın çok yavaş ilavesi ile % 80 doygunluğa getirildi. $(NH_4)_2SO_4$ ilavesi ile değişen pH, 1 M tris çözeltisi ile 7.4'e ayarlandı.

Kolon Kromatografileri

% 80 amonyum sülfat kesiti çökeleği, 5 mM trisodyum sitrat, 1 mM EDTA, % 10 $(NH_4)_2SO_4$, pH = 7.4 olan çözeltide çözüldü ve aynı çözelti ile dengelenmiş bulunan 3.4 x 85 cm Sephadex G-150 kolonuna uygulandı (Şekil 1). 13 cc 'lik fraksiyonlar toplandı, protein ve aktivite bakımından taranarak en yüksek özgül aktivite gösteren fraksiyonlar birleştirildi.

Hacmi azaltmak için enzim çözeltisi LKB Amicon filtresinde 3 kg/cm^2 basınç altında 8 kez konsantre edildi ve 5 mM trisodyum sitrat, 5 mM $MgSO_4$ ve 1 mM EDTA, pH = 7.4 tamponu ile dengelenmiş olan 1 x 60 cm'lik Sephadex G-25 kolonuna uygulanarak amonyum sülfattan arındırıldı.

Elüe edilen protein aynı pH'ta ve aynı tampon ile dengelenmiş bulunan 2 x 12 cm boyutlarında dietilaminoetil Sephadex A-50 kolonuna uygulandı. Enzim aynı tamponla elüe edildi (Şekil 2).

Yüksek özgül aktivite gösteren elüatlar birleştirildi ve pH metrede

pH 6.1'e getirildi. Numune, 5 mM trisodyum sitrat, 5 mM MgSO₄, 1 mM EDTA, pH = 6.1 olan 2.5 x 10 cm boyutlarında karboksi metil Sephadex C-50 kolonuna uygulandı.

Kolona tutunan enzim bir arada gerçekleştirilen tuz ve pH gradyanı ile elüe edildi. Tuz gradyanı 5-100 mM trisodyum sitrat konsantrasyonlarında, pH gradyanı 6.1-7.4 pH aralığında gerçekleştirildi. Aktif enzim 74 mM trisodyum sitrat konsantrasyonunda ve pH = 6.3 'te elüe edildi (Şekil 3). Yüksek özgül aktivite gösteren fraksiyonlar birleştirildi, pH 7.4'e getirildi ve 4°C'ta saklandı.

Bu şartlarda enzim, aktivite kaybetmeden 3-4 ay dayanmaktadır.

Saflaştırma işleminin değişik kademelerini oluşturan Sephadex G-150 kolon kromatografisi, DEAE Sephadex A-50 ve CM Sephadex C-50 iyon değiştirici kolonlarından elüe edilen, enzimden ayrılan örnekler saflaştırma işlemlerinin etkinliğini saptamak üzere jel elektroforezine uygulandı.

Jel elektroforezinde enzimin gerek protein gerekse aktivite boyaması yapıldı.

Karaciğer izoziminin Saflaştırılması
(Tablo II) :

Homojenizasyon

Taze olarak alınan ve buz içinde laboratuvara getirilen siğır karaciğeri küçük parçalara kesildi, soğuk musluk suyunda yıkandıktan sonra kıyma makinasından çekildi.

Doku her 100 gramı için 100 cc 0.25 M sukroz, 0.01 M tris-Cl, 1mM süksinat ve 0.2 mM EDTA bulunduran pH = 7.8 tampon içinde Waring blender'da

bir dakika süre ile homojenize edildi. Homojenat bu tampon içinde -20°C 'ta aktivite kaybetmeden saklanabilmektedir.

Proteolitik Enzimlerin İnhibisyonu

Homojenat 27.000 g'de 20 dakika süre ile santrifüjlendi ve çökelek atıldı. Bulunması muhtemel proteolitik enzimleri inhibe edebilmek için fenil metil sulforül florür (PMSF) ilave edildi. PMSF, süpernatandaki total proteinin yüzde birinin proteolitik enzimler olduğu varsayılarak mol/mol olacak şekilde, izopropil alkol içinde çözülmüş olarak ilave edildi (33). Kullanılan izopropil alkolün, total homojenat hacminin 1/200'ünden fazla olmamasına dikkat edildi.

Yapılan kontrol deneylerinde yukarıda bildirilen konsantrasyonda PMSF'nin, izositrat dehidrogenaz aktivitesi üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı saptandı.

Birinci Isı Denatürasyonu

27.000 g süpernatanı % 1 Na_2SO_4 konsantrasyonuna getirilerek 10 dakika süre ile 59°C 'ta ısı denatürasyonuna tabi tutuldu. 10 dakika sonunda, su-buz karışımında 4°C 'a kadar soğutulan karışım 15.000 g'de 10 dakika süre ile santrifüj edildi. Çökelek bir kez sukrozlu tamponla yıkandı, yıkama suyu süpernatana katıldı.

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Kesitlemeleri

Isı denatürasyonu süpernatanı katı amonyum sülfat ilavesi ile iki saat içinde % 65 doygunluğa getirildi. Karışımın pH'sı doymuş amonyak çözeltisi ile $\text{pH} = 7.0$ 'de tutuldu. Yarım saat süre ile karıştırılan ve bir gece bekletilen suspansiyon 15.000 g'de 30 dakika süre ile santrifüj edildi.

% 65 $(NH_4)_2SO_4$ çökeleği 1 mM EDTA ve % 12.5 amonyum sülfat bulunduran pH = 4.5, 0.1 M trisodyum sitrat tamponu içinde homojen hale getirildi ve 27.000 g'de 30 dakika süre ile santrifüjlendi. Çökelek aynı tamponla bir kez yıkandı ve yıkama süpernatana birleştirildi.

Süpernatana katı amonyum sülfatın çok yavaş olarak ilavesi ile (yaklaşık 3 saat sürede) % 45 doygunluğa getirildi. Bir saat bekletilen karışım 20.000 g 30 dakika süre ile santrifüj edildi. Enzim aktivitesini içeren çökelek % 10 amonyum sülfat bulunduran, 100 mM trisodyum sitrat, 10 mM $MgSO_4$, pH = 7.0 tamponunda, mümkün olan en küçük hacimde çözündü.

İkinci Isı Denatürasyonu

Çözelti 60°C'ta 5 dakika süre ile ısıtıldı, su-buz karışımında 4°C'a kadar soğutuldu ve 15.000 g'de 5 dakika santrifüjlendi, çökelek atıldı.

Kolon Kromatografileri

Süpernatana % 10 $(NH_4)_2SO_4$ içeren 0.1 M trisodyum sitrat, 10 mM $MgSO_4$, pH = 7.4 tamponu ile dengelenmiş 3.4 x 90 cm boyutlarında Sephadex G-150 kolonuna uygulandı. Kolonun boş hacmi (Void volume) 380 cc olarak saptandıktan sonra ilk 325 cc elüat atıldı. Daha sonra 4 cc hacimlerde fraksiyonlar toplandı. Aktivite ve protein tayinleri yapıldı (Şekil 5). Yüksek özgül aktivite gösteren fraksiyonlar toplandı, 5 mM trisodyum sitrat, 5 mM $MgSO_4$, 1 mM EDTA, pH = 7.4 tamponuna karşı her seferinde 1 : 20 oranında 3 x 6 saat süre ile dializ edildi.

Numune, dializ çözeltisi ile dengelenmiş 3.1 x 26 cm boyutlarındaki iyon değiştirici DEAE selüloz kolonuna uygulandı. Bir kolon hacmi kadar (yaklaşık 180 cc) tamponla yıkandı. Enzim, kolondan 5-500 mM trisodyum

sitrat tuz gradyanı ile elüe edildi (Şekil 6). Özgül aktivitesi en yüksek olan fraksiyonlar bir araya toplandı. 5 mM trisodyum sitrat, 5 mM MgSO₄, 1 mM EDTA, pH = 6.5 tamponu ile dengelenmiş Sephadex G-25 kolonunda tuzdan arındırıldı.

Numunenin pH'sı 0.01 M HCl ile 5.8'e getirildi ve 5 mM trisodyum sitrat, 5 mM MgSO₄ ve 1 mM EDTA pH = 5.8, tamponu ile dengelenmiş 3.1x10 cm boyutlarında CM Sephadex C-50 iyon değiştirici kolonuna uygulandı ve aynı tampon ile elüe edildi. Yüksek özgül aktivite gösteren kısımlar birleştirilerek 10 mM MgSO₄ ve 1 mM DL-izositrat konsantrasyonuna getirildi ve 4°C'ta saklandı.

Bu şartlarda enzim aktivite kaybetmeden su-buz karışımında uzun süre saklanabilmektedir.

A k t i f K ö m ü r D e n e y l e r i

Birinci ısı denatürasyonu sonrasında karaciğer izositrat dehidrogenazı yaklaşık olarak 50 mg/ml konsantrasyonda değişik oranda aktif kömürle muamele edildi. Suspansiyon 0.45 mikron çapındaki milipor filtreden süzüldü. Süzüntüde protein ve aktivite tayinleri yapıldı.

I s ı D e n e y l e r i

Tuzsuz hale getirilen enzim çözeltileri 50°C'ta su banyosunda inkübe edildi. İnkübasyondaki çözeltiden sıfırncı dakikada ve değişik zaman aralıklarında 0.02 cc lik numuneler alınarak yukarıda sözü edilen ve hacmi 3 cc olan tayin ortamına (Bkz : Gereç ve Yöntemler, Aktivite Tayini) ilave edilip enzim aktivitesi 340 nm dalga boyunda izlendi.

Isı deneyleri çeşitli tuzları bulunduran enzim çözeltileri ile de

tekrarlanarak bu tuzların ısı stabilizasyonu bakımından enzim üzerindeki etkisi araştırıldı.

Ü r e D e n e y l e r i

37°C 'ta yapıldı. Bu deneylerde enzim çözeltisi, amonyum sülfat ve MgSO₄ - izositrat ile muamele edildi ve ortama 3 M olacak şekilde katı üre ilave edildi.

K i n e t i k D e n e y l e r

Bu deneylerde kullanılacak enzim çözeltileri 5 mM trisodyum sitrat, 5 mM MgSO₄ ve 1 mM EDTA ortamında ve uygun pH'ta saklanan enzimlerin stok çözeltilerinden alınan örneklerin günlük olarak tuzdan arındırılması ile hazırlandı (Bkz : Gereç ve Yöntemler, Tuzdan arındırma).

Deneyler 3-6 saat arasında tamamlandı ve bu süre boyunca tuzsuz enzim çözeltileri su-buz karışımında saklandı. Tepkimeler, ortama enzim ilavesi ile başlatıldı. Ortamda 0.1 M tris-Cl pH = 7.5, 1 mM MnCl₂ bulunuyordu.

Tepkime karışımına katılacak NADP⁺ nin gerçek konsantrasyonu, sübstratın tamamının indirgeneceği şekilde yürütülen tepkimede, 340 nm dalga boyunda gözlenen optik dansite değişiminden saptandı. NADPH için ekstinksiyon katsayısı olarak 6.22×10^3 kullanıldı (34).

Tepkime karışımına katılacak izositratın gerçek konsantrasyonu da benzer şekilde; yeterli miktarda NADP⁺ içeren ortamda, izositratın tamamının kullanılacağı biçimde yürütülen örnek bir tepkimede 340 nm dalga boyunda gözlenen optik dansite değişiminden hesaplandı.

Tepkimeler 30°C'ta ayarlı Beckman spektrofotometresinde 1 cm ışık

yollu, 1 ml'lik quartz kuvetlerde takip edildi. Optik dansite değişimleri spektrofotometreye bağlı otomatik kaydedici ile grafiklendi. Kaydedicinin tüm skalası, gözlenmesi beklenen optik dansite değişimine uygun olacak biçimde seçildi (0.1-0.5 A).

İlk hızlar ortamda mevcut, kısıtlayıcı sübstratın % 10'undan azının tepkimeye girdiği zaman aralıklarından saptandı. Bu bölgelerde hızlar tam bir düzgünlük göstermekte idi.

Yapılan kontrol deneyleriyle, deney süresince enzimin aktivite kaybetmediği saptandı.

K i n e t i k İ n h i b i s y o n D e n e y l e r i

Değişik tuzların inhibitör etkilerinin araştırıldığı deneylerde, tayin ortamı, uygun tuz kullanılarak istenen konsantrasyona getirildi ve tepkime tuzdan arındırılmış enzimin katılması ile başlatıldı. İlk hızlar otomatik kaydedici ile saptandı. Tayin ortamı, 0.1 M tris klorür, pH = 7.5, 1 mM MnCl₂, 50 µM D-izositrat ve 50 µM NADP⁺ içermekte idi.

S O N U Ç L A R

Kalp izoziminin saflaştırılmasında homojenizasyon sonucu pH'nın 5.8'e düştüğü ve bu pH'da sağlam mitokondri izolasyonunun veriminin azaldığı saptandı. Bu yüzden özellikle sonifikasyona geçmeden önce pH'nın 7.8 de tutulmasına dikkat edildi.

Bu kademede mitokondrilerin sağlam olarak elde edildiği, sonifikasyondan önce ve sonra 27.000 g süpernatanı ve çökeleğinde izositrat dehidrogenaz aktivitesi ile birlikte, tamamen zarsal bir enzim olduğu bilinen süksinik dehidrogenaz aktivitesinin takibi ile saptandı. Sonifikasyondan önce süpernatanda her iki enzimin de aktivitesi gözlenemezken, sonifikasyon sonrasında, süksinik dehidrogenaz aktivitesi çökelekte, IDH aktivitesi ise bütünü ile süpernatanda bulundu.

Enzimin süpernatana çıkışının sabit güçte zamana bağımlı olduğu ve sonifiye edilen çözelti hacmine bağlı olarak bir platoya eriştiği tesbit edildi. Daha uzun süreli sonifikasyonun enzim üzerinde belli bir inaktivasyona yol açmadığı gözlemlendi (35).

% 45 doygunlukta $(NH_4)_2SO_4$ ile çöktürülen protein fraksiyonunda kalp IDH'ı aktivitesinin yaklaşık olarak % 25 'inin kaybedilmesine karşın önem-

li oranda protein atılmakta, % 80 doygunlukta $(NH_4)_2SO_4$ ile ise, bir önceki kademeye göre çok yüksek verimle, aktif protein elde edilmekte ve bu kademeler sonucunda 6 kez saflaşma elde edilebilmektedir (Tablo I).

Şekil 1'de görüldüğü gibi kalp izozimi Sephadex G-150 kromatografisinde keskin bir tepecik vermemekle birlikte, belirgin bir ayırma uğramaktadır. Bu kademede toplanan aktif fraksiyonlar, pH = 7.4'te DEAE Sephadex A-50 kolonuna uygulandığında, enzimin kolona tutunmadan elüe edilebildiği, total proteinin ise yaklaşık % 60'ının kolonda kaldığı gözlemlendi (Şekil 2, Tablo I). Bu kademede meydana gelen aktivite kaybı yaklaşık %10 olarak hesaplandı.

Şekil 3'te kalp izoziminin karboksi metil Sephadex C-50 iyon değiştirici kolonuna tutunduğu ve birlikte gerçekleştirilen tuz ve pH gradyanı ile % 50 verimle 2 kez saflaşarak elüe edildiği görülmektedir.

Şekil 4, kalp tipi IDH, saflaştırmanın değişik kademelerinden alınan örneklerde yapılan jel elektroforezinin sonuçlarını göstermektedir.

Sephadex G-150 kolonu sonrasında jel üzerinde biri kalın olmak üzere üç protein bantı gözlenmektedir.

DEAE Sephadex A-50 sonrasında mobilitesi yüksek olan bant kaybolmakta, CM Sephadex sonrasında ise, jel yüksek proteinle yüklendiğinde dahi enzime yakın yürüyen yaygın protein bantı minimal bir seviyeye düşmekte, jelin en tepesinde koyu tek bant kalmaktadır.

Şekil 4 d'de gözlemlendiği gibi aktivite boyaması ile, boyanan proteinin kalp tipi IDH olduğu kanıtlanmaktadır.

Karaciğer izositrat dehidrogenazının saflaştırılmasında kullanılan birinci 1s1 denatürasyonu kademesinde aktif enzim % 77 verimle elde edildi ve total proteinin % 70 'i atıldı (Tablo II).

