

283881

SİĞİR BEYİNİ KORTEKSİNDEN  
SİKLİK NÜKLEO TİD FOSFODİESTERAZIN  
SAFLAŞTIRILMASI VE KİNETİK ÖZELLİKLERİ

Yük. Kim. Nazmi Özer

DOKTORA TEZİ

Hacettepe Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Biyokimya Bilim Dalı

ANKARA

1974

## Ö Z E T

Sığır beyni korteksinin çözünür kesiti, 105.000 X g dökültüsü, doğrudan sefadeks G-200 kolonuna uygulandığında 250.000 (S<sub>1</sub>) ve 165.000 (S<sub>2</sub>) molekül ağırlığında iki değişik cNPDE; amonyum sülfat kesitlemesinden sonra uygulandığında 390.000 molekül ağırlığında tek cNPDE çıktı. Bu üç etkinlikten S<sub>2</sub> ile ileri saflaştırma denendi; toplam 35 kezlik bir saflaştırma elde edildi.

S<sub>1</sub> ve S<sub>2</sub> nin ısı-bozunum hızları değişikti ve S<sub>2</sub> nin S<sub>1</sub> den daha dayanıklı olduğu bulundu. S<sub>1</sub> de S<sub>2</sub> gibi etkinleyici protein tarafından etkinleştirildiği halde S<sub>2</sub> gibi doygunluğa eristirilemedi. S<sub>1</sub>'in cAMP, cGMP, cUMP; S<sub>2</sub> nin de cAMP, cGMP'yi yıktığı ve S<sub>1</sub>'in cGMP, S<sub>2</sub> nin ise cAMP'ye daha özgül olduğu görüldü.

S<sub>2</sub> DEAE-selüloza uygulandığında birisi etkinleyici proteine duyarlı diğeri duyarsız iki etkinlik zirvesi elde edildi (D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>). Bu iki zirvenin sıklık nükleotidlere farklı davranışları oldu. D<sub>2</sub> zirvesinin de S<sub>2</sub> de görülen cAMP'ye özgüllüğün arttığı görüldü.

## İ Ç İ N D E K İ L E R

	<u>Sayfa</u>
Giriş .....	1
<b>MADDE, AYGI T VE YÖNTEMLER</b>	
Kimyasal Madde ve Aygıtlar .....	11
Beyinden 105.000 X g Dökültüsünün Hazırlanışı .....	11
Etkinleyici Proteinin Saflaştırılması .....	12
Protein Tayinleri .....	13
Etkinlik Tayini I .....	13
Etkinlik Tayini II.....	13
<b>Sefadex G-200 Kromatografisi ile Molekül Ağırlığı</b>	
Saptanması .....	16
Isı Bozunum Deneyleri .....	16
DEAE-Selüloz Kromatografisi .....	16
Kinetik Çalışmaları .....	17
<b>SONUÇLAR</b>	
Saflaştırma .....	18
Etkinleyici Proteinin Çeşitli Kesitlere Etkisi .....	30
Isının Fosfodiesteraz Etkinliği Üzerine Etkisi .....	40
Kinetik Çalışmaları .....	51
<b>TARTIŞMA</b> .....	66
<b>KAYNAKLAR</b> .....	71

## Ş E K İ L L E R ve T A B L O L A R

	<u>Sayfa</u>
Glikoliz (Şekil 1) .....	1
İkincil Uyarıcı kavramının tanımı (Şekil 2) .....	4
Karaciğer ve Kasta Glikojenosis ve Glikojenolizis (Şekil 3) .....	5
AutoAnalyzer ile Fosfat Tayini (Şekil 4) .....	15
Ultrasantrifüj (105.000 X g) dökültüsünde Amonyum Sülfat Kesitlemesi (Şekil 5) .....	19
Çözünür Kesitteki Siklik Nükleotid Fosfodiesterazın Amonyum Sülfat Çökertmesinden Sonra Verdiği Sefadeks G-200 Profili (Şekil 6) .....	21
Sefadeks G-200 kolonunun bilinen proteinlerle Standardizasyonu (Şekil 7) .....	23
Çözünür Kesitin Sefadeks G-200 Profili (Şekil 8) ..	25
Sefadeks G-200'den Elde Edilen S <sub>1</sub> Kesitinin Aynı Kolona Uygulandığında Verdiği Profil (Şekil 9) ....	27
Değişik Fosfodiesteraz Örneklerinde Güne Göre Etkinlik Değişimi (Tablo I) .....	29
Sefadeks G-200'den Elde Edilen S <sub>2</sub> Kesitinin DEAE-Selüloz Kromatografisi (Şekil 10) .....	31
Fosfodiesterazın Saflaştırılması (Tablo II) .....	33
Sefadeks G-200 S <sub>1</sub> ve S <sub>2</sub> Kesitlerinin Etkinleyici Proteine Duyarlılığı (Şekil 11) .....	34

DEAE-Selüloz (PH 6,2) Sonrası Fosfodiesteraz Etkinliğinin Etkinleyici Proteine Duyarlılığı (Şekil 12) .....	36
DEAE-Selüloz (PH 7,5) Sonrası D <sub>1</sub> ve D <sub>2</sub> Kesitlerinin Etkinleyici Proteine Duyarlılığı (Şekil 13) .....	38
Çözünür Kesitte (105.000 X g dökültüsü) Fosfodiesteraz Etkinliğinin Değişik Sıcaklıklarda Zamana Bağlı Bozunumu (Şekil 14) .....	41
Çözünür Kesitteki Fosfodiesterazın 60°C de Verdiği Bozunum Eğrisinin Birinci Dereceli Birleşenleri (Şekil 15) .....	43
Centriflo ile Deriştirilmiş 105.000 X g Dökültüsünün 60°C de Verdiği Fosfodiesteraz Isı-Bozunum Eğrisi ve Birinci Dereceli Birleşenleri (Şekil 16) .....	45
Sefadeks G-200 S <sub>1</sub> Kesitinin 60°C de Verdiği Isı-Bozunum Eğrisi ve Birleşenleri (Şekil 17) .....	47
Sefadeks G-200 S <sub>2</sub> Kesitinin 60°C de Verdiği Isı-Bozunum Eğrisi ve Birinci Dereceli Birleşenleri (Şekil 18) .....	49
Sefadeks G-200 S <sub>1</sub> Kesitinin 60°C de Verdiği Isı-Bozunum Kinetiğinin İkinci Dereceden Analizi (Şekil 19) .....	52
Sefadeks G-200 S <sub>2</sub> Kesitinin 60°C de Verdiği Isı-Bozunum Kinetiğinin İkinci Dereceden Analizi (Şekil 20) .....	54

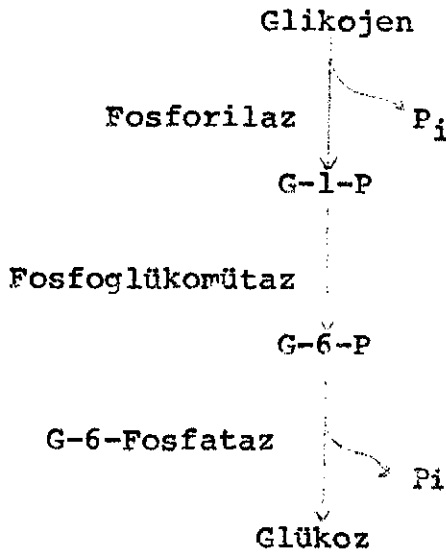
Değişik Fosfodiesteraz Kesitlerinin Kinetik	
Parametreleri (Tablo III) .....	56
Sefadeks G-200 S <sub>1</sub> Kesitinin Kinetik Özellikleri	
(Şekil 21) .....	57
Sefadeks G-200 S <sub>2</sub> Kesitinin Kinetik Özellikleri	
(Şekil 22) .....	59
DEAE-Selüloz (PH 6,2) D <sub>1</sub> Kesitinin Kinetik Özellik-	
leri (Şekil 23) .....	62
DEAE-Selüloz (PH 6,2) D <sub>2</sub> Kesitinin Kinetik Özellik-	
leri (Şekil 24) .....	64

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

cAMP	Siklik 3', 5' -Adenozin Monofosfat
cGMP	Siklik 3', 5' -Guanozin Monofosfat
cUMP	Siklik 3', 5' -Uridin Monofosfat
5'-AMP	5' -Adenozin Monofosfat
PDE	Fosfodiesteraz
cNPDE	Siklik Nükleotid Fosfodiesteraz
R <sub>0</sub> 20-1724	4-(3-butoxy-4-methoxy benzyl)-2-imidazolidione
SQ 20.009	1-ethyl-4-(isopropylidenehydrazine)-1H- pyrazole-(3,4-b)-pyridine-5-carboxylic acid ethylester hydrochloride
G-1-P	Glükoz-1-Fosfat
G-6-P	Glükoz-6-Fosfat

## GİRİŞ

Glukagon ve epinefrinin karaciğerde glikojen yıkımı ve glükoz üretimi üzerinde çok hızlı, belirgin ve tekrarlanabilir etkileri vardır. Glikojen yıkımının biyokimyası fosforilaz, fosfoglukomütaz ve glükoz-6-fosfataz enzimleriyle yapılan çalışmalarla belirlenmiştir<sup>1</sup> (Şekil 1).



Sekil 1

Fosforilaz in vitro hem glikojenin yıkımını hemde sentezini yürüttüğü halde canlıda epinefrin enjeksiyonundan sonra glikojen sentezinin hiç olmaması, buna karşılık yıkımın çok hızlı olması sentez ve yıkımda farklı etkenlerin görev aldığı şüphesini uyandırdı. Sentezde görev alan glikojen sentetazın bulunması ile bu şüphe açıklığa kavuşturuldu. Hormon deneylerinde glikojen yıkımının arttığı sancı ölçülen kan glükoz seviyelerine dayandırılıyordu. Kan glükoz seviyesindeki artmanın hücre dışına etkin taşınmadaki artmaya değilde hücre içinin glükoka aşırı doygunluğuna



bağlı olduğu hücre içi derişimlerin ölçülmesi ile açıklığa kavuşturuldu. Ayrıca glikojen yıkım hızının fosforilaz basamağında denetlendiği epinefrin ve glukagonun etkisinin bu enzimin etkinleştirilmesi yoluyla olduğu gösterildi.<sup>2</sup>

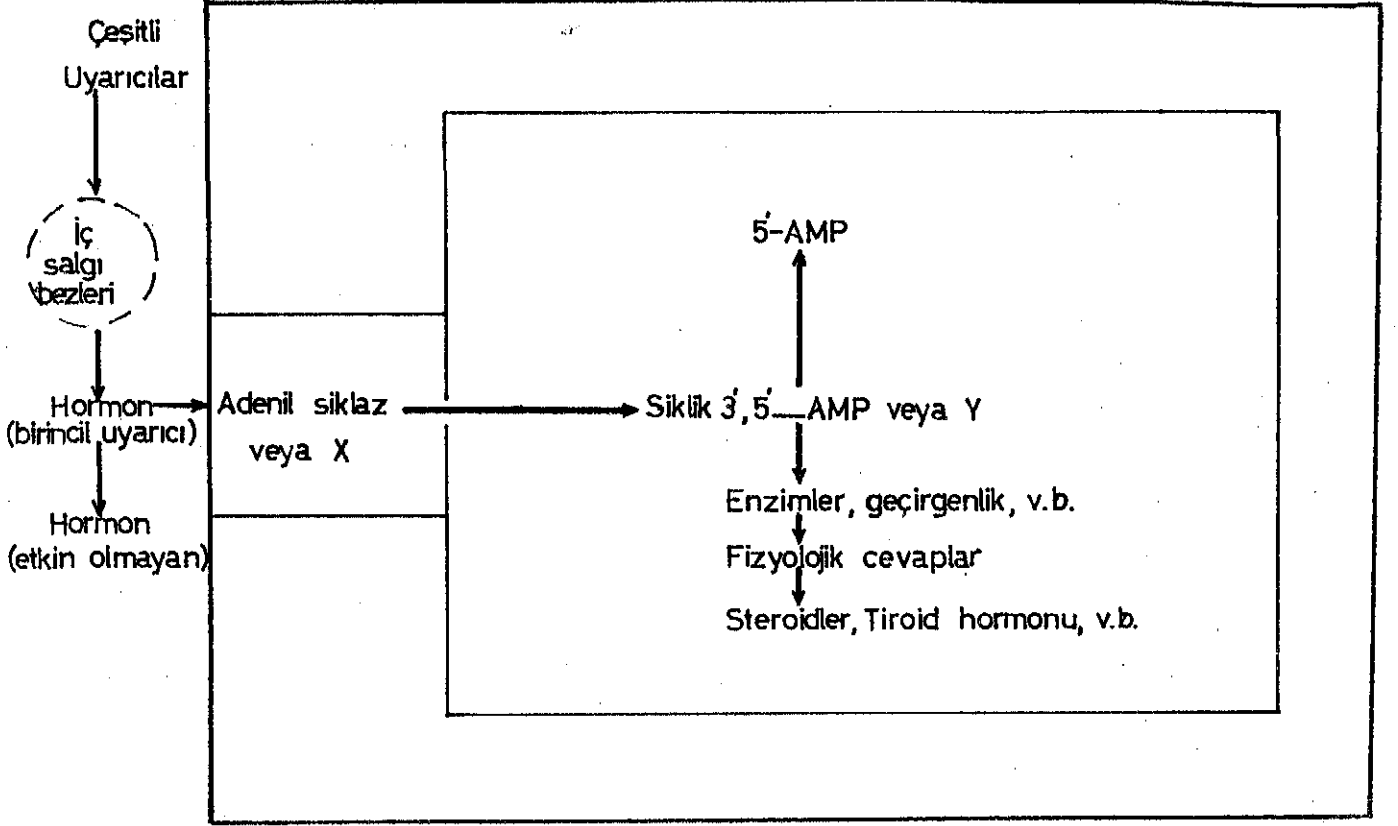
Karaciğer dilimleri hormonlarla inkübe edildiğinde fosforilaz etkinliğinin artması bu enzimi allosterik bir mekanizma ile etkinleştiren bir ara ürünün var olabileceğini düşündürdü. Ayrıca bu hormanların yalnız parçalanmış hücrelerde etkili olduğu bulundu. Kas ve Karaciğerden saflaştırılan fosforilazın fosfat katılımı ile etkin fosforilaza çevrilebildiği katılım hızının glukagon ve epinefrin tarafından hızlandırıldığı ve katılım için ATP, homojenat ve magnezyumun şart olduğu gösterildi<sup>3-6</sup>.

Etkinleşmenin gerçek nedeni aranırken homojenatların hormonlara cevabının iki basamakta olduğu bulundu<sup>6</sup>. Birinci basamakta homojenatın çözünmez kesimi hormonların varlığında ısıya dayanıklı, diyalize edilebilen ve iyon değıştiricilerde saflaştırılabilen bir etken üretiyor. İkinci basamakta ise bu etken homojenatın dökültüsünde etkin fosforilazın oluşumunu uyarıyor. Gerçekte dökültüde hormonlar etkin değıldirler<sup>7</sup>. Daha sonra bu ısıya dayanıklı etkenin cAMP olduğu ve hayvanlarda mikroorganizmalarda ve bitkilerde yaygın olduğu gösterildi<sup>8-18</sup>.

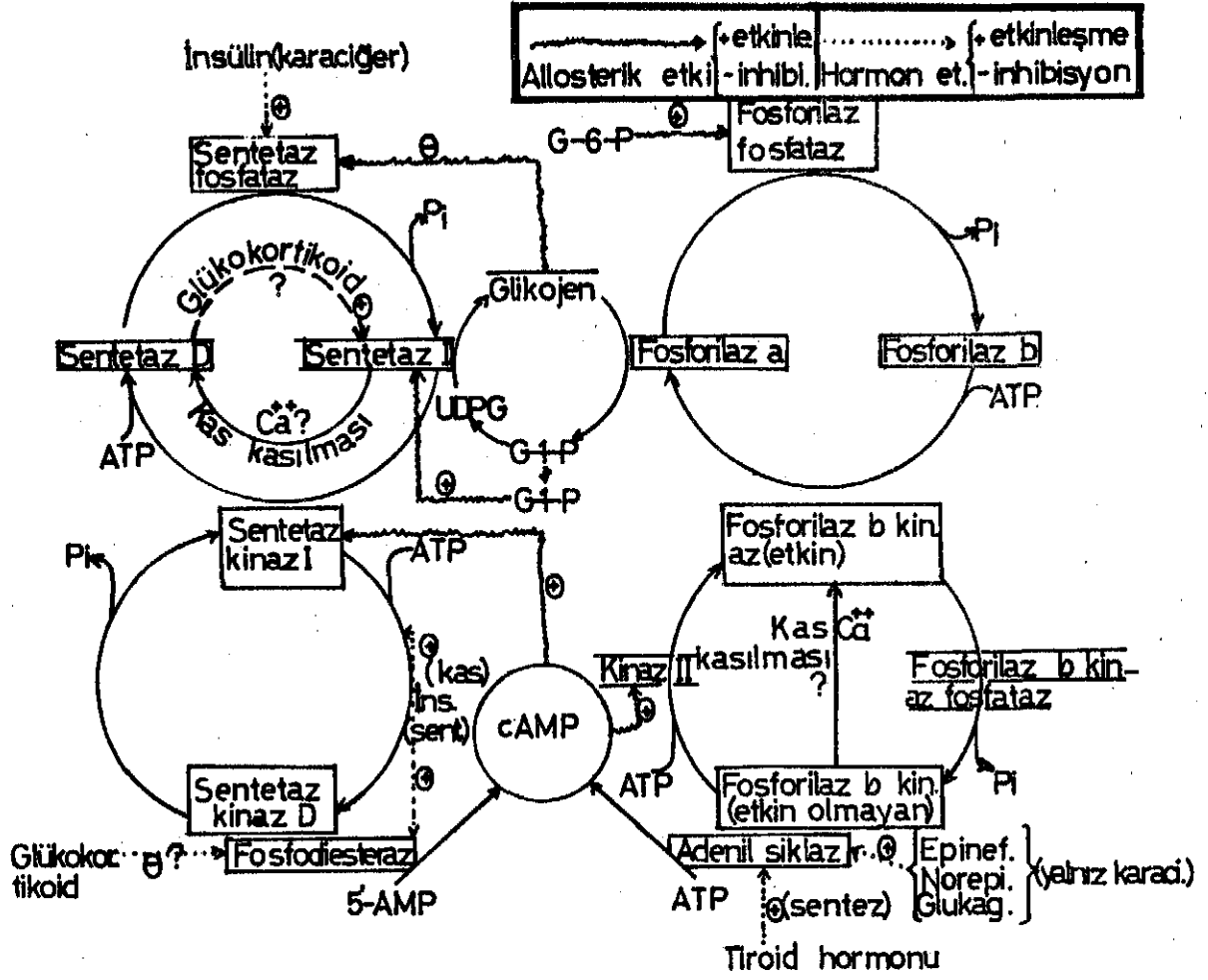
cAMP nin yanı sıra doğal olarak bulunabilen ikinci siklik nükleotid cGMP olmuştur<sup>19,20</sup>. Diğer siklik nükleotidler  $10^{-8}$  mol/kilogramı tesbit edebilecek duyarlıktaki radioimmünoassay yöntemi ile bulunamamıştır<sup>21,22</sup>.

cAMP çoklukla hücre zarına yerleşmiş ve büyük bir olasılıkla bir lipoprotein olan adenil siklaz tarafından sentezlenir<sup>23-25</sup>. Hormonlar yine hücre zarına yerleşmiş olan reseptörlere bağlanarak etkinliklerini gösterirler. Hormonların bağlandığı reseptörler ya adenil siklazın bir parçası veya adenil siklaz ile yakın ilişkisi olan bölgelerdir. Hormonlar reseptörlere bağlanınca hormon-reseptör bağlanmasının sonucu olarak siklazın inhibisyonuna veya etkinleşmesine göre cAMP'nin hücre içi derişimi düşecek veya yükselecektir. Eğer hormon cAMP nin seviyesini arttırıyorsa hormon "birincil uyarıcı" (first messenger) cAMP ise "ikincil uyarıcı" (second messenger) diye adlandırılır. Bu ana kavram şekil 2 de görölüyor. Bu kavrama göre birincil uyarıcı istenen bilgiyi hücreye taşır ve ikincil uyarıcı da bu bilgiyi hücre işleyişine aktarır. cAMP seviyesinin artmasının ortaya getirdiği sonuç hücrenin cinsine ve içinde bulunduğu koşullara bağlı olacaktır. cAMP'nin bu görevi nasıl yaptığı çok iyi bilinmemekle birlikte bazı iyi anlaşılmış sistemlerde vardır. Örneğin; karaciğer glikolizisindeki görevi şekil 3)<sup>26</sup>.

