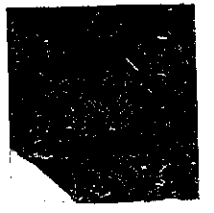


283816



Hacettepe Üniversitesi  
Tıp Fakültesi  
Biyokimya Bölümü

**SIĞIR BEYNİNDEN HYDROXYINDOLE - O - METHYL TRANSFERASE ENZİMİNİN  
SAFLAŞTIRILMASI VE KİNETİK ÖZELLİKLERİ**

**Dr. Alpaslan M. Karahasanoğlu**

**Doktora Tezi**

**1970**

Hacettepe Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Biyokimya Bölümü

SIĞIR BEYNİNDEN HYDROXYINDOLE-O-METHYL TRANSFERASE ENZİMİNİN  
SAFLAŞTIRILMASI VE KİNETİK ÖZELLİKLERİ

Dr. Alpaslan M. Karahasanoğlu

Doktora Tezi

1970

## İÇİNDEKİLER

ÖZET	
GİRİŞ	1
MATERYEL VE METODLAR	10
SONUÇLAR	24
Enzimin Saflaştırılması	24
Enzimin Katalitik Özellikleri	42
TARTIŞMA	53
REFERANSLAR	58

## GİRİŞ

Biolojik kontrol mekanizmalarının en mühimlerinden birinin ışık ya da aydınlık-karanlık ritminin olduğu çok eskiden beri tahmin edilmiş, ancak asrımızın ikinci yarısında gösterilebilmiştir. Işık stimulusu iki tarzda algılanır. Birincisi 24 saatlik devrede gece-gündüz farkından, diğeri ise 1 yıllık bir devre içinde gece-gündüz uzunluğu oranının belli bir hızla değişmesinden hissedilir. 24 saatlik devrenin uzun seneler boyunca etraflıca incelenmesi sonunda bazı adrenal (Halberg 1959) ve hipofizer hormonların (Bakke ve Lawrence 1965), vücut ısısının (Halberg 1954), memeli hücrelerinin sentetik faaliyetlerinin (Jardetsky 1956) diurnal ritm gösterdikleri tesbit edilmiştir. Yıllık ritm ise geyik gibi bazı vahşi hayvanlarda gözlenen senede bir gonadal maturasyon ve bunu takiben atrofi ile tarif edilir. Bütün bu biolojik ritimler normal olarak çevredeki ışığa senkronize olarak çalışır. Meselâ normal gece-gündüz ritminde bulunan fareler karanlık başladıktan 4-6 saat sonra östrus'a

girerler. Eğer ışıklı period 12 saat ileriye alınırsa bir hafta içinde östrus saati de 12 saat ileri kayar. Son yıllarda bahsedilen bütün bu ritmik aktivitenin pineal bezin kontrolunda olduğu anlaşılmıştır. Pinealin bu görevi saldıği hormon mahiyetindeki indol türevi yapısı gösteren bir bileşik yani melatoninle, gerçekleştirdiği anlaşılmıştır. Böylece memelilerde ritmik değişiklikler hormonal yönden değerlendirilmeye başlanmıştır.

Ritmik değişiklikleri algılayamayan hayvanlarda (Zeitgeber sistemin tahribi, karanlıkta kalma v.s.) bu diurnal değişmeler devam ederse de period 24 saate ayarlı kalmaz. Bu durumdaki sıkluslara "Serbest Seyreden" sıklus denir ve 22-26 saat arasında periodlar değişir. Endojen olan 24 saatlik ritm gösteren ve algılanma bozulunca "Serbest Seyreden" sıkluslara sirkadien ritimler denir.

Corpus pinealenin ışıkla ilgisinin ilk ispatı fosil tetkikleriyle başlamıştır. Filojenide ilk kademelerdeki bazı balık fosillerinin parieto-frontal kemiklerinde bulunan foramenlerden anlaşıldığına göre bu canlılarda bir üçüncü göz mevcuttur (Edinger 1956). Bu gözün kalıntısı bazı amfibilerde halen de mevcuttur. Işık stimülüsünü ve onda meydana gelen değişiklikleri algılayan störnorgan veya parietal göz diye anılan ve epifize bağlı olan bu organın evölüsyon sırasında kafatasında önce daha içe doğru göç ettiği sonra da pinealle yekvücut olduğu düşünülür. Bu göçü ispat eden bulgu düşük evölüsyon formlarında (amfibi v.s.) pineal kesitlerinde tamamen klasik retina yapısının görülmüş olmasıdır (Oksche 1965; Van de Kamer 1965). Bugünkü görüşler bu retinal yapının zamanla yerini endokrin faaliyet özelliği gösteren hücrelere bıraktığı ve ışık algılanması göre-

vinin diğer gözlere bırakıldığı düşünceindedir, zira parietal-  
den içeri muhaceret sırasında yapı birkaç subkomissural organ  
ile bağıntı gösteren neural fibriller haricinde SSS ile sinir-  
sel munasebetini tamamen kaybeder; buna mukabil sadece zengin  
damar ağları ile beraber seyreden sempatik sinirler ile innerve  
olur (Kappers 1965, Iraldi 1965). Böylece evolüsyon skalasında  
yavaş yavaş ilerleyen bu özel organın bugünkü bilgilerimize gö-  
re pineal bez olduğu anlaşılmaktadır. Anatomik ve embriyolojik  
araştırıcılar pineal bezin çift karakterli olduğuna işaret et-  
mekte ve bu karakterleri şu şekilde açıklamaktadırlar.

a- Pineal düşünöldüğu gibi orta hat üzerinde tek organ  
değildir. Embrionik anterior neural plakta bilateral olarak iki  
tohum mevcuttur ve bunlar sonradan birleşirler. İlginç nokta  
bu bilateral embrionik organın bir tanesi çıkartılınca diğer-  
nin tam bir pineal teşkil etmek üzere gelişmesidir.

b- Gelişmiş pineal, evolusyonda düşük soğuk kanlı hayvan-  
larda olduğu gibi frontal organa veya onun kalıntısına bağlı  
olarak ışık algılaması yapar.

1955 yıllarından sonra pinealin ışığa bağlı biolojik  
ritmleri nasıl kontrol ettiği araştırılmaya başlanmış ve sirkar-  
dien ritmi doğurduğu ispat edilmiştir (Wurtman 1968, Wurtman  
1968 a, Axelrod 1968 ve Quay 1968). Daha 1941 yılında bile  
(Fiske 1941) pineal bez ağırlığının hayvanların ışıkda veya ka-  
ranlıkta tutulmaları ile değiştiğine işaret edilmişti. İlk bul-  
gu karanlıkta pineal ağırlığının arttığı, aydınlıkta azaldığı  
şeklindeydi. Son yıllarda Wurtman ve Axelrod bezin ağırlığının  
esas olarak melatonin muhtevasına bağlı olarak değiştiğini ispat  
etmişlerdir (Wurtman 1968 a, Wurtman 1968). Daha sonra Moore

1967'de bezin hormon sentezinin retinadan kalkan ve primer optik traktüs ile beraber seyreden fakat farklı sinaps yapan aksesuar optik sinirler vasıtasıyla tembih edildiğini nöroanatomik olarak göstermiştir. Aksesuar optik trakta ait fibriller Bochenek nüvesinde sinaps yaptıktan sonra superior servikal ganglionna erişmektedirler. Moore bu bulgularını ispat etmek için enükleasyon, çeşitli noktalarda optik trakt kesimi ve servikal ganglionektomi ile ışık stimulusu yolunu göstermiştir. Işığa bağlı pek çok ritmleri kontrol eden pineal bezin kendisinde belki de en mühim olarak kabul edilmesi gereken biolojik siklüslerden bazıları mevcuttur. Bezin serotonin, melatonin, ve noradrenalin muhtevası bir diurnal ritm göstermektedir. Buna ilâve olarak serotonin sentezinin ana enzimlerinden triptofan hidroksilaz'ın ışık ile aktive olduğu burada belirtilmelidir. Pineal biokimyasal aktivitenin sirkadien oluşu ilk defa 1959 da Roth tarafından gösterildi (Roth 1959). Müellif pineal dokusunun geceleri  $P^{32}$  yi daha fazla enkorpore ettiğini müşahade etti. Yukarıda bahsedilen melatonin, serotonin ve moradrenalin siklüsleri daha sonra gösterildi.

Pineal bez gece 12'de en fazla miktarda melatonin ihtiva ederken 24 saatte en düşük serotonin seviyesini de beraber gösterir. Gündüz 12'de azami serotonin ihtiva eden bez bu sırada melatonin ritminin en düşük noktalarından birindedir. Bu bulgular araştırmacılar da serotonin ritminin ışığa daha az duyarlı olduğu fikrini uyandırınca serotonin ritminin ışığa direkt ilgisi araştırıldı. Deney hayvanlarının bir hafta devamlı karanlıkta veya aydınlıkta kalmalarının serotonin ritmini bozmadığı hatta pineal serotonin konsantrasyonunu bile pek değiştirmedığı

anlaşıldı. O halde serotoninin diurnal ritminin biokimyasal mekanizması ne olabilir?

1- Gündüzün triptofan hidroksilazın ışıkla aktivasyonu neticesinde daha çok 5 hidroksi triptofan ve daha çok serotonin sentez edilebileceği bir ihtimaldir.

2- Serotonin karanlıkta pineal dokusunda sentetik faaliyette kullanıldığı, aydınlıkta ise serbest hale geçip bezin dışına çıktığı diğer bir ihtimaldir.

3- Karanlıkta MAO aktivitesi yüksek olabilir ve serotoninini yıkabilir.

Yapılan deneylerde (Snyder ve Axelrod 1965) triptofan hidroksilazdaki ışığa bağlı aktivasyona karşılık aromatik L-Amino asit dekarboksilaz'ın ve MAO aktivitelerinin ışıkla ilgili olmadıkları görüldü. İkinci ihtimalin, yani serotoninin karanlıkta sentetik faaliyette kullanılması çok büyük bir ihtimalle özellikle melatonin yapımı ile paralel gideceğinden şimdilik doğru olarak kabul edilmelidir.

Melatonin veya N-Asetil 5 Methoxytriptamin'in bir hormon olduğuna işaret eden pek çok bulgu vardır:

- a- Melatonin sadece pineal bezde sentez edilir (Axelrod 1961). Vücutta diğer hiçbir organda sentetik aktivite gösterilememiştir.
- b- Melatonin pinealden dolaşıma salınır (Axelrod 1961).
- c- Diğer organlar dolaşımdan konsantrasyon farkına rağmen melatoninini alıp konsantre edebilirler (Axelrod 1961, Wurtman 1964).
- d- Radyoaktif melatonin verilerek yapılan çalışmalarda hormonu fazla konsantre eden bazı organların melato-



ninin target organı olduğu gösterilmiştir (Over, iris sempatik zincir, periferik sinir, testis, tiroid, adrenal, böbrek uterus) (Wurtman 1968).

- e- Sıçanlara subkutan veya intraperitoneal verilen mikrogram miktarındaki melatonin over ağırlığını azaltır (Wurtman 1963), östrusa mani olur, tiroid hücresinin boyunu küçültür, I<sup>131</sup> alımını azaltır, yeni doğan farede vajen açılmasını geciktirir. Preoptik bölgeye melatonin (15-30 mikrogram) tatbik edilip EEG çekilince elektrik aktivitede azalma tespit edilir ve hayvanlar uyur. Barchas melatoninin hexobarbitalin uyutucu tesirini % 50 arttırdığını belirtmiştir (Barchas 1967). Düşük vertebralılarda da melanoforların kontraksiyonuna sebep olarak deriyi beyazlaştırır (Bagnara J.T. 1960).
- f- Melatonin karaciğer tarafından mikrozomal bir enzimle 6 mahallinden hidroksillenir, sonra sülfat veya glukuronat türevi olarak itrah edilir. (Axelrod 1961)
- g- Melatonin sentezinin serotoninden başladığı düşünülmüş ve Wurtman tarafından Şema I teklif edilmiştir. Bu şemada görüldüğü gibi hormonun sentezi için serotoninin önce N-asetillenmesi sonra 5-mahallindeki hidroksilinden metoksi türevi haline geçmesi gerekmektedir. Bu olaylar bir asetilleyen bir de metoksi teşkil ettirebilen iki enzimi gerektirir. Melatoninin sentezinde N-asetilleyen enzimin hız kısıtlayıcı olmadığı, aktivitenin diğer ilgili enzim aktivitelerine göre çok yüksek oluşundan tahmin edilmektedir. Buna karşılık sentezin fizyolojik regülatörü son kademe enzimi olan HIOMT'dur. (Wurtman 1968 a)



Bu metabolik yolun regülasyonu hakkında fizyolojik deliller biokimyasal seviyeden pek az incelenmiştir. Fakat HIOMT enzimi hakkında elimizde bulunan ilginç gözlemler şunlardır:

- a- Moore (1967), bezdeki fizyolojik faaliyet ve melatonin sirkadyen ritminin paralelizm gösterdiğini ispatlayan ve neuroanatomik seviyede bu olayları retinaya bağlayan çalışmasında HIOMT enziminin sirkadyen ritminin melatonin ve bu hormonun sebep olduğu ritmik hadiselerle elâle gittiğini bulmuştur. Şöyle ki HIOMT aktivitesi gece yarısı maksimale erişip müteakiben sabaha kadar düşmekte, akşam saat 6'dan itibaren tekrar artmakta, yani ışıkta azalıp karanlıkta çoğalmaktadır. Devamlı ışıkta tutulan hayvanlar normalin 1/4-1/5'i kadar melatonin yapabilecek HIOMT aktivitesi gösterirken devamlı karanlıkta bırakılan hayvanlar normal ışık alan gruptan daha fazla melatonin sentez etmemiştir. Bu nokta substrat inhibisyonuna işaret edebilir; yani melatonin kritik bir konsantrasyondan sonra HIOMT'u inhibe etmektedir.
- b- Weiss bu değişikliklerin enzimin melatonin tarafından ürün inhibisyonuna bağlı olduğunu ileri sürmüş ve enzimin belki de bezdeki 3'-5' AMP'nin pinealdeki sirkadyen ritmi ile fonksiyonunun yakından ilgili olduğunu ileri sürmüştür. Aynı zamanda bezin ışık ile yeni enzim molekülleri sentez ettiği iddia edilmiştir (Weiss 1968, Wurtman 1968 a, Axelrod 1968).
- c- Axelrod ve Weissbach enzimi pinealden 20 defa saflaştırmış ve en iyi substratının NAS olduğunu, faaliyeti

için SAM'ın mutlaka mevcut olmasının gerektiğini, ağır metaller tarafından inhibe edildiğini klasik katekol-O-metil transferazdan farklı olarak bir metal ionuna ihtiyaç göstermediğini ileri sürmüştür.

Bütün bu bulgular HIOMT aktivitesinin biokimyasal olarak daha iyi incelenmesi zorunluluğunu ortaya koymaktadır. Bu gaye ile memeli sirkadyen ritminin daha iyi anlaşılması için siğir corpus pinealesinden HIOMT enziminin saflaştırılması için bir metod kurulmuş ve enzim en az 4300 defa saflaştırılıp biokimyasal ve fizikokimyasal bazı özellikleri tespit edilmiştir. Şöyle ki, enzim allosterik bir protein olup bazı Krebs siklusu ara ürünleri tarafından kuvvetle aktive edilmektedir. Gözlenen muhtelif polimerizasyon derecelerine işaret eden fizyolojik bir yapıda bulunmakta ve allosterik davranışı için bu gözlem bir fizikokimyasal dayanak teşkil etmektedir. Krebs siklusu ara ürünleri tarafından aktivasyonu da HIOMT sirkadyen ritmi için biokimyasal yeni bir görüş ortaya atmaktadır.

## MATERYEL VE METOD

### Pineal Bezin Elde Edilişi :

Sığır pineal bezleri saflaştırma materyeli olarak kullanılmıştır. Bu gaye ile günlük olarak taze kesilmiş sığır beyinlerinden bez toplanmış ve buz içinde laboratuara getirilmiştir. Moore (1967-1968) sıçan bezindeki aktivitenin bez likit azot içinde hemen dondurulmazsa süratle azaldığını göstermiştir. Ancak yapılan kontrol tecrübeleri 48 saate kadar enzimin ortanda sitrat olmak şartı ile bezden çekilip aktive edilebileceğini göstermiştir. Bu sebeple günlük kesilip soğukda saklanmış beyinlerden bezler alınmıştır.

