

283822

T. C.

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
Sağlık Bilimleri Fakültesi

KOBAY LENSİ  
GLÜKOZ - 6 - FOSFAT DEHİDROGENAZININ  
SAFLAŞTIRILMASI ve ÖZELLİKLERİ

Biyokimya Programı

DOKTORA TEZİ

SEZER YARIMAĞAN

ANKARA, 1975

T.C.

Hacettepe Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Fakültesi

KOBAY LENSİ

GLÜKOZ-6-FOSFAT DEHİDROGENAZININ  
SAFLAŞTIRILMASI ve ÖZELLİKLERİ

Biyokimya Programı

DOKTORA TEZİ

Sezer Yarımağan

Rehber Öğretim Görevlisi:

Dr.Konçuy Mergen

Ankara-1975

## İ Ç İ N D E K İ L E R

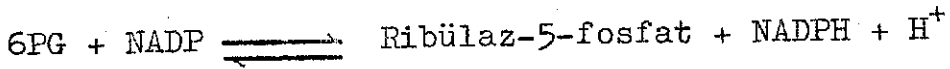
GİRİŞ .....	1
MATERYAL, ARAÇ ve YÖNTEMLER .....	4
Kimyasal maddeler.....	4
Araçlar .....	4
Tamponlar .....	4
Lenslerin sağlanması .....	5
11.000 g.süpernatantının hazırlanması .....	6
G6PD aktivitesinin ölçülmesi .....	6
Protein miktarının ölçülmesi .....	7
Amonyum sülfat çöktürmesi .....	7
İyon değiştirici kromatografiler .....	8
Sefadex G-200 filtrasyonu .....	8
Selüloz asetat elektroforezi .....	8
BULGULAR .....	10
Enzimin dayanıklılığı .....	10
Saflaştırma .....	10
Selüloz asetat elektroforezi bulguları .....	17
Sefadex G-200 ile enzimin molekül ağırlığının bulunması .....	18
Saflaştırılmış enzimin kinetik özellikleri .....	19
G6P ve NADP $K_m$ leri .....	19
pH'nın enzim kataliz hızına etkisi .....	24
Değişen $Mg^{++}$ derişiminin enzim kataliz..... hızına etkisi	25
Diğer iyonların enzim kataliz hızına etkisi.....	26

TARTIŞMA.....	29
ÖZET.....	38
KISALTMALAR LİSTESİ.....	39
KAYNAKLAR .....	40

## G İ R İ Ő

Pentoz fosfat metabolik yolu nükleotid sentezi için gerekli ribozlar ile steroid hidrosillenmesi, yağ asidi, kollersterol sentezleri ve glutatyonun indirgenmesi için gerekli NADPH'nın sağlandığı ana metabolik yollardır biridir.

Bu metabolik yola G6P'ın giriş hızını G6PD (D-glukoz-6-fosfat: NADP oksidoredüktaz, E.C., 1.1.1, 49) enzimi  $G6P + NADP \rightleftharpoons$  6 fosfoglukonolakton + NADPH + H<sup>+</sup> tepkimesi ile kontrol eder. Bu tepkime metabolik yolun hız kısıtlayıcı basamağıdır. Burada oluşan 6 fosfoglukonolakton pentoz fosfat yolunu daha sonraki bir basamağında 6PGD enzimi ile



tepkimesini verir ve bir mol daha NADPH oluşur bu çalışmada G6PD aktivitesinin ölçülmesi NADPH oluşması esasına dayandığından ilk dikkat edilecek nokta 6PGD'in ortamdır uzaklaştırılmasıdır.

G6PD ilk olarak 1931 yılında Warburg ve Christian tarafından bulunmuştur. (27,28) 1932 de maya G6PD'sinin saflaştırılmasına çalışılmış, (29) ancak 5-8 kere saflaştırılabilen enzim daha sonra Negelein'in çalışmaları ile 65 kere saflaştırılmıştır. (18)

Bazı kalıtsal anemilerde insan alyuvar G6PD sinin değişik-  
lik gösterdiği dikkati çekmiş ve 1948, de Turchetti favizmde ilacın  
yol açtığı hemolizin bir alyuvar anomalisinden ileri geldiğini  
belirtmiş<sup>(26)</sup>; 1949 da Pauling ve arkadaşları bunun moleküler bir  
hastalık olabileceğini düşünmüşlerdir.<sup>(20)</sup>

Protein tekniklerindeki ilerlemelerden sonra Yoshida normal  
insan ~~alyuvarlarından~~ G6PD yi kristallendirmiş, kinetik özelliklerini  
ve amino asit miktarlarını belirtmiştir.<sup>(34)</sup> Gene 1966 da alyuvar  
G6PD'si kısmen saflaştırılıp kinetik özellikleri incelendiğinde  
alyuvar enzimi ile belirgin farkları olduğu görülmüş,<sup>(5)</sup> buradan  
alyuvar ve alyuvar enzimlerinin farklı genetik kontrol altında  
olduğu kanısına varılmıştır.

Daha sonra yağ dokusu, kas, karaciğer,<sup>(23,1)</sup> meme bezi<sup>(19,22)</sup>  
adrenal korteks<sup>(31)</sup> ve lens<sup>(6)</sup> gibi memeli dokularından G6PD nin  
saflaştırması ve tanımlanması yapılmıştır. Bu dokularda G6PD'nin  
miktarı ve spesifik aktivitesi hormonal ve dietsel şartlara bağlı  
olarak değişmektedir.

G6PD aktivitesi tavşan, koyun, sığır, rat ve kobay gibi meme-  
lilerin lenslerinde de incelenmiş ve en yüksek aktivite kobayda  
bulunmuştur.<sup>(6)</sup> Ancak kobay lensinden bugüne değin G6PD saflaş-  
tırılmamıştır.

İnsan lensi ile olan çalışmalar ise ancak kataraktlı lens-  
lerle yapılabilmektedir.<sup>(10,36,37)</sup>

Bu bulgulara dayanarak bizim çalışmamızda kobay lensi G6PD'ı kısmen saflaştırıldıktan sonra kinetik özellikleri incelenmiştir.

Bu bulgular normal, erişkin kobay lensi G6PD'sine ait olup daha sonra yapılabilcek bir çalışma ile deneysel katarakt geliştirilmiş lenslerle kıyaslanarak katarakt biyokimyasında G6PD'nin rolü açıklanabilir.

## MATERYAL, ARAÇ ve YÖNTEMLER

### 1. Kimyasal Maddeler:

NAD, NADP, G6P, 6PG, dehidroandrosteron, pregnenolon,  $3\beta$ -hidroks<sup>1</sup>  
 $5\alpha$ -androstan-17-on, prednizolon disodyum fosfat,  $\beta$ -metazon disodyum  
fosfat, fosfolin iodid, pilokarpin, üreaz, katalaz, alkoldehidrogenaz,  
DEAE selüloz, ECTEOLA selüloz E-102 B 96 "Sagma Chemical Company"den;  
sığır serum albumini "Armour Pharmaceutical Company" den; Sefadeks  
G-200 "Pharmacia Fine Chemicals" firmasından; diğer kimyasal madde-  
ler "Fisher" ve "BDH Chemical Ltd" firmalarından alınmış olup saftır.

### 2. Araçlar:

Ölçüm odası sabit sıcaklıkta tutulabilen "Zeiss" PM Q II  
spektrofotometresi, "Sorvall" ultrasantrifüjü, "Beckman" pH metresi,  
"Leybol Heraeus Typ D<sub>2</sub>" vakum buharlaştırıcısı, "Potter Elvehjem"  
teflon homojenizatörü, "Gelman" elektroforez aracı kullanılan özel  
araçlardır.

### 3. Tamponlar:

Fosfat tamponları için gereken molaritedeki  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  aynı  
molaritedeki  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ile istenilen pH'ya cam elektrodla ayarlandı.



$10^{-1}$  M Tris-HCl pH=8,0 tamponu G6PD ve 6PGD aktivitelerinin ölçümünde kullanıldı. Bu tampon aktivite ölçme tüpündeki son derişimi  $1,4 \times 10^{-2}$  M olacak şekilde  $MgCl_2$  içermektedir.

G6PD saflaştırmasında kullanılan bütün tamponlara son derişimleri  $10^{-3}$  M olacak şekilde EDTA pH=7,0 ve  $2 \times 10^{-6}$  M olacak şekilde NADP katılmıştır.(bu derişimlerde NADP ve EDTA içeren tamponlardan "N-E" içeren diye söz edilecektir)

pH'nın G6PD enziminin kataliz hızına etkisi aşağıdaki tamponlar kullanılarak incelendi.

pH: 5,0 - 6,0	$10^{-1}$ M asetat tamponu
pH: 6,5 - 8,0	$10^{-1}$ M Tris-HCl tamponu
pH: 8,0 - 9,5	$10^{-1}$ M glisin tamponu

Bu tamponların hepsi aktivite ölçüm tüpündeki son derişimi  $1,4 \times 10^{-2}$  M olacak şekilde  $MgCl_2$  içermektedir.

Selüloz asetat elektroforezinde kullanılan tampon  $10^{-1}$  M pH=8,9 barbütürat tamponudur.

#### 4. Lenslerin Sağlanması:

Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları laboratuvarından sağlanan 650-800 gr. ağırlığındaki erişkin, beyaz kobaylar kullanıldı. Çalışmada cins farkı gözetilmedi.

Kobaylar kalblerine hava verilerek öldürüldü ve lensleri mümkün olduğu kadar kısa sürede çıkarılıp bulgular kısmında açık-

lanacak nedenden dolayı bekletilmeden homojenize edildi.

5. 11.000 g Süpernatantının Hazırlanması:

100-120 mg. ağırlığındaki kobay lensleri lens başına 1 ml "N-E" içeren  $10^{-2}$  M  $KPO_4$  tamponu içinde  $+4^{\circ}C$  de 5 dakika homojenize edildi. Homojenat ultrasantrifüjde 20 dakika 11.000 g'de santrifüj edildi. Süpernatant "N-E" içeren  $10^{-2}$  M  $KPO_4$  pH=6,5 tamponuna karşı 15 saat dializ edildi, bu sırada dializ suyu üç kez değiştirildi. Dializ edilmiş 11.000 g süpernatantı G6PD saflaştırmasında kullanıldı.

6. G6PD Aktivitesinin Ölçülmesi:

NADPH oluşumuna bağlı 340 milimikrondaki absorbanstaki değişikliği  $25^{\circ}C$  de spektrofotometrede izlendi. (37)

Enzim miktarı dakikada 0.005 - 0.050 O.D. verecek şekilde ayarlandı ve tepkime sübstrat katılması ile başlatıldı.

NADPH oluşumuna bağlı olarak 340 milimikronda oluşan absorbanstaki değişikliği ilk 5 dakikada doğrusal ve katılan enzim miktarı ile orantılıdır. Üç tüpün kapsamı Tablo I de verilmiştir. G6PD aktivitesi 2 numaralı tüpte okunan absorbanstaki farkından 3 numaralı tüpte okunan absorbanstaki farkını çıkartarak elde edildi. 1 numaralı tüp kördür.