Hücrede cAMP nin görevi glikogenolizisteki basit görevinden hücrenin en önemli kilit noktalarını yöneten düzenleyici ajan görevine kadar değişir. Bu nedenle hücrede cAMP nin seviyesi çok önemlidir ve cAMP nin seviyesi hormonların kontrolü altında olan iki enzim tarafından ayarlanır<sup>27</sup>. Bunlardan birincisi yukarıda adı geçen ve cAMP yi ATP den sentezleyen adenil siklaz diğeri ise cAMP yi 5'-AMP ye yıkan cAMP fosfodiesterazdır<sup>25,28</sup>.



Şekil : 2 İkincil uyarıcı kavramının tanımlanması.



Şekil : 3. Karaciğer ve kasta : Glikojenezis ve glikojenolizis.

cAMP'yi parçalayan bir etkinlik ilk kez köpek beyin, karaciğer ve kalbinde bulundu<sup>9</sup>. Daha sonra tek hücreli canlılardan insana kadar pek çok türde cAMP ve cGMP'yi aynı ya da değişik özgüllüklerle parçalayan fosfodiesterazlar görüldü<sup>28-35</sup>. Buna ek olarak, cUMP doğal olarak gözlenemediği halde, cUMP'ye özgül bir PDE'nin varlığı köpek kalbinde ve sıçan yağ hücrelerinde gösterildi<sup>36,37</sup>.

Sıklık nükleotid fosfodiesteraz etkinliği aynı canlının organları arasında önemli değişiklikler gösterdiği gibi aynı organın değişik bölgelerinde de değişik etkinlikler görülebilir<sup>28,34,38</sup>.

Birçok dokuda cAMP PDE hücrenin hem çözünür hem de çözünmez kısmında bulunur<sup>28,36,37,39-43</sup>. Birçok çözünmez enzim için olduğu gibi çözünmez cAMP PDE lar hakkında çok az şey bilinmektedir; verilen bilgilerin hemen hemen tamamı çözünür fosfodiesterazları kapsamaktadır.

Enzimin pH optimumu oldukça yayvandır ve pH 8.0 değerlerinde bir zirve verir<sup>28,31,34,44</sup>. Sıçan beyninden hazırlanan cAMP PDE pH 5.5-5.0 arasında tersinir bir şekilde çöker; çökeleğin içinde bulunduğu ortam nötralleştirildiğinde etkinliğin tekrar çözünür olduğu görülür<sup>45</sup>. Enzim pH 5.0 ın altında tersinmez bozunuma uğradığı halde pH 10.0 da, 0°C de hiç etkinlik kaybetmeden veya çok az bir kayıpla bir saat bekletilebilir. Fosfodiesterazın etkinliğinde 45°C ve daha yüksek sıcaklıklarda ani bir düşüş görülür<sup>33,44,46</sup>.

Memelilerde bulunan PDE ların herbirinin cAMP'ye karşı değişik çekicilikleri vardır<sup>39,43,47</sup>. Bu fosfodiesterazlar genellikle pürin 3'-5'-siklik nükleotid fosfatlarına karşı daha etkindirler ama daha düşük bir hızla da olsa pirimidin 3',5'-siklik nükleotid fosfatlarının da yıkarlar<sup>38,51</sup>.

İmidazol birçok dokudan elde edilen cAMP fosfodiesterazı etkinleştirir, ancak bunu nasıl başardığını bilinmemektedir. cAMP fosfodiesteraz mg tarafından etkinleştirilir. Mn ve Co Mg 'un yerini kısmen tutabilirdiği halde Zn , Ni , Fe etkisizdir<sup>34</sup>. Mg 'un varlığında Mn , sıgır beyni fosfodiesterazının  $V_m$  ve  $K_m$ 'ini yükseltir. Bu bulgu Mn in enzim-tepkiyen karmaşık birleşimini etkileyerek tepkiyenin ürüne yıkılmasını hızlandırdığı şeklinde yorumlanmıştır. Optimum Mg derişimi değişik kaynaklı fosfodiesterazlar için değişiktir. Örneğin tavşan beyninden elde edilen bir cAMP fosfodiesteraz maksimum etkinliği 0.8 mM da gösterdiği ve daha yüksek derişimlerde inhibe olduğu halde, köpek kalbinden elde edilen PDE'in optimum etkinlik için gereksindiği magnezyum derişimi 5-7 mM dır<sup>34,38</sup>.

Memelilerden elde edilen PDE lar metil ksantinler, papaverin, epinefrin ve siklik 3'-5'-nükleotid benzerleri tarafından inhibe edilirler<sup>28,44,46,53,58</sup>. Bu inhibitörlerden bazılarının hücrelere eklenmesi ile PDE'in hormonlara karşı duyarlılığının arttığı ve daha düşük hormon derişiminde optimal şartlarda gözlenen inhibisyonun görülmesi ile anlaşılmıştır<sup>26</sup>.

Hayvan dokularına dağılmış olan cAMP PDE'ı bilinen protein saflaştırma yöntemleri ile yüksek derecede saflaştırmak mümkün olamamıştır. Bilinen yöntemler uygulandıında enzimin etkinliği ya çok düşmekte, ya da tamamen yok olmaktadır<sup>34,59</sup>. Beyindeki PDE etkinliği kalbe göre yüksek olmakla birlikte kalp enzimi saflaştırmaya daha dayanıklıdır<sup>9</sup>.

Saflaştırma ilerledikçe PDE dan ayrılan bir faktör nedeni ile etkinlik yok olmakta veya çok düşmektedir. Bu faktörün ısıya ve DNaz'a dayanıklı, triptik enzimlere dayanıksız olması ve diyalize edilememesi bir protein olduğunu ortaya çıkardı<sup>59</sup>. Protein 80 kez sığır beyinden, 8000 kez sığır kalbinden saflaştırıldı<sup>60,61</sup>. Sığır beyinden saflaştırılan proteinin molekül ağırlığı jel elemesi ile 40.000 bulunduğu halde sığır kalbinden elde edilenin molekül ağırlığı jel elemesi ile 27.000, sedimentasyon-difüzyon ile 19.200 bulundu. Ayrıca proteinin iki değişik Michealis-Menten sabiti,  $K_m$ , ile üzerindeki üç bölgeye kalsiyumu başlama yeteneği olduğu ve gerçek PDE etkinleştiricisinin kalsiyum-etkinleştirici protein karmaşık birleşimi olduğunu gösterildi<sup>62,63</sup>. Etkinleştirici protein-kalsiyum karmaşık birleşimi etkinleştirici etkisini enzimin cAMP için olan  $V_m$ 'ini arttırıp  $K_m$ 'ini düşürerek başardığı ve etkinleştirici-enzim ilintisinin doğrudan etkinleştirici derişimine bağlı olması enzimle etkinleştirici arasında stoikiyometrik bir ilintinin varlığını göstermektedir<sup>60</sup>.

CAMP PDE saflaştırmasındaki bütün zorluklara rağmen tavşan beyninden 3, sıçan serebral korteksinden yüzde 22 verimle 11, sığır beyninden 50, köpek kalbinden 173, sığır kalbinden yüzde 2,9 verimle 320, Serratia Marcencens yüzde 30 verimle 1125 ve kurbağa alyuvarlarından yüzde 29 verimle 1640 kez saflaştırılabilmıştır<sup>29,31,34,38,59,64,65</sup>.

Siklik nükleotid fosfodiesterazlar için önerilen molekül ağırlıkları çok çeşitlilik göstermekte ve 51.000 ile 2.000.000 arasında değişmektedir<sup>29-32,42,65,66</sup>. Değişik doku ve hücreler için değişik molekül ağırlıkları önerildiği gibi aynı hücre için de değişik molekül ağırlığında ve özellikte cNPDE larında varlığı öne sürülmüştür<sup>29,42,51,65,66</sup>. Değişik fosfodiesterazların varlığı kuramı jel kromatografisinde birden fazla etkinlik zirvesi,elektroforezde birden fazla band, aynı nükleotid için birden fazla  $K_m$  veya farklı inhibitörlere karşı farklı davranışların gözlenmesine dayandırılmaktadır<sup>29,31,42,43,45,47,51,54,65-67</sup>. Örneğin; Ro 20-1724 sıçan alyuvarı PDE'ı için sıçan beyin PDE'ı için olduğundan daha kuvvetli bir inhibitördür<sup>68</sup>. SQ 20.009'un sıçan ve tavşan beyni PDE'ı için oldukça özgül olduğu gösterilmiştir<sup>69</sup>.

Memeli kalb dokusundan elde edilen PDE'ların  $K_m$ 'leri  $1 \times 10^{-4}$  dolaylarındadır<sup>28-34</sup>. Beyinden elde edilen PDE larınki ise biraz daha yüksektir<sup>27</sup>. Son senelerde beyin kesitlerinde ikinci bir PDE'ın bulunduğu ve bunun  $K_m$ 'inin  $1-5 \times 10^{-6}M$  olduğu gösterilmiştir<sup>42-44,67</sup>.



Bu çalışmanın amacı sığır beyni korteksinden cAMP PDE'ı kısmen saflaştırmak ve özelliklerini araştırmaktır. Bilindiği üzere cAMP, hormonların etkisinin hücre-İçi ileticisidir, ve hücrenin en önemli kontrol merkezleri cAMP tarafından yönetilir<sup>11,13,14</sup>. cAMP bu kontrol görevini hücre İçi seviyesinin alçalıp yükselmeleri ile başarır. cAMP nin hücre İçi seviyesinde hormonlar tarafından yönetilen İki enzimin etkisi altında olduğunu daha önce söylemiştik. Bu enzimlerden biriside cAMP PDE olduğu-na göre hücre etkinliklerinin İyi anlaşılabilmesi İÇin cAMP PDE'ın çok İyi anlaşılması gerekir. Enzim saflaştırması İÇin etkinliğin en yüksek olduğu doku olan korteks seçilmiştir.

MADDE, AYGIT VE YÖNTEMLER

Kimyasal Madde ve Aygıtlar: Adenozin 3',5'-siklik mono-fosforik asit ve guanozin, üridin 3',5'-siklik monofosfat ile adenozin 5'-monofosfatın sodyum tuzları, katalaz (sığır karaciğeri), üreaz (jakbean),  $\beta$ -galaktozidaz (karaciğer), serum albümini (sığır), yılan zehiri (Crotalus adamanteus) Sigma Chemical Company (ABD); serum albümini (insan),  $\gamma$ -Globülin (insan), Mann Research Laboratories (Batı Almanya); Blue dekstran, Sefadeks G-200, Pharmacia (İsveç); DEAE-Selüloz DE 52, Whatman Biochemicals Limited (İngiltere) den alındı. Kullanılan diğer bütün kimyasal maddeler BDH (İngiltere) ve Merck (Batı Almanya) firmalarından alındı.

Spektrofotometrik ölçümler Zeiss PMQ II spektrofotometresi, ultrasantrifüjlemeler Beckman L3-50 santrifüjü, kolon kromatografileri Pharmacia kolonları, deriştirmeler Centriflo (Amicon) veya liyofilizatör ve fosfat tayinleri Technicon AutoAnalyzer ile yapıldı.

Beyinden 105.000 X g Dökültüsünün Hazırlanışı: Beyin mezbahadan taze olarak sıvı azot içerisinde alındı. Beyin korteksi soğuk odada ( 4°C de) kazındı. Gram yaş doku başına 4-5 ml homojenizasyon tamponu (25 mM Tris-HCl pH 8.1, 10 mM MgCl<sub>2</sub>) eklendi ve Waring Blendor ile yüksek devirde 2,5 dakika homojenize edildi. 15.500 X g de 20 dakika santrifüj ile dökültü toplandı. Toplanan dökültü 105.000 X g de 90 dakika santrifüj edildi ve dökültü 20 mililitrelik örnekler halinde plastik şişelerde -30°C de

donduruldu. Bu şekilde hazırlanan örnekler  $-30^{\circ}\text{C}$  de 3-4 ay etkinliklerinden hiçbirşey kaybetmeden saklanabildi. 105.000 X g dökültüsüne eşit hacimde yüzdeyüz doygunlukta amonyum sülfat çözeltisi karıştırılarak eklendi. Arada bir karıştırılarak yarım saat bekletildi. Çökelek 15.500 X g de 10 dakika santrifüjleme ile toplandı. Dökültü etkinleştirici protein saflaştırılması için ayrıldı. Çökelek diyaliz tamponunda (25 mM Tris-HCl pH 7,5; 5mM  $\text{MgCl}_2$ ) çözüldü. Örnek diyaliz torbasına aktarılarak her defasında 5 litre olmak üzere 20 litre tampona karşı 24 saat diyaliz edildi. Diyalizat 20 mililitrelik parçalar halinde plastik şişelerde dondurulup saklandı. Bu şekilde  $-30^{\circ}\text{C}$  de saklanmış örneklerin 1-2 ay etkinliklerinin tamamını koruduğu görüldü.

Etkinleştirici Proteinin Saflaştırılması: Amonyum sülfat dökültüsü pH metre kullanılarak ve buz içerisinde 1 N HCL ile pH 4'e getirildi. Bir saat but üzerinde bekletildikten sonra 3000 X g'de 20 dakika santrifüjleme ile çökelek toplandı. Dökültü atıldı. Çökelek diyaliz tamponunda (30 mM İmidazol-HCl pH 6,5; 1 mM  $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ , 200 mM NaCl) çözüldü. Çözelti kaynar su banyosunda 6 dakika tutulduktan sonra hemen buzlu suda soğutuldu. Meydana gelen çökelek 3000 X g'de 10 dakika santrifüjleme ile atıldı. Dökültü diyaliz torbasına konulduktan sonra her defasında bir litre olmak üzere toplam 5 litre diyaliz tamponuna karşı 5 saat diyaliz edildi. Diyalizat 3 mililitrelik parçalar halinde cam şişelerde  $-30^{\circ}\text{C}$  de donduruldu.

Protein Tayinleri: Protein derişimlerinin yüksek olduğu ilk saflaştırma basamaklarında hem Biüret hemde Lowry yöntemlerine göre protein tayini yapıldı, protein derişiminin düşük olduğu son saflaştırma basamaklarında yalnız Lowry yöntemi kullanıldı<sup>70,71</sup>. Verim hesaplarında ve protein yıkantılarında Warburg'un yöntemi (280-260 nm) kullanıldı<sup>72</sup>.

Etkinlik Tayini I. : Tepkime ortamı, 50 mM Tris-HCl pH 8.1 içinde 3 mM MgSO<sub>4</sub>, 100 µg yılan zehiri, uygun derişimde enzim içermekte idi. Otuzyedı derecede 15 dakikalık bir inkübasyondan sonra tepkime 1 mM olacak şekilde tepkiyenin (cAMP, cGMP veya cUMP) eklenmesi ile başlatıldı. Toplam inkübasyon hacmi 1 ml idi. Tepkime 30 dakika 37°C de sürdükten sonra 0.2 ml % 55 lik trikloroasetik asit eklenerek durduruldu. Etkinleyici ile olan deneylerde etkinleyici öninkübasyon öncesinde ortama eklendi. Inkübasyon hacmi yine 1 mililitre idi.

Etkinlik Tayini II. : Tepkime ortamı 50 mM Tris-HCl pH 8.1 içinde 3 mM MgSO<sub>4</sub> ve uygun derişimde enzim içermekteydi. Otuzyedı derecede 15 dakikalık öninkübasyondan sonra tepkime son derişimi 1 mM olacak şekilde tepkiyenin (cAMP, cGMP veya cUMP) eklenmesi ile başlatıldı. Toplam inkübasyon hacmi 1 ml idi. Tepkime 30 dakika 37°C de sürdükten sonra tüpler kaynar su banyosunda 3 dakika tutularak durduruldu. Tüpler tekrar 37°C de dengelendikten sonra 100 µg yılan zehiri eklenip 20 dakikalık bir inkübasyon daha yapıldı. Inkübasyon sonunda tepkime 0.2 ml % 55 lik trikloroasetik asit eklenmesi ile durduruldu. Her iki

etkenlik tayini için de kör tüpleri yapıldı. Kör tüplerine tepkiyen (cAMP, cGMP veya cUMP), TCA eklenmesinden sonra eklendi.