### Kimyasal Maddeler :

Bütün çalışmada sonsuz rezistans veren tamamen iyonsuz su bileşikleri çözmekde kullanılmıştır. SAM H<sup>3\*</sup> ve SAM C<sup>14\*</sup> Amersham Ltd. İngiltereden soğuk SAM Sigma Ltd. USA'dan temin edilmiştir. Spesifik aktivite SAMH<sup>3</sup> için 1,02  $\mu$ c/1 mM, SAM C<sup>14</sup> için

\*Kısaltmalar: SAM: S- Adenosyl methionine; NAS: N- acetyl serotonin. OAA: Oxalacetate, MES: Morpholinoethane Sulfonic acid, MOPS: Morpholinopropane sulfonic acid. OPD: o- phtaldialdehid; BPA: Bovin plazma albumin.

52 mc/1 mM idi. SAM deneylerde 0,05 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içinde sulandırılarak kullanılmışdır. (SAM H<sup>3</sup> 1/500 - SAM C<sup>14</sup> 1/25 - SAM 10<sup>-3</sup>M) Kullanılan SAM'ın biyolojik aktiflik oranı çok kesif HIOMT kullanılarak uzun bir enkübasyon sonunda melatonin olarak enkorpore edilen radyoaktiviteden ve 259,5 m<sub>μ</sub> da adenin absorbansından hesaplanmıştır. Bu değer % 70 den aşağı değildir ve kinetik hesaplarda substrat molaritesi buna göre düzeltilmiştir.

Kullanılan diğer bütün bileşikler asgari C.P. grade'da seçilmiştir. Organik asitlerin tuzları genellikle potasyum tuzu olarak hazırlanmıştır.

Süstitüe sellülozlar Peterson ve Sober metoduna göre hazırlanmıştır (Peterson 1962). Sefadex G-200 Pharmacia firmasının tarif ettiği şekilde hazırlanmıştır (Pharmacia bülteni). Brushit, Çy alumina, kalsiyum fosfat jeli klâsik yolla hazırlanmıştır (Colowich 1957).

Density gradient santrifügasyonu için kullanılan sucrose U.V. absorban malzemedan Norit ile muamele edilerek arınmıştır.

Radyoaktif sayım için Bray solüsyonu kullanılmışdır (1960). Ekstraksiyonda kullanılan kloroformun daha az söndürme yapan bakiye bırakması için, solvent asgari bir defa distillenmiştir. İnfrared analizi için melatonin hazırlandığı zaman kullanılan solventler (kloroform ve heptan) spectroscopic grade seçilmiştir.

#### Aletler ve Metodlar :

Radyoaktivite sayımları üç kanallı ve computer'a bağlı Packard tricarb liquid scintillasyon cihazında yapılmıştır. Alet AES (automatic external standardizasyon) ile mücehhez olup, numunedeki quenching (söndürme) miktarı ve extrapolasyonla dpm tes-

biti imkânı verdiğiinden kinetik deneylerde substrat konsantrasyonu hesaplamak imkân dahiline girmiştir. Bütün sayımlar en düşük cpm veren nümune sayımı  $\pm 2,5$  S.D. verecek süreden daha uzun süre içinde ve çift olarak yapılmıştır. Radyoaktivite tayin kapları birden fazla defa kullanıldığında en ufak radyoaktif kontaminanın kalmaması için mutad temizlik ardından aseton içinde çalkalanmıştır.

Kloroformun melatonine ekstraktif gücü ve bu işlemdeki sapma denendiğinde saf melatonin kullanılmış ve birleşik kimyasal olarak fluorimetrik tayin edilmiştir. Bu gaye ile Maickel ve Miller'in o-phtaldialdehid kullanan fluorimetrik metodu seçilmiştir (Maickel 1966). Melatoninin verdiği katılma ürününün emisyon ve ekstinksiyon dalga boyları Aminco-Bowman spektrofotometresinde tesbit edildikten sonra metod autoanalizer'a adapte edilmiştir. Ancak fluorimetrik metodun hassas olduğu hudut radyoaktif deneye göre yüz ile bin defa daha düşük olduğundan SAM'ın yüksek maliyeti göz önünde tutularak enzim tayininde kullanılmamıştır, ayrıca OPD ile reaksiyon veren NAS da % 0,2 oranında kloroform fazına çekilmektedir. Substratın % 5-10'unun kullanıldığı ilk hız ölçümü için bu büyük bir mahzur teşkil etmiştir.

Infrared analizi Perkin-Elmer modeli bir infrared spektrofotometrede yapılmıştır.

Density gradient analizleri % 5-20 şükroz gradientinde yapıldı (Schachmann 1963). Beckmann L-2D analitik ultrasantrifüjünde SW 39 tipi rotorla 39000 rpm'de + 4°C'de 25 saat santrifüj edildi. 0.15 ml'lik 30 fraksiyon toplandı. Mukayese proteini olarak saflaştırılmış BPA kullanıldı. Bu gaye ile BPA, DEAE

Selulozdan geçirildi ve ana fraksiyon olan ikinci protein zirvesi kullanıldı; preparatın saflık derecesi akrilamid jel elektroforezi ile ayrıca kontrol edildi. Santrifüj tübunun dibi delinmek sureti ile toplanan nünunelerin bir kısmı Folin Ciocolteau metodu ile protein analizine tabi tutuldu (Lowry 1951); bir kısmı da şekilde tarif edildiği gibi aktivite analizine tabi tutuldu. Molekül ağırlığı  $(M_1/M_2)^{2/3} = D_1/D_2$  formülü kullanılarak hesaplanmıştır.

Akrilamid elektroforezi Davis ve Ornstein'e göre (Davis 1965) pH = 9,2'de trisglisin tamponunda yapılmış; elektroforez Bromofenol mavisi bandının göçü ile takip edilmiştir.

"Thin layer" kromatografisi Kieselguhr kullanılarak yapılmıştır. İndol lekeleri OPD kullanılarak developpe edilmiş (Maickel 1966), ve U.V. lâmbası ile gözlenmiştir.

Neticelerin değerlendirilmesinde mutad biyoistatistik metodlar kullanılmıştır.

Protein tayini genellikle Warburg metodu ile yapılmıştır (Warburg 1941). Düşük protein konsantrasyonunda daha hassas olan Folin-Ciocolteau metodu kullanılmıştır (Lowry 1951). Sonuçlar Zeiss PMQ II spektrofotometresinde okunmuştur.

#### Enzim Aktivitesinin Tayini :

Axelrod tarafından teklif edilen metod ile yapılmıştır (Axelrod 1961). Bu metod sentez edilen melatoninin selektif olarak kloroform fazına ekstre edilebilmesi esasına dayanır. Bu gaye ile uygun bir tampon içinde pH 8 fosfat 0,2 ml enzim solüsyonu üzerine 0,05 ml SAM H<sup>3</sup> veya C<sup>14</sup>  $3,3 \times 10^{-6}$  M (spesifik aktivitesi 1,02  $\mu$ c/1 M), 0,05 ml  $3 \times 10^{-3}$  M NAS ilâve edilir.



15'- 30' 37°C da inkübe edilir. Tepkime 1 ml  $2 \times 10^{-1}$  M pH = 10 Borat ilâve edilerek durdurulur. 10 ml kloroform ilâve edilir. Melatonin Vortex ile fazlar iyice emülsifiye edilerek kloroform çekilir. Santrifüjle kloroform su fazı kesin olarak ayrılır. Su fazı trompla emilir. Aktarılan kloroform fazı yeniden borat tamponu ile yıkanarak temizlenir. Bu ameliye iki defa tekrarlanır. Alınan orijinal numunenin takriben yarısı kadar bir numune uçurularak bakiye üzerine Bray solusyonu ilâve edilir ve sayacda sayılır.

Bu metod şu modifikasyonlara tabi tutulmuştur:

a- Enzim saflaştırma ameliyesi süresince DEAE selüloz kademesine kadar eğer ortamda bir aktivatörü varsa dayanıklıdır, ve meselâ sitrat içinde pH 6-8 arasında 37°C da 1,5-2 saat ısıtılırsa tamamen aktive edilir, aksi takdirde aktivite düşük tesbit edilir. Bu sebepten DEAE selüloz kademesine kadar saflaştırma esnasında aktivite tesbit edilecek numune 1,5 saat 37°C da pH 6-8 arasında  $5 - 10 \times 10^{-3}$  M potasyum sitrat içinde preaktif ve edilmiş sonra tayin yapılmıştır.

b- NAS  $3 \times 10^{-3}$  M yerine genellikle tatminkâr sonuç veren  $4 \times 10^{-4}$  M solusyonu hazırlanarak kullanılmıştır.

c- DEAE kademesinden sonraki saflaştırma numunelerinde ve saf enzim ile çalışıldığı zaman preinkübasyon yapılmamış, ortama 1 mg/ml BPA ilâve edilmiş ve inkübasyon genellikle bir dakika süre ile yapılmıştır. Bu hususla ilgili kontrol deneyleri ilerde verilecektir.

d- Kinetik çalışmalar için saf enzim önce 20 mg/ml evvelce dializle iyonsuz kılınmış BPA içinde minimal sulandırılmış

ve 1/1000 hacimde soğuk iyonsuz suya karşı üçer saat süre ile iki defa ortam değiştirilerek dializ edilmiş, dializi müteakip preparat uygun oranda sulandırılarak kullanılacak en ufak miktarlarında tüplere pipetlenmiş ve dondurularak tayin zamanına kadar  $-20^{\circ}\text{C}$  saklanmışdır.

e- Bir dakikalık inkübasyonlarda reaksiyonu derhal sona erdirmek için bu bakımdan tatminkâr olmayan  $2 \times 10^{-1}$  M Borat yerine önce Borat tamponu kloroformla iyice satüre edilmiş bu suretle melatoninin maksimum ekstraksiyonu temin edilmiş, deneyden hemen evvel 4 hacim kloroformla satüre borat 1 hacim asetonla karıştırılmış, bu karışımdan 1 ml reaksiyonu durdurmak için kullanılmışdır. Bu modifikasyon ekstraksiyon ve körü etkilememiştir.

f- Kinetik ölçüm yapıldığında enzim  $\text{HCO}_3$  tarafından gidetle aktive edildiğinden,  $\text{HCO}_3^-$  tutulmasının en az olacağı pH 6'da pK'sı 6'dan düşük bir tamponla çalışılma yoluna gidilmiştir.

Bu metodla kör sayımları (yani enzim ihtiva etmeyen tüpler) radyoaktivitenin en fazla %01'inin nonspesifik olarak kloroform fazına geçtiğine işaret etmiştir. Bu ihmal edilebilir bir değerdir.

Ekstraktif ameliye esnasında kloroformun su fazından ayrılmasından sonra su fazı tromp ile emilirken bir miktar kloroform evapore olmaktadır. Bu evaporasyonun, müteaddid yıkamaların, deneyi ne kadar etkilediği, saf melatonin önce kloroformla satüre suda çözülerek sonra kloroformla ekstre edilerek, kloroform fazındaki melatoninin fluorimetrik tayini ile araştırılmış

ve peşpeşe 30 ekstraktif ameliyede hata orijinal numuneye göre  $\% \pm 2,0$  S.D. olarak tesbit edilmiştir.

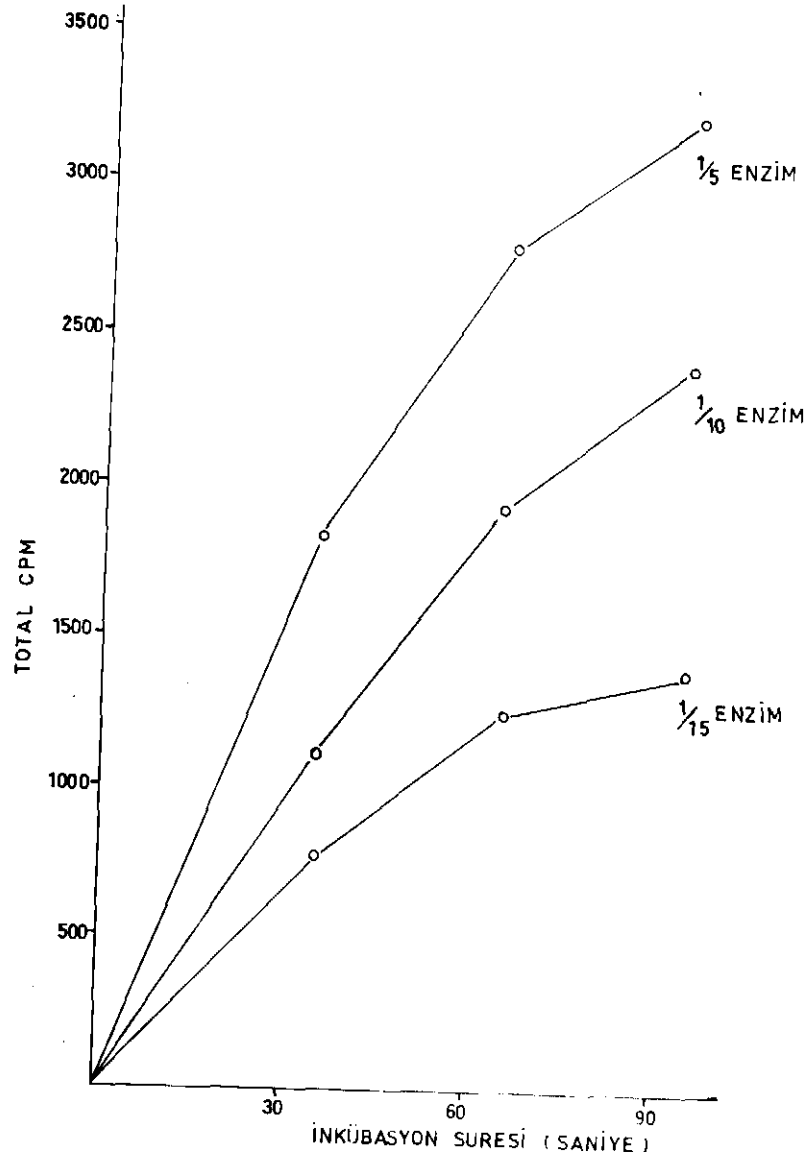
Linearite ve Stoikiometri Deneyi :

Saf enzim aktivitesinin linearitesi substrat ile çeşitli süreler inkübe edilerek araştırılmıştır. Sonuç şekil 1 de gösterilmiştir. Görüldüğü gibi hız 1 dakikaya kadar lineerdir. Daha yüksek inkübasyon sürelerinde sonuçlar üçlü deneylerde dağınık tesbit edilmiş ve bu gözlem deney sisteminde birikmeye başlayan melatoninin inhibisyonuna atfedilmiştir. Linearite ve stoikiometri saflaştırmanın her kademesinde yukardaki şekilde gösterilen değerlere yakın tesbit edilmiştir. Saf enzim kullanıldığında eğer ortama 0,2 - 1 mg BPA yahut diğer bir protein (ovalbumin gibi) ilâve edilmezse radyoaktivite inkorporasyonu çok azalmakta, linearite kaybolmakta, OAA aktivasyonu azalmakta ve enzim denatüre olmaktadır. Linearite kaba homogenatlardan sefa-deks sonrası saflaştırma kademesine kadar ortamda başka bir protein ilâvesi olmasa da muhafaza edilmektedir. Bu da enzimin hava oksijeni tarafından, veya yüzey gerilimi ile denature olduğuna işaret etmektedir. Nitekim saf enzim  $-20^{\circ}$  ile  $+37^{\circ}$ C arasında kesif preparat halinde muhafaza edilebilirken, dilüsyon ile derhal aktivitesini kaybetmektedir. Bazı preparatlar muhtemelen ağır metal kontaminasyonuna bağlı olmak üzere spontan denatüre olmaktadır. Bu denaturasyon  $-20^{\circ}$ C'de dahi bazen vuku bulmaktadır. Bu sebepten kullanılan cam malzeme çok temiz olmalıdır. Enzim aktivatörü mevcut veya değilken ve saflaşmanın her kademesinde  $10^{-5}$  ile  $10^{-4}$  M GSH ile hemen tamamen ve irreversibl olarak inhibisyon göstermekte ve inaktive edilmektedir. Bu se-

ŞEKİL 1

LİNEARİTE ve STOİKİOMETRİ DENEYİ

Kinetik için hazırlanmış enzim çeşitli süreler boyunca nihai  $3,3 \times 10^{-7}$  M SAMH<sup>3</sup>,  $10^{-4}$  M MAS, BPA 1 mg/ml, sitrat  $3 \times 10^{-3}$  M pH = 7,0 de inkübe edilmiştir. Absiste inkübasyon süreleri, ordinatta tesbit edilen total melatonine cpm inkorporasyonu belirtilmiştir. Deneyler triple yapılmış, sonuç ortalamaya göre ifade edilmiştir.



bepile enzim muhafaza ve saflaştırmasında thiollerden kaçınılmalıdır.