Enzim aktivitesi milletlerarası enzim ünitesi olarak ifade edildi. Bir milletler arası enzim ünitesi (I.U.)  $25^{\circ}C$  de, dakikada bir mikromol NADP indirgeyen enzim miktarıdır. (36)

Spesifik aktivite mg. protein başına milletler arası enzim ünitesi olarak ifade edildi.

Tüp	1	2	3
$10^{-1}$ M Tris-HCl pH=8,0	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml
$10^{-2}$ M G6P	-	0,3 ml	-
$10^{-2}$ M 6PG	-	0,3 ml	0,3 ml
$2 \times 10^{-3}$ M NADP	-	0,3 ml	0,3 ml
Enzim	0,6 ml	0,6 ml	0,6 ml
Su	0,9 ml	-	0,6 ml

Tablo I

G6PD aktivitesinin ölçülmesi

7. Protein Miktarının Ölçülmesi:

Protein miktarı Warburg Christian<sup>(30)</sup> ve Lowry<sup>(14)</sup> yöntemleri ile ölçüldü. İkinci yöntem birinciye göre 20 kere daha duyarlıdır. Standard olarak sığır serum albumini kullanıldı.

8. Amonyum Sülfat Çöktürmesi:

iyonik kuvvetin dar sınırlar içinde değiştirilmesi, proteinlerin çözünürlüğünü büyük ölçüde değiştirir. Bundan yararlanarak % 30-50 amonyum sülfat kesitinde kobay lensi G6PD'sinin iki kere saflaşması sağlandı. Ancak bu yöntem verimi çok düşürdüğünden kullanılmadı.

9. Iyon Değiştirici Kromatografiler:

DEAE selüloz ve ECTEOLA selüloz E-102 B 96 Peterson ve Sober yönetimine göre hazırlandı. (21)

Akış hızlarının yüksek olmaması için kolonlara basınç uygulanmadı. Kolon kromatografisi gene Peterson ve Sober yöntemine göre yapıldı. (21)

10. Sefadex G-200 Filtrasyonu:

Bu amaçla "Sephadex-Pharmacia" bültenine göre hazırlanan sefadex G-200 kullanıldı. (24)

Hazırlanan kolonların "Blue dextran 2000" ile bulunan ölü hacmi literatürdeki değerlere uygundu. (2)

Sefadex G-200 kolonları "N-E" içeren  $10^{-2}$  M  $KPO_4$  pH=6,5 tamponu ile üç gün yıkanarak dengeye getirildi ve bulgular kısmında bildirileceği gibi molekül ağırlığı bilinen proteinler kullanılarak haritalandı.

11. Selüloz Asetat Elektroforezi:

Selüloz asetat elektroforezi yüksek ayırma gücü ve kısa sürede sonuç vermesinden dolayı seçildi. (15)

Elektroforez "Gelman" firmasının aracı, nümune uygulayıcısı ve aynı firmanın 1 inç x 6,75 inç boyutlarındaki "Sepraphore III" şeritleri ile yapıldı. 10 dakika tamponda bekletilen şeritlere 0,001 mg. protein içeren 0,002 ml. nümune uygulandı.

Elektroforez 400 V gerilim ve 1,5 mA/cm akım şiddeti altında 45 dakika sürdürüldü. Bu sürenin sonunda çıkarılan şeritler, oda ısısında "amido Black 10B" ile boyandı. Boyanın fazlası (50:30:20) oranında karıştırılmış (  $\text{CH}_3\text{COOH}$  :  $\text{CH}_3\text{OH}$  :  $\text{H}_2\text{O}$  ) ile yıkanıp şeritler kurutuldu. Sonra (10:90) oranında karıştırılmış (  $\text{CH}_3\text{OH}$  :  $\text{H}_2\text{O}$  ) ile berraklaştırıldı ve tesbit edildi.

## B U L G U L A R

### 1. Enzimin Dayanıklılığı:

Bu çalışmada kobay lensi G6PD'sinin uzun süre bozunmadan bekletmek için en uygun pH=6,5 olarak saptandı.

11.000 g süpernatanı yalnızca iyonsuz su veya  $10^{-2}$  M  $KPO_4$  pH=6,5 tamponu içinde hazırlanıp  $+4^{\circ}C$  de bir gece bekletilmekle G6PD aktivitesinin 42 % sini; bekletme  $-20^{\circ}C$  de yapıldığında G6PD aktivitesinin 11 % ni yitirdi.

11.000 g süpernatanı  $2 \times 10^{-6}$  M NADP ve  $10^{-3}$  M EDTA pH=7,0 içeren  $10^{-2}$  M  $KPO_4$  pH=6,5 tamponu içinde hazırlanıp bekletildiğinde  $+4^{\circ}C$  de 10 gün;  $-20^{\circ}C$  de 4 ay süre ile G6PD aktivitesinde ölçülebilir bir azalma olmadı. Bu nedenle G6PD saflaştırmasında kullanılan bütün tamponlara son derişimleri  $10^{-3}$  M olacak şekilde EDTA pH=7,0 ve  $2 \times 10^{-6}$  M olacak şekilde NADP katıldı ( N-E )

### 2. Saflaştırma:

Bütün saflaştırma işlemleri  $+4^{\circ}C$  de yapıldı.

Saflaştırmada ilk sorun G6PD'yi 6PGD den ayırmaktı. Bu amaçla değişik saflaştırma yöntemleri ile 6PGD'nin uzaklaştırılması denendi. Tablo II bu saflaştırma yöntemleri ile 6PGD'nin ne oranda uzaklaştığını göstermektedir.

Nümune	6PGD/G6PD
11.000 g süpernatanı	1/10
% 30-% 50 Amonyum sülfat kesiti	1/22
Sefadeks G-200 sonrası	1/37
DEAE-Selüloz sonrası	0
ECTEOLA-Selüloz sonrası	0

Tablo II

Çeşitli saflaştırma yöntemleri ile kobay lensi  
G6PD'sinin 6PGD'den arınma miktarı

G6PD enzimini saflaştırmak için sırası ile DEAE ve  
ECTEOLA selülozlar, sefadeks G-200 kolonları kullanıldı. Bütün  
kolonlar önceden "N-E" içeren  $10^{-2}$  M  $KPO_4$  tamponu ile dengelendi.  
Bütün dializler aynı tampona karşı yapıldı.

DEAE Selüloz Kolon Kromatografisi:

Yöntemler kısmında belirtildiği şekilde hazırlanan  
11.000 g süpernatanı 2 cmx70 cm boyutlarındaki DEAE selüloz kolo-  
nuna uygulandı. 11.000 g süpernatın geçtikten sonra kolon ölü  
hacminin 3-4 katı "N-E" içeren  $10^{-2}$  M  $KPO_4$  pH=6,5 tamponu ile  
yıkandı ve  $10^{-2}$  M -  $8 \times 10^{-1}$  M  $KPO_4$  gradienine bağlandı. Her 5 ml

bir tüpe alındı, tüplerde bilinen yöntemlerle G6PD aktivitesi ve protein miktarı ölçüldü. Şekil I DEAE selüloz kolon kromatografisi ile kobay lensinden G6PD saflaştırılmasına göstermektedir.

**ECTEOIA Selüloz Kolon Kromatografisi:**

DEAE selüloz kolonundan çıkan aktif tüpler birleştirildi, 15 saat dializ edildi ve 2 cmx70 cm boyutlarındaki ECTEOIA selüloz kolonuna uygulandı. ECTEOIA selüloz kolon kromatografisi DEAE selüloz kolon kromatografisi ile tamamen aynı esaslara dayanır. Yalnız burada elüsyon için kullanılan  $KPO_4$  gradieni  $10^{-2}M-2,5 \times 10^{-1} M$  arasındadır.

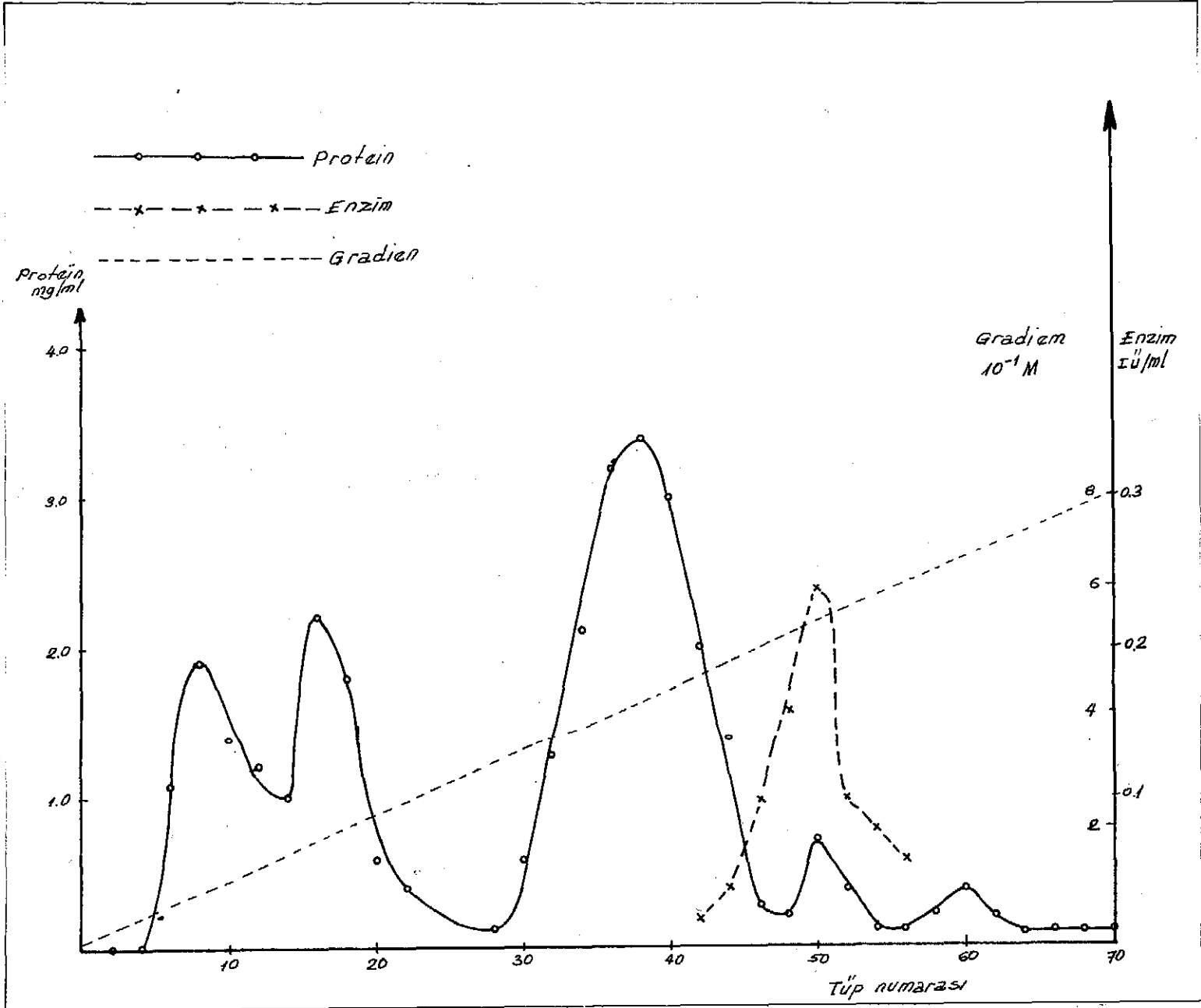
**Safadeks G-200 Filtrasyonu:**

ECTEOIA selüloz kolonundan alınan aktif tüpler birleştirildi, 15 saat dializ edildi ve safadeks G-200 kolonuna uygulandı. Enzimin geçişi biter bitmez "N-E" içeren  $10^{-2}M$   $KPO_4$  pH=6,5 tamponu ile elüsyona geçildi. Toplanan tüplerde bilinen yöntemlerle enzim ve protein miktarları ölçüldü. Şekil 3 safadeks G-200 gel filtrasyonu ile G6PD saflaştırmasını göstermektedir.