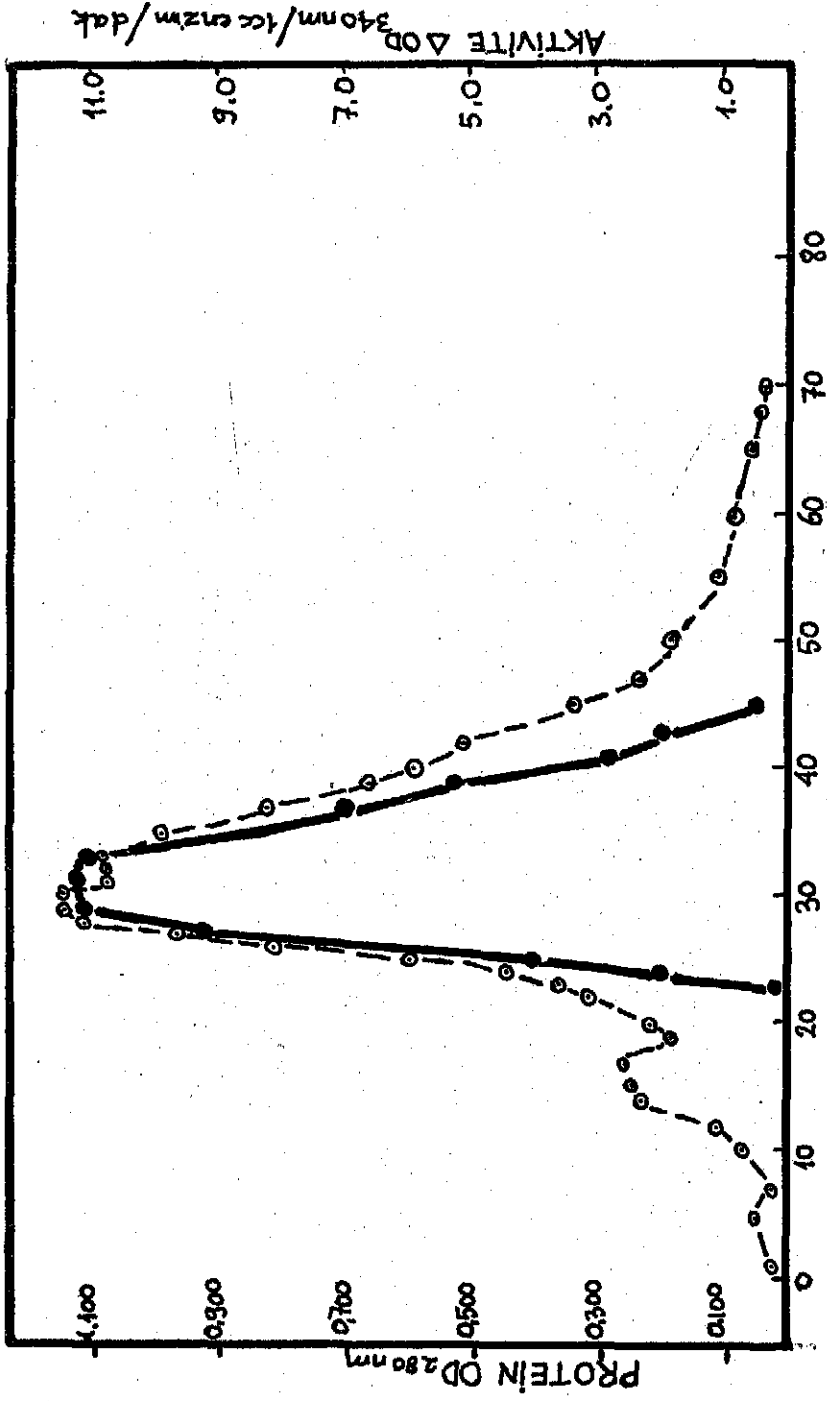
İŞLEM	HACİM(cc)	TOTAL * PROTEİN (mg)	TOTAL ** AKTİVİTE	ÖZGÜL *** AKTİVİTE IU/mg protein	VERİM %	KAÇ KEZ SAFLAŞTIĞI
Sonifikasyon sonrası 27000g supernatantı	126	1110	1200	1.08	100.0	1.0
% 45 (NH ₄) ₂ SO ₄ supernatantı	240	334	932	2.79	77.6	2.6
% 80 (NH ₄) ₂ SO ₄ çökeleği	15	140	898	6.41	74.8	5.9
SEPHADEX G-150 KOLONU	86	70	778	11.11	64.8	10.3
DEAE Sephadex A-50 KOLONU	64	25	702	28.08	58.5	26.0
CM Sephadex C-50 KOLONU	28	6.78	309	45.58	25.8	42.0

Tablo I : NADP⁺ bağımlı sığır kalbi izositrat dehidrogenazının safleştirilmesi.

* 280 nm absorpsiyonu. A % 1 = 11.8 olarak kabul edildi (11).

** Birim enzim aktivitesi, dakikada 1 μmol NADPH oluşturan enzim miktarı olarak hesaplandı.

*** Özgül aktivite, enzim aktivitesinin mg olarak protein miktarına bölünmesi ile elde edildi.

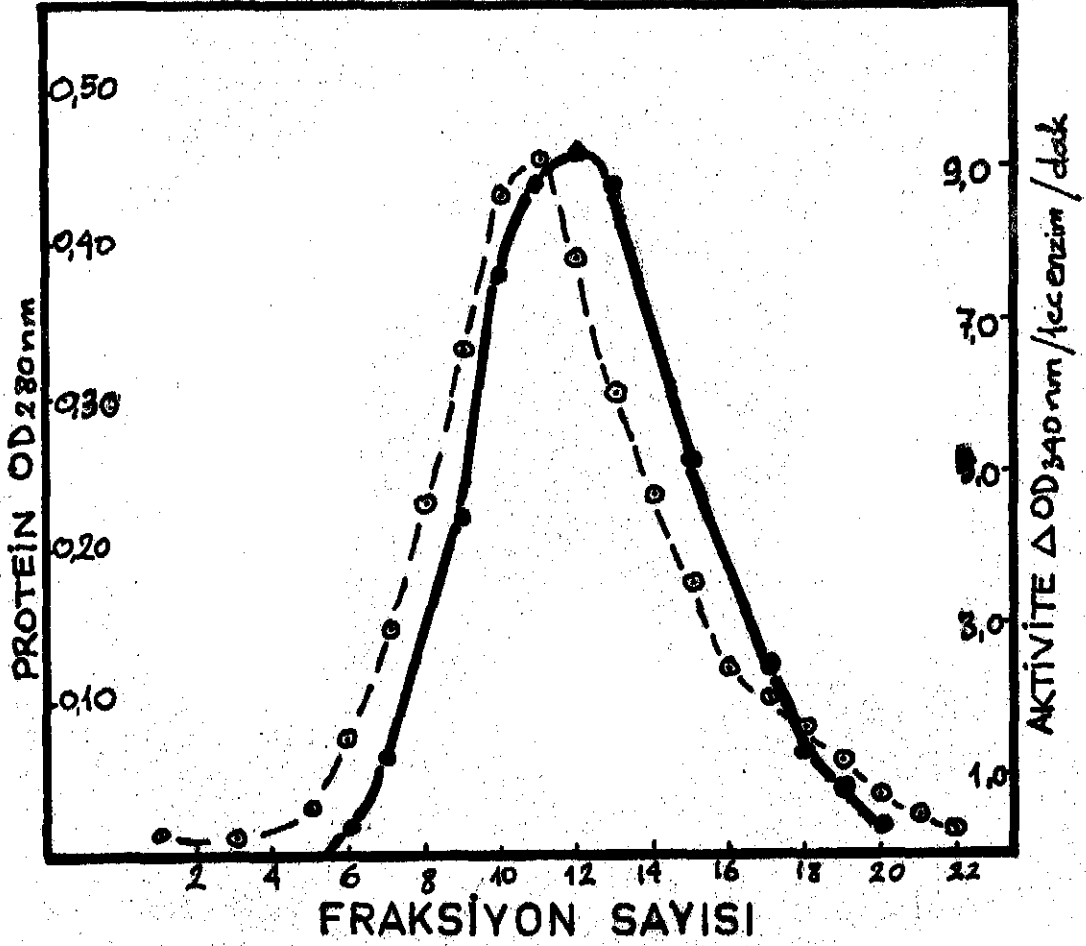


FRAKSİYON SAYISI

Sekil 1 : Siğır kalbi NADP⁺ bağımlı izositrat dehidrogenazının (IDH) sephadex G-150 kolonundan elüsyonu.

Kolon 5 mM trisodyum sitrat, 1 mM EDTA, % 10 (NH₄)₂SO₄, pH = 7.4 çözeltisi ile dengelendi. Her tüpte 280 damla (yaklaşık 13 cc) çözelti toplandı. En yüksek IDH aktivitesi 31. tüpte (378 cc) elde edildi.

- Protein : 280 nm-absorbsiyonu.
- Aktivite : 1 cc enzim çözeltisinin, 1 dakikada, 340 nm dalga boyundaki optik dansite değişimi.

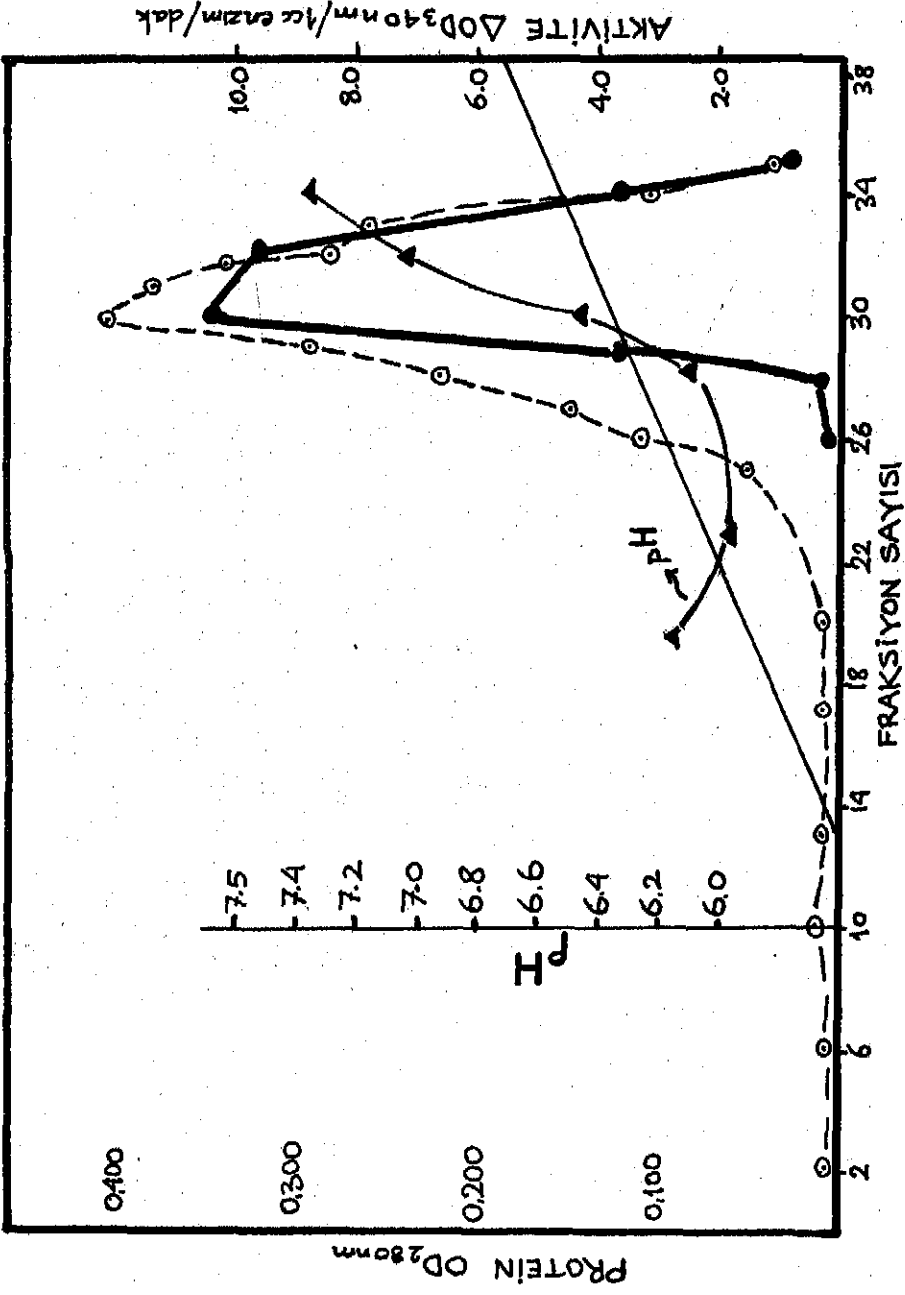


Şekil 2 : Sığır kalbi NADP⁺ bağımlı İDH'ının DEAE sephadex A-50 kolonundan elüsyonu.

Kolon 5 mM trisodyum sitrat, 5 mM MgSO₄, 1 mM EDTA, pH = 7.4 tamponu ile dengelendi. Enzim aynı tamponla yıkanarak elüe edildi. Fraksiyon hacmi 3 cc.

○ Protein : 280 nm absorpsiyonu

● Aktivite : 1 cc enzim çözeltisinin, 1 dakikada, 340 nm'deki optik dansite değışimi.



Sekil 3 : Sığır kalbi NADP⁺ bağımlı İDH'ının karboksil metil sephadex C-50 kolonundan elüsyonu.

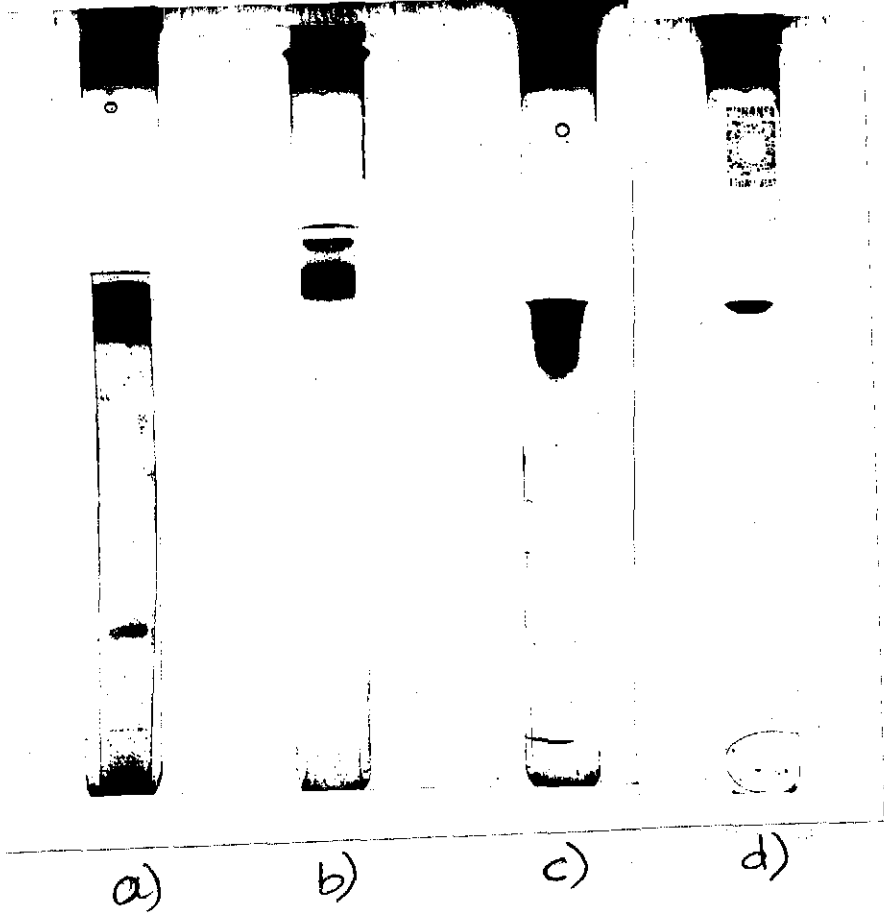
Kolon 5 mM trisodyum sitrat, 5 mM MgSO₄, 1 mM EDTA, pH = 6.1 çözeltisi ile dengelendi. 13. ve 36. tüpler arasında 5-100 mM sitrat gradyanı ve aynı tüpler arasında pH = 6.1 - 7.4 pH gradyanı uygulandı. Fraksiyon hacmi : 3 cc.

○ Protein : 280 nm absorpsiyonu

● Aktivite : 1 cc enzim çözeltisinin, 1 dakikada, 340 nm'deki optik dansite değişimi.

▲ pH

--- 5-100mM sitrat gradyanı



Şekil 4 : Sığır kalbi $NADP^+$ bağımlı IDH 'ının saf-
laştırılmasında çeşitli kademelerde ya-
pılan poliakrilamid jel elektroforezi ve
aktivite boyaması.

- a) Sephadex G-150 kolonu sonrası (50 μ gr protein)
- b) DEAE Sephadex A-50 kolonu sonrası (50 μ gr protein)
- c) CM-Sephadex C-50 kolonu sonrası (50 μ gr protein)
- d) Aktivite boyaması (50 μ gr protein).

İ Ş L E M	HACİM(cc)	TOTAL PROTEİN (mg)	TOTAL AKTİVİTE IU	ÖZGÜL AKTİVİTE IU/mg protein	VERİM %	KAÇ KEZ SAFLAŞTIĞI
27000 % SUPERNATANI	440	86808	4130	0,048	100	1.0
BİRİNCİ İSİ DENATÜRASYONU SUPERNATANI	602	25056	3170	0,127	77	2.6
% 65 (NH ₄) ₂ SO ₄ ÇÖKELEĞİ	275	18150	2838	0,129	57	2.7
% 45 (NH ₄) ₂ SO ₄ ÇÖKELEĞİ	86	5418	2053	0,38	49	7.9
İKİNCİ İSİ DENATÜRASYONU SUPERNATANI	81	3524	2050	0,58	49	12.1
SEPHADEX G-150 KOLONU	122	423	1670	3,95	40	82.3
DEAE SELÜLOZ KOLONU	24	37	787	21,3	19	444.4
CM SEPHADEX C-50 KOLONU	30	24	812	33,8	19	704.0

Tablo II : NADP⁺ bağımlı siğir karaciğeri izositrat dehidrogenazının saflaştırılması.

* 280 nm absorpsiyonu.

** Birim enzim aktivitesi, dakikada 37°C 'ta 1 µmol NADPH oluşturan enzim miktarı olarak hesaplandı.

*** Özgül aktivite, enzim aktivitesinin mg olarak protein miktarına bölünmesi ile elde edildi.

Amonyum sülfatlama kademeleri iki farklı pH'da (7.0-4.5) gerçekleştirildi ve kalan total proteinin % 80'i uzaklaştırılarak % 64 verimle aktif enzim elde edildi.