Kinetik deneylerde bu düşüncelerle bir dakikalık inkübasyonlar tercih edilmiştir. Deneyler genellikle üçlü yapılmıştır. % 90'dan fazla deneyde üçlü tayinler birbirlerinin  $\pm$  % 10 değeri içinde bulunmuştur.

#### Melatonin'in İnhibitör Etkisi :

Enzim hızının linearitesinin süratle kaybolması enzimin ürünü olan melatoninin ortamda birikmesine bağlıdır. Nitekim ortamda  $10^{-6}$  M melatonin mevcutken katalitik hız, enzim ister MES, ister OAA içinde inkübe edilsin, nihai SAM  $H^3$   $3,3 \times 10^{-7}$  M, NAS  $10^{-4}$  M, BPA 1 mg/ml pH = 6,0 da, yüzde elli oranında düşük tespit edilmiştir. İlginç bir gözlem de melatonin mevcutken tespit edilen hızların büyük varyasyon göstermesidir. Bu da 30, 60, 90 saniye gibi kısa inkübasyonlar esnasında üçlü-dörtlü deneylerin sonuçlarının birbirine yakın olmasına karşı daha uzun süren inkübasyonlarda sonuçların dağınık ve bazen birbirinden çok uzak tesbiti gözlemini izah eder.

#### Aktivite Tarifi :

Saflaştırma ameliyesi süresince 15-30 dakikalık inkübasyonlar yapılmış, alınan numunenin verdiği total cpm yahut randıman ve spesifik aktivite artımı hesabında fraksiyonlara ait total cpm bu suretle tesbit edilmiştir. Bu metodla aktivite tayini yukarda tartışılan mahzurlardan dolayı sadece semikantitatifdir.

Kinetik deneylerde bir dakikalık inkübasyonlarla tesbit

edilen ilk sentezden, hız, 1 saatte 1 mgr saf enzimin 37°C da pH 6'da sentez ettiği  $\mu$ Mol melatonin olarak ifade edilmiştir.

#### Enzim Hızına İzotop'un Etkisi :

Saf enzim preparatına H<sup>3</sup> veya C<sup>14</sup> ile işaretli izotopun etkisi şekil 2 de gösterilmiştir. Bu deneyde görüldüğü üzere radyoaktif sübstrat equimolar soğuk substrat ile sulandırıldığında enkorporasyon sulandırma ile lineer bir bağıntı göstermektedir. Yani C<sup>14</sup> veya H<sup>3</sup>'un hız üzerine belirli bir etkisi yoktur.

Radyoaktivite böyle bir etkinin en iyi gösterilebileceği düşük seviyede tutulmuştur. Sayımlar A.E.S. ile quenching bakımından düzeltilmiştir.

#### Enzimin Isıya Dayanıklılığı ve Kinetik Deneyler İçin

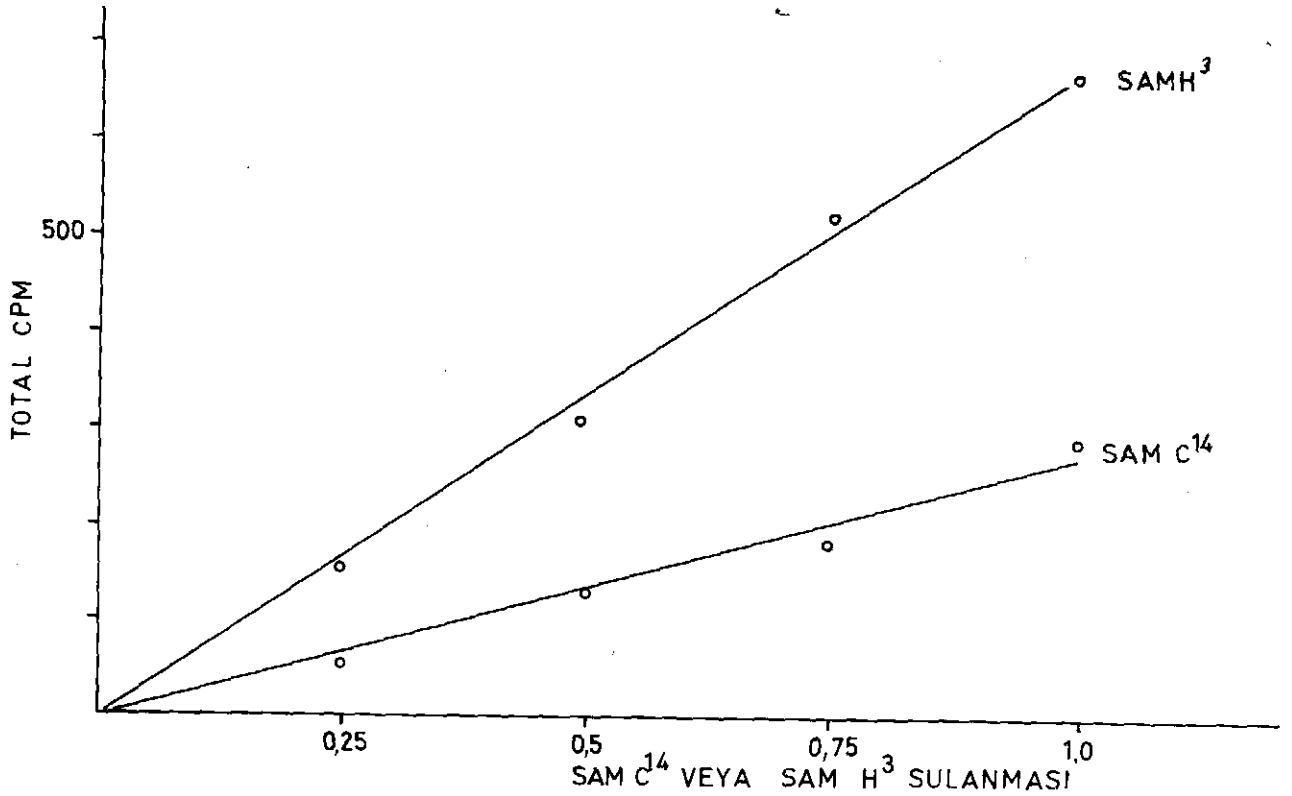
##### Hazırlanışı :

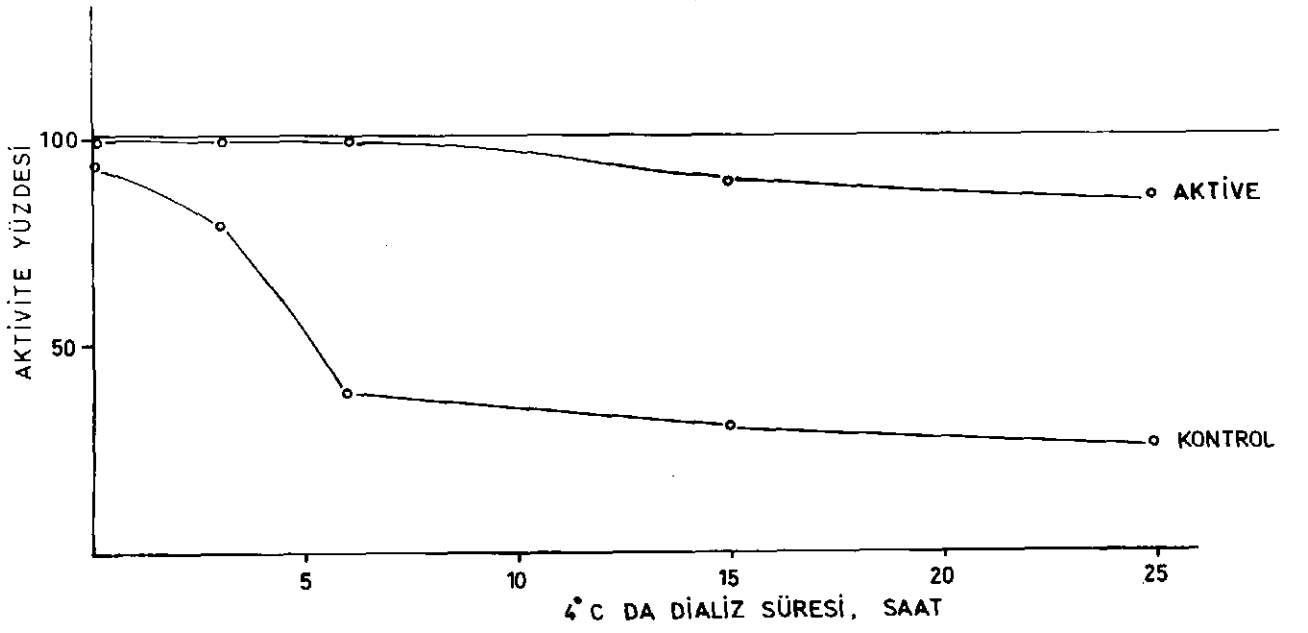
DEAE saflaştırması kademesine kadar enzim oda harareti, 4°C ve -20°C da tamamen stabildir. Meselâ böyle bir preparat ortamda  $5-10 \times 10^{-3}$  M pH = 6-8 sitrat varken oda hararetinde hiçbir aktivite kaybı olmadan 24 saat bırakılabilir. Enzim saflaştıkça labilleşmektedir. Şekil 3 a'da saf enzimin 37°C ye dayanıklılığı gösterilmiştir. Görüldüğü gibi böyle bir preparat ortamda aktivatörü varken bile süratle deaktive olmaktadır. -20°C de saf enzim kesif (1 mg/ml) olarak şartıyla 15 gün kadar aktivitesinden büyük bir miktarını kaybetmeden saklanabilir. Ancak tekrarlanan çözme ve donmalar veya dilüsyon süratle enzim kaybına sebep olur. Enzim 0°C da dialize edildiğinde (Şekil 3 b de gösterildiği gibi) aktivitesinin bir kısmını kaybetmektedir.

ŞEKİL 2

İZOTOPLARIN ENZİM KATALİZİNE  
ETKİSİ

Kinetik şartlar için hazırlanmış enzim kullanılarak pH= 7.5  $10^{-2}$  M sitrat , 1 mg./ml BPA ,  $10^{-4}$  M NAS içinde 1 dakika inkübasyon yapıldı . Soğuk SAM ,  $SAMH^3$  ve  $SAMC^{14}$  molariteleri 259.5 milimikronda okunarak tayin edildi . Bundan sonra  $SAMH^3$  veya  $SAMC^{14}$  ekimolar soğuk SAM ile 3/4 , 1/2 , 1/4 oranlarında dilüe edildi . Bütün deneylerde nihai SAM konsantrasyonu  $2.2 \times 10^{-7}$  M olarak ayarlandı . Tesbit edilen radyoaktivite total cpm olarak ordinatta , radyoaktif sübstratın sulanması absisinde gösterildi . Deneyler üçlü tayinin ortalaması olarak verildi .







Dializ ortamından aktivatörün uzaklaştırılmasına bağlı olarak MES içindeki hızlar düşmekte fakat enzim 24 saat kadar aktive edilebilir halde kalmaktadır. Ancak aktivite kaybına manf olmak için bütün deneylerde saf enzim 4°C de 6 saat dializ edildikten sonra hemen çalışılacak numuneler miktarında taksim edildikten sonra dondurulmuş ve her deney için donmuş enzim bir kere çözül-  
dükten sonra kullanılmıştır. Enzimin uzun saklanması gerektiğin-  
de konsantre bir preparat hazırlanarak dializ edilmiş ve dondu-  
rulmuştur. Kinetik ölçüm için dializ edilen enzim preparatların-  
da ortama daima BPA ilâve edilmiştir. BPA ilâve edilmediği du-  
rumlarda enzim süratle deaktive olmuştur.

## SONUÇLAR

### ENZİMİN SAFLAŞTIRILMASI :

Bütün deneyler + 4°C yapılmıştır.

#### I- Homojenizasyon ve Hücrenin Solübl Kısımının Toplanması :

Toplanan pineal bezler makasla önce üstlerini kaplayan meninges kesildikten sonra teflon homojenizatörde 0,33 M sucrose içinde W/v % 12 oranında homojenize edildi; 14000 rpm'de 15 dakika santrifügasyonla myelin, mitokondri, zarsal kısımlar, nüve ve parçalanmamış hücreler uzaklaştırıldı. Homojenatın 0,25 M sucrose'da 100.000 x g santrifügasyonu ile mikrosomal fraksiyonun elimine edildiği deneylerle yapılan saflaştırma ameliyesi daha iyi sonuç vermedi. Bulanık süpernatant toplandı ve keşif pH 8 sitrat ilâve edilerek  $5 \times 10^{-3}$  M sitrat konsantrasyonunda 37°C da 1,5 saat ısıtıldı, sonra -20°C da müteakip kademeye kadar saklandı. Saflaştırmanın bu bölümünde randıman % 83, saflaştırma ortalama olarak 3,9 mislidir. Dondurulmuş preparat bir

aydan fazla aktivitesini kaybetmeden yaşamaktadır.

2- Amonyum Sülfat Kesidi :

+ 4°C'da süpernatanın her litresine 209 gram solid amonyum sülfat ilâve edilerek % 35 saturasyona getirildi, çöken protein fraksiyonu 14000 rpm de 15 dakika santrifügasyonla atıldı. Toplanan süpernatanın her litresine 129 gram amonyum sülfat ilâve edilerek % 55 saturasyona erişildi. Çökelek 14000 rpm de 15 dakika santrifügasyonla toplandı. Bu çökeleğin aktivitenin takriben % 85'ini ihtiva ettiği tesbit edildi; çökelek keside sokulan süpernatın hacminin 1/20'si hacimde suda çözüldü. Sarı bulanık çözelti  $5 \times 10^{-3}$  m pH 8 sitrata karşı 1/1000 hacimde sekizer saat sürelerle üç defa dializ mayii değiştirilerek dializ edildi. Dializ sonunda koagüle olmuş proteinler 14000 rpm'de 30 dakika santrifügasyonla atıldı. Bulanık süpernatın dondurularak -20°C saklandı. Enzim bu kademedede aktivitesini kaybetmeden 1 ay muhafaza edilebilir. Bu kademedede randıman süpernatana göre takriben % 80 tesbit edilmiştir. Ortalama 5 defa saflaştırma temin edilmektedir.

Bu preparatın  $C_{\gamma}$  alumina, Brushite, kalsiyum fosfat jeli ve celite ile saflaştırılmasına teşebbüs edilmişse de bunlardan sade  $C_{\gamma}$  alumina sonuç vermiş fakat düşük randıman dolayısıyla kullanılmamıştır. Enzim CM selluloz da çeşitli pH'larda tutunmamıştır.

3- Sefadeks G 200 Jel Filtrasyonu ile Saflaştırma :

3 x 50 cm'lik bir kolonda 210 ml evvelce pH = 8,  $5 \times 10^{-3}$  M sitrat ile uzun bir süre içinde tamamen dengeye getirilmiş sefadeks G 200 jelinden, jel hacminin 1/20-1/30'u (7-10 ml) kadar

hacimde amonyum sülfatla saflaştırılmış ve aynı tampona karşı dializ ile dengeye getirilmiş nümune geçirildi. Müteakiben jel aynı tamponla yıkandı, 5 ml'lik fraksiyonlar toplandı. Kolonda önce koyu sarı ve bulanık, proteince çok zengin bir fraksiyon, arkasından enzim aktivitesini ihtiva eden fraksiyon 7-8 kere daha düşük protein konsantrasyonu içinde elüe edildi (Şekil 4). Spesifik aktivitesi yüksek fraksiyonlar toplandı. Enzim kolondan birkaç molekül ağırlığında çıkmaktadır. Ana fraksiyonun saflaştırılması ortalama olarak 32 deneyde 4,5 defa bulunmuştur. Aktivitenin yüzde 73'ü ortalama olarak ana fraksiyonda yer almaktadır; kalan aktivite ana fraksiyondan önce çıkan iki ufak zirve içinde eş miktarda dağılmıştır. Toplanan ana enzim fraksiyonu çok hafif sarı renkli olup berraktır. Bu kademede enzim sitrat içinde 24 saat 37°C da aktivite kaybolmadan muhafaza edilebilir. Bununla beraber preparat DEAE sellüloz kolonlarına girinceye kadar önce 37°C da bir saat aktive edildikten sonra - 20°C da muhafaza edilmiştir.