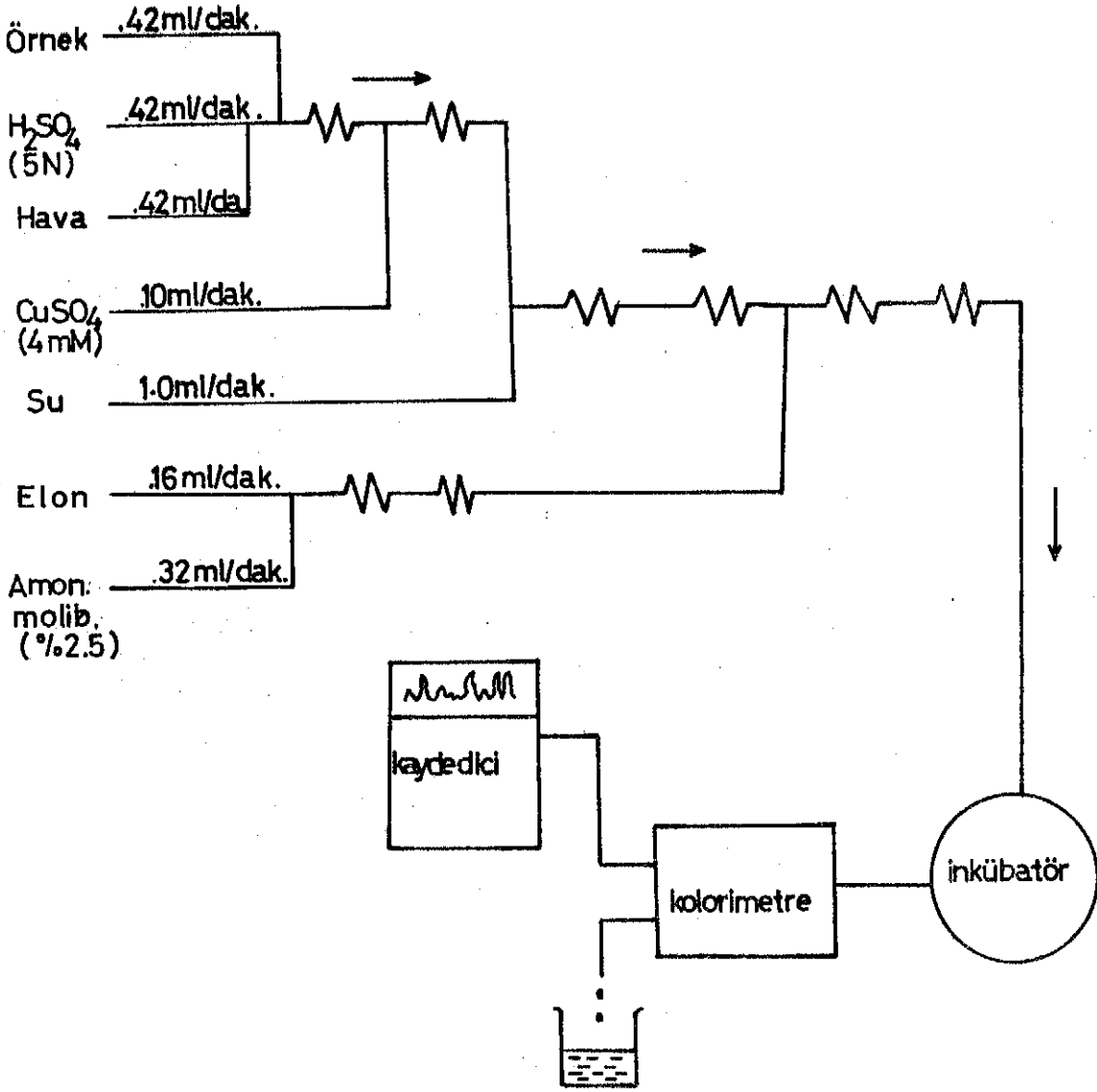
Asitle tepkimeler durdurulduktan sonra bozunmuş protein santrifüjle uzaklaştırıldı. Dökültüde fosfat tayini Fiske-Subbarow'un yöntemine göre ya elle ya da aynı oranlar korunarak Auto-Analyzer ile yapıldı<sup>73</sup> (Şekil 4). Her iki sistem de bilinen anorganik fosfat örnekleriyle önceden standardize edildi.

Bir ünite mililitre enzim başına bir dakikada ve 37°C de 100 nmol anorganik fosfat veren etkinlik diye tariflendi.

Tepkime ortamı her zaman sabit tutulmasına karşın bazen inkübasyon süresi değiştirildi. Yapılan değişiklikler yapıldığı yerlerde ayrıca belirtildi.

Bazı ön deneyler ile yılan zehirinin etkinliği ölçüldü. Bir mikromol adenozin-5'-fosfatın 100 µg yılan zehiri tarafından 10 dakikadan daha kısa bir sürede parçalandığı ve su içinde 1 mg/ml derişimindeki yılan zehirinin -20°C de etkinliğinden hiçbirşey kaybetmeden 6 ay saklanabildiği saptandı.

Siklik adenozin 3', 5'-monofosfat fosfodiesteraz etkinliğinin 60 dakika süresince değişmediği, cAMP yıkım hızının aynı kaldığı ve enzim derişimi ile cAMP parçalanma hızı arasında doğrusal bir ilişki olduğu ön deneylerle görüldü.



Şekil : 4

Sefadex G-200 Kromatografisi ile Molekül Ağırlığı

Saptanması: Kromatografi için 2,5 X 100 cm boyutlarında Pharmacia kolonu kullanıldı. Kolon, 25 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM MgCl<sub>2</sub> ile dengelendikten sonra diyalizat veya 105.000 X g dökültüsü uygulandı ve eşit hacimle fraksiyonlar toplandı. Akış hızı peristaltik pompa ile ayarlandı. Sefadex G-200 kolonunun ölü hacmi 6.1 ml yüzde 0.25 lik blue dekstran kullanılarak ölçüldü. Daha sonra molekül ağırlığı bilinen beş proteinin her birinden 2 mg alındı. Bu (10 mg) protein karışımı 6.1 ml kolon yıkama tamponunda çözüldü. Kullanılan standart proteinler karaciğer  $\beta$ -galaktozidazı (520.000), jackbean üreazı (480.000), karaciğer katalazı (250.000), insan (serum)  $\gamma$ -globülini (154.000) ve insan serum albümini (65.000) idi. Bu karışım kolondan geçirildikten sonra aynı şartlarda diyalizat ve 105.000 X g dökültüsü geçirildi. Molekül ağırlığı ile yıkanma hacmi arasındaki logaritmik ilintiden adenozin 3', 5'-siklik monofosfat fosfodiesterazın molekül ağırlığı bulundu<sup>74</sup>.

Isı Bozunum Deneyleri: 105.000 X g dökültüsündeki cAMP PDE etkinliğinin ısıya karşı dayanıklılığını çeşitli sıcaklıklarda araştırıldı. Ayrıca 50°C de dökültü ve sefadex G-200 yıkantısındaki etkinlik zirvelerinin ısıya dayanıklılığı, davranışları ve nitelikleri araştırıldı.

DEAE-Selüloz Kromatografisi: DEAE-Selüloz kromatografisi değişik pH, tampon ve değişik örneklerle yapıldı. Örneğin uygulanmasından sonra enzim kolondan tuz gradienti ile söküldü.

Kinetik Çalışmaları: Sefadex G-200 ve DEAE-Selüloz yıkantısı etkinlik zirvelerinde cAMP, cGMP ve cUMP için Michaelis-Menten ilişkilerine bakıldı<sup>62</sup>. Her tepkiyen için  $K_m$  ve  $V_m$  Lineweaver-Burk grafiğinden hesaplandı<sup>75</sup>.



## SONUÇLAR

### SAFLAŞTIRMA

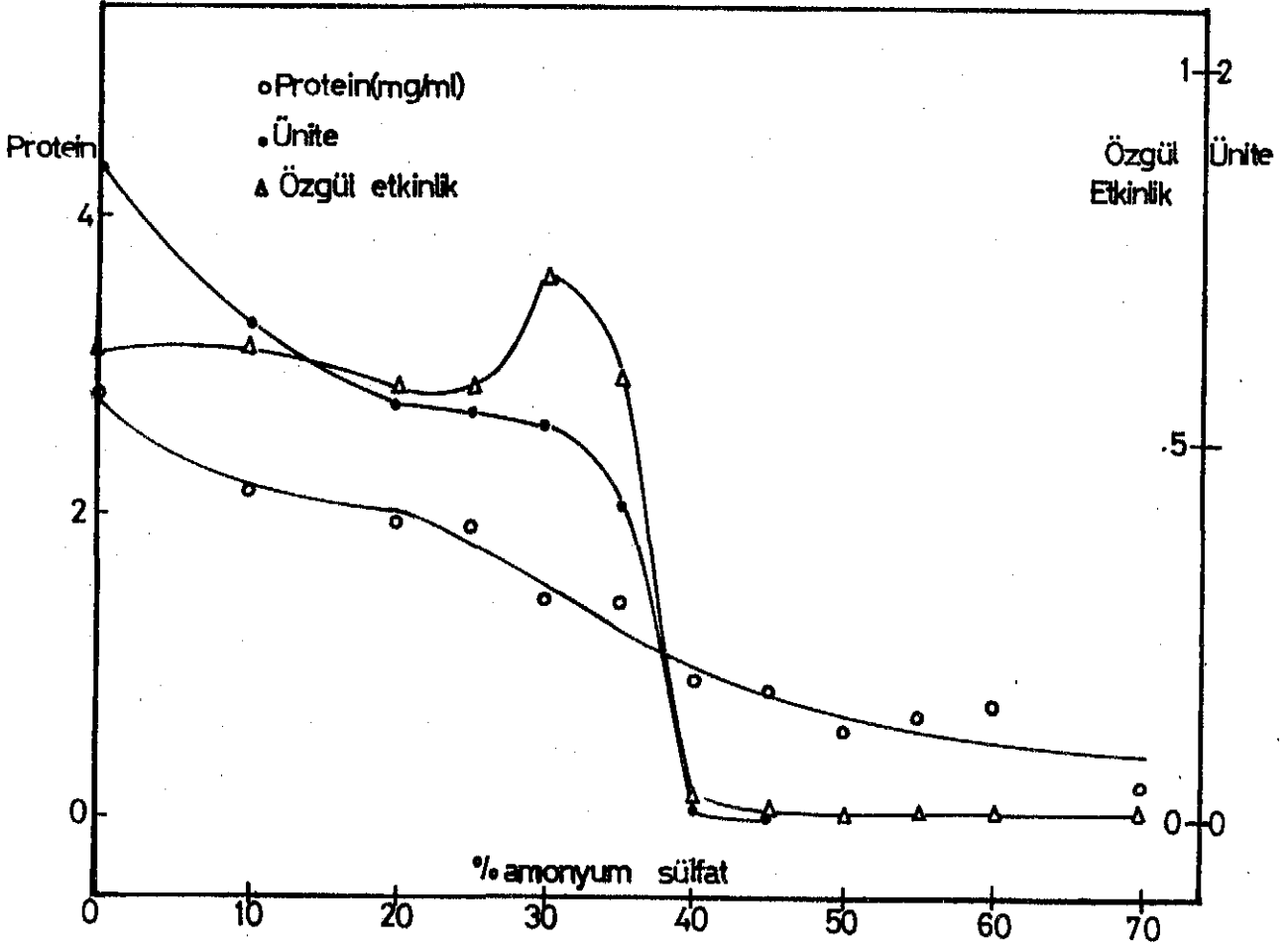
Homojenatın 105.00 X g de santrifüjü ile elde edilen dökültünün ammonyum sülfat kesitlemesi yapıldı. PDE etkinliğinin % 40-45 ammonyum sülfat doygunluğunda çöktüğü görüldü. Ancak toplam protein ve etkinlik çöküşleri birbirine paralel gittiğinden, % 25-35 ammonyum sülfat kesitinin dışında özgül etkinlikte belirgin bir artış sağlanamadı (Şekil 5).

Yüzde 0-50 ammonyum sülfat kesitinden elde edilen diyalizat sefadeks G-200 elemesine tabi tutulduğunda, hemen hemen ölü hacimde, tek etkinlik zirvesi çıktı (Şekil 6). Zirvedeki etkin proteinin molekül ağırlığı, yıkanma hacmi standart proteinlerin yıkanma hacmi ile karşılaştırılarak, 390.000 bulundu (Şekil 7).

Sefadeks G-200 kolonuna doğrudan 105.000 X g dökültüsü uygulandığında iki etkinlik zirvesi gözlemlendi (Şekil 8). Birinci zirvedeki etkin proteinin molekül ağırlığı 250.000, diğerinin ki ise 165.000 idi. İkinci zirvenin birinci zirvenin alt-birimlerinden bir veya birkaçını kaybederek oluştuğu düşüncesi ile birinci zirve tekrar aynı kolona uygulandı. Zirve yine aynı yıkanma hacminde geldi (Şekil 9).

Dökültü (105.000 X g) 4°C de 9 gün etkinliğinden hiçbirşey kaybetmeden saklanabildiği halde sefadeks G-200 yıkantıları -30°C de bir haftada etkinliklerinin yüzde ellisini kaybetti (Tablo 1).

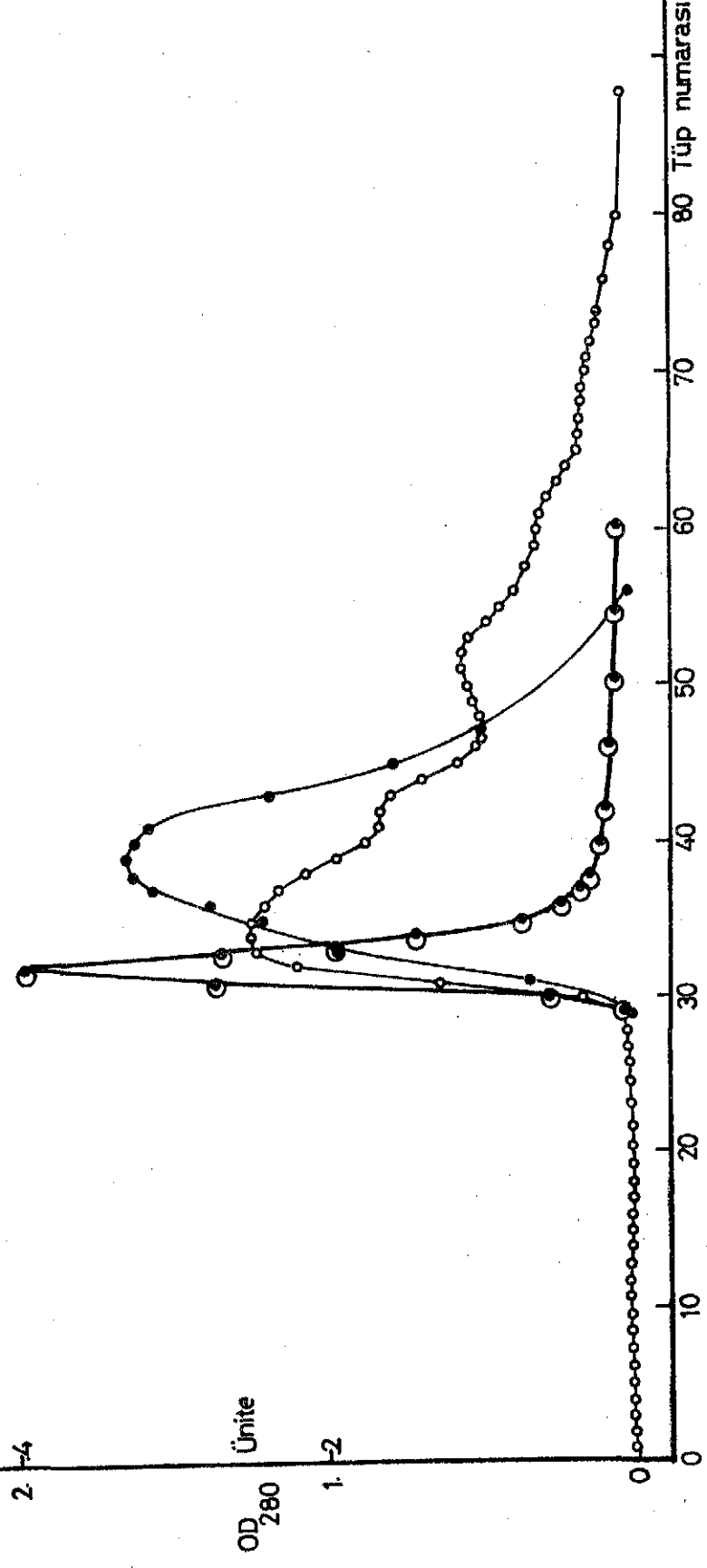
Şekil 5. Ultrasantrifüj (105.000 X g) dökültüsünde amonyum sülfat kesitlemesi: Dökültüde kalan protein (o—o); etkinlik (—●—●); özgül etkinlik (Δ—Δ).



Şekil : 5

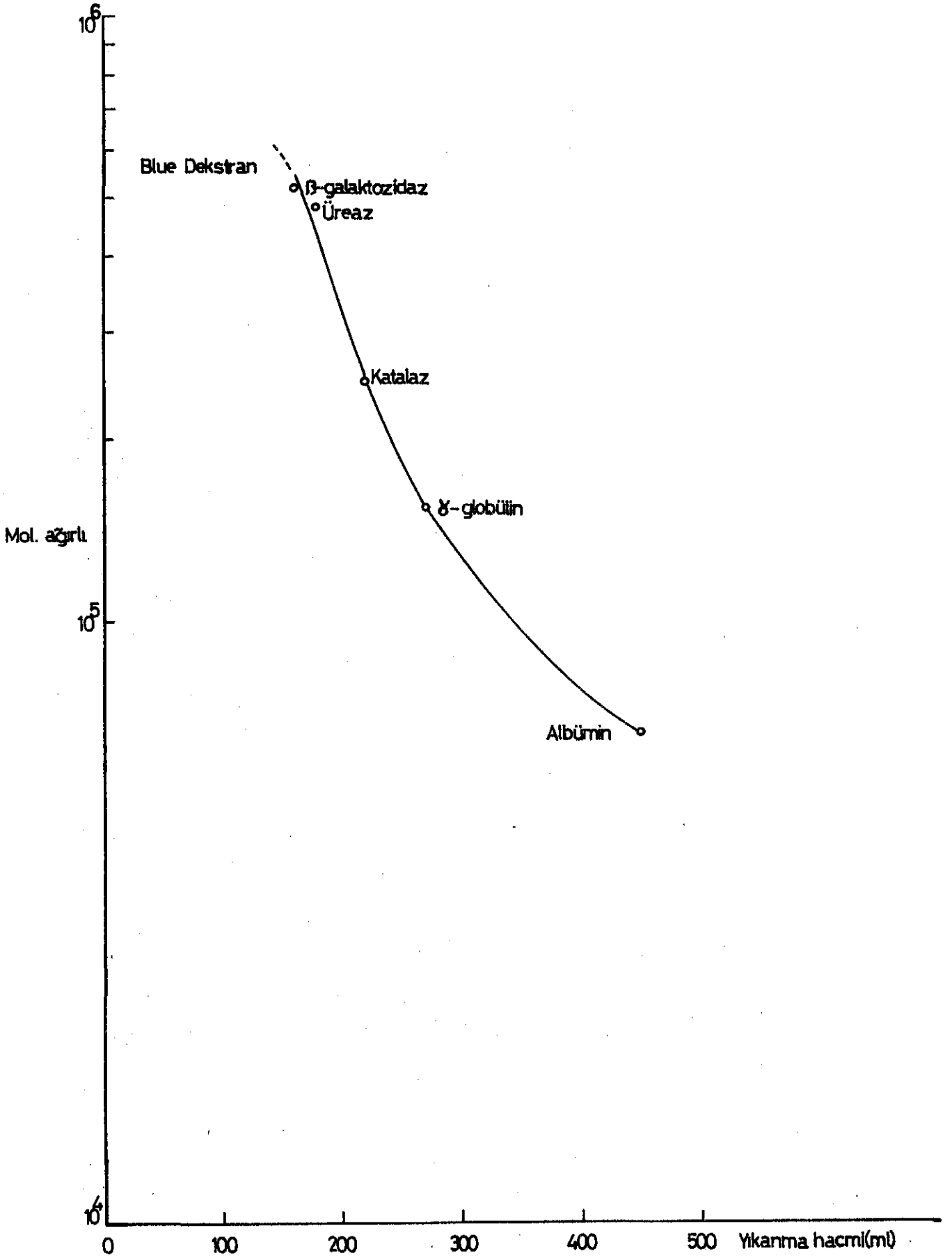
Şekil 6. Çözünür kesitteki PDE'in amonyum sülfat çökertmesinden sonra verdiği sefadeks G-200 profili. (●—●), Blue dekstran; (○—○), protein; (●—●), etkinlik. Kolon boyutları 2,5 X 100 cm. Uygulanan protein miktarı 134 mg (22 mg/ml). Akış hızı 12 ml/saat. Fraksiyon hacmi 5 ml.

- Blue dekstran
- Protein (OD<sub>280</sub>)
- Ünite



Şekil : 6

Şekil 7. Sefadex G-200 kolonunun bilinen proteinlerle standardizasyonu.