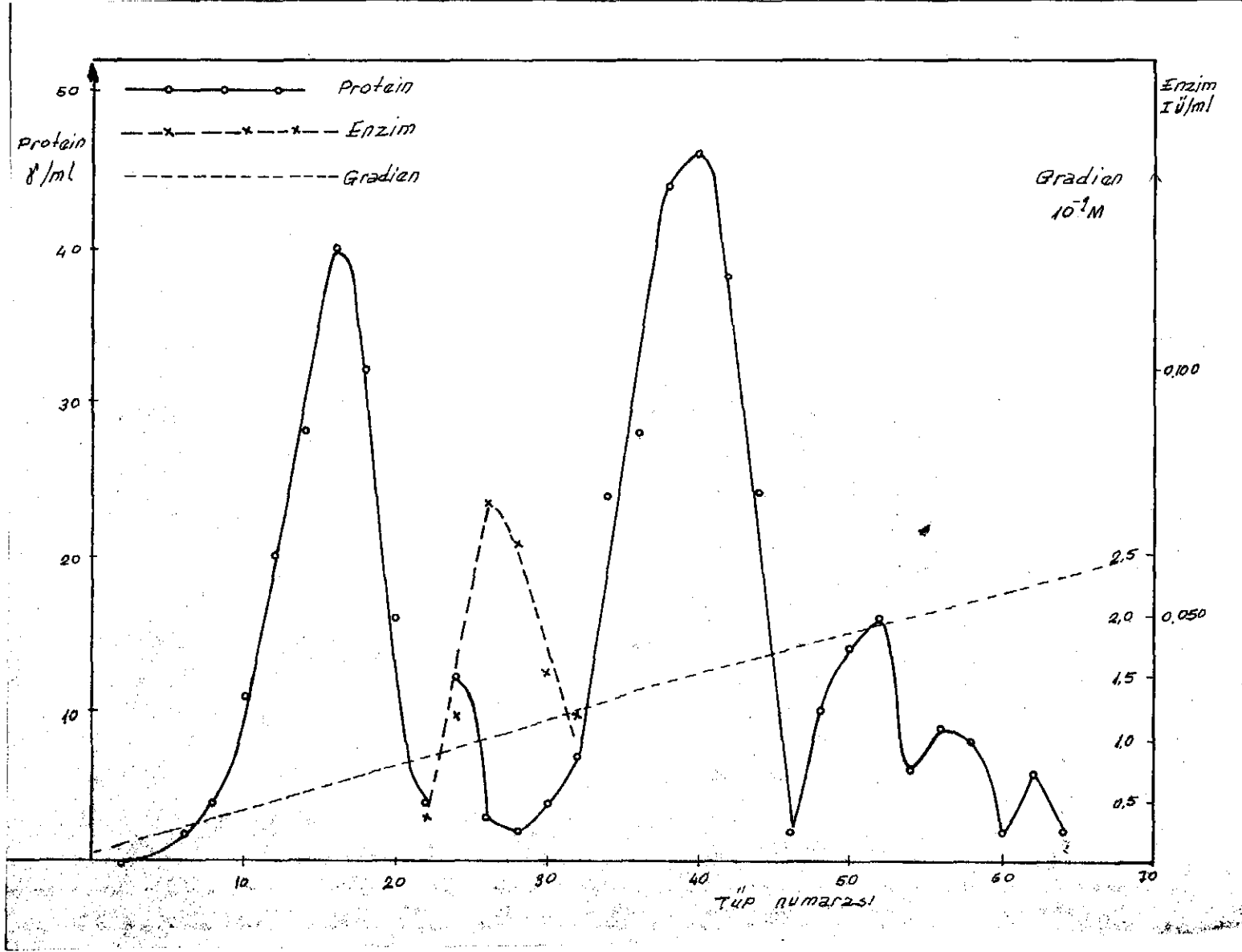
Safadeks G-200 kolonundan çıkan enzim 11.000 g süpernatana göre 686 kere saftır, G6PD enziminden arınmıştır ve başlangıçtan beri saflaştırmanın verimi 5,37 % dir.

Saflaştırmanın her basamağı en az 20 kez tekrarlandı. Tablo III kobay lensinden G6PD saflaştırmasının özetini vermektedir.

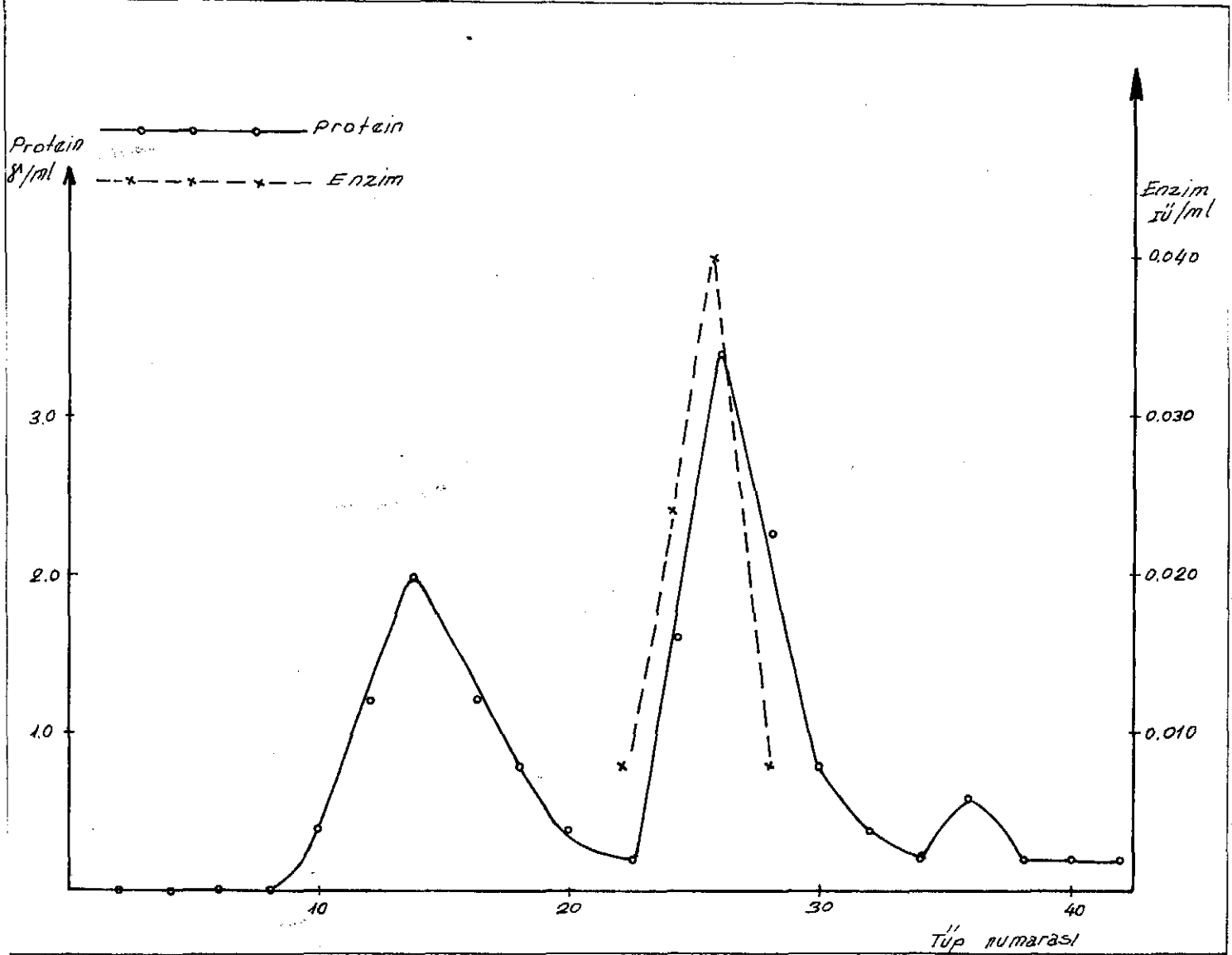




ŞEKİL 1- G6PD'in DEAE selüloz kolonundan elüsyonu;Kolon boyutları (2 cm x 70 cm); akış hızı 30 ml/saat; elüsyon tamponu "N-E" içeren  $KPO_4$  tamponu  $\cdot pH=6,5 \cdot 10^{-2} M - 8 \times 10^{-1} M$



Şekil 2- G6PD'in ECTEOLA selüloz kolonundan elüsyonu: Kolon boyutları (2 cm x 70 cm); akış hızı 30 ml/saat; elüsyon tamponu "N-E" içeren  $KPO_4$  tamponu pH=6,5  $10^{-2} M - 2,5 \times 10^{-1} M$



Şekil 3- G6PD'in sefadex G-200 filtrasyonu; Kolon boyutları  
(1,5 cm x 50 cm); akış hızı 40 ml/saat; elüsyon tamponu  
"N-E" içeren  $10^{-2}$  M  $KPO_4$  tamponu pH=6,5

	Hacim (ml)	Protein (mg/ml)	Aktivite IU/ml	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (IÜ)	Spesifik Aktivite (IU/mg)	<u>6PGD</u> G6PD	Saflaşma	Verim %
11.000 g. Süpernatanı	12	25,20	0,434	302,40	5,21	0,017	1/10		
DEAE-Selüloz sonrası	18	0,53	0,146	9,54	2,63	0,275	0	16,2	50,5
ECTEOLA-Selüloz sonrası	10	0,006	0,046	0,060	0,46	7,66	0	27,9	17,5
Sefadéks G-200 sonrası	8	0,003	0,035	0,024	0,28	11,66	0	1,52	60,8
Toplam								686	5,37

Tablo III

Kobay lensinden G6PD saflaştırılması

3. Selüloz Asetat Elektroforezi Bulguları:

Sefadeks G-200 kolonundan alınan aktif tüpler birleştirildi, 15 saat  $2 \times 10^{-6}$  M NADP içeren iyonsuz suya karşı dializ edilerek  $KPO_4$  ve EDTA uzaklaştırıldı. Dializden alınan enzim vakum buharlaştırıcısı aracılığı ile kuruluğa kadar buharlaştırıldı. Kuru artık 0,05 ml iyonsuz suda çözüldü ve bu çözeltiden alınan 0,002 ml (0,001 mg protein içeren) selüloz asetat şeridine uygulanarak elektroforeze tâbi tutuldu.