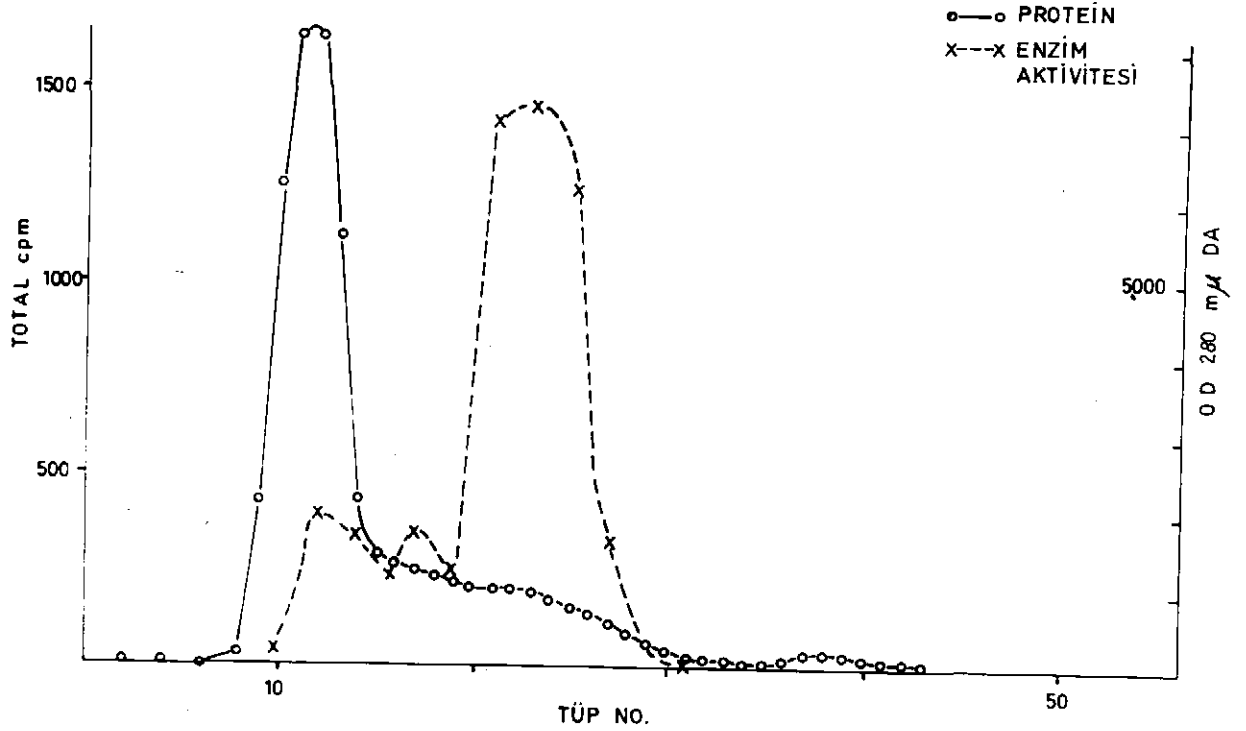
#### 4- DEAE Sellüloz ile Saflaştırma :

Beş sefades G 200 filtrasyonu saflaştırmasından elde edilen malzeme birleştirildi.  $5 \times 10^{-3}$  M pH = 7,5 sitrat tamponuna karşı 1/40 hacim oranında altışar saat süre ile 3 defa dializ edildi. Dializde aktivite kaybı olmadı. Evvelce aynı tampon ile dengeye getirilmiş olan 3 x 30 cm'lik DEAE selüloz kolonundan geçirildi. Kolon geçirilen dializatın hacminde aynı tamponla yıkandı. Müteakiben enzim kolondan pH = 7,5  $5 \times 10^{-3}$  M'dan  $5 \times 10^{-1}$  M'a kadar kompleks bir sitrat gradyeni ile elüe edildi. Bu gaye ile autograde dokuz bölmeli gradyen aleti kullanıldı. Dokuz bölmenin 1, 2, 3, 5, 6, ve 8.inci bölmelerine 160'ar ml

ŞEKİL 4

HIOMT AKTİVİTESİNİN SEFADEKS G-200 JEL FİLTASYONU İLE  
SAFLAŞTIRILMASI

Saflaştırma metinde belirtildiği gibi yapılmıştır . Toplanan fraksiyonlarda protein Warburg metoduna göre uygun bir tarzda sulandırılarak , enzim aktivitesi metodolojide tarif edildiği üzere fraksiyon içinden alınan bir numune Axelrod metoduna göre tayin edilmiştir . Tüp numarası absisde , alınan numunenin verdiği total cpm ordinatta gösterilmiştir .



$5 \times 10^{-3}$  M; 4 ve 7 nolu bölmelere 160 ml  $7,5 \times 10^{-2}$  M; 9 nolu bölmeye 160 ml  $5 \times 10^{-1}$  M pH = 7,5 sitrat tamponu konuldu. Gradyenin molarite hesabı teorik olarak Peterson ve Sobere göre yapıldı (Peterson 1962); boya ile tecrübî olarak eğrinin şekli tesbit edildi ve teorik hesaba uyduğu gözlemlendi. Bu şekilde elde edilen gradyen şekil 5'de gösterildiği gibi enzimin kolondan elüe edildiği kritik bölgede  $2-4 \times 10^{-2}$  M arasında yatık bir konsantrasyon değişimi eğrisi sağlamaktadır. Elüsyon hızı dakikada 1-3 ml civarında idi; elüat renksiz idi. 10 ml'lik fraksiyonlar toplandı. Enzim herbiri farklı iyonik kuvvetlerde selulozdan ayrılan iki küçük, bir büyük olmak üzere üç fraksiyonda elüe edilmektedir. Ana fraksiyon (spesifik aktivitesi en yüksek olan zirve) toplandığı zaman 12 ayrı deneyde saflaştırma ortalama olarak 6 defa bulunmuş ve randıman % 65 civarında tesbit edilmiştir. Toplanan enzim nispeten dayanıksız olduğundan protein ve enzim analizi uzun süre bekletilmeden yapıldı; ve spesifik aktivitesi yüksek uygun fraksiyonlar toplanarak donduruldu.

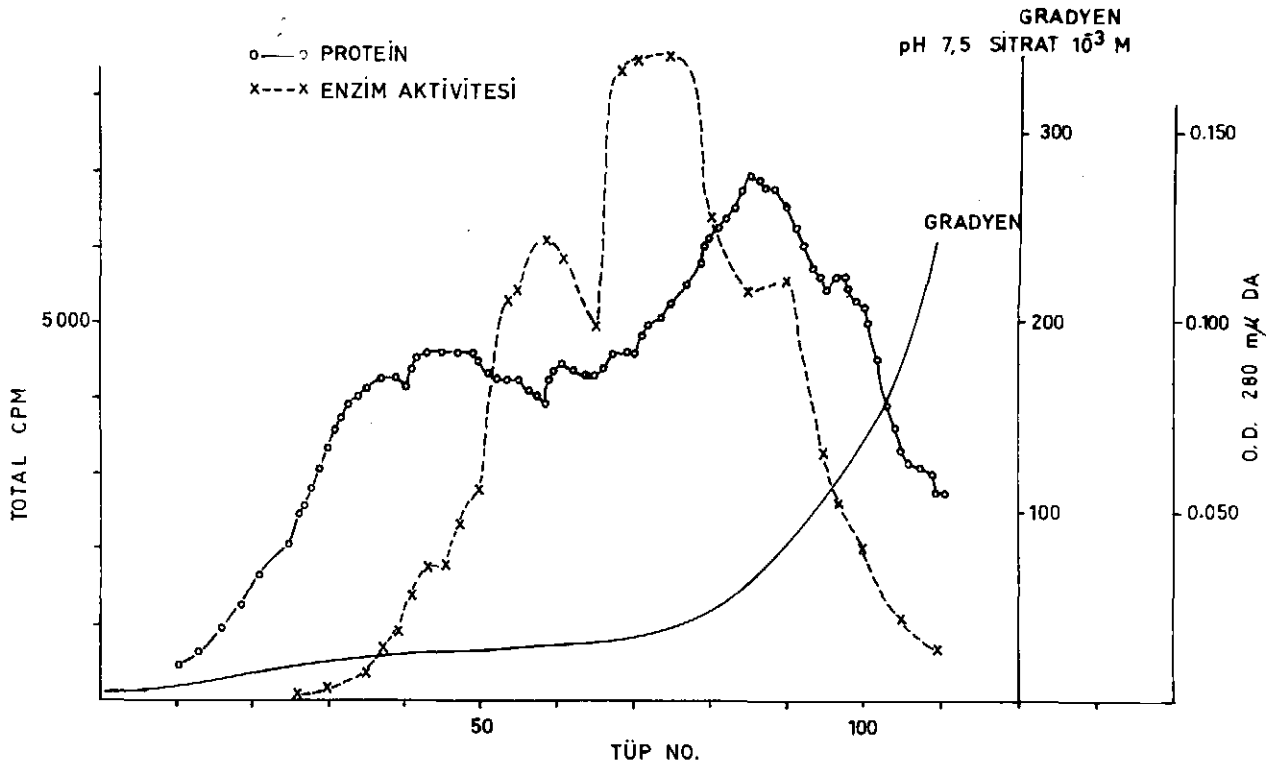
#### 5- ECTEOLA Seluloz ile Saflaştırma :

4 ilâ 5 DEAE seluloz saflaştırmasından elde edilen malmeye birleştirildi.  $2 \times 10^{-3}$  M pH = 7,8 sitrat tamponuna karşı 1/40 hacim oranında beheri 6 saat süre ile 3 defa tampon değiştirilerek dializ edildi. Dializ esnasında aktivitenin % 20'si kayboldu. Bundan sonra 3 x 30 cm'lik evvelce  $2 \times 10^{-3}$  M pH= 7,8 sitrat tamponu ile dengeye getirilmiş olan ECTEOLA cellulose'dan geçirildi. Kolon geçirilen dializatın yarısı hacminde aynı tamponla yıkandı. Muteakiben enzim kolondan pH = 7,8  $2 \times 10^{-3}$  M'dan  $5 \times 10^{-2}$  M'a kadar lineer sitrat gradyeni ile elüe edildi.

ŞEKİL 5

HIOMT AKTİVİTESİNİN DEAE SELÜLOZ İLE SAFLAŞTIRILMASI

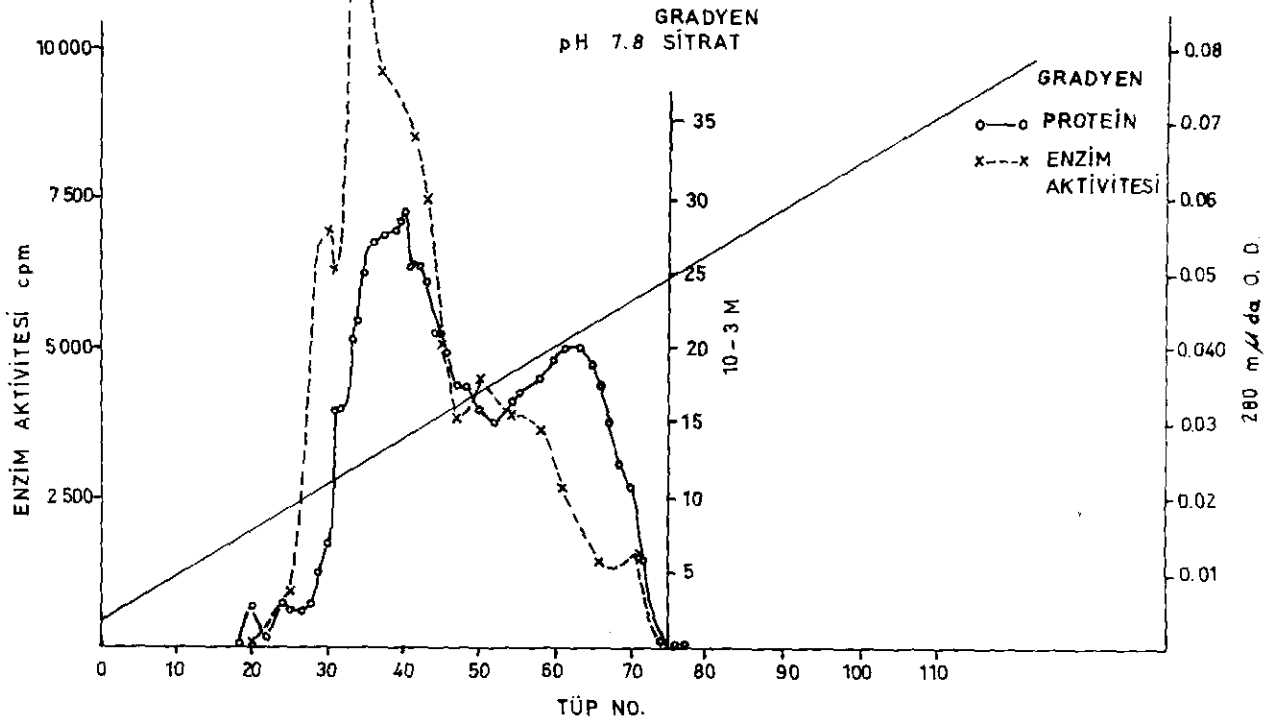
Safılaştırma metinde belirtildiği gibi yapılmıştır . Toplanan fraksiyonlarda protein Warburg metoduna göre sulandırmadan , enzim aktivitesi metodolojide tarif edildiği üzere fraksiyon içinden sulandırılmadan alınan bir nümunedeki Axelrod metoduna göre tayin edilmiştir . Tüp numarası absistde , nümunenin verdiği total cpm ordinatta gösterilmiştir . Kolonda önden çıkan % 20 protein ve kolonda kalan tatbik edilen malzemenin % 25 ini teşkil eden protein grafikde gösterilmemiştir .



ŞEKİL 6

HIOMT AKTİVİTESİNİN ECTEOLA SELÜLOZ İLE SAFLAŞTIRILMASI

Saflaştırma metinde belirtildiği gibi yapılmıştır . Toplanan fraksiyonlarda protein Warburg metoduna göre sulandırmadan ,enzim aktivitesi metodoloji bölümünde tarif edildiği üzere fraksiyon içinden alınan bir numunede sulandırmadan Axelrod metoruna göre tayin edilmiştir . Absisde tüp numarası , ordinatta numunenin verdiği total cpm gösterilmiştir . Kolonda önden çıkan % 2 protein ve kolonda kalan ,tatbik edilen malzemenin % 85 ini teşkil eden protein grafikde gösterilmemiştir .