Şekil : 7

Şekil 8. Çözünür kesitin sefadeks G-200 profili. Kolon boyutları 2,5 X 100 cm. Uygulanan protein miktarı 350 mg (18 mg/ml). Akış hızı 15 ml/saat. Fraksiyon hacmi 4 ml.



- BLUE DEXTRAN
- ÜNİTE
- PROTEİN (OD<sub>280</sub>)

ÜNİTE

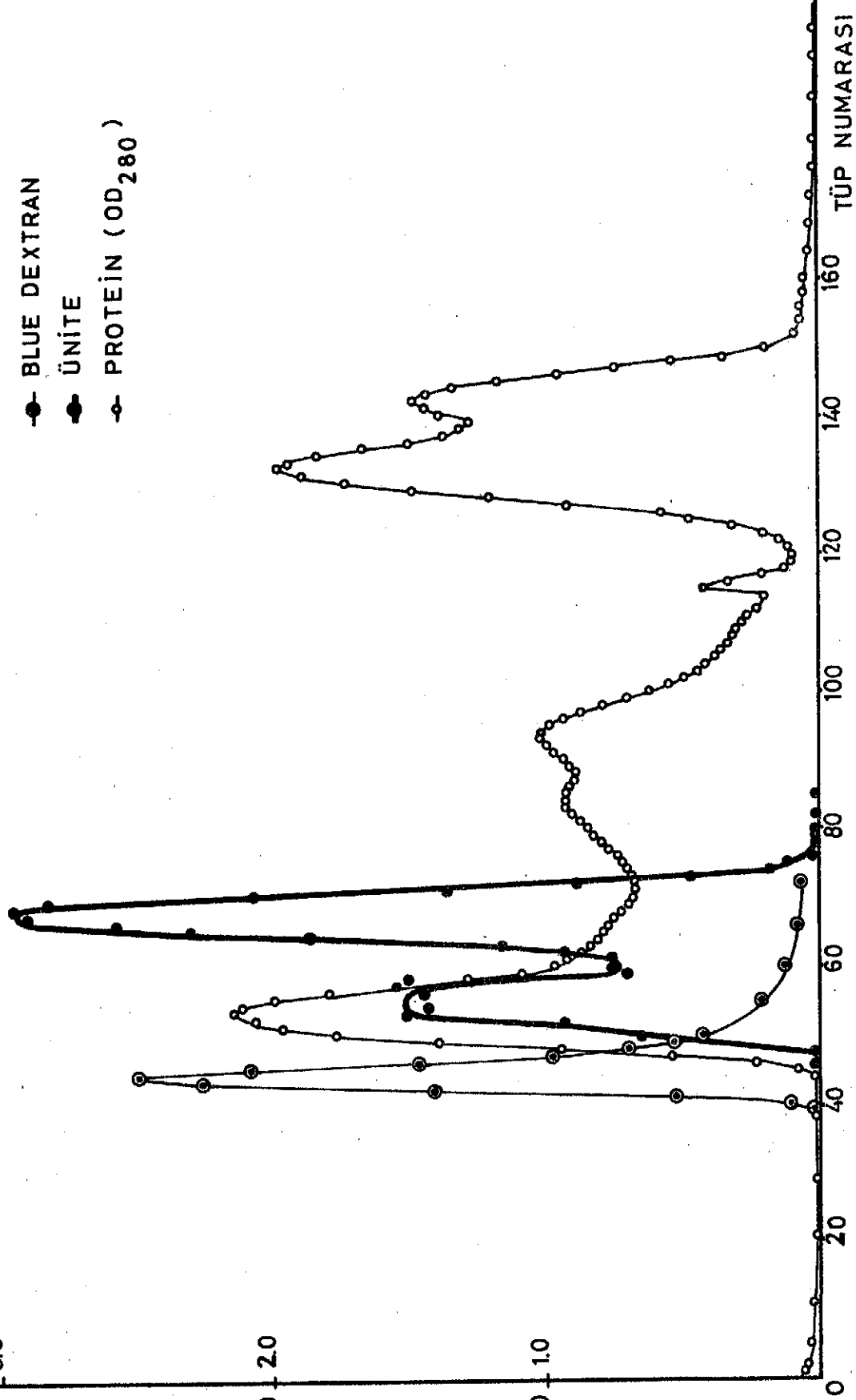
3.0

OD<sub>280</sub>

2.00

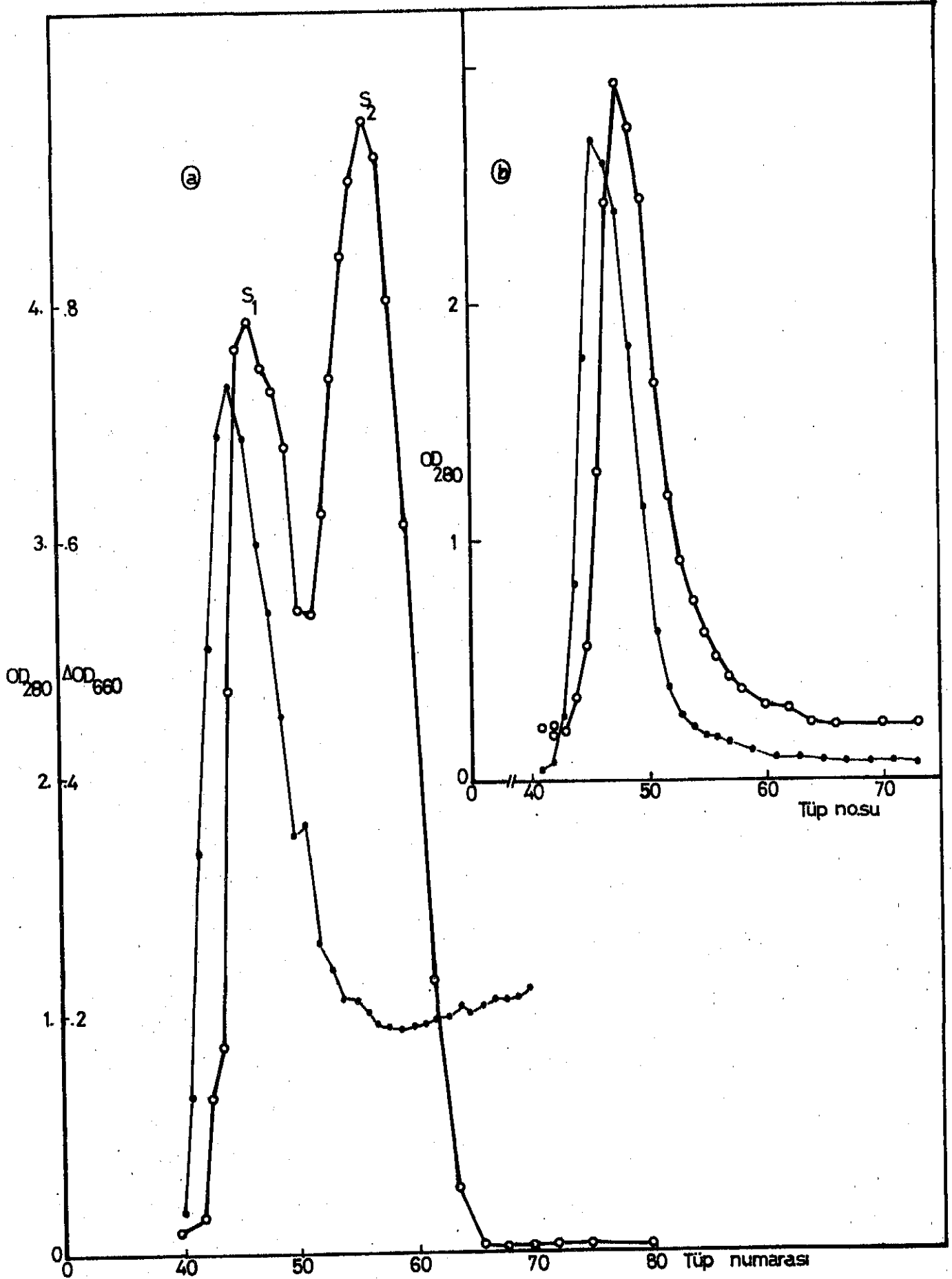
1.00

0



Şekil : 8

Şekil 9. Sefadex G-200'den elde edilen  $S_1$  sesitinin aynı kolona uygulandığında verdiği profil. (a) 195.000 X g dökültüsünün profili. (b)  $S_1$ 'in aynı kolona uygulandığında aynı yıkama şartları altında verdiği profil. (—○—), Protein; (—●—), etkinlik ( $\Delta OD_{660}$ ).



Şekil: 9

Tablo 1

Değişik Fosfodiesteraz Örneklerinde Güne Göre Etkinlik Değişimi.

Örnek	Derece (°C)	Zaman (gün)	Etkinlik ( $\Delta OD_{660}^{10'}$ )
105.000 X g dökültüsü (18 mg protein/ml)	4	0	0.353
		1	0.250
		6	0.311
		8	0.361
		9	0.317
Sefadeks Zirve I (S <sub>1</sub> ) (3mg protein/ml)	-30	1	0.265
		2	0.263
		6	0.152
Sefadeks Zirve II (S <sub>2</sub> ) (1mg protein/ml)	-30	1	0.322
		2	0.318
		6	0.145

Sefadex G-200 (Şekil 8) yıkantısının ikinci zirvesi liyotilizatör ile deriştirilerek pH 7,5'e dengelenmiş DEAE-selüloza uygulandı. Protein-etkinlik profili Şekil 10'da görölüyor. Kolonda enzim iki etkinlik zirvesi- ne ayrıldı ve yüzde 73 etkinlik verimi ile çıktı.

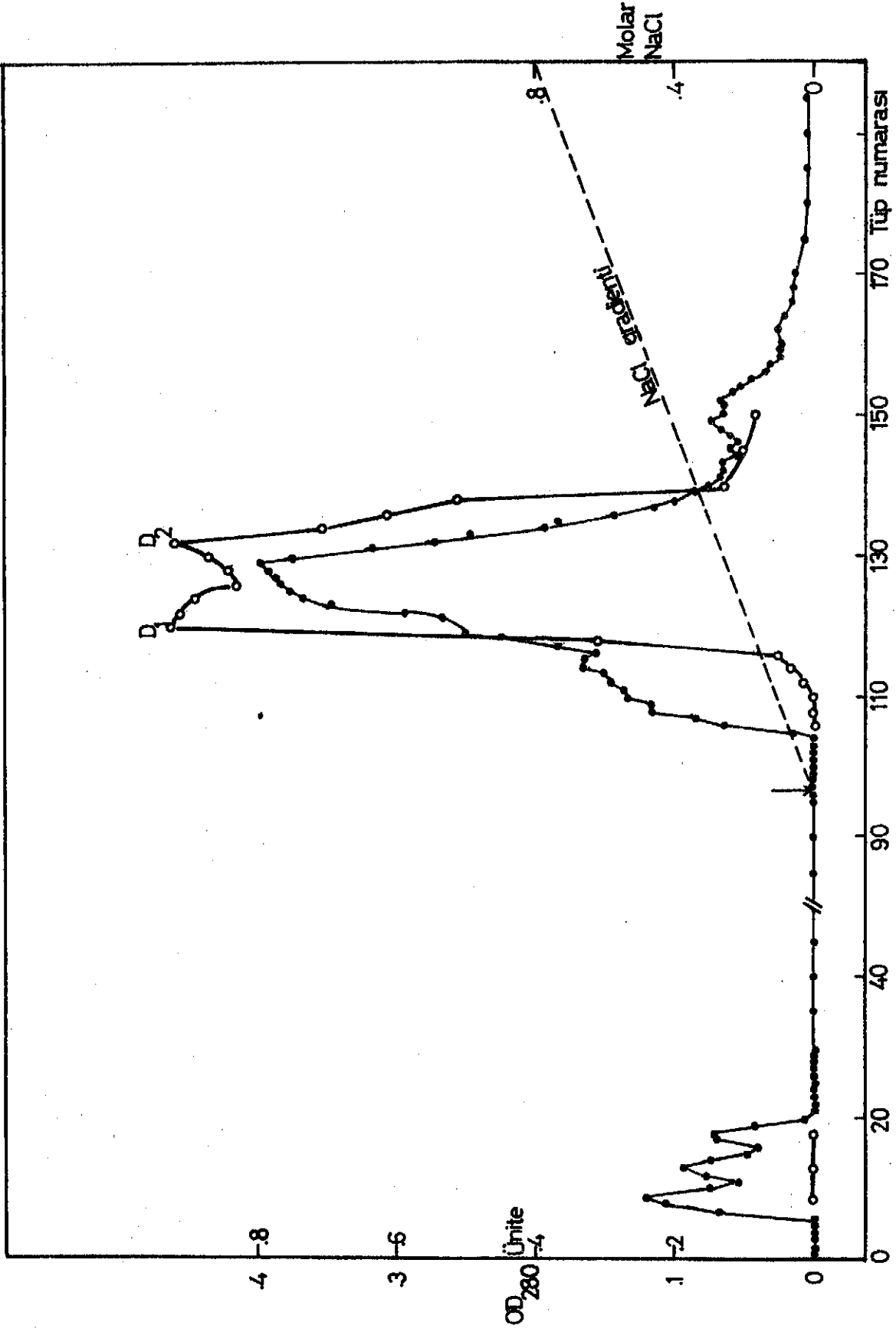
#### ETKİNLEYİCİ PROTEİNİN ÇEŞİTLİ KESİTLERE ETKİSİ

Etkinleyici proteinin etkisi saflaştırmanın çeşitli basamaklarında araştırıldı. Etkinleyicisiz saflaştırma oranı ile etkinleyicili saflaştırma oranı arasında 2 kezlik bir fark görüldü (Tablo II).

Etkinleştirici proteinin sefadex G-200 sonrası birinci etkinlik zirvesine etkisi, kullanılan etkinleştiri- rici derişim sınırları arasında, tam olarak karakterize edilemedi. Buna karşılık ikinci zirvenin etkinleyici tarafından etkinleştirilmesi parabolik bir eğri ile doygun- luğa ulaştı (Şekil 11).

Etkinleştirici protein birleştirilmiş DEAE-selüloz (pH 6,2) sonrası PDE zirvelerindeki etkinliği 2,3 kez arttırdı (Şekil 12). DEAE-Selüloz ile daha yüksek pH'da (7,5) yapılan kromatografi de ikin etkinlik zirvesi verdi. Birinci etkinleyici proteine tamamen duyarsızdı. İkinci zirve düşük etkinleyici derişimlerinde duyarsız olduğu halde etkinleyici derişimi arttıkça etkinleşme de arttı. Belli bir derişimden sonra etkinleşmede düşüş görüldü (Şekil 13).

Şekil 10. Sefadeks G-200'den elde edilen S<sub>2</sub> kesitinin DEAE-selüloz kromatografisi. (●—●), Protein; (○—○), etkinlik. Kolon boyutları 0.9 X 30 cm. Uygulanan protein miktarı 14 mg (2.55 mg/ml). Yıkama tamponu 25 mM tris. HCl, pH 7,5 1 mM MgCl<sub>2</sub>. Akış hızı 15 ml/saat.



Şekil : 10

Tablo II

Fosfodiesterazın Saflaştırılması.

Kesit	- Etkinleyici Protein		+Etkinleyici Protein	
	Özgül Etkinlik	Saflaştırma Oranı	Özgül Etkinlik	Saflaştırma Oranı
Homojenat	0.49	1	0.49	1
105.000Xg <sup>a</sup>	0.75	1.5	0.75	1.5
Sefadeks <sup>b</sup> S <sub>1</sub>	0.80	1.6	-	-
G-200 S <sub>2</sub>	1.7	3.5	5.9	12
DEAE-selüloz <sup>c</sup>	7.5	15	17	35
Yıkantısı				

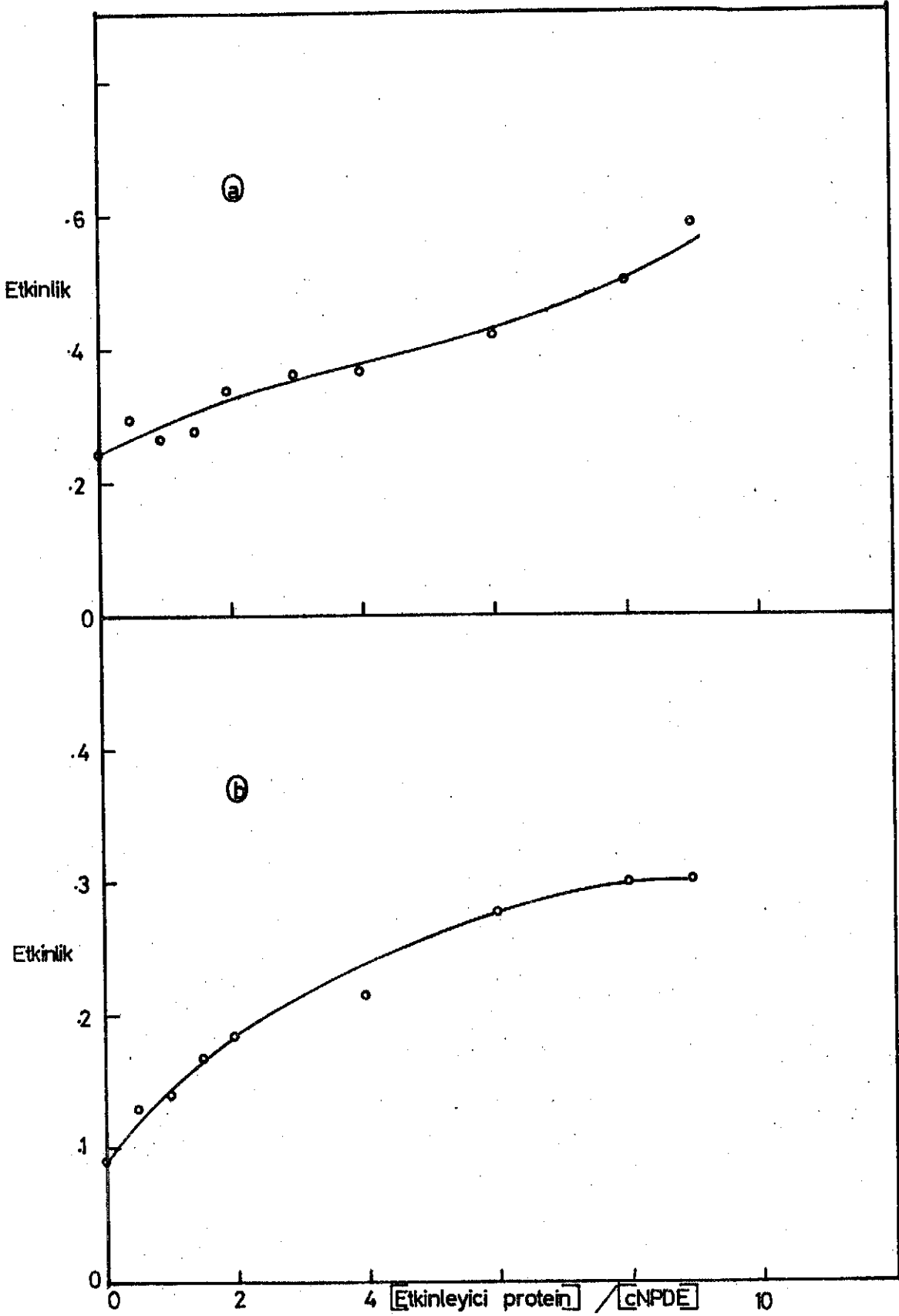
<sup>a</sup> PDE etkinliğinin % 63'ü çözümlenir kesitte bulundu.