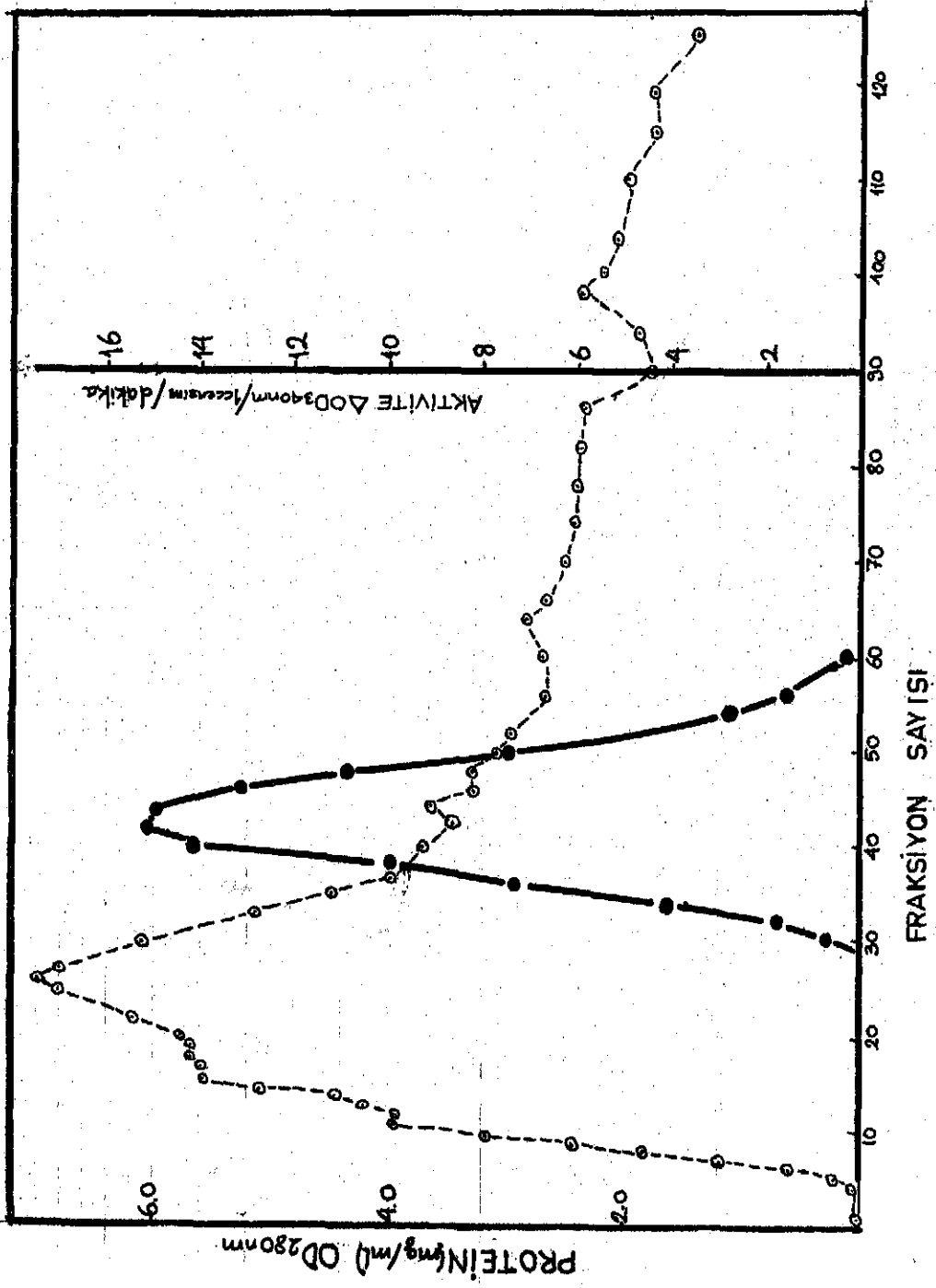
Şekil 5'te karaciğer İDH'sının Sephadex G-150 jel kromatografisi elüsyon sonucu görülmektedir. Bu kademede protein aktif fraksiyonlar öncesi ve sonrasında yaygın olarak elde edilmekte, aktif enzim ise keskin bir zirve oluşturmaktadır. Enzimin bu kademede bir önceki kademeye oranla 6.8 kez saflaştığı ve proteinin % 88 oranda atıldığı Tablo II'de görülmektedir.

Şekil 6 karaciğer İDH'sının DEAE selüloz iyon değiştirici kolonundan elüsyonunu göstermektedir. Görüldüğü gibi karaciğer İDH'ı pH = 7.4'te ve kolon tamponunun iyon şiddetinde kolona etkin biçimde tutunmaktadır. Kolon tamponu ile yapılan yıkamada izositrat dehidrogenaz aktivitesi göstermeyen çok büyük miktarda protein atılmakta, tuz gradyanı ile gerçekleştirilen, enzimi kolondan sökme işlemi sırasında ise, aktif enzim çok özgül şekilde ve yine yabancı proteinlerden büyük miktarda arınmış olarak elde edilmektedir.

DEAE selüloz kademesinde enzim, bir önceki kademeye göre 5.4 kez saflaşmakta, proteinin ise % 91'i uzaklaştırılmaktadır.

Karboksimetil Sephadex C-50 iyon değiştirici kolonunun elüsyonu oldukça saf protein görünümü vermektedir. Karaciğer İDH'ı bu kolona tutunmadan çıkmakta, total proteinin bir kısmı ise kolonda kalmaktadır (Şekil 7).

Şekil 8 karaciğer İDH'sının poliakrilamid jel elektroforezinde gerçekleştirilen aktivite ve protein boyamasını göstermektedir. Protein boyamasında görüldüğü gibi, 700 kez saflaştırılmış olmasına karşın, karaciğer İDH'ı jel üzerinde biri kalın üç bant vermektedir. Yine, karaciğer İDH'sının aynı şartlarda altında gerçekleştirilen elektroforezde, kalp tipi İDH'a göre daha yüksek mobilite gösterdiği, protein ve aktivite boyamalarından anlaşılmaktadır.

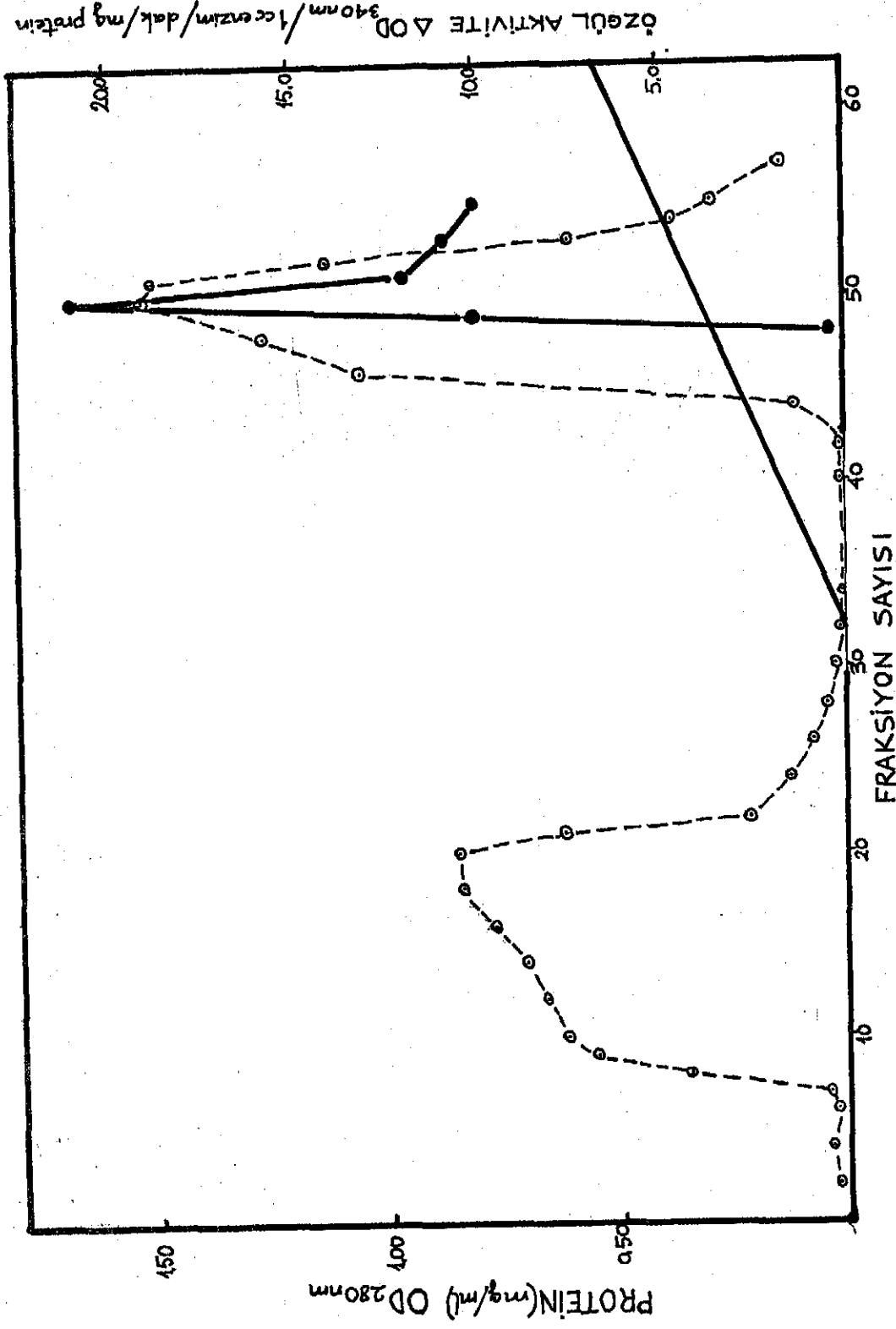


Şekil 5 : NADP⁺ bağımlı siğir karaciğeri izositrat dehidrogenazının (IDH) sephadex G-150 kolonundan elüsyonu.

Numune ve kolon 100 mM sitrat, 10 mM MgSO₄ ve % 10 (NH₄)₂CO₃ tamponu ile dengelendi. Tüplerde 4 cc çözelti toplandı. İlk 325 cc bir araya toplandı.

○ Protein : 280 nm absorpsiyonu

● Aktivite : 1 cc enzim çözeltisinin, 1 dakikada 340 nm dalga boyunda oluşturduğu optik dansite değişimi.

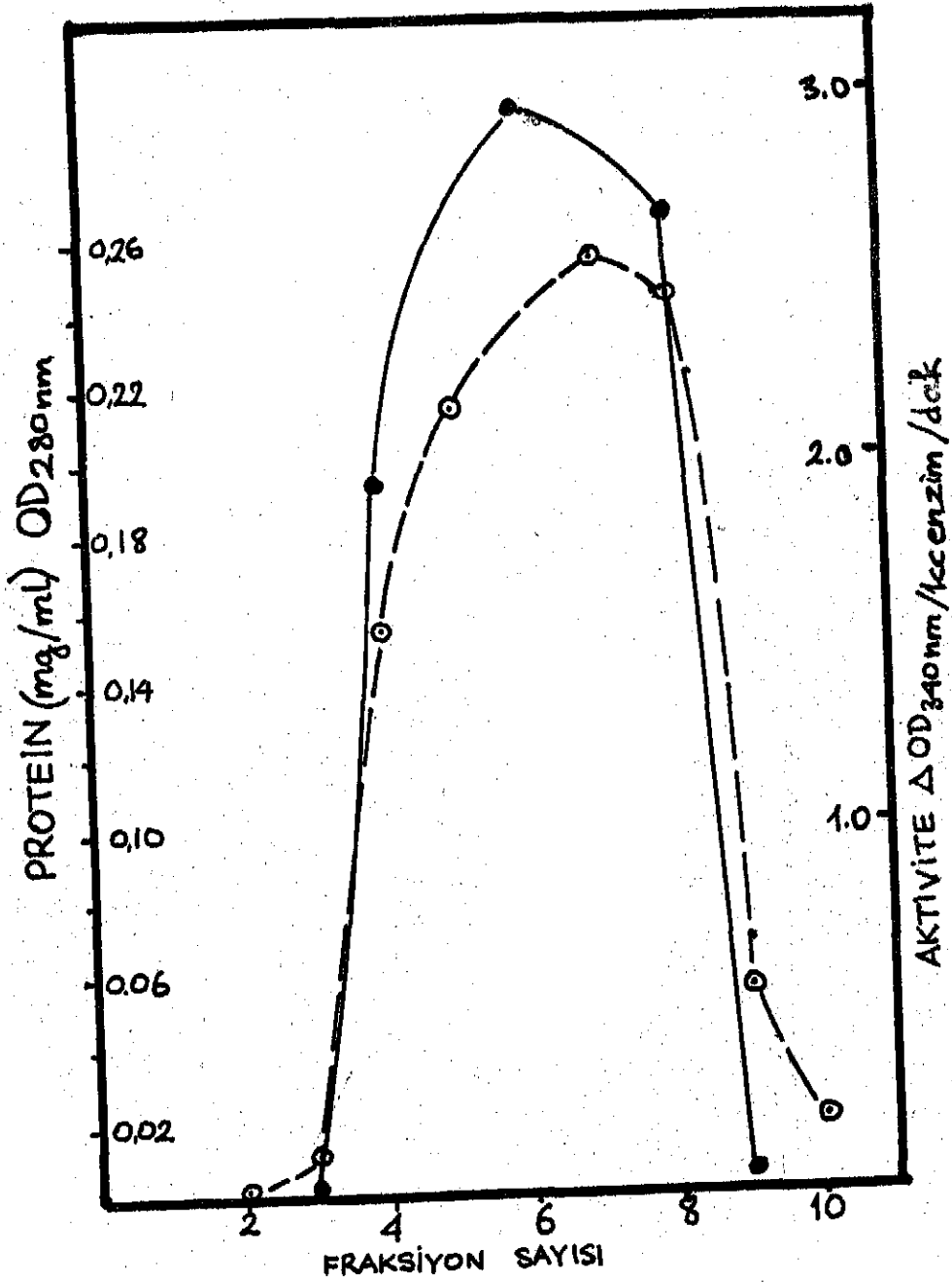


Sekil 6 : NADP⁺ bağımlı sıgır karaciğeri İDH'ının DEAE sellüloz kolonundan elüsyonu.

Kolon 5 mM trisodyum sitrat, 5 mM MgSO₄ ve 1 mM EDTA, pH = 7.4 tamponu ile dengelendi. Numune, kolon tamponuna karşı dializ edilerek aynı iyon konsantrasyonlarına getirildi. Kolon 32. tüpte 5-500 mM sitrat gradyanına bağlandı. Enzim, 64 mM sitratta ve 50. tüpte elde edildi.

○ Protein : 280 nm absorpsiyonu

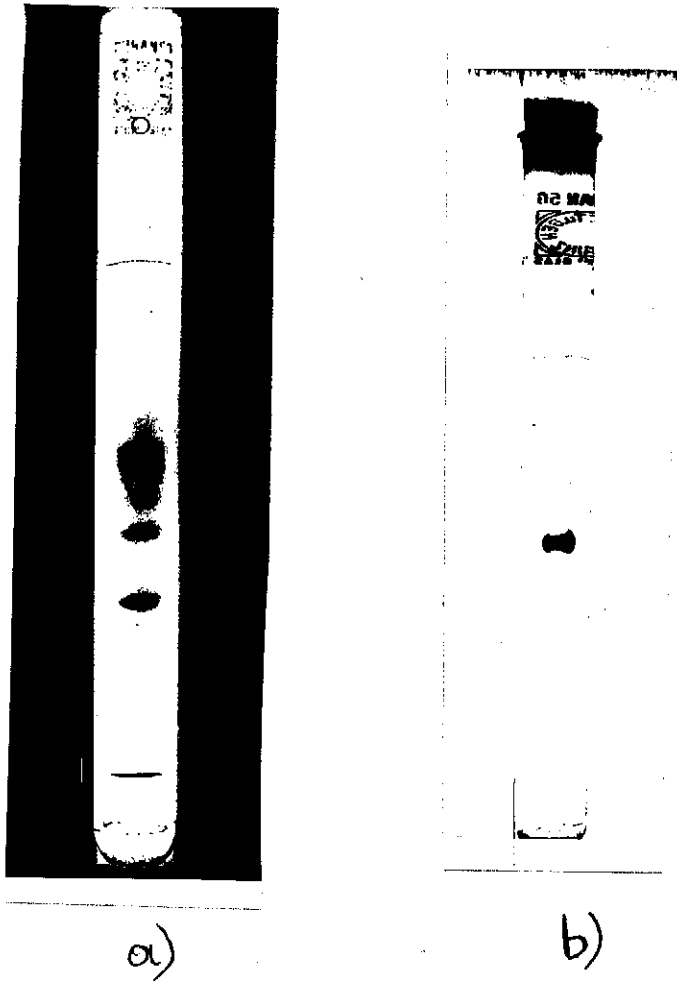
● Özgül aktivite : Aktivite / mg protein



Şekil 7 : NADP⁺ bağımlı siğir karaciğeri İDH'ının karboksi metil Sephadex C-50 kolonundan elüsyonu.

Kolon 5 mM trisodyum sitrat, 5 mM Mg SO₄, 1 mM EDTA pH = 5.8 tamponu ile dengelendi. Numunenin pH'ı 0.01 M HCl ile 5.8'e getirilerek kolona uygulandı. Enzim aynı tamponla elüe edildi. Tüplerde 3 cc çözelti toplandı.