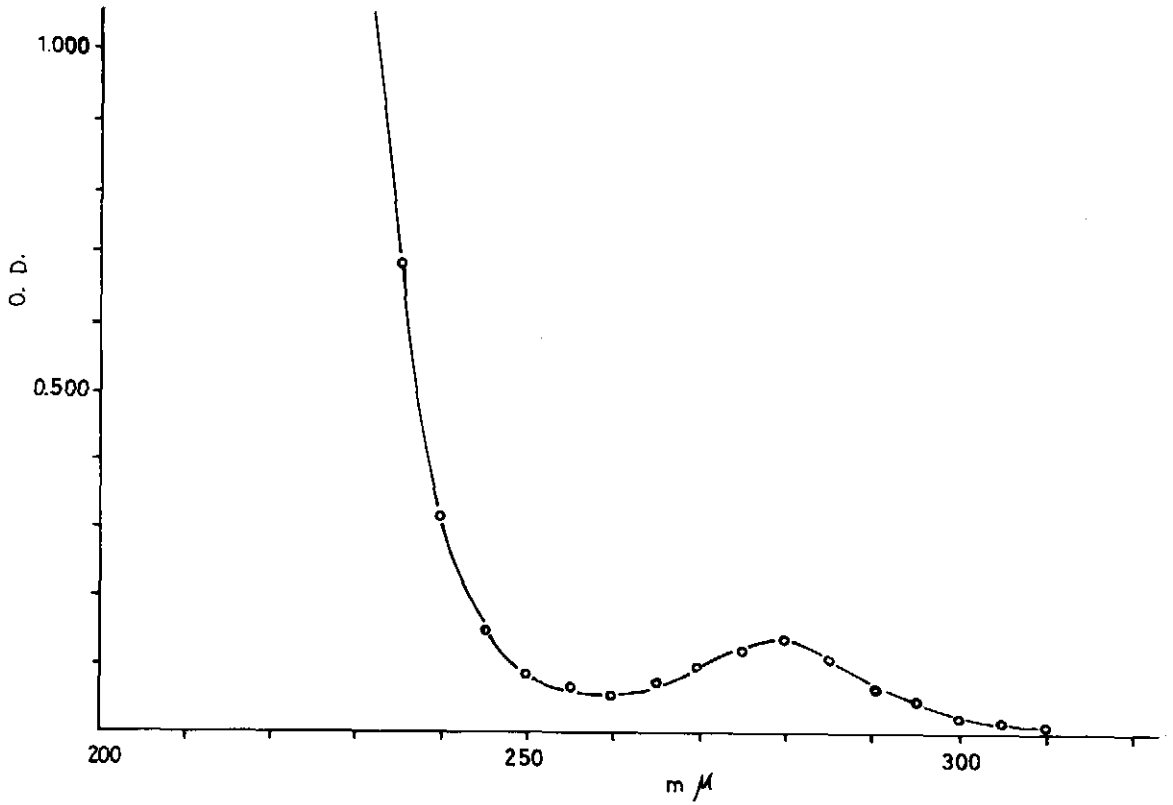




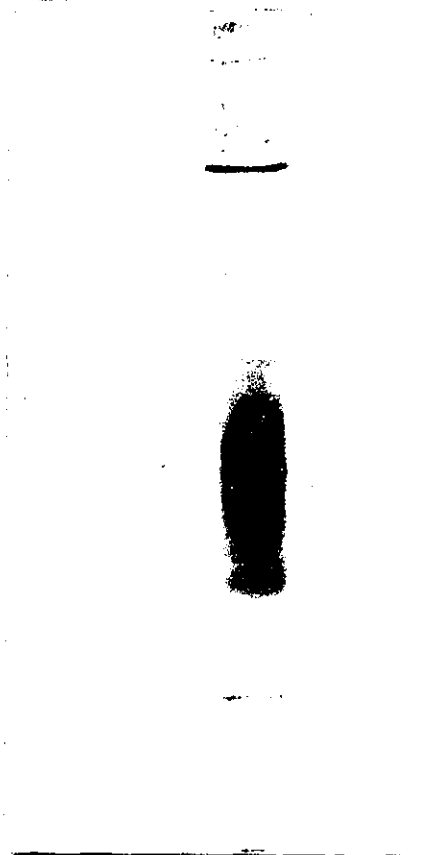
ŞEKİL 7

SAF ENZİMİN SPEKTRUMU

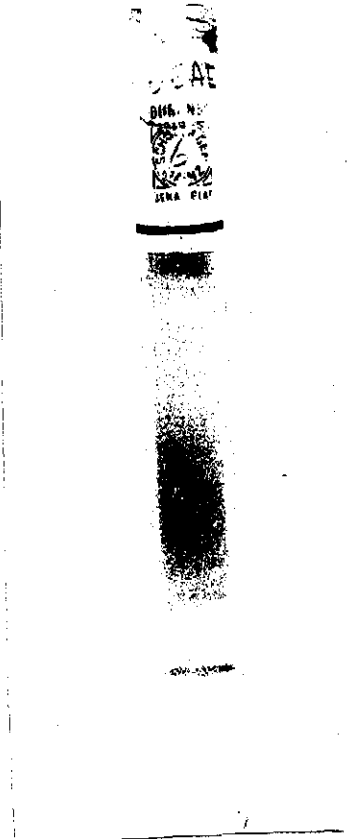
ECTEOLA selülozdan saflaştırılmış , DEAE selülozdan geçirilerek kesifleştirilmiş enzim 1/10 sulandırılmış , kullanılan sitrattan gelen U.V. absorbe eden safsızlıklar göz önüne alınarak uygun sitrat körü hazırlanmış ve absorbans spektrumu tayin edilmiştir . Görüldüğü gibi enzim bir proteine özgül olmak üzere 260 milimikronda 280 milimikrondan daha az absorbans vermiştir . Peptid bağının absorbans verdiği erken U.V. de absorbans 260 ve 280 milimikrondan Warburg metoduna göre hesaplanarak bulunan protein konsantrasyonuna uygun bir değerdedir . Enzimin 300 milimikrondan ileride önemli bir absorbansı yoktur .



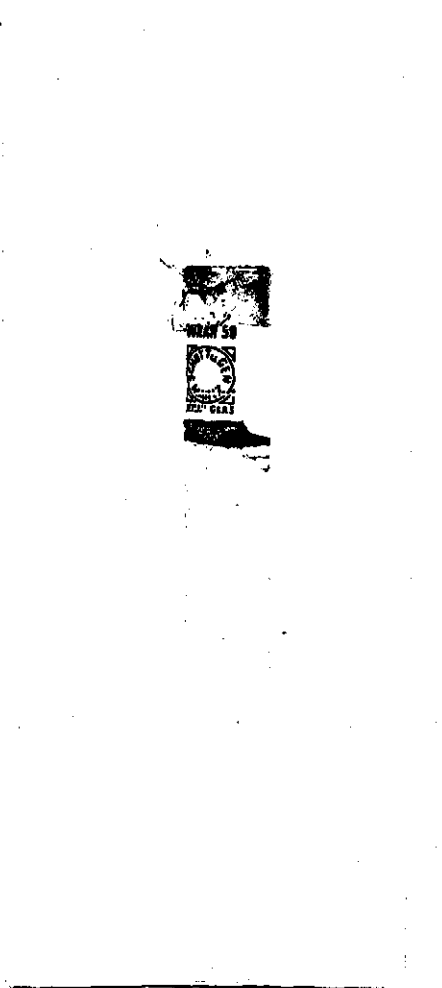
A)



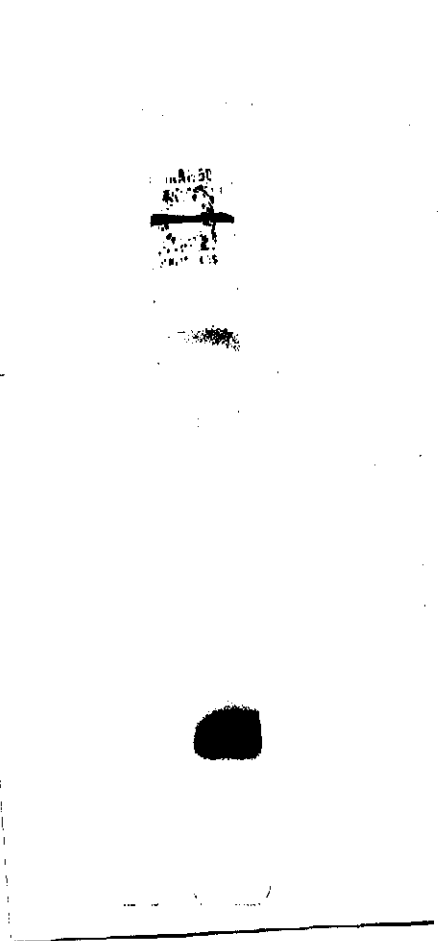
B)



C)



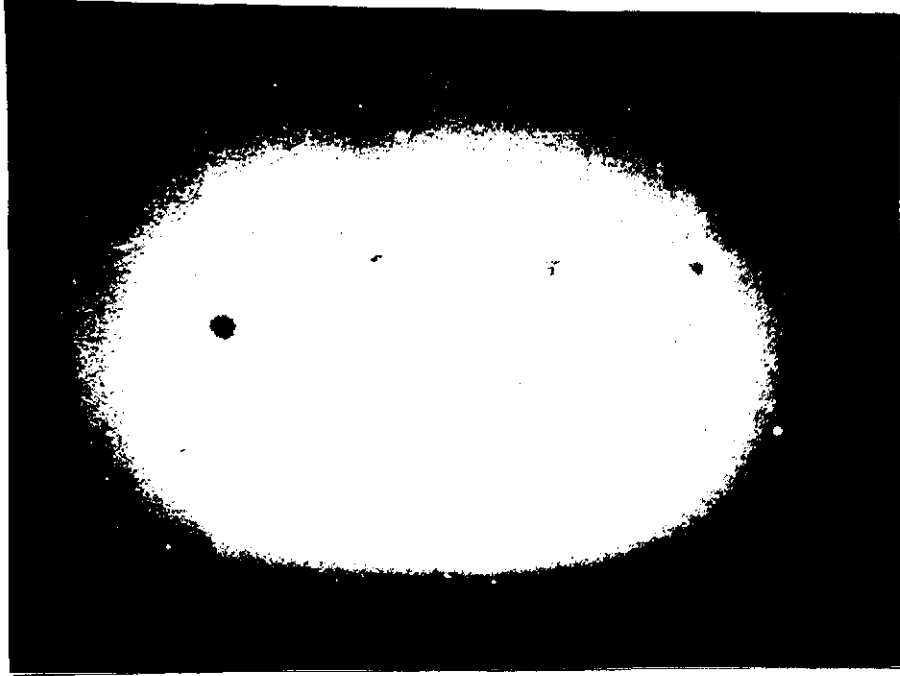
D)



ŞEKİL 10

SENTEZ EDİLEN ÜRÜNÜN TANIMLANMASI

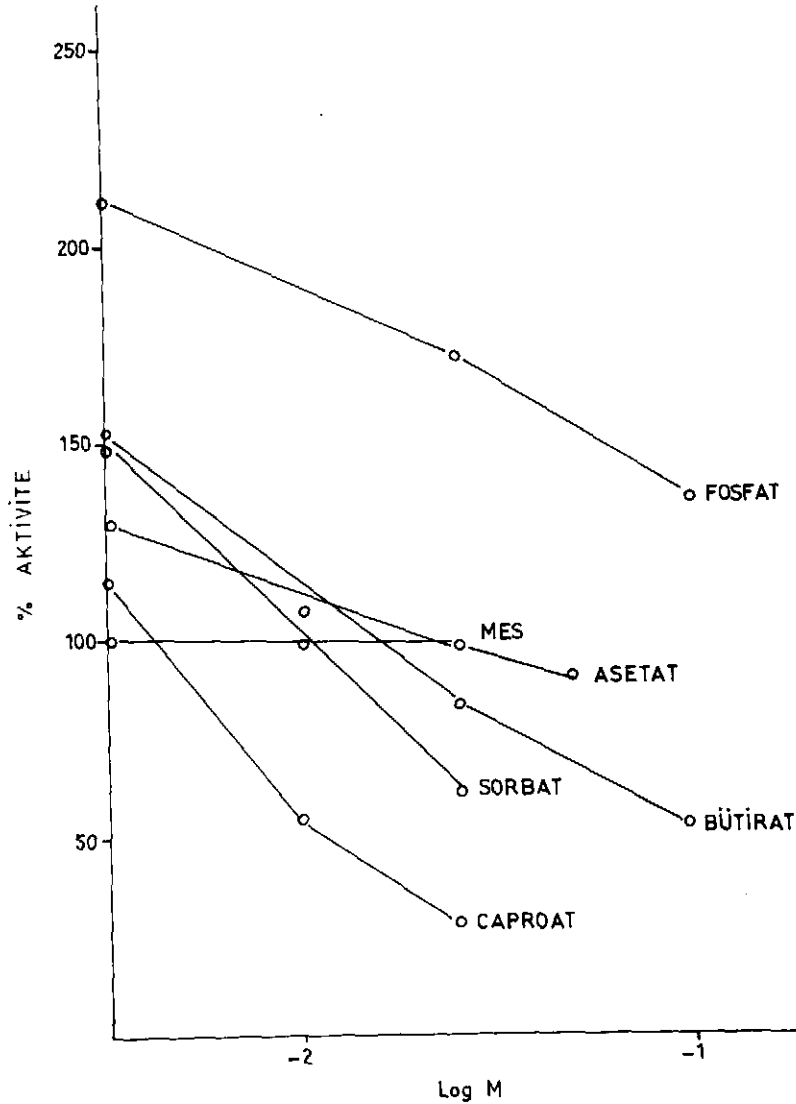
Metinde tarif edildiği üzere hazırlanan ve kesifleştirilen nümune kromatografi plâğına tatbik edildi . Solvent, kloroform/ n-propanol/ $\text{NH}_3$  4/4/1 kullanıldı ; front plâğın üst ucuna 1 cm. yanaşincaya kadar yürütüldü . Plâk kurutuldu , 30 ml metanol , 20 ml 12 N HCl içinde çözülmüş 5 mg. OİD püskürtüldü .  $120^\circ\text{C}$  da ısıtıldı ; 5 dakika sonra karakteristik olarak NAS sarı , m melatonin mavi floresan leke verdiler . Plâkdaki sıra 1) NAS 2) Melatonin 3) NAS + Melatonin 4) Enzimatik kataliz sonunda sentez edilen melatonin ' dir .



ŞEKİL 11

ÇEŞİTLİ ANYONLARIN İNHİBİTÖR ETKİSİ

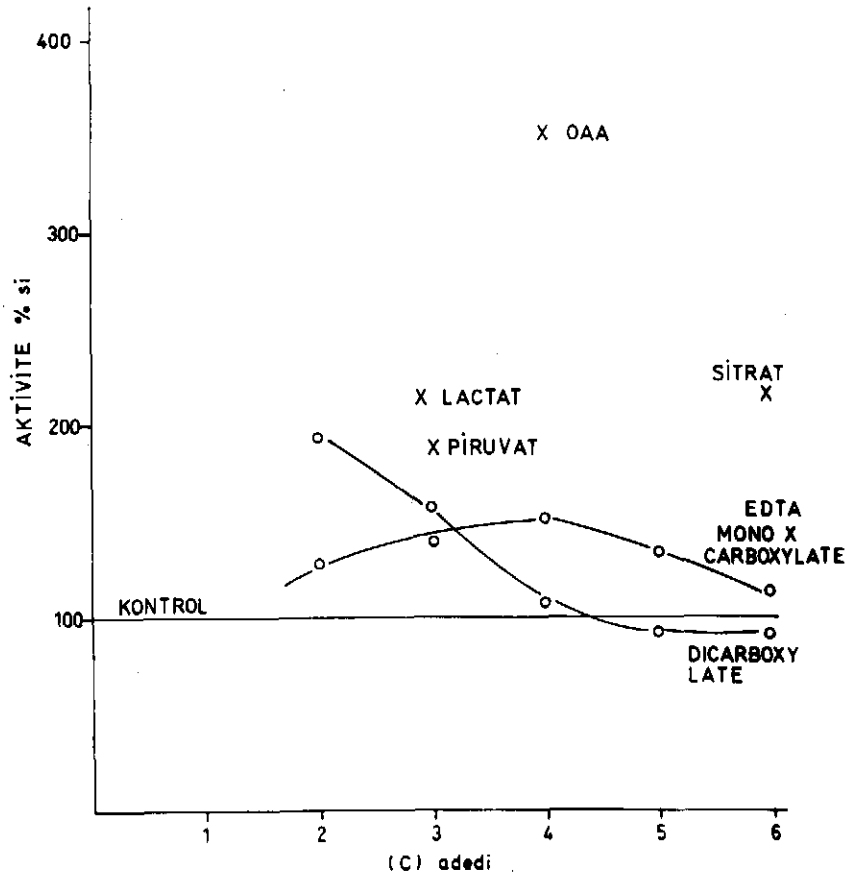
Kinetik deney için hazırlanmış bir enzim üzerine çeşitli "Modifier"lar ilâve edilerek şekilde gösterilen konsantrasyonlara erişildi . Sonra enzim nihai  $\text{SAMH}^3$   $3.3 \times 10^{-7} \text{M}$  ,  $\text{NAS}$   $10^{-4} \text{M}$  ,  $\text{BPA}$   $1 \text{ mg./ml}$  ,  $\text{pH}= 6$  da 1 dakika inkübe edildi . Bütün deneyler üçlü yapıldı , sonuç olarak vasat verildi .  $\text{MES}$  varken gözlenen hız kontrol aktivite ( % 100 ) kabul edilerek diğer birleşiklerle tesbit edilen hızlar buna göre yüzde olarak ordinatta bildirildi. Absisde " Modifier " molaritesinin logaritması gösterilmiştir.