<sup>b</sup> Sefadeks elemesinde verim % 80-100

<sup>c</sup> DEAE-Selülozda verim % 50-76

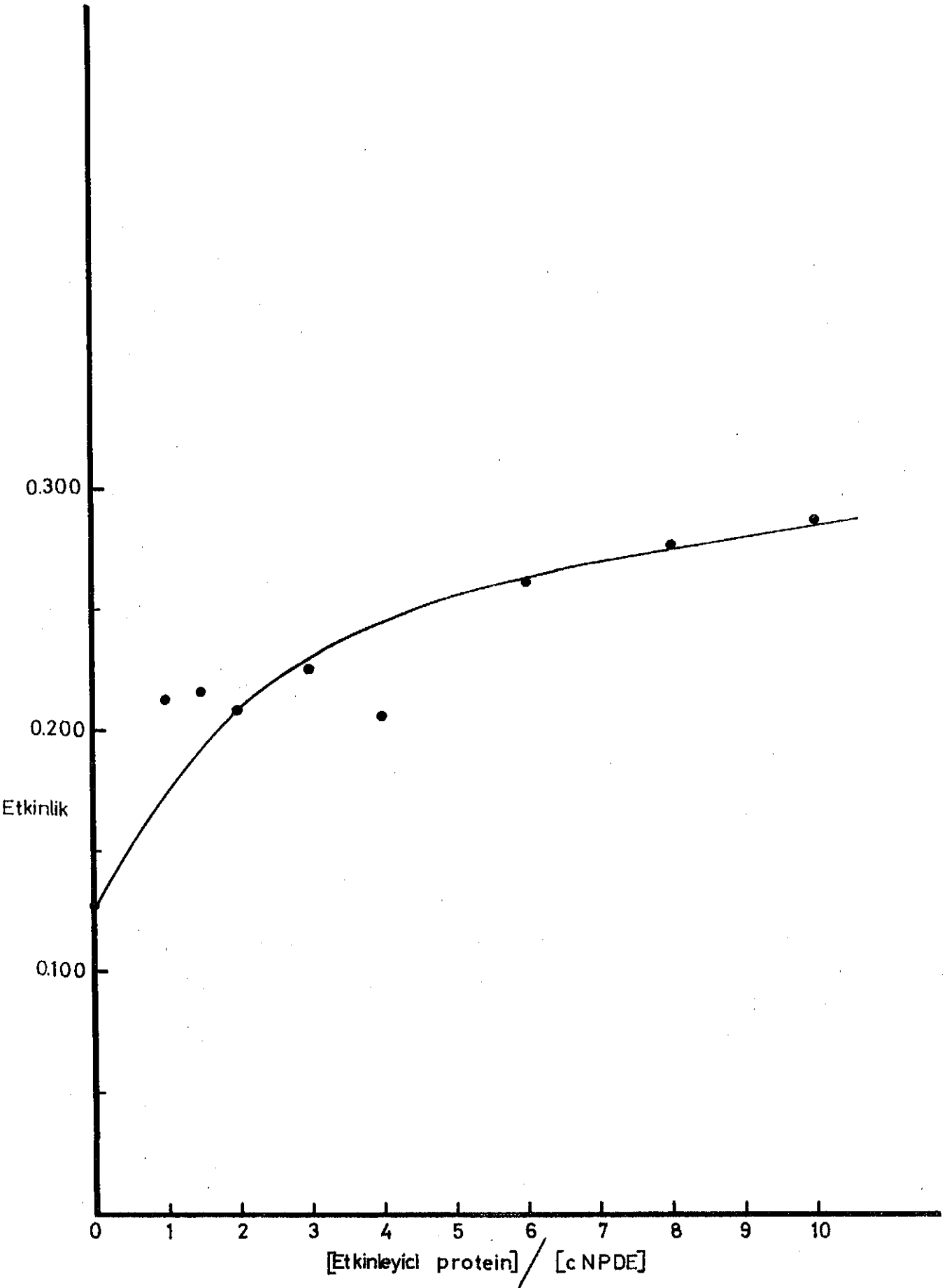


Şekil 11. Sefadex G-200 S<sub>1</sub> ve S<sub>2</sub> kesitlerinin etkinleyici proteine duyarlılığı. (a) S<sub>1</sub>, (b) S<sub>2</sub>. Etkinlik  $\Delta OD_{660}$ . Protein tayin metodu Lowry. ( PDE 1 mg protein/ml inkübasyon karışımı)



Şekil : 11

Şekil 12. DEAE-selüloz (pH 6,2) sonrası PDE etkinliğinin etkinleyici proteine duyarlılığı. Etkinlik  $\Delta OD_{660}^{30'}$ .  
( PDE 50  $\mu$ g protein/ml inkübasyon karışımı)



Şekil :12

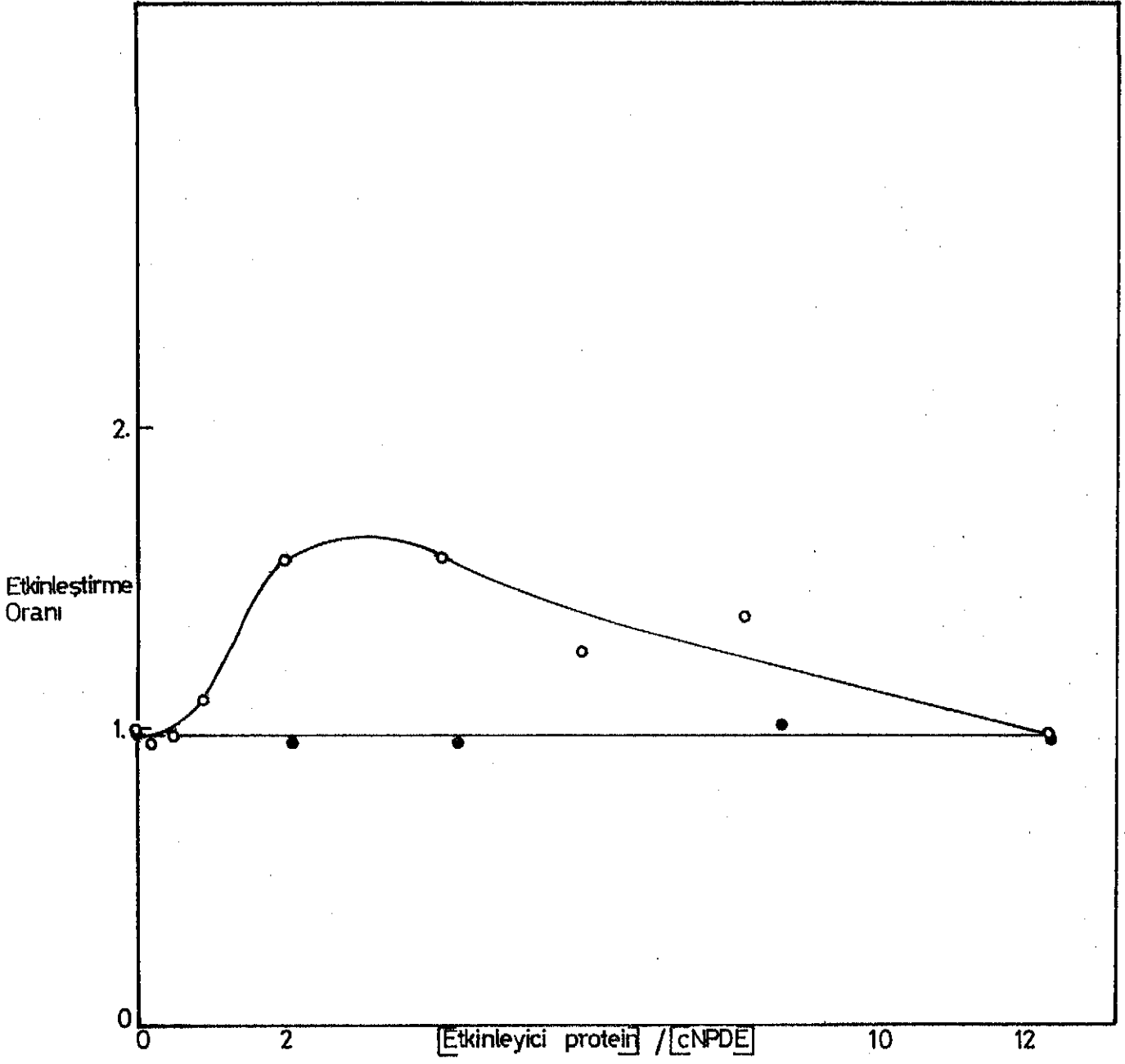
Şekil 13. DEAE-selüloz (pH 7,5) sonrası D<sub>1</sub> ve D<sub>2</sub> kesitlerinin etkinleyici proteine duyarlılığı. (●—●), D<sub>1</sub>; (○—○), D<sub>2</sub>. Etkinleştirme oranı=

$$\text{Etkinlik} \left[ \frac{\text{EP}}{\text{cNPDE}} \right] = x$$

---

$$\text{Etkinlik} \left[ \frac{\text{EP}}{\text{cNPDE}} \right] = 0$$

( PDE 40 µg protein/ml inkübasyon karışımı)



Şekil : 13

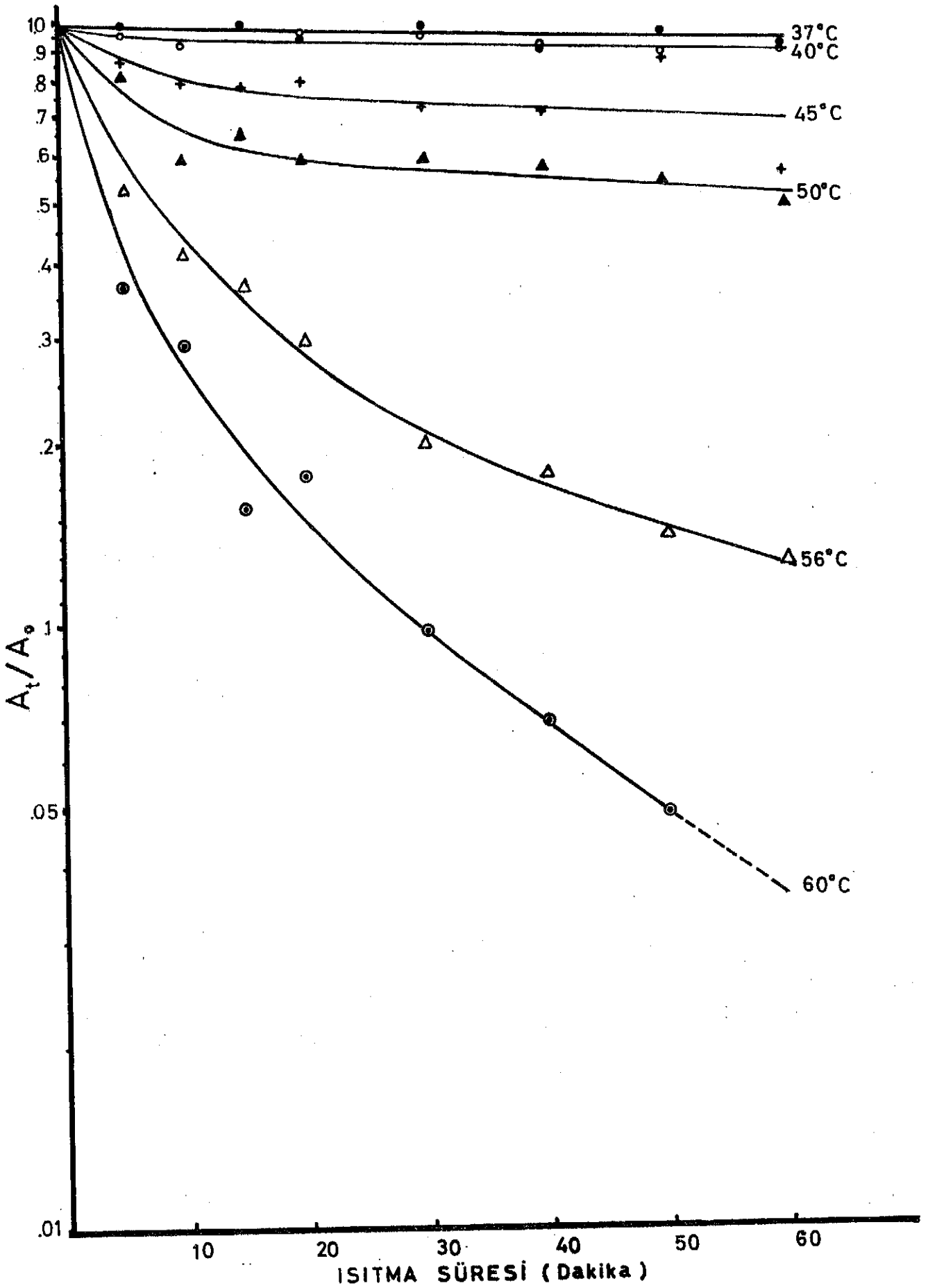
### ISININ FOSFODİESTERAZ ETKİNLİĞİ ÜZERİNE ETKİSİ

Değişik sıcaklıklarda 105.000 X g dökültüsü ısıtıldığına zamana bağlı değişik etkinlik bozunum özellikleri görüldü (Şekil 14). Enzim 37-40°C'de bir saat etkinliğinin tamamını koruduğu halde, sıcaklık arttıkça enzim bozunum hızı da arttı. Etkinliğin 60°C'deki düşüş hızının iki birleşenli birinci derece kinetiğine uyduğu görüldü (Şekil 15). Birinci birleşenin ısı bozunum yarı-ömrü 2,5 dakika, ikincinin ise 20 dakika idi. Dökültü Centriflo filtreleri ile deriştirildiğinde her iki birleşenin de yarı-ömrü kısaldı, birinci birleşen için 0,9 dakika, ikinci birleşen için ise 7 dakika oldu (Şekil 16).

Sefadex G-200 sonrası etkinlik zirvelerinin ısıya dayanıklılıkları oldukça farklı idi. Birinci zirvenin ısıya dayanıklılığı doğrudan ölçüldüğünde 105.000 X g dökültüsüne benzer bozunum özellikleri görüldü. Bozunum, iki birleşenli birinci derece kinetiğine uydu Birinci birleşenin bozunum yarı-ömrü 0,7 dakika, ikinci birleşenininki ise 8 dakika bulundu (Şekil 17). İkinci sefadex G-200 zirvesi de bifazik birinci derece kinetiği gösterdi. İkinci zirvenin çabuk bozulan birleşeni, 105.000 X g dökültüsü ve birinci zirvenin birinci birleşenlerinkine yakın bir yarı-ömürle (0,9 dakika) bozundu. İkinci birleşen ise ısıya daha dayanıklı idi ve 14 dakikalık bir yarı-ömürle bozunduğu görüldü (Şekil 18).

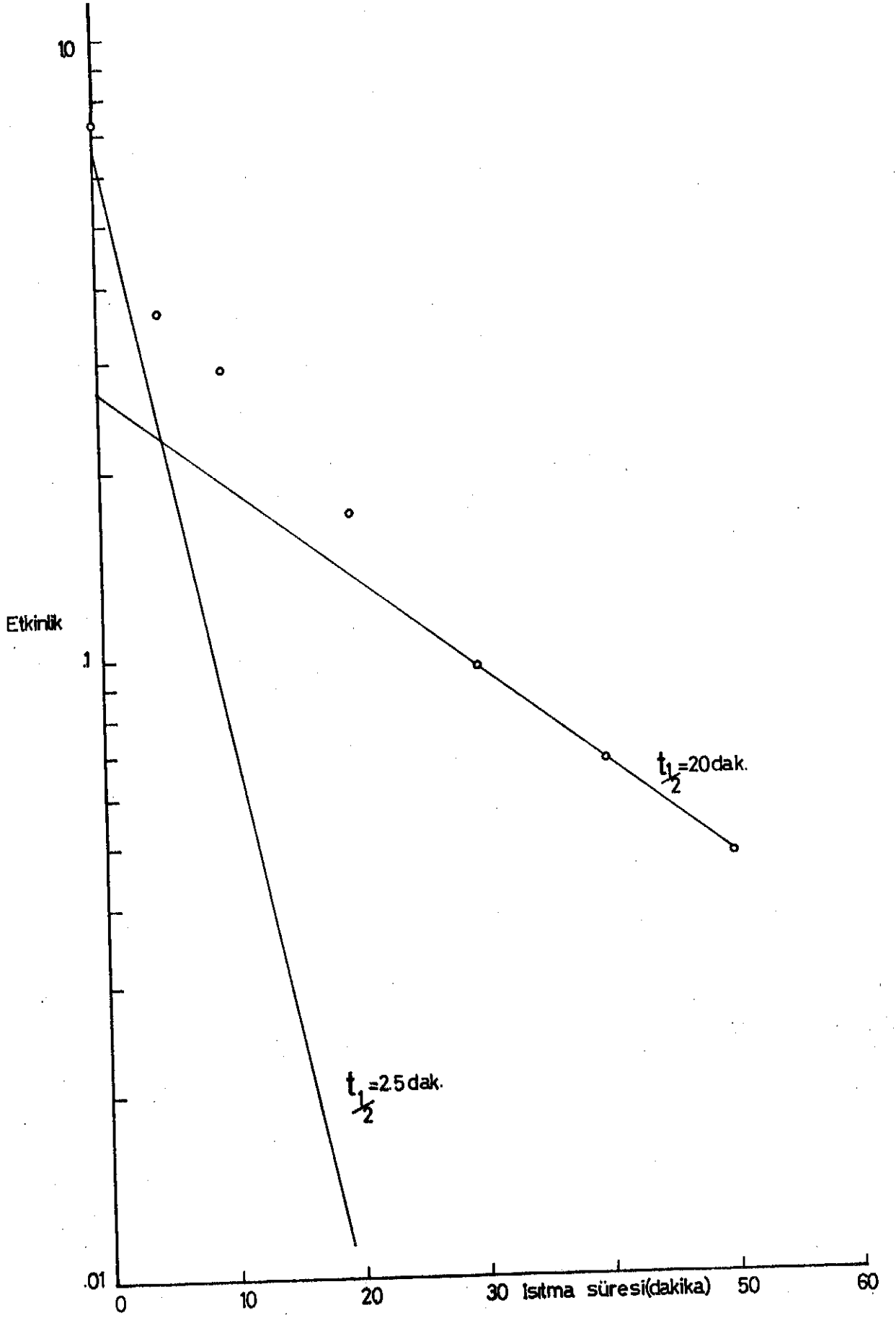
Şekil 14. Çözünür kesitte (105.000 X g dökültüsü) PDE etkinliğinin değişik sıcaklıklarda zamana bağlı bozunumu.  
 $A_t$ , Etkinlik.