- Protein : 280 nm absorpsiyonu
- Aktivite



Şekil 8 : Sığır karaciğeri $NADP^+$ bağımlı IDH 'ının poliakrilamid jel elektroforezinde aktivite ve protein boyaması.

a) Protein boyaması

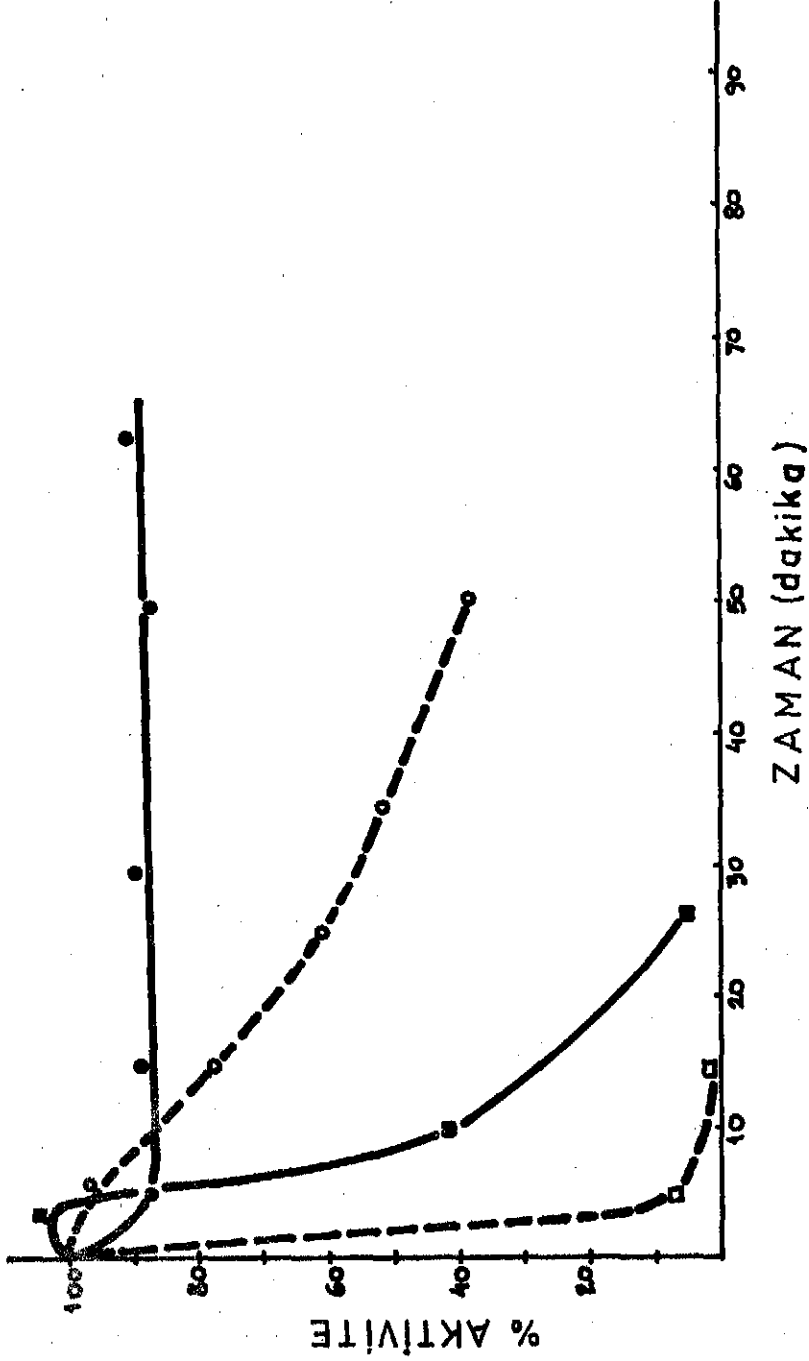
b) Aktivite boyaması.

Genel olarak NADP⁺ bağımlı dehidrogenazlar için affinite kromatografisi materyali olarak kullanılan 2',5' ADP - Sepharoz 4B izositrik dehidrogenazi bağlanmamaktadır (30). Bu ligand kullanılarak yapılan deneylerde gerek kalp gerekse karaciğer IDH'ları kolona tutunmadan elüe edilebilmiştir. Bundan başka kolona uygulanan total protein de tümüyle kolona tutunmadan çıktığından ortamda yabancı dehidrogenazların bulunmadığı sonucuna varılmıştır.

NADP⁺ bağımlı IDH'lar için uygun bir affinite materyali olarak rapor edilen (31) NADP⁺ - agaroz kullanıldığında, yine her iki izozimin denen PH aralığında bu liganda da bağlanmadığı saptanmıştır.

Aktif kömürle yapılan deneyler ufak örneklerde ve saflaştırmanın başlangıç kademelerinde bir miktar saflaşma sağlanmışsa da büyük hacimlerde çalışmada ortaya çıkan süzme sorunlarından dolayı kullanılmamıştır.

Sığır kalbi ve karaciğeri NADP⁺ bağımlı izositrat dehidrogenazları, düşük tuz konsantrasyonlarında (5 mM trisodyum sitrat, % 20 gliserol, 1 mM EDTA, PH = 7.5) ısı etkisi ile denatüre olmaktadır. Ortamda yüksek oranda gliserolün bulunması ve fizyolojik PH'nın kullanılması bu denatürasyonu önlememektedir. Şekil 9 da görüldüğü gibi 50°C'ta her iki izozim de kolayca denatüre olmaktadır. Yine aynı şekilden, karaciğer enziminin ısı denatürasyonuna karşı kalp tipi IDH'tan daha dayanıklı olduğu anlaşılmaktadır. 37°C'ta ısı dayanıklılığı farkı daha belirgin olarak ortaya çıkmakta, 50. dakika sonunda kalp enziminin aktivitesi başlangıç aktivitesinin % 38 'ine kadar düşmekte iken karaciğer enzimi başlangıç aktivitesinin % 88 'ini korumaktadır.



Şekil 9 : 5 mM trisodyum sitrat, % 20 Gliserol, 1 mM EDTA, pH = 7.5 olan ortamda NADP⁺ bağımlı sığır kalp ve karaciğer izositrat dehidrogenazlarının (İDH) ısı etkisi ile bozunmaları.

Aktivite tayini gereç ve yöntemlerde belirtilen şekilde, 37°C ve 50°C de inkübe edilen enzim çözeltilisinden sıfırıncı dakikada ve çeşitli zaman aralıklarında alınan 0.02 cc numunelerin reaksiyon küvetine ilavesi ile yapıldı.

- 50°C de kalp izozimi
- 50°C de karaciğer izozimi
- 37°C de kalp izozimi
- 37°C de karaciğer izozimi

Şekil 10 A 'da kalp, Şekil 10 B'de ise karaciğer izozimlerinin 50°C ta, amonyum sülfat ile ısı denatürasyonuna karşı korunmaları gözlenmektedir. Görüldüğü gibi karaciğer enzimi % 10 amonyum sülfat konsantrasyonunda tam olarak korunmakta, kalp enzimi ise ancak % 40 amonyum sülfat konsantrasyonunda stabilize edilebilmektedir.

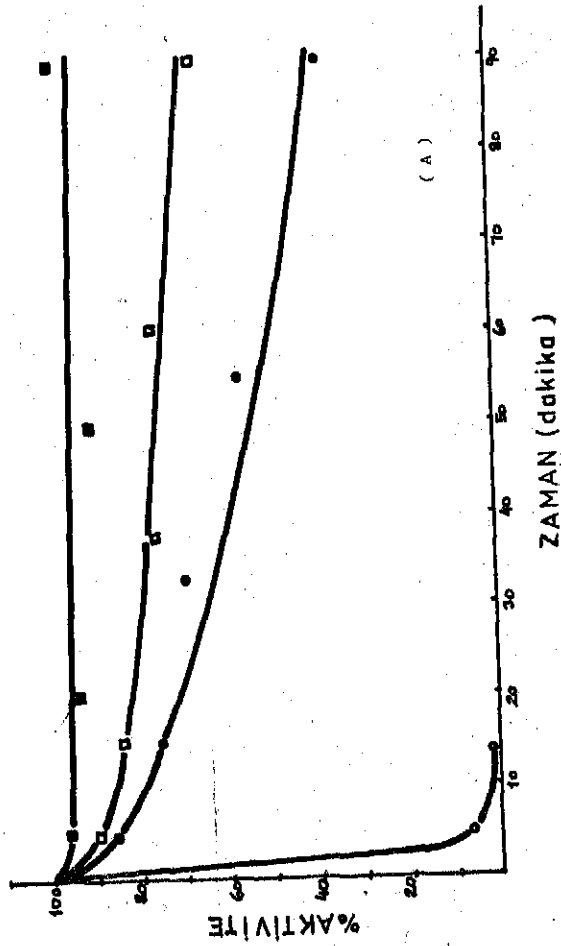
Şekil 11 A'da kalp, Şekil 11 B'de karaciğer IDH'larının 50°C'ta sodyum sülfat tarafından ısı denatürasyonuna karşı korunması görülmektedir. Şekil incelendiğinde sodyum sülfatın da karaciğer izozimini kalp tipine göre daha düşük konsantrasyonlarda stabilize ettiği anlaşılmaktadır.

% 1 Na₂SO₄ 'lı ortamda kalp izoziminin, 50 dakika süre sonunda, başlangıç aktivitesinin % 95'ini kaybetmesine karşın karaciğer enzimi aynı sodyum sülfat konsantrasyonunda başlangıç aktivitesinin % 95'ini korumaktadır. % 5 Na₂SO₄ konsantrasyonunda ise kalp tipinde, ısı etkisine karşı korunmada % 1 Na₂SO₄ 'a göre belirgin bir farklılık bulunmamasına karşın, karaciğer IDH'ının % 150'ye varan bir oranda aktive olduğu görülmektedir.

Kalp tipi IDH'ın Na₂SO₄ 'la, ısı etkisine karşı tam olarak korunması ancak Na₂SO₄ konsantrasyonu % 10'a (700 mM) çıkarıldığında mümkün olmaktadır.

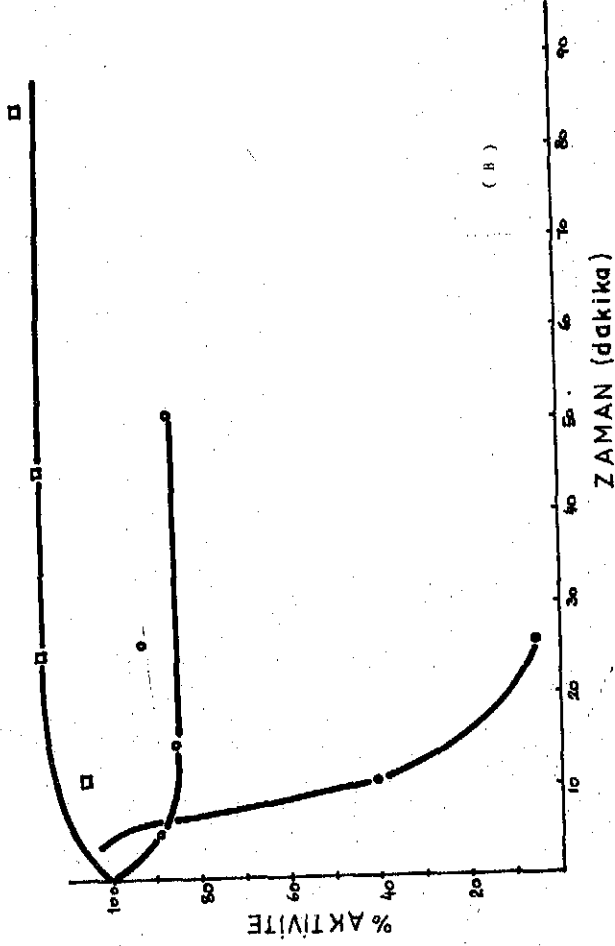
Tek değerli bir katyon olan amonyum iyonunun varlığında, 50°C'ta kalp IDH'ı, ısı etkisine karşı daha dayanıksız hale gelmekte ve 5 mM trisodyum sitrat, % 20 gliserol ve 1 mM EDTA bulunduran ortamdakine göre daha çabuk inaktive olmaktadır (Şekil 12).

Karaciğer izozimi üzerinde ise NH₄⁺ iyonunun, düşük tuz konsantrasyonundakine göre az da olsa pozitif bir etkisi vardır. Şekil 12, % 20 ve % 40 NH₄Cl bulunduran ortamda, 50°C'ta kalp ve karaciğer IDH'larının ısı denatürasyonlarını göstermektedir. Kalp tipi IDH üzerinde NH₄Cl'ün etkisinin % 20 ve % 40 NH₄Cl konsantrasyonlarında değişmediği de şekilde gözlenmektedir.



(10 A) Karp Enzimi

- Amonyum sülfatsız
- % 10 Amonyum sülfatlı
- % 20 Amonyum sülfatlı
- % 40 Amonyum sülfatlı

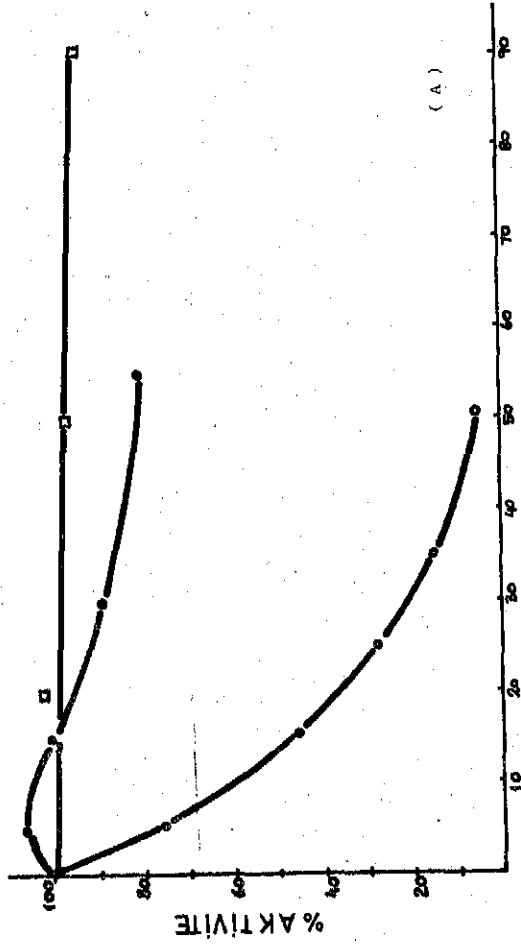


(10 B) Karaciğer Enzimi

- Amonyum sülfatsız
- % 10 Amonyum sülfatlı
- % 20 Amonyum sülfatlı
- % 40 Amonyum sülfatlı

Şekil 10 : NADP-bağımlı sığır karp (A) ve karaciğer (B) İDH'lerinin $(NH_4)_2SO_4$ tarafından, $50^\circ C$ de ısı denatürasyonuna karşı korunmaları.

Sephadex G-25 kolonunda tuzdan arındırılan enzim çözeltileri, daha sonra katı amonyum sülfat ile istenen konsantrasyona getirildi. $50^\circ C$ de inkübasyona bırakılan enzim çözeltilerinden sıfırıncı dakikada ve çeşitli zamanlarda numuneler alındı ve aktiviteye bakıldı. (Aktivite tayini için gereç ve yöntemlere bakınız).



(A) Kalp izozimi

Sekil 11 : NADP⁺ bağımlı sağır kalp (A) ve Karaciğer (B) İDH'lerinin Na₂SO₄ tarafından, 50°C de ısı denatürasyonuna karşı korunmasını.

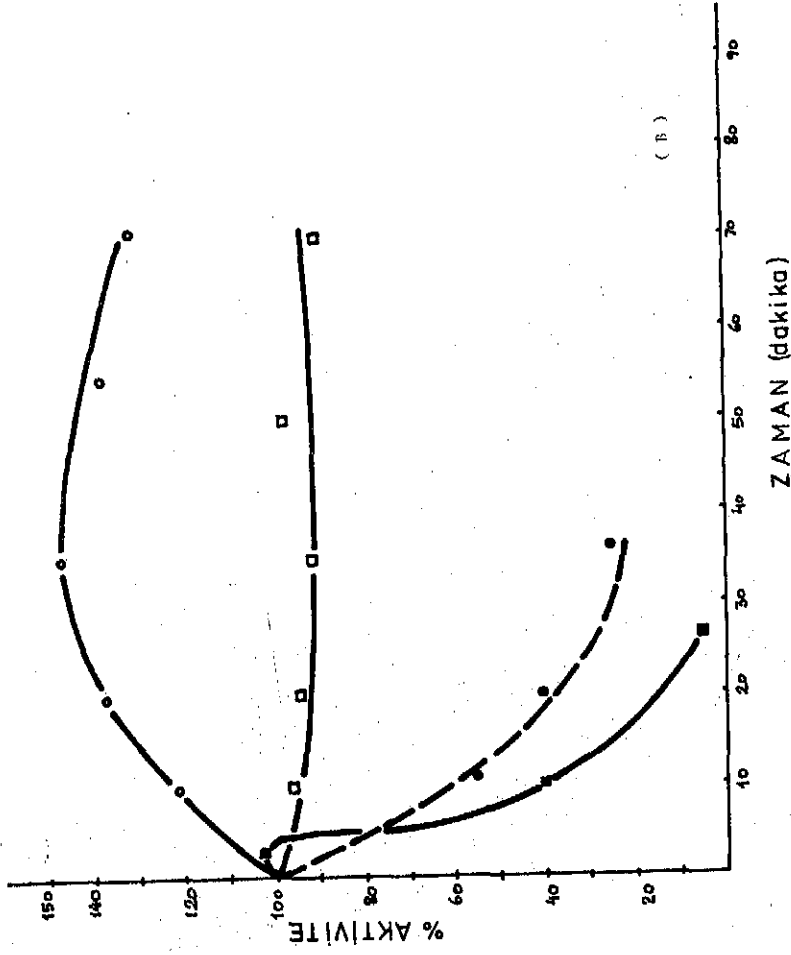
5 mM trisodyum sitrat, % 20 Gliserol, 1 mM EDTA ile dengelenmiş sephadex G-25 kolonunda tuzdan arındırılan enzim çözeltileri Na₂SO₄ ile istenen konsantrasyona getirildi ve 50°C de inkübe edildi. Sıfırıncı dakikada ve değişik zaman aralıklarında numuneler alındı ve yöntemlerde anlatıldığı şekilde aktiviteye bakıldı.