ŞEKİL 13

KARBON ADEDİNE GÖRE ORGANİK ASİTLERİN KATALİZ HIZINA ETKİSİ

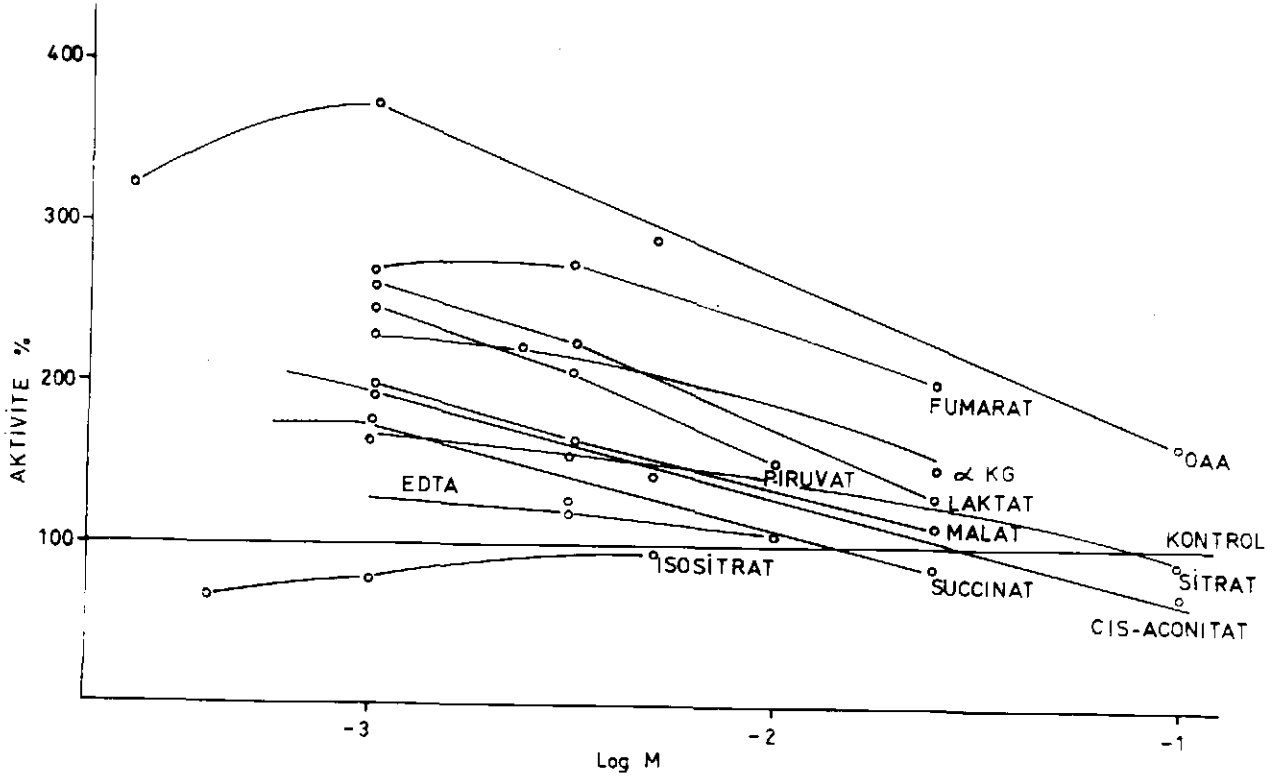
Kinetik deney için hazırlanmış bir enzim preparatına " Modifier "  $3 \times 10^{-3}M$  konsantrasyonda ilâve edildi , sonra nihai  $SAM H^3$   $3.3 \times 10^{-7}M$  ,  $NAS 10^{-4}M$  ,  $BPA 1 mg. / ml$  ,  $pH= 6$  da bir dakika inkübe edildi . Her deney üçlü tayinin ortalamasıdır .  
( o -- o ) bildirilen seriye dahil organik asitleri ;  
( X ) karbon adedi o kadar olan fakat türev yapıda ve özel etkisi olduğu için tabloda özel olarak belirtilmek istenen organik asitlere işaret etmektedir . Abside kullanılan asitlerin karbon adedi , ordinata kontrol  $3 \times 10^{-3}M$  MES varken ( KONTROL ) gözlenen aktiviteye göre hesaplanan ilk hız yüzdeleri işaretlenmiştir .



ŞEKİL 14

KREBS SIKLÜSÜ ARA ÜRÜNLERİNİN KATALİZ HIZINA ETKİSİ

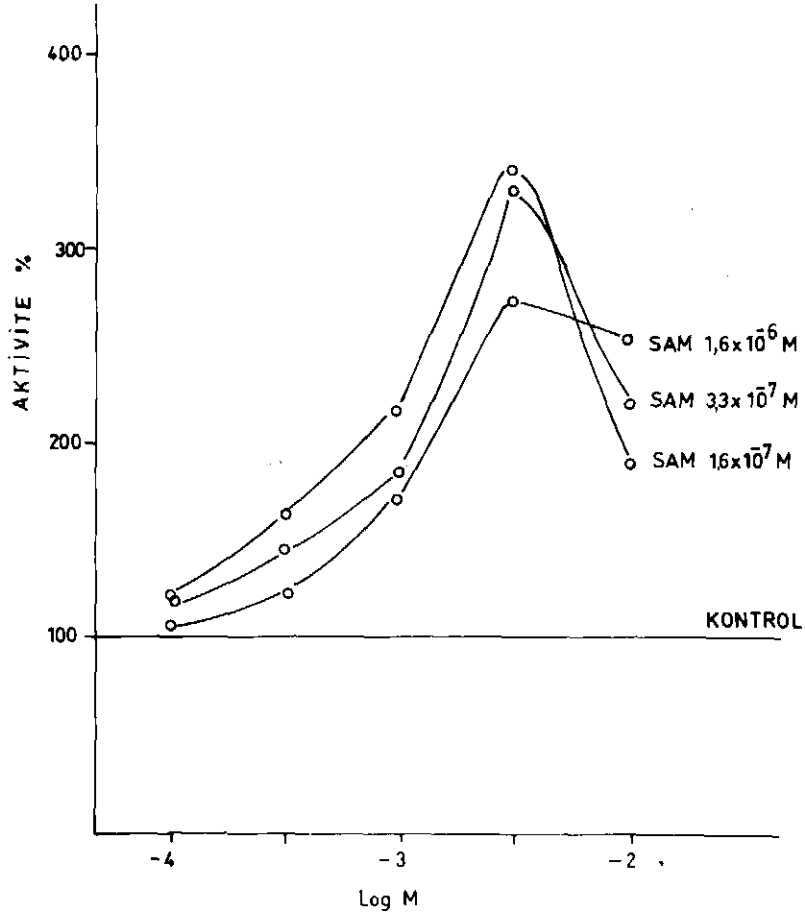
Metodoloji bölümünde tarif edildiği üzere hazırlanan saf enzime deneyden hemen evvel " Modifier " lar gösterilen konsantrasyonda ilâve edildi . Deney karışımı nihai  $\text{SAM H}^3$   $3.3 \times 10^{-7}\text{M}$  ,  $\text{NAS}$   $10^{-4}\text{M}$  ,  $\text{BPA}$   $1 \text{ mg./ml}$  ,  $\text{pH}$  6-idi ; bir dakika inkübasyon yapıldı . Sonuçlar triple deneylerin ortalamasıdır . "Modifier " lar varken bulunan hız aynı deney şartlarında  $3 \times 10^{-3}\text{M}$   $\text{MES}$  varken gözlenen hıza göre yüzde olarak ordinatta , "modifier " molaritesinin logaritması absiste gösterildi .

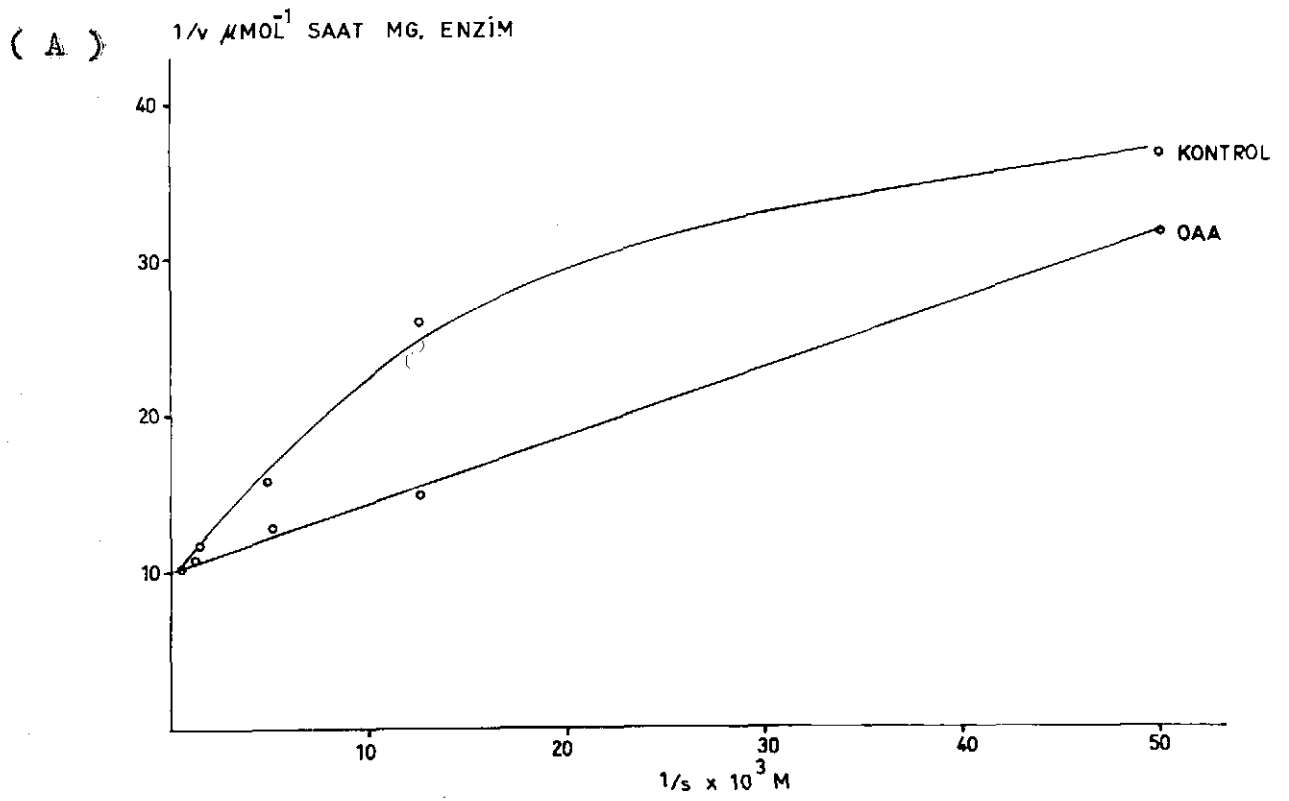


ŞEKİL 15

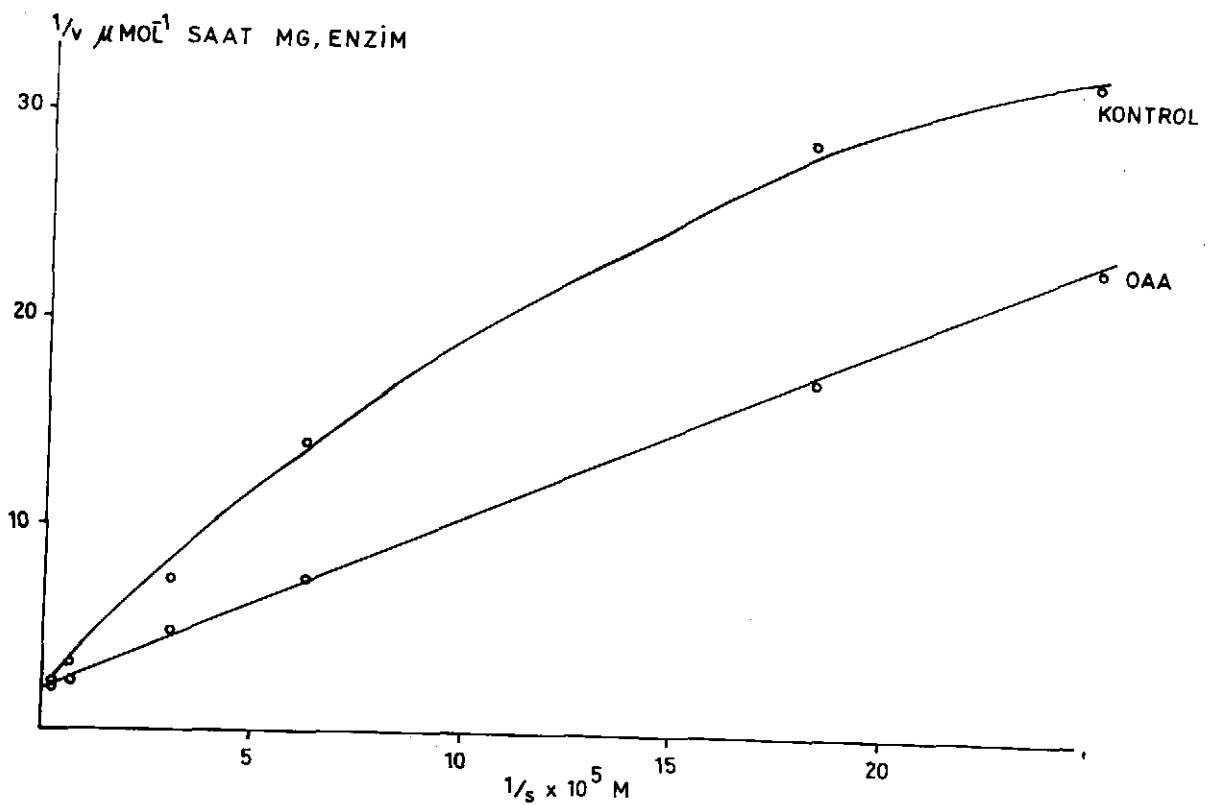
OAA' NİN ÇEŞİTLİ SAM KONSANTRASYONLARINDA ETKİSİ

Kinetik için hazırlanmış saf enzim deneyden hemen önce çeşitli konsantrasyonlarda OAA ile karıştırıldı . İnkübasyon karışımı nihai grafikte gösterilen konsantrasyonlarda SAM  $H^3$ ,  $10^{-4}$  M NAS, 1 mg./ml BPA , pH = 6 idi . İnkübasyon bir dakika yapıldı . Kontrol deneyinde  $3 \times 10^{-3}$  M MES mevcuttu . OAA nın ilâve edildiği deneylerde uygun tamponlamayı temin etmek için gene aynı konsantrasyonda MES deney karışımında mevcuttu . Sonuçlar triple tayinlerin ortalamasıdır . Absisde OAA molaritesinin logaritması , ordinatta kontrol MES deneyine göre gözlenen hız yüzdesi belirtildi.





( B )





ŞEKİL 16

HIOMT AKTİVİTESİNE AİT LINEWEAVER- BURK KİNETİK EĞRİLERİ

Kinetik deney için saf enzim hazırlandı . Kontrol deneyinde nihai MES  $2 \times 10^{-3}M$  , BPA 1 mg./ ml , pH = 6 , aktive deneyde OAA  $3 \times 10^{-3}M$  , BPA 1 mg./ ml , pH = 6 idi. Enzim süstratları ile 1 dakika inkübe edildi . Sonuçlar üçlü tayinlerin ortalaması olarak verilmiştir . (A) SAM  $H^3$  konsantrasyonu  $5.5 \times 10^{-7}M$  da sabit tutuldu , NAS konsantrasyonu değiştirildi .(B) NAS konsantrasyonu  $7 \times 10^{-5}M$  da sabit tutuldu , SAM  $H^3$  konsantrasyonu değiştirildi .

### Çeşitli SAM Konsantrasyonlarında OAA'nın Etkisi

Saf enzimin ilk hızına çeşitli konsantrasyondaki OAA'nın etkisi Şekil 15'de gösterilmiştir. Enzim allosterik bir proteinden beklendiği gibi substrat konsantrasyonu arttığı oranda OAA tarafından daha az aktive edilmekte; gene OAA inhibisyonu yüksek substrat konsantrasyonlarında daha az olmaktadır.

### Enzimin Melatonin Sentezinin Kinetik Karakteri

Saf enzimin MES ile tamponlanmış veya OAA ile aktive edilmiş bir ortamda önce bir sonra öbür substratı sabit konsantrasyonda tutulup, ikinci substratının konsantrasyonu değiştirilerek katalitik hızı ölçülmüştür. Sonuçlar Lineweaver-Burk eğrileri olarak Şekil 16'da gösterilmiştir (Lineveaver-Burk 1939). Bu şekilden gözlendiği gibi enzimin hem NAS hem de SAM ile verdiği hız eğrileri ortamda bir aktivatör yokken hiperbolik, OAA varken lineerdir; yani enzim allosterik bir proteinden beklendiği gibi hareket etmekte substratı tarafından aktive edilmekte, substrat aktivasyon etkisi OAA tarafından silinmektedir.