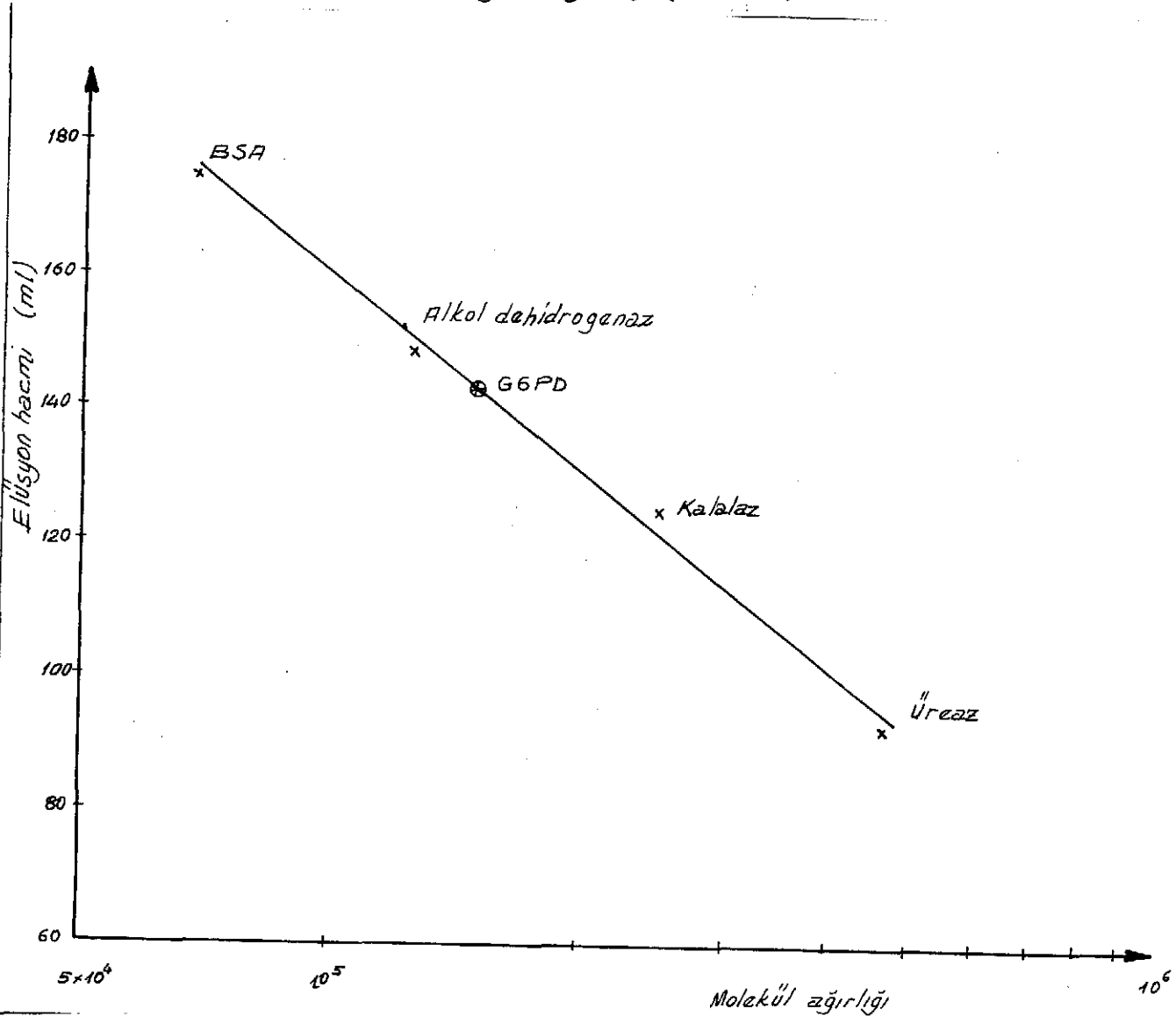


Şekil 4- Saflaştırılmış kobay lensi G6PD'sinin selüloz asetat elektroforezi: 0,001 mg. protein ile çalışılmış ve "amido black 10B" ile boyanmıştır.

4. Sefadex G-200 İle Enzimin Molekül Ağırlığının Bulunması:

Enzimin molekül ağırlığı sefadex G-200 kolonunda Andrews<sup>(2)</sup> yöntemine göre yapıldı. Standart olarak üreaz (473.000), katalaz (250.000), alkol dehidrogenaz (125.000) ve BSA (68.000) kullanıldı.

Enzimlerin 280 milimikronda absorbanların okunması ve bilinen molekül ağırlığına karşı elüsyon hacimlerinin semi logaritmik grafiklenmesi ile standart eğri çizildi. G6PD için aktivite tarandı. Enzimlerin molekül ağırlığı  $150,000 \pm 5000$  bulundu.



Şekil 5- Sefadex G-200 standart grafiği: Kolon (2,5 x 50 cm)

elüsyon tamponu pH=6,5  $10^{-2}$  M  $KPO_4$

5. Safılaştırılmış Enzimin Kinetik Özellikleri:

a) G6P ve NADP  $K_m$ 'leri:

G6P  $K_m$  değerini bulmak için son NADP derişimi  $4 \times 10^{-4}$  M da sabit tutulup son G6P derişimi  $100 \times 10^{-6}$  M -  $6,25 \times 10^{-6}$  M arasında değiştirildi.

NADP  $K_m$  değerin bulmak için son G6P derişimi  $2 \times 10^{-3}$  M da sabit tutulup son NADP derişimi  $50 \times 10^{-6}$  M -  $3,125 \times 10^{-6}$  M arasında değiştirildi.

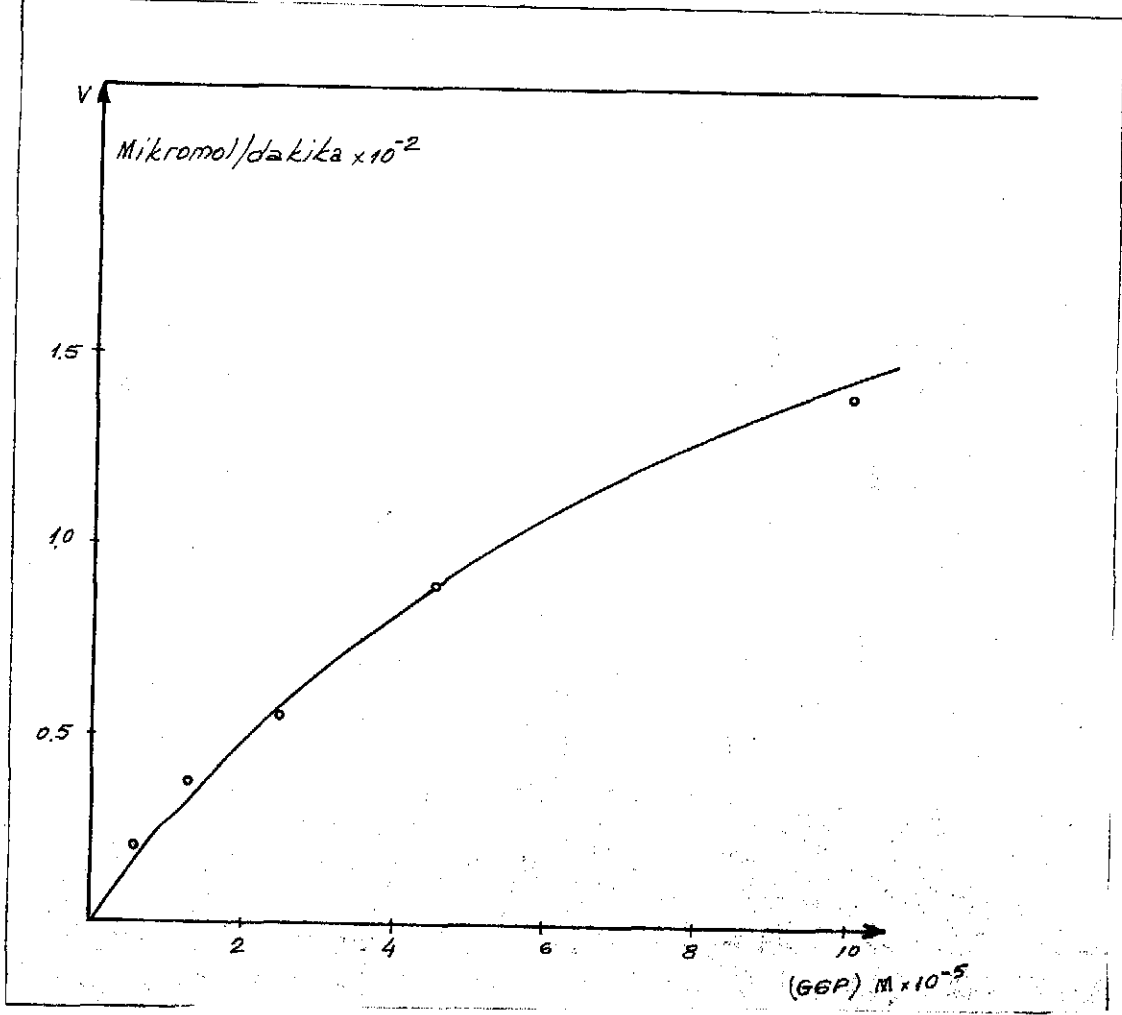
Hız ölçümleri ölçü grupları halinde 12'şer kez tekrarlandı. Hız hesaplamalarında ilk 1 ve 2 dakikalardaki absorpsiyon değişmeleri esas alındı.

pH=8,0 ve  $25^{\circ}\text{C}$  da son  $\text{Mg}^{++}$  derişimi  $1,4 \times 10^{-2}$  M iken:

G6P için  $K_m = (32,6 \pm 0,2) \times 10^{-6}$  M

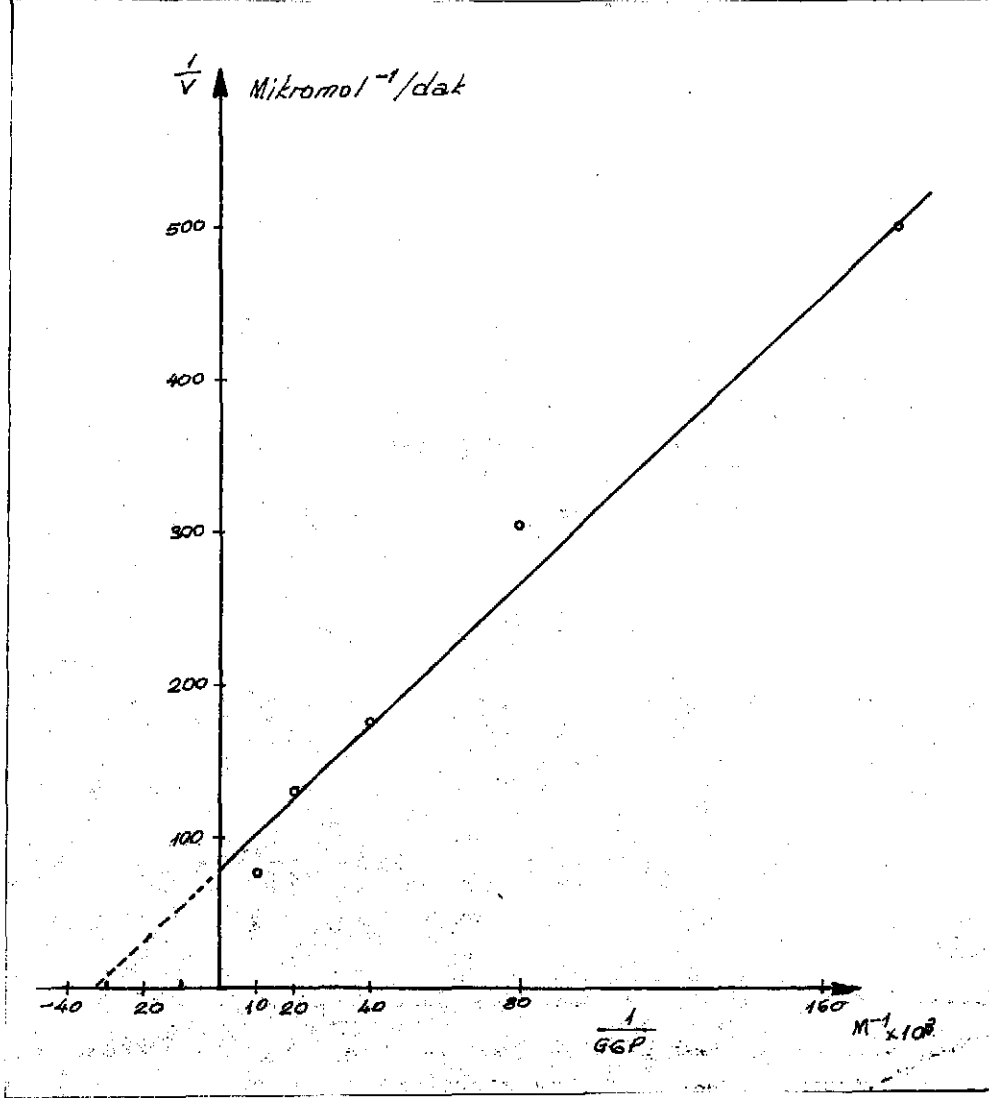
NADP için  $K_m = (12,5 \pm 0,1) \times 10^{-6}$  M olarak saptandı.

şekil 6 ve şekil 7 G6PD enzim kataliz hızının artan sübstrat derişimleri ile artışın ve her iki sübstrat için Lineweaver-Burk grafiklerini göstermektedir.

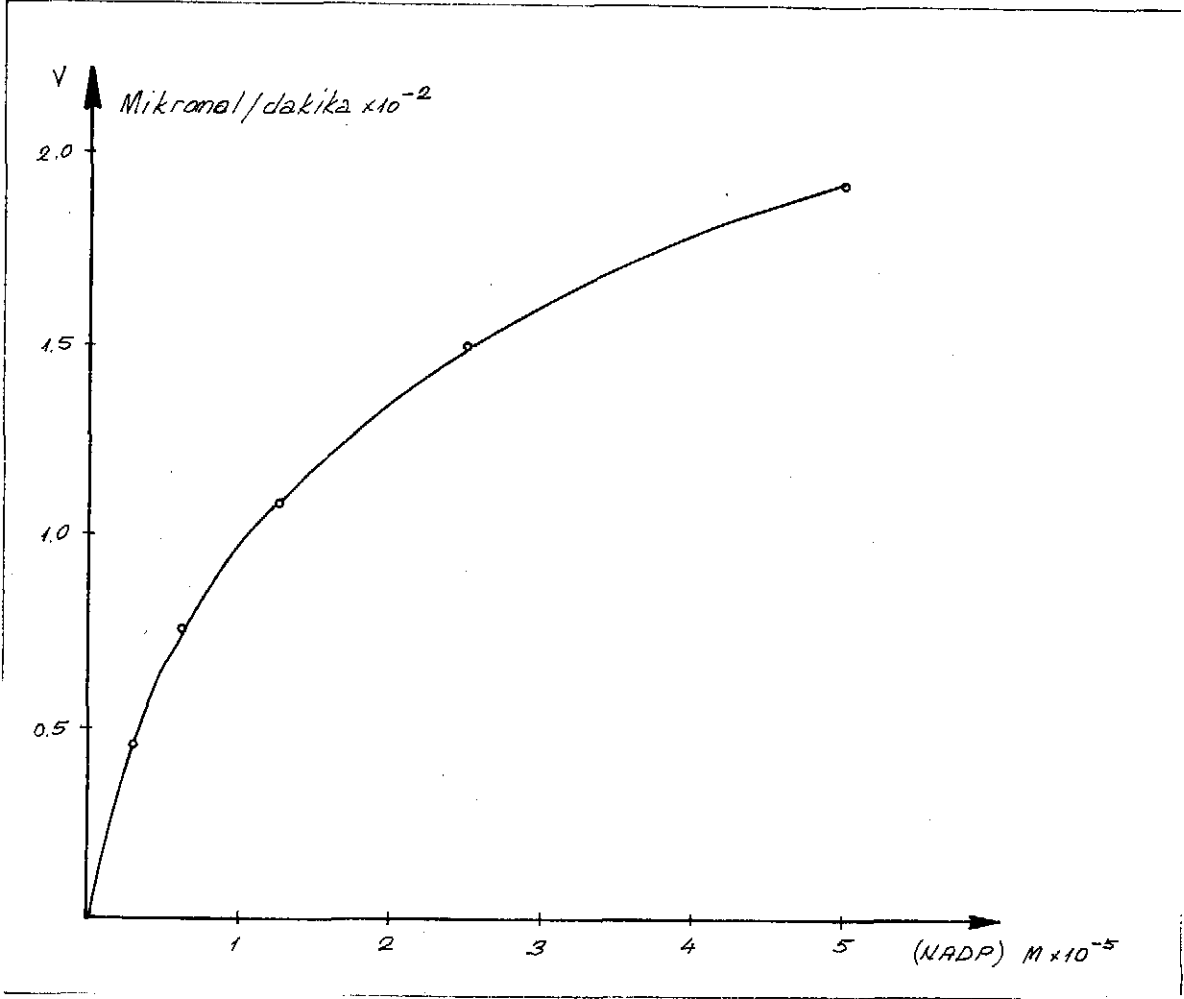


Şekil 6a- G6PD'nin (G6P) değişken iken Michaelis-Menten eğrisi: (Mg<sup>++</sup>)= 1,4 x 10<sup>-2</sup> M; (NADP)= 4 x 10<sup>-4</sup> M; pH=8,0 ve 25°C

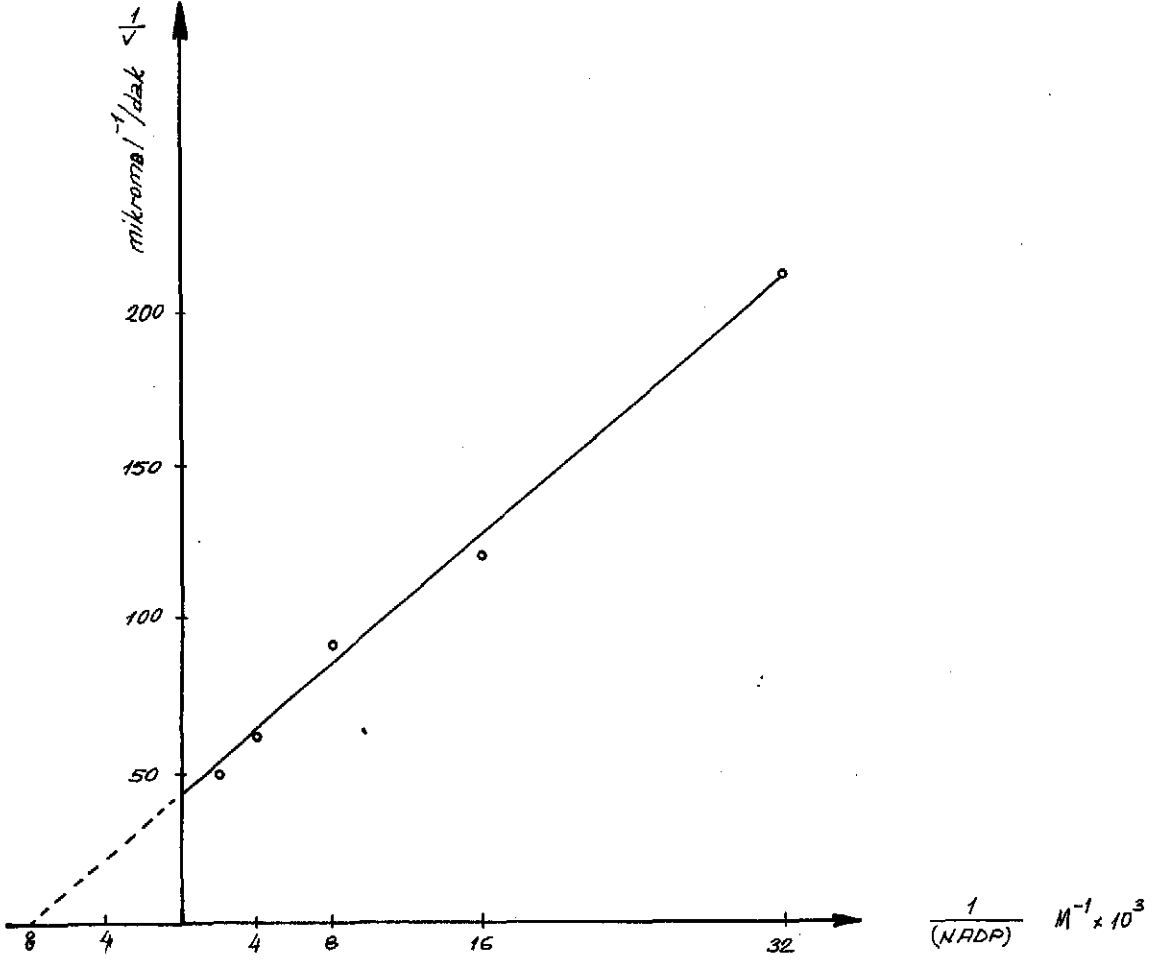




ŞEKİL 6b- G6PD'nin (G6P) değişken iken Lineweaver-Burk grafiği: (Mg<sup>++</sup>) = 1,4 x 10<sup>-2</sup> M; NADP = 4 x 10<sup>-4</sup> M; pH=8,0 ve 25°C



ŞEKİL 7a) G6PD'nin (NADP) değişken iken Michaelis-Menten eğrisi; (Mg<sup>++</sup>) = 1,4 x 10<sup>-2</sup> M (G6P) = 2 x 10<sup>-3</sup> M; pH=8,0 ve 25°C