(11 A) Kalp izozimi

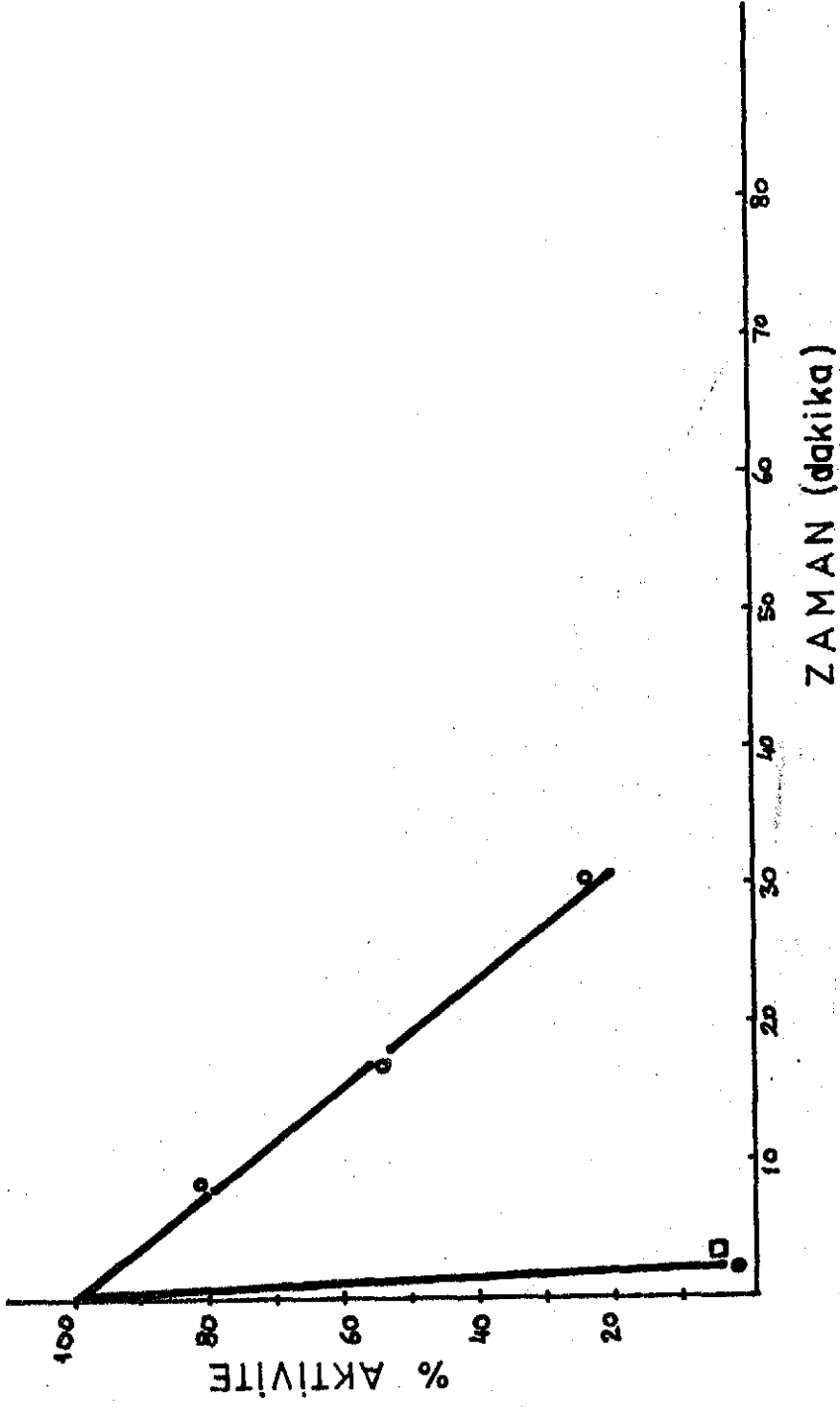
- % 1 Na₂SO₄ (70 mM)
- % 5 Na₂SO₄ (350 mM)
- % 10 Na₂SO₄ (700 mM)
- % 5 Na₂SO₄ (350 mM)

(11 B) Karaciğer izozimi

- Sodyum sülfatsız
- % 0.14 Na₂SO₄ (10 mM)
- % 1 Na₂SO₄ (70 mM)
- % 5 Na₂SO₄ (350 mM)



(B)



Şekil 12 : NH_4Cl 'ün 50°C de NADP^+ bağımlı siğır kalp ve karaciğer IDH'larının ısı denatürasyonları üzerine etkisi.

5 mM trisodyum sitrat, % 20 Gliserol, 1 mM EDTA, pH = 7.4 ile dengelenmiş sephadex G-25 kolonunda tuzdan arındırılan enzim çözeltileri, katı amonyum klorür ile istenen konsantrasyona getirildi ve 50°C de inkübe edildi. Sıfırncı dakikada ve değişik zaman aralıklarında 0.02 cc numuneler alınarak yöntemlerde anlatıldığı gibi aktiviteye bakıldı.

● Kalp Enzimi; % 20 Amonyum Klorür

□ Kalp Enzimi; % 40 Amonyum Klorür

○ Karaciğer enzimi; % 20 Amonyum Klorür

Yine tek değerli bir katyon olan sodyum iyonu, 50°C'ta kalp izoziminin ısı denatürasyonu üzerinde belirgin bir etki göstermemekte, buna karşın % 5'lik NaCl karaciğer izozimini ısı denatürasyonuna karşı tam olarak stabilize etmektedir. Şekil 13, kalp ve karaciğer IDH'ları üzerinde NaCl'ün farklı etkisini açıkça göstermektedir.

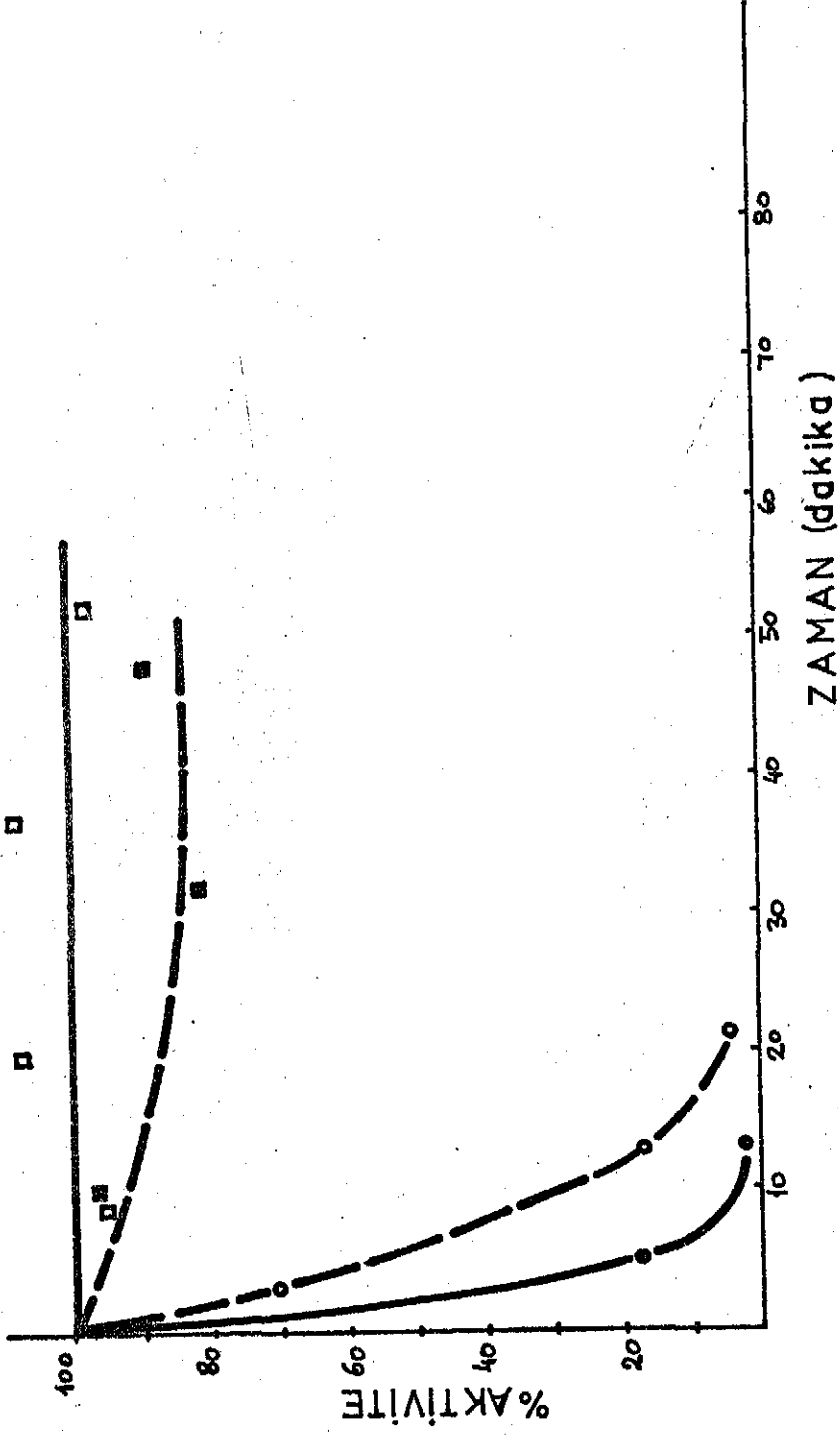
Bulgular iki izozim arasında çeşitli tuzlarla ısı denatürasyonuna karşı korunma bakımından farklılıklar bulunduğunu, karaciğer enziminin daha düşük konsantrasyonlarda ve hem anyon hem de katyonlarla stabilize edilebildiğini, kalp enziminin ise amonyum sülfat ve sodyum sülfat ile stabilize edilmekle birlikte sodyum klorürle stabilize edilemediğini göstermektedir.

Amonyum sülfat, kalp ve karaciğer IDH izoenzimlerini 37°C'ta üre denatürasyonuna karşı da korumaktadır. Şekil 14, üreli ortamda tuzsuz ve amonyum sülfatlı kalp ve karaciğer izozimlerinin 37°C'ta denatürasyon eğrilerini göstermektedir. Amonyum sülfatla önceden inkübe edilmiş IDH'ın üre denatürasyonuna dayanıklı hale döndüğü ve bu bulgunun her iki izozim için de geçerli olduğu şekilden anlaşılmaktadır.

Üre denatürasyonuna karşı dayanıklılığın, Mg-izositrat kompleksi ile de gerçekleştirilebildiği Şekil 15 de gösterilmiştir.

Tablo III sığırcı kalbi ve karaciğeri NADP⁺ bağımlı izositrat dehidrojenazlarının değişik iyon değiştiricilere tutunma özellikleri bakımından farklılıklarını göstermektedir.

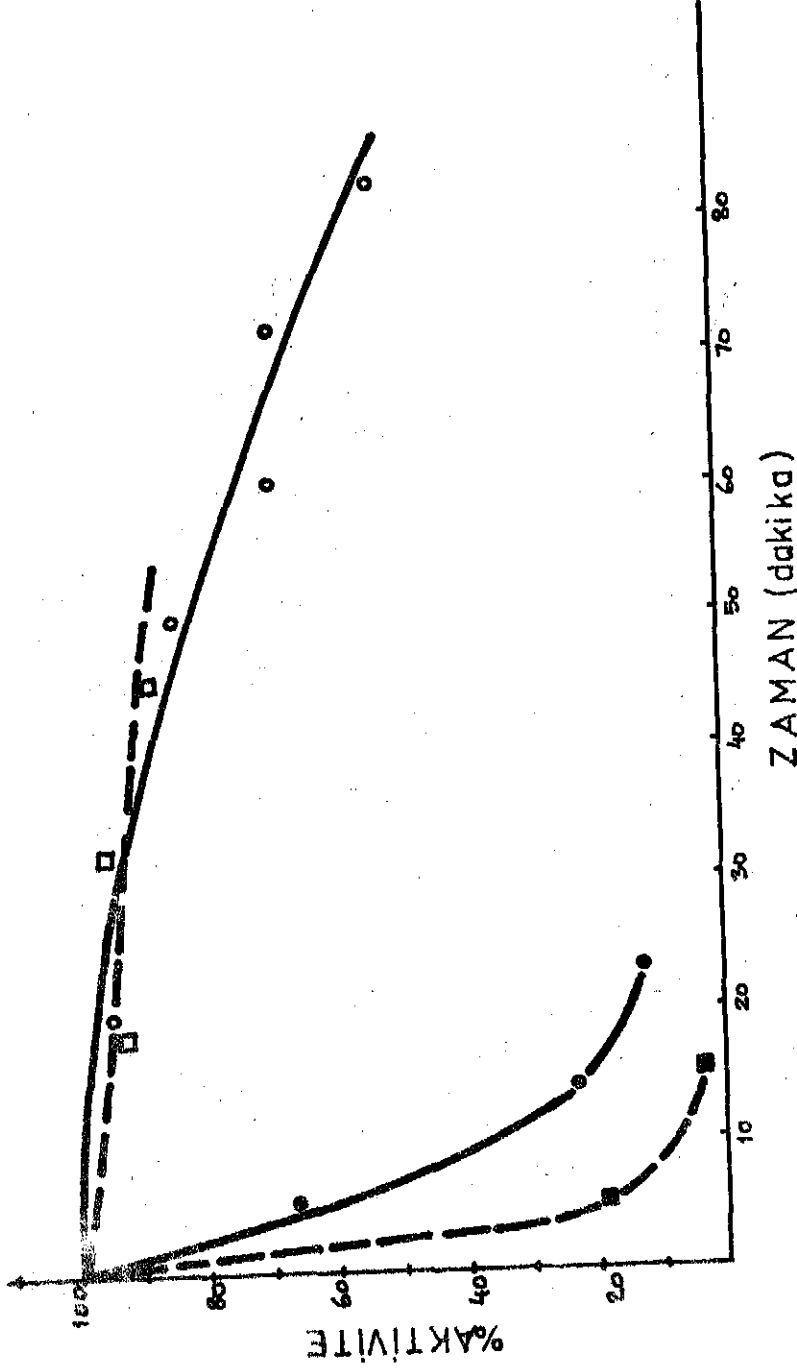
Görüldüğü gibi kalp tipi IDH pozitif yüklü bir matrikse sahip olan DEAE iyon değiştiricisine pH=7.4'te tutunmamaktadır. Karaciğer tipi IDH ise aynı kolona gerek pH = 6.1'de gerekse pH = 7.4'te tutunmakta ve konsantrasyon gradyanı ile sökülebilmektedir.



Şekil 13 : NaCl'ün 50°C de sıgır kalbi ve karaciğeri NADP⁺ bağımlı İDH'ları üzerindeki stabilizasyon etkisi.

Enzim çözeltileri katı NaCl ilavesi ile istenen konsantrasyonlara getirildi ve 50°C de inkübe edildi. İnkübasyon ortamından sıfıncı dakikada ve değişik zaman aralıklarında alınan 0.02 cc örneklerde aktivite tayini yapıldı.

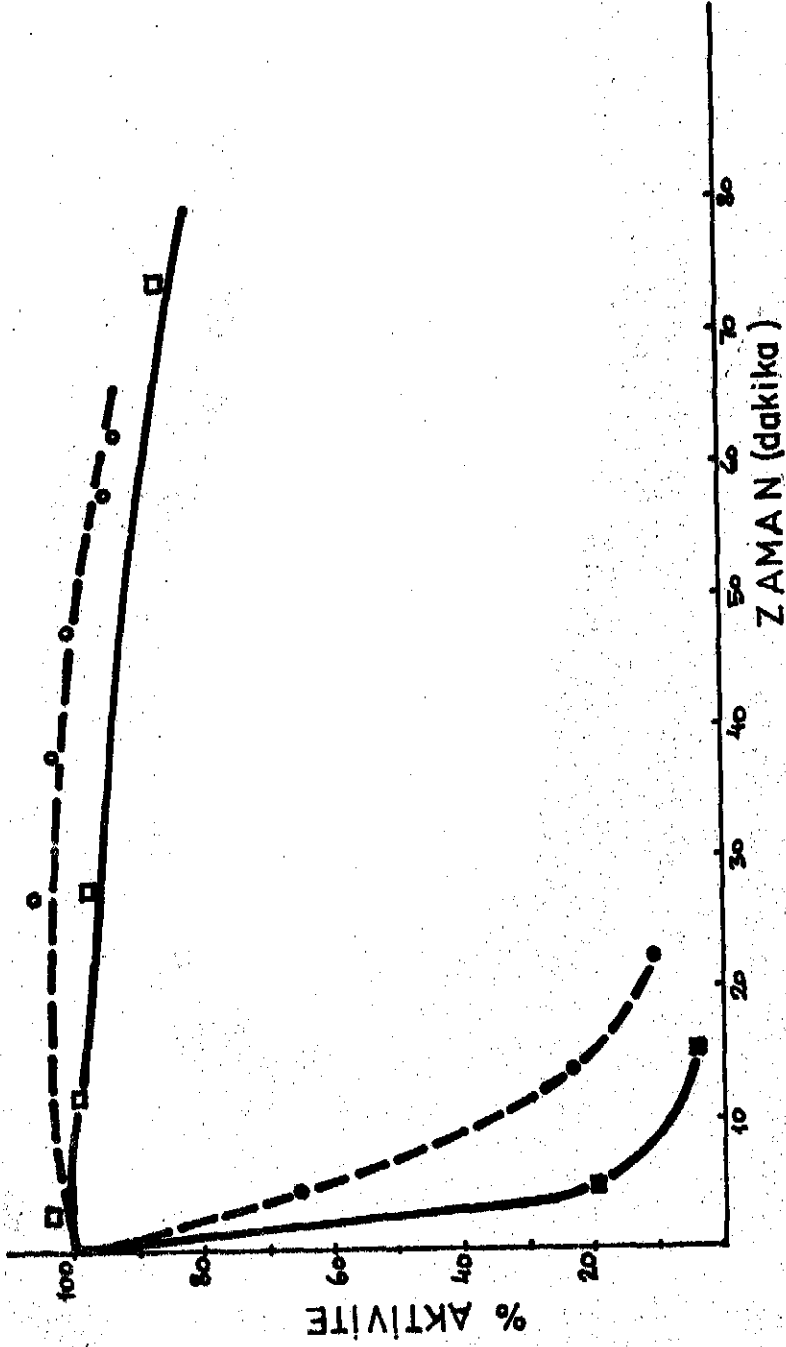
- Kalp izozimi (% 5 NaCl)
- Kalp izozimi (Doymuş NaCl)
- Karaciğer izozimi (Doymuş NaCl)
- Karaciğer izozimi (% 5 NaCl)



Şekil 14 : Amonyum sülfatın, 37°C de, sağır kalp ve karaciğer NADP⁺ bağımlı İDH'lerinin, üre denatürasyonu üzerindeki koruyucu etkisi.