Enzim, önceki gibi substrat konsantrasyonu arttığı oranda OAA tarafından daha az aktive edilmekte; gene OAA inhibisyonu yüksek substrat konsantrasyonlarında daha az olmaktadır.

### Enzimin Melatonin Sentezinin Kinetik Karakteri

Saf enzimin MES ile tamponlanmış veya OAA ile aktive edilmiş bir ortamda önce bir sonra öbür substratı sabit konsantrasyonda tutulup, ikinci substratının konsantrasyonu değiştirilerek katalitik hızı ölçülmüştür. Sonuçlar Lineweaver-Burk eğrileri olarak Şekil 16'da gösterilmiştir (Lineveaver-Burk 1939). Bu şekilden gözlendiği gibi enzimin hem NAS hem de SAM ile verdiği hız eğrileri ortamda bir aktivatör yokken hiperbolik, OAA varken lineerdir; yani enzim allosterik bir proteinden beklendiği gibi hareket etmekte substratı tarafından aktive edilmekte, substrat aktivasyon etkisi OAA tarafından silinmektedir.

aktiviteye etkileyen diğ er proteinlerin mevcudiyeti ve enzimin kaba ekstrede tam aktif olmaması olabilir. Bu deney pH 6'da anlamlı bir kinetik ölçüm yapılabileceğini göstermektedir.

#### Katyonların Katalitik Hıza Etkisi

Yüksek "modifier" konsantrasyonlarında enzim inhibisyonu gözlenmesi bu inhibisyonun anyon veya katyonlar tarafından mı meydana getirildiği sorununu ortaya çıkarmaktadır. Bu gaye ile enzim nihaf  $5 \times 10^{-2}$  M Li-, Na-, K- asetat ile inkübe edilmiş ve ilk hız ölçülmüştür. Bu deneylerde katyonların etkisi arasında herhangi bir fark gözlenmemiştir.

#### Halojenlerin Katalitik Hıza Etkisi

Enzimin substratlarından SAM iodür tuzu halinde bulunduğ undan enzimin hızına halojenlerin bir etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır.  $2 \times 10^{-3}$  M konsantrasyonlarında olmak üzere  $3 \times 10^{-3}$  M MES pH = 6 içinde florür, klorür, bromür ve iodürün mevcudiyetinde gözlenen hızlar kontrol  $3 \times 10^{-3}$  M pH = 6 MES'de gözlenen hızlardan farkı bulunmamıştır.

#### Karbon Adedine Göre Organik Asitlerin Kataliz Hızına Etkisi

Enzim Krebs siklusu intermedyerleri tarafından kuvvetle aktive edildiği için diğ er organik asitlerin kataliz ilk hızına etkileri tetkik edilmiştir (Şekil 13). Görüldüğü gibi çeşitli mono ve dikarboksilik asitlerin düşük molaritede enzimi biraz aktive veya inhibe edici etkileri mevcuttur. Ancak gözlendiği gibi meselâ 3 karbonlu 2 asit (laktat ve piruvat) propionata göre enzimi aynı molaritede çok daha fazla aktive etmektedirler.

## ENZİMİN KATALİTİK ÖZELLİKLERİ

### Anyonların Enzim Üzerine Etkisi

Enzim kinetiğinin incelenebilmesi için enzim hızına etkisi olmayan bir tampon birleşige ihtiyaç vardı. Bu gaye ile otuzu aşkın birleşigin enzim hızına etkisi araştırılmıştır. Bu birleşiklerin çoğu düşük konsantrasyonlarda enzimi aktive, yüksek konsantrasyonda inhibe ediyor tesbit edilmiştir. Örnek olarak Şekil 11'de bazı monokarboksilik asitler, fosfat ve MES'in kataliz ilk hızına etkisi gösterilmiştir. Görüldüğü gibi MES nisbeten yüksek konsantrasyonda dahi ( $2,5 \times 10^{-2}$  M) etkisizdir. Bütün diğer iyonlar yüksek konsantrasyonda inhibitör olarak tesbit edilmiştir. MOPS'ın etkisi de MES'e benzemektedir. Monocarboxylic asitlerin inhibitör etkisi zincir boyu uzadıkça daha belirli hale geçmektedir. Bu gözlemlere dayanarak inert bir tampon olarak MES tercih edilmiştir.

### pH'nin Katalitik Aktiviteye Etkisi

Saf enzimin çeşitli pH'larda hızı Şekil 12'de gösterilmiştir. Deneylerin kinetik bir anlam taşıyabilmesi için enzim OAA ile tamamen aktive edilmiş durumda ve substrat aktivasyonunun iyi gözlendiği  $1,6 \times 10^{-6}$  M SAM H<sup>3</sup> içinde inkübe edilerek ilk hız ölçülmüştür. Yüksek pH'larda tamponlama ortamına katılan inert tamponlar MES ve MOPS tarafından temin edilmiştir. Görüldüğü gibi enzimin geniş bir pH optimum'u mevcuttur. Kaba pineal ektreleri kullanıldığında benzer eğriler gözlenmiştir; ancak pH = 8'deki optimum daha belirlenmiş ve eğri daha dik bulunmuştur. Bunun birkaç sebebi enzimin saf olmaması, kaba homojenatta

vardı. DEAE selülozdan elüe edilmiş enzim preparatında da ana enzim bantının arkasında çok diffüz, soluk, sınırları iyi belirsiz müteaddit protein bantları gözlenmektedir.

ECTEOLA selüloz ile saflaştırılmış enzim preparatındaki ana bant dışındaki bantlar muhtemelen density gradient centrifugation analizinde gözlenen daha ufak molekül ağırlığındaki uniteleri temsil etmektedir.

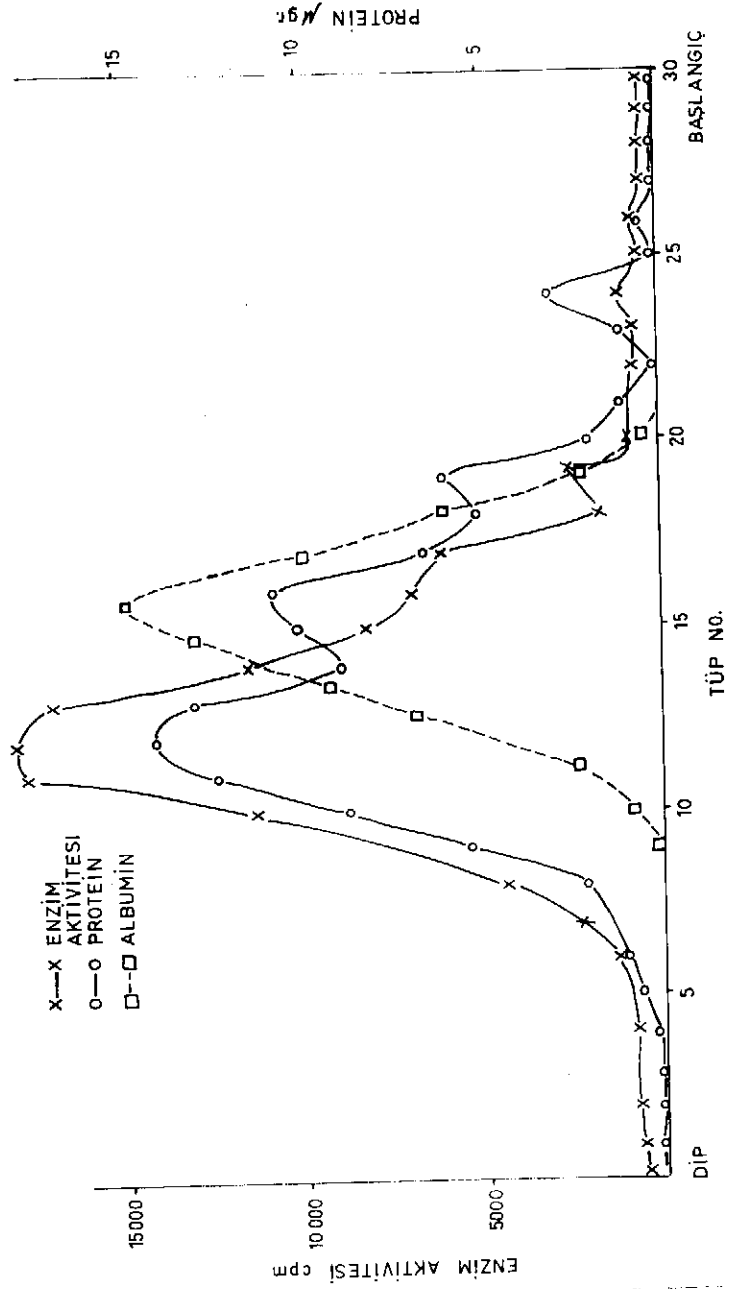
### Enzimin Molekül Ağırlığının Density Gradient Centrifugation ile Tayini

DEAE'den geçirilerek kesifleştirilmiş saf enzim proteini metodolojide tarif edildiği üzere density gradient centrifugationa tabi tutuldu. Şekil 9'dan görüldüğü gibi dört protein zirvesi ve her zirveye tekabül eden bir enzim aktivite zirvesi gözlemlendi. Molekül ağırlığı hesaplandığında (Schachmann 1963) bu zirvelerden ana zirvenin 126.000, diğerlerinin sıra ile 69.000, 41.500, 24.500 olduğu bulundu. Bu sonuç enzimin muhtemel monomerinin 25.000 molekül ağırlığı civarında olduğunu, diğerlerinin dimer, trimer v.s. gibi yapıları temsil ettiğini telkin etmektedir. Ana zirve muhtemelen tetra-veya pentamerdir. Proteinin % 75'i ana zirvede, % 25'i ufak zirvelerde; aktivitenin % 90'ı ana zirvede % 10'u ufak zirvelerde yer almaktadır. İlginç bir nokta polimer enzimin (ana zirve) çok yüksek spesifik aktivitesine karşı diğerlerinin herbirinin spesifik aktivitelerinin 4 defa daha düşük oluşudur. Bunun sebebi enzimin bu tip unitelerinin daha kolay denatüre olması veya daha az aktif olması diye düşünülebilir. Density gradient centrifugation ile tesbit edilen multipl aktivite ve bu aktivitelere tekabül eden

ŞEKİL 9

DENSITY GRADIENT CENTRIFUGATION İLE ENZİMİN MOLEKÜL AĞIRLIĞININ  
TAYİN EDİLMESİ

Saflaştırılmış ve kesifleştirilmiş enzim önce dializ ile pH= 7.8  $5 \times 10^{-3}$ M sitrat içinde dengeye getirildi . Bu preparattan alınan ve 120 mikrogram enzim proteini ihtiva eden 0.1 ml nümune  $5 \times 10^{-3}$ M pH= 7.8 sitrat ihtiva eden % 5 den 20 ye kadar lineer sükroz gradyenine tatbik edildi . Aynı şartlarda 50 mikrogram saflaştırılmış BPA 0.1 ml içinde tatbik edildi . Beckman L 2 D analitik ultrasantrifüjünde SW 39 tipi swinging bucket kullanılarak 39000 rpm ve  $3^{\circ}\text{C}$  da 25 saat santrifügasyon yapıldı . Deney iki defa tekrar edildi . Sonuçlar iki deneyin ortalaması olarak bildirildi . Toplanan damlaların bir kısmı uygun sulandırma ile enzim analizine tabi tutuldu . Nihai SAM  $\text{H}^3$   $3.3 \times 10^{-7}$ M , NAS  $10^{-4}$ M , BPA 1 mg./ml , pH= 7 ,  $5 \times 10^{-3}$ M sitrat tamponu içinde bir dakika inkübe edildi . Sonuçlar mikro gram olarak damladaki total protein ve damladaki enzim aktivitesi totali cpm olarak bildirilmiştir .



proteinler bundan önce sefadex G 200 filtrasyonunda, DEAE ve ECTEOLA cullulose deneylerinde gözlemlenen birden fazla zirve için bir yorum zemini teşkil edebilir. Aynı şekilde akrilamid elekt-roforezinde de bir tanesi koyu, üçü daha açık olan 4 band göz-lenmesi yukarıdaki bütün bulguları teyid etmektedir.

#### Saf Enzimin Sentez Ettiği Ürünün Melatonin Olduğunun Tesbiti

Kinetik deneylerden bakiye kalan melatonin muhtevası bakımından yüksek tesbit edilen kloroform ekstreleri bir araya toplanmış, kloroform vakumda 37°C da uçurularak kesifleştiril-miş, önce iki defa 0,1 N HCl, sonra 4 defa su ile yıkanmıştır. Temizlenmiş kloroform ekstresi kuruluğa yakın uçurulmuş, prepa-rat üstüne üç defa 0.2 ml -20°C de soğutulmuş heptan ilâve edi-lerek kloroformdan gelen geride biriken katran tabiatındaki bi-leşikler eritilmiş ve alınmıştır; her yıkamada melatonin sant-rifüjle çökertilmiştir. Bakiye toz solid madde olarak yetersiz miktarda olduğundan minimal kloroform içinde çözülmüş ve infra-red analizi yapılmıştır. Spektrumunda metoksi grubunun verdiği band gözlenmiştir.

Aynı malzeme Thin Layer kromatografi ile incelenmiştir (Şekil 10). Enzimin sentez ettiği birleşik gözlendiği gibi: a) Kimyasal sentez edilmiş melatoninle aynı R<sub>f</sub> değerinde tesbit edilmiştir. b) OPD ile tepkimeden sonra aynı mavi floresansı göstermiştir. c) Leke kazanıp radyoaktif sayım yapıldığında yük-sek radyoaktivite ihtiva ettiği gözlenmiştir. Bütün bu bulgular enzimin NAS ve SAM'dan melatonin sentez ettiğini göstermektedir.



ŞEKİL 8

SAFLAŞTIRMANIN BAZI KADEMELERİNDEN ALINAN NÜMUNELERİN AKRİLAMİD  
JEL ELEKTROFOREZİ

Elektroforez % 7 akrilamid üzerinde pH= 9.2 Tris-glisin tamponu kullanarak metodolojiğe bildirildiği gibi yapıldı .

- A) Sefadeks G 200 filtratı
- B) DEAE sellüloz elüatı
- C) ECTEOLA selüloz elüatı (kesifleştirilmiş )
- D) Kontrol, Albümin

### Enzim'in Spektrumu

Safılaştırılıp kesifleştirilmiş aktivitenin protein tabiatında olup olmadığı 2 şekilde araştırılmıştır. Önce kesif preparat 1/10 sulandırılıp spektrumu alınmış (Şekil 7) ve bunun bir proteinin spektrumuna uyduğu görülmüştür. İkinci olarak enzim bir proteinden beklendiği gibi Folin Ciocolteau reaktifini redüklemiştir.

### Safılaştırılmış Enzimin Akrilamid Elektroforezi İle Tetkiki

Saf enzim 6 saat süre ile  $5 \times 10^{-3}$  M pH = 7 sitrat tamponuna karşı dializ edildikten sonra 100 mikrogram protein ihtiva eden bir miktar metodoloji bölümünde tarif edildiği gibi akrilamid elektroforezine tabi tutulmuştur. Enzimin ilerlemesi BPA ile mukayese edilmiştir. Enzimin zayıf anyon değiştirici selulozlar (ECTEOLA selüloz gibi) kullanılarak en iyi safılaştırılabilmesi, katyon değiştirici malzemeye tutunmaması gözlemlerini teyit etmek üzere enzim proteini süratle anoda (hattâ albuminden daha hızlı) göç eder tesbit edilmiştir. Bu karakteri itibarı ile enzim asidik bir protein intibasını uyandırmaktadır. Safılaştırılmış enzim disk elektroforezinde dört bant olarak bulunmuştur. Bu bantlardan biri (en hızlı ilerleyeni) belirli diğer üçü silikdir (Şekil 8). Akrilamid ortamı katalitik aktiviteyi bozduğundan bantların enzim aktivitesi araştırılamamıştır. Şekil 8'de safılaştırma derecesini göstermek üzere sefadeks filtrasyonu yapılmış bir preparat ile DEAE selüloz kromatografisi ile safılaştırılmış enzimden hazırlanan akrilamid elektrofrezininin sonuçları da takdim edilmiştir. Görüldüğü gibi sefadeksden filtre edilmiş enzim preparatında halâ pek çok protein bandı

Elüsyon hızı dakikada 5 ml civarında idi. Toplanan fraksiyonların hacmi 10 ml idi. Fraksiyonların protein ve enzim analizi bekletilmeden yapıldı. Sonuç şekil 6'da gösterilmiştir. Bu kademede enzim hemen kesifleştirme ameliyesine geçilmezse süratle denatüre olmaktadır. Enzim bir büyük iki ufak ve büyük olana bitişik total 3 fraksiyon halinde çıkmaktadır. Büyük fraksiyon müteakip kesifleştirme ameliyesine tabi tutulmuştur. Ana fraksiyon toplandığı zaman üç ayrı deneyde saflaştırma ortalama olarak 8 defa bulunmuş ve randıman % 50 civarında tesbit edilmiştir.