ŞEKİL 7b- G6PD'nin (NADP) değişken iken Lineweaver-Burk grafiği: (Mg<sup>++</sup>) = 1,4 x 10<sup>-2</sup> M; (G6P) = 2 x 10<sup>-3</sup> M; pH=8,0 ve 25°C

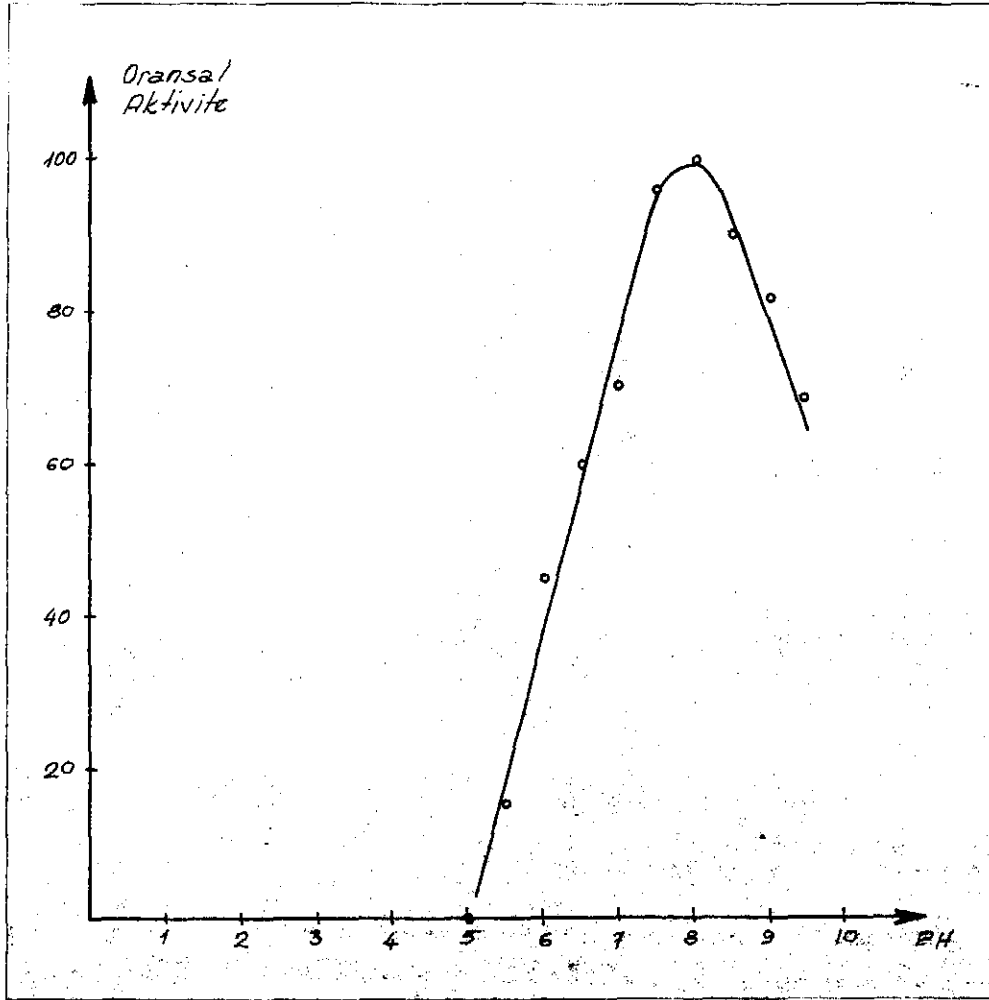
b. pH'nin Enzim Kataliz Hızına Etkisi:

Saflaştırılmış enzimin kataliz hızına pH'nın etkisi yöntemler kısmında belirtilen tamponlar kullanılarak incelendi. Bütün ölçmeler 25°C de ve  $1,4 \times 10^{-2}$  M  $MgCl_2$  varlığında yapıldı.

Enzimin kataliz hızının en yüksek olduğu pH=8,0 olarak saptandı.

pH= 5,0 iken G6PD inaktifdi. pH > 9,5 olduğunda ortama konulan  $MgCl_2$  hidroksit şeklinde çöktüğünden ölçme yapılamadı.

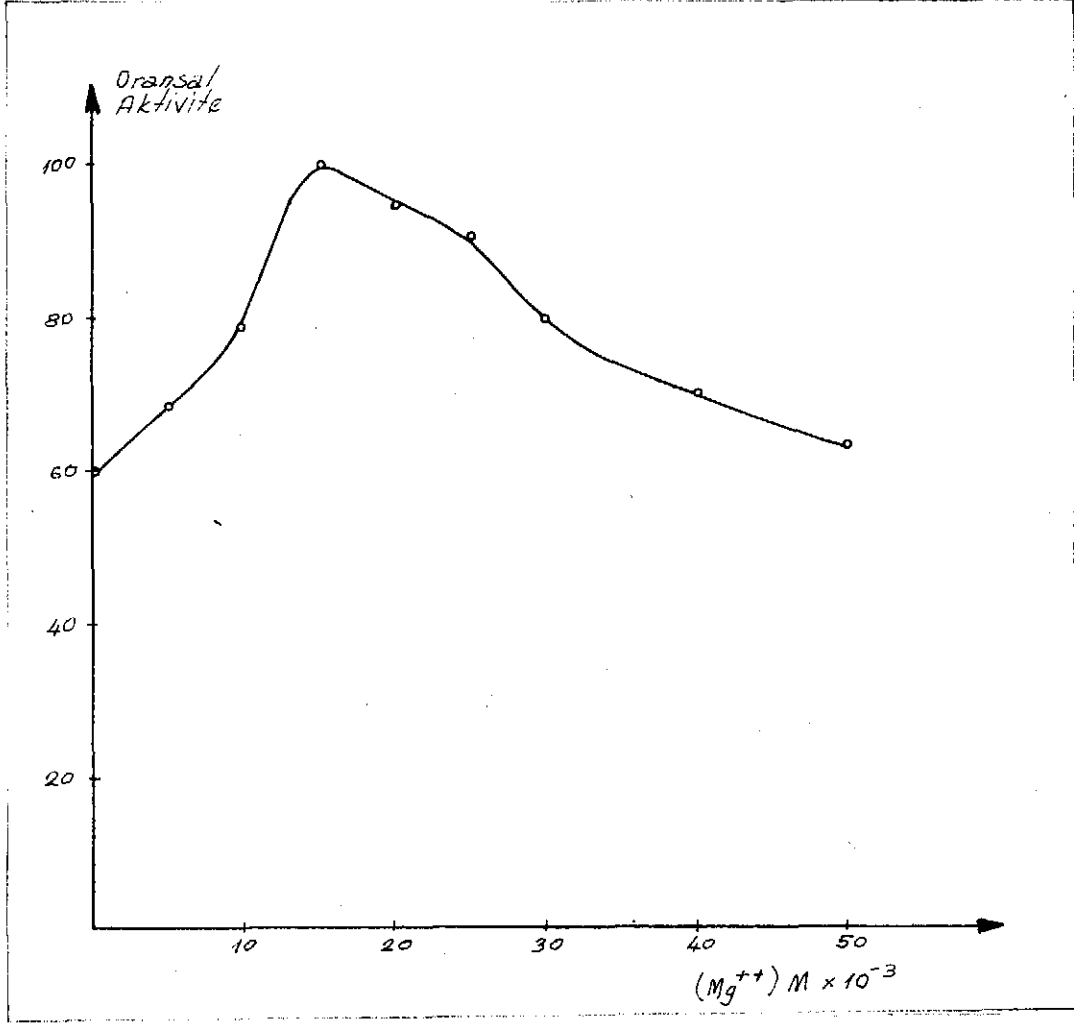
Şekil 8 G6PD kataliz hızına pH'nın etkisini göstermektedir.



ŞEKİL 8- G6PD Kataliz hızına pH'nın etkisi

c. Değişen  $Mg^{++}$  Derişiminin Enzim Kataliz Hızına Etkisi:

$Mg^{++}$  G6PD aktivitesi için gereklidir. Kataliz tepkimesinin hızı  $Mg^{++}$  derişimi  $1,5 \times 10^{-2}$  M iken en fazladır.  $0,5 \times 10^{-2}$  M'in altında ve  $3,0 \times 10^{-2}$  M üstünde hızla düşer. Şekil 9 G6PD aktivitesi üzerine  $Mg^{++}$  derişiminin etkisini göstermektedir.



ŞEKİL 9- Değişen  $Mg^{++}$  derişiminin G6PD aktivitesine etkisi

Ölçmeler pH= 8,0 ve  $25^{\circ}C$  de yapıldı.

d. Diğer İyonların Enzim Kataliz Hızına Etkisi:

Diğer katyon ve anyonların G6PD kataliz hızına etkisi araştırıldı. Son derişimleri:

(G6P) =  $10^{-3}$  M; (NADP) =  $10^{-3}$  M; ( $Mg^{++}$ ) =  $1,4 \times 10^{-2}$  M; pH = 8,0 ve  $25^{\circ}C$  de :

$1,4 \times 10^{-2}$  M  $Ca^{++}$  enzim aktivitesini 22 % inhibe etti. Aynı derişimdeki  $Ba^{++}$  16 %;  $Fe^{++}$  3 % oranında inhibisyon gösterdi.

$Li^{+}$ ,  $Na^{+}$ ,  $K^{+}$ ,  $Mn^{++}$ ,  $Cd^{++}$ ,  $Ni^{++}$ ,  $Co^{++}$ ,  $Hg^{++}$ ,  $Pb^{++}$ ,  $Al^{+++}$ ,  $Fe^{+++}$ ,  $Cr^{+++}$  ve anyonlardan  $Cl^{-}$ ,  $NO_2^{-}$ ,  $NO_3^{-}$ ,  $HCO_3^{-}$ ,  $CN^{-}$ ,  $CH_3COO^{-}$ ,  $CO_3^{-}$ ,  $C_2O_4^{-}$ ,  $C_4H_4O_6^{-}$ ,  $C_6H_5O_7^{-}$ ,  $BO_3^{-}$  etkisizdir.

e. Inhibisyon Deneyleri:

$K^{+}$  ve  $PO_4$  : Bizim kullandığımız derişimlerde ( $10^{-2}$  M  $8 \times 10^{-1}$  M )  $K^{+}$  ve  $PO_4$  inhibitör değildir. Safılaştırmayı  $KPO_4$  yerine aynı molarite ve pH'da Tris tamponu ile yaptığımızda G6PD aktivitesi bakımından bir fark gözlenmedi.

Kortikosteroidler:  $\beta$ -metazon ve prednisolon disodium fosfat denenmiş kortikosteroid derişimi  $3 \times 10^{-2}$  M kadar arttırıldığı halde belirli bir inhibisyon gözlenmemiştir.

Antikolinesterazlar: Glokom tedavisinde kullanılan ve güçlü bir antikolinesteraz olan fosfolin iodid son derişimi % 1'e kadar arttırıldığı halde G6PD'yi inhibe etmedi. Gene bir

miotik ve kolinesteraz inhibitörü olan pilokorpin  $2 \times 10^{-2}$  M derişime kadar inhibisyon etkisi yapmadı.