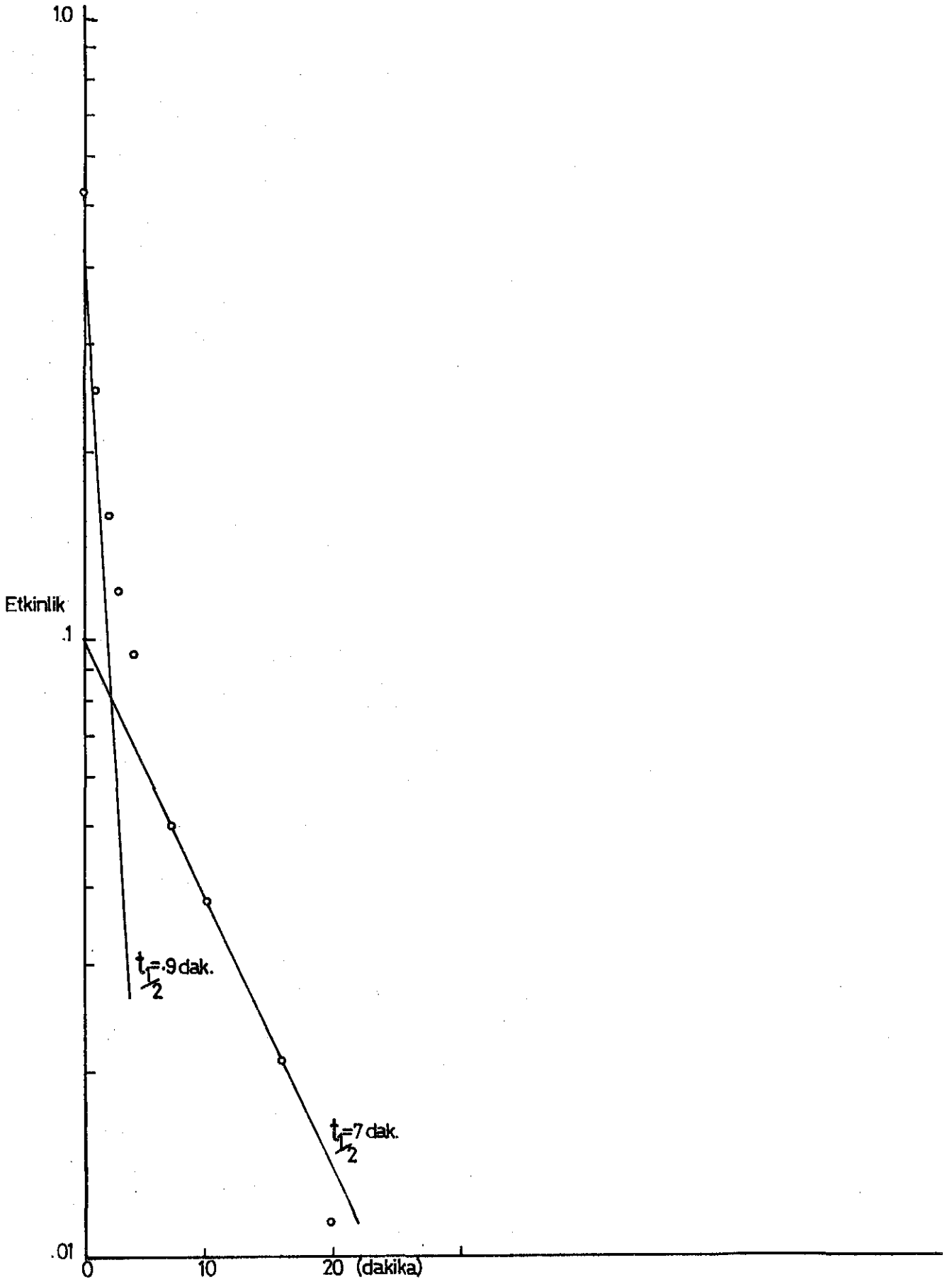
Şekil:14

Şekil 15. Çözünür kesitteki PDE'ın 60°C de verdiği  
hozunun eğrisinin birinci dereceli birleşenleri.



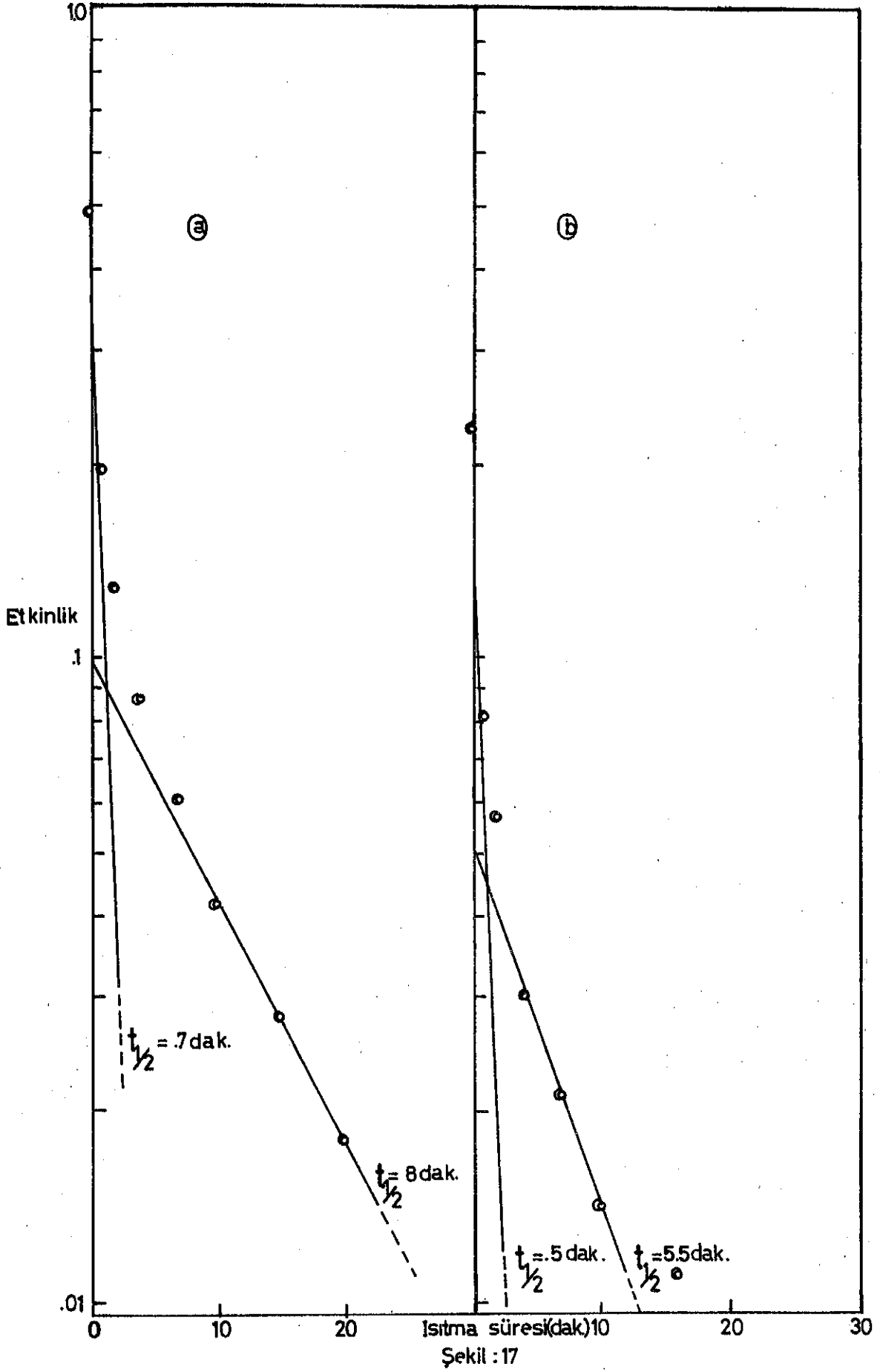
Şekil :15

Şekil 16. Centriflo ile deriştirilmiş 105.000 X g  
dökültüsünün 60°C de verdiği PDE ısı-bozunum eğrisi ve  
birinci dereceli birleşenleri.



Şekil : 16

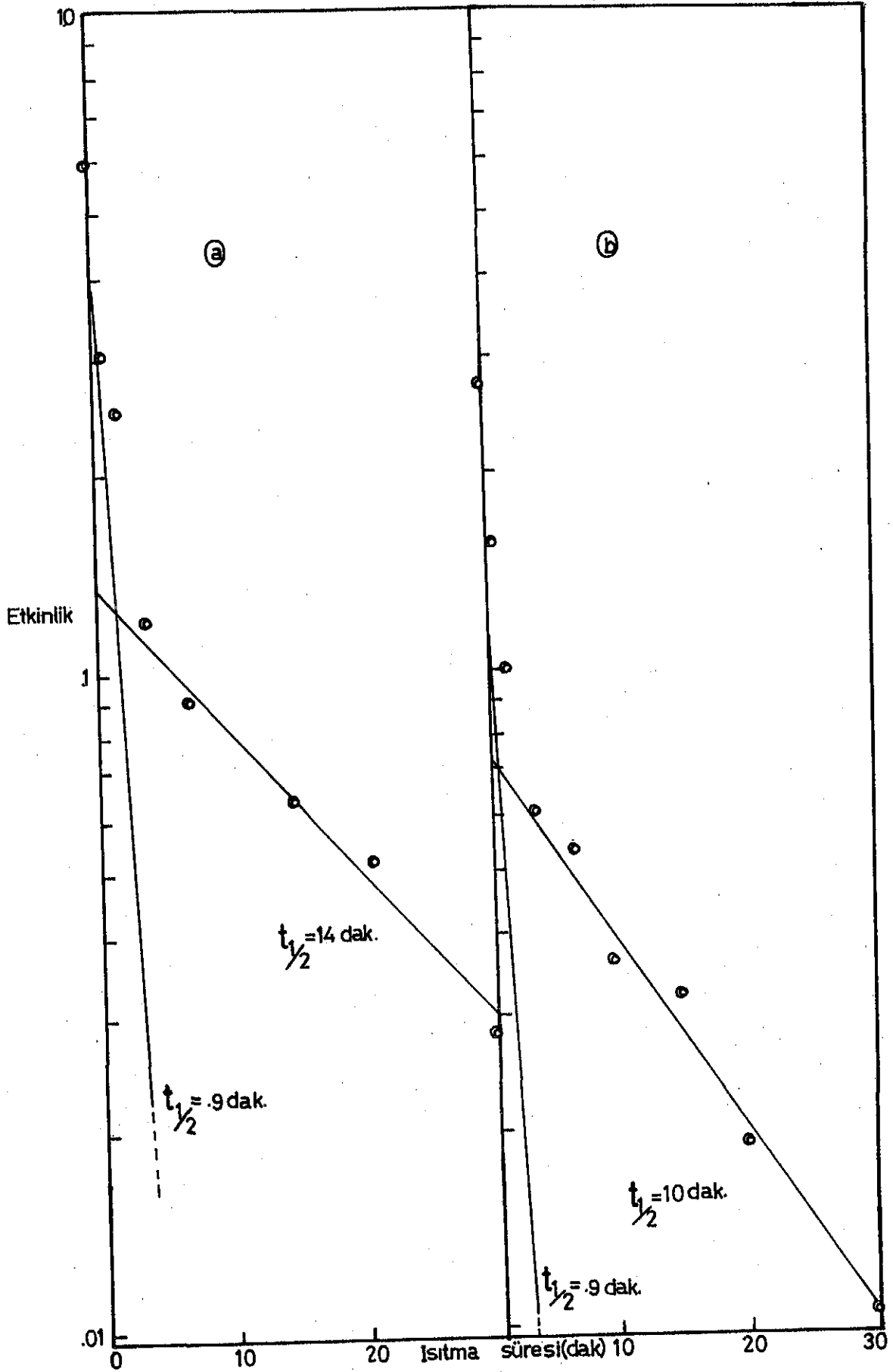
Şekil 17. Sefadeks G-200  $S_1$  kesitinin  $60^{\circ}\text{C}$  de verdiği ısı-bozunum eğrisi ve birinci dereceli birleşenleri. (a)  $S_1$ .  
(b)  $1/3 S_1$ .



Şekil : 17

Şekil 18. 17 gibi;  $S_1$  yerine  $S_2$ .





Şekil : 18

Sefadeks G-200 sonrası zirvelerinin ısı-bozunum kinetiklerinin aynı zamanda

$$\frac{-d \text{ (Etkinlik)}}{d \text{ (Zaman)}} = k' \text{ (Etkinlik)}^2$$

cinsinden ikinci dereceden bir olaya da uyduğu görüldü. Hız sabitleri ( $k'$ ) birinci zirve için  $2,3 \text{ OD}^{-1} \text{ dakika}^{-1}$ , ikinci zirve için  $1,1 \text{ OD}^{-1} \text{ dakika}^{-1}$  idi (Şekil 19). Zirvelerdeki protein üç kez seyreltiğinde sabitler sıra ile 6,94 ve 2,75'e yükseldi (Şekil 20).

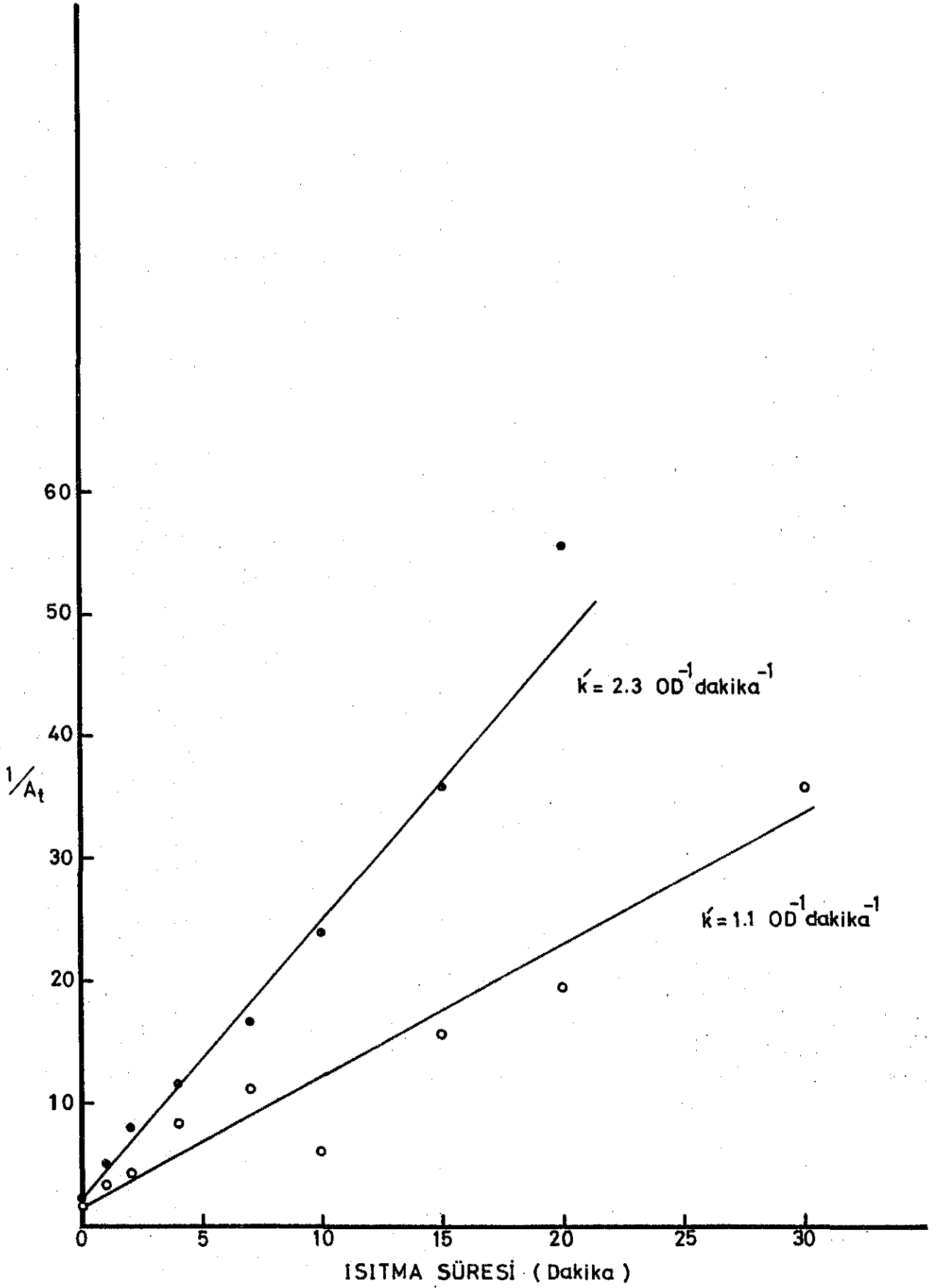
#### KINETİK ÇALIŞMALARI

Sefadeks G-200 yıkantısı zirve I, II ( $S_1, S_2$ ) ve DEAE-selüloz (pH 6,2) tuz yıkantısı zirve I, II ( $D_1, D_2$ ) ile yapılan kinetik çalışmaların sonuçları Tablo III'de görülmektedir. Her üç tepkiyen (cAMP, cGMP ve cUMP) için dört zirve de monofazik sonuçlar verdi.

Tablo III'ten görüldüğü gibi  $S_1$  zirvesinin en iyi cUMP'yi daha sonra sırayla cAMP ve cGMP'yi bağıladıği halde en iyi cGMP'yi yarısı kadar bir hızla cAMP'yi ve 7 kez düşük bir hızla da cUMP'yi parçaladıği bulundu (Şekil 21).

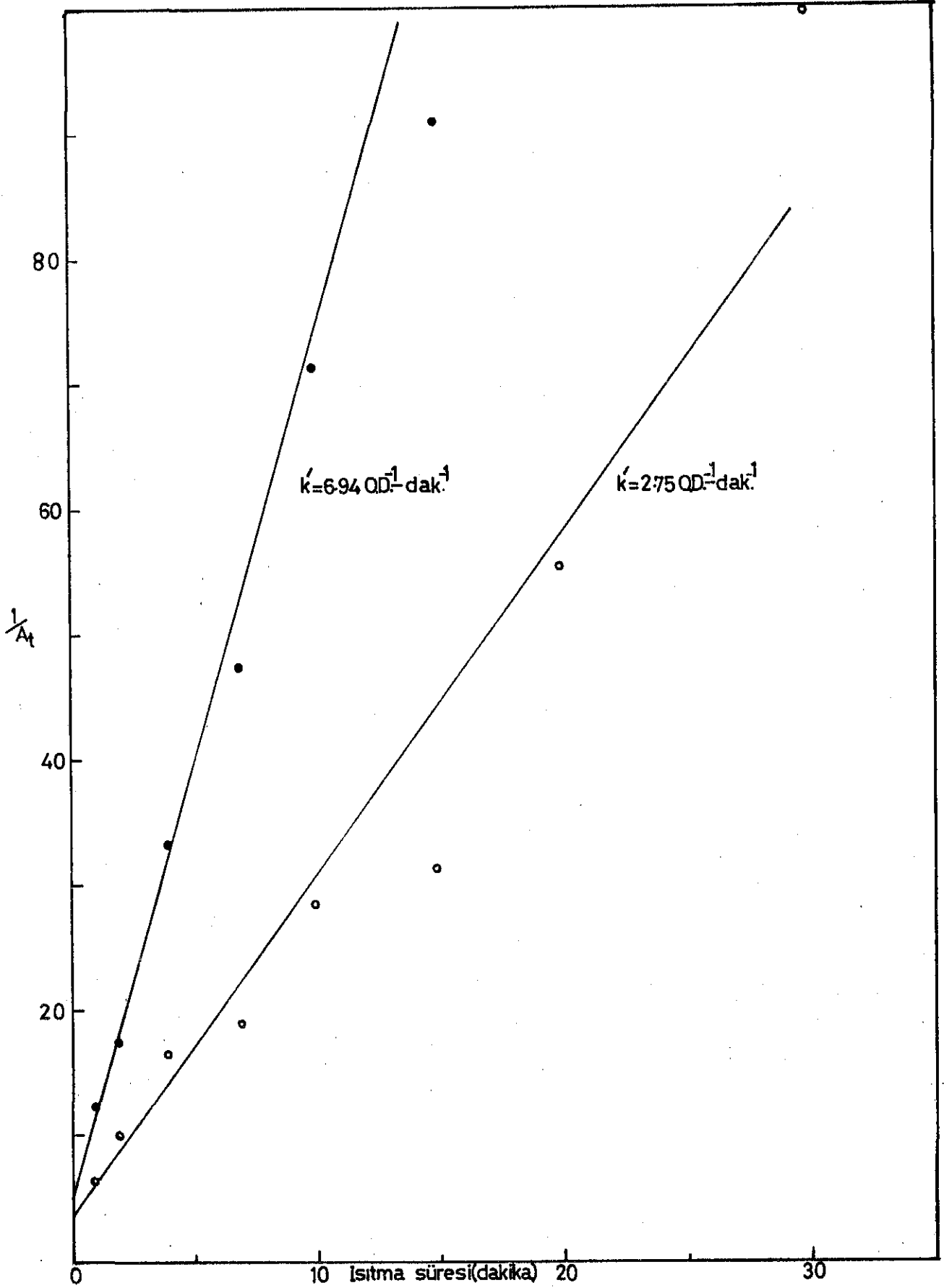
$S_2$  zirvesi ise cGMP'yi cAMP'den 4 kez daha fazla bağıladıği halde cAMP'yi cGMP'den 1,3 kez daha hızlı yıktığı görüldü. Gözlenebildiği kadarı ile  $S_2$  zirvesi cUMP'yi ne bağıladı, ne de parçaladı (Şekil 22).