5 mM trisodyum sitrat, 1 mM EDTA, % 20 Gliserol, pH = 7.4 tamponu ile dengelenmiş sephadex G-25 kolonundan geçirilen enzim çözeltisi 3 M olacak şekilde üre ilavesinden sonra 37°C de inkübe edildi. Aynı işlem sephadex G-25 sonrası ortam % 40 (NH₄)₂SO₄ konsantrasyonuna getirilerek tekrarlandı. Değişik zamanlarda alınan 0.02 cc örneklerde aktiviteye bakıldı.

- Kalp izozimi (3 M üre)
- Karaciğer izozimi (3 M üre)
- Karaciğer izozimi (% 40 amonyum sülfat, 3 M üre)
- Kalp izozimi (% 40 amonyum sülfat, 3 M üre)



Şekil 15 : NADP⁺ bağımlı sıgır kalp ve karaciğer İDH'lerinin üre denatürasyonuna karşı Mg-izosütrat kompleksini tarafından korunması.

Sephadex G-25 kolonundan geçirilen enzim çözeltisi 3 M üre olacak şekilde üre ile muamele edildikten sonra 37°C de inkübe edildi. Aynı işlem kolon sonrasında ortam, üreden önce 1 mM izosütrat ve 10 mM MgSO₄ konsantrasyonlarına getirilerek tekrarlandı.

- Kalp izozimi (3 M üre)
- Karaciğer izozimi (3 M üre)
- Kalp izozimi (1 mM izosütrat, 10 mM MgSO₄, 3 M üre)
- Karaciğer izozimi (1 mM izosütrat, 10 mM MgSO₄, 3 M üre)

iyon değiştirici	K A L P	KARACİĞER
DEAE Sephadex A-50 pH = 7.4	-	+ **
DEAE Sephadex A-50 pH = 6.1		+
CM Sephadex C-50 pH = 6.5	+	-
CM Sephadex C-50 pH = 5.8	+	-

Tablo III : Sığır kalbi ve karaciğeri NADP⁺ bağımlı izositrat dehidrogenazlarının elektriksel ylık bakımından farklılıkları*.

* Bütün kolonlarda iyon değiştiriciler, 5 mM trisodyum sitrat, 5 mM MgSO₄, 1 mM EDTA tamponu ile, belirtilen pH 'ta dengelendi.

** + işareti tutunmayı gstermektedir.

Yine Tablo III'ten gözlenebileceği gibi kalp izozimi gerek $pH = 5.8$ gerekse $pH = 6.5$ 'ta, negatif yüklü bir matrikse sahip olan karboksimetil iyon değiştiricisine tutunmakta, karaciğer izozimi ise her iki pH 'ta da bu kolona tutunmamaktadır.

şekil 16'da kalp izoziminin üç ayrı $NADP^+$ konsantrasyonunda izositrat ilgisi görölmektedir. şekilde göröldüğü gibi $NADP^+$ konsantrasyonu arttırıldıkça kalp IDH 'ının izositrat için elde edilen V_{max} değeri artmakta ve K_M değeri azalmaktadır (Tablo IV).

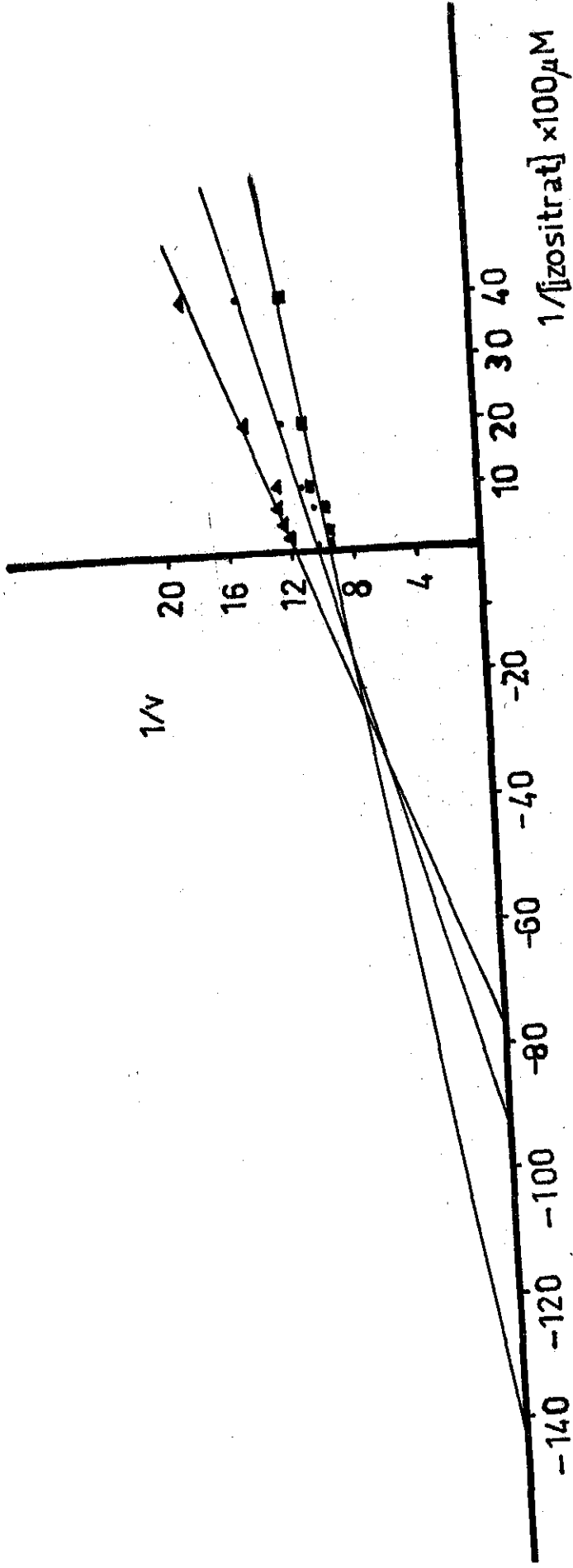
Enzimin $NADP^+$ ilgisi üç ayrı izositrat konsantrasyonunda incelendiğinde 5 ve 25 μM izositratta tam ters bir durum gözlenmekte, artan izositrat konsantrasyonu ile birlikte K_M değeri artmakta, yani ilgi azalmaktadır. 50 μM izositratta ise K_M değerinin bir düşüş kaydettiği görölmektedir (şekil 17).

Yapılan deneylerde kalp tipi IDH 'ın aktivitesi, Mn^{+2} bulunmayan ortamda gözlenmedi. 50 μM $NADP^+$ ve 50 μM D-izositrat konsantrasyonlarında kalp IDH 'ının Mn^{+2} ilgisi 2.1 μM olarak hesaplandı (şekil 18).

Karaciğer tipi IDH 'ın izositrat için K_M değeri, 20, 50 ve 100 μM $NADP^+$ konsantrasyonlarında 2 μM olarak hesaplandı (şekil 19, Tablo IV).

şekil 20'de karaciğer tipi IDH 'ın 5, 25 ve 50 μM izositrat konsantrasyonlarında $NADP^+$ ilgisi gösterilmektedir. Tablo IV'te göröldüğü gibi 5 μM izositrat konsantrasyonlarında $K_M = 4.8$, 25 ve 50 μM izositrat konsantrasyonlarında ise $K_M = 8$ değerleri grafikten hesaplanmıştır.

Karaciğer IDH 'ının Mn^{+2} ilgisi şekil 21'de gösterilmektedir. Mn^{+2} sız ortamda enzim aktivitesi gözlenmemiştir. Bu izozimin Mn^{+2} için K_M değeri 50 μM izositrat ve 50 μM $NADP^+$ konsantrasyonlarında 1.2 μM olarak hesaplanmıştır.



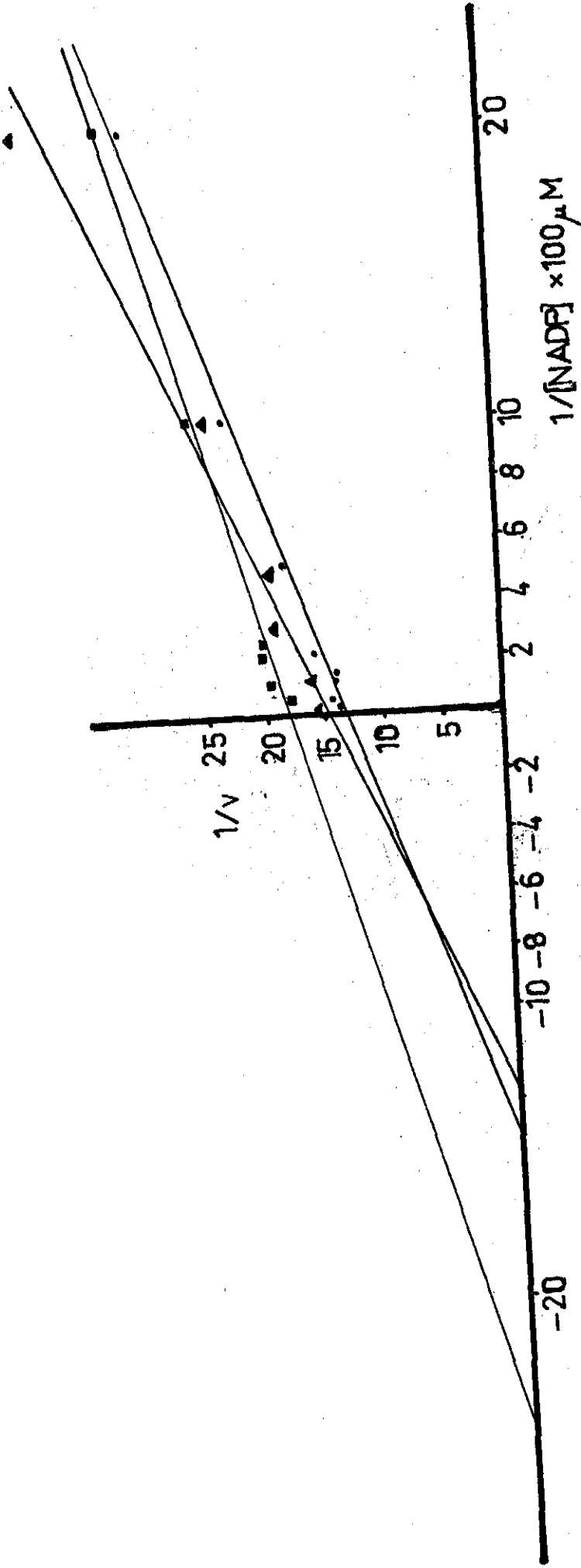
Şekil 16 : NADP⁺ bağımlı sığır kalbi IDH'ının değişen NADP⁺ konsantrasyon-
larında izositrat ilgisi ($1000 \mu M$ Mn Cl₂).

- ▲ $10 \mu M$ NADP⁺
- $50 \mu M$ NADP⁺
- $100 \mu M$ NADP⁺

İzositrat ilgisi	10 μ M NADP ⁺	50 μ M NADP ⁺	100 μ M NADP ⁺
K A L P K _M (μ M)	1.3	1.1	0.7
KARACİĞER K _M (μ M)	2.0	2.0	2.0
NADP ⁺ ilgisi	5 μ M izosit.	25 μ M izosit.	50 μ M izosit.
K A L P K _M (μ M)	4.1	7.8	6.8
KARACİĞER K _M (μ M)	4.8	8.0	8.0

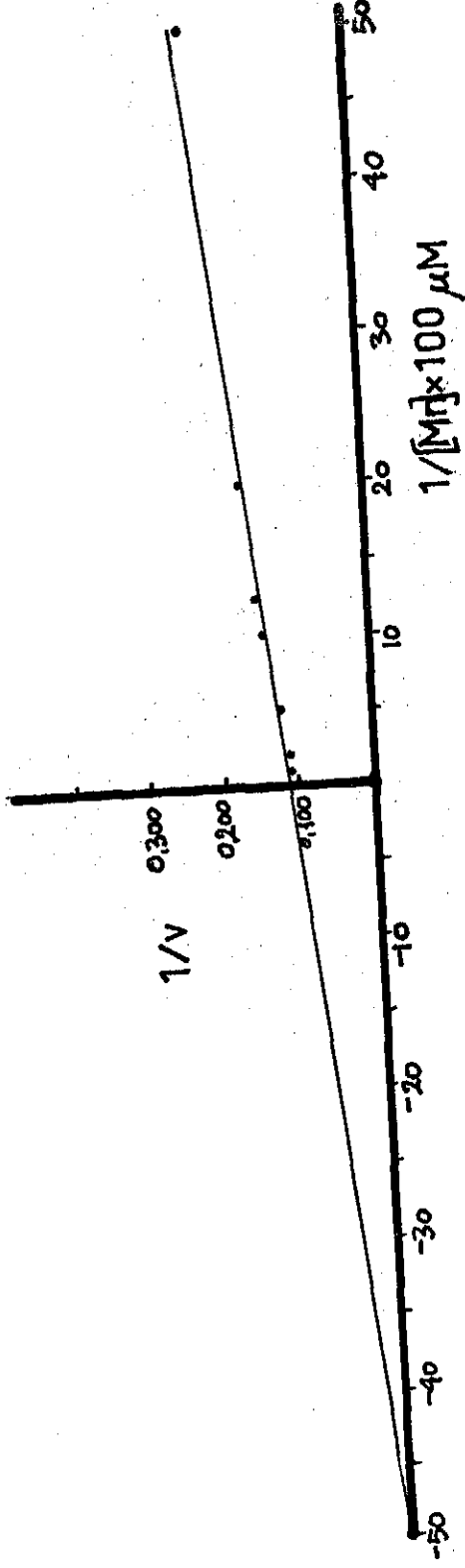
Tablo IV : NADP⁺ bağımlı sığır kalp ve karaciğer İDH izozimlerinin izositrat ve NADP⁺ ilgileri (K_m)*

* 1000 μ M MnCl₂ bulunduran ortamda çalışıldı.

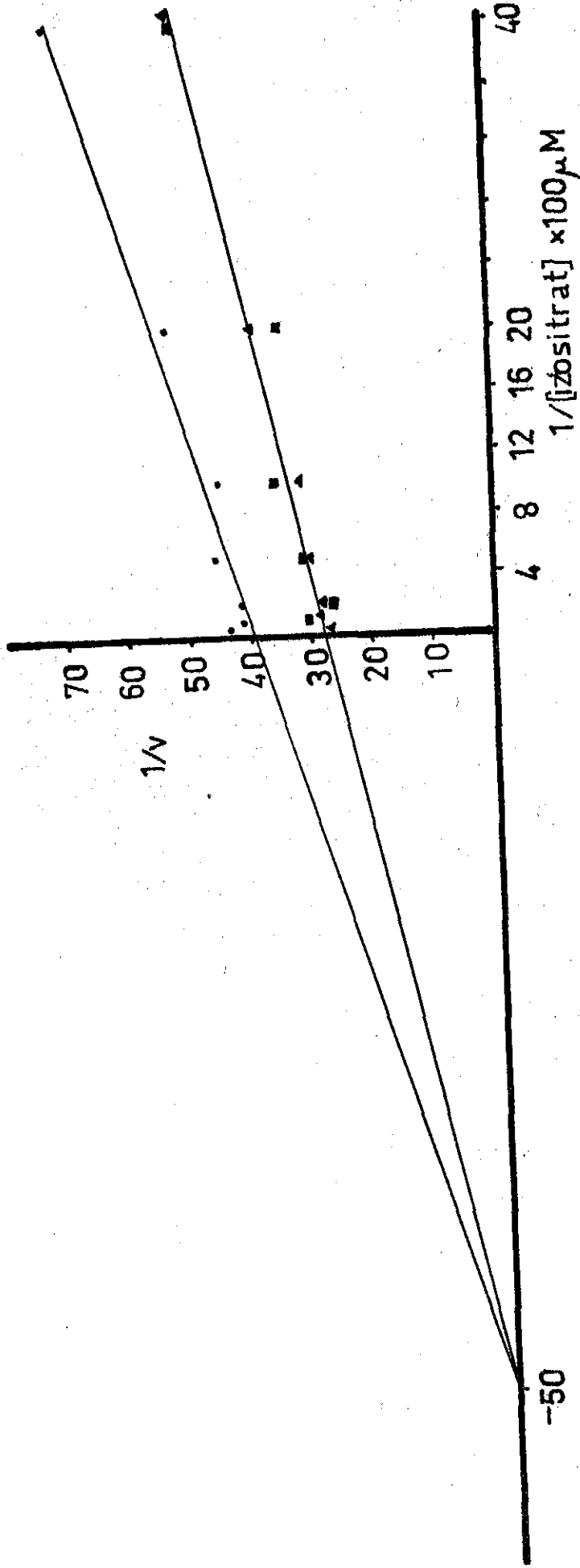


ŞEKİL 17 : Siğır kalbi NADP⁺ bağımlı İDH'nin 1000 μM MnCl₂ ve değişen izositrat konsantrasyonlarında NADP⁺ ilgisi.