Belirtilen derişimlerin üzerine çıkıldığında inhibisyon gözlendi ise de bu inhibisyonlar ortama konan inhibitör miktarı ile orantılı değildi.

**Süstrat Benzerleri:** Saflaştırılan kobay lensi G6PD'ı NADP ye tam özgül olup NAD'yi hiç indirgemedi.

G6P benzeri olarak G, G1P, G16DP, F6P denendi enzim G6P'a tam özgül olup bu süstratlar derişimleri kullanılan G6P derişiminin 10 katına çıktığı zaman bile yükseltgemedi.

**Son Ürün İnhibitörleri:** Bazı steroid hormonlar ve yağ asitleridir. Steroid hormonlardan: Dehidro androsteron, pregnenolon ve  $3\beta$ -OH- $5\alpha$ -androstan-17-on denendi ve kobay lensi G6PD'ı için çok kuvvetli inhibitörler olduğu gözlendi. Bu steroidlerin  $K_i$  değerlerini bulmak için pH= 8,0; son ( $Mg^{++}$ ):  $1,4 \times 10^{-2}$  M; son (NADP):  $4 \times 10^{-4}$  M (doygunluk derişimi) sabit tutulup; (G6P):  $100 \times 10^{-6}$  M -  $6,25 \times 10^{-6}$  M arasında değiştirildi ve inhibitör varlığında enzimin kataliz hızı incelendi.

Yağ asitlerinden asetik (2 C), bütirik (4 C) miristik (14 C), palmitik (16 C), stearik (18 C), ve oleik (18 C), asitler sodyum tuzları halinde denendi ve inhibitör etki göstermediler.

10 karbonlu doymuş bir yağ asidi olan kaprik asit sodyum tuzu halinde kullanıldı ve kobay lensi G6PD si için inhibitör olduğu gözlemlendi. Tablo IV belirtilen koşullarda üç inhibitör steroid ve sodyum kaprata ait Ki değerlerini vermektedir.

Inhibitör	Inhibitör Derişimi	Deney sayısı	Ki $\bar{+}$ standart sapma
Dehidroandrosteron	$10^{-4}$ M	12	$(1,70 \bar{+} 0,04) 10^{-4}$ M
3 $\beta$ -OH-5 $\alpha$ -androstan 17-on	$2 \times 10^{-6}$ M	12	$(2,13 \bar{+} 0,07) 10^{-6}$ M
Pregnenolon	$10^{-5}$ M	12	$(7,40 \bar{+} 0,34) 10^{-6}$ M
Sodyum kaprat	$10^{-3}$ M	6	$(2,20 \bar{+} 0,12) 10^{-3}$ M

TABLO IV- G6PD'in son ürün inhibitörlerinin Ki değerleri:

(G6P) değişken; (NADP) =  $4 \times 10^{-4}$  M; (Mg<sup>++</sup>) =  $1,4 \times 10^{-2}$  M;

pH= 8,0 ; 25°C



## T A R T I Ő M A

G6PD başta insan alyuvarları<sup>(34)</sup> olmak üzere insan akyuvarları<sup>(5)</sup>, insan plasentası<sup>(17)</sup>, rat kası, yağ dokusu ve karaciğeri<sup>(1,23,32)</sup>, rat meme bezi<sup>(19,22)</sup> siğır adrenal korteksi<sup>(31)</sup>, maya<sup>(29,37)</sup>, asetobakter ksilinum<sup>(3)</sup> gibi birçok türlerin değişik dokularından kısmen saflaştırılmış ve özellikleri incelenmiştir.

Tavşan, kobay, siğır, koyun, rat gibi memeli lenslerinin G6PD aktivitesi incelendiğinde en yüksek aktivite kobayda bulunmuştur.<sup>(6)</sup>

Normal ve kataraktlı insan lensi ile Zinkham (1961); Freidburg ve Meyer (1968) alışmalar yapmışlardır. Bu araştırmacılar kataraktlı insan lensinde G6PD aktivitesinin azaldığını bunun yaşlanma ile azalan protein çözünürlüğüne bağlı olduğunu ileri sürmüşlerdir.<sup>(6)</sup> 1964 de Kinoshita<sup>(10)</sup>; 1966 da Westring ve Pisciotta tarafından insanlardan kalıtsal katarakta alyuvar G6PD aktivitesinin de azaldığı gösterilmiştir.<sup>(33)</sup>

1966 da Hockwin ve arkadaşları sığır lensinde karbonhidrat metabolizması ile ilgili 8 ayı enzimin aktivitelerini ölçmüş ve yaşlanmış lenslerde bütün dehidrogenazların azaldığını göstermişlerdir.<sup>(8)</sup> Aynı araştırmacıların 1968 de yaptıkları bir çalışmada çözünebilir protein miktarı ile birlikte G6PD nin de azaldığı bulunmuştur.<sup>(9)</sup>

Pentoz fosfat metabolik yolunu kontrol eden G6PD enziminin lens metabolizması ve katarakt oluşumunda da önemli bir rolü olduğundan bizim çalışmamızda kobay lensinden ileri bir saflaştırması yapıldı ve bazı özellikleri incelendi.

Bu çalışmada lensler bekletilmedi. Lensler beklemekle  $-20^{\circ}\text{C}$  de 4 ay,  $+4^{\circ}\text{C}$  de 10 gün süre ile G6PD aktivitesini koruyordu. Ancak bekletilmiş lenslerden elde edilen 11.000 g. süpernatanı DEAE selüloz kolonundan elüe olurken 200 ml.lik geniş bir aralıkta ( $2 \times 10^{-1}\text{M}$  -  $7 \times 10^{-1}\text{M}$  tuz gradieni) G6PD aktivitesi görülüyordu. Enzimin alt yapısından ileri geldiğini sandığımız bu durum saflaşmayı engelliyor ve enzimin derişimini azaltıyordu.

Yeni çıkarılmış lenslerle çalışıldığında elüsyon 25 - 30 ml.lik bir aralıkta tamamlandı ( $5 \times 10^{-1}\text{M}$   $\text{KPO}_4$  derişiminde) bütün G6PD tek ve keskin bir zirve halinde elde edildi (Şekil 1)

Bulgular kısmında değinildiği gibi G6PD aktivitesinin korunması için enzim saflaştırmasında kullanılan bütün çözeltilere son derişimi  $2 \times 10^{-6}$  M olacak şekilde NADP ve  $10^{-3}$  M EDTA pH= 7,0 katıldı. Daha düşük NADP derişimlerinde G6PD aktivitesi korunamıyordu.

Mc Charlton ve arkadaşlarının<sup>(6)</sup> koyun lensi G6PD'sinin saflaştırmasında kullandıkları merkaptto etanol bu çalışmada kullanılmadı. Çünkü aktivitenin yaygınlaşmasını önlemiyordu.

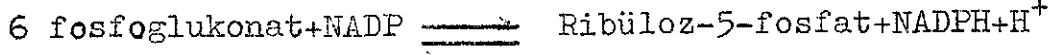
Kobay lensi G6PD'si belirtilen yöntemlerle saflaştırıldı. Son aşamada elde edilen enzimin spesifik aktivitesi 11,66 IU/mg. idi. Bu değer koyun lensinden saflaştırılan G6PD için 0,146 IU/mg<sup>(6)</sup> insan alyuvarlarından kristallendirilen G6PD için 750 dir.<sup>(34)</sup>

G6PD saflaştırmasında eskiden beri anyon değıştirici reçinelerden yararlanmışmıştır.<sup>(6,23,32)</sup> Bu çalışmada DEAE ve ECTEOLA selülozlar arka arkaya kullanılmakla daha ileri ve yüksek verimli bir saflaşma sağlandı.

Çok kullanılan enzim saflaştırma yöntemlerinden biri olan amonyum sülfat çöktürmesi verimi düştüğünden kullanılmadı.

Sefadex G-200 filtrasyonu daha yüksek bir verim alındığı için anyon değıştiricilerden sonra kullanıldı.

G6PD'yi öncelikle 6PGD'den arıtmak gerekti. Bilindiği gibi 6PGD enzimi:



tepkimesine göre NADP yi redükler. G6PD aktivitesi 340 milimikrondaki absorbands değişikliğini ölçerek tayin edildiğinden 6PGD varlığında bulunan aktivite yalnız G6PD ye değil, her iki dehidrogenaza birden ait olur. Tablo 3 de görüldüğü gibi G6PD yi 6PGD den tam arıtan yöntemler anyon değiştirici kromatografiler olduğundan saflaştırmaya bunlarla başlandı.

DEAE selüloz, ECTEOLA selüloz, sefadeks G-200 sırası G6PD nin en yüksek verimle en saf olarak elde edilmesine yaradığı için, tercih edildi.

Saflaştırmanın son aşamasında elde edilen enzim 1h.000 g. süpernatantına göre 686 kere saftır ve başlangıçtan beri verim 5,37 % dir.

Saflaştırılmış G6PD nin selüloz asetat elektroforezi yapıldı. Şekil 4 de görüldüğü gibi bu nümune oldukça saf ve kinetik çalışmalar için uygundur.

Saflaştırılmış kobay lensi G6PD sinin sefadeks G-200 filtrasyonu ile molekül ağırlığı 150.000  $\pm$  5000 bulundu.

(Şekil 5)

Yöntemler kısmında belirtilen tamponlarla pH'nın enzim kataliz hızına etkisi incelendiğinde kataliz hızının pH= 8,0 de

en yüksek olduğu bulundu. Bu değer insan alyuvarı<sup>(34)</sup>, rat, karaciğeri<sup>(23,32)</sup>, koyun lensi<sup>(6)</sup> gibi birçok dokulardan elde edilen G6PD için bulunan pH değerinin aynıdır. (Şekil 8).  $pH > 9,5$  iken ortama konan  $MgCl_2$ ,  $Mg(OH)_2$  olarak çöktüğünden ölçme yapılamadı.

Enzimin kataliz hızı  $1,2 \times 10^{-2} M - 2,5 \times 10^{-2} M$   $MgCl_2$  varlığında en yüksektir, bu değerlerin dışında hızla düşer. (Şeki 9)

$Ca^{++}$ ,  $Ba^{++}$  ve  $Fe^{++}$   $Mg^{++}$  yerine geçtiklerinden bu iki değerlikli katyonların varlığı kataliz hızını azalttı.

Saflaştırılmış koyun lensi G6PD'sinin  $pH = 8,0$  ve  $1,4 \times 10^{-2} M$   $Mg^{++}$  varlığında  $K_m$  değerleri:

G6P için  $K_m = (32,6 \pm 0,2) 10^{-6} M$

NADP için  $K_m = (12,5 \pm 0,1) 10^{-6} M$  olarak saptandı. (Şekil 6 ve 7)

Bu değerler koyun lensi G6PD si için bulunan  $K_m$  lerin aynıdır. <sup>(6)</sup> Tablo V'de değişik memeli dokuları ve mikroorganizmalardan saflaştırılan G6PD lerin  $K_m$  değerleri görülmektedir.