Şekil 19. Sefadeks G-200  $S_1$  kesitinin  $60^\circ\text{C}$  de verdiği ısı-  
bozunum kinetiğinin ikinci dereceden analizi. (●—●)  
 $S_1$ ; (○—○)  $S_2$ .



Şekil : 19

Şekil 20. 19 gibi;  $S_1 \times 1/3 : S_2 \times 1/3$



Şekil : 20

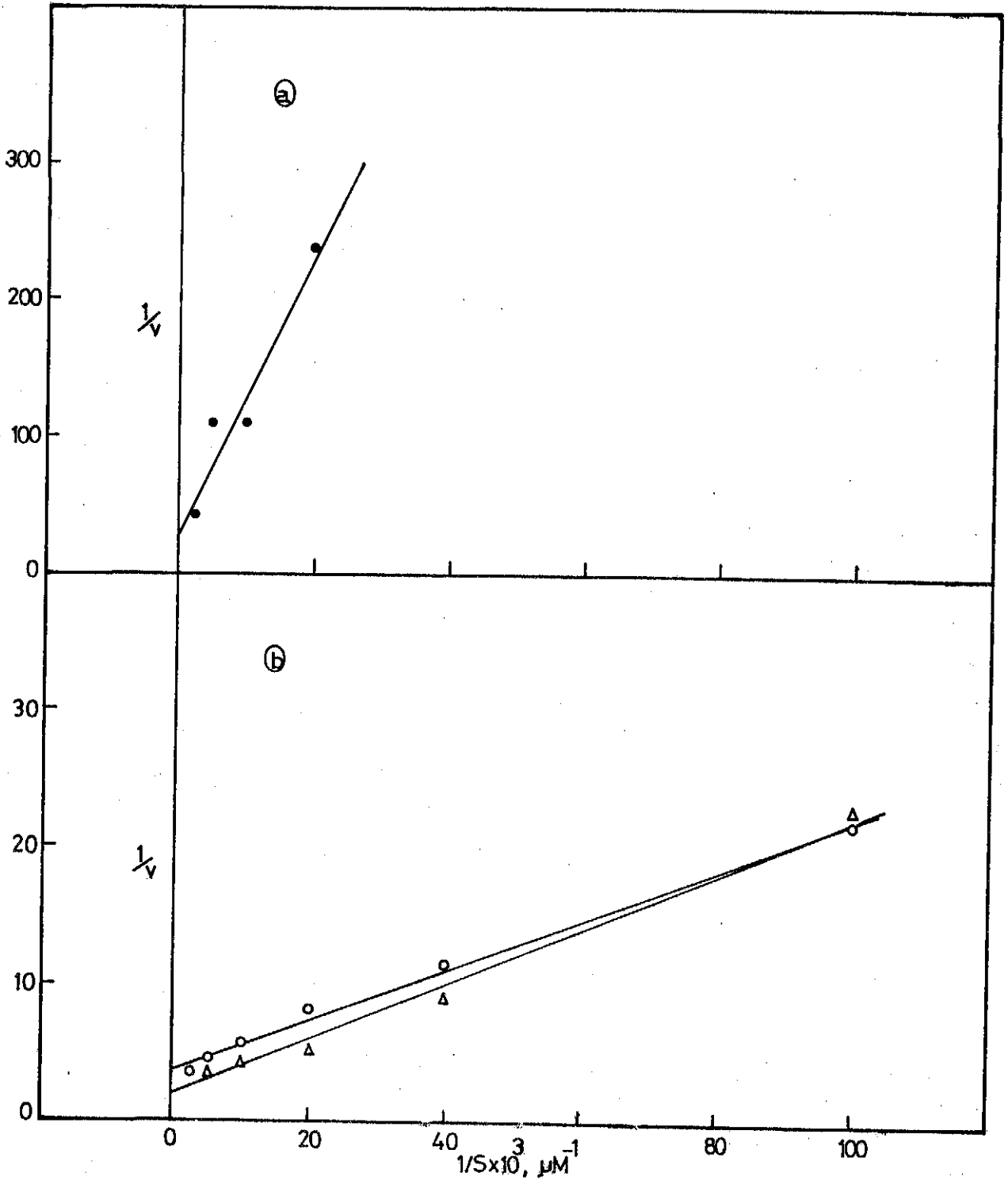
Tablo III

Değişik Fosfodiesteraz Kesitlerinin Kinetik Parametreleri.

Tepkiyen	Sefadeks G-200 sonrası				DEAE-selüloz sonrası			
	S <sub>1</sub>		S <sub>2</sub>		D <sub>1</sub>		D <sub>2</sub>	
	K <sub>m</sub> (M)	V <sub>m</sub>	K <sub>m</sub> (M)	V <sub>m</sub>	K <sub>m</sub> (M)	V <sub>m</sub>	K <sub>m</sub> (M)	V <sub>m</sub>
cAMP	4,9X10 <sup>-5</sup>	2,7	2,5X10 <sup>-4</sup>	3.1	2,1X10 <sup>-4</sup>	0.54	9,8X10 <sup>-5</sup>	0.75
CGMP	9,6X10 <sup>-5</sup>	4,8	6,1X10 <sup>-5</sup>	2,3	3.0X10 <sup>-5</sup>	0.23	2,6X10 <sup>-5</sup>	0.16
cUMP	3,5X10 <sup>-5</sup>	0.35	-	-	2,9X10 <sup>-4</sup>	0.096	2,8X10 <sup>-4</sup>	0.047
					2,8X10 <sup>-6</sup>	0.020	1.0X10 <sup>-5</sup>	0.0053

Şekil 21. Sefadeks G-200 S<sub>1</sub> kesitinin kinetik özellikleri.  
(a) cUMP ile elde edilen Lineweaver-Burk çizgisi. (b) cAMP  
(-o—o-) ve cGMP (-Δ—Δ) ile elde edilen L-B çizgileri.



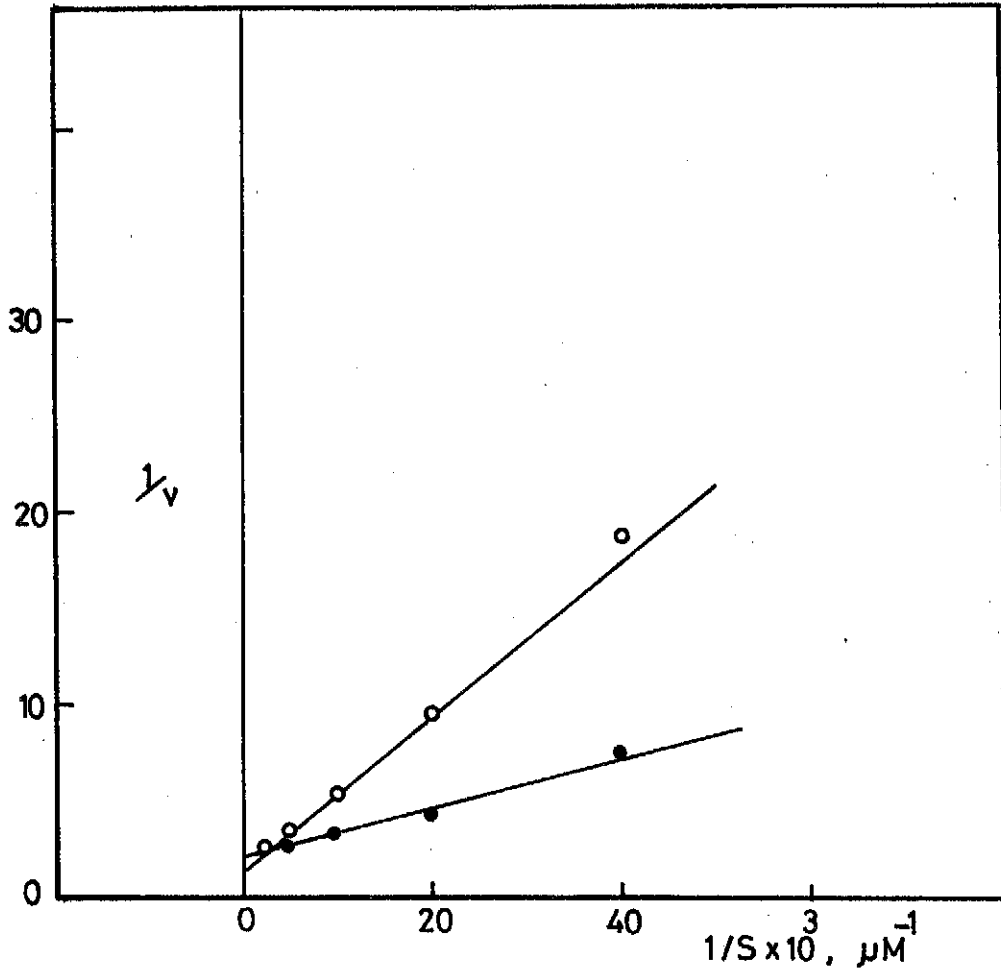


Şekil : 21

Şekil 22. Sefadeks G-200 S<sub>2</sub> kesitinin kinetik özellikleri.

(-o—o-), cAMP ile elde edilen Lineweaver-Burk çizgisi;

(-●—●-), cGMP ile elde edilen L-B çizgisi.



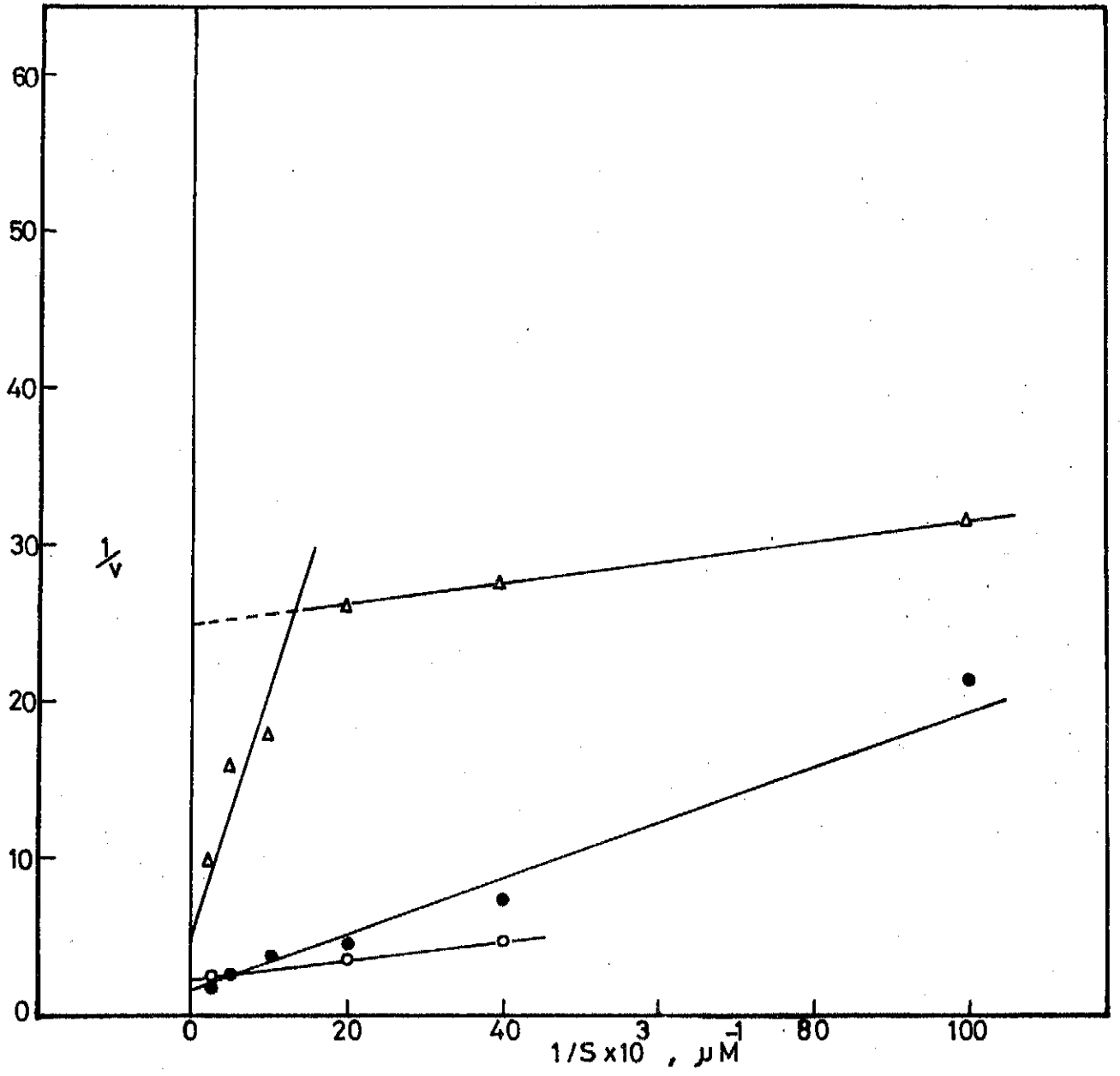
Şekil : 22

DEAE-selüloz yıkantısı  $D_1$  ve  $D_2$  zirveleri cAMP ve cGMP'yi monofazik, cUMP'yi ise bifazik bir davranışla parçaladı.  $D_1$  zirvesi cGMP'yi cAMP'den 8 kez daha iyi bağladığı halde cAMP'yi cGMP'den 2,34 kez daha iyi yıktığı görüldü (Şekil 23).  $D_1$  zirvesinin cUMP için iki farklı  $K_m$  değeri içerdiği ve birinin diğerinden 100 kez daha fazla olduğu gözlemlendi. cUMP'yi 100 kez daha iyi bağlayan etkin bölge cUMP'yi 5 kez daha düşük bir hızla yıkabiliyordu.

$D_2$  zirvesinde  $D_1$  gibi cGMP'yi cAMP'den daha iyi bağlıyor fakat cAMP'yi daha yüksek bir hızla (4,6 kez) yıkıyordu (Şekil 24).  $D_2$  de  $D_1$  gibi cUMP için iki ayrı  $K_m$  değeri içeriyordu. Bunlardan birisi diğerinden 3 kez daha yüksekti. Bağlama yeteneği 3 kez daha düşük olan etkin bölge ise cUMP'yi 9 kez daha iyi kırılmaktaydı.

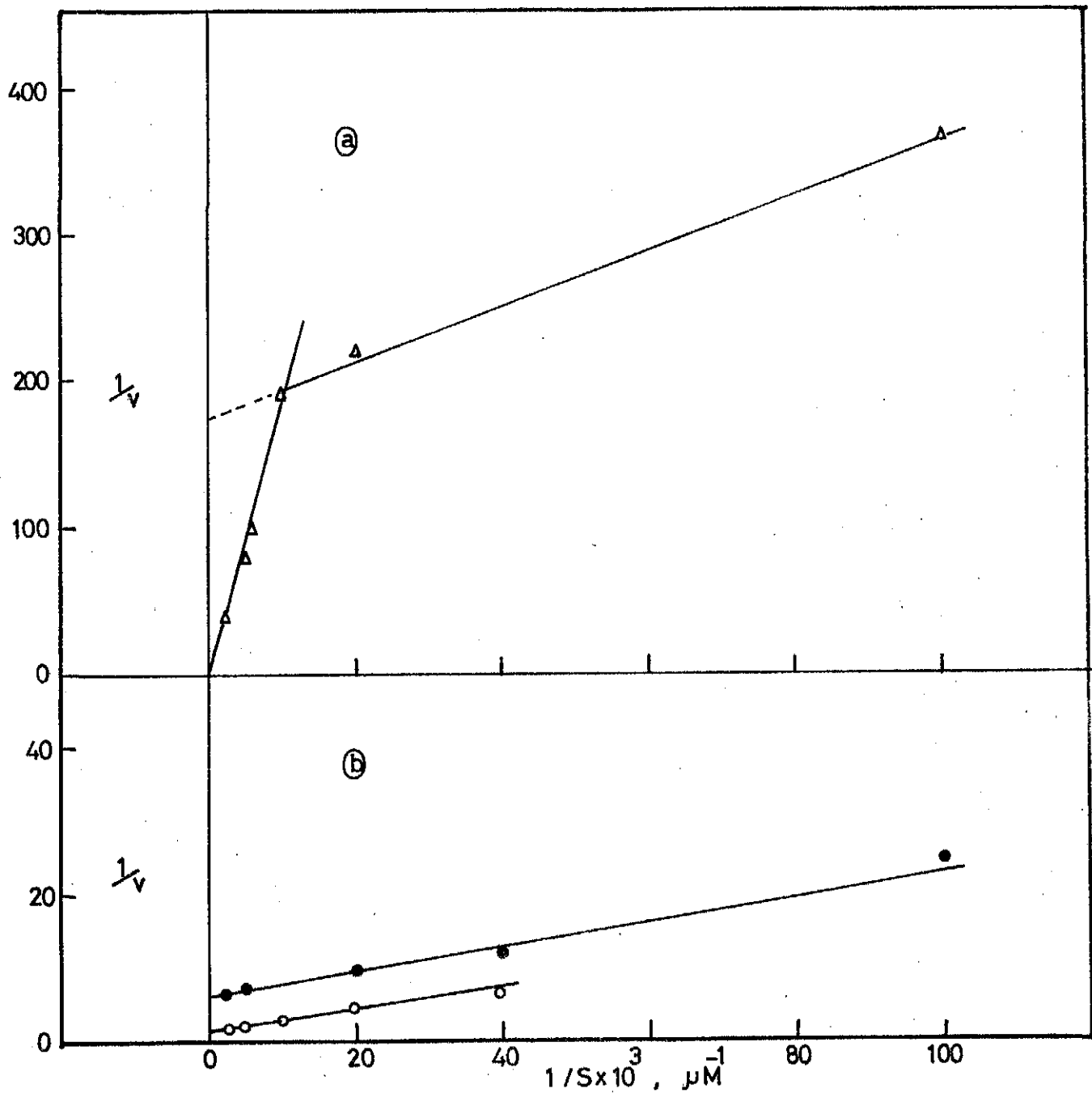
$K_m$  ve  $V_m$  değerleri "least squares" yöntemi kullanılarak hesaplandı.