#### 6- Enzim Aktivitesinin Kesifleştirilmesi :

Toplanılan uygun, spesifik aktivitesi yüksek fraksiyonlar sitrat muhtevaları  $5 \times 10^{-3}$  M'a getirilmek üzere soğuk iyon-suz su ile sulandırıldı ve evvelce  $5 \times 10^{-3}$  M pH = 7,8 sitrat ile dengeye getirilmiş  $1 \times 5$  cm'lik DEAE selüloz kolonundan geçirildi. Kolonda toplanan enzim 1 M pH = 7,8 sitrat ile kesif olarak elüe edildi. Toplanan birer ml'lik fraksiyonlar uygun bir tarzda sulandırılarak (protein tayini için 1/10, enzim tayini için 1/100, 1 mg/ml BPA içinde) gerekli nümune alındıktan sonra hemen  $-20^{\circ}\text{C}$  da donduruldu. Bu tip preparat müteakip çalışmalarda enzimin kinetik, fizikokimyasal ve biyokimyasal özelliklerini tetkik için kullanıldı.

Saflaştırma ameliyesinin çeşitli kademeleri toplu olarak Tablo 1'de özetlenmiştir.

## TARTIŞMA

Taktim edilen çalışmada sığır pineal bez HIOMT aktivitesi büyük ölçüde saflaştırılmış ve özellikleri incelenmiştir. Evvelce Axelrod tarafından gösterildiği gibi (Axelrod 1961) bu aktivite sadece pineal bezde bulunmaktadır. Nitekim bu çalışmada da çeşitli sığır ve sığan dokularından ve beyin bölgelerinden temin edilen homojenatlarda HIOMT aktivitesine rastlanmamıştır. Yine Axelrod tarafından teklif edildiği gibi enzimin en iyi sübstratı NAS'dır ve SAM'a mutlak ihtiyaç göstermektedir. Saf enzimin indol türevlerine ilgisi çalışmada şimdilik etraflıca araştırılmamıştır.

Enzim klasik ekstraksiyon metodları ile pineal bezden çıkarılmış ve hücre fraksiyonlanması teknikleriyle sitoplazmada yer aldığı gösterilmiştir. Enzim saflaştırma ameliyesinin ileri kademelerine kadar ortamda sitrat veya bikarbonat bulunduğu sürece dayanıklıdır. Saf enzim dilüsyon ile kolayca denatüre olmaktadır. Axelrod, Moore ve Weiss tarafından (Axelrod 1961 b

Moore 1967-1968, Weiss 1968) sıçan pineal homojenatlarındaki aktiviteye atfedilen süratli denaturasyonun gözlemi enzimin saflaştırmanın ilk kademelerinde dayanıklı olabilmesi için mutlaka sitrat içinde tutulması lüzumuna işaret etmektedir. Bahsedilen müellifler bu tedbiri almamışlardır. Nitekim enzim bezden ekstre edildiğinde aktiviteler düşük iken sitrat ilâvesinden ve en az 1,5 saat 37°C de inkübe edilmesinden sonra aktivite minimum 4-5 defa yükselmektedir. Bu durumdaki enzim dondurulmasa bile uzun bir süre dayanır; hatta buz dolabında 15 gün terkedi-len bir preparat aktivitesini aynı ile muhafaza etmiştir. Daha önceki araştırmacıların enzimi saflaştırma yönüne gidememelerinin sebebi bu şekilde aktivasyon tedbirinin alınmamasıdır.

Enzimin sitoplazmada yer alması, spesifik aktivitesinin oldukça düşük olması saflaştırma ameliyesini zorlaştırmıştır. Örneğin hemen hemen renksiz, büyük bir grup proteinin çoktan atılmış olduğu sefadeks filtrasyonu sonunda akrilamid elektroforezinde gösterildiği gibi halâ pek çok tip protein mevcuttur. Enzimin saflaşmasının son kademesinde dahi akrilamid elektroforezinde ve density gradient santrifugasyonunda biri koyu diğerleri silik dört bant gözlenmektedir. Ancak böyle bir preparatın içinde gözlenen dört band muhtemelen metinde tartışıldığı gibi enzimin çeşitli polimerizasyon yapısında olmasından ileri gelmektedir. Nitekim enzim kolayca polimerleşmektedir ve polimerizasyon derecesi fizyolojik preparatlarda density gradient santrifugasyonunda tesbit edilen tipten daha da büyüktür. Zira örneğin sefadeks filtrasyonunda enzim aktivitesinin % 10'u çok yüksek molekül ağırlığına işaret etmek üzere gayrisafiyetle beraber kolonun ölü hacmi içinde, bir diğer % 10'u da biraz daha

hafif molekül ağırlığında olduğunu göstermek üzere ilk proteinin hemen arkasından çıkmaktadır. Gene süstitüe selülozlarda farklı iyonik kuvvetlerde farklı spesifik aktivitedeki enzim proteininin elüsyonu density gradient sentrifugasyonunda farklı spesifik aktivitede zirvelerin bulunuşu, monomerlerden çok yüksek polimere kadar harmonik bir dizinin enzimin polimerizasyonu için söz konusu olduğunu telkin etmektedir. Bu polimerlerin teker teker saflaştırılması ve kinetik özelliklerinin incelenmesi ayrı bir çalışma konusudur.

Saflaştırma ameliyesinde anyon değiştirici her tip malzemenin kullanılabilmesi, enzimin anoda süratle elektroforetik göçü, katyon değiştiricilere tutulmaması asidik bir protein olduğunu telkin etmektedir.

Enzimin saflaştırılması sırasında tuzla veya pH ile koldan elüsyonu elüsyonda kullanılan tuz sitrat ise en iyi şekilde başarılabilir. Diğer organik tuzlar kullanıldığında enzim ya yaygın zirveler halinde elüe edilmekte veya süratle denatüre olmaktadır.

Saf enzimin kinetik davranışı çok ilginçdir. Enzim hem NAS hem de SAM ile süstrat aktivasyonu gösterir. Kataliz hızı ortamda aktivatör varken Michaelis-Menten kinetiklerine uyar. Aktivatörler yüksek konsantrasyonlarda aynı zamanda inhibitördürler. Bu bulgular allosterik bir proteinle karşılaştığımızı işaret eder (Monod 1963-1965, Özand 1969, Frieden 1962). Enzimin en iyi aktivatörü OAA'dır. Allosterik bir proteinden beklenacağı gibi eğer enzimin süstratı tarafından aktive edildiği hudut içinde hız ölçülürse, yani SAM ve NAS konsantrasyonu arttırılırsa OAA'nın aktivator etkisi silinir. Yine her allosterik

protein için söz konusu olan farklı polimerizasyon dereceleri bahis konusudur. Düşük polimerler (monomer, dimer, trimer) nispeten inaktif, yüksek polimerler çok aktiftir. Saf enzim süratle denature olduğundan, ayrıca ağır metallere çok hassas olduğundan desensitizasyona yol açacak bir metod kurulamamıştır.

İlginç olan bir fizyolojik bulgu enzimin özellikle OAA, alfa keto glutarat, karbondioksit, sitrat tarafından aktivasyonu ve saflaştırmada sitrat ve karbondioksit tarafından korunmasıdır. Bu bileşikler diğer allosterik enzimler için modifier olarak teklif edilmiştir. Örneğin sitrat fosfofruktokinaz için inhibitör, (Parmeggiani 1963, Garland 1963), karbondioksit pyruvik karboksilaz için aktivatör (Scrutton 1965), sitrat asetil CoA karboksilaz için aktivatör (Wakil 1962), OAA NADP kullanan izositrik dehidrogenaz için aktivatör (Plant 1963), alfa keto glutarat, NAD kullanan izositrik dehidrogenaz için inhibitördür (Plant 1963). Son olarak gösterildiği gibi S.S.S. de iletim enzimi olan Asetilkolinesteraz HIOMT için tarif edilen bütün allosterik özellikleri aynı ile göstermektedir. Aynı aktivatör bileşikler aynı konsantrasyonlarda şeklen aynı aktivasyon eğrileri vererek Asetilkolinesterazı da etkilemektedirler (Emerk 1970). İki enzimin özellikleri bu bakımdan hemen tamamen aynıdır. Ancak tek fark olarak pyruvat ve laktat Asetilkolinesterazı inhibe ederlerken HIOMT'u aktive ederler. Enzimin hızına ATP, ADP, AMP ve 3'-5' AMP'nin bariz bir etkisi yoktur. Bu bulgular enzimin fizyolojik görevi bakımından şu ihtimali akla getirmektedir: Eğer pinealosit içinde dıştan gelen bir uyarma sonucunda krebs siklusu tamamen doyurulursa sitoplazmaya OAA ve sitratın sızması beklenebilir. Bu iki bileşiğin sitoplazmaya karbonhidrat

ve yağ metabolizmasının çeşitli safhalarında sızabildiği ve allosterek başlangıç enzimlerini aktive ederek gluconeogenez ve lipogenezi başlattığı ispat edilmiştir. (Wakil 1962, Plant 1963, Scrutton 1965, Garland 1963). Gluconeogenez ve lipogenez başlangıcındaki enzimlerin aktivasyonuna sebep olan OAA ve sitratın optimum konsantrasyonları  $1-5 \times 10^{-3}$  M arasındadır. Bu değerler HIOMT için de aynı ile söz konusudur. Roth tarafından gösterildiği gibi bezde karanlıkta HIOMT aktivitesinin yükselmesi ve dolayısıyla melatoninin aktif olarak sentez edilmesi esnasında artmış bir  $P^{32}$  enkorporasyonu vukubulmaktadır. Yani bezin enerjice zengin fosfatlarının metabolik dönüşümü çok artmıştır. Dolayısıyla bu şartlar altında Krebs siklusu faaliyetinin artması, oksidatif fosforilasyonun sature olması ve sitoplazmaya Krebs siklusu intermedyerlerinin sızması, glikolizin doyması ile laktat hatta pyruvat birikmesi beklenmelidir. Bu bileşikler de enzimi aktif halde tutarlar.

Fizyolojik uyarımlarla ilgili olarak artmış HIOMT aktivitesinin gözleendiği durumlarda bu artmış aktivitenin de novo enzim sentezine bağlı olabileceği muhtemelse de yüksek aktivitenin yukardaki tarzda izahı yani Krebs siklusu ara ürünlerinin aktivasyonu bu çalışmanın ispat ettiği gibi muhtemelen ana fizyolojik sebeptir.



REFERANSLAR

- Axelrod, J., P.D. MacLean, R.W. Albers, H.W. Weissbach. Regional Neurochemistry, ed. by S.S. Kety, J. Elkes, Oxford, Pergamon Press sahife : 307 (1961)
- Axelrod, J., H.W. Weissbach, J. Biol. Chem. 236:211 (1961b)
- Axelrod, J., R.J. Wurtman . Advances in Pharmacology . ed. by S. Garattini, P.A. Shore , New York, Academic Press Vol.6, Part A sahife:157 (1968)
- Bagnara, J.T. , Science 132:1481 (1960)
- Bakke, J.L., N.L. Lawrence Metab., Clin. Exptl. 14:841 (1965)
- Barchas, J., F. DaCosta, S. Spector . Nature 214:919 (1967)
- Bray, G.A. Analytical Biochemistry 1:279 (1960)
- Colowick, S.P., N.O. Kaplan. Methods in Enzymology, New York , Academic Press Vol.1, sahife:1 (1962)
- Davis, B.J., Ornstein . Ann. N.Y. Acad. Sci. 121:404 (1965)
- Edinger, T. Progr. in Neurobiology:I:120 (1956)
- Emerk. K. Doktora tezi (1970)
- Frieden, C. J. Biol. Chem. 239:3522 (1964)
- Garland, P.B., P.J. Randle. Nature 200:169 (1963)
- Halberg, F., A. Zander, M.V. Hougum, H.R. Muhleman Am. J. Physiol. 177:361 (1954)
- Halberg, F., R.E. Peterson, R.H. Silber. Endocrinology 64:222 (1959)
- Iraldi De, A.P., L.M. Zieher, E. DeRobertis. Structure and Function of the Epiphysis Cerebri . ed. by A.J. Kappers, J.P. Schadé Amsterdam, Elsevier Publishing Company Vol 10:389 (1965)

- Jardetsky, C. D., C. P. Barnum, F. Halberg. Am. J. Physiol. 187:608 (1956)
- Kamer, De, J. C. V. Structure and Function of the Epiphysis Cerebri  
ed. by J. A. Kappers, J. P. Schadé, Amsterdam, Elsevier Publishing  
Company Vol 10:31 (1965)
- Kappers, J. A., ibid: Sahife:87 (1965)
- Lineweaver, H., D. Burk. J. Am. Chem. Soc. 56:658 (1939)
- Lowry, O. M., N. J. Rosebrough, J. Biol. Chem. 193:265 (1951)
- Maickel, R. P., F. P. Miller. Anal. Chem. 38:1937 (1966)
- Monod, J., J. P. Changeux, F. Jacob. J. Mol. Biol. 6:306 (1963)
- Monod, J., Wyman, J., J. P. Changeux. J. Mol. Biol. 12:88 (1965)
- Moore, R. Y., A. Heller, R. J. Wurtman, J. Axelrod. Science 155:220 (1967)
- Moore, R. Y., A. Heller, R. J. Wurtman, R. K. Bhatnagar., J. Axelrod  
Arch. Neurol. 18:208 (1968)
- Oksche, A. in Structure and Function of the Epiphysis Cerebri,  
ed. by J. A. Kappers, J. P. Schadé, Amsterdam, Elsevier Publishing  
Company Vol 10:3 (1965)
- Özand, P.: Monograph. Graphical Solution of the Kinetic Equation  
pertaining to the activity of Allosteric Enzymes,  
Hacettepe Press, Ankara (1969)
- Parmeggiani, A. R., M. Bowman. Biochem. Biophys. Res. Com. 12:269 (1963)
- Peterson, E. A., H. A. Sober. in Methods in Enzymology, ed. by  
S. P. Colowick, N. O. Kaplan. New York, Academic Press  
Vol V:1 (1962)
- Pharmacia Bülteni: Sephadex-Gel Filtration in theory and  
Practice (1968)
- Plaut, G. W. E. in The Enzymes. ed. by P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrbäck  
Vol 7: 105 (1963)
- Quay, W. B. in Advances in Pharmacology ed. by S. Garattini, P. A.  
Shore, New York, Academic Press Vol. 6, 283 (1968)

- Roth, W.D., R.J. Wurtman, M.D. Altschule. Endocrinology 71:888 (1962)
- Roth, W.D. in The Structure and Function of Epiphysis Cerebri,  
ed. by J.A. Kappers, J.P. Schadé. Amsterdam, Elsevier Publishing  
Company, Vol 10: 552 (1965)
- Schachman . Biochemistry 2:887 (1963)
- Scrutton, M.C., D.B. Keech, J. Biol. Chem. 240:574 (1965)
- Snyder, S.H., J. Axelrod. Science 149:542 (1965)
- Wakil, S.J. Lipid Metabolism in Ann. Rev. Biochem. 31:369 (1962)
- Warburg, O., W. Christian . Biochem. Z. 310:384 (1941)
- Weiss, B. in Advances in Pharmacology. Vol 6A:152 (1968)
- Wurtman, R.J., Axelrod, J., L.S. Philips. Science 142:1071 (1963)
- Wurtman, R.J., J. Axelrod, J.E. Fisher. Science 143:1329 (1964)
- Wurtman, R.J., J. Axelrod, S.H. Snyder. Endocrinology 76:798 (1965)
- Wurtman R.J., J. Axelrod, D.E. Kelly The Pineal New York  
Academic Press 1968
- Wurtman, R.J., J. Axelrod, in Adv. in Pharmacology. Vol 6A:141 (1968A)
- Fiske, V.M. Endocrinology 29:187 (1941)

47