- 5 μM D-izositrat
- ▲ 25 μM D-izositrat
- 50 μM D-izositrat

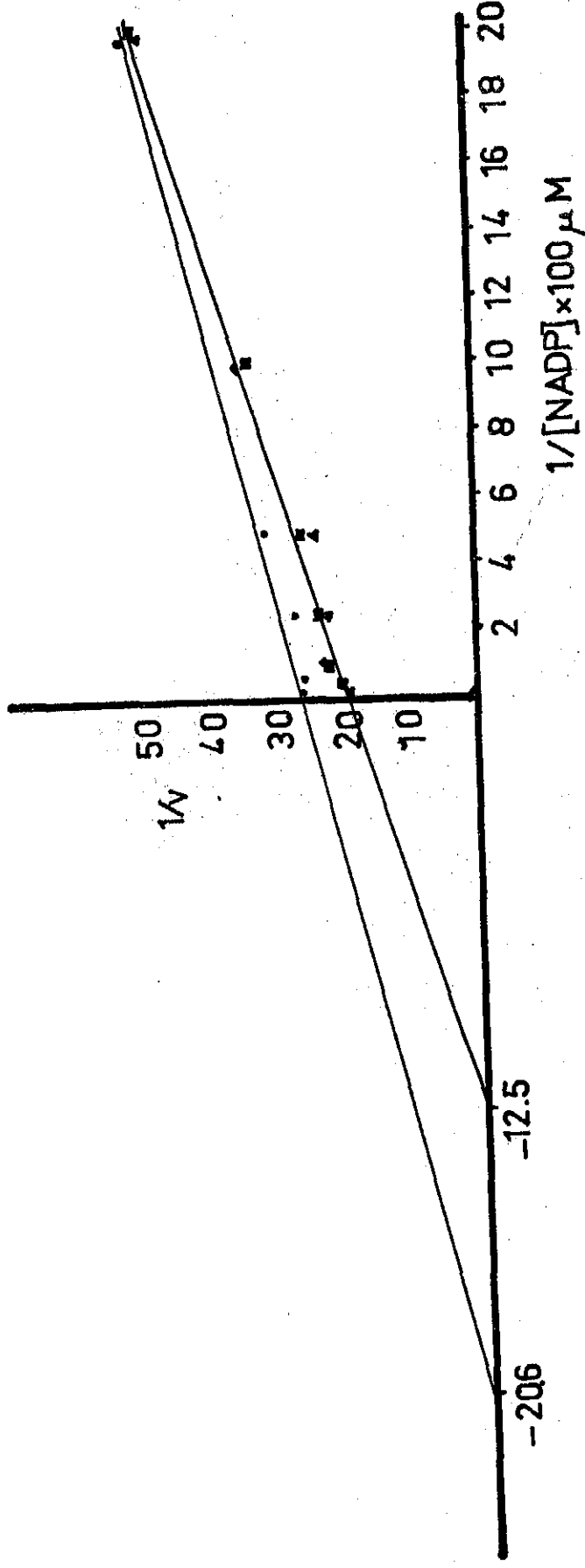


ŞEKİL 18 : Siğır kalbi NADP⁺ bağımlı İDH'ının, 100 μM DL izositrat ve 50 μM NADP⁺ konsantrasyonunda Mn⁺² ilgisi.



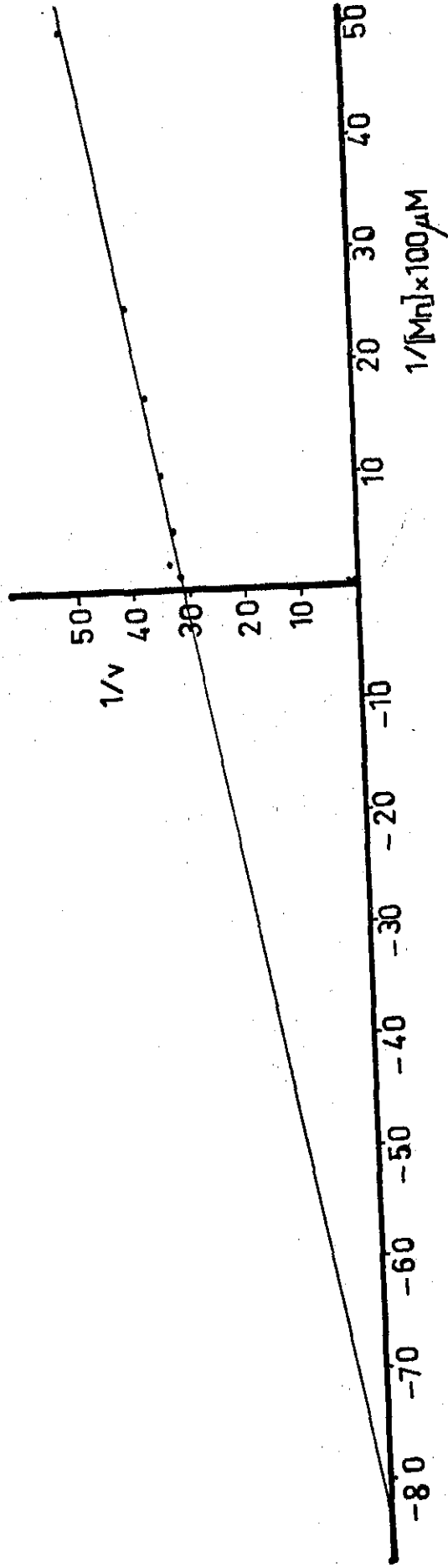
Sekil 19 : Sığır karaciğeri NADP⁺ bağımlı İDH'inin, 1000 μM MnCl₂ ve değişen NADP⁺ konsantrasyonlarında izositrat ilgisini.

- 10 μM NADP⁺
- ▲ 50 μM NADP⁺
- 100 μM NADP⁺



Şekil 20 : Sığır karaciğeri NADP⁺ bağımlı İDH'ının 1000 μM MnCl₂ ve değişen izositrat konsantrasyonlarında NADP⁺ ilgisi.

- 5 μM izositrat
- ▲ 25 μM izositrat
- 50 μM izositrat



Şekil 21 : Sığır karaciğeri NADP⁺ bağımlı IDH'nun 100 μM DL izositrat ve 50 μM NADP⁺ konsantrasyonunda Mn⁺² ilgisi

Tablo IV incelendiğinde kalp tipi IDH'ının izositrat ilgisinin artan $NADP^+$ konsantrasyonu ile arttığı, karaciğer tipinin izositrat ilgisinin ise değişmediği görülmektedir. Ayrıca $NADP^+$ ilgileri bakımından, iki izozim, artan izositrat konsantrasyonunda $NADP^+$ ilgilerinin düşmesi bakımından benzerlik göstermektedirler.

Tablo V, Mn^{+2} ilgileri bakımından izozimler arasında yaklaşık iki misli fark bulunduğunu göstermektedir.

Kinetik inhibisyon deneylerinde amonyum sülfat, amonyum klorür, sodyum klorür ve sodyum sülfatın, izozimlerin aktiviteleri üzerindeki etkileri incelendi. Her tuz için altı değişik konsantrasyonda çizilen inhibisyon eğrilerinden % 50 inhibisyona neden olan iyon şiddeti (mM), görünür k_i olarak saptandı. Tablo VI kalp ve karaciğer izozimleri için saptanan farklı K_i 'leri göstermektedir. Tablodan görüldüğü gibi, bütün bu tuzlar karaciğer ve kalp IDH'larını yüksek konsantrasyonlarda inhibe etmektedirler.

Ayrıca karaciğer izoziminin bu tuzlarla kalp tipi IDH'tan daha düşük konsantrasyonlarda inhibe edilebildiği de tablonun incelenmesinden açığa çıkmaktadır. Örneğin Na_2SO_4 karaciğer IDH'ını ortamın iyon şiddeti 240 mM iken % 50 oranında inhibe edebilmekte, kalp IDH'ınının % 50 inhibisyonu için ise 515 mM'lık Na_2SO_4 gerekmektedir.

Her iki izozim için NH_4^+ iyonunun özel bir inhibitör etkisi olduğu, $SO_4^{=}$ iyonunun ise NH_4^+ ile beraber karaciğer izozimi üzerinde bir inhibisyona neden olduğu Tablo VI'da görülebilir.

KALP K_M (μM)	2.1
KARACİĞER K_M (μM)	1.2

Tablo V : NADP^+ bağımlı siğir kalp ve karaciğer İDH izozimlerinin Mn^{+2} ilgisi*.

* Ortamda $100 \mu\text{M}$ DL-izositrat ve $50 \mu\text{M}$ NADP vardır.

örnek	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (mM)	NH_4Cl (mM)	NaCl (mM)	Na_2SO_4 (mM)
KALP	260	285	355	515
KARACİĞER	180	195	300	240

Tablo VI : Değişik tuzların NADP^+ bağımlı siğir kalp ve karaciğer İDH'ları üzerindeki inhibitör etkisi*

* Değerler, enzimlerin ilk hızlarını % 50 oranında inhibe eden iyon şiddetini (mM) yansıtmaktadır (Apparent K_i).

T A R T I Ő M A

Deneylet sonunda siğir kalp ve karaciğeri, $NADP^+$ bağımlı izositrat dehidrogenazları (İDH), kalp izozimi homojen olmak üzere saflaştırıldı ve izozimler arasında gerek minimal miktarda tuz bulunduran ortamda gerekse yüksek konsantrasyonunda tuzların bulunduğu ortamda ısı etkisine karşı dayanıklılık, elektriksel yük, çeşitli tuzlarla inhibisyon ve K_M değerleri bakımından farklılıklar saptandı.

$NADP^+$ bağımlı siğir kalbi İDH'ı mitokondriyel bir enzimdir. Bu enzimin, örneğin, malat dehidrogenaz enziminde olduğu gibi mitokondri iç zarı ile matriks arasında bir denge halinde bulunmadığı ve sadece matrikste lokalize olduğu bu laboratuvarıda yapılan deneylerde gösterilmiştir (35).

Bu nedenle $NADP^+$ bağımlı kalp tipi İDH'ın yüksek verimle elde edilebilmesi için her şeyden önce mitokondrilerin sağlam olarak eldesi gerekmektedir. Mitokondrilerin parçalanması veya dış zarında çatlakların oluşması halinde matriks enzimi olan İDH dışarı çıkmakta ve santrifüj sonunda süpernatanda kalmaktadır (10).

Mitokondrilerin sağlam olarak elde edilebilmesi pH'nın 7.5 civarında tutulması ve homojenizasyon için cam-teflon homojenizatör kullanılmasıyla gerçekleştirilebildi.

Bu yöntemin yüksek verimle çalıştığı süksinik dehidrogenaz aktivitesinin takibi ile saptandı (Bkz. Sonuçlar).

Sonifikasyon işlemiyle mitokondrilerin parçalanmasında, kullanılan sonikatörün ucu, çözeltinin hacmi ve zaman, belirleyici etmenler olarak ortaya çıkmaktadır. Güç sabit tutulmak üzere çözelti hacmi ve zaman arasında doğru bir orantı vardır.

Kalp izozimi, işlemler sonunda 42 kez saflaştırıldı ve homojen olarak elde edildi. Numune poliakrilamid jel elektroforezinde protein bakımından tek bir bant halinde boyanmaktadır (Şekil 4).

Elektroforez ters polarite ile çalışıldığında hiç bir protein bandı elde edilememektedir. Bu durum kalp IDH'ının saf olarak elde edildiğinin bir göstergesidir.

Karaciğer izozimi, 700 kez saflaştırılmış olmasına karşın poliakrilamid jel elektroforezinde 3 bant vermektedir.

Mitokondriyel bir enzim olan kalp IDH'ının saflaştırılmasına sitoplazmik fraksiyonlar ve mitokondri zarı uzaklaştırılarak başlandığı için, 42 kez saflaştırılmasına karşın tek bant olarak elde edilebildi.

Karaciğer izoziminde ise çekirdek ve mitokondri dışında tüm sitoplazmik enzimler saflaştırma işleminin başında ortamda bulunmakta idi. Bu yüzden karaciğer izoziminin, 700 kez saflaşmış olmasına karşın jel elektroforezinde tek bant vermemesi çelişik bir durum değildir.

Kalp IDH'ı saflaştırma sonunda % 26 verimle elde edilmiştir (Tablo I).

Tablo I incelendiğinde önemli aktivite kaybının birinci amonyum sülfat kesitlemesi ve CM Sephadex iyon değiştirici kolonunda meydana geldiği

ve diğer kademelerin ortalama % 90 verimle gerçekleştirildiği görülmektedir.

% 45 amonyum sülfat kesitlemesinde aktivite kaybı enzimin bir kısmının çökelekte kalmasından ileri gelmektedir, çünkü kalp izozimi bu şartlarda dayanıklıdır (Şekil 10 A).

CM Sephadex iyon değiştiricisinde meydana gelen aktivite kaybı ise saflaştırma esnasında ilk defa pH'nın 6.1'e düşürülmesinden ve aktif enzimin pH'ya bağlı olarak inaktive olmasından ileri gelmektedir.

Bu iki kademedede de % 70 oranında proteinin uzaklaştırılabilmesi, aktivite kayıplarına rağmen, bu kademelerin saflaştırmada kullanılmasını gerektirmektedir. Ayrıca CM Sephadex kademesi % 45 verimle çalışmasına karşın, mobilitesi kalp IDH'ına yakın ve diffüz bir bant olarak gözlenen proteinin uzaklaştırılması için kaçınılmaz bir kademe olarak saflaştırmada kullanılmaktadır.

DEAE Sephadex A-50 kolonunun elüsyonunda, aktivite ve protein profillerinin oldukça çakışık olmasına karşın, bu kademedede kolonda tutunan yabancı proteinlerden ötürü 2.5 kez bir saflaşma elde edilebilmiştir. Bu kademedede uygulanan çözeltinin minimal hacimde olması kolona tutunmayan enzimin, yaygın olarak çıkmasını önlemek için gereklidir.

Kalp IDH'ı için elde edilen nihai özgül aktivite 37°C 'ta ve $A_{280}^{1\%} = 11.8$ olarak kabul edildiğinde (11), 45'tir. Bu değer şimdiye kadar sığır kalbi veya domuz kalbi için rapor edilen en yüksek değerdir (9,11).

NADP⁺ bağımlı sığır karaciğeri IDH'ı sitoplazmik bir enzim olduğundan homojenizasyon işlemi Waring blenderla gerçekleştirildi. Bu izozimde, saflaştırılmaya 27.000 g süpernatanı ile başlandı.

Enzim sonuç olarak % 19 verimle elde edildi (Tablo II). Tablodan görüldüğü gibi en yüksek aktivite kaybı DEAE selüloz iyon değiştirici kolonu kademesinde oluşmaktadır. Birinci ısı denatürasyonu ve amonyum sülfat kademelerinde de belli oranda aktivite kayıpları mevcuttur.

Birinci ısı denatürasyonu sırasında % 23 oranında aktivite kaybı olmasına karşın özgül aktivite en az 2.5 katı arttırılmaktadır. Karaciğer izozimi birinci ısı denatürasyonunun gerçekleştirildiği şartlarda (% 1 Na_2SO_4) ısıya karşı dayanıklı olduğu halde (Şekil 11 B) bu kademe de % 23 oranında aktivite kaybının oluşması, kaba homojenattaki proteinlerin çökerken aktif enzimi de birlikte inoküle ederek çöktürdüğünü düşündürmektedir.

İkinci ısı denatürasyonu şartlarında ise (100 mM sitrat, 10 mM MgSO_4 , % 10 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) enzim aktivitesinin hiç yitirilmediği Tablo II'de görülmektedir.

Bu yüzden birinci ısı denatürasyonunun çıkarılıp saflaştırma işlemlerine amonyum sülfatlamalarla başlanması ve daha sonra seyreltik ortamda tek bir ısı denatürasyonu yapılması önerilebilir.

DEAE selüloz kademesinde verimde meydana gelen düşüş, inaktivasyondan değil, özgül aktivitesi düşük olan fraksiyonların alınmamasındandır (Şekil 6).

Şekil 5, Şekil 6 ve Tablo II'nin birlikte incelenmesi Sephadex G-150 ve DEAE selüloz kademelerinin çok büyük oranda saflaşmaya neden olduklarını göstermektedir. Bu iki kademe sonucu özgül aktivite 0.58'den 21.3'e çıkarılmıştır.

DEAE selüloz kolonuna uygulanan enzim çözeltisinin hacminin yüksek oluşu saflaşmada herhangi bir sorun yaratmamaktadır, çünkü bu şartlarda

iyon değiştiriciye özgül olarak tutunan enzim kolonda konsantre olmakta ve konsantrasyon gradyanı ile çok küçük hacimde elde edilebilmektedir.