1935 de Theorell<sup>(25)</sup> ve 1955 de Glaser ve arkadaşları<sup>(7)</sup> fosfatın insan alyuvar G6PD sinin inhibe ettiğini belirtmişlerse de bizim çalışmamızda  $10^{-2} M$   $\vee$   $8 \times 10^{-1} M$  arasında  $KPO_4$  inhibitör etki göstermedi. Saflaştırmayı  $KPO_4$  tamponu yerine aynı molarite ve pH'da Tris tamponu ile yaptığımızda G6PD aktivitesi bakımından bir fark görülmedi.

G6PD	G6P için $K_m (10^{-6}M)$	NADP için $K_m(10^{-6}M)$
İnsan alyuvarları	50 - 78	2,9 - 4,4
İnsan akyuvarları	16	8,1
Sığır adrenal korteksi	42	5,6
Rat yağ dokusu	35	1,7
Rat kası	34	2,1
Rat karaciğeri	48	1,1
Maya	35	2,8
Asetobakter ksilinum	2500	40
Koyun lensi	32	12

Tablo V

Çeşitli türlerden saflaştırılan G6PD'lerin  $K_m$  değerleri

1960 da Black ve arkadaşları kortikosteroid tedavisi sırasında katarakt oluşumunun hızlandığını belirtmişler ve deneysel katarakt denemeleri yapmışlardır.<sup>(26)</sup> 1971 de M. Charlton ve arkadaşları ise yüksek derişimde prednisolon disodyum fosfat ve  $\beta$ -metazon disodyum fosfatın koyun lensi G6PD si

için inhibitör olduğunu göstermiştir.<sup>(6)</sup> Kobay lensi G6PD si ise 30 mM derişimde bile bu kortikosteroidlerle inhibe olmadı. Gene 1971 de Charlton ve arkadaşlarının inhibitör olarak belirttiği pilokarpin ve fosfolin iodid 25 mM derişime kadar inhibitör etkisi göstermediler.

1970 de R. Raineri ve arkadaşları rat meme bezinden<sup>(22)</sup> 1973 de Richard W. Geisler rat karaciğer, kas ve yağ dokusundan<sup>(23)</sup> gene 1973 de Benziman ve arkadaşları asetobakter ksilinumdan<sup>(3)</sup> saflaştırdıkları G6PD'lerin sübstrat olarak hem NADP hem NAD yi kullanabildiğini belirtmişlerdir. Kobay lensi G6PD si ise NADP ye tam özgül olup NAD yi indirgemedi.

G6PD nin steroidlerle inhibe olduğu ilk kez 1960 da Marks ve Banks tarafından gözlenmiştir.<sup>(16)</sup> Aynı araştırmacılar daha sonraki çalışmalarında maya G6PD sinin steroidlerle inhibe olmadığını, bu özelliğin memeli enzimine ait olduğunu açıkladılar.

Memeli G6PD'sinin steroidlerle inhibisyonu 1961 ve 1963 de Levy ve arkadaşları<sup>(12,13)</sup> 1970 de R. Raineri ve arkadaşları tarafından incelenmiştir.<sup>(22)</sup> Raineri kullandığı 18 steroidin yapısı ile inhibisyon gücü arasında bir bağlantı kurmuş 17 veya 20. karbonda bir keto grubu bulunmasının inhibisyon için gerekli olduğunu ve steroidin yapısı düzlemsel (planar) oldukça inhibisyon gücünün arttığını belirtmiştir. Bu yapıya en uygun bileşik

5 $\alpha$ -androstan-17-on'dur. Gene bu araştırıcıya göre enzim üzerinde hidrofobik bir cep vardır, bu cep steroid bağlama bölgesi olarak iř görür. (22)

Bizim alışmamızda inhibitör olarak kullanılan 3 steroid arasında 3 -hidroksi-5 -androstan-17-on un kuvvetli bir G6PD inhibitörü olduğu saptandı. Bu bulgu R. Raineri'nin sonuçları ile bağdaşmaktadır.

1960 da Marks ve Banks tarafından dehidroandrosteron'un insan alyuvar G6PD sinin gcl bir inhibitör olduğunu bildirmiş ancak inhibisyon kinetikleri ve Ki değerleri çalışılmamıştır. (16)

Bizim alışmamızda da dehidro androsteron kobay lensi G6PD sini inhibe etti ve  $K_i = 1,70 \pm 0,04$  M bulundu. Kullanılan diğer iki steroidin Ki değerleri ise Raineri'nin rat meme bezi için bulduğu Ki lerle karşılaştırmalı olarak aşağıda verilmiştir.

	A	B
	Ki ( $10^{-6}$ M)	Ki ( $10^{-6}$ M)
3 $\beta$ -hidroksi-5 $\alpha$ -androstan-17-on	3,56	2,13 $\pm$ 0,07
Pregnenolon	5,70	7,40 $\pm$ 0,34

A: Rat meme bezi G6PD'si

B: Kobay lensi G6PD'si



Görüldüğü gibi bizim bulduğumuz Ki'ler rat meme bezi için bildirilenlerden çok farklıdır. Bunun tür ve doku farkından ileri geldiği kanısındayız. Buna göre G6PD tüplerinin ayrılmasında  $K_m$  değerlerinden başka Ki değerlerinden de yararlanılabilir.

## Ö Z E T

G6PD enzimin kobay lensinden elde edilerek DEAE selüloz ECTEOLA selüloz iyon değiştiricileri .ve sefadeks G-200 filtrasyonu aracılığı ile saflaştırıldıktan sonra selüloz asetat elektroforezi ile saflık derecesi tesbit edildi.

Sefadeks G-200 filtrasyonu ile molekül ağırlığı 150.000±5000 bulundu.

Enzimin her iki sübstratına ait  $K_m$  değerleri; kataliz hızına iyonların, pH'nın ve inhibitörlerin etkileri incelendi. Diğer tür ve dokulardan elde edilen G6PD ler için bilinen inhibitörler kobay lensi enzimi için de denendi ve inhibisyon gücü  $K_i$  değeri olarak saptandı.

Not: Bu çalışmada kullanılan sübstrat ve inhibitörleri hediye olarak gönderen Bilim Dalımızın kurucusu, değerli hocamız Prof.Dr. Pınar Özand'a teşekkürü görev biliriz.

## KISALTMALAR LİSTESİ

BSA:	Sığır serum albumini
EDTA:	Etilen diamin tetraasetik asit
G:	Glükoz
G1P:	Glükoz-1-fosfat
G6P:	Glükoz 6-fosfat
G16P:	Glükoz-1,6-di-fosfat
G6PD:	Glükoz 6 fosfat dehidrogenaz
KPO <sub>4</sub> :	Potasyum fosfat tamponu
M:	Molar
mM:	Milimolar
NAD:	Nikotinamid adenin dinükleotid
NADP:	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NADPH:	İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
O.D.:	Optik dansite.
6PG:	6-fosfo glukonat
6PGD:	6-fosfoglukonat dehidrogenaz

K A Y N A K L A R

1. Ammon Hizi and gad Yagl (1974) European J. of Biochemistry 45, 201 - 209
2. Andrews, P. (1965) Biochem. J. 96 , 595
3. Benziman Moshe and Mazover A. (1973)  
The Journal of Biochemistry 248, 5, 1603 - 1608
4. Black, R.L., Oglesby, R.B., von Sallmann, L. and Bunim, J.J  
(1960) J. Amer. Med. Ass. 174, 166
5. Bonsignore, A., Fornaini, G., Leoncini, G., Fantoni and Segni, P. (1966) Journal of Clinical Investination 45, 12, 1966.
6. Charlton Josephine M. and Heyningen Ruth van (1971)  
Exp. Eye. Res. 11, 147 - 160
7. Glaser L. and Brown, D.H. (1955) J. Biol. Chem. 216, 67
8. Hockwin, O., Weimar, L., Noll, E., Licht, W. (1966)  
Albrecht Graefes Clin. Exp. Arch. Ophthalmol. 170, 99
9. Hockwin, O., and Gassner, R. (1968) Exp. Eye. Res. 7, 269.

10. Kinoshita, J.H. (1964) Arch. Ophthalmol 72 , 554
11. Kuby, Stephen A., Wu, James, T., and Roy, R.N (1974)  
Archives of Biochemistry and Biophysics 165, 153 - 178
12. Levy, H.R., (1961) Biochem. Biophys. Res. Commun. 6 , 49
13. Levy, H.R., (1963) J. Biol. Chem. 238, 775
14. Lovry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.,  
(1951) J. Biochem. 193 , 265.
15. Maregno Rowe, A.V., (1965) J. Clin Pathol. 18, 790 - 792
16. Marks, P.A., and Banks, J. (1960).  
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 46, 447
17. Menzel, P., Gobbert, M. and Oertel, G.W. (1970).  
Hormone and Metabolic Research 2 , 225 - 227
18. Negelein, E. and Hass, E. (1935) Biochem. Z. 282, 206
19. Nevaldine, H., Barbara, Hayde H. Costance and Levy  
Richard (1974) Archives of Biochemistry and Biophysics.  
165, 398 - 406
20. Pauling, L., Ittano, H.A., Singer, S.J. and Wells, I.C.  
(1949) Science 110 , 543 - 548

21. Peterson, E.A., Sober, H.A. "Methods in Enzymology" (1962)  
ed. Colowick, S.P., Kaplan, N.O., Academic Press, Inc.,  
New York, Vol 5, 3
22. Raineri, R. and Richard Levy, H. (1970) Biochemistry, 9, 11,  
2233 - 43
23. Richard W. Geisler, Alyn, Mc. Clure and Robert J. Hansen  
(1973) Biochimica et Biophysica Acta, 327, 1-10
24. "Sephadex-gel filtration in theory and practise" bulletin  
(1966) Pharmacia Fine Chemicals, Upsala, Sweden
25. Theorell, H. (1935) Biochem. Zeits, 275, 416
26. Turchetti, A. (1948) Riforma Med., 62, 325 - 328
27. Warburg, O. and Christian, W. (1931) Biochem. Z., 238, 131
28. Warburg, O. and Christian, W. (1931) Biochem. Z., 242, 206
29. Warburg, O. and Christian, W (1932) Biochem. Z., 254, 438
30. Warburg, O. and Christian, W. (1942) Biochem. J. 310, 384
31. Wayne E. Criss and Kenneth W. Mc. Kerns (1968) Biochemistry,  
7, 1, 125 - 134
32. Watanabe Akiharu and Taketa Kazuhisa (1972)  
J. Biochem. 72, 1277 - 1280

33. Westring, D.W. and Pisciotta, A.V. (1966) Arch. Int. Med. 118, 385
34. Yoshida, A. (1966) J. Biol. Chem. 241 , 4966
35. Yoshida, A. (1968) Hereditary Disorders of Eryocyte Metabolism, ed. Ernest Beutler, M.D.
36. Zinkham, W.H. (1958) Bull. John. Hopk. Hosp. 102, 169
37. Zinkham, W.H. and Lenhard, R.E (1959) J. Pediat. 55, 319