Şekil 23. DEAE-selüloz (pH 6,2) D<sub>1</sub> kesitinin kinetik özellikleri. (Δ—Δ), cUMP; (●—●), cAMP ve (o—o), cGMP ile elde edilen L-B çizgileri.



Şekil : 23

Şekil 24. DEAE-selüloz D<sub>2</sub> kesitinin kinetik özellikleri.  
(a) cUMP'nin L-B eğrisi. (b) cAMP (—o—o) ve cGMP  
(—●—●) nin L-B çizgileri.



Şekil : 24



## Tartışma

Değişik Dokularda yapılan çalışmalardan siklik nükleotid fosfodiesterazın birden fazla şekli olduğu anlaşılmaktadır<sup>65</sup>. Kakuichi ve arkadaşları sıçan beyni çözünür kesitinden Sefaroz 6-B elemesiyle cAMP'ye çekicilikleri farklı iki ayrı etkin protein elde ettiler<sup>51</sup>. Rosen, kurbağa alyuvarı çözünür kesitini sefadeks G-200'den geçirdi; birincisi 200.000, ikincisi 100.000 molekül ağırlığında ve ikincisi cAMP'ye oldukça özgül olan iki çeşit cNPDE buldu<sup>29</sup>. Goren ve arkadaşları sığır kalbinden, gene sefadeks G-200 elemesiyle, biri 400.000, ikincisi 260.000 molekül ağırlığında iki etkin protein ayırdılar<sup>65</sup>. Ancak burada yüksek molekül ağırlıklı proteinin amonyum sülfat kesitlemesine bağlı yapay bir PDE türü olduğu savlandı.

Çalışma ortamımız olan sığır beyni korteksi çözünür kesiti (105.000 X g dökültüsü) de, doğrudan doğruya sefadeks G-200'e uygulandığında, biri 250.000 (S<sub>1</sub>) diğeri ise 165.000 (S<sub>2</sub>) molekül ağırlığında iki etkinlik zirvesi verdi (Şekil 8). Çözünür kesitte iki ayrı PDE olduğu, molekül ağırlığı farklarının yanında, farklı ısı-bozunum özellikleri (Şekil 17, 18), etkinleyici proteine olan davranışlar (Şekil 11) ve cAMP'ye olan özgüllükler (Tablo III) ile de kanıtlandı. Etkinlik zirvelerinin birbirlerinden türemediklerini kesinlikle söylemek olası değilse de, aralarında dinamik bir denge olmadığını, S<sub>1</sub>'in tekrar aynı kolona uygulandığında ilk kezki yıkama

hacminde çıkması ile, gösterildi (Şekil 9).

Çözünür kesit amonyum sülfatlanıp, çöken etkinlik tekrar çözüldükten sonra (diyalizat) sefadeks G-200'e uygulandığında 390.000 molekül ağırlığında tek zirve elde edildi (Şekil 8). Bu molekül ağırlığı değerinin çözünür kesit doğrudan doğruya sefadeks G-200'e uygulandığında elde edilen iki zirvenin molekül ağırlıklarının toplamına yakın olması, bir agregasyon olayını akla getirmektedir. Bu veri, sığır kalbinden elde edilen 400.000 molekül ağırlıklı proteinin yapay olduğu savını desteklemektedir. Sığır beyin ve kalb çözünür kesitlerinde yapılan çalışmalar arasında önemli bir fark, beyinde görülen 165.000 molekül ağırlıklı etkin proteinin kalbde bulunamamış olmasıdır.

Çözünür kesit (105.000 X g dökültüsü) ile yapılan ısı-bozunum deneyleri, bu kesitte ısıya dayanıklılıkları farklı iki etkinlik olduğunu gösterdi (Şekil 15). Ayrıca Centriflo ile değiştirilmiş dökültüde etkinliklerin 60°C deki yarı-ömürlerinin, değiştirilmemiş dökültüdekine kıyasla, kısalmış olduğu görüldü (Şekil 16). Bu bulgu, enzimin çözeltide bulunan ve enzimle stoikiyometrik ilintisi bulunan etkinleyici proteinin Centriflo işlemi sırasında kaybedilerek ısıya dayanıklı enzim-etkinleyici protein karmaşık bileşiğinin bozulmuş olması şeklinde yorumlanabilir.

Etkinleyici proteinin koruyucu etkisi sefadeks G-200 sonrası S<sub>1</sub> ve S<sub>2</sub> zirvelerinde de görüldü; etkinleyici

proteine karşı daha doygun olan S<sub>2</sub>'nin ısıya S<sub>1</sub> zirvesinden daha dayanıklı olduğu bulunduğu gibi (Şekil 11a,b; 17a,18a), bu zirvelerin seyreltilmesi de enzim-etkinleyici protein  $\Rightarrow$  enzim + etkinleyici protein dengesini bozan bir etken olacak, etkinliğin ısıya dayanıklılığını azalttı (Şekil 17, 18). Bu genel bulgunun dışında S<sub>1</sub> ve S<sub>2</sub>'nin ısı-bozunum kinetiklerinin oldukça kompleks olduğu görüldü. Şöyle ki, 105.000 X g dökültüsü ile elde edilen bifazik ısı bozunumu iki etkinliğin varlığı şeklinde yorumlanmış ve bu iki etkinliğin sefadeks filtrelemesindeki S<sub>1</sub> ve S<sub>2</sub> zirvelerini oluşturduğu düşünülmüştü. Bu varsayımınla S<sub>1</sub> ve S<sub>2</sub>'nin ısı bozunumlarının birinci dereceden olaylar olması beklenirken, veriler aksini gösterdi. Bozunum hızının etkin proteinin derişimine ikinci dereceden bağımlı ve bozunum hız sabitinin de başlangıç etkin protein derişimiyle ters orantılı olduğu görüldü (Şekil 19, 20). Özetle, S<sub>1</sub> ve S<sub>2</sub> nin ısı-bozunum kinetikleri

$$\frac{-d (\text{Etkinlik})}{d (\text{Zaman})} = \frac{k}{(\text{Etkinlik})_0} (\text{Etkinlik})^2$$

şeklindeydi. Bunun yanında S<sub>1</sub> ve S<sub>2</sub>'nin seyreltilmesinin (Etkinlik)<sub>0</sub> değerinde beklenen düşüşü vermediği, enzimin özgül etkinliğinin arttığı bulundu.

Tablo III'ten görüldüğü gibi sefadeks G-200'den çıkan birinci etkin zirve cGMP'yi cAMP'den 2, cUMP'den ise 7 kez daha hızlı yıkmaktadır. İkinci zirve ise cAMP'yi cGMP'den 1,3 kez daha hızlı yıkmakta, cUMP üzerinde etkisiz kalmaktadır. Bu sonuçlar Kakuichi ve arkadaşları ile Rosen'in bulgularına paraleldir<sup>29,51</sup>.

Şıçan beyni çözünür kesiti sefaroz 6B'den geçirildiğinde elde edilen birinci zirve cAMP ile cGMP'yi aynı hızla yıkıp, cUMP için çok düşük etkinlik gösterdiği halde ikinci zirvenin cGMP ve cUMP'yi cAMP'nin yarısı kadar bir hızla yıktığı gösterilmişti<sup>51</sup>. Rosen ise sefadeks G-200 den ikinci zirvenin cAMP için oldukça özgül olduğunu buldu<sup>29</sup>. Sığır beyni korteksi çözünür kesitinde de birincisi (S<sub>1</sub>) cGMP'ye ikincisi (S<sub>2</sub>) cAMP'ye daha özgül iki tür cNPDE olduğu görüldü. Ancak S<sub>1</sub> kesitiyle yapılan kinetik çalışmalar bu kesitle sığır kalbinden elde edilen benzer molekül ağırlıklı etkin protein arasında farklar olduğunu göstermektedir. Her iki enzimle cGMP için elde edilen K<sub>m</sub> değerleri benzer olduğu halde, kalb enzimiyle cAMP için iki K<sub>m</sub> değeri ( $2,9 \times 10^{-4}$ ,  $1,3 \times 10^{-5}$  M) bulundu ve bu, tepkiyen dayanışması (substrate cooperativity) olarak yorumlandı<sup>65</sup>. Buna karşılık S<sub>1</sub> cAMP için de tek K<sub>m</sub> değeri ( $4,9 \times 10^{-5}$  M) verdi.

İleri saflaştırma çözünür kesitin sefadeks G-200 elemesiyle elde edilen S<sub>2</sub> zirvesiyle sürdürüldü. DEAE-selüloza uygulanacak olan zirve önce Centriflo veya liyofilizatör ile deriştirildi. Centriflo ile deriştirme- de % 60'a varan etkinlik kayıpları gözlemlendi. Kaybın, enzimin filtreye kuvvetle adzorbe olmasından doğduğu, filtre-altı etkinlik ve filtre-altı ve -üstü protein derişimleri ölçülerek, saptandı. Liyofilizasyon için kullandığımız vakum pompası-desikatör sisteminde de etkinlik kaybını % 30-40'ın altına düşüremedik. DEAE-selüloz (pH 7,5) kromatografisi S<sub>2</sub> etkinliğini iki ayrı zirveye ayırdı (D<sub>1</sub> ve D<sub>2</sub>). Bu zirvelerin etkinleyici

proteine olan davranışları araştırıldığında  $D_1$ 'in etkinleyici proteine duyarsız,  $D_2$ 'nin ise duyarlı olduğu ve etkinleyici derişimi arttıkça etkinleşmenin de arttığı, ancak belli bir derişimden sonra etkinleşmenin gerilediği sonuçlar bölümünde sunulmuştu (Şekil 13).  $D_1$  ve  $D_2$ 'nin etkinleyici proteine olan farklı devranışları ilk bakışta bu iki etkinliğin aynı enzimin etkinleyiciye doygun ve doygun almayan şekilleri olduğu izlenimini vermektedir. Oysa  $D_2$ 'nin yüksek etkinleyici derişimlerinde inhibe olması  $D_1$  ile  $D_2$  arasında daha köklü farklar olduğunu göstermektedir; etkinleyiciye doygun olduğu varsayılan  $D_1$  kesitinde de inhibisyon gözlenmesi gerekirdi. DEAE-selüloz kesitleri ile yapılan kinetik çalışmalar,  $D_1$ 'in  $D_2$ 'ye göre etkinleyici proteine olan duyarlılığın yanında tepkiyen özgüllüğü bakımından da farklı olduğunu gösterdi (Tablo III). Ancak kesitlerin saf olmaması, farkların yapısal nedenlerine inilmesini önledi.

KAYNAKLAR

1. Cori, C. F., *Physiol. Rev.* 11, 143 (1931).
2. Sutherland, E. W., *Recent. Progr. Hormone Res.* 5, 441 (1950).
3. Rall, T. W., Sutherland, E. W., ve Wosilait, W. D., *J. Biol. Chem.*, 218, 483 (1956).
4. Cori, G. T., ve Cori, C. F., *J. Biol. Chem.*, 158, 321 (1945).
5. Wosilait, W. D., ve Sutherland, E. W., *J. Biol. Chem.*, 218, 469 (1956).
6. Krebs, E. G., ve Fischer, E. H., *Biochem. Biophys. Acta* 20, 150 (1956).
7. Rall, T. W., Sutherland, E. W., ve Berthet, J., *J. Biol. Chem.* 224, 463 (1957).
8. Sutherland, E. W., *Proc. 3rd. Int. Congr. Biochem.*, sayfa 317-327, Academic Press, New York (1956).
9. Sutherland, E. W., ve Rall, T. W., *J. Biol. Chem.*, 232, 1077 (1958).
10. Sutherland, E. W., ve Robinson, G. A., *Pharmacol. Rev.* 18, 145 (1966).
11. Robinson, G. A., Butcher, R. W., ve Sutherland, E. W., *Annu. Rev. Biochem.* 37, 149 (1968).
12. Sutherland, E. W., ve Robinson, G. A., *Diabetes* 18, 799 (1969).
13. Sutherland, E. W., Robinson, G. A., ve Butcher, R. W., *Circulation* 37, 279 (1968).
14. Breckenridge, B. M., *Ann. Rev. Pharmacol* 10, 19 (1970).
15. Okabayashi, T., Yoshimoto, A., ve Ide, M., *J. Bacteriol* 86, 930 (1963).

16. Makman, R. S., ve Sutherland, E.W., J. Biol.Chem. 240, 1309 (1965).
17. Perlman, R. L. ve Pastan, I., J. Biol.Chem. 243, 5420 (1968).
18. Raymond, P., Narayan, A., ve Pradet, A., Biochem. Biophys. Res. Commun. 53, 1115 (1973).
19. Ashman, D. F., Lipton, R., Melicow, M.M., ve Price, T.D., Biochem. Biophys. Res. Commun. 11, 330 (1963).
20. Price, T.D., Ashman, D. F., ve Melicow, M.M., Biochem. Biophys. Acta 138, 452 (1967).
21. Hardman, J.G., Davis, J. W., ve Sutherland, E.W., J. Biol. Chem. 241, 4812 (1966).
22. Steiner, A.L., Parker, C.W., ve Kipnis, D.M., J. Clin. Invest. 49, 43a (1970).
23. Davoren, P.R., ve Sutherland, E.W., J. Biol.Chem. 238, 3016 (1963).
24. Oye, I., ve Sutherland, E.W., Biochem. Biophys. Acta 127, 347 (1966).
25. Sutherland, E.W., Rall, T.W., ve Menon, T., J. Biol. Chem. 237, 1220 (1962).
26. Harper, H.A., Physiological Chemistry, Sayfa 236, 13. baskı, California, ABD (1971).
27. Robinson, G.A., Butcher, R.W., ve Sutherland, E.W., Cyclic AMP, Academic Press, Sayfa 1-22,84, New York (1971).
28. Butcher, R.W., ve Sutherland, E.W., J. Biol. Chem. 237, 1244 (1962).
29. Rosen, O.M., Arch. Biochem. Biophys. 137, 435 (1970).

30. Chang, Y.Y., *Science* 161, 57 (1968).
31. Okabayashi, T., ve Ide, M., *Biochem. Biophys. Acta* 220, 116 (1970).
32. Monn, E., ve Christiansen, R.O., *Science* 173, 540 (1971).
33. Pichard, A.L., Hanoune, J., ve Kaplan, J.C., *Biochem. Biophys. Acta* 315, 370 (1973).
34. Nair, K.G., *Biochemistry* 5, 150 (1966).
35. Mandel, L.R., ve Kuehl, Jr., F.A., *Biochem. Biophys. Res. Commun* 28, 13 (1967).
36. Hardman, J.G., ve Sutherland, E.W., *J. Biol. Chem* 240, 3704 (1965).
37. Klotz, U., ve Stock, K., *Naunyn-Schmiederbergs Arch. Pharmakol.* 269, 117 (1971).
38. Drummond, G.I., ve Perrot-Yee, S., *J. Biol. Chem.* 236, 1126 (1961).
39. Beavo, J.A., Hardman, J.G., ve Sutherland, E.W., *J. Biol. Chem.* 245, 5649 (1970).
40. DeRobertis, E., Arnaiz, G.R.D.L., Alberici, M., Butcher, R.W., ve Sutherland, E.W., *J. Biol. Chem.* 242, 3487 (1967).
41. Coren, E.N., Hirsch, A.H., ve Rosen, O.M., *Anal. Biochem.* 43, 156 (1971).
42. Russel, T.R., Terasaki, W.L., ve Appleman, M.M., *J. Biol. Chem.* 248, 1334 (1973).
43. Thompson, W.J., ve Appleman, M.M., *Biochemistry* 10, 311 (1971).
44. Cheung, W. Y., *Biochemistry*, 6, 1079 (1967).



45. Chasin, M., ve Harris, D.N., Methods in Molecular Biology Vol 3, Ed. Chasin, M., Marcel Dekker, Inc., Sayfa 170,175, New York, (1972).
46. Bevers, M.M., Smits, A.E., Rijn, J.V., ve Wijk, R.V., Biochem.Biophys. Acta 341, 120 (1974).
47. Thompson, W.J., ve Appleman, M.M., J.Biol.Chem. 246, 3145 (1971).
48. Drummond, G.I., ve Powell, A.C., Mol.Pharmacol. 6, 24 (1970).
49. Goren, E.N., ve Rosen, O.M., Arch. Biochem. Biophys. 142, 720 (1971).
50. Rosen, O.M., Arch. Biochem. Biophys. 139, 447 (1970).
51. Kakiuchi, S., Yamazaki, R., ve Teshima, Y. Biochem. Biophys. Res. Commun. 42, 968 (1971).
52. Cheung, W.Y., Fed. Proc. 28, 473 (1969).
53. Honda, F., ve Imamura, H., Biochem. Biophys. Acta 161, 267 (1968).
54. O'Dea, R.F., Haddox, M.K., ve Goldberg, N.D., Fed.Proc. 29, 473 (1970).
55. Beavo, J.A., Rogers, N.L., Crofford, O.B., Hardman, J.G., Sutherland, E.W., ve Neuman, E.W., Mol. Pharmacol 6, 597 (1970).
56. Kukovetz, W.R., ve Pösch, G., Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. 267, 189 (1970).
57. Goren, E.N., ve Rosen, O.M., Mol. Pharmacol. 8, 380 (1972).
58. Michal, G., Nelboch, M., ve Weimann, G., Z. Anal. Chem. 252, 189 (1970).

59. Cheung, W.Y., J.Biol.Chem. 246, 2859 (1971).
60. Cheung, W.Y., ve Patrick, S., Fed. Proc. 29, 602 (1970).
61. Teo, T.S., Wang, T.H., ve Wang, J.H., J.Biol.Chem. 248, 588 (1973).
62. Michaelis, L., ve Menten, M., Biochem. Z. 49, 333, (1913).
63. Teo, T.S., ve Wang, J.H., J. Biol.Chem. 248, 5950 (1970).
64. Miki, N., ve Yoshida, H., Biochem. Biophys. Acta 268, 166 (1972).
65. Goren, E.N., ve Rosen, O.M., Arch. Biochem. Biophys. 153, 384 (1972).
66. Thompson, W.J., ve Appleman, M.M., Fed. Proc. 29, 602, (1970).
67. Brooker, G., Thomas, Jr., L.J. ve Appleman, M.M., Biochemistry 7, 4177 (1968).
68. Sheppard, H., ve Wiggan, G., Biochem. Pharmacol 20, 2158 (1971).
69. Chasin, M., Fed. Proc. 30, 1268 (1971).
70. Gornall, A.G., Bardawill, C.S., ve David, M.M., J. Biol. Chem. 177, 751 (1949).
71. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., ve Randall, R.J., J. Biol. Chem. 193, 265 (1951).
72. Warburg, O., ve Christian, W., Biochem. Z. 310, 384 (1941).
73. Fiske, C. H., ve Subbarow, Y., J. Biol. Chem. 66, 375 (1925).

74. Adrews, P., Biochem. J. 96, 595 (1965).
75. Lineweaver, H., ve Burk, F., J. Am. Chem. Soc. 56,  
658 (1934).
76. Russel, T.R., Thompson, W.J., Schneider, F.W., ve  
Appleman, M.M., Proc. Natl. Acad. Sci. 69, 1791 (1972).