Karaciğer İDH'ının CM iyon değiştiriciden elüsyonu incelendiğinde çakışık protein ve aktivite profilleri, poliakrilamid jel elektroforezi ile gözlenen proteinlerin (şekil 8) net yük açısından benzerlik gösterdiğini kanıtlamaktadır. Daha ileri bir saflaştırma için bu çalışmada belirtilen yöntemlerden daha farklı ilkelerle çalışan yöntemlerin uygulanması gerekmektedir.

Literatürde karaciğer izozimi için değişik molekül ağırlıkları ve değişik saflaştırma oranlarının rapor edilmesi (10,11,14,18) bu durumun ortamda bulunması muhtemel proteolitik enzimlerin aktivitesinden ileri gelebileceği fikrini uyandırmaktadır. Bu yüzden, bizim çalışmalarımız sırasında 27.000 g süpernatana vakit geçirilmeksizin PMSF katılmıştır.

PMSF ile yapılan deneylerde saflaştırma işlemlerinin tekrarlanabilirliği sağlanmıştır.

Literatürde 500 kez saflaştırılmış ve özgül aktivitesi 17.7 olan sığır karaciğeri $NADP^+$ bağımlı İDH'ı için jel elektroforezinde tek bant elde edildiği rapor edilmektedir (10). Bizim alışmamızda karaciğer İDH'ı 700 kez saflaştırıldı ve özgül aktivitesi 33.8'e kadar yükseltildi. Buna karşın enzimin poliakrilamid jel elektroforezinde 3 bant verdiği gözlendi. alışmalar arasında aktivite tayin yöntemleri bakımından bazı farklılıklar bulunmakta ise de bu farklılıklar bizim çalışmalarımızda elde edilen değerleri izah edecek düzeyde değildir.

Kalp ve karaciğer tipi İDH'lar arasında gözlenen ilk farklılıklar saflaştırma işlemleri sırasında açığa çıkmıştır.

Tablo III incelendiğinde kalp ve karaciğer izozimlerinin net yükleri bakımından tamamen farklı özellikler gösterdikleri görülmektedir. Karaciğer İDH'sinin kalp tipine göre çok daha negatif bir net yüke sahip olduğu bu izozimin katyon değiştiriciye tutunmaması, anyon değiştiriciye ise sıkıca bağlanmasından anlaşılmaktadır. Ayrıca elektroforetik mobiliteleri de kalp ve karaciğer izozimlerinin net yük farklılıklarını açıkça ortaya koymaktadır (Şekil 4, Şekil 8).

İnsan kalbi İDH'ı ile yapılan deneyler de kalp İDH'sinin elektroforetik mobilitesinin çok düşük olduğunu göstermektedir (36). Bu deneylerde % 5 lik poliakrilamid jellerin kullanılmış olması, düşük mobilitenin, proteinin boyutlarından çok, net yüküne bağlı olduğunu vurgulamaktadır.

Isı denatürasyonu deneyleri $NADP^+$ bağımlı sığır kalp ve karaciğer İDH'ları arasında belirgin yapısal farklılıklar bulunduğunu göstermektedir.

Kalp İDH'ı gerek çok düşük tuz konsantrasyonlarında gerekse yüksek tuz konsantrasyonlarında ısı etkisine karşı karaciğer tipinden daha dayanıksızdır (Bkz. Sonuçlar).

Izozimler ısı denatürasyonuna karşı, üzerlerinde etkili olan anyonlar ve katyonlar bakımından da farklılıklar göstermektedirler. Kalp İDH'ı yalnız yüksek sülfat iyonlarının varlığında ısıya dayanıklı hale gelmekte, sodyum, amonyum ve klorür iyonları ile etkilenmemektedir. Karaciğer izozimi ise kalptekinden farklı olarak NaCl ile tamamen stabilize olmaktadır. NH_4Cl varlığında karaciğer izozimi de ısıya karşı dayanıklı değildir (Şekil 12).

Sodyum sülfat ve amonyum sülfat kalptekine göre çok daha düşük konsantrasyonlarda karaciğer enzimini stabilize edebilmektedir (Şekil 10, Şekil 11).

Ayrıca, bazı araştırmacıların sıçan kalbi izozimi için tarif ettikleri amonyum sülfat aktivasyonu bizim deneylerimizde gözlenmemiştir (9).

Karaciğer izozimi NaCl ile ısı etkisine karşı korunabilme özelliği bakımından kalp tipinden ayrılmaktadır. Karaciğer IDH'ı ısı etkisine karşı NaCl ile korunmasına karşın, NH_4Cl ile korunmamaktadır. Demek ki koruyucu etki \pm 1 değerlikli katyonların genel bir etkisi değildir.

Sodyum sülfatın amonyum sülfata göre çok daha düşük bir konsantrasyonda IDH izozimlerini, ısı etkisine karşı koruması, stabilizasyonda sodyum ve sülfat iyonlarının birlikte bir etkileri olduğunu düşündürmektedir.

Isı deneyleri sonunda elde edilen bulgular ışığında kalp izoziminin stabilizasyon mekanizması özgül bir anyon etkisi, yani sülfat iyonlarından ileri gelen bir etki, karaciğerinki ise genel bir tuz etkisi olarak görülmektedir.

Denatürasyonun gerçekleştirilmesinde sıcaklıktan farklı olarak üre kullanıldığında kalp ve karaciğer IDH'ları arasında ilk 10 dakikada önemli dayanıklılık farkı gözlenmekte ve bu farklılık tuzsuz ortamda $50^{\circ}C$ 'taki ısı denatürasyonunu anımsatmaktadır (Şekil 9, Şekil 14). Her iki izozim için de etkin bir koruyucu olan $(NH_4)_2SO_4$, izozimleri üre denatürasyonuna karşı da etkin bir şekilde koruyabilmektedir.

Isı dayanıklılığı ve elektriksel yük bakımından yukarıda belirtilen farklılıkların yanında her iki izozimin kinetik özellikleri bakımından da farklılıkları bulunmuştur.

Bu çalışmada yapılan kinetik deneyler mekanistik farklılıkları ortaya koyacak ölçüde detaylı değilse de, izositrat ilgisi açısından kalp ve karaciğer tipi enzimlerin farklı mekanizma ile çalıştığı, Şekil 16 ve Şekil 19'un karşılaştırılmasından açıkça görülmektedir.

$NADP^+$ ilgisi açısından ise, iki izozim karşılaştırıldığında (Şekil 17, Şekil 20) gerek geri tepkime gerekse inhibisyon parametreleri saptanmadığından mekanizma için öneriler yapmak mümkün değildir.

Tablo IV'te bildirilen K_M değerleri, eğrilerin absisi kestiği noktalardan saptanmış olup iki sübstratlı bu enzimler için gerçek K_M değerleri değildir.

Gerek izositrat gerekse $NADP^+$ için saptanan görünür K_M değerlerinin çok düşük olması deneylerin hassasiyetinin aynı oranda yüksek olmasını gerektirdiğinden ve CO_2 ve α -ketoglutarat kullanılarak geri tepkime parametrelerinin saptanması gerekliliğinden ötürü izozimler arasında K_M değerleri bakımından gözlenen farklılıkların anlamlı olduğunu önermek bu deneylerle mümkün değildir. Diğer taraftan kalp izozimi için bulunan K_M izositrat değerleri literatürde verilenlerden en az 10 kez düşüktür (37). K_M $NADP^+$ değerleri ise literatürde farklı dokular için verilen değerlerle uygunluk göstermektedir (36).

Karaciğer izozimi için ise, gerek $NADP^+$ gerekse izositrat değerleri literatürde rapor edilen değerlere uymaktadır (10).

Literatürde, farklı dokulardan izole edilen izozimler için çok değişik K_M değerlerinin bulunması, farklı tayin ortamlarının kullanılması yanında aktivite için şart olan, Mn^{+2} iyonları ile kolaylıkla kompleks verebilecek EDTA iyonlarının değişik konsantrasyonlarda ortama ilave edilmesinden ileri gelmektedir.

Bu çalışmada EDTA'nın kinetik parametreler üzerinde etkili olduğu kesin olarak saptanmış ve kinetik deneylerde önce kullanılan tuzdan arındırma kolonları ile EDTA ortamdan uzaklaştırılmıştır.

Isı stabilizasyonunda kullanılan tuzların etkileri kinetik olarak incelendiğinde, yüksek konsantrasyonlarda bu tuzların sığır kalp ve karaciğer IDH'ları üzerinde inhibitör etkisi gözlenmiştir.

Bu tuzların konsantrasyonları iyon şiddeti cinsinden verildiğinde ve % 50 inhibisyona neden olan konsantrasyonları karşılaştırıldığında her iki izozim için amonyum iyonlarının özel bir inhibitör etkiye sahip olduğu görülmektedir (Tablo VI). Buna karşın sülfat iyonlarının yalnız karaciğer için özgül bir inhibitör etkisi vardır.

Genel olarak karaciğer izoziminin inhibisyonu daha düşük, tuz konsantrasyonlarında sağlanabilmektedir.

Karaciğer izoziminin NH_4Cl dışında adı geçen bütün tuzlarla gerek ısı gerekse üre denatürasyonuna karşı korunabilmesi NH_4^+ iyonlarının bu izozime bağlanmasının özgül bir konformasyon değişikliğini oluşturduğu kanısını uyandırmaktadır. Bu bulgu inhibisyon deneyleri ile de doğrulanmaktadır.

Kalp izoziminin sadece $SO_4^{=}$ iyonları ile ısı denatürasyonuna karşı korunabilmesi fakat bu iyonlarla özgül bir inhibisyona uğramaması bu izozimin korunma mekanizmasının karaciğer tipine göre tamamen farklı bir yoldan gerçekleşmesi olasılığına işaret etmektedir.

Diğer taraftan izozimlerin net yükleri gözönüne alınması sülfat iyonlarının, net yükü daha pozitif olan kalp IDH'ına özgül olarak bağlanmasını, NH_4^+ iyonlarının ise net yükü negatif olan karaciğer IDH'ına özgül olarak bağlanmasını izah edebilir.

Izozimler genel olarak ya değişik alt birimlerin farklı oranda polimerleşmesi ile ya da amino asit dizisinde farklılıklarla belirlenir.

IDH'ların alt birim yapısı ve aminoasit dizisi bilinmemektedir.

Amino asit dizisinde meydana gelecek farklılıklar enzim üzerinde bulunan hidrofobik bölgelerin farklılaşmasını ve böylelikle tersiyer yapının değişmesini sağlayabilir. Amino asit kompozisyonunda meydana gelecek farklılıklar da aynı tip değişiklikleri meydana getirebilir.

Her iki izozimin net yüklerinin oldukça farklı oluşu, kompozisyon- da yüklü amino asitlerin değişik oranda bulunmasının yanısıra, yüklü amino asitlerin tersiyer yapı içinde farklı dağılımlarından da doğabilir.

Bu nedenlerden her iki izozim için amino asit kompozisyonlarının, amino asit dizilerinin ve alt birim sayılarının kesin olarak bilinmesi, farklılıkları daha moleküler seviyede açıklamak için gereklidir.

Ö Z E T

$NADP^+$ bağımlı sığır kalp ve karaciğeri izositrat dehidrogenazları (IDH) saflaştırıldı.

Kalp izozimi poliakrilamid jel elektroforezinde tek protein bantı vermekte, ters polarite ile yapılan elektroforezde ise hiç bant vermemektedir. Karaciğer izozimi 700 kez saflaştırılmış olmasına karşın jel elektroforezinde 3 bant vermektedir.

İki izozim arasında ısı etkisine karşı dayanıklılık, çeşitli inorganik tuzlarla ısıya karşı korunma, bu tuzlarla inhibe edilme özellikleri ve net elektrik yükleri bakımından belirgin farklılıklar bulundu. Ayrıca, sübstratları olan Mn^{+2} - izositrat ve $NADP^+$ ilgileri bakımından da bazı farklılıklar saptandı.

Her iki izozim sülfat iyonlarının ve Mg^{+2} - izositrat kompleksinin varlığında $50^{\circ}C$ 'ta ısı ve $37^{\circ}C$ 'ta üre denatürasyonuna karşı stabilize edilmektedirler. Buna karşın Na^+ iyonunun yalnız karaciğer IDH'ı üzerinde koruyucu bir etkisi vardır.

Inhibisyon deneyleri NH_4^+ iyonunun her iki izozim üzerinde inhibitor etkisinin olduğunu göstermektedir.

Karaciğer izoziminin NH_4Cl dışında bütün denenen tuzlarla ısı etkisine karşı stabilize edilmesi ve aynı zamanda bu tuzlarla kolayca inhibe olması, buna karşın kalp izoziminin yalnız $SO_4^{=}$ iyonları ile korunabilmesi fakat SO_4 ile kolayca inhibe edilmemesi, kalp ve karaciğer IDH'larının ısıya karşı korunma mekanizmalarının farklı olduğu kanısını uyandırmaktadır.

Bu bulgular aynı zamanda izozimler arasında önemli tersiyer ve sekonder yapı farklılıklarının bulunduğunu da göstermektedir.

K I S A L T M A L A R

İDH : İzositrat Dehidrogenaz

DEAE : Dietil aminoetil

CM : Karboksi metil

PMSF : Phenil metil sulfonil florür

NAD⁺ : Nikotinamid Adenin Dinükleotid, okside

NADP⁺ : Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat, okside

K A Y N A K L A R

1. Ochoa, S.E., *J. Biol. Chem.*, 174, 133 (1948).
2. Moyle, J., Dixon, M., *Biochim. Biophys. Acta.*, 16, 434 (1955).
3. Siebert, G., Dubuc, J., Warner, R.C., Plaut, G.W.E., *J. Biol. Chem.*, 225, 965 (1957).
4. Colman, R.F., *J. Biol. Chem.*, 243, 2454 (1968).
5. Greville, G.D., *Citric Acid cycle*, Lowenstein, J.M., (derleyen), New York, s.25 (1969).
6. Lowenstein, J.M., *Metabolic Pathways*, Greenberg, D.M., Ed., New York, c. I, s. 146 (1967).
7. Plaut, G.W.E., *The Enzymes*, Boyer, P.D., Lardy, H., Myerback, K., (derleyenler), New York, c. 7, s. 105 (1963).
8. Bell, J.L. ve Baron, D.N., *Enzym. Biol. Clin.*, 9, 393 (1968).
9. Islam, M., Bell, J.L., Baron, D.N., *Biochem. J.*, 129, 1003 (1972).
10. Carlier, M., Pantaloni, D., *Eur. J. Biochem.*, 37, 341 (1973).
11. Macfarlane, N., Mathews, B., Dalziel, K., *Eur. J. Biochem.*, 74, 553 (1977).
12. Lowenstein, J.M., Smith, S.R., *Biochim. Biophys. Acta*, 56, 385 (1962).
13. Bell, J.L., Baron, D.N., *Biochem. J.*, 90, 8P (1964).
14. Colman, R.F., Szeto, R.C., Cohen, P., *Biochemistry*, 9, 4945 (1970).
15. Colman, R.F., *J. Biol. Chem.*, 247, 6727 (1972).

16. Magar, M.E., Robbins, J.F., *Biochim. Biophys. Acta*, 191, 173 (1969).
17. Kemper, D.L., Kaplan, N.O., *Fed. Proc.* 30, 1059 (1971).
18. Illingworth, J.A., Tipton, K.F., *Biochem. J.*, 118, 253 (1970).
19. Plaut, G.W., *Curr. Top. Cell. Regul.*, 2, 1 (1970).
20. Marr, J.J., Weber, M.M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 45, 1019 (1971).
21. Cohen, P.F., Colman, R.F., *Biochemistry*, 11, 1501 (1972).
22. Uhr, M.L., Thompson, V.W., Cleland, W.W., *J. Biol. Chem.*, 249, 2920 (1974).
23. Sanner, T., Ingebretsen, O.C., *Arch. Biochem. Biophys.*, 172, 59 (1976).
24. Balamir, A., Emerk, K., *Türk Biyokimya Dergisi*, 2, 134 (1977).
25. Kaplan, N.O., Colowick, S.P. (derleyenler), "Methods in Enzymology", Acad. Press, New York and London, c. II, s. 681 (1955).
26. Layne, E., "Methods in Enzymology", Colowick, S.P., Kaplan, N.O. (derleyenler), Acad. Press., New York and London, c. III, s. 447 (1956).
27. Davis, B.J., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121, 404 (1964).
28. Weber, K., Osborn, M., *J. Biol. Chem.*, 244, 4406 (1969).
29. Henderson, N.S., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 151, 429 (1965).
30. "Affinity Chromatography of NADP⁺ dependent Enzymes", Pharmacia Fine Chemicals Firması yayınları, Sweeden (1976).
31. Margit, H.Y., Reeves, H.C., *Biochim. Biophys. Acta*, 445, 280 (1976).
32. Smith, A.L., "Methods in Enzymology", Colowick, S.P., Kaplan, N.O. (derleyenler), Acad. Press, New York and London, c. X, s. 81 (1967).
33. Lundblad, R.L., *Biochem.*, 10, 2501 (1971).
34. Dawson, R.M.C., Elliot, D.C., Elliot, W.H., Jones, K.M., "Data for Biochemical Research", Clarendon Press, Oxford (1969).
35. Balamir, A., Emerk, K., Yayınlanmamış sonuçlar.
36. Seelig, G.F., Colman, R.F., *J. Biol. Chem.*, 252, 3671 (1977).
37. Plaut, G.W.E., Beach, R.L., Aogaichi, T., *J. Biol. Chem.*, 250, 6351 (1975).